

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10492

研究課題名(和文)メカニカルストレス誘発性変形性関節症におけるIL-1、TLRシグナルの重要性

研究課題名(英文)IL-1 and TLR signals play an important role in mechanical stress-induced osteoarthritis

研究代表者

二木 康夫 (NIKI, Yasuo)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：10276298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ATDC5細胞をAlginate beads培養し、軟骨化したATDC5とコラーゲンスキャフォールドを使用した三次元軟骨モデルを作成した。微量のIL-1 を添加しメカニカルストレスを加えると、ADAMTS4、IL-1RのmRNAの発現が有意に上昇し、それらはTRPV4により調節されていた。軟骨細胞表面のIL-1Rの発現が圧縮力学ストレスにより刺激され、続いて起こるIL-1感受性の増大がOAの病因に影響していると考えられた。またTRPV4はIL-1感受性を調整し、OAの進行を抑制するための重要なmechanosensorの一つとして機能していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We made a three-dimensional cartilage construct. ATDC5 cells were cultured in alginate beads and seeded within collagen scaffold. Cyclic compressive loading was applied to the cartilage constructs using a cyclic load bioreactor. The mRNA levels of ADAMTS4 and IL-1R1 were substantially increased by the excessive compressive stress. Compressive stress plus subtle level of IL-1 upregulated ADAMTS4 and IL-1R1 expressions. TRPV4 regulated ADAMTS4 and IL-1R1 mRNA levels by cyclic compressive stress. The expression of the IL-1R1 on the surface of chondrocytes would be stimulated by compressive mechanical stress, and subsequent increment of IL-1 susceptibility would be implicated in the OA pathology. TRPV4 channel regulation is one of the most important mechanosensor that controls IL-1 susceptibility and prevents development of OA.

研究分野：整形外科 膝関節 関節リウマチ

キーワード：メカニカルストレス 三次元軟骨モデル IL-1 TRPV4

### 1. 研究開始当初の背景

OA の発症、進行における軟骨変性、破壊に MMP (matrix metalloproteinase) や ADAMTS ( a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) などの蛋白分解酵素が重要な役割を果たすことは近年の研究から明らかであるが、現状ではこれらをブロックする治療は成功をおさめていない。これまで OA の病態形成には主として 3 つの要素が注目されてきた。1 つ目は、型コラーゲンやフィブロネクチンなどの基質蛋白や断片が damage-associated molecular patterns (DAMPs) として軟骨細胞のパターン認識受容体 ( pattern recognition receptor: PRR) に働くとするもの、2 つ目は、滑膜細胞や軟骨細胞から分泌される炎症性サイトカインによる関節リウマチに似た軟骨破壊様式、3 つ目は、軟骨細胞の肥大化やアポトーシスなどの軟骨内骨化シグナルである。とくに 1 つ目の PRR を介したメカニズムにおいて、TLR および NOD-like receptor (NLR) が注目されている。これらの PRR においてフィブロネクチン断片、ヒアルロン酸断片、ヘパラン硫酸、S100A8 および A9 蛋白などがリガンドとして働いている。NLR は最終的に IL-1 変換酵素 (Caspase ) を活性化する蛋白複合体で、Caspase は更に Pro-IL-1 を mature IL-1 へ活性化させる。本研究では、軟骨破壊においてもっとも重要なサイトカインとして知られている IL-1 と TLR に着目し、OA との関連を、in vivo、in vitro で証明することを目的としている。とくに in vitro の実験においては、力学刺激装置を用いて、圧負荷環境下で三次元培養した軟骨細胞を実験に用いる。過去に圧負荷を持続的に加えながら定量的な軟骨破壊のメカニズムを検討した研究は極めて少ない。

### 2. 研究の目的

変形性関節症 (OA) の発症、進行における軟骨変性、破壊には、メカニカルストレスが関与しているのは明らかであるが、その分子メカニズムについては不明な点が多い。メカニカルストレスによって生じた関節内構成蛋白の断片による NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) を介した Interleukin-1 (IL-1) の活性化と、IL-1 レセプター (IL-1R)、toll 様受容体 (TLR) 以下の下流のシグナル発現増強による 2 面性の働きが変形性関節症の進行に関与している可能性がある。本研究では三次元力学刺激装置を用いて、圧負荷環境下で軟骨細胞を三次元培養し、メカニカルストレスがケミカルなシグナルへ変換され、マトリックス破壊酵素産生に至る機序を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) ATDC5 を用いた三次元培養軟骨モデルの構築とメカニカルストレスの影響

マウス EC (Embryonal Carcinoma) 細胞由来クローン化細胞株である ATDC5 を Alginate beads で包埋した。ITS、BMP-2 を加えた 5% fetal bovine serum (FBS) 添加 DMEM (Dulbeccos modified Eagles medium) 培養液で 6 日間 Alginate beads 培養することで、三次元的に軟骨化した細胞を作成した。Alginate beads を溶解して細胞を回収し、5 × 10<sup>6</sup> 細胞をコラーゲン溶液に混和し、コラーゲンスキャフォールド (アテロコラーゲンスポンジ MIGHTY, KOKEN) に播種させた三次元培養軟骨モデルを作成した。そこに力学負荷培養装置 (CLS、テクノビュー) を用いて、繰返し力学負荷を加えて、メカニカルストレスの応答性を検討した。ADAMTS4、MMP-3、IL-6、IL-1、IL-1R の発現を real time PCR にて評価した。

#### (2) メカニカルストレスと IL-1R シグナル、TRPV4 との関連についての検討

作成した三次元軟骨モデルにメカニカルストレスをかけることで、IL-1R の発現について測定した。また通常炎症の反応を起こさないと考えられる程度の微量の IL-1 (1pg/ml) を添加して力学負荷をかけることで、ADAMTS4 と IL-1R の発現に与える影響について検討した。さらにメカノレセプターである Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) との関連に着目した。カルシウム透過性非選択性カチオンチャネルである TRPV4 は、関節軟骨の発達と維持に、重要な調節の役割を果たしている (Clark et al., 2010.)。TRPV4 agonist である GSK1016790A (GSK101) と antagonist である HC-067047 (HC) を添加して、それぞれの発現の関連性を検討した。

#### (3) IL-1R KO マウスを用いた OA モデルの作成

OA モデルとしてマウスの destabilization of medial meniscus (DMM) モデルを使用した。8 週齢雄の IL-1R KO マウスに DMM モデルを作成し、Wild Type マウスと比較した。術後 8 週時に病理組織学的検討を行い、Osteoarthritis Research Society International (OARSI) score にて評価した。

### 4. 研究成果

三次元軟骨モデルに過剰なメカニカルストレスを加えると、ADAMTS4、MMP-3、IL-6、IL-1R の mRNA の発現が有意に上昇した。IL-1 は発現の上昇を認めなかった。また 1pg/ml の IL-1 を添加して力学負荷をかけると、ADAMTS4 と IL-1R の発現がそれぞれ 3 倍と 8 倍へさらなる上昇を認めた。1pg/ml の IL-1 の添加のみでは発現の上昇は認めなかった。TRPV4 agonist はメカニカルストレスで上昇した ADAMTS4、IL-1R の mRNA の発現上昇を抑制し、TRPV4 antagonist はそれらの発現上昇をさらに促進した。また、OA モデルでは、術後 8 週時の OARSI score にて WT マウスと比較し、IL-1R KO マウスで軟骨の変性が抑制

された。  
多くの研究において、潜在的に脱分化していると考えられる二次元の単層培養を行い、伸展刺激によるストレスの影響が検討されている。本研究では、より生体の関節軟骨に類似した状況で圧縮ストレスを選択した。また、ATDC5細胞を、短期間 alginate beads 培養を行い分化させ、成熟した軟骨細胞の性質を維持し、コラーゲンゲルとコラーゲンスキャフォールドを使用して三次元軟骨モデルを作成した。正常軟骨において、軟骨細胞が活性化した IL-1 を産生する能力については議論的である。本研究より軟骨化した三次元環境下で、過剰な圧縮ストレスにより細胞が IL-1 に対する感受性を獲得し、滑膜や軟骨細胞自体から産生された微量の IL-1 の反応で、細胞は ADAMTS や MMP を産生する。それに対して、軟骨の恒常性を維持するために IL-1R の発現を抑制し、IL-1 の感受性を調整するために、TRPV4 が活性化させると考えられた。この所見は、関節軟骨において TRPV4 が軟骨の恒常性維持するために、mechanosensor、osmosensor として機能しているという過去の報告と合致する。関節軟骨において過剰なメカニカルストレスがかかり続けると、TRPV4 は IL-1 感受性を調整し、OA の進行を抑制するための重要な mechanosensor の一つとして機能していると考えられる。

以上より、軟骨細胞表面の IL-1R の発現が圧縮力学ストレスにより刺激され、続いて起こる IL-1 感受性の増大が OA の病因に影響していると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 5 件)

発表者名：Yuki Takeda, Yasuo Niki, Yusuke Fukuhara, Yoshitsugu Fukuda, Kazuhiko Udagawa, Toshiyuki Kikuchi, Takeshi Miyamoto, Morio Matsumoto, Masaya Nakamura

発表標題：Excessive Cyclic Compression Stress Increases Susceptibility to IL-1 in 3D-cultured Chondrocytes

学会等名：2018 Orthopaedic Research Society

発表年：2018 年

発表者名：Yuki Takeda, Yasuo Niki, Yusuke Fukuhara, Yoshitsugu Fukuda, Kazuhiko Udagawa, Toshiyuki Kikuchi, Takeshi Miyamoto, Morio Matsumoto, Masaya Nakamura

発表標題：Excessive Cyclic Compression

Stress Increases Susceptibility to IL-1 in 3D-cultured Chondrocytes

学会等名：2017 American college of Rheumatology

発表年月日：2017 年

発表者名：武田勇樹 二木康夫 福原悠介 福田良嗣 宇田川和彦 菊地寿幸 宮本健史 松本守雄 中村雅也

発表標題：ATDC5 においてメカニカルストレスは TRPV4 を介して IL-1R の発現に關与する

学会等名：第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会

発表年月日：2017 年

発表者名：武田勇樹 二木康夫 福原悠介 福田良嗣 宇田川和彦 菊地寿幸 宮本健史 松本守雄 中村雅也

発表標題：ATDC5 を用いた三次元培養軟骨モデルの確立とメカニカルストレスの応答性

学会等名：第 29 回日本軟骨代謝学会

発表年月日：2016 年

発表者名：武田勇樹 二木康夫 福原悠介 福田良嗣 宇田川和彦 菊地寿幸 宮本健史 松本守雄 中村雅也

発表標題：ATDC5 を用いたコラーゲンスポンジ三次元培養軟骨モデルとメカニカルストレスの影響

学会等名：第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会

発表年月日：2015 年

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

なし

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

特記事項なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

二木 康夫 (NIKI, Yasuo)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授  
研究者番号：10276298

##### (2) 研究分担者

福原 悠介 (FUKUHARA, Yusuke)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教  
研究者番号：60594645

宇田川 和彦 (UDAGAWA, Kazuhiko)  
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・助教  
研究者番号 : 70528364

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
なし