

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15555

研究課題名(和文) HIF-1 をターゲットとした新しいOA治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new OA therapy targeting HIF-1a

研究代表者

久保 俊一 (Kubo, Toshikazu)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20178031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：関節軟骨は生理的に低酸素環境にあり、軟骨細胞の生存、分化、代謝にはHIF-1 が重要である。われわれはラットをtreadmill装置で強制走行させることで関節軟骨でHIF-1,2 の発現が変化することを解析した。さらに低酸素環境下でのmechanical stress応用機構をin vitroで解析することで、低酸素環境下では定常酸素環境下と異なる遺伝子が軟骨代謝を制御している可能性があることを解明した。

研究成果の概要(英文)：Articular cartilage is physiologically in a hypoxic condition, and HIF-1 is important for chondrocyte survival, differentiation, and metabolism. We tried to force rats to run on treadmill and evaluate that the production of HIF-1, 2 in articular cartilage were changed by running speed. Furthermore, by analyzing the mechanical stress application mechanism in hypoxic condition in vitro, We expected that genes different from regulating in normoxic condition may regulate cartilage metabolism in hypoxic condition.

研究分野：軟骨代謝

キーワード：関節軟骨 低酸素 メカニカルストレス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

関節軟骨は無血管組織であるため、軟骨細胞は生理的に低酸素環境下で恒常性を維持している。Hypoxia-inducible factor(HIF)-1 α は低酸素環境下で発現するストレス応答性転写因子であり、変形性関節症 (osteoarthritis; OA) における軟骨変性に関与していることが明らかとなっている。われわれは、HIF-1 α は軟骨基質代謝を亢進させ、軟骨保護作用を持つことを明らかにした。(Kubo T. et al. J Orthop Res, 2014)。このことから、HIF-1 α は OA 治療の新たなターゲット分子として期待できる。

HIF-1 α の発現を促進させる薬剤の一つに、塩化コバルトがあるが、生体毒性があり臨床応用は不可能である。このため、生体毒性のない薬剤の探索が必要である。また、運動は関節内に低酸素環境を誘導するという報告があり (Eur J Appl Physiol, 2012)、運動刺激により関節軟骨で HIF-1 α の発現を促進できる可能性がある。そこで HIF-1 α の発現を促進、または分解抑制する薬剤や刺激を明らかにすることができれば新規 OA 治療法の開発の基盤となる可能性がある。

2. 研究の目的

関節軟骨において HIF-1 α を賦活化する薬剤や刺激を明らかにすることで新規 OA 治療法の開発が可能か検討すること。

3. 研究の方法

(1)treadmill 走行を用いた運動が関節軟骨へ与える影響の評価

12 週齢雄性の wistar 系ラットを用いて 45 分間の単回走行を行った。走行後すぐに sacrifice し、膝関節を HIF-1 α , HIF-2 α で免疫染色した。また、同様に単回走行後に膝関節軟骨から RNA を抽出した。転写因子として sox9, NF- κ B, anabolic factor として aggrecan, col2a1, catabolic factor として

ADAM-TS5, MMP-13, col10a1 の遺伝子発現を real time RT-PCR で解析した。

(2)低酸素培養と伸展刺激装置を併用した関節内 in vitro モデルの作製

6 週齢雄性の wistar 系ラットの肩関節、股関節、膝関節から軟骨組織を採取し、軟骨細胞を単離した。単離した軟骨細胞を 1 型コラーゲンコーティングを施したシリコンチャンバーに播種し 2 日間培養した。その後 5%低酸素環境下でメニコン社製の自動伸展培養装置 ShellPa を用いて間欠的な mechanical stress を加えた。また、同様の実験系を低酸素環境下でも行った。伸展強度は 20%で、刺激時間 24 時間で行った。刺激後すぐに total RNA を回収し、real time RT-PCR 解析した。

4. 研究成果

12m/min 群ではほとんどの軟骨代謝関連因子で遺伝子発現の変化を認めなかった。

20m/min 群では sox9 と ADAM-TS5 の遺伝子発現が有意に上昇した (図 1)。

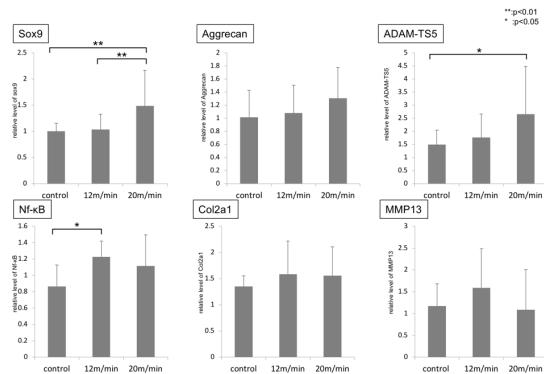


図 1. ラット関節軟骨に treadmill 走行が与える影響

免疫組織化学染色では、control 群と比較し 12m/min 群では HIF-1 α の染色性が上昇していた (図 2)。control 群と比較し 20m/min 群では HIF-2 α の染色性が上昇し、12m/min 群では低下した (図 3)。

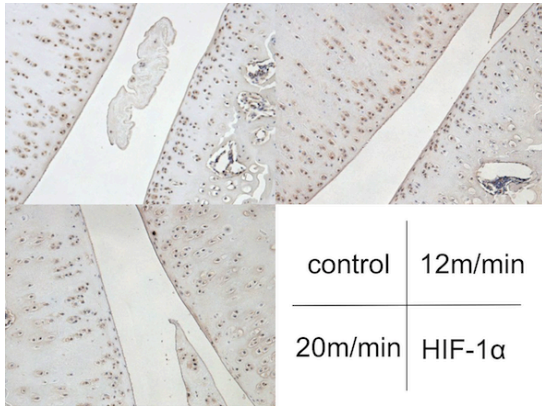


図 2. treadmill 走行による HIF-1 α の発現変化

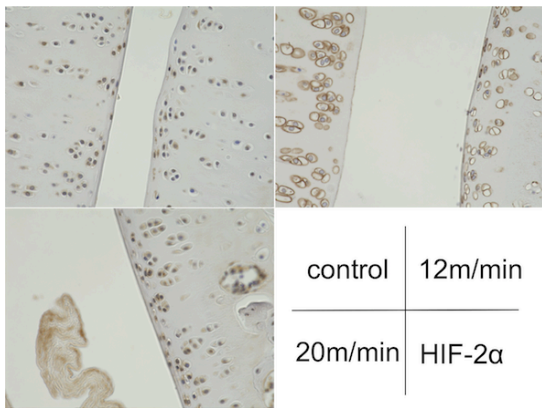


図 3. treadmill 走行による HIF-2 α の発現変化

ラットトレッドミル単回走行では control 群と 12m/min 群で遺伝子発現の有意差を認めなかった。このことから単回走行では、適度な運動が軟骨代謝に与える影響は少ないと考えた。一方、反復走行により OA を発症する速度とされる 20m/min 群では単回走行でも軟骨代謝に変化が生じた。HIF-1, 2 α 産生が走行速度によって変化したことから HIF-1, 2 α は運動における軟骨代謝のバランスを調整している可能性があると考えた。次に軟骨細胞の低酸素環境下での mechanical stress に対する応答機構を解明するため低酸素培養装置内で自動伸展培養装置を用いた実験を行った。5%低酸素環境下で 20%伸展刺激を 24 時間加え続けることで様々な遺伝子発現に変化が生じた。特に HIF-1, 2 α は低酸素環境下で mechanical stress を加えることで有意に上昇していた (図 4)。このことから定常酸素

下と低酸素環境下では mechanical stress に対する反応が変化することがわかり、より in vivo モデルに近い環境で stress 応答を解析することで実際の関節内での軟骨代謝が解析可能であり、新規 OA 治療法の開発につながる可能性がある。

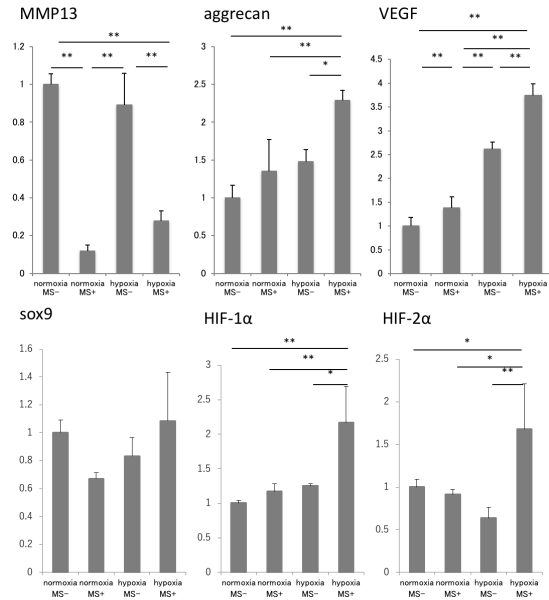


図 4. 関節軟骨における低酸素環境下での mechanical stress 応答機構の解析

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 1 件)

Ichimaru S, Nakagawa S, Arai Y, Kishida T, Shin-Ya M, Honjo K, Tsuchida S, Inoue H, Fujiwara H, Shimomura S, Mazda O, Kubo T. Hypoxia Potentiates Anabolic Effects of Exogenous Hyaluronic Acid in Rat Articular Cartilage, International Journal of Molecular Sciences, 査読有, vol.17, 2016, E1013.

〔学会発表〕 (計 7 件)

(国際学会)

1. Honjo K, Arai Y, Tsuchida S, Nakagawa S, Inoue H, Saito M, Ichimaru S, Shimomura S, Inoue A, Terauchi R, Mazda O, Kubo T. HSP70 induced by HIF-1 α regulates anabolic

responses in chondrocytes under hypoxic conditions, 18th World Congress of the Osteoarthritis Research Society International, 2015.4.30-5.3, Seattle, WA, USA.

2. Ichimaru S, Nakagawa S, Arai Y, Tsuchida S, Inoue H, Shimomura S, Mazda O, Kubo T. Pharmacological effects of exogenous hyaluronan in articular cartilage under hypoxia, 19th World Congress of the Osteoarthritis Research Society International, 2016.3.31-4.3, Amsterdam, Netherlands.

3. Shimomura S, Inoue H, Arai Y, Nakagawa S, Tsuchida S, Ichimaru S, Mazda O, Kubo T. The effect of treadmill running on knee articular cartilage in rats, 20th World Congress of the Osteoarthritis Research Society International, 2018.4.27-4.31, Las Vegas, NV, USA.

(国内学会)

1. 市丸昌平, 中川周士, 新井祐志, 土田真嗣, 井上裕章, 下村征史, 松田 修, 久保俊一. 低酸素環境下にある軟骨細胞に対する外因性ヒアルロン酸の薬理効果. 第30回日本整形外科学会基礎学術集会, 2015.10.22, 富山

2. 市丸昌平, 中川周士, 新井祐志, 土田真嗣, 井上裕章, 本城邦晃, 白井寿治, 寺内 竜, 松田 修, 久保俊一. Pharmacological effects of exogenous hyaluronan in articular cartilage under hypoxia. 第29回日本軟骨代謝学会, 2016.2.19, 広島

3. 市丸昌平, 中川周士, 新井祐志, 土田真嗣, 井上裕章, 下村征史, 松田 修, 久保俊一. 低酸素環境下における外因性ヒアルロン酸の薬理効果の変化. 第31回日本整形外科学会基礎学術集会, 2015.10.13, 福岡

4. 下村征史, 井上裕章, 新井祐志, 中川周士, 土田真嗣, 市丸昌平, 松田 修, 久保俊一. トレッドミル走行がラット膝関節軟骨に与える影響. 第31回日本整形外科学会基礎学術集会, 2015.10.13, 福岡

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/orthoped/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

久保 俊一(Kubo Toshikazu) 京都府立医科大学・医学研究科・教授 研究者番号:20178031

(2)研究分担者

新井 祐志(Arai Yuji) 京都府立医科大学・医学研究科・准教授 研究者番号:50347449

中川 周士(Nakagawa Shuji) 京都府立医科大学・医学研究科・助教 研究者番号:30643382

(3)連携研究者

松田 修(Mazda Osam) 京都府立医科大学・医学研究科・教授 研究者番号:00271164