

令和元年5月17日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10897

研究課題名(和文) ヒアルロン酸レセプターCD44の断片化阻害による、軟骨細胞の脱分化抑制効果

研究課題名(英文) Inhibition of CD44 cleavage suppresses the chondrocyte de-differentiation

研究代表者

高橋 伸典 (Takahashi, Nobunori)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：20570196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究期間において、主としてCD44の断片(CD44-ICD)自体が関節軟骨細胞の脱分化を誘導する事実と、CD44の断片化を阻害することで脱分化が抑制されることを明らかにした。更に関節軟骨特異的にADAM10(CD44断片化における主要プロテアーゼ)をノックアウトしたマウス(Col2a1-cre; ADAM10)では、野生型と比較して変形性関節症モデル(内側半月板不安定化)における関節軟骨変性が抑制されることを明らかにした。CD44の断片化は機能的ヒアルロン酸受容体の減少のみならず、CD44-ICD産生による脱分化誘導によっても細胞外マトリクス喪失に直結する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性関節症(OA)は極めて一般的な関節障害で、薬物治療に関する研究も過去に多く試みられたが、現時点で臨床応用されているのは高分子ヒアルロン酸(HA)の関節内注射のみである。そのHAにしてもマウスでの関節軟骨保護効果は示されているが、ヒトに対する効果は限定的である。CD44断片化抑制による機能的HA受容体保持により、HAの治療効果が向上する可能性がある。またOAの病因自体不明であるが、CD44断片化とCD44-ICD産生による細胞外マトリクス喪失および関節軟骨細胞の脱分化がその一端を担っている可能性がある。本研究結果により、OAの病因・病態理解と治療における新たな展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：We mainly demonstrated that the fragment of cleaved CD44 (CD44-ICD) had a function to induce the de-differentiation of articular chondrocytes. We also demonstrated that the cartilage degradation in the conditional knock-out mice (Col2a1-cre; ADAM10) was apparently suppressed compared to that in the wild-type mice. The cleavage of CD44 can result in diminished extracellular matrix because of both decreased functional membranous receptor for hyaluronan and induction of de-differentiation by CD44-ICD.

研究分野：整形外科

キーワード：変形性関節症 ヒアルロン酸 CD44 断片化 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

変形性関節症 (OA) は日本でも最も一般的な関節障害である。OA は関節軟骨の変性疾患であり、遺伝的要因、加齢、肥満などが関与するとされるが、未だに詳細な病因は不明である。軟骨細胞において細胞 - マトリックス間の相互作用は細胞外環境の変化を感知し、修復反応を誘導する重要な手段である。この様な相互作用においてヒアルロン酸 (HA) とその主要受容体である CD44 との結合は中心的役割を果たしている。軟骨細胞において、CD44 を介する細胞内シグナル誘導は CD44-HA 結合の喪失により惹起され、マトリックス破壊を促進する遺伝子群 (MMP-3、MMP-13、iNOS) やマトリックス形成に関わる遺伝子群 (2 型コラーゲン、アグリカン、HAS-2、BMP-7) の発現を亢進させる (Schmitz I et al. Osteoarthritis Cartilage 2009)。このように CD44-HA 結合は細胞外マトリックスを保持するために必要であり、それが故に軟骨の恒常性維持に必須であるといえる。また組織学的にも、細胞外マトリックスの喪失が OA の最初期に認められる変化であることから、CD44-HA 結合の障害が OA 発症への第一歩である可能性が高いと考えられる。これまで CD44-HA 結合喪失モデルとしては、HA オリゴ糖、ヒアルロニダーゼ、dominant-negative CD44 等が用いられてきたが、生体内でこれらが同定されていないという問題点がある。

我々は最初に、OA 関節軟骨において CD44 の断片化亢進が認められることを見いだした (図 1) (Takahashi N, et al. Arthritis Rheum 2010)。軟骨細胞における CD44 の断片化では、細胞外領域における膜型 MMPs による第一切断後、C 末端側の断片が γ -secretase で切断されて intracellular domain (ICD) を生ずる。そして CD44-ICD は、CD44 の C 末端と細胞骨格との結合を競合的に阻害し、CD44-HA 結合を抑制することが確認された (Mellor L, et al. J Biol Chem 2013)。これらの事実から、OA へと進行していく CD44-HA 結合喪失の最初のきっかけとして、軟骨細胞における CD44 の断片化が重要であるという仮説を得るに至り、in vitro での CD44 断片化 OA 軟骨細胞モデルとして「脱分化軟骨細胞」と「メカニカルストレス過剰負荷モデル」を用いて研究を進めている。

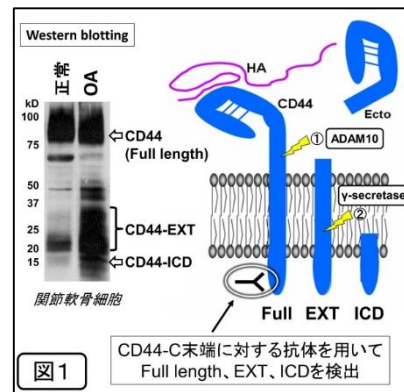


図1 CD44-C末端に対する抗体を用いて Full length、EXT、ICDを検出

2. 研究の目的

主要なヒアルロン酸 (HA) 受容体である CD44 の機能性は、関節軟骨の恒常性維持に極めて重要である。CD44 の断片化は、その受容体機能喪失および細胞内断片 (ICD) 増加による Cell-HA 結合の喪失、すなわち細胞外マトリックスの喪失に直結するため、軟骨細胞の脱分化や変形性関節症 (OA) における軟骨変性に深く関与していると考えられる。これまでに OA 軟骨細胞における CD44 断片化の亢進を確認し、各種阻害剤により CD44 の断片化抑制が可能であることを明らかにした。本研究では、軟骨細胞の脱分化における CD44 断片化の意義と ICD 自体の機能解析を更に進めると共に、OA 動物モデルを用いて CD44 断片化抑制による OA 発症抑制・治療の可能性を探る。本研究成果により、OA の病因・病態理解と治療における新たな展望が開ける可能性がある。

3. 研究の方法

(1) in vitro

以下の二つのモデルを用いて CD44 の断片化と脱分化について検討する。

- ・CD44-ICD 強制発現モデル: ウシ関節軟骨に Empty または CD44-ICD 発現プラスミドを遺伝子導入して、細胞外マトリックス形成能、遺伝子発現変化について検討する。
- ・過剰メカニカルストレスモデル: ウシ関節軟骨細胞をストレッチチャンパー上で培養し、伸展刺激を加えて過剰ストレス環境を作成して検討する。

(2) in vivo

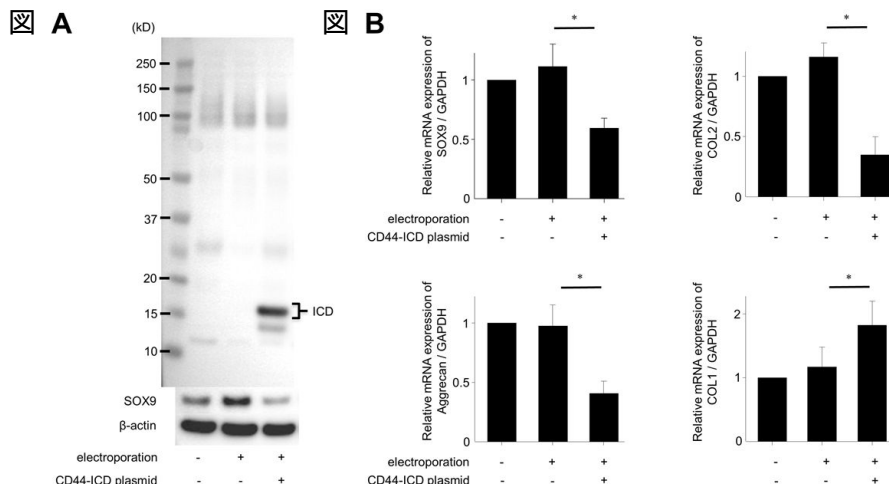
OA 動物モデルとして、再現性に優れた内側半月板不安定化 (DMM) モデルを採用する。片膝に阻害剤、反対側膝に生理食塩水を各々関節内注射し、6~12 週間経過後に頸椎脱臼法にて屠殺し評価する。関節軟骨特異的 ADAM10 ノックアウトマウス (Col2a1-cre; ADAM10) の系を樹立し、野生型マウス (BALB/c) との比較を行い、ADAM10 欠損の軟骨変性に対する効果を評価する。評価項目は組織学的および分子生物学的に行う。

4. 研究成果

【CD44-ICD 強制発現による軟骨細胞の脱分化】

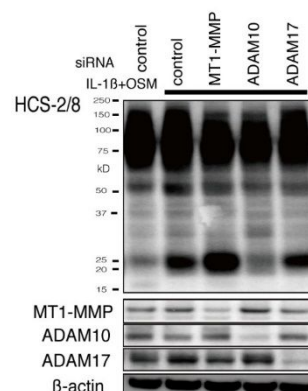
初代ウシ関節軟骨細胞 (1×10^6) に対して、CD44-ICD をコードするプラスミド (pCMV/myc/cyto-CD44ICD) を、NEPA21 エレクトロポレーター (NEPAGENE) を用いて遺伝子導入した (図 A)。CD44-ICD の強制過剰発現により、軟骨分化のマスターレギュレーターである SOX9 および主要な細胞

外マトリクス構成分子であるアグリカンと Ⅱ型コラーゲンの発現量が低下し、Ⅰ型コラーゲンの発現量が上昇する脱分化パターンを示すことが明らかとなった(図B)。



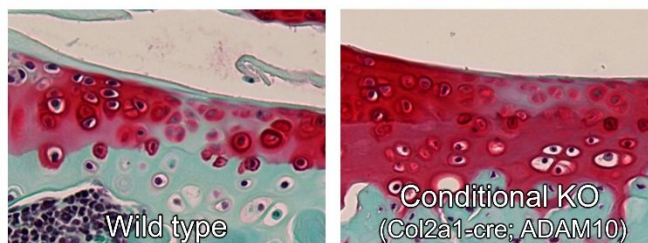
【過剰メカニカルストレスによる CD44 断片化と ADAM10 阻害剤による断片化抑制】

過剰なメカニカルストレスは関節軟骨変性につながる事が知られている。シリコン製専用ストレッチチャンパー上で sub-confluent (約 1 週間) まで培養し、STB140 (STREX 社) を用いて CO2 インキュベーター内で伸展刺激を加える。過剰ストレスとしては 20% 伸展、60 cycles/min を中心に設定を調整して、CD44 断片化を誘導することに成功した。我々は ADAM10 を siRNA 法によりノックダウンすることで、CD44 断片化が抑制されることから(右図) HCS-2/8 細胞において IL-1 刺激下で CD44 を断片化する主要なプロテアーゼが ADAM10 であることを発見した。



【OA モデルマウスにおける CD44 断片化抑制の効果】

我々は先ず関節軟骨特異的 ADAM10 ノックアウト(KO)マウス(Col2a1-cre; ADAM10)の系を樹立した。KO マウスおよび野生型(Wild type)マウスに対して、OA モデルとして内側半月板不安定化モデルを作成した。KO マウスでは WT マウスと比較して、サフラニン O 染色の低下が抑制されており、ADAM10 阻害による OA の発症予防効果が示唆される結果であった(右図)。



【まとめ】

以上のように我々は、過剰なメカニカルストレス負荷は ADAM10 を主要なプロテアーゼとして CD44 を断片化することを明らかにした。更に断片化で産生される CD44-ICD はそれ自体に関節軟骨細胞を脱分化させる機能を持つことが、強制発現モデルで明らかになった。これは今までに報告されたことがなく、OA の発症病態を明らかにする上で価値のあるデータであると考えている。ADAM10 ノックアウトマウスを用いることにより、生体内においても ADAM10 を抑制することによって OA を予防できる可能性が示唆される画期的なデータを得ることが出来た。今後も CD44 断片化のメカニズムと軟骨細胞に対する影響を分子生物学的に、また動物モデルを用いた CD44 断片化の生体内での影響を更に進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

1. Terabe K, Takahashi N, Cobb M, Askew EB, Knudson CB, Knudson W. Simvastatin promotes restoration of chondrocyte morphology and phenotype. Arch Biochem Biophys (査読有). 2019;665:1-11. 10.1016/j.abb.2019.01.038
2. Watanabe T, Takahashi N, Hirabara S, Ishiguro N, Kojima T. Hyaluronan Inhibits Tlr-4-Dependent RANKL Expression in Human Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. PloS one (査読有). 2016;11(4):e0153142. 10.1371/journal.pone.0153142
3. Terabe K, Takahashi N, Takemoto T, Knudson W, Ishiguro N, Kojima T. Simvastatin inhibits CD44

- fragmentation in chondrocytes. Arch Biochem Biophys (査読有) . 2016;604:1-10. 10.1016/j.abb.2016.05.019
4. Ohmi Y, Ise W, Harazono A, Takakura D, Fukuyama H, Baba Y, Narazaki M, Shoda H, Takahashi N, et al. (19人中9番目) Sialylation converts arthritogenic IgG into inhibitors of collagen-induced arthritis. Nature communications (査読有) . 2016;7:11205. 10.1038/ncomms11205
 5. Matsumoto T, Takahashi N, Kojima T, Yoshioka Y, Ishikawa J, Furukawa K, Ono K, Sawada M, Ishiguro N, and Yamamoto A. Soluble Siglec-9 suppresses arthritis in a collagen-induced arthritis mouse model and inhibits M1 activation of RAW264.7 macrophages. Arthritis Res Ther (査読有) . 2016;18(1):133. 10.1186/s13075-016-1035-9
 6. Kobayakawa T, Takahashi N, Sobue Y, Terabe K, Ishiguro N, Kojima T. Mechanical stress loading induces CD44 cleavage in human chondrocytic HCS-2/8 cells. Biochem Biophys Res Commun (査読有) . 2016;478(3):1230-5. 10.1016/j.bbrc.2016.08.099
 7. Ishikawa J, Takahashi N, Matsumoto T, Yoshioka Y, Yamamoto N, Nishikawa M, Hibi H, Ishiguro N, Ueda M, Furukawa K, and Yamamoto A. Factors secreted from dental pulp stem cells show multifaceted benefits for treating experimental rheumatoid arthritis. Bone (査読有) . 2016;83:210-9. 10.1016/j.bone.2015.11.012
 8. Hanabayashi M, Takahashi N, Sobue Y, Hirabara S, Ishiguro N, Kojima T. Hyaluronan Oligosaccharides Induce MMP-1 and -3 via Transcriptional Activation of NF-kappaB and p38 MAPK in Rheumatoid Synovial Fibroblasts. PloS one (査読有) . 2016;11(8):e0161875. 10.1371/journal.pone.0161875

〔学会発表〕(計 21件)

1. 横田裕、高橋伸典 滑膜肉腫様細胞株 (SW982) において、Methotrexate と Siglec-9 の併用により IL-1 刺激による炎症性マーカーの発現が抑制された 第 32 回日本軟骨代謝学会 2019 年
2. 岸本賢治、高橋伸典 Anti-Inflammatory Effect of Carbenoxolone in human synovial cells 第 32 回日本軟骨代謝学会 2019 年
3. 服部恭典、高橋伸典 The potential role of metabolic reprogramming and cartilage degradation via transient receptor potential vanilloid-4 第 32 回日本軟骨代謝学会 2019 年
4. 鈴木望人、高橋伸典 HYALURONAN SUPPRESSES THE EXPRESSION OF CATHEPSIN K INDUCED BY MECHANICAL STRESS LOADING IN A HUMAN. The Orthopaedic Research Society 2019 Annual Meeting, USA 2019 年
5. 西梅剛、高橋伸典 Raloxifene augments IL-1 expression induced by TNF in SW983. The Orthopaedic Research Society 2019 Annual Meeting, USA 2019 年
6. 祖父江康司、高橋伸典 機械的ストレスによる軟骨脱分化における CD44 断片化の関与 第 31 回日本軟骨代謝学会 2018 年
7. 鈴木望人、高橋伸典 軟骨様細胞株 (HCS2/8) において、メカニカルストレスによるカテプシン K の発現亢進は高分子ヒアルロン酸により抑制する 第 31 回日本軟骨代謝学会 2018 年
8. 祖父江康司、高橋伸典 Adam10 Inhibitor Suppresses Chondrogenic Dedifferentiation Induced By Cd44 Cleavage In Bovine Primary Chondrocytes. The Orthopaedic Research Society 2018 Annual Meeting, USA 2018 年
9. 鈴木望人、高橋伸典 HYALURONAN SUPPRESSES THE EXPRESSION OF CATHEPSIN K INDUCED BY MECHANICAL STRESS LOADING IN A HUMAN CHONDROSARCOMA CELL LINE HCS-2/8. The Orthopaedic Research Society 2018 Annual Meeting, USA 2018 年
10. 西梅剛、高橋伸典 Dkk1 発現低下作用のある薬剤の軟骨細胞に対する効果についての検討 第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会 2018 年
11. 祖父江康司、高橋伸典 ADAM10 阻害剤がウシ初代軟骨細胞において機械的ストレスによる CD44 断片化と軟骨脱分化を抑制する 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会 2017 年
12. 鈴木望人、高橋伸典 軟骨様細胞株 (HCS2/8) において、カテプシン K の発現は TRPV4 刺激により亢進する 第 30 回日本軟骨代謝学会 2017 年
13. 祖父江康司、高橋伸典 ADAM10 阻害剤がウシ初代軟骨細胞において機械的ストレスによる軟骨脱分化を抑制する 第 30 回日本軟骨代謝学会 2017 年
14. 西梅剛、高橋伸典 DKK-1 分子発現亢進による新規変形性関節症治療薬の開発 DKK-1 promoter 領域と pGL4.10 をつないだ construct 作成 2017 年
15. 祖父江康司、高橋伸典 ADAM10 inhibitor suppresses CD44 cleavage and chondrogenic dedifferentiation in bovine primary chondrocyte cells. The Orthopaedic Research Society 2017 Annual Meeting, USA 2017 年

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小嶋 俊久

ローマ字氏名：Kojima, Toshihisa

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学系研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：70378032

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。