

令和元年6月20日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16704

研究課題名(和文)変形性膝関節症におけるSOD活性の動向と病理学的意義の解明

研究課題名(英文)Elucidation of trends and pathological significance of SOD activity in knee osteoarthritis

研究代表者

小池 正人(Koike, Masato)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：70767574

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):本研究の目的は末期OAとSOD活性の関連性を明らかにすることである。末期膝OA患者と膝ACL再建術または半月板部分切除術を行った患者由来の軟骨・滑膜および大腿骨頸部骨折患者とhip OA患者由来の軟骨でSOD活性を評価した。膝OA滑膜・軟骨のSOD活性は有意に低下を認めたが、軟骨においてSOD活性と年齢に弱い負の相関を認めた。股関節OA軟骨のSOD活性は、年齢と相関なく有意に低下していた。SOD活性は加齢よりもOAとの関連性が強いことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末期膝OA患者の膝関節組織におけるSOD活性の関連性を明らかにすることで、動物モデルで証明されたOAにおけるSODの関連性の強さを証明することができた。すなわち、ヒトの膝OAにおいてSOD活性の調節が軟骨変性病態へキーファクターであることが証明できた。SOD活性がOA疾患の予防、治療のバイオマーカーとなる可能性が期待され、本研究の完遂後もさらなる発展応用が見込まれ、推定患者数が2,530万人以上いるとされる膝OA患者および将来膝OAに悩まされるであろう予備軍の患者に対して確実に貢献できる。

研究成果の概要(英文): SOD activity is a marker that can be used to comprehensively evaluate the enzymatic capacities of SOD1, SOD2, and SOD3; however, the trend of SOD activity in end-stage osteoarthritic tissues remains unknown. In the present study, we found that SOD activity in end-stage osteoarthritic synovium of the knee was significantly lower than that in control synovium without the influence of age. The SOD activity was significantly lower in the end-stage knee osteoarthritic cartilage than in the control, but a weak negative correlation was observed between aging and SOD activity. However, SOD activity in end-stage hip osteoarthritic cartilage was significantly lower than that in control cartilage without the influence of aging. The relationship between osteoarthritis and SOD activity was stronger than the relationship between aging and SOD activity. These results indicate that direct regulation of SOD activity in joint tissues may lead to suppression of osteoarthritis progression.

研究分野：軟骨代謝

キーワード：変形性関節症 抗酸化酵素SOD 酸化ストレス 加齢 軟骨変性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

日本国内にいる変形性膝関節症(以下膝 OA)の患者は40歳以上で2530万人以上もいるものの、病態のメカニズムが不明で、有用なバイオマーカーがないのが現状である。過度なメカニカルストレスは変形性関節症(OA)の主要な病態である軟骨変性をきたすことが知られている。しかしながら、過度なメカニカルストレスがなぜ軟骨変性を助長するのかは明らかになっていない。近年、OAの病態には酸化ストレスが強く関係していると報告されている。そこで、過度なメカニカルストレスが軟骨変性を助長するメカニズムには酸化ストレスの増加が直接関わっているという仮説を立てた。酸化ストレスの原因となる活性酸素(スーパーオキシド)の蓄積は生体機能の低下、すなわち老化を進行させる原因であり、臓器老化または疾病発症・進行に深く関連している。スーパーオキシドは酸素代謝の副産物として産生され、生体物質を酸化すること(酸化ストレス)で機能不全を起こす結果、細胞毒性を発生させると考えられている。その中でスーパーオキシドを処理する内在性の抗酸化酵素 Superoxide dismutase (SOD)は重要な生理学的役割を果たしていることが解明されてきた。OAとSODの関係性を報告する論文は散見されており、一つ目のグループからは大腿骨頸部骨折患者由来の大腿骨頭と比較すると膝 OA 関節軟骨で SOD2 の発現が有意に低下していたと報告された (Aigner et al., *Arthritis Rheum* 2006)。二つ目のグループからはプロテオミクス解析において大腿骨頸部骨折患者由来の大腿骨頭と比較すると膝 OA 関節軟骨で SOD2 がタンパクレベルで有意に低下していたと報告された。(Ruiz-Romero et al., *Mol Cell Proteomics* 2009)。しかしながら SOD2 の低下が OA の原因なのか結果なのかは不明であるとともに、その機序に関しても全く未知であった。

申請者は過度なメカニカルストレスが軟骨のスーパーオキシドを誘導するかを明らかにするため、野生型マウスに外科的手術により変形性関節症を誘導するマウスを用いて、明らかな軟骨変性がくる前(早期 OA の時期)において、関節軟骨におけるスーパーオキシドの増加と SOD2 の発現の低下を見出した。メカニカルストレスという負荷がない状態で野生型マウス関節軟骨細胞にスーパーオキシド誘導剤であるパラコートでスーパーオキシドを誘導すると、スーパーオキシドが増加する一方でミトコンドリア膜電位が低下している細胞数の増加、ミトコンドリア呼吸鎖の機能低下とともに SOD2 の発現低下、基質合成関連遺伝子(*Col2a1*, *Acan*)の低下、基質分解酵素関連遺伝子(*Mmp3*, *Mmp13*, *Adamts5*)の増加を認め、メカニカルストレスが過剰にスーパーオキシドを誘導するとミトコンドリア機能不全とともに抗酸化酵素 SOD2 の発現低下を誘導するメカニズムを明らかにした。次に SOD2 の低下が直接軟骨変性を助長する原因であるかを明らかにするため、軟骨細胞でのみ SOD2 が欠損するマウス(軟骨特異的 Sod2 欠損マウス: *Col2a1Cre*; *Sod2<sup>fl/fl</sup>* マウス)を作製した。SOD2 のない軟骨細胞を単離培養し、解析を行なったところ、スーパーオキシドの有意な増加、電子顕微鏡レベルでミトコンドリアの膨化、ミトコンドリアクリステ構造の破綻を認め、ミトコンドリア膜電位が低下している細胞数の増加、ミトコンドリア呼吸鎖の機能低下とともに SOD2 の発現低下、基質合成関連遺伝子(*Col2a1*, *Acan*)の低下、基質分解酵素関連遺伝子(*Mmp3*, *Mmp13*, *Adamts5*)の増加を認めた。また軟骨でのみ SOD2 のない老齢マウス(12 か月齢)で軟骨変性が加速することや、外科的手術で変形性関節症を誘導することでも軟骨変性が加速することを見出し、世界で初めて関節軟骨における SOD2 が軟骨変性に対し防御的役割を持っていることを明らかにした (OARSI 2014 young investigator award 受賞、ANZBMS 2014 Christopher & Margie Nordin young investigator poster award 受賞、ASBMR 2014 plenary poster 受賞、ASBMR 2014 travel grant 受賞、第 32 回日本骨代謝学術集会 ANZBMS travel award 受賞、Koike et al., *Sci Rep* 2015、第 22 回日本軟骨代謝学会論文賞受賞)。この研究を通じて酸化ストレスの一つであるスーパーオキシドによる軟骨変性メカニズムを解明した。

### 2. 研究の目的

近年、DNA チップを用いた解析で OA 患者の変性した関節軟骨における SOD1, SOD2 がいずれも発現低下を認めたと報告された (Scott et al., *Ann Rheum Dis* 2010)。申請者は SOD1 欠損マウスより初代軟骨細胞の単離培養を行なったところ、線維芽細胞様の異常形態を示したことから、SOD1 も軟骨の恒常性の維持に重要な働きをしていることが明らかとなった。(unpublish data) 近年、SOD はタンパク合成後にニトロ化、糖化、グルタチオン化、リン酸化などの様々な翻訳後修飾を受け、遺伝子発現・タンパク量の増減がそのまま直接活性を反映すると限らないことが指摘されている。(Yamakura et al., *Biochim Biophys Acta*. 2010) またラットモデルにおいて、加齢に伴い軟骨における SOD2 タンパク質の量が増加したにもかかわらず、翻訳後修飾であるリジンのアセチル化の増加により SOD2 活性が低下することが報告されている (Fu et al., *Arthritis Rheumatol*, 2016)。これらの知見に基づいて、我々は SOD 遺伝子発現およびタンパク質量よりも SOD 活性を評価することに焦点を当てた。本研究では、SOD1 および SOD2 を統合的に評価できる SOD 活性に注目し、末期膝 OA 患者における SOD 活性の動向を明らかにすることで、SOD 活性が膝 OA の予防・治療のバイオマーカーとなりうるかを見出すことを目的とする。

### 3. 研究の方法

当院で人工膝関節全置換術を行った Kellgren-Lawrence grade 4 (KL4)の末期膝 OA 患者(膝

OA 群：平均年齢 72.6 歳)6 例 6 膝と膝前十字靭帯損傷再建手術または半月板部分切除術を行った KLO,1 の患者 ( 対照群：平均年齢 31.6 歳 )6 例 6 膝の膝蓋大腿関節外側より関節軟骨および滑膜を採取した。採取後 2 時間以内に、OCT コンパウンドに包埋し、10 μm の厚さで凍結切片を作製した。数分間室温で乾燥後、スーパーオキシドを特異的に検出する 10 μM ジヒドロエチジウム溶液を 20% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、37 条件下で 30 分間対照群と OA 群の切片を同時に染色した。その後染色した軟骨および滑膜を PBS で洗浄し、100 個の細胞を任意に選択し、蛍光の平均値を Image J を用いて定量した。次に、当院で人工膝関節全置換術を行った KL4 の末期膝 OA 患者 ( 膝 OA 群：平均年齢 76.8 歳 )18 例 18 膝と膝前十字靭帯損傷再建手術または半月板部分切除術を行った KLO,1 の患者 ( 対照群：平均年齢 30.4 歳 )10 例 10 膝の膝蓋大腿関節外側より関節軟骨および滑膜を採取し、SOD 活性 (U/mg protein) を評価した。SOD 活性は関節軟骨および滑膜をコンパウンド包埋し室温にて融解。ビーズクラッシャーにサンプルを入れ、生理的リン酸緩衝液 300 μL を混和し、4600 rpm で 30 秒遠心する操作を 2 回行うことで破碎。ホモジネートを回収し、10,000G で 10 分、4 で遠心、回収し NWLSS Superoxide Dismutase ELISA Kit を用いて SOD 活性を評価した。また採取できた検体の総タンパク量で SOD 活性を補正するため、蛋白濃度の測定には和光純薬工業 Protein Assay Kit を使用した。また人工骨頭置換術を施行された大腿骨頸部骨折患者 ( 対照群：平均年齢 82.64 歳 )14 例 14 股と人工股関節全置換術を施行された変形性股関節症患者 ( 股関節 OA 群：平均年齢 70.0 歳 )11 例 11 股より関節軟骨を採取し、脂質過酸化分解生成物の一つであるマロンジアルデヒド (MDA) で酸化ストレスを評価した。また SOD 活性 (U/mg protein) も評価した。股関節の軟骨における SOD 活性は Cayman Chemical Superoxide Dismutase Assay Kit で評価した。採取できた検体の総タンパク量で SOD 活性を補正するため、蛋白濃度の測定には和光純薬工業 Protein Assay Kit を使用した。SOD 活性は年齢と SOD 活性の関連性は spearman 相関係数で評価した。本研究は本学倫理委員会の承認を得てインフォームドコンセントの上行われた。統計処理には Mann-Whitney U 検定を用いた。

#### 4 . 研究成果

膝 OA 軟骨および滑膜ともに対照群に比べ有意に活性酸素量が増加していた。また膝 OA 滑膜の SOD 活性は年齢との相関はなく有意に低下していた。膝 OA 軟骨においては SOD 活性は有意に低下していたものの、SOD 活性と年齢と弱い負の相関を認めたため、加齢による影響を否定できなかった。股関節 OA 軟骨における MDA は対照群に比べ有意に増加していた。股関節 OA 軟骨における SOD 活性は、大腿骨頸部骨折患者 ( 対照群 ) の平均年齢は有意に高いにもかかわらず、年齢との相関はなく有意に低下していた。加齢に伴い SOD は低下することが知られている。今回、対照群の年齢に関係なく膝 OA および股関節 OA 軟骨において SOD 活性の低下を認めたことから、SOD 活性の低下は加齢との関係性よりも OA との関連性が強いことが明らかとなった。今回 2 種類の Superoxide Dismutase Assay Kit を用いて研究を行なった。テトラゾリウム法を用いた Cayman Chemical の Superoxide Dismutase Assay Kit は活性の測定レンジが狭いものの、感受性が高く再現性は良好であった。ヘマトキシリンの自動酸化能で評価する NWLSS の Superoxide Dismutase Assay Kit と Cayman Chemical の Superoxide Dismutase Assay Kit の両者を用いて同一サンプルで SOD 活性を評価したところ、強い正の相関関係を認めた ( $r = 0.828$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 17$ ) ことから ( 図 1 ) より感受性の高い Cayman Chemical の Superoxide Dismutase Assay Kit が軟骨における SOD 活性の評価に適していると考え、股関節 OA 軟骨における SOD 活性の評価は Cayman Chemical の Superoxide Dismutase Assay Kit を用いた。SOD 活性が OA における疾患のバイオマーカーになる可能性を秘めていることが明らかとなった。

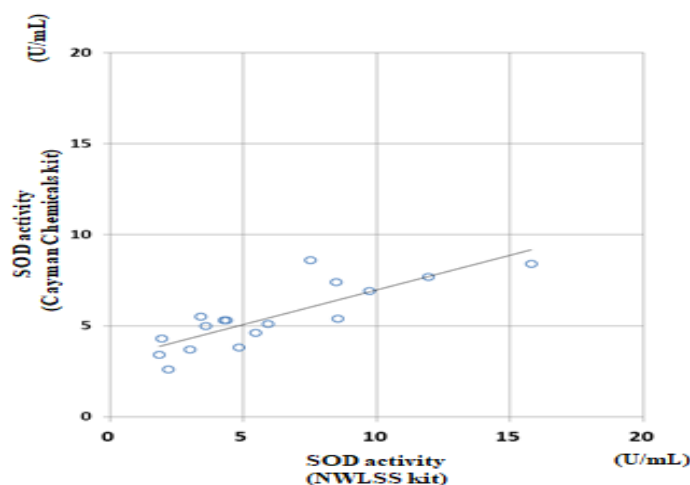


図 1 . 股関節の関節軟骨を用いた 2 つの SOD 活性キットを用いた SOD 活性値の相関関係

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

1. Masato Koike, Hidetoshi Nojiri, Hiroaki Kanazawa, Hiroto Yamaguchi, Kei Miyagawa, Nana Nagura, Sammy Banno, Yoshiyuki Iwase, Hisashi Kurosawa, Kazuo Kaneko, Superoxide dismutase activity is significantly lower in end-stage osteoarthritic cartilage than non-osteoarthritic cartilage. PLoS ONE 13(9):e0203944. (2018).

[学会発表](計3件)

1. 小池 正人、野尻 英俊、幡野 佐巳依、宮川 慶、澤 満美子、岩瀬 嘉志、黒澤 尚、金子 和夫. 末期膝 OA における SOD 活性とスーパーオキシドの動向. 第 17 回日本抗加齢医学会総会、東京、2017 年 6 月 2 日-4 日
2. 小池 正人、野尻 英俊、幡野 佐巳依、宮川 慶、澤 満美子、岩瀬 嘉志、黒澤 尚、金子 和夫. 末期膝 OA では軟骨と滑膜ともにスーパーオキシド増加と SOD 活性低下のバランス破綻が生じている. 第 32 回日本整形外科基礎学術集会、沖縄、2016 年 10 月 13 日-14 日
3. Masato Koike, Hidetoshi Nojiri, Sammy Banno, Kei Miyagawa, Mamiko Sawa, Hiroaki Kanazawa, Nana Nagura, Yoshiyuki Iwase, Hisashi Kurosawa, Kazuo Kaneko, IMBALANCE BETWEEN LOW SOD ACTIVITY AND EXCESSIVE SUPEROXIDE OCCURS IN END-STAGE OA CARTILAGE AND SYNOVIUM. OARSI 2017 World Congress, Las Vegas, 2017 年 4 月 27 日

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

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。