

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591687

研究課題名（和文） ヒアルロン酸による関節破壊抑制のメカニズム解析

研究課題名（英文） Mechanism of cartilage protection by hyaluronan

研究代表者

大月 孝志 (OHTSUKI TAKASHI)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：10534802

研究成果の概要（和文）：

ヒアルロン酸をサイトカイン刺激軟骨細胞に添加することで軟骨基質分解酵素の発現が抑制され、その作用は使用濃度、分子量に比例して増加することを細胞レベルで確認した。また、手術によるラット変形性膝関節症モデルの膝へのヒアルロン酸投与試験においても同様に濃度依存的、分子量依存的な関節保護効果を確認した。ヒアルロン酸の早期変形性関節症治療薬としての可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：

Hyaluronan (HA) treatment suppressed cytokine induced cartilage proteolytic enzymes ADAMTS4 and 9 mRNA expression in OUMS-27 size dependently. In addition, intra-articular HA injection protected knee cartilage destruction and aggrecan degradation in a size dependent manner in rat OA model. Our results show HA might be used as drug for early stage osteoarthritis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：マトリックスバイオロジー

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：関節軟骨・ヒアルロン酸・ADAMTS・アグリカン・メカノセンサー

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(OA)は、整形外科領域では最も頻度の高い骨・関節疾患である。現在、関節破壊の進行例に対し細胞外マトリックス成分であるヒアルロン酸の関節内投与治療が行われている。その作用は、ヒアルロン酸の保水性および弾性保持によると考えられ

ているが、ヒアルロン酸投与ではOAの根幹である関節破壊は治癒しない。

OAの関節破壊を防ぐにはマトリックス分解酵素の抑制が重要である。OAでは、アグリカンが分解され、断片が関節液中に認められる。我々が発見しADAMTS-5とADAMTS-9はアグリカンを分解するアグリカナナーゼである(J

Biol Chem 2001 ; 276(34):31502-9)、(*J Biol Chem.* 2002 ; 277(14):12182-9)。また、我々は2005年にサイトカイン刺激下のヒト軟骨細胞でアグリカナナーゼファミリーのうちADAMTS-9が他のアグリカナナーゼよりもはるかに強く誘導されることを世界で初めて報告していた(*Arthritis Rheum.*2005 ; 52(5) : 1451-60)。

2. 研究の目的

ヒアルロン酸はOAの進行例に対しその物理的な性状(保水、弾性)により用いられている。ヒアルロン酸の新規機能としてマトリックス分解抑制・マトリックス再生機能に関する解析を行い、早期OA治療薬としてヒアルロン酸の可能性を探る。

3. 研究の方法

①

ヒアルロン酸によるアグリカナナーゼ発現阻害

ヒト軟骨細胞(OUMS-27)をインターロイキン-1 β (IL-1 β)、腫瘍壊死因子(TNF- α)で刺激するとアグリカナナーゼの発現が誘導される。この試験系にヒアルロン酸を添加し、培養細胞中のアグリカナナーゼ(ADAMTS-1,4,5,9)発現への影響をreal-time RT-PCR法にて定量的に検討する。

②

炎症性サイトカイン刺激下でのメカニカルストレスのアグリカナナーゼ発現への影響の検討

炎症性サイトカイン(IL-1 β 、TNF- α) (各10ng/mL) 刺激条件下でメカニカルストレス(5%伸長、0.5Hz、6h)を加える。細胞よりRNAを調整し、real-time RT-PCR法によりADAMTS4、MMP-13のmRNA発現を検出する。

③

OAモデルラットへのヒアルロン酸投与の効果

ヒアルロン酸(HA)を関節内に投与した場合の関

節損傷抑制効果を検討する。OA手術より5日目から、PBS(対照)、ヒアルロン酸[(300kDa、800kDa、2700kDa)、10 mg/mL]を(50 μ l/膝、2回/週)で投与する。OA手術後6週(各n=10)で各群の罹患関節のパラフィン切片における組織学(サフラン- O 染色)検討を行う。さらに、主要な軟骨基質アグリカンのアグリカナナーゼによる分解断端を免疫染色により特異的に検出する。

④

炎症性サイトカイン刺激下でのメカニカルストレスのアグリカナナーゼ発現に関するメカノセンサーの解析

メカニカルストレスによる細胞内カルシウム濃度の変化を蛍光顕微鏡により観察する。

炎症性サイトカイン(IL-1 β 、TNF- α) (各10ng/mL) 刺激条件下でメカニカルストレス(5%伸長、0.5Hz、6h)を加える。同時にメカノセンサー阻害剤を添加しメカノセンサーの介在を検出する。

4. 研究成果

細胞レベル

HAはサイトカインによる炎症性刺激による軟骨基質分解酵素(アグリカナナーゼ、マトリックス・メタロプロテナーゼ)の発現を抑制した。また炎症性サイトカインによる軟骨基質(2型コラーゲン、アグリカン)の発現抑制を改善した。

モデル動物(ラットOAモデル)

ラットOAモデル関節内へのHA投与試験を実施し、分子量依存的な軟骨損傷抑制を確認した。

メカノセンサー

炎症性サイトカイン刺激による軟骨基質分解酵素(アグリカナナーゼ、マトリックス・メタロプロテナーゼ)発現誘導をメカニカルストレスが抑制した。この作用にはメカノセンサーが関与していることを確認した。

OAにおける軟骨基質分解酵素の役割、ヒアルロン酸による軟骨基質分解酵素の発現抑制、メカ

ニカルストレスによる軟骨基質分解酵素の発現抑制などを広く世界に発信した。今後は当該研究で得られた知見をもとに詳細なメカニズム解析 (microRNA、メカノセンサーの特定、炎症性シグナルとメカノシグナルのクロストーク) が可能となり、OA治療法の改善に役立つと考えられる。

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 3 件)

- ① Obika M, Ogawa H, Takahashi K, Li J, Hatipoglu OF, Cilek MZ, Miyoshi T, Inagaki J, Ohtsuki T, Kusachi S, Ninomiya Y, Hirohata S The tumor growth inhibitory effect of ADAMTS1 is accompanied by the inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Sci.* 査読あり、10 巻、103 号、P1889-97、2012 年
- ② Zeynel Cilek M, Hirohata S, Faruk Hatipoglu O, Ogawa H, Miyoshi T, Inagaki J, Ohtsuki T, Harada H, Kamikawa S, Kusachi S, Ninomiya Y AHR, a novel acute hypoxia-response sequence, drives reporter gene expression under hypoxia in vitro and in vivo. *Cell Biol Int.* 査読あり、35 巻、1 号、P1-8、2011 年
- ③ Iwamoto M, Hirohata S, Ogawa H, Ohtsuki T, Shinohata R, Miyoshi T, Hatipoglu FO, Kusachi S, Yamamoto K, Ninomiya Y. Connective tissue growth factor induction in a pressure-overloaded heart ameliorated by the angiotensin II type 1 receptor blocker olmesartan. *Hypertens Res.* 査読あり、33 巻、12 号、P1305-11、2010 年

[学会発表] (計 19 件)

- ① 浅野恵一 (代表)、廣畑聡、小比賀真就、O.F. Hatipoglu、小川弘子、稲垣純子、大月孝志、石井裕子、幡中邦彦、草地省蔵、

米沢朋子、大橋俊孝、二宮善文

Novel vector construct driven under acute hypoxia .

第6回 高度医療都市を創出する未来技術国際シンポジウム

創薬開発システム構築のための戦略

2013/2/7-8 岡山

- ② 廣畑聡(代表)、小比賀真就、小川弘子、稲垣純子、浅野恵一、大月孝志、草地省蔵、二宮善文
ADAMTS1 メタロプロテアーゼによる血管・リンパ管新生研究の新展開
文部科学省新学術領域研究 がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動 公開シンポジウム 2013/01/29-30 東京
- ③ 廣畑聡(代表)、浅野恵一、Mehmet Z. Cilek、O.F. Hatipoglu、小川弘子、大月孝志、稲垣純子、草地省蔵、二宮善文
ADAMTS1 プロモーターを利用した低酸素感受性発現ベクター
第 10 回がんとハイポキシア研究会
2012/12/06-07 横浜
- ④ 大月孝志(代表)、Mehmet Z. Cilek、O.F. Hatipoglu、西田圭一郎、二宮善文、廣畑聡
ADAMTS1 inhibit angiogenesis :*in vitro* and *in vivo* study
ASMB 2012 Joint Meeting of the American Society for Matrix Biology and the Society for Glycobiology 2012/11/11-14 (San Diego, CA, USA)
- ⑤ 廣畑聡(代表)、大月孝志、小比賀真就、小川弘子、稲垣純子、草地省蔵、二宮善文
The tumor growth inhibitory effect of ADAMTS1 is accompanied by the inhibition of tumor angiogenesis
ASMB 2012 Joint Meeting of the American Society for Matrix Biology and the Society for Glycobiology 2012/11/11-14 (San Diego, CA, USA)
- ⑥ 大月孝志(代表)、Mehmet Z. Cilek、O.F. Hatipoglu、西田圭一郎、二宮善文、廣畑聡

- Hyaluronan size dependent articular cartilage protection effect (in vivo and in vitro study).
第 44 回日本結合組織学会学術大会第 59 回マトリックス研究会大会合同学術大会
2012/06/07-08 東京
- ⑦ 廣畑聡(代表)、小比賀真就、O.F. Hatipoglu、小川弘子、Mehmet Z. Cilek、稲垣純子、大月孝志、石井裕子、幡中邦彦、草地省蔵、米沢朋子、大橋俊孝、二宮善文
ADAMTS1 inhibit angiogenesis :*in vitro* and *in vivo* study
第 44 回日本結合組織学会学術大会第 59 回マトリックス研究会大会合同学術大会
2012/06/07-08 東京
- ⑧ 大月孝志(代表)、西田圭一郎、廣畑聡、二宮善文
Cyclic tensile strain inhibits Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor- α induced aggrecanase in human chondrosarcoma cell line OUMS-27.
第 25 回日本軟骨代謝学会学術集会
2012/03/09-10 名古屋
- ⑨ 大月孝志(代表)、西田圭一郎、廣畑聡、二宮善文
Cyclic tensile strain inhibits Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor- α induced aggrecanase in human chondrosarcoma cell line OUMS-27 by mechano-sensors.
第 26 回日本軟骨代謝学会学術集会
2012/03/01-2 大阪
- ⑩ 大月孝志(代表)、西田圭一郎、廣畑聡、二宮善文
Hyaluronan inhibits aggrecanase in human chondrosarcoma cell line OUMS-27 in a size dependent manner.
第 34 回日本分子生物学会年会 第 86 回日本生化学会合同大会 2011/12/13-16 横浜
- ⑪ 廣畑聡(代表)、小比賀真就、O.F. Hatipoglu、小川弘子、Mehmet Z. Cilek、稲垣純子、大月孝志、石井裕子、幡中邦彦、草地省蔵、米沢朋子、大橋俊孝、二宮善文
ADAMTS1 inhibit angiogenesis by inducing apoptosis:*in vitro* and *in vivo* study
第 43 回日本結合組織学会学術大会第 58 回マトリックス研究会大会合同学術大会
2010/08/19-20 大分
- ⑫ O.F. Hatipoglu、(代表)、小比賀真就、廣畑聡、小川弘子、Mehmet Z. Cilek、稲垣純子、大月孝志、石井裕子、幡中邦彦、草地省蔵、米沢朋子、大橋俊孝、二宮善文
ADAMTS1 is involved in apoptosis in endothelial cells caused by TNF- α
第 43 回日本結合組織学会学術大会第 58 回マトリックス研究会大会合同学術大会
2010/08/19-20 大分
- ⑬ 大月孝志(代表)、篠畑綾子、廣畑聡、草地省蔵、二宮善文
Angiotensin II type 1 receptor blocker olmesartan reduced cytokine gene expression and ameliorated cardiac function.
第 43 回日本結合組織学会学術大会第 58 回マトリックス研究会大会合同学術大会
2010/08/19-20 大分
- ⑭ 大月孝志(代表)、西田圭一郎、廣畑聡、二宮善文
Hyaluronan inhibits aggrecanase in human chondrosarcoma cell line OUMS-27 in a size dependent manner.
第 24 回日本軟骨代謝学会学術集会
2011/03/04-05 福岡
- ⑮ O.F. Hatipoglu(代表)、Mehmet Z. Cilek、廣畑聡、小川弘子、稲垣純子、大月孝志、熊岸加苗、草地省蔵、二宮善文
AHR, a novel acute hypoxia-response sequence, drives reporter gene under hypoxia in vitro and in vivo
第 33 回日本分子生物学会年会 第 85 回日本生化学会合同大会 2010/12/07-10 神戸
- ⑯ 大月孝志(代表)、廣畑聡、岩本睦、篠畑綾子、草地省蔵、二宮善文
Induction of connective tissue growth factor

in the pressure-overloaded heart was ameliorated by angiotensin II type 1 receptor blocker olmesartan
第 42 回日本結合組織学会学術大会第 57 回マトリックス研究会大会合同学術大会
2010/08/19-20 秋田

- ⑰ 廣畑聡(代表)、小比賀真就、O.F.Hatipoglu、小川弘子、M.Z. Cilek、高橋克也、稲垣純子、三好享、大月孝志、石井裕子、草地省蔵、米澤朋子、大橋俊孝、二宮善文
Gene Transfer of ADAMTS1 Inhibited Angiogenesis and Tumor Growth in a Protease-independent Manner
第 42 回日本結合組織学会学術大会第 57 回マトリックス研究会大会合同学術大会
2010/08/19-20 秋田
- ⑱ O.F. Hatipoglu(代表)、廣畑聡、小比賀真就、M.Z. Cilek、小川弘子、三好享、稲垣純子、大月孝志、草地省蔵、米澤朋子、T. 大橋俊孝、二宮善文
ADAMTS1 Induces Apoptosis on Endothelial Cells
第 42 回日本結合組織学会学術大会第 57 回マトリックス研究会大会合同学術大会
2010/08/19-20 秋田
- ⑲ M.Z Cilek(代表)、廣畑聡、O.F. Hatipoglu、小川弘子、三好享、稲垣純子、大月孝志、大橋俊孝、米澤朋子、原田浩、上川慈、草地省蔵、二宮善文
ADAMTS1 Promoter Drives Reporter Gene into Hypoxic Endothelial Cell in Vitro and in Vivo
第 42 回日本結合組織学会学術大会第 57 回マトリックス研究会大会合同学術大会
2010/08/19-20 秋田

[その他]

チャレンジ・セミナー(遺伝子からわかること
2011/09/27)

ドクター・キッズ・スクール(2012/02/18)

ホームページ等

<http://mbb-okayama.sakura.ne.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大月 孝志 (OHTSUKI TAKASHI)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：10534802

(2)研究分担者

西田 圭一郎 (NISHIDA KEIICHIRO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授

研究者番号：80284058

廣畑 聡 (HIROHATA SATOSHI)

岡山大学・国際センター・准教授

研究者番号：90332791

(3)連携研究者

二宮 善文 (NINOMIYA YOSHIFUMI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
教授

研究者番号：70126241