

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24年 5月25日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890181

研究課題名（和文） 軟骨変性疾患におけるモノカルボン酸トランスポーターの役割の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the role of monocarboxylate transporters on chondrocytes' degenerative change of joint disease

研究代表者

吉村 健太郎 (YOSHIMURA KENTARO)

昭和大学・歯学部・ポストドクター

研究者番号：10585699

研究成果の概要（和文）：炎症性サイトカインの一種であるインターロイキン-1 β (IL-1 β) は関節リウマチや変形性関節症などの疾患において細胞内の一酸化窒素および活性酸素種の産生を亢進させ、軟骨細胞変性・細胞死を誘導する。我々は IL-1 β で刺激した軟骨細胞で乳酸の産生が亢進することに着目し、乳酸の輸送担体であるモノカルボン酸トランスポーター1 (MCT-1) の遺伝子発現を抑制することで、IL-1 β 誘導性の軟骨細胞死が有意に抑制されることを見出した。

研究成果の概要（英文）：Interleukin-1 β (IL-1 β) induces cell death in chondrocytes in a nitric oxide (NO)- and reactive oxygen species (ROS)-dependent manner. In this study, increased production of lactate was observed in IL-1 β -treated mouse chondrocytic ATDC5 cells prior to the onset of their death. IL-1 β -induced cell death in ATDC5 cells was suppressed by introducing an siRNA for monocarboxylate transporter-1 (MCT-1), a lactate transporter distributed in plasma and mitochondrial inner membranes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,090,000	327,000	1,417,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,290,000	687,000	2,977,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：口腔生化学

1. 研究開始当初の背景

(1) 変形性関節症 (OA) および関節リウマチ (RA) は軟骨変性が起こる代表的な疾患である。これらの軟骨変性疾患では、インターロイキン-1 β (IL-1 β) や腫瘍壊死因子- α 等の炎症性サイトカインが各種タンパク分解酵素や活性酸素種 (ROS) の産生を介して軟骨細胞の変性を進行させると考えられている。OA や RA 罹患者の生活の質を維持する上で、軟

骨細胞の細胞死と軟骨基質の消失を伴う軟骨変性をいかに抑制するかが重要な課題となっている。

(2) 申請者らの研究グループは、軟骨細胞を IL-1 β で刺激すると、一酸化窒素 (NO) を産生する誘導型 NO 合成酵素 (NOS2) および ROS の一種であるスーパーオキシド (O_2^-) を産生する食細胞型 NADPH オキシダー

ゼ(NOX2)の発現が上昇し、NO と O₂の反応生成物である ONOO⁻が細胞死を引き起こすことを発見し報告した。さらに、NOS2 および NOX2 の発現に先立ち乳酸産生が亢進することに着目して、乳酸輸送担体であるモノカルボン酸トランスポーター (MCT) の阻害剤を作用させた軟骨細胞では IL-1β による細胞死が有意に抑制されることを見出した。このことから、申請者は MCT 阻害が軟骨変性疾患の予防あるいは治療に有効であるとの仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、OA や RA 等の軟骨変性疾患の病態形成における MCT の役割を明らかにし、MCT を標的とした新たな OA および RA に対する予防・治療方法の開発の可能性を探ることである。

3. 研究の方法

申請者は MCT が軟骨変性に関与する分子メカニズムを解明し、代表的軟骨変性疾患である OA および RA に対する MCT 阻害の有効性を明らかにするために、培養軟骨細胞を用いて以下の項目について2年間に亘り解析した。

(1) IL-1β 刺激による細胞死に関与する MCT サブタイプの同定: IL-1β で刺激した初代培養マウス肋軟骨細胞およびマウス軟骨様細胞株 ATDC5 細胞から mRNA を採取し、既知の 14 種の MCT サブタイプの遺伝子発現を RT-PCR により評価することで細胞死に関与する MCT サブタイプを同定した。

(2) MCT に依存した NOS2・NOX2 の発現および NO・ROS 産生メカニズムの解明: (1)の実験で IL-1β による細胞死に関与することが明らかとなった MCT サブタイプについて、siRNA 導入による発現抑制を行った軟骨細胞を用いて IL-1β 刺激後の経時的な NOS2・NOX2 発現を RT-PCR により解析し、NO・ROS 産生に対する MCT の関与を評価した。

(3) MCT を介した NF-κB 活性化メカニズムの解明: NOS2 および NOX2 の発現を制御する転写因子として知られている NF-κB の活性化について、IL-1β 刺激後の IκBα の発現を Western blotting によって評価し、MCT 依存的なシグナル伝達経路を同定した。

4. 研究成果

(1) IL-1β 刺激時のマウス軟骨様細胞株 ATDC5 細胞における各 MCT サブタイプの mRNA 発現を RT-PCR で解析した。乳酸の輸送に関与し、かつ IL-1β で発現が強く誘導されるサブタイプは MCT-1 であった。そこで siRNA を細胞に導入し遺伝子発現を抑制 (MCT-1 KD)

したところ、IL-1β によって誘導される細胞死は有意に抑制された (図 1)。

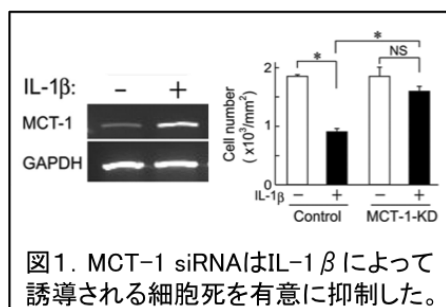


図1. MCT-1 siRNAはIL-1βによって誘導される細胞死を有意に抑制した。

(2) IL-1β 刺激によって誘導され、細胞死の原因となる NO、O₂-をそれぞれ産生する NOS-2 および NOX-2 の発現について、定量的 RT-PCR で解析した。MCT-1 siRNA を導入した細胞では IL-1β で誘導される NOX-2 の発現が非常に強く抑制された (図 2)。このことから MCT-1 は NOX-2 の発現を介して細胞死に関与すると考えられた。

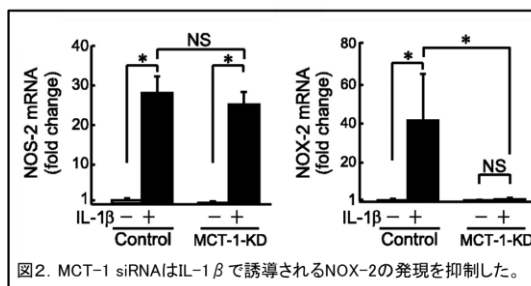


図2. MCT-1 siRNAはIL-1βで誘導されるNOX-2の発現を抑制した。

(3) NOX-2 の発現を誘導する転写因子である NF-κB の活性化における MCT-1 siRNA の影響を検討するため、IL-1β 刺激後の IκBα の発現を Western blotting によって解析した。MCT-1 siRNA を導入した細胞では刺激後 36 時間から生じる IκBα の消失が抑制されていた (図 3)。また、NF-κB

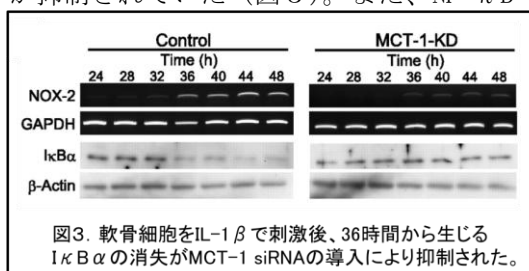


図3. 軟骨細胞をIL-1βで刺激後、36時間から生じる IκBα の消失がMCT-1 siRNAの導入により抑制された。

活性化の主要な原因となる細胞内 ROS 産生をフローサイトメトリーで解析したところ MCT-1 siRNA を導入した細胞では NOX-2 発現より以前に生じる初期 ROS 産生が抑制されていた (図 4)。以上の結果から、MCT-1 は IL-1β 刺激後の初期 ROS 産生に関与し、産生した ROS による IκBα の消失および NF-κB 活性化を介して NOX-2 の発現を誘導し細胞死を引き起こすと考えられた。

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 2 件)

- 1 Tsukasaki M, Yamada A, Suzuki D, Aizawa R, Miyazono A, Miyamoto Y, Suzawa T, Takami M, Yoshimura K, Morimura N, Yamamoto M, Kamijo R: Expression of POEM, a positive regulator of osteoblast differentiation, is suppressed by TNF- α . **Biochem Biophys Res Commun** 410: 766-770, 2011 (査読あり)
- 2 Yoshimura K, Miyamoto Y, Yasuhara R, Maruyama T, Akiyama T, Yamada A, Takami M, Suzawa T, Tsunawaki S, Tachikawa T, Baba K, Kamijo R: Monocarboxylate transporter-1 is required for cell death in mouse chondrocytic ATDC5 cells exposed to interleukin-1 β via activation of nuclear factor- κ B and expression of phagocyte-type NADPH-oxidase. **J Biol Chem** 286: 14744-14752, 2011 (査読あり)

[学会発表] (計 12 件)

- 1 Akiyama T, *et al.*: Enhancement of inflammatory osteoclastogenesis by lysine-specific gingipain. IOF Regionals - 2nd Asia-Pacific Osteoporosis and Bone Meeting and the Australian and New Zealand Bone and Mineral Society (ANZBMS) Annual Scientific Meeting with the Japanese Society for Bone and Mineral Society (JSBMR), September 4-8, 2011, Gold Coast, Australia
- 2 吉村健太郎, 他: Monocarboxylate transporter-1 は骨芽細胞分化を正に制御する. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会, 2011 年 7 月 28~30 日, 大阪
- 3 秋山智人, 他: リシン特異的ジンジパインによる炎症性骨破壊促進機構の解析. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会, 2011 年 7 月 28~30 日, 大阪
- 4 塚崎雅之, 他: TNF- α は細胞接着分子 POEM の発現を抑制し、骨芽細胞分化を制御している. 第 31 回昭和歯学会総会, 2011 年 7 月 2 日, 東京
- 5 Yoshimura K, *et al.*: Monocarboxylate transporter-1 is required for cell death in mouse chondrocyte-like ATDC5 cells exposed to interleukin-1 β via late phase activation of NF- κ B and expression of phagocyte-type NADPH-oxidase. The Joint International

- Meeting Sponsored by The Japanese Society for Interferon and Cytokine Research, The Japanese Society for Macrophage Molecular and Cell Biology, Cytokine/Chemokine, Immunity, and Diseases, May 25-27, 2011, Osaka, Japan
- 6 Akiyama T, *et al.*: Dual effects of lysine-specific gingipain on inflammatory osteoclastogenesis. The Joint International Meeting Sponsored by The Japanese Society for Interferon and Cytokine Research, The Japanese Society for Macrophage Molecular and Cell Biology, Cytokine/Chemokine, Immunity, and Diseases, May 25-27, 2011, Osaka, Japan
 - 7 Maruyama T, *et al.*: Carbonic anhydrase IX suppresses hypertrophic differentiation of chondrocytes. The 32nd Annual Meeting of American Society of Bone and Mineral Research, October 15-19, 2010, Toronto, Canada
 - 8 吉村健太郎, 他: Monocarboxylate transporter-1 は、IL-1 β 刺激後の軟骨細胞で後期 NF- κ B 活性化を起し、NOX-2 発現とそれに依存した細胞死を誘導する. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会, 2010 年 9 月 20 日~22 日, 東京
 - 10 吉村健太郎, 他: Monocarboxylate transporter-1 は、IL-1 β 刺激後の軟骨細胞で後期 NF- κ B 活性化を起し、NOX-2 発現とそれに依存した細胞死を誘導する. 第 28 回日本骨代謝学会学術集会, 2010 年 7 月 21 日~23 日, 東京
 - 11 Yoshimura K, *et al.*: Monocarboxylate transporter-1 is involved in activation of nuclear factor- κ B and expression of phagocyte-type NADPH-oxidase in mouse chondrocytic ATDC5 cells exposed to interleukin-1 β . The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Application of Nitric Oxide, June 14-18, 2010, Kyoto, Japan
 - 12 Miyamoto Y, *et al.*: Nitric oxide promotes odontoblastic differentiation. The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Application of Nitric Oxide, June 14-18, 2010, Kyoto, Japan

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ

<http://www10.showa-u.ac.jp/~oralbio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 健太郎 (Yoshimura Kentaro)
昭和大学・歯学部・ポストドクター
研究者番号：10585699

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし