

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592213

研究課題名(和文)変形性関節症の治療を目的とした軟骨細胞のアポトーシス制御機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of apoptosis mechanism in chondrocytes for prevention of osteoarthritis

研究代表者

西山 隆之(NISHIYAMA, Takayuki)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・医学研究員

研究者番号：10379373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：EPA処理によってNOの生産過剰で引き起こされた、MMP3、13の発現が抑制され、また、p38MAPK、p53のリン酸化、および、caspase-3およびPARPの活性化が抑制され、アポトーシスを減少したことから、OAの予防、治療に有用である可能性が示唆された。これらの内容に対して、国際学会で1回、国内学会で2回発表、さらに軟骨組織におけるアポトーシスを介した関節症性変化制御に関連する目的で、p53R2、PTENという分子でも研究を行い、これに関連する英語論文2本を発表している。

研究成果の概要(英文)：Objective: Oxidative stress has been reported to induce apoptosis and degeneration of chondrocytes. But the mechanism of EPA in apoptosis and degeneration of chondrocytes has been unknown. We evaluated that the function of EPA on apoptosis and degeneration of chondrocytes. Methods: The expression of MMPs were detected by real-time PCR, and apoptosis related proteins were detected by western blotting and FACS. C57BL/6J mice were used for detecting MMPs expression by immunohistochemistry. Results: EPA inhibited SNP-induced apoptosis of chondrocytes. EPA inhibited SNP-induced expressions of MMP3 and MMP13. The progression of OA was prevented by articular injection of EPA in vivo. Immunohistochemistry demonstrated that MMP3 and MMP13 expression were increased in DMM model. However, intra-articular injection of EPA inhibited the expressions of MMP13. Conclusion: The treatment of EPA can control the oxidative stress-induced OA progression. EPA may be a new therapeutic approach in OA therapy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学・関節病学

キーワード：EPA 軟骨組織 アポトーシス 変形性関節症

## 1. 研究開始当初の背景

近年、高齢化社会の到来とともにともにも変形性関節症などの著しい関節障害を有する患者は増加の一途をたどっている。これらの患者は疼痛や可動域制限のために、日常生活動作が著しく障害され、ひいては生活・人生の質 (Quality of Life) の低下を生じる。このような変形性関節症に対する手術的治療として人工関節置換術は非常に良好な成績を収め、確立されたものとなっているが、その反面、人工関節のゆるみなどの合併症もあり、これにとって代わる治療法の開発が待たれるところである。

誰もが思う「傷んだ軟骨をとりもどせないのか？」という希望をかなえ得る治療方法として、軟骨再生が注目され、その研究の成果により様々な生体内の多分化能を有する細胞などから軟骨細胞を得ることが可能となりつつある。しかしこれらの細胞は、脱分化や細胞死 (アポトーシス) を生じるために軟骨細胞としての性格を長期的に保つことは難しく、これが大きな障害となっている。

それでは、変形性関節症のように進行していく軟骨障害をくい止める、もしくは進行のスピードを落とさせる方法はないのか？

そこで、今回着目するのは軟骨細胞の細胞死 (アポトーシス) である。変形性関節症では軟骨細胞のアポトーシスが亢進していることが報告されている。本研究では軟骨細胞におけるアポトーシスに着目し、これらの制御メカニズムの解明を目的とした研究を行ない、さらにはそれを利用した変形性関節症の治療法の可能性を検証する。これまでの変形性関節症などの関節障害に対しては、成長因子や増殖因子からのアプローチが主流でありアポトーシスを利用したアプローチはほ

とんど行われていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究では、軟骨のアポトーシスに関して着目し、その制御に関与する因子を見出し、その機能を評価する。その第一歩として、代表的な癌抑制遺伝子の一つである p53 とその関連因子に着目した。p53 は癌抑制遺伝子として知られているが、DNA 損傷の生じた細胞の細胞周期制御や DNA 修復、アポトーシスへの誘導などに深く関与していることが報告されている。また、組織の老化に関与すると報告もあり、変形性関節症などの加齢変化との関連が考えられる。一般的に細胞にストレスが加わり DNA が損傷されると p53 の発現が上昇し、転写因子活性を上昇させて細胞周期が一旦停止すると考えられている。その後、過度なストレスによって DNA の修復が不可能な細胞に対してはアポトーシスを誘導させる。その際、p53 の標的遺伝子である p53AIP1 はミトコンドリア内で発現活性を上昇させ、細胞をアポトーシスへ誘導する重要な働きを果たしている。

主に軟骨組織における軟骨細胞のアポトーシスに関連した研究を行ってきた。その中でも p38MAPK という分子に着目した。

p38 MAPK は多機能であり細胞のアポトーシスに関与するだけでなく、分化、増殖、炎症の誘導にも関与することが報告されている。一方、変形性関節症においては IL-1 $\beta$  といった炎症性サイトカインの亢進が正常関節に比べ亢進することにより炎症、ひいては関節破壊につながっているとの研究報告も散見される。実際、関節リウマチの研究分野ではリウマチ滑膜細胞において p38MAPK の活性を抑えることで IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカインの発現が発現亢進が抑制され滑膜の炎症が抑えられるとの報告がある (Rheumatology, 2008)。さらに近年 EPA (eicosapentaenoic acid) が p38MAPK の活性を

抑制するということと言われており、我々はこの点に注目し変形性関節症における関節の破壊をEPAを介したp38MAPK抑制効果で、アポトーシスの制御と同時に炎症をコントロールすることで同時に抑制することができないかを検討する

### 3. 研究の方法

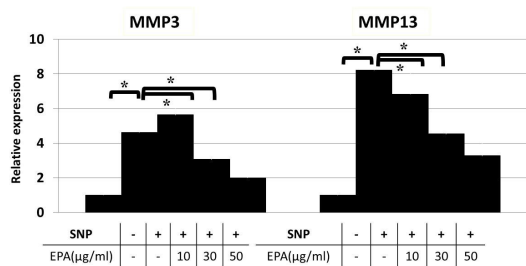
軟骨細胞としてNHACKnを単層培養し、EPA30μg/mlを8時間添加し、その後、NOドナーのソディウムニトロプルシッド(SNP)1mMを30分、12時間負荷した。抽出した細胞でreal time RT-PCRにてMMP3、13を検出し、Western Blottingにてp38MAPK、p53のリン酸化、cleaved caspase 3、cleaved PARPを検出し、FACSにて軟骨のアポトーシスを解析した。

次に10週令のC57BL6Jマウスに変形性関節症モデル(DMMモデル)を作成し、毎週EPAを関節内投与し、術後12週で屠殺し組織学的、免疫組織学的に評価を行った。

### 4. 研究成果

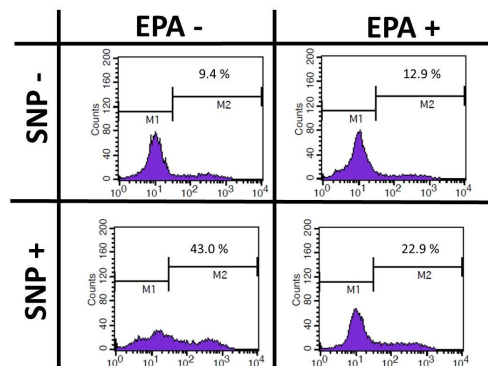
(1) real time RT-PCRではNHACKnにSNP負荷でのMMP3、13の増加を認め、EPA添加にてそれが容量依存性にMMP3、13の発現が抑制された。(Figure 1)

Figure 1



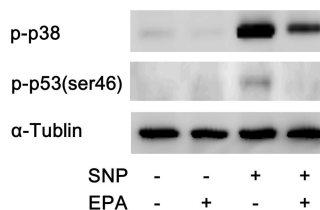
(2)フローサイトメトリーでは、SNP負荷による軟骨のアポトーシスが、EPA添加によって抑制された。(Figure 2)

Figure 2



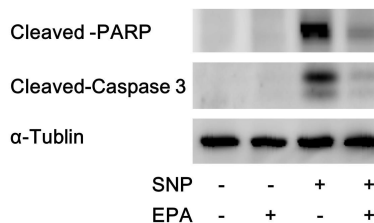
(3)Western BlottingではSNP負荷でp38MAPK、p53のリン酸化が増加し、EPAを添加することで、そのリン酸化が抑制された。(Figure 3)

Figure 3



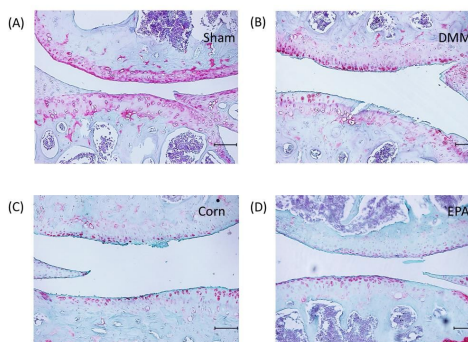
(4)また、アポトーシスに關与するcaspases 3、PARPの活性化がSNP負荷で増加し、EPAにて抑制された。(Figure 4)

Figure 4



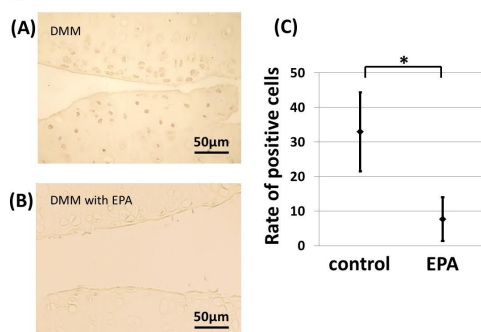
(5)DMMモデルを作成し12週後にsafranin O染色で比較すると、EPA投与群でOAの進行が抑制された。(Figure 5)

Figure 5



(6) TUNEL 染色で EPA 投与群すると TUNEL 陽性細胞は減少した。つまりアポトーシスを抑制している。(Figure 6)

Figure 6



### 考察

EPA 処理によって NO の生産過剰で引き起こされた、MMP3、13 の発現が抑制され、また、p38MAPK, p53 のリン酸化、および、caspase-3 および PARP の活性化が抑制され、アポトーシスを減少したことから、OA の予防、治療に有用である可能性が示唆された。今後臨床実用に向けた取り組みが必要である。

### 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 2 件)

Kawakita K, Nishiyama T, Fujishiro T, Hayashi S, Kanzaki N, Hashimoto S, Takebe K, Iwasa K, Sakata S, Nishida K, Kuroda R, Kurosaka M: Akt phosphorylation in human chondrocytes is regulated by p53R2 in response to mechanical stress: Osteoarthritis Cartilage. 2012;20:1603-9.

Iwasa K, Hayashi S, Fujishiro T, Kanzaki N, Hashimoto S, Sakata S, Chinzei N, Nishiyama T, Kuroda R, Kurosaka M. PTEN regulates matrix synthesis in adult human chondrocytes under oxidative stress. J Orthop Res. 2014 ;32:231-7

[学会発表](計 3 件)

坂田 周平、林 申也、藤代 高明、神崎 至幸、橋本 慎吾、岩佐 賢二郎、鎮西 伸顕、木原 伸介、黒田 良祐、黒坂 昌弘 題目：エイコサペンタエン酸は酸化ストレス依存性の軟骨細胞の変性、アポトーシスを抑制する。日本整形外科基礎学術集会 2013、千葉

坂田 周平、林 申也、藤代 高明、神崎 至幸、橋本 慎吾、岩佐 賢二郎、鎮西 伸顕、木原 伸介、黒田 良祐、黒坂 昌弘 題目：エイコサペンタエン酸は酸化ストレス依存性の軟骨細胞の変性、アポトーシスを抑制する。日本軟骨代謝学会 2013 年 大阪

Shuhei Sakata, Shinya Hayashi, Takaaki Fujishiro, Kohei Kawakita, Noriyuki Kanzaki, Shingo Hashimoto, Kenjiro Iwasa, Nobuaki Chinzei, Shinsuke Kihara, Takayuki Nishiyama, Ryosuke Kuroda, Masahiro Kurosaka 題目 Oxidative stress-induced chondrocytes apoptosis and matrix loss were inhibited by eicosapentaenoic acid, OARSI meeting 2013, Philadelphia, USA

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

### 6 . 研究組織

(1)研究代表者

西山 隆之 (NISHIYAMA, Takayuki)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：10379373

(2)研究分担者

林 申也 ( HAYASHI, Shinya )

神戸大学・医学部附属病院・特命助教

研究者番号：20437487

藤代 高明 ( FUJISHIRO, Takaaki )

神戸大学・医学部附属病院・特命助教

研究者番号：50448172

神崎 至幸 ( KANZAKI, Niroyuki )

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30514632

(平成23年4月~9月まで研究に参画)

黒田 良祐 ( KURODA, Ryosuke )

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80379362

黒坂 昌弘 ( KUROSAKA, Masahiro )

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：70170115

西田 康太郎 ( NISHIDA, Kotaro )

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00379372