

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592219

研究課題名(和文) 軟骨変性の進行における小胞体ストレスの役割に関する分子生物学的解析

研究課題名(英文) Functional analysis of endoplasmic reticulum stress in the progression of cartilage degeneration

研究代表者

水田 博志 (Mizuta, Hiroshi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：60174025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：アポトーシス関連分子Chopの遺伝子欠損マウスの変形性関節症(OA)モデルと、同マウスの軟骨細胞を用いた解析により、Chopが軟骨細胞アポトーシスに直接的な役割を果たし、Chopを介した小胞体ストレス性アポトーシスが軟骨変性の進行に寄与することを示した。また、小胞体ストレスセンサー蛋白Perk, Ire1, Atf6の遺伝子欠損マウスのOAモデルと、各遺伝子発現が抑制された軟骨細胞を用いて、Atf6が軟骨変性の進行に関与し、またIre1とAtf6が軟骨細胞の同化作用に影響を及ぼすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of proapoptotic transcription factor Chop in murine chondrocyte apoptosis and in the progression of cartilage degeneration, using Chop-knockout (Chop^{-/-}) chondrocytes and model of surgically-induced osteoarthritis (OA) in Chop^{-/-} mice. Our results indicate that Chop plays a direct role in chondrocyte apoptosis and that endoplasmic reticulum (ER) stress-mediated apoptosis contributes to the progression of cartilage degeneration in mice. We also investigated the role of ER stress sensor Perk, Ire1alpha, and Atf6alpha in cartilage degeneration and chondrocyte metabolism with Perk^{+/-}, Ire1alpha^{+/-}, and Atf6alpha^{-/-} mouse models of OA and these genes-knockdown chondrocytes. The results suggest that Atf6alpha involves the progress of cartilage degeneration and the expression of Ire1alpha and Atf6alpha relates with chondrocyte anabolism.

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

キーワード：小胞体ストレス 軟骨変性 軟骨細胞 小胞体ストレス関連遺伝子 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 (OA) における軟骨細胞は様々な catabolic な代謝変調をきたし、最終的にはアポトーシスを起こし細胞死にいたることが知られているが、この過程の詳細なメカニズムは明らかとなっていない。近年、細胞の蛋白合成を担う小胞体の異常 (小胞体ストレス) が、糖尿病や神経変性疾患、動脈硬化など種々の疾患の発症や増悪に関与することが指摘され、OA においても発症や進行の分子メカニズムとして注目されている。

細胞は小胞体ストレスを受けると、膜上のセンサー蛋白 (PERK、IRE1、ATF6) を活性化し、1) GRP78 などの小胞体シャペロンによる折りたたみ機能の向上、2) 新生タンパクの翻訳抑制、3) 変性タンパクの分解除去の3つのストレス応答を誘導して、自身の恒常性維持につとめる。しかし、小胞体ストレスが過剰となると、細胞は CHOP/GADD153 (C/EBP homologous protein) の誘導や JNK の活性化を介してアポトーシスを起こし死滅する。

OA において、変性軟骨では GRP78 の増加が報告され、われわれも PERK や IRE1 が活性化していることを明らかにした。また OA 軟骨では変性・破壊の進行とともに CHOP の発現と軟骨細胞のアポトーシスの頻度が相関して増加することを示した。さらに、小胞体ストレス誘導剤 Tunicamycin (TM) で培養ヒト関節軟骨細胞を刺激すると、軟骨細胞のアグリカン (Acan) mRNA 発現が抑制され、アポトーシスが增加することを明らかにした。

これらの先行研究の結果は、小胞体ストレスが OA の病態に関与していることを強く示唆するが、その関与を直接的に示すものとはいえず、小胞体ストレスの役割についても明確ではない。また、PERK、IRE1、ATF6 の3つのセンサー蛋白を介して引き起こされる小胞体ストレス応答は細胞種によって異なり、疾患の病態にもそれぞれ異なる役割を担っていることが示されている。

2. 研究の目的

OA における Chop と小胞体ストレスセンサー蛋白 PERK、IRE1、ATF6 の役割を明らかにすることを本研究の目的とし、軟骨変性の進行、軟骨細胞代謝とアポトーシスの影響について解析した。

3. 研究の方法

(1) Chop に関する解析

i) マウス OA モデルにおける検討

8週齢雄の野生型 (WT) と Chop 遺伝子ノックアウト (Chop^{-/-}) マウスに対して、内側側副靭帯切離と内側半月切除による OA モデルを用いて、術後 0、4、8、12 週後に膝関節を摘出して、組織標本を作成し、以下の解析を行った。

軟骨変性の評価: Safranin-O 染色による modified Mankin score で、脛骨と大腿骨の膝関節面における軟骨変性度を評価した。

アポトーシスの評価: TUNEL 染色と c-caspase3 の免疫染色を行い、それらの陽性細胞率を算出し評価した。

小胞体ストレスの評価: Grp78、Xbp1s、Chop の免疫染色を行い、それぞれの陽性細胞率を評価した。

軟骨細胞機能の評価: II 型コラーゲン (Col2) と Mmp13 の免疫染色を行い、Col2 は H-score を、Mmp13 は陽性細胞率を算出し、それぞれ評価を行った。

ii) マウス培養軟骨細胞における検討

5週齢雄の WT と Chop^{-/-} マウスの関節軟骨から軟骨細胞を単離・培養後、TM を 1 µg/ml 投与した。24 時間後に mRNA とタンパクを抽出し、以下の解析を行った。

小胞体ストレスの評価: Chop、Grp78、Xbp1s mRNA 発現を qPCR で、Chop と Grp78 のタンパク量を Western blotting で評価した。

アポトーシスの評価: DNA の断片化を ELISA と TUNEL 染色で、c-caspase3 の発現を免疫染色で評価した。

軟骨細胞機能の評価: Col2a1、Acan、Mmp13 mRNA の発現を qPCR で評価した。

(2) PERK、IRE1、ATF6 に関する解析

i) マウス OA モデルにおける検討

8週齢雄の WT と各センサー蛋白の遺伝子ノックアウト (Perk^{+/-}、Ire1^{+/-}、Atf6^{-/-}) マウスに対して、内側側副靭帯切離と内側半月切除による OA モデルを作成した。術後 4 週後に膝関節を摘出して組織標本を作成し、以下の解析を行った。

軟骨変性の評価: Safranin-O 染色による modified Mankin score で評価した。

アポトーシスの評価: TUNEL 染色を行い、TUNEL 陽性細胞率で評価を行った。

小胞体ストレスの評価: Xbp1s の免疫染色を行い、陽性細胞率で評価した。

軟骨細胞機能の評価: Col2 の免疫染色を行い、H-score で評価した。

ii) マウス培養軟骨細胞における検討

5週齢雄の WT マウスの関節軟骨から軟骨細胞を単離し、Perk、Ire1、Atf6 に対する siRNA と Lipofectamine を用いて、それぞれの遺伝子発現を抑制した。コントロール群には negative control siRNA を用いた。TM を 1 µg/ml 投与し、24 時間後に mRNA とタンパクを抽出し、以下の解析を行った。

小胞体ストレスの評価: Xbp1s mRNA の発現を qPCR で評価した。

アポトーシスの評価: DNA の断片化を ELISA で評価した。

軟骨細胞機能の評価: Col2a1、Acan、Mmp13 mRNA の発現を qPCR で評価した。

4. 研究成果

(1) Chop に関する解析

i) マウス OA モデルにおける検討

軟骨変性の評価

Chop^{-/-} マウスでは、WT マウスと比較して Safranin-O の染色性が低下した (図 1A)。modified Mankin score は、脛骨、大腿骨ともに *Chop*^{-/-} マウスの方が有意に低値であった (図 1B、C)。

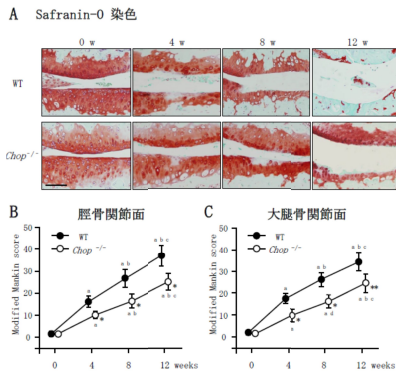


図 1. 軟骨変性の経時的変化

アポトーシスの評価

TUNEL 陽性細胞と c-caspase3 陽性細胞は *Chop*^{-/-} マウスで少なく (図 2A、B) それぞれの陽性細胞率は *Chop*^{-/-} マウスで有意に低値であった (図 2C、D)。

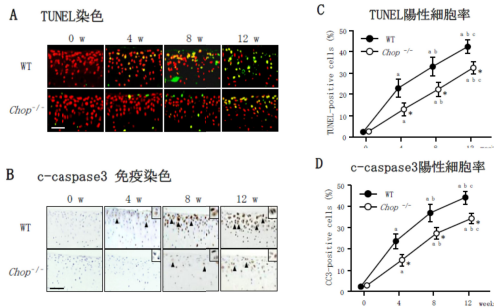


図 2. アポトーシスの経時的変化

小胞体ストレスの評価

Chop 陽性細胞は、WT マウスでのみ多く認められた (図 3A)。 *Chop* 陽性細胞率は、WT マウスでのみ週数の経過とともに増加した (図 3B)。 Grp78 と Xbp1s の陽性細胞数は、両マウスで同等であり (図 3C、D) 陽性細胞率は有意差は認めなかった (図 3E、F)。

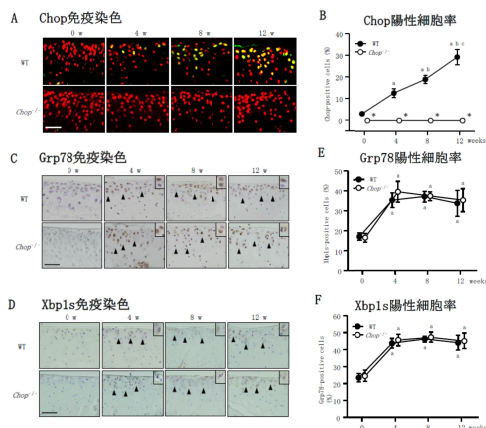


図 3. 小胞体ストレスの経時的変化

軟骨細胞機能の評価

WT と比較して *Chop*^{-/-} マウスで Col2 の染色性は保たれており (図 4A) H-score は有意に高かった (図 4B)。 Mmp13 の陽性細胞数は、*Chop*^{-/-} マウスの方が少なく (図 4C) 陽性細胞率では *Chop*^{-/-} マウスで有意に低値であった (図 4D)。

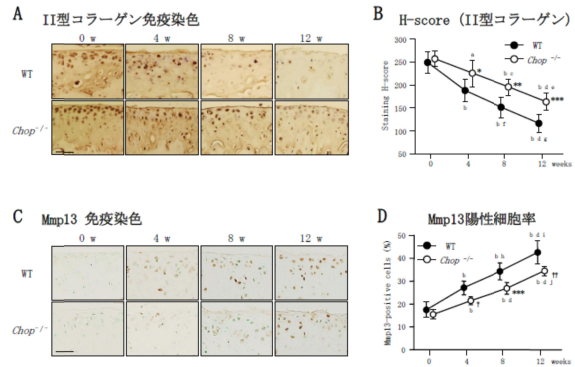


図 4. 軟骨細胞機能の経時的変化

ii) マウス培養軟骨細胞における検討 小胞体ストレスの評価

TM 投与によって、*Chop* の発現は WT マウスでのみ増加した (図 5A、B) が、Grp78 (図 5C、D) と Xbp1s (図 5E) の発現は WT と *Chop*^{-/-} マウスで同等に増加した。

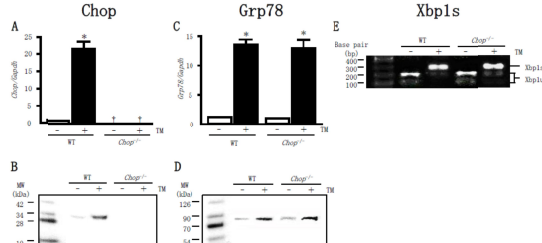


図 5. 小胞体ストレス発生の比較

アポトーシスの評価

TM 投与により両マウスとも TUNEL 陽性細胞、c-caspase3 陽性細胞が増加したが、*Chop*^{-/-} マウスで陽性細胞数が少なかった (図 6A、B)。 ELISA でも同様に、TM によるアポトーシス増加は *Chop*^{-/-} マウスで有意に低かった (図 6C)。

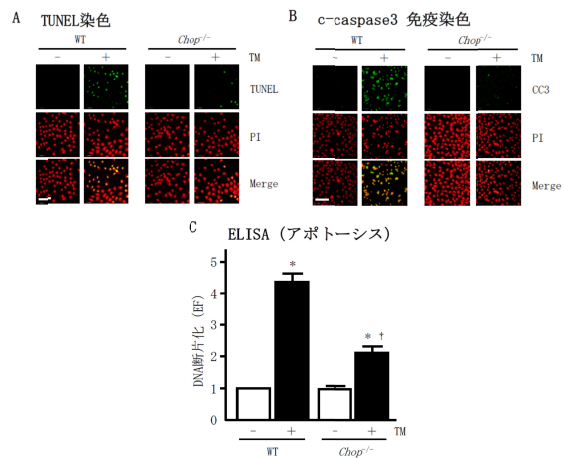


図 6. アポトーシス発生の比較

軟骨細胞機能の評価

Col2a1 と *Acan* mRNA の発現は、TM 投与によって両マウスとも低下したが、*Chop*^{-/-} マウスにおける低下は WT マウスより有意に抑制された (図 7A、B)。 *Mmp13* mRNA の発現は、TM 投与で両マウスとも増加したが、*Chop*^{-/-} マウスにおける増加は WT マウスより有意に抑制された (図 7C)。

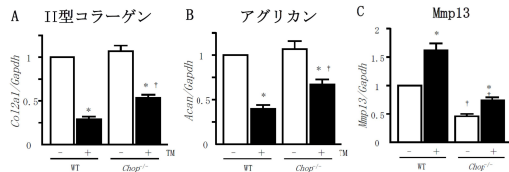


図 7. 軟骨細胞機能の比較

(2) PERK、IRE1、ATF6 に関する解析

i) マウス OA モデルにおける検討

軟骨変性の評価

Safranin-O の染色性は、WT と比較して *Perk*^{+/-}、*Irel1*^{+/-} マウスでは変わらなかったが、*Atf6*^{-/-} マウスでは低下した (図 8A)。 modified Mankin score は、WT と比較して *Perk*^{+/-}、*Irel1*^{+/-} マウスでは変わらなかったが、*Atf6*^{-/-} マウスでは有意に高かった (図 8B)。

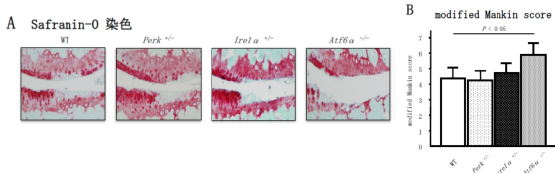


図 8. 軟骨変性度の比較

アポトーシスの評価

TUNEL 陽性細胞は、WT と比較して *Perk*^{+/-}、*Irel1*^{+/-} マウスでは変わらなかったが、*Atf6*^{-/-} マウスでは多く認められた (図 9A)。 TUNEL 陽性細胞率は、WT と比較して *Perk*^{+/-}、*Irel1*^{+/-} マウスで有意差はなかったが、*Atf6*^{-/-} マウスで有意に高かった (図 9B)。

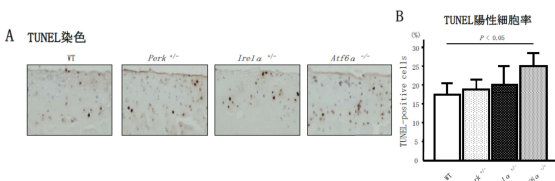


図 9. アポトーシス発生の比較

小胞体ストレスの評価

Xbp1s 陽性細胞率は、WT と比較して *Perk*^{+/-} マウスでは変わらなかったが、*Irel1*^{+/-}、*Atf6*^{-/-} マウスでは有意に低値を呈した (図 10)。

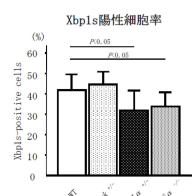


図 10. 小胞体ストレス発生の比較

軟骨細胞機能の評価

II 型コラーゲンの免疫染色による H-score は、WT と比較して *Perk*^{+/-}、*Irel1*^{+/-}、*Atf6*^{-/-} マウスで有意差は認めなかった (図 11)。

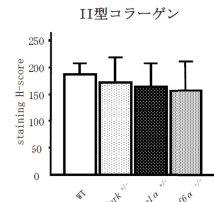


図 11. 軟骨細胞機能の比較

ii) マウス培養軟骨細胞における検討

小胞体ストレスの評価

Xbp1s mRNA の発現は、TM 投与によってコントロール群、*Perk*、*Irel1*、*Atf6* KD 細胞のいずれも増加したが、その発現上昇はコントロール群より *Irel1*、*Atf6* KD 細胞で低かった (図 12)。

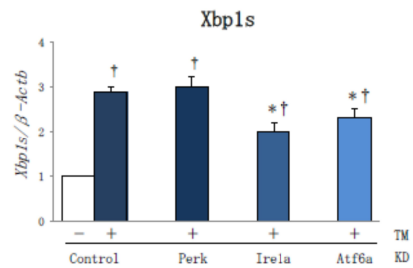


図 12. 小胞体ストレス発生の比較

アポトーシスの評価

アポトーシスは、TM 投与によってコントロール群、*Perk*、*Irel1*、*Atf6* KD 細胞のいずれも増加したが、コントロール群より各 KD 細胞で有意に高かった (図 13)。

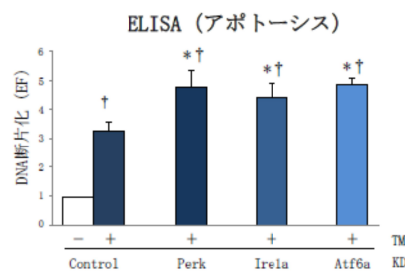


図 13. アポトーシス発生の比較

軟骨細胞機能の評価

TM 投与による *Col2a1* mRNA の発現低下は、コントロール群、*Irel1*、*Atf6* KD 細胞で認められたが、コントロール群と比較して *Irel1*、*Atf6* KD 細胞の方が有意に低かった (図 14A)。 TM 投与による *Acan* mRNA の発現低下は、コントロール群、*Irel1*、*Atf6* KD 細胞で認められたが、コントロール群より *Irel1* KD 細胞で有意に低かった (図 14B)。 *Mmp13* mRNA の発現は、TM 投与でコントロール群、*Perk*、*Irel1*、*Atf6* KD 細胞でいずれも有意に増加したが、各 KD 細胞とコントロール群の間には有意差は認めなかった (図 14C)。

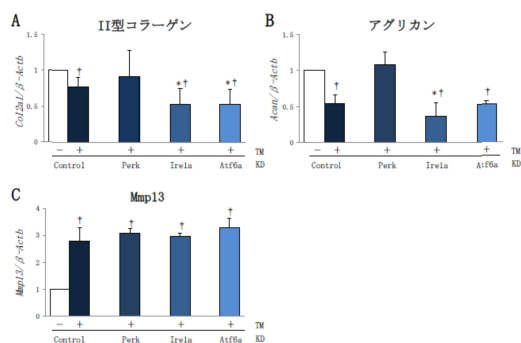


図 14. 軟骨細胞機能の比較

(3) まとめ

Chop^{-/-} マウス OA モデルでは軟骨変性の進行、II 型コラーゲンの発現低下、および Mmp13 の発現増加が抑制されるとともに、軟骨細胞アポトーシスの増加が抑制された。また、培養細胞では、*Chop*^{-/-} マウス軟骨細胞でアグリカンと II 型コラーゲンの発現低下の抑制とともにアポトーシス増加が抑制された。これらのことから、Chop を介した小胞体ストレス性アポトーシスが軟骨変性の進行に寄与し、Chop が軟骨細胞アポトーシスに直接的な役割を果たすことが示された。

また、*Atf6*^{-/-} マウス OA モデルでは、軟骨変性が進行することから、*Atf6* が OA の病態の進行に重要な役割を果たすことが示唆された。さらに、*Ire1* と *Atf6* のノックダウン細胞において、II 型コラーゲンとアグリカンの発現低下したことから、これらのセンサー蛋白は軟骨細胞の同化作用に関与する可能性があることが示された。

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 1 件)

Yusuke Uehara, Jun Hirose, Soichiro Yamabe, Nobukazu Okamoto, Tatsuya Okada, Seiichi Oyadomari, Hiroshi Mizuta: “Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis contributes to articular cartilage degeneration via C/EBP homologous protein.” *Osteoarthritis and Cartilage*, 査読有, 2014 (in press)

[学会発表](計 5 件)

上原悠輔、廣瀬隼、久永哲、水田博志: “小胞体ストレスセンサー蛋白 Atf6 は軟骨細胞の同化作用に関与する” 第 27 回日本軟骨代謝学会. (20140301). 京都. 京都府医師会館

水田博志: “OA 軟骨変性の病態と画像診断” 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 (招待講演). (20131018). 千葉. 幕張メッセ国際会議場

上原悠輔、廣瀬隼、高田興志、山部聡一郎、水田博志: “軟骨変性における小胞体

ストレスセンサーの役割” 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会. (20131017). 千葉. 幕張メッセ国際会議場
上原悠輔、廣瀬隼、高田興志、山部聡一郎、水田博志: “小胞体ストレスはアポトーシスを誘導して関節軟骨変性を来す” 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会. (20121027). 名古屋. 名古屋国際会議場
水田博志: “軟骨破壊の病態と治療” 第 4 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会. (20120719). 沖縄. 沖縄コンベンションセンター

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水田 博志 (MIZUTA, Hiroshi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究番号: 6 0 1 7 4 0 2 5

(2) 研究分担者

廣瀬 隼 (HIROSE, Jun)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 4 0 4 3 3 0 0 7

岡田 龍哉 (OKADA, Tatsuya)

熊本大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号: 9 0 5 8 8 4 0 1

高田 興志 (TAKADA, Koji)

熊本大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 7 0 5 9 9 4 3 0

(平成 24 年度まで)

(3) 連携研究者

親泊 政一 (OYADOMARI, Seiichi)

徳島大学・疾患ゲノム研究センター・教授

研究者番号: 9 0 5 0 2 5 3 4