

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011 ～ 2012
 課題番号：23659716
 研究課題名（和文） 変形性膝関節症に対する後期糖化最終生成物による半月板変性の影響
 研究課題名（英文） The effect of advanced glycation end products to meniscal degeneration of osteoarthritic knees
 研究代表者
 平岩 秀樹 (HIRAIWA HIDEKI)
 名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
 研究者番号：70566976

研究成果の概要（和文）：

加齢関連物質である後期糖化最終生成物（AGE）の受容体（RAGE）の働きを変形性膝関節症（膝 OA）患者より採取した軟骨や半月板で調査した。AGE による代謝反応は RAGE を介して行われ、膝 OA 患者の治療で広く使われるヒアルロン酸によりその効果が減弱した。また OA などの損傷組織から分泌される alarmin のひとつで RAGE リガンドでもある S100 蛋白についても調査したところ、これらは OA 組織に多く存在しており、OA 同様な代謝反応が MAPK や NF κ B を介して行われていた。

研究成果の概要（英文）：

To obtain a novel knowledge about the progression of osteoarthritic knee, we investigated the function of advanced glycation endproducts (AGE) and the receptor of AGE (RAGE) in the process of osteoarthritis using the cartilage and the meniscus from osteoarthritic knee. The catabolic effects of meniscus by AGE were regulated through RAGE pathways, and were suppressed by hyaluronan which is used for treatment of osteoarthritic knee. Moreover, S100 protein, that is one of the ligand of RAGE and secreted by damaged tissues of osteoarthritic knee, regulated the catabolic effects of cartilage via p38 MAPK and NF-kappaB pathways.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野： 関節病学

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： 関節病学 軟骨代謝 加齢

1. 研究開始当初の背景

膝 OA は高齢者に幅広くみられる疾患であり、その中心症状である膝痛や機能障害（歩行障害、可動域制限、内反変形など）により患者の活動性は低下し、それに伴い労働力は低下し、さらにその治療にかかる費用が増大

するなどの問題が起こっている。膝 OA の治療や予防のためこれまでたくさんの研究が世界中で行われてきているが、その発生や進行に関与する因子が多く複雑であることによりその病態は明瞭となっておらず、今後も調査の必要な項目は数多い。膝 OA の進行と

膝半月板の変性に密接な関係があることは以前より知られており、膝 OA の予防にとって半月板が重要な役割を果たすと考えられている。しかし損傷半月板が膝の二次的 OA に与える影響の調査はあるが、一次的 OA に深く関連する半月板の変性に対する調査はそれほど行われていない。

また加齢関連物質である後期糖化最終生成物 (AGE) やその受容体である RAGE が関節軟骨の変性変化に関与することが最近の研究で少しずつ解明されてきている。AGE とは、糖とタンパクが無酵素的反応を起こして形成される不可逆的な架橋反応物の総称であり、一旦形成されると分解は難しく、生成物ごと除去するしかないため、軟骨などの代謝回転の遅い組織では加齢とともに蓄積されていき、組織の器質的な変化や化学的な反応を起こすことが知られている。膝関節の関節軟骨や半月板組織に対する AGE の作用として、①半減期の長いコラーゲンと架橋形成した AGE の蓄積により組織特性が変化し、弾力性の低下や組織の脆弱化がみられたり、②AGE を特異的リガンドとして認識する細胞表面受容体 (RAGE) による炎症の惹起や、軟骨分解反応を亢進などがみられ、これらが膝 OA の進行に寄与していることが分かっている。さらにこの RAGE には AGE 以外にもリガンドがあり、そのなかには膝 OA における損傷組織およびその周囲組織より分泌され、損傷細胞の修復や破壊に関与すると考えられている S100 タンパクや HMBG-1 などの alarmin や損傷関連分子パターン (DAMP) があり、近年 RAGE に関する注目は上がってきてはいるが、その詳細については未だ解明されていない。

2. 研究の目的

今回我々は膝 OA の予防に対する新しい知見を得るため、膝関節内構造物のうち軟骨だけでなく半月板にも着目し、加齢に関連する物質である AGE やその受容体である RAGE がどのように軟骨や半月板の変性変化、膝 OA の進行に関与するのか、またその反応はどのような経路によるものなのかを調査し、さらに膝 OA の治療に広く用いられるヒアルロン酸がその反応を抑制しうるかどうかを調査した。また他にも、OA 等の損傷組織より分泌される RAGE のリガンドで、最近注目されつつある S100 タンパクの膝 OA に対する役割についても OA 軟骨と正常軟骨を用いて調査した。

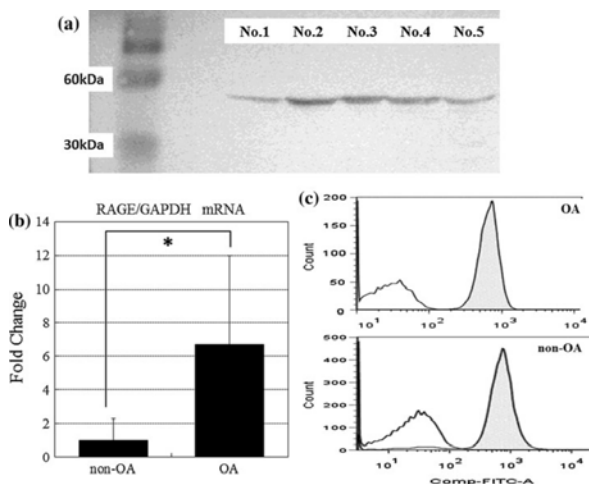
3. 研究の方法

研究は人工膝関節置換手術の際に採取した OA 膝の半月板や軟骨、さらに対照として

外傷などで手術した若年者の半月板や大腿骨頸部骨折で人工骨頭手術をした患者の OA 変化のない大腿骨頭を用いて行った。組織切片にて RAGE や S100 タンパクなどの発現を調査。組織を溶解して抽出した細胞に AGE や S100A12 タンパクを反応させた際の炎症や代謝反応について RT-PCR や ELISA、Western blotting、Flow cytometry などを用いて調べた。代謝反応については濃度勾配をつけた AGE や S100 タンパクを、RAGE を発現している細胞と反応させることで調べ、経路に関しては RAGE のデコイのように働き、RAGE の反応を抑制する soluble-RAGE を用いて調査したり、その下流で代謝反応に関与すると想定される MAPK や NFκB の経路の発現分子を直接調査したり、その経路を阻害する阻害薬を用いた際の代謝反応の変化について調査した。また AGE による炎症反応を抑制する方法についても、膝 OA 治療で広く用いられる分子量 80 万のヒアルロン酸を用いて調査した。

4. 研究成果

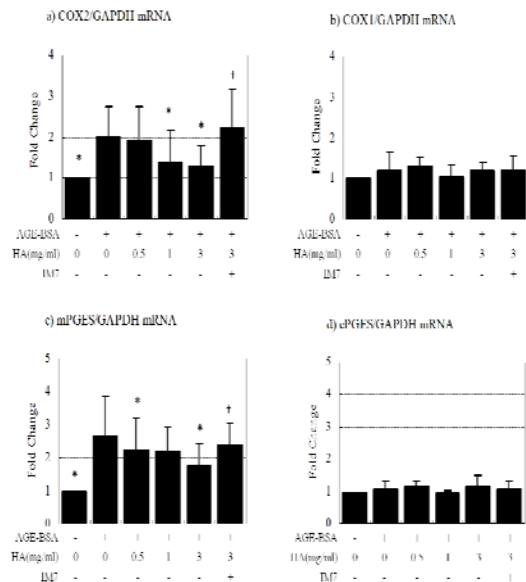
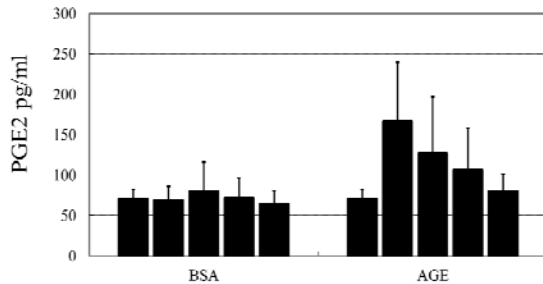
①OA もしくは非 OA 膝から採取した半月板における RAGE の発現程度を調べた。OA 膝半月板では全例 RAGE の発現がみられ、また非 OA 膝の半月板と比較すると、OA 膝から採取した半月板の方で RAGE の発現は優位であり、これらのことより、RAGE は OA 組織に広く発現していることがわかった (上 Western bolt、左下 PCR、右下 Flow cytometry)。



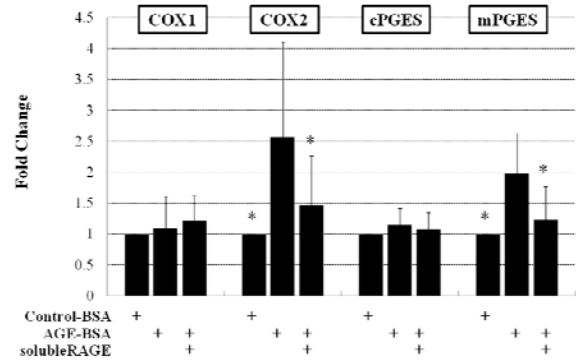
②OA 膝より採取した半月板より抽出した半月板細胞に AGE を反応させると、炎症に関連する PGE2 やその反応酵素である COX-2 や mPGES-1 の発現が上昇した。しかし、細胞の恒常性に関与する COX-1 や cPGES に関しては、変化は見られなかった。

このことから AGE は PGE2 を介する炎症反応により OA の進行に関与すると考えられた。

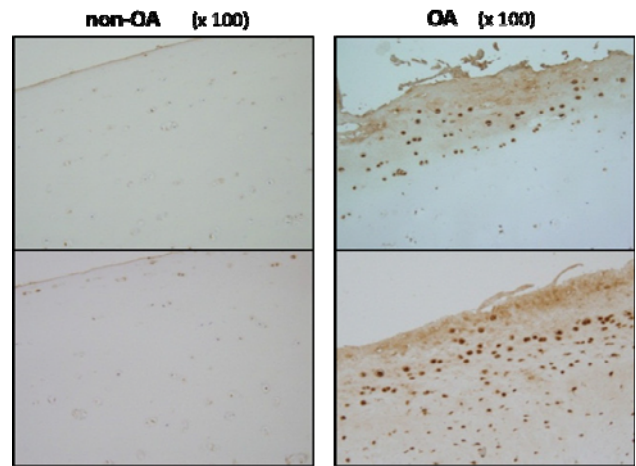
さらに膝 OA の治療で用いられる分子量 800 k Da のヒアルロン酸を追加して培養したところ、AGE による炎症反応はヒアルロン酸により濃度依存性に抑制された。またヒアルロン酸はその受容体のひとつである CD44 を介して作用していることも証明された。(下は PCR の結果であるが、Western blot でも同様の結果が得られた)。



③AGE による代謝反応が RAGE を介していることを証明するため、RAGE のデコイのように働き、RAGE 反応を抑制する soluble-RAGE を AGE とともに半月板細胞に添加して培養したところ、AGE による COX-2 と mPGES-1 発現の上昇は抑制された。このことから AGE により惹起される炎症反応は、RAGE を介して行われていることが分かった。



④膝 OA 患者から採取した OA 軟骨と大腿骨頸部骨折患者から採取した非 OA 軟骨における S100 タンパクの発現を調べたところ、OA 軟骨の方が S100A12 タンパクの発現が優位であった。このことより S100 タンパクが OA に深く関係すると考えられた。



⑤ヒト OA 軟骨における S100A12 タンパクの効果を知るため、OA 軟骨より採取した軟骨細胞に recombinant の S100A12 タンパクを添加したところ、OA 進行における catabolic な反応に関与するマトリックス分解因子である MMP-1,-3,-13 および血管新生因子である VEGF の発現は有意に上昇し、また anabolic な反応に関与するマトリックス合成因子の COL2 や Aggrecan の発現は減少したため、S100A12 タンパクは膝 OA の進行に関与があると考えられた。またこれらの反応は soluble-RAGE を加えることで抑制されることから、RAGE を介した反応であることが証明された。

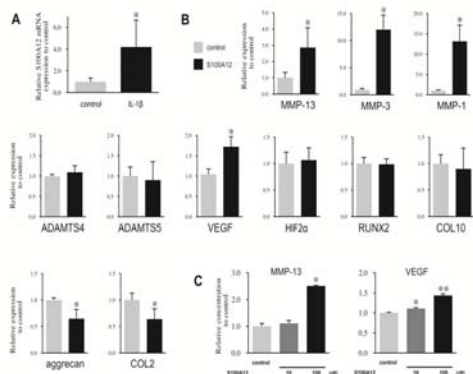


Fig. 2. Expression of mRNA and protein production in human OA chondrocytes stimulated with IL-1 β and S100A12. (A) S100A12 mRNA expression in OA chondrocytes stimulated with IL-1 β (10 ng/ml) for 24 h was measured by real-time RT-PCR ($n = 5$) and normalized to GAPDH. (B) Expression of mRNA in OA chondrocytes stimulated with S100A12 (100 nM) for 24 h was measured by real-time RT-PCR ($n = 5$) and normalized to GAPDH. (C) Production of MMP-13 and VEGF in the culture medium of OA chondrocytes stimulated with S100A12 (10 nM and 100 nM) for 24 h was measured by ELISA ($n = 3$). Data are expressed as mean \pm SD. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared with each control sample.

⑥この RAGE より下流の経路を調べるため MAPK と NF-kappaB の各阻害薬を用いて反応の変化を調査したところ、MAPK のうち p-38 の阻害薬と NF-kappaB の阻害薬により RAGE の反応は抑制された。このことから RAGE の代謝反応はこれらの経路を介して行われていることが分かった。

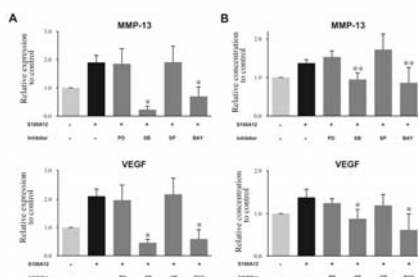


Fig. 4. Expression of mRNA and protein production of MMP-13 and VEGF in human OA chondrocytes pretreated with MAPK and NF-kB inhibitors. OA chondrocytes were pretreated with PMSF (10 μ M), SB203580 (10 μ M), JNK inhibitor (10 μ M), or Bay K 8646 (10 μ M) for 30 min and stimulated with S100A12 (100 nM) for 24 h. (A) Expression of MMP-13 and VEGF mRNA was measured by real-time RT-PCR ($n = 5$) and normalized to GAPDH. (B) Protein production of MMP-13 and VEGF in the culture medium was measured by ELISA ($n = 4$). Data are expressed as mean \pm SD. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared with control cells treated with S100A12 alone.

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) Nakashima M, Sakai T, Hiraiwa H, Hamada T, Omachi T, Ono Y, Inukai N, Ishizuka S, Matsukawa T, Oda T, Takamatsu A, Yamashita S, Ishiguro N. Role of S100A12 in the pathogenesis of osteoarthritis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Jun 8;422(3):508-14. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.05.036. Epub 2012 May 16. 査読あり.
- (2) Hiraiwa H, Sakai T, Mitsuyama H, Hamada T, Yamamoto R, Omachi T, Ohno Y, Nakashima M, Ishiguro N. Inflammatory effect of advanced glycation end products on human meniscal cells from osteoarthritic

knees. *Inflamm Res.* 2011 Nov;60(11):1039-48.

doi: 10.1007/s00011-011-0365-y. Epub 2011 Aug 13. 査読あり.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 石塚真哉, 酒井忠博, 平岩秀樹, 濱田恭ら, OA 半月板における HIF-2 α の高発現, 第 40 回日本関節病学会(2012.11.8 鹿児島)
- ② 中島基成, 酒井忠博, 平岩秀樹, 濱田恭ら, S100A12 タンパクによる変形性関節症の進行における影響, 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会(2012.10.26 名古屋)
- ③ 石塚真哉, 酒井忠博, 平岩秀樹, 濱田恭ら, 変形性関節症(OA)半月板細胞における hypoxiainducible factor-2 α (HIF-2 α) の高発現と軟骨内骨化関連遺伝子の制御, 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会(2012.10.26 名古屋)
- ④ Nakashima M, Sakai T, Hiraiwa H, Hamada T, Ishiguro N, et al. The effect of S100A12 in the pathogenesis of osteoarthritis. *Orthopaedic Research Society* 2012.2.4 San Francisco, California, USA
- ⑤ Ishizuka S, Sakai T, Hiraiwa H, Hamada T, Ishiguro N, et al. Increased expression of Hypoxia-inducible factor-2 α in osteoarthritic meniscus cells. *Orthopaedic Research Society* 2012.2.4 San Francisco, California, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平岩 秀樹 (HIRAIWA HIDEKI)
名古屋大学大学院医学系研究科・助教
研究者番号：70566976

(2) 研究分担者

酒井 忠博 (SAKAI TADAHIRO)
名古屋大学大学院医学系研究科・講師
研究者番号：60378198

濱田 恭 (HAMADA TAKASHI)
名古屋大学大学院医学系研究科・助教
研究者番号：90566978

山本隆一郎 (YAMAMOTO RYUICHIRO)
名古屋大学大学院医学系研究科・医員
研究者番号：80586743

(3) 連携研究者なし