

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 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790420

研究課題名（和文）軟骨細胞の遊走能に着目したヒト変形性関節症の病態解析

研究課題名（英文）Migratory potential of chondrocytes in human osteoarthritic cartilage

研究代表者

木村 徳宏 (KIMURA TOKUHIRO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40445200

研究成果の概要（和文）：

ヒト変形性関節症（OA）関節軟骨組織から単離・培養した OA 軟骨細胞を用いて、monolayer wound assay により遊走能を評価し、OA 病態に関与するサイトカイン・増殖因子の遊走に与える作用を検討した。血小板由来増殖因子（PDGF）と血管内皮増殖因子（VEGF）が遊走を促進する一方、インターロイキン（IL）-1 β と TGF- β には遊走抑制効果が観察された。VEGF による遊走促進には、ERK によるシグナル伝達と MMP ファミリー分子の発現誘導が関与しており、IL-1 β による遊走抑制にはプロスタグランジン E2 の産生が関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Migratory potential of osteoarthritic (OA) chondrocytes was examined by monolayer wound assay using cultured chondrocytes isolated from human OA cartilage samples. Migration of OA chondrocytes was regulated by cytokines/growth factors that are involved in OA pathophysiology: platelet-derived growth factor (PDGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulated migration whereas interleukin (IL)-1 β and transforming growth factor- β suppressed migration. Stimulation of migration by VEGF may involve ERK signals and expression of MMP family molecules. Suppression of migration by IL-1 β might be related to production of prostaglandin E2.

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	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：関節、軟骨、変形性関節症、細胞運動、細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症（osteoarthritis, OA）は最も頻度の高い関節疾患のひとつであり、高齢者に多く、関節の痛みや可動域制限をきたし日常生活を著明に障害する。膝・股関節等の荷重関節の OA は進行性で、関節軟骨が破壊され、最終的には人工関節置換が必要となる

難治性疾患である。高齢化社会となったわが国において、人々の quality of life (QOL) の向上の観点からも OA の病態解明は急務であり、障害された関節の再生を目指した治療戦略の開発が必要である。現在、OA の病態として、加齢や関節の力学的ストレスを背景に「関節軟骨の破壊」と「軟骨の不完全な再生」

が繰り返されることが知られているが、疾患メカニズムの十分な解明には程遠い状況である。

OA の病態研究においては、従来より軟骨破壊の視点から研究が行われてきた。OA 関節軟骨組織ではプロテアーゼ、特にマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) ファミリーと ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) ファミリーの分子が発現し、軟骨の細胞外マトリックスであるプロテオグリカン (アグリカン等) やコラーゲンの分解が起こり、軟骨組織の断裂や摩耗につながる。研究代表者らのグループはこれまでに ADAM ファミリーの中の ADAMTS 群に属する ADAMTS4 分子 (アグリカナーゼ-1) がヒト OA 軟骨のアグリカン分解に関与することを明らかにし (Naito S et al. *Pathol Int* 57:703-11, 2007)、OA の治療薬のひとつであるヒアルロン酸が ADAMTS4 発現を抑制することを報告してきた (Yatabe T et al. *Ann Rheum Dis* 68:1051-8, 2009)。

軟骨細胞は組織破壊に反応して増殖等の再生性変化を起こす。ヒト OA 軟骨では軟骨細胞が増殖し細胞集団を形成する像 (cloning と呼ばれる) が高頻度に見られ、軟骨の不完全再生の所見と考えられる。研究代表者らのグループはこの cloning のメカニズムのひとつとして、OA 軟骨細胞に ADAM12 が高発現し IGF-1 の系を介して細胞増殖に関わることを提唱した (Okada A et al. *Arthritis Rheum* 58:778-89, 2008)。さらに研究代表者は、複数の MMP および一部の ADAM 分子に対し分泌・活性阻害作用を有する細胞膜結合型分子 RECK (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) に注目し、この分子がヒト OA の cloning 軟骨細胞に高発現しており、細胞増殖に必要なだけでなく、軟骨細胞の遊走を抑制していることを発見した (Kimura T et al. *Am J Pathol* 176:2858-67, 2010)。これらのことから、OA 軟骨の cloning 病変は、軟骨細胞が組織破壊に反応して増殖するものの、遊走阻害により不完全な軟骨再生に陥っている病態を反映している可能性が示唆された。

組織の修復・再生では、①修復を担当する細胞の増殖、②障害部位への細胞の遊走、③もとの組織への再分化、が重要である。皮膚や骨組織と異なり、関節軟骨は血管のない組織のため、修復担当細胞が血流により供給されることは期待できず、軟骨組織内の細胞が

増殖するとともに破壊部位に移動・再分布するプロセスがより完全な修復に必須である。従来、軟骨は再生能のきわめて低い組織と想定されてきたが、研究代表者らの上記の知見や他のグループのデータから、OA 軟骨細胞は十分な増殖能力を持っているものの、組織内で遊走能が抑えられているためにその再生能力を発揮できない可能性が注目されつつある (Koelling S et al. *Cell Stem Cell* 4:324-35, 2009; Lotz MK et al. *Arthritis Rheum* 62:2206-18, 2010)。

従って、軟骨細胞の遊走能に関する研究が重要であるが、これまでのところその情報はきわめて乏しい。2 次元培養下での遊走や軟骨組織片からの細胞遊出 (outgrowth) についての記載的な研究が見られ (Morales II. *Osteoarthritis Cartilage* 15:861-71, 2007)、遊走促進因子として血清成分と PDGF (platelet-derived growth factor) が指摘されている (Mishima Y et al. *J Orthop Res* 26:1407-12, 2008)。しかし、軟骨細胞の遊走促進因子・抑制因子については未知の部分が多く、遊走機構についてはほとんど解明されていない。研究代表者らによる予備実験では、OA 軟骨細胞の 2 次元での遊走を VEGF (vascular endothelial growth factor) が促進するという結果を得ており、遊走促進のメカニズムも含めた研究を進めつつある。最近 Koelling らは、OA 軟骨片から遊出してくる細胞には遊走能に富んだ “chondrogenic progenitor cell” が含まれていると提唱し、この細胞が軟骨組織中を遊走できる可能性を示唆しているが、この細胞の性状については不明な点が多い (Koelling S et al. *Cell Stem Cell* 4:324-35, 2009)。OA 軟骨片から遊出してくる細胞が軟骨組織のどの部位由来なのかもわかっておらず、また OA 軟骨組織中や 3 次元マトリックス中での軟骨細胞の遊走の性状を直接観察した研究もほとんどなく、この分野の基礎的なデータの蓄積が必要と考えられる。

2. 研究の目的

OA 軟骨における軟骨細胞の遊走の特徴とメカニズムを明らかにすること。それにより、OA における不完全な軟骨再生の病態解明と、軟骨再生の促進に役立てる。

3. 研究の方法

(1) 2 次元遊走モデルを用いた遊走の促進・

抑制因子の解明

膝関節 OA 患者の人工関節置換術時に切除される関節組織から軟骨細胞を単離・培養する。この培養 OA 軟骨細胞の 2 次元における遊走能を monolayer wound assay (Liang CC et al. Nature Protocols 2:329-33, 2007) を用いて評価し、遊走を促進・抑制する因子について、特に OA 病態において重要な役割を演じると考えられている各種のサイトカイン・増殖因子 (VEGF、PDGF、IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β 、IGF-I、ケモカイン) を中心に調べる。

(2) 細胞遊走時に誘導されるプロテアーゼの探索

単層培養した OA 軟骨細胞に wound を作製し細胞を遊走させ、RNA・蛋白質を抽出する。RT-PCR 法とイムノブロット法により、遊走時に発現が誘導される MMP ファミリーのプロテアーゼをスクリーニングし、高発現する分子種を同定する。

(3) シグナル阻害薬等を用いた遊走メカニズムの検討

上記の実験で同定された遊走促進・抑制因子について、OA 軟骨細胞の 2 次元遊走を各種の阻害薬の存在下に行い、遊走の調節にどのシグナル経路が関わっているか検討する。

(4) 細胞の軟骨分化の状態と遊走能との関係の検討

インスリンにより軟骨細胞へと分化誘導されるマウス細胞株 ATDC5 を用いて、軟骨分化前後の細胞の遊走能の比較を行う。細胞が産生した細胞外マトリックスの影響を除くため、細胞をコラゲナーゼおよびプロナーゼ液で処理した上で monolayer wound assay を行う。

4. 研究成果

(1) OA の病態において重要と考えられる各種のサイトカイン・増殖因子について、monolayer wound assay により OA 軟骨細胞の遊走に及ぼす影響を検討したところ、PDGF と VEGF が遊走促進作用を示す一方、IL-1 β と TGF- β には遊走を抑制する作用が観察された。TNF- α 、IGF-I、ケモカイン (RANTES、MCP-1) では、遊走促進・抑制作用ははっきりしなかった。

(2) VEGF による OA 軟骨細胞の遊走促進時に誘導される MMP ファミリーのプロテアーゼを RT-PCR 法で検討したところ、MMP-1、MMP-3、MT1-MMP の発現が上昇していた。また、MMP 阻害薬である BB94 を加えた上で VEGF を作用させると遊走は抑制され、これらの MMP 分子の活性が VEGF による遊走促進に必要なことが示唆された。

(3) VEGF による OA 軟骨細胞の遊走促進において、イムノブロット法により細胞内タンパク質のリン酸化を検討すると、ERK のリン酸化が亢進していた。そこで ERK リン酸化の阻害薬である U0126 を加えた上で VEGF を作用させると、OA 軟骨細胞の遊走は抑制され、VEGF による遊走促進には ERK によるシグナル伝達に関与していることが示唆された。

また、軟骨細胞において IL-1 β シグナルの下流に位置していると考えられているプロスタグランジン E2 (PGE2) についても遊走への影響を調べたところ、遊走抑制作用を有することがわかった。遊走抑制に関与する PGE2 受容体のサブタイプを検討するため、EP1/2 拮抗薬 AH6809、EP1 拮抗薬 SC19220、EP4 拮抗薬 AH23848 の存在下実験を行ったところ、いずれの拮抗薬も PGE2 の遊走抑制作用をブロックしなかった。この結果から、PGE2 の遊走抑制作用は EP3 受容体を介している可能性が考えられた。

(4) ATDC5 細胞株をインスリンにより軟骨分化させ、分化前後の細胞の遊走能を比較したところ、分化前に比べて、分化後の細胞の遊走能は低下していた。遊走能と細胞の軟骨分化の状態との間に密接な関係があることが示唆された。

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)

Okubo M, Kimura T, Fujita Y, Mochizuki S, Niki Y, Enomoto H, Suda Y, Toyama Y, Okada Y. Semaphorin 3A is expressed in human osteoarthritic cartilage and antagonizes vascular endothelial growth factor

165-promoted chondrocyte migration: An implication for chondrocyte cloning. *Arthritis Rheum.*, 査読有, 2011; 63: 3000-3009.

〔学会発表〕(計3件)

① 木村徳宏, クローニング病変から見た関節軟骨変性の病態(シンポジウム 軟骨エイジング—そのメカニズムと評価). 第40回日本関節病学会. 2012年11月9日. 鹿児島市民文化ホール(鹿児島県). (招待講演)

② 木村徳宏, 岡田愛子, 谷田部拓, 大久保匡, 戸山芳昭, 野田亮, 岡田保典. ヒト変形性関節症軟骨において RECK は高発現し軟骨細胞のクローニングに関わる. 第25回日本軟骨代謝学会. 2012年3月10日. ウィルあいち(愛知県). (招待講演)

③ 木村徳宏, 岡田保典. 関節軟骨のリモデリング(シンポジウム 慢性炎症下における組織リモデリング). 第57回日本病理学会秋期特別総会. 2011年11月17日. 日本教育会館(東京都). (招待講演)

〔その他〕

ホームページ <http://keio-okada-lab.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 徳宏 (KIMURA TOKUHIRO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 40445200