

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791571

研究課題名(和文)軟骨細胞分化におけるヘパラン脱硫酸酵素の役割と変形性関節症への治療応用

研究課題名(英文)Role of heparan sulfate endosulfatase for chondrogenesis and osteoarthritis therapy

研究代表者

大槻 周平(Otsuki, Shuhei)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：20589840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：変形性関節症の変性軟骨でよく見られる軟骨細胞凝集塊には幹細胞の特性を有する細胞が多く含まれ、自己修復の期待が持てると考えられた。軟骨細胞が成熟していく過程(軟骨分化)で細胞凝集塊でも発現が見られたSulf-1が重要な役割を担っており、特に、軟骨変性に重要な役割を示すMMP-13の発現をin vitroで抑制していたことがわかった。マウスを用いたin vivoでも同様の結果が得られ、その機序としてはFGF2/Erkシグナルが関与している可能性が示唆された。Sulf-1は変形性膝関節症の新規治療薬として今後の検討が期待できる。

研究成果の概要(英文)：chondrocyte clusters adjacent to severe cartilage degeneration have specific characteristics, with progenitor and proliferative potential. Intra-articular injection of Sulf-1 suppressed OA progression with MMP-13 down-regulation. Sulfs may have the potential of the novel OA therapy.

研究分野：軟骨

キーワード：軟骨再生 変形性関節症 ヘパラン硫酸

1. 研究開始当初の背景

1) 軟骨は自己修復能が乏しい組織であり、そのメカニズムについては様々な方向から検討が進められている。軟骨変性領域に多く存在する軟骨細胞凝集塊(cluster)は、これまで軟骨変性の指標としてこれまで考えられてきたが、その一方でこれらの細胞凝集塊は軟骨同化因子も発現していることがわかった。そこで、今回まず、細胞凝集塊の再生能について検討した。ヘパラン硫酸脱硫酸酵素(Sulf)が軟骨変性に関わり、細胞凝集塊にもまた高発現していることは申請者が以前報告した。Sulf 欠損マウスでは軟骨の変性が優位に進行することがわかった。そこで、本研究では、軟骨変性に対する Sulf による新規治療の可能性とその作用機序について検討を行った。

2. 研究の目的

1) 細胞凝集塊(Cluster)の性質を観察し再生医療の可能性を検討すること、2) 軟骨変性に関与している Sulf の投与による新規治療の可能性を検討することである。

3. 研究の方法

1) 倫理委員会の承認を得て、人工膝関節置換術で切除する変性した軟骨組織を用いた。グルコサミノグリカンを評価する Safranin O 染色および免疫染色を行い組織学的に検討した。次に、採取した cluster 細胞と単細胞を各々平面培養し、トルイジンブルー染色にて軟骨再生の可能性を検討した。

2) 軟骨細胞分化株(ATDC5)を用いて軟骨分化における Sulf-1 の発現を real time PCR にて検討した。

次に、Sulf-1 の細胞毒性を検討するため、様々な濃度におけるアポトーシス発生について Annexin V を用いた検討を行った。軟骨組織における変性で代表的なマーカーの一つである MMP13 に注目し、western blotting にて Sulf-1 と MMP13 発現抑制効果について検

討した。C57BL6 マウスの膝関節に内側半月脱臼による変形性膝関節症モデルを作成し、その直後から、様々な濃度の Sulf-1 の関節内投与による軟骨変性抑制効果を MMP-13 や FGF-2 の免疫染色を用いながら検討を行った。

4. 研究成果

1) 細胞凝集塊は最も変性した軟骨の周辺(MPC 領域)に多く存在していた。MPC 領域の軟骨細胞は、肉眼および Safranin O 染色では変性していない部位(LPC 領域)の軟骨細胞よりも増殖能に富み、更に、間葉系幹細胞の性質をより多く有することが免疫染色によって示された。また、採取した軟骨細胞の平面培養結果も同様に、MPC 領域から採取した細胞(主に細胞凝集塊の細胞)は軟骨基質を多く産生していた(図1)。

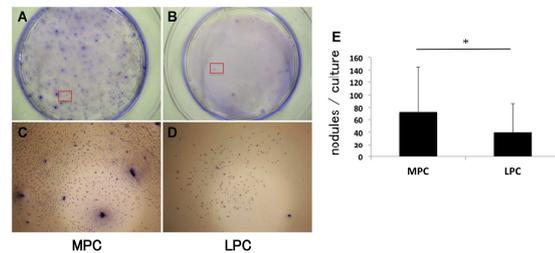


図1: 細胞凝集塊を多く含んでいた領域(MPC)は単細胞を多く含んだ(LPC)より14日の培養により、軟骨基質を産生する組織が多く見られた。

これらの結果は、人工関節手術を受ける様な進行した変形性膝関節症においても、軟骨細胞には自己修復能が保たれていることを示唆する。間葉系幹細胞の特性を有した細胞凝集塊を軟骨分化へ誘導することができれば、再生医療への新しいアプローチになりうると考えた。

2) ATDC5 に3週間の軟骨分化誘導をかけた。トルイジンブルーでの染色性や Col2a1 の発現などから軟骨分化が進んでいることがわかる(図2A,B)。その過程で、Sulf-1 の発現は優位に低下していたが、Sulf-2 の発現には大きな変化がなかった。これは軟骨分化

においては、Sulf-1の方が何らかの役割を担っていることを示唆する(図2B)。また、MMP-13の発現はSulf-1の発現とは逆に徐々に増加していた。(図2)

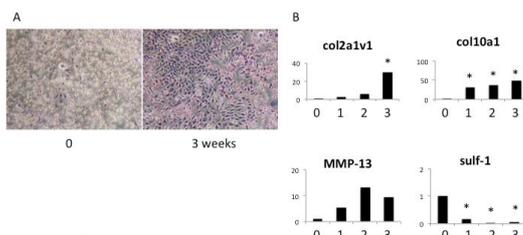


図2:(A) ATDC5のトルイジンブルー染色。3週間で軟骨分化していることが分かる。(B) ATDC5の分化に伴いSulf-1は徐々に発現が低下している一方、MMP-13の発現は増加していた。

Sulf-1 蛋白を 0-1000ng/ml の濃度で 2×10^5 cell/well の ATDC5 に 24 時間刺激を加えて細胞死に対する影響をアポトーシスアッセイキット(Muse Annexin V and Dead Cell kit Millipore)を用いて測定した。その結果、Sulf-1 は 1000ng/ml までの濃度では細胞死を誘導する様な毒性を示さなかった(図3)。

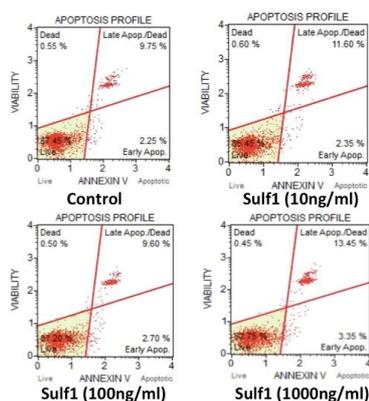


図3: Muse Annexin V and Dead Cell kitによるアポトーシスの検討。いずれの濃度においても、細胞死を惹起していなかった。

Sulf-1 刺激による MMP-13 の発現を western blotting にて観察した。Sulf-1(10ng/ml)と IL-1 β (10ng/ml)を 24 時間 ATDC5 に刺激した。その結果、MMP-13 の発現は Sulf-1 によって優位に抑制されていることがわかった(図4)。

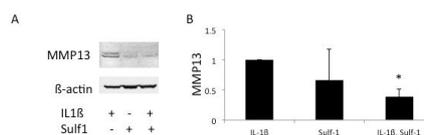


図4: Sulf-1 刺激による MMP-13 の発現の変化。肉眼的にも定量的にも Sulf-1 の刺激により MMP-13 の発現は抑制されていた。

次に動物実験を行った。

マウスの内側半月板冠状靭帯を切離し、変形性関節症モデルを作成した。1度目の Sulf-1 関節内投与はその際に行い、以後は1週ごとに3回関節内投与した。処置から4週間目に評価した。投与する Sulf-1 の濃度は 1、10、100 ng/10 μ l とした。その結果、コントロールの PBS 10 μ l 投与マウスでは変形性関節症が進行し、軟骨が消失していたが、Sulf-1 の関節内投与群では軟骨が比較的保たれており、軟骨保護作用による変形性関節症の進行抑制が示唆された(図5)。

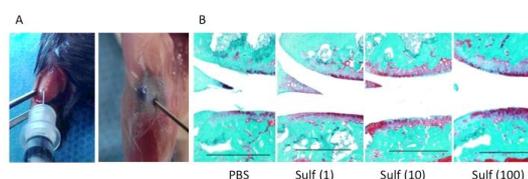


図5:(A) マウスへの関節内投与の風景(左)。予備実験にて 10 μ l のピオクタンインを投与し、関節内へ問題なく注入できていることを確認している(右)。(B) PBS 投与群に比べ、Sulf-1 投与群では染色性が保たれている。

最後に抑制効果の作用機序を探るべく組織の免疫染色を行った。ターゲットは invitro の実験で Sulf-1 による抑制が示唆された MMP-13 と MMP-13 の発現を Erk1/2 を介して促進する FGF2 に着目した。その結果、FGF2, MMP-13 と、変形性関節症誘導モデル

では Sulf-1 投与により発現が抑制されていることがわかった。一方 sham 手術では発現に有意差は見られなかった(図 6)。

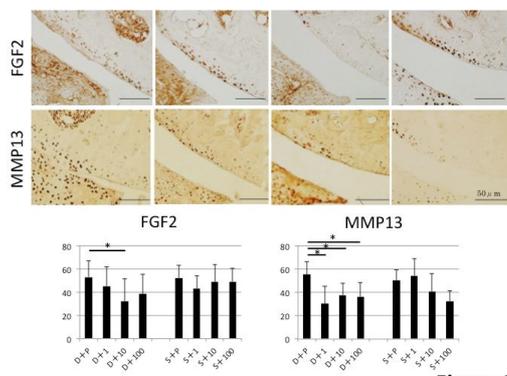


図 6 : 変形性膝関節症誘導(D)群と Sham(S)群における Sulf-1 投与による FGF2, MMP13 抑制効果。

まとめ : 本研究では、変形性関節症の変性軟骨でよく見られる軟骨細胞凝集塊には幹細胞の特性を有する細胞が多く含まれ、自己修復の期待が持てると思われた。軟骨細胞が成熟していく過程(軟骨分化)で細胞凝集塊でも発現が見られた Sulf-1 が重要な役割を担っており、特に、軟骨変性に重要な役割を示す MMP-13 の発現を *in vitro* で抑制していたことがわかった。マウスを用いた *in vivo* でも同様の結果が得られ、その機序としては FGF 2 /Erk シグナルが関与している可能性が示唆された。Sulf-1 は変形性膝関節症の新規治療薬として今後の検討が期待できる。

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 1 件)

1) Chondrocyte Clusters Adjacent to Sites of Cartilage Degeneration have Characteristics of Progenitor Cells. J Orthop Res. 2015 in press. Yoshiaki Hoshiyama, Shuhei Otsuki et al.

[学会発表](計 4 件)

1) 2013 日本整形外科学会基礎学術集会 (千葉)

変形性膝関節症における軟骨細胞クラスタの局在とその作用 星山芳亮、大槻周平、黒川義隆、小田周平、中島幹雄、常德剛、岡本純典、根尾昌志

2) 2013 日本整形外科学会基礎学術集会 (千葉)

関節軟骨変性に対するヘパラン硫酸 6-O 脱硫酸酵素 (Sulf) の抑制効果 黒川義隆、大槻周平、星山芳亮、小田周平、根尾昌志

3) 2013 Osteoarthritis Research Society International in Philadelphia

Potential of Cartilage Regeneration based on Chondrocyte Cluster in Osteoarthritis Yoshiaki Hoshiyama, Shuhei Otsuki, Shuhei Oda, Yoshitaka Kurokawa, Mikio Nakajima, Tsuyoshi Jotoku, Yoshinori Okamoto and Masashi Neo

4) 2013 International Cartilage Research Society in Turkey

Intra-articular injection of heparan sulfate endosulfatase (Sulf) suppresses cartilage degeneration Yoshiaki Kurokawa, Shuhei Otsuki, Yoshiaki Hoshiyama, Shuhei Oda, Masashi Neo

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大槻 周平(Otsuki Shuhei)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 20589840