

平成 29 年 9 月 29 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462361

研究課題名(和文)天然高分子化合物による軟骨アンチエイジングへの挑戦

研究課題名(英文)The effect of anthocyanidin on skeletal antiaging

研究代表者

古賀 大介(Daisuke, Koga)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・非常勤講師

研究者番号：60422482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々はキッコーマン社との共同研究により軟骨代謝に対するプロシアニジンB3の効果を、培養細胞およびマウス外傷性変形性膝関節症モデルを用いて検証した。その結果、プロシアニジンB3は酸化ストレス抑制に伴い軟骨保護作用と異所性骨化予防効果を示した。元来、アントシアニジンは腸管からの吸収効率が極めて低いため、経口投与されたアントシアニジンが小腸から吸収され、門脈を経て末梢臓器に至るといった経路は想定しにくい。したがって我々は、経口投与されたアントシアニジンが腸内細菌叢に与える影響を調べるために、糞便解析を行った。

研究成果の概要(英文)：We disclosed anthocyanidin prevented osteoarthritis (OA) progression in a murine OA model. To explore the mechanisms of anti-inflammatory role of anthocyanidin, we have analysed the effect of oral administration of anthocyanidin to gut microbiota.

研究分野：分子生物学

キーワード：アントシアニジン 腸内フローラ

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 (OA) は関節軟骨が変性し摩耗する疾患であるが、その発症メカニズムは十分に解明されていない。ヒトにおいて、肥満は変形性関節症の重要な危険因子のひとつであるが、非荷重関節においても関節症変化が促進されることより (Cicutini ら 1996 年、Oliveria ら 1999 年)、体重負荷によるメカニカルストレス増加のみが関節軟骨変性の機序であるとは考えにくい。現在 OA に対する薬理的な治療方法の手段は限られており、経口摂取可能で根治的治療効果を有する治療薬が待望される。

OA の進行において酸化ストレスは重要な役割を演じる。プロシアニジン (PCN) は赤ワインの主要なポリフェノールであり、ブドウ種子に多く含まれる。プロシアニジン 2 量体のひとつであるプロシアニジン B 3 は消化管から吸収されて血中移行し、強力な抗酸化力を持つ。最近我々は㈱キッコーマン社との共同研究により、軟骨代謝に対するプロシアニジン B 3 の効果を、培養細胞およびマウス外傷性変形性膝関節症モデルを用いて検証した。その結果、プロシアニジン B 3 は酸化ストレス抑制に伴い軟骨保護作用と異所性骨化予防効果を示した。また、興味深いことに B 3 は軟骨細胞様細胞株 A T D C 5 の軟骨分化を促進した。この成果は PLoS ONE に投稿された (古賀、麻生ら PLoS ONE. 2012;7(5)業績参照) が、内容の先進性と有用性を評価され、Nature Reviews Rheumatology に Research Highlight として掲載された。

我々は最近、高脂肪食負荷 (HFD) によるマウス変形性膝関節症モデル (HFDOA モデル) を確立した。このモデルでは、高脂肪食給餌開始後、OA 進行に先行して膝蓋下脂肪体 (IPFP) の増加が認められる。その後、IPFP 肥大化の進行に伴い、骨棘形成、軟骨アポトーシス亢進などの OA に特徴的な病理所見が進行する。IPFP では骨棘形成部周囲に滑膜細胞浸潤と血管新生が認められるが、qRT-PCR 法による IPFP の解析では、高脂肪食群にてマクロファージ表面抗原 CD68 の上昇に伴い、アディポカイン、炎症性サイトカインの発現が亢進する。このように、高脂肪食にて誘導される OA では、IPFP へのマクロファージ浸潤とそれに伴う炎症性サイトカイン分泌亢進が重要な役割を果たすことが明らかとなった。このモデルの特徴は、メタボリックシンドロームに伴う変形性膝関節症発症を反映するのみでなく、外科的侵襲がなく、アポトーシス細胞数、骨棘体積、

IPFP の面積や遺伝子発現が定量可能であり、変形性膝関節症の重症度を客観的に定量することが可能となることである。

2. 研究の目的

以上の背景をもとに、本研究では以下の目的を立てた。

- (1) 高脂肪食誘導性変形性膝関節症モデルに対してプロシアニジン類を投与し、膝関節の組織学的解析を行い、これらの治療効果、変性予防効果を検証する。
- (2) 高脂肪食負荷によって増加する膝蓋下脂肪体における炎症性サイトカイン類の発現解析とプロシアニジン類による炎症抑制効果の検証を行う。

3. 研究の方法

C57BL/6J マウス (オス、n=10) に 7 週齢時より、HFD (脂肪含有率 32%、日本クレア) あるいは通常食 (ND、脂肪含有率 4.6%、日本クレア) の給餌を開始した。高濃度のアントシアニジンを含む GSE (ブドウ種子抽出物) 投与群と溶媒投与群に分類した。GSE はゾンデにより連日実施され、投与量は 100mg/kg、あるいは 1000mg/kg とされた。HFD 給餌開始後 12 週にて膝関節を採取し、脱灰後、膝関節にて矢状方向の連続切片を作成し組織学的評価を行った。膝蓋下脂肪体 (IPFP) と内臓脂肪採取し、qPCR 法にて mRNA 発現解析を行った。μCT にて大腿骨骨密度を測定した。

4. 研究成果

マウスの体重は、HFD によって増加した。GSE100mg/kg 投与では体重に影響は認められなかったが、同 1000mg/kg 投与によって体重は減少した。骨密度測定では GSE 投与による一定の効果は認められなかった。qPCR 法による膝蓋下脂肪体の評価では GSE 投与において炎症性サイトカインの発現が抑制されていた。

膝関節の組織学的解析では、HFD により骨棘形成と、変形性膝関節症の進行に伴って生じる軟骨下骨肥厚が認められた。1000mg/kg 投与群において骨棘形成が抑制されていた。100mg/kg 投与群、1000mg/kg 投与群のいずれにおいても、軟骨下骨肥厚が抑制されていた。GSE を投与したマウスの骨組織を μCT によって解析したところ、GSE 投与群において海面骨量が増加していた。以上より GSE は HFD によって惹起される変形性膝関節症を抑制し、骨量を増加させた。

なお、GSE の経口摂取は、マウス腸内細菌叢に影響をあたえることが見出されたため、特許出願を行った (特願 2016-144770)。

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 8 件)すべて査読あり

Xanthine oxidoreductase activation is implicated in the onset of metabolic arthritis. Aibibula Z, Ailixiding M, Iwata M, Piao J, Hara Y, Okawa A, Asou Y. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Mar 25;472(1):26-32. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.02.039.

Limited significance of screening computed tomography after cementless total hip arthroplasty with highly cross-linked polyethylene at 7-10 years of follow-up. Takada R, Jinno T, Koga D. Yamauchi Y, Asou Y. Muneta T, Okawa A. *Mod Rheumatol.* 2016 Feb 16:1-4.

Comparison of Different Materials and Proximal Coatings Used for Femoral Components in One-Stage Bilateral Total Hip Arthroplasty. Miyatake K, Jinno T, Koga D. Yamauchi Y, Muneta T, Okawa A. *J Arthroplasty.* 2015 Dec;30(12):2237-41. doi: 10.1016/j.arth.2015.06.019. Epub 2015 Jun 14.

Is Drain Tip Culture Prognostic of Surgical Site Infection? Results of 1380 Drain Tip Cultures in Total Hip Arthroplasty. Takada R, Jinno T, Koga D. Hirao M, Muneta T, Okawa A. *J Arthroplasty.* 2015 Aug;30(8):1407-9. doi: 10.1016/j.arth.2015.02.038. Epub 2015 Feb 28.

MicroRNA-145 regulates osteoblastic differentiation by targeting the transcription factor Cbfb. Fukuda T, Ochi H, Sunamura S, Haiden A, Bando W, Inose H, Okawa A, Asou Y. Takeda S. *FEBS Lett.* 2015 Oct 24;589(21):3302-8. doi: 10.1016/j.febslet.2015.09.024. Epub 2015 Oct 9.

Pivotal role of Sirt6 in the crosstalk among ageing, metabolic syndrome and osteoarthritis. Ailixiding M, Aibibula Z, Iwata M, Piao J, Hara Y, Koga D. Okawa A, Morita S, Asou Y. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Oct 23;466(3):319-26. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.019. Epub 2015

Sep 8.

Mitochondrial superoxide in osteocytes perturbs canalicular networks in the setting of age-related osteoporosis. Kobayashi K, Nojiri H, Saita Y, Morikawa D, Ozawa Y, Watanabe K, Koike M, Asou Y. Shirasawa T, Yokote K, Kaneko K, Shimizu T. *Sci Rep.* 2015 Mar 16;5:9148. doi: 10.1038/srep09148.

Initial responses of articular tissues in a murine high-fat diet-induced osteoarthritis model: pivotal role of the IPFP as a cytokine fountain. Iwata M, Ochi H, Hara Y, Tagawa M, Koga D. Okawa A, Asou Y. *PLoS One.* 2013 Apr 12;8(4):e60706. doi: 10.1371/journal.pone.0060706.

[学会発表](計 9 件)

Xanthine oxidase inhibitor febuxostat attenuate high fat diet-induced osteoarthritis. Zulipiya Aibibula\*2, Maierhaba Ailixiding\*1, Jinying Piao\*2, Daisuke Koga2, Atsushi Okawa2, Yoshinori Asou2 Annual meeting for Orthopaedics Research Society (国際学会) 2016年03月05日~03月08日 フロリダ州オーランド(米国) メタボリックシンドロームと変形性膝関節症のクロストークにおけるサーチュイン遺伝子 Sirt6 の機能解析 麻生 義則, Maierhaba Ailixiding, Zulipiya Aibibula, 朴 金瑛, 古賀 大介, 大川 淳, 森田 定雄 日本整形外科基礎学術集会 2015年10月22日~10月23日 富山国際会議場(富山県富山市)

高脂肪食誘導性変形性膝関節症におけるキサンチンオキシダーゼ(XOR)の機能解析 麻生 義則, Zulipiya Aibibula, Maierhaba Ailixiding, 朴 金瑛, 金光文, 古賀大介, 大川 淳 日本整形外科基礎学術集会 2015年10月22日~10月23日 富山国際会議場(富山県富山市)

セメント使用/非使用の人工関節再置換術の選択 セメントレスカップによる人工股関節再置換術 神野 哲也, 古賀 大介, 木村 晶理, 高田 亮平, 平尾 昌之, 星野 ちさと, 森田定雄, 大川 淳, 宗田 大 東日本整形災害外科学会 2015年09月11日~09月12日 コラッセ福島(福島県福島市)

人工股関節全置換術後患者に対する静脈血栓塞栓症予防 術前リスクスコアリングによる抗凝固薬の用量調節の有用性  
吉原 有俊, 古賀 大介, 高田 亮平, 平尾 昌之, 宗田 大, 大川 淳, 神野 哲也  
日本人工関節学会 2016年02月26日~02月27日 グランフロント大阪(大阪府大阪市)

人工股関節全置換術におけるトラネキサム酸静脈内投与の効果と凝固線溶系に与える影響 平尾 昌之, 神野 哲也, 古賀 大介, 高田 亮平, 瀬川 裕子, 星野 ちさと, 麻生 義則, 森田 定雄, 宗田 大, 大川 淳 日本股関節学会 2015年10月30日~10月31日 グランフロント大阪(大阪府大阪市)

高脂肪食負荷による膝蓋下脂肪体肥大化は力学的負荷とは独立して変形性膝関節症を惹起する岩田 宗峻, 越智 広樹, 原康, 古賀 大介, 大川 淳, 麻生 義則 日本整形外科学会基礎学会 2014年10月09日~10月10日 鹿児島

サーチュイン遺伝子 Sirt6 による軟骨代謝制御機構の解析 朴 金瑛, 辻 邦和, 越智 広樹, 古賀 大介, 大川 淳, 竹田 秀, 麻生 義則 日本整形外科学会基礎学会 2014年10月09日~10月10日 鹿児島

The distinct role of the infrapatellar fat pad in a murine high-fat diet-induced osteoarthritis model. Munetaka Iwata<sup>1</sup>, Hiroki Ochi<sup>2</sup>, Yasushi Hara<sup>1</sup>, Masahiro Tagawa<sup>1</sup>, Daisuke Koga<sup>3</sup>, Atsushi Okawa<sup>3</sup>, Yoshinori Asou Annual meeting of American Society for Bone and Mineral Research 2013年10月06日 Baltimore USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: ブドウ種子抽出物を含む更年期障害改善剤

発明者: 麻生 義則 庭野 克己 菅野 太郎

権利者: 株式会社エーゼット

種類: 特願

番号: 2016-144770

出願年月日: 2016年7月22日

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古賀 大介 (KOGA, Daisuke)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・非常勤講師

研究者番号: 60422482

(2) 研究分担者

麻生 義則 (ASOU, Yoshinori)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任准教授

研究者番号: 50345279

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: