

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462366

研究課題名(和文) ヒアルロン酸レセプターCD44の断片化阻害による、軟骨細胞の脱分化抑制効果

研究課題名(英文) Inhibition of CD44 cleavage suppresses the chondrocyte de-differentiation

研究代表者

高橋 伸典 (Takahashi, Nobunori)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：20570196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究期間において、主として過剰なメカニカルストレスがメカノレセプターであるTRPV4の活性化とADAM10の発現亢進を介して、HCS-2/8軟骨様細胞株とウシ関節軟骨細胞におけるCD44の断片化を促進することを明らかにすることが出来た。CD44の断片化は、機能的ヒアルロン酸受容体の減少とCD44の細胞内ドメインの産生による細胞外マトリックス喪失に直結する。TRPV4阻害剤やADAM10阻害剤によるCD44の断片化の抑制効果も明らかになったことから、今後は変形性関節症動物モデルを用いて発症予防と治療効果を中心に検証を進めたい。

研究成果の概要(英文)：We mainly demonstrated that the excess mechanical stress loading can induce the CD44 fragmentation via the activation of TRPV4, a primary mechano-receptor, and the increased ADAM10 expression. CD44 fragmentation results in decreased 'functional' hyaluronan receptors and increased CD44 intracellular domain, leading to the diminished extracellular matrix in a chondrocyte. We also demonstrated that we successfully suppress the CD44 fragmentation using a TRPV4 antagonist or ADAM10 inhibitors under the mechanical stress loading condition. We will be able to start the in vivo study using animal osteoarthritis models as a next step.

研究分野：整形外科

キーワード：変形性関節症 ヒアルロン酸 CD44 断片化 メカニカルストレス

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 (OA) は日本でも最も一般的な関節障害である。OA は関節軟骨の変性疾患であり、遺伝的要因、加齢、肥満などが関与するとされるが、未だに詳細な病因は不明である。軟骨細胞において細胞 - マトリックス間の相互作用は細胞外環境の変化を感知し、修復反応を誘導する重要な手段である。このような相互作用においてヒアルロン酸 (HA) とその主要受容体である CD44 との結合は中心的役割を果たしている。軟骨細胞において、CD44 を介する細胞内シグナル誘導は CD44-HA 結合の喪失により惹起され、マトリックス破壊を促進する遺伝子群 (MMP-3、MMP-13、iNOS) やマトリックス形成に関わる遺伝子群 (2 型コラーゲン、アグリカン、HAS-2、BMP-7) の発現を亢進させる (Schmitz I et al. Osteoarthritis Cartilage 2009)。このように CD44-HA 結合は細胞外マトリックスを保持するために必要であり、それが故に軟骨の恒常性維持に必須であるといえる。また組織学的にも、細胞外マトリックスの喪失が OA の最初期に認められる変化であることから、CD44-HA 結合の障害が OA 発症への第一歩である可能性が高いと考えられる。これまで CD44-HA 結合喪失モデルとしては、HA オリゴ糖、ヒアルロニダーゼ、dominant-negative CD44 等が用いられてきたが、生体内でこれらが同定されていないという問題点がある。

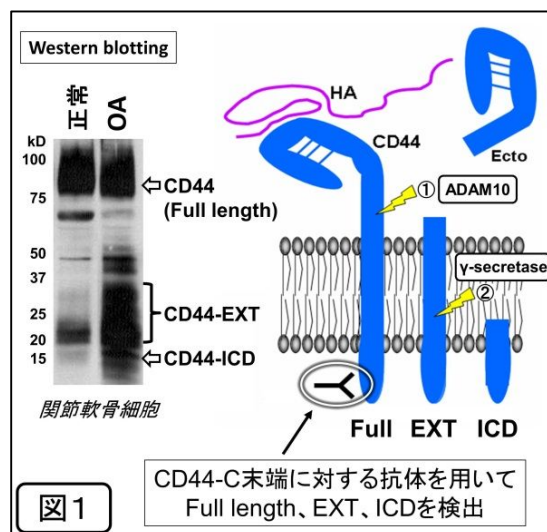
我々は最初に、OA 関節軟骨において CD44 の断片化亢進が認められることを見いだした (右、図 1) (Takahashi N, et al. Arthritis Rheum 2010)。軟骨細胞における CD44 の断片化では、細胞外領域における膜型 MMPs による第一切断後、C 末端側の断片が γ -secretase で切断されて intracellular domain (ICD) を生ずる。そして CD44-ICD は、CD44 の C 末端と細胞骨格との結合を競合的に阻害し、CD44-HA 結合を抑制することが確認された (Mellor L, et al. J Biol Chem 2013)。

これらの事実から、OA へと進行していく CD44-HA 結合喪失の最初のきっかけとして、軟骨細胞における CD44 の断片化が重要であるという仮説を得るに至り、in vitro での CD44 断片化 OA 軟骨細胞モデルとして「脱分化軟骨細胞」と「メカニカルストレス過剰負荷モデル」を用いて研究を進めている。

2. 研究の目的

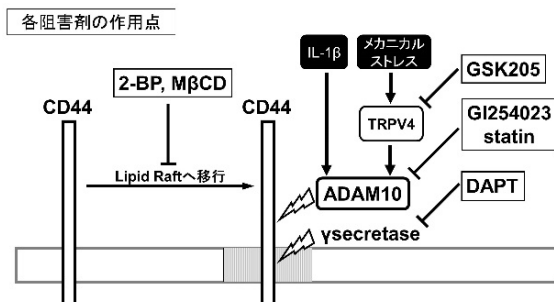
主要なヒアルロン酸 (HA) 受容体である CD44 の機能性は、関節軟骨の恒常性維持に極めて重要である。CD44 の断片化は、その受容体機能喪失および細胞内断片 (ICD) 増加による Cell-HA 結合の喪失、すなわち細胞外マトリックスの喪失に直結するため、軟骨細胞の脱分化や変形性関節症 (OA) における軟骨変性に深く関与していると考えられる。これまでに OA 軟骨細胞における CD44 断片化の亢進を確認し、各種阻害剤により CD44 の断片化抑制が可能であることを明らかにした。本研究では、軟骨細胞の脱分化における CD44 断片化の意義と ICD 自体の機能解析を更に進めると共に、OA 動物モデルを用いて CD44 断片化抑制による OA 発症抑制・治療の可能性を探る。本研究成果により、OA の病因・病態理解と治療における新たな展望が開ける可能性がある。

< CD44 の断片化様式と western blotting >



3. 研究の方法

細胞モデルおよび動物モデルによる検討を並行して行う。細胞モデルでは ADAM10 阻害剤およびスタチンを中心に各種阻害剤による CD44 断片化および脱分化に対する抑制効果を検証する（下図参照）。



断片化については、より OA 発症様式に近いと思われるメカニカルストレス過剰負荷モデルを中心に行う。脱分化度評価は遺伝子発現変化（Sox9、アグリカン等）、細胞外マトリックス定量で行う。OA 動物モデルでは、細胞モデルにおいてより効果が高いと判断された阻害剤を中心として、関節内投与による CD44 断片化抑制効果、軟骨変性抑制効果について検討する。

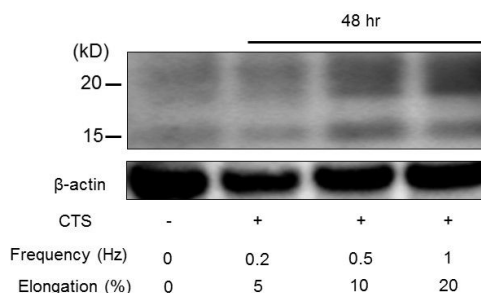
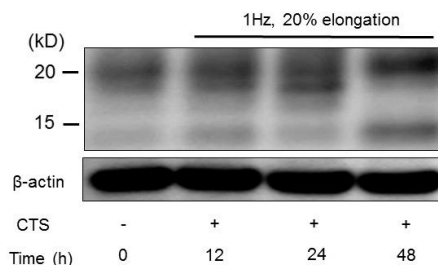
CD44 の断片化は western blotting に加えて血中および関節液中の CD44-Ecto（細胞外ドメイン）定量で評価し、軟骨変性評価はレントゲン撮影、組織学的評価、軟骨細胞の遺伝子発現変化により評価する。

4. 研究成果

【メカニカルストレスによる CD44 の断片化】

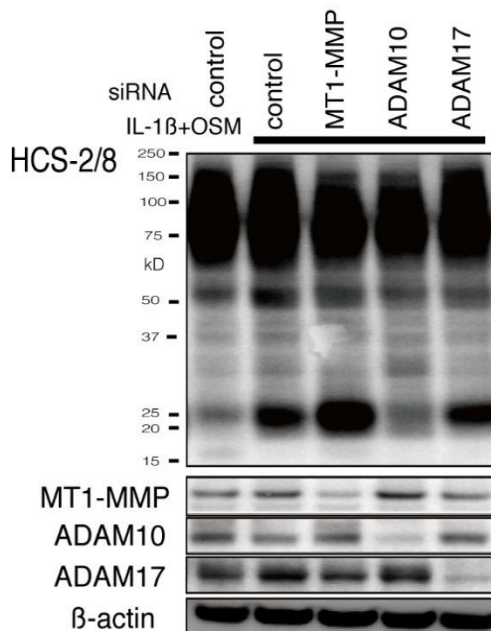
過剰なメカニカルストレスは関節軟骨変性につながる事が知られている。シリコン製専用ストレッチチャンパー上で sub-confluent(約1週間)まで培養し、STB140（STREX社）を用いて CO2 インキュベーター内で伸展刺激を加える。

次図のように過剰ストレスとしては 20%伸展、60 cycles/min を中心に設定を調整して、CD44 断片化を誘導することに成功した。

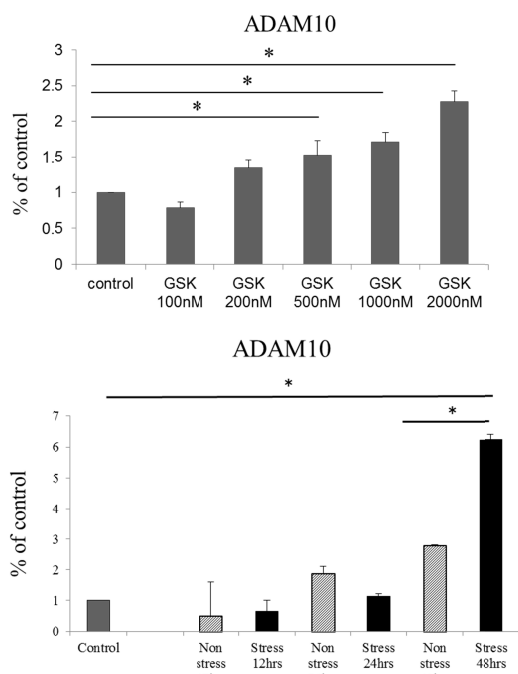


【ADAM10 阻害剤による断片化阻害効果】

我々は ADAM10 を siRNA 法によりノックダウンすることで、CD44 断片化が抑制されることから（下図）HCS-2/8 細胞において IL-1 刺激下で CD44 を断片化する主要なプロテアーゼが ADAM10 であることを発見した。

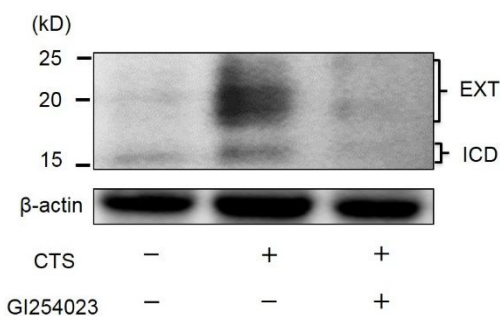


メカニカルストレスによって ADAM10 の mRNA 発現亢進が誘導されることを確認した。



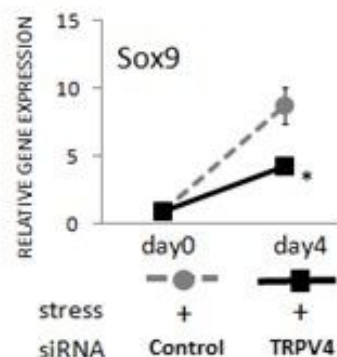
次いで、メカニカルストレスによる CD44 断片化導入に対する、ADAM10 阻害剤の効果を検討した。

次図のように ADAM10 阻害剤 (G1254023) は用量依存的に CD44 の断片化を抑制した。



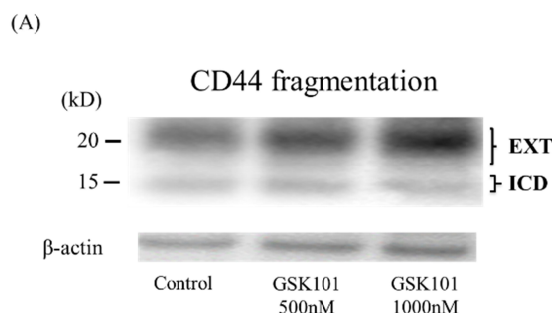
【TRPV4 活性化による CD44 断片化】

我々は軟骨様細胞株 (ATDC5) における主要なメカノレセプターが TRPV4 であることを明らかにした。次図のようにメカニカルストレスによって Sox9 発現は増強するが、siRNA による TRPV4 のノックダウンにより、Sox9 発現亢進が抑制された。

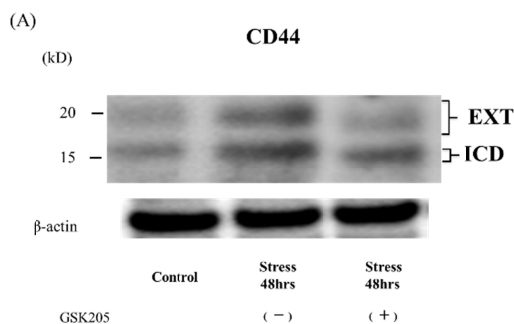


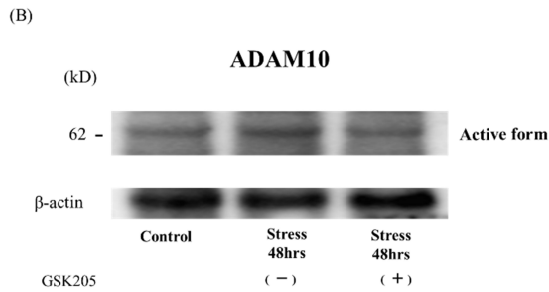
我々はメカニカルストレスのケミカルモデルとして、特異的 TRPV4 アゴニストである GSK101 を添加して、ADAM10 発現亢進と CD44 断片化が再現されるかどうか検討した。下図のように、GSK101 の添加により ADAM10 発現は用量依存的に亢進した。

GSK101 の添加により、下図のように CD44 の断片化が導入された。



更に特異的 TRPV4 阻害剤である GSK205 の添加により、メカニカルストレスによる ADAM10 発現誘導と CD44 断片化が抑制されることが確認された (下図)。





【まとめ】

以上のように我々は、過剰なメカニカルストレス負荷は TRPV4 をメカノレセプターとして、ADAM10 の発現亢進を介して CD44 を断片化することを明らかにした。これは今までに報告されたことがなく、OA の発症病態を明らかにする上で価値のあるデータであると考えている。

ADAM10 阻害により CD44 断片化を抑制出来れば、ヒアルロン酸に対する機能的受容体の減少や CD44-ICD の発生による細胞外マトリックス喪失を防ぐことが可能になることが期待される。関節軟骨における細胞外マトリックス喪失は代表的な OA 発症の初期変化であることから、ひいては OA の発症そのものを抑制できるようになることが期待される。今後 OA 動物モデル (マウスの半月板不安定化 OA モデルなど) を使用して、ADAM10 阻害剤やスタチン投与による、OA 発症予防効果について検討が必要であると考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Tatsuo Watanabe, Nobunori Takahashi, Shinya Hirabara, Naoki Ishiguro, Toshihisa Kojima. Hyaluronan inhibits TLR-4 dependent RANKL expression in human rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *PLOS ONE*, 査読有り, 2016, in press

〔学会発表〕(計 8 件)

祖父江康司、高橋伸典、小嶋俊久、石黒直樹、ADAM10 inhibitor suppresses chondrogenic dedifferentiation in bovine primary chondrocyte cells. 第 2 回 JCR ベーシックリサーチカンファレンス、東京大学 (東京都文京区) 2015 年 10 月 2 日

小早川知範、高橋伸典、小嶋俊久、石黒直樹、軟骨様細胞株 (HCS-2/8) において、機械的ストレスは ADAM10 発現を介して CD44 を断片化する、第 2 回 JCR ベーシックリサーチカンファレンス、東京大学 (東京都文京区) 2015 年 10 月 2 日

小川義和、高橋伸典、小嶋俊久、石黒直樹、TRPV4 活性化による軟骨分化促進にヒアルロン酸は ICAM-1 を介して関与する、第 2 回 JCR ベーシックリサーチカンファレンス、東京大学 (東京都文京区) 2015 年 10 月 2 日

小早川知範、高橋伸典、小嶋俊久、石黒直樹、軟骨様細胞株 (HCS-2/8) において、機械的ストレスは ADAM10 発現を介して CD44 を断片化する、第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会、富山国際会議場、ANA クラウンプラザホテル富山及び富山市民プラザ (富山県富山市) 2015 年 10 月 22 日

小早川知範、高橋伸典、小嶋俊久、石黒直樹、軟骨様細胞株 (HCS-2/8) において、機械的ストレスは ADAM10 発現を介して CD44 を断片化する、第 29 回日本軟骨代謝学会、広仁会館 (広島県広島市) 2016 年 2 月 20 日

祖父江康司、高橋伸典、小嶋俊久、石黒直樹、ADAM10 阻害剤がウシ初代軟骨細胞において軟骨脱分化を抑制する、第 29 回日本軟骨代謝学会、広仁会館 (広島県広島市) 2016 年 2 月 20 日

Tomonori Kobayakawa, Nobunori

Takahashi, Toshihisa Kojima, Naoki Ishiguro. The mechanical stress loading can induce the fragmentation of CD44 by increased ADAM10 expression in a chondrocyte cell line. 62nd annual meeting of orthopaedic research society, Orlando, Florida, USA 2016 年3月7日

Yasumori Sobue, Nobunori Takahashi, Toshihisa Kojima, Naoki Ishiguro. ADAM10 inhibitor suppresses chondrogenic dedifferentiation in bovine primary chondrocyte cells. 62nd annual meeting of orthopaedic research society, Orlando, Florida, USA 2016 年3月7日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高橋 伸典 (TAKAHASHI, Nobunori)
名古屋大学・医学部附属病院・病院講師
研究者番号：20570196

(2)研究分担者

小嶋 俊久 (KOJIMA, Toshihisa)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70378032