

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462374

研究課題名(和文) 機械的ストレスの軟骨変性誘導における小胞体ストレスの発生と病態生理に関する研究

研究課題名(英文) Involvement of endoplasmic reticulum stress induced by mechanical stress in the pathogenesis of cartilage degeneration

研究代表者

廣瀬 隼(Hirose, Jun)

熊本大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：40433007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：変形性関節症(OA)の発症と進展の重要因子である機械的ストレスによって軟骨細胞内で生じる酸化ストレス、カルボニルストレスおよび小胞体ストレスの発生と互いの関連性を検討した。ラット正常軟骨細胞培養系において、生理的な機械的ストレスでは3つの細胞内ストレスは上昇しなかったが、機械的ストレスが過剰になると、各ストレスは相関して上昇し、アポトーシスの上昇と軟骨細胞機能の低下にも有意な関連性を示した。ラットOAモデルにおいては、各細胞内ストレス阻害剤を投与すると、それぞれ対応するストレスが抑制され、同時に軟骨変性の進行も抑制された。

研究成果の概要(英文)：To clarify the activation and relationship of oxidative stress, carbonyl stress and endoplasmic reticulum stress in chondrocytes induced by mechanical stress against articular cartilage, we evaluated the role of the three intracellular stresses on chondrocyte apoptosis and cartilage degeneration. In cultured rat articular chondrocytes, hyper mechanical loading increased all three intracellular stresses. These reactions were involved with crosslink of each stress and chondrocyte dysfunction and apoptosis. In the experimental rat OA model caused by knee instability, treatment of the each stress suppressor reduced the corresponding stress and cartilage degeneration.

研究分野：医歯薬学

キーワード：軟骨変性 小胞体ストレス 酸化ストレス カルボニルストレス

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 (OA) は関節軟骨と関節構成体の退行変性を基盤とし、それに続発する軟骨・骨の破壊および増殖性変化をきたす進行性疾患であり、進行すれば歩行などの日常生活動作にも支障を来す。OA の発症と進展には、肥満や老化、力学的負荷、解剖学的異常、遺伝的素因など多くの要素が複雑に関係しているが、最も重要な因子は局所における機械的ストレスである。適度な機械的ストレスは関節液を介した拡散により酸素や栄養分が軟骨細胞に供給され、細胞活動が活性化されて軟骨の恒常性維持に働くが、過度の機械的ストレスは軟骨基質を直接傷害するだけでなく、酸化ストレスを誘導して軟骨変性を惹起する。その過程において種々の生物学的反応が生じるが、酸化反応は糖や脂質からアルデヒド基やカルボニル基を有する物質 (カルボニル) を生成し、これらの量が生体の消去能力を超えて増加するとカルボニルストレスが生じる。カルボニルは非常に不安定なため、蛋白を化学修飾して糖化最終産物 (AGEs) を生じ、新たな酸化ストレスを発生させる。また AGEs や生合成の過程で生じた異常蛋白は小胞体にも蓄積し小胞体ストレスが生じる。これらの細胞内に生じるストレスはそれぞれが個々に軟骨変性に関与することが報告されている。しかし、軟骨細胞内でそれぞれがどのように連携するかは明らかにされておらず、機械的ストレスが各細胞内ストレスにどのように影響し、多様な病態を呈するかは依然不明なままである。

2. 研究の目的

関節軟骨に対する機械的ストレスによって発生する、軟骨細胞の酸化ストレス、カルボニルストレス、小胞体ストレスの程度を評価することを目的とした。また、各ストレスの関連性と、それらが軟骨細胞機能と細胞死、および軟骨変性に及ぼす影響について検討した。

3. 研究の方法

1) ラット軟骨細胞培養系における検討

(1) 5週齢 Wistar ラットの正常軟骨細胞を単離培養し、STREX 社製 STB-140 を用い、生理的刺刺激として伸展率 2% (CTS2%)、病的刺刺激として伸展率 10% (CTS10%) の刺刺激 (各 10 cycles/min) を 24 時間実施した。細胞溶解物を抽出後、酸化ストレスは DCFH-DA、カルボニルストレスは DNPH を ELISA で評価し、小胞体ストレスは Grp78 と Chop の mRNA 発現

を qPCR で、Xbp1 の mRNA 発現を RT-PCR で解析した。また、アグリカン (Acan) と型コラーゲン (Col2a1) の mRNA 発現を qPCR で、アポトーシスを ELISA で定量評価した。

(2) 上記と別の正常軟骨細胞培養系において、CTS10% の伸展刺刺激を加える前に、抗酸化剤として N-acetylcysteine (NAC, 1mM)、カルボニルストレス抑制剤として Aminoguanidine (AMG, 1mM)、小胞体ストレス抑制剤として 4-phenylbutyric acid (PBA, 3mM) をそれぞれ添加した群を作成した。また、薬剤非投与細胞を対照群とした。24 時間の機械的刺刺激 (MS+) 後に細胞を採取し、上記と同様の評価を行った。

2) ラット in vivo model における検討

5週齢雄 Wistar ラットの右膝前十字靭帯を切離して不安定性誘導による膝 OA モデルを作成した。1 週後より、酸化ストレス阻害剤として N-acetylcysteine (NAC, 100mM)、カルボニルストレス阻害剤として Aminoguanidine (AMG, 100mM)、小胞体ストレス阻害剤として 4-phenylbutyric acid (PBA, 10mM) をそれぞれ週 2 回、3 週間 (合計 7 回) 関節内に注入した。PBS (200 μ l) を投与した対照群と前十字靭帯を切離さない Sham 群を別に作成した。投与終了後 4 週 (術後 8 週) 時に膝関節を摘出し、PFA 固定、脱灰後にパラフィン標本作製し、薄切片を作成した。酸化ストレス、カルボニルストレス、小胞体ストレスを、それぞれ抗 8-OHdG 抗体、抗 DNPH 抗体、抗 p-eIF2

抗体を用いた免疫染色により評価した。またアポトーシスは TUNEL 染色で、軟骨変性度は Safranin-O 染色後 Mankin スコアでそれぞれを評価した。

4. 研究成果

1) ラット軟骨細胞培養系における検討

(1) DCFH-DA、DNPH、Grp78、Chop、および Xbp1 の発現は、CTS2% の刺刺激では無刺刺激群と差はなかった (図 1)。CTS10% の刺刺激ではそれぞれ 2.9 倍、2.4 倍、1.4 倍、2.0 倍にすべて有意に上昇し、Xbp1 の発現も同様の傾向を示した。同時に Acan と Col2a1 の発現低下 (38%、41%) とアポトーシスの上昇 (2.5 倍) がみられた。DCFH-DA、DNPH、Xbp1 と Chop の mRNA 発現は互いに有意な相関を示した (表 1)。

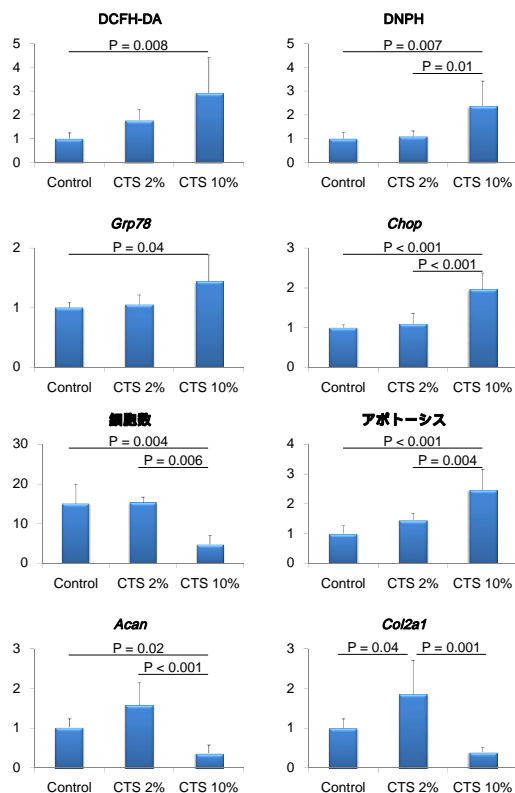


図 1. 進展率 2% と 10% 刺激による変化

表 1. 評価項目の相関関係

	DNP	Grp78	Chop	Xbp1	Acan	Col2a1	Apoptosis
DCFH-DA	r 0.669 P 0.002	0.262 0.294	0.767 0.000	0.523 0.026	-0.335 0.174	-0.371 0.130	0.499 0.035
DNP	r - P -	0.598 0.009	0.879 0.000	0.583 0.011	-0.505 0.033	-0.456 0.057	0.446 0.064
Grp78	r - P -	- -	0.591 0.010	0.393 0.106	-0.622 0.006	-0.423 0.080	0.465 0.052
Chop	r - P -	- -	- 0.002	0.673 0.031	-0.508 0.029	-0.513 0.029	0.604 0.008
Xbp1	r - P -	- -	- -	- 0.034	-0.502 0.292	-0.263 0.003	0.651 0.003
Acan	r - P -	- -	- -	- -	- 0.001	0.706 0.027	-0.521 0.027
Col2a1	r - P -	- -	- -	- -	- -	- 0.132	-0.368 0.132

r : Pearson の相関係数

(2) DCFH-DA は NAC により、DNP は AMG によってそれぞれ対照群より有意に低下した (図 2)。Grp78 と Chop の発現は NAC、AMG、PBA により対照群に対して有意に低下し、Xbp1 の発現も同様の傾向を示した (図 3)。アポトーシスの変化と Acan および Col2a1 の発現に関しては、全薬剤で同等の効果を認め、対照群と比較するとアポトーシスで抑制傾向がみられた。また、全ての評価項目はそれぞれが互いに有意な相関関係を認めた。

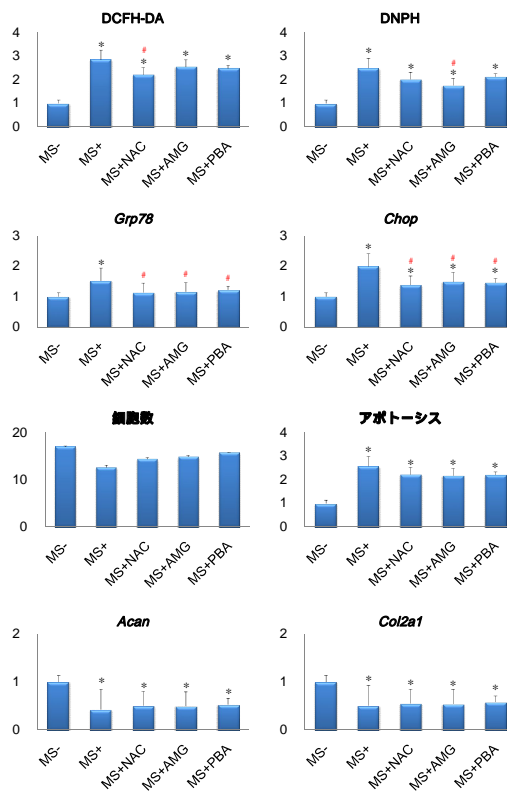


図 2. 進展率 10% 刺激による各ストレス阻害剤の効果

*P<0.05 (vs MS -) # P<0.05 (vs MS +)

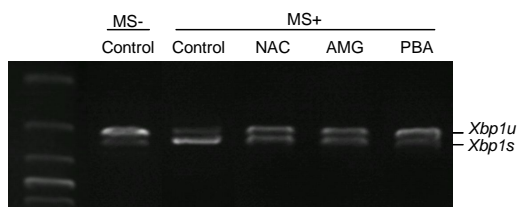


図 3. 進展率 10% 刺激による各ストレス阻害剤の Xbp1 発現に対する効果

2) ラット in vivo model における検討

NAC 投与群では抗 8-OHdG 抗体染色で、AMG 投与群では抗 DNP 抗体染色で、PBA 投与群では抗 p-eIF2 抗体染色において、それぞれの染色性が低下した (図 4)。これら 3 群の軟骨変性度は Sham 群に比べて進行したが、対照群と比較すると、大腿骨内側顆軟骨では有意に低い変性度を示した (図 5)。脛骨軟骨では NAC 投与群と AMG 投与群で対照群より有意な低下を認めた。一方アポトーシスは 3 つのストレス阻害剤投与群と対照群の間で明らかな差はなかった。

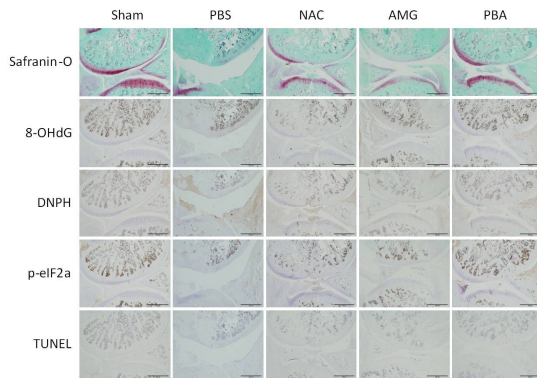


図4. ラット OA モデルにおける各ストレス阻害剤の効果

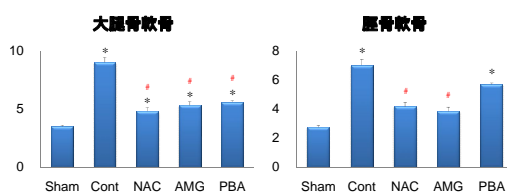


図5. 軟骨変性度 (Mankin スコア)

* $P < 0.05$ (vs Sham) # $P < 0.05$ (vs Cont)

3) まとめ

生理的な機械的ストレスでは各ストレスの誘導はなく、軟骨代謝は改善した。一方、機械的ストレスが過剰になると酸化ストレスが上昇し、その過程においてカルボニルストレスと小胞体ストレスも上昇することが明らかになった。そして各細胞内ストレスがそれぞれ相関して上昇し、それらはアポトーシスの増加およびアグリカンと型コラーゲンの発現低下に関連した。特に各ストレス抑制剤を用いた実験結果を考慮すると、機械的ストレスによって誘導された酸化ストレスとカルボニルストレスは互いに関連し、小胞体ストレスの誘導に寄与する可能性が示唆された。ラット OA モデルでは、各ストレス抑制剤がそれぞれ対応するストレスを抑制し、同時に軟骨変性の進行も抑制された。

以上より、過剰な機械的ストレスによって各種細胞内ストレスは誘導され、それぞれは互いに関連し、軟骨細胞の機能低下とアポトーシス亢進により軟骨変性の進行に関与することが示唆された。今後のさらなる研究により各細胞内ストレスの軟骨変性に及ぼす詳細な機序が解明されれば、OA の発症や進行を抑制する有効な治療法の開発につながる可能性がある。

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)

廣瀬隼、水田博志: 軟骨変性における AGEs と小胞体ストレスのクロストーク、関節外科; 査読なし, 34, 2015, 70-75

[学会発表](計4件)

廣瀬隼、久永哲、上原悠輔、笠智就、水田博志: 機械的ストレスによって生じる酸化ストレス、カルボニルストレス、小胞体ストレスの軟骨細胞に及ぼす影響と関連性、第29回日本整形外科学会基礎学術集会、2014.10.9、城山観光ホテル(鹿児島)

廣瀬隼、水田博志: OA 発症における AGEs と小胞体ストレス(シンポジウム: OA 発症メカニズム) 第29回日本整形外科学会基礎学術集会、2014.10.10、城山観光ホテル(鹿児島)

廣瀬隼、上原悠輔、水田博志: 機械的刺激による小胞体ストレスの発生と軟骨細胞機能に及ぼす影響、第28回日本軟骨代謝学会、2015.3.6、東京医科歯科大学(鈴木章夫記念講堂)(東京)

廣瀬隼、水田博志: 軟骨変性における細胞内ストレスの関連性、第30回日本整形外科学会基礎学術集会、2015.10.22、富山国際会議場(富山)

[その他]

ホームページ等

http://kumadai-seikei.com/kennkyu/knkyu_gaiyou/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣瀬隼 (HIROSE JUN)

熊本大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 40433007

(2) 研究分担者

水田博志 (MIZUTA HIROSI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号: 60174025

(3) 研究分担者

岡元信和 (OKAMOTO NOBUKAZU)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号: 70600162