

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：34448

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460928

研究課題名(和文) 軟骨局所RA系の役割と意義：高血圧と軟骨変性疾患の相関分子メカニズム

研究課題名(英文) Angiotensin II Modulates Hypertrophic Differentiation and Apoptosis of Chondrocytes: Relationship of hypertension to Osteoarthritis

研究代表者

青木 元邦 (Aoki, Motokuni)

森ノ宮医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：00346214

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)：本研究ではレニン-アンジオテンシン系の軟骨細胞代謝への関与を検討した。骨折モデルマウスで、持続的アンジオテンシンIIの投与が軟骨細胞分化を促進し細胞死を抑制した。さらにアンジオテンシンIIの軟骨変性疾患病態進展への関与を検討するため、モデル動物を検証した。作成モデルは変形性関節症の病態を反映し、今後の検討に有用と考えられた。変形性関節症では、肥大軟骨細胞への分化、肥大軟骨細胞から分泌されるMMP等による軟骨変性が主たるメカニズムであり、アンジオテンシンII阻害は抑制的に作用し、変形性関節症を有する高血圧患者への包括的治療が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Little is known about the function of Angiotensin II (Ang II) in chondrocytes. In this study, we investigated the role of Ang II in chondrocytes using a rib fracture model mouse. Continuous infusion of Ang II to a mouse resulted in promotion of differentiation of chondrocytes. Moreover, Ang II infusion suppressed apoptosis of chondrocytes. Administration of an Ang II receptor blocker attenuated the suppression of apoptosis of chondrocytes. These data suggested that Ang II promoted differentiation of chondrocytes and reduced apoptosis of chondrocytes, independently of blood pressure, suggesting a new concept for comprehensive treatment osteoarthritis (OA). Also, we evaluated the methodology of an OA model mouse. We made two animal models and histological studies indicated that both models reflected the pathological change of OA. These models is useful to investigate a new treatment for patients with hypertension and OA.

研究分野：高血圧

キーワード：レニン-アンジオテンシン系 アンジオテンシンII アンジオテンシン受容体拮抗剤 高血圧 変形性関節症

## 1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症・変形性関節症は、近年注目されているロコモティブシンドロームの原因となる代表的疾患であり、患者 ADL へ与えるインパクトは大きい。従来、老化を基盤とした老年症候群として考えられていたが、一方で、「高血圧が発症の危険因子である」「老年症候群の保有数と発症頻度が比例する」という疫学的報告もあり、その発症・進展には単なる加齢のみならずなんらかの他の因子が関与する可能性が高い。これまでに申請者らは骨代謝と血圧調整機構であるレニン-アンジオテンシン系 (RA 系) の関連を基礎研究で明らかにしてきた。破骨細胞・骨芽細胞の共培養系を用いた基礎研究にて、アンジオテンシン II が骨芽細胞内の ERK を介し NFkB ligand (RANKL) の発現を上昇させ破骨細胞分化・活性化を促進することを報告し (FASEB J. 2008, Hypertens Res. 2009)、さらにアンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) 群と Ca 拮抗薬群を長期間の追跡調査で比較検討したヒト臨床研究において、RA 系阻害による骨吸収マーカー低下を確認し、ARB の他降圧剤に対する優位性も見出している(本課題期間中に発表)。

高齢者では変形性関節症と高血圧症の合併頻度も高くなる。一見独立して保有される老年症候群とも考えられるが、骨粗鬆症同様、なんらかの関連性も指摘されていた(Ann Rheum Dis.1975)。さらに近年、変形性関節症とメタボリック症候群構成因子数との関連に関する研究から、高血圧が変形性関節症発症の危険因子であるとの報告がなされ (Osteoarthritis Cartilage.2012)、2 つの疾患の関連が強く示唆されている。しかし両疾患の関連機構は未知であり、高血圧が軟骨変性に影響する分子メカニズムは依然として不明である。骨代謝同様、RA 系の関与が想定できるが、RA 系の軟骨細胞代謝へ及ぼす影響については、これまでにアンジオテンシン II 受容体が軟骨細胞に存在することを示唆する報告があるにとどまり、詳細な作用及びその分子機序は未知である。

申請者らは、これまで骨折修復過程の分子メカニズムについて、骨芽細胞・軟骨細胞の分化調節因子 Runx2 や骨基質蛋白であるオステオポンチン・オステオカルシンなどの遺伝子発現を中心にその分子メカニズムを明らかにし (J Bone Miner Res.1998、J Orthop.2003、J Bone Miner Res.1999)、また近年では RA 系と軟骨細胞分化の関連を示唆する重要なデータを得た。骨折モデル動物における仮骨形成過程の観察で、アンジオテンシン II (AII) 持続投与による軟骨細胞分化の促進する可能性を見出した。

変形性関節症を合併した高齢者高血圧

治療では、それぞれの疾患を包括的に考える治療が理想的であり、変形性関節症の病態に血圧が及ぼす分子メカニズムを明らかにすることは老年医学上極めて重要である。

## 2. 研究の目的

骨折モデル動物の仮骨形成過程において、AII が軟骨細胞分化・軟骨細胞死に及ぼす影響を検討する。また、変形性関節症モデル動物を作成し、同モデルにおいて、AII の軟骨変形に及ぼす影響を検討する。これらにより、RA 系が軟骨代謝・変形性関節症進展に及ぼす影響を明らかにし、変形性関節症治療にリンクさせ ADL を考慮した包括的新高血圧治療概念を提唱する。

## 3. 研究の方法

1) 骨折モデルマウスを用いた AII 刺激による仮骨形成異常 (吸収遅延) の検討

骨折治癒過程では軟骨細胞が肥大軟骨細胞に分化し仮骨がいったん形成され、アポトーシスを起こすことでは骨化が進展する。既に申請者らは preliminary data として、骨折後 Osmotic mini pomp による AII 持続投与が肥大軟骨細胞分化を促進し、アポトーシスを抑制して仮骨吸収遅延が生じることを確認しているが、アポトーシス抑制分子機構については未だ不十分である。

①n 数増加による上記現象の更なる検証：各種分化マーカー (Collagen X, MMP-13, SOX9 等) の発現レベル、トルイジンブルーによる仮骨吸収遅延の検出、Tunnel 法によるアポトーシス軟骨細胞数。

②AII 刺激によるアポトーシス抑制機構の分子メカニズム検討：アポトーシス関連因子 (Bcl-xL・Bcl-2, bax) の発現に及ぼす AII の影響の検討。

2) 関節不安定性変形性関節症モデルの作成と検証。

関節不安定性変形性関節症を靭帯切断法にて作成し、モデル動物としての妥当性を検証する。

## 4. 研究成果

軟骨細胞分化過程と骨化に至る過程が観察可能である Growth plate (骨端線: マウス) において増殖軟骨細胞及び肥大軟骨細胞にアンジオテンシン II (AII) 受容体を検出し、局所 RA 系の存在を明らかにした (図 1)。

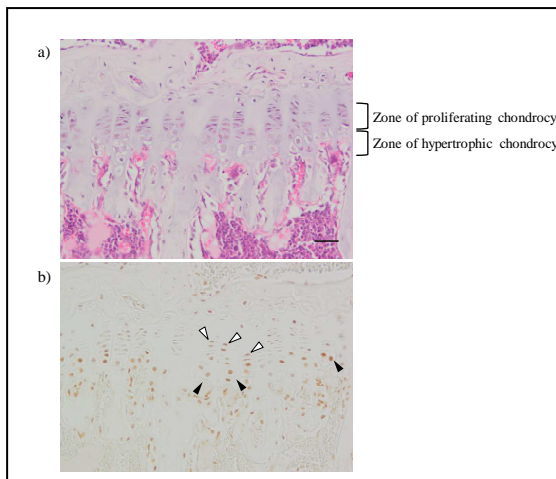


図 1 : ATR1 (アンジオテンシン II 受容体) に対する免疫染色  
軟骨細胞 (open arrow) 及び肥大軟骨細胞 (closed arrow) にアンジオテンシン II (AII) 受容体の発現を認める。

次に骨折モデルマウスに AII を浸透圧ポンプで持続投与し、AII の軟骨代謝に及ぼす影響を検討した。図 2 に示すように、骨折後の仮骨形成部位では軟骨分化が確認できる (step 2)。さらには肥大軟骨細胞がアポトーシスを起こして骨化に至るため (step 2~3)、細胞死への影響も検討できる。

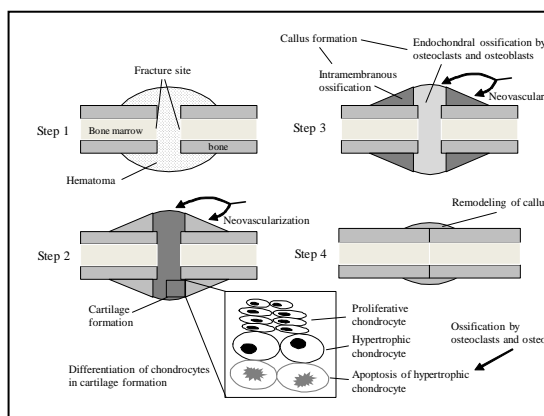


図 2 : 骨折修復過程

これまでの結果同様、ARB 投与により抑制された。ヒドララジン投与では仮骨肥大が抑制されないことから、血圧の影響ではなく、アンジオテンシン受容体を介した直接的な作用と考えられた。さらに軟骨細胞分化マーカーであり、肥大軟骨細胞のマーカーである type X collagen (col 10), SOX9, MMP13 の mRNA 発現が亢進していた。以上より、AII が肥大軟骨細胞分化を促進している可能性が示唆された。

さらに本研究では同モデルにおいて、AII のアポトーシスに対する影響も検討した。Tunnel 染色法にて、AII 持続投与群では肥大軟骨細胞死が抑制され、この作用は ARB 投与で打ち消され、ヒドララジンでは阻害され

なかった (図 3)。以上のことから、アンジオテンシン II は肥大軟骨細胞死に抑制的に作用すると考えられ、さらに同作用は血圧の影響ではなく、アンジオテンシン受容体を介した直接的な影響と考えられた。

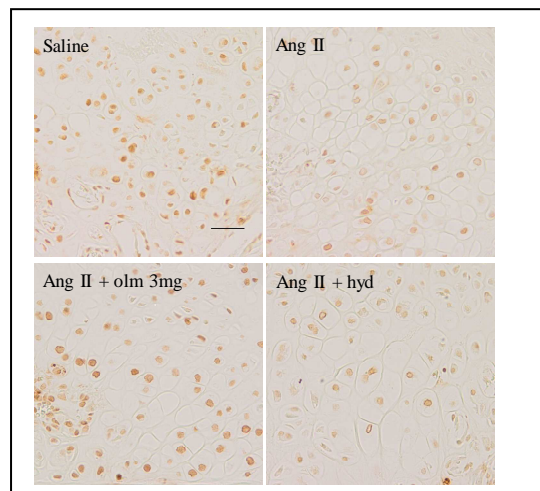


図 3 : Tunnel 染色

また、骨折部位から抽出した mRNA を用いた RT-PCR 法による検討で、AII 持続投与群でアポトーシス抑制遺伝子 (Bcl-xL・Bcl-2) の発現亢進が認められた (図 4、5)。これらの発現亢進は ARB 投与で阻害され、ヒドララジンにより阻害されなかった (図 4、5) ことから、同作用は血圧の影響ではなく、アンジオテンシン受容体を介した直接的な影響と考えられた。アポトーシス促進遺伝子 bax の発現に影響は認められなかった。

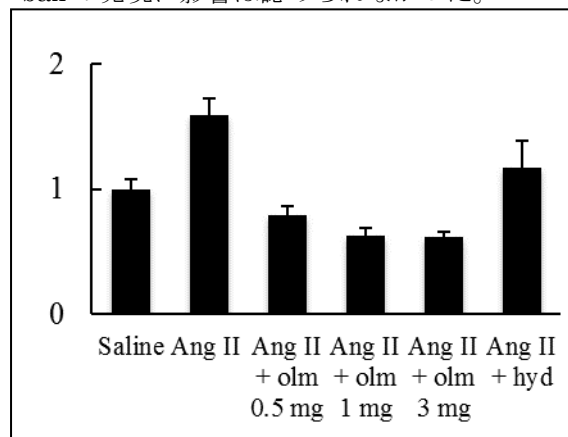


図 4 : Relative expression (Bcl-2 / GAPDH)

AII 投与で Bcl-2 の発現は有意に亢進し、ARB 投与にて有意に抑制された。

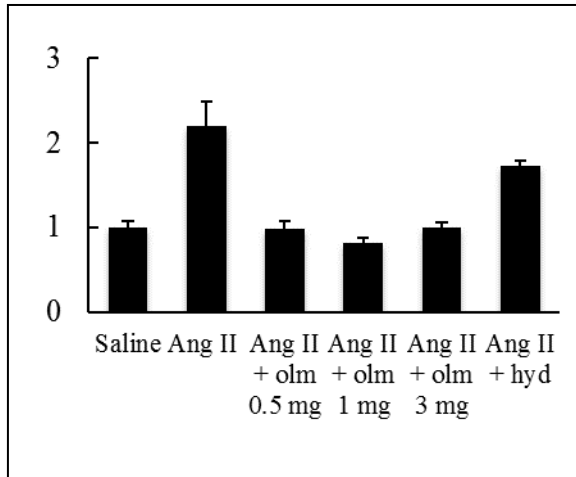


図5 : Relative expression (Bcl-xL/GAPDH)  
AII 投与で Bcl-xL の発現は有意に亢進し、ARB 投与にて有意に抑制された。

これらの結果から、Ang II 投与は軟骨細胞分化を促進し、軟骨細胞死には抑制的に作用すると考えられた。変形性関節症においては、局所での静止軟骨細胞から肥大軟骨細胞への分化、さらに肥大軟骨細胞から分泌される MMP、type X collagen による軟骨変性が病態進展に関与していると想定されることから、AII はその進展を促進し、ARB 投与は進呈阻害に作用すると考えられた (図6)。

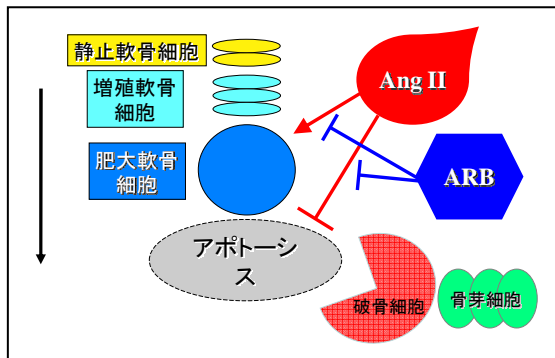


図6

さらに、変形性関節症モデルの作成とその妥当性を検証した。本研究では、AII の関節軟骨に対する影響を観察するために、遺伝的・生化学的因子が関与しない関節不安定性モデルを選択した。8 週齢雄 C57BL/6J マウスの膝関節において靭帯や関節半月を切離・切除することで、関節不安定性や適合性を低下させ、変形性関節症を発症させた。評価に適したモデルを作成するために、2 種類のモデル作成方法による比較を行った。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色とサフラニン O/Fast Green 染色にて評価した。

- ① 膝関節内側側副靭帯 (MCL) および前十字靭帯 (ACL) 切離モデル

デル

- ② 膝関節内側側副靭帯 (MCL) 切離および内側半月 (MM) 切除モデル

HE 染色にて、MCL+ACL 切離モデルでは大腿骨顆部の形状が不整であり、また滑膜組織の肥厚や関節腔への組織増生、脛骨前方には異常な軟骨組織の増殖を認めた。また MCL 切離+MM 切除モデルにおいても大腿骨顆部の不整や滑膜組織の変化、関節腔への組織増生などを認めたが、MCL+ACL 切離モデルと比較するとその程度は軽度であった (図7)。

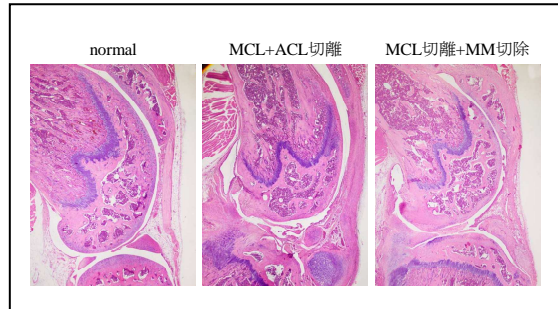


図7 : マウス膝関節部 HE 染色

また、サフラニン O/Fast Green 染色にて、MCL+ACL 切離モデルではサフラニン O/Fast Green による染色がわずかにみられるのみで軟骨組織は広く欠損していた。MCL 切離+MM 切除モデルでは大腿骨顆部で軟骨組織の欠損がみられるが、膝蓋大腿関節においては膝蓋骨側、大腿骨側ともに軟骨組織は比較的良好に保たれていた (図8)。

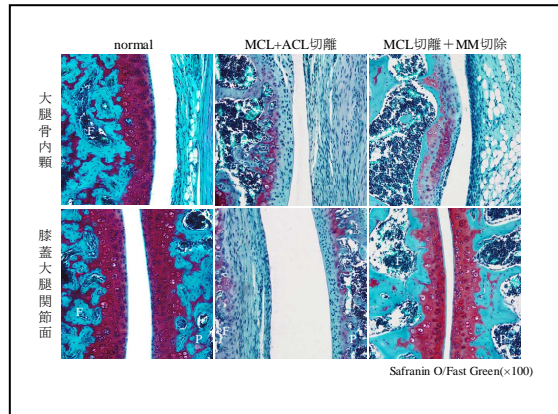


図8 : マウス膝関節部サフラニン O/Fast Green 染色

組織学的評価法でスコアリングすると、いずれのモデルも軟骨の変性は進行しており、MCL+ACL 切離モデルでは軟骨組織の変性が強く、MCL 切離+MM 切除モデルでは変化が mild であった。これらのモデルは変形性膝関節症モデルとして妥当であり、今後同モデルを用いて AII の影響を検証する。

倫理的配慮：  
森ノ宮医療大学動物実験倫理審査承認

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 2 件)

1. Kawahata H, Sotobayashi D, Aoki M, Shimizu H, Nakagami H, Ogihara T, Morishita R. Continuous infusion of angiotensin II modulates hypertrophic differentiation and apoptosis of chondrocytes in cartilage formation in a fracture model mouse. *Hypertens Res*. 2015, 38, 382–393.
2. Aoki M, Kawahata H, Sotobayashi D, Yu H, Moriguchi M, Nakagami H, Ogihara T, Morishita R. Effect of Angiotensin II Receptor Blocker, Olmesartan, on Turnover of Bone Metabolism in Bedridden Elderly Hypertensive Women with Disuse Syndrome. *Geriatr Gerontol Int*. 2015, 15(8):1064-72.

[学会発表] (計 1 件)

Hirohisa Kawahata, Motokuni Aoki, Ryuichi Morishita, Toshio Ogihara, Effect of angiotensin II on differentiation and apoptosis of chondrocytes in cartilage formation in the process of fracture healing. Oral presentation. 11th Asia Pacific Congress of Hypertension. June 4 - 7, 2015, Bali, Indonesia

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○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]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 元邦 (Motokuni Aoki)  
森ノ宮医療大学・保健医療学部・教授  
研究者番号：00346214

(2) 研究分担者

川畑 浩久 (Hirohisa Kawahata)  
森ノ宮医療大学・保健医療学部・教授  
研究者番号：30454680

中神 啓徳 (Hironori Nakagami)  
大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授  
研究者番号：20325369

(3) 連携研究者

荻原 俊男 (Toshio Ogihara)  
大阪大学・医学系研究科・名誉教授  
研究者番号：60107042