

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462319

研究課題名(和文) 軟骨変性におけるミトコンドリア内酸化ストレスの病理学的役割の検証

研究課題名(英文) Pathological role of mitochondrial oxidative stress in cartilage degeneration

研究代表者

野尻 英俊 (Nojiri, Hidetoshi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10317456

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)：ヒト変形性関節症(OA)患者の関節軟骨においてミトコンドリアに局在する抗酸化酵素superoxide dismutase 2(SOD2)が有意に低下しているという報告があるが、SOD2の異常が軟骨変性の直接的原因かは明らかになっていない。我々は野生型マウスに外科的OA誘導モデル(DMM)と軟骨特異的Sod2欠損マウスを使用し、過度なメカニカルストレスが軟骨細胞のミトコンドリアスーパーオキシドを過剰産生すること、そして軟骨変性を誘導することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We herein demonstrate that mechanical loading promoted mitochondrial superoxide generation and selective Sod2 downregulation in chondrocytes in vivo and that mitochondrial superoxide inducer also downregulated Sod2 expression in chondrocytes in vitro. A genetically manipulated model revealed that Sod2 deficiency in chondrocytes also resulted in mitochondrial superoxide overproduction and dysfunction, thus leading to cartilage degeneration. Intra-articular injection of a permeable antioxidant effectively suppressed the mechanical loading-induced mitochondrial superoxide generation and cartilage degeneration in mice. Our findings demonstrate that mitochondrial superoxide plays a pivotal role in the development and progression of osteoarthritis, and the mitochondrial superoxide balance may therefore be a promising target for the treatment of cartilage degeneration.

研究分野：整形外科

キーワード：酸化ストレス 軟骨 変形性関節症 加齢 変性 メカニカルストレス

## 1. 研究開始当初の背景

平成 22 年度厚生労働省の国民生活基礎調査によると、65 歳以上の人の要介護の原因の第 5 位 (7.4%)、要支援の原因の第 1 位 (19.4%) が関節疾患となっている。よって関節疾患の予防・治療は医療面だけでなく本邦の経済、社会においても重要な課題である。関節疾患とは軟骨変性の進行に伴い関節変形をきたす疾患で、日常生活動作 (ADL) の低下や関節痛などの症状を呈する症候群 (変形性関節症 osteoarthritis (以下 OA)) であるがその治療戦略、予防対策は未だ決め手がないのが現状である。

一方、活性酸素の蓄積は生体機能の低下、すなわち老化を進行させる原因であり、臓器老化または疾病発症・進行に深く関連している。活性酸素は酸素代謝の副産物として産生され、生体物質を酸化すること (酸化ストレス) で機能不全を起こす結果、細胞毒性を発生させると考えられている。その中で活性酸素を処理する内在性の抗酸化酵素 Superoxide dismutase (SOD) は重要な生理学的役割を果たしていることが解明されてきた。

軟骨細胞における変性過程に酸化ストレスが関与をしていることがいくつかの先行研究で示唆されている。その中に人 OA の軟骨においてミトコンドリア局在の SOD である SOD2 の発現が選択的に低下しているというプロテオミクス解析があった (Mol. Cell. Proteomics 2009)。さらに人の DNA チップを用いた解析で OA 軟骨において存在する 3 つの SOD アイソフォーム (SOD1, SOD2, SOD3) すべての発現低下を示した報告もされ (Ann Rheum Dis 2010)、OA と SOD の関連について注目を集めている。しかしこの変化が軟骨変性の原因なのか、それとも変性が引き起こした結果なのかは不明であるとともに、その機序に関して全く未知である。

我々は SOD1 (細胞質局在の SOD) または SOD2 の欠損マウスを作製し老化進展、障害を臓器別に解析することでそれぞれの役割を研究してきた。その中で、我々は SOD1 を欠損させたマウスにおいて骨量減少、骨質異常が認められることを発見した (Nojiri *et al.* JBMR 2011)。さらにそのマウスを尾部懸垂した廃用モデルの実験において SOD1 が骨萎縮に防御的役割を持っていることを証明した (Morikawa, Nojiri *et al.* JBMR 2013)。また骨特異的 SOD2 欠損マウスの解析から SOD2 が骨形成の調節因子であることを証明している (Kobayashi, Nojiri *et al.* ASBMR young investigator award 2013 受賞)。さらに骨格筋特異的 SOD2 欠損マウスの解析では、ミトコンドリア呼吸鎖の障害によるエネルギー (ATP) 産生の著しい低下がもたらす筋力低下が引き起こされることを明らかにした (Kawahara, Nojiri *et al.* FRBM 2010)。これらの研究により酸化ストレスの運動器機

能低下、老化への重要な関連性とその突破口となる分子機構を解明してきた。

今までの研究結果から、活性酸素に対する酸化ストレス耐性能は臓器毎、細胞毎に大きく異なり、活性酸素の発生機序や防御システムが細胞固有の制御下に存在することが予想された。よって活性酸素の病理学的役割を臓器毎、細胞毎そして細胞質局在、ミトコンドリア局在の酸化ストレス処理機構毎に解析する必要があると考えた。

## 2. 研究の目的

我々は軟骨でのミトコンドリアにおける酸化ストレスが及ぼす病理的变化をみるため Sod2 遺伝子欠損マウスの解析を検討したがそのマウスは新生児致死であり、軟骨の加齢変性過程におけるスーパーオキシドの病理学的意義や SOD2 の役割を解明することが不可能であった。そこで研究協力者が作製した Sod2 flox マウス (Ikegami *et al.* BBRC 2002) を軟骨特異的 Cre マウスと交配し軟骨特異的な遺伝子欠損マウスを作製した。この酸化ストレス誘導モデルの形態変化を解析することで軟骨の変性機序への SOD2 の関連性を解明し、人の OA 軟骨における SOD2 の発現低下が OA 発症原因なのか OA から引き起こされた結果なのかを証明することを目的とした。また同時にヒト OA 軟骨におけるスーパーオキシドの発生量、SOD 活性を測定し、モデルマウスでの事象の再現性を確認した。

## 3. 研究の方法

### 軟骨特異的な SOD2 欠損マウスを作製

軟骨特異的プロモーター Cre マウスと Sod2 flox マウスを交配し、ミトコンドリア内に局在し活性酸素を処理する抗酸化酵素である SOD2 を軟骨特異的に欠損させたマウスを作製した。

### 軟骨における酸化ストレス過剰状態の確認

ROS (reactive oxygen species; 活性酸素種) の発生を捉える。膝関節より軟骨細胞を採取しスーパーオキシド検出用蛍光試薬 DHE にて ROS を蛍光発色させ FACS で蛍光強度、細胞数の定量化を行う。

### 軟骨細胞、関節軟骨の形態変化

軟骨細胞の培養、マウス膝関節の切片の作製により培養細胞の観察や OA スコアリングによる組織学的解析を行った。

### 代謝変化の解析による軟骨変性の検証

膝軟骨から抽出した mRNA を用いて、軟骨同化マーカー、軟骨異化マーカーの発現レベルの定量的 RT-PCR を行った。さらに軟骨培養において軟骨基質合成能を測定した。

### ミトコンドリアの機能と形態の変化

軟骨から抽出したミトコンドリアの膜電位測定し、電子顕微鏡で形態を観察した。

#### OA 誘導実験

膝関節内側半月板の前方付着部を解離することにより膝関節の動揺性を惹起する Destabilization of the medial meniscus (DMM)モデルを作製し、OA スコアリングによる組織学的解析を行った。

#### 抗酸化剤によるレスキュー実験

ビタミン C 誘導体 (パルミチン酸を側鎖にもつ脂溶性ビタミン C : APPS) を関節注射し、軟骨変性の抑制効果を組織学的に評価した。

#### ヒト軟骨におけるスーパーオキシド発生量、SOD 活性の測定

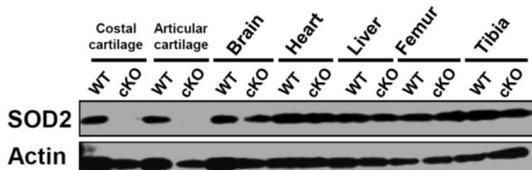
人工膝関節全置換術 (TKA) を行った KL4 の患者 (OA 群) 5 例 5 膝と膝前十字靭帯損傷再建手術 (ACL 再建術) または半月板部分切除術を行った KLO,1 の患者 (対照群) 5 例 5 膝の関節軟骨および滑膜を採取し、スーパーオキシド特異的蛍光試薬である DHE 染色で蛍光強度を測定した。さらに TKA を行った KL4 の患者 (OA 群) 18 例 18 膝と ACL 再建術または半月板部分切除術を行った KLO,1 の患者 (対照群) 9 例 9 膝の関節軟骨および滑膜を採取し、SOD 活性を評価した。

#### 4. 研究成果

#### 軟骨特異的な SOD2 欠損マウスを作製

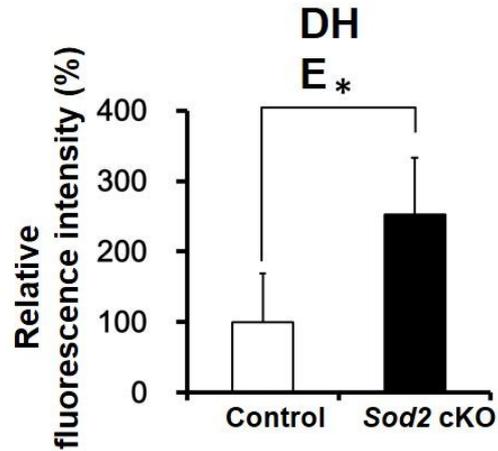
軟骨特異的プロモーター Cre マウス (Col2a1-Cre) と Sod2 flox マウスの交配から軟骨特異的 SOD2 欠損マウス (Col2a1-Cre, Sod2 flox/flox マウス: Sod2 cKO) を作製した。マウスの膝軟骨から DNA、RNA 及び蛋白を抽出し PCR にて Sod2 遺伝子欠損バンドを確認、RT-PCR による mRNA 発現レベルとウエスタンブロット法による SOD2 蛋白発現レベルの測定を行ったところ軟骨において特異的に SOD2 の完全な欠損が確認できた。

Control Sod2 cKO



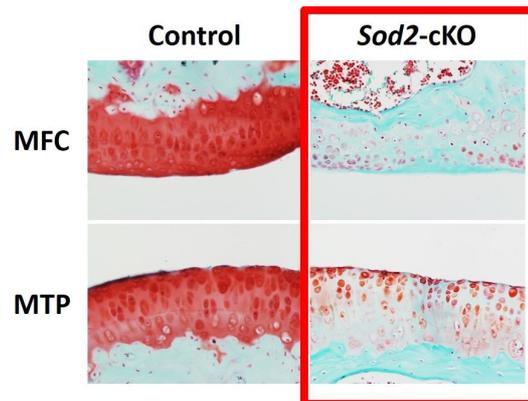
#### 軟骨における酸化ストレス過剰状態の確認

膝関節より軟骨細胞を採取しスーパーオキシド検出用蛍光試薬 DHE にて蛍光発色させ FACS で蛍光強度を定量したところ ROS (reactive oxygen species; 活性酸素種) の過剰な発生を認めた。これらの結果から軟骨特異的に SOD2 の欠損とそれに伴うスーパーオキシド過剰発生を誘導することに成功した。



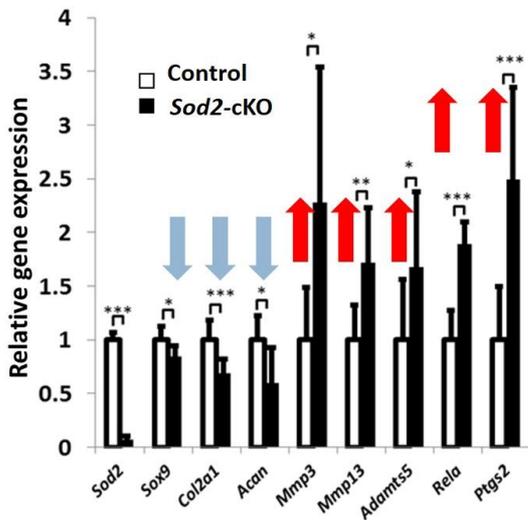
#### 軟骨細胞、関節軟骨の形態変化

12 か月齢の軟骨特異的 SOD2 欠損加齢マウスの膝において自然発症の変形性関節症変化が確認できた。基質形成能を示す染色性の低下が著明であった。自然発症の OA が認められた。



#### 代謝変化の解析による軟骨変性の検証

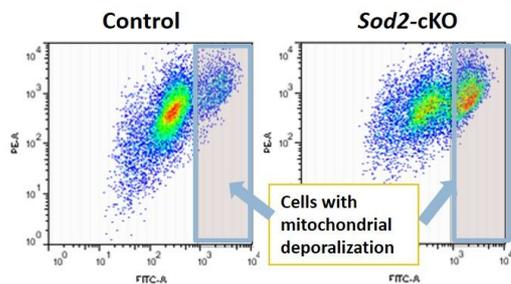
マウス膝軟骨から抽出した mRNA を用いて定量的 RT-PCR を行ったところ、軟骨同化マーカーの発現低下、軟骨異化マーカーの発現上昇が明らかとなった。炎症の惹起を示す遺伝子の発現上昇が示された。さらに軟骨細胞培養においてはプロテオグリカン産生が有意に低下していた。



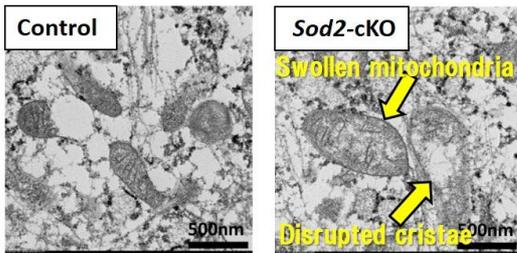
### ミトコンドリアの機能と形態の変化

ミトコンドリア膜電位の低下とミトコンドリアの形態異常（膨化とクリステ構造の破壊）が認められた。

#### Mitochondrial membrane potential (JC-1)

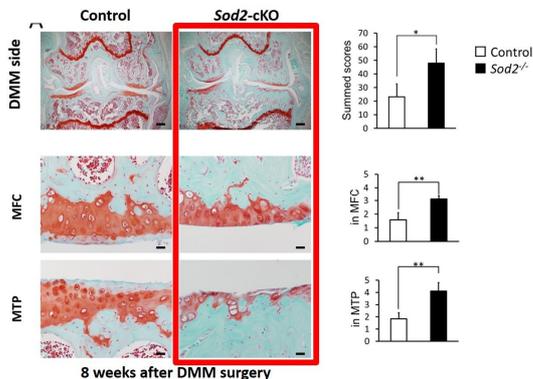


#### Mitochondrial morphology



### OA 誘導実験

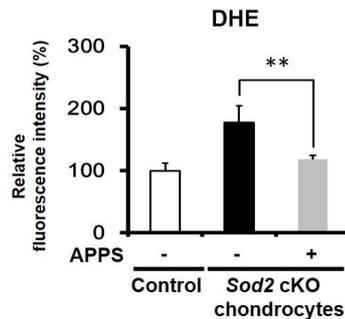
DMM モデルを作製し関節軟骨への機械的刺激の過負荷を行ったところ、DMM 後 8 週の軟骨特異的 Sod2 欠損マウス膝で組織学的に軟



骨変性が促進していた。

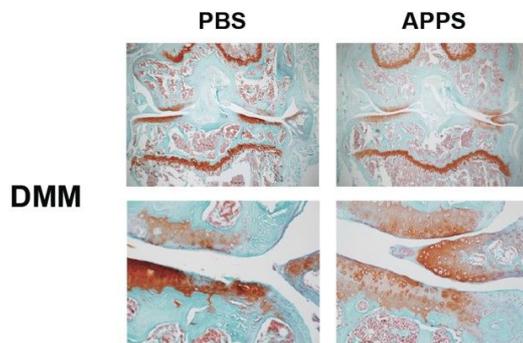
### 抗酸化剤によるレスキュー実験

APPS は Sod2 欠損軟骨細胞におけるスーパ

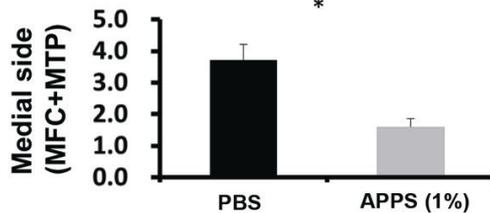


ーオキシド発生量を有意に抑制した。

生体においても APPS の関節注射により関節軟骨のスーパーオキシド発生量が有意に



### DMM



抑制され、軟骨摩耗を有意に抑制した。

### ヒト軟骨におけるスーパーオキシド発生量、SOD 活性の測定

DHE 染色の蛍光強度は対照群に対し、OA 群の関節軟骨および滑膜ではいずれも有意に増加していた。また関節軟骨における SOD 活性は対照群に対し、OA 群で有意に低下を認めた。また滑膜における SOD 活性は対照群に対し、OA 群で有意に低下を認めた。

これらの結果より関節軟骨へのメカニカルストレス誘導下において、また加齢において軟骨細胞における SOD2 の低下、スーパーオキシドの増加が変形性関節症の発症の原因であることが証明された。またヒト OA 膝より採取した軟骨および滑膜において SOD 活性の低下およびスーパーオキシドの過剰状態が認められ、マウスを用いた実験結果と矛盾しない結果であった。

加齢に伴い変形性関節症に起因する運動機能の障害は増加し、その対策は超高齢社会

が続く中で非常に重要な課題である。今回の結果は軟骨代謝における酸化ストレス制御の重要性を意味し、変形性関節症の予防・治療においてスーパーオキシド、活性酸素種の除去、SOD 活性の上昇などが鍵となることを示した。今後、酸化ストレス制御が可能となり、関節痛に悩む患者が減少し、高齢者がいつまでも健康で生き生きとした生活がおくれる超高齢社会となることを願う。

#### 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)

Koike M, Nojiri H, Ozawa Y, Watanabe K, Muramatsu Y, Kaneko H, Morikawa D, Kobayashi K, Saita Y, Sasho T, Shirasawa T, Yokote K, Kaneko K, Shimizu T: Mechanical overloading causes mitochondrial superoxide and SOD2 imbalance in chondrocytes resulting in cartilage degeneration. Sci Rep. 2015

Kobayashi K, Nojiri H, Saita Y, Morikawa D, Ozawa Y, Watanabe K, Koike M, Asou Y, Shirasawa T, Yokote K, Kaneko K, Shimizu T: Mitochondrial superoxide in osteocytes perturbs canalicular networks in the setting of age-related osteoporosis. Sci Rep. 2015

[学会発表](計 3 件)

Koike M, Nojiri H, Ozawa Y, Watanabe K, Masuda I, Muramatsu Y, Kaneko H, Morikawa D, Kobayashi K, Sasho T, Shirasawa T, Yokote K, Kaneko K, Shimizu T. Sod2 deficiency in chondrocytes accelerates age-related osteoarthritis in mice. Osteoarthritis Research Society International (OARSI) world congress 2014, Paris, France, Apr., 24-27, 2014, [OARSI 2014 Young Investigator Award]

Koike M, Nojiri H, Ozawa Y, Watanabe K, Masuda I, Muramatsu Y, Kaneko H, Morikawa D, Kobayashi K, Sasho T, Shirasawa T, Yokote K, Kaneko K, Shimizu T: Chondrocyte-specific deletion of Sod2 exacerbates age-related cartilage degeneration in mice. Australia and New Zealand Bone & Mineral Society (ANZBMS) 24th Annual Scientific Meeting, Queenstown, New Zealand, Sep., 7-10, 2014 [ANZBMS 2014 Christopher & Margie Nordin Young Investigator Poster Award]

Koike M, Nojiri H, Ozawa Y, Watanabe K, Masuda I, Muramatsu Y, Kaneko H, Morikawa D, Kobayashi K, Sasho T, Shirasawa T,

Yokote K, Kaneko K, Shimizu T: Chondrocyte-specific Deletion of Sod2 Exacerbates Cartilage Degeneration Associated with Low Mitochondrial Membrane Potential in Mice. American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2014 Annual Meeting, Houston, Sep., 12-15, 2014, [ASBMR 2014 Plenary Poster] & [ASBMR 2014 Young Investigator Travel Grant]

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: 特許願

発明者: 清水孝彦、金子和夫、野尻英俊、小池正人

権利者: 国立大学法人 千葉大学、学校法人 順天堂、昭和電工株式会社

種類:

番号: 2015-100963

出願年月日: H27.5.18

国内外の別: 国内

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

野尻 英俊 (NOJIRI, Hidetoshi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 10317456