

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670665

研究課題名(和文)変形性関節炎におけるエンドサイトーシスの新たな機能とその重要性

研究課題名(英文)The role of endocytosis in osteoarthritis

研究代表者

廣畑 聡 (HIROHATA, Satoshi)

岡山大学・保健学研究科・教授

研究者番号：90332791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：アグリカンを分解するアグリカナーゼのうち、ADAMTS5が重要であることはノックアウトマウスを使った実験で証明されているがその制御機構は十分に解明されていない。我々は、軟骨様細胞であるOUMS-27細胞においてエンドサイトーシスが起きていることを明らかにした。さらにエンドサイトーシス関連分子であるLRP-1を検討したところ、OUMS-27をIL-1 β 刺激した際にLRP-1が切断されることを発見した。一方でLRP-1のアンタゴニストとして働くと考えられるReceptor-associated protein (RAP)のmRNA発現レベルはIL-1 β によって変化しないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The regulation of ADAMTS5 is crucial for osteoarthritis. However, little is known for its mechanism. We hypothesized that endocytosis may be involved in ADAMTS5 regulation. First, we found that endocytosis occurred in OUMS-27. We next examined endocytosis-related molecule, LRP-1 and RAP. The mRNA level of receptor-associated protein (RAP), antagonist of LRP-1, was not changed by IL-1 β stimulation. It is interesting that the small-sized bands were found by Western blotting using anti-LRP-1 antibody after IL-1 β stimulation. This is considered to be a short LRP-1 and the shedding of LRP-1 may be occurred by IL-1 β stimulation.

研究分野：分子生物学

キーワード：軟骨 培養細胞

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(OA)は、整形外科領域では最も頻度の高い骨・関節疾患である。関節に豊富に含まれる軟骨成分であるアグリカンは、OAの早期例において発現誘導されるアグリカン分解酵素(アグリカナーゼ)により分解される。1999年アグリカナーゼが精製され、ADAMTS4であることが判明した。ADAMTS4に次いで我々が最初に発見したADAMTS5、ADAMTS8、ADAMTS9がアグリカナーゼ活性を持つことも明らかとなった(*J Biol Chem.* 1999; 274(33): 23443-50. *J Biol Chem.* 2003; 278(11): 9503-13.)。2005年*Nature* (2005; 434(7033): 648-652)にADAMTS5のマウスOAにおける重要性が発表されたが、ヒトOAにおいてADAMTS5は発現増加しない報告や炎症性サイトカインによって誘導されない報告が相次ぎ、ヒトOAにおけるADAMTS5の重要性はまだ結論が出ていない。

ADAMTS5の発現調節に関する大変興味深い論文が報告された(Yamamoto et al., *FASEB J* 2013; (27) 2: 511-521)。ADAMTS5がエンドサイトーシス受容体であるLRP-1によって軟骨細胞内に取り込まれる報告である。この発見はエンドサイトーシスがADAMTS5の発現調節制御機構である可能性を示すと共にOAは軟骨のエンドサイトーシス機能不全であるという新たな視点を切り拓く可能性があると思えるに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は“ADAMTS5の制御にエンドサイトーシスが関わっており、その破綻が変形性関節炎の発症を引き起こす”という仮説をもとに二つのテーマに挑戦する。

- 1) 軟骨様細胞での細胞内取り込み機構としてのエンドサイトーシス
- 2) 変形性関節炎(OA)の病態におけるエンドサイトーシスの役割

3. 研究の方法

(1) 軟骨様細胞での細胞内取り込み機構としてのエンドサイトーシス

軟骨細胞培養系においてエンドサイトーシスによって細胞表面のタンパク質が軟骨細胞内に取り込まれるかを検証する。次にエンドサイトーシスに作用するいくつかの刺激を加えてADAMTS5の取り込みとアグリカン分解に与える影響を検討する。

(2) 変形性関節炎(OA)の病態におけるエンドサイトーシスの役割

軟骨様細胞におけるエンドサイトーシス関連分子の発現変化をサイトカイン刺激前後で検討する。

4. 研究成果

まず、軟骨様細胞であるOUMS-27細胞をインターロイキン1(IL-1)で刺激したところ、軟骨特異的な細胞外マトリックス成分であるアグリカン分解が促進していること

が確認され、同細胞はアグリカナーゼ発現制御機構を検証する実験系に用いるのに妥当な細胞であることが証明された。

OUMS-27細胞においてエンドサイトーシスが起きているかを次に検討した。培養細胞をN-Hydroxysuccinimide (NHS)-SS-biotinでラベルした後に、エンドサイトーシスにて細胞内に取り込まれたビオチンを検出する実験系を構築した。4ではエンドサイトーシスは起こらず、37においてエンドサイトーシスが起きていることをトランスフェリンレセプターを指標に確認した。

次にOUMS-27細胞をインターロイキン1(IL-1)で刺激した。刺激前後でエンドサイトーシス関連分子であるLRP-1(エンドサイトーシス受容体)およびreceptor-associated protein(RAP; LRP-1のアンタゴニスト)の発現を半定量的RT-PCRおよびウエスタンブロットングにて検討した。IL-1刺激24時間後に有意なLRP-1の発現増加を認めたと、一方でRAPのmRNA発現量には明らかな変化は認めなかった。ウエスタンブロットングでは、IL-1刺激24時間後にLRP-1タンパク増加に加えて新たに小さなバンドを検出することに成功した。これは、一部が切断された短いLRP-1であると考えられた。LRP-1の切断がエンドサイトーシスに影響することが予想され、LRP-1切断がアグリカナーゼ活性を制御している機構の一つである可能性が示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

1. Yamamoto K, Okano H, Miyagawa W, Visse R, Shitomi Y, Santamaria S, Dudhia J, Troeberg L, Strickland DK, Hirohata S, Nagase H. MMP-13 is constitutively produced in human chondrocytes and co-endocytosed with ADAMTS-5 and TIMP-3 by the endocytic receptor LRP1. *Matrix Biol.* 2016 Apr 12. pii: S0945-053X(16)30031-2. 査読有 doi:10.1016/j.matbio.2016.03.007.
2. Komatsubara I, Kondo J, Akiyama M, Takeuchi H, Nogami K, Usui S, Hirohata S, Kusachi S. Subclavian steal syndrome: a case report and review of advances in diagnostic and treatment approaches. *Cardiovasc Revasc Med.* 2016 Jan-Feb;17(1):54-8. 査読有 doi: 10.1016/j.carrev.2015.11.001.
3. Ishii H, Kamikawa S, Hirohata S, Mizutani A, Abe K, Seno M, Oohashi T, Ninomiya Y. Eosinophil Cationic Protein Shows Survival Effect on H9c2 Cardiac Myoblast Cells with Enhanced Phosphorylation of ERK and Akt/GSK-3 under Oxidative Stress. *Acta Med Okayama.* 2015 Jun;69(3):145-53. 査読有

4. Altuntas A, Halacli SO, Cakmak O, Erden G, Akyol S, Ugurcu V, Hirohata S, Demircan K. Interleukin-1 induced nuclear factor- β binds to a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 9 promoter in human chondrosarcoma cells. Mol Med Rep. 2015 Jul;12(1):595-600. 査読有 doi: 10.3892/mmr.2015.3444.
5. Doi M, Nosaka K, Miyoshi T, Iwamoto M, Kajiyama M, Okawa K, Nakayama R, Takagi W, Takeda K, Hirohata S, Ito H. Early eicosapentaenoic acid treatment after percutaneous coronary intervention reduces acute inflammatory responses and ventricular arrhythmias in patients with acute myocardial infarction: A randomized, controlled study. Int J Cardiol. 2014 Oct 20; 176(3): 577-82. 査読有 doi: 10.1016/j.ijcard.2014.08.055.
6. Kitawaki T, Oka H, Usui S, Hirohata S, Kusachi S. New Estimation Method of Total Creatine Phosphokinase Release in Early Stage in Acute Myocardial Infarction. International Journal of Cardiovascular and Cerebrovascular Disease 2014; 2(2):18-27. 査読有 doi: 10.13189/ijccd.2014.020202.
7. Demircan K, Topcu V, Takigawa T, Akyol S, Yonezawa T, Ozturk G, Ugurcu V, Hasgul R, Yigitoglu MR, Akyol O, McCulloch DR, Hirohata S. ADAMTS4 and ADAMTS5 Knockout Mice Are Protected from Versican but Not Aggrecan or Brevican Proteolysis during Spinal Cord Injury. Biomed Res Int. 2014; 2014: 693746. 査読有 doi: 10.1155/2014/693746.
8. Inagaki J, Takahashi K, Ogawa H, Asano K, Hatipoglu OF, Zeynel Cilek M, Obika M, Ohtsuki T, Hofmann M, Kusachi S, Ninomiya Y, Hirohata S. ADAMTS1 inhibits lymphangiogenesis by attenuating phosphorylation of the lymphatic endothelial cell-specific VEGF receptor. Exp Cell Res. 2014 May 1; 323(2):263-75. 査読有
9. Miyoshi T, Doi M, Usui S, Iwamoto M, Kajiyama M, Takeda K, Nosaka K, Nakayama R, Okawa K, Takagi W, Nakamura K, Hirohata S, Ito H. Low serum level of secreted frizzled-related protein 5, an anti-inflammatory adipokine, is associated with coronary artery disease. Atherosclerosis. 2014; 233(2): 454-459. 査読有
〔学会発表〕(計30件)
1. Keiichi Asano, Junko Inagaki, Yuri Shoji, Takashi Ohtsuki, Toshitaka Oohashi and Satoshi Hirohata. Association of Extracellular Matrix Cleavage and Tumor Vasculature Formation. 第9回高度医療都市を創出する未来技術国際シンポジウム 2016年2月5日 岡山市
2. 大月孝志、品岡玲、熊岸加苗、佐藤美来、金道幸子、長谷川みさ、海原弘貴、浅野恵一、障子友理、稲垣純子、大橋俊孝、西田圭一郎、廣畑 聡 ラット変形性関節症モデルへのヒアルロン酸投与による軟骨保護効果の解析 第29回日本軟骨代謝学会 2016年2月19-20日 広島市
3. Naofumi Amioka, Tatsuya Yamaji, Naoaki Matsuo, Kenzo Kagawa, Yukari Nakano, Daisuke Yamada, Nobuhiko Ohnishi, Atsushi Takaishi, Masayuki Ueda, Satoshi Hirohata, Hiroshi Itoh. The Impact of Dyslipidemia and MDA-LDL on Coronary Slow Flow Phenomenon in Patients with Unstable Angina Pectoris. 第80回日本循環器学会学術集会 2016年3月18-20日 仙台市
4. 廣畑 聡、大月孝志、稲垣純子 細胞外マトリックス分解酵素ADAMTS1の多様性 日本薬学会第136年会 シンポジウムS54「ダウン症遺伝子21番染色体から創薬標的を探す」2016年3月27-29日 横浜市
5. Takashi Ohtsuki, Yuri Shoji, Keiichi Asano, Aya Hirata, Teruyuki Kawadi, Junko Inagaki, Kanae Kumagishi, Keiichiro Nishida, Toshitaka Oohashi, Satoshi Hirohata. HYALURONAN TREATMENT REDUCED MATRIX DEGRADATION BOTH IN VITRO AND IN VIVO RAT OSTEOARTHRITIS MODEL. 10th International conference HYALURONAN 2015 2015年6月7-11日 イタリア・フィレンツェ
6. Satoshi Hirohata, Omer Faruk Hatipoglu, Eriko Kusunoki, Takashi Ohtsuki, Junko Inagaki, Shozo Kusachi, Yoshifumi Ninomiya. ADAMTS1 null mice demonstrated omphalocele phenotype. ゴードンカンファレンス matrix metalloproteinase 2015年8月2-7日 米国メイン州・サンデーリバー
7. Keiichi Asano, Junko Inagaki, Yuri Shoji, Matthias Hofmann, Takashi Ohtsuki, Toshitaka Oohashi, Satoshi Hirohata. Impact of Versicanolysis in

- Tumor Angiogenesis. ゴードンカンファレンス matrix metalloproteinase 2015年8月2-7日米国メイン州・サンデーリバー
8. Takahiro Hirayama, Tomoki Kitawaki, Keiji Sato, Tetsuya Yumoto, Kumiko Hayashi, Kohei Tsukahara, Atsuyoshi Iida, Hideo Yamanouchi, Michihisa Terado, Ichiba Shingo, Toyomu Ugawa, Satoshi Hirohata, Yoshihito Ujike. IS IT POSSIBLE TO DISTINGUISH SEPTIC SHOCK FROM OTHER CAUSES OF SHOCK BY ANALYZING VARIATIONS OF ARTERIAL PRESSURE WAVEFORMS? : A SINGLE-CENTER PILOT STUDY. 第12回世界集中治療医学会議, 2015年8月29日-9月1日 韓国・ソウル
 9. Keiichi Asano, Junko Inagaki, Yuri Shoji, Matthias Hofmann, Takashi Ohtsuki, Aya Hirata, Teruyuki Kawadi, Yoshifumi Ninomiya, Satoshi Hirohata, Toshitaka Ohashi. Is Versicanolysis associated with tumor angiogenesis? 第8回高度医療都市を創出する未来技術国際シンポジウム 2016年2月6日 岡山市
 10. 大月孝志, 金道幸子, 長谷川みさ, 稲垣純子, 浅野恵一, 障子友理, 熊岸加苗, 西田圭一郎, 大橋俊孝, 廣畑 聡 The effect of mechanical stress intensity on extracellular matrix and matrix metalloproteinases. 伸展刺激の強度による細胞外マトリックスタンパクおよびマトリックス分解酵素発現への影響 BMB 2015 (日本分子生物学会) 2015年12月1-4日 神戸市
 11. 平山 隆浩, 北脇 知己, 林 久美子, 湯本 哲也, 塚原 紘平, 佐藤 圭路, 鶴川 豊世武, 廣畑 聡, 氏家 良人 脈波波形の解析による敗血症診断の補助手法の研究 PILOT STUDY 第5回中四国臨床工学会 2015年11月21-22日 広島市
 12. 熊岸 加苗, 大月 孝志, 廣畑 聡, 河村 顕治, 大塚 愛二, 坂田賢一郎, 坂田 俊輔 変形性膝関節症の治療効果に関する生化学的解析~滑液内軟骨分解活性の検討~ 第28回日本臨床整形外科学会学術集会 2015年7月19-20日 下関市
 13. Naofumi Amioka, Masayuki Ueeda, Soichiro Kobashi, Tatsuya Yamaji, Yuya Sudo, Yuji Koide, Yukari Nakano, Daisuke Yamada, Nobuhiko Ohnishi, Atsushi Takaishi, Satoshi Hirohata. The impact of uric acid level as an oxidative stress marker in patients with acute coronary syndrome. 第47回日本動脈硬化学会総会・学術集会2015年7月9-10日 仙台市
 14. 網岡尚史, 小橋宗一郎, 須藤雄也, 山地達也, 小出祐嗣, 中野由加理, 山田大介, 大西伸彦, 高石篤志, 上枝正幸, 廣畑 聡 急性心筋梗塞患者における尿酸の酸化ストレスマーカーとしての意義の検討 日本循環器学会 中国四国地方会 2015年6月19-20日 松山市
 15. Daisuke Yamada, Masayuki Ueeda, Atsushi Takaishi, Nobuhiko Ohnishi, Yukari Nakano, Yuji Koide, Naofumi Amioka, Satoshi Hirohata, Hiroshi Itoh. Baseline MDA-LDL before PCI could Predict Long Term Prognosis of Patients with Coronary Artery Disease. 第79回日本循環器学会学術集会 2015年4月24-26日 大阪市
 16. 廣畑 聡, 大月孝志, 稲垣純子, 浅野恵一, 川地輝幸, 障子友理, 平田 彩 シーズ発表: 急性低酸素をターゲットにした診断・治療分子の研究 中央西日本メディカルイノベーション 2015 2015年2月17-18日 岡山市
 17. 廣畑 聡 岡山大学病院医療現場からのニーズの発信: 高感度急性虚血性疾患用診断キットの開発 中央西日本メディカルイノベーション 2015 2015年2月17-18日 岡山市
 18. Junko Inagaki, Katsuyuki Takahashi, Hiroko Ogawa, Omer Hatipoglu, Mehmet Cilek, Masanari Obika, Takashi Ohtsuki, Shozo Kusachi, Yoshifumi Ninomiya, Satoshi Hirohata. ADAMTS1 inhibits lymphangiogenesis by attenuating phosphorylation of the lymphatic endothelial cell-specific VEGF receptor. The 18th International Vascular Biology Meeting 2014年4月14-17日 京都市
 19. Ohtsuki T, Kawadi T, Hirata A, Asano K, Inagaki J, Kumagishi K, Nishida K, Ninomiya Y, Hirohata S. Cyclic tensile strain (CTS) down-regulates interleukin(IL)-1 and Tumor necrosis factor(TNF)- induced matrix degrading enzymes mRNA expression in human chondrosarcoma cell line OUMS-27 by mechano sensor. International symposium on mechanobiology 2014 2014年5月20-23日 岡山市
 20. Oohashi T, Hagaya M, Ono M, Yamada S, Ohtsuki T, Maehara A, Hirohata S, Nishida K, Kuboki T, Kakuta H,

- Ninomiya Y. Creation of Novel Articular Cartilage Specific X-ray Imaging Probes Composed of Lysine Oligomers. American Society for Matrix Biology Biennial Meeting 2014 年 10 月 12 - 15 日 米国オハイオ州クリーブランド
21. Keiichi Asano, Junko Inagaki, Matthias Hofmann, Teruyuki Kawadi, Aya Hirata, Yuri Shoji, Takashi Ohtsuki, Yoshifumi Ninomiya, Satoshi Hirohata ADAMTS cleaved versican in tumor angiogenic area. American Society for Matrix Biology Biennial Meeting 2014 年 10 月 12 - 15 日 米国オハイオ州クリーブランド
22. Satoshi Hirohata, Omer Faruk Hatipoglu, Eriko Kusunoki, Takashi Ohtsuki, Junko Inagaki, Keiichi Asano, Yuri Shoji, Teruyuki Kawadi, Aya Hirata, Yoshifumi Ninomiya. Perinatal lethality in ADAMTS1 deficient mouse. American Society for Matrix Biology Biennial Meeting 2014 年 10 月 12 - 15 日 米国オハイオ州クリーブランド
23. Takashi Ohtsuki, Satoshi Hirohata, Yuri Shoji, Keiichi Asano, Aya Hirata, Teruyuki Kawadi, Junko Inagaki, Kanae Kumagishi, Keiichiro Nishida, Toshitaka Ohashi, Aiji Ohtsuka. Decreased Sox9 mRNA expression by cytokine stimulation was ameliorated by hyaluronan in chondrosarcoma cells. American Society for Matrix Biology Biennial Meeting 2014 年 10 月 12 - 15 日 米国オハイオ州クリーブランド
24. 楠絵里子、稲垣純子、大月孝志、川地輝幸、平田彩、浅野恵一、マティアス ホフマン、二宮善文、廣畑 聡 胎生期 ADAMTS1 ノックアウトマウスの解析 第 46 回日本結合組織学会学術大会 第 61 回マトリックス研究会大会 2014 年 6 月 5-7 日 名古屋市
25. 浅野恵一、稲垣純子、マティアス ホフマン、川地輝幸、平田彩、大月孝志、二宮善文、廣畑 聡 担がんマウスモデルにおけるパーシカン分解の解析 第 46 回日本結合組織学会学術大会 第 61 回マトリックス研究会大会 2014 年 6 月 5-7 日 名古屋市
26. 大月孝志、廣畑聡、障子友理、浅野恵一、平田彩、川地輝幸、稲垣純子、熊岸加苗、西田圭一郎、二宮善文 ヒアルロン酸短期投与によるラット変形性関節症モデルの関節軟骨保護効果の検討 第 46 回日本結合組織学会学術大会 第 61 回マトリックス研究会大会 2014 年 6 月 5-7 日 名古屋市
27. 稲垣純子、高橋克之、小川弘子、浅野恵一、Omer Faruk Hatipoglu、Mehmet Zeynel Cilek、小比賀真就、大月孝志、Matthias Hofmann、草地省蔵、二宮善文、廣畑聡 ADAMTS1 は VEGFC と結合してリンパ管新生を抑制する 第 46 回日本結合組織学会学術大会 第 61 回マトリックス研究会大会 2014 年 6 月 5-7 日 名古屋市
28. 大橋俊孝、加来田博貴、芳谷 学、大月孝志、大野充昭、山田翔也、前原亜美、廣畑 聡、西田圭一郎、窪木拓男、二宮善文 新規 X 線造影剤による変形性膝関節症ラット関節軟骨の高解像度マイクロ CT 造影 第 46 回日本結合組織学会学術大会 第 61 回マトリックス研究会大会 2014 年 6 月 5-7 日 名古屋市
29. 豊永慎二、間島圭一、中津高明、廣畑 聡、草地省蔵 低酸素運動負荷時の血圧応答と家庭血圧の関連 第 37 回日本高血圧学会総会 2014 年 10 月 17 - 19 日 横浜市
30. 熊岸加苗、大月孝志、廣畑聡、河村顕治、大塚愛二、坂田賢一郎、坂田俊輔変形性膝関節症の治療効果に関する生化学的解析 第 27 回日本臨床整形外科学会学術集会 2014 年 7 月 20 - 21 日 仙台市
- 〔産業財産権〕
取得状況 (計 1 件)
名称: 再灌流療法の治療効果を判定するキット
発明者: 廣畑 聡、臼井真一
権利者: 岡山大学
種類: 特許
番号: 第 5 6 5 1 8 9 0 号
取得年月日: 2014 年 11 月 28 日
国内外の別: 国内
〔その他〕
ホームページ等
http://www.fhs.okayama-u.ac.jp/teacher/dm_104_hirohata
6. 研究組織
(1) 研究代表者
廣畑 聡 (HIROHATA, Satoshi)
岡山大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号: 90332791
(2) 研究分担者
山田浩司 (YAMADA, Hiroshi)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 80325092
大月孝志 (OHTSUKI, Takashi)
岡山大学・大学院保健学研究科・非常勤研究員
研究者番号: 10534802