

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：18001

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670670

研究課題名(和文)滑膜細胞の活性化機構：伸展刺激にともなうp53の機能低下

研究課題名(英文)Activation mechanism of synovial cells: depression of p53-function by stretching

## 研究代表者

田中 康春 (TANAKA, Yasuharu)

琉球大学・医学部・教授

研究者番号：20124878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：変形性関節炎では関節軟骨の摩耗とともに滑膜組織を構成する滑膜細胞の活性化が主要な病態となっている。関節軟骨の再生に効果があるとされているグルコサミン(GlcN)が、滑膜細胞の活性化に対してどう影響をおよぼすのかについて、伸展負荷による活性化誘導装置を用いて調べた。GlcNは、滑膜細胞の活性化の指標であるCox-2遺伝子の伸展依存的に起こる発現を顕著に抑制した。又、GlcNは、炎症惹起性の薬剤刺激にともなうCox-2発現も強く抑制した。これらの結果は、GlcNには滑膜細胞の活性化を抑制する作用を有するという新たな知見が得られたことを示している。

研究成果の概要(英文)：Activation of synoviocytes that construct synovial tissue is a major pathological condition. Although glucosamine is useful as a component of articular cartilage for regeneration of the cartilage, but it is unknown whether glucosamine affects the activation of synoviocytes. I examined the effect of glucosamine on stretch-dependent activation of synoviocytes using a cell stretch-loading system. The pretreatment of synoviocytes with glucosamine suppressed stretch-dependent Cox-2 expression, which is a typical hallmark of synoviocytes activation. In addition, glucosamine strongly suppressed an inflammatory reagent-dependent Cox-2 expression. These results suggest that glucosamine has an ability to inhibit the synoviocyte activation.

研究分野：分子生物学

キーワード：滑膜細胞 変形性関節炎 グルコサミン Cox-2

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)ならびに変形性関節症(OA)に罹患した滑膜組織では、線維芽様滑膜細胞(FLS)の異常増殖と NF $\kappa$ B の活性化を介した炎症性因子の発現亢進が観察される。筆者は、以前に細胞伸展装置を用い、ウサギ FLS に伸展負荷をかけることで、NF $\kappa$ B の活性化を介した炎症性因子、COX-2 (シクロオキシゲナーゼ 2)、iNOS (誘導型 NO シンターゼ) の発現亢進が誘導する系を確立した。p53 が NF $\kappa$ B の活性化を抑制するという多数の報告があることから、筆者は FLS が伸展負荷依存的に起こる p53 の発現低下が、NF $\kappa$ B の活性化に密接に関係するのではないかという仮説を立て、検証することを当初の目的とした。しかしながら、筆者の伸展負荷系では、COX-2 の活性化と p53 の低下は、必ずしも両立しなかったことから、研究の方向を伸展負荷依存的な炎症性因子の発現を抑える物質の解明に重点を置くことにした。

2. 研究の目的

グルコサミン (GlcN)は、軟骨マトリクスの構成因子であるヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸合成の材料の一つとして知られている。ところが最近、神経膠細胞において、LPS(リポポリサッカライド)刺激依存的な COX-2 および iNOS 発現の誘導をグルコサミンが抑えるという報告がなされた (Nitric Oxide, 31;1-8, 2013)。この事実は、グルコサミンに抗炎症作用があることを示している。そこで、グルコサミンが滑膜の活性化も抑えるのではないかと考え、伸展ストレス依存的な滑膜細胞の活性化に対するグルコサミンの作用を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

HIG-82(ウサ関節由来 FLS)を、当研究室で行っている伸展負荷装置により活性化する系を用い、GlcN が COX-2 の発現を抑制するのにかについて、COX-2 の発現ならびに Cox-2 の発現を支配する転写因子 NF $\kappa$ B の活性化抑制をウエスタンブロット法ならびにレポーターアッセイにて調べた。また、薬剤刺激による COX-2 の発現誘導に対する GlcN の効果についても検討を加えた。

4. 研究成果

(1) 伸展負荷の p53 発現に及ぼす効果について：

HIG-82 細胞をシリコン製チャンバーに接着培養後、CO<sub>2</sub> インキュベーター内に設置した細胞伸展装置にセットし、図 1 に示す条件下に 1 時間伸展負荷をかけ、その後 1 時間の回復 (静置条件) を待って細胞を回収し、その可溶化タンパクを調製後、ウエスタンブロットにより p53 を検出した。600, 1200 cycle/h で cox-2 の発現誘導は観察されるが (図省略)、これらの伸展条件下で p53 の発

現低下は検出されなかった。

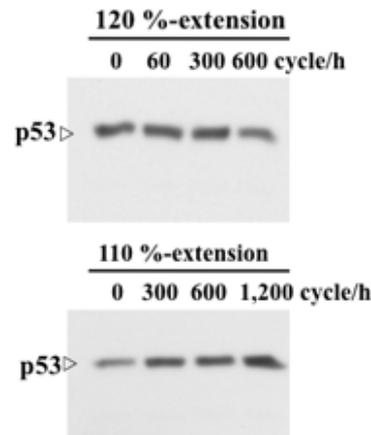
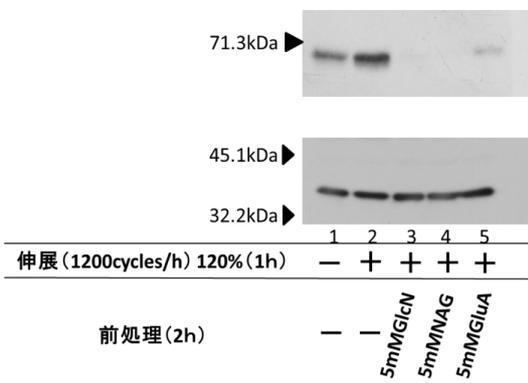


図 1 p53 発現に対する伸展負荷の影響について

(2) グルコサミン (GlcN)による滑膜細胞活性化の抑制：

以前に報告したように、滑膜細胞 (HIG-82) の伸展刺激は、細胞の活性化の指標となる NF $\kappa$ B の活性化を介した Cox-2 や iNOS の発現を誘導する (J. Biochem. 147:633-644, 2010)。そこで、GlcN が、伸展負荷依存的な COX-2 発現に影響を及ぼすのかをウエスタンブロット法により調べた (図 2)。5 mM GlcN もしくは、同一濃度の構造類似物質 N-アセチルグルコサミン (NAG)、グルクロン酸 (GluA) で HIG-82 細胞を 2 時間前処理後、記載の伸展条件下で活性化刺激を行った。

図 2 伸展刺激にともなう Cox-2 の発現亢進と



GlcN による抑制

図に示すように、伸展刺激は Cox-2 (上段カラムの 71.3 kDa 近傍のバンド) の発現を亢進したが、GlcN 前処理により顕著に発現が抑制された。NAG や GluA にも同様の抑制効果が観察された。一方、内部コントロールとしたグリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH; 下段カラムの 45.1 kDa, 32.2 kDa の間に位置するバンド) の発現には、これらの処理による影響はみられなかった。

ホルボールエステル (PMA)は、プロテインキナーゼCの活性化剤であり、多様な細胞に対して、NF $\kappa$ Bの活性化を誘導することが知られている。そこで、PMA刺激依存的なCox-2発現誘導をGlcNが抑制しうるのかについても調べた(図3)。

Cox-2の発現(図3上段カラム)に対して、5 mM濃度のGlcN、NAG、およびグルコースいずれも影響を与えなかった。

一方、100 nM PMAで4時間処理したHIG-82細胞では、顕著にCOX-2の発現増加が観察された。しかしながら、5mM GlcNで2時間前処理によりこのPMA依存的なCOX-2発現は著しく抑えられ、加えて、その量的低下を示したCox-2の分子サイズが、わずかに小さくなっていった。現時点で、分子サイズの低下の原因は不明である。GlcNに対し、5 mM NAGもしくはグルコースによる前処理は、PMA依存的COX-2発現を抑えることができなかった。NAGはGlcN同様に、伸展刺激依存的なCOX-2の発現に対しては抑制効果を示した(図2)。伸展刺激とPMA刺激では、NF $\kappa$ B活性化に至る初発経路が異なり、おそらくNAGは前者のみを、GlcNは両経路に共通するステップを阻害するとも考えられるが、現時点では不明である。

下段カラムは、内部コントロールのGAPDHで、その発現はこれらの処理による変動はみられなかった。

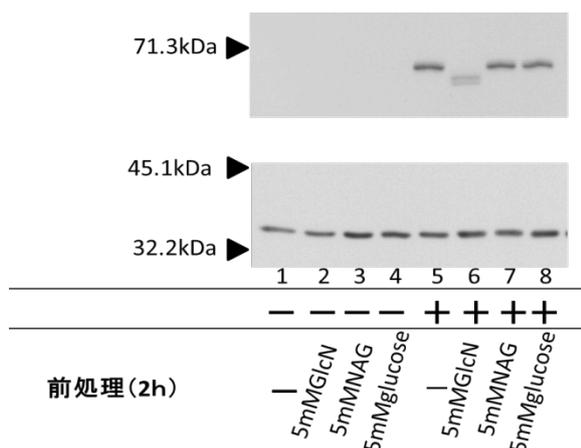


図3 PMA刺激にともなうCox-2発現と、GlcNによる抑制

### (3) NF $\kappa$ Bの活性化におよぼすGlcNの効果

先述したように、筆者は以前、伸展刺激にともなうCox-2の発現誘導に、Cox-2遺伝子の転写調節を支配しているNF $\kappa$ Bの活性化が関与していることを報告している。

そこで、伸展刺激にともなうNF $\kappa$ Bの活性化をGlcNが抑制しうるのかについて検討した(図4)。

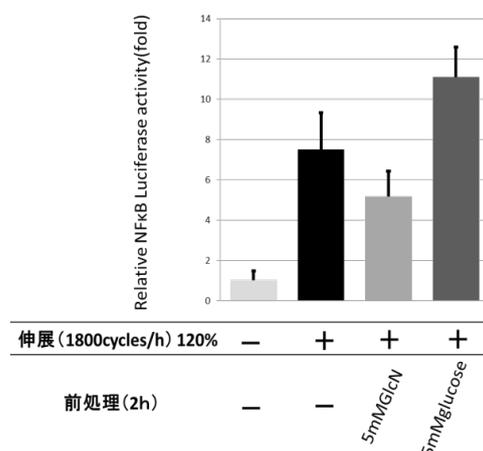


図4 伸展刺激に伴うNF $\kappa$ B活性の亢進とGlcNによる抑制

図に示されるような伸展条件によって、NF $\kappa$ Bの転写調節活性は約7.5倍に増加した。一方、5 mM GlcN前処理した場合、伸展依存的なNF $\kappa$ B活性の増加は約5倍に抑えられた。同濃度のグルコースは、逆にNF $\kappa$ Bの転写調節活性を11倍へと促進した。これらの結果は、伸展刺激にともなうNF $\kappa$ Bの活性化過程のあるステップ、もしくは直接的に活性化したNF $\kappa$ Bを阻害することでGlcNは、Cox-2の発現を抑制している可能性を強く示唆している。

薬剤刺激にともなうNF $\kappa$ Bの活性化を、GlcNが抑制しうるのかについて検討した(図5)。ここでは、NF $\kappa$ Bを活性化させるサイトカインとして、入手のしやすさの点から、ヒトTNF $\alpha$ を用いて、ヒト非小細胞性肺癌細胞H1299を図に示された条件下に処理した。

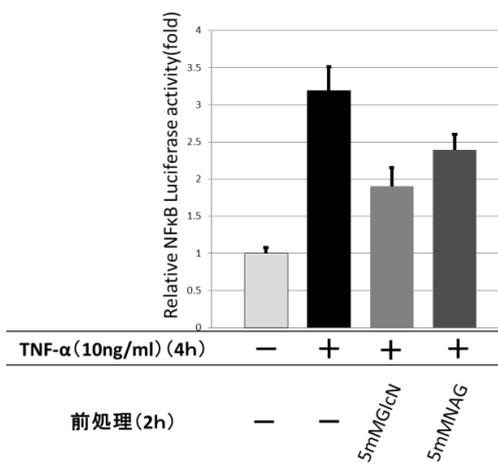


図5 TNF $\alpha$ 刺激にともなうNF $\kappa$ B活性の亢進とGlcNによる抑制

図に示されるように、TNF $\alpha$ 刺激によって、NF $\kappa$ Bは3倍以上に活性亢進したが、5 mM GlcN前処理後TNF $\alpha$ 処理した場合には活性亢進は2倍弱に抑えられた。同濃度のNAGも抑制効果を示したが、GlcNに比べ弱かった。

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)

- ① Sakaba, Y, Awata H, Morisugi T, Kawakami T, Sakudo A, Tanaka Y, 15-Deoxy- $\Delta$ 12, 14-prostaglandin J2 induces PPAR $\gamma$ - and p53-independent apoptosis in rabbit synovial cells. Prostaglandins Other Lipid Mediat., 査読有。Vol. 109-111、 2014、 pp. 1-13 DOI: 10.1016

[学会発表] (計 2 件)

- ① Analysis of poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors isolated from *Syzygium samarangense*, Yakabu H, Kamata Y, Tamanaha A, Shimoji M, Kato M, Maedomari T, Teruya S, Ichiba T, Tanaka Y, 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会, 神戸ポートアイランド (神戸市), 2015. 12. 01-04
- ② マウス胚性線維芽細胞における HPV16 発現にともなうポリ ADP リボースの亢進、西航、金城七代、島袋哲也、金城貴夫、田中康春、第 87 回日本生化学会大会、京都国際会館 (京都市)、2014. 10. 15-18

[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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 康春 (TANAKA, Yasuharu)

琉球大学・医学部・教授

研究者番号：20124878

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：