

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02136

研究課題名(和文) 関節内低酸素環境に着目したHIF-1 誘導運動療法の開発

研究課題名(英文) Development of HIF-1 $\alpha$ -induced exercise therapy focusing on the intra-articular hypoxic environment

研究代表者

新井 祐志 (Arai, Yuji)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50347449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：定常酸素環境下(21%)、低酸素環境下(5%)において自動伸展培養装置を用いて間欠的なmechanical stressを加えた。酸素環境、伸展強度、刺激時間によって遺伝子の挙動は異なり、低酸素環境下での軟骨細胞のmechanical stress応答機構は定常酸素環境下とは異なった。低酸素環境下では、mechanical stressを加えるとHIF-1 $\alpha$ が有意に上昇し、anabolic factorは上昇、catabolic factorは低下していた。低酸素環境下では、HIF-1 $\alpha$ が軟骨基質代謝を制御している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた知見により、運動療法のメカニズムが究明できれば、OAの発症、進行を予防できる新たな運動療法の道が拓ける。さらに本研究の先には、現行の薬物療法と組み合わせることで相乗的にanabolicな効果を得られる革新的な運動療法が開発できる可能性もある。本研究の成果により健康寿命の延長をもたらす、年々増加する医療費の抑制に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Intermittent mechanical stress was applied using an automated stretching culture apparatus under normoxia (21%) and hypoxia (5%). The gene expression differed according to the oxygen environment, extension intensity, and stimulation time, and the mechanism of chondrocyte response for mechanical stress under hypoxic conditions was different from that under normoxia. In the hypoxic environment, HIF-1 $\alpha$  was significantly increased, anabolic factor was increased, and catabolic factor was decreased when mechanical stress was applied. In a hypoxic environment, HIF-1 $\alpha$  may regulate cartilage substrate metabolism.

研究分野：軟骨代謝

キーワード：軟骨 低酸素環境 メカニカルストレス 伸展刺激 HIF-1

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在、わが国では超高齢化が進み、介護保険料、医療費は年々増加している。要介護の原因の2割は運動器疾患とされている。中でも変形性関節症(OA)は、X線学的有病者数が2500万人以上と推測されており、高齢化社会の進行とともに今後さらに増加することが予測される。そのため、OAの進行を予防できる保存療法の発展が求められる。保存療法には運動療法や薬物療法などがあり、積極的に行われているが、OAが進行し、手術を要する症例は少なからず存在している。運動療法は、薬物療法など他の保存療法と比較し、簡便で安全である。また、低コストで実践可能であるため、社会的ニーズが高く、近年注目されている。さらに、運動療法はOAの治療においてエビデンスレベル、推奨グレードともに最高ランクである。しかし、いまだにメカニズムは解明されておらず、至適な運動強度や運動時間は明確でない。運動療法が軟骨に与える影響を分子生物学的に解明することで、新たな運動療法の開発が可能となる。

### 2. 研究の目的

運動療法は安全面や経済面で優れており、OAに対する予防や治療として広く行われている。しかし、運動が関節軟骨に与える分子生物学的な影響は明らかではない。一方、関節内は生理的に低酸素環境であり、関節軟骨は恒常的に hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  を発現し、関節内のホメオスタシスを維持している。また、HIF-1 $\alpha$  はメカニカルストレスとの関与が指摘されている。軟骨のメカニカルストレス応答機構における HIF-1 $\alpha$  の役割を解明し、運動により HIF-1 $\alpha$  の発現を制御できれば、新たな運動療法の礎となる。本研究の目的は、低酸素環境における分子生物学的動態を解析し、軟骨保護に最適な HIF-1 $\alpha$  誘導運動療法の樹立を目指すことである。

### 3. 研究の方法

#### (1) *in vitro* で最適な刺激強度の解析

ラットの肩、膝、股関節から関節軟骨を採取し、コラゲナーゼを用いて軟骨細胞を単離した。培養には低酸素インキュベーター(Model 9200E, Wakenyaku 社)と培養細胞伸展システム(ShellPa, Menicon Life Science 社)を用いた。酸素濃度設定(1%, 5%), 伸展ストレス強度の設定(5%, 10%, 20%), および刺激時間設定(1時間, 6時間, 12時間, 24時間)を行い、最適な伸展ストレス強度、刺激時間を検討した。伸展ストレス強度、刺激時間が軟骨細胞の viability に与える影響も評価した。

#### (2) 酸素濃度が軟骨細胞の mechanical stress 応答に与える影響

最適な伸展ストレス強度、刺激時間において、酸素環境が軟骨細胞の同化・異化遺伝子の発現に与える影響を検討した。シリコンチャンバー(STREX 社)にI型コラーゲン(CELLMATRIX, 新田ゼラチン)をコーティングし、初代軟骨細胞( $1 \times 10^5$  cells)を播種した。DMEM(FBS 10%)で48時間培養し、DMEM(FBS free)に変更した後、4群(normoxia mechanical stress (MS)-, normoxia MS+, hypoxia MS-, hypoxia MS+)に分けた。24時間後に total RNA を回収し realtime RT-PCR で遺伝子発現を評価した。

#### (3) 低酸素環境下での mechanical stress 応答における HIF-1 $\alpha$ の役割

低酸素環境下での軟骨細胞の mechanical stress 応答における HIF-1 $\alpha$  の役割を調べるために siHIF-1 $\alpha$  を用いて HIF-1 $\alpha$  を knockdown し、遺伝子発現に与える影響を確認した。シリコンチャンバー(STREX 社)にI型コラーゲン(CELLMATRIX, 新田ゼラチン)をコーティングし、初代軟骨細胞( $5 \times 10^4$  cells)を播種した。Overnight 後、si-HIF-1 $\alpha$  (SASI\_Rn01\_00053994; Sigma-Aldrich), siRNA Universal Negative Controls (si-control) (SIC-001; Sigma-Aldrich) を Cationic liposome (Lipofectamine RNAiMAX Reagent; Invitrogen) を使用して transfection した。12時間定常酸素下で導入した後に、DMEM(FBS free)に変更した後、24時間の伸展ストレスを加え total RNA を回収し realtime RT-PCR で遺伝子発現を評価した。

#### (4) 強制走行が関節軟骨中の HIF-1 $\alpha$ 産生に与える影響

*in vivo* において、mechanical stress が HIF-1 $\alpha$  の発現に与える影響を評価するために rat をトレッドミルマシン(TMS8D; MEQUEST 社)を用いて強制走行させ、膝関節軟骨における HIF-1 $\alpha$  産生を評価した。12週齢雄 Wistar rat を control 群, moderate running(12 m/min)群, excessive running(20 m/min)群の3群に分け、45分間の強制走行を行い、走行直後に安楽死させ、右膝関節を摘出した。パラフィン包埋後、膝関節内側を sagittal 面で切断、切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色, Safranin O 染色, HIF-1 $\alpha$  の免疫染色を施行し組織学的評価を行った。

#### (5) HIF-1 $\alpha$ 安定化が関節軟骨代謝に与える影響

*in vivo* において、関節軟骨中に存在する軟骨細胞での HIF-1 $\alpha$  が軟骨代謝に与える影響を評価するために、HIF-1 $\alpha$  の分解を制御するプロリン水酸化酵素(PHD)を阻害し、HIF-1 $\alpha$  を安定化する deferoxamine (DFX) を使用した。Wistar rat の右膝関節に PBS (n=7), DFX 300  $\mu$ M (n=9) を 50  $\mu$ L 関節内投与し、投与8時間後に sacrifice して関節軟骨を採取した。採取した関節軟骨を凍結破砕して total RNA を回収し realtime PCR で評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 伸展ストレス強度は20%, 刺激時間24時間は決定した. 同条件は軟骨細胞の viability に影響しなかった(図1).

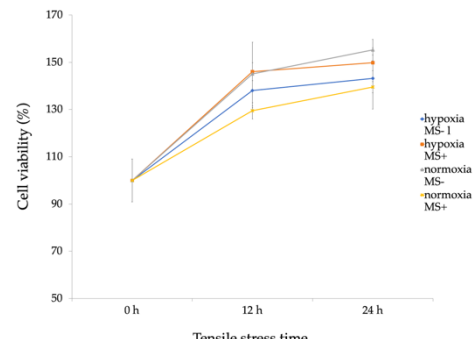


図1. 軟骨細胞の cell viability

(2) siHIF-1 $\alpha$  の発現は, 伸展ストレス刺激単独 (normoxia MS+群) および低酸素環境単独 (hypoxia MS-群) では変化しなかった. しかし, それらを同時に加える (hypoxia MS+群) ことで normoxia MS-群と比較して発現が有意に上昇した(図2). 軟骨細胞の代表的な anabolic factor である aggrecan の発現も HIF-1 $\alpha$  と同様であった(図2). これらのことから, 低酸素環境下では, HIF-1 $\alpha$  および aggrecan の発現は mechanical stress に応答し, 上昇することが分かった. 軟骨細胞の代表的な catabolic factor である MMP13 および ADAM-TS5 は, normoxia MS-群と比較して normoxia MS+群, hypoxia MS+群で有意に低下していた(図2). このことから, MMP13 および ADAM-TS5 の発現は酸素濃度に影響を受けず, 伸展ストレスに応答して低下することが分かった.

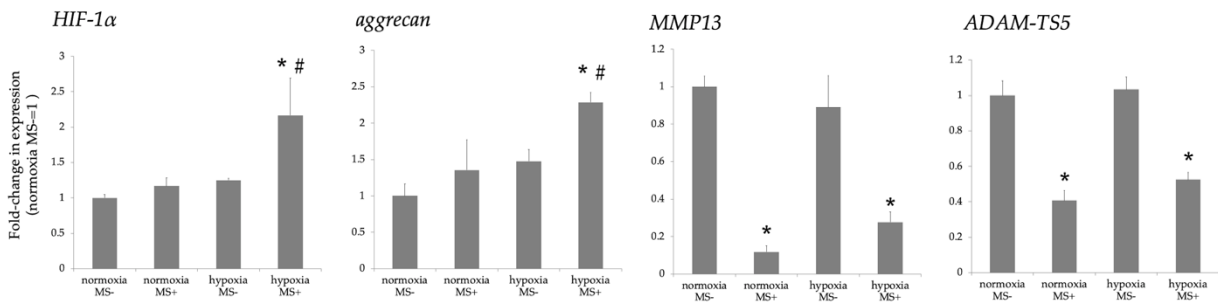


図2. 低酸素環境下における軟骨細胞の伸展ストレス応答

(3) siHIF-1 $\alpha$  導入による HIF-1 $\alpha$  の knockdown 効率は75%であった. siHIF-1 $\alpha$  の導入により, HIF-1 $\alpha$  および aggrecan の発現は減少し, ADAM-TS5 の発現は上昇した. さらに, si-HIF-1 $\alpha$  を導入し, 伸展ストレス刺激を加えると加えない場合と比較して HIF-1 $\alpha$  の発現は上昇した.

si-control を導入し, 伸展ストレス刺激を加えることで HIF-1 $\alpha$ , aggrecan の発現は上昇し, ADAM-TS5 の発現は減少した. しかし, si-HIF-1 $\alpha$  の導入により, aggrecan の発現上昇および ADAM-TS5 の発現減少は打ち消された(図3). これらの結果から, HIF-1 $\alpha$  は低酸素環境下で aggrecan および ADAM-TS5 の発現を制御している可能性, 低酸素環境下での aggrecan, ADAM-TS5 の伸展ストレス応答に関与している可能性がある.

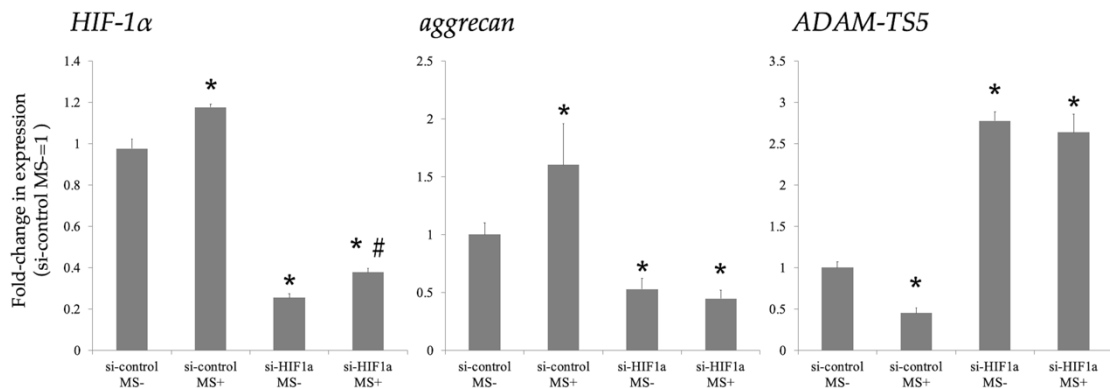


図3. 低酸素環境下での伸展ストレス応答に対する HIF-1 $\alpha$  の役割

(4) HE 染色, Safranin O 染色では, いずれの群間にも有意差はなかった. 関節軟骨中の軟骨細胞における HIF-1 $\alpha$  は, moderate running 群で増加していたが, excessive running 群で control 群と同程度であった(図4). すなわち, 関節軟骨中の軟骨細胞での HIF-1 $\alpha$  発現は中等度の mechanical stress によって増強し, 過剰な mechanical stress によって減少した. これらのことから, 関節軟骨の mechanical stress 応答に HIF-1 $\alpha$  が関与している可能性がある.

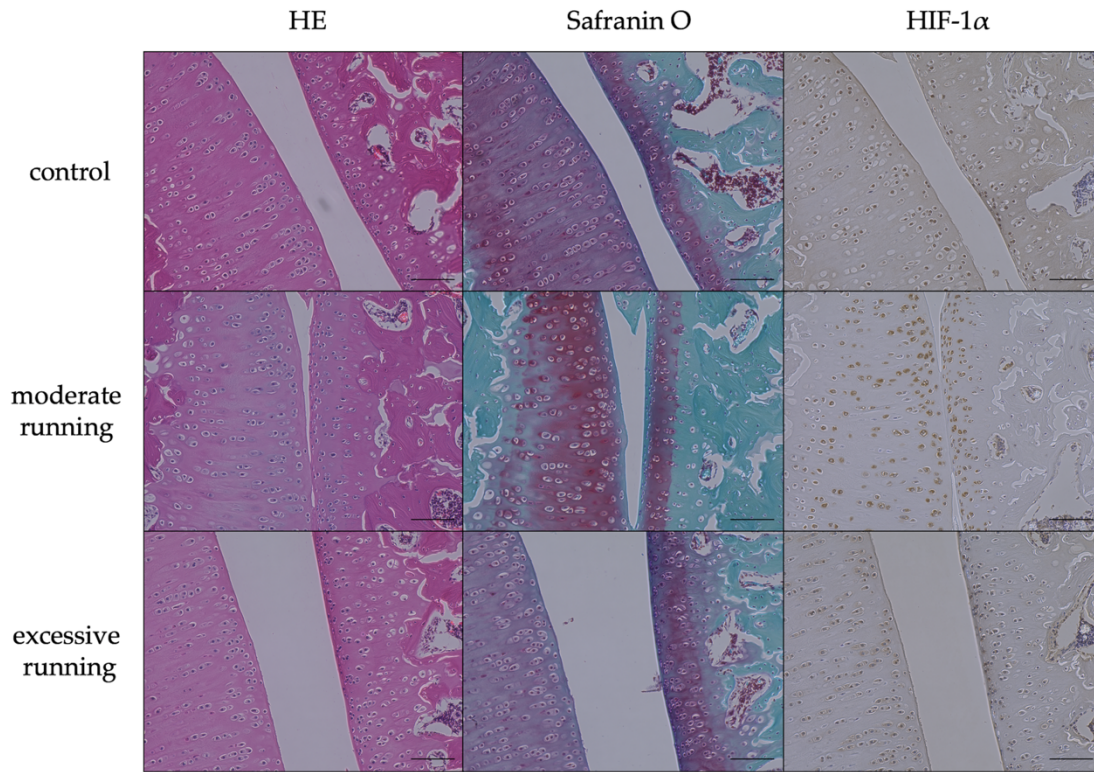


図 4. treadmill 走行が rat 膝関節軟骨細胞での HIF-1 $\alpha$  発現に与える影響

(5) DFX 投与 8 時間後には遺伝子レベルでは HIF-1 $\alpha$  の発現は変化していなかったが代表的な軟骨細胞の anabolic factor である aggrecan の発現は上昇していた(図 5). このことから、関節軟骨細胞中での HIF-1 $\alpha$  安定化は軟骨代謝に影響している可能性がある.

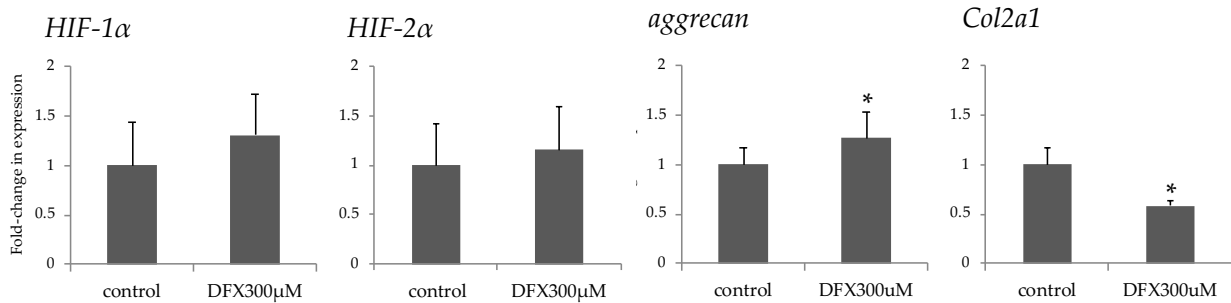


図 5. *in vivo* での HIF-1 $\alpha$  安定化が関節軟骨の軟骨代謝に与える影響

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujii Yuta, Inoue Hiroaki, Arai Yuji, Shimomura Seiji, Nakagawa Shuji, Kishida Tsunao, Tsuchida Shinji, Kamada Yoichiro, Kaihara Kenta, Shirai Toshiharu, Terauchi Ryu, Toyama Shogo, Ikoma Kazuya, Mazda Osam, Mikami Yasuo	4. 巻 20
2. 論文標題 Treadmill Running in Established Phase Arthritis Inhibits Joint Destruction in Rat Rheumatoid Arthritis Models	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5100 ~ 5100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20205100	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mizoshiri Naoki, Shirai Toshiharu, Terauchi Ryu, Tsuchida Shinji, Mori Yuki, Hayashi Daichi, Kishida Tsunao, Arai Yuji, Mazda Osam, Nakanishi Tohru, Kubo Toshikazu	4. 巻 42
2. 論文標題 The tetraspanin CD81 mediates the growth and metastases of human osteosarcoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cellular Oncology	6. 最初と最後の頁 861 ~ 871
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13402-019-00472-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimomura S, Inoue H, Arai Y, Nakagawa S, Fujii Y, Kishida T, Ichimaru S, Tsuchida S, Shirai T, Ikoma K, Mazda O, Kubo T	4. 巻 19
2. 論文標題 Treadmill Running Ameliorates Destruction of Articular Cartilage and Subchondral Bone, Not Only Synovitis, in a Rheumatoid Arthritis Rat Model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19061653	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Fujii Y, Inoue H, Arai Y, Nakagawa S, Tsuchida S, Shimomura S, Mazda O, Kubo T
2. 発表標題 HIF-1 in articular cartilage is up-regulated by treadmill running in vivo
3. 学会等名 21st World Congress of the Osteoarthritis Research Society International (OARSI) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fujii Y, Inoue H, Arai Y, Nakagawa S, Tsuchida S, Shimomura S, Mazda O, Kubo T
2. 発表標題 Histological evaluation of treadmill running on knee joint of rat arthritis model
3. 学会等名 26th Annual Meeting of European Orthopaedic Reserch Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤井雄太, 井上裕章, 新井祐志, 中川周士, 土田真嗣, 下村征史, 松田 修, 久保俊一
2. 発表標題 トレッドミル走行がラット関節炎モデルの膝関節に与える組織学的評価
3. 学会等名 第33回日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shimomura S, Inoue H, Arai Y, Nakagawa S, Tsuchida S, Ichimaru S, Fujii Y, Mazda O, Kubo T
2. 発表標題 Hypoxic Condition Promotes Differentiation From Human iPSC to Cartilage
3. 学会等名 65th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Seiji Shimomura, Hiroaki Inoue, Yuji Arai, Shuji Nakagawa, Shinji Tsuchida, Shohei Ichimaru, Osam Mazda, Toshikazu Kubo
2. 発表標題 The effect of treadmill running on knee articular cartilage in rats
3. 学会等名 20th World Congress of the Osteoarthritis Research Society International (OARSI) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Seiji Shimomura, Shinji Tsuchida, Yuji Arai, Shuji Nakagawa, Hiroaki Inoue, Shohei Ichimaru, Yuta Fujii, Osam Mazda, Toshikazu Kubo
2. 発表標題 Regulation of inflammatory cytokine expression and osteoclastgenesis by gap junctional protein in vitro and in vivo.
3. 学会等名 The 5th annual meeting of the international cytokine and interferon society (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Seiji Shimomura, Hiroaki Inoue, Yuji Arai, Shuji Nakagawa, Shinji Tsuchida, Shohei Ichimaru, Yuta Fujii, Osamu Mazda, Toshikazu Kubo
2. 発表標題 Effects of hypoxic conditions in differentiation of human iPSC to cartilage
3. 学会等名 64th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	久保 俊一  (Kubo Toshikazu)  (20178031)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授   (24303)	
研究分担者	中川 周士  (Nakagawa Shuji)  (30643382)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教   (24303)	
研究分担者	井上 裕章  (Inoue Hiroaki)  (60457968)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教   (24303)	