

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390404

研究課題名（和文）関節軟骨疾患治療に向けた関節内環境ストレス応答機構の解明

研究課題名（英文）The analysis of cellular stress response towards novel conservative therapies for joint disease

研究代表者

久保 俊一（KUBO TOSHIKAZU）

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：20178031

研究成果の概要（和文）：分子シャペロンである heat shock protein 70（HSP70）は、低酸素環境に対するストレス応答機構として軟骨細胞に誘導され、基質代謝を亢進し、細胞を保護していた。われわれは、関節軟骨に HSP70 を安全に、効率的に誘導する方法としてアミノ酸であるグルタミンを関節内注射し、すでに臨床応用されているマイクロ波で温熱刺激を加える方法を開発した。この HSP70 誘導療法は、動物実験で変形性関節症の進行を抑制した。グルタミンと温熱療法を併用した HSP70 誘導療法は変形性関節症の新規保存療法として臨床応用につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：When heat shock protein 70 (HSP70), a molecular chaperone, was induced in chondrocytes as a stress response mechanism under hypoxic condition, the expression of extracellular matrix gene were increased, and the chondrocytes were protected. We developed the efficiently and safe methods that supplementation of glutamine in combination with moderate heat treatment using a microwave applicator induced sufficient increased of HSP70 for therapeutic purposes in vivo. These findings showed that controlling HSP70 expression in the cartilage using supplementation of glutamine in combination with thermotherapy might offer a novel strategy for suppressing cartilage degeneration in osteoarthritis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2009 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2010 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：関節外科学，軟骨代謝学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：heat shock protein 70, ストレス応答機構, 変形性関節症, 低酸素, 温熱, グルタミン, マイクロウェーブ

## 1. 研究開始当初の背景

正常な関節軟骨では、常に外界からの刺激に応答しながら、修復や改変を通して環境に適応し、その構造と機能を維持している。変形性関節症（OA）では過剰な機械的・物理的

ストレスのために、刺激応答機構のバランスが破綻している可能性がある。われわれは、細胞内のストレス応答機構のなかで、heat shock protein (HSP) 70 をはじめとする分子シャペロンによる応答が、さまざまなストレ

スから細胞を防御し、過剰な刺激による損傷からの回復を促進することに注目し、研究を開始した。HSP70 がヒト軟骨細胞で OA の組織学的重症度と相関して発現している (Toshikazu Kubo, et al. Arthritis Rheum, 1985; Scand J Rheumatol, 1997; Osteoarthritis Cartilage, 1997) ことを明らかにし、OA の病態に HSP70 の発現が関与していることを明らかにした。

### (1) HSP70 の発現解析

HSP70 は非生理的なメカニカルストレスにより軟骨細胞に誘導され (Toshikazu Kubo, et al. J Orthop Res, 1997), 誘導された HSP70 が非生理的圧力から軟骨細胞を保護していた (Toshikazu Kubo, et al. J Orthop Res, 2006)。さらに、軟骨細胞に遺伝子を導入させ、HSP70 の発現を誘導することで、軟骨代謝が促進され (Toshikazu Kubo, et al. J Rheumatol, 1997), 細胞傷害性ストレスから軟骨細胞が保護されることを明らかにした (Toshikazu Kubo, et al. J Rheumatol, 2001; Arthritis Rheum, 2003)。しかし、培養軟骨細胞での研究結果が、必ずしも、生体関節内で反映されるものではなかった。これは、関節内固有の環境がストレス応答に影響している可能性を示している。関節軟骨は無血管組織であり、低酸素環境にある。軟骨細胞は代謝調節を行いながら低酸素環境に適応して生存している。細胞が低酸素へ適応するために低酸素誘導因子 hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) が重要な役割を果たしている。近年、HIF-1 $\alpha$  が低酸素以外にも圧力、酸化などのストレスに対する応答機構としても機能していることや、ショウジョウバエ Kc167 細胞で HIF-1 が HSP70 発現を誘導することが報告された。これらは、HSP70 の発現および機能に低酸素環境が大きく影響する可能性を示している。しかし、低酸素環境の軟骨細胞における HSP70 誘導および細胞保護作用の詳細な解析は行われていない。関節内特有の低酸素環境で、HSP70 を誘導する分子メカニズムの解明することは、効率的な HSP70 誘導療法を開発する基礎データとなる。

### (2) HSP70 誘導療法の開発と OA 治療効果

遊離アミノ酸であるグルタミン (Glu) が HSP70 を細胞内に誘導することに着目した。Glu による HSP70 の誘導が、細胞傷害性ストレスから培養軟骨細胞を保護することを明らかにした (Toshikazu Kubo, et al. Osteoarthritis Cartilage, 2006)。しかし、動物実験において、ストレスが負荷されていない状態では、Glu による HSP70 の誘導がなく、細胞保護効果は十分ではなかった。つまり、生体の関節内では Glu による HSP70 発現の誘導に影響する固有のストレス環境が存

在する可能性があると考えた。

一方、温熱療法は OA に対して臨床で広く用いられている。われわれは、動物実験でマイクロウェーブ照射器 (MW) を用いた温熱刺激により、HSP70 が関節内に誘導され、さらに関節軟骨の基質代謝を亢進させることを明らかにしてきた (Toshikazu Kubo, et al. J Orthop Res, 2007)。関節内に Glu と温熱刺激を併用することにより、HSP70 を安全に誘導できる可能性がある。

### 2. 研究の目的

(1) 低酸素環境における HSP70 の発現が、軟骨基質代謝および細胞保護効果に与える影響を検討する。

(2) Glu と温熱療法の併用による関節軟骨への効率的な HSP70 の誘導方法を開発し、動物 OA モデルに対する治療効果を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 低酸素環境における HSP70 発現メカニズムの解析とその効果

日本白色家兎の肩、膝、および股関節から単離した初代軟骨細胞を用いた。マルチガスインキュベーター (三洋電機機器・MCO-18M) を用いて、4 種類の酸素条件 (1%, 2%, 5%, および 20%) 下に、12 時間~48 時間単層培養した。また、20%の酸素条件下に HIF-1 $\alpha$  の誘導剤である塩化コバルト (CoCl<sub>2</sub>) を用いて擬似低酸素環境でも培養した。HIF-1 $\alpha$  あるいは HSP70 の抑制実験として、HIF-1 $\alpha$  あるいは HSP70 に対する特異的な siRNA (siHIF-1 $\alpha$  あるいは siHSP70) を導入した。HIF-1 $\alpha$  および HSP70 の遺伝子発現を real time RT-PCR 法で検討した。軟骨の基質代謝に対する影響として、プロテオグリカンコアプロテイン

(PG) および II 型コラーゲン (Col II) の遺伝子発現を解析した。NO 誘導性アポトーシス負荷に対する影響を検討するため、NO 誘導剤である sodium nitroprusside (SNP) (0.5mM) を添加し、細胞活性に lactate dehydrogenase (LDH) assay を用いた。termina dUTP nick end-labeling (TUNEL) 染色を行い、TUNEL 細胞陽性率を測定し、アポトーシスを評価した。

(2) HSP70 誘導療法の開発と OA 治療効果

*In vitro* では 9~11 週齢の日本白色家兎から単離した軟骨細胞を用いた。Gln 含有培地で培養した後、39°C の温熱刺激 (heat shock : HS) を 10 分間加えた。HSP70 の抑制実験では、siHSP70 およびケルセチン (quercetin : Que) を添加した。軟骨細胞から RNA を抽出し、real-time RT-PCR 法で HSP70 および aggrecan

の遺伝子発現を検討した。

*In vivo*では2.45GHzのMWを用いて8週齢のWistarラットの両膝に20W,40Wおよび60Wの温熱刺激を20分間加えた。それぞれの関節内温度を測定した。次に、無処置群、ラットの両膝にphosphate-buffered saline(PBS)を関節内投与する群(PBS群)、Gln(200mM)を関節内投与する群(Gln群)、MWを照射する群(MW群)およびMWとGlnを併用する群(MW+Gln群)に分け、Real-time RT-PCRを用いて、HSP70、aggrecanおよびCol IIの遺伝子発現を解析した。さらに、Queを用いたHSP70抑制試験を行った。ラットの左膝前十字靭帯を切離し、OAモデルを作製した。PBSを関節内投与する群(対照群)、MWとGlnを併用する群(MW+Gln群)、MWとGlnの併用にQueを関節内投与する群(MW+Gln+Que群)および膝関節を切開しただけのsham群に分けた。MWの照射とGlnの関節内投与は週2回の頻度で行い、4週経過後に左膝関節を採取した。Hematoxylin-eosin染色およびSafranin O染色を行った。Modified Mankin scaleを用いて軟骨変性の程度を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 低酸素環境におけるHSP70発現メカニズムの解析とその効果

① HIF-1 $\alpha$ およびHSP70の遺伝子発現は、定常酸素濃度(O<sub>2</sub>濃度20%)で培養した群に比べ、O<sub>2</sub>濃度1,2,5%で培養した群で亢進した。(図1A)また、低酸素濃度(O<sub>2</sub>濃度1%)で12時間以上培養したすべての群では、定常酸素環境で培養した群に比べ、HIF-1 $\alpha$ およびHSP70の遺伝子発現は、亢進した。(図1B)

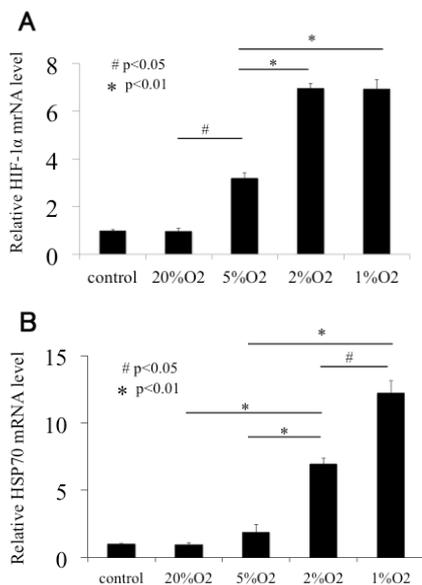


図1 低酸素環境がHIF-1 $\alpha$ およびHSP70に与える影響

② 定常酸素濃度でHIF-1 $\alpha$ の誘導剤(CoCl<sub>2</sub>)を用いた群は、無処置群と比べ、HSP70の遺伝子発現は増強した。(図2A) siHIF-1 $\alpha$ を導入した群では低酸素濃度で培養しても、HSP70の増強は認めなかった。(図2A)しかし、siHSP70を導入した群と低酸素濃度で培養した群で、HIF-1 $\alpha$ の発現に有意な差はなかった。(図2B)

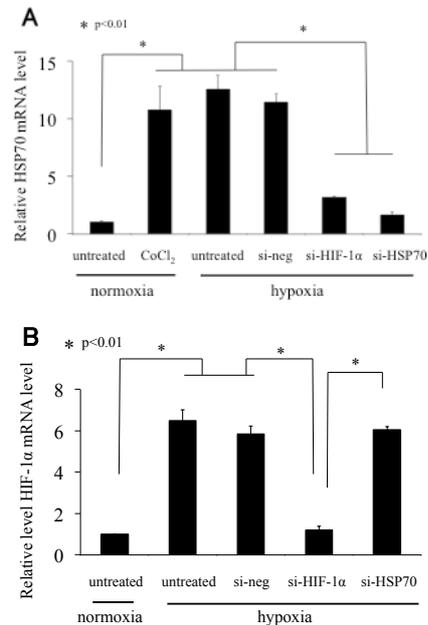


図2 HIF-1 $\alpha$ がHSP70に与える影響

③ PGおよびCol IIの遺伝子発現は、CoCl<sub>2</sub>を導入した群および低酸素環境で培養した群で有意に亢進した。それらの亢進は、siHIF-1 $\alpha$ あるいはsiHSP70を導入した群で消失した。(図3A, B)

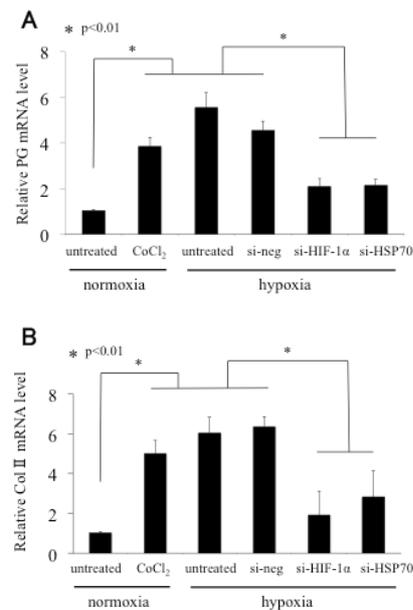


図3 低酸素環境およびHSP70が軟骨の基質代謝に対する影響

④ SNP によるアポトーシス誘導実験では、LDH 活性の吸光度は、低酸素濃度で培養した群は、定常酸素濃度で培養した群に比べ、有意に抑制された。siHIF-1 $\alpha$  および siHSP70 を導入した群では、その抑制を認めなかった。(図 4 A), TUNEL 陽性細胞の割合は、NO 負荷後に低酸素濃度で培養した群では、 $5.4 \pm 0.3\%$  であり、NO 負荷後に定常酸素濃度で培養した群では、 $19.1 \pm 1.0\%$  であり、低酸素濃度で培養することで、NO 誘導性のアポトーシスは抑制された。また、この作用は、siHIF-1 $\alpha$  および siHSP70 を導入した群では認めなかった。(図 4B)

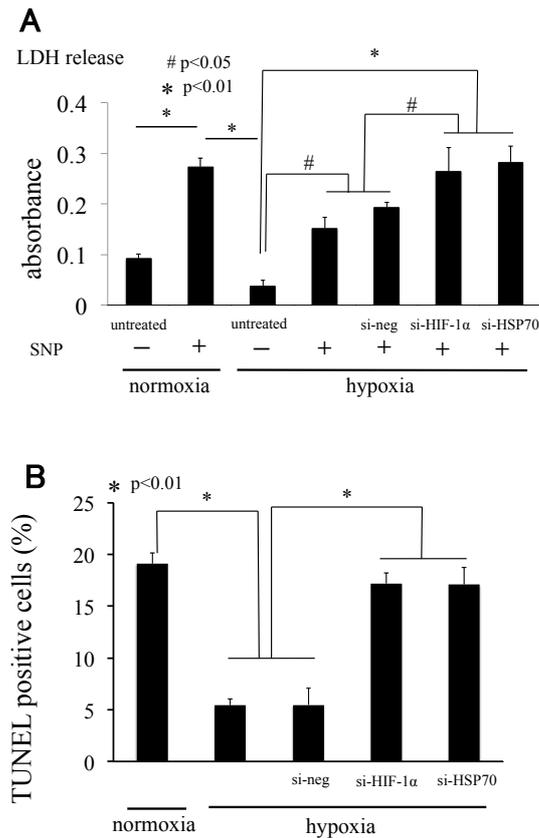


図 4 低酸素環境および HSP70 が NO 誘導性のアポトーシスに及ぼす影響

培養軟骨細胞において HSP70 は、低酸素環境で誘導され、HIF-1 $\alpha$  により制御されていた。また低酸素環境では軟骨基質代謝が亢進し、NO 誘導性のアポトーシスが抑制された。これらの作用は、HIF-1 $\alpha$  および HSP70 により制御されていた。

関節軟骨は無血管組織であるため、低酸素環境下にある。軟骨細胞が低酸素環境下でも生存するために、HSP70 がストレス応答機構として、軟骨細胞に誘導され、細胞を保護している可能性がある。

(2) HSP70 誘導療法の開発と OA 治療効果

① HSP70 の発現は、HS のみおこなった群と比べて、siHSP70 を添加した群では 68%, Que を添加した群では 33%低下していた。(図 5 A) aggrecan の発現も HS のみおこなった群と比べて、siHSP70 を添加した群では 56%, Que を添加した群では 44%低下していた。(図 5 B)

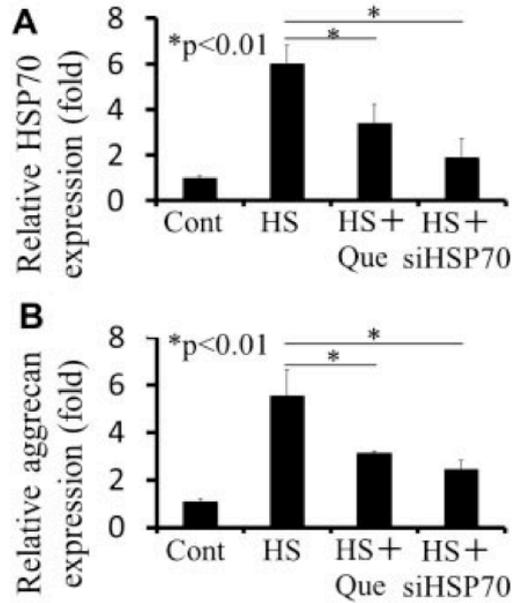


図 5 siHSP70 と Que による遺伝子発現抑制効果

② MW の強度 0, 20, 40 および 60W で関節内温度はそれぞれ  $32.7 \pm 0.3^\circ\text{C}$ ,  $36.2 \pm 0.34^\circ\text{C}$ ,  $38.3 \pm 0.22^\circ\text{C}$ ,  $43.2 \pm 1.12^\circ\text{C}$  であった。以後の実験では MW の強度を 40W とした。(図 6)

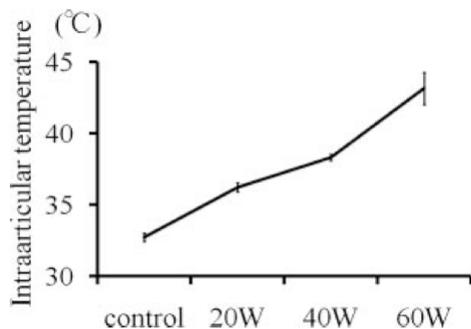


図 6 適切な温熱刺激の強度設定

③ PBS 群と Gln 群では HSP70 と aggrecan の遺伝子発現は変化しなかった。MW 群では HSP70 と aggrecan の発現は無処置群と比べ増加したが、有意ではなかった。MW+Gln 群で HSP70 と aggrecan の発現は有意に増加した。(図 7 A, B) Col II の発現は MW 群や MW+Gln 群でも増加しなかった。(図 7 C)

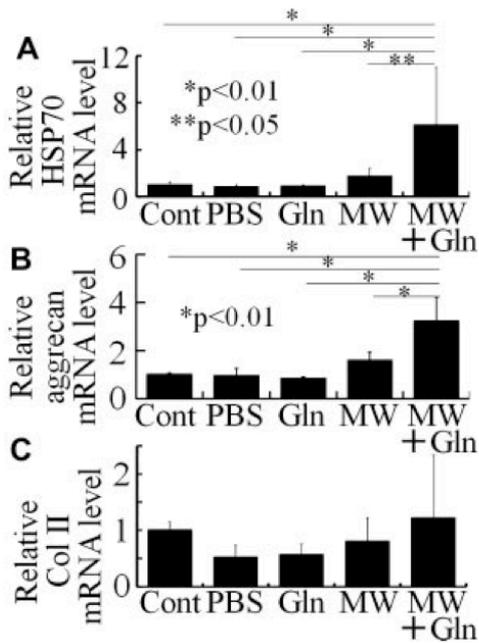


図7 MWとGlnの併用によるHSP70, aggrecanおよびCol IIの遺伝子発現

④ Que単独投与によりHSP70およびaggrecanの遺伝子発現は影響されなかった。MW+Gln群にQueを投与すると、HSP70とaggrecanの発現増加は消失した。(図8A, B)

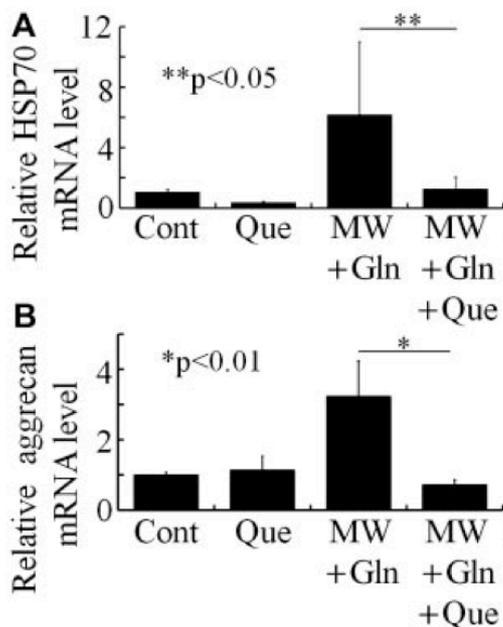


図8 HSP70によるaggrecanの発現への影響

⑤ 組織学的評価では、対照群に関節軟骨表層に不整はみられなかったが、軟骨基質のSafranin Oの染色性が低下していた。MW+Gln群では軟骨基質の染色性が保たれており、軟

骨基質の破壊が抑制されていた。(図9A) OAの重症度は対照群に比べてMW+Gln群で軽度であった。MW+Gln+Que群では軟骨基質の染色性が低下し、MWとGlnの併用による治療効果は消失した。OAの重症度はMW+Gln群に比べて増悪し、対照群と同程度であった。(図9B)

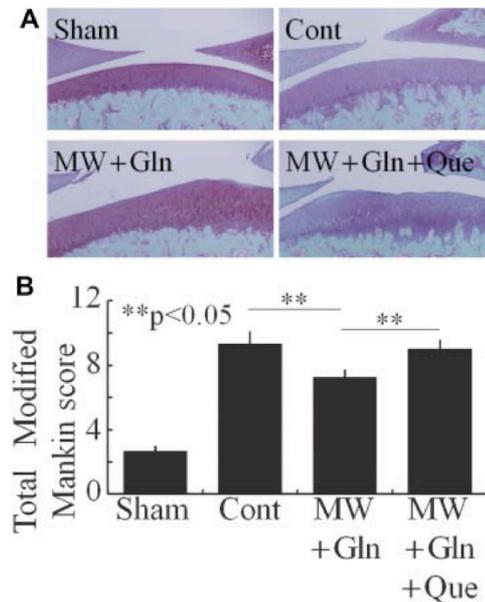


図9 GluとMWの併用療法によるOAの進行抑制効果

GluとMWの併用がHSP70を誘導し、軟骨代謝を活性化させ、動物モデルに対してOAの進行を抑制する効果をもつことが明らかとなった。またsiHSP70またはQueを用いた実験において、GluとHSの併用効果が消失した。これらの効果にはHSP70が関与している可能性がある。

温熱療法は臨床で広く行われており、Glnの投与は簡便かつ安全・安価である。GluとMWの併用による軟骨細胞のHSP70誘導は臨床応用につながる可能性がある。

## 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4件)

- ① Hitoshi Tonomura, Kenji A. Takahashi, Osam Mazda, Yuji Arai, Masaharu Shin-Ya, Atsuo Inoue, Kuniaki Honjo, Tatsuya Hojo, Jiro Imanishi, Toshikazu Kubo, Effects of heat stimulation via microwave applicator on cartilage matrix gene and HSP70 expression in the rabbit knee joint, Journal of Orthopaedic Reseach, 査読有, Vol. 26,

2008, p34-41

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jor.20421/abstract;jsessionid=C846DE7EF515F96FD6959D9EDB20BDBA.d03t02>

- ② Kenji A. Takahashi, Hitoshi Tonomura, Yuji Arai, Ryu Terauchi, Kuniaki Honjo, Nobuyuki Hiraoka, Tatsuya Hojo, Taisuke Kunitomo, Toshikazu Kubo, Hyperthermia for the treatment of articular cartilage with osteoarthritis, International Journal of Hyperthermia, 査読有, Vol.25, No8, 2009, p661-667  
<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/02656730903107519>
- ③ Shuji Nakagawa, Yuji Arai, Osam Mazda, Tsunao Kishida, Kenji A. Takahashi, Kei Sakao, Masazumi Saito, Kuniaki Honjo, Jiro Imanishi, Toshikazu Kubo, N-Acetylcysteine Prevents Nitric Oxide-Induced Chondrocyte Apoptosis and Cartilage Degeneration in an Experimental Model of Osteoarthritis, Journal of Orthopaedic Research, 査読有, Vol.28, 2010, p156-163  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jor.20976/abstract>
- ④ Shinya Fujita, Yuji Arai, Shuji Nakagawa, Kenji A. Takahashi, Ryu Terauchi, Atsuo Inoue, Hitoshi Tonomura, Nobuyuki Hiraoka, Hiroaki Inoue, Shinji Tsuchida, Osam Mazda, Toshikazu Kubo, Combined microwave irradiation and intraarticular glutamine administration-induced HSP70 expression therapy prevents cartilage degradation in a rat osteoarthritis model, Journal of Orthopaedic Research, 査読有, Vol.30, 2012, p401-407  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jor.21535/abstract>

[学会発表] (計4件)

- ① Shinji Tsuchida, Yuji Arai, Ryu Terauchi, Kuniaki Honjo, Shuji Nakagawa, Nobuyuki Hiraoka, Hiroaki Inoue, Masazumi Saito, Osam Mazda, Tsunao Kishida, Toshikazu Kubo, Effect of hypoxia on cartilage matrix gene and heat shock protein 70 expression in cultured chondrocytes, 57th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, 2011.1.13-16, Long Beach Convention Center (Long Beach, CA, USA)
- ② Shinji Tsuchida, Yuji Arai, Ryu Terauchi, Kuniaki Honjo, Hiroaki Inoue, Masazumi Saito, Osam Mazda, Toshikazu

Kubo, Effect of hypoxia on the expression of cartilage matrix gene and heat shock protein 70 in cultured chondrocytes, 14th World Congress of the Osteoarthritis Research Society International (OARSI), 2011.9.15-18, Hilton San Diego Bayfront (San Diego, CA, USA)

- ③ 土田真嗣, 新井祐志, 寺内 竜, 本城邦晃, 中川周士, 平岡延之, 井上裕章, 齊藤正純, 久保俊一, 低酸素環境が HSP70 と軟骨細胞外基質合成に与える影響, 第24回日本軟骨代謝学会, 2011.3.5, 九州大学医学部百年講堂 (福岡県)
- ④ 土田真嗣, 新井祐志, 寺内 竜, 本城邦晃, 中川周士, 平岡延之, 井上裕章, 齊藤正純, 松田 修, 久保俊一, 低酸素環境および HIF-1 $\alpha$  が培養軟骨における HSP70 と軟骨細胞外基質合成に与える影響, 第26回日本整形外科学会基礎学術集会, 2011.10.21, ベイシア文化ホール (群馬県)

[その他]

ホームページ等

<http://www.kpu-m.ac.jp/k/orthoped/about/clinic.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

久保 俊一 (KUBO TOSHIKAZU)  
京都府立医科大学・医学研究科・教授  
研究者番号: 20178031

### (2) 研究分担者

新井 祐志 (ARAI YUJI)  
京都府立医科大学・医学研究科・講師  
研究者番号: 50347449  
高橋 謙治 (TAKAHASHI KENJI)  
京都府立医科大学・医学研究科・講師  
研究者番号: 50347449

(H20→H22: 連携研究者)

### (3) 連携研究者