

機関番号：17401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591784

研究課題名 (和文) 変性関節軟骨細胞における小胞体ストレスの発生機序とその病態生理に関する研究

研究課題名 (英文) Pathogenesis and pathological role of endoplasmic reticulum stress in cartilage degeneration

研究代表者

水田 博志 (MIZUTA HIROSHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：60174025

研究成果の概要 (和文)：

軟骨細胞内に蓄積した糖化最終産物 (AGEs) は小胞体ストレスを惹起し、軟骨細胞機能の障害とアポトーシスを誘導することがラットの軟骨細胞培養系と生体系で実証された。さらにヒト軟骨細胞でも同様な結果が得られたが、変性軟骨細胞では正常軟骨細胞に比べて、AGEs 蓄積による小胞体ストレス発生の感受性が高いことが示された。細胞内に蓄積した AGEs により引き起こされる小胞体ストレスは軟骨変性の新たな進行機序として認識される。

研究成果の概要 (英文)：

Endoplasmic reticulum stress (ER stress) induced by intracellular advanced glycation end products (AGEs) caused chondrocyte dysfunction and apoptosis in vitro and in vivo study of rats. Human osteoarthritic chondrocytes were more sensitive to AGEs-induced ER stress than normal chondrocytes. These pathological responses are recognized as a new mechanism of the cartilage degeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：糖化最終産物、小胞体ストレス、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 (OA) は軟骨基質の破壊により進行するが、その過程には軟骨細胞の代謝変化や細胞死が大きな役割を果たしている。

小胞体ストレスは糖尿病や神経変性疾患など種々の疾患に関与することが報告されている。小胞体ストレスを受けた細胞では、1) 分子シャペロンの誘導、2) 翻訳抑制、3) ユビキチン・プロテアソーム系による異常蛋白の除去 (ERAD) の3つのストレス応答が誘導され、細胞の生存が試みられる。しかし、小胞体ス

トレスが持続すると CHOP が誘導され、細胞はアポトーシスに陥ることから、軟骨細胞死の発生に関与している可能性も考えられる。

一方、OA の発症には機械的負荷、解剖学的異常、遺伝的素因など複雑な要因が関与しているが、その最大の危険因子は加齢である。近年、加齢と OA を関連づける key factor として糖化最終産物 (AGEs) が注目されている。AGEs は、細胞外マトリックスの架橋形成により軟骨基質の物性を変化させるとともに、AGEs 受容体 (RAGE) を介した軟骨細胞への生

物学的作用により OA の発症に関与するとされているが、その詳細はなお不明である。

近年、線維芽細胞培養系に AGEs 前駆体を添加すると細胞内に AGEs が生成され、プロテアソームの分解作用に抵抗すること、また AGEs 前駆体を添加したヒト胚性腎細胞培養系では細胞のユビキチン化が増加することなどが報告され、AGEs の細胞内蓄積が小胞体ストレスの発生に関与していることが示唆されている。

以上の背景を受けて、われわれは軟骨細胞に蓄積された AGEs が小胞体ストレスを惹起し、これがストレス応答の限界を超えることで細胞死を引き起こすという仮説をたてた。

2. 研究の目的

上記の仮説を検証することを目的として、(1)AGEs の細胞内蓄積と、それに伴う小胞体ストレスの発生およびアポトーシスをラット正常軟骨細胞培養系で解析した。次に、(2)ラット生体において、関節軟骨細胞への AGEs 蓄積と小胞体ストレスの発生、そしてそれらに関連して軟骨変性が生じるかを検討した。さらに、(3)ヒト軟骨細胞培養系において、AGEs の細胞内蓄積による小胞体ストレスとアポトーシスの変化を評価し、正常軟骨細胞と変性軟骨細胞との反応性の違いを比較検討した。

3. 研究の方法

(1)ラット正常関節軟骨細胞培養系における解析

5 週齢 Wistar rat より関節軟骨を採取し、トリプシン・コラゲナーゼ処理にて軟骨細胞を分離後、DMEM 培地で培養し、1 週後に culture slide と 24 well plate、6 well plate に継代培養した。AGEs 前駆体であるリボース (RB) 20mM、グリコルアルデヒド (GA) 300 μ M を培養液に添加し、おのおの 6 日後と 2 日後に culture slide をパラホルムアルデヒド (PFA) 固定し、24 well plate、6 well plate からは軟骨細胞を回収して RNA と細胞蛋白質を抽出した。対照には小胞体ストレス誘発物質であるツニカマイシン (Tn) 10 μ g/ml を 1 日間添加した培養系を用いた。

① 細胞内 AGEs 蓄積の評価：culture slide の軟骨細胞を抗 AGEs 抗体 6D12 で免疫細胞科学的に評価した。

② 小胞体ストレスの評価：RT-PCR により、*Chop* および活性型 *Xbp1* の mRNA 発現を解析した。ウェスタンブロット (WB) 法で、細胞蛋白質のユビキチン化を解析した。

③ 軟骨細胞機能の評価：RT-PCR により、II 型コラーゲン、およびアグリカンの mRNA 発現を解析した。

④ アポトーシスの評価：細胞蛋白質を用い、ELISA 法でアポトーシスを定量的に評価した。

(2)ラット in vivo モデルにおける解析

8 週齢 Wistar rat の右膝関節内に RB (2 μ mol、週 2 回、7 週間) あるいは GA (3 μ mol、連日、7 日間) を注入し (各 5 匹)、その 1 週後に屠殺し膝関節を摘出した。摘出した膝関節を PFA 固定し、脱灰後、パラフィン標本を作製した。また、別の各 5 匹を屠殺して摘出した膝関節軟骨を粉砕して RNA を抽出した。GA 群のみはさらに、別の各 5 匹の関節軟骨より蛋白を抽出した。リン酸緩衝生理食塩水を同様に関節内に注入した膝関節軟骨を上記実験群の対照として用いた。

① 軟骨細胞の AGEs 蓄積評価：パラフィン標本を用いて、抗 AGEs 抗体 6D12 により免疫組織学的に AGEs を検出した。また、軟骨蛋白質を用い、WB 法で AGEs を定量的に評価した (GA 群のみ)。

② 小胞体ストレスの評価：抽出した RNA を用いて、*Chop* と活性型 *Xbp1* の mRNA 発現を RT-PCR 法で解析した。パラフィン標本を用いて、抗ユビキチン抗体により免疫組織学的に軟骨細胞のユビキチン蓄積を検出した。

③ アポトーシスの評価：パラフィン標本を用いて、TUNEL 染色により軟骨細胞のアポトーシスを解析した。

④ 関節軟骨の変性と軟骨細胞機能の評価：パラフィン切片の H-E 染色とサフラニン-O 染色により軟骨変性を組織学的に評価した。抽出した RNA を用いて、II 型コラーゲンとアグリカンの mRNA 発現を RT-PCR 法で解析した。

(3)ヒト軟骨細胞培養系における解析

ヒト正常軟骨細胞 (NHAC-kn) および変性軟骨細胞を 3 群に分け、それぞれ 24 well plate、6 well plate、culture slide に DMEM 培地で培養した。変性軟骨細胞は人工膝関節置換術を施行した変形性関節症症例において、切除した脛骨関節面より高度変性部ならびに軽度変性部の軟骨を採取し、酵素処理により軟骨細胞を分離して用いた。

RB (200mM) または GA (1000 μ M) を培養液に添加し、おのおの 2 日後と 1 日後に 24 well plate、6 well plate からは軟骨細胞を回収して RNA と細胞蛋白質を抽出し、culture slide は PFA 固定を行った。

① 細胞内 AGEs 蓄積の評価：culture slide の軟骨細胞を抗 AGEs 抗体 6D12 で免疫細胞科学的に評価した。WB 法で細胞蛋白質の AGEs 蓄積を定量的に評価した。

② 小胞体ストレスの評価：RT-PCR 法により、*CHOP* および活性型 *XBPI* の mRNA 発現量を解析した。WB 法で細胞蛋白質のユビキチン化を解析した。

③ 軟骨細胞機能の評価：RT-PCR 法により、II 型コラーゲンおよびアグリカンの mRNA 発現量を評価した。

④ アポトーシスの評価：culture slide の軟

骨細胞を用い、TUNEL 染色でアポトーシスを評価した。

4. 研究成果

(1) ラット正常関節軟骨細胞培養系における解析結果

① 細胞内 AGEs 蓄積の評価

RB 投与群は 4 日後と 6 日後に細胞内 AGEs の蓄積を認め、6 日間投与が強かった (図 1)。GA 投与群では 2 日後に AGEs 蓄積を認めた。

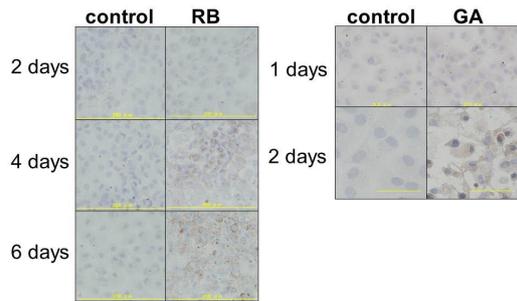


図1: AGEs蓄積(免疫染色)

以下、RB 6 日間、GA 2 日間投与による実験を行った。

② 小胞体ストレスの評価

Tn 刺激により *Chop* mRNA は 4.1 倍、活性型 *Xbp1* mRNA は 5.3 倍、ユビキチン化蛋白の発現量は 9.6 倍とそれぞれ増加した ($p < 0.05$) (図 2, 3)。RB 投与により、*Chop* mRNA 発現は 1.7 倍 ($p < 0.05$) に増加したが、活性型 *Xbp1* mRNA 発現とユビキチン化蛋白量は control と差がなかった。一方、GA 投与では、*Chop* mRNA 1.9 倍、活性型 *Xbp1* mRNA 4 倍、ユビキチン化蛋白 1.9 倍とそれぞれ増加した ($p < 0.05$)。

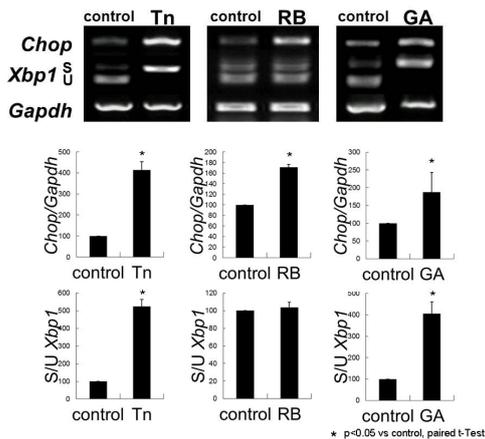


図2: 小胞体ストレスマーカー (RT-PCR; *Chop*, *Xbp1*)

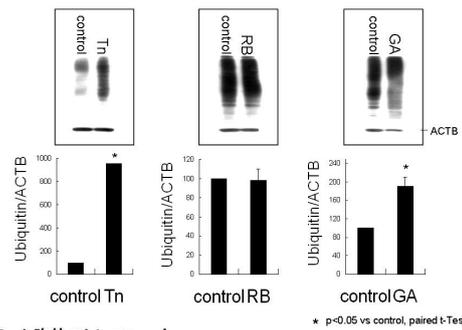


図3: 小胞体ストレスマーカー (ウエスタンブロット; ユビキチン)

③ 軟骨細胞機能の評価

Tn 投与による II 型コラーゲン mRNA 発現は control と差がなく、アグリカン mRNA 発現は 72% に低下した ($p < 0.05$) (図 4)。RB 投与では、II 型コラーゲンとアグリカンの mRNA 発現は 81% と 33% に、GA 投与では 69% と 0% にそれぞれ低下した ($p < 0.05$)。

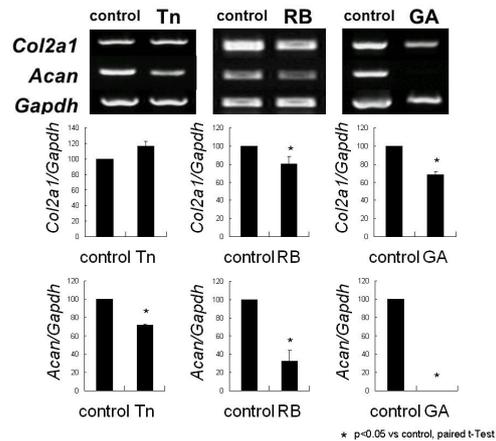


図4: 軟骨細胞機能 (RT-PCR; II型コラーゲン、アグリカン)

④ アポトーシスの評価

アポトーシスの頻度は、Tn 投与では 9.6 倍、GA 投与では 11 倍の増加を認め ($p < 0.05$)、RB 投与では control と有意な差がなかった (図 5)。

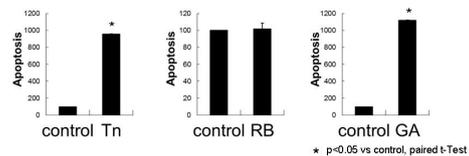


図5: アポトーシス (ELISA)

⑤ 小括

ラット培養軟骨細胞において、AGEs 前駆体の刺激により、細胞内に AGEs を蓄積することが確認された。そして蓄積した細胞内 AGEs により小胞体ストレスが発生し、軟骨細胞の機能

障害とアポトーシスが誘導された。

(2)ラット in vivo モデルにおける解析結果

① 軟骨基質および軟骨細胞の AGEs 蓄積評価
免疫染色では、RB、GA 投与ともに、ほぼ全ての軟骨細胞が染色され、軟骨基質は染色されなかった (図 6)。

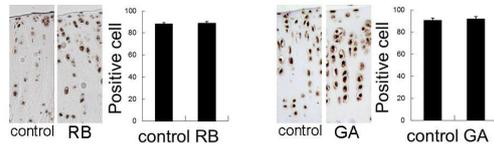


図6: AGEs蓄積 (免疫染色)

WB 法では GA 投与により AGEs 蓄積が 1.3 倍に増加した ($p < 0.05$) (図 7)。

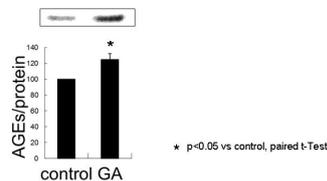


図7: AGEs蓄積 (ウエスタンブロット)

② 小胞体ストレスの評価

RB 投与では *Chop* と活性型 *Xbp1* mRNA およびユビキチン化蛋白の発現は control と差がなかったが、GA 投与ではそれぞれ 2.5 倍、1.4 倍、1.3 倍に増加した ($p < 0.05$) (図 8)。

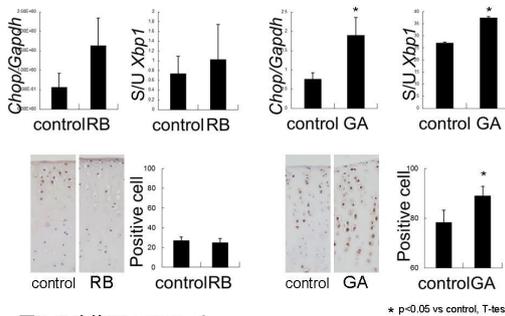


図8: 小胞体ストレスマーカー

上: RT-PCR (real-time RT-PCR; *Chop*, RT-PCR; *Xbp1*)
下: ユビキチン化蛋白免疫染色

③ アポトーシスの評価

アポトーシスの頻度は RB 投与では有意な変化がなく、GA 投与では 4.7 倍に増加した ($p < 0.05$) (図 9)。

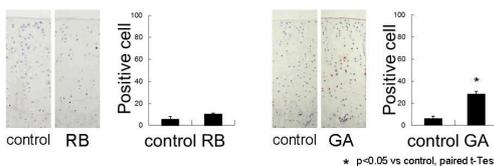


図9: アポトーシス (TUNEL染色)

④ 関節軟骨の変性と軟骨細胞機能の評価

H-E 染色で軟骨構造と軟骨細胞形態は、RB、GA 投与ともに control 群と同じく正常だった (図 10)。プロテオグリカン含有量を示すサフランin-O の染色性も control 群と比べて違いはなく、組織学的に軟骨変性は認めなかった。

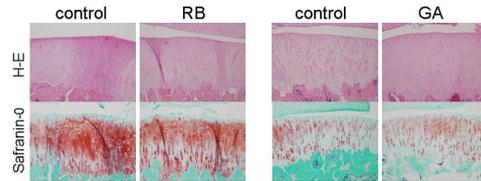


図10: 組織学的評価 (H-E染色・サフランin-O染色)

RB 投与により、II型コラーゲンとアグリカンの mRNA 発現に有意な変化を認めなかったが、GA 投与では II型コラーゲン mRNA の発現が 47%に低下した ($p < 0.05$) (図 11)。

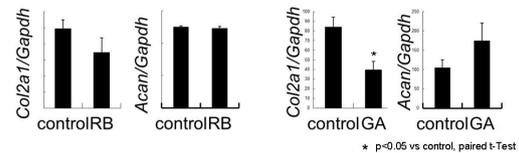


図11: 細胞機能 (real-time RT-PCR: II型コラーゲン, アグリカン)

⑤ 小括

ラット膝関節への GA 投与により、軟骨細胞内に AGEs が蓄積し、小胞体ストレスの発生、軟骨細胞機能の障害、およびアポトーシスの誘導が確認された。

(3) ヒト軟骨細胞培養系における解析結果

① 細胞内 AGEs 蓄積の評価

ヒト正常培養軟骨細胞 NHAC-kn において、RB では 200mM 2 日間、GA では 1000 μ M 1 日間の刺激で、免疫染色法により細胞内 AGEs 蓄積が確認された (図 12)。

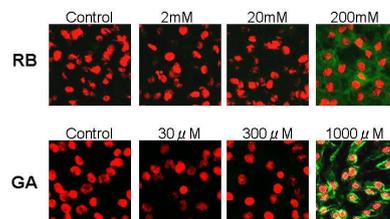


図12: AGEs蓄積 (免疫染色)

NHAC-knをRBで2日間、もしくはGAで1日間刺激

上記の条件で変性軟骨細胞を刺激した結果、正常軟骨細胞と同様に細胞内 AGEs の蓄積が確認された (図 13)。

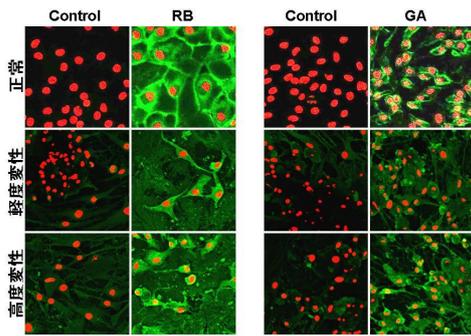


図13: AGEs蓄積(免疫染色)

WB法による評価では、RBとGAの投与により、正常群におけるAGEsの蓄積はそれぞれ9.2倍と9.0倍に増加した ($p < 0.05$) (図14)。軽度変性群では、RBとGAの投与によりそれぞれ3.2倍と4.7倍、高度変性群ではそれぞれ5.6倍と6.1倍にAGEsの蓄積が増加した ($p < 0.05$)。軽度変性群と高度変性群のAGEs蓄積に有意差はなかったが、正常群と比較すると両変性群は、RBとGAともにAGEs蓄積が少なかった ($p < 0.05$)。

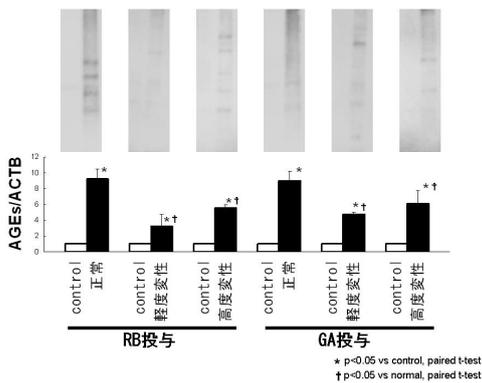


図14: AGEs蓄積(ウエスタンブロット)

② 小胞体ストレスの評価

正常群では、RB投与により *CHOP* mRNA と活性型 *XBPI* mRNA およびユビキチン化蛋白の発現はそれぞれ17.0倍、6.6倍、2.1倍に増加しており ($p < 0.05$)、GA投与ではそれぞれ1.4倍、5.6倍、1.9倍に増加した ($p < 0.05$) (図15, 16)。軽度変性群と高度変性群の *CHOP* mRNA 発現は、RB投与により6.0倍、6.4倍に増加し、活性型 *XBPI* mRNA は12.0倍、28.1倍に、ユビキチン化蛋白発現は2.8倍、2.6倍にそれぞれ増加した ($p < 0.05$)。また、GA投与では軽度変性群および高度変性群の *CHOP* mRNA 発現が3.3倍と3.9倍に増加し、活性型 *XBPI* mRNA が166.0倍と20.9倍、ユビキチン化蛋白発現が3.7倍と6.5倍にそれぞれ増加した ($p < 0.05$)。

軽度変性群と高度変性群の比較では、RB投与による小胞体ストレスマーカーの発現に有意な差はなかったが、GA投与では高度変性群で活性型 *XBPI* mRNA の発現が低く、ユビキチン

化蛋白の発現が高かった ($p < 0.05$) (図15, 16)。正常群と変性群を比較すると、RB投与では *CHOP* mRNA の発現が両変性群とも正常群より低く ($p < 0.05$)、逆にGA投与では *CHOP* と活性型 *XBPI* の mRNA、ユビキチン化蛋白の発現は両変性群の方が高かった ($p < 0.05$)。

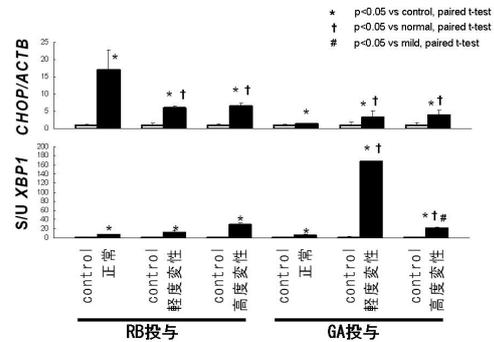


図15: 小胞体ストレスマーカー (real-time RT-PCR; *CHOP*, RT-PCR; *XBPI*)

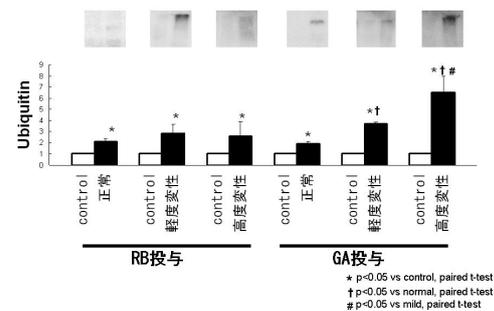


図16: 小胞体ストレスマーカー(ウエスタンブロット;ユビキチン)

③ 軟骨細胞機能の評価

RBとGAの投与により、正常群でII型コラーゲンとアグリカンの mRNA 発現量は低下したが ($p < 0.05$)、軽度変性群と高度変性群では control と有意な差を認めなかった (図17)。変性群間での比較では、II型コラーゲンとアグリカンの mRNA 発現に有意な差はみられなかったが、正常群との比較では、GA投与によるII型コラーゲン mRNA の発現が両変性群で有意に低かった ($p < 0.05$)。

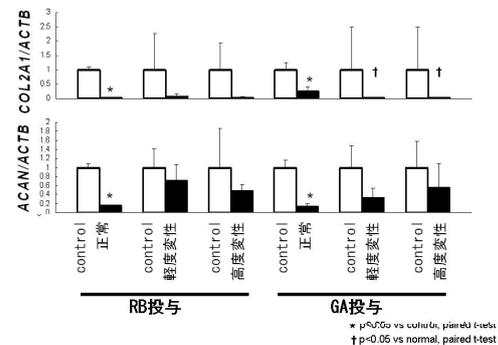


図17: 細胞機能 (real-time RT-PCR; II型コラーゲン、アグリカン)

④ アポトーシスの評価

RB または GA の刺激により、3 群とも TUNEL 陽性細胞率が増加した ($p < 0.05$) (図 18)。軽度変性群と高度変性群の陽性細胞率は、RB と GA どちらの投与でも有意差はなかったが、正常群と変性群を比較すると、RB 刺激では両変性群が正常群より陽性細胞率は低く ($p < 0.05$)、逆に GA 刺激では両変性群が高かった ($p < 0.05$)。

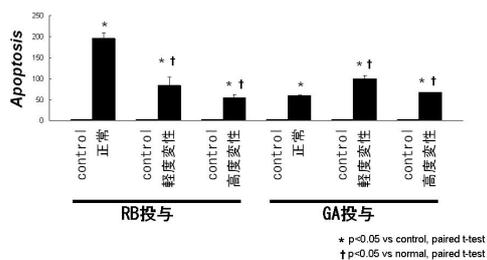


図 18: アポトーシス (TUNEL 染色)

⑤ 小括

ヒト正常軟骨細胞においても、RB または GA の投与により細胞内に AGEs が蓄積し、小胞体ストレスの発生、軟骨細胞機能の障害およびアポトーシスの誘導が確認された。変性軟骨細胞でも同様の变化を認めたが、正常軟骨細胞と比較して、GA 投与による AGEs の蓄積は少ないにも関わらず、小胞体ストレス応答やアポトーシスの発生頻度は高かった。この結果から、変性軟骨細胞では細胞内 AGEs の蓄積に対する小胞体ストレス発生の感受性が高いことが推察された。

(4) 研究成果のまとめ

本研究により、軟骨細胞内に AGEs が蓄積すると小胞体ストレスが発生し、軟骨細胞機能が障害され、アポトーシスが誘導されるとするわれわれの仮説を実証することができた。国内外において、軟骨細胞内に蓄積する AGEs の作用を検討した報告はこれまでなく、細胞内に蓄積した AGEs による小胞体ストレスの誘導と軟骨細胞死の関連性を明らかにした本研究は、軟骨変性の病態解明において重要な意義を持ち、軟骨変性進行の新たな機序を見出したものと考えられる。今後は、OA の進行を抑制しうる新たな治療法の開発をめざして、AGEs 蓄積の阻害や小胞体ストレスの発生抑制が軟骨変性の進行に与える影響について研究を進めていく予定である。

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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 水田博志: 変形性関節症の病態と治療 ~

新たな治療法の可能性を求めて～、第 38 回日本関節病学会、2010 年 11 月 18 日、ウエスティン都ホテル京都 (京都)

- ② 山部聡一郎、廣瀬隼、高田興志、砥上若菜、水田博志: 糖化最終産物の軟骨細胞内蓄積は小胞体ストレス応答を介してアポトーシスを誘導する、第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会、2010 年 10 月 15 日、国立京都国際会館 (京都)
- ③ 高田興志、廣瀬隼、仙波圭、山部聡一郎、水田博志: 軟骨変性において軟骨細胞内の糖化最終産物は小胞体ストレスを惹起する、第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会、2009 年 11 月 6 日、パシフィコ横浜 (横浜)
- ④ 高田興志、水田博志、廣瀬隼、仙波圭: 糖化最終産物の軟骨細胞内蓄積は小胞体ストレスを誘導する、第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会 2008 年 10 月 24 日、国立京都国際会館 (京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水田 博志 (MIZUTA HIROSHI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号: 60174025

(2) 研究分担者

廣瀬 隼 (HIROSE JUN)
熊本大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 40433007
仙波 圭 (SENBA KEI)
熊本大学・医学部附属病院・医員
研究者番号: 00398190