

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592267

研究課題名(和文) 軟骨変性と軟骨再生過程における低分子量蛋白と細胞骨格の関与についての研究

研究課題名(英文) The role of small GTP-binding proteins and cytoskeleton in the development of osteoarthritis and chondrogenesis

研究代表者

松田 秀一 (Matsuda, Shuichi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40294938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト軟骨細胞と滑膜細胞においてsiRNAによる特異的な低分子Gタンパクの発現抑制モデルを作成し、軟骨変性と軟骨再生過程における低分子量G蛋白と細胞骨格・接着因子の役割についての解析を行った。低分子量G蛋白の発現抑制は、軟骨特異的遺伝子の発現を亢進させ、炎症性サイトカインであるIL6の発現を抑制するという結果を確認した。特に、Rac1の抑制は、すべての軟骨特異的遺伝子の発現を促進させるため、スタチン同様に、Rac1の機能阻害が軟骨再生促進と軟骨変性抑制の両方の効果を有することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the role of small GTP-binding proteins and cytoskeleton in the development of osteoarthritis and chondrogenesis. Human chondrocytes and synoviocytes were transfected with siRNA for RhoA, Rac1, and CDC42. Knock-down of small GTP-binding proteins resulted in the induction of chondrocyte specific gene expressions in chondrocytes as well as the reduction of proinflammatory gene expression in synoviocytes. Especially, the effects of Rac1 knock-down were consistent with those of statin on the expressions of chondrocyte specific genes and proinflammatory genes.

研究分野：整形外科学

キーワード：スタチン 低分子量G蛋白 軟骨変性 軟骨再生

1. 研究開始当初の背景

(1) 変形性関節症は、進行性の軟骨変性により、関節機能を著しく障害する有病性疾患であり、高齢者の50%以上が罹患し、QOL低下の原因となる最も多い関節疾患である。現在の変形性関節症に対する薬物療法としては、鎮痛薬などの対症療法が主であり、変形性関節症の軟骨変性を抑制できる有効な治療薬は確立されておらず、多くの高齢者のQOLの向上のためにも、変形性関節症に対する有効な治療薬の開発が待たれている。

(2) 変形性関節症の進行の原因としては、関節内の炎症によって軟骨細胞や滑膜細胞より産生が促進されるマトリックス分解酵素による軟骨基質分解と、軟骨細胞の脱分化に伴う軟骨基質産生の低下が主原因である。そのため、変形性関節症治療のターゲットとしては、軟骨基質分解を抑制することと軟骨再生を促進させる両面からのアプローチが重要である。現在までのところ、変形性関節症の新規治療薬としては、抗サイトカイン薬やプロテアーゼ阻害薬が候補であるが、副作用やコストの問題で未だ臨床応用には至っていない。

(3) これらの問題点を解決すべく、我々が先行研究で注目した HMG-CoA 還元酵素阻害薬(スタチン)は、コレステロール低下作用の他に、抗サイトカイン作用や抗 MMPs 作用、および細胞分化促進作用を有することが報告されている。そこで我々は、家兔変形性関節症モデルに対してスタチンの関節内投与を行い、軟骨変性、滑膜炎の抑制作用を確認し、さらに、骨髄間葉系幹細胞にスタチンを作用させ、軟骨細胞への分化を促進させることも明らかにした。

(4) このようなスタチンの多面的な作用は、メバロン酸経路の中間産物である Farnesyl-PP や Geranylgeranyl-PP などのイソプレノイドの産生低下が関与している。イソプレノイドは、細胞内において Rho や Ras などの低分子量 G 蛋白を介したシグナル伝達に必須の分子であり、細胞膜や標的蛋白上で機能する際のアンカーとして働く。スタチンの作用メカニズムとしては、イソプレノイドのうち特に GGPP の産生阻害が影響し、その下流の Rho を介したシグナル伝達の関与が示唆されている。

2. 研究の目的

軟骨変性過程では、滑膜組織での滑膜細胞の増殖、血管内からの単球系細胞の遊走には、Rho や Rac などの低分子量 G 蛋白を介したシグナルによる細胞骨格、運動の再構成、活性化の関与が考えられる。一方、軟骨再生過程では、間葉系幹細胞の軟骨分化と軟骨細胞の表現型維持において、細胞接着因子を介した低分子量 G 蛋白シグナル伝達が重要な役割を担っていることが示唆される。これらを解明することにより、変形性関節症治療の新たな治療ターゲットとして、低分子量 G 蛋白の

制御について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 軟骨細胞と滑膜細胞を用いて、分子生物学的な手法で軟骨変性過程における低分子量 G 蛋白の関与について解析する。本研究では、低分子量 G 蛋白シグナルを抑制することで、細胞骨格の再構成や細胞遊走が抑制され、またサイトカイン刺激の抑制にも関連し、軟骨異化作用因子の産生が抑制されるのではないかと仮説する。細胞に特異的に siRNA や阻害薬を用いて低分子量 G タンパクの機能発現を抑制したモデルを作成する。これらの操作で軟骨変性因子である IL-1 や MMPs の発現や産生への影響を RT-PCR や ELISA 法で測定する。さらに、軟骨変性過程として、IL-1 で刺激をして、IL-6 や MMP-13 の発現、産生の変化を RT-PCR や ELISA 法で測定する。

(2) 軟骨細胞を用いて、分子生物学的な手法で軟骨再生過程における低分子量 G 蛋白関与について解析する。本研究では、軟骨再生の過程(細胞接着、凝集、軟骨細胞分化、軟骨基質産生)のいずれかにおいて、低分子量 G 蛋白によるシグナル伝達の修飾により軟骨再生を加速することができるのではないかと仮説する。軟骨細胞に RhoA, Rac, Cdc42 を遺伝子導入し、強発現させたモデルを作成する。また特異的に siRNA や阻害薬を用いて低分子量 G タンパクの機能発現を抑制したモデルも作成する。軟骨再生過程の実験系としては、細胞を3次元培養し、軟骨再生過程を再現する。軟骨分化の評価としては、RT-PCR とウエスタンブロット法で軟骨特異的因子である SOX-9 や 型コラーゲンの発現、産生の変化を測定する。

4. 研究成果

(1) 本研究遂行における最も重要なステップは、軟骨変性と軟骨再生過程における低分子量 G 蛋白と細胞骨格・接着因子の関与についての解析を行うために、siRNA や強発現プラスミドを用いた手法による特異的な低分子量 G タンパクの機能発現の抑制、もしくは促進したモデルを作成することである。その解析には基本的な分子生物学的手法である PCR、ウエスタンブロット、免疫染色や ELISA などを使用した。細胞の種類は、より臨床的な応用を目的とした観点から、人工膝関節置換術後に採取したヒト新鮮軟骨、滑膜組織より酵素処理にて分離した、軟骨細胞と滑膜細胞を2~3週間培養して使用した。

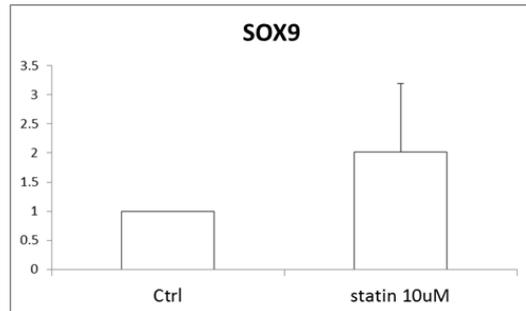
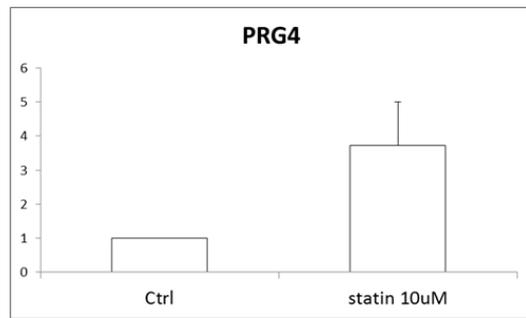
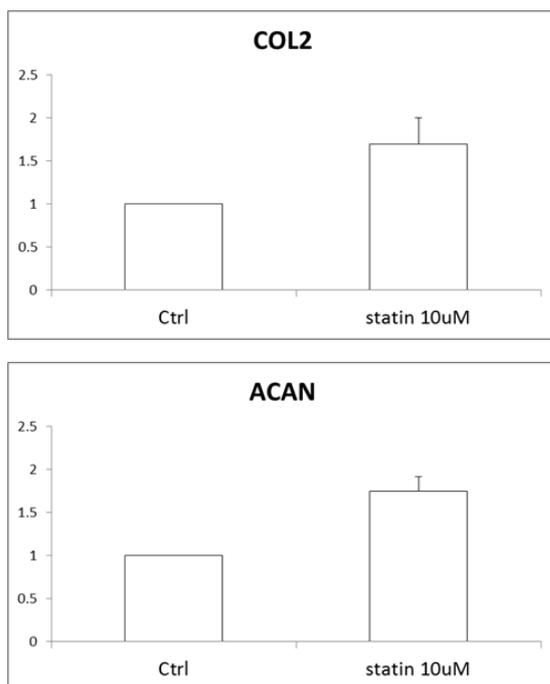
(2) まず、これら採取した細胞において、これまで効果を検討してきたスタチンに加え、Rho シグナルの下流を阻害する ROCK 阻害薬である Y-27632 を用いて、薬剤性に低分子量 G 蛋白を阻害した。これまでの結果と同様に、Simvastatin と Y-27632 で刺激した細胞の細胞形態は、細胞骨格、運動の抑制により、紡錘状から円形状への変化を認めた。また、培養液を薬剤なしの新しいものに交換するこ

とにより、これらの変化は可逆的なものであることを確かめた。IL-1 により 24 時間刺激後に培養上清の MCP-1 の産生濃度を ELISA 法にて測定すると、Simvastatin と Y-27632 とともに濃度依存性に MCP-1 の低下を認めたと、Simvastatin のほうがより MCP-1 の産生が低下した。細胞にスタチンを作用させると、低分子量 G 蛋白の発現とともに活性が低下することを RhoA/Rac1/Cdc42 Activation Assay により確認した。これを基に、次の siRNA による低分子量 G 蛋白の特異的抑制実験を行った。

(3) 低分子量 G 蛋白のうち、スタチンが主に機能を抑制すると考えられる RhoA、Rac1、CDC42 を特異的に阻害するために、siRNA による低分子量 G 蛋白のノックダウンモデルの作成より開始した。軟骨細胞と滑膜細胞に siRNA をトランスフェクション後 48 時間、72 時間でそれぞれ細胞蛋白を回収し、ウエスタンブロットで RhoA、Rac1、CDC42 の蛋白定量を行い、72 時間後のサンプルでより蛋白産生低下を認めた。細胞形態の変化としては、それぞれにおいて細胞骨格、運動の低下によるものと思われる円形状への変化を認めた。MTT アッセイを行い、これら特異的 siRNA が細胞増殖や細胞死に影響がない条件下であることを確認した。

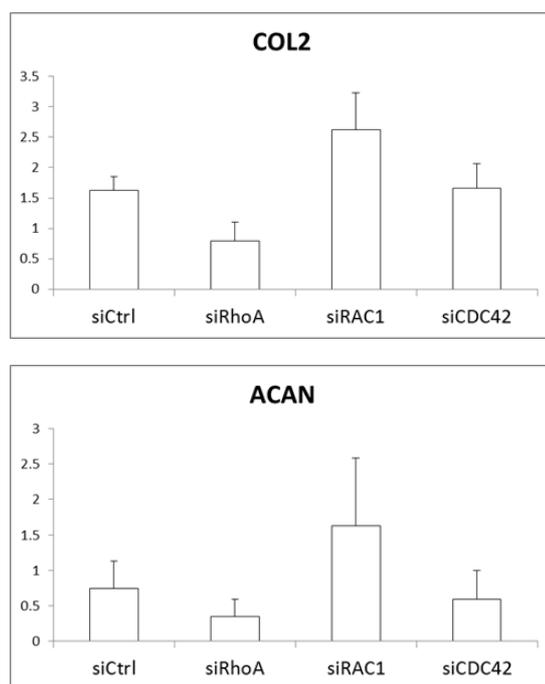
(4) 次に、作成した軟骨細胞で軟骨特異的遺伝子の発現を RT-PCR で測定を行った。また、スタチンの作用との比較を行った。図 1 のように、スタチンはすべての因子の発現を有意に促進した。

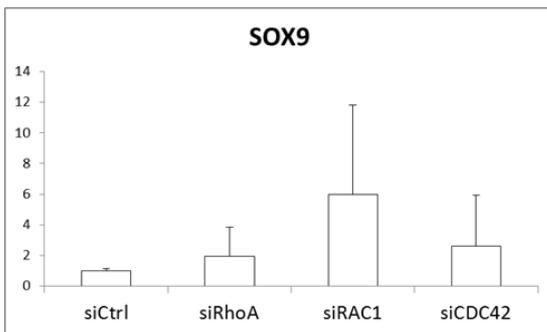
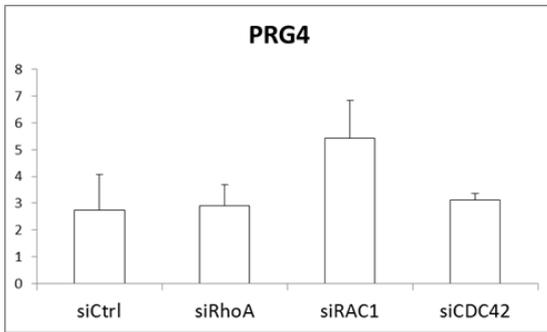
図 1 . 軟骨細胞におけるスタチンによる軟骨特異的遺伝子の発現促進



低分子量 G 蛋白の RhoA、Rac1、Cdc42 の siRNA を行った結果では、Rac1 のノックダウンが最も軟骨特異的遺伝子の発現を誘導した。(図 2) COL2 と ACAN については、RhoA と Rac1 は逆の作用を示した。一方、軟骨分化のマスター遺伝子である SOX9 は、すべての低分子量 G 蛋白のノックダウンにおいて促進されることがわかり、低分子量 G 蛋白の抑制により軟骨分化再生を促進することが示唆された。

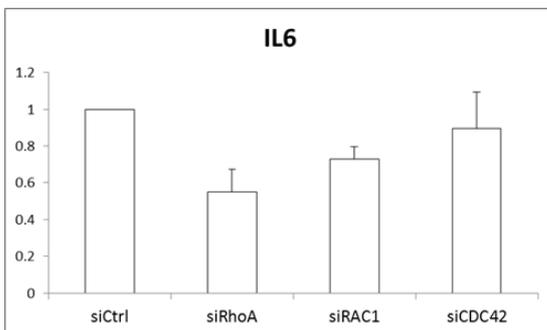
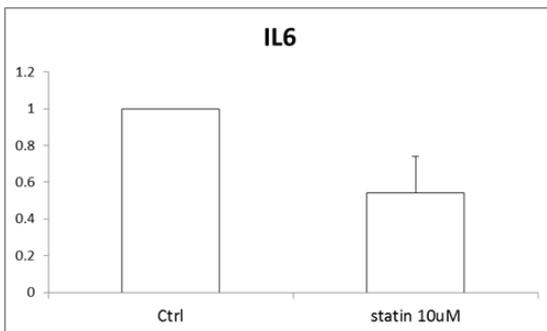
図 2 . 軟骨細胞における siRNA による低分子 C 蛋白の抑制が軟骨特異的遺伝子の発現に与える効果





(5) 続いて、低分子量 G 蛋白をノックダウンした滑膜細胞における IL-6 の発現を RT-PCR で測定した。図 3 のように、スタチンは IL6 の発現を有意に抑制した。siRhoA は他の低分子量 G 蛋白と比較し、IL6 の発現を抑制した。この結果は、先行実験で認めた、ROCK 阻害薬である Y-27632 が MCP-1 産生を抑制したことに一致する。

図 3 . 滑膜細胞におけるスタチンおよび siRNA による低分子 C 蛋白の抑制が IL-6 の発現に与える影響



(6) siRNA による実験において、低分子量 G 蛋白の発現抑制は、スタチン同様に軟骨特異的遺伝子の発現を亢進させ、炎症性サイトカインである IL6 の発現を抑制した。特に、Rac1 の抑制は、すべての軟骨特異的遺伝子の発現を促進させることを確認した。軟骨分化のマスター遺伝子である SOX9 は、すべての低分子量 G 蛋白のノックダウンにおいて促進され、低分子量 G 蛋白の亢進により抑制されることがわかり、低分子量 G 蛋白は軟骨分化再生において重要な働きを有することが示唆された。

(7) 本研究によって、変形性関節症治療の研究領域において、新しい治療ターゲット(低分子量 G 蛋白)を提唱することができたので、複雑な病態である変形性関節症のさらなる病態解明へとつながると期待できる。また、すでに報告済みのスタチンの変形性関節症に対する効果の裏付けともなり、スタチンが関節内投与用の治療薬としてさらに注目されると考えられる。今後、臨床使用につながり、その効果が確認されれば、変形性関節症の患者に対して、安全面、コスト面において有効な治療が可能となり、社会的な貢献が非常に大きいものと考えられる。

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 1 件)

1. 松田秀一. 膝関節痛の診断および変形性膝関節治療の保存療法. 日本医師会雑誌. 141, 1717-1721, 2012, 査読無 <https://www.med.or.jp/cme/jjma/>

[学会発表](計 11 件)

1. 松田秀一. 変形性膝関節治療の保存療法. 福島県北臨床学術講演会(招待講演). 2014年6月25日. ウェディングエルティ(福島市)
2. 松田秀一. 変形性膝関節治療の保存療法. 第121回中部日本整形外科・災害外科学会学術集会(招待講演). 2013年10月3日. 名古屋国際会議場(名古屋市)
3. 松田秀一. 変形性膝関節治療の保存療法. 第50回日本リハビリテーション医学会学術集会(招待講演). 2013年6月13日. 東京国際フォーラム(東京都)
4. 松田秀一. 変形性膝関節治療に対する新たな治療の試み. 国際学術フォーラム(招待講演). 2013年4月3日. ホテルグランヴィア大阪(大阪市)
5. 松田秀一. 変形性膝関節治療の保存治療. 西京都整形・消化器ジョイントフォーラム(招待講演). 2012年12月15日. からすま京都ホテル(京都市)
6. 松田秀一. 変形性膝関節治療に対する外科的治療. 第4回しまなみ骨関節フォーラム(招待講演). 2012年12月6日. ホ

- テル大和屋本店（松山市）
7. 松田秀一. 変形性膝関節治療の現状と課題. Osteoporosis seminar in Niigata 2012(招待講演). 2012年10月18日. ANAクラウンプラザホテル新潟（新潟市）
 8. 松田秀一. 変形性膝関節治療の治療戦略. 愛知県整形外科医会（招待講演）. 2012年7月5日. 名古屋東急ホテル（名古屋市）
 9. 松田秀一. 変形性膝関節治療の現状と課題. 第241回京都整形外科医会学術講演会（招待講演）. 2012年6月23日. ホテルグランヴィア京都（京都市）
 10. 松田秀一. 若年者における膝関節痛-診断と治療-. 第5回滋賀県整形外科・痛み of 研究会（招待講演）. 2012年6月16日. 琵琶湖ホテル（大津市）
 11. 松田秀一. 変形性膝関節治療の up-to date. 第14回ひむか骨関節・脊椎脊髄疾患セミナー（招待講演）. 2012年5月26日. ワールドコンベンションセンターサミット（宮崎市）

6. 研究組織

(1)研究代表者

松田 秀一（MATSUDA SYUICHI）
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：40294938

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし