

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462372

研究課題名(和文) ヒアルロン酸の変形性関節炎アップストリーム治療薬としての新展開と関節保護作用

研究課題名(英文) New approach of hyaluronan as osteoarthritis drug and analysis of articular cartilage protection mechanism

研究代表者

大月 孝志(Ohtsuki, Takashi)

岡山大学・保健学研究科・非常勤研究員

研究者番号：10534802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：1)ヒアルロン酸(HA)によるサイトカイン誘導性アグレカナーゼ発現抑制micro RNAの検出分解系酵素を制御すると考えられる複数のmiRNAを検出した。2) OAモデルラットへのHA投与の長期効果 長期(9w)投与試験では有意な軟骨損傷抑制効果は見られたが、効果は中期より減少した。3) メカニカルストレスのヒアルロン酸受容体遺伝子発現への影響 軟骨細胞のHA受容体CD44、ICAM1 mRNA発現変動は見られなかった。4)メカニカルストレスによるマトリックスタンパク発現への影響 弱いメカニカルストレス刺激で軟骨細胞のマトリックスタンパク、アグリカン、2型コラーゲン遺伝子発現が増大した。

研究成果の概要(英文)：Detection of miRNAs control cytokine induced aggrecanase We detected several miRNA s using miRNA array technique. Long term hyaluronan (HA) treatment reduced cartilage destruction, significantly, but its protection was limited. We revealed mechanical stress did not change HA receptor genes CD44 and ICAM1 mRNA expression level in chondrosarcoma cell line OUMS-27. Weak mechanical stress induced cartilage matrix proteins, both aggrecan and type 2 collagen in OUMS-27.

研究分野：マトリックスバイオロジー

キーワード：軟骨 マトリックス ADAMTS 変形性関節症

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(OA)は、整形外科領域では最も頻度の高い骨・関節疾患である。

OAの関節破壊を防ぐにはマトリックス分解酵素の抑制が重要である。OAでは、アグリカンが分解され、断片が関節液中に認められる。我々が発見したADAMTS-5とADAMTS-9はアグリカンを分解するアグリカナーゼである(*J Biol Chem* 2001; 276(34):31502-9)(*J Biol Chem.* 2002; 277(14):12182-9)。また、我々は2005年にサイトカイン刺激下のヒト軟骨細胞でアグリカナーゼファミリーのうちADAMTS-9が他のアグリカナーゼよりもはるかに強く誘導されることを世界で初めて報告していた(*Arthritis Rheum.*2005; 52(5):1451-60)。H22-24に採択された基盤研究CにおいてADAMTS9mRNAがヒアルロン酸の分子量に比例して抑制されることを見いだしていた(未発表データ)。

2. 研究の目的

ヒアルロン酸(HA)はOAの進行例に対しその物理的な性状(保水、弾性)により用いられている。ヒアルロン酸の新規機能としてマトリックス分解抑制・マトリックス再生機能に関する解析を行い、早期OA治療薬としてヒアルロン酸の可能性を探る。

3. 研究の方法

(1)HAによるサイトカイン誘導性アグリカナーゼ発現抑制に関与するmicro RNAの検出
ヒト軟骨様細胞を無処理群、サイトカイン群、HA前処理+サイトカイン群に分けmiRNAを回収しmiRNA arrayを行う

(2)OAモデルラットへのHA投与の長期効果
前十字靭帯、内側側副靭帯を切断、半月板内側切除したOAモデルラットに対し、手術後5日後から分子量2700kDaのヒアルロン酸50µL(10mg/ml)、週2回のスケジュールで投与し、9週後に殺処分し大腿骨遠位端の骨頭軟骨の損傷度をOARSIスコアリングシステムにより数値化した。

(3)メカニカルストレスのヒアルロン酸受容体遺伝子発現への影響
軟骨様細胞に対し周期的変形性刺激を加え、HA受容体CD44、ICAM1mRNA発現をRT-PCR法により定量する。

(4)メカニカルストレスによるマトリックスタンパク発現への影響
軟骨様細胞に対し周期的変形性刺激を与えマトリックスタンパク、アグリカン、2型コラーゲン遺伝子発現をRT-PCR法により定量する。

4. 研究成果

(1)ヒアルロン酸(HA)によるサイトカイン誘導性アグリカナーゼ発現抑制micro RNAの検出
分解系酵素を制御すると考えられる複数のmiRNAを検出した。

(2)OAモデルラットへのHA投与の長期効果
長期(9w)試験では有意な軟骨損傷抑制効果は見られたが、効果は中期間(6w)より減少した。

(3)メカニカルストレスのヒアルロン酸受容体遺伝子発現への影響

軟骨細胞のHA受容体CD44、ICAM1mRNA発現変動は見られなかった。

(4)メカニカルストレスによるマトリックスタンパク発現への影響

弱いメカニカルストレス刺激で軟骨細胞のマトリックスタンパク、アグリカン、2型コラーゲン遺伝子発現が増大した。

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5件)

MMP-13 is constitutively produced in human chondrocytes and co-endocytosed with ADAMTS-5 and TIMP-3 by the endocytic receptor LRP1.

Yamamoto K, Okano H, Miyagawa W, Visse R, Shitomi Y, Santamaria S, Dudhia J, Troeberg L, Strickland DK, Hirohata S, Nagase H.

Matrix Biol. 2016 Apr 12. pii: S0945-053X(16)30031-2. (査読あり)

Interleukin-1 induced nuclear factor- β binds to a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 9 promoter in human chondrosarcoma cells.

Altuntas A, Halacli SO, Cakmak O, Erden G, Akyol S, Ugurcu V, Hirohata S, Demircan K. *Mol Med Rep.* 2015 Jul;12(1):595-600 (査読あり)

ADAMTS4 and ADAMTS5 knockout mice are protected from versican but not aggrecan or brevican proteolysis during spinal cord injury.

Demircan K, Topcu V, Takigawa T, Akyol S, Yonezawa T, Ozturk G, Ugurcu V, Hasgul R, Yigitoglu MR, Akyol O, McCulloch DR, Hirohata S.

Biomed Res Int. 2014;2014:693746. doi: 10.1155/2014/693746. Epub 2014 Jul 3. (査読あり)

ADAMTS1 inhibits lymphangiogenesis by attenuating phosphorylation of the lymphatic endothelial cell-specific VEGF receptor.

Inagaki J, Takahashi K, Ogawa H, Asano K, Faruk Hatipoglu O, Cilek MZ, Obika M, Ohtsuki T, Hofmann M, Kusachi S, Ninomiya Y, Hirohata S. *Exp Cell Res.* 2014 May 1;323(2):263-75. (査読あり)

Tumor growth inhibitory effect of ADAMTS1 is accompanied by the inhibition of tumor angiogenesis.

Obika M, Ogawa H, Takahashi K, Li J, Hatipoglu OF, Cilek MZ, Miyoshi T, Inagaki J, Ohtsuki T, Kusachi S, Ninomiya Y, Hirohata S.

Cancer Sci. 2012 Oct;103(10):1889-97. (査読あり)

[学会発表](計 40件)

(1)第2回国際リハビリテーションシンポジウム in 京都

2016/03/25-26

京都大学(杉浦地域医療研究センター)

Assesment of therapeutic value of osteoarthritis rehabilitation by molecular biological and biochemical approach

大月孝志(代表)、熊岸加苗、品岡怜、西田圭一郎、大塚愛二、坂田賢一郎、坂田俊輔、河村顕治、廣畑聡

(2)第29回日本軟骨代謝学会

2016/02/19-20

広島(広仁会館)

ラット変形性関節症モデルへのヒアルロン酸投与による軟骨保護効果の解析

大月孝志(代表)、品岡怜、熊岸加苗、佐藤未来、金道幸子、長谷川みさ、海原弘貴、浅野恵一、障子友理、稲垣純子、大橋俊孝、西田圭一郎、廣畑聡

(3)第38回分子生物学会 第88回日本生化学会大会 合同大会

2015/12/01-04

神戸(神戸国際会議場)

伸展刺激の強度による細胞外マトリックスタンパクおよびマトリックス分解酵素発現への影響

大月孝志(代表)、金道幸子、長谷川みさ、稲垣純子、浅野恵一、障子友理、熊岸加苗、西田圭一郎、大橋俊孝、廣畑聡

(4)ゴードン研究会議

2015/08/02-07

米国メイン州(サンデーリバー)

Impact of Versicanolysis in Tumor Angiogenesis.

浅野恵一(代表)、稲垣純子、障子友理、マティアス ホフマン、大月孝志、大橋俊孝、廣畑聡

(5)ゴードン研究会議

2015/08/02-07

米国メイン州(サンデーリバー)

ADAMTS1 null mice demonstrated omphalocele phenotype.

廣畑聡(代表)、オメル ファルク ハティポール、楠絵里子、大月孝志、稲垣純子、草地省蔵、二宮善文

(6)第28回日本臨床整形外科学会学術集会

2015/7/19-20

山口(海峡メッセ)

Biochemical analysis of osteoarthritis conservative therapy-matrix degrading activity in synovial fluid-

熊岸加苗、品岡加苗、大月孝志(代表)、廣畑聡、河村顕治、大塚愛二、坂田賢一郎、坂田俊輔

(7)第13回がんハイポキシア研究会

2015/06/05-06

静岡(国立遺伝学研究所)

腫瘍血管新生における細胞外マトリックス分解の意義

浅野恵一(代表)、稲垣純子、障子友理、マティアス ホフマン、大月孝志、大橋俊孝、廣畑聡

(8)10th International Confewrence HYALURONAN 2015

2015/06/07-11

フィレンツェ(イタリア)

HYALURONAN TREATMENT REDUCED MATRIX DEGRADATION BOTH IN VITRO AND IN VIVO RAT OSTEOARTHRITIS MODEL.

大月孝志(代表)、障子友理、浅野恵一、平田彩、川地輝幸、稲垣純子、熊岸加苗、西田圭一郎、大橋俊孝、廣畑聡

(9)第47回日本結合組織学会学術大会 第62回マトリックス研究会大会 合同学術集会

2015/05/15-16

東京(コクヨホール)

A feasible study of molecular bio-imaging of articular cartilage proteoglycans

大橋俊孝(代表)、加来田博貴、芳谷学、廣畑聡、山田朔也、二宮善文、西田圭一郎

(10)第47回日本結合組織学会学術大会 第62回マトリックス研究会大会 合同学術集会

2015/05/15-16

東京(コクヨホール)

Moderate mechanical stress differently altered the mRNA expressions of aggrecan, collagen and ADAMTSs in human chondrosarcoma cells.

大月孝志(代表)、金道幸子、長谷川みさ、平田彩、川地輝幸、浅野恵一、稲垣純子、障子友理、熊岸加苗、西田圭一郎、大橋俊孝、廣畑聡

(11)第47回日本結合組織学会学術大会 第62回マトリックス研究会大会 合同学術集会

2015/05/15-16

東京(コクヨホール)

Versicanolysis by ADAMTS in tumor angiogenesis

浅野恵一(代表)、稲垣純子、障子友理、マティアス ホフマン、大月孝志、廣畑聡、大橋俊孝

(12)第8回高度医療都市を創出する未来技術国際シンポジウム

2015/02/06

岡山(岡山大学)

Is Versicanolysis associated with tumor angiogenesis?

浅野恵一(代表)、稲垣純子、障子友理、マティアス ホフマン、大月孝志、平田彩、川地輝幸、二宮善文、廣畑聡、大橋俊孝

(13)第37回分子生物学会

2014/11/25-27

横浜(パシフィコ横浜)

The effect of mechanical stress on extracellular matrix and matrix metalloproteinases
平田彩(代表)、大月孝志、稲垣純子、浅野恵一、川地輝幸、障子友理、大橋俊孝、二宮善文、廣畑聡

(14)第12回がんとハイポキシア研究会
2014/11/21-22

佐賀(ホテルマリターレ創世佐賀)
ADAMTSマトリックス分解酵素は乳がん細胞株間において異なる低酸素応答性を有する
浅野恵一(代表)、稲垣純子、障子友理、マティアス ホフマン、大月孝志、平田彩、川地輝幸、草地省蔵、二宮善文、大橋俊孝、廣畑聡

(15)第12回がんとハイポキシア研究会
2014/11/21-22

佐賀(ホテルマリターレ創世佐賀)
炎症性サイトカイン刺激による軟骨肉腫細胞 OUMS-27 のマトリックス分解酵素 mRNA 発現誘導の周期的伸張変形(Cyclic Tensile Strain)による軽減効果 -低酸素条件の検討-
大月孝志(代表)、障子友理、浅野恵一、平田彩、川地輝幸、稲垣純子、熊岸加苗、西田圭一郎、大橋俊孝、廣畑聡

(16)American Society for Matrix Biology
2014 Meeting
2014/10/12-15

クリーブランド、オハイオ州(マリオットキーセンター)
Proteolysis of versican was observed in tumor angiogenic area
浅野恵一(代表)、稲垣純子、マティアス ホフマン、川地輝幸、平田彩、障子友理、大月孝志、二宮善文、廣畑聡

(17)American Society for Matrix Biology
2014 Meeting
2014/10/12-15

クリーブランド、オハイオ州(マリオットキーセンター)
Perinatal lethality in ADAMTS1 deficient mouse
廣畑聡(代表)、オメル ファルク ハティポール、楠絵里子、大月孝志、稲垣純子、浅野恵一、障子友理、川地輝幸、平田彩、二宮善文

(18)American Society for Matrix Biology
2014 Meeting
2014/10/12-15

クリーブランド、オハイオ州(マリオットキーセンター)
Decreased Sox9 mRNA expression by cytokine stimulation was ameliorated by hyaluronan in chondrosarcoma cells
大月孝志(代表)、障子友理、浅野恵一、平田彩、川地輝幸、稲垣純子、熊岸加苗、西田圭一郎、大橋俊孝、廣畑聡

(19)第27回日本臨床整形外科学会学術集会
2014/07/20-21

仙台(サンプラザホール)
変形性膝関節症の保存的治療の効果に関する生化学的解析
熊岸加苗(代表)、大月孝志、酒井孝文、廣畑聡、渡邊徹大、河村顕治、大塚愛二、坂田賢一郎、坂田俊輔

(20)第46回日本結合組織学会学術大会 第61回マトリックス研究会大会 合同学術集会
2014/06/5-7

名古屋(ウインクあいち)
ADAMTS1はVEGFCと結合してリンパ管新生を抑制する
稲垣純子(代表)、高橋克之、小川弘子、浅野恵一、オメル ファルク ハティポール、メメント ゼイネル チレッキ、小比賀真就、大月孝志、マティアス ホフマン、草地省蔵、二宮善文、廣畑聡

(21)第46回日本結合組織学会学術大会 第61回マトリックス研究会大会 合同学術集会
2014/06/5-7

名古屋(ウインクあいち)
新規X線造影剤による変形性膝関節症ラット関節軟骨の高解像度マイクロCT造影
大橋俊孝(代表)、加来田博貴、芳谷学、大月孝志、大野充昭、山田朔也、前原亜美、廣畑聡、西田圭一郎、窪木拓男、二宮善文

(22)第46回日本結合組織学会学術大会 第61回マトリックス研究会大会 合同学術集会
2014/06/5-7

名古屋(ウインクあいち)
担がんマウスモデルにおけるパーシカン分解の解析
浅野恵一(代表)、稲垣純子、マティアス ホフマン、川地輝幸、平田彩、大月孝志、二宮善文、廣畑聡

(23)第46回日本結合組織学会学術大会 第61回マトリックス研究会大会 合同学術集会
2014/06/5-7

名古屋(ウインクあいち)
胎生期ADAMTS1ノックアウトマウスの解析
楠絵里子(代表)、稲垣純子、大月孝志、川地輝幸、平田彩、浅野恵一、マティアス ホフマン、二宮善文、廣畑聡

(24)第46回日本結合組織学会学術大会 第61回マトリックス研究会大会 合同学術集会
2014/06/5-7

名古屋(ウインクあいち)
Short period Hyaluronan treatment reduced cartilage degradation in rat osteoarthritis model.
大月孝志(代表)、廣畑聡、障子友理、浅野恵一、平田彩、川地輝幸、稲垣純子、熊岸加苗、西田圭一郎、二宮善文

(25)The 2nd International Symposium on Mechanobiology (ISMB 2014)

2014/05/20-23
岡山(岡山大学Jホール)
Creation of Novel Articular Cartilage Specific X-ray Imaging Probes Composed of Lysine Oligomers
大橋俊孝(代表)、芳谷学、大野充昭、山田朔也、大月孝志、前原亜美、廣畑聡、西田圭一郎、窪木拓男、加来田博貴、二宮善文

(26)The 2nd International Symposium on Mechanobiology (ISMB 2014)
2014/05/20-23
岡山(岡山大学Jホール)
Cyclic tensile strain (CTS) down-regulates interleukin(IL)-1b and Tumor necrosis factor(TNF)-a induced matrix degrading enzymes mRNA expression in human chondrosarcoma cell line OUMS-27 by mechano sensor
大月孝志(代表)、川地輝幸、平田彩、浅野恵一、楠絵理子、稲垣純子、熊岸加苗、西田圭一郎、二宮善文、廣畑聡

(27)The 18th International Vascular Biology Meeting
2014/4/14-17
京都(みやこめっせ)
ADAMTS1 inhibits lymphangiogenesis by attenuating phosphorylation of the lymphatic endothelial cell-specific VEGF receptor
稲垣純子(代表)、高橋克之、小川弘子、オメル ファルク ハティポール、メメット ゼイネル チレッキ、小比賀正就、大月孝志、草地省蔵、二宮善文、廣畑聡

(28)第27回日本軟骨代謝学会
2014/02/28-03/02
京都(京都府医師会館)
Inflammatory cytokine induced Hyaluronan synthases under hyaluronan treatment in human chondrosarcoma cell line OUMS-27 cells
大月孝志(代表)、川地輝幸、平田彩、浅野恵一、楠絵理子、稲垣純子、熊岸加苗、西田圭一郎、二宮善文、廣畑聡

(29)第7回高度医療都市を創出する未来技術国際シンポジウム
2014/02/07
岡山(岡山大学)
ADAMTS1 was differently regulated in breast cancer cells
浅野恵一(代表) 廣畑聡、小比賀正就、オメル ファルク ハティポール、小川弘子、メメット ゼイネル チレッキ、稲垣純子、大月孝志、石井裕子、幡中邦彦、草地省蔵、米沢朋子、大橋俊孝、二宮善文

(30)第7回高度医療都市を創出する未来技術国際シンポジウム
2014/02/07
岡山(岡山大学)

Structurally simple cartilage probes constructed with -lysine oligomers targeting chondroitin sulfates
加来田博貴(代表)、芳谷学、山田翔也、古沢優貴、前田亜美、廣畑聡、西田圭一郎、大野充昭、大月孝志、二宮善文、大橋俊孝

(31)第36回日本分子生物学会年会
2013/12/03-06
神戸(神戸国際会議場)
Cyclic tensile strain (CTS)による炎症性サイトカイン誘導性細胞応答に対する抑制機構 -micro RNA arrayによる解析-
大月孝志(代表)、川地輝幸、平田彩、浅野恵一、楠絵理子、稲垣純子、熊岸加苗、西田圭一郎、二宮善文、廣畑聡

(32)第26回日本臨床整形外科学会学術集会
2013/07/14-15
静岡(グランシップ静岡)
変形性膝関節症への運動・薬物併用療法に関する解析
熊岸加苗(代表)、大月孝志、酒井孝文、廣畑聡、渡邊徹大、河村顕治、大塚愛二、坂田俊輔

(33)第45回日本結合組織学会学術大会 第60回マトリックス研究会大会 合同学術集会
2013/06/28-29
和歌山(和歌山県立医科大学高度医療人育成センター)
ヒアルロン酸(HA)分子量と関節軟骨保護効果の解析(in vivo & in vitro)
大月孝志(代表)、廣畑聡、浅野恵一、楠絵理子、稲垣純子、西田圭一郎、二宮善文

(34)第26回日本軟骨代謝学会
2013/03/01-02
大阪(千里ライフサイエンスセンター)
Cyclic tensile strain (CTS)による炎症性サイトカイン誘導性 ADAMTS ファミリー発現抑制機構へのメカノセンサーの関与
大月孝志(代表)、廣畑聡、西田圭一郎、二宮善文

(35)第6回高度医療都市を創出する未来技術国際シンポジウム
2013/2/7-8
岡山(岡山大学)
Novel vector construct driven under acute hypoxia
浅野恵一(代表)、廣畑聡、小比賀正就、オメル ファルク ハティポール、小川弘子、メメット ゼイネル チレッキ、稲垣純子、大月孝志、石井裕子、幡中邦彦、草地省蔵、米沢朋子、大橋俊孝、二宮善文

(36)第10回がん&ハイポキシア研究会
2012/12/06-07
横浜(横浜市開港記念館)
ADAMTS1 プロモーターを利用した低酸素感受性発現ベクター

廣畑聡 (代表)、浅野恵一、メメット ゼイネル チレッキ、オメル ファルク ハティポール、小川弘子、小比賀正就、大月孝志、稲垣純子、草地省蔵、二宮善文

(37)ASMB 2012 Joint Meeting of the American Society for Matrix Biology and the Society for Glycobiology
2012/11/11-14

サンディエゴ、カリフォルニア州 (シェラトンホテル・マリーナ)

The tumor growth inhibitory effect of ADAMTS1 is accompanied by the inhibition of tumor angiogenesis

廣畑聡 (代表)、大月孝志、小比賀真就、小川弘子、稲垣純子、草地省蔵、二宮善文

(38)ASMB 2012 Joint Meeting of the American Society for Matrix Biology and the Society for Glycobiology
2012/11/11-14

サンディエゴ、カリフォルニア州 (シェラトンホテル・マリーナ)

Cyclic tensile strain inhibits Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor- induced aggrecanase in human chondrosarcoma cell line OUMS-27 by stretch-activated channels

大月孝志 (代表)、西田圭一郎、廣畑聡、二宮善文

(39)第 44 回日本結合組織学会学術大会 第 59 回マトリックス研究会大会 合同学術集会

2012/06/07-08

東京 (日本青年館)

ADAMTS1 inhibit angiogenesis : in vitro and in vivo study

廣畑聡 (代表)、小比賀正就、オメル ファルク ハティポール、小川弘子、メメット ゼイネル チレッキ、稲垣純子、大月孝志、石井裕子、幡中邦彦、草地省蔵、米沢朋子、大橋俊孝、二宮善文

(40)第 44 回日本結合組織学会学術大会 第 59 回マトリックス研究会大会 合同学術集会

2012/06/07-08 東京 (日本青年館)

ヒアルロン酸 (HA) 分子量と関節軟骨保護効果の解析 (in vivo & in vitro)

大月孝志 (代表)、メフメット ゼイネル チレッキ、オメル ファルク ハティポール、西田圭一郎、二宮善文、廣畑聡

〔その他〕

アウトリーチ活動

ドクター・キッズ・スクール (2013/9/27)
小学生に対して健康、体の仕組みをわかりやすく説明する学習講座

6. 研究組織

(1)研究代表者

大月 孝志 (Takashi Ohtsuki)

岡山大学大学院保健学研究科・非常勤研究員

研究者番号 : 10534802

(2)研究分担者

廣畑 聡 (Satoshi Hirohata)

岡山大学大学院保健学研究科・教授

研究者番号 : 90332791

西田 圭一郎 (Keiichiro Nishida)

岡山大学大学院医歯薬学研究科・準教授

研究者番号 : 80284058

(3)連携研究者

藤淵 航 (Wataru Fujibuchi)

京都大学 iPS 研究所・教授

研究者番号 : 60273512

篠畑 綾子 (Ryoko Shinohata)

岡山大学大学院保健学研究科・助教

研究者番号 : 70335587

草地 省蔵 (Shozo Kusachi)

岡山大学大学院保健学研究科・特任教授

研究者番号 : 30214943

二宮 善文 (Yoshifumi Ninomiya)

岡山大学大学院医歯薬学研究科・教授

研究者番号 : 70126241