

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462303

研究課題名(和文)メカニカルストレスに対する軟骨細胞の小胞体ストレス応答の解明

研究課題名(英文)The study of endoplasmic reticulum stress pathway in mechanical stress-loaded chondrocyte

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(医)・教授

研究者番号：60174025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、過剰なメカニカルストレスが長時間継続すると、小胞体ストレスが惹起され、軟骨細胞の同化作用の低下と異化作用の亢進が生じ、アポトーシスが增加することが示され、このことはOAが発生する高齢者の関節内環境に近似した条件下でも確認された。また、小胞体膜上のセンサー蛋白であるATF6がメカニカルストレスによる軟骨細胞の同化作用の低下と異化作用の亢進、アポトーシスの増加に対して抑制的に働いている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study showed that endoplasmic reticulum (ER) stress was induced by long-term excessive mechanical stress, resulting decrease of anabolic function, increase of catabolic function, and apoptosis in cultured chondrocytes. We also confirmed this finding in conditions mimicking the intra-articular environments in elderly patients with osteoarthritis. Furthermore, it was suggested that ATF6, the ER stress sensor protein, may reduce the negative effects by mechanical stress such as decrease of anabolic function, increase of catabolic function, and increase of apoptosis in chondrocytes.

研究分野：整形外科

キーワード：小胞体ストレス 軟骨細胞機能 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(OA)は高齢者の生活の質を低下させ、健康寿命の延伸を阻害する代表的な運動器疾患である。急速な高齢化が進むわが国ではOAの軟骨破壊の進行を抑制する原因療法の開発が急務となっており、そのためにはOA病態の分子メカニズムの解明による治療標的分子の同定が不可欠である。OAは軟骨基質が破壊されることで進行するが、その過程では軟骨細胞の代謝変化が大きな役割を果たしている。OA軟骨細胞では型コラーゲンやアグリカンなどの軟骨基質産生の低下、matrix metalloproteinase 13 (MMP13)などの軟骨基質破壊酵素や炎症性サイトカインなどの産生亢進など様々なcatabolicな代謝変調をきたし、最終的にはアポトーシスを起こし細胞死にいたることが知られているが、この過程の詳細な分子メカニズムは明らかではない。

近年、糖尿病をはじめとする種々の疾患で細胞の代謝変調やアポトーシスを惹起するメカニズムとして小胞体ストレス応答(UPR)が注目されている。UPRとは、小胞体内に蓄積した構造異常蛋白によって小胞体膜上のセンサー蛋白(PERK, IRE1、ATF6)の活性化が生じ、小胞体シャペロンによる折りたたみ機能の向上、新生タンパクの翻訳抑制、および変性タンパクの分解除去の促進による、タンパクの恒常性維持機構である。しかし、UPRの限界を超えて構造異常蛋白が蓄積すると、C/EBP homologous protein(CHOP)の誘導を介してアポトーシスを起こして細胞は死滅する。

一方、OAにおいても、変性軟骨での小胞体シャペロンGRP78の増加などが報告され、小胞体ストレスの病態への関与が示唆されている。われわれは、先行研究において、ヒトOA軟骨組織で軟骨変性の進行と相関してPERK、GRP78、CHOPの発現が増加することを示し、小胞体ストレス誘導剤Tunicamycinで培養軟骨細胞に小胞体ストレスを誘発すると軟骨細胞のアグリカン(Acan)mRNA発現が抑制され、アポトーシスの頻度が相関して増加することなどを明らかにした¹⁾。また加齢とともに軟骨組織に蓄積されOA発症の一要因と考えられているAGEsに関して軟骨細胞におけるGRP78のAGEs化が小胞体ストレスを惹起することを報告した²⁾。さらにChopノックアウトマウスにOAモデルを作成すると関節軟骨の変性・破壊が抑制されること³⁾、センサー蛋白の中でATF6の活性化が軟骨保護作用において中心的な役割を果たすことを明らかにした。

これらの先行研究の結果は、小胞体ストレスがOAの病態に深く関与していることを示すものであるが、OAにおける小胞体ストレスの発生機序や小胞体ストレス応答の分子メカニズムにはなお明らかではない点が少ない。なかでもOAの局所要因として最も重要な因子とされているメカニカルストレスと小胞体ストレス発生の関連については評価されておらず、その機序は全く不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、OAの発生要因として最も重要な因子であるメカニカルストレスに対する軟骨細胞の小胞体ストレス発生とそのストレス応答について、生体環境に近似した条件下ならびに小胞体ストレス関連分子を抑制・過剰発現させた軟骨細胞を用いた解析により、OAの軟骨変性・破壊進行における小胞体ストレス応答の分子メカニズムとその役割を解明することである。

3. 研究の方法

(1)メカニカルストレス負荷による軟骨細胞の小胞体ストレス応答発生と細胞機能・アポトーシスの解析

5週齢雄wistarラットの大腿骨頭と膝関節から関節軟骨を採取し、酵素的に軟骨細胞を単離培養した。初代培養細胞を5%CO₂ incubator内に設置した培養細胞自動伸展装置STB-140のchamber内で培養後、生理的な刺激とされる0.5Hz、5%の伸展刺激(CTS)を30分負荷した。また、過剰な刺激として0.5Hz、10%CTSを0、4、12、24時間加えた。その後、qPCRにより小胞体ストレスを*Grp78*、*Chop*、*Xbp1 spliced form (Xbp1s)* mRNAの発現で、軟骨細胞機能を*Col2a1*、*Acan*、*Mmp13*のmRNA発現で評価した。また、アポトーシスをELISAとTUNEL染色によるDNA断片化でそれぞれ評価した。

(2)生体環境に近似した環境下でのメカニカルストレス負荷による影響の解析

1. 低酸素状態における検討

低酸素状態として酸素濃度を1%(コントロール18%)に設定したマルチガスインキュベータMG-70M内にSTB-140を設置し、0.5Hz、10%のCTSを24時間負荷した後、qPCRにより小胞体ストレスを*Xbp1s*、*Grp78*、*Chop*のmRNAで、軟骨細胞機能を*Col2a1*、*Acan*、*Mmp13*のmRNAで評価した。またアポトーシスをELISAとTUNEL染色によるDNA断片化で評価した。

2. AGEs蓄積軟骨細胞における検討

高齢者の軟骨のモデルとしてAGEs前駆体Glycolaldehyde(100μM)を添加して(コントロール0μM)AGEsを蓄積させた軟骨細胞に10%、0.5HzのCTSを24時間負荷した後、上記と同様の解析を行った。

(3)ストレスセンサー蛋白の遺伝子発現を抑制あるいは過剰発現させた培養軟骨細胞に対するメカニカルストレス負荷の影響の解析

ATDC5細胞をITS培地で分化誘導後、*Perk*、*Ire1*、および*Atf6*遺伝子の発現をそれぞれsiRNAとlipofectamineを用いてノックダウン(KD)を行った後、STB-140内で培養し、0.5Hz、10%のCTSを24時間負荷した。qPCRにより小胞体ストレスを*Xbp1s*、*Grp78*、*Chop*のmRNA発現で、軟骨細胞機能を*Col2a1*、*Acan*、*Mmp13*のmRNA発現で評価した。また、アポトーシスをELISAとTUNEL染色によるDNA断片化で評価した。また、ウイルスベクターを用いて*Atf6*遺伝子を過剰発現させた細胞を作製し、同様の条件でCTSを24時間負荷し、解析を行った。

4. 研究成果

(1) メカニカルストレス負荷による軟骨細胞の小胞体ストレス応答発生と細胞機能・アポトーシスの解析

5%CTS では小胞体ストレスとアポトーシスは刺激前と変わりなく、軟骨細胞機能は *Col2a1*, *Acan*, *Mmp13* とともに軽度亢進した。4 時間の 10%CTS でも同様に、刺激前と比較して小胞体ストレスとアポトーシスは同等であり、*Col2a1*, *Acan*, *Mmp13* はそれぞれ 28%、31%、23% 亢進した。一方、12 時間の 10%CTS では *Xbp1s* が増加し、*Grp78*, *Chop* はそれぞれ 11%、49% の増加、アポトーシスは 35% の増加を認め、*Col2a1*, *Acan* はそれぞれ 33%、42% の低下、*Mmp13* は 13% の増加がみられた。24 時間の 10%CTS ではこれらの変化が増強し、*Xbp1s* は顕著に増加、*Grp78*, *Chop* はそれぞれ 31%、88% の増加、アポトーシスは 52% の増加、*Col2a1*, *Acan* はそれぞれ 53%、50% の低下、*Mmp13* は 22% の増加がみられた (図 1)。

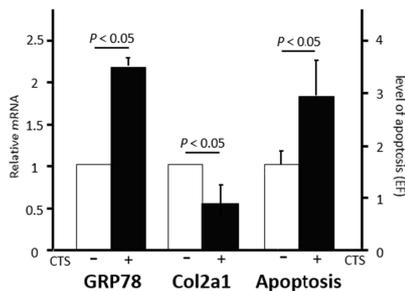


図 1. 0.5Hz、10%CTS、24 時間負荷における小胞体ストレス、軟骨細胞のコラーゲン合成能およびアポトーシスの評価

以上の結果より、適度な伸展刺激、あるいは過剰な伸展刺激でも短時間の刺激であれば軟骨細胞の同化作用が亢進するが、過剰な伸展刺激が長時間継続すると小胞体ストレスが増加し、これに伴い軟骨細胞の異化作用が亢進し、アポトーシスも増加することが示され、メカニカルストレスによる軟骨変性の進行機序における小胞体ストレスの関与が示唆された。

(2) 生体環境に近似した環境下でのメカニカルストレス負荷による影響の解析

1. 低酸素状態における検討

低酸素下では、コントロールと比較して小胞体ストレスの増加 (*Grp78*, *Chop* がそれぞれ 14%、30% 増加) とともに、軟骨細胞の同化作用の低下 (*Col2a1* が 24% 低下) と異化作用の亢進 (*Mmp13* が 11% 増加) を認め、アポトーシスが 25% 増加した。一方、低酸素下で CTS を負荷すると、*Xbp1s* の発現は増加し、*Grp78* と *Chop* はそれぞれ 13%、42% の増加、*Col2a1*, *Acan* はそれぞれ 26%、35% の低下、*Mmp13* は 20% の増加、アポトーシスは 33% の増加を認めた (図 2)。

2. AGEs 蓄積軟骨細胞における検討

AGEs 蓄積細胞では、コントロールと比較して小胞体ストレスの増加 (*Grp78*, *Chop* がそれぞれ 22%、30% 増加) とともに軟骨細胞の同化作用の低下 (*Col2a1* が 42% 低下) と

異化作用の亢進 (*Mmp13* が 21% 増加) を認め、アポトーシスが 36% 増加した。一方、AGEs 蓄積下で CTS を負荷すると、*Xbp1s* 発現は増加し、*Grp78* と *Chop* はそれぞれ 16%、23% の増加、*Col2a1*, *Acan* はそれぞれ 22%、26% の低下、*Mmp13* は 9% の増加、アポトーシスは 24% の増加を認めた (図 3)。

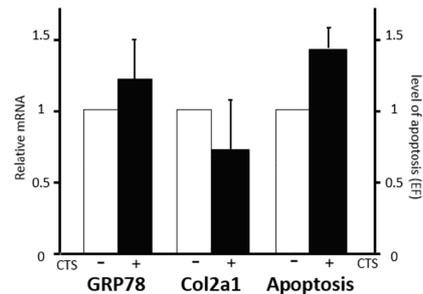


図 2. 低酸素状態下での CTS 負荷による小胞体ストレス、軟骨細胞のコラーゲン合成能およびアポトーシスの評価

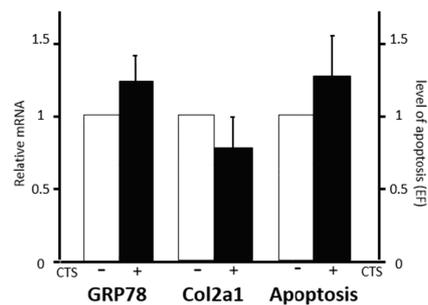


図 3. AGEs 蓄積軟骨細胞に対する CTS 負荷による小胞体ストレス、軟骨細胞のコラーゲン合成能およびアポトーシスの評価

以上の結果より、低酸素下および AGEs の蓄積した状態下では、過剰な機械的刺激により小胞体ストレスが増加するとともに、軟骨細胞機能が低下し、アポトーシスが亢進することが示された。

(3) ストレスセンサー蛋白の遺伝子発現を抑制あるいは過剰発現させた培養軟骨細胞に対するメカニカルストレス負荷の影響の解析

正常細胞と比較して、*Perk* KD 細胞では *Xbp1s* の発現は変わらず、*Grp78* と *Chop* は 17% の低下と 18% の増加を認めた。*Col2a1* および *Acan* の発現はそれぞれ 6%、12% 低下し、*Mmp13* およびアポトーシスはそれぞれ 10%、16% の増加を認めた。*IRE1* KD 細胞では *Xbp1s* の発現は変わらず、*GRP78* と *Chop* は 14% の低下と 9% の増加を認めた。*Col2a1* および *Acan* の発現はそれぞれ 5%、8% 低下、*Mmp13* およびアポトーシスはそれぞれ 7%、21% 増加を認めた。*Atf6* KD 細胞では *Xbp1s* の発現は低下し、*Grp78* と *Chop* は 44% の低下と 38% の増加を認めた。*Col2a1* および *Acan* の発現はそれぞれ 24%、17% 低下、*Mmp13* およびアポトーシスはそれぞれ 37%、54% の増加を認め、いずれも有意差を認めた (図 4)。

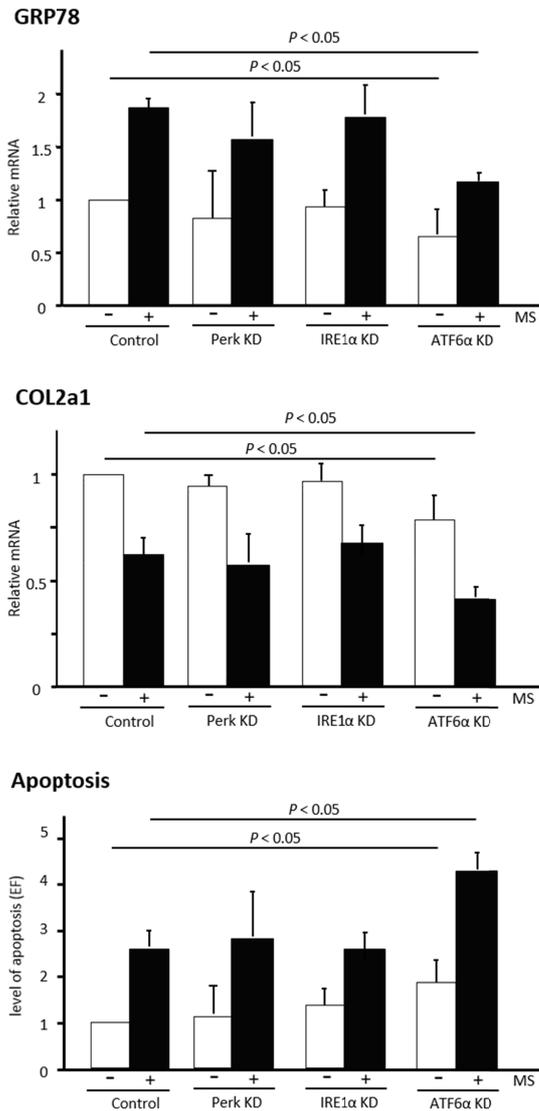


図 4. ストレスセンサー蛋白遺伝子抑制細胞における CTS 負荷による小胞体ストレス、軟骨細胞のコラーゲン合成能およびアポトーシスの評価

以上の結果より、メカニカルストレスによる軟骨細胞の同化作用の低下と異化作用の亢進、ならびにアポトーシスの増加に *Atf6* が重要な役割を果たす可能性が示唆された。そこで、ウイルスベクターを用いて *Atf6* 遺伝子を過剰発現させた細胞を作製し、同様の条件で CTS を負荷した。その結果、*Xbp1s* 発現は増加し、*Grp78* は 15 倍の増加、*Chop* は 25% の低下、*Col2a1*、*Acan* はそれぞれ 19 倍、8 倍の増加、*Mmp13* とアポトーシスはそれぞれ 14%、21% の低下を認めた (図 5)。この結果より、メカニカルストレスによる軟骨細胞の同化作用低下と異化作用亢進、およびアポトーシス増加に対して、ATF6 が抑制的に関与することが示唆された。

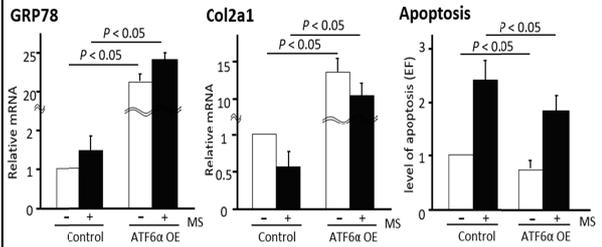


図 5. *Atf6* 遺伝子過剰発現株における CTS 負荷による小胞体ストレス、軟骨細胞のコラーゲン合成能およびアポトーシスの評価

以上、本研究により、過剰なメカニカルストレスが長時間継続すると、小胞体ストレスが惹起され、軟骨細胞の同化作用の低下と異化作用の亢進が生じ、アポトーシスが增加することが示され、このことは OA が発生する高齢者の関節内環境に近似した条件下でも確認された。また、小胞体膜上のセンサー蛋白である ATF6 がメカニカルストレスによる軟骨細胞の同化作用の低下と異化作用の亢進、アポトーシスの増加に対して抑制的に働いている可能性が示唆された。

< 引用文献 >

1. Takada K, Hirose J, Mizuta H, et al. Enhanced Apoptotic and Reduced Protective Response in Chondrocytes Following Endoplasmic Reticulum Stress in Osteoarthritic Cartilage. *Int J Exp Pathol.* 92: 232-242, 2011.
2. Yamabe S, Hirose J, Mizuta H, et al. Intracellular Accumulation of Advanced Glycation End Products Induces Apoptosis Via Endoplasmic Reticulum Stress in Chondrocytes. *FEBS J.* 280: 1617-1629, 2013.
3. Uehara Y, Hirose J, Mizuta H, et al. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis contributes to articular cartilage degeneration via C/EBP homologous protein. *Osteoarthritis Cartilage.* 22: 1007-1017, 2014.

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)

上原悠輔、廣瀬隼、山部聡一郎、笠智就、水田博志

小胞体ストレスセンサー蛋白 *Atf6* は分子シャペロンの誘導を促して軟骨細胞の同化作用に関与する

第 29 回日本整形外科学会基礎学術集會 城山観光ホテル(鹿児島市、鹿児島県)

2014 年 10 月 9 日

上原悠輔、廣瀬隼、笠智就、水田博志
軟骨細胞の異化作用における ATF6 の

役割

第28回日本軟骨代謝学会
東京医科歯科大学（文京区、東京都）
2015年3月6日

上原悠輔、廣瀬隼、笠智就、水田博志
軟骨細胞における小胞体ストレスセン
サー蛋白 Atf6 の役割の解析

第30回日本整形外科学会基礎学術集会
富山国際会議場（富山県、富山市）

2015年10月23日

上原悠輔、廣瀬隼、水田博志
軟骨細胞における機械的刺激下での小
胞体ストレスセンサー蛋白 ATF6 の機
能解析

第31回日本整形外科学会基礎学術集会
福岡国際会議場（福岡県、福岡市）

2016年10月13日

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

取得状況（計 0件）

〔その他〕

なし

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・准教授
研究者番号： 40433007

岡元 信和 (OKAMOTO, Nobukazu)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号： 70600162

(3) 連携研究者

親泊 政一 (OYADOMARI, Seiichi)

徳島大学・疾患ゲノム研究センター・教授
研究者番号： 90502534