

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462312

研究課題名(和文) 生理的低酸素環境の再現による軟骨細胞のストレス応答機構の究明

研究課題名(英文) Investigation of stress response mechanism of chondrocytes by reproduction of physiological hypoxic environment

研究代表者

新井 祐志 (Arai, Yuji)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50347449

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)：高分子ヒアルロン酸(HA)は、変形性関節症に対する関節内注射薬として広く臨床使用されているが、低酸素環境下での薬理効果は明らかではない。本研究の目的は低酸素環境下でHAが関節軟骨に与える影響を明らかにすることである。関節軟骨に対する外因性高分子HAの軟骨同化的な薬理作用は、低酸素環境下で促進されることが明らかとなった。そのメカニズムとして、HIF-1経路によってCD44の発現が亢進し、外因性高分子HAに対する結合親和性が向上した可能性が示された。外因性高分子HAの軟骨同化的な薬理効果の発揮には、軟骨細胞周辺の低酸素環境の維持が重要であると考えた。

研究成果の概要(英文)：High molecular weight hyaluronic acid (HA) is widely used clinically as an intra-articular injection for osteoarthritis, but the pharmacological effect under hypoxic condition is not clear. The purpose of this study is to clarify the effect of HA on articular cartilage under hypoxia. It was revealed that the cartilage assimilatory pharmacological action of the exogenous macromolecule HA on articular cartilage is promoted in hypoxic condition. As a mechanism, it was shown that the expression of CD44 was enhanced by the HIF-1 pathway and the binding affinity to the exogenous polymer HA was improved. Maintaining the hypoxic environment around chondrocytes is important for exerting the anabolic effect of exogenous high molecular weight HA.

研究分野：chondrocyte

キーワード：HIF-1 hyaluronic acid CD44 articular cartilage extracellular matrix hypoxia

### 1. 研究開始当初の背景

関節軟骨は血管構造を持たないため、低酸素環境下にある。低酸素環境は軟骨細胞に対して anabolic な影響を与える。低酸素環境の破綻は変形性関節症 (osteoarthritis; OA) の発症や進行に影響を与えると報告されている。OA の病態にはさまざまなストレスが関与しており、ストレスが軟骨細胞に与える影響を調べることは極めて重要である。これまでわれわれは軟骨細胞におけるストレス応答機構を分子シャペロンである heat shock protein (HSP)70 を中心に研究し、hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  が低酸素によって誘導され、HSP70 の産生を介して軟骨を保護することから、低酸素下でのストレス応答機構に重要な役割を持つ可能性があることを報告してきた。

低酸素環境における軟骨細胞のストレス応答機構の解析が、OA に対する新たな保存療法を開く可能性があると考えた。

### 2. 研究の目的

- (1) 低酸素環境下で関節軟骨を(高分子ヒアルロン酸)HA 添加下で組織培養し、細胞外基質の合成能について解析すること。
- (2) 低酸素環境下にある初代関節軟骨細胞に対する HA の効果のメカニズムを解析すること。

### 3. 研究の方法

- (1) 低酸素環境下で関節軟骨を HA 添加下で組織培養し、細胞外基質の合成能および細胞外基質蛋白の上流転写因子である SOX9 の発現について real-time RT-PCR および Western blotting 法、DMMB 法で解析した。
- (2) 低酸素環境下で初代軟骨細胞を HA 添加下でペレット培養し、Safranin-O 染色および型コラーゲンに対する免疫染色法で組織学的に解析した。
- (3) 低酸素環境下にある初代関節軟骨細胞における HA 受容体の発現を real-time RT-PCR で解析した。
- (4) hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) による CD44 の発現の制御を調べるため、siHIF-1 を初代関節軟骨細胞にトランスフェクションし、HIF-1 および CD44 の発現を real-time RT-PCR および Western blotting 法で解析した。

### 4. 研究成果

- (1) ラット関節軟骨を 4000  $\mu$ g/ml HA 添加下に 72 時間 1%低酸素培養を行い 型コラーゲンおよびアグリカンの mRNA 発現を real-time RT-PCR で解析した(図 1A,B)。型コラーゲンの mRNA の発現は無処置群に対して 4000  $\mu$ g/ml HA および 1%低酸素環境の両刺激群で有意に亢進した。ラット関節軟骨を 4000  $\mu$ g/ml HA 添加下に 1%低酸素培養を行い sGAG 産生量を DMMB assay で定量した(図 1D, E, F)。sGAG 総量の DNA 量による補正値は、無処置群

と比較して HA 添加および低酸素環境の両刺激群で有意に増加した。また、無処置群および HA 添加単独群または低酸素環境下単独群と比較して、HA 添加および低酸素環境の両刺激群で HIF-1 および SOX9 の蛋白産生が増加した(図 2A)。また、無処置群および HA 添加単独群または低酸素環境下単独群と比較して、HA 添加および低酸素環境の両刺激群で SOX9 の遺伝子発現が増加した(図 2B)。

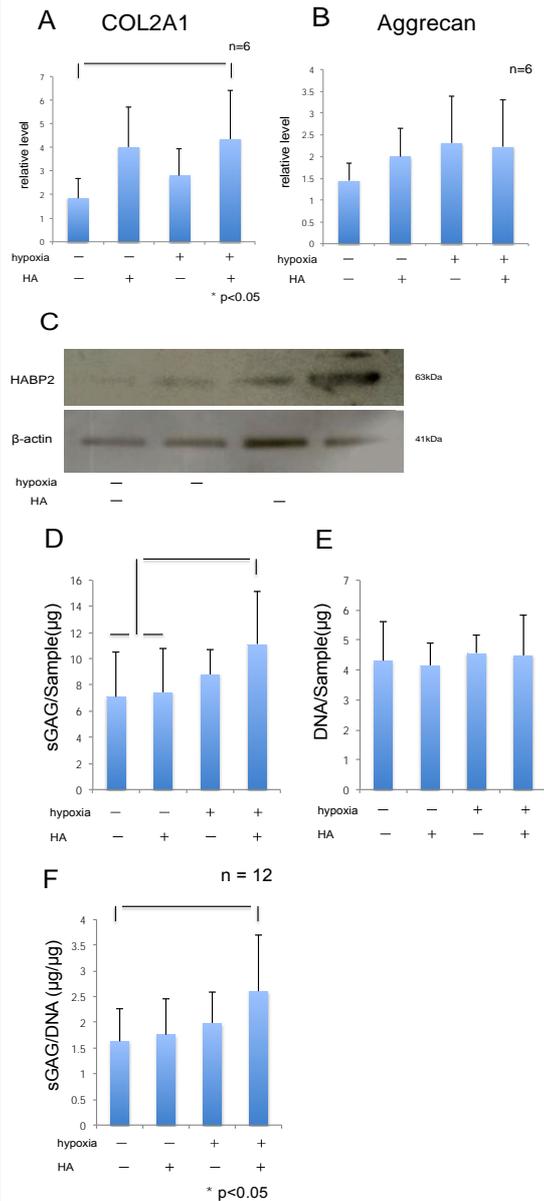


図 1. ラット関節軟骨を 4000  $\mu$ g/ml HA 添加下に 72 時間 1%低酸素培養を行い 型コラーゲンおよびアグリカンの mRNA 発現を real-time RT-PCR で (A, B) HABP2 の蛋白発現を Western blotting 法で解析した (C). ラット関節軟骨を 4000  $\mu$ g/ml HA 添加下に 1%低酸素培養を行い sGAG 産生量を DMMB assay で定量した (D). DNA 量を測定し、sGAG 産生量を補正した (E, F)

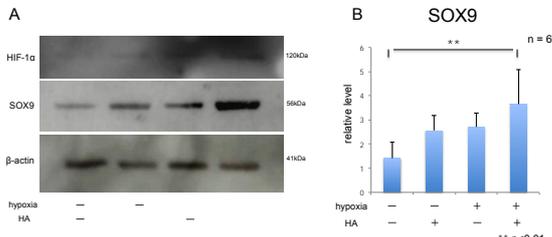


図 2. ラット関節軟骨を 4000  $\mu$ g/ml HA 添加下に 72 時間 1% 低酸素培養を行い SOX9 および HIF-1 の蛋白発現を Western blotting 法で解析した (A). SOX9 の mRNA 発現を real-time RT-PCR で解析した (B).

(2) 組織学的解析では、HA 添加および低酸素環境の両刺激群では、Safranin O 染色および型コラーゲンに対する免疫染色の染色性は、定常酸素群および低酸素のみの群と比較してさらに増加した (図 3A, B) .

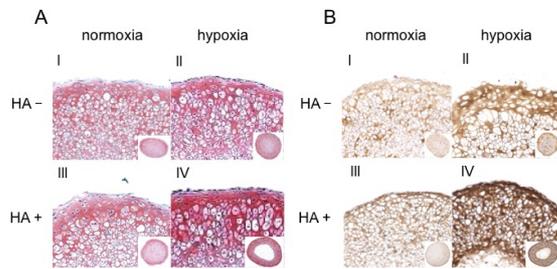


図 3. ラット初代関節軟骨細胞を 4000  $\mu$ g/ml HA 添加下に 14 日間 1% 低酸素環境下でペレット培養を行い, Safranin-O 染色および型コラーゲンに対する免疫染色を行った (A, B)

(3) 低酸素環境下では、HA 受容体のうち CD44 mRNA が最も発現が増加しており、siHIF-1 のトランスフェクションによって発現が有意に抑制された。CD44 mRNA の発現は低酸素環境下で有意に上昇したが、その他の HA 受容体である ICAM-1 および HMMR の遺伝子発現に変化は無かった (図 4A, B, C). LYVE-1 の遺伝子発現は軟骨細胞でみられなかった (data not shown). HIF-1 のターゲット遺伝子である VEGF の遺伝子発現は、CD44 と同様に低酸素環境下で有意に上昇した (図 4D) .

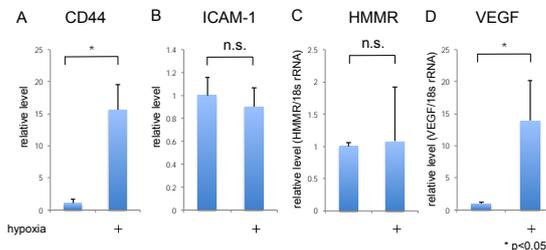


図 4. 酸素環境下における HA 受容体の発現動態を real-time RT-PCR で解析した .

(4) siHIF-1 のノックダウン効果はトランスフェクション後 84 時間でも持続していた (図 5A) . 低酸素環境下では HIF-1 のター

ゲット遺伝子である VEGF の mRNA 発現は増加し、siHIF-1 のトランスフェクションにより発現は有意に抑制された (図 5B) . 低酸素環境下で増加した CD44 mRNA の発現も、siHIF-1 のトランスフェクションにより有意に抑制され、VEGF と同様の発現の変化を示した (図 5C) . 蛋白レベルでも同様に、siHIF-1 のノックダウン効果はトランスフェクション後 84 時間でも持続しており、CD44 は siHIF-1 によって発現が抑制された (図 5D) .

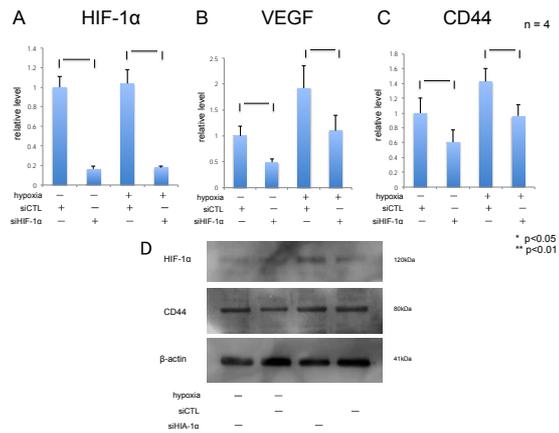


図 5. ラット初代関節軟骨細胞に siHIF-1 をトランスフェクションし、72 時間定常酸素環境下および 1% 低酸素環境下で平板培養し HIF-1、VEGF、CD44 の mRNA 発現を real-time RT-PCR (A, B, C) , HIF-1 および CD44 の蛋白発現を Western blotting 法で解析した (D) .

## 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 2 件)

Shohei Ichimaru, Shuji Nakagawa, Yuji Arai, Tsunao Kishida, Masaharu Shin-Ya, Kuniaki Honjo, Shinji Tsuchida, Hiroaki Inoue, Hiroyoshi Fujiwara, Seiji Shimomura, Osam Mazda, Toshikazu Kubo, Hypoxia Potentiates Anabolic Effects of Exogenous Hyaluronic Acid in Rat Articular Cartilage, International Journal of Molecular Science, 査読有, vol.17, 2016, E1013.

Shinji Tsuchida, Yuji Arai, Kenji A. Takahashi, Tsunao Kishida, Ryu Terauchi, Kuniaki Honjo, Shuji Nakagawa, Hiroaki Inoue, Kazuya Ikoma, Keiichiro Ueshima, Tomohiro Matsuki, Osam Mazda, Toshikazu Kubo, HIF-1a-Induced HSP70 Regulates Anabolic Responses in Articular Chondrocytes under Hypoxic Conditions, JOURNAL OF ORTHOPAEDIC RESEARCH, 査読有, vol.32, 2014, 9975-980.

〔学会発表〕(計9件)

Seiji Shimomura, Shinji Tsuchida, Yuji Arai, Shuji Nakagawa, Hiroaki Inoue, Shohei Ichimaru, Yuta Fujii, Osam Mazda, Toshikazu Kubo, Regulation of inflammatory cytokine expression and osteoclastogenesis by gap junctional protein in vitro and in vivo, The 5th annual meeting of the international cytokine and interferon society, 2017.10.29-11.2, Kanazawa, Japan.

Seiji Shimomura, Hiroaki Inoue, Yuji Arai, Shuji Nakagawa, Shinji Tsuchida, Shohei Ichimaru, Osam Mazda, Toshikazu Kubo, The effect of treadmill running on knee articular cartilage in rats, 20th World Congress of the Osteoarthritis Research Society International, 2017.4.27-30, Caesar's Palace(Las Vegas, United States).

市丸昌平, 中川周士, 新井祐志, 土田真嗣, 井上裕章, 下村征史, 松田 修, 久保俊二, 低酸素環境下における外因性ヒアルロン酸の薬理効果の変化, 第31回日本整形外科学会基礎学術集会, 2016.10.13-14, 博多.

下村征史, 井上裕章, 新井祐志, 中川周士, 土田真嗣, 市丸昌平, 松田 修, 久保俊二, トレッドミル走行がラット膝関節軟骨に与える影響, 第31回日本整形外科学会基礎学術集会, 2016.10.13-14, 博多.

Shohei Ichimaru, Shuji Nakagawa, Yuji Arai, Shinji Tsuchida, Hiroaki Inoue, Seiji Shimomura, Osam Mazda, Toshikazu Kubo, Pharmacological effects of exogenous hyaluronan in articular cartilage under hypoxia 19th World Congress of the Osteoarthritis Research Society International, 2016.3.31-4.3, RAI Convention Center (Amsterdam, Netherlands).

Shohei Ichimaru, Shuji Nakagawa, Yuji Arai, Shinji Tsuchida, Hiroaki Inoue, Seiji Shimomura, Osam Mazda, Toshimazu Kubo, Pharmacological effects of exogenous hyaluronic acid in articular cartilage under hypoxia, 第29回日本軟骨代謝学会, 2016.2.19-20, 広島.

市丸昌平, 中川周士, 新井祐志, 土田真嗣, 井上裕章, 本城邦晃, 白井寿治, 寺内 竜, 松田 修, 久保俊二, 低酸素環境下にある軟骨細胞に対する外因性ヒアルロン酸の薬理効果, 第30回日本整形外科学会基礎学術集会, 2015.10.22-23, 富山.

Kuniaki Honjo, Shinji Tsuchida, Shuji Nakagawa, Hiroaki Inoue, Masazumi Saito, Shohei Ichimaru, Seiji Shimomura, Atsuo Inoue, Ryu Terauchi, Osam Mazda, Toshikazu Kubo. HSP70 induced by HIF-1 regulates anabolic responses in chondrocytes under hypoxic conditions, 18th World Congress of

the Osteoarthritis International, 2015.4.30-5.3. Washington State Convention Center(Seattle, WA, USA)

Shohei Ichimaru, Shinji Tsuchida, Yuji Arai, Shuji Nakagawa, Hiroaki Inoue, Tomohiro Matsuki, Kuniaki Honjo, Keiichiro Ueshima, Osam Mazda, Toshikazu Kubo, The anabolic effects of HIF-1 -induced HSP70 in rabbit articular chondrocyte under hypoxic conditions, 61th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, 2015.3.28-31. MGM Grand Hotel (Las Vegas, NV, USA)

〔その他〕  
ホームページ等なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

新井 祐志 (ARAI YUJI)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：50347449

### (2) 研究分担者

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

中川 周士 (NAKAGAWA SHUJI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：30643382

土田 真嗣 (TSUCHIDA SHINJI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：10719834