

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07195

研究課題名(和文) 軟骨変性疾患におけるNADPHオキシダーゼの役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of NADPH oxidase in cartilage degenerative diseases

研究代表者

井上 咲映 (INOUE, SAKIE)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：20783252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：NADPHオキシダーゼ(NOX)-2に依存した酸性化によるヒアルロニダーゼの活性化が細胞外基質減少の原因であることを突き止めた。関節リウマチでは軟骨の変性以外に骨の吸収が進行することが大きな問題となっている。本研究では、一酸化窒素およびNOX由来の活性酸素種の下流シグナル分子として発見された8-nitro-cGMPが、炎症性サイトカインの刺激により破骨細胞とその前駆細胞で産生され、破骨細胞分化を促進に関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that NADPH oxidase (NOX)-2 activity-dependent acidification induced activation of hyaluronidase in chondrocyte cultures, which caused reduction in extracellular matrix. In rheumatoid arthritis, bone resorption progresses in addition to cartilage degradation. Hence, we studied the molecular mechanism of bone resorption occurs in an NO- and ROS-dependent manner. We found that 8-nitro-cGMP, a novel downstream signaling molecule of NO and ROS, was produced by osteoclasts and its progenitor cells in an NADPH oxidase-dependent manner after stimulation by inflammatory cytokines. We also found that 8-nitro-cGMP promoted osteoclast differentiation.

研究分野：軟骨変性疾患

キーワード：軟骨 軟骨変性疾患 NADPHオキシダーゼ

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(OA)は加齢や関節への過度の機械的刺激によって発症する疾患で、関節軟骨の軟骨細胞の細胞死と細胞外マトリックスの減少を特徴とする。また、関節リウマチ(RA)は免疫異常による滑膜炎が関節軟骨の変性と骨の破壊を引き起こす疾患である。OAおよびRAの発症にはインターロイキン-1(IL-1)などの炎症性サイトカインが関与する。これまでに申請者らの研究グループは、IL-1の刺激を受けた軟骨細胞で、活性酵素(ROS)産生酵素のひとつであるNADPHオキシダーゼ(NOX)-2の発現が誘導され、これが軟骨細胞の細胞死に必要なことを報告してきた。

2. 研究の目的

NOX-2由来の活性酵素(ROS)の役割に着目し、軟骨変性疾患における軟骨細胞外マトリックス減少のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1. IL-1によるヒアルロニダーゼ活性上昇メカニズムの解明

(1)細胞外マトリックス減少へのNOX-2あるいはその他のNOXの関与を明らかにする。7種類のNOXファミリー酵素が知られている。これまでに、NOX-2の軟骨細胞死への関与が明らかなので[J Biol Chem 286:14744-52, 2011]、NOX-2その他のNOXファミリー酵素の発現・活性抑制が細胞内外の酸性化、ヒアルロニダーゼ活性化、細胞外マトリックス減少に与える影響を明らかにした。

(2)細胞外マトリックス減少への軟骨細胞内・外の酸性化の関与を明らかにした。軟骨細胞培養の培地を人為的に様々なpHに固定することで、IL-1依存性のヒアルロニダーゼの活性化および細胞外マトリックスの減少がどのように変化するかを明らかにした。

(3)細胞外マトリックス減少へのヒアルロニダーゼ活性の関与を明らかにする。軟骨細胞に発現する主要なヒアルロニダーゼであるヒアルロニダーゼ-1、-2、-3のRNA干渉がIL-1依存性の細胞外マトリックスの減少に与える影響を明らかにした。

(4)細胞外マトリックス減少へのヒアルロン酸受容体CD44の関与を明らかにする。軟骨細胞はヒアルロン酸受容体であるCD44を介してヒアルロン酸とアグリカンを結合している。そこで、CD44の中和抗体あるいはCD44のRNA干渉がIL-1依存性の細胞外マトリックスの減少に与える影響を明らかにした。

2. 軟骨細胞培養系におけるIL-1による酸性化のメカニズムの解明

軟骨細胞培養系におけるNOX活性に依存した酸性化のメカニズムを解明するために、種々のpH調節タンパク質(Na⁺/H⁺ exchanger、

H⁺-ATPase、monocarboxylate transporterなど)の阻害剤あるいはRNA干渉が軟骨細胞のIL-1依存性の細胞内・外の酸性化に与える影響を明らかにした。

4. 研究成果

(1)NOX阻害剤AEBSFはIL-1誘導性のhyaluronidase発現を抑制しないが、pHを調整しない時にヒアルロニダーゼ活性上昇を抑制した

CD44,hyaluronidase1-3をIL-1存在下、非存在下にて48時間培養しRT-PCRにて評価したところ、IL-1が誘導するヒアルロニダーゼ発現はNOXに非依存性であった(図1A)。軟骨細胞培養でIL-1によって誘導されたヒアルロニダーゼ活性の上昇はpHの調整をしない時にAEBSFによって抑制された(図1B、C)。

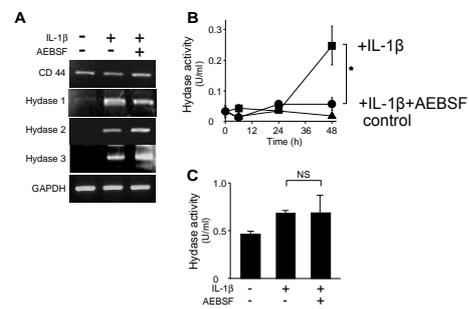


図1 NOX阻害剤はIL-1βが誘導するヒアルロニダーゼ活性上昇を抑制した

(2)NOX阻害剤はIL-1が誘導した細胞内・外の酸性化を抑制した

ATDC5にITSを添加し3週間培養後IL-1と阻害剤を添加し48時間培養し、細胞内外のpHを測定した。

NOX活性は軟骨細胞培養における酸性化に関与していた(図2A、B)。

pHの調整なしでは細胞外基質は減少するが、pHの調節により元の細胞外基質が減少しIL-1添加時の基質減少は少なかった(図2C)。

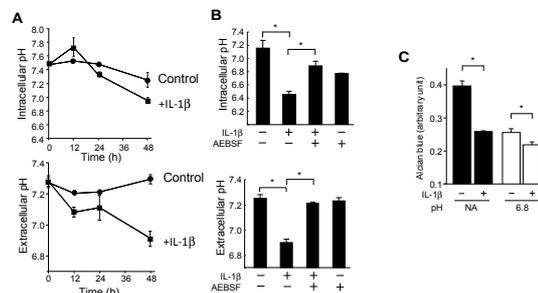


図2 NOX阻害剤はIL-1βが誘導した細胞内・外の酸性化を抑制した

(3)NOX-2に依存してIL-1が細胞内・外の酸性化と細胞外基質減少を誘導した

AEBSFによる酸性化の抑制とNOX2のアンチセンスODNは、NOX-2に依存してIL-1が細胞内・外の酸性化と細胞外基質減少を誘導していることを示した(図3A、B、C、D)[雑誌

論文①、学会発表①～④]。

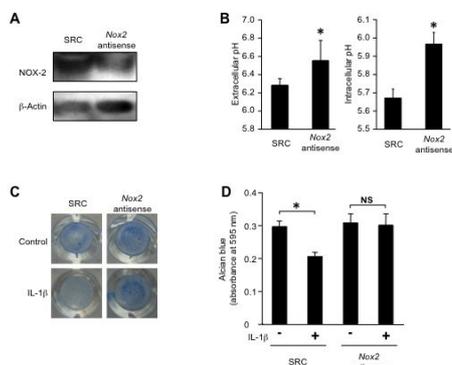


図3 NOX-2に依存してIL-1βが細胞内・外の酸性化と細胞外基質減少を誘導した

(4) 破骨細胞分化が NOX 活性に依存して促進された

RA では軟骨変性に加えて骨吸収の亢進が大きな問題である。そこで、骨吸収における NOX の役割を解析した。破骨細胞前駆細胞は、NOX 活性依存的に 8-nitro-cGMP を生成し、これが破骨細胞分化を促進することを見出した[雑誌論文]。

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)

Kaneko K, Miyamoto Y, Tsukuura R, Sasa K, Akaike T, Fujii S, Yoshimura K, Nagayama K, Hoshino M, Inoue S, Maki K, Baba K, Chikazu D, Kamijo R:

8-Nitro-cGMP is a promoter of osteoclast differentiation induced by RANKL.

Nitric Oxide. 査読有、72 巻、2018 、46-51. doi: 10.1016/j.niox.2017.11.006

Funato S, Yasuhara R, Yoshimura K, Miyamoto Y, Kaneko K, Suzawa T, Chikazu D, Mishima K, Baba K, Kamijo R:

Extracellular matrix loss in chondrocytes after exposure to interleukin-1 in NADPH oxidase-dependent manner.

Cell Tissue Res. 査読有、368 巻、2017 、135-144. doi: 10.1007/s00441-016-2551-2

[学会発表] (計 4 件)

宮本洋一、船登咲映、安原理佳、吉村健太郎、金子児太郎、近津大地、美島健二、馬場一美、上條竜太郎 :

NADPH オキシダーゼ-2 に依存した軟骨基質の減少

第 3 回日本骨免疫学会，2017 年

笹 清人、吉村 健太郎、宮本 洋一、船登 咲映、安原理佳、美島健二、馬場一美、上條竜太郎 :

NADPH オキシダーゼ依存的軟骨マトリックスの喪失.

第 70 回日本酸化ストレス学会学術集会，2017 年

船登咲映、安原理佳、宮本洋一、吉村健太郎、美島健二、馬場一美、上條竜太郎：インターロイキン-1 刺激後の軟骨細胞様 ATDC5 細胞における NADPH オキシダーゼに依存した細胞外基質の減少

第 71 回日本口腔科学会学術集会，2017 年

船登咲映、安原理佳、宮本洋一、吉村健太郎、美島健二、馬場一美、上條竜太郎：インターロイキン-1 で刺激した軟骨細胞による NADPH-オキシダーゼに依存した細胞外マトリックスの分解

第 58 回歯科基礎医学会学術大会，2016 年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

昭和大学歯学部口腔生化学講座
<http://www10.showa-u.ac.jp/~oralbio/> 昭和大学歯学部歯科補綴学講座
<http://prostho.showa-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

井上 (船登) 咲映 (INOUE (FUNATO), Sakie)
昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：20783252

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()