

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：34304

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21192

研究課題名(和文) ExosomeによるOA早期マーカー探索と運動・栄養効果のモニタリング指標の確立

研究課題名(英文) Search for early marker of Osteoarthritis using Exosome and establish monitoring index of exercise and nutritional effects

研究代表者

石飛 博之 (ISHITOBI, Hiroyuki)

京都産業大学・現代社会学部・助教

研究者番号：30772074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：変形性関節症(OA)に対し、ハーブなどに含まれるカルノシン酸(CA)の効果をヒト滑膜・軟骨細胞を用いて検討した。CAはヒト滑膜・軟骨細胞において抗酸化酵素HO-1を活性化させ、さらに軟骨分解酵素などのOA関連遺伝子の発現を抑制した。CAが軟骨細胞においてOA様の変化を抑制する分子機構として、CAは軟骨恒常性を維持するmiR-140を活性化し、Bach1遺伝子の発現を抑制することでHO-1を活性化させることを見出した。今後、CAの効果をマウスレベルで検討することはOA予防に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we explored the effect of carnosic acid (CA) on osteoarthritis (OA) using human synovial fibroblast and human chondrocytes. The expression of heme oxygenase-1(HO-1) was upregulated in human synovial fibroblasts and chondrocytes treated with CA in a dose-dependent manner. CA had no effect on the expression of Col2a1 in chondrocytes. CA suppressed the expression of OA-related genes in human synovial fibroblast and chondrocytes. In addition, the expression of the cartilage-degrading enzyme was suppressed. We found that CA activates miR-140 which maintains cartilage homeostasis and activates HO-1 by suppressing the expression of Bach1 gene as its molecular mechanism. These findings suggest that CA is an effective HO-1 inducer and have a potential to be a supplement for OA prevention.

研究分野：分子生物学 運動器疾患

キーワード：変形性関節症 microRNA カルノシン酸 Exosome

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えた我が国において、「寝たきり」にならず、いかに健康寿命を伸ばすかということは大きな課題である。運動器疾患は寝たきり原因の割合の多くしめ、その中でも変形性関節症(OA)は約3000万人もの罹患者が示唆されている。現在、OAの治療の多くは抗炎症薬による痛みや腫れの抑制、人工関節置換といった対症療法が主な治療方法である。それゆえ疾患マーカーを用いた早期発見やサプリメントなどによる予防といった先制的な医療は殆ど存在しない。今後、更なる高齢化に伴う罹患者の増加と、これに必要とされる医療費の拡大が予測される。また、OA症状の悪化は著しくQOL(Quality of life)を損なうことから、これらの対策としてOAに対する新たな治療の開発や診断マーカーの発見が必要である。

OAの原因の一つに加齢や機械的ストレスによって誘導される酸化ストレスが考えられていたことから、研究代表者らは抗酸化酵素ヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)に注目し研究を進めてきた。HO-1の抑制因子であるBach1欠損マウスを用いた解析から、野生型に比べHO-1が高発現するBach1欠損マウスはOA様変化が抑制されることを報告している(Takada T et al., Arthritis Res Ther, 2015)。このことから、抗酸化能を高めるとの報告のある適度な運動や栄養素の摂取(Davidson RK et al., Arthritis Rheum, 2013)によってHO-1を活性化することはOAの予防効果が得られるのではないかと仮説を立て、これを明らかにすることを試みた。また、これらの分子機構については新たな遺伝子制御因子であるmicroRNA(miRNA)に注目して研究を行った。miRNAは複数の標的因子の発現を微調整することで軟骨の恒常性を維持していることが報告されている(Miyaki S et al., Genes Dev, 2010)。また、miRNAは細胞内で機能したのち分解されると考えられてきたが、近年では骨髄や血液等の体液に分泌されるExosome等の顆粒小胞にmRNAや、タンパクと共に含まれ、標的細胞内へ移動し、遺伝子の発現を制御するという細胞間コミュニケーション因子として注目されている(Valadi H et al., Nature Cell Biol, 2007)。以上のことから、本研究ではOA疾患に対し、抗酸化ストレスの観点からアプローチを試み、分子機構としてmiRNAに注目し研究を進めた。

## 2. 研究の目的

HO-1の活性化がOA予防に繋がるという仮説を明らかにするために、栄養成分としてハーブなどに含まれるカルノシン酸(CA)に注目した。CAはOA予防に効果があると報告されたスルフォラファン(Davidson RK et al., Arthritis Rheum, 2013)と同様に抗酸化作用があること、神経細胞などでは、酸化ストレスから生体を防御するKeap-Nrf2システムを

制御しHO-1を活性化することが知られている(Satoh T et al., J Neurochem, 2008)。本研究では、CAが関節を構成する細胞に対し、関節保護作用があるか、及びそのメカニズム検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

- CAによるOA予防効果の検討 -

### (1) 滑膜細胞を用いた in-vitro 実験

CA及びIL1-をヒト滑膜細胞に添加し、HO-1の発現をウエスタンブロット法により定量した。OA関連遺伝子として、軟骨基質や軟骨分解酵素の発現をリアルタイムPCR法により評価した。

### (2) 軟骨細胞の in-vitro 実験

CA及びIL1-をヒト軟骨細胞に添加し、HO-1の発現をウエスタンブロット法により定量した。OA関連遺伝子として、軟骨基質や軟骨分解酵素の発現をリアルタイムPCR法により評価した。また、マウス由来軟骨組織を用いて、同様にCA及びIL-1を添加し、グルコサミノグリカン(GAG)の分解抑制能を評価した。

### (3) OA様変化の抑制分子機構(軟骨細胞)

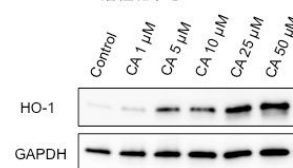
CAを添加した軟骨細胞からRNAを精製し、miRNAマイクロアレイ解析を行った。得られた結果とデータベース解析からmiRNAとその標的遺伝子を予測した。予測された標的遺伝子の3'UTR側をルシフェラーゼ遺伝子の下流に繋いだベクターをHEK293T細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイにより評価を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 滑膜細胞を用いた in-vitro 実験

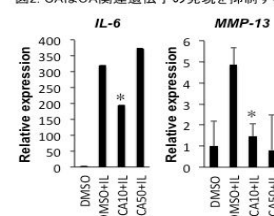
CAをヒト滑膜細胞に添加したところ、濃度依存的にHO-1の発現が増加することを確認した(図1)。

図1. CA濃度依存的にHO-1は活性化する



CA及びIL1-をヒト滑膜細胞に添加し、OA関連遺伝子等の発現を検討したところ、IL-6やMMP-13の発現を抑制することが明らかとなった(図2)。

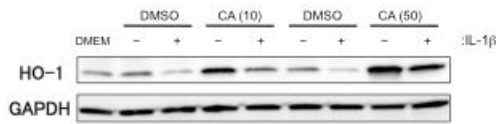
図2. CAはOA関連遺伝子の発現を抑制する



(2) 軟骨細胞の In-vitro における評価

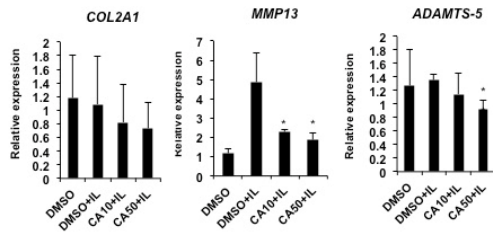
CA 及び IL-1 $\beta$  をヒト軟骨細胞に添加し、HO-1 の発現を評価した結果、CA10,50 $\mu$ M と濃度依存的に HO-1 の発現の増加を確認した。また、CA 添加により、IL-1 $\beta$  によって誘導される HO-1 の発現低下を抑制することが明らかとなった(図3)。

図3 CA,IL-1 $\beta$  添加によるHO-1の発現変化



そこで、OA 関連遺伝子等の発現を検討した結果、CA 添加によって軟骨基質を構成する Col2a1 の遺伝子発現に変化は観察されなかった。一方で、IL-1 $\beta$  添加によって発現が増加した軟骨分解酵素 ADAMTS-5 や MMP-13 の発現は CA を添加した場合、発現を抑制できることを確認した(図4)。

図4 CA,IL-1 $\beta$  添加によるOA 関連遺伝子の変化



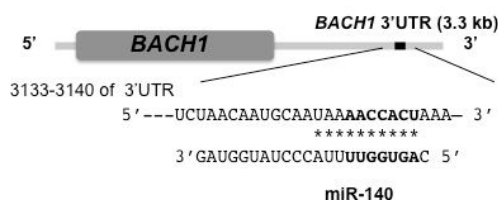
また、マウスより関節軟骨組織を採取し、同様の処理を行い、GAG の放出を定量した結果、CA 存在下では GAG の放出が抑制された。

(1),(2)の研究成果から、IL-1 $\beta$  誘導性の OA 様状況下において、CA は関節を構成する滑膜細胞、軟骨細胞を保護することが明らかとなった。

(3) OA 様変化の抑制分子機構(軟骨細胞)

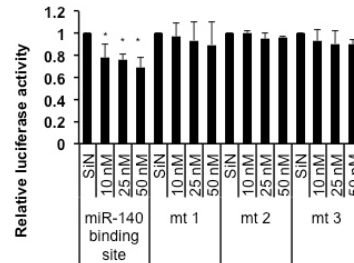
CA 添加を行なった軟骨細胞を用いて miRNA に対するマイクロアレイ解析を行なった結果、軟骨の恒常性維持に重要な役割を果たす miRNA-140 の発現増加を確認した。Target Scan の結果 Bach1 遺伝子 3' UTR 側に miR-140 の結合配列の存在が確認され、miR-140 が Bach1 を標的遺伝子としていることが予測された(図5)。

図5. BACH1 遺伝子の3' UTR側にはmiR-140の結合配列が存在する



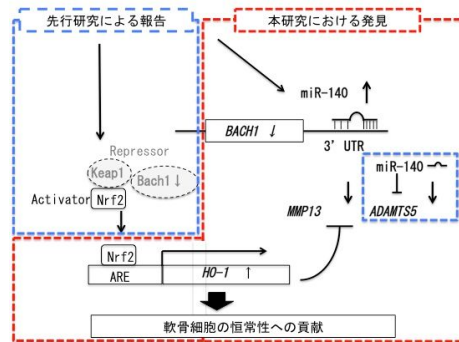
Bach1 の 3' UTR 側をルシフェラーゼ遺伝子の下流に繋いだベクターを HEK293T 細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイにより評価を行なった。miR-140 を導入した場合、ルシフェラーゼの活性が低下した。一方、miR-140 の結合配列に変異を導入した場合、ルシフェラーゼの活性に変化が見られなかった(図6)。

図6. ルシフェラーゼ活性の変化



以上のことから、IL-1 $\beta$  誘導性の OA 様状況下において、CA は軟骨の恒常性維持に重要な microRNA-140 を介して Bach1 の機能を抑制すること、そしてその結果、HO-1 の活性化を誘導して関節を構成する細胞を保護するという新たな機序が明らかとなった(図7)。

図7. 軟骨細胞におけるCAの作用機序



現在、マウス個体を用いて CA の関節投与や飲水投与による検討を行なっている。In-vitro での効果が In-vivo においても観察できれば将来的にはサプリメントによる OA 予防の開発に繋がる可能性がある。

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5件)全て査読有

- Miyata M, Iwata S, Mifude C, Tajima M, Kameyama M, Ihara M, Matsui T, Yamagishi S, Ishitobi H, Miyaki S, Kaseda K.

A novel *Mucidosphaerium* sp. from Beppu hot spring down-regulates inflammatory gene expression in skin and articular cells. *Alternative Therapies in Health and Medicine*. 2018. In press.

2. Chie K. M, Ishitobi H, Miyaki S and Kaseda K. Mitochondrial Regulation in the Pathogenic Process of Inflammatory Arthritis by Microalgal Mucidosphaerium Species. Molecular Medicine: Current Aspects. 2017 1(1):003.
3. Sumiyoshi N\*, Ishitobi H\* (co-first author), Miyaki S, Miyado K, Adachi N, Ochi M. The role of tetraspanin CD9 in osteoarthritis using three different mouse models. Biomed Res. 2016;37(5):283-291.
4. Furuta T, Miyaki S, Ishitobi H, Ogura T, Kato Y, Kamei N, Miyado K, Higashi Y, Ochi M. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Promote Fracture Healing in a Mouse Model. Stem Cells Transl Med. 2016 Dec;5(12):1620-1630.
5. Shibata S, Ishitobi H, Miyaki S, Kawaoka T, Kayashima T, Matsubara K. Carnosic acid protects starvation-induced SH- SY5Y cell death through Erk1/2 and Akt pathways, autophagy, and FoxO3a. International. Int J Food Sci Nutr. 2016 Dec;67(8):977-82.

〔学会発表〕(計3件)

1. 石飛 博之, 真田 洋平, 加藤 義雄, 生田 祥也, 柴田 紗知, 松原 主典, 安達 伸生, 味八木 茂.  
カルノシン酸は heme oxygenase-1 を誘導し軟骨変性を抑制する  
日本農芸化学会, 2018年3月15-18日  
ホテルナゴヤキャッスル, 名城大学 (名古屋市)
2. 柴田紗知, 石飛博之, 奥田真友美, 味八木茂, 萱島知子, 川岡知博, 松原主典.  
老化促進マウスにおけるカルノシン酸の肝臓及び腎臓保護効果  
日本農芸化学会, 2017年3月17-20日  
ウェスティン都ホテル京都, 京都女子大学(京都市)
3. 松原主典, 柴田紗知, 石飛博之, 味八木茂, 萱島知子, 川岡知博.  
老化促進マウスにおけるカルノシン酸の長期間経口摂取による脳機能及び運動機能への影響.

日本抗加齢学会, 2016年6月10-12日パ  
シフィコ横浜 会議センター (横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石飛 博之 (ISHITOB I, Hiroyuki)  
京都産業大学・現代社会学部健康スポーツ  
社会学科・助教  
研究者番号: 30772074

(4) 研究協力者

味八木 茂 (MIYAKI, Shigeru)  
広島大学・病院・講師  
研究者番号: 10392490