

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11024

研究課題名(和文) 活性型ビタミンD3誘導体:エルデカルシトールの永久軟骨細胞に対する作用機序の解明

研究課題名(英文) The effect of Eldecalcitol on permanent articular chondrocytes.

研究代表者

大田 陽一(OHTA, Yoichi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：50633484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、活性型ビタミンD3誘導体(エルデカルシトール)の軟骨細胞、特に永久軟骨細胞に対する作用機序の解明を行うことにより、関節軟骨変性予防効果のメカニズムを追及することである。マウス骨端部の軟骨細胞から表層軟骨細胞と成長軟骨細胞を分離し培養を行った。エルデカルシトール添加後のRNAを回収し、関節マーカーの発現評価を中心に研究を行った。転写因子Ergの発現について検索した結果、表層軟骨細胞において、エルデカルシトール投与細胞では非投与細胞と比較してErgの発現量は有意に増加した。一方、成長軟骨細胞ではエルデカルシトール投与細胞と非投与細胞でErgの発現量に有意な差は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

活性型ビタミンD3誘導体(エルデカルシトール)は表層軟骨細胞：永久軟骨細胞と成長軟骨細胞ではその作用効果に相違があることが考えられた。これまでにマウス変形性関節症誘導モデルを用い、エルデカルシトールの局所関節内投与による早期における関節軟骨変性予防効果を解明した(Biochem Biophys Res Commun. 2018 ;495(1):179-184.)。本研究の結果からエルデカルシトールの関節軟骨変性予防効果は永久軟骨細胞である関節軟骨表層細胞をターゲットとしていることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the effect of active vitamin D3 analog (eldecalcitol) on chondrocytes, especially permanent articular chondrocytes, and its preventive effect on articular cartilage degradation. Cartilage tissue was harvested from neonatal mice, then isolated to superficial zone chondrocytes and growth plate chondrocytes. Treatment of superficial zone chondrocytes with eldecalcitol significantly increased the expression of transcription factor Erg. On the other hand, there was no significant increase of Erg expression in the treatment of growth plate chondrocytes with eldecalcitol.

研究分野：整形外科学

キーワード：活性型ビタミンD3誘導体 エルデカルシトール 関節軟骨 永久軟骨細胞

1. 研究開始当初の背景

関節軟骨の変性に起因する痛みを伴う変形性関節症の患者数は、超高齢社会を迎えている現在、飛躍的に増加しており、患者の QOL (Quality of Life) を著しく低下させている。それゆえ、変形性関節症を主体とした関節軟骨の変性予防は、変性軟骨の再生とともに、高齢者の QOL を維持し、健康寿命を延伸するうえで、重要な課題である。

関節軟骨組織は大別すると、成長軟骨 (Transient articular cartilage) と永久軟骨 (Permanent articular cartilage) の 2 種類に分類される。前者は関節軟骨組織の大部分を占める軟骨細胞である成長軟骨細胞によって形成され、肥大化、石灰化などの最終分化を経て骨組織に置換されるのに対して、特に後者を形成する骨端部側の軟骨細胞である永久軟骨細胞は最終分化することなく関節軟骨 (永久軟骨) として機能することが知られている。また、関節形成時には GDF-5 や Wnt9a などの様々な因子やシグナル伝達経路が作用していることが考えられている (引用文献)。特に軟骨細胞分化調節機構に関わるメカニズムの一つとして、転写因子 Erg (ets-related-gene) が軟骨細胞分化を制御し、関節軟骨機能の長期維持に役立っていることが報告されている (引用文献)。

また、近年、臨床研究において、血清ビタミン D の低値が変形性膝関節症や変形性股関節症の進行に関係するという報告 (引用文献、) がされており、*In vitro* の研究では、軟骨細胞にビタミン D レセプターが存在すること (引用文献、) が報告されている。これらに注目し、我々は活性型ビタミン D₃ 誘導体：エルデカルシトール (1,25-dihydroxy-2-(3-hydroxypropyloxy) vitamin D₃) の関節内投与がマウス内側不安定型関節症モデルの関節軟骨変性予防効果があることを発表した (引用文献)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、活性型ビタミン D₃ 誘導体 (エルデカルシトール) の軟骨細胞、特に永久軟骨細胞に対する作用機序の解明を行うことにより、関節軟骨変性予防効果に関するメカニズムを追及することである。

3. 研究の方法

(1) エルデカルシトールによる表層軟骨細胞分化制御の評価

生後 3-5 日のマウス骨端部の軟骨細胞を単離した。単離した軟骨細胞を表層軟骨細胞と成長軟骨細胞に分離し (引用文献)、表層軟骨細胞に 1,25-dihydroxy-2-(3-hydroxypropyloxy) vitamin D₃ (10⁻⁹M) を添加後、RNA を回収し、関節軟骨マーカーとして Erg、Lubricin、PTHrP の発現量を real time RT-PCR 法を用いて評価した。その他、軟骨細胞分化マーカーとして Type X コラーゲンの発現についても評価した。

(2) エルデカルシトールによる成長軟骨細胞分化制御の評価

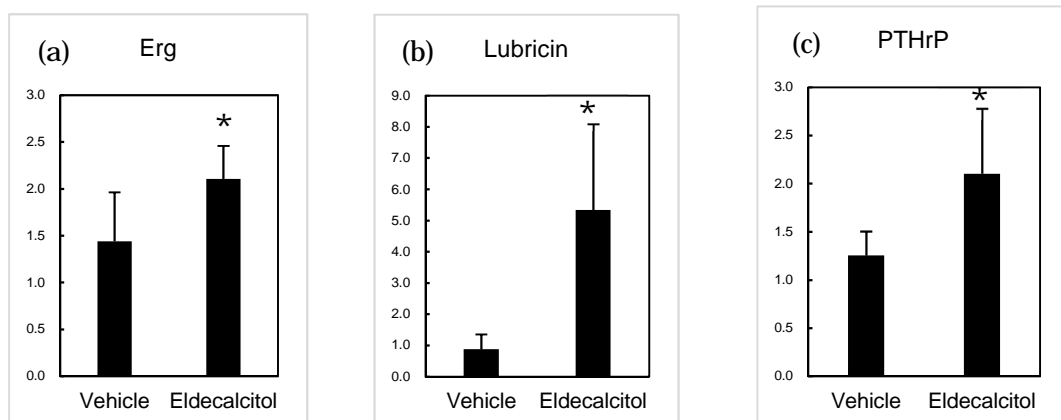
生後 3-5 日のマウス骨端部の軟骨細胞を単離した。単離した軟骨細胞を表層軟骨細胞と成長軟骨細胞に分離し (引用文献)、成長軟骨細胞に 1,25-dihydroxy-2-(3-hydroxypropyloxy) vitamin D₃ (10⁻⁹M) を添加後、RNA を回収し、関節軟骨マーカーとして Erg、Lubricin の発現量を real time RT-PCR 法を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) エルデカルシトールによる表層軟骨細胞分化制御の評価

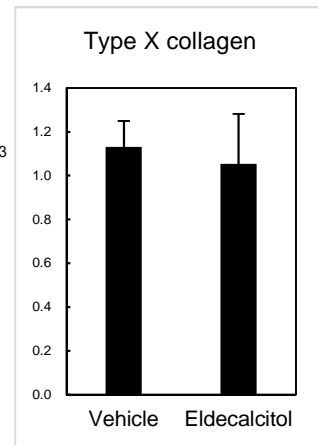
1,25-dihydroxy-2-(3-hydroxypropyloxy) vitamin D₃ (10⁻⁹M) を添加後の real time RT-PCR 法の結果、表層軟骨細胞においては 1,25-dihydroxy-2-(3-hydroxypropyloxy) vitamin D₃ (10⁻⁹M) 投与細胞では非投与細胞と比べて Erg、Lubricin 及び PTHrP の有意な発現量の増加が認められた (図 1-a, b, c)。

図 1 : 表層軟骨細胞における関節軟骨マーカーの評価 (*: p<0.05)



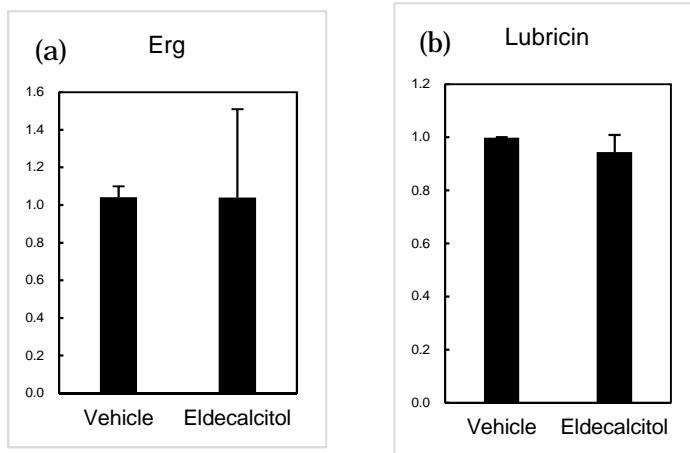
Type X コラーゲンの発現においては、
1,25-dihydroxy-2-(3-hydroxypropyloxy) vitamin D₃ (10⁻⁹M) 投与による発現上昇は認められなかった (図 2)。

図 2 : 表層軟骨細胞における軟骨細胞分化マーカーの評価



(2)エルデカルシトールによる成長軟骨細胞分化制御の評価
一方、1,25-dihydroxy-2-(3-hydroxypropyloxy) vitamin D₃ (10⁻⁹M) を添加後の real time RT-PCR 法の結果、成長軟骨細胞では Erg、Lubricin 発現量において 1,25-dihydroxy-2-(3-hydroxypropyloxy) vitamin D₃ (10⁻⁹M) 投与細胞と非投与細胞でいずれも有意な差は認められなかった (図 3-a,b)。

図 3 : 成長軟骨細胞における関節軟骨マーカーの評価



(図 1、2、3 ; Eldecalcitol: 1,25-dihydroxy-2-(3-hydroxypropyloxy) vitamin D₃)

研究結果(1)、(2)から、エルデカルシトールによる表層軟骨細胞：永久軟骨細胞分化制御機構の存在が示唆された。また、永久軟骨細胞と成長軟骨細胞ではエルデカルシトールの作用効果に相違があることが考えられた。これまでにわれわれはマウス変形性関節症誘導モデルを用い、エルデカルシトールの局所関節内投与による早期における関節軟骨変性予防効果を解明した(Biochem Biophys Res Commun. 2018 ;495(1):179-184.)。本研究の結果から考えると、エルデカルシトールによる関節軟骨変性予防効果は永久軟骨細胞である関節軟骨表層細胞をターゲットとしていることが考えられた。また、その投与方法としてエルデカルシトールの関節内局所投与が関節軟骨変性予防効果に有用であったのではないかと考えている。

< 引用文献 >

Koyama E, Shibukawa Y, Nagayama M, Sugito H, Young B, Yuasa T, Okabe T, Ochiai T, Kamiya N, Rountree RB, Kingsley DM, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M, Pacifici M. A distinct cohort of progenitor cells participates in synovial joint and articular cartilage formation during mouse limb skeletogenesis. *Dev Biol.* 2008;316(1):62-73.

Ohta Y, Okabe T, Larmour C, Di Rocco A, Maijenburg MW, Phillips A, Speck NA, Wakitani S, Nakamura T, Yamada Y, Enomoto-Iwamoto M, Pacifici M, Iwamoto M. Articular cartilage endurance and resistance to osteoarthritic changes require transcription factor Erg. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(10):2679-90.

Muraki S, Dennison E, Jameson K, Boucher BJ, Akune T, Yoshimura N, Judge A, Arden NK, Javaid K, Cooper C. Association of vitamin D status with knee pain and radiographic knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2011;19(11):1301-6.

Chaganti RK, Parimi N, Cawthon P, Dam TL, Nevitt MC, Lane NE. Association of 25-hydroxyvitamin D with prevalent osteoarthritis of the hip in elderly men: the osteoporotic fractures in men study. *Arthritis Rheum.* 2010;62(2):511-4.

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

Bergink AP, Uitterlinden AG, Van Leeuwen JP, Buurman CJ, Hofman A, Verhaar JA, Pols HA. Vitamin D status, bone mineral density, and the development of radiographic osteoarthritis of the knee: the rotterdam Study. *J Clin Rheumatol*. 2009;15(5):230-7.

Norman AW, Roth J, Orci L. The vitamin D endocrine system: steroid metabolism, hormone receptors, and biological response (calcium binding proteins). *Endocr Rev*. 1982;3(4):331-66.

Tetlow LC, Smith SJ, Mawer EB, Woolley DE. Vitamin D receptors in the rheumatoid lesion: expression by chondrocytes, macrophages, and synoviocytes. *Ann Rheum Dis*. 1999;58(2):118-21.

Yamamura K, Ohta Y, Mamoto K, Sugama R, Minoda Y, Nakamura H. Effect of eldecalcitol on articular cartilage through the regulation of transcription factor Erg in a murine model of knee osteoarthritis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;495(1):179-184.

Yasuhara R, Ohta Y, Yuasa T, Kondo N, Hoang T, Addya S, Fortina P, Pacifici M, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M. Roles of β -catenin signaling in phenotypic expression and proliferation of articular cartilage superficial zone cells. *Lab Invest*. 2011;91(12):1739-1752.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamamura Kazumasa, Ohta Yoichi, Mamoto Kenji, Sugama Ryo, Minoda Yukihide, Nakamura Hiroaki	4. 巻 495
2. 論文標題 Effect of eldecalcitol on articular cartilage through the regulation of transcription factor Erg in a murine model of knee osteoarthritis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 179 ~ 184
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2017.10.155	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大田 陽一、山村 一正、真本 建司、竹村 進、中村 卓、洲鎌 亮、箕田 行秀、中村 博亮
2. 発表標題 活性型ビタミンD3誘導体（エルデカルシトール）の転写因子Ergを介した関節軟骨変性予防効果
3. 学会等名 第32回 日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山村 一正、大田 陽一、真本 建司、箕田 行秀、洲鎌 亮、中村 博亮
2. 発表標題 活性型ビタミンD3誘導体（エルデカルシトール）の転写因子Ergを介した関節軟骨細胞に与える影響
3. 学会等名 第32回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 真本 建司、大田 陽一、上山 秀樹、市川 耕一、今井 祐記、箕田 行秀、高岡 邦夫、中村 博亮
2. 発表標題 -TCPを担体としたrh-BMP-2局所投与とZoledronate全身投与の併用による骨髄内環境下骨形成促進効果
3. 学会等名 第32回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	洲鎌 亮 (SUGAMA Ryo) (00779457)	大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師 (24402)	
研究 分担者	箕田 行秀 (MINODA Yukihide) (90453133)	大阪市立大学・大学院医学研究科・講師 (24402)	