

令和元年6月8日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17097

研究課題名(和文) 軟骨疾患に対する活性イオウ種による新規治療法の開発基盤の確立

研究課題名(英文) An in vitro study of reactive sulfur species for treatment of cartilage diseases

研究代表者

星野 真理江 (Hoshino, Marie)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：10756464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：NaHSは活性イオウ分子種(RSS)の前駆物質である。NaHSは、器官培養マウス胎児脛骨の伸長を促進した。組織解析によりNaHSは成長板の増殖軟骨細胞層の幅を広げることが分かった。NaHSは初代培養軟骨細胞の増殖を促進した。一方、NaHSはII型コラーゲンやX型コラーゲンなど軟骨細胞の分化マーカーの発現には影響を及ぼさなかった。RSS産生酵素の一つと考えられているシスタチオニン- γ -リアーゼの阻害は軟骨細胞の増殖を抑制した。以上より、硫化水素やそれ由来のRSSは軟骨細胞増殖を促進すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟骨は血管がなく、酸素の供給に乏しい組織である。酸素呼吸以外の方法で増殖に要するエネルギーを獲得していると考えられる。最近、ミトコンドリアにおけるイオウ呼吸の存在が示唆されている。電子供与体として活性イオウ分子種を、電子供与体として硫化水素を利用するものである。今回、硫化水素が軟骨細胞の増殖を促進することが明らかとなったことから、酸素の供給に乏しい環境下にある軟骨細胞は、イオウ呼吸を利用している可能性が示唆される。また、今回の成果は、骨伸長の新しい制御方法開発の基礎となるものである。

研究成果の概要(英文)：Sodium hydrogen sulfide (NaHS), a persulfide generator, accelerated elongation of mouse embryonic tibias in ex-vivo cultures. Histochemical analyses revealed that NaHS expanded width of the proliferating zone in growth plates. While NaHS facilitated proliferation of mouse primary chondrocytes, it did not affect the expression of mRNAs for type II and type X collagens and aggrecan in chondrocytes. In addition, propargylglycine, an inhibitor for cystathionine gamma-lyase, a persulfide-producing enzyme, suppressed both elongation of the tibias and proliferation of chondrocytes. These observations indicate that persulfides promote elongation of bones as a consequence of enhanced proliferation of growth plate chondrocytes.

研究分野：生化学

キーワード：軟骨細胞 硫化水素 活性イオウ分子種

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素 (NO) や一酸化炭素 (CO) に加え、硫化水素 (H₂S) がガス状シグナル分子として同定された。骨や軟骨に対する硫化水素の作用については、ほとんど報告がない。硫化水素は、より反応性の高い活性イオウ分子種の前駆体であることが知られている。活性イオウ分子種は、イオウ原子が複数結合した分子で、NO と活性酸素の下流シグナル分子である 8-ニトロ-cGMP を始めとして、種々の求電子化合物と反応し、その生物活性を消失させることが報告されている (1)。また、タンパク質のシステイン-SH 基と反応しポリサルファー化することで、タンパク質の機能を変化させることが示唆されている (2, 3)。一方、上記のように活性イオウ分子種と反応することで分解・不活性化することが知られている新規シグナル分子 8-ニトロ-cGMP も種々のタンパク質のシステイン-SH 基と反応し、これに cGMP が付加される S-グアニル化と呼ばれる翻訳後修飾をすることで、様々な生物活性を発揮することが知られているが (4)、骨・軟骨組織での 8-ニトロ-cGMP の動態や生理・病理学的機能は報告がなく、重要な研究課題として残されていた。NO や活性酸素が骨・軟骨の発生、成長、種々の病態発現に関与することが示唆されていることから、NO や活性酸素の下流シグナルおよびその調節因子である 8-ニトロ-cGMP および硫化水素や活性イオウ分子種などが骨・軟骨組織でどのような役割を持っているかは非常に興味深い問題である。本研究では、これらの分子が骨伸長にどのような役割を果たしているか、さらに、骨伸長を司る成長板の形態や成長板を構成する軟骨細胞の増殖にどのような影響を及ぼすかを検討することとした。また、我々は、軟骨細胞様 ATDC5 細胞をインターロイキン-1 刺激することで細胞死および基質分解が進行することを報告しており (5-7)、この *in vitro* 軟骨変性モデルを用いて 8-ニトロ-cGMP および硫化水素や活性イオウ分子種の保護作用も合わせて解析することとした。また、本研究を始める段階で、我々は、予備的検討において、マウス胎児脛骨の器官培養系に硫化水素ドナーである硫化水素ナトリウム (NaHS) を添加することで脛骨の長軸方向への伸長が促進されることを見出していた。

2. 研究の目的

硫化水素ドナーである NaHS および Na₂S₂、Na₂S₃、Na₂S₄ などの活性イオウ分子種ドナーを培地中に添加し、軟骨細胞の増殖に及ぼす影響を解析した。軟骨細胞の分化マーカー遺伝子の発現に及ぼすこれらのイオウ化合物の影響を解析した。また、NaHS、Na₂S₂、Na₂S₃、Na₂S₄ を器官培養マウス胎児脛骨の培養液に添加し、脛骨の伸長を計測した。成長板軟骨の組織染色を行い成長板の形態を解析した。また、上記のように硫化水素や活性イオウ分子種が 8-ニトロ-cGMP の分解不活性化の開始因子であることから、8-ニトロ-cGMP は軟細胞あるいは培養脛骨に対して硫化水素や活性イオウ分子種と逆の効果をもたらすと予想した。そこで、軟骨細胞の増殖および培養脛骨の伸長に対する 8-ニトロ-cGMP の影響を調べた。さらに、我々は IL-1 によって誘導される軟骨細胞死が NO および活性酸素依存的に起こることを見出していることから、IL-1 によって誘導される軟骨細胞死に対する NaHS および Na₂S₂、Na₂S₃、Na₂S₄ の保護作用を ATDC5 細胞を用いて検討した。

3. 研究の方法

哺乳 1 日齢の ddY マウスの肋骨をコラゲナーゼ消化することで肋軟骨細胞を回収し、培養した。また、胎生 16 日の ICR マウスから脛骨を採取し、器官培養を行った。それぞれの培養系に NaHS および Na₂S₂、Na₂S₃、Na₂S₄ あるいは 8-ニトロ-cGMP を添加した。細胞増殖は細胞数の計測により評価した。脛骨の伸長は、実体顕微鏡下に長軸方向の長さを生息することで評価した。軟骨細胞の分化マーカーとして、II 型コラーゲン遺伝子、X 型コラーゲン遺伝子の発現を定量的 RT-PCR により解析した。マウス軟骨細胞株 ATDC5 を IL-1 存在下に培養し、細胞死を誘導する際に、NaHS および Na₂S₂、Na₂S₃、Na₂S₄ を IL-1 と同時に加え、72 時間培養後に細胞死を評価した。

4. 研究成果

NaHS は活性イオウ分子種の前駆物質である。NaHS は、器官培養マウス胎児脛骨の伸長を促進した。組織解析により NaHS は成長板の増殖軟骨細胞層の幅を広げることが分かった。NaHS は初代培養軟骨細胞の増殖を促進した。一方、II 型コラーゲンや X 型コラーゲンなど軟骨細胞の分化マーカーの発現には影響を及ぼさなかった。RSS 産生酵素の一つと考えられているシタチオニン- リアーゼの阻害は軟骨細胞の増殖を抑制した。以上より、硫化水素やそれ由来の RSS は軟骨細胞増殖を促進すると考えられた。一方、活性イオウ分子種ドナーの Na₂S₂、Na₂S₃ あるいは Na₂S₄ にはそのような作用が認められなかった。

8-ニトロ-cGMP は軟骨細胞の増殖および培養脛骨の伸長を促進した。8-ニトロ-cGMP は、培養脛骨の成長板軟骨の増殖軟骨細胞層で生成していることを見出した。さらに 8-ニトロ-cGMP は、増殖軟骨細胞の増殖を促進することを明らかにした。IL-1 により誘導される ATDC5 細胞の細胞死は、NaHS あるいは活性イオウ分子種ドナーにより抑制されなかった。

軟骨は血管がなく、酸素の供給に乏しい組織である。酸素呼吸以外の方法で増殖に要するエネルギーを獲得していると考えられる。最近、ミトコンドリアにおけるイオウ呼吸の存在が示唆されている。電子供与体として活性イオウ分子種を、電子供与体として硫化水素を利用するものである。今回、硫化水素が軟骨細胞の増殖を促進することが明らかとなったことから、酸素

の供給に乏しい環境下にある軟骨細胞は、イオウ呼吸を利用している可能性が示唆される。また、今回の成果は、骨伸長の新しい制御方法開発の基礎となるものである。

<引用文献>

- (1) Nishida M, et al., Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration. *Nat Chem Biol* 8:714-724, 2012
- (2) Ida T, et al., Reactive cysteine persulfides and S-polysulfidation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:7606-7611, 2014
- (3) Akaike T, et al., Cysteinyl-tRNA synthase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nat Commun* 8:1177, 2017
- (4) Sawa T, et al., Protein-S-guanylation by the biological signal 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Nat Chem Biol* 3:727-735, 2007
- (5) Yasuhara R, et al., Interleukin-1 induces death in chondrocyte-like ATDC5 cells through mitochondrial dysfunction and energy depletion in a reactive nitrogen and oxygen species-dependent manner. *Biochem J* 389:315-323, 2005
- (6) Yoshimura K, et al., Monocarboxylate transporter-1 is required for death in mouse chondrocytic ATDC5 cells exposed to interleukin-1 via late phase activation of nuclear factor B and expression of phagocyte-type NADPH oxidase. *J Biol Chem* 289:15621-16630, 2011
- (7) Funato S, et al., Extracellular matrix loss in chondrocytes after exposure to interleukin-1 in NADPH oxidase-dependent manner. *Cell Tissue Res* 368:135-144, 2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Kotaro Kaneko, Yoichi Miyamoto, Risa Tsukuura, Kiyohito Sasa, Takaaki Akaike, Shigemoto Fujii, Kentaro Yoshimura, Kazuhiro Nagayama, Marie Hoshino, Sakie Inoue, Koutaro Maki, Kazuyoshi Baba, Daichi Chikazu, Ryutaro Kamijo: 8-Nitro-cGMP is a promoter of osteoclast differentiation induced by RANKL. *Nitric Oxide* 72:46-51, 2018 (査読有)

Marie Hoshino, Kotaro Kaneko, Yoichi Miyamoto, Kentaro Yoshimura, Dai Suzuki, Takaaki Akaike, Tomohiro Sawa, Tomoaki Ida, Shigemoto Fujii, Hideshi Ihara, Junichi Tanaka, Risa Tsukuura, Daichi Chikazu, Kenji Mishima, Kazuyoshi Baba, Ryutaro Kamijo: 8-Nitro-cGMP promotes bone growth through expansion of growth plate cartilage. *Free Radical Biology and Medicine* 110:63-71, 2017 (査読有)

〔学会発表〕(計 1 件)

片岡 真理江、宮本 洋一、金子 児太郎、赤池 孝章、近津 大地、馬場 一美、上條 竜太郎：新規シグナル分子 8-ニトロ-cGMP は骨の伸長を促進した。第 33 回日本酸化ストレス学会関東支部会、2018

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

研究プロジェクト 昭和大学歯科補綴学講座 http://prostho.showa-u.ac.jp/study_project/

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

6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：宮本洋一

ローマ字氏名：Miyamoto, Yoichi

研究協力者氏名：金子児太郎

ローマ字氏名：Kaneko, Kotaro

研究協力者氏名：長山和弘

ローマ字氏名：Nagayama, Kazuhiro

研究協力者氏名：赤池孝章

ローマ字氏名：Akiake, Takaaki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。