

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17155

研究課題名(和文) 軟骨変性疾患のVivoでのNADPHオキシダーゼに依存したヒアルロン酸分解の解明

研究課題名(英文) NADPH oxidase-dependent degradation of hyaluronan in cartilage degenerative diseases

研究代表者

井上 咲映 (Inoue, Sakie)

昭和大学・歯学部・兼任講師

研究者番号：20783252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：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。我々は、OAの発症に関わるインターロイキン-1 (IL-1) による軟骨細胞死の誘導と細胞外マトリックス分解の促進にNADPHオキシダーゼが関わることを明らかにした。関節軟骨は血管からの酸素の供給がないため、酸素分圧は極めて低く、特に深部のそれは1%以下である。我々は、IL-1 刺激後のNADPH oxidaseの発現が酸素分圧に依存することを明らかに、これにモノカルボン酸トランスポーター1が関わることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国内の変形性関節症(OA)は、自覚症状を有する患者だけで1000万人に達する。OAの発症予防や治療法の開発は重要な課題である。OAでは、関節軟骨の基質成分の減少と軟骨細胞死が起こる。これらの変性は関節軟骨表層から始まる。関節軟骨には血管が走行せず、酸素分圧は表層で6%、深層では1%以下と言われる。本研究で、軟骨細胞死と軟骨基質減少に重要な役割を果たすNADPHオキシダーゼの発現とそれに必要なモノカルボン酸トランスポーター1の発現が酸素分圧に依存することを発見した。これは、OAの発症機序の解明と治療・予防法の開発に重要な情報といえる。

研究成果の概要(英文)：Osteoarthritis (OA) is a disease caused by aging or excessive mechanical stimulation of joints. OA is characterized by chondrocyte cell death and extracellular matrix loss in articular cartilage. We had shown that NADPH oxidase is involved in the induction of chondrocyte cell death and extracellular matrix degradation induced by interleukin-1 (IL-1), one of the cytokines which are known to be involved in the pathogenesis of OA. Articular cartilage has a very low partial pressure of oxygen, especially in the deep part of the cartilage, which is less than 1%, due to the lack of oxygen supply from blood vessels. In this study, we found that the expression of NADPH oxidase in chondrocytes after IL-1 stimulation is dependent on the partial pressure of oxygen and that monocarboxylate transporter 1 is involved in this process.

研究分野：生化学

キーワード：変形性関節症 NADPHオキシダーゼ モノカルボン酸トランスポーター 酸素分圧 軟骨細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 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、軟骨細胞の細胞死と細胞外マトリックスの減少を伴う、関節軟骨の変性が起こる。OAは、疼痛や腫脹、可動域制限などにより生活の質を著しく低下させる。国内だけで1000万人の患者がいると推定される。OAや関節リウマチ(RA)の発症にインターロイキン-1 (IL-1)などの炎症性サイトカインが関与することが知られる。

(2) 我々の研究グループは、これまでにIL-1の刺激を受けた軟骨細胞で、活性酸素種(ROS)産生酵素のひとつである食細胞型の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および細胞外マトリックスの分解に重要であることを報告してきた(Biochem J 389:315-323, 2005; Cell Tissue Res 368:135-144, 2017)。また、NOX-2の発現には、モノカルボン酸トランスポーター(MCT)-1が必要であることを見出している(J Biol Chem 286:14744-14752, 2011)。

## 2. 研究の目的

(1) IL-1に暴露された軟骨細胞の細胞死と細胞外マトリックス減少にいかに関与するかを明らかにすることを目的としている。それにより、NOX-2あるいはMCT-1の制御に基づいたOAなどの軟骨変性疾患の有効な治療法の開発基盤が確立されると考えた。OAにおける関節軟骨の変性は、関節軟骨表層から始まることが知られている。関節軟骨は、血管によって栄養されていないため、酸素の供給が限られている。滑液から酸素を受け取りやすい表層の酸素分圧は約6%だが、深層では1%以下といわれる。そこで、軟骨細胞におけるIL-1刺激後のNOX-2およびMCT-1の発現に対する酸素分圧の影響を調べることで、OAにおける関節軟骨の変性が表層から起こること機序を考察した。

(2) また、OAにおける軟骨細胞の細胞死と細胞外マトリックスの分解に関与することが知られている、好中球エラスターゼによる破骨細胞分化誘導に関して検討することとした。これは、RAにおける骨破壊の機序の解明にも重要と考えられた。

## 3. 研究の方法

(1) 好氣的条件(20%酸素)下および嫌氣的条件(2%酸素)下に培養したマウス軟骨細胞様ATDC5細胞をIL-1で刺激し、細胞死を観察した。我々は、IL-1刺激後数時間以内に発現が始まる誘導型一酸化窒素合成酵素(NOS-2)および36から48時間に発現するNOX-2の両者が必要であることを報告している(Biochem J 389:315-323, 2005; J Biol Chem 286:14744-14752, 2011)。そこで、好氣的条件下および嫌氣的条件下にATDC5細胞をIL-1で刺激し、両酵素遺伝子の発現を調べた。NOX-2の発現誘導にミトコンドリアのROS産生が関与することが示唆されているので(J Biol Chem 286:14744-14752, 2011)、酸化ストレスにより誘導される抗酸化酵素のひとつであるヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)の発現を調べた。また、ATDC5細胞におけるMCT-1の発現を解析した。さらに、MCT-1の発現誘導機構に関する情報が少ないため、酸素分圧に依存したMCT-1の発現誘導の違いを解析するため、NF- $\kappa$ B阻害剤(BAY11-7082)、HIF-1経路の阻害剤(chrysin)および促進剤(DMOG)の効果を解析した。

(2) 好中球エラスターゼが破骨細胞分化を促進する可能性を検証するため、マウス骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系にヒト好中球およびエラスターゼ阻害剤(elastinal)を加え、破骨細胞分化を酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ(TRAP)活性で評価した。さらに、破骨細胞分化抑制因子(osteoprotegerin, OPG)の好中球エラスターゼによる分解を、抗OPG抗体を用いたwestern blottingで評価し、OPGの分解部位をEdman分解で解析した。

## 4. 研究成果

(1) IL-1によるATDC5細胞の細胞死は、低酸素下では抑制されていた。好氣的条件下および嫌氣的条件下にATDC5細胞をIL-1で刺激し、NOS-2とNOX-2の発現を調べた。IL-1刺激24時間後のNOS-2 mRNAの発現は、好氣的条件下、嫌氣的条件下で大きな違いが見られなかった。一方、NOX-2 mRNAの発現は嫌氣的条件下で抑制されていた。これは、NOS-2の発現には酸素分圧が大きく影響しないが、NOX-2の発現には酸素が重要な役割を果たしていることを示唆する。NOX-2の発現誘導にミトコンドリアのROS産生が関与することが示唆されているので(J Biol Chem 286:14744-14752, 2011)、酸化ストレスにより誘導される抗酸化酵素のひとつであるヘムオキシゲナーゼ-1の発現を調べたところ、好氣的な培養条件では、IL-1刺激後24時間以内に発現が誘導されたが、嫌氣的な条件下では、誘導が起こらなかった。これは、活性酸素産生酵素である、食細胞型NADPHオキシダーゼの発現誘導に活性酸素が関係することを示唆している。関節表層の酸素分圧に等しい6%酸素と深部のそれである1%酸素の環境で、IL-1存在下、ATDC5細胞におけるMCT-1の発現を解析した。IL-1刺激後のMCT-1 mRNAの発現を調べたところ、6%

酸素に比べ、1%酸素では発現が抑制されていた。これらの結果は、酸素分圧が高い関節軟骨表層では MCT-1 の発現が高く、そのため、NOX-2 の発現誘導が起こりやすいため、軟骨基質の分解が起こりやすい可能性を示唆している。

(2) 好中球は、RA をはじめ炎症病巣に集積することが知られている。好中球が細胞外に放出するエラスターゼは、組織破壊を引き起こし、RA の病態形成に関与する。また、OA の発症にも関与することが報告されている。我々は、好中球が破骨細胞分化を促進し、少なくともその一部にエラスターゼが関与することを見出した。さらに、好中球エラスターゼが破骨細胞分化抑制因子である OPG を分解することを明らかにした(Bone 132:115216, 2020)。

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 1件）

1. 著者名 Sugisaki R, Miyamoto Y, Yoshimura K, Sasa K, Kaneko K, Tanaka M, Itose M, Inoue S, Baba K, Shirota T, Chikazu D, Kamiyo R	4. 巻 132
2. 論文標題 Possible involvement of elastase in enhanced osteoclast differentiation by neutrophils through degradation of osteoprotegerin.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bone.2019.11.115216.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------