

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09630

研究課題名(和文) サイクリックAMPが関節軟骨細胞分化に与える影響とその機序解明

研究課題名(英文) The effect of cyclic AMP on the differentiation of articular chondrocytes.

研究代表者

間中 智哉 (MANAKA, Tomoya)

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師

研究者番号：50382122

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)：本研究の目的は、サイクリックAMPが、関節軟骨の表層に存在する永久軟骨細胞に与える影響とその機序を解明することである。マウス骨端部の軟骨細胞から表層軟骨細胞を分離し培養を行った。forskolin添加後のRNAを回収し、関節軟骨マーカーとしLubricin/PRG-4及びPTHrPの発現量を、また、軟骨細胞分化マーカーとしてType Xコラーゲンの発現量をReal time RT-PCR法を用いて評価を行った。forskolin投与細胞ではLubricin/PRG-4及びPTHrPの発現量は非投与細胞と比較して有意に上昇し、Type Xコラーゲンに関しては非投与細胞と比較して有意に減少した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

表層軟骨細胞においてアデニル酸シクラーゼ活性作用により細胞内サイクリックAMP濃度を上昇させる効果のあるforskolin投与により、関節軟骨マーカーのRNA発現量が上昇し、軟骨分化マーカーの発現量は減少した。本研究の結果から、サイクリックAMPは関節軟骨の表層に存在する永久軟骨細胞分化を制御することが考えられた。サイクリックAMPシグナルによる関節軟骨表層細胞をターゲットとした関節軟骨変性予防効果が期待できるのではないかと考えている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the effect of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling on chondrocytes, especially permanent articular chondrocytes, and its preventive effect on articular cartilage degeneration. Cartilage tissue was harvested from neonatal mice, then isolated to superficial zone chondrocytes and growth plate chondrocytes. Treatment of superficial zone chondrocytes with forskolin; adenylyl cyclase activator significantly increased the expression of articular cartilage markers lubricin/proteoglycan 4 (PRG-4) and PTHrP. The chondrocyte differentiation marker type X collagen was significantly decreased. The regulation of superficial zone chondrocytes by cAMP signaling could be potentially effective against articular cartilage degeneration.

研究分野：整形外科学

キーワード：関節軟骨 永久軟骨細胞 サイクリックAMP

1. 研究開始当初の背景

関節軟骨の変性が主な病態である変形性関節症の本邦における患者数は超高齢社会を迎えて急速に増加している。また超高齢社会を迎えている現在、変形性関節症は要介護リスクが高い状態であるロコモティブシンドロームの要因となっており、これら運動器疾患の進行予防は、健康寿命延伸に直結することが考えられる。これまで、EP2 選択的アゴニストがウサギ軟骨欠損モデルの軟骨再生を促すこと(引用文献)や recombinant human PTH(1-34)の関節内投与による、マウス膝関節不安定モデルの関節軟骨変性の抑制効果の報告(引用文献)がされている。EP2 アゴニスト、PTH はいずれも細胞内のサイクリック AMP (cAMP)濃度を上昇させる効果があるため、cAMP シグナルが軟骨細胞の分化制御に関与していることが推察されるが、cAMP シグナルが軟骨細胞の分化制御に関わる詳細は不明である。関節軟骨は大別すると成長軟骨 (Transient articular cartilage) と永久軟骨 (Permanent articular cartilage) の2種類に分類されるが、これまでに表層部の永久軟骨細胞分化制御への cAMP のシグナルの関与を追及した報告はない。

2. 研究の目的

本研究では cAMP シグナルが関節軟骨細胞 (永久軟骨細胞) の細胞分化に与える影響を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)cAMP 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、アデニル酸シクラーゼ活性作用により細胞内cAMP濃度を上昇させる効果のある forskolin を添加した。RNAを経時的に回収し関節マーカーとしてLubricin/PRG-4及びPTHrPの発現量を、また、軟骨細胞分化マーカーとしてType Xコラーゲンの発現量をReal time RT-PCR法を用いて評価を行った。

(2)cAMP による軟骨細胞分化制御のペレット培養を用いた組織学的評価

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 forskolin を添加し、ペレット培養を行いペレットの組織学的評価を行った。

4. 研究成果

(1)cAMP による表層軟骨細胞分化制御の評価

forskolin (25 μ M、50 μ M)を添加後の Real time RT-PCR 法の結果、表層軟骨細胞において、forskolin (50 μ M)投与群では非投与群と比較して Lubricin/PRG-4 の発現量は有意に増加した(図1-(a))。また、forskolin (25 μ M)投与群では非投与群と比較して PTHrP の発現量は有意に増加した(図1-(b))。一方、軟骨細胞分化マーカーである Type X コラーゲンの発現量に関しては、forskolin (50 μ M)投与群では非投与群と比較して有意に減少した(図2)。

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)

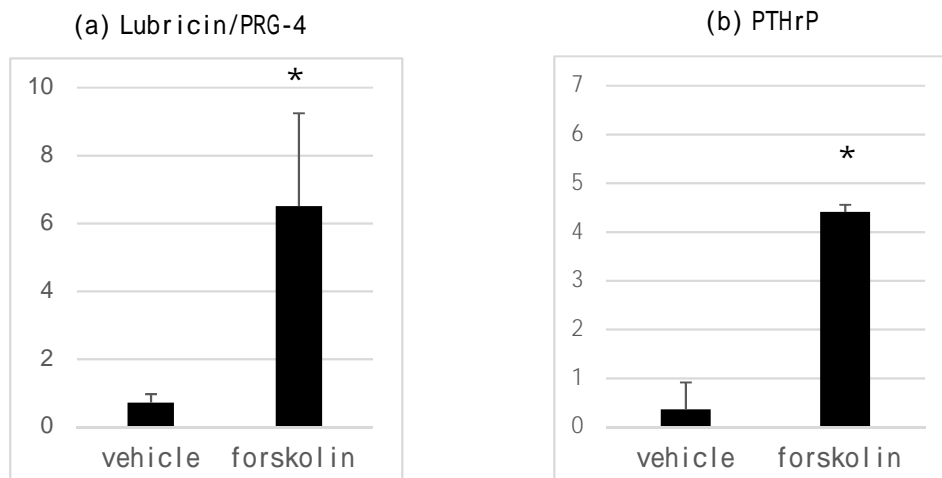
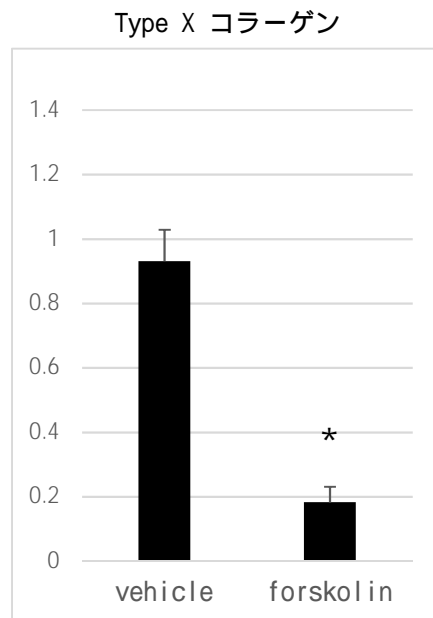


図 2：表層軟骨細胞における軟骨細胞分化マーカーの評価(*:p<0.05)



(2)cAMP による軟骨細胞分化制御のペレット培養を用いた組織学的評価

表層軟骨細胞に forskolin (50 μ M)を添加後のペレット培養の組織学的評価の結果、forskolin 投与により、アルシアンブルー染色が増強され、免疫染色の結果では Type X コラーゲンの発現が抑制された。

研究結果(1)、(2)から、cAMP は表層軟骨細胞：永久軟骨細胞分化を制御することが考えられた。cAMP シグナルによる関節軟骨表層細胞をターゲットとした関節軟骨変性予防効果が期待できるのではないかと考えている。

<引用文献>

Otsuka S, Aoyama T, Furu M, Ito K, Jin Y, Nasu A, Fukiage K, Kohno Y, Maruyama T, Kanaji T, Nishiura A, Sugihara H, Fujimura S, Otsuka T, Nakamura T, Toguchida J. PGE2 signal via EP2 receptors evoked by a selective agonist enhances regeneration of injured articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17:529-38.

Erik R. Sampson¹, Matthew J. Hilton¹, Ye Tian¹, Di Chen¹, Edward M. Schwarz, Robert A. Mooney, Susan V. Bukata¹, Regis J. O'Keefe¹, Hani Awad, J. Edward Puzas¹, Randy N. Rosier, and Michael J. Zuscik. Teriparatide, a Chondro-Regenerative Therapy for Injury-Induced Osteoarthritis. *Sci Transl Med*. 2011; 3:101ra93.

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0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	大田 陽一 (OHTA Yoichi) (50633484)	大阪市立大学・大学院医学研究科・講師 (24402)	

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