

機関番号：15301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591780

研究課題名 (和文)

変形性関節症軟骨におけるアグリカン分解機構の解明とエピジェネティック制御法の開発
研究課題名 (英文) Elucidation of the mechanism of aggrecan degradation and epigenetic regulation of aggrecanase expression in osteoarthritic cartilage

研究代表者

西田 圭一郎 (NISHIDA KEIICHIRO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：80284058

研究成果の概要 (和文)：

軟骨マトリックスの破壊に重要である MMP-13, あるいは ADAMTS-4, -5, -9 といったアグリカナーゼが軟骨細胞においてメカニカルストレスによって遺伝子発現が調節される遺伝子であること、メカニカルストレスによる基質破壊に転写因子 RUNX2 が深く関与し、変形性関節症発症 (OA) の治療ターゲットとなることを示した。さらに、HDAC 阻害剤が RUNX2 発現に抑制的に働くことも判明した。HDAC 阻害剤によるエピジェネティックな制御が、OA 早期のアグリカン分解に関わるアグリカナーゼの発現を阻害することで新たな治療法の一つとなる可能性がある。

研究成果の概要 (英文)：

We investigated the mechanism of mechanical stress-induced expression and regulation of aggrecanases and examined the role of runt-related transcription factor 2 (RUNX-2) in chondrocyte-like cells. A uni-axial cyclic tensile strain (CTS) (0.5 Hz, 10% stretch) induced expression of RUNX-2, MMP-13, ADAMTS-4, -5, and -9 by SW1353 cells. Overexpression of RUNX-2 up-regulated expression of MMP-13 and ADAMTS-5, whereas RUNX-2 siRNA resulted in significant downregulation of mechanically-induced MMP-13 and ADAMTS-5 expression. CTS induced activation of p38 MAPK, and CTS induction of RUNX-2, MMP-13 and ADAMTS-5 mRNA was down-regulated by the selective p38 MAPK inhibitor SB203580 but not by the p44/42 MAPK inhibitor U0126, or the JNK MAPK inhibitor JNK inhibitor II. These results suggested that RUNX-2 might have a role as a key downstream mediator of p38's ability to regulate mechanical stress-induced MMP-13 and ADAMTS-5 expression. Furthermore, histone deacetylase (HDAC) inhibitor, trichostatin A and MS-275 downregulated the expression of mechanically-induced RUNX-2 and ADAMTS-5. The epigenetic regulation of RUNX-2 transcriptional factor by HDAC inhibitor might be beneficial for the suppression of cartilage degeneration of early phase of osteoarthritis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：変形性関節症、軟骨破壊、アグリカナーゼ、メカニカルストレス

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は日常整形外科診療で最も遭遇する疾患の一つであり、本邦での有病者は800万人ともいわれている。発症要因には遺伝、生活様式、職業、スポーツ・外傷などが判明しているが、いまだに詳細は不明の部分が多く、軟骨破壊に至る病態解明、疾患修飾性の薬剤開発が期待されている。

これまでに、OA軟骨破壊に主要な役割を果たすとされるMMP-13は転写レベルでRUNX2の制御を受けていること、アグリカン分解に重要とされるADAMTS-5遺伝子のプロモーター領域にはRUNX2結合領域が存在することが判明している。我々はOA発症における軟骨細胞に対するメカニカルストレスのターゲット転写因子としてRunx2に注目した。OA軟骨破壊の主たる原因の一つであるメカニカルストレスが、これら転写因子、蛋白分解酵素の発現に与える影響についてin vitroで検討し、その機序を解明することでOAの新規治療薬の開発が可能であるという着想に至った。

2. 研究の目的

MMP-3, MMP-13などのマトリックスメタロプロテアーゼ、ADAMTS-4, -5, -9といったアグリカナーゼが軟骨細胞においてメカニカルストレスによって遺伝子発現が調節される遺伝子であるかどうかを検討することで、軟骨細胞におけるメカニカルストレス-Runx2-アグリカナーゼ経路について世界に先駆けて解析していくことを目的とした。次に軟骨保護的に作用するIL-4や、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤によるエピジェネティックな遺伝子発現制御

が軟骨破壊抑制効果を持つか否か、特に、アグリカナーゼ発現に対する阻害効果を持つか否か、およびその機序について検討した。

3. 研究の方法

(1)メカニカルストレスが軟骨細胞の遺伝子発現に与える影響の検討

①ヒト軟骨細胞様細胞(SW1353)を5日間単層培養後、ST140(STREX社)を用いて30分間の周期的伸展負荷(CTS)(0.5Hz, 10%)を加えた。転写因子RUNX2およびMMP-13, ADAMTS-1, 4, 5, 9 mRNA発現に与える影響をRT-PCR, real-time RT-PCRにより経時的に検討した。また、RUNX2の過剰発現及びsiRUNX2の導入による影響を検討した。

②メカニカルストレスがシグナル伝達に与える影響を検討するため、CTS負荷後のp38, ERK, JNKのリン酸化に与える影響をWestern blotで検討した。

(2)メカニカルストレスによる蛋白分解酵素遺伝子発現変化の人為的制御

①抗炎症性サイトカインとしてインターロイキン(IL)-4(10 nM)を添加し、CTS負荷後の転写因子RUNX2およびMMP-13, ADAMTS-1, 4, 5, 9 mRNA発現に与える影響をRT-PCR, real-time RT-PCRにより経時的に検討した。

②CTS12時間前にHDAC阻害剤(HDACi, TSA: 10nM, MS-275: 100nM)を加えた群を作成した。負荷前後のRUNX-2, ADAMTS-5, アグリカン, II型コラーゲンのmRNAの発現をRT-PCR, real-time PCRにより経時的に検討した。HDACiによる細胞障害性についてはMTTアッセイを用いて確認した。さらに

免疫染色により RUNX-2, ADAMTS-5 の蛋白レベルでの発現変化についても検討した。

4. 研究成果

(1) 研究結果

①CTSにより RUNX2 mRNA は1時間後をピークとして約4.5倍に、MMP-13, ADAMTS-4, 9はRUNX2より遅れて24時間後より約3倍に発現が亢進した。ADAMTS-5は2峰性に発現が亢進した。RUNX2の過剰発現によりMMP-13, ADAMTS-5の発現が亢進し、siRUNX2の導入によりMMP-13, ADAMTS-5の発現が抑制された。

②CTSにより p38 MAPK のリン酸化の亢進が認められた。p38 MAPK の阻害剤であるSB203580によってCTSによって誘導されたRUNX-2, ADAMTS-5の発現は抑制された。一方、p44/42 MAPK および JNK MAPK の関連は認められなかった。

③IL-4 (10ng/ml)はCTSによって発現が亢進するRUNX2, MMP-13, ADAMTS-5の発現に対し抑制的に働いた。

④TSA, MS-275投与により、細胞活性は下がることなく、HDACi非存在下ではCTSにて有意に上昇したRUNX-2, ADAMTS-5のmRNAの発現が抑制されていた。アグリカン、II型コラーゲンのmRNAの発現についてはHDACi投与群で有意に上昇していた。また免疫染色により、HDACi非存在下で局在的に発現していたRUNX-2, ADAMTS-5もその発現は蛋白レベルで抑制されていた。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

本研究では、軟骨マトリックスの破壊に重要であるMMP-13,あるいはADAMTS-4, -5, -9といったアグリカナーゼが軟骨細胞においてメカニカルストレスによって遺伝子発現が調節される遺伝子であること、メカニカルストレスによる基質破壊に転写因子RUNX2が深く関与し、変形性関節症発症の治療ターゲットとなることを初めて示した。本研究成果はOsteoarthritis and Cartilageに掲載された。さらに今回、抗炎症性サイトカインであるIL-4, およびHDAC阻害剤がRUNX2発現に抑制的に働くことも判明した。新規治療法の確立のために、今後は動物モデルなど用いたin vivoの検証が必要である。

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2件)

①Tetsunaga T, Nishida K, Furumatsu T, Naruse K, Hirohata S, Yoshida A, Saito T, Ozaki T. Regulation of mechanical stress-induced MMP-13 and ADAMTS-5 expression by RUNX-2 transcriptional factor in SW1353 chondrocyte-like cells. Osteoarthritis and Cartilage 2010;19:222-232, 査読有。

②西田圭一郎. メカニカルストレスと軟骨破壊. 臨床リウマチ 2009;21:92-94, 査読有。

〔学会発表〕 (計5件)

①鉄永智紀, 西田圭一郎, 古松毅之, 斎藤太一, 成瀬恵治, 尾崎敏文. ヒト軟骨細胞様細胞においてADAMTS-5はRUNX-2を介してメカノセンシティブに機能するアグリカナーゼである. 日本整形外科学会基礎学術集会, 2010. 10. 15, 京都府。

②鉄永智紀, 西田圭一郎, 古松毅之, 吉田晶, 国定俊之, 成瀬恵治, 三谷茂, 尾崎敏文. ヒト軟骨細胞様細胞における力学的負荷誘導性のRUNX2およびMMP-13, ADAMTS-5発現の検討. 第24回日本整形外科学会基礎学術集会. 2009. 11. 6, 横浜市。

③鉄永智紀, 西田圭一郎, 古松毅之, 米澤朋子, 二宮善文, 成瀬恵治, 尾崎敏文. 軟骨細胞様細胞における力学的負荷誘導性のRunx2およびMMP-13, ADAMTS-5の発現. 第22回日本軟骨代謝学会. 2009. 3. 6, 名古屋市。

④鉄永智紀, 西田圭一郎, 古松毅之, 吉田晶, 国定俊之, 成瀬恵治, 尾崎敏文. 軟骨細胞様細胞においてIL-4は力学的負荷誘導性のCbfa1/Runx2およびMMP-13, ADAMTS-5の発現を抑制する. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会. 2008. 10. 24, 京都府。

⑤鉄永智紀, 西田圭一郎, 門田康孝. 軟骨細胞様細胞(OUMS-27)に対するメカニカルストレスによるRunx2および蛋白分解酵素の発現. 第52回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2008. 4. 23, 札幌市。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 圭一郎 (NISHIDA KEIICHIRO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：80284058

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

鉄永智紀、古松毅之、吉田晶、尾崎敏文
(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科整形
外科学)

成瀬恵治 (岡山大学大学院医歯薬学総合
研究科システム生理学)