

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591659
 研究課題名（和文） 酸化ストレスと小胞体ストレスが軟骨変性に及ぼす影響とその病態生理に関する研究
 研究課題名（英文） Involvement of oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of cartilage degeneration
 研究代表者
 廣瀬 隼 (HIROSE JUN)
 熊本大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：40433007

研究成果の概要（和文）：

酸化ストレス、カルボニルストレス、小胞体ストレスが関節軟骨細胞の代謝変化と軟骨変性に及ぼす影響を検討した。ラット正常軟骨細胞培養系において、3つのストレスを薬剤を用いて誘導あるいは抑制した結果、各ストレスはそれぞれの発生と反応経路において互いに関連して、軟骨細胞の機能低下とアポトーシスを惹起することが示された。ラット生体膝に負荷した酸化ストレス、カルボニルストレス、小胞体ストレスは、それぞれがアポトーシスと軟骨変性の進行に関与したが、互いの関連性については確認できなかった。

研究成果の概要（英文）：

To clarify the relationship of oxidative stress, carbonyl stress and endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of cartilage degeneration, we evaluated the role of the three stresses on chondrocyte function and apoptosis. In cultured rat articular chondrocytes, stimulation with or without suppression of each stress regulated chondrocyte function and apoptosis. These reactions were involved with crosslink of the three stresses. In the experiment of direct infusion of the inducers of each stress into rat knees, chondrocyte apoptosis and cartilage degeneration were increased; however, no connections among these stresses could be found.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：軟骨変性、酸化ストレス、小胞体ストレス、カルボニルストレス

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症（OA）は関節軟骨と関節構成体の退行変性を基盤とし、それに続発する軟骨と骨の破壊および増殖性変化をきたす整形

外科領域で最も頻度の高い疾患である。その発症と進展には、力学的負荷、解剖学的異常、全身的因子、遺伝的素因など多くの要素が複雑に関係しているが、軟骨破壊の本態は、軟

骨基質の同化作用に対する異化作用の亢進である。その過程では軟骨細胞の代謝変化が大きな役割を果たしている。代謝変調をきたした軟骨細胞は、軟骨基質の産生能が低下し、炎症性サイトカインやプロテアーゼの産生が亢進する。そして最終的にはアポトーシスを起こして細胞死にいたることが知られている。軟骨細胞の代謝には、細胞内で発生する種々のストレスが影響しており、1) 活性酸素種や一酸化窒素などによる酸化ストレス、2) 糖化最終産物 (AGEs) の蓄積によるカルボニルストレス、3) 小胞体内に不良蛋白が蓄積する小胞体ストレスが代表的なものである。これまで個々のストレスに関する研究から、それぞれが細胞機能障害や細胞死に関与することが明らかとなってきた。しかしながら、カルボニルストレスや小胞体ストレスの研究は新たな分野であり、酸化ストレスを含めたこれらのストレスの関連性は包括的に評価されておらず、病態への詳細な関与は不明である。

2. 研究の目的

軟骨細胞における酸化ストレス、カルボニルストレス、小胞体ストレスの関連性を総合的に評価することを目的とする。本研究では、ラットの軟骨細胞培養系と生体系において、各種ストレスを誘導あるいは阻害する物質を投与し、軟骨細胞内で生じる各ストレスの変化を評価して、それらが軟骨細胞機能と細胞死に及ぼす影響を解析した。

3. 研究の方法

(1) ラット正常軟骨細胞培養系における酸化ストレス、カルボニルストレス、小胞体ストレスの関連性

5週齢雄 Wistar rat の膝関節より正常軟骨を採取し、軟骨細胞を分離培養して、一回継代細胞を使用した。酸化ストレスを Lipopolysaccharide (LPS; 0, 100, 1000, 5000 ng/ml)、カルボニルストレスを Glycolaldehyde (GA; 0, 100, 500, 1000 μ M)、小胞体ストレスを Tunicamycin (TM; 0, 1, 5, 10 μ g/ml) で刺激誘導した。24時間後に軟骨細胞を回収し、cell lysate から蛋白と mRNA を抽出した。

① 酸化ストレス: 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) を用いて蛋白の酸化を ELISA 法で計測した。

② カルボニルストレス:

2, 4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) を用いて蛋白のカルボニル化を ELISA 法で計測した。

③ 小胞体ストレス: *Xbp-1* の発現を RT-PCR で、*Chop* の発現を Real Time-PCR で解析した。Internal control はアクチン (*Actb*) を使用した。

④ 軟骨細胞機能: アグリカン (*Acan*) と II

型コラーゲン (*Col2a1*) の発現を Real Time-PCR で定量した。

⑤ アポトーシス: DNA 断片化を ELISA で計測した。

(2) ラット正常軟骨細胞培養系における各ストレスの抑制効果

上記のラット軟骨細胞培養系において、LPS (1 μ g/ml)、GA (500 μ M) または TM (1 μ g/ml) により各ストレスを刺激誘導した。さらに抗酸化剤として N-acetylcysteine (NAC, 1mM)、カルボニルストレス抑制剤として

Aminoguanidine (AMG, 1mM)、小胞体ストレス抑制剤として 4-phenylbutyric acid (PBA, 3mM) をそれぞれに併用投与し、24時間後に回収した軟骨細胞の cell lysate から蛋白と mRNA を抽出した。

① 酸化ストレス: DCFH-DA を用いて蛋白の酸化を ELISA 法で計測した。

② カルボニルストレス: DNPH を用いて蛋白のカルボニル化を ELISA 法で計測した。

③ 小胞体ストレス: *Chop* の発現を Real Time-PCR で解析した。

④ 軟骨細胞機能: *Acan* と *Col2a1* の発現を Real Time-PCR で定量した。

⑤ アポトーシス: DNA 断片化を ELISA で計測した。

(3) 生体膝における各ストレスの軟骨変性に及ぼす影響

5週齢雄 Wistar rat の右膝関節内に、LPS (200 μ g/ml)、GA (1M)、TM (100 μ g/ml) をそれぞれ 50 μ l 注入した。1週後と4週後に膝関節を摘出して、Paraformaldehyde 固定、脱灰後にパラフィン標本作製した。Phosphate buffered saline (PBS) を関節内に 50 μ l 注入した PBS 群と、前十字靭帯切離による OA モデル (ACL 群) を対象として別に準備し、PBS 群は投与後1週と4週時に、ACL 群は術後4週時に組織を採取した。パラフィン標本から薄切切片を作成して、酸化ストレス、カルボニルストレス、小胞体ストレスをそれぞれ抗 8-OHdG 抗体、抗 AGEs 抗体、抗 XBP-1 抗体を用いた免疫染色により評価した。また軟骨変性度を Toluidine blue 染色、アポトーシスを TUNEL 染色によりそれぞれ評価した。

4. 研究成果

(1) ラット正常軟骨細胞培養系における酸化ストレス、カルボニルストレス、小胞体ストレスの関連性

① 酸化ストレス: LPS と GA の濃度依存性に DCFH-DA は上昇した (図 1)。

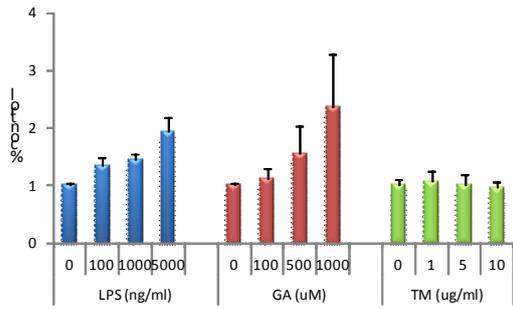


図 1. DCFH-DA

② カルボニルストレス：GA の濃度依存性に DNPB は上昇した (図 2)。

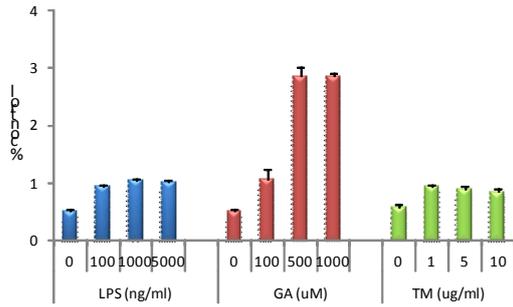


図 2. DNPB

③ 小胞体ストレス：Xbp1 の発現は GA と TM 刺激により増加した (図 3)。Chop の発現も同様に GA と TM により増加した (図 4)。

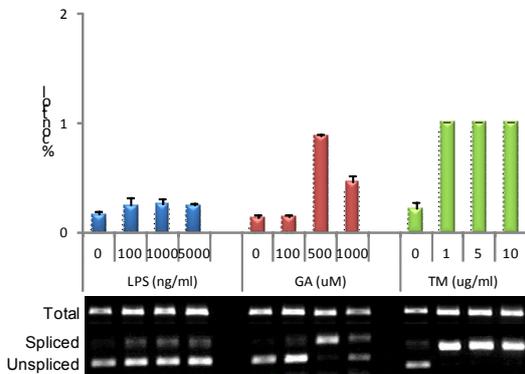


図 3. Xbp1(spliced/total)

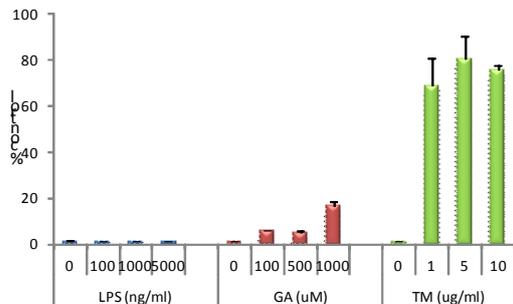


図 4. Chop/Actb

④ 軟骨細胞機能：Acan の発現は LPS、GA、TM の刺激により濃度依存性に低下した (図 5)。Col2a1 も同様に LPS、GA および TM によって発現が低下した (図 6)。

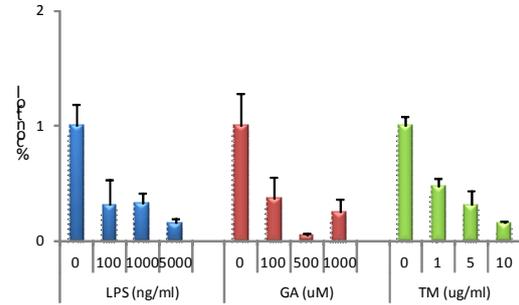


図 5. Acan/Actb

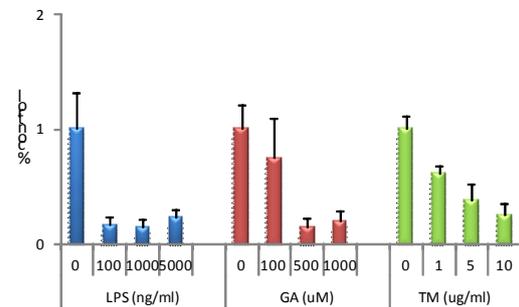


図 6. Col2a1/Actb

⑤ アポトーシス：LPS、GA および TM の刺激により濃度依存性に DNA 断片化が増加した (図 7)。

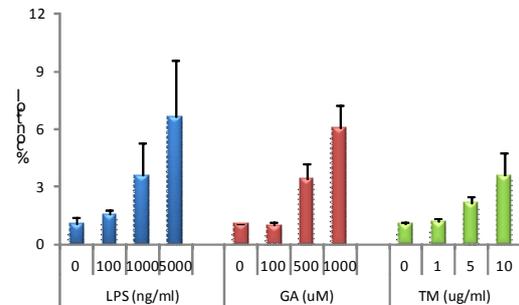


図 7. DNA 断片化

(2) ラット正常軟骨細胞培養系における各ストレスの抑制効果

① 酸化ストレス：LPS により上昇した DCFH-DA は抗酸化剤 NAC だけでなく、カルボニルストレス阻害剤 AMG と小胞体ストレス阻害剤 PBA によって有意に抑制された (図 8)。また GA による DCFH-DA 上昇に対しても同様に、NAC、AMG、PBA は抑制効果を認めた。

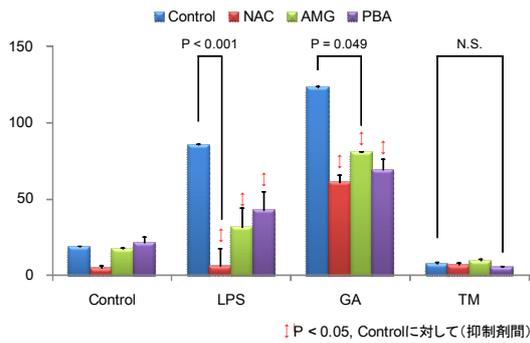


図 8. DCFH-DA

② カルボニルストレス:GA 刺激により有意に上昇した DCFH-DA は、AMG だけでなく NAC と PBA によっても有意に抑制された (図 9)。また LPS と TM 刺激による DCFH-DA は、NAC と PBA によりそれぞれ抑制された。

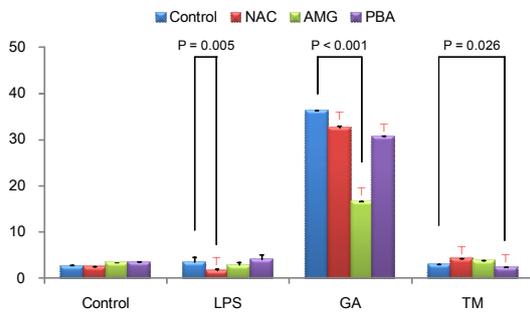


図 9. DNP

③ 小胞体ストレス:各ストレス刺激剤によって *Chop* の発現は上昇し、TM 刺激による上昇において PBA は有意な抑制効果を示した (図 10)。また、LPS 刺激においては AMG と PBA が *Chop* の発現を有意に抑制した。

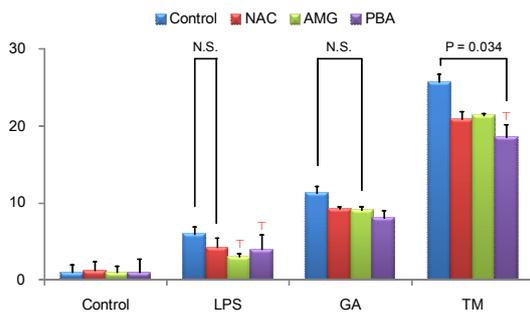


図 10. *Chop/Actb*

④ 軟骨細胞機能:*Acan* の発現は各ストレス刺激剤で抑制されたが、LPS と TM による反応は、NAC と PBA によりそれぞれ有意に回復した (図 11)。*Col2a1* の発現も同様に、各ストレス刺激剤で抑制され、特に TM 刺激による抑制は PBA によって有意に回復した (図 12)。

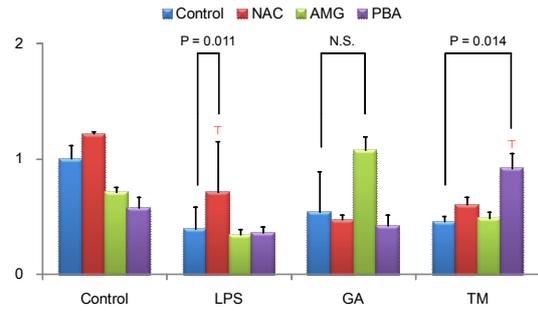


図 11. *Acan/Actb*

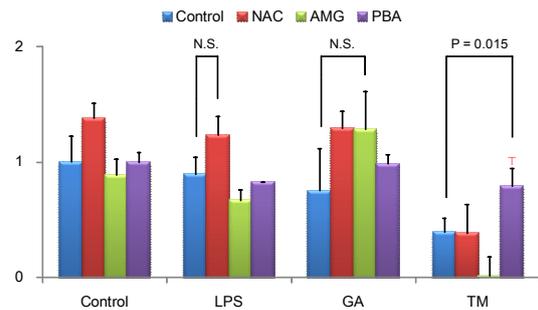


図 12. *Col2a1/Actb*

⑤ アポトーシス:各ストレス刺激剤で有意に増加した DNA 断片化は、それぞれのストレス阻害剤によって有意に抑制された (図 13)。

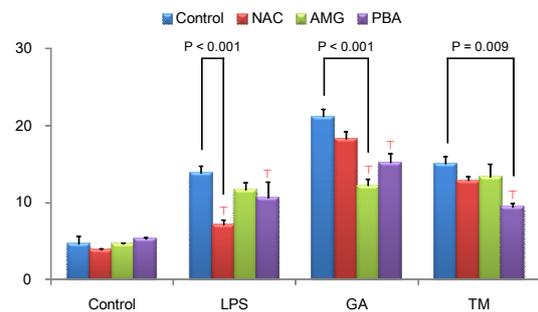


図 13. DNA 断片化

(3) 生体膝における各ストレスの軟骨変性に及ぼす影響

薬剤投与1週後の軟骨変性度と TUNEL 染色陽性細胞数は各群間で差がなかったが、LPS 群では 8-OHdG、GA 群では AGEs、TM 群では XBP-1 の陽性細胞数がそれぞれ上昇した (図 14)。4 週後の軟骨変性度は、GA 群 (Mankin score 9 点) で有意に上昇し、TUNEL 染色は LPS 群と TM 群で ACL 群と同等の上昇を示した (図 15)。薬剤投与1週後に上昇した 8-OHdG、AGEs、XBP-1 の陽性細胞数は、4 週後には PBS 群と差がなかった (図 15)。

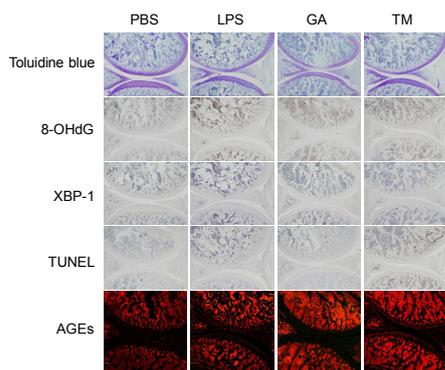


図 14. 薬剤投与 1 週後の関節軟骨組織 (×20)

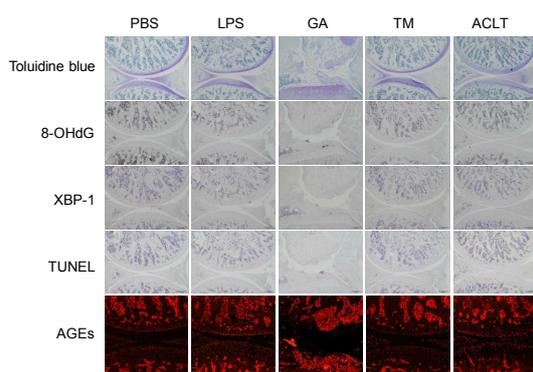


図 15. 薬剤投与 4 週後の関節軟骨組織 (×20)

(4) まとめ

軟骨細胞培養系において、各ストレスの刺激によりそれぞれのストレスは上昇し、該当する阻害剤によって有意に抑制された。軟骨細胞機能とアポトーシスも同様の傾向を認めた。3つのストレスの関連性については、酸化ストレスの刺激により小胞体ストレスが有意に上昇し、その抑制ではカルボニルストレスが有意に低下した。カルボニルストレスの刺激は酸化ストレスと小胞体ストレスを有意に上昇させ、その抑制により酸化ストレスが有意に回復した。小胞体ストレスの刺激は酸化ストレスとカルボニルストレスに影響を及ぼさなかったが、その抑制効果はカルボニルストレスにおいて認めた。以上より、3つのストレスはそれぞれの発生と反応経路において互いに関連し、特に酸化ストレスとカルボニルストレスは他のストレスにも強く影響を及ぼしながら、軟骨細胞の機能低下とアポトーシスを誘導し、軟骨変性に関与することが示唆された。生体内で発生した酸化ストレス、カルボニルストレス、小胞体ストレスは、それぞれが軟骨変性を誘導するが、互いの関連性については確認できなかった。薬剤投与濃度や抑制剤の併用、あるいは解析時期などさらなる検討が必要である。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 廣瀬隼、上原悠輔、山部聡一郎、高田興志、水田博志: 軟骨細胞障害における酸化ストレス、カルボニルストレス、小胞体ストレスの作用 (第 2 報)、第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会、2012. 10. 27、名古屋国際会議場 (愛知)
- ② 上原悠輔、廣瀬隼、山部聡一郎、高田興志、水田博志: 軟骨細胞障害におけるカルボニルストレス、酸化ストレス、小胞体ストレスの作用、第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会、2011. 10. 20、ペイシア文化ホール (群馬)

[その他]

ホームページ等

http://kumadai-seikei.com/kennkyu/knkyu_gaiyou/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣瀬 隼 (HIROSE JUN)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40433007

(2) 研究分担者

水田 博志 (MIZUTA HIROSI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：60174025