

## 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 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791368

研究課題名（和文） 小胞体ストレスと破骨細胞

研究課題名（英文） ER Stress response in osteoclastogenesis

研究代表者

小山 賢介（KOYAMA KENSUKE）

山梨大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80456491

研究成果の概要（和文）：

慢性関節炎モデルにSubABを投与するとArthritis Scoreや病理組織学的検討でコントロールと比較して抑制された。以前我々が示した急性期関節炎モデルマウスと同様の結果であった。破骨細胞についても病理学的にTRAP染色で減少していることが確認された。次にIn VitroでのSubABの効果をマウス骨髄細胞を用いて検討した。SubABで刺激するとRAW264.7細胞、マウス骨髄細胞から起こる破骨細胞分化が抑制され、TRAP染色陽性細胞の減少が確認できた。このことはreal time PCR法で破骨細胞マーカーを測定することでMRNAレベルでも確認することができた。

研究成果の概要（英文）：

SubAB reduced arthritis score and synovitis in collagen induced arthritis (CIA) model mice. We used chronic model but the suppressive effects of SubAB was similar to acute model. We investigate osteoclasts in this model. TRAP positive osteoclasts in SubAB were less than control in pathological analysis. Next, we investigated the effects of SubAB to osteoclastogenesis in vitro. SubAB inhibited osteoclastogenesis directly in RAW264.7 cell and mouse bone marrow cell. This concentration of SubAB did not affect differentiation of macrophage in mouse bone marrow cell.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000円	570,000円	2,470,000円
2011年度	1,200,000円	360,000円	1,560,000円
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000円	930,000円	4,030,000円

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：破骨細胞、小胞体ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチなどの炎症性関節炎を引き起こす疾患では、骨、軟骨の破壊を生じ、最終的には関節変形のため手術に至ることが

多い。近年、生物学的製剤が登場し、以前と比べて関節リウマチの手術件数が減少したという報告もある。（*Arthritis Rheum* 2004）しかし全症例に効果が発揮されているわ

けではなく、更なる研究が急がれる。

我々は、関節リウマチにおける小胞体ストレス反応にも注目している。RA 滑膜細胞では、過剰に発現したシノビオリンが小胞体関連分解 (ERAD) として働き、自らの異常増殖に関与している (*Nature Clinical Practice Rheumatology* 2008) という報告や小胞体関連シャペロンである heat shock protein 70 (HSP70) が RA の滑膜細胞に高発現している (*Autoimmunity* 2009)、また細胞外 HSP70 は滑膜細胞において TNF- $\alpha$  によって誘導される proinflammatory mediator の産生を抑制する (*Arthritis Res Ther* 2008) など近年多くの報告をみる。これらより RA では、小胞体ストレス関連因子が変形性関節症などの炎症性疾患と比べると多く発現していて、かつ HSP70 は関節炎モデルマウスの炎症反応を抑制する (*Novartis Found Symp* 2008) ということもわかっている。我々は最近、マクロファージに標的をしぼった研究ではあるが、Shiga toxinogenic Escherichia coli より精製されたトキシンで、HSP70 シャペロンの 1 つである GRP78 を分解することで小胞体ストレス反応を引き起こす作用を持つ Subtilase cytotoxin (Sub AB) を II 型コラーゲンカクテルによって誘導される炎症性関節炎モデルマウスに投与し、関節炎を抑制することを報告した (*J Immunol* 2009)。このモデルでは、病理組織学的な比較検討で骨軟骨の破壊の程度に明らかな有意差はなかったが、骨破壊などは抑制傾向であった。しかし、今回使用したモデルは、炎症反応が 3 週間程度しか継続しないため、長期間炎症にさらされる RA 患者に例えて骨軟骨破壊を評価するモデルとしては不十分である。以上より小胞体ストレス反応と関節リウマチの関節炎は深く関与していると考えられるが、具体的な作用メカニズムや小胞体ストレスがどの程度関節リウマチの炎症反応に寄与しているのかは依然として不明である。これらをより明確に解明していくことは、関節リウマチの新たな治療法の確立につながると考えている。また骨、軟骨破壊の原因は、破骨細胞の活性化であり、今までに多くの研究成果が発表されている。破骨細胞の活性化因子である RANKL (receptor activator of NF-kappaB ligand) に対する抗体 Denosumab なども開発され、RA 患者の structural damage を防いだとの報告もある (*Arthritis Rheum* 2008)。このことから、関節リウマチ治療において破骨細胞はターゲットの 1 つであるが、現在、破骨細胞における小胞体ストレスに注目した検討はなされてなく、破骨細胞分化抑制などの効果があれば、治療への更なる期待を持つことができる。そこで SubAB の骨への作用について研究を深めたいと考えた。

## 2. 研究の目的

SubAB の具体的な作用メカニズムや小胞体ストレスがどの程度関節リウマチの炎症反応に寄与しているのか確認すること。骨軟骨破壊といった観点から破骨細胞に注目し、SubAB の効果を検証すること。

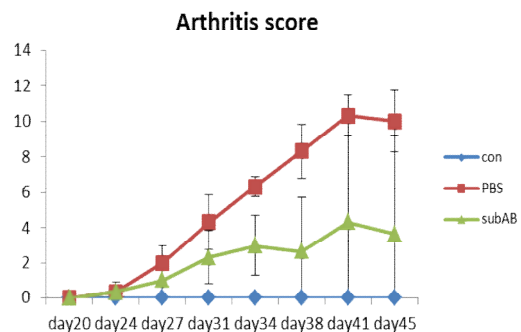
## 3. 研究の方法

(1) Sub AB 小胞体ストレス反応を引き起こす薬剤を DBA/1 マウスを使用した数ヶ月観察可能な関節炎モデルマウスに投与し、骨や軟骨に対する小胞体ストレスの効果を病理組織学的にみる。関節炎の評価は、両手関節、足関節、足部を実際に測定し、スコア化して評価した。SubAB はマウス 1 匹あたり  $0.1 \mu\text{g}$  を腹腔内投与した。同量の PBS を腹腔内に投与する群を比較対象とした。

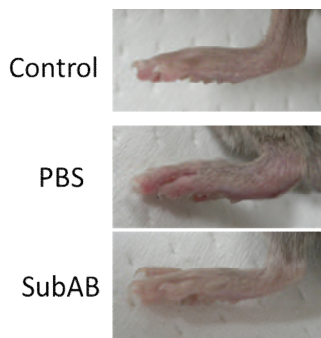
(2) Macrophage/monocyte cell line である RAW264.7 や mouse 骨髄細胞に RANKL で刺激をすると破骨細胞に分化する。この実験系に Sub AB や tunicamycin が破骨細胞の形成抑制因子として影響をもたらすか検討する。破骨細胞を TRAP 染色し、数の検討。また、どの経路で抑制されるか Western blot や real time PCR 法を用いて RANK の発現、NF-kappaB の活性化などをみる。

## 4. 研究成果

(1) 関節炎モデルマウスの炎症惹起過程において、2 度目の免疫前に SubAB を投与した群と PBS を投与した群を比較すると SubAB を投与した群では、肉眼的にも、スコアでも関節炎を抑制することができた。(図 1)

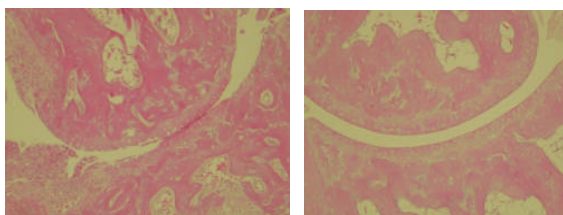


(図 1 : Arthritis Score)



(図1 肉眼所見)

次に病理学的に評価した。HE染色では、PBS群では関節近傍の滑膜炎と軟骨破壊、それに伴う関節裂隙の狭小化が確認できるが、SubAB群では滑膜炎は抑制され、関節軟骨及び関節裂隙も保たれていた。(図2)

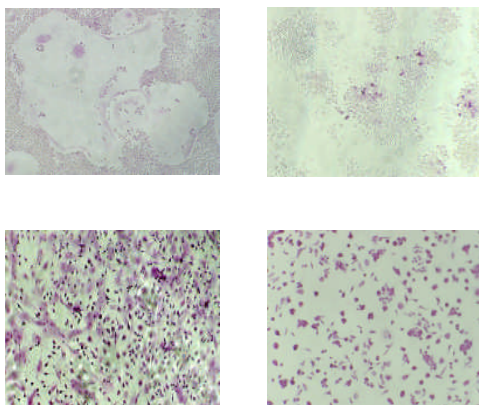


PBS

SubAB

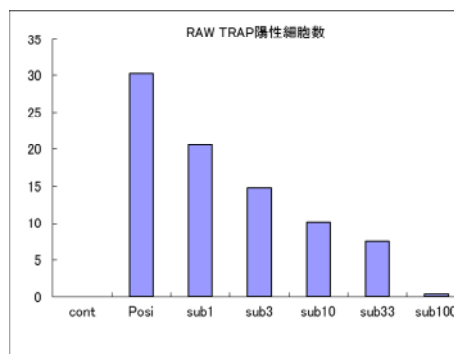
(図2)

(2) RAW264.7 cell, mouse bone marrow cell に RANKL 刺激し破骨細胞分化を起す系に、SubAB で共刺激すると破骨細胞分化が抑制される。RAW264.7 細胞を RANKL50ng/ml で刺激する際に SubAB100ng/ml で共刺激し3日ごとに同様の刺激を繰り返し7日目に TRAP 染色を行った。Mouse bone marrow cell では mouse 大腿骨から骨髓細胞を取り出し、M-CSF10ng/ml で刺激、2日目に RANKL50ng/ml で刺激すると同時に SubAB100ng/ml で刺激し、10日目に TRAP 染色を行った。



(図3 上: RAW264.7 下: mouse bone marrow)

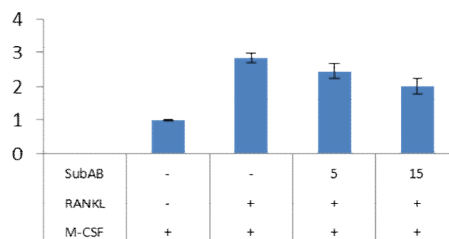
図3のように ubAB は Mouse bone marrow cell の破骨細胞分化を抑制した。3人の検者で肉眼的に TRAP 陽性細胞をカウントしたところ SubAB の濃度依存的に TRAP 陽性細胞が減少することも確認できた。(図4)



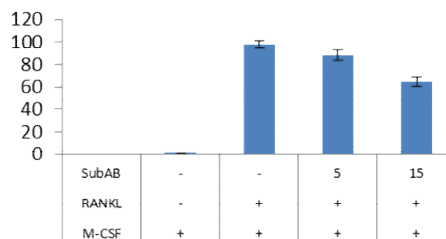
(図4)

SubAB の濃度に関しては、*J Immunol* 2009 を参考とした。細胞死に関して、FACS と WST アッセイを行い検証されている。

SubAB の効果を、mRNA レベルでも確認するため、Real-time PCR を行った。図5で mouse bone marrow cell のデータを示す。Mouse bone marrow cell に RANKL と M-CSF で刺激するものをコントロールとし、SubAB の効果を見た。SubAB は濃度依存的に破骨細胞マーカーである NFATC1、Cathepsin K を抑制することが確認された。

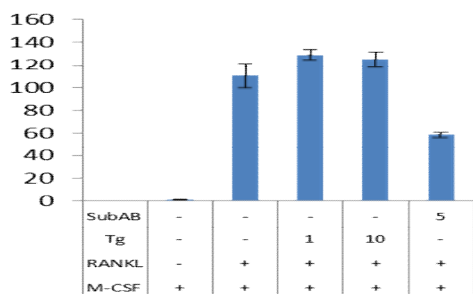


(図5 Real-time PCR : NFATC1)



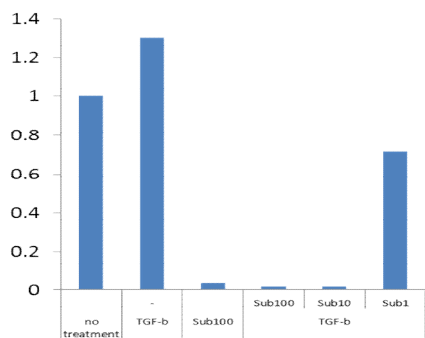
(図5 Real-time PCR : Cathepsin K)

図5で示した作用はTapsigarginでは見られず、SubAB 特異的な反応であることも示唆された。(図6)



(図6)

次に、同様の実験系で反応経路に関して検討した。破骨細胞分化のマスタースイッチである RANK の発現を mRNA レベルで確認した。BBRC2008 で示されていた TGF- $\beta$  が RANK の mRNA 発現を増加させる系をポジティブコントロールとし、SubAB を同時に刺激すると、SubAB は RAW264.7 細胞において RANK の発現を濃度依存的に抑制した。(図7)



(図7 Real-time PCR : RANK)

これらの結果より SubAB は破骨細胞分化に対して抑制的な効果を持つと考えられる。

## 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)

なし (現在雑誌論文作成中)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/orthop/research.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小山 賢介 (KOYAMA KENSUKE)

山梨大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80456491

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

