

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 6 月 11 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791407

研究課題名（和文） ヒト変形性関節症における軟骨破壊の分子機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanism of cartilage degradation in human osteoarthritis

研究代表者

澤地 恭昇（SAWAJI YASUNOBU）

東京医科大学・医学部・ポストドクター

研究者番号：20571152

研究成果の概要（和文）：変形性関節症(OA)に対する根本的な治療法は未だ存在しない。OA 病態形成に関わる軟骨破壊に中心的役割を担う細胞外基質分解酵素 ADAMTS-4 および-5 が同定されたが、その発現調節機構は十分解明されていない。本研究は当該酵素発現を促進あるいは抑制し得る細胞内情報伝達経路をヒト関節軟骨を用いて明らかにした。本研究成果は、今後、軟骨破壊抑制を目指した新規薬剤開発の礎になるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Although ADAMTS-4 and -5 have been identified as important enzymes for development of osteoarthritis (OA), their regulation has been unclear. In this study, we explored and identified intracellular signaling pathways that lead either stimulatory or inhibitory for the expression of these enzymes in human articular cartilage explants. These results may contribute to the development of new drugs that target cartilage degeneration in human OA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：軟骨代謝，細胞外基質分解酵素，細胞内情報伝達

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会に伴い患者数増加の一途をた

どる変形性関節症(OA)に対する根本的な治療法は存在しない。OA 病態形成の初期に観察

される関節軟骨の破壊に、細胞外基質分解酵素群である ADAMTS-4 および-5 が同定されていたが、それらの遺伝子発現調節機構は明らかにされていなかった。一方で、遺伝子欠損マウス等を用いた変形性関節症モデルを解析することでヒト OA の病態を解明する試みがなされていたが、我々はヒト、マウス、ブタ由来のそれぞれの関節軟骨における当該酵素発現調節機構が、動物種間で大きく異なる可能性をステロイドおよび線維芽細胞増殖因子(FGF-2)を用いた研究により見いだしていた。

そこで本研究は、主にヒト由来の関節軟骨を用いて、ヒト OA 病態形成における軟骨破壊の分子機構を解明すべく、ADAMTS-4 および-5 の発現調節機構を細胞内伝達経路に着目し研究を行った。

## 2. 研究の目的

ヒト OA 病態形成に関わる軟骨組織分解酵素(ADAMTS-4 および-5) 遺伝子の発現調節機構を、細胞内情報伝達経路に着目しヒト関節軟骨組織を用いて解明し、ヒト軟骨破壊の制御を可能にするような新規薬剤開発の基盤となる研究を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 炎症性サイトカインにより誘導される細胞内シグナルの探索

ヒト軟骨組織における ADAMTS-4 および-5 の誘導活性および軟骨組織破壊に対する効果を炎症性サイトカインである IL (interleukin)-1 と TNF (tumor necrosis factor) $\alpha$ とで比較検討し、以降の実験に用いるサイトカインを決定する。

上記結果の炎症性サイトカインにより活性化される細胞内情報伝達経路を、特異的な抗リン酸化抗体等を用いて同定する。

### (2) 各種細胞内情報伝達経路の軟骨破壊に対する効果

上記結果で活性化された細胞内伝達経路に対する特異的な阻害剤を用いて、軟骨破壊に対する効果を ADAMTS-4 および-5 発現、さらに当該酵素により切断されるアグリカン断片に対する neo-epitope 抗体 (抗 ARGS 抗体および抗 AGEG 抗体)を用いた Western blot 法により解析する。

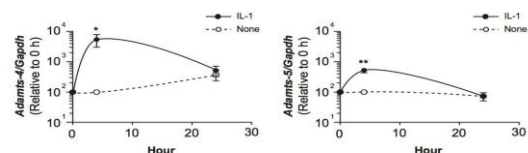
### (3) 軟骨破壊における細胞内情報伝達経路の動物種差

マウス変形性関節症モデルにおける、目的細胞内情報伝達経路の役割を検討する前段階として、マウス関節軟骨を用いてヒト関節軟骨と同様の実験を行い、同モデルの有用性を確認する。

## 4. 研究成果

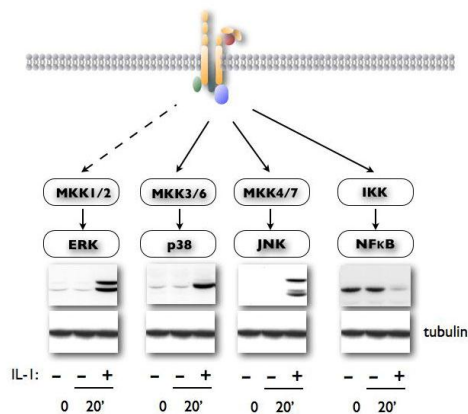
### (1) 炎症性サイトカインにより誘導される細胞内シグナルの探索

ヒト関節軟骨破壊に対する炎症性サイトカインの効果を検討するため IL-1 および TNF $\alpha$ の効果と比較検討した。その結果、IL-1 は TNF $\alpha$ に比べ強力に軟骨破壊を惹起し、ADAMTS-4 および-5 の発現を誘導した。しかしながらそれらの発現は、刺激後 4-5 時間をピークとした一過性であった。これらの結果より以降の実験には IL-1 を用い、ADAMTS-4 および-5 遺伝子発現は刺激後 5 時間で解析した。



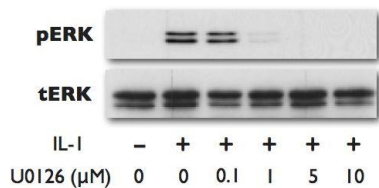
次に、ヒト軟骨組織において IL-1 により活性化される細胞内情報伝達経路の解明を試みた。その結果 IL-1 は MAP

(mitogen-activated protein) kinases である p38, ERK および JNK のリン酸化を誘導した。また, NFκB 活性化の指標である IκBα の分解も誘導した。以上の結果より, ヒト軟骨組織において IL-1 は, 少なくとも 3 種の MAP kinases および NFκB 経路を活性化することが明らかとなった。

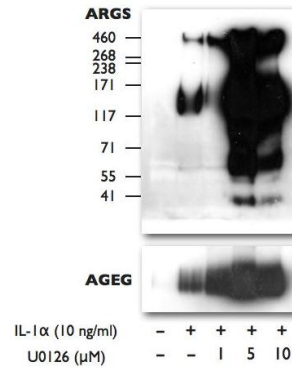


### (2) 各種細胞内情報伝達経路の軟骨破壊に対する効果

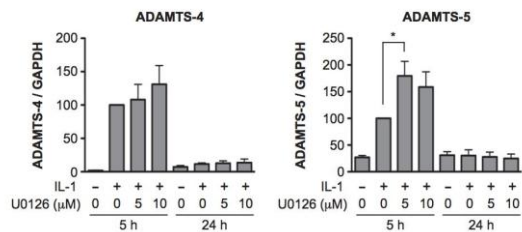
上記の結果をふまえ, 各種 MAP kinases および NFκB に対する特異的阻害剤を用いて軟骨破壊を調節し得る細胞内情報伝達系を探索した。その結果, p38 および NFκB 経路を阻害すると軟骨破壊は抑制され, その効果は NFκB 阻害剤で顕著であった。一方, ERK 上流の MEK1/2 を U0126 により阻害すると, IL-1 により誘導される ERK のリン酸化は濃度依存的に抑制され 1 μM でほぼ完全に抑制された。



同阻害剤を用いて, 軟骨破壊に対する効果を検討したところ, IL-1 により誘導される軟骨破壊は ERK 経路を阻害することで顕著に促進した。この結果より ERK 経路が, 軟骨破壊に対し保護効果を有するものと推察された。



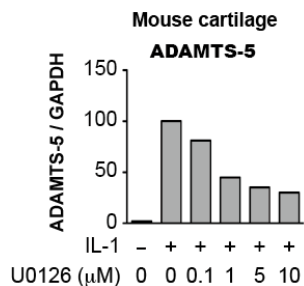
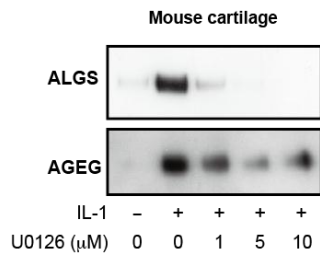
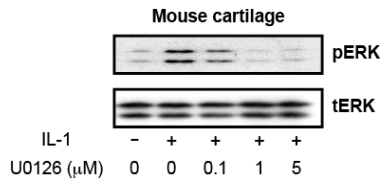
さらに, 同経路の ADAMTS-4 および-5 発現に対する効果を検討したところ, IL-1 により誘導される ADAMTS-4 および-5 遺伝子発現はともに ERK 経路を阻害することで促進し, 特に ADAMTS-5 発現は IL-1 単独と比較し統計的に優位に促進した。



### (3) 軟骨破壊における細胞内情報伝達経路の動物種差

上記結果が in vivo で起こりうるか否かマウス変形性関節症モデルを用いた実験を行う前段階として, マウス関節軟骨を用いてヒト組織と同様の検討を行った。その結果, ヒト関節軟骨と同様, IL-1 により誘導される

ERK のリン酸化は U0126 により顕著に抑制されたものの、IL-1 により誘導される軟骨破壊はヒト軟骨とは相反して強力に抑制され、また、ADAMTS-5 遺伝子発現も抑制されることが明らかとなった。



以上の結果より、ヒト OA 病態形成における関節軟骨破壊およびこれに関与する酵素群 (ADAMTS-4 および-5) の発現調節機構をヒト軟骨組織を用いて解析したところ、炎症刺激で活性化される p38 および NFκB 経路は当該酵素群の遺伝子発現に直接的に関与し、これらに対する阻害剤は軟骨破壊保護効果を持つと考えられる。一方、ERK 経路は炎症刺激により活性化されるものの、軟骨破壊に対し抑制的に作用するといったネガティブフィードバック様の生理活性を持つことが明

らかとなった。すなわち ERK 経路を活性化させるような薬剤の開発は、軟骨破壊保護効果を示すと期待される。さらに同経路を活性化すると軟骨細胞の増殖、細胞外基質の産生促進といった軟骨再生効果も報告されており、ヒト OA の軟骨破壊保護効果に加え、変形軟骨を修復する効果も期待される。

本研究成果は、根本的な保存治療法が存在しない変形性関節症に対して、細胞内情報伝達経路を標的とした軟骨破壊抑制を目指す新規薬剤開発の礎になるものと期待される。

## 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)

[学会発表] (計 3 件)

①発表者：澤地 恭昇, Faisal Rana, Jeremy Saklatvala, 山本 謙吾

発表表題：ヒト軟骨組織破壊における ERK 経路の役割

学会名：第 25 回日本軟骨代謝学会

発表年月日：2012 年 3 月 10 日

発表場所：ウィルあいち、名古屋市

②発表者：澤地 恭昇, Faisal Rana, Judith Hynes, Jeremy Saklatvala, 山本 謙吾

発表表題：軟骨破壊に対するステロイド効果の動物種間における相違

学会名：第 24 回日本軟骨代謝学会

発表年月日：2011 年 3 月 4 日

発表場所：九州大学、百年堂、福岡市

s

③発表者：澤地 恭昇, Rana Faisal, Jeremy Saklatvala, 山本 謙吾

発表表題：Role of ERK pathway for aggrecan degradation in human articular cartilage.

学会名：7<sup>th</sup> Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies

発表年月日：2010 年 10 月 16 日

発表場所：京都国際会館、京都市

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤地 恭昇 (SAWAJI YASUNOBU)

東京医科大学・医学部・ポストドクター

研究者番号：20571152