

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592236

研究課題名(和文)メカニカルストレスに応答する軟骨細胞核酸修復酵素活性調節機構と軟骨変性機序の解析

研究課題名(英文)Ogg1 protects against the catabolic stress-induced downregulation of chondrocyte activity and the apoptosis in OA.

研究代表者

遊道 和雄 (Yudoh, Kazuo)

聖マリアンナ医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60272928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：変形性関節症(Osteoarthritis, OA)の発症に関与する機械的ストレスに対する軟骨細胞応答や防御機構、軟骨変性の機序については未だ不明な点が多い。これまで我々は、OA軟骨においてグアニン酸化体を始めとする核酸の酸化損傷の蓄積とこれら防御因子(DNA損傷修復酵素 Ogg1, APEX2, MTH1)の発現変動を見だし、OAの病因・病態に軟骨細胞の核酸の酸化損傷と、その防御機構の異常が関与する可能性を示した。核酸損傷修復酵素に関する研究成果をもとに、OA病因病態の解明に向けた研究を行った。

研究成果の概要(英文)：It is well known that chondrocytes produce excess amounts of reactive oxygen species (ROS) as well as proinflammatory cytokines and chemokines in response to mechanical and chemical stresses. An oxidized form of guanine, 8-oxo-7,8-dihydroxyguanine (8-oxoguanine), is a major causative lesion for mutagenesis by ROS, because it can cause a stable base pair with adenine or cytosine during DNA replication. 8-Oxoguanine DNA glycosylase (Ogg1) repairs 8-oxoguanine, one of the most abundant DNA adducts caused by oxygen free radicals. We demonstrated that depletion of cellular antioxidant, Ogg1, in osteoarthritic chondrocytes participates in the degeneration of articular cartilage in OA. Our findings suggest that Ogg1 may have a potential to protect against the catabolic factor-induced down-regulation of chondrocyte activity and apoptosis in OA.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：整形外科学

キーワード：変形性関節症 核酸損傷 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) **研究対象疾患治療の現状**： 本研究の対象となる変形性関節症 (Osteoarthritis, OA) は、関節軟骨の変性・摩耗とその後の二次性滑膜炎、および軟骨・骨の新生増殖などに基づく進行性の関節変性疾患である。発症早期から関節痛を訴える例が多く、病期の進行にしたがって関節痛増悪と関節変形による可動性、支持性の低下から、日常生活動作は大きく障害される。関節症患者数は、本邦において1000万人強、米国では2500万人強と推定され、有病率は関節リウマチの約10~20倍とされている。治療については、症状進行に伴う疼痛と関節軟骨変性をともに抑制しうる治療法は未だ開発されていない。変形性関節症は、わが国で年間約90万人もの新たな発症者がいるとの報告もあり、医療費を含む経済損失が国民総生産の1%に及ぶとされ、米国でも医療費は毎年860億ドルを超えると報告されている。

## (2) 研究の学術的背景

**変形性関節症発症のメカニズム**： 国内外における多くの精力的研究から、変形性関節症の発症は加齢に伴う軟骨基質マトリックスの組成変化に加えて、肥満や荷重等のメカニカルストレスと、それに伴い誘導される酸化ストレス(活性酸素種)の蓄積が関与し、軟骨細胞 DNA 損傷および軟骨基質の変性を引き起こすとされ、加齢と酸化ストレスならびに、関節軟骨変性の発症・進行は密接な関連を持つことが明らかとされてきた。そこで我々は、変形性関節症発症の主要因と考えられる関節軟骨組織へのメカニカルストレスによって生じる軟骨組織における過剰なフリーラジカル産生と、軟骨細胞 DNA 酸化損傷および軟骨変性との関連について一連の研究を進め、軟骨変性の発生機序を軟骨細胞の DNA 酸化損傷の観点から解明中である。

**DNA 修復酵素について**： 遺伝情報を担う DNA を構成する塩基のうち、活性酸素

種により生じる DNA 損傷のなかで、グアニンの酸化体である 8-oxoguanine は DNA 複製の際にシトシンと同程度の効率でアデニンと結合する point mutation を引き起こし、これが発症をはじめ様々な疾患の病因の一つと考えられている。この DNA 酸化損傷に対する防御機構として、DNA 修復酵素 Ogg1 や AP エンドヌクレアーゼ(APEX2)の重要性が指摘されている。近年、DNA 塩基グアニン酸化体に対する防御因子 DNA 修復酵素の発現低下が、筋萎縮性側索硬化症やアルツハイマー病の神経細胞において確認されており、神経変性疾患の病因・病態との関連が示唆されている。さらに、神経以外の組織の変性疾患における当該因子の病態への関与も報告されている。

## 2. 研究の目的

OAの発症に関与する機械的ストレスに対する軟骨細胞応答や防御機構、軟骨変性の機序については未だ不明な点が多い。これまで我々は、OA軟骨においてグアニン酸化体を始めとする核酸の酸化損傷の蓄積とこれら防御因子 (DNA 損傷修復酵素 Ogg1, APEX2, MTH1)の発現変動を見だし、OAの病因・病態に軟骨細胞の核酸の酸化損傷と、その防御機構の異常が関与する可能性を示した。

核酸損傷修復酵素に関する研究成果をもとに、次の OA 病因病態の解明に向けた研究を行なった。

OA 誘導因子に応答する軟骨細胞の核酸損傷修復酵素の活性調節機構の解明

OA 誘導因子に応答した核酸修復酵素調節機構の異常と軟骨変性への関与

## 3. 研究の方法

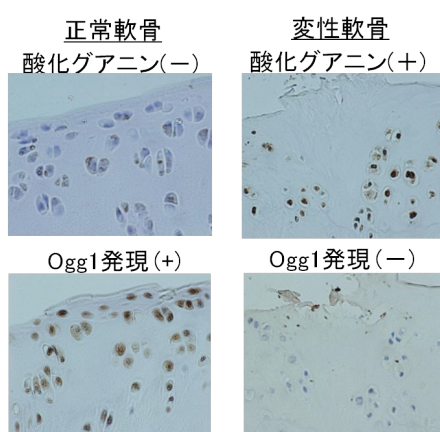
ストレス応答因子 (DNA 損傷修復酵素)に関する以下の検討を行なった。

- (1) 軟骨細胞内の活性酸素種検出と DNA 酸化損傷検証
- (2) DNA 修復酵素活性変化の検証
- (3) DNA 修復酵素欠損軟骨細胞、過剰発現細胞における細胞活性の評価

(4) OA 患者関節軟骨組織におけるストレス応答因子発現度と軟骨組織変性度との関連

#### 4. 研究成果

我々はこれまでに、DNA 損傷修復酵素 OGG 1 の発現度は変形性関節症の軟骨組織変性度と相関して低下していること、変性軟骨部の細胞にはグアニン酸化体が高発現することを見出した。軟骨変性部においては DNA 酸化損傷の結果としてグアニン酸化体が高発現しており、これに相反して DNA 損傷修復酵素 OGG1 活性は低下しているため、DNA 損傷が蓄積し



て細胞死や軟骨組織の恒常性低下、軟骨変性につながっていくことが示唆された。

さらに最近、軟骨変性・異化の誘導因子に反応した DNA 修復酵素 APEX2 の発現が、正常軟骨細胞ではみられず、OA 患者由来軟骨細胞のみにおいて上昇していることを新たに見出した。

細胞ストレス応答の結果、活性酸素種により生じる DNA 損傷のなかでもグアニン酸化体は発癌をはじめ様々な疾患の病因の一つと考えられている。この酸化グアニンを修復する DNA 損傷修復酵素 OGG 1 や APEX2 については筋萎縮性側索硬化症やアルツハイマー病の神経細胞で発現の低下が報告され(Kikuchi H et al., Acta Neuropathol. 2002, 408-414)、神経変性疾患の病因・病態との関連が示唆されている。こうした神経変性疾患における知見ならびに、応答関連遺伝子・蛋白に関する我々の最近の研究成果が本研究着想の基盤となった。

OA 誘導因子に対する細胞応答情報伝

達路、ストレス応答調節機構、DNA 修復酵素の生物学的機能ならびに、その活性低下の機序については今後のさらなる解析が必要である。

#### 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 4 件)

1. Sato T, Yamano Y, Tomaru U, Shimizu Y, Ando H, Okazaki T, Nagafuchi H, Shimizu J, Ozaki S, Miyazawa T, Yudoh K, Oka H, Suzuki N. Serum level of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 as a biomarker of disease activity in relapsing polychondritis. Modern Rheumatol. 2014;24(1):126-136 (査読有り).
2. Murata M, Yudoh K, Shimizu H, Beppu M, Nakamura H, Kato T, Masuko K. Layilin, a talin-binding hyaluronan receptor, is expressed in human articular chondrocytes and synoviocytes and is down-regulated by interleukin-1 $\beta$ . Modern Rheumatology. 2013;23(3):478-88 (査読有り).
3. Ando H., Sato T., Tomaru U., Yoshida M., Utsunomiya A., Yamauchi J., Araya N., Yagishita N., Coler-Reilly A., Shimizu Y., Yudoh K., Hasegawa Y., Nishioka K., Nakajima T., Jacobson S., Yamano Y. Positive feedback loop via astrocytes causes chronic inflammation in virus-associated myelopathy. Brain. 2013;136:2876-87 (査読有り).
4. Yoshioka T, Kurokawa MS, Sato T, Nagai K, Iizuka N, Arito M, Takakuwa Y, Nakano H, Ooka S, Suematsu N, Okamoto K, Yudoh K, Nakamura H, Suzuki N, Ozaki S, Kato T. Protein profiles of peripheral blood mononuclear cells as a candidate biomarker for Behçet's disease. Clin Exp Rheumatol. 2013 Nov 14. [Epub ahead of print] (査読有り).

[学会発表](計 3 件)

1. Yudoh K. Mitochondrial DNA repair enzyme Ogg1 is essential for protection against the downregulation of chondrocyte activity in OA. The 2013 World Congress on Osteoarthritis., April 18~21, 2013, Philadelphia, USA.
2. Yudoh K. Impairment of Mitochondrial 8-oxoguanine DNA glycosylase (Ogg1) against of accumulation of oxidative stress. The 2012 World Congress on Osteoarthritis., April 26~29, 2012, Barcelona, Spain.
3. Yudoh K. 8-oxoguanine DNA glycosylase activity in OA. EULAR 2012., May 25~28, 2011, London, UK.

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)  
〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

遊道 和雄 (Yudoh, Kazuo)  
聖マリアンナ医科大学・医学(系)研究科  
(研究院)・教授  
研究者番号: 60272928

### (2) 研究分担者

唐澤 里江 (Karasawa, Rie)  
聖マリアンナ医科大学・医学(系)研究科  
(研究院)・講師  
研究者番号: 50434410