

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790337

研究課題名(和文)変形性関節におけるオートファジーの役割

研究課題名(英文)The role of autophagy in osteoarthritis

研究代表者

松下 雄彦(MATSUSHITA, Takehiko)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40467650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは細胞内の不要なタンパクや器官を除去する細胞内浄化機構である。本研究ではオートファジーが変形性関節症の病態や進行に関与していると我々は仮説をたて、研究を行った。オートファジー誘導に必須遺伝子であるAtg5を軟骨細胞特異的にノックアウトしたマウスを作製して解析を行った。また、オートファジーの活性化剤のラパマイシンによる変形性関節症進行抑制効果を調べた。変形性関節症の誘発により、Atg5ノックアウトマウスでは変形性関節症の進行が促進され、一方でラパマイシンの投与で抑制される傾向をみとめた。オートファジーは変形性関節症の病態に関わる重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is an intracellular self-clearance mechanism. In this study, we hypothesized that autophagy is involved in pathogenesis and progression of osteoarthritis (OA). We conditionally disrupted Atg5, an essential gene for induction of autophagy, in cartilage of mice and analyzed. We also examined the effects of rapamycin, an activator of autophagy against development of OA. Progression of OA induced by destabilization of medial meniscus was accelerated in the cartilage-specific Atg5 knockout mice while progression of OA was delayed by the treatment of rapamycin. Our observation suggests that autophagy plays an important role in pathogenesis and progression of OA.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般・加齢医学

キーワード：変形性関節症 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は整形外科領域で最も多い疾患で、関節軟骨の変性、消失によって関節変形、疼痛を生じ、日常生活において著しい機能低下をもたらす。これまで研究により、様々な病態変化が報告されているが、未だその詳細な制御機構は解明されていない。

細胞内のタンパク分解システムの一つである autophagy (自食作用) は、生物種間で高率に保存され、種々の細胞生理学的な過程において重要な役割を果たしていると報告されている。autophagy の主な役割は細胞内の不要なタンパクや損傷した器官を除去することにより、細胞内の環境を健全な状態に保つことであり、このため、老化による autophagy の低下が不要な物質の蓄積をもたらす、様々な老化現象に関与していることが示唆されている。さらに、autophagy の不全による異常タンパクの蓄積が Alzheimer や Huntington 病といった神経変性疾患の病態の一つとして報告されるようになり、老化、変性疾患において重要な役割を果たしていることが示唆されている。

そこで autophagy が軟骨細胞変性疾患である変形性関節症に関与していると我々は仮説をたて、研究を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、autophagy の軟骨細胞における役割を調べることにより、変形性関節症の病態の解明および、新しい治療方法を開発する手がかりをつくること。

3. 研究の方法

(1) autophagy 誘導に必須遺伝子である autophagy-related 5 (Atg5) を軟骨細胞特異的にノックアウトするコンディショナルノックアウトマウスを作製。

コンディショナルノックアウトマウスの作製には Cre-*loxP* system を用いた。

(2) 軟骨細胞における autophagy の機能不全がもたらす影響を組織学的解析中心にして調べた。

(3) autophagy が老化に伴った軟骨変性に及ぼす影響をしらべるため、老齢化した Atg5 コンディショナルノックアウトマウスの解析を行った。

(4) コンディショナルノックアウトマウスを用いて、autophagy 抑制による変形性関節症の進行におよぼす影響効果を調べた。

(5) ラパマイシンを用いて autophagy 活性の変形性関節症進行抑制効果に関する解析を行った。

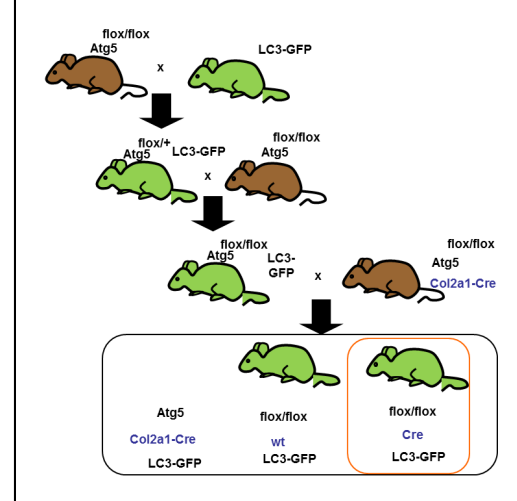
4. 研究成果

(1) 軟骨細胞特異的 Atg5 コンディショナルノックアウトマウスの作製

まず、Cre-*loxP* の系を用いてコンディショナルノックアウトマウスを作製して解析を行った。Atg5 遺伝子の exon3 を *loxP* site で挟んだ変異遺伝子をもつマウス Atg5^{flox/flox} マウスを購入し (RIKEN Bioresource center, RBRC02975)、軟骨細胞に特異的に発現する type2 collagen の promoter 制御下に Cre を発現する *Col2a1-Cre* トランスジェニックマウスと交配し、軟骨細胞で特異的 Atg5 をノックアウトの作成を行った。ノックアウトマウスの確認はマウスの尾から DNA を抽出し PCR にて確認し、cre による recombination も同様に PCR にて確認を行った。また、Atg5 がノックアウトされているかを免疫染色にて確認した。

軟骨細胞特異的 Atg5 ノックアウトマウスである Atg5^{flox/flox}; *Col2a1-Cre* マウスは生後、生き延びることが可能であったが、死亡する率が高く、メンデルの法則で得られる予定より少なかった。生後1日目のマウスを用いた、骨格解析では明らかな四肢、脊椎といった骨格系の異常はみとめなかった。また、Atg5^{flox/flox}; *Col2a1-Cre* マウスおよび Atg5^{flox/+}; *Col2a1-Cre* マウス、Atg5^{flox/flox} マウスの間にも明らかな差はみとめず、このため、生き延びた Atg5^{flox/flox}; *Col2a1-Cre* マウスを交配に用いて、Atg5^{flox/flox} マウスと交配して、より、多数の Atg5^{flox/flox}; *Col2a1-Cre* マウスを得られるようにした。

図1 交配図

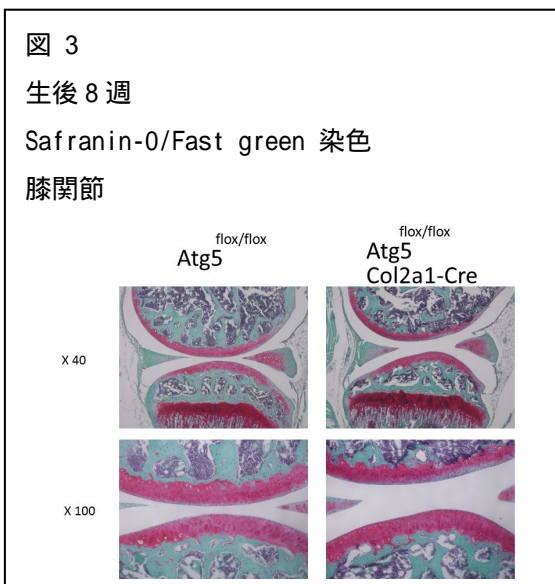


一方 *GFP-LC3* トランスジェニックマウス (RIKEN, RBRC00806) を購入し、Atg5^{flox/flox} マウスと交配して Atg5^{flox/+}; LC3-GFP マウスを作製し、さらにこの Atg5^{flox/+}; LC3-GFP マウスと Atg5^{flox/flox} マウスを交配し、Atg5^{flox/flox}; LC3-GFP マウスを得た。最後に、Atg5^{flox/flox}; *Col2a1-Cre* マウスと Atg5^{flox/flox}; LC3-GFP マウスを交配することにより、Atg5^{flox/flox}; LC3-GFP; *Col2a1-Cre* マウスと Atg5^{flox/flox}; LC3-GFP マウスを獲得し、両マウス間での GFP の蛍光の差を調べることでより autophagy の状態を確認した (図1)。この解

析には組織学的な解析が行えるように、脱灰が不要な胎生 16.5 日のマウスを用いて行った。解析には蛍光発色が失われないように、凍結切片を作製して解析を行った。解析の結果では予想に反して、関節軟骨、及び成長軟骨帯中の軟骨細胞での autophagy そのものの活性が胎生期では低く、蛍光顕微鏡での差をはっきりととることが困難であった。手技的な問題もあると考えられ、現在検討を引き続き行っている。

(2) 軟骨細胞特異的 Atg5 コンディショナルノックアウトマウスの組織解析

肉眼的および骨格解析では明らかな異常を認めなかったが、次に組織学的に骨格系の異常がないかを評価した。胎生期 16.5 日および生後 1 日、生後 8 週のマウスの四肢および脊椎を採取し、ホルマリン固定の後に、パラフィン切片を作製した。その後 safranin-O/Fast green 染色を行い組織学的に評価した。Atg5^{flox/flox} マウスと Atg5^{flox/flox}; Col2a1-Cre マウス成長軟骨帯には明らかな差を認めなかった。また、関節軟骨にも明らかな差を認めなかった (図 2, 3)。



(3) 老齢化 Atg5 コンディショナルノックアウトマウスの解析

さらに、老化に伴った過程で軟骨変性に及ぼす影響を調べるために、老齢化マウスを用いて解析を行った。初期の成長期を生き延びた Atg5^{flox/flox}; Col2a1-Cre マウスはコントロールマウスと比較して明らかな寿命には差はなく生後 1 年以上飼育が可能であった。生後 1 年齢以上のマウスより、膝関節を採取して組織学的に解析を行った。サフラニンの染色性はコントロール群と比較してやや低下している傾向をみとめたが (図 4)、統計学的に有意な差には至らなかった。

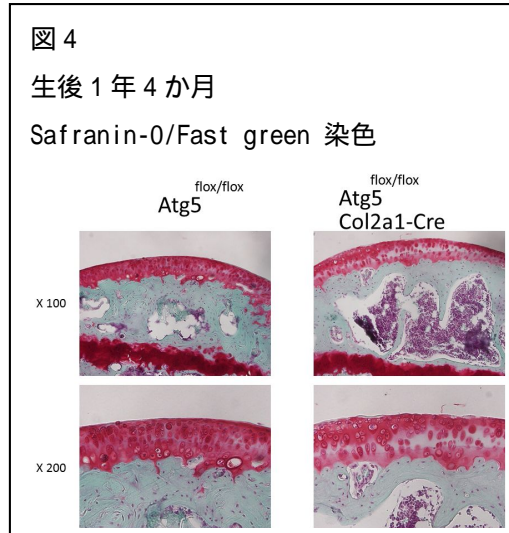
(4) Atg5 コンディショナルノックアウトマウスを用いた変形性関節症モデルによる変形性関節症進行の解析

次に変形性膝関節症モデルを作製して、Atg5^{flox/flox} マウスと Atg5^{flox/flox}; Col2a1-Cre マウスで変形性関節症の進行の差異を調べた。

生後 8 週のマウスの片膝関節に内側半月板不安定化による変形性関節症モデルを作成し、対側は切開のみを加えて解析を行った。術後 8 週でマウスより膝関節を採取して、組織学的に解析を行った。

変形性関節症の進行は内側半月不安定化手術を行った膝にのみみとめ、手術モデルの妥当性を確認した。変形性関節症の進行は、Atg5^{flox/flox}; Col2a1-Cre マウスでは Atg5^{flox/flox} マウスと比して進行している傾向をみとめた。

メカニズムの詳細については現在免疫染色等にて解析を行っている。



(5) ラパマイシンを用いて autophagy 活性の変形性関節症進行抑制効果に関する解析

Atg5^{flox/flox}; Col2a1-Cre マウスの変形性関節症進行が進む傾向がみられ、外傷性の変形性関節症においては autophagy が抑制的に働いている可能性が示唆されたため、逆にオートファジーの活性化による、変形性関節症の進行抑制効果を調べることにした。

オートファジーの活性化は活性化薬剤として広く用いられているラパマイシンを使用し、関節内投与を行った。関節内投与には徐放が可能となる、ラパマイシン含有ハイドロゲルを作成し、非投与群コントロール群、水溶性の単独投与群、ラパマイシン含有ハイドロゲル投与群間で比較検討を行った。変形性関節症による影響を調べるために、生後8週の野生型マウスに内側半月不安定化による変形性関節症モデルを作成し、創部を縫合する前に関節内に投与をおこなった。また、LC3-GFP トランスジェニックマウスを用いて、同様に、ラパマイシン投与群と非投与群とで、オートファジーの活性を比較した。

術後10週ではラパマイシン含有ハイドロゲル投与群では免疫染色にてLC3の染色の増強をみとめた。同様にLC3-GFP トランスジェニックマウスではLC3-GFPの蛍光シグナルが増強しており(図5)、術後10週においても、ラパマイシンによるautophagyの活性化が持続していることが示唆され、ゼラチンハイドロゲルによる有効性が確認された。一方、変形性関節症の進行に関しては非投与群と比較して、ラパマイシン投与群は非投与群と比較して変形性膝関節症の進行が有意に遅れていた(図6)。さらに、ラパマイシン含有ハイドロゲルと単独投与群で比較すると、ラパマイシン含有ハイドロゲル投与群でより変形性関節症進行が有意に抑制される傾向をみとめた。

図5

ラパマイシン投与群と非投与群の比較。
LC3-GFP トランスジェニックマウスによる変形性関節症モデル作製術後10週

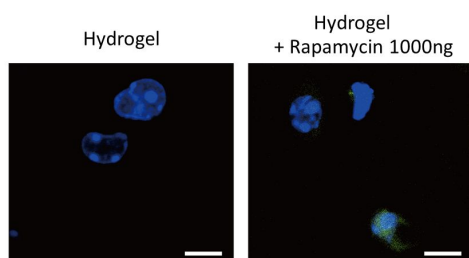
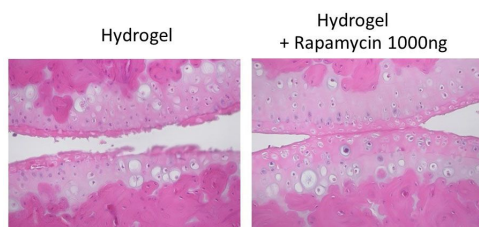


図6

ラパマイシン投与群と非投与群の比較。
術後10週。Hematoxylin&Eosin 染色



< 結語 >

以上のことより、autophagy は軟骨細胞において保護的な役割を果たし、外傷性変形性関節症の進行を抑制している可能性が示唆された。

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 0件)

〔学会発表〕(計 2件)

第28回日本整形外科基礎学術集会
(2013.10.17-18)

マウス変形性関節症モデルにおける徐放化 rapamycin 投与の関節症進行抑制効果
松崎時夫、松下雄彦、高山幸治、松本知之、岡真也、長井寛斗、齋藤高志、田畑泰彦、黒田良祐、黒坂昌弘

2013 World Congress osteoarthritis research international (2013.4.18-21)
Intra-articular administration of gelatin hydrogels incorporating rapamycin-micelle reduces development of experimental osteoarthritis in a murine model.

Mtsuzaki T, Matsushita T, Tabata Y, Saito T, Matsumoto T, Nagai K, Kurosaka M, Kuroda R.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

松下 雄彦 (MATSUSHITA, Takehiko)

神戸大学医学部・附属病院・助教

研究者番号：40467650