

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791679

研究課題名（和文）

ヒアルロン酸レセプターCD44の断片化阻害による、軟骨細胞の脱分化抑制効果

研究課題名（英文）

Inhibition of CD44 cleavage suppresses the chondrocyte de-differentiation

研究代表者

高橋 伸典 (TAKAHASHI NOBUNORI)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：20570196

研究成果の概要（和文）：本研究期間において、主としてスタチン製剤による CD44 の断片化抑制効果と、その作用機序についての解析を進めることが出来た。スタチン製剤は効果的に CD44 の断片化を抑制し、その作用機序としては Lipid raft の構成成分であるコレステロールの生成抑制のみならず、Ras 経路や Rac/Rho 経路の関与が強く示唆される結果であった。膜型 MMP として MT1-MMP、ADAM10/17 が関与するが、単独ではなく各 MMP の相互作用によるものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that simvastatin effectively inhibited the IL-1/OSM induced CD44 cleavage. This inhibitory effect would mainly depend on the suppressive cholesterol production, the major component of lipid raft. However, our current results also suggest that the Ras and Rac/Rho pathway were included in the mechanism of the suppressive CD44 cleavage. The interactional expression of membrane type MMPs (MT-MMP, ADAM10 and 17) were included in this mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：整形外科

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：変形性関節症、ヒアルロン酸、CD44、断片化、Lipid Raft、Statin 製剤

1. 研究開始当初の背景

主要なヒアルロン酸 (HA) レセプターである CD44 の機能性は、関節軟骨の恒常性維持に極めて重要である。CD44 は酵素的断片化によりレセプターとしての機能を喪失し細胞内断片 (ICD) を生ずる。CD44 の断片化は Cell-HA 結合の喪失につながり、予想される ICD の転写因子としての機能と共に、軟骨細胞の脱分化に深く関わっている可能性がある。本研究では、脱分化軟骨細胞を変形性関節症モデルと位置づけ、関節軟骨細胞の脱分化における CD44 断片化の意義と ICD 自体の機能解析を行い、断片化抑制による脱

分化制御の可能性を探る。本研究成果により、変形性関節症の発症予防および治療における新たな展望が開ける可能性がある。

2. 研究の目的

我々の研究の方向性は常に軟骨の細胞外マトリックス破壊の予防、抑制および修復を目指すものである。これまでの研究結果から、CD44 の断片化は軟骨細胞の脱分化、細胞外マトリックス喪失につながることを示すことが出来た。今後次にまず明らかにすべきは、CD44 の断片化抑制により、脱分化過程の抑制が可能であることを証明することで

ある。更に CD44 断片化と OA の病因・病態との関連を明らかにするためには、は動物モデルにおける CD44 断片化抑制の効果を検証することが必要である。具体的には以下の 2 点となる。①in vitro の実験系として、OA 軟骨細胞モデルにおいて、各種阻害剤を用いた CD44 断片化抑制による、脱分化抑制効果（遺伝子発現、BMP シグナル、マトリックス形成など）を検証すること。②in vivo として、OA 動物モデルを作成し、適切な CD44 断片化阻害剤の関節内注射による OA 発症や進行の抑制効果を検証すること。使用する阻害剤としては、CD44 断片化に直接関わる MMP および γ セクレターゼの阻害剤を使用するが、in vivo で使用する場合に、細胞毒性が強い可能性がある。

間接的アプローチとして断片化抑制の別アプローチとしては CD44 の Lipid Raft への移行阻害、スタチン製剤の使用も試みる。サイトカイン誘導による CD44 断片化においては、Lipid Raft への移行阻害により断片化が著明に抑制されるため、脱分化による自然発生的断片化に対する効果も充分期待出来る。

スタチン製剤は MMP 発現抑制を介して CD44 断片化を抑制することに加え、その安全性が確立されているため、特に in vivo での効果が期待される。そのため今回の研究機関では、スタチン製剤が CD44 の断片化を抑制することを明らかにすることを主眼に行った。

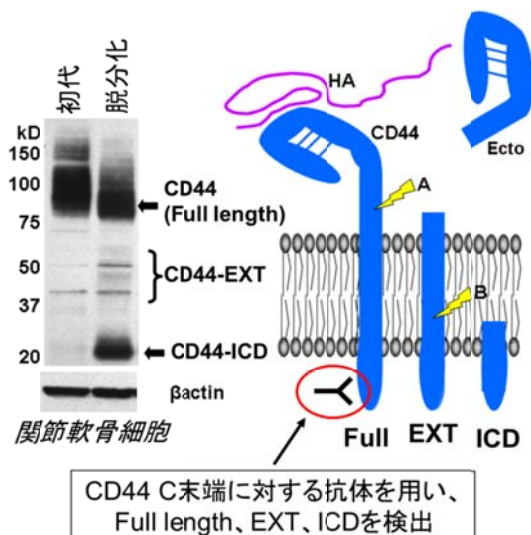
3. 研究の方法

【使用細胞】

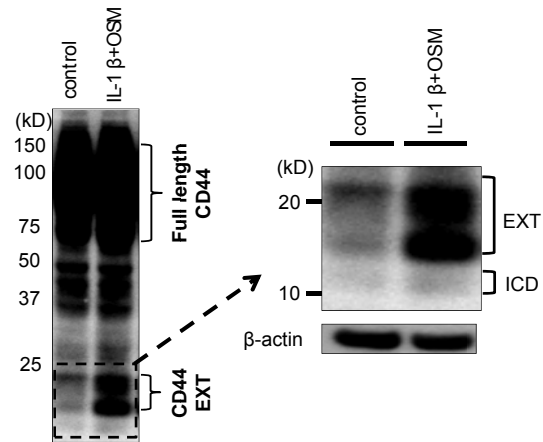
本研究期間においては、実験の再現性をより高くする目的で、セルラインを使用することとした。ヒト軟骨肉腫由来軟骨細胞様細胞株である HCS を主として使用した。

【スタチン製剤による CD44 断片化抑制効果】

Cell Lysis Buffer(Cell Signaling)を用いてタンパクを抽出する。CD44 の細胞内 C 末端に特異的に結合するポリクローナル抗体である cytotail を用いた Western Blotting により CD44 断片化を検討した（下図）。



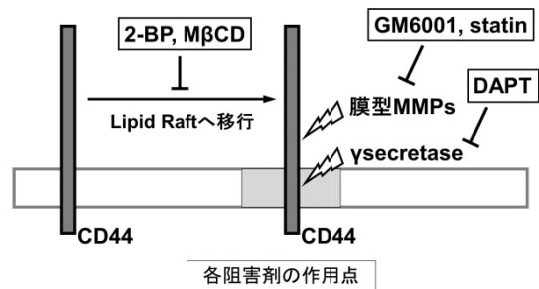
IL-1β (0.5ng/ml) とオンコスタチンM(OSM、10ng/ml)にて 24 時間刺激することにより、HCSにおいてCD44の断片化を誘導することが出来る（下図）。



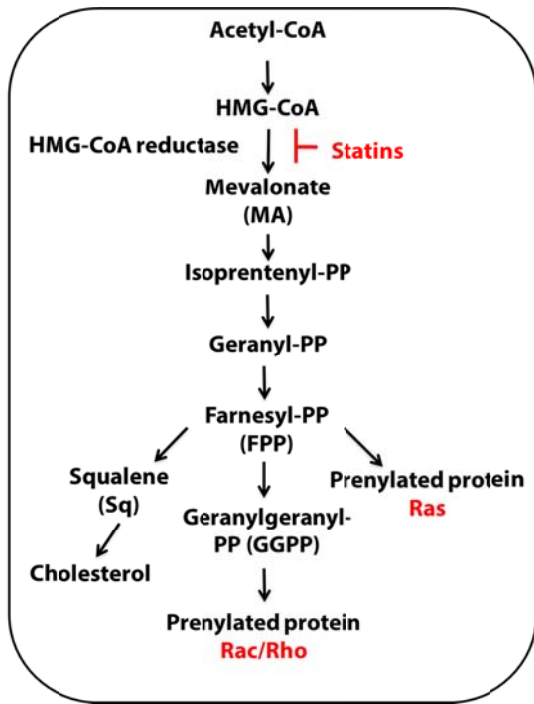
脂溶性スタチン製剤である simvastatin にて 48 時間 pre-treatment した後、IL-1β+OSM 刺激を加えることにより、スタチンによる CD44 の断片化抑制効果を western blotting にて評価した。

【スタチンの CD44 断片化抑制効果に関与する機序・経路の検討】

CD44 は Lipid raft へ移行することにより、膜型 MMP (MT1-MMP、ADA10/17) により第一段階の切断、更にガンマセクレターゼにより第二段階の切断を受けて代謝される（下図）。



スタチンの第一の作用はコレステロール生成抑制であり、これによる Lipid raft の機能低下が CD44 断片化抑制に対する機序として第一に考えられる。しかしスタチンは作用するメバロン酸経路の特徴から、farnesyl 化や geranylgeranyl 化をも抑制するなど、コレステロール生成抑制以外に多様な効果があることがこれまでに報告されているため今回はこれらコレステロール生成経路以外の作用についても検討した（次頁左上図）。



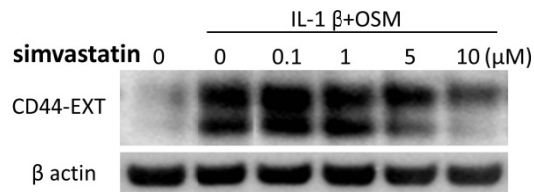
4. 研究成果

【SimvastatinによるCD44断片化抑制】

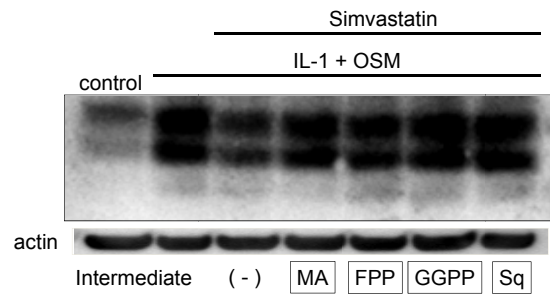
Simvastatinにて48時間の前処置を加えることにより、IL-1 β +OSMによるCD44の断片化を、濃度依存性に抑制することが確認された(下図)。

【メバロン酸経路の中間産物添加による、CD44断片化抑制のキャンセル効果】

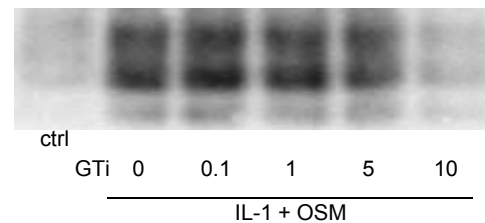
SimvastatinによるCD44断片化抑制のメカニズムを検討するため、メバロン酸経路の各中間産物を同時添加して、断片化抑制効果がキ



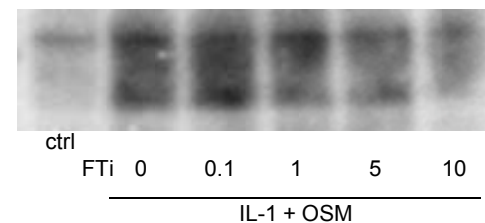
ャンセルされるかどうかを検討した。まず statin の作用点の直下産物であるメバロン酸 (MA) を添加すると、CD44断片化抑制効果が明らかにキャンセルされていた。またさらに下流のファルネシルピロリン酸 (FPP)、ゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP)、コレステロールの前駆物質であるスクアレン (Sq) の添加においても、CD44の断片化抑制効果がキャンセルされた。特にGGPPとSqでキャンセル効果が強く認められており、今回の結果から断片化抑制にはLipid raftとの関連が強いコレステロール経路のみならず、ゲラニルゲラニル化も関与している可能性が高いことが分かった(右上図)。



Ras superfamily 蛋白の活性化はプレニル化 (ファルネシル化、およびゲラニルゲラニル化) という脂質の修飾が必須である。ゲラニルゲラニル化阻害剤が濃度依存的にCD44断片化を抑制したこと(下図)、

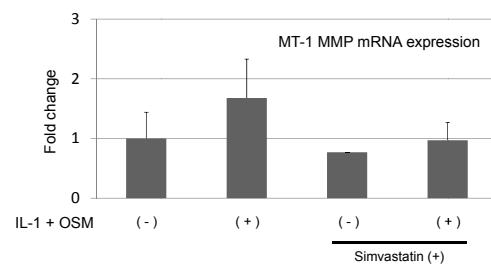


またファルネシル化阻害剤も同様にCD44断片化を抑制したことより(下図)、コレステロール生成抑制によるLipid raft機能低下以外にも、スタチンによるCD44の断片化抑制にはRas経路やRac/Rho経路の関与が強く示唆された。

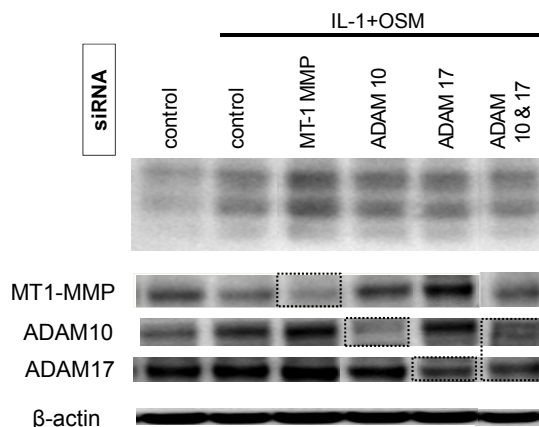


【膜型MMPとCD44断片化】

Simvastatinによる膜型MMPの産生抑制について、mRNAレベルで検討したところ、MT1-MMPについては抑制効果を認めたが(下図)、ADAM-10, 17については明らかでなかった。



更に膜型 MMP (MT1-MMP、ADAM10、ADAM17) の発現を、siRNA による RNA 干渉によりノックダウンして CD44 の断片化に与える影響を調査した。いずれの膜型 MMP も単独ノックダウンでは、明らかな CD44 断片化抑制効果を認めなかったが、ADAM10/17 のダブルノックダウンでは、断片化抑制効果を認めた。また、MT1-MMP のノックダウンで ADAM10/17 発現が亢進したり、ADAM17 のノックダウンで MT1-MMP と ADAM10 発現が亢進したりと、これら膜型 MMP の発現量に関しては相互作用があることが示唆され、Lipid raft での CD44 断片化を複雑に制御していると考えられた (下図)。

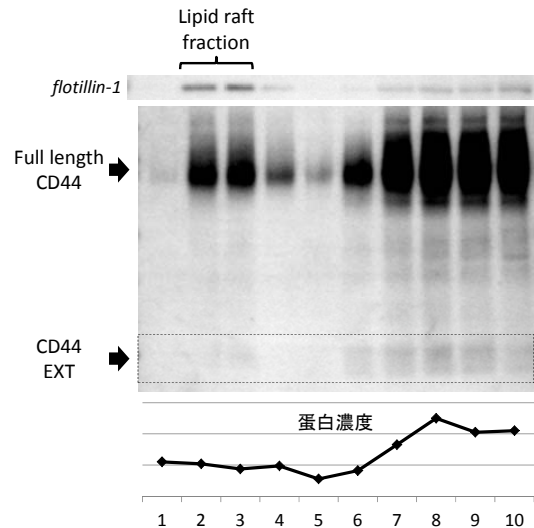


【シヨ糖密度勾配遠心法による CD44 の Lipid raft における局在の検討】

単層培養した HCS 細胞を TritonX-100 にて細胞溶解し、ホモジェナイザーで破碎した。80%スクロースで均一にした後、35%、5%のスクロースを重層し、4℃にて 39,000rpm で 20 時間遠心分離した。

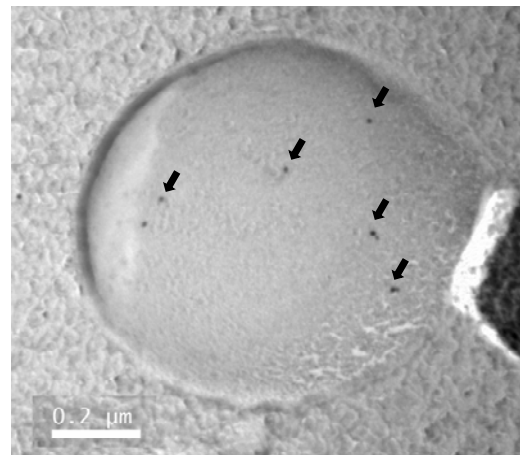
遠心後上部から等量の 10 分画に分配した。シヨ糖密度勾配遠心法では、低密度分画に TritonX-100 不溶性分画が得られ、これを detergent-resistant membrane (DRM) と呼ぶ。この DRM に Lipid raft が存在することが分かっている。

今回の結果でも、低密度である分画 2, 3 に Lipid raft マーカーである flotillin-1 を検出し、同分画において CD44 の存在が確認された。また同分画では Full length CD44 のみが検出され、EXT のバンドを認めなかったことから、Lipid raft における切断後には、速やかに細胞内へ取り込まれることが示唆された (右上図)。



【凍結割断レプリカ標識法による細胞表面における CD44 局在の視覚化】

金箔上に HCS 細胞を単層培養した後、HPM010 にて液体窒素で冷やした純銅のブロックに圧着するメルトコンタクト法で細胞を急速凍結させた。次に凍結割断レプリカ作成装置 (BAF400) にて金箔を細胞から引き剥がし、白金と炭素を蒸着し薄膜を形成させ、レプリカを作成した。このレプリカを 80℃、18 時間 SDS 処理し、ブロッキング後抗 CD44 cytotail 抗体処理をした。直径 10nm 金コロイド付着抗体を 2 次抗体として使用して電子顕微鏡で撮像したところ、細胞膜上に CD44 の分布を示すドット (下図、黒矢印) を確認することが出来た。今後の研究において、Lipid raft と共局在や、各種刺激における局在変化の検討に応用して用いる予定である。



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)

Lipophilic statins inhibit CD44 fragmentation in chondrocyte cells. Terabe K, Kojima T, Takahashi N, Ishiguro N. *59th annual meeting of Orthopaedic Research Society*. San Antonio, USA. 2013/1/26-29

スタチンは軟骨様細胞における CD44 の断片化を阻害する. 寺部健哉、高橋伸典、小嶋俊久、石黒直樹. 第 26 回日本軟骨代謝学会, 大阪. 2013/3/1-2

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 伸典 (TAKAHASHI NOBUNORI)
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
研究者番号: 20570796

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし