

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390356

研究課題名(和文) ストレス応答機構を軸とした変形性関節症に対する分子標的治療の新展開

研究課題名(英文) New development of the molecular targeted therapy for osteoarthritis arthritis with respect to stress-response mechanism

研究代表者

久保 俊一 (Kubo, Toshikazu)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20178031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では5MPaの静水圧下では培養軟骨細胞におけるHIF-2 の発現はNF- Bの発現上昇を伴うことなく誘導されることが明らかとなった。HIF-2 およびその下流にあるMMPsはOAの発症と進行に関与していることから、本研究の結果はOAの病態解明に役立つ可能性がある。また、10m/min群と12m/min群と比べて、20m/min群でOAが進行していたことから、20m/min群の運動負荷は過度であることが明らかとなった。過度な強制走行は軟骨代謝とタンパク分解酵素の遺伝子発現を制御してOAを進行させると考えた。

研究成果の概要(英文)：We showed that expression of HIF-2 in cultured chondrocytes is induced independent of NF- B expression under a hydrostatic pressure of 5 MPa. These results may help in elucidation of the pathology of OA because HIF-2 and MMPs, acting downstream of HIF-2, are involved in initiation and progression of OA. Further, as compared to 10 m/min group and 12m/min group, 20 m/min group exercise was found to be excessive, since OA had progressed in 20 m/min group. We considered that excessive forced running caused the progression of OA.

研究分野：整形外科学

キーワード：変形性関節症 ストレス応答機構 関節軟骨 軟骨細胞

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 変形性関節症に対する治療戦略

生体内は外界からの刺激に対するストレス応答機構により、恒常性を維持している。HSP70 をはじめとする分子シャペロンによる応答は、さまざまな刺激から細胞を防御するとともにストレスによる損傷から回復を促進している。しかし、変形性関節症(OA)では過剰な機械的・物理的刺激により、細胞内ストレス応答機構が十分に機能せず、軟骨基質の代謝が変化し、アポトーシスが誘導されることで、OA が発症・進行する。このため、ストレス応答機構を強化することが OA 治療戦略の鍵となる。

### (2) heat shock protein (HSP)70 の発現

われわれは、ヒト OA 軟骨細胞において HSP70 が組織学的重症度と相関して発現していること (Kubo T. et al. Arthritis Rheum, 1985, Kubo T. et al. Scand J Rheumatol, 1997) を明らかにし、HSP70 が OA の病態に関与していることを報告した。HSP70 の役割を解明するためにさまざまな刺激に対する関節軟骨のストレス応答を解析した。HSP70 はメカニカルストレスの強度に依存して軟骨細胞に誘導され (Kubo T. et al. J Orthop Res, 1997), 誘導された HSP70 は非生理的圧力から軟骨細胞を保護していた (Kubo T. et al. J Orthop Res, 2006)。HSP70 の遺伝子導入実験やアミノ酸であるグルタミンにより軟骨細胞に HSP70 の発現を誘導することで、軟骨代謝が促進され (Kubo T. et al. J Rheumatol, 1997, Kubo T. et al. Osteoarthritis Cartilage, 2006), 細胞障害性ストレスから軟骨細胞が保護されることを明らかにした (Kubo T. et al. J Rheumatol, 2001, Kubo T. et al. Arthritis Rheum, 2003, Kubo T. et al. Osteoarthritis Cartilage, 2006)。また、マイクロウェーブ照射器による適切な温熱刺激が HSP70 を誘導し、正常関節軟骨の基質代謝を亢進することを明らかにした (Kubo T. et al. J Orthop Res, 2008)。さらに、2011 年、低酸素ストレスにより HSP70 が誘導されることを明らかにし、その発現メカニズムを詳細に解析した。低酸素環境で誘導される hypoxia inducible factor (HIF) -1 は、軟骨基質の代謝に重要な役割がある。HIF-1 の軟骨基質代謝の亢進作用には HSP70 によるストレス応答機構が必須であることを明らかにした (Kubo T. et al. J Orthop Res, 2014)。以上から、さまざまな刺激に対するストレス応答機構として、関節軟骨に HSP70 が誘導され、anabolic な作用を増強させることを証明した。しかし、近年注目されている catabolic な作用に対する HSP70 の役割はほとんど分かっていない。HSP70 の誘導を OA 治療戦略とするためには、近年報告された複数の OA 治療標的分子における HSP70 の役割を解明する必要がある。

### (3) OA における catabolic 因子の役割

OA における軟骨変性・破壊には、matrix metalloproteinase (MMP) や a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5 (ADAMTS-5) のようなタンパク分解酵素が重要である (Nature, 2005)。しかし、これらの抑制薬は OA に対する薬理効果が確立されておらず、重篤な筋痛、骨痛、腱鞘炎などの副作用は避けられない (Cardiovasc Res, 2006, Cur Drug Target, 2007)。そのため、タンパク分解酵素の上流シグナルとして、軟骨細胞の肥大化・アポトーシスを制御する軟骨内骨化シグナルの解析がすすめられた (Mol Cells, 2008)。なかでも、HIF-2 が重要であることが報告された (Nature Med, 2010)。HIF-2 は、肥大分化した軟骨細胞の特異的マーカー遺伝子である X 型コラーゲン (COL10A1), MMP3, 9, 13, 軟骨内骨化の関連因子である Indian hedgehog (IHH), OA の骨棘形成に関与している vascular endothelial growth factor (VEGF) を誘導し、関節軟骨の catabolic な作用を促進させる。HIF-2 の発現は、nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) シグナルによって調整されている (Nature Med, 2010)。NF- $\kappa$ B/HIF-2 シグナルは炎症だけでなく、メカニカルストレスによっても活性化することから OA の発症と進行に重要なはたらきがあると考えられている。近年、HSP70 は LIM 蛋白ファミリーに属する核内蛋白 PDZ and LIM domain protein-2 (PDLIM2) と共同して NF- $\kappa$ B を分解していること (Trends in Immunol, 2008), アフリカミドリサル Cos-1 細胞で HSP70 が IKK と共同して NF- $\kappa$ B の炎症に対する発現を抑制し、アポトーシスを抑制していること (Genes Dev, 2004), マウスのマクロファージで HSP70 を抑制すると、NF- $\kappa$ B の主要な転写因子である RelA が、核内の  $\kappa$ B プロモーター領域に応答して炎症性サイトカインを産生すること (Cell Stress Chaperones, 2009) が報告された。さらに、ヒトの網膜色素上皮において HSP70 は、NF- $\kappa$ B を調整するマスター因子であることが証明された (Pharmacol Res, 2011)。これらは、軟骨細胞における HSP70 の誘導が NF- $\kappa$ B/HIF-2 シグナルを抑制する可能性を示唆している。

## 2. 研究の目的

これまで関節軟骨に対するさまざまな刺激に対し、HSP70 が anabolic な作用を増強させることを明らかにし、HSP70 の誘導が OA 進行抑制に有用である可能性を示してきた。本研究では、OA 分子標的である NF- $\kappa$ B/HIF-2 シグナル、軟骨肥大分化関連因子、および軟骨基質分解酵素に対する HSP70 の役割を網羅的に解析し、OA 発症メカニズムにおける HSP70 の機能解析を行う。さらに、HSP70 を効果的に誘導できる運動条件を検討し、これまで開発してきた HSP70 誘導法と運動療法を併用することにより、軟骨形成を促進させ、

catabolic な作用を抑制できる新規運動療法を開発する。以上から、ストレス応答機構を軸とした OA に対する新たな予防戦略を確立する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 炎症性ストレス (*in vitro*)

日本白色家兔の肩・股・膝関節から酵素処理によって単離した関節軟骨細胞に対し、IL-1 による炎症性ストレスを加えた。全 RNA を回収し、NF- $\kappa$ B, HIF-2, MMP-13, MMP-3, VEGF の遺伝子発現を real-time RT-PCR で解析した。

#### (2) 静水圧ストレス (*in vitro*)

0, 5, 10 または 50MPa の静水圧ストレスを 2 時間負荷した。30 分後に全 RNA を回収し、NF- $\kappa$ B, HIF-2, MMP-13, MMP-3, VEGF の遺伝子発現を real-time RT-PCR で解析した。

#### (3) 強制走行による運動刺激 (*in vivo*)

12 週齢雄 Wistar 系ラット (n = 12) を、走行速度に応じて 10m/min 群, 12m/min 群, 20m/min 群に分けた。1 日 1 時間、週 5 回の走行を行った。自由飼育したものを control 群 (n = 4) とした。6 週間後に、左膝関節軟骨から全 RNA を抽出し、軟骨代謝関連因子として aggrecan, col2a1, MMP-13 および ADAMTS-5 の遺伝子発現を real time RT-PCR で解析した。右膝関節に対して Safranin O 染色を行い、軟骨の組織学的変性度を modified Mankin score を用いて定量化した。

### 4. 研究成果

#### (1) 炎症性ストレス (*in vitro*)

培養関節軟骨細胞に対し IL-1 による炎症性ストレスを加え遺伝子発現を解析した。NF- $\kappa$ B, HIF-2, MMP-13, MMP-3, VEGF の遺伝子発現は、IL-1 刺激群で有意に上昇した (図 1)。

#### (2) 静水圧ストレス (*in vitro*)

次に、培養関節軟骨細胞に対する静水圧ストレスの影響を解析した。5MPa の静水圧をかけると、HIF-2, MMP-13, MMP-3 の遺伝子発現が有意に増加した。50MPa の静水圧をかけると、HSP70, NF- $\kappa$ B, VEGF の遺伝子発現は有意に上昇したが、MMP-13, MMP-3 は低下した (図 2)。

培養関節軟骨細胞に対する炎症性刺激により HIF-2 や NF- $\kappa$ B, MMP-13, MMP-3, VEGF の遺伝子発現が亢進することが報告されている。本研究でも過去の報告と同様にこれらの遺伝子発現は全て上昇し、培養環境やプライマーが適切であることを確認した。HIF-2 は通常の関節軟骨では産生されないがヒト OA 軟骨組織では産生される。膝関節に不安定性を与える DMM モデルを HIF-2 ノックアウトマウスで作製したところ野生型

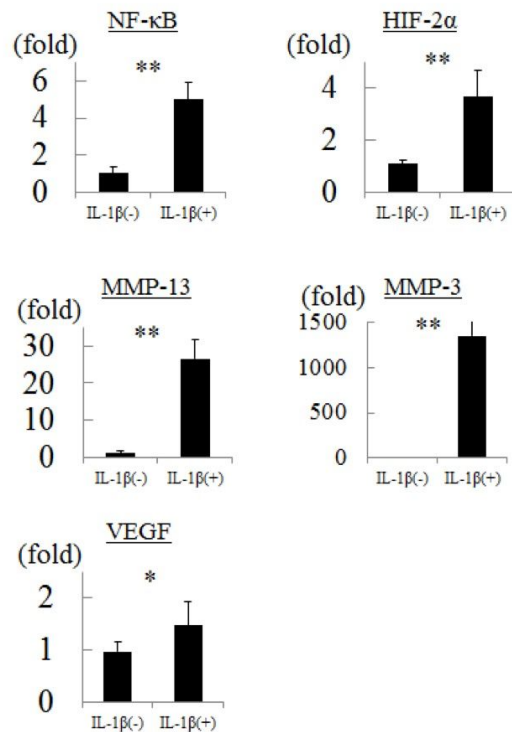


図 1. IL-1 刺激による遺伝子発現の変化

と比較して OA 進行は抑制され HIF-2 に加えて MMP-13 の遺伝子発現が低下することが明らかにされている。そのため、OA に対する分子レベルでの治療標的として HIF-2 が注目されている。一方、ラット下大静脈において伸展ストレスが HIF-2 を過剰発現させることや、HIF-2 欠損マウスの血管内皮細胞でインテグリン発現が低下することが報告されており、HIF-2 の発現が圧力やそのセンサーと関係している可能性がある。しかし、軟骨組織における HIF-2 発現と圧力に関する報告はなく本研究は初めて HIF-2 と静水

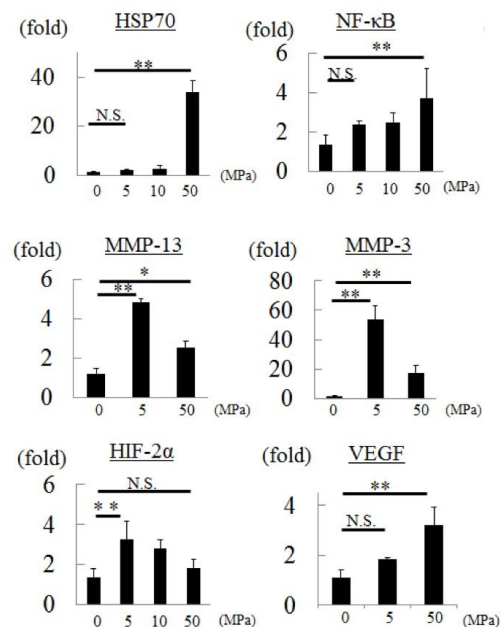


図 2. 静水圧による遺伝子発現の変化

圧の関係について明らかにした。

軟骨肉腫用細胞を用いた研究で、静水圧はストレス応答タンパクである HSP70 発現を圧依存性に誘導することを我々は明らかにしている。本研究では、HSP70 の遺伝子発現は 10MPa 以下の静水圧では変化なかったが 50MPa の静水圧を負荷することで有意に上昇した。このことから 50MPa は培養軟骨細胞にとって過度の静水圧であると考え、以降の実験を行った。HSP70 と NF- $\kappa$ B の関係に関しては肝癌細胞の研究で HSP70 は NF- $\kappa$ B を誘導するとの報告がある。本研究でも Control 群と比較した HSP70 と NF- $\kappa$ B の遺伝子発現は、5MPa では変化なく 50MPa ではともに有意に亢進しており、静水圧で誘導された HSP70 が NF- $\kappa$ B 発現を誘導した可能性がある。NF- $\kappa$ B と HIF-2 の関係について川口らは HIF-2 プロモーターを用いたスクリーニングによって、NF- $\kappa$ B が HIF-2 の上流で制御していると述べている。しかし本研究では 5MPa の静水圧負荷で NF- $\kappa$ B の上昇を伴うことなく HIF-2 の発現が有意に亢進していたことから、5MPa の静水圧は NF- $\kappa$ B を介さず HIF-2 を制御している可能性があると考えた。過去の報告と異なる理由として、本研究では培養細胞における静水圧の影響のみを検討していることが挙げられる。また、HIF-2 の活性化により産生される HIF-3 のように HIF-2 に対する negative feedback 機構を形成する因子の影響である可能性がある。MMP-13 と MMP-3 は HIF-2 により誘導されることが明らかにされている。本研究でも HIF-2 の発現と同様に MMP-13 と MMP-3 の遺伝子発現も Control 群と比較して 5MPa 群で最も亢進した。MMP-13 や MMP-3 の遺伝子発現は 50MPa 群でも亢進していたが、5MPa の静水圧を負荷された群と比較すると有意に低かった。VEGF は HIF-2 により誘導されると報告されているが、BMP-2, Rho, HIF-1 などにも誘導されその制御機構を一元的に述べることは困難である。本研究でも HIF-2 の発現が VEGF の発現と一致しなかったのは HIF-2 以外の因子が影響を与えた可能性があると考えた。

まとめとして、5MPa の静水圧下では培養軟骨細胞における HIF-2 の発現は NF- $\kappa$ B の発現上昇を伴うことなく誘導されることが明らかとなった。HIF-2 およびその下流にある MMPs は OA の発症と進行に関与していることから、本研究の結果は OA の病態解明に役立つ可能性がある。

(3) 強制走行による運動刺激 (*in vivo*)  
動物実験により、*in vivo* でのメカニカルストレスが関節軟骨に与える影響を検討した。20m/min 群の aggrecan の遺伝子発現は 10m/min 群より有意に低下し、col2a1 の発現は 12m/min 群と比べて有意に低かった。MMP-13 の遺伝子発現は control 群と比較して 20m/min 群で有意に上昇していたが、

ADAMTS-5 の発現に有意差はなかった(図3)。

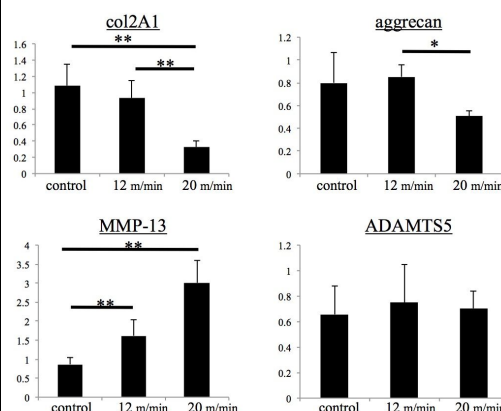


図3. 強制走行による遺伝子発現の変化

modified Mankin score は他の群と比較して 20m/min 群で有意に高値であった(図4)。

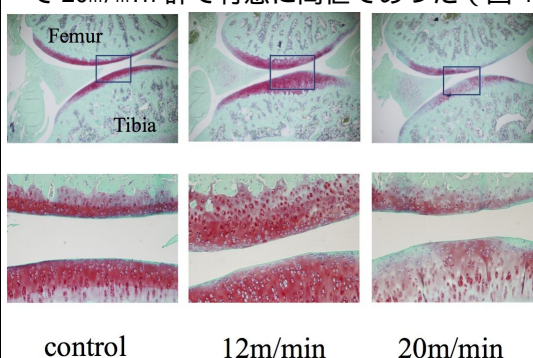


図4. 組織学的評価

本研究では、10m/min 群と 12m/min 群と比べて、20m/min 群で OA が進行していたことから、20m/min 群の運動負荷は過度であることが明らかとなった。また、20m/min 群で aggrecan および col2a1 の遺伝子発現は低下し、MMP-13 の発現が上昇していたことから、過度な走行は軟骨代謝とタンパク分解酵素の遺伝子発現を制御して OA を進行させると考えた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Hiroaki Inoue, Yuji Arai, Tsunao Kishida, Ryu Terauchi, Kuniaki Honjo, Shuji Nakagawa, Shinji Tsuchida, Tomohiro Matsuki, Keiichiro Ueshima, Hiroyoshi Fujiwara, Osam Mazda, Toshikazu Kubo, Hydrostatic pressure influences HIF-2 alpha expression in chondrocytes, International Journal of Molecular Sciences, 査読有, vol.16, 2015, p1043-1050  
Shinji Tsuchida, Yuji Arai, Kenji A. Takahashi, Tsunao Kishida, Ryu Terauchi, Kuniaki Honjo, Shuji Nakagawa, Hiroaki Inoue, Kazuya Ikoma, Keiichiro Ueshima, Tomohiro

Matsuki, Osam Mazda, Toshikazu Kubo, HIF-1 -induced HSP70 regulates anabolic responses in articular chondrocytes under hypoxic conditions, Journal of Orthopaedic Research, 査読有, vol.32, 2014, p975-980  
Nobuyuki Hiraoka, Yuji Arai, Kenji A. Takahashi, Osam Mazda, Tsunao Kishida, Kuniaki Honjo, Shinji Tsuchida, Hiroaki Inoue, Saori Morino, Mary Ann Suico, Hirohumi Kai, Toshikazu Kubo, Mild electrical stimulation with heat stimulation increase heat shock protein 70 in articular chondrocyte, Journal of Orthopaedic Research, 査読有, Vol.31, 2013, p894-900

[学会発表](計5件)

Shohei Ichimaru, Shinji Tsuchida, Yuji Arai, Shuji Nakagawa, Hiroaki Inoue, Tomohiro Matsuki, Kuniaki Honjo, Keiichiro Ueshima, Osam Mazda, Toshikazu Kubo, The anabolic effects of HIF-1 -induced HSP70 in rabbit articular chondrocyte under hypoxic conditions, 61st Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, 2015.3.28-31, MGM Grand Hotel (Las Vegas, NV, USA)  
Kuniaki Honjo, Yuji Arai, Shinji Tsuchida, Shuji Nakagawa, Hiroaki Inoue, Masazumi Saito, Shohei Ichimaru, Seiji Shimomura, Atsuo Inoue, Ryu Terauchi, Osam Mazda, Toshikazu Kubo, HSP70 induced by HIF-1 regulates anabolic responses in chondrocytes under hypoxic conditions, 18th World Congress of the Osteoarthritis Research Society International, 2015.4.30-5.3, Washington State Convention Center (Seattle, WA, USA)  
Hiroaki Inoue, Yuji Arai, Ryu Terauchi, Shuji Nakagawa, Masazumi Saito, Shinji Tsuchida, Tomohiro Matsuki, Shohei Ichimaru, Osam Mazda, Toshikazu Kubo, Effect of inflammation stress on the hypertrophic differentiation related gene expression in cultured chondrocytes, 17th World Congress of the Osteoarthritis Research Society International, 2014.4.24-27, The Center of New Industrial and Technologies (Paris, France)  
Hiroaki Inoue, Yuji Arai, Ryu Terauchi, Shuji Nakagawa, Masazumi Saito, Nobuyuki Hiraoka, Shinji Tsuchida, Tomohiro Matsuki, Osam Mazda, Toshikazu Kubo, Effect of mechanical stress on the hypertrophic differentiation related gene expression in cultured

chondrocytes, 16th World Congress of the Osteoarthritis Research Society, 2013.4.18-21, Philadelphia Marriott Downtown hotel (Philadelphia, PA, USA)  
Tomohiro Matsuki, Yuji Arai, Shinji Tsuchida, Ryu Terauchi, Hiroaki Inoue, Shuji Nakagawa, Atsuo Inoue, Osam Mazda, Toshikazu Kubo, The roles of heat shock protein 70 on chondrocytes, 16th World Congress of the Osteoarthritis Research Society International, 2013.4.18-21, Philadelphia Marriott Downtown hotel (Philadelphia, PA, USA)

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/orthoped/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

久保 俊一 (KUBO TOSHIKAZU)  
京都府立医科大学・医学研究科・教授  
研究者番号：20178031

(2)研究分担者

新井 祐志 (ARAI YUJI)  
京都府立医科大学・医学研究科・講師  
研究者番号：50347449

寺内 竜 (Terauchi Ryu)

京都府立医科大学・医学研究科・講師  
研究者番号：20575154

藤原 浩芳 (Fujiwara Hiroyoshi)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：90381962

(3)連携研究者

松田 修 (Mazda Osam)

京都府立医科大学・医学研究科・教授  
研究者番号：00271164