

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592286

研究課題名(和文)軟骨細胞核酸修復酵素APEX2の活性と軟骨変性機序の解析

研究課題名(英文)The analysis between degeneration of chondrocytes in Osteoarthritis and DNA repair enzyme APEX2.

研究代表者

油井 直子(YUI, NAOKO)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：20266696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：変形性関節症は、関節軟骨の変性や物理的摩擦の影響によって引き起こされる二次性滑膜炎、および骨・軟骨の新生増殖性変化にもとづく進行性の関節変性疾患である。近年、加齢にともなう軟骨基質の変化に加えて、肥満や荷重などのメカニカルストレスと、それにともない誘導される酸化ストレス(活性酸素種)の蓄積が、OAの発症と進行に密接に関与することが明らかとなっている。今回我々は、酸化ストレスの応答機構としてDNA損傷に対する修復酵素(Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 2: Apex2)の存在に着目し、変形性関節症の軟骨細胞におけるApex2の発現とその応答機序について検討した。

研究成果の概要(英文)：Apex 2 plays a critical role in DNA repair caused by oxidative damage in a variety of human somatic cells. We speculated that chondrocyte Apex 2 may protect against the catabolic process of articular cartilage in osteoarthritis (OA). Higher levels of Apex 2 expression were histologically observed in severely compared with mildly degenerated OA cartilage from STR/OrtCr1j mice. The immunopositivity of Apex 2 was significantly correlated with the degree of cartilage degeneration. Moreover, interleukin-1 induced the expression of Apex 2 in chondrocytes, while Apex 2 silencing using small interfering RNA reduced chondrocyte activity in vitro. Our findings suggest that Apex 2 may have the potential to prevent the catabolic stress-mediated down-regulation of chondrocyte activity in OA.

研究分野：医歯薬学

キーワード：変形性関節症 軟骨細胞 DNA修復酵素 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究の対象となる変形性関節症は、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) 変形性関節症発症のメカニズムとして、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解析を行うこととした。

遺伝情報を担うDNAを構成する塩基(アデニン、グアニン、シトシン、チミン)は、シャルガフの法則からアデニンはチミン、グアニンはシトシンとしか水素結合せず、DNA鎖は互いに逆向きに二重らせんとなる。しかし、

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)等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。そこで今回我々は、神経以外の組織の変性疾患と変形性関節症の病態に見られる変性に着目した。

## 2. 研究の目的

(1) 酸化ストレスの応答機構として軟骨細胞のDNA損傷に対する修復酵素(apurinic/apyrimidinic endonuclease 2: APEX2)の存在に着目し、軟骨細胞における発現とその応答機序について検討した。

(2) DNA修復酵素(apurinic/apyrimidinic endonuclease 2: APEX2)の調節機構の変化・破綻が軟骨変性の誘因となるか否かを検証した。

## 3. 研究の方法

(1) 分子生物学的検討: 整形外科外来において、変形性関節症と診断され手術にいたった患者からインフォームドコンセントを得たうえで、人工関節置換術時に採取した関節軟骨からOA軟骨培養細胞を分離樹立した。コントロール軟骨細胞は、外傷性大腿骨頭部骨折で人工骨頭置換術時に採取した骨頭軟骨から分離樹立した。OA軟骨細胞またはコントロール軟骨細胞の培養系に軟骨異化誘導因子であるIL-1(10ng/ml)を経時的に添加したあとの軟骨細胞を回収し、DNA修

復酵素 APEX2 活性をウェスタンブロット法にて解析した。さらに、RNA 干渉法を用いて DNA 修復酵素 APEX2 機能抑制細胞 (short interfering RNA: siRNA) を作製し、同様の軟骨異化誘導因子を添加して得られた培養上清を用いて、軟骨細胞活性 (プロテオグリカン産生量) を ELISA 法を用いて測定した。

(2) 免疫組織学的検討: 自然発症の変形性関節症マウス (STR/ORTCrj mice) の各週令 (4, 8, 12, 16, 20, 24 週令) ごとに作製された膝関節部の病理組織標本を Safranin-O 染色して、OA 軟骨組織変性度を Mankin 法 (OA 変性度の点数評価法) を用いて評価した。さらに、anti-APEX2 抗体で軟骨細胞の免疫組織染色をおこない、関節軟骨組織変性度と APEX2 陽性細胞発現度との関連について評価した。

なお本研究は、聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会臨床試験部会 (承認 1315 号) の承認を得たものである。統計は Student's t 検定または Fisher の検定を用いた。

#### 4. 研究成果

(1) 軟骨細胞の培養系に IL-1 (10ng/ml) を添加すると、DNA 修復酵素 APEX2 の発現は、コントロール軟骨細胞ではほとんどみられず、OA 患者由来の軟骨細胞においてのみ認められた (図 1-A、図 1-B)。

(2) IL-1 非添加時の APEX2 発現量を基準として、IL-1 添加後の APEX2 発現量の時間的推移を観察すると、添加後約 2 時間後に一旦発現の低下を認めた後、徐々に増加し約 6 時間から 8 時間後に初期の APEX2 発現量へ回復していた (図 1-C)。この反応の推移は、OA 軟骨細胞に異化因子が作用すると一過性に活性が低下するものの、時間の経過とともに修復が進み変性の回復が生じて来ているのではないかと推測された。

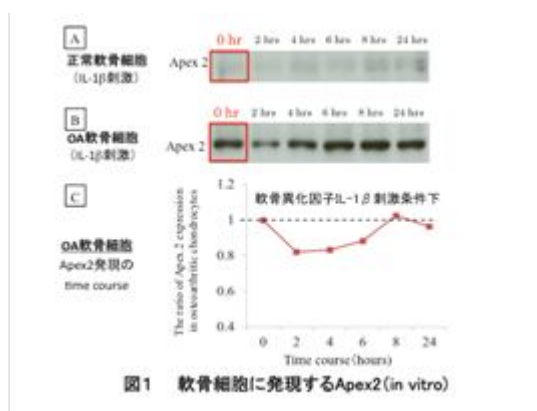


図1 軟骨細胞に発現するApex2 (in vitro)

(3) 軟骨細胞の RNA 干渉実験として APEX2 機能抑制細胞を作製した結果では、APEX2 の発現抑制率は 19~41%であった。(図 2)。一般的に培養軟骨細胞への遺伝子導入効率は 20~30%と他の培養細胞と比較しても低いことが知られているが、今回の実験における抑制率は十分であったと考えられた。

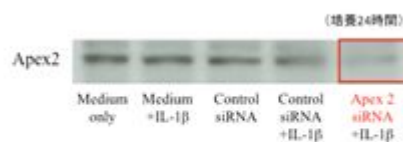


図2 軟骨細胞のRNA干渉実験

(4) 上記の結果をもとに、APEX2 機能抑制細胞へ IL-1 を添加して軟骨細胞の活性指標となるプロテオグリカンの産生量を測定すると、コントロール軟骨細胞は添加の有無にかかわらずプロテオグリカンの産生量に違いを認めなかったが、OA 軟骨細胞は IL-1 の添加により明らかにプロテオグリカンの産生量が低下していた (図 3)

( $p < 0.05$ )

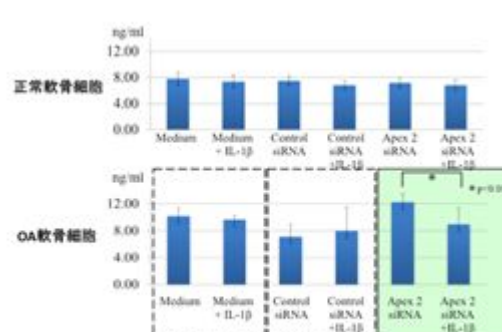
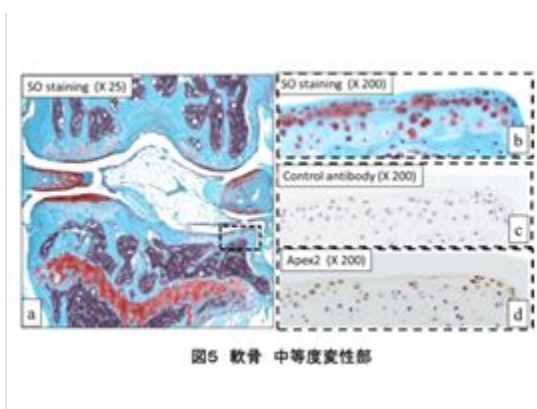
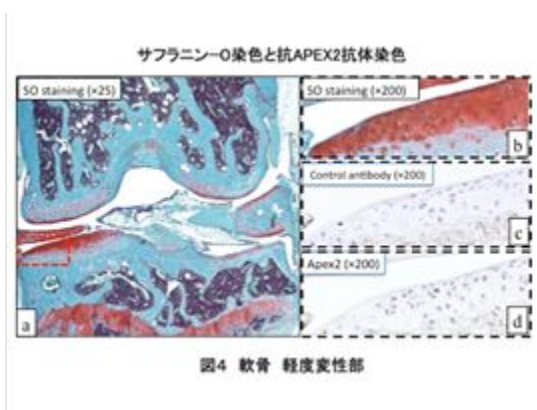
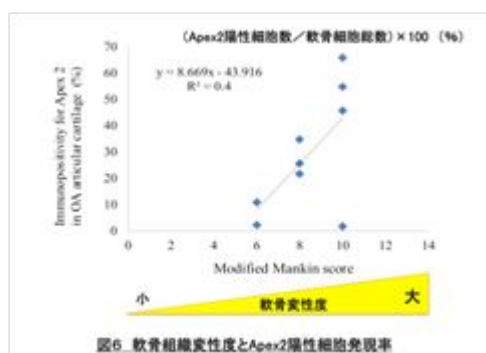


図3 軟骨細胞のプロテオグリカン産生量 (24hr後)

(5) 変形性関節症自然発症のマウスの膝関節部を観察すると、軽度軟骨変性部の組織はサフラニンOによる染色性が良好で、軟骨基質のプロテオグリカンも豊富であり、軟骨細胞密度も正常、APEX2免疫染色は陰性であった。(図4)一方、中等度変性部の軟骨組織を観察すると、サフラニンOによる染色性は低下し、軟骨基質のプロテオグリカンも減少、軟骨細胞密度も乏しく、APEX2免疫染色は陽性で、軟骨組織の表層にAPEX2陽性細胞を認めた。(図5)



(6) 変形性関節症マウスの軟骨組織変性度と軟骨組織におけるAPEX2陽性細胞発現率との関連を検討したところ、軽度から中等度の軟骨変性部位ではAPEX2陽性細胞の発現率は低く、変性の程度が進行していくのに従って陽性細胞の出現頻度が増加していた。組織変性度を示すModified Mankinスコアと関節軟骨におけるAPEX2陽性細胞発現率(%)との間に正の相関が見られた(図6)。



(5) 考察として、変形性関節症の病因として、加齢による軟骨基質の退行性変化に加えて、肥満や荷重によるメカニカルストレス、それともない誘導される酸化ストレスの関与が知られている。細胞のストレス応答の結果、活性酸素種により生じるDNA損傷が、発癌をはじめ様々な疾患の病因の1つとも考えられている。このDNA損傷修復酵素の1つであるAPEX2は、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、神経変性疾患の病態・病因との関連性が示唆されている。

今回我々は、OA発症にみられる“変性”に着目し、軟骨変性・異化の誘導因子に応答したDNA修復酵素APEX2の発現が、正常軟骨細胞では見られず、OA患者由来の軟骨細胞のみにおいて上昇していることを見いだした。また、DNA修復酵素APEX2は、変形性関節症の軟骨組織変性度と相関して発現することも明らかとなった。これは、軟骨細胞内のDNA修復酵素の発現や活性は、ストレスの少ない状態では機能発現を認めないが、メカニカルストレスの程度や、その蓄積に応答して変化するということが示された。また、DNA修復酵素APEX2は、軟骨細胞の防御機構として恒常性の維持に働くが、外因性ストレスに対抗しきれず機能が低下すると、軟骨細胞の活性低下や細胞死(アポトーシス)等を惹起し、変形性関節症の発症や増悪に関与しうると考えられるため、OA発症の経路において何らかの制御を受けるものと示唆された。

## 引用文献

- 1.Mankin, H.J.; Dorfman, H.; Lippiello, L.; Zarins, A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1971, 53, pp.523–537.
- 2.Yudoh, K.; Nguyen, T.; Nakamura, H.; Hongo-Masuko, K.; Kato, T.; Nishioka, K. Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: Oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis Res. Ther.* 2005, 7, pp.R380–R391.
- 3.Xiongwei, Z.; Hyoung-gon, L.; George, P.; Mark, A.S. Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: An update. *Biochim. Biophys. Acta* 2007, 1772, pp.494–502.
- 4.Sompol, P.; Ittarat, W.; Tangpong, J.; Chen, Y.; Doubinskaia, I.; Batinic-Haberle, I.; Abdul, H.M.; Buttfield, D.A.; Clair, D.K.S.T. A neuronal model of Alzheimer's disease: An insight into the mechanisms of oxidative stress-mediated mitochondrial injury. *Neuroscience* 2008, 153, pp.120–130.
- 5.Daniel, G.; Rafal, R.; Agnieszka, S.; Tomasz, D.; Krzysztof, N.; Maciej, K.; Aleksander, A.; Ryszard, O. Oxidative stress and Oxidative DNA damage is characteristic for mixed Alzheimer disease/vascular dementia. *J. Neurol. Sci.* 2008, 266, pp.57–62.
- 6.Russell, H.S. Brain aging, Alzheimer's disease, and mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 2011, 1812, pp.1630-1639.

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

1. Naoko Yui, Hirotaka Yoshioka, Hiroto Fujiya, Hruki Musha, Moroe Beppu, Rie Karasawa, Kazuo Yudoh. The DNA Repair Enzyme Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease (Apex Nuclease)2 Has the Potential to Protect against Down-Regulation of Chondrocyte Activity in Osteoarthritis. *International journal of Molecular Sciences*, 査読有, Vol .15, 2014, 14921-14934, DOI:10.3390/ijms 150914921

〔学会発表〕(計 1件)

1. Naoko Yui, Kazuo Yudoh, Rie Karasawa, Hirotaka Yoshioka, Hruki Musha. DNA repair enzyme Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 2 (Apex2) has a potential to protect against the down-regulation of chondrocyte activity in osteoarthritis. OARSI 2014, 2014.4.24-27, Paris (France).

〔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〕なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

油井 直子 ( YUI, Naoko )

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 2 0 2 6 6 6 9 6

### (2)研究分担者

遊道 和雄 ( YUDOH, Kazuo )

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・教授

研究者番号： 6 0 2 7 2 9 2 8

(2)研究分担者

唐澤 里江 ( KARASAWA, Rie )

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・講師

研究者番号： 5 0 4 2 4 4 1 0