

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462376

研究課題名(和文) Smpd3の軟骨細胞肥大分化及びヒアルロン酸産生減少における機能解析

研究課題名(英文) Analysis on function of Smpd3 in chondrocyte maturation and hyaluronan synthesis

研究代表者

梶 博則 (Kakoi, Hironori)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：50423728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：正常な関節軟骨細胞は分化成熟しないが、内軟骨性骨化過程を模した現象が変形性関節症(OA)では起こりBMPシグナルはこれを促進する。Smpd3発現は、軟骨細胞においてBMPシグナルによってRunx2依存的に誘導された。Smpd3の機能抑制は、この軟骨細胞分化を著明に促進し、Akt経路を増強した。Smpd3過剰発現は、逆に軟骨細胞成熟とAkt-S6のリン酸化を抑制した。ヒアルロン酸合成はこのAkt経路の下流だった。BMPシグナルはOA形成に促進的である一方で、Smpd3経路を活性化して異常な内軟骨性骨化過程を抑える事で、OA変性に抑制的なnegative feedback機構を形成した。

研究成果の概要(英文)：Normal chondrocytes remain in immature state, however, chondrocytes in osteoarthritis (OA) cartilage undergo this endochondral ossification-like process, which is driven by BMP signaling. Treatment of BMP induced Smpd3 expression in a Runx2-dependent manner in chondrocytes. Loss-of-function of Smpd3 promoted chondrocyte maturation and Akt signaling. Smpd3 gain-of-function experiments resulted in inhibition of chondrocyte differentiation and Akt-S6 pathway. Hyaluronan (HA) synthesis was inhibited by Smpd3 via Akt pathway in chondrocytes. Hence, BMP signaling promoted OA initiation of cartilage, at the same time, it activated Smpd3 pathway to suppress Akt signaling and chondrocyte maturation as well as HA synthesis, as a negative feedback mechanism. Our results suggested that promotion of Smpd3 pathway (by application of mimicking compound like ceramide) may be valuable in treatment and/or prevention of OA progression.

研究分野：整形外科学

キーワード：Smpd3 BMP 変形性関節症

1. 研究開始当初の背景

正常な関節軟骨細胞は分化を早期で静止しており、決して子供の成長板の様に分化成熟・肥大化して骨に置き換わることは無い。しかしこの内軟骨性骨化過程を模した現象が変形性関節症(OA)では起こる。正常関節軟骨の分化進行を抑制するメカニズムはよく分かっていないが、骨形成蛋白(BMP)の関わりは重要である。軟骨細胞の分化成熟・肥大化を、BMPシグナルは *in vitro* と *in vivo* において促進するが、実際 BMP を関節内直接投与すると、関節軟骨の肥大化と骨化、すなわち OA 変性を招く。従って関節軟骨における BMPシグナルの抑制は OA 抑止の一つのオプションであり、我々は TGF- β シグナルが誘導する転写抑制因子 SnoN が、BMPシグナルを抑制し、OA 進展に抑制的である可能性を報告した(Kawamura I, *et al.*, *J Biol Chem*, 2012)。だが SnoN 単独による軟骨細胞肥大化抑制効果は完全ではなく、OA 発症機序の多様性から鑑みても、他にも複数の BMP 誘導性の責任因子があると予想される。

Sphingomyelin phosphodiesterase 3(*Smpd3*)は筋芽細胞株 C2C12 において BMP-2 により誘導される(Chae Y., *et al.*, *BMB Reports*, 2008)が、その loss-of-function mutant mice (*fragilis ossium: fro*)は内軟骨性骨化と膜性骨化の両者が遅延して成獣で脆弱な骨表現型を示し、ヒトの非コラーゲン型 osteogenesis imperfecta のモデルとされている(Aubin I., *et al.*, *Nat Genet*, 2005)。*Smpd3* KO マウスも mild ながら骨量の低下を示すが(Stoffel W., *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 2005 & *Am J Pathol*, 2007)、重要な事は KO マウスも *fro/fro* マウスも、肥大軟骨細胞分化が亢進して骨化が遅延し chondrodysplasia を呈するという事で、*Smpd3* が genetic には BMPシグナルの下流で、軟骨細胞分化成熟・肥大化に対する抑制因子である事が示唆される。我々は既に *Smpd3* のマウス成獣組織発現分布を検討し、確かに長管骨骨幹端海綿骨にて最高レベルの発現を確認した一方、関節軟骨にも中程度の mRNA 発現を捉えている。BMP で誘導した ATDC5 軟骨細胞では、分化中期から後期にかけて発現が上がる事を確認し、BMP は直接の誘導因子ではないものの、*Smpd3* の発現に重要である事をうかがわせる。しかし軟骨細胞分化における *Smpd3* の cell-autonomous な役割の有無と分子メカニズムについては、全く分かっていない。本研究では、1) *Smpd3* の時間的・空間的発現プロファイルを、培養軟骨細胞分化系とマウス組織、及び OA 臨床組織サンプルで mRNA レベルと蛋白レベルで解析し、2) その内高い発現が得られた *in vitro* 培養系で、*Smpd3* の loss of function による軟骨細胞分化への生理的役割の検討と、発現の低い低分化度の軟骨前駆細胞において、gain of function による病理的機能を解析した。この際、*Smpd3* の下流で動く細胞内シグナルを詳細に調べ、最も肥大軟骨細胞分化抑制に直結する責任

分子を同定した。

2. 研究の目的

(1) *Smpd3* の時間的・空間的発現プロファイルリング

Smpd3 が軟骨細胞分化の特に後期肥大成熟期に抑制的であるという仮説が正しければ、その分化の時間と場所に *Smpd3* が発現しているはずである。OA 病理における役割解明が最終的な目的の一つなので、OA 軟骨病理組織における発現分布を免疫染色で解析した。*Smpd3* 遺伝子は neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)蛋白をコードしているため、抗 nSMase2 抗体を用いた。この際、マウス胎生 17.5 日長管骨成長板の免疫染色もコントロールとして施行し、内軟骨性骨化イベントと OA 病理との比較検討を行った。

In vitro では、ATDC5 以外の軟骨細胞分化系も比較対象としながら、BMP 以外の軟骨分化誘導系における *Smpd3* の経時的発現パターンを mRNA と nSMase2 蛋白レベルで解析した。

(2) *Smpd3* の軟骨細胞分化における役割検討と下流シグナル解析

Smpd3 の発現が高い軟骨細胞分化系に *Smpd3* siRNA を導入し、分化成熟過程がどの様に影響を受けるのか、軟骨細胞分化マーカーの mRNA レベルの解析により評価した。また比較的未分化な前駆細胞に *Smpd3* 発現ウイルスを感染させ、分化が抑えられるか検証した。

nSMase2 は細胞膜においてセラミドを合成し、これは lipid second messenger として細胞分化、増殖、アポトーシス等に関与するが、セラミドの軟骨細胞における役割は明らかではない。nSMase2-セラミド経路が線維芽細胞において Akt-mTOR-S6K 経路を抑制し、結果として HA 合成酵素 *Has2* の発現抑制、転じて HA 産生を低下させる事(Qin J., *et al.*, *J Biol Chem*, 2012)から、同じメカニズムが軟骨細胞分化過程においても働いている可能性を仮定した。そこで軟骨細胞分化過程における Akt-mTOR-S6K 経路の活性化を詳細にウエスタンブロットで検討し、これが *Smpd3* のノックダウンや過剰発現で影響を受けるか調べた。そして Akt-mTOR-S6K 経路の各種抑制剤を用いて、このシグナル経路が *Smpd3*/nSMase2 と逆の効果を、軟骨細胞分化と *Has2*・HA の発現に及ぼす可能性を検証し、分指標的候補として評価した。

(3) OA 治療を見据えた *in vivo* の *Smpd3* 機能解析

In vivo において *Smpd3*/nSMase2 が肥大軟骨細胞分化・OA 進展を抑制しうるのか検討した。まずマウス胎仔中足骨の *ex vivo* 器官培養系に *Smpd3* 発現ウイルスを感染させ、肥大軟骨分化が抑制されるか解析した。nSMase2 抑制剤が逆の作用を示す事も検証した。

3. 研究の方法

(1) OA 軟骨、内軟骨性骨化過程、培養軟骨細胞分化系における *Smpd3* の時間的・空間的発現プロファイリング

最も臨床に直結する重要な情報は臨床病理組織から得られる。最初に OA 臨床病理組織における *Smpd3*/nSMase2 発現を免疫組織染色で解析した。仮説からして正常静止軟骨細胞と病的肥大軟骨や骨棘では発現が低く、その中間段階の肥大変性しつつある軟骨細胞において強いシグナルがあると予想して丁寧に検証した。この際、マウス胎生 17.5 日長管骨 growth plate も同時に染色し、正常内軟骨性骨化過程の発現パターンと比較し、nSMase2 発現細胞の分化 status の判断材料にした。

同様に Has2 の免疫染色を行い、仮説通り nSMase2 と発現が逆相関するか比較・検討した。

ATDC5 細胞、C3H10T1/2 細胞、そしてマウス初代軟骨細胞のマウス軟骨細胞分化系と、ヒト正常軟骨細胞株 C28/I2 を、BMP-2 誘導系または TGF- β 1 + dexamethasone + ITS supplements による誘導系を用いて、それぞれ monolayer / micromass / pellet culture 系に分けて、経時的な *Smpd3* mRNA と nSMase2 蛋白の発現パターンを、それぞれ定量的 RT-PCR とウエスタンブロットでプロファイリングした。この時、Has2 発現も同時に解析し、やはり *Smpd3*/nSMase2 と逆相関するか評価した。

(2) *Smpd3* の発現ベクター、アデノウイルス・レンチウイルス作製

Smpd3 発現ベクターは、ATDC5 細胞の分化後期 cDNA より PCR 法でクローニングし、V5 タグを付して作製した。これを基にアデノウイルス及びレンチウイルス発現ベクターに導入し、ウイルスを 293A 及び 293FT 細胞で産生・精製した。これを ATDC5 細胞に感染させて、transgene 発現レベルを内因性 *Smpd3*/nSMase2 と比較して評価した。

In vitro での *Smpd3* の loss/gain of function 実験による軟骨細胞分化への影響評価

既に我々のグループ内外で実績のある ATDC5 細胞の siRNA 実験系 (siRNA は off-target 効果を防ぐデザインをされた異なる 4 種類のカクテル)において、*Smpd3* ノックダウンの軟骨細胞分化への影響を、分化マーカー (*Sox9*, *Sox5/6*, *Col2a1*, *Col11a2*, *aggrecan*, *Col10a1*, *Mmp13*) を分化段階毎に定量的 RT-PCR 解析して評価するした。また *Smpd3* の誘導に重要とされ、かつ肥大軟骨細胞分化とそのマーカー *Col10a1* の誘導に不可欠な *Runx2* の発現への影響も、確認しておく。順次 C3H10T1/2、C28/I2、マウス初代軟骨細胞でも同様に実験した。

Smpd3 アデノ/レンチ・ウイルスを用いて 3)-a) の系に感染させ、逆の効果、すなわち肥大軟骨細胞分化抑制が得られるか解析・評価した。

同時に Has2 発現を定量的 RT-PCR とウ

エスタンブロットで、HA 発現はビオチン化 HA 結合蛋白(HABP)を介して検討し、分化 status とリンクして *Smpd3* の影響を受けるか確認した。

(3) *Smpd3* の下流シグナル、セラミド-Akt 経路の活性検討と機能解析

主に ATDC5 細胞における、特に BMP-2 誘導(*Smpd3* が誘導される)軟骨細胞分化系において、Akt-mTOR-S6K 経路が線維芽細胞の報告同様に *Smpd3* の下流で抑制されるのか、それぞれのリン酸化抗体を用いたウエスタンブロットで活性を調べた。

各種機能抑制剤 [nSMase2:GW4869, Akt:MK2206, mTOR:Rapamycin] を用いて ATDC5 細胞の軟骨細胞分化を解析し、*Smpd3* の下流で Akt 経路が重要である事を検証した。

nSMase2-セラミド・シグナルを mimic する目的で細胞膜透過性 C2 ceramide を添加し、Akt 経路と Has2 発現、そして肥大軟骨分化が逆相関するか、ウエスタンブロットと定量的 RT-PCR で解析した。

Smpd3 ノックダウンにより Akt シグナル経路が活性化されるか、またこの時 Akt 経路の抑制剤を併用すると軟骨細胞分化の亢進がキャンセルされるか検証した。

Smpd3 ノックダウンによりセラミドが減少したところに C2 ceramide を加え、Akt 経路と軟骨細胞分化の亢進がキャンセルされか確認した。

Smpd3 発現ウイルスにより Akt シグナル経路活性が抑制されるか、ウエスタンブロットで確認した。

Akt シグナル経路は receptor tyrosine kinase (RTK) 群によって活性化され比較的シグナル特異性が低く、軟骨細胞分化を促進する insulin (ITS supplements にも含有)の受容体も RTK の 1 種であることから、*Smpd3* の下流として Akt 経路がどの程度特異的なのかを、市販の RTK signaling antibody array を用いて、*Smpd3* ノックダウンと過剰発現系で解析した。

Smpd3 機能を欠失した *fro/fro* マウスの軟骨ではアポトーシスの減少があり内軟骨性骨化が遅れるので、*Smpd3* が軟骨細胞のアポトーシスに促進的である事が示唆されるが、セラミドもアポトーシスを直接促進する事が知られているので、ノックダウンと GW4869 による *Smpd3*/nSMase2 の loss of function と、ウイルス発現系と C2 ceramide による gain of function で、*Smpd3*-セラミド経路の軟骨細胞アポトーシスへの関与を明らかにした。

(4) *In vivo* 軟骨細胞肥大化と OA 病態における *Smpd3* の機能解析

マウス胎仔中足骨の *ex vivo* 器官培養系における *Smpd3* 発現ウイルス感染・導入の影響を、骨格標本作製と RNA 解析による分化評価で解析する。nSMase2 抑制剤 GW4869 によ

る逆効果も確認した。ヒト OA 組織における nSMase2 発現を免疫組織化学染色で検討した。

4. 研究成果

Smpd3 発現は、ATDC5 軟骨細胞やマウス初代軟骨細胞を BMP-2 で分化誘導すると増加したが、これは軟骨成熟と共に増加する Runx2 の siRNA でキャンセルされた。Smpd3 ノックダウンや nSMase2 抑制剤 GW4869 は、この軟骨細胞分化を著明に促進し、この時同時に Akt と下流の S6 蛋白のリン酸化が増強した。nSMase2 機能を mimic する細胞透過性 C2-セラミドや Smpd3 過剰発現は、逆に軟骨細胞成熟と Akt-S6 のリン酸化を抑制した。マウス中足骨培養系に GW4869 を作用させると、BMP-2 で増加した肥大軟骨層と基質石灰化が著明に促進され、この効果は C2-セラミドでキャンセルされた。HA 合成酵素 Has2 と HA は軟骨細胞成熟に必須な事を軟骨細胞における Has2 ノックダウンで確認した。軟骨細胞を BMP-2 で分化誘導して免疫染色すると、Has2 発現と HA 産生は減少した。ここに Smpd3 siRNA を導入すると Has2-HA 発現が増加し、これは Akt 抑制剤 MK2206 で阻止された。セラミドは脱リン酸化酵素 PP2A を活性化するので、我々の知見と併せると、Smpd3 経路は PP2A を活性化させ、その既知の基質である Akt のリン酸化を減じ、結果として下流の軟骨細胞分化促進機構と、Has2 発現を抑制する事が示唆された。BMP シグナルは OA 形成に促進的である一方で、Smpd3-セラミド経路を活性化して異常な内軟骨性骨化過程を抑える事で、OA 変性に抑制的な negative feedback 機構を形成する事がわかった。すなわち、この経路の活性化は OA の予防や治療に、具体的にはセラミドなどの Smpd3-セラミド経路擬似薬は役立つであろうし、逆に GW4869 などの Smpd3 抑制剤誘導体は、積極的に内軟骨性骨化を期待する骨折治療や骨再生医療には促進補助剤として有効かもしれない。

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2件)

1. BMP signaling upregulates neutral sphingomyelinase 2 to suppress chondrocyte maturation via the Akt signaling pathway as a negative feedback mechanism.

Kakoi H, Maeda S, Shinohara N, Matsuyama K, Imamura K, Kawamura I, Nagano S, Setoguchi T, Yokouchi M, Ishidou Y, Komiya S.

J Biol Chem 289: 8135-8150, 2014

査読あり

2. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Enhancer Binding Protein 3 is Essential for the Expression of Asparagine-linked Glycosylation 2 in the Regulation of Osteoblast and Chondrocyte Differentiation. Imamura K, Maeda S, Kawamura I, Matsuyama K, Shinohara N, Yahiro Y, Nagano S, Setoguchi T, Yokouchi M, Ishidou Y, Komiya S. *J Biol Chem* 289: 9865-9879, 2014
査読あり

[学会発表](計9件)

1. 第29回日本整形外科学会基礎学術集会、【鹿児島県鹿児島市】、10月9日～10日、2014年(鹿児島大学医学部整形外科)
Runx2 依存的に軟骨細胞成熟時に誘導される nSMase2 は Akt 経路と Has2 発現の制御を介して軟骨細胞成熟を抑制する
鹿児島大学整形外科
○榎博則, 篠原直弘, 松山金寛, 今村勝行, 河村一郎, 横内雅博, 小宮節郎
医療関節材料開発講座
前田真吾, 石堂康弘
2. 第32回日本骨代謝学会、【大阪府大阪市】、7月24日～26日、2014年(島根大学医学部内科学第一)
BMPシグナルにより Runx2 依存的に誘導される nSMase2 はセラミドを介して Akt 経路と軟骨細胞成熟を抑制する
鹿児島大学整形外科
○榎博則, 篠原直弘, 松山金寛, 今村勝行, 河村一郎, 横内雅博, 小宮節郎
医療関節材料開発講座
前田真吾, 石堂康弘
3. 第36回日本分子生物学会年会【兵庫県神戸市】2013年12月3日～6日
BMP-2 シグナルは neutral sphingomyelinase 2 の誘導による Akt シグナル経路の抑制を介して軟骨細胞分化成熟を制御する
前田真吾¹, 榎博則², 松山金寛^{1,2}, 河村一郎², 今村勝行^{1,2}, 篠原直弘^{1,2}, 永野聡², 瀬戸口啓夫³, 横内雅博², 石堂康弘¹, 小宮節郎^{1,2}
¹鹿児島大学大学院医歯学総合研究科医療関節材料開発講座
²鹿児島大学大学院医歯学総合研究科整形外科
³鹿児島大学大学院近未来運動器医療創生学講座
4. The 3rd International Symposium by JSPS Core-to-Core Program “Cooperative International Framework in TGF-β Family Signaling” 【Matsuyama, Japan】 October 28-29, 2013
BMP-2-induced nSMase2 suppresses

- chondrocyte maturation
Shingo Maeda, Hironori Kakoi, Kanehiro Matsuyama, Ichiro Kawamura, Katsuyuki Imamura, Naohiro Shinohara, Satoshi Nagano, Takao Setoguchi, Masahiro Yokouchi, Yasuhiro Ishidou, and Setsuro Komiya
 Department of Medical Joint Materials, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University
5. 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会【千葉県千葉市】2013 年 10 月 17 日 ~ 18 日
 Smpd3/nSMase2 はセラミドを介した Akt シグナル経路阻害により ATDC5 軟骨細胞分化とヒアルロン酸合成酵素 Has2 の発現を抑制する
榎博則^{1,2}、前田真吾¹、松山兼寛^{1,2}、今村勝行^{1,2}、河村一郎²、篠原直弘^{1,2}、横内雅博²、石堂康弘¹、小宮節郎^{1,2}
¹ 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科医療関節材料開発講座
² 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科整形外科学
6. The American Society for Bone and Mineral Research 2013【Baltimore, USA】October 4-7, 2013
 Neutral Sphingomyelinase 2 Is Increased During BMP-induced Differentiation of ATDC5 Chondrocytes to Suppress the Maturation as a Negative Feedback Mechanism
Shingo Maeda¹, Hironori Kakoi², Kanehiro Matsuyama^{1,2}, Katsuyuki Imamura^{1,2}, Ichiro Kawamura², Naohiro Shinohara^{1,2}, Masahiro Yokouchi², Yasuhiro Ishidou¹, Setsuro Komiya^{1,2}.
¹Department of Medical Joint Materials, and ²Department of Orthopaedic Surgery, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, Kagoshima, Japan
7. TGF-β meeting in Uppsala【Uppsala, Sweden】May 30- June 2, 2013
 BMP signaling induces sphingomyelin phosphodiesterase 3 to suppress chondrocyte maturation and expression of hyaluronan synthase 2 in ATDC5 chondrocytes
Shingo Maeda¹, Hironori Kakoi^{1,2}, Kanehiro Matsuyama^{1,2}, Ichiro Kawamura^{1,2}, Katsuyuki Imamura^{1,2}, Naohiro Shinohara^{1,2}, Masahiro Yokouchi², Yasuhiro Ishidou¹, and Setsuro Komiya^{1,2}
¹Department of Medical Joint Materials, and ²Department of Orthopaedic Surgery, Kagoshima University, Kagoshima, Japan.
8. 国際骨代謝学会・日本骨代謝学会 第 2 回合同国際会議【兵庫県神戸市】2013 年 5 月 28 日 ~ 6 月 1 日
 Smpd3/nSMase2 suppresses Akt signaling

- pathway to inhibit chondrogenic differentiation and expression of Has2 in ATDC5 cells
Hironori Kakoi^{1,2}, Shingo Maeda¹, Ichiro Kawamura², Katsuyuki Imamura^{1,2}, Naohiro Shinohara^{1,2}, Masahiro Yokouchi², Yasuhiro Ishidou¹, Setsuro Komiya^{1,2}
¹Department of Medical Joint Materials, ²Department of Orthopaedic Surgery, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University
9. ESCEO13-IOF Rome 2013【Rome, Italy】April 17-20, 2013
 Smpd3 prevents maturation and expression of hyaluronan synthase 2 in ATDC5 chondrocytes
Hironori Kakoi^{1,2}, Maeda S¹, Imamura K^{1,2}, Kawamura I^{1,2}, Ishidou Y¹, Yokouchi M² and Komiya S^{1,2}
¹Department of Medical Joint Materials, Kagoshima University, Kagoshima, JAPAN and ²Department of Orthopaedic Surgery, Kagoshima University, Kagoshima, JAPAN.

〔その他〕
 ホームページ等
<http://www.orthop-kagoshima-u.com/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

榎 博則

(Kakoi Hironori)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：50423728

(2)研究分担者

前田 真吾

(Maeda Shingo)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・特任

准教授

研究者番号：60353463

小宮 節郎

(Komiya Setsuro)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：30178371

石堂 康弘

(Ishidou Yasuhiro)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・特任

准教授

研究者番号：10300740

(3)連携研究者

なし

