

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 15 日現在

機関番号：32403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861338

研究課題名(和文)軟骨細胞外環境の再構築を誘導するコラーゲン分解物の探索

研究課題名(英文)The effect of collagen degradation products on cartilage metabolism.

研究代表者

中谷 祥恵 (Sachie, Nakatani)

城西大学・薬学部・助手

研究者番号：20453425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では関節軟骨の外傷および疾患時に生成されるコラーゲン分解物が、関節軟骨の破壊を知らせる伝達物質としてなんこつ細胞に認識され、遺伝子発現を介して細胞外環境を再構築する可能性を検討した。

申請者はコラーゲン分解物の1つであるプロリル-ヒドロキシプロリン(P0)が軟骨細胞の遺伝子発現を介してアグリカン産生を増加させる生理活性ペプチドであることを見出した。P0の標的遺伝子を探索した結果、変形性関節症時に発現が増加することが報告されているPKCzetaのmRNA発現をP0が抑制する可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Aging is one of risk factors for the articular cartilage disorder known as osteoarthritis. It is generally accepted that collagen hydrolysate (CH) supplements ameliorate aging-induced osteoarthritis. The purpose of this study was to explore gene markers for an effective solution to treat osteoarthritis by using transcriptome analysis of chondrocyte cell lines supplemented with CH.

Gene ontology analysis indicated a new candidate gene, protein kinase C zeta (PKC zeta), for the differentiation of chondrocytes. The mRNA levels of PKC zeta in the transcriptome analysis were suppressed by CH. Our findings suggest that PKC zeta may be a candidate age-promoting factor in articular cartilage and that CH could suppress PKC zeta expression to prevent aging of articular cartilage.

研究分野：軟骨代謝学

キーワード：コラーゲン コラーゲン加水分解物 プロリル-ヒドロキシプロリン 軟骨 軟骨細胞

1. 研究開始当初の背景

関節軟骨は弾力性を持つ結合組織で、軟骨細胞と細胞自身が産生した細胞外基質 (ECM) で構成されている。軟骨の主要な ECM は Ⅱ型コラーゲン、ヒアルロン酸、アグリカンで、これらの複合的な働きによって関節の特徴である弾力性が維持されている。

Ⅱ型コラーゲンは三重らせん構造を持つため酵素が作用し難く、関節軟骨のコラーゲン半減期は約 100 年と報告されている (Verzili et al., J Biol Chem., 275 (2000))。しかし、外傷やメカニカルストレスなどの物理的な破壊でコラーゲンの三重らせん構造が崩れると、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) などの分解酵素が作用し、コラーゲンはペプチドもしくはアミノ酸に代謝される。

申請者はコラーゲン分解物のプロリルヒドロキシプロリン (PO) が、アグリカンの産生を促進し、軟骨細胞の石灰化を抑制することで関節機能を維持させることを見出した (S. Nakatani et al., Osteoarthritis and Cartilage, 17 (2009))。この実験において、軟骨細胞にもペプチドトランスポーター 1 (PEPT1) が発現していることを確認した。また、アミノ酸やプロリルヒドロキシプロリングリシンのトリペプチドは軟骨細胞に影響を与えなかった。以上のことから、コラーゲン加水分解物には生理活性を持つペプチドが含まれ、軟骨細胞の遺伝子発現を介して軟骨分化および ECM 産生を調節することが明らかになった。

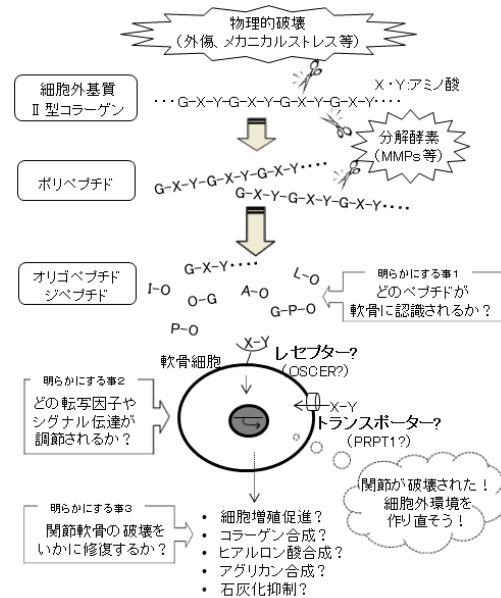
最近の研究で、軟骨細胞は細胞外の環境を感知し、細胞分化や ECM 産生を調節することがすでに報告されている。申請者も細胞外に Ca が存在すると軟骨細胞にカルシウムセンシングレセプターが発現し、成熟軟骨細胞から石灰化軟骨への分化が促進されることを明らかにしている (Nakatani S. et al, Biochem Biophys Res Commun., 348, (2006))。また、遊離のコンドロイチン硫酸が細胞外に存在すると、軟骨細胞の MMP の mRNA を抑制することが報告されている (K. Imada et al., Biol. Pharm. Bull., 33 (2010))。これらの報告から、軟骨細胞は細胞外環境に応じて分化や ECM 産生を調節し、機能を調節していると考えられた。そこで申請者は、疾病や外傷などの結果、コラーゲンが MMP の作用を受けて分解され、細胞外に O 含有ペプチドが生成されると、軟骨細胞が細胞外環境が破壊されていると認識し、関節軟骨に最適な細胞環境を再構築するためのフィードバックをすると仮説した。

2. 研究の目的

本研究では関節軟骨の外傷および疾患時に生成されるコラーゲン分解物が、関節破壊を知らせる伝達物質として軟骨細胞に認識され、遺伝子発現を介して細胞外環境を再構

築する可能性を検討した。

申請者はコラーゲン分解物の一つであるプロリルヒドロキシプロリン (PO) が軟骨細胞の遺伝子発現を介してアグリカン産生を増加させる生理活性ペプチドであることを見出した。しかし、PO の標的転写因子など詳細な作用メカニズムは不明である。また、コラーゲン分解物には複数のヒドロキシプロリン含有ペプチドが報告されていることから、PO 以外にも生理活性ペプチドが存在することが予想される。本研究は、軟骨の細胞増殖や細胞外基質産生を誘導する生理活性ペプチドを特定し、その標的遺伝子を明らかにすることを目的とした。



3. 研究の方法

マウス由来前駆軟骨細胞株 ATDC5 を 5% Fetal Bovine Serum, 100 μl/ml Penicillin, 50 μl/ml Streptomycin, 50 μl/ml Kanamycin を含む D-MEM/F-12 培地を用いて 37 °C、5%CO2 条件下で培養した。ATDC5 を 5.0 × 10⁵ cell/cm² ずつ播種し、24 時間培養後サンプル添加培地へ培地交換した。通常培地をノーマル (N) とし、PO および OG はそれぞれ 0.1 mM、コラーゲン加水分解物のコラペブ JB (CH) は 0.1 mg/ml になるよう通常培地で調整した。

培養開始 2 日後、5 日後、9 日後にサンプル (N, 0.1 mM PO, 0.1 mM OG, 0.1 mg/ml CH) を添加し 3 時間後に RNA 抽出を行った。培地は 2 日ごとに培地交換を行い培養 5 日目に I.T.S. (5 μg/ml Insulin, 5 μg/ml Transferrin, 5 ng/ml Sodium selenite) を添加し、石灰化を誘導させた。2 日後を増殖期、5 日後を成熟期、9 日後を肥大化期と定義し、抽出した total RNA を DNA マイクロアレイ実験に用いて、mRNA 発現レベルを比較した。解析は解析支援ソフトである Subio および KeyMolnet Lite と公共のデータベースで

ある KEGG、Gene Ontology を用いた。

4. 研究成果

DNA マイクロアレイ実験を行った結果、Nと比較してペプチド添加によって発現が 1/2 倍以下に減少する遺伝子が 2 倍以上に増加する遺伝子よりも多かった。特に増殖期での mRNA 発現レベルの減少が顕著に見られた。

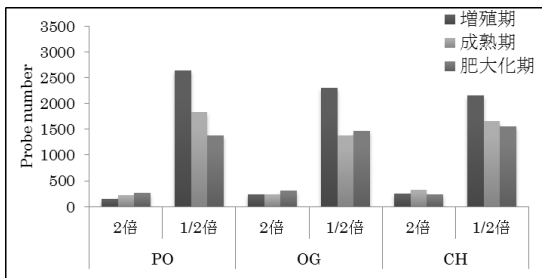


図. 発現が 2 倍以上もしくは 1/2 以下に変動したプローブ数

関節軟骨に存在する軟骨細胞の多くは肥大化軟骨細胞まで分化せず、成熟軟骨細胞で分化が停止しているため、申請者は増殖期から石灰化期にかけて mRNA 発現レベルが増加する遺伝子群をスクリーニングした。また、これら軟骨の石灰化過程で増加する遺伝子を CH、PO、OG で抑制する遺伝子群をスクリーニングし、GO 解析を用いてターゲット遺伝子を検索した。

その結果、protein kinase C signaling cascade に分類される protein kinase C zeta (PKC zeta) の mRNA 発現レベルは軟骨の分化が促進するに従って増加し、CH および PO 存在下ではその増加が抑制されることを見出した。さらに KeyMolnet 解析を行い、PKC zeta の下流遺伝子を検索した結果、細胞外基質分解酵素である ADAM4 および ADAMTS17 の mRNA 発現レベルも CH および PO で抑制できることを明らかにした。

以上の結果、CH および PO は、変形性関節症時に発現が増加することが報告されている PKCzeta の mRNA 発現を PO が抑制する可能性を見出した。

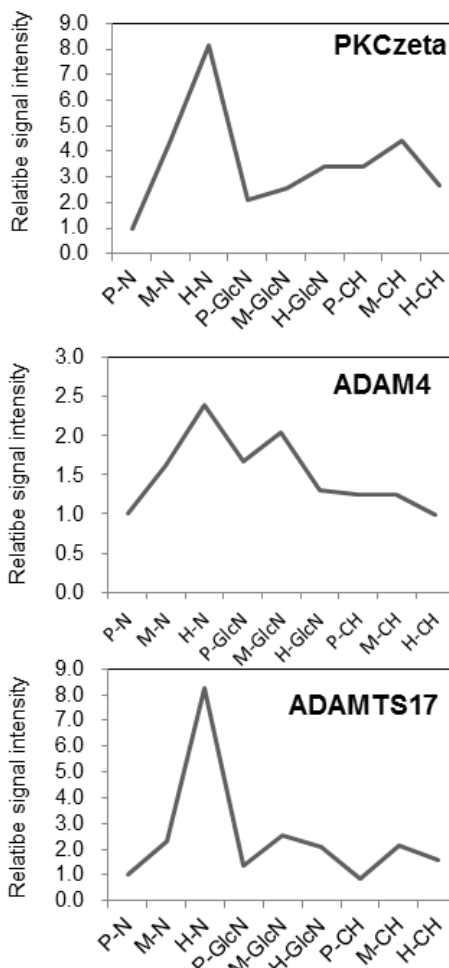


図. PKC zeta, ADAM4 and ADAMTS17 の mRNA 発現パターン. P-N=1 の相対値を示した.

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1件)

- Sachie Nakatani, Kenji Kobata, Hiroto Nakajima, Yoshifumi Kimira, Hiroshi Mano, Fumihito Sugihara, Masahiro Wada. Transcriptome of ATDC5 cultured with glucosamine hydrochloride and collagen hydrolysate indicates a new candidate gene for the differentiation of chondrocytes. 査読あり, Journal of Chitin and Chitosan Science, 2 (3), 233-237, 2014.

[学会発表](計2件)

- S. Nakatani, K. Kobata, H. Nakajima, Y. Kimira, H. Mano, F. Sugihara, M. Wada, Identification of the cartilage maintenance gene induced by supplementation of glucosamine or collagen hydrolysate.

10th Asia Pacific Chitin & Chitosan Symposium、 Oct. 4 ~ 8th (2013)、
Yonago Tottori pref.

- Yuto ENDO, Sachie NAKATANI, Hiroto NAKAJIMA, Yoshifumi KIMIRA, Hiroshi MANO, Fumihito SUGIHARA, Kenji KOBATA, Masahiro WADA, Effects of hydroxyproline containing dipeptides on pre-chondrogenic cells, The 3rd International Conference on Nutraceutical and Cosmetic Sciences, Nov. 11-12 (2014), Tokyo.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中谷 祥恵 (Sachie, Nakatani)

城西大学・薬学部・助手

研究者番号：20453425

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：