

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893104

研究課題名(和文) 運動負荷による細胞外ATPを介した変形性関節症発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of osteoarthritis by mechanical stimulation via extracellular ATP

研究代表者

小川 寛恭 (Ogawa, Hiroyasu)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：70464104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：変形性関節症(OA)で軟骨変性を引き起こすシグナル経路は明らかにされていない。今回、我々は外科的OAモデルマウスまたはFluid Flow Shear Stress (FFSS)が軟骨細胞で細胞外ATP受容体P2X7を介したシグナルが活性酸素(ROS)を産生することを明らかにした。OAモデルマウスでは関節軟骨でP2X7シグナルを活性化してNADPH依存性にROSが産生される。ROSはERKとp38MAPKを活性化することでMMP13の発現を促進し軟骨変性を引き起こす。本研究は、細胞外ATP/P2X7シグナルがROS産生依存的にMMP13の発現を促進することがOAの原因であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The signaling pathways which promote the degradation of articular cartilage in osteoarthritis have not yet been elucidated. In this work, we demonstrate that surgically induced joint destabilization or administration of Fluid Flow Shear Stress (FFSS) induces the generation of Reactive Oxygen Species (ROS) in articular chondrocytes via signaling by the extracellular ATP receptor, P2X7. We have found that joint destabilization surgery activates P2X7 signaling in articular cartilage and consequently induces both NADPH oxidase (NOX) complex-dependent elevation of ROS, which promote the activation of both ERK and p38 MAPK. The consequent phosphorylation of Jun by these kinases activates the expression of the metalloproteinase, MMP13, which in turn promotes cartilage degradation. Our findings highlight the importance of extracellular ATP/P2X7 signaling in the induction of ROS-dependent MMP13 expression in the murine surgical model for osteoarthritis.

研究分野：整形外科

キーワード：軟骨代謝 変形性関節症 メカニカルストレス 細胞外ATP MMP13 P2X7 関節軟骨 軟骨細胞

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は原因が肥満・外傷・老化・遺伝等と多岐にわたる疾患であるがその発症メカニズムや病態は未だ多くの部分が明らかにされていない。同疾患の終末像は一貫して関節破壊による運動器機能不全であり、一度発症すると現代の医学を持ってしてもその病態を制御する事はできない。本邦は歴史的に例を見ない超高齢化社会に突入し運動器に対する重要性が増す中、高齢化に伴い増加し続ける変形性関節症患者は健康的側面からはもちろん経済的側面から観ても深刻な社会問題であり、新たな治療法の開発に対する社会的要請は極めて高い。その為にもまず変形性関節症の発症メカニズム・病態を明らかにすることが必要不可欠であると考えられる。本研究では、本疾患の原因の中でも、頻度・科学的インパクトから特に重要と考えられる外傷（過剰な運動負荷）による変形性関節症の発症メカニズムに焦点を当てる。関節外傷（関節軟骨に対する過剰な運動負荷）はどのように変形性関節症を発症するのか？マウスの内側半月板と頸骨顆部軟骨表面を連結する靭帯（meniscotibial ligament）を切離すると半月板さらに関節自体が不安定化し変形性関節症の病態で中心的な役割を果たすマトリックスメタロプロテアーゼ13（MMP13）の発現が上昇し、変形性関節症を発症する。このように、関節の不安定性による異常（過剰）な運動負荷は軟骨変性を引き起こす。この軟骨変性に関わる重要な因子の一つとして先に述べたMMP13が挙げられる。MMP13は軟骨の主成分である2型コラーゲンを特異的に分解するが、軟骨特異的にMMP13をノックアウトしたマウスは関節不安定性変形性関節症に抵抗性を示し、MMP13阻害剤も同様に同変形性関節症の発症を抑

制する。反対に、関節軟骨特異的にMMP13を過剰発現させたマウスは変形性関節症を発症する。このような数多くの研究から、MMP13が変形性関節症の治療の有力なターゲットである事については既に科学的コンセンサスが得られている。

2. 研究の目的

関節軟骨に対する運動負荷に関する過去の研究では、正常な関節運動では運動負荷のかかる軟骨部位でルブリシン/Prg4が最も多く発現する事や、関節軟骨表面への様々な運動刺激（動的摩擦刺激、圧迫刺激、動的圧迫刺激、Fluid Flow Stress）は全てルブリシン/Prg4を発現する事等が報告されている。ごく最近、申請者はPrg4ノックインマウス（Prg4+/CreERT2）を使用して、マウスの自発走行は関節軟骨表層細胞におけるルブリシンの発現を促進する事を明らかにし、更に、Fluid Flow Shear Stress（FFSS）は軟骨細胞からPannexin1またはConnexin43 hemichannelを通してATPとPGE2の細胞外分放出を引き起こし、さらにこれらの細胞外ATP及びPGE2がPrg4の発現を促進することを報告した。関節軟骨細胞は関節表面からの距離によって表層~中間~深層軟骨細胞に分類されそれぞれの性質も異なるが、興味深い事に本研究計画の予備実験で、FFSSまたは細胞外ATPは（ウシ）表層軟骨細胞でPrg4等の軟骨保護因子を発現するだけでなく、（ウシ）中間層軟骨細胞またはマウス骨端軟骨細胞ではMMP13等の軟骨破壊因子の発現も促進した（PGE2はMMP13の発現を抑制した）（図1）。これらの予備実験の結果から、関節軟骨に対する異常な運動負荷は軟骨細胞に対するFFSSを増加することで細胞外ATPの放出を促進し、細胞外ATPは中間~深層軟骨細胞でMMP13の発現を上昇させ、最終的に変形性関節

症を発症すると推測される。従って、本研究の目的は、まず第一に、外傷性変形性関節症マウスモデルまたは軟骨細胞に FFSS を与えた状態において、細胞外 ATP がどのようなシグナル経路を介して MMP13 の発現を上昇させるのか、更にマウス実験ではこの ATP シグナルが変形性関節症の発症に必須かどうかを明らかにする事である。次いで、その ATP シグナルを制御する薬剤を用いて新たな変形性関節症の治療薬を同定する事である。

図 1

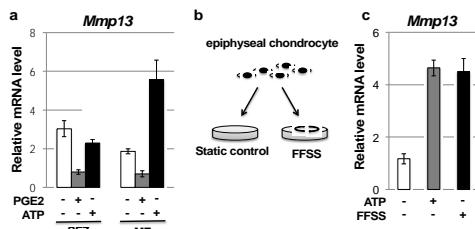


図 1
a) PGE2 及び ATP のウシ軟骨細胞における Mmp13 mRNA 発現量の変化。SFZ, Superficial zone chondrocyte; MZ, middle zone chondrocyte.
b) 軟骨細胞を水平回転式シェーカー上で培養し Fluid Flow Shear Stress (FFSS) を与えた。
c) ATP 及び FFSS のマウス軟骨細胞における Mmp13 mRNA 発現量の変化

3. 研究の方法

予備実験で FFSS 及び細胞外 ATP が軟骨細胞で P2X7-ATP 受容体 / Ca^{2+} シグナル経路を介して MMP13 の発現を促進する事を確認したが、FFSS/細胞外 ATP による細胞内 Ca^{2+} の上昇がどのようなシグナル経路を介して MMP13 の発現を促進するかを明らかにする。

P2X7 受容体が関節軟骨での MMP13 の発現及び変形性関節症に関わっているかどうかを明らかにする。

P2X7 受容体アンタゴニスト及び P2X7 受容体シグナル経路阻害剤を用いた変形性関節症の治療モデルの開発。

4. 研究成果

FFSS は軟骨細胞から細胞外 ATP を分泌させ細胞外 ATP 受容体 P2X7 を介して活性酸素産生と EGFR シグナルを活性化し、ERK と p38 MAPK のリン酸化、更にこれらよりリン酸化された Jun が MMP13 の発現を促

進した。野生型マウスとは対照的に、P2X7 ノックアウトマウスは軟骨変性に抵抗性を示した。また、細胞実験で示唆されたメカニカルストレスによる MMP13 の発現促進及びその関連分子 (細胞外 ATP、TGF- β 、活性酸素、MAPK 等) に関しても、マウス関節軟骨において同様の変化が確認された。メカニカルストレスは細胞外 ATP-P2X7 受容体-活性酸素シグナル経路を介して MMP13 の発現制御、さらに軟骨変性に関与していることが示された。変形性関節症患者では活性酸素が増加していることが報告されており今回の結果を支持するものである。本研究で明らかとなった MMP13 発現シグナル経路に関する分子は変形性関節症の治療標的の候補になりうる。

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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

第 33 回日本骨代謝学会学術集会 一般演題: 小川寛恭 メカニカルストレスは P2X7 受容体-活性酸素経路を介して MMP13 を発現し軟骨変性を引き起こす (2015 年 7 月 23-25 日、京王プラザホテル(東京都新宿区))

第 33 回日本骨代謝学会学術集会 招待講演: 小川寛恭 運動刺激による細胞外 ATP 及び PGE2 を介した軟骨代謝制御メカニズム (2015 年 7 月 23-25 日、京王プラザホテル(東京都新宿区))

第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会 一般演題: 小川寛恭 メカニカルストレスは P2X7 受容体-活性酸素経路を介して MMP13 を発現し軟骨変性を引き起こす (2015 年 10 月 22 日、富山国際会議場(富山県富山市))

〔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：

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

小川 寛恭 (OGAWA, Hiroyasu)

岐阜大学大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：70464104

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：