

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 11 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462388

研究課題名(和文) ストレス応答分子としてのRhoファミリータンパク質の機能と関節変性反応への関与

研究課題名(英文) Function of stress effector molecules in the catabolic reactions of chondrocytes and roles in OA progression/repression.

研究代表者

福田 寛二 (FUKUDA, Kanji)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：50201744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：非侵襲的な変形性膝関節症(OA)の治療においては、破壊責任分子経路の同定とこれに介入する方法を確立する必要がある。本研究では細胞内にストレスを伝達し軟骨に組織破壊的变化をもたらす分子としてRho/ROCK経路とそれを取り巻く分子経路に着目した。活性酸素によるストレスはRho/ROCK、TAK1の活性化を誘導し、軟骨基質の発現抑制と滑膜炎変化を誘導した。一方でRac、Nrf2の活性化は軟骨基質の発現、抗ストレス分子の発現を誘導した。これらの分子はいずれもストレス応答経路として重要であり、薬理的介入は新規のOA治療戦略として有望である。

研究成果の概要(英文)：Despite advances in diagnosis, surgery and epidemiological understandings, any effective treatment to prevent or/and cure from osteoarthritis (OA) have not been discovered. Here we searched the effector molecules potentially playing a central role in the stress transduction that can activate OA changes, and found that small-GTPase Rho and Rac had an opposite effect in the cartilage matrix maintenance. We also found that the activity of TGF $\beta$ -activated kinase 1(TAK1) could be regulated by Rho/ROCK, and the TAK1 activity induced expression of a tissue degeneration factor Cox-2 in the synovial fibroblast cells. Finally, we examined a defensive role of anti-stress molecule Nrf2 against the stress-mediated OA change and demonstrated that Nrf2 was important to maintain chondrocyte matrix. Our findings provide the basis for new biologic and pharmacological approaches to the prevention and treatment of OA.

研究分野：整形外科

キーワード：変形性関節症 活性酸素 Rhoキナーゼ TAK1

## 1. 研究開始当初の背景

高齢社会の到来に伴い変形性関節症 (Osteoarthritis, OA) の有病率が増加しており、その治療は大きな社会的課題となっている。軟骨変性により生じた荒廃関節に対し、関節形成術が行われ一定の臨床成績が得られているが、患者負担軽減のためには軟骨変性を予防、もしくは改善させる薬理的アプローチが今後目指すべき方向性であると考えられる。これまでに蛋白分解阻害剤 (TIMP) をはじめ、多くの疾患修飾薬剤が報告されたが、臨床応用に至った薬剤は存在しない。本来 OA は機械的ストレスを要因として発症する疾患である。申請者はこれまでに、機械的ストレスが軟骨細胞および軟骨組織に与える影響について検討してきた。軟骨細胞に対する機械的ストレスは、活性酸素種 (Reactive oxygen species, ROS) や一酸化窒素 (Nitric oxide, NO) を誘導することを報告した。現在までに、これらを細胞内に伝達する分子として Rho GTPase が重要な役割を担っている可能性を見いだしたが、詳細な分子経路は不明である。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、低分子量 GTPase を中心に軟骨細胞内ストレス伝達機構を改めて検討することにより、新規薬剤の開発につながる知見を得ることを目的とした。

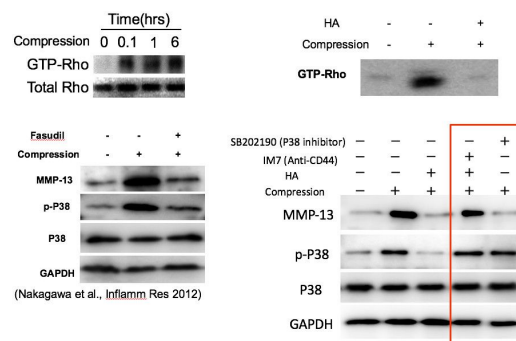
## 3. 研究の方法

ウシの関節軟骨を前足部 MP 関節より無菌的に採取した。ウシ培養軟骨に対し、LPA、過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、ROCK 阻害剤、TAK1 阻害剤、ヒアルロン酸 (HA) を添加し、GTP-Rho ならびに軟骨マトリクス産生、軟骨変性関わ

る遺伝子の発現を観察した。MAPK の活性化は、それぞれの抗体を用いウェスタンブロット (WB) で確認した。抗ストレス遺伝子 Nrf2 ならびに抗ストレス分子として使用したヒアルロン酸の作用を確認するため Nrf2、HA 受容体 CD44、HA 受容体 CD54 に対する siRNA を使用した。また、OA モデルとして内側半月板切除 (DMM) マウスを作成し、免疫染色を実施した。

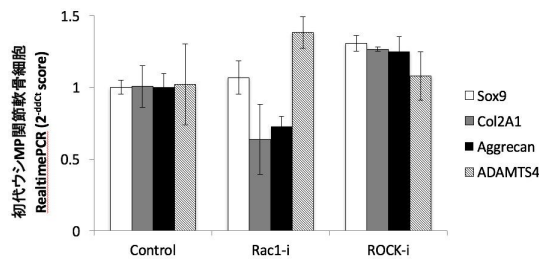
## 4. 研究成果

圧迫負荷により軟骨の Rho キナーゼは活性化された。LPA による Rho の活性化は単独で軟骨マトリクス関連遺伝子の抑制、プロテアーゼの発現を上昇させた。ROCK 阻害剤である Fasudil の添加は圧迫負荷による MAPK の活性化を抑制しただけでなく、マトリクス関連遺伝子 Sox9、Col2A1 発現の上昇、プロテアーゼ ADAMTS-4、MMP-13 の発現抑制を誘導した。



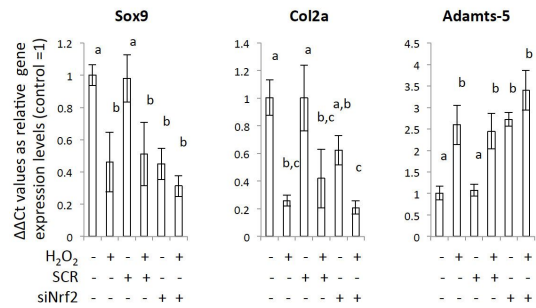
また、HA の添加は Rho のリン酸化を阻害した。このことから、メカニカルストレスは Rho の活性化を介して軟骨に負に作用することが明らかとなった。次に、低分子 GTPase Rac の作用を検討した。細胞の動態やキナーゼの活性化において Rho と Rac は相反する作用をもつことが報告されている。軟骨細胞における Rac の抑制は、Sox9、Col2A1 の発現低下と

ADAMTS-4 の発現上昇を誘導した。以上から、軟骨細胞のストレス応答ならびに組織破壊には Rho、Rac の関係性が重要であることが示唆された。



以上から、軟骨における Rho/ROCK の阻害は軟骨に保護的に作用すると考えられた。しかし一方で、Rho/ROCK が軟骨マトリクス発現のマスター転写因子である Sox9 と直接相互作用すること、ROCK は全身の恒常性維持や胎児発生に重要な分子であり ROCK2 のノックアウトマウスが血栓形成、胎盤機能不全、胎児発育遅延などの形質を示すなどの報告がある。そこで本研究では関節内細胞のストレス応答に広く視野を広げ、さらなる介入対象分子を検討した。

まず、過度の圧迫負荷が ROS や NOS の発生をもたらすという知見に着目し、Rho/ROCK ならびに ROS で活性化されるエフェクター分子として MAP3K である TAK1 に着目した。今回の検討では、TAK1 の制御により軟骨細胞の機能回復を誘導することはできなかったが、関節炎症において中心的な役割を果たす滑膜細胞において有用性が示された。滑膜細胞における活性酸素の発生は TAK1 のリン酸化を誘導し、JNK、NF- $\kappa$ B、p38 といったストレス伝達に関わる MAPK の活性化を介して Cox-2 の発現を誘導した。TAK1 の阻害は Cox-2 の発現を阻害した。これより、滑膜細胞においては TAK1 が炎症と組織破壊につながる制御分子として機能している可能性が示唆された (Onodera et al., 2015a)。



また、軟骨細胞においては抗ストレス分子である Nrf2 の機能に着目した。Nrf2 の安定化は Sox9、Col2 の発現を誘導し、MMP-13 の発現を阻害した。一方、Nrf2 のノックダウンは軟骨にカタボリックな変化をもたらした (Onodera et al., 2015b)。

本研究では 1) 軟骨における Rho/ROCK の活性化は基本的にはカタボリックな反応を誘起し、ROCK 阻害剤である Fasudil の使用は有効であること、2) TAK1 は Rho/ROCK と並行して、あるいは下流で活性化される分子であり、同様に MAPK を介して滑膜細胞での炎症性変化を誘導すること、3) 抗ストレス分子 Nrf2 の活性は軟骨のアナボリックな機能に重要であり、HA の使用で安定化させられることを明らかにした。上記の分子はいずれも OA 治療の対象分子として重要であると考えられ、今後安全性試験を含めた詳細な検討が必要であると考えられる。

## 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 7 件)

1. Kanao K, Shiraishi M, Higashimoto Y, Maeda K, Sugiya R, Okajima S, Chiba Y, Yamagata T, Terada K, Fukuda K, Tohda Y. Factors associated with the effect of pulmonary rehabilitation on physical activity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Geriatr Gerontol Int.* 2015 Dec 4. doi:10.1111/ggi.12656. 査読：有

2. Higashimoto Y, Honda N, Yamagata T, Sano A, Nishiyama O, Sano H, Iwanaga T, Kume H, Chiba Y, Fukuda K, Tohda Y. Exertional dyspnoea and cortical oxygenation in patients with COPD. *Eur Respir J*. 2015 Dec;46(6):1615-24. doi:10.1183/13993003.00541-2015. 査読：有
3. Takehara T, Teramura T, Onodera Y, Frampton J, Fukuda K. Cdh2 stabilizes FGFR1 and contributes to primed-state pluripotency in mouse epiblast stem cells. *Sci Rep*. 2015 Sep 30;5:14722. doi: 10.1038/srep14722. 査読：有
4. Higashimoto Y, Yamagata T, Maeda K, Honda N, Sano A, Nishiyama O, Sano H, Iwanaga T, Chiba Y, Fukuda K, Tohda Y. Influence of comorbidities on the efficacy of pulmonary rehabilitation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Geriatr Gerontol Int*. 2015 Aug 5. doi: 10.1111/ggi.12575. 査読：有
5. Onodera Y, Teramura T, Takehara T, Shigi K, Fukuda K. Reactive oxygen species induce Cox-2 expression via TAK1 activation in synovial fibroblast cells. *FEBS Open Bio*. 2015 Jun 6;5:492-501. doi: 10.1016/j.fob.2015.06.001. 査読：有
6. Onodera Y, Teramura T, Takehara T, Fukuda K. Hyaluronic acid regulates a key redox control factor Nrf2 via phosphorylation of Akt in bovine articular chondrocytes. *FEBS Open Bio*. 2015 May 29;5:476-84. doi:10.1016/j.fob.2015.05.007. 査読：有
7. Maeda K, Higashimoto Y, Honda N, Shiraishi M, Hirohata T, Minami K, Iwasaki T, Chiba Y, Yamagata T, Terada K, Matsuo Y, Shuntoh H, Tohda Y, Fukuda K. Effect of a postoperative outpatient pulmonary rehabilitation program on physical activity in patients who underwent pulmonary resection for lung cancer. *Geriatr Gerontol Int*. 2015 May 8. doi: 10.1111/ggi.12505. 査読：有

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

福田 寛二 (FUKUDA Kanji)  
近畿大学・医学部・教授  
研究者番号：50201744

### (2)研究分担者

寺村 岳士 (TERAMURA Takeshi)  
近畿大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：40460901