

Title	関節破壊誘導因子の探索とその機能解析
Author(s)	森山, 輝一
Citation	平成28年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書. 2017
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/60312
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

平成28年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書

ふりがな 氏名	もりやま きいち 森山 輝一	学部 学科	歯学部 歯学科	学年	4年
ふりがな 共同 研究者名	井上 愛弓	学部 学科	歯	学年	4年
	西中 瑛美		歯		4年
	山田 雅治		歯		4年
	和田 真実		歯		4年
アドバイザー教員 氏名	村上智彦	所属	歯学研究科生化学教室		
研究課題名	関節破壊誘導因子の探索とその機能解析				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。				

【研究目的】

近年、超高齢社会を迎え、変形性関節症や関節リウマチといった関節疾患の患者数が急増している。これらの疾患では関節軟骨組織が破壊されるが、関節軟骨の再生能力は非常に乏しいため、関節軟骨の組織破壊は歩行障害などの運動機能不全に直結する。その結果、患者の quality of life (QOL)は著しく障害される。関節軟骨組織の破壊に関与する分子として、Matrix Metalloproteinase (MMP)ファミリーなどの細胞外プロテアーゼが知られている。細胞外プロテアーゼは、炎症性サイトカインなどによって発現誘導されることが報告されているが、関節軟骨におけるその発現制御機構は未だ不明の部分が多い。関節軟骨の破壊に関わる分子メカニズムが解明されれば、関節疾患に対する新規治療法の開発につながる可能性がある。そこで本研究では、関節軟骨の破壊に関わる細胞外プロテアーゼの発現誘導に関与する因子の探索とその機能解析を行うことを目指した。

【研究計画】

変形性関節症や関節リウマチの患部では炎症進行に伴って、その病態が増悪する。炎症を起こしている関節部位ではマクロファージなどの免疫担当細胞が炎症性サイトカインなどを産生し、病態の形成に関与している。Tumor Necrosis Factor (TNF)や Interleukin (IL)-1などの炎症性サイトカインは細胞外プロテアーゼなどの発現を誘導することが知られているが、関節軟骨自身に対する解析はあまりなされていない。細胞外プロテアーゼの中でも特に MMP13 が関節軟骨疾患の発症に深く関連すると報告されており、その発現制御機構が注目されている。そこで、本研究では関節組織における炎症状態を模倣するために、マクロファージの主要な炎症起因为物質である Lipopolysaccharide (LPS)をマクロファージに作用させ、マクロファージから産生されるタンパク質群（細胞上清）に注目した。この細胞上清中に関節軟骨において MMP13 の発現を誘導する液性因子が含まれている可能性が高いと考え、この細胞上清を用いて、関節軟骨において MMP13 の発現を誘導する液性因子の探索と機能解析を行った。

【研究方法】

マクロファージと関節軟骨細胞の分離培養法

生体内におけるマクロファージの特徴を保持するとされる骨髄細胞由来マクロファージの初代培養 (Bone marrow derived macrophages; BMDMs) を用いた。マクロファージの分化誘導には M-CSF が必須であることから、M-CSF を産生することが知られている L929 細胞を大量培養し、L929 細胞の培養上清を用意した。ICR マウスから骨髄細胞を採取し、L929 細胞上清を含む培養液で 1 週間培養してマクロファージに分化させた。

そこに細菌外毒素である LPS (10ng/ml) を加えることによって炎症様環境を再現し、炎症状態におけるマクロファージの細胞培養上清を入手した。

生後 4 日齢の ICR マウスから後肢の膝関節組織を採取し、0.25%トリプシンで 1 時間処置後上清を廃棄し、更に 0.25%コラゲナーゼにて 2 時間処理した。上清中に分散された細胞は遠心後、培養液 (10%FCS DMEM) に置換し、フィブロネクチンコートディッシュに撒き、37°C で 20 分培養後、PBS にて洗浄し、フィブロネクチンコート

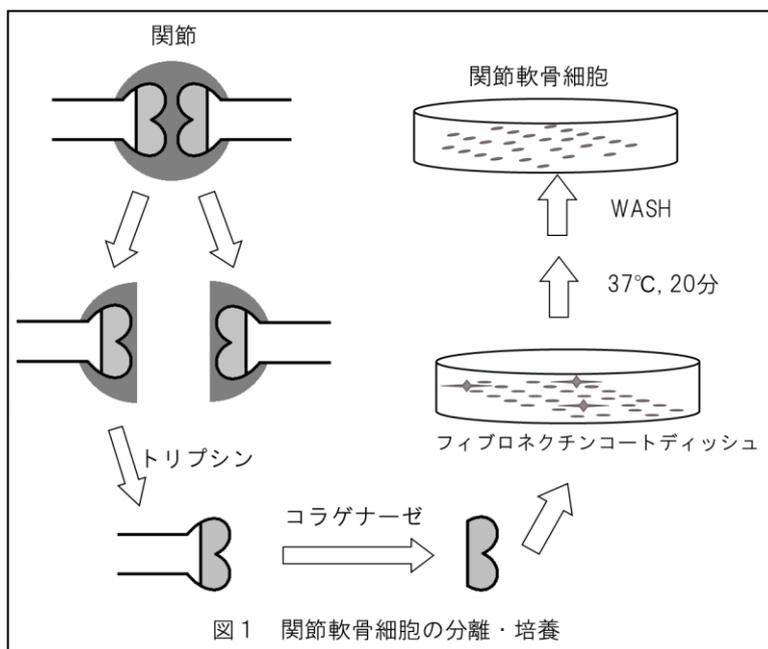


図1 関節軟骨細胞の分離・培養

ディッシュに残存している細胞を関節軟骨細胞とした (図 1)。

MMP13 の発現誘導および定量

M-CSF (L929 細胞培養上清) にて分化誘導させたマクロファージに、LPS を添加し、3-4 時間培養後の上清を回収した。続いて、生後 4 日齢 ICR マウスから分離・培養した関節軟骨細胞に、前述のマクロファージ培養上清を添加し、16 時間培養後、全 RNA を抽出した。抽出した全 RNA を通法により逆転写により cDNA を作製し、MMP13 の発現を qPCR 法にて定量測定した。また必要に応じて、他の細胞外プロテアーゼの mRNA 発現も qPCR 法にて定量測定した。全ての mRNA の発現は、 β -actin の mRNA 量にて標準化した。

液性因子の探索と機能解析

LPS 刺激および非刺激のマクロファージ培養上清を遠心式ろ過フィルターにて粗精製を行い、分子量の異なるフラクションに分割した。各フラクションを関節軟骨細胞に添加し、MMP13 mRNA の発現を測定した。そして MMP13 mRNA の発現を顕著に促進させるフラクションを質量分析 (LC-ESI-MS/MS (Thermo Scientific 社 LTQ Orbitrap Velos + ETD)) によりショットガン解析を行った。LPS 非刺激および LPS 刺激マクロファージの培養上清を添加した関節軟骨細胞の質量分析結果を比較し、後者で多くのペプチド数を示した因子を、MMP13 誘導因子 (MMP13-I) 候補とした。

同定した MMP13-I のリコンビナントタンパク質をマウス関節軟骨細胞に添加し、MMP13 の発現が促進されるかの検討を行った。

【研究経過】

ICR マウスから得た骨髄細胞を M-CSF を含む L929 細胞上清存在下で 1 週間培養してマクロファージへと分化誘導した。このマクロファージに対して、LPS 非刺激あるいは刺激を行い、各々の培養上清 (Conditioned Medium (CM)) を CM LPS(-)、CM LPS(+) とした。次にマウス関節軟骨細胞に、非添加、LPS 添加、CM-LPS(-) 添加あるいは CM LPS(+) 添加し、qPCR 法によって MMP13 mRNA 発現を解析した。

その結果、CM LPS(+) 添加群において MMP13 mRNA の高い発現が見られた。このことより、LPS 添加により炎症様環境下においてマクロファージが MMP13-I 分泌していることが判明した (図 2)。

次にこの CM LPS(+) を遠心式ろ過フィルターを用いて分子量ごとに分割し、各フラクションを先ほどと同様に関節軟骨細胞に加え、MMP13 mRNA の発現を qPCR 法にて解析した。その結果、分子量が 50kDa 以上 100kDa 以下のフラクションに、MMP13-I 活性が存在することが認められた。多くの炎症性サイトカインは 50kDa 以下であることから、50kDa~100kDa の未知のタンパク質が MMP13-I である可能性が考えられた。

分子量に着目することによって目的タンパク質が存在すると考えられる範囲が限定されたため、次に CM LPS(+) と CM LPS(-) の 50kDa 以上 100kDa 以下のフラクションを質量分析にて解析した。質量分析解析の結果、CM LPS(+) だけに確認されたペプチドが 32 個、CM LPS(-) のみに確認されたペプチドが 3 個、両方において確認されたペプチドが 112 個であった。これらの中から、CM LPS(+) のみに確認されたペプチドに相当する因子と、CM LPS(-) で観察されるものの CM LPS(+) でより多くのペプチド数を認めた因子を MMP13-I 候補因子として抽出した。

抽出された因子の中で、分子量が 50kDa~100kDa の範囲であり、分泌タンパク質である因子を MMP13-Ia とした。MMP13-Ia のリコンビナントタンパク質を関節軟骨細胞に添加し、MMP13 mRNA の発現を調べた。その結果、MMP13-Ia は MMP13 を強力に誘導することが明らかとなった (図 3)。また、この MMP13-Ia は細胞外プロテアーゼ MMP3 などの mRNA の発現も顕著に誘導したことから、MMP13-Ia が、関節軟骨

に作用し、MMP13 などの細胞外プロテアーゼの発現を誘導し、関節軟骨破壊に関与している可能性が示唆された。

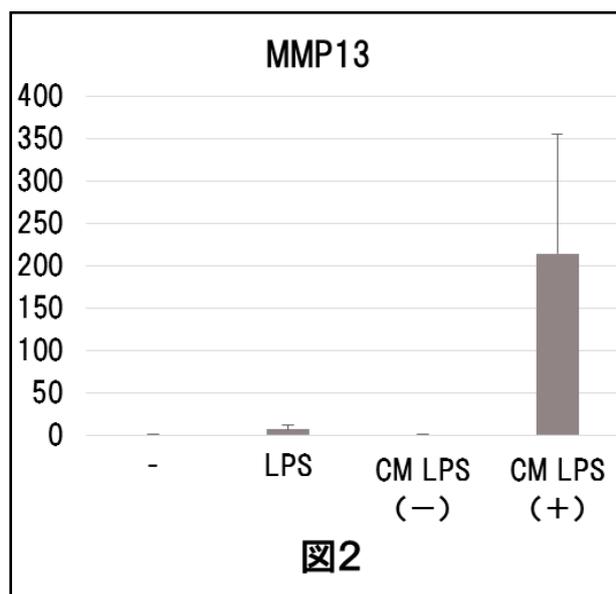


図2

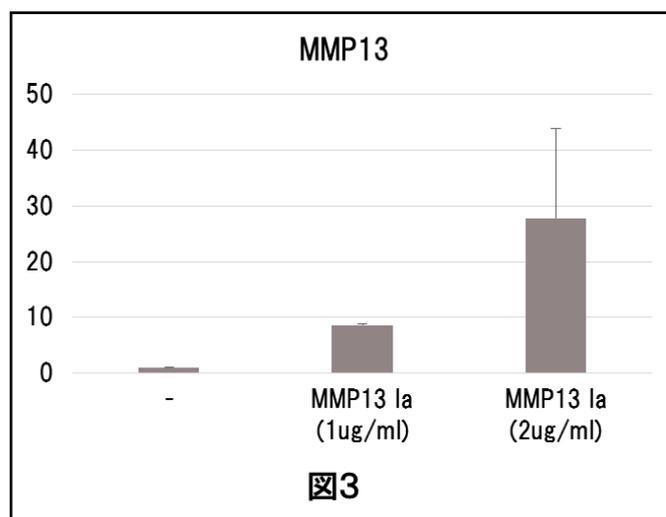


図3

【研究成果】

変形性関節症や関節リウマチの病体患部の関節では、関節軟骨破壊が生じ、運動障害に陥る。この関節軟骨破壊を誘導する因子として MMP13 などの細胞外プロテアーゼが知られており、これら細胞外プロテアーゼの発現制御機構が注目されている。今回の研究では、関節軟骨破壊時に炎症が生じていることに着目し、炎症時マクロファージが産生するタンパク質が関節軟骨細胞において MMP13 の発現を誘導するかを検討した。その結果、図 2 のように LPS 刺激のマクロファージ細胞上清が強力に MMP13 を発現誘導することがわかった。次に分子量ごとに分けることができる遠心ろ過フィルターを用いて各フラクションに分割し、関節軟骨細胞に加え、MMP13 の発現誘導効果を有することを確認した。当初は多くの炎症性サイトカインが含まれる分子量 50kDa 以下に強い活性が認められると予測していたが、予想に反し、50KDa~100KDa の範囲内に存在する因子が MMP13 の発現を強力に誘導することが判明した。さらに、ショットガン法による質量分析解析の結果、MMP13-Ia が同定された。この MMP13-Ia を関節軟骨細胞培養に添加したところ、図 3 のように MMP13 が濃度依存的に発現誘導された。この結果は、MMP13-Ia が新規の MMP13 発現誘導因子である可能性を強く示唆した。

今後は引き続き、MMP13-Ia の作用機序と関節軟骨破壊における役割の解明を進めると共に、MMP13-Ia 以外の MMP13 誘導タンパク質の探索および同定を目標に研究を進めていく予定である。