

変形性関節症における GADD45 β の発現と機能

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
運動機能修復学講座整形外科

井尻幸成

はじめに

変形性関節症 (Osteoarthritis:OA) は加速する高齢化社会において、いわゆるCommon diseaseとして最も頻度の高い骨・関節疾患である。本疾患は高齢者の日常生活を著しく低下させるためその病態解明が重要な研究課題であるが、詳細な発生機序や決定的な治療効果が期待できる標的分子は明らかになっていない。外傷後に高頻度に発生すること、加齢による発生頻度の増加や進行性の関節変形などから、本症の発生・進行には生体力学的ストレスが関与することが示唆されてきた。

我々はOAの軟骨を組織学的重症度に分類比較し、OAの初期変化に特異的な発現をする遺伝子を網羅的に検索した。その結果、初期OAの軟骨で発現が亢進する遺伝子のうち、ストレス反応性分子として知られているGADD45 β (Growth Arrest and DNA damage inducible protein 45 β)に注目した。¹

GADD45 β は軟骨細胞の単層培養系においてBMP-2によって短時間で(12hr)誘導される分子で、軟骨細胞の内軟骨性骨化の過程で肥大軟骨の形成に関与する。²内軟骨性骨化では、増殖軟骨細胞が、基質を形成し、そのリモデリングを行いながら徐々に肥大し、本来のType II collagen主体の蛋白合成から、Type X collagen主体の蛋白合成へと、その同化機能を変貌させる。その後、MMP-13、MMP-3、VEGFなどの基質分解酵素、血管誘導因子の発現により、基質の破壊、血管の侵入、骨芽細胞の増殖、基質合成による骨基質への置換が進む。軟骨細

胞の増殖、肥大化にはBMP-2が関与することが知られており、我々の先行研究において、BMP-2により誘導されたGADD45 β が、軟骨細胞の肥大化に関わり、Type X collagenやMMP-13などの肥大軟骨細胞特有の遺伝子発現を、AP-1を介して制御していることが判明した。

この分子のOAでの機能を検討する目的で実験的検討を行った。

方法

1. 加齢マウスにおけるGADD45 β の発現 (免疫組織学的検討)

58週齢の老化マウス(SAMP1)6匹及びピントロールとして58週齢のICRマウスの両膝を麻酔下に摘出し冠状断で切り出し、HE染色及びGADD45 β による免疫染色を施行した。陽性細胞数を、関節軟骨中心部と辺縁部にて比較検討した。細胞の計測は各検体で50 μ m x 100 μ mの領域を軟骨表層部と深部でそれぞれ8領域無作為に選択し、統計学的検討にはANOVAを用いた。

2. 軟骨細胞培養系を用いてそのApoptosisに対する関与の検討 (Hoechst staining, Cell Death Assay)

1. 培養細胞にはATDC5 cellを用いた。予めlentiviral-siRNA-GFP, lentiviral-siRNA-GADD45 β を導入したGFP-knockdown (KD) cellとGADD45 β KD cellを用いて比較検討した。

2. これらの細胞がDMEM-Ham's F-12 10%

FCSにてsemi-confluentに達した後、50ng/ml TNF- α にて24hr serum freeにて培養し、10mg/ml Hoechst 33342 dyeによる染色と、Cell death assay kit (Roche)によるfragmented chromatinの定量を行った。

結果

1. 加齢マウスにおける GADD45 β の発現 (免疫組織学的検討)

加齢マウス (SAMP1) およびコントロール (ICR) ともに関節中心部では、表層の軟骨細胞に規則的に染色陽性で、深層部は殆ど染まらなかった。一方、関節辺縁部では、加齢マウスで陽性細胞数が増加し、特にEnthesis部、深層部にも陽性細胞数が有意に増加していた (図1)。

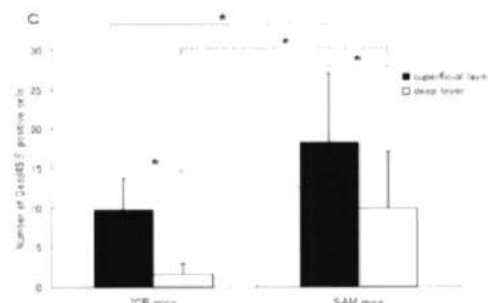
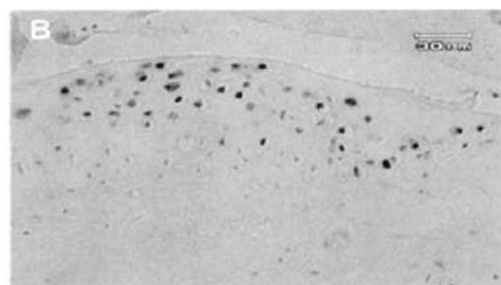
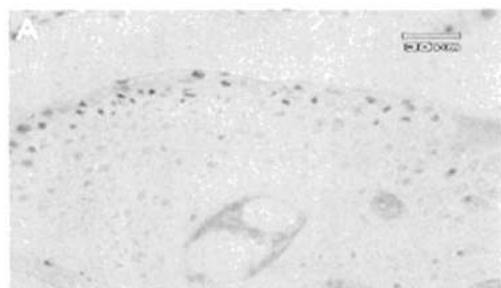


図1. GADD45 β の免疫染色。

- A) ICR マウスの関節辺縁部。
- B) SAMP1 マウスの関節辺縁部。
- C) ICR マウスおよびSAMP1 マウスの関節辺縁部でのGADD45 β 陽性細胞数の比較。

* P < 0.05, ANOVA 検定。

2. 軟骨細胞培養系を用いてその Apoptosis に対する関与の検討 (Hoechst staining, Cell Death Assay)

GFP KD cell で TNF- α により誘導される Apoptosis は、GADD45 β KD においてさらにその程度が亢進した。(図3, 4)

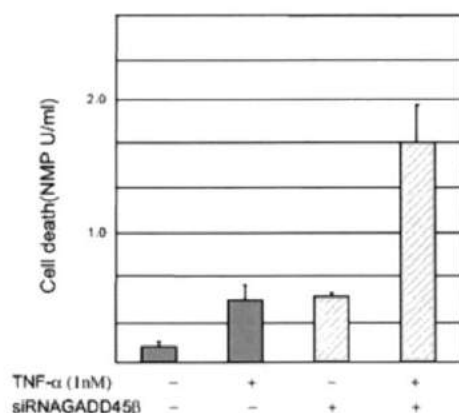


図3. TNF- α 投与によるアポトーシス誘導系における Cell Death Assay.

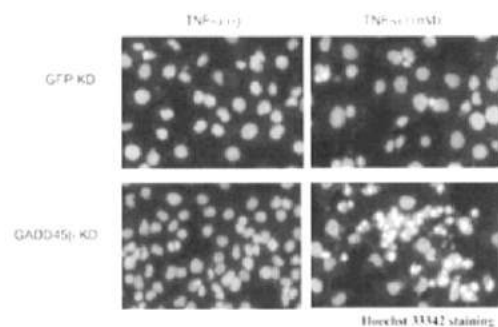


図4. TNF- α 投与によるアポトーシス誘導系における Hoechst staining. Original magnification x40.

考 察

今回の我々の検討ではGADD 4 5 β がOA軟骨において、変性を示す深層部のcluster chondrocytesに発現亢進し、Anti-Apoptoticの作用を有していることが示された。OAにおける軟骨細胞のApoptosisについては議論があり、その頻度が増えるという報告からあまり増加しないという報告まである。^{3,4,5,6,7} 我々は、Apoptosisが増加し、これにより軟骨基質の生産が増加低下するのではなく、むしろAnti-apoptoticな作用によりApoptosisやNecrosisを逃れる一方で、phenotypeを変化させ、いわゆるdedifferentiationにより、Type X collagenやMMP-13、Type I collagenなど、正常の軟骨細胞では発現が抑制されている蛋白の生産が亢進すると考えている。この形質転換にストレス反応性分子GADD 4 5 β が関わっている。^{8,9,10,11,12}

最近、我々はGADD 4 5 β と協調的に作用し、OAの軟骨細胞においてType X collagenやMMP-13などの遺伝子発現を制御する転写因子としてC/EBP β を同定した。この分子は、GADD 4 5 β と相乗的にAP-1活性を亢進する。ICR マウスでも正常軟骨に発現しているが、SAMP1 マウスでは関節辺縁部やenthesisに強く発現し、この部位ではGADD 4 5 β と共発現している。これらのことは、C/EBP β は正常な軟骨で何らかの機能を有しており、OAの進行でGADD 4 5 β と共発現したときに軟骨細胞の形質転換を促進することを示している。GADD 4 5 β 自身は、細胞のHomeostasisに関わる分子であり、細胞周期にも関わることから、多くの周囲の分子と協調して機能するいわゆるhouse keeping geneである。^{8,9,10} これが、特定の環境で一群の分子と協調して、病的な形質転換に関与することは興味深い。今後、OAの軟骨変性が、どのようなトリガーで、どのような分子群の協調によって進行するのかを、GADD 4 5 β を中心に解明していきたいと考えている。

謝 辞

本研究は、平成18年度財団法人日本股関節学会の研究助成により行った。

文 献

1. Kosei Ijiri, Luiz F Zerbini, Haibing Peng, et al. Differential expression of Gadd45 β in normal and osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum*,2008,58(7),2075-87.
2. Ijiri K, Zerbini LF, Peng H et al. A novel role for Gadd45 β as a mediator of MMP-13 gene expression during chondrocyte terminal differentiation. *J Biol Chem*,2005,280,38544-55.
3. Aigner T, Vornehm SI, Zeiler G et al. Suppression of cartilage matrix gene expression in upper zone chondrocytes of osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 1997;40:562-9.
4. Aigner T, Zien A, Gehrsitz A, Gebhard PM, Mckenna L. Anabolic and catabolic gene expression pattern analysis in normal versus osteoarthritic cartilage using complementary DNA-array technology. *Arthritis Rheum* 200;44:2777-89.
5. Aigner T, Fundel K, Saas J, Gebhard PM, Haag J, Weiss T, et al. Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:3533-44.
6. Sandell LJ, Aigner T. Articular cartilage and changes in arthritis: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res* 2001;2:107-13
7. Aigner T, Kim HA, Roach HI. Apoptosis in osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2004;30:639-53.
8. Abdollahi A, Lord KA, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA. Sequence and expression of a cDNA encoding MyD118: a novel myeloid differentiation

- primary response gene induced by multiple cytokines. *Oncogene* 1991;6:165-7.
9. Zerbini LF, Wang Y, Czibere A, Correa RG, Cho JY, Ijiri K, et al. NF- κ B-mediated repression of growth arrest and DNA-damage inducible proteins 45 α and γ is essential for cancer cell survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:13618-23.
 10. Papa S, Zazzeroni F, Bubici C, Jayawardena S, Alvarez K, Matsuda S, et al. Gadd45 β mediates the NF- κ B suppression of JNK Signalling by targeting MKK7/JNKK2. *Nat Cell Biol* 2004;6:146-53.
 11. Aigner T, Gebhard PM, Schmid E, Bau B, Harley V, Poschl E. SOX9 expression does not correlate with type collagen expression in adult articular chondrocytes. *Matrix Biol* 2003;22:363-72.
 12. Vairapandi M, Balliet AG, Hoffman B, Liebermann DA. With a role in S and G2/M Cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress. *J Cell Physiol* 2002;192:327-38.