

変形性関節症予防を目的とした関節軟骨変性とリンクする肥大軟骨細胞分化を制御する標的分子の同定と機能解析

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

医療関節材料開発講座

前田真吾、石堂康弘

運動機能修復学講座 整形外科学

梶博則、今村勝行、篠原直弘、松山金寛、河村一郎、小宮節郎

はじめに

進行した変形性関節症(OA)は不可逆的なので、一生を自身の関節で活動する為には軟骨変性を予防する他ない。これからの更なる高齢化社会や若年 OA 患者にとって、この関節軟骨変性の進行抑制治療は、待望される次世代医療であろう。薬物治療は一つの理想的なアプローチであるが、しかしその開発の前提となる関節軟骨変性の分子メカニズムは、完全に解明されていない。我々は、この関節軟骨変性における責任分子の同定と、その機能解析を目的として研究を行って来た。

軟骨細胞の分化は、間葉系細胞が凝集してマスター転写因子 Sox9 を発現する事で始まり、II 型コラーゲン(Col2a1)やアグリカン(Acan)を発現する増殖軟骨細胞、さらに X 型コラーゲン(Col10a1)を発現する肥大軟骨細胞へと成熟して周囲の基質を石灰化し、最終的にはマトリックス・メタロプロテナーゼ 13(Mmp13)等を発現して終末分化を遂げる。正常な関節軟骨は、Col2a1 や Acan を発現する静止軟骨細胞で占められるが、OA になるとこれらが異常に分化進行して成熟・肥大化し Col10a1 を発現し、軟骨基質も石灰化を伴い、内軟骨性骨化が進行した結果と

して骨棘が形成される事が分かっている [1, 2]。軟骨の肥大・成熟化には Runx2 の発現が必要であり、このプロセスを骨形成蛋白(BMP)シグナルは協調的に促進する [3-5]。実際、動物の関節内に BMP-2 を注入すると関節軟骨細胞の肥大化を来たし、内軟骨性骨化過程が異常に進行して骨棘を形成し、OA の表現型になる [6]。したがって Runx2 活性と BMP シグナルの亢進が OA 病理の一部である事が示唆されており、これを抑える事が OA の進行抑制や治療に繋がる可能性がある。最近、我々は BMP で誘導した軟骨細胞分化において、転写抑制因子 SnoN の発現が増加し、BMP シグナルの下流メディエーターである Smad1/5/8 と共役する Smad4 の機能を阻害する事で、negative feedback 的に BMP シグナルと、これに付随する軟骨細胞肥大化を抑制する事、そして SnoN が変性初期から中程度のヒト OA 関節軟骨に発現していて、OA 進行に対して抑制的に働いている可能性を報告した [7]。しかし、SnoN の軟骨肥大化に対する役割は部分的であり、他にも BMP シグナルの下流で誘導される責任因子があると考えた。そこで我々は、筋芽細胞 C2C12 において Runx2 と BMP-2 によって協調的に誘導される S

mpd3 遺伝子[8]に着目した。Smpd3 の loss-of-function 変異 fragilias ossium (fro)マウスの成長軟骨においては、肥大軟骨層が著明に拡大しており、Smpd3 がコードする neutral sphingomyelinase2 (nSMase2)が軟骨細胞の肥大・成熟に抑制的に働く可能性が考えられたからである[9]。重要な事に、Smpd3 のノックアウト(KO)マウスの膝関節は著明に変形し骨棘を伴う正に OA の表現型を示した[10]。nSMase2 は細胞質内にセラミドを合成し、これが間接的に Akt シグナルを抑制する事が分かっている[11]が、軟骨細胞における分子作用メカニズムについては不明であった。本研究では、軟骨細胞においても Runx2 と BMP シグナルによって Smpd3 が誘導されるか、そしてその場合、Smpd3/nSMase2 の軟骨細胞分化、特に肥大・成熟過程における役割について検討した。

方法

1) 使用細胞と分化誘導

マウス軟骨細胞株 ATDC5、ヒト軟骨細胞株 C28/I2、マウス間葉系前駆細胞 C3H10 T1/2 細胞、マウス初代軟骨細胞を用いた。マウス初代軟骨細胞は生後 2 日目の C57BL/6J マウスの大腿骨頭、大腿骨膝関節面、脛骨膝関節面より関節軟骨を採取し、コラジェナーゼ D による消化にて採取した。いずれも DMEM/Ham's F12 (1:1)+10% FBS 培養液で維持し、軟骨細胞分化は、BMP-2(300ng/ml, Peprotech 社)とインシュリン/トランスフェリン/セレンウム(IT S)添加剤にて誘導した。

2) マウス胎仔中足骨器官培養

胎生 16.5 日の C57BL/6J マウス胎仔より中足骨を採取し、軟骨細胞と同様に分化

誘導した。軟骨基質をアルシアン・ブルーで、肥大軟骨石灰化基質をアリザリン・レッドで染色した。

3) RNAi

RNAi は Dharmacon 社の ON-TARGET plus SMART pool を、Invitrogen 社の Lipofectamine RNAiMax で導入した。

4) プラスミドとアデノウイルス

マウス Smpd3 cDNA は ATDC5 細胞より RT-PCR 法を用いて増幅し、pEF-DEST51 発現ベクター、pAd/CMV/V5-DEST アデノウイルスベクターにそれぞれクローニングした。

5) 抑制剤と C2-セラミド

新生蛋白合成阻害剤シクロヘキシミド(CHX, Sigma 社)は 10mM で BMP-2 添加 2 時間前に導入した。nSMase 機能阻害剤 GW4869 (Sigma 社)は 1 μ M、細胞内セラミド機能、すなわち nSMase2 の働きを mimic できる細胞膜透過性 C2-セラミド(Enzo Life Sciences 社)は 10 μ M で用いた。PI3K 阻害剤 LY294002 (Sigma 社)と Akt 阻害剤 MK2206 (Chemie Tek 社)、そして mTOR 阻害剤ラパマイシン(Sigma 社)も BMP-2 添加と同時に導入した。

6) ウェスタンブロット

用いた抗体は、anti-Runx2 (8G5, MBL 社)、anti-nSMase2 (H-195, Santa Cruz 社)、anti-aggrecan (H-300, Santa Cruz 社)、anti-collagen type II α 1 (LSBio 社)、anti-phospho-Akt (S473) (587F11, Cell signaling 社)、anti-Akt (5G3, Cell Signaling 社)、anti-phospho-S6 ribosomal protein (Ser235/236) (D57.2.2E, Cell Signaling 社)、anti-S6 ribosomal protein (54D2, Cell Signaling 社)、anti-pho

spho-PI3K(no. 4228, Cell Signaling 社)、anti-PI3K (p85)(no. 610045, BD Transduction Laboratories 社)、anti-phospho-Smad1/5/8(no. 9511, Cell Signaling 社)、anti-Smad1(no. 9743, Cell Signaling 社)、horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit secondary antibody、anti-mouse secondary antibody (Cell Signaling 社)、anti-tubulin antibody(DM1A, T9026, Sigma 社)である。ウエスタンブロットのシグナルは LAS 4000 Mini Image Analyzer (Fujifilm 社)で検出した。

7) 免疫細胞・組織蛍光染色

用いた抗体は、anti-aggrecan(H-300, Santa Cruz 社)、anti-collagen type I I α 1(LSBio 社)、anti-nSMase2 rabbit polyclonal antibody(H-195, Santa Cruz 社)、anti-Has2 mouse monoclonal antibody(D-8, Santa Cruz 社)で、Anti-mouse Alexa Fluor 488 と anti-rabbit Alexa Fluor 568 (Invitrogen) で蛍光標識した。ウサギ、マウスの正常 IgG を陰性対照に置いた。ヒアルロン酸 (HA) の検出には、サンプルを streptavidin/biotin blocking kit (Vector 社) でブロックし、0.05%の trypsin を 1 U/ml の chondroitinase ABC(Sigma 社)で消化した。

さらに CAS block 処理後、biotin-conjugated HA-binding protein(HABP) (Hokudo 社)と 1 μ g/ml の Alexa Fluor 488-conjugated streptavidin(Invitrogen 社)を反応させた。

8) 定量的 RT-PCR (qRT-PCR)

RNA は TRIzol reagent (Invitrogen 社)で抽出し、1 μ g を Verso cDNA Kit(The

ermo Scientific 社)を用いて cDNA に逆転写した。qPCR は、SYBR premix Ex Taq I I (Takara 社)と Thermal Cycler Dice TP 850(Takara 社)を用いて施行した。

結果

Smpd3/nSMase2 の発現誘導パターン

ATDC5 細胞に BMP-2 を添加すると、Acan は 1 日目から 3 日目にかけて急速に発現が立ち上がり、従って分化初期マーカーとして認識されているが、後期成熟・肥大軟骨マーカーである Col10a1 は 7 日後よりゆっくりと発現増加する(図 1A)。Smpd3 は、Acan と Col10a1 を融合した様な発現様式で、BMP 刺激 1 日目より 1 4 日まで上昇し続けた(図 1A)。In vivo 軟骨組織においては、マウス胎生 17.5 日の上腕骨における免疫蛍光染色で観ると、nSMase2 蛋白は骨(b)に著明に発現していたが、肥大軟骨(h)、特に前肥大軟骨(ph)にも中程度の発現を認めた(図 1B)。In vitro における BMP-2 による Smpd3 の誘導が下流の Smad1/5/8 を介した直接的なものか、あるいは新生蛋白を介した間接的なものか判別するために CHX で処理すると、BMP-2 による Smpd3 の誘導は起きなかった(図 1C)。同時に、C2C12 細胞で報告されている様に Runx2 も必要なのか siRNA 実験をすると、Runx2 ノックダウン下ではやはり BMP-2 による Smpd3 の誘導はなかった(図 1D)。この事は nSMase2 蛋白レベルでもウエスタンブロットで確認された(図 1E)。従って、軟骨細胞において、Smpd3/nSMase2 は BMP-Smad シグナルと Runx2 と協調的に直接誘導され、かつこれらシグナル系が高まる分化後期に発現量が増加する事が分かり、したがって OA 軟

骨変性期に発現する可能性が示唆された。

Smpd3/nSMase2 の軟骨細胞分化への影響

ATDC5 軟骨細胞に siSmpd3 を導入して loss-of-function を観察すると、Col2a1 も Col10a1 も、特に BMP-2 刺激下において著明に発現が亢進した(図 2A)。これが軟骨基質産生にも反映されるかアルシアン・ブルー染色を行った。ATDC5 軟骨細胞と初代軟骨細胞の両者において BMP-2 刺激で青く染まる様になるが、nSMase2 阻害剤 GW4869 を加えるとさらに染色性が増強し、nSMase2 の機能を mimic する C2-セラミドは逆に減弱させた(図 2B)。確かに GW4869 は用量依存的に Col2a1 発現を亢進したし(図 2C)、C2-セラミドは逆に Col2a1 と Col10a1 の発現を減弱させた(図 2D)。さらに nSMase2 の関与を確かめる為にアデノウイルスで Smpd3 を過剰発現しても、C2-セラミドと同じ結果が得られた(図 2E)。したがって Smpd3/nSMase2-セラミド経路は軟骨細胞分化を抑制する事が分かった。

Smpd3/nSMase2 の軟骨細胞分化における分子メカニズム

Fibroblast において Smpd3/nSMase2-セラミド経路が Akt 経路を抑制するが[11]、Akt 経路は軟骨細胞分化に対して促進的に機能する事が分かっているので、初代軟骨細胞における nSMase2 の Akt への影響をウエスタンブロットで検討した。BMP-2 刺激は Akt と下流の S6 蛋白のリン酸化を惹起したが、Smpd3 発現アデノウイルスは、これらを抑制し、siSmpd3 は逆にこれらリン酸化を増強した(図 3A)。nSMase2 の作用に Akt が関わっているか阻害剤 MK2206 を用いて検討すると、siSmp

d3 によって増強されたアルシアン・ブルー染色性が、MK2206 によりほぼ完全にキャンセルされた(図 3B)。同様に、Acan と Col2a1、Col10a1 の発現を調べると、Akt の上流の PI3K の阻害剤 LY294002 (LY)、MK2206 (MK)、下流の mTOR 阻害剤ラパマイシン (Rp)、いずれもこれらの発現を抑制した(図 3C)。すなわち、Smpd3/nSMase2 は PI3K/Akt/mTOR 経路を抑制する事で、軟骨細胞分化を制御している事が示唆された。

Smpd3/nSMase2 の ex vivo 軟骨器官培養系と、ヒアルロン酸産生への関わり

Smpd3/nSMase2-セラミド経路が組織レベルでも軟骨成熟肥大化に抑制的か、マウス胎仔 16.5 日中足骨器官培養系をアルシアン・ブルー/アリザリン・レッドで染色して調べた。BMP-2 添加により肥大軟骨細胞明瞭領域の拡大と石灰化軟骨基質の出現が観られるが、GW4869 は著明にこれを亢進し、C2-セラミドは逆に抑制した(図 4A)。

OA 軟骨からのヒアルロン酸 (HA) 産生が減る事は周知だが、その原因はよく分かっていない。Fibroblast において Smpd3/nSMase2-セラミド経路が Akt 経路抑制を介して HA 合成酵素 Has2 の発現を抑制する[11]事に注目し、軟骨細胞で調べた。BMP シグナルは軟骨細胞を成熟へと導き、OA ステージに向かわせると考えられるが、確かに BMP-2 添加によって Has2 の発現は下がった(図 4B)。重要な事に、同時に Smpd3 をノックダウンすると Has2 発現が回復し(図 4B)、この効果は Akt 阻害剤 MK2206 (MK) でキャンセルされた(図 4C)。蛋白レベルで確認する為に免疫細胞蛍光

染色を行うと、BMP-2 添加により nSMase 2 発現が増強すると同時に Has2 と HA のシグナルは著明に減弱し、さらに Smpd3 をノックダウンすると Has2 と HA は元に回復した(図 4D)。したがって、Smpd3/nSMase2 は軟骨分化のみならず HA 産生をも抑制する事が示唆された。

考察

今回、軟骨細胞において、Smpd3/nSMase2-セラミド経路が Akt 経路の制御を介して分化を成熟させない様に適度に調節している事が分かり、このシステムの破綻が OA に繋がる可能性が示された。また、同時に HA 産生も抑制している事が分かり、Smpd3/nSMase2-セラミド経路が強すぎても関節軟骨を OA に傾ける可能性があり、Smpd3/nSMase2 の発現量は、BMP シグナルと Runx2 の量と機能によって、fine-tuning されている可能を指摘出来る。これらの微妙な調節は、BMP/Runx2 が誘導する Smpd3/nSMase2 の negative-feedback とも言える。一方で骨の再生医療や骨折治療を考えた場合、Smpd3/nSMase2-セラミド経路を抑制すれば、内軟骨性骨化過程のスピードを速める事が出来るかもしれない、その効果を示す抑制剤 GW4869 等が現に存在している。逆に OA の予防や進行抑制に鑑みたとき、これを抑制するコンパウンドとして今回セラミドが候補に挙がった。いずれも化学合成物質であるので、動物実験を重ねながら臨床応用に適したそれぞれの化合物の derivative が開発されれば、新しい整形外科領域の薬剤開発へと発展するかもしれない。

成果

本研究の一部は 2014 年に Journal of Biological Chemistry 誌に掲載された。

Kakoi H, Maeda S, Shinohara N, Matsuyama K, Imamura K, Kawamura I, Nagano S, Setoguchi T, Yokouchi M, Ishidou Y, and Komiya S. Bone Morphogenetic Protein (BMP) Signaling Up-regulates Neutral Sphingomyelinase 2 to Suppress Chondrocyte Maturation via the Akt Protein Signaling Pathway as a Negative Feedback Mechanism. *J. Biol. Chem.*, 289:8135-8150, 2014.

謝辞

本研究は平成 24 年度公益財団法人日本股関節研究振興財団の研究助成により行いました。同財団に深謝致します。

引用文献

1. Sandell, L. J., and Aigner, T. (2001) Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res.* 3, 107-113
2. Dreier, R. (2010) Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. *Arthritis Res. Ther.* 12, 216
3. Zheng, Q., Zhou, G., Morello, R., Chen, Y., Garcia-Rojas, X., and Lee, B. (2003) Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo. *J. Cell Biol.* 162, 833-842
4. Volk, S. W., Luvalle, P., Leask, T., and Leboy, P. S. (1998) A BMP responsive transcriptional region in the chicken type X collagen gene. *J. Bone Miner. Res.* 13, 1521-1529
5. Kempf, H., Ionescu, A., Udager, A. M., and Lassar, A. B. (2007) Prochondrogenic signals induce a competence for Runx2 to activate hypertrophic chondrocyte gene expression. *Dev. Dyn.* 236, 1954-1962
6. van Beuningen, H. M., Glansbeek, H. L., van der Kraan, P. M., and van den Berg, W. B. (1998) Differential effects of local application of BMP-2 or TGF- β 1 on both articular cartilage composition and osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage* 6, 306-317
7. Kawamura, I., Maeda, S., Imamura, K., Setoguchi, T., Yokouchi, M., Ishidou, Y., and Komiyama, S. (2012) SnoN suppresses maturation of chondrocytes by mediating signal cross-talk between transforming growth factor- β and bone morphogenetic protein pathways. *J. Biol. Chem.* 287, 29101-29113
8. Chae, Y. M., Heo, S. H., Kim, J. Y., Lee, J. M., Ryoo, H. M., and Cho, J. Y. (2009) Upregulation of *smad3* via BMP2 stimulation and Runx2. *BMB Rep.* 42, 86-90
9. Khavandgar, Z., Poirier, C., Clarke, C. J., Li, J., Wang, N., McKee, M. D., Hannun, Y. A., and Murshed, M. (2011) A cell-autonomous requirement for neutral sphingomyelinase 2 in bone mineralization. *J. Cell Biol.* 194, 277-289
10. Stoffel, W., Jenke, B., Holz, B., Binczek, E., Gunter, R. H., Knifka, J., Koebke, J., and Niehoff, A. (2007) Neutral sphingomyelinase (SMPD3) deficiency causes a novel form of chondrodysplasia and dwarfism that is rescued by *Col2A1*-driven *smad3* transgene expression. *Am. J. Pathol.* 171, 153-161
11. Qin, J., Berdyshev, E., Poirier, C., Schwartz, N. B., and Dawson, G. (2012) Neutral sphingomyelinase 2 deficiency increases hyaluronan synthesis by up-regulation of Hyaluronan synthase 2 through decreased ceramide production and activation of Akt. *J. Biol. Chem.* 287, 13620-13632

図表

図1 *Smpd3*/*nSMase2* の発現誘導様式と *BMP*/*Runx2* の必要性

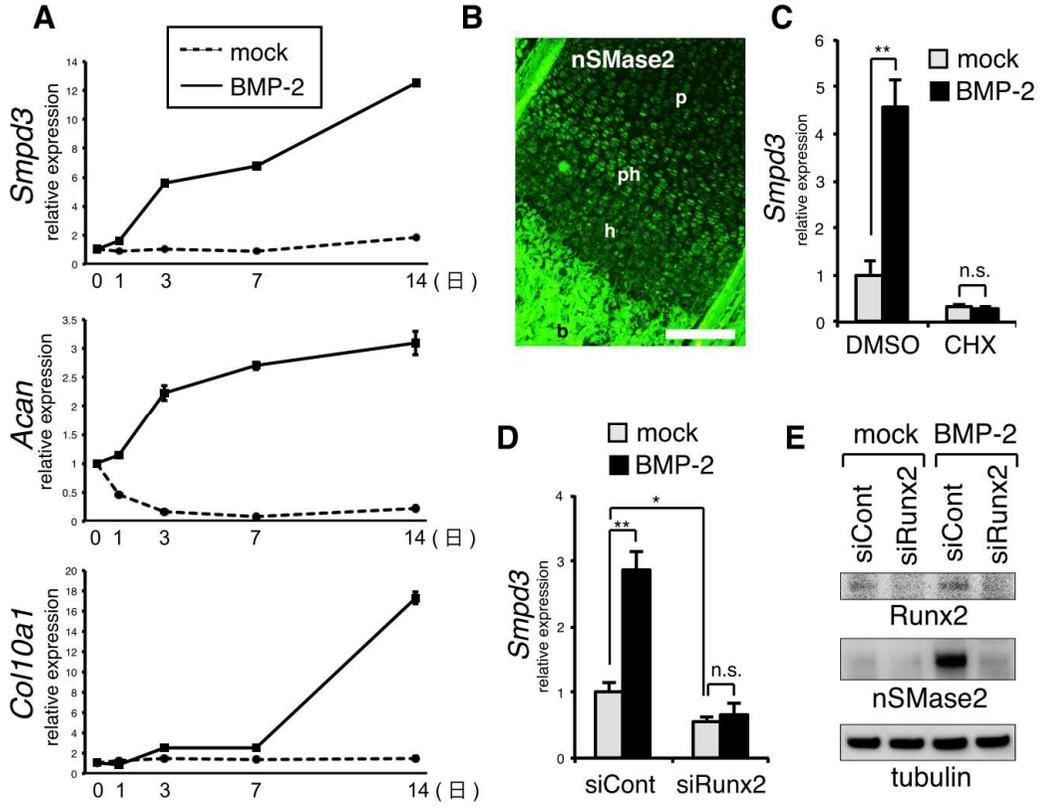


図 2 Smpd3/nSMase2 の軟骨細胞分化への影響

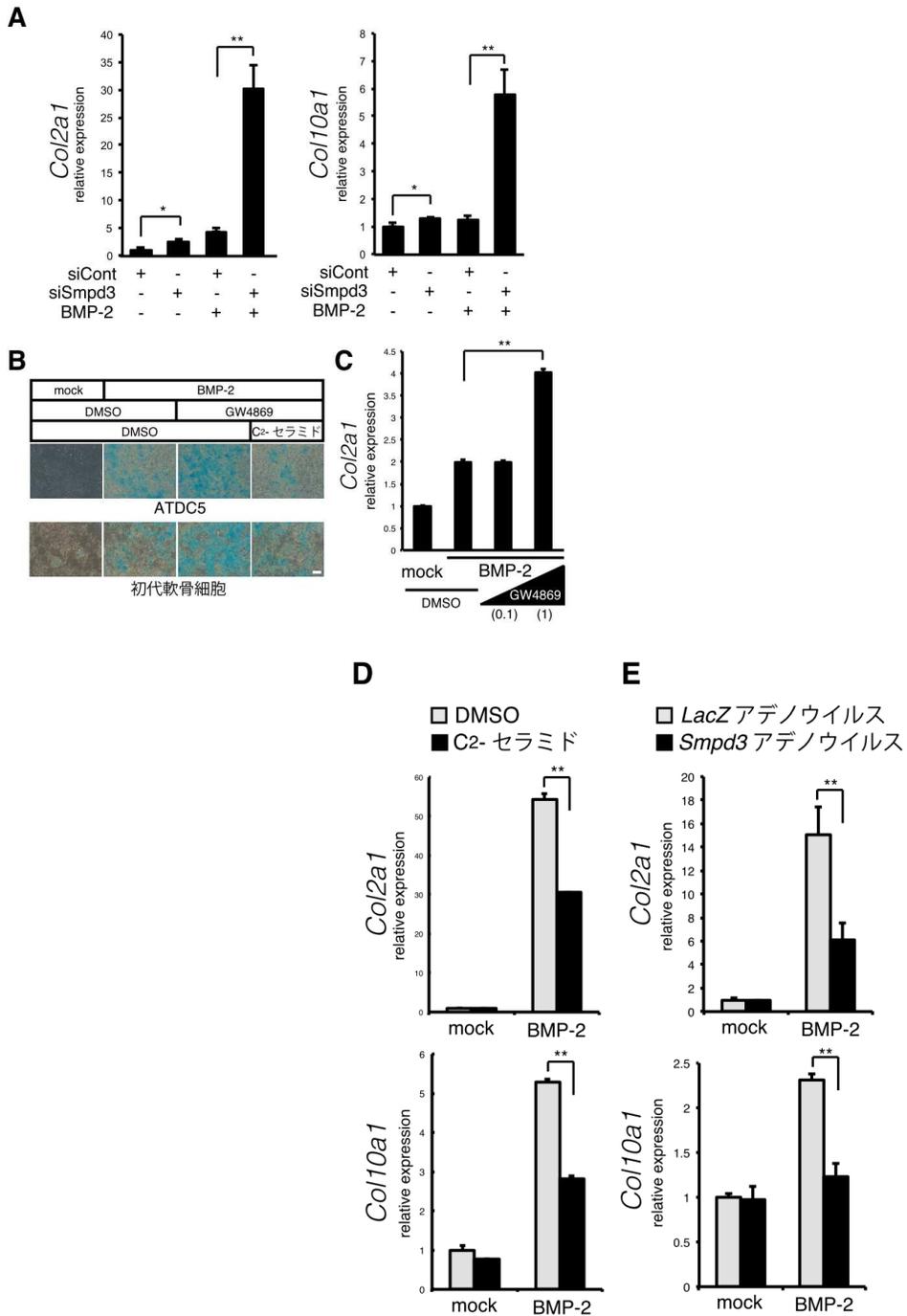


図3 Smpd3/nSMase2 は Akt 経路を介して軟骨細胞分化を制御する

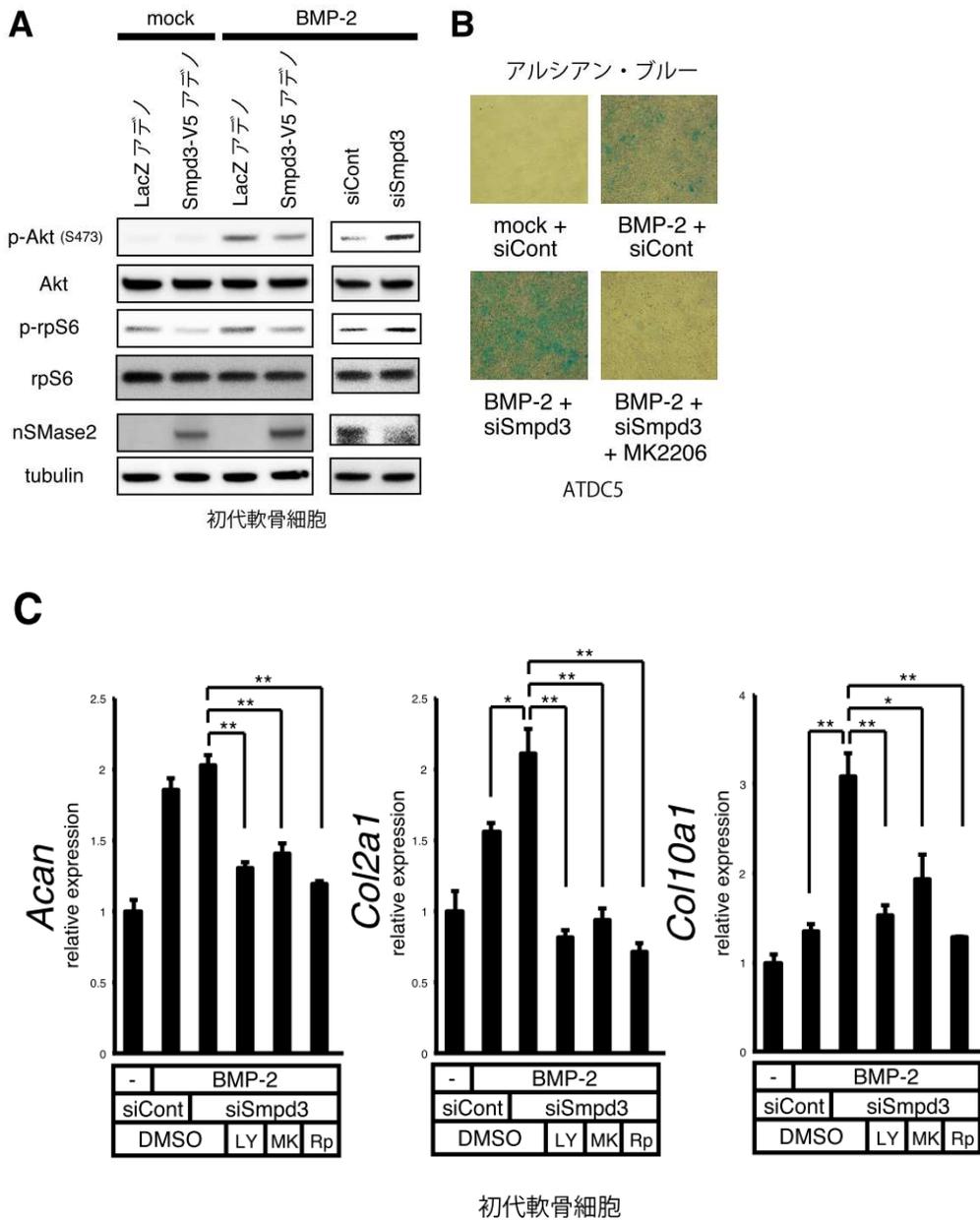


図 4 Smpd3/nSMase2 の軟骨器官培養系と、ヒアルロン酸産生への関り

