



## Oxidative stress-induced apoptosis and matrix loss of chondrocytes is inhibited by eicosapentaenoic acid

Sakata, Shuhei

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2015-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6275号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006275>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

## 学位論文の内容要旨

Oxidative stress-induced apoptosis and matrix loss of chondrocytes is inhibited by eicosapentaenoic acid

エイコサペンタエン酸は酸化ストレス依存性の軟骨アポトーシスと軟骨基質の減少を抑制する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻  
整形外科学  
(指導教員: 黒坂 昌弘教授)

坂田 周平

### 【目的】

変形性関節症 (OA) は高齢者における最も一般的な慢性疾患であり、OA は関節軟骨の喪失によっておこる進行性の疾患である。軟骨細胞のアポトーシスは OA の病態に関係しており、重症度や進行度と関連している。また、OA 軟骨組織の特徴として軟骨基質が減少している。MMPs (matrix metalloproteinases) は主な軟骨基質である type-II collagen の分解酵素であり、その発現の上昇が OA 軟骨組織では認められる。

エイコサペンタエン酸 (EPA) は魚から摂取される n-3 不飽和脂肪酸であり、抗酸化剤の一種である。また、健康維持に必須であり、心血管疾患治療薬、アルツハイマーの進行予防薬としても使用されおり、炎症性サイトカインや MMPs の放出を抑制するとの報告がある。EPA が OA の進行を予防するメカニズムは依然として明らかではない。そこで我々は in vitro、in vivo においてそのメカニズムを調査した。

### 【方法】

#### in vitro での軟骨細胞のアポトーシス、変性の解析

ヒト正常軟骨細胞である NHAC-kn を使用した。30 万細胞を単層培養し、EPA を 10、30、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で 8 時間添加し、その後、一酸化窒素 (NO) のドナードラッグである、sodium nitroprusside (SNP) を 1mmol/l で 12 時間負荷した。そこから採取した細胞を用いて、Flow cytometry、Western blotting、real time-PCR を行った。Flow cytometry ではアポトーシスを解析し、Western blotting にてアポトーシス関連タンパクであるリン酸化 p53、リン酸化 p38MAPK (p38 Mitogen-activated Protein Kinase)、cleaved caspase3、cleaved PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) を解析した。real time-PCR では軟骨基質変性に関与する MMP3、MMP13 の発現を解析した。

#### in vivo での軟骨細胞のアポトーシス、変性の解析

生後 8 週の野生型マウス (C57BL/6J) の膝を顕微鏡下に内側副韌帯切離、内側半月板を切除し OA モデル (DMM) を作製した。術後各週にコーン油、EPA を膝関節内に注射を行った。Sham 群、DMM 群、DMM 群にコーン油関節内注射群 (Corn)、DMM 群にコーン油 + EPA 関節内注射群 (EPA) の 4 群を作成し、術後 12 週において、変形性関節症の進行を SafraninO 染色を用いて観察した。評価は Mankin grading を用いて行った。また、軟骨細胞のアポトーシスを TUNEL 染色を用いて解析した。軟骨細胞の変性は MMP13 の発現を免疫組織化学染色することで解析した。

### 【結果】

#### in vitro での軟骨細胞のアポトーシスの解析

酸化ストレス依存性の軟骨細胞のアポトーシスにおける EPA のメカニズムを解析した。Flow cytometry ではアポトーシスを起こした細胞の割合は SNP 負荷群で 43.9% (n=3) で

あったが、EPA 添加群では 29.7% (n=3) と有意差をもって減少した (Fig. 1A, B)。Western blotting では SNP 負荷群でリン酸化 p38MAPK (n=3)、リン酸化 p53(ser46) (n=3) の発現が増加し、EPA 添加群では有意にその発現は抑制された (Fig. 1C, D)。また、Cleaved caspase3 (n=3)、cleaved PARP (n=3) も SNP 負荷群で発現が増加し、EPA 添加群で有意にその発現が抑制された (Fig. 1E, F)。

#### in vitro での軟骨細胞の変性の解析

酸化ストレス依存性の軟骨細胞変性における EPA のメカニズムを解析した。real time-PCR では、SNP 負荷群で MMP3 (n=3)、MMP13 (n=3) の発現が有意に増加していた。MMP3 では 30 µg/ml 以上の EPA を添加した群 (n=3) では、濃度依存性にその発現は有意に抑制されていた (Fig. 2A)。MMP13 では 30 µg/ml 以上の EPA を添加した群 (n=3) で有意に発現が抑制されていた (Fig. 2B)。

#### in vivo での変形性関節症の進行の解析

変形性関節症の進行を Safranin O 染色にて解析した。肉眼的には DMM 群、Corn 群、EPA 群にて滑膜炎を認めたが、それぞれに明らかな差は認めなかった。Sham 群 (n=8) では明らかな軟骨変性は認めなかった (Fig. 3A)。DMM 群 (n=8) では軟骨層の亀裂を認め、基質の染色性的低下を認めた (Fig. 3B)。Corn 群 (n=8) では軟骨表面の変性と、基質の染色性的低下を認めた (Fig. 3C)。しかし、EPA 群 (n=8) では軟骨組織の変性、基質の染色性的低下は認めなかった (Fig. 3D)。Mankin grading では Sham 群に比較して DMM 群、Corn 群で有意にスコアが上昇し、EPA 群ではその上昇が有意に減少した。

#### in vivo での軟骨細胞のアポトーシスの解析

軟骨細胞のアポトーシスを TUNEL 染色にて解析した。DMM にコーン油関節内注射群 (control) (n=4) で TUNEL 陽性細胞/全細胞は 33% となっており、DMM に EPA 関節内注射群 (EPA) (n=4) は 7.7% であった。この 2 部間差は有意であった (Fig. 4A, B, C)。

#### in vivo での軟骨細胞変性の解析

軟骨細胞の変性を免疫組織化学染色にて解析した。DMM にコーン油関節内注射群 (control) (n=4) で MMP13 陽性細胞/全細胞は 43.2% となっており、DMM に EPA 関節内注射群 (EPA) (n=4) は 15.1% であった。この 2 部間差は有意であった。 (Fig. 4D, E, F)

#### 【考察】

NO は様々な反応を引き起こす free radical であり、NO の過剰産生は軟骨細胞のアポトーシスを引き起こす。われわれは以前に酸化ストレスが軟骨細胞死を引き起こすことを報告している。また、OA 軟骨で iNOS (inducible nitric oxide synthase) の発現が増加していること、

NO 産生増加によってミトコンドリア酵素や MMPs の活性が増強されることが報告されている。NO は p38MAPK のリン酸化を引き起こし、p53 のリン酸化を誘導する。それによって caspase3、PARP を介したアポトーシスが誘導される。本研究では NO の過剰産生による酸化ストレスによって引き起こされる軟骨細胞のアポトーシスが EPA 添加によって抑制され、また p38MAPK-p53 のリン酸化の抑制を介してアポトーシスを抑制していることが示唆された。

MMP3、MMP13 は代表的なコラーゲン分解因子である。n-3 脂肪酸が OA 軟骨に薬剤負荷することで起こる MMP3、MMP13 の発現を抑制することが報告されている。我々の研究では酸化ストレスによって MMP3、MMP13 の発現は増加し、EPA を添加することで有意にその発現は抑制されたことを証明した。

*in vivo* ではイヌ OA モデルの滑膜で MMP の発現を魚油が抑えられること、ギニアピッグで n-3 脂肪酸を経口摂取させることで OA の進行を抑制できたことなどが報告されている。これらの報告では n-3 脂肪酸が OA の進行を抑制する証拠は示されていない。我々は、マウス OA モデルを用いて EPA を関節内注射することで軟骨細胞のアポトーシスを抑制し、MMP13 の発現を減少させることを明らかにした。これにより EPA は軟骨細胞のアポトーシスを予防し、MMP の発現を抑制することで軟骨細胞、軟骨基質の両面で OA の進行を抑制することを証明した。

【結語】EPA は酸化ストレス依存性の軟骨細胞のアポトーシスを抑制し、MMP の発現を阻害することで OA の進行を抑制する。

神戸大学大学院医学(系)研究科 (博士課程)

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2475 号	氏名	坂田 周平
論文題目 Title of Dissertation	<p>エイコサペンタエン酸は酸化ストレス依存性の軟骨アポトーシスと 軟骨基質の減少を抑制する</p> <p>Oxidative stress-induced apoptosis and matrix loss of chondrocytes is inhibited by eicosapentaenoic acid .</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner 千井みどり</p> <p>副査 Vice-examiner 寺内浩人</p> <p>副査 Vice-examiner 真庭謙昌</p>		
(要旨は1,000字～2,000字程度)			

変形性関節症 (OA) は関節軟骨の変性によっておこる進行性の疾患であり、軟骨細胞のアポトーシス、細胞外基質変性によって OA は進行する。

酸化ストレスは軟骨細胞のアポトーシスや炎症を励起する。エイコサペンタエン酸 (EPA) は n-3 不飽和脂肪酸であり、抗酸化剤の一種である。また、EPA が炎症性サイトカインや MMPs を抑制するなどの報告や、食餌に EPA を配合することで OA を予防したとの報告がある。しかし、EPA が OA の進行を予防するメカニズムは依然として明らかではなく、本研究でそのメカニズムを調査した。

In vitro では、ヒト正常軟骨細胞を単層培養し、EPA を 10、30、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  と、sodium nitroprusside (SNP) を 1mmol/l を順に添加した。採取した細胞を用いて、Flow cytometry、Western blotting、real time-PCRを行った。

In vivo では、生後 10 週の野生型マウスで OA モデル (DMM) を作製した。術後各週にコーン油、EPA を膝関節内注射した。Sham 群、DMM 群、DMM 群にコーン油注射群 (Corn)、DMM 群にコーン油+EPA 注射群 (EPA) を作成し、術後 12 週において、SafraninO 染色、TUNEL 染色、免疫組織化学染色を行い解析した。

In vitro での軟骨細胞のアポトーシスの解析

Flow cytometry では、SNP 負荷でアポトーシスを起こした細胞は増加し、EPA 添加群では有意に減少した。Western blotting では SNP 負荷群で増加したリン酸化 p38MAPK、リン酸化 p53(ser46)、EPA 添加群で有意に抑制された。Cleaved caspase3、cleaved PARP も SNP 負荷群で発現が増加し、その増加は EPA 添加群で有意に抑制された。

In vitro での軟骨細胞の変性の解析

Real time-PCR では、SNP 負荷群で MMP3、MMP13 の発現が有意に増加し、その増加は 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上の EPA を添加した群で、濃度依存性の傾向で抑制された。

In vivo での変形性関節症の進行の解析

Safranin O 染色で、Sham 群では明らかな軟骨変性は認めなかった。DMM 群、Corn 群では軟骨層の損傷を認め、基質の染色性の低下を認めた。EPA 群では軟骨組織の変性、基質の染色性の低下は認めなかった。Mankin grading では DMM 群、Corn 群でスコアが上昇し、EPA 群ではその上昇が有意に減少した。

In vivo での軟骨細胞のアポトーシスの解析

DMM にコーン油関節内注射群で TUNEL 陽性細胞は 33% であり、DMM に EPA 関節内注射群は 8% であった。2 郡間差は有意であった。

In vivo での軟骨細胞変性の解析

MMP13 を免疫組織化学染色にて解析した。DMM にコーン油関節内注射群で陽性細胞/全細胞は 43% であり、DMM に EPA 関節内注射群は 15% であった。2 郡間差は有意であった。

#### 考察および結論

1. 軟骨細胞に対する酸化ストレスは、p38MAPK、p53、caspase3、PARP を介したアポトーシスが誘導することが報告されている。本研究では酸化ストレスによる、それらのリン酸化や発現が EPA によって抑制された。
2. n-3 脂肪酸が軟骨への薬剤負荷で起こる MMP3、MMP13 の発現を抑制する報告がある。本研究では、酸化ストレスによる MMP3、MMP13 の発現増加が EPA 添加で有意に抑制された。
3. In vivo ではイヌや豚の OA モデルで MMP の発現を魚油が抑制したことや、OA の進行を抑制した報告がある。本研究ではマウス OA モデルへの EPA 関節内注射で変形性関節症の進行を予防し、軟骨細胞のアポトーシスを抑制し、MMP13 の発現が減少した。  
以上より、EPA は in vitro、in vivo で酸化ストレス依存性の軟骨細胞のアポトーシスを抑制し、軟骨変性を抑制することで OA の進行を予防することが明らかとなった。

本研究は EPA が軟骨細胞のアポトーシスを抑制し、さらに細胞外基質の減少を抑制することで OA の進行を予防することを研究したものであるが、マウス OA モデルに対しても、抗酸化剤である EPA 使用により OA を予防、さらにメカニズムを初めて解明した報告である。変形性関節症に対して、EPA を用いることが、新たな治療アプローチと成り得るとした点で価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。