

# 軟骨細胞様細胞において IL-4 は力学的負荷誘導性の RUNX2 および MMP-13、ADAMTS-5 の発現を抑制するか

岡山大学大学院

鉄永智紀、西田圭一郎、古松毅之、成瀬恵治、  
広畑聡、斎藤太一、尾崎敏文

## はじめに

変形性関節症 (OA) の病態はいまだ明らかでないが、MMP に代表される一連の蛋白分解酵素が軟骨破壊の進展に重要であると考えられてきた。多くの MMPs は IGD の Asn341-Phe342 結合部位を切断するが、現在までに OA の進行過程で Asn341-Phe342 とは全く異なる部位でも切断されることがわかってきている。特に OA での主な切断部位は Glu373-Ala374 であり、ADAMTS-4、-5 がこの部位での切断に関与する酵素であることが判明した。また、近年 OA 発症におけるメカニカルストレスのターゲットとして RUNX-2 も注目されている。いくつかの ADAMTS 遺伝子のプロモーター領域には RUNX-2 結合領域が存在することが報告されており、今回我々は軟骨細胞におけるメカニカルストレス—RUNX-2—アグリカナゼ経路について解析した。

OA 治療として ADAMTS 阻害剤を応用する場合、軟骨変性が進行し MMPs による II 型コラーゲンの破壊が進行してからでは ADAMTS 阻害剤の効果は期待しにくい。従って OA 初期のアグリカナゼ活性を解明する必要があるが、現在 OA におけるアグリカナゼの特異的転写因子、調節機構は十分に解明されていない。本研究では、メカニカルストレスにより RUNX-2 発現が亢進するかどうかの検討、RUNX-2 と MMP-13、ADAMTS-family の軟骨破壊における役割の解明、RUNX-2 による軟骨破壊の促進が軟骨保護作用を有するとされる IL-4 により抑制されるか否か、及びその機序について検討した。

## 方法

細胞培養：SW1353 (ヒト軟骨細胞様細胞) を 10mL DMEM (10% FBS、37°C、5% CO<sub>2</sub>) で単層培養した。

ストレッチ (CTS)：SW1353 を 2×2 cm のストレッチチャンバー上で単層培養した。ST140 (STREX 社) を使用して CTS (0.5 Hz、10% 伸張刺激、30 分間) を負荷した。このシステムを使用することでほとんどの細胞に均一な伸張負荷を加えることができる [1]。CTS を加えないものをコント

ロールとして使用した。

RT-PCR、Real-time PCR：cDNA は 1・g の RNA から作製し、10pmol のプライマーで RT-PCR を行った。使用したプライマーは表 1 に示す。RT-PCR は 32 サイクル (G3PDH は 25 サイクル)、94°C 30 秒、60°C (RUNX-2 は 55°C) 30 秒、72°C 30 秒、72°C 7 分を行った。Real-time PCR は CTS 直後の遺伝子発現を 1 とし、COL2A1、Aggrecan、RUNX-2、MMP-13、ADAMTS-4、-5、-9 遺伝子発現を G3PDH で除して表した。

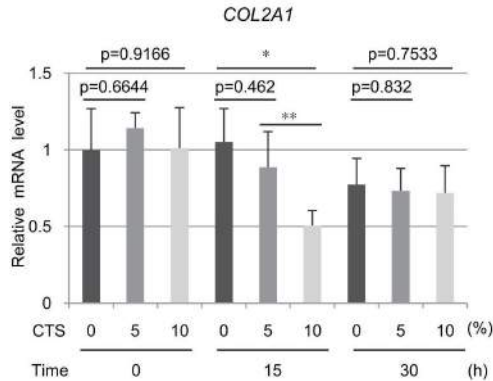


図 1 CTS の違いによる COL2A1 遺伝子発現の変化、10%CTS にて 14 時間後に一過性に減少したが 30 時間後には回復した。  
\*p=0.0041、\*\*p=0.0459

**RUNX-2 過剰発現:** RUNX-2 の過剰発現が MMP-13、ADAMTS-4、-5、-9 遺伝子発現に及ぼす影響について検討した。RUNX-2 の過剰発現には 0.5・L の FuGENE6、250ng の RUNX-2 expression plasmid[2]を使用した。導入後、細胞を 24 時間培養し、その後 CTS (0.5 Hz、10%、30 分間) を負荷した。RUNX-2 と ADAMTS-5 遺伝子発現は CTS 1 時間後、MMP-13、ADAMTS-4、-9 は 24 時間後に細胞を回収し RT-PCR および real-time PCR を行った。

**siRUNX-2:** Silencer Select Pre-designed siRNA を用いて RUNX-2 small interfering RNA (siRNA) assay を行った。30%

コンフルエントの SW1353 に対し、1.5・L の Oligofectamine、siRNA (2・M) を導入した。siRNA 導入後 48 時間で CTS を負荷し RUNX-2、MMP-13、ADAMTS-4、-5、-9 遺伝子発現について RT-PCR、real-time PCR で検討した。

**免疫染色:** RUNX-2 と ADAMTS-5 の局在を免疫染色で検討した。CTS 負荷後 1 時間で固定し、抗 RUNX-2 抗体 (10mg/mL)、抗 ADAMTS5 抗体 (10mg/mL) を使用した。また、Alexa Fluor 488-conjugated antibody (10mg/mL、anti-mouse)、Alexa Fluor 568-conjugated phalloidin (2mg/mL)、Hoechst 33342 (1mg/mL) を使用した。

Gene name	Primer sequence (5'-3')	Primer sequence (3'-5')
COL2A1	AAT TCC TGG AGC CAA AGG AT	AGG ACC AGT TGC ACC TTG AG
RUNX-2	CTC TAC CAC CCC GCT GTC TT	CAC CTG CCT GGC TCT TCT TAC
MMP-13	CTT GAT GCC ATT ACC AGT C	GGT TGG GAA GTT CTG GCC A
ADAMTS-4	AGG CAC TGG GCT ACT ACT AT	GGG ATA GTG ACC ACA TTG TT
ADAMTS-5	TAT GAC AAG TGC GGA GTA TG	TTC AGG GCT AAA TAG GCA GT
ADAMTS-9	GGA CAA GCG AAG GAC ATC C	ATC CAT CCA TAA TGG CTT CC
G3PDH	CAT CAA GAA GGT GGTGAA GCA G	CGT CAA AGG TGG AGG AGT GG

表 1 RT-PCR および real-time PCR で使用したプライマー

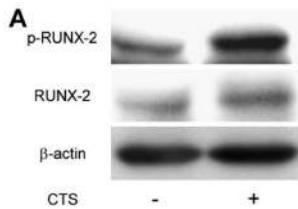
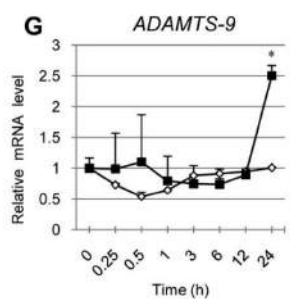
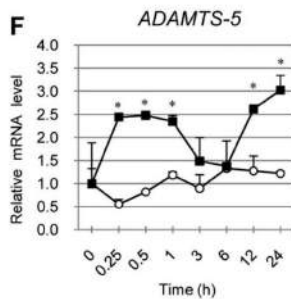
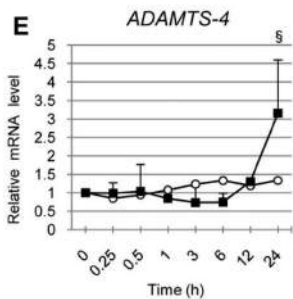
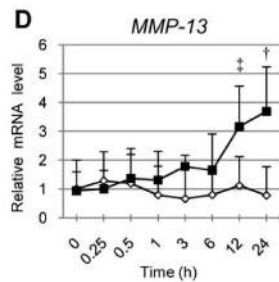
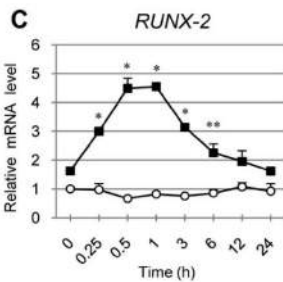
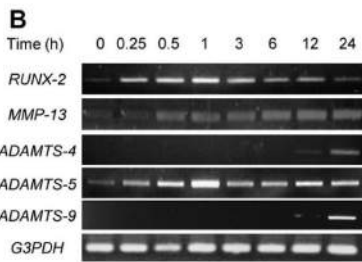


図2 CTS が RUNX-2、MMP-13、ADAMTS に与える影響。(A)CTS 後で RUNX-2 のリン酸化が起こった。(B, C)CTS 後に 15 分で RUNX-2 の発現が亢進した。(B, D, E, G)CTS24 時間後には MMP-13、ADAMTS-4、ADAMTS-9、の発現が亢進した。(B, F)ADAMTS-5 は二時性に発現が亢進した。  
\* $p < 0.0001$ , \*\* $p = 0.0001$ , †  $p = 0.0002$ , ‡  $p = 0.0009$ , §  $p = 0.0017$ , ○=CTS(-), ■=CTS(+)



**Western blot 法および MAPKs:** CTS 負荷 1 時間後に細胞を回収し SDS-PAGE (10 · g /lane)を行った。抗体は抗-p38、-p44/42、-JNK MAPK、-phospho-p38、-p44/42、-JNK MAPK 抗体を使用し、1:1000 (phospho-p38 は 1:2000)、4°C、over night で行った。二次抗体は horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse secondary antibody (1:10000)、anti-rabbit secondary antibody (1:10000)を使用した。Western blot の濃度解析には Image J software を使用した。また、5-50 · M の p38 抑制剤(SB203580)、p44/42 抑制剤(U0126)、JNK 抑制剤(JNK inhibitor II)を

導入しその効果を検討した。

**IL-4 treatment:** SW1353 をストレッチチャンバー上で培養後、hrIL-4 (10 ng/ml)を 24 時間添加した。その後、CTS を負荷し、IL-4 の影響について検討した。  
**in vivo:** ラット膝に対して ACL、MCL、MM を切除することで OA モデルを作製し、rrIL-4 (10, 50, and 100 ng/joint/day)を関節内注射した。その後、2、4、6 週で膝関節から組織を採取しサフラニン 0 染色を行った。軟骨破壊について modified Mankin score および Osteoarthritis Research Society International scoring system で評価した。

**統計解析:** 全ての検討は3回以上繰り返して、同様の結果が得られた。グループ間の解析は one-もしくは two-way ANOVA、Bonferroni post-hoc test を用い、平均 ± 95% 信頼区間で表している。統計的有意差は  $P < 0.05$  とした。

## 結果

### SW1353 cells lost their phenotypic type II collagen and aggrecan gene expression after 10% CTS.

まず、CTS が SW1353 の type II collagen と aggrecan 遺伝子発現に及ぼす影響について検討した。細胞形態については CTS の前後で変化は認めなかった (data not shown)。5% CTS では 15 時間 ( $p=0.462$ ) および 30 時間 ( $p=0.832$ ) の両方とも COL2A1 遺伝子発現に変化を認めなかったが、10% CTS では 15 時間 ( $p=0.0041$ ) まで徐々に発現量の低下し、30 時間後に ( $p=0.753$ ) 元のレベルまで回復した (図 1)。この結果より、10% CTS が SW1353 に対して異化的に働くものと考えた。

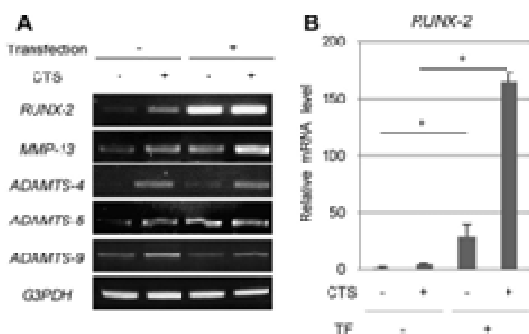
CTS stimulated MMP-13 and aggrecanase gene expressions in chondrocyte-like cells.

メカニカルストレスが SW1353 に及ぼす

影響について検討するために CTS を負荷した。RUNX-2 phosphorylation was detected at 15 minutes after CTS (図 2 A)。CTS により RUNX-2 mRNA は 1 時間後をピークとして約 4.5 倍に ( $p < 0.0001$ ) (図 2 B、C)、MMP-13、ADAMTS-4、9 は RUNX-2 より遅れて 24 時間後より約 3 倍に発現が亢進した (MMP-13;  $p=0.0002$ , ADAMTS-4;  $p=0.0017$ , ADAMTS-9;  $p < 0.0001$ ) (図 2 B、D、E、G)。ADAMTS-5 遺伝子発現は CTS 直後に亢進し ( $p < 0.0001$ )、3 時間後に減少 ( $p=0.0975$ )、24 時間後に再度亢進した ( $p < 0.0001$ ) (図 2 B、F)。

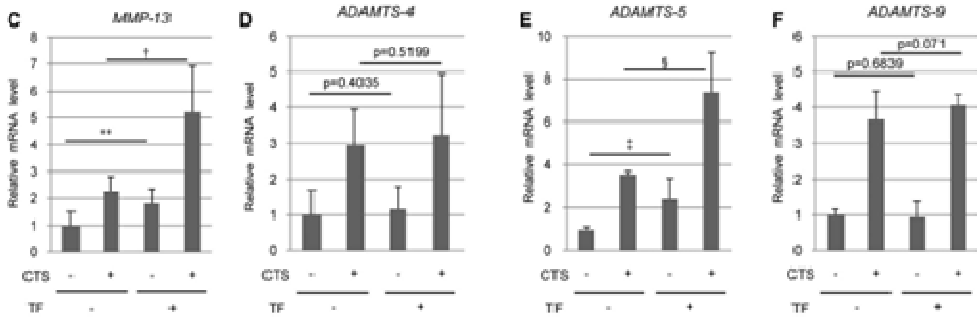
### MMP-13 and ADAMTS-5 gene expression was controlled by RUNX-2.

RUNX-2 の過剰発現が CTS 負荷時の遺伝子発現に及ぼす影響を検討した (図 3)。RUNX-2 の過剰発現により RUNX-2 遺伝子発現は著明に亢進した ( $p < 0.0001$ ) (図 3 A、B)。また、RUNX-2 の過剰発現により MMP-13、ADAMTS-5 遺伝子の発現が亢進した (MMP-13;  $p=0.0001$ , ADAMTS-5;  $p=0.0002$ ) (図 3 A、C、E)。一方、ADAMTS-4 ( $p=0.5199$ ) と ADAMTS-9 遺伝子発現 ( $p=0.071$ ) は RUNX-2 過剰発現で特に変化を認めなかった (図 3 A、D、F)。



**図 3 RUNX-2 過剰発現。CTS により RUNX-2、MMP-13、ADAMTS-4、-5、-9 遺伝子発現は亢進した。MMP-13(A,C)、ADAMTS-5 (A,E) 遺伝子発現は RUNX-2 の過剰発現にて亢進した。一方、ADAMTS-4、-9 遺伝子は変化なかった(A,D,F)**

**\* $p < 0.0001$ , \*\* $p = 0.0062$ , † $p = 0.0001$ , ‡ $p = 0.0103$ , § $p = 0.0002$**



**CTS-induced MMP-13 and ADAMTS-5 gene expression was inhibited by siRUNX-2.**

次に、RUNX-2 siRNAを導入した。RUNX-2 siRNAの導入によりRUNX-2遺伝子発現は90%抑制された(p<0.0001)(図4A)。また、RUNX-2 siRNAの導入によりMMP-13(p=0.003)とADAMTS-5遺伝子発現も著明に抑制された(p<0.0001)(図4B、C)。一方、ADAMTS-4(p=0.3918)とADAMTS-9

S-9遺伝子発現(p=0.781)はRUNX-2 siRNAの導入前後で変化は認められなかった(図4A、D、F)。CTS誘導性のMMP-13およびADAMTS-5遺伝子発現(p<0.0001)はRUNX-2 siRNA導入により抑制された(MMP-13, p=0.2949; ADAMTS-5, p=0.4065)(図4B、C)。また、免疫染色では、RUNX-2、MMP-13およびADAMTS-5の染色性はsiRUNX-2の導入で低下した(data not shown)。

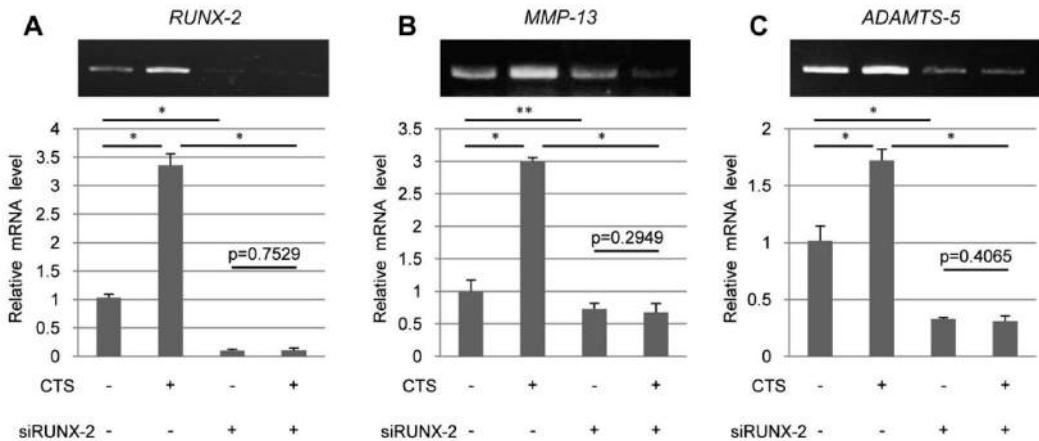


図4 sRUNX-2の導入。sRUNX-2の導入(A)によりMMP-13(B), ADAMTS-5(C)遺伝子発現は抑制された。CTS誘導性のMMP-13, ADAMTS-5発現はsRUNX-2の導入後は認められなかった(B, C)。\*p<0.0001, \*\*p=0.003

**Mechanical stretch increases the RUNX-2 and ADAMTS-5 expressions.**

SW1353においてCTSが細胞接着とストレスファイバー形成に及ぼす影響につい

て免疫染色で検討した。CTSによりストレスファイバーの染色性が増加した(図5, red signals)。しかしながら、ストレスファイバーの方向はストレッチの方向と

は一致しなかった。CTSにより RUNX-2は染色性が亢進し核に染まっていた(図5、RUNX-2、green signals)。一方、ADAMTS

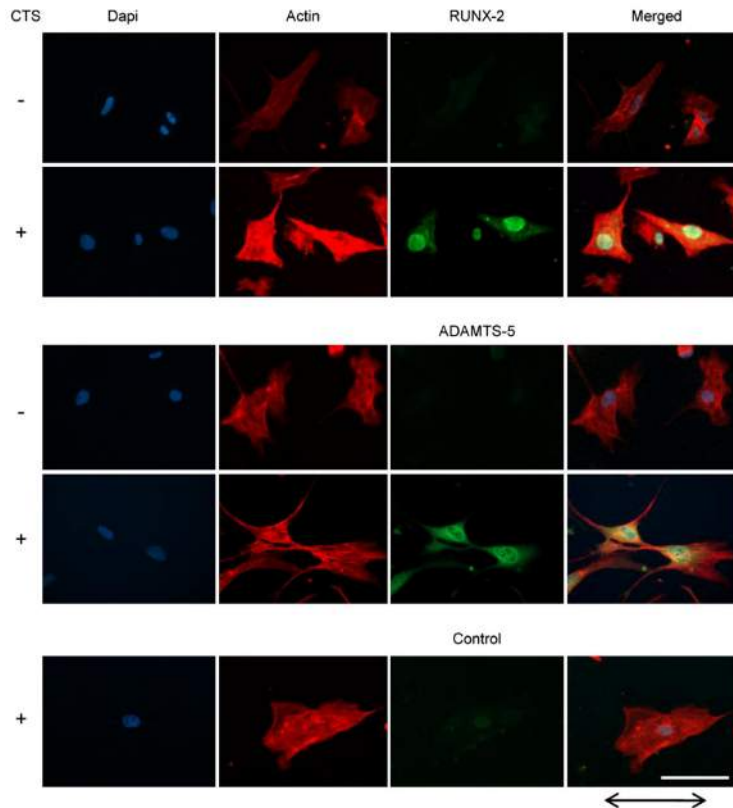


図5 CTSにより stress fiberが増加した(CTS, red signal), RUNX-2は核に、ADAMTS-5は細胞質に認められる。矢印, ストレッチの方向, Bar, 100  $\mu$  m

**CTS stimulated phosphorylation of MAPKs in SW1353 cells.**

RUNX-2の発現亢進メカニズムの解明のために、MAPKs (p38, p44/42, JNK) のリン酸化について検討した。CTSにより p38のリン酸化がCTSを負荷しないものと比較し6.2倍増加した( $p < 0.0001$ ) (図6 A上、B)。p44/42とJNKのリン酸化は増加しなかった( $p = 0.0741, 0.6616$ ) (図6 A、中、下、B)。この結果はCTSがp38を介した経路を活性化していることを示し

ている。MAPKs抑制剤の影響をreal-time PCRにて検討した。SB203580はCTS後のRUNX-2(図6 C、 $p < 0.0001$ )、MMP-13(図6 D、 $p < 0.0001$ )とADAMTS-5遺伝子発現(図6 E、 $p = 0.0152$ )を用量依存性に抑制した(図6 C、D)。一方、U0126とJNK inhibitor IIはRUNX-2、MMP-13およびADAMTS-5遺伝子発現に特に影響を及ぼさなかった(data not shown)。

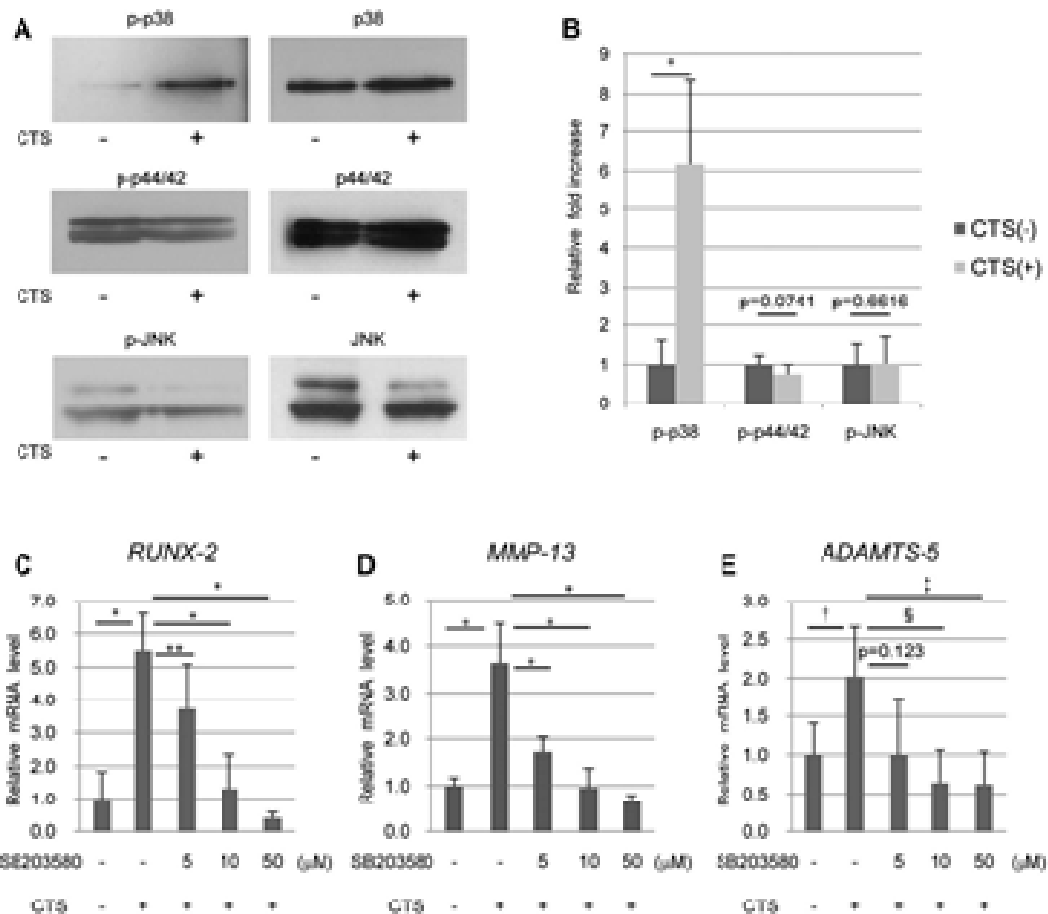


図 6 CTS 誘導性の RUNX-2, MMP-13, ADAMTS-5 発現は p38MAPK 経路を介している。(A, B)CTS 後 30 分で p38 のリン酸化は認められるが p44/42, JNK のリン酸化は認められなかった。RUNX2 (C), MMP-13 (D), ADAMTS-5 (E) は SB203580 により用量依存性に抑制された。

\* $p < 0.0001$ , \*\* $p = 0.0313$ , † $p = 0.0451$ , ‡ $p = 0.0152$ , § $p = 0.0174$

**IL-4 inhibit CTS-induced MMP and aggrecanase gene expressions.**

IL-4 treatment を行った後 CTS を負荷した。IL-4 treatment により CTS で亢進した MMP-13, ADAMTS-4, -5, -9 の発現は低下した (図 7)。また MMP-13, ADAMT

S を制御していると考えられる RUNX-2 についても同様に発現が抑制された。また、IL-4 treatment の効果を in vivo で確認するために組織学的検討を行った。IL-4 treatment により有意に Mankin score が低下した (図 7)。

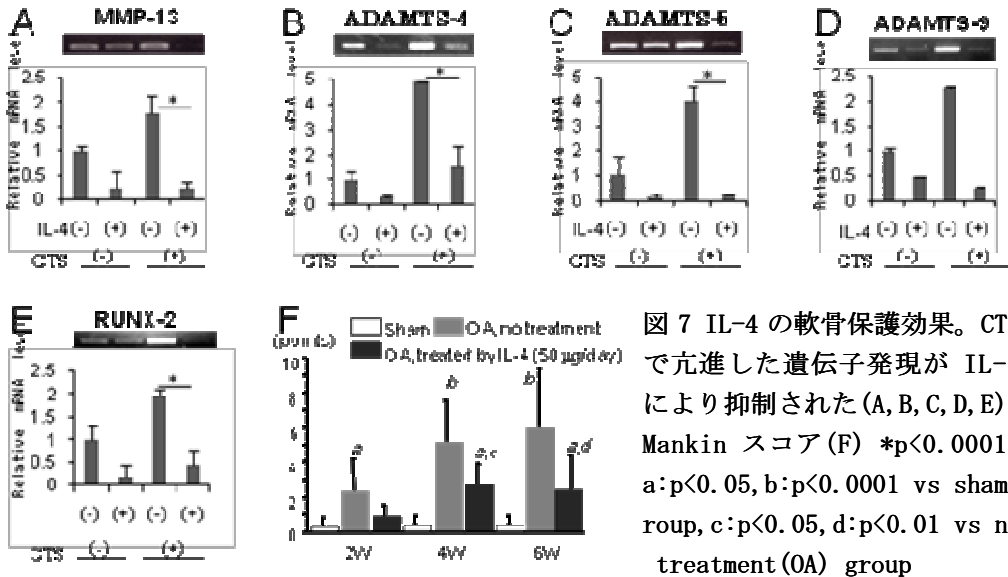


図 7 IL-4 の軟骨保護効果。CTS で亢進した遺伝子発現が IL-4 により抑制された (A, B, C, D, E) Mankin スコア (F) \* $p < 0.0001$ , a: $p < 0.05$ , b: $p < 0.0001$  vs sham group, c: $p < 0.05$ , d: $p < 0.01$  vs no treatment (OA) group

### 考察

軟骨細胞は圧迫刺激に対して蛋白レベルあるいは遺伝子レベルで良く反応する細胞である。日常生活において関節軟骨は 15%の圧迫刺激 (5%の伸張刺激) を受けている。弱い機械的刺激はプロテオグリカンや II 型コラーゲンの産生を促し、強い機械的刺激はマトリックスの産生を抑制し軟骨破壊をきたす。本研究において、II 型コラーゲン遺伝子の発現は 0.5 Hz、5%の CTS では抑制されなかったが、10%の CTS を負荷することで抑制された。このことは 10% CTS が SW1353 において異化的な刺激であることを示している (図 1)。

MMPs や ADAMTSs などが軟骨変性において重要な役割を演じており、ADAMTS の中でも ADAMTS-4、-5 は最も蛋白分解活性が高く、OA の病因に関与する主要なアグリカナーゼである。しかし現在のところ、MMP あるいは ADAMTS 抑制剤はその副作用

から OA 治療薬になりえていない。従って、OA の治療において、これらの酵素のより上流のメカニズムの解明が必要である。ADAMTS-4、-5 のプロモーター領域には RUNX-2 結合領域が存在する。このことは ADAMTS-4、-5 が RUNX-2 の下流にあり、そのターゲットとなりうることを示している。さらに RUNX-2 は MMP-13 のプロモーター領域も刺激し軟骨変性を来す。本研究では、RUNX-2 が機械的刺激誘導性の ADAMTS-5 および MMP-13 の調節因子であることを初めて示した。これは RUNX-2 がマトリックス変性におけるターゲットとなりうることを示している。

ADAMTS 遺伝子発現はそれぞれ異なった調節を受けている。例えば ADAMTS-4 は IL-1 $\cdot$ 、TNF $\cdot$ 、TGF- $\cdot$ などの炎症性サイトカインによってコントロールされている。我々はこれまでに ADAMTS-9 が IL-1 $\cdot$ あるいは TNF $\cdot$ に誘導されることを報告している [3]。本研究において、CTS の



24 時間後に ADAMTS-4、-9 遺伝子発現が亢進した (図 2)。しかしながら、ADAMTS-4、-9 遺伝子発現は RUNX-2 の直接的な影響は受けていなかった。ADAMTS-4、-9 遺伝子発現は機械的刺激により誘導されている可能性もあるが、RUNX-2 とは別の因子、例えば CTS 誘導性の IL-1 等の影響を受けている可能性もある。一方、ADAMTS-5 活性がどのようにコントロールされているかはいまだ解明されていない。c-fos、c-jun などの転写因子は刺激後 1 時間で増加するとの報告があるが、炎症性サイトカインの ADAMTS-5 に対する影響については議論の余地がある。本研究では CTS 後に ADAMTS-5 は二峰性に発現が亢進した。CTS 後 1 時間での発現亢進は機械的刺激誘導性の RUNX-2 経路を介しており、24 時間後に亢進した発現は炎症性サイトカインによる影響がある可能性があると考えられるが、これについては今後の課題である。

また IL-4 の軟骨保護効果については、IL-4 treatment により有意に Mankin score の低下を認めた。IL-4 の添加で CTS で亢進した RUNX-2、MMP-13、ADAMTS いずれの発現も抑制されたことより、IL-4 が RUNX-2 あるいは従来から考えられているように IL-1 に作用することで軟骨保護的に働く可能性が示唆された。今後のさらなる検討により OA 治療への応用も考えられる可能性が示唆された。

MAPK が MMP-13 および ADAMTS-5 に及ぼす影響についても検討した。SW1353 において、CTS 後に p38 のリン酸化が起り、また、SB203580 は用量依存性に RUNX-2、MMP-13、ADAMTS-5 遺伝子発現を抑制した。このことより RUNX-2 誘導性の MMP-13、A

DAMTS-5 遺伝子発現は p38 が中心的な役割を演じていることが分かった。ヒト軟骨細胞において IL-1・誘導性の MMP-13 遺伝子発現は p38 を介しているとの過去の報告は我々の結果を支持するものと考えられる。

本研究により、軟骨細胞様細胞である SW1353 において異化的な機械的刺激が誘導する MMP-13、ADAMTS-5 は RUNX-2 により調節されており、また p38 MAPK 経路が関与していることが分かった。

1. Naruse K, Yamada T, Sokabe M. Involvement of SA channels in orienting response of cultured endothelial cells to cyclic stretch. *Am J Physiol* 1998; 274: H1532-1538.
2. Furumatsu T, Shukunami C, Amemiya-Kudo M, Shimano H, Ozaki T. Scleraxis and E47 cooperatively regulate the Sox9-dependent transcription. *Int J Biochem Cell Biol*; 42: 148-156.
3. Demircan K, Hirohata S, Nishida K, Hatipoglu OF, Oohashi T, Yonezawa T, et al. ADAMTS-9 is synergistically induced by interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha in OUMS-27 chondrosarcoma cells and in human chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 1451-1460.