

主論文の要旨

**Metabolic reprogramming in chondrocytes to
promote mitochondrial respiration reduces
downstream features of osteoarthritis**

軟骨細胞の代謝変化において、ミトコンドリア呼吸の
活性化は変形性関節症の進行を抑制する

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
運動・形態外科学講座 整形外科学分野

(指導：今釜 史郎 教授)

大橋 禎史

【緒言】

変形性関節症(OA)は高齢化社会である本邦において最も一般的な関節障害であり、今後も患者数が増加することが予想される。関節軟骨は再生能が低く、軟骨障害は不可逆な経過を辿るため、治療は抗炎症薬などの対症療法と、人工関節置換術などの手術治療が中心であるが、現在のところ、進行予防するための有効な治療法は無い。我々の先行研究において、OAモデル軟骨細胞は、嫌気性解糖系が亢進されており、同時に好気性解糖系が抑制されている状態であることを報告した。また、嫌気性解糖系阻害剤である 2-deoxyglucose(2DG)により、この代謝変化を阻害することで、軟骨保護作用が得られることも明らかになった(Terabe et al. J Biol Chem 2019)。しかしながら、この代謝変化における機序は不明な部分が多く、全容解明には至っていない。

本研究は、細胞培養液中のグルコースをガラクトースに置換し、好気性解糖系を亢進させた。ガラクトースは多くの食物に含まれている単糖であり、体内に入ると Leloir 経路を経て解糖系に合流するが、その代謝速度は遅いため、嫌気性解糖系のみでは細胞エネルギー需要を満たせず、代償的に好気性解糖系が亢進するとされている。本研究の目的は OA モデル軟骨細胞の代謝変化における好気性解糖系に注目し、その代謝機序について検討することである。

【対象および方法】

ウシ、もしくはヒト関節軟骨より単離した初代軟骨細胞を使用した。IL1 β により刺激された軟骨細胞を OA モデル軟骨細胞と定義した。また、グルコース培養軟骨細胞をコントロールと定義した。軟骨細胞をグルコース、ガラクトース培養液、それぞれの培養液に IL1 β を加えた条件で、24 時間培養した。細胞内代謝は Seahorse Flux analyzer(Agilent 社製)を用い、嫌気性解糖系、好気性解糖系の状態を評価した。ミトコンドリアの状態を評価するために、正常な膜電位を持つミトコンドリアを Tetramethylrhodamine(TMRM)、全てのミトコンドリアを Mito Tracker Green FM(Mito Green)で染色し、蛍光顕微鏡にて観察した。それぞれの吸光度を定量後に TMRM/Mito Green ratio を算出した。活性酸素(ROS)は Dichlorofluorescein diacetate(DCFDA)を用い、蛍光顕微鏡にて観察、吸光度の定量を行った。一酸化窒素(NO)は Griess reagents を用い、吸光度の定量を行った。matrix metalloproteinase13(MMP13), inducible nitric oxide synthase(iNOS)の mRNA 発現量は real-time RT-PCR 法により、測定した。MMP13, phospho-AMP-activated protein kinase(pAMPK), total-AMP-activated protein kinase(tAMPK), peroxisome proliferators-activated receptor- γ co-activator-1 α (PGC1 α)のタンパク発現量は Western Blotting 法により、定量した。軟骨切片は Safranin O/Fast Green 染色により、観察された。軟骨切片から培養液内に漏出したプロテオグリカン Dimethylmethylene Blue(DMMB)アッセイによって測定された。

【結果】

ガラクトース培養により、コントロールと比較し、嫌気性解糖系の抑制、好気性解

糖系の亢進を認め、IL1 β による代謝変化の抑制を認めた(図1)。IL1 β により、コントロールと比較し、TMRM/Mito Green ratioの低下を認め、ガラクトース培養にて、その傾向の抑制を認めた(図2)。IL1 β により、コントロールと比較し、iNOSのmRNA発現、NO、ROSの産生が亢進を認め、ガラクトース培養にて、その傾向の抑制を認めた(図3)。IL1 β によるMMP13の発現亢進、軟骨切片におけるSafranin O染色の脱落、DMMBアッセイにて、軟骨切片からのプロテオグリカン漏出の亢進らの傾向はガラクトース培養により、抑制された(図4)。ヒト軟骨において、ガラクトース培養により、IL1 β によるMMP13の発現が抑制された。また、IL1 β により、pAMPKとPGC1 α の発現が抑制され、ガラクトースにより発現が亢進した(図5)。

【考察】

以前の研究においてヒアルロン酸産生を亢進させるHyaluronic acid synthase2-over expression (HAS2-OE) (Ishizuka et. al. J Biol Chem 2019)と、ヒアルロン酸産生阻害剤である4-methylumbelliferone (4MU) (Ishizuka et. al. J Biol Chem 2016)に軟骨保護作用があることを報告した。これらはヒアルロン酸に対して相反する作用を持つが、細胞内のUDP-sugar poolを減少しているという点で共通しており、ヒアルロン酸産生量以外の機序が関与するのではないかという仮説を立てた。

この仮説に注目した先行研究にてOAモデル軟骨細胞の代謝変化が明らかになると共に、HAS2-OE、4MUは共通して、この代謝変化を阻害しながら軟骨保護作用を示していることが分かった。また、2DGによってOAによる代謝変化を直接的に阻害することで、前述と同様の実験結果を再現することができ、OAの病態において、細胞内代謝が重要であると考えられたが、その詳細な機序の解明には至らなかった。

本研究はガラクトース培養を利用してOA代謝の機序について検討した。ガラクトース培養による嫌気性解糖系の抑制、好気性解糖系の亢進は先行研究と同様にOAによる代謝変化を抑制し、軟骨保護作用を示した(図1、4)。

また、本研究では新たに好気性解糖系をミトコンドリアの膜電位、障害マーカー、活動性に関連する遺伝子の評価をすることにより、詳細を検討した。その結果、OAモデル軟骨細胞はミトコンドリアの障害を起こしていること、軟骨保護時には同時にミトコンドリア機能も保護されていることが明らかになった(図2、3、5)。先行研究で用いられた2DGに対しても同様の実験系(資料未記載)が行われ、ほぼ同様の傾向を得たことから、OAの進行予防において、好気性解糖系の経路の一部であるミトコンドリアの機能の維持が重要であることが示唆された。

この研究のLimitationとして細胞内代謝のデータに対して標準化がされていないことが挙げられる。この実験系ではデータを細胞数により標準化することが推奨されているが、本実験での培養条件は軟骨細胞において細胞数に大きな影響を与えないことが予備実験で明らかになっており、行われていない。また、本研究はin vitro実験系のみでしか検討されておらず、今後の研究の発展のためにはin vivo実験系の計画が必須である。

【結論】

初代軟骨細胞において、ガラクトース培養によって、OA による代謝変化の抑制と共に軟骨保護作用を認めた。OA の代謝変化において好気性解糖系の経路の一部であるミトコンドリアの機能の維持は重要である。