

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

再発性多発軟骨炎の診断と治療体系の確立
—再発性多発軟骨炎の病因病態解明に向けた基礎的解析—

研究分担者 遊道 和雄 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター

研究要旨： 再発性多発軟骨炎 (relapsing polychondritis、以下 RP) は、原因不明で稀な難治性疾患である。本邦における疫学情報や病態研究は不十分であり、診断・治療法の確立のため RP の病因病態解明を進める必要がある。本年度は、本疾患の進行、すなわち軟骨炎 (軟骨組織の炎症細胞浸潤・破壊) の病因病態解明および新規治療法開発の糸口を探求するため、軟骨細胞のストレス応答や防御機構、軟骨変性の機序を行なったので報告する。

A.研究目的

i) 研究の背景

再発性多発軟骨炎 (relapsing polychondritis、以下 RP) は、原因不明で稀な難治性疾患である。本邦における疫学情報や病態研究は不十分であり、かつ診断・治療のための指針が作成されていない。その為、認知度が低く診断が見過ごされているケースも多く、気道軟骨病変などの臓器病変を伴う患者の予後は極めて不良であり、診断、治療法の確立が急務である。

我々は平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業[課題名:再発性多発軟骨炎の診断と治療体系の確立]において、RP に対する患者実態・疫学調査(RP 239 症例)を行ない、本邦の患者実態(有病率、初発年齢、性差、臨床像、予後)に加えて、ステロイド剤や免疫抑制剤、生物学的製剤の治療薬の効果に関して新たな知見を得た。しかしながら、本症に対する薬物療法の有効性については未だ不明な点も多く、既に軟骨炎が進行し、変性破壊が進んでしまった軟骨組織病変については、薬物療法で進行を抑制することはできても、その組織そのものの機能を維持または再建することは困難と言わざるを得ない。

特に軟骨組織は、無血管・無神経分布の自己修復能のない組織であり、発生学的にも組織学的にも細胞外マトリックスが組織体積比 90% (細胞成分 10%) を占め、かつ高度に分化した硬組織であるが、軟骨組織の炎症発生の病因・病態、軟骨細胞応答能や防御機構、

軟骨変性のメカニズムについては未だ不明な点が多い。

ii) 本年度研究の目的

本年度研究の目的は、再発性多発軟骨炎における進行性の軟骨炎の病因病態解明に向けて、軟骨の炎症・変性発生機序の解明を目指し、様々な外因性ストレスに対する軟骨細胞応答能や防御機構および軟骨変性のメカニズムを in vitro で解析することである。

iii) 期待される研究成果

本研究は、RP 発症と密接に関わる外因性ストレスに対する軟骨細胞の応答機構、特に未だ解明されていない外因性ストレスに対する軟骨防護機構としての細胞内ストレス応答因子の生物学的重要性 (軟骨変性との関連) について解明を試みる初めての基礎的研究である。本研究を通じて、関節軟骨変性の発生機序を軟骨細胞 DNA 損傷修復酵素の変化の観点から詳解し、新規の RP 病因・病態解析および治療法開発研究の糸口が得られた。

iv) 研究期間内の達成点と今後の課題

「防御機構としての軟骨細胞ストレス応答の調節機構」と「細胞ストレス応答調節機構の変化・破綻がもたらす軟骨変性における意義」を検討した。

具体的には、軟骨異化因子 (炎症) に応答する軟骨細胞 DNA 損傷修復酵素(Ogg1, Apex2)発現・活性の細

胞内情報伝達路を解析し、ストレス応答の調節機構・防御機構としての役割を検証した。

さらに現在、DNA 修復酵素群の調節機構の変化・破綻が軟骨変性の誘因となるか否かを解析中である。

B. 研究の概要

本研究の着想点・仮説： 最近、細胞のストレス応答機構として DNA 損傷に対する修復酵素の重要性が指摘されている。我々は、炎症や酸化ストレス等に応答して軟骨細胞内の DNA 修復酵素の発現や活性は変化し、軟骨細胞内の防御機構として関節軟骨の恒常性維持に働くが、外因性ストレスに抗しきれなくなって機能が低下すると軟骨細胞活性の低下や細胞死、炎症等を惹起し、RP においても軟骨変性や軟骨炎の発症・増悪に関連するのではないかと考えている。

本年度の研究成果

DNA 損傷修復酵素に関する知見：

我々は本研究において、DNA 損傷修復酵素 Ogg1 の発現度は軟骨組織の変性度と相関して低下していること、変性軟骨部の細胞にはグアニン酸化体（8-oxoguanine）が高発現することを見出した（国際変形性関節症学会 OARSI2013 発表、OARSI2014 発表予定、論文投稿中）。

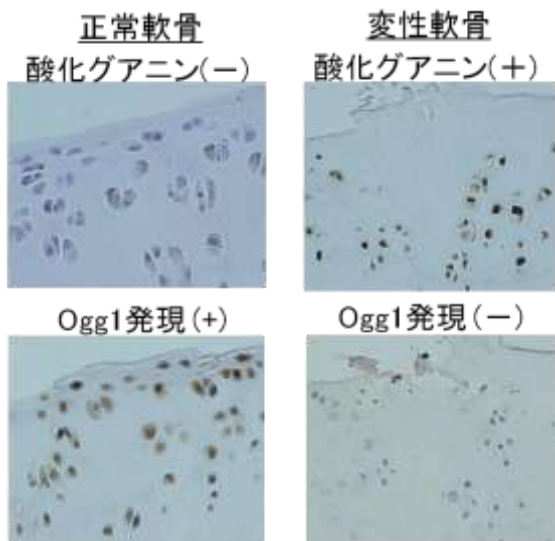


図 1. 変性軟骨組織に発現する DNA 修復酵素 (Ogg1)
(自著投稿論文図表より改変)

図 1 にみるように、軟骨変性部においては DNA 酸化損傷の結果としてグアニン酸化体が高発現しており、これに相反して DNA 損傷修復酵素 Ogg1 活性は低下していた。この研究結果から、変性部の軟骨細胞では DNA 損傷が蓄積して細胞死や軟骨組織の恒常性低下がみられ、ひいては軟骨変性につながっていくことが示唆された。現在、Ogg1 発現動態の変化と RP の軟骨炎発症のメカニズムとの関連を検討している。

さらに本研究において、軟骨変性・異化の誘導因子に応答した DNA 修復酵素 AP エンドヌクレアーゼ (Apex2) の発現が、正常軟骨細胞ではみられず、変性軟骨組織における軟骨細胞のみにおいて上昇していることを新たに見出した（投稿準備中）。

C. 考察

1) 疾患における軟骨変性・炎症発症機序について

国内外における多くの精力的研究から、軟骨の発症は加齢・老化に伴う軟骨基質マトリックスの組成変化に加えて、炎症等のケミカルストレス、肥満や荷重等のメカニカルストレスと、それに伴い誘導される酸化ストレス（活性酸素種）の蓄積が関与し、軟骨細胞 DNA 損傷および軟骨基質の変性を引き起こすとされ、酸化ストレスと関節軟骨変性の発症・進行は密接な関連を持つことが明らかとされてきた。

そこで我々は、軟骨病変の主要因と考えられる軟骨組織への炎症を含む様々なストレスによって生じる軟骨組織における過剰なフリーラジカル産生と、軟骨細胞 DNA 酸化損傷および軟骨変性との関連について一連の研究を進め、軟骨変性の発生機序を軟骨細胞の DNA 酸化損傷の観点から解明中である。

2) DNA 修復酵素(Ogg1, Apex2)について

遺伝情報を担う DNA を構成する塩基（アデニン、グアニン、シトシン、チミン）は、シャルガフの法則からアデニンはチミン、グアニンはシトシンとしか水素結合せず、DNA 鎖は互いに逆向きに二重らせんとなる。しかし、活性酸素種により生じる DNA 損傷のなかで、グアニンの酸化体である 8-oxoguanine は DNA 複製の際にシトシンと同程度の効率でアデニンと結合する point mutation を引き起こし、これが発症をはじめ様々な疾患の病因の一つと考えられている。この DNA 酸

化損傷に対する防御機構として、DNA 修復酵素 Ogg1 や Apex2 の重要性が指摘されている。

近年、DNA 塩基グアニン酸化体を修復する DNA 損傷修復酵素 Ogg1 や Apex2 については、筋萎縮性側索硬化症やアルツハイマー病の神経細胞で発現の低下が報告され、神経変性疾患の病因・病態との関連が示唆されている(Kikuchi H et al., Acta Neuropathol. 2002, 408-414)。さらに、神経以外の組織の変性疾患における当該因子の病態への関与も研究が進められている。

こうした神経変性疾患における知見ならびに、変性軟骨組織における細胞応答関連遺伝子・蛋白に関する我々の本研究成果は、RP の病因病態の解明の一助となり、診断と治療法の向上に役立つものとする。

結語

RP において軟骨組織は再発・多発性に変性破壊されていく。軟骨組織は無血管で、かつ自己治癒能に乏しいことから、ADL 障害に対して QOL を維持するためには、予防とともに早期の比較的小範囲・軽度変性の段階から病変を治療して増悪させないような、発症早期～中期に対応した新しい治療法の確立が求められている。しかし、軟骨変性を早期から抑制し、保護する有効な医薬品は未だない。

我々は、未だ病因が明らかでない RP における軟骨炎、軟骨変性の発生機序の解明を目指し、変性軟骨組織由来の軟骨細胞を用いて *in vitro* 解析を行なった。その結果、我々は変性軟骨ではグアニン酸化体を始めとする核酸の酸化損傷の蓄積と、これに対する防御因子 DNA 修復酵素 Ogg1, APEX2 の発現変動を見だし、軟骨変性の病因・病態に軟骨細胞の核酸酸化損傷と、その防御機構の異常が関与する可能性を初めて明らかにした。

この核酸修復酵素に関する研究成果を基に、今後以下以下の RP 病因病態の解明に向けた研究を行なう。

(1) 軟骨細胞における RP 関連因子(炎症性サイトカイン)に反応する核酸修復酵素の活性調節機構を解析する。

(2) RP 関連因子に反応する核酸修復酵素活性の変動と軟骨変性との関連を解明し、さらに治療ターゲットを探索する。

文献

1. Yudoh K., et al. Potential involvement of mitochondrial DNA repair enzyme, 8-oxoguanine DNA glycosylase (Ogg1), in the degeneration of articular cartilage in osteoarthritis (OA): Ogg1 protects against the catabolic stress-induced downregulation of chondrocyte activity and the apoptosis in OA (submitted).
2. Yui N., Karasawa R., Yudoh K. DNA repair enzyme, apurinic/apyrimidinic endonuclease 2 (APEX2), has a potential to protect against the down-regulation of chondrocyte activity in osteoarthritis (preparing).