

## 研究課題

変形性関節症保護効果のある機能性食品の探索とその効果

代表研究者: 広島大学病院 未来医療センター 講師 味八木 茂

共同研究者: 広島大学大学院教育学研究科 准教授 松原 主典

## まとめ

変形性関節症(OA)は、根本的な治療薬がなく、その予防が重要である。我々は、軟骨でヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)が恒常的に発現することがOAを緩和させることを示したことから、HO-1を誘導する機能性食品成分を調べた。その結果、いくつかの食品成分が、細胞レベルでHO-1を誘導し、軟骨保護効果を示した。また、この食品成分を摂取することによりマウスモデルにおけるOA進行を抑制できる可能性を示唆した。

## 1. 研究の目的

運動器疾患は、生活の質を著しく低下させるものであり、要介護・支援の原因1位である。中でも、変形性関節症(OA)は、加齢などに伴い多くの人が罹患する世界的な疾患であり、我が国においても2000万人いるとされているが、OAに対する治療は、痛みなどに対する対処療法、最終的には人工関節への置換治療であり、発症・進行を抑制する薬剤等の方法はない。申請者は、これまでmicroRNA、オートファジー活性、抗酸化作用のあるヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)などがOAの発症・進行の抑制に重要な役割をもつことを明らかにした。この結果より、副作用なく日常的にこれら因子を誘導することで関節組織の恒常性を維持させる方法として、機能性食品成分に注目した。本研究は、1)軟骨細胞と滑膜細胞にオートファジーや抗酸化酵素を誘導する新規食品機能成分を探索し、関節の恒常性維持に効果的であるかを遺伝子およびタンパク質の発現解析により明らかにする。2)経口投与による関節組織でのオートファジーや抗酸化酵素の誘導効果および早期にOAを発症する老化促進マウス(SAMP8)でのOA発症抑制効果を病理組織学的に明らかにすることを目的とする。以上の結果より、科学的な証拠に基づいたOAの発症・進行を抑制するサプリメントの開発を目指す。

## 2. 研究の方法・経過

野生型マウスにおいて抗酸化酵素HO-1は、加齢とともに軟骨や半月板においてその発現が減少し、12ヶ月齢から22ヶ月齢にかけてその発現はほとんど消失していた。HO-1の転写抑制因子であるBach1のノックアウト(KO)マウス軟骨を用いたマイクロアレの結果、1ヶ月齢のBach1 KOマウスの関節軟骨細胞では、野生型マウスに比べてHO-1の発現が3.6倍増

加しており、Bach1 KO マウスで増加している遺伝子群の上位 10 位に含まれていた。そして、22 ヶ月齢の老齢マウスにおいて、Bach1 KO マウスは野生型マウスに比べて関節軟骨での HO-1 の発現やオートファジー活性を保っていた。22 ヶ月齢老化マウスの膝関節組織評価により、Bach1 KO マウスは野生型マウスに比べて有意に軟骨破壊・変性、半月板の変性、滑膜増生、軟骨下骨の変性などを抑制し、OA 進行を抑制していた。また、靭帯切除による OA 誘導モデルも同様に靭帯切除 8 週後において野生型マウスに比べて Bach1 KO マウスでは OA の進行を有意に抑制した(現在投稿中)。以上のことから、HO-1 を誘導するような機能性食品成分に注目した。

## 2-1. 新規食品機能成分の探索とヒト軟骨細胞及び滑膜細胞での OA 抑制作用機構の解明

### 1) 新規機能性食品成分のスクリーニング

食品機能成分を添加した培養ヒト軟骨細胞及び滑膜細胞を用いてウェスタンブロットおよびリアルタイム PCR によりオートファジーの活性化および HO-1 の発現誘導作用を検討した。また、機能性食品成分による軟骨細胞における miR-140 の発現誘導作用をリアルタイム PCR により解析した。

### 2) 機能性食品成分により発現変化する miRNA の同定

機能性食品成分未処理および処理群のマウス培養関節軟骨細胞より RNA を精製し、miRNA の網羅的発現解析を nCounter システムにより解析した。

### 3) 抗炎症作用および軟骨関連遺伝子発現の解析

IL-1 $\beta$  刺激下における培養軟骨・滑膜細胞での機能性食品成分による抗炎症作用を検討するために炎症性サイトカインと軟骨基質分解酵素関連の遺伝子発現をリアルタイム PCR および培養上清中のタンパク質濃度を ELISA 法により解析した。

### 4) ex vivo 培養系を用いた機能性食品成分による軟骨基質分解抑制効果の検討

マウスの大腿骨頭より軟骨を採取し、IL-1 $\beta$  刺激下に機能性食品成分と培養し、培養液中に放出された軟骨基質を測定することで、機能性食品成分による軟骨基質の分解抑制効果を検討した。

## 2-2. OA 発症モデルマウスへの機能性食品成分経口投与による有効性の評価

上記1よりカルノシン酸、スルフォラファン、酒粕中に含まれている成分 A が、ヒト軟骨細胞及び滑膜細胞でオートファジーの活性化もしくは HO-1 の誘導作用が確認されたことから、これら成分に対して以下の解析を行った。

### 1) 経口摂取による関節組織でのオートファジー活性および HO-1 の誘導作用の検討

C57BL/6 マウスを用いて、機能性食品成分の経口摂取が関節軟骨など関節組織でのオートファジー活性や HO-1 を誘導するのか、そして OA 抑制に有効かどうかを免疫組織化学的手法により検討した。

## 2) 老化促進マウスへの経口投与による OA 抑制作用

機能性食品成分が OA 抑制効果を示すかどうかを明らかにするために、老化促進マウスとして知られている SAMP8 マウスを用いて膝関節組織をサフラニン O ファストグリーン染色により病理組織学的評価を行った。12ヶ月齢 SAMP8 マウスは、ほぼ全てのマウスで関節軟骨の破壊を伴う OA を自然発症することを確認している。この1ヶ月齢マウスに機能性食品成分を11ヶ月間飲料水に含ませることで経口投与し、12ヶ月齢で屠殺し OA 発症の抑制効果を組織学的に評価した。また、これらのサンプル回収時点の血清を採取し、BioPlex システムを用いて炎症性サイトカインを測定した。

## 3. 研究の成果

ハーブの一種であるローズマリーに含まれるカルノシン酸及びブロッコリースプラウトに多いスルフォラファンは、濃度依存的にヒト関節軟骨細胞および滑膜細胞において抗酸化酵素である HO-1 の発現を誘導した。オートファジー活性については顕著な誘導能は示さなかった。軟骨細胞においてカルノシン酸により発現が2倍以上誘導される miRNA を6種類、減少する miRNA 66種類を同定した。しかし、その中に軟骨の恒常性維持に重要な miR-140 の発現は含まれていなかった。カルノシン酸やスルフォラファンは、滑膜細胞および軟骨細胞において IL-1 $\beta$  による炎症性刺激に対して軟骨変性に重要な役割を持つ軟骨基質分解酵素である MMP3 や MMP13 の発現増加や炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  や IL-6 の発現を抑制した。また、関節軟骨組織を用いた *ex vivo* 実験では、カルノシン酸やスルフォラファンが軟骨基質の分解を抑制した。以上のことよりカルノシン酸やスルフォラファンは、抗炎症効果を有し、OA 予防に有効であることを示唆した。マウスでのこれら機能性食品成分の経口摂取は、膝関節軟骨細胞における HO-1 やオートファジー活性を有意に誘導するという結果は得られなかった。これは、検出方法の問題とともに、経口摂取によって関節軟骨細胞への機能性食品成分が到達し、作用していない可能性も考えられる。実際、カルノシン酸やスルフォラファンを11ヶ月間摂取した SAMP8 は、コントロールとほぼ同等に軟骨破壊を伴う重度な OA を発症し、有意な OA 抑制効果はみられなかった。しかし、カルノシン酸を摂取したマウスでは、行動学的な解析においては認知能力の低下を抑制し、肝臓組織の解析においては脂肪肝や線維化を抑制する傾向であり、OA 以外への予防効果を共同研究者である松原らにより進めている。さらに、酒粕中に含まれている機能成分 A を摂取した SAMP8 では、組織学的解析により

OA を抑制していることから、さらにマウス数を増やすとともに、摂取による関節軟骨組織への作用を明らかにするために現在解析を進めている。

#### 4. 今後の課題

本研究は、機能性食品成分の摂取による OA 抑制効果の可能性を示すことができた。しかし、機能性食品成分の摂取によるマウス個体レベルでの軟骨細胞における HO-1 の誘導および発現維持効果を本研究では明らかにすることができなかった。これは常に問題となることだが、血管が存在せずに、豊富な細胞外マトリックスに包まれた関節軟骨細胞で薬剤や機能性食品成分が作用し、有効性があることを示すことが必要である。今後は、HO-1 などが誘導されると蛍光もしくは発光するような遺伝子改変マウス(センサーマウス)を用いて、機能性食品成分の摂取により軟骨を含むどの組織でその発現が誘導されているのかを *in vivo* イメージングにより解析し、証明して行くことが重要となると考えられる。

#### 5. 研究結果の公表方法

現在上記内容で論文投稿を準備中であり、今年度中に国際誌へ投稿する予定である。

本研究の一部は第 14 回日本抗加齢医学会総会(2014 年 6 月 6-8 日、大阪国際会議場)で「カルノシン酸による変形性関節症の予防効果の検討」という演題で発表した。