

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H06263

研究課題名(和文)変形性関節症の治療標的を目指した軟骨細胞メカノトランスダクション機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of chondrocyte mechanotransduction for the therapeutic target of osteoarthritis

研究代表者

小川 寛恭(Ogawa, Hiroyasu)

岐阜大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：70464104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、運動刺激による新たなMMP13発現制御メカニズムを明らかにした。また、この運動刺激シグナルが軟骨変性を引き起こすサイトカインシグナルともPLGC1をクロストークポイントとしていることを明らかにした。MMP13の新たな制御メカニズムを明らかにしたことに加えて、ドラッグスクリーニングでサイトカインおよび運動刺激によるMMP13発現を抑制する低分子化合物を多数発見した。今回、サイトカインの新たなシグナル経路と複数のMMP13を抑制する低分子化合物の発見により病態修飾性変形性関節症治療薬の実現に近づいたと言える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、運動刺激による新たなMMP13発現制御メカニズムを明らかにした。また、この運動刺激シグナルが軟骨変性を引き起こすサイトカインシグナルともPLGC1をクロストークポイントとしていることを明らかにした。MMP13の新たな制御メカニズムを明らかにしたことに加えて、ドラッグスクリーニングでサイトカインおよび運動刺激によるMMP13発現を抑制する低分子化合物を多数発見した。今回、サイトカインの新たなシグナル経路と複数のMMP13を抑制する低分子化合物の発見により病態修飾性変形性関節症治療薬の実現に近づいたと言える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we clarified a novel mechanism of MMP13 expression control by mechanical stimulation. In addition, it was clarified that the signaling pathway of this mechanical stimulation employs PLGC1 as a crosstalk point with the cytokine signal that causes cartilage degeneration. In addition to clarifying the new regulatory mechanism of MMP13, we found many small molecules that suppress the expression of MMP13 by cytokine and mechanical stimulation in drug screening. It can be said that the discovery of a low-molecular compound that suppresses signaling pathways of cytokines and multiple MMP13 has brought us closer to the realization of a disease-modifying osteoarthritis therapeutic drug.

研究分野：整形外科学

キーワード：変形性関節症 軟骨代謝 運動刺激 病態修飾性変形性関節症治療薬 マトリックスメタロプロテアーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症の病態は、靭帯/軟骨外傷や肥満等によって関節軟骨に繰り返し加わる過剰な力学的ストレスによる軟骨変性であるが、分子レベルでは軟骨細胞による軟骨保護/増加作用と軟骨変性作用の均衡の破綻と言える。変性軟骨は軟骨細胞外マトリックスであるアグリカン、2型コラーゲン、ルプリシン等の産生低下や細胞外マトリックス分解酵素(MMPs/ADAMTSs)の産生増加によって特徴付けられることから、変形性関節症の治療薬(法)の開発のためには軟骨細胞による軟骨保護/増加作用と軟骨変性作用の均衡の制御機構を知ることが必要不可欠である。過去に変形性関節症に対する MMPs/ADAMTSs 阻害剤の開発が試みられたが副作用の問題等により臨床応用には至っていない。一方、非薬物治療である運動療法の臨床的有効性は数多く報告されている。適度な運動は健常成人において軟骨保護作用を示すだけでなく、変形性関節症患者においても疼痛抑制効果や運動機能改善効果が確認されていて、In vitro 実験においては、運動刺激による細胞外マトリックス合成促進効果も報告されている。これらの事実から、軟骨細胞における運動療法/運動刺激によるシグナル伝達経路は明らかにされていないものの、それらのシグナル伝達経路には軟骨保護・増加作用を発揮するシグナル分子が含まれ、これらのシグナル分子を物理的・薬理的に制御することで変形性関節症を治療できる可能性がある。そのためには運動刺激による軟骨代謝制御シグナル伝達経路を明らかにし、MMPs/ADAMTSs の発現抑制作用と同時に細胞外マトリックス産生増加作用を発揮して変形性関節症の病態を根本的に改善しうる分子標的を同定する必要がある。

2. 研究の目的

軟骨組織は運動器の中心となる関節の円滑な運動を可能にする一方、軟骨代謝は運動刺激によって制御されている。変形性関節症に対する運動療法/運動刺激の有効性が確認されていることから、運動刺激による軟骨代謝制御シグナル経路には、変形性関節症治療の分子標的が含まれると推察される。本研究では、細胞外 ATP の分解産物である細胞外 adenosine のシグナル伝達経路に着目し、運動刺激がどのようなシグナル伝達経路を介して軟骨代謝を制御しているかを幅広く明らかにし、軟骨代謝制御における中心的なシグナル分子を可能な限り数多く同定する。それにより軟骨変性抑制作用及び軟骨組織増加作用を同時に発揮する変形性関節症の治療標的となるシグナル分子を決定し、最も有効な変形性関節症新規治療薬(法)の開発を目指す。

3. 研究の方法

- 細胞実験：軟骨細胞 cell line SW1353、マウス初代関節軟骨細胞を使用。
- 運動刺激：シェアーカー上で細胞培養を行い培養細胞に fluid flow shear stress (FFSS) を与える。
- 試薬：IL-1b、TNF-a、各種 agonist、antagonist、siRNA を使用。
- プロテオーム解析：isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ) method, a chemical label detected by mass spectrometry、Ingenuity Pathway Analysis (IPA)
- 低分子化合物 high throughput screening: 3,399 種低分子化合物ライブラリー (Validated Compounds Library provided by Drug Discovery Initiative, The University of Tokyo)、MMP13 発現に伴い GFP を発現する軟骨細胞株 (SW1353-pMMP13-GFP) の作成
- 免疫染色
- マウス外傷性変形性関節症モデル：半月板靭帯切除による変形性関節症モデル

4. 研究成果

本研究では、運動刺激は軟骨細胞において細胞外 adenosine シグナル経路を介して MMP13 の発現を制御していること明らかにした。軟骨細胞に運動刺激を与えると

MMP13 の発現が上昇するが、運動刺激によって細胞外 ATP が増加し、その細胞外 ATP がその分解酵素によって adenosine に分解され、この細胞外 adenosine が MMP13 発現を促進していることを明らかにした。細胞外 adenosine 受容体である A2B 受容体は G タンパク質(Gq)結合受容体であることから PI3K/Ca⁺⁺/Calmodulin/PKC シグナル経路を活性化すると推測され、現在、カルシウムシグナルに焦点を絞り研究を継続している。一方、炎症性サイトカインも同様にカルシウムシグナル活性化を介して MMP13 を発現する。我々は、運動刺激及びサイトカインによる MMP13 発現上昇に共通したシグナル経路を明らかにするためにドラッグライブラリーを使用したハイスループットスクリーニングでサイトカイン誘発性 MMP13 発現を抑制する低分子化合物を同定した。このような化合物は、運動刺激 FFSS による MMP13 発現の上昇も抑制することから、サイトカイン誘発性 MMP13 と運動刺激による MMP13 発現上昇を引き起こすシグナル経路はクロストークしていることが強く示唆された。また、同定した化合物の中でも痛風治療薬コルヒチンに着目し、コルヒチンによる MMP13 発現抑制メカニズムを解明した。コルヒチンは微小管に結合する化合物であることからサイトカイン(IL-1b,TNF-a)の新しい MMP13 発現を制御する新しいシグナル経路を明らかにした。さらに、コルヒチンを外傷性変形性関節症マウスモデルに経口投与すると軟骨変性を抑制したことから、コルヒチンは変形性関節症治療薬の候補となり得ることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ogawa H, Matsumoto K, Akiyama H.	4. 巻 26
2. 論文標題 Coronal tibiofemoral subluxation is correlated to correction angle in medial opening wedge high tibial osteotomy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.	6. 最初と最後の頁 3482-3490
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00167-018-4948-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iwai C, Fushimi K, Nozawa S, Shirai Y, Ogawa H, Yasura K, Shimizu K, Akiyama H.	4. 巻 27
2. 論文標題 Bilateral vocal cord palsy after a posterior cervical laminoplasty.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Eur Spine J	6. 最初と最後の頁 549-554
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00586-018-5649-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ogawa H, Akiyama H.	4. 巻 28
2. 論文標題 Cartilage/chondrocyte research and osteoarthritis. Mechanobiology for development of osteoarthritis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clin Calcium	6. 最初と最後の頁 789-795
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） ClicCa1806789795	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ogawa H, Matsumoto K, Akiyama H.	4. 巻 138
2. 論文標題 New angle measurement device to control the posterior tibial slope angle in medial opening wedge high tibial osteotomy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Arch Orthop Trauma Surg	6. 最初と最後の頁 299-305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00402-017-2846-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yozawa S, Ogawa H, Matsumoto K, Akiyama H.	4. 巻 33
2. 論文標題 Periarticular Injection of Tranexamic Acid Reduces Blood Loss and the Necessity for Allogeneic Transfusion After Total Knee Arthroplasty Using Autologous Transfusion: A Retrospective Observational Study.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Arthroplasty	6. 最初と最後の頁 86-89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.arth.2017.08.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto K, Ogawa H, Fukuta M, Mori N, Akiyama H.	4. 巻 31
2. 論文標題 Comparative Study for Alignment of Extramedullary Guides versus Portable, Accelerometer-Based Navigation in Total Knee Arthroplasty.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Knee Surg.	6. 最初と最後の頁 92-98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/s-0037-1602133	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小川寛恭、松本和、秋山治彦
2. 発表標題 Double level derotational osteotomyを施行した習慣性膝蓋骨脱臼の1例
3. 学会等名 第102回岐阜県整形外科集談会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川寛恭、松本和、秋山治彦
2. 発表標題 Double level derotational osteotomyを施行した習慣性膝蓋骨脱臼の1例
3. 学会等名 第67回 東海関節外科研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川寛恭、松本和、秋山治彦
2. 発表標題 脛骨外側亜脱臼はmedial opening wedge high tibial osteotomyの矯正角度に關する
3. 学会等名 第91回日本整形外科学会學術總會
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川寛恭、市川勝寛、松本和、秋山治彦
2. 発表標題 前十字靭帯再建術待機期間と治療成績の關連性
3. 学会等名 第103回岐阜県整形外科集談会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川寛恭、市川勝寛、松本和、秋山治彦
2. 発表標題 Coronal tibiofemoral subluxationから考えるOWHTOの至適矯正角度
3. 学会等名 第7回日本Knee Osteotomy フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川寛恭、市川勝寛、松本和、秋山治彦
2. 発表標題 Double level derotational osteotomyを施行した習慣性膝蓋骨脱臼の1例
3. 学会等名 第7回日本Knee Osteotomy フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川寛恭、松本和、秋山治彦
2. 発表標題 半月板縫合術におけるRed zoneとWhite zoneの組織治癒の比較
3. 学会等名 第5回 岐阜スポーツ整形外科研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川寛恭、吉岡大輝、松本和、秋山治彦
2. 発表標題 外側型変形性膝関節症に対するOxford; Fixed Lateral Partial Kneeの使用経験
3. 学会等名 第131回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----