

令和元年6月18日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10840

研究課題名(和文) DUSP-1によるヒト変形性関節症の軟骨変性および神経侵入制御の解明

研究課題名(英文) Regulation of cartilage degeneration and innervation by DUSP-1 in the development of osteoarthritis

研究代表者

澤地 恭昇 (Sawaji, Yasunobu)

東京医科大学・医学部・助教(特任)

研究者番号：20571152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：変形性関節症(OA)の病態を制御しうる保存療法は確立されていない。本研究は、炎症刺激の細胞内情報伝達を担うMAP kinasesおよびその脱リン酸化酵素であるDUSP1のOA病態形成への関与についてDUSP1をknock downしたヒト関節滑膜細胞を用いて検討した。DUSP1 knock down細胞において、IL-1により誘導されるOA病態形成分子である神経成長因子および細胞外基質分解酵素の発現増強が認められた。DUSP1はOA病態を制御しうる分子であることが明らかとなり、新規OA保存治療の開発の礎となる成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、細胞内情報伝達分子を標的とした薬剤開発が様々な疾患に適用されている。本研究ではMAP kinaseの3種類のサブタイプ(ERK, p38およびJNK)の阻害剤単独では、OA病態形成の制御は困難であることを見出し、これらを包括的に制御しうるDUSP1にその可能性を見出した点は学術的意義のある研究といえる。また、超高齢化社会において患者数の増加が不可避なOAに対する根本的保存療法が確立されていない現状において、DUSP1を調節することでOA病態制御の可能性を見出したことは、今後の新規OA治療薬開発への礎となることが強く期待され、社会的意義の高い研究であると思われる。

研究成果の概要(英文)：Disease modifying drugs for osteoarthritis (OA) have yet to be established. This study investigated the involvement of inflammatory signaling pathway by focusing on MAP kinases and their endogenous phosphatase, DUSP1 in the development of OA. Expression of nerve growth factor (associated with innervation) and matrix metalloproteinases (associated with cartilage degeneration) induced by IL-1 was enhanced in DUSP1 knocked down human synovial fibroblasts. This study sheds light on DUSP1 as a novel target molecule for the conservative treatment of OA.

研究分野：整形外科学

キーワード：変形性関節症 軟骨変性 神経侵入 DUSP-1

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 (osteoarthritis: OA) は、軟骨組織の破壊による関節変形と機能低下および疼痛を特徴とする運動器疾患であり、超高齢化社会を迎えた我が国においてその患者数は増加の一途をたどっている。末期 OA に対しては、人工関節置換術といった外科的手術により関節機能を回復させ、良好な臨床成績が得られているが、当該疾患に対する根本的な保存的治療法は未だ確立されていない。

一方、OA の対症療法の一つとして、炎症により誘導される酵素である cyclooxygenase (COX)-2 の活性を阻害する薬剤により、炎症メディエータとして知られる prostaglandin (PG)E₂ 産生を抑制する保存療法が短期的な疼痛緩和には有用であるとされ汎用されているが、OA の病態形成に対する効果については不明であった。OA の病態形成には、上記 COX-2 により誘導される PGE₂ に加え、神経成長因子 (nerve growth factor: NGF) による関節滑膜への神経侵入による疼痛発現と軟骨組織の細胞外基質を分解するタンパク質分解酵素である matrix metalloproteinases (MMPs) や a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs (ADAMTS) による軟骨破壊が関与することが知られていた。我々は本研究課題の先行研究としてヒト関節由来の滑膜細胞を用いて、炎症刺激により誘導される NGF や細胞外基質分解酵素発現に対する選択的 COX-2 阻害剤の効果を検討したところ、NGF や MMPs 発現はむしろ促進され、PGE₂ は逆にこれらを抑制することを見出した。

そこで本研究は、PGE₂ による NGF および MMPs 発現抑制機序を明らかにすることで新規 OA 保存治療の標的分子を見出すことを目的として、炎症刺激の細胞内情報伝達を担う mitogen-activated protein (MAP) kinases とその内因性脱リン酸化酵素である dual specificity phosphatase (DUSP)1 に着目して研究を行なった。

2. 研究の目的

OA 新規保存治療の標的細胞内情報伝達経路として MAP kinases-DUSP1 経路に着目し、各種 MAP kinases 阻害剤および DUSP1 knock down 細胞を用いて OA 病態形成分子である NGF および MMPs 発現に対する効果を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

末期 OA に対する人工関節置換術時に得られるヒト関節滑膜組織より滑膜細胞を pronase/collagenase による酵素消化法により単離培養し、以下の実験に用いた。

(1) ヒト関節滑膜細胞における MAP kinases 阻害剤の NGF および MMPs 発現に対する効果

ヒト関節滑膜細胞を、MAP kinases のサブタイプである ERK, p38 および JNK の阻害剤 (U0126 for ERK, SB203580 for p38, SP600125 for JNK) 存在下、炎症性サイトカインである interleukin (IL)-1 β で刺激し、誘導される NGF および MMPs 発現を realtime PCR 法により測定した。

(2) DUSP1 を knock down したヒト関節滑膜細胞における NGF および MMPs 発現制御

ヒト関節滑膜細胞に DUSP1 siRNA を遺伝子導入し DUSP1 knock down 細胞を作成した。同細胞を IL-1 β 刺激し、誘導される MAP kinases のリン酸化を Western blot 法により、誘導される NGF および MMPs 発現を realtime PCR 法により測定し、非 knock-down 細胞と比較検討した。

(3) MAP kinase 経路および DUSP-1 発現に対する PGE₂ の作用

PGE₂ の MAP kinases-DUSP1 経路に対する効果を Western blot 法により、DUSP1 発現に対する効果を realtime PCR 法により評価した。

4. 研究成果

(1) ヒト関節滑膜細胞における MAP kinases 阻害剤の NGF および MMPs 発現に対する効果

ヒト関節滑膜細胞を、ERK (U0126), JNK (SP600125) または p38 (SB203580) 阻害剤存在下 IL-1 β 刺激し、NGF および MMPs 発現に対する効果を検討した。IL-1 β により誘導される

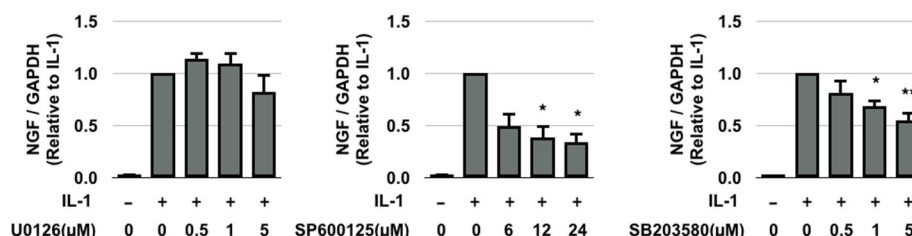


Fig 1. Effect of MAP kinase inhibitors on NGF expression in human synovial fibroblasts.

NGF 発現は、JNK および p38 阻害剤により濃度依存的に有意に抑制されたが、ERK 阻害剤による影響は観察されなかった (Fig 1)。

IL-1 β により誘導される MMP-13 発現は、ERK, JNK および p38 阻害剤により濃度依存的に有意に抑制された (Fig 2)。IL-1 β により誘導される MMP-1 発現は、JNK 阻害剤により、MMP-3 発現は、ERK および JNK 阻害剤により濃度依存的に有意に抑制された (結果省略)。以上の結果より、NGF および MMPs 発現に MAP kinase 経路が関与することが明らかとなったが、その経路は標的遺伝子により異なることが示唆された。すなわち MAP kinase のサブタイプである ERK, JNK または p38 を個別に阻害するのみでは OA 病態形成の制御には至らないことが示唆された。

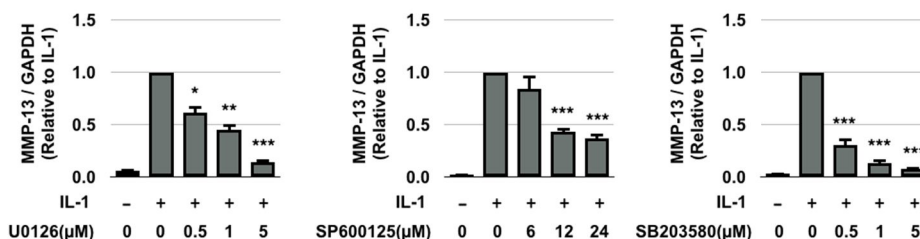


Fig 2. Effect of MAP kinase inhibitors on MMP-13 expression in human synovial fibroblasts.

(2) DUSP1 を knock-down したヒト関節滑膜細胞における NGF および MMPs 発現制御

MAP kinases の ERK, JNK および p38 経路を脱リン酸化する DUSP1 を調節することで OA 病態形成分子を制御可能か否か検討するため、DUSP1 siRNA を遺伝子導入することで DUSP1 knock down 細胞を調整し検討した。siRNA により DUSP-1 発現は約 75%抑制された (Fig 3)。

DUSP-1 knock down 細胞における MAP kinases (p38, JNK および ERK)のリン酸化は、非 knock down 細胞と比べ、リン酸化の増強および遷延が観察された (Fig 4)。

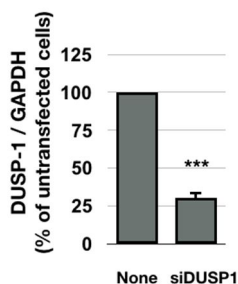


Fig 3. Knock down DUSP1 by siRNA in human synovial fibroblasts

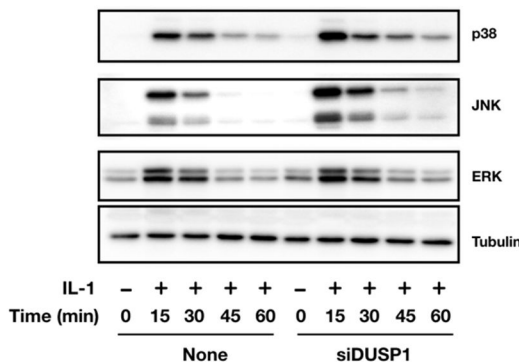


Fig 4. DUSP1 knock down exaggerated IL-1-induced phosphorylation of MAP kinases in human synovial fibroblasts

DUSP-1 knock down 細胞における NGF および MMPs 発現に対する効果を検討した。IL-1 β により誘導される NGF (Fig 5 左図) および MMP-13 (Fig 5 右図) 発現は、DUSP1 knock down 細胞において有意に促進した。同様に IL-1 β により誘導される MMP-1 および MMP-3 発現においても DUSP1 knock down 細胞において有意な促進効果が観察された (結果省略)。

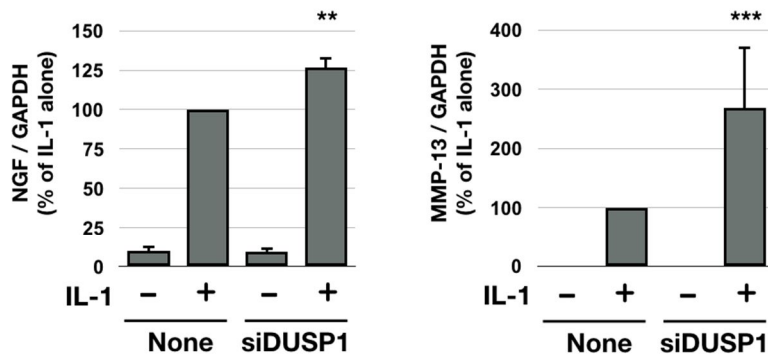


Fig 5. DUSP1 knock down exaggerated IL-1-induced NGF and MMP-13 expression in human synovial fibroblasts

(3) MAP kinase 経路および DUSP-1 発現に対する PGE₂ の作用

先行研究において PGE₂ が、NGF および MMPs 発現を抑制することを見出したことから、PGE₂ の MAP kinases のリン酸化および DUSP1 発現に対する作用について検討した。IL-1 β 刺激により誘導される MAP kinases (p38, JNK および ERK) のリン酸化は、PGE₂ の添加により抑制された (Fig 6 左図)。また、DUSP1 発現は IL-1 β により誘導され、PGE₂ の添加によりさらに有意に促進した (Fig 6 右図)。以上の結果から、PGE₂ は DUSP1 発現を促進させることで MAP kinases のリン酸化を抑制し、OA 病態形成に関わる NGF および MMPs 発現を制御するものと思われる。

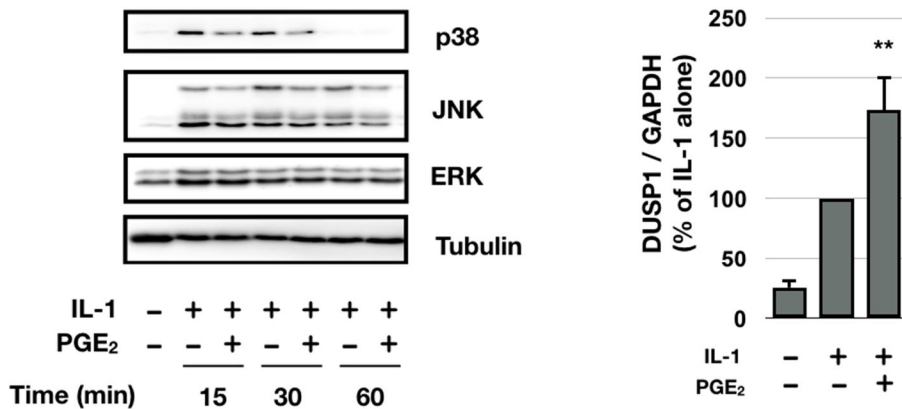


Fig 6. Effect of PGE₂ on MAP kinases phosphorylation and DUSP1 expression in human synovial fibroblasts.

以上の結果より、OA 病態形成に関わる NGF および MMPs 発現は、炎症刺激の細胞内情報伝達経路である MAP kinases により制御されることが明らかとなった。しかしながら、これら分子の発現は MAP kinases のサブタイプである ERK, p38 および JNK によりそれぞれ異なった調節を受けることも判明し、個別の MAP kinase のサブタイプの阻害剤による OA 病態制御は困難であると推察される。一方で DUSP1 は、MAP kinase のサブタイプ全てに対して脱リン酸化効果を示し、DUSP1 knock down 細胞において、NGF および MMPs の発現増強が観察された。すなわち、DUSP1 は OA 病態形成を制御する分子であることが強く示唆された。本研究成果により、DUSP1 を用いた新規 OA 保存療法の可能性が示唆され、超高齢化社会において患者数が増加する OA 治療に多く貢献するものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 2 件）

Makiko Yorifuji, Yasunobu Sawaji, Kenji Endo, Taiichi Kosaka, Kengo Yamamoto
“Limited efficacy of COX-2 inhibitors on nerve growth factor and metalloproteinases
expression in human synovial fibroblasts” Journal of Orthopaedic Science, 査読有, Vol.
21, 2016, pp 381-388
DOI:10.1016/j.jos.2016.01.004

澤地恭昇, 宮本泰典, 依藤麻紀子, 正岡利紀, 宍戸孝明, 山本謙吾 「変形性関節症に対
する薬物治療の展望」 整形・災害外科, 査読無, 59 巻, 2016, pp 1181-1188
https://www.kanehara-shuppan.co.jp/magazines/search_list.html?kubun=05527

〔学会発表〕（計 5 件）

Asato Maekawa, Yasunobu Sawaji, Kenji Endo, Takuya Kusakabe, Takamitsu Konishi,
Toshiyuki Tateiwa, Toshinori Masaoka, Takaaki Shishido, Kengo Yamamoto “DUSP-1
involves in the mechanism of PGE₂ suppression of MMPs and NGF in human synovial
cells” The 28th Japanese-Korean Combined Orthopaedic Symposium, 2018 年

前川麻人, 澤地恭昇, 遠藤健司, 日下部拓哉, 小西隆允, 正岡利紀, 宍戸孝明, 山本謙吾
「ヒト関節滑膜細胞における PGE₂ による NGF および MMP 発現抑制への DUSP1 の関
与」 第 16 回 整形外科痛みを語る会, 2018 年

前川麻人, 澤地恭昇, 遠藤健司, 日下部拓哉, 小西隆允, 立岩俊之, 正岡利紀, 山本謙吾
「DUSP-1 によるヒト変形性関節症の軟骨変性および神経侵入制御の解明」 第 33 回
日本整形外科学会基礎学術集会, 2018 年

前川麻人, 澤地恭昇, 遠藤健司, 日下部拓哉, 小西隆允, 正岡利紀, 宍戸孝明, 山本謙吾
「DUSP-1 によるヒト変形性関節症の軟骨変性および神経侵入制御の解明」 第 11 回
日本運動器疼痛学会, 2018 年

澤地恭昇, 依藤麻紀子, 宮本泰典, 立岩俊之, 正岡利紀, 宍戸孝明, 山本謙吾 「変形性
関節症の病態形成における選択的 COX-2 阻害剤の有用性の相違」 第 31 回 日本整形外
科学会基礎学術集会, 2016 年

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmuortho.com>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：山本 謙吾

ローマ字氏名：(YAMAMOTO, Kengo)

所属研究機関名：東京医科大学

部局名：医学部

職名：主任教授

研究者番号（8 桁）：10246316

研究分担者氏名：宍戸 孝明

ローマ字氏名：(SHISHIDO, Takaaki)

所属研究機関名：東京医科大学

部局名：医学部

職名：准教授
研究者番号（8桁）：70266500

研究分担者氏名：正岡 利紀
ローマ字氏名：(MASAOKA, Toshinori)
所属研究機関名：東京医科大学
部局名：医学部
職名：准教授
研究者番号（8桁）：70256270

研究分担者氏名：遠藤 健司
ローマ字氏名：(ENDO, Kenji)
所属研究機関名：東京医科大学
部局名：医学部
職名：准教授
研究者番号（8桁）：90266479

研究分担者氏名：立岩 俊之
ローマ字氏名：(TATEIWA, Toshiyuki)
所属研究機関名：東京医科大学
部局名：医学部
職名：講師
研究者番号（8桁）：00424630

(2)研究協力者

研究協力者氏名：前川 麻人
ローマ字氏名：(MAEKAWA, Asato)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。