

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09062

研究課題名(和文) R-spondin2を通じた変形性関節症の分子機構の解明とその治療薬の応用開発

研究課題名(英文) R-spondin2 activation of Wnt/b-catenin signaling in chondrocytes and prevention of osteoarthritis

研究代表者

竹上 靖彦 (Yasuhiko, Takegami)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50755345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においては古典的Wntシグナルの活性化によるRspo2の異常が変形性関節症に関連すると考えた。既存薬のオフラベル効果をもちいたドラッグ・リポジショニング(DR)の手法をもちいてRspo2を抑制することで変形性関節症進行の抑制をする薬剤の探索をおこない抗うつ剤であるMianserinがRspo2による軟骨細胞の増殖分化を制御することを明らかとした。つづいて、ラットによる内側半月板切除モデルを作成し、Mianserinの関節内投与を行い組織学的に変形性関節症の進行が抑制されることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存薬のオフラベル効果による変形性関節症の治療薬の報告は少なく、本研究によって抗うつ剤であるMianserinが変形性関節症の進行予防効果を有する可能性について明らかとすることにできた。本研究の成果をもってMianserinによる関節症進行予防のヒトへの投与を含めた検討が可能となる。また、古典的Wntシグナルおよびそのシグナルを活性化させるRspo2が軟骨細胞に影響を与えることも同時に明らかとした。今後このシグナルをターゲットとしたさらなる研究をすすめることができる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we hypothesized that abnormalities in Rspo2 caused by activation of classical Wnt signaling are associated with osteoarthritis. Using the drug repositioning (DR) method based on the off-label effects of existing drugs, we searched for drugs that inhibit the progression of osteoarthritis by suppressing Rspo2, and found that the antidepressant Mianserin regulates the proliferative differentiation of chondrocytes by Rspo2. Next, we prepared a rat model of medial meniscectomy and administered mianserin intra-articularly to the rats, and histological analysis showed that the progression of osteoarthritis was inhibited.

研究分野：整形外科

キーワード：Wntシグナル 変形性関節症

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(OA)の患者数は年々増加(推定約2,500万人)しており、その治療は社会的に重要である。OAの発症機序のひとつとして古典的Wntシグナルの活性化による軟骨細胞の分化異常がある。古典的Wntシグナル経路は内軟骨性骨化を含めた発生過程の多くの現象や疾患の発症に関与しているシグナル経路である。報告者は独立した分泌タンパク質であるRspo2がWnt分泌タンパク質と協働して古典的Wntシグナル経路を活性化し、軟骨細胞の増殖分化を制御していることを示していた。近年、古典的Wntシグナル経路とOAの関連が指摘されている。そこで、Rspo2は軟骨細胞の分子機構の異常を生じ、OAと関連する可能性があると考えた。また、既認可薬のオフラベル効果により別の疾患に用いるドラッグリポジショニング(DR)を用いることにより、Rspo2を治療ターゲットとしたOAの病態の制御をおこなう既認可薬の探索を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究の目標は、(1)Rspo2が古典的Wntシグナル経路の中で、他の因子とどのように関連し活性化され、OAの進行に関わっているかを詳細に明らかにすること(2)DRの手法を用い、Rspo2をターゲットとしたOA病態制御を可能とする既認可薬を発見することを目的とした。

3. 研究の方法

膝OA患者の関節液におけるRspo2量の定量化をおこなった。適切な書面によるインフォームドコンセントを得た後、膝OA患者52名(男性16名、女性36名、年齢36~93歳、平均年齢74.6歳)から、外来で針穿刺により滑膜フイドサンプルを採取した。膝OAの重症度診断は、American Rheumatism Associationの基準に基づいて行われた。採取した滑膜燃料サンプル中のRspo2と総タンパク質の濃度を定量した。Rspo2は、Human R-Spondin 2 (RSP02) ELISA Kitを用いて、吸光度を測定した。全タンパク質の濃度は、Pierce 660nm Protein Assay Kitを用いて定量した。また、関節液に含まれるグリコサミノグリカン(GAG)の濃度を、1,2-ジメチルメチレンブルーを用いた分光光度法による色素結合アッセイで評価した。

TOPFlashルシフェラーゼレポーターアッセイを用いてFDA承認の1,271種類の薬剤をスクリーニングした。Rspo2を介したWnt/ β -カテニンシグナルの活性化を特異的に抑制する薬剤を同定するために、FDA承認の1,271の化学物質をスクリーニングした。Wnt/ β -カテニンシグナル活性をTOPFlashルシフェラーゼレポーターアッセイで定量化した。ヒト軟骨肉腫(HCS-2/8)細胞をもちいた。TOPFlash frefyルシフェラーゼレポーターベクターと0.25 μ gのRenillaルシフェラーゼプラスミドをトランスフェクションした。トランスフェクション後24時間目に、96ウェル培養プレートに4 \times 10⁴ cells/wellで播種し、各薬剤10 μ Mの存在下で24時間インキュベートした。培地に組換えヒトRspo2タンパク質(rhRspo2, R&D Systems)および/または組換えヒトWnt3aタンパク質(rhWnt3a, R&D Systems)を添加した。ルシフェラーゼ活性は、PowerScan MX (DS Pharma Biomedical)のDual Luciferase Reporter Assay System (Promega)を用いて測定した。

すべての動物実験は、名古屋大学動物実験規程の推奨事項に従って行われ、名古屋大学大学院医学系研究科の動物実験委員会で承認された。10週齢のWistar/ST系雄ラットをイソフランで麻酔し、内側半月板の外科的不安定化(DMM)手術により右膝関節をOA化した。対照的な左膝には、皮膚と関節包を切開してシャム手術を行った。ラットを無作為にPBS群とmianserin群(各3匹)に分け、50 μ lのPBS(コントロール群)と50 μ lのPBSに50 μ Mのmianserinを入れたもの(mianserin群)をそれぞれ週1回両膝に関節内注射した。手術後8週目にラットを屠殺し、膝関節を4%パラホルムアルデヒド中で一晩融合させた後、脱灰し、パラフィンに包埋した。各サンプルの大腿骨内側顆の中央部(つまり体重負荷部)を中心に複数の切片を作成した。最も狭い関節間部分を横切る1つの切片を、Safranin OとFast-greenで染色した。OAの進行は、脛骨側と大腿骨側の両方の関節軟骨について、modified Mankin組織学的スコアに従って評価した。また、免疫蛍光染色によって、関節軟骨細胞の細胞質および核における β -カテニンの平均シグナル強度をMetaMorph software (Molecular Devices, LLC)を用いてブラインドで定量した。核内の β -カテニンの強度が細胞質内の強度と同等以上の場合、その細胞は核内 β -カテニン陽性と認識した。

4. 研究成果

我々はまず、軟骨プロテオグリカンのGAG鎖の分解産物であるグリコサミノグリカン(GAG)が、X線で評価したOAの重症度の増加に伴い、関節液中に増加していることを確認した。関節内のRspo2はOAの悪化に伴い、重症度(Kellgren-Lawrence (KL)分類)グレード3までは徐々に増加したが、KLグレード4では減少したことを確認した。これは、関節内でRspo2を産生する細胞やその他の細胞の数が、KLグレード4で減少したことを表しているのかもしれないと考えられた。

また、Rspo2 はヒト軟骨肉腫(HCS)-2/8細胞において、Rspo2で還元されたECMの量を増加させる。次に、Rspo2によるWnt/ β -カテニンシグナルの活性化を阻害し、OAの進行を抑制する臨床応用可能な薬剤の同定を試みた。HCS-2/8細胞において、FDA承認の1,271種類の薬剤の存在下で、TOPFlashルシフェラーゼレポーターアッセイを用いてWnt/ β -カテニンシグナル活性を定量化し、Rspo2が活性化するWnt/ β -カテニンシグナルを抑制する薬剤を探索した。組換えヒトRspo2(rhRspo2)単独では、HCS-2/8細胞のWnt/ β -カテニンシグナルを活性化しないが、低用量の組換えヒトWnt3a(rhWnt3a)の存在下では、シグナルを増強した。そこで、120ng/mlのrhRspo2と20ng/mlのrhWnt3aを用いてドラッグスクリーニングを行ったところ、四環系抗うつ剤(TeCA)の一つであるMianserin(ヒスタミン系H1受容体、セロトニン系5-HT₁₋₇受容体、 α_2 アドレナリン系受容体のアンタゴニスト)がTOPFlashレポーター活性を用量依存的に抑制した。MianserinはrhWnt3a単独で活性化されるWnt/ β -カテニンシグナルを抑制しなかった。HCS-2/8細胞では、120ng/mlのrhRspo2と20ng/mlのrhWnt3aがWnt/ β -カテニン応答性のAXIN233のmRNA発現を上昇させ、ミアンセリンがAXIN2の発現上昇を抑制することが観察された。また、Wnt/ β -カテニン応答性遺伝子であるCCND134とMYC35にも同様の傾向が見られた。次に、他の2つの四環系抗うつ剤のMaprotilineとMirtazapineについて同様の実験を行ったが、TOPFlashレポーター活性を抑制しなかった。以上のことから、MianserinはRspo2を介してTOPFlashレポーター活性を阻害し、その効果は四環構造とは関係がないと考えられた。

Wnt/ β -カテニンシグナルが活性化されていない場合の軟骨細胞への影響を調べるために、ECMを高レベルで産生するマウス軟骨細胞ATDC5において、ECM産生に対するMianserinの影響を評価した。アルシアンブルー染色の定量的解析により、MianserinはrhRspo2によるプロテオグリカンの減少を改善したが、rhWnt3aによる減少は改善しなかった。また、Mianserinは、Rspo2によるAxin2の発現量増加を抑制し、Rspo2によるSox9、Col2a1、Acanの発現量減少を抑制した。これらの結果は、MianserinがRspo2によるECM産生の抑制を緩和することを示していると考えられた。Rspo2は、分化したATDC5細胞において、48時間後のRnf43/Znrf3およびLgr4/5/6のmRNAの発現を変化させなかった。一方、Rspo2は分化したATDC5細胞において、48時間後にLrp6、Lrp5、Frizzled6(Fzd6)、 β -カテニンタンパク質の発現を増加させたが、これはLrp6のSer1490でのリン酸化が増加したことに起因すると考えられた。ミアンセリンは、分化したATDC5細胞やHEK293細胞において、rhRspo2を介したLrp6、Lrp5、Fzd6、 β -カテニンタンパク質の増加、およびLrp6のリン酸化を抑制することでその働きを抑制すると推測された。以上からMianserinはRspo2とLgr5の結合を直接抑制し、軟骨細胞におけるLrp6の発現や β -カテニンの蓄積を抑制することがわかった。

OA軟骨(OAC)に対するミアンセリンの影響を調べるために、人工膝関節置換術を受けたOA患者からOA細胞を分離した。OAC細胞では、ATDC5細胞と同様に、Rnf43/Znrf3 mRNA、Lgr4-6 mRNA、Lgr5タンパク質が発現していることが確認された。細胞生存率測定の結果、100 μ M以下のMianserinはOAC細胞に対して毒性を示さなかった。イムノプロットの結果、MianserinはrhRspo2による β -カテニンの蓄積を減少させた。

また、ラットのOAモデルでは、関節軟骨細胞に対するMianserinの影響を調べた。ラットは、内側半月板の破壊手術によるOA誘導後、週1回、50 μ lのリン酸緩衝生理食塩水(PBS、対照)または50 μ MのMianserinを8週間にわたり関節内に注射した。手術後8週間で、DMM手術を受けた膝において、Mianserinは関節表面のSafranin-O染色を改善し、関節軟骨構造を維持した。また、Mianserinは、 β -カテニンの細胞内および核内の強度を低下させ、 β -カテニン陽性細胞の比率を低下させた。ラットのOAモデルでは、ミアンセリンを関節内に注射すると、関節軟骨細胞のWnt/ β -カテニンシグナルが抑制され、OAの進行が改善された。軟骨における β -カテニンの機能低下は、アポトーシス細胞を増加させることで骨関節症の変化も引き起こすことから、関節軟骨には一定レベルのWnt/ β -カテニンシグナルが必要である。MianserinをヒトのOA患者に適用するには、投与プロトコルの最適化、副作用の精査、ラットOAモデルでの併用による相加効果の検討などが必要である。また、うつ病患者への長期投与によるOA発症の抑制効果を疫学的に評価することで、OA患者への影響を明らかにすることができる。Mianserinは、Rspo2を介したWnt/ β -カテニンシグナルの異常な活性化を伴うヒト疾患を改善するリポジショニング・ドラッグとなる可能性があると期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Takegami Yasuhiko, Seki Taisuke, Osawa Yusuke, Kusano Taiki, Ishiguro Naoki	4. 巻 -
2. 論文標題 The relationship between radiographic findings and patient-reported outcomes in adult hip dysplasia patients: A hospital cross-sectional study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2019.09.007	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 Takegami Yasuhiko, Seki Taisuke, Higuchi Yoshitoshi, Osawa Yusuke, Ishiguro Naoki	4. 巻 30
2. 論文標題 Measurement of equivalence between the web and paper versions of the Japanese Orthopaedic Association Hip Disease Evaluation Questionnaire	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 397 ~ 401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2019.1592799	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 Okura Toshiaki, Ohkawara Bisei, Takegami Yasuhiko, Ito Mikako, Masuda Akio, Seki Taisuke, Ishiguro Naoki, Ohno Kinji	4. 巻 9
2. 論文標題 Mianserin suppresses R-spondin 2-induced activation of Wnt/ -catenin signaling in chondrocytes and prevents cartilage degradation in a rat model of osteoarthritis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-39393-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Osawa Yusuke, Hasegawa Yukiharu, Seki Taisuke, Takegami Yasuhiko, Amano Takafumi, Ishiguro Naoki	4. 巻 23
2. 論文標題 Patient-reported outcomes in patients who undergo total hip arthroplasty after periacetabular osteotomy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Science	6. 最初と最後の頁 346 ~ 349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2017.11.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kusano Taiki, Seki Taisuke, Higuchi Yoshitoshi, Takegami Yasuhiko, Osawa Yusuke, Ishiguro Naoki	4. 巻 33
2. 論文標題 Preoperative Canal Bone Ratio is Related to High-Degree Stress Shielding: A Minimum 5-Year Follow-Up Study of a Proximally Hydroxyapatite-Coated Straight Tapered Titanium Femoral Component	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Arthroplasty	6. 最初と最後の頁 1764 ~ 1769
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.arth.2017.12.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Osawa Yusuke, Seki Taisuke, Takegami Yasuhiko, Kasai Takehiro, Higuchi Yoshitoshi, Ishiguro Naoki	4. 巻 42
2. 論文標題 Do femoral head collapse and the contralateral condition affect patient-reported quality of life and referral pain in patients with osteonecrosis of the femoral head?	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Orthopaedics	6. 最初と最後の頁 1463 ~ 1468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00264-018-3867-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Higuchi Yoshitoshi, Seki Taisuke, Hasegawa Yukiharu, Takegami Yasuhiko, Morita Daigo, Ishiguro Naoki	4. 巻 29
2. 論文標題 32-mm ceramic-on-ceramic total hip arthroplasty versus 28-mm ceramic bearings: 5- to 15-year follow-up study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 HIP International	6. 最初と最後の頁 65 ~ 71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1120700018760971	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Morita Daigo, Seki Taisuke, Higuchi Yoshitoshi, Takegami Yasuhiko, Amano Takafumi, Ishiguro Naoki	4. 巻 28
2. 論文標題 The influence of early radiolucent lines appearing on femoral head penetration into HXLPE cemented sockets	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 HIP International	6. 最初と最後の頁 369 ~ 374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1120700018754308	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Osawa Yusuke, Seki Taisuke, Takegami Yasuhiko, Kusano Taiki, Makida Kazuya, Ishiguro Naoki	4. 巻 42
2. 論文標題 Cementless total hip arthroplasty for osteonecrosis and osteoarthritis produce similar results at ten?years follow-up when matched for age and gender	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Orthopaedics	6. 最初と最後の頁 1683 ~ 1688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00264-018-3987-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Higuchi Yoshitoshi, Seki Taisuke, Hasegawa Yukiharu, Morita Daigo, Komatsu Daigo, Takegami Yasuhiko, Ishiguro Naoki	4. 巻 104
2. 論文標題 Comparison of cementless total hip arthroplasty survivorship between metal-on-highly cross-linked polyethylene and ceramic on ceramic bearings: A case control study with a 5-9-year follow-up	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research	6. 最初と最後の頁 663 ~ 669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.otsr.2018.04.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Morita Daigo, Hasegawa Yukiharu, Seki Taisuke, Amano Takafumi, Takegami Yasuhiko, Kasai Takehiro, Higuchi Yoshitoshi, Ishiguro Naoki	4. 巻 476
2. 論文標題 A Possible New Radiographic Predictor of Progression of Osteoarthritis in Developmental Dysplasia of the Hip	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Orthopaedics and Related Research	6. 最初と最後の頁 2157 ~ 2166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/CORR.0000000000000458	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Higuchi Yoshitoshi, Seki Taisuke, Takegami Yasuhiko, Komatsu Daigo, Morita Daigo, Ishiguro Naoki	4. 巻 104
2. 論文標題 Same survival but higher rate of osteolysis for metal-on-metal Ultamet versus ceramic-on-ceramic in patients undergoing primary total hip arthroplasty after 8 years of follow-up	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research	6. 最初と最後の頁 1155 ~ 1161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.otsr.2018.08.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takegami Yasuhiko, Ohkawara Bisei	4. 巻 2
2. 論文標題 Wnt/Beta-catenin Signaling as one of the Therapeutic Targets in Osteoarthritis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nov Tech Arthritis Bone Res	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.19080/NTAB.2017.02.555590	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Takegami Yasuhiko
2. 発表標題 "THE ASSOCIATIONS BETWEEN CIRCULATING MICRORNAs AND OSTEOARTHRITIS OF THE KNEE IN COMMUNITY-DWELLING PEOPLE: YAKUMO STUDY,"
3. 学会等名 OARSI World Congress on Osteoarthritis (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究分担者	関 泰輔 (Seki Taisuke) (20528822)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師 (13901)	
研究分担者	宮本 健太郎 (Miyamoto Kentaro) (50789899)	名古屋大学・医学部附属病院・医員 (13901)	
研究分担者	樋口 善俊 (Higuchi Yoshitoshi) (80792738)	名古屋大学・医学部附属病院・医員 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------