

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：47118

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K13028

研究課題名（和文）変形性関節症改善を目的とした網羅的スクリーニングと効率的手法の開発

研究課題名（英文）Development of efficient methods for comprehensive screening to improve osteoarthritis

研究代表者

長光 博史（Nagamitsu, Hiroshi）

中村学園大学短期大学部・食物栄養学科・准教授

研究者番号：20333271

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：変形性関節症(OA:osteoarthritis)は、関節軟骨の変性・消失を特徴とする疾患である。特に膝関節でのOAは高齢者において発症者数が多く、QOLの低下や医療費の増加を招くため治療法の開発が望まれる。関節破壊の直接の原因とされる、タンパク質分解酵素の1つであるMMP-13、アグリカンの分解酵素のADAMTS-5は、治療の上で重要な標的である。本研究ではこれらのタンパク質の発現を制御する、食品成分の探索を効率的に行うためのツールとして、ルシフェラーゼ活性を指標とした解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ルシフェラーゼ活性を指標としたことで、多検体でも迅速に測定することが可能になることが期待される。また、実験動物でのOA進行度の評価として、関節痛の疼痛閾値測定と、左右の体重バランス変化は、解剖することなく経時的にかつ安価に測定できるメリットがある。今回測定した食品成分は限られたが、ルシフェラーゼ活性で効果の見込まれた成分が発見されれば、動物での試験と併せて効率的に評価できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Osteoarthritis (OA) is a disease characterized by degeneration and loss of articular cartilage. In particular, OA in the knee joint affects a large number of elderly people, and the development of treatment methods is indispensable to decrease in quality of life and an increase in medical costs. MMP-13, a proteolytic enzyme involved in joint destruction, and ADAMTS-5, an aggrecan degrading enzyme, are important therapeutic targets. In this study, luciferase activity was used as a tool to efficiently search for food ingredients that regulate the expression of these proteins.

研究分野：生化学

キーワード：変形性関節症

1.研究開始当初の背景

変形性関節症(OA:osteoarthritis)は、関節軟骨の変性・消失を特徴とし、特に膝関節での OA は、国内で予備軍を含め 2500 万人と推定されている。OA は原因が解明されていないため、現状では疼痛緩和といった対症療法に頼るのみであり、最終的には人工関節置換という重い負担を高齢者に課している。また OA 発症に伴う疼痛・水腫は外出意欲を失わせる結果、ロコモティブシンドロームといった QOL(Quality of Life)の低下を招くだけでなく、OA による転倒、骨折は「寝たきり」の原因となり医療費の増加に直結する。

関節軟骨は、プロテオグリカンと呼ばれるタンパク質-糖鎖複合体とそれに埋もれた軟骨細胞から構成される。正常な軟骨細胞は常に細胞外へプロテオグリカンを分泌し、そのクッション性と酸素や栄養分の貯留により保護されている。一方で OA では軟骨細胞によるプロテオグリカン破壊が合成を上回る結果、関節構造の崩壊が進む。これまでに性別、肥満、力学的負荷などの危険因子が酸化ストレスを引き起こし、OA 発症を導くと考えられている。関節破壊の直接の原因は、炎症性サイトカンを介したタンパク質分解酵素(MMP-1,3,13)とされているが、関節内は軟骨細胞だけでなく、繊維芽細胞、滑膜細胞など多様な細胞があるため、OA におけるタンパク質分解酵素誘導の機構は明らかでない。

2.研究の目的

OA の根本的治療法の確立には、DMOAD(disease modifying osteoarthritis drug)の探索が不可欠であるが、これまでに実用化に至った分子は存在しない。申請者は食品成分から構成される化合物ライブラリを用い、培養細胞と実験動物の 2 つの系において軟骨基質およびその破壊に係る分子を指標に網羅的解析を行い、DMOAD となる可能性のある分子を探索することを目的とした。OA 発症で見られる関節破壊には、関節固有の II 型コラーゲンを分解することが知られているタンパク質分解酵素、MMP(Matrix Metalloproteinase)-13、およびプロテオグリカンの 1 種であるアグリカンの分解酵素である、ADAMTS-5(a disintegrin and thrombospondin motif-5)に着目し、これらの発現を抑制する食品成分の探索を目指す。

3.研究の方法

(1)レポーター 遺伝子の構築

既に構築されているヒトゲノム由来の BAC クローンライブラリー(RP-11)を基に、MMP-13 および ADAMTS-5 のプロモーター領域およそ 3kb をサブクローニングし、それぞれ pGL4.16(プロメガ)のホタルルシフェラーゼの合成遺伝子をコードする luc2 遺伝子の upstream に配置した。これを大腸菌 DH5a に形質導入し、アンピシリンでセレクションを行った。

(2)プラスミドの導入と食品成分添加による発現解析

ヒト軟骨肉腫由来、SW1353(ATCC)は、10% fetal bovine serum(FBS)を添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) で、37 °C、5%CO₂ 下で培養した。24 ウェルマイクロプレ

ートに、1 ウェルあたり 100,000 個の SW1353 を撒き、24h 培養を行った。(1)で構築したレポータープラスミドと、補正のための pGL4.74(プロメガ)の 2 種類のプラスミドをトランスフェクションし、24 時間培養を行った。

FBS を含まない DMEM に培地交換後、各食品成分(α -トコフェロール, アスコルビン酸)を添加し、6時間培養を行った。細胞溶解後にルシフェラーゼ活性を測定した。溶解に用いた DMSO に対する相対値で評価した。

(3)モノヨード酢酸投与による人為的 OA 発症モデル評価系の確立

モノヨード酢酸(MIA)は膝関節内に投与することで、変形性膝関節症に近い症状を示すことから、簡便な方法として利用されている。小動物における OA の進行を評価する指標として、疼痛の閾値の変化、OA 発症に伴う、左右の後肢にかかる荷重変化の確立を試みた。試験群では、C57BL/6 の左片関節に 1mg の MIA を投与し、疼痛の定量化には、PAM(Pressure Application Measurement, Ugo Basile)により評価した。対照として生理食塩水を投与したものと比較した。また、左右の後肢における荷重変化は、それぞれの後肢を 2 つの独立した天秤で測定した。正常な側を基準として、MIA を投与側の足にかかる荷重の相対値を指標とした。

4.研究成果

(1)レポーター 遺伝子の構築

BAC クローンの RP11-212L17(chr11:102,797,397-103,006,065)を鋳型に MMP-13 の開始コドンおよそ 3kb の領域を PCR で増幅した。同様に、RP11-1079A16 (chr21:26,962,359-27,163,503)を鋳型として、ADAMTS-5 の開始コドンおよそ 3kb の領域を PCR で増幅した。得られたクローンについて塩基配列を解析し、目的の配列であることを確認した。

(2)プラスミドの導入と食品成分添加による発現解析

トランスフェクション後の SW1353 に、抗酸化成分である α -トコフェロール, アスコルビン酸をそれぞれ添加し(n=5)、MMP-13 と ADAMTS-5 の発現へ及ぼす影響を解析した(図 1、図 2)。コントロールの DMSO と比較して、有意な差は認められなかった。

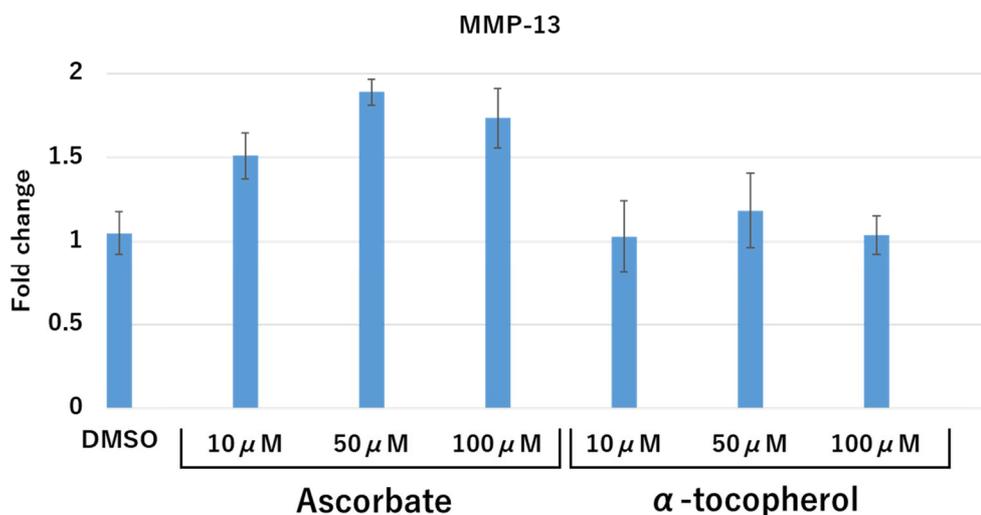


図 1.MMP13 発現に及ぼすアスコルビン酸、 α -トコフェロールの影響

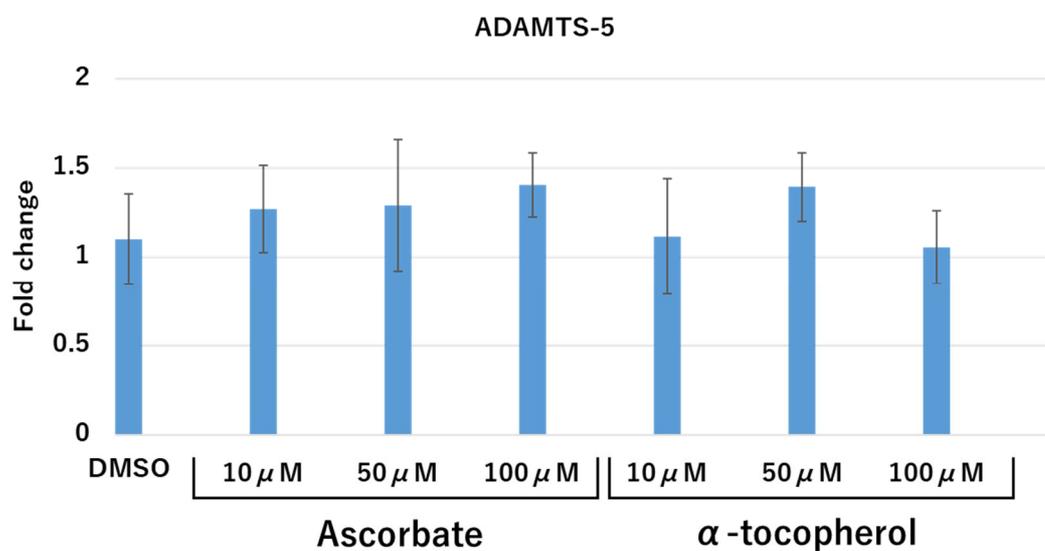


図 2.ADAMTS-5 発現に及ぼすアスコルビン酸、 α -トコフェロールの影響

(3)モノヨード酢酸投与による人為的 OA 発症モデル評価系の確立

膝関節を圧迫した時に、マウスが痛みを感じる閾値を評価したところ、図 3 のように投与 3 週目で閾値が低下しており、痛みに対する感受性が高まっていることが確認できた。また、左右の荷重バランス変化も顕著となり、OA 発症側の足にかかる負担を避けていることが示された(図 4)。関節標本の顕鏡像の比較では、粘着フィルムを使った薄切に安定した結果が得られず、今後の検討課題として残った。

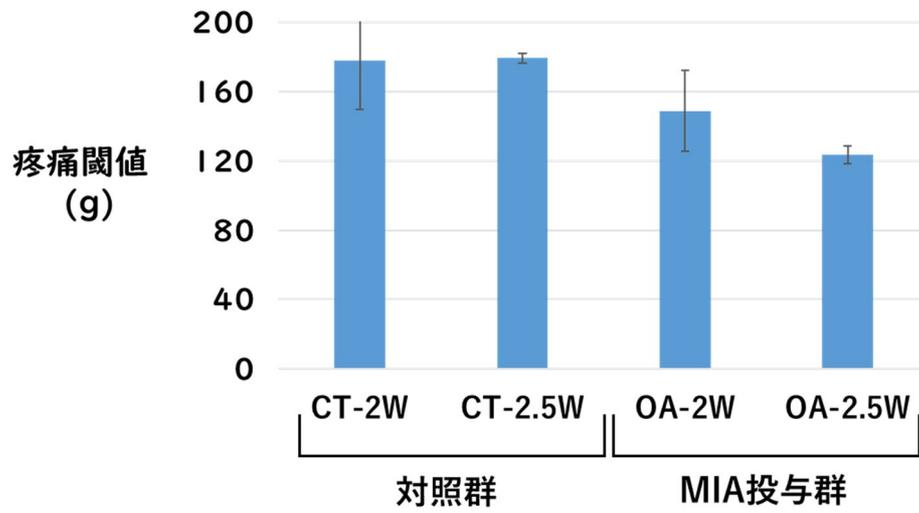


図 3.関節疼痛感受性の変化

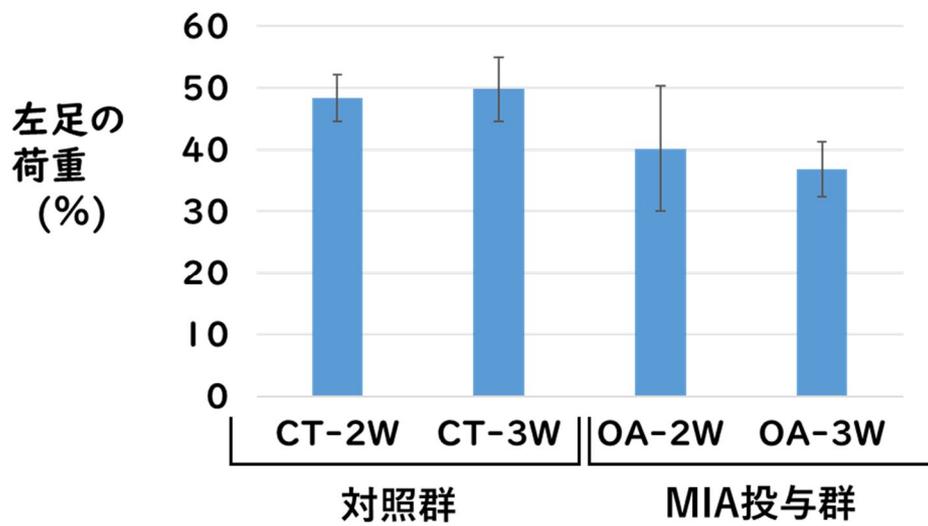


図 4.MIA 投与側の足にかかる荷重割合の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------