

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16655

研究課題名（和文）ヒアルロン酸合成酵素の遺伝子導入による新たな変形性膝関節の治療にむけて

研究課題名（英文）For treatment of knee osteoarthritis with HAS2 transgene

研究代表者

石塚 真哉（Ishizuka, Shinya）

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：40813316

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：動物を用いた実験として研究計画にあったDMM OAモデルマウス（変形性膝関節症を発症するマウス）の作成を行い、OA変化が生じていることの確認を行うため、DMM OAモデルマウスを作成後、膝関節のサフラニンO染色でプロテオグリカンの喪失が生じていることを確認した。また同組織における免疫組織化学染色を行いMMP-3、-13の発現解析により各種分解酵素のタンパクの発現上昇、局在を確認した。上記の作成したDMM OAモデルマウスを用いて、ヒアルロン酸合成阻害剤である4-Methylumbelliferone, 4-MUをマウス膝関節内に投与し、上述した各種OA変化が抑制されることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性膝関節症（膝OA）に対する保存的治療のひとつとして広く行われているヒアルロン酸の関節内投与は頻回の注射の痛み、また感染の危険性などのマイナスな面もある。我々は細胞を用いた実験で後頸が確認されているヒアルロン酸合成酵素の関節内組織、細胞への遺伝子導入による新たな膝OAに対する治療を目指しており、今回の研究成果では膝OAモデルマウスの作成の確立、薬剤の関節内投与による効果の確認、ヒアルロン酸阻害による抗炎症効果までを動物実験で示すことができた。今回の成果をもとにウイルスベクターによる遺伝子導入とそれによる膝OAの進行抑制効果を今後の研究につなげていく予定である。

研究成果の概要（英文）：We evaluated the effect of methylumbelliferone (4-MU), that we previously showed its anti-inflammatory features in activated osteoarthritic (OA) chondrocytes in vitro, using in vivo model to confirm whether 4-MU was effective at limiting the effects of OA on articular cartilage in vivo. The progression of OA was evaluated after destabilization of the medial meniscus (DMM) surgery on C57BL/6 mice in the presence or absence of 4 MU containing chow. Mice fed 4-MU after DMM surgery exhibited significant suppression of OA starting from an early stage in vivo. Mice fed 4-MU exhibited lower OARSI scores after DMM; reduced osteophyte formation and reduced MMP3 and MMP13 immunostaining. 4-MU also exerted pronounced chondroprotective effects on murine joint cartilage exposed to IL1 in vitro and, blocked IL1 -enhanced lactate production in cartilage explants. We will evaluate HAS2 overexpression effect using similar experimental model.

研究分野：整形外科学

キーワード：ヒアルロン酸

1. 研究開始当初の背景

現在行われているヒアルロン酸の関節内投与の効果は次に示すものである。

**物理的效果**：炎症によって低分子化をうけた関節液中のヒアルロン酸を高分子ヒアルロン酸で置換することで、関節軟骨にかかる機械的ストレスを減少させる効果。

**補充効果**：ヒアルロン酸を喪失した軟骨組織に高分子ヒアルロン酸を補充する、という変性軟骨に対するサプリメントとしての効果。

**生物学的効果**：軟骨細胞表面の CD44 に結合、作用することで、アグリカン、2型コラーゲンの分解酵素であるアグリカナーゼ(主に ADAMTS-4、-5)、コラゲナーゼ(主に MMP-13)をはじめその他多くの OA の進行に関連する分解酵素の発現を抑制する薬理的効果。

しかし一方で、問題点・課題として次のものが挙げられる。

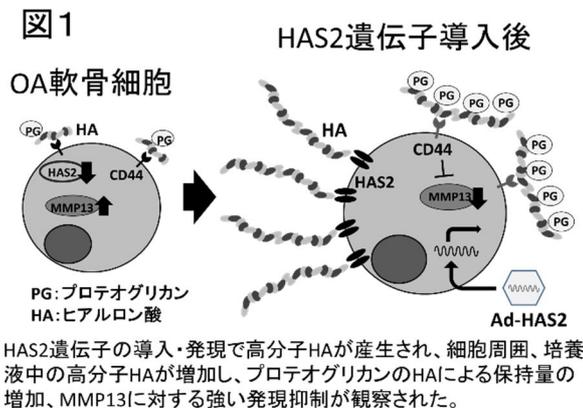
- (1) 投与された中・高分子ヒアルロン酸の多くはマトリックスの間を浸透していくことができないため、ヒアルロン酸は軟骨の最表層にしか作用できていない。
- (2) 注射の痛みという身体的ストレスを定期的にする。
- (3) 刺入部局所の炎症反応と、比較的稀ではあるが感染の危険性がある。

効果にも影響する最も重要な問題点は(1)であり関節内投与されたヒアルロン酸は数百 kDa という高い分子量のため細胞外マトリックス間を浸透し軟骨細胞に到達するには至らず、表層の軟骨細胞の一部にのみ作用しているだけとなっており、過去の多くの研究で示されてきた軟骨細胞に対する薬理作用を臨床の場において十分に発揮できていないと考えられる。

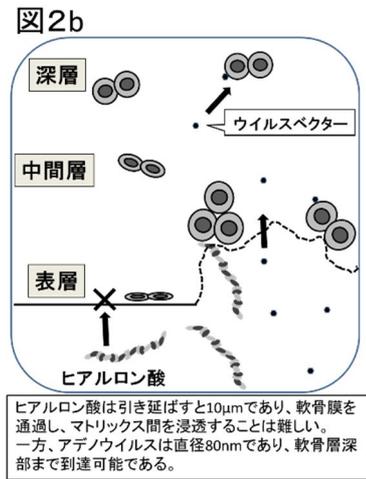
2. 研究の目的

本研究の目的は膝 OA の保存治療の中心的役割を担ってきたヒアルロン酸の関節注射における問題点を解決するべく、単回の注射によるウイルスベクターの投与で軟骨細胞、滑膜細胞に HAS2 を遺伝子導入し、内因性のヒアルロン酸の産生を高めるという新たな方法の有効性を in vivo で検証し、臨床応用

に展開するための基盤とすることである。我々はこれまでの研究で、HAS2 をヒト OA 軟骨細胞に遺伝子導入し過剰発現させることで内因性ヒアルロン酸の産生が亢進すること(Ishizuka et al. J Biol Chem. 2016)、また IL-1 により誘導される MMP-13 の発現が HAS2 の発現亢進によって濃度依存的に、かつ著しく抑制されることを発見し報告している(米国整形外科学会(ORS) 2014 で発表)(図 1)。これら内因性ヒアルロン酸の発現亢進は、外因性にヒアルロン酸を添加した場合と比較して著しく高い蛋白分解酵素の発現抑制効果を示した(国際ヒアルロン酸学会(ISHAS) 2015 で発表)。HAS2 遺伝子の遺伝子導入に関して、遺伝子導入後に HAS2 遺伝子の発現をコントロールするためドキシサイクリン発現誘導システム(図 2a)を用いることを考え、予備実験として 2D、3D 培養下で Ad-tet-mycHAS2 を遺伝子導入した軟骨細胞がドキシ



サイクリン濃度依存的に HAS2 を発現することを確認している。また、我が国ですでに臨床応用されているアデノウイルス (Ad-V) アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた遺伝子導入を計画しており、そのためにヒトの膝関節組織を用いた Ex-vivo の研究で、Ad-V, AAV で滑膜に効率的に遺伝子導入が可能であること、また軟骨に関しては変性が進んだ軟骨ほど導入効率が高く、正常に近い軟骨では遺伝子導入がされにくいことを確認している。(図 2b) 正常軟骨には遺伝子導入されないことは臨床応用を考える上では非常に重要であると考えている。



### 3. 研究の方法

- ・ OA model mouse の作成手技の確立

- ・ OA model mouse の膝関節内への薬剤 (具体的にはヒアルロン酸合成阻害剤 4-MU) 投与により OA 進行が抑制されるかを検証する。具体的には膝関節のサフラニン O 染色でプロテオグリカンの喪失が生じていることを確認、また同組織における免疫組織化学染色を行い MMP-3、-13 の発現解析により各種分解酵素のタンパクの発現上昇、局在を確認する。

- ・ ウイルスベクターの種類、ウイルスベクター投与のタイミング、ドキシサイクリンの投与量とタイミング、遺伝子導入効率の各組織での確認を行う。

具体的には In vivo 実験において過去の研究で用いられている OA model mouse (Destabilization of the medial meniscus (DMM) OA model mouse) を作成後、膝関節内へ Ad-tet-GFP (green fluorescence protein)、AAV-tet-GFP の2種類のウイルスベクターを投与し、2週間経過した後にドキシサイクリンを経口投与、以降2, 4, 8, 12週で膝関節の組織切片を作成し軟骨、滑膜での GFP の発現の確認とドキシサイクリンの投与量の至適範囲を決定する。また Ad-V と AAV で遺伝子導入効率、蛋白発現までの時間などを比較・検討し以降の実験でどちらのウイルスベクターを用いるか決定する。

- ・ 上述した実験で得られたデータをもとに HAS2 の遺伝子導入によるマウス膝関節内でのヒアルロン酸濃度の上昇、分子量の定量と OA に対する抗炎症作用の有無を検証する。

### 4. 研究成果

上述のごとく作成した DMM OA モデルマウスを用いて、ヒアルロン酸合成阻害剤である 4-Methylumbelliferone, 4-MU マウス膝関節内に投与し、プロテオグリカンの喪失が抑制されることを確認した。また同様の実験系で OA 変化によって生じる MMP-3, 13 の発現亢進が 4-MU の投与により抑制されることを確認した。上述した OA 変化が膝関節内への薬剤投与によって抑制されることを確認できたため、次に HAS2 の過剰発現による効果を確認することとなった。

しかしながら、HAS2 過剰発現のためのウイルスベクター投与の条件調節を行う経過でウイルスベクターが不足し、再度増殖を行うためのプロセスに時間を要したため、今回の期間においては HAS2 の過剰発現による膝 OA の抑制効果の検証をするには至らなかった。

本研究成果をもとに今後の研究として上述した HAS2 の遺伝子導入を OA モデルマウスの膝関節に行い、OA の進行抑制効果を検証することを今後の研究として現在計画している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Ishizuka S, Tsuchiya S, Ohashi Y, Terabe K, Askew EB, Ishizuka N, Knudson CB, Knudson W.  | 4. 巻<br>294               |
| 2. 論文標題<br>Hyaluronan synthase 2 (HAS2) overexpression diminishes the procatabolic activity of chondrocytes by a mechanism independent of extracellular hyaluronan. | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>J Biol Chem   | 6. 最初と最後の頁<br>13562-13579 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1074/jbc.RA119.008567   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する              |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Saho Tsuchiya, Shinya Ishizuka, Kenya Terabe, Yoshifumi Ohashi, Naoko Ishizuka, Emily B. Askew, Cheryl B. Knudson, Warren Knudson |
| 2. 発表標題<br>HAS2 Overexpression in Chondrocytes Downregulates Cytokine Activated Metabolism   |
| 3. 学会等名<br>2019 Annual Meeting of Orthopaedic Research Society（国際学会）   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Saho Tsuchiya, Shinya Ishizuka, Warren Knudson                                  |
| 2. 発表標題<br>HAS2 Overexpression in Chondrocytes Downregulates Cytokine Activated Metabolism |
| 3. 学会等名<br>Orthopaedic Research Society（国際学会）  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Idota M, Ishizuka S   |
| 2. 発表標題<br>Anti-inflammatory effect of 4-methylumbelliferone (4-MU) in human ACL-derived cells |
| 3. 学会等名<br>2021 Annual Meeting of Orthopaedic Research Society（国際学会）                           |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>井戸田 大, 平岩 秀樹, 石塚 真哉  |
| 2. 発表標題<br>ヒト前十字靭帯由来細胞における4-Methylumbelliferone(4-MU)およびヒアルロン酸合成酵素2(HAS2)過剰発現による抗炎症作用 |
| 3. 学会等名<br>第35回日本整形外科学会基礎学術集会   |
| 4. 発表年<br>2021年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|