

令和 3 年 6 月 1 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：18K16678

研究課題名（和文）軟骨細胞における代謝リプログラミングのメカニズムと役割の解明

研究課題名（英文）Mechanism for the Chondroprotective Effects of Glycolysis Inhibitor

研究代表者

寺部 健哉（Terabe, Kenya）

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：10816870

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究期間において、軟骨細胞の炎症下において細胞内の代謝リプログラミングが発生しglycolysisが亢進することを確認した。更に2DG、DCA、ガラクトースなどのglycolysis阻害剤が代謝変動を介して抗炎症効果、軟骨保護作用を有することを明らかにした。本研究ではglycolysis阻害剤の効果発現メカニズムを検討した結果、AMPKが代謝リプログラミングを制御している結果が得られ、さらにAMPKの活性化を亢進させる作用を持つAICARが軟骨保護作用を有することを明らかにした。軟骨変性において代謝リプログラミングが発生し、これを制御することで軟骨を保護できる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

OAは一般的な関節障害である一方で、これまでに臨床応用されているのは高分子ヒアルロン酸の関節内注射のみであり、変性進行を制御する薬物治療の確立には至っていない。OAはメタボリックシンドロームに共通する慢性炎症を基盤とした全身性疾患ととらえられるようになっており、この観点からも軟骨変性において代謝リプログラミングが関与していることを本研究で明らかにしたことは重要である。さらにこの代謝を制御して効果を発現する2DG、ガラクトースやAICARが軟骨保護作用を有することを明らかにしたのは画期的である。これによりOAの病因、病態理解につながるのみならず、新たなOA治療薬に発展することが期待できる。

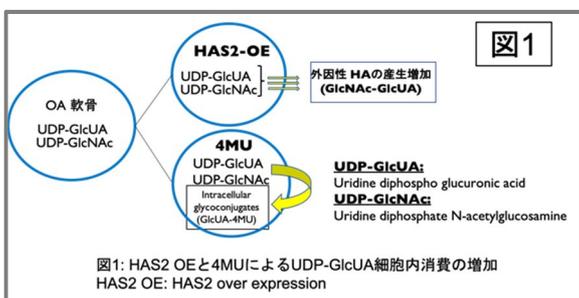
研究成果の概要（英文）：We mainly demonstrated that inflammation by induced metabolic reprogramming which is reduced mitochondrial potential and enhanced dependence on glycolysis in chondrocytes. We also demonstrated that glycolysis inhibitors such as 2DG returned the cell metabolism, and reversed the pro-inflammatory agents-induced increases the expression of MMP13. Although IL-1 lost safranin O staining in cartilage samples, coincubation with glycolysis inhibitors blocked in the loss of proteoglycan. AMPK is associate with energy homeostasis in chondrocytes. IL-1 treatment decreased accumulation of phosphor AMPK but co-treatment with glycolysis inhibitors resulted in a rescue of the pAMPK status. Co treatment with AICAR, which is inducer of AMPK, also induced chonroprotective effect, glycolysis inhibitors or AICAR have chondroprotective effect by changing metabolism and upregulate AMPK.

研究分野：整形外科学

キーワード：変形性関節症 metabolic reprogramming 嫌気性解糖 2-Deoxy-D-glucose

1. 研究開始当初の背景

変形性膝関節症 (OA) は最も一般的な関節障害である。一方でその病因、病態についてはいまだ未解明であり関節変性の進行を制御する治療法の確立には至っていない。我々はこれまでに継続してあるヒアルロン酸 (HA) の研究を継続してきた。HA 関節注射は OA の治療薬ガイドラインとして推奨されているように、軟骨保護作用を有することは明らかである (Bannuru RR et al Osteoarthritis Cartilage 2011)。我々の研究結果から HA 合成酵素である HAS2 を軟骨細胞に強制発現 (HAS2OE) すると軟骨保護作用を示し矛盾のない結果を得た。一方で逆の作用を持つ HA 合成阻害剤である 4-Methylumbelliferone (4-MU) は細胞外 HA を減少させるにも関わらず、ほぼ HA や HAS2OE と同様の軟骨保護作用を示した (Ishizuka S et al J Biol Chem 2016)。この結果より我々は HA の効果は細胞外 HA のみではなく他のメカニズムの存在を考慮した。そこで HAS2OE と 4MU の共通点を検討した結果、細胞内のウリジンニリン酸グルクロン酸 (Uridine diphosphate



glucuronic acid: UDP-GlcUA) の消費について注目した。HA は N-アセチルグルコサミン (Uridine diphosphate N-acetylglucosamine: UDP-GlcNAc) と UDP-GlcUA の二糖による繰り返し構造からなるが、HAS2OE と 4MU は細胞内の UDP-GlcUA の消費が亢進する (図1)。これらより細胞外の HA

ではなく細胞内の sugar pool (UDP-GlcUA) の低下が HA の効果に重要であると考えた。そこで乳癌細胞に HAS2 を強制発現すると細胞内の sugar pool を低下させ細胞内の糖代謝が変化し、細胞の表現系が変化するという報告 (Chanmee T et al J Biol Chem 2016) から軟骨細胞でも細胞糖代謝の変動が関与していると仮説を立てた。通常細胞は解糖系代謝によってグルコースが酸化されピルビン酸となったのちミトコンドリアに運ばれてクエン酸回路代謝により ATP を産生する (図3)。一方同時期に OA が進行すると代謝リプログラミングが発生し、嫌気性解糖 (glycolysis) によるピルビン酸から乳酸への変換が優位となる (Mobasher A et al Nat Rev Rheumatol 2017)。また glycolysis の亢進によりミトコンドリアダメージが増加し軟骨細胞のエネルギー代謝の key regulator である AMP-activated protein kinase (AMPK) の減少につながると報告されている。以上より我々はこの glycolysis 亢進を抑制することで軟骨保護作用を得られるという仮説のもとで研究を行った。HIF1 は低酸素ストレスに対する適応応答で代謝リプログラミングを発生させる中心的な転写因子であるが、軟骨細胞への IL-1 刺激によって HIF1 発現の亢進を確認した。さらに glycolysis 阻害剤である 2-Deoxy-D-glucose (2-DG) を用いた結果、2DG は MMP13 などの軟骨分解酵素の発現を抑制する効果を認め、細胞外のプロテオグリカンの維持に

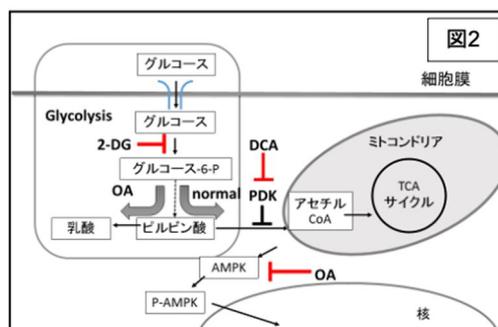


図3: Western blot and bar graphs showing the effect of 2-DG on IL-1β-induced expression of MMP13 and TSG6. The Western blot shows protein levels for MMP13 and TSG6 in cells and medium. The bar graphs show the relative expression of MMP13 and TSG6. The bottom panel shows Safranin O staining of cartilage explants under control, IL-1β, and IL-1β + 2-DG conditions.

有用であった (図 2)。これは glycolysis を阻害する薬剤が OA に対して高い有用性をもつ可能性を示唆しており、この代謝変動が重要であると考えて研究を継続している。

## 2. 研究の目的

OA における代謝リプログラミングの意義を明らかにすることで現在まだ不十分な OA の病態解明に近づくことである。OA は加齢に伴い有病率が増加する (Yoshimura N et al. Int Epidemiol. 2010) が、これはメタボリックシンドロームに共通する慢性炎症を基盤としたものであり、OA は単純な関節疾患ではなく、全身性疾患ととらえられるようになっている。この観点からも代謝リプログラミングの制御としての glycolysis 阻害剤が有用な治療薬となり得る可能性がある。本研究では in vitro での新たな OA 細胞モデルを使用し glycolysis の更なる機能解析をすすめ、in vivo で glycolysis 阻害剤の有効性を検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1). in vitro

#### **IL-1 刺激による mitochondrial respiration (好気性代謝) と glycolysis (嫌気性代謝) の変動評価**

ウシ関節軟骨に IL-1 刺激に加えて、4MU と 2DG の有無による代謝変動を細胞外 flux analyzer (Agilent Technologies 社製) で検討した。

#### **その他の OA モデルで glycolysis の有無を確認**

その他の pro-inflammatory agents として N-terminal fibronectin fragment preparation (FN-fr)、lipopolysaccharide (LPS)、tumor necrosis factor (TNF) を用いて 4MU と 2DG の効果を MMP13 の発現で検討した。

#### **2DG 以外の glycolysis 阻害剤の有用性について検討**

2DG 以外の glycolysis 阻害剤として dichloroacetate (DCA) とガラクトース培養を用いて IL-1 $\beta$  刺激による glycolysis 亢進と MMP13 の発現の効果を検討した。

#### **HIF1 制御による抗炎症効果の検討**

代謝リプログラミングのメカニズムの検討目的に siRNA 法を用いて HIF1 を knockdown して MMP13 の発現を検討した。

#### **glycolysis 導入による AMPK の活性化変動の解析**

IL-1 $\beta$  刺激による glycolysis 導入によって、または glycolysis 阻害剤の使用での AMPK の活性化の変動について検討した。

#### **5-Aminoimidazole-4-Carboxamide Riboside (AICAR) による AMPK 活性化亢進の検討**

IL-1 $\beta$  刺激による炎症下に AMPK を活性化する作用を持つ AICAR が軟骨保護作用を有するか MMP13 の発現とサフラニン O 染色で検討した。

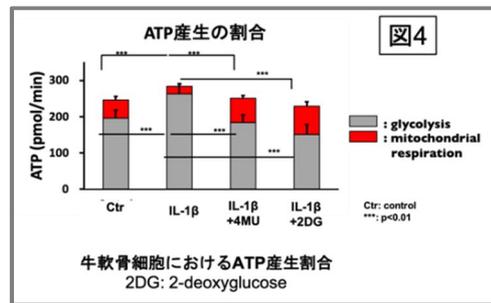
### (2). in vivo

強制走行負荷による OA モデルマウスで 2-DG の効果を検討した。BALB/c マウスを 12m/min で 60 分、週 5 回のトレッドミル走行を 4 週間強制走行装置 (室町機械社) で施行したものを OA モデルとして検討した。

## 4. 研究成果

【軟骨細胞における IL-1 $\beta$  刺激による glycolysis の評価】

牛軟骨を培養し IL-1 で刺激し flux analyzer により ATP 産生における mitochondrial respiration(好気性代謝)と glycolysis(嫌気性代謝)の寄与率を検討した。さらに 4MU と 2DG を添加した変化を確認した(図 4)。興味深いことに軟骨細胞は無血管野に存在するため他細胞では ATP 産生において mitochondrial respiration(好気性代謝)の寄与率



が高いことが知られているが軟骨細胞では control 細胞でも ATP 産生の約 80%が glycolysis 由来であった。IL-1 刺激によりこの glycolysis の割合が上昇し 4MU と 2DG では control と同様に低下した。これより IL-1 刺激により代謝リプログラミングが発生し glycolysis が亢進した。さらに 4MU はこの代謝リプログラミングを抑制していることが明らかとなった。

#### 【他の pro-inflammatory agents における 4MU と 2DG の抗炎症効果の検討】

In vitro 実験系でのその他の OA モデルとして pro-inflammatory agents である FN-fr、LPS、TNF を用いて 4MU と 2DG の効果を MMP13 の発現で確認した。FN-fr、LPS、TNF はいずれも軟骨細胞における MMP13 の発現亢進を認めたが、4MU と 2DG は IL-1β 刺激時の検討と同様に FN-fr、LPS、TNF による刺激においても MMP13 の亢進を抑制した(図 5)。

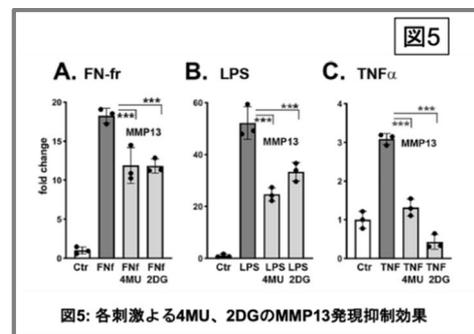


図5: 各刺激による4MU、2DGのMMP13発現抑制効果

#### 【他の glycolysis 阻害剤である DCA の効果の検討】

2DG 以外の glycolysis 阻害剤である dichloroacetate(DCA)を用いて検討した。DCA はピルビン酸からアセチル CoA への変換を阻害する 3-ホスホイノシド依存性プロテインキナーゼ 1(PDK1)の阻害剤である(図 2)。DCA は IL-1 による glycolysis 阻害し、2DG と同様に MMP13 の発現抑制効果を確認した(図 6)。

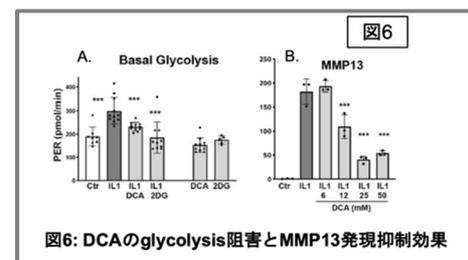


図6: DCAのglycolysis阻害とMMP13発現抑制効果

#### 【他の glycolysis 阻害剤であるガラクトースの効果の検討】

次に 2DG、DCA と同様に glycolysis 阻害効果を持つガラクトースについて検討した。ガラクトースは単糖類の一つで、その特徴的な代謝から glycolysis の抑制、TCA cycle の亢進作用が報告されている(Aguer C et al.

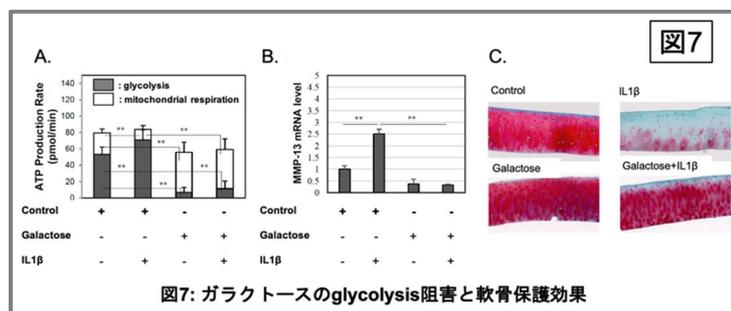
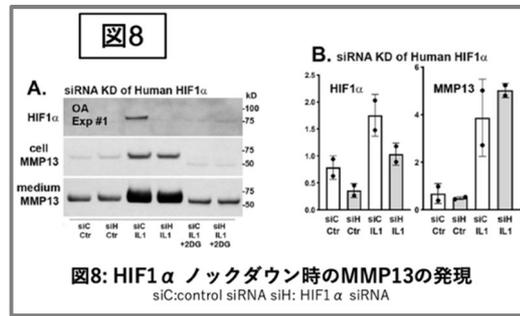


図7: ガラクトースのglycolysis阻害と軟骨保護効果

PLoS One 2011)。我々の実験系でもガラクトース培養により glycolysis 亢進の抑制を認めた(図 7A)。さらに MMP13 の発現亢進抑制に加えて 2DG と同様にサフラニン O 染色でのプロテオグリカンの IL-1β 刺激による減少を抑制した(図 7B.C)。これにより 2DG と同様に軟骨保護作用を確認した。

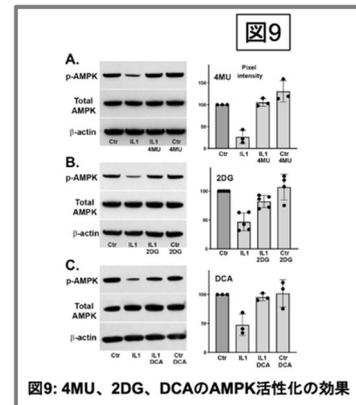
【HIF1 制御による抗炎症効果の検討】

先行実験から軟骨細胞は IL-1 刺激により HIF1 の発現が亢進する。HIF1 は glycolysis 関連遺伝子を発現し、代謝を変動させて炎症に関与していると仮説を立てた。siRNA 法で HIF1 を knockdown して検討したところ軟骨細胞の MMP13 の発現は抑制されなかった (図 8)。この結果から HIF1 は glycolysis 亢進に関与していると考えられるが、glycolysis 阻害による効果は HIF1 以外の制御因子が存在する可能性を考慮した。



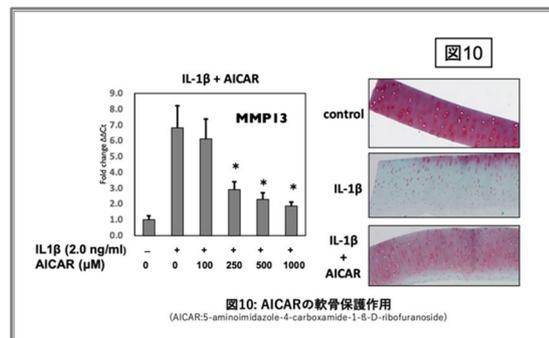
【glycolysis 導入による AMPK の挙動の解析】

以上の結果より、我々は AMPK に注目し検討した。IL-1 刺激により AMPK の活性化した状態である phospho-AMPK(pAMPK)発現は減少した (図 9)。2DG、4MU、DCA はいずれも pAMPK が control と同程度に維持されていた。以上より炎症により pAMPK の活性化が低下して glycolysis 亢進、軟骨破壊につながる可能性を示唆した。



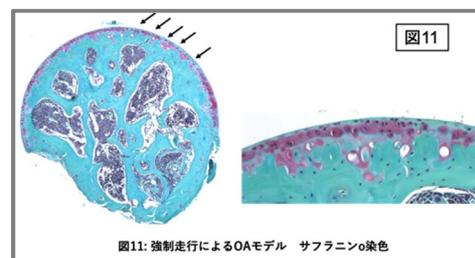
【AICAR による軟骨保護作用の検討】

上記より IL-1 刺激による MMP13 発現亢進時に AMPK 活性化の低下を認め、glycolysis 阻害剤がその活性化を維持したことから AMPK の活性化維持が軟骨保護作用を有する可能性を検討した。AMPK を活性化作用のある AICAR は IL-1 刺激による MMP13 発現の亢進を抑制し、サフラニン O 染色を維持し軟骨保護作用を示した (図 10)。



【OA マウスモデルを用いた 2DG の効果の検討】

強制走行負荷による OA モデルマウスを作成した。強制走行後大腿骨頭のサフラニン O 染色を行い一部染色性の低下を認めたが (図 11)、2-DG の関節注射による実験モデルの作成には至らず、評価可能な結果を得ることができなかった。



【まとめ】

以上の検討から我々は、軟骨細胞の炎症下において細胞内の代謝プログラミングが発生し glycolysis が亢進することを明らかにした。さらに 2DG をはじめとする glycolysis 阻害剤が抗炎症効果、軟骨保護作用を有することを確認した。代謝プログラミングを制御する因子を検討したところ本実験系では AMPK が制御している可能性を示した。さらに AICAR による軟骨保護作用を明らかにした。以上より 2DG、ガラクトースや AICAR が代謝変動を介して新たな OA 治療薬となる可能性を示した。今後も OA における代謝プログラミングのメカニズムの解明と治療薬への実現化のために研究を更に進めていく予定である。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Terabe Kenya, Ohashi Yoshifumi, Tsuchiya Saho, Ishizuka Shinya, Knudson Cheryl B., Knudson Warren	4. 巻 294
2. 論文標題 Chondroprotective effects of 4-methylumbelliferone and hyaluronan synthase-2 overexpression involve changes in chondrocyte energy metabolism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 17799 ~ 17817
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.009556	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 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件/うち国際学会 9件）

1. 発表者名 Kenya Terabe, Yoshifumi Ohashi, Shinya Ishizuka, Saho Tsuchiya, Cheryl B. Knudson, Warren Knudson
2. 発表標題 MECHANISM OF CHONDROPROTECTIVE EFFECTS OF 4-METHYLUMBELLIFERONE AND 2-DEOXYGLUCOSE
3. 学会等名 Hyaluronan2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshifumi Ohashi; Kenya Terabe; Shinya Ishizuka; Saho Tsuchiya; Cheryl B. Knudson; Warren Knudson
2. 発表標題 Mechanism for the Chondroprotective Effects of 4-Methylumbelliferone in Chondrocytes and Cartilage
3. 学会等名 Orthopaedic research society 2019 Annual meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大橋 禎史, 前田 真崇, 紀平 大介, 服部 恭介, 岸本 賢治, 寺部 健哉, 高橋 伸典, 小嶋 俊久, 石黒 直樹
2. 発表標題 変形性関節症における一酸化窒素産生についての考察
3. 学会等名 第33回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 服部恭典 高橋伸典 浅井秀司 寺部健哉 祖父江康司 西梅剛 鈴木望人 横田裕 大橋禎史 岸本賢治 紀平大介 前田真崇 石黒直樹 小嶋俊久
2. 発表標題 IL-1 存在下におけるTRPV4の軟骨破壊に対する役割の検討
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 服部恭典 高橋伸典 浅井秀司 寺部健哉 祖父江康司 西梅剛 鈴木望人 横田裕 大橋禎史 岸本賢治 紀平大介 前田真崇 石黒直樹 小嶋俊久
2. 発表標題 IL-1 存在下におけるメカニカルストレスの軟骨破壊に対する影響の検討
3. 学会等名 日本リウマチ学会ベーシックリサーチ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenya Terabe, Nobunori Takahashi, Yoshifumi Ohashi, Toshihisa Kojima, Naoki Ishiguro, Cheryl Knudson, Warren Knudson
2. 発表標題 MECHANISM OF CHONDROPROTECTIVE EFFECTS OF 4-METHYLBELLIFERONE AND 2-DEOXYGLUCOSE
3. 学会等名 American College of Rheumatology annual meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横田裕、高橋伸典、浅井秀司、寺部健哉、石黒直樹、小嶋俊久
2. 発表標題 MTX and Siglec-9 combination treatment suppresses the expression of MMP-13 induced IL-1 in synovium sarcoma cell (SW982)
3. 学会等名 日本リウマチ学会ベーシックリサーチ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenya Terabe, Nobunori Takahashi, Shinya Ishizuka, Yoshifumi Ohashi, Masataka Maeda, Warren Knudson, Cheryl Knudson, Toshihisa Kojima, Naoki Ishiguro
2. 発表標題 MECHANISM OF CHONDROPROTECTIVE EFFECTS OF 2-DEOXYGLUCOSE
3. 学会等名 annual European Congress of Rheumatology 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kenya Terabe, Nobunori Takahashi, Shinya Ishizuka, Yoshifumi Ohashi, Masataka Maeda, Warren Knudson, Cheryl Knudson, Toshihisa Kojima, Naoki Ishiguro
2. 発表標題 Mechanisms of chondroprotective effects of 2-deoxyglucose
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会 International Concurrent Workshop
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yutaka Yokota, Nobunori Takahashi, Kenya Terabe, Toshihisa Kojima, Shiro Imagama
2. 発表標題 Exogenous Hyaluronan Inhibits Enhanced Glycolysis In Articular Chondrocytes Treated With II-1
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2021 Annual Meeting Registration (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshifumi Ohashi, Nobunori Takahashi, Kenya Terabe, Toshihisa Kojima, Shirou Imagama, Cheryl . Knudson, Warren Knudson
2. 発表標題 The Metabolic Change In Osteoarthritis
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2021 Annual Meeting Registration (国際学会)
4. 発表年 2021年

1 . 発表者名 Kenji Kishimoto, Takahashi Nobunori, Shuji Asai, Kenya Terabe, Toshihisa Kojima, Shiro Imagama
2 . 発表標題 Metabolic Change in Early Inflammatory Synovial Cells
3 . 学会等名 Orthopaedic Research Society 2021 Annual Meeting Registration ( 国際学会 )
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 K. Hattori, K. Terabe, N. Takahashi, T. Kojima, S. Imagama
2 . 発表標題 The activation of transient receptor potential vanilloid-4 inhibits IL-1 -induced articular cartilage degradation via regulation of the CaMKK/AMPK/NF- B signaling pathway
3 . 学会等名 rthopaedic Research Society 2021 Annual Meeting Registration ( 国際学会 )
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Maeda Masataka, Kenya Terabe, Shuji Asai, Nobunori Takahashi, Toshihisa Kojima, Shiro Imagama
2 . 発表標題 Chondroprotective effect of AICAR involve changes in chondrocyte energy metabolism
3 . 学会等名 Orthopaedic Research Society 2021 Annual Meeting Registration ( 国際学会 )
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 寺部 健哉、高橋 伸典、大橋 禎史、横田 裕、岸本 賢治、服部 恭典、紀平 大介、前田 真崇、小嶋 俊久、石黒 直樹
2 . 発表標題 glycolysis 阻害剤である 2-Deoxy-D-glucose の軟骨保護作用の検討
3 . 学会等名 第 33 回日本軟骨代謝学会
4 . 発表年 2021年

1. 発表者名 岸本 賢治、高橋 伸典、寺部 健哉、石黒 直樹、小嶋 俊久
2. 発表標題 炎症下における滑膜細胞の代謝リプログラミング
3. 学会等名 第 33 回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

本研究課題で得られた研究成果について、発表した "Chondroprotective effects of 4-methylumbelliferone and hyaluronan synthase-2 overexpression involve changes in chondrocyte energy metabolism" によって第 26 回日本軟骨代謝学会賞を受賞した。

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