

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：83904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09619

研究課題名(和文)代謝リプログラミング制御による軟骨破壊抑制—新規関節リウマチ治療を目指して—

研究課題名(英文) Inhibition of cartilage destruction by controlling metabolic reprogramming - Aiming for novel rheumatoid arthritis treatment -

研究代表者

小嶋 俊久 (Kojima, Toshihisa)

独立行政法人国立病院機構(名古屋医療センター臨床研究センター)・その他部局等・その他

研究者番号：70378032

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、1)滑膜細胞、ウシおよびヒト軟骨細胞を用いたLPSおよび、IL-1刺激による培養系、2)マウスの変形性関節症(半月板切除によるメカニカルストレス)モデルにて、代謝リプログラミング制御による滑膜炎抑制、軟骨破壊抑制の可能性について検証した。LPSおよび、IL-1刺激により、タンパク分解酵素の発現、代謝リプログラミング(glycolysis、glutaminolysis、脂肪代謝)は亢進することが確認された。それぞれの代謝阻害薬は、代謝リプログラミングを制御し、軟骨破壊抑制効果が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチ(RA)治療において、サイトカインを標的とした分子標的治療を用いても半数以上の患者は、寛解に至らず、骨軟骨破壊が進行している。治療効果積み上げのためには、サイトカイン以外を標的にした、軟骨破壊抑制を目指す介入法が必須である。近年、解糖系代謝リプログラミングを制御することが、炎症、悪性腫瘍の新たな治療標的として注目されている。軟骨破壊に対する代謝リプログラミングの関与を、glycolysis、アミノ酸代謝、脂肪代謝の多方面から検討した。代謝リプログラミング制御によるRAにおける軟骨破壊抑制を目指す治療開発の足掛かりになると考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the possibility of suppressing synovitis and cartilage destruction by regulating metabolic reprogramming in 1) LPS- and IL-1 -stimulated synovial cells, bovine and human chondrocytes, and 2) a mouse model of osteoarthritis (mechanical stress caused by meniscectomy). LPS and IL-1 stimulation enhanced proteolytic enzyme expression and metabolic reprogramming (glycolysis, glutaminolysis, and fat metabolism). Each metabolic inhibitor was shown to regulate metabolic reprogramming and inhibit cartilage destruction.

研究分野：整形外科

キーワード：軟骨代謝 関節リウマチ 代謝リプログラミング

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)治療において、強力な生物学的製剤治療を用いても半数以上の患者は、寛解に至らず、骨軟骨破壊が進行している。軟骨は関節機能の要であり、治療効果積み上げのためには、サイトカイン以外を標的にした、軟骨破壊抑制を目指す介入法が必須である。

近年、解糖系代謝リプログラミング(ミトコンドリアでの好氣的解糖系から嫌氣的解糖 glycolysis への変化)を制御することが、炎症、悪性腫瘍の新たな治療標的として注目されている。これまで、我々は、軟骨破壊機序として機械的ストレスに注目して研究を進めてきた。

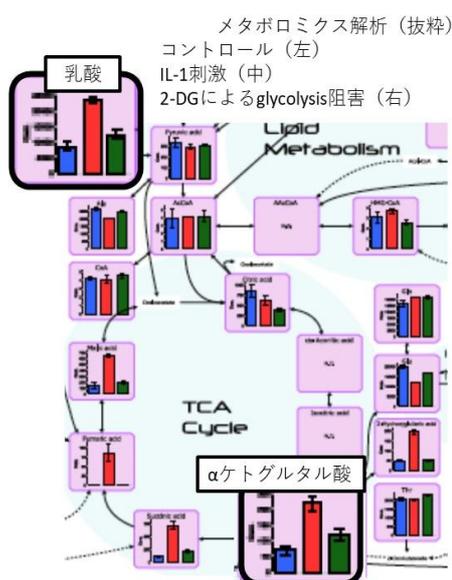
今回、機械的ストレスと解糖系代謝リプログラミングの関連が解明されれば、glycolysis の制御は軟骨破壊そして滑膜炎の両方の病態に関与しうる。以上より本研究課題の核心をなす学術的「問い」は“軟骨細胞において、機械的ストレスは解糖系代謝リプログラミングと関連するか、そして、glycolysis の制御が新たな RA 治療戦略となりうるか否か”である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1)軟骨細胞における機械的ストレスと解糖系代謝リプログラミングの関連について、さらに、炎症性サイトカイン、TLRの刺激による機械的ストレスへの相乗効果を解明すること、2)マウス関節炎+機械的ストレスモデルに対する glycolysis 阻害剤の軟骨破壊抑制作用を明らかにし、治療法としての可能性について検証することとした。

以上の検討に加え、軟骨細胞だけでなく、RA 関節炎の病態の中心である滑膜細胞においても解糖系代謝リプログラミングの関連について、検討することとした。

また、生体内のエネルギー代謝は、糖代謝のみならず、アミノ酸、脂質代謝など多数の経路が関連して行われている。炎症など様々な刺激により影響を受け、通常ミトコンドリアを介した好氣性解糖から嫌氣性解糖 glycolysis へ shift する。さらに、解糖系が促進されるとともに、ミトコンドリアへのグルタミン流入量が増加し、グルタミン代謝 (glutaminolysis) が促進する代謝のリプログラミングがおこるといわれている。これら



ら代謝リプログラミングが悪性腫瘍、炎症性疾患で、新たな治療標的として注目され、炎症における免疫担当細胞、滑膜細胞については、これら細部内エネルギー代謝に関する研究が進んできている。

我々も予備的検討して、単離したウシ軟骨細胞に IL-1 刺激をし、glycolysis 抑制剤である 2DG により glycolysis を抑制する実験系において、エネルギー代謝を網羅的に評価するメタボロミクス解析を行ったところ、左図に示すように、2-DG による glycolysis の抑制(乳酸の上昇抑制)と同時に glutaminolysis の抑制(ケトグルタル酸の上昇抑制)が起こっており、炎症下の軟骨細胞では同時多発的に代謝変動が発生していることが確認された(寺部健哉 他 第 37 回日本整形外科学会基礎学術集会 2022)。

そこで、糖代謝のみならず、アミノ酸、脂質代謝への介入効果も検証することとした。

3. 研究の方法

1) ウシ滑膜細胞を単離培養し、LPS 刺激を行った。炎症性サイトカイン、解糖系関連遺伝子の発現の変化、またそれに対する 2-DG の効果をリアルタイム PCR にて検討した。さらに、transcription factor cAMP response element binding protein (CREB) のリン酸化の変化について検証した。細胞内糖代謝を細胞外フラックスアナライザー(XF)で評価した。

2) ウシ軟骨細胞、変形性膝関節症由来のヒト軟骨を単離培養した。IL-1 により刺激。Glucose を galactose に置き換えて、glucolysis の変化、軟骨保護作用について検討した。

ミトコンドリアダメージを、Reactive oxygen species (ROS)、Nitric oxide (NO) により評価。細胞内糖代謝を細胞外フラックスアナライザー(XF)で評価した。

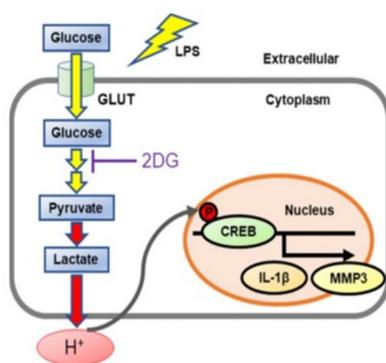
3) ウシ軟骨細胞を単離、培養し、IL-1 により刺激。グルタミン代謝阻害薬である E G C G を投与し、タンパク分解酵素 MMP 1 3 の発現(mRNA、タンパク)を評価。細胞内糖代謝を細胞外フラックスアナライザー(XF)で評価した。さらに変形性膝関節症由来のヒト軟骨を使用し、IL-1 により刺激し、MMP 1 3 の発現を検討し、グルタミン添加の有無による MMP 1 3 の発現の変化を検討した。

4) ウシ軟骨細胞、変形性膝関節症由来のヒト軟骨を IL-1 により刺激し、脂質代謝調節因子である SREBP 阻害剤として fatostatin を使用した。IL-1 刺激下で fatostatin を添加し、脂肪酸合成に関わる、acetyl-CoA carboxylase(ACC)、ATP クエン酸リアーゼ(ACLY)の発現、タンパク分解酵素 MMP 1 3 の発現、AMPK のリン酸化、軟骨を explant culture し、サフラニン-0 染色に軟骨変性の抑制効果も検討した。

5) 9週齢 C57BL/6 マウスに用いて、半月板切除による変形性関節症モデル(DMM:destabilization of medial meniscus)を作成した。術後 2-DG または、生理的食塩水を週一回、15 週まで投与した。15 週時の膝関節切片を作成し、サフラニン-0 による染色性から、軟骨変性を評価した。

4. 研究成果

滑膜細胞におけるLPS刺激による炎症性変化の
Glycolysis制御による抑制効果のメカニズム



1) LPS刺激により、炎症性サイトカインIL-1 α の発現、GLUT1、HK2などのglucolysis関連分子の発現は亢進した。XFにおいても、細胞内代謝は glycolysisへ変化していることが確認された。LPS刺激により起こるglycolysisは、2DGにより抑制され、重要な転写調節因子であるCREBを調節することを示した(左図)。

(Kishimoto K et al. Arch Biochem Biophys 2021; 708:108962)

2) IL-1 刺激による軟骨細胞培養系では、グルコースの取入れに競合すると考えられるgalactoseの添加により、glycolysisの制御、ミトコンドリアダメージが抑制され、軟骨破壊抑制が可能であることを証明した(Ohashi Y et al. Sci Rep 2021; 11(1):15131)。

3) IL-1 の刺激によりMMP-13の発現は亢進した。また、XFにてglycolysisの亢進が確認された。EGCGの添加にてこれらの亢進は抑制された。glutaminolysisの制御により、glycolysisも抑制され、軟骨破壊抑制ができることを検証した(紀平大介 他 第37回日本整形外科学会基

礎学術集会 2022)。

4) fatostatinは、IL-1 刺激による亢進したMMP13もSREBPとともに抑制した。また、IL-1 刺激により亢進したACC、ACLYも抑制していた。軟骨のexplant cultureにおいて、SREBP阻害薬であるfatostatinは、IL-1 刺激による軟骨破壊を抑制した。(佐藤良 他 第37回日本整形外科学会基礎学術集会 2022)。

5) In vivoの実験系で、マウスを用いて関節炎モデルとしてcollagen-induced arthritisを、メカニカルストレスモデルとして走行負荷モデル、半月板損傷モデルを確立した。半月板損傷モデルにおいて、2-DG の関節内投与による軟骨保護作用を示した(長谷川純也 他 第35回軟骨代謝学会 2023)。

炎症、もしくはメカニカルストレスによる軟骨破壊には、様々な代謝リプログラミングが関与していることが示された。代謝リプログラミングの制御による軟骨破壊抑制の新規治療法としての可能性が示唆された。現在も、さらなる検証を積み重ねている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohashi Y, Takahashi N, Terabe K, Tsuchiya S, Kojima T, Knudson CB, et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Metabolic reprogramming in chondrocytes to promote mitochondrial respiration reduces downstream features of osteoarthritis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 15131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-94611-9	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 Kishimoto K, Terabe K, Takahashi N, Yokota Y, Ohashi Y, Hattori K, Kihira D, Maeda M, Kojima T, Imagama S.	4. 巻 708
2. 論文標題 Metabolic changes in synovial cells in early inflammation: Involvement of CREB phosphorylation in the anti-inflammatory effect of 2-deoxyglucose.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arch Biochem Biophys	6. 最初と最後の頁 108962
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.abb.2021.108962	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 Hattori K, Takahashi N, Terabe K, Ohashi Y, Kishimoto K, Yokota Y, Suzuki M, Kojima T, Imagama S.	4. 巻 11
2. 論文標題 Activation of transient receptor potential vanilloid 4 protects articular cartilage against inflammatory responses via CaMKK/AMPK/NF-kappaB signaling pathway.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 15508
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-94938-3	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 服部恭典 高橋伸典 寺部健哉 小嶋俊久他
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 日本整形外科学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kyosuke Hattori, Nobunori Takahashi, Kenya Terabe, Toshihisa Kojima et al.
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 Orthopedic Research society (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 服部恭典 高橋伸典 石黒直樹 小嶋俊久
2. 発表標題 IL-1b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回日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横田裕 高橋伸典 石黒直樹 小嶋俊久
2. 発表標題 IL-1b刺激による軟骨細胞の代謝リプログラミングに対するヒアルロン酸の効果
3. 学会等名 第34回日本整形外科基礎学術集会
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	寺部 健哉 (Terabe Kenya) (10816870)	名古屋大学・医学部附属病院・病院助教 (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	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	祖父江 康司 (Sobue Yasumori) (70790715)	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