

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09620

研究課題名(和文) ヒアルロン酸レセプターCD44の断片化阻害による、軟骨細胞の脱分化抑制効果

研究課題名(英文) The suppressive effect on chondrocyte dedifferentiation by preventing the fragmentation of hyaluronan receptor CD44

研究代表者

高橋 伸典 (Takahashi, Nobunori)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：20570196

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)：本研究期間において、主としてCD44の断片(CD44-ICD)自体が関節軟骨細胞の脱分化を誘導する事実と、CD44の断片化を阻害することで脱分化が抑制されることを明らかにした。更に関節軟骨特異的にADAM10(CD44断片化における主要プロテアーゼ)をノックアウトしたマウス(Col2a1-cre; ADAM10)では、野生型と比較して変形性関節症モデル(内側半月板不安定化)における関節軟骨変性が抑制されることを明らかにした。CD44の断片化は機能的ヒアルロン酸受容体の減少のみならず、CD44-ICD産生による脱分化誘導によっても細胞外マトリクス喪失に直結する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性関節症(OA)の根本的治療薬が存在しない現在、その病態と進行のメカニズムの理解を深めることが急務である。ヒアルロン酸は関節軟骨を構成する主要な細胞外マトリックスの一つであり、その機能を健全に保持するためには受容体であるCD44の機能が保たれることが必要である。本研究によりCD44の断片化を阻害することにより関節軟骨細胞の脱分化と機能性保持が示されたことは、今後のOA診療において新たな選択肢が生まれる可能性につながる。すなわちヒアルロン酸の関節内補充にCD44断片化阻害併用することによる効果増強は社会的意義が大きい。方法論確立と社会実装にむけて更なる開発を進める必要がある。

研究成果の概要(英文)：We mainly demonstrated that the fragment of cleaved CD44 (CD44-ICD) had a function to induce the de-differentiation of articular chondrocytes. We also demonstrated that the cartilage degradation in the conditional knock-out mice (Col2a1-cre; ADAM10) was apparently suppressed compared to that in the wild-type mice. The cleavage of CD44 can result in diminished extracellular matrix because of both decreased functional membranous receptor for hyaluronan and induction of de-differentiation by CD44-ICD.

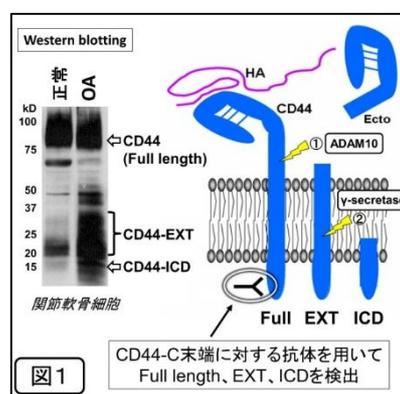
研究分野：関節軟骨の変性メカニズム

キーワード：変形性関節症 関節軟骨変性 ヒアルロン酸 CD44断片化

### 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 (OA) は日本でも最も一般的な関節障害である。OA は関節軟骨の変性疾患であり、遺伝的要因、加齢、肥満などが関与するとされるが、未だに詳細な病因は不明である。軟骨細胞において細胞 - マトリックス間の相互作用は細胞外環境の変化を感知し、修復反応を誘導する重要な手段である。この様な相互作用においてヒアルロン酸 (HA) とその主要受容体である CD44 との結合は中心的役割を果たしている。軟骨細胞において、CD44 を介する細胞内シグナル誘導は CD44-HA 結合の喪失により惹起され、マトリックス破壊を促進する遺伝子群 (MMP-3、MMP-13、iNOS) やマトリックス形成に関わる遺伝子群 (2 型コラーゲン、アグリカン、HAS-2、BMP-7) の発現を亢進させる (Schmitz I et al. Osteoarthritis Cartilage 2009)。このように CD44-HA 結合は細胞外マトリックスを保持するために必要であり、それが故に軟骨の恒常性維持に必須であるといえる。また組織学的にも、細胞外マトリックスの喪失が OA の最初期に認められる変化であることから、CD44-HA 結合の障害が OA 発症への第一歩である可能性が高いと考えられる。これまで CD44-HA 結合喪失モデルとしては、HA オリゴ糖、ヒアルロニダーゼ、dominant-negative CD44 等が用いられてきたが、生体内でこれらが同定されていないという問題点がある。

我々は最初に、OA 関節軟骨において CD44 の断片化亢進が認められることを見いだした (図 1) (Takahashi N, et al. Arthritis Rheum 2010)。軟骨細胞における CD44 の断片化では、細胞外領域における膜型 MMPs による第一切断後、C 末端側の断片が  $\gamma$ -secretase で切断されて intracellular domain (ICD) を生ずる。そして CD44-ICD は、CD44 の C 末端と細胞骨格との結合を競合的に阻害し、CD44-HA 結合を抑制することが確認された (Mellor L, et al. J Biol Chem 2013)。これらの事実から、OA へと進行していく CD44-HA 結合喪失の最初のきっかけとして、軟骨細胞における CD44 の断片化が重要であるという仮説を得るに至り、in vitro での CD44 断片化 OA 軟骨細胞モデルとして「脱分化軟骨細胞」と「メカニカルストレス過剰負荷モデル」を用いて研究を進めている。



### 2. 研究の目的

主要なヒアルロン酸 (HA) 受容体である CD44 の機能性は、関節軟骨の恒常性維持に極めて重要である。CD44 の断片化は、その受容体機能喪失および細胞内断片 (ICD) 増加による Cell-HA 結合の喪失、すなわち細胞外マトリックスの喪失に直結するため、軟骨細胞の脱分化や変形性関節症 (OA) における軟骨変性に深く関与していると考えられる。これまでに OA 軟骨細胞における CD44 断片化の亢進を確認し、各種阻害剤により CD44 の断片化抑制が可能であることを明らかにした。本研究では、軟骨細胞の脱分化における CD44 断片化の意義と ICD 自体の機能解析を更に進めると共に、OA 動物モデルを用いて CD44 断片化抑制による OA 発症抑制・治療の可能性を探る。本研究成果により、OA の病因・病態理解と治療における新たな展望が開ける可能性がある。

### 3. 研究の方法

#### (1) in vitro

以下の二つのモデルを用いて CD44 の断片化と脱分化について検討する。

- ・CD44-ICD 強制発現モデル: ウシ関節軟骨に Empty または CD44-ICD 発現プラスミドを遺伝子導入して、細胞外マトリックス形成能、遺伝子発現変化について検討する。
- ・過剰メカニカルストレスモデル: ウシ関節軟骨細胞をストレッチチャンバー上で培養し、伸展刺激を加えて過剰ストレス環境を作成して検討する。

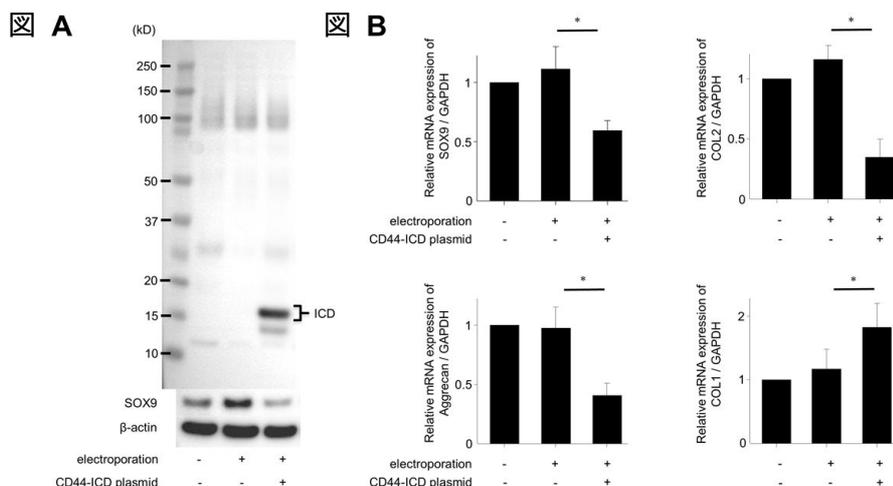
#### (2) in vivo

OA 動物モデルとして、再現性に優れた内側半月板不安定化 (DMM) モデルを採用する。片膝に阻害剤、反対側膝に生理食塩水を各々関節内注射し、6 ~ 12 週間経過後に頸椎脱臼法にて屠殺し評価する。関節軟骨特異的 ADAM10 ノックアウトマウス (Col2a1-cre; ADAM10) の系を樹立し、野生型マウス (BALB/c) との比較を行い、ADAM10 欠損の軟骨変性に対する効果を評価する。評価項目は組織学的および分子生物学的に行う。

### 4. 研究成果

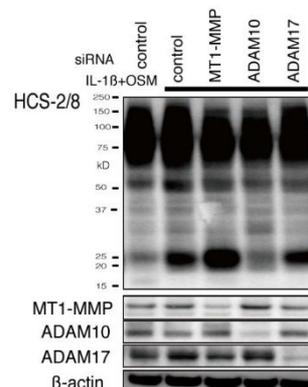
### 【CD44-ICD 強制発現による軟骨細胞の脱分化】

初代ウシ関節軟骨細胞 ( $1 \times 10^6$ ) に対して、CD44-ICD をコードするプラスミド (pCMV/myc/cyto-CD44ICD) を、NEPA21 エレクトロポレーター (NEPAGENE) を用いて遺伝子導入した (図 A)。CD44-ICD の強制過剰発現により、軟骨分化のマスターレギュレーターである SOX9 および主要な細胞外マトリクス構成分子であるアグリカンと Ⅱ型コラーゲンの発現量が低下し、Ⅰ型コラーゲンの発現量が上昇する脱分化パターンを示すことが明らかとなった (図 B)。



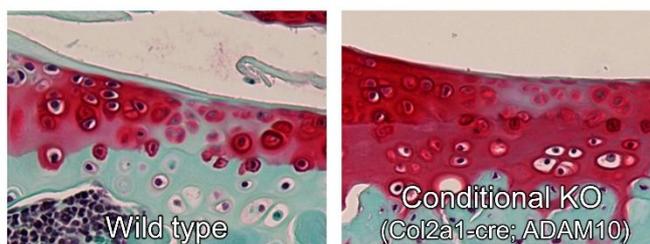
### 【過剰メカニカルストレスによる CD44 断片化と ADAM10 阻害剤による断片化抑制】

過剰なメカニカルストレスは関節軟骨変性につながる事が知られている。シリコン製専用ストレッチチャンパー上で sub-confluent (約 1 週間) まで培養し、STB140 (STREX 社) を用いて CO2 インキュベーター内で伸展刺激を加える。過剰ストレスとしては 20% 伸展、60 cycles/min を中心に設定を調整して、CD44 断片化を誘導することに成功した。我々は ADAM10 を siRNA 法によりノックダウンすることで、CD44 断片化が抑制されることから (右図) HCS-2/8 細胞において IL-1 刺激下で CD44 を断片化する主要なプロテアーゼが ADAM10 であることを発見した。



### 【OA モデルマウスにおける CD44 断片化抑制の効果】

我々は先ず関節軟骨特異的 ADAM10 ノックアウト (KO) マウス (Col2a1-cre; ADAM10) の系を樹立した。KO マウスおよび野生型 (Wild type) マウスに対して、OA モデルとして内側半月板不安定化モデルを作成した。KO マウスでは WT マウスと比較して、サフラニン O 染色の低下が抑制されており、ADAM10 阻害による OA の発症予防効果が示唆される結果であった (右図)。



### 【まとめ】

以上のように我々は、過剰なメカニカルストレス負荷は ADAM10 を主要なプロテアーゼとして CD44 を断片化することを明らかにした。更に断片化で産生される CD44-ICD はそれ自体に関節軟骨細胞を脱分化させる機能を持つことが、強制発現モデルで明らかになった。これは今までに報告されたことがなく、OA の発症病態を明らかにする上で価値のあるデータであると考えている。ADAM10 ノックアウトマウスを用いることにより、生体内においても ADAM10 を抑制することによって OA を予防できる可能性が示唆される画期的なデータを得ることが出来た。今後も CD44 断片化のメカニズムと軟骨細胞に対する影響を分子生物学的に、また動物モデルを用いた CD44 断片化の生体内での影響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7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

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(1)
2. 論文標題 Activation of transient receptor potential vanilloid 4 protects articular cartilage against inflammatory responses via CaMKK/AMPK/NF- B 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 -
1. 著者名 Ohashi Y, Takahashi N, Terabe K, Tsuchiya S, Kojima T, Knudson CB, Knudson W, Imagama S.	4. 巻 11(1)
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 Suzuki Mochihito, Takahashi Nobunori, Sobue Yasumori, Ohashi Yoshifumi, Kishimoto Kenji, Hattori Kyosuke, Ishiguro Naoki, Kojima Toshihisa	4. 巻 10
2. 論文標題 Hyaluronan suppresses enhanced cathepsin K expression via activation of NF- B with mechanical stress loading in a human chondrocytic HCS-2/8 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-57073-8	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 Terabe Kenya, Takahashi Nobunori, Cobb Michelle, Askew Emily B., Knudson Cheryl B., Knudson Warren	4. 巻 665
2. 論文標題 Simvastatin promotes restoration of chondrocyte morphology and phenotype	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2019.01.038	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 該当する

1. 著者名 Sobue Yasumori, Takahashi Nobunori, Ohashi Yoshifumi, Suzuki Mochihito, Nishiume Tsuyoshi, Kobayakawa Tomonori, Terabe Kenya, Knudson Warren, Knudson Cheryl, Ishiguro Naoki, Kojima Toshihisa	4. 巻 9
2. 論文標題 Inhibition of CD44 intracellular domain production suppresses bovine articular chondrocyte de-differentiation induced by excessive mechanical stress loading	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14901
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-50166-4	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 該当する

1. 著者名 Ogawa Yoshikazu, Takahashi Nobunori, Takemoto Toki, Nishiume Tsuyoshi, Suzuki Mochihito, Ishiguro Naoki, Kojima Toshihisa	4. 巻 14
2. 論文標題 Hyaluronan promotes TRPV4-induced chondrogenesis in ATDC5 cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0219492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0219492	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14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 寺部健哉
2. 発表標題 軟骨細胞における細胞内代謝変動の網羅的解析による検討
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 紀平 大介
2. 発表標題 軟骨細胞におけるグルタミン代謝阻害による抗炎症効果の検討
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤 良
2. 発表標題 脂質代謝制御による軟骨保護作用の検討
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋 伸典
2. 発表標題 変形性膝関節症のヒアルロン酸治療 分子生物学的理解
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshifumi Ohashi; Nobunori Takahashi; Kenya Terabe; Saho Tsuchiya; Toshihisa Kojima; Warren Knudson; Cheryl Knudson; Shiro Imagama
2. 発表標題 Metabolic Reprogramming In Chondrocytes To Promote Mitochondrial Respiration Reduces Downstream Features Of Osteoarthritis
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2021 Annual Meeting Registration (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kihira Daisuke; Nobunori Takahashi; Kenya Terabe; Toshihisa Kojima; Yoshifumi Ohashi; Masataka Maeda; Ryo Sato; Hironobu Kosugiyama; Jyunya Hasegawa; Shiro Imagama
2. 発表標題 Metabolic reprogramming via glutamine metabolism in chondrocytes under inflammatory conditions
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2021 Annual Meeting Registration (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 紀平 大介、高橋 伸典、寺部 健哉、大橋 禎史、小嶋 俊久、今釜 史郎
2. 発表標題 軟骨細胞におけるグルタミン代謝阻害による抗炎症作用の検討
3. 学会等名 第 34 回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田 真崇、寺部 健哉、浅井 秀司、高橋 伸典、小嶋 俊久、今釜 史郎
2. 発表標題 AICARの軟骨保護には細胞内代謝の変化が関係する
3. 学会等名 第 34 回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小杉山 裕巨、高橋 伸典、寺部 健哉、大橋 禎史、小嶋 俊久
2. 発表標題 高分子ヒアルロン酸のNF-kB経路に対する影響の検討
3. 学会等名 第 34 回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 良、寺部 健哉、大橋 禎史、高橋 伸典、小嶋 俊久、今釜 史郎
2. 発表標題 関節炎の炎症抑制における脂肪酸代謝の関与
3. 学会等名 第 34 回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yutaka Yokota, Nobunori Takahashi
2. 発表標題 Exogenous hyaluronan can affect the metabolic reprogramming in articular chondrocytes treated with IL-1b
3. 学会等名 Annual meeting of Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 大橋禎史、高橋伸典
2. 発表標題 4-methylumbelliferoneと2-deoxyglucoseの軟骨保護作用の作用機序
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 服部恭典、高橋伸典
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 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 岸本賢治、高橋伸典
2. 発表標題 滑膜様細胞株におけるcarbenoxoloneの抗炎症効果の検討
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年～2020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	小嶋 俊久  (Kojima Toshihisa)  (70378032)	名古屋大学・医学系研究科・准教授    (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
---------	---------