

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18496

研究課題名(和文) 変形性関節症の新しい治療 - OAモデルのCD44断片化とADAM10に注目して -

研究課題名(英文) New Treatment for Osteoarthritis - Focusing on CD44 cleavage and ADAM10 in Osteoarthritis models

研究代表者

鈴木 望人 (Suzuki, Mochihito)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：30826748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒアルロン酸レセプターであるCD44とヒアルロン酸の結合は細胞外マトリックスを保持し、軟骨細胞の恒常性を維持する。本研究期間において、変形性関節症における軟骨変性や伸展ストレスによる機械的刺激ではCD44断片化が亢進し、CD44断片化に最も関与している蛋白分解酵素としてADAM10が考えられることについて研究を行ってきた。ADAM10(CD44断片化における主要プロテアーゼ)を軟骨特異的ノックアウトマウスとしてCol2a1-cre;ADAM10f1/f1を用いて、野生型マウスと比較検討を行うことで、軟骨変性におけるADAM10の役割について示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会において変形性関節症(OA)の患者は増加傾向であるものの、有効な治療法は未だ存在せず、OAに関する研究を進めていく必要がある。軟骨変性に関与しているヒアルロン酸レセプターであるCD44について解明していくことが、軟骨変性のメカニズムを解明することにつながると考えている。本研究は軟骨変性におけるCD44断片化とADAM10の関与について解明していくことで、軟骨変性の病態のメカニズムを解明でき、OA治療および予防につなげていくことができる。本研究の成果により、今後新たなOA予防の治療薬開発の一助となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The binding of hyaluronan to the hyaluronan receptor CD44 maintains the extracellular matrix and chondrocyte homeostasis. In this study period, we have investigated that CD44 cleavage is enhanced by mechanical stimulation due to cartilage degeneration and extension stress in osteoarthritis, and that ADAM10 is the most likely proteolytic enzyme involved in CD44 cleavage as a cartilage-specific knockout mouse, Col2a1-cre; ADAM10f1/f1, and compared it with wild-type mice to demonstrate the role of ADAM10 in cartilage degeneration.

研究分野：整形外科

キーワード：変形性関節症 軟骨変性モデル DMM手術 ADMA10 CD44断片化

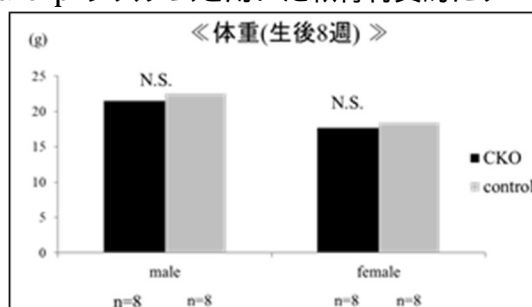
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会において変形性関節症 (OA) の患者は増加傾向であるものの、有効な治療法は未だ存在せず、OA に関する研究を進めていく必要がある。OA における軟骨変性には遺伝、年齢、肥満やメカニカルストレスなど様々な因子が関与していると考えられているが、その病因および病態などメカニズムは明らかになっていない (Guilak F, et al. Best Pract Res Clin Rheumatol.2011)。またヒアルロン酸レセプターである CD44 は軟骨変性・保護に関与している報告は散見される。ヒアルロン酸レセプターである CD44 とヒアルロン酸の結合は細胞外マトリックスを保持し、軟骨細胞の恒常性を維持すると報告がある。CD44 が断片化することによって細胞外マトリックスが消失するため、CD44 の断片化が軟骨細胞の脱分化、さらには OA にかかわっている可能性が示唆されている。以前に申請者らのグループでは、*in vitro* 研究にて OA における軟骨変性や伸展ストレスによる機械的刺激では (1) CD44 断片化が亢進している、(2) CD44 断片化に ADAM10 が関与している、について報告した。そのため軟骨変性に関与しているヒアルロン酸レセプターである CD44 について解明していくことが、軟骨変性のメカニズムを解明することにつながると考えている。本研究の目的は、ADAM10 欠損マウスを作製して、OA モデルにおける CD44 断片化と ADAM10 の関与について解明していくことである。軟骨変性の病態を解明することで、今後 OA 治療および予防につなげていきたいと考えている。

2. 研究の目的

軟骨変性では CD44 断片化が亢進し、CD44 断片化に最も関与している蛋白分解酵素として ADAM10 が考えられることを証明してきた。しかし、これまで進めてきた CD44 断片化と ADAM10 の関係について、*in vivo* 研究では証明されていないことから、我々は新たに研究を進めていく必要があると考えた。よって研究代表者は「ADAM10 欠損マウスにおいて、メカニカルストレス下で CD44 断片化は抑制され、さらに軟骨変性を抑制する」という仮説を立てた。ADAM10 欠損マウスとして、ADAM10 コンディショナルノックアウトマウスを作製して研究を行っていくことである。非特異的 ADAM10 ノックアウトマウスでは、発生に関与している ADAM10 まで欠損してしまうことから、胎児仮死となってしまう。非特異的 ADAM10 ノックアウトマウスでは研究を進めていくことが困難であり、軟骨変性について評価していくことを目的とするため、Cre/loxP システムを用いた軟骨特異的にノックアウトする ADAM10 コンディショナルノックアウトマウス作製していく。よって、発生に関与する ADAM10 の影響なく、通常の成長過程を経ることで、軟骨変性を評価することが可能となった(右図 CKO ; コンディショナルノックアウト)



トマウス、control ; 正常マウス)。本研究の目的は、ADAM10 コンディショナルノックアウトマウスを用いて、軟骨変性に関与しているヒアルロン酸レセプターであるCD44 と、CD44 断片化抑制に関与している ADAM10 について解明していくことである。

3 . 研究の方法

本研究では(1)vivo 研究下での軟骨変性における ADAM10 の役割、(2)vivo/ex vivo 研究下での CD44 断片化による軟骨変性のメカニズム、を明らかにするために以下の 3 つの軟骨変性モデルで実験計画を樹立し、評価を行うこととした。研究に用いるマウスは軟骨特異的ノックアウトマウスとして *Col2a1-cre;ADAM10^{fl/fl}*、正常マウスとして *ADAM10^{fl/fl}* とする。

DMM model (in vivo モデル) : 手術による強制的な mild OA モデルとして出後 8 週齢で両群に対して DMM 手術(Glasson SS, et al. Osteoarthritis Cartilage.2007)を行い、術後 6-10 週時点で軟骨変性・骨形態変化について評価する。

長期自然経過 (in vivo モデル) : 両群マウスを 12 か月の間、通常の飼育を行い、通常の成長過程における軟骨変性を評価する。

Explant culture (ex vivo モデル) : 生後 4 週時点での大腿骨頭を採取して、explant culture による ex vivo 研究(Pathak NN, et al. Inflamm Res.2015)を行う。2 日間の前処置を行った上で、IL-1 による 24-72 時間の刺激を加えて、軟骨変性を評価する。

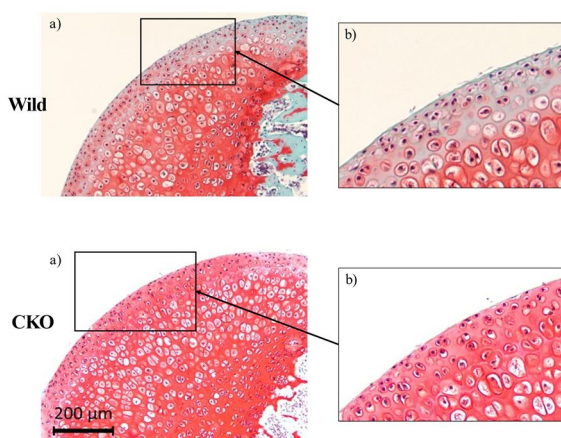
4 . 研究成果

【DMM model (in vivo モデル)】

軟骨特異的ノックアウトマウス(CKO マウス)として *Col2a1-cre; ADAM10^{fl/fl}*、正常マウス(Wild マウス)として *ADAM10^{fl/fl}* に対して、生後 8 週時点で DMM 手術を実施した。術後 6 週および 10 週時点で Sacrifice したマウスの膝関節の切片に対してサフラニン O 染色を行い、OARSI スコア(Furman BD, et al. J Orthop Res.2007)を用いて軟骨変性を評価した。昨年度の報告にて、CKO マウス/Wild マウスの術後 6 週モデルでは OARSI スコア 2.4/1.9、術後 10 週モデルでは 6.1/14.2 であった。CKO マウスは Wild マウスと比較して、術後 6 週モデルでは有意差はないものの、術後 10 週モデルで有意に軟骨変性を抑制していたことがわかった(P<0.05)。

【Explant culture (ex vivo モデル)】

生後 4 週時点での大腿骨頭を採取して、explant culture による ex vivo 研究(Pathak NN, et al. Inflamm Res.2015)を行い、軟骨変性を評価した。IL-1 による 72 時間の刺激を行ったところ、サフラニン O 染色低下を認めた(右図)。またコンディショナルノックアウトマウスと比較して、Wild マウスは免疫染



色にて ADMATS-5, MMP13 の発現が有意に認められたことから、ADAM10 は軟骨変性に関与していることが考えられた。

【まとめ】

以上のように軟骨変性における ADAM10 の役割について、軟骨特異的ノックアウトマウス (CKO マウス)を用いて示した。しかしまだ軟骨変性と CD44 断片化を結びつける明らかなデータを示しておらず、今後さらなる研究を進めていく必要がある。

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suzuki M, Kojima T, Takahashi N, Asai S, Terabe K, Kaneko A, Hirano Y, Hanabayashi M, Oguchi T, Takagi H, Kanayama Y, Yabe Y, Funahashi K, Fujibayashi T, Tsuboi S, Ito T, Yoshioka Y, Ishikawa H, Sobue Y, Nishiume T, Yokota Y, Ishiguro N.	4. 巻 31(4)
2. 論文標題 Higher doses of methotrexate associated with discontinuation of oral glucocorticoids after initiation of biological DMARDs: A retrospective observational study based on data from a Japanese multicenter registry study.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 796-802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2021.1879428	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- κ 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 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- κ 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 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 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 Ogawa Yoshikazu, Takahashi Nobunori, Takemoto Toki, Nishiime 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, Asai Shuji, Sobue Yasumori, Ohashi Yoshifumi, Koshima Hiroshi, Okui Nobuyuki, Ishikawa Hisato, Takahashi Nobunori, Terabe Kenya, Kishimoto Kenji, Hattori Kyosuke, Imagama Shiro, Kojima Toshihisa	4. 巻 22
2. 論文標題 Influence of frailty on patient global assessment in rheumatoid arthritis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Geriatr Gerontol Int	6. 最初と最後の頁 399 ~ 404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ggi.14375	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 Sobue Yasumori, Suzuki Mochihito, Ohashi Yoshifumi, Koshima Hiroshi, Okui Nobuyuki, Funahashi Koji, Ishikawa Hisato, Inoue Hidenori, Kojima Masayo, Asai Shuji, Terabe Kenya, Kishimoto Kenji, Maeda Masataka, Kihira Daisuke, Imagama Shiro, Kojima Toshihisa	4. 巻 12
2. 論文標題 Validation of grip strength as a measure of frailty in rheumatoid arthritis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21090
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-21533-5	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 2件)

1. 発表者名 Hironobu Kosugiyama, Mochihito Suzuki, Nobunori Takahashi, Masataka Maeda, Toshihisa Kojima, Shiro Imagama.
2. 発表標題 ADAM10 knock-out mice exhibited less cartilage degeneration in the surgical osteoarthritis model.
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2021 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Suzuki M, Takahashi N, et al.
2. 発表標題 Hyaluronan suppresses the expression of cathepsin K induced by mechanical stress loading in a human chondrosarcoma cell line HCS-2/8
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2021 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田真崇、鈴木望人、石黒直樹、小嶋俊久、高橋伸典
2. 発表標題 関節軟骨のADAM10機能不全は変形性関節症の進行を抑制する
3. 学会等名 第6回JCRベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木望人、高橋伸典
2. 発表標題 関節リウマチ患者のアンメットニースにおけるRAPID3の有用性
3. 学会等名 第95回日本整形外科学会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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