

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09408

研究課題名(和文) 軟骨細胞死から軟骨変性に至る分子機構の解明とその抑制による軟骨保護作用の検討

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of the protection of cartilage degeneration via chondrocyte death and investigation of cartilage protection by its inhibition

研究代表者

西谷 江平(Nishitani, Kohei)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：70782407

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)：大腿骨・脛骨間に繰り返しストレスを加えるCyclic compressionモデルによる軟骨損傷モデルを、ラットを用いて新規作成した。このモデルは外傷性軟骨損傷から変形性関節症へと至るモデルであることを確認した。Cyclic compression前から細胞死抑制効果のある新規化合物であるKUS121を投与したところ、軟骨保護効果が確認された。軟骨保護効果の機序として、小胞体ストレス応答の軽減による、軟骨細胞死抑制効果が確認された。軟骨細胞死抑制のメカニズムとして、小胞体ストレス応答の軽減を通じたMAP-kinaseカスケード、蛋白分解酵素の抑制が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性関節症は対症療法と、末期での人工膝関節置換術以外に根本的な治療法がない疾患であるが、今回効果が確認されたKUS化合物による小胞体ストレス抑制による軟骨細胞死抑制効果と、それに伴う蛋白分解酵素抑制効果は、変形性関節症における軟骨保護作用を持つ可能性がある。特に外傷性の関節症では、この化合物を受傷早期に投与することにより、将来起こると考えられる軟骨損傷とその後の変形性関節症への進展を防ぐ効果が期待される。軟骨損傷と変形性関節症に対する新たな治療法となる可能性が示唆されたと考える。

研究成果の概要(英文)：A novel rat model of cartilage injury was created using the cyclic compression model, in which repetitive stress is applied between the femur and tibia. The model was confirmed to be a model of traumatic cartilage injury leading to osteoarthritis. The administration of KUS121, a novel compound with a cell death inhibitory effect showed chondroprotective effects. As the mechanism of the chondroprotective effect, the inhibition of chondrocyte death was confirmed by the reduction of the endoplasmic-reticulum stress. As the mechanism of chondrocyte death inhibition, inhibition of MAP-kinase cascade and proteolytic enzymes through reduction of endoplasmic-reticulum stress response was observed.

研究分野：整形外科学

キーワード：変形性関節症 軟骨損傷 小胞体ストレス 炎症性サイトカイン 力学的ストレス MAPキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は、高齢者の日常生活を妨げる代表的な疾患であり、関節軟骨の変性が病因の中心にある。関節軟骨を直接治療する薬剤は存在せず、薬剤で除痛を行うものの、除痛が十分でない患者は人工関節置換術などの手術療法を行うのが現状である。中でも、変形性膝関節症においては、その約9割が一次性、約1割が二次性の変形性関節症とされる。二次性の変形性関節症は一次性とはその発症メカニズムを異にするものであり、違う視点での治療・進行防止が必要となる。二次性の変形性関節症は外傷の後に発生することが多い。この数十年の外傷治療の進歩により、関節内骨折においても関節面の転位の少ないより強固な内固定が可能となった。これにより二次性変形性関節症の減少が期待されたが、二次性変形性関節症への進行頻度は全く減少していない。外科的治療の進歩により軟骨を含む骨折が物理的に安定したにも関わらず、変形性関節症が減少しない理由としては、当初の外傷によるダメージとその後の炎症期の軟骨細胞死が、将来の変形性関節症の発生に大きく関与していると考え、受傷早期の軟骨に化学的に介入することにより二次性変形性感染症への進展を防止できないかと考えた。

先に述べたように変形性関節症の軟骨を治す薬剤は存在せず、症状の緩和する治療があるのみである。治験として Nerve growth factor を抑制し症状と身体機能を改善させる第3相試験が終了しているが認可はされていない。この治療法では病態は改善されないが、変形性関節症の病態への介入の難しさが、症状緩和の方向へ研究が向かっている原因と考える。海外では Wnt 阻害薬、他家軟骨細胞治療などの治験が行われているが、実用化に至ったものは存在しない。変形性関節症の病態は、完全に解明されたとは言い難く、加齢・解剖的要因・関節不安定性・微小な炎症など様々原因が混在するため、全ての病態に対して改善する治療が難しいのが現状である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、軟骨損傷時の分子メカニズムを解明し、その第一段階とされる軟骨細胞の necrosis とそれに続く apoptosis を防ぐことにより、その後の炎症・軟骨分解酵素の亢進を止め、軟骨損傷、ひいては最終的な二次性変形性関節症の発症を抑制することである。

このため、まず病態が単純である関節不安定性を伴わない、軟骨に対する外傷後の軟骨損傷に起因する二次性変形性関節症のモデルを使用することとした。このモデルは、近年海外でマウスモデルとして公表された新たなモデルであり、今回は関節注射による治療介入が容易なラットに応用して研究する予定である。まずこのモデルを用いて軟骨損傷後の分子メカニズムの経時的な解明を行う。次に受傷後早期の軟骨細胞に介入しその後の apoptosis、早期の炎症、軟骨分解酵素の産生などの負のカスケードを止めることを目標としている。軟骨細胞の apoptosis を防ぐアプローチとしては、不飽和脂肪酸を用いて apoptosis と軟骨分解酵素の抑制が報告されており、本法も有効なアプローチと考える。応募者らの保持している KUS 化合物はすでにヒトへの安全性が確認されており、今回の研究の有効性が確認された場合に、臨床試験への移行も比較的にスムーズに行えるのではないかと考えた。

3. 研究の方法

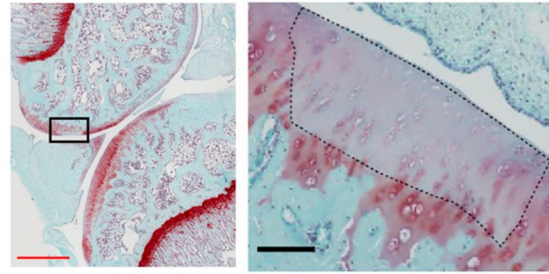
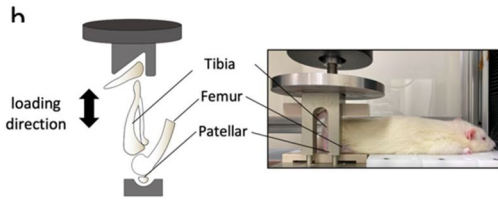
(1) 大腿骨・脛骨間に繰り返しストレスを加える Cyclic compression モデルをラットを用いて作成した。Cyclic compression モデルを行う際の compression 強度、速度、回数などを変化させて最適なモデルの作成を目指した。短期間での軟骨損傷の発生と、長期間での変形性関節症への進行の有無を観察した。

(2) このモデルに対して、細胞死抑制効果のある新規化合物である KUS121 を投与して、介入後に生じる軟骨損傷を軽快させる効果があるかを検討した。検討は、肉眼的所見を行い、その上で組織学的検討として、損傷面積、生存細胞数の比較、関節軟骨評価スコアによる検討と、関節軟骨の染色によるアポトーシスマーカー、炎症性サイトカイン、蛋白分解酵素や、小胞体ストレス応答などの検討を行った。

(3) 軟骨細胞死に関連するメカニズムの検討のため、軟骨器官培養系における KUS 化合物による軟骨細胞死抑制効果の検討と、軟骨細胞単層培養系を用いた KUS 化合物による細胞死抑制メカニズムの検討を行った。軟骨細胞死は小胞体ストレスを引き起こすツニカマイシンを投与して惹起した。

4. 研究成果

(1) ラット Cyclic compression モデルに対する作成では 20N 60Cycle の compression で軟骨損傷の作成が可能であった。下に実験条件を示す。

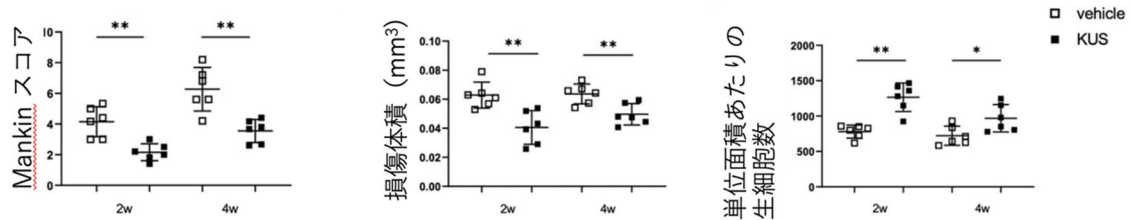


介入後2週で大腿骨後方顆部の軟骨細胞死を、4週で軟骨損傷を生じることを確認した(右図)。

軟骨細胞死の経時変化を知るため、Cyclic compression 後ごく早期の細胞死を蛍光染色で確認すると、受傷後3時間程度から軟骨細胞死が確認され、6時間後から生細胞も減少していた。

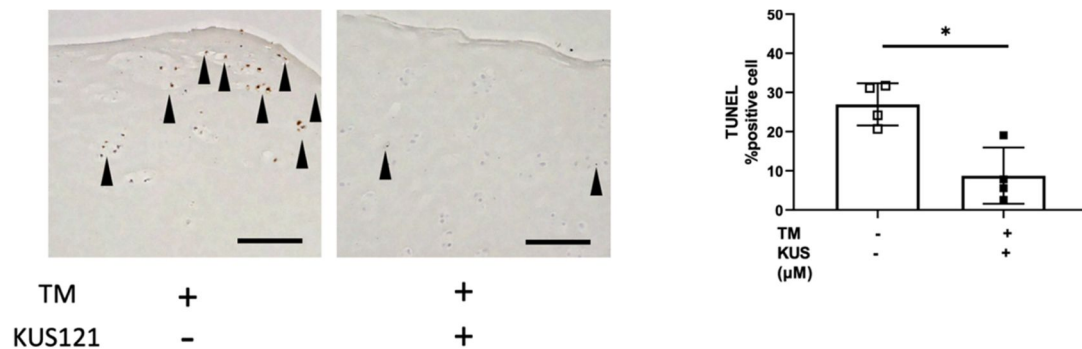
また、このモデルでは6ヶ月では大腿骨、脛骨の軟骨変性、半月板の変性も見られ、外傷性軟骨損傷から変形性関節症へと至るモデルであることを確認した。

(2) KUS121 投与により、2週、4週で細胞死抑制効果により、生存細胞数の有意な改善が確認され、軟骨基質においても、損傷領域の減少や、変形性関節症スコアの軽減が見られた(下図)。

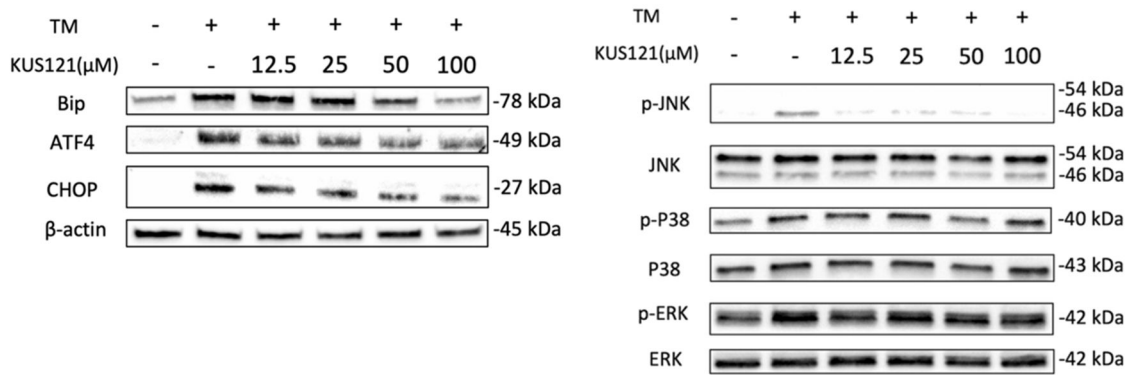


また、免疫染色において、小胞体ストレスの軽減と軟骨破壊分解酵素の抑制が見られた。Cyclic compression により滑膜においても滑膜炎様の変化を生じたが、KUS121 の投与により滑膜においても、Sublining layer の肥厚や炎症細胞の浸潤などの軽減が見られ、滑膜炎の程度を表すスコアも軽減した。免疫染色においても、滑膜内のタンパク分解酵素の発現も低下していた。

(3) KUS121 が作用する valosin-containing protein (VCP) 蛋白質は、滑膜や軟骨細胞にも発現し、KUS121 が軟骨細胞において ATP 消費を抑制する作用を有することを確認した。軟骨器官培養にツニカマイシンを投与し小胞体ストレスを惹起したところ生細胞数が減少したが、KUS121 を投与することによる生細胞数のレスキューに成功した(下図)。



軟骨細胞を用いたメカニズムの検討では、KUS121 は小胞体ストレスと応答のうち、PERK、ATF4、CHOP のカスケードと IRE1 から JNK Map キナーゼのカスケードの抑制を介して細胞死抑制効果を得ていることがわかった。さらに KUS121 は炎症性サイトカインである、TNF- α 、IL-1 を抑制し、また軟骨基質分解酵素である MMP13 や ADAMTS-5 を抑制することも確認された。同様のメカニズムは、軟骨細胞の Cell line である ADTC-5 細胞においても確認した。



(4) Cyclic compression モデル以外の外傷性変形性関節症モデルである、内側半月板部分切除モデルにおいても、KUS121 の効果による軟骨保護効果を検討した。内側半月板部分切除モデルは受傷後 2 週、4 週で軟骨変性を来すことを確認し、またこのモデルにおいては術後 1 日からの KUS121 の投与によって炎症性サイトカイン抑制効果や、蛋白分解酵素抑制効果があり、結果的に軟骨細胞死や軟骨変性を抑制できることを確認した。

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 2件）

1. 著者名 Shigeo Yoshida, Kohei Nishitani, Hiroyuki Yoshitomi, Shinichi Kuriyama, Shinichiro Nakamura, Takayuki Fujii, Motoo Saito, Yu Kobori, Akinori Murakami, Koichi Murata, Hiromu Ito, Hideki Ueno, Shuichi Matsuda	4. 巻 -
2. 論文標題 Knee Alignment Correction by High Tibial Osteotomy Reduces Symptoms and Synovial Inflammation in Knee Osteoarthritis Accompanied by Macrophage Phenotypic Change From M1 to M2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Arthritis and Rheumatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/art.42424.	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 Sachiko Iwai, Hanako O. Ikeda, Hisashi Mera, Kohei Nishitani, Motoo Saito, Akitaka Tsujikawa, Akira Kakizuka	4. 巻 11
2. 論文標題 KUS121 attenuates the progression of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15651
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-95173-6	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 Saito M, Nishitani K, Ikeda H0, Yoshida S, Iwai S, Ji X, Nakahata A, Ito A, Nakamura S, Kuriyama S, Yoshitomi H, Murata K, Aoyama T, Ito H, Kuroki H, Kakizuka A, Matsuda S.	4. 巻 10
2. 論文標題 A VCP modulator, KUS121, as a promising therapeutic agent for post-traumatic osteoarthritis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20787
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-77735-2.	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 吉田 繁央、西谷 江平、小堀 悠、藤井 貴之、村田 浩一、中村 伸一郎、栗山 新一、吉富啓之、伊藤 宣、松田 秀一
2. 発表標題 高位脛骨骨切り術による下肢アライメント矯正は、関節滑膜における炎症を改善し、滑膜マクロファージの極性をM1からM2優位とする
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 2022年

1. 発表者名 Motoo Saito; Kohei Nishitani; Hanako O Ikeda; Shigeo Yoshida; Sachiko Iwai; Xiang Ji; Akihiro Nakahata; Koichi Murata; Tomoki Aoyama; Hiromu Ito; Hiroshi Kuroki; Akira Kakizuka; Shuichi Matsuda
2. 発表標題 Kus121, A Vcp Modulator, Regulates Endoplasmic Reticulum Stress- induced Apoptosis And Protects Against Progression Of Post-traumatic Osteoarthritis In Rats
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society, 2020 ANNUAL MEETING (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西谷江平、斉藤元央、中村伸一郎、栗山新一、伊藤宣、松田秀一
2. 発表標題 VCP阻害剤である新規化合物は軟骨細胞死抑制効果を介し、外傷性軟骨損傷に対して軟骨保護作用をもつ
3. 学会等名 第12回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 斉藤 元央、西谷 江平、池田 華子、伊藤 宣、岩井 祥子、季 翔、村田 浩一、青山 朋樹、黒木 裕士、垣塚 彰、松田 秀一
2. 発表標題 新規VCP ATPase阻害剤であるKUS121は小胞体ストレス応答抑制を介した軟骨細胞死抑制作用により関節軟骨保護作用を有する
3. 学会等名 第35日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 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
--	---------------------------	-----------------------	----

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