

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18002

研究課題名(和文) CRISPRライブラリーを用いた変形性関節症の原因遺伝子の網羅的解析

研究課題名(英文) CRISPR/Cas9 library screening for genes involved in the osteoarthritis

研究代表者

久永 哲 (hisanaga, satoshi)

熊本大学・病院・特任助教

研究者番号：30827308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：変形性膝関節症の過程でどのようなメカニズムが原因で軟骨細胞の恒常性が破綻し、過剰な小胞体ストレスが発生するかは全く分かっていない。本研究では小胞体ストレスを感知する軟骨細胞株を樹立し、その後CRISPRライブラリーを用いて遺伝子を解析したところ、分子シャペロンとの関連性が確認された。変形性膝関節症患者および疾患モデルラットの関節軟骨では分子シャペロンの発現が上昇しており、また変形性膝関節症患者より採取した軟骨細胞に化学的に合成したシャペロンを投与することで、軟骨基質の分泌が増加することが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性関節症は関節軟骨の変性を主座とする疾患であり、関節痛、関節腫脹や運動機能の低下の要因となる。治療としては対症療法としてのNSAIDsの内服、ヒアルロン酸やステロイドの関節内注射や理学療法などの保存的療法、人工関節置換術や骨切り術などの手術療法があげられる。しかしながら軟骨の変性を抑制するような根治的治療は存在せず、治療法の開発のためには軟骨変性の病的解明が必要である。本研究にてシャペロンの投与により、変形性関節症の進行が抑制される可能性が新たに示され、引き続き疾患モデルラットを用いた検討を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：It is unknown what mechanism causes chondrocyte homeostasis to occur during the process of knee osteoarthritis, resulting in excessive endoplasmic reticulum stress. In this study, we established a chondrocyte cell line that senses endoplasmic reticulum stress, and then analyzed the gene using the CRISPR library, and confirmed its association with the molecular chaperone. The expression of molecular chaperone is increased in the articular cartilage of patients with knee osteoarthritis and disease model rats, and by administering chemically synthesized chaperone to chondrocytes collected from patients with knee osteoarthritis, the secretion of extracellular matrix was increased.

研究分野：整形外科学

キーワード：変形性膝関節症 小胞体ストレス 分子シャペロン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(OA)は関節軟骨の変性を主座とする疾患であり、関節痛、関節腫脹や運動機能の低下の要因となる。治療としては対症療法としてのNSAIDsの内服、ヒアルロン酸やステロイドの関節内注射や理学療法などの保存的療法、人工関節置換術や骨切り術などの手術療法があげられる。しかしながら軟骨の変性を抑制するような根治的治療は存在せず、治療法の開発のためには軟骨変性の病的解明が必要である。

我々は以前よりOAのメカニズムとして、小胞体ストレスという細胞内ストレスが関与していることに注目してきた。小胞体ストレスとは正常に折りたたまれなかったタンパクが小胞体に蓄積することであり、細胞にはこの小胞体ストレスに対応するために小胞体ストレス応答とよばれるタンパク品質管理機構が存在する。まず小胞体ストレスにより、小胞体膜上のセンサーであるPERKが活性化することで新規タンパクの翻訳を抑制し、次にIRE1とATF6が活性化することで分子シャペロンを誘導し小胞体の処理能力を向上させる。しかしながらストレスが回避できない場合はアポトーシスが誘導され、細胞が除去される。我々は、以前より軟骨変性と小胞体ストレスの関連に関して検討を行っており、軟骨変性の過程において小胞体ストレスが惹起され(Takada K et al. *Int J Exp Pathol* 2011)、それにより軟骨細胞に細胞死が誘導されること(Uehara Y et al. *Osteoarthritis Cartilage* 2014)、タンパクの翻訳が抑制されることで軟骨基質の分泌が低下すること(Hisanaga S et al. *Scientific Reports* 2018)を新たに解明してきた。しかしながら、軟骨変性の過程でなぜ軟骨細胞において小胞体ストレスが発生しているかは未だにわかっておらず、それゆえ臨床応用の際に標的とする分子の同定されていない。

過去の報告で、変形性膝関節症患者の関節軟骨では電子顕微鏡写真にて小胞体が拡張している軟骨細胞が確認されており(Miosge N et al. *Osteoarthritis Cartilage* 1988)、関節軟骨の変性がおこる過程において、何らかの要因で軟骨細胞が小胞体ストレスを処理できずに小胞体内に構造異常蛋白が蓄積し、それが細胞外基質の分泌の低下や、軟骨細胞のアポトーシスを介して、病態進行の原因となっている可能性が示唆される。

我々は、小胞体ストレスセンサーの一つであるPERKの活性化が、新規タンパクの翻訳を調整することで、小胞体からの型コラーゲンの分泌に重要な役割をはたしていることを新たに報告した(Hisanaga S et al. *Scientific Reports* 2018)。そしてPERKの活性化誘導薬であるSalubrinalを投与することで、逆に軟骨基質の分泌を促進できることが判明した(未発表)。つまり軟骨細胞での小胞体ストレスが発生する機序を解明することで、軟骨変性抑制の標的となる分子を発見しうることが示唆されるが、現在までに軟骨細胞において解析されてきた小胞体関連分子は限られている。

2. 研究の目的

以上の背景を受けて、どのような遺伝子が原因で軟骨細胞の恒常性が破綻し、過剰な小胞体ストレスが発生するかは全く分かっていない。本研究では小胞体ストレスを感知する軟骨細胞株を樹立し、その後CRISPRライブラリーを用いて、軟骨細胞の恒常性に関与する小胞体関連あるいは小胞体ストレスが惹起される遺伝子を同定し、人工膝関節置換術後の関節軟骨および単離した軟骨細胞を用いることで、軟骨細胞における同定した遺伝子の機能解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

小胞体ストレスを惹起する遺伝子群リストの作成

小胞体ストレス反応遺伝子であるXbp1が結合する配列(UPRE配列)にGFPを挿入したレンチウイルスベクターを作成し、ヒト軟骨肉腫株(HCS)に遺伝子導入を行い、小胞体ストレスを感知する細胞を作成した。この細胞に対して、CRISPR sgRNAライブラリーを用い、DNA変異の導入を行った。その後GFP発現量にて細胞のソーティングを行い、ゲノムDNAを抽出し、次世代シーケンサーでゲノム情報を取得し、小胞体ストレスに影響を及ぼす遺伝子のリスト化を行った。

関節軟骨における発現遺伝子の解析

人工膝関節置換術を施行する変形性膝関節症患者の内・外側の軟骨組織を術中に採取し、RNA抽出した後にcDNAを作成し、RT-qPCRにて遺伝子発現解析を行った。外側の関節軟骨をコントロールとし、内側の関節軟骨の遺伝子発現変化を確認した。

ラットOAモデルの解析

8週令、雄のC57BL/6Jマウスを用いて、右膝関節の前十字靭帯切離によるOAモデルを作製した。OAモデル作製8週後に屠殺し、骨軟骨組織を採取し、採取組織を4%PFAで12時間固定後、EDTAで脱灰し、パラフィン包埋後に組織切片を作製した。その後免疫染色法で小胞体の主要なシャペロンの一つであるGRP78の発現を評価した。

軟骨細胞に対する化学シャペロン投与の解析

人工膝関節置換術を施行する変形性膝関節症患者の内・外側の軟骨組織を採取し、軟骨細胞を単離した。その後小胞体ストレス誘導薬であるTunicamycinと、化学シャペロンである4-PBAを投与し、12時間DMEM培地で培養を行い、その後培地を回収した後にCollagen type2の発現をELISAにて評価を行った。

4. 研究成果

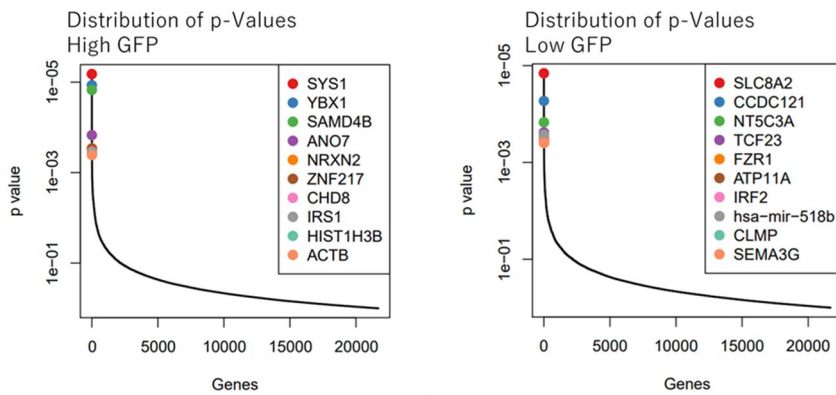


図 1. CRISPR ライブラリー解析

小胞体ストレスを感知する細胞での、High GFP および Low GFP の上位 10 遺伝子をリスト化した。小胞体ストレスに関与する既知の遺伝子は確認されなかった(図 1)。しかしながら、High GFP 群の上位遺伝子に、分子シャペロンである熱ショックタンパク質 (Heat Shock Protein; HSP) が多数存在していたことより、軟骨細胞で分子シャペロンが小胞体ストレスの軽減に重要な役割を持つことが示唆された。

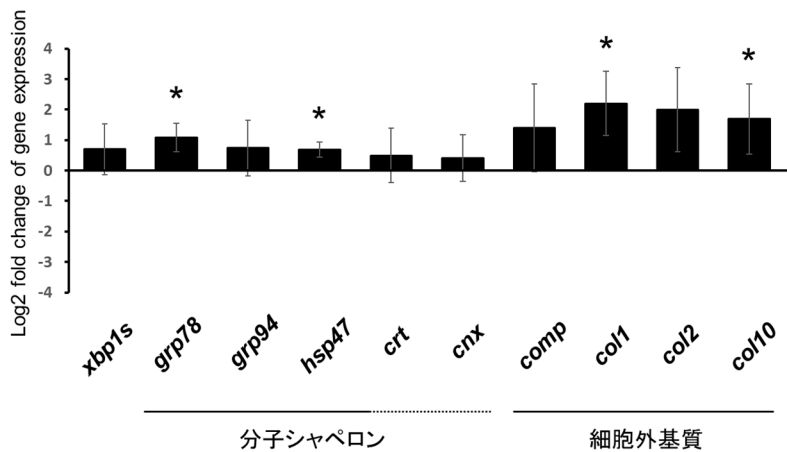


図 2. ヒト関節軟骨 RT-qPCR

内側型変形性膝関節症の大腿骨外顆関節軟骨に対する内顆関節軟骨の遺伝子発現変化を RT-qPCR で確認したところ、細胞外基質である *comp*、*collagen type1*、*collagen type2* および *collagen type10* の発現が上昇していた(図 2)。加えて、主要な小胞体シャペロン群の発現を確認したところ、*grp78*、*grp94*、*hsp47*、*crt* および *cnx* の発現も上昇を認めた(図 2)。

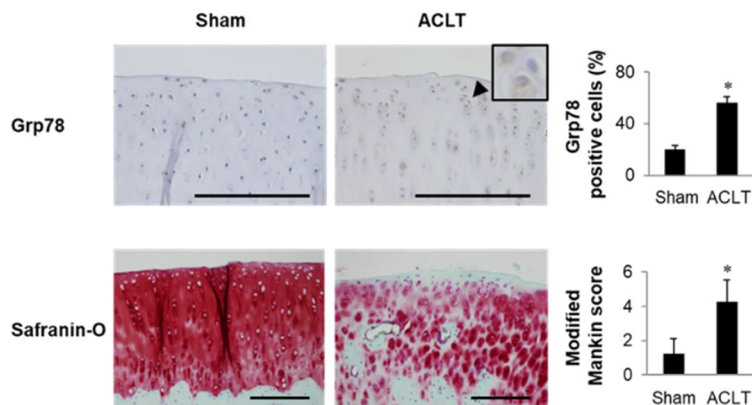
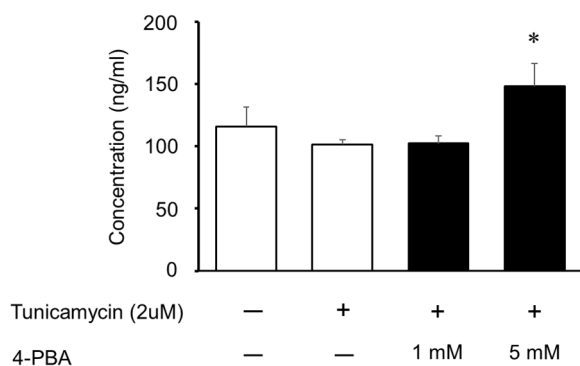


図 3. ラット OA モデル GRP78 免疫染色

同様に、ラット OA モデルでは、変性の進行とともに小胞体の主要なシャペロンである GRP 陽性細胞は 19.9%から 56.0%に有意に増加した(図 3)。

人工膝関節置換術を施行する変形性膝関節症患者の内・外側の軟骨組織を採取し、軟骨細胞を単離した後に、化学シャペロンである 4-PBA を小胞体ストレス誘導薬である tunicamycin と同時に投与し、培地中に放出される Collagen type2 を ELISA にて確認した。5mM の 4-PBA の投与で、有意に培地中の Collagen type2 が増加した(図 4)。

図 4. Collagen type2 ELISA



以上の結果より、軟骨変性の過程において細胞基質の発現が上昇していることで、小胞体内でのタンパクのフォールディングの需要が上がったことにより、分子シャペロンの発現が上昇していることが確認された。また OA 患者の軟骨細胞において 4-PBA の投与が基質の分泌を増加させたことより、軟骨変性の過程で軟骨細胞内の基質の折り畳み助ける分子シャペロンが増加することで、基質の分泌が増加し関節軟骨の変性が抑制される可能性が示された。これまでに、4-PBA や TUDCA など、いくつかの化学シャペロンが発見されており、糖尿病や神経変性疾患等での治療効果がマウスを用いた病態モデルで報告されている (Cao AL et al. Laboratory Investigation 2016) (Inden M et al. J Neurochem 2007)。今後変形性膝関節症においても動物モデルに対する化学シャペロンの投与やウイルスベクターを用いて分子シャペロンの発現を上昇させることで、実際に関節軟骨の変性抑制効果があるかを検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久永 哲
2. 発表標題 小胞体ストレスセンサーPERKによる軟骨基質分泌の制御機構
3. 学会等名 第8回JCRベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久永 哲
2. 発表標題 小胞体ストレスセンサーPERKによる軟骨基質分泌の制御機構およびOA治療への応用の検討
3. 学会等名 第33回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------