

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16658

研究課題名（和文）変形性膝関節症におけるGRK5の機能解析と治療への応用

研究課題名（英文）Identifying the Role of GRK-5 in the Pathogenesis of Osteoarthritis and Therapeutic Potential

研究代表者

居石 卓也（Sueishi, Takuya）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：40896700

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）： GRK5阻害薬を原薬としたOA疾患修飾効果を発揮する関節内投与と治療の開発を目指した。その過程で、Amlexanoxの濃度の最適化・用量を検証し、さらにAmlexanoxの溶媒としてヒアルロン酸を用いることで、単剤よりも軟骨保護の相乗効果があることを明らかにした。

変形性膝関節症の病態形成には半月板の変性が関連していることは報告されており、半月板変性にGRK5が関与しているかを検証した。結果、ヒト半月板やマウス半月板細胞を用いた実験系において、GRK5は半月板細胞にanabolic、catabolic作用を有していないことが示唆される結果であった。そのため、これ以上の検証には進まなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性膝関節症は膝関節の軟骨が変性摩耗する病気で、高齢者の生活の質を低下させる代表的な疾患である。現状の薬物治療は、内服（NSAID、非麻薬性鎮痛薬）と関節内注射（ヒアルロン酸、ステロイド）があるが症候改善薬であり、疾患修飾治療薬はない。

Amlexanoxはすでに他科領域において安全性が確認されており、生産コストの面でも臨床応用しやすいという利点がある。また全く違う分野の疾患の治療に役立つ試みは創造性に富んでいる。GRK5阻害薬（アンレキサノクス）とヒアルロン酸の混合によるOA進行抑制効果は相乗的であり、疾患修飾性OA治療の候補としてさらなる検証が必要である。

研究成果の概要（英文）： We aimed to develop a drug for OA disease modification using a GRK5 inhibitor as the active ingredient. In the process, we validated the optimized concentration and dosage of Amlexanox. Furthermore, the use of hyaluronic acid as a solvent for Amlexanox was found to have a synergistic effect on cartilage protection compared to a single agent.

It has been previously reported that meniscus degeneration is closely related to the pathogenesis of knee osteoarthritis, and we tested whether GRK5 is involved in meniscus degeneration. The results suggest that GRK5 does not have anabolic or catabolic effects on meniscus cells in experimental systems using human and mouse meniscus cells. Therefore, we did not proceed to further validation.

研究分野：変形性膝関節症

キーワード：変形性膝関節症 疾患修飾治療薬 GRK5 Amlexanox ヒアルロン酸

1. 研究開始当初の背景 (本研究の着想に至った経緯)

申請者が行った先行研究の出発点として、軟骨研究領域において学術的に高いインパクトがあり、臨床的なアンメットニーズを同時に満たすことを念頭に、変形性関節症(OA)の治療標的因子の探索的研究をまず立案した。ヒトの新鮮な正常膝、OA膝でのRNAシーケンスによる遺伝子発現比較にて発現差のあった因子の中から着目したGRK5をノックアウトマウスを用いて機能解析した結果、GRK5はOAの病態進行に深く関わる軟骨変性制御因子であるNF- κ Bの上流として、病態の悪化にcriticalに関与する因子であることを明らかにした。また、GRK5阻害剤であるAmlexanoxの関節内投与は、マウス膝軟骨の変性の進行を抑制できることも明らかにした。しかし、OAの病態に関与するGRK5のメカニズムは、NF- κ Bの制御因子であるI κ Bのリン酸化を介し、NF- κ Bを正方向に制御するという機構以外、先行研究では明らかにできていない。OA病態におけるGRK5のさらなるメカニズムの解析が必要との着想に至った。

また、Amlexanoxを原薬としたOA疾患修飾治療薬の創出を目指し、関連する研究を進めた。関節内投与用治療薬は液剤であり、Amlexanox原末の溶媒としては、HA溶液が最も適していると考えている。その理由は、HAは関節機能改善剤として広く臨床で使用され安全性はさる事ながら、関節内滞留性に優れており、低分子化合物であるAmlexanoxの関節内での徐放効果を期待できる点があげられる。AmlexanoxとHAとの合剤による新規治療薬の創出という絵を描き、GRK5の病態への関与の解明と並行し研究を進める予定とした。

(関連する国内外の研究動向と本研究の位置づけ)

これまでの国内・外の研究から、軟骨変性過程の最も下流で直接的に軟骨基質を分解する因子は、MMPsなどのプロテアーゼやNF- κ Bなどの炎症制御転写因子であると考えられる(Nat Rev Dis Primers. 2016 13;2:16072.)。しかし、それらの直接的な阻害作用の薬剤は、海外の臨床試験で軟骨保護の有効性がなかった。

そこで本研究では、有望なOA治療標的候補であるGRK5を見出した申請者による先行研究をもとに、これまでにない新規OA疾患修飾薬の創出を目指すだけでなく、さらなるGRK5の病態解析を行って、OA病態の一端の解明に寄与することを大きな目標とした。

2. 研究の目的

これまでの申請者の研究において、GRK5が軟骨細胞においてNF- κ B経路を促進させるように働くことは明らかにできた一方、NF- κ B以外にGRK5が及ぼす機構に関しては検証できていない。本研究の目的は、軟骨変性過程における、GRK5のNF- κ B以外への作用を解析し、OA病態形成におけるGRK5が果たす役割を明らかにすることとした。また、Amlexanoxを原薬としたOA疾患修飾治療薬の創出を目指し、まずはAmlexanoxの濃度と溶媒の最適化、及び製品候補の開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

OAの病態形成におけるGRK5の機能解析

軟骨細胞において、GRK5の下流として作用する因子を網羅解析する目的で、同腹のGRK $^{-/-}$ マウスとGRK $^{+/+}$ マウスより軟骨細胞を分離培養し、2群間でMicroarrayによるmRNA発現の網羅的な比較解析を行った。

OAの病態形成におけるGRK5の関わる病期の同定

共同研究所である Scrips 研究所より提供された、Kellgren-Laurence 分類 grade0-、つまり正常~severe OA 膝まで様々な OA grade の新鮮膝の paraffin 包埋切片を用い、GRK5の発現を免疫染色にて確認する。

半月板変性におけるGRK5の機能解析

変形性膝関節症の病態形成には半月板の変性が深く関連していることは以前から報告されており、半月板変性にGRK5が関与しているかを検証した。様々なOA gradeのヒト膝半月板組織や、aging model マウスでのGRK5発現を検証した。同腹のGRK^{-/-}マウスとGRK^{+/+}マウスより軟骨細胞を分離培養し、Microarrayによる解析を行った。

Amlexanoxの濃度と溶媒の最適化、及び製品候補の開発

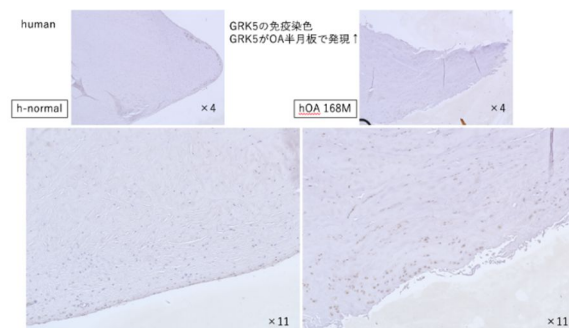
関節内投与用治療薬の剤形は、液剤であり、Amlexanox 原末の溶媒としては、ヒアルロン酸(以下HA)水溶液が最も適していると考えられた。従来治療のHA単体とステロイド単体に対する優位性試験として、マウスOAモデルを用いて、組織学的な比較試験とトレッドミル疼痛誘発に対する有効性試験を行った。

4. 研究成果

Microarray 結果にて、GRK5^{+/+}に比し、GRK^{-/-}細胞ではIL-6やMMPsといった種々のOA-related catabolic factorのみならず、その上流因子の発現低下も認めた。さらなる検証を進めておりここにその詳細の記載は控える。

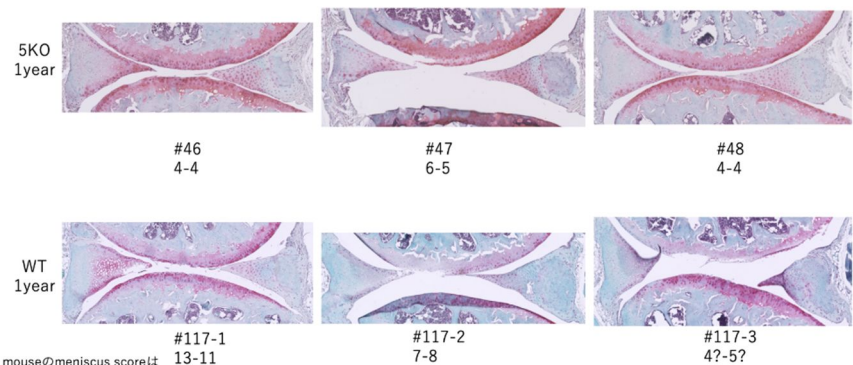
共同研究所からのヒト新鮮膝組織切片の提供が滞ったため、残念ながらこちらに関しては検証できなかった。

・ヒト半月板組織でのGRK5蛋白発現はOAと正常半月板で有意差はなかった(右図、統計結果は省略、以下同様)。



・1年生存aging modelにおいて、GRK5KOマウスではWTマウスに比し、半月板の変性が軽度であった(右図)。

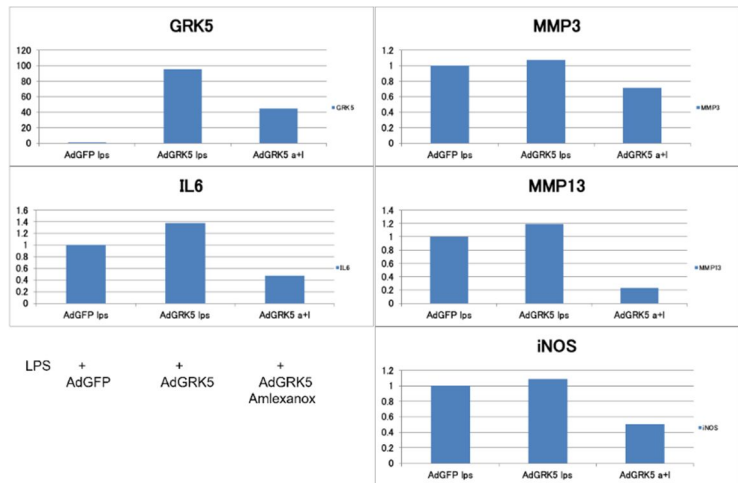
5KO(46.47.48)とWT(117-1.2.3)の1年生存のサフラニン染色 n=3



mouseのmeniscus scoreは
1.表面の構造
2.細胞の充実度
3.基質の染色性
をもとにscoringする

5KOとWTの1yr aging model
→ WTの方が半月板悪くなりやすい

・ヒト正常半月板細胞に、Adenovirus ベクターでGRK5過剰発現し、LPS刺激後にreal time PCRを行ったところ、過剰発現でcatabolic factorのmRNA発現に有意な変化は認めなかった(下図、n数を増やして検証したが有意差はなかった)。Amlexanoxは半月板細胞においても保護的に作用していることは示唆された(有意差あり、未掲載)。



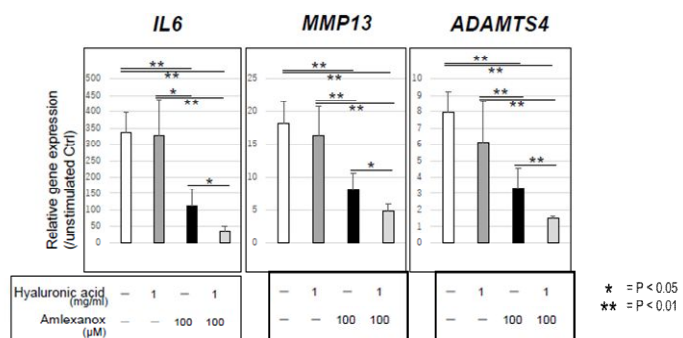
・ Microarray 結果にて、マウス由来 GRK5 +/+ と GRK5 -/- 半月板細胞において、各種 catabolic factor をはじめとした mRNA 発現に有意差は認めなかった。

上記以外の他結果も踏まえ、半月板の変性においては GRK5 は特異的な病態因子ではない可能性が高く、さらなる検証は行わなかった。

特許申請に関連する実験結果を簡潔に示す。

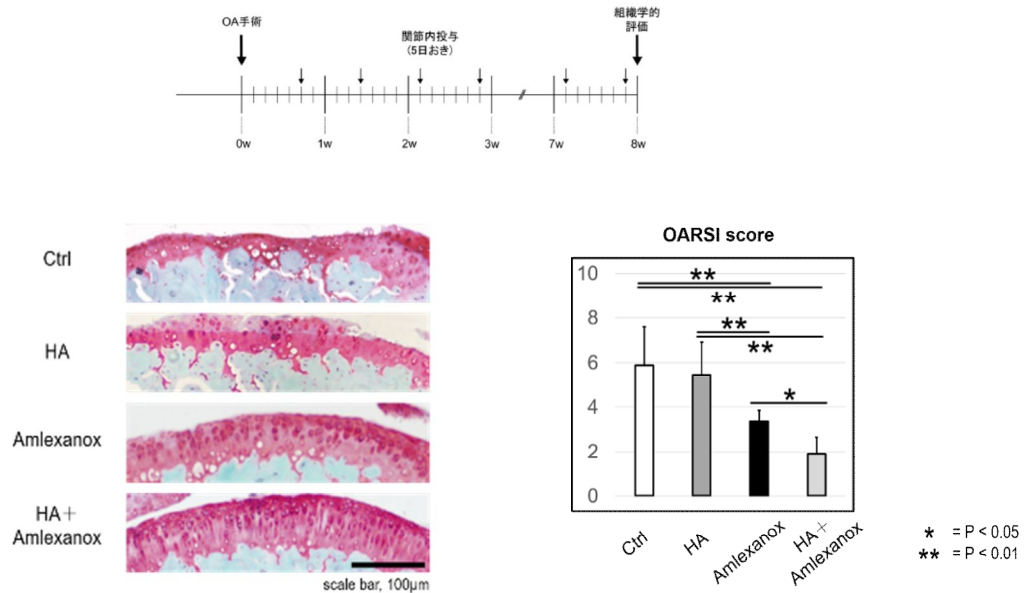
・ ヒト OA 軟骨細胞に Amlexanox (培地中の濃度 : 1 0 0 μ M) 及びヒアルロン酸 (培地中の濃度 : 1 m g / m L) を添加し、4 8 時間インキュベートした。対照として、何も投与せず 4 8 時間インキュベートとしたものと、Amlexanox (培地中の濃度 : 1 0 0 μ M) 又はヒアルロン酸 (培地中の濃度 : 1 m g / m L 、重量平均分子量を投与して、4 8 時間インキュベートとしたものも準備した。

ヒアルロン酸単独投与では、IL 6、MMP 1 3 及び ADAMTS 4 の mRNA 発現の有意な低下は認められなかった。Amlexanox 単独投与によって、IL 6、MMP 1 3 及び ADAMTS 4 全ての発現が有意に低下した。Amlexanox 及びヒアルロン酸の同時投与によって、コントロール比 1 0 . 5 8 %、2 6 . 2 5 %、1 8 . 9 5 %、アンレキサノクス単独比 3 2 . 0 7 %、5 9 . 8 9 %、4 5 . 0 8 % の IL 6、MMP 1 3 及び ADAMTS 4 の発現の有意な抑制を認め、相乗的な効果であった。



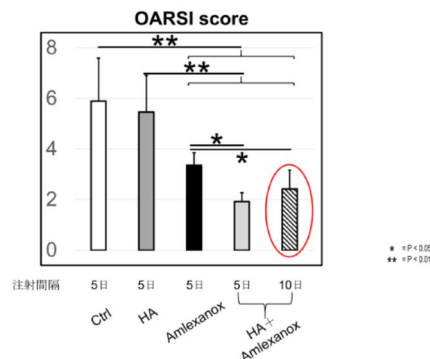
・ 1 2 週齢の雄マウス (野生型マウス及び GRK 5 KO マウス) に DMM モデルを作成し、5 日おきに 8 週間、生食投与群 (1 0 μ L)、ヒアルロン酸溶液関節内投与群 (1 0 m g / m L、1 0 μ L)、Amlexanox 溶液投与群 (1 0 0 μ M、1 0 μ L)、Amlexanox (1 0 0 μ M) 及びヒアルロン酸 (1 0 m g / m L) の混合溶液投与群 (1 0 μ L) に分けた。手術後 8 週時点での膝関節組織の切片をサフラン O で染色した。

次図で示すように、ヒアルロン酸投与群では、スコアの有意な改善はなかった。Amlexanox 単独投与群では、有意な低下を認めた。Amlexanox 及びヒアルロン酸の同時投与群では、コントロール群比 3 2 . 5 8 %、Amlexanox 単独群比 5 7 . 2 1 % の有意なスコアの低下を認め、相乗的な軟骨変性抑制効果であった。



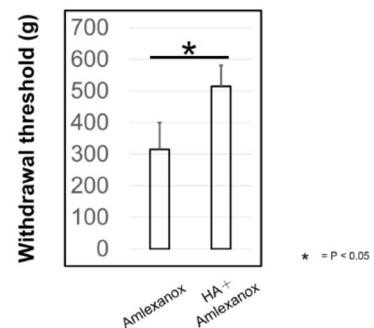
・同様にOAを誘発したマウスに10日おきに8週間、Amlexanox (100 μ M) 及びヒアルロン酸 (10 mg / mL) の混合溶液を投与した。OA誘導手術後8週時点での各群の膝関節組織の切片をサフラニンOで染色した。

下図のように、Amlexanox 及びヒアルロン酸の同時投与群では、投与間隔を10日に延ばしても、Amlexanox 単独投与群よりも、軟骨変性抑制効果が有意に高かった。



・OA誘発マウスに、10日おきに8週間、Amlexanox (100 μ M) 及びヒアルロン酸 (10 mg / mL) の混合溶液を投与した群と、5日おきに8週間、Amlexanox 溶液を投与した群 (100 μ M、10 μ L) において、OA誘導手術後8週時点で、SMALLGO小動物用アルゴメータ (Bioseb社製、型番BIO-SMALLGO+) を用いて、関節への圧刺激に対する痛みの閾値を測定した。

右図に示すように、Amlexanox 及びヒアルロン酸の同時投与群では、Amlexanox 単独投与群よりも、痛みを軽減できることが明らかになった。



以上の結果をまとめ、変形性関節症の進行抑制剤及び進行抑制キットという名称で特許申請を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Uchida Taisuke, Akasaki Yukio, Sueishi Takuya, Kurakazu Ichiro, Toya Masakazu, Kuwahara Masanari, Hirose Ryota, Hyodo Yuki, Tsushima Hidetoshi, Lotz Martin K., Nakashima Yasuharu	4. 巻 75
2. 論文標題 Promotion of Knee Cartilage Degradation by $\text{I} \beta$ Kinase in the Pathogenesis of Osteoarthritis in Human and Murine Models	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Arthritis & Rheumatology	6. 最初と最後の頁 937 ~ 949
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/art.42421	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 Kuwahara Masanari, Akasaki Yukio, Kurakazu Ichiro, Sueishi Takuya, Toya Masakazu, Uchida Taisuke, Tsutsui Tomoaki, Hirose Ryota, Tsushima Hidetoshi, Teramura Takeshi, Nakashima Yasuharu	4. 巻 36
2. 論文標題 C10orf10/DEPP activates mitochondrial autophagy and maintains chondrocyte viability in the pathogenesis of osteoarthritis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	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） 10.1096/fj.202100896R	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 Kuwahara Masanari, Akasaki Yukio, Goto Norio, Kurakazu Ichiro, Sueishi Takuya, Toya Masakazu, Uchida Taisuke, Tsutsui Tomoaki, Hirose Ryota, Tsushima Hidetoshi, Nakashima Yasuharu	4. 巻 23
2. 論文標題 Fluvastatin promotes chondrogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells by inducing bone morphogenetic protein 2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Pharmacology and Toxicology	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） 10.1186/s40360-022-00600-7	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 Toya Masakazu, Akasaki Yukio, Sueishi Takuya, Kurakazu Ichiro, Kuwahara Masanari, Uchida Taisuke, Tsutsui Tomoaki, Tsushima Hidetoshi, Yamada Hisakata, Lotz Martin K., Nakashima Yasuharu	4. 巻 11
2. 論文標題 G protein-coupled receptor kinase 5 deletion suppresses synovial inflammation in a murine model of collagen antibody-induced arthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-021-90020-0	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 Kurakazu I., Akasaki Y., Tsushima H., Sueishi T., Toya M., Kuwahara M., Uchida T., Lotz M.K., Nakashima Y.	4. 巻 29
2. 論文標題 TGF- β 1 signaling protects chondrocytes against oxidative stress via FOXO1/autophagy axis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Osteoarthritis and Cartilage	6. 最初と最後の頁 1600 ~ 1613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.joca.2021.07.015	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0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 変形性関節症の進行抑制剤及び進行抑制キット	発明者 居石 卓也、他7名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、QP210037	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------