

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16708

研究課題名(和文)新規NF- $\kappa$ B阻害ペプチドによる新規変形性関節症治療法の開発研究課題名(英文)Development of a novel therapeutic approach for rheumatoid arthritis using a newly designed NF- $\kappa$ B inhibitory peptide.

研究代表者

恵谷 悠紀(Etani, Yuki)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60898930

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文): 内側半月板と不安定化する処置により、術後8週時点でマイクロCTでの関節面骨硬化像と組織標本での関節軟骨の摩耗が確認された。この内側半月板不安定化モデルマウスに対しMTI- ペプチドを関節内投与したが、注射部位を中心とした滑膜炎など軟部組織の炎症反応を認め、軟骨組織の保護作用は認められなかった。

軟骨細胞株ATDC5細胞にLPSを添加することで軟骨蛋白分解酵素であるMMP-3、MMP-13が上昇した。そして、10ng/ml LPSにMTI- ペプチド3mg/mlを加え同様に24時間培養したところMMP-3、MMP-13の発現が低下した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会において変形性膝関節症の患者数は約2530万人を数え、かつ増加傾向である。既存のNSAIDsの内服・外用や、ヒアルロン酸関節内投与は一定の鎮痛効果が認められるが病状の進行抑制には効果が不十分であり、ステロイド関節内投与は軟骨壊死の懸念があることより新規治療薬の開発が待望されている。転写因子 Nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)は変形性関節症においては疼痛や病状を悪化させる。本研究は新規開発されたNF- $\kappa$ B阻害ペプチド: MTI- ペプチドの効果を検討した。MTI- ペプチドは軟骨分解酵素の発現を抑制しており、変形性関節症予防の新規治療法として期待される。

研究成果の概要(英文): Treatment involving medial meniscal destabilization resulted in observed subchondral bone sclerosis on microCT imaging and cartilage erosion on histological examination at 8 weeks postoperatively. In the medial meniscal destabilization model mice, intra-articular administration of MTI- peptide was performed; however, inflammatory reactions in soft tissues, including synovitis centered around the injection site, were observed, and no protective effect on cartilage tissue was observed.

Addition of LPS to the ATDC5 chondrocyte cell line led to an increase in MMP-3 and MMP-13, enzymes involved in cartilage protein degradation. Subsequently, when 3mg/ml of MTI- peptide was added to the cells along with 10ng/ml LPS and cultured for 24 hours, a decrease in the expression of MMP-3 and MMP-13 was observed.

研究分野: 変形性関節症、関節リウマチ、骨粗鬆症

キーワード: 変形性関節症 NF- $\kappa$ B ペプチド製剤 軟骨保護

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会において要介護・要支援に至る最多の原因は運動器の障害であり、中でも変形性膝関節症 (Osteoarthritis: OA) の患者数は約 2530 万人と最多を占め、かつ増加傾向である。既存の Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) の内服・外用や、ヒアルロン酸関節内投与は一定の鎮痛効果が認められるが病状の進行抑制には効果が不十分であり、ステロイド関節内投与は軟骨壊死の懸念があることより新規治療薬の開発が待望されている。

Nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) は炎症・免疫・細胞分化などを司る転写因子であり、変形性関節症においては滑膜炎を惹起したり、軟骨細胞のアポトーシスや石灰化を促進したり、軟骨下骨の骨吸収を促進することで疼痛や病状を悪化させる。これまでに NF- $\kappa$ B を直接阻害する薬剤はステロイドが実用化されているが、軟骨壊死・骨粗鬆症・血糖値上昇・消化管潰瘍等の様々な副作用を惹起する。

当研究グループの岡本らはヒト全組織普遍的に発現している核内酸性蛋白質 (Macromolecular translocation inhibitor-、以下 MTI-) を世界で初めて発見し、この MTI- が NF- $\kappa$ B に直接結合しその転写活性を阻害する内因性 NF- $\kappa$ B 阻害因子であることを見出した (特許第 4874798 号)。先行研究でペプチド製剤 (MTI- ペプチド) は、種々の炎症性疾患 (関節炎・結膜炎・アトピー性皮膚炎等) モデル動物の病状や TNF- $\alpha$  による骨形成抑制を改善しており、MTI- ペプチド製剤は変形性関節症に対する新規治療薬としても期待される。

### 2. 研究の目的

本研究は変形性関節症モデル動物において、NF- $\kappa$ B の亢進による滑膜炎や軟骨細胞のアポトーシス・石灰化に対して MTI- ペプチドを関節内投与することの炎症・疼痛の緩和や関節症の進行抑制効果を検討し、詳細な作用機序を解明してヒトへの臨床応用への基盤を確立することである。

### 3. 研究の方法

モノヨード酢酸誘導性変形性関節症モデルマウスの作成方法、評価方法の確立: C57BJ/6 マウス (雄 8 週齢) の膝関節内に生理食塩水 (10 $\mu$ l) に希釈したモノヨード酢酸 [0.1mg (重症モデル) もしくは 0.01mg (中等症モデル)] を投与し 3 週後に評価を行った。

内側半月板不安定化モデルマウスの作成方法、評価方法の確立: より臨床に即した OA モデルの作成として、10 週齢マウスに対し内側半月板と脛骨関節面の結合組織を切離し内側半月板を不安定化する処置を行い、術後 8 週で評価を行った。

内側半月板不安定化モデルマウスへの MTI- ペプチド投与効果の確認: 上記の内側半月板不安定化モデルマウスに対し、MTI- ペプチド (4mg・10 $\mu$ l/回) を週 3 回 8 週間関節内投与し評価を行った。

軟骨細胞株 ATDC5 細胞に対する MTI- ペプチド投与効果の確認: 軟骨細胞株 ATDC5 細胞の培養液に、NF- $\kappa$ B 経路を介して炎症を惹起する Lipopolysaccharide (LPS) を加え 24 時間培養し、RNA を回収し qPCR を実施した。また、LPS と同時に MTI- ペプチドを加え同様に 24 時間培養し効果を検討した。

### 4. 研究成果

モノヨード酢酸投与後 3 週で膝関節において組織標本で関節軟骨の消失を認めた。

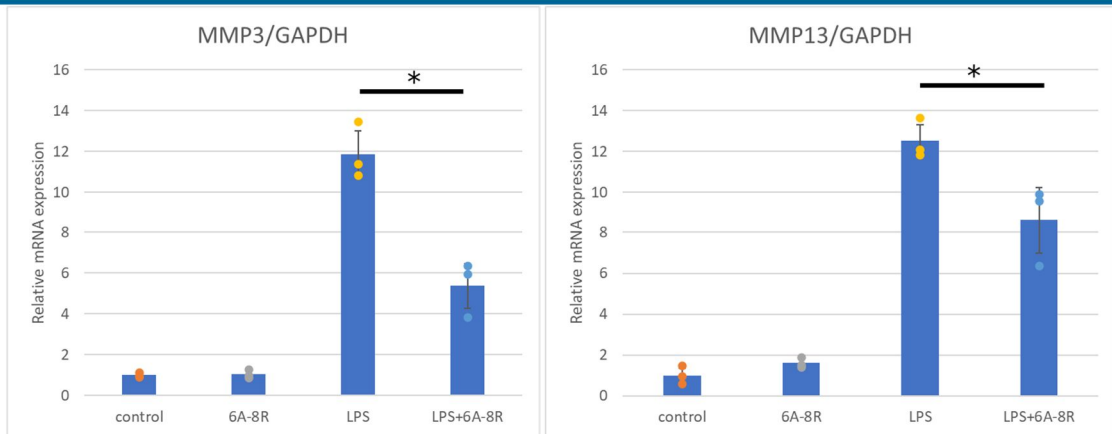
内側半月板と不安定化する処置により、術後 8 週時点でマイクロ CT での関節面骨硬化像と組織標本での関節軟骨の摩耗が確認された。

内側半月板不安定化モデルマウスへの MTI- ペプチド投与効果の確認: 上記の内側半月板不安定化モデルマウスに対し MTI- ペプチドを関節内投与したが、注射部位を中心とした滑膜炎など軟部組織の炎症反応を認め、軟骨組織の保護作用は認められなかった。

軟骨細胞株 ATDC5 細胞に LPS を添加することで軟骨蛋白分解酵素である MMP-3、MMP-13 が上昇した。そして、10ng/ml LPS に MTI- ペプチド 3mg/ml を加え同様に 24 時間培養したところ MMP-3、MMP-13 の発現が低下した。

以上の結果から、*in vitro* で MTI- ペプチドは軟骨分解酵素の発現を抑制しており、変形性関節症予防の新規治療法として期待される。関節内投与では注射部位に炎症をきたし期待された効果が得られなかったが、今後は投与方法を腹腔内投与や静脈内投与など全身投与に切り替えての効果評価を検討している。

# MTI-Ⅱペプチドの投与により 軟骨蛋白分解酵素MMP-3, MMP-13が低下



ATDC5 (軟骨細胞株)  
+6A-8R (MTI-Ⅱペプチド) 3 mg/ml  
+LPS 10 ng/ml

n=3, Mean±SD, Tukey-Kramer法, \*P<0.05

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 16件）

1. 著者名 Ebina K., Etani Y., Tsuboi H., Nagayama Y., Kashii M., Miyama A., Kunugiza Y., Hirao M., Okamura G., Noguchi T., Takami K., Goshima A., Miura T., Fukuda Y., Kurihara T., Okada S., Nakata K.	4. 巻 33
2. 論文標題 Effects of prior osteoporosis treatment on the treatment response of romosozumab followed by denosumab in patients with postmenopausal osteoporosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Osteoporosis International	6. 最初と最後の頁 1807 ~ 1813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00198-022-06386-y	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 Noguchi Takaaki, Hirao Makoto, Tsuji Shigeyoshi, Etani Yuki, Ebina Kosuke, Tsuboi Hideki, Okamura Gensuke, Akita Shosuke, Okada Seiji, Hashimoto Jun	4. 巻 14
2. 論文標題 Characteristics of Intermetatarsal Angle Between the Second and Fifth Metatarsals (M2-M5A) in the Rheumatoid Foot	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cureus	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) 10.7759/cureus.24831	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 Etani Yuki, Hirao Makoto, Ebina Kosuke, Tsuboi Hideki, Noguchi Takaaki, Okamura Gensuke, Miyama Akira, Takami Kenji, Nampei Akihide, Tsuji Shigeyoshi, Owaki Hajime, Okada Seiji, Hashimoto Jun	4. 巻 104
2. 論文標題 Modified Scarf Osteotomy with Medial Capsular Interposition Combined with Metatarsal Shortening Offset Osteotomy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Joint Surgery	6. 最初と最後の頁 1269 ~ 1280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2106/JBJS.21.01486	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 Ebina Kosuke, Hirano Toru, Maeda Yuichi, Okita Yasutaka, Etani Yuki, Hirao Makoto, Yamamoto Wataru, Hashimoto Motomu, Murata Koichi, Onishi Akira, Jinno Sadao, Hara Ryota, Son Yonsu, Amuro Hideki, Kotani Takuya, Shiba Hideyuki, Katayama Masaki, Yamamoto Keiichi, Kumanogoh Atsushi, Okada Seiji, Nakata Ken	4. 巻 -
2. 論文標題 Add-on effectiveness of methotrexate or iguratimod in patients with rheumatoid arthritis exhibiting an inadequate response to Janus kinase inhibitors: The ANSWER cohort study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Modern 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) 10.1093/mr/roac092	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 Ebina Kosuke, Etani Yuki, Tsuboi Hideki, Nagayama Yoshio, Kashii Masafumi, Miyama Akira, Kunugiza Yasuo, Hirao Makoto, Okamura Gensuke, Noguchi Takaaki, Takami Kenji, Goshima Atsushi, Miura Taihei, Fukuda Yuji, Kurihara Takuya, Okada Seiji, Nakata Ken	4. 巻 33
2. 論文標題 Impact of the duration of previous osteoporosis treatment on the effect of romosozumab in patients with postmenopausal osteoporosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Osteoporosis International	6. 最初と最後の頁 2441 ~ 2443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00198-022-06545-1	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 Etani Yuki, Hirao Makoto, Ebina Kosuke, Noguchi Takaaki, Okamura Gensuke, Tsuboi Hideki, Miyama Akira, Tsuji Shigeyoshi, Kunugiza Yasuo, Okada Seiji, Hashimoto Jun	4. 巻 12
2. 論文標題 Improvement of Knee Alignment and Function After Corrective Surgery for Hindfoot Deformity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JBJS Case Connector	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) 10.2106/JBJS.CC.21.00805	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 Noguchi Takaaki, Hirao Makoto, Tsuji Shigeyoshi, Ebina Kosuke, Etani Yuki, Tsuboi Hideki, Okamura Gensuke, Akita Shosuke, Okada Seiji, Hashimoto Jun	4. 巻 7
2. 論文標題 Modified scarf osteotomy with capsular interposition as salvage for resection or silicone implant arthroplasty in patients with rheumatoid arthritis. A report of three cases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology Case Reports	6. 最初と最後の頁 34 ~ 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/mrcr/rxac079	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 Oyama Shohei, Ebina Kosuke, Etani Yuki, Hirao Makoto, Kyuuma Masanao, Fujii Yasuyuki, Iwata Katsuya, Ogawa Bunichiro, Hasegawa Tomoya, Kawano Sasagu, Nakanishi Yutaka, Okada Seiji, Nakata Ken	4. 巻 12
2. 論文標題 A novel anti-TNF- drug ozoralizumab rapidly distributes to inflamed joint tissues in a mouse model of collagen induced arthritis	5. 発行年 2022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/s41598-022-23152-6	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 Murakami Tomohiko, Takahata Yoshifumi, Hata Kenji, Ebina Kosuke, Hirose Katsutoshi, Ruengsinpinya Lerdluck, Nakaminami Yuri, Etani Yuki, Kobayashi Sachi, Maruyama Takashi, Nakano Hiroyasu, Kaneko Takehito, Toyosawa Satoru, Asahara Hiroshi, Nishimura Riko	4. 巻 15
2. 論文標題 Semaphorin 4D induces articular cartilage destruction and inflammation in joints by transcriptionally reprogramming chondrocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Signaling	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) 10.1126/scisignal.abl5304	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 Hirao Makoto, Ebina Kosuke, Etani Yuki, Kaneshiro Shoichi, Tsuboi Hideki, Noguchi Takaaki, Okamura Gensuke, Kunugiza Yasuo, Nakaya Hiroyuki, Nishikawa Masataka, Tsuji Shigeyoshi, Takahi Koichiro, Owaki Hajime, Hashimoto Jun	4. 巻 6
2. 論文標題 Modified Anterolateral Approach for Total Ankle Arthroplasty	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Foot & Ankle Orthopaedics	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) 10.1177/24730114211013342	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 Etani Yuki, Hirao Makoto, Ebina Kosuke, Kunugiza Yasuo, Noguchi Takaaki, Tsuboi Hideki, Tsuji Shigeyoshi, Okada Seiji, Hashimoto Jun	4. 巻 12
2. 論文標題 Midfoot Derotational Osteotomy for Ankylosing Inversion Deformity in Patients with Rheumatoid Arthritis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JBJS Case Connector	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) 10.2106/JBJS.CC.21.00613	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 Ebina Kosuke, Hirano Toru, Maeda Yuichi, Yamamoto Wataru, Hashimoto Motomu, Murata Koichi, Onishi Akira, Jinno Sadao, Hara Ryota, Son Yonsu, Amuro Hideki, Takeuchi Tohru, Yoshikawa Ayaka, Katayama Masaki, Yamamoto Keiichi, Okita Yasutaka, Hirao Makoto, Etani Yuki, Kumanogoh Atsushi, Okada Seiji, Nakata Ken	4. 巻 12
2. 論文標題 Factors affecting drug retention of Janus kinase inhibitors in patients with rheumatoid arthritis: the ANSWER cohort study	5. 発行年 2022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/s41598-021-04075-0	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 Etani Yuki, Hirao Makoto, Ebina Kosuke, Noguchi Takaaki, Okamura Gensuke, Miyama Akira, Tsuboi Hideki, Nampei Akihide, Tsuji Shigeyoshi, Owaki Hajime, Okada Seiji, Hashimoto Jun	4. 巻 18
2. 論文標題 Combination of Modified Scarf Osteotomy and Metatarsal Shortening Offset Osteotomy for Rheumatoid Forefoot Deformity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Environmental Research and Public Health	6. 最初と最後の頁 10473 ~ 10473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijerph181910473	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 Noguchi Takaaki, Hirao Makoto, Tsuji Shigeyoshi, Ebina Kosuke, Tsuboi Hideki, Etani Yuki, Akita Shosuke, Hashimoto Jun	4. 巻 18
2. 論文標題 Association of Decreased Physical Activity with Rheumatoid Mid-Hindfoot Deformity/Destruction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Environmental Research and Public Health	6. 最初と最後の頁 10037 ~ 10037
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijerph181910037	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 Ebina Kosuke, Tsuboi Hideki, Nagayama Yoshio, Kashii Masafumi, Kaneshiro Shoichi, Miyama Akira, Nakaya Hiroyuki, Kunugiza Yasuo, Hirao Makoto, Okamura Gensuke, Etani Yuki, Takami Kenji, Goshima Atsushi, Miura Taihei, Nakata Ken, Okada Seiji	4. 巻 88
2. 論文標題 Effects of prior osteoporosis treatment on 12-month treatment response of romosozumab in patients with postmenopausal osteoporosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Joint Bone Spine	6. 最初と最後の頁 105219 ~ 105219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbspin.2021.105219	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 Miyama Akira, Ebina Kosuke, Hirao Makoto, Okamura Gensuke, Etani Yuki, Takami Kenji, Goshima Atsushi, Miura Taihei, Oyama Shohei, Kanamoto Takashi, Yoshikawa Hideki, Nakata Ken	4. 巻 39
2. 論文標題 Effects of iguratimod on glucocorticoid-induced disorder of bone metabolism in vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 639 ~ 648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-021-01206-5	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 恵谷 悠紀
2. 発表標題 Combined effect of teriparatide and an anti-RANKL monoclonal antibody on bone defect regeneration in mice with glucocorticoid-induced osteoporosis
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会・学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 恵谷 悠紀
2. 発表標題 足関節矯正手術による下肢全体アライメントへの影響
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会・学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 恵谷 悠紀
2. 発表標題 人工足関節置換術における改変型前外側アプローチの試み
3. 学会等名 第50回日本リウマチの外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 恵谷 悠紀
2. 発表標題 足関節矯正手術による下肢全体アライメントへの影響
3. 学会等名 第50回日本リウマチの外科学会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 恵谷 悠紀
2. 発表標題 足関節矯正手術による下肢全体アライメントへの影響
3. 学会等名 第46回日本足の外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 恵谷 悠紀
2. 発表標題 人工足関節置換術における改変型前外側アプローチの試み
3. 学会等名 第46回日本足の外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 恵谷 悠紀
2. 発表標題 人工足関節置換術における改変型前外側アプローチの試み
3. 学会等名 第52回日本人工関節学会
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
---------	---------