

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16744

研究課題名（和文）変形性膝関節症における分子シャペロンの機能解析および治療への応用

研究課題名（英文）Functional analysis of molecular chaperones in knee osteoarthritis and their therapeutic application

研究代表者

久永 哲（Hisanaga, Satoshi）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：変形性膝関節症患者の軟骨では、分子シャペロン関連の遺伝子の増加が確認されており、シングルセルRNAシーケンシングでは、正常軟骨に近いClusterの中に細胞の恒常性維持関与している軟骨細胞群が同定され、その領域でシャペロンを含む小胞体ストレス関連遺伝子が上昇していた。さらに細胞系譜解析を行うと正常軟骨からOA軟骨に進展していく過程において、小胞体ストレス関連遺伝子が上昇している細胞群を認め、同細胞群では、COL2Aの発現が低下していた。つまり正常軟骨からOA軟骨に移行する過程で、タンパク折りたたみ機能が低下し、細胞外基質産生能の低下を引き起こしており、OA進行の一因であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性関節症は高齢者の健康寿命の延伸を阻害する代表的な運動器疾患である。軟骨破壊の進行を抑制する原因療法の開発が急務となっており、そのためには軟骨変性病態の分子メカニズムの解明による治療標的分子の同定が不可欠である。今回正常軟骨が変性する過程で小胞体に負荷がかかり、病態進行の一因となっている可能性が示唆された。今後その過程での薬剤による小胞体の負荷の軽減により進行予防が期待できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：increased expression of molecular chaperone-related genes has been confirmed in cartilage from patients with osteoarthritis of the knee, and single-cell RNA sequencing identified the chondrocyte group involved in maintaining cellular homeostasis in a cluster close to normal cartilage, in which endoplasmic reticulum stress-related genes, including chaperones, were elevated. Furthermore, cell lineage analysis revealed a cell group in which endoplasmic reticulum stress-related genes were elevated during the process of progression from normal cartilage to OA cartilage, and in this cell group, expression of COL2A was reduced. In other words, during the transition from normal cartilage to OA cartilage, protein folding function is reduced, causing a decrease in the ability to produce extracellular matrix, suggesting that this is one of the factors contributing to the progression of OA.

研究分野：変形性膝関節症

キーワード：変形性膝関節症 小胞体ストレス

### 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、高齢者の生活の質を低下させ、健康寿命の延伸を阻害させる。治療としては対症療法としての NSAIDs の内服、ヒアルロン酸の膝関節内投与や理学療法などの保存的療法に加え、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。しかしながら現在においても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。

我々は以前より膝関節の OA のメカニズムとして、小胞体ストレスという現象に注目し、研究を行ってきた。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、細胞にはその状況を解消しようとする小胞体ストレス応答 (unfolded protein response : UPR) が存在する。しかしながら、小胞体ストレスおよび UPR の制御により、OA の進行予防につながるかはまだ十分に検討はなされていない。

### 2. 研究の目的

分子シャペロンや化学シャペロンの働きにより、OA 進行の過程で軟骨基質の分泌が増加し、軟骨変性が抑制される可能性が示されている。本研究では OA 患者より関節軟骨を採取し、分子シャペロン群およびその働きに関与する遺伝子発現を確認し、また化学シャペロンの軟骨細胞、軟骨基質の染色性や軟骨変性の抑制効果を検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

人工膝関節置換術を施行する内側型変形性膝関節症患者の内側および外側の骨軟骨組織を術中に採取し、シングルセル RNA シーケンシングを行った。

化学シャペロンである 4-PBA 投与が軟骨変性の進行に及ぼす影響を ACL を切離したマウス膝 OA モデルで解析した。術後 1 週間より 3 週間、4-PBA (5mM、50 μ l) を週 2 回関節内に投与し、12 週後にサンプリングし、膝関節骨軟骨組織を採取した。HE 染色とサフラニン-O 染色標本で modified Mankin score を算出し軟骨変性を評価した

### 4. 研究成果

術中に採取した軟骨組織より RNA を抽出し、各細胞の遺伝子発現プロファイルをもとに細胞集団を分類し、軟骨細胞の同定を行った(図1)。

サンプリングを行った細胞群には軟骨細胞に加え、血液細胞や線維芽細胞等も含まれていたため、その中で軟骨細胞のみを抽出し、解析を行った。

軟骨細胞群を再度遺伝子発現プロファイルをもとに細分化した(図2)。

細胞の前肥大軟骨細胞が大半を占める中、クラスター6あるいは7には HomC

(homeostatic chondrocyte) や、肥大軟骨細胞の割合が多かった。

また正常軟骨が多く含まれるクラスター7と OA 軟骨が多く含まれるクラスター6の2群を比較したとこと、興味深いことにクラスター7で分子シャペロンを含む小胞体ストレス関連遺伝子の上昇を認めた。また系

譜解析にて細胞群を確認したところ、cluster3 を始点とし、5→7→0 の順に細胞が分化しており、cluster7 は OA に至る前の軟骨細胞群であることが示された。

図1

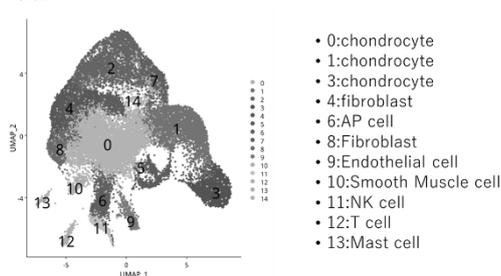


図2

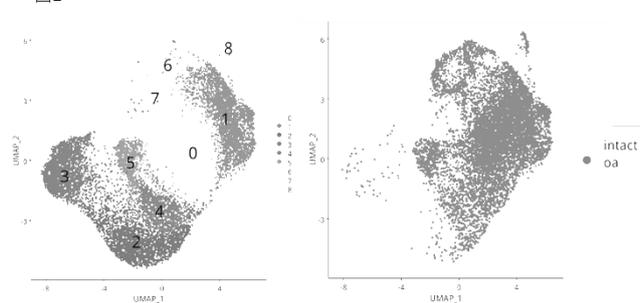


図3

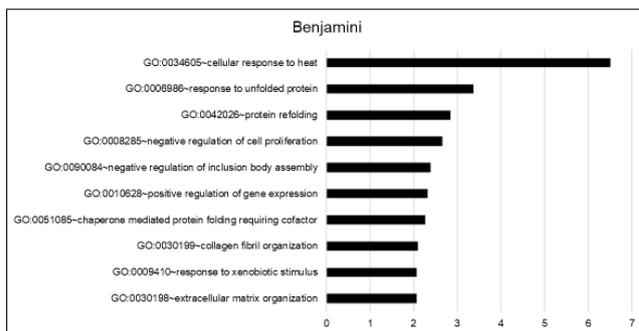


図4

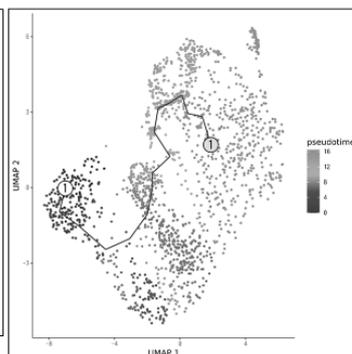
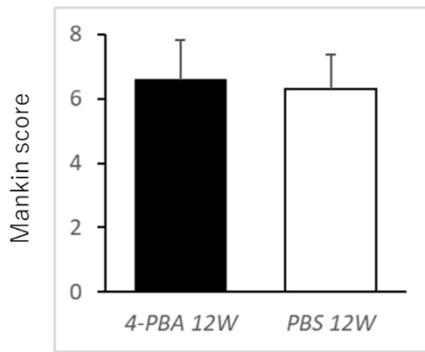


図5



これらの結果より正常軟骨からOA軟骨に移行する過程で、正常軟骨細胞での基質産生が上昇し、タンパク折りたたみ機能が亢進することにより小胞体ストレス反応が上昇し、OA進行の一因であることが示唆された。化学シャペロンである4-PBA投与が軟骨変性の進行に及ぼす影響をACLを切離したマウス膝OAモデルで解析したが、術後12週の時点ではわずかに変性が抑制される傾向があったが、明らかな有意差はなかった。シングルセルRNAシーケンシングの結果より、小胞体ストレスが活性化するのはOA進行の一過程であり、より適切なタイミングでのシャペロンの投与の検討が必要であった可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------