

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H05097

研究課題名(和文)変形性関節症の早期病態に即した治療標的分子の探索

研究課題名(英文)Research on therapeutic targets for early-stage osteoarthritis

研究代表者

赤崎 幸穂 (Akasaki, Yukio)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：60568963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,400,000円

研究成果の概要(和文)：研究成果として、変形性関節症の早期病態に関与する候補因子を3つ同定できた。1つ目は、軟骨細胞においてNF- κ Bの活性化を制御する新規因子としてG protein-coupled receptor kinase 5 (GRK5)を同定した。GRK5インヒビターを治療薬として臨床応用する計画を進めている。2つ目は、FOXO転写因子のターゲット遺伝子であり、細胞の異常タンパク異化に関与する因子であるDEPPを同定した。その機序は、ミトコンドリアにおけるオートファジーを介していた。3つ目は、変形性関節症においてNF- κ Bの活性化に関与する新しいキナーゼを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性関節症患者の大多数である早期変形性関節症の治療は、確立していない。本研究では、変性が進行する前の早期変性軟骨を解析して、軟骨変性のきっかけとなる原因因子を同定する、これまでにない早期病態に即した疾患修飾治療の研究である。本研究が完成すれば、変形性関節症治療の研究領域において、早期治療の新しい治療標的を提唱することができ、複雑な病態である変形性関節症のさらなる病態解明と新規創薬へとつながり、ひいては数百万人規模の患者の利益になりうる。

研究成果の概要(英文)：As a result of this research, three candidate factors involved in the early pathophysiology of osteoarthritis have been identified.

First, G protein-coupled receptor kinase 5 (GRK5) was identified as a novel factor that regulates the activation of NF- κ B in chondrocytes. We are proceeding with a plan to clinically apply the GRK5 inhibitor as a therapeutic drug. Second, we identified DEPP, which is a target gene for FOXO transcription factors and a factor involved in abnormal protein catabolism in cells. The mechanism was mediated by autophagy in mitochondria. Third, a novel kinase involved in the activation of NF- κ B in osteoarthritis has been identified.

研究分野：軟骨代謝

キーワード：変形性関節症 軟骨変性 滑膜炎

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は、進行性の軟骨変性により関節機能を著しく障害する不可逆的な疾患であり、日本では約 800 万人が罹患している。しかしながら、未だ変形性関節症に対する疾患修飾治療薬はなく、末期症例に対しては金属製の人工関節置換術が施行されている。一方、患者の大多数である早期変形性関節症 (KL 分類 1~2) の治療は、確立していない。今後は、変形性関節症の早期病態に即した疾患修飾治療薬の開発が重要な課題である。そのためには、変形性関節症の病期に応じた分子レベルの病態解明が必須であり、特に早期の変形性関節症における軟骨組織の恒常性破綻の要因を明確にすることが不可欠である。しかしながら、これまでの変形性関節症研究では、変性が進んだ後の軟骨組織が研究試料であり、早期病態を分子レベルで解析した報告はない。

2. 研究の目的

本研究は、変性早期のヒト軟骨組織における遺伝子・蛋白発現を網羅的に解析して、早期病態に特異的な因子・シグナルを明らかにする。次に焦点を絞り、軟骨組織の恒常性維持に不可欠な protein quality control (蛋白の品質管理) に関連する因子に着目し、軟骨細胞による基質分解酵素の異常産生の要因となる因子を同定する。さらに、それら protein quality control 異常因子の正常化による軟骨変性抑制効果を検討し、早期変形性関節症を対象にした治療標的分子を探索する。

3. 研究の方法

ヒト早期変性軟骨と正常軟骨における遺伝子発現プロファイリングを RNA シーケンスで行う。同定した早期病態に特異的な protein quality control 関連因子群のノックダウン軟骨細胞を作成し、misfold 蛋白蓄積誘導による異化作用因子発現変化を解析する。有意な因子についてはノックアウトマウスを作成し、早期関節症変化を解析する。また、早期変性軟骨と正常軟骨における軟骨基質沈着蛋白のプロファイリングをハイスループットプロテオーム解析で行う。有意な沈着蛋白については軟骨細胞に対する生理活性を解析し、その沈着メカニズムを検討する。以上より明らかにした早期病態に特異的な protein quality control 関連因子および基質沈着蛋白の正常化による軟骨変性抑制効果を、変形性関節症動物モデルを使用して検討する。

4. 研究成果

本研究の最終的な成果としては、3つの新規治療標的因子を同定し、詳細な機能解析とモデルマウスでの検証を行い、論文発表を行った。そのうちの2因子の阻害薬を原薬とした変形性関節症治療薬の臨床応用へ向けての取り組みを行っている。

以下は、研究成果の経緯である。

ヒト新鮮屍体膝より早期変性軟骨と正常軟骨を採取し、RNA と蛋白を分離して抽出した。高純度の RNA のみで、RNA ライブラリーを作成し、RNA シーケンスを行った。得られたデータをフィルタリングし、発現に有意差がある遺伝子の抽出、解析を行ったところ、約 300 の遺伝子を同定した。発現差のあった各遺伝子群のうちで、protein quality control (autophagy、proteasome システム、小胞体ストレスなど) の異常に関連する decidual protein induced by progesterone (DEPP) および慢性炎症のリモデリングに参与する G protein-coupled receptor kinase 5 (GRK5) を疾患関連因子の第一候補とした。

DEPP については、ヒト軟骨細胞において飢餓状態、酸化ストレスなどでその発現が亢進することを確認し、CRISPR/Cas9 システムを用いたノックアウトマウスを作成した。GRK5 については、GRK5 ノックアウトマウスの提供を受け、軟骨細胞の遺伝子プロファイルをマイクロアレイによって解析した。野生型と比較し、著明な炎症性サイトカインやプロテアーゼの発現低下を認めた。GRK5 インヒビターなどを用いて培養軟骨細胞での詳細な機能解析を行った。さらに、GRK5 インヒビターは治療薬として国内特許出願を行った。

それぞれの因子の軟骨細胞における機能を解析するとともに、これまでに作成したノックアウトマウスを用いて、膝内側半月板不安定モデルを作成後、4週(早期)の軟骨変性を特殊染色にてスコア化し、野生型マウスと比較・解析した。GRK5 については、GRK5 ノックアウトマウスにおいて野生型と比較し、著明な炎症性サイトカインやプロテアーゼの発現低下を認めた。GRK5 インヒビターなどを用いて培養軟骨細胞での詳細な機能解析を行った。さらに、GRK5 インヒビターをマウス OA モデルへ関節内投与を行い、軟骨変性抑制効果を明らかとした。

DEPP については、CRISPR/Cas9 システムを用いて作成したノックアウトマウスの解析を行った。生後早期の個体より軟骨細胞を採取し、マイクロアレイによる機能解析を行った。マウス OA

モデルを作成し、関節軟骨変性に関わる表現型の解析を行った。

研究実績として、以下のように変形性関節症の早期病態に関与する候補因子を3つ同定できた。

1つ目は、軟骨細胞における炎症シグナルを調節する新規因子として G protein-coupled receptor kinase 5 (GRK5) を同定し、その機序は NF- κ B の活性化の制御であることを明らかにした。GRK5 ノックアウトマウスにおいて野生型に比較し、著明な炎症性サイトカインやプロテアーゼの発現低下を認めた。さらに、GRK5 インヒビターをマウス OA モデルへ関節内投与を行い、軟骨変性抑制効果を明らかとした。これらの内容は、Arthritis and Rheumatology に掲載された。GRK5 インヒビターを治療薬として臨床応用する計画を立案し、次相へ進めている。また、GRK5 の滑膜炎発症に関する研究も行い、その成果は Scientific Reports に掲載された。

2つ目は、FOXO 転写因子のターゲット遺伝子であり、細胞の異常タンパク異化に関与する因子である decidual protein induced by progesterone (DEPP) を同定した。その軟骨細胞における機能を解析するとともに、CRISPR/Cas9 システムで作成したノックアウトマウスを用いて、膝内側半月板不安定モデルを作成し、DEPP ノックアウトマウスでは軟骨変性が早期に発症することを明らかにした。その機序は、ミトコンドリアにおけるオートファジーを介していた。研究成果は、FASEB journal に掲載された。

3つ目として、本研究を行う中で偶然に発見した変形性関節症軟骨において NF- κ B の活性化に関与する新しいキナーゼについて、ヒトサンプルおよび軟骨細胞で機能解析を行った。その阻害薬の関節内投与が軟骨変性を抑制する効果を明らかにし、現在論文投稿中およびその阻害薬の特許出願準備中である。

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 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sueishi T, Akasaki Y, Goto N, Kurakazu I, Toya M, Kuwahara M, Uchida T, Hayashida M, Tsushima H, Bekki H, Lotz MK, Nakashima Y	4. 巻 72
2. 論文標題 GRK5 Inhibition Attenuates Cartilage Degradation via Decreased NF- B Signalling.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arthritis and Rheumatology	6. 最初と最後の頁 620-631
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/art.41152.	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 該当する
1. 著者名 Kurakazu I, Akasaki Y, Hayashida M, Tsushima H, Goto N, Sueishi T, Toya M, Kuwahara M, Okazaki K, Duffy T, Lotz MK, Nakashima Y	4. 巻 294
2. 論文標題 FOXO1 transcription factor regulates chondrogenic differentiation through transforming growth factor 1 signaling.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry.	6. 最初と最後の頁 17555-17569
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.009409.	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 該当する
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
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 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12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 居石卓也, 赤崎幸穂, 津嶋秀俊, 倉員市郎, 遠矢政和, 桑原正成, 内田泰輔, 中島康晴
2. 発表標題 G protein-coupled receptor kinase (GRK)-5阻害は、NF- κ B経路の制御を介して変形性関節症における軟骨変性を抑制する
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 居石卓也, 赤崎幸穂, 池村聡, 藤原稔史, 津嶋秀俊, 倉員市郎, 遠矢政和, 桑原正成, 内田泰輔, 中島康晴
2. 発表標題 G protein-coupled receptor kinase (GRK)-5阻害は、NF- κ B経路の制御を介して変形性関節症における軟骨変性を抑制する
3. 学会等名 第83回九州リウマチ学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠矢政和, 赤崎幸穂, 津嶋秀俊, 居石卓也, 倉員市郎, 桑原正成, 内田泰輔, 池村聡, 藤原稔史, 山田久方, 中島康晴
2. 発表標題 炎症性関節炎の病態形成におけるGRK5(G protein-coupled receptor kinase 5)の機能解析
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 倉員 市郎, 赤崎 幸穂, 林田 光正, 後藤 徳雄, 居石 卓也, 遠矢 政和, 桑原 正成, 中島 康晴
2. 発表標題 FoxO1転写因子はp21の発現および細胞周期抑制を促進し、TGF シグナルによる軟骨分化を制御する
3. 学会等名 第34回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 赤崎幸穂, 水内秀城, 瀧井 敏, 津嶋秀俊, 川原慎也, 中島康晴
2. 発表標題 外側楔状足底板を使用した全下肢立位XpによるHTO前後JLCA変化の術前予測
3. 学会等名 第47回日本関節病学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 赤崎幸穂, 林田光正, 後藤徳雄, 倉員市郎, 居石卓也, 遠矢政和, 中島康晴
2. 発表標題 Forkhead box O (FOXO) 転写因子は、オートファジー関連蛋白を制御し、軟骨細胞の酸化ストレス抵抗を維持する
3. 学会等名 第91回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takuya Sueishi, Yukio Akasaki, Norio Goto, Ichiro Kurakazu, Masakazu Toya, Masanari Kuwahara, Yasuharu Nakashima
2. 発表標題 The regulation of cartilage degradation by GRK-5 during osteoarthritis development
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 居石卓也, 赤崎幸穂, 福士純一, 池村聡, 後藤徳雄, 倉員市郎, 遠矢政和, 中島康晴
2. 発表標題 G protein-coupled receptor kinase (GRK)-5阻害は, NF B経路を介した炎症反応を抑えることにより変形性関節症の軟骨変性を抑制する
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 居石卓也, 赤崎幸穂, 後藤徳雄, 倉員市郎, 遠矢政和, 桑原正成, 中島康晴
2. 発表標題 G protein-coupled receptor kinase (GRK)-5阻害は, NF B経路の制御を介して変形性関節症における軟骨変性を抑制する
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ichiro Kurakazu, Yukio Akasaki, Mitsumasa Hayashida, Norio Goto, Takuya Sueishi, Masakazu Toya, Masanari Kuwahara, Yasuharu Nakashima
2. 発表標題 FoxO1 transcription factor regulates chondrogenic differentiation via TGF 1 signaling
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 倉員市郎, 赤崎幸穂, 林田光正, 後藤徳雄, 居石卓也, 遠矢政和, 桑原正成, 中島康晴
2. 発表標題 FoxO1転写因子はTGF 1シグナルによる軟骨分化を制御する
3. 学会等名 第32回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 居石卓也, 赤崎幸穂, 後藤徳雄, 倉員市郎, 遠矢政和, 林田光正, 中島康晴
2. 発表標題 G protein-coupled receptor kinase (GRK)-5阻害は、NF B経路を介した炎症反応を抑えることにより変形性関節症の軟骨変性を抑制する
3. 学会等名 第31回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 変形性関節症の予防又は治療剤、及び医薬組成物	発明者 中島康晴、赤崎幸穂、居石卓也、遠矢正和、倉員市郎、桑	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-015993	出願年 2019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