

令和 2 年 5 月 13 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11003

研究課題名(和文) テネイシンCのドメイン(TN11A2)を用いた軟骨治療への応用

研究課題名(英文) Applied treatment for cartilage using tenascin C domain (TN11A2)

研究代表者

長谷川 正裕 (HASEGAWA, Masahiro)

三重大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40308664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：テネイシンC(TNC)のドメインであるTN11A2の軟骨変性抑制作用を調べるために、マウスの靭帯切離による外傷性変形性関節症モデルを作製し、TN11A2を投与すると軟骨変性抑制効果を8週まで認め、関節炎の誘発も認めなかった。培養軟骨細胞にTN11A2を添加して遺伝子発現の差異をreal-time PCRで解析すると、炎症性サイトカインであるTNF、軟骨細胞のanabolic factorであるbFGF、catabolic factorであるMMP3の遺伝子発現量がコントロール群と比較し有意に多かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟骨治療は非常に困難であり、軟骨損傷、変性は変形性関節症を誘発する。変形性関節症の予防・治療に利用する新しい候補分子として、軟骨修復能、軟骨変性抑制効果を有するマトリセルラープロテインであるテネイシンC(TNC)に着目してきた。しかし、TNCは炎症を誘発する可能性があり、特定のドメインであるTN11A2を用いた実験を行ってきた。軟骨変性抑制効果のある薬物は臨床応用されていないが、TN11A2がその候補となりえることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：TN11A2 is a peptide of tenascin-C. We evaluated whether TN11A2 could prevent articular cartilage degeneration without inducing synovitis in vivo study. TN11A2 was injected into the knee joint of mice to evaluate the induction of synovitis. Synovitis was not enhanced with TN11A2 administration. TN11A2 was injected into the knee joint of post-traumatic osteoarthritis mice model. Histologic examinations were made. Development of osteoarthritis was suppressed.

An in vitro study was also performed using cultured human chondrocytes. The expressions of various mRNAs were compared with TN11A2 treatment using real-time polymerase chain reaction. TN11A2 upregulated the expressions of tumor necrosis factor- $\alpha$ , matrix metalloproteinase 3, and basic fibroblast growth factor. In conclusion, we demonstrated that TN11A2 could prevent cartilage degeneration without synovitis.

研究分野：整形外科

キーワード：関節軟骨 軟骨変性 テネイシンC

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)の予防・治療に利用する新しい候補分子として、軟骨修復能、軟骨変性抑制効果を有するマトリセルラープロテインであるテネイシン C (TNC) に着目している。培養軟骨細胞を用いた研究や、家兎および TNC-ノックアウト (KO) マウスの検討から TNC が軟骨修復を促進していることを明らかとした。さらに TNC は軟骨変性抑制効果も認めている。しかし、TNC の特定のドメイン投与で関節炎を惹起するという報告もある。TNC は複数のドメインにて構成されており、それぞれが複数の作用を有することが報告されている。

#### 2. 研究の目的

TNC のドメインの中でも、軟骨細胞増殖に関与する  $\alpha 1$  インテグリンを活性化するペプチドである TNIIIA2 がある。TNC による軟骨修復および変性抑制作用は TNIIIA2 を含む部位が担っている可能性を考えた。TNIIIA2 が軟骨に対して作用しているか検討し、またその分子メカニズムを明らかにする。

#### 3. 研究の方法

1) マウス関節内に TNIIIA2 の投与を行い、滑膜炎の発生および変化をコントロール群と比較し評価した。組織学的評価は HE 染色を行い、Synovitis score を用いて評価した。

2) 前十字靭帯および内側側副靭帯の切離した外傷性変形性膝関節症モデルマウスを作成し、TNIIIA2 を関節内に投与を行った。投与後 2 週間から 12 週間までの軟骨変性をコントロール群と比較し評価した。組織学的評価は HE 染色、サフラニン O 染色を行い、Mankin score を用いて評価した。

3) 変形性膝関節症患者の関節軟骨から単離した軟骨細胞を用いた。TNIIIA2 を添加し細胞増殖アッセイを用いてコントロール群と比較し評価した。

4) 変形性膝関節症患者の関節軟骨から単離・単層培養した軟骨細胞を用いた。軟骨細胞に TNIIIA2 を添加した。real-time PCR 法を用いて炎症性サイトカイン、軟骨細胞における anabolic factor、catabolic factor の遺伝子発現量を測定し、非添加群と比較した。

5) 変形性膝関節症によるヒト変性関節軟骨組織および正常軟骨組織を抗 TNC 抗体および抗 TNIIIA2 抗体を用いて染色を行った。

#### 4. 研究成果

1) マウス膝関節内に TNIIIA2 の投与を行ったところ、投与後 2 週においては軽度滑膜炎の発生を認めた。しかし投与後 4 週では滑膜炎は改善していた。コントロール群でも同様の変化を認めた。Synovitis score でも両群に有意差は認められなかった。TNIIIA2 関節内投与においては有意な関節炎の誘発は認められないことが分かった。

2) 変形性膝関節症モデルマウスに対して TNIIIA2 の関節内投与を行い、コントロール群と比較を行ったところ、投与後 4 週・8 週において TNIIIA2 投与群で軟骨変性の進行が抑制された。Mankin score でも TNIIIA2 投与群において投与後 4 週・8 週においてスコアが低値であり、有意に変性が抑制されたと考えられた。投与後 12 週においては両群に差は認められなくなった。変形性膝関節症モデルマウスに TNIIIA2 の膝関節内投与を行うことで 8 週間までの軟骨変性が抑制されることが分かった。

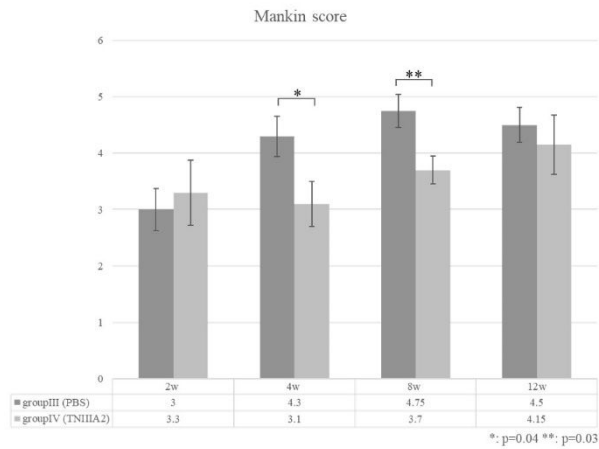


図 1.Mankin score

投与後 4 週・8 週において有意に TN111A2 投与群にて低値であった

3) 軟骨細胞に対して TN111A2 の添加を行ったところコントロール群と比較して、投与後 6 日目において有意に細胞増殖が促進された。軟骨細胞に対して TN111A2 の添加を行うことで軟骨細胞の増殖を促進することが分かった。

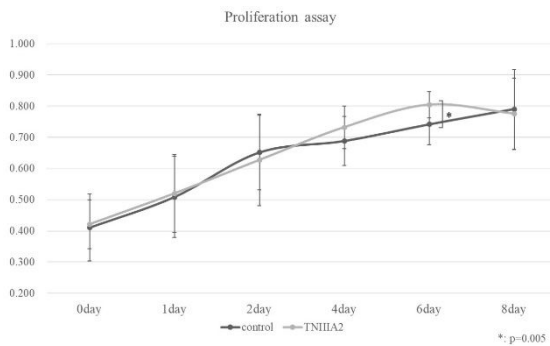


図 2.細胞増殖アッセイ

コントロール群と比較し 6 日目にて TN111A2 投与群では有意に細胞数の増加を認めた

4) 軟骨細胞への TN111A2 投与を行った後に real-time PCR を行ったところ炎症性サイトカインである TNF、軟骨細胞の anabolic factor である bFGF、catabolic factor である MMP3 の遺伝子発現量がコントロール群と比較し有意に多かった。TN111A2 は軟骨細胞に投与すると、炎症性サイトカイン、anabolic factor、catabolic factor の発現を促すことが分かった。

5) ヒト変性関節軟骨においては抗 TNC 抗体および抗 TN111A2 抗体による染色を行うと、軟骨変性を認める軟骨表面に染色性を認めた。TN111A2 を含む部位は TNC では常時発現している部位ではないため、変性の条件下では TNC および TN111A2 を含む部位は同様の発現をしている可能性があると考えられた。

以上の結果から、本研究において TN111A2 は TNC と同様に軟骨細胞増殖および変性抑制作用を持つ可能性が示唆された。TNC と同様の部位にて発現を認めることから、TNC の軟骨細胞増殖や変性抑制効果は TN111A2 を含む部位が担っている可能性が考えられる。いまだ明らかになっていない TNC の作用機序の解明に役立つとともに、現在は実現できていない軟骨修復促進および軟骨変性抑制作用を発現させる研究につながるものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Hattori T, Hasegawa M, Unno H, Iino T, Fukai F, Yoshida T, Sudo A                                   | 4. 巻<br>-             |
| 2. 論文標題<br>TNIIIA2, The Peptide of Tenascin-C, as a Candidate for Preventing Articular Cartilage Degeneration | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Cartilage   | 6. 最初と最後の頁<br>-       |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1177/1947603520912300.   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する          |
| 1. 著者名<br>Unno H, Hasegawa M, Suzuki Y, Iino T, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Sudo A.                         | 4. 巻<br>25            |
| 2. 論文標題<br>Tenascin-C promotes the repair of cartilage defects in mice.                                       | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>J Orthop Sci.   | 6. 最初と最後の頁<br>324-330 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.jos.2019.03.013.  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する          |
| 1. 著者名<br>Hasegawa M, Yoshida T, Sudo A.  | 4. 巻<br>28            |
| 2. 論文標題<br>Role of tenascin-C in articular cartilage.   | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>Mod Rheumatol.  | 6. 最初と最後の頁<br>215-220 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1080/14397595.2017.1349560.  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する          |
| 1. 著者名<br>Matsui Y, Hasegawa M, Iino T, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Sudo A.                                 | 4. 巻<br>9             |
| 2. 論文標題<br>Tenascin-C Prevents Articular Cartilage Degeneration in Murine Osteoarthritis Models.              | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>Cartilage.  | 6. 最初と最後の頁<br>80-88   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1177/1947603516681134.   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する          |

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yoshio Hattori, Masahiro Hasegawa, Tetsuya Hattori, Takahiro Iino, Fumio Fukai, Toshimichi Yoshida, Akihiro Sudo |
| 2. 発表標題<br>The peptide of Tenascin-C promotes chondrocyte proliferation by activating Integrin-FAK-PI3K/Akt pathway         |
| 3. 学会等名<br>Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2020 (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Tetsuya Hattori, Masahiro Hasegawa, Hironori Unno, Shine Tone, Yohei Naito, Takahiro Iino, Fumio Fukai, Toshimichi Yoshida, Akihiro Sudo |
| 2. 発表標題<br>TNIIIA2 as a candidate for preventing articular cartilage degeneration&nbsp;   |
| 3. 学会等名<br>19th European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology (EFORT) Congress (国際学会)                               |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>服部徹也、長谷川正裕、海野宏至、森川正和、細井敬、刀根慎恵、内藤陽平、須藤啓広 |
| 2. 発表標題<br>テネシシンCのペプチドであるTNIIIA2のマウス関節内投与による効果     |
| 3. 学会等名<br>第33回日本整形外科学会基礎学術集会                      |
| 4. 発表年<br>2018年                                    |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>服部徹也、長谷川正裕、海野宏至、若林弘樹、須藤啓広                         |
| 2. 発表標題<br>TNIIIA2による軟骨変性抑制効果の検討：TNIIIA2の関節内投与による軟骨変性抑制効果の検討 |
| 3. 学会等名<br>第62回日本リウマチ学会                                      |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>服部徹也、長谷川正裕、森川正和、吉田利通、今中恭子、須藤啓広 |
| 2. 発表標題<br>テネイシンCペプチドの軟骨細胞における効果          |
| 3. 学会等名<br>第5回Matricellフォーラム              |
| 4. 発表年<br>2018年                           |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Tetsuya Hattori, Masahiro Hasegawa, Hironori Unno, Takashi Hosoi, Naoya Ito, Takahiro Iino, Kyoko Imanaka-Yoshida, Toshimichi Yoshida, Akihiro Sudo |
| 2. 発表標題<br>Prevention of cartilage degeneration using the peptide of tenascin-C&nbsp;  |
| 3. 学会等名<br>18th European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology (EFORT) Congress (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2017年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Naoya Ito, Masahiro Hasegawa, Tetsuya Hattori, Takashi Hosoi, Hironori Unno, Yoshiaki Suzuki, Yoshihiro Miura, Yuriyo Matsui, Keiichi Miyamoto, Akihiro Sudo |
| 2. 発表標題<br>Elastin is useful for ligament-bone junction healing in rabbits.   |
| 3. 学会等名<br>18th European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology (EFORT) Congress (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2017年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Tetsuya Hattori, Masahiro Hasegawa, Hironori Unno, Masakazu Morikawa, Takashi Hosoi, Takahiro Iino, Fumio Fukai, Toshimichi Yoshida, Akihiro Sudo |
| 2. 発表標題<br>TN111A2, the peptide of tenascin-C, prevents degeneration of cartilage without synovitis in mice osteoarthritis model                             |
| 3. 学会等名<br>Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2018 (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>長谷川正裕, 服部徹也, 伊東直也, 細井 敬, 今中(吉田)恭子, 吉田利通, 須藤啓広 |
| 2. 発表標題<br>テネインCを用いた関節軟骨の修復・変性抑制                         |
| 3. 学会等名<br>第49回日本結合組織学会学術大会                              |
| 4. 発表年<br>2017年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>服部 徹也, 長谷川 正裕, 海野 宏至, 細井 敬, 伊東 直也, 刀根 慎恵, 内藤 陽平, 山口 敏郎, 若林 弘樹, 須藤 啓広 |
| 2. 発表標題<br>TN111A2による軟骨変性抑制効果の検討  |
| 3. 学会等名<br>第32回日本整形外科学会基礎学術集会   |
| 4. 発表年<br>2017年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>服部徹也、長谷川正裕、海野宏至、細井敬、伊東直也、今中（吉田）恭子、吉田利通、深井文雄、須藤啓広 |
| 2. 発表標題<br>TN111A 2 による軟骨変性抑制効果の検討                          |
| 3. 学会等名<br>第49回日本結合組織学会                                     |
| 4. 発表年<br>2017年   |

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>服部徹也、長谷川正裕、海野宏至、若林弘樹、須藤啓広 |
| 2. 発表標題<br>TN111A 2 による軟骨変性抑制効果の検討   |
| 3. 学会等名<br>第61回日本リウマチ学会              |
| 4. 発表年<br>2017年                      |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>服部徹也、長谷川正裕、海野宏至、刀根慎恵、内藤陽平、山口敏郎、須藤啓広 |
| 2. 発表標題<br>TNIIIA 2 による軟骨変性抑制効果の検討             |
| 3. 学会等名<br>第9回関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 (JOSKAS)        |
| 4. 発表年<br>2017年                                |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                           | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                     | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 須藤 啓広<br><br>(SUDO Akihiro)<br><br>(60196904)       | 三重大学・医学系研究科・教授<br><br><br>(14101)         |    |
| 研究分担者 | 吉田 利通<br><br>(YOSHIDA Toshimichi)<br><br>(80166959) | 三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト<br><br><br>(14101) |    |