

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11013

研究課題名(和文)変形性関節症に対する小胞体ストレス応答を標的とした新規治療の開発

研究課題名(英文)Development of a novel therapy targeting the unfolded protein response in osteoarthritis

研究代表者

水田 博志(MIZUTA, Hiroshi)

熊本大学・病院・非常勤診療医師

研究者番号：60174025

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)：本研究では、小胞体ストレスを抑制することが報告されているSalubrial、Quercetinおよび4-PBAの効果をマウス変形性膝関節症モデルを用いて検証した。それぞれの薬剤は週2回で3週間、膝関節内に投与した。軟骨変性の進行抑制効果はいずれの薬剤でも実証されず、培養細胞で示されている軟骨細胞の同化作用の促進および小胞体ストレス応答の抑制も確認されなかった。週2回の投与頻度では軟骨細胞の代謝変調に対する十分な改善効果が得られなかった可能性が考えられる。今後、薬剤の連日関節内投与による軟骨変性の進行抑制効果を検証することが必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性関節症(OA)は高齢者の生活の質を低下させ健康寿命の延伸を阻害する代表的な運動器疾患であり、OAの軟骨変性の進行を抑制する原因療法の開発が急務である。OAの病態では小胞体ストレスの関与が注目されており、小胞体ストレスを抑制する薬剤によりOAの軟骨変性の進行を抑制する可能性が示唆されている。本研究ではマウスOAモデルにおける週2回の関節内投与による治療効果は実証できなかったが、薬剤の投与方法が結果に影響した可能性が考えられ、薬剤の連日関節内投与など投与方法を変えた今後の研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：Salubrial, quercetin, and 4-phenylbutyric acid has been reported to suppress endoplasmic reticulum stress in cultured cells. We examined their effects in a mouse model of osteoarthritis of the knee. Each drug was injected into an intra-articular space twice a week for 3 weeks. None of the drugs suppressed the progression of cartilage degeneration; moreover, neither the promotion of anabolic action in chondrocytes nor the suppression of unfolded protein response was observed. We speculate that twice-weekly administration may not have been sufficient to improve the modulation of chondrocyte metabolic activity. Further studies are needed to verify the effect of daily intra-articular administration of the abovementioned drugs on the inhibition of cartilage degeneration.

研究分野：整形外科

キーワード：変形性関節症 軟骨変性 小胞体ストレス 小胞体ストレス応答 Salubrial Quercetin 4-PBA

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)は高齢者の生活の質を低下させ健康寿命の延伸を阻害する代表的な運動器疾患である。急速に高齢化が進むわが国ではOAの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いる。OAは軟骨基質が破壊されることで進行するが、その過程では軟骨細胞の代謝変化が大きな役割を果たしている。OA軟骨細胞では型コラーゲンやAggrecanなどの軟骨基質産生の低下、matrix metalloproteinase 13(MMP13)などの軟骨基質破壊酵素や炎症性サイトカインの産生亢進など様々なcatabolicな代謝変調をきたし、最終的にはアポトーシスを起こし細胞死にいたることが知られている。

近年、糖尿病、動脈硬化や家族性パーキンソン病など種々の疾患で細胞の代謝変調やアポトーシスを惹起するメカニズムとして小胞体ストレスが注目されている。小胞体ストレスが惹起された細胞では自身の恒常性を維持するために、1)小胞体内の異常蛋白を正常な構造に戻す分子シャペロン遺伝子の活性化、2)新たな蛋白合成を抑える翻訳抑制、3)ユビキチン・プロテアソーム系による変性蛋白の分解除去(ER associated protein degradation: ERAD)の小胞体ストレス応答(unfolded protein response: UPR)を誘導する。UPRは小胞体膜上のPERK、IRE1、ATF6などのセンサー蛋白が小胞体ストレスを感知することで開始されるが、UPRの限界を超えて異常蛋白が蓄積すると、細胞はC/EBP homologous protein(CHOP)の誘導やc-Jun N-terminal kinaseの活性化を介してアポトーシスを起こし死滅する。

一方、OAにおいても、変性軟骨での小胞体シャペロンGRP78の増加などが報告され、小胞体ストレスの病態への関与が示唆されている。われわれは、先行研究において、ヒトOA軟骨組織で軟骨変性の進行と相関してp-PERK、GRP78、CHOPの発現が増加することを示し、Tunicamycinで培養軟骨細胞に小胞体ストレスを誘発すると軟骨細胞のAggrecan mRNA発現が抑制され、アポトーシスの頻度が相関して増加することなどを明らかにした¹⁾。また加齢とともに軟骨組織に蓄積されOA発症の1要因と考えられているAGEsに関して、軟骨細胞における分子シャペロンGRP78のAGEs化が小胞体ストレスを惹起することを報告した²⁾。さらにChopをノックアウトした軟骨細胞にTunicamycinで小胞体ストレスを誘発するとアポトーシスの発現は有意に抑制され、ChopノックアウトマウスにOAモデルを作成すると関節軟骨の変性・破壊が抑制されることを示し、Chopを介した小胞体ストレス性アポトーシスがOAの軟骨変性の進行に大きく寄与していることを明らかにした³⁾。

このように様々な疾患の病態に小胞体ストレスが関与していることが明らかになっていくのに伴い、小胞体ストレス応答を標的とした治療法開発の試みが進められている。SalubrinalはeIF2

の脱リン酸化反応を阻害しUPRを持続させ、小胞体ストレスを軽減することが報告されている⁴⁾。また、フラボノイドであるQuercetinは腸上皮細胞におけるカルシウム動態調節不全に起因する小胞体ストレスに対し、保護的作用を有することが報告されている⁵⁾。さらに、ケミカルシャペロンである4-フェニル酪酸(4-PBA)は神経細胞において小胞体ストレス性アポトーシスを抑制することが報告されており⁶⁾、神経変性疾患を対象とした投薬効果の検討がなされている。一方で、これらの薬剤がOAにおける軟骨変性の進行に及ぼす作用については明らかではない。われわれは、先行研究で、培養軟骨細胞に小胞体ストレス誘導剤Tunicamycinとともに4-PBAを投与すると、小胞体ストレスの抑制と同時に軟骨細胞の同化機能低下とアポトーシスが抑制されたことを明らかにした⁷⁾。このことは、上記の先行研究の結果とも併せ、薬剤による小胞体ストレスの抑制がOAの軟骨変性の進行を抑制する可能性を示唆しており、OAの新たな治療薬剤の開発に繋がる可能性を有していると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、小胞体ストレスを抑制することが報告されているSalubrinal、Quercetinおよび4-PBAの関節内投与による軟骨変性の進行抑制効果についてマウスOAモデルを用いて解析することにより、OAに対する小胞体ストレス応答を標的とした新規治療法の有用性を検討することである。

3. 研究の方法

(1)軟骨基質産生に及ぼすSalubrinalおよびQuercetinの影響に関する培養細胞での解析

ATDC5細胞培養系にInsulin 20 μ g/mlとSalubrinal 0.1 μ M、1 μ M、あるいは2 μ Mを同時に投与し、2週後にプレート上で固定してAlcian Blue染色を行い、proteoglycanの産生を評価した。

マウス単離軟骨細胞系に、小胞体に異常蛋白を蓄積させるPERK inhibitor(GSK2606414) 2 μ MとQuercetin 20 μ Mあるいは100 μ Mを添加し、24時間後に培地交換を行い、さらに4時間後の培地中に分泌された型コラーゲンをELISAで解析した。

(2)マウスOAモデルにおけるSalubrinal、Quercetinおよび4-PBAの影響の解析

マウスOAモデルの作製

雄の8週令C57BL/6Jマウスを用いて、右膝関節の前十字靭帯切離によるOAモデルを作製した。

薬剤の関節内投与と試料採取

OAモデル作製1週後より、Salubrinal(5mM、50 μ l)、Quercetin(5mM、50 μ l)あるいは4-PBA(5mM、50 μ l)をそれぞれ週2回で3週間、関節内に投与した。それぞれに対照群としてPBS(50 μ l)

を同様な方法で関節内に投与した。OA モデル作製 8 週後および 12 週後に屠殺し、膝関節骨軟骨組織を採取した。採取組織を 4%PFA で 12 時間固定し、一晚脱脂後、10%EDTA で 3 日間脱灰し、パラフィン包埋後に組織切片を作製し、以下の解析に供した。

解析

パラフィン標本の HE 染色と Safranin-O 染色により、軟骨変性を組織学的に評価し、modified Mankin score で軟骨変性度を解析した。またパラフィン標本を用い免疫染色法で 型コラーゲン、Aggrecan、MMP13、および ADAMTS5 の発現を評価し、 型コラーゲン、Aggrecan は H-score で、MMP13 と ADAMTS5 は陽性細胞率でそれぞれ解析した。さらに p-eIF2、CHOP、XBP1s および GRP78 の免疫染色を行い、それぞれの発現を陽性細胞率で解析し、小胞体ストレス応答を評価した。また TUNEL 染色を行い、それぞれの陽性細胞率で軟骨細胞のアポトーシスを解析した。

4. 研究成果

(1) 軟骨基質産生に及ぼす Salubrinal および Quercetin の影響に関する培養系での解析
Salubrinal は濃度依存的に Alcian Blue 染色の染色性を増加させ、proteoglycan の産生を亢進することが明らかとなった (図 1)。また Quercetin 100 μ M の投与で培地中の 型コラーゲンの発現は 1.7 倍に増加し (図 2) Salubrinal と同様に軟骨同化作用を促進することが示された。

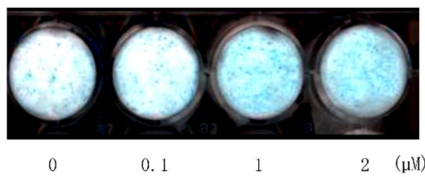


図 1 Salubrinal 添加と染色性

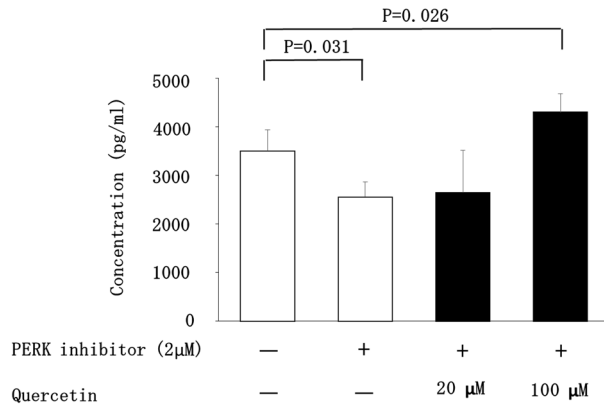


図 2 Quercetin 添加と 型コラーゲンの発現

(2) マウス OA モデルにおける Salubrinal の影響の解析
Salubrinal 群と対照群の軟骨変性度には 8 週、12 週ともに有意差を認めなかった (図 3)。また軟骨細胞機能についても、 型コラーゲン、Aggrecan、MMP13、ADAMTS5 のいずれも両群間に差はみられなかった。さらに小胞体ストレス応答 (p-eIF2、CHOP、XBP1s および GRP78) ならびにアポトーシスの発生についても両群間で有意差を認めなかった (表 1)。

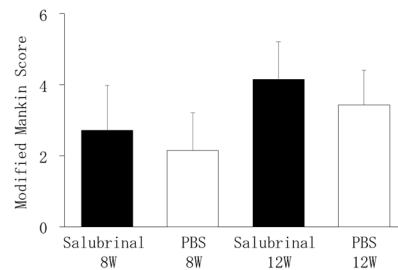


図 3 Salubrinal と軟骨変性度

表 1 Salubrinal 群と対照群の比較

		8週		12週	
		Salubrinal	PBS	Salubrinal	PBS
軟骨細胞機能	型コラーゲン	170.7 \pm 20.3	201.1 \pm 42.9	156.4 \pm 28.8	183.3 \pm 40.9
	Aggrecan	56.0 \pm 36.9	52.4 \pm 37.3	39.9 \pm 11.1	48.9 \pm 40.0
	MMP13	56.2 \pm 9.7	67.5 \pm 10.7	54 \pm 5.8	54.5 \pm 9.8
	ADAMTS5	41.4 \pm 6.3	38.7 \pm 8.9	29.4 \pm 6.7	33.2 \pm 12.3
小胞体ストレス応答	p-eIF2	28.8 \pm 13.0	23.2 \pm 21.0	4.5 \pm 4.4	2.8 \pm 2.9
	CHOP	54.1 \pm 21.1	58.2 \pm 15.2	51.6 \pm 19.6	32.5 \pm 19.4
	XBP1s	18.5 \pm 12.7	16.1 \pm 17.7	17.8 \pm 11.9	15.4 \pm 14.7
	GRP78	78.3 \pm 14.6	72.6 \pm 30.8	71.1 \pm 17.7	76.4 \pm 13.6
アポトーシス		11.2 \pm 7.1	17 \pm 7.8	11.2 \pm 5.7	12 \pm 11.7

(3) マウス OA モデルにおける Quercetin の影響の解析
軟骨変性度は、8 週、12 週ともに Quercetin 群と対照群の間に有意な差を認めず、Quercetin による軟骨変性の進行抑制効果は確認できなかった (図 4)。軟骨細胞機能は、同化系の 型コラーゲンおよび Aggrecan、異化系の MMP13 および ADAMTS5 とともに両群間に差を認めなかった。小胞体ストレス応答 (p-eIF2、CHOP、XBP1s および GRP78)、またアポトーシスの発生についても Quercetin 群と対照群の間に有意な差はみられなかった (表 2)。

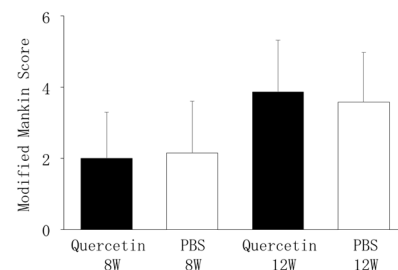


図 4 Quercetin と軟骨変性度

表 2 Quercetin と対照群の比較

		8週		12週	
		Quercetin	PBS	Quercetin	PBS
軟骨細胞機能	型コラーゲン	150.8 ± 66.5	163.4 ± 87.6	140.1 ± 70.1	143.7 ± 75.0
	Aggrecan	45.3 ± 42.3	29.3 ± 37.7	40.0 ± 26.6	36.4 ± 28.5
	MMP13	47.6 ± 15.4	54.6 ± 7.0	42.3 ± 8.7	49.3 ± 9.3
	ADAMTS5	22.0 ± 8.0	23.8 ± 6.3	34.4 ± 12.7	35.6 ± 8.2
小胞体ストレス応答	p-eIF2	26.3 ± 11.6	24.1 ± 7.4	28.7 ± 2.3	27.4 ± 5.6
	CHOP	54.0 ± 8.3	50.0 ± 8.1	62.5 ± 12.7	52.0 ± 8.6
	XBP1s	45.8 ± 8.4	40.7 ± 6.5	47.0 ± 10.4	46.3 ± 7.9
	GRP78	46.6 ± 8.6	53.7 ± 9.3	52.8 ± 15.5	50.6 ± 8.2
アポトーシス		14.5 ± 11.6	12.1 ± 7.4	12.8 ± 2.3	13.2 ± 5.6

(4) マウス OA モデルにおける 4-PBA の影響の解析
 軟骨変性度については、8 週、12 週ともに対照群と差を認めず、4-PBA による軟骨変性の抑制は示されなかった (図 5)。軟骨細胞機能についても、型コラーゲン、Aggrecan、MMP13、ADAMTS5 のいずれも対照群と有意差を認めなかった。小胞体ストレス応答については、p-eIF2、CHOP、XBP1s および GRP78 とともに 4-PBA 投与で改善傾向がみられたものの、有意差は認めなかった。アポトーシスの発生についても、4-PBA 群と対照群で差を認めなかった (表 3)。

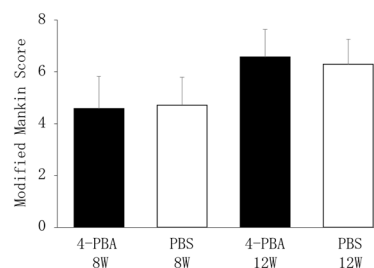


図 5 4-PBA と軟骨変性度

表 3 4-PBA と対照群の比較

		8週		12週	
		4-PBA	PBS	4-PBA	PBS
軟骨細胞機能	型コラーゲン	88.3 ± 47.0	92.0 ± 34.5	94.7 ± 37.0	75.9 ± 64.1
	Aggrecan	34.6 ± 35.4	25.7 ± 23.0	16.7 ± 6.3	34.7 ± 28.8
	MMP13	37.8 ± 8.3	43.7 ± 7.4	37.3 ± 12.0	35.9 ± 10.9
	ADAMTS5	36.6 ± 7.8	33.8 ± 5.0	37.0 ± 12.5	37.5 ± 5.8
小胞体ストレス応答	p-eIF2	40.2 ± 9.1	40.0 ± 7.2	36.3 ± 9.2	43.2 ± 10.7
	CHOP	42.8 ± 12.0	46.0 ± 8.8	43.0 ± 7.8	49.6 ± 7.2
	XBP1s	37.2 ± 11.0	49.1 ± 7.0	40.0 ± 11.3	45.5 ± 9.3
	GRP78	44.1 ± 13.6	58.6 ± 11.4	40.7 ± 15.9	51.7 ± 8.4
アポトーシス		20.7 ± 14.1	18.3 ± 7.7	25.3 ± 10.3	20.4 ± 9.2

以上の結果をまとめると、本研究では小胞体ストレスを抑制することが報告されている Salubrinal、Quercetin および 4-PBA の関節内投与によるマウス OA モデルでの軟骨変性の進行抑制効果は実証されなかった。また培養細胞を用いた先行研究ならびに本研究で示された軟骨細胞の同化作用の促進もみられなかった。さらに、これらの薬剤による小胞体ストレスの抑制効果から予測される小胞体ストレス応答の抑制についても、4-PBA でその傾向がみられたものの、有意な抑制はいずれの薬剤でも確認されなかった。このことは、本研究でマウス OA モデルに投与された薬剤が本来の薬理作用を發揮しなかった可能性を示唆している。近年、Liu DD ら⁸⁾はラット OA モデルに対して腹腔内に 4-PBA を 14 日間連続投与し、軟骨変性の進行が抑制されることを示している。本研究では、臨床応用を念頭において比較的高濃度で週 2 回の薬剤投与を行った。しかし、小胞体ストレス応答は細胞の機能維持のために可逆性にかつ迅速に生じることが知られており、週 2 回の投与頻度では軟骨細胞の代謝変調に対する十分な改善効果が得られなかった可能性が考えられる。今後、薬剤の連日関節内投与による軟骨変性の進行抑制効果を検証するとともに、臨床応用可能な薬剤の持続投与法の開発について研究を進めることが必要と考える。

<引用文献>

Takada K, Hirose J, Senba K, Yamabe S, Oike Y, Gotoh T and Mizuta H. Enhanced apoptotic and reduced protective response in chondrocytes following endoplasmic reticulum stress in osteoarthritic cartilage. *Int J Exp Pathol.* 92:232-242, 2011.

Yamabe S, Hirose J, Uehara Y, Okada T, Okamoto N, Oka K, Taniwaki T and Mizuta H. Intracellular accumulation of advanced glycation end products induces apoptosis via endoplasmic reticulum stress in chondrocytes. *FEBS J.* 280:1617-1629, 2013.

Uehara Y, Hirose J, Yamabe S, Okamoto N, Okada T, Oyadomari S and Mizuta H. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis contributes to articular cartilage degeneration via C/EBP homologous protein. *Osteoarthr Cartil.* 22:1007-1017, 2014.

Boyce M, Bryant KF, Jousse C, Long K, Harding HP, Scheuner D, Kaufman RJ, Ma D, Coen

DM, Ron D and Yuan J. A selective inhibitor of eIF2 dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science*. 307:935-939, 2005.

Natsume Y, Ito S, Satsu H and Shimizu M. Protective effect of quercetin on ER stress caused by calcium dynamics dysregulation in intestinal epithelial cells. *Toxicology*. 258:164-175, 2009

Wiley JC, Meabon JS, Frankowski H, Smith EA, Schecterson LC, Bothwell M and Ladiges WC. Phenylbutyric acid rescues endoplasmic reticulum stress-induced suppression of APP proteolysis and prevents apoptosis in neuronal cells. *PLoS ONE*. 5:e9135. doi:10.1371/journal.pone.0009135. 2010.

廣瀬隼, 上原悠輔, 水田博志. 機械的ストレスによって生じる軟骨細胞の酸化ストレス、カルボニルストレス、小胞体ストレスとそれぞれの抑制効果. 90:S1488, 2016

Liu DD, Zhang BL, Yang JB and Zhou K. Celastrol ameliorates endoplasmic stress-mediated apoptosis of osteoarthritis via regulating ATF-6/CHOP signalling pathway. *J Pharm Pharmacol*. 72:826-835, 2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久永哲、山部聡一郎、上原悠輔、親泊政一、水田博志
2. 発表標題 小胞体ストレスセンサーPERKによる軟骨基質分泌の制御機構およびOA治療への応用の検討
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 久永哲、唐杉樹、岡元信和、親泊政一、水田博志
2. 発表標題 小胞体ストレスセンサーPERKによる軟骨基質分泌の制御機構およびOA治療への応用の検討
3. 学会等名 第33回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久永哲、伊藤仁、舛田哲朗、岡元信和、水田博志、親泊政一、宮本健史
2. 発表標題 軟骨細胞への小胞体ストレスがコラーゲン輸送に及ぼす影響およびOA治療への応用の検討
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020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
研究分担者	廣瀬 隼 (HIROSE Jun) (40433007)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授 (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	唐杉 樹 (KARASUGI Tatsuki) (80706482)	熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・講師 (17401)	
研究 分担者	岡元 信和 (OKAMOTO Nobukazu) (70600162)	熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・助教 (17401)	
研究 協力者	久永 哲 (HISANAGA Satoshi)		
連携 研究者	親泊 政一 (OYADOMARI Seiichi) (90502534)	徳島大学・先端酵素学研究所・教授 (16101)	