

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16675

研究課題名(和文) 過剰な力学的負荷で誘導される軟骨変性促進分子GREM1を標的とした新規治療法開発

研究課題名(英文) Investigation of new osteoarthritis treatment targeting GREM1 induced by excessive mechanical stress loading.

研究代表者

張 成虎 (Chang, Song Ho)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80780551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：超高齢化社会において要支援の状態を引き起こす変形性関節症(OA)に対する治療法の開発は喫緊の課題である。OAの原因は過剰なメカニカル力学的負荷であることは以前より知られていたがそのメカニズムは解明されていなかった。今回我々は力学的ストレス応答因子Rac1を介してNFκBシグナルが活性化されることによって分泌蛋白GREM1が分泌され、GREM1はVEGFR2-NFκBシグナルを介して関節軟骨を進行させることを発見した。本研究ではGREM1を標的とした新規治療法の実用化に向けた阻害剤、低分子化合物、抗体の開発の足がかりとなるデータを得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過剰な力学的ストレスによって誘導される関節破壊因子GREM1をターゲットとした新規治療法の開発がもたらす国民の健康寿命の向上や医療経済への貢献は計り知れない。現在まで解明されていなかった過剰な力学的ストレスがOAを発症する機序の中で主要な役割を果たす因子が分泌蛋白であったという発見は学術的に興味深い知見であり、治療ターゲットが分泌蛋白という特性からレセプターの阻害因子、低分子化合物、中和抗体など様々な治療法の開発へと発展する可能性がある。本研究を足がかりとして有効な治療法が開発されれば、現在の侵襲的な手術療法やエビデンスが不十分な保存療法にとて変わる世界に先駆けた治療法となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Japan is facing super-aged society, which no one have ever experienced. Osteoarthritis (OA) is a major problem which render large number of aged population disable, and deprive them of healthy normal life. Excessive mechanical stress is well known factor to induce OA. However, the pathomechanism of cartilage degradation under excessive mechanical loading remains unknown.

We found secretory protein GREM1 induced by excessive mechanical stress loading play a pivotal role to induce cartilage degradation via GREM1-VEGFR2-NFκB signaling pathway. Furthermore, we identified Rac1-NFκB signal to induce GREM1 under excessive mechanical stress loading in the joint cartilage. In the present study, we could look into the candidates of inhibitors, low-molecular compounds and neutralizing antibodies as new treatment of OA targeting GREM1.

研究分野：軟骨代謝、変形性関節症

キーワード：変形性関節症 力学的ストレス 軟骨代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本政府は2025年には人口の1/4が75歳以上という人類史上遭遇したことの無い超高齢化社会に突入すると報告しており、近年日本の高齢化社会は凄まじい速度で進行している。厚生労働省の国民生活基礎調査において高齢者が要支援の状態になる原因の第一は関節疾患であり、ADL、QOLを低下せしめ要介護の原因となるロコモティブシンドロームの最大の原因となっている。そのような状況の中でOAに対する新規治療法の開発は日本社会の喫緊の課題となっている。この大きな課題を前に、申請者の研究室では軟骨細胞を制御するシグナル群の解明に取り組み、Sox9、Runx2などの転写因子群から cGKI1、GSK3、Aktなどのリン酸化酵素、HIF-2、NF- κ B、Notchシグナルなどによる多様な制御機構を解明するとともに、独自に開発した膝、脊椎、足関節の変形性関節症マウスモデルを用いてOAの分子病態生理の解明でも世界トップクラスの成果を挙げてきた(Nat Commun 2016 in press, Osteoarthritis and Cartilage 24:688, 2015, Proc Natl Acad Sci U S A. 10:112, 2015; Ann Rheum Dis. 73:2062, 2014, J Biol Chem. 288:28620, 2013; Proc Natl Acad Sci USA. 110:1875, 2013; Nat Med 16:678, 2010; Arthritis Rheum 62:826, 2010; J Clin Invest 118:2506, 2008; Dev Cell 14:689, 2008; EMBO Rep 8:504, 2007; Nat Med 12:665, 2006)。しかし、OAの発症機序の分子生物学的なメカニズムの多くは未だに解明されておらず、特にOAの最も大きな原因と言われている過剰な力学的負荷による軟骨変性機序に関しては多くが未解明のままである。申請者はこの壮大なテーマに挑むべく、細胞伸展負荷装置や独自に作成した3次元周期的静水圧負荷装置などを駆使してマウス初代軟骨細胞や関節軟骨器官培養に過剰な力学的負荷を与え、網羅的遺伝子発現解析から関節軟骨に対して破壊的に作用する分泌蛋白Grem1を同定した。

2. 研究の目的

本研究の目的は分泌蛋白 Grem1 (GREM1) をターゲットとした関節疾患に対する原因療法、および新規治療法の開発に挑戦することである。申請者は過剰なメカニカルストレスによって誘導される分泌蛋白 GREM1 が OA の強力な促進因子であることを突き止めた。また、申請者の研究によって GREM1 は VEGFR2-NF- κ B シグナルを介して関節軟骨を破壊することが判明した。さらに、GREM1 がメカニカルストレス応答因子 Rac1-活性酸素-NF- κ B シグナルの下流に位置していることも明らかとなった。近年 GREM1 は関節リウマチ(RA)の滑膜にも多く発現していることが最近報告され、GREM1 のシグナルは全ての関節疾患の治療標的となりうる可能性が示唆された。本研究はヒト手術検体や各種モデルマウスを用いた実験系を駆使して GREM1-VEGFR2-NF- κ B シグナルに対する中和抗体や阻害薬の効果を解析し、創薬・技術開発に応用するための基礎検討を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

申請者は既に先行研究でGREM1がVEGFR2-NF- κ Bシグナルを介して過剰な力学的負荷に伴う関節軟骨破壊に重要な役割を果たしていることを見出しているため、このメカノトランスダクションパスウェイを調節することによる治療法の開発に着手した。

(1) OA、RAの手術サンプルを用いたGREM1の発現解析

基礎検討として、ヒトOA、RA患者におけるGREM1の発現、機能解析を行う。東大整形外科で行うOA、RAの人工関節置換術で得られる関節液、関節軟骨、滑膜の検体と、半月板損傷、靭帯損傷などの手術で得られる比較的健常な軟骨、滑膜の検体について、GREM1やその関連分子の発現や活性をリアルタイムPCR、ELISA、組織免疫染色にて比較検討する。

(2) GREM1-VEGFR2-NF- κ Bシグナルを標的とした阻害剤の検討

GREM1-VEGFR2-NF- κ Bシグナルの標的がOA、RAの治療手段となりうるかを、マウス初代軟骨細胞、関節軟骨器官培養、またはヒト手術サンプルを用いて集中的に検討する。既存のGREM1中和抗体、VEGFR2アンタゴニスト・阻害剤・中和抗体、NF- κ Bシグナル阻害薬を入手しrhGREM1を正常関節軟骨に投与したあとその軟骨破壊作用が抑制されるか、またOA、RA患者の検体を用いてEx vivoで各種阻害剤の作用をGREM1関連分子のmRNAの発現や蛋白の発現そして炎症性サイトカインの動きを観察することによって検討する。

(3) OAモデルマウス、RAモデルマウスを用いた in vivoでの検討

有力な阻害剤については、半月板、靭帯の手術にて変形性関節症を誘導するマウス膝OAモデル、コラーゲン抗体誘導性関節炎モデル(RAモデル)の膝関節内、もしくは全身に投与してOA、RAに対する予防効果を検討する。評価においては組織学的評価、mRNAなどを用いた各マーカーの定量的評価を行う。理想的には関節軟骨におけるGREM1-VEGFR2-NF- κ Bシグナルを特異的に阻害する効果を持つものが望ましい。

(4) GREM1をターゲットとした新規治療法の実用化に向けた低分子化合物、抗体の探索

マウス OA モデル、RA モデルにおいて GREM1 や VEGFR2 の抗体が有望であれば、マウスモノクローナル抗体を自作して作用の強いクローンを選別する。阻害剤が有望であれば、研究協力先

である東京大学疾患生命工学センターの所有する低分子化合物ライブラリーを用いて類似作用が期待できる構造のものを選び、リード化合物作成へと繋げる。投与方法としてはミセルなどの核酸医薬の最新の知見を用いた Drug Delivery System も含め検討を行う。有効かつ細胞毒性等の副作用が少ない投与量を検討し、実用化に向けた最適化を行う。これらの影響は、多くのデータベースや文献等を通して in silico に解析を行う。

4. 研究成果

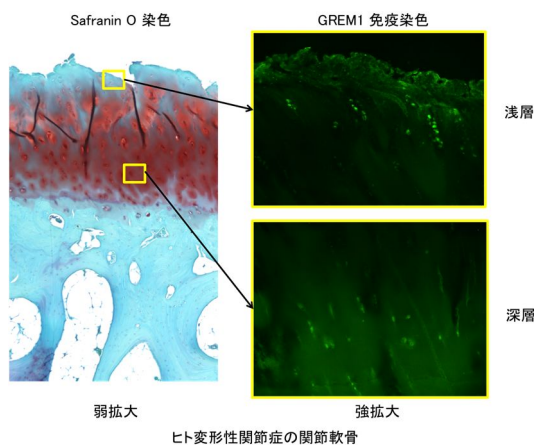
(1) ヒトOA 患者の手術サンプルが入手しやすい臨床研究室である当研究室の利点を活かして人工関節置換術で得られる比較的健常な軟骨と変性の進んだ関節軟骨を組織免疫染色で比較したところ、変性の進んで破壊された関節軟骨で GREM1 の発現が上昇していた。また、興味深いことに関節軟骨の深層と軟骨下骨に GREM1 が多く発現していた。関節軟骨深層と軟骨下骨は過剰なメカニカルストレスを多く受ける部分であることが予想され、GREM1 とメカニカルストレスの密接な関係が示唆された。(右図参照)

(2) GREM1-VEGFR2-NF- κ B シグナルのターゲティングが OA, RA の治療手段となるかを検証するためにマウス 初代軟骨細胞、関節軟骨器官培養、を用いて実験を実施した。VEGFR2 阻害薬と

recombinant human GREM1 を同時に投与したところ、recombinant human GREM1 によって誘導される炎症性サイトカインが抑制された。NF- κ B シグナルの代表的な阻害剤である ikk inhibitor を用いた実験でも同様に recombinant human GREM1 により惹起される炎症性サイトカインが強く抑制されていた。これらの結果は GREM1 による OA 発症のターゲットとして VEGFR2 阻害剤、NF- κ B シグナル阻害剤が有効であることが示唆された。

(3) OA モデルマウスに GREM1 の中和抗体を関節内注射すると OA の進行が抑制されることが確認された。現在 RA モデルマウスについても関節破壊に対する抑制効果を様々な GREM1 の阻害剤を用いて解析している。

(4) 「GREM1 をターゲットとした新規治療法の実用化に向けた低分子化合物、抗体の探索」について GREM1 や VEGFR2 の抗体が有望であると考え、マウスモノクローナル抗体を自作して作用の強いクローンを選別している。また、GREM1 の上流シグナルである過剰な力学的負荷に反応する Rac1 の応答メカニズムについて更に研究を続けている。GREM1 のカタボリックな作用を上流のシグナルで制御する阻害剤の開発も進めている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Chang SH, Mori D, Kobayashi H, Mori Y, Nakamoto H, Okada K, Taniguchi Y, Sugita S, Yano F, Chung UI, Kim-Kaneyama JR, Yanagita M, Economides A, Canalís E, Chen D, Tanaka S, Saito T	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Excessive mechanical loading promotes osteoarthritis through the gremlin-1-NF- B pathway.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1442
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-09491-5.	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 張成虎
2. 発表標題 GREMLIN1 INDUCED BY EXCESSIVE MECHANICAL STRESS LOADING ENHANCES CARTILAGE DEGRADATION.
3. 学会等名 The 7th Seoul Symposium on Bone Health, Seoul, Korea 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 張成虎
2. 発表標題 過剰なメカニカルストレスは Gremlin-1-NF-kB シグナルを介して変形性関節症を引き起こす
3. 学会等名 第33回 日本軟骨代謝学会
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
---------------------------	-----------------------	----