

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09507

研究課題名(和文) 低酸素環境での新規分子HYBIDの制御による変形性関節症治療法の開拓

研究課題名(英文) Pioneering Treatment of Osteoarthritis by Regulation of HYBID, in Hypoxia

研究代表者

井上 裕章 (Inoue, Hiroaki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師

研究者番号：60457968

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)：HAの分解において新規分子HYBIDが中心的な役割を担い、OAにおいては正常関節と比較してHYBIDの発現が亢進しておりHA分解能力と相関することが明らかにされた。我々はHYBIDの抑制効果の増強が従来のHA治療にブレイクスルーを惹き起こす新たな治療戦略となりうると考え、抑制効果を増強する因子について検討した。

我々はsiHYBID導入によるHYBID発現を抑制した軟骨細胞を用いて低酸素環境がHYBID抑制効果に与える影響について検討した。しかし低酸素環境によるHYBIDへの影響は軽微であったことから、HYBID制御因子として低酸素刺激単独での効果は十分ではなくさらなる検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性関節症(osteoarthritis; OA)に対する保存療法として高分子ヒアルロン酸(hyaluronic acid: HA)の関節内注射が広く使用されている。しかし、高分子HAは関節内で速やかに分解されるため、十分な効力を発揮するには分解を抑制する必要がある。我々はHA分解抑制を増強する因子を開拓することにより、定期的な関節注射がメインである従来のHA治療を大幅に改善することが可能であると考え、HYBIDに注目し主に低酸素環境が与える影響について検討を行った。しかし、低酸素環境がHYBID抑制を増強する効果は軽微であり、低酸素環境以外の因子も含めたさらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：HYBID plays a central role in hyaluronan degradation, and its expression is upregulated in OA compared to normal joints, which correlates with the ability to degrade hyaluronan. We hypothesized that the enhanced inhibitory effect of HYBID could be a new therapeutic strategy, and researched the factors that enhance the inhibitory effect.

We investigated the effect of hypoxia on HYBID suppression using chondrocytes in which HYBID expression was suppressed by siHYBID transfection. However, the effect of hypoxia on HYBID was not significant, suggesting that hypoxia alone is not sufficient as a regulator of HYBID and further studies are needed.

研究分野：運動器

キーワード：HYBID 低酸素 ヒアルロン酸

## 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(osteoarthritis; OA)は関節軟骨の退行性変化により関節変形と機能障害をきたす疾患である。OA に対する保存療法として高分子ヒアルロン酸 (hyaluronic acid: HA)の関節内注射が広く使用されている。しかし、高分子 HA は関節内で速やかに分解されるため、十分な効力を発揮するには分解を抑制しその分子構造を維持する必要がある。近年、関節内での高分子 HA の分解において新規分子 HYBID が中心的な役割を担い、OA においては正常関節と比較して HYBID の発現が亢進しており HA 分解能力と相関することが明らかにされた。そのため HYBID は新しい OA の治療標的候補として注目されている。一方、関節内は恒常的に低酸素環境にあり、われわれは正常関節の環境因子を再現することで高分子 HA の薬理作用が高まることを見出した。低酸素刺激は HYBID の制御因子も亢進させることから、低酸素環境の強化は高分子 HA の効果増強に加え、その分解抑制、さらに軟骨同化作用をもたらし、従来の HA 治療にブレイクスルーを惹き起こす新たな治療戦略となりうると考えた。

## 2. 研究の目的

これまで OA に対してさまざまな外因性の高分子 HA 製剤の開発が進められ一定の効果が得られてきたが、HA の分解の速さのため長期間有効に作用することは困難であった。本研究では外因性 HA の新規開発ではなく、HYBID を介して内因性と外因性両者の高分子 HA の分子構造を維持することで薬理効果を長時間持続させることを目指す。一方で関節軟骨は血管構造を持たないため、酸素濃度は他の臓器よりも著しく低い。われわれは低酸素環境が HIF-1 $\alpha$  を介した軟骨保護作用を有していることや、低酸素環境の再現により外因性高分子 HA は軟骨基質を増加させることを報告した。また、低酸素環境が遺伝子発現を介して HYBID 発現を抑制するなど、酸素環境が HYBID の発現を調整することが報告されている。しかし OA の進行によって関節内低酸素環境が破綻すると、HYBID の発現や機能に作用し、高分子 HA の分解を促進する可能性がある。そのため、本研究の目的は低酸素環境下で HYBID が外因性高分子 HA を分解するメカニズムを明らかにすること、HYBID の活性を制御し高分子 HA の作用維持による新規 OA 予防・治療法を開発することである。

## 3. 研究の方法

HA の分解機構に低酸素やメカニカルストレスが与える影響について *in vitro* で検討した。予備実験としてヒト軟骨肉腫細胞を使用し、その後 6 週齢雄性の wistar 系ラットから軟骨組織を採取し、軟骨細胞を単離した。単離した軟骨細胞を単層培養し、実験に使用した。

### (1) HA の分解機構に低酸素やメカニカルストレスが与える影響

ヒト軟骨肉腫細胞に低酸素刺激、メカニカルストレスを加え、HYBID, TMEM-2, HYAL-2 といった HA の分解に関連する遺伝子の発現を *realtime PCR* で検討した。

### (2) HA の合成分解機構に低酸素の持続時間が与える影響

ラット軟骨細胞を低酸素インキュベーターを用いて 1%低酸素環境で培養した。1, 3, 6, 24, 72 時間低酸素刺激を加えた後に細胞を回収し、HIF-1 $\alpha$ , HYBID, CD44, HYAL-1, 2, HAS-1, 2, 3 といった HA の合成分解に関連する遺伝子の発現を *realtime PCR* で評価した。

### (3) HYBID の抑制が HA の合成分解機構に与える影響

軟骨細胞に RNAiMAX を用いて siHYBID を導入する条件を検討した。軟骨細胞に siHYBID を導入し、1%低酸素環境で 6, 24 時間低酸素刺激を加えた。同様に *realtime PCR* を用いて HIF-1 $\alpha$ , HYBID, CD44, HYAL-1, 2, HAS-1, 2, 3 といった HA の合成分解に関連する遺伝子の発現を評価した。

## 4. 研究成果

(1) HYBID, TMEM-2, HYAL-2 といった分解に関与する遺伝子の発現は、低酸素、メカニカルストレスによって明らかな傾向は認めなかった(図 1)。その中でも分解に関与する遺伝子は低酸素によって亢進する傾向にあった。そのため低酸素に絞って検討することとした。

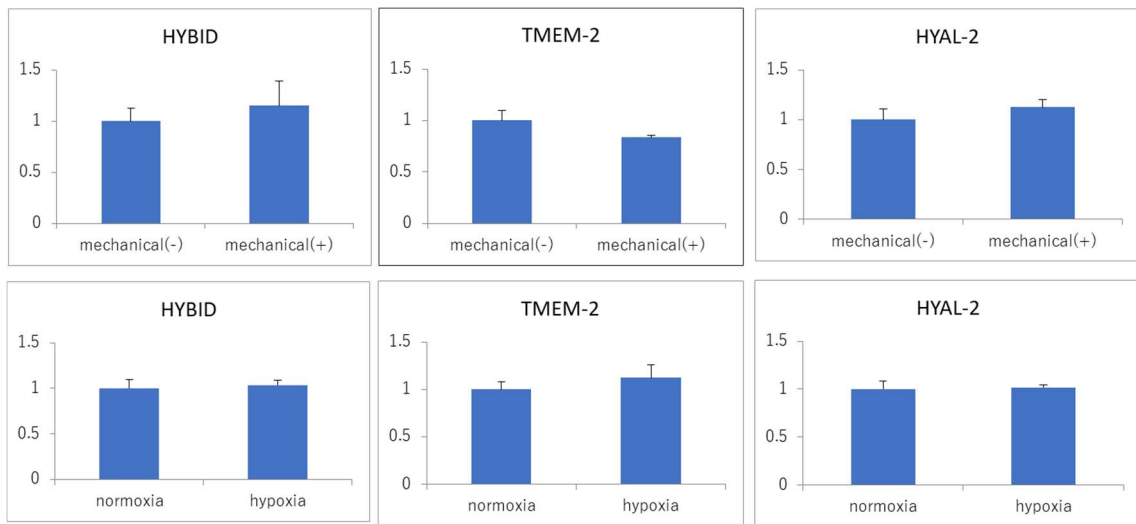


図 1. HA の分解機構に低酸素やメカニカルストレスが与える影響

(2) ラット軟骨細胞を 1%低酸素環境下で培養すると低酸素誘導因子である HIF-1 $\alpha$  は継時的に増加傾向にあり 72 時間では有意に発現が亢進していた. 分解酵素である HYAL-1 は 24 時間以降で増加しており, HIF-1 $\alpha$  と似た傾向を示していた. 分解酵素である HYBID は時間依存性に減少していた. また HA 受容体である CD44 は低酸素環境で発現が低下していた. HA 合成酵素である HAS は低酸素環境で増加する傾向にあり, HAS-1, 2 では 6h で著明に発現が増加していた(図 2). 以上から持続する低酸素環境は分解酵素である HYBID を抑制させる一方で HYAL は増加させていた. 関節内の HA 分解の中心は HYBID と報告されていることから関節内の HA 分解は抑制傾向にあると考える. また, HA 合成酵素である HAS はいずれも増加しており, 低酸素環境は関節内の HA 分解を抑制し, 合成を促進することで高分子 HA 維持に作用している可能性がある.

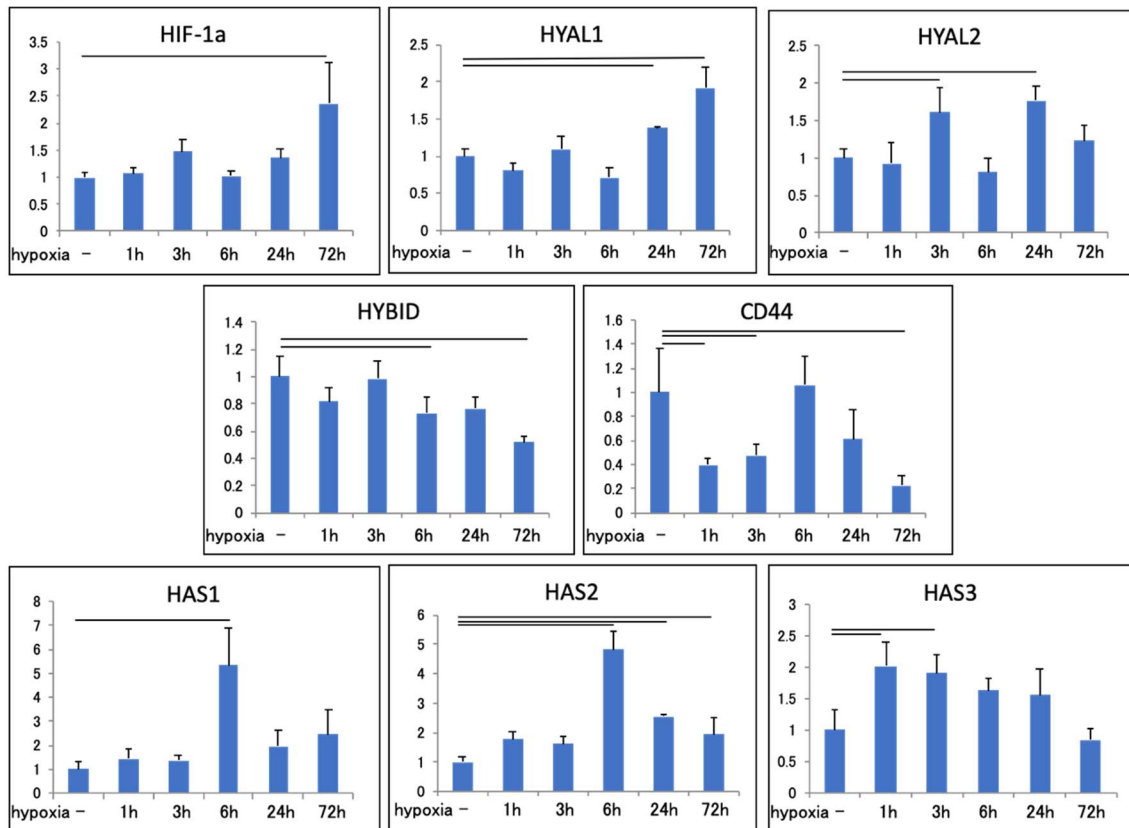


図 2. HA の合成分解機構に低酸素の持続時間が与える影響

(3) HYBID がヒアルロン酸代謝に与える影響を評価するために、低酸素環境下での HYBID 抑制実験を施行した。低酸素誘導因子 (HIF-1 $\alpha$ ), HYBID, CD44, ヒアルロン酸分解酵素 (HYAL-1, 2), ヒアルロン酸合成酵素 (HAS-1, 2, 3) を測定することで、低酸素環境が HYBID 抑制効果およびヒアルロン酸代謝に与える影響を検討した。

軟骨細胞に HYBID を標的とした siRNA (siHYBID) を導入する条件を検討し、有意な HYBID 遺伝子発現抑制を確認した。次に siHYBID を導入した軟骨細胞を 6, 24 時間 1% 低酸素環境で培養し、real-time RT-PCR 法を用いて HIF-1 $\alpha$ , HYBID, CD44, HYAL-1, 2, HAS-1, 2, 3 の遺伝子発現を解析し、HYBID がヒアルロン酸代謝に与える影響を評価した。HYBID は siHYBID で十分に抑制されていたが、低酸素環境との併用では HYBID の抑制効果が増強しなかった。HIF-1 $\alpha$ , HYAL-1, 2 は低酸素環境で発現は増加していたが、HYBID の抑制による影響は認めなかった。ヒアルロン酸合成酵素である HAS-1, 2 は HYBID の抑制で増加しており、特に HAS-1 は HYBID の抑制で著明に増加していた。

低酸素環境下で HYBID を抑制することが、ヒアルロン酸合成酵素の増加を介した高分子ヒアルロン酸維持に貢献する可能性がある。しかし低酸素環境による HYBID への影響は軽微であったことから、HYBID 制御因子として低酸素刺激単独での効果は十分ではなくさらなる検討が必要である。

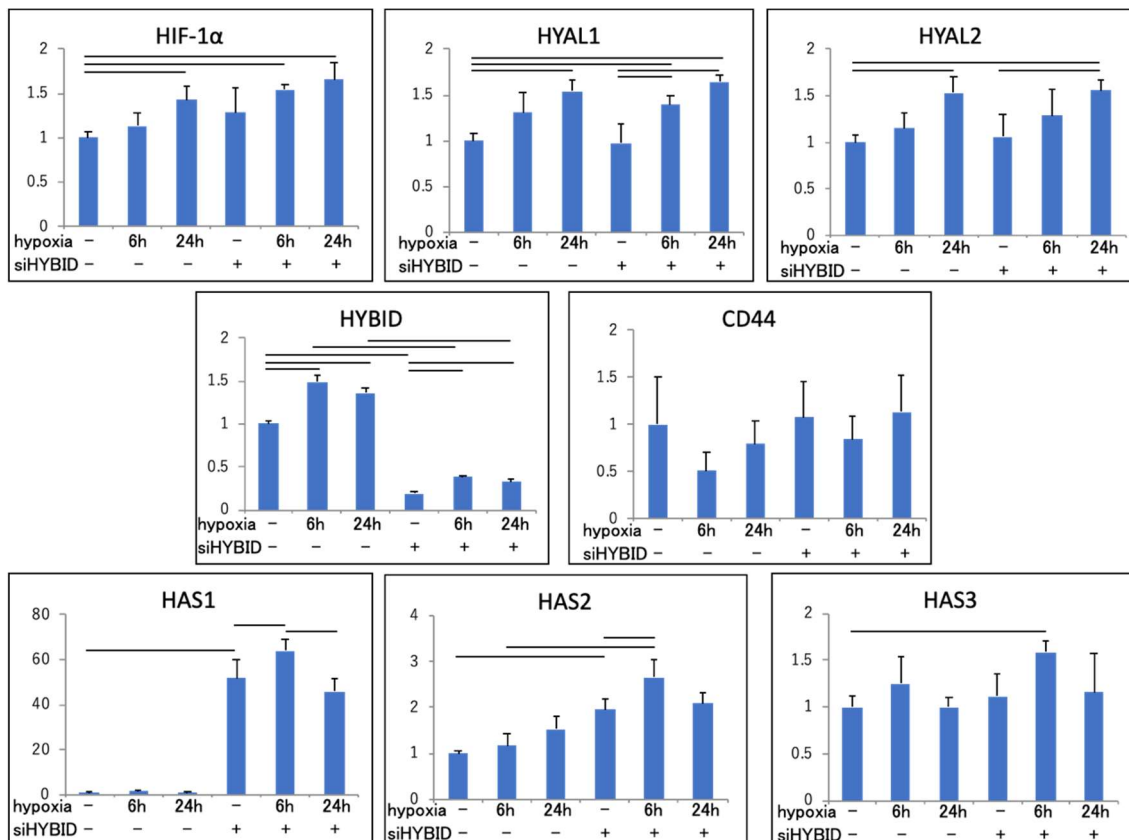


図 3. HYBID の抑制が HA の合成分解機構に与える影響

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 2件）

1. 発表者名 Kaihara K, Inoue H, Nakagawa S, Arai Y, Fujii Y, Mazda O, Takahashi K
2. 発表標題 Influence of heat stress on SIRT1-transfected chondrocytes
3. 学会等名 2021 Annual Meeting of Orthopaedic Research Society(国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 貝原健太, 井上裕章, 中川周士, 新井祐志, 藤井雄太, 松田 修, 高橋謙治
2. 発表標題 SIRT1導入細胞に対する温熱ストレスの検討
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

1. 発表者名 Kaihara K, Nakagawa S, Inoue H, Inoue A, Arai Y, Fujii Y, Kamada Y, Cha R, Mazda O, Takahashi K
2. 発表標題 Sustained hypoxia suppresses the production of pro-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis synovial cell via negative feedback of HIF-1
3. 学会等名 2022 ORS annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2022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	松田 修  (Mazda Osam)  (00271164)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授    (24303)	

6. 研究組織（つづき）

	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	中川 周士  (Nakagawa Shuji)  (30643382)	京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教    (24303)	
研究分担者	新井 祐志  (Arai Yuji)  (50347449)	京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・准教授    (24303)	

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