

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18061

研究課題名（和文）軟骨細胞における代謝リプログラミングのメカニズムと役割の解明

研究課題名（英文）The Role of Intracellular Metabolic Reprogramming in Chondrocytes

研究代表者

寺部 健哉（Terabe, Kenya）

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：10816870

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）：本研究により2DGは炎症による多数の代謝変動を制御し、in vivoで関節変性抑制効果を示した。さらにAICARによるAMPK活性化の維持によりin vitro、in vivoのいずれの検討においても関節変性抑制効果を認め、矛盾ない結果を示した。AMPK活性化の低下によりミトコンドリア機能障害、炎症の惹起、ROS産生増加、オートファジーの抑制、小胞体ストレス亢進などの膝OAの病態の主座となる細胞内変化に大きく関与する。以上よりAMPK活性化がOA進行を抑制する新規治療薬となり得ることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でAMPK活性化の維持がOAにおけるinflammagingを改善し、関節変性抑制剤として効果を発揮する可能性を示した。これまでに新規OA治療薬の開発は多数行われきたが、OAの複雑な病態のためいずれも臨床応用に至っていない。新規化合物がOAに有用で臨床応用可能となれば、医学の発展に大きな貢献を果たす。

研究成果の概要（英文）：This study demonstrated that 2DG regulates multiple intracellular metabolic changes induced by inflammation in vitro. 2DG also exhibits joint degeneration suppression effects in OA model mouse. Furthermore, maintaining AMPK activation with AICAR showed consistent results in both in vitro and in vivo studies, also demonstrating joint degeneration suppression effects. The decline in AMPK activation is significantly involved in intracellular changes that are central to the pathogenesis of knee OA, such as mitochondrial dysfunction, inflammation induction, increased ROS production, autophagy inhibition, and enhanced endoplasmic reticulum stress. These findings suggest that AMPK activation could serve as a novel therapeutic approach to inhibit the progression of OA.

研究分野：整形外科

キーワード：軟骨代謝 変形性関節症 細胞内代謝変動

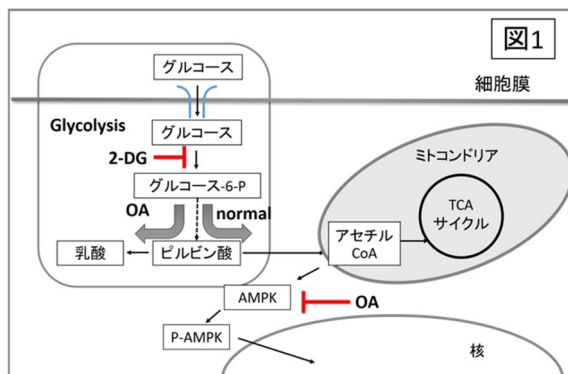
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

変形性膝関節症 (OA) は本邦において患者数が 700 万人から 1000 万人と推計される最も一般的な関節障害である。一方でその病因、病態についてはいまだ未解明でありその治療は抗炎症薬などの対症療法と人工関節置換術などの手術治療が中心となっており関節変性の進行を制御する治療法の確立には至っていない。

近年 OA の病態について代謝リプログラミングの関与が指摘されており我々は糖代謝に注目して研究を続けてきた。正常軟骨細胞では解糖系代謝によって 1 分子のグルコースが酸化され 2 分子のピルビン酸となったのちミトコンドリアに運ばれてクエン酸回路代謝により最終的に 36 分子の ATP を産生する (図 1)。一方 OA が進行すると代謝リプログラミングが起こり、嫌気性解糖 (glycolysis) によるピルビン酸から乳酸への変換が優位となり ATP 産生は 2 分子のみとなることが報告されている (Mobasher A et al. Nat Rev rheumatol 2017)。また glycolysis の亢進によりミトコンドリアダメージが増加し軟骨細胞のエネルギー代謝の key regulator である AMP-activated protein kinase (AMPK) の減少につながり、これがさらに炎症反応を惹起するとされている。我々はこれまでにこの glycolysis 阻害剤がこの代謝リプログラミングを抑制し抗炎症効果、軟骨保護作用があることを明らかにした (図 2) (Terabe K et al. J Biol Chem 2019)。



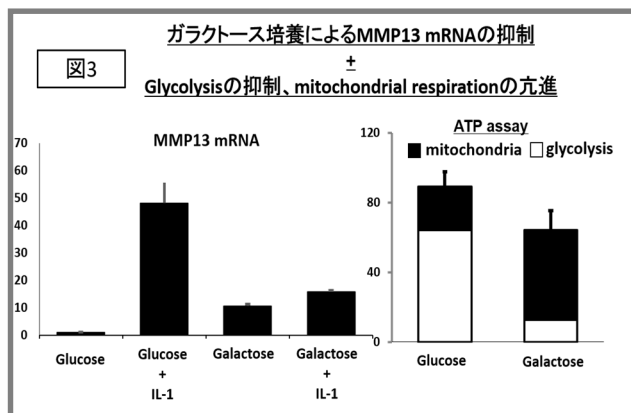
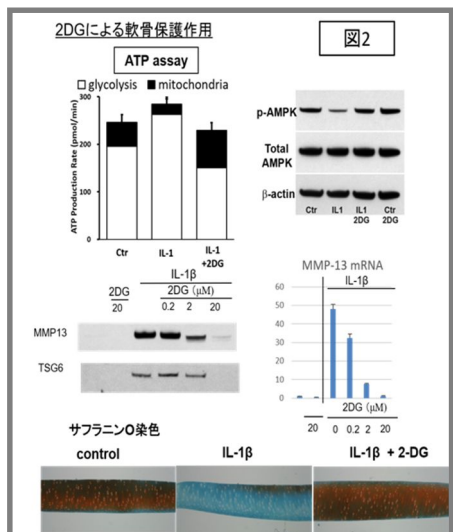
これまで我々の研究で明らかとなった事実は以下の通りである。

軟骨細胞への IL-1 刺激によって代謝リプログラミングが誘発され glycolysis が亢進し、mitochondrial respiration が低下する (図 2)。

Glycolysis 阻害剤である 2-Deoxy-D-glucose (2-DG) が IL-1 刺激による軟骨細胞の変性を抑制する (図 2)。

phospho AMP-activated protein kinase (p-AMPK) の発現が IL-1 刺激により抑制され、2DG により回復する (図 2)。

ガラクトース培養にて 2DG と同様に IL-1 刺激による glycolysis 亢進が抑制され、MMP13 の mRNA 発現が抑制された (図 3)。



以上の glycolysis 阻害剤である 2DG とガラクトースが抗炎症作用を示した事実から、OA の発生、進行において糖代謝リプログラミングの関

与が重要であり、これを制御することが新たな治療薬の開発につながるとの仮説をもって研究を行なった。

2. 研究の目的

OA における代謝リプログラミングの意義を明らかにすることで現在まだ不十分な OA の病態解明に近づくことである。OA は加齢に伴い有病率が増加する(Yoshimura N et al. Int Epidemiol. 2010)が、これはメタボリックシンドロームに共通する慢性炎症を基盤としたものであり、OA は単純な関節疾患ではなく、全身性疾患ととらえられるようになっている。この観点からも代謝リプログラミングの制御としての glycolysis 阻害剤が有用な治療薬となり得る可能性がある。本研究の目的は OA における代謝リプログラミングの意義とその機能解析をさらに進めることと in vivo での OA 動物モデルで glycolysis 阻害剤の有効性を検討する二つである。

3. 研究の方法

1) 質量分析 (メタボローム解析) による代謝関連遺伝子の網羅的検索

ウシ関節軟骨に IL-1 刺激に加えて、2DG 投与して糖代謝以外の細胞内代謝変動を網羅的に解する目的に質量分析を用いてメタボローム解析を行った。メタボローム解析は Human Metabolome Technologies 社に委託し capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry(CE-TOFMS)を用いて行った。

2) OA マウスモデルにおける 2DG に関節変性抑制効果の検討

OA 動物モデルとして、再現性に優れた内側半月板不安定化 (DMM) モデルを採用した。2DG 投与は関節内注射で行った。片膝に 2DG、反対側膝に生理食塩水を各々関節内注射し、術後 8 週で組織学的検討としてサフラニン O 染色をし、評価方法は OARSHI score を用いた。

3) 5-Aminoimidazole-4-Carboxamide Riboside (AICAR) による p-AMPK の強制発現の関節変性抑制効果の検討

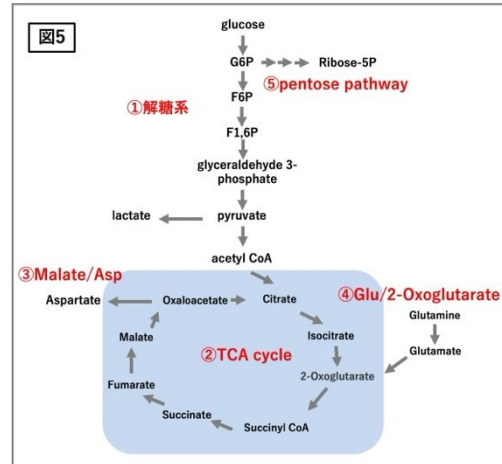
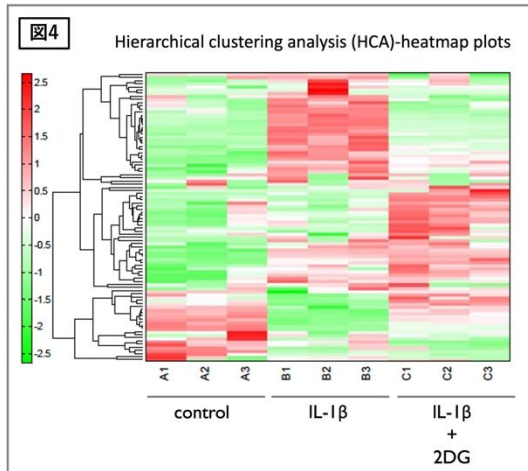
これまでの検討から p-AMPK は IL-1 刺激により低下し、2DG で回復した。これにより AICAR による p-AMPK を発現することで軟骨保護作用の有無を解析した。RT-PCR, Western Blotting 法で、MMP13, TSG6 の発現解析を行った。さらに 2) と同様に OA マウスモデルを作成し、AICAR の関節内投与を行い、関節変性抑制効果の有無を検討した。片膝に 2DG、反対側膝に生理食塩水を各々関節内注射し、術後 8 週で組織学的検討としてサフラニン O 染色の検討を行った。

4. 研究成果

1) 質量分析 (メタボローム解析) による代謝関連遺伝子の網羅的検索

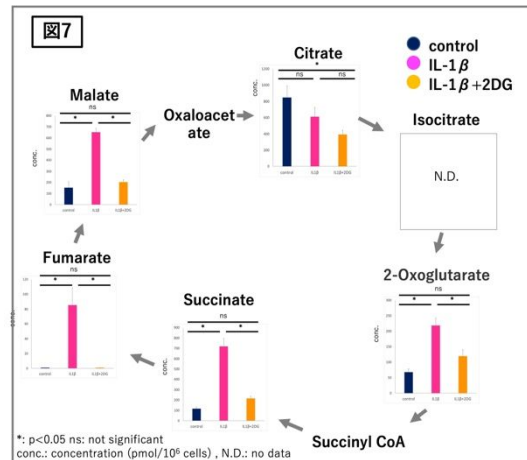
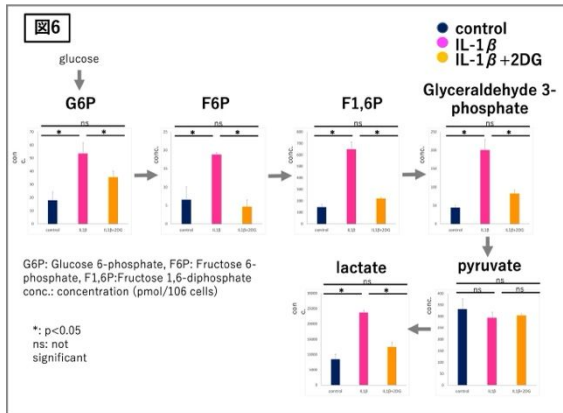
ウシ軟骨細胞に IL-1 刺激により複数の代謝産物の変動を認めた (図 4)。特に変動を優位

に認めた5つの経路を示す(図5)



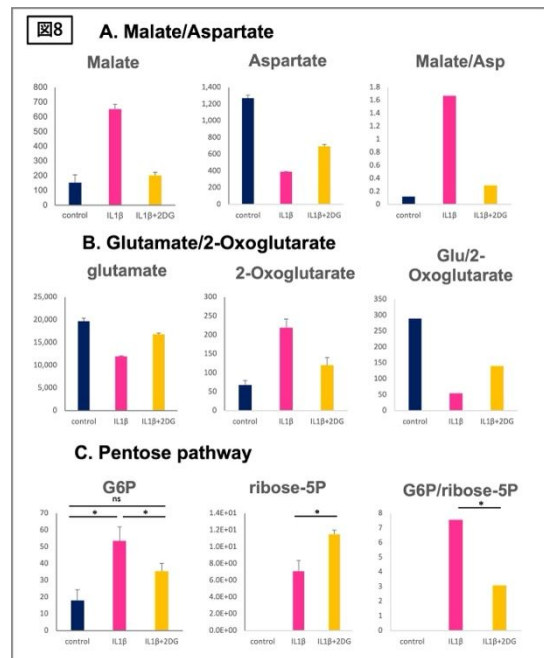
解糖系、 TAC cycle

glycolysisの最終産物である乳酸やその中間産物はIL-1刺激で亢進し、2DGはこれを抑制した(図6)。またクエン酸回路のケトグルタル酸、コハク酸、フマル酸もIL-1で増加し代謝亢進を示し、同様に2DGは抑制した(図7)。



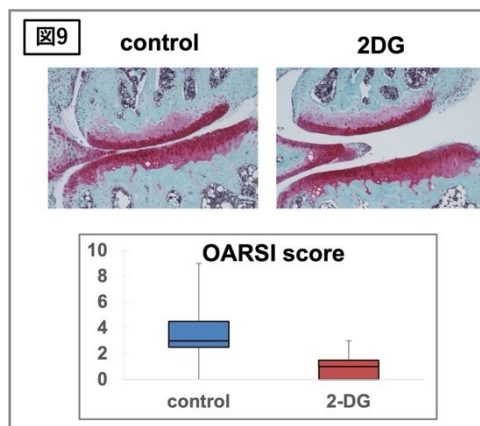
Malate/Aspartate、 Glutamate/2-Oxoglutarate、 Pentose pathway

アミノ酸代謝でエネルギー産生の指標であるリンゴ酸/アスパラギン酸比がIL-1で亢進し、アミノ酸分解を示すグルタミン酸/2-オキソグルタル酸比の低下を認めたため、アミノ酸代謝亢進によるエネルギー産生の亢進を示した(図8A, B)。またペントース経路の指標であるグルコース6-リン酸/リボース5-リン酸比も亢進した。2DGはこれらの代謝変動を部分的に抑制した(図8C)。



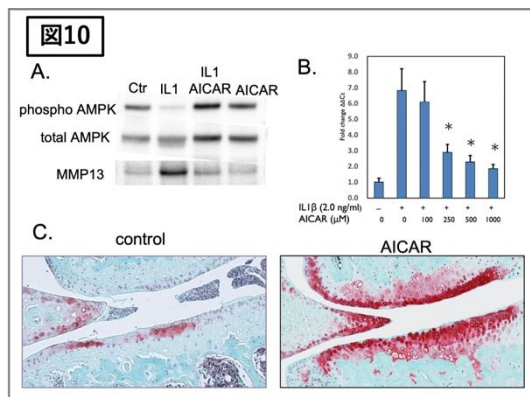
2) OA マウスモデルにおける 2DG に関節変性抑制効果の検討

OA マウスモデルに対して 2DG の関節内注射を施行した。術後 8 週でコントロール群では軟骨の不連続性を認めたが 2-DG 群は維持される傾向を認めた。OARSHI score による評価では有意に 2DG 群は低値であり、関節変形抑制作用を認めた。さらに MMP13 の免疫染色において 2DG 群が control 群と比較して発現が低下しており、OARSI score の検討の結果と矛盾しないものであった (図 9)。



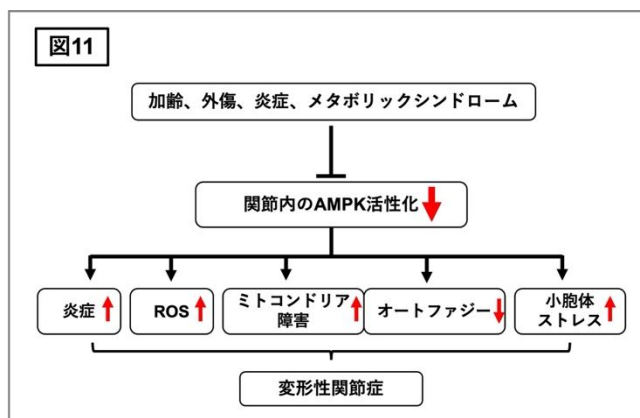
3) 5-Aminoimidazole-4-Carboxamide Riboside (AICAR)による p-AMPK の強制発現の関節変性抑制効果の検討

IL-1 刺激による炎症下の軟骨細胞では AMPK の活性化は低下した (図 10A)。AMPK を活性化させる 5-Aminoimidazole-4-Carboxamide Riboside (AICAR)は *in vitro*で IL-1 刺激による MMP13 の mRNA 発現の亢進を抑制した (図 10B)。 *in vivo*で OA マウスモデルへの関節注射で関節変性抑制効果を明らかにした (図 10C)。このように AMPK 活性化が 2DG と同様に関節変形抑制効果を認めた。



【まとめ】

以上の検討から我々は、2DG は炎症による多数の代謝変動を制御し、*in vivo*では関節変性抑制効果を示した。さらにこれまでに報告した AMPK 活性化の維持により軟骨保護作用の効果を示すために AICAR を用いて検討し、*in vitro*、*in vivo*のいずれの検討においても矛盾ない結果を示した。AMPK は細胞老化の制御において重要な役割を担っており、エネルギー代謝の制御にとどまらず、細胞内の恒常性維持に多様な効果を発揮している。このため AMPK 活性化の低下によりミトコンドリア機能障害、炎症の惹起、ROS 産生増加、オートファジーの抑制、小胞体ストレス亢進などの膝 OA の病態の主座となる細胞内変化に大きく関与する (図 11)。以上より AMPK 活性化による OA 進行抑制のメカニズムの解明と新規治療薬の創製に向けた研究を更に進めていく。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kishimoto Kenji, Terabe Kenya, Takahashi Nobunori, Yokota Yutaka, Ohashi Yoshifumi, Hattori Kyosuke, Kihira Daisuke, Maeda Masataka, Kojima Toshihisa, Imagama Shiro	4. 巻 708
2. 論文標題 Metabolic changes in synovial cells in early inflammation: Involvement of CREB phosphorylation in the anti-inflammatory effect of 2-deoxyglucose	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 108962 ~ 108962
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.abb.2021.108962	査読の有無 無
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 Ohashi Yoshifumi, Takahashi Nobunori, Terabe Kenya, Tsuchiya Saho, Kojima Toshihisa, Knudson Cheryl B., Knudson Warren, Imagama Shiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Metabolic reprogramming in chondrocytes to promote mitochondrial respiration reduces downstream features of osteoarthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15131 ~ 15146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-94611-9	査読の有無 無
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29件（うち招待講演 0件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 寺部健哉, 前田 真崇, 紀平 大介, 佐藤 良, 小杉山 裕亘, 長谷川 純也, 小嶋 俊久
2. 発表標題 軟骨細胞における細胞内代謝変動の網羅的解析による検討
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 紀平大介, 寺部 健哉, 大橋 禎史, 前田 真崇, 小杉山 裕亘, 佐藤 良, 長谷川 純也, 高橋 伸典, 小嶋 俊久, 今釜 史郎
2. 発表標題 軟骨細胞におけるグルタミン代謝阻害による抗炎症効果の検討
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤良, 寺部 健哉, 高橋 伸典, 大橋 禎史, 紀平 大介, 前田 真崇, 小杉山 裕巨, 長谷川 純也, 小嶋 俊久, 今釜 史郎
2. 発表標題 脂質代謝制御による軟骨保護作用の検討
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤良, 寺部健哉, 大橋禎史, 紀平大介, 前田真崇, 小杉山裕巨, 高橋伸典, 小嶋俊久, 今釜史郎
2. 発表標題 脂質代謝制御による軟骨保護作用の検討
3. 学会等名 第9回ベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田真崇
2. 発表標題 AICARの軟骨保護効果には、軟骨保細胞のエネルギー代謝が関係する
3. 学会等名 第9回ベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小杉山裕巨
2. 発表標題 高分子ヒアルロン酸はNF- κ B経路においてIRAKを抑制する
3. 学会等名 第9回ベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷川純也, 寺部健哉, 浅井秀司, 大橋禎史, 前田真崇, 佐藤良, 小杉山裕亘, 今釜史郎
2. 発表標題 DMMモデルマウスに対する2-DG関節内注射の効果
3. 学会等名 第35回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤良, 寺部健哉, 高橋伸典, 大橋禎史, 紀平大介, 前田真崇, 小杉山裕亘, 長谷川純也, 浅井秀司, 小嶋俊久, 今釜史郎
2. 発表標題 脂質代謝制御による軟骨保護作用の検討
3. 学会等名 第35回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 寺部 健哉 高橋 伸典 浅井 秀司 大橋 禎史 前田 真崇 紀平 大介 佐藤 良 小杉山 裕亘 長谷川 純也 今釜 史郎 小嶋 俊久
2. 発表標題 軟骨細胞における細胞内代謝変動の網羅的解析による検討
3. 学会等名 第8回JCRベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 良
2. 発表標題 関節炎における脂肪酸代謝の炎症抑制に対する検討
3. 学会等名 第8回JCRベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 良
2. 発表標題 Involvement of fatty acid metabolism in inflammation suppression of arthritis
3. 学会等名 第34回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小杉山 裕亘
2. 発表標題 高分子ヒアルロン酸のNF-kB経路における影響
3. 学会等名 第8回JCRベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小杉山 裕亘
2. 発表標題 高分子ヒアルロン酸のNF-kB経路における影響
3. 学会等名 第34軟骨代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大橋 禎史
2. 発表標題 Metabolic reprogramming in chondrocytes to promote mitochondrial respiration reduces downstream features of osteoarthritis
3. 学会等名 Orthopaedic research society annual meeting 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田 真崇 寺部 健哉 高橋 伸典 浅井 秀司 大橋 禎史 紀平大介 佐藤良 小杉山裕亘 長谷川純也 今釜 史郎 小嶋俊久
2. 発表標題 AICARの軟骨保護作用と細胞内代謝に関する検討
3. 学会等名 第8回JCRベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田 真崇 寺部 健哉 高橋 伸典 浅井 秀司 大橋 禎史 紀平 大介 佐藤 良 小杉山 裕亘 長谷川 純也 今釜 史郎 小嶋 俊久
2. 発表標題 AICARの軟骨保護作用と細胞内代謝に関する検討
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田 真崇 寺部 健哉 高橋 伸典 浅井 秀司 大橋 禎史 紀平 大介 佐藤 良 小杉山 裕亘 長谷川 純也 今釜 史郎 小嶋 俊久
2. 発表標題 AICARの軟骨保護作用と細胞内代謝に関する検討
3. 学会等名 第34回軟骨代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yutaka Yokota, Nobunori Takahashi, Kenya Terabe, Toshihisa Kojima, Shiro Imagama.
2. 発表標題 Exogenous Hyaluronan Inhibits Enhanced Glycolysis In Articular Chondrocytes Treated With II-1
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2021 Annual Meeting Registration (国際学会)
4. 発表年 2021年

1 . 発表者名 Yoshifumi Ohashi,Nobunori Takahashi, Kenya Terabe, Toshihisa Kojima,Shirou Imagama, Cheryl . Knudson, Warren Knudson.
2 . 発表標題 The Metabolic Change In Osteoarthritis
3 . 学会等名 Orthopaedic Research Society 2021 Annual Meeting Registration (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Kenji Kishimoto, Takahashi Nobunori, Shuji Asai, Kenya Terabe, Toshihisa Kojima, Shiro Imagama.
2 . 発表標題 Metabolic Change in Early Inflammatory Synovial Cells
3 . 学会等名 Orthopaedic Research Society 2021 Annual Meeting Registration (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 K. Hattori, K. Terabe, N. Takahashi, T. Kojima, S. Imagama.
2 . 発表標題 The activation of transient receptor potential vanilloid-4 inhibits IL-1 -induced articular cartilage degradation via regulation of the CaMKK/AMPK/NF- B signaling pathway
3 . 学会等名 Orthopaedic Research Society 2021 Annual Meeting Registration (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Maeda Masataka, Kenya Terabe, Shuji Asai, Nobunori Takahashi,Toshihisa Kojima, Shiro Imagama.
2 . 発表標題 Chondroprotective effect of AICAR involve changes in chondrocyte energy metabolism
3 . 学会等名 Orthopaedic Research Society 2021 Annual Meeting Registration (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1. 発表者名 寺部 健哉、高橋 伸典、大橋 禎史、横田 裕、岸本 賢治、服部 恭典、紀平 大介、前田 真崇、小嶋 俊久、石黒 直樹
2. 発表標題 glycolysis 阻害剤である 2-Deoxy-D-glucose の軟骨保護作用の検討
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 岸本 賢治、高橋 伸典、寺部 健哉、石黒 直樹、小嶋 俊久
2. 発表標題 炎症下における滑膜細胞の代謝リプログラミング
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 服部 恭典、高橋 伸典、寺部 健哉、石黒 直樹、小嶋 俊久
2. 発表標題 TRPV4 を介したメカニカルストレスが関節軟骨破壊に及ぼす作用の検討
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 前田 真崇、大橋 禎史、寺部 健哉、小嶋 俊久、高橋 伸典
2. 発表標題 AICAR は軟骨保護作用を有するか
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 岸本 賢治, 高橋 伸典, 寺部 健哉, 小嶋 俊久
2. 発表標題 炎症下における滑膜細胞の代謝リプログラミング
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 大橋 禎史, 前田 真崇, 紀平 大介, 服部 恭典, 岸本 賢治, 横田 裕, 寺部 健哉, 高橋 伸典, 小嶋 俊久, 石黒 直樹
2. 発表標題 変形性関節症における代謝変化の検討
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 服部 恭典, 高橋 伸典, 寺部 健哉, 小嶋 俊久
2. 発表標題 IL-1 存在下におけるTRPV4活性化の軟骨破壊に対する役割の検討
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------