

令和 3年 4月 22日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 令和元年度

受付番号 201960187

氏名 飯島 弘貴

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: ピッツバーグ大学 (国名: 米国)
2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。
骨髄間葉系幹細胞移植に最適な関節内微小環境を目指すニッチェリハビリテーション
3. 派遣期間: 令和 元年 5月 21日 ~ 令和 3年 3月 31日
4. 受入機関名及び部局名
受入機関名: University of Pittsburgh
部局名: Department of Physical Medicine and Rehabilitation
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意(A4判相当3ページ以上、英語で記入も可)**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式10-別紙1~4に記入の上、併せて提出すること。

本研究の当初の目的は、リハビリテーション介入によって骨髄間葉系幹細胞移植に最適な関節内微小環境をどのように構築するかを探ることであった。しかし、当初想定していたよりも、マウスの膝関節の内腔が狭く、再現性が担保された方法での幹細胞移植が困難であった。そこで、関節軟骨に内在する軟骨細胞を対象とし、その軟骨細胞の表現型が細胞周辺の微小環境(細胞外基質の物理特性)によってどのように制御されるのか、そのメカニズム解析を主な目的とした。本研究成果の概要を以下に示す。なお、これらの結果については2021年にbioRxivに掲載済である。

超高齢社会を迎えた本邦において、高齢者の約半数が有するとされる変形性膝関節症の病態解明と治療法の開発が急務である。申請者は変形性膝関節症の特徴である加齢性軟骨変性の分子メカニズムが不明であることが治療法開発の障壁だと着想し、これまでに報告された知見について体系的整理を行った結果、加齢性軟骨変性における炎症性サイトカイン上昇、細胞老化、オートファジー機能低下の3大要因の関与が明らかになった (*Iijima H, eLife, under review; OARSI Connect '21 Oral presentation*)。そこで、我々はこれらの要因を制御する長寿タンパク α -Klotho に着目し、加齢関節軟骨における α -Klotho の発現分布を評価した (*Iijima H, OARSI 2020 Young Investigator Award*)。その結果、マウスならびにヒトにおける加齢性軟骨変性と α -Klotho 発現低下が関連し (Fig.1A)、また、 α -Klotho の遺伝子発現が減少する遺伝子改変マウスにおいては、加齢性軟骨変性が加速した (Fig.1B 上)。これらの結果は、加齢に伴う α -Klotho

の低下が加齢性軟骨変性の発症、進行に関与することを示している。その一方、 α -Klotho の遺伝子発現を過剰発現させた加齢マウスでは、加齢性軟骨変性が改善した (Fig.1B 下)。 α -Klotho の発現制御が新規の治療標的になる可能性を秘めている。

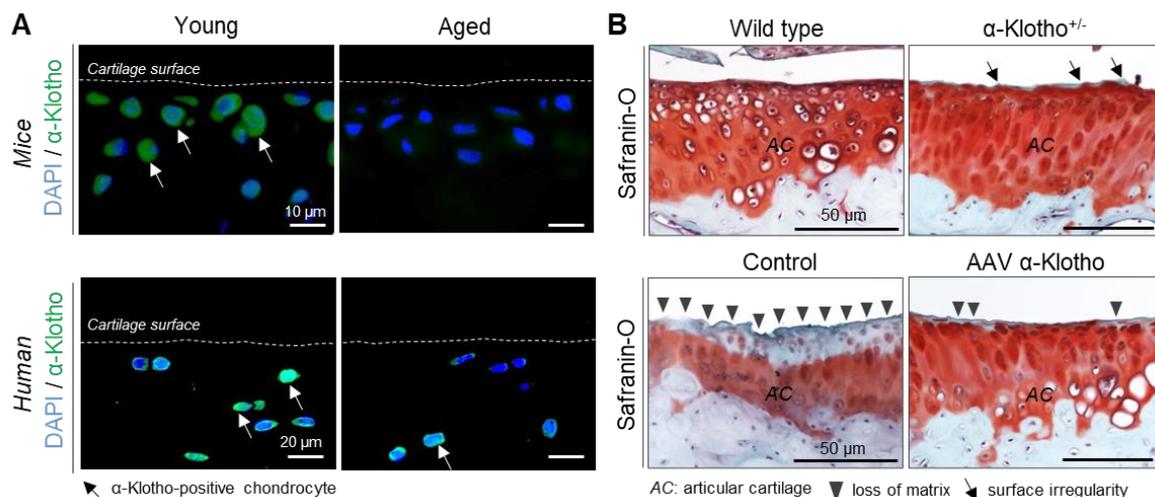


Fig. 1. Role of α -Klotho on articular cartilage. A. Comparison of α -Klotho expression between young and aged cartilage from mice and human samples. B. Effects of loss ($Klotho^{+/-}$) or gain (adeno-associated virus (AAV)-mediated α -Klotho delivery), on cartilage histology, as determined by Safranin-O.

何故、加齢した軟骨では α -Klotho の発現が減少するのか？原子間力顕微鏡を用いた過去の報告では、加齢マウスの関節軟骨では若年マウスと比較して関節軟骨の硬さ (Young's modulus) が約 2-3 倍であることから (Stolz M, Nat Nanotechnol 2009)、我々は、軟骨細胞周辺の微小環境の加齢変化、すなわち細胞外基質の物理特性の変化がメカノトランスダクションを介して α -Klotho 発現を低下させ、加齢性軟骨変性を招くとの仮説を立てた。そこで、若年 (5-30kPa) および加齢マウス (50-100kPa) の細胞外基質の硬さを再現したポリアクリルアミドゲル上に軟骨細胞を播種すると、期待していたとおり、軟骨細胞の α -Klotho ならびに基質産生能が低下した (Fig.2A-B)。

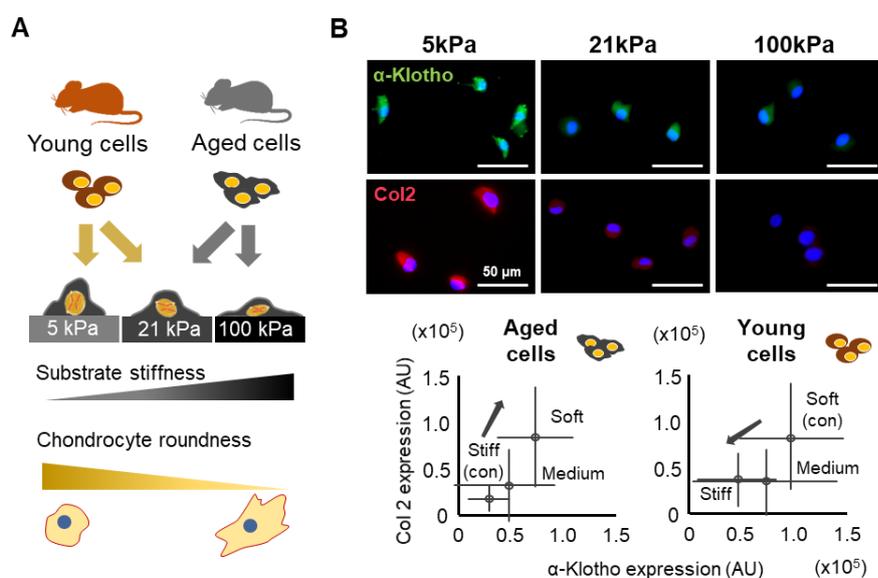


Fig. 2. Matrix stiffness regulates chondrocyte α -Klotho expression. A. Schematic showing the experimental protocol. Primary chondrocytes isolated from young and aged cartilage were seeded onto polyacrylamide gels engineered to mimic a physiological range of knee cartilage ECM stiffnesses (5kPa, 21kPa, and 100kPa). B. Stiff substrate reduces α -Klotho and type II collagen in chondrocytes regardless of age of the cell donor. Data are presented as means \pm 95% confidence intervals.

前述の *In vitro* の結果を *In vivo* で検討するため、LOX inhibitor である BAPN を加齢マウスに 4 週間投与し、関節軟骨の変化を評価した (Fig.3A)。BAPN を投与することで、LOX に依存したコラーゲン架橋の減少を介して関節軟骨の Young's modulus の減少が期待できる。実際に BAPN を投与した結果、 α -Klotho 発現が低下し (Fig.3B)、加齢性軟骨変性が改善した (Fig.3C)。以上の結果は、関節軟骨において細胞外基質の物理特性が α -Klotho の発現を制御することを示しており、新規治療法ならびに最適なりハビリテーションの確立に向けての示唆を与えている。

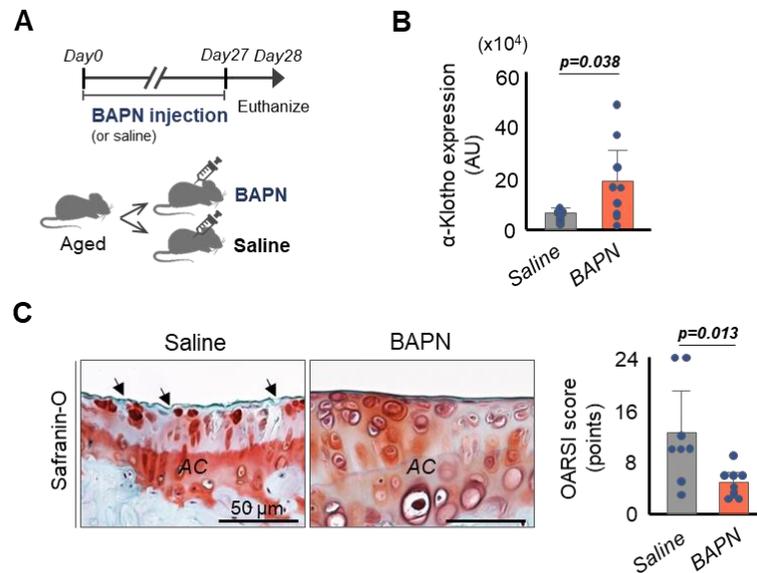


Fig. 3. BAPN injection improves α -Klotho expression and cartilage integrity in aged mice.

A. Schematic showing the experimental protocol of BAPN daily injection. **B.** BAPN injection in aged mice improves α -Klotho expression. **C.** BAPN injection in aged mice improves cartilage integrity. Representative histological sections stained with Safranin-O/Fast Green are provided. Black arrows indicate loss of cartilage matrix. OARS1 score (0-24 points; higher value indicates more severe cartilage degeneration) assessed by blinded assessor is provided.