162　変形性関節症治療薬開発に向けた基盤研究	村山　正承

【目的】軟骨細胞は異化・同化作用により軟骨組織の恒常性を維持する。関節軟骨の損傷により生じる骨組織の変性や変形が特徴的な骨代謝疾患である変形性関節症は高齢化社会・生活習慣病が深刻化する日本では症状のある患者が約1,000 万人、潜在的な患者が 3,000 万人と推定され、早急に解決すべき医療課題の一つである。その治療には主に保存療法や手術療法が選択されるが根治療法が確立しておらず、治療薬・治療法の開発に向けた軟骨細胞制御機構の更なる理解が必要とされる。再生医療研究の発展に伴い再生医療技術による治療法の開発が進められているが、患者由来の幹細胞は増殖能が低いことが知られる。CTRP3 は軟骨細胞増殖活性を有することが知られていたが、その受容体は明らかでなかった。本研究では軟骨細胞株 ATDC5 を用いて CTRP3 受容体の同定を試みた。

【方法】軟骨細胞株 ATDC5 細胞を用いて、軟骨細胞増殖における CTRP3 受容体の同定を試みた。受容体候補である PAQR 受容体ファミリーの遺伝子発現解析、RNA 干渉による遺伝子発現制御を行い、CTRP3 受容体としての PAQR 受容体ファミリーを評価した。

【結果】本研究により、CTRP3 は軟骨細胞の増殖を、PAQR2 を介して制御していることを明らかにした。CTRP3 受容体の同定は世界で初めてのことである。本研究成果は *Translational and Regulatory Sciences* 誌にて発表した。

CTRP3 は受容体 PAQR2 を介して軟骨細胞の増殖を制御する



162. 変形性関節症治療薬開発に向けた基盤研究

村山　正承

関西医科大学 附属生命医学研究所 モデル動物部門

Key words：変形性関節症，軟骨細胞，CTRP3，CTRP6

緒　言

変形性関節症は関節軟骨の損傷により生じる骨組織の変性や変形が特徴的な骨代謝疾患である。その治療には主に保存療法や手術療法が選択されるが、再生医療研究の発展に伴い再生医療技術による治療法の開発も進んでいる。関節表面を覆う関節軟骨は、コラーゲンやプロテオグリカンなどの細胞外マトリックスとこれらを産生する軟骨細胞から成る。軟骨細胞は同化作用だけでなく、マトリックスメタロプロテアーゼを産生することで異化作用も行うことから、軟骨組織の恒常性の維持に軟骨細胞の代謝制御は重要である。そのため、軟骨細胞は変形性関節症に対する幹細胞医療や治療薬・治療法の開発において重要な研究対象である。

CTRP ファミリーは adipokine として知られ、代謝内分泌において類似した役割を果たす。しかし、CTRP ファミリー分子の受容体についてはほとんど報告がない。CTRP3 は軟骨細胞増殖因子として同定され精力的な研究が行われたが、CTRP3 受容体は明らかでなかった。研究代表者らは *CTRP3* 欠損マウスを作製し、関節リウマチをはじめとする自己免疫疾患の発症に関与することを報告している［1］。本研究では CTRP3 受容体の同定に成功し、さらに他の CTRP 分子も軟骨細胞増殖因子であることを見出した。本研究成果は変形性関節症に対する新たな治療薬・治療法の開発に繋がることが期待される。

方法および結果

1. 軟骨細胞株 ATDC5

軟骨細胞増殖における CTRP3 の受容体を同定するため、軟骨細胞株 ATDC5 を用いた。ATDC5 細胞は理化学研究所バイオリソース研究センターから購入した。ATDC5 細胞は 5%血清、1%ペニシリンーストレプトマイシンを含む HAM's F-12 培地にて維持し、80～90%程度でトリプシン／EDTA を用いて継代を行った。

2. 軟骨細胞における PAQR 受容体ファミリーの発現解析

CTRP ファミリー分子である adiponectin は PAQR1、PAQR2、PAQR3 を受容体として生理機能を発揮する。また、これら三つの受容体と PAQR4 を含んだ四つの受容体がクラスⅠ PAQR ファミリーである［2］。軟骨細胞における 11 ある PAQR ファミリーの発現強度を検討するため、次のプライマーセットを用いてリアルタイム PCR 解析を実施した。

Gapdh : 5'- TTCACCACCATGGAGAAGGC-3', 5'- GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'
Paqr1 : 5'- AGACAAGAGCAGGAGTGTTCCT-3', 5'- GGTGATGTACATCACAGCCATG-3'
Paqr2 : 5'- GGACACATCTCCTAGGTTGTGT-3', 5'- TGGCAGTACACCGTGTGGAAGA-3'
Paqr3 : 5'- TTCCAGGTCTGCATGCTTTGCT-3', 5'- AGACATAGCAGCCCAGTATTCC-3'
Paqr4 : 5'- AACATCTACACACACGGGCTAG-3', 5'- AGAGGTGATACAGCACAGAGGC-3'
Paqr5 : 5'- TTCTACAGGCTCTTCCTGTTCC-3', 5'- GTGACTGTGGCCAATGTAGTCA-3'
Paqr6 : 5'- TTCTACAGGCTGCGGCTGTGTT-3', 5'- TGGTGGCTGTGGCCAATATAGT-3'
Paqr7 : 5'- ATCGTCTTGGCCTCCTTCACCT-3', 5'- CAGGACGGCTCTATGGCATAGT-3'

Paqr8 : 5'- AGAAGCACAACGAGGTGGTCAA-3', 5'- CAAGAGGCTGCAGGTGAGGTAA-3'

Paqr9 : 5'- AGTGCTTCATCCTGTCCGGCTA-3', 5'- GCAGAACTTACTGAGGAACAGC-3'

Paqr10 : 5'- CACCTCAGGATGGTAGAGCACT-3', 5'- TGATCCACACCAGCCAGCGCAT-3'

Paqr11 : 5'- TGCTACACACACGCATTTCATG-3', 5'- AGTAGATGACCATCCGATCGCA-3'

リアルタイム PCR 解析の結果、他の PAQR 受容体と比較してクラスⅠPAQR 受容体の発現が高いことがわかった（図 1）。

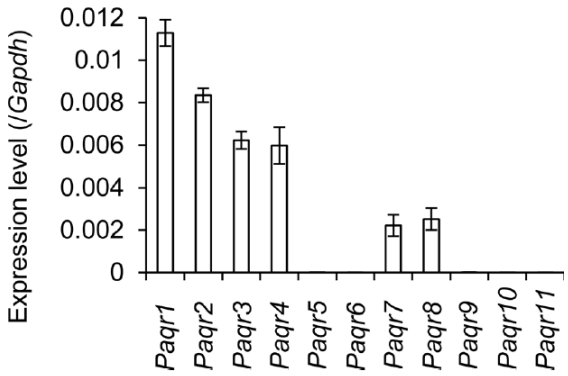


図 1. 軟骨細胞における PAQR 受容体ファミリーの遺伝子発現

軟骨細胞株 ATDC5 における PAQR 受容体ファミリーに遺伝子発現強度をリアルタイム PCR にて評価した。それぞれの遺伝子は *Gapdh* に対する相対的な発現強度であり、ΔΔCt 法で評価した。N＝3 の平均値を図示した。

3. RNA 干渉によるクラスⅠPAQR 受容体の遺伝子発現制御

CTRP3 による軟骨細胞増殖制御におけるクラスⅠPAQR 受容体の役割を解明するため、これら 4 受容体の遺伝子発現を次の配列を用いて RNA 干渉により制御することとした。

S: sense sequence、AS: anti-sense sequence

Negative control-1: S; GUGCGCUGCUGGUGCCAACCCTT, AS; GGGUUGGCACCAGCAGCGCACTT

Paqr1: S; GAGACUGGCAACAUCUGGACATT, AS; UGUCCAGAUGUUGCCAGUCUCTT

Paqr2: S; GCUUAGAGACACCUGUUUGUUTT, AS; AACAAACAGGUGUCUCUAAGCTT

Negative control-2: S; CGUUAAUCGCGUAUAAUACGCGUAT,

AS; CAGCAAUUAGCGCAUAUUAUGCGCAUA

Paqr3: S; GGCAUUGGAUUAUGCAGGAAUUUCT, AS; AGAAAUUCCUGCAUAAUCCAAUGCCAU

Paqr4: S; ACAUUGGUCCUGCUUGUAUCAUCTG, AS; CAGAUGAUACAAGCAGGACCAAUGUCC

四つのクラスⅠPAQR 受容体に対する RNA 干渉を行った結果、コントロール配列に比べいずれの遺伝子発現も顕著に抑制することが出来た（図 2）。

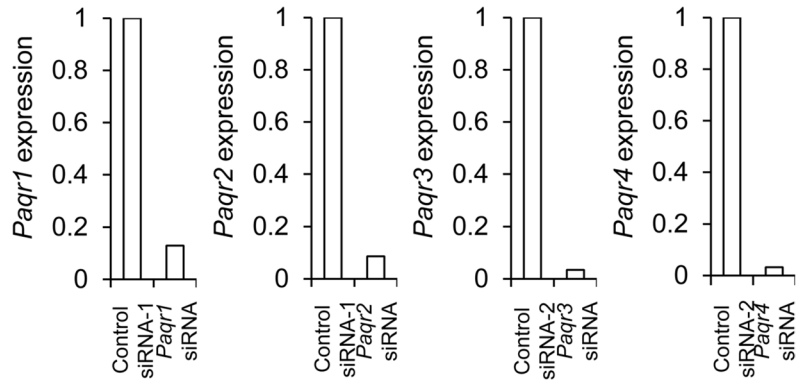


図 2. クラス I PAQR 受容体に対する RNA 干渉

ADTC5 細胞におけるクラス I PAQR 受容体の遺伝子発現を RNA 干渉にて制御した。*Gapdh* に対する相対的な遺伝子発現強度を、ΔΔCt 法で評価することで RNA 干渉による遺伝子発現効率を評価した。

4. CTRP3 による軟骨細胞増殖におけるクラス I PAQR 受容体の役割の解明

最後にクラス I PAQR 受容体遺伝子発現制御下にて、軟骨細胞に対する CTRP3 の効果を検討した。RNA 干渉により遺伝子発現を制御した 1×10^4 個の ATDC5 細胞を 48-well plate にて培養し組換え体 CTRP3 を添加し、細胞の増殖を評価した。その結果、CTRP3 による軟骨細胞の増殖は PAQR2 遺伝子発現制御下でのみ抑制された（図 3）。

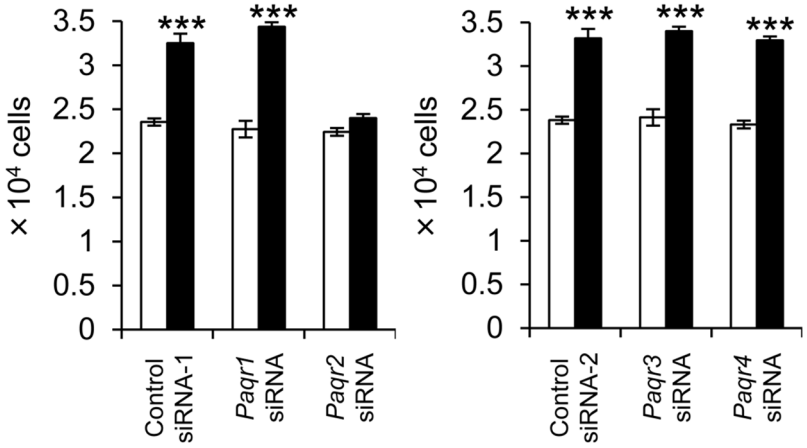


図 3. RNA 干渉下における CTRP3 の細胞増殖能の評価

RNA 干渉にて遺伝子発現を誘導した ATDC5 に対する組換え体 CTRP3 の細胞増殖活性を評価した。□CTRP3 なし、■CTRP3 あり（50 ng/ml）。平均値±標準誤差を示した。t-検定による有意差（n＝4）：***P＜0.001。

考　察

本研究によりこれまで受容体が明らかでなかった CTRP3 の受容体を明らかにすることが出来た［3］。また、他の CTRP ファミリー分子も軟骨細胞増殖活性を有していることを明らかにしており（未発表）、軟骨細胞代謝にて CTRP ファミリー分子が重要な役割を担っていることが明らかとなった。これらの成果より CTRP ファミリー分子が変形性関節症に対する重要な研究標的であると考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究は上原記念生命科学財団の支援のもと実施し、研究成果の一部を *Translational and Regulatory Sciences* 誌にて発表することが出来ました。この場を借りて深く御礼申し上げます。

文　献

1） Murayama MA, Kakuta S, Haruhashi T, Shimizu K, Seno A, Kubo S, Sato N, Saijo S, Hattori M, Iwakura Y. CTRP3 plays an important role in the development of collagen-induced arthritis in mice. Biochem Biophys Res Commun. 2014 Jan 3;443(1):42-8. Epub 2013 Nov 20. PMID: 24269820 DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.11.040.

2） Tang YT, Hu T, Arterburn M, Boyle B, Bright JM, Emtage PC, Funk WD. PAQR proteins: a novel membrane receptor family defined by an ancient 7-transmembrane pass motif. J Mol Evol . 2005 Sep;61(3):372-80. DOI: 10.1007/s00239-004-0375-2.

3） Murayama MA, Iwakura Y. C1q/TNF-related protein 3 regulates chondrogenic cell proliferation via adiponectin receptor 2 (progestin and adipoQ receptor 2). Translat Regulat Sci. 2(1): 19–23, 2020; doi: 10.33611/trs.2_19