

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15536

研究課題名(和文)変形性膝関節症の治療薬を目指した関節軟骨最表層を再生誘導する低分子化合物の探索

研究課題名(英文) Identification of candidate compounds for the maintenance of SFZ in the articular cartilage through Prg4 induction

研究代表者

矢野 文子 (Yano, Fumiko)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：80529040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨全体を保護する重要な関節軟骨最表層(SFZ)に発現しているPrg4に着目し、軟骨代謝に関連する各シグナルの修飾化合物をSFZ細胞に投与し、Prg4発現上昇をリアルタイムRT-PCRで網羅的に解析した。Hif2a、Wntシグナルが有望であることがわかり、各々のcDNAマイクロアレイを行い、遺伝子発現プロファイルを取得した。Hif2aはPrg4のプロモーター活性を持つことが示されたのでChIPシーケンス解析を行った。In vivoではPrg4特異的Hif2aシグナルの強制発現型、機能抑制型マウス、またはPrg4特異的Wntシグナル強制発現型、機能抑制型マウスのOAモデルでの解析を行った。

研究成果の概要(英文)：The superficial zone (SFZ) of articular cartilage plays a cartilage-protective role by secretion of lubricin (Prg4). We separately isolated the SFZ cells and then treated with various agonists which are related to chondrogenic differentiation. When we analyzed treated SFZ cells by RT-PCR, Hif2a and Wnt signaling are candidate for upregulation of Prg4 expression and were performed by cDNA microarray. Since Hif2a significantly showed Prg4-promoter activity, to further know the mechanism of Prg4 regulation by Hif2a, we performed ChIP sequencing analysis using activated Hif2a in SFZ cells. In vivo analysis, we analyzed OA development of 4 types; Prg4-CreERT2; Hif2a flox (loss-of-function) or Hif2a Tg mice (activated Hif2a in Prg4 expressing cells), Prg4-CreERT2; catenin flox mice (loss-of-function) or Prg4-CreERT2; cateninEx3 flox (activated catenin in Prg4 expressing cells).

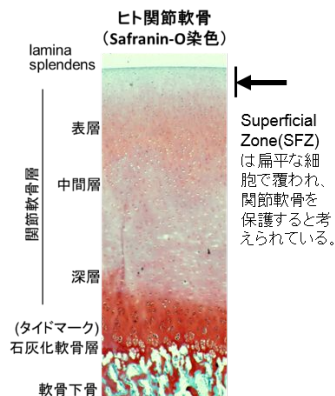
研究分野：軟骨代謝

キーワード：変形性膝関節症 関節軟骨最表層

### 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(OA)は高齢者の生活の質を脅かす代表的な運動器疾患であり、申請者が属する東京大学医学部整形外科で実施している国内最大のコホート研究 (ROAD study) によると膝関節だけでも国内に 780 万人が痛みを苦しんでいる (Osteoarthritis Cartilage 17:1137,2009)。その患者数は高齢人口の増加とともに増え続けている。その病因については加齢や物理的ストレス、炎症などの関与が示唆されているが、分子レベルでの病態解明は始まったばかりである。我々は従来から OA の基礎研究を展開しており、膝 OA の in vivo での解析を可能にすべく世界に先駆けてマウスを用いた膝 OA モデルを樹立し (Osteoarthritis Cartilage 13:632-41,2005)、そのモデルを用いて Runx2 や C/EBP、Carminerin、HIF2A などの軟骨内骨化を制御する転写因子群が OA の発症・進行をも強力に制御していることを明らかにした (Arthritis Rheum 54:2462-70,2006, Nature Med 12:665-70,2006, PLoS One 4:e4 543,2009, Nature Med 16:678-86,2010)。臨床では、軽度から中等度の膝 OA に対する根本的な治療法は未だなく、運動療法、ヒアルロン酸注射や鎮痛剤投与といった対症療法が行われており、原因療法となる軟骨組織再生を誘導する治療薬はこれまでにない。

最近では、関節軟骨組織の最表層 (Superficial Zone; SFZ)(下図にしめす)の破綻が OA 発症のトリガーであること、SFZ 細胞はルプリシン(Prg4) など潤滑成分を多く分泌して関節の滑動性を担保し、その深層の



(Superficial Zone; SFZ)(下図にしめす)の破綻が OA 発症のトリガーであること、SFZ 細胞はルプリシン(Prg4) など潤滑成分を多く分泌して関節の滑動性を担保し、その深層の

関節軟骨全体を保護する作用があることなどが明らかとなってきた。

### 2. 研究の目的

関節軟骨最表層 (SFZ) は、軟骨全体を保護する重要な組織である。本研究では、新規 SFZ 細胞分化モニタリングシステム、ルプリシン(Prg4)-GFP を利用し、低分子化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、Prg4 を誘導する化合物や SFZ の再生を誘導する化合物を探索する。同定した化合物の作用機序の解明するために最先端の分子生物学的手法で網羅的に解析し、安全かつ有効な新規変形性膝関節症治療薬の開発を目指す。さらにマウスモデル上でも治療効果の検討を行い、変形性膝関節症の新規治療法の実現化を総合的に加速することを目指す。

### 3. 研究の方法

(1) Prg4-GFP モニタリングシステムによる SFZ 保護・再生化合物のスクリーニング  
SFZ に特異的に発現する Prg4 の近位プロモーター断片の下流に GFP 遺伝子を接合したトランスジーンをマウス間葉系細胞 C3H10T1/2 に安定導入した株を用い、Prg4 を強力に誘導し、SFZ 細胞分化誘導しうるような骨・軟骨代謝が関連する各シグナルの修飾化合物を探索する。

(2) 候補化合物の Prg4 誘導能および SFZ 細胞分化能の解析

(1) で検討した、シグナルを増強する化合物がどの程度 Prg4 誘導能や SFZ 細胞分化誘導能を持つかを、in vitro で検討する。Prg4 の発現レベルの変化や、その他の SFZ マーカーである Wnt9a などの発現、深層軟骨マーカーであるアグリカンなどの発現を解析する。また SFZ 細胞は線維芽細胞に似た細長い形状であり、対照的に深層の軟骨細胞は立方体に近い形状であることから、形状的な変化も記録、解析する。培養細胞レベルでの検討で有望と考えられる候補化合物については、器官培養での検討も行う。マウス大腿骨頭を単

離し、化合物存在下に 5 日間培養を行い、上清へのアグリカンの放出量を定量するほか、培養後の大腿骨頭を組織学的に解析し、SFZ の厚さや細胞密度などを調べ、化合物の効果を評価する。またマウスとヒトで効果に違いがみられることも予想されるため、これらの候補化合物についてヒト軟骨細胞を用いた検証も行う。申請者らは人工膝関節全置換術時に関節軟骨を採取することを東京大学医学部研究倫理審査委員会から既に承認されており（受付番号 622-3）、様々な変性グレードのヒト軟骨組織・細胞を入手することができる。またヒト正常軟骨細胞については、商業ベースで入手済みである（Cryo NHAC-kn, Cambrex Bio Science Walkersville 社）。これらのヒト軟骨組織・細胞を用いて、候補化合物が同様の効果を発揮するかどうか検証する。

（ 3 ）候補化合物の標的タンパクと作用機序の解明

同定した化合物の SFZ 再生誘導の分子メカニズムを明らかにするため、Total RNA を回収後、cDNA マイクロアレイを行い、遺伝子発現プロファイルを取得する。得られたプロファイルを検証、統合することで、Prg4 が発現上昇させる候補シグナルの作用機序の解明を目指す。さらに Prg4 のプロモーターを活性化させるシグナルに関しては ChIP シークエンス解析を行う。これらの解析によって得られる情報は、関節軟骨の形成、維持を知る鍵にもなることが予想される。

（ 4 ）変形性膝関節症モデルマウスを用いた治療効果の検討

OA 誘発手術（DMM モデル）翌週から野生型マウスの膝関節腔内に（ 2 ）で最適化した濃度の化合物を局所投与し、膝 OA に対する抑制効果を検討する。組織学的評価基準は、近年、動物膝 OA モデルの重症度診断において世界的な標準として注目されている Osteoarthritis Research Society International（OARSI）が提唱する histopathology grading

system（*Osteoarthritis and Cartilage* 18（2010））および我々が確立した grading system を用いて定量化する。また、Col1, Col2, Col10, Prg4, Mmp13 など軟骨分化、肥大分化マーカーの発現を ISH にて確認するほか、蛋白分解酵素による基質変性を反映する VDIPEN、NITEGE を免疫組織化学染色法により検出する。

#### 4 . 研究成果

（ 1 ）Prg4-GFP モニタリングシステムによる SFZ 保護・再生化合物のスクリーニング  
当初計画であった、Prg4 のプロモーターを用いた細胞株の樹立に関しては、発現コピー数が極端に少ないことが分かり、マウス関節軟骨から関節軟骨最表層（Superficial Zone; SFZ）の細胞と、軟骨層の細胞を取り分ける手法を確立し、Prg4、1 型コラーゲンのマーカーが SFZ 特異的に発現し、軟骨細胞では発現が低いことを確認し、この SFZ 細胞を実験に用いることとした。

（ 2 ）候補化合物の Prg4 誘導能および SFZ 細胞分化能の解析

SFZ 細胞を用いて、軟骨代謝が関連する各シグナルの修飾化合物を投与することで、Prg4 のマーカーの上昇をリアルタイム RT-PCR で網羅的に解析した。Hif2a、Wnt シグナルが有望であることがわかった。これらのデータを参考に、Prg4 発現領域における Hif2a または Wnt シグナルの役割を明らかにするために Prg4 特異的 Hif2a シグナルの強制発現型、機能抑制型マウス、または Prg4 特異的 Wnt シグナル強制発現型、機能抑制型マウスの OA モデルでの解析を行った。Wnt シグナルに関しては Wnt アゴニストと種々の Wnt リガンドを添加して関節軟骨最表層の変化を Ex vivo（マウス大腿骨頭の器官培養）で組織学的に SFZ の厚さや細胞密度などを調べ、化合物の効果を評価した。

（ 3 ）候補化合物の標的タンパクと作用機序の解明  
Prg4 の標的シグナルを Wnt と Hif2a に絞り、

その作用機序を解析するために、( 2 ) で作出したマウス 5 日齢の関節より SFZ 細胞を単離し、cDNA マイクロアレイを行い、遺伝子発現プロファイルを取得し、解析を行った。さらに Hif2a は Prg4 のプロモーター活性を持つことが示されたので ChIP シーケンス解析を行った。

( 4 ) 変形性膝関節症モデルマウスを用いた治療効果の検討

( 2 ) で Wnt の種々のアゴニストと Wnt リガンドを添加して関節軟骨最表層の変化を In vitro または Ex vivo で検証した結果、Wnt シグナルを活性化する化合物 CHIR は Prg4 の発現を増強することが In vitro または Ex vivo で示され、関節軟骨最表層を保護する候補化合物として、関節軟骨最表層細胞に対する CHIR 投与濃度を最適化し、現在は CHIR をマウス OA モデル( DMM モデル: 関節軟骨最表層のみ、ダメージを与える方法と観察期間を最適化した ) に投与し、現在、組織学的解析を行っている。Hif2a シグナルに関しては、Hif2a を増強するシグナルでアゴニストとして用いられる化合物を ( 3 ) の ChIP シーケンス解析から同定する予定である。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 17 件 )

1. Oichi T, Taniguchi Y, Soma K, Chang SH, Yano F, Tanaka S, Saito T. A Mouse Intervertebral Disc Degeneration Model by Surgically-Induced Instability. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2017 Oct 9. doi: 10.1097/BRS.0000000000002427
2. Kobayashi H, Ikegami M, Ushiku T, Anraku M, Ohki T, Shinoda Y, Tanaka S, Kawano H. Secondary Chondrosarcoma Presenting with Symptoms Similar to Thoracic Outlet Syndrome. *Case Rep Orthop*. 2018 Mar 12;2018:9347145. doi: 10.1155/2018/9347145.
3. Kobayashi H, Iida T, Yamamoto T, Ikegami M, Shinoda Y, Tanaka S, Kawano H. Lymphaticovenous Anastomoses for Lymphedema Complicated by Severe Lymphorrhea Following Resection of Soft-Tissue Sarcomas of the Adductor Compartment: A Report of Two Cases. *JBJS Case Connect*. 2017 Oct-Dec;7(4):e80. doi: 10.2106/JBJS.CC.17.00078.
4. Kobayashi H, Ito N, Akiyama T, Okuma T, Kinoshita Y, Ikegami M, Shinoda Y, Fukumoto S, Tanaka S, Kawano H. Prevalence and clinical outcomes of hip fractures and subchondral insufficiency fractures of the femoral head in patients with tumour-induced osteomalacia. *Int Orthop*. 2017 Dec;41(12):2597-2603. doi: 10.1007/s00264-017-3610-3.
5. Tsuda Y, Ogura K, Kobayashi E, Hiruma T, Iwata S, Asano N, Kawai A, Chuman H, Ishii T, Morioka H, Kobayashi H, Kawano H. Impact of geriatric factors on surgical and prognostic outcomes in elderly patients with soft-tissue sarcoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2017 May 1;47(5):422-429. doi: 10.1093/jjco/hyx016.
6. Kobayashi H, Akiyama T, Okuma T, Shinoda Y, Oka H, Ito N, Fukumoto S, Tanaka S, Kawano H. Three-dimensional fluoroscopic navigation-assisted surgery for tumors in patients with tumor-induced osteomalacia in the bones. *Comput Assist Surg (Abingdon)*. 2017 Dec;22(1):14-19. doi: 10.1080/24699322.2017.1282044.
7. Huang KC, Yano F, Murahashi Y, Takano S, Kitaura Y, Chang SH, Soma K, Ueng SWN, Tanaka S, Ishihara K, Okamura Y, Moro T, Saito T. Sandwich-type PLLA-nanosheets loaded with BMP-2 induce bone regeneration in critical-sized mouse

- calvarial defects. *Acta Biomater.* 2017 Sep 1;59:12-20. \*co-first authors
8. Kawata M, Taniguchi Y, Mori D, Yano F, Ohba S, Chung UI, Shimogori T, Mills AA, Tanaka S, Saito T. Different regulation of limb development by p63 transcript variants. *PLoS One.* 2017 Mar 23;12(3):e0174122. doi: 10.1371/journal.pone.0174122. eCollection 2017 Mar 23.
  9. Kobayashi H, Chang SH, Mori D, Itoh S, Hirata M, Hosaka Y, Taniguchi Y, Okada K, Mori Y, Yano F, Chung UI, Akiyama H, Kawaguchi H, Tanaka S, Saito T. Biphasic regulation of chondrocytes by Rela through induction of anti-apoptotic and catabolic target genes. *Nat Commun.* 2016 Nov 10;7:13336. doi: 10.1038/ncomms13336.
  10. Taniguchi Y, Kawata M, Ho Chang S, Mori D, Okada K, Kobayashi H, Sugita S, Hosaka Y, Inui H, Taketomi S, Yano F, Ikeda T, Akiyama H, Mills AA, Chung UI, Tanaka S, Kawaguchi H, Saito T. p63 Regulates Chondrocyte Survival in Articular Cartilage. *Arthritis Rheumatol.* 2017 Mar;69(3):598-609. doi: 10.1002/art.39976.
  11. Chang SH, Yasui T, Taketomi S, Matsumoto T, Kim-Kaneyama JR, Omiya T, Hosaka Y, Inui H, Omata Y, Yamagami R, Mori D, Yano F, Chung UI, Tanaka S, Saito T. Comparison of mouse and human ankles and establishment of mouse ankle osteoarthritis models by surgically-induced instability. *Osteoarthritis Cartilage.* 2016 Apr;24(4):688-97. doi: 10.1016/j.joca.2015.11.008.
  12. Miyamoto H, Morizaki Y, Kashiya T, Tanaka S. Grey-scale sonography and sonoelastography for diagnosing carpal tunnel syndrome. *World J Radiol.* 2016 Mar 28;8(3):281-7. doi: 10.4329/wjr.v8.i3.281.
  13. Kodama R, Muraki S, Oka H, Iidaka T, Teraguchi M, Kagotani R, Asai Y, Yoshida M, Morizaki Y, Tanaka S, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T, Yoshimura N. Prevalence of hand osteoarthritis and its relationship to hand pain and grip strength in Japan: The third survey of the ROAD study. *Mod Rheumatol.* 2016 Sep;26(5):767-73. doi: 10.3109/14397595.2015.1130673.
  14. Saito T, Yano F, Mori D, Kawata M, Hoshi K, Takato T, Masaki H, Otsu M, Eto K, Nakauchi H, Chung UI, Tanaka S. Hyaline cartilage formation and tumorigenesis of implanted tissues derived from human induced pluripotent stem cells. *Biomed Res.* 2015;36(3):179-86. doi: 10.2220/biomedres.36.179.
  15. Kobayashi H, Shinoda Y, Ohki T, Kawano H. Intercostal neuralgia as a symptom of an osteoblastoma in thoracic spine.
  16. Saito T, Ohba S, Yano F, Seto I, Yonehara Y, Takato T, Ogasawara T. Runx1 and Runx3 Are Downstream Effectors of Nanog in Promoting Osteogenic Differentiation of the Mouse Mesenchymal Cell Line C3H10T1/2. *Cell Reprogram.* 2015 Jun;17(3):227-34. doi: 10.1089/cell.2014.0059. *BMJ Case Rep.* 2015 Jul 2;2015. pii: bcr2015210720. doi: 10.1136/bcr-2015-210720.
  17. Okuma T, Hirata M, Yano F, Mori D, Kawaguchi H, Chung UI, Tanaka S, Saito T. Regulation of mouse chondrocyte differentiation by CCAAT/enhancer-binding proteins. *Biomed Res.* 2015;36(1):21-9. doi: 10.2220/biomedres.36.21.
- [学会発表](計 9件)
1. Fumiko Yano, Taku Saito, Shinsuke Ohba, Sakae Tanaka, Ung-il Chung: Runx1

- contributes to articular cartilage maintenance through enhancement of cartilage matrix production and suppression of hypertrophic differentiation. Cold Spring Harbor Asia conference on Bone & Cartilage: From Development to Human Diseases, 2016.10.24-10.28 (The Suzhou Dushu Lake Conference Center, Suzhou, China) (査読有・ポスター発表)
2. 矢野文子、斎藤琢、大庭伸介、鄭雄一：Runx1による軟骨分化制御機構 第31回日本整形外科学会基礎学術集会 2016.10.13-14 福岡国際会議場、福岡 (シンポジウム口演)
  3. 矢野文子、斎藤琢、大庭伸介、鄭雄一：Runx1による軟骨分化制御機構 第34回日本骨代謝学会学術集会 2016.7.20-23 大阪国際会議場、大阪 (シンポジウム口演)
  4. 矢野文子、斎藤琢、大庭伸介、田中栄、鄭雄一：Runx1による軟骨分化制御機構 第2回 骨免疫学会 2016.7.6-8 ホテルモントレ沖縄スパ&リゾート、沖縄 (査読あり、ポスター発表)
  5. **Fumiko Yano**, Taku Saito, Shinsuke Ohba, Ung-il Chung: Runx1 contributes to articular cartilage maintenance through enhancement of cartilage matrix production and suppression of hypertrophic differentiation. The second Herbert Fleisch Workshop, 2016.2.28-3.1 (Novotel Brugge Centrum Brugge, Belgium) (査読有・口頭発表・ポスター発表)
  6. 矢野文子、斎藤琢、宮本健史：変形性関節症の新規治療候補薬の作用解析 東大病院先端医療開発フォーラム 2016.2.2 東京大学 伊藤国際学術研究センター 伊藤謝恩ホール、東京 (査読なし、口頭・ポスター発表)
  7. 矢野文子：軟骨再生を誘導する変形関節

症治療候補薬の in vivo モデルにおける効果～そのメカニズムの解析とターゲット分子の探索～ 第18回骨代謝研究会 2015.11.30 慶応義塾大学医学部総合医科学研究棟、東京 (口頭発表、招待口演)

8. Fumiko Yano: A novel disease-modifying osteoarthritis drug candidate targeting Runx1 LMU-Utoko Symposium 2015. 2015, 10.27-31 (Innovation Center for Biotechnology, Munich, Germany)
9. 矢野文子: Runx1による軟骨分化制御機構 第16回運動器科学研究会 2015.9.11-12 みなみホール、鹿児島 (査読あり、口頭発表)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

取得状況 (計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.u-tokyo-ortho.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 文子 (YANO, Fumiko)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：80529040

(2) 研究分担者

小林 寛 (KOBAYASHI, Hiroshi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20407951

森崎 裕 (MORIZAKI, Yutaka)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30508099