

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15551

研究課題名(和文) 軟骨特異的プローブによる関節軟骨in vivo造影と定量評価システムの確立

研究課題名(英文) Establishment of in vivo imaging and quantification of articular cartilage by using a cartilage-specific probe.

研究代表者

大橋 俊孝(Oohashi, Toshitaka)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50194262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：Ke4-TIBに加えて新規軟骨イメージングプローブ2Ke2-TIBの創出とラット変形性関節症モデルによる、in vivo造影とCT撮像による定量評価を試みたが、理想的な条件設定は完了していない。Ke4-TIBについては特許が2017年3月24日に成立した。プローブ開発と並行して、将来マウス関節軟骨変性モデルが研究へ使用されることを想定して、新規関節軟骨変性モデルの作製にとりかかった。軟骨に豊富に発現している細胞外マトリックス遺伝子(A遺伝子)のFloxマウスをRosa26-cre ERTマウスと交配させた。生後1週よりタモキシフェン投与を開始し、未投与群に比べ、低身長と関節軟骨異常を認めた。

研究成果の概要(英文)：A new X-ray imaging probe 2Ke2-TIB has been created in addition to Ke4-TIB. These probes were examined for in vivo imaging of articular cartilage by CT using rat osteoarthritic model. A new patent regarding Ke4-TIB has been established on March 24th, 2017. Since we speculate the increasing use of mouse genetic model for drug discovery research, we created a new mouse genetic model by crossing floxed "A" gene mice, encoding a proteoglycan gene abundant in the articular cartilage, with Rosa26-creERT mice. The mice exhibited a dwarfism and articular cartilage degeneration after starting injection of tamoxifen at one week of age. These developments of new imaging probes and a mouse model will contribute to the future research on osteoarthritis drug discovery. A collaboration with a group in the University of Munich has started for nano Xray CT.

研究分野：軟骨代謝学

キーワード：軟骨変性 プロテオグリカン X線 nano CT

### 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 (OA) の本邦での有病者数は約 800 万人と推定されており、人口の高齢化とともにさらに増加することが予想される。医療経済上もその早期診断法の確立、新しい治療法の開発が急務である。

関節軟骨においてはアグリカンのコアタンパク部分に結合したコンドロイチン硫酸鎖あるいはヒアルロン酸が高度に水和したゲル体を形成し、それが空間を充たすことによって軟骨組織の力学的強度を生み出している。種々のプロテアーゼで分解されアグリカンが減少すると、軟骨の力学的強度が著しく損なわれ、一層病態が進行してしまう。中でも ADAMTS-5 によるアグリカンコアタンパク質の N 末端側の IGD ドメインでの切断が最も重要とされている (Glasson et al., Nature 2005; Little et al., J Clin Invest 2007)。以上から、特に早期診断において、関節軟骨基質分解の初期症状であるプロテオグリカン分解をより鋭敏に検出する画像解析法の開発が最重要点となる。

我々は、アグリカンのグリコサミノグリカン鎖に結合性を示すペプチドを用いれば、軟骨基質を定性・定量できるのではないかと考えた。塩基性ペプチドであるオクタアルギニン (R8) ペプチドが、マウス膝関節腔内投与後 ex vivo 3D 解析により、CAIA 関節炎モデルでの結合量減少を高解像度でイメージングすることに成功した (大橋、西田 Osteoarthritis Cartilage 2009; Clinical Calcium 2011, 特許 5463013 号)。さらに、軟骨基質の ChS 鎖の構造に基づき理論的に設計された X 線 CT 用新規小分子プローブ Ke4-TIB を創出した。

### 2. 研究の目的

中小動物の関節軟骨病変の進行を鮮明に評価出来れば、変形性関節症などの関節疾患を対象とする新規治療薬開発への貢献が期待できる。既存の軟骨標識技術としては、ex vivo で使用可能な軟骨特異的 CT プローブや蛍光プローブが報告されているが、前者は画像の解像度において、後者は合成方法・分子構造において課題があった。我々は、より容易に合成が可能で、解像度の高い組織染色が可能な X 線 (ヨウ素ラベル)・蛍光バイモダルプローブを創出した (特願 2012-055511; PCT/JP2013/056974)。本研究ではラット OA モデルでの高解像度関節軟骨可視化プローブの in vivo 造影・定量評価プロトコル化を目的とする。また、将来 OA の創薬研究において、様々なマウス遺伝子変異 OA モデルの必要性が高まることが予想され、新しい OA モデルを作製する。

### 3. 研究の方法

(1) 新規関節軟骨特異的 X 線プローブの創出：既に創出していた X 線プローブ (Ke4-TIB) の実験により、プローブが軟骨認識に必要なコンドロイチン硫酸鎖の周

産期カチオン間距離も判明したことから、合成容易な新たな X 線プローブとして、トリヨードベンゼンに対しリシンダイマーを両端に有する 2Kε2-TIB の創出を行った。

(2) X 線プローブ (Ke4-TIB) による CT 撮像を行い、そのデータ解析を行った。抽出した標本から X 線画像と同一の切片を作製、SafO 染色と同様な軟骨基質減少を抽出し定量することを試みた。

(3) 初年度の関節軟骨の X 線による in vivo 造影に加え、同技術が将来の関節症モデルマウス研究へ利用されることを想定して、マウス関節軟骨変性モデルの例として、新規関節軟骨変性モデルの作製にとりかかった。軟骨に豊富に発現している細胞外マトリックス (当該 X 線プローブの検出基質でもある) 遺伝子 (ここでは A 遺伝子と呼ぶ) の Flox マウスを Rosa26creERT マウスと交配させ、A gene fl/fl; Rosa26-creERT マウスを作製した。

### 4. 研究成果

(1) 新規軟骨特異的 X 線プローブの創出：計画通りに創出ができた。Ke4-TIB より、合成の成工程数が半分で済むため、合成が容易であり、収率も良い結果となった。

(2) X 線プローブ (Ke4-TIB) による CT in vivo 撮像：ex vivo に比べて in vivo では関節腔内濃度を充分確保することが難しく、理想的な条件設定が完成していない。In vivo の関節腔内注射時において、関節腔から情報させる投与方法も今後考える。

(3) 研究期間内に、"A" gene fl/fl; Rosa26-creERT マウスを作製することができた。生後 1 週より、タモキシフェン (creERT システム活性化薬剤) を投与した。その結果、投与群では未投与群に比べて、有意に低身長と関節軟骨異常を認めた。低身長の原因は、A 遺伝子が関節軟骨に加え、成長板軟骨にも発現している影響と考えられる。タモキシフェン投与時期を変えることで、成長板への影響は低減できると予想する。即ち、投与時期の違いにより関節軟骨変性症あるいは軟骨無形成症モデルとなり得る。なお、本モデル研究はミュンヘン大学 (Aszodi 研究室) との海外共同研究により進められている。ミュンヘン大学は、高解像度 X 線 CT (Nano CT) による画像解析技術も有している。今後、in vivo イメージングと従来の病理切片解析との詳細な比較検討を行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3件)

Yoshioka Y, Ono M, Maeda A, Kilts TM, Hara ES, Khattab H, Ueda J, Aoyama E, Oohashi T, Takigawa M, Young MF, and Kuboki T. CCN4/WISP-1 positively regulates chondrogenesis by controlling TGF-b3 function.

Bone, 査読有, Vol 83, 2016, 162-170, Doi.org/10.1016/j.bone.2015.11.007

Nakahara R, Nishida K, Hashizume K, Harada R, Machida T, Horita M, Ohtsuka A, Ozaki T.

MRI of rheumatoid arthritis: comparing the outcome measures in rheumatology clinical trials (OMERACT) scoring and volume of synovitis for the assessment of biologic therapy.

Acta Med Okayama, 査読有, Vol 69(1), 2015, 29-35.

Kobayashi T, Furusawa Y, Yamada S, Akehi M, Takenaka F, Sasaki T, Akahoshi A, Hanada T, Matsuura E, Hirano H, Tai A, Kakuta H.

Positron emission tomography to elucidate pharmacokinetic differences of regioisomeric retinoid x receptor agonists.

ACS Med Chem Lett. 査読有, Vol. 6(3), 2015 334-338. doi: 10.1021/ml500511m.

〔学会発表〕(計 3件)

大橋俊孝、加来田博貴、芳谷学、山田翔也、大月孝志、廣畑聡、二宮善文、西田圭一郎

関節軟骨造影剤を用いた関節軟骨プロテオグリカンの評価

日本結合組織学会、東京、平成 27 年 5 月 15 - 16 日

大橋俊孝

関節軟骨特異的イメージングプローブ  
平成 27 年度 第 3 4 回 バイオ技術シーズ公開会、大阪、平成 27 年 9 月 28 日

大月孝志、吉田浩之、品岡 玲、熊岸品岡香苗、チレッキ メフメットゼイネル、ハティポール オメルファルク、稲垣純子、西田圭一郎、岡田保典、廣畑 聡

HYBID (HYaluronan-Binding protein Involved in hyaluronan Depolymerization) 遺伝子の炎症性サイトカインによる発現機構解析 日本軟骨代謝学会 京都 2017 年 3 月 3 - 4 日

〔図書〕(計 1件)

西田圭一郎、大橋俊孝、関節軟骨のイメージング、第 2 章 基礎, 最新医学別冊 診断と治療の ABC. 変形性関節症. 2017, 58-63.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.okayama-u-mbb.jp/>

日本軟骨代謝学会理事就任

2017 年 3 月

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋 俊孝 (OOHASHI, Toshitaka)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 5 0 1 9 4 2 6 2

(2) 研究分担者

西田圭一郎 (NISHIDA Keiichiro)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 8 0 2 8 4 0 5 8

加来田 博貴 (KAKUTA Hiroki)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 8 0 3 6 2 9 6 1

(3) 連携研究者

廣畑 聡 (HIROHATA Satoshi)

岡山大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号: 9 0 3 3 2 7 9 1

大月孝志 (OHTSUKI Takakashi)  
岡山大学・大学院保健学研究科・客員研究員  
研究者番号：10534802

(4)研究協力者  
アゾーディ アティラ (ASZDI Attila)  
ミュンヘン大学・外科学再生医療部門・教授