

令和元年6月22日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01924

研究課題名(和文) ミトコンドリア活性増進という観点からの変形性関節症治療と分子的基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular analysis of the mitochondrial proteins as a potential therapeutic target for the treatment of osteoarthritis

研究代表者

下畑 宣行 (Shimohata, Nobuyuki)

立命館大学・生命科学部・講師

研究者番号：30419709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：低分子化合物TD-198946 (TD) は軟骨分化を促進する変形性関節症治療薬の有効な候補である。我々は、TDの標的としてミトコンドリアタンパク質M1及びM2を同定した。我々は、TDがM1及びM2を介して軟骨分化を促進することを考え、以下の研究を行った。TDは、M1の発現量及び細胞内量を増加させることを確認した。これらは、軟骨分化の進行に伴うものであることが示唆された。更に、TDによってMAPK経路が促進することが分かり、またM1はMAPKの活性を抑制的に制御する一方で、M2はその活性を抑制的に調節することも分かった。またこれらの骨軟骨促進因子を搭載する顆粒状微小人工骨の改良も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性膝関節症の治療に関しては現在まで対症療法のみであり、我々がTDを利用することで実現を目指しているような、本質的な治療法(関節軟骨の変性予防や修復・再生)は存在していなかった。また、これらのミトコンドリアタンパク質と変形性関節症治療を結びつけた研究は今までに無く、二重三重の意味で独創的だと考えている。

変形性膝関節症は高齢者の生活の質を低下させるロコモティブシンドロームの中でも最も重大な運動器変性疾患であり、画期的な原因治療薬の開発に繋げることができれば、痛みを苦しむ世界中の患者にとって大きな利益となるのは勿論のこと、国内の医療・製薬業界への波及効果も計り知れないと考えている。

研究成果の概要(英文)：Osteoarthritis (OA) is marked by loss of hyaline in the articular cartilage through stress-related injury, inflammation, or a genetic defect. However, the exact pathogenesis of OA is still not elucidated. Additionally, generally OA treatments provide only symptomatic relief. We found that TD-198946 (TD) strongly induced chondrogenic differentiation of progenitors without chondrocyte hypertrophy, which is also observed in OA. We previously identified M1 and M2, the mitochondrial proteins, as the candidates of TD target. In this research, we found that TD treatment facilitated the expression and cellular amount of M1, suggesting that the M1 expression was induced, along with the chondrogenic differentiation. We also discovered that TD promoted MAPK phosphorylation and M1 suppressed MAPK phosphorylation while M2 accelerated it. Finally, we improved the synthetic bone filler with regard to the efficient release of chondro-osoteogenic inducers.

研究分野：生物分子化学

キーワード：骨軟骨 微小人工骨 再生治療 ミトコンドリア

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は四肢や脊椎の関節軟骨が変性・摩耗する疾患で、失われた軟骨は二度と再生されることはない(図1)。変形性関節症は、全ての関節部で生じる可能性があるが、特に膝にその主病変をもつ変形性膝関節症は、肥満や運動不足などの生活習慣自身がリスクファクターに挙げられるため、生活習慣病の一つとされる。また、特に年齢との関連が強く示唆される疾患でもあり、高齢者になるにつれて発症リスクが高まることが知られている。変形性膝関節症に罹患した患者の Quality of Life (QOL) は大きく損なわれるためその治療は重要な課題であるが、現状では対症療法が主体であり、軟骨組織再生を誘導する根本的な治療法は開発されていない。

我々の研究グループは、関節軟骨組織を保護し再生させる低分子化合物 TD-198946 (図2A, TD) を同定し、TD が軟骨分化を促進し軟骨基質を合成するが(図2B)、肥大分化(変形性膝関節症の発生に關与)を促進しないという性質を有することを見出した(Ann Rheum Dis, 72:748-753, 2013)。TD は変形性膝関節症の治療薬として最適な特性を有していることになる。我々は、プロテオミクス解析とナノ磁性ビーズとを併用した研究によって、TD の標的タンパク質の同定を試みた。TD を結合したナノ磁性ビーズと間葉系幹細胞由来のタンパク質溶液を反応させた後、TD に結合したタンパク質を溶出して単離し、SDS-PAGE を行った結果、TD を結合したビーズを用いたときのみ特異的に見られるバンドがあることが分かった。LC-MS/MS によってそのバンドを解析したところ、TD 標的タンパク質候補として M1 及び M2 を同定した。M1 及び M2 は、ミトコンドリア内膜に局在しており、ミトコンドリアの形態・機能維持に重要な働きをしており、これらの作用が TD の軟骨分化促進に關与していることが示唆された。

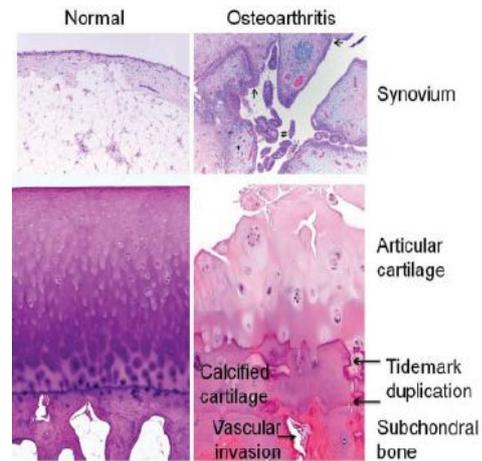


図1 変形性膝関節症患者の関節組織

(Arthritis Rheum, 64:16977-1707, 2012)

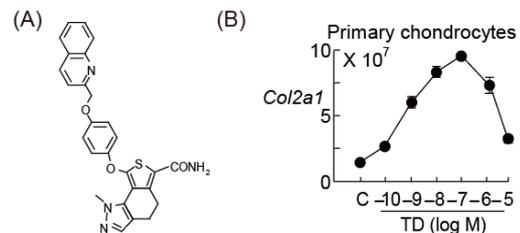


図2 TD-198946 の構造式 (A)と軟骨分化マーカー発現の促進効果 (B)

(Ann Rheum Dis, 72:748-753, 2013)

## 2. 研究の目的

本研究においては、TD とミトコンドリアタンパク質 M1 及び M2 の機能の関連を解析し、軟骨分化における新規シグナル経路の解明を目的とする。また、M1 及び M2 に結合する他の低分子化合物が軟骨分化促進活性を有するのかどうかについても調べ、より効果の高い変形性関節症治療薬の開発に繋がる知見を得ることを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) 軟骨分化に伴う M1 及び M2 の細胞内量及び遺伝子発現量の変化

#### TD 処理に伴う M1 の発現量・細胞内量変化の解析

間葉系幹細胞株 (C3H10T1/2) を TD で処理し、qRT-PCR (TaqMan 法) によって M1 及び M2 の発現量を定量的に測定した。更に、TD 処理後のタンパク質抽出液を採取して、SDS-PAGE と Western Blotting (WB) を行い、M1 及び M2 の細胞内量を調べた。

#### 軟骨細胞系列における M1 の発現量・細胞内量の解析

軟骨前駆細胞株 (ATDC5) に関しても、qRT-PCR 及び WB を実施し、M1 及び M2 の発現量、細胞内量を測定した。

### (2) M1 及び M2 の関与する細胞内シグナル経路の解析

#### 経時的な TD 処理による MAPK 経路の活性化の解析

TD で経時的に処理した C3H10T1/2 に関して、MAPK 経路のリン酸化状態を、抗リン酸化抗体を用いた WB によって解析した。

#### M1 及び M2 安定発現株における MAPK 経路の活性化の解析

M1 もしくは M2 を安定に発現する細胞株を構築し(Flip-In-293 細胞株)、M1 及び M2 の過剰発現が MAPK 経路の活性化にどのように關与するかを、抗リン酸化抗体を用いた WB によ

て解析した。

### (3) M1 及び M2 に結合する低分子化合物が軟骨分化に及ぼす影響

M1 及び M2 に結合することが知られている低分子化合物 AF、CA、RC に関して、軟骨分化活性を有するのかを Toluidine Blue 染色 (TB 染色) もしくは qRT-PCR による軟骨分化マーカー (col2a1) の発現量によって評価した。さらに、軟骨分化活性だけでなくこれらの低分子化合物が、骨分化活性を有するのか骨芽細胞株 (MC3T3E1) を用いて、Alkaline Phosphatase 染色 (ALP 染色) もしくは qRT-PCR による軟骨分化マーカー (alp, bglap) の発現量によって評価した。

### (4) 骨軟骨分化因子を搭載する微小人工骨の改良

我々のグループが開発したテトラポッド型微小人工骨 (Tetrabone, TB) は従来の顆粒状人工骨に対して優れた力学的特性と血管侵入性を有する (Acta Biomater, 8:2340-7, 2012)。TB に対して、Trehalose をコーティングすることで、骨軟骨分化促進因子の徐放性が向上するかを、recombinant human BMP-2 (rhBMP-2) を併用し、その骨分化活性を指標に調べた。

## 4. 研究成果

### (1) 軟骨分化に伴う M1 及び M2 の細胞内量及び遺伝子発現量の変化

#### TD 処理に伴う M1 の発現量・細胞内量変化の解析

TD が M1 および M2 の細胞内量に対してどのような調節を果たしているのかを解析した。C3H10T1/2 に対して TD 処理を行い、その後 qRT-PCR 法によって M1 および M2 の発現量について解析を実施したところ、TD の濃度依存的に M1 の発現量が上昇していることが確認された。一方、M2 においてはその傾向は見られなかった。

次に、C3H10T1/2 に TD を添加した後に 7 日間培養し、M1 および M2 の細胞内量の変動について解析を行った。その結果、TD 処理 4 日目において M1 の細胞内量の増加が確認される一方、M2 の細胞内量には大きな変動は見られなかった。これらの結果から、TD は M1 の発現および M1 の細胞内量の増加に寄与していることが考えられた。

#### 軟骨細胞系列における M1 の発現量・細胞内量の解析

軟骨の分化状態と M1 および M2 との関連性について調べた。C3H10T1/2 および ATDC5 について qRT-PCR を実施し、M1 および M2 の発現量について解析を行った。その結果、C3H10T1/2 と比較して、ATDC5 においては M1 の発現量は 3 倍に上昇していることが分かった。M2 の発現量に関しては両者の細胞株の間に大きな差は見られなかった。転写因子 Runx1 は TD 処理によって発現が上昇し、軟骨分化を進行させる効果を有する (Ann Rhum Dis, 72:748-753, 2013)。M1 のプロモーター上流配列には Runx family の共通モチーフや Runx1 複合体の認識配列が存在しており、Runx1 が phb1 の発現を制御している可能性が考えられる。従って、M1 の発現は軟骨分化の進行に伴って促進すると考えられる。

次に、C3H10T1/2 および ATDC5 について WB を行い、M1 および M2 の細胞内量について解析を行った結果、C3H10T1/2 と比較して ATDC5 においては、M1 の細胞内量は約 3.5 倍であり、M2 に関しては細胞内量に大きな差は見られないことが分かった。軟骨分化の状態が進むにつれて M1 の発現量および M1 の細胞内量が増加することが示唆され、これらの M1 の働きによるミトコンドリア活性の変化が軟骨分化に関与していることが考えられた。

### (2) M1 及び M2 の関与する細胞内シグナル経路の解析

#### 経時的な TD 処理による MAPK 経路の活性化の解析

MAPKs は、細胞増殖シグナルや、様々な環境ストレスや炎症性サイトカインによって活性化されることが知られており、さらに骨軟骨分化にも重要な働きを担っていることが分かっている (Cell Signal, 26:979-1000, 2014)。TD の持つ軟骨分化促進機能と MAPK 経路の活性化との関連性について確認した。C3H10T1/2 に TD を処理し、MAPK のリン酸化量の変化について解析を行ったところ、TD 処理によって MAPK のリン酸化量が顕著に増加することが確認された。この結果により、TD は MAPK のリン酸化に対して促進的に作用していることが示唆された。TD は、MAPK のリン酸化を促進することで、MAPK の持つ軟骨分化を正に調節する働きをしていることが考えられた。

#### M1 及び M2 安定発現株における MAPK 経路の活性化の解析

TD の標的因子である M1 及び M2 と、MAPK のリン酸化活性との関連について調べた。M1 単体での MAPK への効果について調べるために、M1 安定発現株に TD 処理した後、M1 を過剰発現させ MAPK のリン酸化量の変化について解析を行った。TD 未処理の M1 安定発現株において、M1 の細胞内量が増加するにつれて p38 のリン酸化量が減少することが確認された。TD 未処理の M1 安定発現株と TD 処理を行った M1 安定発現株を比較すると、TD 処理によって、MAPK のリン酸化量が増加していることも確認された。これらの結果から考えると、M1 単体の働きとして MAPK のリン酸化を抑制していることが示唆された。

M1 と同様の手法を用いて、M2 が単独で有する MAPK 経路への効果について調べた。M2 安定発現株において、TD 処理後過剰発現を行った。MAPK のリン酸化の変動について解析を行ったところ、TD 未処理の M2 安定発現株において、MAPK のリン酸化量の顕著な増加が確認された。TD 未処理と TD 処理を行った場合とを比較すると、TD 処理によって、MAPK のリン酸化量の急激な上昇が抑制されたことが確認できた。以上の結果より、M2 は MAPK のリン酸化を昂進する働きを持つと考えられる。TD によって M2 の過剰発現が抑制され、その結果 MAPK のリン酸化の急激な増加の抑制が生じたと考えられる。

### (3) M1 及び M2 に結合する低分子化合物が軟骨分化に及ぼす影響

M1 及び M2 には既知のリガンドが多数存在しており (AF, CA, RC, AD など)、それらの低分子化合物は M1 及び M2 を介してミトコンドリア活性を含めた様々な細胞機能を変動させることが知られている (Chem & Biol, 20: 316-331, 2013)。

AF で C3H10T1/2 を処理したところ、軟骨分化マーカー (col2a1) の発現及び軟骨基質産生の昂進 (TB 染色) が確認された (図 3)。さらに、MC3T3E1 に AF4 を添加したところ、TD とは異なり骨分化マーカー (alp, bglap) の発現上昇及び酵素活性の昂進が確認された。この骨芽細胞分化は、BMP シグナル阻害剤である Noggin によって抑制されることから、通常 BMP シグナル経路に依存的な形であることが分かった。また、RC、CA には骨軟骨分化促進効果は無いことが確認された。

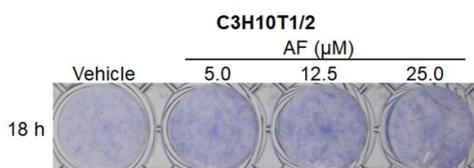


図 3 AF の軟骨分化促進効果解析 (TB 染色)

AF は、濃度依存的な M1 の細胞内量の減少と MAPK のリン酸化昂進を誘導することも分かり、TD と同様に MAPK を介して骨軟骨分化を促進する可能性が考えられた。

### (4) 骨軟骨分化因子を搭載する微小人工骨の改良

trehalose を表面にコーティングした TB に対して rhBMP-2 で処理を行い、rhBMP-2 をロードした TB を実験に用いた。

Trehalose をコートした TB は、そうでないものに比較して有意な骨分化活性促進効果を有することが分かった。即ち、Trehalose をコーティングすることで TB に効率の良い徐放性が備わったと考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 8 件)

1. 渡邊優雅子、五十嵐遼、矢野文子、鄭雄一、早野俊哉、**下畑宣行** 軟骨分化を促進する TD-198946 の分化制御機構の解析 第41回日本分子生物学会年会 2018年
2. 内川紗織、山谷美沙希、**下畑宣行** セラミド類似ポリマーによる抗炎症効果の解析 第41回日本分子生物学会年会 2018年
3. **下畑宣行**、渡邊優雅子、倉田蓮太郎、五十嵐遼 骨軟骨分化促進効果を有する低分子化合物の効果解析 第91回日本生化学大会 2018年
4. 渡邊優雅子、五十嵐遼、矢野文子、鄭雄一、早野俊哉、**下畑宣行** 軟骨細胞の分化過程におけるミトコンドリアタンパク質の機能解析 2017年度生命科学系合同年次大会 (ConBio2017) 2017年
5. 渡邊優雅子、久保菌祐美、矢野文子、鄭雄一、早野俊哉、**下畑宣行** 軟骨再生を誘導する新規DMOAD候補の分子機序の解析 第64回日本生化学会近畿支部例会 2017年
6. 五十嵐遼、鈴木優衣、田中悠稀、久保菌祐美、**下畑宣行**、矢野文子、鄭雄一、早野俊哉 TD-198946 の軟骨分化促進効果に関連した網羅的相互作用タンパク質解析 第39回日本分子生物学会 2016年
7. **下畑宣行**、五十嵐遼、阿部俊之、矢野文子、鄭雄一、早野俊哉 変形性関節症治療薬候補 TD-198946 の有する軟骨分化促進効果の解析 第89回日本生化学大会 2016年
8. **下畑宣行** 骨軟骨疾患の新たな治療戦略 -TD-198946 の分子機序の解析 第4回生命科学コロキウム 2016年

〔その他〕

研究室ホームページ

<http://www.ritsumei.ac.jp/lifescience/bm/biomedicalcompounds/>