

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11009

研究課題名(和文) ドラッグ・リポジショニングによる変形性関節症の新規治療薬開発

研究課題名(英文) Development of new therapeutic drug for osteoarthritis by drug repositioning

研究代表者

ハティポール オメル・ファルク (HATIPOGLU, OMER FARUK)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・非常勤研究員

研究者番号：90791765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では変形性関節症に重要なECM分解酵素に着目し、ECM分解酵素の合成を抑制することで軟骨基質の破壊を抑制できる化合物を探索しようと考えた。理化学研究所が提供している400種類のパイロットライブラリーをスクリーニングし、ECM分解酵素の発現抑制効果を検討した結果、化合物Xは、炎症性サイトカインであるIL-1による炎症で惹起された、MMP3・MMP13・ADAMTS4・ADAMTS9という4種類の細胞外マトリックス分解酵素のmRNA発現を有意に抑制した。また炎症を促進する役割を持つ酵素COX2の発現もまた有意に抑制し、化合物XはOAの治療に有効である可能性があると考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性関節症(OA)は過度の力学的ストレスや加齢変化によって、関節破壊が生じる慢性炎症性疾患である。軟骨が消失することで疼痛や可動域制限等が生じ、患者の生活の質を著しく低下させるため、社会的にも重要な課題である。しかし、有力な治療法に乏しく、痛み止めなどの対症療法にとどまっている。今本研究では400の化合物ライブラリーをOUMS-27(軟骨肉腫)に添加し、細胞外基質分解酵素のMMP-13及びADAMTS4,9, COX-2のmRNA発現量をリアルタイム定量PCR法及びwestern blot法にて検討した。スクリーニング検索を行った結果、有力な候補化合物を3つ決定した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the ECM-degrading enzymes that are important for osteoarthritis, and sought to find compounds that can inhibit the destruction of cartilage matrix by inhibiting the synthesis of ECM-degrading enzymes. We screened 400 kinds of pilot libraries provided by RIKEN. Results of examining the effect of suppressing the expression of ECM-degrading enzymes compound X significantly suppressed the mRNA expression of four extracellular matrix degrading enzymes such as MMP3, MMP13, ADAMTS4, and ADAMTS9, which were induced by inflammation caused by the inflammatory cytokine IL-1. It also significantly suppressed the expression of the enzyme COX2, which has a role in promoting inflammation. It was considered that compound X may be effective in treating OA.

研究分野：病態医化学

キーワード：変形性関節症 ドラッグ・リポジショニング 細胞外基質分解酵素

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 (osteoarthritis:OA) は過度の力学的ストレスや加齢変化によって、関節破壊が生じる慢性炎症性疾患である。軟骨が消失することで疼痛や可動域制限等が生じ、患者の生活の質を著しく低下させるため、社会的にも重要な課題である。しかし、有力な治療法に乏しく、痛み止めなどの対症療法にとどまっている。

関節軟骨は主に軟骨細胞と細胞外基質 (extracellular matrix: ECM) から構成されており、ECM は主にコラーゲン・アグリカンなどから成る。関節に炎症が生じると、軟骨細胞は ADAMTS4 や ADAMTS9, MMP13 といった ECM 分解酵素を産生する。これらの分解酵素により軟骨基質が切断され、損傷を受けることが OA の発症につながると考えられている。

そこで本研究では ECM 分解酵素に着目し、ECM 分解酵素の合成を抑制することで軟骨基質の破壊を抑制できる化合物を探索しようと考えた。理化学研究所が提供している 400 種類のパイロットライブラリーをスクリーニングし、ADAMTS4 や ADAMTS9, MMP13, MMP3, Cyclooxygenase 2 (COX2) の発現抑制効果を検討した。

先行研究では、ECM 分解酵素の発現に対して抑制効果があるものを検討した。軟骨様細胞である OUMS-27 を IL-1 で刺激すると ADAMTS9 mRNA や MMP13 mRNA が一過性に発現誘導することが知られている。この IL-1 による mRNA 発現誘導に対して抑制効果が見られた化合物のうち、最も有力な候補としてパイロットライブラリー新規化合物、化合物 X が挙げられた。

OA において IL-1 刺激を行うと ECM 分解酵素の発現が増加するシグナル伝達経路の 1 つに MAPK シグナル伝達経路がある。本研究では化合物 X による ECM 分解酵素の発現抑制メカニズムを解明することを目的として、MAPK である ERK1/2, p38, JNK の、IL-1 によるリン酸化、また、化合物 X 処理によるリン酸化抑制効果について検討した。

### 2. 研究の目的

現在他疾患に用いられている薬剤が変形性関節症 (OA) の治療に利用できるという「ドラッグ・リポジショニング」という概念がある。申請者は、他疾患に使われているある薬剤 A が細胞外マトリックス代謝を抑制する分子 X の発現を抑制するデータを得たことから、ドラッグ・リポジショニングの概念に基づいた新治療法の可能性に注目した。すなわち、本研究の目的は既存の薬剤による OA の新たな治療法を発見することである。既に日常診療で用いられている薬剤で OA に対して新たな有効な効果を持つ薬剤を見つけ出せれば、医療費の高騰を招くことなく患者に恩恵をもたらすことができる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞及び培養方法

ヒト軟骨用細胞株である OUMS-27 を使用した。OUMS-27 は 10%Fetal bovine serum 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium (富士フィルム和光純薬株式会社) にて、37℃, 5%CO<sub>2</sub> 条件下のインキュベータで培養した。

#### (2) 化合物の細胞毒性評価

OUMS-27 を 96well プレート (Thermo Fisher Scientific) に播種し ( $5.0 \times 10^3$  細胞/well), 2 日間培養し定着させた。その後一晩 (16 時間) starvation (0%FBS DMEM) を行い、各化合物を培養液に添加した (10 µg/ml : 24 時間)。プロトコル通りに調整した MTS assay 試薬を添加し、4 時間インキュベートした後、490nm で吸光度を測定した。MTS assay 試薬には CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) を使用した。

#### (3) リアルタイム定量 PCR

##### 化合物の添加と IL-1 刺激

OUMS-27 を 12well プレート (VIOLAMO 社) に播種 ( $5.0 \times 10^4$  細胞/well) し、3 日間培養した。その後化合物 X を添加 (10 µg/ml (28.4 µM)) し、24 時間後に IL-1 刺激 (5.0 ng/mL) を行い、6 時間後に細胞を回収した。IL-1 は R&D systems 社のものを使用した。

##### RNA 抽出及び逆転写反応

TRI Reagent® (コスモ・バイオ株式会社) によって RNA を抽出し、Eppendorf BioPhotometer D30 (Eppendorf 社) によって RNA を定量化した。その後、ReverTra Ace® (TOYOBO 社) を使用し逆転

写反応を行い cDNA に合成した。

#### リアルタイム定量 PCR

StepOnePlus™Real-Time PCR System Upgrade (Thermo Fisher Scientific 社)を使用しリアルタイム定量 PCR を行った。95℃, 20 秒の後, 95℃, 1 秒と 60℃, 20 秒を 40 サイクルの反応条件で行った。TaqMan™ Fast Advanced Master Mix(Applied Biosystems 社)とそれぞれの probe(MMP13, Hs00233992\_m1; ADAMTS4, Hs00192708\_m1; ADAMTS9, Hs00172025\_m1; COX2, Hs00153133\_m1; GAPDH, Hs99999905\_m1)(Applied Biosystems 社)を使用し, MMP13, ADAMTS4, ADAMTS9, COX2 の mRNA 発現レベルをそれぞれ検討した。

#### (4) ウエスタンブロッティング

##### 化合物の添加と IL-1 刺激

OUMS-27 を 6well プレート(VIOLAMO 社)に播種( $1.0 \times 10^5$ 細胞/well)し, 3 日間培養した。その後条件に応じて薬剤添加や IL-1 刺激(5.0ng/mL)を行った。IL-1 刺激時間検討においては IL-1 刺激(5.0ng/ml)をそれぞれ 0 分, 20 分, 30 分を行い細胞を回収した。化合物 X の効果検討においては化合物 X を添加(10 µg/ml (28.4 µM))し, 24 時間後に IL-1 刺激(5.0ng/ml)を行い 20 分後に細胞を回収した。濃度依存性の検討においては化合物 X をそれぞれ 1 µg/ml (2.84 µM), 2 µg/ml (5.68 µM), 5 µg/ml (14.2 µM), 10 µg/ml (28.4 µM) 添加し, 24 時間後に IL-1 刺激(5.0ng/ml)を行い 20 分後に細胞を回収した。

##### タンパク質抽出

培地を TBS で洗浄し Lysis buffer を添加(300ml/well)した。氷上で約 60 分振盪した後, 細胞を回収した。BIO-RAD 測定キットを用いてタンパク質濃度測定を行った。

##### ポリアクリルアミドゲル電気泳動とウエスタンブロッティング解析

タンパク質量を等量に調節した細胞溶解液, 2-mercaptoethanol, 4× Sample buffer を混合し, 100℃で 5 分間加熱後, 遠心(15000rpm, 5 分, 4℃)した。10%SDS-PAGE ゲルを用いてポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行った(20 V 20 分後, 40V 50 分)。泳動後に PVDF メンブレン(Merck 社)にトランスファーを行い(4℃, 30V, overnight(0/N)), メンブレンをブロッキング液(5%スキムミルク/TBS-T, 室温 1.5 時間)と反応させた後, 一次抗体(1/1000 希釈 室温 1.5 時間, Cell Signaling TECHNOLOGY 社 Sigma Aldrich 社)と反応させた。TBS-T(10 分 3 回)で洗浄後, 二次抗体(1/5000 希釈 室温 1.5 時間, sera care 社 Sigma Aldrich 社)を反応させ, TBS-T(10 分 3 回)で洗浄後, 化学発光(Amersham Imager 600, GE Healthcare Life Sciences 社)にて解析を行った。各シグナルの活性化は, 当該タンパク質発現量におけるリン酸化タンパク質の割合をデンストメーターで測定して, 定量化した。一次抗体として抗  $\beta$ -Actin マウスモノクローナル抗体 (SIGMA-ALDRICH 社), 抗 ERK1/2 ウサギモノクローナル抗体 (Cell Signaling TECHNOLOGY 社), 抗リン酸化 ERK1/2 ウサギモノクローナル抗体 (Cell Signaling TECHNOLOGY 社), 抗 p38 ウサギモノクローナル抗体 (Cell Signaling TECHNOLOGY 社), 抗リン酸化 p38 ウサギモノクローナル抗体 (Cell Signaling TECHNOLOGY 社), 抗 JNK ウサギモノクローナル抗体 (Cell Signaling TECHNOLOGY 社), 抗リン酸化 JNK ウサギモノクローナル抗体 (Cell Signaling TECHNOLOGY 社)を使用した。二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗マウス IgG(H+L)抗体 (Sigma Aldrich 社), ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG(H+L)抗体 (sera care 社)を使用した。

統計解析は平均値  $\pm$  標準誤差(mean  $\pm$  SEM)で標記し, unpaired student t-test にて  $p < 0.05$  を有意差ありとした。Real-time 定量 PCR は  $n=6$ , ウエスタンブロッティングは  $n=3$  で行った。

## 4. 研究成果

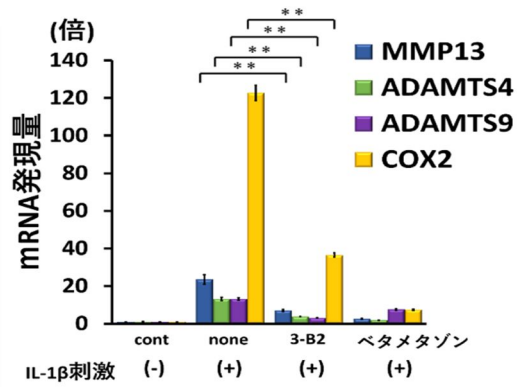
### (1) 細胞毒性定量及び生存の評価

OUMS-27 を用いて 400 種類のパイロットライブラリーについて, MTS assay を用いて細胞毒性を評価した。化合物を加えていないコントロールを 1 とし, 細胞の生存率が 8 割以下になった化合物は, 細胞毒性が強いと判断した。以下, 強い細胞毒性の認められなかった 345 種類の化合物について, 各細胞外マトリックス分解酵素の発現抑制効果を検討した。

(2) リアルタイム定量 PCR

化合物 X の投与によって MMP13, ADAMTS4, ADAMTS9, COX2 のすべてにおいて mRNA の発現が有意に抑制されることが確認された。

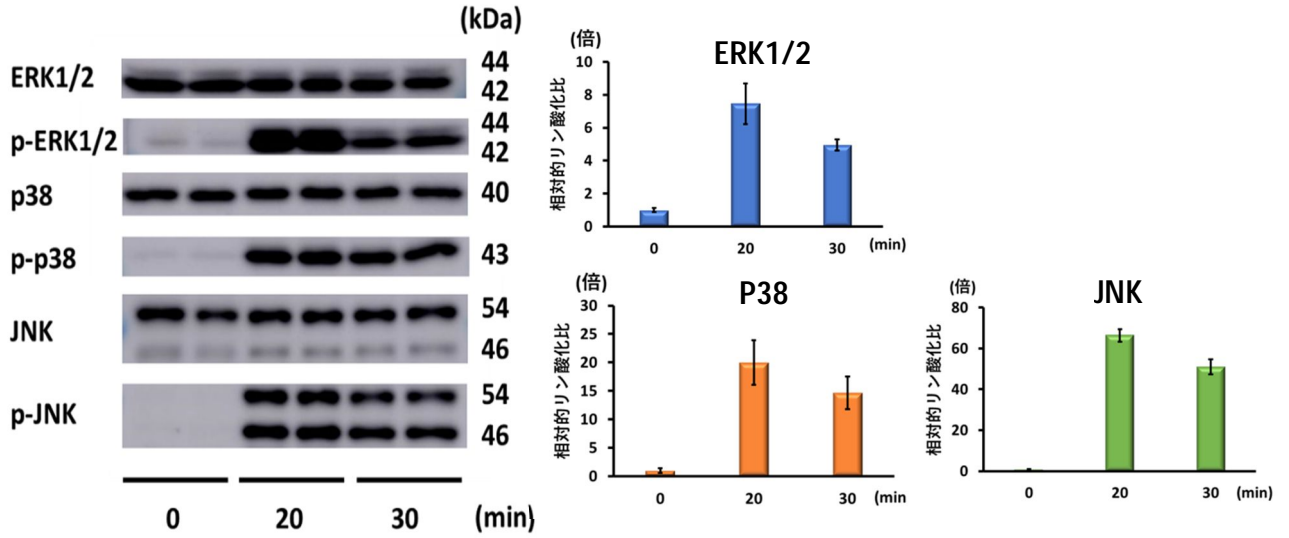
図 1 mRNA 発現抑制効果



(3) ウェスタンブロッティング

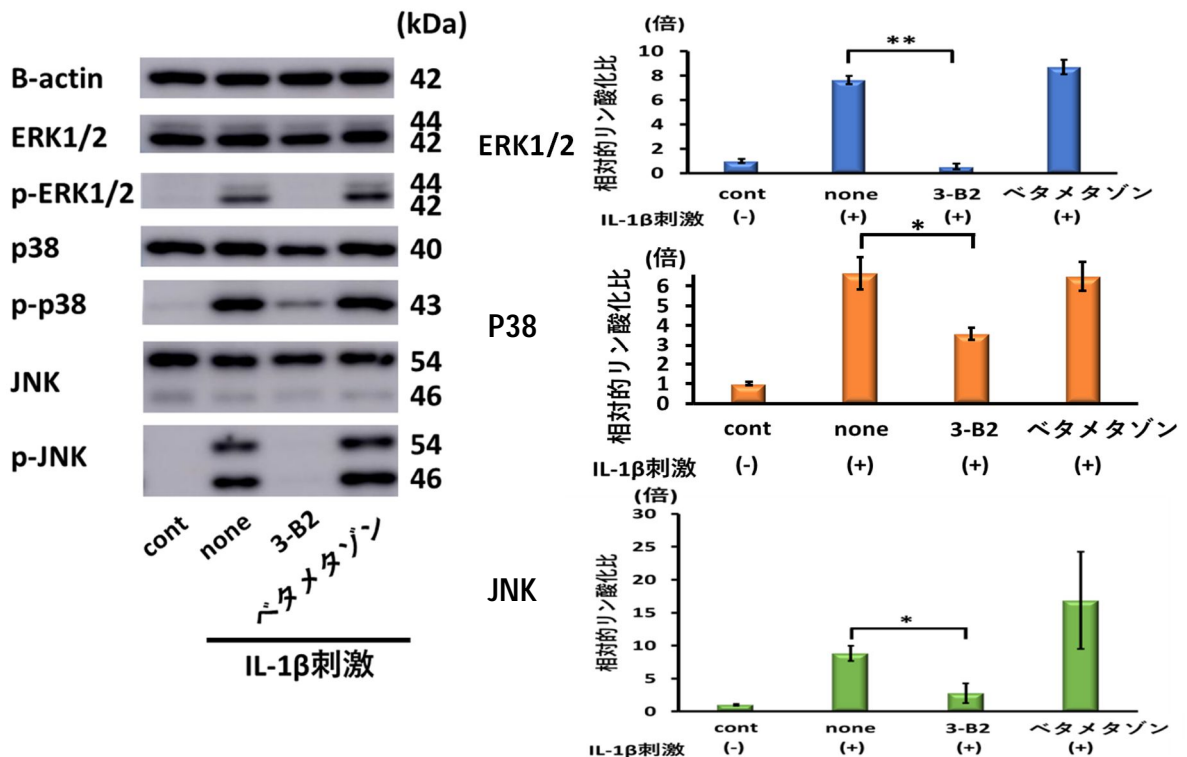
IL-1 刺激時間検討

ERK1/2, p38, JNK が IL-1 刺激に反応し、刺激後 20 分でリン酸化はピークを迎えた。一過性にリン酸化が促進され、各シグナルの活性化が起こることが明らかとなった。



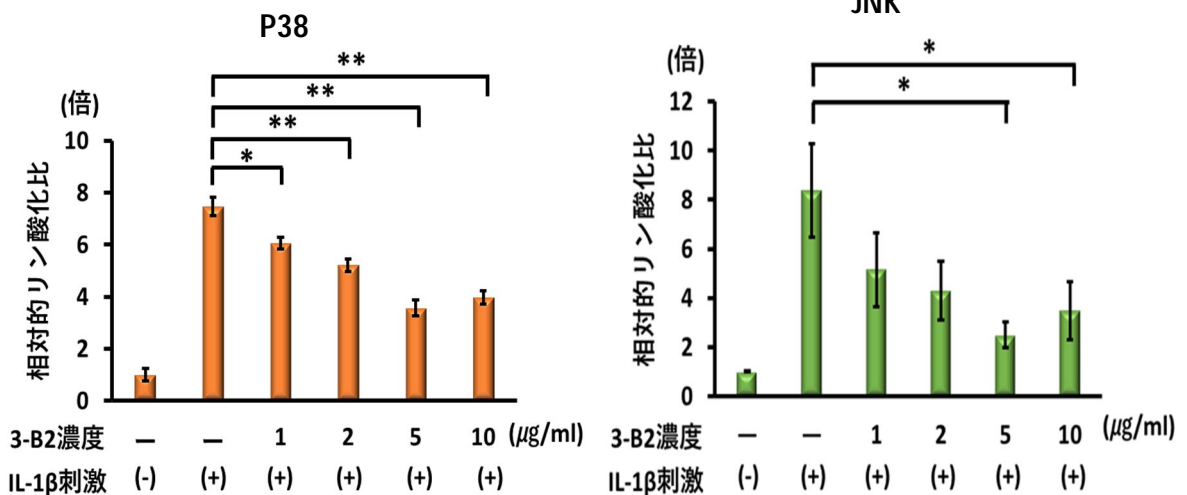
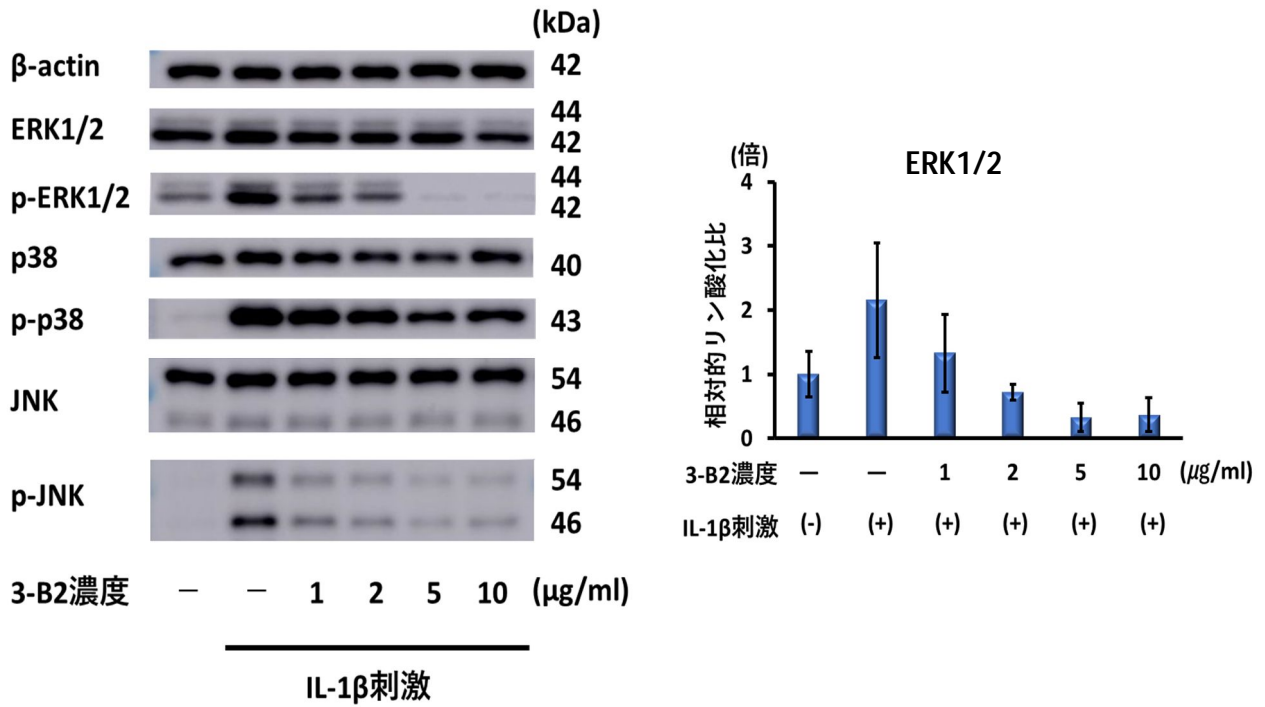
化合物 X の効果検討

IL-1 刺激による各シグナルのリン酸化は化合物 X 投与によって抑制された。一方で、化合物 X と同様に ADAMTS4 や ADAMTS9, MMP13 などの ECM 分解酵素発現誘導を抑制するベタメタゾンはこれらのシグナル活性化に対する効果は見られなかった。



### 濃度依存性の検討

IL-1 刺激による各シグナルのリン酸化促進は化合物 X 投与によって濃度依存的に抑制された。



### 考察

化合物 X によって ERK1/2, p38, JNK のリン酸化が抑制されていたことから, 化合物 X は MAPK シグナル伝達経路の MAPK, またはその上流の受容体やキナーゼに作用し, NF- $\kappa$ B などの下流のシグナル伝達を抑制することで ECM 分解酵素の発現を抑制していると考えられる。一方で, 副腎皮質ステロイドホルモンであるベタメタゾンとは異なる機序で同じ ECM 分解酵素抑制作用を持つと考えられることから, これら 2 つの薬剤は併用した際には相加的な効果を持つことが期待される。

今後は, 今回検討した ERK1/2, p38, JNK の上流や下流のシグナル伝達経路についてもさらに検討し, 作用機序の解明につなげたいと考えている。最終的に OA 治療薬として臨床応用を目指すためには, 動物などを用いた生体でも化合物 X が同様に作用するかを明らかにする必要がある。そのためには, ラット手術 OA モデルに対して化合物 X を投与する実験などを行い, 関節破壊に対する効果を確認する必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ohtsuki T, Asano K, Inagaki J, Shinaoka A, Kumagishi-Shinaoka K, Cilek MZ, Hatipoglu OF, Oohashi T, Nishida K, Komatsubara I, Hirohata S.	4. 巻 36
2. 論文標題 High molecular weight hyaluronan protects cartilage from degradation by inhibiting aggrecanase expression.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Orthop Res	6. 最初と最後の頁 3247-3255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jor.24126.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Asano K, Edamatsu M, Hatipoglu OF, Inagaki J, Ono M, Ohtsuki T, Oohashi T, Hirohata S.	4. 巻 72(3)
2. 論文標題 Host-produced ADAMTS4 Inhibits Early-Stage Tumor Growth.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Med Okayama.	6. 最初と最後の頁 257-266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18926/AMO/56071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Bender Onur, Gunduz Mehmet, Cigdem Sadik, Hatipoglu Omer Faruk, Acar Muradiye, Kaya Mesut, Grenman Reidar, Gunduz Esra, Ugur Kadriye Serife	4. 巻 47
2. 論文標題 Functional analysis of ESM1 by siRNA knockdown in primary and metastatic head and neck cancer cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Oral Pathology & Medicine	6. 最初と最後の頁 40~47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/jop.12648	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yaykasli KO, Hatipoglu OF, Yaykasli E, Kaya E, Ozsahin M, Uslu M.	4. 巻 118
2. 論文標題 Dose-dependent effects of adiponectin on ADAMTS-9 gene expression in human chondrocytes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bratislava Medical Journal	6. 最初と最後の頁 386~390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4149/BLL_2017_075	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Omer Faruk Hatipoglu, Eyyup Uctepe, Kentaro Ikemura, Esra Gunduz, Mehmet Gunduz, Muradiye Acar, Takumi Nishimura, Miho Tachiki, Takashi Ohtsuki, Satoshi Hirohata
2. 発表標題 MoleculEx siRNA attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis
3. 学会等名 51st Japan Society for Matrix Biology and Medicine
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuto Nishimura, Miho Tachiki, Kentaro Ikemura, Junko Inagaki, Takashi Ohtsuki, Omer Faruk Hatipoglu, Shogo Watanabe, Satoshi Hirohata
2. 発表標題 Cardioprotective effect of eosinophil cationic protein in rat cardiotoxicity model caused by anti-cancer agent
3. 学会等名 51st Japan Society for Matrix Biology and Medicine
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大月孝志、劉 国楽、西村拓人、立木美穂、岡田真澄、品岡 玲、チレッキ メフメット、オメル ハティポール、稲垣純子、古松毅之、西田圭一郎、下田将之、岡田保典、廣畑 聡
2. 発表標題 メカニカルストレスによるHYBID遺伝子の発現抑制
3. 学会等名 第32回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村拓人、立木美穂、稲垣純子、Omer Faruk Hatipoglu、大月孝志、池村 健太郎、劉 国楽、廣畑 聡
2. 発表標題 好酸球由来カチオン性タンパクの精製および酸化ストレス下での心筋芽細胞保護効果の検討
3. 学会等名 第13回 日本臨床検査学教育学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Liu G, Ohtsuki T, Shinaoka A, Komatsu K, Notsu Y, Hatipoglu OF, Nishimura T, Inagaki J, Yamada H, Nishida K, Sun L, Hirohata S.
2. 発表標題 Isolation and characterization of extracellular microvesicles in osteoarthritis
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Ohtsuki, Lyu Chen, Hiroyuki Yoshida, Akira Shinaoka, Kanae Kmagishi-Shinaoka, Mehmet Zeynel Cilek, Omer Faruk Hatipoglu, Junko Inagaki, Keiichiro Nishida, Yasunori Okada, Satoshi Hirohata
2. 発表標題 Inflammatory cytokine induced HYBID (HYALURONAN-BINDING PROTEIN INVOLVED IN HYALURONAN DEPOLYMERAZATION) -Expression mechanism-
3. 学会等名 HA2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 浅野恵一、廣畑 聡、大月孝志、オメル・ファルク・ハティポール、稲垣純子、大橋俊孝
2. 発表標題 ワークショップ2：がん微小環境の実体 がん微小環境におけるパーシカン分解酵素ADAMTSの局在と血管新生におけるパーシカンの意義.
3. 学会等名 第49回 日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大月孝志、品岡玲、熊岸-品岡加苗、メフメット・ゼイネル・チレッキ、オメル・ファルク・ハティポール、稲垣純子、西田圭一郎、廣畑聡
2. 発表標題 ワークショップ3：関節の修復・再生 メカニカルストレスの軟骨細胞に及ぼす多彩な作用-マトリックス合成促進と炎症性サイトカイン誘導性マトリックス分解活性抑制
3. 学会等名 第49回 日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 大月孝志、品岡 玲、品岡 加苗、Cilek Mehmet、Hatipoglu Omer、西村 拓人、稲垣 純子、西田 圭一郎、廣畑 聡
2. 発表標題 炎症性サイトカイン誘導性マトリックス分解酵素発現のイオンチャネルを介した抑制とその機構解析 Inflammatory cytokine-induced matrix degrading enzymes expression were attenuated by mechanical stress through transient receptor potential cation channel
3. 学会等名 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大月 孝志  (OHTSUKI TAKASHI)  (10534802)	岡山大学・保健学研究科・非常勤研究員   (15301)	
研究分担者	稲垣 純子  (INAGAKI JUNKO)  (90271056)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教   (15301)	
研究分担者	廣畑 聡  (SATOSHI HIROHATA)  (90332791)	岡山大学・保健学研究科・教授   (15301)	