

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19620

研究課題名（和文）アグリカンの陰性荷電に着目したOAに対するcharge based DDSの開発

研究課題名（英文）Development of charge based DDS for OA based on the negative charge of aggrecan

研究代表者

久保 俊一（Kubo, Toshikazu）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・特任教授

研究者番号：20178031

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：in vitroおよびin vivo実験において正電荷付与したヒアルロン酸が関節軟骨に与える影響について解析した。正電荷付与したヒアルロン酸群のanabolicな因子の発現は従来型のヒアルロン酸群と比較して差はなく、カチオン化することによる軟骨代謝への悪影響はみられなかった。またin vivoにおいて正電荷付与したヒアルロン酸は従来型ヒアルロン酸に比べて軟骨変性予防効果が高い傾向を認めた。従来型のヒアルロン酸と比べて軟骨への悪影響はなく、関節軟骨に長期間吸着する事で効果が持続す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（osteoarthritis: OA）に対する根本的な治療薬を開発するためには、OAの病態解明による創薬と同時に、未だ困難とされる軟骨細胞へのDDSの開発を並行して行う必要がある。今回のDDSの開発は、標的臓器の特徴に着目することが斬新である。本研究で得られた知見によりcharge based DDSを創製できれば、OAに対する斬新な薬物療法の開発に向けて大きく前進すると考える。さらに、本研究の成功は今後の薬剤開発において組織環境が重要であることを提言し、他分野の新規薬剤開発、修飾でも寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The effects of positively charged hyaluronan on articular cartilage were analyzed in in vitro and in vivo experiments. The expression of anabolic factors in the positively charged hyaluronan group was not different from that in the conventional hyaluronan group, and cationization did not have a negative effect on cartilage metabolism. In vivo, positively charged hyaluronan tended to be more effective in preventing cartilage degeneration than conventional hyaluronan, suggesting that the effect of positively charged hyaluronan on cartilage may be sustained by long-term adsorption to articular cartilage.

研究分野：軟骨代謝

キーワード：軟骨 変形性関節症 ヒアルロン酸

## 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) は関節軟骨や滑膜、軟骨下骨などの関節構成体の退行性疾患である。近年、遺伝子改変動物を用いた分子生物学的手法によって OA の病態解明が進み、有力な治療標的の候補が同定されてきた。これらに対する種々の抗体や核酸、ペプチド、低分子化合物が合成され、OA モデル動物の関節内に投与されている。これらのうち一部は OA の進行抑制効果を認めている (Nat Rev Rheumatol, 2014)。われわれは関節内注射薬として既存薬剤である高分子ヒアルロン酸の薬理作用に着目して研究を行ってきた。最近では低酸素インキュベーターを併用した三次元培養で関節内環境を再現した培養条件下で高分子ヒアルロン酸を投与すると anabolic 効果が増強されることを明らかにした (Kubo T. et al. Int J Mol Sci, 2016)。このように病態解明による治療標的の同定は飛躍的に進んでいるが、関節軟骨に持続的に作用させることは困難であり、新たなドラッグデリバリーシステム (drug delivery system: DDS) の開発が課題となっている。

### 2. 研究の目的

関節軟骨は軟骨組織の中でも特徴的な細胞外基質で構成されており硝子軟骨と呼ばれる。硝子軟骨は主に II 型コラーゲンおよびプロテオグリカンから構成される。II 型コラーゲンの密な配置が障壁となり投与された薬剤は細胞外基質に浸透し軟骨細胞へ到達することが分子量によらず困難である。また、関節液は滑膜に存在する毛細血管やリンパ管によって絶えず循環しているため、関節内投与された薬剤は短時間のうちに関節外へ排出されてしまう。

関節軟骨の主要なプロテオグリカンであるアグリカンは陰性に帯電している。われわれはこの特性に着目し、陰性陽性多剤配合剤を造影剤として用い静電的に関節軟骨に吸着させることによって変性軟骨と健常軟骨のコントラストを可視化することに成功した (Kubo T. et al. J Magn Reson Imaging, 2014)。タンパク質を簡単に正電荷付与 (カチオン化) する手法は以前から報告されており、遺伝子導入などの手法としてわれわれも利用してきた (Kubo T. et al. J Orthop Sci, 2001)。このことから、治療薬をカチオン化することによって関節軟骨への DDS へ応用できないかと考え本研究の着想に至った。これが実現すれば軟骨細胞への新たなドラッグデリバリーを可能とし、薬剤の効果増強や新たな効果の発見、持続時間の延長にもつながる。本研究の目的は、アグリカンの陰性荷電に着目した OA に対する charge based DDS を開発し治療効果を検討することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) in vitro でカチオニックヒアルロン酸が関節軟骨細胞に与える影響の解析

6 週齢 Wistar rat の肩・膝・股関節から関節軟骨を採取し、コラゲナーゼを用いて軟骨細胞を単離した。Dulbecco's Modified Eagle Medium に PBS を添加した群 (Control 群)・ヒアルロン酸を添加した群 (HA 群)・カチオニックヒアルロン酸を添加した群 (cationic HA 群) の 3 群に分けて軟骨細胞を培養し、72 時間後に total RNA を回収し、qPCR で mRNA 発現量を検討した。

#### (2) in vivo でカチオニックヒアルロン酸が関節軟骨に与える影響の解析

8 週齢 Wistar rat を使用し、モノヨード酢酸 0.2mg を関節内に投与し、rat OA model を作製した。PBS 投与群 (control 群)、ヒアルロン酸投与群 (HA 群)、カチオニックヒアルロン酸投与群 (cationic HA 群) にわけて 2 回/週で 4 週間関節内注射後に膝関節を採取し、サフラニン O 染色し軟骨の変性を Modified Mankin score で解析した。

### 4. 研究成果

(1) Sox9 の発現と Collagen2a1 の発現は各群で差がなかった。cationic HA 群での Aggrecan の発現は control 群に比べて有意に上昇した (図 1)。このことから cationic HA は conventional な HA と比べ、関節軟骨細胞に対して anabolic な代謝に関して負の影響を与えないことが分かった。

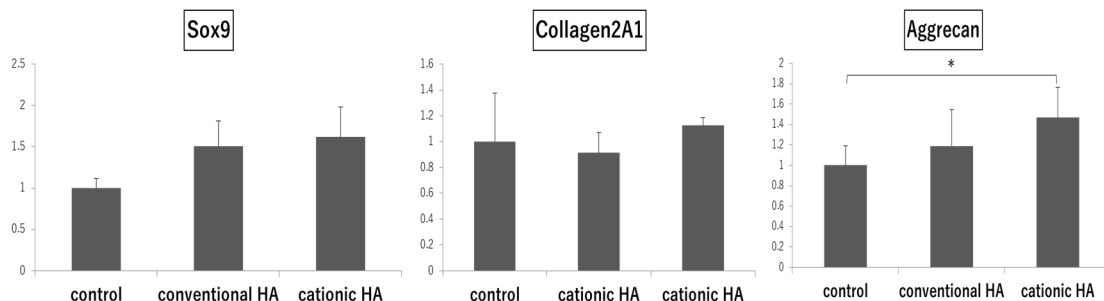


図 1. カチオニックヒアルロン酸が関節軟骨細胞に与える影響

(2)

関節軟骨の変性の指標である modified Mankin score は各群で有意差はなかったが、conventional HA 群に対して cationic HA 群で低く、軟骨変性予防効果が高い傾向が認められた。(図2)

従来型のヒアルロン酸と比べて、関節軟骨に長期間吸着する事で効果が持続する可能性があると考えた。

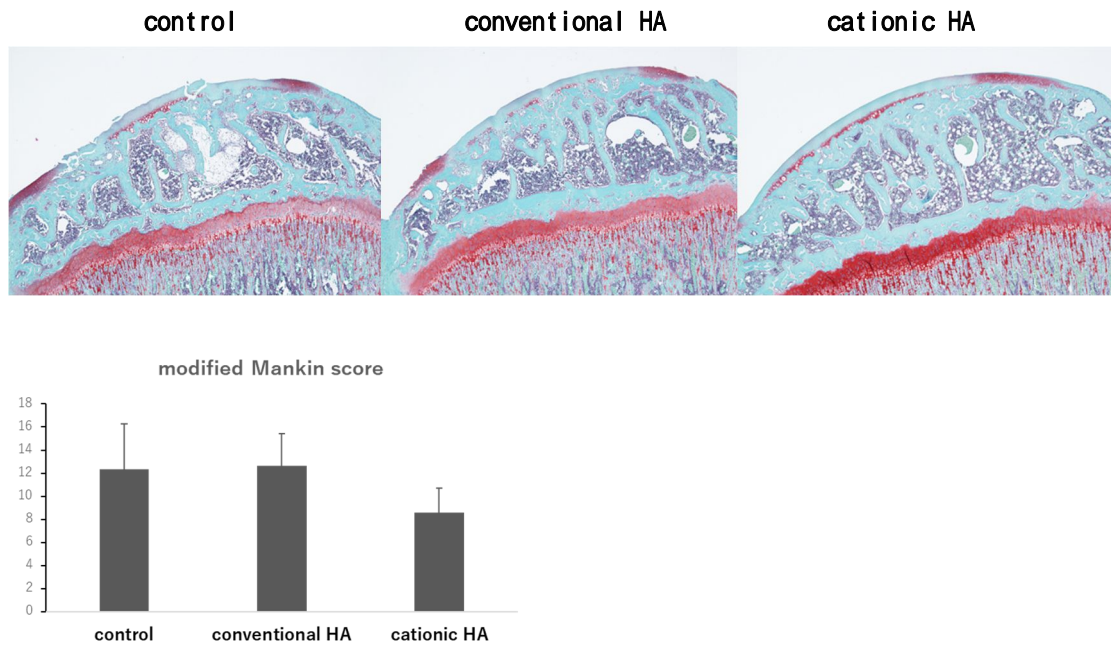


図2. カチオンックヒアルロン酸が関節軟骨に与える影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yoichiro Kamada; Hiroaki Inoue; Yuji Arai; Seiji Shimomura; Shuji Nakagawa; Shinji Tsuchida; Yuta Fujii; Kenta Kaihara; Osam Mazda; Yasuo Mikami
2. 発表標題 Analysis Of Reaction To Tensile Stress In Chondrocytes In Hypoxic Environment
3. 学会等名 2020 Annual Meeting of Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shimomura S, Inoue H, Arai Y, Nakagawa S, Tsuchida S, Ichimaru S, Fujii Y, Mazda O, Kubo T
2. 発表標題 The effects of treadmill exercise at a single time on knee articular cartilage in vivo
3. 学会等名 26th Annual Meeting of European Orthopaedic Reserch Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下村征史, 井上裕章, 新井祐志, 中川周士, 土田真嗣, 市丸昌平, 藤井雄太, 松田 修, 久保俊一
2. 発表標題 ヒトiPS細胞から軟骨組織分化における酸素濃度の影響の検討
3. 学会等名 第33回日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2018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	新井 祐志  (Arai Yuji)  (50347449)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授    (24303)	

6. 研究組織（つづき）

	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	中川 周士  (Nakagawa Shuji)  (30643382)	京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教    (24303)	
研究 分 担 者	井上 裕章  (Inoue Hiroaki)  (60457968)	京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教    (24303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関