

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591686

研究課題名（和文） 変形性関節症の診断治療用の軟骨指向性多機能ナノプローブの開発

研究課題名（英文） Development of cartilage directed multifunctional nano-probes for diagnosis and treatment of osteoarthritis.

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・准教授

研究者番号：50194262

研究成果の概要（和文）：本研究は、少子高齢化により増加傾向にある変形性関節症などの関節変性疾患において、軟骨変性の早期診断と治療を目指すための、軟骨指向性ナノプローブ開発の研究である。ポリアルギニンペプチド(R8) に DOTA-Gd を付加したプローブの関節軟骨造影効果を *ex vivo*, *in vivo* で確認した。R8 に軟骨変性保護タンパク N-TIMP3 を付加させ、リウマチ関節炎モデルマウスでその効果を試したが、*in vitro* でみられた効果程は明瞭な結果は得られなかった。導入タンパクの持続発現による効果の増強など改善の余地がある。

研究成果の概要（英文）：Current research aimed to develop a new multifunctional nano-probes for diagnosis and treatment of osteoarthritis, which will increase according to the acceleration of demographic aging. We could demonstrate the effect of cartilage-specific contrast agent, octaarginine peptide conjugated with DOTA-Gd, in *ex vivo* and *in vivo* experiments of rabbit knee joints. While R8-N-TIMP3, designed as a cartilage protective agent, did not show sufficient protective effect in a mouse model of rheumatoid arthritis although it showed in *ex vivo* tissue culture experiments. Further study is necessary after a prolonged expression of R8-NTIMP-3 in the arthritic knee joints.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：マトリックス生物学、軟骨代謝学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：関節軟骨、プロテオグリカン、MRI、マトリックスメタロプロテアーゼ、分子標的化

## 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。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ポリアルギニンペプチドが、マウス膝関節腔内投与により、石灰化軟骨層を除く関節軟骨に特異的に結合することを報告した。中でも、オクタアルギニン (R8) ペプチドが高い結合性を示した。さらに、*ex vivo* 解析ではあるが、OPT (Optical projection tomography) を用いて、蛍光ラベル R8 の関節軟骨への集積を 3D で解析し、コラーゲン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。

## 2. 研究の目的

しかしながら、蛍光による生体イメージングには、光の散乱・深部からの光の到達

の困難さがあり、画像解析用の撮像は解像度に限界がある。本研究の目的として、① R8ペプチドに光の欠点を補う他の検出モダリティを付与して、関節軟骨の画像化に取り組むこととした。そして、その候補モダリティはMRであると判断した。

また、R8ペプチドは軟骨組織への薬物標的化の潜在能力があり、軟骨保護剤 R8-NTIMP3については、*in vitro*でその阻害活性増強効果をすでに確認できている。②本研究のもう1つの目的は、*in vivo*での R8-NTIMP3の軟骨保護効果検討とする。

## 3. 研究の方法

(1) R8ペプチドのMRプローブ化：DOTA-Gd を R8 に結合させたプローブ (DOTA-Gd-G2R8) を合成し、MRによる軟骨のイメージングを検討した。固相合成法により合成したG2R8のN末端にDOTAを結合させた後、Gd を配位させてDOTA-Gd-G2R8を合成した。ウサギ膝関節へのプローブの結合について、7T MR I を用いて *ex vivo*, *in vivo*条件で評価を行った。

(2) 関節軟骨保護剤R8-NTIMP3の発現：リコンビナントタンパクは、pET vectorを用いて、大腸菌内で発現させ、溶菌後ライセート上清より、タンパクに付加したHisタグを用いて、Niカラムアフィニティー精製を行った。対照には、R8を持たないN-TIMP3タンパクあるいはR8-EGFPタンパクを用いた。遺伝子導入による発現には、動物細胞用発現pRCプラスミドにN-TIMP3 cDNAを挿入したものをを用い、関節包に注入後電気穿孔法により導入する方法をとった。

## 4. 研究成果

(1) 合成したDOTA-Gd-G2R8プローブの7 T MR I における T1, T2 短縮効果を *in vitro* 実験にて確認した。ウサギ膝関節に

DOTA-Gd-G2R8 を直接注入し、MR による軟骨集積性を検討したところ、大腿骨、脛骨の骨端の周りにT1短縮効果が見られた。造影剤注入直後では、大腿骨周辺の軟骨部が白く明瞭に造影されており、5時間後ではさらに脛骨の周囲も白く明瞭に造影され、その効果は24時間後も観察された。これらの結果は、関節軟骨部分を造影したものであると思われたが、確証を得るため、また造影効果を経時的に観察するため、*ex vivo*イメージングを行った。ウサギ膝関節大腿骨端部を、樹脂製チューブ内に固定、チューブ両端には液の注入口、出口を設け、遠隔操作により液の交換ができるものである。この装置を用いることにより、関節軟骨部が造影される過程、造影後さらにPBSにより洗浄される過程も観察することができた。最終的に、造影に使用した試料は固定・脱灰後パラフィンブロックとし、切片を軟骨染色のサフラニンO染色施行後、MR I横断面像と比較した。以上により、MR Iで造影剤の染色された部分は、軟骨層であることが確認できた。さらに、ウサギ軟骨欠損モデル、早期変形性関節症モデルを作製、同様の*ex vivo*実験を施行し、良好な結果を得た。これらの、*ex vivo*実験の検討をもとに最終的に、ウサギ膝関節軟骨の*in vivo*造影を行った。注入部近傍で造影剤とよく接した箇所を中心に、関節軟骨の造影効果が確認できた。*ex vivo*の実験より、造影剤の軟骨集積シグナルが低下していたが、これは生体内では造影剤の関節包からの排泄がリンパ管などを通して進み、実質的濃度が低下した結果と考えられる。今後さらに検討を重ねれば、中型動物を中心に関節軟骨の質的評価が可能な造影剤として実用が可能なことが示された。

(2) 関節破壊特異的阻害剤R8-NTIMP3の治療効果の検討: 大腸菌発現R8-NTIMP3リコンビナントタンパクを抗コラーゲン抗体関節炎モ

デルマウス膝関節に注射して、治療効果を検討したが、有意な治療効果を認めなかった。そこで、遺伝子導入により、R8-NTIMP3タンパクを発現させる方法を検討することにした。軟骨組織あるいは周辺組織に持続的発現させる遺伝子導入法による方法を検討するため、EGFP発現プラスミドコンストラクト(pEGFP)を作製した。また、遺伝子導入のためのエレクトロポレーションの条件設定をpEGFPを用いて行った。R8-EGFPプラスミドによる遺伝子導入予備実験では、滑膜組織・筋肉組織への導入が確認できた。R8-NTIMP3導入による関節炎(CAIA)モデルの治療効果を*in vivo*で検討したが、*in vitro*組織実験で出たほどの効果が確認できなかった。改善するためには、ウイルスベクターなどを使用し、導入効率・発現の持続などをさらに向上させる必要があると考えられる。

#### 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 9 件)

- ① T. Kanazawa, T. Furumatsu, M. Hachioji, T. Oohashi, Y. Ninomiya, and T. Ozaki. Mechanical stretch enhances COL2A1 expression on chromatin by inducing SOX9 nuclear translocation in inner meniscus cells. *J. Orthop. Res.* 査読有 30, 468-474 (2012).
- ② H Kakuta, N Yakushiji, R Shinozaki, F Ohsawa, S Yamada, Y Ohta, K Kawata, M Nakayama, M Hagaya, C Fujiwara, M Makishima, S Uno, A Tai, A Maehara, M Nakayama, T Oohashi, H Yasui, and Y Yoshikawa. RXR Partial Agonist CBT-PMN Exerts Therapeutic Effects on Type 2 Diabetes without the Side Effects of RXR Full Agonists. *ACS Med. Chem. Lett.*, **3**, 427-432 (2012) 査読有.
- ③ Bekku Y, Saito M, Moser M, Fuchigami M,

- Maehara A, Nakayama M, Kusachi S, Ninomiya Y, Oohashi T. Bral2 is indispensable for the proper localization of brevican and the structural integrity of the perineuronal net in the brain stem and cerebellum. *J Comp Neurol*. 査読有 2011 doi: 10.1002/cne.23009.
- ④ Minematsu H, Otani T, Oohashi T, Hirai M, Oie K, Igarashi K, Ohtsuka A. Development of an active targeting liposome encapsulated with high-density colloidal gold for transmission electron microscopy. *J Electron Microsc.* 査読有 2011;60(1):95-99.
- ⑤ Oohashi T, Naito I, Ueki Y, Yamatsuji T, Permpoon R, Tanaka N, Naomoto Y, Ninomiya Y. Clonal overgrowth of esophageal smooth muscle cells in diffuse leiomyomatosis-Alport syndrome caused by partial deletion in COL4A5 and COL4A6 genes. *Matrix Biol.* 査読有 2011 30(1):3-8.
- ⑥ 大橋俊孝, 西田圭一郎 関節軟骨のバイオイメージング *Clinical Calcium* 査読無、2011, 21(6), 100-106
- ⑦ Neurocan contributes to the molecular heterogeneity of the perinodal ECM. Y. Bekku and T. Oohashi, *Arch. Histol. Cytol.* 査読有 73, 95-102 (2010).
- ⑧ Bekku Y, Vargová L, Goto Y, Vorisek I, Dmytrenko L, Narasaki M, Ohtsuka A, Fässler R, Ninomiya Y, Syková E, Oohashi T. Bral1: its role in diffusion barrier formation and conduction velocity in the CNS. *J Neurosci.* 2010 査読有 30(8):3113-23.
- ⑨ 大橋俊孝 軟骨組織のバイオイメージング *臨床整形外科* 査読無 2010, 45(5), 454-457
- ① 前原亜美ら、炎症標的化金コロイド内包リポソームのリウマチ関節炎部位への集積の光学・電子顕微鏡観察、第26回日本生化学会、2013年3月1日-2日、吹田
- ② 大橋俊孝ら、炎症標的化金コロイド内包リポソームのリウマチ関節炎部位への集積の光学・電子顕微鏡観察、第85回日本生化学会、2012年12月14日-16日、博多
- ③ 入江崇義ら、軟骨集積性MR用オクタアルギニン含有プローブの合成と生体イメージングへの応用、第6回日本分子イメージング学会総会、2012年5月26-27日、神戸
- ④ 前原亜美ら、炎症標的化金コロイド内包リポソームのリウマチ関節炎部位への集積、第25回日本軟骨代謝学会、2012年3月9日-10日、名古屋
- ⑤ 古谷満寿美ら、炎症標的化金コロイド内包リポソームのリウマチ関節炎部位への集積、第43回日本結合組織学会、第58回マトリックス研究会、2011年6月10日-11日、大分
- ⑥ 大橋俊孝ら、R8-N-TIMP3による軟骨分解保護効果の検討、第24回日本軟骨代謝学会、2011年3月4-5日、博多
- ⑦ 大橋俊孝ら、炎症標的化リポソームのリウマチ関節炎部位への集積、病理学会カンファレンスー電子顕微鏡観察ー、2010年8月6日-7日、岡山
- ⑧ 入江崇義ら、MRによる軟骨のイメージングを目指したオクタアルギニン含有プローブの合成、第5回日本分子イメージング学会総会、2010年5月22-23日、大津
- ⑨ 松本衣未ら、シアリルルイスX糖鎖結合リポソームのリウマチ関節炎部位への集積についての電子顕微鏡的検討、第51回日本生化学会中国・四国支部例会、2010年5月14日-15日、山口

[学会発表] (計 11件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 件）

名称：軟骨組織マーカー及び軟骨組織可視化  
用試薬

発明者：大橋 俊孝、加来田 博貴

権利者：国立大学法人 岡山大学

種類：特許願

番号：特願 2012-055511

出願年月日：平成 24 年 3 月 31 日

国内外の別：国内

名称：リジンオリゴマー誘導体及びそれから  
なる軟骨組織マーカー

発明者：大橋 俊孝、加来田 博貴

権利者：国立大学法人 岡山大学

種類：特許願

番号：PCT/JP2013/56974

出願年月日：平成 25 年 3 月 31 日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://mbb-okayama.sakura.ne.jp/>

## 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・  
准教授

研究者番号：50194262

### (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：80284058

### (3) 連携研究者

小松 直樹 (KOMATSU NAOKI)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30253008