

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390350

研究課題名(和文) 軟骨変性破壊の共有パスウェイを標的とした分子治療の開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic strategy targeting common pathway of cartilage degeneration

研究代表者

木村 友厚 (Kimura, Tomoatsu)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：80167379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：運動器疾患である椎間板変性症(IVD)や変形性関節症(OA)の病態には多くの分子メカニズムが関与している。われわれはc-fos/AP-1が主要な因子の1つであることを明らかにし、その特異的阻害により髄核細胞、椎間板組織、軟骨細胞の基質分解酵素発現を抑制できることを示した。さらにIVDおよびOAモデル動物を作製し、これに対するc-fos/AP-1阻害効果を見た結果、椎間板と関節の変性破壊を顕著に阻止できることが明らかとなった。これらはIVDとOA病態に共通してc-fos/AP-1が関与することを示すとともに、本分子をターゲットとする治療戦略がIVDとOAの両者に有効となることを示している。

研究成果の概要(英文)：Intervertebral disc disease (IVD) and osteoarthritis (OA) are the most common musculoskeletal diseases and numerous molecular mechanisms have been associated with these conditions. We identified c-fos/AP-1 as a molecule that shares pathological pathways in both of IVD and OA. Using newly developed specific inhibitor for the c-fos/AP-1, we demonstrated that the inhibitor mainly reduced expression of matrix-degrading enzymes, such as mmp-13 and adamts5 in disc cells, disc tissue, as well as in chondrocytes. Medication of the c-fos/AP-1 inhibitor to IVD and OA model animals demonstrated remarkable inhibitory effect on the progression of these conditions. Thus, therapeutic strategies targeting c-fos/AP-1 could become an important direction to treat both of IVD and OA.

研究分野：医歯薬学

キーワード：関節 軟骨 椎間板

1. 研究開始当初の背景

(1)変形性関節症(OA)や椎間板変性症(IVD)に代表される運動器の common disease は多因子疾患である。この多因子の関与する疾患病態のメカニズムとして、力学的要因を基盤に、軟骨・椎間板基質 (ECM) 代謝、サイトカインの役割、様々なシグナル伝達の変化、細胞の異常分化とアポトーシス・オートファジー、さらに種々の疾患感受性遺伝子の関与などが明らかにされてきた。また OA と IVD 病態における加齢の及ぼす分子メカニズムもわかりつつある。

これらの知見に基づいて OA や IVD の病態制御を目指して、例えば ECM 分解酵素やシグナルの阻害戦略、あるいは成長因子の投与などなどが試みられてはきた。しかし標的分子への特異性の低さや副作用、または有効性の欠如により、なかなか有効な方策が見いだせていない。病態メカニズムにかかわる多くのターゲット分子があり、それを如何に絞り込んで治療の標的とできるのか、手付かずの状態である。

(2)OA と IVD において見られることは、それぞれの組織の変性や破壊であるが、両組織は構造的・発生学的には異なっている。しかし臨床的に両疾患の合併頻度が非常に高いことに加えて、両者の ECM 成分や変性の分子基盤には部分的な共通点がある。一つは変性破壊に直接に関与する ECM 分解メカニズムであり、また他方では、多数見出されてきた疾患感受性遺伝子の機能(軟骨・骨分化や代謝)の類似性があることなどである。そこで互いに相関する両疾患の組織において、類似の発現変動を示す分子の網羅的解析の中で、同様の pathway のキーファクターを選び出し、それが OA と IVD で共通して連動する分子であれば、これをターゲットに両疾患の制御を行うことができる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

OA と IVD に代表される運動器の common disease の発症・進行にかかわる様々な要因が分子レベルで明らかにされてきているが、その何れをどのように in vivo で具体的にターゲットとして制御できるか、不明な点が多い。本研究は関節・脊椎疾患 (OA と IVD) の病態解明を基盤に、両者に共通して存在する分子病態メカニズム、すなわち軟骨・椎間板の ECM 分解/合成の上流をターゲットとし、これにかかわる分子を特異的に in vivo で制御することにより、疾患の新たな治療戦略を展開しようとするものである。

3. 研究の方法

(1)OA 関節軟骨と IVD 椎間板における遺伝子発現変化について、既知の網羅的解析結果とデータベースから、密接に連動して発現変化

するものを明らかにする。予備的検索で c-fos/AP-1 MMP-3,13、c-fos/AP-1 TGFβ/IL-1、TNFα ADAMTS-5,9 が明らかとなっており、これには転写因子 c-fos と下流の炎症性サイトカインや ECM 分解酵素が含まれているため、まず上流の c-fos/AP-1 を primary ターゲットとし、その特異的阻害薬による抑制効果を検証した。

(2)新規の特異的阻害薬として、AP-1/DNA 複合体の X 線構造解析結果を基にデザインし、合成ペプチドの 3 次元ファーマコアから変換した低分子化合物が既に研究協力者により作成されていた。この AP-1 阻害薬は DNA 上の AP-1 結合配列への AP-1 の結合を特異的にブロックして AP-1 の転写活性を阻害した。これを用いて、まず髄核細胞および関節軟骨細胞に対して、in vitro で c-fos/AP-1 阻害によって直接的に MMP-3、-13 発現などが変動するか、炎症性サイトカインや ECM 成分、ECM 代謝に関わる遺伝子発現はどうかを解析した。髄核細胞に対する in vitro 検討は、まず家兎からの細胞を用いて行った。さらにマウス椎間板の器官培養で、同様の検討を行った。

(3)c-fos/AP-1 阻害効果を、疾患動物モデルにおいて解明した。8 週齢の C57BL6/J マウス膝関節に実体顕微鏡下で内側半月付着部切離を行い、この destabilization(DMM)モデルによる緩徐進行性の OA を誘導した。対照として関節切開までに留める sham 手術を行った。OA 誘導後の 2 週目より、連日 (週 5 日) に AP-1 阻害薬を経口 tube にて投与し、24 週までの長期観察を行った。投与量は、予備検討での関節移行濃度とマウス体表面積から 25、50mg/kg とし、投与期間中の体重測定、筋を含む各臓器の組織学的スクリーニングを行った。膝関節については形態学的変化を中心に解析し、軟 X 線撮影、microCT、一部のマウスについては膝 MRI を撮像した。HE ならびに Safranin-O 染色による組織学的解析と、II、X 型コラーゲン、MMP などの免疫組織染色を行った。

(4) IVD に対する c-fos/AP-1 阻害の意義を調べるために、12 週齢ラット 32 匹の尾椎椎間板に 18G 針穿刺による IVD モデルを作成した。Co5/6 椎間板は未穿刺(コントロール)、Co6/7 椎間板は半穿刺、Co7/8 椎間板は全穿刺とした。16 匹ずつの 2 群にそれぞれにプラセボ、特異的 c-fos/AP-1 阻害薬を 4 週または 8 週間の経口投与を行った。単純 X 線、MRI を撮影し、椎間板変性の程度を評価した。X 線では disc height ratio を計測し、MRI T2mapping 画像では髄核の T2 値の平均を算出し、Co5/6 椎間板を基準として穿刺した椎間板変性の程度を比較検討した。

4. 研究成果

(1)OA 軟骨と IVD 組織の既知の発現解析とデータベースから、両者の共通 pathway が種々存在するが、その上流に存在する c-fos/AP-1 を primary ターゲットとすることとした。AP-1/DNA 複合体の X 線構造解析結果を基に既にデザインされている特異的 c-fos/AP-1 阻害薬を用い、まず in vitro で関節軟骨細胞に対する効果を検討した。その結果、関節軟骨細胞では炎症性サイトカイン発現の変動とともに、Mmp の中では-1, -3, -13 の発現低下が認められた。Adams5 発現の軽度抑制傾向、Col2a1, Agc の増大傾向があるものの有意ではなかった。

一方、髄核細胞に対する c-fos/AP-1 阻害により、MMP-3, 13, Adams5 の発現抑制が認められたが、Col2a1 や Agc の遺伝子発現には一定の傾向を認めなかった。そこで 2 週齢

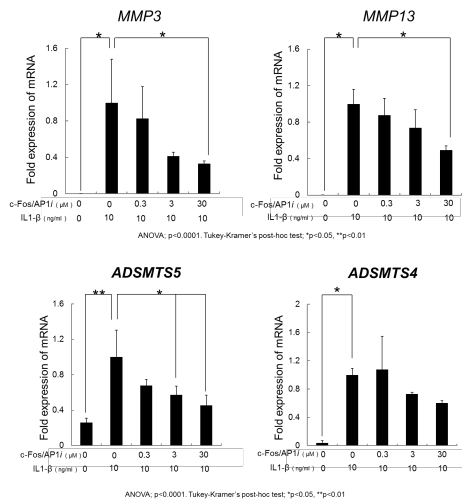


図 1. c-Fos/AP-1 阻害と髄核細胞の遺伝子発現変化

マウスの軟骨終板・線維輪・髄核を含む器官培養での検討を行ったところ、ほぼ同じ発現変動パターンを示したことから、c-fos/AP-1 阻害は、関節軟骨細胞、髄核細胞、椎間板組織においてほぼ同等に、Mmp-3, 13 を介して作用を示すと考えられた。

(2) c-fos/AP-1 阻害効果を in vivo で疾患動物モデルにおいて明らかにするため、C57BL6/J マウス膝関節に DMM による緩徐進行性 OA を誘導し、2 週目より c-fos/AP-1 阻害薬またはプラセボを経口投与し、24 週までの観察を行った。この観察期間に阻害薬投与による体重変化、臓器障害など特記すべき有害事象を認めなかった。24 週までの microCT による形態解析では、c-fos/AP-1 阻害薬投与により骨棘形成が抑制される一方、軟骨下骨の骨形態計測では差異を認めず、軟骨下骨代謝には大きな影響は与えないことが推測された。組織学的解析では、DMM モデルでプラセボ群では OA 変化が緩徐に進行したのに対して、c-fos/AP-1 阻害薬投与群では OA 進行がほぼ完全に抑制されていた。

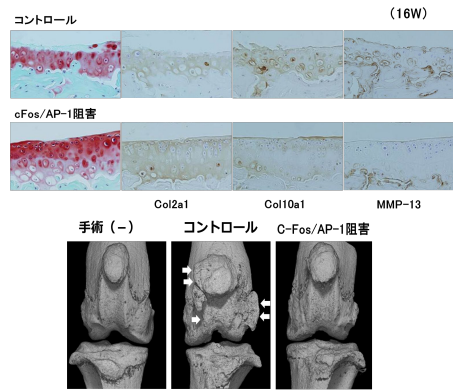


図 2. cFos/AP-1 阻害による OA 進行の抑制

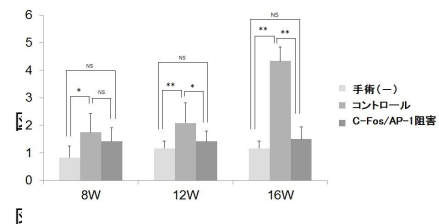
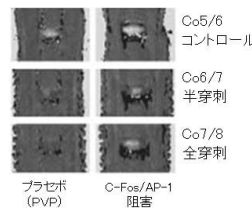


図 3. 組織学的スコア (脛骨内側関節面)

これらの結果は、先の in vitro での軟骨細胞に対する結果と合わせて、c-fos/AP-1 阻害により Mmp-13 発現抑制を中心に軟骨 catabolism が顕著に阻止され、これが OA の構造改善薬/進行抑制となりうる高い可能性を示すものであった。

(3) IVD モデルとして、まずラット尾椎椎間板の穿刺モデルの有用性を検討した結果、全穿刺・半穿刺により程度の異なった椎間板変性が誘導できること、また一匹のラットで 3 椎間の穿刺法 (穿刺、半穿刺、無穿刺) を行うことが有効で、かつ再現性が高いことを軟 X 線撮影と MRI で確認した。

引き続き本手法で IVD を誘導後 2 週目より



連日プラセボまたは c-fos/AP-1 阻害薬投与を行った結果、X 線像での解析で、4 週後では 2 群間

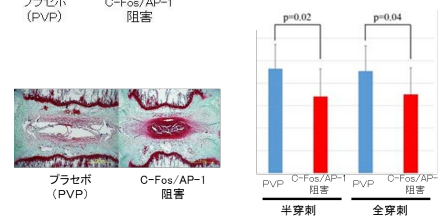


図 4. 椎間板 MRI 像、組織像と組織スコア

で disc height index (DHI) の差を認めなかったが、8 週後では AP-1 阻害薬投与群で、半穿刺、全穿刺の何れでも DHI 減少が有意に抑制された。4.7T MRI の T2mapping による解析でも、4 週投与では差を認めなかったが、8 週投与後では半穿刺、全穿刺のどちらもプラセ

ボ群に比べ AP-1 阻害薬投与群で有意に T2 値が高かった。

組織学的解析では、c-fos/AP-1 阻害薬投与群において、8 週後の線維輪の破綻と髄核変成の進行が抑制されており、histological grading score も有意に低値であった。

以上の結果は、軟骨変成の共通 pathway 解析からターゲットとして選択した c-fos/AP-1 の阻害により、関節軟骨のみならず椎間板についても変性の進行を阻止できる可能性を初めて示したものである。c-fos/AP-1 が OA と IVD という、運動器の common disease の、具体的な治療標的となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Seki S, Tsumaki N, Motomura H, Nogami M, Kawaguchi Y, Hori, T Suzuki K, Yahara Y, Higashimoto M, Oya T, Ikegawa S, Kimura T. Cartilage intermediate layer protein promotes lumbar disc degeneration. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, 446, 2014, 876-881

DOI:10.1016/j.bbrc.2014.03.025

Motomura H, Matsushita I, Seki E, Mine H, Kimura T. Inhibitory effect of tacrolimus on progression of joint damage in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*. 査読有, 17, 2014, 749-754

DOI:10.1111/1756-185X.12227

Song YQ, Karasugi T, Cheung KM, Chiba K, Ho DW, Miyake A, Kao PY, Sze KL, Yee A, Takahashi A, Kawaguchi Y, Kimura Chan D, et al. Lumbar disc degeneration is linked to a carbohydrate sulfotransferase 3 variant. *J Clin Invest*. 査読有, 123, 2013, 4909-4917

DOI: 10.1172/JCI69277

Nogami M, Tsuno H, Koike C, Okabe M, Yoshida T, Seki S, Matsui Y, Kimura T, Nikaido T. Isolation and characterization of human amniotic mesenchymal stem cells and their chondrogenic differentiation. *Transplantation*, 査読有, 93, 2012, 1221-1228.

DOI: 10.1097/TP.0b013e3182529b76

Suzuki K, Matsui Y, Higashimoto M, Kawaguchi Y, Seki S, Hori T, Yahara Y, Kanamori M, Kimura T. Myxoid liposarcoma-associated EWSR1-DDIT3 selectively represses osteoblastic and chondrocytic transcription in multipotent mesenchymal cells. *PLoS*

One, 査読有, 7, 2012, e36682

DOI: 10.1371/journal.pone.0036682

〔学会発表〕(計 7 件)

Makino H, Seki S, Motomura H, Yahara Y, Nogami M, Shiozawa S, Kimura T. Effect of a selective inhibitor of c-Fos/AP-1 protein on intervertebral disc degeneration induced by needle puncture in rats. *Orthopaedic Research Society*, 2015, March 28-30, Las Vegas

Nogami, M, Seki, S, Motomura, H, Nikaido, T, Kimura, T. Cartilage regenerative capacity of amnion-derived ECM-coated PLGA scaffold in a cartilage defect model in macaque monkeys. *Orthopaedic Research Society*, 2015, March 28-30, Las Vegas

箭原康人, 木村友厚, 妻木範行. 生後軟骨の恒常性維持における SIK3 の役割. 第 28 回日本軟骨代謝学会, 2015, March 6-7, 東京

Makino H, Kawaguchi Y, Nakano M, Yasuda T, Seki S, Suzuki K, Kimura T. Lumbar disc degeneration progression in young adults in their 20's. 41st Annual Meeting of the International Society for the Study of the Lumbar Spine, 2014, June 3-7, Seoul

Nogami M, Seki S, Matsui Y, Motomura H, Koike C, Okabe M, Yoshida T, Nikaido T, Kimura T. Cartilage regenerative capacity of amnion-derived ECM-coated PLGA scaffold. *Orthopaedic Research Society*, 2013 Jan, 26-29, San Antonio
野上真紀子, 関 庄二, 元村 拓, 下条 竜一, 杉森一仁, 渡邊健太, 牧野紘士, 二階堂敏雄, 木村友厚. 羊膜由来細胞外マトリックスと PLGA 担体を用いたサル膝関節軟骨修復. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2014, Oct 9-10, 鹿児島

箭原康人, 木村友厚, 妻木範行. マウス OA モデルにおける関節軟骨細胞分化の解析. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2014, Oct 9-10, 鹿児島

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 友厚 (KIMURA Tomoatsu)
富山大学大学院医学薬学研究部(医学)・教授
研究者番号：80167379

(2) 研究分担者

川口 善治 (KAWAGUCHI Yoshiharu)
富山大学大学院医学薬学研究部(医学)・准教授
研究者番号：00262527

関 庄二 (SEKI Shoji)
富山大学大学院医学薬学研究部(医学)・助教
研究者番号：00432112