

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02561

研究課題名(和文)脂質代謝とSIK3による軟骨形成・分化の新しい制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of regulation of chondrocyte differentiation by SIK3 and lipid metabolism

研究代表者

妻木 範行 (Tsumaki, Noriyuki)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：50303938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,700,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨は関節運動と骨の成長に重要な役割を果たす。本研究においてコンディショナルノックアウトマウスを作製し、SIK3が関節軟骨の形質を制御し、関節症治療のターゲットになることを明らかにした。そして、SIK3を阻害する化合物がマウス変形性関節症モデルの軟骨変性を軽減することを示し、薬剤開発のシーズを見出した。また、軟骨細胞の性質を維持する働きがある化合物を同定した。この化合物は軟骨の性質の維持に必要な転写因子であるSox9の分解を抑制していた。

研究成果の概要(英文)：Cartilage plays important roles in joint motion and bone growth. In this project, we created conditional knockout mice and found that SIK3 regulates properties of articular cartilage and can be a target molecule for osteoarthritis. We showed that a SIK3 inhibitor rescues the mice with the osteoarthritis model and can be a lead molecule for drug. In a separate experiment, we found a molecule that sustains chondrocytic properties of chondrocytes. This compound inhibited degradation of Sox9 which is important for maintenance of chondrocytic phenotype.

研究分野：骨・軟骨代謝学

キーワード：軟骨細胞 分化 SIK3 コンディショナルノックアウトマウス

## 1. 研究開始当初の背景

発生過程において各骨格はまず軟骨で形成される。次いで内軟骨性骨化の過程を経て、中心部から徐々に骨に置換される。結果として各骨格コンポーネントの両端に残存する軟骨は、さらに関節軟骨と成長軟骨に分かれ、それぞれ関節運動と骨の成長を担う。関節軟骨は無血管組織で治癒能力に乏しく、その損傷・変性は変形性関節症に至り、QOLを低下させる。日本の変形性関節症の罹患数は1000万人以上とされるが、根治的治療方法はない。成長軟骨の機能不全は低身長と骨格の変形を起し、難病の骨系統疾患を引き起こす。ほとんどの骨系統疾患では治療薬は無い。これら軟骨疾患の治療方法を開発するためには、軟骨形成・分化制御機構を解明することが必要である。我々は以下のように、脂質代謝と SIK3 が軟骨形質に重要な役割を果たしているとの知見を得、本研究計画の着想に至った。

### 1) 脂質代謝による軟骨形成・分化制御の研究

軟骨無形成症 (ACH) を始めとする FGFR3 病は、FGF 受容体 3 型遺伝子の機能獲得型変異が原因で発症する。主な病変は成長軟骨にあり、低身長と骨格の変形を主訴とする。根治的な治療薬は未だ無い。我々は ACH 患者の皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を作製し、軟骨細胞に分化させて軟骨病態を再現することに成功した (iPS 細胞疾患モデル)。そして、スタチンがこの iPS 細胞疾患モデルの病態を軽快させることを発見した。スタチンが ACH の軟骨病変を軽快させる正確な仕組みは不明である。一方、我々は軟骨形質の維持機構を研究する中で、脂質代謝の重要性を示唆する知見を得た。これまで軟骨細胞代謝における脂質代謝は注目されていたとは言えない。本申請で、軟骨組織における脂質代謝を研究することは、軟骨形成・分化の新たな制御機構の発見に至ると共に、スタチンによる ACH 軟骨異常の回復の機序を解明し、難治性軟骨疾患の新たな治療法を実現する事に貢献すると考えた。

### 2) SIK3 による軟骨形成・分化制御の研究

SIK には SIK1, SIK2, SIK3 のファミリーメンバーが存在する。SIK1, SIK2 は幹細胞、脂肪細胞、筋細胞などでエネルギー代謝、脂質代謝を制御することが知られていたが、SIK3 の生体での役割は不明であった。そこで我々が SIK3 の conventional knockout mice を作った所、重度の骨格異常がおこり、軟骨細胞分化に major な表現型があることが判明した。そして生後の SIK3 ノックアウトマウスでは、関節軟骨が著名に厚くなっていた。変形性関節症では関節軟骨が変性し、その厚みが薄くなるのが病変である。そこで、我々は SIK3 の阻害が変形性関節症治療になるとの仮説を立て、本研究計画を建てた。SIK3 による、関節軟骨代謝と変形性関節症病態の制御機

構を解明する。そして、SIK3 の阻害剤をスクリーニングし、変形性関節症の治療薬候補となり得るかを調べる。

SIK は他組織では脂質代謝を制御している事から、1) 脂質代謝による制御と 2) SIK3 による制御のしくみがつながって統合され、軟骨形成・分化を制御する新たな機構の発見に至る可能性もあると考える。

## 2. 研究の目的

1) 脂質などの代謝による軟骨形成・分化制御を明らかにするために、軟骨形質の維持に役割を果たす分子を網羅的に探索する。リプログラム軟骨細胞様細胞株 290-2-14 細胞 (Hiramatsu et al., J Clin Invest, 2011) を用いてスクリーニングを行い、軟骨形質維持にかかわる化合物と遺伝子を探索する。

2) SIK3 による軟骨形成・分化制御を解析するために、CreER / loxP システムを用いて生後軟骨特異的に SIK3 をコンディショナルノックアウトしたマウスを作製し、関節軟骨代謝における SIK3 の役割を解析する。そして、ここで得られた知見を元に、軟骨変性にかかわる分子シグナルを同定し、その活性を変化させ得る化合物をスクリーニングして変形性関節症の創薬を目指す。

## 3. 研究の方法

1) 290-2-14 細胞を用いて遺伝子と化合物の網羅的探索を行った。軟骨形質維持に必須な遺伝子を探索するために、全遺伝子を網羅する shRNA ライブラリーを導入して遺伝子ノックダウンを行った。軟骨形質を維持する作用がある化合物を探索するために、低分子化合物ライブラリーを添加した。290-2-14 細胞は軟骨特異的に GFP を発現するトランスジェニックマウスから作られており、軟骨形質を獲得すると GFP が発現し、軟骨形質を失うと GFP 発現が減弱する。GFP 蛍光を指標に、探索を行った。

2) SIK3 による軟骨形成・分化制御の研究については、タモキシフェン投与下に生後の関節軟骨特異的に SIK3 を欠失する Col11a2-CreER; SIK3flox/flox コンディショナルノックアウトマウス (SIK3 cKO) を作製した。2 週齢の Col11a2-CreER; SIK3flox/flox マウスと Col11a2-CreER; SIK3flox/+マウスに tamoxifen を腹腔内投与した。Tamoxifen 投与 2 週間後に、膝関節の成長軟骨、関節軟骨を組織学的に評価した。また 7 週齢の Col11a2-CreER; SIK3flox/flox マウスと SIK3flox/flox マウスに tamoxifen を投与し、8 週後に膝関節の成長軟骨、関節軟骨における組織解析を行った。

## 4. 研究成果

1) リプログラム軟骨細胞様細胞である 290-2-14 細胞を用いてスクリーニングを行い、軟骨細胞マーカー発現を上昇させる遺伝子 A と化合物 A-674563 を発見した。遺伝子 A

は脂質代謝にかかわる酵素をコードし、軟骨分化に代謝が係わる可能性を示唆した。本研究期間中においては、遺伝子 A の同定を行い、その詳細な機能解析は今後の課題とした。一方、化合物 A-674563 については解析を終えられた。A-674563 は、マウス培養軟骨細胞においても軟骨マーカー発現を上昇させた。シクロヘキシミド、BafilomycinA1、MG132 を使用した実験を行い、この化合物は軟骨マーカー遺伝子発現を促進する転写因子である Sox9 蛋白質の分解を抑制しその蛋白量を増やすとの結果を得た。トランスクリプトーム解析を行い、この化合物は蛋白質の脱ユビキチン化を促進する Usp29 (ubiquitin-specific peptidase 29) 遺伝子の発現を上昇させることを見出した。軟骨細胞の性質を維持する機構として、Sox9 蛋白質の分解を抑制することでその蛋白量を増やし、軟骨マーカー発現を促進するメカニズムがあると考えた。この結果を論文 (T. Kobayashi, K. Fujita, T. Kamatani, S. Matsuda, N. Tsumaki, A-674563 increases chondrocyte marker expression in cultured chondrocytes by inhibiting Sox9 degradation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 495 (2018) 1468-1475.) に報告した。

2) SIK3 が変形性関節症 (OA) 軟骨の病態に関連しているかを調べるために、ヒト OA 軟骨サンプルを用いて、活性型であるリン酸化 SIK3 の発現を免疫染色によって調べた。OA の程度が重度な軟骨ほど、リン酸化 SIK3 の発現が上昇していた。この発現上昇が OA の原因と結果のどちらであるかを調べるために、生後の関節軟骨で SIK3 遺伝子を欠失するコンディショナルノックアウトマウスを作製した。コンディショナルノックアウトマウスの関節軟骨は厚くなった。次いで、SIK3 コンディショナルノックアウトマウスの膝関節に半月板を切離して OA モデルを導入したところ、軟骨変性の程度はコントロールマウスに比べて軽度であった。これらの結果から、SIK3 が OA 治療の標的分子になると考えた。そして、SIK3 シグナルの下流である HDAC と CREB の活性を指標とし、化合物ライブラリーをスクリーニングし、SIK3 を特異的に阻害するプテロシン B を得た。プテロシン B を OA モデルマウスに投与すると、OA の程度を抑えた。この結果より、プテロシン B は OA の分子標的治療薬のリード化合物になりうると考えた。SIK3 を分子標的とした OA における軟骨変性の抑制は、軟骨を厚くする効果と軟骨細胞の肥大化変化を抑える効果とのどちらかあるいは両方が関与していると推測した。本研究成果を論文 (Yahara, Y., Takemori, H., Okada, M., Kosai, A., Yamashita, A., Kobayashi, T., Fujita, K., Itoh, Y., Nakamura, M., Fuchino, H., et al. (2016). Pterostatin B prevents chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis in mice by inhibiting SIK3. *Nat Commun* 7, 10959.)

に報告した。

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 3 件)

Yasuhito Yahara, Hiroshi Takemori, Minoru Okada, Azuma Kosai, Akihiro Yamashita, Tomohito Kobayashi, Kaori Fujita, Yumi Itoh, Masahiro Nakamura, Hiroyuki Fuchino, Nobuo Kawahara, Naoshi Fukui, Akira Watanabe, Tomoatsu Kimura and Noriyuki Tsumaki, Pterostatin B prevents chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis in mice by inhibiting SIK3, *Nature Communications*, 査読有, Vol.7, 2016, 1-18.  
doi: 10.1038/ncomms10959

Takeshi Kimura, Akihiro Yamashita, Keiichi Ozono and Noriyuki Tsumaki, Limited immunogenicity of human iPS cell-derived cartilages, *Tissue Engineering Part A*, 査読有, Vol.22, 2016, 1367-1375.  
doi: 10.1089/ten.tea.2016.0189

Kobayashi T, Fujita K, Kamatani T, Matsuda S, Tsumaki N, A-674563 increases chondrocyte marker expression in cultured chondrocytes by inhibiting Sox9 degradation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, Vol.495, 2018, 1-1468.  
doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.180

[学会発表](計 15 件)

Noriyuki Tsumaki, iPSC disease modeling of FGFR3 chondroplasia, The 12th International Skeletal Dysplasia Society (ISDS) Meeting, 2015/7/29, Istanbul, Turkey.

妻木範行, FGFR3 軟骨形成異常症と疾患 iPS 細胞モデル研究、第 26 回 日本小児整形外科学会学術集会、2015/12/4、岐阜県岐阜市

Noriyuki Tsumaki, Use of cell reprogramming technologies in research on cartilage diseases, The Croucher Foundation Advanced Study Institute (ASI), 2016/1/11-13, Hong Kong.

山下晃弘、妻木範行、スタチンによる FGFR3 軟骨形成異常症の病態回復、第 29 回 日本軟骨代謝学会、2016/2/19-21、広島市

妻木範行、iPS 細胞モデルによる骨系統疾患の病態解明と創薬、第 15 回日本再生医療学会総会、2016/3/17-19、大阪市

Noriyuki Tsumaki, Use of induced pluripotent stem cell technologies in disease modeling of skeletal dysplasia, The 13th International Congress of Human Genetics (ICHG2016), 2016/4/3-7 Kyoto, Japan

Noriyuki Tsumaki, Application of iPS cell technologies to cartilage regeneration and disease modeling, The 3rd International Cartilage Repair Society (ICRS) Summit in collaboration with Osteoarthritis Research Society International (OARSI), 2016/4/10-11, Kyoto, Japan

Noriyuki Tsumaki, Application of iPSC technology to disease modeling for chondrodysplasia, Application of iPSC technology to disease modeling for chondrodysplasia, 2016/5/19-22 West Palm Beach, Florida, USA

妻木範行、疾患 iPS 細胞モデルを使った骨系統疾患の治療薬の探索、第 50 回日本小児内分泌学会学術集会 [ JSPE ] 第 9 回アジア太平洋小児内分泌学 [ APPES ] 総会、2016/11/17、東京

妻木範行、骨系統疾患の疾患 iPS 細胞モデルと創薬研究、第 39 回日本分子生物学会年会、2016/11/30、横浜

Noriyuki Tsumaki, Sik3 suppresses disease in murine OA, 2017 OARSI World Congress on Osteoarthritis, 2017/4/27-5/1, Las Vegas

妻木範行、同種 iPS 細胞を用いた関節軟骨損傷に対する再生治療法の開発第 9 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 ( JOSKAS 2017 ) 2017/6/22-24、札幌市

妻木範行、ラットの膝関節軟骨欠損モデルを用いた、ヒト iPS 細胞由来軟骨移植の安全性評価、第 38 回日本炎症・再生医学会、2017/7/18、大阪

妻木範行、軟骨細胞分化研究と関節軟骨

損傷の治療方法開発、第 35 回日本骨代謝学会学術集会、第 35 回日本骨代謝学会学術集会、2017/7/27-29、博多市

Noriyuki Tsumaki, Application of iPS cell technologies to the research of cartilage diseases, 2018 Bones and Teeth Gordon Conference, 2018/1/28-2/2, Houston, USA

[ 図書 ] ( 計 10 件 )

妻木範行、箭原康人、日本医師会、日本医師会雑誌 第 144 巻・特別号(1)、2015、3

妻木範行、山下晃弘、岡田稔、日本メディカルセンター、腎と骨代謝 第 28 巻第 3 号、2015、7

妻木範行、O.l.i.v.e. 第 5 巻第 3 号 ( 通巻 16 号 ) - 骨代謝と生活習慣病の連関 - 株式会社メディカルレビュー社、2015、8

妻木範行、ニュー・サイエンス社、月刊細胞 The CELL Vol.48 No.2, 2016、6

妻木範行、羊土社、実験医学 第 34 巻第 4 号、2016、5

妻木範行、山下晃弘、医学出版 月刊 糖尿病 DIABETES Vol.8 No6、2016、7

妻木範行、日本医学出版 先進医療 NAVIGATOR 今日の再生医療、2016、2

妻木範行、公益社団法人日本整形外科学会、日整会広報室ニュース ( 第 106 号 ) 2016、1

妻木範行、先端医学社 KeynoteR・A vol.4 no.4 2016、4

妻木範行、医学書院 標準整形外科学 第 13 版 2017、6

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 3 件 )

名称：新規軟骨細胞誘導方法

発明者：妻木範行

権利者：妻木範行

種類：特許

番号：特願 2017-500763

出願年月日：2016 年 2 月 19 日

国内外の別：国内

名称：新規軟骨細胞誘導方法  
発明者：妻木範行  
権利者：妻木範行  
種類：特許  
番号：15/552156  
出願年月日：2016年2月19日  
国内外の別：国外

名称：新規軟骨細胞誘導方法  
発明者：妻木範行  
権利者：妻木範行  
種類：特許  
番号：16752594.8  
出願年月日：2016年2月19日  
国内外の別：国外

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
ヒト iPS 細胞由来軟骨組織は免疫原性が低く  
移植用組織への利用が期待できる  
<https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/finding/161028-140000.html>

植物由来成分であるプテロシン B は SIK3 を  
阻害し変形性関節症の治療薬開発のリード  
化合物となる。  
<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/160325-100000.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

妻木 範行 (TSUMAKI, Noriyuki)  
京都大学・iPS 細胞研究所・教授  
研究者番号：50303938

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )