

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20480

研究課題名(和文)フルオシノロンアセトニド(FA)を用いた変形性関節症の予防・治療法の開発

研究課題名(英文)Development of prevention and repair of degenerative joint disorders with fluocinolone acetonide (FA).

研究代表者

笈田 育尚(OIDA, Yasutaka)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：50625720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：日本に約1000万人の患者がいると言われる変形性関節症は、慢性の関節炎を伴う関節疾患であるが、未だ確実な治療は存在しない。我々は、変形性関節症の治療法の開発を目的としてスクリーニングをし、フルオシノロンアセトニド(FA)を強力な軟骨細胞分化促進作用を有する薬剤として同定した。実際、免疫不全マウスの大腿骨膝蓋面に軟骨全層欠損を作製し、FAとTGF- β 3刺激したヒト骨髄由来間葉系間質細胞を欠損部に移植した。その結果、軟骨欠損部ほぼ完全に再生された。

研究成果の概要(英文)：Osteoarthritis is the most common chronic condition of the joints, affecting approximately ten million Japanese and articular cartilage repair remains a challenging problem. Based on a high-throughput screening and functional analysis, we found that fluocinolone acetonide (FA) strongly potentiated chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hBMSCs). In an in vivo cartilage defect model in knee joints of immunocompromised mice, transplantation of FA/TGF- β 3-treated hBMSCs could completely repair the articular surface.

研究分野：骨組織および軟骨組織などの硬組織の再生医療のトランスレーショナルリサーチ

キーワード：フルオシノロンアセトニド 軟骨細胞分化 軟骨再生 ヒト骨髄由来間葉系間質細胞

1. 研究開始当初の背景

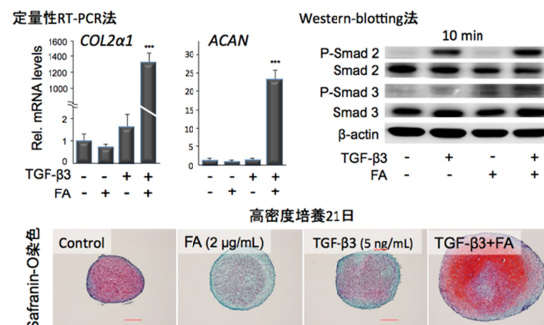
我が国における介護保険の要支援原因疾患の第一位は関節疾患である。関節疾患は、労働力の低下、生活の質の低下、寝たきり高齢者の増加、医療費の高騰などを引き起こす原因の一つと考えられ社会問題となっている。関節疾患の症状の多くは、変形性関節症により生じていると考えられており、変形性関節症への対応が必要である。この変形性関節症は関節軟骨の退行性変化が疾患の本態であり、関節軟骨の退行性変化への予防・治療の開発が急務である。

軟骨細胞増殖、軟骨再生作用を有することが知られている軟骨由来軟骨成長因子 (CCN2/CTGF) は、膝関節軟骨の加齢性変化に抵抗性を示すことや、実験的変形性関節症モデルの関節腔内に CCN2 を投与すると関節軟骨を石灰化させることなく修復できることが報告されてきた。我々はこれらの研究結果から、CCN2 を関節軟骨で特異的に増加させる方法を明らかにすれば、変形性関節症の治療が可能になると考え、ゲノム創薬の一つである GPCR オーファンペプチドリガンドライブラリーを用い CCN2 の発現を制御する新規ペプチドの探求を試み、CCN2 の発現を制御する新規ペプチド：ハルミンの同定に成功した。実際、ハルミンは、*in vitro* において軟骨細胞分化促進作用と抗炎症作用の双方を有しており、変形性関節症の予防、治療に有用な分子であると期待された (Emilio et al., *Biochimie*, 2013)。しかしながら、ラットを用いた *in vivo* 実験においては、変形性関節症の治療に対して期待される効果は認められなかった。

2. 研究の目的

我々は、軟骨細胞分化の分子生物学的観点に基づいたスクリーニングシステムを構築し、FDA から承認された 640 種類の薬剤を対象に、関節軟骨の退行性変化への予防・治療に効果がある薬剤のスクリーニング実験を実

施した。はじめに、軟骨の主成分である Type コラーゲンの合成を促進する薬剤を抽出するため、Type コラーゲンのルシフェラーゼレポーター遺伝子を軟骨細胞株 ATDC5 細胞に遺伝子導入し、一次スクリーニングを実施した。次に、抽出された 86 因子に関し、Aggrecan (*Acan*)、*Col2*、*Sox-9* の遺伝子発現量をハイスループット定量性 RT-PCR システムを構築し、二次スクリーニングを実施した。最後に、抽出された 8 因子に関し、ヒト骨髄由来間葉系間質細胞 (hBMSCs) を TGF- β 3 存在下で、高密度培養法にて培養し、軟骨基質合成に与える影響を評価した。その結果、ハルミンよりも軟骨細胞分化促進作用の強いグルココルチコイドの一つであるフルオシノロンアセトニド (Fluocinolone acetone: FA) を同定することに成功した (下図)。



FAはTGF- β 3の軟骨細胞分化作用を強力に促進する。

本申請研究では、(1) FA の軟骨細胞分化促進メカニズムを解明し、(2) FA を応用したより確実な変形性関節症の予防・治療法を開発する。

3. 研究の方法

(1) FA の軟骨細胞分化シグナル伝達経路の検討

同定した FA で hBMSCs を刺激し、刺激前後における細胞内の様々なシグナル伝達分子の活性を pathway array 法により検討し活性化されているシグナル経路の同定を試みた。また、発現量に違いを認めたシグナル経路に関し、通常の western blotting 法にて確認した。

同定されたシグナル経路に関し、そのシグナル経路の阻害剤または促進剤を作用させ、軟骨細胞分化がどのように影響をうけるか、

軟骨細胞分化マーカーを指標に，western blotting 法にて評価した。

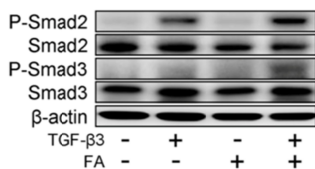
(2) *in vivo* における FA の変形性関節症の予防・治療効果の検討

In vivo において FA の軟骨再生能を検討するため，軟骨細胞誘導培地にてペレット培養した hBMSCs を免疫不全マウスの大腿骨膝蓋面に作製した軟骨全層欠損部に移植し，軟骨組織損傷部位の治療効果を検討した。移植 1 ヶ月後にマウスを屠殺し膝関節を回収、組織切片を作製し，H.E 染色，トリイジンブルー染色，軟骨特異的マーカーの Type collagen の免疫組織染色法を用い組織学的検討を行った。また，他グルココルチコイドである triamcinolone acetonide (TA)，dexamethasone (DEX) を対照群として用いた。

4. 研究成果

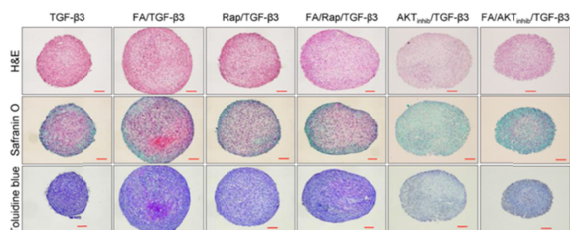
(1) FA の軟骨細胞分化シグナル伝達経路の検討

western blotting 法にて FA の TGF- β 3 シグナル伝達を確認した。その結果，FA は TGF- β 3 誘導性の Smad2/3 のシグナルを活性化することが明らかとなった(下図)。



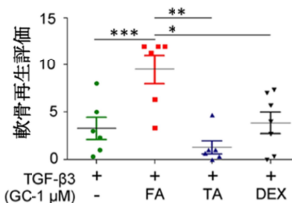
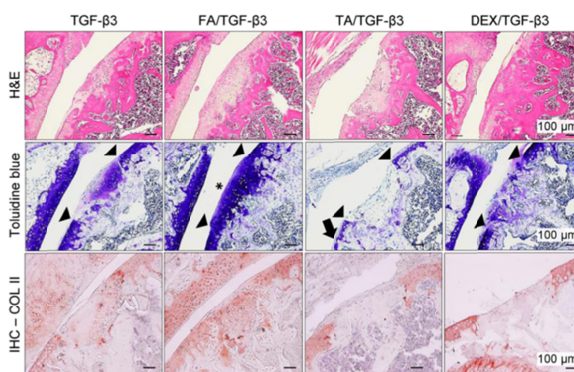
また，Pathway array 解析の結果，FA は mTOR/AKT シグナルを活性化することが確認された。

同定された mTOR/AKT シグナル経路に関し，mTOR 阻害薬であるラパマイシンで，FA の効果は抑制された。また，AKT 阻害剤で hBMSCs の軟骨細胞分化は完全に抑制された(下図)。



(2) *in vivo* における FA の変形性関節症の治療効果の検討

免疫不全マウスの大腿骨膝蓋面に作製した軟骨全層欠損部に軟骨細胞誘導培地にてペレット培養した hBMSCs を移植し，*in vivo* における軟骨再生能を検討した。その結果，FA/TGF- β 3 移植群において，II 型コラーゲン陽性の軟骨組織が再生されている像が確認された。一方，非刺激群，TGF- β 3 単独刺激群，FA 単独刺激群のみならず，TA/TGF- β 3，DEX/TGF- β 3 刺激群においても，軟骨再生は認められなかった(下図)。



以上の結果から，我々が軟骨細胞分化誘導因子として同定した FA は，hBMSCs において mTOR/AKT シグナル伝達経路を介して，TGF- β 3 の下流である Smad2/3 を活性化することで軟骨細胞分化を促進している事が明らかとなった。

また，マウスの大腿骨膝蓋面軟骨全層欠損部への hBMSCs 移植モデル実験の結果から，FA を用いて hBMSCs を軟骨細胞へと分化誘導し，軟骨損傷部に移植する治療法が変形性関節症をはじめとした軟骨が損傷，欠損した症例に対して有用である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Hara ES, Ono M, Yoshioka Y, Ueda J, Hazehara Y, Pham HT, Matsumoto T, Kuboki T. Antagonistic Effects of Insulin and TGF- β 3 during Chondrogenic Differentiation of Human BMSCs under a Minimal Amount of Factors. Cells Tissues Organs. 査読有 201(2):88-96. 2016
doi: 10.1159/000442411.
2. Hara ES, Ono M, Pham HT, Sonoyama W, Kubota S, Takigawa M, Matsumoto T, Young MF, Olsen BR and Kuboki T. Fluocinolone Acetonide Is a Potent Synergistic Factor of TGF- β 3-Associated Chondrogenesis of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells for Articular Surface Regeneration. J Bone Miner Res. 30(9):1585-96. 2015.
doi: 10.1002/jbmr.2502.

〔学会発表〕(計4件)

1. Hara ES, Ono M, Pham HT, Sonoyama W, Kubota S, Takigawa M, Matsumoto T, Young MF, Olsen BR and Kuboki T. A High-throughput Screening Identified Fluocinolone Acetonide as a Potent Synergistic Factor of TGF- β 3 mediated chondrogenesis of BMSCs for Articular Repair. The 36th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Seattle USA. 2015. 10.09-10.12.
2. Hara ES, Ono M, Pham HT, Sonoyama W, Kubota S, Takigawa M, Matsumoto T, Young MF, Olsen BR and Kuboki T. A Novel Method to Induce Strong Chondrogenesis of BMSCs and Promote Articular Surface Repair using Fluocinolone Acetonide and TGF- β 3. Biomedical Engineering Society 2015 Annual Meeting. Tampa USA. 2015. 10.07-10.10.
3. Hara ES, 大野充昭, Pham HT, 園山亘, 久保田聡, 滝川正春, 松本卓也, Young MF, Olsen BR, 窪木拓男 Among Glucocorticoids Fluocinolone Acetonide is Unique in Potentiating TGF- β 3 mediated Chondrogenesis of BMSCs and Promoting Articular Cartilage Repair. 第33回日本骨代謝学会学術大会 東京 日本 2015.07.23-07.25.

4. Hara ES, 大野充昭, Pham HT, 園山 亘, 久保田 聡, 滝川正春, 松本卓也, Young MF, Olsen BR, 窪木拓男 The combination of Fluocinolone Acetonide and TGF- β 3 Promoters Strong Chondrogenesis of hBMSCs for Articular Regeneration. 第6回骨バイオサイエンス研究会. 2015.07.05 岡山 日本

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計1件)

名称: 軟骨細胞分化誘導促進剤
発明者: 窪木拓男, エミリオ サトシ ハラ, 大野充昭, 園山亘, 滝川正春
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 5854492号
取得年月日: 2015年12月18日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笈田 育尚 (OIDA Yasutaka)
岡山大学・大学病院・医員
研究者番号: 50625720

(2) 研究協力者

窪木 拓男 (KUBOKI Takuo)
研究者番号: 00225195

大野 充昭 (ONO Mitsuaki)
研究者番号: 60613156

Emilio Satoshi Hara
研究者番号: 40779443