

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15661

研究課題名(和文) Dkk1分子発現亢進による新規変形性関節症治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of a new drug for treating osteoarthritis caused by increased expression of Dkk1 molecule

研究代表者

石黒 直樹 (Ishiguro, Naoki)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20212871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：Dkk1亢進作用を持つ化合物を見出すことは出来なかった。-catenin変異がありWnt全体が亢進する可能性を考えた。Dkk1はWntの標的分子で、亢進した細胞ではDkk1産生が亢進する。このDkk1産生細胞では亢進作用が検出されにくい可能性を考え、細胞を変更して化合物を得た。mRNAのレベルではDkk1発現亢進作用が確認できたが、luciferase assayではWnt活性が上昇しており逆の結果となった。研究の目標をDkk1発現低下作用のある薬剤の新規開発に変更し、薬剤を選定しmRNAレベルでDkk1発現低下、Wntの活性低下作用を確認し、滑膜細胞や牛軟骨細胞にて検討を継続している。

研究成果の概要(英文)：We could not find a compound with an enhancing effect on Dkk1 expression. As a cause, we considered the possibility that -catenin mutation induces the increasing of Wnt signal. Dkk1 is a target gene of Wnt signal, and Dkk1 production is enhanced in cells that are enhanced. Considering the possibility that the enhancing action of the drug is difficult to detect in such Dkk1 producing cells, two kinds of compounds were obtained by changing the cells. These drugs were able to confirm Dkk1 expression enhancing action even at the level of mRNA. However, in the luciferase assay by TOP flash, the Wnt signal activity increased and the opposite result was obtained. The goal of the research was changed to a new development of a drug having a Dkk1 expression lowering action. At present, one kind of drug is selected to confirm the reduction of Dkk1 expression at the mRNA level and the activity of decreasing the activity of Wnt signal. We are continuing the examination.

研究分野：整形外科学

キーワード：Dkk1 Wnt signal -catenin

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は極めて多くの罹患患者を持つ疾患である。治療では関節保護効果と関節症治療効果が求められる。関節保護効果を臨床的に証明した薬剤は存在しない。僅かにヒアルロン酸関節内投与に一部その期待が集まるのみである。ステロイドに見られるような強力な抗炎症作用は結果として、関節症進展を助長することは周知の事実である。関節炎と関節症進展が同時に治療される医薬品開発が望まれる。Wnt シグナル経路の抑制作用を持つFRZB(Frizzled related protein)の発現を亢進させることで関節症治療法の開発を目的に検討を行い、Verapamil を見出した。Verapamil はラットACL損傷モデルで関節症の進行をWnt シグナル抑制により抑えることが出来ることを示した。既に製薬企業から関節炎治療薬として特許申請がされていたために、臨床開発を断念した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、もう一つのWntシグナル抑制効果を持つDkk1を標的分子として、同じくDrug repositioning 戦略を用いてDkk1発現を亢進する化合物を選定し、関節症治療薬としての可能性を検討することである。Wntシグナルの抑制は関節炎抑制と、軟骨保護の複合的な効果が期待でき、関節保護効果と関節炎治療効果を併せ持つ関節治療薬の開発が期待できる。更にWntシグナルの抑制は関節炎の抑制効果をはじめ、Tide Mark骨化機序の抑制など軟骨保護に加えて複合的な効果が期待できる。関節保護効果と関節炎治療効果を併せ持つ関節治療薬の開発を目標とした。

3. 研究の方法

【H28年度】 一次 screening : Dkk1 のプロモーター領域をレポーター遺伝子である luciferase に繋いだ construct を作成し、HCT116 細胞に遺伝子導入する。安定的に導入

遺伝子を発現するクローンを得た後、luciferase assay により Dkk1 発現を促進する化合物を購入した Drug panel (約 1200 種類の既存化合物)より見出す一次 screening を行う。条件を満たす化合物が得られない場合は細胞種を変更する計画だった。そこで、細胞種をヒト軟骨細胞由来 HCS2/8 に変更して一次 Screening を継続し、化合物を複数得ることとした。HCS細胞にて容量依存性に Dkk1 mRNA 発現量の変化が誘導できる一次候補化合物を選定する。候補化合物が得られない場合は、更に細胞種を変更して一次 screening 繰り返し、候補化合物を選定する。候補化合物の選定に困難を極めた事からその理由を Wnt シグナルとの関連で検討する。購入したヒト軟骨細胞株を使用して再現性を確認して、確認できた物を一次候補化合物とする。

二次 screening : ヒト軟骨細胞株を使用して、Wnt3a 刺激により Wnt シグナルを亢進させる。それに一次 screening 化合物を作用させて細胞内 catenin 濃度を Western Blot で定量化し、Wnt シグナル抑制効果を確認する。細胞免疫組織で catenin の核内移行の抑制効果を組織学的にも検討する。Wnt シグナル活性化の化合物添加による容量依存的な抑制効果を証明する。容量依存的な抑制効果が証明できた化合物は Wnt シグナル亢進により惹起される Sox9, アグリカン, 型コラーゲン分子 mRNA の発現量低下を回復できることを検討する。これら軟骨細胞形質に関わる分子の発現量低下が回復されることを示すことは軟骨保護効果を確認する上で重要である。更に分解に関わる MMP-1, -3 についても mRNA 発現量の変化を確認する。ヒト OA 患者由来軟骨細胞にても同様な検討を行う。以上により軟骨細胞レベルでの検討で候補化合物の数を 1 ないし 2 に絞り込む。相応しい化合物が見出せない場合、再度一次 Screening から細胞種を変えてやり直す。

【H29 年度】 三次 Screening：ラット ACL 切断モデルにて組織学的に Mankin Score を用いて候補化合物の関節軟骨破壊抑制効果を検討する。経口投与と関節内投与の2経路について、薬効を検討する。ACL 切断後4週と8週に組織を採取して投与による効果を確認する。

また、Wnt シグナルの抑制剤は成長軟骨において肥大軟骨細胞への分化を抑制すると考えられる。ラット胎児脛骨器官培養にて肥大軟骨細胞層への効果を検討する。Hypertrophic chondrocyte への分化抑制効果が認められれば骨系統疾患への応用も可能性としてはいる。複数の候補化合物を得た場合、構造的な類似性を検討し、リード化合物として新規化合物合成の可能性を検討する。これには臨床研究支援センターの協力を必要とする。

4. 研究成果

Dkk1 の発現を亢進から Wnt signal を抑制して、結果として関節破壊を抑制する物質を既存化合物から求めることを目的に研究を開始した。

一次 screening として Dkk1 のプロモーター領域をレポーター遺伝子である luciferase に繋いだ construct を作成開始した。Dkk1 の転写開始点から上流約 2kbp をプロモーター領域として PCR で増幅した。pGL4.10 に組み込んだコンストラクトを HCT116 細胞に遺伝子導入し安定的なクローンを作成した。既存薬パネル 1186 種類の薬剤から dual luciferase assay により Dkk1 promoter 活性を上昇させる薬剤を 62 種類に絞り込んだ。薬剤濃度は一律 10 μ M で screening を行った。この 62 種類の薬剤について3回、同様の screening を行い上位9種類の薬剤について Dkk1 mRNA を RT-PCR により計測した。mRNA レベルでは有意な増加が見られず低下しているものも見られた。HCT116

細胞にて容量依存性に Dkk1 mRNA 発現量の変化が誘導できる一次候補化合物の選定を試みたが、安定的な結果を得るに至らなかった。高齢者で使用しやすい薬剤 320 種類に絞り、一度目の screening の結果上位 80 種類について細胞をヒト軟骨細胞由来 HCS2/8 に変更し、安定的な発現クローンを再構築して、一次 screening を行った。結果7種類まで絞り込んだが mRNA のレベルで有意に Dkk1 発現亢進作用が見られた薬剤は存在しなかった。HCT116 細胞には -catenin 変異があり細胞質に蓄積するため Wnt signal 全体が亢進していると報告されている。Dkk1 は Wnt signal の標的遺伝子のため HCT116 では Dkk1 産生が亢進している。HCS 細胞でも Dkk1 産生亢進が報告されており、このような Dkk1 産生細胞では screening による薬剤のプロモーター活性亢進作用が検出されにくい可能性があった。このため細胞を HEK293 細胞に再度変更して 320 種類の薬剤について一次 screening を行い2種類に絞り込んだ。この2種の薬剤は mRNA のレベルでも Dkk1 発現亢進作用が確認できた。しかし、同時に行った TOP flash による luciferase assay では Wnt signal 活性が低下することなくむしろ上昇しており逆の結果となった。結果、二次 screening の対象となる化合物を選定することが出来なかった。

Dkk1 は Wnt signal の標的遺伝子であるため一般的には Wnt signal 亢進による結果として Dkk1 の発現が亢進する。今回は Dkk1 の発現亢進による Wnt signal 抑制を目指したが、feed back 機構による代償が働く可能性が示唆された。そこで研究の方向性を変化させ、Wnt signal を低下させる薬剤は Dkk1 を低下させるため、研究の目標を Dkk1 発現低下作用のある薬剤の新規開発に変更した。現在このような薬剤を1種類選定し mRNA レベルでの Dkk1 発現低下、Wnt signal の活性低下作用を確認した。細胞種を滑膜細胞や牛の軟骨

細胞に変更して現在も研究を継続し、この化合物で二次 screening を開始している。この化合物は Wnt signal 抑制により抗炎症効果と軟骨保護効果を持つ物質である事が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

Asai S, Fujibayashi T, Oguchi T, Hanabayashi M, Hayashi M, Matsubara H, Ito T, Yabe Y, Watanabe T, Hirano Y, Kanayama Y, Kaneko A, Kato T, Takagi H, Takahashi N, Funahashi K, Takemoto T, Asai N, Watanabe T, Ishiguro N, Kojima T. Predictors of biologic discontinuation due to insufficient response in patients with rheumatoid arthritis who achieved clinical remission with biologic treatment: A multicenter observational cohort study. *Mod Rheumatol*. 2018 査読有 Mar;28(2):221-226. DOI: 10.1080/14397595.2017.1332558.

Hattori Y, Kojima T, Kaneko A, Kida D, Hirano Y, Fujibayashi T, Yabe Y, Oguchi T, Kanayama Y, Miyake H, Kato T, Takagi H, Hayashi M, Ito T, Shioura T, Takahashi N, Ishikawa H, Funahashi K, Ishiguro N. High rate of improvement in serum matrix metalloproteinase-3 levels at 4 weeks predicts remission at 52 weeks in RA patients treated with adalimumab. *Mod Rheumatol*. 2018 Jan;28(1):119-125. 査読有 DOI: 10.1080/14397595.2017.1317320.

Miyamoto K, Ohkawara B, Ito M, Masuda A, Hirakawa A, Sakai T, Hiraiwa H, Hamada T, Ishiguro N, Ohno K. Fluoxetine ameliorates cartilage degradation in osteoarthritis by

inhibiting Wnt/ -catenin signaling. *PLoS One*. 2017 Sep 19;12(9):e0184388. DOI: 10.1371/journal.pone.0184388.

査読有

宮本健太郎, 小田智之, 黒河内和俊, 高橋成夫, 平岩秀樹, 濱田恭, 山下暁士, 岸本烈純, 土谷早穂, 酒井忠博. 小児膝伸展機構損傷後に膝蓋腱骨化を生じた 2 例. *JOSKAS*. 2017; 42(2):364-365. 査読有

酒井忠博, 平岩秀樹, 濱田 恭, 小田智之, 山下暁士, 宮本健太郎, 岸本烈純, 土谷早穂, 大羽宏樹, 川村佑介. スポーツで受傷した膝複合靭帯損傷に総腓骨神経損傷を合併した 2 例. *JOSKAS*.

2017;42(2):370-371. 査読有

濱田 恭, 平岩 秀樹, 小田 智之, 山下 暁士, 宮本 健太郎, 岸本 烈純, 土谷 早穂, 川村 佑介, 大羽 宏樹, 酒井 忠博. Coxitis knee に対する人工膝関節置換術の治療成績. *JOSKAS*.

2017;42(2):296-297. 査読有

平岩 秀樹, 酒井 忠博, 濱田 恭, 大野 洋平, 小田 智之, 山下 暁士, 宮本 健太郎, 岸本 烈純, 土谷 早穂, 大羽 宏樹, 川村 佑介. 反復性肩関節脱臼に対する空気をういた関節造影 CT の診断能の検討. *肩関節*. 2017; 41(3):649-652. 査読有

Ishizuka S, Sakai T, Hiraiwa H, Hamada T, Warren K, Ono Y, Nakashima M, Matsukawa T, Oda T, Takamatsu A, Yamashita S, Ishiguro N.

Hypoxia-inducible factor-2 induces expression of type X collagen and matrix metalloproteinases 13 in osteoarthritic meniscal cells.

Inflammation Research. 2016;65(6):439-48. 査読有.

DOI:10.1007/s00011-016-0926-1.

Oda T, Sakai T, Hiraiwa H, Hamada T, Ono Y, Nakashima M, Ishizuka S, Matsukawa T, Yamashita S, Tsuchiya S, Ishiguro N., Osteoarthritis-derived chondrocytes are a potential source of multipotent progenitor cells for cartilage tissue engineering. Biochem Biophys Res Commun. 2016 ; 479(3):469-4752. 査読有 DOI:10.1016/j.bbrc.2016.09.085.

Takegami Y, Seki T, Kaneuji A, Nakao A, Hasegawa Y, Ishiguro N., Validity of a tablet computer version of the Japanese Orthopaedic Association hip disease evaluation questionnaire: a pilot study. Nagoya Journal of Medical Science. 2016;78(3):237 - 244. 査読有 Higuchi Y, Hasegawa Y, Seki T, Komatsu D, Ishiguro N. Significantly Lower Wear of Ceramic-on-Ceramic Bearings Than Metal-on-Highly Cross-Linked Polyethylene Bearings: A 10- to 14-Year Follow-Up Study. The Journal of arthroplasty. 2016;31(6)-1246 - 1250. DOI:10.1016/j.arth.2015.12.014. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

Tsuchiya S, Sakai T, Hiraiwa H, Hamada T, Ono Y, Oda T, Yamashita S, Miyamoto K, Kishimoto Y, Kawamura Y, Oba H, Ishiguro N. Analysis of Tendon-related Genes and Angiogenesis-related Genes in Tendon-like Cells. Annual Meeting of Orthopaedic Research Society. San Diego(America). 2017.03.19-22.

Miyamoto K, Ohkawara B, Hirakawa A, Sakai T, Hiraiwa H, Hamada T, Ohno K, Ishiguro N. Fluoxetine ameliorates cartilage degradation in

osteoarthritis by inhibiting Wnt/ -catenin signaling. Annual Meeting of Orthopaedic Research Society. San Diego(America). 2017.03.19-22.

Kasai T, Uezumi A, Nakatani M, Ishiguro N., Ohno K, Yamada H, Tsuchida K. Promethazine hydrochloride inhibits ectopic fat formation in skeletal muscle. Annual Meeting of Orthopaedic Research Society. San Diego(America). 2017.03.19-22.

Morita D, Nishida Y, Higuchi Y, Seki T, Ikuta K, Ishiguro N. Short-range ultraviolet irradiation with LED device effectively increases serum levels of 25(OH)D. Annual Meeting of Orthopaedic Research Society. San Diego(America). 2017.03.19-22.

西梅 剛, 高橋伸典, 小嶋俊久, 石黒直樹, 大河原美静, 大野欣司. DKK-1 分子発現亢進による新規変形性関節症治療薬の開発 ... 103 DKK-1promoter領域と pGL4.10 をつないだ construct 作成. 第30回日本軟骨代謝学会. 京都. 2017.03.03-04.

岸本烈純, 大河原美静, 酒井忠博, 平岩秀樹, 濱田恭, 大野洋平, 山下暁士, 小田智之, 土谷早穂, 大野欽司, 石黒直樹. Wnt/ ・カテニンシグナル経路は腱関連遺伝子発現に影響を与える. 第90回日本整形外科学会学術総会. 仙台. 2017.05.18-21.

〔図書〕(計0件)

該当なし

〔産業財産権〕

該当なし

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0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

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

石黒 直樹 (ISHIGURO Naoki)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号：20212871

(2)研究分担者

酒井 忠博 (SAKAI Tadahiro)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：60378198
(平成29年7月まで研究分担者)

平岩 秀樹 (HIRAIWA Hideki)
名古屋大学・医学部附属病院・病院講師
研究者番号：70566976

高橋 伸典 (TAKAHASHI Nobunori)
名古屋大学・医学部附属病院・病院講師
研究者番号：20570196
(平成29年7月より研究分担者)

(3)連携研究者
該当なし

(4)研究協力者
該当なし