

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 24 年 4 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659269

研究課題名（和文）SOX9 発現量増加に注目した軟骨細胞脱分化防止法開発—軟骨細胞移植治療の改善—

研究課題名（英文）The research of the drugs that can promote SOX9 mRNA expression in chondrocyte.

研究代表者

石黒 直樹 (ISHIGURO NAOKI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20212871

研究成果の概要（和文）：転写因子 SOX9 の発現量増加に対する薬剤効果を検討し、候補化合物を複数見出すことが出来たが、一部の実験系では効果が有るものの、ヒト軟骨細胞では効果を明らかとすることが出来なかった。Back up 研究から Runx2 発現を増強させる物質を見出し、これを先行させて研究を続行した。最終的に候補物質を 2 種類に絞り込み、これら化合物が BMP 刺激存在下で骨芽細胞形質の発現増強に関わること、骨芽細胞分化促進効果が有ることを確認した。骨芽細胞分化促進剤（骨形成促進剤及びその用途）として特許申請（特願 2011-185306JP）を行った。

研究成果の概要（英文）： We successfully found out two drugs that could up-regulate mRNA expression of SOX9. However, these two drugs showed only the limited effects on the metabolism of native chondrocytes. We could not achieve stable results with these two substances. We decided to repeat the drug screening again. According to the back up experiment concerning RUNX2, two drugs were identified. These two drugs up-regulate mRNA expression of ALP and osteocalcin with modification of the non-canonical pathway of BMP signal. We started the new experiment concerning newly bone formation with these drugs in animal model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	0	1,400,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	2,700,000	390,000	3,090,000

研究分野：医歯薬学

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：SOX9, Runx2, BMP, 骨芽細胞分化

1. 研究開始当初の背景
軟骨欠損の治療は整形外科領域における重要な課題であるにも関わらず、未だに解決に至っていない問題である。自己軟骨細胞移植治療（ACT）は現在臨床に用いられて

いる期待される治療法であるが、移植軟骨細胞を効率よく大量に得る方法が課題となっている。組織幹細胞や IPS 細胞といった可能性も検討されているが、その実現には

時間が必要であろう。単層培養下では軟骨細胞の形質転換に伴い細胞形態と表面マーカーに変化が起こることを明らかにした。これにより安定した形質を持つ軟骨細胞を得ることができるが、細胞数が限られるという問題も新たに発生した。培養過程で形質を安定させつつ、細胞増加を図る必要がある。先の萌芽研究にて「軟骨細胞の代謝に対する各種薬剤の影響の検討—スクリーニングシステムの構築—」にて、スクリーニング系を確立した。このスクリーニング系で種々の転写因子活性に影響を及ぼす物質の検討を行った。既にヒトに使用されている化合物から off label の効能を検討する。ヒトへの応用については安全性など比較的保证されている面が期待出来るので臨床使用への迅速な展開が期待出来る。

2. 研究の目的

当初目的は最も効率よく軟骨細胞の脱分化を抑制し、かつ細胞の増殖に影響しない物質を期間内に特定し、これをヒト軟骨細胞培養に用いて現状の ACT の治療成績を改善することであった。術後の繊維性軟骨の過剰増殖による移植軟骨過形成の合併症を経験した。これを解決するには良質な形質を持った軟骨細胞を確保する必要がある。この問題の解決方法の一つとしてヒトに使用実績のある既知化合物の中から SOX9 発現を増強する物質を特定してヒト軟骨細胞単層培養下での脱分化が抑制する方法を開発することであった。既知化合物としてヒトに投与されているので、臨床的には使用可能と考えた。最終的に化合物に絞り込み、期間内に安全性の確認を行い、医薬品の適応外使用として倫理委員会の承認を得て臨床研究を開始準備までを、本研究終了時までに達成することであった。

3. 研究の方法

健常者全血由来の genomic DNA から PCR 法で増幅した、約 1kb の SOX9 promoter を pGL4 Luciferase Reporter Vector に挿入した。10cm dish に培養したヒト軟骨肉腫細胞株 HCS2/8 に phRL-TK Vector (コントロール) と SOX9 promoter を導入した pGL4 Vector を co-transfection した。24 時間後に 96-well plate に細胞を移し、1040 種類の薬剤をそれぞれ 10 μ M 添加し、さらに 24 時間後に、dual-luciferase assay を行った。luciferase 活性を上昇させる傾向のある薬剤を 1 次スクリーニングで 40 種類に、さらに 2 次スクリーニングで 6 種類に絞り込んだ。最後に、この 6 種類の薬剤に対し、濃度依存性の luciferase 活性を検討した。これら化合物をヒト軟骨細胞(購入)に作用させて SOX9 の発現増強効果と II 型コラーゲン、プロテオグリカンの mRNA 発現量とタンパク量を定量的に評価した。

4. 研究成果

このスクリーニング系を用いて標的物質として転写因子 SOX9 の発現量増加に対する薬剤効果を検討した結果、候補化合物を複数見出すことが出来た (図 1)。抗凝固剤 X とインターフェロン誘導剤 Y が luciferase 活性を著しく上昇させた。X は、濃度依存的に luciferase 活性を上昇させる傾向があった。一方、Y は、20 μ M で強力に luciferase 活性を上昇させたが、50 μ M では細胞が死滅し、活性は著明に低下した。これら化合物を実際にヒト軟骨細胞の単層培養系用いて脱分化防止効果を検討したが、培養条件に大きく作用されることがわかり、再度スクリーニングから実験を再検討中となった。一部にはプロテオグリカン、II 型コラーゲンの mRNA 発現量の増加も見られたが、再現性に問題があった。一方、Back up 検討項目である RUNX2 mRNA 発現増強物質については化合物の絞り込みに成功し、オステオカルシン、ALP など骨芽細胞分化マーカーの増強を確認することが出来た。作用機序の解明を進め BMP signal の none-canonical pathway に作用している事を確認した。BMP signal が働

く環境下ではその作用を強めることが期待出来ることから骨折治療、骨形成促進作用を利用した骨移植術併用などの臨床での使用が期待出来る。この二種類の化合物は同一の薬効を持ち構造式の類似性がある。これら研究成果から特許申請（骨形成促進剤及びその用途：特願 2011-185306JP）を行った。この化合物を用いて臨床研究を開始するために必要な動物実験データを蓄積中である。

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 73 件）

1. Sakai T, Ishiguro N. Cartilage implantation for the bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. Clin Calcium. 22(2):245-9. Japanese. 2012 査読有
2. Kaneko H, Kitoh H, Wasa J, Nishida Y, Ishiguro N. Chondroblastoma of the femoral neck as a cause of hip synovitis. J Pediatr Orthop B. 21(2):179-82. 2012 査読有
3. Kitoh H, Kaneko H, Kondo M, Yamamoto T, Ishiguro N, Nishimura G. Spondylometaphyseal dysplasia with cone-rod dystrophy. Am J Med Genet A. 155A(4):845-9. 2011 査読有
4. Hirano Y, Kojima T, Kanayama Y, Shioura T, Hayashi M, Tsuboi S, Ishiguro N. Anti-tumor necrosis factor therapy in rheumatoid arthritis patients with a history of deep prosthetic joint infection: a report of four cases. Mod Rheumatol. 21(5):542-7. 2011 査読有
5. Kojima T, Kaneko A, Hirano Y, Ishikawa H, Miyake H, Oguchi T, Takagi H, Yabe Y, Kato T, Ito T, Terabe K, Fukaya N, Kanayama Y, Shioura T, Funahashi K, Hayashi M, Kato D, Matsubara H, Fujibayashi T, Kojima M, Ishiguro N. Study protocol of a multicenter registry of patients with rheumatoid arthritis starting biologic therapy in Japan: Tsurumai Biologics Communication Registry (TBCR) Study. Mod Rheumatol. in press, 2011 査読有
6. Kojima T, Kaneko A, Hirano Y, Ishikawa

H, Miyake H, Takagi H, Yabe Y, Kato T, Terabe K, Fukaya N, Tsuchiya H, Shioura T, Funahashi K, Hayashi M, Kato D, Matsubara H, Ishiguro N. Early aggressive intervention with tocilizumab for rheumatoid arthritis increases remission rate defined using a Boolean approach in clinical practice. Mod Rheumatol. in press, 2011 査読有

7. Hirano Y, Kojima T, Kanayama Y, Shioura T, Hayashi M, Kida D, Kaneko A, Eto Y, Ishiguro N. Influences of anti-tumor necrosis factor agents on postoperative recovery in patients with rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol. 29(5):495-500. 2010 査読有
8. Nakashima Y, Haga N, Kitoh H, Kamizono J, Tozawa K, Katagiri T, Susami T, Fukushi J, Iwamoto Y. Deformity of the great toe in fibrodysplasia ossificans progressiva. J Orthop Sci. 15(6):804-9. 2010 査読有
9. Dai J, Kim OH, Cho TJ, Schmidt-Rimpler M, Tonoki H, Takikawa K, Haga N, Miyoshi K, Kitoh H, Yoo WJ, Choi IH, Song HR, Jin DK, Kim HT, Kamasaki H, Bianchi P, Grigelioniene G, Nampoothiri S, Minagawa M, Miyagawa S, Fukao T, Marcelis C, Jansweijer MCE, Hennekam RCM, Bedeschi F, Mustonen A, Jiang Q, Ohashi H, Furuichi T, Unger S, Zabel B, Lausch E, Superti-Furga A, Nishimura N, Ikegawa S. Novel and recurrent TRPV4 mutations and their association with distinct phenotypes within the TRPV4 dysplasia family. J Med Genet. 47(10):704-709, 2010 査読有
10. Nishimura G, Dai J, Lausch E, Unger S, Megarbané A, Kitoh H, OH Kim, Cho TJ, Bedeschi F, Benedicenti F, Mendoza-Londono R, Silengo M, Schmidt-Rimpler M, Spranger J, Zabel B, Ikegawa S, Superti-Furga A. Spondylo-epiphyseal dysplasia, Maroteaux type (pseudo-Morquio syndrome type 2) and parastremmatic dysplasia are caused by TRPV4 mutations. Am J Med Genet. 152A(6):1443-1449, 2010 査読有

〔学会発表〕（計 72 件）

1. 石黒 直樹, 小嶋 俊久. 生物学的製剤の種類と外科治療のリスク. 第 55 回日本リウマチ

学会.2011.7.17-20.(神戸)

2. 鬼頭浩史, 金子浩史, 馬淵晃好, 三島健一、石黒直樹. 軟骨無(低)形成症の身体的特徴. 第26回東海小児整形外科懇話会 2011.2.19(名古屋)
3. 鬼頭浩史, 三島健一, 金子浩史, 石黒直樹. 進行性骨化性線維異形成症における早期(骨化発症前)の臨床的、X線学的特徴. 第84回日本整形外科学会 2011.5.12-15(横浜)
4. 鬼頭浩史, 金子浩史, 北小路隆彦, 服部義、石黒直樹. ペルテス病の治療成績に関連する因子の検討. 第50回日本小児股関節研究会 2011.6.24-25(諏訪)
5. 鬼頭浩史, 金子浩史, 馬淵晃好, 三島健一、松下雅樹、石黒直樹、北小路隆彦、服部義. 重度大腿骨頭すべり症に対する創外固定法による骨切り術—プレート法との比較— . 第22回日本小児整形外科学会 2011.12.8-9(京都)
6. Hiroshi Kaneko, Hiroshi Kitoh, Ryuichiro Yamamoto, Naoki Ishiguro, Kinji Ohno. Drug screening for transcriptional activation of SOX9. 2011 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2011.1.13-16. Long Beach(USA)
7. 鬼頭浩史, 金子浩史, 馬淵晃好, 三島健一、石黒直樹. 軟骨無(低)形成症の身体的特徴. 第26回東海小児整形外科懇話会. 2011.2.19(名古屋)
8. 鬼頭浩史, 金子浩史, 石黒直樹. 培養骨髄細胞移植を併用した骨延長術. 第83回日本整形外科学会 2010.5.27-30, (東京)
9. 鬼頭浩史, 金子浩史, 石黒直樹. 骨系統疾患に対する培養骨髄細胞移植を併用した骨延長術. 第83回日本整形外科学会 2010.5.27-30, (東京)
10. 酒井忠博, 平岩秀樹, 濱田恭, 山本隆一郎, 大間知孝顕, 大野洋平, 中島基成, 石塚真哉, 松川哲也, 石黒直樹. 三角筋拘縮症に合併した反復性肩関節脱臼の1例. 第37回日本肩関節学会 2010.10.8-9. (仙台)
11. 小嶋俊久, 石黒直樹, 萩野昇, 後藤美賀子, 山本一彦, 宮坂信之, 山中寿, 竹内勤, 當間重人. 本邦におけるエタネルセプトの使用状況—関節リウマチ 10427例の横断調査より—. 第54回日本リウマチ

学会総会 学術集会 2010.4.22-25(神戸)

12. 平野裕司, 大石幸由, 小嶋俊久, 石黒直樹, 金子敦史. RAに対するアダリムマブの臨床成績—生物学的製剤未投与例と他製剤からの変更例の比較—. 第54回日本リウマチ学会総会 学術集会 2010.4.22-25(神戸)

[図書] (計8件)

1. 石黒直樹, 中村茂, 他. II 疾患編 16 運動器疾患 変形性膝関節症. 今日の診断指針 第6版/医学書院:1526-1527, 2010

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 骨形成促進剤及びその用途
発明者: 大野欽司、石黒直樹、
鬼頭浩史、三島健一
権利者: 国立大学法人名古屋大学
種類: 特許
番号: 特許 2011-185306
出願年月日: 平成 23 年 8 月 26 日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]
ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

鬼頭浩史 (KITOH HIROSHI)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 40291174

酒井忠博 (SAKAI TADAHIRO)
名古屋大学・医学部附属病院・病院講師
研究者番号: 60378198

(3) 連携研究者

なし