

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792142

研究課題名(和文)変形性関節症の予防や治療を目指した結合組織成長因子発現制御ペプチドの探索と評価

研究課題名(英文) A search and evaluation of the peptides that control the connective tissue growth factor for the prevention and the treatment of osteoarthritis.

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) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：結合組織成長因子(CTGF/CCN2)は、軟骨細胞の増殖・成熟及び基質合成を促進し、関節軟骨を修復できることが報告されている。本研究では、CCN2の発現を亢進する新規化合物を網羅的に探索し、*in vitro*にてその機能解析を行った。

その結果、CCN2の発現を促進する因子として同定されたハルミンは軟骨分化促進作用、抗炎症作用の双方を持ち合わせる変形性関節症の予防、治療に有用な分子である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：CCN2 / connective tissue growth factor (CTGF) has been reported to have essential role in cartilage development, chondrocyte proliferation and differentiation as well as regulation of the extracellular matrix metabolism. This study screened a compound library and identified harmine as a novel inducer of CCN2. This finding indicates harmine as a potential drug for prevention and / or repair of cartilage degradation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学，再生歯学

キーワード：ハルミン CCN2 -カルポリン 軟骨細胞 軟骨再生

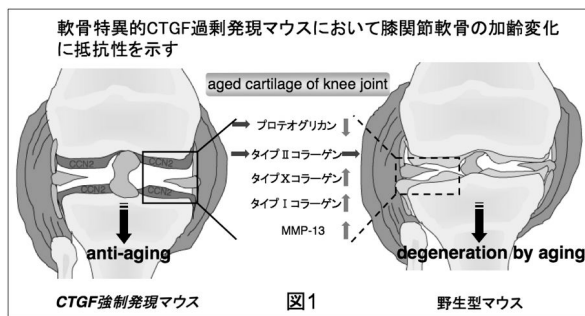
科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は、関節軟骨の退行性変化がその疾患の本態である。また、本疾患は介護保険の要支援原因疾患の第一位で、医療費の高騰、労働力の低下など、世界中で社会問題となっている。

中西らは、ヒト軟骨肉腫由来軟骨細胞株 HCS-2/8 より、軟骨系の細胞に強く発現する遺伝子 *hcs24/ctgf* を単離し、その遺伝子がコードする軟骨由来軟骨成長因子 (CTGF) が、軟骨細胞増殖、軟骨再生作用を示すことを発見した (Nakanishi et al., *Endocrinology*, 2000)。また興味深い事に、軟骨特異的 CTGF 過剰発現マウスにおいて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 CTGF 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おり (Nishida et al., *JBMR*, 2004, Itoh et al., *PLoS One*, 2013 Aug 12, : 図 1)。



「CTGF を関節軟骨で特異的に増加させる方法」が明らかになれば、これまで消炎鎮痛剤やヒアルロン酸の投与等しかなすすべがなかった変形性関節症の予防や治療が可能になると期待されている。

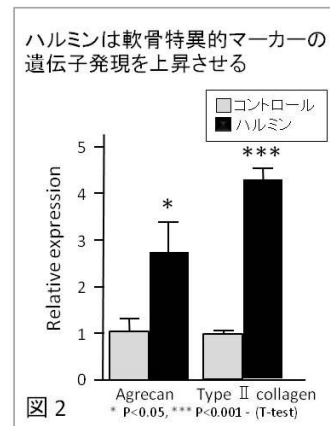
一方、2003 年にヒトゲノムの全解読が報告され、ゲノム科学を基盤とする新しい創薬アプローチが可能となり、ゲノム創薬は現在臨床で世界的に頻用されている薬物の

大半を占めるようになってきた。

しかし、変形性関節症に関する研究は他の生活習慣病と比較しても明らかに遅れており、変形性関節症に対するゲノム科学のアプローチは国内外を通じて殆ど行われていない。そこで、軟骨再生能、関節軟骨の加齢性変化に抵抗性を示す CTGF に注目し、ゲノム創薬の 1 つである GPCR オープンペプチドリガンドライブラリーを用い CTGF の発現を制御する新規ペプチドの探求を行い、CTGF の発現を制御する数種類の新規ペプチドの同定に成功した。

その同定されたペプチドの一つであるハルミンはアルカロイド化合物で、パッションフルーツなどに含まれる植物成分であり、人体に対して比較的安全性に富む物質である。また、ハルミンの軟骨細胞分化促進作用を検討した結果、ハルミンはマウス軟骨前駆細胞である ATDC5 の軟骨分化を促進する事が確認された

(図 2)。つまりこの結果はスクリーニングがうまくいっていることを示している。



2. 研究の目的

本研究では、CTGF の発現を亢進させるハルミンを含む新規同定ペプチドの網羅的探索を行い、同定された新規ペプチドの機能解析をし、*in vitro*における効果を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

スクリーニング実験では、ヒト軟骨肉腫由来軟骨細胞株 (HCS-2/8) を 96-well プレートに播種し、86 種類のオーファンリガンド (Enzo Life Sciences) にて刺激し、培地中の CCN2 のタンパク量を ELISA 法にて定量した。

同定した分子の細胞への毒性試験は、MTS 法 (Promega) および LDH 毒性アッセイ (Roche) にて検討した。

同定分子の軟骨分化に与える効果を検討するため、CCN2, Sox-9, Aggrecan, Type II Collagen の mRNA の遺伝子レベルを定量性 RT-PCR 法にて評価した。

また、軟骨前駆細胞である ATDC5 を使用した micromass culture において軟骨分化を誘導し、mRNA の遺伝子レベルを定量性 RT-PCR 法にて評価した。

最後に、炎症存在下における効果进行评估するため TNF- α で刺激し、CCN2, Sox-9, Aggrecan, Type II Collagen の mRNA の遺伝子レベルを定量性 RT-PCR 法にて評価した。

4. 研究成果

スクリーニングの結果、検索したオーファンリガンドライブラリー中ではハルミンが CCN2 の発現を上昇させる唯一の分子として同定され、5 nM の濃度において、細胞増殖を抑制したが、細胞毒性は認めなかった。また、ハルミンは軟骨分化マーカー遺伝子の発現量を定量した結果、CCN2, Sox-9, Aggrecan, Type II Collagen の発現を促進した。

Micromass culture の結果、ハルミンは CCN2, Aggrecan, Type II Collagen の遺伝子発現を促進した。(図 3)

炎症性環境下における効果を検討するため、軟骨肉腫細胞 (HCS-2/8) と変形性関節

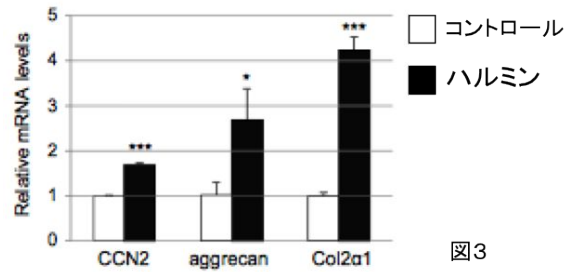


図3

症患者の軟骨細胞 (HAC) に、TNF- α で刺激を加えたところ、CCN2, Aggrecan, Type II Collagen の遺伝子発現が大きく減少した。ところが、ハルミンを加えると TNF- α の影響で減少した CCN2, Aggrecan, Type II Collagen の遺伝子発現が改善した。(図 4-1, 2, 3)

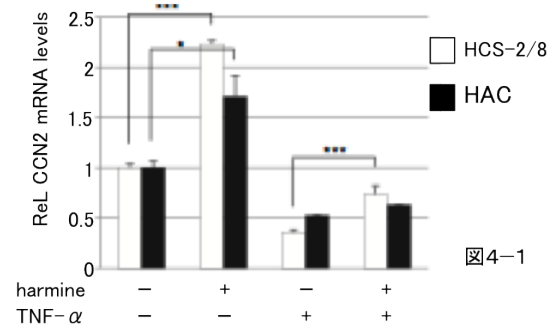


図4-1

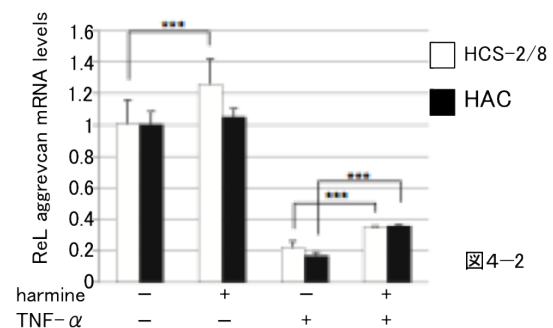


図4-2

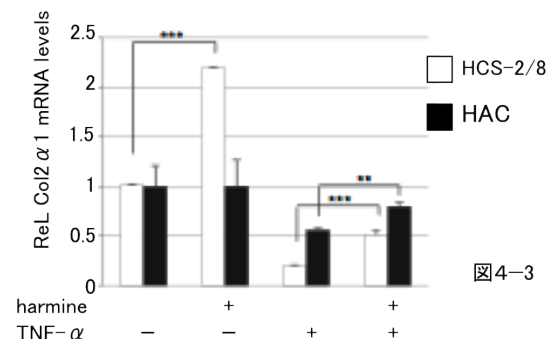


図4-3

本研究では、植物に含まれるアルカロイド化合物のカルボリンの1つであるハルミ

ンの軟骨代謝における，有効な効果を初めて明らかにした．つまり，*in vitro* において CCN2，Sox-9，Aggrecan，Type II Collagen の遺伝子発現を促進した．また，TNF- の刺激による炎症環境下において，harmine は TNF- によって大きく減少した CCN2，Sox-9，Aggrecan，Type II Collagen の遺伝子発現を改善した．

以上の結果から CCN2 の発現を促進する因子として同定されたハルミンは軟骨細胞分化促進作用，抗炎症作用の双方を持ち合わせる変形性関節症の予防，治療に有用な分子である可能性が示唆された．

しかし本研究は，*in vitro* 研究であり *in vivo* における研究が必要不可欠である．またハルミンは非常に小さな分子であるため，キャリアと化学的結合ができにくく，組織内でのハルミンの作用時間が限られてくる．臨床応用の為には，ハルミンと結合する生体材料や薬などの開発が必要であり，今後ますますの研究を遂行する．

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hara ES, Ono M, Kubota S, Sonoyama W, Oida Y, Hattori T, Nishida T, Furumatsu T, Ozaki T, Takigawa M, Kuboki T.

Novel chondrogenic and chondroprotective effects of the natural compound harmine
Biochimie

doi: 10.1016/j.biochi.2012.10.016.

査読有り 95巻 2013 pp374-381

〔学会発表〕(計 6 件)

Hara ES, Ono M, Kubota S, Sonoyama W, Oida Y, Hattori T, Nishida T, Furumatsu T, Ozaki T, Takigawa M, Kuboki T. The CCN2-inducer Harmine promotes

chondrogenesis and protection against TNF -induced inflammation. 第 59 国際歯科研究学会日本部会 (JADR) 総会・学術大会 - Hatton award competition. Hiroshima, Japan. 2011.10.8

Hara ES, Ono M, Kubota S, Sonoyama W, Oida Y, Hattori T, Nishida T, Furumatsu T, Ozaki T, Takigawa M, Kuboki T. The CCN2-inducer Harmine promotes chondrogenesis and protection against TNF -induced inflammation. 第 59 国際歯科研究学会日本部会 (JADR) 総会・学術大会. Hiroshima, Japan. 2011, 10.8

Hara ES, Ono M, Kubota S, Sonoyama W, Hattori T, Nishida T, Takigawa M, Kuboki T. Harmine, an inducer of CCN2/CTGF, promotes chondrogenesis and rescues TNF- -induced downregulation of cartilage markers. 第 2 骨バイオサイエンス研究会. Okayama, Japan. 2011.8.28

Hara ES, Ono M, Kubota S, Sonoyama W, Hattori T, Nishida T, Furumatsu T, Ozaki T, Takigawa M, Kuboki T. Harmine, an inducer of CCN2/CTGF, promotes chondrogenesis and protection against TNF- -induced inflammatory condition. 第 4 日本 CCN ファミリー研究会. Okayama, Japan. 2011.8.28

Hara ES, Ono M, Kubota S, Sonoyama W, Hattori T, Takigawa M, Kuboki T. Harmine, an inducer of CCN2/CTGF, promotes chondrogenesis and suppresses TNF- -induced inflammatory response. 第 29 日本骨代謝学会. Osaka, Japan. 2011, 7.29.

Hara ES, Ono M, Kubota S, Sonoyama W, Hattori T, Takigawa M, Kuboki T. Novel chondroprotective and anti-inflammatory effects of the natural compound harmine. 第 24 日本軟骨代謝学会. Fukuoka, Japan. 2011, 3.4.

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

6 . 研究組織

研究代表者

笈田 育尚 (OIDA YASUTAKA)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
インプラント再生補綴学分野 医員

研究者番号 : 50625720

研究協力者

窪木 拓男 (KUBOKI TAKUO)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
インプラント再生補綴学分野 教授

研究協力者

園山 亘 (SONOYAMA WATARU)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
インプラント再生補綴学分野 講師

研究協力者

大野 充昭 (ONO MITSUAKI)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
インプラント再生補綴学分野 助教

研究協力者

エミリオ ハラ サトシ

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
インプラント再生補綴学分野 助教

研究協力者

新川 重彦 (SHINKAWA SHIGEHICO)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
インプラント再生補綴学分野 医員

研究協力者

中島 隆 (NAKAJIMA RYU)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
インプラント再生補綴学分野 大学院生