

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670648

研究課題名(和文) 軟骨特異的蛍光X線デュアルプローブを用いた中小動物関節軟骨画像評価システムの確立

研究課題名(英文) Creation of articular cartilage-specific bio-molecular imaging probe with potentials of dual modalities.

研究代表者

大橋 俊孝(Oohashi, Toshitaka)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：50194262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：中小動物の関節軟骨病変の進行を鮮明に評価できるin vivo用蛍光・X線デュアルプローブの創出を目的として研究を行った。特に、X線プローブの要件としてヨウ素を含む化合物分子量がなるべく小さく、かつ軟骨プロテオグリカン結合性を担保させなければいけない。そのために、軟骨標的化部分を リジンオリゴマーとした。同造影剤の軟骨造影能力をラット膝関節を用い、ex vivoマイクロCTにより評価した。その結果、Ke4-TIBがラットOAモデル膝関節軟骨基質の減少を高解像度で画像化し、X線密度低下として数値化することができた。軟骨のX線in vivoイメージングの可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：In the process of cartilage degeneration seen in osteoarthritis, loss of proteoglycan from articular cartilage has been widely accepted as a critical early event. We investigated bio-molecular imaging of articular cartilage using our molecular probes targeting articular GAGs. Chondroitin sulfate, a major component of articular cartilage, has negative charge caused by sulfates. We designed lysine oligomers (monomer - pentamer) which were connected with the  $\alpha$ -carboxyl and  $\epsilon$ -amino group. These lysine oligomers possess  $\epsilon$ -amino groups as cationic moieties. Then, we created a novel articular cartilage imaging X-ray probe Ke4-triiodobenzene (Ke4-TIB) and demonstrated an ex vivo imaging of articular cartilage in rat osteoarthritic models. The imaging could quantitate loss of proteoglycan from osteoarthritic cartilage. Ke4-TIB may have a potential of in vivo X-ray imaging in animal arthritic models in future, which contribute to drug discovery research for osteoarthritis.

研究分野：マトリックス生物学

キーワード：プロテオグリカン 変形性関節症 X線 動物モデル 創薬

## 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 (OA) の本邦での有病者数は約 800 万人と推定されており、人口の高齢化とともにさらに増加することが予想される。医療経済上もその早期診断法の確立、新しい治療法の開発が急務である。

関節軟骨においてはアグリカンのコアタンパク部分に結合したコンドロイチン硫酸鎖あるいはヒアルロン酸が高度に水和したゲル体を形成し、それが空間を充たすことによって軟骨組織の力学的強度を生み出している。種々のプロテアーゼで分解されアグリカンが減少すると、軟骨の力学的強度が著しく損なわれ、一層病態が進行してしまう。中でも ADAMTS-5 によるアグリカンコアタンパク質の N 末端側の IGD ドメインでの切断が最も重要とされている (Glasson et al., Nature 2005 ; Little et al., J Clin Invest 2007)。以上から、特に早期診断において、関節軟骨基質分解の初期症状であるプロテオグリカン分解をより鋭敏に検出する画像解析法の実現が最重要点となる。

我々は、アグリカンのグリコサミノグリカン鎖に結合性を示すペプチドを用いれば、軟骨基質を定性・定量できるのではないかと考えた。塩基性ペプチドであるオクタアルギニン (R8) ペプチドが、マウス膝関節腔内投与により、関節軟骨に特異的に結合することを報告した (Osteoarthritis Cartilage 2009) 特願 2008-154179。さらに、ex vivo 3D 解析により、CAIA 関節炎モデルでの結合量減少を高解像度で蛍光イメージングすることに成功した。(総説：大橋、西田 Clinical Calcium 2011 他)

学術的な特色及び予想される結果と意義：

本研究は、中小動物の関節変性疾患モデルにおける関節軟骨画像評価用プローブ開発が目的である。1) 特効薬がまだない OA 治療の病態メカニズム研究・薬剤開発、2) 関節リウマチにおいては生物学的製剤などの治療

効果評価、さらに 3) 軟骨再生研究などにおいて、in vivo レベルでの評価システムへのニーズが高い。

完成されれば、本邦の関節変性疾患の基礎研究において、個々の研究の臨床応用の可能性を探るツールとして非常に価値の高いものとなる。

## 2. 研究の目的

しかしながら、蛍光による生体イメージングには、光の散乱・深部からの光の到達の困難さがあり、画像解析用の撮像は解像度に限界がある。本研究の目的として、蛍光の欠点を補う他の検出モダリティを付与して、関節軟骨の画像化に取り組むこととした。また、ヒト臨床においては、非造影の MRI 画像解析の技術がここ数年で急速に進歩している。

一方、OA の治療は、外科的な人工関節置換術以外には、確立されていない。上記のように、関節軟骨の変性はプロテオグリカンの分解がまず進行し、コラーゲンの分解まで進行すると、軟骨の変性は不可逆な病態に進行してしまう。軟骨変性の早期発見・早期治療は臨床でももちろん望まれるが、創薬・治療法の実現をする上では、動物モデル実験は欠かせない。

従って、我々はラット・ウサギなどを用いた動物実験に供する関節軟骨イメージング法の確立をめざし、その第一候補モダリティは X 線とした。ただし、骨折モデル実験における軟骨仮骨形成やマウスのような小動物では蛍光イメージングの有用性は残される。

## 3. 研究の方法

ウサギ、マウスでのモデルも検討したが、最終的には、ラットの内側側副靭帯、内側半月板の切除、後十字靭帯を切断する「関節不安定性 OA モデル」を作製し主に利用した。6 週間から 8 週間経過で、変形性関節症が完成

する．合成したX線プローブ ( Ke4-TIB ) を PBS に溶解させた溶液に , 大腿骨遠位端を浸漬し , 軽く PBS で洗浄後 , ex vivo マイクロ CT (Skyscan1272)にて撮影を行った . 3次元画像を再構築後 , X線密度を色表示させて , 骨軟骨の X線密度を画像化した . さらに , 関節軟骨部分を抽出し , X線密度の数値化を行う . 造影実験後 , 関節を取り出し , 固定・脱灰後パラフィン標本とした .

#### 4 . 研究成果

##### ( 1 ) Ke4-TIB の関節軟骨造影効果

造影剤処理前・処理後での X線画像解析結果で , 健常軟骨部での有意な造影効果を認めた .

##### ( 2 ) 健常側・OA 側での軟骨基質造影結果の比較

ラット大腿骨遠位端 ( 正常および OA 内側顆 ) の ex vivo X線マイクロ CT 造影を行い , OA 側での軟骨基質減少を画像化して確認することができた . 特に , 内側顆での軟骨基質濃度が低下していることが認められた . 一方 , 健常側では , 内顆部・外顆部ともに軟骨基質濃度減少は認められなかった . また , 軟骨部分の画像を抽出し , その部分の X線密度を数値化することに成功した . その結果でも , OA 側内顆部の軟骨基質減少が示された . さらに , 同サンプルを固定・脱灰し , パラフィンブロックを作製後 , 切片をサフラニン O 染色し , 病理切片上でも OA 側・健常側の比較ができた .

以上により , 動物実験での X線 in vivo バイオイメージングによる関節軟骨基質定量の可能性を示した .

( 3 ) その他の結果 : 先行して研究が開始されていた DOTA-Gd-G2R8 プローブの 7 T MRI 研究成果が Med Chem Commn 誌に掲載された . 特に , ウサギ膝関節軟骨の in vivo 造影により , 関節軟骨への造影剤集積や造影剤の関節包からの排泄の状況が経時的に観察されたことが , 評価された .

#### 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 5 件 )

Kawata K, Morishita K, Nakayama M, Yamada S, Kobayashi T, Furusawa Y, Arimoto-Kobayashi S, Oohashi T, Makishima M, Naitou H, Ishitsubo E, Tokiwa H, Tai A, Kakuta H. RXR Partial Agonist Produced by Side Chain Repositioning of Alkoxy RXR Full Agonist Retains Antitype 2 Diabetes Activity without the Adverse Effects *J Med Chem*. 査読有 2015; 58: 912-926. DOI: 10.1021/jm501863r

Maehara A, Nishida K, Furutani M, Matsumoto E, Ohtsuka A, Ninomiya Y, Oohashi T. Light and electron microscopic detection of inflammation-targeting liposomes encapsulating high-density colloidal gold in arthritic mice. *Inflamm Res*. 査読有 2014; 63: 139-147. DOI: 10.1007/s00011-013-0682-4

Susuki K, Chang KJ, Zollinger DR, Liu Y, Ogawa Y, Eshed-Eisenbach Y, Dours-Zimmermann MT, Oses-Prieto JA, Burlingame AL, Seidenbecher CI, Zimmermann DR, Oohashi T, Peles E, Rasband MN. Three Mechanisms Assemble Central Nervous System Nodes of Ranvier. *Neuron*. 査読有 2013; 78: 469-482. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.03.005

Young TR, Bourke M, Zhou X, Oohashi T, Sawatari A, Fässler R, Leamey CA. Ten-m2 is required for the generation of binocular visual circuits. *J Neurosci*. 査読有 2013; 33:12490-12509. DOI: 10.1523/jneurosci.4708-12.2013

Irie T, Oda K, Shiino A, Kubo M, Morikawa S, Urushiyama N, Aonuma S, Kimura T, Inubushi T, Oohashi T, Komatsu N. Design, synthesis, and preliminary ex vivo and in vivo evaluation of cationic magnetic resonance contrast agent for rabbit articular cartilage imaging. *Med Chem Commun*. 査読有 2013; 4: 1508-1512. DOI: 10.1039/c3md00229b

[ 学会発表 ] ( 計 3 件 )

大橋俊孝 他 新規造影剤による変形性関節症ラット関節軟骨の高解像度マイクロ CT 造影 第 46 回日本結合組織学会 (名古屋) 2014 年 6 月 5 日-7 日

大橋俊孝 他 リジンオリゴマープローブからなる関節軟骨特異的 X線プローブの創出 第 27 回日本軟骨代謝学会 (京都) 2014 年 2 月 28 日-3 月 1 日

大橋俊孝 , 加来田博貴 バイオイメージングを用いた関節軟骨の評価 第 27 回日本臨床バイオメカニクス学会 指定シンポジス

ト(神戸) 2013年11月22日-23日

〔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 0件)

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

〔その他〕

ホームページ等

分子医化学分野 ホームページ

<http://www.okayama-u-mbb.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大橋 俊孝(OHASHI TOSHITAKA)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：50194262

### (2) 研究分担者

西田 圭一郎(NISHIDA KEIICHIRO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号：80284058

加来田 博貴(KAKUTA HIROKI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号：80362961