

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09549

研究課題名(和文) mTORC1を標的とした変形性関節症治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of new therapeutic drugs for osteoarthritis targeting mTORC1

研究代表者

松下 雄彦 (Matsushita, Takehiko)

神戸大学・医学研究科・特命准教授

研究者番号：40467650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Mechanistic target of rapamycin complex (mTORC) 1 阻害剤の一つであるテムシロリムスの投与はヒト軟骨細胞においてIL1- β 誘導性軟骨細胞外基質遺伝子の発現低下、分解酵素発現上昇、オートファジー低下およびアポトーシスを抑制した。また、若年および老齢マウスの外傷性変形性膝関節症誘発モデルと老化促進マウスであるSenescence Accelerated Mice Prone 8 においてテムシロリムス膝関節内投与により、変形性膝関節症の進行遅延を認めた。テムシロリムスの軟骨細胞保護効果および変形性関節症進行に対する抑制効果が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

テムシロリムスはmechanistic target of rapamycin complex (mTORC) 1 阻害剤の一つであるが、水溶性であることより、他のmTOR阻害剤と比して関節内投与に適している可能性がある。本研究においてテムシロリムス関節内投与による変形性関節症進行抑制効果を小動物実験モデルにおいて確認された。また、軟骨細胞においてサイトカインに対する保護作用をみとめ、今後の変形性関節症治療薬としての開発のための前段階の研究成果が示された。

研究成果の概要(英文)：Temsirolimus is a water-soluble form of mechanistic target of rapamycin complex (mTORC) 1 inhibitor. In human chondrocytes, the treatment with temsirolimus inhibited IL1- β -induced reduction in extracellular matrix gene expressions, upregulation in cartilage degrading enzyme expressions, reduced autophagy and increased apoptosis. The intra-articular administration of temsirolimus attenuated trauma-induced progression of knee osteoarthritic (OA) in young and aged mice, and the spontaneous accelerated knee OA progression in Senescence Accelerated Mice Prone 8 mice. The results of this study suggested that temsirolimus may have a protective effect on cartilage and attenuate OA progression.

研究分野：変形性関節症

キーワード：変形性関節症 テムシロリムス

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 (OA) は国内では 2400 万人にも上るされる関節疾患であるがその治療薬は未だ開発されていない。

mechanistic target of Rapamycin (mTOR)は、細胞増殖や分化を制御する細胞内情報伝達物質であるが、その情報伝達において調節タンパクとし結合し、mTOR Complex (mTORC)と呼ばれる複合体を形成して情報伝達が行われる。mTORC1 抑制剤であるラパマイシンは、寿命延長効果¹⁾や老化に伴った種々の組織の変性を抑制することが報告されており²⁾、ラパマイシンによる抗老化効果が期待されてきた。

我々は、ヒト軟骨細胞において、ラパマイシンによるオートファジー活性化が OA 様遺伝子の発現やアポトーシスを抑制することを報告し³⁾、マウスの OA モデルにおいて、ラパマイシンの腹腔内投与やラパマイシン含有ゼラチンゲルの関節内投与により OA の進行を抑制することを報告した⁴⁾。さらに、mTOR は OA の進行に伴って上昇し、生後に mTOR を軟骨細胞特異的にノックアウトマウスしたマウスにおいて外傷性 OA の進行が抑制されたことが報告された⁵⁾。これらのことより mTOR の上昇は OA の発症に寄与し、mTOR の抑制は OA の治療となり得る可能性が強く示唆されてきた。一方、ラパマイシンは免疫抑制剤であることより、副作用を考慮すると関節内注射が好ましいと考えられる。テムシロリムスは国内で使用されている mTORC1 の一つであるが、水溶性であるという特徴があり、また、椎間板細胞の細胞死・オートファジー・細胞外基質分解に対する保護効果が報告されている⁶⁾。このため、他の mTOR 阻害剤と比して関節内投与に適する可能性があるが、テムシロリムスの関節内注射による OA に対する進行抑制効果は明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、テムシロリムス投与による軟骨細胞に対する保護効果ならびに関節内投与による OA 進行抑制効果を臨床応用への前段階的研究として調べることである。

3. 研究の方法

(1) In vitro:

ヒト正常軟骨細胞として NHAC-Kn (Normal Human Articular, Chondrocyte-knee, Lonza 社) を使用。まず、投与至適濃度を決定するために、テムシロリムスの薬剤毒性評価を行った。テムシロリムスの濃度を 10, 100nM, 1 μ M, 10 μ M、50 μ l に振り分けて投与し、MCCK-8 アッセイにて行った。次に、培養液中に IL-1 10ng/ml を添加して 24 時間ヒト正常軟骨細胞を培養したの後にテムシロリムスを投与しその 24 時間後に mRNA を採取した。群分けは IL-1 刺激 (-)・テムシロリムス刺激 (-) IL-1 刺激 (-)・テムシロリムス刺激 (+) IL-1 刺激 (+)・テムシロリムス刺激 (-) IL-1 刺激 (+)・テムシロリムス刺激 (+) の 4 群に分けておこなった。細胞外基質遺伝子や細胞外基質分解酵素および炎症性サイトカイン遺伝子の発現変化を real-time PCR にて調べた。mTOR・p-mTOR の発現は western blotting 法にて調べた。

オートファジーへ及ぼす影響を LC3-II/I 比と Beclin1 のタンパク発現量を western blotting 法を用いて調べた。さらに、アポトーシスに対する影響を TUNEL 染色にて評価した。

(2) In vivo:

12 週齢及び 55 週齢の野生型マウス (C57BL/6J) に内側半月板不安定化 (destabilization of the medial meniscus, DMM) による OA モデルを作成し、1 週毎に関節内にテムシロリムス (10 μ l, 100nM/回) を投与した。コントロール群には同量の生理食塩水を投与した。OA モデル作成術後 4、8、12 週で膝関節を採取した。Safranin-O/Fast green 染色を行い、Osteoarthritis Research Society International (OARSI) スコアを用いて OA 進行を組織学的に評価した。さらに免疫染色にて type II collagen, MMP-13, ADAMTS-5, IL-1 および IL-6 の発現を調べた。

また、10 週齢の老化促進マウスである Senescence Accelerated Mice Prone 8 (SAMP8) に対し、1 週毎に関節内にテムシロリムス (10 μ l, 100nM/回) を投与し、投与後 4、8、12 週で膝関節を採取して、OA 進行抑制効果を組織学的に評価した。

4. 研究成果

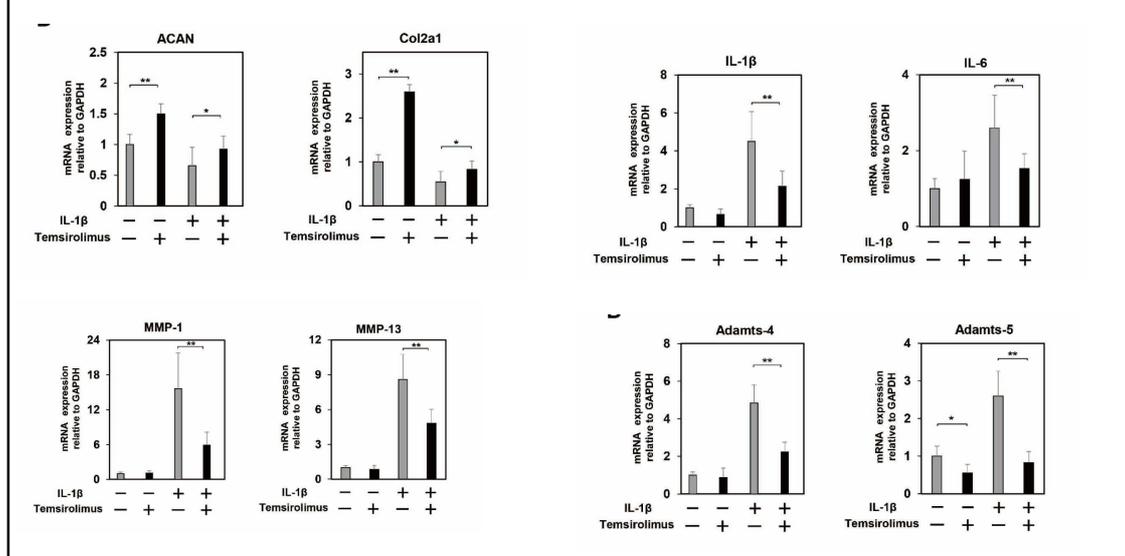
(1)

In vitro:

吸光度測定による細胞生存率は、テムシロリムス 1 μ M までは有意差を認めなかったが、1 μ M 以上では有意に低下していた。この結果を踏まえ 100nM を至適濃度とする方針とした。

Real-time PCR 解析では、IL-1 刺激により MMP-1, MMP-13, ADAMTS-4, ADAMTS-5, IL-1 及び IL-6 mRNA の発現が有意に上昇したが、テムシロリムス投与により有意に抑制されていた。一方、Aggrecan (ACAN) 及び COL2A1 は IL-1 により有意に低下したが、テムシロリムスにより部分に発現が改善された (図 1)。

図 1. 遺伝子発現変化



テムシロリムスの投与は、IL-1 刺激のあり、なしの条件下共に LC3-II/I 比と Beclin1 の発現を有意に上昇させた。また、TUNEL 染色における IL-1 誘導性 TUNEL 陽性細胞の割合を有意に減少させた。(図 2)

(2) In vivo:

12 週齢のマウスを用いた OA 誘発モデルにおいて、術後 8、12 週での OARS1 スコアは、コントロール群と比較してテムシロリムス投与群が有意に低く、OA 進行遅延を認めた。55 週齢のマウスを用いた OA 誘発モデルにおいても術後 8、12 週で OARS1 の有意な低値をテムシロリムス群でみとめ、OA 進行抑制傾向をみとめた (図 3,4)。

10 週齢 SAMP8 マウスを用いた実験では、投与後 8 週 (18 週齢) 12 週 (22 週齢) においてテムシロリムス投与群の OARS1 スコアがコントロール群と比して有意に低く、OA 進行遅延傾向を認めた。

術後 8 週での免疫染色による解析では、type II collagen 陽性細胞の割合は 12 週齢及び 55 週齢のマウスを用いた OA モデルにおいてテムシロリムス投与群が有意に高く、MMP-13、ADAMTS-5、陽性細胞の割合はコントロール群が有意に高かった。IL-1 及び IL-6 陽性細胞の割合は、生後 12 週及び 55 週の OA モデルではコントロール群が有意に高かったが、SAMP8 マウスではコントロールと投与群との間に有意差は認めなかった。

図 2. オートファジーとアポトーシスへの効果

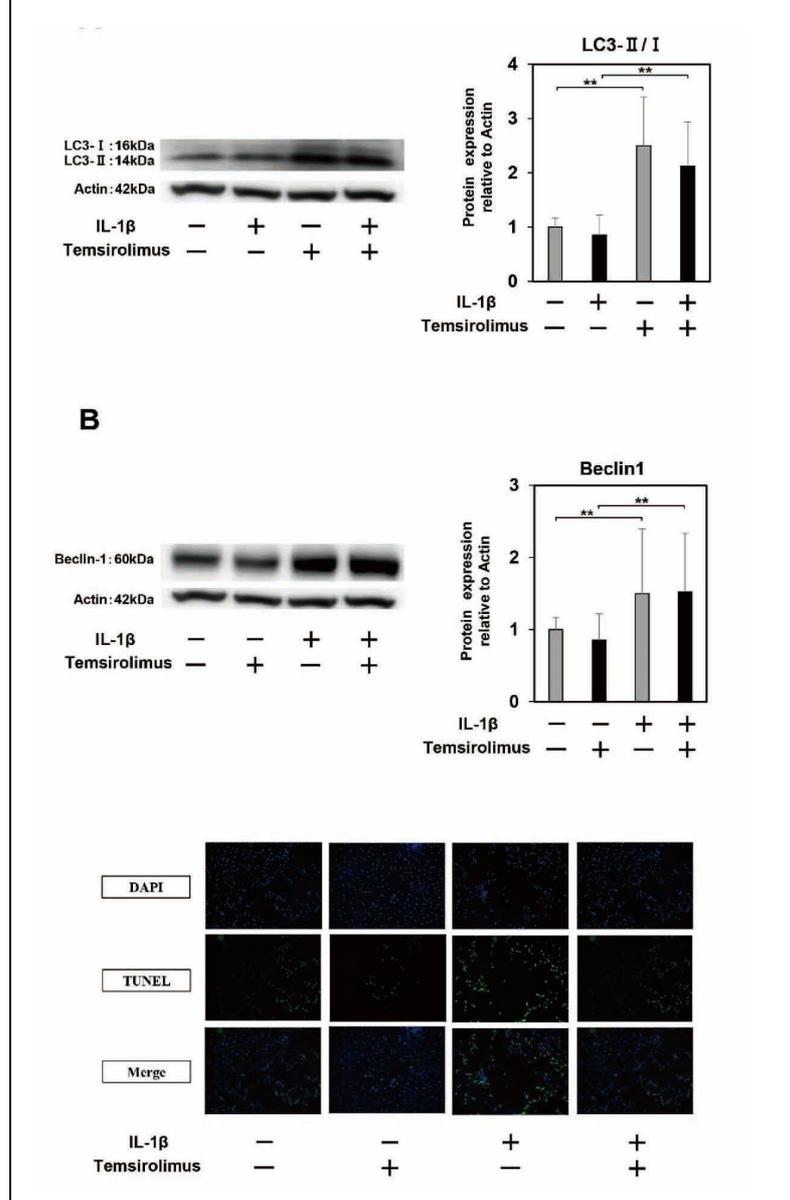


図 3. 12 週齢のマウスを用いた外傷性変形性関節症モデルの解析結果

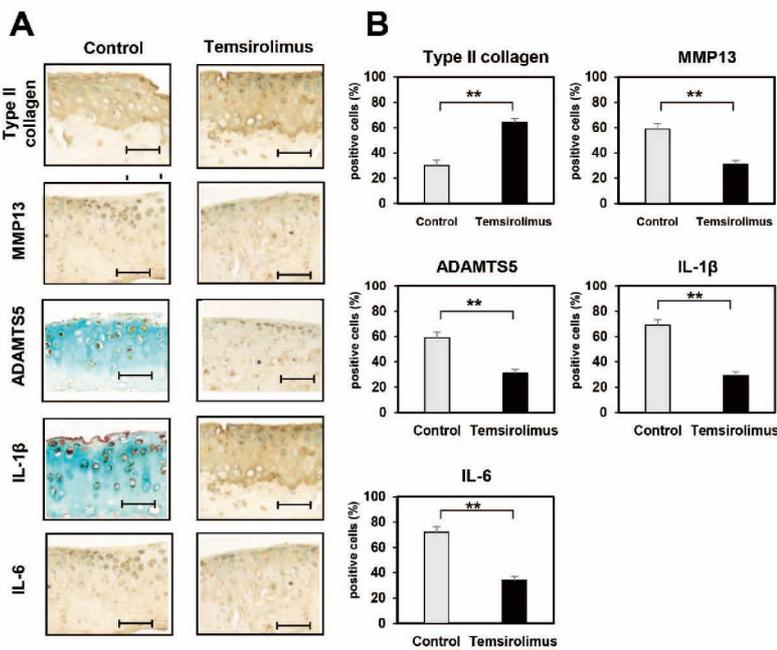
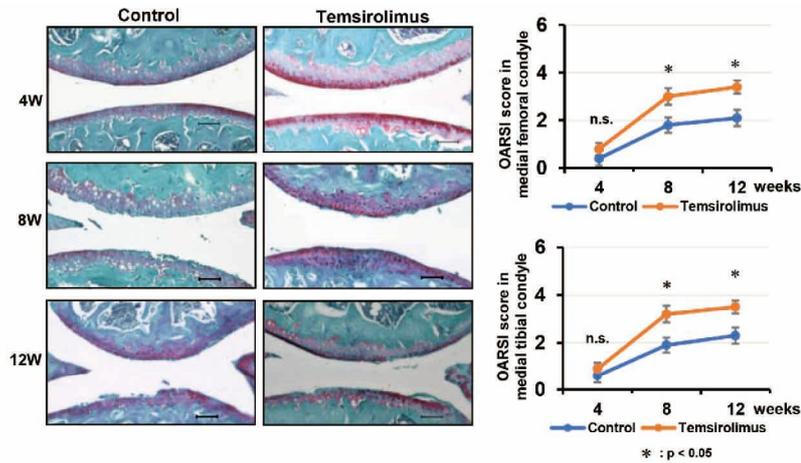
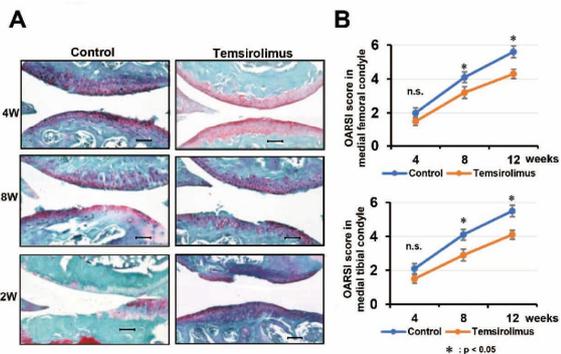
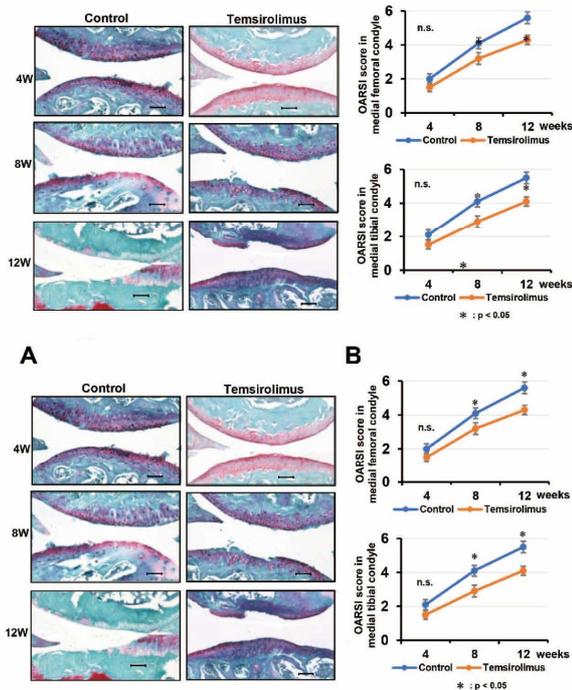


図 4. 55 週齢のマウスを用いた外傷性変形性関節症モデルの解析結果



本研究の結果から得られた知見をまとめは以下の通りである。ヒト軟骨細胞において IL-1 刺激誘導による OA 様発現変化、オートファジー低下、アポトーシス増加に対して抑制的な効果をもとめた。テムシロリムス膝関節内投与は若年および老齢マウスにおいて外傷誘発性膝 OA の進行および老化促進マウスにおける膝 OA 進行抑制した。

以上の結果から、テムシロリムス関節内投与による OA 進行抑制効果および軟骨細胞保護効果が示され、OA の治療薬としての可能性が示唆された。

<引用文献>

- 1) Harrison DE et al, Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice, *Nature*, 460(7253), 2009, 392-5
- 2) Wilkinson DS et al, Analysis of aging in *Caenorhabditis elegans*, *Methods Cell Biol*, 107, 2012, 353-81
- 3) Sasaki H et al, Autophagy modulates osteoarthritis-related gene expression in human chondrocytes, *Arthritis & Rheumatology*, 64(6), 2012, 1920-8
- 4) Matsuzaki T et al, Intra-articular administration of gelatin hydrogels incorporating rapamycin-micelles reduces the development of experimental osteoarthritis in a murine model, *Biomaterials*, 35(37), 2014, 9904-11
- 5) Zhang Y et al, Cartilage-specific deletion of mTOR upregulates autophagy and protects mice from osteoarthritis, *Annals of the Rheumatic Diseases*, 74, 2015, 1432-1440
- 6) Kakiuchi Y et al, Pharmacological inhibition of mTORC1 but not mTORC2 protects against human disc cellular apoptosis, senescence, and extracellular matrix catabolism through Akt and autophagy induction, *Osteoarthritis and Cartilage*, 27(6), 2019, 965-976

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森昭嘉、松下雄彦、長井寛斗、荒木大輔、神崎至幸、星野祐一、黒田良祐
2. 発表標題 mTORC阻害剤テムシロリムスの軟骨細胞保護効果に関する検討
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Akiyoshi Mori, Takehiko Matsushita, Kanto Nagai, Daisuke Araki, Noriyuki Kanzaki, Yuichi Hoshino, Ryosuke Kuroda
2. 発表標題 Protective and beneficial effects of Temozolomide on human chondrocyte under interleukin 1-beta stimulation
3. 学会等名 2021 OARSI Virtual World Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	由留部 崇 (Yurube Takashi) (10514648)	神戸大学・医学部附属病院・助教 (14501)	
研究分担者	松本 知之 (Matsumoto Tomoyuki) (50546588)	神戸大学・医学部附属病院・講師 (14501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	高山 孝治 (Takayama Koji) (80546490)	神戸大学・医学部附属病院・医学研究員 (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関