

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：33304

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12694

研究課題名（和文）骨指向性を有する新規変形性関節症治療薬の創薬研究

研究課題名（英文）Drug discovery for osteoarthritis with enhanced drug delivery to bone

研究代表者

高橋 達雄（Takahashi, Tatsuo）

北陸大学・薬学部・教授

研究者番号：50445904

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：変形性関節症（OA）は関節軟骨の変性によって引き起こされる疾患である。本研究の目的は、関節軟骨の修復作用を有する疾患修飾性OA治療薬を創製し、その有効性を立証することである。フラバノンの1つであるliquiritigenin（liq）は、軟骨細胞のエストロゲン受容体を介して細胞の増殖を促進させ、その結果、軟骨基質の形成を促進することを明らかとした。OAモデルマウスを用いた検証によって、liqはOAモデルマウスの関節病変を改善することが明らかとなり、骨指向性を高めたliqはOAに対する治療効果がliqと比較して高かった。以上の結果から、liqの疾患修飾性OA治療薬としての有用性が立証された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性関節症（OA）は高齢者に好発する慢性の関節疾患であり、痛みを伴うだけでなく関節機能の低下ももたらす。自覚症状のある患者は国内に1000万人いるといわれており、要介護の主要な原因疾患の一つでもあるため、OAの効果的な予防法と治療法の確立が急務の課題である。現在、OAの薬物療法は主に症状を改善するものしかなく、病気の進行を抑える疾患修飾性OA治療薬はない。本研究の成果は、フラバノンのliquiritigeninが疾患修飾性OA治療薬として有用であることを立証し、OA治療の新たな選択肢を増やすものである。

研究成果の概要（英文）：Osteoarthritis (OA) is a disease caused by the degeneration of articular cartilage, and is a major factor in the decline of quality of life. The purpose of this study is to create a disease-modifying OA treatment drug that has the effect of repairing articular cartilage and to demonstrate its effectiveness. It has been revealed that liquiritigenin (liq), a flavanone, promotes cell proliferation via the estrogen receptor of chondrocytes, and as a result, promotes the formation of cartilage matrix. Verification using OA model mice revealed that liq improved joint lesions in OA model mice, and liq tagged with acidic oligopeptides to enhance bone targeting had a higher therapeutic effect against OA than liq. These results demonstrate the usefulness of liq as a disease-modifying OA treatment drug.

研究分野：薬理学

キーワード：変形性関節症 軟骨基質 フラバノン liquiritigenin 軟骨細胞 滑膜細胞 骨指向性

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 (OA) は高齢者に好発する慢性の関節疾患であり、痛みを伴うだけでなく関節機能の低下ももたらすため QOL 低下の大きな要因となっている。日本における要介護になった原因の約 10%が関節疾患であり、健康長寿社会の実現のためには、OA の効果的な予防法と治療法の確立が急務の課題である。

OA の薬物療法は、主に痛みなどの症状を改善するものしかなく、病態の進行を抑えたり、再発を防止したりする治療薬 (=疾患修飾性 OA 治療薬) は臨床応用されていない。疾患修飾性 OA 治療薬の作用は、関節軟骨の修復を促進もしくは軟骨の分解を抑制して正常な軟骨構造を再建することによって関節機能を復元するものである。軟骨細胞は軟骨の構成成分である軟骨基質を合成・分泌することによって軟骨の形成と維持を担っており、申請者はフラバノンの 1 つである liquiritigenin (liq) が軟骨細胞に作用し、軟骨基質の形成を増加させることを新たに見出している。これは、liq が疾患修飾性 OA 治療薬となる可能性を示している。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、関節軟骨の修復作用を有する疾患修飾性 OA 治療薬を創製し、軟骨細胞培養系および OA モデルマウスを用いてその有効性を立証することである。

### 3. 研究の方法

本研究では、liq の有効性を立証した上で以下の 2 つのアプローチによりフラバノンの OA 治療効果の増強を目指す。

1 つ目のアプローチは、liq の軟骨基質形成促進作用に関わる機序を検証することで標的分子を明らかにし、コンピューター解析 (ドッキング解析) を行うことによって OA に対する治療効果の高い高活性フラバノンを創製する。

2 つ目のアプローチは、骨指向性ペプチドとして機能する酸性オリゴペプチドを高活性フラバノンに付加することによって骨指向性を増大させ、関節への薬物送達量を増加させる。

#### (1) マウス軟骨前駆細胞 (ATDC5 細胞) 培養系における軟骨基質形成の評価

ATDC5 細胞を 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  トランスフェリンと 30 nM 亜セレン酸ナトリウムを含む培地中で 5~20  $\mu\text{M}$  liq 存在下もしくは非存在下で 21 日間培養し、軟骨基質の形成を評価した。軟骨基質に含まれるグリコサミノグリカン (GAG) はジメチルメチレンブルー (DMMB) アッセイ及びアルシアンブルー液 (pH2.5) 染色によって定量し、軟骨基質中のアグリカンは、ウェスタンブロッティングにより定量した。細胞増殖能は DNA の定量及び BrdU アッセイによって評価した。軟骨細胞への分化は、軟骨細胞マーカー (Aggrecan、ALP、Col2a、Col10a、SOX9) の遺伝子発現を定量的 PCR 法によって評価した。

#### (2) ヒト滑膜細胞 (MH7A 細胞) 培養系における炎症性サイトカインとプロテアーゼ産生の評価

インターロイキン (IL)  $-1\beta$  は、滑膜細胞からの炎症性サイトカインやプロテアーゼの産生を促進することで軟骨基質を破壊し、OA の進行との関係が示唆されている。MH7A 細胞を IL- $1\beta$  で処置し、炎症性サイトカインとプロテアーゼの発現を定量的 PCR 法もしくはウェスタンブロッティングによって定量した。

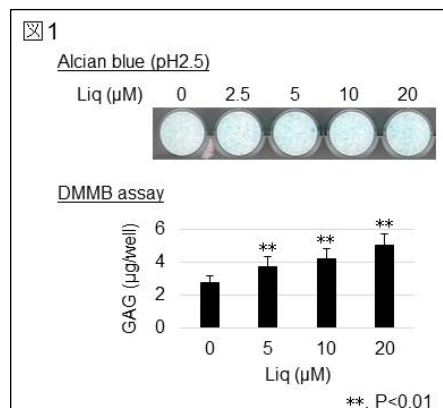
#### (3) OA モデルマウスの関節病変の評価

OA モデルとして半月板不安定化 (DMM) マウスを作製し、liq (3~30 mg/kg) を 1 日 1 回、4 週間にわたり経口投与した。また、酸性オリゴペプチドを付加した liq (D6-liq) は、1 週間に 1 回、4 週間にわたり DMM マウスに腹腔内投与した。その後、後肢の薄切片を作成してサフラニン染色の結果をスコア化 (OARSI スコア) することで治療効果の評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) liq の軟骨基質形成に及ぼす作用の検証

ATDC5 細胞は培養 9 日目~21 日目にかけて軟骨細胞への分化に伴い、細胞外マトリックス中の GAG 量とアグリカン発現量の経日的な増加が認められた。Liq 存在下では、培養 15 日目以降、濃度依存的に有意な GAG 量とアグリカン発現量の増加を認めた (図 1)。



Liqの軟骨基質形成促進作用の機序を明らかにする目的で、細胞増殖と軟骨細胞分化への影響を検証した。細胞数の指標としてDNAを定量した結果、liqは処置9日目以降でDNA量を濃度依存的に有意に増加させた。BrdUアッセイの結果においても、liqは細胞増殖能を増加させることが確認された。

ATDC5細胞は培養9日目以降、軟骨細胞のマーカー遺伝子の発現が経時的に増加し、軟骨細胞への分化が遺伝子レベルでも確認された。Liqはこれらの遺伝子発現に影響を与えなかった。

以上の結果から、liqは軟骨細胞の分化に影響を与えず、主に軟骨細胞の増殖を促進することで軟骨基質の形成を促進することが示唆された。

### (2) Liqの軟骨基質形成促進作用に関わる機序の解明

フラバノンの多くはエストロゲン受容体に作用することが知られているため、レポーターアッセイによりエストロゲン受容体の転写活性を測定したところ、liqはエストロゲン受容体の転写活性を濃度依存的に増加させた。エストロゲン受容体アンタゴニスト (fulvestrant) はliqによるGAG産生増加作用と細胞増殖促進作用をほぼ完全に抑制したことから、liqはエストロゲン受容体の転写活性の増加を介して軟骨基質形成を促進していると考えられた。他方、エストロゲン受容体の内因性リガンドであるエストラジオールは、エストロゲン受容体の転写活性をliqと同程度に増加させる濃度で作用させても軟骨基質形成を促進させなかったことから、軟骨基質形成促進作用はliq特有の作用であることが示された。

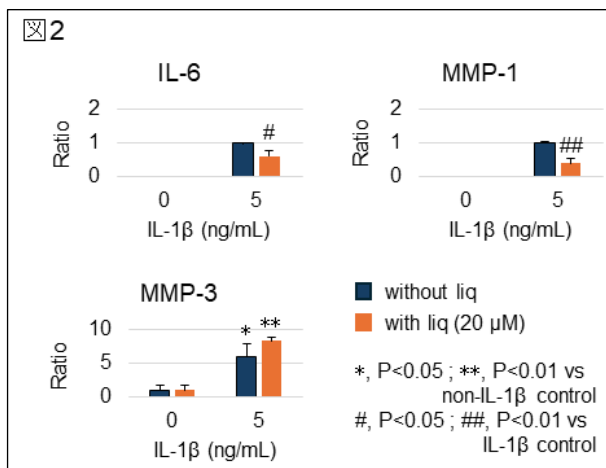
Liqは細胞増殖シグナルとして機能するAkt及びERKのリン酸化を増加させたが、fulvestrantを併用すると、これらのリン酸化は抑制された。また、AktもしくはERKの阻害剤はいずれもliqの軟骨基質形成促進作用を抑制したことから、liqはエストロゲン受容体を介してAkt及びERKを活性化することにより軟骨細胞の増殖を促進し、その結果、軟骨基質の形成を促進させたと考えられる。

### (3) 軟骨基質形成促進作用に関するフラバノンの構造活性相関

水酸基の位置と数が異なる複数のフラバノンを用いて検証した結果、軟骨基質形成促進作用にはフラバノンのA環7位もしくは6位水酸基とB環3'位もしくは4'位水酸基が重要であった。ドッキング解析の結果からも上記の水酸基はエストロゲン受容体との親和性に重要であることが確認された。フラバノンの中でもliqが最も強い軟骨基質形成促進作用を示したため、これを疾患修飾性OA治療薬の候補化合物としてOAモデルマウスの治療効果の検証に用いることとした。

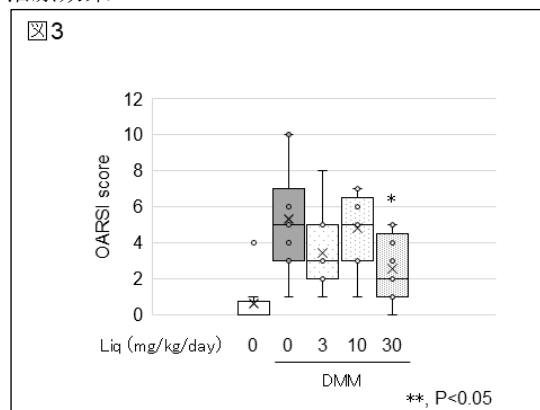
### (4) IL-1 $\beta$ 誘導性の炎症性サイトカインとマトロプロテアーゼ産生におけるliqの作用

IL-1 $\beta$ を処置したMH7A細胞では、IL-6、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-1およびMMP-3の培養培地中への分泌量の増加が認められた。Liqは、MH7A細胞におけるIL-1 $\beta$ 誘導性のIL-6とMMP-1の培地中への分泌を抑制したが、MMP-3の分泌に対しては影響を与えなかった(図2)。また、liqはエストロゲン受容体非依存的にIL-1 $\beta$ シグナルの下流にあるC/EBP $\beta$ の核内濃度を低下させることも見出した。以上の結果から、liqはMH7A細胞におけるIL-1 $\beta$ シグナルを抑制し、軟骨基質の破壊に関係するIL-6とMMP-1の産生を抑えることにより、OAの病態を改善する可能性が示唆された。



### (5) OAモデルマウスの関節病変に対するLiqの治療効果

OAモデルマウスのOARSIスコアは健常なマウスと比較して高値を示したが、高用量(30 mg/kg)のliqを1日1回投与することによってOARSIスコアは有意に低下した(図3)。また、30 mg/kgのliqを1週間に1回腹腔内投与してもOARSIスコアは改善されなかったが、D6-liq(liq 30 mg/kgに相当)は1週間に1回の腹腔内投与であってもOARSIスコアを有意に低下させた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋 達雄、山岸 しなの、鈴木 宏一、亀井 敬、高橋 寿明、三浦 雅一、松尾 由理、野村 政明
2. 発表標題 ヒト滑膜細胞におけるIL-1 誘導性のIL-6とマトリックスメタロプロテアーゼの産生に対するリクイリチゲニンの効果
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 高橋 達雄
2. 発表標題 甘草成分が軟骨を増やし、膝の痛みを改善する
3. 学会等名 北陸大学公開市民講座
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古山 佳奈、鈴木 宏一、三浦 雅一、松尾 由理、野村 政明、高橋 達雄
2. 発表標題 リクイリチゲニンのエストロゲン受容体を介した細胞増殖シグナル活性化と変形性関節症モデルマウスに対する治療効果
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石原 詩、山本 美夢、鈴木 宏一、亀井 敬、三浦 雅一、松尾 由理、野村 政明、高橋 達雄
2. 発表標題 リクイリチゲニンはエストロゲン受容体を介してATDC5細胞の軟骨基質産生を増加させる
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 達雄
2. 発表標題 健康寿命の鍵を握るフレイルは予防できるのか？
3. 学会等名 市民公開講座2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 達雄
2. 発表標題 フレイル予防を実現する骨粗しょう症と変形性関節症の予防・治療サプリメント事業について
3. 学会等名 令和3年度石川県次世代ヘルスケア産業協議会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 軟骨細胞への分化促進剤、軟骨細胞の増殖促進剤および軟骨基質産生促進剤	発明者 三浦雅一、高橋達雄、鈴木宏一、吉川展司	権利者 学校法人北陸大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/034704	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 軟骨細胞への分化促進剤、軟骨細胞の増殖促進剤および軟骨基質産生促進剤	発明者 三浦 雅一、高橋 達雄、鈴木 宏一、吉川展司	権利者 学校法人北陸大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-152615	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 軟骨細胞への分化促進剤、軟骨細胞の増殖促進剤および軟骨基質産生促進剤	発明者 三浦 雅一、高橋 達雄、鈴木 宏一	権利者 学校法人北陸大学
産業財産権の種類、番号 特許、7457353	取得年 2024年	国内・外国の別 国内

〔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	鈴木 宏一  (Suzuki Hirokazu)  (70257484)	北陸大学・薬学部・准教授    (33304)	

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	佐藤 友紀  (Sato Yuki)  (30367495)	北陸大学・薬学部・准教授    (33304)	

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