

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 3 月 13 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：22659270

研究課題名（和文）薬効スクリーニング法による OA 治療薬の開発—SOX9 を活性化する薬剤の
同定—研究課題名（英文）Drug development for osteoarthritis(OA) by drug screening for
transcriptional activation of SOX9

研究代表者

金子 浩史 (KANEKO HIROSHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：60566975

研究成果の概要（和文）：転写因子 SOX9 は軟骨分化におけるマスター遺伝子である。変形性関節症（OA）軟骨において SOX9 遺伝子を過剰発現させると、細胞外マトリックス合成が促進され正常軟骨レベルに修復される。ゆえに SOX9 遺伝子発現を促進する薬剤は OA 治療薬として期待できる。我々は SOX9 遺伝子のプロモーター領域に作用し、その発現を活性化する薬剤を同定するため、1,184 種類の FDA 認可薬のオフラベル効果をスクリーニングした。その結果、2 つの薬剤が SOX9 の遺伝子発現を活性化させる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：A transcription factor SOX9 is a key regulator of cartilage metabolism. Overexpression of SOX9 gene in osteoarthritis (OA) articular cartilage stimulates extracellular matrix synthesis and the expression of extracellular matrix components can be restored to levels similar to those in normal. These results suggest that a drug able to enhance SOX9 gene expression is expected to improve symptoms of OA. We screened for off-label effects of 1,184 chemical compounds approved by FDA to identify a drug able to enhance SOX9 gene expression by activating the promoter region. Finally, two compounds showed beneficial effects.

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	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	450,000	3,350,000

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

キーワード：SOX9 遺伝子、薬効スクリーニング、軟骨細胞、軟骨再生、オフラベル治療薬、プロモーター、ルシフェラーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1)急速な高齢化社会の到来とともに、変形性関節症 (OA) をはじめとする退行性の関節障害に罹患し、介護を必要とする人の数は増加の一途を辿っている。OA は関節軟骨の変性や損傷に起因するが、軟骨組織は自己修復能に乏しいため、軟骨組織の再生医療が治療法の一つとして期待されている。

(2)SOX9 遺伝子は 1994 年に屈曲肢異形成症の原因遺伝子として同定された。その後、遺伝子操作マウスの解析が行われ、SOX9 は軟骨組織のもととなる未分化間葉系細胞の凝集および軟骨細胞への初期分化に必須の転写因子であり、さらに分化後の軟骨細胞でも適切な増殖および成熟維持に重要であることが明らかとなっている。我々は SOX9 を強制発現させた骨髄細胞をヌードマウスの背部皮下に移植し、軟骨様組織を形成することに成功した。この組織では II 型コラーゲンは強発現されるのに対し、X 型コラーゲンの発現は認められなかったことから、SOX9 は軟骨分化までは促進的に、軟骨細胞の肥大化および骨化には抑制的に働くことが明らかとなり、SOX9 の活性化は軟骨基質の形質維持に極めて重要であるとの発想に至った。

(3)OA における軟骨変性の予防、修復に対する薬物治療の可能性を探るため、1,040 種類の FDA 認可薬を用いて、SOX9 遺伝子の発現を促進させる薬剤の薬効スクリーニングを行った。SOX9 遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼ・レポーターベクターに挿入し、これをヒト軟骨肉腫細胞株にトランスフェクションした。この細胞株に薬剤を添加し、デュアル・ルシフェラーゼアッセイを行った結果、ルシフェラーゼ活性を上昇させる 2 種類の薬剤 (抗凝固剤 X とインターフェロン誘導剤 Y) を同定した。

2. 研究の目的

(1) OA における軟骨変性の予防、修復に対する薬物治療の可能性を探るため、1,040 種類の FDA 認可薬 (MicroSource 社) を用いて薬効スクリーニングを行い、2 種類の薬剤 (抗凝固剤 X とインターフェロン誘導剤 Y) が SOX9 のプロモーター領域に作用して遺伝子発現を促進する可能性が示唆された。そのうち、抗凝固剤 X は濃度依存性に SOX9 の遺伝子発現を促進する可能性があることがわかった。抗凝固剤 X をヒト軟骨肉腫細胞株に添

加して、SOX9 の mRNA およびタンパク発現量の上昇を確認する。さらに SOX9 の標的である II 型コラーゲンやアグリカンの発現を評価する。また、軟骨内骨化過程を反映する ATDC5 株にこれら薬剤を添加して、X 型コラーゲンの発現を評価することにより、軟骨の形質維持 (肥大化の抑制) 作用を検討する。次いで、OA モデルのマウスにこれら薬剤を投与し、変性軟骨を組織学的に検討して OA 予防薬としての可能性を探る。

(2)別のオフラベル薬剤を検討するため、新たに 1,184 種類のスクリーニング用薬剤 (Prestwick Chemical 社) を購入し、同様の手法で薬効スクリーニングを行い、候補薬剤を同定する。

3. 研究の方法

(1)軟骨肉腫細胞株を用いた *in vitro* 実験
①ヒト軟骨肉腫細胞株 HCS2/8 を継代培養し、6 ウェル・プレートに 50%コンフルエントとなった時点で、ジメチルスルホキシド (DMSO) で溶かした抗凝固剤 X を添加した。投与薬剤の濃度は、予備実験と同様に 0 (DMSO のみ)、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50 μM とする。薬剤を添加しない HCS2/8 をコントロールとした。

②薬剤添加 24 時間後にトータル RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 法により SOX9 遺伝子の mRNA 発現量を調べた。また同時に SOX9 遺伝子の標的となる II 型コラーゲンおよびアグリカンの mRNA 発現量も検討した。

(2)ATDC5 株を用いた *in vitro* 実験

①ATDC5 株にインスリンを添加しながら培養することにより、軟骨多段階分化モデルを構築した。SOX9 を発現する前肥大軟骨細胞に分化した時点で、上述と同様の濃度勾配にて抗凝固剤 X を添加した。

②薬剤添加 12 時間、24 時間後、48 時間、72 時間後にトータル RNA および細胞内タンパクを抽出し、定量的 RT-PCR 法により X 型コラーゲンの発現を mRNA レベルで検討した。

(3)Prestwick Chemical 社製の薬剤を用いた薬効スクリーニング

①健康者全血由来の 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。

②10cm 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。

③24 時間後に 96-well plate に細胞を移し、1,184 種類の薬剤をそれぞれ $10\ \mu\text{M}$ 添加し、さらに 24 時間後に、dual-luciferase assay を行った。

④luciferase 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 27 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。

4. 研究成果

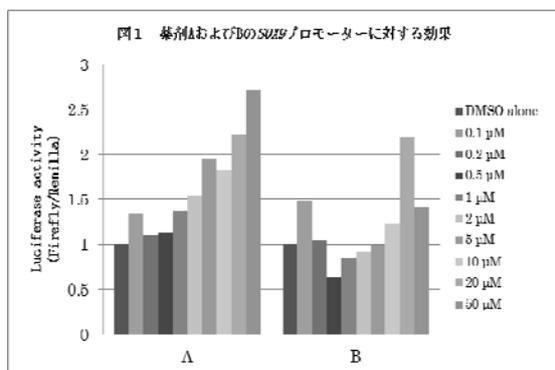
(1)軟骨肉腫細胞株に抗凝固剤 X を添加して、SOX9、II 型コラーゲンおよびアグリカンの mRNA 発現量を検討したが、明らかな上昇を認めなかった。

(2)ATDC5 株に抗凝固剤 X を添加して、X 型コラーゲンの発現を mRNA 発現量を検討したが、明らかな低下を認めなかった。

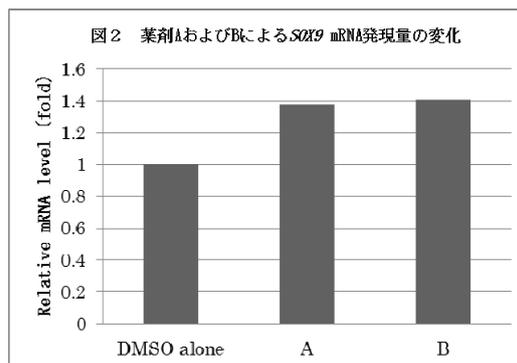
以上の結果より、予備実験において抗凝固剤 X は SOX9 promoter に作用して濃度依存性に luciferase 活性を促進していたが、今回の 2 種類の細胞株を用いた in vitro 実験では明らかな SOX9 遺伝子発現の上昇効果がみられず、それに関連した遺伝子発現への影響も認めなかった。そのため予定していた OA モデルマウスを用いた動物実験は行わず、(3)の実験を行った。

(3)①別の候補薬剤を探るため、1184 種類のスクリーニング用薬剤 (Prestwick Chemical 社) を購入し、予備実験と同様の手法で薬効スクリーニングを行った。その結果、2 つの薬剤 A と B が luciferase 活性を促進していた (図 1)。そのうち、薬剤 A は濃度依存性に luciferase 活性を促進していた。

②続いて、(1)と同様にヒト軟骨肉腫細胞株 HCS2/8 に薬剤 A および B を薬剤濃度 $10\ \mu\text{M}$ で添加し、24 時間後にトータル RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 法により SOX9 遺伝子の mRNA



発現量を調べた。その結果、どちらの薬剤も SOX9 遺伝子の mRNA 発現量を上昇させた (図 2)。



③濃度依存性に関する検討をヒト軟骨肉腫細胞株 HCS2/8 と ATDC5 株で行った結果、薬剤 A は $10\sim 50\ \mu\text{M}$ の濃度において、濃度依存性に SOX9 遺伝子の mRNA 発現量を上昇させた。

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 7 件)

- ①Kaneko 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):179-182, 2012 査読有
- ②Kitoh H, Kaneko H, Kondo M, Yamamoto T, Ishiguro N, Nishimura G. Spondylometaphyseal dysplasia with cone-rod dystrophy. Am J Med Genet 155A:845-849, 2011 査読有
- ③Mishima K, Kitoh H, Katagiri T, Kaneko H, Ishiguro N. Early clinical and radiographic characteristics in fibrodysplasia ossificans progressiva: A report of two cases. J Bone Joint Surg 93-A:e52:1-5, 2011 査読有
- ④Kaneko H, Kitoh H, Matsuura T, Masuda A, Ito M, Mottes M, Rauch F, Ishiguro N, Ohno K. Hyperuricemia cosegregating with osteogenesis imperfecta is associated with a mutation in GPATCH8. Hum Genet 130(5):671-683, 2011 査読有
- ⑤金子浩史, 鬼頭浩史, 石黒直樹. Vocabulary SOX9. 臨床雑誌 整形外科 62: 666, 2011 査読無
- ⑥金子浩史, 鬼頭浩史, 石黒直樹. 股関節炎症状を呈した大腿骨近位部軟骨芽細胞腫の 1 例. 日小整誌 20:120-124, 2011. 査読有
- ⑦鬼頭浩史, 北小路隆彦, 金子浩史, 馬淵晃好, 三島健一, 石黒直樹. Ponseti 法による先天性内反足の治療成績-全身性疾患や合併奇形の有無による成績の比較- 日小整誌 20:353-356, 2011 査読有

〔学会発表〕（計 12 件）

- ①金子浩史, 鬼頭浩史, 馬淵晃好, 三島健一, 松下雅樹, 石黒直樹, 西村玄. SOX9 遺伝子に変異を認めた small patella syndrome の非定型例. 第 23 回日本整形外科学会 骨系統疾患研究会、2011.12.9. (京都)
- ②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. 第 22 回日本小児整形外科学会 2011.12.8-9. (京都)
- ③金子浩史, 鬼頭浩史, 馬淵晃好, 三島健一, 松下雅樹, 石黒直樹, 岩田浩志, 北小路隆彦, 服部義. 1 歳 6 か月以降に診断された股関節脱臼に対する治療成績. 第 22 回日本小児整形外科学会学術集会 2011.12.8-9. (京都)
- 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 回小児股関節研究会 2011.6.24-25. (諏訪)
- ⑤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)
- ⑥金子浩史, 鬼頭浩史, 馬淵晃好, 三島健一, 石黒直樹. 二分肋骨の 5 例. 第 26 回東海小児整形外科懇話会 2011.2.19. (名古屋)
- ⑦Kaneko H, Kitoh H, Yamamoto R, Ishiguro N, Ohno K. Drug screening for transcriptional activation of SOX9. 57th ORS Annual Meeting 2011.1.13-16. (Long Beach, CA, 米国)
- ⑧鬼頭浩史, 金子浩史, 北小路隆彦, 石黒直樹. Ponseti 法による先天性内反足の治療成績-全身性疾患や合併奇形の有無による成績の比較-日本小児. 第 21 回整形外科学会 2010.11.26-27. (徳島)
- ⑨金子浩史, 鬼頭浩史, 馬淵晃好, 三島健一, 石黒直樹, 西村玄. 著明な肩甲骨低形成を伴う small patella syndrome の 1 例. 第 22 回日本整形外科学会 骨系統疾患研究会 2010.11.27. (徳島)
- ⑩金子浩史, 鬼頭浩史, 馬淵晃好, 三島健一, 石黒直樹. 非典型的大腿骨頭すべり症の特徴. 第 21 回日本小児整形外科学会学術集会 2010.11.26-27. (徳島)
- ⑪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 2010.5.26-30. (東京)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 浩史 (KANEKO HIROSHI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教
研究者番号：60566975

(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

(3) 連携研究者

なし