

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659665

研究課題名(和文)新規スクリーニング法を用いた変形性膝関節症治療薬の開発

研究課題名(英文) a new disease-modifying osteoarthritis drug (DMOAD) candidate using a cell based screening system

研究代表者

矢野 文子 (Yano, Fumiko)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80529040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Col2-GFP-ATDC5システムによる2500種類の低分子化合物スクリーニングの結果、軟骨分化促進化合物としてTD-198946(TD)を同定した。OA治療候補薬として、TD-198946の効果を見る為に、マウスOAモデル(予防モデルもしくは治療モデル)の膝関節腔内に注射を行ったところ、膝関節軟骨組織の修復と破壊抑制に効果があることが示唆された。TDのターゲット分子を探索するためにDNAマイクロアレイと直接の標的分子を探索するためにLC-MSMS解析を行い、in vitroでの作用メカニズムの解析を行った。TD-198946はRunx1の発現を上昇させ、軟骨分化を促進させることがわかった。

研究成果の概要(英文)：To identify a new disease-modifying osteoarthritis drug (DMOAD) candidate, we screened 2500 synthetic small compounds for chondrogenic agents via four steps using the Col2GFP-ATDC5 system and identified a small thienoindazole derivative compound, TD-198946, as a novel DMOAD candidate. We tested its efficacy as a DMOAD via intra-articular injections directly into the joint space in a mouse model of OA both at the onset (prevention model) and 4 weeks after (repair model). We further investigated the mechanism of the drug action and its molecular target using in vitro (DNA microarray analysis and Proteomic analysis) and in vivo assays. TD-198946 strongly induced chondrogenic differentiation without promoting hypertrophy and successfully prevented and repaired degeneration of the mouse articular cartilage. TD-198946 exerted its effect through the regulation of Runx1 expression.

研究分野：軟骨代謝学

キーワード：変形性膝関節症 軟骨再生

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省では、国内での変形性膝関節症 (Osteoarthritis: 膝 OA) 患者数を、自覚症状を有する患者数で約 1000 万人、潜在的な患者数 (X 線診断による患者数) で約 3000 万人と推定しており、高齢人口の増加によって運動器変性疾患の患者数は増え続けている。その主たる疾患である変形性膝関節症については加齢や物理的ストレス、炎症などの関与が示唆されているものの、分子レベルでの病態解明は始まったばかりであり、関節軟骨の変性予防や、修復・再生といった本質的な治療技術は現在も確立されていない。その病因については加齢や物理的ストレス、炎症などの関与が示唆されているものの、分子レベルでの病態解明は始まったばかりである。申請者らのグループでは従来から変形性膝関節症の基礎研究を展開しており、変形性膝関節症の *in vivo* での解析を可能にすべく世界に先駆けてマウスを用いた変形性膝関節症モデルを樹立し (Osteoarthritis Cartilage 13:632-41,2005)、そのモデルを用いて Runx2 や C/EBP β 、Carminerin、HIF2A などの軟骨内骨化を制御する転写因子群が変形性膝関節症の発症・進行をも強力に制御していることを明らかにした (Arthritis Rheum 54:2462-70,2006, Nature Med 12:665-70,2006, PLoS One 4:e4543,2009, Nature Med 16:678-86,2010)。申請者らは、軟骨内骨化の後期にみられる軟骨細胞の肥大分化に類似した現象が変形性膝関節症においてもみられること、肥大分化促進因子を抑制することによって変形性膝関節症の発症・進展を抑えられることを証明した (Arthritis Rheum 60:166-78,2009)。しかしながら、変形性膝関節症に対する根本的な治療法は未だなく、軽度から中等度の膝 OA に対する治療は運動療法、ヒアルロン酸注射や疼痛コントロールといった、対処療法が行われており、現在までに原因療法となる軟骨組織再生を誘導する治療薬はこれまでにない。

2. 研究の目的

新規軟骨分化モニタリングシステムである Col2GFP システムを利用し、低分子化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、関節軟骨再生を誘導する化合物を同定する。同定した化合物の軟骨分化作用機序の解明するために最先端の分子生物学的手法で網羅的に解析し、安全かつ有効な新規変形性膝関節症治療薬の開発することを目的とする。さらにマウスモデル上でも治療効果の検討を行い、変形性膝関節症の新規治療法の実現化を総合的に加速することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 大規模低分子化合物のスクリーニング

大量スクリーニングをより簡便にするべく新規軟骨分化モニタリングシステムを用いた。軟骨細胞特異的に発現する 2 型コラーゲンプロモーター断片 (Col2) の下流にクラゲの発光蛋白 (GFP) 遺伝子を組み込んだ合成遺伝子 (Col2GFP) で、この遺伝子が導入された細胞は軟骨細胞に分化すると GFP の蛍光を発する。このシステム (4. 研究成果 (1) 図) を利用し、低分子化合物ライブラリーのスクリーニング (約 5000 種類) を行い、GFP の蛍光を指標に軟骨分化を強力に誘導する低分子化合物を同定した。

(2) 同定した化合物の軟骨分化作用機序を *in vitro* で解析

同定した軟骨分化誘導候補低分子化合物の最適濃度の検討のため、マウス、イヌ、ヒト関節軟骨細胞を用いて、*in vitro* 解析を行う。これらの細胞に 1) でヒットした化合物を種々の濃度で曝露し、培養 1 週間で mRNA を回収し、リアルタイム PCR 法で軟骨分化誘導能を、軟骨基質合成能を染色で解析した。

(3) 関節軟骨再生誘導化合物の分子メカニズム解析

同定した化合物の関節軟骨再生誘導の分子メカニズムを明らかにするため、軟骨分化のできる細胞株に化合物を曝露し、Total RNA を回収後、cDNA マイクロアレイを行い、遺伝子発現プロファイルを取得した。

化合物の結合タンパク質を明らかにするため、化合物結合型ナノ磁性ビーズを作製し、LC/MS による同定を行った。

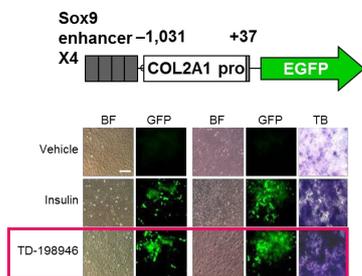
(4) 変形性膝関節症モデルマウスを用いた関節軟骨再生誘導化合物の治療効果の検討

申請者らが確立したマウス膝 OA モデルを用いた (Osteoarthritis Cartilage 13:632,2005)。OA 誘発手術後 8 週でほぼすべての野生型マウスの膝に OA が発症していることを確認している (Osteoarthritis Cartilage 13:632,2005) ので、術後 8 週より、野生型マウスの膝関節腔内に 2) で最適化した濃度の化合物を局所投与し、膝 OA に対する治療効果、発症の進展の影響を組織学的解析で検討した。組織学的評価基準は、近年、動物膝 OA モデルの重症度診断において世界的な標準として注目されている Osteoarthritis Research Society International (OARSI) が提唱する histopathology grading system (Osteoarthritis Cartilage 14:13,2006) および我々が確立した grading system を用いて定量化した。また、軟骨必須転写因子 Sox9、その Cofactor である Sox6、(3) で得られた誘導因子、COL10A1、MMP-13、VEGF などの肥大分化、石灰化マーカーの発現を免疫組織化学染色法により検出し、検討した。

4. 研究成果

(1) 大規模低分子化合物のスクリーニング

方法に記した、新規軟骨分化モニタリングシステムで 3 種類の化合物をヒット化合物として同定した。



そのなかでも、TD-198946 が最も軟骨分化を促進することがしめされた。

(2) 同定した化合物の軟骨分化作用機序を in vitro で解析

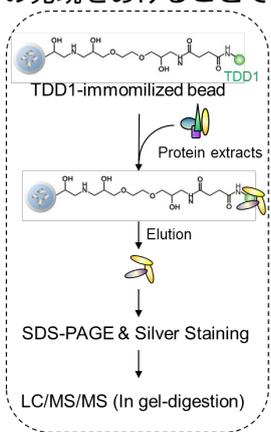
TD-198946 は 2 型コラーゲンの発現を上昇させ、軟骨基質合成を促進し、軟骨組織を再生誘導する機能を持った化合物であり、マウス関節軟骨細胞、ヒト関節軟骨細胞を軟骨分化誘導能があることが示された。

(3) 関節軟骨再生誘導化合物の分子メカニズム解析

TD のターゲット分子を探索するために DNA マイクロアレイを行い、Gene Ontology 解析を行ったところ、

転写因子のなかで、一番発現が高いのは、Runx1 で次に Sox5, Sox6 であった。siRNA によって Runx1 および Sox5/6 をノックダウンすると、TD-198946 による 2 型コラーゲンの mRNA 発現は抑制された。TD-198946 は転写因子 Runx1, Sox5, Sox6 の発現をあげることで軟骨分化を促進させることが示唆された。

さらに、TD の直接の標的分子を探索するために LC-MSMS を用いた解析を行った。まず、TD-198946 に LC-MSMS の解析のため、磁性ビーズが結合できるようなアームを設置し、その活性をみた

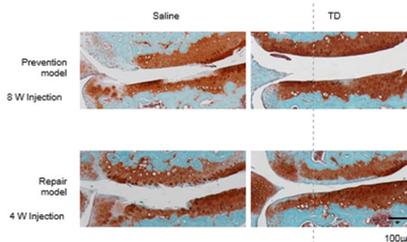


ところ、TD-D1 (TD-derivative 1) の Col2a1 の発現誘導に対する効果は、TD とほぼ同程度であったので、この位置でビーズを結合することにし、in gel digestion 法で解析したところ、ある分子 X (現在論文作成中) が TD-D1 と結合するタンパク質として同定された。

(4) 変形性膝関節症モデルマウスを用いた関節軟骨再生誘導化合物の治療効果の検討

変形性膝関節症 (OA) モデルマウスを用いた TD-198946 投与による治療効果の検討を行った。OA モデル作成直後から 5 日に 1 回、8 週間、関節腔に 10 μl 投与する群を予防モデル、OA モデル作成 4 週間後から 4 週間、5 日に 1 回投与する群を治療モデルとして、通常 OA モデルを評価している 8 週間後で組織学的解析を行った。

いずれのモデルにおいても、TD-198946 投与によって、非投与群 (軟骨破壊と骨棘の形成を抑制していることが組織と変形性膝関節症のグレイディングスコア OARS1 スコアから示された。



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 17 件)

1. Okuma T, Hirata M, Yano F, Mori D, Kawaguchi H, Chung UI, Tanaka S, Saito T. Regulation of mouse chondrocyte differentiation by CCAAT/enhancer-binding proteins. *Biomed Res.* 2015;36(1):21-9. doi: 10.2220/biomedres.36.21.
2. Sugita S, Hosaka Y, Okada K, Mori D, Yano F, Kobayashi H, Taniguchi Y, Mori Y, Okuma T, Chang SH, Kawata M, Taketomi S, Chikuda H, Akiyama H, Kageyama R, Chung UI, Tanaka S, Kawaguchi H, Ohba S, Saito T. Transcription factor Hes1 modulates osteoarthritis development in cooperation with calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Mar 10;112(10):3080-5. doi: 10.1073/pnas.1419699112.
3. Okada K, Fukai A, Mori D, Hosaka Y, Yano F, Chung UI, Kawaguchi H, Tanaka S, Ikeda T, Saito T. Identification of SCAN Domain Zinc-Finger Gene ZNF449 as a Novel Factor of Chondrogenesis. *PLoS One.* 2014 Dec 29;9(12):e115169. doi: 10.1371/journal.pone.0115169.
4. Yano F, Ohba S, Hosaka Y, Saito T, Chung UI. : Disease-modifying effects of TD-198946 on progressed osteoarthritis in a mouse model. *Ann Rheum Dis.* 2014 Nov;73(11):2062-4. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205672.
5. Uehara K, Yasunaga H, Morizaki Y, Horiguchi H, Fushimi K, Tanaka S. Necrotising soft-tissue infections of the upper limb: risk factors for amputation and death. *Bone Joint J.* 2014 Nov;96-B(11):1530-4. doi: 10.1302/0301-620X.96B11.34888.
6. Saito T, Yano F, Mori D, Ohba S, Hojo H, Otsu M, Eto K, Nakauchi H, Tanaka

- S, Chung UI, Kawaguchi H.: Generation of Col2a1-EGFP iPS cells for monitoring chondrogenic differentiation. *PLoS One*. 2013 Sep 16;8(9):e74137. doi: 10.1371/journal.pone.0074137.
7. Yano F, Hojo H, Ohba S, Saito T, Honnami M, Mochizuki M, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI.: Cell-sheet technology combined with a thienoinazole derivative small compound TD-198946 for cartilage regeneration. *Biomaterials*. 2013 Jul;34(22):5581-7. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.04.008.
 8. Komiyama Y, Ohba S, Shimohata N, Nakajima K, Hojo H, Yano F, Takato T, Docheva D, Shukunami C, Hiraki Y, Chung UI.: Tenomodulin expression in the periodontal ligament enhances cellular adhesion. *PLoS One*. 2013 Apr 10;8(4):e60203. doi: 10.1371/journal.pone.0060203.
 9. Hojo H, Ohba S, Taniguchi K, Shirai M, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K, Mishina Y, Yamada M, Konno T, Takato T, Kawaguchi H, Kambara H, Chung UI.: Hedgehog-Gli activators direct osteo-chondrogenic function of bone morphogenetic protein toward osteogenesis in the perichondrium. *J Biol Chem*. 2013 Apr 5;288(14):9924-32. doi: 10.1074/jbc.M112.409342.
 10. Yano F, Saito T, Ogata N, Yamazawa T, Iino M, Chung UI, Kawaguchi H.: β -Catenin regulates PTH/PTHrP receptor signals and chondrocyte hypertrophy through binding to its intracellular C-terminal region. *Arthritis Rheum*. 2013 Feb;65(2):429-35. doi: 10.1002/art.37779.
 11. Yano F, Hojo H, Ohba S, Fukai A, Hosaka Y, Ikeda T, Saito T, Hirata M, Chikuda H, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI.: A novel disease-modifying osteoarthritis drug candidate targeting Runx1. *Ann Rheum Dis*. 2013 May;72(5):748-53. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-201745.
 12. Ogasawara T, Ohba S, Yano F, Kawaguchi H, Chung UI, Saito T, Yonehara Y, Nakatsuka T, Mori Y, Takato T, Hoshi K.: Nanog promotes osteogenic differentiation of the mouse mesenchymal cell line C3H10T1/2 by modulating bone morphogenetic protein (BMP) signaling. Nanog promotes osteogenic differentiation of the mouse mesenchymal cell line C3H10T1/2 by modulating bone morphogenetic protein (BMP) signaling. *J Cell Physiol*. 2013 Jan;228(1):163-71. doi: 10.1002/jcp.24116.
 13. Miyamoto H, Miura T, Morizaki Y, Uehara K, Ohe T, Tanaka S. Comparative study on the stiffness of transverse carpal ligament between normal subjects and carpal tunnel syndrome patients. *Hand Surg*. 2013;18(2):209-14. doi: 10.1142/S0218810413500251.
 14. Uehara K, Miura T, Morizaki Y, Miyamoto H, Ohe T, Tanaka S. Ultrasonographic evaluation of displaced neurovascular bundle in Dupuytren disease. *J Hand Surg Am*. 2013 Jan;38(1):23-8. doi: 10.1016/j.jhsa.2012.09.013.
 15. Echigo R, Shimohata N, Karatsu K, Yano F, Kayasuga-Kariya Y, Fujisawa A, Ohto T, Kita Y, Nakamura M, Suzuki S, Mochizuki M, Shimizu T, Chung UI, Sasaki N.: Trehalose treatment suppresses inflammation, oxidative stress, and vasospasm induced by experimental subarachnoid hemorrhage. *J Transl Med*. 2012 Apr 30;10:80. doi: 10.1186/1479-5876-10-80.
 16. Hojo H, Ohba S, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI.: Gli1 protein participates in Hedgehog-mediated specification of osteoblast lineage during endochondral ossification. *J Biol Chem*. 2012 May 18;287(21):17860-9. doi: 10.1074/jbc.M112.347716.
 17. Miyamoto H, Miura T, Morita E, Morizaki Y, Uehara K, Ohe T, Tanaka S. Fungal arthritis of the wrist caused by *Candida parapsilosis* during infliximab therapy for rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*. 2012 Nov;22(6):903-6. doi: 10.1007/s10165-012-0594-0.
- [学会発表](計 10件)
1. 矢野文子, 齋藤琢: 変形性関節症の新規治療候補薬の作用解析 東大病院先端医療開発フォーラム 2015.1.22 東京大学 伊藤国際学術研究センター 伊藤謝恩ホール、東京 (査読なし、口頭・ポスター発表)
 2. 矢野文子, 齋藤琢: 変形性関節症治療を目指した軟骨再生医療研究 第42回日本関節病学会 共催シンポジウム 2014.11.7 虎ノ門ヒルズ、東京 (シンポジウム口演)
 3. 矢野文子、北條宏徳、大庭伸介、深井厚、

- 保坂陽子、池田敏之、斎藤琢、平田真、筑田博隆、高戸毅、川口浩、鄭 雄一：新規 OA 治療候補化合物は Runx1 をターゲットとしている 第 33 回日本運動器移植・再生医学研究会 2014.9.27 第一ホテル両国、東京（査読あり、口頭発表）
4. Fumiko Yano, Yoko Hosaka, Atsushi Fukai, Taku Saito, Hironori Hojo, Shinsuke Ohba, Hiroshi Kawaguchi, Tsuyoshi Takato, Ung-il Chung: A novel disease-modifying osteoarthritis drug candidate targeting Runx1 第 14 回東京大学生命科学シンポジウム 2014.4.26 東京大学 伊藤国際学術研究センター 伊藤謝恩ホール、東京（査読なし、口頭・ポスター発表）
 5. 矢野文子, 北條宏徳, 大庭伸介, 深井厚, 保坂陽子, 池田敏之, 斎藤琢, 平田真, 筑田博隆, 高戸毅, 川口浩, 鄭雄一: 新規 OA 治療候補化合物は Runx1 をターゲットとしている. 第 27 回日本軟骨代謝学会 2014.2.28-3.1 京都府医師会館、京都（**第 19 回日本軟骨代謝学会賞受賞口演**）
 6. 矢野文子, 保坂陽子, 斎藤琢, 北條宏徳, 大庭伸介, 高戸毅, 鄭雄一: 新規 OA 治療候補化合物は Runx1 をターゲットとしている. FIRST 合同国際シンポジウム 2014.2.21 東京大学 伊藤国際学術研究センター 伊藤謝恩ホール、東京（査読なし、口頭・ポスター発表）
 7. 矢野文子, 大庭伸介, 鄭雄一: 変形性関節症の新規治療候補薬の発見 東大病院先端医療開発フォーラム 2014.1.24 東京大学 伊藤国際学術研究センター 伊藤謝恩ホール、東京（査読なし、口頭・ポスター発表）
 8. Fumiko Yano, Yoko Hosaka, Atsushi Fukai, Taku Saito, Hironori Hojo, Shinsuke Ohba, Hiroshi Kawaguchi, Tsuyoshi Takato, Ung-il Chung: A novel disease-modifying osteoarthritis drug candidate targeting Runx1 第 13 回東京大学生命科学シンポジウム 2013.6.8 東京大学 伊藤国際学術研究センター 伊藤謝恩ホール、東京（査読なし、口頭・ポスター発表）
 9. 矢野文子, 大庭伸介, 鄭雄一: 変形性関節症の新規治療候補薬の発見 東大病院先端医療開発フォーラム 2013.1.25 東京大学 伊藤国際学術研究センター 伊藤謝恩ホール、東京（査読なし、口頭・ポスター発表）
 10. 矢野文子, 北條宏徳, 大庭伸介, 池田敏之, 斎藤琢, 本阿彌宗紀, 平田真, 筑田博隆, 望月学, 佐々木伸雄, 高戸毅, 川口浩, 鄭雄一: 細胞シート工学を用いた新規軟骨再生誘導剤による膝関節軟骨再生法の開発 第 11 回日本再生医療学

会総会 2012.6.12-14 パシフィコ横浜、神奈川（**若手研究奨励賞受賞者講演**）

11. Fumiko Yano, Yoko Hosaka, Atsushi Fukai, Taku Saito, Hironori Hojo, Shinsuke Ohba, Hiroshi Kawaguchi, Tsuyoshi Takato, Ung-il Chung: A novel disease-modifying osteoarthritis drug candidate targeting Runx1. Frontiers 2013 EPFL Symposium. 2013, 6.21-22 (Swiss Federal Institute of Technology in Lausanne, Lausanne, Switzerland) (査読なし、ポスター発表)
12. Fumiko Yano, Hironori Hojo, Shinsuke Ohba, Yoko Hosaka, Atsushi Fukai, Taku Saito, Hiroshi Kawaguchi, Ung-il Chung. Prevention and Repair of Cartilage Degeneration by A Novel Small Thienindazole-Derivative Compound. 1st Joint Symposium 2012 Bridging Cancer Nanotechnology. 2012.8.13-14 (The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas) (査読なし、ポスター発表)
13. Fumiko Yano, Yoko Hosaka, Atsushi Fukai, Taku Saito, Hironori Hojo, Shinsuke Ohba, Hiroshi Kawaguchi, Ung-il Chung: Prevention and repair of cartilage degeneration by a novel thienindazole-derivative compound. 2012 World Congress on Osteoarthritis (OARSI). 2012. 4 (Barcelona, Spain). (査読有・ポスター発表) (**2012 OARSI (Osteoarthritis Research Society International) Young Investigator Award**)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/~oralsurg/archive.html#original>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 文子 (YANO, Fumiko)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：80529040

(2) 研究分担者

森崎 裕 (MORIZAKI, Yutaka)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30508099