

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 23 日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893133

研究課題名(和文)変形性関節症に対する新規薬物治療の可能性

研究課題名(英文)Investigation of new therapeutic approaches for preventing osteoarthritis

研究代表者

高山 孝治(TAKAYAMA, KOJI)

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80546490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：Rapamycinの関節内投与により、マウス変形性膝関節症モデルでの軟骨変性進行抑制効果を認めた。この変性抑制効果は軟骨細胞でのrapamycinによるオートファジーの活性化を介していることが示唆された。さらに、関節軟骨の遺伝子発現量を検討するとIL-1、IL-6などの炎症性サイトカインの発現も減少していることが確認され、rapamycinの軟骨変性抑制効果はオートファジーの活性化のみならず、mammalian target of rapamycin (mTOR) シグナルの抑制による炎症性サイトカインの発現抑制も介していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The local intra-articular injection of rapamycin significantly delayed articular cartilage degradation at 8 and 12 weeks after destabilizing the medial meniscus (DMM) surgery. A reduction in mammalian target of rapamycin (mTOR) expression and the activation of an autophagy marker: light chain 3 (LC3) in the chondrocytes was observed in the rapamycin treated mice. Rapamycin treatment also decreased matrix metalloproteinase 13 (MMP13) expressions at 8 and 12 weeks after DMM surgery. Local intra-articular injection of rapamycin may represent a strategy to prevent the development of articular cartilage damage. Further studies that explore mTOR inhibition will provide novel insights into the pathophysiology of osteoarthritis and could lead to the establishment of new therapeutic approaches for slowing down the progression, or preventing osteoarthritis.

研究分野：整形外科

キーワード：軟骨変性 ラパマイシン オートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(OA)は膝関節疾患の中で最も高頻度にかかる疾患の一つであり、病状の進行によって歩行障害など日常生活に支障をきたすこととなる。現在我が国での患者数は700万人から1000万人と推定されているが、今後急速な高齢化に伴い、さらなる患者数の増大が予想され、社会的損失、経済的負担が大きくなることが示唆されている。その治療方法として、現在のところ、消炎鎮痛剤の投与やヒアルロン酸の関節腔内注射などの保存的治療が行われ、保存的治療抵抗性なものには、侵襲の大きい、人工膝関節置換術による手術加療を余儀なくされる例が多い。しかしながら手術に伴った合併症、人工関節耐用年数を考慮した活動性の制限や複数回の手術を要する場合などの問題も伴う。これまで、OAの病態解明にむけた多くの研究がおこなわれているが、未だその詳細な制御機構は解明されていない。

近年、軟骨変性の原因の一つとして、軟骨細胞のアポトーシス、細胞老化が関与していることが報告されている。一方、オートファジーは細胞内タンパク質分解機構の一つとして細胞内のクリアランスに関連し、細胞の生存や代謝を調節していると報告されており、オートファジーが細胞のアポトーシス、細胞老化、そして変性疾患の病態への関与が報告されている。我々は、関節軟骨の変性過程におけるオートファジーの発現変化を研究し、変性初期にはオートファジーが防御的に亢進し、変性末期にはオートファジーの発現が減少していることを報告した。またヒト正常軟骨細胞において、interleukin-1 (IL-1) による異化ストレスを加えると、軟骨細胞のアポトーシスの増加、軟骨細胞の変性マーカーである matrix metalloproteinase 13 (MMP13), A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5 (ADAMTS5)の発現上昇が起こるが、オートファジー促進効果のある rapamycin 投与することで、アポトーシスの減少と変性マーカーの発現抑制が確認され、rapamycin 投与がオートファジーを促進させることで、軟骨の変性に対する防御機構として働いていることを報告した。さらに近年、rapamycin の腹腔内全身投与による変形性膝関節症の進行抑制効果が報告されているが、全身投与による rapamycin の関節内への移行性、全身投与に伴う副作用が懸念される。本研究の目的は、臨床応用に向けて、rapamycin の関節内投与における関節軟骨変性の抑制効果を検討することである。

## 2. 研究の目的

mammalian target of rapamycin (mTOR)阻害薬である rapamycin による寿命延長効果、変性疾患抑制効果が報告されている。運動器

疾患においても、in vitro にて rapamycin による軟骨細胞のアポトーシスの減少、変性抑制効果が報告され、in vivo にて rapamycin の腹腔内全身投与による変形性膝関節症の進行抑制効果が報告されている。しかし、rapamycin の全身投与に伴う副作用も報告されており、変形性膝関節症の治療に rapamycin を全身投与することは現実的ではない。本研究の目的は、臨床応用に向けて、rapamycin の関節内投与における関節軟骨変性の抑制効果を検討することである。本研究の仮説は rapamycin の関節内投与は、全身投与に比較し、少量の投与量で関節軟骨変性抑制効果が得られ、副作用の発生を減少させることである。

## 3. 研究の方法

(1) マウス変形性膝関節症モデルにおける rapamycin 関節内注射の治療効果

C57BL/6 マウスの右膝関節を切開し、meniscotibial ligament を同定、切離することで、内側半月板を損傷させ、OA モデルを作成した(DMM OA マウス)。このモデルは、手術後8週間以降で関節軟骨の変性を来し、マウス変形性膝関節症モデルとして確立されている。作成した OA モデルマウスに rapamycin を8週間、関節内注射を行った。過去の報告により、関節軟骨の組織培養にて、rapamycin の投与効果が4日間継続しており、rapamycin の投与間隔は週2回とした。治療効果は、以下のグループに分けて判定した。

- 1) 10 $\mu$ M rapamycin を 10 $\mu$ l 関節内注射。
- 2) PBS を 10 $\mu$ l 関節内注射(control 群)。左膝関節には、関節切開のみを加え、右膝関節と同濃度の rapamycin または PBS をそれぞれ関節内注射した(sham 群)。

手術後8週および12週において、関節軟骨の変性状態を組織学的、分子生物学的に解析評価した。Rapamycin による mTOR 抑制効果、およびオートファジーの発現を light chain 3 (LC3)の免疫組織学的染色にて確認し、トルイジンブルー染色による組織学的評価を行った。軟骨変性抑制効果のメカニズムを matrix metalloproteinase 13 (MMP13), Type X collagen (Col10A1), vascular endothelial growth factor (VEGF)などの免疫学的組織染色にて評価を行った。また、関節軟骨より RNA を採取し、遺伝子発現の変化を real time PCR にて定量的に解析評価した。

(2) マウス変形性膝関節症モデルにおける徐放化 rapamycin 関節内投与の治療効果

京都大学再医科学研究所、田畑泰彦教授より生体吸収性ハイドロゲルの提供を受けた。難水溶性低分子薬物である rapamycin をハイドロゲル内に均一に組み込ませる(含有)ために、まず薬物を水可溶化させることが必要と

なる。生体適合性に優れ、すでに臨床応用化されている生体吸収性高分子であるゼラチンと乳酸オリゴマーを使用する。乳酸オリゴマーをグラフト反応させることでミセル形成能をもつ乳酸オリゴマーグラフトゼラチンを作成する。この乳酸オリゴマーグラフトゼラチンによって rapamycin を水可溶化する。次に、水可溶化 rapamycin を含むゼラチン水溶液からハイドロゲルを調整、rapamycin 含有ゼラチンハイドロゲルを得る。この徐放システムでは、ハイドロゲル内に含有固定化された水可溶化 rapamycin は、ハイドロゲルの分解とともに、ハイドロゲルから徐放化される。予備実験として行った rapamycin 含有ゼラチンハイドロゲルのハイドロゲル分解性と rapamycin の徐放性の評価では、良好な相関関係を認めた。この rapamycin 含有ゼラチンハイドロゲルをマウス OA モデルに関節内投与した。治療効果は、以下のグループに分けて行った。1) 1000ng rapamycin 含有ゼラチンハイドロゲル (高濃度治療群), 2) 100ng rapamycin 含有ゼラチンハイドロゲル (低濃度治療群), 3) 1 $\mu$ g rapamycin のみ (単回注射群), 4) ゼラチンハイドロゲルのみ (control 群)。手術後 16 週において、関節軟骨の変性状態をサフラニン O 染色による組織学的評価、オートファジーの発現を LC3 の免疫組織学的染色にて確認し、関節軟骨より RNA を採取し、mTOR, MMP13, MMP3, Col2a1, IL-1, IL-6 などの遺伝子発現の変化を real time PCR にて定量的に解析評価した。

#### 4. 研究成果

Rapamycin の節軟骨変性の抑制効果を検討するため、平成 25 年度はマウス変形性膝関節症モデルにおける rapamycin 関節内注射の有効性を検討した。作成した DMM OA モデルマウスおよび Sham マウスに週に 2 回 rapamycin (10 $\mu$ M, 10 $\mu$ l) を 8 週間関節内注射を行い、手術後 8 週および 12 週において、関節軟骨の変性状態を組織学的、分子生物学的に解析評価した。トルイジンブルー染色にて、rapamycin 投与群は control 群に比べ術後 8 週、12 週において有意な軟骨変性の減少を認めた (図 1)。

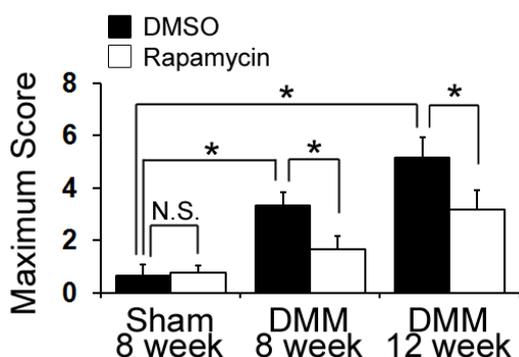


図 1 .Rapamycin 関節内投与による OA 抑制効果 (\*\*\*)  $p < 0.001$

また、変形性関節症においてコラーゲン分解に関与している matrix metalloproteinase 13 (MMP13)の発現は rapamycin により抑制されており、rapamycin の関節内注射による軟骨変性抑制効果が確認できた。そのメカニズムとして、rapamycin 投与により、p-mTOR の発現は減少し、LC3 の発現は増強していることより、rapamycin によるオートファジーの活性化を介していることが示唆された。また、rapamycin の投与に VEGF の発現も減少しており、rapamycin による軟骨変性抑制効果は血管新生抑制も介している可能性が示唆された (図 2)。

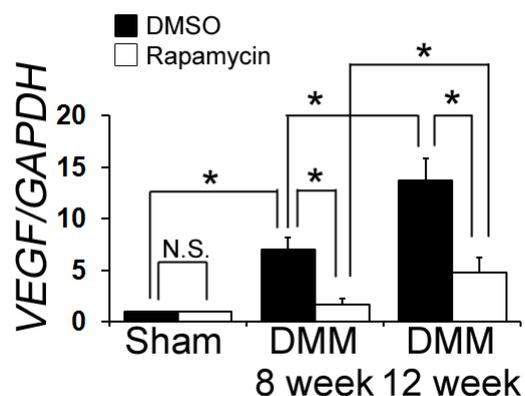


図 2. Rapamycin による VEGF の抑制効果

Rapamycin を関節内に徐放的に投与するために、rapamycin 含有ゼラチンハイドロゲルを作成し、rapamycin 含有ゼラチンハイドロゲルから rapamycin が徐放化されることを確認した。次に DMM OA モデルマウスに 1) 1000ng rapamycin 含有ゼラチンハイドロゲル群, 2) 100ng rapamycin 含有ゼラチンハイドロゲル群, 3) 1 $\mu$ g rapamycin のみ単回注射群, 4) ゼラチンハイドロゲルのみ control 群の比較検討を行なった。1000ng Rapamycin 含有ゼラチンハイドロゲルを関節内投与した群は他の群に比べ、OA の進行が抑制されていることをサフラニン O 染色にて組織学的に確認した。また関節軟骨のオートファジー関連タンパクの発現量を検討すると 1000ng Rapamycin 含有ゼラチンハイドロゲル群で LC3-II/LC3-I 比の増加を認めており、ラパマイシンの投与による OA 進行抑制効果は、軟骨細胞でのオートファジーの活性化を介していることが示唆された。さらに、関節軟骨の遺伝子発現量を検討すると Rapamycin 含有ゼラチンハイドロゲル群で IL-1, IL-6 などの炎症性サイトカインの発現も減少していることが確認され、rapamycin の OA 抑制効果はオートファジーの活性化のみならず、mammalian target of rapamycin (mTOR) シグナルの抑制により、炎症性サイトカインの発現抑制を介していることが示唆された (図 3)。

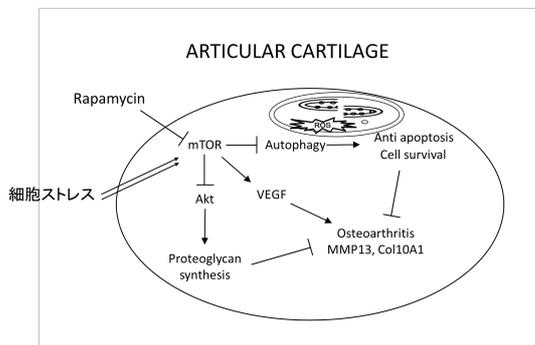


図 3. Rapamycin による関節軟骨変性抑制(仮設図)

## 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1件)

Takayama K, Kurosaka M et al.  
Local intra-articular injection of rapamycin delays articular cartilage degeneration in a murine model of osteoarthritis.  
Arthritis Research & Therapy, 査読有,  
2014 Nov 17;16(6):482.  
doi: 10.1186/s13075-014-0482-4.

[学会発表](計1件)

Takayama K, Kurosaka M et al.  
Local intra-articular Injection of Rapamycin Delays Articular Cartilage Degeneration in a Murine Model of Osteoarthritis.  
2015 Annual Meeting - Orthopaedic Research Society. 2015.3.28-31, ラスベガス(アメリカ)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

高山 孝治 (TAKAYAMA, Koji)  
神戸大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：80546490