

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670660

研究課題名(和文)TRPV4-SOX9を標的とした新規骨・軟骨治療薬開発

研究課題名(英文)Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) plays a pivotal role in chondrogenic mechanotransduction in ATDC5 cells

研究代表者

石黒 直樹 (Naoki, Ishiguro)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20212871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨細胞分化におけるTRPV4の働きに注目し、その発現量と活性化をコントロールすることにより病態における軟骨細胞の脱分化抑制や分化促進による内軟骨性骨化促進の可能性を検討する事を目的に研究を行った。ATDC5細胞を用いて、軟骨分化には機械的刺激が促進的に働きうること、それにはTRPV4が主に関わる事が示された。また、TRPV4活性化物質は臨床使用可能な適切な化合物を見出すことが出来なかった。今後更に化合物範囲を拡大してscreeningを進める必要があると考えられた。

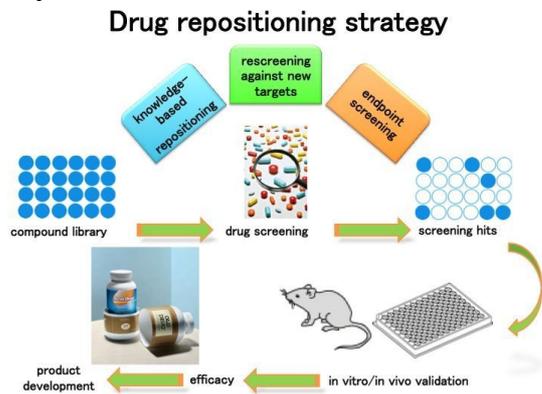
研究成果の概要(英文)：The study aimed to determine the role of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) in the response to mechanical stress in chondrogenic cells. Sox9 and AGC mRNA levels were significantly higher in cells after mechanical stress loading compared to cells that were not stretched. Up-regulation of Sox9 mRNA induced by mechanical stress was attenuated by RR and TRPV4 siRNA. A pharmacological activator of TRPV4, 4-phorbol 12, 13-didecanoate (4-PDD), increased chondrogenesis. The findings suggest that Ca²⁺ signaling activated by mechanical stress and regulated by TRPV4 promotes chondrogenesis in ATDC5 cells. This suggests that artificial activation of TRPV4 may serve as an intervention for treating osteoarthritis.

研究分野：整形外科

キーワード：TRPV4 ATDC5 SOX9

1. 研究開始当初の背景

学術的背景：TRPV family (V1~V4) は機械刺激受容体として知られているが、TRPV4 が SOX9 を介して軟骨分化に関わることが示された(J Biol Chem 282:32158,2007)。この分子はヒトでも軟骨分化に関与し、分子の異常は骨系統疾患の原因となる (Am J Med Genet 152A:1169,2010)。TRPV4 の発現低下が変形性関節症 (以下 OA) では見られること (A&R62:2973,2010) 異常が OA 発症に関わることが示された (NatGenet43:1142,2011)。既に軟骨分化に関わる遺伝子 SOX9 に注目し、遺伝子導入により効率的に軟骨細胞を得る方法を開発し(BBRC301:338,2003)。先行する萌芽研究(平成 22~23 年度)において SOX9 mRNA 発現量を増加させる化合物を独自開発の Drug Screening 法により見出し in vitro では効果を示した。しかし、動物実験では効果を明確にすることが出来なかった。SOX9 を標的とした軟骨形成促進研究は異なる面からの検討が必要となった。更に骨形成に関わるとの報告が今年なされた (Bone54:172,2013)。TRPV4 に注目し、その遺伝子発現を促進する物質と活性化物質の両面を検討し、TRPV4 活性化を介しての軟骨細胞、組織幹細胞での SOX9 発現量増加を図る。このために Drug repositioning 手法により既知医薬品の中から、新たに TRPV4 発現増加・活性化物質を探索し、軟骨細胞形質の発現促進による関節症治療や内軟骨性骨化促進による骨折治療促進の可能性を検討するものである。軟骨形成に関わる新たな標的である TRPV4 と SOX9 の関係に注目する点に独創性がある。TRPV4 活性化物質の探索は従来の考え方と全く別のメカニズムからの軟骨・骨形成促進治療の可能性検討であり、変形性関節症における軟骨変性を抑制する軟骨形質維持物質としての可能性も検討できる。本研究成果は関節症治療の可能性や内軟骨性骨化の促進による骨形成促進治療の糸口を提供するものと考えた。



2. 研究の目的

軟骨細胞分化における TRPV4 の働きを注目し、その発現量と活性化をコントロールすることにより病態における軟骨細胞の脱分化抑制や分化促進による内軟骨性骨化促進

の可能性を検討するものである。Drug repositioning 手法により既知医薬品の中から、新たに TRPV4 発現増加・活性化物質を探索し、軟骨細胞形質の発現促進による関節症治療や内軟骨性骨化促進による骨折治療促進の可能性を検討するものである。軟骨形成に関わる新たな標的である TRPV4 と SOX9 の関係に注目する点に独創性がある。軟骨細胞脱分化と組織幹細胞軟骨分化促進に関わる化合物を見出すこと、可能性によってはリード化合物として更に新規化合物を探索することを目的とした。

- (1) 薬物スクリーニングを利用した探索研究：1200 種類の既知の医薬物標本から独自開発のスクリーニング技術を用いて薬物を探索する。軟骨細胞分化と TRPV 活性化の関係に注目してスクリーニングを行い、発現量増加と活性化に関わる化合物を探索する。
- (2) (2)TRPV4 活性化に関わる刺激とその伝達経路の解明：TRPV4 活性化は軟骨細胞脱分化と組織幹細胞軟骨分化促進に関与すると考え、これによる軟骨分化促進機序の解明と臨床応用の探索的検討を目的とした。

3. 研究の方法

(1)TRPV4 プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだベクターを作成する。C3H10T1/2 細胞に導入することで、drug screening 系を作成し、既存薬(1184 種類)の中から TRPV4mRNA 発現上昇に関わる化合物を探索する。同様に TRPV4 はカルシウムイオンチャンネルである事に注目して、高感度のカルシウムイオンセンサーとして蛍光蛋白プロ-ブを用いて細胞内カルシウムイオン変化を指標に TRPV4 活性化物質を同じく既存薬 Drug panel から探索する。二つの手法によりそれぞれの候補化合物を得る。ヒト軟骨細胞への作用を確認する目的で、TRPV4mRNA 発現量増加と活性化作用を持つ候補化合物を添加、SOX9, 型コラーゲン、プロテオグリカンの mRNA, 蛋白量の変化を検討した。

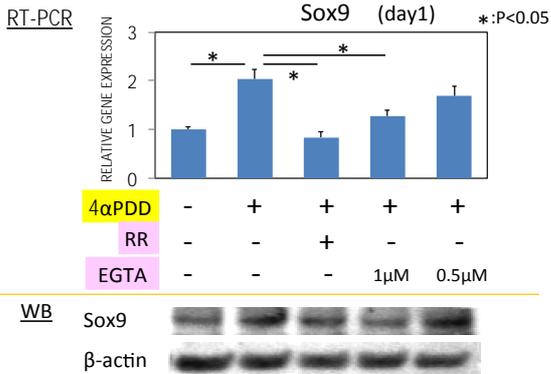
(2)TRPV4 活性化に関わる刺激として機械的刺激に注目し、内軟骨性分化のモデルとして ATDC5 細胞を利用した。機械的刺激付加装置で ATDC5 細胞培養培養を行う事により TRPV4 活性化を確認する。更に活性化阻害物質の添加、Ca イオンの除去等で TRPV4 活性化阻害による SOX9mRNA 発現の変化とその下流の遺伝子 (Aggrecan, Type II collagen 等) mRNA 発現量の変化を検討する。これにより内軟骨性骨化機序での TRPV4 の働きとその分子メカニズムを検討した。

4. 研究成果

(1)TRPV4mRNA 発現量の増強に働く物質の探索は遺伝子導入細胞が上手く機能せず断

念した。活性化物質については候補化合物を見出したが、有力な 4 PDD (4 α -phorbol 12,13-didecanoate)は TRPV4 活性化を起こす物質であるが、毒性のために人には使用できない事が調査で判明した。

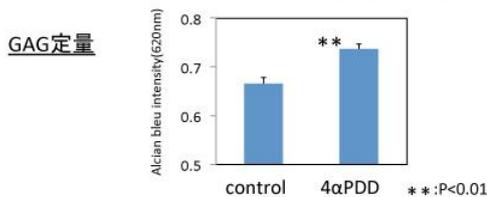
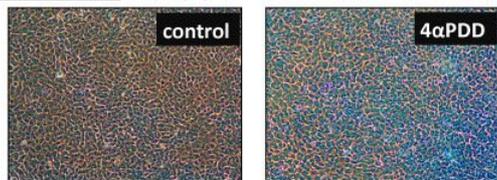
The effects of TRPV4 chemical activator on chondrogenesis



ATDC5 細胞では 4 PDD 刺激での TRPV4 活性化によって SOX9 発現が増強し、その結果として Aggrecan 合成が高まる事を証明出来た。このことは TRPV4 の活性化は SOX9 発現増強を介して、ATDC5 細胞の軟骨細胞分化を促進することにより現象として aggrecan 産生が効率よく起こっていると考えられる。

(2)代表的 TRPV4 刺激である機械的刺激に注

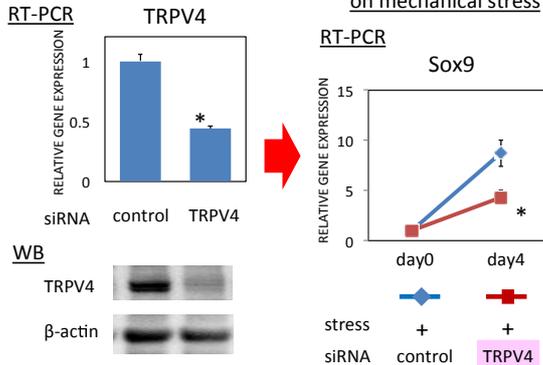
Alcian blue染色 (day7)



目した。TRPV4 を siRNA により抑制した ATDC5 細胞細胞では機械的刺激に軟骨分化促進作用は抑制されることを示した(下図)。

このことから、(1)軟骨分化には機械的の刺激

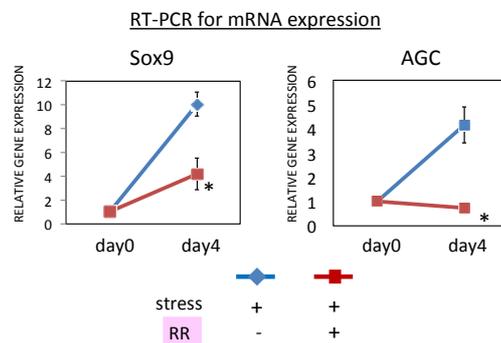
knock down of TRPV4 effect of TRPV4 siRNA on mechanical stress



が促進的に働きうること、それには TRPV4 が主に関わる事が示された。TRPV4 活性化物質は臨床使用可能な適切な化合物を見出すことが出来ず、今後更に化合物範囲を拡大して screening を進める必要があった。

考察: TRPV4 プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだベクターを作成し、ATDC5 細胞に Transfection し、この ATDC5 細胞で TRPV4 mRNA 発現上昇による SOX9 蛋白の恒常的産生量上昇を来す物質を求めて対象化合物を拡げてスクリーニングを行った。結果において大きなばらつきが見られ、再現性のある結果を得ることが出来なかった。一方、機械的刺激によっては TRPV4 が活性化され、その結果 SOX9 mRNA 上昇が起こること、SOX9 下流の軟骨形質分化を示す型 Collagen, aggrecan 等の産生量上昇が招来されることを示した(下図)。

effects of TRPV4 inhibition on chondrogenesis induced by mechanical stress



運動(機械的)刺激は未分化軟骨細胞に働き軟骨細胞の分化誘導を促進することが強く示唆された。一方、SOX9 mRNA 上昇を起こす化学物質は複数同時に観察され、結果から類推すると、TRPV4 を介さない SOX9 mRNA 上昇が起こっている可能性が示唆された。

そこで、方針を変更して、SOX9 遺伝子発現量を上昇させる物質を標的として、研究を行った。内軟骨性骨化を再現可能な ATDC5 細胞を用いて、各細胞分化の段階での SOX9 上昇に対する薬剤効果を検討する実験系を用いた。化合物について作用点の解析を進め、この化合物の物質特許を調べて、既知の作用では無いことを確認した。本化合物を利用して各種の軟骨細胞に作用させる実験系を構築し、軟骨形質を代表する物質の発現促進を確認した。軟骨分化に関わる影響を検討したところ、本化合物は内軟骨性骨化の過程を刺激する作用を持ち、最終的には軟骨細胞は肥大軟骨細胞化することを示した。これは内軟骨性骨化の最終段階にまで到達することを示し、関節軟骨組織に代表される軟骨組織に留まる作用を持たないことが示された。従って、この物質では軟骨形質の維持には向かないことが明白となり、これ以上の研究を断念した。

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 13 件)

1. Hasegawa S, Kitoh H, Ohkawara B, Mishima K, Matsushita M, Masuda A, Ishiguro N, Ohno K. Tranilast stimulates endochondral ossification by upregulating SOX9 and RUNX2 promoters. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Feb;470(2):356-61. 査読有
2. Kojima T, Takahashi N, Kaneko A, Kida D, Hirano Y, Fujibayashi T, Yabe Y, Takagi H, Oguchi T, Miyake H, Kato T, Watanabe T, Hayashi M, Shioura T, Kanayama Y, Funahashi K, Asai S, Yoshioka Y, Terabe K, Takemoto T, Asai N, Ishiguro N. Predictive factors for achieving low disease activity at 52 weeks after switching from tumor necrosis factor inhibitors to abatacept: results from a multicenter observational cohort study of Japanese patients. *Clin Rheumatol*. 2016 Jan;35(1):219-25. 査読有
3. Yoshioka Y, Takahashi N, Kaneko A, Hirano Y, Kanayama Y, Kanda H, Takagi H, Ito T, Kato T, Saito K, Funahashi K, Asai S, Takemoto T, Terabe K, Asai N, Ishiguro N, Kojima T. Disease activity early in treatment as a predictor of future low disease activity in RA patients treated with iguratimod. *Mod Rheumatol*. 2016 Mar;26(2):169-74. 査読有
4. Mishima K, Kitoh H, Ohkawara B, Okuno T, Ito M, Masuda A, Ishiguro N, Ohno K. Lansoprazole Upregulates Polyubiquitination of the TNF Receptor-Associated Factor 6 and Facilitates Runx2-mediated Osteoblastogenesis. *EBioMedicine*. 2015 Nov 17;2(12):2046-61. 査読有
5. Mishima K, Kitoh H, Kadono I, Matsushita M, Sugiura H, Hasegawa S, Kitamura A, Nishida Y, Ishiguro N. Prediction of Clinically Significant Leg-Length Discrepancy in Congenital Disorders. *Orthopedics*. 2015 Oct;38(10):e919-24. 査読有
6. Asai S, Takahashi N, Funahashi K, Yoshioka Y, Takemoto T, Terabe K, Asai N, Ishiguro N, Kojima T. Concomitant Methotrexate Protects Against Total Knee Arthroplasty in Patients with Rheumatoid Arthritis Treated with Tumor Necrosis Factor Inhibitors. *J Rheumatol*. 2015 Dec;42(12):2255-60. 査読有
7. Takahashi N, Kojima T, Kaneko A, Kida

D, Hirano Y, Fujibayashi T, Yabe Y, Takagi H, Oguchi T, Miyake H, Kato T, Watanabe T, Hayashi M, Kanayama Y, Funahashi K, Asai S, Yoshioka Y, Takemoto T, Terabe K, Asai N, Ishiguro N. Longterm efficacy and safety of abatacept in patients with rheumatoid arthritis treated in routine clinical practice: effect of concomitant methotrexate after 24 weeks. *J Rheumatol*. 2015 May;42(5):786-93. 査読有

8. Kitoh H, Kaneko H, Mishima K, Matsushita M, Kadono I, Nishida Y, Ishiguro N. Early and late fracture following extensive limb lengthening in achondroplasia and hypochondroplasia. *Bone Joint J*. 2014 Sep;96-B(9):1269-73. 査読有
9. Mishima K, Kitoh H, Haga N, Nakashima Y, Kamizono J, Katagiri T, Susami T, Matsushita M, Ishiguro N. Radiographic characteristics of the hand and cervical spine in fibrodysplasia ossificans progressiva. *Intractable Rare Dis Res*. 2014 May;3(2):46-51. 査読有

[学会発表](計 19 件)

1. 三島健一, 鬼頭浩史, 松下雅樹, 門野泉, 杉浦洋, 長谷川幸, 北村暁子, 西田佳弘, 石黒直樹. 先天性股関節脱臼 (DDH) に対するリューメンビューゲル (RB) 法の治療成績不良因子の検討. 第 88 回日本整形外科学会学術総会. 神戸ポートピアホテル, 神戸国際会議場, 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市). 2015.5.21-24
2. 鬼頭浩史, 三島健一, 松下雅樹, 杉浦洋, 長谷川幸, 北村暁子, 石黒直樹. 骨系統疾患の診断と治療 - わが国の現状と展望 -. 第 88 回日本整形外科学会学術総会. 神戸ポートピアホテル, 神戸国際会議場, 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市). 2015.5.21-24
3. 三島健一, 鬼頭浩史, 杉浦洋, 松下雅樹, 長谷川幸, 北村暁子, 門野泉, 西田佳弘, 石黒直樹. ランソプラゾールによる骨形成促進効果の解析. 第 88 回日本整形外科学会学術総会. 神戸ポートピアホテル, 神戸国際会議場, 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市). 2015.5.21-24
4. 長谷川幸, 鬼頭浩史, 三島健一, 松下雅樹, 杉浦洋, 北村暁子, 西田佳弘, 石黒直樹, 大野欽司. 軟骨細胞における SOX9 発現を促進させる既存薬の検索. 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会. 富山国際会議場, A N A クラウンプラザホテル 富山, 富山市民プラザ (富山県富山市). 2015.10.22-23
5. 松下雅樹, 鬼頭浩史, 三島健一, 杉浦洋,

- 長谷川幸,北村暁子,西田佳弘,石黒直樹,大野欽司. Meclozine は軟骨無形成症における大後頭孔および脊柱管狭窄を改善しうる. 第30回日本整形外科学会基礎学術集会. 富山国際会議場,ANAクラウンプラザホテル富山,富山市民プラザ(富山県富山市). 2015.10.22-23
6. 杉浦洋,鬼頭浩史,三島健一,松下雅樹,長谷川幸,北村暁子,大河原美静,西田佳弘,石黒直樹,大野欽司. 骨芽細胞におけるFGF23の発現を抑制する既存薬の検索. 第30回日本整形外科学会基礎学術集会. 富山国際会議場,ANAクラウンプラザホテル富山,富山市民プラザ(富山県富山市). 2015.10.22-23
7. 松下雅樹,鬼頭浩史,三島健一,杉浦洋,長谷川幸,北村暁子,西田佳弘,石黒直樹,大野欽司. 軟骨無形成症における根本的治療薬の開発. 第30回日本整形外科学会基礎学術集会. 富山国際会議場,ANAクラウンプラザホテル富山,富山市民プラザ(富山県富山市). 2015.10.22-23
8. 松下雅樹,鬼頭浩史,三島健一,西田佳弘,石黒直樹,大野欽司. meclozine はオフラベル効果によりFGFR3シグナルを抑制し軟骨無形成症の根本的治療薬となりうる. 第28回日本軟骨代謝学会.東京医科歯科大学(東京都文京区). 2015.3.6-7
9. 松下雅樹,鬼頭浩史,三島健一,石黒直樹,大野欽司. 乗り物酔い止めOTC薬meclozineはFGFR3シグナルを抑制して軟骨無形成症の低身長をレスキューする. 第32回小児代謝性骨疾患研究会.千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市) 2014.12.6
10. Mishima K, Kitoh H, Matsushita M, Sugiura H, Hasegawa S, Ishiguro N. Lansoprazole regulates osteoclast formation and function. Orthopaedic Research Society. オーランド(アメリカ). 2016.3.5-8
11. Matsushita M, Kitoh H, Mishima K, Sugiura H, Hasegawa S, Ishiguro N, Ohno K. Radical Therapeutic Strategy For Foramen Magnum Stenosis And Spinal Canal Stenosis In Achondroplasia. Orthopaedic Research Society. オーランド(アメリカ). 2016.3.5-8
12. Kojima T, Takahashi N, Kaneko A, Kida D, Hirano Y, Fujibayashi T, Yabe Y, Takagi H, Oguchi T, Miyake H, Kato T, Watanabe T, Hayashi M, Shioura T, Kanayama Y, Funahashi K, Asai S, Yoshioka Y, Terabe K, Takemoto T, Asai N, Ishiguro N. Predictive Factors for Achieving Low Disease Activity at 52 Weeks after Switching from Tumor Necrosis Factor Inhibitors to Abatacept: Results from a Multicenter Observational Cohort Study of Japanese Patients. American College of Rheumatology. サンフランシスコ(アメリカ). 2015.11.6-11
13. Kojima T, Ishikawa H, Nishida K, Hashimoto J, Miyahara H, Tanaka S, Haga N, Niki Y, Kojima M, Ishiguro N. Relationship between index of activity speed (Time Up and Go test) and patient-reported outcome in patients with long-standing rheumatoid arthritis: multicenter prospective cohort study for evaluation of joint surgery on physical function. American College of Rheumatology. サンフランシスコ(アメリカ). 2015.11.6-11
14. Matsushita, Masaki; Kitoh, Hiroshi; Kenichi Mishima; Ishiguro Naoki; Ohno Kinji. Meclozine enhances skeletal growth in transgenic achondroplasia mice with a constitutive active FGFR3 mutation. 2015 Annual Meeting - Orthopaedic Research Society.ラスベガス(アメリカ) 2015.3.28-31
6. 研究組織
- (1)研究代表者
石黒直樹(ISHIGURO,NAOKI)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号:20212871
- (2)研究分担者
鬼頭浩史(KITOH,HIROSHI)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号:40291174

小嶋俊久(KOJIMA,TOSHIHISA)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号:70378032

三島健一(MISHIMA,KENICHI)
名古屋大学・医学系研究科・
寄附講座助教
研究者番号:40646519
- (3)連携研究者
大野欽司(OHNO,KINJI)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号:80397455