

Prg4を標的とした変形性関節症治療薬開発のための基盤研究

東京大学医学部附属病院 整形外科・脊椎外科 骨・軟骨再生医療寄付講座
特任講師 矢野 文子

(共同研究者)

ハーバード大学 医学部 ボストン子供病院 整形外科
教授 Matthew L. Warman

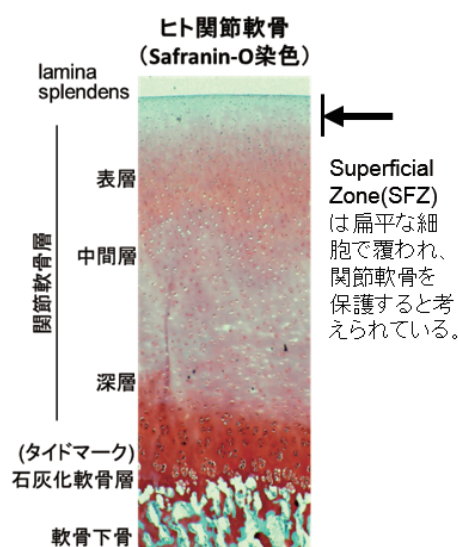
はじめに

変形性関節症 (OA) は高齢者の生活の質を脅かす代表的な運動器疾患であり、申請者が属する東京大学医学部整形外科で実施している国内最大のコホート研究 (ROAD study) によると膝関節だけでも国内に780万人が痛みを苦しんでいる⁽¹⁾。その患者数は高齢人口の増加とともに増え続けている。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が、分子レベルでの病態解明は始まったばかりである。我々は従来からOAの基礎研究を展開しており、膝OA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膝OAモデルを樹立し⁽²⁾、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OA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⁽³⁾。臨床では、軽度から中等度の膝OAに対する根本的な治療法は未だなく、運動療法、ヒアルロン酸注射や鎮痛剤投与といった対症療法が行われており、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。

最近では、関節軟骨組織の最表層 (Superficial Zone; SFZ) (右上図に示す) の破綻がOA発症のトリガーであること、SFZ細胞はルプリシン (Prg4) など潤滑成分を多く分泌して関節の滑動性を担保し、その深層の関節軟骨全体を保護する作用があることなどが明らかとなってきた。

本研究の目的はPrg4を発現誘導する化合物やSFZの再生を誘導する化合物を探索し、同定した化合物の作用機序を分子生物学的手法で解析し、安全かつ有効な新規変形性膝関節症治療薬の開発を目指す。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。



結 果

(1) Prg4-GFPモニタリングシステムの検討

当初計画であった、Prg4のプロモーターを用いた細胞株の樹立に関しては、共同研究先で、Prg4の近位プロモーター断片とエンハンサーをタンデムに繋げ、その下流にLacZ遺伝子を接合したトランスジーンを持ったマウスが作出され、 β gal染色にて確認した。しかしながら、マウス組織において、上記のトランスジーンが発現コピー数が極端に少ないことが分かり、細胞株の樹立とマウスの系統作成は中止となった。そこで、マウス関節軟骨から関節軟骨最表層 (Superficial Zone; SFZ) の細胞と、軟骨層の細胞を取り分ける手法より⁽⁴⁾、Prg4、I型コラーゲンのマーカーがSFZ特異的に発現し、軟骨細胞では発現が低いことを確認し、このSFZ細胞を実験に用いることとした。

(2) Prg4プロモーターを用いたSFZ保護・再生化合物のスクリーニング

SFZ細胞を用いて、いずれの軟骨代謝関連のシグナルが、Prg4のプロモーター活性を上昇させるかを検討するためにPrg4プロモーターアッセイを行った。我々がすでにライブラリーとして保有している、種々の骨・軟骨代謝関連遺伝子のベクターとPrg4プロモーターの近位プロモーターベクターを遺伝子導入し、ルシフェラーゼ活性を確認したところ、これらの関連遺伝子群よりHif2a、Wntシグナルが有望であることがわかった。

これらのデータを参考に、Prg4発現領域におけるHif2aまたはWntシグナルの役割を明らかにするためにPrg4特異的Hif2aの強制発現型、機能抑制型マウス、またはPrg4特異的Wntシグナル強制発現型、機能抑制型マウスの系統を作出した。これらのマウスから、SFZ細胞を採取し⁽⁴⁾、 $1\mu\text{M}$ の水溶性タモキシフェンを投与し、それぞれ最適化した投与日数でmRNAを回収し、リアルタイムRT-PCRで解析した。SFZに発現が高い既知のPrg4、ErgのマーカーをみるとWntシグナル強制発現のSFZ細胞でこれらのマーカーが発現上昇しており、反対にWntシグナル機能抑制型のSFZ細胞においては発現が下がっていた。Hif2についても強制発現型のSFZ細胞において、Prg4の発現が高く、機能抑制型のSFZ細胞において、Prg4の発現が低かった。

(3) 候補化合物のPrg4誘導能の解析

Prg4の発現を上昇させ、関節軟骨最表層を保護する作用のある変形性膝関節症治療候補薬として、安価で簡便な投与方法として、シグナルのアゴニストもしくは、リガンドの化合物を探索することとした。上記に述べたよう、Hif2aとWntシグナルが候補であるが、化合物として様々な種類を入手できるのは、Wntシグナルであることから、Wntシグナルを増強する化合物をターゲットに関節軟骨最表層の保護作用を解析した。

In vitroの解析において、野生型マウスのSFZ細胞にWntアゴニストと種々のWntリガンドタンパクを投与し、Prg4発現を確認したところ、数ある中のWntリガンドのなかでも、

ある3種のWntリガンド投与とWntアゴニストは顕著にPrg4の発現をあげることがリアルタイムRT-PCRで示された。

次にEx vivo (マウス大腿骨頭の器官培養)⁽⁵⁾での検討を行った。同様に上記のIn vitro解析でPrg4発現をあげるWntアゴニストと3種のWntリガンドを添加して関節軟骨最表層の変化を組織学的にSFZの厚さや細胞密度などを調べ、化合物の効果を評価した。Wntアゴニスト修飾化合物を投与することで、SFZ層の厚みが増し、免疫組織学的にPrg4の発現増強が確認された。細胞密度に関しても、扁平な形態であるSFZ細胞様細胞の細胞数がコントロールに比較して多く、一定面積におけるSFZ細胞様細胞の密度が高いことが示された。In vitro, Ex vivoのデータより、WntシグナルはPrg4の発現を上昇させ、関節軟骨最表層の維持と再生に必須であることが示唆された。

(4) 候補化合物の標的タンパクと作用機序の解明

これまでの報告から、Prg4はメカニカルストレスに呼応して発現し、その経路はCrebを解することが報告されているため⁽⁶⁾、WntシグナルとCrebとの関係性について、WntがPrg4の発現を上げる作用機序を解析した。旋回培養システムで細胞にメカニカルストレスを与える系⁽⁶⁾が確立されているので、そのシステムを用いて、Prg4の発現を確認したところ、2時間をピークにPrg4の発現が上昇し、そのタイムコースにおける変化はβカテニン(Wntシグナルのマーカー)発現も上昇していた。(3)で検討したWntアゴニストを投与し、Creb1のタンパク発現をウエスタンブロットで確認したところ、有意にCreb1のタンパク発現量が増えていた。これらの結果から、WntシグナルはCrebを介し、かつメカニカルストレスに反応し、Prg4の発現を上昇させることが示唆された。

(5) 変形性膝関節症モデルマウスを用いた治療効果の検討

(3)、(4)の解析からWntのアゴニスト化合物を、関節軟骨最表層を保護する変形性膝関節症治療候補薬として、マウスOAモデル⁽⁷⁾(DMMモデル：関節軟骨最表層のみ、ダメージを与える方法と観察期間を最適化した)に投与し、現在、組織学的解析を行っている。

*現在、論文投稿中で、図は投稿予定のものと重複する可能性があり、省かせていただきました。

考 察

これらの解析より、関節軟骨最表層に発現しているPrg4を制御することで、関節軟骨を保護することが示され、その作用を持つ化合物は変形性膝関節症治療候補薬になりうることが示唆された。さらに最近の基礎検討において、Prg4発現細胞には組織幹細胞の特性があり抗炎症作用を有すること、Prg4タンパクには未分化幹細胞の分化を抑制するとともに、

このような幹細胞の特性を保持する作用があることが示唆されている。これらのことから、Prg4発現細胞が関節全体の恒常性維持を担っている可能性があり、ますます、Prg4発現細胞をコントロールすることが、変形性膝関節症治療薬の開発に繋がることが考えられる。

要 約

関節軟骨最表層に発現するPrg4はWntシグナルによって発現上昇し、Wntシグナルのアンチゴニストまたはリガンドは関節軟骨最表層を保護する変形性膝関節症治療候補薬になる可能性が示唆された。

文 献

1. Muraki S, Oka H, Akune T, Mabuchi A, En-yo Y, Yoshida M, et al. Prevalence of radiographic knee osteoarthritis and its association with knee pain in the elderly of Japanese population-based cohorts: the ROAD study. *Osteoarthritis Cartilage*. 17 (9) :1137–43, 2009
2. Kamekura S, Hoshi K, Shimoaka T, Chung U, Chikuda H, Yamada T, et al. Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthritis Cartilage*. 13 (7) :632–41, 2005
3. Saito T, Fukai A, Mabuchi A, Ikeda T, Yano F, Ohba S, et al. Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2alpha during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nat Med*. 16 (6) :678–86, 2010
4. Yasuhara R, Ohta Y, Yuasa T, Kondo N, Hoang T, Addya S, et al. Roles of beta-catenin signaling in phenotypic expression and proliferation of articular cartilage superficial zone cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 91 (12) :1739–52, 2011
5. Stanton H, Golub SB, Rogerson FM, Last K, Little CB, Fosang AJ. Investigating ADAMTS-mediated aggrecanolytic activity in mouse cartilage. *Nat Protoc*. 6 (3) :388–404, 2011
6. Ogawa H, Kozhemyakina E, Hung HH, Grodzinsky AJ, Lassar AB. Mechanical motion promotes expression of Prg4 in articular cartilage via multiple CREB-dependent, fluid flow shear stress-induced signaling pathways. *Genes Dev*. 28 (2) :127–39, 2014
7. Glasson SS, Blanchet TJ, Morris EA. The surgical destabilization of the medial meniscus (DMM) model of osteoarthritis in the 129/SvEv mouse. *Osteoarthritis Cartilage*. 15 (9) :1061–9, 2007