

氏 名 やはら やすひと
箭原 康人

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 174 号

学位授与年月日 平成 27 年 9 月 28 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
生命・臨床医学専攻

学位論文題目 Identification of SIK3-targeting compound for treatment of
osteoarthritis
(SIK3 経路阻害剤は変形性関節症の進行を抑制する)

論文審査委員

(主査)	教授	北島 勲
(副査)	教授	笹原 正清
(副査)	教授	森 寿
(副査)	教授	戸邊 一之
(指導教員)	教授	木村 友厚

論文内容の要旨

【目的】

変形性関節症 (OA) は頻度の高い運動器疾患であり、関節機能とQOLの低下を引き起こす。OAの発症には、外傷や過度の力学的ストレス、加齢変化に伴う関節軟骨の変性など、多要因が関与することが知られており、その分子メカニズムも詳細に検討されてきた。しかし現在に至るまで、有効な治療薬は開発されていない。近年、OAの関節軟骨において、関節軟骨細胞の肥大化が認められることから、この肥大化の制御がOA治療のターゲットとなる可能性が考えられ始めている。Sasagawaらは、AMP-activated protein kinase (AMPK) ファミリーに属するsalt-inducible kinase 3 (Sik3)を全身で欠失するマウスにおいて、成長軟骨細胞における肥大化が抑制されることを見出ししていた。本研究の目的は、tamoxifen誘導型の軟骨細胞特異的Sik3欠失マウスを作成し、実験的OAモデルにおけるSik3の役割とその阻害効果を明らかにするとともに、新たに同定したSIK3経路阻害剤の抗OA効果を明らかにすることである。

【方法および結果】

人工膝関節置換術時に切除し余剰となった関節軟骨を用いて、リン酸化SIK3の蛋白発現を免疫染色によって確認した。その結果、変性が強い関節軟骨において、リン酸化SIK3の発現が上昇しており、OAの進行に伴ってSIK3経路が活性化する可能性が示唆された。続いて、*Col11a2-CreER; Sik3^{flox/flox}*マウスを作成した。このマウスは、軟骨細胞特異的に発現するXI型コラーゲン α 2鎖遺伝子(*Col11a2*)のプロモーター/エンハンサー制御下にCreERを発現している。Tamoxifenの投与によりCreERが細胞質から核へと移行し、loxPサイトにおいて組み換えが起こり、Sik3のエクソン5が欠失する。このマウスと*Rosa26-Stop^{flox}-EYFP*テスターマウスを交配し、*Col11a2-CreER; Sik3^{flox/flox}; Rosa26-Stop^{flox}-EYFP* (*Sik3^{D/D}-EYFP*マウス)を作成した。この*Sik3^{D/D}-EYFP*マウスは、tamoxifenの投与により、Sik3が欠失した細胞においてYFPが発現する。この発現はその後維持されるため、YFPの発現を追うことで、Sik3欠失細胞の分化過程を追跡することができる。2週齢の*Sik3^{D/D}-EYFP*マウスにtamoxifenを投与し、2週間後(生後4週齢)に膝関節部の成長軟骨、関節軟骨を組織学的に評価したところ、*Sik3^{D/D}-EYFP*マウスでは、コントロールマウスに比べて関節軟骨全層、関節軟骨非石灰化層、成長軟骨全層の厚みが有意に増加することが明らかとなった。次に、YFPと肥大軟骨細胞マーカーであるX型コラーゲン(Col10)の免疫染色を行った。その結果、Sik3が欠失したYFP陽性の軟骨細胞ではCol10の発現が認められなかった。以上の結果から、Sik3の欠失によって軟骨細胞の肥大化が阻害され、関節軟骨、成長軟骨の厚みが増大したものと考えられた。次に、7週齢の*Col11a2-CreER; Sik3^{flox/flox}*マウス(*Sik3^{D/D}*)と*Sik3^{flox/flox}*マウス(*Sik3^{f/f}*)にtamoxifenを投与し、8週齢時に膝関節のmeniscotibial ligamentを切離して関節不安定性を誘発する手術 (Destabilized medial meniscus; DMM) およびShma手術を行った。手術後8週間後(生後16週齢)に関節軟骨の組織学的解析を行った。その結果、Sham手術を行った*Sik3^{D/D}*マウスの関節軟骨、成長軟骨の厚みは、*Sik3^{f/f}*マウスに比べて有意に増加した。またDMM手術を行った*Sik3^{D/D}*マウスの関節症スコアは、*Sik3^{f/f}*マウスに比べて有意に低かった。さらに*Sik3^{D/D}*マウスでは、関節軟骨におけるCol10の蛋白発現が有意に低下していた。これらのことから、Sik3の欠失は軟骨の厚みを増加させるとともに、関節軟骨におけるCol10の発現を抑制し、関節症の進行を防ぐことが示された。続いて、低分子化合物のスクリーニングを行い、SIK3経路阻害剤としてcompound Xを同定した。Compound Xをマウスの軟骨細胞ペレットに添加して4週間培養し、軟骨関連マーカーのmRNA発現を定量PCR法により評価した。その結果、compound Xは*Col10a1*の発現を濃度依存的に抑制した。また、胎生15.5日齢のマウス中手骨軟骨原基を摘出し、阻害剤とともに7日間培養した。サフラニンO染色、Col10の免疫染色を行った結果、compound X添加群では、軟骨細胞の肥大化とCol10の蛋白発現が有意に抑制された。以上の結果から、本阻害剤は*in vitro*の実験系で、軟骨細胞の肥大化を強く抑制することが示された。

本阻害剤の *in vivo*での抗OA効果を評価するため、8週齢のC57BL/6マウスの右膝にDMM手術を行い、compound Xおよびvehicleを関節内注射し(週3回)、術後8週後に組織学的解析を行った。Compound Xの関節内注射は、DMM手術によって誘発された関節症変化の進行を有意に抑制し、関節軟骨の非石灰化層におけるCol10の発現を抑制した。

【総括】

本研究結果は、OAの関節軟骨においてSIK3経路が活性化しており、それが軟骨細胞の肥大化を促進することによって、OAの病態に寄与していることを示した。また、生後のマウスにおいてSik3を欠失させることによって、軟骨細胞の肥大化が抑制される一方で関節軟骨の厚みが増加すること、関節症の進行が抑制されることを初めて明らかにした。さらに新たに同定したSIK3経路阻害剤は、軟骨細胞の肥大化を抑制し、マウスOAモデルにおいて関節症の進行を防ぐことを示した。以上の結果から、本阻害剤はOAの治療薬の有力な候補となり得ると考える。

学位論文審査の要旨

〔研究目的〕

変形性関節症 (osteoarthritis, OA) は、わが国において患者が約800万人存在することが推定されている。OA発症には外傷、過度の力学的ストレス、加齢に伴う関節軟骨の変性など多因子の関与が知られており、その発症分子機序も解明されつつあるが、有効な治療法は確立されていない。最近、関節軟骨細胞の肥大化制御がOAの治療標的となる可能性が示唆されており、また、Sasagawaらは、salt-inducible kinase 3 (Sik3)遺伝子ノックアウトマウスで成長軟骨細胞の肥大化が抑制されていることを見出していた(Development;2012;139:1153-63)。本研究の目的は、tamoxifen誘導型軟骨細胞特異的Sik3欠失マウスを作成し、本マウスに実験的OA発症処置を施行しOA発症におけるSik3の関与を解明するとともに、新規同定したSik3経路阻害剤のOA治療効果を明らかにすることである。

〔方法並びに成績〕

- 1) 人工膝関節置換術時に切除した関節軟骨を用いて、リン酸化SIK3タンパク質発現を免疫染色にて検討した。変性が強い部位においてリン酸化SIK3が強く染色され、OA進行に伴いSik3シグナル伝達が活性化する可能性が示唆された。
- 2) 軟骨細胞特異的に発現するXI型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子(Col11a2)プロモーター/エンハンサーを用い、Sik3エクソン5が欠失するCol11a2-CreER:Sik3^{fllox/fllox}マウスを作成した。本マウスとRosa26-Stop^{fllox}-EYFPテスターマウスとを交配しCol11a2-CreER:Sik3^{fllox/fllox}; Rosa26-Stop^{flox}-EYFP (Sik3^{f/f}-EYFPマウス)を作成した。Tamoxifenの投与により軟細胞特異的Sik3欠失(Sik3^{D/D}マウス)を得た。2週齢時にtamoxifenを投与し4週齢時に関節軟骨を検討すると、Sik3^{D/D}-EYFPマウスは、コントロールのSik3^{D/+}-EYFPマウスに比べて関節軟骨全層、関節軟骨非石灰化層、成長軟骨全層の厚みが有意に増加し、Sik3欠失軟骨細胞では肥大軟骨細胞マーカーであるCol10タンパク質の発現が認められなかった。
- 3) 8週齢時に関節不安定性誘導手術 (destabilized medial meniscus, DMM) を行った。sham手術を行ったSik3^{D/D}マウスは、Sik3^{f/f}マウスに比べて有意に関節軟骨が肥厚した。また、DMM手術を施行したSik3^{D/D}マウスの関節症スコアは、Sik3^{f/f}マウスに比べて有意に低下しCol10のタンパク質発現が有意に低下していた。
- 4) SIK3経路阻害によるOA治療の可能性が示唆されたため、SIK3シグナルを減弱させる低

分子化合物のスクリーニングを行い、compound Xを同定した。マウス軟骨細胞ペレットに添加し、4週間培養した結果、compound Xは、SIK3標的分子であるHDAC4を介した*Mef2c* mRNA発現の濃度依存的抑制とCREBリン酸化を介した*Prp4* mRNAの発現上昇を誘導した。また、胎生15.5日齢マウス中手骨軟骨原基に対して、compound Xは軟骨細胞を肥大させCol10タンパク質発現を抑制した。さらに、8週齢C57BL/6マウス右膝にDMM手術を行い、週3回compound Xの関節内注射を施行した結果、関節症進行を有意に抑制し、関節軟骨非石灰化層のCol10タンパク質発現を抑制した。最後に、ヒト軟骨細胞に対する効果を検討するために、ヒトiPS細胞から分化誘導した軟骨パーティクルで検討した。その結果、*Col10A1*とアルカリフォスファターゼ(*ALP*) mRNAの発現が有意に抑制された。

〔総括〕

本研究では、tamoxifen誘導型軟骨細胞特異的*Sik3*欠失マウスの作成とその解析により、OAの罹患関節軟骨ではSIK3経路が活性化しており、その活性化が軟骨細胞の肥大化を促進することが明らかにされた。*Sik3*を欠失させることによって軟骨細胞肥大化が抑制される一方で、関節軟骨の厚みが増加し、関節症進行が抑制されることを初めて明らかにした成果は、その新規性が高く評価できる。また、低分子SIK3経路阻害剤を同定し、SIK3阻害によるMEF2C発現抑制を介する軟骨肥大化抑制とPRG4発現上昇を介する関節軟骨の潤滑性増加の分子薬理機序を明らかにした点に学術的重要性を認める。本研究で実施された実験的OAモデル（DMM手術）は急性期OAにおける解析結果であったが、加齢に伴うOAモデルでの検討が加わればさらに内容が充実するものとする。今回見出された低分子SIK3経路阻害剤compound Xは、リードケミカルとして関節軟骨障害治療に道を拓く可能性を示したことに臨床的意義が認められた。

以上より、本審査委員会は、本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。