

主論文の要旨

Verapamil Protects against Cartilage Degradation in Osteoarthritis by Inhibiting Wnt/ β -Catenin Signaling

〔 Verapamil は Wnt/ β -Catenin シグナル伝達経路を阻害し
変形性関節症における軟骨破壊を抑制する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
運動・形態外科学講座 整形外科学分野

(指導：西田 佳弘 准教授)

高松 晃

【緒言】

変形性関節症(OA)は、関節軟骨の破壊と骨棘形成を特徴とする進行性の変性疾患である。特に高齢者において慢性的な障害を及ぼす疾患であり、国内の有病者数は2000万人以上と推計される。発生要因として、加齢、骨粗鬆症、肥満、外傷、遺伝子異常などが挙げられるが、OAの病態に関する詳細な分子機構については未解明な点も多く、その治療法は対症療法のみで根本的治療法は存在しないのが現状である。

Wnt 蛋白は生体にとって必須な分泌タンパクであり、組織の発生や恒常性維持において重要な役割を担っている。Wnt シグナル伝達経路の異常が種々の疾患を引き起こすことが既に報告されており、OA と Wnt シグナルの関連についても近年いくつかの報告が散見される。例えば、2009 年に Wnt シグナルの分泌性アンタゴニストである *FRZB* の一塩基多型が女性の OA 発症に関与することが報告された。また、Wnt シグナル経路のアンタゴニストである *Gsk-3 β* のノックアウトマウスでは OA が進行しやすいことが報告されている。これらの先行研究から、Wnt シグナル経路の異常な活性化が OA の発症や進行と関連していることが予想され、Wnt シグナル経路を制御することが OA に対する治療に繋がる可能性があると考えられる。

Drug repositioning strategy は、既認可薬の中からある設定条件の下にスクリーニングを行い新たな薬効を見つけ出し、実用化に繋げようとするものである。この手法の最大の利点は、薬剤の用法や副作用が既に知られており安全性が担保されていることである。

本研究の目的は、ヒト軟骨細胞において *FRZB* 遺伝子の発現を増強し、且つ Wnt シグナル経路を抑制する薬剤を **Drug repositioning** により同定し、その OA に対する薬剤効果を実証することである。

【対象と方法】

FDA 既認可薬の中から Wnt シグナル経路の拮抗因子である *FRZB* のプロモーター活性を増強し、且つ Wnt シグナル経路の活性を抑制する薬剤の検索を行った。薬剤の効果検証のため、ヒト OA 軟骨細胞にて軟骨形成関連遺伝子への作用を **realtime RT-PCR** で、軟骨細胞株 *ATDC5* の分化過程での細胞外基質産生能を **Alcian blue** 染色で、ヒト OA 軟骨細胞での β -catenin の蛋白量を **Western blotting** にて評価した。胎生期マウスの脛骨器官培養にて、成長板での β -catenin の免疫組織染色と、肥大軟骨細胞数の定量化を行った。ラット OA モデルでの *Verapamil* の関節内投与による効果を OA 誘導後 4 週、8 週で組織学的に評価し、関節軟骨内での β -catenin による免疫組織染色を行った。

【結果】

FRZB の発現を活性化し、Wnt シグナル経路を抑制する薬剤として *Verapamil* を同定した (Figure 1)。*Verapamil* はヒト OA 軟骨細胞において、*FRZB* だけでなく *AGCN*, *COL2A1*, *SOX9* の発現を促進し、*Wnt3A* で誘導された Wnt/ β -catenin シグナル経路の標的遺伝子である *AXIN2* と *MMP3* の発現を抑制した。また、*Verapamil* は *ATDC5* の軟

骨分化過程において Wnt3A で阻害された Alcian blue の染色性を救済し、Western blotting で β -catenin の総蛋白量を抑制した (Figure 2)。胎生期マウスの脛骨器官培養において Verapamil は成長板での β -catenin の蓄積を阻害し、肥大軟骨細胞の総数を抑制した。ラット OA モデルにおける Verapamil の関節内投与により、OA 誘導後 4 週、8 週において有意に OA の進行が抑制された (Figure 3)。

【考察】

本研究は関節軟骨の恒常性維持に関わるとされる *FRZB* 遺伝子の発現を上昇させる薬剤を同定した初めての報告である。また、Verapamil は *FRZB* の発現の上昇を介して Wnt/ β -catenin シグナルの阻害剤として機能することも併せて示された。そして、Verapamil は *AGCN*, *COL2A1*, *SOX9* などの軟骨形成性遺伝子の発現を上昇させ、catabolic マーカーである MMP3 の発現を抑制することで、OA の進行を抑制することが示唆された。しかし、Verapamil が *FRZB* の遺伝子発現を上昇させる詳細な分子機構については未解明であり課題が残されている。また、ヒトでの臨床応用に向けて、より適正な薬剤濃度や投与頻度などについてのさらなる検討が必要である。

【結論】

Verapamil は Wnt/ β -Catenin シグナル伝達経路を阻害し変形性関節症における軟骨破壊を抑制する