

主論文の要旨

**Tranilast stimulates endochondral ossification by
upregulating *SOX9* and *RUNX2* promoters**

（トラニラストは*SOX9*および*RUNX2*プロモーターの活性化を介して
内軟骨性骨化を促進させる）

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）

長谷川 幸

【諸言】

骨折治癒には炎症期、修復期、リモデリング期があり、多くの細胞や成長因子、サイトカインなどが複雑に作用しあっており、なかでも修復期では内軟骨性骨化が重要な過程である。内軟骨性骨化は未分化間葉系細胞の凝集から始まり、軟骨細胞への分化成熟を経て骨へと置換される。内軟骨性骨化の複雑な過程は様々なサイトカインや転写因子によって調節されているが、SOX9は軟骨細胞の増殖・分化に関わり、内軟骨性骨化の特に早期分化において必須の転写因子である。一方、骨形成に關与する転写因子RUNX2は後期内軟骨性骨化において重要である。これらのSOX9とRUNX2は骨格発生だけでなく、骨折治癒の修復期においても重要な役割を果たしている。内軟骨性骨化においてSOX9とRUNX2の発現を促進させることは骨折の治癒促進になりうると考えられる。

本研究ではdrug repositioning の手法を応用して軟骨原性細胞でのSOX9および骨原性細胞でのRUNX2の発現を上昇させる既存薬を同定し、内軟骨性骨化における薬剤の作用を検討した。

【対象および方法】

マウス軟骨細胞株ATDC5細胞にSOX9プロモーターをサブクローニングしたルシフェラーゼレポーターベクターを遺伝子導入し、安定細胞株を作製した。同様にマウス間葉系細胞株C3H10T1/2細胞にRUNX2プロモーターを遺伝子導入し、安定細胞株を作製した。両安定細胞株に既存薬を含む1186種類の薬剤を添加して24時間後にルシフェラーゼアッセイを行い、SOX9およびRUNX2プロモーター活性を促進させる薬剤のスクリーニングを行った。スクリーニングにより選択した薬剤の作用機序を同定するため、正常ATDC5細胞を用いて、軟骨形成関連遺伝子発現を定量的PCR法、後期軟骨分化の指標としてアルカリフォスファターゼ（ALP）活性を経時的に測定した。また、細胞外マトリックス形成をアルシアンブルー染色、石灰化をアリザリンレッド染色で評価した。

【結果】

抗アレルギー薬として長年使用実績のあるtranilast は、ATDC5細胞におけるSOX9プロモーター活性とC3H10T1/2細胞におけるRUNX2プロモーター活性を濃度依存性の上昇させた。(Figure 1A, B)。

次に、内軟骨性骨化の分化誘導モデルであるATDC5細胞を用いてtranilastの作用を経時的に検討した。20 μ M tranilastを投与することで早期軟骨分化マーカーであるSox9、Col2a1、Acan遺伝子発現が促進された。(Fig. 2A-C) また、後期軟骨分化マーカーにおいて、tranilastは10日目および14日目のRunx2やCol10a1、Mmp13遺伝子発現を促進させた。(Fig. 2D-F) 軟骨分化を制御するシグナルに関連する遺伝子 (Pthrp、Ihh、Axin2、Tgfb1) の発現を調べたところ、PthrpおよびIhh遺伝子の発現が10日目および14日目で上昇し、tranilastによって有意に促進した。(Fig. 3A, B) Axin2遺伝子は14日目でtranilast

による発現促進を認めた。(Fig. 3C) *Tgfb1*は10日目および14日目で発現増加を認めたが、*tranilast*による有意な作用は認めなかった。(Fig. 3D)

ALP活性を調べたところ、21日目に*tranilast*による有意なALP活性上昇を認めた。(Fig. 4A) 21日目のアルシアンブルー染色にて、10 μ Mおよび20 μ M *tranilast*により、濃度依存性に染色性の増強を認めた。(Fig. 4B) 同様に、10 μ Mおよび20 μ M *tranilast*投与にてアリザリンレッド染色による石灰化の増強を認めた。(Fig. 4C)

【考察】

drug repositioning は既存薬の新たな効能を発見する手法であり、候補薬を段階的に絞り込んでいく手順により研究の経費と時間を削減できることが可能となる。我々は抗アレルギー薬である*tranilast*が内軟骨性骨化の促進作用を有することを明らかにした。*Tranilast*は1982年から日本と韓国において使用されており、重篤な副作用なく安全に使用されてきた実績があるが、内軟骨性骨化に対する作用の報告はない。

本研究で、*tranilast*は分化誘導したATDC5細胞において軟骨分化を刺激する作用を有することが示された。分化誘導したATDC5細胞において、*tranilast*は早期軟骨分化において*Sox9*発現を増加させることによって細胞外軟骨基質である*Col2a1*や*Acan*発現も増強させた。さらに、後期軟骨分化においても*Runx2*だけでなく*Col10a1*や*Mmp13*発現も増強させた。最終的に*tranilast*は細胞外軟骨基質の産生やALP活性を増加させ、石灰化を促進させる傾向があった。

ATDC5細胞の軟骨分化を刺激する物質はいくつか報告されている。*Kaempferol*はEPK/BMP-2シグナル活性化を介してATDC5細胞の軟骨分化を誘導している。*Adiponectin*はATDC5細胞の増殖から成熟までを促進させる作用があり、軟骨形成に関与するシグナルである*Ihh*や*Pthrp*などの発現を増強させる。*Genkwadaphnin*はERKおよびJNKシグナルに作用することで軟骨分化を促進させ、 β -*catenin*発現も増強させる作用を有する。*Tranilast*は、これらの物質と同様な遺伝子の発現を増強させることによってATDC5細胞における軟骨分化を促進させており、内軟骨性骨化の促進剤となりうる可能性を秘めている。

高容量(100 μ M)の*tranilast*はTGF β シグナル抑制作用を有することが近年報告されている。本研究において、低用量(20 μ M)の*tranilast*は*Tgfb1*遺伝子発現には作用しないことが示された。したがって、*tranilast*による内軟骨性骨化の効果的な作用はTGF β シグナルとは関連がないと考えられる。また、他の抗アレルギー薬は*Sox9*および*Runx2*発現促進を示さなかったことから、軟骨形成における*tranilast*の薬理学的作用は抗アレルギー作用とは異なると考えられる。

【結論】

*tranilast*はATDC5細胞において*Sox9*および*Runx2*の発現を上昇させ、細胞外基質形成を促進させ、ALP活性の上昇および石灰化を促進させる作用を有する。*Tranilast*は内軟骨性骨化を促進させることで骨折治療を促進させる治療薬となる可能性がある。