

## 主論文の要旨

### **Fluoxetine ameliorates cartilage degradation in osteoarthritis by inhibiting Wnt/ $\beta$ -catenin signaling**

Fluoxetine は Wnt/ $\beta$ -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)

宮本 健太郎

## 【緒言】

変形性関節症（Osteoarthritis：OA）は高齢者の運動機能を脅かす代表的な疾患であり、我が国で最も患者数の多い関節疾患として知られ、膝関節だけで国内に 2500 万人の患者がいると推定される。アライメント異常や外傷などの過剰なメカニカルストレスに加齢や代謝異常などが加わると、関節軟骨の恒常性が破綻し、軟骨の変性、破壊による関節裂隙の狭小化や滑膜炎、軟骨下骨の硬化や骨棘形成が進行する。この進行過程では、軟骨の細胞外基質の分解酵素や炎症性サイトカインの発現が増強され、最終的に軟骨細胞が細胞死を起こすことが知られているが、誘発原因となる分子生物学的なメカニズムは不明な点が多い。

Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルは、主に細胞の増殖や分化を制御するシグナルで、組織や器官の形成、癌の発生に加え、関節では軟骨などの恒常性維持に重要なシグナルである。Wnt 蛋白のない状態では、細胞質で GSK-3、CK1、APC などにより構成される分解複合体により、 $\beta$ -catenin はリン酸化、ユビキチン化されプロテアソームで分解される。Wnt 蛋白があると、 $\beta$ -catenin の分解複合体が不活性化され、 $\beta$ -catenin が細胞内に蓄積する。その結果、 $\beta$ -catenin は核内へ移行して標的遺伝子の発現を誘導する。

近年、この Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが軟骨の恒常性維持だけでなく、その異常活性化が OA 進行の誘発原因の一つであることが、遺伝子解析やヒト関節軟骨を用いた研究において報告され、OA 治療の有用な標的であると考えられている。しかし、軟骨特異的に  $\beta$ -catenin を無くしたマウスでは軟骨細胞の細胞死と OA 様の関節破壊がみられることから、軟骨の恒常性維持には適度な Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルは必須であると考えられ、他の臓器での副作用や癌発生も想像されることから、 $\beta$ -catenin を直接の標的にすることは難しい。

我々は、この問題点を解決するために Drug repositioning の手法を用いて、すでに適切な容量や副作用の知られる既存薬の中から、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを適度に制御する薬剤を同定するスクリーニングを行った。

## 【対象および方法】

軟骨様細胞株 HCS に TOPflash ベクターを遺伝子導入し、luciferase assay を用いて 1186 種の FDA 既認可薬の中から、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを適度に抑制する薬剤を同定した。

加えて、軟骨に分化させた軟骨前駆細胞株 ATDC5 への効果も検討した。この時、Wnt シグナル活性化剤として Wnt3A 蛋白、または分解複合体を不活性化する LiCl を同時に処置し、これらの効果を抑制する作用を検討した。細胞外基質量への作用を Alcian blue 染色で、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの標的遺伝子 Axin2 と軟骨の分化に重要な遺伝子 Sox9、Mmp13 の発現量への作用を realtime RT-PCR で、 $\beta$ -catenin の総蛋白量とリン酸化状態への作用を Western blotting で評価した。また、人工膝関節置換術時に採取したヒト OA 軟骨細胞への作用も、免疫蛍光染色による  $\beta$ -catenin の核局在の可視化で検討した。最終的に、生体内での OA 進行を抑制する作用を検討した。ラット膝

OA モデルに薬剤を関節内投与し、その効果を OA 誘導後 8 週で組織学的に検討し、関節軟骨内での  $\beta$ -catenin の核局在も検討した。

### 【結果】

luciferase assay で Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを抑制する薬剤として Fluoxetine を同定した (Figure 1)。分化した ATDC5 において Fluoxetine は Wnt3A 蛋白、LiCl で抑制された Alcian blue の染色性を救済した。また Fluoxetine は Wnt3A 蛋白、LiCl により誘導される Axin2、Mmp13 の発現量上昇を抑制し、Sox9 の発現量低下を救済した (Figure 2)。加えて、Fluoxetine は LiCl が誘導するリン酸化  $\beta$ -catenin 量の低下と総  $\beta$ -catenin 量の上昇を阻害した。OA 軟骨細胞では Fluoxetine は LiCl で誘導された  $\beta$ -catenin の核局在を阻害した。ラット膝 OA モデルでは、Fluoxetine の関節内投与により OA の進行が有意に抑制され、関節軟骨内での  $\beta$ -catenin の核局在を阻害した (Figure 3)。

### 【考察】

現在、臨床で使用可能な OA に対する薬物治療はアセトアミノフェン、NSAIDs やオピオイドなどの内服薬とステロイドやヒアルロン酸の関節内注射など、炎症や痛みを軽減させる薬物のみであり、OA の誘発原因を抑制あるいは修飾する薬剤は存在しない。

本研究において我々は、Drug repositioning の手法を用いて Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを阻害し変形性関節症における軟骨破壊を抑制する薬剤として Fluoxetine を同定した。Fluoxetine は Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを介して、軟骨の分化に必須な Sox9 遺伝子の発現を上昇させ、一方細胞外基質を分解する Mmp13 遺伝子の発現を抑制することで、細胞外基質量を増加させることが示唆された。

我々は過去に、カルシウムブロッカーである Verapamil が Wnt 蛋白を阻害する FRZB の発現増強を介して Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを阻害することを報告した。Fluoxetine は LiCl による分解複合体の不活性化を阻害することから、Verapamil とは異なり、この分解複合体を介して異常に活性化された Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを抑制し、OA 進行を抑制していることが示唆された。

Fluoxetine は SSRI の一種であり、OA 患者の疼痛に対して使用される SNRI と同様に疼痛改善効果があると考えられる。OA の誘発原因も抑制する効果を証明することで今後の臨床応用が期待される。

### 【結語】

Fluoxetine は Wnt/ $\beta$ -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。