

<研究課題>

医薬ビッグデータとフェノタイプスクリーニングによる変形性関節症治療薬の探索

代表研究者: 広島大学病院 未来医療センター 講師 味八木 茂
共同研究者: 九州工業大学大学院情報工学研究院 教授 山西 芳裕

【まとめ】

変形性関節症(OA)は、根本的な治療薬がなく、その開発が重要である。そこで、既存薬情報をもとに、ビッグデータと機械学習を取り入れたドラッグリポジショニングとその作用機序の解明を目的とした。本研究により抽出された既存薬のOA抑制効果を老化促進マウス(SAMP8)により検証した。その結果、SAMP8マウスは、早期にOAを自然発症すること、このマウスを用いた検証の結果、1種の薬剤がOA抑制効果を示した。

1. 研究の目的

運動器疾患は、生活の質を著しく低下させるものであり、要介護・支援の原因1位である。中でも、変形性関節症(OA)は、加齢などに伴い多くの人が罹患する世界的な疾患であり、我が国においても2000万人いるとされている。OAに対する治療は、痛みなどに対する対処療法が主であるが、最終的には人工関節置換術の適用となり、発症・進行を抑制する薬剤等の治療法はない。OAの危険因子は、主に加齢(1次性OA)であり、メタボリックシンドローム、スポーツなどによる外傷(2次性OA)によっても軟骨をはじめとする関節構成組織の恒常性の破綻により引き起こされる。我々は、これまでmicroRNA、オートファジー活性、抗酸化酵素が軟骨恒常性およびOAの発症・進行に重要な役割をもつことを遺伝子改変マウスなどにより明らかにしてきた¹⁻⁴⁾。しかし、加齢に伴うOA進行を抑制するような薬剤の開発には至っていない。そこで本研究は、1) これまでに動物モデルで報告されたOA抑制効果を示した数少ない化合物を正例とし、その構造や薬理機能、そして、その化合物による軟骨細胞での遺伝子発現応答情報と医薬ビッグデータよりOA治療薬として応用可能な既存医薬品候補を探索する。2) 早期にOAを発症

する老化促進マウス(SAMP8)を用いてOA発症抑制効果を示す医薬品を同定することを目的とする。以上の結果より、OA発症機構や科学的な証拠に基づいたOA治療薬候補を揃え、ヒトでのOA治療薬の開発に向けた基盤研究を目指す。

2. 研究方法と経過

2-1) ビッグデータを用いた機械学習プログラムによる *In silico* 解析

OA治療薬となり得る既存薬を医薬ビッグデータに基づく機械学習法により探索する。研究分担者である山西らが開発した機械学習プログラム⁵⁻⁷⁾により、これまでの一般的であるOAモデルマウス(靱帯切離などによるOA誘導モデル; 2次性OA)によりOA抑制効果が報告されている化合物(エピジェネティック関連酵素阻害剤、イオンチャネル阻害剤、骨粗鬆症薬、老化細胞除去薬など)を正例として、まず正例5種を指標に、その情報と本研究で得た発現データ、そしてKEGGデータベースなどを用いて日本や欧米で承認されている全ての薬物に適用し、薬物に関する構造を含むケミカル情報や副作用情報、薬物応答遺伝子発現情報、疾患に関するフェノタイプ情報やパスウェイ情報などの網羅的データを融合解析し、潜在的な薬物の効能を体系的に大規模予測するための *in silico* 手法を用いた解析を行うことで、候補既存薬を探索した。

2-2) 自然発症OAモデルマウスへの薬剤投与によるOA抑制効果

(1) 正例既報化合物と抽出した候補薬剤によるOA抑制効果の確認
これまでC57BL/6jマウスにおけるOAの自然発症には、1年半以上もの飼育が必要であることや

その発症時期や程度が一様でないことから、より簡便に比較的短期間に OA を誘導できるモデルマウス(靭帯切離などによる OA 誘導モデル;2 次性 OA)が利用されてきた。しかし、投薬対象は加齢依存的な 1 次性 OA が重要であると考え、抽出した候補薬剤の効果を評価するモデルマウスとして老化促進マウス(SAMP8)に注目した。我々は、経時的に SAMP8 マウスの膝関節の病理組織、microCT による軟骨下骨や大腿骨における骨密度、筋力などを詳細に解析した。そして、候補薬の OA 抑制効果を確認するために、SAMP8 マウスの膝関節内や腹腔内、経口への投与による OA 発症の抑制効果を同様に解析した。

(2) 作用機序の同定と新たな OA 発症機構の同定
既存の医薬品の多くはすでに標的分子や作用機序が明らかになっている場合が多くあり、それらの軟骨細胞や OA における標的分子や作用機序との関係を解析することで新たな OA 発症機構の解明についても検討する。

3. 研究の成果

3-1)ビックデータを用いた機械学習プログラムによる *In silico* 解析

正例 5 種を指標とし、予備解析としてその情報と本実験で得た発現応答データ、そして KEGG データベースなどを用いて日本や欧米で承認されている全ての薬物に適用し、薬物に関する構造を含むケミカル情報や副作用情報、薬物応答遺伝子発現情報、疾患に関するフェノタイプ情報やパスウェイ情報などの網羅的データを融合解析し、潜在的な薬物の効能を体系的に大規模予測するための *in silico* 手法を用いた解析により挙がってきた数多くの候補既存薬からまずは 3 種の薬剤に注目した。

3-2)正例候補としての既報化合物の OA 抑制効果の確認

老化促進マウス(SAMP8)は、これまでに学習・記憶障害といった認知症のモデルマウス(約 40 週齢で発症)として知られているが、経時的に膝関節を解析したところ 9 週齢で軟骨において老化細胞とアポトーシス細胞が増加し、23 週齢では一様に重篤な OA を示すことから一次性的な自然発症 OA モデルとして有用であることを明らかにした。また、

軟骨変性以前に起こる関節内組織の変化を観察すると、6 週齢より軟骨下骨の硬化促進、関節軟骨におけるタイプ 10 型コラーゲン陽性の肥大軟骨細胞の増加や大腿骨における骨密度の低下が認められた。注目した候補薬剤がこの自然発症 OA モデルである SAMP8 マウスにおいて OA 抑制効果を示すかどうかを確認するために、1ヶ月齢の SAMP8 マウスの腹腔もしくは関節内投与、経口投与を施し、23 週齢における OA 発症の抑制効果を病理組織学的解析などにより評価した。その結果、現在までに正例とした既報化合物を含め 8 種類の効果を検証したが、1次性 OA モデルである SAMP8 マウスへの投与においては、老化細胞除去薬として報告された既報薬剤と本システムによって新たに抽出した 1 種の薬剤についてのみ OA が軽減される結果を得た。OA 抑制効果を示した薬剤について、既報薬剤は、経口投与によりマウスの OA 様変化の組織学的評価基準となっている OARSI スコアにおいて、有意差は認められるものの、その効果は非常に軽度であり、軟骨下骨の硬化、タイプ 10 型コラーゲン陽性細胞の増加や骨密度の低下は改善していなかった。新たに抽出した薬剤については、タイプ 10 型コラーゲン陽性細胞の増加は認められたが、軟骨下骨の硬化や骨密度低下の改善を伴い、OA 様変化を抑制していた。このことから SAMP8 マウスが薬剤等の治療介入効果を評価するのにも適していることも示された。そこで、新たに抽出した薬剤の投与マウスより軟骨由来 RNA を精製し、遺伝子発現応答解析を RNA-Sequence を用いて網羅的に解析し、自前のデータとした。今後、既存の医薬品でもあることからすでに標的分子や作用機序が明らかであり、それらの軟骨細胞や OA における標的分子や作用機序との関係を解析することで新たな OA 発症機構の解明に向けて解析している。 _

4. 今後の課題

これまでの一般的な OA モデルマウス(外科的な靭帯切離などによる OA 誘導モデル;2 次性 OA)により OA 抑制効果が報告された既報化合物 5 種を本システムにおける正例として予備解析をスタートした。そして、正例とした化合物がこの自然発症 OA モデルである SAMP8 マウスにおいても OA 抑制効果を示すかどうか、すなわち本研究システムにおける正例化合物として適しているかどうかを確認したところ、自然発症モデルである SAMP8 マウ

スにおいてその効果を示した化合物は1種であった。これは、1次性OAと2次性OAモデルに対する効果の違いなども考えられる。今後の本システムの実施において候補薬剤を抽出する精度をより高める上でも、正例とする化合物については、SAMP8マウスモデルを用いて最低5種は確認する必要があると考えている。本研究期間内では目標としていた正例化合物最低5種の選択には至っていないが、引き続き数種の化合物について現在も継続中である。正例とした化合物の薬物応答遺伝子発現情報など自前のデータが少ない中で、予備解析であったことから、今後は、上述したように正例化合物のデータ取得などについてさらに精査した上で *In silico* 解析を実施し、新たなOA発症機構や科学的な証拠に基づいたOA治療薬候補を同定していく。

5. 研究成果の公表方法

本研究の一部は以下のように国際学会にて口頭発表済みである。

Yohei Sanada, Shigeru Miyaki, Yasunari Ikuta Masahiro Shinohara, Keita Nagira, Hiroyuki Ishitobi, Kiminori Matsubara, Masakazu Ishikawa, Tomoyuki Nakasa, Nobuo Adachi. Senescence accelerated mice as a new animal model for ageing related osteoarthritis development Orthopaedic Research Society 2020 Annual Meeting, February 8-11, 2020. Phenix, Arizona, USA.

また、本研究の一部の成果について論文投稿を準備中であり、今年度中には国際誌へ投稿する予定である。

参考論文

1. Miyaki S, Nakasa T, Otsuki S, Grogan SP, Higashiyama R, Inoue A, Kato Y, Sato T, Lotz M, Asahara H. MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates IL-1 responses. *Arthritis Rheum*, 60(9):2723-30, 2009.

2. Miyaki S, Sato T, Inoue A, Otsuki S, Ito Y, Yokoyama S, Kato Y, Takemoto F, Nakasa T, Yamashita S, Takada S, Lotz MK, Ueno K H, Asahara H. microRNA-140 plays dual roles both in cartilage development and homeostasis. *Genes Dev*, Jun 1;24(11):1173-85, 2010.
3. Caramés B, Hasegawa A, Taniguchi N, Miyaki S, Blanco FJ, Lotz M. Autophagy activation by rapamycin reduces severity of experimental osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 71(4): 575-81, 2012.
4. Takada T, Miyaki S, Ishitobi H, Hirai Y, et al. Bach1 deficiency reduces severity of osteoarthritis through upregulation of heme oxygenase-1. *Arthritis Res Ther*, 17:285, 2015.
5. Yamanishi Y, Kotera M, Moriya Y, Sawada R, Kanehisa M, and Goto S. "DINIES: drug-target interaction network inference engine based on supervised analysis" *Nucleic Acids Research*, 42, W39-W45, 2014
6. Sawada R, Iwata M, Tabei Y, Yamato H, and Yamanishi Y. "Predicting inhibitory and activatory drug targets by chemically and genetically perturbed transcriptome signatures", *Scientific Reports*, 8:156, 2018.
7. Iwata M, Hirose L, Kohara H, Liao J, Sawada R, Akiyoshi S, Tani K, and Yamanishi Y. "Pathway-based drug repositioning for cancers: computational prediction and experimental validation", *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(21), 9583–9595, 2018.

以上