
トピックス

骨軟骨腫の治療薬開発に向けたレチノイン酸受容体 γ アゴニストの作用**Retinoic acid receptor γ agonist action for the development of therapeutic agents for osteochondroma****はじめに**

がんは悪性新生物とも呼ばれ、乳がん、肺がん、胃がん、そして前立腺がんがよく知られている。日本では高齢化の影響によりがんの罹患率及び死亡率は増加の一途をたどっている。2023年に行われた厚生労働省の調査によると、がんは日本人における総死亡数の24.3%を占めており死因のトップとなっている¹⁾。がん細胞は2つの遺伝的特徴を持ち、ひとつは正常な制御を離れて増殖することであり、もうひとつは他の細胞があるはずの場所に浸潤し定着することである。これら2つの特徴が組み合わさることで、がん細胞は悪性腫瘍細胞として増殖し、さらに様々な組織に転移し、組織の機能を障害することで機能不全を引き起こし、死の危険を生む。一方で、がんには希少がんと呼ばれるがんが存在し、日本では人口10万人あたり年間6例未満の新規診断が確認されている²⁾。日本での希少がん診断数は種類の多さから年間のがん診断数全体の15%程度を占めているが、個々の診断数の少なさから研究が少ない。Gattaら³⁾の調査によると、一般的ながん患者の5年生存率が65%であるのに対して希少がんは47%と低い。骨に発生するがんには他の臓器で発生したがんが骨に転移する「転移性骨腫瘍」と骨自体からがんが発生する「原発性悪性骨腫瘍」の2種類が存在する。軟骨肉腫は原発性悪性骨腫瘍の1種であり、骨の肉腫のうち2番目に発症頻度が高いことが知られる希少がんのひとつである。

骨軟骨腫は良性腫瘍であるが、悪性化することにより軟骨肉腫となる危険性を有する。近年、骨軟骨腫の治療には外科手術が一般的な手法となっているが、幾度もの手術や腫瘍の位置による手術難度の違いから、患者への負担を軽減するために治療薬の開発が求められている。最近の研究により、骨軟骨腫の形成がレチノイン酸受容体(Retinoic acid receptor: RAR)アゴニストにより阻害されることが明らかとなった⁴⁾。本稿で

は、骨軟骨腫に関わる軟骨形成について概説し、その治療薬の開発に有益な情報となり得るRARアゴニストが作用する分子機構に関する最近の知見について紹介する。

軟骨形成とビタミンA

RARは、生体内では活性化ビタミンAである全-トランスレチノイン酸がリガンドとして結合することで、転写因子として機能する核内受容体スーパーファミリーのひとつである。RARには α 、 β 、 γ と呼ばれる3つのサブタイプが存在し、それぞれが同じく核内受容体スーパーファミリーに属するレチノイドX受容体とヘテロダイマーを形成し、レチノイン酸応答配列を介して標的遺伝子の発現を調節する。ビタミンAの役割のひとつとして軟骨形成の制御があり、多くの報告がされている。軟骨は軟骨マトリックスから構成されており、その主要なタンパク質はII型コラーゲンで、およそ90%を占めている。そのため、軟骨形成にはII型コラーゲンが大きく関与している。例えば、ひよこの胸骨から単離した軟骨細胞をレチノイン酸に曝露するとII型コラーゲンのpro α 1(II)鎖の発現が低下する⁵⁾。またウシ軟骨細胞をレチノイン酸とIL-6ファミリーのサイトカインであるオンコスタチンMの共存在下で培養すると、II型コラーゲンの主要な分解酵素として軟骨の形成を阻害するMatrix metalloproteinase-13(Mmp13)の発現が相乗的に増加し、コラーゲンの分解も相乗的に促進することから、レチノイン酸とオンコスタチンMの組合せが軟骨マトリックスの代謝回転に影響する可能性がある⁶⁾。Yuら⁷⁾の研究によると、軟骨マトリックスの破壊や滑膜炎などを引き起こす炎症性疾患である変形性関節症患者の軟骨細胞では、健常者と比較してRAR γ の発現レベルが高い。C28/I2ヒト軟骨細胞にRAR γ を高発現させるとMatrix metalloproteinase-9(Mmp9)やADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 5(Adams5)などの軟骨マトリックス分解

に参与するタンパク質の発現が上昇し、軟骨マトリックスの形成に参与するコラーゲンの I 型 $\alpha 1$ 鎖, I 型 $\alpha 2$ 鎖, II 型 $\alpha 1$ 鎖, そして Aggrecan をそれぞれコードする *Colla1*, *Colla2*, *Col2a1*, そして *Acan* の mRNA 発現レベルが低下する。一方で, RAR γ に対する shRNA を発現することで, C28/I2 細胞において RAR γ をノックダウンさせると, *Mmp9* や *Adamts5* の mRNA 発現レベルは低下する。これらの結果から, RAR γ の活性化は軟骨マトリックスの分解を正に制御することによって, 軟骨形成を抑制することが期待される。

軟骨の形成と分解の制御機構

高齢化が進む現代社会では骨粗鬆症や変形性関節症などの骨に関する病気が問題となっている。軟骨の形成や分解には転写因子である SRY-box9 (Sox9) や Runt-related transcription factor (Runx) 1/2/3, *Mmp13* や *Adamts5* が参与するとともに Stat 経路が重要な役割を果たす。Bi ら⁸⁾ は Sox9 ホモ欠損 ES 細胞を野生型胚盤胞に注入することで, キメラ胚を作製して軟骨細胞の分化が正常に起こるか評価した。その結果, ホモ欠損 ES 細胞のキメラ胚は正常な軟骨分化を示さなかった。一方で, マウス由来間葉系幹細胞株 C3H10T1/2 細胞に Sox9 を高発現させると, Bone morphogenetic protein-2 (BMP2) シグナル誘導性の軟骨形成が促進した⁹⁾。以上の結果より, 軟骨細胞への分化に Sox9 が必要であることが判明した。

Runx2 を欠損したマウスでは胸骨における正常な軟骨細胞の分化が阻害される¹⁰⁾。さらに Runx1 は間葉系幹細胞の軟骨細胞への分化を促進する¹¹⁾。間葉系幹細胞特異的に Runx1 を欠損したマウスや Runx2 欠損マウスでは胸骨の軟骨突起の発達が遅れ, Runx1 と Runx2 の両方を欠損したマウスは胸骨を完全に消失する¹⁰⁾。

Runx1 と Runx2 の両方を欠損したマウスの胚における胸骨となる部位では, 軟骨形成に必須である Sox5 と Sox6 の発現が低下する。また, C3H10T1/2 細胞と Hela 細胞を用いた Sox6 のプロモーター領域における Chip アッセイによると, Runx1 と Runx2 が Sox6 のプロモーター領域に結合することから, Sox6 の発現調節には Runx1 と Runx2 が関与している。Runx2 を欠損したマウスでは骨幹部の軟骨細胞サイズが縮小し, Runx2 と Runx3 の両方を欠損したマウスではさらに細胞サイズが縮小して軟骨細胞の成熟が完全に阻害される¹²⁾。これらの結果より, Runx1, Runx2, Runx3 は軟骨細胞への分化や成熟に関与することがわかる。さらに, 間葉系幹細胞で Stat3 をノックダウンすると軟骨マトリックスの蓄積が抑制され, リン酸化された Sox9, つまり活性型 Sox9 の発現レベルが減少する¹³⁾。Sox9 の下流には Sox5 や Sox6 のような軟骨形成に重要な遺伝子が存在しているため, Stat3 が間葉系幹細胞の軟骨形成分化に重要な役割を果たすことが推測される。

Mmp13 は II 型コラーゲンの分解に参与する。*Mmp13* のホモ欠損マウスは肥大軟骨細胞の増加や成長板の異常な成長を示す¹⁴⁾。一方で, JAK-STAT 経路の活性化に伴って *Mmp13* や *Adamts4* の発現が増加し, 軟骨組織を構成するプロテオグリカンの 1 種である Aggrecan の発現が減少するが, JAK-STAT 経路を選択的に阻害する AG490 によって *Mmp13* と *Adamts4* の発現は減少する¹⁵⁾¹⁶⁾。また, ヒト CHON-001 軟骨細胞を抗炎症薬であるフェブラゾン存在下で培養すると, *Adamts5* の発現が抑制されて, TNF- α 誘発性の Aggrecan の分解が抑制される¹⁷⁾。これらの結果から軟骨マトリックスの分解には *Mmp13*, *Adamts4*, *Adamts5* が参与し, その上流には JAK-STAT 経路が関わると推測される (図 1)。

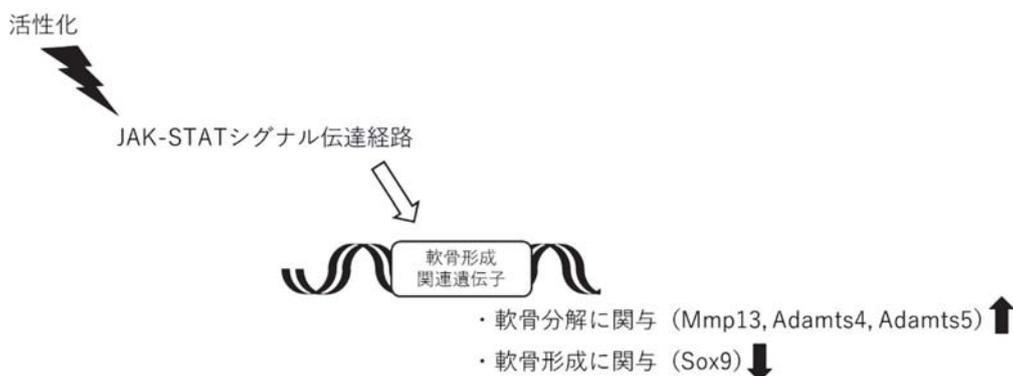


図 1 JAK-STAT シグナル伝達経路による遺伝子変動の概念

骨軟骨腫の形成を阻害する RAR γ アゴニスト

軟骨マトリックスの分解に重要な役割を果たす Mmp13 や Adamts4, Adamts5 の作用によって、骨軟骨腫の形成は阻害される¹⁷⁾。現在までに多発性骨軟骨腫モデルマウスにおいて、骨軟骨腫の形成を阻害することが実証されている薬剤は BMP シグナル伝達の阻害剤である LDN-193189, Indian hedgehog (Ihh) の阻害剤である PF-04449913, そして RAR γ 選択的アゴニストであるパロパロテンの3種類である。LDN-193189 は BMP2 シグナル伝達により誘発される Sox9 と Acan の mRNA 発現レベルの上昇を抑制し、骨軟骨腫の成長を阻害する¹⁸⁾。さらに、LDN-193189 は軟骨形成に重要な Smad1/5/8 のリン酸化レベルを低下させ、内因性抗軟骨因子である Fgf9 と Fgf18 の mRNA 発現レベルを増加させる。一方で、細胞の生存・増殖・分化に関与する tyrosine phosphatase SHP2 をコードする Ptpn11 をノックアウトしたマウスは中軟骨腫症に似た症状を発症し、軟骨腫症モデルマウスとして利用されるが、PF-04449913 を4週間投与することで、外骨腫の数が著しく減少する¹⁹⁾。また、Inubushi ら²⁰⁾は遺伝性多発性骨軟骨腫モデルマウスとして、硫酸グリコサミノグリカンであるヘパラン硫酸の合成に不可欠な Ext1 (Exostosin-1) をノックアウトしたマウスを用いて、骨軟骨腫におけるパロパロテンの影響を評価したところ、Smad1/5/8 のリン酸化が減少し、それに伴って骨軟骨腫の形成が阻害されることを見いだした。しかし、パロパロテンの臨床試験では骨格成熟度が低い未成年男女において骨端線異常が観察された²¹⁾²²⁾。また、Garcia ら⁴⁾は骨軟骨腫モデルマウスを用いて、パロパロテンの影響を評価したところ、パロパロテンは骨軟骨腫モデルマウスにおいて、Mmp13 と Adamts5 の発現上昇と Sox9 の発現低下を引き起こし、骨軟骨腫の成長を抑制した。しかし、パロパロテンの投与はマウスの脛骨の長さを短縮させる副作用を有した。パロパロテンによる Mmp13 と Adamts5 の発現増加と Sox9 の発現低下について上流の経路を評価するために、C57BL/6J マウスから単離した軟骨培養細胞をパロパロテン存在下で培養すると、Stat3 のリン酸化が増加し、活性化された。さらに、パロパロテンによる Stat3 の活性化を RAR γ ヘテロ欠損軟骨細胞と RAR γ ホモ欠損軟骨細胞で評価したところ、RAR γ ヘテロ欠損軟骨細胞では Stat3 が活性化されたが、RAR γ ホモ欠損軟骨細胞では活性化されず、Stat3 活性化が RAR γ に依存的であることが示唆された。以上の結果から、パロパロテンは骨軟骨腫に対して成長を阻害する効果が期待され

ている。しかし、臨床試験や動物試験におけるパロパロテンの成長阻害や脛骨長の減少についてはさらなる検討が必要であり、今後の研究に注目が寄せられる。

おわりに

本稿では、軟骨組織における骨軟骨腫の治療薬を開発するために有用となり得る RAR γ アゴニストについて紹介した。レチノイン酸や RAR γ アゴニストは軟骨細胞の分化に対する阻害剤として機能することが知られている。Garcia ら⁴⁾の研究成果により、RAR γ のアゴニストであるパロパロテンの作用が骨軟骨腫の形成を阻害するのに有効である可能性が示された。しかし、希少がんである骨軟骨腫の治療薬の候補として挙げられている3つの薬剤のうちパロパロテンは臨床試験が行われたものの、骨端線異常を引き起こす有害事象が観察された²¹⁾²²⁾。パロパロテン自体を骨軟骨腫の治療薬として使用することはできないが、彼らの研究成果は骨軟骨腫の治療に重要な情報となる。今後も骨軟骨腫の阻害に有用な経路の研究が展開され、治療薬の開発が進むことを期待したい。

Key words: vitamin A, osteochondroma, cartilage, cancer, retinoic acid receptor

¹Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agriculture, Osaka Metropolitan University

²Center for Research and Development of Bioresources, Osaka Metropolitan University

Tomoki Oba¹, Tomoya Kitakaze¹, Naoki Harada¹, Ryoichi Yamaji^{1,2}

¹大阪公立大学農学研究科生命機能化学専攻

²大阪公立大学生物資源開発センター

大場 智貴¹, 北風 智也¹, 原田 直樹¹, 山地 亮一^{1,2}

利益相反自己申告：申告すべきものなし

(2025.2.12 受付)

文 献

- 厚生労働省 令和5年人口動態統計月報年計(概数)の概況 (2023) <https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai23/index.html> (2025-01-24)
- 国立がん研究センター. さまざまな希少がんの解説. (2024).

- <https://www.ncc.go.jp/jp/rcc/about/index.html> (2025-01-31).
- 3) Gatta G, van der Zwan J M, Casali P G, Siesling S, Dei Tos A P, Kunkler I, Otter R, Licitra L, Mallone S, Tavilla A, Trama A, Capocaccia R, RARECARE working group (2011) Rare cancers are not so rare: the rare cancer burden in Europe. *Eur J Cancer* **47**, 2493–2511
 - 4) Garcia S A, Wilson K, Tang N, Tian H, Oichi T, Gunawardena A T, Chorny M, Alferiev I S, Herzenberg J E, Ng V Y, Iwamoto M, Enomoto I M (2024) Analysis of the actions of RAR γ agonists on growing osteochondromas in a mouse model. *Int J Mol Sci* **25**, 7610
 - 5) Horton W E, Yamada Y, Hassell J R (1987) Retinoic acid rapidly reduces cartilage matrix synthesis by altering gene transcription in chondrocytes. *Dev Biol* **123**, 508–516
 - 6) Shingleton W D, Jones D, Xu X, Cawston T E, Rowan A D (2006) Retinoic acid and oncostatin M combine to promote cartilage degradation via matrix metalloproteinase-13 expression in bovine but not human chondrocytes. *Rheumatology (Oxford)* **45**, 958–965
 - 7) Yu Y W, Li S Y, Zhang L J, Wang Q L, Liu Z G, Chen Q Z, Song H Y, Shen D Y, Yan J (2022) Retinoic acid receptor gamma (RAR γ) promotes cartilage destruction through positive feedback activation of NF- κ B pathway in human osteoarthritis. *Mediators Inflamm* **2022**, 1875736
 - 8) Bi W, Deng J M, Zhang Z, Behringer R R, de Crombrugge B (1999) Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* **22**, 85–89
 - 9) Liao J, Hu N, Zhou N, Lin L, Zhao C, Yi S, Fan T, Bao W, Liang X, Chen H, Xu W, Chen C, Cheng Q, Zeng Y, Si W, Yang Z, Huang W (2014) Sox9 potentiates BMP2-induced chondrogenic differentiation and inhibits BMP2-induced osteogenic differentiation. *PLoS One* **9**, e89025
 - 10) Kimura A, Inose H, Yano F, Fujita K, Ikeda T, Sato S, Iwasaki M, Jinno T, Ae K, Fukumoto S, Takeuchi Y, Itoh H, Imamura T, Kawaguchi H, Chung U, Martin J F, Iseki S, Shinomiya K, Takeda S (2010) Runx1 and Runx2 cooperate during sternal morphogenesis. *Development* **137**, 1159–1167
 - 11) Wang Y, Belflower R M, Dong Y F, Schwarz E M, O'Keefe R J, Drissi H (2005) Runx1/AML1/Cbfa2 mediates onset of mesenchymal cell differentiation toward chondrogenesis. *J Bone Miner Res* **20**, 1624–1636
 - 12) Yoshida C A, Yamamoto H, Fujita T, Furuichi T, Ito K, Inoue K, Yamana K, Zanma A, Takada K, Ito Y, Komori T (2004) Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev* **18**, 952–963
 - 13) Kondo M, Yamaoka K, Sakata K, Sonomoto K, Lin L, Nakano K, Tanaka Y (2015) Contribution of the interleukin-6/STAT-3 signaling pathway to chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheumatol* **67**, 1250–1260
 - 14) Inada M, Wang Y, Byrne M H, Rahman M U, Miyaura C, López-Otín C, Krane S M (2004) Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17192–17197
 - 15) Yao Z Z, Hu A X, Liu X S (2017) DUSP19 regulates IL-1 β -induced apoptosis and MMPs expression in rat chondrocytes through JAK2/STAT3 signaling pathway. *Biomed Pharmacother* **96**, 1209–1215
 - 16) Chen B, Liu Y, Cheng L (2018) IL-21 enhances the degradation of cartilage through the JAK-STAT signaling pathway during osteonecrosis of femoral head cartilage. *Inflammation* **41**, 595–605
 - 17) Xiong X, Liu L, Xu F, Wu X, Yin Z, Dong Y, Qian P (2021) Feprazone ameliorates TNF- α -induced loss of aggrecan via inhibition of the SOX-4/ADAMTS-5 signaling pathway. *ACS Omega* **6**, 7638–7645
 - 18) Sinha S, Mundy C, Bechtold T, Sgariglia F, Ibrahim M M, Billings P C, Carroll K, Koyama E, Jones K B, Pacifici M (2017) Unsuspected osteochondroma-like outgrowths in the cranial base of hereditary multiple exostoses patients and modeling and treatment with a BMP antagonist in mice. *PLoS Genet* **13**, e1006742
 - 19) Yang W, Wang J, Moore D C, Liang H, Dooner M, Wu Q, Terek R, Chen Q, Ehrlich M G, Quesenberry P J, Neel B G (2013) Ptpn11 deletion in a novel progenitor causes metachondromatosis by inducing hedgehog signalling. *Nature* **499**, 491–495
 - 20) Inubushi T, Lemire I, Irie F, Yamaguchi Y (2018) Palovarotene inhibits osteochondroma formation in a mouse model of multiple hereditary exostoses. *J Bone Miner Res* **33**, 658–666
 - 21) Pignolo R J, Baujat G, Hsiao E C, Keen R, Wilson A, Packman J, Strahs A L, Grogan D R, Kaplan F S (2022) Palovarotene for fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP): results of a randomized, placebo-controlled, double-blind phase 2 trial. *J Bone Miner Res* **37**, 1891–1902
 - 22) Pignolo R J, Hsiao E C, Al Mukaddam M, Baujat G, Berglund S K, Brown M A, Cheung A M, De Cunto C, Delai P, Haga N, Kannu P, Keen R, Sang K H L Q, Mancilla E E, Marino R, Strahs A, Kaplan F S (2023) Reduction of new heterotopic ossification (HO) in the open-label, phase 3 MOVE trial of palovarotene for fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). *J Bone Miner Res* **38**, 381–394