

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18990

研究課題名(和文) GSK-3阻害薬の局所投与による骨再生療法の探索

研究課題名(英文) Search for bone regeneration therapy by local administration of GSK-3 inhibitors

研究代表者

有岡 将基 (ARIOKA, Masaki)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：20733554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：GSK3阻害薬の中でSB216763が強力な破骨細胞分化抑制効果を認めた。また、GSK3阻害薬はCOX-2やmPGES-1を抑制し、破骨細胞の分化阻害した可能性がある。骨芽細胞でも、SB216763が最も石灰化を促進した。アデニン腎症マウスを用いた実験で、リチウムの経口投与が海綿骨量を増加させた。しかし、尿崩症をきたすため、他の特異的なGSK3阻害薬の効果の検討および局所投与の方法に更なる検討が必要である。GSK3阻害は骨再生に導くが、GSK3は多彩な生理活性に重要な役割を担うため、癌化のリスクが懸念される。GSK3活性化薬のDIF-1が癌の増殖・浸潤を抑制することも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：SB216763 inhibited the strongest osteoclast differentiation. Moreover, the GSK3 inhibitors might inhibit osteoclast differentiation by suppressing the production of PGE2 through inhibition of COX-2 and mPGES-1. In response to the effect on osteoblasts, SB216763 resulted in promoting the most calcification. Although systemic administration of GSK3 inhibitors promotes bone formation, it was not known whether it is effective in patients with renal failure. Oral administration of lithium increases trabecular bone mass using adenine-induced uremic mice. It would be necessary to investigate the effect of other specific GSK3 inhibitors and study of the drug delivery system for local administration. Inhibiting activation of GSK3 would promote bone regeneration. On the other hand, we must also be concerned about the risk of cancer progression. Differentiation inducing factor-1, GSK3 activator, suppressed cancer proliferation / infiltration.

研究分野：薬理学

キーワード：GSK3 GSK3阻害薬 炎症 骨再生 腎不全

## 1. 研究開始当初の背景

骨再生を調節する複数の細胞内シグナルの中で、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路は骨芽細胞への分化調節に重要な働きをしていることが報告されている。我々はこの伝達経路の主要な調節因子である GSK-3 に注目した。GSK-3 $\beta$ ヘテロ欠損マウス(GSK-3 $\beta^{+/}$ )では、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路の恒常的活性化により Wnt 標的遺伝子であり、骨芽細胞分化に不可欠な Runx2 の発現が上昇し、骨量の増加ならびに骨再生速度の上昇が認められた。このことから、GSK-3 は骨代謝と骨再生の調節に重要な働きをしており、骨再生促進薬として期待できるターゲットになりえることを見出した。GSK-3 阻害薬は未分化間葉系細胞において、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル依存性に骨芽細胞の分化を促進し、破骨細胞において Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル非依存性に分化を抑制することを明らかにした。さらに、GSK-3 阻害薬をラットの骨損傷部に局所投与することで、新生骨形を促進できることが示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究は我々が培養細胞と骨欠損モデルラットを用いて、局所投与により骨再生を促進することを見出したグリコゲン合成酵素キナーゼ (GSK) -3 阻害薬の“骨再生促進薬”としての臨床応用を目指す橋渡し研究である。我々はすでに GSK-3 阻害薬の一つであるリチウムの生体内での作用について検討を行い、リチウムの局所投与が骨形成を促進することを明らかにしてきた。しがしながら、解明できていない作用機序や臨床応用するにあたり解決すべき課題も明らかとなった。そこで、本研究は、①破骨細胞における GSK-3 の役割の解明、②リチウムより優れた GSK-3 阻害薬の探索、および③既存の骨再生療法との併用効果の検討の3点について検討する予定としていた。これら以外にも GSK3 阻害薬の抗炎症効果、腎不全における全身投与の骨形成への効果、癌に対する骨化を検討した。

## 3. 研究の方法

- (1) 前破骨細胞として RAW-D 細胞を 37°C、5%CO<sub>2</sub> 気相下、10%FBS 含有  $\alpha$ -MEM で培養した。分化誘導には、RANKL 50ng/ $\mu$ l で4日間刺激した。培地は2日毎に交換した。種々の GSK3 阻害剤を用いて、破骨細胞分化に与える影響を検討した。評価は、TRAP 染色を行い、活性および破骨細胞数をカウントした。
- (2) また、ウエスタンブロット法により、破骨細胞分化のマスター調節因子である NFATc1 のタンパク質発現を評価した。
- (3) 次に、破骨細胞分化調節には骨芽細胞のインタラクションも無視できない。骨芽

細胞から分泌される因子によっても影響されるため、破骨細胞分化誘導因子である RANKL および OPG のタンパク質発現をウエスタンブロット法で検討した。未分化間葉系細胞 C3H10T1/2 を 37°C、5%CO<sub>2</sub> 気相下、10%FBS 含有  $\alpha$ -MEM で培養し、種々の GSK3 阻害剤で刺激を行った。

- (4) 破骨細胞の分化促進因子として、円強刺激が有名であるため、GSK3 阻害薬が炎症反応に与える影響を検討することとした。細胞はヒト急性単球性白血病細胞株である、THP-1 を PMA によってマクロファージ様細胞に分化させて用いた。LPS 10  $\mu$ g/ml を培地に添加して炎症刺激を加え、GSK-3 阻害薬の抗炎症効果を検討した。
- (5) 未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2 を用いて、より強力な骨形成作用のある GSK3 阻害薬の探索を行った。9日間、37°C、5%CO<sub>2</sub> 気相下、10%FBS 含有  $\alpha$ -MEM で培養し、アルカリフォスファターゼ染色で評価した。
- (6) in vitro で検討した特異性や阻害機序の違い GSK-3 阻害薬の効果を、生体内でも検証を行った。雄 11 週齢の Wistar ラットの足を除毛・消毒 (70%エタノール) し、三種混合麻酔薬 (塩酸メドミジン 0.15 mg/kg; ミダゾラム 2 mg/kg; 酒石酸ブトルファンール 2.5 mg/kg) を腹腔内注射し、以下の処理を行った。脛骨に 30 mm の皮膚切開を加え、筋肉および骨膜を剥離して脛骨表面を露出させる。膝関節から 6 mm 下方から歯科用バーで長さ 5 mm、幅 1.5 mm、深さ 1 mm の骨欠損を作製する。欠損サイズは、事前に作製しておいた同サイズの型を用いることで規定した。BD マトリゲル TM 基底膜マトリックスは低温では液状だが、およそ 30 度でゲル化する性質がある。この性質を利用した GSK-3 阻害薬の局所投与方法として、生理食塩水で溶解した GSK-3 阻害薬溶液を作製し、氷上で液状の至適終濃度の GSK-3 阻害薬を含有した BD マトリゲル TM 基底膜マトリックスを調整した後に、37 °C の温水上でゲル化させ、骨欠損部に作製したゲルを填入し、吸収性のコラーゲン膜で被覆した。術野を生理食塩水で洗浄し、切開部位を縫合した。ラットは術後 14 日後にセボフルレン吸入により安楽死させ、脛骨を摘出して解析を行った。骨形態計測の解析には micro-CT Skyscan 1076 scanner を用いて、撮影条件は 60 kV, 167  $\mu$ A でスライス幅 18  $\mu$ m で行った。
- (7) GSK3 を操作することで、骨再生には良い効果をもたらしているが、同時に GSK3 は生理活性に重要な役割をこなうため、癌化のリスクに関しても懸念しなければならない。GSK3 活性化薬である

Differentiation inducing factor-1 (DIF-1) が悪性黒色腫細胞株である B16BL6 細胞に及ぼす増殖抑制効果および浸潤抑制効果を検討した。細胞は 37°C、5% CO<sub>2</sub> 気相下、10%FBS 含有 RPMI1640 で培養した。経時的に MTT assay を用いて増殖に対する影響を検討した。浸潤に対する効果の評価は、Boyden chamber に 10μg のマトリゲルをコーティングして、血清を含まない培地で細胞を播種し、10%FBS を誘導因子にして細胞遊走・浸潤に及ぼす DIF-1 の影響を検討した。

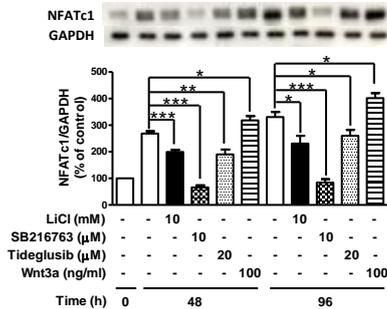
#### 4. 研究成果

- 種々の GSK3 阻害薬、いずれも破骨細胞分化を抑制することが分かった。古典的 Wnt シグナル伝達経路のアゴニストである Wnt3a の刺激では反対に破骨細胞分化促進的に働いていることから、Wnt シグナル非依存的な経路で効果を発揮している可能性が示唆された。



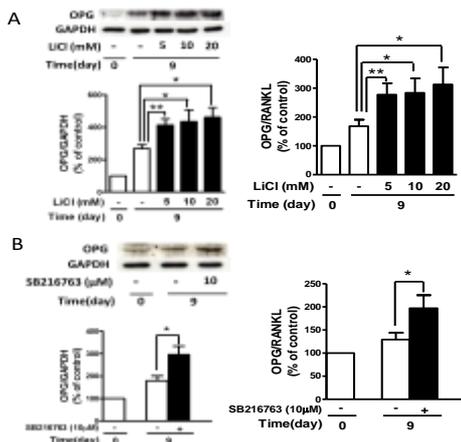
- 上記の結果と相関して、NFATc1 のタンパク質発現は GSK3 阻害薬により減少していることがわかった。

図2: GSK3阻害剤のRAW-DIにおけるNFATc1発現への影響



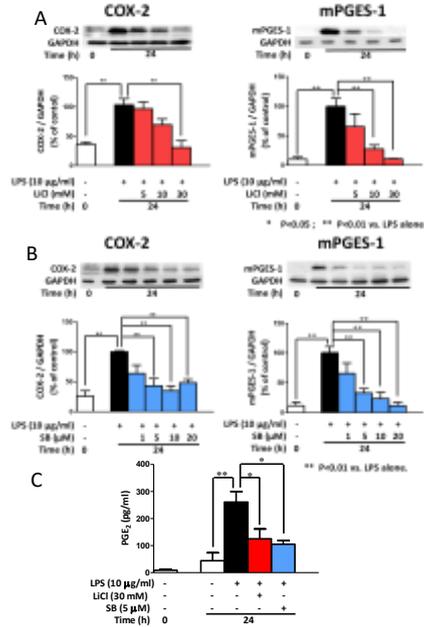
- 骨芽細胞における破骨細胞調節因子の発現に関しては、GSK3 阻害薬はオステオプロテジェリン (OPG) の発現を上昇させることで、OPG/RANKL 比を上昇させることが分かった。

図3: GSK3阻害剤のC3H10T1/2におけるOPG/RANKLへの影響



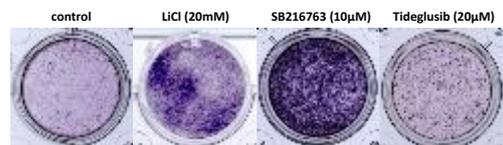
- 次に、GSK3 阻害薬は LPS 刺激による炎症反応を抑制することが分かった。COX-2 と mPGES-1 の発現抑制をすることで、プロスタグランジン E<sub>2</sub> の産生を抑制できることが明らかになった。

図4: GSK3阻害剤のTHP-1における炎症への影響



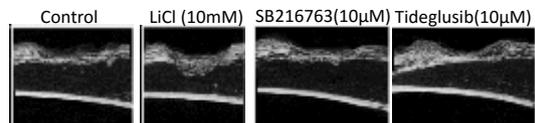
- 芽細胞における GSK3 阻害薬の骨形成効果の検討では、SB216763 が最もアルカリフォスファターゼ活性が強力であることがわかった。

図5: GSK3阻害剤のC3H10T1/2における骨形成への影響



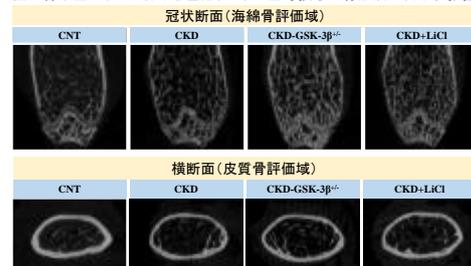
- ラット骨欠損モデルにおいて、GSK3 阻害薬局所投与における骨形成促進効果に明らかな差を認めなかった。

図6: GSK3阻害剤局所投与の骨再生に及ぼす in vivo 実験



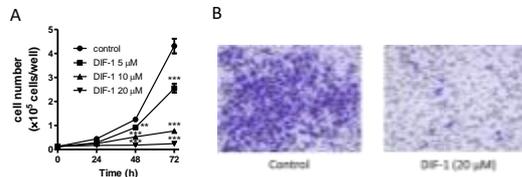
- 腎不全モデルにおける、塩化リチウムの全身投与では海綿骨量の骨形成を促進することはできたが、皮質骨の骨形成促進はしなかった。

図7: 腎不全マウスにおける塩化リチウム全身投与の骨形成に及ぼす影響



- (8) GSK3 は多彩な生理活性を持つため、癌化のリスクが懸念されるため、GSK3 活性化薬のがんに対する影響を検討した。GSK3 活性化薬である DIF-1 は悪性黒色腫細胞株 B16BL6 の増殖と浸潤を抑制した。

図8: GSK3活性化薬の悪性黒色腫細胞増殖および浸潤抑制効果



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Akihiro Nagano, Masaki Arioka (equally contributed author), Fumi Takahashi, Etsuko Matsuzaki, Toshiyuki Sasaguri, Celecoxib inhibits osteoblast maturation by suppressing the expression of Wnt target genes, *Journal of Pharmacological Sciences*, 133, 1, 18-24, 2017. 01.
2. Issei Egashira, Fumi Takahashi-yanaga, Risa Nishida, Masaki Arioka, Kazuhiro Igawa, Yoshimichi Nakatsu, Teruhisa Tsuzuki, Yusaku Nakabeppu, Takanari Kitazono, Toshiyuki Sasaguri, Celecoxib and 2,5-dimethylcelecoxib inhibit intestinal cancer growth by suppressing the Wnt/beta-catenin signaling pathway, *Cancer Science*, 108, 1, 108-115, 2017. 01.
3. Narihito Tatsumoto, Masaki Arioka (corresponding), Shunsuke Yamada, Fumi Takahashi-Yanaga, Masanori Tokumoto, Kazuhiko Tsuruya, Takanari Kitazono, Toshiyuki Sasaguri, Inhibition of GSK-3 $\beta$  increases trabecular bone volume but not cortical bone volume in adenine-induced uremic mice with severe hyperparathyroidism, *Physiological Reports*, 4, e131010, 2016. 10.
4. Ai Fujita, Fumi Takahashi-Yanaga, Sachio Morimoto, Tatsuya Yoshihara, Masaki Arioka, Kazunobu Igawa, Katsuhiko Tomooka, Sumio Hoka, Toshiyuki Sasaguri, 12,5-Dimethylcelecoxib prevents pressure-induced left ventricular remodeling through activation of GSK-3, *Hypertension Research*, 40, 130-139, 2017. 02.
5. Toshihiro Noma, Fumi Takahashi,

Masaki Arioka, Yoshihide Mori, Toshiyuki Sasaguri, Inhibition of GSK-3 reduces prostaglandin E2 production by decreasing the expression levels of COX-2 and mPGES-1 in monocyte/macrophage lineage cells, *Biochemical Pharmacology*, 116, 120-129, 2016. 07.

6. Mohamed Rasha, Sachio Morimoto, Ibrahim I, Zhan DY, Du CK, Masaki Arioka, Yoshihara T, Takahashi-Yanaga F, Toshiyuki Sasaguri, GSK3 $\beta$  heterozygous knockout is cardioprotective in a knock-in mouse model of familial dilated cardiomyopathy, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 310, 1805-1815, 2016. 05
7. Masaki Arioka, Masanori Sasaki, Kotaro Ishii, Masaki Kanamoto, Takahiro Yamashiro, Yoshihide Mori. Acase of pediatric mandibular osteonecrosis caused by leakage of arsenic trioxide, *Jpn J Oral Maxillofac Surg*, 63, (1), 15-20, 2017. 01.

[学会発表] (計 14 件)

1. 有岡 将基, 高橋 富美, 笹栗 俊之, DIF-1 suppresses proliferation, migration and metastasis of malignant melanoma, 第 90 回日本薬理学会年会, 2017. 03. 17.
2. 有岡 将基, 高橋 富美, 佐々木 匡理, 杉 友貴, 森 悦秀, 笹栗 俊之, 歯科インプラント埋入のための抜歯窩への炭酸リチウム局所単回投与の安全性および骨形成促進作用の評価, 第 37 回日本臨床薬理学会学術総会, 2016. 12. 02.
3. Narihito Tatsumoto, Masaki Arioka, Shunsuke Yamada, Masanori Tokumoto, Kazuhiko Tsuruya, Takanari Kitazono, Toshiyuki Sasaguri, The Anti-Calcific And Anti-Apoptotic Effects of GSK-3 Inhibitors In Cultured Human Aortic Smooth Muscle Cells, ASN kidney week 2016, 2016. 11. 18.
4. Masaki Arioka, Fumi Takahashi-Yanaga, Toshiyuki Sasaguri, DIF-1 suppresses proliferation, migration and metastasis of malignant melanoma, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016. 10. 07.
5. 野間 俊宏, 高橋 富美, 有岡 将基, 笹栗 俊之, The potential of GSK-3 inhibitors as novel anti-inflammatory drugs, 第 89 回日本薬理学会年会, 2016. 03. 11.
6. 有岡 将基, 高橋 富美, 笹栗 俊之, DIF-1 inhibits proliferation, infiltration and metastasis of malignant melanoma through GSK-3

- activation、第89回日本薬理学会年会、2016.03.10.
7. 辰元 為仁、**有岡 将基**、山田 俊輔、徳本 正憲、鶴屋 和彦、北園 孝成、笹栗 俊之、Increase in trabecular bone volume by inhibition of GSK-3beta in uremic mice、第89回日本薬理学会年会、2016.03.09.
  8. Narihito Tatsumoto, **Masaki Arioka**, Shunsuke Yamada, Masanori Tokumoto, Kazuhiko Tsuruya, Takanari Kitazono, Toshiyuki Sasaguri, Increase in Trabecular Bone Volume by Inhibition of GSK-3b in Uremic Mice, ASN kidney week 2015, 2015.11.06.
  9. **有岡 将基**、高橋 富美、笹栗 俊之、DIF-1 は GSK-3β の活性化を介して悪性黒色腫に抗腫瘍効果をもたらす、第36回日本臨床薬理学会学術総会、2015.12.09.
  10. 辰元 為仁、**有岡 将基**、山田 俊輔、徳本 正憲、鶴屋 和彦、北園 孝成、笹栗 俊之、GSK3β 阻害は慢性腎臓病 (CKD) マウスの海綿骨量を増加させる、第68回日本薬理学会西南部会、2015.11.21.
  11. 野間 俊宏、高橋 富美、**有岡 将基**、笹栗 俊之、GSK-3 阻害薬の抗炎症薬としての可能性、第68回日本薬理学会西南部会、2015.11.21.
  12. **有岡 将基**、高橋 富美、笹栗 俊之、DIF-1 による悪性黒色腫の増殖・浸潤・転移の抑制、第68回日本薬理学会西南部会、2015.11.21.
  13. **Masaki Arioka**, Fumi Takahashi, Toshiyuki Sasaguri, DIF-1 exerts antitumor activity by suppressing the Wnt/β-catenin signaling pathway in melanoma cell line B16BL6, The 74th annual meeting of the Japanese cancer association, 2015.10.08.
  14. 野間 俊宏、高橋 富美、**有岡 将基**、佐々木 匡理、笹栗 俊之、森 悦秀、GSK-3 阻害薬の NF-κB を介した抗炎症薬としての可能性、第69回日本口腔科学会学術集会、2015.05.13.

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

[その他]  
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有岡 将基 (ARIOKA, Masaki)  
 九州大学・大学院医学研究院・助教  
 研究者番号：20733554

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )