

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K17105

研究課題名（和文）ドラッグリポジショニングを用いた骨形成促進

研究課題名（英文）Osteogenesis Promotion Using Drug Repositioning

研究代表者

山口 大輔（Yamaguchi, Daisuke）

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：70795111

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではHeat shock proteins (HSPs) 誘導剤として知られている Geranylgeranylacetone (GGA)に注目をした。GGAは主に胃粘膜保護薬として使用されているが、特に骨組織へ与える影響は明らかになっていない。そこで「GGAが骨芽細胞においてHSPsを誘導し分化を促進する」という仮説を立て、この仮説をin vitroの実験系で検証することを目的とし、マウス骨芽細胞様細胞(MC3T3E-1)にGGAを投与し細胞応答や表現型の変化を検討した結果、MC3T3E-1にGGAを投与することでコラーゲン生成量が増加し石灰化促進することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医薬品を新たに開発するのではなく、開発が中断した薬剤や市販の薬剤を新規効能として利用するドラッグリポジショニングを用いて研究を行うことにした。今回注目した薬剤はGGAが主成分でありHSP誘導能をもつテプレノンである。しかしながら今までに骨の治癒を促進する生物学的な機序を明らかにした報告はない。したがって本研究では我々が確立した実験方法に準じて骨芽細胞様細胞に対してGGAを投与した結果コラーゲン生成量が増加し石灰化促進することを確認することができた。

研究成果の概要（英文）：We focused on geranylgeranylacetone (GGA), which is known as a heat shock proteins (HSPs) inducing agent. GGA is mainly used as a gastric mucosal protective agent; however, its effects on bone tissues have not been studied. Therefore, we hypothesized that “GGA induces HSPs in osteoblasts thereby promotes cell differentiation”, and administered GGA to MC3T3E-1 cells to examine cell responses. As a results, GGA promoted the differentiation of MC3T3E-1 in an in vitro cell culture model.

研究分野：骨再生医療

キーワード：Geranylgeranylacetone

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 喪失歯に対するインプラント治療の有用性と課題

歯を失った患者に対して行う口腔インプラント治療は長期にわたり顎口腔機能を改善させると共に、有床義歯と比較して心理面にまで良い影響をあたえる方法として評価されるようになり有効な治療法として認知されるようになった。チタンインプラントが骨と結合するオッセオインテグレーションは光学顕微鏡で観察したときにチタンと骨が直接的に接触することと定義され、チタンインプラント成功の必須条件である。しかし、インプラントを埋入してからオッセオインテグレーションが得られるまでに3ヶ月から半年の治癒期間を設ける必要がある。我々医師はこの治癒期間を短縮する方法を確立することが患者のQOL向上につながると考えている。

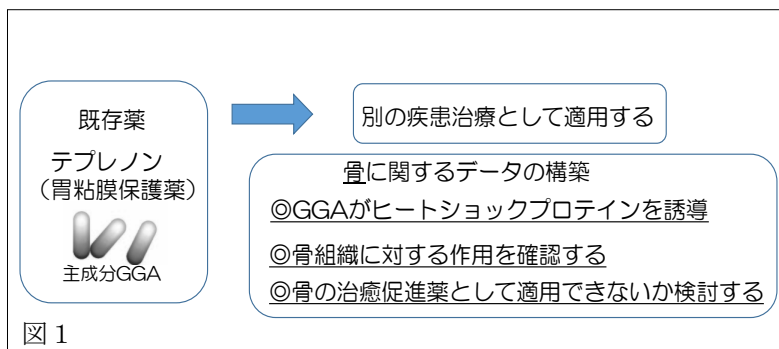
### (2) 物理刺激による骨の治癒促進の可能性

我々は、骨折の治癒促進に用いられる低出力超音波パルス等の物理的な刺激を利用し埋入したインプラント周囲の骨の治癒が促進できる可能性が指摘し、これまでにRatの大腿骨にインプラントを埋入し、LIPUSの照射がインプラント埋入後の骨治癒の初期において骨-チタン結合を促進すること報告してきた。cDNAマイクロアレイを用いた網羅的解析を行った結果よりコラーゲン合成酵素遺伝子や細胞外基質に関連する遺伝子さらに骨基質特異的の発現が上昇していることが確認された。また近年、熱ショックプロテイン(Heat shock proteins: Hsps)の合成が誘導され細胞増殖の制御や分化に関与していることがわかってきた。そこで我々は安全性が確立され効率よく体内でHspを誘導し、骨の治癒を促進する方法はないだろうかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究において我々は、熱ショックプロテイン(Heat shock proteins: Hsps)誘導剤として知られているGeranylgeranylacetone(GGA)が主成分の胃粘膜保護薬、テプレノンに注目をした。テプレノンは安全性と体内

動態が確認されてきた既承認薬であるが骨の治癒を促進する生物学的な機序を明らかにした報告はない。したがって「GGAが骨芽細胞におけるHSPを誘導し分化を促進する」という仮説を立てた。本研究ではこの仮説



を *in vitro* の実験系で検証することを目的とし、マウス骨芽細胞様細胞(MC3T3E-1)にGGAを投与しGGA投与群とコントロール群の細胞応答や表現型の変化を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養

新生マウス頭蓋冠由来MC3T3E-1細胞を、15%FBS(Equitech-Bio、USA)、 $10^{-8}$ Mデキサメタゾン(Sigma、USA)、50mg/mlL-アスコルビン酸2リン酸(Sigma、USA)、10mM $\beta$ -グリセロリン酸塩(Sigma、USA)、抗菌薬-抗真菌薬合剤(Life Technologies、USA)を $\alpha$ -MEM

(Life Technologies、USA) に添加した培養液中に懸濁し、10cm 培養皿 (Corning、USA) で培養した。培養 3 日目に継代し、12well 培養液皿に  $3 \times 10^4$  cell/well 播種した。培養は、5% CO<sub>2</sub>、37°C 環境下のインキュベーターで行い、培養液の交換は、3 日に 1 回行った。

## (2) GGA の投与

GGA は Teprenon (エーザイ) を使用し 100% エタノール (和光純薬) とジメチルスルホキシド (和光純薬) で溶解した。その後、 $\alpha$ -MEM (Life Technologies、USA) で希釈し  $10^{-4}$  M の GGA 溶液を作成した。GGA 溶液を継代初日から 3 日に 1 度投与し GGA 群とした。一方、GGA 溶液を投与しなかった群をコントロール群とした。コントロール群には Teprenon を添加させず、100% エタノールとジメチルスルホキシドのみを GGA 溶液と同じ濃度になるよう  $\alpha$ -MEM で希釈した溶液を作成し、継代初日から毎日投与した。

## (3) 細胞増殖

培養開始 7 日目、14 日目に WST-8 法 (Cell Counting Kit-8、同仁化学、熊本) を用いて細胞数を測定した。すなわち、細胞培養皿の組織を PBS で静かに 2 回洗浄してから培養液を 900  $\mu$ l 加えた後に、Cell Counting Kit 溶液を各ウェルに 100  $\mu$ l 添加して CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 20 分間培養し呈色反応させた。その後、反応液を 96well に 100  $\mu$ l ずつ移し、吸光度計 (Microplate Reader 680 BIORAD、USA) を用いて 450nm の吸光度を測定し、細胞数の変化の相対値とした。

## (4) コラーゲンの定量

培養 7 日目、14 日目の組織中に生成されたコラーゲンの定量を行った。この方法はコラーゲンと特異的に結合する Sirius Red (Polysciences、USA) を用いて染色されたコラーゲンを吸光度の値として定量する方法である<sup>18)</sup>。すなわち、培養組織を PBS で洗浄し Bouin 液 (Polysciences、USA) で培養組織を固定し、洗浄後、飽和ピクリン酸 (関東化学、東京) で溶解した Sirius Red 染色液 (100mg/100ml) で 1 時間の染色を行った。余剰な染色液を 0.01M HCl で洗浄した後に、0.1M NaOH 溶液で Sirius Red を溶解し、吸光度計 (Microplate Reader 680、BIORAD、USA) を用いて 550nm の吸光度を測定し評価した。

## (5) ALP 活性の測定

ALP 活性の測定は、培養 7 日目、14 日目に p-ニトロフェニルリン酸基質法を用いて測定した。すなわち、PBS 1 ml に基質緩衝液 (ラボアッセイ ALP、和光純薬工業) 100  $\mu$ l を添加して、10 分間インキュベートして呈色反応させた。その後、反応液を 96well 培養皿に 100  $\mu$ l ずつ移し、吸光度計 (Microplate Reader 680、BIORAD、USA) を用いて 405nm の吸光度を測定しアルカリホスファターゼ活性値を求めた。

## (6) 石灰化の評価

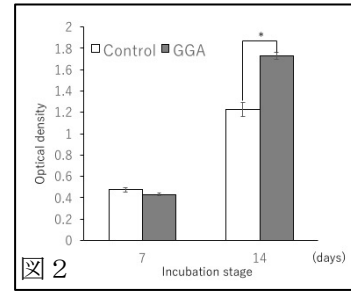
培養 28 日目に Alizarin Red S 染色を行い画像処理法を用いて染色された面積を定量した。この方法は金属イオンと結合する性質をもつ Alizarin Red S (Thermo Fisher Scientific、USA) を用いてカルシウム塩沈着部を染色させ石灰化の指標とする方法である。すなわち、培養細胞を 10% 中性緩衝ホルマリン液 (和光純薬、大阪) で 10 分間固定し精製水で洗浄後、Alizarin Red

S 染色溶液 (pH 4.1-4.3) で 10 分間染色後、精製水で 4 回洗浄した。染色された面積を画像処理ソフトウェア (image J、NIH、USA) を用いて定量化した。

#### 4. 研究成果

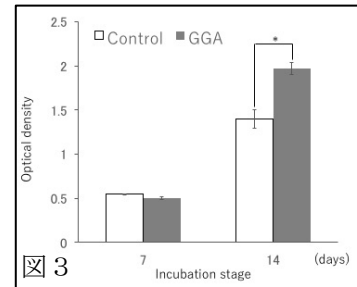
##### (1) 細胞増殖能の評価

図 2 は培養 7 日目、14 日目の細胞数の相対値を吸光度の値として示したグラフである。分散分析の結果、培養 14 日目ではコントロール群と比較して GGA 投与群で有意に細胞数が多いと判定された ( $p < 0.05$ )。一方、7 日目では有意差を認めなかった。



##### (2) コラーゲンの定量

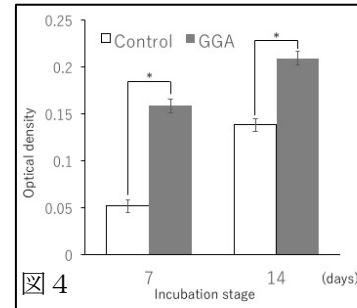
図 3 は培養 7 日目、14 日目のコラーゲンの生成量を吸光度の値で示したグラフである。分散分析の結果、培養 14 日目においてコントロール群と比較して GGA 投与群でコラーゲン生成量の有意な増加を認めた ( $p < 0.05$ )。



##### (3) ALP 活性の測定

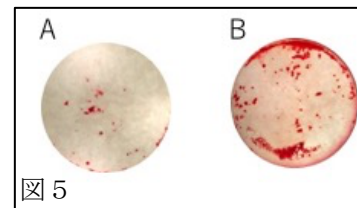
図 4 は培養 7 日目、14 日目の ALP 活性の測定結果を示したグラフである。

分散分析の結果、培養 7 日目および 14 日目において、GGA 群は Control 群と比較して有意に ALP 活性が高かった ( $p < 0.05$ )。



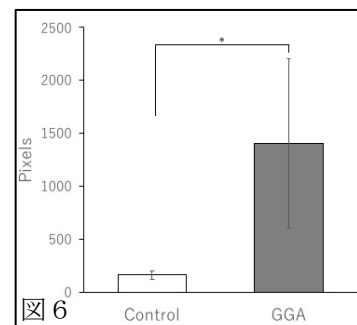
##### (4) 石灰化の評価

図 5A, B に Alizarin Red S 染色による培養組織像を示す。また図 6 は培養 28 日目の石灰化の様相を Alizarin Red S 染色により求めたグラフである。培養日数ごとに一元配置分散分析を行った結果、GGA 投与群はコントロール群と比較して有意に画素数が多かった ( $p < 0.05$ )。



本研究では GGA が骨芽細胞へ与える影響を検討する目的で MC3T3E-1 の増殖能と分化能および石灰化能の測定を行った。

その結果、MC3T3E-1 の増殖や分化が促進され、石灰化の足場となるコラーゲンの合成が促進を認めたことから、骨形成を促進することが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamaguchi Daisuke, Takeuchi Kazuo, Ueno Atsuko, Kato Daisuke, Miyamae Shin, Murakami Hiroshi	4. 巻 30
2. 論文標題 Experimental Repositioning of Geranylgeranylacetone to Enhance Bone Remodeling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Hard Tissue Biology	6. 最初と最後の頁 1~6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2485/jhtb.30.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口大輔, 竹内一夫, 古田弘樹, 上野温子, 村上弘, 武部純
2. 発表標題 ドラッグリポジショニングを用いた骨芽細胞分化促進の試み
3. 学会等名 第19回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------