

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18495

研究課題名（和文）カーボンナノマテリアル誘導骨芽細胞活性化機序に基づく骨形成促進薬の開発

研究課題名（英文）Development of bone formation-promoting drugs based on osteoblast activation mechanism induced by carbon nanomaterials.

研究代表者

出田 宏和 (Ideta, Hiromasa)

信州大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00838534

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：カーボンナノホーン（CNH）による骨形成促進作用は骨芽細胞の膜レセプターを介するものではない事が明らかとなった。骨芽細胞に取り込まれるナノマテリアルであるCNH、カーボンブラック、ナノフェライトの中で骨芽細胞の骨形成促進効果を示したのはCNHだけだったことから、その形態的特徴を細胞が認識していると推察された。細胞内のCNHはそれを含む小胞化しており、さらにCNHの周りにはリン酸化カルシウムの蓄積が観察された。この蓄積と骨形成促進の関係を今後、解明していく予定である。また、骨芽細胞系を使った骨形成の評価は培地の影響を受けるため、生体内で起きる骨形成反応を反映させた培養条件を検証する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カーボンナノマテリアル（CNM）による骨形成促進効果のメカニズムはこれまで不明のまま、ドラッグデリバリーシステムやインプラントなどへの応用研究が進められてきた。本研究によってCNMの骨形成能促進効果を期待した医療開発の場合、細胞内に取り込まれることを前提にして開発すべきであり、用途を明確にすることができた。さらにCNH周辺で観察されたリン酸化カルシウムの沈着は未解決である基質小胞形成仮説におけるメカニズム解明の一助になると考えている。

研究成果の概要（英文）：We have revealed that the osteogenesis-promoting effects of carbon nanohorns (CNH) are not mediated by membrane receptors on osteoblasts. Of the nanomaterials incorporated into cells, only CNH among carbon black, CNH, and nanoferrite showed stimulatory effects on osteogenic potential, suggesting that osteoblasts recognized the morphological characteristics of CNH intracellularly. Intracellular CNH were found to become vesiculated, with calcium phosphate accumulation seen around the vesicles. The precise relationship between this accumulation and the promotion of bone formation will be analyzed in future studies. In addition, since the evaluation of bone formation using the osteoblast system is affected by culture medium properties, it will be necessary to elucidate the culture conditions that reflect the bone formation reaction occurring in vivo.

研究分野：整形外科

キーワード：骨芽細胞 カーボンナノホーン カーボンナノマテリアル

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨粗鬆症の現状

骨粗鬆症は骨の脆弱性が増大し骨折の危険性が高まる疾患である。高齢化が急速に進んだ本邦では、認知機能障害や運動機能障害などの加齢に伴う疾患が増大しており、高齢者が介護を要する原因として骨粗鬆症を背景とした転倒骨折があり、要介護を要する原因の第3位である(平成28年厚生労働省国民生活基礎調査)。椎体骨折は最初に生じる脆弱性骨折として多く認められる骨折であり、新規の椎体骨折のリスクは4倍、大腿骨近位部骨折のリスクは3~5倍になる。大腿骨近位部骨折は日常生活動作や歩行能力が著しく低下し、骨折後に寝たきりに至る頻度が高い。高齢者はまた、骨折を契機に呼吸・循環器障害、認知症などの全身的な合併症を併発することも多く1年後の死亡率は10.1%と生命予後も低下する。骨粗鬆症治療を行うことで脆弱性骨折を予防すること、骨折の連鎖を断つことは介護予防や健康寿命延伸につながる。

(2) 骨粗鬆症の治療薬の問題点

骨粗鬆症の治療は、骨粗鬆症の予防と治療ガイドラインなどに基づいて行われている。薬物療法として、破骨細胞の骨吸収抑制が主であるビスホスホネート薬、選択的エストロゲン受容体モジュレーター(SERM)やデノスマブ、骨形成促進が主であるテリパラチド(商品名:フォルテオやテリボン)が一般的に使用される。現時点ではビスホスホネート薬などの骨吸収抑制薬が第1選択とされているが、骨吸収抑制薬の臨床的な効果は部分的であり、骨折リスクが明らかな例において30~50%程度低下させるにすぎない。

(3) 骨形成促進薬の開発の現状

骨芽細胞の分化や機能発現のメカニズムは分子生物学的研究手法によって教科書的にはかなり明らかになっている。しかし、何故かこれらのメカニズムをベースにした骨芽細胞をターゲットにした治療薬の開発は進んでいない。

近年、骨細胞から分泌されるスクレロスタチンが骨芽細胞のWntのアンタゴニストとして作用して骨形成を抑制している事が明らかとなり、このタンパク質に対する抗体薬であるロモソズマブが承認申請されていたが、米食品医薬品局(FDA)は副作用の問題で2017年7月に非承認になっている。そして、日本で承認されている唯一の骨形成促進薬は副甲状腺ホルモン(PTH)の遺伝子組換え体であるテリパラチドがあるが、適応が「骨折の危険性の高い骨粗鬆症」であることや使用期間に制限があり、かつ、国内の臨床試験で19%の副作用が見られたなどの問題がある。

2. 研究の目的

我々のグループはカーボンナノチューブ(CNT)に骨芽細胞の分化誘導能がある事を報告している(Shimizu et al, Adv Mater. 2012)。さらに、我々は酸化型カーボンナノホーン(CNH)という粒径およそ100 nmのウニ状の二次凝集体でも前骨芽細胞由来と言われているMC3T3-E1細胞の分化誘導を促進する可能性を見出した。CNHは多くの細胞では細胞内に取り込まれることが明らかになっているが、我々は骨芽系細胞ではCNHを細胞に取り込むことなく骨芽細胞系細胞膜上のレセプターを介して分化誘導能の促進が起こったと考えている。そこで、カーボンナノマテリアル(CNM)が骨芽細胞の膜で作用している骨芽細胞の活性化メカニズムを明らかにすることで新たな骨芽細胞をターゲットにした治療方法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) MC3T3 - E1 マウス前骨芽細胞の培養条件と骨形成応答への影響

MC3T3 - E1 マウス前骨芽細胞(MC)は骨研究で最もよく用いられるセルラインであるが、再現性に問題があると言われているため、我々はその特性を培地条件を変えて検討した。具体的にはMCをMEM培地とDMEM培地で培養するだけでなく、MEMはアスコルビン酸(AA)添加済タイプと無添加タイプを購入した上で、無添加タイプには使用直前にAA添加を行う群も用意した。また、DMEMも使用直前添加群も用意し、それぞれの培地条件でのMCの増殖性を比較した。さらに、それぞれの培地条件下におけるMCの石灰化培地による石灰化刺激に対する応答性も評価した。評価項目としてALP活性、アリザリン染色、骨芽細胞の分化マーカーの発現変化をそれぞれ測定した。

(2) CNM 暴露 MC での骨形成能への影響

MCを培養プレートに24時間接着後、CNMであるCNHとカーボンブラック(CB)を5µg/mLの濃度で暴露した。その後、ALP活性、アリザリン染色、骨芽細胞の分化マーカーの発現変化をそれぞれ測定した。

(3) CNM 暴露 MC の透過型電子顕微鏡観察

MC をカバーガラス上で 24 時間培養し、石灰化培地にした上で 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の CNH と CB を暴露し、3 日毎に培地交換を行いながら、28 日間培養した。MC は PB でウォッシュ後、2.5% グルタルアルデヒドで固定した。1% 四酸化オスミウム液で後固定し、脱水後、エポキシ樹脂包埋した。超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察した。

(4) ラット脛骨での CNM 投与による骨形成への影響

ラット脛骨にドリルで穴をあけ、同量の CNH と CB を投与した。12 週間後、投与部位の骨組織を採取し、骨形成量をマッソントリクローム染色で評価した。

(5) ナノサイズフェライトの骨形成能への影響

カーボンと異なるナノ材料としてナノフェライトを自作し、そのサイズはナノサイズで確認した。MC を培養プレートに 24 時間接着後、石灰化刺激培地にした上で、ナノフェライトを暴露し、2 日毎に培地交換を行いながら、21 と 28 日間培養した。アリザリン染色をし、石灰化におけるナノフェライトの影響を評価した。さらに、このサンプルの TEM 観察も行った。

4. 研究成果

(1) MC の培養条件と骨形成応答への影響

MC の細胞増殖性は MEM 培地では添加物に関わらず MC は増殖したものの、DMEM 培地では全く異なる結果となった。DMEM 培地では AA が添加されていない場合、スタート時の細胞密度が非常に濃い場合を除いて細胞は増殖しなかった。さらに AA を添加した場合でも細胞濃度が低い場合は細胞増殖が抑制され、増殖するためには一定以上の細胞密度が必要であった。この AA の細胞増殖増強効果は MEM 培地でも認められ、新鮮 AA を加えた MC で最も増殖が高かった。

このように培地による細胞増殖性への違いが見られた事から、さらにこの培地条件が骨形成能にどのような影響を与えるかを MC が増殖しなかった AA 無添加 DMEM 培地を除く 4 種類の培地で石灰化刺激をした時の骨形成能を調べた。ALP 活性では DMEM 培地で石灰化刺激をしても活性が上昇しなかったにもかかわらず (図 1A)、アリザリン染色では MEM 培地群よりも遅れるものの石灰化結節の形成が確認された (図 1B)。さらに骨芽細胞の分化マーカーも石灰化刺激による反応はマーカー遺伝子毎に異なった。これらの結果は培養細胞を用いた骨芽細胞の骨形成評価が生体で起こる骨形成への影響を正しく評価できているとは限らない事を示しており、現状では材料による骨形成評価は最終的に動物実験を行わないと評価できないという事を示唆している。

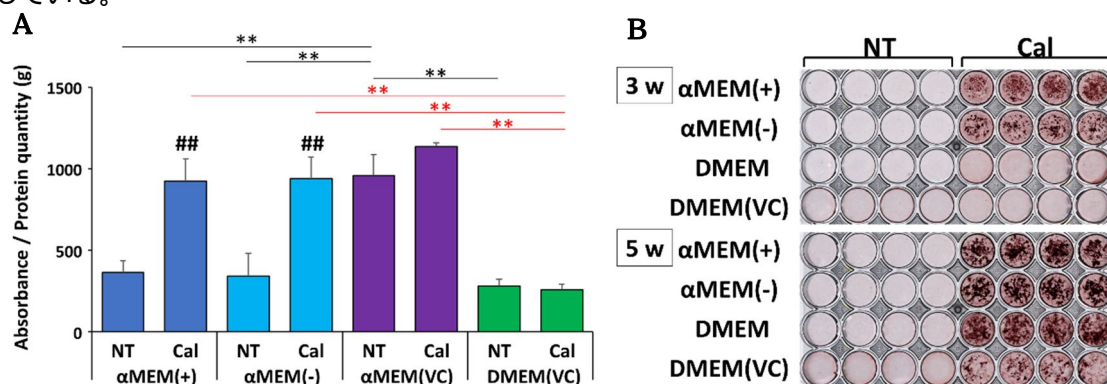


図 1. A : MC における異なる培地での石灰化刺激による ALP 活性の変化 . B : MC における異なる培地での石灰化刺激による石灰化結節形成変化 .

(2) CNM 暴露 MC での骨形成能への影響

MC による骨形成評価が必ずしも動物実験に反映されない可能性が (1) で明らかとなり、改善の必要性があるものの、現状において一般的に使われている MEM 培地での MC での骨形成評価の手法をこの研究では使用した。

CNM 自体の骨形成能を評価するため、MC には石灰化刺激をしない状態で CNM を暴露したにもかかわらず、ALP 活性の上昇が確認できた。(図 2A)。また石灰化刺激化において CNH のみ石灰化結節の形成増加が確認できた (図 2B)。一方で CNH と同サイズの CB では同様の変化が見られなかった。

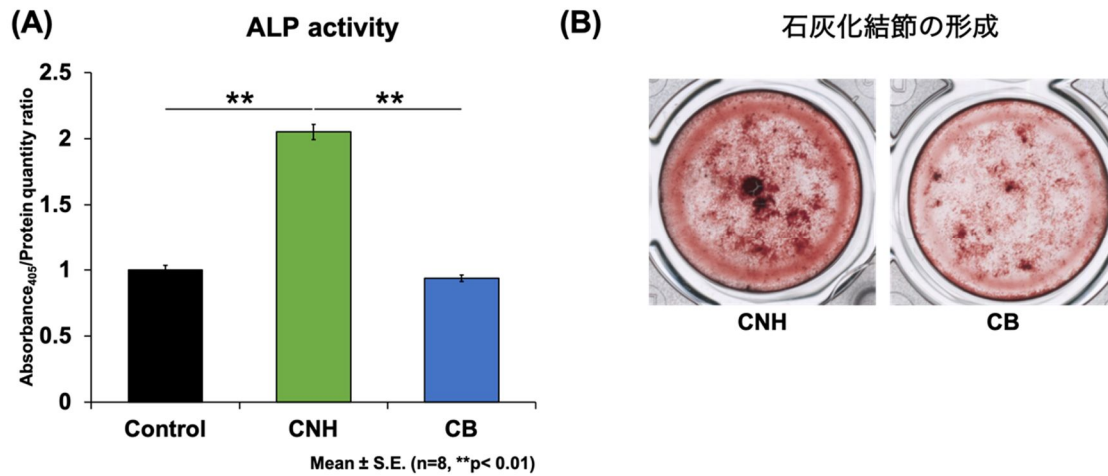


図 2. A : MC における非石灰化刺激化での CNM 暴露による ALP 活性の変化 . B : MC における石灰化刺激化での CNM 暴露による石灰化結節形成変化.

(3) CNM 暴露 MC の TEM 観察

CNH と CB を暴露した MC を TEM で観察したところ、どちらの CNM も細胞内に取り込まれていた (図 3 A,B)。この結果から CNM の取り込みに関わる受容体が骨形成促進に関わっているとは考えにくく、他の要因を考える必要がある。図 3A で細胞内小胞に取り込まれている CNH の一部で CNH の周りにリン酸カルシウム沈着が観察できる。さらに、このような小胞が CNH では細胞外にも観察できた。一方で CB では細胞内での CB 近辺でのリン酸カルシウム沈着、および、CB を含んだ細胞外小胞は観察されなかった。これらの結果は CNH で観察されたリン酸カルシウム沈着 CNH 小胞が骨形成促進に関わっている可能性がある。

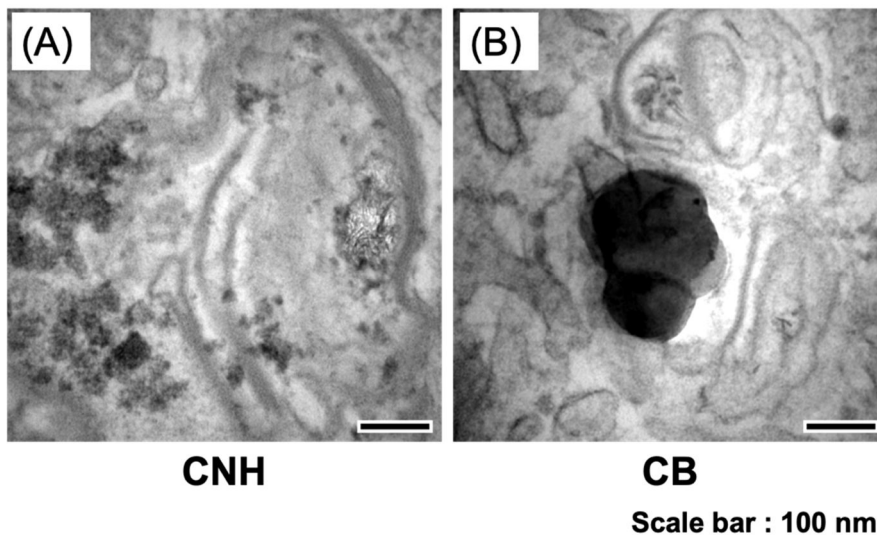


図 3. MC における石灰化刺激化での CNM 暴露による取り込み評価(A : CNH、B : CB).

(4) ラット脛骨での CNM 投与による骨形成への影響

ラット脛骨に投与した CNM による骨形成への影響は MC での評価と同様に、CNH では骨形成促進効果が確認できたが (図 4A)、CB ではその効果が確認できなかった (図 4B)。この結果は少なくとも MC で CNH を暴露した際に見られた骨形成促進メカニズムが動物レベルでも誘発されている可能性を示しており、このメカニズムを応用した骨粗鬆症薬の可能性のある事を示している。

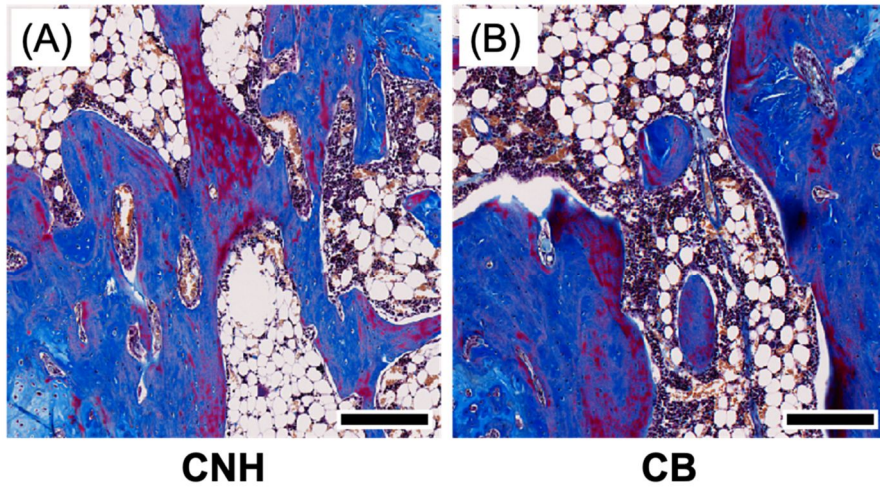


図 4.ラット脛骨における CNM 暴露による骨再生評価 (A : CNH、B : CB) .

(5) ナノサイズフェライトの骨形成能への影響

我々は CNH で観察される骨形成促進作用がカーボン由来であることを確認するため、ナノフェライトを作製し、このナノマテリアルの石灰化結節形成への影響を調べた。ナノフェライトは細胞内に取り込まれるものの石灰化促進作用は見られなかった。ただし、CNH と同じように細胞外小胞に内包化されたナノフェライト自体は観察できたことから、CNH による骨形成促進は CNH の周りに沈着したリン酸カルシウムが重要な役割をしている可能性が示唆された。

(6) 総括

CNH による骨形成促進作用は研究開始時に予測した骨芽細胞の膜レセプターを介するものではなく、CNH の形態的特徴を細胞が細胞内で認識し、これを小胞化した中で CNH を核としたリン酸化カルシウムの蓄積が誘導されて起こる現象である可能性がある。今後、この小胞化内で起こる CNH 周辺のリン酸カルシウム蓄積のメカニズムを解明するとともに、その小胞が細胞内にあるだけで促進効果が得られるのか、それとも細胞外に放出されることによって誘発されるのかを明らかにする必要がある。

また、MC を含む骨芽細胞系を使った骨形成の評価は培地の影響を受けるため、生体内で起きる骨形成反応と一致する培養条件を検証する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Izumiya M, Haniu M, Ueda K, Ishida H, Ma C, Ideta H, Sobajima A, Ueshiba K, Uemura T, Saito N, Haniu H.	4. 巻 22
2. 論文標題 Evaluation of MC3T3-E1 Cell Osteogenesis in Different Cell Culture Media.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci. 2021;22:7752.	6. 最初と最後の頁 7752
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22147752	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka M, Izumiya M, Haniu H, Ueda K, Ma C, Ueshiba K, Ideta H, Sobajima A, Uchiyama S, Takahashi J, Saito N.	4. 巻 12
2. 論文標題 Current Methods in the Study of Nanomaterials for Bone Regeneration.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nanomaterials (Basel).	6. 最初と最後の頁 1195
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nano12071195	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 上田勝也 他
2. 発表標題 カーボンナノホーンに対する骨関連細胞の細胞 応答性評価
3. 学会等名 第34回日本整形外科学基礎学術集会
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
---------	---------