

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2022

課題番号：19K24118

研究課題名（和文）プロテインキナーゼC阻害剤を用いた新規骨再生医療技術の開発

研究課題名（英文）Effects of PKC Inhibitor on Osteogenic Differentiation and Bone Regeneration

研究代表者

松岡 秀（Matsuoka, Shu）

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：60845957

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：PKC inhibitorであるiso-H-7は、骨芽細胞特異的遺伝子(Osterix, Osteocalcin, BSP)の発現を有意に促進していることが明らかになり、Alizarin Red染色によって細胞外基質の石灰化を有意に促進していることが明らかとなった。また、Western Blotting解析により、iso-H-7はPKC α 、PKC β Iの発現を抑制していることが明らかとなった。

また、ラットの頭蓋骨骨欠損部において、H-E染色の結果、control群に対して、iso-H-7群で著大な新生骨の形成が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、骨芽細胞文化および骨組織再生への関与について報告の少ないPKCの生理学的作用を、薬物的観点からアプローチすることで解析し、PKCアイソザイムが新たな骨再生治療の標的分子となり得るかを探索することを目的としている。また、すでにある程度の薬理活性が知られている化合物をプローブとして、生体内での骨形成促進作用を解明することで、細胞内、生体内における作用機序の解明に利用可能なため、これまでの常識を覆す知見が得られることが期待されると考えている。

研究成果の概要（英文）：The PKC inhibitor iso-H-7 was found to significantly promote the expression of osteoblast-specific genes (Osterix, Osteocalcin, BSP). On Alizarin Red staining, iso-H-7 significantly promoted calcification of extracellular matrix. Western blotting analysis showed that iso-H-7 suppressed the expression of PKC α and PKC β I. At the calvarial defect site, bone regeneration was more markedly enhanced in the groups treated with iso-H-7 than in the control group.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：再生医学

1. 研究開始当初の背景

生体内での骨代謝機構を解明することは、歯槽骨増生や歯槽骨吸収の予防が必要とされる歯科臨床において重要な課題である。近年、多種多様な化合物を用いて生体分子の機能を制御し、その生物学的解析から生命現象を解明する、ケモゲノミクスが発展している。生体内分子の機能や反応を標的とした化合物の探索には、培養細胞を基盤とした化合物ライブラリーのスクリーニングが有用な方法であり、骨代謝分野においても、スクリーニングによる骨芽細胞分化促進および破骨細胞分化抑制に関わる小分子化合物の発見が報告されている。これまでに申請者らは、1280 種類の小分子化合物ライブラリーから、独自のスクリーニングを行い、骨芽細胞分化に影響を及ぼす候補化合物として、iso-H-7 を検出した。iso-H-7 は PKC inhibitor として知られているが、iso-H-7 が骨芽細胞分化に関連するという報告はない。また、PKC は 10 種類以上のアイソザイムからなるタンパク質ファミリーで、それぞれのアイソザイムについて、さまざまな疾患との関連が報告されているが、どの PKC アイソザイムが骨芽細胞分化および生体内での骨形成に影響を及ぼしているかは未だ明らかになっていない。

そこで、骨芽細胞分化ならびに骨組織再生における PKC アイソザイムの関与を明らかにすることは、PKC が骨再生治療の新たな標的分子として、骨代謝機構の解明の一助や新たな骨再生治療のみならず、骨代謝疾患における分子標的治療を前進することにも繋がる挑戦的な課題であると考え、本研究を立案するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、骨芽細胞分化および骨組織再生への関与について報告の少ない PKC の生理学的作用を、薬理的観点からアプローチすることで解析し、PKC アイソザイムが新たな骨再生治療の標的分子となり得るかを探索することを目的としている。

3. 研究の方法

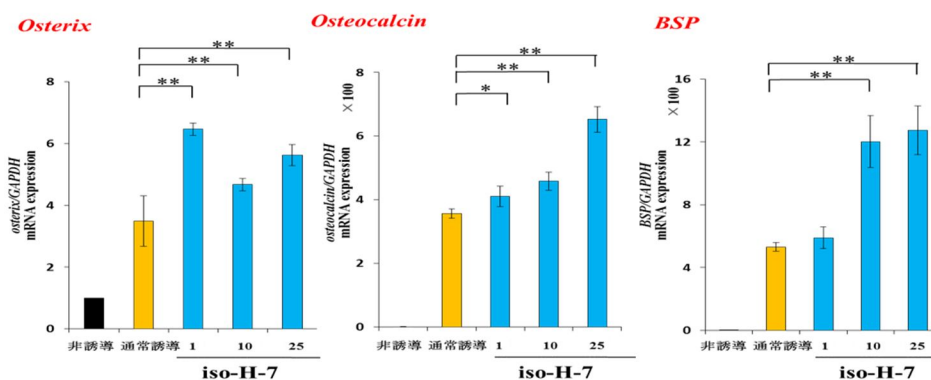
(1) PKC inhibitor である iso-H-7 がマウス骨芽前駆細胞株の骨芽細胞分化に及ぼす影響を Realtime RT-PCR 解析および Alizarin Red 染色を用いて検討する。

(2) ラット頭蓋骨欠損部に iso-H-7 を含浸したコラーゲンスポンジを埋入し、その後 2, 3 日毎に iso-H-7 を埋入部位に局部注射する。術後数週間で頭蓋骨を摘出し、摘出した頭蓋骨に対して iso-H-7 がラットの骨再生および PKC アイソザイムの発現に及ぼす影響を検討する。

4. 研究成果

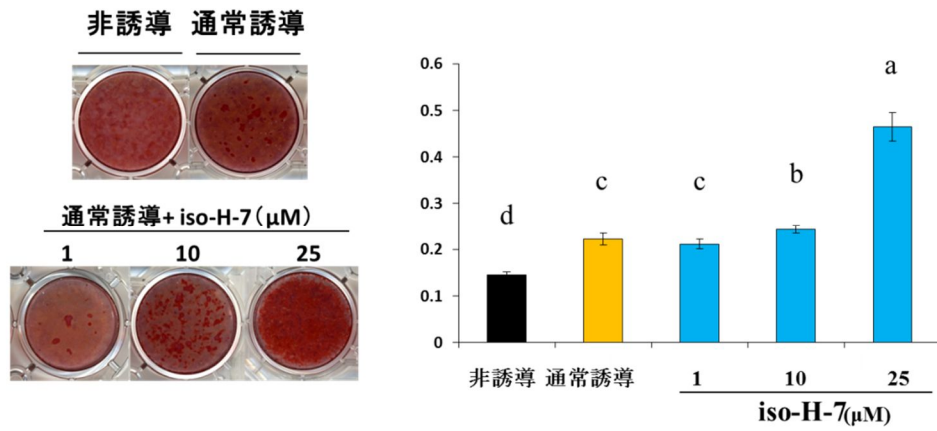
リアルタイム PCR 解析の結果、iso-H-7 は分化誘導 21 日目において、用いたすべての濃度で骨芽細胞分化マーカー遺伝子である *Osterix*、*Osteocalcin* の発現を有意に促進し ($P < 0.05$)、10 μM 、25 μM の濃度で骨芽細胞分化誘導マーカーである *BSP* の発現を有意に促進した ($P < 0.01$) (図 1)。

図 1



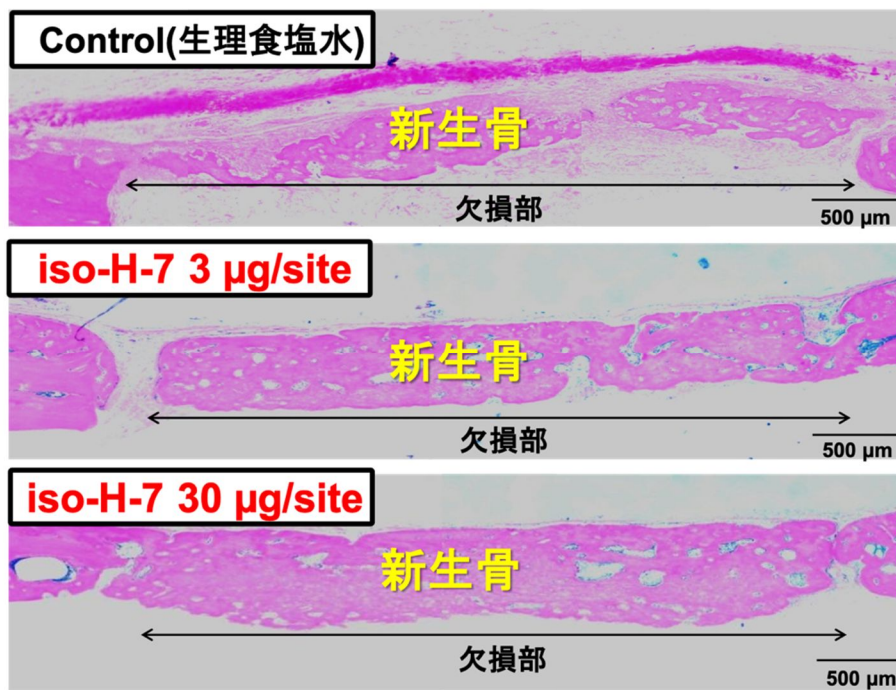
また、Alizarin Red 染色の結果、iso-H-7 は分化誘導 30 日目において、10, 25 μM の濃度で濃度依存的に細胞外基質の石灰化を有意に促進した ($P < 0.05$) (図 2)。

図 2



頭蓋骨欠損ラット実験モデルにおいて，術後3週目に摘出した頭蓋骨の組織切片をHE染色にて観察した． iso-H-7 投与群および非投与群ともに頭蓋骨欠損部位に新生骨の形成を認めたが， iso-H-7 投与群により広範囲にわたり多くの新生骨を認めた（図3）．

図 3



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 畔堂佑樹 萱島浩輝 盛林昭仁 松岡 秀 巽 秀人 石垣尚一 江草 宏 矢谷博文
2. 発表標題 外側性垂直的骨造成における生体防御機構の新規解析
3. 学会等名 日本口腔インプラント学会第51回学術大会
4. 発表年 2021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
---------	---------