

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09454

研究課題名（和文）ドラッグリポジショニングによる骨粗鬆症治療薬に対する破骨細胞作用機構の解明

研究課題名（英文）Study of osteoclast inhibitions to prevent osteoporosis by drug repositioning

研究代表者

中村 美穂（Nakamura, Miho）

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・非常勤講師

研究者番号：40401385

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）：本研究は、抗生物質として永年臨床で使用されてきたテトラサイクリン系薬剤の骨代謝への作用機構を明らかにし、骨粗鬆症薬としてリポジショニングすることを目的としている。本研究では、数種類の市販テトラサイクリン系薬剤が骨組織に沈着した状況を模倣した培養基板を作製し、ヒト初代破骨細胞および骨芽細胞培養を行った結果、数種類のテトラサイクリン系薬剤による破骨細胞吸収抑制および骨芽細胞分化促進が認められた。本研究の成果より、既存抗生物質薬テトラサイクリンの新しい機能を見出し、低コスト・長期利用可能な骨粗鬆症薬への可能性を示すことが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、抗生物質として永年臨床で使用されてきたテトラサイクリン系薬剤が骨代謝に及ぼす影響について調べた。その結果、数種類の市販テトラサイクリン系薬剤が、破骨細胞（骨を分解する細胞）を抑制し、骨芽細胞（骨を形成する細胞）を促進することが見出された。このことから、数種類のテトラサイクリン系薬剤は、低コスト・長期利用可能な骨粗鬆症薬として応用される可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to understand the mechanism of effects of tetracycline derivatives on the bone metabolism as a repositioning drug for osteoporosis treatment. In this study, some types of commercial tetracycline derivatives were used for the evaluations of human osteoblasts and osteoclasts. Some of the tetracycline derivatives inhibit osteoclast differentiation and resorption and promote osteoblast proliferation and differentiation.

研究分野：細胞生物学・バイオマテリアル

キーワード：破骨細胞 骨芽細胞 リポジショニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人口の急速な高齢化に伴い、骨粗鬆症患者数は年々増加しており、骨粗鬆症に起因する骨折患者は年間 900 人 (3 秒に 1 人) と報告され、罹患率と死亡率は年々増加傾向にある(1)。2010-2025 年の間に、50 歳以上の女性の 3 人に 1 人、男性の 5 人に 1 人が骨粗鬆症に起因する骨折を経験し、今後も増加し続けると推定されている(2)。骨粗鬆症対策は、我が国も含め世界的な最重要課題の一つとして位置付けられる。

骨粗鬆症の治療薬は、骨吸収を抑制する薬、骨形成を促進する薬、吸収と形成の骨代謝を調節する薬の三つに大別される。世界骨粗鬆症財団によると、第 1 選択薬である骨吸収抑制薬には、ビスフォスフォネート(BPs)、抗 RANKL 抗体があり、第 2 選択薬である骨形成促進薬である副甲状腺ホルモン(PTH)、抗スクレロスチン抗体が列挙される。しかし、これらの薬剤は副作用・合併症・高コストが問題となっている。例えば、BPs の長期使用はむしろ骨折危険率が上昇すること、非定型骨折(3)・腎障害・顎骨壊死(4)・骨肉腫(5) の発生増加等の副作用が報告されている。そのため、BPs を 6 年間使用すると、患者は他の治療方法の選択を勧められる。抗 RANKL 抗体は 2010 年、抗スクレロスチン抗体は 2019 年に発売開始されたことを考えると、優れた骨粗鬆症治療薬開発は世界的にも依然ニーズが高い。

我々の研究グループは、ドラッグリポジショニングとして、テトラサイクリン (TCs) 系抗生物質の骨粗鬆症薬剤としての適用可能性を検討した。TCs は特許期限の切れた薬剤であることから低コストである。また、抗生物質として長年臨床現場で使用されている

実績から優れた生体安全性が期待される。しかし、骨粗鬆症薬として骨代謝への作用機構についての体系的知見はまだない。骨代謝への作用機構、特に、破骨細胞（骨分解細胞）・骨芽細胞（骨形成細胞）、さらに全身的副作用・合併症の有無が明らかになれば、新しい骨粗鬆症治療薬としてのリポジショニングの可能性が期待される。

2．研究の目的

本研究は、抗生物質として永年臨床で使用されてきたテトラサイクリン系薬剤の骨代謝への作用機構を明らかにし、骨粗鬆症薬としてリポジショニングの可能性を探ることを目的とした。

3．研究の方法

培養基板の作製

テトラサイクリン系薬剤が骨組織に沈着した状況を模倣した培養基板を作製した。数種類の市販テトラサイクリン系薬剤を添加した Hanks 溶液を用いて骨ミネラルを人工的に沈着させた(6)。骨ミネラル沈着を阻害しない添加濃度の最適化を行った。作製した材料基板の材料学的解析を行い、骨組織と比較検討した。

破骨細胞培養試験

倫理委員会に承認された方法により、ヒト末梢血から破骨細胞前駆細胞を採取した。破骨細胞分化誘導因子（M-CSF, RANKL）を添加した培養液中で 14 日間培養を行った。

細胞をパラフォルムアルデヒドで固定し、TRAP および核染色を行い、顕微鏡観察を行った。多核巨細胞を計測することで破骨細胞分化を比較検討した。顕微鏡観察後、細胞を除去し、3次元レーザー顕微鏡で培養基板上の吸収ピットを観察・計測した。破骨細胞による吸収ピットの深さ・体積を比較検討した。一部の細胞については、細胞を細胞

溶解液で処理し、超音波処理後に凍結保存した。MMP - 9 濃度を ELISA キットにより測定した。

骨芽細胞培養試験

倫理委員会に承認された方法により、ヒト骨髄から間葉系幹細胞を採取した。WST 法により骨芽細胞増殖に与える影響を検討した。また、骨芽細胞細胞分化誘導因子 (β -glycerophosphate, ascorbic acid, dexamethasone) を添加した培養液中で 4 週間培養を行った。細胞をパラフォルムアルデヒドで固定し、アリザリンレッド S 染色を行った。

4 . 研究成果

走査型電子顕微鏡観察により、培養基板上を Hanks 溶液に浸漬すると、表面にミネラルが沈着したことが確認された。蛍光顕微鏡観察を行うと、テトラサイクリン系薬剤が沈着物表面分散していた。

培養基板上で破骨細胞を培養すると、テトラサイクリン系薬剤が低濃度の時は破骨細胞分化・吸収を阻害しないが、高濃度になると、破骨細胞分化・吸収を阻害することが見出された。また、テトラサイクリン系薬剤の種類によって阻害効果が異なっていた。破骨細胞の MMP - 9 発現も同様に阻害されていたため、テトラサイクリン系薬剤は破骨細胞の MMP - 9 発現を抑制することによって、破骨細胞吸収を阻害することが認められた。

培養基板上で骨芽細胞を培養すると、骨芽細胞の増殖率はほぼ変化しなかった。テトラサイクリン系薬剤が高濃度の時は骨芽細胞分化が阻害された。しかし、数種のテトラサイクリン系薬剤は低濃度になると、骨芽細胞分化を促進することが見出された。

本研究の成果より、既存抗生物質薬テトラサイクリンの新しい機能を見出し、低コスト・長期利用可能な骨粗鬆症薬への可能性を示すことが期待される。ひいては、将来的に、高齢化社会における生活の質に大きく貢献すると考えられる。

参考文献

1. J. E. Compston, M. R. McClung, W. D. Leslie, Osteoporosis. *Lancet* **393**, 364-376 (2019).
2. J. Y. Noh, Y. Yang, H. Jung, Molecular Mechanisms and Emerging Therapeutics for Osteoporosis. *Int J Mol Sci* **21**, (2020).
3. A. A. Lloyd *et al.*, Atypical fracture with long-term bisphosphonate therapy is associated with altered cortical composition and reduced fracture resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 8722-8727 (2017).
4. M. A. Hristamyan-Cilev *et al.*, Bisphosphonate-associated Osteonecrosis of the Jaws: a Survey of the Level of Knowledge of Dentists about the Risks of Bisphosphonate Therapy. *Folia Med (Plovdiv)* **61**, 303-311 (2019).
5. T. Ohba *et al.*, Pleiotropic effects of bisphosphonates on osteosarcoma. *Bone* **63**, 110-120 (2014).
6. T. Hanawa, K. Asami, K. Asaoka, Repassivation of titanium and surface oxide film regenerated in simulated bioliquid. *J Biomed Mater Res* **40**, 530-538 (1998).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件/うち国際共著 11件/うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Bergara-Muguruza Leire, Abdel Razik Heba E., Chen Peng, Ashida Maki, Takao Hanawa, Vallitu Pekka, Nakamura Miho	4. 巻 340
2. 論文標題 Calcium Carbonate/Hydroxyapatite Microparticles and Osteoblast Responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Solid State Phenomena	6. 最初と最後の頁 101 ~ 106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4028/p-06ymbz	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 該当する
1. 著者名 Abdel Razik Heba E., Nakamura Miho, Bergara-Muguruza Leire, Sarwar Uruj, Hassan Mohammad, Horowitz Robert, El-Ghannam Ahmed	4. 巻 340
2. 論文標題 Osteoblast-Mediated Resorption of Porous Bioactive SCPC Granules Enhances Bone Regeneration in Human Extraction Sockets	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Solid State Phenomena	6. 最初と最後の頁 107 ~ 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4028/p-32eola	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 該当する
1. 著者名 Bergara-Muguruza Leire, Makela Keijo, Yrjala Tommi, Salonen Jukka, Yamashita Kimihiro, Nakamura Miho	4. 巻 13
2. 論文標題 Surface Electric Fields Increase Human Osteoclast Resorption through Improved Wettability on Carbonate-Incorporated Apatite	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 58270 ~ 58278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsami.1c14358	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 該当する
1. 著者名 El Ghannam Ahmed, Nakamura Miho, Muguruza Leire Bergara, Sarwar Uruj, Hassan Mohammad, Fotawi Randa Al, Horowitz Robert	4. 巻 109
2. 論文標題 Inhibition of osteoclast activities by SCPC bioceramic promotes osteoblast mediated graft resorption and osteogenic differentiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part A	6. 最初と最後の頁 1714 ~ 1725
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.a.37167	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 該当する

1. 著者名 Sirkia Saara V., Nakamura Miho, Qudsia Syeda, Siekkinen Minna, Sm?tt Jan-Henrik, Peltonen Jouko, Heino Terhi J., Hupa Leena, Vallittu Pekka K.	4. 巻 37
2. 論文標題 Structural and elemental characterization of glass and ceramic particles for bone surgery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dental Materials	6. 最初と最後の頁 1350 ~ 1357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dental.2021.06.004	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 該当する

1. 著者名 Plyusnin Artem, He Jingwei, Elschner Cindy, Nakamura Miho, Kulkova Julia, Spickenheuer Axel, Scheffler Christina, Lassila Lippo V. J., Moritz Niko	4. 巻 26
2. 論文標題 A Polymer for Application as a Matrix Phase in a Concept of In Situ Curable Bioresorbable Bioactive Load-Bearing Continuous Fiber Reinforced Composite Fracture Fixation Plates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1256 ~ 1256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules26051256	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 該当する

1. 著者名 El-Ghannam A, Nakamura M, Muguruza LB, Sarwar U, Hassan M, Fotawi RAI, Horowitz R.	4. 巻 -
2. 論文標題 Inhibition of osteoclast activities by SCPC bioceramic promotes osteoblast-mediated graft resorption and osteogenic differentiation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Biomed Mater Res	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.a.37167	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 該当する

1. 著者名 Plyusnin A, He J, Elschner C, Nakamura M, Kulkova J, Spickenheuer A, Scheffler C, Lassila LV.J, Moritz N.	4. 巻 26
2. 論文標題 A Polymer for Application as a Matrix Phase in a Concept of In Situ Curable Bioresorbable Bioactive Load-Bearing Continuous Fiber Reinforced Composite Fracture Fixation Plates.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules26051256	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 該当する

1. 著者名 Nohara K, Itoh S, Akizuki T, Nakamura M, Matsuura T, Fukuba S, Okada M, Izumi Y, Iwata T, Yamashita K.	4. 巻 108
2. 論文標題 Enhanced new bone formation in canine maxilla by a graft of electrically polarized - tricalcium phosphate particles.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biomed Mater Res. Applied Biomaterials B	6. 最初と最後の頁 2820-2826.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.b.34612	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 Sanchez-Reverte Alba, Fontcuberta-Rigo Margalida, Nakamura Miho, Puigbo Pere	4. 巻 107
2. 論文標題 Use of the Phylobone database for the annotation of bone extracellular matrix proteins in reindeer (<i>Rangifer tarandus</i>)	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Science Progress	6. 最初と最後の頁 2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/00368504241244666	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 該当する

1. 著者名 Washihira Naoto, Murakami Mika, Nakamura Miho, Fujii Sho, Matsushima Takahide, Asahara Hiroshi, Kishida Akio, Tanabe Tadao, Kimura Tsuyoshi, Kobayashi Mako, Yamamoto Masaya	4. 巻 234
2. 論文標題 Application of a genetically engineered macrophage cell line for evaluating cellular effects of UV/US-treated poly(ethylene terephthalate) microplastics	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Colloids and Surfaces B: Biointerfaces	6. 最初と最後の頁 113735 ~ 113735
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.colsurfb.2023.113735	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 Fontcuberta-Rigo Margalida, Nakamura Miho, Puigbo Pere	4. 巻 11
2. 論文標題 Phylobone: a comprehensive database of bone extracellular matrix proteins in human and model organisms	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bone Research	6. 最初と最後の頁 44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41413-023-00281-w	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 該当する

1. 著者名 Ubele-Kalnina Darta, Nakamura Miho, Gross Karlis Agris	4. 巻 14
2. 論文標題 Inter-Laboratory Study on Measuring the Surface Charge of Electrically Polarized Hydroxyapatite	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Functional Biomaterials	6. 最初と最後の頁 100 ~ 100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jfb14020100	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 該当する

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Bergara-Muguruza L, Makela; K, Yrjala; T, Salonen J, Yamashita, K, Nakamura
2. 発表標題 Surface Electric Fields Increase Osteoclast Resorption on Carbonate Incorporated Apatite.
3. 学会等名 32nd European Society for Biomaterials 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Bergara-Muguruza L, AbdelRazik HE, Chen P, Mashida M, Hanawa T, Vallittu P, Nakamura M
2. 発表標題 Calcium carbonate-hydroxyapatite microparticles and osteoblast responses. Surface Electric Fields Increase Osteoclast Resorption on Carbonate Incorporated Apatite
3. 学会等名 32nd Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in medicine (Bioceramics32) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 AbdelRazik HE, Nakamura M, Bergara-Muguruza L, Sarwar U, Hassan M, Fotawi AIR, Horowitz R, El-Ghannam A
2. 発表標題 Osteoblast-mediated resorption of porous bioactive SCPC granules enhances bone regeneration in human extraction sockets
3. 学会等名 32nd Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in medicine (Bioceramics32) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nakamura M
2. 発表標題 Improvement of surface wettability and cellular interactions by bioceramic eletcrets.
3. 学会等名 The 14th Pacific Rim Conference of Ceramic Societies (Pacrim13) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nakamura M
2. 発表標題 Designed biomaterials to mimic the mechanical properties of bone.
3. 学会等名 International Workshop Bioelectronic Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nakamura M
2. 発表標題 A new concept of hydroxyapatite for bone regeneration -nano structure and response to mechanical strain
3. 学会等名 The 16th International Workshop on Biomaterials in Interface Science (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村美穂
2. 発表標題 骨基質の材料学的解析とメカニカルストレス応答性
3. 学会等名 日本セラミックス協会秋季シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Fontcuberta-Rigo M, Nakamura M, Puigbo P
2. 発表標題 Phylobone: A new resource for osteoporosis research
3. 学会等名 World Congress on Osteoporosis, osteoarthritis and musculoskeletal diseases 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yamamoto M, Murakami M, Washihira N, Nakamura M, Matsushima T, Asahara H, Kishida A, Kobayashi M, Fuji Si, Tanabe T, Kimura T
2. 発表標題 Evaluation of cellular responses to oxidized poly(ethylene terephthalate) microplastics using a genetically engineered macrophage.
3. 学会等名 Biomaterials International Conference 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023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
研究分担者	塙 隆夫 (Hanawa Takao) (90142736)	東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授 (12602)	
研究分担者	蘆田 茉希 (Ashida Miki) (50708386)	東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教 (12602)	
研究分担者	陳 鵬 (Chen Peng) (70708388)	東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教 (12602)	

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
---------	---------