

令和 6 年 9 月 26 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：20K09474

研究課題名(和文) 抗酸化作用とPDE阻害作用を併せ持つ新規骨粗鬆症治療薬の開発に関する研究

研究課題名(英文) a novel therapeutic agent for osteoporosis having both antioxidant activity and PDE inhibitory activity

研究代表者

天野 均 (HITOSHI, AMANO)

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：90212571

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)：ヘリオキサンチン誘導体は抗炎症・抗アレルギー薬として知られ、ステロイド製剤に替わる喘息治療薬である。本研究ではヘリオキサンチン誘導体(TH)による骨芽細胞に対する骨形成能を *in vitro* 実験で再確認したところ、TH単独添加群は、ステロイドを含む骨誘導培地培養時よりも百分の1の濃度においてALP活性上昇等の石灰化誘導が認められた。従って、効率的かつ持続的な骨形成を誘導には、成熟骨芽細胞への分化促進因子(TH、ステロイドホルモン等)に前骨芽細胞の増殖因子を併用することが重要と考えられた。ヘリオキサンチン誘導体はステロイド療法の減薬を促進でき、低濃度で骨形成を誘導することが出来ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヘリオキサンチン誘導体は抗炎症・抗アレルギー薬として知られ、ステロイド製剤に替わる喘息治療薬である。本研究ではヘリオキサンチン誘導体(TH)単独添加群は、ステロイドを含む骨誘導培地群が誘導する骨形成作用と拮抗した。またヘリオキサンチン誘導体は、ステロイド製剤の減薬を促進でき、低濃度で骨形成能を誘導することから、ステロイド性骨粗鬆症の治療薬として期待できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Helioxanthin derivatives are known as anti-inflammatory and anti-allergic drugs, and are an alternative to steroid preparations for the treatment of asthma. In this study, we reconfirmed the osteogenic potential of helioxanthin derivatives (TH) for osteoblasts in *in vitro* experiments, and found that TH alone induced calcification, including an increase in ALP activity, at one-hundredth the concentration of TH alone than when cultured in bone induction medium containing steroids. Therefore, the combination of factors that promote differentiation into mature osteoblasts (TH, steroid hormones, etc.) and growth factors for preosteoblasts was considered important for inducing efficient and sustained bone formation. It was suggested that helioxanthin derivatives can promote reduction of steroid therapy and induce bone formation at low concentrations.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：ステロイド性骨粗鬆症 ヘリオキサンチン誘導体 抗酸化物質 PDE阻害薬 骨形成 骨吸収 骨芽細胞 破骨細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヘリオキサンチン誘導体 (TH) は、研究協力者の Ohba らによって MC3T3E1 細胞の ALP 活性を亢進するスクリーニングにより見出された低分子化合物である。BMP 様作用を持ち骨芽細胞分化・骨形成亢進に関与することが報告されている。ところが、なぜ BMP 様の作用を持つのか？破骨細胞分化に影響は？と言う点は未解明であった。申請者らは、TH の構造式から NO ドナーとなり得ると考え、骨代謝調節機構におけるレドックスシステムの役割から TH の持つ抗酸化作用を活かした骨粗鬆症治療薬開発の可能性を探ろうと着想した

2. 研究の目的

本研究は、ヘリオキサンチン誘導体の *in vivo* での骨代謝に及ぼす影響を明らかにする。TH の持つ破骨細胞分化抑制機序が、細胞分化が進むにつれて所持する薬物代謝酵素によって産生された NO により生じること。さらに産生された NO を介したレドックスシステムを骨粗鬆症モデルマウスに応用することにより、骨形成促進・骨吸収抑制を同時に果たすし、骨量減少の予防する新規骨粗鬆症治療薬の開発に寄与することが目的である。

3. 研究の方法

ヘリオキサンチン誘導体における *in vitro* レベルの実験

1) TH-NO 系による破骨細胞抑制機序の解明

まずは、細胞レベルにおける解析として、造血幹細胞を用いた破骨細胞分化誘導系に TH を添加し、破骨細胞分化誘導阻害作用の有無を検証するとともに培地中の NO 産生量をチェックする。代謝・産生された NO であることを証明するために NOS 阻害薬等を用いることで内在性の NO の関与が無いこと及び NO により活性化するグアニルシクラーゼ阻害薬を用いることで代謝による NO 産生が破骨細胞抑制機序であることを証明する。

2) TH による前骨芽細胞に及ぼす影響に関して骨誘導培地を用いない実験系で検証する。

In vitro の骨芽細胞による石灰化誘導にはステロイドホルモンを含む骨誘導培地に薬物を添加し、骨芽細胞の分化マーカー及び石灰化量を画像解析するが、TH 単独添加による前骨芽細胞に及ぼす影響を解析する。

ヘリオキサンチン誘導体における *in vivo* レベルの実験

In vitro 実験の結果を踏まえ、骨形成促進し、骨吸収抑制を行える至適濃度の範囲の TH を生体内に投与する。頭蓋骨欠損モデルに徐放製剤化した TH を投与して、 μ CT による骨量測定を行い骨再生の有無を検証する。

4. 研究成果

ヘリオキサンチン誘導体における *in vitro* レベルの実験

1) TH-NO 系による破骨細胞抑制機序

d/dY 系マウスの大腿骨、脛骨から調整した造血幹細胞に、培養開始時よりヘリオキサンチン誘導体を 2 または 5 μ M 添加したものと、非添加の対照群とに分け 37 \pm 5%CO₂, 95% air 気相下にて培養した。CSF-1 と RANKL を共添加し 6 日間培養後、破骨細胞を同定した。ヘリオキサンチン誘導体添加群において TRAP 陽性多核細胞及び F アクチンリングを有する細胞の大きさ、数ともに濃度依存的に減少した。また、培養上清中の NO 濃度が濃度依存的かつ時間依存的に上昇した。NO のシグナル伝達経路を阻害するグアニル酸シクラーゼ作用阻害剤の ODQ [1H [1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-one] を添加したところ、破骨細胞分化抑制が解除された。ヘリオキサンチン誘導体による破骨細胞分化阻害に NO が関与している可能性が示唆された。また cGMP を基質とする PDE 活性は TH 添加により濃度依存的に抑制され、10 μ M TH は 40 μ M IBMX の阻害効果と同等であった。ヘリオキサンチン誘導体による破骨細胞分化阻害に NO と PDE 活性阻害が関与している可能性が示唆された。参考文献 1)

2) TH による前骨芽細胞に及ぼす影響

前骨芽細胞株 MC3T3E1 細胞を用いて MEM 培地にて 37 \pm 5%CO₂, 95% air 気相下にて培養した。TH は、低濃度でも細胞増殖を停止させるばかりでなく、経時的に濃度依存的に低下させる。一方、骨芽細胞への分化指標である ALPase 活性を従来知られているよりも濃度依存的に亢進させ

た。また *in vitro* の石灰化を検証するために培養後 21 日目に von kossa 染色による石灰化した面積を画像解析したところ、濃度依存的に石灰化面積は亢進した。従来報告されている石灰化誘導培地に TH を添加した場合よりも 100 倍低濃度でこの現象は起きていた。骨誘導培地にはステロイドホルモンが含まれており、TH はその作用に拮抗しつつ非常に強力な骨芽細胞分化因子であることが判明した。

ヘリオキサンチン誘導体における *in vivo* レベルの実験

In vitro における骨形成促進作用は、骨芽細胞の分化因子であることがわかったので、5 週令 B6 マウスの頭蓋骨に骨欠損部を作成し、足場材料であるゼラチンハイドロゲルに TH を染み込ませ欠損部に埋入する骨再生モデルマウスを用いた *in vivo* 実験を行った。欠損部に埋め込める足場材料に浸漬できる薬用量に限界があり、低濃度で分化作用がある TH でもポジティブコントロールとして投与した BMP2 と同様の骨形成は認められなかった。また TH の持つ細胞増殖能の抑制作用が生体内での骨再生を抑制している可能性が示唆された。そこで TH は徐放製剤化して持続的に骨芽細胞分化させると骨形成は亢進した。しかしながら、持続的な大量の骨形成促進には、前骨芽細胞の増殖を主に骨形成促進をする PTH との協力作用が必要ではないかと示唆された。

参考文献

1) Amano H, Iwaki F, Oki M, Aoki K, Ohba S. An osteogenic helioxanthin derivative suppresses the formation of bone-resorbing osteoclasts. *Regen Thera* 11; 290-296, 2019

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 5件／うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Takahashi K, Amano H, Urano T, Li M, Oki M, Aoki K, Amizuka N, Nakayama KI, Nakayama K, Udagawa N, Higashi N.	4. 巻 18
2. 論文標題 p57Kip2 is an essential regulator of vitamin D receptor-dependent mechanisms.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0276838
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0276838	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 Mohammad Ibtehaz Alam, Megumi Mae, Fatima Farhana, Masayuki Oohira, Yasunori Yamashita, Yukio Ozaki, Eiko Sakai and Atsutoshi Yoshimura	4. 巻 23
2. 論文標題 NLRP3 inflammasome negatively regulates RANKL-induced osteoclastogenesis of mouse bone marrow macrophages but positively regulates it in the presence of lipopolysaccharides.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 6096
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23116096	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 Yu Yamaguchi, Tomoko Kadowaki, Nozomi Aibara, Kaname Ohyama, Kuniaki Okamoto, Eiko Sakai and Takayuki Tsukuba	4. 巻 23
2. 論文標題 Coronin1C is a GDP-specific Rab44 effector that controls osteoclast formation by regulating cell motility in macrophages.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 6619
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23126619	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 Keizo Nishikawa, Hina Takegami, Hiromi Sesaki,	4. 巻 Oct 15
2. 論文標題 Opa1-mediated mitochondrial dynamics is important for osteoclast differentiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 MicroPubl Biol.	6. 最初と最後の頁 650
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.17912/micropub.biology.000650	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 Nishikawa K, Seno S, Yoshihara T, Narazaki A, Kikuta J, Sakaguchi R, Suzuki N, Takeda N, Semba H, Yamamoto M, Okuzaki D, Motooka D, Kobayashi Y, Koseki H, Matsuda H, Yamamoto M, Tobita S, Mori M and Ishii M	4. 巻 6
2. 論文標題 Osteoclasts adapt to physioxia perturbation through DNA demethylation,	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO Reports	6. 最初と最後の頁 e53035
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202153035	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 Megumi Mae, Mohammad Ibtehad Alam, Yasunori Yamashita, Yukio Ozaki, Kanako Higuchi, S.M. Ziauddin, Jorge Luis Montenegro Raudales, Eiko Sakai, Takayuki Tsukuba, Atsutoshi Yoshimura	4. 巻 22
2. 論文標題 The role of cytokines produced via the NLRP3 inflammasome in mouse macrophages stimulated with dental calculus in osteoclastogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222212434	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 Manh Tien Tran, Yuka Okusha, Yunxia Feng, Chiharu Sogawa, Takanori Eguchi, Tomoko Kadowaki, Eiko Sakai, Takayuki Tsukuba, Kuniaki Okamoto	4. 巻 1868
2. 論文標題 A novel role of HSP90 in regulating osteoclastogenesis by abrogating Rab11b-driven transport	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research	6. 最初と最後の頁 119096
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamcr.2021.119096	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 Tsuyoshi Nishioku, Momomi Kawamoto, Ryuya Okizono, Eiko Sakai, Kuniaki Okamoto, Takayuki Tsukuba	4. 巻 530
2. 論文標題 Dimethyl fumarate prevents osteoclastogenesis by decreasing NFATc1 expression, inhibiting of erk and p38 MAPK phosphorylation, and suppressing of HMGB1 release	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 455-461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.088	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 Suzuki T, Uruno A, Yumoto A, Taguchi K, Suzuki M, Harada N, Ryoke R, Naganuma E, Osanai N, Goto A, Suda H, Browne R, Otsuki A, Katsuoka F, Zorzi M, Yamazaki T, Saigusa D, Koshiha S, Nakamura T, Fukumoto S, Ikehata H, Nishikawa K, et al	4. 巻 3
2. 論文標題 Nrf2 contributes to the weight gain of mice during space travel.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Commun Biol.	6. 最初と最後の頁 496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01227-2.	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 Yuka Okusha, Manh Tien Tran, Mami Itagaki, Chiharu Sogawa, Takanori Eguchi, Tatsuo Okui, Tomoko Kadowaki, Eiko Sakai, Takayuki Tsukuba, and Kuniaki Okamoto	4. 巻 9
2. 論文標題 Rab11A functions as a negative regulator of osteoclastogenesis through dictating lysosome-induced proteolysis of c-fms and RANK surface receptors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9112384	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 Manh Tien Tran, Yuka Okusha, Yunxia Feng, Masatoshi Morimatsu, Penggong Wei, Chiharu Sogawa, Takanori Eguchi, Tomoko Kadowaki, Eiko Sakai, Hirohiko Okamura, Keiji Naruse, Takayuki Tsukuba, and Kuniaki Okamoto	4. 巻 21
2. 論文標題 The inhibitory role of Rab11b in osteoclastogenesis through triggering lysosome-induced degradation of c-Fms and RANK surface receptors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21249352	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 Nishikawa K, Ishii M	4. 巻 39
2. 論文標題 Novel method for gain-of-function analyses in primary osteoclasts using a non-viral gene delivery system.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bone Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 353-359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-020-01161-7.	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 Eiko Sakai, Mari Sato, Nassirhadjy Mentily, Takayuki Tsukuba, and Chikara Sato	4. 巻 11
2. 論文標題 Liquid-phase ASEM imaging of cellular and structural details in cartilage and bone formed during endochondral ossification: Keap1-deficient osteomalacia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5722
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-84202-z	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15件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 柿崎良輔、及川里奈、高橋優太、天野均、浦野友彦、中山啓子、中山敬一、高橋勝彦、東伸昭
2. 発表標題 ビタミンD3が誘導する骨芽細胞の脂肪滴形成はp57Kip2に依存する
3. 学会等名 第143回日本薬学会年会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 高橋 優太、及川 里奈、柿崎 良輔、Masud Kahn、天野均、青木和広、高橋 勝彦、東 伸昭
2. 発表標題 マウス大腿骨におけるヘパラナーゼ発現と発現細胞の探索
3. 学会等名 第143回日本薬学会年会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 坂井詠子, Farhana Fatima, 小柳悠, 山口優, 筑波隆幸
2. 発表標題 Rufy4はRUNドメインを介して破骨細胞による骨吸収を制御する
3. 学会等名 第95回日本生化学会年会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 山口優, 門脇知子, 相原希美, 大山要, 岡元邦彰, 坂井詠子, 筑波隆幸
2. 発表標題 Coronin1CはGDP特異的Rab44エフェクターでありマクロファージの細胞運動を調節すること
3. 学会等名 第95回日本生化学会年会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 青木和広
2. 発表標題 骨形態計測学の現状と未来を考える
3. 学会等名 第42 回日本骨形態計測学会（招待講演）
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 西川恵三
2. 発表標題 骨のPhysioxia生物学
3. 学会等名 第94回日本生化学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤主税、Nassirhadjy Mently, 佐藤真理、笠畑尚喜、坂井詠子
2. 発表標題 大気圧走査電子顕微鏡 ASEM による骨細胞と軟骨の観察
3. 学会等名 第41回骨形態計測学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤主税、坂井詠子
2. 発表標題 骨組織における破骨細胞と骨芽細胞の水中観察
3. 学会等名 第23回日本骨粗鬆症学会、第39回日本骨代謝学会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂井詠子、佐藤主税、佐藤真理、Farhana Fatima、筑波隆幸
2. 発表標題 Keap1遺伝子欠損マウスにみられる軟骨内骨化の抑制：X線μCTおよび水中での大気圧電子顕微鏡による観察
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Eiko Sakai; Mari Sato; Nassirhadjy Memtily; Takayuki Tsukuba; Chikara Sato
2. 発表標題 Liquid-phase imaging of bone development and calcification by atmospheric scanning electron microscopy (ASEM): Application to immuno-labeling and rapid tissue observation of genetically modified mouse
3. 学会等名 Microscopy & Microanalysis 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 王里奈、高橋優太、藤野ゆうな、Masud Kahn、天野均、青木和広、高橋勝彦、東伸昭
2. 発表標題 マウス大腿骨におけるヘパラーゼの発現
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤主税、坂井詠子、笠畑尚喜、佐藤真理、杉本真也
2. 発表標題 大気圧走査電子顕微鏡 ASEM による免疫電顕法による組織の最近観察とcryo-TEM
3. 学会等名 第76回日本顕微鏡学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 青木 和広、池淵 祐樹、Masud Khan、菅森 泰隆、田村 幸彦、本間 雅
2. 発表標題 石灰化組織評価の実践とネットワーキング 骨形態計測法からシグナル伝達研究への発展.
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 青木 和広、清水 優里、Lu Wei、廣橋 優奈、曾根 絵梨、池淵 祐樹、Masud Khan、Fatma Rashed、田村 幸彦、菅森 泰隆、寺坂 尚紘、宇田川 信之、依田 哲也、本間 雅、菅 裕明.
2. 発表標題 RANKL-RANK-OPGシグナル研究の最前線 膜型RANKLを標的にした骨形成促進薬の開発.
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 天野 均、大庭 伸介、青木 和広
2. 発表標題 ヘリオキサンチン誘導体による破骨細胞分化誘導系に及ぼす影響に関する研究
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 西川恵三	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 5
3. 書名 実験医学 酸素環境と臓器機能～感知・応答のメカニズムから最新の酸素イメージングまで	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>口腔基礎工学分野 国立大学法人 東京医科歯科大学 https://www.tmd.ac.jp/ohe/teachers/Basic_Oral_Health_Sciences_54d4928260bdf/</p>
--

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	坂井 詠子 (SAKAI EIKO) (10176612)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教 (17301)	
研究分担者	西川 恵三 (NISHIKAWA KEIZO) (30516290)	大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授 (常勤) (14401)	
研究分担者	青木 和広 (AOKI KAZUHIRO) (40272603)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (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
---------	---------