

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月1日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659356

研究課題名（和文）Id2 欠損マウスを活用した低分子化合物ハルミンの骨組織再生作用の解析

研究課題名（英文）Analysis of bone regeneration using small-molecule harmine and Id2-knockout mice

研究代表者

江草 宏 (EGUSA HIROSHI)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：30379078

研究成果の概要（和文）：本研究計画は、小分子化合物を Id2 遺伝子欠損マウスに由来する骨芽細胞および破骨細胞に作用させることで、新たな細胞内分子機構を探索することを目的として行われた。その結果、小分子化合物 harmine は、破骨細胞分化に重要な役割をする NFATc1 の活性をリン酸化酵素 DYRK1A の阻害を介して増強するが、同時に破骨細胞の分化抑制因子として作用する Id2 の発現を増強する結果、破骨細胞分化における細胞融合を著明に抑制することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：This research project was performed aiming at investigating new molecular mechanisms using Id2-knockout mouse-derived osteoclasts/osteoblasts and small-molecules. We found that small-molecule harmine is a potent activator of NFATc1 due to its interference with the functions of the protein kinase DYRK1A in osteoclast progenitors, and via its induction of Id2 expression, thus leading to the disruption of the fusion events mediating osteoclastogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	0	1,400,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	420,000	3,220,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・再生歯学

キーワード：再生歯学・harmine・Id2・骨芽細胞・破骨細胞・ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

骨組織は、骨芽細胞と破骨細胞のバランスの上に成り立っているため、新たな歯周組織再生薬には、骨芽細胞・破骨細胞双方に対する効果的な作用が期待される。また、骨芽細胞・破骨細胞の分化メカニズムを解明することは骨組織の機能と形態を維持する上で重要な課題である。

近年、Receptor Activator of NF- κ B

Ligand (RANKL) 刺激によるシグナル伝達系において活性化される転写因子である Nuclear Factor of Activated T cells c1 (NFATc1) が破骨細胞分化に必須であることが見出された。

我々はこれまでに、破骨細胞の分化に影響を及ぼす化合物・因子のハイスループットスクリーニングを目的とし、RAW264.7 細胞に NFATc1 プロモーター/ルシフェラーゼレポ

ーターベクターを導入することで、このレポーター遺伝子を安定発現させた RAW264.7 細胞株を樹立している (図 1)。

さらに、この細胞株を RANKL 刺激により破骨細胞へ分化誘導し、機能不明の生体物質である orphan ligands ライブラリーを用いた化合物スクリーニングから、NFATc1 の活性化を亢進させる小分子化合物として、ハマビシ科の植物から得られる β -カルボリンアルカロイドの一種であるハルミン (harmine) を見出してきた。

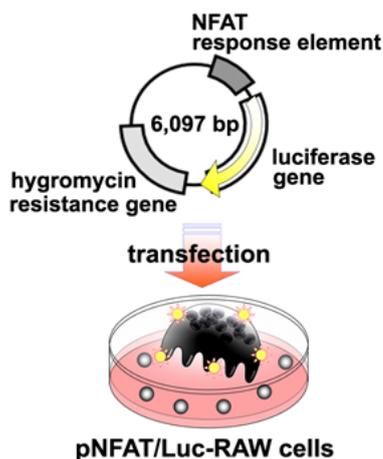


図 1 NFAT/ルシフェラーゼレポーター遺伝子を恒常発現する破骨細胞前駆細胞の作製 (Egusa H. et al., Bone, 2011 より)

一方で、basic helix-loop-helix 型転写因子の機能抑制因子である inhibitor of DNA binding/differentiation-2 (Id2) は、破骨細胞の分化 (Lee J. et al., Blood, 2006) および間葉系幹細胞の骨芽細胞分化 (Peng Y. et al., J Biol Chem, 2004) に関与することが示唆されている。

以上を背景に我々は、Id2 遺伝子欠損マウスから樹立した骨芽細胞・破骨細胞の分化過程にハルミンなどの小分子化合物を作用させることが、これらの細胞分化過程における分子機構を解析する画期的なツールとなる可能性に着目した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Id2 遺伝子欠損マウスおよびこれから分離した骨芽細胞および破骨細胞を用いた解析から、harmine の骨芽・破骨細胞への作用機序および骨組織再生作用を明らかにし、同時にこれら細胞における Id2 の分化制御機構を探索することである。

そのために、以下の項目を実施した。

- (1) Id2 および harmine が制御する骨芽細胞・破骨細胞内のシグナル伝達機構の探索。
- (2) ハルミン投与がマウス生体内の骨代謝に及ぼす影響の解析。

- (3) harmine が局所の骨組織再生に及ぼす影響の検討。

3. 研究の方法

(1) Id2 および harmine が制御する骨芽細胞・破骨細胞内のシグナル伝達機構を探索する目的で、Id2 遺伝子欠損マウス (+/-, -/-) および野生型マウスの大腿骨骨髓組織から、間葉系幹細胞 (Egusa et al. J Biol Chem 2005) および破骨前駆細胞 (Wang and Egusa et al. J Bone Miner Res 2008) を分離培養し、各細胞をハルミン存在下で骨芽細胞あるいは破骨細胞に分化誘導し、分化過程を以下について検討した。

①骨芽細胞分化評価

アルカリフォスファターゼ活性 (ALP 染色)、基質の石灰化 (von Kossa 染色)、骨芽細胞分化特異的遺伝子発現 (RT-PCR 法)

②破骨細胞分化評価

TRAP 染色陽性多核細胞数、破骨細胞分化特異的遺伝子発現 (RT-PCR 法)、ウェスタンブロットティング法 (Id2, NFATc1, NFATc2, DYRK1A など)

(2) harmine 投与がマウス生体内の骨代謝に及ぼす影響を解析する目的で、野生型 ICR 系妊娠マウスの腹腔に、10 mM ハルミン (240 μ L) を胎生 13.5、14.5、15.5、16.5 日の 4 回にわたり投与した (30 mg/ kgBW/ day)。対照群には同様の手技にて H₂O を同量投与した。胎生 18.5 日にて同腹仔を取り出しアルコール浸漬固定後に、アルシアンブルーおよびアリザリンレッド染色にて骨格標本作製し、ハルミンが骨格系の発生過程に及ぼす影響を検討した。

(3) harmine が局所の骨組織再生に及ぼす影響を検討する目的で、ラット頭蓋骨欠損モデル (Egusa H. et al., Biomaterials, 2009) を用いて、harmine (10 μ g/site) を含んだコラーゲンスポンジを骨欠損部に埋入し、3 および 5 週間後に頭蓋骨を摘出して HE 染色にて骨組織の再生を組織学的に評価した。

4. 研究成果

(1) Id2 および harmine が制御する破骨細胞・骨芽細胞内のシグナル伝達機構の探索

①破骨細胞

harmine は RANKL と相乗的に RAW264.7 細胞およびマウス骨髓由来破骨前駆細胞における NFATc1 の遺伝子・蛋白発現を亢進するばかりでなく、RANKL 非存在下でもこれらの細胞における NFATc1 発現を亢進した。harmine は NFATc1 のリン酸化酵素である DYRK1A の阻害薬として知られている。我々は、破骨前駆細胞が DYRK1A を高発現していることをつき

とめ、harmine による DYRK1A の阻害を介した NFATc1 の脱リン酸化の促進が、NFATc1 発現を亢進することを明らかにした。

一方で harmine は RAW264.7 細胞およびマウス骨髄由来破骨前駆細胞における Id2 の遺伝子・蛋白発現を著明に亢進した。Id2 遺伝子欠損マウスにおける骨髄由来破骨前駆細胞の破骨細胞形成は、野生型マウスと比較して亢進した。また、harmine は細胞死に影響を及ぼさなかった濃度 (1-10 μ M) で破骨細胞の生成を著明に抑制したが、Id2^{-/-}マウスでは harmine の添加により破骨細胞形成が亢進した。以上の結果から、harmine は破骨前駆細胞における NFATc1 発現を、RANKL 非依存的に DYRK1A の阻害を介した NFATc1 の脱リン酸化促進作用により増強するが、同時に分化抑制因子 Id2 発現を増強する結果、破骨細胞分化に抑制的に作用していることが明らかとなった。

②骨芽細胞

harmine が Id2 欠損マウス由来間葉系幹細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響を検討した結果、Id2 遺伝子の欠失自体が、骨芽細胞分化を亢進することが明らかとなった (図2)。

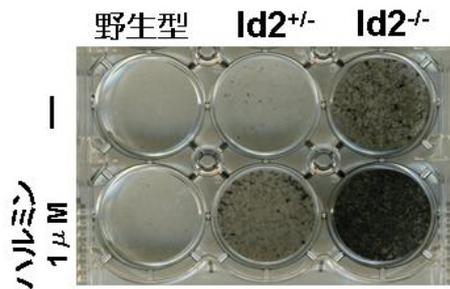


図2 Id2 欠損による骨芽細胞分化亢進分化誘導 24 日目の von Kossa 染色像。Id2 欠損マウス (+/-, -/-) 由来間葉系幹細胞を骨芽細胞に分化誘導すると野生型マウスと比較して著明に細胞基質の石灰化が亢進した。

このような細胞表現型は、これまで野生型マウスから培養した細胞では明確に検出することが困難であった化合物の作用を高集中度に捕らえることを可能にするため、Id2 遺伝子欠損マウスを用いた骨芽細胞分化実験系は、分化過程における分子機構を解析する画期的なシステムと成り得る可能性が示唆された。

(2) harmine を野生型マウスに、LD50 以下の高濃度 (30 mg/ KgBW/ day) で4日間連続腹腔内投与しても、致死・催奇性は示さなかった。また、この投与条件における harmine が、骨格系の発生過程に大きな影響は及ぼしている像は観察されなかった (図3)。

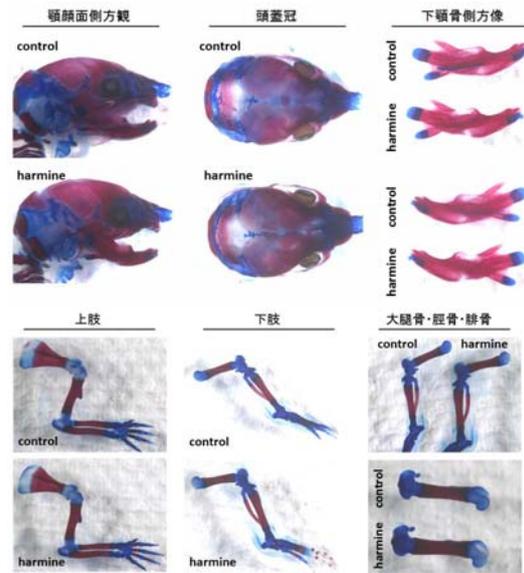


図3 harmine を投与した野生型マウス胎仔の骨格標本 (アルシアンブルーおよびアリザリンレッド染色)

今後、Id2 欠損マウスを用いて同様の実験を行うことにより、Id2 を介した harmine の骨代謝への作用を検討していきたいと考えている。

(3) ラット頭蓋骨欠損モデルにおいて、harmine を含んだコラーゲンスポンジを骨欠損部に埋入した結果、3 および 5 週間後の HE 染色像では、PBS を用いた対照群よりも骨組織再生の遅延が観察された (図4)。この原因として、用いた harmine が 10 μ g/site と高濃度であり、移植周囲の細胞に毒性を示した可能性があるため、今後低濃度での実験を追加していく必要があると考えている。

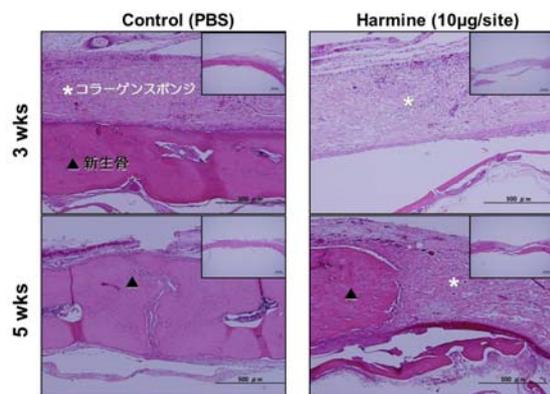


図4 harmine 含浸コラーゲンスポンジをラット頭蓋骨欠損に移植後、3, 5 週目の組織像 (HE 染色)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Egusa H, Doi M, Saeki M, Fukuyasu S, Akashi Y, Yokota Y, Yatani H, Kamisaki Y. The small molecule harmine regulates NFATc1 and Id2 expression in osteoclast progenitor cells. *Bone*, 49(2), 264-274, 2011. (査読有)
DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2011.04.003>
- ② Egusa H, Saeki M, Doi M, Fukuyasu S, Matsumoto T, Kamisaki Y, Yatani H. A small-molecule approach to bone regenerative medicine in dentistry. *Journal of Oral Biosciences*, 52(2), 107-118, 2010. (査読有)
<http://ci.nii.ac.jp/naid/10027105562>

[学会発表] (計7件)

- ① 福安 翔, 江草 宏, 佐伯万騎男, 矢谷博文. 骨芽細胞分化促進作用を有する小分子化合物の探索システムの構築. 第53回歯科基礎医学会学術大会, 2011年10月1日(岐阜).
- ② 福安 翔, 江草 宏, 萱島浩輝, 中野 環, 矢谷博文. 骨形成促進作用を有する小分子化合物の探索システムの構築. 第41回日本口腔インプラント学会学術大会, 2011年9月17日(名古屋).
- ③ 裏口真也, 江草 宏, 萱島浩輝, 福安 翔, 王 放放, 矢谷博文. Id2欠損マウス由来iPS細胞を用いた骨芽細胞分化誘導モデル. 第9回日本再生歯科医学会学術大会, 2011年9月10日(大阪).
- ④ 福安 翔, 江草 宏, 萱島浩輝, 裏口真也, 鎌野優弥, 矢谷博文. 骨芽細胞分化促進作用を有する小分子化合物の探索システムの構築. 第9回日本再生歯科医学会学術大会, 2011年9月10日(大阪).
- ⑤ 福安 翔, 江草 宏, 萱島浩輝, 裏口真也, 鎌野優弥, 佐伯万騎男, 矢谷博文. 骨芽細胞分化促進作用を有する小分子化合物の探索システムの構築. 第112回大阪大学歯学会例会, 2011年6月30日(大阪).
- ⑥ Fukuyasu S, Egusa H, Akashi Y, Kayashima H, Uraguchi S, Yu G, Yatani H. Cell-based double-screening method to identify reliable candidate for osteogenesis-targeting compounds. 89th IADR General Session, 2011年3月16日(San Diego, USA).
- ⑦ Fukuyasu S, Egusa H, Doi M, Kayashima H, Akashi Y, Yatani H. Dual function of small-molecule compound harmine on osteogenesis and osteoclastogenesis.

88th IADR General Session, 2010年7月14日(Barcelona, Spain).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江草 宏 (EGUSA HIROSHI)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 30379078

(2) 研究分担者

矢谷 博文 (YATANI HIROFUMI)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 80174530

佐伯 万騎男 (SAEKI MAKIO)
大阪大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号: 30273692

(3) 連携研究者

横田 義史 (YOKOTA YOSHIFUMI)
福井大学・医学部・教授
研究者番号: 50222386