

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 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究 B

研究期間：2010～2012

課題番号：22791778

研究課題名（和文）トリプトファン誘導体および Dex を用いた骨芽細胞分化促進法の確立と作用機構の解明

研究課題名（英文）Establishment of a method to promote osteoblast differentiation using tryptophan derivatives and Dex, and elucidation of the mechanisms of them

研究代表者

三上 剛和 (MIKAMI YOSHIKAZU)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：80434075

研究成果の概要（和文）：本研究では、新規に合成したトリプトファン誘導体と合成副腎皮質ホルモンの1つであるデキサメサゾン（Dex）の骨芽細胞分化に対する影響とその分子機構について解析を行った。研究の結果、トリプトファン誘導体および Dex は、骨芽細胞分化を促進するものの、その作用効果は作用させる細胞の分化レベルに大きく依存することが明らかになった。さらに、この骨芽細胞促進効果には転写因子 Osterix が重要な役割を担うことが示唆された。また、その一方で、これらの化合物を、骨芽細胞と未分化間葉系幹細胞（MSC）の共培養系へ作用させると、MSC において骨芽細胞マーカーである BSP や ALP の発現が著しく増加することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the effect of newly synthesized tryptophan derivatives and dexamethasone (Dex), a synthetic glucocorticoid, on osteoblast differentiation. The tryptophan derivatives and Dex enhanced terminal osteoblast differentiation, as indicated by mineralization. However, no inductive effect was observed on commitment of mesenchymal stem cells (MSC) into osteoblast differentiation was observed. Furthermore, it was suggested that a transcription factor, Osterix, played an important role in the mechanism by which tryptophan derivatives and dexamethasone induced terminal osteoblast differentiation. In addition, we demonstrated that these agents significantly induced mRNA expression levels of the osteogenic marker genes bone sialoprotein (BSP) and Alkaline Phosphatase (ALP) in MSCs co-cultured with osteoblasts.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：デキサメサゾン，トリプトファン誘導体，骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景
骨芽細胞は骨形成において中心的な役割を

担う細胞である。したがって、骨芽細胞の分化を誘導・促進する因子は骨粗鬆症の治療薬

としての応用が期待される。骨芽細胞分化を促進する因子として、デキサメサゾンが知られるがその作用機序については不明な点が残されている。また、我々は、新規に化学合成したトリプトファン誘導体にも骨芽細胞分化促進効果があることを世界に先駆けて報告した。しかし、このトリプトファン誘導体の骨芽細胞分化に対する作用機序については明らかにされていない。

2. 研究の目的

骨粗鬆症は高齢者人口の増加が進行するなかで罹患者が増加しており、その予防と治療の重要性が増している。しかしながら、現在の医療では、薬物を使用しても骨量の維持が精一杯であり、青壮年期に骨量を増加させることは困難な状況である。そこで、本研究では、骨粗鬆症や骨形成不全症などの治療および予防への応用を目的とし、トリプトファン誘導体 (VEDI) および合成副腎皮質ホルモン(Dex)を用いた骨芽細胞分化促進方法の確立とその作用機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

トリプトファン誘導体およびDexを様々な条件で培養細胞に作用させ、最も効果的に骨芽細胞分化が亢進される条件を同定した。さらに、同定された条件において、網羅的な遺伝子発現解析を行い、関連因子の同定を行った。骨芽細胞分化の指標として次の3点について解析を行った。

- (1) 石灰化物の形成 (方法: Alizarin 染色, 沈着カルシウムの定量)
- (2) Alkaline phosphatase (ALP) 活性 (方法: p-nitrophenyl phosphate を基質とした定量)
- (3) 骨基質タンパク, 関連転写因子の発現量 (方法: real time RT-PCR, Western blotting)。

また、骨芽細胞分化誘導因子の作用効果は作用濃度や時間の他に、作用させる細胞の分化レベルに依存することが知られている。ラット頭蓋冠から樹立された未分化間葉系幹細胞 (ROB-C26) は、サイトカインであるBMP-2を作用させると骨芽細胞へ分化する。そこで、細胞分化レベルに依存した、Dex およびトリプトファン誘導体の作用効果の違いを検討するために、サイトカイン (BMP-2) を用いて未分化間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化誘導しながら、さまざまなタイミングでDexあるいはVEDIを作用させその影響を解析した。

4. 研究成果

- (1) 骨芽細胞分化誘導作用を有する新規合成トリプトファン誘導体の同定

トリプトファンはセロトニンやメラトニンなどの基になる物質であり、その基本骨格は様々な生理活性物質の母骨格となっている。そこで、トリプトファンを基に様々な新規化合物を合成し、生理活性を有する物質の網羅的なスクリーニングを行った。その結果、骨芽細胞のアポトーシスを抑制し、石灰化を促進する効果がある2種類の化合物を同定することに成功した。これらの化合物は、SST-VEDI-1およびSSH-BMIと名付けられた化合物で、どちらもトリプトファンから脱炭酸して得られる構造を基本骨格として持つ (図1)。これらの化合物を培養骨芽細胞に作用させた実験では、培養液中の濃度が 10^{-10} ~ 10^{-11} M という低濃度でも効果が認められた (図1)。さらに、マウスを用いた毒性試験においては、生体に対する安全性が示された (LD50 (半数致死量): 80 mg/kg 以上)。

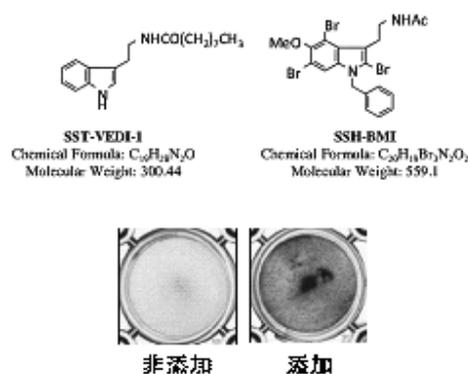


図1. SST-VEDI-1 を培地に添加して培養すると、非添加のものとは比べ、骨芽細胞の石灰化が亢進する(アリザレン染色)。

- (2) 作用させる細胞の分化レベルに依存した作用条件の同定

細胞の分化レベルに依存したDexおよびトリプトファン誘導体の作用効果を検討した結果、ROB-C26をBMP-2添加培地で培養した場合、Dexあるいはトリプトファン誘導体を培養の初期(培養6日目以前)に作用させると骨芽細胞への分化は亢進せず、培養後期(培養9日目以降)に作用させると、骨芽細胞への分化が亢進することが明らかになった(図2)。また、ROB-C26細胞にBMP-2を作用させると骨芽細胞分化誘導転写であるOsterixの発現が誘導され、ROB-C26細胞は骨芽細胞へと分化し、石灰化した骨様結節を形成する。しかし、Dexあるいはトリプトファン誘導体

を培養の初期（培養 0 日目～6 日目）に作用させた場合には、Osterix の発現が抑制され、石灰化物の形成も抑制された。一方、培養後期（培養 9 日目～12 日目）に作用させた場合には、Osterix の発現は抑制されず、BMP-2 を単独で作用させたときよりも顕著にいくつかの骨基質タンパク質の発現量が増加した。これらの結果から、Dex あるいはトリプトファン誘導の骨芽細胞分化に対する作用効果の相違には転写因子 Osterix が重要な役割を担っていると考えられる。

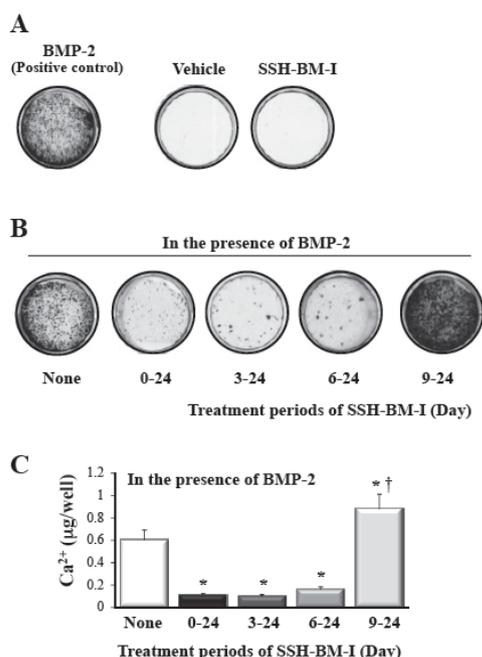


図 2. The effect of SSH-BM-I on osteoblast differentiation in ROB-C26 cells. A) Effect of SSH-BM-I on the formation of mineralized bone-like nodules: Cells were cultured with vehicle or SSH-BM-I (10–10 M) for 24 days and then Alizarin Red S staining was performed. BMP-2 (100 ng/ml) was used as positive control for mineralization of ROB-C26 cells. B) Effect of SSH-BM-I on BMP-2-induced mineralization: Cells were cultured in the presence of BMP-2 (100 ng/ml) and SSH-BM-I (10–10 M). Treatment was commenced on various days, as indicated. After 24 days culture, cells were stained with Alizarin red S and Oil Red O. C) Quantification of calcium deposition: Cells were cultured under the same conditions indicated in panel B. The calcium contents of the cell layers were measured by the o-cresolphthalein complexone method. Mean ± S.D. (n = 3; *P < 0.05 vs. cells treated with BMP-2 alone; †P < 0.05 vs. cells treated with SSH-BM-I beginning on day 0).

(3) 骨芽細胞との共培養系における MSC の分化誘導効果 (論文投稿中)

培養細胞 ML0-A5 は成熟骨芽細胞様の表現型をもつ。この ML0-A5 と MSC を共培養すると

MSC は骨芽細胞へと分化誘導される。そこで、この共培養系に Dex あるいはトリプトファン誘導体を作用させ、MSC の骨芽細胞分化に対する影響を解析した。その結果、ML0-A5 と共培養した MSC では、単独で培養した MSC と比較して、Runx2, Osterix, Dlx5 といった骨芽細胞分化関連転写因子の発現量レベルに差は見られなかった。Dex およびトリプトファン誘導体を添加した場合においても同様の結果であった。一方、ALP および BSP の発現量の発現量は Dex あるいはトリプトファン誘導体を作用させた共培養群において、非添加の共培養群と比較して顕著な増加が認められた。さらに、共培養群では、単独培養群と比較して、ヒストンタンパク質のアセチル化レベルが亢進していた。これらの結果から、ML0-A5 が MSC のクロマチンをリモデリングすることで、Dex やトリプトファン誘導体による ALP や BSP の発現誘導を亢進している可能性が示唆された。

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 6 件)

- ① Mikami Y, Suzuki S, Ishii Y, Watanabe N, Takahashi T, Isokawa K, Honda JM. The p75 neurotrophin receptor regulates MC3T3-E1 osteoblastic differentiation. *Differentiation* 84: 392-9, 2012. DOI:10.1016/j.diff.2012.07.001. 査読有
- ② Mikami Y, Somei M, Watanabe E, Watanabe N, Takahashi T, Honda JM. A novel bromomelatonin derivative suppresses apoptosis with regulating the expression of Bcl-2 family genes. *Lett Drug Des Discov.* 8: 951-960, 2011. DOI:http://dx.doi.org/10.2174/157018011797655287. 査読有
- ③ Mikami Y, Somei M, Tsuda M. SSH-BM-I, a tryptamine derivative, stimulates mineralization in terminal osteoblast differentiation but inhibits osteogenesis of pre-committed progenitor cells. *J Pharmacol Sci.* 18: 63-72, 2011.

DOI:org/10.1254/jphs.10329FP. 査読有

- ④ **Mikami Y**, Ishii Y, Watanabe N, Shirakawa T, Suzuki S, Irie S, Isokawa K, Honda JM. CD271/p75(NTR) Inhibits the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells into Osteogenic, Adipogenic, Chondrogenic, and Myogenic Lineages. *Stem Cells Dev.* 20: 901-913, 2011.

DOI:10.1089/scd.2010.0299. 査読有

- ⑤ **Mikami Y**, Senoo M, Lee M, Yamada K, Ochiai K, Honda JM, Watanabe E, Watanabe N, Somei M, Takagi M. Inhibitory Effects of a Tryptamine Derivative on Ultraviolet Radiation-Induced Apoptosis in MC3T3-E1 Mouse Osteoblasts. *J Pharmacol Sci.* 115: 214-220, 2011.

DOI:org/10.1254/jphs.10208FP. 査読有

- ⑥ **Mikami Y**, Lee M, Irie S, Honda JM. Dexamethasone modulates osteogenesis and adipogenesis with regulation of osterix expression in rat calvaria-derived cells. *J Cell Physiol.* 226: 739-748, 2011.

DOI:10.1002/jcp.22392. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① **三上剛和** 他. 成熟骨芽細胞 MLO-A5 と未分化間葉系幹細胞 C3H10T1/2 の共培養系を用いた細胞間相互作用の検討. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2013 年 3 月 29 日, 香川)
- ② **三上剛和** 他. 成熟骨芽細胞 MLO-A5 は未分化間葉系幹細胞 C3H10T1/2 の Bone Sialoprotein (BSP) および Alkaline Phosphatase (ALP) の発現を誘導する. 第 100 回日本解剖学会関東支部会 (2012 年 10 月 13 日, 東京)
- ③ **三上剛和** 他. 骨芽細胞分化における BMP-2 と Dexamethasone の影響. 第 117

回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2012 年 3 月 27 日, 山梨)

- ④ **三上剛和** 他. Bone morphogenetic protein 2 と Dexamethasone は JAK/STAT シグナルを介して相乗的に Alkaline Phosphatase を活性化させる. 第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会 (2011 年 10 月 1 日, 岐阜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三上 剛和 (MIKAMI YOSHIKAZU)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：80434075