

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592728

研究課題名(和文)コンドロイチン硫酸Eによる骨形成促進作用と骨補填材への応用に関する研究

研究課題名(英文)Promotion of bone formation using chondroitin sulfate E and application to bone regenerating biomaterials

研究代表者

宮崎 達也 (Miyazaki, Tatsuya)

東北大学・歯学研究科(研究院)・大学院非常勤講師

研究者番号：90538638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：コンドロイチン硫酸E(CS-E)は骨芽細胞分化を促進し、破骨細胞分化を抑制する。その作用機序として、CS-Eはosteostatin(OA)及びそのレセプターであるintegrinに結合し、OAのintegrin及びヘパラン硫酸への作用を阻害することで、破骨細胞分化を抑制していることが明らかとなった。一方、骨芽細胞はbiglycan及びE構造を有するCSを産生し、それらは分化(石灰化)前に一過的に上昇していたことから、添加したCS-Eに加え、骨芽細胞が産生したCSも分化に関与していると考えられた。今後は、得られた結果をもとに、CS-Eを用いた骨補填材の可能性について検討予定である。

研究成果の概要(英文)：Chondroitin sulfate E enhances osteoblast differentiation and inhibits osteoclast differentiation. As a mechanism of action, it was demonstrated that CS-E bound to adhesion molecules such as both osteostatin (OA) and its receptor, integrin. And also CS-E inhibited the osteoclast differentiation by blocking the interaction of OA to integrin and heparan sulfate. On the other hands, osteoblast produced biglycan core protein and E-unit of CS. The amount of these molecules transiently increased before osteoblast differentiation (mineralization). These results indicated that not only the exogenously-added CS-E but also endogenous CS contributed the differentiation of the cells. Based on the results in the present study, we will further investigate the potentiality of CS-E as an application to bone regenerating biomaterials.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：コンドロイチン硫酸 インテグリン オステオアクチビン 破骨細胞 骨形成

### 1. 研究開始当初の背景

骨基質には、ヒドロキシアパタイトやコラーゲンに加え、biglycanなどの種々のプロテオグリカン(PG)が存在し、骨代謝を調節している。また、PGの糖鎖であるグリコサミノグリカン(GAG)も、増殖因子の活性調節を介して骨代謝に関与していることが明らかになっている。GAGの一つであるコンドロイチン硫酸(CS)には、いくつかの構造異性体が存在するが、そのうちCS-Eなどの多硫酸化CSが骨形成タンパク質(BMP)と結合して骨芽細胞の分化を促進することを明らかにした(Miyazaki T et al., J Cell Physiol, 217:769-777, 2008)。一方、破骨細胞においては、マクロファージ株 RAW264 の破骨細胞への分化をCS-Eが抑制することを認めている(Miyazaki T et al., Dent Mater J, 29:403-410, 2010)。CS-Eによる破骨細胞分化抑制作用の機序については不明であるが、細胞表面上のインテグリン系の接着分子を介している可能性が示唆されていた。このように、増殖因子や接着分子に結合して細胞の分化を調節するCS-Eは、硫酸基を介してリン酸カルシウム(CaP)にも結合することから、骨補填材への応用が期待されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、CS-Eの骨芽細胞分化促進及び破骨細胞分化抑制作用について、その作用機序を明らかにすることを目的とした。特に、インテグリン系の細胞接着分子等へのGAGの親和性と細胞分化調節作用などの機能について重点的に検討した。また、骨芽細胞が産生するbiglycanタンパク質の発現とそのGAG鎖であるCS構造異性体の挙動についても解析した。得られた結果をもとに、CS-Eの骨代謝調節剤や骨補填材の可能性についても考察した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 骨芽細胞のbiglycan発現

骨芽細胞株 MC3T3-E1 (5%FBS含有MEM) を48wellプレートに播種し培養した。24時間後にアスコルビン酸(50µg/ml)、β-グリセロリン酸(10mM)、デキサメタゾン(10nM)を含む培地に交換して培養した。培養プレートを経時的に回収し、4%パラホルムアルデヒドで固定した後、3%過酸化水素水にて内因性のペルオキシダーゼを失活させた。抗biglycan抗体(GeneTex)に続きHRP標識2次抗体を反応させた。TMB溶液にて発色、1N HClで停止した後、450nmの吸光度を測定した。染色細胞を観察する際には、TMBの代わりにDABを使用した。

#### (2) CS構造異性体の解析(二糖分析)

培養後の細胞から4Mグアニジン塩酸によりマトリックス成分を抽出した。抽出液を透析した後、プロナーゼに続きコンドロイチナーゼABC及びAC-Iで消化した。消化液を限

外濾過し、ろ液中の二糖組成を高速液体クロマトグラフィーにより分析した(Yoshida K et al., Anal Biochem, 177, 327-332, 1989)。

#### (3) CS-Eと接着分子の結合性の検討

CS-Eと接着分子との結合性について検討するために、まず、Ogamoらの方法(Ogamo A et al., Carbohydrate Research, 105:69-85, 1982)を参考に、ビオチンヒドラジドをCS-Eに反応させてビオチン標識CS-E(b-CS-E)を作製した。接着分子としてfibronectin(FN:和光純薬)、vitronectin(VN、R&D Systems)、osteopontin(OPN、和光純薬)、osteointegrin(V3、R&D Systems)を使用した。これらのPBS溶液(10µg/mL)を96wellプレートに添加して固層化した。なお、OAについては、抗IgG抗体を予め固層化した後、OAを結合させた。固層化した接着分子にb-CS-Eを反応させ、アビジンHRPに続きTMB溶液で発色した。1N HClにて停止後、450nmの吸光度を測定することで結合したb-CS-Eを検出した。CS-E以外のGAGについては、b-CS-Eと非標識GAGの競合阻害法により評価した。

#### (4) V3へのOAの結合とCS-Eによる阻害

V3(10µg/mL)を96wellプレートに固層化した後、ブロックエースにてブロッキングした。OA(10µg/mL)を反応させ後、HRP標識抗IgG抗体に続きTMB溶液にて発色した。1N HClで停止した後、450nmの吸光度を測定した。なお、V3及びOAに予めCS-Eを添加することで、CS-Eによる阻害効果も検討した。

#### (5) CaPプレートへの接着分子及びGAGの固層化

接着分子をPBSに溶解し(10µg/mL)、CaPプレートへ添加して室温でインキュベートした。PBSで洗浄した後、実験に使用した。必要に応じ、GAG溶液(100µg/mL)をさらに添加して、接着分子とGAGを結合させた。

#### (6) 破骨細胞分化に対する接着分子及びCS-Eの作用

接着分子及びGAGを固層化したCaPプレートにRAW264細胞を播種して培養した(10%FBS含有DMEM/F-12)。同時にRANKL(100ng/mL)を添加して6日間培養し破骨細胞への分化を誘導した。破骨細胞分化はpitアッセイにて評価した。すなわち、培養後の細胞を除去した後、破骨細胞により形成された吸収窩(pit)を写真撮影し、画像解析ソフトを用いてpit面積を測定した(Miyazaki T et al., Anal Biochem, 410:7-12, 2011)。

#### (7) RAW264細胞へのOAの結合

4%パラホルムアルデヒドで固定、0.3% $H_2O_2$ /メタノールにより内因性ペルオキシダーゼ

の失活した後、ブロックエースにてブロッキングした RAW264 細胞を使用した。同数の細胞をチューブに採取し、OA(10 µg/mL)を添加してインキュベートした。細胞に結合した OA は、HRP 標識抗 IgG 抗体に続き TMB 溶液で検出した。1N HCl で停止した後、上清の 450nm 吸光度を測定した。また、予め細胞及び OA 溶液に GAG (100 µg/mL) を添加して、GAG の結合阻害効果についても検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 骨芽細胞の biglycan 発現及び CS 構造異性体の解析

MC3T3-E1 細胞が biglycan コアタンパクを発現していることを、免疫染色により確認した。また、biglycan の発現は石灰化開始前 (Day12) に一過的に上昇することが明らかとなった。一方、MC3T3-E1 細胞のマトリックス中の CS 構造異性体について解析した結果、E 構造 (CS-E) の存在を認め、biglycan の発現とほぼ同様の挙動を示した。biglycan は骨芽細胞の分化を促進することが報告されており (Parisuthiman D et al, J Bone Miner Res, 20:1878-1886, 2005)、biglycan の GAG 鎖の E 構造が骨芽細胞分化及び破骨細胞分化に関与している可能性が示唆された。

##### (2) CS-E と接着分子の結合性

b-CS-E(0.1 µg/mL 以上)は OA に結合し、b-CS-E と OA の結合を CS-B、CS-E、CPS、Hep、heparan sulfate (HS)は阻害した。FN、VN、OPN、V 3 についても同様の測定を行った結果、GAG の種類により接着分子への親和性が異なったが、CS-E、Hep はこれらの接着分子全てに結合性を示した (表 1)。また、レセプターとリガンドの関係にある V 3 と OA の両者に CS-E は作用し、それらの結合を阻害した。

表 1. GAG と接着分子の結合性

	CS-A	CS-B	CS-C	CS-D	CS-E	CPS	Hep	HS
OA	-	+	-	-	+	+	+	+
FN	-	-	-	-	+	-	+	+
VN	-	-	-	-	+	+	+	-
OPN	-	-	-	-	+	+	+	-
αVβ3	-	-	-	-	+	+	+	-

##### (3) 破骨細胞分化に対する接着分子及び CS-E の作用

OA を固層化した CaP プレートを用い RAW264 細胞を培養した結果、破骨細胞分化 (pit 形成) が促進された。また、RAW264 細胞の破骨細胞分化を OA の中和抗体 (R&D Systems) が抑制したことから、OA からのシグナルが破骨細胞分化を促進していると考えられた。また、CaP プレートに FN を固層化した場合にも pit 形成が促進されたが、VN あるいは V 3 を固層化した場合には、逆に pit 形成は抑制された。

OA により誘導された破骨細胞分化に対し CS-E は抑制作用を示した。また、RAW264 細

胞への OA の結合を CS-E、HS は阻害した。さらに、RAW264 細胞への OA の結合及び破骨細胞分化をヘパリナーゼ III は抑制した。

以上の結果から、OA は V 3 あるいは HS に作用して破骨細胞の分化を促進するが、CS-E はそれらの作用を阻害することで破骨細胞分化を抑制していると考えられた。CS-E は FN、VN、OPN に対しても結合することから、これらの接着分子とレセプターの相互作用についても関与していると推察される。

CS-E は CaP に強く結合し、CS-E の固層化により破骨細胞分化が抑制されることから、骨補填材としての応用も可能と考えられる。CS-E は、CaP + ゼラチンの存在下、in vivo における骨形成を促進することも報告されている (Hosaka YZ et al., Mar Drugs, 11:5024-5035, 2013)。今後は、OA 以外の接着分子についても CS-E の機能について解析し、BMP やインテグリン及びそのリガンドを関連させた新規の骨代謝調節剤や骨補填材の可能性について研究していく予定である。

#### 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) Suzuki K, Anada T, Honda Y, Kishimoto KN, Miyatake N, Hosaka M, Imaizumi H, Itoi E, Suzuki O. Cortical bone tissue response of injectable octacalcium phosphate-hyaluronic acid complexes. Key Eng Mater, 529-530, 296-299, 2013. 査読なし  
DOI:10.4028/www.scientific.net/KEM.529-530.296
- (2) Suzuki O, Anada T. Synthetic octacalcium phosphate: A possible carrier for mesenchymal stem cells in bone regeneration. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc 2013, 397-400, 2013. 査読なし  
DOI:10.1109/EMBC.2013.6609520.

[学会発表](計 2 件)

- (1) 宮崎 達也、宮内 聡、穴田 貴久、多和田 明、鈴木 治、多硫酸化コンドロイチン硫酸の破骨細胞分化抑制作用におけるインテグリンの関与、第 60 回マトリックス研究会・第 45 回 日本結合組織学会学術大会 合同学術集会、2013 年 6 月 28 日、和歌山
- (2) Suzuki K, Anada T, Miyazaki T, Miyatake N, Hosaka M, Imaizumi H, Itoi E, Suzuki O, Biodegradable property of octacalcium phosphate-hyaluronic acid composites as bone substitute materials. The 23rd Interdisciplinary Research Conference on Injectable Osteoarticular Biomaterials and Bone

Augmentation Procedures, 8-10 April  
2013 Boston, USA.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cfe.dent.tohoku.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮崎 達也 (MIYAZAKI TATSUYA)

東北大学・大学院歯学研究科・非常勤講師

研究者番号：90538638

### (2) 研究分担者

鈴木 治 (SUZUKI OSAMU)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：60374948

### (3) 連携研究者

穴田 貴久 (ANADA TAKAHISA)

東北大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：303984667