

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592230

研究課題名(和文) 培養骨髄細胞移植による骨組織再生技術 Runx2を活性化する薬剤の有用性の検討

研究課題名(英文) Bone regeneration using culture-expanded bone marrow cells-Efficacy of Runx2-activating drugs-

研究代表者

鬼頭 浩史(Hiroshi, Kitoh)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40291174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：網羅的な薬効スクリーニング法により、ランソプラゾールがRunx2プロモーター活性を上昇させるオフラベル効果があることを突き止めた。各種骨芽細胞系細胞において、ランソプラゾールは濃度依存性にRunx2のmRNA、タンパクの発現を促進した。また、骨形成マーカーであるアルカリフォスファターゼやオステリックスの発現も上昇させた。さらに、ヒト骨髄細胞の培養において、ランソプラゾールはアルカリフォスファターゼおよびアリザリンレッドの染色性を著しく上昇させた。In vivo実験では、ラット骨折モデルにランソプラゾールを経口投与したところ、ランソプラゾール投与により骨折部における類骨の形成が有意に上昇した。

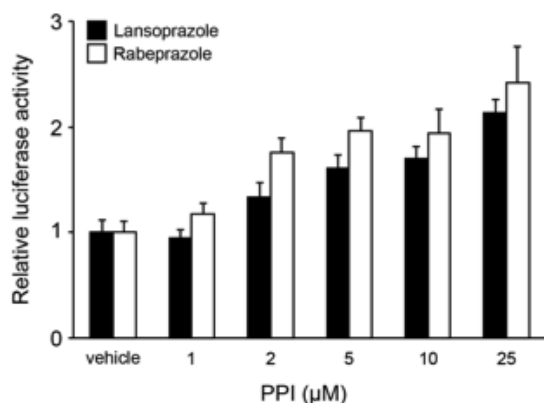
研究成果の概要(英文)：We screened for drugs that activate the Runx2 promoter and identified that lansoprazole, a proton pump inhibitor, upregulated the Runx2 activity. Lansoprazole elevated expression levels of Runx2 mRNA and protein in osteoblast-lineage cells in a dose-dependent manner. Lansoprazole exerted an increase of ALP and Osterix activities in osteoblast-lineage cells. Lansoprazole accelerated the matrix calcium deposition in human bone marrow derived osteoprogenitors. Systemic administration of lansoprazole to a rat fracture model increased osteoblastic parameters and facilitated fracture healing. We propose that lansoprazole holds promise as a therapeutic agent for bone regeneration at fracture sites.

研究分野：整形外科学

キーワード：Runx2 ランソプラゾール 骨組織再生 培養骨髄細胞

1. 研究開始当初の背景

我々はさまざまな基礎研究に基づき、骨延長術の延長部位に培養骨髄細胞と多血小板血漿を移植することにより、骨形成を促進させる細胞治療を開発した。また、細胞移植による骨形成能は、移植する培養骨髄細胞の骨型アルカリフォスファターゼ (BAP) 活性と相関することを示した。そこで、本法の治療効率をさらに向上させるためには、より骨芽細胞に分化した培養様細胞を効率的に獲得し得る培養条件の決定が重要であるとの発想に至った。次いで、骨芽細胞系列への分化に必須な転写因子 *Runx2* に着目して、*Runx2* を制御する薬剤を網羅的に検索した。既存薬を含む 1186 種類の化合物をルシフェラーゼアッセイによりスクリーニングしたところ、プロトンポンプ阻害剤であるランソプラゾールが *Runx2* 遺伝子のプロモーター活性を濃度依存性に上昇させることを確認した (下図)。



2. 研究の目的

ランソプラゾールの生体内外での骨分化能、骨形成能を評価するとともに、*Runx2* の発現を活性化するメカニズムを分子レベルで解明し、臨床応用への可能性を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 各種細胞におけるランソプラゾールの骨芽細胞分化能の評価

ヒト骨肉腫細胞株である human osteosarcoma (HOS)、マウス間葉系細胞株である C3H10T1/2 に対し、あらかじめ濃度勾配 (0.5 μM ~ 40 μM) をつけてランソプラゾールを添加して培養し、内因性の *Runx2* の発現を mRNA レベル (定量的 RT-PCR)、タンパクレベル (western blotting) で評価する。次いで *Runx2* のターゲット遺伝子であるアルカリフォスファターゼやオステオカルシンなどの骨形成マーカーの発現も mRNA レベル (定量的 RT-PCR)、タンパクレベル (western blotting、ELISA Kit) で評価する。さらに、ヒト骨髄間葉系幹細胞株である human mesenchymal stem cell (hMSC) や primary のヒト骨髄細胞をランソプラゾール

ールを添加したデキサメサゾン含有の骨芽細胞誘導培地で培養し、薬剤による骨芽細胞分化能の変化を経代毎に検討する。薬剤による活性化 *Runx2* タンパクの核内移行の上昇についても、核内タンパクに対する western blotting により確認する。

(2) ラット骨折モデルにおけるランソプラゾールによる骨形成能の評価

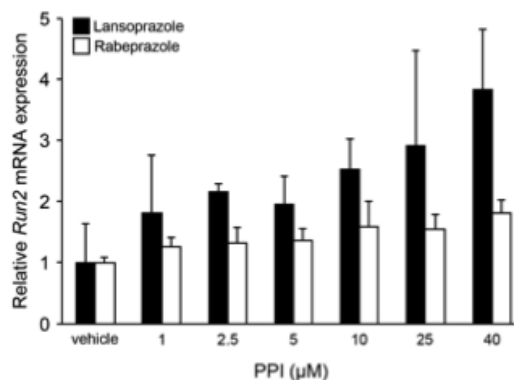
ラット大腿骨骨折モデルを作製し、10 ~ 20 μM のランソプラゾールを飲水に含ませて全身投与し、新生骨を経時的に X 線学的に評価する。また 12 週後に micro-CT で新生骨量を測定したのち、組織切片を作製して新生骨を組織学的 (HE 染色、von Kossa 染色、アルシアンブルー染色など) に評価する。

(3) 薬剤による *Runx2* 活性化メカニズムの解明

あらかじめランソプラゾールまたは vehicle を添加した hMSC 細胞に BMP-2 を投与し、0、15、30、60、120 分後に特異抗体を用いた western blotting にて p-Smad1/5/8 (BMP canonical pathway)、p-p38、p-Erk1/2 (BMP non-canonical pathway) を評価する。また、これら各種細胞内伝達分子のリン酸化阻害薬を用いた阻害実験も同様に行う。同時に *Runx2* プロモーターの serial deletion assay などを行い、薬剤が働く細胞内シグナル伝達経路の同定を試みる。

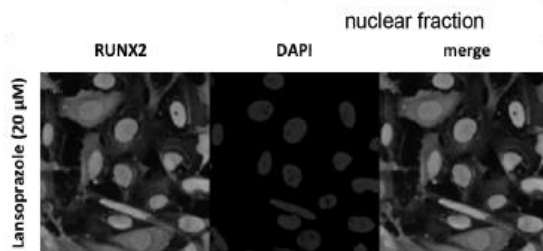
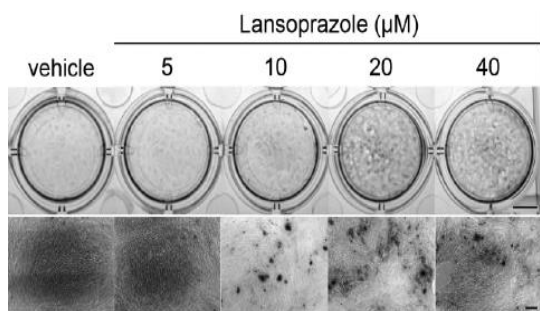
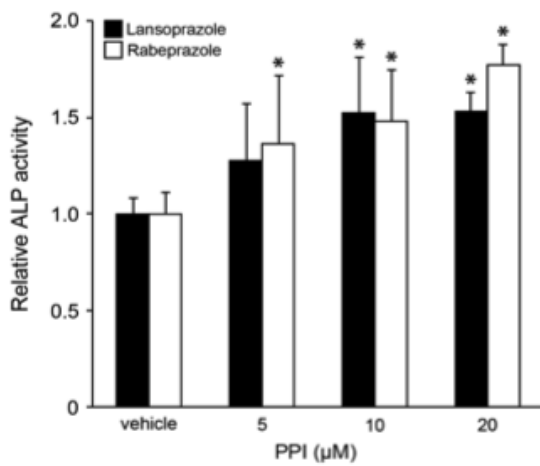
4. 研究成果

HOS、C3H10T1/2、およびヒトの骨髄由来間葉系幹細胞 (BM-MSC) において、ランソプラゾールは *Runx2* のプロモーター、mRNA およびタンパク発現を濃度依存性に上昇させた (下図)。また、*Runx2* のターゲット遺伝子である

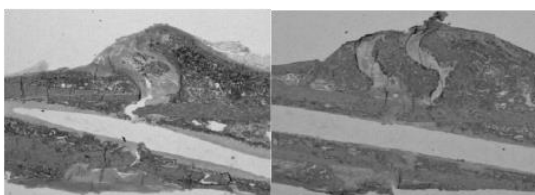


アルカリフォスファターゼ、オステリックスの発現も、ランソプラゾールの投与により濃度依存性に上昇した (事項左上図)。また、primary のヒト骨髄細胞を骨誘導培地にランソプラゾールを添加して培養したところ、最終骨分化の指標である基質の石灰化が薬剤によって亢進することをアリザリンレッド染色にて確認した (事項左中図)。さらに、免疫蛍光化学染色により、ランソプラゾールの添加により細胞質内に存在する *Runx2* タンパクの核内移行が亢進するこ

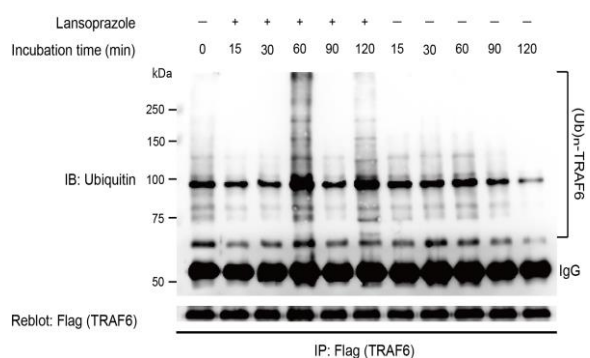
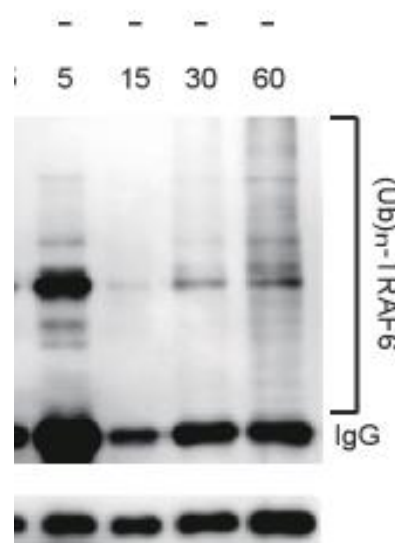
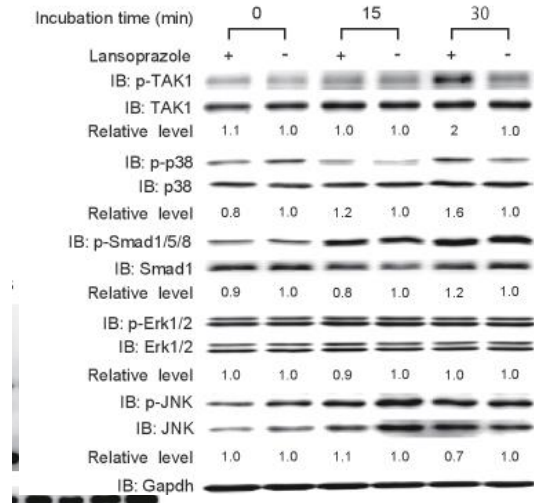
とを確認した (下図)。



ラット骨折モデルにおける *in vivo* 実験では、ランソプラゾールを4週間経口投与した群において、骨折部における仮骨架橋の形成促進を認めた (下図)。骨形態学的検討では、ランソプラゾールの投与により類骨形成が促進され、破骨細胞数は現象した。結果的に薬剤投与により骨癒合は促進した。



各種阻害剤を用いた細胞内シグナル実験では、ランソプラゾールはBMPのcanonical経路であるSmad1/5/8やErk1/2には影響を与えなかったが、noncanonical経路であるTAK1およびp38のリン酸化を促進した (上図、中図)。さらにこの経路の活性化は、TRAF6のpolyubiquitinationを介していることを証明し、canonical経路には依存しないことを確認した (下図)。



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 33 件)

1. Matsushita M, Kitoh H, Subasioglu A, Colak FK, Dundar M, Mishima K, Nishida Y, Ishiguro N. A glutamine repeat variant of the RUNX2 gene causes cleidocranial dysplasia. *Mol Syndromol* (in press), 2015 査読有
2. Olney RC, Prickett TCR, Espiner EA, Mackenzie WG, Duker A, Ditro C, Zabel B, Hasegawa T, Kitoh H, Aylsworth AS, Bober MB. C-type natriuretic peptide (CNP) plasma levels are elevated in subjects with achondroplasia, hypochondroplasia, and thanatophoric dysplasia. *J Clin Endocrinol Metab* (Epub ahead of print), 2015 査読有
3. Matsushita M, Hasegawa S, Kitoh H, Mori K, Ohkawara B, Yasoda A, Masuda A, Ishiguro N, Ohno K. Meclozine promotes longitudinal skeletal growth in transgenic mice with achondroplasia carrying a gain-of-function mutation in the FGFR3 gene. *Endocrinology* (in press), 2015 査読有
4. Mishima K, Kitoh H, Kadono I, Matsushita M, Sugiura H, Hasegawa S, Kitamura A, Nishida Y, Ishiguro N. Growth rate of leg length discrepancy aids in prediction of clinically-significant discrepancy in congenital disorders. *Orthopaedics* (in press), 2015 査読有
5. Hoover-Fong J, Sobreira N, Jurgens J, Modaff P, Blout C, Moser A, Kim OH, Cho TJ, Cho SY, Kim SJ, Jin DK, Kitoh H, Park WY, Ling H, Hetrick KN, Doheny KF, Valle D, Pauli RM. Mutations in PCYT1A, encoding a key regulator of phosphatidylcholine metabolism, cause spondylometaphyseal dysplasia with cone-rod dystrophy. *Am J Hum Genet* 94(1):105-112, 2014 査読有
6. Matsushita M, Kitoh H, Kaneko H, Mishima K, Itoh Y, Tokita Y, Ishiguro N. A novel in-flame deletion of the RUNX2 gene causes a classic form of cleidocranial dysplasia. *J Bone Miner Metab* 32(1):96-99, 2014 査読有
7. Matsushita M, Kitoh H, Michigami T, Tachikawa K, Kaneko H, Mishima K, Ishiguro N. Benign prenatal hypophosphatasia: a treatable disease not to be missed. *Ped Radiol* 44(3):340-343, 2014 査読有
8. Okabe YT, Kondo T, Mishima K, Hayase Y, Kato K, Mizuno M, Ishiguro N, Kitoh H. Biodistribution of locally or systemically transplanted osteoblast-like cells. *Bone Joint Res* 3(3):76-81, 2014 査読有
9. Mishima K, Kitoh H, Haga N, Nakashima Y, Kamizono J, Katagiri T, Susami T, Matsushita M, Ishiguro N. Radiographic characteristics of the hand and cervical spine in fibrodysplasia ossificans progressiva. *Intractable Rare Dis Res* 3(2):46-51, 2014 査読有
10. Matsushita M, Kitoh H, Mishima K, Nishida Y, Ishiguro N. A case of severe proximal focal femoral deficiency with overlapping phenotypes of Al-Awadi-Raas-Rothschild syndrome and Fuhrmann syndrome. *Ped Radiol* 44(12):1617-1619, 2014 査読有
11. Kitoh H, Kaneko H, Mishima K, Matsushita M, Kadono I, Nishida Y, Ishiguro N. Early and late fracture following extensive limb lengthening in achondroplasia and hypochondroplasia. *Bone Joint J* 96-B:1269-1273, 2014 査読有
12. Kaneko H, Kitoh H, Mishima K, Matsushita M, Izumi K, Naoki Ishiguro, Hattori T. Factors associated with an unfavourable outcome after Salter innominate osteotomy in patients with unilateral developmental dysplasia of the hip: Does occult dysplasia of the

- contralateral hip affect the outcome? Bone Joint J 96-B:1419-1423, 2014 査読有
13. Yamamoto R, Matsushita M, Kitoh H, Masuda A, Ito M, Katagiri T, Kawai T, Ishiguro N, Ohno K. Clinically applicable antiangiogenic agents suppress osteoblastic transformation of myogenic cells and heterotopic ossification in mice. J Bone Miner Metab 31(1):26-33, 2013 査読有
 14. Matsushita M, Kitoh H, Itomi K, Kitakoji T, Iwata K, Mishima K, Ishiguro N, Hattori T. Orthopaedic manifestations and diagnostic clues in children with Guillain-Barré syndrome. J Child Orthop 7:177-182, 2013 査読有
 15. Kitoh H, Kaneko H, Mishima K, Matsushita M, Ishiguro N. Prognostic factors for trochanteric overgrowth after containment treatment in Legg-Calvé-Perthes disease. J Pediatr Orthop B 22(5):432-436, 2013 査読有
 16. Nakajima M, Mizumoto S, Miyake N, Kogawa R, Iida A, Ito H, Kitoh H, Hirayama A, Mitsubuchi H, Miyazaki O, Kosaki R, Horikawa R, Lai A, Mendoza-Londono R, Dupuis L, Chitayat D, Howard A, Ferraz-Leal G, Cavalcanti D, Tsurusaki Y, Saitsu H, Watanabe S, Lausch E, Unger S, Bonafe L, Ohashi H, Superti-Furga A, Matsumoto N, Sugahara K, Nishimura G, Ikegawa S. Mutations in *B3GALT6* which encodes a glycosaminoglycan linker region enzyme cause a spectrum of skeletal and connective tissue disorders. Am J Hum Genet 92:1-8, 2013 査読有
 17. Kaneko H, Kitoh H, Mishima K, Matsushita M, Ishiguro N. Long-term outcome of gradual reduction using overhead traction for developmental dysplasia of the hip over 6 months of age. J Pediatr Orthop 33(6):628-634, 2013 査読有
 18. Kitoh H, Kitakoji T, Hattori T, Kaneko H, Mishima K, Matsushita M, Ishiguro N. A comparative study of blade plate fixation and external fixation in osteotomies for slipped capital femoral epiphysis. J Pediatr Orthop B 22(6):542-547, 2013 査読有
 19. Matsushita M, Kitoh H, Kaneko H, Mishima K, Kadono I, Ishiguro N, Nishimura G. A novel *SOX9* H169Q mutation in a family with overlapping phenotype of mild campomelic dysplasia and small patella syndrome. Am J Med Genet A 161(10):2528-2534, 2013 査読有
 20. Matsushita M, Kitoh H, Ohkawara B, Mishima K, Kaneko H, Ito M, Masuda A, Ishiguro N, Ohno K. Meclozine facilitates chondrocyte proliferation and differentiation by attenuating abnormally activated fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) signaling in achondroplasia. PLoS One 8(12):e81569, 2013 査読有
 21. Kitoh H, Achiwa M, Kaneko H, Mishima K, Matsushita M, Kadono I, Ishiguro N. Perhexiline maleate in the treatment of fibrodysplasia ossificans progressiva. An open-labeled clinical trial. Orphanet J Rare Dis 8:163, 2013 査読有
 22. Matsushita M, Kitoh H, Kaneko H, Mishima K, Itoh Y, Hattori T, Ishiguro N. Novel compound heterozygous mutations in the cathepsin K gene in Japanese female siblings with pyknodysostosis. Mol Syndromol 2(6):254-258, 2012 査読有
 23. Kaneko H, Kitoh H, Wasa J, Nishida Y, Ishiguro N. Chondroblastoma of the femoral neck as a cause of hip synovitis. J Pediatr Orthop (B) 21(2):179-182, 2012 査読有
 24. Kaneko H, Kitoh H, Mabuchi A, Mishima K, Matsushita M, Ishiguro N. Isolated bifid rib: Clinical and radiological findings in children. Pediatr Int 54(6):820-823, 2012 査読有
 25. Mabuchi A, Kitoh H, Kaneko H, Inoue M, Hayashi M, Ishiguro N, Suzuki N. The biomechanical effect of the sensomotor

insole on a pediatric intoeing gait. ISRN Orthop 2012:1-5, 2012査読有

[学会発表] (計 19 件)

- 1 鬼頭浩史、三島健一、松下雅樹、杉浦洋、石黒直樹. 骨髄幹細胞を用いた骨延長術. 第 87 回日本整形外科学会 2014. 5. 22-25 (兵庫県、神戸市、神戸国際会議場) シンポジウム
- 2 鬼頭浩史、三島健一、松下雅樹、杉浦洋、石黒直樹. 培養骨髄細胞と PRP の移植を併用した骨延長術. 第 87 回日本整形外科学会 2014. 5. 22-25 (兵庫県、神戸市、神戸国際会議場) シンポジウム
- 3 Hiroshi Kitoh, Hiroshi Kaneko, Kenichi Mishima, Masaki Matsushita, Naoki Ishiguro. Early and late fracture following lower limb lengthening. Annual meeting of Pediatric Orthopedic Society of North America 2014.4.30-5.3 (Los Angeles, USA)
- 4 Masaki Matsushita, Hiroshi Kitoh, Hiroshi Kaneko, Kenichi Mishima, Naoki Ishiguro. Meclozine facilitates proliferation and differentiation of chondrocytes by attenuating abnormally activated FGFR3 signaling in achondroplasia. Annual meeting of Pediatric Orthopedic Society of North America 2014.4.30-5.3 (Los Angeles, USA)
- 5 Hiroshi Kaneko, Hiroshi Kitoh, Kenichi Mishima, Masaki Matsushita, Naoki Ishiguro. A novel Sox9 H169Q mutation in a family with overlapping phenotype of mild campomelic dysplasia and small patella syndrome. 11th International Skeletal Dysplasia Meeting 2013.8.28-31 (Bologna, Italy)
- 6 Masaki Matsushita, Hiroshi Kitoh, Hiroshi Kaneko, Kenichi Mishima, Naoki Ishiguro, Kinji Ohno. Meclozine facilitates chondrocyte proliferation and differentiation by attenuating abnormally activated fibroblast growth factor

receptor 3 (FGFR3) signaling in achondroplasia. International Skeletal Dysplasia Meeting 2013.8.28-31 (Bologna, Italy)

- 7 Masaki Matsushita, Hiroshi Kitoh, Naoki Ishiguro, Kinji Ohno. Drug repositioning for inhibiting the FGFR3 signaling in the treatment of short stature in achondroplasia. 59th annual meeting of Orthopaedic Research Society 2013.1.26-29 (San Antonio, USA)
- 8 Hiroshi Kaneko, Hiroshi Kitoh, Kenichi Mishima, Masaki Matsushita, Naoki Ishiguro. Long-term outcome of gradual reduction with overhead traction for developmental dysplasia of the hip in children over six months of age. Annual meeting of Pediatric Orthopedic Society of North America 2013.5.1-4 (Toronto, Canada)
- 9 鬼頭浩史. 軟骨無形成症に対する治療の展望. 第 85 回日本整形外科学会 2012. 5. 17-20 (京都府、京都市、京都国際会館) シンポジウム
- 10 鬼頭浩史、金子浩史、三島健一、松下雅樹、石黒直樹. ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の細胞増殖能および骨芽細胞分化能 第 23 回日本小児整形外科学会 2012. 11. 30-12. 1 (福岡県、福岡市、九州大学医学部百年講堂)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 骨系統疾患治療薬及びその用途

発明者: 大野欽司、石黒直樹、鬼頭浩史、松下雅樹

権利者: 名古屋大学

種類: 用途特許

番号: PCT/JP2014/054023

出願年月日: 2014 年 2 月 20 日

国内外の別: 国内外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鬼頭 浩史 (Kitoh Hiroshi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 40291174

(2) 研究分担者

なし