

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670817

研究課題名(和文)骨-神経系に作用する受容体を標的とする新たな歯槽骨吸収抑制方法の開発

研究課題名(英文)Development of the new method to control the resorption of alveolar bone, targeting receptor acting on bone - nervous system

研究代表者

矢谷 博文 (YATANI, HIROFUMI)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80174530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：抜歯、歯周病に起因する歯槽骨吸収を抑制し、失われてしまった歯槽骨を再生することは補綴歯科治療の良好な予後のために非常に重要な課題である。本研究の目的は、ケミカルバイオロジーのアプローチから破骨細胞の分化を制御する小分子化合物を探索し、その分子標的を明らかにすることで、新たな歯槽骨吸収抑制技術の基盤を創成することである。スクリーニングの結果、破骨細胞分化を促進する化合物として、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤が検出された。さらにアセチルコリン受容体に対する阻害剤を用いた実験を行なった結果、7-ニコチン性アセチルコリン受容体の阻害剤であるMLAは特異的かつ強力に破骨細胞の形成を抑制した。

研究成果の概要(英文)：Severe resorption of alveolar bone after tooth loss/extraction, makes it difficult to restore the missing teeth with dental implants or prosthodontic approaches. Bone resorption is the unique function of the osteoclast, and anti-resorption therapy to date has targeted this cell. Objectives of this study is to investigate the involvement of MLA in osteoclastogenesis. MLA significantly inhibited the formation of TRAP-positive multinucleated osteoclasts in a concentration-dependent manner. These results suggest, that MLA suppresses osteoclastogenesis and that application of MLA enables to promote new bone formation. These findings represent MLA may be useful for therapeutic strategies against alveolar bone resorption in prosthetic treatments.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：破骨細胞 骨吸収抑制 コリン作動系

1. 研究開始当初の背景

抜歯、歯周病に起因する歯槽骨吸収を抑制し、失われてしまった歯槽骨を再生することは補綴歯科治療の良好な予後のために非常に重要な課題である。歯槽骨の吸収を担うのは活性化された破骨細胞であり、これを防ぐためには破骨細胞の分化・形成を抑制する技術が必要である。破骨細胞をターゲットとした骨吸収抑制剤には、エストロゲン製剤、ビスフォスフォネート製剤などが開発されてきたが、副作用も存在し、歯槽骨の吸収抑制に適した薬剤は未だないのが現状である。

ポストゲノム時代の新しい研究領域であるケミカルバイオロジーの戦略とは、化学(小分子化合物)を推進力として、広範なケミカルライブラリーを活用し、スクリーニングシステムを構築し、生命現象を解明することにより創薬の基盤科学を築くことである。そこで、本研究代表者は、多数の化合物の中から、破骨前駆細胞の破骨細胞分化を制御し、かつ骨形成促進作用を有する化合物を絞り込むためには効率的なスクリーニングシステムの構築が必要となると考えた。

2. 研究の目的

本研究計画では、ケミカルバイオロジーのアプローチから破骨細胞の分化を制御する小分子化合物を探索し、その分子標的を明らかにすることで、新たな歯槽骨吸収抑制技術の基盤を創成するために、以下の項目を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 破骨前駆細胞 (RAW264.7 細胞) から樹立した NFAT/ルシフェラーゼレポーター遺伝子安定発現株を用いて、1280 種類の小分子化合物を含む LOPACK¹²⁸⁰ ライブラリーのスクリーニングを行なう。

(2) 同定した候補化合物が破骨細胞分化に及ぼす影響を明らかにするため、これらの化合物を RANKL とともに RAW 細胞に添加し、5~6 日後に TRAP 染色を行い、陽性の多核細胞数を計測する。

(3) 上記実験より示唆された Ach が破骨細胞分化に関与しているという仮説を検証するため、破骨細胞に対する各種 ACh 受容体に対する阻害剤を用いた破骨細胞分化誘導実験を行なう。これにより破骨細胞分化に関与している ACh 受容体を探索する。

4. 研究成果

(1)

小分子化合物ライブラリースクリーニングシステムを用いた解析から、NFAT 活性を促進する化合物として、コリンエステラーゼ阻害薬である Phenserine および Donepezil を見出した。(図 1)

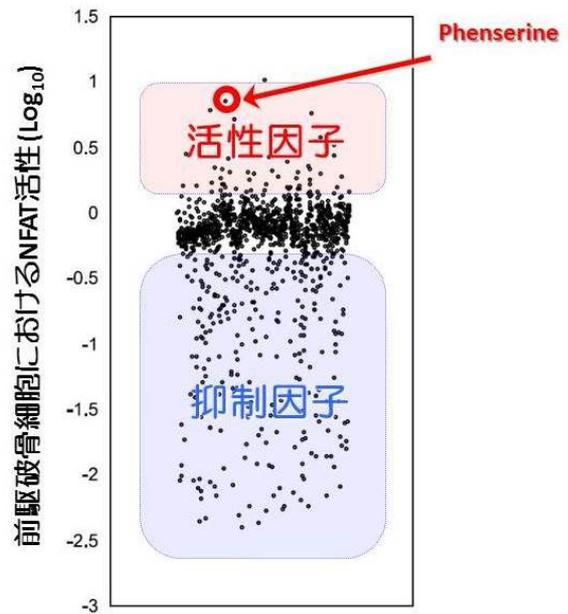


図 1. ライブラリースクリーニングシステム解析により NFAT 活性を促進する化合物

(2)

同定した化合物と RANKL の添加による破骨細胞分化誘導実験の結果、Phenserine および Donepezil は、TRAP 染色陽性の多核細胞を有意に減少させ、破骨細胞分化を抑制した。(図 2)

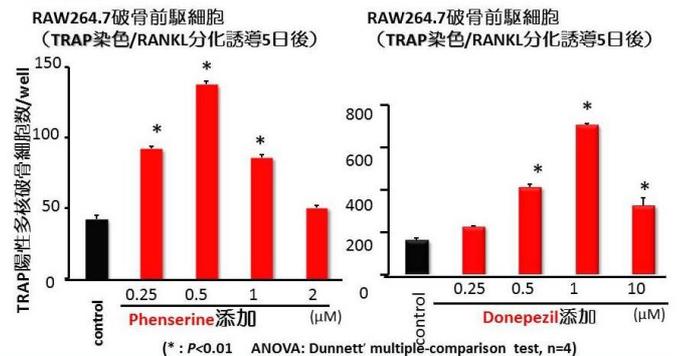


図 2. 候補化合物が破骨細胞分化に及ぼす影響

以上の結果から、破骨細胞には神経系と同様にコリン差動系の細胞分化調節機構が備わっている可能性が示唆された。

(3) ムスカリン性 ACh 受容体の阻害剤 (スコポラミン), 筋肉型ニコチン性 ACh 受容体の阻害剤 (ツボクラリン) および α4β2-ニコチン性 ACh (nACh) 受容体の阻害剤 (DHE) は破骨細胞の分化抑制作用をほとんど示さなかった (図 3)。それに対して、α7-nACh 受容体の阻害剤である MLA は特異的かつ強力に破骨細胞の形成を抑制した。(図 4)

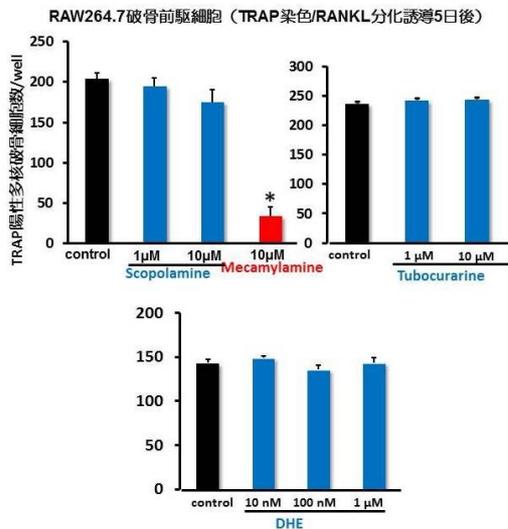


図3 .各種 Ach 受容体阻害剤の破骨細胞分化への影響

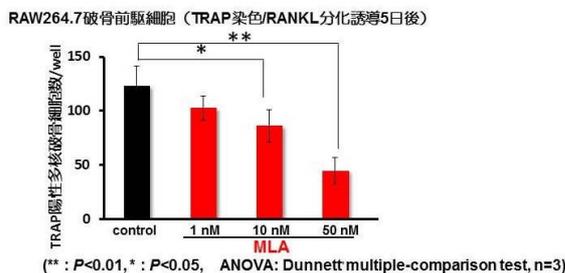


図4 . MLA の破骨細胞分化への影響

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 3 件)

1 .
Nagao S, Goto T, Kataoka S, Toyono T, Joujima T, Egusa H, Yatani H, Kobayashi S, Maki K.
Expression of neuropeptide receptor mRNA during osteoblastic differentiation of mouse iPS cells.
Neuropeptides, 48(6): 399-406, 2014.

2 .
Egusa H
Increasing diversity in prosthodontic research
J Prosthodont Res, 58(4): 191-192, 2014.

3 .
佐伯万騎男, 江草 宏
骨形成促進薬の開発に向けた新たな戦略 — 副甲状腺ホルモン, リチウム, ケンパウロン

日本薬理学雑誌 : 144(6) : 277-280 : 2014 .

〔学会発表〕(計 3 件)

1 .
第 31 回日本骨代謝学会 (2013.5.30, 神戸)
神経型 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体は破骨細胞の分化調整に關与する。
江草 宏, 佐伯万騎男, 矢谷博文

2 .
第 69 回日本口腔科学術集会 (2015.5.13, 大阪) シンポジウム「再生医療の最前線」
歯科医療における再生医療の動向と展望
江草 宏

3 .
日本組織培養学会第 88 回大会 (2015.5.27, 広島) シンポジウム「臨床のための細胞培養」
歯科領域における再生医療の動向と展望
江草 宏

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称 : 破骨細胞が關与する疾患の予防剤または治療剤
発明者 : 江草 宏, 佐伯万騎男, 上崎善規, 矢谷博文

権利者 : 同上

種類 : 特許

番号 : PCT/JP2013/81948

出願年月日 : 2013 年 11 月 27 日

国内外の別 : 外国

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

江草 宏 (EGUSA HIROSHI)

東北大学大学院歯学研究科・教授

研究者番号：30379078