

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31日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390364

研究課題名（和文） ケミカルバイオロジーに基づいた骨形成促進剤の開発に向けた戦略的研究

研究課題名（英文） Development of cell-based screening system for identifying osteogenesis-targeting compounds

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

研究成果の概要（和文）：

破骨細胞あるいは骨芽細胞の分化に作用する新規小分子化合物の探索は、新たな歯槽骨の吸収抑制あるいは再生医療技術に結びつく可能性がある。本研究で我々は、NFAT/ルシフェラーゼレポーター破骨細胞前駆細胞およびI型コラーゲン/GFPレポーター骨芽細胞を用いたハイスループットスクリーニングシステムを構築し、これらのスクリーニングシステムを用いることで、破骨細胞あるいは骨芽細胞の分化に作用する小分子化合物を高い信頼性をもって検出することに成功した。これらの成果は、今後の骨形成を促進する新規化合物の開発に貢献するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：

Small-molecule compounds that potently affect osteoclastogenesis or osteogenesis could form the basis for effective therapeutic strategies for alveolar bone regenerative medicine. In this study, we established osteoclast progenitor cell (NFAT/luciferase reporter cell)- or osteoblast (type I collagen/GFP reporter cell)-based high-throughput screening systems. These screening systems could identify candidates for osteoclastogenesis- or osteogenesis-targeting compounds in reliable manner, thus making it a promising tool for finding novel synthetic regulators of bone formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2011年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2012年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：ケミカルバイオロジー・小分子化合物・骨芽細胞・破骨細胞・骨組織再生

1. 研究開始当初の背景

抜歯、歯周病等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。

骨組織は、骨吸収を司る破骨細胞と、骨形成を担う骨芽細胞のバランスの上に成り立っているため、新たな骨形成促進剤には、骨

芽細胞・破骨細胞双方に有利に作用する効果が期待される。また、既存の骨形成因子(BMP, エムドゲイン等)のタンパク質細胞シグナル分子の臨床応用には、安定化、動物由来、コストなどいくつかの解決すべき課題が残るが、同様の作用をもつ小分子化合物が開発できれば、それらの課題の多くをより容易に解決できると期待される。

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。

これまでに我々は、破骨細胞分化に重要な役割をする NFAT 活性を指標としたルシフェラーゼレポーター破骨細胞株の樹立に成功している(図1)。

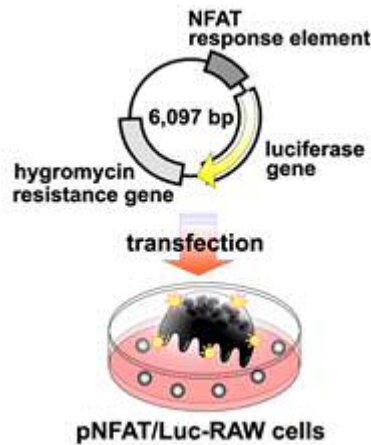


図1：NFAT レポーター破骨細胞株の作製 (Egusa et al. Bone, 2011)

この細胞株は、分化誘導によって NFAT 活性を著明に亢進し、これに伴って発光するルシフェラーゼは発光プレートリーダーによって簡単に測定可能であり、非常に感度、再現性が高い。

本研究の提案にあたり我々は、化合物ライブラリーから骨形成を促す分子を簡便に見出すために、破骨細胞レポーター株に加えて骨芽細胞レポーター株を用いたスクリーニングシステムを構築したうえで、効率的にヒット化合物の作用機序を解明する戦略を着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、破骨細胞・骨芽細胞レポーター株によるスクリーニングシステムを構築し、小分子化合物ライブラリーから骨形成を促進する分子を同定し、治療薬として臨床応用へと展開するための研究基盤を確立することである。

3. 研究の方法

- (1) NFAT 活性を指標としたルシフェラーゼレポーター破骨細胞株を用いて、オーファンリガンドおよび LOPAC¹²⁸⁰ 小分子化合物ライブラリーのスクリーニングを行った。
- (2) 骨芽細胞分化の初期マーカー分子である I 型コラーゲンを指標とした GFP レポーター骨芽細胞前駆細胞株(東京大学・鄭雄一教授より供与)を用いて、信頼性の高いライブラリースクリーニングシステムの構築を試み、LOPAC¹²⁸⁰ 小分子化合物ライブラリーのスクリーニングを行った。

4. 研究成果

- (1) NFAT レポーター破骨細胞株を用いたオーファンリガンドライブラリーのスクリーニングから、破骨細胞活性に関わる因子としてハルミンを特定した。

破骨細胞に対するハルミンの作用機序を検討した結果、ハルミンは NFATc1 のリン酸化酵素である DYRK1A を阻害することで破骨細胞前駆細胞の NFATc1 の発現を促進するが、同時に分化制御因子 Id2 の発現を著明に促進することによって、結果的に破骨細胞形成を抑制していることが明らかとなった(図2)。

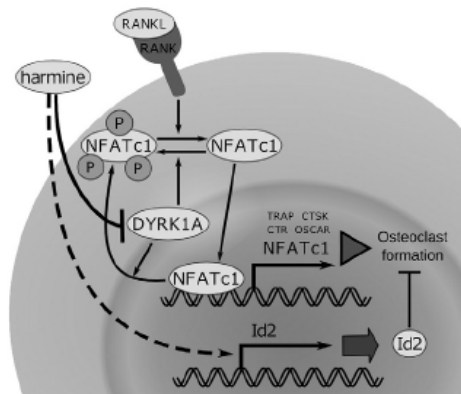


図2 ハルミンの破骨細胞分化抑制作用機序 (Egusa et al. Bone, 2011)

また、ハルミンは試験管内の実験では骨芽細胞に対して石灰化を促進する作用を有している可能性が示唆されており、今後この化合物が骨吸収抑制剤として利用できる可能性が期待される。

- (2) NFAT レポーター破骨細胞株を用いた LOPAC¹²⁸⁰ ライブラリーのスクリーニングから、破骨細胞活性に関わる因子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。また、神経型 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体の特異的阻害薬である

Methyllycaconitine は、破骨細胞形成を強力に抑制したことから、破骨細胞分化調節においてアセチルコリン系に類似した分子機構が関与している可能性が示唆された。

- (3) 化合物の存在下で培養した I 型コラーゲン/GFP レポーター骨芽細胞前駆細胞株の GFP を検出すると同時に、骨芽細胞分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を染色によって検出し、結果を比較検討することで、骨芽細胞分化促進化合物を簡便で高い精度でスクリーニングを可能にするシステムを構築した。

- (4) 構築したスクリーニングシステムを用いた LOPAC¹²⁸⁰ ライブラリーのスクリーニングから、骨芽細胞分化に促進的に作用するいくつかの化合物を同定した。

得られた骨形成促進因子候補化合物のなかで、スクリーニング結果から骨芽細胞分化を促進する可能性の高いものを選択し、実際に骨芽細胞の分化に作用するか否かを、前駆骨芽細胞株 (MC3T3-E1 株) を用いて、ALP 染色および骨芽細胞分化特異的遺伝子発現 (リアルタイム RT-PCR 法) について評価した。その結果、ヒット化合物候補は著明に前駆骨芽細胞の骨芽細胞分化を促進することが明らかとなった。また、候補化合物を頭蓋骨欠損ラット実験モデルに投与し、術後 21 日後の骨組織再生を、HE 染色およびマイクロ CT 画像解析により評価した。その結果、頭蓋骨欠損部位への候補化合物の投与は、骨組織体積および骨塩量を有意に増加させた。

以上の結果から、本研究で構築したスクリーニングシステムは、骨芽細胞分化促進因子の検出を良好な信頼度で可能とすることが示唆された。今後、本研究で得たヒット化合物が標的とする骨芽細胞内の分子機構を明らかにし、各化合物の薬理活性を化学的な修飾によって向上することで、骨再生医療への創薬へつながることが期待される。

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 4 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: 10.1016/j.bone.2011.04.003

- ② Shimada K, Saeki M, Egusa H, Fukuyasu S, Yura Y, Iwai K, Kamisaki Y. RPAP3 enhances cytotoxicity of doxorubicin by impairing NF-kappa B pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 404(4):910-914, 2011. (査読有)

doi: 10.1016/j.bbrc.2010.12.071

- ③ Inoue M, Saeki M, Egusa H, Niwa H, Kamisaki Y. PIH1D1, a subunit of R2TP complex, inhibits doxorubicin induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 403(3-4):340-344, 2010. (査読有)

doi: 10.1016/j.bbrc.2010.11.031

- ④ 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)

doi:10.1016/S1349-0079(10)80039-8

[学会発表] (計 9 件)

- ① 江草 宏, 佐伯万騎男, 矢谷博文. 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節に関与する. 第 31 回日本骨代謝学会, 2013 年 5 月 30 日 (神戸).
- ② 福安 翔, 江草 宏, 矢谷博文. 化合物ライブラリーを用いた骨再生を促進する新規化合物の探索. 第 122 回日本補綴歯科学会学術大会, 2013 年 5 月 18 日 (福岡).
- ③ 水田亜希子, 佐伯万騎男, 江草 宏, 高田健治, 上崎善規. 破骨細胞の分化を誘導する小分子化合物の探索. 第 114 回大阪大学歯学会例会, 2012 年 7 月 5 日 (大阪).
- ④ 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).
- ⑤ 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).
- ⑥ 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).
- ⑦ 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).
- ⑧ 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 (米国 San Diego) .

- ⑨ 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 (スペイン Barcelona) .

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 破骨細胞が関与する疾患の予防剤又は治療剤

発明者: 江草 宏, 佐伯万騎男, 上崎善規, 矢谷博文

権利者: 大阪大学

種類: 特許権

番号: 特願 2012-266070

出願年月日: 2012年12月5日

国内外の別: 国内

[その他]

学術賞受賞

- ① 福安 翔. 第122回日本補綴歯科学会課題口演優秀賞 (演題: 化合物ライブラリーを用いた骨再生を促進する新規化合物の探索), 2013年5月18日.
- ② 江草 宏. 国際歯科研究学会 (IADR) Distinguished Scientist Award (Young Investigator Award), 2012年6月20日.
- ③ 江草 宏. 大阪大学功績賞, 2011年8月1日.
- ④ 福安 翔. Finalist, IADR Arthur R. Frechette 若手歯科補綴学研究者賞 (演題: Cell-based double-screening method to identify reliable candidate for osteogenesis targeting compounds), 2011年3月16日.
- ⑤ 福安 翔. 1st Place Winner, IADR Pre-Prosthetic Regenerative Science Award (演題: Dual function of small-molecule compound harmine on osteogenesis and osteoclastogenesis), 2010年7月14日.

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)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 30379078

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) 研究協力者

福安 翔 (FUKUYASU SHO)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号: 10711054