

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 25 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15683

研究課題名(和文)「急がば回れ」の骨再生：骨吸収促進薬を用いた新規骨疾患治療薬の探索

研究課題名(英文)Osteoclast activator: a promising therapeutic target for osteoporosis

研究代表者

佐伯 万騎男(SAEKI, Makio)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：30273692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：様々な骨吸収抑制薬が骨粗鬆症治療薬として臨床応用されているが、骨形成も同時に抑制され、効果が得られない症例が報告されている。その原因として、いまだ詳細が明らかでない破骨細胞と骨芽細胞のカップリング機構の存在を想定することができる。本研究では、カップリング機構を逆にとり、破骨細胞分化に影響を与える化合物のスクリーニングを行い、破骨細胞活性化薬の中から、新しいタイプの骨形成促進薬としてケンパウロンを発見した。ケンパウロンは破骨細胞分化のマスター遺伝子であるNFATを活性化するとともにRANKL依存性の破骨細胞分化を著明に促進した。ラット頭蓋骨の欠損モデルにおいて、ケンパウロンは骨再生を促進した。

研究成果の概要(英文)：Small molecule compounds that potently affect osteoclastogenesis could be useful as chemical probes for elucidating the mechanisms of various biological phenomena, and as effective therapeutic strategies against bone resorption. An osteoclast progenitor cell-based high-throughput screening system was designed to target activation of nuclear factor of activated T cells (NFAT), which is a key event for osteoclastogenesis. Chemical compound library screening using this system identified kenpaulone, to be an NFAT regulator in osteoclasts. Kenpaulone promoted receptor activator for NF- $\beta$  ligand (RANKL)-induced NFAT activity in RAW264.7 cells and also promoted the formation of TRAP-positive multinucleated osteoclasts from RAW264.7 cells and mouse primary bone marrow macrophages (BMMs) in a concentration-dependent manner.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：骨再生 破骨細胞 骨吸収

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、抜歯、歯周病等に起因する歯槽骨吸収亢進メカニズムの解明やその治療薬の開発をめざし、破骨細胞分化に影響を与える低分子化合物のスクリーニングを NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) シグナル伝達系の活性化を指標として行なってきた。このスクリーニングによって NFAT シグナル伝達系を顕著に活性化する化合物を数十種類単離してきた。そのひとつである Harmine: ハルミンについて解析を行ったところ、Harmine が、NFAT 抑制因子である DYRK1A (Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A) を阻害することで NFAT を活性化することを報告した (佐伯ら、*Bone*, 2011)。その後、非常に興味深いことに、Harmine が破骨細胞分化を活性化するにも関わらず、骨形成を促進することが他のグループから報告された (*BBRC*, 2011)。これらのことは、破骨細胞活性化薬が、いわゆる破骨細胞と骨芽細胞のカップリング機構によって骨芽細胞による骨形成が亢進する可能性を示唆しており、申請者がすでに単離している化合物の中にはこのような活性を示すものが含まれている可能性がある。

### 2. 研究の目的

ビスホスホネートをはじめ様々な骨吸収抑制薬が骨粗鬆症治療薬として臨床応用されているが、このタイプの薬によっては骨形成も同時に抑制され、効果が得られない症例が報告されている。その原因として、いまだ詳細が明らかでない破骨細胞と骨芽細胞のカップリング機構の存在を想定することができる。

本研究では、そのカップリング機構を逆にとり、破骨細胞分化に影響を与える低分子化合物のスクリーニングを行い、破骨細胞活性化薬の中から、新しいタイプの骨形成促進薬を探索する。

### 3. 研究の方法

申請者らが開発した破骨細胞 NFAT レポーター株を用い、ルシフェラーゼアッセイにより大規模な化合物ライブラリーのスクリーニングを行う。化合物ライブラリーは、申請者らが所有している LOPAC ライブラリー (1280 種化合物; Sigma 社) を用いる。

ケンパウロンの破骨細胞への作用機序を明らかにする。

マウス骨髄を用いた破骨細胞分化への影響: スクリーニングでは RAW264.7 株を使用したため、骨髄由来細胞でも同様な破骨細胞分化が活性化されるのか調べる。ケンパウロン / ROCK 阻害剤存在・非存在下で M-CSF、RANKL により分化誘導し、4 日後に細胞を固定後、TRAP 染色し、評価する。

### 4. 研究成果

申請者らは、骨粗鬆症などに見られる骨リモデリング破綻の解明とその治療薬の開発をめざし、破骨細胞分化に影響を与える低分子化合物のスクリーニングを行ってきた。現在進行中の萌芽研究で、マウス前駆破骨細胞 (RAW264.7) に分化のマスター転写遺伝子 NFAT を導入して確立した迅速スクリーニングを行った結果、破骨細胞分化を促進する化合物として GSK-3 阻害剤のケンパウロンを見出し、これまでに以下のことを明らかにした。

ケンパウロンは、

破骨細胞分化のマスター転写因子である NFATc1 の活性を亢進させる。次ページ図に示すように、RAW264.7 細胞の RANKL 依存性 NFAT ルシフェラーゼ活性を約 10 倍増強した (*BB reports*, 2016)。

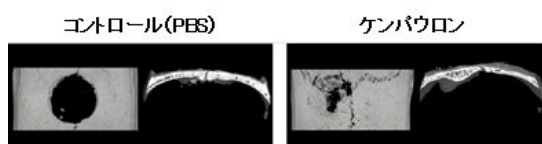
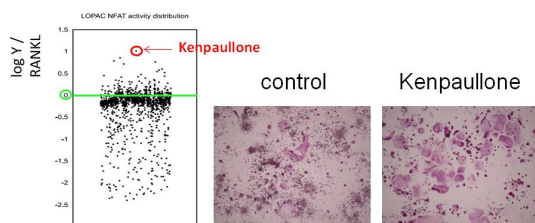
破骨細胞分化を促進する。マウス骨髄を用いた TRAP 染色の結果を下図に示す (*BB reports*, 2016)。骨芽細胞分化には影響しなかった (マウス骨髄、MC3T3、ST2 細胞を用いた結果)。

ラット頭蓋骨欠損部位の骨組織再生を促進したページ下段、未発表データ)。

ケンパウロン処置 RAW264.7 細胞の上清が、ST 細胞を用いた骨芽細胞分化を促進した。平成 28 年に新たに GE 社 AKTA pure25 (クロマトグラフィーシステム) を導入し、ゲル濾過カラムにより培養上清を分離する系を確立した。

破骨分化促進までの結果 (上記 まで) をまとめて、*BB reports* 5, 253-258. (2016) に報告した。

また、マングローブの内生菌から発見された新規 GSK-3 阻害剤の破骨細胞分化促進作用について共同研究を行い、*Phytochemistry Letters* 18, 122-127. (2016) に発表した。



## 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 4 件)

GSK-3 $\beta$  inhibitory activities of novel dichlororesorcinol derivatives from *Cosmosporavilior* isolated from a mangrove plant. Shiono, Y, Miyazaki, N, Murayama, T, Koseki, T, Harizon, Katja, DG, Supratman, U, Nakata, J, Kakahara, Y., Saeki, M., Yoshida, J, Uesugi, S, and Kimura, K. (査読有) *Phytochemistry Letters*. 18, 122-127. (2016)

The inhibitors of cyclin-dependent kinases and GSK-3 $\beta$  enhance osteoclastogenesis.

Akiba Y, Mizuta A, Kakahara Y., Nakata J, Nihara J, Saito I, Egusa H, and Saeki M. (査読有) *BB reports* 5, 253-258. (2016)

Gingival Fibroblasts as Autologous Feeders for Induced Pluripotent Stem Cells.

Yu, G, Okawa, H, Okita, K, Kamano, Y, Wang, F., Saeki, M. Yatani, H, and Egusa, H. *J Dent Res* (査読有) 95(1), 110-8. (2016)

Controlled Osteogenic Differentiation of Mouse Mesenchymal Stem Cells by Tetracycline-Controlled Transcriptional Activation of Amelogenin

Wang, F, Okawa, H, Kamano, Y, Kayashima, H, Osathanon, T, Pavasant, P, Saeki, M. Yatani, H, and Egusa, H.

*PLoS One* (査読有) 10(12), e0145677. (2015)

〔学会発表〕(計 9 件)

柿原嘉人、中田樹里、清川裕貴、山下直行、佐藤宏樹、佐伯万騎男：The screening of physiologically-functional ingredients that prevent osteoporosis. 健康と食品に関する新潟国際会議 2016、朱鷺メッセ(新潟県、新潟市)、2016 年 11 月 10-11 日

中田樹里、柿原嘉人、秋葉陽介、丹原惇、齋藤功、佐伯万騎男：破骨細胞分化に影響を与える薬剤のスクリーニングとその作用機序の解析. 第 34 回日本骨代謝学会学術集会, 国際会議場(大阪府、大阪市), 2016 年 7 月 21-23 日

柿原嘉人、山崎学、木口哲郎、佐伯万騎男：口腔扁平上皮癌進展における分子シヤペロン R2TP の作用機序の解析. 第 58 回歯科基礎医学会, コンベンションセン

ター(北海道、札幌), 2016年8月24-26日

木口哲郎、柿原嘉人、山崎学、永田昌毅、高木律男、佐伯万騎男: リボソーム合成制御因子 R2TP の口腔扁平上皮癌進展における作用機序の解析. 第 67 回日本薬理学会北部会, 北海道大学学術交流会館(北海道、札幌), 2016年9月30日

盛林昭仁、萱島浩輝、佐伯万騎男、矢谷博文、江草宏: 7 ニコチン性アセチルコリン受容体拮抗薬が骨代謝に及ぼす影響. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会、朱鷺メッセ(新潟県、新潟市)、2015年9月11-13日

柿原嘉人、山崎学、佐伯万騎男: 分子シャペロン R2TP complex は、口腔扁平上皮癌の進展にどのように関わるか? -酵母からがん研究へ-、第 57 回歯科基礎医学会学術大会、朱鷺メッセ(新潟県、新潟市)、2015年9月11-13日

中田樹里、柿原嘉人、秋葉陽介、丹原惇、齋藤功、江草宏、佐伯万騎男: 破骨細胞分化に影響を与える薬剤のケミカルライブラリースクリーニング. 第 6 回日本薬理学会北部会、富山国際会議場(富山県、富山市) 2015年9月18日

中田樹里、柿原嘉人、丹原惇、齋藤功、江草宏、佐伯万騎男: 破骨細胞分化に影響を与える薬剤の探索. 第 33 回日本骨代謝学会学術集会、京王プラザ(東京都、新宿区) 2015年7月23-25日

柿原嘉人、中田樹里、清川裕貴、山下直行、塩野義人、佐伯万騎男: 破骨細胞分化を調節する新規低分子化合物の探索、

第 89 回 日本薬理学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市) 2016年3月9-11日

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

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

取得状況(計 0件)

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

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.dent.niigata-u.ac.jp/pharmacology/pharmacology.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐伯 万騎男 (SAEKI, Makio)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号: 30273692

### (2) 研究分担者

柿原 嘉人 (KAKIHARA, Yoshito)  
新潟大学・医歯学系・助教  
研究者番号: 40379938

### (3) 連携研究者

芳澤 享子 (YOSHIZAWA, Michiko)  
松本歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号: 60303137

### (4) 研究協力者

秋葉 陽介 (AKIBA, Yosuke)  
新潟大学・医歯学総合病院・講師  
研究者番号: 70547512