

令和元年6月21日現在

機関番号：31602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11486

研究課題名(和文) イメージング技術を駆使した炎症性骨破壊と修復過程の評価 治療薬開発を目指して

研究課題名(英文) Evaluation of potency of bone-protective candidates using various imaging techniques.

研究代表者

鈴木 恵子 (Suzuki, Keiko)

奥羽大学・歯学部・教授

研究者番号：50119187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：骨粗鬆症や歯周病での炎症性骨破壊は、加齢にともなって発症する骨代謝疾患であり、酸化ストレスが病態に大きく関与することが知られている。本研究で骨代謝疾患治療薬としての有効性を検討した新規ビスホスホネートMPMBPと植物由来成分であるアントシアニンは、いずれも強い抗酸化作用をもつ化合物であり、骨吸収抑制作用のみならず骨形成促進作用を発揮することで、新しい骨を造る治療薬として臨床応用できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床現場で頻用されている第3世代ビスホスホネートは、強力な骨量増加作用をもつためにきわめて有用であるが、顎骨壊死・非定型大腿骨骨折などの重大な副作用が報告されている。本研究で新規開発を目指したMPMBPは抗酸化性側鎖をもつビスホスホネートであることから、NF-kappaB核移行抑制を介した骨芽細胞活性化により骨密度を上昇させるだけでなく、酸化ストレス軽減による骨質改善作用が認められた。すなわち、みずみずしく、しなやかな骨が形成されることが予想され、糖尿病や慢性腎不全患者にみられるような脆弱性骨折リスクをも減少させる全く新しいタイプの骨代謝疾患治療薬として臨床応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bisphosphonates (BPs) have been widely used as anti-resorptive agents in metabolic bone diseases. MPMBP is a novel non-nitrogen-containing BP with an antioxidant side chain that possesses anti-inflammatory properties. Since inflammation is known to be a cause of the pathological bone resorption, we investigated the effects of MPMBP on bone metabolism using imaging techniques. The results showed that: i) MPMBP increased the mRNA expression of ALP, COL-1, OCN, and BSP in MC3T3-E1 cells, ii) MPMBP inhibited the translocation of NF- κ B/p65 to the nuclei in osteoblasts, iii) local injection of MPMBP to alveolar bone induced increases in both the bone mass and thickness of alveolar bone at the local site of injection in rabbits. Taken together, these findings suggest that MPMBP is a promising agent to prevent bone loss, or even accelerate new bone formation, through inducing an uncoupling between bone resorption and bone formation, which is preferable to maintain bone mass and quality.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：炎症性骨破壊 イメージング 骨代謝 ビスホスホネート アントシアニン 抗酸化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症や歯周病での炎症性骨破壊は、加齢にともなって発症する骨代謝疾患である。現在、健康寿命延伸を目的に、失われた骨組織を修復して、骨折を予防するための補助療法として薬物治療が行われている。しかし、臨床現場で使用できる治療薬は骨吸収抑制薬を主体としていることから、骨吸収と骨形成のカップリング（骨代謝回転）を低下させることにより骨の再生・修復を遅らせ、その結果、硬くて脆い骨になることが危惧される。

骨強度には骨密度だけでなく、骨構造、マイクロダメージ、石灰化度、コラーゲン配向性などで評価される骨質も関係することが明らかにされ、骨強度の30%が骨質に依存するといわれている。骨粗鬆症治療薬使用によって骨密度が増しているのに、骨折を予防できないケースが半分くらいあるという深刻な事態を打開するためには、骨質悪化の原因とその解決策を見出す必要がある。一方で、現在、臨床で使用できる唯一の骨形成促進薬であるテリパラチドの骨密度増加効果はビスホスホネート (BP) 製剤と比較しても優れており、椎体骨折に対する予防効果が示されている。しかし、投与期間が2年まで、と定められている。このような現状から、骨吸収抑制作用をもちながら、骨リモデリングを抑制しない、すなわち骨質低下を引き起こさない新規治療薬の開発が望まれている。

2. 研究の目的

BPは、P-C-P結合を基本骨格とする骨吸収抑制薬であり、骨吸収が亢進した病態に対して、最も信頼できる治療薬として使用されている。また、P-C-Pの中心炭素原子に付加される側鎖の違いにより、薬理作用や作用機序などが大きく異なることが知られている。一方、骨粗鬆症や歯周病での炎症性骨破壊などでは、その病態に酸化ストレスが大きく関与していることが明らかにされている。そのため抗酸化物質の働きにより骨疾患が改善されることが推測される。本研究では、側鎖に抗酸化性の (methylthio) phenylthio-基を持つ新規BPである [(4-methylthio) phenylthio] methanebisphosphonate (MPMBP) および強い抗酸化作用を有する植物由来成分であるアントシアニンが骨代謝治療薬として有効であるかどうかについて、さまざまなイメージング技術を用いて、*in vitro* および *in vivo* 両面から評価すること、これにより新しいタイプの治療薬を開発することを目的として実験をおこなった。

3. 研究の方法

(1) 生きたままの動物での細胞動態を非侵襲で観察するため、TLRアゴニスト投与により骨破壊を起こしたSCIDマウスにEGFP-Tg OCP (5×10^6 cells/mouse)を静注して小動物用生体観察システムで観察し、破骨前駆細胞の体内動態について、さらにMPMBP投与による細胞遊走抑制効果について *in vivo* イメージングによる検討を行った。

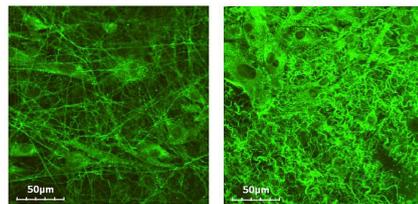
(2) MC3T3-E1細胞および新生仔マウスの頭蓋冠をBP存在下で培養し、骨代謝関連分子の発現について、qPCRについて解析するとともに、免疫染色像を共焦点顕微鏡により観察した。

(3) 生後3日齢から離乳期(8週齢)まで3日に1回、MPMBP 1.2 mg/kg または zoledronate 0.01 mg/kg を投与し、顎骨・歯牙・長管骨の骨微細構造をマイクロCTで解析した。さらに病理組織切片を作製し、HE染色および骨芽細胞・破骨細胞のマーカーについて免疫染色を行い、共焦点顕微鏡像から骨組織修復過程について検討した。

4. 研究成果

(1) 炎症性骨破壊モデルマウスに全身投与した破骨細胞前駆細胞が、起炎物質投与3日後に炎症部位に観察され、5日後には、同部位に骨破壊が起こることが示された。また、イメージング実験終了後に採取した頭蓋冠組織を解析した結果、ドナー由来の細胞が炎症局所でTRAP陽性細胞に分化して吸収窩が形成されることが示された。すなわち、全身循環中に存在する破骨細胞前駆細胞が炎症部位で産生される何らかの分子からの情報を感じて、同部位に遊走して重篤な骨破壊を惹き起こすと考えられた。また、MPMBPを骨破壊モデルマウスに投与したところ、破骨細胞前駆細胞の遊走および骨破壊反応が完全に抑制された。

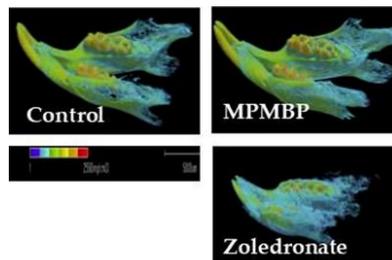
(2) MC3T3-E1細胞およびマウス頭蓋冠培養系にMPMBPを添加したところ、現在使用されているBP (alendronate, pamidronate, incadronate, risedronate, zoledronate) よりも弱い骨吸収抑制作用をもつことが確認された。さらに、従来のBPではみられなかった骨形成関連分子 (ALP, osteocalcin, BMP, BSP) の遺伝子発現促進やコラーゲン合成促進が確認された。



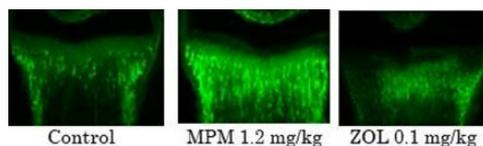
<図1>: 培養頭蓋冠の免疫蛍光染色像。MPMBP添加では、太いコラーゲン線維が束状に産生され、骨形成促進作用をもつことが示された。

(3) 正常新生仔ラットに MPMBP を投与し、MPMBP と zoledronate との比較を行ったところ、両薬物とも脛骨近心端において用量依存的な骨量増加作用を示した。一方、zoledronate 投与では長管骨伸長抑制および歯牙萌出遅延が観察されたのに対し、MPMBP ではこれらの有害作用は軽微であった。この結果から、現在頻用されている窒素含有 BP にみられる骨リモデリングの抑制作用がないことに加えて、新たな骨形成促進が観察されたことから、幼若動物においても有効かつ安全な治療薬となる可能性が示された。

<図2>：下顎骨および下顎切歯・臼歯の BMD 画像
Zoledronate 投与で、著しい骨密度低下
および歯牙萌出抑制が観察された。一方、MPMBP 投
与では、これらの有害作用が軽微であった。



<図3>：脛骨の蛍光（カルセイン）ラベル
MPMBP 投与では、骨梁が明瞭に観察され、骨
形成促進作用が確認された。



(4) sRANKL 投与および卵巣摘出モデルマウスに petunidin(7.5 mg/kg/day)を投与し、脛骨および大腿骨について μ CT による骨形態計測 (BV/TV, Tb. N, Tb. Th)を行った結果、petunidin 投与動物では骨量がコントロールレベルまで回復していた。さらに組織切片で蛍光二重ラベルによる時刻描記法を用いた骨代謝動的パラメーター解析を行ったところ、骨吸収パラメーター (Tb. Sp, ES/BS, Oc. S/BS, N. Oc/BS)が抑制され、骨形成指標 (OV/TV, O. Th, OS/BS, OB. S/BS, N. Ob/BS)が促進されたことから、アントシアニンが骨アナボリック作用をもつことが示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Nagaoka, M.; Maeda, T.; Moriwaki, S.; Nomura, A.; Kato, Y.; Niida, S.; Kruger, M. C.; Suzuki, K. Petunidin, a B-ring 5'-O-Methylated Derivative of Delphinidin, Stimulates Osteoblastogenesis and Reduces sRANKL-Induced Bone Loss. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 2795. doi: 10.3390/ijms20112795
2. Suzuki, K., Nagaoka M, Igarashi K, Shinoda H: MPMBP, a novel bisphosphonate with an antioxidant side chain, stimulates bone formation through inhibition of NF-kappaB nuclear translocation. *Folia Pharmacol. Jpn.*, 153:4-10, 2019. doi: <https://doi.org/10.1254/fpj.153.4>
3. Takizawa A, Chiba M, Ota T, Yasuda M, Suzuki, K., Kanemitsu T, Itoh T, Shinoda H, Igarashi K: The novel bisphosphonate disodium dihydrogen-4-[(methylthio) phenylthio] methanbisphosphonate increases bone mass in post-ovariectomy rats. *J Pharmacol Sci*, 131: 37-50, 2016. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2016.04.011>
4. Moriwaki S, Into T, Suzuki, K., Miyauchi M, Takata T, Shibayama K & Niida S: γ -Glutamyltranspeptidase is an endogenous activator of Toll-like receptor 4-mediated osteoclastogenesis. *Scientific Reports*, 6, 35930, 2016. doi: 10.1038/srep35930

[学会発表] (計 11 件)

1. 鈴木恵子、長岡正博、篠田 壽；窒素非含有ビスホスホネート MPMBP の骨アナボリック作用、第 92 回日本薬理学会年会、2019 年
2. 鈴木恵子、長岡正博、篠田 壽；新規ビスホスホネート MPMBP による炎症性骨破壊抑制作用と骨組織修復促進作用、第 60 回歯科基礎医学会学術大会、2018 年
3. Masahiro Nagaoka, Mirei Chiba, Hisashi Shinoda, Keiko Suzuki ; Differential effects of MPMBP, a novel non-nitrogen-containing bisphosphonate, and zoledronate on bone turnover in neonatal and growing rats. The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, 2018
4. 長岡正博、島村和宏、鈴木恵子；幼若ラットに対する新規ビスホスホネート MPMBP の骨量増加作用、第 65 回奥羽大学歯学会、2018 年
5. 長岡正博、千葉美麗、篠田壽、鈴木恵子；幼若ラットへの新規ビスホスホネート MPMBP 全

- 身投与の影響、第 39 回東北骨代謝・骨粗鬆症研究会、2018 年
6. Takizawa A, Chiba M, Ota T, Yasuda M, Suzuki K, Shinoda H, Igarashi K ; Novel Bisphosphonate Regulates Osteoclastogenesis, Osteogenesis, and Adipogenesis、IADR/AADR/CADR、2017 年
 7. Masahiro Nagaoka、Mirei Chiba、Hisashi Shinoda、Keiko Suzuki ; A novel non-nitrogen-containing bisphosphonate, MPMBP, increases bone mass without adverse effects in neonatal and growing rats、第 65 回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会、2017 年
 8. 鈴木恵子、有本隆文、長岡正博、桑田啓貴、篠田壽 ; Pam3CSK4 局所投与によるラット歯槽骨破壊作用について、第 59 回歯科基礎医学会学術大会、2017 年
 9. Suzuki K, Takeshita F, Nagaoka M, Ochiya T, Shinoda H ; [4-(methylthio) phenylthio] methanbisphosphonate inhibits calvarial bone resorption by suppressing recruitment of osteoclast precursor cells to the inflammatory sites、第 90 回日本薬理学会、2017 年
 10. Suzuki K, Arimoto T, Nagaoka M, Kuwata H, Shinoda H ; Pam3CSK4, a tri-acylated lipopeptide, induces osteoclastogenesis RANK/RANKL-independently and resorbs calvarial bone in vivo through Toll-like receptor 2、第 58 回歯科基礎医学会、2016 年
 11. Maeda T, Nagaoka M, Suzuki A, Kato Y, Suzuki K ; Beneficial effects of phytochemicals: Stimulatory effects of petunidin on osteoblast differentiation and mineralization、第 58 回歯科基礎医学会、2016 年

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称 : MAQUI BERRY EXTRACTS FOR USE IN THE TREATMENT OR PREVENTION OF BONE DISORDERS

発明者 : Lang Stefanie, Bonnlander Bernd, Suzuki Keiko

権利者 : Anklam Extrakt GmbH

種類 : EPC

番号 : 19159847.3-1112

出願年 : 2019

国内外の別 : 国外

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 : なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名 : なし