

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16656

研究課題名（和文）RUNX2を活性化するランソプラゾールに着目した新規骨再生製剤開発の基盤研究

研究課題名（英文）Research for Development of Novel Bone Regeneration Drugs Focusing on Lansoprazole Activating RUNX2

研究代表者

岡部 由香（塚越由香）（Okabe, Yuka）

北里大学・理学部・助教

研究者番号：20468383

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、水溶性ランソプラゾールに培養骨髄細胞と人工骨を組み合わせる新規骨再生製剤開発の基礎研究を行うことを目的とした。

市販のヒト間葉系幹細胞または患者由来の骨髄培養細胞に水溶性ランソプラゾールを1日間投与することで、骨芽細胞の分化とマトリックスのカルシウム沈着が促進された。コラゲンスポンジに培養骨髄細胞を播種し、水溶性ランソプラゾールとともにマウス頭蓋骨欠損モデルに埋植し、骨形成量を測定した。その結果、薬剤非添加群と比べ2倍程度骨形成量が増加した。骨基質に水溶性ランソプラゾールと培養骨髄細胞とを組み合わせることにより、骨折や骨欠損の修復に応用可能であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、すでに安全性が担保された既存薬によって現在の人工骨の欠点を補い、自家骨と同質な医療材料の創出を目指す研究である。既存薬の適応外効果を見出し臨床応用につなげる創薬手法はドラッグリポジショニングと呼ばれ、副作用等のデータがそろっているため臨床応用までの時間と費用を大幅に短縮できる。

さらに歯科口腔外科領域でも、インプラントや口蓋裂の治療において歯槽骨の再生は必要不可欠である。したがって本研究の成果は、整形外科だけでなく歯科口腔外科領域にも応用可能であると考えられる。

研究成果の概要（英文）： It is known that Lansoprazole, a proton pump inhibitor, increases the expression and transcriptional activity of Runx2. This study aims to perform basic research on the development of a novel bone regeneration drug by combining hydrophilic lansoprazole with culture-bone marrow cells and artificial bone.

Treatment of commercially available human mesenchymal stem cells or patient-derived bone marrow stromal cells with 20 μM of hydrophilic lansoprazole for 24 hours promoted osteoblast differentiation and matrix calcium deposition in vitro. When hydrophilic lansoprazole-impregnated collagen sponges seeded with culture-bone marrow cells were implanted in a mouse skull defect model, bone formation was about 2-fold higher in the drug-treated group than in the control group. These results indicated that the combination of hydrophilic lansoprazole and culture-bone marrow cells in the bone matrix was found to apply to the improvement for repairing fractures and bone defects.

研究分野：間葉系幹細胞を用いた再生医療研究

キーワード：骨形成促進 間葉系幹細胞 RUNX2 ランソプラゾール

1. 研究開始当初の背景

骨欠損は、高エネルギー外傷による四肢長管骨の開放骨折、良悪性骨軟部腫瘍に対する外科的切除、人工関節の経年的なゆるみなどに不随して発生する。こうした骨欠損のスタンダードな治療手段は、今なお自家骨移植である。しかしこの方法は、主に骨盤の健常な組織を犠牲にし、採骨にあたって神経血管損傷のリスクを孕み、採骨部に疼痛や変形の後遺症を引き起こす可能性があるため、安全な代替手段が望まれてきた。さらに採骨できる量には限りがあるため、骨欠損の容積が大きくなると、自家骨のみでは補填できなくなる。

こうした背景を踏まえ、外傷や手術行為に不随して発生する骨欠損を安全かつ確実に治療できるようにするため、骨形成能や骨誘導能を兼ねそろえた人工骨の登場が待ち望まれている。

転写因子 Runx2 は、未分化間葉系細胞からの骨芽細胞分化に必要な不可欠な転写因子として知られている。先行研究でドラッグリポジショニング戦略から、Runx2 の発現や転写活性を上昇させる既存薬としてランソプラゾールを同定した。しかしランソプラゾールは単独では骨が細胞分化を優位に促進させなかった。ランソプラゾールの原末は非水溶性のため、これらの先行研究では溶剤として DMSO を用いたが、DMSO には細胞毒性があるため、臨床で応用するため、水溶性ランソプラゾールを用いて骨形成促進効果を検討するという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、水溶性ランソプラゾール、培養骨髄細胞、人工骨を併用したハイブリッド型骨再生製剤開発のための基礎的研究を行い、新規骨再生製剤の実用化に向けた基盤データを構築することを目的とする。

3 . 研究の方法

ロンザ社より間葉系幹細胞を購入し、骨形成培地中で培養を行った。終濃度 20 μ M になるように水溶性ランソプラゾールを添加し、培養 5 日目に ALP 活性を、14 日目にオステオカルシンの濃度を測定した。

同意の得られた患者より骨髓液を採取し、培養を開始した。培養 7 日目にフローサイトメーターにて CD73, CD90, CD105 の表面マーカーの発現を測定した。培養 21 日目にアリザリン染色およびオステオカルシン濃度の測定を行った。

C57BL6 マウスより骨髓を採取し、骨髓細胞を培養した。培養 7 日目に細胞を回収しコラゲンスポンジに培養骨髓細胞と水溶性ランソプラゾール終濃度 20 μ M を添加し、一晚培養を行った。C57BL6 マウスの頭蓋骨にトレパンで直径 2mm の欠損を作製し細胞を播種したコラゲンスポンジを埋植した。8 週間後に X 線および μ CT にて骨形成を評価した。

4 . 研究成果

市販されている骨髓由来間葉系幹細胞を培養し、水溶性ランソプラゾール添加による骨形成の効果、骨芽細胞マーカーとして知られている ALP 活性とオステオカルシンの濃度を測定することにより確認した。その結果、水溶性ランソプラゾール添加後 3 日、5 日目よりも添加後 1 日目に ALP 活性とオステオカルシンの濃度が最大になった(図 1, 2)。そのため以降の研究においては、ランソプラゾール添加後 1 日目に細胞を回収することとした。

実際の骨髓細胞においても水溶性ランソプラゾールに同様の効果があるのかを検証した。まず、培養骨髓細胞から白血球に発現する CD45 を発現している細胞を除き、間葉系幹細胞に発現することが知られている表面マーカーである CD73, CD90, CD105 の発現を確認したところ、どの細胞でも間葉系幹細胞の性質をもつことが確認された。次に骨芽細胞の最終分化を確認したところ、カルシウムの沈着とオステオカルシンの細胞内濃度の上昇が確認された(図 3)。

生体においても同様に骨分化誘導効果があるのか確かめるため、コラゲンスポンジにマウスの骨髓培養細胞とランソプラゾール水溶液を含浸させ、マウス頭蓋骨欠損に埋植した。その結果、

骨量が約2倍促進された(図4)。

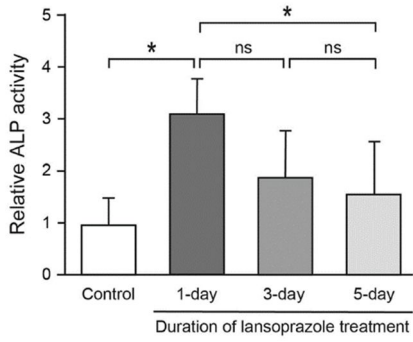


図1, ALP 活性
(購入した間系葉幹細胞)

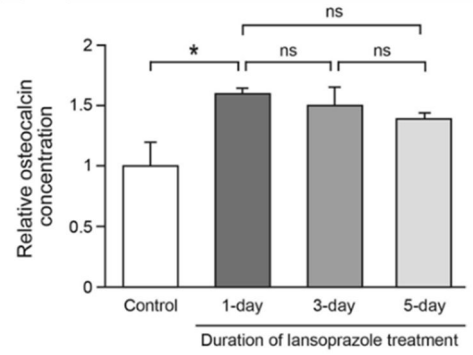


図2, オステオカルシン濃度
(購入した間系葉幹細胞)

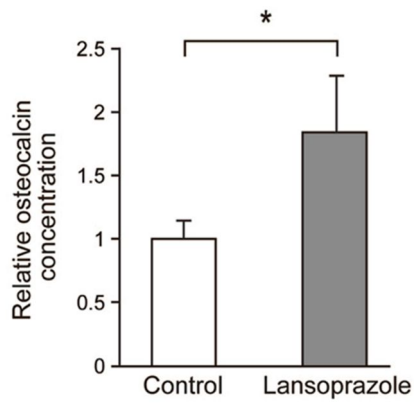


図3, オステオカルシン濃度
(患者由来骨髄細胞液)

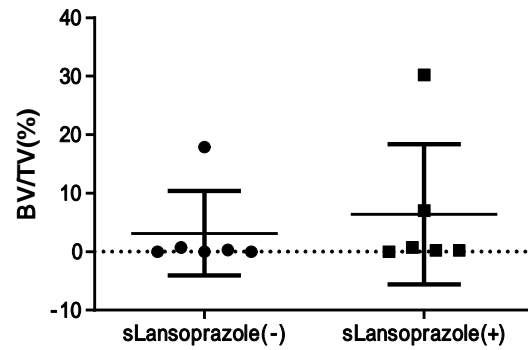


図4, 骨形成量、BV:骨量 TV:総体積

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yuka Tsukagoshi Okabe, Shinobu Shimizu, Yukihiko Suetake, Hisako Matsui-Hirai, Shizuka Hasegawa, Keisuke Takanari, Kazuhiro Toriyama, Yuzuru Kamei, Tokunori Yamamoto, Masaaki Mizuno, Momokazu Gotoh	4. 巻 28
2. 論文標題 Biological characterization of adipose-derived regenerative cells used for the treatment of stress urinary incontinence	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 115-124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/iju.14408	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iida Madoka, Sahashi Kentaro, Kondo Naohide, Nakatsuji Hideaki, Tohnai Genki, Tsutsumi Yutaka, Noda Seiya, Murakami Ayuka, Onodera Kazunari, Okada Yohei, Nakatochi Masahiro, Tsukagoshi Okabe Yuka, Shimizu Shinobu, Mizuno Masaaki, Adachi Hiroaki, Okano Hideyuki, Sobue Gen, Katsuno Masahisa	4. 巻 10
2. 論文標題 Src inhibition attenuates polyglutamine-mediated neuromuscular degeneration in spinal and bulbar muscular atrophy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-12282-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kitase Yuma, Sato Yoshiaki, Ueda Kazuto, Suzuki Toshihiko, Mikrogeorgiou Alkisti, Sugiyama Yuichiro, Matsubara Kohki, Tsukagoshi Okabe Yuka, Shimizu Shinobu, Hirata Hitoshi, Yukawa Hiroshi, Baba Yoshinobu, Tsuji Masahiro, Takahashi Yoshiyuki, Yamamoto Akihito, Hayakawa Masahiro	4. 巻 29
2. 論文標題 A Novel Treatment with Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth for Hypoxic-Ischemic Encephalopathy in Neonatal Rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cells and Development	6. 最初と最後の頁 63 ~ 74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/scd.2019.0221	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kenichi Mishima, Yuka Tsukagoshi Okabe, Masaaki Mizuno, Kinji Ohno, Hiroshi Kitoh, Shiro Imagama	4. 巻 29
2. 論文標題 Efficacy of soluble lansoprazole-impregnated beta-tricalcium phosphate for bone regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Report	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-25184-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡部（塚越）由香、三島健一、加藤勝義、水野正明、鬼頭浩史、石黒直樹
2. 発表標題 水溶性ランソプラゾールの局所投与による骨欠損修復の可能性
3. 学会等名 第19回再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------