

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19089

研究課題名（和文）新規骨代謝標的分子 7-nACh受容体の作動機序を基軸とした骨再生技術の開発

研究課題名（英文）Development of bone regeneration technology targeting nicotinic acetylcholine receptor alpha7

研究代表者

盛林 昭仁（Moribayashi, Akihito）

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：10826952

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）：7ニコチン性アセチルコリン受容体（7-nAChR）は骨芽細胞分化促進に関与していることが明らかとなった。そして、その作用は7-nAChRの増加によって惹起されている可能性が示唆された。7-nAChRに作用する試薬は、局所投与にて骨欠損部の骨形成促進作用を示したが、全身投与では全身の骨へ及ぼす影響は少ない可能性が示唆された。以上より、7-nAChRは骨欠損部における骨再生治療の新たな標的分子として有効である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨代謝には骨芽細胞や破骨細胞以外にも免疫細胞などの様々な細胞が関与している。7-nAChRは既に免疫反応や破骨細胞分化の制御にも関与することが報告されている。本研究は7-nAChRが骨芽細胞分化にも関与すること、および、7-nAChRに作用する試薬の局所投与が骨欠損部において骨形成促進作用を示すことを明らかとした。これらの研究成果は骨代謝機構の解明に新たな知見を与えたと考えられる。そして、この新たな知見は細胞内新規分子機構を標的とした骨代謝制御創薬に結びつく可能性もあり、新規の骨再生促進剤の開発に繋がる可能性も期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study revealed that the 7 nicotinic acetylcholine receptor (7-nAChR) promotes osteoblast differentiation, and showed that the increase in 7-nAChR may cause the promotion of osteoblast differentiation. Local administration of a reagent acting on 7-nAChR promoted bone formation in bone defects. However, systemic administration of these reagents may have little effect on systemic bone. These results suggest that 7-nAChR may be an effective new target molecule for bone regeneration therapy in bone defects.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：7ニコチン性アセチルコリン受容体 骨芽細胞分化 骨組織再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

失われた歯槽骨の再生は補綴歯科治療の重要な課題であり、新たな骨造成法の開発が期待されている。しかし、骨代謝の分子機構はいまだ解明されていない点が多く、新たな治療法に繋がる標的分子の探索が盛んに行われている。近年、 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体 ($\alpha 7$ -nAChR) の骨代謝への関与が報告された。この受容体は免疫反応の制御のみならず、破骨細胞分化への関与も示唆されているが、骨芽細胞分化および骨組織再生に及ぼす影響については明らかにされていない。そこで、本研究代表者は、骨芽細胞分化ならびに骨組織再生における $\alpha 7$ -nAChR の関与を明らかにすることで、 $\alpha 7$ -nAChR が骨再生治療の新たな標的分子となる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、骨芽細胞分化ならびに骨組織再生における $\alpha 7$ -nAChR の関与を解明するため、研究期間内に以下のことを明らかにすることを目的とした。

(1) *in vitro* における検討として、 $\alpha 7$ -nAChR が骨芽細胞分化に及ぼす影響を検討する。

(2) *in vivo* における検討として、

[2 - 1] 局所投与： $\alpha 7$ -nAChR がラット頭蓋骨骨欠損部の骨再生に及ぼす影響を検討する。

[2 - 2] 全身投与： $\alpha 7$ -nAChR が骨粗鬆症モデルマウスに及ぼす影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* における検討： $\alpha 7$ -nAChR が骨芽細胞分化に及ぼす影響の検討方法

$\alpha 7$ -nAChR の特異的拮抗薬である *methylylcaconitine* (MLA) およびその特異的作動薬である PNU-282987 (PNU) がマウス骨芽前駆細胞 (MC3T3-E1 細胞) および SD ラット大腿骨から採取したラット骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) の細胞増殖に及ぼす影響を WST-1 細胞増殖試験にて検討する。また、MLA および PNU が両細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響を、*real time* RT-PCR 解析、ALP 染色、Alizarin Red 染色、Western blotting 解析、および蛍光免疫染色を用いて多面的に評価する。

(2) *in vivo* における検討

[2 - 1] 局所投与： $\alpha 7$ -nAChR がラット頭蓋骨骨欠損部の骨再生に及ぼす影響を検討方法

ラット頭蓋骨骨欠損部に MLA または PNU を含浸したコラーゲンスポンジを埋入し、その後一定の間隔 (2~3 日毎など) で MLA または PNU を局所注射する。MLA および PNU の投与量は *in vitro* での実験結果を参考として算出する。術後数週間で頭蓋骨を摘出し、摘出した頭蓋骨から組織切片を作製し、HE 染色で骨再生を組織学的に評価するとともに、立体的な骨の形成状態および骨塩量や骨体積、骨密度はマイクロ CT 画像解析を用いて定量的に評価する。

[2 - 2] 全身投与： $\alpha 7$ -nAChR が骨粗鬆症モデルマウスに及ぼす影響を検討方法

マウスから卵巣を摘出し、骨粗鬆症モデルマウスを作製する。2, 3 日毎に体重を計測して体重の変化量を記録するとともに、一定の間隔 (日毎など) で MLA または PNU を腹腔内注射する。MLA および PNU の投与量はこれまでの実験結果を参考に算出する。術後数週間で大腿骨、腰椎を摘出し、それらをマイクロ CT 画像解析することで骨密度の変化等を定量的に評価する。

4. 研究成果

(1) *in vitro* における検討： $\alpha 7$ -nAChR が骨芽細胞分化に及ぼす影響の検討

0.1 - 25 μ M の濃度の MLA と PNU は、ともに MC3T3-E1 細胞および MSC の増殖に有意な影響を及ぼさず、両細胞の骨芽細胞分化関連遺伝子の発現および細胞外基質の石灰化を有意に促進した (図 1)。この結果から、 $\alpha 7$ -nAChR は骨芽前駆細胞だけでなく幹細胞にも骨芽細胞分化促進作用を示すことが明らかとなった。

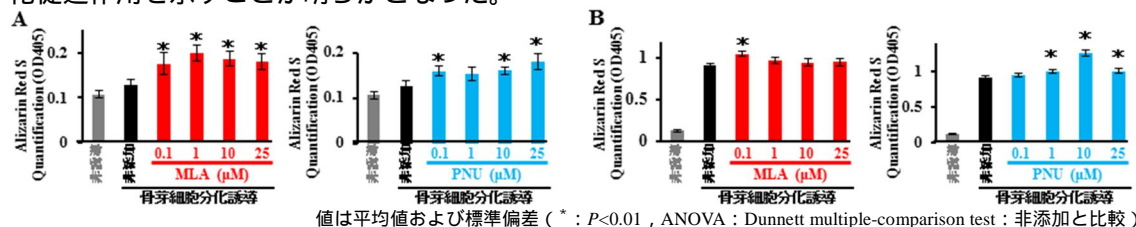


図 1-1: 細胞外基質の石灰化度に及ぼす影響 (Alizarin Red 染色による吸光度測定)
(A) MC3T3-E1 細胞 (分化誘導 30 日目) (B) MSC (分化誘導 21 日目)

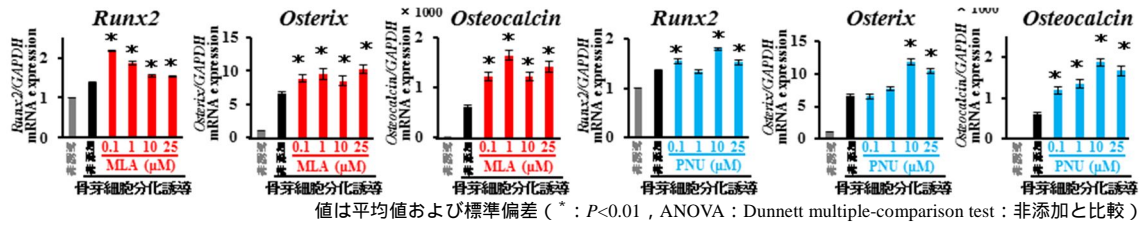


図 1-2: MC3T3-E1 細胞における骨芽細胞特異的遺伝子の発現に及ぼす影響(分化誘導 28 日目)

また, MLA は低濃度で骨芽細胞分化関連遺伝子および $\alpha 7$ -nAChR の発現を促進する傾向を示したのに対し, PNU はこれらの発現を高濃度で促進する傾向を示した(図 2)。これは, MLA と PNU による骨芽細胞分化促進が $\alpha 7$ -nAChR の発現量の増加によって惹起されている可能性を示唆した。

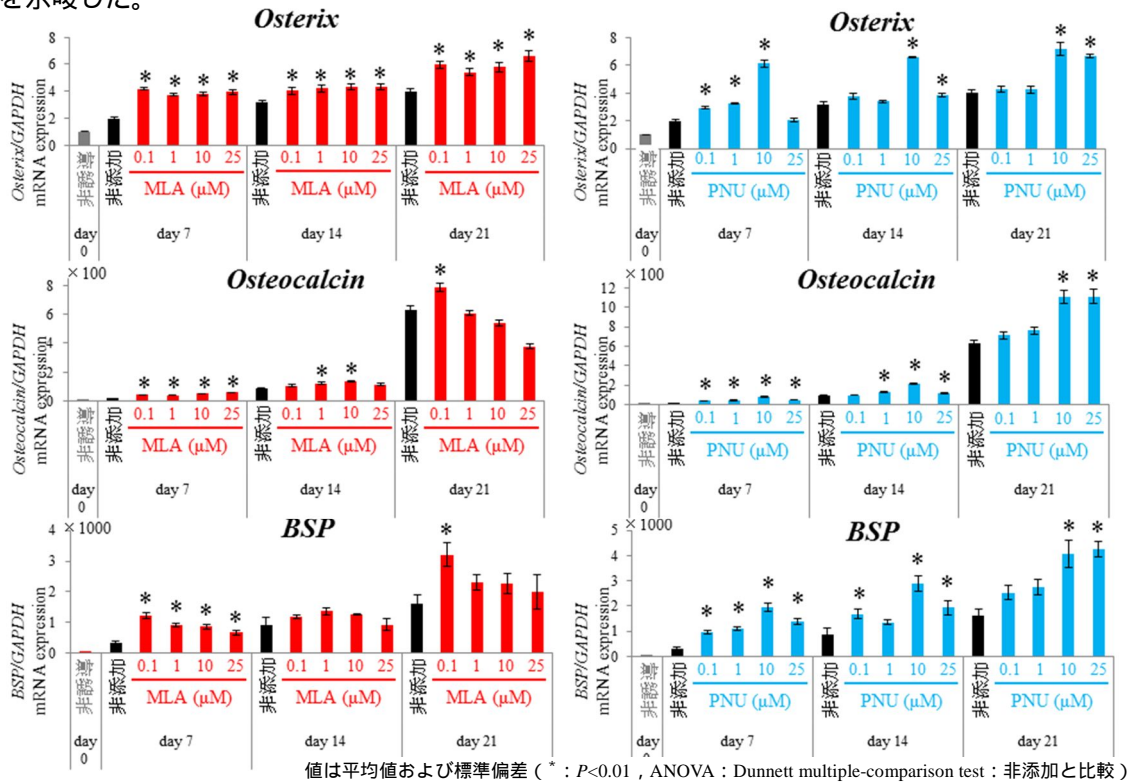


図 2-1: MC3T3-E1 細胞における骨芽細胞分化マーカーの経時的変化

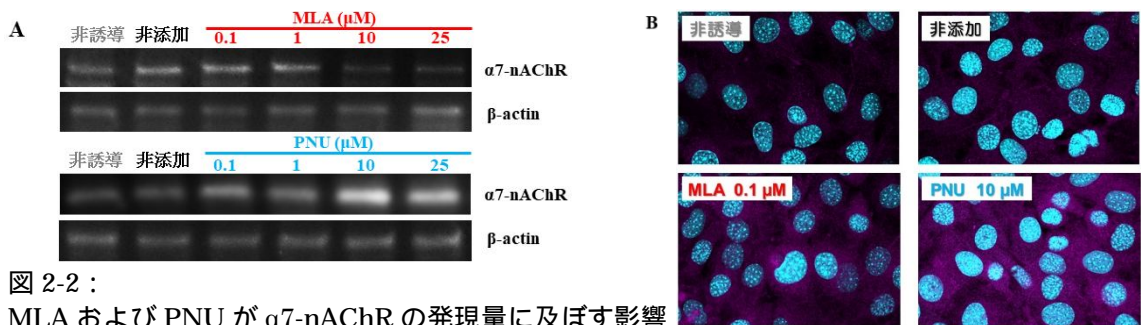


図 2-2 :

MLA および PNU が $\alpha 7$ -nAChR の発現量に及ぼす影響

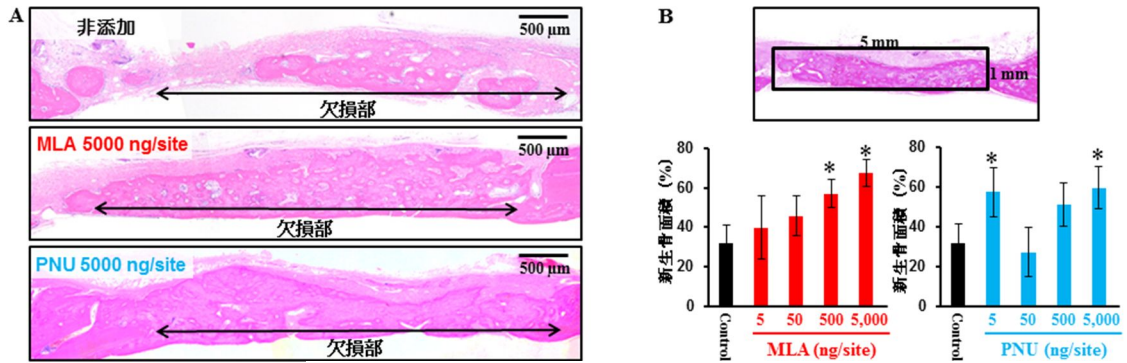
(A) Western blotting (分化誘導 5 日間: MC3T3-E1 細胞)

(B) 蛍光免疫染色(分化誘導 1 日間: MC3T3-E1 細胞, 青: 核, 紫: $\alpha 7$ -nAChR)

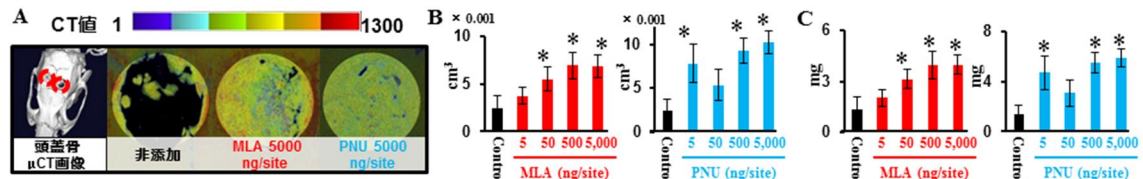
(2) in vivo における検討

[2 - 1] 局所投与: $\alpha 7$ -nAChR がラット頭蓋骨骨欠損部の骨再生に及ぼす影響の検討

移植 21 日後の H-E 染色の結果, control 群に対して, MLA 群および PNU 群のどちらの群においても著大な新生骨の形成を認めた(図 3)。また, マイクロ CT 画像解析の結果, 骨塩量, 骨体積のいずれにおいても MLA 群および PNU 群で有意に骨形成促進作用が認められた(図 4)。



値は平均値および標準偏差 (* : $P < 0.01$, ANOVA : Dunnett multiple-comparison test : 非添加と比較)
 図 3 : MLA と PNU 投与群における新生骨の H-E 染色像の評価
 (A) H-E 染色像 (B) 骨欠損サイズに対応した面積 (黒線の囲み) における新生骨の面積割合



値は平均値および標準偏差 (* : $P < 0.01$, ANOVA : Dunnett multiple-comparison test : 非添加と比較)
 図 4 : MLA と PNU 投与群におけるマイクロ CT を用いた骨再生の評価
 (A) 頭蓋骨欠損部におけるマイクロ CT 画像 (B) 骨体積 (C) 骨塩量

[2 - 2] 全身投与 : $\alpha 7$ -nAChR が骨粗鬆症モデルマウスに及ぼす影響の検討

腹腔注射開始 65 日後のマイクロ CT 画像解析の結果, 骨密度, 骨塩量, 骨体積のいずれにおいても, control 群に対して MLA 群および PNU 群ともに有意な差は認められなかった(図 5)。

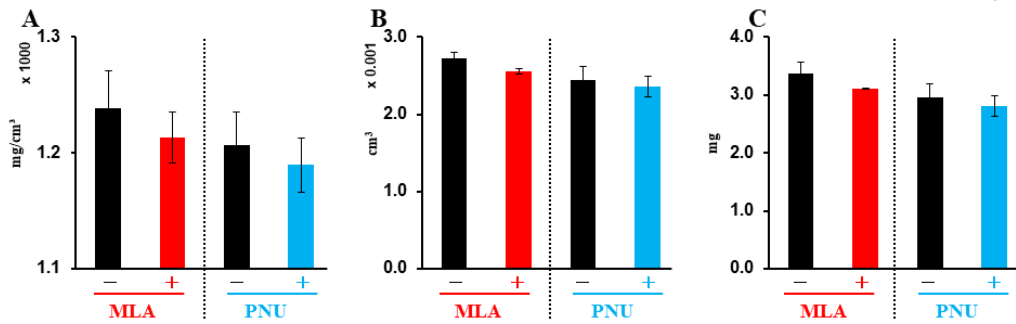


図 5 : 骨粗鬆症モデルマウスへの MLA および PNU 投与群におけるマイクロ CT の評価
 (A) 骨密度 (B) 骨体積 (C) 骨塩量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------