

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20390509

研究課題名（和文）：

新規骨形成性低分子化合物の探索とその骨再生への応用に関する戦略的研究

研究課題名（英文）：

Strategic research for the identification of novel osteogenic small compounds and their application to bone regeneration

研究代表者：森 良之 (MORI YOSHIYUKI)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：70251296

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、新たな骨形成性低分子化合物を同定と効果的な送達システムの開発、及び骨欠損モデル動物による骨再生誘導能の検証を通して、骨形成性低分子化合物による骨再生療法の基盤技術を開発することである。骨形成性低分子化合物として、glabrisoflavone 及び Icaritin を新規に同定した。さらに、リン酸カルシウム担体による化合物徐放システムを確立し、化合物の骨再生効果を骨欠損モデル動物において確認した。

研究成果の概要（英文）：

This study aims to develop fundamental technologies for small compound-based bone regenerative medicine through the identification of novel osteogenic small compounds, the development of effective drug delivery system, and the assessment of bone regeneration activities of such compounds in bone defect models. Here we identified glabrisoflavone and icaritin as osteogenic small compounds. In addition, we established calcium phosphate-based systems for the controlled release of those compounds, and verified their bone regeneration activities in animal models.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2009年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：骨再生療法，骨形成性低分子化合物

1. 研究開始当初の背景

外傷、腫瘍、炎症、先天異常、加齢など様々な原因で生ずる不可逆性骨欠損に対する治療は焦眉の課題である。その治療法として骨再生療法が注目を浴びており、骨形成性蛋白質 (bone morphogenetic protein- BMP)、線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth

factor- FGF)、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor- VEGF)、Runx2 といった骨形成・血管新生を誘導するシグナル分子を外来性に加えることで、より短期間で効率的に骨再生を誘導する試みが盛んに行われている。しかしながら、こうした因子を組換えタンパク質の投与により生体に適

用する場合は、タンパク質の分解あるいは翻訳後修飾による生理活性の低下の問題が付きまとう。一方、ウイルスベクター等を使用した遺伝子導入により適用する場合は、安定した効果が期待できるものの、現状のシステムでは安全性と有効性を両立しているとは言いがたい。このような問題を解決するために、申請者らは骨形成性低分子化合物の骨再生への応用を目指して研究を行ってきた。その結果、武田化学薬品工業の低分子化合物ライブラリーのスクリーニングから、ヘリオキササンチン誘導体（4-(4-methoxyphenyl)pyrid[4',3':4,5]thieno[2,3-b]pyridine-2-carboxamide）を新規の骨形成性化合物として同定した（*Biochem Biophys Res Commun* 357, 854-860, 2007）。

以上より、ヘリオキササンチン誘導体の同定に関する研究の展開研究として、これまでに申請者らが確立した骨芽細胞分化スクリーニングシステムと実験手法を応用し、申請者らが既に所有する天然低分子化合物ライブラリーからさらに有効な新規骨形成性低分子化合物を同定し、これらを用いた新規骨再生システムを開発することを目指して本研究を計画した。本研究で計画している天然低分子化合物ライブラリーを使用した大規模なスクリーニングは、新薬発見率の向上と併せて、投与経路の選択肢が広く副作用の比較的少ない化合物の同定に寄与すると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、申請者らが既に確立した、骨芽細胞分化検出用細胞センサーを用いて、天然低分子化合物ライブラリーのスクリーニングから新たな骨形成性低分子化合物を同定し、さらに同定化合物の効果的な生体へのデリバリーシステムの開発、さらには顎口腔領域を中心とした種々の骨欠損モデルによる骨再生誘導能を検証することを目指した。以上より、新規骨形成性低分子化合物による骨再生療法の基盤技術を開発することを最終目標とした。

3. 研究の方法

(1) 天然低分子化合物ライブラリーを用いた骨形成性低分子化合物のスクリーニング

と候補化合物の骨分化誘導メカニズムの解明

① 天然低分子化合物ライブラリーのスクリーニング

申請者らが開発した骨芽細胞分化検出システムである Colla1-GFP システムを用いる。このシステムは GFP の蛍光を指標に骨芽細胞分化を評価できる細胞センサーとなる。この細胞に申請者が所有する天然低分子化合物ライブラリー由来の化合物約 4,500 種を加える。添加後 5 日と 10 日で GFP の蛍光強度を定量化・スコア化し（5 段階）、その骨分化誘導活性を評価する。

② 候補化合物による骨芽細胞分化誘導の検討とその作用に関するシグナル経路の検索

【候補化合物による骨芽細胞分化誘導・細胞毒性・至適濃度の検討】

①により明らかとなった候補化合物について、MC3T3-E1 細胞を用いて化合物処理濃度を段階的に変えて骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現解析と基質産生の評価、及び細胞毒性試験を行う。これにより候補化合物の骨分化誘導能を確認し、その至適濃度・用量を明らかにする。

【候補化合物により活性化される下流シグナル・遺伝子の解析】

関与するシグナル経路を網羅的に検索するため、候補化合物処理・未処理の MC3T3-E1 細胞間で DNA マイクロアレイにより発現遺伝子の差異を検討する。

【候補化合物と相互作用する生体内分子の解析】

プロテオームスケールで候補化合物と相互作用する分子を網羅的に解析する。

(2) 骨形成性低分子化合物の生体内デリバリーシステムの開発

① 担体からの骨形成性低分子化合物徐放評価系の確立

同定化合物の担体からの徐放性を評価するため、トランスウェル培養系を応用し、骨芽細胞分化を指標にした徐放評価系を確立する本評価系によって動物試験を多用せずに比較的簡便に担体候補を絞り込む事ができる。

② 骨形成性低分子化合物の各種担体材料への添加方法の検討

同定化合物が疎水性であった場合、シクロ

デキストリンを用いた疎水性化合物の水への溶解性の向上を目指すとともに、シクロデキストリンにより分散された状態でも化合物が骨芽細胞分化促進作用を維持しうるかを評価する。

③ 骨形成性低分子化合物を含有させた各種人工骨材料、担体材料からの徐放性の検討

まず、人工骨材料として広く用いられる、リン酸カルシウム担体からの同定化合物の徐放性を上記評価系にて検討し、徐放システムを確立する。つぎに、申請者らが開発を進めてきたインクジェットプリンターによるカスタムメイド型人工骨、あるいはテトラポッド型人工骨に化合物を含有させ、徐放についても検討する。

④ 骨形成性低分子化合物処理後の骨芽細胞分化の維持性の検討

ここまで最適化された低分子化合物の投与法の試作品を作製し、化合物消失後の骨分化作用の維持を詳細に検討することで、骨再生を誘導するのに必要な徐放期間に関する知見を集積する。

(3) 動物モデルを用いた骨形成性低分子化合物の骨再生誘導効果の評価

① マウス頭頂骨臨界骨欠損モデル

直径 4mm の全層欠損を用いて同定化合物の骨再生誘導に関する基礎的知見を得る。術後 4, 6, 8 週で放射線学的評価と組織学的評価により骨再生を評価する。

② ラット中間歯欠損部骨欠損モデル

第 3 大臼歯が萌出する生後 6 週前後に第 2 大臼歯を抜歯し、骨形成性低分子化合物徐放性担体を抜歯部位に注入する。抜歯部の骨欠損部における骨形成の評価を①と同様の手法で行う。

③ ラット歯周疾患モデル

大臼歯に絹糸を巻きつけることで、プラークの停滞による炎症性骨破壊が誘導されるモデルを使用する。担体材料の移植方法として従来から行われるフラップ形成による移植方法とともに、ゲル状の担体材料については注射により化合物含有ゲルを導入する新しい治療法を開発する。骨形成の評価は①と同様の手法で行う。

4. 研究成果

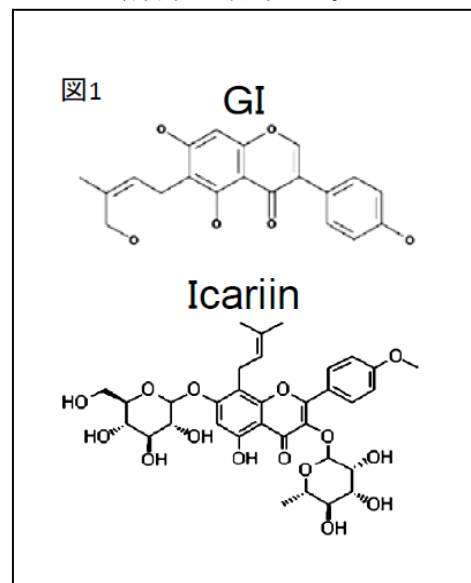
(1) 天然低分子化合物ライブラリーを用いた骨形成性低分子化合物のスクリーニングと候補化合物の骨分化誘導メカニズムの解明 (*Biochem Biophys Res Commun* 376(2):375-9, 2008; *Biochem Biophys Res Commun* 369(2): 444-8, 2008; *Biochem Biophys Res Commun* 395(4): 502-8, 2010)

① 骨形成性低分子化合物の同定

骨芽細胞前駆細胞株 MC3T3-E1 細胞、間葉系細胞株 C3H10T1/2 細胞、線維芽細胞株 NIH3T3 細胞にそれぞれ Col1a1-GFP 遺伝子が安定導入された細胞株を樹立し、GFP の蛍光を指標に骨芽細胞分化を判定できる細胞センサーとして使用した。Col1a1-GFP-MC3T3-E1 細胞を用いた天然・合成低分子ライブラリーのスクリーニングから、骨形成性低分子化合物としてグラブリソフラボン (glabrisoflavone - GI) を新たに同定した (図 1、*Biochem Biophys Res Commun* 376(2):375-9, 2008)。GI は濃度依存性に MC3T3-E1 細胞と初代マウス骨芽細胞における骨分化を誘導し、30 μ M が至適濃度であることが見出された。

さらに、*Epimedium pubescens* から抽出されたフラボノイドグリコシドであるイカリン

(Icariin - IC) が骨形成活性を有することも見出した (図1、*Biochem Biophys Res Commun* 369(2): 444-8, 2008)。ICの *in vitro* における至適濃度は 10 μ M であり、MC3T3-E1 細胞とマウス初代骨芽細胞において BMP2 と Runx2 依存性に骨分化を誘導した。さらに、我々が既に報告した骨形成性低分子化合物ヘリオキサンチン誘導体 (TH、1. 研究開始当初の背景参照) との相乗作用を認め、皮膚線維芽細胞においても骨分化を誘導した。



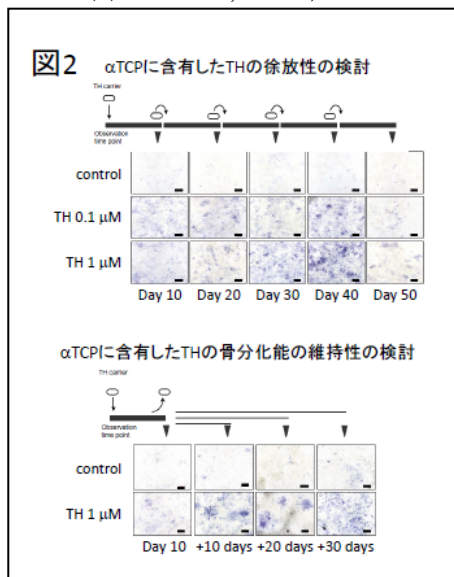
また、骨形成性シグナル経路であるヘッジホッグ経路のアゴニストSAGにも強力な骨形成活性が存在することを見出し、現在詳細な解析を進めている。

② 骨形成性低分子化合物の作用機序の解明

我々が同定した骨形成性低分子化合物の作用機序の解明を目指して、TH処理・未処理のMC3T3-E1細胞においてマイクロアレイを行い、TH処理により転写が活性化される遺伝子を検索した (*Biochem Biophys Res Commun* 395(4): 502-8, 2010)。その結果、THはBMP-Smad経路の活性化を介して、骨形成を誘導する可能性が示唆された。

現在、マスマスペクトロメトリーを用いたプロテオーム解析により、THが相互作用する細胞内分子を検索する準備を進めている。これまでに、磁気ビーズと相互作用する官能基をもつヘリオキサンチン誘導体を合成し、この誘導体がTHと同様の骨形成活性を有することを確認した。今後はこの誘導体を用いて磁気ビーズによるアフィニティー精製を行う予定である。

(2) 骨形成性低分子化合物の生体内デリバリーシステムの開発 (*Biochem Biophys Res Commun* 395(4): 502-8, 2010; *Tissue Eng Part A* 16(1): 233-43, 2010)

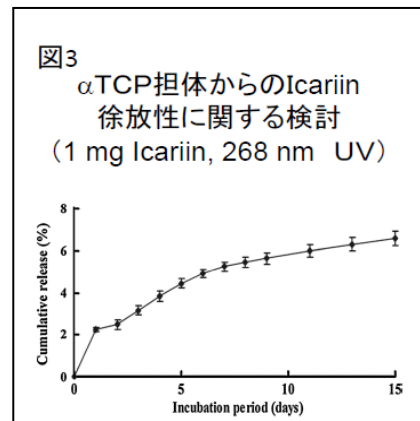


① 担体からの骨形成性低分子化合物の徐放性と維持性の検討

トランスウェル培養系を用いて、担体からの低分子化合物の徐放性の評価系を確立した。この評価系を用いて、THの α TCP担体からの徐放性をMC3T3-E1細胞の骨分化を指標 (ALP染色) に評価した。その結果、40日に

わたって徐放性が持続することが確認された。さらに、同じ評価系において化合物消失後の骨分化作用の維持を検討したところ、TH除去後も一ヶ月わたって、骨分化作用が維持された (図2, *Biochem Biophys Res Commun* 395(4): 502-8, 2010)。現在、テトラポッド型人工骨からのTHとSAGの徐放性について詳細な検討を行っている。

また、ICの α TCP担体からの徐放性についても検討した。IC 1 mgを含む α TCP担体をPBS中に置き、PBS中に放出されるIC量を268 nmのUVにより測定した。その結果、1日目に全体の2%のICが放出され、その後15日までに6%のICが放出されることを確認した (図3, *Tissue Eng Part A* 16(1): 233-43, 2010)。



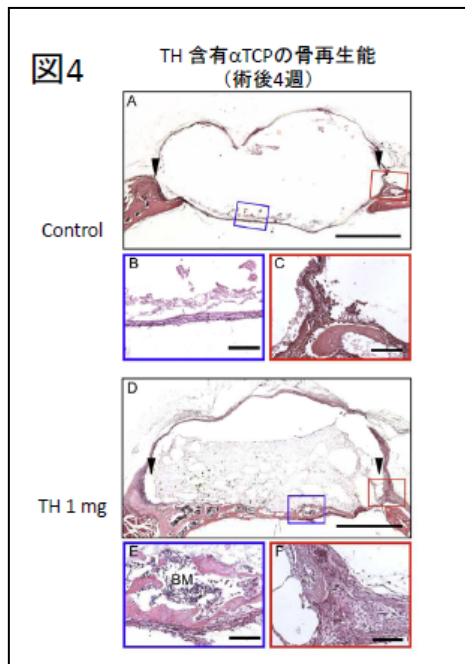
③ 骨形成性低分子化合物の各種担体材料への添加方法の検討

疎水性の骨形成性低分子化合物の溶解方法を検討するため、疎水性であるTHをシクロデキストリンに溶解させて、その骨誘導活性をin vitroにて解析した。45%シクロデキストリン/PBSにTHを溶解させ、MC3T3-E1細胞に曝露したところ、通常のDMSO溶解THと同程度の骨分化能を有することが確認された。また、細胞増殖を指標にした毒性試験から細胞毒性もないことが確認された (投稿準備中)。

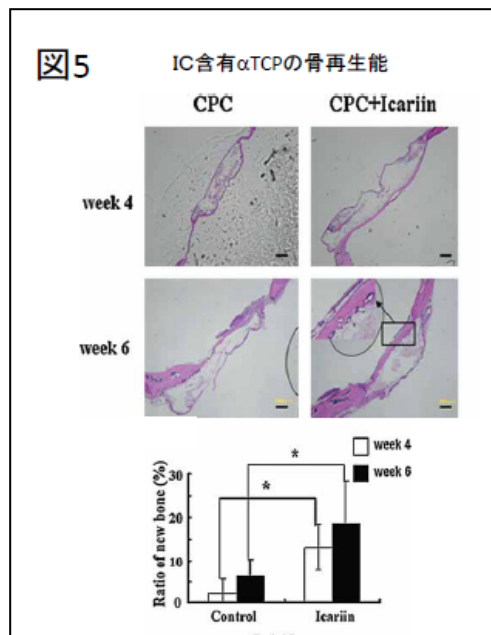
(3) 動物モデルを用いた骨形成性低分子化合物の骨再生誘導効果の評価 (*Biochem Biophys Res Commun* 395(4): 502-8, 2010; *Tissue Eng Part A* 16(1): 233-43, 2010)

マウス頭頂骨臨界骨欠損モデルを用いて、 α TCP担体に含有させたTH及びICの骨再生効果を検証した。TH 1 mgを含有した α TCP担体を骨欠損部に埋植したところ (n=5)、5例全てにおいて、術後一ヶ月で旺盛な骨形成を認

めた。形成された骨組織は骨髄を有していた (図 4、*Biochem Biophys Res Commun* 395(4): 502-8, 2010)。



同様に、IC 1 mg を含有した α TCP 担体についても、有意な骨形成能を認めた (図 5、*Tissue Eng Part A* 16(1): 233-43, 2010)。



以上より、本研究において新規に同定した IC 及び TH を、開発した α TCP 担体による徐放システムと組み合わせることで、効率的な骨再生を in vivo において誘導できることが示唆された。

現在、ラット歯周疾患モデルを用いて、TH の歯槽骨再生に対する効果を検証している。TH 含有 3%ヒドロキシプロピルセルロース

(HPC) ゲルを、歯周炎誘発後 2 週目で歯槽骨欠損部に投与し、放射線学的・組織学的解析を進めている。

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 16 件)

- ① Nakajima K, Komiyama Y, Hojo H, Ohba S, Yano F, Nishikawa N, Ihara S, Aburatani H, Takato T, Chung UI: Enhancement of boneformation ex vivo and in vivo by a helioxanthin-derivative. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, 395(4), 2010, pp. 502-508.
- ② Zhao J, Ohba S, Komiyama Y, Shinkai M, Chung UI, Nagamune T: Icariin: a potential osteoinductive compound for bone tissueengineering. *Tissue Eng Part A*. 査読有, 16(1), 2010, pp233-243.
- ③ Mori Y, Yano F, Shimohata N, Suzuki S, Chung UI, Takato T. Trehalose inhibits oral dryness by protecting the cell membrane. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 査読有, 39(9), 2010, pp916-921.
- ④ Mori Y, Ogasawara T, Motoi T, Shimizu Y, Chikazu D, Tamura K, Fukumoto S, Takato T. Tumor-induced osteomalacia associated with a maxillofacial tumor producing fibroblast growth factor 23: report of a case and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 査読有, 109(3), 2010, pp57-63.
- ⑤ Saijo H, Kanno Y, Mori Y, Chikazu D, Iino M, Takato T. A bone harvesting method involving a surgical template prepared using a three-dimensional model. *Asian. J. Oral. Maxillofac. Surg*. 査読有, 22, 2010, pp20-22.
- ⑥ Mori Y, Susami T, Chikazu D, Saijo H, Sakiyama M, Matsuzaki M, Abe M, Wada M, Iino M, Takato T. Unilateral expansion of a narrow mandibular dental arch combined with bimaxillary osteotomies in a patient with hypoglossia. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 査読有, 38(6), 2009, pp689-693.
- ⑦ Hojo H, Igawa K, Ohba S, Yano F, Nakajima K, Komiyama Y, Ikeda T, Lichtler AC, Woo JT, Yonezawa T, Takato T, Chung UI. Development of

high-throughput screening system for osteogenic drugs using a cell-based sensor. Biochem Biophys Res Commun. 査読有, 376(2), 2008, pp375-379.

- ⑧ Zhao J, Ohba S, Shinkai M, Chung UI, Nagamune T: Icarin induces osteogenic differentiation in vitro in a BMP- and Runx2-dependent manner. Biochem Biophys Res Commun. 査読有, 369(2), 2008, pp444-448.

[学会発表] (計 26 件)

- ① Kanno Y, Takato T, Saijo H, Igawa K, Seto I, Mori Y, Ohkubo K, Sasaki N, Suzuki S, Chung UI. A novel method for designing and fabricating custom-made artificial bones. Bernd-Spiessl-Symposium 2010, 2010 年 6 月 18 日, Basel, Switzerland.
- ② 須佐美隆史, 森良之, 大久保和美, 長濱浩平, 西條英人, 高戸毅. 口唇口蓋裂患者における二段階上顎骨延長・下顎後方移動術を用いた 外科的矯正治療の治療結果. 第 28 回日本頭蓋顎顔面外科学会学術集会. 2010 年 10 月 28-29 日, 京都大学 (吉田キャンパス), 京都
- ③ 森良之, 須佐美隆史, 西條英人, 菅野勇樹, 近津大地, 末永英之, 杉山円, 前田祐二郎, 斎藤健太郎, 飯野光喜, 高戸毅: 進行性骨化性線維異形成症 (FOP) 患者に対する全身麻酔下での抜歯経験. 第 54 回日本口腔外科学会総会, 2009 年 10 月 9-11 日, 札幌コンベンションセンター, 北海道.
- ④ 近津大地, 藤川由美子, 末永英之, 杉山円, 古賀陽子, 阿部雅修, 西條英人, 森良之, 飯野光喜, 高戸毅: Cyclooxygenase-2 は膜性骨の骨折治癒における key factor である. 第 54 回日本口腔外科学会総会, 2009 年 10 月 9-11 日, 札幌コンベンションセンター, 北海道.
- ⑤ 森良之, 須佐美隆史, 西條英人, 大久保和美, 近津大地, 松崎雅子, 仲宗根愛子, 飯野光喜, 高戸毅: Hemifacial microsomia に対する下顎骨延長術における工夫: 第 18 回日本顎変形症学会総会, 2008 年 6 月 17-18 日, 名古屋国際会議場, 愛知県.
- ⑥ 森良之: 骨移植および歯槽骨延長による歯槽骨造成法. 第 29 回日本口腔外科学会 教育研修会 2008 年 2 月 16-17 日, 富士ソフトアキバプラザ, 東京

[図書] (計 8 件)

- ① 森良之・高戸毅, 須佐美隆史, 「3. 下顎関節突起骨折における保存的治療」, 形

成外科診療プラクティス 顔面骨骨折の治療の実際, 平野明喜/一瀬正治/保坂善昭編集, 文光堂 2010 年, p286-289 (総ページ数 324)

- ② 森良之, 「5. 口腔粘膜に白斑のある患者が来院したら?」, 医師・歯科医師のための口腔診療必携; 困ったときのマニュアル・ヒント集 202, 高戸毅監修, 金原出版, 2010 年 pp9. (総ページ数 263)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

東京大学医学部附属病院顎口腔外科・歯科矯正歯科ホームページ:
<http://plaza.umin.ac.jp/~oralsurg/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森良之 (MORI YOSHIYUKI)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 70251296

(2) 研究分担者

近津大地 (CHIKAZU DAICHI)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号: 30343122

小笠原 徹 (OGASAWARA TORU)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 20359623

西條英人 (SAIJO HIDETO)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 80372390

鄭 雄一 (TEI YUICHI / CHUNG UNG-IL)
東京大学・大学院工学系研究科・教授
研究者番号: 30345053

(3) 連携研究者

該当しません。