

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10064

研究課題名(和文)骨結合性超分子による破骨細胞機能調節 -骨吸収抑制新規治療薬の開発-

研究課題名(英文)Regulation of osteoclast function by bone-binding supramolecules

研究代表者

吉川 美弘 (YOSHIKAWA, Yoshihiro)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：70434793

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)：本研究は酸分解性の超分子ポリロタキサンに着目し、ポリロタキサンが骨代謝に及ぼす影響について調べた。ポリロタキサンはニーマンピック病の治療薬として研究が進められていて、分解するとシクロデキストリンを放出し、コレステロールを除去する。今回の実験でカルボキシ基を修飾したポリロタキサンが、骨を模倣したリン酸カルシウムプレート上で培養した破骨細胞の機能を抑制することを明らかにした。今回、得られた結果は、ポリロタキサンが破骨細胞の産生する酸でシクロデキストリンを放出し、破骨細胞の機能を抑制することで、新たな骨吸収治療薬とな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

日本は高齢人口の急速な増加をしており、全身機能だけでなく口腔機能を維持することが健康寿命の延伸につながる。つまり、口腔機能の低下に起因するオーラルフレイルの改善は、今後の介護・予防施策にも大きな影響を与える。そのため、オーラルフレイルの第1段階に含まれる歯周病を改善していくことが、オーラルフレイルの症状を進行させないためにも重要となる。今回得られた結果によって、超分子ポリロタキサンが新たな歯周病治療薬となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study focused on the acid-degradable supramolecular polyrotaxane, which is being investigated as a therapeutic agent for Niemann-Pick disease, and investigated the effects of polyrotaxane on bone metabolism. Upon degradation, polyrotaxane releases cyclodextrins and removes cholesterol. In this experiment, we found that polyrotaxane modified with carboxy groups suppressed the function of osteoclasts cultured on calcium phosphate plates that mimic bone. The results obtained in this study suggest that polyrotaxane releases cyclodextrin with the acid produced by osteoclasts and inhibits osteoclast function, which may lead to a new bone resorption therapeutic agent.

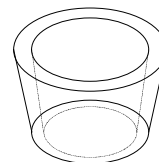
研究分野：骨代謝

キーワード：シクロデキストリン 骨吸収 破骨細胞 ポリロタキサン

## 1. 研究開始当初の背景

(1)シクロデキストリン (CD) は、食料品や医薬品などの広い範囲で現在利用されている環状オリゴ糖であり、内部が疎水性、外部が親水性であるため(右図) 生体内の疎水性低分子と包接化合物が形成することが知られている。

とくに  $\alpha$ -CD は、細胞膜中に存在するコレステロールを包接し膜外へと引き抜くため、 $\alpha$ -CD はコレステロールの機能や役割を解明するための生命科学において現在でも広く利用されている。1990 年に Harada らは、CD とポリエチレングリコール (PEG) を水溶液中で混合したところ自己組織的に多数の CD と PEG が包接錯体を形成することを発見し、さらに両



末端を大きな分子で封止して CD が PEG から抜けられないようにすることに成功し、ポリロタキサンの合成を報告した。この新しい超分子構造体は、機能性高分子材料を開発する上での基本的な構成要素としてきわめて重要であり、現在も盛んに研究が行われている。研究分担者の田村らは、軸高分子末端と封鎖基の間に分解性官能基を配した分解性ポリロタキサンを考案し、生体機能材料としての応用を世界に先駆けて推進している。その一つとして細胞内のエンドソームやリソソームに到達した後に分解するポリロタキサンを設計するために、これらの小胞内の pH が 4 - 5 程度まで低下していることに着目した酸性環境で特異的に分解するポリロタキサンの合成を報告している。2016 年には、酸分解性ポリロタキサンを用いて、コレステロールが蓄積するニーマンピック病モデルマウスの組織中のコレステロール蓄積を有意に抑制し正常レベルを維持することを明らかにした (Tamura A, Sci Technol Adv Mater)。このように世界中で活発に研究が行われている超分子ポリマー・ポリロタキサンであるが、基礎研究にまだ未解明のことが残されており、また臨床応用への展開に関しても検討することが多い。歯周病において破骨細胞の機能を調節することが重要となるが、ポリロタキサンを破骨細胞に作用させると、破骨細胞の分泌した酸がポリロタキサンを分解し、放出したシクロデキストリンが破骨細胞の機能を調節するのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究は  $\alpha$ -シクロデキストリンによる破骨細胞に対する解明されていない基礎研究を完成し、カルボキシ基を修飾した  $\alpha$ -シクロデキストリン (CMC- $\alpha$ -CD) を利用した新しい酸分解性のポリロタキサンが破骨細胞の機能をどのように影響するか明らかにし、歯周病治療薬への臨床応用に展開するための基盤研究を行うことが目的である。

## 3. 研究の方法

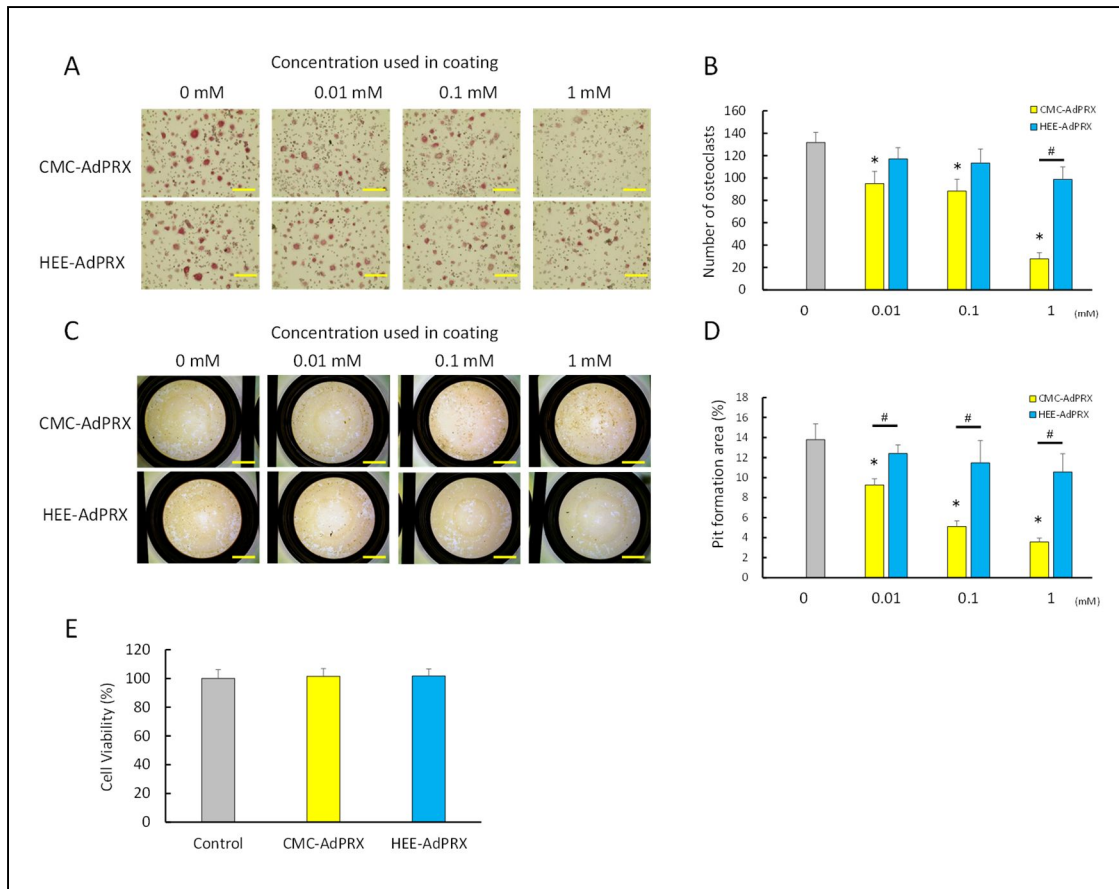
申請者らはすでに酸分解性ポリロタキサンにカルボキシル基を結合したもの (CMC-AdPRX) を合成することに成功しているので、in vitro 実験で破骨細胞の機能発現における合成ポリロタキサンの役割を明らかにする。実験方法として、リン酸カルシウムプレートを用いて、CMC-AdPRX がプレートに結合しているか確認する。さらに破骨細胞が吸収を始めた際に CMC-AdPRX が破骨細胞にどのように影響を及ぼすかについて、RAW264.7 細胞をもちいて、破骨細胞への分化度、破骨細胞の吸収能、アポトーシスについて検討した。さらに、in vivo 実験では CMC-AdPRX をマウスに投与すると骨に集積するか検討した。

## 4. 研究成果

(1) CMC- $\alpha$ -CD は RANKL による破骨細胞様細胞の分化を低下させる成熟破骨細胞に対する骨接着性 CMC- $\alpha$ -CD の影響を明らかにするために、RAW264.7 細胞を RANKL 存在下で 3 日間培養し、その後 CMC- $\alpha$ -CD とインキュベートした CMC- $\alpha$ -CD の存在下では、TRAP 陽性細胞の数は減少した。この結果は、成熟破骨細胞の数が CMC- $\alpha$ -CD の添加により減少したことを示している。

## (2) CMC-AdPRX による吸収窩のピット面積の用量依存的減少

吸収窩に対する CMC-AdPRX の効果を解析するために、リン酸カルシウムプレートに CMC-AdPRX をコーティングし、その上で RAW264.7 細胞を培養した。リン酸カルシウムプレートへの CMC-AdPRX の接着は、蛍光色素を標識した CMC-AdPRX を用いて確認した。TRAP 陽性多核細胞数は、プレートに CMC-AdPRX (0.01-1 mM) をコーティングすると、用量依存的に有意に減少した (A)。同様に、吸収窩のピット面積も用量依存的に有意に減少した (0.01-1 mM) (B)。コントロール群では変化は見られなかった。RANKL を含まない CMC-AdPRX をコートしたリン酸カルシウムプレート上で RAW264.7 細胞を培養した場合、細胞生存率に有意差は認められなかった。これらの結果から、CMC-AdPRX コーティングは単球/マクロファージの細胞生存率には影響しないが、破骨細胞の形成または成熟破骨細胞の生存には影響し、その結果、低濃度でも骨吸収を阻害する可能性があることが示唆された。



## (3) CMC-AdPRX による RAW264.7 由来破骨細胞のアクチンリング構造の破壊

アクチンリングは機能的破骨細胞に特徴的な細胞骨格の特徴である。そこで、RANKL (100ng/mL) をインキュベートした RAW264.7 細胞を用いて、CMC-AdPRX が破骨細胞のアクチンリング構造に影響を及ぼすかどうかを検討した。CMC-AdPRX を塗布したプレート上の破骨細胞では、その構造が破壊された。これらの結果は、CMC-AdPRX が破骨細胞のアクチン環構造を破壊することにより、破骨細胞の生存を抑制することを示唆している。

## (4) CMC-AdPRX の局在

蛍光色素を標識した CMC-AdPRX をマウスに投与し、マウス体内の局在を確認したところ、骨への集積が見られなかった。CMC-AdPRX は破骨細胞の機能を調節するが、骨への集積がみられないため、今後、別の官能基を選択し、修飾しなければならない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 YOSHIKAWA Yoshihiro, TAMURA Atsushi, TSUDA Susumu, DOMAE Eisuke, ZHANG Shunyao, YUI Nobuhiko, IKEO Takashi, YOSHIZAWA Tatsuya	4. 巻 41
2. 論文標題 Calcium phosphate-adsorbable and acid-degradable carboxylated polyrotaxane consisting of - cyclodextrins suppresses osteoclast resorptive activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 624 ~ 632
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2021-331	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉川 美弘、津田 進、堂前 英資、池尾 隆
2. 発表標題 カルボキシ基を修飾した酸分解性ポリロタキサンが破骨細胞に及ぼす影響
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉川 美弘
2. 発表標題 シクロデキストリンやポリロタキサンを用いた歯周組織再生
3. 学会等名 日本歯科理工学会 近畿・中四国地方会 令和4年度夏期セミナー
4. 発表年 2022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
研究分担者	池尾 隆  (IKEO Takashi)  (40159603)	大阪歯科大学・歯学部・教授    (34408)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	吉澤 達也  (YOSHIZAWA Tatsuya)  (40313530)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授    (17401)	
研究分担者	田村 篤志  (TAMURA Atsushi)  (80631150)	東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授    (12602)	

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