

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390460

研究課題名(和文)低分子化合物群による骨再生システムの最適化と分子機序に関する基礎的検討

研究課題名(英文)Optimization of the bone regeneration system using small molecules and examination of its molecular mechanisms

研究代表者

高戸 毅 (Tsuyoshi, Takato)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：90171454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円、(間接経費) 4,410,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、骨形成性低分子化合物を用いて、再生骨の形と量を自在に制御できる骨再生療法を確立するための基礎的知見を集積することである。骨形成性低分子化合物による骨形成誘導法の最適化から、数種の低分子化合物が骨分化を効率的に誘導することが明らかとなった。その作用機序としては、骨芽細胞への運命決定と骨芽細胞の成熟によることが示唆された。また、これらの化合物を骨欠損モデルに局所投与することで、良好な骨再生を誘導できることが動物実験において確認された。これらの知見は、低分子化合物による骨再生法の開発へ寄与するものと思われる。

研究成果の概要(英文)：This study is aimed to obtain basic knowledge on the bone regenerative therapy in which the shape and amount of regenerated bones are controlled by osteogenic small molecules. Optimization of osteogenic small molecule-based bone formation revealed that several small molecules efficiently induced osteoblast differentiation. Mechanistic studies proposed that their modes of action were the cell fate specification into an osteoblast lineage and the subsequent osteoblast maturation. Local administration of the molecules into bone defect models achieved bone regeneration in animals. Thus, these findings will lead to the development of small molecule-based bone regenerative therapies.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：骨再生

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り、その治療法として骨再生療法が注目を浴びて久しい。申請者らは骨形成性シグナルに関する基礎研究を行う一方で、骨形成性低分子化合物による骨再生法の開発に関して精力的に研究を行い、重要な知見を発表してきた。骨形成性低分子化合物の探索的研究の結果、ヘリオキサチン誘導体 (TH; *Biochem Biophys Res Commun*, 2007) とイソフラボン誘導体 (Glabrisoflavone-GI; *Biochem Biophys Res Commun*, 2008) を新たに骨形成性化合物として同定している。また、申請者らは、骨形成性シグナルに関する基礎研究からも低分子化合物による骨再生法の開発につながる知見を得ている。骨発生に必須の Hedgehog (Hh) シグナルに関する検討の結果、Hh シグナルが胎児期の骨発生過程のみならず成体の骨量調節にも関与することを世界で初めて明らかにした (*Dev Cell*, 2008)。ほかに、種々の骨形成性シグナルの役割について、他の研究グループによって示されている。これらの因子あるいはその下流シグナルを制御できる低分子化合物は既に同定されていることから、これらの化合物を骨再生に応用できる可能性は非常に高い。

骨形成は「前駆細胞の誘導」と「前駆細胞の骨芽細胞への分化・成熟」という2つの段階に大別され、前者が「骨形成の位置」を、後者が「骨の量・質」を決定すると考えられる。もし我々がこれらの段階を制御できれば、形成される骨の形と量を自在にコントロールできると考えられる。

以上をふまえ、申請者が同定してきた骨形成性低分子化合物群と骨形成性シグナル作動性化合物群を「骨形成過程における最適な時期」に「最適な量及び組み合わせ」で適用することによって、形成される骨の形と量を制御できるのではないかと考え本研究を着想した。再生骨の形と量を自在にコントロールするための低分子化合物の適用法とその背後にある分子メカニズムの解明は、我々が目指す骨再生法の実現のために必須の課題である。

2. 研究の目的

これまでに申請者らが行ってきた研究の展開研究として、申請者ら自身が同定した骨形成性低分子化合物群、及び骨形成性シグナル作動性化合物群の骨形成誘導過程における適用時期と量を最適化し、それらを使い分けて使用することにより、欠損部周囲の前駆細胞が自律的に再生骨の位置・量・形を決め、骨を再生させるシステムを開発することが本研究の目的である。申請者らが新たに開発した *ex vivo* 骨形成検出システムにより、生体内により近い環境で、骨形成に有効な低分子化合物群の組合せを時期・量を含めて網羅的に検討し、さらにはその背後にある分子メカニズムも解明したいと考えている。また、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の検証も行う。以上より、骨形成性低分子化合物群と骨形成性シグナル作動性化合物群を用いて、再生骨の形と量を自在に制御できる骨再生療法を確立するための基礎的知見を集積することを最終目標とする。

3. 研究の方法

1. *ex vivo* 骨形成検出システムを用いた、骨形成性低分子化合物群と骨形成性シグナル作動性化合物群による骨形成誘導法の最適化：申請者ら自身が同定した骨形成性低分子化合物群及び骨形成性シグナル作動性化合物群の最適な投与量・投与時期について、*ex vivo* 骨形成検出システムである中足骨の器官培養系でスクリーニングを行う。

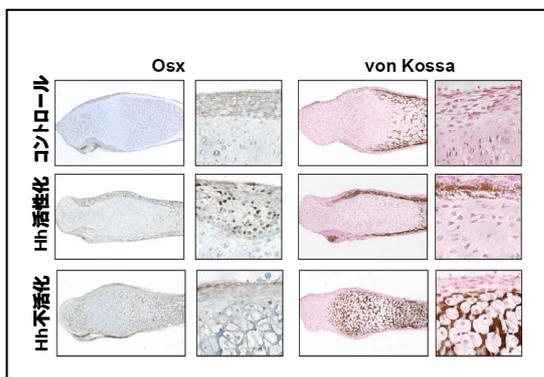
2. 最適化された低分子化合物誘導性骨形成法における分子メカニズムの解明：最適化された低分子化合物誘導性骨形成法の分子メカニズムを検討する目的で、標的遺伝子の検索と相互作用因子の同定を行う。

3. 最適化された低分子化合物誘導性骨形成法の骨再生誘導効果の *in vivo* 評価：小動物における骨欠損モデルを用いた、*in vivo* における骨再生誘導能の検証を行う。

4. 研究成果

1. *ex vivo* 骨形成検出システムを用いた、骨形成性低分子化合物群と骨形成性シグナル作動性化合物群による骨形成誘導法の最適化

過去の報告から、「ヘッジホッグ経路により骨形成性細胞への運命決定が行われる」という仮説を立て、中足骨器官培養系において、ヘッジホッグ経路の活性化および不活化の影響を検討した。その結果、ヘッジホッグ活性化剤 SAG により骨形成領域が顕著に増大する一方、ヘッジホッグ経路の不活化状態では、全く骨は形成されないことが明らかとなった（下図）。これらの知見は、ヘッジホッグ活性化剤 SAG の使用が骨形成に有効であることを示唆すると思われた。また、骨形成初期における SAG 処理が骨形成領域の増加に十分であることが明らかとなった。



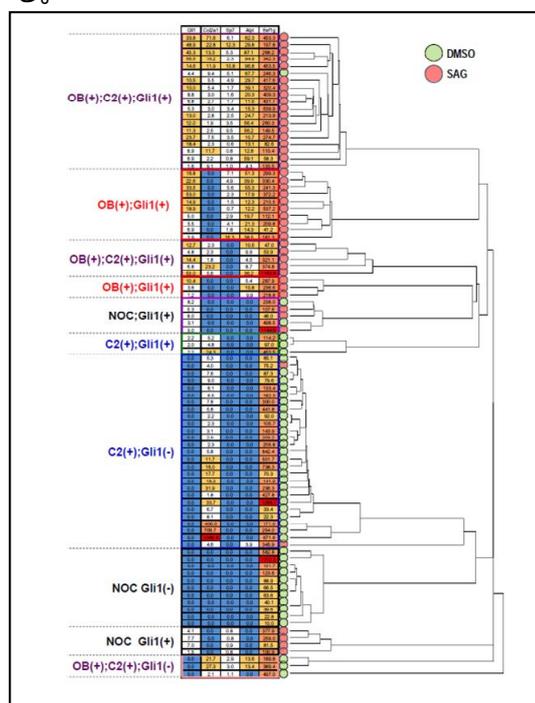
さらに申請者らが骨形成性低分子化合物として報告したヘリオキサンチン誘導体 (TH; *Biochem Biophys Res Commun*, 2007) は、器官培養系において、骨形成領域は増加させないものの、形成骨量を増加させることが判明した。以上から、SAG あるいは TH の単独・併用投与が骨形成誘導に効果的であることが示唆された。

2. 最適化された低分子化合物誘導性骨形成法における分子メカニズムの解明

SAG による骨形成促進効果の分子メカニズムを解析する目的で、マウス初代軟骨膜から採取した細胞を SAG で処理し、処理前と比較して、分化マーカー遺伝子の発現を一細胞定量的 PCR により解析した。その結果、SAG 処理によりヘッジホッグ経路を活性化させると、一部の細胞で骨芽細胞の分化マーカー遺伝子が発現するものの、発現しない細胞も認められた。以上の結果から、SAG 処理によるヘッジホッグシグナルの活性化によって、ある特定の細胞集団だけが骨芽細胞へ分化できるものと考えられた（右上図）。

また、アフィニティー精製とマスペクトロメトリー解析により TH の標的分子を同定することを試みた。アフィニティー精製は FG

ビーズシステム（多摩川精機）により行う (*Science* 327: 1345-50, 2010)。FG ビーズは磁性ビーズに、-OH 基、-NH₂ 基、-COOH 基等が付与されている。TH にアミノ基の修飾を施し、この磁性ビーズと結合できる派生体を作製した。これにより磁性ビーズと TH が結合したカラムとして機能し、TH の標的分子はこのカラムに吸着する。マウス初代前骨芽細胞のライセートをこのカラムに通し、化合物と結合する細胞内分子のアフィニティー精製とビーズに結合した分子の LC-MS による同定を試みている。現在までに有望な候補因子が得られており、詳細な解析を進めている。



3. 最適化された低分子化合物誘導性骨形成法の骨再生誘導効果の in vivo 評価

まず、TH による骨再生誘導効果を検証した。TH は疎水性であり、水に不溶なため、シクロデキストリンに包接させ、ヒドロキシプロピルセルロースを用いて、生体に投与可能な TH 含有ゲルを作製した。生体への投与に先立って、前骨芽細胞株 MC3T3-E1 を用い TH 含有ゲルの細胞毒性および骨芽細胞分化誘導能を検討すると、TH 含有ゲルはインビトロにおいて顕著な細胞毒性は示さず、骨芽細胞への分化を誘導できることが判明した。また、TH 含有ゲルからの TH の徐放についてもインビトロで検証した。すると、TH のゲルからの徐放は少なくとも 8 日間継続することが明らかとなった。

TH含有ゲルの安全性、THの徐放とそれによる骨芽細胞分化促進効果が確認されたことから、次にラット歯周炎モデルにおける骨再生効果の検証を行った。ラット歯周炎モデルは、Wistar rat 8週齢オスの上顎第2臼歯の片側に4週間5-0絹糸結紮を行うことで作製した。本モデルでは、絹糸結紮1週目より歯肉の腫脹と発赤を認め、絹糸除去直後から歯槽骨の炎症性吸収を認め、骨吸収は絹糸除去後4週まで継続することを確認した。

本モデルを用い、絹糸除去後1週間目に、TH含有ゲルを歯肉溝内に注入し、絹糸除去後4週（TH含有ゲル投与後3週）でその歯槽骨再生効果を検証した。マイクロCT像では、対照群、TH投与群共に骨欠損部を認めたが、TH投与群では骨破壊が減少していた。マイクロCT画像をもとに歯槽骨量の定量を行うと、TH投与群では、歯槽骨の減少が有意に抑制されていることが明らかとなった。以上より、THを添加したゲルでは、THの骨形成能を介して、歯槽骨の再生あるいは歯槽骨破壊の抑制を誘導することが示唆された。

SAGの骨再生効果については、げっ歯類における骨欠損モデルを用いて検証を進めており、有望な結果が得られている。

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11件)

1. Ohba S, Chung UI: PTHrP action on skeletal development: a key for the controlled growth of endochondral bones. *Clin Rev Bone Miner Metab* (in press) (査読有)
2. Honnami M, Choi S, Liu IL, Kamimura W, Taguchi T, Hojo H, Shimohata N, Ohba S, Koyama H, Nishimura R, Chung UI, Sasaki N, Mochizuki M: Bone regeneration by the combined use of tetrapod-shaped calcium phosphate granules with basic fibroblast growth factor-binding ion complex gel in canine segmental radial defects. *J Vet Med Sci* (in press) (査読有)
3. Choi S, Liu I, Yamamoto K, Honnami M, Sakai T, Ohba S, Echigo R, Suzuki S, Chung UI, Sasaki N, Mochizuki M: Implantation of tetrapod-shaped granular artificial bones or β -tricalcium phosphate granules in a canine large bone-defect model. *J Vet Med Sci* 76(2):229-235, 2014 (査読有)
4. Choi S, Honnami M, Liu I, Yamamoto K, Ohba S, Echigo R, Suzuki S, Nishimura R, Chung UI, Sasaki N, Mochizuki M: Cranioplasty with custom-made artificial bone after resection of multilobular bone tumor in a dog. *J Vet Clin* 31(1):46-50, 2014 (査読有)
5. Honnami M, Choi S, Liu I, Kamimura W, Taguchi T, Hojo H, Shimohata N, Ohba S, Koyama H, Nishimura R, Chung UI, Sasaki N, Mochizuki M: Repair of rabbit segmental femoral defects by using a combination of tetrapod-shaped granular artificial bones and basic fibroblast growth factor-binding ion complex gel. *Biomaterials* 34(36):9056-9062, 2013 (査読有)
6. Maeda Y, Hojo H, Shimohata N, Choi S, Yamamoto K, Takato T, Chung UI, Ohba S: Bone healing by sterilizable calcium phosphate tetrapods eluting osteogenic molecules. *Biomaterials* 34(22):5530-5537, 2013 (査読有)
7. Hojo H, Ohba S, Taniguchi K, Shirai M, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K, Mishina Y, Yamada M, Konno T, Takato T, Kawaguchi H, Kambara H, Chung UI: Hedgehog-Gli activators direct osteo-chondrogenic function of bone morphogenetic protein toward osteogenesis in the perichondrium. *J Biol Chem* 288(14):9924-9932, 2013 (査読有)
8. Hojo H, Ohba S, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI: Gli1 protein participates in the hedgehog-mediated specification of the osteoblast lineage during endochondral ossification. *J Biol Chem* 287(21):17860-69, 2012 (査読有)
9. Ohba S, Hojo H, Chung UI: Bioactive factors for tissue regeneration: State of Art. *Muscles Ligaments Tendons J* 2(3):193-203,

- 2012 (査読有)
10. Ohba S, Hojo H, Chung UI: Current progress on tissue engineering of bone and cartilage. *Endocrinol Metab* 27(1):1-11, 2012 (査読有)
 11. Saijo H, Kanno Y, Mori Y, Suzuki S, Ohkubo K, Chikazu D, Yonehara Y, Chung UI, Takato T. A novel method for designing and fabricating custom-made artificial bones. *Int J Oral Maxillofac Surg* 40(9):955-60, 2011 (査読有)

〔学会発表〕(計 12 件)

1. Maeda Y, Ohba S, Hojo H, Shimohata N, Yano F, Yamamoto K, Takato T, Chung UI: Bone healing by the combination of SAG- and TH-loaded artificial bones. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research, 2013.5, Kobe, Japan (Travel Award)
2. 菅野勇樹, 西條英人, 鄭雄一, 森良之, 高戸毅: in situ Tissue Engineering 型カスタムメイド人工骨の骨癒合状態の CT による評価. 第 58 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 福岡, 2013.10
3. 波田野典子, 大庭伸介, 鄭雄一, 高戸毅: ラット歯周炎モデルの確立と骨形成性低分子化合物による歯槽骨再生療法の検討, 第 67 回日本口腔科学会総会, 栃木, 2013, 5.
4. 波田野典子, 大庭伸介, 鄭雄一, 高戸毅: 低分子化合物による歯槽骨再生療法の検討とラット歯周炎モデルの確立. 第 12 回日本再生医療学会総会, 神奈川 2013.3
5. 前田祐二郎, 大庭伸介, 北條宏徳, 高戸毅, 鄭雄一: ヘッジホッグシグナル活性化剤とヘリオキサンチン誘導体を搭載した骨形成性薬剤徐放型人工骨の開発. 第 12 回日本再生医療学会総会, 神奈川, 2013.3
6. Takato T: Application of Bone and Cartilage Regenerative Medicine in Oral and Maxillofacial Areas. ACOMS 2012, 2012.11, Kuta, Bali-Indonesia
7. Hojo H, Ohba S, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata H, Suzuki K, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI: Gli1 Participates in the Indian Hedgehog-mediated Osteogenesis during Endochondral Ossification. 34th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2012.10, Minneapolis, MN, USA (Travel Award)
8. Maeda Y, Ohba S, Hojo H, Shimohata N, Yano F, Yamamoto K, Hatano N, Takato T, Chung UI: Development of a Novel Tetrapod-shaped Drug-eluting Artificial Bone. 34th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2012.10, Minneapolis, MN, USA
9. Hojo H, Ohba S, Taniguchi K, Shirai M, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K, Mishina Y, Yamada M, Konno T, Takato T, Kawaguchi H, Kambara H, Chung UI: Osteo-chondrogenic Function of BMP is Directed Toward Osteogenesis by Hh-Gli1 in the Perichondrium. 34th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2012.10, Minneapolis, MN, USA
10. Takato T: The Present and Future of Bone and Cartilage Regenerative Medicine in the Oral and Maxillofacial Area. XXI Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery, 2012.9, Dubrovnik, Croatia
11. 高戸毅: 骨軟骨再生医療の現状と展望. 第 70 回日本矯正歯科学会大会 & 第 4 回国際会議 日本学術会議歯学委員会シンポジウム, 名古屋, 2011.10
12. 大庭伸介, 鄭雄一, Andrew P. McMahon: 遺伝学的手法と組み合わせたクロマチン免疫沈降 - シーケンス法の骨軟骨生物学への応用. 第 24 回日本動物細胞工学会, 東京, 2011.7

〔図書〕(計 2 件)

1. 星和人, 高戸毅: 軟骨細胞を使った顎・顔面の軟骨再生, 再生医療叢書 (日本再生医療学会監修) - 6 骨格系 (脇谷滋之, 鄭雄一編), 12-25, 朝倉書店, 東京, 2012
2. 大庭伸介, 鄭雄一: 多能性幹細胞を使った骨再生, 再生医療叢書 (日本再生医療

学会監修) - 6 骨格系 (脇谷滋之, 鄭雄
一編), 128-140, 朝倉書店, 東京, 2012

〔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

高戸 毅 (TAKATO, Tsuyoshi)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：90171454

(2)研究分担者

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

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

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

鄭 雄一 (TEI, Yuichi/ CHUNG, Ung-il)
東京大学・工学系研究科・教授
研究者番号：30345053

(3)連携研究者

なし