

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 7 月 16 日現在

機関番号：34408  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23792272  
 研究課題名（和文）遺伝的アルゴリズムを用いた BMP-2 共活性無機元素複合薬の開発と評価  
 研究課題名（英文）Development and Evaluation of Drug Cocktails Containing Bioinorganic Elements and BMP-2 by Genetic Algorithms  
 研究代表者  
 本田 義知（HONDA YOSHITOMO）  
 大阪歯科大学・歯学部・助教  
 研究者番号：90547259

研究成果の概要（和文）：本研究は、生物実験と情報工学を組み合わせた Feedback system control (FSC) を駆使し、数限りない組み合わせが考えうる複数の外的因子を最適に混合し、最小限の Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) 量で、最大限の骨芽細胞分化誘導能を引き出す、共活性複合薬創生プロセスの基礎を築く事を目的とした。その結果、骨芽細胞分化を促す複合薬探索に用いる FSC に最適なバイオマーカーを同定し、通常の 100 分の 1 以下の BMP-2 量でも同程度の活性を持つ複合薬のプロトタイプの開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：I established a novel expeditious drug screening approach, Feedback system control (FSC) with differential evolution, to search for optimal drug cocktails that induced osteoblastogenesis of mesenchymal stem cells. With an adequate biomarker, FSC process robustly elicited prospective drug cocktails containing bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), which concentration was lower than one hundredth of conventional osteogenic media.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：情報工学・BMP-2・骨再生・幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

口腔癌、顎骨骨折、歯周病などによって生じた骨欠損修復は、歯科における重要な検討課題となっている。現在骨欠損の治療には自家移植が広く用いられているものの、二次手術の必要性や、採取可能な骨量が限定される事から、優れた代替方法が求められている。この観点から、患者より採取した体性幹細胞と人工骨や成長因子を、単独または複数複合化した治療が広く試みられているが、今だ自

家骨移植と同等の骨形成能を得るには至っていない。BMP-2 は強力な骨形成成長因子として広く認知され、事実マウスを含めた小動物の齧歯類では優れた骨形成能を示す。しかし、ヒトへ用いた場合、必要とされる骨量を誘導するには、コスト、副作用に問題を生じうるほど大量の BMP-2 が必要となる点に未だ課題を残す。この課題を克服するため、BMP-2 の骨形成誘導能に共活性を示す、補助因子の探索が国内外問わず広く試みられている。これ

まで、レチノイン酸 (RA) などが優れた共活性性を発揮する事が報告されているが、劇的に BMP-2 量を低下させるには至っていない。一方、骨芽細胞分化誘導因子として知られる、アスコルビン酸 (AA)、 $\beta$ -グリセロフォスフェート (beta-GP)、デキサメタゾン (DEX) の混合剤も、BMP-2 への顕著な共活性は示さない事が報告されている。以上の背景から、新たに最小限の BMP-2 量でも最大限の相乗効果を引き出す優れた共活性因子が発見されれば、歯科・整形外科の骨欠損治療の進歩に大きく貢献することが予想される。

## 2. 研究の目的

本研究では、生物実験とアルゴリズム (情報工学) を組み合わせた FSC を駆使し、数限りない組み合わせが考える複数の外的因子 (ビタミン、無機元素など) を最適に混合し、最小限の BMP-2 量で、最大限の骨芽細胞分化誘導能を引き出す、共活性複合薬創生の基礎を築くことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 複合薬プロトタイプ of 創製

複合薬開発を考慮した場合、*in vivo* 実験を用いて FSC を遂行する事が望まれる。しかしながら、本 FSC は新規技術であり再生医療領域への応用方法は未だ確立されておらず、慎重な実験が求められた。従って本申請では、FSC による骨形成複合薬開発の第一歩として、複合薬と成分が一致する細胞培養培地をプロトタイプとして作成し、*in vitro* で間葉系幹細胞の骨芽細胞分化を評価する事で FSC の有用性を評価する事とした。(以下複合薬の表記は、*in vitro* における培養液を示す。) 複合薬に用いる共活性因子としては、間葉系幹細胞・骨芽細胞の分化促進効果を持つ事が既に知られているビタミン、ホルモン、無機元素 (Ca など) を機軸として選択した。これらの成分種類と、BMP-2 を様々な濃度で細胞培養用培地へ含有し、複合薬のプロトタイプとした。各成分濃度は、過去の論文を参考に、細胞生存率に影響を与えない濃度を最大濃度として、13 種類程度を検討した。

### (2) 複合薬の提示方法

以下、各複合薬は成分の濃度を表すコードの羅列にて示す事とする。コードの定義はコード 12 を最大濃度とし、コード 11 はコード 12 の 1/2、コード 10 はコード 11 の 1/2、以下同様とする。複合薬の一例: 50  $\mu$ M AA2P + 10 mM beta-GP + 200 nM DEX + 0.1  $\mu$ M RA + 0.4 ng/mL BMP2 + 0.4  $\mu$ g/mL Hep + 0.1 nM VD3 = "99(10)3222"。

### (3) 細胞培養方法

FSC に用いる細胞は、マウス間葉系幹細胞株 (D1 細胞: D1 ORL UVA [D1]CRL-12424) を選択した。D1 細胞は、他の細胞株に比べ、骨分化マーカーの発現が早い点に利点を持つ。D1 細胞は、ATCC より入手し、ダルベッコ変法イーグル最小必須培地に 10% のウシ胎児血清、1% のペニシリン・ストレプトマイシンを添加した増殖培地内で培養し維持した。FSC では継代数 3 から 6 の細胞を使用した。

### (4) FSC プロセス

FSC は下記の要領で遂行した。調製した複数の複合薬で細胞に刺激をかけた後、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性測定または石灰化実験で定量結果を得る。これらの定量結果を適応度としてアルゴリズムに入力し、次のサイクルの複合薬候補となる組成を算出した後、新たな複合薬を調製し再び細胞実験を行なう。これを繰り返し、最適化を進めていく (図 1)。アルゴリズムは、実験の遂行上、遺伝的アルゴリズムから進化的アルゴリズムへと変更した。

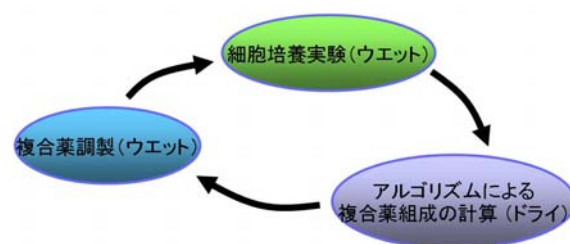


図 1 FSC 模式図

### (5) アルカリフォスファターゼ活性評価

生物実験における 1 つ目の適応度としては、初期骨芽細胞分化マーカーとして知られる ALP 活性を評価した。細胞培養用プレートに細胞を播種後、各複合薬で刺激し、3 日後に ALP 測定を行った。

### (6) 石灰化実験

生物実験における 2 つ目の適応度としては、後期骨芽細胞分化マーカーとして知られる石灰化度を、カルシウム定量評価を用いて調査した。細胞培養用プレートに細胞を播種後、各複合薬で刺激し、所定の日数まで培養後、石灰化度を評価した。また、石灰化の具合を視覚的に確認するため、アリザリンレッド染色を併用した。

### (7) BMP-SMAD シグナル経路の阻害実験

FSC を用いた複合薬探索により、BMP-2 量を大きく減じる組み合わせが発見された場合、副作用を回避する目的からも、作用機序の解明は必須である。これまで、BMP-2 は BMP-2 受容体に結合後、R-smad をリン酸化させ、最終的に核内転写因子の Dlx5、Runx、Osx を活性化する事で、骨芽細胞分化を促す経路がすでに知られている。同定された複合薬は、共活性因子のシグナル伝達経路が複雑にクロストークし、相乗的に作用した結果、優れた骨芽細胞分化を導いたと推察された。そこで、本申請では、メカニズム解明の第一歩として、複合薬がシステムとして働いた場合の、BMP-2-Smad 経路が担った役割を確認した。方法としては、Smad 経路の各種選択的阻害剤 (Noggin、Dorsomorphin など) を用いて Smad 経路の各シグナル因子を阻害し、骨芽細胞分化誘導に与える影響を評価した(図 2)。本評価は、石灰化実験と阻害剤を併用して行った。

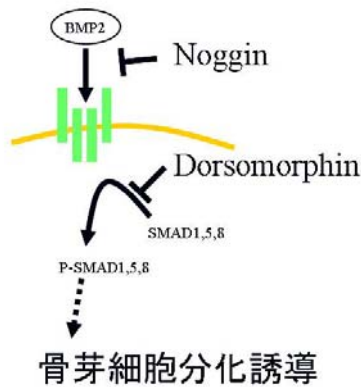


図 2 BMP-2 誘導性骨芽細胞分化に対する Noggin および Dorsomorphin の阻害機序

#### 4. 研究成果

申請段階では、実験期間短縮の観点から初期骨分化マーカーとして知られる初期 ALP を適応度として使用し、無機元素を中心とする複合薬の開発を検討していた。しかしながら、その後の詳細な検討により同マーカーは FSC を用いた複合薬探索に適していない可能性が明らかとなった。例えば、ALP を用いて同定した複合薬は、初期分化は強く誘導するものの、石灰化をいずれも誘導しなかった。さらにこれらの複合薬の組成を精査すると、含まれる RA が総じて高濃度をとるなど、バイオマーカーによっては一つの試薬に大きく結果が左右されてしまう場合がある事が明らかとなった (図 3)。

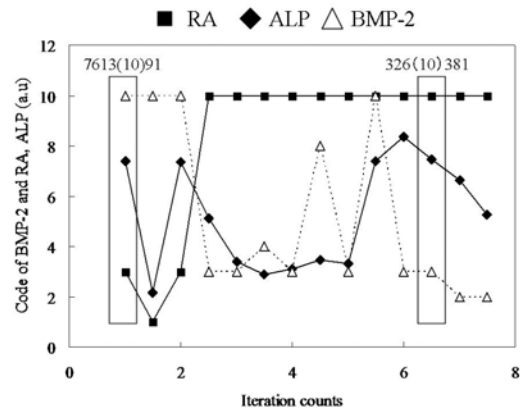


図 3 FSC プロセスにおける各成分の濃度変化の一例。ALP をバイオマーカーとして用いた場合、RA 濃度の顕著な上昇が認められた。

従って本研究期間では計画を一部変更し、将来的な骨再生医療への応用を視野に入れた間葉系幹細胞を確かに骨芽細胞へと分化誘導させる FSC プロセスの確立を主目的とする事にした。最終的な骨形成マーカーである石灰化を適応度に設定し直し、再度 FSC を用いて複合薬の探索を行い、得られた複合薬の機能および組成を精査した。その結果、石灰化度をバイオマーカーとして使用した場合、FSC プロセス 2 サイクル目から高濃度 BMP-2 含有複合薬の約 40% の石灰化を促す複合薬が出現し初め、8 サイクル目には複数の複合薬候補が同定出来た (図 4、5)。

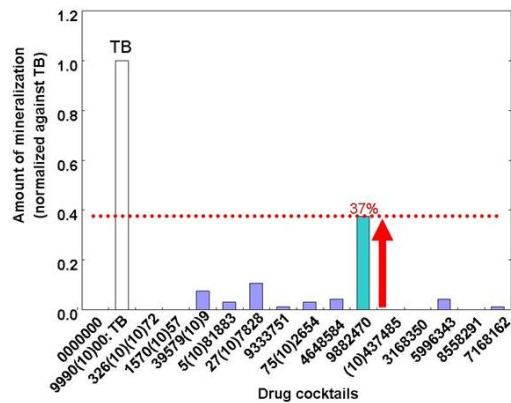


図 4 FSC プロセス 2 サイクル目における各複合薬の石灰化誘導能。TB: 基軸として用いた高濃度 BMP-2 含有複合薬。Y 軸: 各複合薬が誘導した石灰化度。各値は TB の石灰化度に対する相対値。

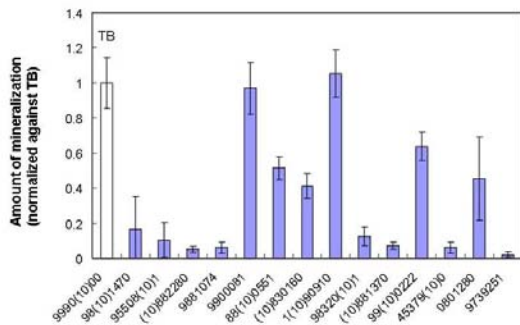


図5 FSCプロセス8サイクル目における各複合薬の石灰化誘導能。TB：基軸として用いた高濃度 BMP-2 含有複合薬。Y 軸：各複合薬が誘導した石灰化度。各値は TB の石灰化度に対する相対値。

同定された複合薬は石灰化を促すだけでなく、他の骨芽細胞分化マーカーも促進するなど、本 FSC は骨芽細胞分化を促す複合薬探索に有用である事が証明された。同研究結果は、国際学会のアメリカ骨代謝学会と MHS2011、国内学会の歯科理工学会において発表された。さらに、同複合薬の分化誘導メカニズムの解明にも取り組んだ結果、得られた複合薬は、一般的に使用される BMP-2 濃度の 100 分の 1 以下の BMP-2 量にも関わらず、BMP-SMAD シグナルを増強して骨芽細胞へと分化誘導している事が明らかとなった (図 6)。また同複合薬は頻用される骨分化培地 (AA、beta-GP、DEX) の組み合わせに比べ、優れた骨芽細胞分化誘導能を持つ事が明らかとなった。これらの成果は、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 において発表された。

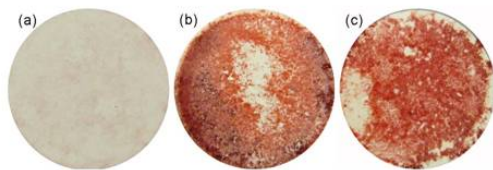


図 6 各複合薬の石灰化誘導能 (アリザリンレッド染色)。(a)コントロール。(b)TB:基軸として用いた高濃度 BMP-2 含有複合薬。(c)同定した複合薬の一例。(c)は(b)に比べ BMP-2 濃度が 100 分の 1 以下にも関わらず同程度の石灰化具合を示した。

以上をまとめると、間葉系幹細胞を安定して骨芽細胞へと分化誘導させる FSC プロセスの確立に成功した。これらの知見は、FSC を

用いた骨再生医療用複合薬や培地開発の基盤知見となることが予想される。また、幹細胞を特定の細胞へと分化誘導する培地の開発に本 FSC 技術を用いた例は過去に無く、他の細胞を用いた同様の分化誘導実験にも貢献するものと思われる。

## 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)

[学会発表] (計 4 件)

①本田義知、鈴木治、西村一郎、人工知能を利用した骨分化培地の再設計、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012、2012 年 11 月 26 日、仙台

②Honda Y、Ding X、Mussano F、Wiberg A、Ho C、Nishimura I、Application of Feedback System Control (FSC) to Identify the Optimized Osteogenic Drug Cocktails、MHS2011、2011 年 11 月 7 日、Nagoya

③本田義知、鈴木治、西村一郎、システム工学を応用した BMP2 含有骨形成複合薬の創生、第 58 回日本歯科理工学会学術講演会、2011 年 10 月 22 日、郡山

④Honda Y、Ding X、Mussano F、Wiberg A、Ho C、Nishimura I、System Engineering Approach to Optimize the Multi-cofactor Combination of Osteogenic Cocktail with Minimized BMP-2 Doses、ASBMR、2011 年 9 月 18 日、San Diego、USA

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

本田 義知 (HONDA YOSHITOMO)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90547259