

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：33602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659833

研究課題名(和文)カーボンナノチューブは骨リモデリングを制御するか？

研究課題名(英文)Do carbon nanotubes control bone remodeling?

研究代表者

高橋 直之(Takahashi, Naoyuki)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授

研究者番号：90119222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：カーボンナノチューブ(CNT)は優れた耐久性を持つため、骨の代替材料としての利用が期待される。我々は2つの新しい機能を見出した。(1)破骨細胞前駆細胞内に取り込まれたCNTは、破骨細胞分化に必要な転写因子NFATc1の核移行を選択的に抑制し、破骨細胞分化を抑制した。(2)CNTはCaの局所的蓄積を引き起こすことにより骨芽細胞分化を促進した。CNTはヒドロキシアパタイト結晶化の核として機能し、骨芽細胞による石灰化を促進した。また、CNTはin vivoにおける骨誘導因子が誘導する異所性の骨形成を促進した。本研究は「CNTは骨リモデリングの調節因子である」という新しい概念を確立した。

研究成果の概要(英文)：Much attention has been focused in recent years on the applications of carbon nanotubes (CNTs) as biomaterials. Application of CNTs to the regenerative medicine including bone regeneration is studied in particular as CNTs have been reported to be useful scaffold materials. In the process in which the skeletal metabolism action of CNT is analyzed, we found two new functions. (1) CNT taken in osteoclast precursors inhibited nuclear translocation of NFATc1, an indispensable transcription factor for osteoclastogenesis, to suppress osteoclastic differentiation. (2) CNTs promote osteoblast differentiation by causing local accumulation of Ca. CNTs served as nuclei of hydroxyapatite crystallization and induced calcification with the help of alkaline phosphatase released by osteoblasts. This synergistic effect promotes bone formation. We have established a new concept that the CNT act as a regulator of bone remodelling.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：機能系基礎歯科学

キーワード：破骨細胞 骨芽細胞 カーボンナノチューブ 石灰化

1. 研究開始当初の背景

カーボンナノチューブ (CNT) は優れた耐久性を持つため、骨と歯の代替材料としての利用が期待される。骨折治癒実験と培養実験において、CNT 繊維材である VGNF (vapor grown carbon nanofiber) と VGCF (vapor grown carbon fiber) に骨形成促進と骨吸収抑制作用があることを見出した。(1)破骨前駆細胞において、CNT は NFATc1 の核内移行を阻害し、破骨細胞分化を抑制した。一方、転写因子 NF- κ B の核内移行を抑制しなかった (Nano Lett 9:1406, 2009)。(2)骨芽細胞培養系で CNT は基質小胞性石灰化を誘導した。この現象は骨芽細胞特異的で、エピタキシー因子と相互作用する可能性が示された。対照となるカーボンブラック (CB) にはこれらの作用は、認められなかった。一方我々は *in vivo* での破骨細胞前駆細胞 (quiescent osteoclast precursors, QOP) を同定した (J Cell Biol 184:541, 2009)。本研究では、QOP を用いて、CNT による NFATc1 転写調節を解析する。CNT を用いて、エピタキシー因子をクローニングすることを計画した。CNT を骨代謝調節因子と定義することで、CNT の新しい側面が明らかにされる。50 年前に Neuman 夫妻が提唱したエピタキシー説の実態解明は、学術的重要性を内包する挑戦的課題と考える。「CNT は骨リモデリングの調節因子である」という概念の確立が期待された。また、CNT の再生医療における利用に飛躍的な進歩が期待された。

2. 研究の目的

CNT は優れた耐久性を持つため、骨と歯の代替材料としての利用が期待される。CNT の骨代謝作用を解析する過程で、我々は 2 つの新しい機能を見出した。(1)破骨細胞前駆細胞内に取り込まれた CNT は、破骨細胞分化に必要な転写因子 NFATc1 の核移行を選択的に抑制し、破骨細胞への分化を抑制した。(2)CNT はエピタキシー因子を集積することで、骨芽細胞の石灰化を促進した。本研究では「CNT は骨リモデリングの調節因子である」という新しい概念を確立する。本研究を行う総合歯科医学研究所は、硬組織研究に特化した研究機関である。硬組織研究者が総力を挙げて 50 年前に Neuman 夫妻が提唱した石灰化理論エピタキシー説の解明を目指すという極めて挑戦的研究である。

3. 研究の方法

本研究では CNT は転写因子をトラップするという仮説に基づき、CNT 結合性転写因子を解析する。CNT 結合性 NFATc1 の機能を解析する。CNT はエピタキシー因子をトラップするという仮説に基づき、エピタキシー因子のクローニングを試みる。CNT による石灰化様式を解析する。そこで、以下の 6 つの実験を行った。

(1)CNT 結合性転写因子の解析：QOP の前駆細胞

である骨髄マクロファージ (Q の細胞抽出液より、CNT 結合性の蛋白質を解析した。

(2)NATc1 の機能阻害機構の解析：CNT による NFATc1 機能阻害機構を解析した。NFATc1 機能阻害機構を解析する中で、抗ガン作用を持つアルクチゲニンが特異的に NFATc1 を抑制することを認めその作用解析も行った。

(3) 骨芽細胞の分化に対する CNT の作用：マウス頭蓋骨由来の骨芽細胞の培養系に CNT を添加し、骨芽細胞分化を評価した。

(4) CNT 結合性エピタキシー因子の解析：培養した骨芽細胞の細胞抽出液より、CNT 結合性の蛋白質を解析した。

(5) 歯髄細胞の石灰化促進機構の解析：マウスから得た歯髄細胞を培養した。その石灰化とそれに及ぼす、CNT の作用を解析した。

(6) CNT の骨形成促進作用の *in vivo* 解析：CNT を含む骨誘導因子 (BMP) ペレットをマウス皮下に移植し、骨形成を評価した。

4. 研究成果

(1) CNT 結合性転写因子の解析：QOP の細胞抽出液から CNT に特異的に結合する転写因子を解析したが、CNT に結合する転写因子を得ることはできなかった。破骨細胞の機能を CNT が抑制していることも考えられるため、現在、破骨細胞の細胞抽出液から CNT に結合する転写因子の解析を行っている。

(2) NATc1 の機能阻害機構の解析：CNT と各種阻害剤を用いて、NFATc1 の木の阻害を解析した。その結果、アルクチゲニンが特異的に NFATc1 を低分子化することを見出した。CNT にはそのような活性は認められなかった。CNT による破骨細胞形成には他の様式を介すると考えられた。一方抗ガン作用を持つアルクチゲニンが特異的に NFATc1 を抑制することを見出した。また、その作用は NFATc1 を低分子化しドミナントネガティブ型 NFATc1 を作ることによることを明らかにした (論文)。このメカニズムが CNT による NFATc1 抑制機構に關与するか現在解析中である。

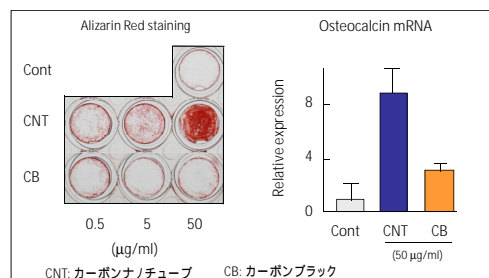
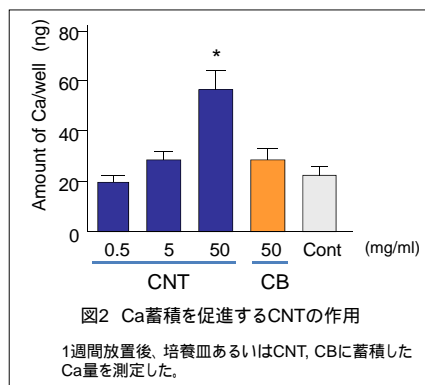


図1 CNT の骨芽細胞分化促進作用

頭蓋骨由来の骨芽細胞培養系にCNTあるいはCBを添加して3週間培養した。培養後、アリザリンレッド染色を行った。また、オステオカルシンmRNAの発現を定量的PCRで測定した。

(3) 骨芽細胞の分化に対する CNT の作用：マウス頭蓋骨由来の骨芽細胞の培養系に CNT を添加したところ、骨芽細胞の分化を促進した。石灰化能と Osteocalcin mRNA の発現を強力に誘導した。一方、CB にはそのような効果は認められなかった(論文 , 図1)。

(4) CNT 結合性エピタキシー因子の解析：培養した骨芽細胞の細胞抽出液より、CNT 結合性の蛋白質を解析したが、エピタキシー因子を同定することはできなかった。しかし、CNT 自身が Ca イオンを蓄積させるため、CNT がエピタキシー因子になることを明らかにした(論文 図2)。また、チタンも同様に Ca イオンを蓄積できることを見出した。



(5) 歯髄細胞の石灰化促進機構の解析：マウスから得た歯髄細胞を培養したところ、歯髄細胞は著しく石灰化能が高いことが認められた。その作用には *Anexin8* が関わることを示された。CNT も歯髄細胞の石灰化を促進する可能性が示唆された。現在 CNT による石灰化促進機構を解析中である。

(6) CNT の骨形成促進作用の *in vivo* 解析：CNT を含む骨誘導因子 (BMP) ペレットをマウス皮下に入れて、骨形成を評価したところ、石灰化促進作用が認められた。以上のように、CNT は骨形成を促進する因子であることが、*in vivo* でも証明された(論文)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 18件)すべて査読あり
Takahashi N, Mizoguchi T, Nakamichi Y, Kobayashi Y, Nakamura M, Willy Hofstetter W, Udagawa N: Osteoclast Cell Lineage: Characteristics and behavior of osteoclast precursors *in vivo* Encyclopedia of Human Body 3rd Edition, in press, 2014.

Nakayama T, Thirukond GJ, Nagasaw S, Kawahara I, Udagawa N, Yagami K, Kawatani M, Osada H, Doi Y, Yoshinaria N, Takahashi N: Osteoclasts polarize on

dental implant materials as if they were on bone. J Oral Biosci, in press, 2014.

Watanabe C, Morita M, Hayata T, Nakamoto T, Kikuguchi C, Li X, Kobayashi Y, Takahashi N, Notomi T, Moriyama K, Yamamoto T, Ezura Y, Noda M: Stability of mRNA influences osteoporotic bone mass via *Cnot3*. Stability of mRNA influences osteoporotic bone mass via *CNOT3*. Proc Natl Acad Sci USA 111:2692-2697, 2014. doi: 10.1073/pnas.1316932111.

Okamoto M, Udagawa N, Uehara S, Maeda K, Yamashita T, Nakamichi Y, Kato H, Saito N, Minami Y, Takahashi N, Kobayashi Y: Noncanonical *Wnt5a* enhances *Wnt/*-catenin signaling during osteoblastogenesis. Sci Rep 4:4493,2014 doi: 10.1038/srep04493.

Yamashita T, Uehara S, Udagawa N, Li F, Kadota S, Esumi H, Kobayashi Y, Takahashi N: Arctigenin inhibits osteoclast differentiation and function by suppressing both calcineurin-dependent and osteoblastic cell-dependent *NFATc1* pathways. PLOS ONE 9: e85878, 2014 doi: 10.1371/journal.pone.0085878.

Maeda K, Takahashi N, Kobayashi Y: Roles of *Wnt* signals in bone resorption during physiological and pathological states. J Mol Med 91:15-23, 2013. doi: 10.1007/s00109-012-0974-0.

Horibe K; Nakamichi Y; Uehara S; Nakamura M; Koide M; Kobayashi Y, Takahashi N, Udagawa N: Roles of cathelicidin-related antimicrobial peptide in murine osteoclastogenesis. Immunology 140:344-351, 2013. doi: 10.1111/imm.12146.

Nakamichi Y, Udagawa N, Takahashi N: IL-34 and CSF-1: similarities and differences. J Bone Miner Metab 31 486-495, 2013. doi: 10.1007/s00774-013-0476-3.

Koide M, Kobayashi Y, Ninomiya T, Nakamura M, Yasuda H, Arai Y, Okahashi N, Yoshinari N, Takahashi N, Udagawa N: Osteoprotegerin-deficient male mice as a model for severe alveolar bone loss: comparison with *RANKL*-overexpressing transgenic male mice. Endocrinology 154:773-782, 2013. doi:

10.1210/en.2012-1928.

Takahashi N: Mechanism of inhibitory action of Eldecalcitol, an active vitamin D analog, on bone resorption in vivo. *J Steroid Biochem Mol Biol* 136:171-174, 2013. doi:pii: S0960-0760(12)00243-9.

Shimizu M, Kobayashi Y, Mizoguchi T, Nakamura H, Kawahara I, Narita N, Usui Y, Aoki K, Hara K, Haniu H, Ogihara N, Ishigaki N, Nakamura K, Kato H, Kawakubo M, Dohi Y, Taruta S, Kim YA, Endo M, Ozawa H, Udagawa N, Takahashi N, Saito N: Carbon nanotubes induce bone calcification by bidirectional interaction with osteoblasts. *Adv Mater*, 24(16):2176-2185, 2012. doi: 10.1002/adma.201103832.

Yamashita T, Takahashi N, Udagawa N: New roles of osteoblasts involved in osteoclast differentiation. *World J Osteoarthritis* 3:175-181, 2012. doi: 10.5312/wjo.v3.i11.175.

He Y, Rhodes SD, Chen S, Wu X, Yuan J, Yang X, Jiang L, Li X, Takahashi N, Xu M, Mohammad KS, Guise TA, Yang FC: c-Fms signaling mediates neurofibromatosis type-1 osteoclast gain-in-functions. *PLoS ONE*, e46900, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0046900.

Nakamichi Y, Mizoguchi T, Arai A, Kobayashi Y, Sato M, Penninger JM, Yasuda H, Kato S, DeLuca HF, Suda T, Udagawa N, Takahashi N: Spleen serves as a reservoir of osteoclast precursors through vitamin D-induced IL-34 expression in CSF-1^{op/op} mice. *Proc Natl Acad Sci UAS*, 109:10006-10011, 2012. doi: 10.1073/pnas.1207361109.

Arai A, Mizoguchi T, Harada S, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Yasuda H, Penninger JM, Yamada K, Udagawa N, Takahashi N: c-Fos plays an essential role in the up-regulation of RANK expression in osteoclast precursors within the bone microenvironment. *J Cell Science* 125:2910-2917, 2012. doi: 10.1242/jcs.099986.

Maeda K, Kobayashi Y, Udagawa N, Uehara S, Ishihara A, Mizoguchi T, Kikuchi Y, Takada I, Kato S, Kani S, Nishita M, Marumo K, Martin TJ, Minami Y, Takahashi N: Wnt5a-Ror2 signaling between

osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. *Nature Med* 18:405-412, 2012. doi: 10.1038/nm.2653.

Suda T, Takahashi F, Takahashi N Bone Effects of vitamin D -Discrepancies between *in vivo* and *in vitro* studies -. *Arch Biochem Biophys*, 523:22-29, 2012. doi: 10.1016/j.abb.2011.11.011.

Nakamura I, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Suda T: Regulation of Osteoclast Function. *Mod Rheumatol* 22:167-177, 2012. doi: 10.1007/s10165-011-0530-8.

[学会発表](計 13件)すべて招待講演
高橋直之 歯周病において破骨細胞はどのように誘導されるか. 第57回春季日本歯周病学会, 岐阜, 2014年5月23日.

高橋直之 骨芽細胞と破骨細胞、そして力の関係. *Dentistry, Quo Vadis?*, 東京, 2013年12月7日.

高橋直之破骨細胞の分化と機能を調節する RANKL-RANK シグナル 城北骨代謝フォーラム東京, 2013年10月29日.

高橋直之 インプラントは Osseointegration をどのように獲得するか 松本歯科大学インプラントカンファレンス, 塩尻, 2013年6月10日.

高橋直之 破骨細胞の分化と機能の調節機構 第86回日本整形外科学会学術総会, 広島, 2013年5月23日.

Naoyuki Takahashi: Mechanism of anti-bone resorptive action of eldecalcitol. Advisory meeting of active vitamin D Kobe, May 28, 2013.

Naoyuki Takahashi: TRAP marks as vestiges of polarized osteoclasts. 6th International symposium on the biology of tartrate resistant acid phosphatase. Kobe, May 27, 2013.

高橋直之 骨吸収を調節する Wnt シグナル. 第4回彩の国骨フォーラム, 埼玉, 2013年2月8日.

高橋直之 破骨細胞前駆細胞を制御する骨芽細胞の新しい役割. 第15回骨とリウマチ研究会, 東京, 2013年1月31日.

高橋直之 チタンインプラント埋入における生体側のイベント II. *Dentistry Quo*

Vadis?, 東京, 2013年12月8日.

高橋直之:破骨細胞の分化を調節する骨芽細胞の新しい役割. 創価大学セミナー, 東京, 2012年11月16日.

高橋直之 破骨細胞はどのように骨を認識し極性化するか. 日本歯科理工学会・中部支部夏季セミナー, 妙高高原, 2012年8月23日.

Naoyuki Takahashi Mechanism of inhibitory action of eldecacitol, an active vitamin D analog, on bone resorption in vivo. 5th Workshop on Vitamin D, Huston, 2012年6月22日.

〔図書〕(計4件)

高橋直之(分担執筆)(2014) "破骨細胞はどのようにして骨組織にのみ形成されるのか" 骨代謝 実験医学臨時増刊号 田中 栄編 p57-63, 羊土社

小出雅則, 高橋直之(分担執筆)(2013) "カルシトニンと骨・ミネラル代謝" 副甲状腺・骨代謝疾患診療マニュアル 竹内靖博編 p 16-7, 診断と治療社

小出雅則, 高橋直之(分担執筆)(2013) "ビスホスホネートの作用機構" ファーマナビゲータービスホスホネート編 2 松本俊夫、萩野 浩編 p30-38, メディカルレビュー社

高橋直之(分担執筆)(2012) "ビタミンDのカルシウム代謝調節機構" ファーマナビゲーター活性型ビタミンD₃製剤編 太田博明、松本俊夫編 p40-46, メディカルレビュー社

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.mdu.ac.jp/graduate/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋直之 (TAKAHASHI, Naoyuki)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授
研究者番号: 90119222

(2) 研究分担者

川原一郎 (KAWAHARA, Ichiro)
松本歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 20319114

中道裕子 (NAKAMICHI, Yuko)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号: 20350829

上原俊介 (UEHARA, Shunsuke)

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号: 90434480