

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32670

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670831

研究課題名(和文)低分子化合物と徐放性ナノゲルを用いた効率的硬組織再生法

研究課題名(英文)Development of new approach for effective bone repair using small natural compounds and sustained-releasing nanogel

研究代表者

太田 正人(Ota, Masato)

日本女子大学・家政学部・准教授

研究者番号：70313228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：超高齢化社会の急激な進行に伴ない、骨粗鬆症や骨折などによる生活の質の低下や長期入院による二次的な医原性疾患のリスクなどが社会問題化しつつある。これを防止するための効率的骨再生法の開発は、国民全般にとって非常に重要かつ火急の重要課題である。我々は、和漢薬として古来から使われてきた朴木から抽出されるホノキオールをBMP2タンパク質と組み合わせて、ナノゲルを用いて骨欠損部に適用し、個体差を解消しつつ、しかも効率よく骨再生を促すことのできる新規骨再生法を開発した。また、本研究では、Honokiol が関わる新規骨再生法が生体内でどのように機能するか詳細なメカニズムを解析するアッセイ系の開発も行なった。

研究成果の概要(英文)：Accompanied by the rapid progress of the super-aging society, the risk of osteoporosis and/or bone fracture, which is related to degradation of quality of life or secondary iatrogenic disease due to long-term hospitalization, is becoming a social problem. To prevent this problem, development of efficient bone regeneration method is an very important and urgent issue for the Japanese people in general. We have developed a new bone regeneration method which combined the honokiol, extracted from magnolia that has been used since ancient times in Japanese medicine, and BMP2 protein and applied to a bone defect using nanogels. This method eliminated the individual differences, yet efficiently to promote bone regeneration. Further, in the present project, we conducted the development of in vitro or in vivo assay systems to analyze the detailed functional mechanism of new bone regeneration method including Honokiol.

研究分野：食物生物学

キーワード：天然低分子化合物 ホノキオール 効率的骨修復法 徐放性ゲル nanogel Bmp2 個体差の解消 超高齢化社会

1. 研究開始当初の背景

(1)骨の再生法に関する研究は国内外において盛んに行なわれているが、実際に臨床に応用されている方法は多くない。米国において現在すでに使用されている骨形成タンパク質 (BMP) -2 タンパク質はその中でも効果が担保された数少ない生理活性物質のひとつであるが、コストや副作用の面で未だなお多いに改善すべき点はある。われわれは、FGF18 タンパク質と BMP-2 タンパク質を新規徐放性ナノゲルを用いて骨欠損部に添加することによって、BMP-2 の骨再生誘導活性の個体差を改善し、比較的低用量の BMP-2 でも骨再生を行なうことのできる方法を開発した (Fujioka-Kobayashi M. et al. Biomaterial, 2012)。さらに、FGF18 合成タンパク質が高価である点を考慮し、コスト面の改善をはかるため、我々は骨芽細胞や未分化間葉細胞において Fgf18 遺伝子の発現を誘導できる活性を持つ化合物を探索した結果、厚朴の樹皮から抽出される Honokiol が Fgf18 遺伝子発現の誘導活性をもつことを発見した。そして、局所投与することにより骨再生を誘導できることを確認した (未発表データ)。これらの結果から、Honokiol は FGF18 様の生理作用を介して BMP-2 による骨組織誘導活性が低用量で発揮できるように改善する可能性が示唆されたため、予備実験として頭蓋骨欠損モデルマウスにて検討した結果、これらの組み合わせが効果的な骨再生法になりうる可能性が強く示唆された。

2. 研究の目的

(1)本研究では、Honokiol と BMP-2 をナノゲルシステムと組み合わせ、新規骨再生法を基盤として改良を加え、低コストでしかも効果的な骨再生法を開発することを目的とした。(2)ホノキオールが有効な天然化合物であるかどうか検討するためには、様々なアッセイ系を用いて検討する必要がある。そのためホノキオールの機能や生体内での副作用の有無、さらに経口投与した場合の消化管への影響などを検討するためのアッセイ系の開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)骨を形成するための具体的な方法として、まず骨芽細胞系細胞株 MC3T3E1 細胞を用いて、ホノキオールが濃度依存的に骨芽細胞を誘導しうるかどうか、アルカリフォスファターゼ活性を示標に評価した。実際には、アルカリフォスファターゼ染色を行ない、染色反応に陽性の細胞の出現頻度、細胞の形態的变化などを総合的に評価し、骨芽細胞誘導活性を判定した。(2)徐放性ゲルと BMP-2 および天然低分子化

合物ホノキオールを組み合わせ、骨形成を効率的行なうための方法として頭蓋骨欠損マウスモデルにて検討した。新規徐放性ナノゲルを用いて様々な濃度の Honokiol と BMP-2 の組み合わせを検討し、なるべく低用量の BMP-2 で効果的に骨を再生する条件の最適化を検討した。さらに、最適化した新規骨再生法において Honokiol がどのような機構を介して骨再生を誘導するのか生化学的 / 分子生物学的手法によって解析した。

(3)水頭症の胎児は頭蓋骨の形成が抑制されており、頭蓋骨の骨低形成の症状を呈する。水頭症の表現型を示す Foxc1 機能欠損ミュータントマウスの表現型を解析し、頭蓋骨の骨形成と水頭症の関連性を明らかにし、この系で、ホノキオールの骨形成促進能をアッセイするために役立つ可能性があるかどうか検討した。

(4)ホノキオールは NF- κ B と結合し、機能を抑制することが知られている。NF- κ B シグナリングは多くの生理的および病的プロセスの調節で重要な役割を果たしている。発生過程における NF- κ B シグナルの抑制によって無汗腺性外胚葉異形成症が生じることは知られているが、歯の発生における NF- κ B シグナルの役割は完全には理解されていない。ホノキオールの NF- κ B シグナルの抑制を *in vivo* レベルでアッセイする系を開発するため、ケラチン 5 プロモータの下流で発現制御される過剰発現マウスである K5-IKK マウスの表現型を解析した。

(5)ホノキオールをはじめとする天然低分子化合物を実際に使用する場合、経口投与することが現実的であり、その際には胃腸を通じて腸管から吸収される。腸管における消化吸収には蠕動運動が関わってくるが、天然低分子化合物の生理的作用を明確にアッセイする系が必要となる。ストレスは胃腸機能障害を含む多くの消化器症状を引き起こす原因のひとつとしてよく知られており、コリン作動性及びアドレナリン作動性遠心性線維を介して腸の動きをコントロールする自律神経系に影響を及ぼす。そこで、*in vitro* でのストレス馴化ラットから単離された腸部分の平滑筋収縮に対する局所アセチルコリン (Ach) の適用とアドレナリン (ADR) の効果を試験し、ストレスによる部位依存的な蠕動運動への影響を検討した。

(6)線維芽細胞増殖因子 (FGF) は、それぞれの受容体 (FGFR 類) を介して種々の細胞の増殖および分化を調節する。胎児マウスにおける歯の発生の初期段階の間、歯牙形成の初期段階で FGF と FGFR は歯の上皮および間葉細胞において発現し、細胞の増殖および分化を調節することが示されている。しかし、歯の発生段階の後期にあたる歯根の発生段階に

おいては FGF の発現パターンについて知られていない。われわれは予備実験で、ホノキオールが幼弱な骨前駆細胞や歯胚形成細胞において Fgf18 の遺伝子発現が認められることを RT-PCR 法によって観察していた。そこで、出生後の冠と根形成段階の間でラット下顎第一大臼歯 (M1) における FGF18 の発現パターンの解析を行なった。

(7) FGF シグナリングは骨格の発達にも関与しており、22 種類の FGF ファミリータンパク質の中では、FGF18 タンパク質が骨芽細胞の分化促進に関与する可能性が示唆されている。FGF18 タンパク質依存的な骨形成促進効果を検討するために、マウス胎児の頭蓋骨の冠状縫合部に FGF18 合成タンパク質を浸したビーズを子宮外微小手術法によって移植した。さらに、発生途中の骨ドメインで骨形成の促進領域と一致して BMP-2 や FGFR-1、-2、-3 の発現量が影響されるかどうか *in situ hybridization* 法を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) コンフルエント条件の骨芽細胞系細胞株 MC3T3E1 細胞に対し、ホノキオールを 0.3、3、30、150 μM の濃度でアスコルビン酸とグリセロリン酸添加条件下で 3 日間培養後、アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色を行ない、染色反応に ALP 陽性の細胞の出現頻度をカウントした結果、3、30 μM において最も ALP 陽性細胞が多く観察された。またこれらの条件下では紡錘型の ALP 陽性細胞が観察され、陽性コントロールとしてデキサメタゾン処理した多角形の ALP 陽性細胞と明らかな形態的变化が観察された。

(2) コラーゲンをういた場合とアクリロイル化コレステロール結合プルラン (CHPA) ナノゲルを用いた場合、後者で有意に修復時間が短縮された。また、Honokiol を組み合わせると全てのマウスで効率よい骨修復が観察され、BMP-2 の骨修復活性の個体差が解消された。骨修復の状況については、X 線マイクロ CT 装置を用いて断層撮影ならびに三次元構築を行ない、新たに形成された骨の形状及び内部の骨梁形成の状況についても検討した。その結果、新たに形成された骨は周囲の骨と同様の形態を持ち、X 線撮影した画像上は有意な違いの認められない骨であった。すなわち、今回用いた材料の組み合わせは、効率よく骨形成を行なう方法として妥当であることが示唆された。

(3) Foxc1 機能欠損 mutant マウスは胎齢 11 日までに終脳の肥大と終脳腹側における血腫の表現型を示した。Foxc1 遺伝子は血管内皮細胞と周皮細胞で発現しており、神経管周囲の頭部間葉細胞でも発現していたことから、Foxc1 は終脳の血管形成と頭蓋骨形成

にとって必要不可欠な転写因子であることが明らかとなった。本 mutant マウスはホノキオールの骨形成促進能をアッセイするために役立つ可能性が示唆された。

(4) K5-1KK マウスは、標準的な Wnt シグナル伝達関連遺伝子の発現亢進と過剰切歯の表現型を示した。通常、野生型切歯上皮において観察されるアポトーシスは、K5-1KK マウスにおいて減少した。K5-1KK マウスにおける過剰切歯は、Wnt 阻害因子である Ectodin 遺伝子の mutant マウスでの過剰切歯と表現型が非常に似ていることが明らかになった。このように、過剰な NF- κ B 活性は、通常は生理的条件下で抑制される異所性歯牙形成プログラムを誘導することが明らかになった。この K5-1KK マウスの過剰切歯の抑制が生じるかどうかを示標として、ホノキオールを経口投与することによって生物学的活性を保ったままホノキオールが腸管上皮から吸収されるかどうかを *in vivo* レベルで検討することができる可能性が示唆された。

(5) ストレスとして実験動物に 1, 6, 30 日間にわたり過重力刺激 (10 分/日) を負荷として加えた結果、ストレスコンディションは回腸および結腸での Ach と Adr の感度に異なった影響を与えた。6 および 30 日のストレス馴化したラットからの結腸のサンプルでは ADR 投与による Ach 誘発性収縮の大きな振幅だけでなく、より大きな拮抗作用を示したのに対し、回腸ではコントロールとストレス馴化したラットとの間で有意差は見られなかった。これらの結果から、ストレス負荷条件下において Ach と Adr を介する平滑筋の感度の変化によって腸運動の自律制御が変化する可能性が示唆された。よって、ストレス負荷条件下で天然低分子化合物を予め投与した実験動物の腸管を用いることにより、蠕動運動の制御への影響をアッセイすることができる可能性が示唆された。

(6) マウス下顎第 1 臼歯 M1 からの cDNA を用いた RT-PCR による FGF18 の検出反応によると、FGF18 の遺伝子発現は生後 5 日目には非常に弱く、*in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) 法では検出されなかった。しかし、*in situ* PCR 法を用いて増幅することによって検出することができた。FGF18 受容体候補の FGFR2c および FGFR3 の転写は RT-PCR および ISH により、生後 7、9 および 15 日で有意に増加し、15 日目の M1 の冠と根の両方部分の象牙芽細胞と象牙芽細胞層下層の細胞内で検出できた。これらの結果から、歯根形成中の象牙芽細胞のマトリックス形成および石灰化の調節において FGF18 シグナリングが継続的に関与していることが示唆された。すなわち、ホノキオールが歯胚の Fgf18 発現に影響を及ぼすかどうかアッセイする系とし

て応用可能であることを示唆された。
(7)間葉で区切られるはずの前頭骨と頭頂骨の冠状縫合領域で FGF18 タンパク質は骨形成を促進し、縫合部の間葉が消失して、これらの骨が骨性癒着した。FGF 受容体の発現は骨格の発達に關与するが、発生途中の骨ドメインで骨形成の促進領域と一致して、FGFR-1、-2、-3 の発現量が維持または亢進された。また、FGF18 タンパク質に依存して骨形成層での BMP-2 の発現上昇が觀察された。これらの結果は、骨芽細胞において BMP-2 の発現誘導、ならびに FGFR-1、-2、-3 の維持または発現誘導により FGF18 が骨形成を促進することを示唆している。本アッセイ系はホノキオールによる骨芽細胞の分化促進活性のアッセイ系として有効であることを示唆している。

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 5 件)

Prasitsak T, Nandar M, Okuhara S, Ichinose S, Ota MS, Iseki S., Foxc1 is required for early stage telencephalic vascular development. Dev Dyn. 2015, 査読有り、vol.244, No.5, pp703-11. doi: 10.1002/dvdy.24269.

Blackburn J, Kawasaki K, Porntaveetus T, Kawasaki M, Otsuka-Tanaka Y, Miake Y, Ota MS, Watanabe M, Hishinuma M, Nomoto T, Oommen S, Ghafoor S, Harada F, Nozawa-Inoue K, Maeda T, Peterková R, Lesot H, Inoue J, Akiyama T, Schmidt-Ullrich R, Liu B, Hu Y, Page A, Ramírez Á, Sharpe PT, Ohazama A. Excess NF- B induces ectopic odontogenesis in embryonic incisor epithelium. J Dent Res. 2015、査読有、vol. 94, No.1, pp121-8. doi: 10.1177/0022034514556707.

Kimoto M, Zeredo JL, Ota MS, Nihei Z, Toda K. Comparison of stress-induced modulation of smooth-muscle activity between ileum and colon in male rats. Auton Neurosci. 2014、査読有、vol.183, pp8-11. doi: 10.1016/j.autneu.2014.01.008.

Baba O, Ota MS, Terashima T, Tabata MJ, Takano Y. Expression of transcripts for fibroblast growth factor 18 and its possible receptors during postnatal

dentin formation in rat molars. Odontology. 2013、査読有、

Nagayama T, Okuhara S, Ota MS, Tachikawa N, Kasugai S, Iseki S. FGF18 accelerates osteoblast differentiation by upregulating BMP-2 expression. Congenit Anom (Kyoto). 2013、査読有、vol.53, No.2, pp83-8. doi: 10.1111/cga.12012.

[学会発表](計 1 件)

Masato Ota, Honokiol cooperatively stimulate harmine-dependent osteogenesis .International Fronteir Meeting. 2015/ Feb/ 13-14 (Tokyo, Bunkyo-ku)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www2.jwu.ac.jp/kgr/jpn/ResearcherInformation/ResearcherInformation.aspx?KYCD=00012255>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

太田 正人 (OTA, Masato)

日本女子大学・家政学部食物学科・准教授
研究者番号：70313228