

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870188

研究課題名(和文) 低分子化合物を用いた骨・歯周組織再生促進システム開発のための基礎的研究

研究課題名(英文) Basic studies for the development of bone and periodontal regeneration system using small molecule compounds

研究代表者

米澤 貴之 (YONEZAWA, Takayuki)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：20410665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：低分子化合物を用いた骨・歯周組織再生促進システム開発のため、骨芽細胞分化促進化合物であるハルミンの作用機構について遺伝子レベル、タンパク質レベル、分子レベルにおける多面的解析を行った。その結果、ハルミンの骨芽細胞分化促進作用にはBMP経路だけでなく、Wnt経路およびヘッジホッグ経路が関わっている可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：To develop strategies for bone-periodontal tissue regeneration using small-molecule compounds, the mode of action of harmine, which is an activator compound of osteoblast differentiation, was investigated. As a result, we found that BMP, Wnt and Hedgehog pathways are involved in the action of harmine on osteoblast differentiation.

研究分野：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：歯周病 骨芽細胞 低分子化合物

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は45歳以上の5割以上が罹患しているとも言われ、最も身近な生活習慣病のひとつである。また、最近の研究によって、歯周病が肥満や糖尿病などの他の生活習慣病の悪化にも深く関与していることが明らかとなっており、メタボリックシンドロームの危険因子としての認識も広まりつつある。したがって、歯周病の治療は、患者の歯の咬合の改善によるQOL (Quality of Life)の向上のみならず、種々の全身疾患の予防・改善のためにも非常に重要である。

歯周病の対策としては、まず予防することが第一であるが、既に歯周組織の破壊が進行している場合には、インプラントの埋入や根治的治療のために、歯槽骨や歯周組織の再形成を誘導することが必要となる。近年、サイトカインタンパク質や各種細胞外マトリックス、さらには幹細胞を用いた骨・歯周組織の再生療法の開発が急速に進んでいるものの、コストや取扱の面で優位性のある低分子化合物を用いた骨・歯周組織再生法の研究はあまり進んでいない。

我々は、これまでに歯や骨などの硬組織の代謝を調節する化合物を天然物由来の低分子化合物より探索し、骨吸収を担う破骨細胞および骨形成を担う骨芽細胞の分化や機能を調節する化合物を多数見出して報告している。それら化合物の中でも、生薬のシツリシなどに含まれるカルボリンアルカロイド化合物のハルミンが、骨吸収を担う破骨細胞の分化を抑制して骨粗鬆症モデル動物の骨密度の減少を抑制することを見出して報告している。(Eur J Pharmacol. 650, 511-518. (2011)) また、ハルミンは BMP (bone morphogenetic protein) シグナル経路を介して、骨形成を担う骨芽細胞の分化を促進し、石灰化を誘導する活性も有することを既に報告している (Biochem Biophys Res Commun. 409, 260-265. (2011))。さらに、その後の研究により、マウス胎児の摘出第一臼歯をレシピエントマウスの腎被膜下に移植する歯胚の成長実験モデルにおいて、歯周組織再生に重要な歯根膜や歯を支えるのに重要な歯槽骨を含む歯根・歯周組織の形成を強力に促進する活性がハルミンにあることを見出している(第22回日本動物細胞工学会2009年度大会(2009)他)。これらのことから、ハルミンは骨吸収抑制作用だけでなく、骨・歯周組織形成・再生促進作用に基づいた骨粗鬆症や歯周病の治療への応用が期待される。

## 2. 研究の目的

ハルミンの骨形成促進作用の詳細なメカニズムについては明らかになっていないことから、この化合物の作用機構を解明することは、歯周組織の形成・再生機構の解明のため、さらには新たな歯周組織再生療法の開発のために、学術的にも社会的にも貢献できると考えられる。本研究では、低分子化合物を用いた新規骨・歯周組織形成誘導法の開発のための基礎検討として、植物由来低分子化合物で、骨・歯周組織形成促進作用を有するハルミンの作用機序を解明することを目的として実験を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 特異的シグナル阻害剤を用いた検討

マウス頭頂骨由来前骨芽細胞株であるMC3T3-E1細胞をハルミン及び各種特異的シグナル調節化合物存在下で一定期間培養後、初期分化マーカーであるアルカリホスファターゼ(ALP)活性を測定して作用を評価した。

### (2) トランスクリプトーム解析

ハルミンの作用における標的遺伝子を明らかにするために、MC3T3-E1細胞をハルミンまたはBMP-2、ヘッジホッグ経路活性化剤、Wntシグナル活性化剤とともに培養後、mRNAを抽出した。DNAマイクロアレイ解析によって、mRNAの発現変動を網羅的に解析した。

### (3) 発現プロテオーム解析

ハルミンによって発現が変動するタンパク質を同定するために、MC3T3-E1細胞をハルミン存在下で培養後、培養上清を回収した。回収した培養上清を濃縮後、トリプシン消化を行ってペプチドサンプルを作製した。サンプルをLC-MSにて測定し、データベース検索によりタンパク質を同定した。

### (4) ハルミン結合タンパク質の同定

2種類の異なる反応基を持つ磁性ナノビーズを用いて、ハルミン誘導体を結合した磁性ナノビーズを2種類作製した。MC3T3-E1細胞の細胞抽出液を調製し、作製したハルミン誘導体結合磁性ナノビーズを用いて、結合タンパク質をアフィニティー精製した。精製したタンパク質はSDS-PAGEにより分離後、銀染色により検出した。

#### (5) ハルミンの作用経路の検討

各種検討によって得られた結果を元に、リアルタイム PCR による遺伝子発現量の検討や、ルシフェラーゼアッセイによる転写活性化について検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 特異的シグナル阻害剤を用いた検討

各種特異的シグナル阻害剤を用いて、ハルミンによる MC3T3-E1 細胞の ALP 活性促進作用に対する作用を解析することで、ハルミンの作用経路について検討した結果、骨芽細胞分化に関わることが知られる BMP シグナル経路の他、Wnt シグナル経路やヘッジホッグシグナル経路なども関与している可能性を見出した。

##### (2) トランスクリプトーム解析

ハルミン存在下で培養した MC3T3-E1 細胞より調製した mRNA を用いて、ハルミンによって変動する遺伝子群をマイクロアレイ解析により検討した。その結果、発現が変動する多数の遺伝子群を同定した。

##### (3) 発現プロテオーム解析

ハルミン存在下で培養した MC3T3-E1 細胞の培養上清中に含まれるタンパク質を調製後、トリプシン消化してサンプルを調製した。調製したサンプルを LC-MS にて解析後、データベース検索した結果、数十のタンパク質を同定した。

##### (4) ハルミン結合タンパク質の同定

ハルミンに直接結合するタンパク質を精製・同定するために、ハルミン誘導体をそれぞれエステル結合およびエーテル結合で結合した磁性ナノアフィニティービーズを作製した。作製した2種類のハルミン誘導体結合アフィニティービーズを用いて、MC3T3-E1 細胞抽出液中のタンパク質のアフィニティー精製を行った。精製したタンパク質について、SDS-PAGE および銀染色について確認した結果、ハルミン誘導体結合アフィニティービーズでアフィニティー精製したサンプルのみで見られるタンパク質バンドを検出した。さらに、このバンドの一部は、フリーのハルミン存在下で競合させてアフィニティー精製を行うと消失することを確認した。

##### (5) ハルミンの作用経路の検討

以上の検討より、BMP シグナル経路以外にもヘッジホッグシグナル経路や Wnt シグナル

経路が、ハルミンの骨芽細胞分化促進作用に関わっていることが示唆されたことから、それらのシグナルの下流で発現が上昇する遺伝子について、リアルタイム PCR にて検討した。その結果、検討した BMP、ヘッジホッグ、Wnt シグナルの下流遺伝子全てにおいて、ハルミン処理による発現の増加が認められた。さらに、これらのシグナル経路の活性化について検証するために、各経路の転写活性化についてそれぞれに特異的なプロモーターを持つレポーター遺伝子を用いたルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、BMP、ヘッジホッグおよび Wnt シグナルのレポーターアッセイにおいて、全て有意なルシフェラーゼ活性の上昇が確認されたことから、ハルミンはそれらのシグナル下流の遺伝子の転写活性化を誘導することが示された。

本研究によって、ハルミンの骨芽細胞分化促進作用には、BMP 経路、Wnt シグナル経路、ヘッジホッグシグナル経路の活性化が関わっている可能性が明らかとなり、それらのシグナルの活性化に関連する発現変動遺伝子やタンパク質の情報を得ることができた。今後は、ハルミンに直接結合する分子の同定を含めて、さらに詳細な作用機構の検討を行う予定である。

#### 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)

Kim HJ, Yonezawa T, Teruya T, Woo JT, Cha BY. Nobiletin, a polymethoxy flavonoid, reduced endothelin-1 plus SCF-induced pigmentation in human melanocytes. *Photochem Photobiol.* 査読有, 91, 2015, 379-386.

doi: 10.1111/php.12400.

Lee JW, Asai M, Jeon SK, Iimura T, Yonezawa T, Cha BY, Woo JT, Yamaguchi A. Rosmarinic acid exerts an anti-osteoporotic effect in the RANKL-induced mouse model of bone loss by promotion of osteoblastic differentiation and inhibition of osteoclastic differentiation. *Mol Nutr Food Res.* 査読有, 59, 2015, 386-400.

doi: 10.1002/mnfr.201400164.

Ha BG, Yonezawa T, Son MJ, Woo JT, Ohba S, Chung UI, Yagasaki K. Antidiabetic

effect of nepodin, a component of Rumex roots, and its modes of action in vitro and in vivo. Biofactors. 査読有, 40, 2014, 436-447.

doi: 10.1002/biof.1165.

Cheong SH, Furuhashi K, Ito K, Nagaoka M, Yonezawa T, Miura Y, Yagasaki K. Daidzein promotes glucose uptake through glucose transporter 4 translocation to plasma membrane in L6 myocytes and improves glucose homeostasis in Type 2 diabetic model mice. J Nutr Biochem. 査読有, 25, 2014, 136-143.

doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.09.012.

Cheong SH, Furuhashi K, Ito K, Nagaoka M, Yonezawa T, Miura Y, Yagasaki K. Antihyperglycemic effect of equol, a daidzein derivative, in cultured L6 myocytes and ob/ob mice. 査読有, Mol Nutr Food Res. 58, 2014, 267-277.

doi: 10.1002/mnfr.201300272.

#### [学会発表](計3件)

米澤貴之, 夏目矩行, 禹濟泰, 鄭雄一. カルノシン酸およびカルノソールの破骨細胞分化抑制作用. 日本薬学会第135年会, 2015年3月25日-28日, 神戸学院大学他, 神戸市.

米澤貴之, 夏目矩行, 禹濟泰, 鄭雄一. 破骨細胞分化に対するカルノシン酸およびカルノソールの作用. 日本動物細胞工学会2013年度大会. 2013年7月18日-19日, ホテルフジタ福井, 福井市.

照屋俊明, 米澤貴之, 間瀬直美, 佐々木宏明, 末永聖武, 車炳允, 禹濟泰, 永井和夫, 破骨細胞の機能に対する Biselyngbyaside の作用. 第15回マリンバイオテクノロジー学会大会, 2013年6月1日-2日, 沖縄市町村自治会館, 沖縄市.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

米澤 貴之 (YONEZAWA TAKAYUKI)

東京大学・大学院工学系研究科・特任助教  
研究者番号: 20410665