

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893122

研究課題名(和文)骨形成促進剤の探索を可能とする化合物ライブラリースクリーニングシステムの構築

研究課題名(英文) Identification of osteogenic-inducible compounds using a chemical compound library

研究代表者

福安 翔 (Fukuyasu, Sho)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：10711054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞分化関連遺伝子の発現に伴いGFP蛍光を発現するように遺伝子操作したレポーター細胞を用いて、GFP蛍光量およびALPを指標に、小分子化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、検出された候補化合物が骨芽細胞分化に及ぼす影響を評価した。さらに、候補化合物を頭蓋骨欠損ラット実験モデルに投与し、骨組織再生を評価した。

その結果、GFP蛍光値およびALP活性を同時に促進した3種の候補化合物において、骨芽細胞分化促進作用を確認し、頭蓋骨欠損部位への候補化合物の投与は、骨再生量を増加させた。以上の結果から、本研究で構築したスクリーニングシステムは今後の骨再生医療、創薬に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Pre-osteoblastic cell line stably transfected with the GFP reporter gene driven by a fragment of type I collagen promoter was used in this study. Reporter-cells were cultured with small-molecules. After 7 days, GFP fluorescence was measured. After 14 days of osteogenic induction, cells were subjected to ALP staining. In the result on screening of small-molecule library, three candidates were discovered. These three small molecules significantly enhanced osteoblastic differentiation of mouse bone marrow stem cells in vitro. The new bone formation in the calvarial defect was regenerated by candidate small-molecule in vivo. These results suggest that the cell-based screening method by the GFP and ALP staining assays could identify candidates for osteogenesis-targeting compounds in reliable manner in comparison to conventional methods, thus making it a promising tool for finding novel synthetic regulators of osteogenesis.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：骨再生

科・部名 口腔補綴科

1. 研究開始当初の背景

機能的かつ審美的なインプラントおよび補綴歯科治療の実現には、低侵襲で確実な歯槽骨増生が不可欠であることから、骨補填材を用いた骨増生術に BMP2 や PDGF などの細胞成長因子を併用する試みが広く行われている。しかし、これらの生理活性物質は、リコンビナントタンパク質であり、コストパフォーマンス、生体内における安定性、安全性等の点で改良すべき課題が残るため、同様の作用をもつ小分子化合物が開発できれば、それらの課題の多くをより容易に解決できると期待される。

ポストゲノム時代の新しい研究領域であるケミカルバイオロジーの戦略とは、化学（小分子化合物）を推進力として、広範なケミカルライブラリーを活用し、スクリーニングシステムを構築し、生命現象を改変することにより創薬の基盤科学を築くことである。以上を学術的背景とし、本研究代表者は、骨芽細胞分化促進作用を有する化合物を簡便かつ高い信頼度で検出するためのスクリーニングシステムの構築、ならびに骨芽細胞分化促進作用および骨形成促進作用を有する化合物の探索が必要となると考えた。

2. 研究の目的

本研究計画では、小分子化合物による新たな骨組織再生材料の開発および、新規骨芽細胞分化機構を明らかにするために、以下の項目を明らかにすることを目的とした。

(1) 型コラーゲン遺伝子の発現に伴い GFP (緑色蛍光タンパク質) 蛍光を発現するように遺伝子操作したレポーター骨芽細胞株を用いたスクリーニングシステムを構築する。作製したスクリーニングシステムを用いたライブラリースクリーニングを行い骨芽細胞分化に対して促進的に働く小分子化合物を同定する。

(2) 同定した小分子化合物が、間葉系幹細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響を明らかにする。

(3) 同定した小分子化合物がラット頭蓋骨欠損部位に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) レポーター細胞株を用い、小分子化合物ライブラリーのスクリーニングを、蛍光値および、アルカリフォスファターゼ活性の二つの骨分化指標についてハイスループットを行う。化合物ライブラリーは、申請者が所有している LOPAC ライブラリー (1,280 種化合物; Sigma 社) を用い、化合物のスクリーニングを行い、検出された化合物を候補化

合物とする。

(2) 同定した化合物群が、実際に初代未分化間葉系幹細胞の骨芽細胞分化に促進的に作用するか否かを、マウス骨髄由来未分化間葉系幹細胞に化合物を添加し、評価を行う。具体的には、染色により、ALP 活性および基質の石灰化を評価し、骨芽細胞分化特異的遺伝子発現を RT-PCR 法にて解析する。また、マウス骨芽細胞株を用いて、細胞毒性を評価する (Cyto Tox-Glo™)。

(3) 8 週令ラット頭蓋骨の左右側に、トレフィンバーで 5mm 径の骨欠損を形成し、同定した小分子化合物を添加した 5mm 径のコラーゲンスポンジを同部位に移植する。その後、化合物を 3~4 日毎に、投与量の合計が 3-30 μg となるように局所注射し 3 週間後の骨形成量を組織切片 H-E 染色像および、マイクロ CT 画像解析を用いて明らかにする。

4. 研究成果

(1) レポーター骨芽細胞株を用いたスクリーニングシステムを構築、ライブラリースクリーニングの実行

作成したスクリーニングシステムを用いて LOPACK1280 ライブラリーのスクリーニングを行った結果、GFP 蛍光値を有意に上昇させ、かつ ALP 染色により活性化作用を示した化合物は、Leflunomide (Lef)、1-(5-isoquinolinylnylsulfonil)-3-methylpiperazine (1-5) 二塩化水素化物および LFM-A13 (LFM) であった。(図 1)

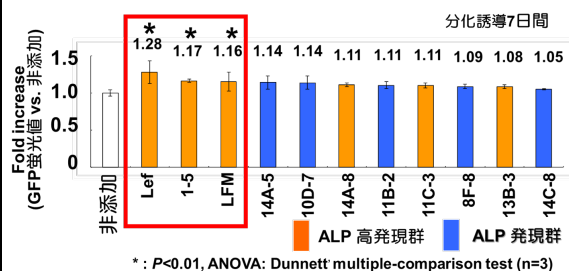


図 1 ALP 活性化作用を示した化合物の GFP 蛍光値

(2) 同定した小分子化合物が、マウス骨髄由来間葉系幹細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響の検討

先の実験により検出された候補化合物は、マウス骨髄由来間葉系幹細胞の骨芽細胞分化における ALP 活性、細胞外基質の石灰化を著明に増強した (図 2)。また、骨芽細胞分化関連遺伝子 (cbfa1, Type I collagen, Osteopontin, Osteocalcin) の発現を促進した (図 3)。

さらに、3種類の候補化合物はマウス由来骨芽細胞株において、1-50 μM の濃度の範囲内では、細胞死に有意な影響を示さないことが示された(図4)

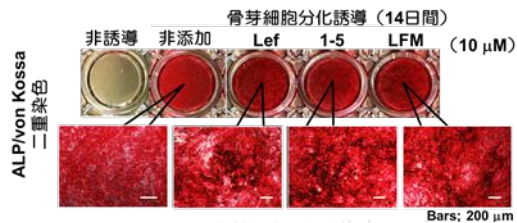


図2 ALP・フォンコッサ二重染色の結果

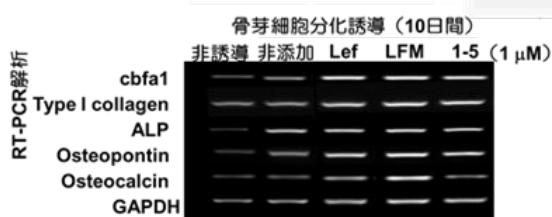


図3 骨芽細胞分化関連遺伝子の RT-PCR 解析の結果

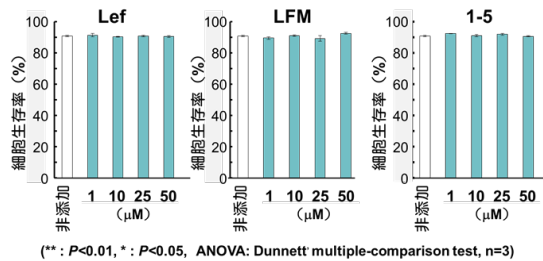


図4 マウス C3T3-E1 株における候補化合物の細胞毒性試験の結果

(3) 同定した小分子化合物がマウス頭蓋骨欠損部位に及ぼす影響の検討

同定した化合物の内、Leflunomide はラット骨髄由来間葉系幹細胞においても ALP 活性および細胞外器質の石灰化を著明に促進した。(図5) 8週齢ラット頭蓋骨欠損部位へ投与し、術後3週後の頭蓋骨欠損部切片の H-E 染色像を評価すると、添加群および非添加群ともに欠損部位における新生骨の形成を認めるが、Leflunomide 投与群において、成熟した皮質骨を示すセメントラインの存在が著明となり、より成熟した骨組織の再生が示唆された(図6)。

頭蓋骨欠損部について、マイクロ CT 画像解析を用いて解析したところ、骨欠損部への Leflunomide の投与により、著明な骨形成が認められ(図7), また欠損部の再生骨面積, 骨組織体積および骨塩量を有意に増加させた(図8)

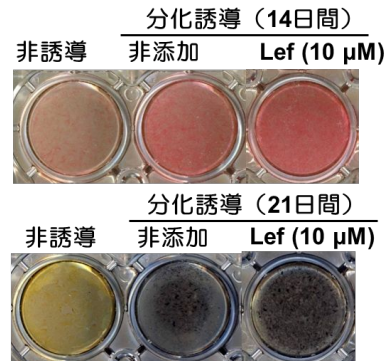


図5 Leflunomide によるラット由来初代未分化間葉系幹細胞の骨芽細胞分化の及ぼす影響 (ALP および von Kossa 染色)

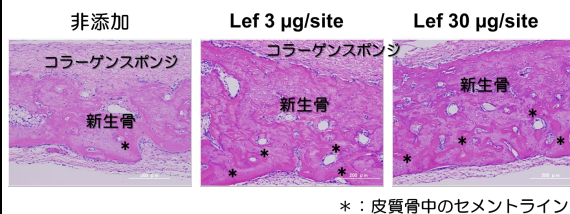


図6 欠損部組織切片 (H-E 染色)

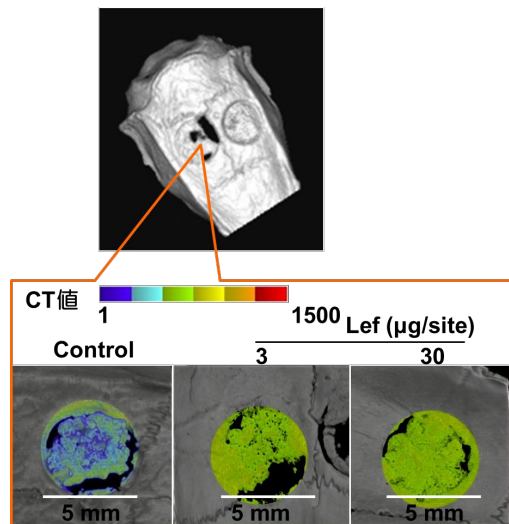


図7 欠損部マイクロ CT 解析像

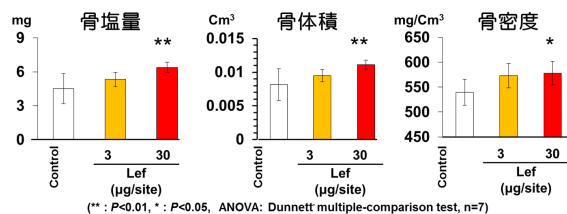


図8 欠損部画像解析の結果

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

福安 翔 (FUKUYASU SHO)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：10711054