The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	化合物ライブラリーを用いた骨形成促進作用を有する小分子化合物の探索
Author(s)	福安, 翔
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/55539
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【20】

氏　　名	福　安　　翔（ふく　やす　　しょう）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯学）
学　位　記　番　号	第　２５７８３　号
学位授与年月日	平成25年３月25日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学　位　論　文　名	化合物ライブラリーを用いた骨形成促進作用を有する小分子化合物の探索
論文審査委員	（主査） 教　授　矢谷　博文 （副査） 教　授　野田　健司　　講　師　波多　賢二　　講　師　北垣　次郎太

論　文　内　容　の　要　旨

緒言

機能的かつ審美的なインプラント治療の実現には確実な骨増生術が不可欠である．しかしながら，現在の骨移植術では外科的侵襲が大きく患者の負担が大きいことや，移植骨の術後吸収を避け得ないことなど解決すべき課題が多い．したがって，より低侵襲で安定した骨増生技術が必要とされており，幹細胞，スキャフォールド，生理活性物質を組み合わせることで組織再生をめざすTissue Engineering（生体組織工学）を基盤とした再生医療の研究が盛んに行われている．現在，骨芽細胞分化促進作用や,骨形成作用を有する生理活性物質として広く知られているBone morphogenetic protein 2（BMP-2）やPlate derived growth factor（PDGF）などの細胞成長因子は，分子量の大きなタンパク質であり，コストパフォーマンス，副作用などの点で問題が残る．我々は，骨増生に用いる細胞活性因子として，分子量が小さく，安価で，化学合成が容易な小分子化合物に着目している．

本研究の目的は，数ある小分子化合物のなかから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を構築すること，ならびに骨芽細胞分化促進作用および生体内における骨形成作用を有する化合物を探索することである．

方法

実験１　既知の骨芽細胞分化促進因子を用いたスクリーニングシステムの確立

Ⅰ型コラーゲン遺伝子の発現に伴ってGreen fluorescent protein（以下GFP）蛍光を発現するように遺伝子操作したマウス骨芽細胞前駆細胞（col-1a1GFP-MC3T3E1）を96 well培養プレートに播種し，ヒト組換えBMP-2（rhBMP-2）あるいは既知の骨芽細胞分化促進化合物（phenamil，resveratrol，harmine）を添加した骨芽細胞分化誘導培地で培養した．培養7日後の細胞のGFP蛍光量を，蛍光マイクロプレートリーダーを用いてハイスループット測定し，続いて14日後の同培養細胞に対して骨芽細胞の分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ（ALP）の活性を染色法および吸光度測定法を用いて検討した．

実験２　化合物ライブラリーを用いたハイスループットスクリーニング

GFP蛍光およびALPを指標とした二重スクリーニングによる骨芽細胞分化評価システムを用いて，分子標的が既知のライブラリーとしては最大規模の「LOPACK^{1280}ライブラリー（1,280種類化合物：SIGMA社）」をスクリーニングした．

実験３　検出された化合物が骨芽細胞に及ぼす影響の検討

検出された候補化合物の細胞毒性および増殖能に及ぼす影響を，マウス骨芽細胞前駆細胞（MC3T3-E1細胞）を用いたWST-1細胞増殖および細胞生存アッセイで検討した．また，候補化合物の骨芽細胞分化促進作用を，MC3T3E1細胞，マウスあるいはラット骨髄由来間葉系幹細胞（mBMSC，rBMSC）およびマウス歯肉由来iPS細胞（m-iPSC）を用いて確認した．骨芽細胞への分化は，ALP活性の吸光度測定，骨芽細胞分化マーカー（Osterix，BSP，Osteocalcin）の遺伝子発現を対象にしたRT-PCR解析および石灰化基質形成を検出するvon Kossa染色法を用いて評価した．

実験４　骨芽細胞分化促進作用が確認された化合物の骨形成作用の検討

化合物を含浸したコラーゲンスポンジを頭蓋骨欠損ラット実験モデルに移植し，術後21日後の移植部位の組織から作製した切片をヘマトキシリン・エオシン（HE）で染色し，化合物による骨組織再生を組織学的に評価した．また，移植部位の頭蓋骨を実験動物用マイクロCTで撮影し，撮影画像のCT値から欠損部に再生した骨組織の体積（BV）および骨塩量（BMC）を評価した．

結果

実験１　既知の骨芽細胞分化促進因子を用いたスクリーニングシステムの確立

rhBMP-2および実験に用いたすべての既知の骨芽細胞分化促進化合物は，col-1a1GFP-MC3T3E1レポーター細胞のGFP蛍光値およびALP活性を著明に増強した．

実験２　化合物ライブラリーを用いたハイスループットスクリーニング

LOPACK^{1280}ライブラリーのスクリーニングの結果，152種類の化合物がGFP蛍光値を増強し，11種類の化合物がALP活性を有意に増強した（$P<0.05$）．このなかで，GFP蛍光値およびALP活性を同時に促進した化合物は，leflunomide（以下Lef），LFM-A13および1-(5-isoquinolinylsulfonil)-3-metylpiperazine dihydrochlorideであった．

実験３　検出された化合物が骨芽細胞に及ぼす影響の検討

上記3種の化合物は，1-50 μMの濃度範囲でMC3T3E1細胞の増殖を濃度依存的に抑制したが，有意な細胞毒性は示さなかった．また，これらの化合物は1-25 μMの濃度でMC3T3E1細胞のALP活性を有意に促進した（$P<0.05$）．さらに，RT-PCR解析およびvon Kossa染色の結果，これらの化合物はMC3T3E1細胞，mBMSC，rBMSCおよびm-iPSCの骨芽細胞分化におけるOsterix，BSP，Osteocalcin遺伝子の発現および細胞外基質の石灰化を促進した．

実験４　骨芽細胞分化促進作用が確認された化合物の骨形成作用の検討

上記3種の化合物のなかでrBMSCの石灰化を最も著明に促進したLefを骨再生促進作用の検討に用いた．移植21日後のHE染色像における骨再生部位の面積は，30 μMのLefを投与することで有意に増加した（$P<0.05$）．さらに，マイクロCTによる解析の結果，30 μMのLefを投与することで骨欠損部位のBV（$P<0.01$）およびBMC（$P<0.001$）は有意に増加した．

結論

本研究で構築した，骨芽細胞分化指標であるⅠ型コラーゲンおよびALP活性を二重指標としたスクリーニングシステムは，骨芽細胞分化に促進的に作用する小分子の検出を簡便かつ高い信頼度で可能とするシステムであることが示された．また，このシステムによって検出されたLefは，骨芽細胞だけではなくBMSCあるいはiPSCなどの幹細胞に対しても骨芽細胞への分化促進作用を有することが明らかとなった．さらに，Lefは骨欠損部の再生を促進する作用を有することが示唆された．

論文審査の結果の要旨

本研究は、第一に骨芽細胞の分化促進作用を示す小分子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を構築し、小分子化合物ライブラリーのスクリーニングを行うこと、第二にスクリーニングより検出された化合物の骨芽細胞分化促進作用および生体内での骨形成促進作用を検討することを目的として行われた。

本研究において、Ⅰ型コラーゲン遺伝子の発現に伴いGFP蛍光を呈するレポーター骨芽細胞を用い、既存の骨芽細胞分化促進因子が細胞のGFP蛍光値およびアルカリフォスファターゼ活性に及ぼす影響が検討された。その結果、これら二つの指標を用いることで骨芽細胞分化を促進する添加因子の検出が効果的かつ定量的に可能であることが明らかとなった。このシステムを用いてLOPAC[1280]小分子化合物ライブラリーをスクリーニングした結果、骨芽細胞分化促進作用を有する小分子化合物、〔Leflunomide，LFM-A13 および 1-(5-isoquinolinylsulfonil)-3-metylpiperazine dihydrochloride (1-5)〕が検出された。さらに、Leflunomideは頭蓋骨欠損ラット実験モデルにおいて、骨形成促進作用を有することが明らかとなった。

本研究で構築したスクリーニングシステムは、骨再生医療に有用な創薬および骨形成メカニズムを解明する上で非常に有用なツールとなることを示すものであり、本研究は博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認める。