The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	プロテインキナーゼC阻害剤iso-H-7が骨芽細胞分化に与える影響
Author(s)	松岡, 秀
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/69495
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　松岡　秀　　）	
論文題名	プロテインキナーゼC阻害剤iso-H-7が骨芽細胞分化に与える影響

論文内容の要旨

【緒言】

抜歯や歯周病によって失われた歯槽骨を再生することは，機能的，審美的なインプラント治療を含めた補綴歯科治療を行う上で非常に重要な課題である．近年，BMP-2 などの成長因子を用いた歯槽骨増生術が広く行われているが，問題点として，大きい外科的侵襲や低い費用対効果が挙げられる．そのことから，合成が容易であり，多くの生理活性をもつ小分子化合物が骨再生医療に有用な生理活性因子として注目されており，骨代謝に関わる小分子化合物を探索し，その標的分子を解明することで，骨再生医療がさらなる発展を遂げることがが期待される．我々の研究グループは，独自のスクリーニングシステムを用いて，骨芽細胞分化を促進する化合物としてプロテインキナーゼ C (PKC) 阻害剤である 1-(5-isoquinolinylsulfonil)-3-metylpiperazinedine (iso-H-7) を見出した. PKC は，生体内の広範な生理機能に関与しているが, PKC が骨芽細胞分化にどのような影響を与えるかは詳しくは明らかになっていない.

本研究の目的は，マウス人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) およびマウス骨芽細胞株 (MC3T3-E1 細胞) を用いて，iso-H-7 が骨芽細胞分化および生体内の骨形成に及ぼす影響を明らかにすることである.

【方法】

iPS 細胞および MC3T3-E1 細胞を，iso-H-7 添加，あるいは非添加で増殖培地中に 6 日間，あるいは骨芽細胞分化誘導培地中に 30 日間培養した.

1. iso-H-7 が iPS 細胞および MC3T3-E1 細胞の細胞増殖に及ぼす影響を WST-1 法で検討した.
2. iso-H-7 が iPS 細胞における骨芽細胞特異的遺伝子(*Runx2, Osteocalcin, Osterix,, Type Ⅰ collagen*) の発現に及ぼす影響をリアルタイム RT-PCR 解析により評価し，細胞外基質の石灰化に及ぼす影響を Alizalin Red 染色により評価することで， iso-H-7 が iPS 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響を検討した.
3. iso-H-7 が Mc3T3-E1 細胞における骨芽細胞特異的遺伝子 (*Osterix, Osteocalcin, BSP)* の発現に及ぼす影響をリアルタイム RT-PCR 解析により評価し，細胞外基質の石灰化に及ぼす影響を Alizalin Red 染色により評価することで, iso-H-7 が MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響を検討した.
4. iso-H-7 が MC3T3-E1 細胞における PKC アイソザイム (PKCα, βⅠ,βⅡ, δ, ζ) の発現に及ぼす影響を Western blotting 解析で検討した.
5. iso-H-7 が骨再生に及ぼす影響を検討するため，iso-H-7 を含浸させたコラーゲンスポンジをラット頭蓋骨に形成した 5 mm の欠損部に填入し, 3 週間にわたり 2，3 日毎に iso-H-7 を局所注射した.3 週間後に頭蓋骨を摘出し，骨組織再生を組織切片観察（HE 染色）およびマイクロ CT 画像解析により評価した．なお，同様の術式で生理食塩水を用いたものを非投与群とした．また，同様の方法で飼育したラットにおいて，1 週後に頭蓋骨を摘出し，頭蓋骨欠損部における PKCα, βⅠの発現を免疫組織化学染色を用いて評価した.

【結果】

1. WST-1 細胞増殖試験により，iPS 細胞において，iso-H-7 は 1-25 μM まで細胞増殖に有意な影響を及ぼさず,また MC3T3-E-1 細胞において, iso-H-7 は 1-10 μM まで細胞増殖に有意な影響を及ぼさなかった.
2. iPS 細胞において，リアルタイム RT-PCR 解析により，iso-H-7 は分化誘導 7 日目において 1-25 μM の濃度で，*Runx2, Osteocalcin* 遺伝子の発現を通常誘導に比べて有意に促進し（ANOVA：$P<0.01$），分化誘導 21 日目において, *Osterix, Type Ⅰ collagen* 遺伝子の発現を通常誘導に比べて有意に促進した（ANOVA：$P<0.01$）．また, Alizarin Red 染色によ

り, iso-H-7 は分化誘導 30 日目の細胞外基質の石灰化を 1-25 μM の濃度で通常誘導に比べて有意に促進した（ANOVA：$P<0.05$）.

3. MC3T3-E1 細胞において，リアルタイム RT-PCR 解析により, iso-H-7 は分化誘導 21 日目において 1-25 μM の濃度で, *Osterix*, *Osteocalcin*, *BSP* 遺伝子の発現を有意に促進した（ANOVA：$P<0.05$）．また, Alizarin Red 染色により, iso-H-7 は分化誘導 30 日目の細胞外基質の石灰化を 10, 25 μm の濃度で通常誘導に比べて有意に促進した（ANOVA：$P<0.05$）.
4. Western blotting 解析の結果, MC3T3-E1 細胞において, PKCβⅡ, δ は非誘導，通常誘導, iso-H-7 添加時のすべてで発現が認められなかった. PKCζ は非誘導，通常誘導, iso-H-7 添加時のすべてで発現が認められたが, iso-H-7 はその発現に影響を及ぼさなかった. PKCα は非誘導，通常誘導, iso-H-7 添加時のすべてにおいて発現が認められ, iso-H-7 は 25 μM の濃度で分化誘導 7 日目において, PKCα の発現を抑制した. PKCβⅠ非誘導，通常誘導, iso-H-7 添加時のすべてにおいて発現が認められ, iso-H-7 は 10, 25 μM の濃度で分化誘導 7, 14 日目において, PKCβⅠの発現を抑制した．さらに，分化誘導に従って本来の PKCβⅠよりも大きい分子量のタンパク質の発現が認められ, iso-H-7 は 10, 25 μM の濃度でそのタンパク質の発現を抑制した.
5. 頭蓋骨欠損モデルの実験により，術後 3 週間で iso-H-7 投与群および非投与群ともに新生骨の形成を認めたが, iso-H-7 投与群により広範囲の新生骨の形成を認めた．また，マイクロ CT 画像解析にて骨体積および骨塩量を測定した結果, 30 μg/site の iso-H-7 投与群は，非投与群と比較して有意な骨形成促進作用を認めた（ANOVA：$P<0.01$）.
   また，免疫組織化学染色より，術後 1 週間の頭蓋骨欠損部において, iso-H-7 は非投与群と比較して PKCα, βⅠの発現を抑制した.

【結論】

PKC inhibitorであるiso-H-7が, PKCα, βⅠと関連して，骨芽細胞分化と生体内での骨形成を促進していることが示唆された．今後，骨芽細胞分化機構におけるPKCαおよびβⅠの機能を詳細に解明することにより，骨代謝のメカニズムの解明およびPKCα, βⅠを標的とした新規の小分子化合物を用いた骨造成術が可能となることが期待される.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　松岡　秀　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　大阪大学教授	矢谷　博文
	副 査　大阪大学教授	田熊　一敞
	副 査　大阪大学准教授	波多　賢二
	副 査　大阪大学講師	和田　誠大

論文審査の結果の要旨

本研究は，骨代謝に関わる分子機序を解明することを目的に，PKC 阻害薬である iso-H-7 が，骨芽細胞分化および生体内の骨形成に及ぼす影響を検討したものである．

研究の結果，iso-H-7 は，iPS 細胞および MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化促進作用を有することが明らかとなり，骨芽細胞分化機構における PKC の関与が示唆された．また，ラット頭蓋骨欠損部位への iso-H-7 の投与は頭蓋骨欠損部での骨形成を促進し，PKCα，βI の発現を抑制したことから，PKC が骨再生治療の新たな標的分子となる可能性が示唆された．

以上の研究成果は，PKC を標的とした新たな再生医療技術の発展に繋がるものと期待され，本研究は博士（歯学）の学位授与に値するものと認める．