

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463157

研究課題名(和文)骨造成促進のための新規治療法開発に向けた基礎的研究

研究課題名(英文)Basic research for establishment of new therapy for acceleration of bone augmentation

研究代表者

川口 浩司(KAWAGUCHI, Kouji)

鶴見大学・歯学部・准教授

研究者番号：50277951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ポリADP-リボシル化反応は、ポリADP-リボース合成酵素(PARP)によって行われ、細胞内の様々な作用に関与している。PARPの間葉系幹細胞(MSC)の分化への関与も報告があるが、即ちPARP阻害剤のMSCへの副作用の可能性を意味する。本研究ではPARP阻害剤のMSCへの影響を調べた。1 μ M PJ34の添加で骨芽細胞への分化が抑制されたが、軟骨や脂肪への分化には影響がなかった。mRNAレベルの骨分化マーカーや転写因子の発現は、PJ34の投与で低下した。よって、PARP阻害剤は骨芽細胞分化を抑制し、ポリADP-リボシル化反応がBMP-2経路を調整することによって関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Poly(ADP-ribosylation) is known to be involved in a variety of cellular processes by poly(ADP-ribose) polymerase (PARP). PARP involvement in MSCs (Mesenchymal Stem Cells) differentiation has been reported suggesting possible side effects of PARP inhibitors on MSCs. Therefore, effects of PARP inhibitors on MSCs were examined in this study. MSCs showed suppressed osteogenic differentiation after 1 μ M PJ34 treatment without showing cytotoxicity, while differentiation of MSCs into chondrocyte or adipocyte was not affected. The mRNA induction of osteogenic markers such as and regulators of transcription factors was suppressed by PJ34 treatment. Extracellular mineralized matrix formation was also suppressed. These results strongly suggest that PARP inhibitors would suppress osteogenic differentiation and poly(ADP-ribosylation) may play a physiological role in osteogenic differentiation by regulating BMP-2 signaling pathway.

研究分野：口腔外科

キーワード：間葉系幹細胞 骨芽細胞 ポリADP-リボシル化 分化 骨造成

1. 研究開始当初の背景

口腔外科臨床において、先天異常、外傷や腫瘍切除後に生じる組織欠損を補う再建術、更にはデンタルインプラント埋入術を行う際の骨造成法として、従来から自家組織移植や人工材料を用いた骨造成が行われてきた。これらの手術方法は比較的安定した治療実績を持つ優れた方法ではあるが、特に欠損部が大きい場合など、十分な骨造成が得られず、骨質・骨量ともに期待値をはるかに下回ることもある。骨欠損修復の失敗は再建治療の不完全につながり、醜形の問題と共に、その後には予定している二次的再建や歯科矯正治療、インプラント治療の適応を根本的に再検討しなければならないことから、安全で確実な骨造成法の確立が求められている。しかしながら、自家組織移植では組織採取部位に新たな組織欠損や瘢痕を生じる事が大きな課題であり、また人工材料の移植においても感染や異物反応による人工物の吸収・露出など、長期予後への不安は完全には払拭されていない。このような問題点を克服する新しい技術開発への期待が高まる中、低侵襲でより安定した組織再建を実現する方法として、組織再生医療の研究が進められている。しかし、異物反応やスキャフォールドの分解産物による組織傷害、更には細胞培養の高コストという現実的な問題があり、一般的な標準治療として普及するために解決すべき問題は多い (Mason C. et al. *Regen Med.* 2008 3(3):351-363)。従って、より安定した骨造成のためには、現行の自家骨移植における骨造成率を限りなく促進させることと、骨吸収率を最小化させることが現実的な解決策であると考える。

Poly(ADP-ribose) polymerase-1(Parp-1) は、Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) を基質として標的タンパク質に ADP-リボースのポリマーを修飾 (ポリ ADP-リボシル化反応) し、DNA 修復や細胞死、テロメア長の調整、ゲノム安定性や細胞分化に関与している (Schreiber V et al. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(7):517-528)。更に PARP は、Mesenchymal Stem Cell(MSC)の分化への関与が報告されているため、そのメカニズムを明らかにすることによって、骨芽細胞の分化促進の要点が明らかになることが期待できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、間葉系幹細胞から骨芽細胞・軟骨芽細胞・脂肪細胞へ分化させる際に、ポリ ADP-リボシル化反応がどのように関与するのか、PARP 阻害剤を用いて比較検証することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、以下の3つに分けて、マウス間葉系幹細胞の細胞分化におけるポリ ADP-リボシル化反応の関与について検証した。

- (1) PARP 阻害剤のマウス間葉系幹細胞に対する細胞毒性について
- (2) PARP 阻害剤のマウス間葉系幹細胞の細胞分化に対する影響について
- (3) 細胞分化の際の、関連因子の発現レベルに対する PARP 阻害剤の影響について

(1) 本研究では、マウスの間葉系幹細胞 (以下 BMMSCs) と間葉系前駆細胞 (以下 KUSA-A1) を用いた。培養培地は、 α -MEM に 2mM L-glutamax、20% ウシ胎児血清、100U/mL ペニシリン・ストレプトマイシン、55 μ M 2-メルカプトエタノールを添加したものを使用した。BMMSCs は C57BL/6 マウス (6週令、オス) の大腿骨から骨髓を採取後 37°C 5% CO₂ 下で 4 時間培養、 α -MEM で培養皿を 2 度洗浄した後、増殖させて得た。両細胞とも培地は 3 日毎に交換し、コンフルエントになれば 1:5 の割合で継代した。

まず、PARP 阻害剤の PJ34 と AZD2281 の細胞障害効果を検証するため、様々な濃度に薬剤を調整して MTT assay と survival assay を行った。そこで、細胞の増殖に影響のない薬剤の選択と濃度を決定した。

次に、1~5 μ M の PARP 阻害剤がポリ ADP-リボシル化を抑制出来るか確認するため、過酸化水素で DNA を障害させた後に生じるポリ ADP-リボース (以下 PAR) レベル、抗 PAR (ポリ ADP-リボース) 抗体を用いて免疫細胞化学的染色を行って調べた。

(2) 続いて、間葉系幹細胞の細胞分化能を、①骨芽細胞、②軟骨細胞、③脂肪細胞の3つについて、PARP 阻害剤の有無によって比較検証した。

①骨芽細胞への分化に対する PARP 阻害剤の影響を調べるため、分化培地は、前述した培養培地に 5 μ M アスコルビン酸、1 μ M デキサメタゾン、1mM β -グリセロリン酸を添加したものを使用した。細胞がコンフルエントとなった時点から分化培地で 30 日間培養し、培地は 3 日毎に交換した。アリザリン染色とフォンコッサ染色を用いて、各々リン酸カルシウムと炭酸カルシウムの析出量を分析した。

②軟骨細胞への分化培地には、DMEM に 1 μ M デキサメタゾン、0.17mM アスコルビン酸、1ng/mL TGF- β 3、1% ITS 液体培地サプリメント、100U/mL ペニシリン・ストレプトマイシンを添加したものを使用し、アルシアンブルー染色を行った。

③脂肪細胞への分化培地には、1 μ M デキサメタゾン、1 μ M インスリン、200 μ M インドメタシン、0.5 μ M 3-イソブチル-1-メチルキサンチン、100U/mL ペニシリン・ストレプト

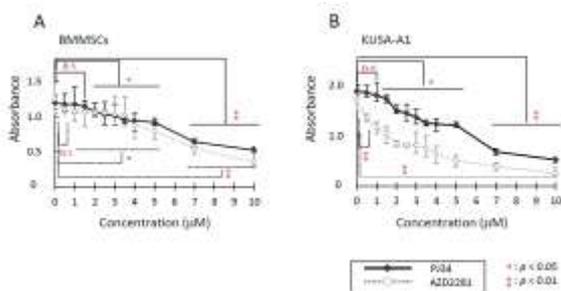
マイシン、10% ウシ胎児血清を添加したものを使用し、脂肪細胞への分化はオイルレッド染色を用いて検証した。

(3) ポリ ADP-リボシル化が骨芽細胞への分化のどのステップで関与しているかを調べるために、*Runx2*、*Osterix*、*BMP2*、*Osteocalcin*、骨シアロタンパクなどの骨分化マーカー、転写制御因子の *Smad1*、*4*、*5*、*8* の発現を調べた。骨芽細胞への分化開始後、10・20・30 日目におけるこれらの因子の mRNA レベルの発現について、1 μ M PARP 阻害剤の有無による違いをリアルタイム PCR で分析した。

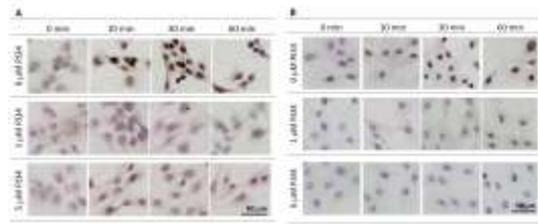
次に、PARP活性がタンパクレベルでも骨芽細胞への分化に関与することを調べるために、western blot解析を行った。mRNAレベルでの解析と同様に30日間骨芽細胞へ分化させた後、10・20・30日目にBMP2、Osterix、Osteocalcinのタンパクレベルでの発現解析を行った。

4. 研究成果

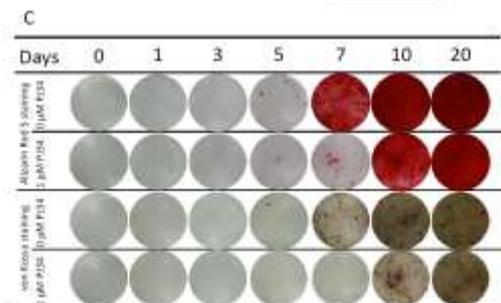
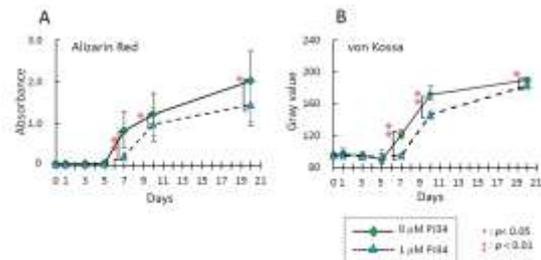
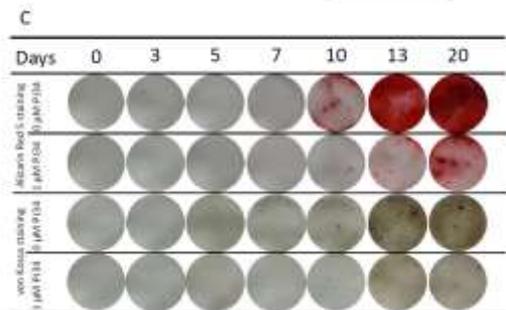
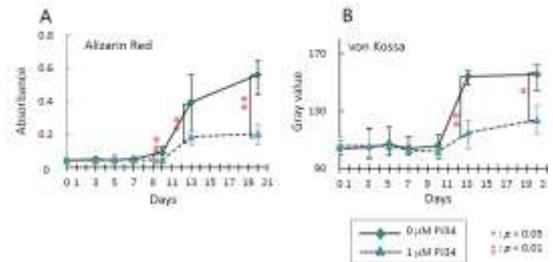
(1) PARP 阻害剤に対する最大半減抑制濃度(以下IC₅₀)は両細胞ともに10 μ M以上で、コントロールと比較して、BMMSCs に対しては6 μ M PJ34 と5 μ M AZD2281 で有意に細胞毒性を認め、KUSA-A1 に対しては4 μ M PJ34 と3 μ M AZD2281 で有意に細胞毒性を認めた。Survival assay での IC₅₀ は、BMMSCs においては PJ34 で6.5 μ M、AZD2281 で5.5 μ M、KUSA-A1 においては、PJ34 で5 μ M、AZD2281 で2 μ M だった。細胞の生存率は、BMMSCs では2 μ M の PJ34 と1 μ M の AZD2281 で、KUSA-A1 では1.5 μ M の PJ34 と0.5 μ M の AZD2281 で有意に減少した ($p < 0.05$)。これらの結果より、細胞毒性の影響を最小限に抑えるため、PARP 阻害剤は1~5 μ M PJ34 を用いることとした。



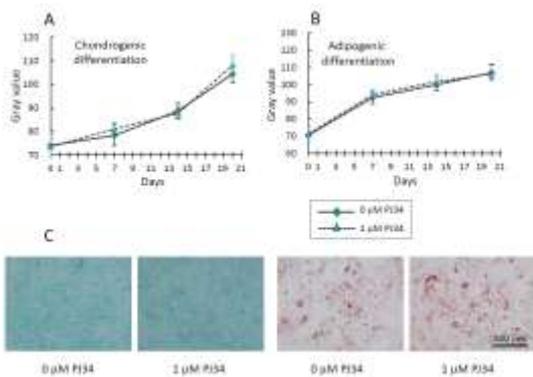
次に、1~5 μ M PJ34 が細胞内のポリ ADP-リボシル化反応を抑制し、PAR レベルが減少するかを調べたところ、それぞれ PAR レベルが低下することが分かり、PARP 活性の阻害が証明された。



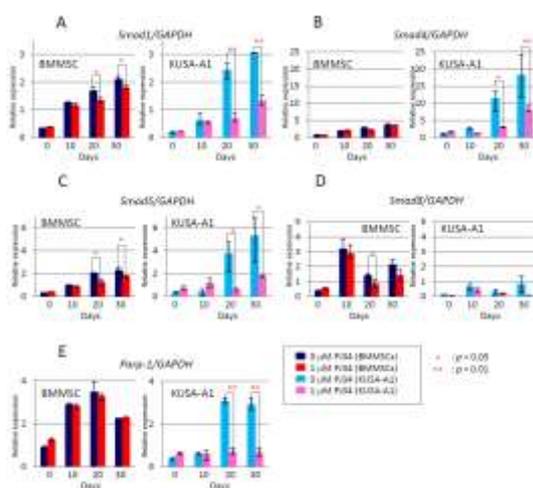
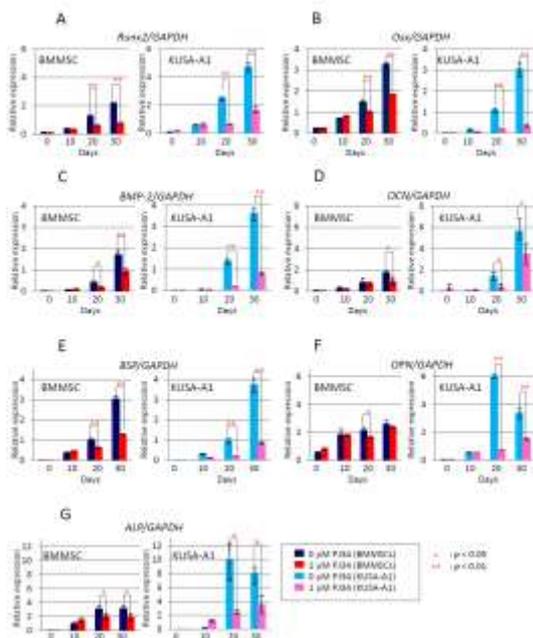
(2) MSC の骨芽細胞への分化を調べたところ、両細胞ともに時間依存性に析出レベルが増加した。更に、コントロール群に比べて1 μ M PJ34 添加群では析出量が低下した。



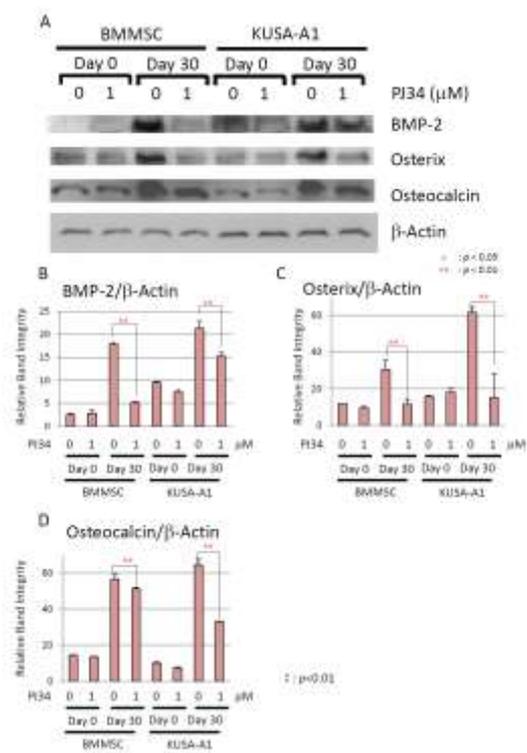
軟骨細胞並びに脂肪細胞への分化に、PJ34 の有無による有意差は認められなかった。従って、PJ34 は間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化には関与するが、脂肪細胞や軟骨細胞への分化には関与しないことが示唆された。



(3) 次に骨分化の関連マーカーの発現について調べた。両細胞とも経時的にこれらのマーカー発現は亢進したが、PARP 阻害剤投与群では、分化開始 20 日目と 30 日目で有意に発現レベルが低下した。また、PARP-1 の発現量は、1 μ M PJ34 を投与した KUSA-A1 で低下した。従って、PARP 活性が BMP シグナル伝達経路に関わることが示唆された。



また、BMP-2、Osterix、Osteocalcinについてはタンパクレベルでも発現レベルを調べた結果、1 μ M PJ34の添加によって、これらの因子がタンパクレベルでも発現が低下することが証明された。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Masaaki Yasukawa, Hisako Fujihara, Koji Kawaguchi, Hiroyuki Yamada, Ryoko Nakayama, Nanami Yamamoto, Yuta Kishi, Yoshiki Hamada, Mitsuko Masutani: Synergetic Effects of PARP Inhibitor AZD2281 and Cisplatin in Oral Squamous Cell Carcinoma in vitro and in vivo. 査読有 Int. J. Mol. Sci. 2016, 17, 272; doi:10.3390/ijms17030272
- ② Koji Kawaguchi, Takanori Eguchi, Akihisa Horie, Kenichi Kumagai, Mitsuhiro Hasebe, Tsuyoshi Amemiya, Yoshiki Hamada. An Immediate Reconstructive Surgery with a Pectoralis Majorcutaneous Flap using the LigaSure Impact Vessel-sealing Device---A Technical Case Report. 査読有 Int J Dent Oral Health 2(1): 2016 doi:http://dx.doi.org/10.16966/2378-7090.15 8 ISSN2378-7090
- ③ Yuta Kishi, Hisako Fujihara, Koji Kawaguchi, Hiroyuki Yamada, Ryoko Nakayama, Nanami Yamamoto, Yuko Fujihara, Yoshiki Hamada, Kazuhito Satomura, Mitsuko Masutani. PARP Inhibitor PJ34 Suppresses Osteogenic Differentiation in Mouse Mesenchymal Stem

Cells by Modulating BMP-2 Signaling Pathway. 査読有 Int. J. Mol. Sci. 2015, 16, 24820-24838; doi:10.3390/ijms161024820

- ④ Koji Kawaguchi, Tsuyoshi Amemiya, Hajime Shimizu, Nobuoki Sakai, Yoshiki Hamada. Image-Guided Robotic Stereotactic Radiotherapy Synchronous Cancer of Maxillary Gingiva and Lung. Int.J.Oral Maxillofac. Surg. 査読有 43(6): 692-695, 2014.
- ⑤ 濱田 良樹, 山田 浩之, 熊谷 賢一, 中岡 一敏, 堀内 俊克, 川口 浩司. カスタムメイド・チタンメッシュトレーと自家腸骨／脛骨海綿骨骨髓細片による下顎骨再建の臨床的有用性. 査読有 日本口腔腫瘍学会誌 26: 78-88, 2014.
- ⑥ Takayoshi Nomura, Junichi Sato, Masaro Matsuura, Koji Kawaguchi, Rei Sekiguchi, Akihisa Horie, Kanichi Seto. Lightweight acrylic resin facial prosthesis for maxillofacial defects: A fabrication and retention method. 査読有 Journal of Prosthetic Dentistry, 110(4):326-330, 2013.106
- ⑦ Sachiko Toubaru, Kyosan Yoshikawa, Seiya Ohashi, Katsuyuki Tanimoto, Azusa Hasegawa, Koji Kawaguchi, Tsuneo Saga and Tadashi Kamada. Accuracy of methionine-PET in predicting the efficacy of heavy-particle therapy on primary adenoid cystic carcinomas of the head and neck. 査読有 Radiation Oncology 2013, 8:143.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 川口 浩司 ミニレクチャー: 蛍光観察法を用いた口腔上皮異形成の検出, 第 60 回日本口腔外科学会学術総会、2015 年 10 月 16-18 日、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)
- ② Nanami Yamamoto, Koji Kawaguchi, Hisako Fujihara, Masaaki Yasukawa, Yuta Kishi, Mitsuiiko Hasebe, Kenichi Kumagai, Yoshiki Hamada. Autofluorescence visualization detection for oral epithelial dysplasia. AAOMS 97th Annual Meeting in Washington, DC, Sep 28- Oct 3, 2015
- ③ Koji Kawaguchi. Image-guided robotic radiosurgery combined with chemotherapy for patients with advanced or recurrent head and neck cancer. Contemporary management for advanced head and neck cancer. Guest society session symposium. XXII Congress European Association for Cranio-Maxillofacial Surgery. 23-26 Sep. 2014. Prague, Czech Republic.
- ④ 山本 那々美, 川口 浩司, 安川 仁章, 熊

谷 賢一, 藤原 久子, 馬杉 亮彦, 岸 悠太, 岡田 奈穂子, 和気 昌弘, 濱田 良樹: 口腔粘膜上皮異形成の非侵襲的検出法 光照射法の臨床使用経験 鶴見大学歯学会 第 79 回例会 2014 年 6 月 28 日, 鶴見大学 (神奈川県・横浜市)

- ⑤ 安川 仁章, 藤原 久子, 山田 浩之, 福岡 愛理, 川口 浩司, 濱田 良樹: 耳下腺に発症した粘液脂肪腫の 1 例. 第 197 回口腔外科学会 関東支部学術集会 2014 年 6 月 7 日, 自治医科大学 (栃木県・下野市)
- ⑥ 藤原 久子, 山田 浩之, 岸 悠太, 中岡 一敏, 川口 浩司, 濱田 良樹: サルコイドーシスとの鑑別が困難なパラコキシジオイデス症の 1 例. 第 195 回日本口腔外科学会関東支部学術集会 2013 年 6 月 1 日, 千葉大学 (千葉県・千葉市)

[図書] (計 3 件)

- ① 川口 浩司: 頭頸部手術デモ DVD No. 1. 「LigaSure Small Jaw を用いた下顎歯肉癌切除術」(法務省認可) 2014.12. COVIDIEN 社
- ② 川口 浩司: 頭頸部手術デモ DVD No. 2. 「LigaSure Small Jaw を用いた上顎歯肉癌切除術」(法務省認可) 2014.12. COVIDIEN 社
- ③ 川口 浩司: 分担執筆、第 21 章、再建外科手術「イラストでみる口腔外科手術」第 3 巻、日本口腔外科学会編、クインッセンス出版株式会社, 東京, p.187-277. 2013.5.10.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川口 浩司 (KAWAGUCHI, Kouji)
鶴見大学・歯学部・准教授
研究者番号: 50277951

(2) 研究分担者

藤原 久子 (FUJIHARA, Hisako)
鶴見大学短期大学部・歯科衛生科・准教授
研究者番号: 80396746

山田 浩之 (YAMADA, Hiroyuki)
岩手医科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 90267542