

骨形成促進効果を有する既存薬の同定とその臨床応用の可能性

名古屋大学医学部整形外科

三島 健一・鬼頭 浩史・金子 浩史
松下 雅樹・門野 泉・石黒 直樹

要旨 2002年から当科で実施している「培養骨髄細胞移植を併用した骨延長術」は、移植する骨芽細胞様細胞の骨分化度が成績に影響する。この治療の臨床成績をさらに向上させるべく、骨形成促進効果を示す医薬品を探索した。骨芽細胞分化に必須の転写因子 Runx2 遺伝子のプロモーター活性を亢進させる既存薬を網羅的にスクリーニングし、2種類のプロトンポンプ阻害薬(Proton Pump Inhibitors : 以下, PPIs), ランソプラゾールとラベプラゾールを同定した。2種類のPPIsは内因性 Runx2 の発現とその転写活性を上昇させ、骨芽細胞分化を促進させた。また、骨折モデル動物に全身投与すると、骨折治癒過程が促進した。この2種類のPPIsは既に安全性が担保された医薬品であり、ex vivoでの臨床応用は即時可能と考えられる。

背景

当施設では2002年から骨延長術適応症例に対して自家培養骨髄細胞移植を併用することにより、healing index および合併症を減少させることに成功し、この細胞治療は2011年に厚生労働省から高度医療の承認を受けた。しかし、細胞治療を併用しても、軟部組織の被覆や局所の血流が乏しい脛骨延長では大腿骨と比較するとやや劣る臨床成績を示し、依然として時間のかかる治療法であることには変わりがない。一方でこの細胞治療の臨床成績を決める因子には、移植する細胞数やその骨分化度も挙げられる⁴⁾。そこで局所条件が不良な脛骨延長においてもこの細胞治療の有効性をさらに向上させるため、培養骨髄細胞の骨分化度を上昇させる簡便な方法を模索した。我々は既存薬の適応外効能を新たに見出し、その効能を治療に即時つなげていくという drug repositioning という方法論に着想を得て、臨床ですでに使

用されている医薬品の中から、骨形成促進効果を示す低分子化合物を検索した。薬効スクリーニングシステムの構築に当たって、転写因子 Runx2 に注目した。

Runx2 は未分化間葉系幹細胞から骨芽細胞系列への分化に必須の転写因子である⁷⁾。Runx2 のノックアウトマウスは全身の骨化が障害され、出生後すぐに呼吸不全で死亡する⁵⁾。また、骨系統疾患の1つである鎖骨頭蓋異形成症は Runx2 の遺伝子変異によって生じる⁹⁾。さらに Runx2 は骨芽細胞が産生する各種骨基質タンパク質の発現をその遺伝子のプロモーター領域に結合することで正に制御しており、生理的な骨芽細胞の機能にも重要な働きをしている⁸⁾。実際に未分化間葉系細胞に Runx2 遺伝子をウイルスベクターによって強制発現させると、骨欠損モデル動物において骨新生が促進される¹⁰⁾。本研究では Runx2 遺伝子のプロモーター活性を上昇させる既存薬を網羅的にスクリーニングし、その薬剤の骨芽細胞分化能

Key words : proton pump inhibitor(プロトンポンプ阻害薬), osteogenesis promoting agent(骨形成促進剤), mesenchymal stem cell(間葉系幹細胞), Runx2(Runx2), drug repositioning(drug repositioning)

連絡先 : 〒466-8560 名古屋市昭和区鶴舞町65 名古屋大学医学部整形外科 三島健一 電話(052)741-2111

受付日 : 2013年5月9日

および骨形成能を検討した。

方法と結果

ルシフェラーゼ遺伝子の上流に約2kbのRunx2プロモーター領域をクローニングしたレポーターベクターを作製、このベクター遺伝子を恒常的に発現した安定発現株細胞(マウス未分化間葉系細胞株C3H10T1/2; 理科研バイオリソースセンター)を樹立した。この安定発現株に1186種類の既存薬(Prestwick Chemical Library®; Prestwick Chemical)を最終濃度20 μMで添加しルシフェラーゼアッセイによる薬効スクリーニングを行った。培養液はBasal Medium Eagle(Sigma-Aldrich)を使用し、培養は37°C、5% CO₂条件下のインキュベーター内で行った。コントロールには溶媒であるDMSOを使用した。

多段階の薬効スクリーニングを経て、濃度依存性にRunx2遺伝子のプロモーター活性を上昇させ、かつ日本国内での使用が認可されている5種類の薬剤を絞り込んだ。最終的には比較的高濃度での使用も可能で、かつ長期使用の実績もある2種類のプロトンポンプ阻害薬(Proton Pump Inhibitors: 以下、PPIs)、ランソプラゾール(タケプロン; 武田薬品工業)とラベプラゾール(パリエット; エーザイ)を候補薬とし、それぞれ原末をSigma-Aldrich, LKT laboratoriesから入手して以下のような目的(①~⑤)で下記の実験(①'~⑤')を行った。

① PPIsは内因性Runx2の発現を上昇させるか?

② PPIsは内因性Runx2を活性化させるか?

③ PPIsは未分化間葉系細胞からの骨芽細胞分化を促進させるか?

④ PPIsが新鮮ヒト骨髄細胞培養系において骨分化誘導を促進させるか?

⑤ PPIsの全身投与によって骨折モデル動物の骨折治癒は促進されるか?

①' 骨芽細胞系列細胞において、内因性Runx2の遺伝子やタンパクの発現をReal-time PCR法や

ウェスタンブロットティング法で検討した。Real-time PCR法ではタカラのSYBR Premix Ex Taq IIとRoche社のLightCycler 480 System、ウェスタンブロットティング法ではGE Life Sciences社のLAS4000をそれぞれ使用した。

②' 内因性Runx2タンパクの活性化による核内移行を骨芽細胞系列細胞から核内タンパク分画を回収し、ウェスタンブロットティング法や免疫蛍光染色法によって評価した。

③' 骨芽細胞系列細胞における骨分化マーカー遺伝子(アルカリフォスファターゼやオステオポンチン)の発現状況をそれぞれELISA法や定量的RT-PCR法によって検討した。

④' 院内倫理審査委員会の承認と患者サイドの同意を得て、3例の白蓋形成不全症例に対するソルター骨盤骨切り術の際に骨盤から骨髄液を採取した。これをFicoll-Paque液(GE Healthcare社)で密度勾配遠心分離し単核球分画を回収、播種した。培養皿に接着した骨髄間葉系幹細胞は直ちに骨分化誘導培地(50 μg/ml アスコルビン酸, 10 mM βグリセロリン酸, 10⁻⁷ M デキサメサゾンを含むDulbecco Modified Eagle Medium; Sigma-Aldrich)で3週間継代培養によって分化増殖し、さらにランソプラゾール含有骨分化誘導培地で6日間培養した。細胞は4%パラフォルムアルデヒド液で固定し、最終骨分化である基質のカルシウム沈着をアリザリンレッド染色法によって評価した。

⑤' ラット大腿骨骨折モデルを作製し、常用量の15倍程度のランソプラゾールを連日経口投与した。投与開始後4週で屠殺して大腿骨を回収、非脱灰標本を作製してVillanueva Goldner染色を行い、骨折部や骨幹端部の骨組織形態計測を行った。

その結果、以下のことがそれぞれ明らかとなった。

① 2種類のPPIsはC3H10T1/2細胞株、ヒト骨肉腫細胞株、ラットやヒトの骨髄由来間葉系細胞において、濃度依存性に内因性Runx2の遺伝子やタンパクの発現を上昇させた。この効果はラ

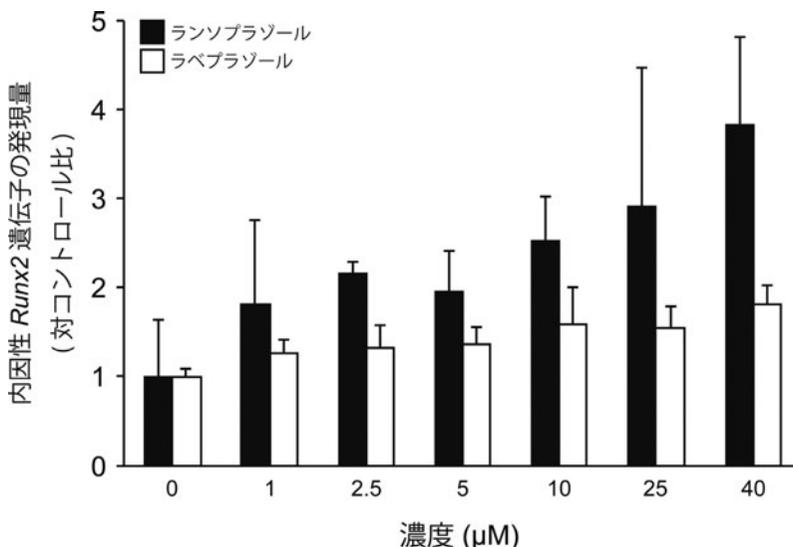


図1. PPIs 刺激による内因性 Runx2 遺伝子の発現量の変化(Real-time PCR 法) あらかじめ BMP(bone morphogenetic protein)-2 を添加して分化誘導を加えた C3H10T1/2 細胞株に PPIs を加え、24 時間後に細胞を回収して解析した。2 種類の PPIs は濃度依存性に内因性 Runx2 遺伝子の発現を増加させた。

ンソプラゾールの方がラベプラゾールよりも優れていた(図1)。

② 2 種類の PPIs は骨芽細胞系列細胞において、内因性 Runx2 タンパクの核内移行を促進させた(図2)。

③ ランソプラゾールは骨芽細胞系列細胞において、Runx2 の下流に位置する骨分化マーカー遺伝子の発現を濃度依存的に上昇させた(図3)。

④ ランソプラゾールは、新鮮ヒト骨髄間葉系細胞培養系において骨分化誘導培地内に添加するだけで、骨芽細胞の最終分化を促進させた。

⑤ ランソプラゾールは骨折部間隙の間葉系組織内に新生される島状の石灰化骨を有意に増加させた。また、骨幹端部の類骨形成を有意に上昇させたが、骨量には影響を与えなかった。一方破骨細胞の数は有意に減少していたが、骨吸収能には影響を与えなかった。

考 察

本研究は、drug repositioning 手法を用いて胃十二指腸潰瘍や胃食道逆流症の治療薬として全世界で幅広く使用されている PPIs が、転写因子 Runx2 の発現とその活性化を介して、骨形成促

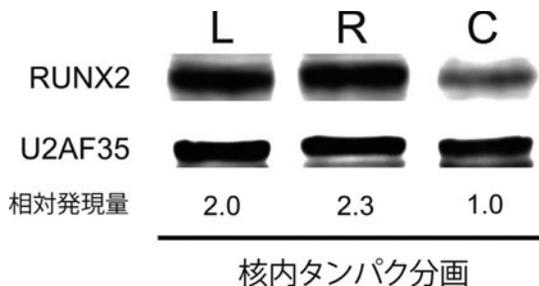


図2. PPIs 刺激による核内タンパク分画に占める RUNX2 タンパク量の変化(ウェスタンブロッティング法)

ヒト骨肉腫細胞株に PPIs を加え 48 時間後に細胞を回収、核内タンパク分画を抽出して解析した。2 種類の PPIs は RUNX2 タンパクの核内移行を促進させた。L:ランソプラゾール(20 μM), R:ラベプラゾール(20 μM), C:コントロール

進効果を発揮することを明らかにした。この手法は新薬の開発が年々鈍化している現在、創薬の現場では注目を集め、盛んに取り入れられている²⁾。例えば、勃起不全が適応のシナデルフィル(商品名バイアグラ)は当初は、狭心症の薬として開発され、男性型脱毛症が適応のフィナステリド(商品名プロペシア)は、元々前立腺肥大症の薬であった。また、アザラシ肢症を引き起こしたサリドマイドも、今や副作用である血管新生抑制効果

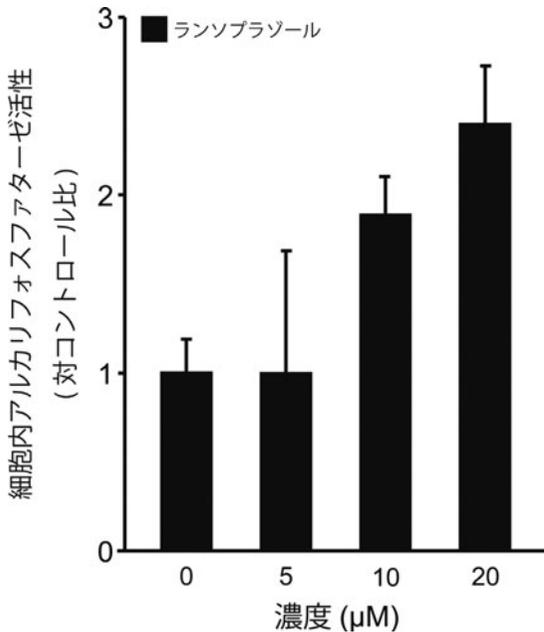


図3. ランソプラゾール刺激による細胞内アルカリフォスファターゼ(ALP)活性の変化(ELISA法)
患者由来骨髄細胞をデキサメサゾン含有骨分化誘導培地で培養, 2回継代後にランソプラゾールを加えてさらに5日間培養し, 細胞を回収して解析した。ランソプラゾールは濃度依存性に細胞内ALP活性を増加させた。

などが逆に注目され, 多発性骨髄腫の治療薬として復活している。長年臨床的に使用され安全性が担保された既存薬からスタートする drug repositioning は, ヒトに対する安全性試験や用量・用法の設定などを一から始める通常の創薬システムと比較すると, 開発期間やコストを大幅に縮小することができる優れた創薬手段である。

現在我々が実施している細胞治療では, 採取した骨髄液から間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cells: 以下, MSCs)を含む単核球分画を遠心機で分離回収し, すぐにデキサメサゾン含有骨分化誘導培地で誘導と増殖を開始している。一般に, MSCsは分化誘導を加えて分化が進むと次第に細胞増殖能は低下していくため, 現行法では培養開始時のMSCsの数, ひいては採取する骨髄液の量に移植時の細胞数はおおむね規定されてしまう。一方で, MSCsを未分化なまま増殖させてから骨分化誘導を開始しようとする, MSCsは細

胞分裂を重ねると多分化能が低下するため, 結局骨分化度が未熟な細胞しか得られない¹⁾。こうしたMSCsを利用した細胞治療のジレンマを解決するためには, 骨分化の促進がどうしても必要となる。本研究で同定されたPPIsの適応外効能は, こうしたジレンマを打開する可能性を秘めている。骨髄由来MSCsをある程度増殖させてからPPIs含有の骨分化誘導培地で培養することで, 現行法と同等の骨分化度の細胞をより多く獲得できるようになるのではないかと我々は考え, 現在PPIsの添加濃度や培養期間の最適化を行っている。

ランソプラゾールの全身投与による骨折治療促進効果を実用化するには, 高容量というハードルがある。in vitro 実験から通常量では無効と判断し, ラットにはヒト常用量の15倍程度のランソプラゾールを与えたが, これをはるかに上回る高用量であっても, 発癌性や催奇形性など目立った有害事象は報告されていない。また, 長期かつ高用量では, 骨粗鬆症性脆弱骨折のリスクを高めるとの注意勧告がFDAから出されているが, 骨折治療での服用は1~数か月以内と想定され, この点に関しても懸念は少ない。したがって, 常用量の10~20倍程度の用量設定であれば, 難治性骨折や偽関節の治療に適応できると考える。また, 2種類のPPIs間に存在するドラッグエフェクトに注目すると, PPIs派生化合物の構造活性連関を検討することで, 新規骨形成促進剤のin silico創薬につながることも期待できる。

今回は検討していない局所投与は, ある程度の期間高濃度を局所で実現できれば, 全身への影響を最小限にできる有望な使用方法である。しかし, 通常担体からの低分子化合物の放出は指数関数的に減衰していくため, 比較的高濃度で緩やかに徐放可能な担体の新規開発が必要と考えられる。我々は, 現存する骨欠損補填剤を加工したPPIs徐放性人工骨の開発を目指したいと考えている。

結語

2種類のPPIs, ランソプラゾールとラベプラゾールには転写因子Runx2を介した骨形成促進

効果が適応外効能として存在する。

文献

- 1) Bianco P, Cao X, Frenette PS et al: The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med* **19** : 35-42, 2013.
- 2) Corbett A, Pickett J, Burns A et al: Drug repositioning for Alzheimer's disease. *Nat Rev Drug Discov* **11** : 833-846, 2012.
- 3) Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H et al: Transplantation of culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma in distraction osteogenesis of the long bones. *Bone* **40** : 522-528, 2007.
- 4) Kitoh H, Kawasumi M, Kaneko H et al: Differential effects of culture-expanded bone marrow cells on the regeneration of bone between the femoral and the tibial lengthenings. *J Pediatr Orthop* **29** : 643-649, 2009.
- 5) Komori T, Yagi H, Nomura S et al: Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* **89** : 755-764, 1997.
- 6) Lim CT, Ren X, Afizah MH et al: Repair of osteochondral defects with rehydrated freeze-dried oligo[poly(ethylene glycol)fumarate] hydrogels seeded with bone marrow mesenchymal stem cells in a porcine model. *Tissue Eng Part A* **19**(15-16) : 1852-1861, 2013.
- 7) Long F: Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13** : 27-38, 2012.
- 8) Schroeder TM, Jensen ED, Westendorf JJ: Runx2: a master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts. *Birth Defects Res C Embryo Today* **75** : 213-225, 2005.
- 9) Shen Z, Zou CC, Yang RW et al: Cleidocranial dysplasia: report of 3 cases and literature review. *Clin Pediatr (Phila)* **48** : 194-198, 2009.
- 10) Wojtowicz AM, Templeman KL, Hutmacher DW et al : Runx2 overexpression in bone marrow stromal cells accelerates bone formation in critical-sized femoral defects. *Tissue Eng Part A* **16**(9) : 2795-2808, 2010.

Abstract

Clinical Application of drug repositioning strategy for bone regeneration

Kenichi Mishima, M, D., et al.

Department of Orthopaedic Surgery, Nagoya University School of Medicine

We report the experimental findings associated with cell therapy during limb lengthening using transplantation of bone-marrow-derived osteoblast-like cells. The cells are cultured in advance for propagation and differentiation from osteoblast progenitors. The transcription factor Runx2 (runt-related transcriptional factor 2) is known to play a pivotal role in regulating chondroblast maturation and osteoblastic cell fate decision of mesenchymal stem cells. Activation of Runx2 in human bone-marrow derived mesenchymal stem cells induces the expression of osteoblastic genes during the early phase of osteoblast differentiation. Previous results suggested that the effectiveness depends in part on the degree of osteoblastic differentiation of the donor cells. To find small compounds that activate Runx2 promoters, we screened clinically applicable drugs, and found two proton pump inhibitors (PPI) - lansoprazole and rabeprazole - that induce osteoblastogenesis by upregulating the expression and transcription activity of Runx2 in osteoblast-lineage cells. Findings in a rat fracture model showed that systemic administration of lansoprazole induced increased osteoblastic parameters and fracture healing. These experimental findings suggested that PPI might be clinically useful in promoting bone regeneration.