

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍)	日高 亨 彦 (宮崎県)
博士の専攻分野	博士 (歯 学)
学位記番号	甲 第 511 号
学位授与年月日	令和3年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科専攻	鶴見大学大学院歯学研究科 (博士課程) 歯学専攻
学位論文題目	Combined Effect of Midazolam and Bone Morphogenetic Protein-2 for Differentiation Induction from C2C12 Myoblast Cells to Osteoblasts (C2C12 筋芽細胞から骨芽細胞への分化誘導に対するミダゾラムと骨形成タンパク質-2の併用効果) Pharmaceutics 12(3): 218. 2020
論文審査委員	主査 教授 奥 村 敏 副査 教授 朝 田 芳 信 副査 教授 河 原 博

内容の要旨

【緒 言】

Drug repositioning とは、ヒトでの安全性や薬物動態が確認されている既存の薬物を用いて、新たな効果を探索する手法である。その大きな利点として、既存の薬物を用いるため、安全性が高いこと、開発コストを抑えられることなどが上げられる。ミダゾラム (MDZ) は、催眠作用、鎮静作用、麻酔作用、抗不安作用、筋弛緩作用、抗けいれん作用などの薬理作用があるベンゾジアゼピン系の麻酔導入・鎮静薬である。MDZ は、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の細胞生存率と骨形成分化に負の影響を及ぼし、また腫瘍および癌細胞に及ぼす影響を調査したいくつかの *in vitro* 研究では、カスパーゼ経路、小胞体ストレス、オートファジー、および細胞周期を調節することによって細胞アポトーシスを誘導することが報告されている。しかし歯科分野では、MDZ はブタ歯髄由来細胞株の象牙芽細胞への分化を促進し、象牙質様ヒドロキシアパタイトの形成を促進する事が報告されている。本研究は、MDZ の骨再生医療における Drug repositioning の可能性を見出す事を目的とした。

【材料と方法】

不死化マウス筋芽細胞株 (C2C12 細胞) を MDZ または Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) 単体、MDZ と BMP-2 (MDZ+BMP-2) の組み合わせで1日間、3日間、7日間、10日間、14日間、21日間培養し、C2C12 細胞の骨芽細胞への分化とシグナル伝達を、細胞生物学的、免疫組織化学的および結晶工学的に調べた。Alkaline phosphatase (ALP) 活性の測定、MTS assay による細胞増殖の測定、筋管細胞のミオシンフィラメントの免疫染色、real time PCR による *ALP*、*RUNX2*、*Osterix*、*MyoD* の遺伝子発現測定、生成された石灰化物の Alizarin red S 染色と Ca 量の測定、X 線回析 (XRD)、エネルギー分散型 X 線回析 (EDS)、透過型電子顕微鏡 (TEM) による石灰化物の同定、GABA_A 受容体 α_1 、GABA_A 受容体 γ_2 、1A 型 BMP 受容体、リン酸化 Smad1/5/8 の免疫染色を行った。

【結 果】

MDZ 20 μ M と BMP-2 500 ng/ml の組み合わせで3日間培養した C2C12 細胞が、最も ALP 活性を上昇させる事が確認された。また BMP inhibitor である LDN193189 を加えると、control と比較し ALP の上昇が認められなかった事から、この MDZ+BMP-2 による ALP 活性の上昇は、BMP-2 依存性である事が示唆された。

MDZ 20 μ M の濃度で C2C12 細胞の Doubling Time に影響を及ぼさず、細胞増殖能に影響を与えない事が示唆された。

10 日間培養した C2C12 細胞のミオシンフィラメントの免疫染色を行った結果、MDZ 20 μ M を加えた群では筋管細胞の

形成不全が確認された。

遺伝子発現では、MDZ+BMP-2で培養1日目の*RUNX2*の発現が上昇し、3日目で*ALP*と*Osterix*の発現が上昇した。また*MyoD*は1日目、3日目ともにcontrolと有意な差は認められなかった。

MDZ+BMP-2で10日間培養し生成された石灰化物は、Alizarin red S染色で染色された。生成された石灰化物のCa量を測定したところ、約 $6.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ のCa量が測定された。

XRDにより、MDZ+BMP-2で14日間および21日間培養し生成された石灰化物はリン酸カルシウムに起因するもので、ヒドロキシアパタイト、あるいはリン酸オクタカルシウムと示唆された。

XRDの結果で示した沈殿物の2次元元素マッピングでは、Ca/Pの原子比率が 1.40 ± 0.01 であり、NaおよびMgが微量元素として検出された。S、Cl、およびKも検出されたが、その量は非常に少量だった。

TEM画像の回析の結果、沈殿物はヒドロキシアパタイトとリン酸オクタカルシウムの混合物であった。

1日間と7日間培養したC2C12細胞の各受容体の免疫染色では、MDZ+BMP-2でGABA_A受容体 α_1 とGABA_A受容体 γ_2 の両方の特定の免疫染色を著しく減少したが、1A型BMP受容体とリン酸化Smad1/5/8の染色性が劇的に増加した。リン酸化p-Smad1/5/8抗体の陽性率は、controlで3.9%、BMP-2のみで16.9%、MDZのみで7.5%、MDZ+BMP-2で35.3%だった。

【考 察】

神経芽腫細胞株、ヒト白血病細胞、および大腸癌細胞では、MDZはカスパーゼ-9、カスパーゼ-3、ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼを活性化し、ミトコンドリア内在性のアポトーシス経路を誘導することが報告されているほか、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株では、MDZはアポトーシスよりもむしろ壊死性細胞死を誘導することが報告されている。またブタ歯髓由来細胞株では、象牙芽細胞への分化を促進し、ヒドロキシアパタイトの形成を促進させ、TGF- β またはBMP-2との組み合わせではそれが抑制される傾向を示したと報告されている。本研究では、 $40 \mu\text{M}$ のMDZを使用するとALP活性が低下し、MDZの細胞毒性が示唆されることを示したが、 $20 \mu\text{M}$ のMDZはC2C12細胞のALP活性、細胞増殖には影響を与えなかった。これらのことからMDZは、標的細胞に対する感受性が異なり、用量によって効果が異なることが示唆された。またMDZとBMP-2の併用は、MDZ単独よりもC2C12細胞の骨芽細胞への分化を促進することを示した。このことから、MDZは硬組織形成に関わる細胞においては、GABA_A受容体応答性よりもTGF- β およびBMPシグナル伝達を優先的に促進していることが示唆された。

【結 論】

MDZ+BMP-2は、MDZ単独よりもC2C12細胞の骨芽細胞への分化を促進することが示唆された。

審査の結果の要旨

日高亨彦氏は、ミダゾラム(MDZ)の骨再生医療におけるドラッグ・リポジショニングの可能性を検討するため、MDZならびにBone Morphogenetic Protein-2(BMP-2)のマウス由来C2C12筋芽細胞における骨芽細胞への分化について細胞生物学的、組織学および結晶工学的手法を用いて調べた。

1) 細胞生物学的実験：C2C12細胞は、MDZ $20 \mu\text{M}$ とBMP-2 500 ng/ml の濃度刺激で骨芽細胞への分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ(ALP)活性をコントロール群に比較して顕著に増加したが、BMP-2抑制剤(LDN-193189)存在下でその効果は顕著に抑制された。また骨芽細胞マーカー(*Runx2*, *Tnfrsf25*, *Osx1*)のmRNA発現量ならびにBMP-2受容体とp-Smad1/5/8のタンパク発現量も増加していた。

以上の結果はMDZとBMP-2の併用投与はBMP-2依存的にC2C12細胞の骨芽細胞への分化を促進させることが示唆された。

2) 組織学的実験：ミオシンフィラメントの免疫染色では、MDZ単独では筋幹細胞構造が不完全ながら維持されていたが、BMP-2投与群と併用群では同程度に筋幹細胞の構造が消失し、骨芽細胞への分化が示唆された。しかしアリザリンレッド染色陽性石灰化物は併用群でのみ観察された。

3) 結晶工学的実験：X線解析の結果より併用群で観察された石灰化物は、リン酸カルシウムに起因するもので、ヒドロキシアパタイトあるいはリン酸オクタカルシウムであることが分かった。またエネルギー分散型X線解析よりCa/Pの原子比率は 1.40 ± 0.01 であることが分かった。

本研究は、MDZの骨再生医療への応用が期待される研究である。よって、本論文は博士(歯学)の学位論文として十分な価値を有するものと判断した。