

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-220561

(P2010-220561A)

(43) 公開日 平成22年10月7日(2010.10.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	2 G 0 4 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 1/02 (2006.01)	A 6 1 P 1/02	4 C 0 8 4
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 15 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2009-72185 (P2009-72185)

(22) 出願日 平成21年3月24日 (2009.3.24)

特許法第30条第1項適用申請有り 「BMB2008
(第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学会
大会) 講演要旨集」 (2008年11月20日 第
31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大
会 合同大会 発行)

(71) 出願人 899000057

学校法人日本大学
東京都千代田区九段南四丁目8番24号

(74) 代理人 110000774

特許業務法人 もえぎ特許事務所

(72) 発明者 大島 光宏

東京都千代田区九段南四丁目8番24号
学校法人日本大学内

(72) 発明者 山口 洋子

東京都千代田区九段南四丁目8番24号
学校法人日本大学内

(72) 発明者 加藤 光保

茨城県つくば市天王台一丁目1番地1号
国立大学法人筑波大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コラーゲン分解阻害剤のスクリーニング方法

(57) 【要約】

【課題】 コラーゲン分解阻害剤のスクリーニング方法および当該方法によって得られたコラーゲン分解阻害剤の提供。

【解決手段】 三次元細胞培養を用いることで、より生体に近い状態でのスクリーニングが可能なコラーゲン分解阻害剤のスクリーニング方法を提供した。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

被験物質を加えた状態で、コラーゲン分解能を有する細胞を三次元細胞培養するコラーゲン分解阻害剤のスクリーニング方法。

【請求項 2】

さらにコラーゲン分解能を高める細胞を加えて、コラーゲン分解能を有する細胞を三次元細胞培養する請求項 1 に記載のコラーゲン分解阻害剤のスクリーニング方法。

【請求項 3】

三次元細胞培養において、コラーゲンを含む担体を用いる請求項 1 または 2 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 4】

コラーゲンを含む担体内にコラーゲン分解能を有する細胞を含めて培養する請求項 3 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 5】

コラーゲン分解能を有する細胞が歯肉線維芽細胞および/または歯根膜線維芽細胞である請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のスクリーニング方法。

【請求項 6】

コラーゲンを含む担体上にコラーゲン分解能を高める細胞を播いて培養する請求項 2 ~ 5 のいずれかに記載のスクリーニング方法。

【請求項 7】

コラーゲン分解能を高める細胞が歯肉上皮細胞である請求項 6 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 8】

コラーゲン分解能を有する細胞によるコラーゲンの分解が、被験物質によって阻害されるか否かを調べ、コラーゲンの分解が阻害されている場合に、該被験物質をコラーゲン分解阻害剤と判断する、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載のスクリーニング方法。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得られたコラーゲン分解阻害剤。

【請求項 10】

Aprotinin、ALK5 Inhibitor I ([3-(Pyridin-2-yl)-4-(4-quinonyl)]-1H-pyrazole) または NNGH (N-isobutyl-N-(4-methoxyphenylsulfonyl)-glycylhydroxamic Acid) である請求項 9 に記載のコラーゲン分解阻害剤。

【請求項 11】

請求項 9 または 10 に記載のコラーゲン分解阻害剤を有効成分とする歯周炎治療薬。

【請求項 12】

コラーゲン分解能を有する細胞、コラーゲンを含む担体を含むコラーゲン分解阻害剤スクリーニングキット。

【請求項 13】

コラーゲン分解能を有する細胞が、歯肉線維芽細胞、歯根膜線維芽細胞または歯肉上皮細胞である請求項 12 に記載のコラーゲン分解阻害剤スクリーニングキット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明はコラーゲン分解阻害剤のスクリーニング方法および当該方法によって得られたコラーゲン分解阻害剤に関する。更に詳しくは、コラーゲンゲルの分解を指標としたコラーゲン分解阻害剤のスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【0002】

コラーゲンは細胞組織を支えるタンパク質であり、皮膚や骨等の生体組織の形成において重要な役割を果たしている。また、歯周組織の形成にも関与しており、歯肉および歯根膜組織のコラーゲン線維が炎症によって破壊されることにより、歯と歯槽骨との結合組織性付着が喪失し、歯の脱落が起こることも知られている。

そこで、近年では再生医療のひとつとして、コラーゲンを担体とした人工皮膚、人工骨の提供や、歯牙を再生する方法の開発等がされている（例えば、特許文献1参照）。

【0003】

また、このような生体組織におけるコラーゲンの働きを指標として、疾病等に有効な成分をスクリーニングする方法や生体における代謝を評価する方法の開発がなされている。

例えば、歯周組織破壊を抑制・改善する有効成分のスクリーニング方法として、歯周病菌の内毒素と被験物質とを歯肉線維芽細胞に接触させ、コラーゲン分解に関連する遺伝子やコラーゲン合成に関連するタンパク質の遺伝子の発現量を調べる方法等が報告されている（例えば、特許文献2参照）。

【0004】

このようなスクリーニング方法によって、歯周組織破壊を抑制・改善する有効成分とされた被験物質については、さらに動物実験を行い、その効果が確認されてきているが、このスクリーニング方法は、二次元の細胞培養法によるものであるため、細胞が生体組織とはかけ離れた状態で培養されている。そのため、培養系においてその有効性が確認されても、実際に薬剤として応用されることは希であった。そこで、より精度の高いスクリーニング方法の提供が望まれている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】国際公開W02003/101503号パンフレット

【特許文献2】特開2006-298913号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、コラーゲン分解阻害剤のスクリーニング方法および当該方法によって得られたコラーゲン分解阻害剤の提供を課題とする。更に詳しくは、コラーゲンの分解を指標としたコラーゲン分解阻害剤のスクリーニング方法の提供を課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、コラーゲン分解能を有する細胞を三次元細胞培養によって培養することで、コラーゲン分解阻害剤がより生体に近い状態でスクリーニングできることを見出し、本発明を完成するに至った。

本発明のスクリーニング方法によって得られるコラーゲン分解阻害剤は、コラーゲンの分解を病因とする、歯周炎等の疾病に対する治療薬の有効成分として用いることができる。

【0008】

すなわち、本発明は次の(1)～(13)のスクリーニング方法等に関する。

(1) 被験物質を加えた状態で、コラーゲン分解能を有する細胞を三次元細胞培養するコラーゲン分解阻害剤のスクリーニング方法。

(2) さらにコラーゲン分解能を高める細胞を加えて、コラーゲン分解能を有する細胞を三次元細胞培養する上記(1)に記載のコラーゲン分解阻害剤のスクリーニング方法。

(3) 三次元細胞培養において、コラーゲンを含む担体を用いる上記(1)または(2)に記載のスクリーニング方法。

(4) コラーゲンを含む担体内にコラーゲン分解能を有する細胞を含めて培養する上記(3)に記載のスクリーニング方法。

10

20

30

40

50

(5) コラーゲン分解能を有する細胞が歯肉線維芽細胞および/または歯根膜線維芽細胞である上記(1)~(4)のいずれかに記載のスクリーニング方法。

(6) コラーゲンを含む担体上にコラーゲン分解能を高める細胞を播いて培養する上記(2)~(5)のいずれかに記載のスクリーニング方法。

(7) コラーゲン分解能を高める細胞が歯肉上皮細胞である上記(6)に記載のスクリーニング方法。

(8) コラーゲン分解能を有する細胞によるコラーゲンの分解が、被験物質によって阻害されるか否かを調べ、コラーゲンの分解が阻害されている場合に、該被験物質をコラーゲン分解阻害剤と判断する、上記(1)~(7)のいずれかに記載のスクリーニング方法。

(9) 上記(1)~(8)のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得られたコラーゲン分解阻害剤。

(10) Aprotinin、ALK5 Inhibitor I ([3-(Pyridin-2-yl)-4-(4-quinonyl)]-1H-pyrazole) または NNGH (N-isobutyl-N-(4-methoxyphenylsulfonyl)-glycylhydroxamic Acid) である上記(9)に記載のコラーゲン分解阻害剤。

(11) 上記(9)または(10)に記載のコラーゲン分解阻害剤を有効成分とする歯周炎治療薬。

(12) コラーゲン分解能を有する細胞、コラーゲンを含む担体を含むコラーゲン分解阻害剤スクリーニングキット。

(13) コラーゲン分解能を有する細胞が、歯肉線維芽細胞、歯根膜線維芽細胞および/または歯肉上皮細胞の一種以上である上記(12)に記載のコラーゲン分解阻害剤スクリーニングキット。

【発明の効果】

【0009】

本発明のスクリーニング方法によって、従来のスクリーニング方法と比較して、より生体に近い状態でコラーゲン分解阻害剤をスクリーニングすることが可能となった。本発明のスクリーニング方法によって得られるコラーゲン分解阻害剤は、コラーゲンの分解を病因とする疾病において、その疾病の治療薬の有効成分として用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】ゲル全体の収縮の状態を示した図である(試験例)。

【図2】ゲル全体の収縮の状態を示した図である(試験例)。

【図3】ゲルのHE染色の結果を示した図である(試験例)。

【図4】ゲルにおける残存コラーゲンを示した図である(試験例)。

【図5】コラーゲン分解関連遺伝子の発現を確認した図である(試験例)。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明の「スクリーニング方法」には、三次元細胞培養を用いることにより、コラーゲン分解阻害剤をスクリーニングする方法であればいずれの方法も含まれる。

ここで、本発明の三次元細胞培養とは、コラーゲングル等のコラーゲンを含む担体を用いてコラーゲン分解能を有する細胞を培養することをいう。

本発明のスクリーニング方法における三次元細胞培養は、コラーゲングル等のコラーゲンを含む担体を用いて、その担体内または担体上でコラーゲン分解能を有する細胞を培養することが好ましい。

本発明の三次元培養においては、培養用プレート等の中にコラーゲンを含む担体を入れて、その担体内または担体上にコラーゲン分解能を有する細胞を培養してもよく、さらに、このコラーゲンを含む担体をプレート等から取り出し、メッシュ等の上に載せ、空気に曝した状態でコラーゲン分解能を有する細胞を培養してもよい。

【0012】

10

20

30

40

50

「コラーゲン分解能を有する細胞」としては、コラーゲンを分解する能力を有する細胞であればいずれの細胞であっても良いが、特に生体組織において該組織に含まれるコラーゲンを分解し、それによって該組織における疾病の病因となる細胞であることが好ましい。

このような細胞として、マクロファージ、単球、好中球等の血球系の付着細胞や浮遊細胞、滑膜細胞、骨芽細胞、線維芽細胞、破骨細胞、がん細胞等が挙げられる。

線維芽細胞としては、例えば、歯肉線維芽細胞、歯根膜線維芽細胞等が挙げられ、これらの線維芽細胞はコラーゲンを含む担体内に含ませて培養することが好ましい。炎症性細胞は結合組織に浸潤することから、例えば線維芽細胞とマクロファージを、コラーゲンを含む担体内に含ませて混合培養することもできる。

また、「コラーゲン分解能を有する細胞」が、がん細胞、血球系の付着細胞等の場合には、コラーゲンを含む担体上に播いて培養することが好ましい。

【0013】

本発明の「スクリーニング方法」においては、さらに「コラーゲン分解能を高める細胞」を加えて、三次元細胞培養することもできる。

ここで、「コラーゲン分解能を高める細胞」とは、「コラーゲン分解能を有する細胞」のコラーゲン分解能を高め、この細胞によるコラーゲン分解を促進する細胞のことをいう。本発明の「コラーゲン分解能を高める細胞」としては、「コラーゲン分解能を有する細胞」のコラーゲン分解能を高められる細胞であればいずれの細胞であっても良いが、例えば、歯肉上皮細胞等の上皮細胞が挙げられる。また、「コラーゲン分解能を有する細胞」であり、さらに「コラーゲン分解能を高める細胞」でもあるマクロファージなどの炎症性細胞やがん細胞が挙げられる。

「コラーゲン分解能を有する細胞」のひとつである上皮細胞を、例えば、「コラーゲン分解能を有する細胞」の一つである線維芽細胞と組み合わせた場合には、細胞同士の相互作用により、線維芽細胞のMMP産生およびその活性化を刺激し、線維芽細胞のコラーゲン分解能を高めることができる。

本発明の「コラーゲン分解能を高める細胞」は、細胞の種類によって、コラーゲンを含む担体内に含ませても、コラーゲンを含む担体上に播いて培養してもよいが、歯肉上皮細胞等の上皮細胞は、コラーゲンを含む担体上に播いて培養することが好ましい。

【0014】

そして、これらの「コラーゲン分解能を有する細胞」や「コラーゲン分解能を高める細胞」を1種または数種組合せてコラーゲンを含む担体に播種したり、コラーゲンを含む担体内に含ませたりして培養することで、本発明のスクリーニング方法を行うこともできる。

【0015】

本発明の「スクリーニング方法」においては、このような三次元細胞培養を、被験物質を加えた状態で行う。被験物質は、コラーゲンを含む担体を作成する段階で担体内に加えてもよく、コラーゲンを含む担体を作成した後や、三次元培養の開始時等に、振り掛ける等して加えても良い。

そして、コラーゲン分解能を有する細胞によるコラーゲンの分解が、被験物質によって阻害されるか否かを調べ、コラーゲンの分解が阻害されている場合に、該被験物質をコラーゲン分解阻害剤と判断することが好ましい。被験物質によって該細胞によるコラーゲンの分解が阻害されるか否かは、コラーゲンゲルの収縮の程度、残存コラーゲン量の定量等、コラーゲンを含む担体の目視による変化やマトリックス金属プロテアーゼ（以下、MMPとする）等のコラーゲン分解関連遺伝子の発現変化を、被験物質を加えない場合と比較して判断することがさらに好ましい。

【0016】

本発明の「スクリーニング方法」に用いる被験物質とは、コラーゲン分解阻害剤の候補物質と考えられる物質のことをいい、いずれのものも用いることができる。

本発明においては、この被験物質のうち、コラーゲン分解能を有する細胞によるコラー

10

20

30

40

50

ゲンの分解を阻害する物質のことを、「コラーゲン分解阻害剤」とする。

【0017】

本発明の「スクリーニング方法」によって得られる「コラーゲン分解阻害剤」は、本発明のスクリーニング方法によって、コラーゲン分解能を有する細胞のコラーゲン分解を阻害する物質であればいずれのものも含まれる。このような物質として、例えば、セリンプロテアーゼ阻害剤である Aprotinin、TGF タイプ I レセプターキナーゼ阻害剤である ALK5 Inhibitor I ([3-(Pyridin-2-yl)-4-(4-quinonyl)]-1H-pyrazole) や MMP-3 特異的阻害剤である NNGH (N-isobutyl-N-(4-methoxyphenylsulfonyl)-glycylhydroxamic Acid) などが挙げられる。

10

【0018】

本発明の「コラーゲン分解阻害剤」は、コラーゲンが分解されることにより、疾病が引き起こされる組織において、その治療薬の有効成分として用いることができる。このような疾病としては、関節リウマチ、変形性関節症、変形性腰椎症、骨粗鬆症、動脈硬化、浸潤・転移癌、クローン病、ヘルニア、全身性エリテマトーデス、糸球体腎炎、リウマチ性多発筋痛症、歯周炎等があげられ、本発明の「コラーゲン分解阻害剤」は有効成分として、これらの疾病の治療薬に含むことができる。

【0019】

本発明の「歯周炎治療薬」は、歯周炎の治療に有効であって、本発明のスクリーニング方法によって得られたコラーゲン分解阻害剤を有効成分とする薬であればいずれのものも含まれる。このようなコラーゲン分解阻害剤としては、本発明のスクリーニング方法によって得られるものであればいずれでも良いが、Aprotinin や ALK5 Inhibitor I、NNGH、これらの誘導体等であることが好ましい。

20

本発明の「歯周炎治療薬」は、このような有効成分に加え、歯周ポケット内への貼薬等、経口投与、経皮投与、直腸内投与、注射などの投与方法に適した固体または液体の医薬用無毒性担体を含むことができる。このような担体としては、例えば、グルコース、乳糖、ショ糖、澱粉、マンニトール、デキストリン、脂肪酸グリセリド、ポリエチレングルコール、ヒドロキシエチルデンプン、エチレングリコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、アミノ酸、ゼラチン、アルブミン、水、生理食塩水などが挙げられる。また、必要に応じて、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、結合剤、等張化剤などの慣用の添加剤を適宜含むこともできる。

30

本発明の「治療薬」は、例えば、錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤などの固形剤、溶液剤、懸濁剤、乳剤などの液剤、凍結乾燥製剤などの形態で用いる事ができ、これらの製剤は製剤上の常套手段により調製することができる。

【0020】

本発明の「コラーゲン分解阻害剤スクリーニングキット」は、歯肉線維芽細胞等のコラーゲン分解能を有する細胞、歯肉上皮細胞等のコラーゲン分解能を高める細胞、コラーゲングル等のコラーゲンを含む担体等を含むキットであることが好ましく、その他にコラーゲン分解阻害剤をスクリーニングする為に必要な試薬等を含むことができる。

このキットには、コラーゲン分解能を有する細胞、コラーゲン分解能を高める細胞またはコラーゲンを含む担体がそれぞれ個別に含まれており、まとめて包装されているものや、コラーゲンを含む担体内にコラーゲン分解能を有する細胞が含まれた状態のものまたは該担体上にコラーゲン分解能を有する細胞が播かれた状態のものも含まれる。

40

【0021】

以下、試験例、実施例をあげて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例】

【0022】

< 歯周炎治療薬のスクリーニング方法 >

コラーゲングルの調製

50

1) コラーゲン分解能を有する細胞の培養

歯肉線維芽細胞 (GF: Gingival fibroblasts)

歯周外科手術の際に切除され不要となった歯肉片、または抜去歯より、Ohshimaの方法(参考文献1)によって、ヒト歯肉線維芽細胞を得た。

ヒト歯肉由来線維芽細胞を得るにあたり歯肉片を細切後、組織片をプレートの底に静置し、組織片から外生した細胞を第1代として第6継代目の細胞を実験に用いた。得られたヒト歯肉線維芽細胞は、GF1、GF2と名付けた。

参考文献1: J Periodontal Res 29, 421-429, 1994

【0023】

10

歯肉線維芽細胞の培養はプレートまたはフラスコ(住友ベークライト)を用い、minimum essential medium(-MEM、Wako)に10%ウシ胎児血清(FBS、Hyclone)および1%Penicillin/Streptomycin/Neomycin溶液(Sigma)を添加した培養液を用い、37、5%CO₂の湿潤条件下で行った。継代は、細胞が容器内でコンフルエントに達した時点で、0.05%trypsin/0.53mMEDTA溶液を用いて細胞を剥離し、面積比が1:3となるように別の容器に播種して行った。

【0024】

2) コラーゲン分解能を高める細胞の培養

20

培養ヒト歯肉上皮細胞 (GE: Gingival epithelial cells)

歯周外科手術の際に切除され、不要となった歯肉片より、Ohshimaの方法(参考文献2)によって、ヒト歯肉上皮細胞を得た。

ヒト歯肉上皮細胞を得るにあたり歯肉片をDispase処理した後、上皮組織部分を結合組織部分から剥離した。上皮組織を細切後、組織片をプレートの底に静置し、組織片から外生した細胞を第1代として第4~8継代目の細胞を実験に用いた。得られたヒト歯肉上皮細胞は、由来ごとにGE1、GE2と名付けた。

培養にはI型コラーゲンがコートされたプレートまたはフラスコ(住友ベークライト)を用い、細胞はEpiLife medium(Invitrogen)に増殖添加剤(S7、Invitrogen)および1%の抗生物質溶液(PSN、Sigma)を加えたもの(EL+)を用いて増殖させ、trypsin-EDTA溶液を用いて適宜継代培養を行った。

30

参考文献2: J Periodontol 79, 912-918, 2008.

【0025】

3) コラーゲンゲルの構築

A. コラーゲン分解能を有する細胞を含むコラーゲンゲルの構築

セルマトリックス type I-A(新田ゼラチン)、5xDMEM、再構成用緩衝液(新田ゼラチン)を混合し、コラーゲン混合溶液を作成した。

ここに上記1)で培養しておいたコラーゲン分解能を有する細胞をトリプシンで分散させてFBSに浮遊させて懸濁した後、6穴プレート内に播種して30分間硬化(ゲル化)させ、コラーゲン分解能を有する細胞を含むコラーゲンゲルを構築した。

40

【0026】

B. コラーゲン分解能を有する細胞とコラーゲン分解能を高める細胞とを含むコラーゲンゲルの構築

上記A.で構築したコラーゲンゲル上に、上記2)で培養しておいた上皮細胞をトリプシンで分散させた後播種し、コラーゲン分解細胞の単層を形成させ、コラーゲン分解能を有する細胞とコラーゲン分解能を高める細胞とを含むコラーゲンゲルを構築した。

【0027】

4) 被験物質の添加

A. コラーゲンゲル内への添加

コラーゲンゲルの構築時に、コラーゲン混合溶液(上記3)、A.)に被験物質を加え

50

、この被験物質を含むコラーゲン混合溶液に、コラーゲン分解能を有する細胞を加え、被験物質とコラーゲン分解能を有する細胞とを含むコラーゲンを構築してスクリーニングに用いた。また、この被験物質とコラーゲン分解能を有する細胞とを含むコラーゲンゲルの上に、さらにコラーゲン分解能を高める細胞を播種し、被験物質とコラーゲン分解能を有する細胞とコラーゲン分解能を高める細胞とを含むコラーゲンゲルを構築してスクリーニングに用いた。

【0028】

B. コラーゲン分解能を高める細胞の播種時の添加

上記3) A. において構築したコラーゲン分解能を高める細胞を含むコラーゲンゲルに、コラーゲン分解能を高める細胞と被験物質とを混ぜたものを播種し、被験物質とコラーゲン分解能を有する細胞とコラーゲン分解能を高める細胞とを含むコラーゲンゲルを構築してスクリーニングに用いた。

10

【0029】

2. コラーゲン分解阻害剤のスクリーニング

上記4) で構築したゲルを、24時間後にプレートの底から浮かせ、コラーゲンゲル浮遊培養を開始した(培養1日目)。浮遊培養開始時点に、再度被験物質を加えた。浮遊培養開始後5日目の段階でコラーゲンゲルの収縮が見られるようであれば、コラーゲンゲルの収縮レベルおよび湿重量や残存コラーゲン量を定量することで、被験物質によるコラーゲン分解阻害の有無や程度を調べ、コラーゲン分解阻害剤のスクリーニングを行った。

また、この段階では十分なコラーゲンゲルの収縮が見られない場合には、浮遊培養開始後5日目に、ゲルをメッシュ上に載せ、ゲル表面が空気に曝される状態でさらに5日間培養を行い、培養開始後11日目に回収したゲルについて、同様に調べ、コラーゲン分解阻害剤のスクリーニングを行った。

20

【0030】

[試験例]

上記の実施例に従い、コラーゲン分解阻害剤のスクリーニングを行った。

1. 被験物質

DX (デキサメタゾン(セルフチゾン、メタスルホ安息香酸デキサメタゾンナトリウム)、昭和薬品化工株式会社)、PD098059 (Biomol)、anti-IL-1 antibody (R&D Systems)、Indomethacin (Sigma)、PD168393 (Calbiochem)、SB203580 (Calbiochem)、SP600125 (Calbiochem)、Aprotinin (Wako)、NNGH (N-isobutyl-N-(4-methoxyphenylsulfonyl)-glycylhydroxamic Acid、MMP-3 inhibitor II、Calbiochem) またはALK5 Inhibitor I (Calbiochem) をそれぞれ被験物質として用いた。

30

またコラーゲン分解阻害剤として知られているMMP阻害剤(Marimastat、TOCRIS)をポジティブコントロールとして用いた。

これらの被験物質はいずれもコラーゲンゲル内に含ませ、さらに培養1日目に培地に添加して試験を行った。各被験物質の終末濃度は、DX 1 μ M、PD098059 5 μ M、抗IL-1抗体 10 μ g/ml、Indomethacin 10 μ M、PD168393 5 μ M、SB203580 2 μ M、SP600125 2 μ M、Aprotinin 1%、Marimastat 10 μ M、NNGH 10 μ M、ALK5 inhibitor I 5 μ Mであった。

40

【0031】

2. コラーゲンゲルの構築およびスクリーニング

実施例に従い、構築したコラーゲンゲルを用い、被験物質のスクリーニングを行った。被験物質を加えていないコラーゲンゲルをネガティブコントロールとして用いた。

【0032】

3. 結果

50

被験物質による、コラーゲン分解阻害の有無を目視およびHE染色によるゲル収縮の観察、ゲルにおける残存コラーゲンの定量等によって調べ、コラーゲン分解阻害剤であるか否かを判断した。

1) 目視およびHE染色によるゲル収縮の観察

図1に被験物質としてAprotinin、Marimastat、NNGH、PD168393およびALK5 Inhibitor Iをそれぞれ用いて三次元細胞培養を行った際の浮遊培養開始後5日目のゲル全体の収縮の状態を示した。その結果、AprotininまたはALK5 Inhibitor Iを加えたゲルでは、他の被験物質を加えたゲルと比較してゲルの収縮が小さく、AprotininおよびALK5 Inhibitor Iはコラーゲン分解能を有する細胞によるコラーゲンの分解を抑制し得ることが示された。

10

図2に被験物質およびポジティブコントロールとしてMarimastat、Aprotinin、およびALK5 inhibitorを用いて三次元細胞培養を行った際のゲル全体の収縮の状態を示した。また図3に培養開始後11日目のゲルをHE染色した結果を示した。被験物質を加えない場合(コントロール)には、線維芽細胞が周囲のコラーゲンを分解したためにできた空胞が観察されたが、AprotininやALK5 Inhibitor Iを加えた場合には、そのような空胞は観察されなかった。

従って、被験物質を加えない場合には、ゲルが収縮するが、AprotininやALK5 Inhibitor Iを加えた場合には、ポジティブコントロールを加えた場合と同様に、ゲルの収縮が抑制されることが確認された。

20

【0033】

2) 残存コラーゲンの定量

被験物質およびポジティブコントロールを用いて三次元細胞培養を行った際のゲルの収縮レベルを、sircol collagen assay (biocolor)を用いて、熱処理によって可溶化した残存コラーゲンの定量を行うことで調べた。ゲルは浮遊細胞培養開始後5日目のものを用いた。

その結果、図4に示したように、AprotininやALK5 Inhibitor Iを加えた場合には、ポジティブコントロールを加えた場合と同様にコラーゲンの分解量が減少することが示された。

30

【0034】

3) コラーゲン分解関連遺伝子の発現確認

被験物質およびポジティブコントロールを加えた状態で三次元細胞培養を行った際の、コラーゲン分解能を有する細胞によるゲル内のMMP遺伝子発現レベルを調べた。

コラーゲンゲル浮遊培養開始後3日目に、ゲルからTrizolを用いてtotal RNAを抽出し、cDNAを作成してreal-time qPCR (Takara)を行い、ゲル収縮に関与すると考えられるMMP遺伝子の発現レベルを調べた。

その結果、図5に示したように、ALK5 Inhibitor Iを加えた場合には、線維芽細胞で主に発現し、コラーゲン分子を一箇所切断する機能を有するMMP-1、MMP-13、この切断によって変性したコラーゲンから得られるゼラチンをさらに細分解するMMP-2、MMP-9、これらのMMPを活性化する役割を有するMMP-3および上皮細胞に由来して線維芽細胞を刺激することでそのMMP産生を誘導するIL-1のいずれにおいても遺伝子発現が低下していることが確認された。

40

【0035】

上記1)~3)の結果より、被験物質のうち、AprotininやALK5 Inhibitor Iがコラーゲン分解阻害剤として有用であることが示唆された。また、本発明のスクリーニング方法によってコラーゲン分解阻害剤のスクリーニングができることが確認された。

【産業上の利用可能性】

【0036】

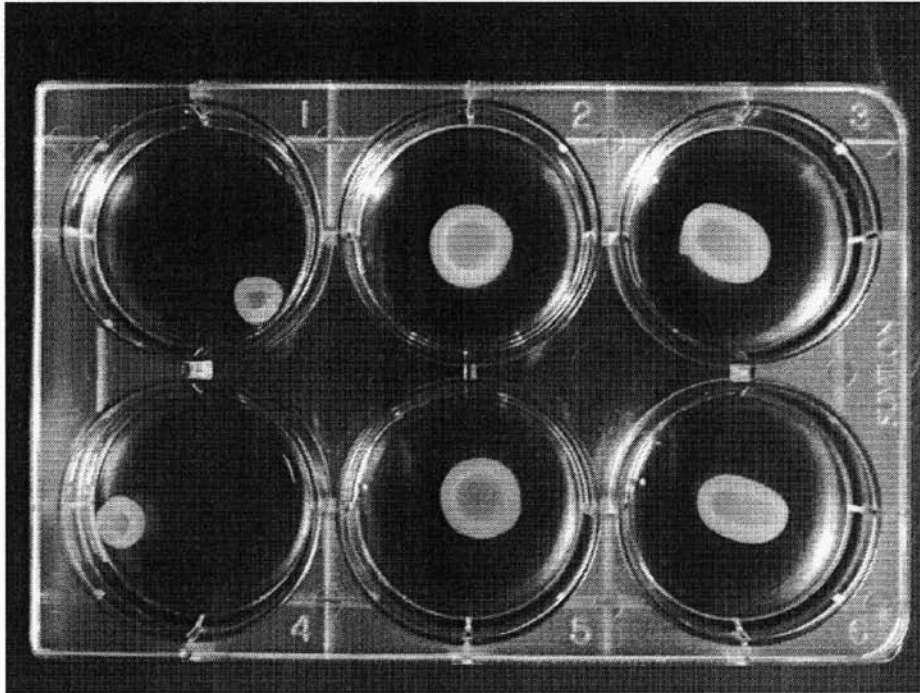
本発明のスクリーニング方法は、新規のコラーゲン分解阻害剤の探索に用いることがで

50

きる。このスクリーニング方法によって得られたコラーゲン分解阻害剤は、歯周病等のコラーゲンの分解を病因とする疾病の治療薬に用いることができる。

【 図 1 】

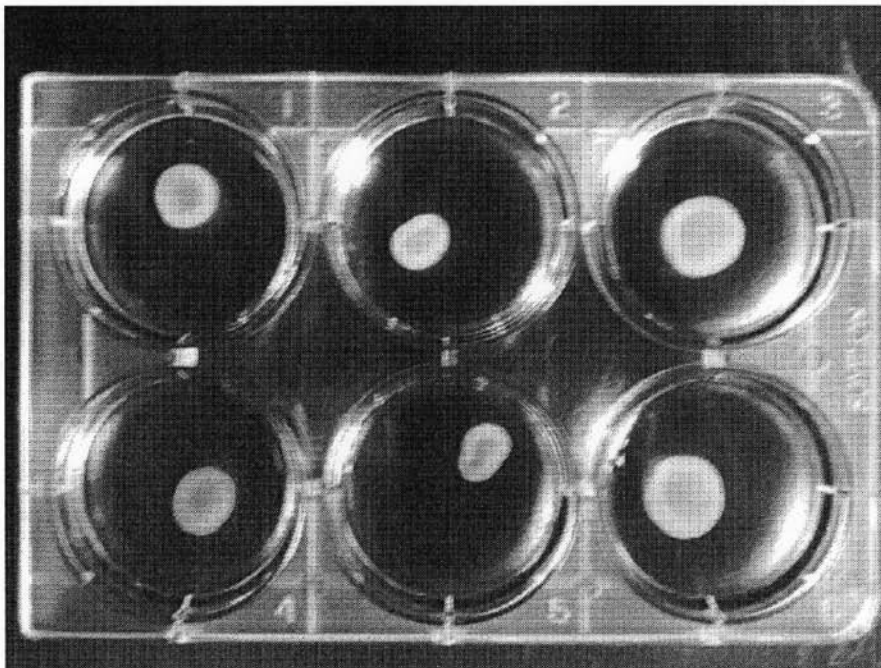
GE1/GF1



Negative
cont.

Aprotinin

Marimastat

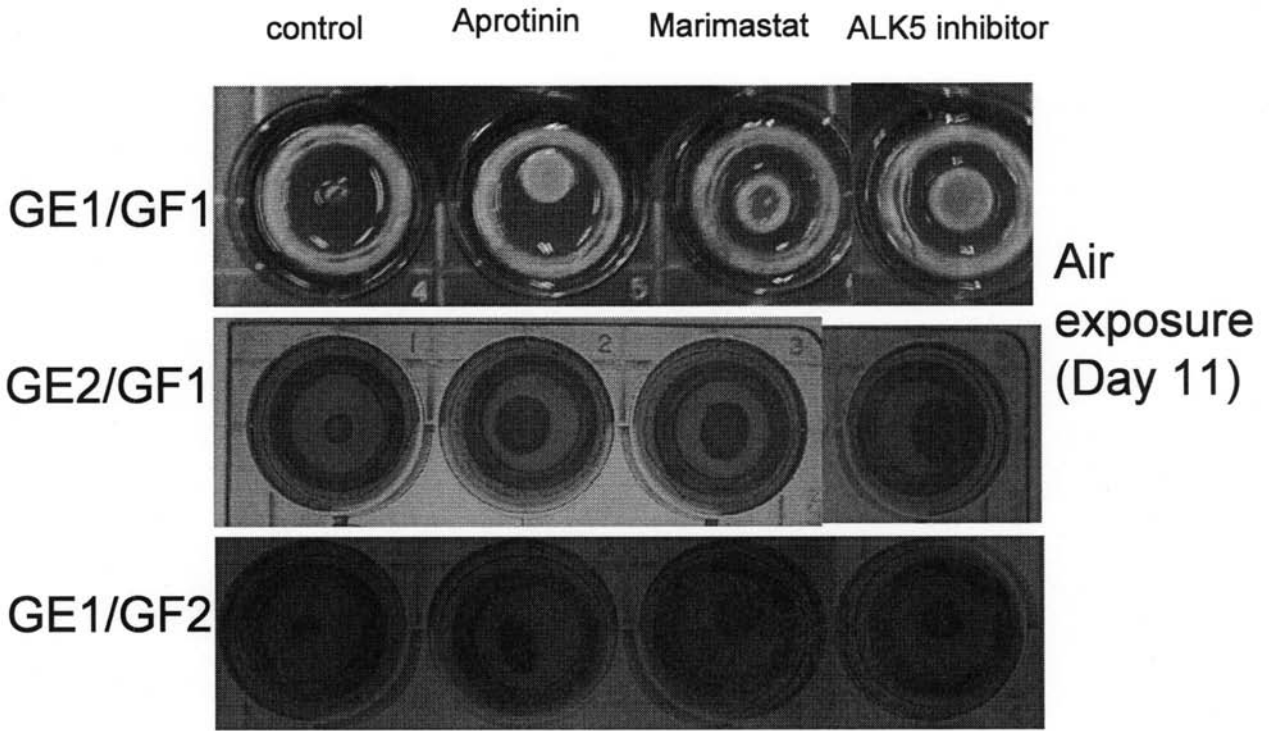


NNGH

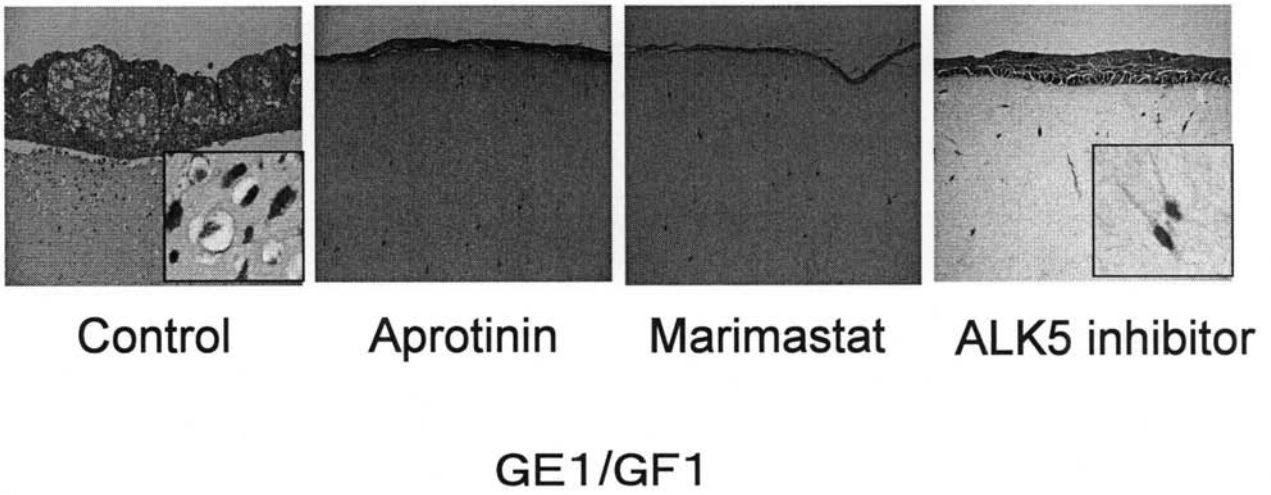
PD168393

ALK5
inhibitor

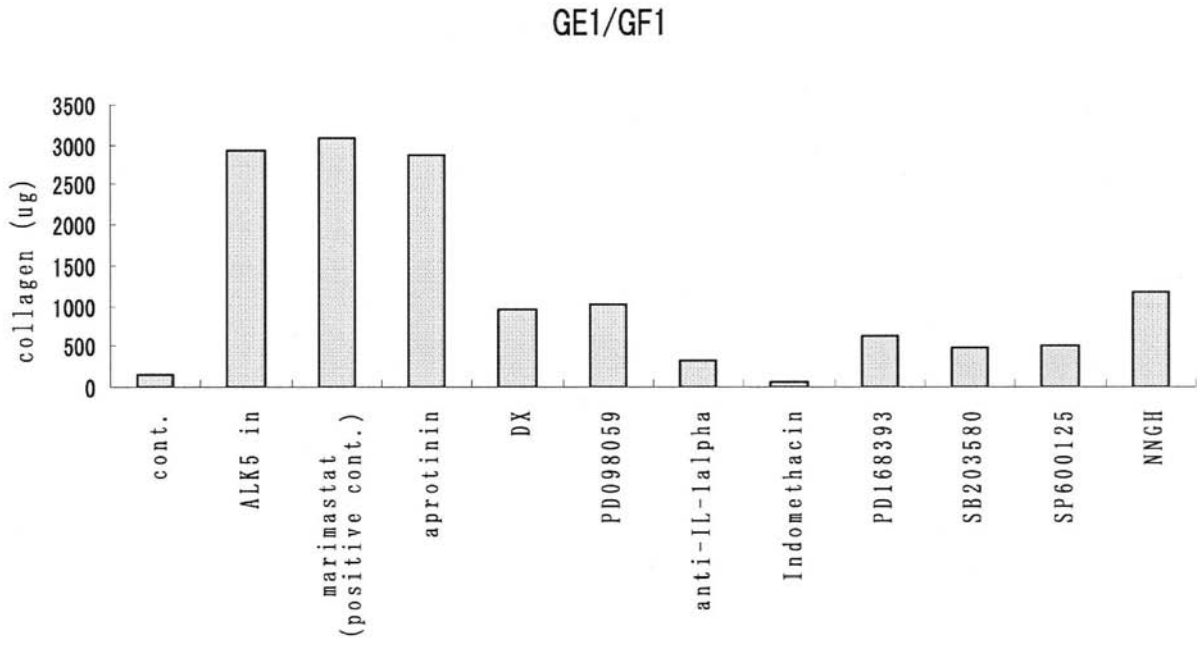
【 図 2 】



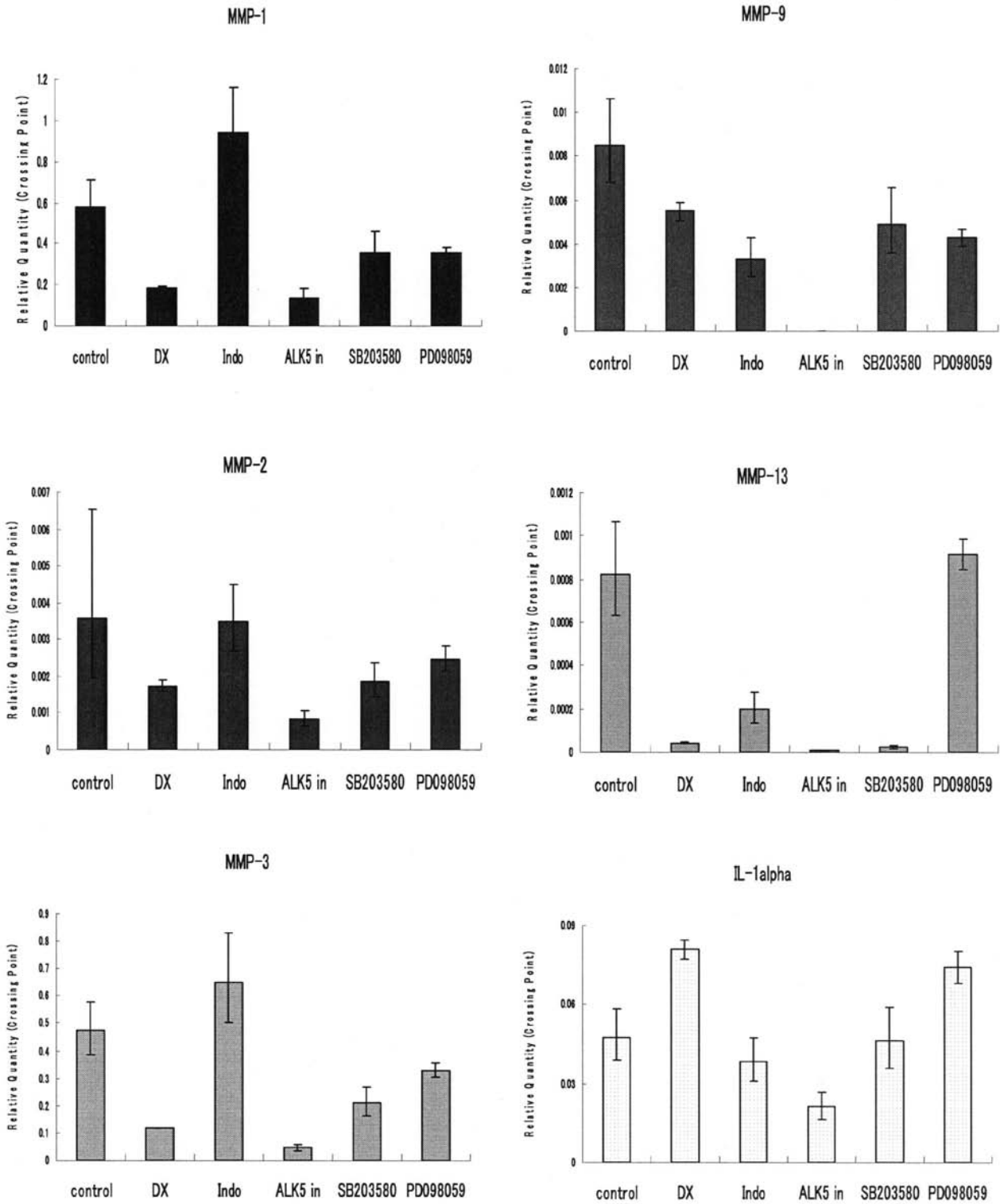
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/15	(2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z	
G 0 1 N 33/50	(2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z	

(72)発明者 松本 直行

東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内

Fターム(参考) 2G045 AA24 BB20 FB04

4B063 QA05 QQ95 QR77 QR85 QS24 QX01

4C084 AA17 NA14 ZA672 ZB112 ZB212