

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11401

研究課題名(和文) 歯槽骨吸収モデルを用いたRANK様ペプチドによる骨再生の試み

研究課題名(英文) Attempt of bone regeneration by RANK peptide using alveolar bone resorption model

研究代表者

小出 雅則 (Koide, Masanori)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師

研究者番号：10367617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はOsteoprotegerin (OPG) 欠損マウスにRANK様ペプチド(W9)を投与して、吸収された歯槽骨に対する修復効果を検討した。歯槽骨吸収が惹起された12週齢のOPG欠損マウスに、W9を投与して6日目に歯槽骨を解析した。W9投与は、槽骨吸収量を有意に減少させた。第一臼歯の根間中隔の歯槽骨の骨形態計測より、OPG欠損マウスにおいて破骨細胞数の有意な増加が観察された。W9投与は、破骨細胞数を有意に減少させた。W9投与は、Osterix陽性の骨芽細胞数を有意に増加させた。W9は、歯槽骨吸収抑制作用とともに骨形成促進作用を有する新規の歯周病治療薬となり得ることが示された。

研究成果の概要(英文)：Osteoblasts express two key molecules for osteoclast differentiation, RANKL and osteoprotegerin (OPG), a soluble decoy receptor for RANKL. RANKL induces osteoclastogenesis, while OPG inhibits it by blocking the binding of RANKL to RANK, a cellular receptor of RANKL. OPG-deficient (OPGKO) mice exhibit severe alveolar bone loss with enhanced bone resorption. RANK peptide (W9) binds to RANKL and blocks RANKL-induced osteoclastogenesis. Here, we show that treatment with W9 restores alveolar bone loss in OPGKO mice by suppressing osteoclastogenesis and enhancing osteoblastogenesis. Administration of W9 to OPGKO mice significantly decreased the osteoclast number and decreased the osteoblast number in the alveolar bone. These results suggest that treatment of OPGKO mice with W9 suppressed osteoclastogenesis by inhibiting RANKL signaling and enhanced osteoblastogenesis in the alveolar bone. Taken together, W9 may be a useful drug to prevent alveolar bone loss in periodontitis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯周病 RANK 歯槽骨 破骨細胞 骨芽細胞 骨形成 骨吸収

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周病は細菌感染による慢性炎症疾患である。この宿主の慢性的な炎症反応により歯周組織破壊および歯槽骨吸収が起こる。この喪失した歯槽骨の垂直的な回復は容易でない。近年、エナメルマトリックス蛋白や fibroblast growth factor-2 (FGF-2)などの歯周組織再生薬が開発され一部臨床応用されている。しかし、歯槽骨形成を直接促進する薬の開発は十分でない。また、骨粗鬆症治療において、骨吸収を強力に抑制するビスホスホネート (BP) や抗 receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) 抗体が臨床応用されているが、骨形成促進薬の開発は十分でない。この為、骨形成促進薬の開発は重要であり、歯周組織においても骨形成促進薬の評価は重要である。

(2) 歯周病モデルとして細菌感染や

lipopolysaccharide (LPS) 投与による動物モデルが用いられる。しかし、細菌や宿主の多様な因子が関与しており、薬の標的因子を限定するのは困難である。近年、遺伝子改変動物を用いた生体レベルでの遺伝子の機能が急速に解明されつつある。我々のグループは、これまで骨代謝関連遺伝子の改変マウスを用いて骨代謝機構の報告をしてきた (文献1)。申請者も RANKL 遺伝子の強発現マウスを用いて、骨吸収抑制薬の作用を検討した。更に、骨吸収が亢進した Osteoprotegerin (OPG) 遺伝子欠損マウスが自然発症型の歯槽骨吸収モデルであることを示した。このモデルに骨吸収を抑制する抗 RANKL 抗体を投与して、歯槽骨が維持されることを明らかにした。

破骨細胞は骨を吸収する唯一の細胞である。破骨細胞の分化には骨組織中の骨芽細胞系細胞が必須である。骨芽細胞が発現する破骨細胞分化誘導因子である RANKL と OPG は、破骨細胞の分化制御に重要である。骨芽細胞の細胞膜上に発現する RANKL が破骨細胞前駆細胞の受容体 RANK に結合すると、前駆細胞は多核の破骨細胞へ分化する。更に、成熟破骨細胞も RANK を発現しており、RANKL は破骨細胞を活性化する。

破骨細胞に発現する RANK の構造を模倣して RANK 様ペプチドが開発された。このペプチドは、9 個のアミノ酸から構成される環状ペプチドである。RANK 様ペプチドは、RANK のリガンドである RANKL と結合して破骨細胞形成や骨吸収を抑制する (文献2)。最近、RANK 様ペプチドは骨吸収抑制のみならず、骨形成作用を持つことが明らかになった (文献3)。更に、RANK 様ペプチドは骨芽細胞に直接作用して石灰化を促進すること、および軟骨細胞の増殖や分化を促進することが示された。RANK 様ペプチドは、RANKL を介して骨芽細胞分化を促進することが示唆されている。それらの作用は骨誘導因子 (BMP-2) により相乗的に促進されることも示された。

2. 研究の目的

(1) 歯槽骨吸収モデルに対する RANK 様ペプチドによる骨再生効果の解明 : OPG 遺伝子欠損の歯槽骨吸収モデルに RANK 様ペプチドを投与して、歯槽骨吸収量や骨量を定量する。骨吸収や骨形成を定量する。RANK 様ペプチドによる歯槽骨の再生効果を明らかにすることである。

(2) RANK 様ペプチドの骨形成促進機序の解明 : RANK 様ペプチドによる OPG 遺伝子欠損骨芽細胞の分化促進作用を明らかにする。マイクロアレイ解析により、RANK 様ペプチドの骨形成促進因子を探索して骨形成促進機序を明らかにすることである。

(3) RANK 様ペプチド誘導性の骨形成因子の同定 : RANK 様ペプチド誘導性の骨形成因子を探索することである。

3. 研究の方法

歯槽骨吸収モデルに RANK 様ペプチドを投与して、歯槽骨の再生効果とその作用機序を解明することが本研究の目標である。

(1) 歯槽骨吸収モデルへの RANK 様ペプチド投与実験 : OPG 遺伝子欠損マウスは全身性の骨吸収亢進を呈する。歯槽骨は 8 週齢より骨吸収が進行して、12 週齢で重度の歯槽骨吸収を呈する。RANK 様ペプチドは、3 回/日の 5 日間の皮下投与で、皮質骨の骨形成を促進する。A) 歯槽骨吸収を呈する 12 週齢の OPG 遺伝子欠損マウスに RANK 様ペプチドを 3 回/日の 5 日間皮下投与する。B) 投与前後のマウス歯槽骨をマイクロ CT で撮影する。評価は、ヒトと同様にセメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離を歯槽骨吸収量として測定する。C) 歯槽骨および大腿骨の骨量を測定する。これらの評価より、歯槽骨と全身に及ぼす RANK 様ペプチドによる骨量増加効果を明らかにする。

(2) RANK 様ペプチドを投与した歯槽骨吸収モデルの生化学および組織学的解析 : RANK 様ペプチドは、骨吸収抑制と骨形成促進を介して歯槽骨を再生すると想定されるため、両因子の評価を行う。全身への作用は血清を解析して、歯槽骨は免疫組織化学的に解析する。A) 血清中の骨吸収マーカーである TRAP5b と骨形成マーカーである ALP 量を測定する。B) 歯槽骨の破骨細胞の数や分布の変化を解析するため、破骨細胞マーカーである TRAP や カテプシン K 染色を行う。骨吸収能を評価するため、骨表面で破骨細胞が占める割合を測定する。C) 歯槽骨の骨芽細胞の数や分布の変化を解析するため、ALP や オステオカルシン染色を行う。骨形成能を評価するため、カルセイン 2 重ラベル間の距離を測定して、骨形成速度を解析する。D) 全身への作用として、免疫組織化学的に大腿骨の破骨細胞数と骨吸収能を測定する。大腿骨の骨芽細胞数と骨形成速

度を測定する。歯槽骨と全身へのペプチドの作用を解析する。これらの評価より、RANK様ペプチドによる骨吸収抑制と骨形成促進作用を明らかにする。

(3) OPG 遺伝子欠損骨芽細胞に対する RANK 様ペプチドの分化促進機序の解析 : OPG 様ペプチドは RANKL と結合して骨形成を促進することが示された。つまり、OPG 遺伝子欠損マウス由来の骨芽細胞では骨形成能が低下している可能性がある。A) OPG 遺伝子欠損と対照マウスの頭蓋骨より骨芽細胞を採取する。これらの細胞に RANK 様ペプチド添加して石灰化誘導培地で 4 週間培養して、ALP や Alizarin Red 染色を行う。B) 骨芽細胞に rOPG や RANK 様ペプチドを添加して石灰化誘導培地で 1 週間培養する。遺伝子発現を解析する。rOPG と RANK 様ペプチドで共通に増加する骨形成遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法で定量する。これらより、RANK 様ペプチドによる OPG 遺伝子欠損骨芽細胞の分化促進作用を明らかにする。RANKL を介する RANK 様ペプチドによる骨芽細胞の分化促進機序を明らかにする。

(4) RANK 様ペプチドを投与した歯槽骨吸収モデルの遺伝子発現解析 : RANK 様ペプチドの骨吸収抑制と骨形成作用及び新規骨形成因子を転写レベルで解析する。歯槽骨よりトータル RNA を抽出して、骨吸収マーカーである TRAP や カテプシン K と骨形成マーカーであるオステオカルシン発現をリアルタイム PCR 法で定量する。RANK 様ペプチドの歯槽骨の骨量増加効果を転写レベルで明らかにする。

4. 研究成果

(1) 歯槽骨吸収モデルへの RANK 様ペプチド投与実験 : A) OPG 遺伝子欠損マウスの歯槽骨は 12 週齢で重度の歯槽骨吸収を呈する。マウス歯槽骨をマイクロ CT で撮影して、評価を行った。RANK 様ペプチドは、3 回/日の 5 日間の皮下投与で、歯根に囲まれた根間中隔における歯槽骨の骨量が有意に増加した。この骨量の増加は、強力な骨吸収抑制能を示す BP のリセドネイト (Rise) と同等であった (図 1、2)。B) マイクロ CT 画像より、ヒトと同様にセメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離を歯槽骨吸収量として測定した。RANK 様ペプチドの投与は、歯槽骨吸収量を有意に低下させた。これらの結果は、RANK 様ペプチドの投与は、歯槽骨の維持効果を示した。

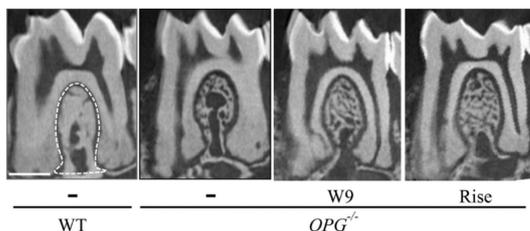


図 1. マウス根間中隔の CT 像

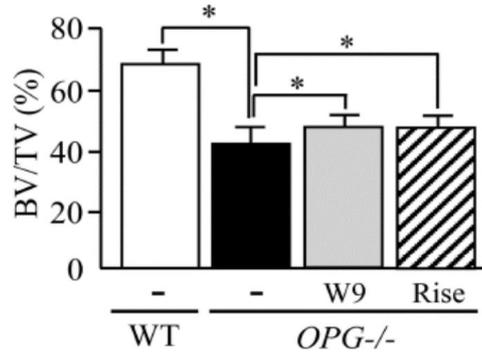


図 2. マウス根間中隔の骨量

(2) RANK 様ペプチドを投与した歯槽骨吸収モデルの生化学および組織学的解析 : RANK 様ペプチド投与による、全身の骨吸収と骨形成を評価するため血清 TRAP5b と血清 ALP を測定した。A) RANK 様ペプチド投与は、血清 TRAP5b と血清 ALP 値に影響を及ぼさなかった。B) 歯槽骨の破骨細胞の数や分布の変化を解析するため、破骨細胞マーカーである TRAP 染色を行った。RANK 様ペプチド投与は、歯槽骨の破骨細胞数を有意に減少させた。C) 歯槽骨の骨形成を評価するため、骨芽細胞の数を計測した。RANK 様ペプチド投与は、歯槽骨の骨芽細胞数を有意に増加させた。D) 歯槽骨の骨形成を詳細に評価するため、Osterix の免疫学的組織染色を行った。RANK 様ペプチド投与は、歯槽骨の Osterix 陽性細胞数を有意に増加させた (図 3、4)。これらの結果は、RANK 様ペプチドの投与は、歯槽骨の骨形成を促進することを示した。

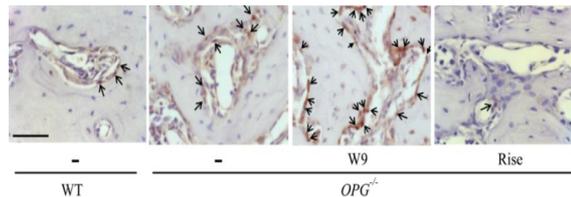


図 3. マウス根間中隔の Osterix 染色像

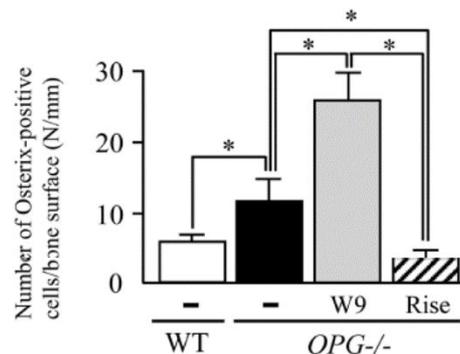


図 4. Osterix 陽性細胞数

(3) OPG 遺伝子欠損骨芽細胞に対する RANK 様ペプチドの分化促進機序の解析 : OPG 様ペプチドは RANKL と結合して骨形成を促進することが示された。つまり、OPG 遺伝子欠損マウス

ス由来の骨芽細胞では骨形成能が低下している可能性がある。OPG 遺伝子欠損と対照マウスの頭蓋骨より骨芽細胞を採取した。これらの細胞に RANK 様ペプチド添加して石灰化誘導培地で 4 週間培養して、ALP や Alizarin Red 染色を行った。OPG 遺伝子欠損骨芽細胞は、対照の骨芽細胞と同等の骨形成能を示した。RANK 様ペプチドの添加は、OPG 遺伝子欠損骨芽細胞および対照の骨芽細胞の骨芽細胞分化を同様に促進させた。これらの結果は、RANK 様ペプチドが OPG 非依存的に骨芽細胞に直接作用することを示した。

(4) RANK 様ペプチドを投与した歯槽骨吸収モデルの遺伝子発現解析: 歯槽骨よりトータル RNA を抽出して、骨吸収マーカーである TRAP や カテプシン K と骨形成マーカーであるオステオカルシン発現をリアルタイム PCR 法で定量した。RANK 様ペプチド投与は、歯槽骨の骨吸収マーカーを減少させる傾向を示した。しかしながら、有意な減少を示さなかった。今回の結果は歯槽骨以外の組織も混入しているため、明確な結果が得られなかったと考えている。

以上の結果より、RANK 様ペプチドは骨芽細胞分化を促進させることが示された。RANK 様ペプチドは、歯槽骨吸収抑制作用とともに骨形成促進作用を有する新規の歯周病治療薬となり得ることが示された。本研究結果は、学術雑誌である PLoS One に公表した。

(引用文献)

- 1) Yamamoto Y. et al. *Endocrinology*, 147:3366-3374, 2006.
- 2) Aoki K. et al. *J Clin Invest*, 116:1525-1534, 2006.
- 3) Furuya Y. et al. *J Biol Chem* 55:5562-5571, 2013.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

Koide M, Kobayashi Y, Yamashita T, Uehara S, Nakamura M, Hiraoka BY, Ozaki Y, Iimura T, Yasuda H, Takahashi N and Udagawa N. Bone Formation is coupled to resorption via suppression of sclerostin expression by osteoclasts. *J Bone Mineral Res*, 査読有, 32, 2017, 2074-2086.
doi: 10.1002/jbmr.3175.

Ozaki Y, Koide M, Furuya Y, Ninomiya T, Yasuda H, Nakamura M, Kobayashi Y, Takahashi N, Yoshinari N and Udagawa N. Treatment of OPG-deficient mice with WP9QY, a RANKL-binding peptide, recovers

alveolar bone loss by suppressing osteoclastogenesis and enhancing osteoblastogenesis. *PLoS One*, 査読有, 12, 2017, e0184904.
doi: 10.1371/journal.pone.0184904.

Nakamura M, Nakamichi Y, Mizoguchi T, Koide M, Yamashita T, Ara T, Nakamura H, Penninger JM, Furuya Y, Yasuda H and Udagawa N. The W9 peptide directly stimulates osteoblast differentiation via RANKL signaling. *Journal of Oral Biosciences*, 査読有, 59, 2017, 146-151.

Murakami K, Kobayashi Y, Uehara S, Suzuki T, Koide M, Yamashita T, Nakamura M, Takahashi N, Kato H, Udagawa N and Nakamura Y. A Jak1/2 inhibitor, baricitinib, inhibits osteoclastogenesis by suppressing RANKL expression in osteoblasts in vitro. *PLoS One*, 査読有, 12, 2017, e0181126.
doi: 10.1371/journal.pone.0181126.

Kobayashi Y, Thirukonda GJ, Nakamura Y, Koide M, Yamashita T, Uehara S, Kato H, Udagawa N, Takahashi N. Wnt16 regulates osteoclast differentiation in conjunction with Wnt5a. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 463, 2015, 1278-1283.
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.102.

Kobayashi Y, Uehara S, Koide M, Takahashi N. The regulation of osteoclast differentiation by Wnt signals. *Bonekey Rep*, 査読有, 4, 2015, 713.
doi:10.1038/bonekey.2015.82.

Sakai K, Shimodaira S, Maejima S, Udagawa N, Sano K, Higuchi Y, Koya T, Ochiai T, Koide M, Uehara S, Nakamura M, Sugiyama H, Yonemitsu Y, Okamoto M, Hongo K. Dendritic cell-based immunotherapy targeting Wilms' tumor 1 in patients with recurrent malignant glioma. *Journal of Neurosurgery*, 査読有, 123, 2015, 989-997.
doi:10.3171/2015.1.JNS141554.

[学会発表](計9件)

Koide M, Regulation of sclerostin expression by bone resorption, 第59回歯科基礎医学会学術大会, 2017年9月, 松本歯科大学(長野県塩尻市)

尾崎友輝, 小出雅則, 古屋優理子, 二宮禎,

保田尚孝, 中村美どり, 吉成伸夫, 高橋直之, 宇田川信之, W9 ペプチド投与による OPG 遺伝子欠損マウスの歯槽骨喪失の改善効果, 第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 2017 年 9 月, 松本歯科大学 (長野県塩尻市)

尾崎友輝, 小出雅則, 古屋優理子, 二宮禎, 保田尚孝, 中村美どり, 吉成伸夫, 高橋直之, 宇田川信之, W9 ペプチド投与による OPG 遺伝子欠損マウスの歯槽骨喪失の改善効果, 第 35 回日本骨代謝学会学術集会, 2017 年 7 月, ホテル日航福岡 (福岡県福岡市)

小出雅則, 小林泰浩, 山下照仁, 上原俊介, 尾崎友輝, 飯村忠浩, 中村美どり, 保田尚孝, 高橋直之, 宇田川信之, 破骨細胞由来の LIF は骨細胞における sclerostin の発現を低下させ、骨形成を促進する, 第 35 回日本骨代謝学会学術集会, 2017 年 7 月, ホテル日航福岡 (福岡県福岡市)

小出雅則, 小林泰浩, 山下照仁, 上原俊介, 尾崎友輝, 中村美どり, 高橋直之, 宇田川信之, 破骨細胞が分泌する LIF は sclerostin の発現を低下させ、骨形成を促進する, 第 2 回日本骨免疫学会ウインターセミナー, 2017 年 1 月, ホテルマロウド (長野県軽井沢町)

尾崎友輝, 小出雅則, 宇田川信之, 吉成伸夫, W9 ペプチドは OPG 遺伝子欠損マウスの歯槽骨吸収を改善する, 第 59 回春季日本歯周病学会学術大会, 2016 年 5 月 (鹿児島県鹿児島市)

尾崎友輝, 小出雅則, 二宮禎, 中村美どり, 高橋直之, 宇田川信之, 吉成伸夫, W9 ペプチドは Osteoprotegerin 遺伝子欠損マウスの歯槽骨吸収を改善する, 第 23 回日本歯科医学会総会, 2016 年 10 月 (福岡県福岡市)

小出雅則, 小林泰浩, 山下照仁, 上原俊介,

尾崎友輝, 飯村忠浩, 中村美どり, 保田尚孝, 高橋直之, 宇田川信之, 骨吸収の促進は骨細胞における Sclerostin の発現を低下させ、骨形成を促進する, 第 33 回日本骨代謝学会学術集会, 2015 年 7 月 (東京都新宿区)

尾崎友輝, 小出雅則, 古屋優里子, 二宮禎, 保田尚孝, 中村美どり, 吉成伸夫, 高橋直之, 宇田川信之, W9 ペプチドによる OPG 遺伝子欠損マウスの歯槽骨吸収の抑制効果, 第 33 回日本骨代謝学会学術集会, 2015 年 7 月 (東京都新宿区)

〔図書〕(計 5 件)

宇田川信之, 小出雅則, 中村美どり, メディカルレビュー社, ファーマナビゲーター抗 RANKL 抗体編, 第 2 章 5 歯周病モデル動物における RANKL 療法, 2016, (152-159)

宇田川信之, 小出雅則, 溝口利英, 中村美どり, 下平滋隆, 田口明, 日本顎交合学会誌, 骨はダイナミックに躍動している日本顎交合学会誌, 2016, 36 (161-170)

中村美どり, 小出雅則, 宇田川信之, ビスホスホネート薬の薬物動態, CLINICAL CALCIUM, 2016, 26 (1561-1570)

小出雅則, 宇田川信之, THE BONE 骨リモデリングの制御機構, 第 9 章 スクレロスタチンによる骨リモデリング制御, メディカルレビュー社, 2016, 30 (169-173)

中村美どり, 中道裕子, 小出雅則, 宇田川信之, THE BONE 骨リモデリングの制御機構, 第 10 章 オステオプロテグリンによる骨リモデリング制御, メディカルレビュー社, 2016, 30 (175-180)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

松本歯科大学、大学院ホームページ

<https://www.mdu.ac.jp/graduate/index.html>

松本歯科大学、研究所ホームページ 最新論文紹介

<https://www.mdu.ac.jp/laboratory/5750/006092.html>

日本骨代謝学会ホームページ 1st Author
http://www.jsbmr.jp/1st_author/268_mkoide.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小出 雅則 (KOIDE, Masanori)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号：10367617

(2) 研究分担者

二宮 禎 (NINOMIYA, Tadashi)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：00360222

宇田川 信之 (UDAGAWA, Nobuyuki)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：70245801

(3) 連携研究者

なし