

機関番号：17102
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20390472
 研究課題名（和文） リン脂質リポソームによる食細胞機能制御に基づく
 新しい骨吸収制御法の開発
 研究課題名（英文） Inhibition of bone destruction by phosphatidylserine-containing
 liposomes based on the regulation of phagocytes functions
 研究代表者
 中西 博 (HIROSHI NAKANISHI)
 九州大学・大学院歯学研究院・教授
 研究者番号：20155774

研究成果の概要（和文）：

本研究は、細胞膜リン脂質のホスファチジルセリン（PS）を含むリポソーム（PSL）が破骨細胞前駆細胞から成熟破骨細胞への成熟を抑制し、慢性関節リウマチの動物モデルにおける骨破壊を抑制することを発見した。PS リポソームの骨破壊に対する抑制作用は破骨前駆細胞に取り込まれることにより TGF- β 1 ならびに PGE₂ の産生分泌を誘導し、破骨細胞への成熟に必須な因子の発現を抑制することによるものであることが解明できた。これらの発見により、PSL の適用が慢性関節リウマチ、歯周炎ならびに骨粗鬆症に伴う骨破壊に対する新たな治療薬になる可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：

This study investigated the effects of phosphatidylserine-containing liposomes (PSLs) on the osteoclastogenesis. In the rat bone marrow culture system, osteoclast precursors phagocytosed PSLs to secrete TGF- β 1 and PGE₂, which in turn inhibited osteoclastogenesis through the downregulation of receptor activator for NF- κ B ligand, receptor activator of NF- κ B. Consistent with these in vitro observations, i.m. injection of PSLs significantly increased the plasma level of TGF- β 1 and PGE₂ and decreased the expression of receptor activator for NF- κ B ligand, receptor activator of NF- κ B the skeletal tissues of ankle joints of rats with adjuvant arthritis. Together with the inhibitory effects on osteoclastogenesis, PSLs are involved in regulation of bone remodeling. Because PS is a component of the cell membrane, PSLs therefore can be a potentially effective pharmacological intervention against abnormal bone loss, such as osteoporosis without deleterious side effects.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2009 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：リポソーム、炎症性骨吸収、骨芽細胞、破骨細胞、ホスファチジルセリン

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症治療薬の第一選択薬として定着しつつあり臨床で広く使用されているビスホスホネート製剤は骨への長期蓄積や顎骨壊死を引き起こすことから、効果的かつ安全な治療薬の確立が切望されている。

2. 研究の目的

リン質リポソーム (PSL) は抗炎症作用、骨吸収抑制作用、ならびに骨形成促進作用を有することが期待できることから、「PSL が炎症に伴う骨破壊を抑制し、骨形成を促進する」ことを検証することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

慢性炎症モデル (アジュバント関節炎モデル、根尖性歯周炎モデル) ならびに培養マクロファージを用いて PSL によりマクロファージなどの食細胞から炎症に関わる因子の産生やその産生に関与する細胞内シグナル系を詳細に解析した。さらに、培養系を用いて PSL の破骨細胞ならびに骨芽細胞の分化・成熟に対する作用を詳細に検討した。さらに PSL の骨芽細胞の分化・成熟に対する作用を詳細に検討した。

4. 研究成果

(1) ラットのアジュバント関節炎 (AA) に伴う骨吸収に対する末梢投与した PSL の影響 *in vivo* 解析を行った。まず、筋注した PSL は AA ラットの末梢血中の単球ならびに骨髓腔のカルトニンレセプター陽性破骨前駆細胞に取り込まれることを確認した。マクロ CT を用いた解析により、PSL は関節炎に伴う骨吸収を検討した結果、PSL は AA ラットの足関節組織における炎症にほとんど影響することなく骨破壊を強力に抑制した。さらに、PSL 投与は AA ラット足関節における破骨細胞の数を顕著に抑制し、血清中におけるプロスタグランジン E_2 (PGE_2) ならびに $TGF-\beta 1$ の産生を有意に増加した。今年度の後半には、破骨細胞の形成系を用いて *in vitro* での解析を行った。破骨細胞の形成系においても PSL は破骨細胞前駆細胞に取り込まれ、破骨細胞への成熟を抑制することが明らかになった。さらに、PSL は破骨細胞分化・機能に非須な因子である RANKL とそのレセプター RANK の発現を抑制すること、破骨細胞前駆細胞同士の融合に関連因子である ICAM-1 ならびに CD44 の発現を抑制することを明らかにした。さらに、PSL は破骨細胞前駆細胞から

PGE_2 ならびに $TGF-\beta 1$ の産生分泌を増加し、 PGE_2 ならびに $TGF-\beta 1$ は破骨細胞の分化を抑制することが明らかになった。これまでの結果から、PSL は破骨細胞前駆細胞などの細胞から PGE_2 ならびに $TGF-\beta 1$ の産生分泌を促進することにより、破骨細胞前駆細胞の融合や分化に関連因子の発現を抑制し、破骨細胞への分化や成熟を抑制すると考えられる。

(2) 根尖性歯周炎モデルにおける骨吸収ならびに骨形成に対する PSL の効果を検討した。ラットの下顎第一臼歯遠心根を抜髄、開放することにより、自然感染による根尖病変の成立を図ることにより根尖性歯周炎モデルの作製を行った。術後 7 日目に、根管内に PSL (100 μM) または対照群としてホスファチジルコリンリポソーム (PCL, 100 μM) を貼薬した。その後、3 日および 7 日目に、ラットの下顎骨を摘出し、免疫組織化学的ならびに組織化学的手法により炎症性マクロファージの指標となる ED-1 ならびに IL-1 β 、骨吸収 (成熟破骨細胞) の指標となる TRAP ならびに RANKL、骨形成 (成熟骨芽細胞) の指標となる ALP ならびに BMP-2 の染色を行った。その結果、PSL 投与群は生食ならびに PCL 投与群と比較して骨吸収の指標となる TRAP ならびに RANKL 陽性細胞数の減少、炎症性マクロファージの指標となる ED-1 ならびに IL-1 β 細胞数の減少、ならびに骨形成 (成熟骨芽細胞) の指標となる ALP ならびに BMP-2 の発現増大が認められた。これらの結果より、PSL は炎症性骨吸収を抑制すると同時に骨形成を促進することで根尖性歯周組織の治癒に関与することが示唆された。そこで、PSL が直接的に骨芽細胞前駆細胞の分化・成熟を促進する可能性について解析を行う目的でラット胎仔頭蓋冠由来細胞による骨芽細胞初代培養系の確立を行った。具体的には、ラットの胎仔頭蓋冠の小骨片を 37°C で 0.1% コラゲナーゼと 0.05% トリプシンを含む PBS を使い酵素処理し、遊離してきた細胞を 10% FBS を含む α MEM 中で 3 日間培養を行うことにより骨芽細胞を安定的に得る事に成功した。

(3) 2009 年度の研究により、PSL が骨芽細胞の分化・成熟を促進することが明らかになったため、ラット胎仔頭蓋冠由来細胞による骨芽細胞初代培養系を用い、PSL が骨芽細胞の分化・成熟を促進するメカニズムの解析を行った。ラットの胎仔頭蓋冠の小骨片を酵素処理し、21 日間培養した。PSL 添加後 7、14、21 日目に骨芽細胞を回収し、トータル RNA ならびに細胞可溶分画を調整した。リアルタイム RT-PCR により骨芽細胞におけるその分化を促進因子である $TGF-\beta 1$ ならびに骨芽細胞

への分化を決定因子である RANX2 の発現を検討すると共にウェスタットプロットにより MAPK/ERK シグナルカスケードも解析した。その結果、PSL 投与後 4 日目から RANX2 発現は有意に増加され、PSL 投与後 7 日目から TGF- β 1 発現の有意な増加も認められた。さらに、PSL 投与 60 分後に骨芽細胞における ERK のリン酸化の有意な増大も認められた。一方、PSL により骨形成の作用を検討するため、ラットの切歯抜歯モデルを用い、PSL を投与したラットの抜歯窩周囲の骨密度を μ CT にて解析した。その結果、PSL 投与 4 週間後抜歯窩周囲の骨形成は有意に増大し、免疫染色により骨形成部位に TGF- β 1 の高発現も認められた。以上の結果より PSL は MAPK/Erk シグナルカスケードを介して TGF- β 1 ならびに RANX2 の発現を増加させることで、骨芽細胞の分化・成熟を直接促進することが明らかになった。

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 11 件)

- (1) Wu Z, Nakanishi H, Phosphatidylserine-containing liposomes: potential pharmacological interventions against inflammatory and immune diseases through the production of prostaglandin E₂ after uptake by myeloid derived phagocytes, *Ach. Immunol. Therap. Exp.* 59, 196-201, 2011.
- (2) Wu Z, Ma HM, Kukita T, Nakanishi Y, Nakanishi H. Phosphatidylserine-containing liposomes inhibit the differentiation of osteoclasts and trabecular bone loss. *J Immunol.* 15;184(6):3191-3201, 2010.
- (3) Terada K, Yamada J, Hayashi Y, Wu Z, Uchiyama Y, Peters C, Nakanishi H. Involvement of cathepsin B in the processing and secretion of interleukin-1 β in chromogranin A-stimulated microglia. *Glia.* 58(1):114-124, 2010.
- (4) Zhang R, Sun L, Hayashi Y, Liu X, Koyama S, Wu Z, Nakanishi H. Acute p38-mediated inhibition of NMDA-induced outward currents in hippocampal CA1 neurons by interleukin-1 β . *Neurobiol Dis.* 38(1):68-77, 2010.
- (5) Sun L, Wu Z, Baba M, Peters C, Uchiyama Y, Nakanishi H. Cathepsin B-dependent motor

neuron death after nerve injury in the adult mouse. *Biochem Biophys Res Commun.* 399(3):391-395, 2010.

- (6) Nakanishi H, Wu Z. Microglia-aging: Roles of microglial lysosome- and mitochondria-derived reactive oxygen species in brain aging. *Behav. Brain Res.*
 - (7) Wu Z, Tokuda Y, Zhang XW, Nakanishi H. Age-dependent responses of glial cells and leptomeninges during systemic inflammation. *Neurobiol. Disease* 32: 543-551, 2008.
 - (8) Hayashi Y, Yoshida M, Yamato M, Ide T, Wu Z, Ochi-Shindou M, Kanki T, Kang D, Sunagawa K, Tsutsui H, Nakanishi H. Reverse of brain aging by an overexpression of human mitochondrial transcription factor A in mice. *J. Neurosci.* 28: 8624-8634, 2008.
 - (9) Sakamoto M, Miyamoto KI, Wu Z, Nakanishi H. Possible involvement of cathepsin B released by microglia in methylmercury-induced cerebellar pathological changes in the adult rats. *Neurosci. Lett.* 442: 292-296, 2008.
 - (10) Zhang R, Yamada J, Hayashi Y, Wu Z, Koyama S, Nakanishi H. Inhibition of NMDA-induced outward currents by interleukin-1 β in hippocampal neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372: 816-820, 2008.
 - (11) Yamada J, Hayashi Y, Jinno S, Wu Z, Inoue K, Kohsaka S, Nakanishi H. Reduced synaptic activity precedes synaptic stripping in vagal motoneurons after axotomy. *Glia* 56: 1148-1462, 2008.
- [学会発表] (計 46 件)
- (1) Nakanishi H. Involvement of extracellular nucleotides in microglial synaptic stripping response. 第 81 回日本薬理学会年会、シンポジウム「細胞外ヌクレオチドによる脳機能制御—分子ダイナミクスと疾病への関与」2008 年 3 月 17 日 (横浜)
 - (2) Hayashi Y, Yoshida M, Yamamoto M, Ide T, Kang D, Nakanishi H. Novel therapeutic intervention with overexpression of TFAM

against the age-dependent memory impairment. 第 81 回日本薬理学会年会、2008 年 3 月 17 日 (横浜)

(3) Wu Z, Tokuda Y, Zhang XW, Nakanishi H. Age-dependent differentiation of the barrier function of the leptomeninges in the cerebral cortex by activated glial cells during the systemic inflammation. 第 26 回 CINP、2008 年 7 月 13 日 (ミュンヘン)

(4) Wu Z, Nakanishi H. Age-dependent differential regulation of tight junction proteins in the leptomeninges by glial cells during systemic inflammation. Neuroscience 2008、2008 年 11 月 23 日 (ワシントン DC)

(5) Nakanishi H, Terada K, Yamada J, Hayashi Y, Wu Z. Involvement of cathepsin B in the processing and secretion of interleukin-1 β in chromogranin A-stimulated microglia. Neuroscience 2008、2008 年 11 月 23 日 ((ワシントン DC))

(6) Yamada J, Jinno S, Nakanishi H. Reduced synaptic activity mediated by extracellular nucleotides precedes synaptic stripping after an axotomy. Neuroscience 2008、2008 年 11 月 23 日 ((ワシントン DC))

(7) Hayashi Y, Yoshida M, Yamato M, Ide T, Wu Z, Nakanishi H. Overexpression of human TFAM prevents age-dependent memory impairment in mice by suppression of mitochondrial oxidative stress. Neuroscience 2008、2008 年 11 月 23 日 ((ワシントン DC))

(8) 武 洲、馬 紅梅、中西 博、破骨前駆細胞の貪食機能に着目した新たな骨破壊抑制法、第 50 基礎歯科医学会、2008 年 9 月 25 日 ((東京))

(9) 馬 紅梅、武 洲、中西 博、Phosphatidylserine-containing liposomes ameliorates the cytokine imbalance in the ankle joints of adjuvant arthritic rats. 第 50 基礎歯科医学会、2008 年 9 月 25 日 (東京)

(10) Zhang R, Wu Z, Nakanishi H. Inhibition of NMDA-induced outward currents by interleukin-1 β in hippocampal neurons. 第 50 基

礎歯科医学会、2008 年 9 月 25 日 (東京)

(11) 徳田幸恵、張 馨文、武 洲、中西 博、中高年における慢性末梢炎症は深刻な脳炎症を引き起こす、第 50 基礎歯科医学会、2008 年 9 月 25 日 (東京)

(12) 林 良憲、井手友美、中西 博、TFAM 過剰発現によるミクログリア内レドックス制御と老化に伴う脳機能低下の防止、第 13 回グリア研究会、2008 年 11 月 8 日 (東京)

(13) 山田 純、神野尚三、中西 博、細胞内標識法を用いたミクログリアならびにアストロサイト突起の微細構造の解析、第 13 回グリア研究会、2008 年 11 月 8 日 (東京)

(14) 中西 博、林 良憲、井手友美、武 洲、ミトコンドリア転写因子 A の過剰発現によるミトコンドリア内レドックス制御ならびに老化に伴う脳機能低下の制御、第 61 回日本薬理学会西南部会、2008 年 11 月 28 日 (米子)

(15) 武 洲、中西 博、末梢炎症に対する髄膜—グリア連関の汎脳性の老化に伴う変容、第 61 回日本薬理学会西南部会、2008 年 11 月 28 日 (米子)

(16) Zhang R, Nakanishi H. Involvement of p38 MAPK in interleukin-1 β -induced inhibition of NMDA-induced outward currents in hippocampal neurons. Berlin Brain Days, 2008 年 12 月 10 日 (ベルリン)

(17) Wu Z, Tokuda Y, Zhang XW, Nakanishi H. Age-dependent differential microglial and astrocytic responses through leptomeninges during systemic inflammation. 第 82 回日本薬理学会年会、2009 年 3 月 16 日 (横浜)

(18) Nakanishi H, Terada K, Yamada J, Hayashi Y, Wu Z. Involvement of cathepsin B in the processing and secretion of interleukin-1 β in chromogranin A-stimulated microglia.. 第 82 回日本薬理学会年会、2009 年 3 月 (横浜)

(19) Nakanishi H. Microglia-aging: Roles of microglial lysosome-and mitochondria-derived reactive oxygen species in brain aging. 第 52 回日本神経化学会、シンポジウム「ミクログリアの機能と病態—最近の研究動向と将来の

- 展望—」、2009年6月24日(群馬県伊香保)
(20) Nakanishi H, Yamada J. Extracellular nucleotide-mediated reduced synaptic activity precedes microglial synaptic stripping after an axotomy. International Symposium on Purinergic Signalling in New Strategy of Drug Discovery, Fukuoka Purine 2009, 2009年7月24日(福岡)
- (21) Wu Z, Nakanishi H. Age-dependent differential phenotypic changes of glial cells by systemic inflammation. 9th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease. 2009年9月10日(パリ)
- (22) 中西 博、末梢炎症により惹起される脳炎症の老化による増悪：鍵を握る脳の免疫担当細胞ミクログリアの動態について、第52回秋期日本歯周病学会、シンポジウム「歯周組織の免疫応答から考える全身への影響」2009年10月11日(宮崎)
- (23) 武 洲、劉 霞、中西 博、末梢炎症によるミクログリア活性化と脳老化の促進、第14回グリア研究会、2009年11月14日(大阪)
- (24) 山田 純、神野尚三、中西 博、運動神経軸索切断後のアストロサイト形態・ミクログリアの形態の比較検討、第14回グリア研究会、2009年11月14日(大阪)
- (25) 林 良憲、中西 博、ミクログリアのニューロン保護作用：NMDA誘発こうフィン毒性に対するミクログリア培養上清の保護メカニズムの解析、第62回日本薬理学会西南部会、2009年11月27日(愛媛)
- (26) Zhang R、劉 霞、孫 麗、林 良憲、武 洲、中西 博、インターロイキン-1 β のp38MAPキナーゼの活性化を介したNMDAにより惹起されるCa²⁺活性化K⁺電流の抑制作用、第62回日本薬理学会西南部会、2009年11月27日(愛媛)
- (27) 中西 博、カテプシンB阻害による疼痛制御、第5回九大痛みの研究会、2010年2月19日(福岡)
- (28) 中西 博、ミクログリアのリソソーム・ミトコンドリア系を標的としたグリア創薬に可能性、第130回日本薬学会年会、130回
年会祈念融合型シンポジウム「グリア創薬の最前線と可能性」2010年3月29日(岡山)
- (29) Hayashi Y, Fujita S, Odagaki Y, Shinagawa R, Kagamiishi Y, Nakanishi H. Neuroprotection of microglia-conditioned medium on excitotoxic neuronal injury through inhibition of large cation conductance. 第83回日本薬理学会年会、2010年3月16日(大阪)
- (30) Wu Z, Nakanishi H. Microglial cathepsin B: A strategic target for neuroprotective agents. BIT's Inaugural Symposium on Enzyme & Biocatalysis-2010. 2010年4月22日(上海)
- (31) Wu Z, Liu X, Nakanishi H. Reverse of the rheumatoid arthritis-induced acceleration of brain aging in the middle age by minocycline. The 1st International Congress on Controversies in Longevity, Health and Aging. 2010年6月24日(バルセロナ)
- (32) Hayashi Y, Fujita S, Odagaki Y, Shinagawa R, Kagamiishi Y, Nakanishi H. Protective effects of microglia-conditioned medium against NMDA-induced dendritic injury through an inhibition of non-selective cation conductance. Neuro2010, 2010年9月2日(神戸)
- (33) Kawaji K, Hayashi Y, Koyano K, Yokoyama T, Nakanishi H. Preferential inhibitory effects of S-ketamine on both NMDA receptor currents and neuropathic pain. Neuro2010, 2010年9月2日(神戸)
- (34) Yamada J, Jinno S, Nakanishi H. Differential involvement of astrocytes and microglia in neuronal survival after hypoglossal nerve injury. The 29th Naito Conference: Glia World. 2010年10月5日(湘南村)
- (35) Hayashi Y, Kawaji K, Nakanishi H. Preferential inhibitory effects of S-ketamine on neuropathic pain through both the neuronal based and microglia related mechanisms. The 29th Naito Conference: Glia World. 2010年10月5日(湘南村)
- (35) Sun L, Wu Z, Hayashi Y, Nakanishi H. A possible involvement of cathepsin B in nociceptive processing through the processing

and secretion of interleukin-1 family from microglia. Neuroscience 2010, 2010年11月14日 (サンジエゴ)

(36) Hayashi Y, Zhang R, Sun L, Wu Z, Nakanishi H. Acute p38-mediated inhibition of K_{Ca} channels activated by Ca^{2+} influx through both NMDA receptor and voltage-gated Ca^{2+} channels by interleukin-1 β , Neuroscience 2010, 2010年11月14日 (サンジエゴ)

(37) Kawaji K, Hayashi Y, Nakanishi H. S-ketamine preferentially inhibits neuropathic pain through the neuronal-based and microglia-related mechanisms. Neuroscience 2010, 2010年11月14日 (サンジエゴ)

(38) 孫 麗、武 洲、中西 博、炎症性疼痛発症におけるミクログリアのカテプシンBの関与、第52回歯科基礎医学会学術大会2010年9月20日 (東京)

(39) 張 馨文、孫 麗、武 洲、中西 博、神経障害性疼痛におけるミクログリアのカテプシンSの関与、第52回歯科基礎医学会学術大会2010年9月20日 (東京)

(40) 劉 霞、武 洲、中西 博、慢性末梢炎症によるミクログリア活性化と海馬LTPの障害、第52回歯科基礎医学会学術大会2010年9月20日 (東京)

(41) 武 洲、馬 紅梅、久木田敏夫、中西 博、ホスファチジルセリンリポソームによる炎症性骨破壊抑制メカニズムの解析、第52回歯科基礎医学会学術大会2010年9月20日 (東京)

(42) 馬 紅梅、武 洲、李 銀姫、久木田敏夫、中西 博、ホスファチジルセリンリポソームによる骨形成の促進、第52回歯科基礎医学会学術大会2010年9月20日 (東京)

(43) 張 馨文、林 良憲、武 洲、中西 博、ミクログリアの産生するカテプシンSの神経障害性疼痛発症における役割、第15回グリア研究会、2010年10月23日 (福岡)

(44) 孫 麗、武 洲、中西 博、ミクログリアの産生するカテプシンBの炎症性疼痛発症における役割、第15回グリア研究会、2010年10月23日 (福岡)

(45) 武 洲、劉 霞、中西 博、中年ルイスラットにおけるアジュバント関節炎に伴うミクログリア活性化と海馬長期増強の障害、第63回日本薬理学会西南部会、2010年11月26日 (鹿児島)

(46) 林 良憲、河路広大、中西 博、S-ケタミンのNMDA電流ならびにミクログリア活性化の優位阻害による神経障害性疼痛に対する抑制作用、第63回日本薬理学会西南部会、2010年11月26日 (鹿児島)

[図書] (計 2件)

① Wu Z, Nakanishi H. Regulation of myeloid phagocytes by phosphatidylserine-containing liposomes: possible involvement of prostaglandin E_2 and the potential therapeutic application. In: Prostaglandins: Biochemistry, Functions, Types and Roles (Ed., GM Goodwin) Nova Science Publisher Inc., New York, p81-92, 2010.

② Nakanishi H, Wu Z. Cathepsin-dependent neuronal death pathways induced by methylmercury. In: Methylmercury: Formation, Sources and Health Effects (Ed. AP Clampet) Nova Science Publisher Inc., New York, in press

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 博 (NAKANISHI HIROSHI)
九州大学・大学院歯学研究院・教授
研究者番号：20155774

(2) 研究分担者

武 洲 (TAKE HIRO)
九州大学・大学院歯学研究院・准教授
研究者番号：10420598

(3) 連携研究者

なし