

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18508

研究課題名（和文）骨代謝におけるAdam10の機序の解明とそれを応用した新規骨関連事象抑制薬の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of Adam10 in bone metabolism and development of novel inhibitors of bone-related events based on this mechanism

研究代表者

池田 淳史（Ikeda, Atsushi）

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：60710150

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：最初に、研究責任者が海外で研究していたADAM10と、歯周病の本態である歯槽骨吸収を起こす破骨細胞との関連に着目した。ADAM10が重要な役割を担うNotchシグナル経路が破骨細胞分化に関連するのではないかと考え、研究を開始した。その結果、ADAM10ではなく、ADAM17が作用することで、Jagged1とNotch2を介したNotchシグナル伝達が破骨細胞分化の極早期に生じていることを解明した。また、歯槽骨吸収モデルマウスでもNotchシグナル伝達を介して破骨細胞が生じていることが示唆された。今後は、本メカニズムのさらなる詳細を明らかにすれば、歯周病の治療薬などへと応用できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は、歯の周りの骨を溶かす病気であり、その骨を溶かす役割を担っているのが破骨細胞と呼ばれる細胞である。免疫を担当する細胞が破骨細胞に成長・変化すると言われているが、今回の研究で、その破骨細胞に変化する際の、非常に早い段階で起こっているメカニズムを解明した。今後、このメカニズムをさらに詳細に解明することで、新しい歯周病の治療薬を作ることができる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：First, I focused on the association between ADAM10 and osteoclasts that cause alveolar bone resorption, which is the main cause of periodontal disease. I began my research with the idea that the Notch signaling pathway, in which ADAM10 plays an important role, might be related to osteoclastogenesis.

The results revealed that Notch signaling via Jagged1 and Notch2 occurs very early in osteoclastogenesis by the cleavage of ADAM17, but not ADAM10. The results also suggest that osteoclasts arise through Notch signaling in a mouse model of alveolar bone resorption. In the future, if further details of this mechanism are clarified, it may be possible to apply this mechanism to drugs for the treatment of periodontal disease.

研究分野：歯周病学

キーワード：破骨細胞 ADAM17 Notchシグナル経路

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 歯周病とその発症メカニズム

日本国民の約 80%が罹患している歯周病は、口腔内常在菌である歯周病原細菌が歯周組織に感染し続けることで発症する感染症の一つである。その歯周病原細菌を排除するために働く一連の慢性的な免疫応答によって、血中に存在する単球やマクロファージが破骨細胞へ分化することが知られており、その破骨細胞による歯槽骨の吸収が歯周病の本態である。歯周病発症のメカニズムは、長年の研究によって解明が進んでいるものの、いまだ詳細は不明である。

### (2) A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) と Notch シグナル経路と破骨細胞の関係

ADAM は、膜貫通型タンパク質から構成される遺伝子ファミリーであり、現在では、心肥大、癌細胞の増殖・転移、アルツハイマー病など様々な疾患に関与することが明らかとなり、近年世界的に注目されるようになってきた。その中の一つである申請者がアメリカで研究していた ADAM10 もアルツハイマー病やリウマチなどの疾患に関与しているが、破骨細胞との関係を明確に報告した論文は無い。ADAM10 に関与するシグナル経路として Notch 受容体を介した Notch シグナル経路がある。そこでは、ADAM10 以外の ADAM ファミリーの中で ADAM17 も関与している (Edwards DR., *et al.*, *Molecular Aspects of Medicine*, 2008.)。Notch シグナル経路と破骨細胞との関連を示した論文は数報あるが、詳細な制御機構に関しては明らかになっていない (Ashley JW., *et al.*, *J Cell Biochem.*, 2015., Yu J., *et al.*, *Bone*, 2020.)。

## 2. 研究の目的

以上の背景から、本研究の目的を ADAM10, 17 と Notch シグナル経路が破骨細胞分化にどのように関与しているのかを明らかにすることに設定した。

## 3. 研究の方法

### In Vitro

雄性 12 週齢野生型マウスの大腿骨、および脛骨から骨髓細胞を採取し、50 µg/mL の Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF) を添加した 10% 非働化 FBS 含有 α-MEM 培地中で 6 日間培養し、マクロファージ様細胞へと分化誘導する。7 日目から 50 µg/mL M-CSF と 50 µg/mL Receptor Activator NF-κB Ligand (RANKL) を添加した 10% 非働化 FBS 含有 α-MEM 培地で培養し、破骨細胞様細胞へと分化誘導し、以下の実験に使用する。

- (1) 分化誘導した破骨細胞様細胞で ADAM10, 17 が発現しているか RNA レベルで確認する
- (2) 分化誘導した破骨細胞様細胞と RANKL を加えず未分化のままのマクロファージ様細胞を使用し、以下の実験を行う
  - a) Notch シグナル経路に関連する遺伝子の経時変化を、qPCR 法を使用して RNA レベルで調べる
  - b) 上記 a) で発現していた遺伝子 (Ct 値 :30 以下を基準) を選択し、Western blot 法を使用してタンパク質レベルで経時変化を調べる
- (3) ADAM10, 17 の阻害剤、および上記 2) の実験結果で得られた結果を元に、破骨細胞様細胞中に特異的に発現しているタンパク質に対する中和抗体を使用して、上記の方法での破骨細胞様細胞への分化誘導が抑制できるか確認するために、Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP) 染色を行い、3 核以上の TRAP 陽性細胞を破骨細胞様細胞として捉え、その数を計測し比較する

## In Vivo

雄性 12 週齢野生型マウスの上顎左側第 2 大臼歯に 5-0 絹糸を結紮し、歯槽骨吸収マウスモデルを作製する。なお、上顎右側第 2 大臼歯は結紮せず、陰性対照として使用する。

- (1) 本マウスモデルの上顎左側第 2 大臼歯の辺縁歯肉に、ADAM17 特異的阻害剤 (KP-457) を 15 $\mu$ M, 6 $\mu$ L で注入する群 (注入群) と注入しない群 (非注入群) で以下を検討する
  - a) 歯肉上皮を採取し、RNA を抽出して、qPCR 法を使用して、破骨細胞分化に関連する遺伝子の発現量を比較する
  - b) 上顎骨の組織切片を作製し、破骨細胞の数を TRAP 染色で比較する
- (2) 本マウスモデルの上顎骨の組織切片を作製し、破骨細胞に Notch2 が発現しているか免疫染色で確認する

## 統計解析

本研究の統計解析には、Student's *t*-test, one-way ANOVA, Tukey-Kramer 法を使用した。

## 4. 研究成果

### In Vitro

- (1) 雄性 12 週齢野生型マウスの大腿骨、および脛骨から採取した骨髄細胞から分化誘導したマクロファージ様細胞と破骨細胞様細胞中では、RNA レベルで ADAM10, 17 が共に発現していた (表 1)。

Gene name	M $\phi$ Average Ct value	OC Average Ct value
Adam10	21.3	21.6
Adam17	21.3	21.0
B-actin	15.9	16.2

M $\phi$ : Macrophages OC: Osteoclasts n=3

表 1: マクロファージ様細胞と破骨細胞様細胞中の Adam10, 17 の発現

- (2) 雄性 12 週齢野生型マウスの大腿骨、および脛骨から採取した骨髄細胞から分化誘導したマクロファージ様細胞と破骨細胞様細胞中での破骨細胞分化マーカーである Nuclear Factor of Activated T Cells 1 (NFATC1),

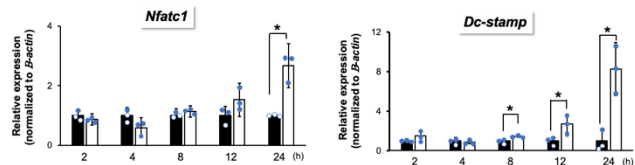


図 1: マクロファージ様細胞と破骨細胞様細胞中の破骨細胞分化マーカーの mRNA 発現の経時変化

- Dendrocyte Expressed Seven Transmembrane Protein (DC-STAMP) と Notch シグナル経路に関連する遺伝子の経時変化を RNA レベルで調べた。その結果、*Nfatc1* と *Dc-stamp* の発現量は、破骨細胞様細胞中で優位に増加していた (図 1)。Notch シグナル経路の受容体では、*Notch Receptor (Notch) 1, 3, 4* が発現していた。また、Notch シグナル経路のリガンドでは、*Jagged Canonical Notch Ligand 1 (Jagged1)* が発現していた。その中で、*Notch2* と *Jagged1* の発現量は、破骨細胞様細胞へ分化誘導を開始した極初期に優位に増加していた。反対に *Notch1, 4* と破骨細胞分化開始 12, 24 時間後の *Jagged1* の発現量は破骨細胞様細胞中で優位に減少していた (図 2)。

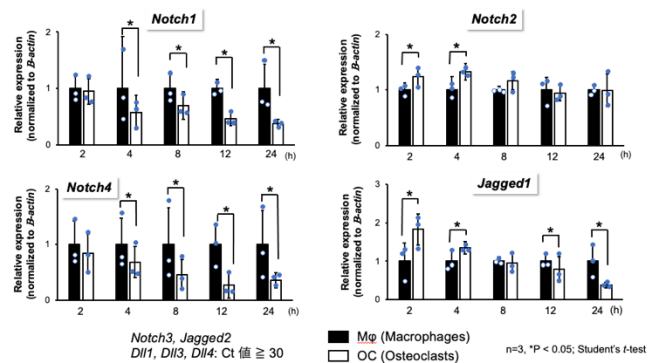


図 2: マクロファージ様細胞と破骨細胞様細胞中の Notch シグナル因子の mRNA 発現の経時変化

また、上記 RNA レベルの実験結果を元に、それに対応するタンパク質発現の経時変化の確認を行った。その結果、JAGGED1 と NOTCH2 の発現量は、破骨細胞様細胞へ分化誘導を開始した極初期に増加していた。しかし、RNA レベルで優位に減少していた NOTCH1, 4 に関しては、差は無かった (図 3)。

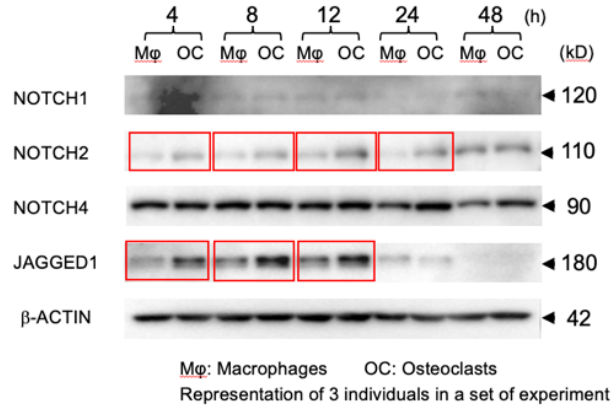


図 3 : マクロファージ様細胞と破骨細胞様細胞中の Notch シグナル因子関連タンパク質発現の経時変化

(3) 上記 (2) の結果を元に、JAGGED1 の中和抗体とそのアイソタイプコントロールを用いて、破骨細胞様細胞への分化誘導が抑制できるか TRAP 染色を使用して、破骨細胞様細胞の数を計測した。また、ADAM10, 17 の特異的阻害剤である GI254023X, KP-457 とその溶媒 (DMSO) を使用して、同様の実験を行った。その結果、JAGGED1 の中和抗体と ADAM17 の特異的阻害剤 (KP-457) を使用した群では、アイソタイプコントロール、および DMSO 群と比較し、優位に破骨細胞様細胞の形成が抑制された (図 4, 5) が、ADMA10 の特異的阻害剤 (GI254023X) を使用した群では優位な差は無かった (図 5)。

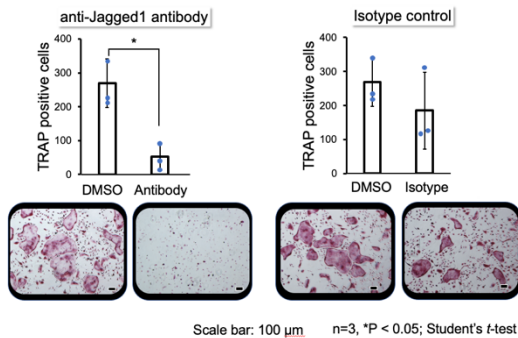


図 4 : JAGGED1 中和抗体を用いた破骨細胞様細胞の形成抑制

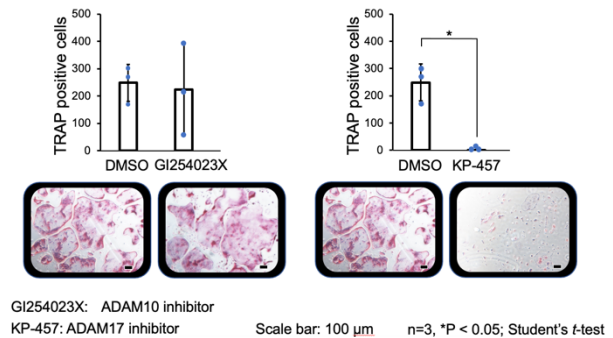


図 5 : ADAM10, 17 特異的阻害剤を用いた破骨細胞様細胞の形成抑制

### In Vivo

(1) 雄性 12 週齢歯槽骨吸収モデルマウスを用いて実験で、KP-457 を注入した群では注入しなかった群と比較し、*Nfatc1* の発現量が優位に減少していた (図 6)。また、組織切片中の破骨細胞数も減少していた。(図 7)。

(2) 本マウスモデルの上顎骨の組織切片中の破骨細胞には NOTCH2 が発現していた (図 8)。

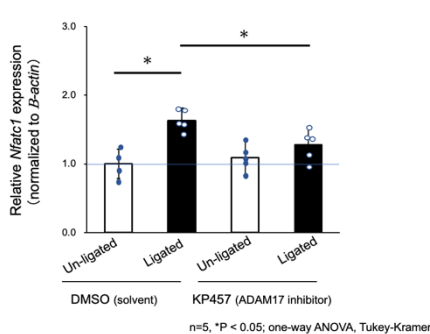


図 6 : 歯槽骨吸収モデルマウスの組織中の *Nfatc1* 発現量

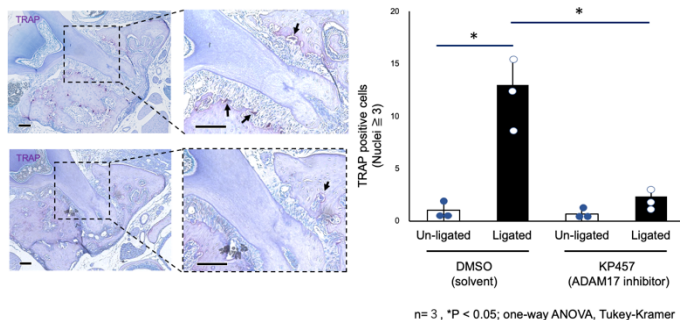
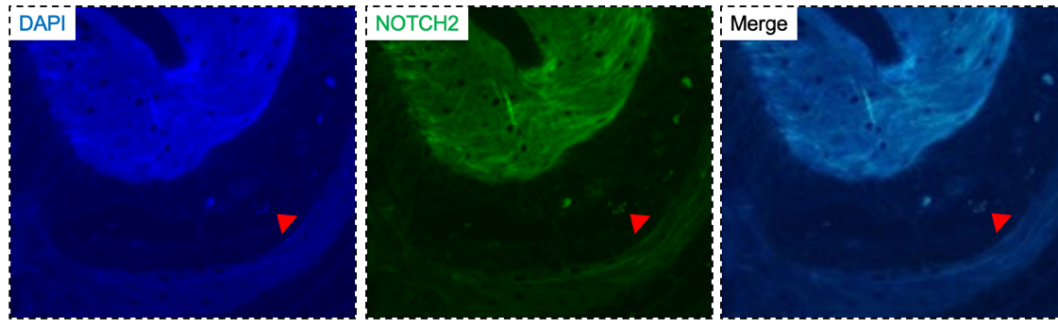


図 7 : 歯槽骨吸収モデルマウスの組織中の TRAP 陽性細胞数



Arrow heads: Osteoclast n=1

図 8 : 歯槽骨吸収モデルマウスの組織中での破骨細胞と NOTCH2 の発現

以上の結果より、マクロファージから破骨細胞へ分化する極初期には、ADAM10ではなく、ADAM17が作用することで、Jagged1とNotch2を介したシグナル伝達が生じていることが解明された。また、実際の歯槽骨吸収の場合でも同じメカニズムで破骨細胞が生じていることが歯槽骨吸収マウスモデルで示唆された。今後はこのメカニズムのさらなる詳細を明らかにすることで、歯周病の治療薬や同じ骨吸収を呈する疾患である関節リウマチの治療、そして破骨細胞に働きかける骨粗鬆症薬の新たな開発などへと応用できる可能性がある。

<参考文献>

1. Edwards DR., Handsley MM., Pennington CJ. "The ADAM metalloproteinases." *Molecular Aspects of Medicine*. 2008; 29(5): 258-289
2. Ashley JW., Ahn J., Hankenson KD. "Notch signaling promotes osteoclast maturation and resorptive activity." *J Cell Biochem*. 2015; 116(11): 2598-2609
3. Yu J., Canalis E. "Notch and the regulation of osteoclast differentiation and function." *Bone*. 2020; 138: 115474

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 本行 令奈, 池田 淳史, 井手口 英隆, 山本 直史, 高柴 正悟
2. 発表標題 歯周炎組織においてADAMが破骨細胞分化に与える影響
3. 学会等名 第66回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本行令奈, 池田淳史, 山本直史, 高柴正悟
2. 発表標題 Notchシグナル伝達経路を介した破骨細胞分化のメカニズム
3. 学会等名 日本歯科保存学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------