

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月 16日現在

機関番号：17102
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21390516
 研究課題名（和文） 抗NHA2モノクローナル抗体を用いた顎堤骨吸収抑制効果の解析
 研究課題名（英文） Studies on inhibitory effects of the monoclonal antibodies to NHA2 on alveolar bone resorption
 研究代表者
 牧平 清超（MAKIHIRA SEICHO）
 九州大学・歯学研究院・准教授
 研究者番号：80304450

研究成果の概要（和文）：

抗NHA2モノクローナル抗体を用いて破骨細胞におけるNHA2の機能解析を行った。その結果、NHA2は未成熟な破骨細胞同士の融合に深く関与していることを見いだした。また、顎骨は咬合力をはじめとした様々な外的刺激を受けることから、メカニカルストレスを負荷した状況をシミュレートし、この刺激下での抗NHA2モノクローナル抗体の破骨細胞と骨芽細胞への影響について検討したが、結論に至るまでの十分なデータを得ることはできなかった。

研究成果の概要（英文）：

The functions of NHA2 during osteoclast differentiation were investigated using the monoclonal antibodies (anti-NHA2 mAb). The data suggest that NHA2 is involved in cell-cell fusion during osteoclast differentiation. On the other hand, mechanical loading conditions result in alveolar bone resorption. Therefore, we investigated the effects of anti-NHA2 mAb on osteoblast and osteoclast differentiation under mechanical loading. However, the data was not enough for conclusion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

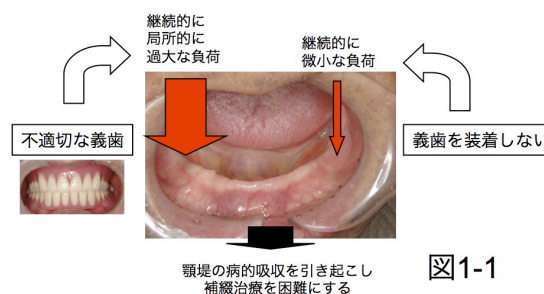
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴理工系歯学

キーワード：骨吸収, 破骨細胞, 補綴処置, NHA2, メカニカルストレス

1. 研究開始当初の背景

義歯床下の顎堤骨を保全することはよりよい予後を長期間得る上で非常に重要である。無歯顎など歯による骨組織への生理学的負荷が消失した場合には顎堤吸収などが起こる。逆に荷重が大きい場合にも骨吸収を引



き起こすことがある(図 1-1). また, 歯周病やインプラント周囲炎による歯槽骨吸収, 抜歯後の歯槽骨レベルの低下, 骨移植後の骨吸収を抑制することは補綴処置を長期間成功する上で同様に重要である(図 1-2). このような外来刺激(荷重, 細菌など)による骨吸収や炎症性骨吸収では, 破骨細胞が活性化され骨吸収が促進されていると考えられている. この破骨細胞を主に活性化する因子が Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL) である(図 2). RANKL は破骨細胞前駆体細胞膜上の RANK 分子に結合し破骨細胞の分化を促進する. RANKL-RANK のシグナルは TNF- α Associated Factor (TRAF)2, TRAF5,

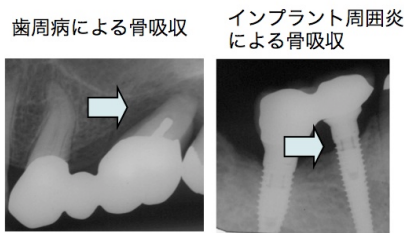


図1-2

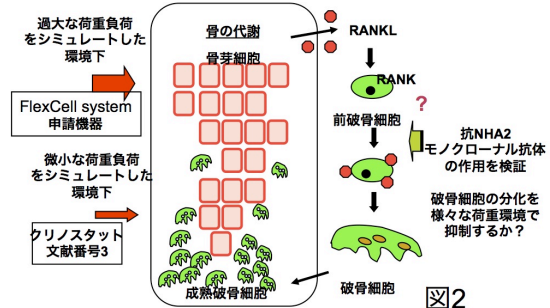
TRAF6 などを介して核内に伝達される. なかでも TRAF6 がその中心的役割を果たしている. 我々は TRAF1 が負の調節因子であることを明らかにしている. RANKL シグナルは破骨細胞前駆体上の RANK に結合し, TRAF 6 などを介して核内に伝達される. この RANK をコードする遺伝子が先天的に変異する場合があります, 遺伝子の変異部位によって, 広範性骨格性高ホスファターゼ症, 家族性広汎性骨溶解症 (Familial Expansile Osteolysis, FEO), あるいは骨パジェット病 (Paget's Disease of Bone, PDB) と呼ばれる骨の疾患が見られる. その他にも難聴, 歯の喪失, 高カルシウム血症などが見られる. このように歯科, 医科領域で骨吸収の解明とその対応が重要である.

近年, 荷重や張力などのメカニカルストレスによる骨芽細胞や破骨細胞への分子レベルでの影響が検討され始めている. 我々は, 微小重力環境を作り出すことができる3次元クリノスタット培養装置(以下クリノスタット)を利用して, 微小重力環境が骨芽細胞および破骨細胞の分化に与える影響および骨吸収に関連したマーカー遺伝子の発現変化を検討し報告してきた. また, インプラント周囲の骨吸収に, 破骨細胞が深く関与し RANKL と OPG という分子が重要な役割を果たしているデータを得ている. これらの骨吸収の問

題解決には, RANKL という分子に注目し, 破骨細胞をコントロールすることが一つの有効な手段だと考えられている.

2. 研究の目的

本研究では, 通常培養, 過大な負荷および微小な負荷(微小重力)をシミュレートした培



養環境下で, 我々の作製した抗NHA2モノクローナル抗体が, 破骨細胞の分化を抑制するかを検討する(図2). その抑制作用に関連したメカニズムの検討も含めて行う. 将来的に本抗体の技術を薬へと発展させるために必要な基礎的知見を得る.

まず平成21年度については, NHA2 の破骨細胞における機能解明および過大な負荷をシミュレートした培養環境下での破骨細胞の動態を検証する. さらに22年度以降に関しては, 過大な負荷, 微小な負荷をシミュレートした培養環境で我々の抗NHA2モノクローナル抗体が, 破骨細胞の分化にどのような影響を与えるか, またその詳細なメカニズムについて検討を行う.

3. 研究の方法 (図 3)

(平成21年度)

(1)通常培養下で破骨細胞におけるHNA2の

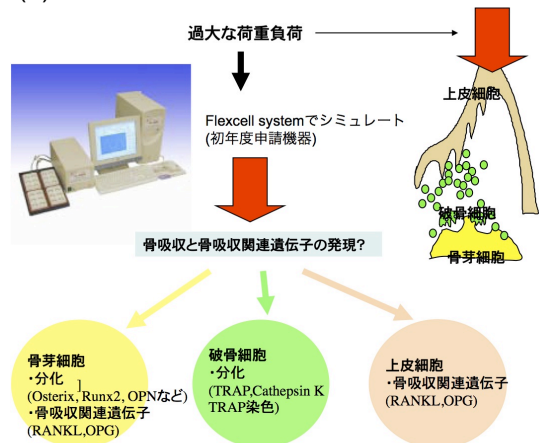


図3

機能解析および抗NHA2モノクローナル抗体の効果を検証

抗NHA2モノクローナル抗体の破骨細胞分

化抑制効果は、特許申請でもわかるようにその十分な知見は得ている。しかしながら、NHA2自体の破骨細胞における機能については、世界でも我々と数名の研究者しか研究に着手していないため詳細は不明である。本研究の中心となすNHA2の機能解明をRNAi、過剰発現などをはじめとした最新の分子生物学的手法を用いて明らかにしていく。

(2)過大な負荷をシミュレートした環境下での骨芽細胞と破骨細胞の動態を検証

骨芽細胞や破骨細胞、またそれらの共存培養に過大な負荷をかけ、お互いの動態を検討している研究は少ない。また過大、微小な荷重負荷を交互に繰り返し負荷した検証はなされていない。顎堤骨吸収と応力の関係は不明な点が多く、これまでの我々の微小な負荷をかけた実験に、新規にFlex Cell systemを購入して過大な荷重負荷をかけられる培養環境を作り出し、これまでのデータと比較検討する。これによって、両者からの骨吸収を解明していく。

(平成22年度以降)

(3)過大な負荷荷重および微小な負荷荷重をシミュレートした環境下での破骨細胞の動態と抗NHA2モノクローナル抗体の破骨細胞分化抑制効果の検討

様々な荷重を破骨細胞にかけ、細胞の反応を解析すると同時に我々の新規抗体が、細胞反応をどのように制御するか検討する。

4. 研究成果

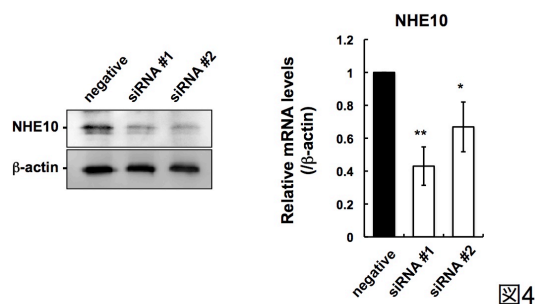


図4

NHA2(NHE10) siRNA 法と、作製し精製した抗 NHA2 モノクローナル抗体を利用して、破骨細胞における NHA2 の機能解明を試みた。はじめに、NHA2 siRNA で前処理し、NHA2 の発現をウェスタンブロッティングと real time RT-PCR 法で確認した。NHA2 siRNA #1 と #2

は NHE2 の発現を RNA レベルとタンパクレベルで抑制した(図4)。可溶性 RANKL を添加した場合、RAW264.7 細胞において破骨細胞の分化マーカーである cathepsin K mRNA の発現量は、siRNA の前処理なしで可溶性 RANKL を添加した RAW264.7 細胞による cathepsin K mRNA の発現量と比較して有意に低かった(データ示さず)。同様に抗 NHA2 モノクローナル抗体を添加した場合も RAW264.7 細胞において cathepsin K mRNA の発現抑制が認められた(データ示さず)。図5に示すように NHA2(NHE10) siRNA 処理は、破骨細胞の分化を抑制した、特に、破骨細胞同士の融合を抑制した。

以上より、NHA2 と骨基質を分解する酵素である cathepsin K との間には相互作用がある可能性が示唆され、また NHA2 は、破骨細胞同士の誘導にも関与していることが示唆された。したがって、NHA2 は歯槽骨吸収に関与している可能性が示された。

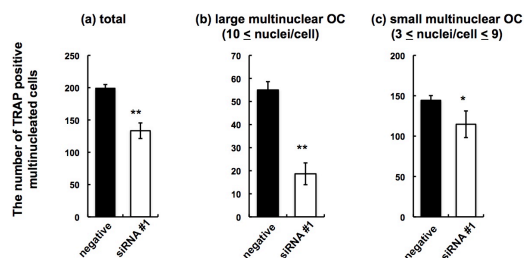


図5

次に、作成した 10 種類以上の抗 NHA 2 (別名 NHE10)モノクローナル抗体の中から予備実験によって選択した抗 NHA2(別名 NHE10)モノクローナル抗体(6B11)が周期性伸展刺激の条件下における破骨細胞と骨芽細胞にどのような影響を与えるかについて検討した。

はじめにストレッチ装置(本研究費で購入)を用いて周期性伸展刺激を破骨細胞と骨芽細胞に負荷した。その結果、5%の周期性伸展刺激は、破骨細胞におけるRANKLによって発現が増強したTRAPおよびDC-STAMP mRNA の発現を抑制することが示された(図6)。同様に、5%の周期性伸展刺激は、骨芽細胞における

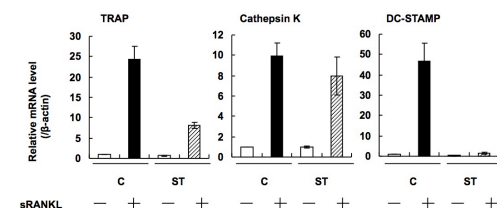


図6

OsterixおよびALPase mRNAの発現を抑制することが示された(図7)。したがって、5%の周期性伸展刺激は、破骨細胞と骨芽細胞の分化を抑制することが示唆された(図6, 7)。

マウス由来の初代培養破骨細胞を用いた実

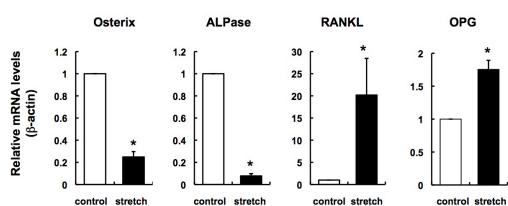
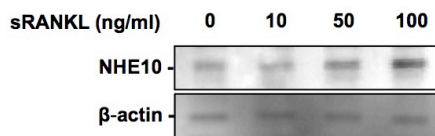


図7

験で、初代培養の破骨細胞に関しても RAW264.7細胞と同様にNHA2のRNAおよびタンパク質は可溶性RANKL刺激によって増加することが判明した(図8)。したがって、NHA2は破骨細胞の分化に重要な役割を果たしている可能性がさらに確かなものとなった

RAW264.7



Bone marrow cells

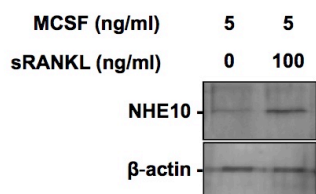


図8

ストレッチ装置を用いた周期性伸展刺激の条件下で培養した破骨細胞に対する抗NHA2モノクローナル抗体(6B11)の影響について検討した。予備実験で抗NHA2モノクローナル抗体(6B11)は、周期性伸展刺激による骨芽細胞と破骨細胞の分化抑制的な作用に対しては、抑制的に働く可能性が示されたが、周期性伸展刺激と抗体の濃度などの条件を変えると再現性がとれなかったことから結論を出すことはできなかった。

以上より、NHA2は破骨細胞の分化過程で未成熟な破骨細胞同士の融合に関して重要な役割を果たしていることを初めて見出すことができた。さらに抗NHA2モノクローナル抗体のなかでも6B11クローンはNHA2

分子をターゲットとした骨吸収抑制剤の1候補としての可能性が示唆された。また、顎骨は咬合力をはじめとした様々な外的刺激を受けることから、培養細胞を用いてメカニカルストレスを負荷した状況をシミュレートし、この刺激下での抗NHA2モノクローナル抗体(6B11)の破骨細胞と骨芽細胞への影響について検討したが、結論に至るまでのデータを得ることはできなかった。

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7件)

- ① Seicho Makihira, Hiroki Nikawa, Takahiro Shuto, Masahiro Nishimura, Yuichi Mine, Koichiro Tsuji, Keishi Okamoto, Yuhiro Sakai, Masanori Sakai, Naoya Imari, Satoshi Iwata, Mika Takeda, Fumio Suehiro Evaluation of trabecular bone formation in a canine model surrounding a dental implant fixture immobilized with an antimicrobial peptide derived from histatin. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 査読有, 22: 2765-2772, 2011
- ② Seicho Makihira, Hiroki Nikawa; Mikihito Kajiya; Toshihisa Kawai; Yuichi Mine; Eduardo Kosaka; Marcelo J Silva; Kei Tobiume; Yoshihiro Terada. Blocking of sodium and potassium ion-dependent adenosine triphosphatase-alpha1 with ouabain and vanadate suppresses cell-cell fusion during RANKL-mediated osteoclastogenesis. *European Journal of Pharmacology*, 査読有, 30: 409-148, 2011
- ③ Yuichi Mine, Seicho Makihira, Hiroki Nikawa, Hiroshi Murata, Ryuji Hosokawa, Aya Hiyama, Sumiyo Mimura. Impact of titanium ions on osteoblast- osteoclast- and gingival epithelial-like cells. *Journal of Prosthodontic Research*, 査読有, 54: 1-6, 2010
- ④ Seicho Makihira, Yuichi Mine, Hiroki Nikawa, Takahiro Shuto, Eduardo

- Kosaka, Masaru Sugiyama, Ryuji Hosokawa. Immobilized-OPG-Fc on a titanium surface inhibits RANKL-dependent osteoclast differentiation in vitro. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 査読有, 21:647-653, 2010
- ⑤ Seicho Makihira, Takahiro Shuto, Hiroki Nikawa, Keishi Okamoto, Yuichi Mine, Yuko Takamoto, Masaru Ohara, Koichiro Tsuji. Titanium Immobilized with an Antimicrobial Peptide Derived from Histatin Accelerates the Differentiation of Osteoblastic Cell Line, MC3T3-E1, International Journal of Molecular Sciences, 査読有, 11, 1458-1470, 2010
- ⑥ Keishi Okamoto, Tatsuyuki Nakatani, Yuki Nitta, Seicho Makihira, Satoshi Iwata, Hiroki Nikawa, Takayuki Takahagi. Differentiation Capability Evaluation of Osteoblast by Functionalized DLC Thin films with Plasma Processing, Journal of Photopolymer Science and Technology, 査読有, 23, 591-594, 2010
- ⑦ Seicho Makihira, Yuichi Mine, Hiroki Nikawa, Takahiro Shuto, Satoshi Iwata, Ryuji Hosokawa, Kohei Kamoi, Shota Okazaki, Yu Yamaguchi. Titanium ion induces necrosis and sensitivity to lipopolysaccharide in gingival epithelial-like cells. Toxicology in Vitro 査読有, 24,1905-1910, 2010

〔学会発表〕(計19件)

- ① 首藤崇裕, 牧平清超, 峯裕一, 二川浩樹, 寺田善博 抗NHEモノクローナル抗体を固定化したチタンが破骨細胞と骨芽細胞の分化に与える影響 第33回日本歯科技工学会学術大会 2011.10.1-2 (東京)
- ② 峯裕一, 牧平清超, 二川浩樹 Na⁺/H⁺交換輸送体(NHE10)は破骨細胞前駆細胞の融合に関与している 第29回日本骨代謝学会 学術集会

2011.7.28-30 (大阪)

- ③ 牧平清超, 二川浩樹, 峯裕一, 諸井亮司, 寺田善博 メカニカルストレスによる顎堤の骨吸収に関する研究 --- 周期性伸展刺激が骨芽細胞と破骨細胞に与える影響--- 日本老年歯科医学会第22回学術大会 2011.6.17 (東京)
- ④ 岡崎昌太, 牧平清超, 峯裕一, 首藤崇裕, 諸井亮司, 寺田善博, 二川浩樹 メカニカルストレスに対する破骨細胞の反応にカルシウムの流入が関与している 日本補綴歯科学会第120回記念学術大会 2011.5.20-22 (広島)
- ⑤ 竹田美佳, 坂井将典, 牧平清超, 西村正宏, 坂井裕大, 首藤崇裕, 峯裕一, 岩田慧, 今利直也, 末廣史雄, 二川浩樹, 辻紘一郎: 口腔インプラントに固定化した新規塩基性抗菌ペプチド(JH8194)の骨増生効果 Part II in vivo 解析 第32回日本バイオマテリアル学会大会 2010.11.29-30 (広島)
- ⑥ 首藤崇裕, 二川浩樹, 牧平清超, 峯裕一, 西村正宏 口腔インプラントに固定化した新規塩基性抗菌ペプチド(JH8194)の骨増生効果 Part I in vitro 解析 第32回日本バイオマテリアル学会大会 2010.11.29-30 (広島)
- ⑦ 牧平清超, 二川浩樹 イノベーション ジャパン 骨の吸収を促進する酵素を抑える物質 2009.9.16-18 (東京)
- ⑧ 岩田慧, 牧平清超, 二川浩樹, 高萩隆行, 岡本圭司, 熊谷宏, 首藤崇裕, 峯裕一 Biomimetic DLC 処理したチタンが骨芽細胞と破骨細胞の分化に与える影響: 平成22年度日本歯科補綴学会中国・四国支部学術大会 2010.8.29 (高松)
- ⑨ 峯裕一, 牧平清超, 二川浩樹, 山口裕, 岡崎昌太: 顎堤骨吸収における Na⁺/H⁺ exchanger 10 の関与 社団法人日本補綴歯科学会第119回学術大会 2010.6.11-13 (東京)
- ⑩ 峯裕一, 牧平清超, 二川浩樹, 山口裕, 岡崎昌太, 河原和子 RANKL に依存した RAW264.7 細胞の成熟破骨細胞への

- 分化過程における Na⁺/H⁺ exchanger 10 の役割 日本組織培養学会第 83 回大会 2010.5.20-21 (岡山)
- ⑪ 首藤崇裕, 牧平清超, 二川浩樹, 峯 裕一, 岡崎昌太, 高本祐子, 山口裕 JH8194 固定化チタンによる MC3T3-E1 細胞の ALPase 活性への影響 第 31 回日本歯科技工学術大会 2009.11.22-23 (福岡)
- ⑫ 鴨居浩平, 牧平清超, 二川浩樹, 岩田慧, 里田隆博, 村山 長 チタンイオンとリポ多糖が歯肉上皮細胞に与える影響 第 31 回日本歯科技工学術大会 2009.11.22-23 (福岡)
- ⑬ 岡崎昌太, 牧平清超, 二川浩樹, 首藤崇裕, 峯 裕一, 高本祐子, 山口 裕 チタンイオンは LPS によるヒト歯肉線維芽細胞の CCL2 発現を増強する 第 31 回日本歯科技工学術大会 2009.11.22-23 (福岡)
- ⑭ 岩田 慧, 牧平清超, 二川浩樹, 鴨居浩平, 高萩隆行, 岡本圭司 DLC コーティングしたチタンが骨分化に与える影響 第 31 回日本歯科技工学術大会 2009.11.22-23 (福岡)
- ⑮ 宮井良介, 牧平清超, 二川浩樹, 岡崎昌太, 峯 裕一, 山口 裕, 河原和子, 野宗万喜, 原 久美子, 松本厚枝, 仁井谷善恵 Amiloride が破骨細胞の分化に与える影響 第 60 回中国地区歯科医学大会 2009.10.25 (広島)
- ⑯ 河村 卓, 牧平清超, 二川浩樹, 河原和子, 西村正宏, 下江宰司, 玉本光弘, 村山 長, 里田隆博, 竹本俊伸, 杉山 勝, 天野秀昭新規抗菌ペプチド JH8194 がヒト間葉系幹細胞の増殖に与える影響 第 60 回中国地区歯科医学大会 2009.10.25 (広島)
- ⑰ 首藤崇裕, 牧平清超, 二川浩樹, 杉山 勝, 岩田慧, 岡崎昌太 JH8194 を固定化したチタンによる骨芽細胞の分化促進作用 第 39 回日本口腔インプラント学会学術大会 2009.9.25-27 (大阪)
- ⑱ 岩田 慧, 牧平清超, 二川浩樹, 岡本圭司, 高萩隆行, 西村正宏, 首藤崇裕, 岡崎昌太 DLC コーティングしたチタ

ンが骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞の分化に与える影響 日本口腔インプラント学会 2009.9.25-27 (大阪)

- ⑲ 峯 裕一, 牧平清超, 岡崎昌太, 二川浩樹 P 型 ATPase 阻害剤は RANKL 添加に依存した RAW264.7 の細胞融合を抑制する 第 27 回日本骨代謝学会学術集会 2009.7.23-25 (大阪)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧平 清超 (MAKIHIRA SEICHO)
九州大学・大学院歯学研究院・准教授
研究者番号：80304450

(2) 研究分担者

二川 浩樹 (NIKAWA HIROKI)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：10228140

里田 隆博 (SATODA TAKAHIRO)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：80170801

弓削 類 (YUGE LOIS)
広島大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号：20263676

寺田 善博 (TERADA YOSHIHIRO)
九州大学・大学院歯学研究院・教授
研究者番号：30038898

篠原 義憲 (SHINOHARA YOSHINORI)
九州大学・大学院歯学研究院・助教
研究者番号：00423533