

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593000

研究課題名(和文)オリゴ核酸の選択的デリバリーシステムを活用した新規骨粗鬆症治療薬の開発

研究課題名(英文) Novel therapeutic approach using beta-glucan based oligonucleotides delivery system for osteoporosis

研究代表者

有吉 渉 (ARIYOSHI, WATARU)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：40405551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞前駆細胞に恒常発現している糖鎖認識受容体dectin-1と特異的な結合能を有するシゾフィランと核酸の複合体を用いて、破骨細胞に対する選択性の高いドラッグデリバリーシステムの構築が可能であることを明らかにした。

一方、糖鎖であるcurdlanはdectin-1を介して、破骨細胞の分化および骨吸収活性を負に制御することを見出した。さらに、抑制メカニズムとしてSykのタンパクの発現抑制を介した破骨細胞分化のマスター因子NFATc1の負の制御が関与していることを証明した。

本研究で得られた知見は、骨代謝疾患に対する新たな治療戦略確立に向けての展開に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Several immune system cell surface receptors are reported to be associated with osteoclastogenesis. Dectin 1, a lectin receptor for β -glucan, is found predominantly on cells of the myeloid lineage. In this study we have developed a delivery system for oligonucleotides using schizophyllan (SPG), a polysaccharide that belongs to the β -glucan family. Application of complex consisting SPG and TNF receptor associated factor 6 (TRAF6) specific siRNA to osteoclast progenitor cells inhibited the osteoclast formation in vitro.

On the other hand, we also demonstrated that the dectin-1 agonist curdlan potentially inhibits osteoclast differentiation, especially nuclear factor of activated T cell cytoplasmic 1 (NFATc1) expression, and that Syk kinase plays a crucial role in the transcriptional pathways.

These data suggest that application of this new complex and curdlan administration could be potential candidates for the treatment of osteoclast-related diseases such as osteoporosis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：破骨細胞 シゾフィラン dectin-1 ドラッグデリバリー カードラン

1. 研究開始当初の背景

ビスフォスフォネート製剤(BP製剤)は、石灰化抑制作用を有する生体内物質であるピロリン酸をより安定な構造に変えた化合物で、投与経路にかかわらず骨に沈着して骨ミネラルと強固に結合することで、破骨細胞に選択的に取り込まれ、アポトーシスを誘導し、骨吸収を抑制する。骨に吸着したBPが破骨細胞に特異的に作用することは骨粗鬆症や悪性腫瘍にみられる高カルシウム血症などの骨吸収病変の治療薬として極めて重要な特徴である。さらにBPは骨折防止効果を発揮することから、わが国における骨粗鬆症治療薬の第一選択薬となっている。

しかし、2003年にMarxがBP製剤の投与により発生した難治性の顎骨壊死(ビスフォスフォネート関連顎骨壊死: bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: BRONJ)を報告して以来、相次いで同様の報告がなされるようになり、歯科臨床上の大きな問題となっている。BRONJの発症機序についてはいくつかの説があるのみで、統一見解が得られておらず、この疾患の爆発的な増大が懸念されている。こうした契機からより特異性が高く、かつ副作用の少ない骨吸収抑制薬の開発が急務である。

近年の骨代謝研究の成果から、単球-マクロファージ系の細胞は破骨細胞へと分化し、骨吸収に強く関与していること、そしてこの分化機構に関連する分子が次々に同定されてきた。その一方で、細胞外マトリックスの構成成分であるグリコサミノグリカンと呼ばれる多糖は動物の結合組織を中心にあらゆる組織に普遍的に存在し、足場としての役割のほかに、細胞シグナル伝達を介し、接触する細胞の発生、増殖、移動、形態形成、代謝機能等に影響を及ぼしていることが証明され、臨床においても、創傷治癒や炎症反応との関連が指摘されている。このような背景から申請者は、糖鎖が破骨細胞の分化・骨吸収活性に及ぼす影響について研究を継続してきた。

一連の研究結果から、細胞には糖鎖に特異的な認識機構と代謝機構が具備されていることが証明され、ドラッグデリバリーシステム(DDS)への応用の可能性が示唆された。そこで、抗原提示細胞上に特異的に発現する糖鎖認識タンパクであるパターン認識受容体dectin-1に注目した。dectin-1は、多糖の1つである1-3グルカンを認識することが知られている。そこで、1-3グルカンであるSPGの3重らせん構造を1本の鎖を核酸によって置換した複合体を作製して、破骨細胞に特異的に遺伝子を導入する新しい選択的デリバリーシステムを構築することが極めて有効であると考えて、今回の研究に至った。

2. 研究の目的

今回、破骨細胞前駆細胞において、恒常的

に発現している糖鎖認識タンパクdectin-1に注目し、dectin-1と特異的な結合能を有するシゾフィラン(SPГ)の一部を核酸と置換した複合体を用いて、破骨細胞に選択的なDDSを構築することを目的としている。

3. 研究の方法

(1)SPGによる破骨細胞に対するDDSの構築

SPG複合体形成

破骨細胞分化抑制に関するノックダウンの候補分子として、TNF受容体ファミリーのシグナル分子であるTNF receptor associated factor 6 (TRAF6)を選択した。データベースを参考に3種のTRAF6siRNAを合成し、発現抑制が最も顕著であった配列をSPGとの複合体形成に使用した。

細胞培養

*in vitro*における破骨細胞分化誘導系として、破骨細胞前駆細胞株であるRAW264.7細胞(RAW)とマウス骨髄細胞を使用した。RAW細胞については、dectin-1過剰発現株を樹立し(d-RAW)併せて研究に用いた。

同培養系に対し、SPG-TRAF6si複合体を添加し、破骨細胞分化誘導因子(RANKL)およびマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)存在下に培養を行った。培養後の細胞よりサンプルを回収し、生化学的分析に用いた。

生化学的分析

a. Real-time RT-PCR分析

培養後の細胞より、mRNAを回収し、TRAF6遺伝子レベルの発現を定量した。

b. 酒石酸耐性酸ホスファターゼ染色

培養後の細胞を破骨細胞の代表的マーカーである酒石酸耐性酸ホスファターゼ(TRAP)染色キットを用いて染色し、TRAP陽性多核細胞を破骨細胞として計測した。

(2)curdlanによる破骨細胞分化抑制

細胞培養

上述のRAW264.7細胞とマウス骨髄細胞を用いた破骨細胞分化誘導系に対して、dectin-1のリガンドであるcurdlanを添加して、培養を行った。培養後の細胞より、サンプルを回収し、生化学的分析に用いた。

生化学的分析

a. 酒石酸耐性酸ホスファターゼ染色

上述と同様、培養後の細胞にTRAP染色を行い、破骨細胞数の計測を行った。

b. 骨吸収活性分析

の培養をリン酸カルシウムプレート上で行った。培養後、細胞を除去し、形成された骨吸収窩数を光学顕微鏡下に観察、計測した。

c. アクチンリング染色

培養後の細胞に対し、ファロイジン染色を行い、活性化破骨細胞が骨吸収時に形成するアクチンリングを観察した。

d. Real-time RT-PCR分析

培養後の細胞より、mRNA を回収し、破骨細胞分化マーカーの遺伝子レベルの発現を定量した。

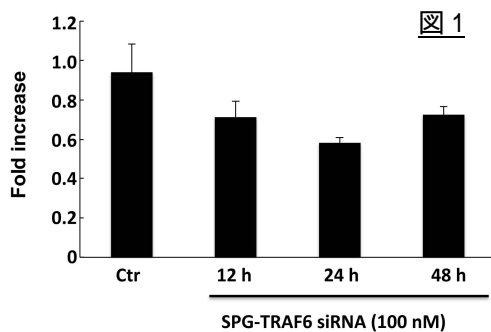
e. Western blotting 分析

培養後の細胞より、タンパクを抽出し、破骨細胞分化への関与が報告されている細胞内分子の発現および活性化について評価を行った。

4. 研究成果

(1) SPG による破骨細胞に対する DDS の構築
SPG-TRAF6siRNA 複合体による TRAF6 の遺伝子発現抑制

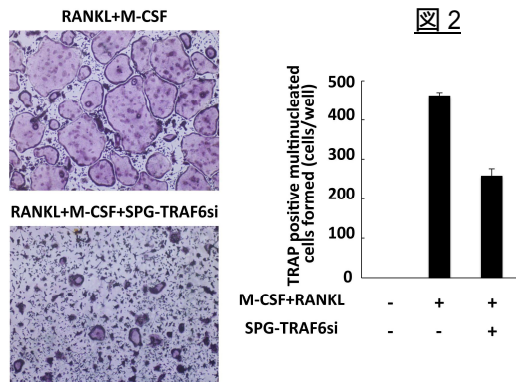
d-RAW 細胞に対し、SPG-TRAF6siRNA 複合体を添加したところ、複合体添加後 24 時間で、45.1%の TRAF6 遺伝子の発現抑制が観察された (図 1)。



SPG-TRAF6siRNA 複合体による破骨細胞分化抑制

d-RAW を RANKL 存在下に SPG-TRAF6siRNA 複合体を添加して 7 日間培養し、TRAP 染色を行ったところ、RANKL に誘導される破骨細胞形成は SPG-TRAF6siRNA 複合体の添加により、抑制された (data not shown)。

一方、マウス骨髄細胞においても、RANKL および M-CSF 存在下に誘導される破骨細胞形成は、SPG-TRAF6siRNA 複合体の添加により、有意に抑制された (図 2)。

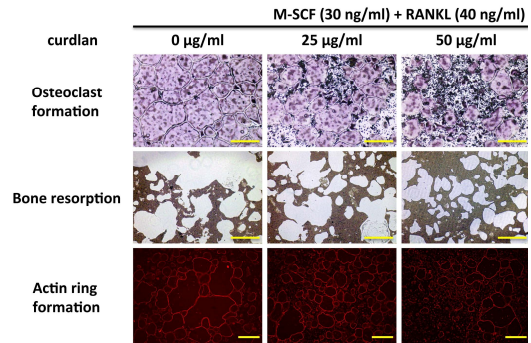


以上の結果から、SPG-核酸複合体は、破骨細胞に対する選択性の高い DDS として有用であることが示唆された。

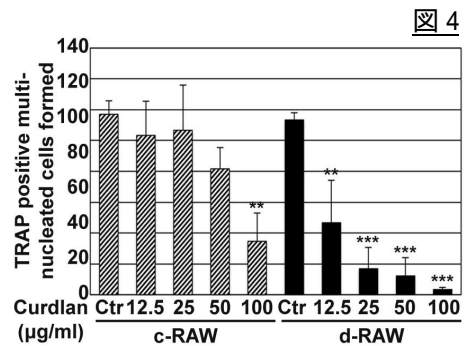
(2) curdlan による破骨細胞分化抑制

curdlan による破骨細胞分化および骨吸収活性の抑制

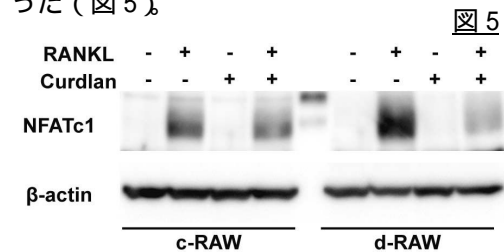
マウス骨髄細胞に対して、curdlan を添加して、培養を行ったところ、M-CSF および RANKL に誘導される破骨細胞形成 (図 3 上段)、骨吸収窩形成 (図 3 中段)、破骨細胞成熟化を示すアクチンリング形成 (図 3 下段) のいずれも濃度依存的に抑制された。 [図 3]



RAW 細胞についても、RANKL に誘導される破骨細胞形成は、curdlan の添加により、抑制された。この抑制能は control vector 導入株 (c-RAW) と比較して、dectin-1 過剰発現株 (d-RAW) において、特に顕著であり (図 4)、curdlan の破骨細胞分化抑制が dectin-1 を介して、惹起されていることが示唆された。



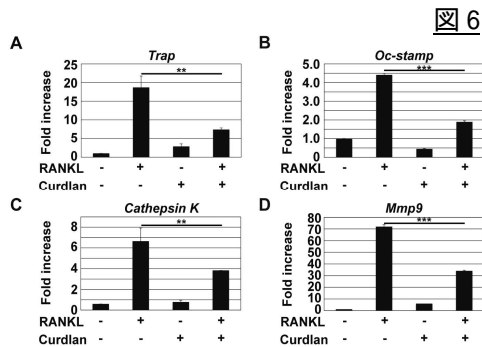
curdlan による転写因子 NFATc1 の発現抑制 NFATc1 は、破骨細胞分化の過程で必須の転写因子であることが明らかにされている。Western blotting 分析の結果、RAW 細胞において、RANKL による NFATc1 タンパクの発現誘導は、curdlan の添加により、抑制された。この抑制能は、破骨細胞分化と同様、c-RAW と比較して、d-RAW において、特に顕著であった (図 5)。



NFATc1 は破骨細胞の分化過程で起こるダイナミックな形態変化や骨吸収能に関与する遺伝子の発現を誘導することが報告されている。NFATc1 に誘導される破骨細胞分化マーカーとして、TRAP (図 6A)、OC-STAMP (図

6B) cathepsin K (図 6C) MMP9 (図 6D) の遺伝子発現レベルについて Real-time RT-PCR 法を用いて解析した。d-RAW において、RANKL による破骨細胞分化マーカーの発現誘導はいずれも curdlan の添加により、有意に抑制された。

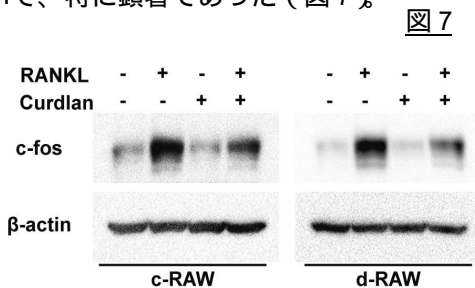
このことから、curdlan-dectin-1 シグナリングは、RANKL による NFATc1 の発現誘導を抑制することにより、破骨細胞分化を負に制御することが明らかとなった。



curdlan による転写因子 AP-1 シグナリングの抑制

RANKL が破骨細胞前駆細胞上の受容体 RANK を介して伝達された破骨細胞分化シグナルは、さまざまな経路を伝達し、転写因子 AP-1 の発現を誘導することが知られている。AP-1 は 2 量体の転写因子で、典型的なものは Fos タンパクと Jun タンパクなどから構成されるヘテロダイマーである。また、標的遺伝子の探索により、NFATc1 が c-Fos 依存的に破骨細胞で発現されることも報告されている。

Western blotting 解析の結果、RAW 細胞において、RANKL による c-Fos タンパクの発現誘導は、curdlan の添加により、抑制された。この抑制能は、c-RAW と比較して d-RAW において、特に顕著であった (図 7)。



一方、AP-1 と同様に、RANKL により誘導され、NFATc1 の発現制御に参与する転写因子 NF- B については、curdlan による活性化の抑制は観察されなかった (data not shown)。以上の結果から、curdlan は AP-1 の活性化の抑制を介して、RANKL による NFATc1 の発現誘導を抑制することが示唆された。

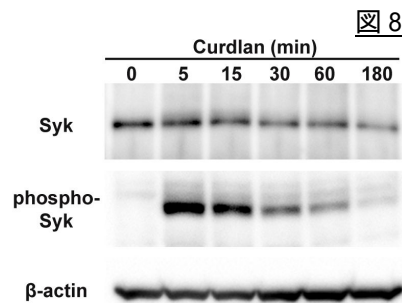
curdlan による Syk タンパクの分解

NFATc1 の活性化には、AP-1 や NF- B といった転写因子を介したシグナル経路に加えて、ITAM 配列を有する FCR や DAP12 などの

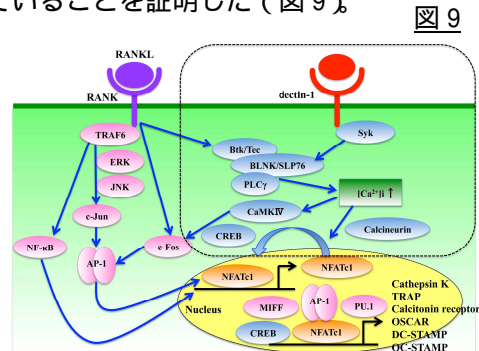
免疫受容体を介したシグナル伝達系が重要であることも明らかとされている。

RANKL により、これらの免疫受容体の ITAM モチーフはリン酸化され、非受容体型チロシンキナーゼである Syk がリクルートされる。Syk が、細胞内 Ca シグナルを誘導する結果、NFATc1 が活性化され、破骨細胞の分化が促進する。

d-RAW に curdlan を添加したところ、Syk タンパクの発現レベルの著明な低下が時間依存的に観察された (図 8)。この curdlan による Syk タンパクの負の制御は、遺伝子の発現抑制によるものではなく、タンパク分解機構が関与していることが推測された。この分解機構については、現在検討中である。



今回の研究で、curdlan は破骨細胞前駆細胞上に発現する dectin-1 を介して、破骨細胞の分化および骨吸収活性を負に制御することを見出した。さらに、抑制メカニズムとして非受容体型チロシンキナーゼである Syk のタンパク発現抑制を介した破骨細胞分化のマスター因子 NFATc1 の負の制御が関与していることを証明した (図 9)。



本研究で得られた知見は、骨代謝疾患に対する新たな治療戦略確立に向けての展開に寄与するものと考えられる。

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 13 件)

Ichimiya H, Takahashi T, Ariyoshi W, Okinaga T, Nishihara T, Compressive force induces prostaglandin E2 production via cyclooxygenase-2 in synovial cell, Journal of Oral and

Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology, 査読有, 2012, 24 (2): 115-118.
<http://www.journals.elsevier.com/journal-of-oral-and-maxillofacial-surgery-medicine-and-pathology>
Mitsugi S, Ariyoshi W, Okinaga T, Kaneuji T, Kataoka Y, Takahashi T, Nishihara T, Mechanisms involved in inhibition of chondrogenesis by activin-A, Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有, 2012, 420 (2): 380-384.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.03.003
Okinaga T, Ariyoshi W, Akifusa S, Nishihara T, Essential role of JAK/STAT pathway in the induction of cell cycle arrest in macrophages infected with periodontopathic bacterium *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Medical microbiology and Immunology, 査読有, 2013, 202 (2): 167-174.
DOI: 10.1007/s00430-012-0282-x
Morishita M, Ariyoshi W, Okinaga T, Usui M, Nakashima K, Nishihara T, A. *actinomycetemcomitans* LPS enhances foam cell formation induced by LDL, Journal of Dental Research, 査読有, 2013, 92 (3): 241-246.
DOI: 10.1177/0022034512473309
Nogami S, Takahashi T, Ariyoshi W, Yoshiga D, Morimoto Y, Yamauchi K, Increased levels of interleukin-6 in synovial lavage fluid from patients with mandibular condyle fractures: correlation with magnetic resonance evidence of joint effusion, Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 査読有, 2013, 71 (6): 1050-1058.
DOI: 10.1016/j.joms.2013.01.021.
Kataoka Y, Ariyoshi W, Okinaga T, Kaneuji T, Mitsugi S, Takahashi T, Nishihara T, Mechanisms involved in suppression of ADAMTS4 expression in synoviocytes by high molecular weight hyaluronic acid, Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有, 2013, 432 (4): 580-585.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.02.043
Fujii S, Okinaga T, Ariyoshi W, Takahashi O, Iwanaga K, Nishino N, Tominaga K, Nishihara T, Mechanisms of G1 cell cycle arrest and apoptosis in myeloma cells induced by hybrid-compound histone deacetylase inhibitor, Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有, 2013, 434 (3): 413-420.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.03.043
Ariyoshi W, Okinaga T, Knudson C,

Knudson W, Nishihara T, High Molecular Weights Hyaluronic Acid Regulates Osteoclast Formation by Inhibiting Receptor Activator of NF- κ B Ligand through Rho Kinase, Osteoarthritis Cartilage, 査読有, 2014, 22 (1): 111-120.

DOI: 10.1016/j.joca.2013.10.013

Morishita M, Saeki R, Okinaga T, Ariyoshi W, Okahashi N, Usui M, Nakashima K, Nishihara T, New system for detection of oral bacterial adhesion to macrophages *in vitro*, Journal of Scientific Research, 査読有, 2014, 2 (7): 82-6.

<http://www.banglajol.info/index.php/JSR>

Obara S, Akifusa S, Ariyoshi W, Okinaga T, Usui M, Nakashima K, Nishihara T, Pyroglutamated apelin-13 inhibits lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines in murine macrophage J774.1 cells, Modern Research in Inflammation, 査読有, 2014, 3 (2): 59-66.

<http://www.scirp.org/journal/mri/>

Saito N, Ariyoshi W, Okinaga T, Kamegawa M, Matsukizono M, Akebiyama Y, Kitamura C, Nishihara T, Inhibitory effects of ameloblastin on epithelial cell proliferation, Archives of Oral Biology, 査読有, 2014, 59 (8): 835-840.

DOI: 10.1016/j.archoralbio

Yamasaki T, Ariyoshi W, Okinaga T, Adachi Y, Hosokawa R, Mochizuki S, Sakurai K, Nishihara T, Dectin-1 Agonist, Curdlan, Regulates Osteoclastogenesis by Inhibiting Nuclear Factor of Activated T-cells Cytoplasmic 1 through Syk Kinase, The Journal of Biological Chemistry, 査読有, 2014, 289 (27): 19191-19203.

DOI: 10.1074/jbc.M114.551416

Kuramitsu-Fujimoto S, Ariyoshi W, Saito N, Okinaga T, Kamo M, Ishisaki A, Takata T, Yamaguchi K, Nishihara T, Novel biological activity of ameloblastin in enamel matrix derivative, Journal of Applied Oral Science, 査読有, 2015, 23 (1): 49-55.

DOI: 10.1590/1678-775720140291

〔学会発表〕(計 14 件)

片岡良浩、有吉 渉、西原達次：マクロファージ及び滑膜細胞におけるプロテアーゼ産生に及ぼすヒアルロン酸の影響、第33回日本炎症・再生医学会、福岡市、2012年7月5日-6日

有吉 渉、沖永敏則、西原達次：破骨細胞

支持能に対する高分子量のヒアルロン酸の抑制効果について、第54回歯科基礎医学会学術大会、郡山市、2012年9月14日-16日

山崎 徹、有吉 渉、沖永敏則、細川隆司、西原達次：破骨細胞分化におけるDectin-1の作用について、第54回歯科基礎医学会学術大会、郡山市、2012年9月14日-16日

Kataoka Y, Ariyoshi W, Okinaga T, Kaneuji T, Takahashi T, Nishihara T: High-Molecular-Weight Hyaluronic Acid down-regulates the expression of ADAMTS4 in synoviocytes. 91th General Session & Exhibition of the IADR, Seattle, United States, March 20-23, 2013.

Yamasaki T, Ariyoshi W, Okinaga T, Hosokawa R, Nishihara T: Effect of Dectin-1 signaling on osteoclastogenesis. 91th General Session & Exhibition of the IADR, Seattle, United States, March 20-23, 2013.

Kataoka Y, Ariyoshi W, Okinaga T, Nishihara T: High molecular weight hyaluronan down-regulates the expression of ADAMTS4 via p38 MAPK signaling pathway in human synoviocytes. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research, Kobe, Japan, May 28-June 1, 2013.

Yamasaki T, Ariyoshi W, Okinaga T, Hosokawa R, Nishihara T: Curdlan regulates osteoclastic differentiation and function. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research, Kobe, Japan, May 28-June 1, 2013.

Ariyoshi W, Okinaga T, Nishihara T: Inhibitory Effect of Hyaluronic Acid on Osteoclastogenesis via Rho Kinase. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research, Kobe, Japan, May 28-June 1, 2013.

Ariyoshi W, Okinaga T, Knudson CB, Knudson W, Nishihara T: High molecular weights Hyaluronic Acid Regulates Osteoclastogenesis. Hyaluronan 2013, Oklahoma, United States, June 2-7, 2013.

山崎 徹、有吉 渉、正木千尋、中本哲自、西原達次、細川隆司：CurdlanはDectin-1を介して破骨細胞形成を抑制する□、公益社団法人日本補綴歯科学会設立80周年記念第122回学術大会、福岡市、2013年5月17日-19日

山崎 徹、有吉 渉、沖永敏則、細川隆司、西原達次：Curdlan-dectin-1を介した新たな破骨細胞分化の制御機構、第55回歯科基礎医学会学術大会、岡山市、2013年9月20日-22日

清宮弘康、有吉 渉、西原達次：三次元培養骨芽細胞にメカニカルストレスを加えることにより分泌されるIL-33を介した破骨細胞分化抑制メカニズム、第32回日本骨代謝学会学術集会、大阪市、2014年7月24日-26日

有吉 渉、沖永敏則、西原達次：Sykの分解を介した1-3グルカンによる破骨細胞分化制御機構、第56回歯科基礎医学会学術大会、福岡市、2014年9月25日-27日

Sakurai T, Ariyoshi W, Okinaga T, Nishihara T: Interleukin-17 Induces Expression of MMP-3 via MAPKs Pathway on Synoviocytes. IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition, Boston, United States, March 11-14, 2015.

〔図書〕(計 1 件)

有吉 渉、西原達次、ヒョーロン・パブリッシャーズ、日本歯科評論 文献と臨床の橋わたし 歯周炎におけるマクロファージの機能の多様性、2012、2-4

〔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

http://www.kyu-dent.ac.jp/research/lecture/infection_molecule

6. 研究組織

(1)研究代表者

有吉 渉 (ARIYOSHI, Wataru)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：40405551

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし