

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670787

研究課題名(和文) TNF2型受容体アゴニストによる新規骨吸収抑制薬の創生

研究課題名(英文) New bone resorption inhibitor based on agonistic function for TNF type 2 receptor

研究代表者

大谷 啓一(OHYA, Keiichi)

東京医科歯科大学・歯学部・名誉教授

研究者番号：10126211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病の原因因子の一つであるTNF(腫瘍壊死因子)は炎症性骨吸収のメディエーターである。2つある受容体のうち、TNF2型受容体は破骨細胞の骨吸収を負に制御している。そこで本受容体へのアゴニスト候補物質を探索し、炎症性骨吸収抑制を主作用とする歯周病治療薬の開発を計画した。TNF2型受容体へのアゴニストを用いて、マウス骨髄細胞培養による破骨細胞作成系を用いてアゴニストの効果を検討したが、有意に破骨細胞形成を抑制する効果を認めることができなかった。さらにマウス頭蓋骨皮下にTNFを投与して骨吸収窩を形成させた。この系にTNF2型受容体へのアゴニストを投与しても骨吸収窩の形成抑制は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：TNF (tumor necrosis factor) is one of regulatory protein for the periodontal diseases and also be a mediator for the inflammatory bone destruction. Within two distinct TNF receptors, TNF receptor 2 (TNFR2) is known to reduce the differentiation of osteoclasts. In order to develop and find new therapeutic candidates for periodontal diseases, we attempted to find agonists for TNFR2 and to test them for reducing the inflammatory bone resorption. The agonist for TNFR2 was evaluated for its inhibitory effect on osteoclast formation in the bone marrow cells culture system, but its effect was not remarkable and showed no significance. In addition, the agonist for TNFR2 failed to show its inhibitory effect on the number of bone resorption pits induced by the subcutaneous TNF-injection in mouse calvaria.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：骨吸収 TNF TNF2型受容体 炎症 歯周病 骨粗鬆症 リウマチ ナノゲル

1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯周病原細菌による感染が原因である。その結果、歯周組織に炎症反応と破壊が生じ、顎骨では骨の吸収が起こり歯を喪失する。歯の喪失は咀嚼機能の減退を招いて食事の質が低下する。その結果、健康の破綻を来して、QOL の低下を招く。特に中・高齢者における歯周病による歯の喪失は、健康を損ない、寿命にも影響すると思われる。歯周病を防ぐには、歯面の機械的清掃や抗菌薬投与などによる病原菌の除去とともに、歯周組織における炎症病変とそれにより起こる骨吸収(炎症性骨吸収)を治療・予防できる薬物療法の開発が急務である。

これまで開発されてきた多くの骨疾患治療薬は骨粗鬆症などの代謝性骨疾患の治療を目的としており、作用発現までの時間が遅く、一方で作用持続時間が長いこともあり、炎症性骨吸収が起こる歯周病などへの治療薬にはなりにくい。歯周病治療薬は作用発現までの時間が早く、持続時間が適度であり、効果消失が早いなどオン、オフがはっきりした薬が望ましい。

近年、炎症性骨吸収のメカニズム解明が進み、炎症性メディエーターである TNF(腫瘍壊死因子)を介して、免疫担当細胞や炎症性細胞が破骨細胞をリクルートし、活性化する機構が明らかになった。我々は2つ存在する TNF 受容体の中で TNF2型受容体に着目し研究を行ってきた。その中で、TNF2型受容体欠損マウスにおいて LPS 投与による骨吸収が増大することを見出した(Mian MD et al, JBMM, 26:469-477, 2008)。これまで TNF による骨吸収促進作用には 1 型受容体が重要であることが知られていたが、2 型受容体の機能に関しては Abu-Amer (J Biol Chem 275:27307-10, 2000)らが *in vitro* の系にて骨吸収に抑制的に作用していることを示した以外、詳細は不明であった。我々の遺伝子改変マウスにおける実験結果は TNF2型受容体が骨吸収に抑制的に作用していることを *in vivo* にて初めて示したものであった。TNF2型受容体は 1 型受容体による骨吸収機構のフィードバックとして成立している可能性が考えられた。

さらに LPS 刺激ではなく、ナノゲルと TNF を用いたマウス頭蓋骨吸収実験系を用いて詳細に検討したところ、TNF2型受容体への刺激は破骨細胞数の減少を起こすことを確認し、この受容体が骨吸収機構に抑制的な作用を有することを明らかにした(Nagano K et al, J Bone Min Metab, 29:671-678, 2011)。

以上の研究成果により、TNF2型受容体の骨吸収機構における抑制的な役割が明らかとなった。そこで TNF2 型受容体を刺激する新規アゴニストの探索が、新しい骨吸収抑制薬発見の契機となりうる可能性が考えられた。新規アゴニストの効果が骨吸収活性を抑制するならば、歯周病のような炎症が原因となる病態への治療薬候補になるものと思われた。

2. 研究の目的

本研究では新規の薬物創薬ターゲットとして TNF2 型受容体を想定して検討を行うこととした。TNF1 型・2 型受容体は細胞内ドメインにおける

death domain の有無と、情報伝達下流に位置する NF- κ B 核移行などのプロセスに違いがある。さらに両受容体の情報伝達下流においてクロストークなどの相互作用があり、細胞における TNF 作用の調整を行っていると考えられる。

これまでの研究によると、TNF 1 型受容体欠損マウスでは骨吸収が明らかに抑制されることから、TNF の破骨細胞活性への促進的作用は主に 1 型受容体を介していると考えられる。一方、我々の研究によると、TNF2型受容体欠損マウスにおける LPS 刺激による炎症性骨吸収の増大(Mian 論文)は、TNF2型受容体が1型受容体の骨吸収促進効果をネガティブに制御しフィードバックをかけていることによると推察した。つまり1型と2型受容体の相反する作用により TNF による骨吸収が制御されている可能性が予想された。従って、2 型受容体のアゴニスト候補物質は、破骨細胞における骨吸収シグナルを抑制することにより炎症に伴う骨吸収を抑制すると予想された。

本研究は炎症性骨吸収への薬物治療開発を目指して、TNF2型受容体という新規創薬目標を設定し、骨吸収抑制作用を示す新たな候補薬物を探索するものである。その研究の一環として、得られた小分子量の TNF2型受容体アゴニストが、新規骨吸収抑制薬として応用が可能かどうか明らかにすることを研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) TNF2型受容体へのアゴニスト

大阪大学研究協力者がファージを用いたアフィニティーパンニング法によりスクリーニングして得られた小分子量の TNF2型受容体アゴニストを用いた。

(2) *In vitro* での破骨細胞様細胞形成系における実験

マウス骨髄細胞培養系

骨髄細胞を 7 週齢雄性 C57BL/6J マウスより採取し、48-well plate に播種した (6×10^5 /well)、M-CSF (10 ng/ml) を添加し破骨前駆細胞形成を誘導(24 時間)した。更に M-CSF (10 ng/ml)、RANKL (5 ng/ml) あるいは mouse TNF-(mTNF) (10 ng/ml) を添加し破骨細胞形成を誘導(48 時間)した。この際、TNF2型受容体アゴニストを添加し、破骨細胞形成が抑制されるかどうか検討した。48 時間の形成誘導の後、細胞をホルマリン固定した。細胞は脱水後、TRAP(酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ)染色を行い、破骨細胞を観察した。

マウス骨髄細胞と骨芽細胞の共培養系

マウス頭蓋骨より骨芽細胞様細胞を得て 24-well plate に播種し (6×10^4 /well)、MEM 培地にて 24 時間培養した。骨髄細胞を 7 週齢雄性 C57BL/6J マウスより採取し播種 (6×10^5 /well) した。Vitamin D₃ (10^{-8} M)、または Oncostatin M (5 ng/ml) を添加し、破骨細胞形成を誘導した。この際、TNF2型受容体アゴニストを添加した。Vitamin D₃ 投与群は 96 時間、Oncostatin M 投与群は 168 時間培養した。細胞をホルマリン固定、脱水後、TRAP 染色を行い、破骨細胞を観察した。

(2) *In vivo* マウス実験 (マウス頭蓋骨骨吸収モデル)

5 週齢雄性の C57BL/6J マウス頭蓋骨皮下に Human TNF- α (hTNF) を 1 日 1 回 4 日間投与した (0.1 mg/kg). 投与の際, cholestrol-bearing pullulan(CHP) ナノゲルを担体として用いた.

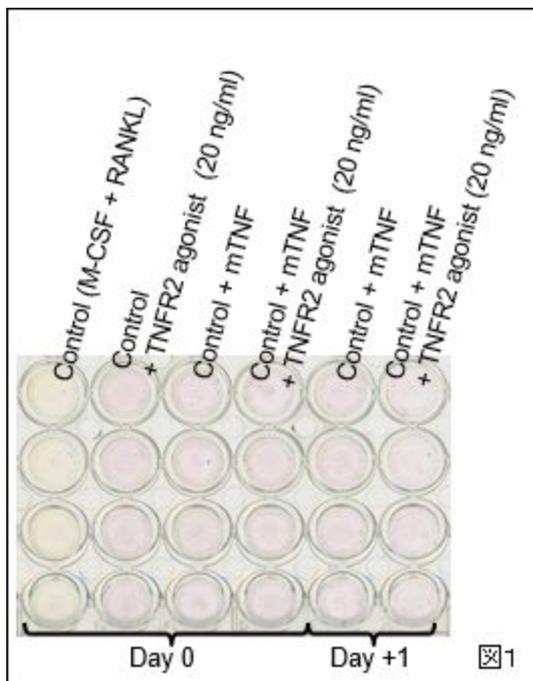
実験群には hTNF の投与後, CHP ナノゲルあるいはラズベリー型 CHP ナノゲルを担体として, 頭蓋骨皮下に TNF2 型受容体アゴニストを投与し, アゴニスト投与により骨吸収窩形成が抑制されるかどうか検討した.

アゴニスト最終投与より 24 時間経過後, マウスを屠殺し頭蓋骨を回収, グルタルアルデヒド-ホルマリン混合液による固定を行った. 頭蓋骨に出現する骨吸収窩を軟 X 線写真により確認し, DEXA により骨密度 (BMD) を測定した.

4. 研究成果

(1) マウス骨髄細胞培養系を用いた研究

RANKL および mTNF により破骨細胞形成 (TRAP 染色で赤く見える) を誘導した. TNF2 型受容体アゴニスト (TNFR2 Agonist) を添加したが, 明らかな破骨細胞形成の抑制は認められなかった (図 1, day 0).



TNF の添加時期により破骨細胞形成誘導が増強されるという報告があり, TNF の添加を 1 日遅らせた実験も行った. (図 1, day 1) しかしながら破骨細胞形成は変化なく, アゴニスト添加による明らかな形成抑制は認められなかった.

TNF2 型受容体アゴニストの活性が TNF に対して 1/8 であるとの情報から, アゴニストの濃度を高くし, 同様の破骨細胞形成誘導培養実験を行った. TNF2 型受容体アゴニストを高濃度 (100 ~ 2000 ng/ml) で添加したが, 明らかな破骨細胞形成の抑制は確認できなかった (図 2).

(2) マウス骨髄細胞と骨芽細胞の共培養系にお

ける実験

Vitamin D₃ の添加により, 図 3 中の Control 群で示す通り, 破骨細胞形成が誘導された. ここへ図に示した濃度でアゴニストを添加した. しかしながら, 明らかな破骨細胞形成の抑制は認められなかった.

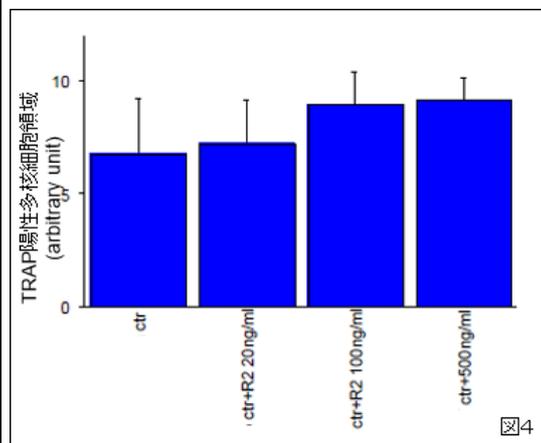
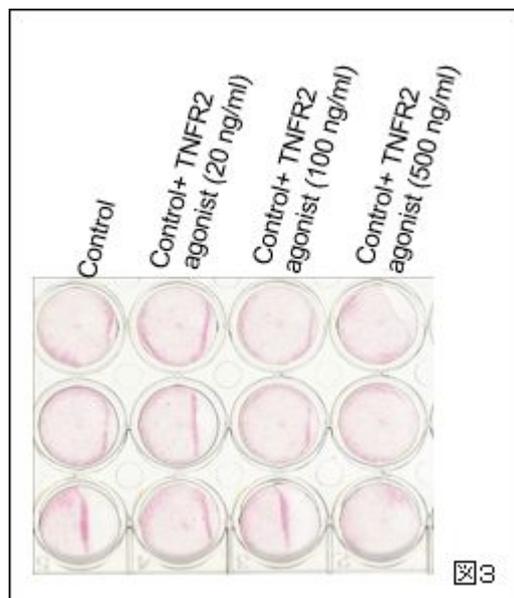
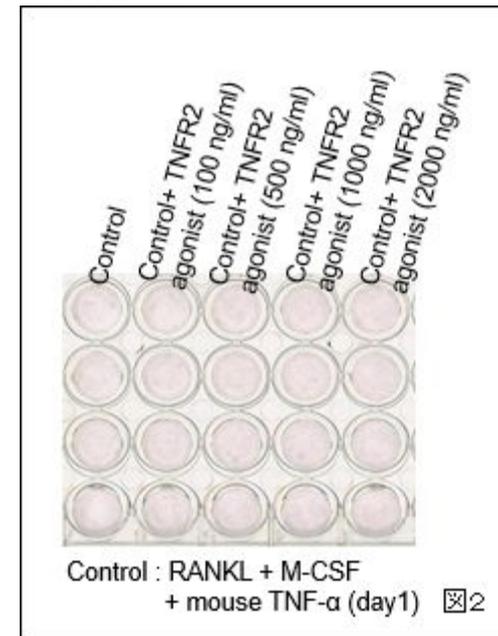


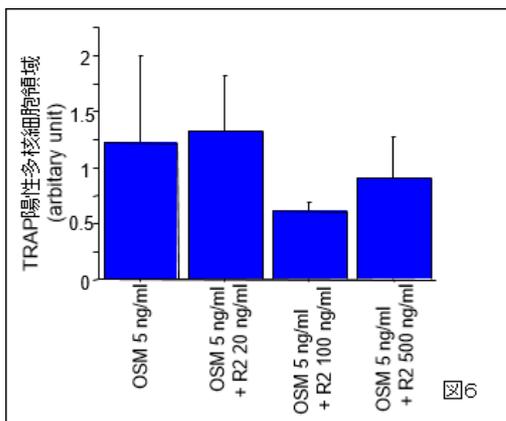
図4

さらに画像解析により、TRAP陽性を示す多核細胞(破骨細胞とみなされる)の領域を計測した。Vitamin D₃の添加により、TRAP陽性の多核細胞形成が誘導されたが、TNF2型受容体アゴニストの添加によるTRAP陽性多核細胞領域の減少は認められなかった(図4)。

Oncostatin M (OSM)の添加により、図5中のControl群で示す通り、破骨細胞形成が誘導された。ここへTNF2型受容体アゴニスト(TNFR2 Agonist)を図5で示した濃度で添加した。しかしながら、明らかな破骨細胞形成の抑制は認められなかった。



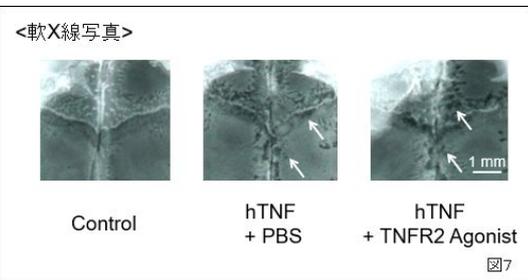
さらに画像解析により、TRAP陽性を示す多核細胞の領域を計測した。OSMの添加により、TRAP陽性の多核細胞形成が誘導された。ここへTNF2型受容体アゴニスト(TNFR2 Agonist)を添加した。アゴニストを100 ng/mlで添加すると、TRAP陽性多核細胞領域は減少傾向を示すものの、有意な差は認められなかった(図6)。



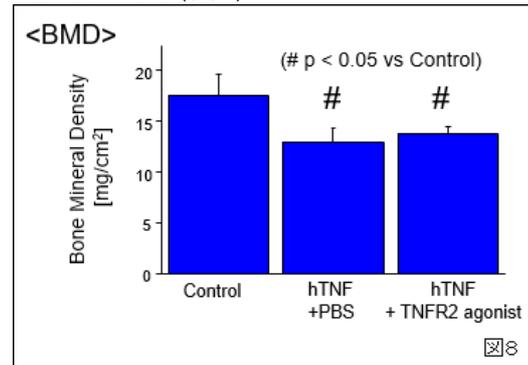
(3) マウス頭蓋骨骨吸収モデル

軟X線写真(図7)における観察では、hTNFの投与により、マウス頭蓋骨表面に骨吸収窩(白矢印)が形成された。同部位へCHPナノゲルによりTNF2型受容体アゴニスト(TNFR2 Agonist)を投与したが、骨吸収窩形成の抑制は明らかではなかった。

DEXAを用いて骨密度(BMD)の計測を行った。hTNFの投与により、マウス頭蓋骨骨密度BMD

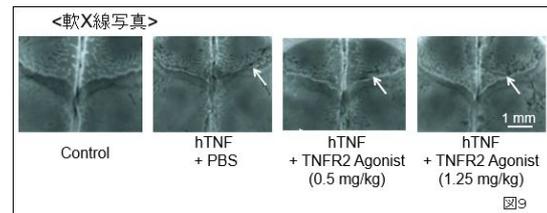


は有意に低下した。しかし、TNFR2 Agonistを同部位に投与したが、骨密度減少の抑制は認められなかった(図8)。

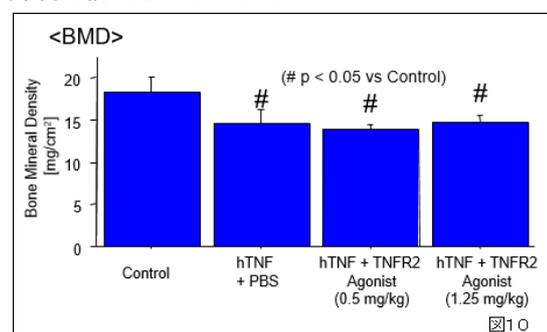


上記実験のCHPナノゲルによるTNF2型受容体アゴニストの効果が明確ではなかったため、CHPナノゲルをPEG架橋して薬物保持性と徐放性を高めたラズベリー型CHPナノゲルを用いた検討を行った。

軟X線写真における観察では、hTNFの投与により、マウス頭蓋骨表面に骨吸収窩(白矢印)が形成された(図9)。ラズベリー型CHPナノゲルを用いてTNF2型受容体アゴニスト(TNFR2 Agonist)を高い濃度で投与したが、明らかな骨吸収窩形成の抑制は認められなかった。



DEXAを用いたBMDの測定結果では、hTNFの投与により、マウス頭蓋骨骨密度(BMD)は有意に低下した(図10)。ラズベリー型CHPナノゲルによりTNF2型受容体アゴニスト(TNFR2 Agonist)を同部位に投与したが、骨密度減少の抑制は認められなかった。



(4) 研究結果の考察

我々はこれまでの研究において、破骨細胞形成・機能発現過程における TNF あるいは RANKL(receptor activator of nuclear factor kappa B ligand)の受容体結合への拮抗薬開発を行い有望な成果を上げてきた。これらの薬物は NF- κ B(nuclear factor kappa B)の核移行を抑制し転写活性を抑えることで破骨細胞の形成・機能発現を抑制した(表)。

	W9 ペプチド(WP9QY)	CIAM 化合物	AVE1627
種類	TNF 受容体拮抗薬	TNF 受容体拮抗薬	Ikk- 阻害薬
メカニズム	TNF 受容体 /TNF、RANK/RANKL 相互作用抑制	TNFR1, RANK の構造変化(予想)	Ikk- のリン酸化反応を抑制
効果	・骨吸収抑制 ・抗炎症作用 ・骨形成促進(予想)	・骨吸収抑制 ・抗炎症作用(予想) ・骨形成促進(予想)	・骨吸収抑制(予想) ・抗炎症作用(予想) ・骨形成促進

特に W9 ペプチドは TNF と TNF 受容体の結合を阻害する環状ペプチドとして創生された。その後の研究により W9 ペプチドは TNF スーパーファミリーをなす RANKL と受容体 RANK への結合も抑制することが明らかとなり、その結果、破骨細胞の増殖・分化・吸収活性への阻害と骨吸収抑制効果が認められた。抗炎症作用に関しても *in vivo* においてコラーゲン誘導関節炎の炎症スコアを下げることで示された。TNF 作用を修飾する本ペプチドは小分子量であり、抗原抗体反応なども起きにくいことが予想され、また製造単価も低額である。しかし、生体内半減期が短く、安定性に問題があるため、デリバリーの工夫や構造変化などの試みがされている。

TNF スーパーファミリーは破骨細胞の分化・増殖に必須の RANK/RANKL 相互作用を包含している。特に RANK/RANKL を標的とした薬物開発が行われ、代謝性骨疾患治療薬の新規治療薬が上市されている。歯周病に起こる炎症性病態は TNF や RANK/RANKL が関与しており、これら病態改善に必要な治療薬の創薬標的として TNF 2 型受容体は合理性があると思われる。

TNF 受容体は 1 型と 2 型が存在しており、それぞれ別の機能をしている可能性とともに、情報伝達下流でのクロストークによる相互作用により TNF の機能が調整されていると考えられている。1 型糖尿病や自己免疫疾患では TNF の 2 つの受容体のバランスが破綻していると考えられており、TNF 2 型受容体へのアゴニスト様作用が治療に有効であるとして薬物開発が行われている (Fausutman DL and Davis M, TNF receptor 2 and diseases: autoimmunity and regenerative medicine. *Frontiers in Immunology*, 4: 478,

2013)。本研究で検討した TNF 2 型受容体へのアゴニスト様作用を骨吸収抑制薬の作用メカニズムとして活用する考えは極めてユニークな発想であり、全世界的にも唯一といってよい試みである。

TNF 2 型受容体へのアゴニスト様作用をもつ薬物候補はペプチド、抗体、小分子化合物があり、この中では抗体が最も活性が高いと考えられる。抗体医薬品は多くの薬物が開発されて応用されているが、高価な点や副作用もあり、歯周病治療薬として普及するには障害が多い。TNF 2 型受容体への抗体に関しても開発段階にあると思われる。

一方、小分子化合物は合成が容易であり、様々な工夫を行えるなど、実際に歯周病などに応用する際には利点が多いと思われる。今回用いた小分子化合物は TNF 2 型受容体に結合力を持つ化合物をスクリーニングして得られたものであるが、初期段階にあり、結合活性や化学構造などに改良する余地のあるものである。

最初に本化合物を *in vitro* の 2 つの破骨細胞形成実験系を用いてその効果を検証したが、顕著な作用は見いだせなかった。破骨細胞形成の刺激は TNF、RANK、Vitamin D₃、Oncostatin M など様々なものを使用したが、いずれの場合にも TNF 2 型受容体アゴニストの破骨細胞形成抑制作用を見出すことはできなかった。

さらに、マウス頭蓋骨骨吸収モデルを用いて、hTNF により誘導される骨吸収窩形成が TNF 2 型受容体アゴニストの投与により抑制されるかどうか検討した。骨吸収や骨形成を示す化合物などを検討するには、*in vitro* の実験系での検討が手軽であるが、候補薬物の効果を真に確認するには *in vivo* の検討が必須である。今回用いたナノゲルをキャリアーとした TNF 投与によるマウス頭蓋骨の骨吸収窩形成実験系は、比較的簡便な方法であり、軟 X 線写真を画像解析することにより、骨吸収活性を短時間で評価できるので有用である。

アゴニストを頭蓋骨に hTNF と同程度に投与したが、骨吸収窩形成の抑制を確認することはできなかった。さらに、アゴニストの活性が TNF の 1/8 であるという報告から、アゴニストを高濃度で投与したが効果は認められなかった。さらに徐放性の高い担体(ラズベリー型 CHP ナノゲル)に変更しアゴニストの効果を検討したが、骨吸収窩形成の抑制を確認することはできなかった。

上記のように今回用いたアゴニストはスクリーニング初期段階の小分子化合物でありその活性も低いことが予想された。したがって本研究の成果は、本アゴニストを骨吸収阻害薬の候補とすることには否定的なものであるが、実施された研究手法と方向は正しいものであり、次の研究につながる重要なものである。自己免疫疾患治療などの分野においては TNF 2 型受容体を標的とする薬物開発は注目される創薬戦略である。歯周病のような炎症反応と歯槽骨吸収を病態とする疾患への薬物開発として TNF 2 型受容体を創薬標的として想定することは有望な戦略と思われる。さらなる研究の発展が望まれる。

今後、スクリーニングして得られる TNF2型受容体アゴニストの活性を高め、化学構造の変化による安定性の増強、生体内での薬物徐放などの工夫を行うことにより、より効果の高い化合物が得られれば、歯周病の治療薬候補として有望なものが見つかるかと期待できる。

なお当初の研究計画では骨組織における TNF1型受容体と2型受容体の情報伝達経路下流の違いを明らかにする予定であったが、研究手段の不足により行うことができなかった。

(5)おわりに

本研究において、歯周病などの炎症性骨吸収が生じる疾患の薬物療法に用いる候補薬物として、小分子量 TNF2型受容体アゴニストの検討を行った。その中で今回得られた候補分子を *in vitro*, *in vivo* にて検討したが、その効果を確認することはできなかった。今後さらに活性が高く、生体内安定性に優れ、有害作用が少ない候補物質が得られれば、骨吸収阻害薬の候補として歯周病の治療に用いられることも夢ではないと思われる。

(6)謝辞

本研究を行うにあたって堤 康央 (TUTUMI Yasuo) 大阪大学・薬学部・教授より TNF2型受容体アゴニストを提供頂いた。また研究実施にあたり、大学院生であった永野健一、加藤玄樹、菅森泰隆、佐藤俊三氏らに協力いただいた。各位に深甚なる謝意を表する。

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 3 件)

1. Sato T, Alles N, Khan M, Nagano K, Takahashi M, Tamura Y, Shimoda A, Ohya K, Akiyoshi K, Aoki K : Nanogel-crosslinked nanoparticles increase the inhibitory effects of W9 synthetic peptide on bone loss in a murine bone resorption model. International Journal of Nanomedicine 2015;10 3459-3473, doi: /10.2147/IJN.S61566, 査読あり
2. Aoki K, Maeda M, Nakae T, Okada Y, Ohya K, Chiba K: A disulfide bond replacement strategy enables the efficient design of artificial therapeutic peptides. Tetrahedron. doi:10.1016/j.tet.2014.05.079, 査読あり
3. Khan, M, Alles, N, Soysa, N, Mamun, A, Nagano, K, Mikami, R, Furuya, Y, Yasuda, H, Ohya, K, Aoki, K: The local administration of TNF- and RANKL antagonist peptide promotes BMP-2-induced bone formation. J Oral Biosciences. 2013; 55 47-54. doi:10.1016/j.job.2012.12.005, 査読あり

(学会発表) (計 5 件)

1. 佐藤俊三、田村幸彦、大谷啓一、青木和広. NanoClik ナノ粒子のペプチド徐放性の検討 NanoClik ナノ粒子が W9 の骨吸収抑制作用を助けるメカニズム . 第 35 回日本歯科薬物療法学会学術大会 2015 年 6 月 20.21 日 横浜市 鶴見大学
2. 青木和広、菅森泰隆、加藤玄樹、上原智己、新井祐貴、Md.Zahirul Haq Bhuyan、Neil Alles、Masud Khan、高橋真理子、田村幸彦、若林則幸、大谷啓一. RANKL 結合ペプチドの骨吸収抑制作用と骨形成促進作用. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2014 年 9 月 25-27 日 福岡 福岡国際会議場
3. 菅森泰隆、本間雅、加藤玄樹、田村幸彦、古屋優里子、保田尚孝、田畑泰彦、宇田川信之、大谷啓一、鈴木洋史、青木和広. RANKL 結合ペプチドはマウス頭蓋骨欠損モデルの骨新生を促進する. 第 32 回日本骨代謝学会学術集会、2014 年 7 月 24-26 日、大阪府 大阪国際会議場
4. 青木和広. 骨吸収疾患に対するペプチド製剤開発の可能性. 薬力学研究会学術講演会、2014 年 2 月 25 日、東京都 東京医科歯科大学
5. 青木和広. ペプチド薬の可能性-骨吸収抑制ペプチドの骨形成促進作用-. 日本薬学会第 134 年会(一般セッション: 次世代バイオ医薬開発に向けた創薬イノベーション). 2014 年 3 月 27-30 日. 熊本県 熊本大学

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/hpha/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大谷 啓一(OHYA Keiichi)

東京医科歯科大学・歯学部・名誉教授

研究者番号:10126211

(2)研究分担者

青木 和広 (AOKI Kazuhiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号:40272603

高橋 真理子(TAKAHASHI Mariko)

東京医科歯科大学・歯学部・技術職員

研究者番号:90334440