

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670656

研究課題名(和文)骨吸収抑制・骨形成促進バイファンクショナル高分子医薬の創製

研究課題名(英文)Development of a bifunctional, anti-resorptive and pro-osteogenic, compound

研究代表者

本間 雅 (Honma, Masashi)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：60401072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：RANKLは、成熟破骨細胞形成を刺激するシグナル入力因子として広く認識されているが、我々は、骨芽細胞に発現するRANKLは、破骨細胞成熟過程で放出される膜小胞エクソソームに組み込まれたRANKを受容し、骨形成促進活性を示すことを見出している。そこでこのRANK含有エクソソームをミミックする高分子化合物を創製することで、RANKL正方向シグナルを遮断すると同時に、RANKL逆シグナルを入力する化合物になると考え、検討を進めた。RANKL細胞外ドメインに結合するW9ペプチドのN末端に、ビオチン修飾を施した化合物は、未修飾のW9ペプチドと比較して、大幅に薬理活性が増大することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：RANKL is widely recognized as a signal input molecule to stimulate osteoclastogenesis, however; we have found that the osteoblastic RANKL acts as an osteogenic signal acceptor for RANK incorporated into osteoclastic exosomes. In the present study, we aimed to develop a polymeric compound which mimics the properties of osteoclastic exosomes which enable both the inhibition of RANKL forward signaling and the stimulation of RANKL reverse signaling. N-terminal biotinylation of W9 peptide, which has been shown to bind RANKL extracellular domain, resulted in the significant increase of pharmacological effect of W9 peptide.

研究分野：整形外科学

キーワード：シグナル伝達 骨代謝 ナノ材料

1. 研究開始当初の背景

RANKL は、骨芽細胞に発現するリガンド分子であり、生体における骨吸収レベルを最終的に決定する最も重要な因子である。近年、生理的な破骨細胞形成過程において RANKL の主な供給源となるのは骨細胞であることを示唆する結果が相次いで報告され (Nakashima et al. Nat Med 2011, Xiong et al. Nat Med 2011)、骨代謝回転全体像に対する理解が大きく変更された。研究代表者らも三次元培養骨細胞を用いた破骨細胞形成評価系を構築し、骨細胞樹状突起に局在する RANKL が、破骨前駆細胞へ直接接触することが効率的な破骨細胞形成に必要であることを明らかにした (Honma et al. JBMR 2013)。

一方研究代表者らがこれまで行ってきた解析から (Kariya et al. JBMR 2009, Aoki et al. JBMR 2010, Kariya et al. JBMR 2011)、骨芽細胞に発現する RANKL は細胞表面への発現量が厳密に調節されていることが明らかになっている。RANKL による破骨細胞形成制御において、中心的な役割を果たす骨細胞だけでなく、骨芽細胞においても RANKL の細胞内動態を精密に制御・調節する分子機構が存在していることから、骨芽細胞において RANKL が何らかの生理的に重要な機能を担っている可能性を想起させるが、上述のパラダイム転換を受けて、現状では骨芽細胞に発現する RANKL の生理的役割が不明瞭となっている。

研究代表者らはこの点に着目した分子論的研究を進めている最中であり、現在までに、A. 成熟破骨細胞は RANK 分子を含有するエクソソーム膜小胞を細胞外へ分泌し、B. この RANK 含有エクソソームを用いて骨芽細胞を刺激した場合、骨形成活性が大きく上昇すること、さらに、C. 骨芽細胞表面に局在する RANKL 分子が RANK 含有エクソソームの受容体として機能し、骨芽細胞内へシグナルを発生することが、骨形成活性上昇の主要因であること、などを見出している。

すなわち、この新規に見出された、骨芽細胞内 RANKL 逆シグナル経路は、破骨細胞に依る骨吸収フェーズから骨芽細胞による骨形成フェーズへのカップリングを媒介する機構の 1 つであると考えられる。また、RANK 含有エクソソームは、骨芽細胞表面に発現する RANKL 分子の細胞外ドメインと相互作用し、RANKL 分子を架橋してクラスターを形成させることで、Src family kinase (SFK) などの下流分子活性化を引き起こすことなども明らかになりつつある。

これら背景に基づき、成熟破骨細胞より放出される RANK 含有エクソソームの性質をミミックする分子を創出すれば、RANKL 分子を架橋して骨芽細胞内に骨形成シグナルを入力すると共に、骨細胞上の RANKL を被覆して破骨前駆細胞へのシグナル入力を遮

断することで破骨細胞の形成も抑制できると考え、本研究の立案に至った。

2. 研究の目的

現在臨床で用いられている抗 RANKL 抗体 デノスマブは、骨細胞に発現する RANKL 細胞外ドメインに結合して破骨前駆細胞へのシグナル入力を遮断することで破骨細胞形成を強力に抑制するが、同時に骨形成の低下を引き起こすことも知られている。研究代表者らがカップリング機構の 1 つとして見出した成熟破骨細胞より分泌される RANK 含有エクソソーム小胞から骨芽細胞上 RANKL へのシグナル伝達経路を治療標的として利用し、骨形成シグナルを骨芽細胞側に入力して骨芽細胞の成熟を刺激すると同時に、骨細胞による破骨前駆細胞へのシグナル入力も遮断して、成熟破骨細胞の形成を抑制するバイファンクショナルな高分子医薬品が創製できれば、従来の抗 RANKL 抗体と比較して有用性の高い医薬品候補化合物になる可能性が期待される。

本研究では、上述の薬理的な特性を達成するために、RANKL 細胞外ドメインに結合するペプチドリガンドを、多数担持した高分子をデザインすることを目標とした。ペプチドリガンドを分子表面に多数共有結合させるためには、連続して分岐するデンドリマー構造を有し、生分解性で毒性の低い高分子である bis-MPA デンドロンをコアの構造として採用するのが適切と考えられた。また生体に投与された際に、腎臓における糸球体濾過を回避し、十分な血中滞留性を確保するためには、分子量として 50 ~ 60kDa 程度が必要である。そのため本研究では、コア構造とペプチドリガンドの間に PEG2,000 のスペーサーを用いることで分子サイズを大きくする方式を試みることにした。

3. 研究の方法

水溶性デンドロンの合成

ポリマー・コンジュゲートの挙動を追跡することを考慮し、bis-MPA デンドロンの中心部分にダンシル基の導入を行った。ダンシル・クロライドとエチレンジアミンの反応によって、ダンシル基に bis-MPA への導入を行う際の反応点となる 1 級アミン基を導入した。得られた生成物を用い、カルボキシル基を中心の官能基として有する bis-MPA デンドロンに対して、縮合反応を行い、bis-MPA デンドロンの中心部分にダンシル基を導入した。さらに、bis-MPA デンドロンの表面に存在するヒドロキシル基を、炭酸ビス(ペンタフルオロフェニル)を用いて活性化し、PEG2000 を導入するための、反応性官能基とした。PEG は、片側末端にカルボキシル基が、逆側の末端にアミン基が付加されたものを用いた。こ

の、PEG2000 で表面修飾され、極めて高い水溶性を示す bis-MPA デンドロンを、RANKL 細胞外ドメインと結合性を示すペプチドリガンドの担持に用いることとした。

ファージディスプレイ手法を用いた、RANKL 結合ペプチドの探索

現在までに報告されている RANKL 細胞外ドメイン結合ペプチドである、W9 および OP3-4 は、いずれも脂溶性が高く、報告の配列に基づいて依頼合成した各ペプチドに関しては、高 pH などの特殊な条件以外では水への溶解度も低いものであった。

そこで、7 残基の直鎖状ランダムペプチドを提示するファージディスプレイライブラリーを用い、RANKL 細胞外ドメインの組み換えタンパク質をベイトとして用いたスクリーニングを行い、RANKL 細胞外ドメインに結合し、かつ水溶性の高いペプチドリガンドの探索を行った。

ペプチドリガンドを担持した bis-MPA デンドロンの調製

の検討では、RANKL 細胞外ドメインに対して十分な親和性を示す直鎖状ペプチドを得ることが出来なかった。そこで、W9 および OP3-4 に関して、bis-MPA デンドロンの表面に導入した PEG 鎖の先端に、これらのペプチドを担持させた高分子の調製を試みた。

ビオチン修飾 W9 ペプチドの調製

の検討では、W9 あるいは OP3-4 ペプチドを担持させ、かつ水溶性を維持する高分子の合成は困難であることが明らかとなったため、全く異なる手法で、目標とする生理活性物質を得る必要がある。W9 ペプチドに関しては、溶液調製方法に関しては開示されていないものの、オリエンタル酵母社より、高濃度に溶解されたペプチド水溶液が試薬として市販されており、中性領域でも mM オーダーの比較的高濃度で溶解状態を維持している。そこで、この溶液を用いた検討を試みることにした。

W9 ペプチドの水溶性を一定レベルで確保するための要件が開示されていないため、有機溶媒系などを用いて W9 ペプチドに修飾を加えて反応・精製操作を行った場合、これまでの検討と同様に凝集・沈殿を生じてしまう可能性が懸念された。そこで、水溶液中で W9 ペプチドに直接、最小限の修飾を加えることで活性の増強を図ることとした。W9 ペプチドにはアミン基は N 末端のみであるため、この部位を修飾部位として選択した。W9 ペプチドの活性を増大させるためには、複数の分子が会合した微粒子状に形成することが必要と考えられる。そのため、水溶液

中で複数分子が会合するための疎水性相互作用する分子構造を選択する必要がある。適度な脂溶性と水溶性のバランスを勘案した結果、W9 ペプチドの N 末端にビオチン修飾する手法を検討することとした。

ビオチン修飾 W9 ペプチドを用いた生理活性の評価

で調製したビオチン修飾 W9 ペプチドに関して、生理活性を未修飾の W9 ペプチドと比較を行った。

4. 研究成果

水溶性デンドロンの合成

PEG2000 をスペーサーとして用い、高い水溶性を示す bis-MPA デンドロンの合成スキームが構築された。

ファージディスプレイ手法を用いた、RANKL 結合ペプチドの探索

ファージディスプレイライブラリーのスクリーニングを複数回実施したが、直鎖状の 7 残基ランダムペプチドの中からは、W9 や OP3-4 のような既存のペプチドリガンドと比較して、十分な結合親和性を示すものは得られなかった。

ペプチドリガンドを担持した bis-MPA デンドロンの調製

の結果を受け、当初の予定から変更して W9 および OP3-4 を表面に多数担持する高分子の合成を試みた。しかしながら、高い水溶性を示す bis-MPA デンドロンと、脂溶性の高い W9 あるいは OP3-4 ペプチドと反応させた生成物は、水溶液で希釈を行うと直ちに凝集し、沈殿物を形成してしまった。デンドロンおよび PEG スペーサーを用いて、高分子には高い水溶性を付与しているが、微粒子状の構造物の表面に脂溶性のペプチドが多数提示されることで、微粒子間の疎水性相互作用が生じ、凝集・沈殿するものと考えられた。

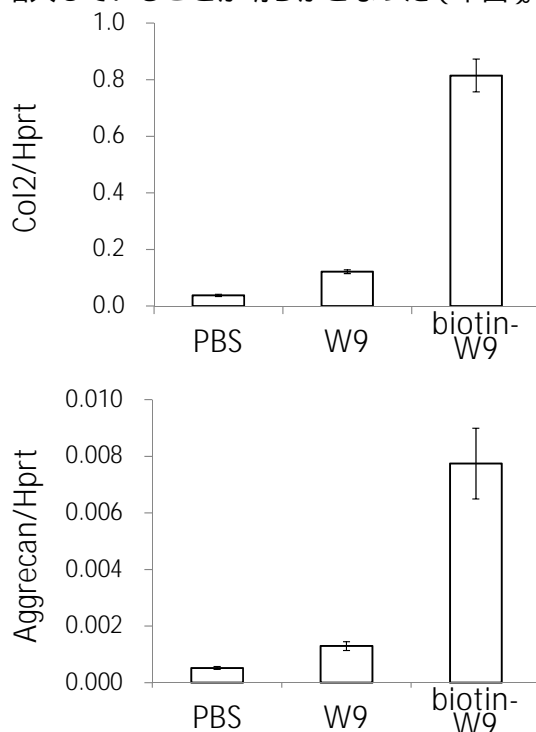
ビオチン修飾 W9 ペプチドの調製

そこで、RANKL 細胞外ドメインを認識するペプチドリガンドを、複数担持する高分子を創製するためには、全く異なるアプローチを採用する必要性が生じた。市販試薬メーカーから W9 ペプチドの高濃度水溶液が入手可能であったため、これを用いて検討を進めた。通常の依頼合成によって W9 ペプチドを合成した場合、W9 ペプチドの水溶性は比較的低く、mM オーダーの中性水溶液の調製は困難であったが、当該試薬は特殊な水溶液調製手法を採用しており、高濃度でも水溶性を維持

していたが、溶解度を確保するための調製手法は開示されなかった。そこで、この水溶液をそのまま化学修飾して検討に用いることとし、N末端の1級アミンに対し、NHS型の活性エステルを有するビオチンと反応させ、ビオチン修飾を導入した。ビオチン修飾導入後も、W9ペプチドの水溶液では沈殿形成は認められず、高濃度の水溶液として調製することが可能であった。

ビオチン修飾W9ペプチドを用いた生理活性の評価

の手法によって、W9ペプチドが水溶液中で会合し、より高いRANKL逆シグナル入力能力を有することが期待された。そこで骨芽細胞系の細胞を用いてこの点を評価したところ、未修飾のW9ペプチドと比較して、活性の増強が認められた。さらに、W9ペプチドの生理活性を評価する際に用いられている、前軟骨細胞の分化促進活性に関しても検討を加えた。その結果、前軟骨細胞株ATDC5細胞において、ビオチン修飾W9ペプチドは未修飾のW9ペプチドと比較して、軟骨細胞マーカーの発現誘導効果が顕著に増大していることが明らかとなった(下図)。



一連の検討結果は、N末端にビオチン修飾を施したW9ペプチドは、未修飾W9と比較して、大幅にRANKL逆シグナル入力活性が増大している可能性を示唆しており、今後逆シグナルの活性化度合の評価、生体レベルで投与した際の薬理効果などを評価する。

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1件)

Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, Suzuki H. Regulatory mechanisms of RANKL presentation to osteoclast precursors. *Curr Osteoporos Rep*. 2014 Mar; 12(1):115-20. doi: 10.1007/s11914-014-0189-0. Review.

[学会発表](計1件)

本間雅、林円香、池淵祐樹、青木重樹、菅森泰隆、青木和広、鈴木洋史 骨芽細胞におけるRANKL逆シグナルの役割 第33回日本骨代謝学会学術集会, 京王プラザホテル(東京都・新宿区), 2015年07月23~25日

6. 研究組織

(1)研究代表者

本間 雅 (HONMA, Masashi)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号: 60401072