

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15656

研究課題名(和文) RANK様ペプチドによる新規骨・軟骨形成促進薬の創生

研究課題名(英文) A new drug development for accelerating bone and/or cartilage formation by RANK-like peptide

研究代表者

長谷川 望 (HASEGAWA, Nozomi)

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：50770228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：すでに軟骨分化促進作用が明らかとなっているRANK様ペプチドであるOP3-4ペプチドを直径20 μ mの粒子状ゼラチンハイドロゲルを足場材料として用い、monoiodoacetate誘導変形性関節症(OA)マウスモデルの膝関節腔内に打ち込んだ。トルイジンブルー染色でメタクロマジーを起こす正常軟骨組織が、OAモデルでは明らかに減少したが、OP3-4投与により、正常軟骨細胞が回復していた。このOAモデルでは骨破壊がおこらず、骨形成活性指標も抑制されないことから、OP3-4が骨破壊を抑制した結果もたらされた間接的な作用ではなく、OP3-4の直接作用により、軟骨変性が改善されたことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The RANK-like peptide OP3-4, which has already been shown to have a promoting effect of cartilage differentiation, is used with a gelatin hydrogel scaffold in a 20 μ m diameter size, and we injected the peptide-contained materials into the right knee joint cavity of the MIA(monoiodoacetate)-induced osteoarthritis (OA) mouse model. Normal cartilage tissue that causes metachromasia with toluidine blue staining, was obviously decreased in the OA model, but normal cartilage tissues were recovered by the OP3-4 administration. In this OA model, bone destruction was not occurred and the bone formation activity index measured by administration of the fluorescent dyes, was not inhibited. Our data indicated that the RANK-like peptide OP3-4 did not seem to show indirect effects for recovering normal cartilage due to a result of suppression of bone destruction, but the direct effects of OP3-4 improved the cartilage degeneration.

研究分野：硬組織薬理学

キーワード：軟骨変性抑制 骨形成 ラベリング法 RANKL結合ペプチド ゼラチンハイドロゲル

1. 研究開始当初の背景

我々は、TNF (tumor necrosis factor)- α 結合ペプチドである WP9QY ペプチド (以下、W9 ペプチド) が同じ TNF スーパーファミリーに属する RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) にも結合することから、RANKL の拮抗薬として働き、破骨細胞分化抑制および破骨細胞吸収活性抑制双方に効果を発揮することを示してきた (Aoki et al, J Clin Invest 2006)。研究開始当初には、W9 ペプチドが骨形成促進作用を示すことが明らかとなり (Furuya et al, J Biol Chem 2013, Khan et al, J Oral Biosciences, 2013)、RANKL に結合する別のペプチドである OP3-4 ペプチドも骨形成促進作用を示すことが明らかとなっていた (Uehara et al, J Dent Res, 2016, Arai et al, Eur J Pharm, 2016, Sugamori et al, BioEssays, 2016)。このことは、RANKL に結合するペプチド (以下、RANK 様ペプチド) のスクリーニングにより骨形成活性のあるペプチドをスクリーニングできることを示唆していた。

しかしながら、RANKL に結合する物質すべてが骨形成活性を所有するわけではなく、抗 RANKL 抗体や OPG (osteoprotegerin) は、RANKL に親和性が高いが、骨芽細胞分化を促進しない。このことは、RANKL に結合することは、骨形成活性を上げる必要条件にはなっても、十分条件にはなっていないことを示している。

一方、我々は W9 ペプチドをマウス関節リウマチモデルの皮下に継続的な投与をすることにより、膝関節の骨破壊を抑制すること示した (Saito et al, Arthritis Rheum, 2007)。興味深いことに、この論文では骨破壊の抑制だけでなく、軟骨変性の抑制も示していた。さらに、同じ RANK 様ペプチドである OP3-4 ペプチドも同様の関節リウマチモデルにおいて、骨破壊抑制を示すと共に、骨形成活性促進と軟骨変性抑制作用も示していた (Kato et al, Arthritis Res Ther, 2015)。しかしながら、この軟骨変性抑制作用が、骨破壊を抑制したために生まれたものなのか、RANK 様ペプチド直接の作用で引き起こされたものなのかは明らかではなかった。

2. 研究の目的

以上の研究開始当初の背景から、骨形成促進作用と軟骨変性抑制作用を同時に発揮するペプチドの開発のために、以下の3つの目的を立てた。

- (1) RANKL に結合するペプチドのスクリーニングを行い骨・軟骨形成促進薬候補を洗い出すこと
- (2) 骨形成促進作用発現メカニズムの解明のために、RANKL に結合するだけでなく、何のファクターが RANK 様ペプチドと OPG との違いを生み出しているのかを明らかにすること
- (3) RANK 様ペプチドの軟骨変性抑制作用が

直接作用なのか、あるいは骨破壊を抑制したことによる間接作用なのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1)の目的のためには、大阪大学薬学部と医薬基盤・健康・栄養研究所と3者の共同研究により、既存 RANK 様ペプチドを鋳型として、ファージディスプレイ法を用いた RANKL に親和性の高いペプチドのスクリーニングをおこなった。さらに BIAcore を用いて RANKL 結合親和性の強いペプチドを4つ選び、環状のものと同様の直鎖状のペプチドと合わせて8種類のペプチドを骨芽細胞に添加し、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を測定し、既存の RANK 様ペプチドである W9 や OP3-4 ペプチドと比較した。

(2)の目的のためには、ST2 細胞に RANKL 結合ペプチド添加、6時間後、24時間後の膜に存在する RANKL 量を定量化した。これは、東京大学医学部附属病院薬剤部との共同研究により、骨形成活性発現が、細胞膜への RANKL 輸送に関連すると考えているからである。また、RANKL に対する良い抗体がないため、ST2 細胞に GFP-RANKL の融合タンパクをコードする遺伝子を導入し、GFP 抗体で RANKL 発現量を定量化した。膜タンパクの標識は、ビオチン化法を用いた。

(3)の目的のためには、変形性関節症 (OA) のマウスモデルである monoiodoacetate (MIA) モデルを用いた。ペプチドの足場材料として、徐放性を期待して京都大学田畑泰彦先生との共同研究により粒径 20 μ m のゼラチンハイドロゲルを足場材料として用いて注射した (詳細は Bhuyan et al, J. Pharmacol. Sci., 2017; 134 (2): 124-130. を参照)。また、RANK 様ペプチドが、骨芽細胞分化と軟骨細胞分化をともに促進することから、未分化間葉系幹細胞株 C3H10T1/2 細胞を用いて RANK 様ペプチド添加 24 時間後と 48 時間後の増殖活性を MTT 変法により検討した。

4. 研究成果

(1) RANK 様ペプチドのスクリーニング

大阪大学薬学部と医薬基盤・健康・栄養研究所と3者の共同研究により、すでに我々が実験してきた RANK 様ペプチドを鋳型として、アフィニティパンニングによる RANKL に結合親和性の高いペプチドのスクリーニングをおこなった。しかしながら、W9 ペプチドや OP3-4 ペプチドと同程度の ALP 活性を発揮するペプチドは見つけることが出来たが、W9 などの既存の RANK 様ペプチドより有意に高い ALP 活性を発揮する新規骨形成促進ペプチドは見つけることが出来なかった。

RANK 様ペプチドのスクリーニングは、RANKL に対する親和性によるスクリーニングのほか、韓国の研究グループからは、RANKL

と RANK の結合部位から分子モデリングによりペプチドを設計した発表があるが、骨吸収抑制剤としての発表であり、骨形成促進作用を持ち合わせる RANK 様ペプチドに関してはまだ世界に例を見ない。

今後、臨床応用を見据えた場合、ペプチドの弱点である易分解性を克服できるペプチドの創製が望まれる。また、研究背景でも述べたが、RANKL に親和性があるだけでは、骨形成活性を持つ薬剤にはならないことから、骨形成促進作用が発揮されるメカニズム解明が望まれる。この点、次項で示す OPG と RANK 様ペプチドとの違いは新規骨形成促進ペプチドをスクリーニングする上で重要な情報を与えていると思われる。

(2) RANK 様ペプチドによる骨芽細胞株 ST2 細胞膜上の RANKL 発現量の比較

東京大学医学部附属病院薬剤部との共同研究により、ST2 細胞に W9 および OP3-4 添加、6 時間後、24 時間後の細胞膜に存在する RANKL 量を定量化した。この結果、両ペプチドとも添加 6 時間後、24 時間後ともに、細胞膜の RANKL 量が増加している結果を得た。一方、OPG 添加により細胞膜の RANKL 量は添加 6 時間後、24 時間後ともに、無添加群に比べて変化を示さなかった。

今後、細胞膜上の RANKL 量の違いと骨芽細胞分化促進作用の違いとの相関性を示すことにより、新規骨形成促進薬開発に向けた展開が期待できる。現在、ABiS の支援により細胞膜への RANKL 輸送の様子を可視化する支援を受けている。

膜 RANKL を介したシグナルを我々は逆シグナルと呼んでいるが、Rev Endocr Metab Disord (2015) 16:131-139 でも紹介されている。

(3) OA モデルによる RANK 様ペプチドの軟骨変性に対する直接作用の検討

MIA モデルの立ち上げに時間がかかったが、マウスが死なずに変形性関節症が発症する最適投与量は 25 mg/kg であった。

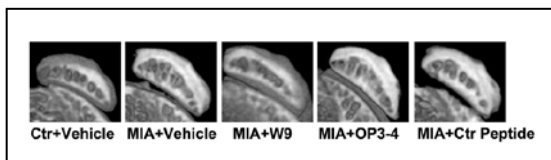


図 1 変形性関節症モデルにおける骨の変化

図 1 は、MIA モデルにおける patellofemoral joints (膝蓋大腿関節) の μ CT 像である。

関節リウマチモデルでは、骨破壊が激しく軟骨変性を抑制する所見は得られていたが、RANK 様ペプチドによる直接作用によるか骨破壊を抑制することによる軟骨変性の抑制作用なのかは、関節リウマチモデルでは明らかには出来なかった。

今回、MIA モデルにより、骨破壊が引き起こされていないことを確かめることができ

(図 2)、RANK 様ペプチドの作用を骨破壊抑制作用による間接的な作用による軟骨変性抑制という可能性は除去することができた。

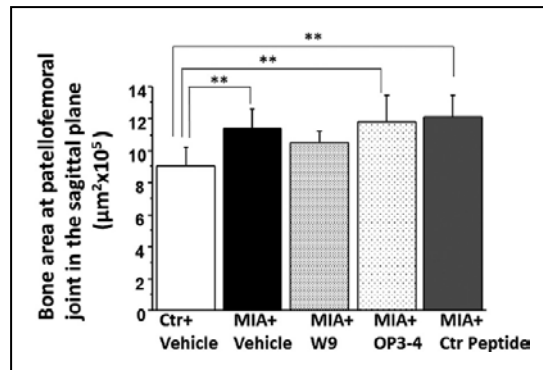


図 2 膝蓋大腿関節における骨量の変化

1.8 mm × 1.5 mm の関心領域内の μ CT 像上の骨量変化を示す。データは平均値 ± S.D. **p < 0.01 vs Ctr+Vehicle、なお、Vehicle は、生理食塩水を含浸させたものを注入した群である。

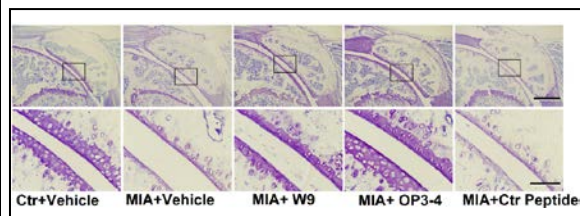


図 3 膝蓋大腿関節における軟骨変性に対する OP3-4 ペプチドの抑制効果

上のパネルの四角で囲った部位の拡大像が下のパネルの組織像である。スケールバーは上のパネルが 500 μ m、下のパネルが 100 μ m

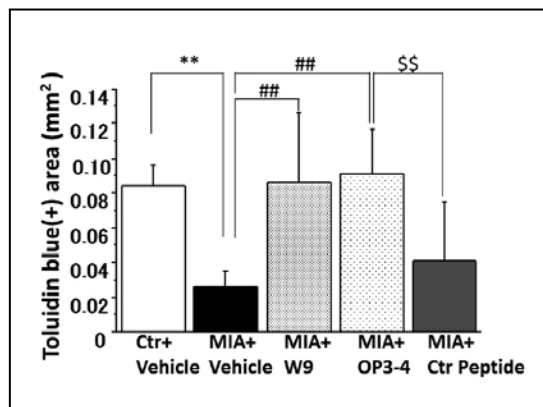


図 4 RANK 様ペプチドの軟骨変性抑制作用 トルイジンブルー染色陽性面積の変化

MIA 投与 7 日後から炎症が引き起こされた状態で治療薬候補の投与を開始した。治療薬候補は、MIA 投与後、7、14、21 日後に関節腔内に 3 回投与し、最終投与後、7 日後に安楽死させた。通常炎症状態では骨形成活性が下がるが、MIA 投与群において骨棘形成を思わせる骨形成指標である calcein の蛍光ラベ

ルの上昇が認められた (J. Pharmacol. Sci.. 2017; 134 (2): 124-130 の Fig.3 参照)。

このような状況で、図4に示すように、正常な軟骨基質を紫で染めるトルイジンブルーの染色面積は、MIAモデルでは明らかに減少しており、軟骨変性が明らかに亢進していた。一方、RANK様ペプチドであるW9およびOP3-4の投与により、有意に軟骨変性を抑制する結果を示した。RANKLに結合親和性の低いコントロールペプチドの投与では、この軟骨変性に対する作用は発揮されなかった。

また、我々はRANK様ペプチドの軟骨細胞への直接作用として、すでにATDC5細胞に対する軟骨への分化を促進する結果を発表していたが (Kato et al, Arthritis Res Ther, 2015)、骨芽細胞分化促進と軟骨細胞分化促進をともに兼ね備えるRANK様ペプチドの作用メカニズムを検証するために、骨と軟骨双方の起源である間葉系幹細胞の株細胞を用いて増殖アッセイを行った。その結果、RANK様ペプチド添加24時間後と48時間後において、RANK様ペプチドによる増殖活性の上昇が認められた。一方、RANKLにアフィニティの低いコントロールペプチドでは、この作用は認められなかった。

以上結果から、RANK様ペプチドは軟骨細胞に直接作用し、軟骨変性を抑制している可能性が示唆された。今後、軟骨への作用メカニズムに関して詳細な検討が必要であるが、骨形成促進および、軟骨変性抑制作用を併せ持つRANK様ペプチドの研究展開に臨床応用への期待が掛かる。

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)

- ① Md Zahirul Haque Bhuyan, Yukihiko Tamura, Eri Sone, Yuki Yoshinari, Chizuko Maeda, Mariko Takahashi, Yasuhiko Tabata, Ramachandran Murali, Yoshihiro Waki, Kazuhiro Aoki: The intra-articular injection of RANKL-binding peptides inhibits cartilage degeneration in a murine model of osteoarthritis. J. Pharmacol. Sci.. 2017; 134 (2): 124-130. DOI: 10.1016/j.jphs.2017.05.008 (査読あり)

[学会発表] (計 2件)

- ① Md. Zahirul Haque Bhuyan, Chizuko Maeda, Yuki Yoshinari, Marin Kawasaki, Yasutaka Sugamori, Genki Kato, Mariko Takahashi, Yukihiko Tamura, Kazuhiro Aoki. The therapeutic effects of the RANKL-binding peptides on cartilage destruction. 13th Bone Biology Forum 2016. 08. 20 Cross Wave Makuhari (Chiba)
- ② Md. Zahirul Haque Bhuyan, Yoshinari Y,

Kawasaki M, Sugamori Y, Kato G, Takahashi M, Tamura Y, Aoki K. The preliminary results on the effects of RANKL-binding peptide of cartilage destruction. 12th Bone Biology Forum 2015. 08. 21 Cross Wave Makuhari (Chiba)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 望 (HASEGAWA, Nozomi)
東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師
研究者番号：50770228

(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・教授
研究者番号：40272603

田村 幸彦 (TAMURA, Yukihiko)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：40188446

(3) 連携研究者

高橋真理子 (TAKAHASHI, Mariko)
東京医科歯科大学・歯学部・技術系職員
研究者番号：90334440

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

鎌田 春彦 (KAMATA, Haruhiko)
国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所・創薬デザイン研究センター・プロジェクトリーダー

研究者番号：00324509

田畑 泰彦 (TABATA, Yasuhiko)
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授
研究者番号：50211371

(4) 研究協力者

吉成 悠紀 (YOSHINARI, Yuki)
東京医科歯科大学・歯学部歯学科・学生

前田 千寿古 (MAEDA, Chizuko)
東京医科歯科大学・歯学部歯学科・学生

Md Zahirul Haque BHUYAN
28~29年度東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・大学院生

なお、本研究は、文部科学省科学研究費助成事業「先端バイオイメージング支援プラットフォーム」ABiS・光学顕微鏡支援（支援担当：藤森俊彦博士）を受けていることに感謝したい。