

平成 22 年 5 月 13 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791350
 研究課題名（和文） T細胞活性化補助シグナル分子PD-1を標的としたRNAアプタマーによる骨吸収抑制
 研究課題名（英文） Inhibition of bone resorption by RNA aptamer for immunoregulatory receptor PD-1 induced on activated T cell.
 研究代表者
 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

研究成果の概要（和文）：T細胞活性化抑制補助シグナル分子であるPD-1分子が炎症性骨吸収に関与していると仮説をたて、そのシグナル制御が炎症性骨吸収を抑制する薬物ターゲットとなる可能性の探索をはじめた。また、標的分子に特異的に結合するRNAアプタマーの作製を試みた。RNAアプタマーの作製は技術的にも困難を要し、作成してその抑制効果を検討することは難しかった。今後さらにアプタマーのような新しい創薬技術を開発することにより、より効果や安全性の高い新規医薬品の設計に役立つ基礎的情報を得る可能性があると思われた。

研究成果の概要（英文）：PD-1 is a negative regulator of immune responses. We made a hypothesis that PD-1 is involved in inflammatory bone resorption and that PD-1 signal has possibilities as a drug target which inhibit inflammatory bone resorption. RNA aptamer for PD-1 might be a candidate and thus we tried to make an aptamer. During the research period, it was technically difficult to make the aptamer and to investigate the effect. To get basic knowledge of more effective and safety medical product, it is important to create new drug-discovery technology like an aptamer in the future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：硬組織薬理

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、骨代謝、特に骨吸収疾患の病態と免疫系細胞の異常が関連することが明らかになりつつあり、その解明を目的として骨免疫

学分野が創設され、多くの研究が行われるようになってきた。特にT細胞の機能変化と破骨細胞形成制御のメカニズムに注目が集まっていた。例えば、歯周病における骨吸収は

炎症性に起こり、サイトカインによって活性化したT細胞やB細胞などの免疫系細胞の強い関与が指摘されていた。また、骨粗鬆症モデルである卵巣摘出マウスでは、活性化したT細胞が放出するTumor Necrosis Factor (TNF) に依存的に骨吸収が引き起こされるという報告がある (Roggia C et al, PNAS, 98(24), 13960-5, 2001)。

その中、我々の研究グループはT細胞の活性化制御と骨代謝の係に着眼し、T細胞活性化制御補助シグナルである Programmed Death 1 (PD-1) の遺伝子欠損マウスの表現型解析を行った。その結果、自己免疫疾患様症状を示し、骨量の増加が認められた。また、破骨細胞数の減少が認められ、PD-1 が骨吸収に関与していることが推察された。これらの研究成果から、PD-1 は破骨細胞形成において正の制御因子として機能していることが推測された。

また、RNA は遺伝情報発現の媒体としてだけでなく、触媒活性のある多機能性生体高分子であると注目されるようになっていた。様々なRNAの中でも、アプタマーは抗体に似た性質を持つことから、医薬品候補としての研究開発が国内外で行われるようになっていた。

そこで、破骨細胞活性化メカニズムに関与していると推測されるPD-1分子の機能を解明することによって、そのメカニズム制御を標的とした新規薬物の開発が可能となるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、自己免疫疾患の原因分子の一つでありT細胞の活性化を抑制する補助シグナル分子として機能するPD-1が、炎症性骨吸収に関与していると仮説をたてた。炎症性骨吸収機構におけるT細胞による破骨細胞活性化メカニズムとPD-1分子の機能の関係を明らかにすることによって、PD-1/PD-L1シグナル制御が炎症性骨吸収を抑制する薬物ターゲットとなる可能性を探索することを目的とした。

さらに、破骨細胞活性化メカニズム制御を標的としたRNAアプタマーを取得し、免疫システムと骨吸収メカニズムの相互作用に着目した新規核酸医薬品の作用標的となる基礎的情報の取得を目指した。

RNAアプタマーは炎症物質や受容体などの標的物質に特異的に結合してその機能を阻害する働きがあり、核酸医薬品として注目されている。また、免疫排除を受けず、毒性が低いといわれおり、より効果や安全性の高い新規薬物の開発に大きな可能性を持っていると考えられた。

3. 研究の方法

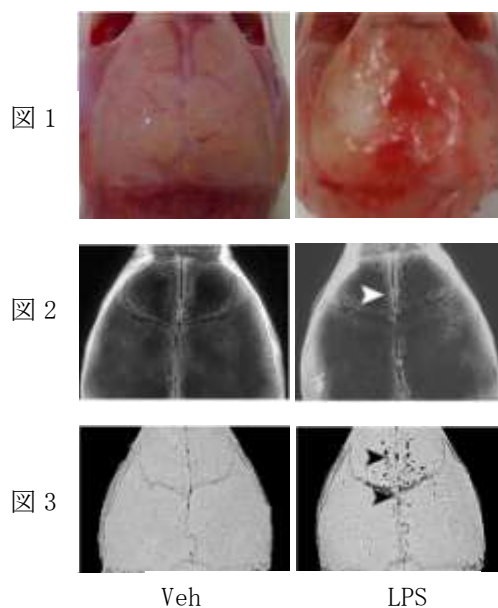
- (1) PD-1 RNA アプタマー作製の検討
- (2) 炎症性骨吸収モデルの作成
マウス頭蓋骨に細菌毒素であるLipopolysaccharide (LPS) を投与し、炎症性骨吸収モデルを作成した。
- (3) X線装置による解析
- (4) 骨量・骨密度における表現型の解析
骨塩量測定機器 (DXA) を用いて解析した。
- (5) 骨形態計測法における表現型の解析
採取した頭蓋骨をレジン包埋し、非脱灰薄切片を作成した。骨吸収の指標を解析した。

4. 研究成果

以前本研究室で炎症性骨吸収モデルを確立したがLPSあるいは歯周病原菌 *P. gingivalis* の連日投与を行わなければならない実験系であった。そのため、より簡便に炎症性骨吸収モデルを作製するために改良を加え、モデルマウスとして用いることができるかどうかの検討を行った。

8週齢C57BL/6Jのワイルドタイプマウス(WT)の頭蓋骨にLPS(10mg/kg)を単回投与し、連日投与ではなくても炎症性骨吸収が発症するかどうかを検証した。対照としてPBS (Vehicle)の単回投与を行った。投与後5日後に屠殺し、比較検討した。

LPS投与群では、頭蓋骨に炎症を認め(図1)、軟X線装置およびマイクロフォーカスX線CT装置による解析(図2、3)ではVehicle群と比べて放射線透過箇所が多数確認された。



また、DXA による解析の結果 LPS 投与群の BMD は有意に減少していた (図 4)。

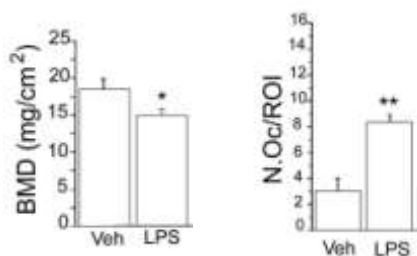


図 4

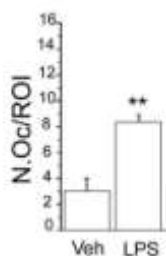


図 5

さらに、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRAP) 染色にて破骨細胞を同定したところ、LPS 投与群の破骨細胞数は有意に増加していた (図 5)。LPS 投与によって破骨細胞誘導能が高まることが示された。

これらの結果から、LPS の単回投与でも炎症性の骨吸収を引き起こすことが示され、より簡便に炎症性骨吸収モデルを作製する手法が確立されたと考えられる。

RNA アプタマーの作製は技術的にも困難を要し、作成してその抑制効果を検討することは難しく、その効果を確認するまでにいたらなかった。アプタマーは生化学的に不安定で半減期が短く、生体内ではヌクレアーゼによって分解されてしまうため、化学修飾などの工夫をして安定化をはかる必要がある。

アプタマーは抗体にはない特性をもち、炎症物質や受容体などの様々な標的物質を特異的に標的分子として認識することができ、免疫原性が低いとされている。さらに、アプタマーは化学的に合成するため、アプタマーに特異的に結合して作用を抑制するオリゴヌクレオチドで解毒剤をつくることが可能である。これらの特性は治療薬として使用するのに大きな利点をもつため、安定化による実用化が期待される。

近年、RNA の多様性が注目されており、創薬ターゲットとしてさまざまな研究・開発が進められている。RNA 医薬品として、アンチセンス医薬品、RNAi 医薬品、miRNA 医薬品、アプタマー医薬品などが開発されてきた。そのなかでもアプタマー医薬品の第 1 号として Macugen® が血管新生加齢性黄斑変性症 (AMD) の治療薬として米国 FDA に販売承認され、各種アプタマーに関する特許が取得されるなど米国や日本でも開発が進んでいる。また、アプタマー-AS1411 は点滴静注されており、局所のみだけでなく全身投与においても有効であることが示されている。医薬品としてだけでなく、アプタマーをチップ化し診断薬としての開発の試みも行われている。アプタマーの利点や特徴を活かし、より効果的でより安全な核酸医薬品として確立されるように、また、さらに新しい創薬技術の研究・開発が

進められることが期待される。

T 細胞の活性化には、抗原提示細胞からの第 1 シグナルを T 細胞受容体が受けると共に、補助シグナルとして co-stimulator への第 2 シグナルを必要とする。PD-1 は、負の補助シグナル受容体として T 細胞の過剰な活性化を抑制しており、炎症性骨吸収に関与していると推測されていることから、炎症性骨吸収機構における T 細胞による破骨細胞活性化メカニズムを抑制するターゲットとなりうる可能性があると考えられる。このメカニズムが今後さらに詳細に解明されることによって、その基礎的情報を基盤としたより効果の高い新規医薬品の設計に役立つと思われる。

このような研究は自己免疫疾患に付随する骨病変ばかりでなく、炎症性疾患である歯周病を含め免疫システムと関連する様々な骨疾患の治療に貢献するものと期待される。さらに、PD-1 の受容体である PD-L1 が膵臓癌細胞への免疫反応を抑制しており、そのシグナルを制御することによって抗腫瘍反応を向上しうることが報告されており (Chen L, Nature Rev. Immun. Vol.4, 336-347, 2004)、PD-1 分子の制御が癌治療にも役立つことが予測されている。PD-1 に関するメカニズムが解明され基礎的開発が成功すれば、癌の骨破壊に対しても応用できるとと思われる。そして、癌に付随する様々な病変も制御できる可能性も明らかにでき、臨床的意義が大きいと考えられる。

今後さらに PD-1 を含め他のシグナル分子や破骨細胞誘導関連タンパクに関して機能解析を進め、創薬ターゲットとしての可能性を検証し、新しい発想による薬物開発の研究に取り組みたい。

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 Soysa NS, Alles N, Takahashi M, Aoki K, Ohya K. Defective NIK in *aly/aly* mice prevents bone resorption induced by local injection of Lipopolysaccharide. Journal of Periodontology (投稿中、査読有)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 中地浩之、高橋真理子、青木和広、大谷啓一他 5 名、TNF- α 制御による顎骨骨量増生への薬理学的アプローチ、第 8 回日本歯科骨粗鬆症研究会、2010 年 4 月 4 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし