

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5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：2011～2012

課題番号：23659867

研究課題名（和文）骨形成活性を有する新規ペプチドの創生：ペプチドのRANKL結合部位の同定

研究課題名（英文） Development of a new anabolic peptide on bone by the identification of the novel RANKL binding site of an anabolic peptide

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) は、樹状細胞の分化や破骨細胞の分化および機能を促進するタンパクだが、最近では乳腺の発達や体温調節にいたるまで様々な生理的な役割を持つことが明らかにされてきた。本研究で明らかになった成果は、RANKLに結合するペプチドが骨形成を促進することであり、またその作用メカニズムは骨代謝分野だけでなく、RANKLの生理的な意味を解明するうえで重要な発見となったと考えている。

特に重要な発見は、2種類のRANKL結合ペプチドが持つ骨形成活性の差が、RANKL逆シグナルの差として明らかに示せたことである。当初、2種の骨形成促進ペプチドの骨形成誘導能の差は、RANKLの結合部位による差として現れるものと仮定し研究を進めていたが、RANKL結合ペプチドが、100 μ M以上の高濃度で初めて、骨芽細胞分化促進作用が現れることから、骨芽細胞膜表面上にRANKLの集合体(クラスター)を形成させ、RANKL逆シグナルを入れるスイッチになるという作用メカニズムが示唆される。

今後、骨形成活性が強まる最適なRANKL間距離の解明、あるいはRANKLのクラスター化を引き起こさせるリガンドの探索など、治療薬開発に向けてさらなる研究の展開が期待できる。

なお、骨形成ペプチドのRANKL逆シグナル活性解析に関しては、研究協力者として東京大学医学部附属病院薬剤部の本間雅先生に加わっていただいた。ここに感謝の意を表します。

研究成果の概要（英文）：

Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) promotes dendritic cell differentiation and osteoclast differentiation and function. Recent findings also revealed the wide-ranging physiological roles of RANKL such as the mammalian gland development and the thermoregulation. We found in this study that RANKL binding peptides promote bone formation, leading to a significant finding to clarify the physiological roles of RANKL.

This study yields the important finding that anabolic activity on bone formation was dependent on the RANKL-reverse-signaling intensity. The comparison of bone formation activities between two RANKL-binding peptides guided us to this conclusion. At the beginning of this study, we hypothesized that the differences of RANKL binding sites between two anabolic peptides might induce the differences of bone formation activities between the two peptides. Since the stimulatory effects of osteoblast differentiation was appeared only when the peptide concentration was higher around 100 μ M and over, we thought that making a RANKL clustering on the surface of osteoblast membrane might be a trigger of the RANKL-reverse-signaling.

Further studies are necessary for leading this study toward the development of a new therapeutic agent, such as clarification of an appropriate distance between RANKL molecules that can switch on the bone formation activity, and the development of a ligand, which can make a RANKL clustering.

Finally we thank Dr. Masashi Honma (Department of Pharmacy, The University of Tokyo Hospital, Faculty of Medicine) for analyses of the bone formation peptides on the RANKL-reverse-signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：歯科薬理学

1. 研究開始当初の背景

腫瘍壊死因子(TNF- α)に結合し、TNF α の阻害ペプチドであるWP9QY(W9)はTNF1型受容体のリガンド認識部位に似せて設計された9つのアミノ酸で構成されたペプチドである。

TNF1型受容体とRANKは同じTNF受容体ファミリーであり、RANKとTNF1型受容体の相同配列比較をしてみるとW9ペプチドが設計されたリガンド認識部位(3番目のシステインリッチドメインの最初のループ)の構造に共有するアミノ酸が多いことから、我々はこのW9ペプチドがRANKLにも結合し、RANKLの阻害剤として骨吸収抑制作用を有するか否かを検討してきた。その結果、予想通り、W9はRANKLに結合し、RANKLの阻害剤としてRANKL誘導の破骨細胞形成を抑え、骨吸収モデルを用いた動物実験においてもTNF受容体1型および2型が共に欠損したマウスにおいても骨吸収抑制作用を発揮することを明らかにした。

その後、オリエンタル酵母の保田尚孝博士と共にW9ペプチドの骨形成促進作用を明らかにしてきたが、その作用メカニズムはRANKLを介した作用であるかどうかは明らかではなかった。

2. 研究の目的

W9ペプチドの骨形成促進作用がRANKLを介した作用であることを明らかにし、W9ペプチドよりも骨形成促進作用が強いペプチドを探索するとともに、その骨形成作用が変化するメカニズムを解明すること。

3. 研究の方法

まず、RANKLに結合するペプチド候補として、TNF受容体ではなくRANKのデコイ受容体であるOPG上のRANKL結合部位を鋳型として設計されたペプチドXを用いた。

ペプチドXの骨形成促進能をW9ペプチドと比較するために、頭頂骨から単離した骨芽細胞様細胞を用いたin vitroの系とBMP-2を用いた背部筋膜下にコラゲン担体を用い

た異所性骨石灰化のモデルと京都大学再生医科学研究所の田畑泰彦教授から供与されたゼラチンハイドロゲル担体を用いた頭頂骨欠損モデルを用いたin vivoの系により検討を加えた。

骨形成促進作用のメカニズム解明のために、TNF1型受容体欠損マウス、TNF α 欠損マウス、RANKL欠損マウス(松本歯科大宇田川信之教授より供与)およびこれらのバックグランドマウスであるC57BL/6Jマウスをコントロールマウスとして用いた。また、RANKL逆シグナルを研究してきた東京大学医学部付属病院薬剤部の本間雅先生との共同研究でRANKL逆シグナルが動くか否かをターゲット蛋白のリン酸化抗体を用いたWestern blotting法により行った。

4. 研究成果

W9ペプチドはTNF α とRANKL双方に結合するペプチドであるが、さらにRANKL特異的に結合するペプチドの方が骨形成活性が高いのではないかという仮説のもとに実験を進めた。

予想通り、W9ペプチドよりペプチドXの方がin vitroの骨芽細胞分化促進能、in vivoのBMP-2が誘導する異所性骨石灰化作用を促進する能力、さらに、ペプチド単体でも頭頂骨欠損モデルにおける新生骨再生能のいずれにおいても約2倍の骨形成促進作用を示した。

一方、W9ペプチドの異所性骨石灰化促進メカニズム解明のために、まずTNF α 欠損マウスおよびTNF1型受容体欠損マウスを用いてコントロールマウスと同様な実験を行った。我々はTNF α による骨形成阻害作用をin vivoの実験系(切歯抜歯窩骨新生モデル)を用いてすでに明らかにしていたため、TNF α の阻害作用も持つW9ペプチドの骨形成促進能はTNF α を阻害することにより引き起こされると考えられた。

ところが、上記のTNFシグナルを阻害するマウスを用いてもW9ペプチドによる骨形成促進作用はコントロールマウスと同様に

現れたことから W9 ペプチドの骨形成促進作用は RANKL を介した作用であると仮定した。実際、RANKL 欠損マウスを用いた W9 ペプチドによる異所性骨石灰化促進作用は完全に抑えられ、RANKL を介する骨形成促進作用の可能性が示唆された。

最後に、W9 ペプチドとペプチド X とが同じ RANKL 結合ペプチドであるにもかかわらず、骨形成促進作用が異なる理由を検討した。数年前から骨芽細胞に RANK をコートしたビーズの刺激で RANKL 逆シグナルが入り、骨芽細胞の膜への輸送が亢進することを発見していた東京大学医学部附属病院薬剤部の本間雅先生に W9 よりペプチド X の方が骨形成促進作用の強い理由を RANKL 逆シグナルの強弱で説明できないか検討していただいた。その結果、予想通りペプチド X の方が W9 ペプチドより RANKL 逆シグナルが強かった。

これらの結果は、RANKL に結合する薬剤が新規骨形成促進剤開発のリード化合物となることを示しており、また RANKL が関連する多様な生理活性を制御する上においても重要な発見になったと思われる。ただ、W9 ペプチドにしてもペプチド X にしても *in vitro* の系で 100 μ M 以上の高濃度にならないと骨芽細胞分化を促進しないこと、RANKL がクラスター化しないと逆シグナルを入れられない可能性を示しており、今後、RANKL 逆シグナルを安定して入れることができる最適な RANKL 間距離の解析、また RANKL のクラスター化を引き起こさせるリガンドの探索など、治療薬開発に向けてさらなる研究の展開が期待される。

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 11 件) 全て査読有

- (1) M Khan, 以下 9 人中 9 番目 K Aoki. The local administration of TNF- α and RANKL antagonist peptide promotes BMP-2-induced bone formation. *J Oral Biosciences* 55, 47-54, 2013
- (2) Furuya Y. 以下 10 人中 7 番目 K Aoki. Stimulation of bone formation in cortical bone of mice treated with a receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)-binding peptide that possesses osteoclastogenesis inhibitory activity. *J Biol Chem* 288(8):5562-71, 2013
- (3) K Fujiki, K Aoki, 以下 6 名. The influence of mechanical stimulation on osteoclast localization in the mouse maxilla: bone histomorphometry and finite element analysis.

Biomech Model Mechanobiol DOI 10.1007/s 10237- 012-0401-z, 2012

- (4) H Furuta, 以下 12 名中 6 番目 K Aoki. Selective inhibition of NF- κ B suppresses bone invasion by oral squamous cell carcinoma *in vivo*. *Int J Cancer* 131 E625-E635, 2012
 - (5) E Oue, 以下 10 名中 4 番目 K Aoki. CXCL2 synthesized by oral squamous cell carcinoma is involved in cancer-associated bone destruction. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 424, 456-461, 2012
 - (6) N Soysa, N Alles, K Aoki, K Ohya. Osteoclast formation and differentiation: An overview. *J Med Dent Sci* 59, 65-74, 2012
 - (7) H Nakachi, K Aoki, 以下 9 名. A structural modulator of tumor necrosis factor type 1 receptor promotes bone formation under lipopolysaccharide-induced inflammation in a murine tooth extraction model. *European J Pharmacology* 679, 132-138, 2012
 - (8) K Aoki, N Alles, N Soysa, K Ohya. Peptide-based delivery to bone. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64, 1220-1238, 2012
 - (9) N. S. Soysa, 以下 4 名中 3 番目 K. Aoki. Defective nuclear factor- κ B-inducing kinase in *aly/aly* mice prevents bone resorption induced by local injection of lipopolysaccharide. *J Periodont Res*, Vol.46, pp280-284, 2011
 - (10) K. Nagano, 以下 9 名中 9 番目 K. Aoki. The tumor necrosis factor type 2 receptor plays a protective role in tumor necrosis factor- α -induced bone resorption lacunae on mouse calvariae. *J Bone Miner Metab*, Vol.29, pp671-681, 2011
 - (11) K. Miyagawa, 以下 11 名中 10 番目 K. Aoki. A novel underuse model shows that inactivity but not ovariectomy determines the deteriorated material properties and geometry of cortical bone in the tibia of adult rats. *J Bone Miner Metab*, Vol.29, pp422-436, 2011
 - (12) Hao J, 以下 5 名中 4 番目 K. Aoki. Enhanced osteoblast and osteoclast responses to a thin film sputtered hydroxyapatite coating. *J Mater Sci Mater Med*. Vol. 22(6), pp1489-99, 2011
- [学会発表] (計 29 件)
- (1) M Mamun, 以下 7 名中 7 番目 K Aoki. Bone Regeneration Using Gelatin Hydrogel as a Novel Scaffold for a RANKL Antagonist Peptide W9. 第 12 回日本再生医療学会総会 2013 年 3 月 21 日~23 日 横浜市
 - (2) M Khan, 以下 9 名中 9 番目 K Aoki. A Small Peptide Inhibitor of Inflammatory Bone Resorption Promotes BMP-2-Induced

- Bone Formation. 第 86 回日本薬理学会年会 2013 年 3 月 21 日～23 日 福岡市
- (3) 加藤玄樹, 以下 9 名中 9 番目 青木和広. OPG 様ペプチドは II 型コラーゲンに誘導されたマウス関節炎における骨密度の低下を阻害する. 第 11 回日本歯科骨粗鬆症研究会学術大会・総会 2013 年 3 月 2 日 東京
- (4) 清水康広, 青木和広, 以下 5 名. 咬合異常によるストレスホルモンの上昇が骨密度に与える影響～マウス成長期咬合異常モデルを用いた長管骨骨密度解析～. 第 11 回日本歯科骨粗鬆症研究会学術大会・総会 2013 年 3 月 2 日 東京
- (5) M Khan, 以下 8 名中 8 番目 K Aoki. TNF- α Antagonist Peptide Increases Ectopic Bone Formation under RANKL-Dependent Mechanism 66thJADR 2012 年 12 月 14 日～15 日 新潟
- (6) N Alles, 以下 4 名中 4 番目 K Aoki. OPG mimetic peptide increases bone formation *in vitro* and *in vivo*. ASBMR2012 2012 年 10 月 13 日～15 日 Minneapolis USA
- (7) N Alles, 以下 4 名中 4 番目 K Aoki. RANKL-antagonist-peptide repairs Critical Bone Defect in Calvariae in mice ASBMR2012 2012 年 10 月 13 日～15 日 Minneapolis USA
- (8) 古屋優里子, 以下 6 名中 3 番目 青木和広. 骨形成ペプチド W9 の作用メカニズム解析 第 30 回日本骨代謝学会学術集会 2012 年 7 月 19 日～21 日 東京
- (9) 永井香絵, 以下 8 名中 4 番目 青木和広. p130Cas は破骨細胞の機能発現に重要な役割をもつ 第 54 回歯科基礎医学会学術大会 2012 年 9 月 14 日～16 日 郡山
- (10) 庄井香, 青木和広, 大谷啓一, 下川仁彌太. 埋伏過剰歯の幹細胞の特性について 第 54 回歯科基礎医学会学術大会 2012 年 9 月 14 日～16 日 郡山
- (11) M Mamum, 以下 5 名中 5 番目 青木和広. BMP 誘導骨再生におけるゼラチンのペプチド担体としての有用性 第 54 回歯科基礎医学会学術大会 2012 年 9 月 14 日～16 日 郡山
- (12) 中村仁美, N Alles, 青木和広, 以下 5 名. NF- κ B1 の欠損は非荷重による骨量減少を抑制する 第 54 回歯科基礎医学会学術大会 2012 年 9 月 14 日～16 日 郡山
- (13) 大澤賢次, 以下 6 名中 3 番目 青木和広. NF- κ B2 の p100 のプロセッシングは骨代謝において重要である 第 54 回歯科基礎医学会学術大会 2012 年 9 月 14 日～16 日 郡山
- (14) 平田-土屋志津, 以下 8 名中 4 番目 青木和広. NF- κ B p65 は Smad4 と結合することで BMP2 による骨芽細胞分化を抑制する 第 54 回歯科基礎医学会学術大会 2012 年 9 月 14 日～16 日 郡山
- (15) 永井香絵, 以下 10 名中 5 番目 青木和広. p130Cas は破骨細胞の機能発現に関与する 第 30 回日本骨代謝学会学術集会 2012 年 7 月 19 日～21 日 東京
- (16) 青木和広, 田村幸彦, 大谷啓一. マウス抜歯モデルを用いた骨形成評価法 - 骨吸収抑制作用のある薬剤の骨形成促進効果の検討 - 第 32 回日本歯科薬物療法学会 2012 年 6 月 30 日～7 月 1 日 大阪
- (17) M Khan, 以下 5 名中 5 番目 K Aoki. RANKL-Mediated Bone Formation By TNF-alpha Antagonist Peptide IADR GENERAL SESSION June 18-23 2012 Iguacu Falls BRAZIL
- (18) 藤木健吾, 青木和広, 以下 4 名. マウス顎骨のローカルストレインが破骨細胞の出現と骨吸収に及ぼす影響 日本補綴歯科学会第 121 回学術大会 2012 年 5 月 26 日～27 日 横浜
- (19) 藤木健吾, 青木和広, 以下 3 名. メカニカルストレスによる顎堤吸収とそのメカニズムに関する研究, 第 76 回口腔病学会学術大会 2011 年 12 月 9 日～10 日 東京
- (20) 藤木健吾, 以下 4 名中 1 番目 青木和広. 顎骨内部の応力分析と組織形態評価の試み 日本補綴歯科学会・東京支部総会・第 15 回学術大会 2011 年 11 月 26 日 東京
- (21) 中村仁美, 青木和広, 以下 5 名. 非荷重による骨量減少における NF- κ B の役割, 第 53 回歯科基礎医学会学術大会 2011 年 9 月 30 日～10 月 2 日 岐阜
- (22) 古田弘之, 以下 6 名中 4 番目 青木和広. 口腔扁平上皮癌の顎骨浸潤モデルの確立と NF- κ B 阻害剤による顎骨浸潤抑制効果の検討 第 53 回歯科基礎医学会学術大会 2011 年 9 月 30 日～10 月 2 日, 岐阜
- (23) 妹尾吉訓, 以下 7 名中 3 番目 青木和広. NF- κ B 非古典的経路による骨形成の抑制, 第 53 回歯科基礎医学会学術大会 2011 年 9 月 30 日～10 月 2 日 岐阜
- (24) M.Khan, 以下 12 名中 12 番目 K.Aoki. A Bone Resorption Inhibitor Promotes Bone Formation. 第 59 回国際歯科研究学会日本部会(JADR)総会・学術大会, 2011 年 10 月 8 日～9 日 広島
- (25) 佐藤俊三, 以下 4 名中 4 番目 青木和広. CHP ナノゲルとラズベリー型 CHP ナノゲルをペプチド担体として用いた際の比較一低 Ca 食飼育マウスを用いた骨吸収

抑制効果の検討—第53回歯科基礎医学学会
学術大会 2011年9月30日～10月2日 岐
阜

- (26) M.Khan, 以下6名中6番目 K.Aoki. Both
TNF- α and RANKL Antagonist Peptide
Stimulates Bone Formation in TNF- α
Deficient Mice to the Same Extent as in Wild
Type Mice. ASBMR2011, 2011年9月16日
～20日 San Diego, CA, USA
- (27) カーン・マスード、以下6名中6番目 青
木和広. TNF- α 拮抗ペプチドはTNF- α
非依存的に骨形成を亢進する. 第29回
日本骨代謝学会学術大会 2011年7月28
日～30日 大阪
- (28) M.Khan, 以下4名中4番目 青木和広. The
stimulatory effects of TNF- α and RANKL
antagonist peptide W9 on bone formation. 第
31回日本骨形態計測学会 2011年5月20
日～22日 岐阜
- (29) 青木和広、以下8名. The stimulatory effects
of NF- κ B inhibitor on bone formation
(NF- κ B活性化抑制による骨形成促進作
用) 第84回日本薬理学会年会 2011年3
月22日～24日 横浜

〔図書〕(計 3件)

- (1) 青木和広、大谷啓一. TNF ペプチドアン
タゴニストによる骨吸収抑制作用『ペプ
チド医療の最前線』((株)シーエムシー
出版) 65-73, 2012
- (2) 大谷啓一、青木和広、田村幸彦. 現代歯
科薬理学 第5版(医歯薬出版), 111-116,
2012
- (3) 大谷啓一、青木和広. 骨粗鬆症治療薬の
最近の動向について、日本歯科評論、
Vol.71(21) 109-122, 2011

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1件)

名称：新規な架橋構造を含むTNFレセプター
ループペプチドの模倣ペプチドを用いた医
薬組成物

発明者：河野悠介、以下7名中7番目 青木和
広.

権利者：河野悠介

種類：国際特許 (PCT/JP2012/054899)

番号：W02012/121058 AI

出願年月日：2012年2月28日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/hpha/index.html> (硬
組織薬理学分野 国立大学法人 東京医科
歯科大学)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

玉村 啓和 (TAMAMURA HIROKAZU)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・
教授

研究者番号：80217182

中川 敦史 (NAKAGAWA ATSUSHI)

大阪大学・たんぱく質研究所・教授

研究者番号：20188890