

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390437

研究課題名(和文) TRAF1由来の膜通過型ペプチドによる歯槽骨吸収抑制効果の解析

研究課題名(英文) Study on inhibitory effects of synthetic Peptide derived from TRAF1 on osteoclast differentiation

研究代表者

牧平 清超 (Makihira, Seicho)

九州大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80304450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：副作用の少ない骨吸収抑制剤の開発が求められている。我々はTRAF1が破骨細胞の分化を負に制御していることを報告している。そこでTRAF1由来ペプチドの破骨細胞の活性抑制効果を検討した。TRAF1由来配列に細胞内送達能があるアルギニン11残基を付加したペプチドを合成した(T1, T2)。アルギニン11残基のみ(11R)をコントロールとした。T1で処理したRAW細胞では未処理と比較してRANKLにより誘導されたTRAP陽性多核巨細胞数が有意に減少した。以上よりT1はRANKLによる破骨細胞の分化を抑制し骨吸収疾患に応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：There is a need for the development of a material with few side effects to treat diseases of osteolysis, such as a bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. We previously showed that TRAF1, a member of the TRAF family, is a negative regulator of RANKL-dependent osteoclastogenesis. We thus hypothesized that synthetic peptides derived from TRAF1 could have a similar function in pre-osteoclast cells. Two peptides derived from TRAF1 (T1 and T2), N-terminally conjugated with an eleven-arginine sequence (11R), were synthesized. 11R is well known as a membrane-permeable sequence. T1 decreased the number of TRAP-positive osteoclasts in RAW264.7 cells stimulated with RANKL compared to those in RANKL-stimulated cells without T1. On the other hand, 11R and T2 had no effect on these in RAW264.7 exposed to RAW264.7RANKL. The results suggest that a synthetic peptide derived from TRAF1 may be a candidate of therapeutic agent to block osteolysis.

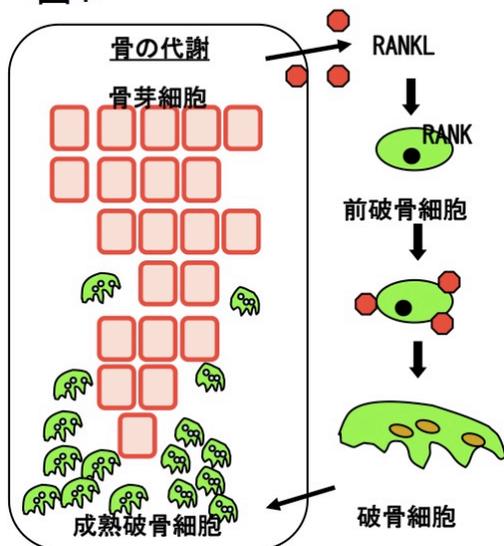
研究分野：歯科補綴学

キーワード：TRAF1 骨吸収 ペプチド 破骨細胞 膜通過

1. 研究開始当初の背景

補綴物に関連した歯周病やインプラント周囲炎による歯槽骨吸収、抜歯後の歯槽骨レベルの低下、骨移植後の骨吸収を抑制することは補綴処置を長期間成功する上で非常に重要である。このような外来刺激(荷重、細菌、金属など)による骨吸収や炎症性骨吸収では、破骨細胞が活性化され骨吸収が促進されていると考えられている(図 1)。この破骨細胞を主に活性化する因子が Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL)である。RANKLは破骨細胞前駆体細胞膜上の RANK 分子に結合し破骨細胞の分化を促進する。RANKL-RANK のシグナルは TNF- α Associated Factor (TRAF)2, TRAF5, TRAF6 などを介して核内に伝達される。我々は TRAF1 が負の調節因子であることを明らかにしている(図 2)。RANKLシグナルは破骨細胞前駆体上の RANK に結合し、TRAF6などを介して核内に伝達される。この RANK をコードする遺伝子が先天的に変異

図 1



する場合があります。広範性骨格性高ホスファターゼ症、家族性広汎性骨溶解症、あるいは骨パジェット病と呼ばれる骨の疾患が見られる。その他にも難聴、歯の喪失、高カルシウム血症などが見られる。このように歯科をはじめ医科領域でも骨吸収の解明とその対応が重要である。現在、骨吸収調節剤として、カテプシン K インヒビター、RANKL 抗体(デノスマブ)、および破骨細胞に直接作用する

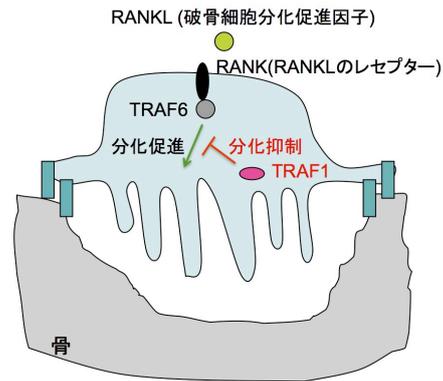


図 2 TRAF1分子はTRAF6下流で破骨細胞の分化を負に制御する

ビスフォスフォネートなどについて臨床研究が行われているが、これらの副作用が問題となっている。特にビスフォスフォネートを投与された患者の顎骨特異的な骨壊死が報告されている。これは歯科医療にとっては大きな問題である。

2. 研究の目的

これまでの研究で TRAF1 の破骨細胞における重要な働きを発見し、TRAF1 が破骨細胞の分化を細胞内で負に制御していることを見いだした。そこで、これらの基礎研究の成果をさらに発展させるため、我々は TRAF1 の機能を模倣できる物質は細胞障害が少なく破骨細胞の分化に対して TRAF1 分子同様に抑制的に作用するのではないかと仮説をたてた。そこでマウスの TRAF1 のアミノ酸配列をもとに、TRAF1 に由来したペプチドに膜通過型の配列を有した部分を組み合わせ合成ペプチドを作製し、破骨細胞への分化を抑制するかどうかを検討することとした。

3. 研究の方法

{平成 24 年度}

(実験 1) 破骨細胞の分化を抑制する TRAF1 由来の膜通過型ペプチドの選択

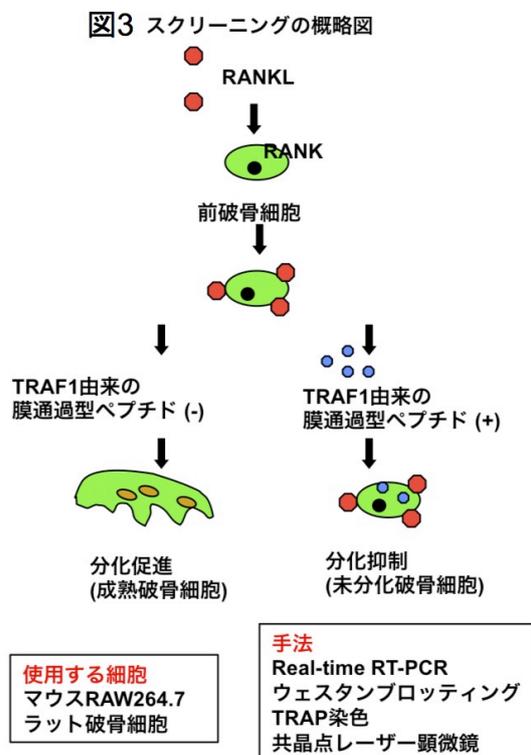
1. 材料 (合成ペプチド) の準備

一般的なモノクローナル抗体の作製基準を参考にして、活性を有する見込みがあるペプチドを作製する。抗原性の可能性が高い部位の情報をもとにして TRAF1 由来のペプチド配列を決定する。さらに決定した配列に膜を通過することが可能となる配列を付与す

る。次にスクリーニング用に純度 80%以上を、さらに絞り込んで純度 90%以上のペプチドを作製する。実験によっては蛍光色素(FITC)を付与したペプチドを準備する。

2. スクリーニングと検証方法

これらの合成したペプチドがRANKLを添加して破骨細胞への分化にどのような影響を与えるかを RNA およびタンパクレベルで解析する。用いる細胞は RAW264.7 細胞とラットの破骨細胞の初代培養細胞を使用する。用いる手技は real time-PCR, ウェスタンブロットリングおよび TRAP 染色である。さらに共晶点レーザー顕微鏡と FITC でラベルしたペプチドを用いてペプチドの細胞内への取り込みを確認する(図 3)。



{平成 25 年度以降}

(実験 2) TRAF1 由来の膜通過型ペプチドの細胞毒性の検証(多角的検証)

はじめに平成 24 年度に選択した TRAF1 由来の膜通過型ペプチドの細胞毒性について詳細に検討する。一般に細胞死はネクロシスとアポトーシスに大別されるため、増殖に与える影響の他に LDH 遊離(ネクロシスのマーカー)と caspase 3 (アポトーシスのマーカー)の以上 3 点について解析する。それぞれ、

MTS アッセイ、LDH release detection kit および caspase 3 活性測定キットを用いて検討する。平成 24 年度に得られた結果と細胞毒性の結果をもとに動物実験に使用するペプチドを選択する。このペプチド(1 種類予定)を用いて TRAF1 由来の膜通過型ペプチドの骨吸収に対する作用を 2 つの実験系で検証する(以下の実験 3 と実験 4)。

(実験 3) TRAF1 由来の膜通過型ペプチドが LPS 誘導型の骨吸収に与える影響(マウス)

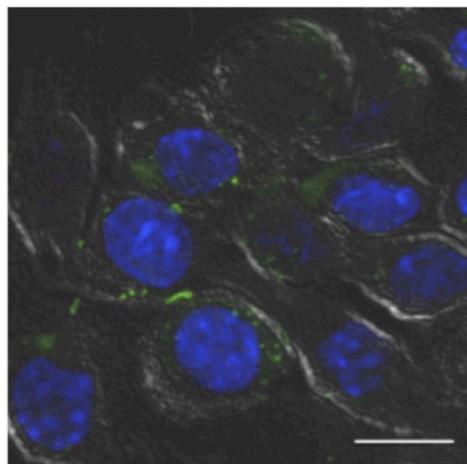
LPS(*Porphyromonas gingivalis* または *E.coli* 由来)をマウスの腹腔内に注射し骨吸収を誘導する。骨吸収は脱灰切片を用いて TRAP 染色を行い確認する。TRAF1 由来の膜通過型ペプチドを投与し、ペプチドの骨吸収抑制効果について組織切片上の TRAP 陽性細胞の出現をマーカーとして検討する。その他の骨研究によく用いられる染色方法での検討も加える。実験は動物倫理規定に従って行う。

(実験 4) TRAF1 由来の膜通過型ペプチドが LPS 誘導型のインプラント周囲の歯槽骨吸収に与える影響(ラット)

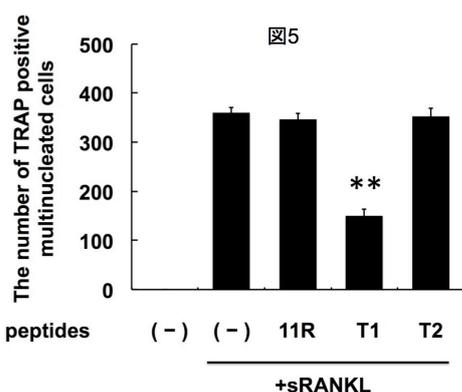
LPS 誘導型のインプラント周囲炎モデルラットを用いて、TRAF1 由来の膜通過型ペプチドがインプラント周囲の骨吸収を抑制するかどうか検討する。切片解析を検討しているが、特に簡単にインプラント周囲の骨吸収の変化を捉えることが可能なマイクロ CT を積極的に用いて検討する。実験は動物倫理規定に従って行う。

4. 研究成果

図4

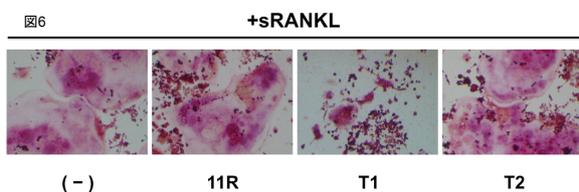


共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察の結果、T1-FITCが、RAW264.7細胞の細胞質内に移行していることを確認した(図4の緑色)。また、T1で処理したRAW264.7細胞では、ペプチド未処理のRAW264.7細胞と比較して、可溶性RANKLにより誘導されたTRAP陽性多核巨細胞の出現数が有意に減少した(ANOVA: $p < 0.01$)。一方、11RおよびT2で

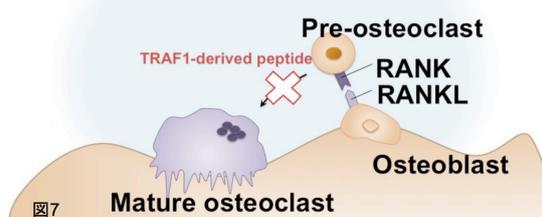


処理したRAW264.7細胞では有意な影響を認めなかった(ANOVA: $p < 0.05$) (図5, 6)。

以上の結果より、TRAF1由来ペプチドであるT1は、RAW264.7細胞の細胞質内へ取り込まれ、可溶性RANKLによるRAW264.7の破骨細胞様細胞への分化を抑制することが示された(図6)。したがって、TRAF1由来



のT1は破骨細胞の分化を抑制し、外来刺激による歯槽骨の骨吸収をはじめとした骨吸収疾患に応用できる可能性が示唆された。



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)

①Yuichi Mine, Seicho Makihiro, Yu Yamaguchi, Hideki Tanaka, Hiroki Nikawa Involvement of ERK and p38 MAPK pathways on Interleukin-33-induced RANKL expression in osteoblastic cells Cell Biology International, 査読あり, 38(5):655-662, 2014

②Takanori Wachi, Takahiro Shuto, Yoshinori Shinohara, Yoshinari Matono, Seicho Makihiro Release of titanium ions from an implant surface and their effect on cytokine production related to alveolar bone resorption Toxicology, 査読あり, 2:327:1-9, 2015

③牧平清超, 峯裕一, 首藤崇裕, 寺田善博, 二川浩樹周期性伸展刺激がRAW264.7細胞とMC3T3-E1細胞に与える影響 老年歯科医学, 査読あり, 27(2) 77-86, 2012

[学会発表] (計21件)

①首藤崇裕, 和智貴紀, 的野良就, 二川浩樹, 牧平清超 TRAF1由来ペプチドの破骨細胞分化および骨吸収に対する抑制効果の解析 第44回日本口腔インプラント学会学術大会 2014.9.12-14 (東京)

②和智貴紀, 首藤崇裕, 的野良就, 諸井亮司, 牧平清超 動物モデルを用いたチタン製インプラント周囲組織中のチタンに関する解析 日本歯科理工学会九州地方会夏期セミナー 2014.8.8 (鹿児島市)

③Takahiro Shuto, Takanori Wachi, Youko Katayama, Seicho Makihiro Effects of Titanium Immobilized with the Monoclonal Antibody to NHE10 on the Differentiation of Osteoclastic and Osteoblastic Cells The 9th Scientific Meeting of the Asian Academy of Osseointegration 2014. 7. 4-5, (Sapporo, Japan)

④ Takanori Wachi, Takahiro Shuto, Yoshinori Shinohara, Yoshihiro Terada, Seicho Makihiro Analysis of Titanium Elution from the Implant Surface The 9th

Scientific Meeting of the Asian Academy of Osseointegration 2014. 7. 4-5, (Sapporo, Japan)

⑤首藤崇裕, 和智貴紀, 片山洋子, 篠原義憲, 的野良就, 諸井亮司, 牧平清超 ラット実験モデルを用いたインプラント周囲粘膜炎の解析 日本補綴歯科学会第 123 回学術大会 2014.5.24-25 (仙台市)

⑥和智貴紀, 首藤崇裕, 中村優介, 的野良就, 篠原義憲, 諸井亮司, 牧平清超 インプラント体表面からの溶出チタンの検討 日本補綴歯科学会第 123 回学術大会 2014.5.24-25 (仙台市)

⑦首藤崇裕, 和智貴紀, 牧平清超 LPS に対するチタン製インプラント周囲組織の反応 平成 25 年度秋期第 62 回日本歯科理工学会学術講演会 2013.10.19-20(新潟市)

⑧Yuichi Mine, Seicho Makihira, Hiroki Nikawa Inhibition of cell-cell fusion during osteoclastogenesis by NHE10-specific monoclonal antibody 5th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry 2013.10.12-13 (Hiroshima, Japan)

⑨首藤崇裕, 和智貴紀, 篠原義憲, 的野良就, 牧平清超 インプラント周囲炎に罹患した組織における RANKL 発現様式 第 43 回日本口腔インプラント学会学術大会 (第 31 回日本口腔インプラント学会九州支部総会・学術大会併催) 2013.9.13-15 (福岡市)

⑩和智貴紀, 首藤崇裕, 篠原義憲, 的野良就, 諸井亮司, 牧平清超 チタンイオン存在下で LPS が歯周組織に与える影響 平成 25 年度日本歯科理工学会九州夏期セミナー 2013.8.30-31(長崎市)

⑪和智貴紀, 首藤崇裕, 篠原義憲, 的野良就, 諸井亮司, 栗田賢一, 牧平清超 チタンイオンと LPS が歯周組織に与える影響 平成 25 年度日本補綴歯科学会九州支部学術大会 2013.8.24-25 (佐賀市)

⑫Takahiro Shuto, Takanori Wachi, Yuichi Mine, Ryoji Moroi, Yoshinari Matono, Hiroki Nikawa, Yoshihiro Terada, Seicho Makihira RANKL Expression in the Tissues around Implant Injected with LPS

2nd Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region 2013.8.21-23 (Bangkok, Thailand)

⑬Yuichi Mine, Seicho Makihira, Hiroki Nikawa, Toshihisa Kawai T, Masaru Ohara, Kazuko Kawahara, Koji Ohta, Takahiro Shuto, Toshio Kukita, Yoshihiro Terada Inhibition of Cellular Fusion during RANKL-Dependent Osteoclastogenesis by NHE10-specific Monoclonal Antibody 2nd Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region 2013.8.21-23 (Bangkok, Thailand)

⑭Yuichi Mine, Seicho Makihira, Takahiro Shuto, Hiroki Nikawa A Synthetic Peptide Derived from TRAF1 Inhibits Osteoclastogenesis and Bone Erosion 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research 2013.6.28 (Kobe, Japan)

⑮峯 裕一, 牧平清超, 田地 豪, 二川浩樹 歯槽骨吸収に関する基礎的研究 -Interleukin-33 が骨芽細胞の RANKL 発現に与える影響- 日本老年歯科医学会第 24 回学術大会, 2013.6.4-6 (大阪市)

⑯峯 裕一, 牧平清超, 首藤崇裕, 二川浩樹 TRAF1 由来ペプチドは RANKL に依存した破骨細胞の分化を抑制する 日本補綴歯科学会第 122 回学術大会 2013.5.18-19 (福岡市)

⑰首藤崇裕 牧平清超 峯裕一 和智貴紀 二川浩樹 寺田善博 抗 NHE10 モノクローナル抗体を固定化したチタンが破骨細胞と骨芽細胞の分化に与える影響第 60 回日本歯科理工学会学術講演会 2012.10.13-14 (福岡市)

⑱和智貴紀, 牧平清超, 首藤崇裕, 峯裕一, 諸井亮司, 二川浩樹, 寺田善博 周期性伸展刺激に対する破骨細胞の反応 日本補綴歯科学会中国四国・九州支部合同学術大会 2012.9.1-2 (広島市)

⑲首藤崇裕 牧平清超 和智貴紀 峯裕一 二川浩樹 寺田善博 金属イオンは骨芽細胞における RANKL/OPG 比に影響を与える 平成

24年度日本歯科理工学会九州支部夏期セミナー 2012.8.17-18 (長崎市)

⑳ Yuichi Mine, Yu Yamaguchi, Seicho Makihira, Hideki Tanaka, Miho K. Furue, Hiroki Nikawa Direct and indirect effects of Interleukin-33 on osteoclast differentiation in vitro 2012 World Congress of In vitro Biology 2012.6.3-7 (Bellevue, USA)

㉑ 首藤崇裕 牧平清超 和智貴紀 二川浩樹 寺田善博 インプラント体周囲の骨吸収への金属イオンの関与 第29回日本口腔インプラント学会九州支部学術大会 2012.1.21-22 (宮崎市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧平 清超 (MAKIHIRA SEICHO)
九州大学・大学院歯学研究院・准教授
研究者番号：80304450

(2) 研究分担者

篠原 義憲 (SHINOHARA YOSHINORI)
九州大学・大学院歯学研究院・助教
研究者番号：00423533

永留 初實 (HATSUMI NAGADOME)
九州大学・大学院歯学研究院・助教
研究者番号：30284516

本田 雅樹 (MASAKI HONDA)
日本大学・歯学部・准教授
研究者番号：70361623