

令和元年6月12日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05503

研究課題名(和文) ラクトフェリンの抗破骨細胞形成部位の決定と骨破壊性病変に対するペプチド医薬の開発

研究課題名(英文) Determination of anti-osteoclastogenesis sites of lactoferrin and development of peptide therapeutics for bone destructive diseases

研究代表者

高田 隆 (Takata, Takashi)

広島大学・医系科学研究科(歯)・教授

研究者番号：10154783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：ウシラクトフェリン(bLF)のTRAF6結合部位の合成ペプチドを作成し、抗炎症作用や破骨細胞形成阻害作用を検討した。その結果1)合成ペプチドは、骨芽細胞とマクロファージ様細胞において、LPS刺激によるTNF- α およびIL-1 β の産生を抑制した。2)また、LPS刺激による骨芽細胞のRANKL発現を抑制し、OPGの発現を維持した。3)さらに、RANKL刺激によるRAW細胞の破骨細胞分化を抑制した。4)合成ペプチドの高所投与は、歯周炎ラットモデルの破骨細胞形成を阻害した。よって、bLF合成ペプチドは抗炎症および破骨細胞形成抑制効果を有し、骨破壊性病変の治療に応用できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨破壊性病変に対し現在、tumor necrosis factor- α (TNF- α)やinterleukin-6 (IL-6)阻害剤などの生物学的製剤が有効とされているが、副作用がなく効果的な骨吸収抑制剤は未だない。我々は既にLFとTRAF6の結合が破骨細胞形成を抑制することを報告している。本研究ではLFのTRAF6結合部位の合成ペプチドがサイトカイン産生と破骨細胞形成を抑制し、骨破壊性病変に対する有効なペプチド医薬となる可能性を示した。LFは安全性の高い食品由来物質である。本研究結果は、安価で、副作用のない新しい治療法の開発に繋がる可能性を内包しており、臨床的に大きな意義を有している。

研究成果の概要(英文)：We prepared synthetic peptides (bLF-p1, bLF-p2, bLF-p3) of TRAF6 binding site of bovine lactoferrin (bLF) and examined their anti-inflammatory and osteoclast formation inhibitory effects. As a result 1) bLF-p2 and bLF-p3 inhibited the production of TNF- α and IL-1 β by both osteoblasts (ST-2) and macrophage-like cells (THP-1) with LPS stimulation. Whereas bLF-p1 showed no inhibitory effect. 2) bLF-p2 and bLF-p3 suppressed the production of RANKL from ST2 by LPS stimulation but maintained OPG expression. 3) bLF-p2 and bLF-p3 inhibited osteoclast differentiation of RAW264 by RANKL stimulation. 4) Local administration of bLF-p2 and bLF-p3 inhibited osteoclastogenesis in LPS-induced periodontitis rat model. Thus, it was suggested that bLF-p2 and bLF-p3 have anti-inflammatory effect and inhibitory effect on osteoclastogenesis, and may be applicable to the treatment of bone destructive lesions like periodontitis.

研究分野：口腔病理学

キーワード：ラクトフェリン 骨破壊疾患 関節リウマチ 歯周病 破骨細胞 ペプチド医薬 TRAF6 TNF-

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

鉄結合性ミルクタンパク質であるラクトフェリン(LF)は哺乳動物のみが有する特異的なタンパクで、哺乳動物の生存や進化にとって重要な役割を演じる。LFは母乳、特に初乳に高濃度に含まれており、抗菌作用、免疫賦活作用、抗炎症作用、抗酸化作用、抗腫瘍作用などの多彩な機能を有することが知られている(Adlerova et al. *Veterinarni Medicina*. 2008)。

歯周炎や関節リウマチ等の骨破壊性病変では、炎症局所に破骨細胞が出現し高度な骨破壊が生じる。その結果、歯の脱落や関節の変形が生じ、QOLの著しい低下をきたす。近年、原因除去療法、サイトカイン療法、再生療法等様々な治療法が提案され、一定の効果が得られているが、未だ安全で効果的な破骨細胞活性化抑制剤はない。

我々はこれまで、LFを炎症性骨破壊性疾患の予防や治療に応用すべく、LFの生物活性、特に抗炎症作用と破骨細胞誘導に対する抑制作用に着目して様々な検討を重ね下記の結果を得た。

- 1) LFは内毒素(LPS)によって引き起こされる破骨細胞誘導に対する影響を阻止する(*Lab Invest*. 2010)
- 2) LFは動物実験モデルで著明な骨破壊抑制作用を示す(*Lab Invest*. 2010)
- 3) LFは歯周病患者と関節リウマチ患者の血清中の炎症性サイトカインレベルを下げ、組織破壊を抑制する(*Biol Pharm Bull*. 2010)
- 4) LFはTRAF6と結合することによって破骨細胞形成を強く抑制する(*J Biol Chem* 2012)

2. 研究の目的

本研究では核磁気共鳴法(NMR)など構造生物学的手法を用いて、LFのTRAF6結合部位を決定し、活性部位の合成ペプチドの抗炎症作用や破骨細胞形成阻害作用を検討することによって、同合成ペプチドが歯周病や関節リウマチなどの骨破壊性病変に対する有効なペプチド医薬になるかどうかを明らかにし新薬開発につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

1) LPSの誘導する炎症性サイトカイン産生に対するペプチドの影響

培養細胞と培養条件

実験にはヒト急性単球性白血病由来マクロファージ様細胞株(THP-1)とマウス骨髄ストローマ細胞株(ST2)を用いた。

ペプチドおよびLPSの投与方法

PMAで分化誘導したTHP-1とST2をbLF(1, 10, 100 µg/ml)もしくはペプチド(bLF-p1, bLF-p2, bLF-p3)(0.02, 0.2, 2 µg/ml)4時間全処理し、LPS(100 ng/ml, 大腸菌由来)を添加した。RT-PCR法による炎症性サイトカインmRNA発現とELISA法による培養上清中のサイトカイン蛋白産生量を測定した。

2) LPSが誘導する骨芽細胞を介した破骨細胞形成に対するペプチドの影響

ペプチドの取り込みとTRAF6との結合の確認

ST2細胞への標識ペプチドの取り込みを免疫蛍光法にて確認するとともに免疫沈降法を用い、FITC標識合成ペプチドとTRAF6の結合を確認した。

骨髄由来マクロファージ(bone marrow derived macrophage; BMDM)の採取と共培養

両端を切断した大腿骨および脛骨の一端から注射針を挿入し、骨髄組織を洗い出し、採取した後、4時間インキュベートし、浮遊細胞のみを回収し、Macrophage Colony Stimulating Factor(MCSF)(50 ng/ml)で刺激し、24時間後に接着細胞を回収し、BMDMとした。ST2とBMDMの共培養を用いLPS誘導破骨細胞形成に対する合成ペプチドの影響を調べた。酒石酸耐性酸性ホスファターゼ(TRAP)染色を施し、3つ以上の核を有するすべてのTRAP陽性細胞を、破骨細胞として顕微鏡下で計数した。

3) 破骨細胞形成に対するペプチドの影響

RANKLによる破骨細胞分化誘導

マウスマクロファージ様破骨細胞前駆細胞(RAWD)を分泌型RANKL(sRANKL)刺激による破骨細胞分化に対する各ペプチドの抑制効果を調べた。3つ以上の核を有するすべてのTRAP陽性細胞を、破骨細胞とした。

RANKLが誘導する破骨細胞分化因子の解析

ROWD細胞を合成ペプチドで4時間前処理した後、sRANKL(100 ng/ml)刺激2時間後に細胞を回収しRNA抽出、RANKLならびにOPGのPCR解析を行った。

4) ラット歯周炎モデルに対するペプチドの作用の検討

実験動物

実験には8週齢の雄性Wistar系ラットを用いた。以下のすべての実験は、広島大学動物実験等規則の倫理規定に準拠して行い、制御された環境(8:00-20:00の照明、22℃)で飼育し、自由に利用できる食物と水を与えた。この実験は広島大学の施設内動物管理使用委員会(承認番号A17-114)によって承認されている。

ラット歯周炎モデルの作成

ミダゾラムと塩酸メドミジン腹腔内麻醉下で、ラットを実験台に固定した。ラットをランダムに4つの群に分け、Cont群、LPS群、ペプチド群 (bLF-p2, bLF-p3) を作製した (図1)。

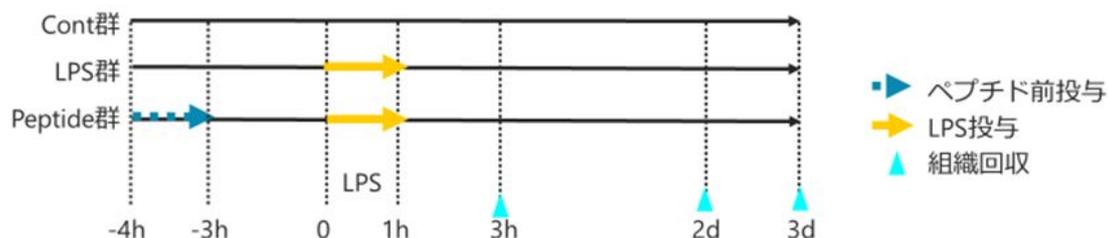


図1 実験スケジュール

ペプチド群は上顎臼歯口蓋側歯肉溝に、ペプチド 2 μ L (2 mg / ml) を10分毎に1時間滴下した (図2a)。ペプチド群とLPS群にはペプチド投与開始4時間後に、滅菌生理食塩水 (大塚メディカル、東京、日本) に 5mg / ml 濃度で溶解させた E.coli - LPS 溶液を浸漬した綿栓 (直径 2mm、長さ 1cm) を、上顎臼歯口蓋側歯肉に1時間静置することで、LPS を歯肉溝から浸透投与した (図2b)。このモデルで TNF- α の発現が明らかにされている3時間後および破骨細胞増加が明らかとなっている3日後に上顎臼歯部を上顎骨ごと摘出した。また TNF- α mRNA の発現が明らかとなっている2日後 [38]に上顎臼歯歯冠周囲の口蓋側遊離歯肉を可及的に摘出し、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

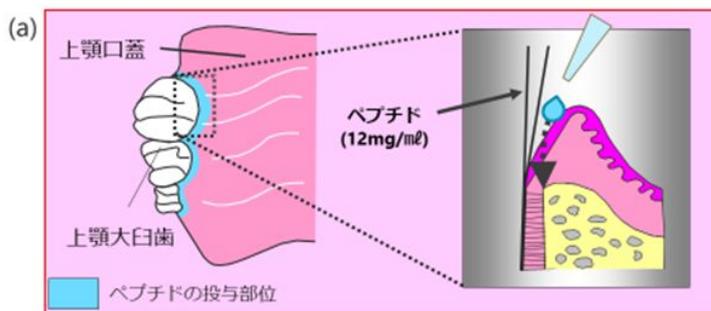


図2 ペプチドおよびLPSの投与部位と方法

RT-PCR

歯肉組織から RNA の抽出し、SYBR $^{\circ}$ Green assay による TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA の定量 PCR を行った。PCR 条件は、変性温度 (98 $^{\circ}$ C、10 秒)、アニーリング反応 (60 $^{\circ}$ C、10 秒)、伸長反応 (68 $^{\circ}$ C、30 秒) を1サイクルとし、45 サイクルとした。反応産物は、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) を内在性コントロールとして定量化した。

組織切片の作成

組織試料を Periodate Lysine Paraformaldehyde (PLP) 固定液 [4% パラホルムアルデヒド、1.2% 塩酸リジン、メタ過ヨウ素酸ナトリウム] に4 $^{\circ}$ C で3日間浸漬・固定した。次に、10% EDTA-4Na リン酸緩衝液を用いて4週間脱灰した後、パラフィン包埋し、厚さ 6.0 μ m で根尖を含む歯の長軸に平行な方向に切断し、連続切片を作製した。切片をヘマトキシリン・エオジンで染色し、歯周組織の状態を観察した。

免疫組織化学

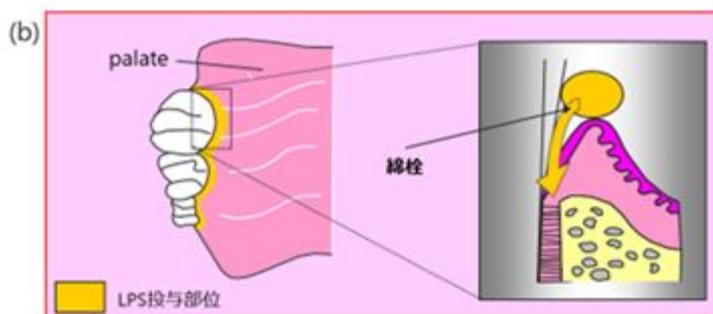
歯周組織における骨吸収関連因子の発現を評価するために、作成した組織切片を用い、Dako EnVision+System を用いて免疫組織化学的染色を行った。一次抗体には抗ラット TNF- α ウサギポリクローナル抗体 (50 倍希釈)、抗 sRANKL ウサギポリクローナル抗体 (200 倍希釈)、抗 OPG ウサギポリクローナル抗体 (400 倍希釈)、抗 cathepsinK 抗体 (200 倍希釈) を用いた。

破骨細胞数計測

CathepsinK 免疫染色標本を用い歯槽骨骨縁に沿って出現する破骨細胞数を、歯槽頂から 1mm の範囲で計数した。CathepsinK は成熟破骨細胞マーカーとして知られているため、CathepsinK 陽性細胞はすべて破骨細胞と定義し、計測した。

統計分析

統計分析には excel 2016 を用い、Student t 検定を行った。P < 0.05 または p < 0.01 を有意とみなした。

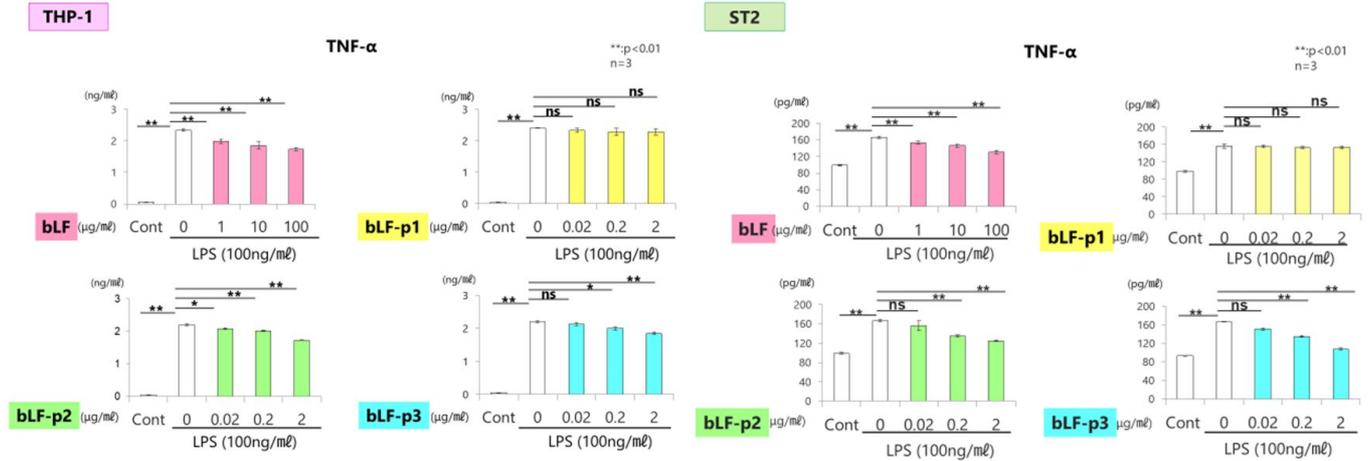


4. 研究成果

本研究は、bLF の TRAF6 結合部位として同定したペプチド(bLF-p1, bLF-p2, bLF-p3)を合成し、その合成ペプチドの抗炎症作用や破骨細胞形成阻害作用を検討することによって、bLF 合成ペプチドが歯周炎などの骨破壊性病変に対する有効なペプチド医薬になるかどうかを検討し、以下の結果を得た。

1. bLF-p2 および bLF-p3 は bLF 同様にマクロファージおよび骨芽細胞における LPS が誘導する炎症性サイトカインを抑制したしかも、これらを組み合わせることによって効果が増強される傾向にあった。bLF-p1 は炎症性サイトカインの上昇を抑制しなかった(図3)。

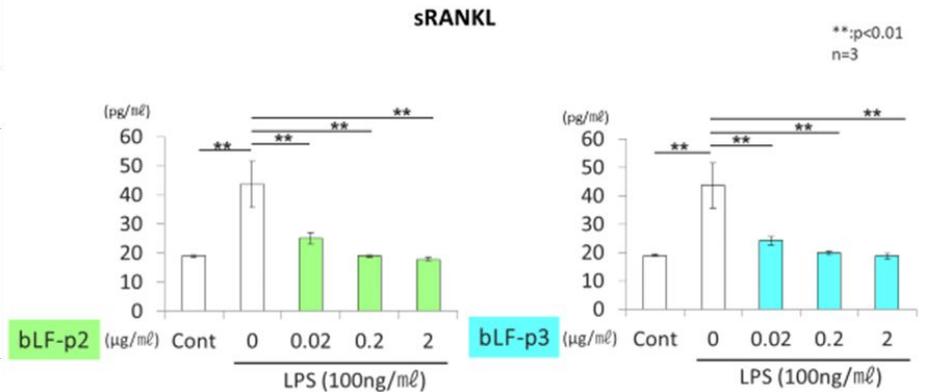
図3 合成ペプチドのサイトカイン発現抑制



2. bLF-p2 および bLF-p3 の投与は、骨芽細胞における LPS が誘導する Rank1 発現の上昇を抑制し、Tnfrsf11b 発現の減少を回復させた。それらによって LPS が骨芽細胞を介して誘導する破骨細胞分化を抑制した(図4)。さらにその分子メカニズムとしてペプチドは細胞内に取り込まれた後 TRAF6 に結合し、そのユビキチン化を阻害することによって、下流の NF- κ B や MAPK における JNK、p38、p65 のリン酸化を阻害しており、それによって炎症系サイトカインである TNF- α 、IL-1 および IL-6、破骨細胞分化因子である RANKL の発現を抑制することで炎症や破骨細胞分化を抑えることが明らかとなった。

図4 合成ペプチドの LPS 誘導 RANKL 発現に及ぼす抑制効果

3. bLF-p2 および bLF-p3 は RANKL による破骨細胞分化そのものも抑制した。ペプチドは TRAF6 と結合しその下流のシグナル伝達を阻害することによって破骨細胞分化マーカーである Oscar、Ctsk、Acp5、Nfatc1 mRNA レベルを抑制することが明らかとなった。



4. bLF-p2 および bLF-p3 はラット歯周炎モデルにおいて、歯周組織における炎症性サイトカインの発現を抑制した。また、免疫組織学的検討で RANKL の発現を抑制し、OPG の発現を回復させていた。さらには破骨細胞の数も優位に抑制し、歯周炎における骨破壊を抑制した(図5ab)。

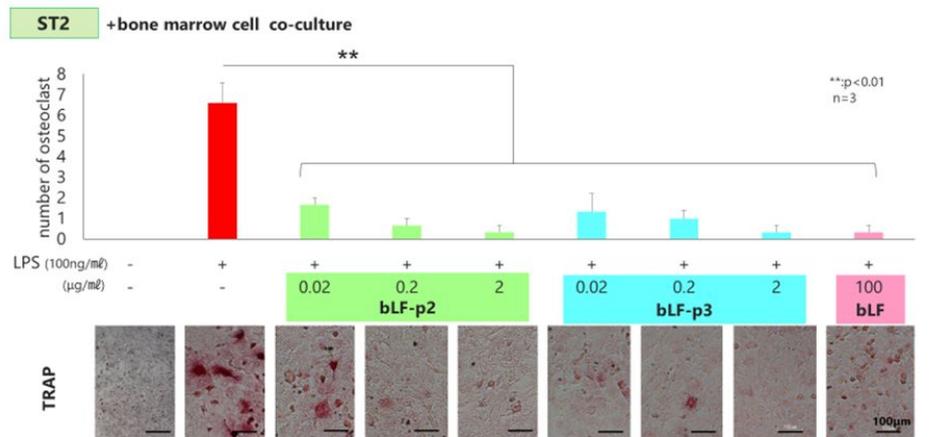
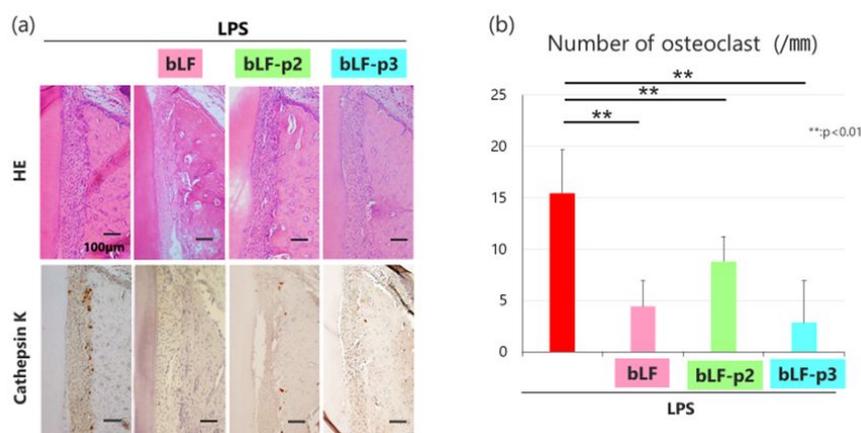


図5 LPS誘導ラット歯周炎モデルの破骨細胞出現に及ぼす合成ペプチドの抑制効果



以上の結果から、合成ペプチド bLF-p2 および bLF-p3 が歯周炎などの骨破壊性病変に対する有効なペプチド医薬となりうることを示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. ラクトフェリン研究に基づく骨破壊性病変に対する新規ペプチド薬の開発:山田 桜, **Che**
C, 宮内睦美, 谷本幸太郎, 高田 隆: 日本ラクトフェリン学会第 8 回学術集会 (広島),
2018.
2. **Development of peptide drug against bone destruction: Yamada S, Chanbora C,**
Miyauchi M, Tanimoto K, Takata T: 第 51 回広島大学歯学会総会 (広島), **2018**.
3. シンポジウム「超高齢社会でのラクトフェリン活用」: ラクトフェリンは歯周病や関節リ
ウマチなどの慢性炎症と炎症性骨破壊を抑制する: 高田 隆: 日本ラクトフェリン学会第 7
回学術集会 (東京), **2016**.
4. リポソーム化ラクトフェリンの経口投与は歯周病や関節リウマチなどの骨破壊性疾患の
進行を制御する: 高田 隆: 第 16 回抗加齢医学会 (横浜), **2016**.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: T R A F 6 の作用を阻害するペプチド、並びにそれを含む N F - B 及び M A P K の
活性化阻害剤、破骨細胞の形成阻害剤、及び医薬組成物

発明者: 高田 隆 (医歯薬保健学研究科)、 楯 真一 (理学研究科)

権利者: 国立大学法人広島大学

種類: 国際特許出願

番号: PCT/JP2019/014447

出願年: 国際出願日 2019 年 4 月 1 日 (優先日: 2018 年 4 月 5 日)

国内外の別:

国内および国外

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 楯 真一

ローマ字氏名： **(Tate Shinichi)**

所属研究機関名：広島大学

部局名： 理学研究科

職名： 教授

研究者番号（8桁）：**20216998**

研究分担者氏名：宮内 睦美

ローマ字氏名： **(Miyachi Mutsumi)**

所属研究機関名：広島大学

部局名： 医歯薬保健学研究科(歯)

職名： 准教授

研究者番号（8桁）：**50169265**

研究分担者氏名：古庄 寿子

ローマ字氏名： **(Furusho Hisako)**

所属研究機関名：広島大学

部局名： 医歯薬保健学研究科(歯)

職名： 助教

研究者番号（8桁）：**00634461**

研究分担者氏名：栃尾 尚哉

ローマ字氏名： **(Tochio Naoya)**

所属研究機関名：広島大学

部局名： 理学研究科

職名： 特任准教授

研究者番号（8桁）：**70466035**

平成 28 年度のみ

研究分担者氏名：安藤 俊範

ローマ字氏名： **(Ando Toshinori)**

所属研究機関名：広島大学

部局名： 医歯薬保健学研究科(歯)

職名： 助教

研究者番号（8桁）：**40754552**

平成 28 年度から 29 年度

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。