

令和元年9月10日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11518

研究課題名(和文) フィブロネクチンN末端断片が結合するCD13の炎症性骨破壊における役割の解明

研究課題名(英文) Clarification of the role of CD13 combined with N-terminal fragment of fibronectin on inflammatory bone resorption.

研究代表者

天野 滋 (AMANO, Shigeru)

明海大学・歯学部・准教授

研究者番号：90167958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：フィブロネクチンN末端のペプチドA(特願2019-115222)が、破骨細胞前駆細胞ではCD13を介して細胞質内に移行して破骨細胞分化を促進させること、一方CD13高発現ヒト線維肉腫由来HT-1080細胞では核内に移動して細胞死を誘導することを見出した。ペプチドAのデリバリー作用を検討するため、破骨細胞分化抑制物質(R-Etodolac)-ペプチドAまたは抗癌剤(Dox)-ペプチドA複合体作製を試みた。このDox-ペプチドAは、HT-1080細胞移植ヌードマウスで腫瘍特異的集積と増殖抑制作用を示した。ペプチドAの抗がん作用とデリバリー作用を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CVCTGNRGEWK、GNRGEW、CNGRC(S-S環状化)のペプチドには、破骨細胞前駆細胞機能維持活性は認められなかったが、ペプチドA(特願2019-115222)にその活性が認められた。さらに、CD13高発現ヒト線維肉腫由来HT-1080細胞に対する抗がん作用も同様にペプチドAにのみその活性が認められた。このペプチドAの抗がん活性は、正常細胞である破骨細胞前駆細胞株4B12細胞とヒトGin-1細胞では認められなかった。このことは、ペプチドAが新規抗がん剤として有効である可能性が出てきたことは、学術的・社会的意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：We found that N-terminal peptide A of fibronectin (Patent application 2019-115222) enhances osteoclast formation via internalization of peptide A-CD13 complex into osteoclast progenitor cells and induces apoptosis of human fibrosarcoma HT1080 highly expressing CD13 via DNA binding in nuclear. Furthermore we tried to prepare R-Etodolac- or Dox-combined peptide A to examine the drug delivery activity of it. Dox-combined peptide A was accumulated in solid tumors of HT-1080 implanted-BALB/c nude mice, and inhibited the growth. Peptide A have anti-tumor activity and tumor specific drug delivery activity.

研究分野：微生物学分野

キーワード：破骨細胞 CD13 Fibronectin NGR配列 がん細胞 HT1080

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞分化・細胞融合・機能発現過程に、骨芽細胞/ストローマ細胞から産生される M-CSF と骨芽細胞や骨細胞の膜上に発現する RANKL の刺激が必要であることが知られている。M-CSF の機能的欠損により骨大理石病を引き起こす op/op マウスでは、マクロファージの減少と破骨細胞の欠損がおきることから、M-CSF は、破骨細胞前駆細胞 (ある種のマクロファージ) に分化させるために必要な因子であると考えられる。RANKL または RANK のノックアウトマウスは破骨細胞分化に異常をきたし、骨大理石骨病様の病態を呈することが明らかにされていることから、RANKL/RANK シグナルが破骨細胞分化には必須であることが証明された。この RANKL/RANK シグナルによって遺伝子発現上昇・活性化してくる NFATc1 が、破骨細胞分化におけるマスター転写因子であることが、NFATc1 欠損した ES 細胞からの破骨細胞形成実験でこの形成が完全に障害されることから明らかにされた。ところで、破骨細胞は骨の局所にしか出現してこない理由として、これらの M-CSF や RANKL の同時刺激が起きる組織が骨であるという理由によるものなのか、またそれ以外の破骨細胞を骨の局所に出現させる別の機構が存在しているのか明らかになっていない。高橋らは、7 週齢成獣マウス骨組織に存在する破骨細胞前駆細胞は、胎生期で増殖能を有していた破骨細胞前駆細胞が骨芽細胞近傍に定着し増殖が停止した F4/80 陰性、RANK 陽性の静止破骨細胞前駆細胞であると提唱している。私共が樹立した破骨細胞前駆細胞株 4B12 細胞は、胎児 14 日目頭蓋冠骨細胞から c-Fms 陽性 RANK 陽性細胞としてセルソーティング、さらにクローニングして樹立化した細胞である。この細胞は、Mac-1 陽性、CD14 陽性、Fc γ II/III R 陽性、F4/80 弱陽性のマクロファージ様細胞であり、破骨細胞前駆細胞としての機能を維持増殖させるためには胎児マウス頭蓋冠由来間葉系細胞の培養上清が必要である。つまり、私共が樹立化した破骨細胞前駆細胞は胎生期の組織由来細胞であり、まさに高橋らが *in vivo* で観察した増殖能を有している胎生期の破骨細胞前駆細胞である可能性が高いと考えられる。また、間葉系細胞も胎生期の細胞であり、この間葉系細胞の培養上清が破骨細胞前駆細胞の増殖とその機能維持に関与しているという私共の *in vitro* の実験結果は、高橋らが *in vivo* で観察した現象を再現できているものと考えられる。胎児マウス頭蓋冠由来間葉系細胞の培養上清に含まれる破骨細胞前駆細胞の機能を維持している液性因子を明らかにすることは、このなぞを解く 1 つの鍵になるかもしれないと考えた。

2. 研究の目的

胎児マウス頭蓋冠由来間葉系細胞の培養上清から破骨細胞前駆細胞の機能を維持する液性因子を精製・同定したところ、Mouse Insulin-2、Fibronectin (Fn) 分解産物 N 末端部分、Nidogen-2 分解産物、そして IGFBP-2 が発見できた。最近、IGFBP-2 ノックアウトマウスで破骨細胞形成抑制と骨吸収減少が認められることが報告され、破骨細胞前駆細胞維持機能因子の一つが IGFBP-2 であるという私共の結果は、これを裏付けるものであると考えられる。IGFBP-2 と Fn 分解産物 N 末端部分で相同性の高いアミノ酸配列領域を basic local alignment search tool (BLAST) を用いて検索したところ、Asn-Gly-Arg-Gly-Glu (NGRGE) の配列が見つかった。最近、NGR モチーフが腫瘍血管で発現している CD13 アイソフォームに結合すること、そしてこの CD13 は単球、破骨細胞でも発現していることが知られている。Fn 分解産物 N 末端 30kDa (Fn30kDa) に破骨細胞前駆細胞の CD13 に結合すること、さらに CD13 は破骨細胞前駆細胞では細胞膜上に、分化した TRAP 陽性多核細胞では核周囲に、そして骨吸収を行っている成熟破骨細胞では ruffled border にその局在が認められる知見を最近得られた。Fn30kDa 刺激によって RANK、TRAF6、NFATc1、c-Fos の遺伝子発現の上昇も認められた。以上から破骨細胞前駆細胞の分化機能維持には Fn30kDa/CD13 シグナル経路が関与している可能性が推測された。そこで、以下の 4 項目を明らかにすることを目的としている。(1) Fn30kDa に存在する CD13 結合部位を明らかにする。(2) anti-Fn30kDa monoclonal antibody を作製し、このフラグメントの骨局所での存在ならびに炎症との関連を明らかにする。(3) CD13 は aminopeptidase N として知られている II 型膜タンパク質である。一般に骨髄球系細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞、上皮細胞、単球、破骨細胞、白血病細胞で発現していることが知られているが、現在糖鎖修飾の違いによる 5 つのサブタイプの存在が知られており、細胞によって異なるという報告もある。しかし、現在までに CD13 の役割とシグナル経路はほとんど明らかにされていない。破骨細胞分化過程において CD13 は特異的局在を示すことから、破骨細胞分化、骨吸収機構における CD13 の役割とシグナル経路を明らかにする。(4) 最後に、CD13 シグナル経路抑制が炎症性骨吸収を抑制できるか否か明らかにする。以上、歯周病原性細菌によって引き起こされる歯槽骨破壊を伴う慢性炎症の機構の一端を明らかにするため、Fn30kDa/CD13 シグナルの役割を検討することを目的としている。

3. 研究の方法

- (1) 細胞：樹立化破骨細胞前駆細胞 4B12 細胞、マウス骨髄細胞由来 M-CSF 依存性マクロファージは破骨細胞形成実験に用いた。ヒト線維肉腫由来 HT-1080 細胞、ヒト骨肉腫細胞株 Hos 細胞、ヒト組織球形リンパ腫・マクロファージ U937 細胞、ヒト骨髄性白血病細胞 HL-60 細胞および急性単球性白血病 THP-1 細胞は、がん細胞増殖抑制実験に用いた。対照として正常細胞としてヒト歯肉線維芽細胞 Gin-1 を用いた。
- (2) 試薬： mM-CSF、sRANKL、ヒト血漿由来 Fn30kDa、マウス IGFBP-2、ペプチド A (特願

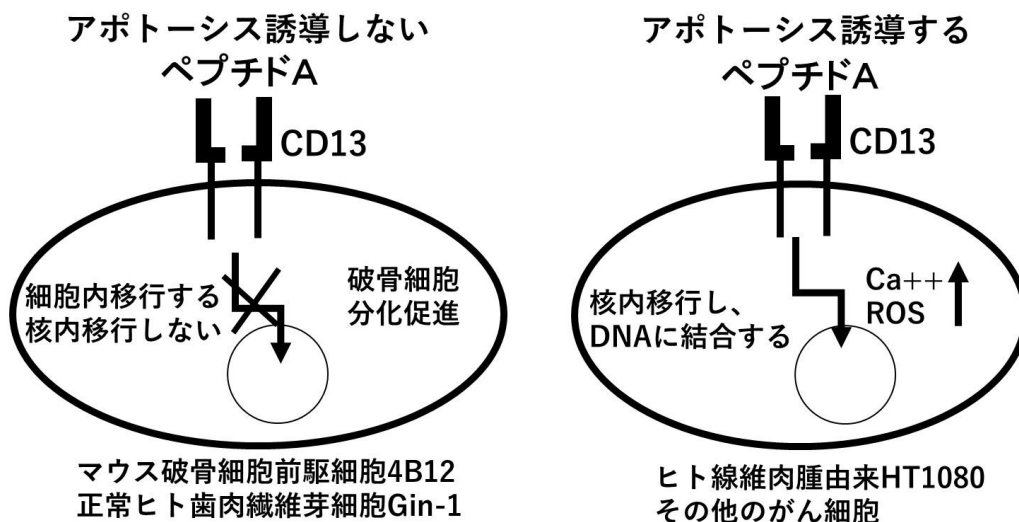
- 2019-115222)、ペプチド B: CVCTGNRGEWK、ペプチド C: GNGRGEW、ペプチド D: CNGRC (S-S 環状化)、FITC-Ahx-ペプチド A、Dox-PEG5-DBCO-Azide-PEG4-ペプチド A、Doxorubicin (Dox) を用いた。
- (3) モノクローナル抗体作製: ラットリンパ節法を用い Fn30kDa を尾根部へ 1 回免疫して、2 ~ 3 週間後血液とラット腸骨リンパ節細胞を採取。PEG を用いてミエローマ細胞と融合、ELISA スクリーニング、ハイブリドーマのクローニングを行い、ペプチド A を認識するモノクローナル抗体を取得する。
 - (4) 破骨細胞前駆細胞分化機能維持活性測定: 4B12 細胞を 96 穴培養プレートに 5000 個播種し、各試料と M-CSF (5 ng/ml) との両刺激で 3 日間培養後、M-CSF と s RANKL 添加 10%FBS 加 α -MEM 培地中で 5 日間培養した後、TRAP 陽性多核細胞数を測定した。
 - (5) 細胞内カルシウムイオン濃度変化: Fluo4-AM 蛍光色素を用いリアルタイムで測定した。
 - (6) アポトーシス試験: 細胞を 96 穴培養プレートに 5000 個播種後、ペプチド A、ペプチド B、ペプチド C、ペプチド D を添加し、7 日間血清添加培地 (α -MEM+10%FBS) で培養した。その後、JC-1 で染色し共焦点レーザー顕微鏡 LSM800 で画像を取得、ImageJ で解析した。
 - (7) がん細胞死誘導試験: FITC-Ahx-ペプチド A 存在下、血清添加培地で 9 日間培養した。その後、生細胞染色用蛍光色素 Calcein-AM と死細胞染色用蛍光色素 Propidium Iodide (PI) で染色した後、共焦点レーザー顕微鏡 LSM800 で画像を取得、ImageJ で解析した。
 - (8) 免疫沈降解析: FITC-Ahx-ペプチド A を HT1080 細胞に 4 °C で 2 時間作用させ、IP Lysis/Wash buffer で溶解し、IgG Fraction Monoclonal mouse anti-Fluorescein (FITC) (抗 FITC 抗体) または Mouse IgG Isotype control (コントロール抗体) と A/G アガロースで免疫沈降した。免疫沈降されてきたタンパク質を SDS-PAGE ゲル (8%) にロードした。ウェスタンブロッティングで、CD13、IgG の重鎖、チューブリン、FITC-Ahx-ペプチド A を検出した。
 - (9) FITC-Ahx-ペプチド A の細胞膜への結合試験: PE 標識ヒト CD13 抗体と FITC-Ahx-ペプチド A で各細胞を染色した。HT1080 細胞の蛍光強度を基準に各細胞の CD13 発現と FITC-Ahx-ペプチド A の結合部位を共焦点レーザー顕微鏡 LMS800 で観察した。
 - (10) FITC-Ahx-ペプチド A の細胞内局在観察: FITC-Ahx-ペプチド A を各細胞部に添加、3 日または 9 日間培養した。培養 3 日目の細胞は、10%ホルマリンエタノールで固定した後、培養 9 日目の細胞は固定せずに、DAPI 染色した。その後、共焦点レーザー顕微鏡 LSM800 で観察した。
 - (11) がんマウスの作成: HT-1080 細胞を 5 週齢 BALB/c ノードマウスの背中へ皮下移植した。移植後の腫瘍が 30~60 mm³ に達したことを確認した後、これをがんマウス実験に供した。
 - (12) がんマウス実験: FITC-Ahx-ペプチド A をがんマウスの腹腔内に 10 mg/kg になるように 3 日ごとに投与した。3 日ごとに DRETEC 体重計 (株式会社ドリテック、Japan) で体重を測定し、ノギス (最大 150 mm、最小 0.05 mm) (MITUTOYO, Japan) で腫瘍の大きさ (推定体積 (短径×長径×高さ× π /6 mm³)) を測定した。
 - (13) がんマウスにおける抗がん剤送達試験: Dox-PEG5-DBCO-Azide-PEG4-ペプチド A を 5 mg/kg、および Dox を 1.2 mg/kg になるようにがんマウスに接種した後、腫瘍の大きさを測定した。

4. 研究成果

- (1) ペプチド A を認識するモノクローナル抗体が取得できた。今後、特許申請する予定である。
- (2) Fn30kDa の NGR を含むペプチド領域、ペプチド A、ペプチド B、ペプチド C、ペプチド D の破骨細胞前駆細胞分化機能維持活性を調べたところ、ペプチド A にのみ、Fn30kDa と同様の活性が認められた。この結果は、ペプチド A の配列がその活性には必要であることがわかった。
- (3) Santos AN 等は、単球の細胞表面の CD13 を認識する抗体を処理すると細胞内カルシウムイオン濃度が上昇し ERK1/2, JNK, and p38 のリン酸化を促進させることを報告している。そこで、CD13 を高発現している HT-1080 細胞を用いて、細胞内カルシウムイオンの上昇がみられるか否か検討した。ペプチド B, C, D と比較してペプチド A を添加したところ、明らかに細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が認められた。このことは、カルシウム上昇に伴うシグナル伝達には、このペプチド A 配列が必要であることが示唆された。
- (4) 細胞内カルシウムの上昇が ROS の発現を上昇させアポトーシスを誘導することが知られている。そこで、HT-1080 細胞に対してアポトーシス誘導が起きるか否か検討した。ペプチド A で刺激したときのみ、アポトーシス率の上昇が認められ、ペプチド B、ペプチド C、およびペプチド D では、アポトーシス率の上昇は観察されなかった。また正常細胞である Gin-1 では、そのアポトーシス率の上昇は観察されなかった。ペプチド A のアポトーシス誘導作用は、正常細胞には影響なく、がん細胞である HT-1080 細胞に対してのみ現れることがわかった。この現象は、非常におもしろい結果であると考えた。
- (5) さらに、このペプチド A によるがん細胞アポトーシス誘導作用が、細胞死を誘導しているか否か調べた。Gin-1 細胞に対する死細胞率の上昇は観察されなかったが、HT-1080 細胞、U937 細胞、HL-60 細胞および Hos 細胞に対する死細胞率の上昇が認められ、1%水準で有意差が認められた。THP-1 細胞に対しては 5%水準で有意差が認められた。このことから、ペプチド A は、正常細胞においては細胞死誘導作用を示さないが、がん細胞においては細胞死誘導作用を示すことから、ペプチド A には高い選択毒性があることがわかった。

- (6) ペプチドAのがん細胞死誘導作用が CD13 を介したものであるか否か、FITC-Ahx-ペプチド A と抗 FITC 抗体を用いて、免疫沈降によって調べた。コントロール抗体で免疫沈降したサンプルからは CD13 が検出されなかったが、抗 FITC 抗体で免疫沈降したサンプルからは CD13 が検出された。このことは、ペプチドAが細胞膜上の CD13 に結合することが示唆された。
- (7) ペプチドAのがん細胞死誘導作用が CD13 に結合した後、どのような経路をたどって起きているか FITC-Ahx-ペプチド A を用いて時間を追って調べてみた。3 日目の細胞死を起していない HT1080 細胞では、FITC-Ahx-ペプチド A (緑色) が核染色の DAPI (青色) の周りの細胞質に存在していた。しかし、9 日目の細胞死が起きている HT1080 細胞では、FITC-Ahx-ペプチド A と DAPI 染色の重ね合わせ画像で水色を呈することから、FITC-Ahx-ペプチド A は核に移行し染色体 DNA と結合していることが確認された。さらに Gin-1 細胞とその他のがん細胞について、共焦点レーザースキャン顕微鏡 LSM800 で Z スキャンを行った。Gin-1 細胞の核は、DAPI によって染色されず、FITC-Ahx-ペプチド A が、細胞質に留まっていることが X Z 断面、Y Z 断面からも確認された。一方、U937 細胞、HL-60 細胞、THP-1 細胞および Hos 細胞では、FITC-Ahx-ペプチド A と DAPI 染色の重ね合わせ画像の色が水色を呈しており、X Z 断面、Y Z 断面から FITC-Ahx-ペプチド A が核に移行し、染色体 DNA と結合していたことが確認された。以上から、ペプチド A は、正常細胞である 4B12 細胞や Gin-1 細胞に対しては核内に移行せず細胞死を誘導しないが、がん細胞の場合は核内に移行して特異的に細胞死を誘導することが明らかとなった。
- (8) そこで、FITC-Ahx-ペプチド A の in vivo での効果を検討するために、HT1080 接種 5 週齢雄 BALB/c nu/nu マウスを用いた。対照投与群と比べ、12 日目から 24 日目まで FITC-Ahx-ペプチド A 投与群は、腫瘍の増殖抑制が 1%水準で有意差が認められた。対照投与群では、24 日目で 1500 mm³ を超えた。その一方で、FITC-Ahx-ペプチド A を用いたマウスでは、約 600 mm³ で、その腫瘍成長抑制効果が確認された。さらにその後、33 日まで、腫瘍の縮小傾向が確認された。
- (9) 最後に抗がん剤送達試験を行った。18 日目から 24 日目まで Dox-PEG5-DBCO-Azide-PEG4-ペプチド A 投与群は対照投与群と Dox 投与群と比べて腫瘍の増殖抑制が 1%水準で有意差が認められた。対照投与群と Dox 投与群では、24 日目で約 2000 mm³ まで大きくなった。その一方で、Dox-PEG5-DBCO-Azide-PEG4-ペプチド A 投与群では、腫瘍の大きさが 18 日目で 800 mm³ から 500 mm³ まで減少し、24 日までその抑制効果が確認された。すなわち、ペプチド A そのものの抗がん効果だけでなく、抗がん剤の効果も重複し、大きく腫瘍を縮小させた。この結果は、ペプチド A が、抗がん剤などの送達キャリアとしても有効であることが証明された。

以上の結果をまとめると下記の模式図のように結論づけられる。FN-I 5 に存在するアミノ酸配列ペプチド A は破骨細胞前駆細胞上の CD13 に結合して、その後細胞内に移行し破骨細胞分化促進を誘導するが、がん細胞上の CD13 に結合した場合、細胞内、核に移行し、DNA に結合、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。さらに、ペプチド A は、抗がん剤をがん細胞の核内に運ぶこともできることがわかった。現在、破骨細胞分化抑制物質 (R-Etodolac) 結合ペプチド A を作製し、in vivo マウス実験を遂行中である。当初の課題とはかけ離れた結果を導き出したが、このペプチド A は正常細胞とがん細胞の違いを認識することができ、がん細胞特異的に核内移行しアポトーシスを誘導することから、がん細胞選択毒性が高い治療薬になる可能性が証明された。この結果を基に、このペプチドに関する特許を出願中である。



5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計 1 件）

- ① 天野 滋、大森喜弘 The N-terminal fragment of Fibronectin binds to CD13 of osteoclast progenitor and enhances osteoclastogenesis. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：細胞透過性ペプチド

発明者：天野 滋

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2019-115222

出願年：令和 1 年

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：関根圭輔

ローマ字氏名：SEKINE keisuke

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8 桁）：00323569