

令和元年6月10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11647

研究課題名(和文) カテプシンK阻害薬とPTH併用による炎症性骨吸収抑制効果の検討

研究課題名(英文) Consideration of inhibitory effect for inflammatory bone resorption with Cathepsin K inhibitors and Parathormone.

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

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)：着目していた炎症抑制作用と骨吸収抑制作用を併せ持つカテプシンK阻害薬 odanacatibの開発が断念されたことに伴い、新たな薬剤候補の探索をすすめた。物質候補の探索には、炎症性骨吸収マウスモデルを用いた検討を行った。幹細胞活性化効果の報告がある絶食療法に着目し、臼歯周囲に糸を巻き付け炎症性骨吸収を誘発した後の回復過程を観察した。興味深いことに、絶食群では明らかな骨形成促進作用が認められ、さらに、安楽死時に摘出した骨髄を培養し、コロニーアッセイ(CFU-F)を行うと、絶食群は有意に増加していた。今後、断食時の炎症性骨吸収回復過程を詳細に検討することにより、新規薬物が生まれ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

バランスがとれた骨代謝回転を導く骨粗鬆症治療薬はまだ開発されておらず、より安全で効果的な治療薬・治療法の探索が求められている。本研究において、食事スケジュールの違いによって代謝機能に及ぼす影響が異なることが示唆され、炎症性骨吸収をはじめ病態に適した食事療法を見出すことができれば、目的とする代謝機能を効果的に向上できる可能性が考えられる。さらに、薬剤との併用によってより効果的に病態改善がもたらされ、骨粗鬆症をはじめ歯周病やインプラント周囲炎などにおける有用な治療方法確立の礎になると期待される。

研究成果の概要(英文)：We started exploring the effects of Odanacatib, a cathepsin K inhibitor on inflammation and bone resorption. However, we faced a difficulty to continue this subject since the development of Odanacatib as a new drug candidate for osteoporosis treatment was stopped. Therefore, we used ligature-induced inflammatory bone resorption model and observed the healing process after inducing the inflammatory bone resorption with a fasting regime, which was reported to promote stem cell activity, to find out a new drug candidate on inflammatory bone resorption. Interestingly, fasting regimen was effective to increase bone formation activity. Furthermore, a colony formation assay (CFU-F) of bone marrow cells showed the significant increase of the mesenchymal stem cells in the fasting-regime group. Further investigation to clarify why fasting regime affects the healing process from the inflammatory bone resorption is necessary to find out a new therapeutic candidate on inflammatory bone resorption.

研究分野：硬組織薬理

キーワード：炎症性骨吸収 インプラント 歯周炎 食事療法

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

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えている今日において、健康上の問題がなく日常的に支援や介護を必要とせず自立した生活ができる「健康寿命」を延ばす取り組みが注目されており、心身共に健康を維持する上でも、口腔機能の維持は重要な役割を担っている。

歯周病やインプラント周囲炎などによる歯や歯槽骨の喪失が ADL/QOL (activity of daily living/ quality of life) に及ぼす影響はとて大きく、近年、歯科治療においてインプラント治療が普及し多くの患者が恩恵を受けている一方、埋入後のメンテナンスの方法によってはインプラント周囲に歯周病と同じような病変が生じることが明らかになっている。しかし、治療法は確立されておらず、有用な治療方法の確立が待たれている。

そこで、当時臨床試験が行われていたカテプシン K 阻害薬 Odanacatib の特異性に着目し、骨形成促進薬の PTH (Parathyroid Hormone) との併用によってより効果的にインプラント周囲炎の病態改善に効果を示すのではないかと仮説を立てた。臨床で使用されている骨粗鬆症治療薬は骨代謝回転全体に影響をもたらしてしまい、骨吸収と骨形成をバランスよく制御できる治療薬がなかったが、Odanacatib は破骨細胞に特異的に発現するカテプシン K を選択的に阻害することによって骨吸収を抑制していたため、新薬として注目されていた。さらに、カテプシン K 阻害薬は、抗炎症作用も報告されており (Asagiri et al; Science, 319, 2008) 全身的な骨量改善だけでなく炎症性骨破壊に対しても有用であると考えられ、インプラント周囲炎などの治療方法確立の礎になると考えられた。

2. 研究の目的

炎症抑制作用と骨吸収抑制作用を両方併せ持つカテプシン K 阻害薬の特異性に着目し、炎症によって病態が進行するインプラント周囲病変の病態改善に対する有用性を見出すことを目的として本研究を計画した。さらに、PTH との併用によってより効果的に骨量改善に結び付くと考え、バランスがとれた骨代謝回転を導く治療方法の礎になる可能性の検討を目指し計画した。

3. 研究の方法

(1) 薬剤候補の探索

本研究で着目していた Odanacatib は、新規骨粗鬆症治療薬として臨床試験が進められていたが、2016 年秋に開発中止が発表された。そこで、カテプシン K 阻害薬と同様の炎症抑制作用と骨吸収抑制作用が見込まれる薬剤候補として、RANKL 結合ペプチド剤の探索を試みた。

(2) インプラント周囲炎誘発モデルマウスの立ち上げ

報告されている論文を参考にし (Nguyen Vo et al; Clin. Oral Impl. Res. 28, 2017) インプラント周囲炎誘発モデルマウスの立ち上げを試みた。麻酔下で、C57BL/6 マウスの上顎左側第 1 臼歯を抜歯し、8 週間後にインプラント体埋入を施した。インプラント埋入 4 週間後にインプラント体の根元をシルク糸で結紮し、インプラント周囲炎の誘発を試みた。

(3) インプラント体を含む非脱灰標本切片作成

骨形態計測法を用いて様々なパラメーターの測定・解析・評価を行うため、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) の観察に適した非脱灰標本の切片作成方法の確立を目指した。

(4) 炎症性骨吸収モデルマウスの再現

報告されている論文を参考にし (Abe et al; J Innuol Methods. 394, 2013) 麻酔下で 7 週齢 C57BL/6 マウスの上顎左側第 2 臼歯の根元をシルク糸で結紮し、7 日間の結紮維持により炎症性骨吸収を引き起こした。

(5) 炎症性骨吸収モデルマウスにおける絶食療法が及ぼす影響の解析

炎症性骨吸収誘発後、マウスを 4 群 (L-/F-群: コントロール群 + 自由摂食、L+/F-群: 歯周炎誘発群 + 自由摂食、L+/IF 群: 歯周炎誘発 + 間欠的 (1 日おき) 絶食群、L+/PF 群: 歯周炎誘発 + 連続的 (2 日間絶食 + 5 日間自由摂食) 絶食群) に分け 3 週間飼育し、炎症性骨吸収からの回復過程を観察した。摘出した骨髄を培養し、コロニーアッセイを行い、アリザリンレッド染色にて石灰化能を測定した。また、血清中の骨代謝マーカー (オステオカルシン、Trap5b、コルチコステロン) を ELISA 法にて測定し、絶食を組み込んだ食事療法が骨代謝マーカーに及ぼす影響を比較検討した。

4. 研究成果

Odanacatib と同様の効果が見込まれる物質の探索のため、マウス間葉系幹細胞株 C3H10T1/2 細胞に RANKL 結合ペプチド剤を添加し、細胞増殖試験を行った。コントロールペプチドを添加した場合と比べて、RANKL 結合ペプチドである W9 もしくは OP3-4 の添加によって細胞が有意

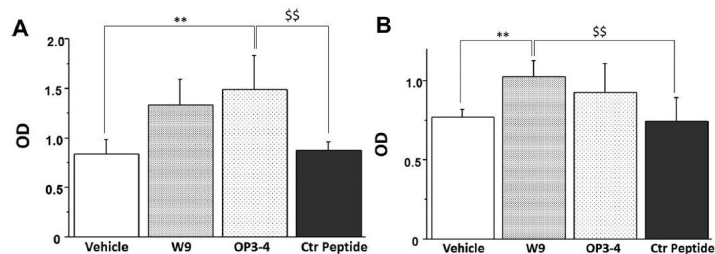


図1 A:24 時間培養、B:48 時間培養

に増殖した(図1)。また、MIA(monosodium-iodoacetate)誘発変形性関節炎モデルマウスの膝関節腔に RANKL 結合ペプチド剤を投与したところ、軟骨変性の抑制が観察された(図2)。これらの結果から、RANKL 結合ペプチド剤は、間葉系間細胞の増殖能だけでなく分化誘導能をもつことが示唆され、新規物質候補になり得る可能性があると考えられた。

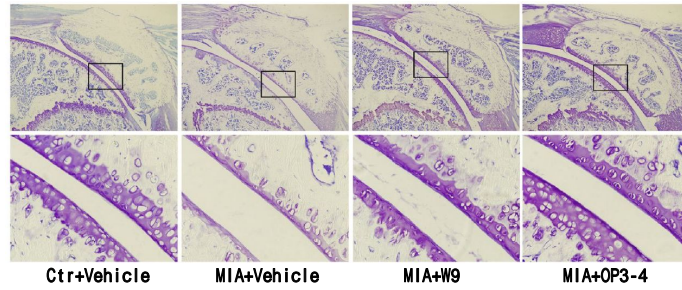


図2 トルイジンブルー染色

また、実験モデルマウスとして、インプラント周囲炎誘発モデルマウスの立ち上げを試みた。報告されている論文を参考に、マウスに抜歯・インプラント体埋入・インプラント体の結紮を施した。インプラント体結紮から2週間後に *in vivo* μ CTを用いた顎骨のX線学的観察を予定していたが、観察までの過程においてインプラント体の脱落などが生じ、実験に供することが可能なマウスを得ることが難しかった。安定してインプラント周囲炎をマウスに誘発するためには、施術におけるさらなる工夫と再検討及び手技向上が必要であった。

インプラント体を含む顎骨標本を CLSM で観察し骨形態計測を行うため、樹脂包埋による非脱灰切片の作成を試みた。まず、Villanueva 骨染色液により前染色した顎骨を MMA 樹脂にて包埋し、包埋ブロックをゼーゲミクロトームで 200 μ m の厚さに切り出した。切り出した切片をプラスチックスライドに載せ、均一の厚さになるように研磨を施すことにより、CLSM での観察が可能な切片を得ることができるようになった。1つの標本から得られる切片数に限りがあるため、得られるパラメーターに限界が生じた。切片の切り出し方や研磨方法の工夫・精度の向上によって、さらにより薄い切片を得られることができるようになれば、様々なパラメーターを測定することができ、より詳細な評価を行うことができるようになると思われる。

Odanacatib と同様の効果が見込まれる物質候補の探索には、炎症性骨吸収モデルマウスを用いた検討を行った。幹細胞活性化効果が報告されている絶食療法に着目し、炎症性骨吸収を伴う病変の病態改善に効果を示すのではないかと仮説をたてた。報告されている論文を参考にして炎症性骨吸収モデルマウスの再現を行い、病態誘発後に絶食を組み込んだ食事スケジュール下で飼育した。

大腿骨から抽出した骨髄を培養し、コロニーアッセイを行った。アリザリンレッド染色を行ったところ、絶食群の骨髄から形成されるコロニーが優位に増加しており、石灰化能亢進が見られた(図3)。また、血清中の骨代謝マーカー(オステオカルシン、Trap5b、コルチコステロン)を ELISA 法にて測定し、食事療法が及ぼす影響を比較検討した。炎症性骨吸収からの回復過程をみたところ、全身の骨代謝マーカーに及ぼす変化は明らかではなかったが、炎症性骨吸収誘発群は未処置群と比べてコルチコステロン減少およびオステオカルシン増加傾向が認められた(図4)。しかし、間欠的絶食群は他群と比べてオステオカルシンおよび TRACP 5b の減少傾向がみられ、骨代謝よりもエネルギー源確保のための脂質代謝などに重点が置かれている可能性が示唆された。食事のスケジュールが及ぼす影響の多様性が示唆され、それぞれの病態や治療薬の種類に適した組み合わせ

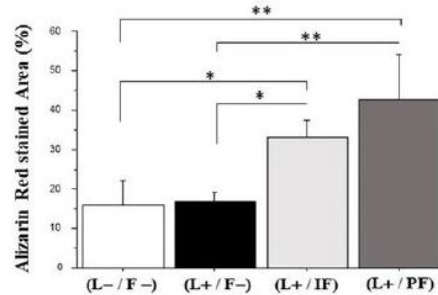


図3 アリザリンレッド染色

* p < 0.05, ** p < 0.01

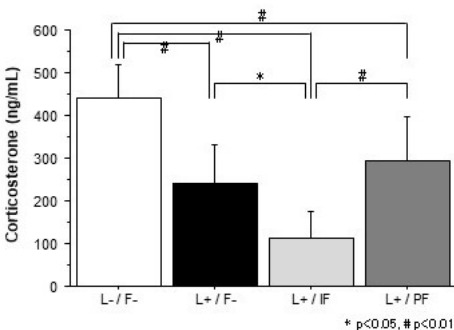
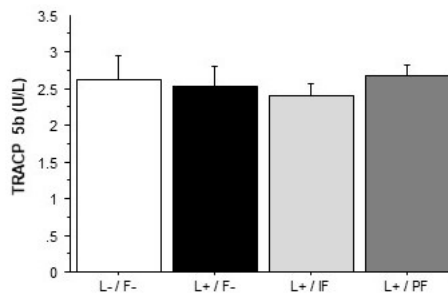
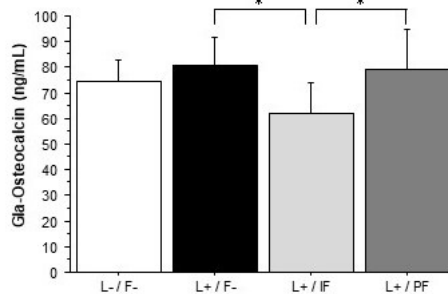


図4 血清中骨代謝マーカー

* p < 0.05, # p < 0.01

を見いだすことができれば、より有効に改善に導く可能性があると思われる。

本研究において、当初計画をしていた Olanacatib を用いた検証を行うことはかなわなかったが、新規候補としての RANKL ペプチド剤の可能性が示唆されたことは有用であると思われる。膝関節腔への局所投与によっても RANKL 結合ペプチド剤が効果を発揮していたことから、インプラント周囲炎や歯周病等の治療にも貢献できると考えられる。間葉系幹細胞は骨芽細胞をはじめ様々な細胞に分化するため、RANKL 結合ペプチドの効果的な投与方法を見いだすことができれば、骨粗鬆症治療薬や様々な再生医療への応用も考えられる。また、病態に適した食事療法を見いだすことができれば、薬剤との併用によってより効果的に病態改善に導く可能性があることが期待される。さらに、今後、断食時の炎症性骨吸収回復過程を詳細に検討することにより、新規薬物が生まれる可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Lia Kartika Wulansari, Boosana Kaboosaya, Masud Khan, Mariko Takahashi, Hidemi Nakata, Shinji Kuroda, Kazuhiro Aoki, Shohei Kasugai: Beneficial effects of fasting regimens on periodontal tissues in experimental periodontitis mice model. Journal of International Dental and Medical Research. 2018; 11(2) : 362-369. <http://www.jidmr.com/journal/contents-of-jidmr-2018-vol-11-no-2/>、査読あり

Md Zahirul Haque Bhuyan, Yukihiro Tamura, Eri Sone, Yuki Yoshinari, Chizuko Maeda, Mariko Takahashi, Yasuhiko Tabata, Ramachandran Murali, Yoshihiro Waki, Kazuhiro Aoki: The intra-articular injection of RANKL-binding peptides inhibits cartilage degeneration in a murine model of osteoarthritis. J. Pharmacol. Sci.. 2017; 134 (2): 124-130. DOI: 10.1016/j.jphs.2017.05.008、査読あり

〔学会発表〕(計1件)

Md.Zahirul Haque Bhuyan, Chizuko Maeda, Yuki Yoshinari, Marin Kawasaki, Yasutaka Sugamori, Genki Kato, Mariko Takahashi, Yukihiro Tamura, Kazuhiro Aoki. The therapeutic effects of the RANKL-binding peptides on cartilage destruction. 13th Bone Biology Forum, 2016.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：青木 和広

ローマ字氏名：(AOKI, kazuhiro)

所属研究機関名：東京医科歯科大学

部局名：大学院医歯学総合研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：40272603

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。