

平成 22 年 5 月 13 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19390471  
 研究課題名（和文） 新規 TNF 受容体阻害 CIAM 化合物による炎症性骨吸収治療薬開発の  
 試み  
 研究課題名（英文） Development of new therapeutic drugs for inflammatory bone  
 destruction by the CIAM compound, a new TNF receptor antagonist.  
 研究代表者  
 大谷 啓一（OHYA KEIICHI）  
 東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授  
 研究者番号：10126211

研究成果の概要（和文）：Cavity-induced allosteric modification (CIAM)化合物は、TNF 受容体のリガンド結合部位の近傍に結合するとリガンドの結合能力に影響を与えて TNF 作用が抑制される。本化合物が破骨細胞の増殖、分化、機能に影響を与え、骨吸収を抑制するのではないかと推測して研究を行なった。CIAM 化合物は破骨細胞形成の抑制し骨量増加を示すことが明らかとなった。さらに炎症性に起こる骨形成抑制に対しても拮抗的に作用することが明らかにされた。CIAM 化合物は炎症により起こる骨吸収あるいは骨形成抑制への新しい創薬化合物として作用する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The cavity-induced allosteric modification (CIAM) compound binds to the cavity located near by the specific loop of the ligand binding site of the TNF receptor and thus inhibits the function of TNF. This study was undertaken to clarify the possibility in which the CIAM compound inhibits the proliferation of the osteoclasts and decreases bone resorption. The CIAM compound inhibited the osteoclast formation and finally increased bone formation. In addition, the compound inhibited the decrease of bone formation which accompanied with the inflammation. These results indicated that the CIAM compound is a new candidate drug both for the inhibitor of bone resorption and for the stimulator of bone formation induced by the inflammatory reactions.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2008 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2009 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

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：TNF 受容体、骨吸収、RANK/RANKL、破骨細胞、NF-κB、骨吸収阻害、低 Ca 食飼育食マウス

## 1. 研究開始当初の背景

略号

CIAM: cavity-induced allosteric modification

TNF: tumor necrosis factor

TNFR: TNF receptor

TRAP: tartrate resistant acid-phosphatase

NF-κB: nuclear factor-κB

IKK: inhibitor for NF-κB kinase

RANK: receptor activator of NF-κB

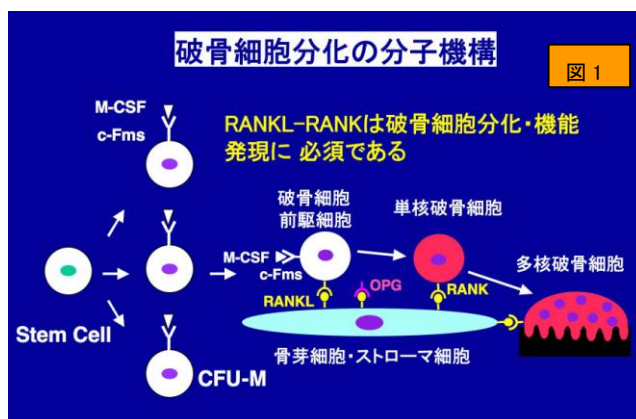
RANKL: RANK ligand

OPG: osteoprotegerin

歯科領域の代表的な疾患である歯周病に付随する炎症性顎骨吸収は、支持組織としての機能を失わせ歯牙の喪失をきたす。歯牙の喪失は直ちに食物を咀嚼する機能の減退を招く。これを防ぐには炎症性骨吸

収を治療・予防できる薬物療法の開発が急務である。これまで開発されてきた骨疾患治療薬の多くは骨粗鬆症などの代謝性骨疾患の治療を目的としており、炎症性骨吸収の抑制を薬物効果の目的としたものはない。したがって歯周病などの治療薬として炎症と骨吸収を抑制する効果を持つ薬物、すなわち炎症性骨吸収治療薬が開発されることが望ましいと考えられる。

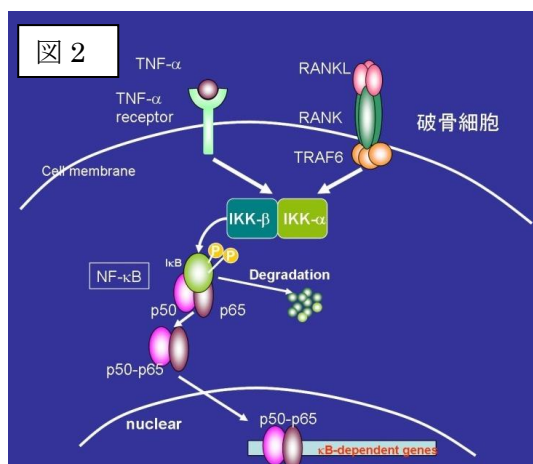
RANK/RANKL 情報伝達システムは破骨細胞増殖・分化機構のキーファクターであり、そのデコイ受容体である OPG とともに骨吸収の制御に関与することが認知されている(図 1)。すでに多くの物質が RANK/RANKL システムをターゲットして開発が進められており、いずれも骨吸収阻害が薬理効果として示されており、有望な方法とされている(表)。



## RANK/RANKL をターゲットとした骨吸収阻害薬 \* 我々が開発しているもの

	OPG	抗 RANKL 抗体 (AMG162)	W9 ペプチド* (WP9QY)	NBD ペプチド* (NBD)	RANKL ワクチン*	CIAM 化合物 今回の研究課題
メカニズム	RANKL の decoy 受容体	RANKL への抗体	TNF 受容体、 RANK/RANKL の相互作用抑制	Ikkβ, Ikkα の複合体形成抑 制	RANKL への ワクチン効果	RANK の構造変化 (予想)
効果	骨吸収抑制	骨吸収抑制	骨吸収抑制 抗炎症	骨吸収抑制 抗炎症	骨吸収抑制	骨吸収抑制(予想) 抗炎症(予想)
研究段階	臨床応用開発中	臨床応用開発中	実験段階	実験段階	実験段階	実験段階
副作用等	不明	不明	不明	不明	不明	不明

しかし骨吸収阻害に加えて炎症を標的とした薬物開発はまだ緒についたばかりである。我々は炎症性骨吸収を阻害できる薬物開発の中で、TNF(腫瘍壊死因子)受容体拮抗ペプチド W9 が RANK/RANKL 相互作用を阻害して骨吸収活性を低下させることを見出した (Aoki et al, J Clin Invest, 116: 1524-34, 2006)。RANK/RANKL は TNF のファミリーを形成しており、細胞内情報伝達の最終経路のひとつとして NF- $\kappa$ B の核移行による遺伝子増幅を行う点では同じメカニズムを共有する(図2)。

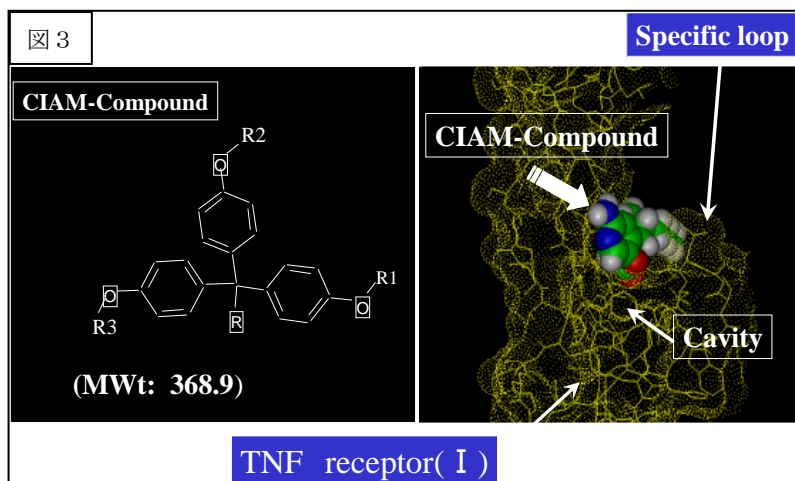


ペプチドW9は TNF 受容体拮抗ペプチドではあるが、RANK/RANKL 相互作用に影響を与えて結果的に破骨細胞機能を抑制して骨吸収を押さえるものと考えられた。また IKK  $\alpha$ 、 $\beta$  複合体生成抑制により NF- $\kappa$ B1 核移行を阻害する 機能ペプチド (NEMO binding domain)NBD ペプチド)を福岡歯科大学との共同研究にて見出し、NF- $\kappa$ B の古典的シグナル経路の遮断が骨吸収活性阻害に有効であることを明らかにした(Jimi et al, Nature Med: 10, 617-624, 2004)。RANK/RANKL 情報伝達経路として NF- $\kappa$ B が破骨細胞の増殖・分化に必須であることから、W9ペプチドによる受容体・リガンド結合の阻害や NBD ペプチドによる NF- $\kappa$ B 核移行の阻害が、薬物開発において重要な標的となる可能性を示した。しかしこれらのペプチドは安定性や薬物としての生体移行性に問題があり現在これらの欠点を克服すべく研究を行っている。

一方で W9ペプチドの共同研究者であるペンシルバニア大学 Prof. Murali は TNF 受容体の構造変化をもたらす アロステリック結合部位に注目して、この部位を pseudoallosteric cavity と呼んだ。TNF 受容体のリガンド結合部位 (specific loop) の近傍に存在する cavity に小分子が結合すると TNF の情報伝達系および NF- $\kappa$ B 核移行は抑制されることを示した (Murali et al, PNAS 102: 10970-10975, 2005) (図3)。彼らはこのような手法を”cavity-induced allosteric modification (CIAM)”と名づけて一連の化合物を見出し、TNF 受容体の機能を変化させる小分子としての可能性を提示している。我々はこの 新規の CIAM 化合物 に注目し、

Prof. Murali との共同研究プロジェクトとして本化合物が破骨細胞の増殖、分化、機能に影響を与え、in vivo にて骨吸収を抑制するのではないかとの発想にいたった。

もし CIAM 化合物 が RANK/RANKL 受容体リガンド複合体形成時にア



ロステリック効果により阻害効果を与えることが本研究において明らかになれば、骨吸収阻害薬としての新たなメカニズムを見出すことになる。CIAM化合物はTNFあるいはRANK/RANKL受容体リガンドの結合を直接阻害したり情報伝達系のある分子機能を阻害するのではなく、受容体のリガンドへの結合能力を変化させることにより破骨細胞に影響を与える新しい薬理作用を有していることが予想される。

## 2. 研究の目的

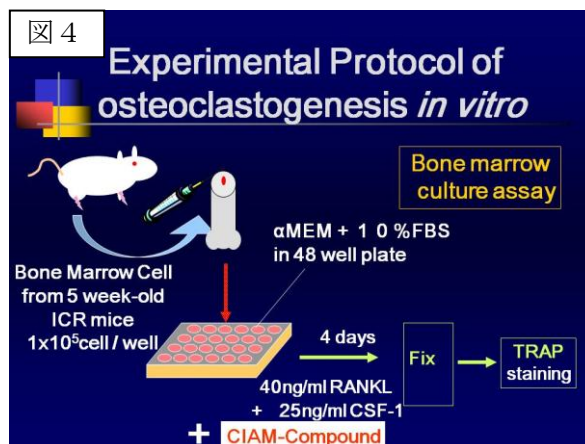
本研究は炎症と骨吸収両者を制御する薬物開発の中で、TNF受容体に影響を与えるCIAM化合物の効果を骨の実験系を用いて明らかにし将来有望な新規化合物としての可能性を探索することにある。

## 3. 研究の方法

CIAM化合物の効果を予備的に検索したところ、*in vitro*における破骨細胞様細胞の形成を阻害することを確認し、この化合物が破骨細胞機能に影響を与える可能性が示された。そこで培養系を用いた観察と実験動物を用いた検索を行い、CIAM化合物の破骨細胞に与える影響について詳細に検討した。

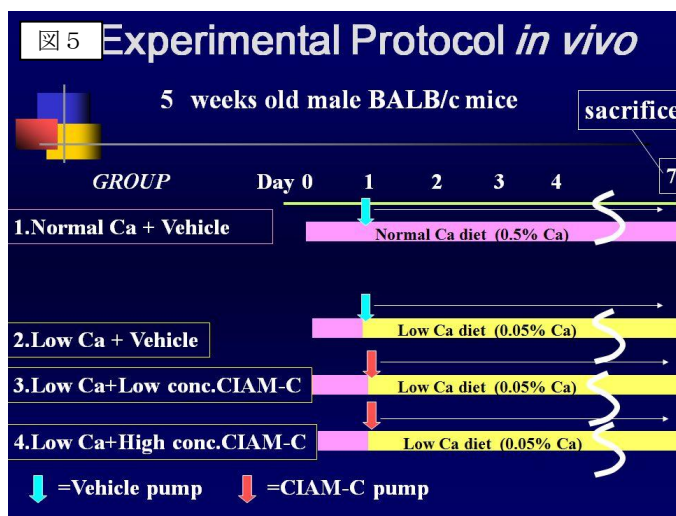
### (1) *In vitro*実験 (図4)

マウス骨髄より骨髄細胞を無菌的に取り出して48穴プレートに $1 \times 10^5$  cells/wellにて培養した。培地は10%FBS含有 $\alpha$ -MEM (100 units/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin)を用いた。25 ng/mlのCSF-1および10, 40, 100 ng/mlのRANKLを添加して4ないし5日培養を行なった。2-5  $\mu$ MのCIAM化合物を同時に添加して破骨細胞形成に与える影響を検討した。細胞は固定後、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRAP)染色を行ない、10倍の対物レンズを用いて顕微鏡にて観察を行なった。10倍の対物レンズを用いて顕微鏡下にて観察を行い、TRAP陽性で3個以上の核を有する細胞を破骨細胞様細胞として計測した。



### (2) *In vivo*実験 (図5)

CIAM化合物の影響を*in vivo*にて検討する目的で低Ca食飼育マウスの実験系を用いた。20匹の5週齢のBALB/cマウスを用いて一匹ずつメタボリックケージにて半合成飼料を用いて飼育した。飼育1日目はノーマルCa食(0.5%Ca含む)にて飼育してその後4群に分けた。実験開始時に1群





のマウスにはノーマルCa食(0.5%Ca含む)で飼育し、残り3群のマウスは低Ca食(0.05%Ca含む)にて飼育を行なった。ノーマルCa食(0.5%Ca含む)飼育マウスには10%DMSOをPBSで溶解した液を浸透圧ポンプ(Alzet Osmotic mini-pumps)を用いて投与した。低Ca食飼育マウスにはCIAM化合物投与を0.25 mg/kg/day あるいは 0.5 mg/kg/dayとなるように調整して浸透圧ポンプ(Alzet Osmotic mini-pumps)を用いて投与した。実験は6日間マウスを飼育し、その間、体重の測定と尿を採取した。実験終了時にマウスを麻酔下にて屠殺して、脛骨、大腿骨を取り出しリン酸緩衝グルタルアルデヒド-フォルマリン混合液にて固定を24時間行なった。固定終了後PBSにて洗浄し、Bone Mineral Density(BMD)をdual energy x-ray absorptionmetry (DEXA ; DXA600R, Aloka, Japan)にて測定した。

#### 4. 研究成果

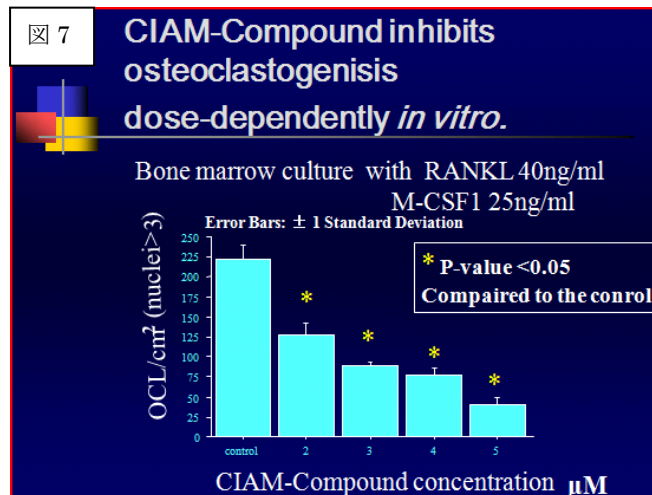
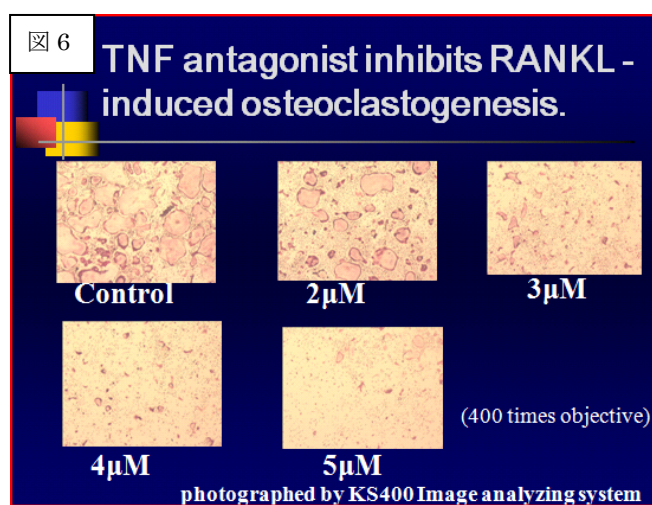
図6はマウス骨髄細胞を40 ng/ml RANKLと 25 ng/ml CSF-1により培養し多核(3核以上)のTRAP陽性細胞の出現におよぼすCIAM化合物の影響をみたものである。対照群の細胞に比べてCIAM化合物は2-5  $\mu$ M濃度で容量依存的に細胞数が少なくなることが認められた。図7は定量的な細胞数の変化を示している。CIAM化合物により用量依存的にTRAP陽性の破骨細胞様細胞数が減少した。

図8はRANKL濃度を増加して破骨細胞様細胞の増殖・分化状況を変化した状況下におけるCIAM化合物の影響を観察したものである。RANKL濃度あげるとCIAM化合物の抑制効果は減少することから、本化合物の作用はRANKLと密接に関連していることが示された。

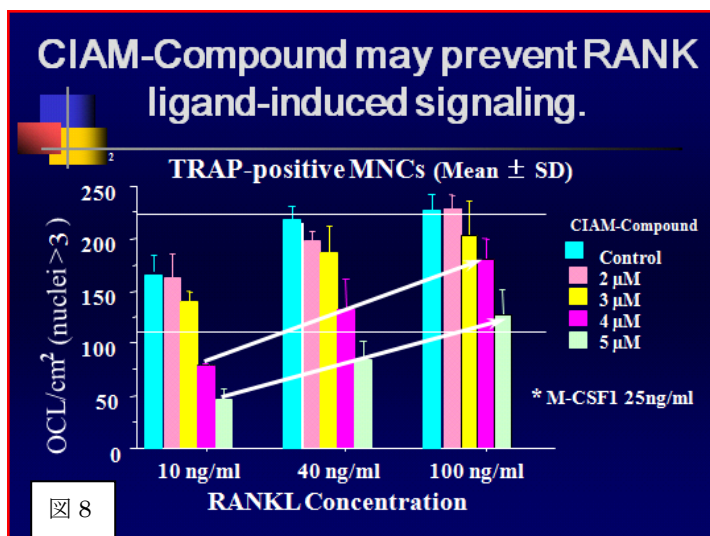
図9はin vivoにおける低Ca食飼育マウスの実験系におけるCIAM化合物

の作用を示したものである。低Ca食飼育により急速に減少するBMDは浸透圧ポンプによるCIAM化合物0.5 mg/kg/dayにより恢復することが認められた。

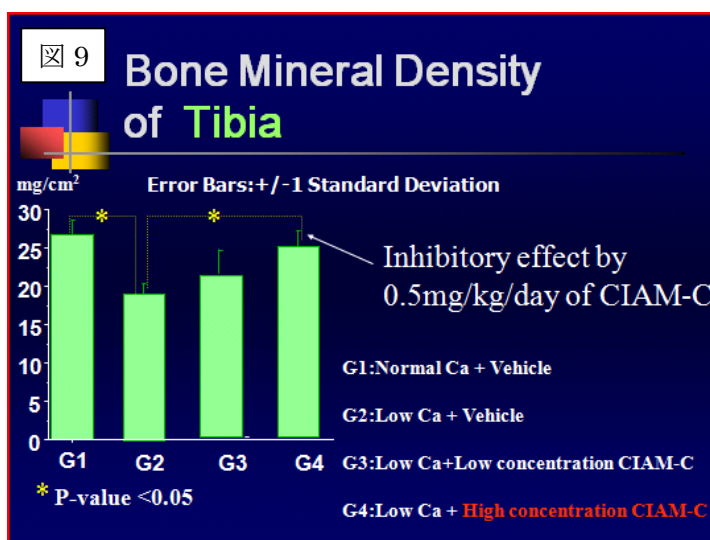
CIAM化合物はTNF受容体のリガンド結合部位の近傍に存在するcavityに結合して、TNFリガンド結合を阻害することにより細胞内情報伝達系が抑制する。またCIAM化合物はペプチド構造を有さない



ことから、我々が従来より開発してきたTNF受容体拮抗薬W9ペプチドとは違う作用機序を有している。この非ペプチド系CIAM化合物を今回実験に用いたところ、CSF-1、RANKLにより誘導される破骨細胞用細胞の形成を濃度依存的に抑制した。さらにその作用はRANK/RANKLにより進行する破骨細胞形成の抑制と関連していることが明らかとなった。



RANKLはその受容体RANKとともに破骨細胞形成におけるキー因子として重要であり、またRANKLはTNFファミリーの一員でもある。RANKLの受容体RANKの細胞外ドメインはTNF1型受容体と類似した構造を有することが報告されている。TNFは炎症性サイトカインであり、歯周病における有力な病態因子として認知されている。CIAM化合物はもともとTNF/TNF受容体複合体の形成を抑制する化合物として見



出されたが、本研究の結果はTNF情報伝達のみではなく、RANK/RANKL情報伝達を阻害する可能性を示唆するものと考えられた。その詳細な機序は不明であるが、破骨細胞形成抑制、骨吸収抑制を目指した新しい創薬候補物質としてCIAM化合物は有望な作用を有するものと思われる。CIAM化合物はTNFあるいはRANKLに関連する情報伝達をともに抑制する可能性があることから、炎症そのものと炎症により惹起される骨吸収を抑制する薬物として価値があると考えられる。

CIAM化合物はこれまで見出してきたTNF受容体拮抗薬W9ペプチドとは違い、分子量が368.9の小分子である。W9ペプチドは生体に投与すると易分解性であり、すぐに効力を失うが、そのため安定な構造変化の工夫や、DDSの開発がおこなわれている。CIAM化合物の生体内挙動は明らかでないが、W9ペプチドに比較して分解されにくい性質を持っている可能性がある。したがって、W9ペプチドに比べてより強い効力を持つ化合物として有望である可能性が考えられた。

CIAM化合物はin vivoにおいても骨吸収抑制効果を示した。低Ca食飼育マウスは急速な骨吸収が進行し、飼育6日後には海綿骨を中心とした骨吸収が起きることが明らかにされており、通常用いられている卵巣摘出マウスよりも簡便に短時期で確実に骨吸収を起こす特徴を有する。本モデルでは破骨細

胞が多数出現し骨吸収を起こすが、CIAM化合物はRANK/RANKL情報伝達を抑制して破骨細胞の減少を引き起こし、骨吸収阻害作用を発揮したものと考えられる。今後、組織標本の解析を進めて、より詳細な骨形態計測を行うことによりCIAM化合物の作用メカニズムの解明を行う予定である。

## 結論

以上の研究によりCIAM化合物の炎症性骨吸収治療薬としての可能性を探索した結果、新規薬物候補として有望な化合物であることが明らかとなった。

## 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 9 件)

1. Saito H, Kojima T, Takahashi M, Horne WC, Baron R, Amagasa T, Ohya K, Aoki K. A tumor necrosis factor receptor loop peptide mimic inhibits bone destruction to the same extent as anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 56:1164-1174, 2007.
2. Asagiri M, Hirai T, Kunigami T, Kamano S, Gober H-J, Okamoto K, Nishikawa K, Latz E, Golenbock D. T, Aoki K, Ohya K, Imai Y, Morishita Y, Miyazono K, Kato S, Saftig P, Takayanagi H. Cathepsin K-Dependent Toll-Like Receptor 9 Signaling Revealed in Experimental Arthritis. *Science* Vol. 319, pp. 624-627, February 2008
3. Mian MD, Saito H, Alles N, Shimokawa H, Aoki K, Ohya K. Lipopolysaccharide-induced bone resorption is increased in TNF type 2 receptor-deficient mice in vivo. *J Bone Miner Metab* Vol. 26, pp469-477, 2008
4. Soysa N, Alles N, Shimokawa H, Jimi E, Aoki K, Ohya K. Inhibition of the classical NF- $\kappa$ B pathway prevents osteoclast bone-resorbing activity. *J Bone Miner Metab*, Vol. 27 (2), pp131-139, 2008
5. Soysa N, Alles N, Aoki K, Ohya K. Three-dimensional characterization of osteoclast bone-resorbing activity in the resorption lacunae. *J Med & Dent Sci*, Vol. 56 (2), pp107-112, 2009
6. Tomomatsu N, Aoki K, Alles N, Soysa N, Hussain A, Nakachi H, Kita S, Shimokawa H, Ohya K, Amagasa T. LPS-Induced Inhibition of Osteogenesis Is TNF- $\alpha$  Dependent in a Murine Tooth Extraction Model. *J Bone Miner Res*, Vol. 24(10), pp1770-1781, 2009
7. Alles N, Soysa N, Hussain A, Tomomatsu N, Saito H, Baron R, Morimoto N, Aoki K, Akiyoshi K, Ohya K. Polysaccharide nanogel delivery of a TNF- $\alpha$  and RANKL antagonist peptide allows systemic prevention of bone loss. *Eur J Pharm Sci.* Vol. 37, pp83-88, 2009
8. Soysa N, Alles N, Weih D, Lovas A, Mian H, Shimokawa H, Yasuda H, Weih F, Jimi E, Ohya K, Aoki K. The Pivotal role of the alternative NF- $\kappa$ B pathway in maintenance of basal bone homeostasis and osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res*, Published on 14<sup>th</sup> December, 2009
9. Maruyama T, Fukushima H, Nakao K, Shin M, Yasuda H, Weih F, Doi T, Aoki K, Alles N, Ohya K, Hosokawa R, Jimi E. Processing of the NF- $\beta$ 2 Precursor, p100, to p52 is Critical for RANKL-Induced Osteoclast Differentiation. *J Bone Miner Res* published on 14<sup>th</sup> December, 2009

[学会発表] (計 14 件)

1. 自見英治郎, 青木和広, 仲村一郎, 大谷啓一. 機械的非荷重による骨量減少における NF- $\kappa$ B シグナルの役割. 第 25 回日本骨代謝学会学術集会 25th Annual Meeting of the Japanese Society for Bone and Mineral Research, 大阪, 2007 年 7 月.
2. 大谷啓一. 骨の最新情報—骨疾患治療薬の現状と未来. The 10<sup>th</sup> Special Meeting of Innovational Advanced Implant Association, 東京, 2007 年 8 月.
3. Soysa N, Alles N, Mian MD, Yasuda H, Jimi E, Shimokawa H, Aoki K, Ohya K. NIK MUTATION IN ALY/ALY MICE CAUSES OSTEOPETROSIS AND REDUCE RANKL INDUCED OSTEOCLASTOGENESIS. 2<sup>nd</sup> International Conference on Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems, 2008 年 6 月 8~13 日, Rhodes (Greece)
4. Soysa N, Alles N, Aoki K, Shimokawa H, Jimi E, Ohya K. Defective Alternative Pathway of NF- $\kappa$ B Causes Mild Osteopetrosis in Mice. 86<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the IADR, 2008 年 7 月 2~5 日, Toronto
5. Tomomatsu N, Aoki K, Hussain MA, Alles N, Shimokawa H, Amagasa T, Ohya K. LPS-induced Inhibition of Osteogenesis is TNF- $\alpha$  Dependent. 30<sup>th</sup> ASBMR Annual Meeting, 2008 年 9 月 12~16 日, Montreal
6. 青木和広, Alles N, Soysa N, 自見英治郎, 下川仁彌太, 大谷啓一. 破骨細胞機能抑制ペプチドによる臨床応用の可能性. 第 50 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2008 年 9 月 23 日~25 日. 東京
7. Nagano K, Aoki K, Mian A.H, Alles N, Shimoda A, Morimoto N, Akiyoshi K, Ohya K. TNF- $\alpha$ -induced bone resorption model using CHP nanogel in mice. Japanese Association for Dental Research 56<sup>th</sup> Annual Meeting, 2008 年 11 月 29 日~30 日, 名古屋
8. Nagano K, Aoki K, Mian H, Alles N, Akiyoshi K, Ohya K. The control release of TNF- $\alpha$  is necessary to mimic the LPS-induced bone resorption on calvaria. 第 82 回日本薬理学会年会. 2009 年 3 月 16 日~18 日. 横浜
9. Soysa N, Alles N, Aoki K, Ohya K. Lack of precursor p100 of NF $\kappa$ B2 causes osteopenia in mice. The 29<sup>th</sup> Japanese Society for Bone Morphometry (第 29 回骨形態計測学会). 2009 年 5 月 28 日~30 日 (土). 大阪
10. 中地浩之、友松伸允、天笠光雄、大谷啓一. 炎症時の抜歯後骨新生は、NBD ペプチドにより亢進される - LPS 投与抜歯窩骨新生モデルを用いた検討 -. 第 29 回日本歯科薬物療法学会、2009 年 6 月 19 日~21 日 (日)、大阪
11. 中地浩之、青木和広、友松伸允、永野健一、Neil Alles、Niroshani Soysa、下川仁彌太、天笠光雄、大谷啓一. LPS 投与



による抜歯後の骨新生は、TNF- $\alpha$ 依存的に抑制される。第 27 回日本骨代謝学会学術集会、2009 年 7 月 23 日～25 日（土）、大阪

12. 永野健一、青木和広、Neil Alles、大谷啓一。TNF- $\alpha$ 誘導の骨吸収に対する TNFR2 の役割。第 51 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、2009 年 9 月 9 日～11 日（金）、新潟

13. 福島秀文、進正史、丸山俊正、青木和広、大谷啓一、細川隆司、自見英治郎。NF- $\kappa$ B 非古典的経路における破骨細胞分化調節機構。第 51 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、2009 年 9 月 9 日～11 日（金）、新潟

14. Ohya K, Soysa N, Alles N, Aoki K. Inhibition of IKK- $\beta$  blocks osteoclast formation and activity. 1<sup>st</sup> meeting of the IADR APR, 2009 年 9 月 22 日～25 日、武漢（中国）

〔図書〕（計 4 件）

1. 青木和広、大谷啓一。腫瘍壊死因子中和療法の新しい展開—WP9QYペプチドによる治療の可能性—。日本歯科評論 (The Nippon Dental Review) , Vol. 67(7), pp170-172, 2007.
2. 大谷啓一。ビスフォスフォネート製剤の現状。DENTAL DIAMOND Vol. 33(475)pp22-24, 2008年7月
3. 大谷啓一、新井豊、斎藤健一。ビスフォスフォネート系薬剤との正しい付き合い方。DENTAL DIAMOND Vol. 33(475)pp32-39, 2008年7月
4. Aoki K. Applications and the Future of Peptide Drugs for Inflammatory Bone Resorption. J Oral Biosci, Vol. 51(3), pp119-133, June 2009

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大谷 啓一 (OHYA KEIICHI)  
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10126211

### (2) 研究分担者

青木 和広 (AOKI KAZUHIRO)  
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：40272603

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

### (3) 連携研究者

自見 英治郎 (JIMI EIJIRO)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：40276598