

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293377

研究課題名(和文) RANKL結合ペプチドのオリゴマー化による新規骨形成促進剤の創生

研究課題名(英文) Development of a new drug candidate to stimulate bone formation by oligomerization of RANKL-binding peptides

研究代表者

青木 和広 (AOKI, Kazuhiro)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：40272603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は抗体製剤に代わる全合成可能なペプチド製剤を骨形成促進薬として開発している。RANKLという分子に結合するペプチドは骨形成活性を持つが、臨床応用のためには、低濃度で安定した骨形成活性を示す工夫が求められていた。

今回、1つの工夫として、RANKLへの高い親和性を持つペプチドのスクリーニングを行い、2つ目の工夫としてBMP-2との併用による骨形成活性の安定化を示し、3つ目にペプチドを含ませる材料(担体)を工夫した。

特に今まで外科手術しかなかった骨造成が、RANKL結合ペプチドとBMP-2を合わせて粒子状の担体を用いることにより、注射した部位に安定した骨造成が可能であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have continuously been studying the stimulatory effects of peptide drugs on bone formation, which are known to be able to be fully synthesized, instead of developing the antibody-drugs. Two problems need to be clarified for developing the peptide drugs toward clinical applications; 1. the effective dose should be low, 2. the drug effects should be stable.

This time, we have performed a peptide screening and obtained drug candidates with higher affinity to RANKL, which could have a stimulatory effects of bone formation at a lower dose. Next, we showed the stable bone formation of the RANKL-binding peptide when used with BMP-2. The third, we have developed appropriate carriers of peptide drugs for inducing bone formation, especially when we used the granular type of gelatin hydrogel carrier, we could obtain the stable bone formation at the site of injection of the peptide with BMP-2.

研究分野：硬組織薬理学

キーワード：新規骨形成薬による骨造成 RANKL結合ペプチド 粒子状担体 BMP-2 CHPナノゲル ゼラチンハイドロゲル ペプチド修飾 注射

## 1. 研究開始当初の背景

研究を開始した 2013 年には、すでに我々は、破骨細胞分化促進因子である RANKL 分子に結合するペプチドが、骨吸収抑制だけでなく、骨形成促進作用も有することを明らかにしていた。その作用は、RANKL 欠損マウスでは発揮しづらいことから、少なくとも RANKL 依存的な骨形成活性促進作用が存在する事も示されていた。一方、分担研究者の本間らは RANKL の受容体 RANK を凝集(オリゴマー化)させると、骨芽細胞膜上に存在する RANKL が受容体として働き、骨芽細胞分化を亢進させることを示唆するデータを得ていた。

我々の開発してきた RANKL 結合ペプチドは、低濃度(1~5 $\mu$ M 程度)で破骨細胞分化を抑制し、高濃度(100 $\mu$ M 以上)で、明らかな骨芽細胞分化亢進を示す。RANKL 結合ペプチドは、小さな RANK と考えられ、高濃度すなわち、RANK がオリゴマー化した状態に近似する状態になると骨芽細胞上の RANKL が受容体として働き、骨芽細胞分化が活性化するのではないかと考えた。RANKL 結合ペプチドの *in vivo* 骨形成活性も、直径 4 mm の欠損部を作成する頭蓋骨骨欠損モデルを埋める場合 560 $\mu$ g という高濃度のペプチドが必要であることが分かっていた(図 1)。



図 1 研究開始当初の RANKL 結合ペプチドの頭蓋骨骨欠損モデルにおける高い骨造成能

また、図 1 に示した RANKL 結合ペプチドの高い骨造成能は、常に得られるものではないことも明らかとなっており、ペプチドの生体安定性を高める必要性があった。

以上のように、RANKL 結合ペプチドの骨形成促進作用は疑いが無いが、高濃度でなければ骨形成活性を示さないこと、骨形成活性が安定して得られないことなどから、臨床応用を目指すためには、低濃度で安定した骨形成活性を示す工夫が求められていた。

## 2. 研究の目的

以上の研究開始当初の背景から、本研究の目的は、生体安定性の悪い RANKL 結合ペプチドの骨形成活性を高め、将来の臨床応用展開を視野に、低濃度で安定した骨形成活性を示す新規骨形成促進剤を創生することである。

## 3. 研究の方法

本研究は大きく分けて次に示す 2 つの方法により推進した。

### (1) RANKL 高親和性ペプチドの選択

RANKL 結合ペプチドの RANKL 結合性を高めたペプチドをスクリーニングすることによ

り、低濃度で骨形成活性が亢進するリードペプチド薬を得ること。

用いた方法の概略は図 2 に示す。主に連携研究者の吉岡が担当した。

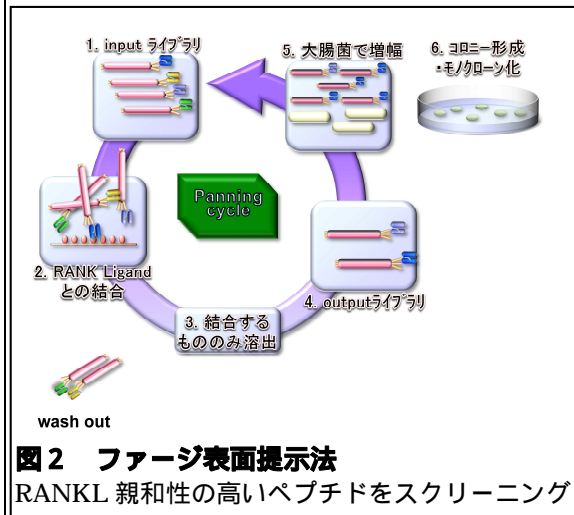


図 2 ファージ表面提示法

RANKL 親和性の高いペプチドをスクリーニング

ファージ表面提示法は、学会発表 8, 9, 14 で発表した方法を用いた。

### (2) リガンド活性を安定化させる工夫

安定した骨形成能を得るために担体の工夫、あるいは、ペプチド自体に修飾を加えて骨形成活性を安定化させる。

#### ペプチド自体の改修

*Tetrahedron* 70:7774-7779, 2014 に記載した方法により半減期を延ばす工夫をする。

#### ペプチドのオリゴマー化

背景に記した RANK のオリゴマー化に似せて、リポソームにポリエチレングリコール(PEG)を介して RANKL 結合ペプチドを付与した人工リガンドを作成する(図 3 参照)。

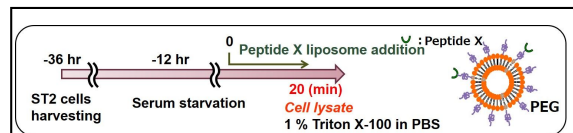


図 3 ペプチドの修飾

RANKL 結合ペプチド(Peptide X)をリポソーム上の PEG を介してオリゴマー化したリガンドを作成する。

## 4. 研究成果

### CHP ナノゲル担体とゼラチンハイドロゲル担体

CHP ナノゲルを PEG で架橋した NanoClick を用いる(論文 5 参照)

1 mm x 2 mm の短冊状と直径 4 mm のゼラチンハイドロゲルシートもしくは、直径 20 $\mu$ m の粒子状ゼラチンハイドロゲルを担体として用いて抜歯窩に填入あるいは、粘膜下注射による骨形成薬剤の投与を行う。(論文 1 ~ 3 参照)

## 4. 研究成果

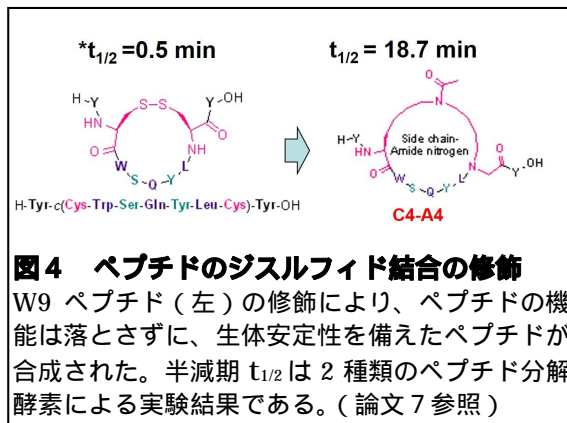
### (1) RANKL 高親和性ペプチド

RANKL に親和性の高いペプチドをファ

ージディスプレイ法によりスクリーニングした結果、従来の W9, OP3-4 ペプチドより RANKL に親和性の高いペプチドがスクリーニングされてきた。特許申請の関係で詳細は別の機会に譲る。

## (2) ペプチド活性を安定化させる工夫 ペプチド自体の改編

環状ペプチドのシステインシステイン間を修飾する技術により、ペプチドの機能はそのままペプチドの半減期を延ばすことが出来た(図4および論文7参照)。



### ペプチドのオリゴマー化

今回、低濃度のペプチドで骨形成活性をもたらすべくペプチドのオリゴマー化を行った。PEG を介してリポソーム化した RANKL 結合ペプチドを 1.25%、2.5%、5%と全 PEG タグに対するペプチド反応性タグの割合を変えて実験したが、どの場合においても、ST-2 細胞における mTORC1 活性、Akt リン酸化の亢進が示された。

*In vitro* では、低濃度のペプチドにより細胞内シグナル活性が亢進したオリゴマー化させたペプチドであるが、頭蓋骨骨欠損モデルはじめ、どの *in vivo* モデルにおいても、単独では骨形成活性を示さなかった。

ペプチド反応性の PEG タグを増やして実験を行ったが、化学合成中に凝集や沈殿を引き起こしてしまい、思ったようにリポソーム化ペプチドの修飾が自由にできず、*in vivo* において低濃度で安定して骨形成活性を示すペプチドリガンドは得られなかった。

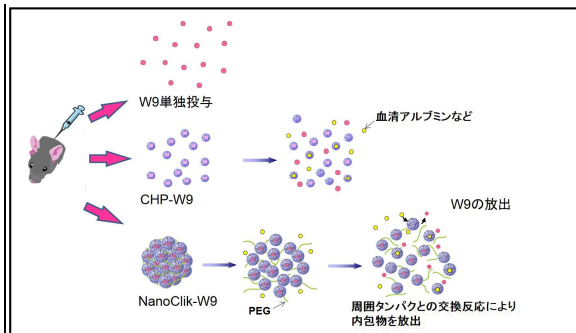
### 担体を用いた臨床応用への工夫

#### a. NanoClik

1日8回という大量投与をしなければ、生物活性を示さなかった RANKL 結合ペプチドであるが(Aoki et al. *J Clin Invest* 2006)、ペプチドの担体として CHP ナノゲルを PEG 架橋した NanoClik を用いると 1日1回の投与で生物活性を示した(図5および論文4参照)。また、CHP ナノゲルより徐放スピードが遅いことが *in vitro* の破骨細胞形成アッセイにより明らかとなった(論文4参照)。

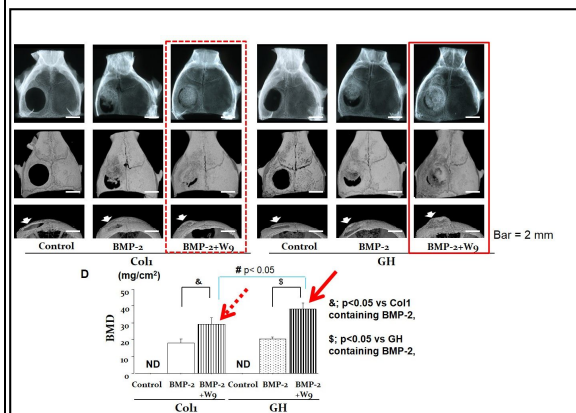
#### b. ゼラチンハイドロゲル

論文9で示すように Bone Morphogenetic Protein (BMP)-2 存在下では RANKL 結合ペプチドは安定して骨を形成するが、コラーゲン

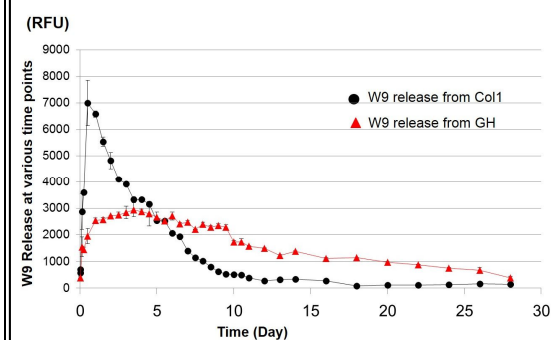


**図5 予想される NanoClik からの RANKL 結合ペプチド W9 の放出の様子** (論文4参照)

担体とゼラチンハイドロゲル担体のどちらが RANKL 結合ペプチドの担体として効率よく骨を誘導できるかを調べた結果が図6である。また、*in vitro* のペプチド徐放能を比べた結果が図7である。ゼラチンハイドロゲル担体の方がコラーゲン担体に比べて、ペプチドを長期に渡り徐放することが明らかとなった。



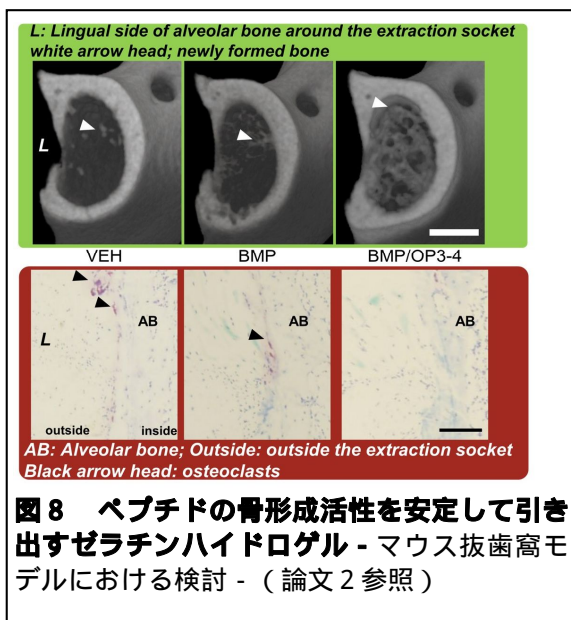
**図6 コラーゲン担体よりもハイドロゲル担体の方がペプチドの骨形成活性を引き出す。**  
(論文8参照)



**図7 RANKL 結合ペプチド W9 の異なる担体における徐放** (論文8参照)

**マウス抜歯窩モデルを用いた検討**  
我々の教室で確立されているマウス抜歯窩モデルを用いて、骨形成活性を検討した。短冊状のゼラチンハイドロゲルを担体に BMP-2 と RANKL 結合ペプチドである OP3-4 を併せて染み込ませ、抜歯窩に

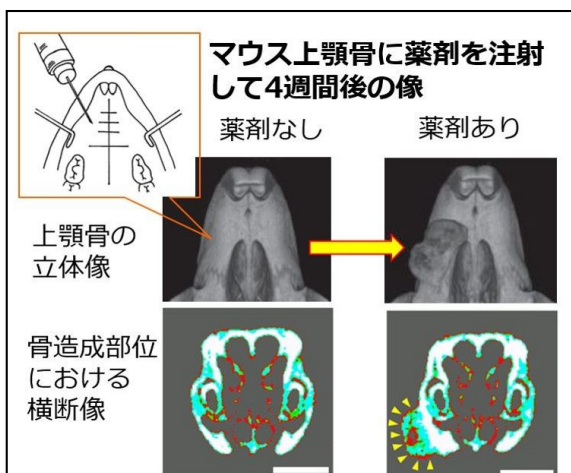
静置すると3週間後、図8に示す骨造成が認められた。BMP-2 単独投与群に比べて、明ら



かな骨形成活性亢進を示した。

### 注射による骨造成法の開発

現在、外科的侵襲を加えずに骨造成を促進する方法は開発されていない。RANKL 結合ペプチドによる安定した骨造成の為に、粘膜下に注射を行うことにより、骨造成を行うことに世界で初めて成功した(図9 参照)。



### 関節リウマチモデルに対する効果

RANKL 結合ペプチドは、局所の骨形成促進

BMP-2 に RANKL 結合ペプチドを粒子状ゼラチンハイドロゲルに含ませて注射すると、注射した部位に骨造成が認められた。通常、BMP-2 による骨造成ではでは薬剤担体より骨が盛り上がることはないが、骨形成促進ペプチドを添加することにより、下のパネル右、黄色の矢頭に示すように上あごから盛り上がって安定した骨が造成されることが明らかとなった。(論文3 参照)

### 関節リウマチモデルに対する効果

RANKL 結合ペプチドは、局所の骨形成促進

剤として開発する予定だが、全身投与における骨形成促進効果、軟骨破壊抑制効果も明らかとなった(論文5 参照)。

### 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24件)

すべて査読ありの雑誌である。研究代表者が責任著者である場合は\*を付けた

1. Yasutaka Sugamori, Setsuko Mise-Omata, Chizuko Maeda, Shigeki Aoki, Yasuhiko Tabata, Ramachandran Murali, Hisataka Yasuda, Nobuyuki Udagawa, Hiroshi Suzuki, Masashi Honma and **\*Kazuhiro Aoki**, Peptide drugs accelerate BMP-2-induced calvarial bone regeneration and stimulate osteoblast differentiation through mTORC1 signaling. *Bioessays* 2016 in press.

2. Yuki Arai, **\*Kazuhiro Aoki**, Yasuhiro Shimizu, Yasuhiko Tabata, Takashi Ono, Ramachandran Murali, Setsuko Mise-Omata, Noriyuki Wakabayashi. Peptide-induced *de novo* bone formation after tooth extraction prevents alveolar bone loss in a murine tooth extraction model. *Eur J Pharm* 2016 in press.

3. T. Uehara, S. Mise-Omata, M. Matsui, Y. Tabata, R. Murali, M. Miyashin, and **\*K. Aoki**. Delivery of RANKL-Binding Peptide OP3-4 Promotes BMP-2-Induced Maxillary Bone Regeneration. *J Dent Res* 0022034516633170, first published on March 22, 2016 as doi:10.1177/0022034516633170

4. Toshimi Sato, Neil Alles, Masud Khan, Kenichi Nagano, Mariko Takahashi, Yukihiro Tamura, Asako Shimoda, Keiichi Ohya, Kazunari Akiyoshi, **\*Kazuhiro Aoki**. Nanogel-crosslinked nanoparticles increase the inhibitory effects of W9 synthetic peptide on bone loss in a murine bone resorption model. *International Journal of Nanomedicine* 10:3459-3473 2015 DOI http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S61566

5. Kato G, Shimizu Y, Arai Y, Suzuki N, Sugamori Y, Maeda M, Takahashi M, Tamura Y, Wakabayashi N, Murali R, Ono T, Ohya K, Mise-Omata S and **\*Aoki K.**: The inhibitory effects of a RANKL-binding peptide on articular and periarticular bone loss in a murine model of collagen-induced arthritis: A bone histomorphometric study. *Arthritis Research & Therapy*

2015 17:251-265 DOI:  
10.1186/s13075-015-0753-8  
6. Natsuki Suzuki, \*Kazuhiro Aoki, Petr Marcián, Libor Borák, Noriyuki Wakabayashi.: A threshold of mechanical strain intensity for the direct activation of osteoblast function exists in a murine maxilla loading model. *Biomech Model Mechanobiol* doi:  
10.1007/s10237-015-0746-1 2015  
7. Aoki, K. Maeda, M. Nakae, T. Okada, Y. Ohya, K. Chiba, K.: A disulfide bond replacement strategy enables the efficient design of artificial therapeutic peptides. *Tetrahedron* 70:7774-7779  
doi:10.1016/j.tet.2014.05.079 2014  
8. Mamun, A. Khan, M. Alles, N. Matsui, M. Tabata, Y. Ohya, K. \*Aoki, K.: Gelatin hydrogel carrier with the W9-peptide elicits synergistic effects on BMP-2-induced bone regeneration. *J Oral Biosciences* 55:217-223 doi:  
10.1016/j.job.2013.06.008 2013  
9. Khan, M. Alles, N. Soysa, N. Mamun, A. Nagano, K. Mikami, R. Furuya, Y. Yasuda, H. Ohya, K. \*Aoki, K.: The local administration of TNF- and RANKL antagonist peptide promotes BMP-2-induced bone formation. *J Oral Biosciences* 55:47-54 doi: 10.1016/j.job.2012.12.006 2013

〔学会発表〕(計 45 件)

1. 青木和広.: 医用ペプチド開発に向けた既存担体の応用研究. 第 66 回医用高分子研究会 2016 年 3 月 14 日 東京(首都大東京秋葉原サテライトキャンパス)  
2. A RANKL-binding peptide accelerates BMP-induced bone regeneration in murine maxilla by subperiosteal injections.: Uehara T, Mise S, Arai Y, Sugamori Y, Kato G, Tamura Y, Tabata Y, Murali R, Wakabayashi N, Miyashin M, Aoki K. 13th Congress of the International Society of Bone Morphometry 2015 年 4 月 27-29 日 東京(東京ガーデンパレスホテル)  
3. マウス抜歯窩に局所適用した RANKL 結合ペプチドと BMP-2 の併用による骨形成促進作用の評価. 新井祐貴, 青木和広, 三瀬節子, 清水康広, 小野卓史, 若林則幸. 第 35 回日本骨形態計測学会 2015 年 6 月 4-6 日 倉敷(倉敷市芸文館)  
4. RANKL 結合ペプチドの軟骨修復作用の検討. 吉成悠紀, Md. Zahirul Haque Bhuyan, 田村幸彦, 青木和広. 第 132 回日本薬理学会関東部会 2015 年 7 月 4 日 浦安(明海大学浦安キャンパス)  
5. 骨芽細胞における RANKL 逆シグナルの役

割(学会シンポジウム 6 骨代謝カップリング機構の新展開 3). 本間雅, 林円香, 池淵祐樹, 青木重樹, 菅森泰隆, 青木和広, 鈴木洋史. 第 33 回日本骨代謝学会学術集会 2015 年 7 月 23-25 日 東京(京王プラザホテル)  
6. The preliminary results on the effects of RANKL-binding peptide of cartilage destruction. :Md. Zahirul Haque Bhuyan, Yoshinari Y, Kawasaki M, Sugamori Y, Kato G, Takahashi M, Tamura Y, Aoki K. 12th Bone Biology Forum 2015 年 8 月 21-22 日 千葉(Cross Wave 幕張)  
7. The effects of the RANK-like peptide on murine rheumatoid arthritis model (マウス関節リウマチモデルにおける RANK 様ペプチドの作用).: 加藤玄樹, 清水康広, 菅森泰隆, 高橋真理子, 田村幸彦, 小野卓史, 大谷啓一, 青木和広. 第 87 回日本薬理学会年会. 2014 年 3 月 19-21 日 仙台(東北大学)  
8. フェージ表面提示法を駆使した新規高親和性骨再生ペプチドの創製に向けた基礎検討.: 永野貴士, 向洋平, 菅森泰隆, 加藤玄樹, 大谷啓一, 青木和広, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 長野一也, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤康央. 日本薬学会第 134 年会. 2014 年 3 月 27-30 日. 熊本  
9. Basic analysis for screening a novel bone-regenerating peptide from the phage peptide library.: Nagano, T. Mukai, Y. Sugamori, Y. Kato, G. Ohya, K. Aoki, K. Higashisaka, K. Yoshioka, Y. Nagano, K. Kamada, H. Tsunoda, S. Tsutsumi, Y. CRS2014 シカゴ 2014 年 7 月 12-16 日  
10. RANKL 結合ペプチドはマウス頭蓋骨欠損モデルの骨新生を促進する.: 菅森泰隆, 本間雅, 加藤玄樹, 田村幸彦, 古屋優里子, 保田尚孝, 田畑泰彦, 宇田川 慎之, 大谷啓一, 鈴木洋史, 青木和広. 第 32 回日本骨代謝学会学術集会 大阪(大阪国際会議場) 2014 年 7 月 24-26 日  
11. RANKL-binding peptides increased bone formation in a murine calvarial defect model.: Sugamori, Y. Honma, M. Kato, G. Tamura, Y. Furuya, Y. Yasuda, H. Tabata, Y. Udagawa, N. Ohya, K. Suzuki, H. Aoki, K. アメリカ骨代謝学会 2014 Houston, Texas, USA 2014 年 9 月 12-15 日  
12. RANKL 結合ペプチドの骨吸収抑制作用と骨形成促進作用.: 青木和広, 菅森泰隆, 加藤玄樹, 上原智己, 新井祐貴, Md. Zahirul Haq Bhuyan, Neil Alles, Masud Khan, 高橋真理子, 田村幸彦, 若林則幸, 大谷啓一. 第 56 回歯科基礎医

学会学術大会・総会 福岡(福岡国際会議場)  
2014年9月25-27日

13. 型ウシコラーゲン誘導のマウス関節リウマチモデルを用いたRANKL結合ペプチドの骨形成促進作用と骨吸収抑制作用.: 加藤玄樹、清水康広、菅森泰隆、田村幸彦、小野卓史、大谷啓一、**青木和広**. 第56回歯科基礎医学会学術大会・総会 福岡(福岡国際会議場) 2014年9月25-27日

14. 骨再生ペプチドの医薬品化を目的とした新規高親和性骨再生ペプチドの創製に向けた基礎検討.: 永野貴土、向洋平、菅森泰隆、加藤玄樹、**青木和広**、大谷啓一、東阪和馬、**吉岡靖雄**、長野一也、鎌田春彦、角田慎一、堤康央. 第87回日本生化学会大会京都(国立京都国際会館) 2014年10月15-17日

15. An Osteoprotegerin-like Peptide Inhibits Bone Loss in Collagen Type II-Induced Murine Arthritis. IBMS/JSBMR 第2回合同国際会議 神戸市(神戸国際会議場) 2013年5月28日-6月1日 Kato, G. Maeda, M. Alles, N. Mamun, A. Khan, M. Sugamori, Y. Takahashi, M. Tamura, Y. Murali, R. Ohya, K. **Aoki, K.** \* Oral Poster Presentation selected

16. RANKL 結合ペプチドの軟骨細胞分化促進と軟骨破壊抑制作用. 第55回歯科基礎医学会学術大会 岡山市(岡山コンベンションセンター) 2013年9月20-22日 菅森泰隆、加藤玄樹、田村幸彦、大谷啓一、**青木和広**.

17. Bone resorption inhibitor peptides work as a bone formation stimulator. The 3rd Tri-University Consortium on Oral Science and Education Tokyo (TMDU) 2013 Nov6-7 **Aoki, K.** Murali, R. Ohya, K.

18. An Osteoprotegerin-like Peptide Prevents Bone Loss in Collagen-Induced Murine Arthritis. The 3rd Tri-University Consortium on Oral Science and Education Tokyo(TMDU) 2013 Nov6-7 Kato, G. Shimizu, Y. Mamun, M. Murali, R. Ohya, K. **Aoki, K.**

〔図書〕(計1件)

Mise-Omata, S, Doi TS, **Aoki K**, Obata Y.: Impact of radiation on hematopoietic niche. edd. Kursad Turksen In Biology in Stem Cell Niche. pp147-160. Springer Humana Press 2015

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: オステオプロテジェリン誘導体及びその用途

発明者: **青木和広**、加藤玄樹、大谷啓一

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 2015-48698

出願年月日: 2015年3月11日

国内外の別: 国内

〔その他〕

**ホームページ等**

<http://www.tmd.ac.jp/hpha/>

東京医科歯科大学よりプレスリリース

「世界初、手術が不要の注射による簡便な顎骨造成をマウスで成功」

歯科医が夢見る患者にやさしい治療法開発への期待

[http://www.tmd.ac.jp/kouhou/press\\_release/newspaper/newspaper\\_H27/index.html](http://www.tmd.ac.jp/kouhou/press_release/newspaper/newspaper_H27/index.html)

**テレビ出演**

TBS 未来の起源

2016年5月22日 22時54分~23時

BS-TBS

2016年5月29日 20時54分~21時

**新聞などへの掲載**

2014年10月6日

薬事日報

2016年3月23日

日刊工業新聞 37面

2016年3月28日

日経産業新聞 8面

2016年6月14日

夕刊フジ「ニッポン 病院の実力」

マイナビニュース

<http://news.mynavi.jp/news/2016/03/23/039/>

ニュースイッチ

<http://newswitch.jp/p/4069>

**6. 研究組織**

(1) 研究代表者

青木 和広 (AOKI Kazuhiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号: 40272603

(2) 研究分担者

本間 雅 (HONMA Masashi)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 60401072

(3) 連携研究者

吉岡 靖雄 (YOSHIOKA Yasuo)

大阪大学・大阪大学微生物病研究所・准教授

研究者番号: 00392308

宇田川 信之 (UDAGAWA Nobuyuki)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号: 70245801