

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：33304

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860359

研究課題名(和文)骨指向性を有する新規骨粗鬆症治療薬の開発

研究課題名(英文)Development of a novel bone-targeting anti-osteoporotic agent

研究代表者

高橋 達雄(Takahashi, Tatsuo)

北陸大学・薬学部・准教授

研究者番号：50445904

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):骨粗鬆症は、骨を作る細胞(骨芽細胞)と骨を壊す細胞(破骨細胞)のバランスが破綻して骨量が減少する疾患である。我々は、EphrinB2が骨芽細胞の分化促進作用と破骨細胞の分化抑制作用を有し、全身投与によって骨粗鬆症モデルマウスで認められる骨量減少が抑制されることを新たに見出した。EphrinB2の骨粗鬆症治療効果を上げるために、骨指向性を有するEphrinB2(AcOP-EphrinB2)を作製したが、高投与量のAcOP-EphrinB2は骨量減少を抑制せず、骨へ高濃度かつ長期間蓄積したAcOP-EphrinB2の骨粗鬆症治療効果は制限されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文):Osteoporosis is associated with a decrease in bone mass, which is maintained by bone-forming osteoblasts and bone-resorbing osteoclasts. We demonstrated that ephrinB2 increased osteoblastic differentiation and decreased osteoclastic differentiation in vitro, and that intravenously injected ephrinB2 ameliorated the bone loss observed in osteoporotic mice. Moreover, we constructed bone-targeting ephrinB2, named as AcOP-ephrinB2, to maximize the therapeutic effect against osteoporosis. However, high dose of AcOP-ephrinB2 showed little anti-osteoporotic effect in osteoporotic mice, that is, long-term and large-amount of accumulation of AcOP-ephrinB2 in bone appeared to be disadvantage in the treatment for osteoporosis.

研究分野：薬理学

キーワード：EphrinB2 骨粗鬆症 骨芽細胞 破骨細胞 骨ターゲティング 酸性オリゴペプチド

1. 研究開始当初の背景

日本における骨粗鬆症の患者数は1,200万人を超えると推定されており、骨粗鬆症の効率的な治療が重要である。骨組織はダイナミックに骨破壊(骨吸収)と骨形成を繰り返し、骨の再構築を営むことによって形態と機能を維持しており、それには骨吸収を行う破骨細胞と骨形成を行う骨芽細胞が大きく関わっている。将来の骨粗鬆症治療には、骨形成を積極的に促進するタイプの薬物が求められており、また骨粗鬆症の性質上、長期に渡り薬物を服用する必要があるため、安全性の高さも要求される。

骨芽細胞の増殖・分化に関わる転写因子及びシグナル分子が次々と明らかになってきている。同様に、破骨細胞と骨芽細胞のクロストークに関する研究も精力的に行われており、特に破骨細胞由来の骨芽細胞活性化因子の探索は骨粗鬆症治療において有用となり得る。破骨細胞と骨芽細胞のカップリング分子として EphrinB2 と EphB4 が見出された。EphrinB2 は成熟破骨細胞で発現している膜結合型タンパク質であり、その特異的な受容体は骨芽細胞の膜に存在する EphB4 である。骨芽前駆細胞は EphrinB2 の刺激を受けることにより、骨芽細胞の分化マーカータンパク質および転写因子の発現が亢進する。このことから、EphrinB2 による EphB4 の活性化が骨芽細胞の分化・成熟ならびに骨量維持に重要であると考えられる。

酸性アミノ酸(アスパラギン酸およびグルタミン酸)のホモペプチドは、骨の主要な無機成分であるハイドロキシアパタイトに高い親和性を有する。この性質を利用し、薬物にアスパラギン酸6つ以上から成るホモペプチド(酸性オリゴペプチド)を付加することで、薬物の骨指向性を増大させることが可能である。申請者らのグループは、エストロゲンによる骨粗鬆症の治療(Ishizaki and Takahashi-Nishioka et al. J Bone Miner Metab 2009, Takahashi-Nishioka et al. Curr Drug Discov Technol 2008)、キノロン系抗菌剤レボフロキサシンによる骨感染症の治療(Takahashi et al. Pharm Res 2008)、酵素タンパク質欠損症の治療(Montano and Nishioka et al. Mol Genet Metab 2008, Nishioka et al. Mol Genet Metab 2006)に酸性オリゴペプチドを応用し、その有用性を報告している。さらに、関節リウマチの病態進展に関与する HMGB1 (high-mobility group box-1) のおとり受容体に酸性オリゴペプチドを付加することによって、関節リウマチモデルマウスにおける関節破壊・骨破壊を軽減させることに成功した(Takahashi et al. Mol Med 2013)。このように、酸性オリゴペプチドは薬物の骨指向性を増大させることによって、骨・関節疾患の薬物療法に効果的であることが明らかになりつつある。

2. 研究の目的

本研究では、骨指向性を有する酸性オリゴペプチドを EphrinB2 に付加することで、EphrinB2 の骨指向性を増大させ、骨形成促進作用を有するタイプの新規骨粗鬆症治療薬を開発することが目的である。

(1) 骨輸送キャリアとして機能する酸性オリゴペプチドを付加することによって、EphrinB2 に骨指向性を持たせる。EphrinB2 ならびに酸性オリゴペプチドを付加した EphrinB2 (AcOP-EphrinB2) は遺伝子組換え技術によって作製する。

(2) EphrinB2 及び AcOP-EphrinB2 の薬理活性は、骨芽細胞及び破骨細胞の分化に対する作用をみることによって明らかにする。体内動態は、蛍光標識した EphrinB2 及び AcOP-EphrinB2 をマウスに投与し、骨組織の蛍光を観察することによって明らかにする。

(3) EphrinB2 及び AcOP-EphrinB2 を骨粗鬆症モデルマウスに投与し、骨組織学的形態パラメーターを計測することによって骨粗鬆症に対する治療効果を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) EphrinB2 と AcOP-EphrinB2 の作製

正常ヒト肺由来 RNA から RT-PCR 法によって EphrinB2 の cDNA を得た。EphrinB2 の細胞膜貫通領域と細胞内領域をコードする DNA 配列を除き、そこへヒト IgG の Fc をコードする DNA 配列を組み込んだ。酸性オリゴペプチドとして 10 個のアスパラギン酸からなる連続配列を設定し、それをコードする DNA 配列を EphrinB2 DNA の C 末端に付加した(図1)。上記の DNA を発現ベクターに組み込んだ後、CHO-K1 細胞へトランスフェクションした。それにより、EphrinB2 及び AcOP-EphrinB2 は培養上清中に分泌されるタンパク質として回収することが可能である。それらのタンパク質を含む培養上清を回収し、Protein A クロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーによって精製した。

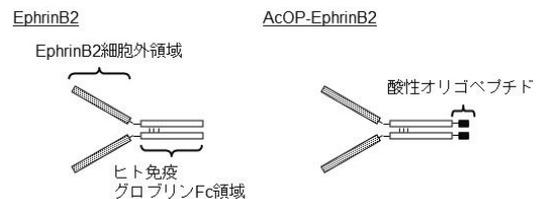


図1 EphrinB2 と AcOP-EphrinB2 の構造

(2) EphrinB2 と AcOP-EphrinB2 の骨指向性

EphrinB2 及び AcOP-EphrinB2 を Alexa488 によって蛍光標識し、マウス (ddY、オス、7 週齢) の尾静脈から投与 (1 mg/kg) した。投与 1、3、7、14 日後に脊椎を摘出した後、薄切切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡にて蛍光を観察した。

(3) マウス骨髄細胞初代培養における骨芽細胞と破骨細胞の分化誘導

マウス (ddY, オス, 6-9 週齢) の大腿骨と脛骨から無菌条件下で骨髄細胞を得た後、組織培養用プレートに細胞を播種した。骨芽細胞の分化実験は、培養開始 1 日後に 0.2 mM ascorbic acid と 2.5 mM α -glycerophosphate を加え、さらに 3 日間培養し、アルカリホスファターゼ (ALP) 陽性細胞を染色した。ALP 陽性細胞を成熟骨芽細胞として評価した。また、骨芽細胞の分化に関わるマーカー遺伝子 (Col1a1, Osteocalcin, Osterix, Runx2, Tnsalp) の発現を定量的 PCR 法によって測定し、骨芽細胞の分化を評価した。破骨細胞の分化実験は、培養開始 1 日後に 10 nM 1, 25-dihydroxyvitamin D3 を加え、さらに 5 日間培養し、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 陽性細胞を染色した。TRAP 陽性の多核細胞を成熟破骨細胞として評価した。EphrinB2 及び AcOP-EphrinB2 は培養開始 1 日後に培養液に加え、骨芽細胞と破骨細胞の分化に及ぼす影響を検証した。

(4) 骨粗鬆症に対する治療効果

骨粗鬆症のモデルとして卵巣切除 (OVX) マウスを作製し、EphrinB2 もしくは AcOP-EphrinB2 を 2 週間に 1 回、0.1 mg/kg 及び 0.3 mg/kg の投与量で合計 2 回静脈内投与した。初回投与から 4 週間後に脊椎を摘出し、組織切片を作製後、Von Kossa 染色により骨の石灰化部を染色して骨量を測定した。また、ALP 染色と TRAP 染色によって石灰化部表面における骨芽細胞数と破骨細胞数をそれぞれ評価した。

4. 研究成果

(1) EphrinB2 と AcOP-EphrinB2 の精製

EphrinB2 と AcOP-EphrinB2 を精製した後、非還元条件下で SDS-PAGE に供し、銀染色を行った。EphrinB2 の分子量はおよそ 130 kDa であり、さらに単一のバンドを与えたことから、充分な純度のタンパク質を精製することに成功した。また、AcOP-EphrinB2 も単一のバンドを与え、酸性オリゴペプチドを付加した分、EphrinB2 よりも分子量はわずかに増加した (図 2)。

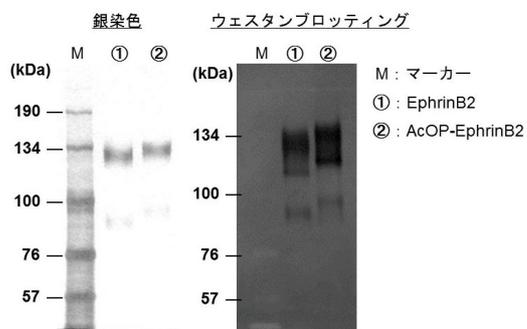


図 2 EphrinB2 と AcOP-EphrinB2 の SDS-PAGE

(2) EphrinB2 と AcOP-EphrinB2 の骨指向性

マウス脊椎において、EphrinB2 は投与 1 日目以降、骨髄もしくは石灰化部表面への分布をほとんど認めなかった。それに対し、AcOP-EphrinB2 は投与 1 日後において石灰化部表面への強い吸着が認められた。その後、経時的に石灰化部表面から消失していったが、投与 14 日後においてもわずかな吸着を認めた (図 3)。このことから AcOP-EphrinB2 は、投与後少なくとも 14 日間は骨へ蓄積し、骨において長期間薬理作用を発揮するものと考えられる。

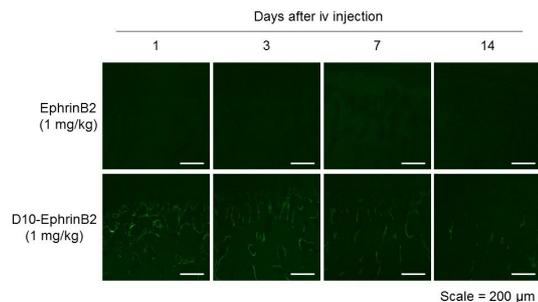


図 3 EphrinB2 と AcOP-EphrinB2 の脊椎への分布

(3) マウス骨髄細胞初代培養における骨芽細胞と破骨細胞分化に及ぼす EphrinB2 と AcOP-EphrinB2 の作用

マウス骨髄細胞初代培養系において、ALP 陽性骨芽細胞数は、1 μ g/mL 以上の EphrinB2 もしくは AcOP-EphrinB2 処置によって増加し、また、骨芽細胞分化に関わるマーカー遺伝子の発現も増加した。TRAP 陽性破骨細胞数は、1 μ g/mL 以上の EphrinB2 もしくは AcOP-EphrinB2 処置によって有意に減少した (図 4)。

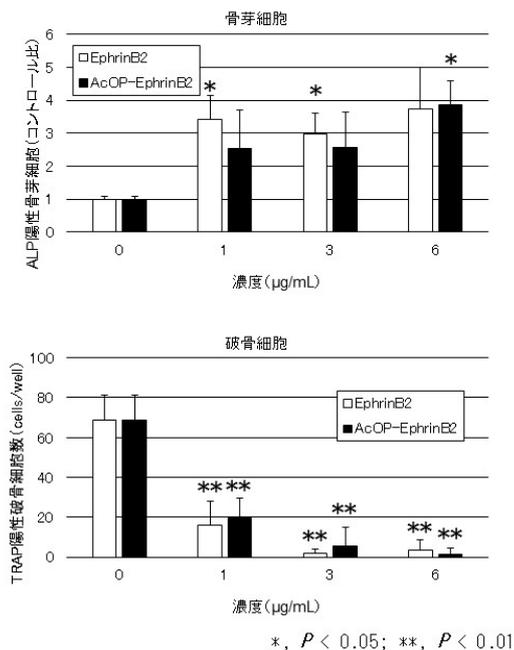


図 4 EphrinB2 及び AcOP-EphrinB2 の骨芽細胞と破骨細胞分化に及ぼす作用

(4) EphrinB2 と AcOP-EphrinB2 の骨粗鬆症治療効果

OVX マウスは正常マウスと比較して脊椎の骨量が顕著に減少したが、EphrinB2 (0.1 及び 0.3 mg/kg) もしくは AcOP-EphrinB2 (0.1 mg/kg) の投与によって OVX マウスの骨量減少は有意に抑制された。しかし高用量 (0.3 mg/kg) の AcOP-EphrinB2 は効果を示さなかったことから、高濃度かつ長期間の AcOP-EphrinB2 の骨組織への蓄積は骨量の減少を抑制しないことが明らかとなった (図 5、図 6)。

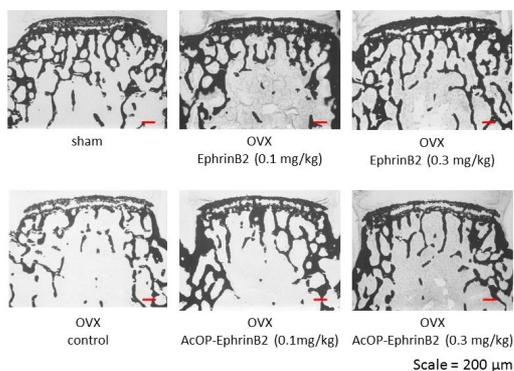


図 5 EphrinB2 もしくは AcOP-EphrinB2 を投与した OVX マウスの脊椎

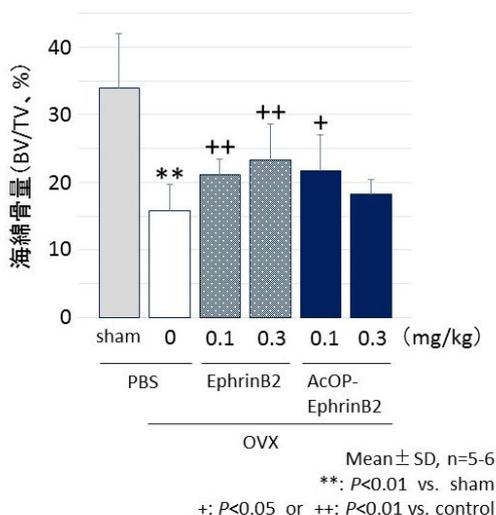


図 6 OVX マウスの脊椎の海綿骨量に及ぼす EphrinB2 もしくは AcOP-EphrinB2 の作用

EphrinB2 及び AcOP-EphrinB2 はいずれも海綿骨表面の骨芽細胞数を増加させたが、その作用は AcOP-EphrinB2 の方が強力であった。また、海綿骨表面の破骨細胞数は正常マウスと比較し OVX マウスで有意に増加したが、この増加は EphrinB2 もしくは AcOP-EphrinB2 の投与によって用量依存的に抑制され、その作用は両者でほぼ同程度であった (図 7)。

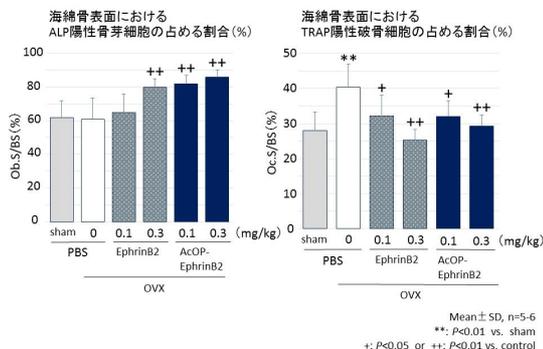


図 7 OVX マウスの脊椎の海綿骨表面における骨芽細胞数と破骨細胞数に及ぼす EphrinB2 もしくは AcOP-EphrinB2 の作用

EphrinB2 は骨芽細胞の分化促進作用と破骨細胞の分化抑制作用を有し、それによって OVX マウスの骨量減少を抑制することが明らかとなった。EphrinB2 への酸性オリゴペプチド付加により骨への指向性は増大し、EphrinB2 よりも海綿骨表面における骨芽細胞数を増加させたが、骨量に及ぼす作用は EphrinB2 よりも弱いものであった。以上の結果から EphrinB2 の方がより強力な骨粗鬆症治療効果を示すと結論付けられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Takahashi Tatsuo, Effect of impaired tissue function on pharmacokinetics of anti-osteoporotic drugs. Clin Calcium, 査読無, 26, 2016, 1539-1545

Takahashi Tatsuo, Improved therapeutic efficacy in bone and joint disorders by targeted drug delivery to bone. Yakugaku Zasshi, 査読無, 136, 2016, 1501-1508

高橋 達雄, 骨指向性薬物の創製と骨・関節疾患治療への応用, Applied Cell Biology, 査読無, 28, 2015, 1-9

〔学会発表〕(計 2 件)

阿部 史葉、山崎 京介、野村 政明、松尾 由理、高橋 達雄、卵巣切除マウスの骨量減少に及ぼす EphrinB2 の作用と酸性オリゴペプチド付加による影響、日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月、金沢

山崎 京介、高橋 達雄、本山 佳太、野村 政明、古林 伸二郎、酸性オリゴペプチド共役 EphrinB2 は卵巣切除マウスにおける骨量減少を抑制した、日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月、仙台

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高橋 達雄 (TAKAHASHI, Tatsu)

北陸大学・薬学部・准教授

研究者番号：50445904