

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861769

研究課題名(和文)破骨細胞形成必須因子M-CSF中和による破骨細胞形成抑制ペプチドの開発

研究課題名(英文)The development of peptide which neutralizes macrophage colony-stimulating factor for inhibition of osteoclastogenesis.

研究代表者

木村 桂介(KIMURA, KEISUKE)

東北大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：70712909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄細胞を用いた破骨細胞形成に対してリコンビナントc-Fms蛋白を作用させたところ破骨細胞形成を抑制した。次にリコンビナントc-Fms蛋白の濃度依存的な実験を行った。0ng/ml,10ng/ml,100ng/ml,1000ng/ml,10000ng/mlの濃度で作用させたところ100ng/mlの濃度から抑制効果が現れ、また1000ng/ml,10000ng/mlの濃度で多核の細胞が減少した。

研究成果の概要(英文)：The recombinant c-fms proteins were inhibited osteoclastogenesis. We used various concentrations of recombinant c-fms proteins (0ng/ml,10ng/ml,100ng/ml,1000ng/ml,10000ng/ml). The effect of inhibition of osteoclastogenesis was dependent on the concentration of recombinant c-fms proteins

研究分野：医歯薬学

キーワード：破骨細胞 M-CSF ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

近年、高齢化に伴い骨粗鬆症、関節リウマチ、癌や感染などによる病的骨吸収を伴う疾患が問題となっている。これらの病的骨吸収を抑制する治療薬としてデノスマブなどの抗RANKL抗体製剤やレミゲートなどの抗TNF- $\alpha$ 抗体製剤などの生物学的製剤が開発され効果をあらわしている。また、破骨細胞形成には macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) および Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) が必須因子とされ、さらに病的破骨細胞形成には炎症性サイトカインであるTNF- $\alpha$  が関与していると考えられている。これらのことから我々は破骨細胞形成必須因子であるM-CSFに注目した。現在までにM-CSFのレセプターであるc-Fmsに対する抗c-Fms抗体が関節炎のモデルマウスにおいて関節部における破骨細胞形成を抑制することがわかっている (Kitaura, H., et. al, J Clin Invest, 2005)。また、抗c-Fms抗体はTNF- $\alpha$ により誘導される破骨細胞形成および骨吸収に対して抑制効果を示した (Kitaura, H., et. al, J Clin Invest, 2005)。また、矯正歯科領域において問題となる歯根吸収も抑えることを報告している (Kitaura, H., et. al, Angle Orthod, 2009)。我々は歯周病の原因と言われている Lipopolysaccharide (LPS) による破骨細胞形成に対しても抗c-Fms抗体が破骨細胞形成および骨吸収を *in vivo*で抑制することを発見した (Kimura, K., et. al, FEMS Immunol Med Microbiol, 2012)。さらにマウス下顎左側第一臼歯近心歯肉にLPSを注射し歯槽骨に破骨細胞形成と骨吸収を誘導した歯槽骨病的骨吸収モデルマウスにおいても抗c-Fms抗体を同時に注射すると破骨細胞形成が抑えられた (Kimura, K., et. al, Oral Diseases, 2013)。しかしながら生物学的製剤、なかでも抗体製剤には優れた治療効果の反面、膨大な製造コ

ストがかかるという大きなデメリットがある。そこで安価で生産できるペプチドが抗体よりも優れた医薬品として、現在注目されている。そこで我々は抗c-Fms抗体がc-Fmsに反応する領域 (抗c-Fms抗体B-cellエピトープ)つまりM-CSFとc-Fmsが結合する領域を見つけ、その領域のペプチドをアンタゴニストとして使用することで、破骨細胞形成を抑えることを考えている。このペプチドも抗c-Fms同様に病的骨吸収をより有効に抑制することも予想でき、実用化できれば歯科領域全般および矯正歯科領域のみならず医療の発展に役に立つと考えている。

## 2. 研究の目的

我々は、現在までに破骨細胞形成に必須のサイトカインであるM-CSFのレセプターであるc-Fmsに対する抗c-Fms抗体 (ラット抗マウスc-Fms抗体 (M-CSF中和抗体); AFS98) が *in vivo*においてTNF- $\alpha$ やLPSが誘導する破骨細胞形成および病的骨吸収を抑制することを発見した。しかしながら、抗体は、非常に高価で実際に臨床応用するには問題となる。そこで本研究は、抗c-Fms抗体が結合する領域を決定し、その領域のペプチドをM-CSFの結合を阻害するアンタゴニストとして使用し、破骨細胞形成および病的骨吸収抑制効果を検討する。また抗c-fms抗体と同等の抑制効果が得られるか比較検討することが目的である。

## 3. 研究の方法

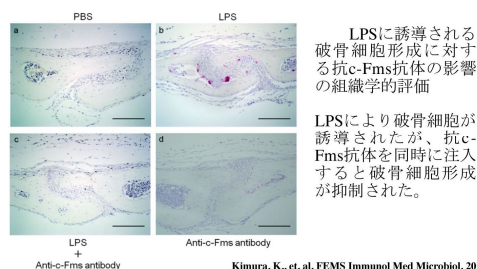
(1)抗c-Fms抗体のc-Fmsに対するの反応領域の決定 (抗c-Fms抗体B-cellエピトープ)の決定  
c-Fms遺伝子のサブクローニングおよび抗c-Fms抗体反応領域のスクリーニングM-CSFのレセプターであるc-FmsのM-CSFの結合領域を含む細胞外領域は、492のアミノ酸からなり1476塩基でコードされている。現在までにこの細胞外領域をコードするc-Fms遺伝子をク

ローニングしている。方法は全骨髄細胞 ( $1 \times 10^7$  個) を 10cm シャーレに播種し、M-CSF (100ng/ml) を添加して、3 日間培養する。0.2% EDTA-PBS で機械的に付着細胞を剥がして、回収する。その回収した付着細胞 ( $1 \times 10^7$  個) を 10cm シャーレにて M-CSF (100ng/ml) 存在下でさらに 3 日間培養する。この細胞は M-CSF 依存性マクロファージで、c-Fms を強く発現する。この細胞より mRNA を回収し c-Fms 特異的プライマーで cDNA を増幅し、T-Vector に組み込み、c-Fms 遺伝子をクローニングした。クローニングした c-Fms 遺伝子を発現ベクター (pGEX) に組み込み、大腸菌にて発現の誘導を行い、そのライゼートと抗 c-Fms 抗体の反応をウェスタンブロッティングでみて、発現を確認した。次に c-Fms 遺伝子のサブクローニングおよび抗 c-Fms 抗体反応領域のスクリーニングを行う。クローニングした c-Fms 遺伝子を適当な制限酵素サイトを利用して切断し発現ベクター (pGEX) に組み込み、サブクローニングし、大腸菌にて発現の誘導を行い、そのライゼートと抗 c-Fms 抗体の反応をウェスタンブロッティングでみる。反応した領域をさらに小さく、サブクローンを作成し、反応領域を限定していく。

ペプチドによる抗 c-Fms 抗体反応領域 (抗 c-Fms 抗体 B-cell エピトープ) の決定領域が限定されたら、オーバーラップした 20 アミノ酸程度のペプチドを合成し、ELISA で反応する領域を絞り込む。反応した領域は抗 c-Fms 抗体の B-cell エピトープで M-CSF 中和ペプチドとして今後の実験に使用する。

#### 4. 研究成果

我々は、現在までに破骨細胞形成に必須のサイトカインである M-CSF のレセプターである c-Fms に対する抗 c-Fms 抗体が *in vivo* において TNF- や LPS が誘導する破骨細胞形成および病的骨吸収を抑制することを発見した。



本研究は、抗 c-Fms 抗体が結合する領域を決定し、その領域のペプチドを M-CSF の結合を阻害するアンタゴニストとして使用し、破骨細胞形成および病的骨吸収抑制への応用を検討する。我々は、現在までにすでにリコンビナント c-Fms 蛋白を作製している。このリコンビナント c-Fms 蛋白に我々が使用している抗 c-Fms 抗体がウェスタンブロッティングで反応することから、抗 c-Fms 抗体が反応する部位 (B-cell エピトープ) が M-CSF と c-Fms の結合を抑制する可能性が十分考えられた。そこで骨髄細胞を用いた破骨細胞形成に対してリコンビナント c-Fms 蛋白を作用させたところ破骨細胞形成を抑制した。これらのことから、B-cell エピトープ領域のペプチドで破骨細胞形成を抑制できることが予想できる。c-Fms の M-CSF の結合領域を含む細胞外領域は、492 のアミノ酸からなり 1476 塩基でコードされている。この細胞外領域をコードする c-Fms 遺伝子をクローニングしている。現在 c-Fms 遺伝子のサブクローニングおよび抗 c-Fms 抗体反応領域のスクリーニングを行っており、クローニングした c-Fms 遺伝子を適当な制限酵素サイトを利用して切断し発現ベクター (pGEX) に組み込み、サブクローニングし、大腸菌にて発現の誘導を行い、そのライゼートと抗 c-Fms 抗体の反応をウェスタンブロッティングで確認を行っている。また *in vitro* にてリコンビナント c-Fms 蛋白の破骨細胞形成に対する濃度依存的な実験を行った。0ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml, 1000ng/ml, 10000ng/ml の濃度で作用させたところ 100ng/ml の濃度から抑制効果が現れ破骨細胞数が減少

した。また 1000ng/ml, 10000ng/ml の濃度では多核の細胞が減少した。

#### 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 8 件)

(1)Saeed, J., Kitaura, H., Kimura, K., Ishida, M., Sugisawa, H., Ochi, Y., Kishikawa, A., Takano-Yamamoto T: IL-37 inhibits lipopolysaccharide-induced osteoclast formation and bone resorption *in vivo*. Immunol. Lett. 175:8-15(2016)

doi: 10.1016/j. 査読あり

(2)Ishida M, Kitaura H, Kimura K, Sugisawa H, Aonuma T, Takada H, Takano-Yamamoto T: Muramyl dipeptide enhances lipopolysaccharide-induced osteoclast formation and bone resorption through increased RANKL expression in stromal cells. J. Immunol. Res. 2015:132765 (2015)

doi: 10.1155/2015/132765 査読あり

(3)Alvarado-Vázquez PA., Morado-Urbina CE., Castañeda-Corral G., Acosta-González RI., Kitaura, H., Kimura, K., Takano-Yamamoto T., Jiménez-Andrade JM: Intra-articular administration of an antibody against CFS-1 receptor reduces pain-related behaviors and inflammation in CFA-induced knee arthritis. Neurosci. Lett. 584, 39-44 (2015). 査読あり

doi: 10.1016/j.neulet.2014.09.053

(4)Hakami ZW., Kitaura, H., Kimura, K., Ishida, M., Sugisawa, H., Ida, H., Takano-Yamamoto T: Effect of Interleukin-4 on orthodontic tooth movement and associated root resorption. Eur. J. Orthod. 37(1), 87-94 (2015).

doi: 10.1093/ejo/cju016. 査読あり

(5)Kimura, K., Kitaura, H., Fujii, T., Ishida, M., Hakami ZW., Takano-Yamamoto T: An anti-c-Fms antibody inhibits osteoclastogenesis in a mouse periodontitis model. Oral Diseases. 20(3):319-324 (2014).

doi: 10.1111/odi.12117. 査読あり

(6)Kitaura, H., Kimura, K., Ishida, M., Sugisawa, H., Kohara H., Yoshimatsu M., Takano-Yamamoto T: Effect of cytokines on osteoclast formation and bone resorption during mechanical force loading of the periodontal membrane. Sci World J. Article ID 617032, 7 pages (2014).

doi: 10.1155/2014/617032. 査読あり

(7)Kitaura, H., Kimura, K., Ishida, M., Hakami Z., Sugisawa, H., Saeed J., Kohara H., Yoshimatsu M., Takano-Yamamoto T: The role of Th1 cytokines on mechanical loading-induced osteoclastogenesis and

bone resorption. Interface Oral Health Science 2014. 269-279 (2014)

doi: 10.1007/978-4-431-55192-8-23 査読あり

(8)Kimura, K., Kitaura, H., Ishida, M., Hakami Z., Saeed J., Sugisawa, H., Takano-Yamamoto T: Effect of macrophage colony-stimulating factor receptor c-Fms antibody on lipopolysaccharide-induced pathological osteoclastogenesis and bone resorption. Interface Oral Health Science 2014. 259-267 (2014)

doi: 10.1007/978-4-431-55192-8-22 査読あり

[学会発表](計 22 件)

(1)越智由美子、北浦英樹、木村桂介、石田匡彦、杉澤晴紀、ジャファリサイド、岸川明子、山本照子: 歯根膜圧迫による破骨細胞形成に対する IL-18 の影響および IL-12 との相互作用、第 66 回東北大学歯学会、仙台 2015 年 12 月 12 日

(2)越智由美子、北浦英樹、木村桂介、石田匡彦、杉澤晴紀、ジャファリサイド、岸川明子、山本照子: 矯正学的歯の移動による破骨細胞形成に対する IL-18 の影響および IL-12 との相互作用の検討、第 74 回日本矯正歯科学会、福岡 2015 年 11 月 18 日~20 日

(3)北浦英樹、木村桂介、石田匡彦、杉澤晴紀、越智由美子、ジャファリサイド、岸川明子、山本照子: 矯正学的歯の移動における破骨細胞形成に関して骨髄移植を利用したキメラマウスによる解析、第 74 回日本矯正歯科学会、福岡 2015 年 11 月 18 日~20 日

(4)木村桂介、北浦英樹、黒木毅、石田匡彦、佐久間知子、長谷川博、山本照子: 先天性疾患を伴う矯正歯科患者に対する生活の質のアンケート調査、第 74 回日本矯正歯科学会、福岡 2015 年 11 月 18 日~20 日

(5)黒木毅、北浦英樹、木村桂介、石田匡彦、小林考敬、小原紀明、出口徹、山本照子: 顎顔面非対称の認識を評価する質問票の信頼性および妥当性の検討、第 74 回日本矯正歯科学会、福岡 2015 年 11 月 18 日~20 日

(6)杉澤晴紀、北浦英樹、上田恭介、木村桂介、石田匡彦、越智由美子、岸川明子、山本照子: TiN コーティングを施した歯科矯正用ワイヤーの耐食性および機械的特性の検討、第 74 回日本矯正歯科学会、福岡 2015 年 11 月 18 日~20 日

(7)Kitaura H, Kimura K, Ishida M, Sugisawa H, Ochi Y, Saeed J, Kishikawa A, Takano-Yamamoto T. Analysis of contribution of marrow stromal cells and bone marrow macrophages to mechanical loading-induced osteoclastogenesis and bone resorption. The 37th Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Seattle, U.S.A. Oct 9th-12th 2015.

(8)Ochi Y, Kitaura H, Kimura K, Ishida M,

Sugisawa H, Saeed J, Kishikawa A, Takano-Yamamoto T. Effect of IL-18 on mechanical loading-induced osteoclastogenesis and bone resorption solely, and in synergy with IL-12. The 37th Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Seattle, U.S.A. Oct 9th-12th 2015.

(9)越智由美子、北浦英樹、木村桂介、石田匡彦、杉澤晴樹、岸川明子、山本照子：メカニカルストレスによる破骨細胞形成および骨吸収に対する IL-18 の影響の解析、第 57 回歯科基礎医学会、新潟 2015 年 9 月 11～13 日

(10)石田匡彦、北浦英樹、木村桂介、杉澤晴紀、山本照子：LPS が誘導する病的破骨細胞形成および骨吸収に対する MDP (muramyl dipeptide) の作用の検討、第 1 回日本骨免疫学会、宮古島 2015 年 6 月 30 日～7 月 2 日

(11)木村桂介、北浦英樹、黒木毅、石田匡彦、佐久間知子、遠藤学、長谷川博、山本照子：口唇裂口蓋裂などの先天疾患を伴う矯正患者に対する顎口腔機能に関する問診票による調査、第 39 回日本口蓋裂学会、東京 2015 年 5 月 21・22 日

(12)Ishida M, Kitaura H, Kimura K, Sugisawa H, Aonuma T, Takada H, Takano-Yamamoto T. Effect of muramyl dipeptide on LPS-induced osteoclast formation and bone resorption. The 62nd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, Osaka, Japan Dec 4th-5th 2014.

(13) Kitaura H, Hakami Z., Kimura K, Ishida M, Sugisawa H, Takano-Yamamoto T. Analysis of effect of IL-4 on mechanical loading-induced osteoclast formation and bone resorption. The 62nd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, Osaka, Japan Dec 4th-5th 2014.

(14)Sugisawa H., Kitaura H., Ueda K., Kimura K., Ishida M., Takano-Yamamoto T. Analysis of the corrosion resistance of titanium nitride coating on orthodontic wires. The 62nd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, Osaka, Japan Dec 4th-5th 2014.

(15)石田匡彦、北浦英樹、木村桂介、ザキウエリハカミ、杉澤晴紀、ジャファリサイド、高田春比古、山本照子：LPS が引き起こす破骨細胞形成および骨吸収に対する MDP の作用の検討、第 73 回日本矯正歯科学会、幕張、2014 年 10 月 20 日～22 日

(16)北浦英樹、ザキウエリハカミ、木村桂介、石田匡彦、杉澤晴紀、井田裕人、ジャファリサイド、山本照子：矯正学的歯の移動における IL-4 の効果、第 73 回日本矯正歯科学会、幕張、2014 年 10 月 20 日～22 日

(17)Ishida M, Kitaura H, Kimura K, Saeed J, Sugisawa H, Takada H., Takano-Yamamoto

T. Muramyl dipeptide enhances Lipopolysaccharide-induced osteoclast formation and bone resorption by enhance of RANKL expression. The 36th Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Houston, U.S.A. Sep 12th-15th 2014.

(18)Kitaura H, Hakami Z., Kimura K, Ishida M, Saeed J, Sugisawa H, Takano-Yamamoto T. Effect of IL-4 on mechanical loading-induced osteoclastogenesis and bone resorption. The 36th Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Houston, U.S.A. Sep 12th-15th 2014.

(19)Sugisawa H., Kitaura H., Ueda K., Kimura K., Ishida M., Saeed J., Ochi Y, Takano-Yamamoto T.: The corrosion resistance of Titanium Nitride (TiN) plating on an orthodontic wires. 9th International Workshop on Biomaterials in Interface Science. Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Summer Seminar 2014, Zao, Miyagi, Japan. Aug 26th-27th 2014.

(20)石田匡彦、北浦英樹、木村桂介、杉澤晴紀、山本照子：LPS 誘導病的骨吸収に対する MDP の作用の検討、第 32 回日本骨代謝学会、大阪、2014 年 7 月 24 日～26 日

(21)北浦英樹、木村桂介、石田匡彦、ハカミザキ、サイド ジャファリ、杉澤晴紀、小原悠、吉松昌子、山本照子：Macrophage colony-stimulating factor 中和による機械的荷重により誘導される破骨細胞形成および破骨細胞形成に対する抑制効果、第 53 回日本生体医工学会、仙台 2014 年 6 月 24 日～26 日

(22)石田匡彦、北浦英樹、木村桂介、杉澤晴紀、高田春比古、山本照子：LPS により誘導される破骨細胞形成および骨吸収に対する MDP の作用について、第 65 回東北大学歯学会、仙台 2014 年 6 月 13 日

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

木村 桂介 (KIMURA KEISUKE)

東北大学 大学院歯学研究科 助教

研究者番号：70712909

### (2)研究分担者

無し

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

無し

( )

研究者番号：