

200401408 H

厚労省科学研究費補助金

痴呆・骨折臨床研究事業

骨及び関節疾患の診断・治療薬の開発に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

平成17(2005)年3月

主任研究者 新飯田俊平

平成16年度 研究報告書 目次

1. 総括研究報告書	1
骨及び関節疾患の診断・治療薬の開発に関する研究	3
国立長寿医療研究センター研究所 運動器疾患研究部 室長 新飯田 俊平	
2. 分担研究報告書	15
1. γ -GTP の骨吸収作用機序に関する研究	17
国立長寿医療センター研究所 運動器疾患研究部 室長 新飯田 俊平	
2. 病的な顎骨吸収と γ -GTP の関係についての研究	23
広島大学医歯薬学総合研究科 教授 高田 隆	
3. 病的環境下における破骨細胞の分化誘導因子に関する研究	30
鳥取大学医学部 教授 林 眞一	
4. 骨吸収亢進と尿中 γ -GTP 排泄量の関連に関する研究	34
国立長寿医療研究センター研究所 運動器疾患研究部 研究部長 池田 恭治	
3. 研究成果の刊行に関する一覧表	39
4. 研究成果の刊行物・別刷	41

1. 総括研究報告書

骨及び関節疾患の診断・治療薬の開発に関する研究

主任研究者 新飯田俊平(国立長寿医療センター研究所・室長)

研究要旨: 酵素活性に依存しない γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ(γ -GTP)の破骨細胞形成活性は、骨髄細胞からのIL-1 β やIL-6の産生亢進を介し、破骨細胞分化因子RANKLの発現を誘導するという経路で作用していることが示唆された。歯肉溝からの γ -GTP投与は急激な歯槽骨破壊を惹起し、 γ -GTPの生体内での破骨細胞誘導活性が確認された。関節炎マウス滑膜組織からの破骨細胞誘導は抗 γ -GTP抗体により抑制され、 γ -GTPが炎症性の骨吸収を抑制する標的となる可能性が示された。細菌成分LPSは炎症を引き起こし、RANKL誘導を惹起するが、SHP-1欠損マウスでは、RANKLに依存せずLPSを介した破骨細胞形成を誘導することが明らかになった。 γ -GTPを過剰発現するトランスジェニックマウスでは骨吸収亢進が示された。さらに、骨吸収の亢進状態では、尿に γ -GTPが排出されることが明らかになり、この排泄量は生体内の骨吸収を反映している可能性が示唆された。

キーワード: 骨吸収, 破骨細胞, γ -GTP, 関節破壊, 骨粗鬆症

分担研究者

林 真一 鳥取大学医学部・教授

高田 隆 広島大学

医歯薬総合研究科・教授

池田恭治 国立長寿医療センター

研究所・研究部長

A. 研究目的

骨折や関節炎による骨破壊は、高齢者においては著しいQOL低下を招くこともある。最近、我々は新規の骨吸収因子として γ -GTPを同定したが、この因子は関節炎や歯周炎で発現していることが明

らかになった。 γ -GTPは主に腎臓近位尿細管で発現し、グルタチオン代謝に関与する重要な酵素であるが、新たに確認された骨吸収亢進作用は酵素活性に依存しないことが明らかになっている。今回我々は、 γ -GTPを標的とした新規の骨吸収抑制剤の開発を目指すにあたり、 γ -GTPによる骨吸収亢進作用メカニズムを明らかにすること、病的環境下での破骨細胞の分化・活性化の特性を明らかにすることは重要な課題である。

関節炎や歯周病のモデル動物では病的な骨吸収が起こる。 γ -GTPの骨破壊

への影響を *in vivo* で解析する目的で、動物への γ -GTP 投与実験と γ -GTP 過剰発現モデルマウスの開発を行った。また、骨吸収が亢進すると尿中に γ -GTP が漏出することを見出したが、これらのマウスを用い、骨吸収マーカーとして可能性を探ると同時にその漏出機構の解明を試みた。

B. 研究方法

1) γ -GTPによる破骨細胞誘導メカニズムの解析

間質系細胞株 ST2 に γ -GTP (AC Biotechnologies Co. Ltd.)を作用させ、12 時間後に細胞を回収し、total RANKL を調整した。サンプルからターゲット DNA を調整し、マウス DNA チップ解析を行った。マウス頭蓋由来骨芽細胞、骨髄血球細胞及び両者の共存培養系にそれぞれに γ -GTP を作用させ、DNA チップ解析で上昇が認められたインターロイキン(IL)-1 β 、IL-6、MIP-1 骨吸収因子の発現変化を real time-PCR 法を用いて解析した。また、それらの培養上清をサンプルとし、蛋白量を ELISA 法により定量した。また、これらの因子に対する抗体を用いた破骨細胞形成抑制実験を行なった。

動物実験倫理委員会を経て、DMA/1 J マウスに対し、コンプリート Freund's アジュバント (Difco) に溶かしたウシ II 型コラーゲン (Cosmo Bio) を投与し、コラーゲン誘導性関節炎 (CIA) マウスを作製した。CIA マウス関節炎部位から得た滑膜組織をサンプルとし、total RNA を調整、通法に従い RT-PCR 法で γ -GTP 発現を検

索した。炎症関節における γ -GTP 発現の局在を抗 γ -GTP 抗体を用いた免疫組織化学で確認した。炎症関節滑膜細胞の培養系から誘導される破骨細胞形成に対して抗 γ -GTP 抗体を添加し、その抑制効果があるかどうか検討した。

2) 病的な顎骨吸収と γ -GTPの関係についての研究

7週齢ウイスター系雄性ラットの両側上顎臼歯歯肉溝から 50 μ g/ml ヒト γ -GTP 溶液 (AC Biotechnologies Co. Ltd.) をマイクロピペットにて 2ml ずつ 10 分毎に 1 時間にわたって投与し、歯肉溝からの γ -GTP の浸透を図った。投与開始後 3 時間、1、2、3 および 7 日後に上顎臼歯部を顎骨ごと採取した。

同様の方法で歯肉溝から 500 μ g/ml 濃度の抗 γ -GTP 抗体を前投与した後、50 μ g/ml 濃度の γ -GTP を投与した。投与後 3 時間と 3 日目の辺縁歯周組織における組織変化を検討した。

5mg/ml 濃度の *E. Coli*-リポポリサッカライド (LPS) を浸した綿棒 (直径 2mm, 長さ 8mm) をラット上顎臼歯部口蓋側歯肉から咬合面にかけて 1 時間静置し、投与開始後 3 時間と 3 日目の辺縁歯周組織を採取し LPS 投与群とした。一方、抗 γ -GTP 抗体群には LPS 投与に先行して、上記の方法で 500 μ g/ml 濃度の抗 γ -GTP 抗体を前投与した。

摘出した材料は、PLP 固定液で 4 $^{\circ}$ C, 8 時間固定後、10% EDTA 溶液中で 5 日間低温脱灰した。AMeX 法にてパラフィン包埋後、4.5mm 厚のパラフィン切片を作成し、組織学的に観察するとともに歯

槽頂から1mmの範囲の歯根膜側歯槽骨縁に沿って出現する破骨細胞数を組織計測学的に測定した。対照として、未処置の材料も同様に観察した

3) 破骨細胞の分化誘導因子に関する研究

骨吸収亢進を示す Src ホモロジー2 チロシン脱リン酸化酵素 (SHP-1) の欠損 viable motheaten (*me^v/me^v*) マウスの骨髓細胞を採取し、RANKL-RANK の情報伝達系と下流シグナルを共有すると考えられている toll-like 受容体 (TLR) のリガンドを用いて破骨細胞誘導の有無を検討した。

血液細胞系譜が完全に欠損する Tal-1 転写因子の遺伝子破壊 ES 細胞株に、テトラサイクリン (Tc) で発現を制御できるシステムを導入した。この Tc により PU.1 転写因子の発現を人為的に制御し、破骨細胞分化の有無を検討した。

4) 骨吸収亢進と尿中 γ -GTP 排泄量の関連に関する研究

Cre-lox P システムを利用した γ -GTP のトランスジェニックマウスを作製した。全身に発現させるグロビンプロモーターの下流に loxP 配列ではさんだ GFP とマウス γ -GTP cDNA を挿入した DNA コンストラクト (以下 floxed GFP/ γ -GTP) を作成した。floxed GFP/ γ -GTP を、全身で Cre を発現する CAG-Cre マウスと交配し、CAG- γ -GTP マウスを作出した。

5 週齢の OPG ノックアウトマウス (日本クレア) をカルシウム含量 1.2%、リン含量

1.08%、ビタミン D 含量 240 IU/100g の飼料 CE-2 で飼育した。9 週齢のホモおよびヘテロノックアウトマウスに 1 mg/kg 体重のアレンドロネート (帝人ファーマ) を週 5 回 2 週間皮下投与した。

マウスの 24 時間尿を採取し、 γ -GTP、クレアチン、デオキシピリジノリン濃度を測定した。値はクレアチニン濃度で補正し、評価した。

γ -GTP 活性はダイヤオート γ -GTP 試薬を用い、自動分析装置 (オリンパス, モデル AU5232) で測定した。デオキシピリジノリン濃度は ELISA 法で測定した。

健康成人ボランティアから尿を採取し、同様のシステムで γ -GTP 値を測定した。尿を 17,000×g で低速遠心した後、上清と沈降物に分画し、前者はさらに 200,000×g で超遠心し、上清と沈降物に分取した後、それぞれの分画の γ -GTP 活性を測定した。動物実験及びヒト尿検体を用いた解析については国立長寿医療センターの動物倫理委員会及び倫理委員会でそれぞれ承認されたものである。また、ヒト尿検体については文書による同意を得ている。

C. 研究結果

1) γ -GTP による破骨細胞誘導メカニズムの解析

ST2 細胞を γ -GTP で 12 時間刺激した後の DNA チップ解析を行った結果、MIP-1、IL-1 α 、IL-6、IL-1 β の各遺伝子発現が、未刺激の ST2 細胞に比べ 5 倍以上上昇していた。これらの結果をもとに、骨芽細胞と骨髓細胞の共存培養系

を γ -GTP で 12 時間刺激し、MIP-1、IL-1 α 、IL-6、IL-1 β の mRNA 発現を調べた結果、IL-1 α を除き、未刺激のときと比べ有意に上昇していた。骨芽細胞と骨髄血球系細胞を分けて同様の検討を行ったところ、骨芽細胞では IL-6 mRNA が、骨髄細胞では IL-1 β と MIP-1 の mRNA が顕著に上昇していた。 γ -GTP の刺激後の破骨細胞形成が、抗 γ -GTP 抗体及び各種サイトカインの抗体によって抑制されるかどうか検討を行った結果、抗 γ -GTP 抗体と、抗 IL-1 抗体、抗 IL-6 抗体及び抗 MIP-1 抗体の3種混合抗体で有意に破骨細胞形成を抑制した。しかし、各抗体単独もしくは2種混合では十分な抑制効果は認められなかった。

CIA マウスの炎症関節では γ -GTP mRNA の発現上昇が認められた。免疫組織化学の結果、炎症滑膜組織内のマクロファージ、プラズマ細胞、血管内皮細胞で陽性反応が認められた。炎症滑膜細胞の培養系ではビタミン D₃のような吸収因子を添加しなくても TRAP 陽性の破骨細胞様細胞が形成される。そこで、この培養系において抗 γ -GTP 抗体の添加が TRAP 陽性細胞の形成を抑制するかどうか、検討を行った。その結果、50 μ g/ml 以上の抗体添加で TRAP 陽性細胞の数は半減した。

2) 病的な顎骨吸収と γ -GTPの関係についての研究

γ -GTP 投与から 3 時間後、深部歯根膜組織では歯根膜側歯槽骨骨縁に沿って活発な骨吸収を営む破骨細胞が観察された。投与 1 日後では歯根膜側

歯槽骨骨縁に出現する破骨細胞は少数となり、投与開始 3 日後の歯根膜側歯槽骨骨縁には再び活発な骨吸収を営む多数の破骨細胞が観察された。

γ -GTP を局所投与した際の歯肉組織における炎症性サイトカイン TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 発現を RT-PCR で調べた結果、TNF- α mRNA 発現は3時間後をピークとする一過性の発現上昇を示した。IL-1 β mRNA 発現は2日、3日後と経時的に増加した。しかし、IL-6 は実験期間を通して発現が認められなかった。

抗 γ -GTP 抗体前投与は、 γ -GTP 局所投与による破骨細胞数の増加を抑制した。 γ -GTP 投与3日後、接合上皮部における好中球浸潤の増加や血管拡張は抗 γ -GTP 抗体前投与群では目立たなくなっていた。また、抗 γ -GTP 抗体前投与群では歯根膜側歯槽骨骨縁に沿って出現する破骨細胞は少なく、それらは骨縁から離れて位置する小型類円形の inactive な細胞であった。

LPS 誘導ラット歯周組織破壊に及ぼす抗 γ -GTP 抗体前投与の効果調べた。LPS 投与直後より深部歯根膜組織では破骨細胞性骨吸収が誘導された。LPS による破骨細胞の誘導は投与後3時間と3日後にピークを有する2相性の増加を示し、 γ -GTP と同じ反応を示した。しかしながら、今回の実験では、抗 γ -GTP 抗体を歯肉溝から前投与してもこれらの変化を抑制することはできなかった。

3) 破骨細胞の分化誘導因子に関する研究

M-CSF 存在下で TLR4 のリガンドである LPS で骨髄細胞を刺激したところ破骨細胞分化が誘導された。この反応は骨髄細胞を用いた場合にのみ観察され、脾臓や腹腔細胞を用いても破骨細胞誘導は観察されなかった。破骨細胞前駆細胞を濃縮するため、表面分子による細胞分取をおこなったところ、これらの細胞は Kit 陽性細胞画分に存在した。

一方、Tall(-/-)ES 細胞株に PU.1 を強制発現させたところ、破骨細胞が誘導された。若干のマクロファージ様細胞も誘導できたが、B細胞、顆粒球、赤血球など他の細胞系譜は誘導できなかった。

4) 骨吸収亢進と尿中 γ -GTP 排泄量の関連に関する研究

全身で γ -GTP を発現するトランスジェニックマウスは骨吸収亢進が認められ、尿中デオキシピリジノリン排泄とともに、クレアチニンで補正した尿中 γ -GTP 排泄量も対照群に比して上昇していた。

同じく骨吸収亢進を示す OPG ノックアウトマウスは、対照としたヘテロマウスと比較して、尿中 γ -GTP 活性が有意に上昇し、既存の骨吸収マーカーであるデオキシピリジノリンと同じ動向を示した。このマウスに、骨吸収抑制薬アレンドロネートを投与すると、尿中デオキシピリジノリン排泄とともに、尿中 γ -GTP 排泄量も、コントロールレベルにまで低下した。

ヒト尿中の γ -GTP 活性は、低速遠心の細胞成分や残渣が主体の沈降物や超遠心後の上清(液性成分)には全体の 15%以下であり、大部分は、超遠心後の沈降物中に認められた。この分画には、

直径数十 nm 程度の微小構造物が含まれる。

D. 考察

1) γ -GTP による破骨細胞誘導メカニズムの解析

高齢者にとって、病的骨破壊は直接的な QOL 低下の原因となりうる。関節炎モデルマウスの炎症滑膜ではマクロファージやプラズマ細胞、血管内皮細胞からの γ -GTP 産生が示唆された。骨髄培養系を用いた実験から、 γ -GTP は IL-1 や IL-6 の産生を促すことが示され、これらのサイトカインがメディエーターとなって骨髄間質系細胞からの RANKL 発現を誘導し、破骨細胞分化を支持していると考えられる。

炎症関節滑膜細胞の培養系では、骨吸収因子の添加なしで破骨細胞形成が誘導されるが、この培養系に抗 γ -GTP 抗体を添加すると破骨細胞誘導は有意に減少した。このことから、炎症関節における骨破壊に γ -GTP は骨吸収因子として積極的に作用しており、抗 γ -GTP 抗体はその活性を抑制することから、抗体治療のシーズとして利用できる可能性が示唆された。

2) 病的な顎骨吸収と γ -GTP の関係についての研究

γ -GTP 投与による破骨細胞増加は投与後 3 時間と 2 ~ 3 日目にピークを有する 2 相性増加を示した。最初ピークは、反応が早く、未知の γ -GTP 受容体を介した直接的作用かもしれない。2 相目のピークは、それに先駆けて、

TNF- α と IL-1 β の mRNA 発現上昇が確認されたことから、歯周組織構成細胞からの骨吸収因子の産生亢進を介した間接的的刺激作用であることが示唆された。

抗 γ -GTP 抗体の前投与は γ -GTP による破骨細胞増加を有意に抑制したが、LPS の誘導する組織変化にほとんど影響を及ぼさなかった。LPS の誘導する組織変化は約 7 日間で終息する一過性の急性滲出性炎とそれに伴う一過性の破骨細胞増加で、人の歯周炎で見られるリンパ球や形質細胞の浸潤を主体とする B 細胞性病変とは異なっている。今回の実験から急性炎症巣における γ -GTP の関与は否定されたが、関節炎モデルマウスやリウマチ患者の病理組織において γ -GTP 産生がみられたことを考えると、 γ -GTP はリンパ球・形質細胞浸潤が主体となるような慢性炎症巣で宿主細胞から産生され、歯槽骨破壊に関わっている可能性が考えられる。

唾液や歯肉溝液で γ -GTP 酵素活性が検出されることが知られている。唾液腺導管での発現の報告はあるが、そのソースはまだ不明である。しかし、その存在が過剰になれば破骨細胞性骨吸収を誘発する可能性があり、今後検討する必要がある。

3) 破骨細胞の分化誘導因子に関する研究

LPS 以外に、プロテオグリカン (TLR2)、CpG オリゴ DNA (TLR9)による実験を行ったが、破骨細胞誘導は観

察されなかったため、この反応は TLR4 に特異的反応と思われる。正常マウス骨髓細胞から Kit 陽性細胞を濃縮すると M-CSF と LPS で少ないながらも破骨細胞が誘導される。さらに、SHP-1 阻害剤の添加でも増加することから、SHP-1 活性を低下させれば正常からもこの刺激で破骨細胞が分化誘導される可能性がある。すなわち、破骨細胞前駆細胞において、SHP-1 活性の低下が生じた場合、LPS などの細菌成分が破骨細胞分化を誘導する可能性が示唆される。

一方、*Tal1* は、少なくとも破骨細胞系譜にとっては、PU.1 の発現を制御する遺伝子と考えられた。PU.1 ノックアウトマウスを用いた実験結果からは B 細胞や顆粒球も PU.1 に依存性であるが、PU.1 だけを強制発現させても回復しない。このことは、単球系血液細胞のみを ES 細胞から分化誘導できることを示しており、新しい研究ツールとしても応用できると思われる。

4) 骨吸収亢進と尿中 γ -GTP 排泄量の関連に関する研究

γ -GTP の過剰発現マウスの骨では骨吸収亢進を示し、尿中 γ -GTP 排泄も増加しており、OPG ノックアウトマウスでの成績と合わせ、尿中 γ -GTP 排泄が、生体内の骨吸収活性を反映している可能性がある。このことは、アレンドロネート投与で骨吸収亢進を改善したときに尿中 γ -GTP 排泄は減少するという結果によってさらに支持される。

尿の分画における解析から、尿へ排

泄される γ -GTP活性の大部分は、超遠心によって沈降する微小構造物と会合していることが示唆される。最近、**exosome** と呼ばれる膜で囲まれた尿中微小構造物のプロテオーム解析が行われ、近位尿細管で多く発現する γ -GTPも **exosome** に会合していることが明らかになっている。近位尿細管の管腔側に存在する γ -GTPが、骨吸収亢進状態では管腔内への排泄が促進されること、また液相に **shedding** されるよりはむしろ **exosome** などの膜で囲まれた構造物に会合したまま尿中に排泄される可能性が考えやすい。

E. 結論

- 1) γ -GTPは骨髄細胞に作用し、IL-1 β などの骨吸収因子の発現を亢進させ、RANKL 依存性の破骨細胞形成を誘導することが示唆された。
- 2) γ -GTPは関節炎で発現し、骨破壊に影響する可能性があり、抑制剤の標的となりうる。
- 3) 歯肉溝からの γ -GTP 局所投与は急激な歯槽骨破壊を誘導することから生体内で骨吸収因子として作用することが明らかになった。
- 4) SHP-1 欠損マウスの骨髄Kit陽性細胞画分に RANKL 非依存性にLPSで破骨細胞に分化する細胞が存在する。
- 5) Tall 遺伝子の破骨細胞(単球系)系譜への機能はPU.1の発現誘導にある。
- 6) γ -GTP 過剰発現マウスは骨吸収亢進を示した。また、クレアチニン値で補正した尿中 γ -GTP 排泄量は、生体内の骨吸収活性を反映する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

主任研究者

- 1) Niida S, Kawahara M, Ishizuka Y, Ikeda Y, Kondo T, Hibi T, Suzuki Y, Ikeda K, Taniguchi N: γ -Glutamyl transpeptidase stimulates RANKL expression independent of its enzymatic activity and serves as a pathological bone-resorbing factor. *J Biol Chem* 279: 5752-5756, 2004
- 2) Nakano Y., Niida S, Dote K, Takenaka S, Hirao H, Miura F, Ishida M, Shingu T, Sueda T, Yoshizumi M, Chayama K: Matrix metalloproteinases 9 contributes to human atrial remodeling during atrial fibrillation. *Journal of The American College of Cardiology* 43(5):818-825, 2004.
- 3) Kodama I, Niida S, Sanada M, Yoshiko Y, Tsuda M, Maeda N, Ohama K: Estrogen regulates the production of VEGF for osteoclast formation and activity in *op/op* mice. *Journal of Bone and Mineral Research* 19(2):200-206, 2004.
- 4) Niida S. Osteoclast-forming activity of the vascular endothelial growth factor. *J. Oral Biosci.* 48(2), (in press), 2005.

分担研究者 高田 隆

- 1) Ohara M, Hayashi T, Kusunoki Y, Miyauchi M, Takata T, Sugai M : Caspase-2 and caspase-7 are involved in CDT-induced apoptosis in Jurkat and MOLT-4 T cell lines. *Infection and Immunity* 72 : 871-879, 2004.
- 2) Miyauchi M, Kitagawa S, Hiraoka M, Saito A, Sato S, Kudo Y, Ogawa I, Takata T: Immunolocalization of CXC-chemokine and recruitment of polymorpho- nuclear leukocytes in the rat molar periodontal tissue after topical application of lipopolysaccharide *Histochemistry and Cell Biology* 121: 291-297, 2004.
- 3) Miyauchi M, Hiraoka M, Oka H, Sato S, Kudo Y, Ogawa I, Noguchi K, Ishikawa I, Takata T : Immuno-localization of COX-1 and COX-2 in the rat molar periodontal tissue after topical application of lipopolysaccharide *Archives of Oral Biology*, 49: 739-746, 2004.
- 4) Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N, Iwata T, Hamaguchi H, Shiba H, Takata T, Kato Y, Kurihara H : Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol*, 75:1281-1287, 2004.

分担研究者 林 眞一

- 1) Tsuneto M, Tominaga A, Yamazaki H, Yoshino M, Orkin SH, Hayashi, S.I.: Enforced expression of PU.1 rescues osteoclastogenesis from embryonic stem cells lacking Tal-1. *Stem Cells*, 23: 134-143, 2005.
- 2) Hayashi SI, Tsuneto M, Yamada T, Nose M, Yoshino M, Shultz LD, Yamazaki H: Lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis in Src homology 2-domain phosphatase-1-deficient viable motheaten mice. *Endocrinology*, 145:2721-2729, 2004.
- 3) Yamane T, Okuyama H, Tsuneto M, Hemmi H, Yamazaki H, Hayashi SI: Osteoclast Lineage (Chapter 27). In "Handbook of Stem Cells, Vol. 1, Embryonic Stem Cells". Eds. R.P. Lanza, J.D. Gearhart, B.L.M. Hogan, R.D. McKay, D.A. Melton, R. Pedersen, J.A. Thomson, and M.D. West, Academic Press, San Diego, CA. pp 295-303, 2004.
- 4) Yoshino M, Yamazaki H, Hayashi SI: Migration of dendritic cells determines divergent immune responses. *Recent Research Development in Biophysics and Biochemistry (Research Signpost)*, 4:29-48, 2004.
- 5) Yamazaki H, Hayashi SI: Contribution of neural crest cells in the tooth development and the possibility of tooth regeneration. *J. Oral. Sci.* 46

(6):509-518, 2004.

6) Yamazaki H, Yoshino M, Hayashi SI: Neural crest stem cells and organogenesis. In "Progress in Stem Cell Research", Ed. F. Columbus, Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY. (In press).

7) Yamazaki H, Sakata E, Yamane T, Yanagisawa A, Abe K, Yamamura KI, Hayashi SI, Kunisada T: Presence and distribution of neural crest-derived cells in the murine developing thymus and their potential for differentiation. *Int. Immunol.*, (In press).

分担研究者 池田 恭治

1) Niida S, Kawahara M, Ishizuka Y, Ikeda Y, Kondo T, Hibi T, Suzuki Y, Ikeda K, Taniguchi N: γ -Glutamyl transpeptidase stimulates RANKL expression independent of its enzymatic activity and serves as a pathological bone-resorbing factor. *J Biol Chem* 279: 5752-5756, 2004

2) Kondo K, Ikeda K, Matsuo K: Detection of osteoclastic cell-cell fusion through retroviral vector packaging. *Bone* 35:1120-1125, 2004

2. 学会発表

主任研究者

1) Niida S, Ikeda K, Shibuya M: Bone morphology of the VEGFR-1

signal-deficient *op/op* mice. The 16th International Congress of IFAA. (Kyoto, Japan), 25/Aug/2004

2) Niida S, Ikeda K, Shibuya M: Bone morphology of the super *op/op* mice, M-CSF and VEGFR-1 signal deficient mice. The 26th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (Seattle, Washington, USA), 1/Oct/2004

3) Hiramatsu K, Tatsumi S, Nimura Y, Takasu H, Niida S, Ito M, Ikeda K: GGT (γ -glutamyltranspeptidase) as a pathogenic factor of bone loss. The 26th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. (Seattle, Washington, USA) 4/Aug/2004

4) 宮内睦美, 岡 広子, 北島正二郎, 齋藤彰久, 北川雅恵, 工藤保誠, 小川郁子, 新飯田俊平, 高田 隆: 口腔扁平上皮癌の浸潤・増殖に及ぼす Vascular endothelial growth factor (VEGF)の影響. 第 15 回日本口腔病理学会総会・学術大会(東京), 2004.8.6

5) 宮内睦美, 石塚保行, 岡 広子, 齋藤彰久, 北川雅恵, 新飯田俊平, 高田 隆: γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (γ -GTP)は歯槽骨破壊のリスクファクターである(1). γ -GTP 局所投与によるラット辺縁歯周組織の変化. 第 47 回秋季歯周病学会学術大会(仙台), 2004.10.15

- 6) 野村篤志, 石塚保行, 杉浦正人, 鈴木健三, 新井康司, 角保徳, 林義治, 宮内睦美, 高田 隆, 新飯田俊平: γ -グルタミルトランスペプチダーゼ(γ -GTP)は歯槽骨破壊のリスクファクターである(2). 歯肉溝 γ -GTP による歯周病診断への可能性. 第 47 回秋季歯周病学会学術大会(仙台), 2004.10.15

分担研究者 高田 隆

- 1) 岡 広子, 宮内睦美, 齋藤彰久, 平岡雅恵, 佐藤 淳, 小川郁子, 野口和行, 石川 烈, 高田 隆: セメント芽細胞の増殖および機能発現機構に関する検討. セメント芽細胞株 OCCM-30 の増殖・分化における prostaglandin E2 受容体の役割について. 第 47 回春季歯周病学会学術大会(鹿児島), 2004.
- 2) 宮内睦美, 岡 広子, 北島正二郎, 齋藤彰久, 北川雅恵, 工藤保誠, 小川郁子, 新飯田俊平, 高田 隆: 口腔扁平上皮癌の浸潤・増殖に及ぼす Vascular endothelial growth factor (VEGF) の影響. 第 15 回日本口腔病理学会総会・学術大会(東京), 2004.
- 3) 北川雅恵, 北川尚嗣, 米川敦子, 岡 広子, 北島正二郎, 齋藤彰久, 工藤保誠, 小川郁子, 宮内睦美, 田原栄俊, 井出利憲, 高田 隆: hTERT 遺伝子導入によるヒトセメント芽細胞標準株の樹立. 第 37 回広島大学歯学会総会(広島), 2004.
- 4) 岡 広子, 宮内睦美, 齋藤彰久, 北川雅

恵, 小川郁子, 野口和行, 石川 烈, 高田 隆: マウスセメント芽細胞株 (OCCM-30) の増殖・分化における PGE2 および PGE 受容体の役割について. 第 46 回歯科基礎医学会学術大会(広島), 2004.

- 5) 宮内睦美, 石塚保行, 岡 広子, 齋藤彰久, 北川雅恵, 新飯田俊平, 高田 隆: γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -GTP) は歯槽骨破壊のリスクファクターである(1). γ -GTP 局所投与によるラット辺縁歯周組織の変化. 第 47 回秋季歯周病学会学術大会(仙台), 2004.
- 6) 野村篤志, 石塚保行, 杉浦正人, 鈴木健三, 新井康司, 角保徳, 林義治, 宮内睦美, 高田 隆, 新飯田俊平: γ -グルタミルトランスペプチダーゼ(γ -GTP)は歯槽骨破壊のリスクファクターである(2). 歯肉溝 γ -GTP による歯周病診断への可能性. 第 47 回秋季歯周病学会学術大会(仙台), 2004.
- 7) 米川敦子, 北川雅恵, 岡 広子, 宮内睦美, 高田 隆: ヒトセメント芽細胞の増殖分化におよぼすプロスタグランジン E2 の役割. 第 20 回日本歯科医学会総会(横浜), 2004.

分担研究者 林 眞一

- 1) 山崎英俊, 坂田恵美, 林 眞一: 神経堤由来細胞の胎仔胸腺における存在時期と部位の検討. 第 37 回日本発生生物学学会(名古屋), 2004.6.6

- 2) 経遠智一, 山崎英俊, 吉野三也, 林 眞一: PU.1 強制発現による *Tal1* 遺伝子欠損 ES 細胞からの破骨細胞誘導。第 2 回幹細胞シンポジウム(東京), 2004.4.26
- 3) Yoshino M, Yamazaki H, Hayashi SI: Measurement of the amount of skin antigens trafficked in the steady state. (P6) 13th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (Osaka, Japan), 1-2/Jun/2004
- 4) 経遠智一, 山崎英俊, 吉野三也, 林 眞一: PU.1 強制発現による *Tal1* 遺伝子欠損 ES 細胞からの破骨細胞誘導。第 22 回日本骨代謝学会(大阪), 2004.8.6
- 5) 林 眞一, 経遠智一, 山田貴佑記, 吉野三也, 山崎英俊: リポポリサッカライドによる SHP-1 異常 viable motheaten マウスからの破骨細胞分化誘導。第 22 回日本骨代謝学会(大阪), 2004.8.6
- 6) 吉野三也, 林 眞一, 山崎英俊: 色素増多症マウスを用いた定常状態における皮膚抗原輸送の量的解析。第 34 回日本免疫学会(札幌), 2004.12.2
- 7) 山崎英俊, 坂田恵美, 経遠智一, 吉野三也, 林 眞一: 神経堤由来細胞の胎仔胸腺における存在時期と部位及びその性状解析。第 34 回日本免疫学会(札幌), 2004.12.1
- 8) 経遠智一, 山崎英俊, 吉野三也, 林 眞一: 野生型 ES 細胞及び PU.1 強制発現による *Tal1* 遺伝子欠損 ES 細胞からの破骨細胞誘導の比較。第 34 回日本免疫学会(札幌), 2004.12.2
- 9) 吉武江奈, 鍋倉 宰, 小野寺雅史, 吉野三也, 山崎英俊, 林 眞一: 卵白アルブミン特異的システムを用いたクロスプレゼンテーション機構解析。第 34 回日本免疫学会(札幌), 2004.12.1
- 10) 坂田恵美, 林 眞一, 吉野三也, 経遠智一, 山崎英俊: 胸腺形成における多分化能を持った神経堤細胞の関与。第 34 回日本免疫学会(札幌), 2004.12.1
- 11) 岸本賢和, 経遠智一, 山田貴佑記, 吉野三也, 山崎英俊, 林 眞一: 樹状細胞から破骨細胞へ向かう新たな分化経路。第 34 回日本免疫学会(札幌), 2004.12.1
- 12) 森香奈子, 経遠智一, 吉野三也, 山崎英俊, 林 眞一: 制御性 T 細胞の分化機構解明のための新生仔免疫寛容システムの構築。第 34 回日本免疫学会(札幌), 2004.12.2
- 分担研究者 池田 恭治
- 1) 平松聖史, 辰巳佐和子, 新飯田俊平, 伊東昌子, 仁村雄次, 池田恭治: γ -GTP と骨・カルシウム代謝, 第 41 回日本臨床分子医学会(福岡), 2004.7.17
- 2) 平松聖史, 辰巳佐和子, 高須 尚, 新飯田俊平, 伊東昌子, 仁村雄次, 池田

恭治: γ GTP を過剰発現するマウスにおける骨粗鬆症、第 22 回日本骨代謝学会 (大阪), 2004.8.7

3) Niida S, Ikeda K, Shibuya M: Bone morphology of the VEGFR-1 signal-deficient *op/op* mice. The 16th International Congress of IFAA. (Kyoto, Japan), 25/Aug/2004

4) Niida S, Ikeda K, Shibuya M: Bone morphology of the super *op/op* mice, M-CSF and VEGFR-1 signal deficient mice. The 26th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (Seattle, Washington, USA), 1/Oct/2004

5) Hiramatsu K, Tatsumi S, Nimura Y, Takasu H, Niida S, Ito M, Ikeda K: GGT

(gamma-glutamyltranspeptidase) as a pathogenic factor of bone loss. The 26th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. (Seattle, Washington, USA.), 4/Oct/2004

6) 池田恭治: 骨粗鬆症の病因を分子レベルから探る(特別公演). 第 6 回日本骨粗鬆症学会 (大宮), 2004.11.20

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
歯周病の判定法

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

2. 分担研究報告書

γ -GTP の骨吸収作用機序に関する研究

主任研究者 新飯田俊平(国立長寿医療センター研究所・室長)

研究要旨:最近、我々は新規の骨吸収因子としてガンマーグルタミルトランスペプチダーゼ(γ -GTP) を同定した。今回、骨髄培養系を用いた実験から γ -GTP は骨髄間質細胞に作用しインターロイキン(IL)-6 を、血球系細胞に作用して IL-1 β 、macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1)の発現を上昇させ、骨髄間質細胞からの破骨細胞分化因子(RANKL)の産生を亢進させていることが示唆された。また、関節炎モデルマウスの滑膜組織内で γ -GTP 発現が上昇していた。炎症滑膜細胞の培養系では破骨細胞が自然誘導されるが、抗 γ -GTP 抗体はこの破骨細胞形成を有意に抑制した。これらことから γ -GTP を標的とした骨破壊抑制剤の可能性が示唆された。

キーワード:骨吸収, 破骨細胞, γ -GTP, 抗 γ -GTP 抗体, 関節炎モデルマウス

A. 研究目的

我々は、病的破骨細胞誘導因子の探索から新規の骨吸収因子として γ -GTP を同定したことを報告した。この酵素は肝・胆道系疾患の検査マーカーとして用いられているが、生体内の作用はグルタチオン代謝に関与している重要な酵素である。この酵素蛋白を骨髄培養系に添加すると破骨細胞形成が有意に上昇するが、このとき破骨細胞分化因子(RANKL)の発現亢進が認められる。興味深いことに、 γ -GTP の酵素活性そのものは破骨細胞誘導には関与しておらず、その作用メカニズムは不明のままである。

一方、病的骨破壊の見られる関節炎

や歯周病のモデル動物について、 γ -GTP の発現を調べたところ、正常な状態では γ -GTP は検出されないが、骨破壊の進む炎症部位では強い発現が認められた。

これらことから、未だ不明である γ -GTP の破骨細胞誘導の作用メカニズムをはじめ、炎症による骨破壊と γ -GTP との関連性、及び γ -GTP が病的骨吸収抑制効果の標的となりうるかどうか、それぞれ検討を行った。

B. 研究方法

1) マウス DNA チップ解析

破骨細胞形成支持能を有するマウス間質系細胞株 ST2 に γ -GTP (AC

Biotechnologies Co. Ltd.)を作用させ、12時間後に細胞を回収し、total RANKLを調整した。対照には γ -GTPの代わりにPBSを添加したST2細胞とし、同様にtotal RANKLを調整した。これらのサンプルからターゲットDNAを調整し、マウスDNAチップ解析を行った。

2) 骨芽細胞及び血球系細胞における骨吸収因子の発現

マウス頭蓋由来骨芽細胞、骨髄血球系細胞及び両者の共存培養系に γ -GTPを作用させ、DNAチップ解析結果から得られたインターロイキン(IL)-1 β 、IL-6、MIP-1、ならびにRANKL、OPGなどの骨吸収関連遺伝子の発現変化をreal time-PCR法を用いて解析した。また、共存培養系の培養上清をサンプルとしてELISA解析を行い、タンパク量を定量した。

3) 各種骨吸収因子の抗体を用いた破骨細胞誘導抑制効果の検討

IL-1 β 、IL-6、MIP-1に対する抗体及び抗 γ -GTP抗体を用い、 γ -GTPを添加した骨髄培養系における破骨細胞形成に及ぼす影響について調べた。

4) コラーゲン誘導性関節炎(CIA)マウスにおける γ -GTPの発現

DMA/1Jマウスに対し、コンプリート Freund's アジュバント(Difco)に溶かしたウシII型コラーゲン(Cosmo Bio)を投与し、感作させることで関節炎を誘導することができる。このCIAマウスを用い、関節炎部位から滑膜組織を採取し試料

とした。抽出した試料から通法に従いtotal RNAを採取し、RT-PCR法により γ -GTPの発現を検索した。

5) CIAマウスの免疫組織学的観察

CIAマウスの炎症関節における γ -GTP発現を組織レベルで確認する目的で、抗 γ -GTP抗体による免疫組織学的観察を行なった。CIAマウスの関節炎の段階を6つに区切り、それぞれの時期における γ -GTPの局在と骨破壊の状況を相対的に観察した。

6) CIAマウス滑膜細胞の培養

炎症関節滑膜細胞の培養系では破骨細胞の自然誘導活性があることが知られている。そこで、この培養系に対して抗 γ -GTP抗体を添加し、破骨細胞の誘導活性が抑制されるかどうか検討した。

C. 研究結果

1) 骨髄におけるRANKL発現の主要なソースは骨髄間質系細胞と考えられている。我々はすでに、破骨細胞形成支持能のある間質細胞株ST2に γ -GTPを作用させると24時間後にRANKLの発現が上昇することを示している。今回、ST2細胞を γ -GTPで12時間刺激した後のDNAチップ解析を行ったが、未刺激のST2細胞に比べ発現が5倍を超える遺伝子は10種類であった。それらの中には、RANKL発現を誘導する骨吸収因子、MIP-1、IL-1 α 、IL-6、IL-1 β が含まれていた。

2) 上記DNAチップ解析の結果をもとに、