

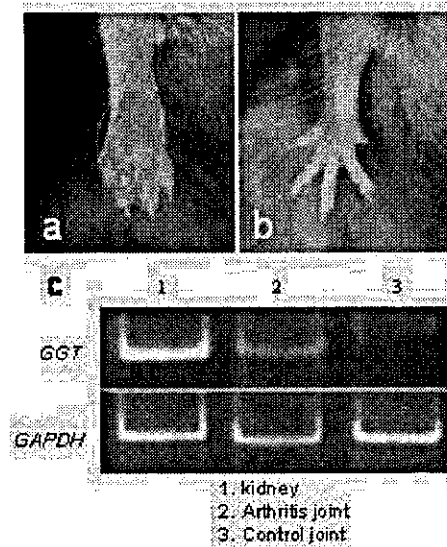
骨芽細胞と骨髄血球細胞の共存培養系を γ -GTPで24時間刺激した後、MIP-1、IL-1 α 、IL-6、IL-1 β の各 mRNA レベルの発現変化調べた結果、未刺激のサンプルと比較し、IL-1 α を除いて、有意に上昇していた。

次に、骨芽細胞と骨髄血球系細胞を分けて培養し、 γ -GTPで刺激後、同様の検討を行った。その結果、骨芽細胞ではIL-6 mRNAが、血球細胞ではIL-1 β とMIP-1のmRNAが顕著に上昇していた。

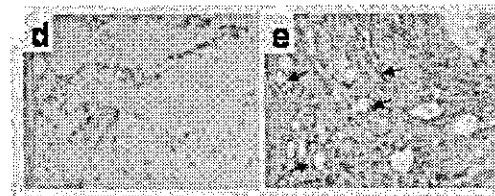
3) 次に、 γ -GTPの刺激後の破骨細胞形成が、抗 γ -GTP抗体及び各種サイトカインの抗体によって抑制されるかどうか検討を行った。その結果、抗 γ -GTP抗体と、抗IL-1抗体、抗IL-6抗体及び抗MIP-1抗体の3種混合抗体で有意に破骨細胞形成を抑制した。しかし、各抗体単独もしくは2種混合では十分な抑制効果は認められなかった。

4) γ -GTPは癌や炎症組織で発現することが知られている。関節炎など骨周囲の炎症で γ -GTP発現があれば、骨破壊に影響を与える可能性がある。そこで、CIAマウスの炎症関節からRNAを回収し、RT-PCR法で γ -GTP mRNAの発現を調べた。その結果、CIA関節における γ -GTP mRNA発現の上昇が確認された(Fig. a-c)。

5) 次に、炎症関節における γ -GTPの局在を明らかにするために、CIAマウス関節の免疫組織化学的観察を行った。炎症で肥厚した関節滑膜内のマクロファ-

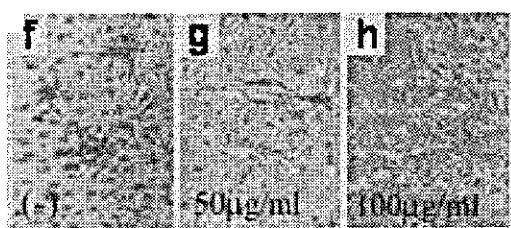


ジやプラズマ細胞、血管内皮細胞で強い免疫染色陽性反応が示された。また、滑膜線維芽細胞でも弱い反応が示された。正常組織では反応はほとんど認められなかった(Fig. e, 矢印はマクロファージと毛細血管, dは正常マウス)。



6) 関節滑膜細胞は線維芽細胞と組織マクロファージから構成されている。炎症滑膜細胞を培養すると、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(Fig. f-h)。



D. 考察

γ -GTP が破骨細胞形成を誘導することが示されていたが、その作用機構は不明であった。今回の骨髄細胞培養系を用いた研究は、 γ -GTP は IL-1 や IL-6 の産生を促すことを明らかにした。したがって、これらのサイトカインがメディエーターとなって骨芽細胞系の細胞からの RANKL 発現を誘導し、破骨細胞を分化させるものと考えられる。

病的骨破壊は炎症関節や歯周病で惹起される。高齢者にとっては、このような病的骨破壊は運動障害や咀嚼障害を引き起こし、直接 QOL 低下に結びつく。我々は、関節炎モデルマウスの炎症滑膜において γ -GTP 発現を確認した。また、関節の免疫組織化学はマクロファージ及びプラズマ細胞からの γ -GTP 発現を明らかにした。組織切片では、炎症による滑膜肥厚がみられるが、その内部に走行する毛細血管の内皮細胞もまた、 γ -GTP 陽性を示した。滑膜細胞(線維芽細胞)自体にも陽性反応が見られたが、微弱なものであった。隣接する組織切片を TRAP 染色すると骨表面のみならず、滑膜組織内にも TRAP 陽性細胞が多数みられ、 γ -GTP の発現と link するような所見が得られた。これらのことから、炎症関節での γ -GTP 発現は関節破壊に積極的に作用している可能性が示唆される。

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ことが知られている。今回滑膜組織における γ -GTP 発現が認められたことから、この培養系に抗 γ -GTP 抗体を添加した。その結果、破骨細胞形成は有意に減少した。このことから、抗 γ -GTP 抗体を含む γ -GTP アンタゴニストの製造は炎症性骨破壊の抑制剤として利用できる可能性を示唆している。

E. 結論

- 1) γ -GTP は骨髄細胞に作用し、IL-1、IL-6、MIP-1 の発現を介して 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) 関節炎では γ -GTP の発現上昇があり、関節破壊との関連性が示唆された。
- 3) 抗 γ -GTP 抗体は炎症滑膜細胞の培養系における破骨細胞形成を抑制した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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.

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.

Niida S. Osteoclast forming activity of the vascular endothelial growth factor. *J. Oral Biosci.*48(2), (in press), 2005.

3. 学会発表

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

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

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

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

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

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.

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), 2004.10.14.

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(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), 2004.10.14.

H. 知的財産権の出願・登録状況	なし
1. 特許取得	
歯周病の判定法	3. その他
	なし
2. 実用新案登録	

病的な顎骨吸収と γ -GTP の関係についての研究

分担研究者 高田 隆（広島大学医歯薬学総合研究科・教授）

研究要旨： γ -GTP はその酵素活性に依存せずに骨髄間質細胞における receptor activator of nuclear factor- κ B(RANKL)の発現誘導し、破骨細胞形成を促進する。また、 γ -GTP は炎症組織において発現することがあり、歯周炎局所で γ -GTP 発現上昇があれば歯槽骨破壊のリスクファクターとなる可能性がある。本研究では、ラット歯肉溝から γ -GTP を直接投与した際の辺縁歯周組織に惹起される組織変化ならびに抗 γ -GTP抗体前投与による γ -GTP作用の抑制効果について検討した。 γ -GTPは投与開始後3時間と3日後にピークを有する2相性の破骨細胞増加を誘導した。なお、2相目の破骨細胞誘導には宿主細胞から産生されるTNF- α やIL-1 β 等の骨吸収活性をもつサイトカイン産生が関与していた。また、抗 γ -GTP抗体の前投与は γ -GTPによる破骨細胞性骨吸収を有意に抑制することから、 γ -GTPは歯周炎の際の歯槽骨破壊のリスクファクターの1つと考えられ、 γ -GTPをターゲットとした歯槽骨破壊制御の可能性が示唆された。

キーワード：歯周病、 γ -GTP、歯槽骨吸収、破骨細胞

A. 研究目的

新規の骨吸収刺激因子として同定された γ -GTPはグルタチオン代謝に関わる酵素として知られるが、その酵素活性に依存せずに骨髄間質細胞における receptor activator of nuclear factor- κ B (RANKL)の発現を誘導し、破骨細胞形成を促進する。また、 γ -GTPは炎症組織において発現することがあり、歯周炎局所で γ -GTP発現上昇があれば歯槽骨破壊のリスクファクターとなる可能性がある。そこで、本研究では、 γ -GTPと歯周組織破壊の関係を明らかにする目的で、実験1として、1)ラット歯肉溝から γ -GTPを

直接投与した際の辺縁歯周組織に惹起される組織変化について、破骨細胞数を中心に経時的に調べるとともに、2)抗 γ -GTP抗体前投与が γ -GTPの惹起する組織変化に及ぼす影響についても併せて検討した。さらに、我々は、これまで5 mg/ml濃度の*E.coli*-LPSを歯肉溝から投与したラット歯周炎モデルを作成し、辺縁歯周組織に惹起される組織学的変化、サイトカイン発現誘導、ケモカイン発現と好中球遊走メカニズム、COX-2発現と破骨細胞誘導などについて明らかにしてきた。そこで、実験2としてこのLPS誘導ラット歯周炎モデルを用い、抗

γ -GTP 抗体前投与が LPS の誘導する歯周組織破壊に及ぼす効果についても検討した。

B. 研究方法

実験1: γ -GTP 局所投与が辺縁歯周組織に及ぼす影響

I) 病理組織学的変化の検討

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 の濃度で蒸留水に溶かしたヒト γ -GTP 溶液 (AC Biotechnologies Co. Ltd.) をマイクロピペットにて 2 ml 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 (Fig.1)。

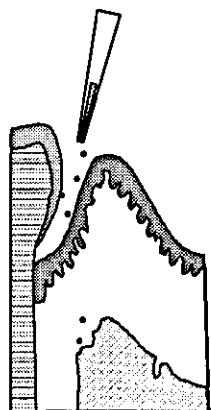


Fig.1: 投与方法

実験スケジュール (Fig. 2) に従い、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。

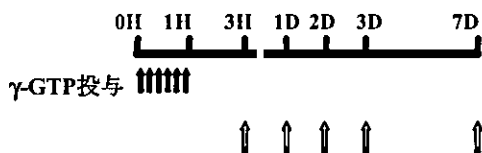


Fig. 2: 実験スケジュール

PLP 固定液で 4°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、Fig.3 に示すように歯槽頂から 1 mm 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。

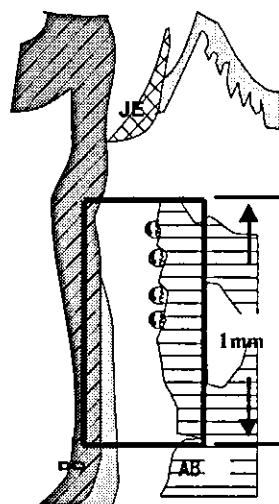


Fig.3: 破骨細胞

計測領域

II) γ -GTP 局所投与後の歯肉組織における cytokines-mRNA 発現の検討

未処置、 γ -GTP 投与 3 時間、1, 2 日目の歯肉組織から total RNA を抽出し、RT-PCR にて cytokines-mRNA 発現を検討した (Fig.4)。

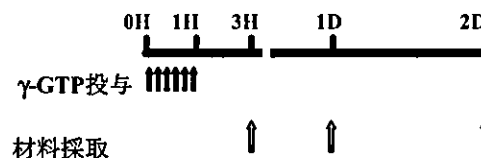


Fig. 4: 実験スケジュール

実験2: γ -GTP 局所投与の誘導する歯

周組織変化に及ぼす抗 γ -GTP 抗体前投与の影響

実験1と同様の方法で歯肉溝から 500 μ g/ml 濃度の 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 (Fig. 5).

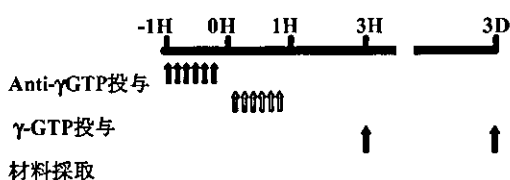


Fig. 5: 実験スケジュール

実験3: LPS 誘導ラット歯周組織破壊に及ぼす抗 γ -GTP 抗体前投与の影響

5mg/ml 濃度の *E. Coli*-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, Anti- γ -GTP 群には LPS 投与に先行して, 実験2と同様の方法で 500 μ g/ml 濃度の γ -GTP 抗体を前投与した (Fig. 6).

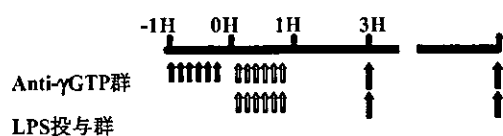


Fig. 6: 実験スケジュール

C. 研究結果

実験 1 : γ -GTP 局所投与が辺縁歯周組織に及ぼす影響

I) 病理組織学的所見

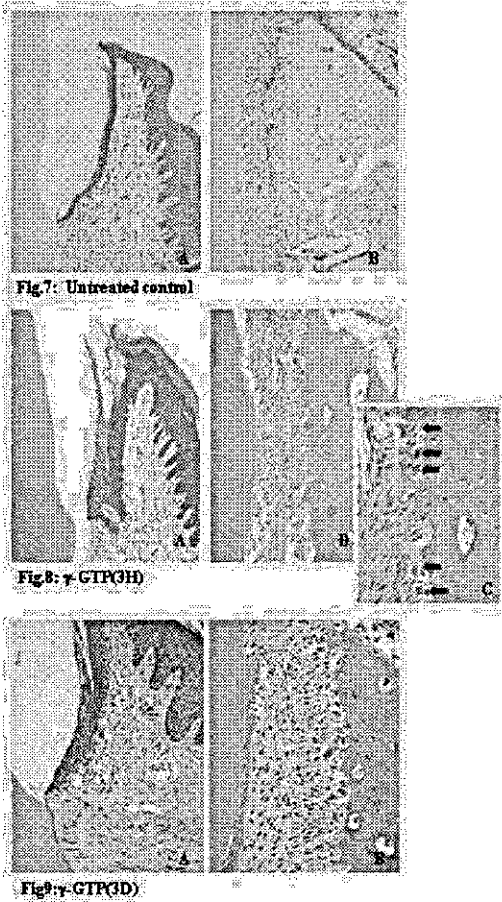
γ -GTP 非投与例: 接合上皮内にごく少数の好中球が遊走し (Fig. 7A), 歯根膜側歯槽骨縁にはわずかに破骨細胞が観察される程度であった (Fig. 7B).

γ -GTP 投与例: γ -GTP 投与 3 時間後では接合上皮領域での好中球浸潤や血管拡張はあまり目立たなかったが (Fig. 8A), 深部歯根膜組織では歯根膜側歯槽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 (Fig. 8B,C).

投与 1 日後の歯根膜側骨縁部に出現する破骨細胞は少数で, 骨縁から離れて位置する inactive なものが多かった. 投与後 2, 3 日後では接合上皮好中球浸潤や血管拡張の目立つものもみられた (Fig. 9A). 投与開始 3 日後の歯根膜側歯槽骨縁には再び active に骨吸収を営む多数の破骨細胞が観察された (Fig. 9B). しかし, 投与 7 日目には, これらの変化は未処置コントロール群とほぼ同様のレベルまで収束していた.

Fig. 10 は, γ -GTP 投与後の破骨細胞数の経時的变化を示している. γ -GTP 投与開始 3 時間後, 歯槽骨縁に沿ってみられる破骨細胞数は 6.5 ± 1.0 cells/mm で, 未処置コントロール群の 1.8 ± 0.53 cells/mm に比べ有意な増加を示した ($p < 0.01$). 投与 1 日後には, 破骨細胞数は 1.83 ± 0.65 cells/mm と, 一旦減少した. その後, 破骨細胞数は 2 日目で 5.1 ± 0.94 cells/mm, 3 日目で 6.8 ± 1.10 cells/mm と再び有意な増加 ($p < 0.01$) を示した. 投与 7 日後, 破骨細胞は未処置コントロールと同様の

値にまで減少した。



II) γ-GTP 局所投与後の歯肉組織における cytokines-mRNA 発現

Fig. 11 に歯肉溝から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-1β, IL-6 mRNA 発現を RT-PCR で調べた結果を示す。

未処置コントロール群では TNF-α, IL-1β mRNA の恒常的な発現が観察されたγ-GTP を投与により, TNF-α mRNA 発現は3時間後をピークとする一過性の発現を示した. IL-1β mRNA 発現は2日, 3日後と経時的に増加した. 一方, IL-6 は実験期間を通して発現が認められなかった.

実験2: γ-GTP 局所投与の誘導する歯周組織変化に及ぼす抗γ-GTP 抗体前投与の影響

抗γ-GTP 抗体前投与はγ-GTP 局所投与による破骨細胞数増加を抑制した. Fig.12 はγ-GTP 投与3日後の歯周組織の代表的病理組織学的変化を示す.

γ-GTP 投与でみられた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(Fig. 10A). また, 抗γ-GTP 抗体前投与群では歯根膜側歯槽骨縁に沿って出現する破骨細胞は少なく, 少数見られる破骨細胞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(Fig.10B).

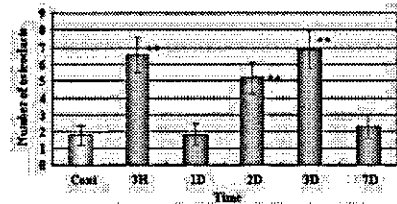


Fig. 10: Effect of γ-GTP on number of osteoclasts

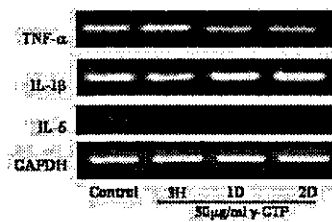


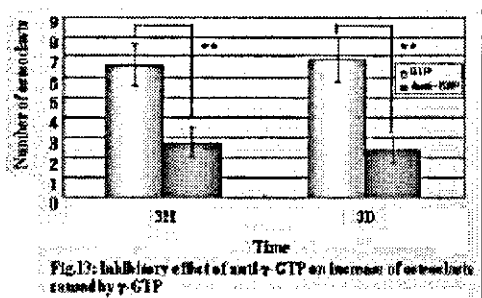
Fig. 11: Expression of cytokines-mRNA in gingival tissue after topical application of γ-GTP



Fig. 12: Anti-γ-GTP-γ-GTP(3D)

Fig.13 にγ-GTP 投与による破骨細胞増加に及ぼす抗γ-GTP抗体前投与の影響を示す. 抗γ-GTP 抗体前投与は3時間でコントロール群の破骨細胞数

(6.56 ± 1.04)を 2.67 ± 1.10 に、3日後の破骨細胞数(6.87 ± 0.68)を 2.36 ± 0.64 にいずれも有意に抑制した($p < 0.01$).



実験3: LPS 誘導ラット歯周組織破壊に及ぼす抗γ-GTP 抗体前投与の影響

LPS 投与によりラット辺縁歯周組織では、投与直後より接合上皮直下の歯肉結合組織において好中球遊走、血管拡張、浮腫が生じ、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相性の増加を示した。今回、実験2と同様の方法で抗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(data not shown).

D. 考察

1) γ-GTP 投与により歯槽骨骨縁に沿って出現する破骨細胞が増加した。歯周炎と同じように骨に接する部位の炎症である慢性関節リウマチの炎症巣において、免疫組織化学的に形質細胞、マクロファージといった浸潤細胞にγ-GTP 陽性反応が示されている。よって歯周炎局所でも、歯周組織構成細胞からのγ-GTP 産生亢進があれば、破骨細胞性骨吸収を直接誘導する原因

となりうる。

2) γ-GTP の誘導す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。γ-GTP を直接骨髄培養系に添加することによりγ-GTP の酵素活性に依存しないRANKL 発現上昇が認められていることから、骨芽細胞上にγ-GTP 自体の受容体が存在する可能性も指摘されている。投与3時間後という急激な破骨細胞増加は、まだ同定されていないγ-GTP 受容体を介した骨芽細胞への直接作用の可能性も推察される。

3) γ-GTP 投与後の歯肉組織では、2～3日後の破骨細胞誘導に先駆けて、投与3時間でTNF-α mRNA 発現が、1から2日後でIL-1β mRNA 発現が増強したことからγ-GTP 投与による2相目のピークは歯周組織構成細胞からTNF-αやIL-1β等の骨吸収活性をもつサイトカインの産生が誘導された結果生じる、間接的的刺激作用である可能性が示唆された。

4) TNF-αやIL-1βは種々の起炎作用を有している。投与開始後2, 3日目の接合上皮や接合上皮直下の結合組織内における好中球数の増加や血管拡張には、歯肉部分で宿主細胞から産生されるこれらのサイトカインが関与すると推察される。

5) 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

ことから、抗 γ -GTP 抗体や γ -GTP 合成阻害剤など γ -GTP をターゲットとした新しい歯槽骨破壊制御の可能性が示唆された。

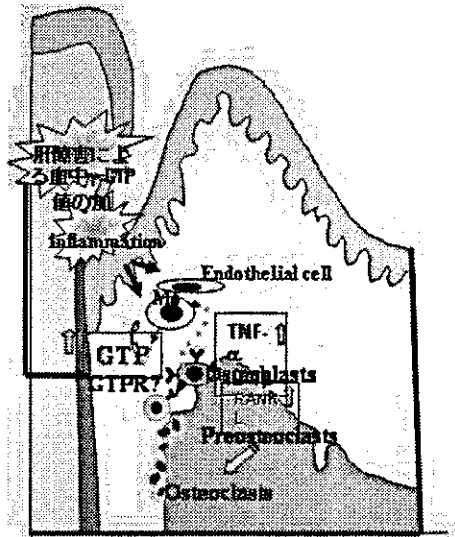


Fig.14. まとめ

6) 抗 γ -GTP 抗体の前投与は 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。今回用いたラット歯周炎モデルにおいて 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、人の歯周炎でみ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、関節リウマチの病変において γ -GTP 産生が形質細胞やマクロファージに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、歯周組織破壊に関わっている可能性もある。今後、B 細胞性病変との関係についても検討する必要がある。

なお、Fig.14 は本研究結果と現在までの知見をまとめたものである。

E. 結論

歯肉溝から γ -GTP を局所投与することにより歯槽骨の破骨細胞性骨吸収が誘導されることが明らかとなった。 γ -GTP は歯周炎の際の歯槽骨破壊のリスクファクターの1つと考えられ、 γ -GTP をターゲットとした歯槽骨破壊制御の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

Miyauchi M, Kitagawa S, Hiraoka M, Saito A, Sato S, Kudo Y, Ogawa I, Takata T :

Immunolocalization of CXC-chemokine and recruitment of polymorphonuclear leukocytes in the rat molar periodontal tissue after topical application of lipopolysaccharide
Histochemistry and Cell Biology 121: 291-297, 2004.

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.

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.

2. 学会発表

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: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:第 47 回春季歯周病学会学術大会(鹿児島), 2004.

口腔扁平上皮癌の浸潤・増殖に及ぼす Vascular endothelial growth factor (VEGF) の影響: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:第 15 回日本口腔病理学会総会・学術大会(東京), 2004

hTERT 遺伝子導入によるヒトセメント芽細胞標準株の樹立: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:第 37 回広島大学歯学会総会(広島), 2004.

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: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:第 46 回歯科基礎医学会学術大会(広島), 2004.

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:宮内睦美, 石塚保行, 岡 広子, 齋藤彰久, γ -GTP, 北川雅恵, 新飯田俊平, 高田 隆:第 47 回秋季歯周病学会学術大会(仙台), 2004.

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). 歯肉溝による歯周病診断への可能性: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:第 47 回秋季歯周病学会学術大会(仙台), 2004.

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:米川敦子, 北川雅恵, 岡 広子, 宮内睦美, 高田 隆:第 20 回日本歯科医学会総会(横浜), 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

分担研究者 林 眞一（鳥取大学・医学部・教授）

研究要旨：正常時には直接破骨細胞分化誘導機能を持たない細菌成分が、SHP-1チロシン脱リン酸化酵素活性が低下することで分化誘導因子となることを明らかにした。また、破骨細胞系譜のみを分化誘導する実験系を、血液細胞系譜全欠損 ES 細胞を用いて確立した。

キーワード：破骨細胞, Toll-like 受容体 (TLR), リポポリサッカライド (LPS), 胚性幹 (ES), Tal-1/SCL 転写因子

A. 研究目的

1) 病的破骨細胞誘導因子の解析:破骨細胞分化には M-CSF と RANKL が必須とされている。M-CSF は Niida らにより VEGF によって代替されることが報告されているが、RANKL の方は未だに代替因子は知られていない。本研究では、病的な状態で RANKL 以外にも破骨細胞分化を誘導する分子があるのか検討することを目的とした。

2) ES 細胞からの破骨細胞分化誘導システムを検討してきたが、破骨細胞だけを誘導する目的で全血液細胞欠損 ES 細胞からの破骨細胞誘導を試みた。

B. 研究方法

1) 血液細胞系譜特異的に発現している 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*) マウスは骨吸収が亢進していることが知られている。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。

2) 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。

C. 研究結果

1) M-CSF 存在下で TLR4 のリガンド、リポポリサッカライド (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。そこで、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、Kit 陽性細胞画分に存在していた。

2) *Tal1*(-/-)ES細胞株に PU.1 を発現させたところ、効率は *Tal1*(+)ES細胞ほどには回復しないが、破骨細胞を誘導することに成功した。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。

D. 考察

1) LPS以外にも TLR のリガンドプロテオグリカン (TLR2)、CpGオリゴDNA (TLR9)でも実験を行ったが、破骨細胞誘導は観察されなかったため、この反応は TLR4 に特異的な反応のように思われる。正常マウス骨髄細胞から 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ことを推測させる。破骨細胞前駆細胞に病的に SHP-1 活性が低下するという状態が生じることで、従来、破骨細胞分化因子ではない LPS 等の細菌成分が破骨細胞分化を制御する可能性を明らかにした。

2) 血液細胞系譜のマスター遺伝子と考えられていた *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

することにあることが示された。PU.1 の KO マウスの結果からは B 細胞、顆粒球も PU.1 に依存性であるが、PU.1 だけを強制発現しても回復しないことが示された。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いる。

E. 結論

1) 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。

2) 血液細胞系譜のマスター遺伝子と考えられていた *Tal1* 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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tsuneto, M., Tominaga, A., Yamazaki, H., Yoshino, M., Orkin, S.H., and Hayashi, S.I.: Enforced expression of PU.1 rescues osteoclastogenesis from embryonic stem cells lacking *Tal-1*. *Stem Cells*, 23: 134-143 (2005).

Hayashi, S.I., Tsuneto, M., Yamada, T., Nose, M., Yoshino, M., Shultz, L.D., and Yamazaki, H.: Lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis in Src homology 2-domain phosphatase-1-deficient viable motheaten mice. *Endocrinology*, 145: 2721-2729 (2004).

Yamane, T., Okuyama, H., Tsuneto, M., Hemmi, H., Yamazaki, H., and Hayashi, S.I.: 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).

Yoshino, M., Yamazaki, H., and Hayashi, S.I.: Migration of dendritic cells determines divergent immune responses. *Recent Research Development in Biophysics and Biochemistry (Research Signpost)*, 4: 29-48 (2004).

Yamazaki, H., and Hayashi, S.I.: Contribution of neural crest cells in the tooth development and the possibility of tooth regeneration. *J. Oral. Sci.* 46 (6): (2004) (In press).

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

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

2. 学会発表

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 回日本発生生物学会、2004 年 6 月 6 日 (名古屋)

経遠智一、山崎英俊、吉野三也、林 眞一: PU.1 強制発現による *Tall* 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、2004 年 4 月 26 日-27 日 (東京)

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 2004, July 1-2, Osaka, Japan.

経遠智一、山崎英俊、吉野三也、林 眞一: PU.1 強制発現による *Tall* 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、2004 年 8 月 6 日 (大阪)

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、2004 年 8 月 6 日 (大阪)

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、2004 年 12 月 2 日 (札幌)

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、2004 年 12 月 1 日 (札幌)

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Ta11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、2004年12月1日(札幌)

吉武江奈、鍋倉 幸、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、2004年12月2日(札幌)

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、2004年12月1日(札幌)

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、2004年12月1日(札幌)

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、2004年12月2日(札幌)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

骨吸収亢進と尿中 γ -GTP 排泄量の関連に関する研究

分担研究者 池田恭治（国立長寿医療センター研究所・研究部長）

研究要旨：骨吸収が亢進した動物モデルを用いて、尿中 γ -GTP の排泄動態について検討した。尿中への排泄状態についても、尿を分画採取して調べた。結果は、尿中 γ -GTP 排泄量が生体内の骨吸収活性を反映することを示唆している。

キーワード：骨粗鬆症，骨吸収，破骨細胞， γ -GTP

A. 研究目的

退行期骨粗鬆症、なかでもエストロゲンの欠乏を主因とする閉経後骨粗鬆症の発症には、骨吸収の亢進、骨の turnover rate の加速、骨量の減少、微細構造の悪化、骨質の低下と骨脆弱性が大きく寄与する。骨吸収は、血球系の細胞から分化して形成される多核の破骨細胞によって営まれる。成熟し活性化した破骨細胞は、骨表面に接着し、酸を分泌することでミネラルの溶解を、さらにタンパク質分解酵素を分泌することにより I 型コラーゲンを主体とする骨基質タンパク質を分解することにより、骨吸収を完成させる。

破骨細胞により分解される I 型コラーゲンの分解産物は、血液および尿への排泄量が、骨吸収を反映する生化学マーカーとして臨床で広く用いられている。また、現在治療の第一選択薬として世界

中で用いられ、我が国にも、数年前から臨床導入されたアレンドロネートやリセドロネートに代表されるビスフォスフォネート薬は、成熟した破骨細胞に作用しアポトーシスを誘導することなどにより、骨吸収を強力に抑制することで、骨密度の喪失を防止し骨折の発生を約 50%減少させることが臨床的に認められている。

Niida らは、新規の骨吸収促進因子を探索する過程で γ -GTP を同定した。 γ -GTP は、本来腎臓でもっとも高発現する細胞外酵素であるが、腎臓から精製した γ -GTP、あるいは遺伝子組み換え型ヒト γ -GTP タンパク質は、破骨細胞の形成を促進する活性を有する。また、我々は最近 γ -GTP を高発現するトランスジェニックマウスを開発し、骨吸収の亢進から骨粗鬆症を呈することを確認した。このマウスでは、血清 γ -GTP が著明高値となるが、尿中への排泄量も増加している。

本研究では、骨粗鬆症の病態に占める γ -GTP の役割について、尿中 γ -GTP の排泄量と骨吸収の程度の関連について検討を行った。

B. 研究方法

骨吸収の抑制薬であるアレンドロネートは、帝人ファーマから購入した。

5週齢のOPGノックアウトマウスは、日本クレアから購入した。カルシウム含量1.2%、リン含量1.08%、ビタミンD含量240 IU/100 g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を週5回2週間皮下投与した。

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。

代謝ケージを用いて24時間尿および血液を採取し、 γ -GTP、クレアチン、デオキシピリジノリン濃度を測定した。後者は、クレアチニン濃度で補正した値を求めて評価した。

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。

動物実験は、国立長寿医療センター

の動物倫理委員会で認められた後、ガイドラインに則って行った。

健康成人ボランティアから尿を採取し、同じく γ -GTP活性を、ダイヤオート γ -GTP試薬を用いて、自動分析装置（オリンパス、モデルAU5232）で測定した。尿を17,000×gで低速遠心した後、上清と沈降物に分画。前者はさらに200,000×gで超遠心し、上清と沈降物に分取後、それぞれの分画の γ -GTP活性を測定した。ヒト尿検体を用いた解析も、国立長寿医療センターの倫理委員会で認められ、文書による同意を得ている。

C. 研究結果

OPGは、破骨細胞形成の負の調節因子であり、これを遺伝的に欠損するマウスは、骨吸収の亢進によって著明な骨粗鬆症を呈する。OPGノックアウトマウスは、対照として用いたヘテロマウスと比較して、血清 γ -GTP活性には差がなかったが、尿中 γ -GTP活性が有意に上昇し、骨吸収の生化学マーカーとして確立されているデオキシピリジノリンと同じ動向を示した。OPGノックアウトマウスに、骨吸収抑制薬である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、クレアチニンで補正した尿中 γ -GTP排泄量も、コントロールレベルにまで低下した。

全身で γ -GTPを発現するトランスジェニックマウスでは、血清 γ -GTP活性が200 IU/L以上と著明高値を示したが、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。

ヒト尿中の γ -GTP 活性は、低速遠心の沈降物（細胞成分や残渣が主体）や超遠心後の上清（液性成分）には全体の15%以下であり、70-80%と大部分は、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

γ -GTP を産生するトランスジェニックマウスの解析から、 γ -GTP は *in vivo* で骨吸収を促進することが確認された。このマウスにおいては、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することを示唆する。このことは、骨吸収の亢進状態をアレンドロネート投与により改善すると、尿中 γ -GTP 排泄は、確立された骨吸収マーカーであるデオキシピリジノリンとともに、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、近位尿細管でもっとも多く発現する γ -GTP も *exosome* に会合していることが明らかになっている。現時点では、尿中の γ -GTP 活性が糸球体を

濾過してくる可能性も否定できないが、近位尿細管の管腔側の膜に存在する γ -GTP が、骨吸収の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。今後、尿中 γ -GTP の分子形態、骨由来の近位尿細管刺激物質と排泄促進のメカニズムの解明が必要である。

E. 結論

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

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

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

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

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

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). 23/Aug/2004

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

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.

池田恭治: 骨粗鬆症の病因を分子レベルから探る(特別講演), 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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

