

200500363A

厚労省科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

骨及び関節疾患の診断・治療薬の開発に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 新飯田俊平

平成18(2006)年3月

厚労省科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

骨及び関節疾患の診断・治療薬の開発に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

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)
分担研究者	池田 恭治	(国立長寿医療センター研究所・部長)
	林 眞一	(鳥取大学・教授)
	高田 隆	(広島大学大学院・教授)
	池田 義孝	(佐賀大学・教授)

平成17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. 抗 γ -GTP抗体の関節破壊抑制効果に関する研究	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. γ -グルタミルトランスペプチダーゼにおける破骨細胞誘導活性の責任領域の同定に関する研究	22
佐賀大学医学部 教授 池田 義孝	
3. 破骨細胞の分化誘導因子に関する研究	25
鳥取大学医学部 教授 林 眞一	
4. 歯周炎に伴う歯槽骨破壊と γ -GTPの関係についての研究	29
広島大学医歯薬学総合研究科 教授 高田 隆	
5. 骨吸収亢進と尿中 γ -GTP排泄量の関連に関する研究	36
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	41
4. 研究成果の刊行物・別刷	45

1. 総括研究報告書

(平成17年度)

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:破骨細胞誘導活性をもつ γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ(γ -GTP)を標的とした骨・関節疾患に対応する診断・治療薬の開発研究を行った。骨破壊をともなう関節炎や歯周炎では γ -GTPの発現上昇がある。 γ -GTPに対する生物学的製剤として抗 γ -GTP抗体を作製した。抗体を関節炎モデルマウスに投与した結果、破骨細胞の減少、骨破壊の緩和が認められた。 γ -GTPによる破骨細胞形成活性は γ -GTPを構成する2つのサブユニットのうちの大サブユニットに存在する可能性が示唆された。細菌の産生する γ -GTPにも破骨細胞誘導活性があることが確認され、歯周炎による歯槽骨破壊の原因となることが示された。以上のことから、 γ -GTPは病的な骨吸収因子と考えられ、その発現抑制は骨吸収抑制の標的となることが示された。一方、尿 γ -GTPの骨吸収マーカーとしての有効性について検討を行った。破骨細胞欠損マウスに人為的に破骨細胞を誘導し、骨吸収を再活性化させると、骨吸収マーカーである尿デオキシピリジノリン濃度の上昇に並行して γ -GTP値も上昇することが確かめられた。このことは、尿 γ -GTP値が骨吸収を反映していることを示しており、マーカーとしての有効性が示された。

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 眞一 鳥取大学医学部・教授
池田義孝 佐賀大学医学部・教授
高田 隆 広島大学大学院・教授
池田恭治 国立長寿医療センター
研究所・部長

A. 研究目的

高齢者における骨折や関節破壊は著しいQOLの低下を招く。最近、我々の同定した新規の骨吸収因子 γ -GTPは従来知られている酵素活性に依存することなく破骨細胞形成を刺激する(J Biol Chem, 2004)。昨年度までの研究から、 γ -GTPはヒト関節リウマチや歯周炎で発現が亢進していることが明らかとなり、これらの疾

患における骨吸収のリスクファクターである可能性が示された。すなわち、 γ -GTP を標的とした生物学的製剤は治療薬として奏効する可能性が考えられる。そこで我々は、 γ -GTP を標的とした新規の骨吸収抑制剤の開発を目的として、 γ -GTP に対する抗体治療薬の作製を試みた。この製剤の効果については、関節炎モデルマウスや歯周炎モデルラットを対象に抗体投与を行い、評価した。また、 γ -GTP の破骨細胞誘導機構はまだ不明な点が多く、破骨細胞の生物学的特性の解明とあわせて引き続き研究を行った。

γ -GTP を標的とした骨代謝関連診断薬開発についての検討を行った。昨年度までの行ったヒト尿検体を用いた解析において、 γ -GTP 値は既存の骨吸収マーカーであるデオキシピリジノリン (DPD)濃度と良好な相関を示すことが明らかになっている。また、骨粗鬆症患者では骨吸収抑制剤の服用で尿 γ -GTP 値が減少に転ずることなどが示されており、実用性が高いことを提唱しているが、そのメカニズムはまだ不明である。本研究では、尿中 γ -GTP の排泄量と骨吸収との関連性について検討を行った。

B. 研究方法

1) 抗 γ -GTP 抗体の作製と関節炎マウス

リコンビナント・ヒト γ -GTP(rh γ -GTP)を抗原として免疫した複数の Balb/c マウスから摘出した脾臓細胞を myeloma 細胞 (SP2/0)と融合させ、ハイブリドーマを作

製して抗体を獲得した(抗体名:AGT1~3)。

コラーゲン誘導性関節炎 (CIA) マウスは、雄 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、感作させることで作出した。

2 度目のコラーゲン投与時から週 2 回、抗 γ -GTP 抗体(AGT1、AGT3)の腹腔投与を 4 週間行った。投与開始から 28 日目に炎症関節部位の摘出を行い、病理標本を作製し、H&E 染色ならびに tartrate resistant acid phosphatase (TRAP)染色を施したのち評価した。抗体薬の効果の比較を行うための抗 TNF- α 抗体投与群とマウス正常 IgG (negative control) 投与群を設定した。

なお、本研究課題において施行された動物実験に関しては、各研究者の所属する機関の動物倫理委員会の承認のもと、それぞれのガイドラインに則って行なわれた。

2) γ -GTP の精製

ラット腎より γ -GTP をイオン交換クロマト、金属キレート、レクチンのアフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過等の各種クロマトグラフィーにより電気泳動上均一に精製した。また、ヒト γ -GTP 発現用の組み換えバキュロウイルスを作製し、昆虫細胞を用いて発現させ、既法に従い感染細胞よりヒト γ -GTP を精製した。 γ -GTP は大小2つのサブユニットで構成されているが、精製 γ -GTP をリチウムドデシル硫酸を用いて変性させ、TOSOH G3000SWXL あるいは G2000SWXL を使

用し変性状態のまま大小のサブユニットを分離した。一方、大サブユニット、小サブユニットをそれぞれ個別に発現させるための組み換えバキュロウイルスを作製し、リコンビナントタンパク質の発現を検討した。

3) 細胞培養

マウス大腿骨より骨髓細胞を回収し、 γ -GTP 存在下で培養した。破骨細胞の誘導活性については、破骨細胞のマーカー酵素である TRAP 染色を施行し、検討した。

未分化 ES 細胞株 D3 細胞を活性型ビタミン D3[1 α ,25(OH)2D3]とデキサメサゾン存在下でストロマ細胞株 OP9 とともに8日間培養した。細胞の回収後、成熟破骨細胞への分化を誘導する培養系に移して、最初の8日間で誘導された破骨細胞前駆細胞について検討した。その際、期間を限定してアスコルビン酸を添加し、破骨細胞前駆細胞の分化誘導に及ぼす効果を検討した。血液細胞系譜前駆細胞を含む Flk-1 陽性細胞の増減も指標とした。

骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞、間質系細胞株 ST2 ならびにセメント芽細胞 OCCM-30 細胞を培養し、24 時間後に rhy-GTP を添加した。添加 2 時間後、total RNA 抽出のため細胞を回収した。

4) ラットの歯槽骨吸収観察

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 バクテリア由来 γ -GTP 溶液を歯肉溝からマイクロピペットにて投与した(1回2 μ l、10分毎に1

時間)。投与後 3 時間、1、2、3および7日後、顎骨を摘出し、PLP 液で固定(4 $^{\circ}$ C、8 時間)後、10%EDTA 溶液(4 $^{\circ}$ C、5 日間)で脱灰した。その後、AMeX 法にてパラフィン切片とし、組織学的観察を行った。対照として、未処置ラット顎骨を用いた。

5) 骨吸収誘導と尿 γ -GTP

マクロファージ形成因子 M-CSF は破骨細胞形成の必須因子であるが、この因子の活性を先天的に喪失した *op/op* マウス(6 週齢)に対し、遺伝子組換え型ヒト M-CSF を腹腔投与し、破骨細胞性骨吸収を誘導した。

骨内部の微細骨梁構造は、マイクロ CT-40 を用いて解析した。TRAP 染色は、脛骨を脱灰後、定法にしたがって行った。

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、DPD 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、自動分析装置で測定した。DPD 濃度は、ELISA 法で測定した。

C. 研究結果

1) 関節炎マウスにおける抗 γ -GTP 抗体の骨破壊抑制効果

ヒト γ -GTP に対するモノクローナル抗体の作製を行い、2種類の抗体(AGT1、AGT3)に、 γ -GTP による破骨細胞誘導

抑制効果(培養系)がみられた。そこで、CIA マウスに AGT1 もしくは AGT3 の抗体を投与し、関節炎の病理学的検討を行った。

未処置群の炎症関節では関節に侵入する滑膜(パンヌス)像がみられ、関節の破壊とともに多数の TRAP 陽性破骨細胞が観察された。これに対し、AGT3 群では、パンヌス形成はほとんどなく、関節の形態が正常に保たれている個体が多かった。また、集積する炎症性細胞群に接する骨面について、未処置群では多数の大型の破骨細胞が観察されたが、AGT3 投与群の破骨細胞は小型で、扁平化しているものが多く、骨面の吸収窩形成も緩慢な傾向が示された。これらの所見は抗 γ -GTP 抗体の影響によるものと考えられた。

2) γ -GTP の破骨細胞誘導活性部位の特定について

ラット腎 γ -GTP および組換えヒト γ -GTP より上記の方法でほぼ均一な大サブユニットおよび小サブユニットを分離することが出来た。マウス骨髄細胞の培養系にそれぞれの単離サブユニットを加えたところ、大サブユニットの場合に有意な破骨細胞誘導活性が確認できた。

大サブユニットのどの領域が誘導活性を示すのかを同定するため、単離した大サブユニットをグリコシダーゼ消化した上で、プロテアーゼにより断片化し、得られたペプチドの誘導活性を検討することで特定しようと試みたが、誘導活性を示すペプチド断片を得ることが出来なかった。

3) 破骨細胞分化に関する研究

未分化 ES 細胞を用いた分化誘導培養系からアスコルビン酸を除くと、ほとんど破骨細胞は誘導できなかった。期間を限定してアスコルビン酸を添加したところ、分化誘導後の最初の4日間添加することで高率な破骨細胞分化誘導が観察された。機能解析のため各種還元剤との比較を行ったが、アスコルビン酸のもつ還元作用そのものが重要ではないことが明らかとなった。アスコルビン酸が存在すると培養4~5日目で出現してくる Flk-1 陽性細胞の比率が増加してくるが、破骨細胞前駆細胞は Flk-1 陽性細胞画分に濃縮された。

4) γ -GTP と歯槽骨吸収

昨年度の研究から、歯周炎で発現する γ -GTP が歯槽骨破壊に及ぼす影響が示唆されたことから、歯周組織構成細胞であるセメント芽細胞と骨芽細胞への γ -GTP の作用について検討した。培養セメント芽細胞および骨芽細胞に γ -GTP を添加すると、TNF- α や IL-1 β mRNA の発現亢進が見られたほか、RANKL mRNA の発現も亢進した。

歯周炎では細菌の産生する LPS が破骨細胞を誘導する。そこで、LPS と γ -GTP で同時に刺激すると、おのおの単独の時よりも RANKL や TNF- α の mRNA 発現が亢進した。

一方、細菌が γ -GTP を発現することが示されたので、遺伝子組換え型細菌 γ -GTP を調整してラット歯肉溝から投与したところ、激しい骨吸収のみならず、歯根の破壊像も観察された。

5) 骨吸収と尿 γ -GTP 値の連動性

破骨細胞欠損の *op/op* マウスの脛骨のマイクロ CT 画像は典型的な大理石骨病を呈し、組織切片では TRAP 陽性の破骨細胞はほとんど検出されなかった。*op/op* マウスに M-CSF を 3 日間連続投与 ($5\mu\text{g} \times 2$ 回/日) すると、破骨細胞骨性骨吸収が惹起し、骨吸収を示すマイクロ CT 画像所見と組織学所見が得られた。*op/op* マウスにおける破骨細胞の出現と並行して、骨吸収の生化学マーカーである DPD の尿中排泄量が著明に上昇し、これに伴って、クレアチニンで補正した γ -GTP 活性の尿中排泄量も著明に上昇することが示された。

D. 考察

1) 関節破壊抑制剤としての抗 γ -GTP 抗体の効果について

高齢者における関節の損傷は ADL および QOL の低下に直接影響を及ぼす要因になる。今回我々は、関節炎で発現上昇がみられる γ -GTP を標的とした抗 γ -GTP 抗体製剤の作製を行い、関節炎モデルマウスによる骨破壊抑制効果について検討を行った。その結果、抗体投与は炎症関節における滑膜増殖を抑制し、破骨細胞による骨吸収に対して効果が示された。その一方で、本抗体には炎症そのものを抑制する効果はなく、問題点も浮上した。この点に関しては、他の抗炎症剤との併用などでカバーできるかどうか、さらなる検討が必要と思われる。しかしながら、関節炎でもっとも懸念され

る関節破壊が抑制されたことは、創薬に向けた可能性を示唆するもので、意義深いものと考えられた。

2) γ -GTP の破骨細胞誘導活性部位について

破骨細胞誘導活性は主として大サブユニットにあることが示唆された。効果的な薬剤開発には、さらに詳細な破骨細胞誘導活性部位の特定をする必要がある。誘導活性のある酵素ペプチド断片を同定するよりも、合成ペプチドのシリーズを作製し、システムティックに検討する方法も有効だと思われる。また、アラニンスクヤニングのような変異タンパク質のシリーズによっても責任領域の同定する方法が考えられる。しかしながら、いずれの方法をとるにしても、もう少し領域を限定するための情報が必要と考えられる。

3) 破骨細胞分化に関する一考察

今回の実験系ではアスコルビン酸が存在しないと破骨細胞前駆細胞はほとんど誘導されなかったことから、アスコルビン酸の破骨細胞分化誘導への重要性が明らかになった。今回、分化誘導 4 ~ 5 日目において、Flk-1 陽性細胞画分の増加が観察された。Flk-1 は側板中胚葉細胞系譜の指標とされているが、一方、沿軸中胚葉の指標とされる PDGFR α 陽性細胞の比率は変化しなかったことから、血液系譜を含む細胞系譜を特異的に分化誘導していると考えられる。

従来、骨形成因子として捕らえられてきたアスコルビン酸が骨吸収の亢

進も誘導することが示唆されたことで、今後の治療法の検討にも有益な情報を加えることになると思う。

4) γ -GTP と歯周炎による歯槽骨破壊

歯周炎で γ -GTP の発現が上昇していることは骨吸収への関与が示唆される。そのメカニズムは、今回の研究から、 γ -GTP がセメント芽細胞や骨芽細胞に作用して骨吸収サイトカインを産生させ、それらがさらに RANKL の発現を亢進させることによって破骨細胞を誘導すると考えられた。

また、 γ -GTP のソースとしては宿主側の細胞のみならず、歯周病菌からも産生されるが、その細菌 γ -GTP にも破骨細胞誘導活性が認められたことで、細菌 γ -GTP が新規の歯槽骨破壊因子であることが明らかになった。

5) 骨吸収亢進と尿 γ -GTP 値の関連性について

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ている。このマウスにおいては、尿中 γ -GTP 排泄も増加しており、これが骨吸収の亢進による可能性が考えられた。そこで本研究では、破骨細胞の gain-of-function および loss-of-function の実験系を応用してこの点を検証した。

まず、gain-of-function モデルとして RANKL の恒常的活性化によって骨吸収の亢進と骨粗鬆症を呈する OPG ノックアウトマウスを用いた検討では、対照群と比較して、尿中 γ -GTP 排泄が増加

しており、骨吸収抑制薬のアレンドロネートを投与すると、骨吸収マーカーである DPD とともに尿中 γ -GTP 排泄も減少した。このことは、骨粗鬆症患者においても臨床的に確認した。さらに、本研究では、loss-of-function の代表例である *op/op* マウスにおいて、逆の動態を確認した。

我々のこれまでの生化学的検討から、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ている。尿中の exosome と呼ばれる膜で囲まれた微小構造物のプロテオーム解析から、近位尿細管に発現する γ -GTP が exosome に会合していることが明らかになっており、我々の検討でも exosome に associate した γ -GTP 活性を検出している可能性が高い。すなわち、血液から糸球体を濾過してきた γ -GTP 活性を検出してい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、骨吸収の亢進に伴って管腔内へ排泄され、この際、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られる。

E. 結論

1. γ -GTP は関節炎による関節破壊抑制治療の効果的な標的と成りうることを示唆された。
2. γ -GTP の持つ破骨細胞誘導活性は

大サブユニットが中心的役割を担っていると考えられた。

3. アスコルビン酸は ES 細胞からの破骨細胞分化誘導を増強させた。その原因は Flk-1 陽性の中胚葉細胞系譜分化誘導を亢進することにあると考えられた。
4. 歯周炎では γ -GTP による骨吸収サイトカイン産生亢進を介して RANKL 依存性破骨細胞形成が惹起すると考えられた。
5. 細菌 γ -GTP は新規の歯槽骨破壊因子である。
6. ヒト尿 γ -GTP 検査で骨吸収亢進を予測する値(カットオフ値)は40~45 IU/L-Cr が妥当であった。
7. 動物実験により、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ことが示された。

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, Kondo T, Hiratsuka S, Hayashi S-I, Amizuka N, Noda T, Ikeda K, Shibuya M: Vascular endothelial growth factor receptor-1 signaling is essential for osteoclast development and bone-marrow formation in CSF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*

102:14016-14021, 2005.

- 2) Niida S: Osteoclast forming activity of the vascular endothelial growth factor. *J. Oral Biosci* 47(2):105-114, 2005.

分担研究者 池田義孝

- 1) Cheng G, Ikeda Y, Iuchi Y, Fujii J.: Detection of S-glutathionylated proteins by glutathione S-transferase overlay. *Arch. Biochem. Biophys.* 435:42-49, 2005
- 2) Otsu K, Sato K, Ikeda Y, Imai H, Nakagawa Y, Ohba Y, Fujii J.: Abortive apoptotic pathway by singlet oxygen due to the suppression of caspase activation. *Biochem J.* 389:197-206, 2005.
- 3) Ishii T, Matsuki S, Iuchi Y, Okada F, Toyosaki S, Tomita Y, Ikeda Y, Fujii J.: Accelerated impairment of spermatogenic cells in SOD1-knockout mice under heat stress. *Free Radic. Res.* 39:697-705, 2005.
- 4) Eguchi H, Ikeda Y, Ookawara T, Koyota S, Fujiwara N, Honke K, Wang PG, Taniguchi N, Suzuki K.: Modification of oligosaccharides by reactive oxygen species decreases sialyl lewis x mediated cell adhesion. *Glycobiology* 15:1094-1101, 2005.
- 5) Wang X, Inoue S, Gu J, Miyoshi E, Noda K, Li W, Mizuno-Horikawa Y, Nakano M, Asahi M, Takahashi M, Uozumi N, Ihara S, Lee S-H, Ikeda Y, et al: Dysregulation of TGF- β 1 receptor activation leads to abnormal lung development and emphysema-like phenotype in core fucose-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:15791-

15796, 2005.

- 6) Ikeda Y, Taniguchi N.: Gene expression of gamma-glutamyl transpeptidase. *Methods. Enzymol.* 401:408-425, 2005.
- 7) Cheng G, Ikeda Y, Iuchi Y, Fujii J.: A novel method to detect S-glutathionylated proteins by glutathione S-transferase. *In* : "Natural Antioxidants and Micronutrients" (B Zhao, G Liu, L Packer, eds), Medimond, Bologna, pp.155-158, 2005.
- 8) Ihara H, Ikeda Y, Taniguchi N.: Reaction Mechanism and Substrate Specificity for Nucleotide-Sugar of Mammalian alpha1,6-Fucosyltransferase. *Glycobiology*, in press.
- 9) Suto D, Ikeda Y, Fujii J, Ohba Y.: Structural analysis of amino acids, oxidized by reactive oxygen species and an antibody against N-Formylkynurenine. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, in press
- 3) Niida S, Kondo T, Hiratsuka S, Hayashi SI, Amizuka N, Noda T, Ikeda K, Shibuya M: Vascular endothelial growth factor receptor-1 signaling is essential for osteoclast development and bone -marrow formation in CSF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 14016-14021, 2005.
- 4) Yamazaki H, Yoshino M, Hayashi SI: Neural crest stem cells and organogenesis (Chapter 6). *In* Trends in Stem Cell Research, Ed. F. Columbus, Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY. pp147-167, 2005.
- 5) 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* 17: 549-558, 2005.

分担研究者 林 眞一

- 1) Tsuneto M, Yamazaki H, Yoshino M, Yamada T, Hayashi SI: Ascorbic acid promotes osteoclastogenesis from embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 335: 1239-1246, 2005.
- 2) Tsuneto M, Tominaga A, Yamazaki H, Yoshino M, Orkin SH, Hayashi SI: Enforced expression of PU.1 rescues osteoclastogenesis from embryonic stem cells lacking Tal-1. *Stem Cells* 23: 134-143, 2005.
- 6) Yamada N, Tsujimura T, Ueda H, Hayashi SI, Ohyama H, Okamura H, Terada N: Down-regulation of osteo- protegerin production in bone marrow macrophages by macrophage colony- stimulating factor. *Cytokine* 31:288-297, 2005.
- 7) Kuhara A, Yamada N, Sugihara A, Ohyama H, Tsujimura T, Hayashi SI, Terada, N: Fos plays no role in apoptosis of epithelia in the mouse male accessory sex organs and uterus. *Endocr J* 52:

153-158, 2005.

- 8) Tsuneto M, Hayashi SI: Function of Tal-1 and its relationship with lineage-affiliated transcription factors in hematopoiesis. *Current Topics in Biochemical Research* (in press).

分担研究者 高田 隆

- 1) Characteristics of periodontal ligament subpopulations obtained by sequential enzymatic digestion of rat molar periodontal ligament.: Kaneda T., Miyauchi M., Takekoshi T., Kitagawa S., Kitagawa M., Shiba H., Kurihara H., Takata T. : *Bone*, 2005 (in press)
- 2) Establishment of cementoblast cell lines from rat cementum lining cells by transfection with temperature-sensitive simian virus-40 T-antigen gene.: Kitagawa M., Kitagawa S., Kudo Y., Ogawa I., Miyauchi M., Tahara H., Ide T., Takata T.: *Bone*, 37, 220-226, 2005.
- 3) Vascular endothelial growth factor plays an important autocrine/paracrine role in the progression of osteoarthritis. : Tanaka E, Aoyama J, Miyauchi M, Takata T, Hanaoka K, Iwabe T, Tanne K. : *Histochemistry and Cell Biology*, 123(3):275-81, 2005.
- 4) Platelet-derived growth factor enhances proliferation and matrix synthesis of temporomandibular joint disc-derived cells. : Hanaoka K, Tanaka E, Takata T,

Miyauchi M, Aoyama J, Kawai N, Dalla-Bona DA, Manano E, Tanne K. : *Angle Orthodontist*, in press, 2005.

分担研究者 池田 恭治

- 1) Takasu H, Sugita A, Uchiyama Y, Katagiri N, Okazaki M, Ogata E, Ikeda K: c-Fos protein as a target of anti-osteoclastogenic action of vitamin D, and synthesis of new analogs. *J Clin Invest* 116:528-535, 2006
- 2) Hishiya A, Iemura S, Natsume T, Takayama S, Ikeda K, Watanabe K: A novel ubiquitin-binding protein ZNF216 functioning in muscle atrophy. *EMBO J* 25:554-564, 2006
- 3) Niida S, Kondo T, Hiratsuka S, Hayashi S, Amizuka N, Noda T, Ikeda K, Shibuya M: Vascular endothelial growth factor receptor-1 signaling is essential for osteoclast development and bone marrow formation in CSF-1- deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:14016-21, 2005
- 4) Ito M, Ikeda K, Nishiguchi M, Shindo H, Uetani M, Hosoi T, and Orimo H: Multi-detector row CT imaging of vertebral microstructure for evaluation of fracture risk. *J Bone Miner Res* 20:1828-36, 2005
- 5) Hishiya A, Ito M, Aburatani H, Motoyama N, Ikeda K, Watanabe K: Ataxia telangiectasia mutated (Atm) knockout mice as a model of osteopenia due to impaired bone formation. *Bone* 37:497-503, 2005

2. 学会発表

主任研究者

- 1) 森脇佐和子, 石塚保行, 池田恭治, 新飯田俊平: γ -GTP は骨吸収サイトカインの発現を誘導し骨吸収を促進する. 第 23 回日本骨代謝学会(大阪). 2005.8.22.
- 2) Amano H, Takahashi K, Niida S, Yamada S: The role of caspase 3 in bone metabolism. The ASBMR 27th Annual Meeting in Nashville, Tennessee, USA. 23/Sept/2005.
- 3) 天野均, 坂井詠子, 新飯田俊平, 加藤有三, 山田庄司: 骨改造現象におけるカスパーゼ3の役割に関する研究. 第 47 回歯科基礎医学会(仙台). 2005.9.
- 4) 宮内睦美, 川添祐亮, 坂本宜也子, 岡広子, 北川雅恵, 石塚保行, 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) と歯槽骨破壊. 第 47 回歯科基礎医学会(仙台). 2005.9.

分担研究者 池田義孝

- 1) 江口裕伸, 池田義孝, 大河原知水, 藤原範子, 小代田宗一, 本家孝一, Peng G. Wang, 谷口直之, 鈴木敬一郎 活性酸素は細胞表面のシアル酸を遊離し、細胞接着を抑制する. 第 29 回日本過酸化脂質・フリーラジカル学会, 10.26-27(2005), 神戸. (過酸化脂質研究, vol.29, 36, 2005.)
- 2) 井原秀之, 池田義孝, 谷口直之: ヒト α 1, 6 フコース転移酵素 (FUT8) のドメイン解

析 (Domain analysis of human α 1,6-fucosyltransferase (FUT8)). 第 25 回日本糖質学会年会 2005 年 7 月 20-22 日(大津)

分担研究者 林 眞一

- 1) Hayashi SI: In vitro organogenesis using a mouse embryonic stem cell. The 21st Century COE Program International Symposium "Fusion of Chromosome Engineering with Stem Cell Biology". 2005 年 3 月 26 日-27 日(米子).
- 2) Yoshino M, Yamazaki H, Hayashi SI: The amount of self-antigens trafficked in the steady state is related to regulation of the immune homeostasis. 14th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages. 2005 年 6 月 3 日-4 日(さいたま市)
- 3) 山崎英俊, 坂田恵美, 林 眞一: マウス胎仔胸腺に存在する神経堤由来細胞の性状解析. 第 38 回日本発生生物学会, 2005 年 6 月 1 日-4 日(仙台)
- 4) Mori K, Tsuneto M, Yoshino M, Yamazaki H, Hayashi SI: Temporal observations of the induction and elimination of the neonatal tolerance. 第 35 回日本免疫学会, 2005 年 12 月 13 日-15 日(横浜)
- 5) Yoshino M, Yamazaki H, Tsuneto M, Hayashi SI: Measurement of the amount of skin self-antigens trafficked in the steady state. 第 35 回日本免疫学会,

2005年12月13日-15日(横浜)

- 6) Yamazaki H, Yoshino M, Tsuneto M, Hayashi SI: Distribution and characteristics of neural crest-derived cells in the developing thymus. 第35回日本免疫学会、2005年12月13日-15日(横浜)
- 7) 福家暢夫、経遠智一、吉野三也、山崎英俊、林 眞一: 骨髄プラズマ細胞の置換・放出機構の解析。第35回日本免疫学会、2005年12月13日-15日(横浜)
- 8) 小川昌宏、経遠智一、吉野三也、山崎英俊、林 眞一: CD4⁺ CD25⁺ 制御性T細胞のB細胞増殖。骨髄プラズマ細胞の置換・放出機構の解析。第35回日本免疫学会、2005年12月13日-15日(横浜)
- 9) Yamazaki H, Tsuneto M, Yoshino M, Yamamura K, Hayashi SI: Potential of Dental Mesenchymal Cells in Developing Teeth. Gordon Research Conference, Craniofacial Morphogenesis and Tissue Regeneration. 2006年1月22日-27日、Ventura, CA, USA.
- 10) Yoshino M, Yamazaki H, Hayashi SI: Measurement of self-antigen trafficking by using hyperpigmented transgenic mouse. Keystone Symposium, Tolerance, Autoimmunity and Immune Regulation (D1). 2006年3月21日-26日、Breckenridge, CO, USA.

分担研究者 高田 隆

- 1) γ -グルタミルトランスペプチダーゼと歯槽

骨破壊:宮内睦美, 川添祐亮, 坂本宜也子, 岡 広子, 北川雅恵, 石塚保行, 新飯田俊平, 高田 隆: 第47回歯科基礎医学会学術大会(宮城), 2005.

- 2) ヒトセメント芽細胞株の樹立とその増殖分化に対する代表的生理活性物質の影響: 北川雅恵, 飯塚新二, 坂本宜也子, 川添祐亮, 岡 広子, 齋藤彰久. 工藤保誠, 小川郁子, 宮内睦美, 高田 隆: 第47回歯科基礎医学会学術大会(宮城), 2005.
- 3) ヒト歯髄細胞に対するエナメルマトリックスタンパクの影響について: 上田浩大, 北川雅恵, 齋藤彰久, 飯塚新二, 宮内睦美, 小川郁子, 尾田 良, 富士谷盛興, 高田隆: 第47回歯科基礎医学会学術大会(宮城), 2005.
- 4) 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. PGE2 刺激に対するセメント芽細胞 OCCM-30 の応答性とPGE 受容体の役割について: 岡広子, 宮内睦美, 古庄寿子, 齋藤彰久, 北川雅恵, 坂本宜也子, 飯塚新二, 小川郁子, 野口和行, 石川烈, 高田隆: 第48回秋季日本歯周病学会学術大会(北海道), 2005.
- 5) 骨芽細胞の増殖分化に及ぼすヘパリンおよびその誘導体の影響: 齋藤彰久, 吉田真希, 中田朝子, 岡 広子, 北川雅恵, 小川郁子, 宮内睦美, 高田隆: 第38回広島大学歯学会総会(広島), 2005.

- 6) ヒト歯髄細胞の増殖・分化に対するエナメ

ルマトリクスタンパクの影響: 上田浩大, 北川雅恵, 齋藤彰久, 宮内睦美, 小川郁子, 尾田 良, 富士谷盛興, 高田 隆: 第 38 回広島大学歯学会総会(広島), 2005.

- 7) 合成アミノ酸ペプチドを用いた歯周・骨再生療法の開発に関する研究: 吉田真希, 中田朝子, 飯塚新二, 岡 広子, 北川雅恵, 北川尚嗣, 工藤保誠, 小川郁子, 宮内睦美, 高田 隆: 第 38 回広島大学歯学会総会(広島), 2005.
- 8) ヒトセメント芽細胞株の樹立: 北川雅恵, 岡 広子, 齋藤彰久, 小川郁子, 宮内睦美, 田原栄俊, 井出利憲, 高田 隆: 第 48 回春季日本歯周病学会学術大会(長崎), 2005.
- 9) 骨芽細胞の増殖, 分化に及ぼすヘパリンおよびその誘導体の影響: 齋藤彰久, 吉田真希, 中田朝子, 岡 広子, 北川雅恵, 小川郁子, 宮内睦美, 高田隆: 第 48 回春季日本歯周病学会学術大会(長崎), 2005.

分担研究者 池田 恭治

- 1) 佐々木文, 渡部美穂, 油谷浩幸, 鈴木宏志, 池田恭治, 渡辺 研:

MAGE-D1/Dlxin-1/ NRAGE 欠損マウスの解析 第 28 回日本分子生物学会年会 12 月 7 日~10 日(福岡)

- 2) 菱谷彰徳, 池田恭治, 渡辺 研: ユビキチン結合タンパク質 ZNF216 の機能 第 28 回日本分子生物学会年会 12 月 7 日~10 日(福岡)
- 3) 辰巳佐和子, 網塚憲生, 伊東昌子, 河野憲二, 池田恭治: 骨細胞の ablation マウス 第 23 回日本骨代謝学会 7 月 21~23 日(大阪)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

骨粗鬆症の診断および/または骨粗鬆症骨折リスクの予測の方法

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

2. 分担研究報告書

抗 γ -GTP 抗体の関節破壊抑制効果に関する研究

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: 慢性リウマチ(RA)などの炎症性関節炎は患者のQOLを著しく低下させる。RA患者の滑膜組織ではガンマ-グルタミルトランスぺプチダーゼ(γ -GTP)の発現亢進が認められる。 γ -GTPを標的とした生物学的製剤開発を目指し、抗 γ -GTP抗体を作製して関節炎モデルマウスに投与した。抗体投与を行った関節炎マウスでは炎症の抑制効果は見られなかったものの、破骨細胞の数の有意な減少を認めた。また、炎症関節部位の破骨細胞は扁平化し、骨吸収機能の低下が示唆された。これらのことから、 γ -GTPのアンタゴニストには炎症性関節破壊の抑制剤としての可能性が期待される。

キーワード: 関節リウマチ, γ -GTP, 破骨細胞, 生物学的製剤, 抗体治療薬

A. 研究目的

新規の破骨細胞誘導因子の探索から新規の誘導因子ガンマ-グルタミルトランスぺプチダーゼ(γ -GTP)を同定した γ -GTPは、一般的には肝・胆道系疾患のマーカー酵素として知られているが、生体内の作用としてはグルタチオン代謝の主要酵素として重要な役割を担っている。この γ -GTPを骨髄培養系に添加すると破骨細胞形成が促進するが、このとき破骨細胞分化因子(RANKL)の発現亢進が認められる(J.Biol.Chem,2004)。興味深いことに、RANKLの発現誘導には γ -GTPの酵素活性は関与していないことが示された。このことから、 γ -GTPはサイトカインのように作用している可能性も示

唆されている。

我々は、この新規骨吸収因子がヒト慢性リウマチや歯周炎のような炎症組織において発現亢進していることを見出した。これらの疾患は進行すると骨破壊を惹起し、患者のQOLを著しく低下させるが、 γ -GTPはこの炎症性骨吸収に対して病態因子として関与している可能性が考えられる。

昨年度、我々は本研究課題において、関節リウマチモデルマウスであるコラーゲン誘導関節炎(CAI)マウスにおける γ -GTPの発現亢進とその局在を明らかにした。さらに、炎症滑膜細胞の培養による破骨細胞誘導系に抗 γ -GTP抗体を添加し、破骨細胞形成への影響を調べたところ、同細胞の誘導は有意に抑制さ

れ、 γ -GTP が関節炎における破骨細胞形成に関与していることが示唆された。これらの結果から、 γ -GTP の破骨細胞誘導活性を抑制することは、関節炎による骨破壊の抑制につながると考えられる。そこで、本年度は、 γ -GTP を標的とした抗体治療薬の開発を目指し、 γ -GTP に対するモノクローナル抗体を作製した。治療薬としての効果は、CIA マウスに投与することで検討した。その結果、炎症関節部位における破骨細胞数の有意な減少や同細胞の骨吸収活性の低下が認められ、関節破壊緩和の一定の効果が示された。

B. 研究方法

1) 抗 γ -GTP 抗体の作製

骨吸収因子 γ -GTP の破骨細胞誘導活性を特異的に中和するモノクローナル抗体を作製した。抗原はリコンビナント・ヒト γ -GTP (rh γ -GTP)で、Balb/c マウスに免疫した。免疫マウスの脾臓細胞を myeloma 細胞(SP2/0)と融合させハイブリドーマを作製した(AC バイオテクノロジーズ)。得られた抗体はウエスタンブロッティング法で検定した。

2) コラーゲン誘導性関節炎(CIA)マウスの作製

雄 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した(図1)。投与は2度行い、2度目は最初

の投与から3週間後に行った。

3) CIA マウスへの抗体投与

上記マウスへの2回目のコラーゲンアジュバンド投与日から各抗体の投与を開始した。実験に用いた抗体は抗 γ -GTP 抗体2種類(AGT1、AGT3)で、対照群には抗 TNF- α 抗体および正常マウス IgG (negative control) の投与を行った。1回の投与量は200 μ g/mouseで、腹腔から週2回のペースで行い4週間続けた。匹数は各群10匹ずつとした。なお、動物実験については、国立長寿医療センターの動物倫理委員会で認められたガイドラインに則って施行された。

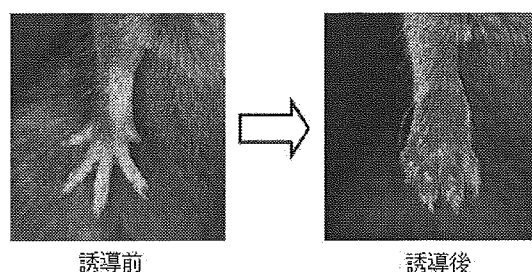


図1. 関節炎の誘導

4) 抗体の効果の確認

各抗体投与から4週間後、麻酔下においてマウスの灌流固定を行い、炎症関節部位の摘出後、通法にしたがいパラフィンに包埋した。これらの試料から組織切片を作製し、H&E染色、TRAP染色、免疫組織化学染色を行い顕微鏡観察に供した。

C. 研究結果

抗体作製作業の結果、4種類の抗 γ -GTP 抗体(AGT1-4)を得た。骨髄培養

に rhG-GTP を添加した破骨細胞誘導系にこれらの抗体をそれぞれ加えた結果、AGT1 と AGT3 において破骨細胞形成の抑制がみられた。この結果を参考に、CIA マウスにおける関節破壊抑制効果を調べるため、AGT1 と AGT3 の2種類の抗体を、材料と方法3)に記載した方法でマウスに投与した。

関節炎の誘導処理直後(炎症の発症前)からの抗体投与による関節炎発症率の抑制効果はいずれの抗体でも完全には抑制されなかったが、AGT1 では 20%程度の抑制効果が示された。この成績はすでに臨床応用されている抗 TNF- α 抗体と同程度であった。

炎症抑制効果については、掌部腫脹部位の測定によっておこなったが、いずれの抗体においても十分な効果が得られなかった。一方、抗 TNF- α 抗体は腫脹を有意に抑制した。

骨破壊抑制効果について、組織切片を作製し、H&E 染色および破骨細胞のマーカー酵素である TRAP 染色を行って検討した。その結果、AGT3 投与群で、有意に破骨細胞減少が見られた。また、

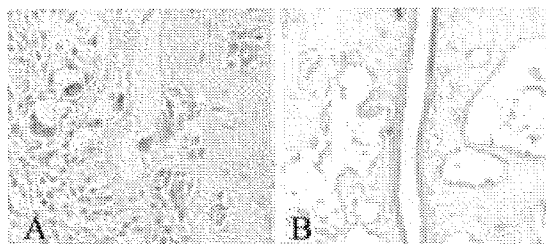


図2. 抗 γ -GTP抗体投与による関節破壊抑制効果。未処置群のマウス足骨関節(中足骨楔状骨間関節)の破壊像(A)と抗体(AGT3)投与群の指関節の組織像(B)。

AGT1 投与群についても破骨細胞数の減少傾向(有意差はない)が示され、抗

体による破骨細胞形成の抑制効果が明らかになった。

関節炎の誘導により腫脹した下肢の足関節の病理学的観察を行った。未処置群の炎症関節では関節に侵入する滑膜(パンヌス)像がみられ、そこには多数の TRAP 陽性の破骨細胞が存在していた(図2A)。これに対し、AGT3 投与群では、パンヌス形成はほとんどなく、関節の形態が正常に保たれている個体が多かった(図2B)。炎症細胞の集積する部位については、未処置群でこれらの細胞集積部位に面する骨表面に多数の大型の破骨細胞が観察されたが(図3A)、抗体投与群では TRAP 陽性の破骨

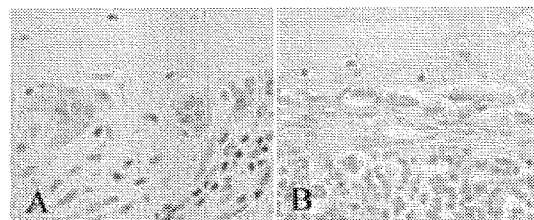


図3. 抗 γ -GTP抗体投与による破骨細胞の活性抑制効果。未処置群のマウスでは炎症部位に大型の破骨細胞が出現している(A)が、抗体(AGT3)投与群では細胞の小型化している(B)。

細胞は観察されるものの、その形態は扁平化し、小型化しているものが多く、骨面の吸収窩形成も緩慢な傾向が示された(図3B)。

D. 考察

炎症関節では病的骨吸収が進み、関節の破壊に至る。このような事態は患者の運動障害を引き起こし ADL や QOL を低下させる。とりわけ高齢者にとっては家