

族の負担も高まり、より深刻な事態に帰結することも多い。

我々はすでに、リウマチ患者滑膜組織および RA モデルのひとつである CIA マウスの炎症滑膜組織における γ -GTP の発現亢進を確認した(昨年度報告書)。その局在は滑膜内の血管内皮細胞、マクロファージ及びプラズマ細胞に認められることが免疫組織化学的検討から示唆されている。また、微弱ではあるが、滑膜細胞(線維芽細胞)の陽性反応も示されている。 γ -GTP が新規の破骨細胞誘導因子であることから、炎症滑膜に包まれる関節において、骨破壊のリスクファクターのひとつとして作用する可能性は高い。

今回我々は、 γ -GTPを標的とした生物学的製剤の開発の一環として、抗 γ -GTP抗体の作製を行い、関節炎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 γ -GTP抗体が関節の骨破壊に対して有効であることが示された。RAのモデルマウスに同抗体を投与した場合、関節炎部位における破骨細胞数の減少や形態の縮小化などが見られた。また、抗体投与群の多くは、パンヌス形成が抑制されていて、関節の破壊まで至る例が少ないことも示された。その一方で、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、さらなる検討も必要と思われる。しかしながら、RAなどの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、意義深いものと考えられる。現在強力な抗関節破壊抑制剤として認可を受

けている抗 TNF- α 抗体治療薬でも、奏効しない症例があることや、副作用の問題が報告されており、新たな生物学的製剤の研究の必要性が指摘されている。この点を鑑み、 γ -GTPを標的とした生物学的製剤の開発は有意義と思われた。

γ -GTPによる破骨細胞誘導の詳細なメカニズムはまだ明らかにされていないが、今後、これらの課題が解決することでより有効な γ -GTPアンタゴニスト製剤開発のシーズが提供されるものと期待している。

E. 結論

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

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

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

2.学会発表

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.

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.

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.

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.

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(特許承認番号第 3709332 号) 2005 年 9 月

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

γ -グルタミルトランスぺ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

分担研究者 池田 義孝（佐賀大学・医学部・教授）

研究要旨：哺乳類 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (γ -GTP) がもつ破骨細胞誘導活性がタンパク質構造上どの領域による機能なのかを、ラット精製酵素およびバキュロウイルス昆虫細胞発現系を用いて生化学的な解析を行い、その同定を試みた。

キーワード：破骨細胞、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (γ -GTP)、サブユニット

A. 研究目的

新規骨吸収促進因子として Niida らにより見出された γ -GTP は分解酵素として本来グルタチオン代謝に関与する酵素タンパク質であり、生体内ではグルタチオンおよびその構成アミノ酸であるシステイン・シスチンの恒常性の維持に関与している。Niida らのこれまでの研究により、破骨細胞誘導因子としての生物活性は加水分解反応・転移反応を触媒する酵素活性に依存しないことが判っており、リガンド-受容体のようなタンパク質-タンパク質相互作用によって新規な生物活性が発現すると考えられる。本研究では γ -GTP タンパク質のどの領域が誘導活性に関与しているか同定することを試みた。

B. 研究方法

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。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。それぞれのサブユニットについて、TRAP 染色陽性細胞および融合細胞の数を指標に破骨細胞誘導活性を検討した。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。

C. 研究結果

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。このことからおそらく破骨細胞誘導能は大サブユニットに担われていると考えられた。さらに、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。詳細な検討のために大サブユニットおよび小サブユニットに相当する領域をそれぞれ組換えタンパク質として昆虫細胞で発現することを試みたが、今のところ精製組換えサブユニットを得るには至っていない。

D. 考察

今回の研究結果から、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。酵素反応の触媒基が小サブユニットに存在することが知られており、酵素活性と独立した生物学的機能であることと合致した結果となった。また、培養系

に加えられた後にリフォールドしている可能性があるものの、変性状態でサブユニットを単離していることから、必ずしも高次構造が必須であるわけではないと考えられる。さらに詳細に活性に必要な、あるいは活性を示す領域を限定する必要があるが、そのためには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ことも有用だと思われる。あるいはアラニンスキャ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が可能であるが、いずれの方法にしてももう少し領域を限定するためある程度の情報が必要だと考えている。

E. 結論

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。また変性状態あるいはそれに近い状態でも活性が発現することから一次構造情報がより重要であることがわかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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.

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.

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.

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, Yamaguchi Y, Aze Y, Tomiyama Y, Fujii J, Suzuki K, Kondo A, Shapiro SD, Lopez-Otin C, Kuwaki T, Okabe M, Honke K, Taniguchi N.: 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.

Ikeda Y, Taniguchi N.: Gene expression of gamma-glutamyl transpeptidase. *Methods. Enzymol.* 401:408-425, 2005.

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.

Ihara H, Ikeda Y, Taniguchi N.: Reaction Mechanism and Substrate Specificity for Nucleotide-Sugar of Mammalian alpha1,6-Fucosyltransferase. *Glycobiology*, in press.

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

2. 学会発表

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.)

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)

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

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：骨形成に必須とされるアスコルビン酸の破骨細胞分化誘導における作用を胚性幹(ES)細胞からの分化誘導系で解析した。その結果、アスコルビン酸が存在しないと破骨細胞はほとんど誘導されないことが明らかになった。この過程の中で、特に Flk-1 陽性の側板中胚葉細胞系譜を効率よく分化誘導することで、破骨細胞の誘導を亢進させることが示された。

キーワード：破骨細胞、アスコルビン酸（ビタミンC）、胚性幹(ES)、Flk-1

A. 研究目的

アスコルビン酸の作用は骨形成に関しては検討されてきたが、骨吸収系への作用についてはほとんど報告されていない。本研究では破骨細胞分化誘導におけるアスコルビン酸の作用を胚性幹(ES)細胞から順次分化段階に添って解析することを目的とした。

B. 研究方法

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、その後細胞を回収して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の出現を検討した。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。

C. 研究結果

未分化 ES 細胞からの8日間の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。効率は悪いが後半の4日間にのみアスコルビン酸を添加することで若干の破骨細胞誘導が観察された。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も明らかとなった。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いたが、同じ中胚

葉系の指標である PDGFR α 陽性細胞の比率は変化していなかった。磁気ビーズ法で細胞を分取したところ、破骨細胞前駆細胞は Flk-1 陽性細胞画分に濃縮された。

D. 考察

アスコルビン酸は骨形成のみならず骨吸収の中心的細胞である破骨細胞分化誘導にも重要であることが明らかになった。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。しかし、その作用は単なるアスコルビン酸の還元作用ではなかった。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。このことは、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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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).

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).

Niida S, Kondo T, Hiratsuka S, Hayashi SI, Amizuka N, Noda T, Ikeda T, 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).

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).

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).

Yamada N, Tsujimura T, Ueda H, Hayashi SI, Ohyama H, Okamura H, Terada N: Down-regulation of osteoprotegerin production in bone marrow macrophages by macrophage colony-stimulating factor. *Cytokine*, 31: 288-297 (2005).

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).

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).

2. 学会発表

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).

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)

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)

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)

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)

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)

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)

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)

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.

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.

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

歯周炎に伴う歯槽骨破壊と 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。前年度本研究で、歯肉溝から投与されたヒト合成 γ -GTP が投与開始後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、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することから γ -GTP が歯周炎の際の歯槽骨破壊のリスクファクターの1つなることを明らかとした。今年度は、歯周構成細胞である骨芽細胞やセメント芽細胞に及ぼす γ -GTP 影響を *in vitro* で検討した。遺伝子組換え型細菌 γ -GTP (B-GTP)を調整し、B-GTP が歯周組織に惹起する組織変化を調べ、ヒト γ -GTP の結果と比較検討した。その結果、*In vitro* の実験では、 γ -GTP 刺激は骨芽細胞・セメント芽細胞の TNF- α , IL-1 β , MIP-1 の mRNA 発現を上昇させた。さらに、骨芽細胞では RANKL mRNA 発現を促進する一方で、OPG mRNA 発現は減少させた。また、歯周病原菌由来 LPS と γ -GTP の同時刺激は、ST2 における TNF- α , RANK mRNA 発現を LPS 単独刺激時よりも促進した。B-GTP のラット歯肉溝からの投与は、ヒト γ -GTPと同様に歯槽骨骨縁に沿って出現する破骨細胞数を有意に増加させた。よって、歯周組織局所での γ -GTP の増加は、骨芽細胞やセメント芽細胞における炎症性サイトカインの発現や破骨細胞誘導に関わる因子の発現を誘導し、炎症の成立と歯槽骨吸収に関わるリスクファクターであると共に、歯周病原菌由来 LPS と協同的に働いて歯周組織破壊の増悪因子となる可能性が示唆された。さらに、*in vivo* の実験で B-GGT が破骨細胞誘導活性を有する事を明らかにできたことから、口腔細菌由来の γ -GTP も歯周組織破壊因子の可能性があり、歯周組織局所での 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

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)

の発現を誘導し、破骨細胞形成を促進することが報告され、慢性肝胆道疾患による全身的血清 γ -GTP 値の上昇や歯周炎局所での 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。我々は、前年度研究において、歯肉溝から投与された γ -GTP が投与開始後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すること。2相目の破骨細胞誘導に宿主細胞から産生される Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)や Interleukin-1beta (IL-1 β)等の骨吸収活性をもつサイトカイン産生が関与することを明らかにした。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を示唆した。

今年度は、実験1として、 γ -GTP による歯槽骨破壊のメカニズムを明らかにする目的で、歯槽骨吸収を制御する骨芽細胞や根吸収に関わるセメント芽細胞に及ぼす γ -GTP 影響を *in vitro* で検討し

た。さらに実験2では、口腔内細菌での γ -GTP 発現が明らかになったことから、遺伝子配列の明らかな細菌の遺伝子組換え型 γ -GTP (B-GTP)を調整し、歯周組織に惹起する組織変化を検討した。

B. 研究方法

実験1: γ -GTP が骨芽細胞やセメント芽細胞に及ぼす影響について

1) γ -GTP がサイトカイン mRNA 発現に及ぼす経時的変化

破骨細胞誘導に関わるサイトカインとして、TNF- α , IL-1 β , IL-6, Macrophage inflammatory protein-1(MIP-1), RANKL, OPG, Macrophage colony stimulating factor (M-CSF)を用い、それらに特異的な primer を作成(表1)して mRNA 発現を RT-PCR で検索した。

表1.

	Sequence	Products(bp)	Ta(°C)	Cycles	Accession no
RT-PCR					
RANKL	Forward 5'-CGCTCTGTTCCCTGTAACCTTCGAGCG	608	58	33	AF019048
	Reverse 5'-TCGTGCTCCCTCCCTTCATCAGGTT-3'				
OPG	Forward 5'-CAGAGACTAATAGATCAAAGGCAG	631	60	30	U94331
	Reverse 5'-ATGAAGTCTCACCTGAGAAGAACC-3'				
M-CSF	Forward 5'-TGAGGACAGACAGGTGGAAC-3'	210	58	30	NM_007778
	Reverse 5'-AAGGGTGAGGATGGAAAGAC-3'				
IL-6	Forward 5'-AATGATGGATGCTACCAAAC TG-3'	156	58	34	M20572
	Reverse 5'-TTCTGTATCTCTCTGAAGGACT-3'				
TNF- α	Forward 5'-ATGAGCACAGAAAGCATGATC-3'	278	58	34	
	Reverse 5'-TACAGGCTTGTC ACTCGAATT-3'				
IL-1 β	Forward 5'-TTCAAAGAAGTGCTG GAAAAGGT	304	58	28	NM_011198
	Reverse 5'-GATCATCTCTACCTGAGTGTCTTT-3'				
GAPDH	Forward 5'-CCA CTCTCCACCTTCG-3'	154	60	30	M32899
	Reverse 5'-GTGGTCCAGGGTTTCTTAC-3'				

Ta: annealing temperature

60mm 型 dish に 5×10^4 cell/dish の割合でマウス頭蓋骨由来骨芽細胞株 (MC3T3-E1) およびマウスセメント芽細胞株 (OCCM-30) を播種し, 1 日目の付着細胞に γ -GTP (AC Biotechnologies Co. Ltd.) を作用させ, 4, 24 時間後に細胞を回収した. total RNA を抽出, 1 μ l の total RNA から cDNA を合成し, KOD-Plus DNA Polymerase (TOYOBO) を用い増幅した. PCR の条件は表1に示す通りである. なお, OCCM-30 は 10 mM HEPES (pH 7.2), 10 % fetal bovine serum (FBS) と 100 U/mL Penicillin-Streptomycin を含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) で, MC3T3-E1 は 10 mM HEPE, 10 % FBS と 100 U/mL Penicillin-Streptomycin を含む α -MEM で培養した.

2) 歯周病原菌由来リポポリサッカライド (LPS) と γ -GTP の同時刺激の影響

γ -GTP が歯周病原菌由来 LPS の誘導する歯周組織破壊に及ぼす影響を検討する目的で, 歯周病原菌の1つである *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 由来 LPS (100 ng/ml) とヒト γ -GTP (100 ng/ml) の同時刺激による OCCM-30 およびマウス骨髄由来間質細胞株 (ST2) におけるサイトカイン mRNA 発現 (RANKL, OPG, TNF- α) を刺激後 2 時間目に RT-PCR で調べ, 各々単独投与した場合と比較検討した. ST2 の培養には 10 mM HEPES, 10 % FBS と 100 U/mL Penicillin-Streptomycin を含む DMEM を用いた.

実験2: B-GTP 局所投与が辺縁歯周組織に及ぼす影響

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 B-GTP をマイクロピペットにて 2 μ l 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 日, 2 日, 3 日および 7 日目に上顎臼歯部を顎骨ごと採取した.

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, 4.5 μ m 厚のパラフィン切片を作成し, 組織学的に観察した. 対照として, 未処置の材料も同様に観察した.

C. 研究結果

実験 1 : γ -GTP が骨芽細胞やセメント芽細胞に及ぼす影響について

1) γ -GTP がサイトカイン mRNA 発現に及ぼす経時的変化

図 1 に 100 ng/ml γ -GTP 刺激後の OCCM-30 ならびに MCT3-E1 におけるサイトカイン mRNA 発現の変化を示す. γ -GTP 刺激により OCCM-30, MC3T3-E1 のいずれにおいても TNF- α , IL-1 β mRNA 発現が明らかに増強された. MC3T3-E1 では, 刺激 4 時間後に IL-6 mRNA の一過性の発現誘導が観察された. MIP-1 mRNA 発現

レベルも上昇していた。

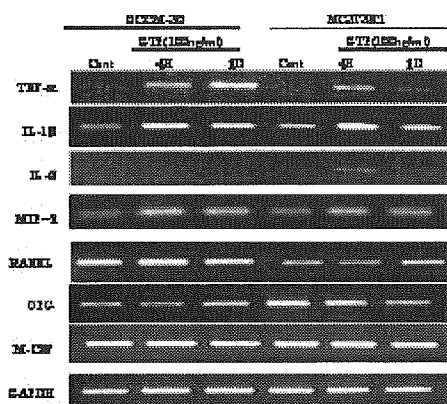


図 1. γ -GTP の刺激による遺伝子発現

MC3T3-E1 において RANKL mRNA 発現レベルは増加, 逆に OPG mRNA 発現レベルは減少した. 一方, OCCM-30 細胞では, RANKL mRNA 発現の変化は観察されなかったが, OPG mRNA 発現レベルは軽度の増加を示した. M-CSF mRNA 発現の変化は観察されなかった.

2) 歯周病原菌由来 LPS と γ -GTP の同時刺激の影響

OCCM-30 では, LPS, γ -GTP いずれも TNF- α , RANKL mRNA の発現レベルを増強させた. 同時刺激も両サイトカイン mRNA の発現を各単独刺激と同程度に増強させた. OCCM-30 の OPG mRNA の発現には変化がみられなかった(図 2).

ST2 では LPS 刺激により, TNF- α , RANKL mRNA 発現が誘導され, OPG mRNA 発現は減少する傾向を示した(図 2). γ -GTP 刺激も同様の傾向を示したが, LPS 刺激よりも変化が小さかつ

た. LPS と γ -GTP の同時刺激でも同様の変化が観察されたが, TNF- α , RANKL mRNA 発現レベルは各々単独で刺激したときよりも増強する傾向を示した.

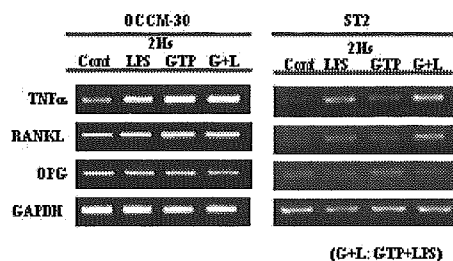


図 2. LPS と γ -GTP の同時刺激による遺伝子発現

実験 2 : B-GTP 局所投与が辺縁歯周組織に及ぼす影響

B-GTP 非投与例: 接合上皮内にごく少数の好中球が遊走し, 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.

B-GTP 投与例: B-GTP 投与 3 時間後, 接合上皮領域での好中球浸潤や血管拡張が目立つようになった. 深部歯周組織では不規則に吸収された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多数観察された(図 3, A). 破骨細胞は TRAP 陽性で, 1~2 個の核を有する小型の細胞が多かった. さらに, 歯根表面にも不規則な吸収窩が多数認められた(図 3, B).

投与 2 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.

投与開始 3 日後の歯根膜側歯槽骨縁には再び骨吸収を営む TRAP 陽性の破骨細胞が多数観察されるようにな

った。

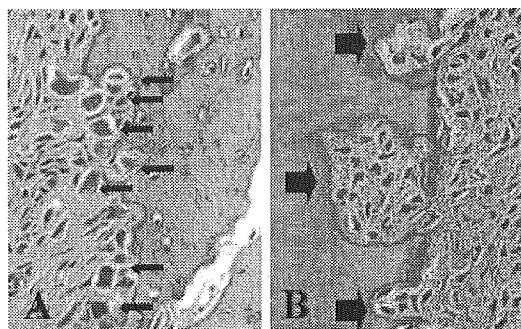


図 3. B-GTP 投与で惹起されたラット歯槽骨とセメント質の破骨細胞性吸収

D. 考 察

1) γ -GTP 刺激は骨芽細胞やセメント芽細胞における TNF- α , IL-1 β , IL-6, MIP-1 および RANKL mRNA の発現増強と OPG mRNA 発現減少を惹起し, 破骨細胞性骨吸収を直接誘導する可能性が示唆された. よって, 歯周組織局所での γ -GTP の上昇は, 歯槽骨破壊の直接的原因となる可能性がある.

2) LPS と γ -GTP の同時刺激は ST2 における TNF- α および RANKL mRNA 発現を, LPS 単独刺激より増加させる傾向を示し, γ -GTP の存在が歯周病原細菌由来 LPS の誘導する歯周組織破壊の増悪因子となる可能性が示唆された. 今後, real-time PCR を用い詳細に検討する必要がある.

3) 口腔細菌のひとつから調整した遺伝子組換え型細菌 γ -GTP の歯肉溝への投与は, ヒト型 γ -GTP と同様, 歯槽骨骨縁に沿って多数の破骨細胞を誘導した. よ

って, 慢性肝疾患に伴う血清 γ -GTP の全身的増加ばかりでなく, 歯周ポケット内プラーク細菌に由来する細菌型 γ -GTP の局所的増加があれば, 歯周炎の際の破骨細胞性骨吸収を直接誘導する可能性がある.

4) 細菌型 γ -GTP の誘導する破骨細胞増加もヒト型 γ -GTP と同様, 投与後3時間と3日目に目立ち, 1, 2日目では少ない傾向を示した. また, その際増加する破骨細胞は核数の少ない小型の破骨細胞が目立った, 今後, 細菌型 γ -GTP による破骨細胞誘導のメカニズムを詳細に検討する必要がある.

E. 結 論

γ -GTP はセメント芽細胞や骨芽細胞に直接作用し, 破骨細胞や破歯細胞を誘導する可能性が示唆された. また, 歯肉溝から細菌型 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惹起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, 歯周病原菌 LPS による歯周組織破壊の増悪因子となる可能性がある. 今後, γ -GTP をターゲットとした歯槽骨破壊制御の可能性をさらに検討する必要がある.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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)

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.

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.

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.

2. 学会発表

γ-グルタミルトランスぺ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.

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.

ヒト歯髓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.

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.

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.

ヒト歯髓細胞の増殖・分化に対するエナメルマトリッ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.

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.

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.

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.

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

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：尿中の γ -GTP が、破骨細胞の活性を反映する指標であるか否かを明らかにする目的で、破骨細胞のいないモデルマウスに破骨細胞を誘導した際の、尿中 γ -GTP の排泄動態について検討した。

キーワード：骨粗鬆症，骨吸収，破骨細胞， γ -GTP

A. 研究目的

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、骨吸収と骨の代謝回転の亢進、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、骨髄中のマクロファージ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、骨吸収を営む。

破骨細胞により分解されるI型コラーゲンの分解産物であるデオキシピリジリン(DPD)、N末端およびC末端テロペプチド(NTX や CTX)の血液および尿における測定値が、骨吸収を反映する生化学

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などのビスフォスフォネート薬は、成熟した破骨細胞に作用してアポトーシスを誘導することにより、骨吸収を強力に抑制すること、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。

主任研究者らは、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(J Biol Chem 2004)。 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、*in vitro*で破骨細胞の形成を促進する活性を有することが確かめられた。さらに、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見出した(論文投稿中)。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、骨粗鬆症や骨折リスクの診断における γ -GTP の役割について、とくに尿中 γ -GTP の排泄量と骨吸収との相関について検討を行った。

B. 研究方法

M-CSF は、森永乳業株式会社より供与を受けた。

*op/+*ヘテロマウスは、Jackson 研究所から購入し、交配によりホモマウス *op/op* を作出した。カルシウム含量 1.2%、リン含量 1.08%、ビタミン D 含量 240 IU/100g の飼料 CE-2 で飼育した。6 週齢の *op/op* マウスに、5 μ g/kg の M-CSF を一日 2 回、3 日間連続して皮下投与した。骨内部の微細骨梁構造は、長崎大学医学部・歯学部付属病院の伊東昌子助教授に依頼して、マイクロ CT-40(スイス、Scanco 社)を用いて、約 10 μ の空間解像度で解析した。破骨細胞マーカーである tartrate resistant acid phosphatase (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、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。

C. 研究結果

M-CSF を欠損した 6 週齢の *op/op* マウスの脛骨をマイクロ CT でスキャンした結果、とくに骨幹端部において典型的な大理石骨病を呈することが確認された。同部位の薄切切片を作製し、破骨細胞の分子マーカーである TRAP 染色を行ったところ、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 を一日 2 回、3 日間連続して皮下投与したところ、野生型と同程度にまでは回復しなかったが、骨幹端部にかけて骨髓腔の形成が見られ、組織学的にも TRAP 陽性の破骨細胞が多数出現した。

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として確立されているデオキシピリジノリンの尿中排泄量が著明に上昇した。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した。驚くべきことに、デオキシピリジノリンおよび γ -GTP の尿中排泄量は、コントロールとして用いた野生型マウスの数倍高値であった。

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デオキシピリジノリンとともに尿中 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

昨年度の結果と合わせ、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。骨での吸収亢進状態が、尿への γ -GTP の排泄を促進するメカニズムの解明が、今後の課題である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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

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

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

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

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回日本分子生物学学会年会 12月7日~10日(福岡)

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

子生物学学会年会 12月7日~10日(福岡)

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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし