

-厚生労働科学研究費補助金-

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

課題番号 H16-痴呆・骨折-011

総合研究報告書

研究期間 平成 16 年度～平成 17 年度

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 (鳥取大学医学部・教授)

高田 隆 (広島大学医歯薬総合大学院・教授)

池田 義孝 (佐賀大学医学部・教授)

平成 18 年(2006 年)3 月

## 目 次

- I. 総合研究報告書  
骨及び関節疾患の診断・治療薬の開発に関する研究 ..... 1  
新飯田俊平（国立長寿医療センター研究所・室長）
  
- II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 25
  
- III. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 29

# I. 総合研究報告書

## 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:**新規の骨吸収因子として同定した $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ( $\gamma$ -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。

関節炎や歯周炎では関節や歯槽骨の破壊が起こり、患者の ADL(日常生活動作)や QOL を低下させる要因となる。関節炎等の炎症組織における $\gamma$ -GTP の発現上昇を認めたことから、 $\gamma$ -GTP に対する抗体を作製し、炎症性骨破壊を惹起するモデル動物に投与した。その結果、炎症部位に隣接する骨組織における破骨細胞数の減少と骨破壊の抑制が示された。これらのことから、 $\gamma$ -GTP のアンタゴニストは関節炎による骨破壊に有効であることが示唆された。一方、骨粗鬆症の早期発見は骨折リスクの予防につながる。骨吸収が亢進すると尿中 $\gamma$ -GTP 値が上昇することを見出した。研究の結果、尿 $\gamma$ -GTP 値は既存の骨吸収マーカーの値と連動することが動物実験などから明らかになった。 $\gamma$ -GTP 検査は既存の骨吸収マーカー検査より、簡便で経済的であることから、集団検診などにおける骨吸収亢進の一次スクリーニングに適していると思われる。

キーワード：骨吸収，破骨細胞， $\gamma$ -GTP，骨粗鬆症，骨吸収マーカー

### 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 (鳥取大学医学部・教授)

高田 隆 (広島大学大学院・教授)

池田義孝 (佐賀大学医学部・教授)

### A. 研究目的

高齢者における骨折や関節炎による骨破壊は ADL(日常生活動作)を拘束し、長期的には著しい QOL の低下を招く要因となる。最近、我々は新規の骨吸収因子として $\gamma$ -GTP を同定した。 $\gamma$ -GTP は主に腎臓の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として知られているが、今回確認された破骨細胞誘導活性は $\gamma$ -GTP の酵素活性に依存

しない新たな生物活性であることが示唆された(J Biol Chem, 2004)。さらに、我々は $\gamma$ -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、 $\gamma$ -GTPが骨吸収活性因子である可能性を支持する結果を得た(論文投稿中)。その後の研究から、 $\gamma$ -GTPはヒト関節リウマチ(RA)滑膜組織に局在することや、RAモデルマウスにおける $\gamma$ -GTP mRNA発現亢進などが明らかとなり、 $\gamma$ -GTPが関節炎による骨破壊リスクファクターである可能性が示唆された。

そこで本研究では、 $\gamma$ -GTPを標的とした新規の骨吸収抑制剤の開発を目指し、 $\gamma$ -GTPに対する抗体を治療薬とする、いわゆる生物学的製剤の有効性について検討を行った。また、その有効性の科学的根拠を明らかにするため、未だ不明な点が多い $\gamma$ -GTPの破骨細胞誘導メカニズムと病的な環境下における破骨細胞分化・活性化について検討を行った。

一方、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、骨吸収に偏った骨代謝回転の亢進、骨量の減少、微細構造の悪化、骨質の低下と脆弱性が大きく寄与する。骨吸収は活性化した破骨細胞が骨表面に接着し、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進行する。

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、CTX)の血液および尿における測定値は骨吸収を反

映する生化学マーカーとして用いられている。

我々は、すでに骨吸収亢進が認められる患者では尿中 $\gamma$ -GTP値が高い傾向にあること、骨粗鬆症治療を継続している患者ではその値が減少に転ずることなどを見出している(未公表)。また、 $\gamma$ -GTP高発現トランスジェニックマウスでは、血清のみならず尿中の $\gamma$ -GTP値の増加もみられる。そこで本研究では、 $\gamma$ -GTPを標的とした骨代謝関連診断薬開発を目指し、骨粗鬆症や骨折リスクの診断における $\gamma$ -GTPの役割について、とくに尿中 $\gamma$ -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

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、それぞれの機関の定めるところのガイドラインに則って行なわれた。

患者サンプルを用いた研究については研究対象者の不利益について十分な説明を行い、インホームドコンセントに基づきプライバシー保護を徹底するとともに、これらの実施については各研究機関における倫理委員会の承認のもと、厚生労働省の倫理規定を遵守して行われた。

### 抗 $\gamma$ -GTP抗体の関節破壊抑制効果に関する研究

### 1) 関節炎モデルマウス

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) 病理学的観察

CIAマウスを4%パラホルムアルデヒドで灌流固定したのち、炎症関節を摘出し、同固定液でさらに8時間後固定を行った。その後、10% EDTA溶液による14日間の低温脱灰を経て、パラフィンに包埋し、組織切片を作製した。切片をH&E染色、酒石酸耐性酸性フォスファターゼ(TRAP)染色、抗 $\gamma$ -GTP抗体(阪大・谷口教授より供与)染色を施し、顕微鏡観察に供した。

### 3) 細胞培養

CIAマウスの炎症滑膜を摘出した後、細切し、細胞の分離を行い、 $\alpha$ -MEM培地(5% FCS)にて8日間培養した。培養破骨細胞様細胞の検出はTRAP染色を行って評価した。

$\gamma$ -GTPの存在下で骨芽細胞/骨髄細胞の共存培養を行った。また、骨芽細胞、間質系細胞株ST2および骨髄血球系細胞をそれぞれ $\alpha$ -MEM培地(含10% FCS)で単独培養した。

### 4) 抗 $\gamma$ -GTPモノクローナル抗体の作製

遺伝子組換え型ヒト $\gamma$ -GTP (rhy-GTP, エーシーバイオテクノロジーズ, 横浜)を抗原として、 $\gamma$ -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

体の作製を行った。rhy-GTPで免疫した複数のBALB/cマウスから脾臓細胞を摘出し、myeloma細胞(SP2/0)と融合させ、ハイブリドーマを作製し、抗体を獲得した(抗体名:AGT1~3)。

### 5) CIAマウスへの抗体投与

抗 $\gamma$ -GTP抗体の関節破壊抑制効果を調べるため、CIAマウスに対し、AGT1およびAGT3の腹腔投与を試みた。投与から21日後、炎症関節部位の病理標本を作製し、骨破壊の程度や破骨細胞数をH&E染色やTRAP染色などを施し、評価した。効果の比較をおこなうため、正常マウスIgG(negative control)投与群、抗TNF- $\alpha$ 抗体投与群の2群を設定した。

### 6) DNAチップ解析

ST2細胞株にrhy-GTP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。

## $\gamma$ -GTPの破骨細胞誘導活性部位の特定に関する研究

### 1) ラット $\gamma$ -GTPの精製

ラット腎より $\gamma$ -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。

### 2) 遺伝子組換え $\gamma$ -GTPの精製

ヒト $\gamma$ -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  $\gamma$ -GTP を精製した。 $\gamma$ -GTP は大小2つのサブユニットで構成されているが、精製  $\gamma$ -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。

## 破骨細胞分化に関する研究

### 1) マウス

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 ( $me^v/me^v$ ) マウスとその対照同腹マウス (+/?) は、米国 Jackson 研究所の Leonard Shultz 博士より供与され、鳥取大学生命機能研究支援センター動物資源開発分野で  $me^v/+$  のヘテロ接合体同士を交配させて作製した。

### 2) 細胞

骨髄細胞は麻酔により安楽死させたマウスの大腿骨より採取した。ES 細胞は D3 細胞株を、その増殖・分化誘導のための支持細胞としてストロマ細胞株 OP9 と ST2 細胞株を用いた。

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  $Tal1^{-/-}J1$  に、テトラサイクリン (Tc) で PU.1 遺伝子発現を制御できるシステムを導入した TUNE ES 細胞株を作成した。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。

### 3) 試薬類

培地は Gibco-BRL 社より、ヒト receptor activator NF- $\kappa$ B リガンド (RANKL) は PeproTec 社より、リポポリサッカライド (LPS)、活性型ビタミン D<sub>3</sub> [ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ]、デキサメサゾン、破骨細胞検出のための TRAP 活性発色試薬はシグマ・アルドリッチ社より購入した。ヒト macrophage colony stimulating factor (M-CSF) は大塚製薬より供与された。ラット抗マウス Kit 抗体 (ACK2)、抗 Flk-1 抗体 (AVAS12) 抗体は神戸・理研、西川先生より供与された。

### 4) 細胞培養

骨髄細胞からの破骨細胞分化誘導には、10% 牛胎児血清入りの  $\alpha$ -MEM 培地にて、ヒト M-CSF とヒト RANKL を添加して 6 日間培養した。

ES 細胞の未分化状態維持のための Leukemia inhibitory factor (LIF) は LIF 産生 CHO 細胞の培養上清を用いた。ES 細胞からの破骨細胞分化誘導は 20% 牛胎児血清入りの  $\alpha$ -MEM 培地中で、未分化 ES 細胞株 D3 細胞を  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  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 (1段階培養法)。血液細胞系譜をより効率的に誘導するため、未分化 ES 細胞を 4-5 日間 OP9 ストロマ細胞株で培養し、血液細胞系譜の細胞を誘導し、その後、ST2 ストロマ細胞株上で  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  とデキサメサゾン存在下でさらに 6 日間培養し、破

骨細胞を分化誘導した(2段階培養法)。

#### 5) 破骨細胞検出

破骨細胞検出のための TRAP 活性発色には、10%ホルマリン固定後、エタノール/アセトンで1分間固定後、10 分間発色した。

### **$\gamma$ -GTP による歯槽骨破壊に関する研究**

#### 1) ラット歯槽骨への試薬投与

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 $\mu$ g/ml の r $\gamma$ -GTP 溶液(エーシーバイオテクノロジー)、細菌 $\gamma$ -GTP(国立感染症研究所・柴山博士より供与)あるいは抗 $\gamma$ -GTP 抗体(AGT3)をマイクロピペットにて 2 $\mu$ l ずつ 10 分毎に 1 時間にわたって投与し、歯肉溝からの $\gamma$ -GTP の浸透を図った。500 $\mu$ g/ml の抗 $\gamma$ -GTP 抗体(AGT3)についても同様の方法で歯肉溝より前投与した。*E. Coli*-LPS の投与は、5mg/ml 濃度の 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時間静置することで行った。

#### 2) 病理学的観察

それぞれの因子の投与開始から3時間後と3日後に顎組織を摘出し材料とした。材料はPLP固定液で8時間(4 $^{\circ}$ C)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 $\mu$ m 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) RT-PCR

骨吸収関連サイトカインの mRNA 発現を検討するため、未処置、 $\gamma$ -GTP 投与 3 時間、1、2 日目の歯肉組織、マウスセメント芽細胞(OCCM-30)及び骨芽細胞系細胞(MC3T3-E1, ST2)を $\gamma$ -GTP(100ng/ml)、LPS(100 ng/ml)単独存在下あるいは同時存在下で培養した後、通常法に従って total RNA を抽出し、RT-PCR 法にて解析を行った。

### **骨吸収亢進と尿 $\gamma$ -GTP 値の関連性に関する研究**

#### 1) 試薬

骨吸収抑制薬アレンドロネートは帝人ファーマから購入した。破骨細胞誘導因子 M-CSF は、森永乳業株式会社より供与を受けた。

#### 2) マウス

Cre-loxP システムを利用した $\gamma$ -GTP 過剰発現マウスを作製した。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 $\gamma$ -GTP cDNA を挿入した DNA コンストラクト(以下 floxed GFP/ $\gamma$ -GTP)を作製した。floxed GFP/ $\gamma$ -GTP を、全身で Cre を発現する CAG-Cre マウスと交配し、CAG- $\gamma$ -GTP マウスを作出した。

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。また、*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。

### 3) 骨疾患モデルマウスでの試薬投与

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。

6 週齢の *op/op* マウスに、5 $\mu$ g/kg の M-CSF を一日 2 回、3 日間連続して腹腔投与した。

### 4) 尿検体

上記処置を施したマウス尿は代謝ケージを用いて 24 時間尿を採取した。

ヒト尿検体については住民検診ボランティア 551 名 (女性、平均年齢 55 歳) から採取した。

### 5) $\gamma$ -GTP と DPD の測定

尿検体を用い、 $\gamma$ -GTP 値、デオキシピリジノリン (DPD) 濃度およびクレアチニン値の測定を行った。

$\gamma$ -GTP 活性はダイヤオート  $\gamma$ -GTP 試薬を用い、自動分析装置 (モデル AU5232, オリンパス社) で測定した。DPD 濃度は ELISA 法により測定した。 $\gamma$ -GTP 値と DPD 濃度はクレアチニン値で補正した後、統計解析を行った。

また、尿検体を 17,000G で低速遠心した後、上清と沈降物に分画し、前者はさらに 200,000G で超遠心し、上清と沈降物に分取し、それぞれの分画の  $\gamma$ -GTP 活性を測定した。

### 6) 骨吸収の評価

骨吸収の状態を把握するため、骨内部の微細骨梁構造はマイクロ CT-40 (ス

イス、Scanco 社) を用い、約 10 $\mu$  の空間解像度で解析を行った (長崎大学・伊東昌子助教授の好意による)。TRAP 染色は、脛骨を脱灰後、定法に従って組織標本を作製し、行った。

## C. 研究結果

### 抗 $\gamma$ -GTP 抗体の関節破壊抑制効果に関する研究

CIA マウスの炎症関節では  $\gamma$ -GTP mRNA の発現上昇を認める。この結果に基づき、初年度は免疫組織化学的検討を行った。その結果、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  $\gamma$ -GTP 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 D<sub>3</sub> 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が、この系に抗  $\gamma$ -GTP 抗体を添加すると TRAP 陽性細胞の形成が抑制された。

上記結果をもとに、2 年目には、ヒト  $\gamma$ -GTP に対するモノクローナル抗体の作製を行った。2 種類の抗体 (AGT1、AGT3) で培養系による  $\gamma$ -GTP 依存性の破骨細胞誘導活性に対する抑制効果がみられた。そこで、CIA マウスに AGT1 および AGT3 の抗体を投与し、関節炎組織の病理学的検討を行った結果、AGT3 群では、パニ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、未処置群あるいはマウス正常 IgG 投与群の炎症細胞の集積する部位では、隣接する骨表面に多数の大型の

破骨細胞が観察されたのに対し、AGT3 投与群では破骨細胞が小型で、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(図 1)。

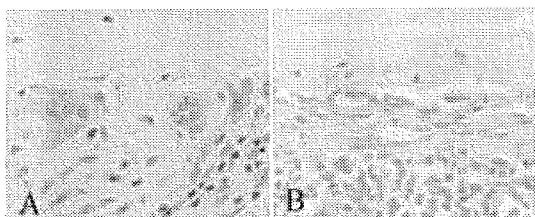


図 1. CIA マウスの骨吸収像。未処置群やマウス正常 IgG 投与では破骨細胞の変化は見られないが、抗 $\gamma$ -GTP 抗体投与群では破骨細胞が小型化し、骨破壊も緩和されている。

一方、初年度には $\gamma$ -GTP による破骨細胞誘導メカニズムの解析について検討を行った。ST2 細胞を $\gamma$ -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 $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 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/骨髄細胞の共存培養系を $\gamma$ -GTP で 12 時間刺激し、MIP-1、IL-1 $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ の mRNA 発現を調べた結果、IL-1 $\alpha$ 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 $\beta$ と MIP-1 の mRNA が顕著に上昇していた。

### $\gamma$ -GTP の破骨細胞誘導活性部位の特定に関する研究

ラット腎 $\gamma$ -GTP および組換えヒト $\gamma$ -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。

### 破骨細胞分化に関する研究

初年度の研究において、M-CSF 存在下で TLR4のリガンドである LPS で骨髄細胞を刺激すると破骨細胞分化が誘導されることが示された。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、*Tal1*<sup>-/-</sup> 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。

2 年目には、未分化 ES 細胞を用いた分化誘導培養系による検討を行った。この系からアスコルビン酸を除くと、破骨細胞はほとんど誘導されなかった。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。

### γ-GTPによる歯槽骨破壊に関する研究

炎症組織におけるγ-GTP発現が示されたことから、初年度はin vivoにおけるγ-GTPの骨破壊に及ぼす影響を確認する目的で、ラット歯肉溝からヒトγ-GTPの投与を行い、歯槽骨破壊について検討した。投与から3時間後、深部歯周組織の歯根膜側歯槽骨骨縁に沿って多数の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、歯根膜側歯槽骨骨縁に再び活性化された破骨細胞が多数観察された(図2)。

γ-GTP投与後の歯肉組織の変化を遺伝子レベルで検討したところ、TNF-αおよびIL-1βのmRNA発現の上昇が示された。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、IL-1β mRNA発現は2日、3日後と経時的に増加した。

次に、抗γ-GTP抗体の骨破壊抑制効果を調べた。抗体前投与は、γ-GTP局

所投与による破骨細胞数の増加を有意に抑制した。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。

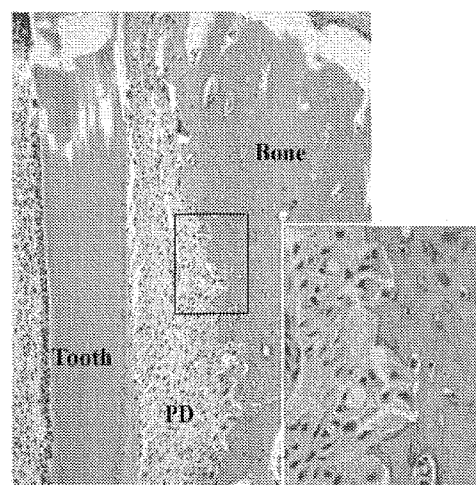


図2. rhy-GTPを歯茎から投与すると歯槽骨表面に破骨細胞が出現して、顎骨吸収を亢進させる。PD:歯根膜

2年目の研究では、歯周組織を構成するセメント芽細胞と骨芽細胞に及ぼすγ-GTPの影響についてin vitroによる検討を行った。その結果、セメント芽細胞(OCCM-30)、骨芽細胞(MC3T3-E1)のいずれにおいてもγ-GTPの刺激によってTNF-α、IL-1βのmRNA発現上昇が示された。また、骨芽細胞ではRANKL mRNAの発現上昇とOPG mRNAの発現低下が示された。歯周炎では歯周病原菌の産生するLPSが歯槽骨破壊に寄与する。そこで、上記細胞培養系に対し

LPS と $\gamma$ -GTP の同時添加を行ったところ、TNF- $\alpha$ およびRANKL mRNA の発現は、それぞれの単独刺激の効果よりやや増強する傾向が示された。

昨年の研究成果によって、歯周病菌が $\gamma$ -GTP を産生することが示されたことから、遺伝子組換え技術を用い、 $\gamma$ -GTP 遺伝子配列が明らかになっている細菌の遺伝子組換え $\gamma$ -GTP を精製し、ラット歯肉溝に投与した。その結果、細菌 $\gamma$ -GTP はヒト $\gamma$ -GTP よりも強い歯槽骨破壊を示すほか、歯根吸収にも影響を及ぼすことが明らかになった(図 3)。

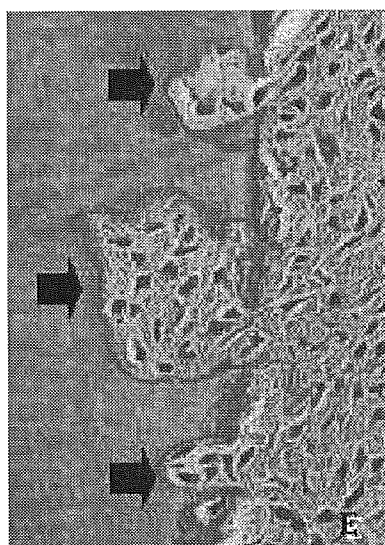


図3. 細菌 $\gamma$ -GTP 投与による歯根吸収.

### 骨吸収亢進と尿 $\gamma$ -GTP 値の関連性に関する研究

平均年齢55歳の女性551名について尿 DPD および尿 $\gamma$ -GTP の測定を行い、それらの値を尿クレアチニン値で補正した後、比較検討を行った。

その結果、尿 $\gamma$ -GTP 値は DPD 値と良好な相関を示した。検査精度や既存検査との比較をする際に用いられる統計解析法のひとつである ROC (受診者動作特性) 曲線を、DPD 値(カットオフ値 7.6) を基準にした感度を Y 軸、偽陽性率を X 軸として、便宜的に作図した。この曲線から、 $\gamma$ -GTP 値が40-45IU/L で 92% 以上の特異度が得られ、カットオフ値は 45 付近が妥当と推測された(図 4)。すなわち、この値より高い場合、DPD 値が基準より高いことが予測され、骨吸収亢進が示唆される結果が得られた。

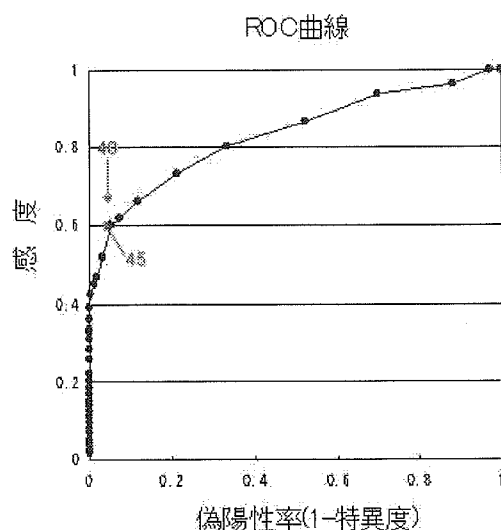


図4. DPD 値を基準としたときの ROC 曲線.

次に、尿 $\gamma$ -GTP が骨吸収と連動していることを骨代謝疾患モデルマウスを用いて検証した。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 $\gamma$ -GTP 活性には差がなかったが、尿中 $\gamma$ -GTP 活性が有意に上

昇し、DPDと同じ動態を示した。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 DPD 排泄とともに、クレアチニンで補正した尿中 $\gamma$ -GTP 排泄量も、コントロールレベルにまで低下した。

M-CSF 活性を欠損した 6 週齢の大理石骨病 *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、破骨細胞性骨吸収を人為的に惹起させると、尿中 DPD 排泄量が著明に上昇した。これらのマウスの骨マイクロ CT 画像と組織像では明らかに骨吸収亢進が確認された。これらの変化と並行して、クレアチニンで補正した $\gamma$ -GTP の尿中排泄量も著明に上昇した。

ヒト尿中の $\gamma$ -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

### 抗 $\gamma$ -GTP 抗体の関節破壊抑制効果

関節の損傷は患者個々人の ADL および QOL 低下に直接影響を及ぼす要因となる。今回我々は、関節炎で発現上昇がみられる $\gamma$ -GTP を標的とした抗 $\gamma$ -GTP 抗体製剤の作製を行い、関節炎モデルマウスでの骨破壊抑制効果について検討を行った。CIA マウスへの抗体

投与は炎症関節における滑膜増殖を抑制や破骨細胞性骨数の減少と活性低下がみられ、一定の効果が示された。このことは、関節炎でもっとも懸念される関節破壊に対する新規の抑制剤として本抗体が治療薬になりうることを示唆している。その一方で、今回作製した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が、 $\gamma$ -GTP が炎症性サイトカインの産生亢進に作用することが示されていることから、この作用を破骨細胞誘導活性と同時に中和する抗体の作製も理論上可能であると思われる。

本研究においては、 $\gamma$ -GTP は炎症滑膜におけるマクロファージやプラズマ細胞、血管内皮細胞から産生され、骨芽細胞/間質細胞や血球系細胞に作用して、IL-1 などのサイトカインメデイエーターの発現亢進や破骨細胞分化因子 RANKL の発現を誘導して破骨細胞分化を支持している可能性が示された。これらのことは、 $\gamma$ -GTP が炎症成立にも関与している可能性を示唆している。

より効果的な $\gamma$ -GTP アンタゴニストを得るために、 $\gamma$ -GTP の破骨細胞誘導活性部位の特定を試みた。2 年目の研究結果から、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。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と思われる。また、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の情報が必要と考えられる。今後、これらの課題が解決することで、より有効な $\gamma$ -GTP アンタゴニスト製剤開発のシリーズが提供されるものと期待された。

骨破壊が惹起される様な病的環境下では想定外の因子が意外な作用を及ぼす可能性もある。そこで、破骨細胞分化に関わる他の因子についても2年間にわたり実験的研究を行った。

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などの細菌成分が直接破骨細胞分化を誘導する可能性が示唆された。

*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。

る。

骨芽細胞に有効とされていたアスコルビン酸は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。破骨細胞の分化誘導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・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から、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われる。

### $\gamma$ -GTPは歯周炎における歯槽骨吸収のリスクとなる

病的骨破壊は歯周炎でも生じる。歯周炎患者の歯肉溝液からは正常状態の歯肉溝液より高い $\gamma$ -GTPが検出される。初年度は、 $\gamma$ -GTPの生体での骨吸収活性を観察する目的で、ラット歯肉溝から $\gamma$ -GTP投与を行った。この投与で、歯槽骨表面で起こる破骨細胞増加は、投与後3時間と2~3日目にピークを有する2相性増加が示された。最初ピークは反応が早いことから、破骨細胞前駆細胞への直接的作用の可能性も考えられる。2相目のピークは、それに先駆けてTNF- $\alpha$ とIL-1 $\beta$ 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。前述した関節炎モデルマウスやリウマチ患者の結果も合わせて考えると、 $\gamma$ -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、骨破壊に影響することが考えられる。また、この実験系に対して行った抗 $\gamma$ -GTP 抗体の前処理は、 $\gamma$ -GTP による破骨細胞増加を有意に抑制したが、このことは、抗体治療薬の骨破壊に対しての有効性を示唆している。

2年目の研究では、 $\gamma$ -GTP の歯周組織の構成細胞(セメント芽細胞と骨芽細胞)への影響について検討を行い、 $\gamma$ -GTP がこれらの細胞からの IL-1 や TNF- $\alpha$ の産生亢進を惹起することが示され、骨髄細胞の系と同様、RANKL 誘導を支持する因子群の産生が $\gamma$ -GTP 依存性の破骨細胞形成に関わることが改めて示された。

興味深いことに、歯周炎原因菌が $\gamma$ -GTP を産生することを見出した。歯周炎における $\gamma$ -GTP のソースは炎症組織内の細胞のみではないことが示された。そこで、遺伝子組換え型細菌 $\gamma$ -GTP を調整し、ラット歯肉溝から投与した結果、 $\gamma$ -GTP 同様に破骨細胞性歯槽骨破壊が惹起されたことから、歯周病原菌群が産生する $\gamma$ -GTP は新規の歯槽骨破壊因子であることが示された。

### 尿中 $\gamma$ -GTP の骨吸収マーカーとしての有効性

住民検診による調査結果から、尿 $\gamma$ -GTP 値が既存の骨吸収マーカーDPDと比較的良好な相関を示すことは、マ-

ーカーとして一定の評価を与えられるのではないかと思われる。このことは動物を用いた実験からも支持された。

初年度の研究で、 $\gamma$ -GTP を産生するトランスジェニックマウスが骨吸収亢進を示し、尿中 $\gamma$ -GTP 排泄も増加していたことから、 $\gamma$ -GTP と骨吸収亢進との関連性が示唆される。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について検討を行った。

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て検討を行った。このマウスでは、対照群と比較して、尿中 $\gamma$ -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、DPD とともに尿中 $\gamma$ -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することができた。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 $\gamma$ -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 $\gamma$ -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 $\gamma$ -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 $\gamma$ -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 $\gamma$ -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)  $\gamma$ -GTP は関節炎による関節破壊抑制治療の効果的な標的となることが示唆された。
- 2)  $\gamma$ -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) 細菌の産生する $\gamma$ -GTP もまた、骨吸収を亢進させることから、細菌 $\gamma$ -GTP は歯周炎による歯槽骨破壊因子である可能性が高い。
- 4) 尿中 $\gamma$ -GTP 排泄量は生体内の骨吸収活性を反映し、骨吸収マーカーとして利用可能である。
- 5) ヒト尿 $\gamma$ -GTP 検査のカットオフ値は 40~45IU/L が適当であった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

書籍・総説

1. Yamane T, Okuyama H, Tsuneto M,

Hemmi H, Yamazaki H, Hayashi SI: Osteoclast Lineage. *In: Handbook of Stem Cells Vol.1, Embryonic Stem Cells.* (編集) Lanza RP, Gearhart JD, Hogan BLM, McKay RD, Melton DA, Pedersen R, Thomson JA, West MD, Academic Press, San Diego CA, 2004, pp.295-303.

2. Yoshino M, Yamazaki H, Hayashi SI: Migration of dendritic cells determines divergent immune responses. *In: Recent Research Development in Biophysics and Biochemistry Part I.* (編集) Fagan J, Shimizu N, Davidson JN, Research Signpost, India, 2004, pp29-48.
3. 新飯田俊平:  $\gamma$ -グルタミルトランスペプチターゼ( $\gamma$ -GTP/GGT)の骨吸収亢進作用 THE LUNG perspectives, 13(1), 70-74, 2005.
4. Niida S: Osteoclast-forming Activity of Vascular Endothelial Growth Factor. *J Oral Biosci*, 47(2), 105-114, 2005.

原著論文

2004 年

1. Niida S, Kawahara M, Ishizuka Y, Ikeda Y, Kondo T, Hibi T, Suzuki Y, Ikeda K, Taniguchi N: Gamma-glutamyltranspeptidase stimulates receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression independent of its enzymatic activity and serves as a pathological bone-resorbing



- factor. **J Biol Chem**, 279(7), 5752-5756, 2004.
2. 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. **J Bone Miner Res**, 19(2), 200-206, 2004.
  3. Nakano Y, Niida S, Dote K, Takenaka S, Hirao H, Miura F, Ishida M, Shingu T, Sueda T, Yoshizumi M, Chayama K: Matrix metalloproteinase-9 contributes to human atrial remodeling during atrial fibrillation. **J Am Coll Cardiol**, 43(5), 808-825, 2004.
  4. 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. **Arch Oral Biol**, 49(9), 739-746, 2004.
  5. Ohara M, Hayashi T, Kusunoki Y, Miyauchi M, Takata T, Sugai M: Caspase-2 and caspase-7 are involved in cytolethal distending toxin-induced apoptosis in Jurkat and MOLT-4 T-cell lines. **Infect Immun**, 72(2), 871-879, 2004.
  6. 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. **Histochem Cell Biol**, 121(4), 291-297, 2004.
  7. 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(9), 1281-1287, 2004.
  8. 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(6), 2721-2729, 2004.
  9. Kondo T, Ikeda K, Matsuo K: Detection of osteoclastic cell-cell fusion through retroviral vector packaging. **Bone**, 35(5), 1120-1126, 2004.
- 2005 年**
10. Niida S, Kondo T, Hiratsuka S, Hayashi SI, Amizuka N, Noda T, Ikeda K, Shibuya M: VEGF receptor 1 signaling is essential for osteoclast development and bone marrow formation in colony-stimulating factor 1-deficient mice. **Proc Natl Acad**

- Sci USA**, 102(39), 14016-14021, 2005
11. 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(1), 134-143, 2005.
  12. Ito M, Ikeda K, Nishiguchi M, Shindo H, Uetani M, Hosoi T, Orimo H: Multi-detector row CT imaging of vertebral microstructure for evaluation of fracture risk. **J Bone Miner Res**, 20(10), 1828-1836, 2005
  13. 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(4), 497-503, 2005
  14. Hishiya A, Ikeda K, Watanabe K: A RANKL-inducible gene Znf216 in osteoclast differentiation. **J Recept Signal Transduct Res**, 25(3), 199-216, 2005.
  15. Cheng G, Ikeda Y, Iuchi Y, Fujii J: Detection of S-glutathionylated proteins by glutathione S-transferase overlay. **Arch Biochem Biophys**, 435(1), 42-49, 2005.
  16. Otsu K, Sato K, Ikeda Y, Imai H, Nakagawa Y, Ohba Y, Fujii J: An abortive apoptotic pathway induced by singlet oxygen is due to the suppression of caspase activation. **Biochem J**, 389(1), 197-206, 2005.
  17. 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(7), 697-705, 2005.
  18. Wang X, Inoue S, Gu J, Miyoshi E, Noda K, Li W, Mizuno-Horikawa Y, Ikeda Y, et al: Dysregulation of TGF-beta1 receptor activation leads to abnormal lung development and emphysema-like phenotype in core fucose-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, 102(44), 15791-15796, 2005.
  19. Tsuneto M, Yamazaki H, Yoshino M, Yamada T, Hayashi SI: Ascorbic acid promotes osteoclastogenesis from embryonic stem cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 335(4), 1239-1246, 2005
  20. Yamazaki H, Sakata E, Yamane T, Yanagisawa A, Abe K, Yamamura K, 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(5), 549-558, 2005.
  21. 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(4), 288-297, 2005.

22. Kitagawa M, Kitagawa S, Kudo Y, Ogawa I, Miyauchi M, Tahara H, Ide T, Takata T: Establishment of cementoblast cell lines from rat cementum lining cells by transfection with temperature-sensitive simian virus-40 T-antigen gene. **Bone**, 37(2), 220-226, 2005.
23. Tanaka E, Aoyama J, Miyauchi M, Takata T, et al: Vascular endothelial growth factor plays an important autocrine/paracrine role in the progression of osteoarthritis. **Histochem Cell Biol**, 123(3), 275-281, 2005.

#### 2006年

24. 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(2), 528-535, 2006
25. 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(3), 554-564, 2006
26. Kaneda T, Miyauchi M, Takekoshi T,

Kitagawa S, Kitagawa M, Shiba H, Kurihara H, Takata T: Characteristics of periodontal ligament subpopulations obtained by sequential enzymatic digestion of rat molar periodontal ligament. **Bone**, 38, 420-426, 2006.

27. Hanaoka K, Tanaka E, Takata T, Miyauchi M, et al: Platelet-derived Growth Factor Enhances Proliferation and Matrix Synthesis of Temporomandibular Joint Disc-derived Cells. **Angle Orthod**, 76(3), 486-492, 2006.

## 2. 学会発表

### 2004年

1. 経遠智一, 山崎英俊, 吉野三也, 林 眞二: 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
2. 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 回春季日本歯周病学会学術大会(鹿児島), 2004.5.21-22
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), 2004.6
4. 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(名古屋), 2004.6.6
  5. 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
  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), 2004.8.25
  7. 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:  $\gamma$ -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
  8. 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.
  9. 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
  10. 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:  $\gamma$ -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
  11. 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 回歯科基礎医学学会学術大会(広島), 2004.9.23-25
  12. 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), 2004.10.1
  13. 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.), 2004.10.4
  14. 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:  $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼは歯槽骨破壊のリスクファクターである(1).  $\gamma$ -GTP 局所投与によるラット辺縁歯周組織の変化。第 47 回秋季日本歯周病学会学術大会(仙台), 2004.10.15