

論文内容要旨

Development of novel peptide drug against bone
destructive diseases

(骨破壊性病変に対する新規ペプチド薬の開発)

主指導教員：谷本 幸太郎教授

(医歯薬保健学研究科 歯科矯正学)

副指導教員：宿南 知佐教授

(医歯薬保健学研究科 生体分子機能学)

副指導教員：加来 真人講師

(広島大学病院 歯科矯正科)

山田 桜

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

歯周炎や関節リウマチなどの骨破壊性病変では、炎症局所に破骨細胞が出現し高度な骨破壊が生じ、歯の脱落や関節の変形が起こり、QOLの著しい低下をきたす。近年、この骨破壊性病変に対し、原因除去療法、サイトカイン療法等様々な治療法が提案され、一定の効果が得られているが、いまだ安全で効果的な骨吸収抑制剤はない。鉄結合性ミルクタンパク質であるラクトフェリン(LF)は母乳、特に初乳に高濃度に含まれており、抗菌作用、免疫賦活作用、抗炎症作用、抗腫瘍作用などの多彩な機能を有する。共同研究を行っている研究室におけるこれまで検討の結果、ウシラクトフェリン (bLF) が TRAF6 と結合することで、NF- κ B と MAPK 経路の活性化を阻害し、LPS の誘導する炎症性サイトカインの産生や破骨細胞形成を強く抑制することが報告されている。また、プロテアーゼにより分解された LF フラグメントから TRAF6 に結合する異なるフラグメントの配列を質量分析により決定し、各フラグメントの配列解析の結果から、共通する配列を LF の TRAF6 結合部位として同定している。そこで本研究では、これらの LF 結合部位の合成ペプチド (bLF-p1-p3) の抗炎症作用や破骨細胞形成阻害作用を検討することによって、bLF 合成ペプチドが歯周病などの骨破壊性病変に対する有効なペプチド医薬になるかどうかを検討した。

1. LPS の誘導する炎症性サイトカイン産生や破骨細胞形成に対するペプチドの影響に関する *in vitro* での検討

1) 炎症性サイトカインに対する影響

PMA 処理ヒトマクロファージ細胞 (THP-1) およびマウス骨芽細胞 (ST2) を用い、*E.coli*-LPS 誘導炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-1 β , IL-6)発現に及ぼす bLF および各ペプチドの効果を調べた。bLF および bLF-p2, bLF-p3 の前処理 (4 時間) は LPS の誘導する mRNA 発現および培養液中のサイトカイン分泌量を有意に抑制したが、bLF-p1 は抑制効果を示さなかった。よって、以後の検討には bLF-p2 と bLF-p3 を用いることとした。

2) 骨芽細胞を介した破骨細胞形成に対する影響

1)と同様に ST2 細胞を *E.coli*-LPS で刺激すると破骨細胞形成関連因子である RANKL 発現が上昇し、OPG 発現は抑制される。bLF-p2 と bLF-p3 は bLF と同様に LPS の誘導する RANKL 発現を抑制し、OPG 発現を回復させた。実際に、マウス骨髄由来細胞と ST2 の共培養への bLF、bLF-p2 と bLF-p3 添加は破骨細胞形成を抑制することを確認した。さらに、その分子メカニズムとして、bLF-p2 と bLF-p3 が LPS による JNK、p38、p65 のリン酸化を阻害することをウェスタンブロットで確認した。また FITC 標識ペプチドを用いた免疫沈降実験にて、ペプチドが細胞内に移行し TRAF6 と結合していることを明らかにした。よって、細胞内に取込まれた bLF ペプチドは、TRAF6 と結合し NF- κ B ならびに MAPK 経路の活性化を阻害することで、骨芽細胞を介した破骨細胞形成を抑制することが示唆された。

3) 破骨細胞に対する影響

破骨細胞前駆細胞 (RAWD)への bLF-p2 と bLF-p3 の添加は、RANKL の誘導する破骨細胞数を優位に減少させた。bLF-p2 と bLF-p3 は破骨細胞分化マーカーである OSCAR, cathepsinK、

TRAF6、NFATc1 の発現を抑制した。さらに、RAW264.7 細胞においてもペプチドと TRAF6 との結合を免疫沈降にて確認した。よって、ペプチドは RANKL-RANK 経路の TRAF6 に結合することで、その活性化を抑制し、破骨細胞の形成・分化を抑制すると考えられた。

2. LPS 誘導性歯周病モデルを用いた炎症性サイトカイン産生や破骨細胞形成に対するペプチドの影響に関する検討

1) 歯周炎モデルの作成

ラット上顎臼歯口蓋側の歯肉縁上に LPS を浸漬した綿栓を 1 時間静置することにより、口蓋側歯周組織に炎症性変化とそれに伴う骨吸収を誘導した (LPS 群)。一方、ペプチド群では LPS 添加前に合成ペプチドを歯肉溝より 2mg/ml 添加した。

2) 歯周組織の組織学的ならびに免疫組織化学的評価

LPS 群では組織学的に歯槽骨歯根膜面の骨吸収像が見られた。また、TNF- α , RANKL, OPG 及び cathepsinK の免疫局在を観察したところ、LPS 群では TNF α , RANKL 発現が上昇し、OPG 発現が減少したが、bLF-p2 と bLF-p3 投与は TNF α , RANKL 発現上昇を抑制し、OPG 発現の低下を回復した。さらに cathepsinK 陽性破骨細胞数を計測したところ、bLF-p2 と bLF-p3 投与は前破骨細胞/破骨細胞数を優位に抑制した。

3) 歯肉組織中のサイトカイン mRNA 発現の検討

LPS 投与 2 日後の歯肉組織において、bLF-p2 と bLF-p3 は TNF- α mRNA 量を有意に抑制し、IL-1 β 、IL-6 も抑制する傾向を示した。

以上のように、新規ペプチド (bLF-p2 と bLF-p3) は LPS の誘導する炎症ならびに破骨細胞形成を抑制した。その分子メカニズムとして細胞内に取込まれたペプチドが TRAF6 に結合し、下流のシグナル伝達系を阻害することで炎症性サイトカイン産生や破骨細胞形成を抑制することを明らかにした。よって、これらの新規ペプチドが骨破壊性病変に対する有効なペプチド医薬になる可能性が示された。