

## 研究者：上原 智己

(所属：東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 小児歯科学分野)

## 研究題目：RANKL 結合ペプチドを用いた顎裂部における骨再生の検討

### 目的：

日本人の 500 人に 1 人という高頻度の割合で発生する先天異常である口唇口蓋裂では、顎裂を併発している場合が多い。そして、その顎裂部の骨欠損を補填する治療として一般に行われている顎裂部骨移植術は、患児腸骨からの自家骨移植を主体としているため侵襲性が高く、採取できる骨の量にも限りがある。現在、局所の骨形成を誘導できるタンパクとして、BMP-2 (bone morphogenetic protein) があげられる。すでに歯科領域だけでなく、整形外科領域でも臨床応用され、多くの報告がなされている。ところがリコンビナントタンパクであるため、精製に費用がかかり、高価であるにも関わらず大量に使用しなければならない点や炎症惹起が必ず起こる点などが問題点としてあげられている。このため、BMP-2 の量を抑えても、同様の骨形成活性を持つ物質の開発が行われてきた。その中でも、我々は RANKL (骨芽細胞に発現する膜貫通タンパク) に結合するペプチドに注目した。すでに我々は、マウスを用いた動物実験において、BMP-2 に RANKL 結合ペプチドを加えると BMP-2 の単独作用に比べて大きな骨造成が認められ得ることを見出している。近年、直径 20  $\mu\text{m}$  の微細なゼラチンハイドロゲルを担体として、注射投与による低侵襲な新規骨造成法を開発した。本研究では、その RANKL 結合ペプチドの 1 つである WP9QY ペプチド (W9 ペプチド) を用い、RANKL 結合ペプチド刺激によりいかにして骨形成シグナルが骨芽細胞に入るのかを詳細に検討する。同様に RANKL に結合する osteoprotegerin ではシグナルが入らない理由を解明することにより、W9 ペプチドより骨形成促進作用の優れた新規骨形成促進薬開発に向けた基礎的研究基盤を構築することを目的とする。

### 対象および方法：

#### 対象：

C57BL6J (野生型マウス) 10 匹および RANKL 点変異マウス (P29A 点変異マウス) 10 匹の頭蓋骨から単離した初代骨芽細胞

#### 方法：

上記初代骨芽細胞に RANKL 結合ペプチドを刺激させ、生化学的・視覚的に膜 RANKL 量が增加するかを定量化した。実際に RANKL 結合ペプチドで刺激させたとき、骨芽細胞膜上の RANKL が本当に増加しているか、また挙動や集積状態、シグナル効率などを明らかにした。

#### ① RANKL 結合ペプチド刺激による RANKL 逆シグナルの活性化が、P29A の点変異により減弱することを検討した実験

P29A 点変異マウスは野生型に比べて、骨量が少なく骨形成作用が抑制されていることが分かっている。P29A 点変異マウスから単離した初代骨芽細胞を用いて、活性化指標である mTORC1 標的分子 S6K1 のリン酸化レベルを Western blot 法により比較検討した。また、

S6K1 のリン酸化亢進により骨形成関連遺伝子である Runx2, Colla1, Alp の発現も亢進することが知られている。そこで、骨芽細胞分化促進作用や mTORC1 の活性化が RANKL 点変異マウス由来の骨芽細胞では、抑えられているか否かを検討した。

② RANKL 結合ペプチド刺激による膜 RANKL の挙動・集積状態のイメージング

初代骨芽細胞に対して、細胞核を H2BmCherry (赤) に、RANKL を GFP-RANKL (緑) に作用させ、48 時間のトランスフェクションを行った。その後共焦点レーザー顕微鏡を用いて、30 分毎に 2 回の撮影を行ってから RANKL 結合ペプチドを添加し、15 分毎の膜上 RANKL の挙動・集積状態のタイムラプスを撮影した。撮影開始時から 50 時間までの観察を行った。

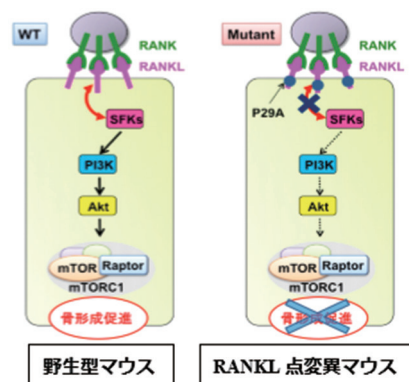


図1 骨芽細胞内でのリン酸化シグナル (P29A 点変異マウスでは骨形成作用が抑制される)

結果および考察：

① RANKL 結合ペプチド刺激による RANKL 逆シグナルの活性化が、P29A の点変異により減弱することを検討した実験

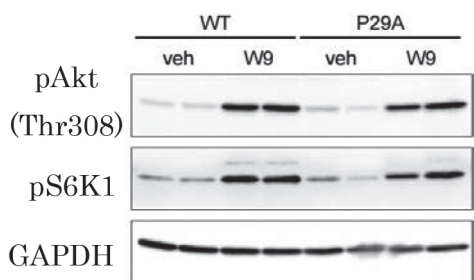


図2 野生型および P29A 点変異マウスより採取した初代骨芽細胞でのシグナル分子のリン酸化の検出

野生型と P29A ではわずかに P29A の方がシグナル活性が減弱していた。考えられる理由としては、刺激濃度が濃い影響か、あるいはビオチン化 W9 では RANKL 以外の経路でもシグナル経路の活性化を起こす可能性が考えられた。

② RANKL 結合ペプチド刺激による膜 RANKL の挙動・集積状態のイメージング

図 3-5 の結果より、RANKL 結合ペプチド (W9 ペプチド) 刺激により、膜 RANKL の活性化

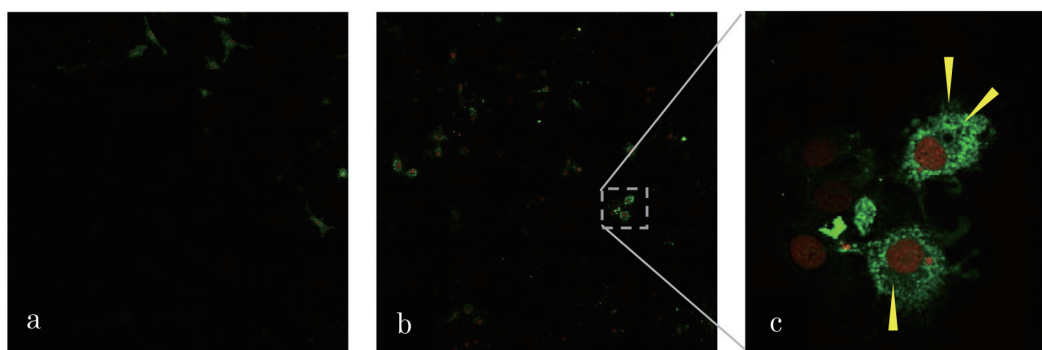


図3 a. RANKL 結合ペプチド刺激前 b. 50 時間後 c. b. 拡大像 細胞膜に GFP-RANKL の集積を認めた。(黄矢印)

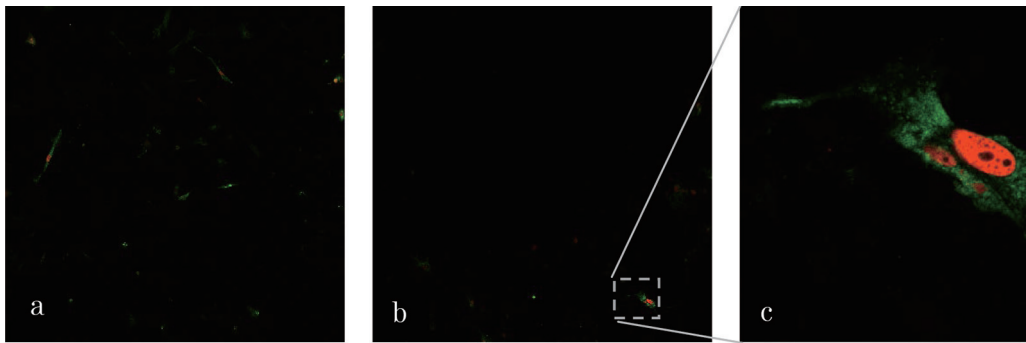


図4 a. RANKL 結合ペプチド無刺激 b. 50 時間後 c. b 拡大像  
細胞膜に GFP-RANKL の発現が認められたものの、RANKL の分布は均一であり、RANKL の集積を認めなかった。

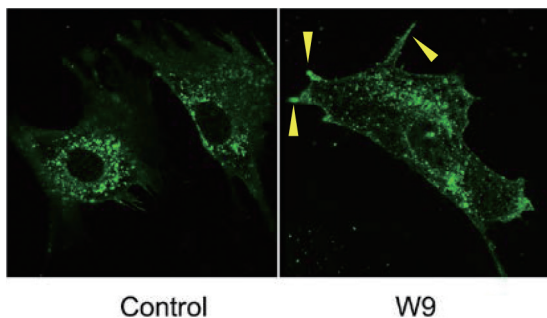


図5 RANKL 結合ペプチド無刺激 (Control) では膜周囲の輪郭が曖昧であったが、RANKL 結合ペプチド (W9) 刺激では膜周囲に RANKL の凝集を認め、輪郭が明瞭となっていた。

および集積を観察することができた。この結果は骨芽細胞上の RANKL が増加していることを示し、膜 RANKL の活性化および集積状態を解析することで、骨形成活性が最も高い時の膜 RANKL の状態を見出すことにつながる。

上記実験により、mTORC1 標的分子 S6K1, Akt のリン酸化が認められ、RANKL 逆シグナルが活性化されていることが判明した。イメージングにおいては、RANKL の数の増加はイメージング可能であったものの、1 分子ごとの挙動までは解析できなかったため、さらなる工夫をして解析する必要がある。

今後はさらに解析を進め、膜 RANKL の挙動についての解析を行い、また原子間力顕微鏡を用いて、膜上の RANKL の挙動や数を定量化していく予定である。この解析により、将来の骨形成促進剤開発の足掛けとすることを検討している。

**成果発表：**(予定を含めて口頭発表, 学術雑誌など)

第 59 回 歯科基礎医学会学術大会 発表予定 (2017 年)