

ヒト破骨細胞の分化に対する  
W9ペプチドの抑制作用

米田 紘一

大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座  
(主指導教員：宇田川信之教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士(歯学)学位申請論文

Inhibitory effect of W9 peptide in human osteoclast differentiation

Koichi Komeda

Department of Hard Tissue Reseach, Graduate School of Oral Medicine  
(Chief Acadmic Advisor : Professor Nobuyuki Udagawa)

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

## 要旨

破骨細胞は高度に石灰化した骨組織を破壊・吸収する唯一の細胞である。その起源は、生体に広く分布するマクロファージ系の細胞である。そして、骨組織は骨吸収と骨形成のバランスにより調節されている。それらのバランス調節は、互いにあたかも連絡を取り合っているかのようにみえるため、この現象は、骨代謝共役と呼ばれている。

アミノ酸9つから構成される W9 ペプチドは、TNF レセプター(TNFR1)と相同性を有し、TNF の作用(アポトーシスの誘導や炎症の惹起など)を抑制することが報告されている。また、W9 ペプチドは破骨細胞分化因子である RANKL と結合することにより、破骨細胞の分化を阻害し、卵巣摘出骨粗鬆症モデルにおける骨量減少を防止することがマウスを用いた実験で明らかにされた。さらに、最近になり、W9 ペプチドは、培養骨芽細胞における石灰化を強力に促進し、W9 ペプチドの投与は正常マウスにおける骨形成を促進し、骨量を増加させることが報告された。

そこで今回、ヒトの細胞培養系における W9 ペプチドの作用を検討することを目的に、ヒト破骨細胞分化誘導系とヒト樹状細胞分化誘導系における W9 ペプチドの効果を解析した。

健康人ボランティアから採取した末梢血から調製した単球を含む細胞画分を、破骨細胞分化因子である RANKL とマクロファージ刺激因子である M-CSF の存在下で 14 日間培養することにより TRAP 陽性ヒト多核細胞が形成された。この培養系に W9 ペプチドを添加することにより、RANKL と M-CSF により誘導される TRAP 陽性ヒト多核破骨細胞形成は濃度依存的に阻害された。一方、GM-CSF と IL-4 の存在下で 10 日間培養することにより誘導される TRAP 陰性のヒト多核樹状細胞の分化に対しては、W9 ペプチドは影響を与えなかった。

ヒト破骨細胞の分化に対して、W9 ペプチドは阻害作用が認められ、同じ単球を起源とする免疫担当細胞として重要な役割を果たす樹状細胞の分化には W9 ペプチドは効果を示さなかったことから、W9 の効果は骨吸収を担当する破骨細胞の分化に特異的であることが示された。

## 緒言

骨組織は、骨吸収と骨形成のバランスにより調節されている。それらのバランス調節は、互いにあたかも連絡を取り合っているかのようにみえるため、この現象は、骨代謝共役（カップリング）と呼ばれる<sup>1)</sup>。骨粗鬆症（オステオポロシス）はこの骨代謝共役が破綻し、骨吸収が骨形成を凌駕するために発症する。破骨細胞分化因子である RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand) が 1997 年に発見されて 10 年余経過した現在、骨粗鬆症患者や癌の骨転移による高カルシウム血症患者に対する RANKL 中和抗体（デノスマブ）が治療薬として臨床応用されたことは RANKL シグナルの解明の重要性を物語っている<sup>2,3,4)</sup>。

破骨細胞は高度に石灰化した骨組織を破壊・吸収する唯一の細胞である。その起源は、生体に広く分布するマクロファージ系の細胞である。破骨細胞とその前駆細胞は receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK) を発現し、骨芽細胞との細胞間接触を介して破骨細胞分化因子である RANKL を認識し、骨吸収活性を備えた成熟した破骨細胞に分化する<sup>5)</sup>。RANKL または RANK の遺伝子を欠損させたノックアウトマウスでは破骨細胞が全く認められず、重篤な大理石骨病を発症することから、RANKL-RANK シグナル系は破骨細胞の分化に必須であることが証明された<sup>2,3,4,5)</sup>。

さらに、RANKL のおとり受容体である Osteoprotegerin (OPG) をマウスに過剰発現させると、骨吸収が抑制された重篤な大理石骨病を呈する。また、Fos や Src などの癌遺伝子を欠損させたマウスにおいても、破骨細胞の分化または骨吸収機能に障害をきたし、骨吸収不全により骨形成が亢進する大理石骨病を呈することが報告されている。

一方、OPG の遺伝子欠損マウス (OPG<sup>-/-</sup>マウス) では、破骨細胞の形成が促進し骨吸収の亢進が認められ、重篤な骨粗鬆症を呈する<sup>6,7)</sup>。興味深いことに OPG<sup>-/-</sup>マウスは骨吸収のみならず、骨形成のマーカーである血清アルカリホスファターゼ (ALP) 活性が正常値の 4 倍も高い値を示し、組織学的にも骨形成の著しい亢進が認められた<sup>8)</sup>。

さらに、特発性高ホスファターゼ血症 (IH) の患者において、OPG 遺伝子の変異が発見された<sup>9,10)</sup>。この患者においては、OPG<sup>-/-</sup>マウスと同様、破骨細胞と同様骨芽細胞が著しく活性化しており、骨形成と骨吸収が活発に行われている組織所見が認められる。また、血清アルカリホスファターゼ活性 (骨形成マーカー) と尿中コラーゲン分解産物である N-テロペプチド量 (骨吸収マーカー) が共に高い値を示した<sup>9,10)</sup>。

欧米において骨粗鬆症に次いで患者数の多い骨疾患である骨パジェット病は、破骨細胞の機能異常により限局した骨吸収の亢進が生じ、続いて骨形成が促進する疾患として

知られているが、遺伝性若年性骨パジェット病 (FPDB) の原因としてOPG遺伝子の完全な欠損が報告された<sup>11, 12, 13, 14</sup>。このOPG欠損患者の血清中にはOPGは検知できないが、興味深いことに可溶性RANKLが高濃度で認められた。この実験結果は、高回転型の骨代謝病態に可溶性RANKLの血清レベルでの亢進が関与している可能性を示している。さらに、RANKが恒常的に活性化された遺伝的変異が家族性広汎性骨溶解症 (FEO) を惹起することが見出されたが、この疾患においても骨吸収と共に骨形成の亢進が認められている<sup>15, 16, 17</sup>。

骨吸収と骨形成が共に亢進している高回転型骨粗鬆症を呈するOPG<sup>-/-</sup>マウスに対して骨吸収阻害薬であるビスホスフォネートを投与することにより、骨吸収を強力に阻害した際に、骨形成マーカーがどのような挙動を示すかについて解析した結果が報告されている<sup>8)</sup>。実験は、骨粗鬆症の症状が著明となる14週齢雄のOPG<sup>-/-</sup>マウスを用いている。ビスホスフォネート(リセドロネート)を毎日皮下投与(0.01 mg/kg, 30日間)し、と殺前にカルセインとテトラサイクリンの2重標識を行った。

OPG<sup>-/-</sup>マウス大腿骨の骨組織においては、ビスホスフォネートの投与により過剰な骨吸収が抑制され成長板の形態回復が認められた。腰椎海綿骨においても同様な結果となった。腰椎皮質骨における骨形態計測の結果、OPG<sup>-/-</sup>マウスにおいて亢進している各種の骨吸収マーカー(破骨細胞面・吸収面・破骨細胞数)および骨形成マーカー(骨芽細胞面・類骨量・石灰化速度・骨形成速度)は共にビスホスフォネート投与によって完全に正常化された<sup>8)</sup>。また、腰椎骨量および骨梁数の回復も認められた。また、骨内膜面における2重標識面は、ビスホスフォネートの投与によって正常レベルにまで低下した。骨形成のマーカーである血清中のアルカリホスファターゼ活性は、正常値以下まで低下した。血清オステオカルシンレベルも、ビスホスフォネート投与により正常化した<sup>8)</sup>。以上の動物実験結果より、骨組織においては、骨吸収と骨形成の共役現象がアクティブに行われていることが明らかとなった。

そこで今回、骨吸収と骨形成の共役現象に関与する可能性が秘められているW9ペプチドに注目し、ヒトへの臨床応用を見据えて、ヒトの細胞培養系における効果を検討した。アミノ酸9つから構成されるW9ペプチドは、アミノ酸9つから構成される。W9ペプチドは、TNFレセプター(TNFR1)と相同性を有し、TNFの作用(アポトーシスの誘導や炎症の惹起など)を抑制することが報告されている<sup>18)</sup>。また、W9ペプチドはRANKLと結合することにより、破骨細胞の分化を阻害し、卵巣摘出骨粗鬆症モデルにおける骨量減少を防止することがマウスを用いた実験で明らかにされている<sup>19)</sup>。さらに、最近になり、W9ペプチドは、培養骨芽細胞における石灰化を強力に促進し、W9ペプチドの

投与は正常マウスにおける骨形成を促進し、骨量(皮質骨)を増加させることが報告された<sup>20)</sup>。以上の実験結果から、RANKLに結合するW9 ペプチドは、RANKシグナルを阻害することにより破骨細胞分化を抑制する（フォワードシグナル）と共に、W9 ペプチドは骨芽細胞表面のRANKLに結合し骨芽細胞分化を誘導する（リバースシグナル）可能性が考えられる（図 1）。

そこで本研究では、ヒト破骨細胞分化と破骨細胞と起源を同一とする樹状細胞の分化に対するW9 ペプチドの効果を解析した。

## 実験材料及び方法

### 1. ヒト末梢血単核細胞 (hPBMC) の調製

インフォームドコンセントを得た健康な男性ボランティアより末梢血を採取（ヘパリン採血）した。ヒト由来末梢血液材料を用いた本実験は、松本歯科大学研究等倫理審査委員会の承認を得ている（承認番号：0089）。

採取した末梢血をFicol-Paque液（Ficol Paque PLUS™, GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK）上に重層した後、遠心分離（1600 rpm, 15°C, 35分）を行った。遠心分離後、血漿とFicol-Paque液の間に分離したヒト末梢血単核細胞（hPBMC）層を回収した。回収したhPBMCsを遠心分離（1600 rpm, 15°C, 7分）3回洗い洗浄し、細胞数を計測した。この細胞画分には、単球およびリンパ球が含まれている。

### 2. ヒト破骨細胞の分化誘導系

hPBMCs ( $1.5 \times 10^5$  cells/well) を48wellプレートに播種し、M-CSF (50 ng/ml) とRANKL(200 ng/ml)を添加して、 $\alpha$ -MEM(10%FBSを含む)中で14日間培養した。培養液交換は3~4日毎に行った。また、W9ペプチド(25~100  $\mu$ M)を培地交換ごとに添加した。培養後、細胞を固定し、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色に供した。赤く染色されるTRAP陽性細胞のうち、3核以上の多核細胞を破骨細胞として計測した。

RANKL (Human soluble glutathione S-transferase (GST)-RANKL) およびW9ペプチド (分化誘導ペプチドW9) は、オリエンタル酵母工業株式会社 (東京) から購入した。M-CSF (Recombinant Human M-CSF, Leukoprol®) は、協和発酵工業株式会社 (東京) から購入した。FBS (ウシ胎仔血清) は、SAFC Biosciences (Lenexa, KS, USA) から購入した。 $\alpha$ -MEM ( $\alpha$ -minimal essential medium) 培地は、Sigma (St. Louis, MO, USA) から購入した。

### 3. ヒト樹状細胞の分化誘導系

hPBMCs ( $1.5 \times 10^5$  cells/well) を48wellプレートに播種し、GM-CSF (50 ng/ml) とIL-4 (50 ng/ml)を添加して、 $\alpha$ -MEM(10%FBSを含む)中で10日間培養した。培養液交換は3~4日毎に行った。また、W9ペプチド(50~200  $\mu$ M)を培地交換ごとに添加した。培養後、細胞を固定し、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色とヘマト

キシリン染色に供した。TRAP陰性の3核以上の多核細胞を樹状細胞として計測した。

GM-CSF (Recombinant Mouse GM-CSF) および IL-4 (Recombinant Mouse IL-4) は、R&D systems (Minneapolis, MN, USA) から購入した。

## 結果

健常人ボランティアから採取した末梢血由来の hPBMCs を RANKL と M-CSF の存在下で培養した。14 日間の培養後、赤く染色される TRAP 陽性の多核細胞が多数形成された (図 2)。

この培養系に W9 ペプチドを添加(25~100  $\mu$  M)することにより、RANKL と M-CSF により誘導される TRAP 陽性ヒト破骨細胞形成は、濃度依存的に阻害された (図 2)。この時、付着しているマクロファージ系の細胞は存在しており、W9 ペプチドの毒性は認められなかった。

TRAP 陽性多核細胞数を定量的に解析した結果、W9 ペプチド (100  $\mu$  M) 添加群では、完全に多核破骨細胞の形成が阻害された (図 3)。

次に、ヒト樹状細胞の分化に対する W9 ペプチドの効果を検討した。hPBMCs を GM-CSF と IL-4 の存在下で 10 日間培養することにより、TRAP には染まらない多核を呈する樹状細胞の形成が認められた (図 4)。TRAP 陽性の破骨細胞様細胞は出現しなかった。

W9 ペプチド(50~200  $\mu$  M)を GM-CSF と IL-4 の共存下で添加しても、樹状細胞の分化には影響を与えなかった (図 4, 5)。

ヒト破骨細胞の分化に対して、W9 ペプチドは阻害作用を示し、同じ単球を起源とする免疫担当細胞として重要な役割を果たす樹状細胞の分化には W9 ペプチドは効果を示さなかったことから、W9 の効果は骨吸収を担当する破骨細胞の分化に特異的であることが示された。



## 考察

ヒトの細胞培養系におけるW9 ペプチドの作用を検討することを目的に、ヒト破骨細胞分化誘導培養系とヒト樹状細胞分化誘導培養系におけるW9 ペプチドの効果を解析した。その結果、末梢血由来の単球を含む細胞画分を、破骨細胞分化因子であるRANKLとマクロファージ刺激因子であるM-CSFの存在下で14日間培養することによりTRAP陽性ヒト多核細胞が形成された。このヒト多核細胞は、象牙質切片上において吸収窩を形成する能力を有しており、破骨細胞の形質を有していることは、松崎らにより報告されている<sup>21)</sup>。

この培養系にW9 ペプチドを添加することにより、RANKLとM-CSFにより誘導されるTRAP陽性ヒト多核破骨細胞形成は濃度依存的に阻害された。この時、高濃度のW9 ペプチドを添加しても、破骨細胞前駆細胞に対してアポトーシスを誘導するような作用は認められなかった。また、成熟した破骨細胞の象牙質切片上における骨吸収活性や破骨細胞の生存・維持に対するW9 ペプチドの効果は検討しておらず、今後の課題である。

一方、GM-CSFとIL-4の存在下で10日間培養することにより誘導されるTRAP陰性のヒト多核樹状細胞の分化に対しては、W9 ペプチドは影響を与えなかった。樹状細胞は、抗原提示細胞として、Tリンパ球やBリンパ球を活性化する機能を具備している免疫細胞である。テトラサイクリン系抗菌剤（ミノサイクリン）は、マウスの培養系において破骨細胞の分化や成熟破骨細胞の骨吸収活性を阻害する一方、樹状細胞の分化を促進する実験結果が報告されている<sup>22)</sup>。免疫機能において重要な役割を果たしている樹状細胞は、ヒト癌患者に対する免疫療法においても「樹状細胞療法」として応用されている。W9 ペプチドがヒト樹状細胞の分化に対しては阻害効果を示さなかったことは臨床応用を考える上でも有用である。

今回の実験結果は、W9は破骨細胞の分化を誘導するRANKLに特異的に結合することにより破骨細胞分化を阻害し、GM-CSFやIL-4により分化誘導される樹状細胞の分化には作用しないものと考えられる。RANKLの受容体であるRANKの発現は、マクロファージ系の破骨細胞前駆細胞の初期の段階から成熟した多核破骨細胞において広いステージで認められる。したがって、RANKLの作用を阻害するW9ペプチドの作用は、破骨細胞分化のすべてのステージに作用を及ぼすものと考えられる。実際に、W9を培養14日間の初期3日間だけ処理したのもでも、破骨細胞形成は部分的に抑制された。また、W9以外にも、同様のアミノ酸配列を呈する様々なペプチドが合成されているが、今回の実験ではその効果を

検討しなかった。

マウスの骨髄細胞培養系におけるW9の効果が報告されている。RANKLとM-CSF存在下でW9を添加し7日間培養後、TRAP染色と骨芽細胞の分化を観察するためのアルカリホスファターゼ（ALP）染色を施したものである。その結果、W9ペプチドは、マウス骨髄細胞におけるRANKL誘導性の破骨細胞形成に対して抑制効果を示すと共に、ALP陽性の骨芽細胞の分化が著明に認められた。高濃度のW9（200  $\mu$ M）添加群において、TRAP陽性細胞は全く認められなくなったが、ALP陽性骨芽細胞からなるNodule形成が著明に認められた。以上の実験結果から、RANKLに結合するW9ペプチドは、RANKシグナルを阻害することにより破骨細胞分化を抑制すると同時に、骨芽細胞表面のRANKLに結合し骨芽細胞分化を誘導する可能性が考えられる<sup>20)</sup>（図1）。

しかしながら、マウスの培養系に示されているW9のリバースシグナルとしての骨芽細胞に対する分化促進効果について、今回の実験系では解析することが出来なかった。今回の培養は、ヒト由来の単球を用いた破骨細胞のみの分化を観察する培養系であり、骨芽細胞系の細胞が含まれていないので、W9の骨芽細胞の分化誘導を示す実験結果は得られなかった。今後、ヒト骨髄細胞を用いた実験を検討する必要がある。

ヒト破骨細胞の分化に対して、W9ペプチドは阻害作用が認められ、同じ単球を起源とする免疫担当細胞として重要な役割を果たす樹状細胞の分化にはW9ペプチドは効果を示さなかったことから、W9の効果は骨吸収を担当する破骨細胞の分化に特異的であることが示された。W9ペプチドのマウスへの全身投与実験の結果、皮質骨における骨密度を著明に増加させる結果を得ており<sup>20)</sup>、為害作用・副作用は認められないため、骨粗鬆症（オステオポロシス）などの骨代謝疾患治療薬として、ヒトへの臨床応用に対して十分可能性があると考えられる。また、癌患者の高カルシウム血症治療薬として投与されるビスホスフォネート製剤による顎骨壊死の副作用の解明に対してもW9ペプチドを用いた研究が寄与できる可能性がある。

現在、歯槽骨吸収が著明に認められるOPG遺伝子欠損マウス<sup>23)</sup>に対するW9ペプチドの投与実験が行われており、その結果に期待したい。さらに、将来的には、顎堤吸収の大きい患者に対して、W9を用いて局所的に顎骨を増生させ、インプラント埋入を可能にもすることなどの臨床応用を考えていきたい。今後、W9ペプチドのヒトへの臨床応用に向けて更なる基礎的研究が必要である。

## 結論

アミノ酸9つから構成される **W9** ペプチドは、ヒト破骨細胞の分化に対して強い阻害作用を示し、同じ単球を起源とする免疫担当細胞である樹状細胞の分化には抑制効果を認めなかった。

## 文献

- 1) Ott SM (2002) Histomorphometric analysis of bone remodeling. In Principles of bone biology, Second edition, Volume 1. ed by Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. New York, Academic press, p303-319
- 2) 高橋直之 (2012) 破骨細胞の分化メカニズム. 医学の歩み 242 : 649-654
- 3) 中村美どり, 宇田川信之 (2011) 骨粗鬆症と RANKL シグナル. Clinical Calcium 8 : 1149-1155
- 4) 上原俊介, 小林泰浩, 高橋直之, 宇田川信之. (2013) 骨形成・骨吸収における関連因子の働き Wnt5a 日本臨床 71 : 146-149
- 5) Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. Proc Natl Acad Sci USA 95 : 3597-3602
- 6) Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S ,Tarpley J ,Capparelli C ,Scully S , Tan HL ,Xu W ,Lacey DL ,Boyle WJ ,Simonet WS (1998) Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. Genes Dev 12 : 1260-1268
- 7) Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T, Sato Y, Nakagawa N, Yasuda H, Mochizuki S, Gomibuchi T, Yano K, Shima N, Washida N, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Ozawa H (1998) Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. Biochem Biophys Res Commun 247 : 610-615
- 8) Nakamura M, Udagawa N, Matsuura S, Mogi M, Nakamura H, Horiuchi H, Saito N, Hiraoka BY, Kobayashi Y, Takaoka K, Ozawa H, Miyazawa H, Takahashi N (2003) Osteoprotegerin regulates bone formation through a coupling mechanism with bone resorption. Endocrinology 144 : 5441-5449
- 9) Cundy T, Hegde M, Naot D, Chong B, King A, Wallace R, Mulley J, Love DR, Seidel J, Fawkner M, Banovic T, Callon KE, Grey AB, Reid IR, Middleton-Hardie CA, Cornish J (2002) A mutation in the gene TNFRSF11B encoding osteoprotegerin causes an idiopathic hyperphosphatasia phenotype. Hum Mol Genet 11 : 2119-2127
- 10) Chong B, Hegde M, Fawkner M, Simonet S, Cassinelli H, Coker M, Kanis J, Seidel J, Tau C, Tüysüz B, Yüksel B, Love D, International Hyperphosphatasia

- Collaborative Group (2003) Idiopathic hyperphosphatasia and TNFRSF11B mutations: relationships between phenotype and genotype. *J Bone Miner Res* 18 : 2095-2104
- 11) Whyte MP ,Obrecht SE ,Finnegan PM ,Jones JL ,Podgornik MN ,McAlister WH ,Mumm S (2002) Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. *N Engl J Med* 347 : 175-184
  - 12) Hardie C-Middleton ,Zhu Q ,Cundy H ,Lin JM ,Callon K ,Tong PC ,Xu J ,Grey A ,Cornish J ,Naot D (2006) Deletion of aspartate 182 in OPG causes Juvenile Paget's disease by impairing both protein secretion and binding to RANKL. *J Bone Miner Res* 21 : 438-445
  - 13) Whyte MP, Singhellakis PN, Petersen MB, Davies M, Totty WG, Mumm S (2007) Juvenile Paget's disease : the second reported, oldest patient is homozygous for the TNFRSF11B "Balkan" mutation(966\_969delTGACinsCTT), which elevates circulating immunoreactive osteoprotegerin levels. *J Bone Miner Res* 22 : 938-946
  - 14) Hughes AE ,Ralston SH ,Marken J ,Bell C ,MacPherson H ,Wallace RG ,van Hul W ,Whyte MP ,Nakatsuka K ,Hovy L ,Anderson DM (2000) Mutations in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis. *Nature Genetics* 24 : 45-48
  - 15) Palenzuela L ,Bauza C-Vives ,Cadenas I-ndezáFern ,Meseguer A ,Font N ,Sarret E ,Schwartz S ,Andreu AL(2002) Familial expansile osteolysis in a large Spanish kindred resulting from an insertion mutation in the TNFRSF11A gene. *J Med Genet* 39 : E67
  - 16) Johnson-Pais TL, Singer FR, Bone HG, McMurray CT, Hansen MF, Leach RJ (2003) Identification of a novel tandem duplication in exon 1 of the TNFRSF11A gene in two unrelated patients with familial expansile osteolysis. *J Bone Miner Res* 18 : 376-380
  - 17) Whyte MP (2006) Paget's disease of bone and genetic disorders of RANKL/OPG/RANK/NF-kappaB signaling. *Ann N Y Acad Sci* 1068 : 143-164
  - 18) Takasaki W, Kajino Y, Kajino K, Murali R, Greene MI (1997) Structure-based design and characterization of exocyclic peptidomimetics that inhibit TNF alpha binding to its receptor. *Nat Biotechnol* 15 : 1266-1270
  - 19) Aoki K, Saito H, Itzstein C, Ishiguro M, Shibata T, Blanque R, Mian AH, Takahashi M, Suzuki Y, Yoshimatsu M, Yamaguchi A, Deprez P, Mollat P, Murali R, Ohya K, Horne WC, Baron R (2006) A TNF receptor loop peptide mimic blocks RANK ligand-induced signaling, bone resorption, and bone loss. *J Clin Invest* 116 :

1525-1534

- 20) Furuya Y, Inagaki A, Khan M, Mori K, Penninger JM, Nakamura M, Udagawa N, Aoki K, Ohya K, Uchida K, Yasuda H (2013) Stimulation of bone formation in cortical bone of mice treated with a receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL)-binding peptide that possesses osteoclastogenesis inhibitory activity. *J Biol Chem* 288 : 5562-5571
- 21) Matsuzaki K, Udagawa N, Takahashi N, Yamaguchi K, Yasuda H, Shima N, Morinaga T, Toyama Y, Yabe Y, Higashio K, Suda T (1998) Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 246 : 199-204
- 22) Kinugawa S, Koide M, Kobayashi Y, Mizoguchi T, Ninomiya T, Muto A, Kawahara I, Nakamura M, Yasuda H, Takahashi N, Udagawa N (2012) Tetracyclines convert the osteoclastic-differentiation pathway of progenitor cells to produce dendritic cell-like cells. *J Immunol* 188 : 1772-1781
- 23) Koide M, Kobayashi Y, Ninomiya T, Nakamura M, Yasuda H, Arai Y, Okahashi N, Yoshinari N, Takahashi N, Udagawa N. (2013) Osteoprotegerin-deficient male mice as a model for severe alveolar bone loss: comparison with RANKL-overexpressing transgenic male mice. *Endocrinology* 154 : 773-782

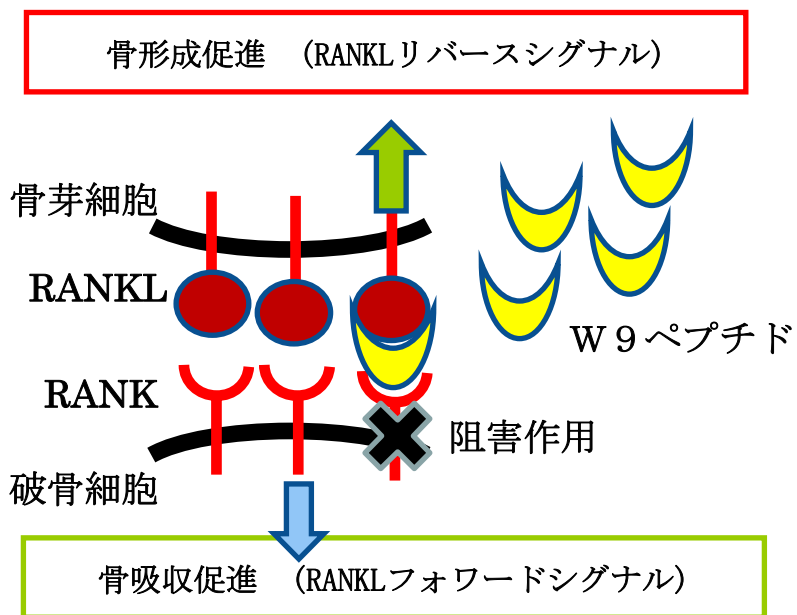


図1 米田紘一

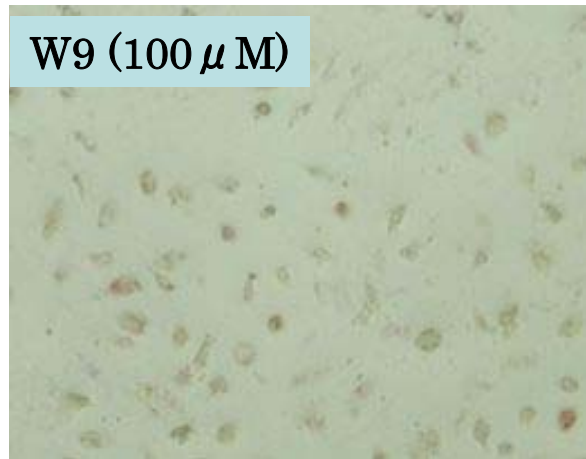
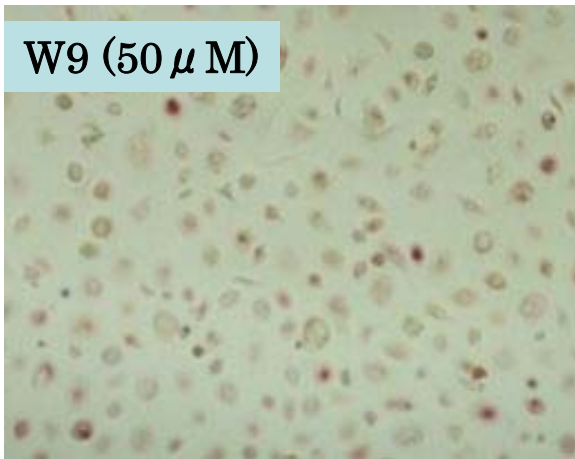
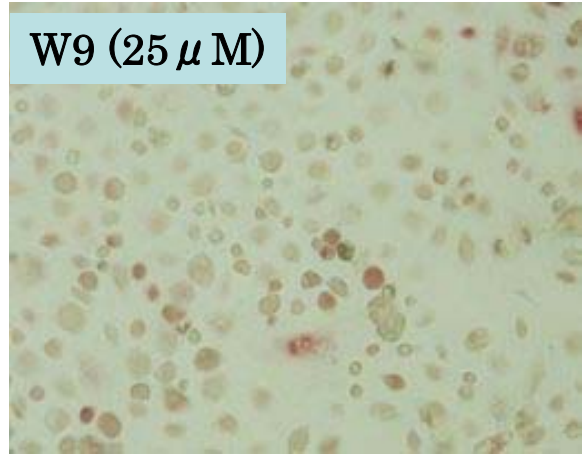
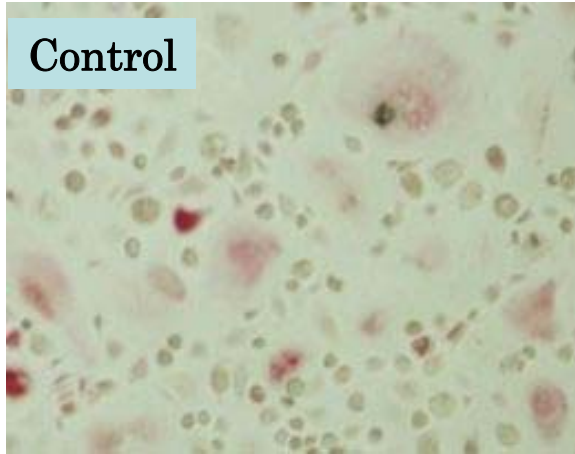


図2 米田紘一



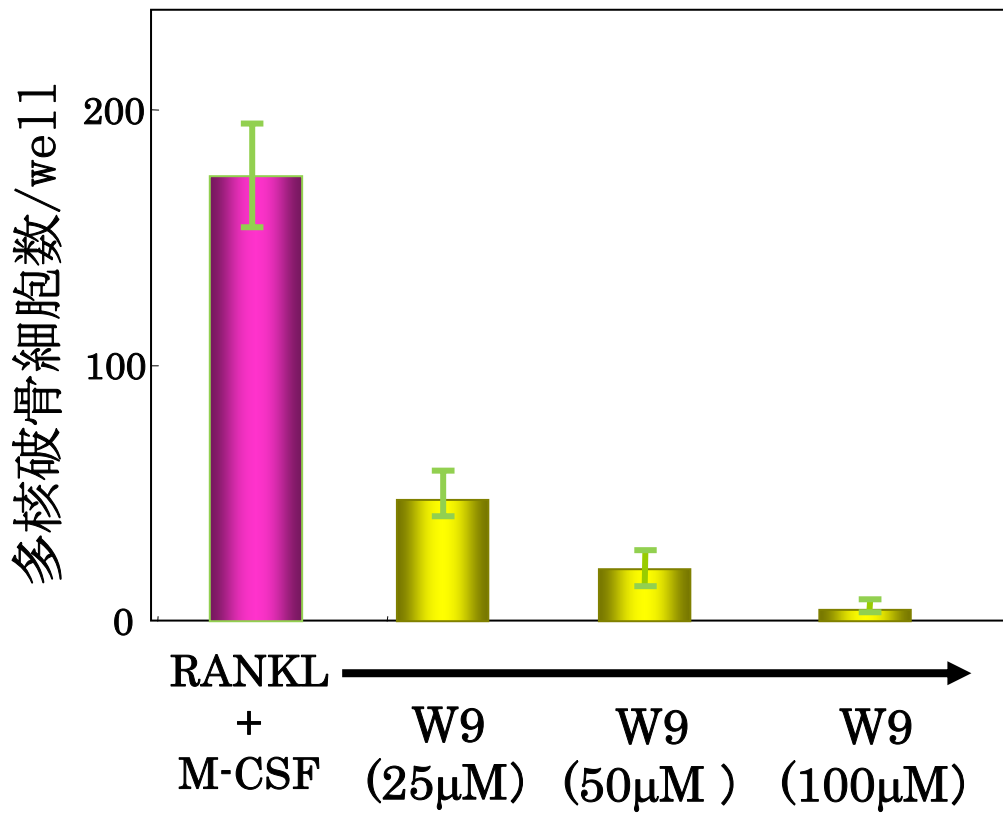


図3 米田紘一

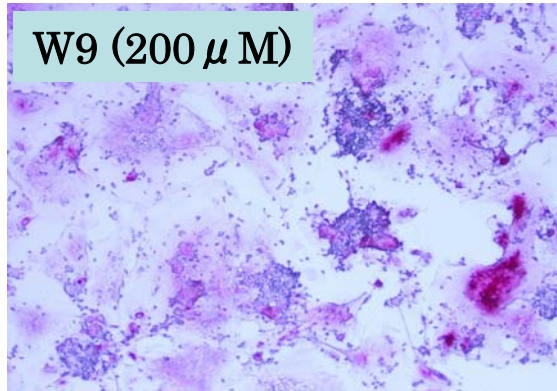
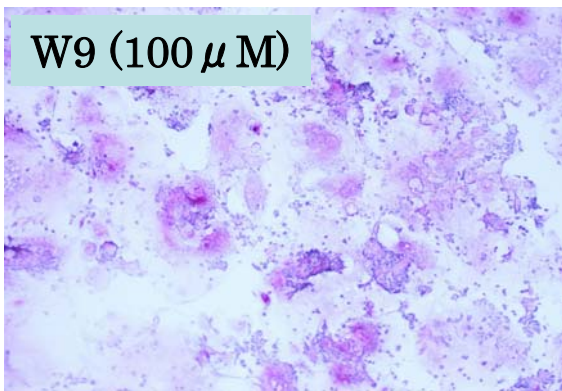
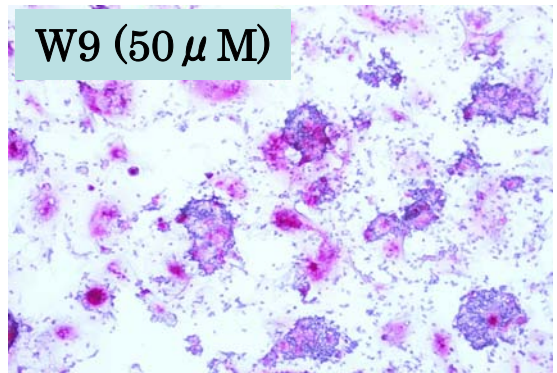
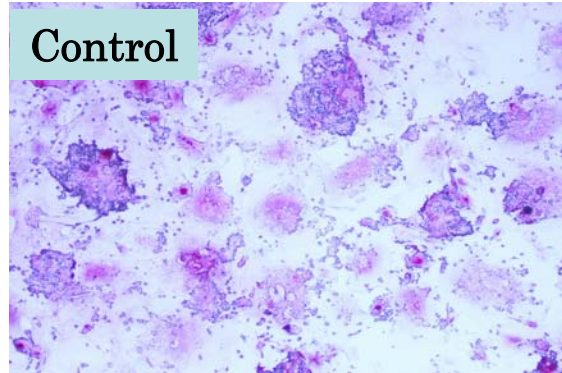


図4 米田紘一

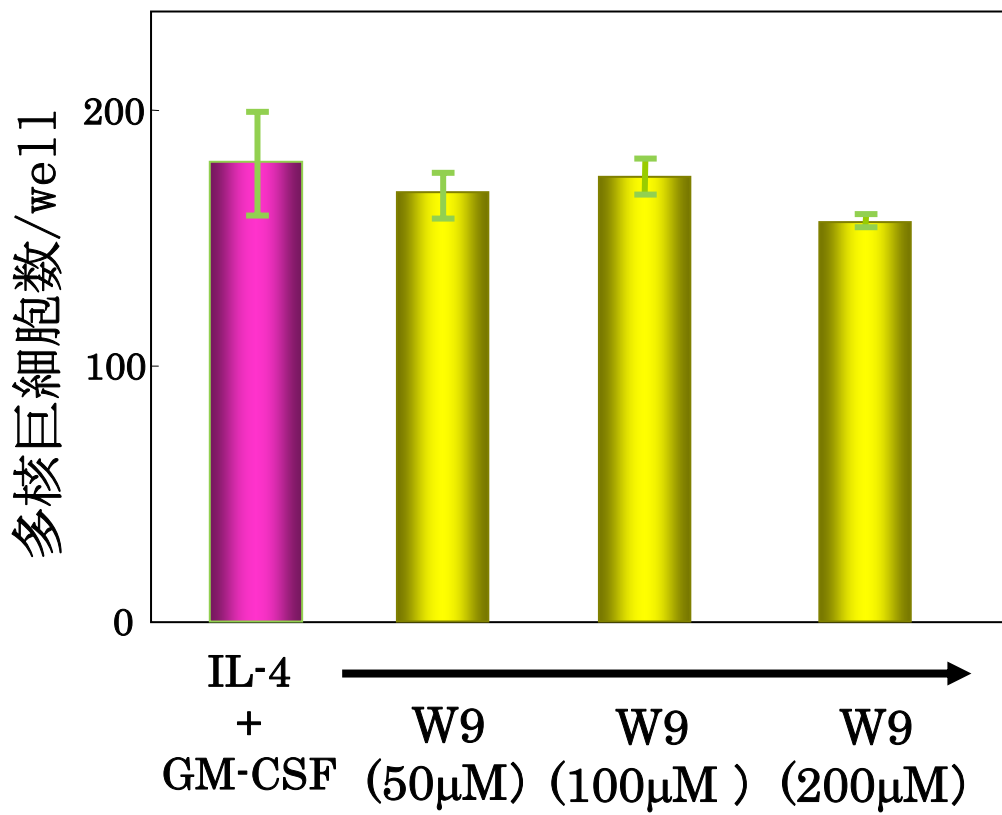


図5 米田紘一

## 図の説明

### 図1 W9 ペプチドの作用機構 (仮説)

W9 ペプチドは RANKL と結合することにより RANK シグナルを阻害することにより破骨細胞分化を抑制すると共に、骨芽細胞表面の RANKL に結合し骨芽細胞分化を誘導する (リバーシグナル) 可能性が考えられる。

### 図2 W9 ペプチドの破骨細胞分化に対する作用

ヒト末梢血単核細胞 (hPBMCs) ( $1.5 \times 10^5$  cells/well) を 48well プレートに播種し、M-CSF (50 ng/ml) と RANKL (200 ng/ml) を添加して、 $\alpha$ -MEM (10% FBS を含む) 中で 14 日間培養した。W9 ペプチド (25~100  $\mu$  M) を培養開始時から添加し、培地交換ごとに加えた。培養後、細胞を固定し、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色に供した。

### 図3 W9 ペプチドの破骨細胞分化に対する作用 (定量的解析)

ヒト末梢血単核細胞 (hPBMCs) ( $1.5 \times 10^5$  cells/well) を 48well プレートに播種し、M-CSF (50 ng/ml) と RANKL (200 ng/ml) を添加して、 $\alpha$ -MEM (10% FBS を含む) 中で 14 日間培養した。W9 ペプチド (25~100  $\mu$  M) を培養開始時から添加し、培地交換ごとに加えた。培養後、細胞を固定し、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色に供した。赤く染色される TRAP 陽性細胞のうち、3 核以上の多核細胞を破骨細胞として計測した。

### 図4 W9 ペプチドの樹状細胞分化に対する作用

ヒト末梢血単核細胞 (hPBMCs) ( $1.5 \times 10^5$  cells/well) を 48well プレートに播種し、GM-CSF (50 ng/ml) と IL-4 (50 ng/ml) を添加して、 $\alpha$ -MEM (10% FBS を含む) 中で 10 日間培養した。W9 ペプチド (50~200  $\mu$  M) を培培養開始時から添加し、培地交換ごとに加えた。培養後、細胞を固定し、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色とヘマトキシリン染色に供した。TRAP 陰性の 3 核以上の多核細胞を樹状細胞として計測した。

図5 W9 ペプチドの樹状細胞分化に対する作用 (定量的解析)

ヒト末梢血単核細胞 (hPBMCs) ( $1.5 \times 10^5$  cells/well) を 48wellプレートに播種し、GM-CSF (50 ng/ml) とIL-4 (50 ng/ml)を添加して、 $\alpha$ -MEM(10%FBSを含む)中で10日間培養した。W9 ペプチド(50~200  $\mu$ M)を培養開始時から添加し、培地交換ごとに加えた。培養後、細胞を固定し、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色とヘマトキシリン染色に供した。TRAP陰性の3核以上の多核細胞を樹状細胞として計測した。