

学位論文

ADAM-Notch シグナル伝達経路を介した 破骨細胞分化のメカニズムの解明

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻
病態機構学講座 歯周病態学分野

本行 令奈

The Elucidation of the Mechanism for Osteoclast Differentiation through ADAM-Notch Signaling Pathway

Department of Pathophysiology-Periodontal Science,
Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences,
Okayama University

Reina HONGYO

(令和5年12月8日受付)

緒言

現在、日本人の約 47.9%が罹患している歯周病¹⁾は、口腔細菌叢の *dysbiosis* によって発症・進行する炎症性疾患の一つである²⁾。その本態は、歯周病原細菌を排除するために働く一連の免疫応答によって、血中に存在する単球が破骨細胞へと分化し、歯槽骨を吸収することにある^{3, 4)}。その際に出現する破骨細胞の分化には、骨芽細胞等が発現する *receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)* シグナル経路が重要であるが、細胞間の情報伝達を担う *Notch* シグナル伝達経路の関与も示唆されている^{5, 6)}

Notch シグナルは、発生過程における分化や制御といった細胞の運命を司り、多種類の細胞からなる生体組織の恒常性を維持している⁷⁾。哺乳類では、細胞膜表面に存在する 5 種のリガンド (*JAGGED1, 2, Delta-like1, 3, 4*) と細胞膜貫通ドメインを有する 4 種の膜貫通型受容体 (*NOTCH1, 2, 3, 4*) が存在している⁸⁾。この *NOTCH* 受容体とリガンドとの結合後、*NOTCH* 受容体の細胞外ドメインが *a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) 10, ADAM17* で切断され、引き続き細胞内ドメインが *γ -secretase* で切断される⁹⁻¹¹⁾。細胞内ドメインが核内へ移行することで、標的遺伝子の転写が生じる⁸⁾。

ADAM ファミリーは、メタロプロテアーゼドメインを有する膜貫通型タンパク質の一群で、現在ヒトでは 21 種類発見されている¹²⁾。細胞膜上の増殖因子、受容体、

接着分子のシェディング等によって、細胞の接着・運動・増殖に関与する多機能分子である。近年、ADAM10 を介した Notch シグナル伝達経路 (ADAM-Notch シグナル伝達経路) と破骨細胞形成との関連が報告されているものの¹³⁾、ADAM17 を介した Notch シグナル伝達経路と破骨細胞との関連は報告されていない。

一方で ADAM10, ADAM17 とは異なる部位を切断する γ -secretase の阻害剤を使用した研究では、 γ -secretase を介した Notch シグナル伝達経路が破骨細胞形成に関与すると報告されている¹¹⁾。さらに、 γ -secretase はアルツハイマー病や癌と関連が報告されており、 γ -secretase 阻害剤が破骨細胞関連疾患だけでなく、癌やアルツハイマー病の予防・治療につながる可能性が示唆されている^{14,15)}。しかし、 γ -secretase 阻害剤は、認知機能の低下や皮膚癌発症の亢進など様々な副作用が懸念されており¹⁶⁾、開発の見通しは経っていない。その原因として、 γ -secretase が Notch シグナル伝達経路の必須因子であり、代替のできないものであるからと考えられている¹⁷⁾。一方、Notch シグナル伝達経路に関与する ADAM10, ADAM17 は、 γ -secretase と異なり、どちらか一方を阻害した場合には他方が代替の機能を有する可能性があるとして報告されている¹⁰⁾。そのため、ADAM 阻害剤は γ -secretase 阻害剤に比べ偽害作用が少ないと考えられている。しかし、ADAM の破骨細胞分化への影響には、上述のように未だ不明な点が多い。そこで本研究は、ADAM-Notch シグナル伝達経路が破骨細胞形成に影響する際の作用

機序を解明することを目的とした。本作用機序の解明は、ADAM が関与する骨吸収抑制薬の開発に繋がる可能性がある。

以上から、マウス骨髄由来マクロファージを用いて、ADAM-Notch シグナルに関わる複数の関連分子から RANKL 誘導性の破骨細胞分化に影響する分子を *in vitro* で探索した。さらに、絹糸結紮歯周炎による歯槽骨吸収誘導モデルマウス（歯周炎モデルマウス）を用いて、歯周炎組織下で ADAM17 が破骨細胞形成に及ぼす影響を *in vivo* で検討した。

材料と方法

1. 試薬

ADAM17 阻害剤 (KP-457 ; AdooQ BIOSIENGE, Irvine, CA, USA) と ADAM10 阻害剤 (GI254023X ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) は dimethyl sulfoxide (DMSO ; Sigma-Aldrich) で希釈して用いた。また, JAGGED1 中和抗体とそのアイソタイプ抗体を, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) から購入した。

2. マウス骨髄由来マクロファージ様細胞と RANKL 誘導性破骨細胞様細胞の調製

Tevlin らの方法¹⁸⁾を一部改変して, 野生型マウス (C57BL/6J, 12 週齢, 雄, 平均体重 30 g ; 日本クレア株式会社, 東京, 日本) の脛骨から骨髄を含む細胞溶液を採取した。採取した細胞溶液から Ficoll-Paque PREMIUM 1.084 (Cytiva, 東京, 日本) を用いて 20℃, 30 分間, 400×g 遠心分離した単球細胞を, 2.0×10^5 cells/well の濃度で 12-well マルチプレート (Corning, Corning, NY, USA) に播種した。培養は, 56℃で 30 分間加熱処理して非働化した 10%ウシ胎児血清 (FBS ; Thermo Fisher Scientific) を含むアルファ改変型イーグル最小必須培地 (MEM α ; 富士フィルム和光純薬, 大阪, 日本) に macrophage colony stimulating factor (M-CSF ; Biolegend, San Diego, CA, USA) を 50 ng/mL で添加して 37℃, 5% CO₂, 100%湿潤下で 6 日間培養し, マウス骨髄由来マクロファージ様細胞へ分化誘導した。

さらにこの細胞は、破骨細胞分化因子である RANKL (Biolegend) と M-CSF を 50 ng/mL ずつ添加して 5 日間培養し、RANKL 誘導性破骨細胞様細胞へと分化誘導した

なお、これらの実験は岡山大学動物実験委員会の承認を受けている (OKU-2020331)。

3. 細胞に使用する試薬の細胞毒性の評価

KP-457, GI254023X, JAGGED1 中和抗体のマウス骨髄由来細胞に対する細胞毒性を、細胞生存能を調べることで検討した。骨髄由来の細胞を 96-well マルチプレート (Corning) に 2.0×10^4 cells/well で播種し、50 ng/mL M-CSF 含有 MEM α を用いてマクロファージ様細胞に分化誘導し、培養細胞の接着面が 80 % 程度のサブコンフルエント状態になるまで培養した。その後、各試薬 (KP-457 : 1–1,000 μ M, GI254023X : 1–1,000 μ M, JAGGED1 中和抗体 : 1–320 mg/mL) を添加し、24 時間後にミトコンドリア脱水素酵素による還元反応を利用した Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所, 熊本, 日本) を用いて、細胞毒性試験を行った。なお、対照として、溶媒 (DMSO) あるいはアイソタイプコントロール抗体 (Thermo Fisher Scientific) を添加した。各 well に WST-8/1-Methoxy PMS 溶液を 10 μ L ずつ添加し、2 時間後に生成されたホルマゼン色素の吸光度を 450 nm の波長でマイクロプレートリーダー (SH-1000 Lab ; コロナ電気, 茨城, 日本) を用いて測定した。そして、各試薬の濃度と測定値から 4 係ロジス

ティック曲線の回帰式を求め、式から計算した値を使用し、細胞生存能を回帰曲線で示した。

4. 破骨細胞様細胞の分化に関与する Notch シグナル伝達経路関連分子の検討

1) 遺伝子の発現量の解析

破骨細胞の分化関連遺伝子と Notch シグナル経路の関連遺伝子の発現量の解析は、quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) 法を用いて検討した。調製したマウス骨髄由来マクロファージ様細胞に RANKL を添加して 2, 4, 8, 12, そして 24 時間後の RANKL 添加群と非添加群から、全 RNA を RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) にて抽出した。RNA の濃度と純度は、NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて 260 nm と 280 nm での吸光度とその比を用いて測定した。全ての RNA の純度は、A260/A280 値が 1.8~2.2 の間であることを確認した。抽出した RNA の 1 µg をテンプレートとして、RNase-free Water (QIAGEN) と SuperScript™ IV VILO Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を混合した溶液にて、25°C で 10 分、42°C で 60 分間熱処理し、mRNA の逆転写産物である complementary DNA (cDNA) を合成した。その後、85°C で 5 分間の加熱で逆転写酵素を不活化した。合成した cDNA の溶液を 10 倍希釈した溶液を、表 1 に挙げた塩基配列を合成したセンスおよびアンチセンス PCR プライマー (各 10 µM) , 2 × Power SYBR Green Master

Mix (Thermo Fisher Scientific) , そして RNase-free Water と混合し, 2 本鎖 DNA を 95℃ で 10 分間変性後, 95℃ で 15 秒の熱変性, 60℃ で 1 分のアニーリングと伸長反応を 40 サイクル行った。この反応は 7300 Fast Real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて行い, その際に PCR 産物が発する蛍光量を SDSv1.X.withRQSoftware (Thermo Fischer Scientific) にて測定した。Notch シグナル関連遺伝子 (*Notch1*, *Notch2*, *Notch3*, *Notch4*, *Jagged1*, *Jagged2*, *Dll1*, *Dll3*, *Dll4*), *Adam10* と *Adam17*, 破骨細胞分化関連遺伝子 (*nuclear factor of activated T cells 1 : Nfatc1*, *dendrocyte expressed seven transmembrane protein : Dc-stamp*) の mRNA 発現量は *beta-actin (Actb)* の mRNA 量を内部対照として, 比較 threshold cycle 法 (比較 Ct 法) にて定量し, 相対発現量として示した。なおそれぞれのプライマーの塩基配列は, オンラインソフトウェアである Primer3 Plus (<https://www.primer3plus.com/>) を用いて候補を選出し, 続いてその中から目的遺伝子の特異的な増幅のみが起こるものを, 別のオンラインソフトウェアである NCBI primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) を用いて確認し, 最終決定した。なお, プライマーの合成はユーロフィンジェノミクス株式会社 (東京, 日本) に委託した。

2) タンパク質産生量の解析

Notch シグナル経路の関連遺伝子に対応するタンパク質産生量の解析は、ウエスタンブロッティング法を用いて検討した。調製したマウス骨髄由来マクロファージ様細胞に RANKL を添加して 4, 8, 12, 24, そして 48 時間経過後の RANKL 添加群および非添加群サンプルに Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich) 含有 RIPA Lysis and Extraction Buffer (Thermo Fisher Scientific) を用いて細胞を氷上で 10 分間溶解し、4℃, 10 分間、16,000× *g* で遠心分離を行い、細胞成分を除去した上清を回収した。タンパク質濃度は BCA 法 (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) を用いて、562 nm の波長の吸光度をマイクロプレートリーダー (SH-1000 Lab) で測定してタンパク質を定量した。

定量した各タンパク質 (10 μg) に sodium dodecyl sulfate (SDS) サンプルバッファ {1% (weight/volume : w/v) SDS, 45 mM Tris-HCl (pH 6.8), 15% (v/v) グリセリン, 144 mM 2-メルカプトエタノール, 0.002% フロモフェノールブルー} を加え、95℃ で維持し 5 分間煮沸して還元状態にした。還元状態にした試料を泳動緩衝液 (25 mM Tris-HCl, 200 mM glycine, 35 mM SDS) を用いたポリアクリルアミドゲル {アクリルアミド濃度 7.5% (v/v)} 電気泳動で 60 分間泳動し (室温, 150 V 定電圧条件), タンパク質を分離した (Mini PROTEAN® Tetra System ; Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA)。分離したタンパク質は、湿式転写装置 (Mini PROTEAN®II : Bio-Rad

laboratories) を用いて転写用バッファー {1.8 mM Tris-HCl, 190 mM glycine, 20 % (v/v) methanol} 中で 60 分間, polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) へ転写した (4℃, 100 V 定電圧条件)。転写後の PVDF 膜は, 5 % (w/v) スキムミルク (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) を含有する Tris-buffered Saline with Tween 20 {TBST : 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4, 0.1 % (v/v) Tween 20} に浸漬し, 室温にて 1 時間のブロッキング操作を施した。その後, 一次抗体を 5 % (w/v) スキムミルク含有 TBST で希釈した溶液中で, PVDF 膜を 4℃ で 1 晩振とうして反応させた。その後, TBST で洗浄し, 二次抗体を 5 % (w/v) スキムミルク含有 TBST で希釈した溶液中に PVDF 膜を浸漬し, 室温で 1 時間振とうして反応させた。なお, 一次抗体は, ウサギ由来抗 NOTCH1 モノクローナル抗体, ウサギ由来抗 NOTCH2 モノクローナル抗体, ウサギ由来抗 NOTCH4 モノクローナル抗体, ウサギ由来抗 JAGGED1 モノクローナル抗体 (いずれも 1:1,000 希釈 ; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を使用した。二次抗体は, ヤギ由来 horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ IgG 抗体 (1:2,000 希釈 ; Cell Signaling Technology) を用いた。反応タンパク質の検出は, enhanced chemiluminescence (ECL) 法 (Super Signal® West Dura Extended Duration Substrate ; Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。なお, 使用した PVDF 膜は, 抗体除去バッファー (Restore™ Western Blot Stripping Buffer ;

Thermo Fisher Scientific) 中で室温にて 30 分間振とうして抗体を除去した後, 上記に記載したブロッキング操作以降と同様の操作を行い, 同一膜上でそれぞれのタンパク質を検出した (リプロービング順: NOTCH1, NOTCH2, JAGGED1, NOTCH4, そして β -ACTIN)。アクリルアミドゲルの各レーンのタンパク質が等量であることを確認するために, マウス由来抗 β -ACTIN ポリクローナル抗体 (1:1,000 希釈; Sigma-Aldrich) と二次抗体としてヒツジ由来 HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (1:5,000 希釈; GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, UK) を用いて検出を行った。標的タンパク質に相対するバンドの強度は, 画像解析ソフト Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて黒化度を数値化し, RANKL 非添加時の黒化度を基準とした相対黒化度とした。

5. JAGGED1 中和抗体, GI254023X, そして KP-457 が破骨細胞様細胞の分化に

及ぼす影響の検討

調製したマウス骨髄由来マクロファージ様細胞に RANKL を添加し破骨細胞様細胞に分化誘導した。その際に RANKL と同時に JAGGED1 の中和抗体 (145 mg/mL), そのアイソタイプ抗体, GI254023X (354 μ M), そして KP-457 (194 μ M) をそれぞれ添加して培養した。そして, RANKL 添加から 5 日後に Nuclease-Free Water (NFW, QIAGEN) で洗浄後, 4%パラフォルムアルデヒド液 (富士フィルム和光純薬) で 5 分

間固定した。その後、0.1 % Triton X-100 を含有する PBS 溶液で 3 回洗浄し、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase : TRAP) 染色キット (コスモバイオ株式会社, 東京, 日本) を用いて染色した。その後、光学顕微鏡 (BX-50 ; オリンパス, 東京, 日本) にて観察し、3 核以上の TRAP 陽性細胞を破骨細胞様細胞とみなし、細胞数を計測した。

6. 歯周炎モデルマウスへの ADAM 阻害剤投与

野生型マウス (WT) に Abe ら¹⁹⁾の手法を用いて上顎左側第二大臼歯に 5-0 絹糸を結紮し、歯周炎モデルを作製した。結紮時には、結紮側の口蓋側歯肉に ADAM17 阻害剤 KP-457 (354 μ M) を 6 μ L マイクロシリンジ (ハミルトンマイクロシリンジ ; Hamilton, Reno, Nevada, USA) を用いて投与した。なお、陰性対照として、溶媒である DMSO (0.2 %) を 6 μ L 投与した。結紮の 4 日後に安楽死させ、上顎骨と歯肉 (上顎第一大臼歯近心から第三大臼歯遠心までの幅 1 mm 口蓋側歯肉) を採取した。(図 1 ; 岡山大学動物実験委員会承認番号 : OKU-2021866)

7. 歯周炎組織中の破骨細胞分化遺伝子の発現量解析

マウスから採取した歯肉組織を, RNA を安定させて保護する RNeasy Lysis Buffer (QUIAGEN) に直ちに浸漬し, *Nfatc1* と *Trap* の遺伝子発現量を前述の qRT-PCR 法で (材料と方法 4) 定量解析した。

8. 組織学的解析

マウスから採取した顎骨を、4%パラホルムアルデヒド溶液（pH 7.4：富士フィルム和光純薬）に24時間浸漬して組織を固定した。その後10%EDTA溶液（pH 8.0：ナカライテスク，京都，日本）で脱灰した後にパラフィン包埋してブロックを作製し、4 μm 間隔で薄切した。

組織切片からキシレン（ナカライテスク）を用いてパラフィンを除去した後、無水エタノール（富士フィルム和光純薬）から70%エタノールまでスライドガラスを4段階で浸漬させて再水和を行った。その後、ヘマトキシリン・エオジン染色（HE染色；富士フィルム和光純薬）あるいはTRAP染色（TRAP染色液；富士フィルム和光純薬）を行った。染色後は70%エタノールから無水エタノールまでスライドガラスを4段階で浸漬させて脱水を行い、キシレンに浸漬させた後にMount-Quick（大道産業株式会社，東京，日本）を用いて封入した。スライドガラスを乾燥させた後、光学顕微鏡（BX-50；オリンパス）にて観察した。なお、TRAP染色時には、第2大臼歯の口蓋根周囲の歯槽骨吸収窩に存在し、かつ3核以上のTRAP陽性細胞を破骨細胞として、その細胞数を計測した。

9. 統計処理

各実験系における統計解析は、3群間以上の差の検定には one-way analysis of

variance (one-way ANOVA) を用い、さらに多重比較検定は Tukey-Kramer test を用いた。2 群間の差の検定には、Student's *t*-test を用いた。各々の統計処理には、GraphPad Prism8 for Windows (version-8.4.3 : GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

結果

1. 破骨細胞分化における Notch シグナル関連遺伝子と破骨細胞分化遺伝子,

Adam10 と *Adam17* 遺伝子の発現

破骨細胞分化に Notch シグナル経路が関与するか検討するため、RANKL 未添加群と RANKL 添加群の *Adam10* と *Adam17* 遺伝子発現量と Notch シグナル関連遺伝子と破骨細胞分化遺伝子の発現量の経時的変化を調べた。RANKL 未添加群に比較して RANKL 添加群では、RANKL 添加の 2-4 時間後には *Notch2* と *Jagged1* の発現量が増加し (図 2DF, * $p < 0.05$) , 24 時間後には *Nfatc1* と *Dc-stamp* の発現量が増加した (図 2AB, * $p < 0.05$) 。また、*Notch1* と *Notch3* の発現量は逆に RANKL 添加の 2 時間後から減少していた。この減少は、2-4 時間後には増加していた *Jagged1* の発現量においても 12 時間以降に見られた。しかし、両群においても、*Adam10* と *Adam17* は発現していたが (Ct 値 = 21-24) , *Notch3*, *Jagged2*, *Dll1*, *Dll3*, そして *Dll4* は発現していなかった (30 < Ct 値) 。

2. 破骨細胞分化における Notch シグナル関連タンパク質の産生

遺伝子発現の結果から、Notch シグナル経路の関連遺伝子 (*Notch1*, *Notch2*, *Notch4*, *Jagged1*) に対応する RANKL 添加 4-48 時間のタンパク質の産生量の経時的な変化を調べた。RANKL 未添加群と比較し、RANKL 添加群では、4-24 時間で NOTCH2 の産

生量が増加し、4-12 時間で JAGGED1 の産生量が増加した。一方で、発現量が減少していた遺伝子に由来する NOTCH1 と NOTCH4 の産生量には変化はなかった(図 3A)。

これら RANKL 添加 4-24 時間後の NOTCH2 の、そして 4-12 時間後の JAGGED1 の産生は、有意差のある増加であった(図 3B, $*p < 0.05$)。

3. JAGGED1 中和抗体および ADAM 阻害剤 KP-457 と GI254023X の細胞への影響

1) 細胞傷害性

骨髄由来マクロファージ様細胞の培養系に JAGGED1 中和抗体, ADAM10 の阻害剤 GI254023X, ADAM17 の阻害剤 KP-457 を添加して培養した結果, 90%の細胞生存能を示す濃度が, JAGGED1 中和抗体では 145 mg/mL, GI254023X では 194 μ M, そして KP-457 では 354 μ M であった(図 4 A)。

2) 破骨細胞様細胞への分化に及ぼす影響

細胞傷害性のない濃度範囲内で, 中和抗体と各種阻害剤の破骨細胞様細胞分化に及ぼす影響を調べた。すなわち, 細胞生存能 90 %を呈する濃度の JAGGED1 中和抗体あるいは ADAM 阻害剤を破骨細胞様細胞への分化誘導開始と同時に添加し, TRAP 染色を用いて評価した。その結果, JAGGED1 中和抗体では破骨細胞様細胞が有意に減少した(図 4B, $*p < 0.05$)。また, KP457 では破骨細胞様細胞数が有意に減少したが, GI254023X では変化がなかった(図 4C, $*p < 0.05$)。

4. 歯周炎組織中における KP-457 の破骨細胞分化に及ぼす影響

1) 歯周炎組織中の破骨細胞分化遺伝子の発現量

歯周炎モデルマウスに KP-457 を歯周炎側の口蓋歯肉に投与し、破骨細胞分化遺伝子 (*Nfatc1*, *Dc-stamp*) の発現量を比較した。KP-457 投与群では、非投与群と比較し、*Nfatc1* の発現は有意に減少した (図 5A, $*p < 0.05$)。また、*Trap* の発現は減少傾向であった (図 5B, $p = 0.5199$)。

2) 歯周炎組織中の破骨細胞分化

HE 染色において、DMSO を投与した陰性対照群と比較し、KP-457 投与群では上皮下組織の炎症性細胞浸潤は抑制されていた (図 6A)。TRAP 染色において、DMSO を投与した陰性対照群と比較し、KP-457 投与群では歯槽骨吸収が抑制される像を観察した (図 6B, 黒色矢印: 破骨細胞)。さらに、KP-457 投与群では、破骨細胞様細胞数は有意に減少した (図 6C, $*p < 0.05$)。

考察

本研究では、*in vitro* 研究において破骨細胞形成における ADAM-Notch シグナル伝達経路との関連を解明するために、まず RANKL 誘導性の破骨細胞分化と Notch シグナル伝達経路が関与するか検討した。その結果、RANKL 添加群で *Jagged1* と *Notch2* は *Nfatc1* と *Dc-stamp* の発現よりも早期に発現することが明らかになった(図 2A, B, D, F)。同様に NOTCH2 と JAGGED 1 のタンパク質産生量も早期に増加した(図 3A, B)。RANKL 添加群、未添加群ともに *Adam10* と *Adam17* を RNA レベルで発現していた。従って、両者ともに破骨細胞の形成に関与する可能性があるため、破骨細胞の形成に関与する可能性のある Notch シグナルのリガンドである JAGGED1 中和抗体と ADAM10 阻害剤、ADAM17 阻害剤の破骨細胞様細胞形成に及ぼす影響を検討した。JAGGED1 中和抗体と、ADAM10, ADAM17 それぞれの阻害剤である GI254023X, KP-457 の効果の検証に先立ち、各細胞生存能を細胞毒性試験で評価したところ、細胞傷害性のない範囲内の濃度、すなわち本研究では、細胞生存能が 90 %を示す濃度で以後の実験系では用いた。すなわち、JAGGED1 中和抗体は 145 mg/mL, GI254023X は 194 μ M, KP-457 は 354 μ M に設定した。これらを使用して破骨細胞様細胞の分化に及ぼす影響を評価したところ、JAGGED1 中和抗体は RANKL 誘導性の破骨細胞分

化を有意に抑制した（図 4 B）。また、KP457 は破骨細胞分化を有意に抑制したが、一方で GI254023X は変化しなかった（図 4 C）。従って、RANKL 作用後に NOTCH リガンドである JAGGED1 と受容体である NOTCH2 が極早期に産生され、ADAM17 を介した NOTCH2 受容体の切断が生じ、NOTCH2 の細胞内ドメインが核内に移行することで破骨細胞分化が促進されると考えられる。Notch シグナル伝達経路の細胞膜外では、NOTCH 受容体の細胞外ドメインにある Negative Regulatory Region (NRR) と呼ばれる細胞外抑制性領域が、リガンド非結合性、もしくはリガンド結合性のエンドサイトーシスによって構造が変化し、同部位が露わになることで ADAM10 あるいは ADAM17 による切断が生じる²⁰⁾。Notch シグナル伝達経路のうち、DLL1 リガンドと NOTCH1 受容体に着目し、両者の結合によって生じる ADAM10、ADAM17 の細胞膜外の選択的切断を検討した研究では、非リガンドによる Notch シグナル伝達経路の誘導には ADAM17 が、リガンドによる Notch シグナル伝達経路の誘導には ADAM10 が細胞膜外の切断に関与している可能性が報告されている¹⁰⁾。しかし、破骨細胞形成においては、RANK-RANKL 結合後、Jagged1-Notch2 シグナル伝達経路には ADAM17 が切断に関与している可能性がある。本研究では JAGGED1、NOTCH2 に着目しており、既報のリガンドと受容体とは異なるため、NRR 領域に作用する ADAM も異なる可能性が考えられる。

また、*in vitro* 研究で得られた結果を基に、絹糸結紮歯周炎マウスモデルを用いた *in vivo* 研究で、歯周炎組織下での ADAM17 が破骨細胞形成に及ぼす影響を遺伝子学的・組織学的に検討した。KP-457 を投与した群は DMSO (溶媒) を投与した KP-457 非投与群と比較して *Nfatc1* の発現量は有意に減少し (図 5A) , 破骨細胞数は有意に減少した (図 6C) 。よって、生体内でも *in vitro* 研究と同様に ADAM17 を介した Jagged1-Notch2 シグナル伝達経路が破骨細胞形成に関与している可能性がある。ADAM17 ノックアウト関節リウマチモデルマウスを使用した研究では、ADAM17 の抑制が TNF- α を減少させ、さらに破骨細胞の形成を抑制した²¹⁾と報告されている。絹糸結紮歯周炎モデルマウスを用いた本研究においても、ADAM17 が歯周炎症を抑制している可能性が考えられるが、本研究では炎症性因子について検討していない。そのため、今後検討が必要である。また、本研究結果から、ADAM17 阻害剤が歯槽骨の吸収を抑制する治療薬として将来的に応用することが望まれるが、Notch シグナル伝達経路は生命活動に必須のシグナルであり、その副作用が懸念される。本研究では KP-457 投与群での体重変化や臓器への傷害は検討していないため、今後検討が必要である。また、ADAM10 阻害剤および ADAM17 阻害剤が歯肉線維芽細胞で発現する CXCL16 を減少させることで歯周組織下での炎症を制御する可能性がある²²⁾と報告されており、本研究結果から ADAM17 阻害剤がマクロファージ以外の細胞に作用した可能性がある

考えられる。本研究では、ADAM17 阻害剤がマクロファージ以外の細胞に与える影響については検討していないため、今後検討が必要である。

以上から、マクロファージの極早期の段階、すなわち破骨細胞前駆細胞様細胞で JAGGED1 と NOTCH2 による Notch シグナル伝達が生じることで、破骨細胞の形成に影響を与える可能性がある（図 7）。この結果は、RANK-RANKL 結合後に破骨細胞様細胞形成中に JAGGED1 と NOTCH2 の発現が誘導されるという報告⁹⁾と一致しているが、破骨細胞様細胞分化の極早期に RNA 発現とタンパク質産生が生じるという点は新規事項である。さらに、JAGGED1 のタンパク質産生量が RANKL 添加 24 時間以降で減少していることから、破骨細胞の分化過程の極早期に Notch シグナル伝達は発生し、24 時間以降でその役目を終える可能性が考えられる。本研究結果から NOTCH1 は RANKL 未添加群および添加群で産生されているものの産生量に変化はなかったため、NOTCH1 は NOTCH2 と比較して破骨細胞の形成における関与は低いと考える。しかし、Notch1 シグナルが破骨細胞の形成を抑制する⁹⁾と報告されているので、Notch1 シグナルと破骨細胞の形成については今後さらなる検討が必要である。

本研究の限界として、破骨細胞の形成において RANK-RANKL 結合後、JAGGED1 と NOTCH2 が発現し Notch シグナル伝達が生じることが明らかとなったが、Notch シ

グナル活性化後から細胞融合までの破骨細胞形成における制御機構については不明である。従って、今後は DNA マイクロアレイを用いて網羅的に遺伝子を解析することで破骨細胞形成時における ADAM17 や JAGGED1 と関連する遺伝子を検討し、制御機構を解明する予定である。また、ADAM17 は Notch シグナル伝達経路以外の経路に関与し、破骨細胞の形成を促進すると報告²³⁾されている。一方で、ADAM17 が受容体である RANK を切断することで RANK-RANKL 結合量が減少するため破骨細胞の形成を抑制するという報告²⁴⁾もあり、ADAM17 が作用するシグナル分子によって破骨細胞の形成に及ぼす影響が異なる。本研究では Notch シグナル伝達経路以外の ADAM17 が関与する可能性のある経路は考慮しておらず、ADAM17 が Notch シグナル伝達経路以外の経路に作用し、破骨細胞の形成に影響を及ぼした可能性は否定できない。従って、ADAM17 が他の経路に関与していないか、さらなる検討が必要である。

今後 ADAM17 阻害剤の骨吸収疾患に対する臨床応用を検討する上で、破骨細胞形成時の Notch シグナル伝達経路の分子生物学的メカニズムだけではなく、なぜ ADAM17 が作用するシグナル経路によって破骨細胞形成の促進と抑制と相反する結果をもたらすのか解明していく必要がある。これらの問題が解決されたとき、ADAM17 阻害剤の骨吸収疾患に対する新たな治療薬としての応用につながると考える。

結論

ADAM-Notch シグナル伝達経路が RANKL 誘導性の破骨細胞分化を促進する際には、分化過程の極早期に Notch シグナル受容体 NOTCH2 とリガンド JAGGED1 が発現して、その後に ADAM17 が作用すると破骨細胞分化が促進するという一経路を解明した。

謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った岡山大学学術研究院
医歯薬学域歯周病態学分野の高柴正悟教授に心から感謝いたします。そして、様々な
面にわたり貴重な御助言と御協力を下さいました、岡山大学病院歯科・歯周科部門の
池田淳史講師ならびに歯周病態学分野の諸先生に厚く御礼申し上げます。

表題脚注

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 病態機構学講座 歯周病

態学分野

(指導：高柴正悟教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

- 第 155 回日本歯科保存学会秋季学術大会（2021 年 10 月：オンライン）
- 第 64 回春季日本歯周病学会学術大会（2023 年 5 月：高松）

引用文献

1. 厚生労働省. 令和4年歯科疾患実態調査. <https://www.mhlw.go.jp/content/10804000/001112405.pdf>
(最終アクセス 2023年12月5日)
2. Curtis MA, Diaz PI, Van Dyke TE. The role of the microbiota in periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2020; 83(1): 14-25.
3. Pan W, Wang Q, Chen Q. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *Int J Oral Sci*. 2019; 11(3): 30.
4. Omi M, Mishina Y. Roles of osteoclasts in alveolar bone remodeling. *Genesis*. 2022; 60(9).
5. Bai S, Kopan R, Zou W, Hilton MJ, Ong CT, Long F, Ross FP, Teitelbaum SL. NOTCH1 regulates osteoclastogenesis directly in osteoclast precursors and indirectly via osteoblast lineage cells. *J Biol Chem*. 2008; 283(10): 6509-6518.
6. Fukushima H, Nakao A, Okamoto F, Shin M, Kajiya H, Sakano S, Bigas A, Jimi E, Okabe K. The association of Notch2 and NF-kappaB accelerates RANKL-induced osteoclastogenesis. *Mol Cell Biol*. 2008; 28(20): 6402-6412.
7. Lai EC. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development*. 2004; 131(5): 965-973.
8. Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*. 2009; 137(2): 216-233.
9. Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, John RD, Cumano A, Roux P, Roy AB, Israël A. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell*. 2000; 5(2): 207-216.
10. Bozkulak EC, Weinmaster G. Selective use of ADAM10 and ADAM17 in activation of Notch1 signaling. *Mol Cell Biol*. 2009; 29(21): 5679-5695.
11. Jin WJ, Kim B, Kim JW, Kim HH, Ha H, Lee ZH. Notch2 signaling promotes osteoclast resorption via activation of PYK2. *Cell Signal*. 2016; 28(5): 357-365.
12. Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med*. 2008; 29(5): 258-89.
13. Zhao R, Wang A, Hall KC, Otero M, Weskamp G, Zhao B, Hill D, Goldring MB, Glomski K, Blobel CP. Lack of ADAM10 in endothelial cells affects osteoclasts at the chondro-osseous junction. *Orthopaedic research*. 2013; 32(2): 224-230.
14. Aguayo-Ortiz R, Guzmán-Ocampo DC, Dominguez L. Toward the Characterization of DAPT Interactions with γ -Secretase. *ChemMedChem*. 2019; 14(10):1005-1010.

15. Chen HF, Huang CH, Liu CJ, Hung JJ, Hsu CC, Teng SC, Wu KJ. Twist1 induces endothelial differentiation of tumour cells through the Jagged1-KLF4 axis. *Nat Commun.* 2014; 5: 4697.
16. Doody RS, Raman R, Farlow M, Iwatsubo T, Vellas B, Joffe S, Kieburtz K, He F, Sun X, Thomas RG, Aisen PS, Alzheimer's Disease Cooperative Study Steering Committee, Siemers E, Sethuraman G, Mohs R, Semagacestat Study Group. A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2013; 369(4): 341-50.
17. 富田泰輔. γ セクレターゼ活性制御機構の理解に基づいたアルツハイマー病治療薬開発. *臨床神経学.* 2012; 52(11): 1165-1167.
18. Tevlin R, McArdle A, Chan CK, Pluvinage J, Walmsley GG, Wearda T, Marecic O, Hu MS, Paik KJ, Kshemendra SY, Atashroo DA, Zeilins ER, Wan DC, Weissman IL, Longaker MT. Osteoclast derivation from mouse bone marrow. *J Vis Exp.* 2014; 6(93): e52056.
19. Abe T, Hajishengallis G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J Immunol Methods.* 2013; 394(1): 49-54.
20. Christian LM. The ADAM family: Insights into Notch proteolysis. *Fly (Austin).* 2012; 6(1): 30-34.
21. Song Y, Jo S, Chung JY, Oh Y, Yoon S, Lee YL, Kim SS, Yang JH, Jang K, Yang CS, Kim TH, Kim YH. RNA interference-mediated suppression of TNF- α converting enzyme as an alternative anti-TNF- α therapy for rheumatoid arthritis. *J Control Release.* 2021; 330: 1300-1312.
22. Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakae H, Matsuo T. CXC chemokine ligand 16 in periodontal diseases: expression in diseased tissues and production by cytokine-stimulated human gingival fibroblasts. *Clin Exp Immunol.* 2007; 149(1): 146-54.
23. Saito K, Horiuchi K, Kimura T, Mizuno S, Yoda M, Morioka H, Akiyama H, Threadgill D, Okada Y, Toyama Y, Sato K. Conditional inactivation of TNF α -converting enzyme in chondrocytes results in an elongated growth plate and shorter long bones. *PLoS One.* 2013; 8(1): e54853.
24. Hakozaki A, Yoda M, Tohmonda T, Furukawa M, Hikata T, Uchikawa S, Takaishi H, Matsumoto M, Chiba K, Horiuchi K, Toyama Y. Receptor activator of NF-kappaB (RANK) ligand induces ectodomain shedding of RANK in murine RAW264.7 macrophages. *J Immunol.* 2010; 184(5): 2442-2448.

図の説明

図 1. 絹糸結紮歯周炎マウスモデルを用いた動物実験のタイムスケジュールと方法

12 週齢の C57BL/6 野生型雄性マウスの上顎左側第二大臼歯歯頸部に 5-0 絹糸を結紮し、歯周組織に炎症を誘導した。また、結紮時に KP-457 を口蓋歯肉に投与した。投与 4 日後に結紮側の口蓋歯肉組織と上顎骨を回収し、口蓋歯肉組織中の *Nfatc1* と *Trap* の発現を real time-PCR 法で、上顎骨を含む歯周組織中の破骨細胞数を TRAP 染色で調べた。

図 2. 破骨細胞様細胞の分化における破骨細胞の分化遺伝子と Notch シグナル経路関連遺伝子と *Adam10*, *Adam17* の発現量の解析

マウス骨髄由来の細胞を 2.0×10^5 cells/cm² の細胞密度で播種し、播種から 7 日後に RANKL (50 ng/mL) を添加した。添加から 2, 4, 8, 12, そして 24 時間後に回収した mRNA を用いて、破骨細胞分化因子である (A) *Nfatc1*, (B) *Dcstamp*, Notch シグナル経路関連遺伝子である (C) *Notch1*, (D) *Notch2*, (E) *Notch4*, (F) *Jagged1*, *Adam10*, *Adam17* の遺伝子発現量を qRT-PCR 法で検討した。グラフはそれぞれ別のマウスから得た骨髄由来の細胞を用いた独立した 3 回の実験の平均値を示す。■ :

RANKL 未添加群, □ : RANKL 添加群, エラーバー : 標準偏差。それぞれの時間における RANKL 添加群と RANKL 未添加群の遺伝子発現量を Student's *t*-test を用いて検定した。* : $p < 0.05$

図 3. 破骨細胞における Notch シグナル経路の関連遺伝子に対応するタンパク質 産生量の解析

マウス骨髄由来の細胞を 2.0×10^5 cells/cm² の細胞密度で播種し, 播種から 7 日後に RANKL (50 ng/mL) を添加した。RANKL 添加後 4, 8, 12, 24, そして 48 時間後に回収したタンパク質中の NOTCH1, NOTCH2, NOTCH4, JAGGED1 タンパク質産生量をウエスタンブロット法で検討した。

(A) NOTCH1, NOTCH2, NOTCH4, JAGGED1 のウエスタンブロッティング像

(B) 相対黒化度で示した NOTCH2 および JAGGED1 のタンパク質産生量

検出されたバンドの強度は, Image J を用いて黒化度を数値化し, マクロファージを 1.0 とした比率で相対黒化度を算出した。グラフはそれぞれ別のマウスから得た骨髄由来マクロファージ様細胞を用いた独立した 3 回の実験の平均値を示す。■ : RANKL 未添加群, □ : RANKL 添加群, エラーバー : 標準偏差。それぞれの時間にお

ける RANKL 添加群と RANKL 未添加群のタンパク質産生量を Student's *t*-test を用いて検定した。* : $p < 0.05$

図 4. JAGGED1 中和抗体, GI254023X, KP-457 の細胞への影響

(A) 細胞の代謝活性の検討。マウス骨髄由来のマクロファージ様細胞を 2.0×10^5 cells/cm² の細胞密度で播種し, 播種から 7 日後に RANKL (50 ng/mL) と同時に JAGGED1 中和抗体 (1–320 mg/mL) , GI254023X (1–1,000 μ M) , あるいは KP-457 (1–1,000 μ M) を添加して 5 日後に cell counting kit 法を用いて細胞生存能を検討した。

(B, C) 破骨細胞様細胞への分化に及ぼす影響の検討。マウス骨髄由来のマクロファージ様細胞を 2.0×10^5 cells/cm² の細胞密度で播種し, 播種から 5 日後に RANKL (50 ng/mL) を添加すると同時に, JAGGED1 中和抗体, そのアイソタイプ抗体, そして GI254023X や KP-457 を添加した。そして, 分化誘導開始 5 日後に TRAP 染色を行った。そして, 3 つ以上の核を有する破骨細胞様細胞を成熟破骨細胞様細胞とみなし, 1 well (3.8 cm²) あたりの成熟破骨細胞様細胞数を計測した。それぞれ別のマウスから得た骨髄由来マクロファージ様細胞を用いた独立した 3 回の実験の代表例の写真とそれらの平均値と標準偏差のグラフを示す。スケールバー : 100 μ m, 拡大率 :

11.1 倍。それぞれの成熟破骨細胞様細胞数の違いを One way ANOVA/Tukey-Kramer test を用いて検定した。* : $p < 0.05$

図 5. 歯周炎組織中での破骨細胞分化遺伝子の発現量に与える KP457 の影響

歯肉組織中の破骨細胞分化関連遺伝子 (A) *Nfatc1*, (B) *Trap* の発現量を qRT-PCR 法で検討した。各遺伝子の発現量を内在性コントロールである *Actb* の発現量で補正し、そして各群内で非結紮側を基準として結紮側の発現量を示す。各群 5 匹ずつから得られた歯肉結合組織を用いて各々独立した実験の平均値と標準偏差を示す。□ : 非結紮群, ■ : 結紮群, エラーバー : 標準偏差。One way ANOVA/Tukey-Kramer test を用いて検定した。* : $p < 0.05$

図 6. 歯周炎組織中での破骨細胞分化に与える KP457 の影響

各群における (A) HE 染色像, (B) TRAP 染色像を示す。染色像の黒線枠内で囲んだ部位の拡大像を下段に示す。DMSO : 溶媒である DMSO を投与した歯周炎マウス群 (陰性対照群), KP-457 : DMSO に溶解した KP-457 を投与した歯周炎マウス群 (実験群)。いずれも、独立したマウス (各群 3 匹で 3 切片ずつ) の代表的組織像である。スケールバー : 100 μm , 黒色矢印: 破骨細胞, 黄色矢印: 絹糸

(C) 破骨細胞数の比較。TRAP 染色陽性かつ 3 核以上の細胞を破骨細胞と定義し、口蓋根周囲の歯槽骨吸収窩に存在する破骨細胞数を計測した。□：非結紮群（健康側対照），■：結紮群，エラーバー：標準偏差。独立したマウス（各群 3 匹で 3 切片ずつ）を用いて，それぞれの破骨細胞数の違いを One way ANOVA/Tukey-Kramer test で検定した。*： $p < 0.05$

図 7. 破骨細胞の分化における ADAM-Notch シグナルの仮説メカニズム概略図

これまでに RANK-RANKL 経路での NFATc1 の活性化を介して破骨細胞が分化する経路が解明されてきた⁴⁾ (①)。一方で，JAGGED1 や NOTCH2 を介した骨代謝への影響も報告されてきたが破骨細胞の分化に対する効果は意見が分かれていた^{5,6)}。本研究では，マクロファージ表面上で RANK-RANKL の結合後で (①)，*Nfatc1* の発現が上昇するよりも前に，NOTCH2 と JAGGED1 発現することが分かった (②)。その際に，NOTCH2 を切断する ADAM17 を阻害 (KP-457) すると *Nfatc1* の発現と破骨細胞の分化が抑制されたことから，ADAM17 が作用して *Nfatc1* の発現と破骨細胞の分化が開始されること (④) が分かった。

表 1. qRT-PCR 法で用いた PCR プライマー

Gene	Direction	Primer sequence	Product Size (bp)
<i>Notch1</i>	forward	5'-ACTGCGAGAACAACACACC-3'	83
	reverse	5'-GGTGAAGGAGTTGATACCATCC-3'	
<i>Notch2</i>	forward	5'-AGACTGGCGACTTCACTTTCG-3'	124
	reverse	5'-ACACCATCCACACAAACTCCTC-3'	
<i>Notch3</i>	forward	5'-ATCTGCCACAGGGGATACAC-3'	123
	reverse	5'-GAGGCAAGAACAGGAAAAGGAG-3'	
<i>Notch4</i>	forward	5'-ACCTCTAATCCCTGCCTGAAC-3'	108
	reverse	5'-GTCCATGTCTTTCTCACATCGG-3'	
<i>Dll1</i>	forward	5'-AGAAGAGAAGATCGCCCAAC-3'	115
	reverse	5'-AGACAGAACATACACCGACTGG-3'	
<i>Dll3</i>	forward	5'-CGGATGCACTCAACAACCTG-3'	125
	reverse	5'-AATGGAAGGGGCTGGTATGAC-3'	
<i>Dll4</i>	forward	5'-GATGGGGAGGTCTGTTTTGTG-3'	112
	reverse	5'-CAGGTGCAGGTATAACCCTTTG-3'	
<i>Jagged1</i>	forward	5'-GCTACTACTGTGATTGCCTTCC-3'	132
	reverse	5'-GTGGACAGATACAGCGATAACC-3'	
<i>Jagged2</i>	forward	5'-CGTCGTCATTCCCTTTCAGTTC-3'	88
	reverse	5'-ATCTGGAGTGGTGTTCATTGTCC-3'	
<i>Adam10</i>	forward	5'-ATGACTGGAGTAGAGGAAGGAG-3'	102
	reverse	5'-TCTTTCAGCCAGAGTTGTGC-3'	
<i>Adam17</i>	forward	5'-AAACAGTCATGGAGGGGTTTG-3'	130
	reverse	5'-CAGGTCAGCTTCCTTTGTGAG-3'	
<i>Nfatc1</i>	forward	5'-AATAACATGCGAGCCATCATC-3'	109
	reverse	5'-TCACCCTGGTGTCTTCCTC-3'	
<i>Dcstamp</i>	forward	5'-TGTGGACTATCTGCTGTATCGG-3'	125
	reverse	5'-AATCATGGACGACTCCTTGGG-3'	
<i>Trap</i>	forward	5'-ATGCCAGCGACAAGAGGTTC-3'	94
	reverse	5'-TGGTTTCCAGCCAGCACATAC-3'	
<i>Actb</i>	forward	5'-CTTTTCCAGCCTTCCTTCTTG-3'	106
	reverse	5'-GGCATAGAGGTCTTACGGATG-3'	