九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

γ-グルタミルトランスペプチダーゼの骨破壊作用

新飯田，俊平
国立長寿医療センター運動器疾患研究部骨代謝制御研究室

https://doi.org/10.15017/12841

出版情報：福岡醫學雜誌. 99 (10), pp.209-213, 2008-10-25. 福岡医学会
バージョン：
権利関係：

KYUSHU UNIVERSITY

γ-グルタミルトランスペプチダーゼの骨破壊作用

国立長寿医療センター 運動器疾患研究部 骨代謝制御研究室

新飯田　俊平

はじめに

炎症による骨破壊は関節リウマチ（Rheumatoid Arthritis，以下 RA）や歯周炎でみられる病態である．RA は長い間人類に苦痛を与え続けているが，近年，生物学的製剤とよばれる抗 TNF-α 抗体製剤（主成分インフリキシマブ）が登場したことで，RA 治療は大きく前進した．これに続く IL-6 や RANKL を標的とした抗体製剤にも大きな期待が寄せられている．最近我々は，新たな抗体製剤の可能性のある標的分子を同定した．γ-グルタミルトランスペプチダーゼ（GGT）は，細胞のグルタチオン（GSH）代謝における γ-グルタミル回路の重要酵素である[1]．一般には肝・胆道系疾患の生化学マーカーとして臨床応用され，飲酒により上昇することもよく知られている．

GGT が骨吸収に関連するという事実はこれまでまったく知られていなかった．我々も骨吸収関連遺伝子として GGT が同定されたときは何かの手違いだと思った．しかし，色々調べてみると，GGT は確かに骨吸収の主役である破骨細胞の分化を支持した[2]．RA モデルのひとつであるコラーゲン誘導性関節炎（CIA）マウスの関節では GGT の発現亢進と，骨吸収への関与が示された[3]．RA 患者の関節滑液からも GGT が検出され，その量は変形性関節炎（OA）患者のそれよりも有意に高値であった[3]．我々は関節炎で発現亢進する GGT の骨破壊への関与を解析し，GGT を標的とした新たな生物学的製剤の可能性を検討した．

1．GGT

GGT（CD224）は外分泌腺の管腔上皮細胞や肝細胞の毛細胆管などに局在する細胞膜外酵素（EC 2.3.2.2）である．GGT は，腎臓においてもっとも大量に存在し，肝臓は腎臓に比べれば 1000 分の 1 程度といわれている．GGT の局在は近位尿細管上皮細胞の上皮縁に局在する．GGT は GSH などの γ-グルタミル化合物の γ-グルタミル基を他のアミノ酸へ転移し，新たな γ-グルタミル化合物を生成する転移反応と，その γ-グルタミル結合を加水分解する反応を触媒する酵素として働く．基質となる GSH は，グルタミン酸，システイン，グリシンからなるトリペプチドで，GGT はグルタミル酸とシステインの γ-グルタミル結合に作用し，グルタミン酸とシスティニルグリシンに分解する．システィニルグリシンはさらにジペプチダーゼによりシステインとグリシンに分解され，各々バラバラになったアミノ酸は細胞内に取り込まれて再び GSH にリクルートされる[1]．GGT はこの一連のグルタミルサイクルの最初のステップの重要な酵素というわけである．

GGT 欠乏では，γ-グルタミル回転が出だしから機能しないので，システイン欠乏症，グルタチオン血症，グルタチオン尿症などの重篤な症状を引き起こす[4]．GGT のノックアウトマウスは体型が小さく，性腺機能不全，白内障などを発症し，数ヶ月で早死にする[5]．このマウスに，N-アセチルシステインを投与するとこれらの病態は明瞭に改善する[5]．このことから，GGT 欠乏による，システイン供給システムが破綻し，体内のシステイン総量が低下したことに原因があることは明らかである．骨組織にも変化が見られる．骨芽細胞による骨形成が抑制され，破骨細胞による骨吸収亢進が認められる．両者のインバランスに

Shumpei Niida
Department of Bone and Joint Disease, Research institute, National Center for Geriatrics and Gerontology (NCGG), 36-3 Gengo, Morioka-machi, Obu City, Aichi 474-8522, Japan
γ-Glutamyl Transpeptidase Acts as a Bone Resorbing Factor

より，このマウスの骨は粗鬆化する[6]．しかし，この病態もシステインの投与で改善する傾向が見られることから，システイン欠乏による間接的な影響と考えるのが自然である．

GGT による GSH の分解や新生に関わるγ-グルタミルサイクルは免疫細胞の活性と生存にも寄与すると考えられている．例えば，GSH は強力なアンチオキシダント物質としても知られているが，リンパ球などの免疫細胞上に発現した GGT が細胞内 GSH 量をコントロールし，NO の発生を制御したり[7]，Fas 誘導性のアポトーシスに抵抗するように働きかけていることが示されている[8]．そこで，リンパ球の集積と骨破壊の両方が観察される RA について，GGT の発現を調べた[3]．RA および OA の患者の方々からインフォームドコンセントの下で滑液を，手術適用患者の方々からは滑液と滑膜を採取し（国立長寿医療センター倫理委員会承認），検討を行った[3]．RA 群の滑液中の GGT 値（酵素活性値）は，OA 群に比べ有意に高値を示した（図１）．滑膜の免疫組織化学的観察では，浸潤したリンパ球のほとんどで GGT 陽性反応を示した．これらの細胞のほか，マクロファージ，プラズマ細胞，毛細血管などで GGT の局在が認められた．

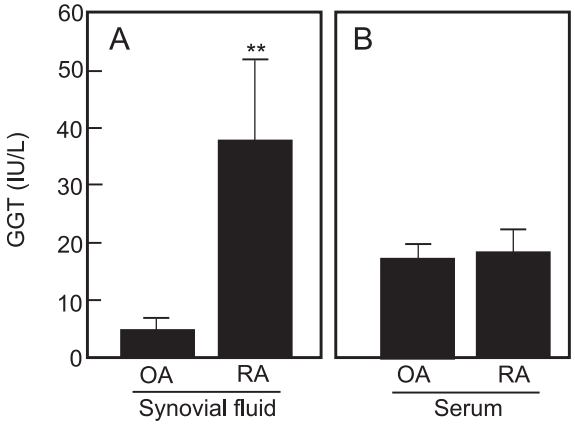

図１ RA と OA 患者の滑液中ならびに血清 GGT 値（酵素活性値）．RA 滑液 GGT は OA に比べ有意に高値を示した（A）．血清 GGT に差は見られない（B）．局所的な GGT の発現亢進が考えられる．
**$p < 0.01$ vs OA

２．GGT の骨吸収作用

我々は，マウスＴリンパ腫細胞 BW5147 株が，マウスに移植すると骨に生着し，激しい骨破壊を引き起こす傾向を見出した[9]．このような病的環境下では未知の骨吸収因子が存在し，破骨細胞の増殖・活性化をさらに亢進しているのではないかと考えた．そこで，BW5147 細胞の培養上清を骨髄培養系に添加したところ，破骨細胞誘導活性を認めたので，この活性を指標に発現クローニング法による骨吸収関連遺伝子探索を実施した[9]．その結果，GGT を含む，これまでに報告されていない複数の破骨細胞分化支持能をもつ遺伝子が同定された．

この結果をうけ，破骨細胞分化誘導活性という GGT タンパクの新たな生物活性について研究を開始した．最初に，ラット腎臓から精製した GGT を骨髄培養系に添加し，誘導される破骨細胞数を無添加群と比較した（この培養系には至適濃度以下の活性型ビタミン D3（間質系細胞からの破骨細胞分化因子 RANKL 誘導物質）を含む）[2]．GGT 添加群では有意に多くの破骨細胞が形成された．多くの骨吸収因子は RANKL の誘導因子であることが多い．そこで，骨芽細胞からの RANKL 発現を調べたところ，GGT の刺激で RANKL mRNA の上昇が確認された．さらに，最近の研究では，GGT は破骨細胞前駆細胞にも直接作用して破骨細胞分化を促進することも明らかになった[3)10]．このとき，GGT は破骨細胞前駆細胞からの RANKL 受容体（RANK）の発現を亢進させていることも示された．次に，in vivo における GGT の骨吸収作用を確認する目的で，GGT を過剰発現するトランスジェニック（Tg）マウスを作出し，それらの骨組織について解析を行なった．骨形態計測学的解析では，同腹の野生型マウスの骨に比べ，有意な骨量減少を認めた[10]．これらの結果は，高 GGT 濃度が骨吸収に影響していることを示すと同時に，例えば，血中 GGT 濃度が上昇する肝炎やアルコール摂取過剰でみられる骨量減少に GGT が関与している可能性を疑わせる．さらに，骨芽細胞でのみ GGT を強制発現する Tg マウスを作出した．このマウスの骨組織においても破骨細胞形成と骨吸収の亢進が認められ，局所的な GGT 発現が骨吸収を刺激することが明らかになった[9]．

GGT の破骨細胞誘導活性において，もっとも注目すべき点は，酵素活性とは無関係な生物活性であることだ． 骨髄培養系に抗 GGT ポリクローナル抗体（阪大，谷口直之教授より供与）を加えておくと，GGT

を添加しても破骨細胞の形成は顕著に抑制される[2]．実は，この抗体に GGT の酵素活性阻害効果はない．このことは，破骨細胞誘導に GGT 酵素活性は関与していないことを示唆する．GGT の酵素活性阻害剤であるアシビシンを GGT に修飾させて骨髄細胞を刺激してもほぼ同等の破骨細胞誘導効果が認められた[2]．酵素活性を欠失させるように改変した GGT 遺伝子を骨髄マクロファージ（破骨細胞前駆細胞）に導入して破骨細胞誘導を刺激すると野生型細胞より多くの破骨細胞が形成される[10]．これらの結果から，我々は，GGT に特異的な受容体が存在し，サイトカインのような機能を発現しているのではないかと考えている．

CIA マウスは RA モデルのひとつとして利用されている．このマウスの炎症滑膜について調べた．RA 患者同様に，炎症滑膜にリンパ球の集積が観察され，それらは GGT 抗体染色に陽性反応を示した[3]．GGT の発現は，滑膜から RNA を抽出して RT-PCR 法で調べた．正常マウスでは GGT mRNA の発現はないが，CIA マウスでは発現が認められた（図２）．これらの結果に基づき，我々は GGT を標的とした新たな治療戦略の可能性を求め，次項の実験を行った．

３．抗 GGT モノクローナル抗体（GGTmAb）による治療効果

炎症滑膜細胞を培養すると自然に破骨細胞形成が起こることが知られている[11)12)]．この系に前出の抗 GGT 抗体を添加すると，抗体を添加しない場合に比べ，誘導される破骨細胞マーカー（TRAP）陽性細胞数は有意に減少した（図３）．この結果は炎症滑膜細胞群から GGT が産生されており，それが同細胞群から誘導される破骨細胞形成に寄与していることを示している．そして同時に，GGT が破骨細胞形成抑制の標的になることを示唆している．

新たな抗体治療薬のシーズとなることを期待して GGT に対するモノクローナル抗体 GGTmAb の作製を行った．精製した GGTmAb （抗体名 AGT-3，AC バイオテクノロジーズ，横浜）を，CIA マウスに対し，適正な管理下において，200 μg/body の割合で週２回，４週間腹腔投与した．比較のため，同量の抗 TNF-α 抗体も同条件で投与した．毎日，体重および炎症スコアを観察し，最初の投与から 28 日目に炎症関節部位を摘出して病理的観察を行った．その結果，コントロールとして設定した PBS 投与群（非治療群）に比べ，GGTmAb 投与群は，TNF-α 抗体投与群とともにＸ線像による関節の破壊スコア（関節の状態を正常から重症までを０点から３点までに点数化して加算したもの）は有意に低かった[3]．病理観察では，Ｘ線スコアに一致して GGTmAb 投与群において関節形態が維持されている個体が多く，抗体による骨破壊抑制効果が示された（図４）．それを裏付けるように，破骨細胞数は，TNF-α 抗体投与群同様，有意に減少していた（図５）．以上の結果から，炎症関節で発現亢進する GGT は明らかに破骨細胞増殖に関わる病態因子であり，GGTmAb は有効な骨破壊抑制薬となることが示された．一方，炎症の抑制効果については TNF-α 抗体投与群では顕著な抑制効果を認めたが，GGTmAb 投与群では若干の緩和があるものの，有意な有効性を認めることはできなかった．

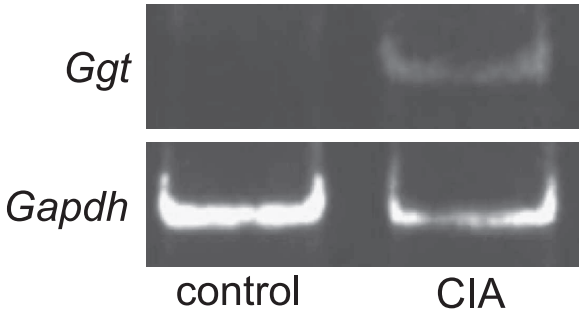

図２　RT-PCR 法による GGT mRNA の検出．CIA マウスでは GGT mRNA の発現が認められた．
（文献３の図改変）

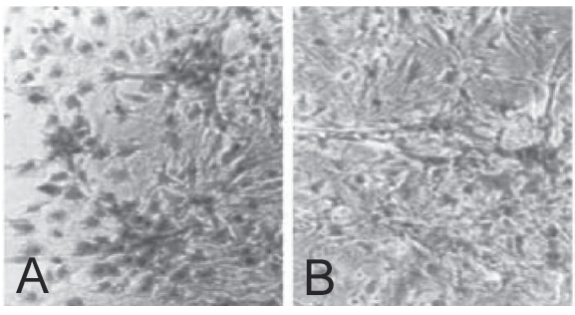

図３　In viro による破骨細胞形成抑制効果．CIA マウスの滑膜細胞を培養すると自然に TRAP 陽性の破骨細胞様細胞（濃く染まっている細胞）の形成が起こる（A）．抗 GGT 抗体を添加した培養系では TRAP 陽性細胞の数が減少している（B）．
（文献３の図改変）

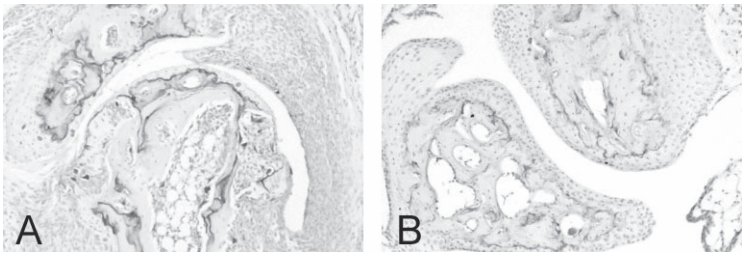

図4 GGTmAb による CIA マウスの骨破壊抑制効果．CIA マウスに対して GGTmAb を 200mg/body × 2times/week を 4 週間投与．抗体投与群（B）では下肢の指関節破壊の亢進が見られず，正常な関節を維持している．写真 A は正常 IgG を投与したマウスの指関節．関節の破壊が認められる．

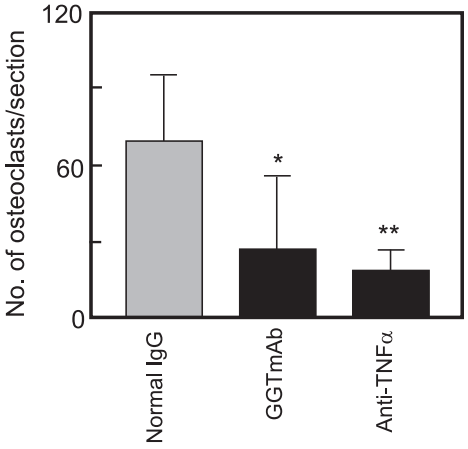

図5 GGTmAb，anti-TNFα Ab 投与後の指関節部の破骨細胞数の比較．コントロール IgG 投与群に比べ，両抗体投与群とも著しい破骨細胞減少が認められた．（文献 3 の図改変）
$^{*}p < 0.05$，$^{**}p < 0.01$ vs control IgG

4．GGT の破骨細胞誘導メカニズム

GGT の破骨細胞分化誘導メカニズムについてはまだ完全に把握されていない．仮説のもっとも肝心な GGT 受容体がまだ同定されていないからだ． しかし，すでに候補となる細胞膜上のタンパクを同定し，その解析を行っており，ごく近い将来全容が明らかになるだろうと期待している．

これまでの研究からは，GGT は骨芽細胞に作用して，RANKL の発現を刺激すること[2)3)10)]，破骨細胞前駆細胞に作用して RANK の発現を一過性に亢進させることなどが示されている[3)]．また，破骨細胞前駆細胞において，破骨細胞分化関連因子である c-Fos，NFATc1，c-Jun などの主要転写因子の発現が GGT の刺激で亢進することも明らかになっている[10)]．これら一連の現象をみると，やはり，受容体を介するシグナルの存在が見えてくる．

おわりに

今回の RA モデルマウスの成績から，関節滑液内において GGT が検出されるヒト RA においても同様のことが起こっている可能性は十分に考えられる．また，同じ炎症性骨破壊を呈する歯周炎でもリンパ球の遊走があり，GGT の局所的 up-regulation が推測される．歯周炎に関しては現在研究中のことでもあり詳細は差し控えるが，確かに歯周炎患者の口腔内 GGT 値は健常人より高い傾向にある．このことからすると，GGT は歯槽骨破壊においても病態因子として作用している可能性は十分考えられるところである．

近年，TNF-α や IL-6，RANKL を標的とした生物学的製剤の登場により，RA の治療に明るい兆しが見えている．このキャスティングボードにさらに抗 GGT 抗体製剤の参入のオファーはあるのか．それは基礎研究者の我々が判断することではないが，こういうオプションがある，ということを臨床の先生方や製薬企業の方々には是非知っておいてもらいたい．一方，炎症性骨破壊の病態理解という面においては，新たな player を見出したという観点から，小さいながらも貢献できたのではないかと思っている．加えて，GGT がサイトカインであるという新たな概念を提唱できるかもしれない．これは，イチロー選手ではないが，何十年も前から酵素と信じられてきた記録を掘り起こす機会になるかもしれないと，密かに思っているところである．

稿を終えるにあたり，今回の執筆の機会を与えて頂きました福岡医学会編集主任幹事続輝久先生，編集幹事野中和明先生，世話役の久木田敏夫先生に感謝いたします．また，GGTmAb の開発者で，共同研究者の石塚保行博士（エーシーバイオテクノロジーズ）には多大なる貢献を頂き深謝いたします．また谷口直之教授（阪大），池田義孝教授（佐賀大）ならびに森脇佐和子博士，鶴留純子氏，川原美幸博士ら他，本研究に参加頂いた共同研究者の方々に改めて感謝いたします．

参 考 文 献

1） Lieberman MW, Barrios R, Carter BZ, Habib GM, Lebovitz RM, Rajagopalan S, Sepulveda AR, Shi ZZ and Wan DF : gamma-Glutamyl transpeptidase. What does the organization and expression of a multipromoter gene tell us about its functions? Am. J. Pathol. 147 : 1175-1185, 1995.

2】 Niida S, Kawahara M, Ishizuka Y, Ikeda Y, Kondo T, Hibi T, Suzuki Y, Ikeda K and 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 : 5752-5759, 2004.

3】 Ishizuka Y, Moriwaki S, Kawahara-Hanaoka M, Uemura Y, Serizawa I, Miyauchi M, Shibata S, Kanaya T, Takata T, Taniguchi N and Niida S : Treatment with anti-gamma-glutamyl transpeptidase antibody attenuates osteolysis in collagen-induced arthritis mice. J. Bone Miner. Res. 22 : 1933-1942, 2007.

4） Meister A and Larsson A : A Glutathione synthetase deficiency and other disorders of the gamma-glutamyl cycle, In Beaudet AL, Scriver CR, Sly WS and Valle D (ed) : in The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 7th ed. pp.1461-1477, McGraw-Hill Inc. New York, 1995.

5） Lieberman MW, Wiseman AL, Shi ZZ, Carter BZ, Barrios R, Ou CN, Chévez-Barrios P, Wang Y, Habib GM, Goodman JC, Huang SL, Lebovitz RM and Matzuk MM : Growth retardation and cysteine deficiency in gamma-glutamyl transpeptidase-deficient mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 : 7923-7926, 1996.

6） Levasseur R, Barrios R, Elefteriou F, Glass DA 2nd, Lieberman MW and Karsenty G : Reversible skeletal abnormalities in gamma-glutamyl transpeptidase-deficient mice. Endocrinology 144 : 2761-2764, 2003.

7） Henson SE, Nichols TC, Holers VM and Karp DR : The ectoenzyme gamma-glutamyl transpeptidase regulates antiproliferative effects of S-nitrosoglutathione on human T and B lymphocytes. J. Immunol. 163 : 1845-1852, 1999.

8） Carlisle ML, King MR and Karp DR : Gamma-glutamyl transpeptidase activity alters the T cell response to oxidative stress and Fas-induced apoptosis. Int. Immunol. 15 : 17-27, 2003.

9） Ishizuka Y, Mochizuki R, Yanai K, Takatsuka M, Nonomura T, Niida S, Horiguchi H, Maeda N and Fukamizu A : Induction of hydroxyapatite resorptive activity in bone marrow cell populations resistant to bafilomycin A1 by a factor with restricted expression to bone and brain, neurochondrin. Biochim. Biophys. Acta. 1450 : 92-98, 1999.

10】 Hiramatsu K, Asaba Y, Takeshita S, Nimura Y, Tatsumi S, Katagiri N, Niida S, Nakajima T, Tanaka S, Ito M, Karsenty G and Ikeda K : Overexpression of gamma-glutamyltransferase in transgenic mice accelerates bone resorption and causes osteoporosis. Endocrinology 148 : 2708-2715, 2007.

11） Suzuki Y, Nishikaku F, Nakatuka M and Koga Y : Osteoclast-like cells in murine collagen induced arthritis. J. Rheumatology 25 :1154-1160, 1998.

12） Suzuki Y, Tsutsumi Y, Nakagawa M, Suzuki H, Matsushita K, Beppu M, Aoki H, Ichikawa Y and Mizushima Y : Osteoclast-like cells in an in vitro model of bone destruction by rheumatoid synovium. Rheumatology (Oxford) 40 : 673-682, 2001.

（参考文献のうち，数字がゴシック体で表示されているものについては，著者により重要なものと指定された分です.）

プロフィール

新飯田　俊平（にいだ　しゅんぺい）

国立長寿医療センター研究所（運動器疾患研究部骨代謝制御研究室）．歯博.

◆略歴：東京理大卒．歯学博士（東北大）．東北歯科大（現 奥羽大），広島大学歯学部を経て平成 14 年より現職.

◆研究テーマと抱負：骨組織の構造と機能の解析．そろそろ骨を卒業したい.