

骨粗鬆症発症メカニズムの解明と創薬開発への試み（29－22）

主任研究者 竹下 淳 国立長寿医療研究センター 運動器疾患研究部（室長）

研究要旨

3年間全体について

骨は、壊されては新たに造られるサイクルを繰り返すことによりカルシウムの恒常性や骨の量と強度及びしなやかさを維持するが、骨粗鬆症に代表される代謝性骨疾患はその制御の破綻が原因と考えられる。骨吸収から骨形成へのカップリング機構は骨の改変を制御する大切な仕組みでありながら長らく未解明の研究課題であった。主任研究者らは、骨代謝の新しいメカニズムの一つであるカップリング機構を分子レベルで解明することにより骨粗鬆症の新規診断薬及び治療薬の開発へ応用することを企画する。すなわち、カップリング因子として **Cthrc1** を同定し(JCI 2013)、その骨形成促進活性を利用し骨粗鬆症治療薬の開発へ応用することを目指した。**Cthrc1** のシグナル伝達機構を解明するために受容体分子として **Wnt** のシグナルを抑制する膜タンパクである **Waif1** を同定した(JBMR 2018)。破骨細胞が産生する **Cthrc1** は骨芽細胞上の **Waif1** に結合し、骨芽細胞分化を刺激することにより骨形成を促進することを明らかにした。骨芽細胞特異的 **Waif1** コンディショナルノックアウト(**Waif1 cKO^{ΔOB}**)マウスの骨解析により骨形成と骨吸収の両方が低下し、低骨代謝回転型で高骨量を発症することがわかった。骨形成の低下は **Waif1** 欠損による **Cthrc1** 刺激が入らないことにより生じ、骨吸収低下は **Waif1** 欠損が **Rankl** 発現の低下を介して破骨細胞形成の減少を引き起こすことを突き止めた。破骨細胞特異的 **Cthrc1 cKO** マウスと同様に **Waif1 cKO^{ΔOB}** マウスにおいても **RANKL** 投与によるカップリング機能評価系により骨吸収後にみられる骨形成の低下を原因とするカップリング機能障害が認められたことから、**Waif1** が **Cthrc1** の機能的な受容機構を司る細胞膜タンパクであることを実証した(JBMR 2018)。カップリング機能を促進する薬剤開発を目指して **Cthrc1** 刺激をミミックする **Waif1** 抗体を取得した。さらに、新しいカップリング因子の探索と機能解明を目的とし、マクロファージが産生し骨形成を促進する分泌因子として **Emilin2** を同定し、**Emilin2** ノックアウトマウスは3ヶ月齢で低骨量を発症し、類骨の増加と石灰化の遅延によりカップリング機能が障害されることを突き止めた。

2019年度について

Waif1 を認識するマウスモノクローナル抗体をマウスに投与することにより **Cthrc1** 刺

激をミミックし骨形成を促進することで骨量を増加する抗体を得ることに成功した。また、マクロファージが産生し骨形成を促進する新しいカップリング因子として **Emilin2** を同定した。**Emilin2** ノックアウトマウスは3ヶ月齢で低骨量を発症し、**RANKL** 投与によるカップリング機能評価系を用いて **Emilin2** 欠損により類骨が増加し石灰化が遅延することでカップリング機能が障害されることを明らかにした。さらに、**Emilin2** は骨折の回復を改善することも判明した。

主任研究者

竹下 淳 国立長寿医療研究センター 運動器疾患研究部（室長）

分担研究者

伊東 昌子 長崎大学病院メディカルワークライフバランスセンター（教授）

研究期間 2017年4月1日～2020年3月31日

A. 研究目的

骨粗鬆症患者の治療と骨折予防としてビスホスホネート薬が主に使われているが、一旦減少した骨量を再び増加し骨質を改善する作用はない。唯一アナボリック効果が期待される副甲状腺ホルモン(PTH)は薬価が高いことと副作用の問題で使用が制限されているために安価で骨を増やすアナボリック薬の開発が求められている。

主任研究者らは、これまでに破骨細胞が産生し骨形成を促進するカップリング因子の探索を行い、**Cthrc1** と **C3a** を同定した。本研究課題では、**Cthrc1** の受容体分子を同定し、カップリングのシグナル伝達機構を解明することによりこのメカニズムを応用して骨粗鬆症をターゲットとした骨形成促進薬の創薬開発の基盤を築くことを目的とした。また、骨代謝の新たなメカニズムを明らかにするためにマクロファージによる骨形成促進機構に着目しマクロファージが産生し骨形成を促進する因子の同定と機能解明を目指した。

B. 研究方法

3年間全体について

Cthrc1に結合する細胞膜タンパクとして**Waif1**を見出し、**Cthrc1**の骨形成促進作用に関わる**Waif1**の役割を解析することにより**Waif1**が**Cthrc1**の受容体であることを実証し、マウスに皮下投与すると骨量を増加するマウスモノクローナル**Waif1**抗体を取得した。また、マクロファージが産生する新しいカップリング因子として**Emilin2**を同定した。

ST2細胞を**Cthrc1**で刺激するとシグナル伝達分子として**PKC δ** 、**ERK**、**JNK**、及び

Rac1が活性化し骨芽細胞分化を促進することを見出したので、この活性化にWaif1が関与するかどうかをWaif1欠損ST2細胞、及びWaif1欠損骨芽細胞を用いてWestern blotting法とALP活性測定により解析した。Waif1 cKO^{ΔOB}マウスは骨形成と骨吸収の両方が低下し高骨量を発症することが判明したので、骨形成と骨吸収の両方が低下する原因を突き止めるためにWaif1 cKO^{ΔOB}マウスの骨における網羅的遺伝子発現解析を行った。また、Waif1欠損ST2細胞を用いてRANKL発現と破骨細胞形成の関連性を解析した。さらに、RANKL投与によるカップリング機能評価系を用いてWaif1 cKO^{ΔOB}マウスを評価することによりWaif1の骨代謝制御機能を解析した。Cthrc1刺激をミミックする薬剤を開発するために可溶性Waif1-His (sWaif1-His)をマウスに免疫し、常法に従いモノクローナル抗体を作成した。FACS解析及びALP活性測定により細胞膜上で発現するWaif1を認識し、骨芽細胞分化を促進するモノクローナル抗体をスクリーニングした。また、キットを用いて抗体のアイソタイプを決定し、IgGタイプ抗体を選出した。復水から得られた精製抗体を10mg/kg、週2～3回、合計10～12回マウスに皮下投与後、血清と大腿骨及び脛骨をサンプリングし、ELISA法により骨形成マーカーの測定、マイクロCT解析、および骨形態計測法により骨解析を行なった。

マウス骨髄由来マクロファージ(BMM)の培養上清を濃縮したものをCell migration assay kitを用いてST2細胞の遊走活性を測定した。次に、BMMを大量に培養し、migration活性を指標とし陰イオン交換カラムを用いて培養上清を分離・濃縮した後、SDS-PAGEにより展開したものをLC-MS/MS解析を用いて原因因子の特定を行った。特定した因子のリコンビナントタンパクを用いてmigration活性を測定した。また、RT-PCR法を用いて原因遺伝子の発現特異性を解析した。マウス大腿骨に骨孔形成術を施し骨回復時におけるマクロファージの出現を遺伝子発現解析、およびタンパクの局在を解析した。さらに、リコンビナントEmilin2を骨孔部位に塗布し、骨の再生をマイクロCTで解析した。CRISPR/Cas9法によりEmilin2ノックアウトマウスを作成し、3ヶ月齢と6ヶ月齢の骨解析を行なうと共にRANKL投与によるカップリング機能の評価系を用いてEmilin2欠損の影響を解析した。

主任研究者が開発したモデルマウスの骨量測定および骨構造・力学特性の解析はすべて、分担研究者の伊東がマイクロCT装置を使って行った。

(倫理面への配慮)

ヒトDNAやES細胞を用いた研究は含まれない。動物実験計画は、所属機関の遺伝子組換え実験安全委員会と動物実験倫理委員会において動物数、麻酔の方法、安楽死の方法、ストレスを和らげる方法など倫理的な側面からの審査を受け、実験は動物愛護の精神に則って実施した。

C. 研究結果

3年間全体について

ST2 細胞の膜タンパク画分から Cthrc1 結合分子として同定した Waif1 は、Cthrc1 刺激により PKC δ と ERK のリン酸化を介して骨芽細胞分化促進に深く関与することがわかった。骨芽細胞特異的に Waif1 を欠損した **Waif1 cKO^{ΔOB}** マウスは、骨形成と骨吸収の両方が低下する低骨代謝回転型で高骨量を発症した。骨形成の低下は **Waif1** を介した **Cthrc1** による骨芽細胞分化促進経路が消失したことが原因であった。一方、骨芽細胞における **Waif1** 発現の消失により **Rankl** の発現が低下し、その結果として破骨細胞形成が減少し骨吸収が低下することが判明した。**Waif1 cKO^{ΔOB}** マウスに **RANKL** を投与すると 10 日後の最低骨量はコントロールと差異が認められないことから **RANKL** 投与による破骨細胞形成と骨吸収活性には **Waif1** 欠損は影響を与えず、骨吸収に引き続いて誘導される骨形成に障害が認められ、2 ヶ月後の骨量回復が顕著に遅延した。**Waif1 cKO^{ΔOB}** マウスのカップリング機能障害は、破骨細胞特異的 **Cthrc1 cKO** マウスと同様な表現型であることから **Waif1** は **Cthrc1** シグナルに重要な細胞膜タンパクであることを実証した。

Waif1 を介した **Cthrc1** 刺激をミミックする薬剤を開発する目的でリコンビナント可溶性 **Waif1** を精製し、これを用いて **Waif1** に対するモノクローナル抗体を作出した。**Waif1** 欠損 ST2 細胞、及び **Waif1** を発現する ST2 細胞を用いて FACS 解析により ST2 細胞膜上で発現する **Waif1** を認識する約 100 種類のモノクローナル抗体を得た。さらに、それらの中からハイブリドーマ細胞の培養上清を用いて ST2 細胞を培養し、骨芽細胞の分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ(ALP)活性を促進する 24 種類の抗体を選出した。これらの中から IgG タイプの 12 種類のモノクローナル抗体を選出し、大量に調整した。抗体をマウスに皮下投与した結果、骨形成を促進し骨量を増やす 2 種類の抗体を得た。

マクロファージが産生し骨形成を促進する因子の存在を仮定し、BMM 細胞の培養上清を濃縮したものに ST2 の migration を促進する活性を検出し、この活性成分から分泌タンパクである **Emilin2** を発見した。**Emilin2** はマクロファージに発現特異性が高く、破骨細胞分化段階においては発現低下が認められた。リコンビナント **Emilin2** は ST2 の migration 活性をだけではなく、骨芽細胞の分化を促進し、脂肪細胞を抑制した。マウス大腿骨に骨孔形成術を施すと一過的に発現上昇するマクロファージ遺伝子と一致して **Emilin2** の発現上昇が認められ、骨折部位にリコンビナント **Emilin2** を塗布すると骨再生が促進した。一方、**Emilin2** ノックアウトマウスは 3 ヶ月齢で低骨量を発症したが、6 ヶ月齢では野生型と差が認められなかった。また、**Emilin2** の欠失により類骨が増加し石灰化が遅延することによりカップリング機能が障害されることが判明した。

2019年度について

Cthrc1 刺激をミミックし骨形成を促進することにより骨量を増加する Waif1 抗体を得ることに成功した。また、新規カップリング因子としてマクロファージが産生し骨形成を促進する Emilin2 を同定した。

D. 考察と結論

3年間全体について

骨代謝制御メカニズムの基本原理の一つであるカップリング機構は、骨吸収から骨形成のリレーを制御する重要な仕組みであり、これによって骨の代謝が正常に行われ骨の量と質が維持される。主任研究者らは、骨粗鬆症などの代謝性骨疾患はカップリング機構の破綻が原因であるとの仮説のもとに、カップリング因子の探索とその作用メカニズムの解明が骨粗鬆症治療薬の開発に重要であると考えている。

主任研究者らがカップリング因子として独自に同定した Cthrc1 は、破骨細胞が産生し骨芽細胞に作用し骨形成を促進することをマウスの遺伝学と新たに確立したカップリング機能を評価する *in vivo* アッセイ系を組み合わせることにより世界で初めて破骨細胞由来のカップリング因子であることを実証した分泌性タンパクである(JCI 2013)。破骨細胞特異的 Cthrc1 cKO マウスは骨形成が低下し低骨量を発症した。全身で Cthrc1 を過剰に発現するトランスジェニックマウスは高骨量を発症した。一方、岐阜大学の秋山らも、軟骨細胞を BMP-2 処理して発現上昇する遺伝子として Cthrc1 を同定し、sKO マウスでは発達異常が見られないものの低骨量を示すのに対して、I 型コラーゲンプロモーターを用いて骨芽細胞系で Cthrc1 を過剰発現するトランスジェニックマウスを作成し、高骨量を発症することを報告した(PLOS ONE 2008)。さらに、主任研究者らは、本研究課題により破骨細胞が産生する Cthrc1 が骨芽細胞上の Waif1 を介して骨芽細胞分化を促進することでカップリング機能を亢進することを明らかにした(JBMR 2018)。骨芽細胞特異的に Waif1 をノックアウトした Waif1 cKO^{ΔOB} マウスは、破骨細胞特異的 Cthrc1 cKO マウスと同様にカップリング機能が障害されていたことから Waif1 が Cthrc1 の機能的な受容機構に極めて重要な細胞膜分子であり、骨代謝制御機構における両分子の重要性が明らかとなった。これらのことは、破骨細胞由来の Cthrc1 がアナボリック薬として働くとの我々のコンセプトを支持するものであり、Waif1 が骨粗鬆症治療薬のターゲットとして妥当であることをあらためて再確認した。

そこで、Cthrc1 シグナルをミミックする薬剤開発を目的とし、Waif1 のモノクローナル抗体を作出した。それらの中から骨芽細胞分化を促進する抗体をスクリーニングし、最終的にマウスに投与することで骨量を増加する抗体を見出した。骨量を増加する抗体は血清骨形成マーカーも高値を示すことからこれらの抗体は Waif1 に結合することで骨芽細胞分化を刺激し骨形成を促進することが判明した。従って当初の目的であるカップリング機能を促進することで骨粗鬆症治療薬のシード薬を見出すということが達成された。今後、ヒ

トに応用するためには抗体の相補性決定領域(CDR)を決定すると共に **Waif1** のエピトープマッピングやヒト化抗体の作成や化合物のスクリーニング系の確立などが必要となることが予想される。

主任研究者らは、これまでに骨リモデリングにおいて成熟した破骨細胞の機能に着目した研究を行ってきたが、骨リモデリングはマクロファージが修復されるべき骨表面に移動・集積し破骨細胞へと分化することで骨吸収相は開始される。生体内のマクロファージを特異的に死滅させると骨形成が低下し、*in vitro* においてはマクロファージが骨芽細胞分化を促進することから骨代謝におけるマクロファージの重要性が示唆される。しかしながら、骨リモデリング機構に関してマクロファージの役割はほとんどわかっていない。本研究課題によりマクロファージの培養上清中に **ST2** 細胞の **migration** を促進する活性を検出し、生化学の手法を駆使することにより原因因子として **Emilin2** を同定した。**Emilin2** は、**Cthrc1** と同様に **C1q** ファミリーに属する **116kDa** の細胞外基質糖タンパクとして心臓の発達や血小板の活性化に関与することが知られているが、骨代謝における働きについては報告されていない。**Emilin2** は **ST2** 細胞の遊走活性を促進し、ストローマ/骨芽細胞系細胞で強制発現すると脂肪細胞分化が抑制され骨芽細胞分化が促進されることから、間葉系細胞の運命決定に関与することが示唆された。破骨細胞が産生する **Emilin2** はカップリング因子として骨リモデリングを制御することが実証されたので、今後、骨粗鬆症の治療薬開発や骨折治療の改善薬としての新たな切り口として注目されることが期待される。

2019年度について

現在、骨粗鬆症の治療薬として **RANKL** 抗体やスクレロスチン抗体が市場され有効性が注目されている。しかしながら、カップリング機構を応用した薬剤は未だ報告されていない。**Waif1** 抗体はカップリング機能を促進することで骨量を増加する画期的なものであり、新しい骨粗鬆症薬のリード薬として開発が期待される。

骨折の治療薬として **FGF2** や **BMP** などの開発が進行していると噂されていたが、未だに市場されていない。**Emilin2** は血管形成に関与することが報告されているが、骨代謝に関わる機能については知られていない。骨孔形成術により大腿骨にドリルで骨折を施すとマクロファージが集積し、**Emilin2** の発現も確認された。また、骨折の治癒過程に作用し、骨の再生を改善することが示唆されたことのみならず、カップリング機能にも重要な役割を果たしていることが実証されたことから骨粗鬆症や骨折の新たな治療薬としての開発が期待される。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

2019年度

なし

2018年度

- 1) Matsuoka K, Kohara Y, Naoe Y, Watanabe A, Ito M, Ikeda K, Takeshita S: WAIF1 is a cell-surface CTHRC1 binding protein coupling bone resorption and formation. J Bone Miner Res. 2018; 33:1500-1512.
- 2) Wang L, Iorio C, Yan K, Yang H, Takeshita S, Kang S, Neel BG, Yang W: A ERK/RSK-mediated negative feedback loop regulates M-CSF-evoked PI3K/AKT activation in macrophages. FASEB J. 2018; 32:875-887.
- 3) Takeshita S, Fumoto T, Ito M, Ikeda K: Serum CTX levels and histomorphometric analysis in Src versus RANKL knockout mice. J Bone Miner Metab. 2018; 36:264-273.

2017年度

- 1) 竹下 淳: 骨吸収と骨形成のカップリング 特集「骨リモデリング制御と疾患」第4章 CLINICAL CALCIUM、株式会社医薬ジャーナル社 vol.27, 1705-1711, 2017.

2. 学会発表

2019年度

- 1) Naoe Y, Takeshita S: Atf3/7 Transcriptionally Regulate the Expression of Cthrc1 in Osteoclasts. The 41st Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Sep. 23, 2019, Orland, Florida, USA

2018年度

- 1) 竹下 淳: 骨吸収から骨形成へのカップリングを制御する Cthrc1/Waif1 シグナル 徳島大学研究クラスター講演会 2019年1月25日 徳島
- 2) Kohara Y, Watanabe A, Ogiso N, Takeshita S: Macrophage-secreted Emilin2 Stimulates Chemotaxis and Differentiation in Stromal/Osteoblastic Cells. The 40th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Sep. 28, 2018, Montreal, Quebec, Canada
- 3) Kohara Y, Matsuoka K, Watanabe A, Ito M, Ikeda K, Takeshita S: Waif1 on osteoblasts functions as a receptor for osteoclast-derived Cthrc1 in bone remodeling. 第16回松山国際学術シンポジウム 2018年9月12日 愛媛
- 4) 竹下 淳: 破骨細胞が産生するカップリング因子 第60回歯科基礎医学会 アップデートシンポジウム9「骨改造制御の新局面: 骨吸収から骨形成への橋渡し機構を探る」 2018年9月7日 博多

2017年度

- 1) Kohara Y, Matsuoka K, Watanabe A, Ito M, Ikeda K, Takeshita S: Waif1 on

osteoblasts regulates bone remodeling as a receptor for osteoclast-derived Cthrc1.

第10回 NAGOYA グローバルリトリート 2018年2月16日 大府

- 2) 小原幸弘、松岡和彦、直江吉則、渡邊 淳、伊東昌子、池田恭治、竹下 淳:
Cthrc1 は Waif1 を介して骨カップリング機能を制御する 第2回 Skeletal Science
Retreat 2017年11月25日 岡山
- 3) Kohara Y, Matsuoka K, Ito M, Ikeda K, Takeshita S: Osteoclast-secreted Cthrc1
Regulates Bone Remodeling through Waif1, a Receptor on Stromal/Osteoblastic
Cells. The 39th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral
Research. Sep. 10, 2017, Denver, Colorado, USA

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし