

長寿医療研究開発費 平成23年度 総括研究報告

骨代謝制御メカニズムの解明と骨粗鬆症への応用に関する研究（23-12）

主任研究者 池田 恭治 国立長寿医療研究センター 運動器疾患研究部長

研究要旨

破骨細胞が分泌し骨芽細胞による骨形成を促進するカップリング因子として同定した候補タンパクについて、その *in vivo* での機能を実証するとともに、それと相互作用する分子の解析からカップリング因子の受容体の探索を開始した。骨代謝の司令塔役として注目される骨細胞（osteocyte）の生理機能を個体レベルで解析するツールを開発し、非荷重などの機械刺激に対する骨の適応反応のメカニズムを解析した。アンジオテンシン II の受容体である AT1a は、血圧や体液・電解質の恒常性に中心的な役割を担うとともに、寿命の制御を行うことでも注目されているが、新たに骨細胞の機能を介して骨代謝にも生理機能を有することが明らかになった。骨細胞は、1個ずつ石灰化骨基質に埋没して存在し、細胞モデルがほとんどないことが研究の進展を妨げていたが、新たに骨芽細胞から骨細胞へ分化系を開発して終末分化に関わる転写因子を同定した。

主任研究者

池田 恭治 国立長寿医療研究センター 運動器疾患研究部 部長

分担研究者

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

渡辺 研 国立長寿医療研究センター 運動器疾患研究部 室長

伊東 昌子 長崎大学放射線部 准教授

A. 研究目的

骨折の予防として我が国では、ビスフォスフォネート薬が主流である。これは、骨の破壊を止めるには有効であるが、積極的に骨を増やす作用はなく、古い骨を新しい骨に造りかえる自己再生も強力に抑制してしまうために、長期での有用性が疑問視される。食道炎などの副作用がありコンプライアンスも悪い。

2010年に日本イーライリリー社から発売が開始されたフォルテオ（R）は、副甲状腺ホルモン（PTH）の自己注射で強力なアナボリック作用が知られているが、1ヵ月分の費用が5万円以上と高価であり、骨折リスクの高い患者が適応で投与期間も18ヶ月と限定的されている。

ビスフォスフォネートとPTHに代表されるように、従来は破骨細胞と骨芽細胞をターゲットとした研究・治療薬の開発が中心であった。しかしながら、骨代謝はこれら細胞間の緊密な連携の上に成り立っており、また近年、第三の細胞である骨細胞（osteocyte）の司令塔としての役割にも注目が集まっている。

主任研究者らは、骨細胞のないマウスを独自に開発し、骨細胞が骨代謝の制御に重要な機能を果たしていること、とりわけ、非荷重などの力学的・機械的環境の変化を感じて、骨代謝の適応に必須の役割を担っていることを世界に先駆けて実証してきた（Cell Metabolism 2007）。また分担研究者の竹下は、骨吸収から骨形成へのカップリングに注目して、骨の自己再生の原動力となる分子の探索を行う系を開発してきた実績がある。

本研究では、破骨細胞あるいは骨芽細胞単独を対象とした研究ではなく、両者を連携するシグナル分子の探索、さらには両細胞の機能を骨の内部から制御する骨細胞に重点を置いて、骨代謝の新しい制御機構・調節因子の探索を行い、骨折予防への応用に資するような知見を得ることを目的として行っている。

B. 研究方法

分担研究者の竹下はすでに網羅的遺伝子発現解析によって、破骨細胞において発現し骨形成を促進するような遺伝子候補を絞り込んでいる。1年目にあたる23年度は、これらカップリングの候補因子のin vivoでの機能を評価するような系を確立してカップリング機構に働くことを証明した。マウスに破骨細胞の強力な分化因子であるRANKLを投与し、骨吸収によって骨量が減少した後に刺激される骨形成とこれによる骨量の回復を指標に、カップリング因子を遺伝工学的に欠失させたマウスと対照群を比較することによって、カップリング因子の生理機能に関する実証実験を行った。

さらに、実際のタンパク活性という視点からも、ex vivoで形成させた破骨細胞と骨芽細胞との共存培養系を利用して、破骨細胞で産生されて骨芽細胞の増殖・分化を促進する活性を評価する新しい検出システムの開発を試みた。破骨細胞の培養上清中にそのような活性が存在することを確認した上で、その活性を担うタンパク性因子の精製方法についても検討した。

主任研究者は、骨細胞をなくしたマウスの解析から、骨細胞が骨代謝において果たす役割を提唱している（Cell Metabolism 2007）。とりわけ、骨細胞がないと非荷重という力学的・機械的刺激に対する骨の応答が破綻することから、骨細胞は機械刺激の受容・伝導に中心的な役割を果たすと考えられる。そこで、骨細胞が果たすメカノ受容機構の

解明をめざして、1年目にあたる23年度は、心臓において圧負荷に対する細胞応答に関わることが知られているアンジオテンシンのAT1a受容体を遺伝的に欠失したマウスを導入して、AT1aが骨代謝においても生理機能を果たしているかどうか検討した。また、骨細胞でのみ標的分子を欠損させる系として、骨細胞で選択的に発現するDMP1 (dentin matrix protein 1) 遺伝子のプロモータを利用したトランスジェニックマウスを樹立し、インテグリンファミリーを骨細胞でのみ欠失したマウスを作出してベースラインの骨解析を、生化学、マイクロCT、骨形態計測法によって行った。

骨細胞は石灰化した組織に1個ずつ埋まって存在するため単離はきわめて困難で、*in vitro*で研究する細胞株もほとんどない。分担研究者の渡辺は、骨細胞を標的とした診断・治療のスクリーニング系の開発をめざして、*in vitro*で骨芽細胞から骨細胞への最終分化に伴う遺伝子発現データを取得して、転写ネットワークの候補因子を絞り込んだ。骨細胞の機能発現を短期間に再現できるような分化系を確立し、この系を利用して骨細胞をターゲットにした化合物スクリーニング系の開発が可能か否かを検討するのが目的である。

主任および分担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。動物実験は、所属機関の動物飼育設備利用者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た。実験は、動物愛護の精神に則って実施した。

C. 研究結果

骨吸収から骨形成へのカップリングは骨代謝の基本メカニズムであり、分担研究者の竹下は、破骨細胞が産生し骨芽細胞のリクルートと分化を促進する、カップリングの候補因子 *Cthrc1* を同定した。*Cthrc1* の産生は加齢とともに低下し、その発現制御機構の一端も解明し、さまざまな病態における骨の代謝回転の高低ともよく合致することが判明した。カップリング機能を *in vivo* で評価する系を確立するために、精製した RANKL を連続で皮下注射して1週間以内に骨吸収の亢進と骨量の減少を誘導し、続いて誘導される骨形成過程によって計8週間で骨量が回復するモデルを樹立した。さらにこの破壊後の骨再生モデルを利用して、*Cthrc1* の遺伝子を欠失したマウスとコントロールマウスで比較実験を行い、破骨細胞で *Cthrc1* を産生しないように設計されたマウスでは骨量の回復が障害されていることを証明した。以上から、*Cthrc1* がカップリング因子であるとの証拠を固めた。また、骨のカップリング活性を *ex vivo* で検出する方法を確立する目的で、破骨細胞と骨芽細胞との共存培養系において、破骨細胞から産生・分泌されて

骨芽細胞の増殖・分化を促進する活性を評価する新しいシステムの開発を行い、種々のカラムによる精製の工程を組み立てた。

主任研究者らは、骨に埋まる骨細胞が骨代謝の制御において、とりわけ非荷重などの物理的刺激の受容・伝達に重要な生理機能を担うことを個体レベルで明らかにし、診断・治療のターゲットであることを提唱した (*Cell Metabolism* 2007)。そこで機械受容に働く可能性があるインテグリンファミリーメンバーを骨細胞を含む骨芽細胞系列で欠失したモデルマウスを樹立し、ベースラインでの低骨量と turnover の抑制など骨代謝制御におけるその生理的意義を明らかにした。分担研究者の渡辺は、骨芽細胞から骨細胞へ *in vitro* で分化させる系を樹立して、骨細胞への終末分化に関わる遺伝子発現データを取得し、転写ネットワークの候補因子を絞り込んだ。また、骨細胞でのみ誘導的に標的分子を欠損させるようにデザインされた、新たなトランスジェニックマウスを作出した。

主任研究者は、アンジオテンシン受容体 AT1a を欠失したマウスが、低血圧に加えて、脂肪組織の減少、高骨量（高代謝回転）を呈すること、さらにエストロゲン欠乏や加齢による骨量減少からも防止されていることを明らかにした (*J Bone Miner Res* 2011)。以上の結果は、レニン・アンジオテンシン系と骨代謝との密接な関係を示唆するとともに、アンジオテンシン受容体 AT1a を欠失したマウスが長寿命を示すとの結果と合わせ (*J Clin Invest* 2009)、アンジオテンシンシグナルのブロックが、加齢に伴う循環系、代謝系、骨格系を含むさまざまな病理過程を遅延または防止する可能性を示す。また、骨細胞が産生するスクロスチンの中和抗体が強力なアナボリック薬として臨床開発中であるが、AT1a KO マウスにおいてはスクロスチンをコードする SOST 遺伝子の発現低下によって骨形成が高まることが判明した。したがって、AT1a シグナルを介するシグナルは、骨細胞機能を介して骨に対してアナボリック効果を発揮することが示唆された。

以上すべてのモデルの、マイクロ CT による 3 次元骨解析は分担研究者の伊東が行った。

D. 考察と結論

骨吸収から骨形成へのカップリングは、骨代謝の基本原則である。まず骨破壊が先行しないと、次の骨形成は刺激されない。骨の老化は、このカップリング機構が衰退する結果と考えられる。強力な骨 turnover の抑制薬であるビスフォスフォネートを投与すると、破壊に歯止めがかかるが、続く形成過程も著明に抑制され、生理的な骨の自己再生過程は阻害され、長期投与において骨質の劣化が懸念される。

カップリング機構については、骨吸収時に、骨基質中に蓄積された TGF- β や IGF-I などの成長因子が放出され、同時に破骨細胞が分泌する酸によって活性化されて、骨芽細胞の増殖あるいは分化・走化性を促進することにより骨形成の促進に寄与するとの説が 1980 年代より提唱され、最近になって、TGF- β 遺伝子の変異マウスを用いて、TGF- β がないと骨形

成が阻害されることが実験的に示されたが (nature medicine 2009)、骨吸収後の形成過程が特異的に阻害されたとの証拠は提示されていない。また、高柳らのグループは、セマフォリン 4D が破骨細胞から分泌されて骨芽細胞の分化を抑制することを報告しているが (nature medicine 2011)、これは破骨細胞による骨吸収の最中に骨形成が抑制されていることの説明にはなるが、吸収後の形成過程、つまりカップリング機構とは逆の反応系である。

分担研究者の竹下が同定した **Cthrc1** は、破骨細胞から分泌することが証明されている数少ない分子の一つである。しかも **Cthrc1** は、破骨細胞が酸やカタレプシン **K** の分泌により骨を吸収しはじめてはじめて産生誘導されるタンパクであり、破骨細胞の吸収活性と密接にリンクしている。**Cthrc1** の骨での発現は、加齢によって段階的に低下し、ビスフォスフォネート投与によって抑制、逆に、**PTH** のように骨の turnover を上げアナボリックに働く状況では高まる、という具合に、骨の代謝状況と **Cthrc1** の産生がきわめてよく相関する。さらに、骨での **Cthrc1** の産生を高めるような化合物を投与すると、エストロゲン欠乏による骨量減少が抑制されるとの予備実験の結果も得ている。したがって、**Cthrc1** は加齢によって減衰するカップリング機能を強化・維持する上で合理的な標的分子と考えられる。

分担研究者の竹下らは、さらに、**Cthrc1** の作用メカニズムを解明するために、その受容体分子の探索を開始した。標的細胞と考えられる骨髄ストローマ細胞の細胞膜画分において、**Cthrc1** と結合する分子を生化学的に解析することにより、初年度は 2, 3 の候補分子の同定に至っている。今後、これらの分子と **Cthrc1** との物理的機能的関係を明確にすることが重要な課題であり、受容体分子の同定はカップリング機能のシグナルメカニズムの解明から、カップリング機能をミミックする化合物への探索につながる可能性がある。

骨の代謝は、破骨細胞と骨芽細胞の間だけでなく、骨に埋まった第三の細胞と言われる骨細胞による骨吸収・形成の制御が最近ますます注目されるようになってきた。主任研究者のグループでは、骨細胞を生体において破壊することによって骨細胞の重要な生理機能を世界にさきがけて報告している (cell metabolism 2007)。そこで、骨細胞が発現する機能分子を探索する目的で、骨芽細胞から骨細胞への分化系の樹立、およびこのモデル細胞系を用いた遺伝子発現解析を行った。その結果、骨芽細胞から骨細胞への終末分化を促進あるいは抑制するいくつかの転写因子を同定した。これらを組み合わせで遺伝子導入することにより骨細胞への分化を促進することも可能となった。このようにして分化した細胞は、**SOST**、**DMP1**、**PTH** 受容体など骨細胞が特異的に発現することが知られている機能分子を発現するようになり、**PTH** 反応性も示す。したがって、現在唯一のアナボリック薬である **PTH** の作用機序解明や新たなアナボリック作用の分子基盤情報を得るのに応用できるかもしれない。

骨細胞の機能分子とその生理機能を明らかにする目的で、本事業において骨細胞で特異的に遺伝子改変を行うためのトランスジェニックマウスを樹立し、細胞膜でのシグナル伝達や機械応答に重要な役割を果たすと考えられるインテグリン分子の欠失モデルを作成し

た。その結果、ベースラインの骨 turnover が抑制され、非荷重による骨応答が阻害されるとの予備的な結果が得られている。我々が報告した骨細胞 ablation モデルにおいても (cell metabolism 2007)、非荷重状態での骨萎縮に骨細胞が中心的に関わることがわかっており、骨細胞表面の機械刺激受容分子と受容・伝達メカニズムの解明は、本研究においても今後の重要な課題である。その意味でも、骨細胞において特定の遺伝子発現を制御できるシステムの開発は重要な成果であるといえる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kaneko K, Ito M, Fumoto T, Fukuhara R, Ishida J, Fukamizu A, Ikeda K: Physiological function of the angiotensin AT1a receptor in bone remodeling. J Bone Miner Res 26: 2959-2966, 2011

2) Ito M, Nakamura T, Fukunaga M, Shiraki M, Matsumoto T: Effect of eldecalcitol, an active vitamin D analog, on hip structure and biomechanical properties: 3D assessment by clinical CT. Bone 49: 328-334, 2011

3) Ito M, Nakata T, Nishida A, Uetani M: Age-related changes in bone density, geometry and biomechanical properties of the proximal femur: CT-based 3D hip structure analysis in normal postmenopausal women. Bone 48: 627-630, 2011

4) Chiba K, Ito M, Osaki M, Uetani M, Shindo H: *In vivo* structural analysis of subchondral trabecular bone in osteoarthritis of the hip using multi-detector row CT. Osteoarthritis Cartilage 19: 180-185, 2011

5) Ito M: Recent progress in bone imaging for osteoporosis research. J Bone Miner Metab 29: 131-140, 2011

6) Matsumoto T, Ito M, Hayashi Y, Hirota T, Tanigawara Y, Sone T, Fukunaga M, Shiraki M, Nakamura T: A new active vitamin D₃ analog, eldecalcitol, prevents the risk of osteoporotic fractures--A randomized, active comparator, double-blind study. Bone 49: 605-612, 2011

7) Wang Y, Liu W, Masuyama R, Fukuyama R, Ito M, Zhang Q, Komori H, Murakami T, Moriishi T, Miyazaki T, Kitazawa R, Yoshida CA, Kawai Y, Izumi S, Komori T: Pyruvate dehydrogenase kinase 4 induces bone loss at unloading by promoting osteoclastogenesis. Bone 50: 409-419, 2012

2. 学会発表

1) Takeshita S: An osteoclast-derived coupling factor. 2nd Asia-Pacific Osteoporosis and Bone Meeting. 9月7日 Gold Coast, Australia

2) Watanabe K, Aburatani H, Ikeda K: An In Vitro Model for Osteocyte Differentiation. The 33rd Annual Meeting of the American Society for Bone & Mineral Research. 9月18日 San Diego, USA

3) Ito M, Fukunaga M, Sone T, Sugimoto T, Shiraki M, Nishizawa Y, Nakamura T: Once weekly teriparatide on hip structure and biomechanical properties. The 33rd Annual Meeting of the American Society for Bone & Mineral Research. 9月18日 San Diego, USA

4) 兼子佳子、伊東昌子、石田純治、深水昭吉、池田恭治: アンジオテンシン受容体の骨代謝における生理機能、第84回日本生化学会大会 9月24日 横浜

5) Ikeda K: Between bone resorption and formation 第8回 Bone Biology Forum 8月19日 三島

伊東昌子: QM法とSQ法による椎体骨折評価。第31回日本骨形態計測学会、5月22日、岐阜

6) 神谷武志、新城宏隆、大湾一郎、金谷文則、伊東昌子、伊藤明美: 骨孔拡大に対するアレンドロネートの効果—実験的検討—。第31回日本骨形態計測学会、5月21日、岐阜

7) 千葉 恒、伊東昌子、南郷侑史、久保田省吾、岡崎成弘、田口憲士、尾崎 誠、進藤裕幸: 放射光CTによる変形性関節症の骨嚢胞の解析。第31回日本骨形態計測学会、5月21日、岐阜

8) 西田暁史、伊東昌子、上谷雅孝、中田朋子、Ch. Muschits: 大腿骨頸部骨密度およびジオメトリの人種による差異—日本人とオーストリア人のQCTによる検討—。第31回日本骨形態計測学会、5月22日、岐阜

9) 中田朋子、伊東昌子、西田暁史、上谷雅孝、池田 聡: 大腿骨近位部の骨密度・骨形態の解析—DXAとCTの比較検討—。第31回日本骨形態計測学会、5月22日、岐阜

10) 岡崎成弘、千葉 恒、伊東昌子、南郷侑史、久保田省吾、田口憲士、尾崎 誠、進藤裕幸: 大腿骨頸部骨折患者の大腿骨頭における微細骨折の存在—放射光CTによるMicrocallusの解析—。第31回日本骨形態計測学会、5月22日、岐阜

11) 伊東昌子: 定量的判定法(QM法)と半定量的判定法(SQ法)による椎体骨折評価。第29回骨代謝学会学術集会、7月29日、大阪

12) 伊東昌子: 骨粗鬆症診療におけるQCTの意義と展望。第29回骨代謝学会学術集会、7月30日、大阪

13) 伊東昌子: 骨粗鬆症治療薬の新たな展開: エルデカルシトール。第13回日本骨粗鬆症学会、11月3日、神戸

14) 伊東昌子: 椎体骨折評価法のグローバル化をめざして: QM法とSQ法による椎体骨折判定。第13回日本骨粗鬆症学会、11月4日、神戸

- 15) 伊東昌子: 骨質評価法: 骨イメージング: 臨床用 CT を用いた骨構造評価へのアプローチ。第13回日本骨粗鬆症学会、11月4日、神戸
- 16) 伊東昌子: エルデカルシトールの大腿骨ジオメトリー・骨密度・骨強度への作用。第13回日本骨粗鬆症学会、11月3日、神戸
- 17) 中田朋子、伊東昌子、西田暁史、上谷雅孝: 大腿骨近位部の骨密度・ジオメトリーの解析—DXA based HSA と CT based HSA の比較検討—。第13回日本骨粗鬆症学会、11月3日、神戸
- 18) 西田暁史、伊東昌子、上谷雅孝、中田朋子、Ch. Muschits: 日本人とオーストリア人の大腿骨頸部骨密度およびジオメトリーの比較。第13回日本骨粗鬆症学会、11月3日、神戸
- 19) 伊東昌子、福永仁夫、曾根照喜、杉本利嗣、白木正孝、西澤良記、中村利孝: テリパラチド週1回投与は大腿骨構造および骨力学特性を著しく改善する—臨床用三次元 CT による評価—。第13回日本骨粗鬆症学会、11月4日、神戸
- 20) 中村利孝、杉本利嗣、中野哲雄、岸本英彰、伊東昌子、福永仁夫、荻野 浩、曾根照喜、吉川秀樹、西澤良記、白木正孝: テリパラチド週1回投与が骨粗鬆症患者の骨折発生に及ぼす効果—無作為二重盲検プラセボ対照試験。第13回日本骨粗鬆症学会、11月4日、神戸
- 21) Ito M: Effect of PTH on bone quality. The 2nd Lilly International Osteoporosis Forum, 3月5日, Hong Kong
- 22) Shinjo H, Kamiya T, Owan I, Kanaya F, Ito M, Ito A: The effects of alendronate on bone-tendon interface -An experimental study-. ISAKOS (International Society of Arthroscopy, Knee Surgery and Orthopaedic Sports Medicine) 2011 Congress, 3月15日, Rio de Janeiro
- 23) Nakamura T, Sugimoto T, Nakano T, Kishimoto H, Ito M, Fukunaga M, Hagio H, Sone T, Yoshikawa H, Nishizawa Y, Shiraki M: Effect of weekly teriparatide in patients with osteoporosis. ASBMR 2011 Annual Meeting, 9月19日, San Diego
- 24) Ito M: The effect of teriparatide on bone quality. Asian Forum on Musculoskeletal Health: Osteoporosis and fractures a challenge for clinicians and orthopedic surgeons, 10月15日, Seoul

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