

骨粗鬆症発症メカニズムの解明と創薬開発への試み(26-17)

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

骨は、壊されては新たに造られることにより強度と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ではその制御が破綻すること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最も大切な仕組みとして分子レベルでは長らく未解明の研究課題であった。我々は、この骨代謝の新しい制御機構を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、そのシグナル伝達機構を解明することにより骨粗鬆症治療薬開発に応用することを目指している。**Cthrc1** に結合する膜タンパクとして強力なアナボリック因子として知られる **Wnt** ともクロストークする **Wnt** 関連分子を同定し、**Cthrc1** がこの分子を介して骨芽細胞分化を促進する知見を得た。また、この分子が **Cthrc1** の受容機構の一部であることを明らかにした。ところが、骨芽細胞特異的ノックアウトマウスは高骨量を示すことからこの膜分子は骨形成に対して負に制御する因子であることが判明した。従って、この分子に結合する化合物、及び抗体薬が新規骨粗鬆症治療薬のシーズとなる可能性が強く示唆された。

Cthrc1 と同様、破骨細胞が産生する補体成分 **C3a** がカップリング因子として働くことを実証し、論文にまとめた(**J Bone Miner Res 2014**)。また、破骨細胞が産生するカップリング因子として注目されている **PDGF** の3つのアイソフォームについて詳しく解析した結果を論文に発表した(**BBRC 2015**)。

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

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)

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)

A. 研究目的

骨粗鬆症患者の治療と骨折予防としてビスフォスフォネート薬が主に使われているが、一旦減少した骨を増やしたり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。

申請者らは、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 と補体成分である C3a を同定した。本研究では、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析し、新しい骨代謝の分子メカニズムを解明することにより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する。

B. 研究方法

Cthrc1の受容体を同定し、シグナルに重要な機能分子を特定することによりCthrc1のシグナル伝達経路の一部を解明した。Cthrc1の受容体KOマウスを作出し、骨代謝における機能解析を行った。Cthrc1シグナルをミミックする低分子化合物をスクリーニングするための細胞株を構築するためにノックアウトマウスから受容体を欠損した骨芽細胞株を樹立した。

これまでにCthrc1刺激によるシグナル伝達分子としてPKC δ 、ERK、JNK、及びRac1が重要であることを見出している。これら4つの分子の中から骨芽細胞分化を促進するのに必須な分子を特定した。Cthrc1の受容体の候補として受容体Xを同定したので、骨代謝における機能を解析するために受容体Xのfloxマウスを作出し、全身及び骨芽細胞特異的KOマウスを作成するためにCAG-creマウス、及びOsterix-creマウスと交配し、それぞれのKOマウスを大量に増やし、骨解析を行った。KOマウスの頭頂骨由来初代骨芽細胞から細胞株を樹立した。また、Crispr/Cas技術を用いてST2細胞で受容体XをKOした細胞株を樹立した。

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

リコンビナントCthrc1を用いてST2細胞の膜タンパク画分からマスペクトル解析に

より *Cthrc1* 結合分子として受容体 X を同定した。shRNA を用いて ST2 細胞で受容体 X の遺伝子発現を阻害すると *Cthrc1* による PKC δ と ERK のリン酸化が障害され、骨芽細胞分化が抑制されることから、*Waif1* は *Cthrc1* の受容機構の一部であることが分かった。ところが、受容体 X の発現を阻害しても ST2 に対する *Cthrc1* の結合能は低下するが完全に消失しないことから *Waif1* 以外にも *Cthrc1* に対する受容体があることが示唆された。そこで、*Cthrc1* と結合することが知られている受容体 Y の発現を shRNA を用いて阻害したところ、*Cthrc1* に対する応答性は保持されるが *Cthrc1* に対する結合能は消失しないことから、受容体 Y は *Cthrc1* の受容体として結合するがシグナルは伝達しないことが予想された。

コンベンショナルな受容体 X ノックアウト(systemic KO: sKO)マウスは水頭症を発症することが知られているが、その他の表現型については報告されていない。そこで、受容体 X sKO マウスの骨を解析したところ、水頭症を発症したグループは野生型に比べ低骨量を示したが、発症しないグループは逆に高骨量を発症することが分かった。Osterix-cre マウスとの交配により骨芽細胞系列で受容体 X を KO したところ(conditional KO: cKO)、雌雄ともに野生型に比べ有意に高骨量を示すことが分かった。

Crispr/Cas 技術を用いて受容体 X 欠損 ST2 細胞株を樹立することに成功した。同様に、ST2 の野生株及び受容体 X KO 株を用いて受容体 Y 欠損株を樹立した。さらに、2 日齢の受容体 X sKO マウス頭頂骨由来骨芽細胞を 3T3 法により株化し、限界希釈培養法によりクローナルな細胞株を樹立することに成功した。今後、これらの細胞株を用いて化合物スクリーニング系を確立する。

D. 考察と結論

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、骨吸収から骨形成へのリレーを制御する仕組みであり、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。我々は、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。

我々が独自にカップリング因子として同定した *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の評価する *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)。我々の研究結果から *Cthrc1* ノックアウトマウスは低骨量であり、全身で *Cthrc1* を発現するトランスジェニックマウスは高骨量であった。一方、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、コンベンショナル KO 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 型コレラゲンプロモーターを用いて *Cthrc1* を過剰発現する

トランスジェニックマウスは高骨量を示すことを報告した(PLOS ONE 2008)。これらのことは我々の結果とも合致し、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る。

佐々木らは、脊索動物の初期発生において脊索特異的に発現する分子として *Cthrc1* を同定し、*Cthrc1* が多様な Wnt 経路のうち平面内極性に関与する Wnt/PCP 経路を選択的に活性化し、内耳の有毛細胞の配向パターンを始めとする組織形成に関与することを明らかにした(Dev Cell 2008)。彼らは、*Cthrc1* が受容体 Y のみならず Wnt 及びその受容体である *Frizzled* と結合することを示した。我々は、本研究により新たに *Cthrc1* が骨芽細胞系列の受容体 X と結合することを見出した。受容体 X は、Wnt/ β カテニン経路を阻害する膜分子である。また、shRNA を用いて ST2 細胞で受容体 X を抑制すると、*Cthrc1* による分化マーカーである ALP 活性の上昇が消失し、*Cthrc1* の結合能も低下した。一方、受容体 Y の発現を抑制しても *Cthrc1* による ALP 活性の上昇は保持された。これらのことから、*Cthrc1* は受容体 X と受容体 Y の両方に結合するが、骨形成促進活性には受容体 X が関与することが示唆された。ST2 細胞で受容体 X と受容体 Y の両方の発現を抑制しても *Cthrc1* に対する結合能は完全には消失しないことから *Frizzled* などの他の分子が結合に関与している可能性が示唆された。*Frizzled* やその他の結合分子が *Cthrc1* の骨形成促進活性に関与しているかどうかは今後の課題である。

Cthrc1 シグナルをミミックする化合物のスクリーニング系を確立する目的で受容体 X ノックアウトマウスの頭頂骨由来骨芽細胞から細胞株の樹立を試みた。現在、2 匹のノックアウトマウス由来の骨芽細胞株を 16 世代培養後に限界希釈培養法によりクローニングを行い、約 20 株の樹立に成功した。今後、それぞれ樹立した細胞株の解析を行いスクリーニングに適した細胞株を選択する予定である。さらに、Crispr/Cas 法を用いて ST2 細胞の受容体 X と受容体 Y、及びその両方を欠損した細胞株の樹立を行った。今後、上記の細胞株と同様に *Cthrc1* によるシグナル伝達を解析し、スクリーニングに適した細胞株を選択する。

受容体 X sKO マウスは水頭症を発症する低骨量と発症しない高骨量の 2 相性を示したが、骨芽細胞特異的受容体 X cKO マウスは雌雄ともに野生型と比較して有意に高骨量を示した。また、cKO マウスに水頭症は認められなかった。このことから水頭症は骨芽細胞以外の、主に脳で発現する受容体 X が欠損することが原因であると考えられる。骨芽細胞特異的受容体 X 欠損により *Cthrc1* の刺激が消失すると骨形成が低下し低骨量を発症することが予想されたが、予想と反して有意な骨量増加を引き起こすことから *Cthrc1* シグナルの複雑さが明らかとなった。Wnt アンタゴニストの一つである *Sclerostin* は、古典的 Wnt シグナルの阻害物質として同定された分子であるが、我々が作製した cKO マウスの血清中 *Sclerostin* 濃度が有意に高いことから、受容体 X がないことで骨芽細胞系列での Wnt シグナルに異常をきたし、その結果として骨形成が促進したと予想される。現在、血清 *Osteocalcin* や P1NP など骨形成マーカーの確認を行っている。*Cthrc1* は Wnt と協調し骨芽細胞の遊走活性を促

進することが分かっているので、樹立した受容体 X 欠損細胞株を用いて Wnt との協調性が上昇しているかどうかを確認する予定である。今後、Cthrc1 シグナルを解明するには、Wnt、受容体 X、及び Sclerostin との関連性を明らかにすることが重要である。骨芽細胞特異的受容体 X cKO マウスが高骨量を発症することから、受容体 X に作用し骨形成を促進する化合物が骨粗鬆症治療薬のターゲットとして有望であることが再確認された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Rahman MM, Matsuoka K, Takeshita S, Ikeda K: Secretion of PDGF isoforms during osteoclastogenesis and its modulation by anti-osteoclast drugs **Biochem Biophys Res Commun** 2015 May 4. pii: S0006-291X(15)00835-9. doi:10.1016/j.bbrc.2015.04.115.
- 2) Fumoto T, Takeshita S, Ito M, Ikeda K: Physiological functions of osteoblast lineage and T cell-derived RANKL in bone homeostasis. **J Bone Miner Res** 29: 830-842, 2014
- 3) Fumoto T, Ishii K, Ito M, Berger S, Schutz G, Ikeda K: Mineralocorticoid receptor function in bone metabolism and its role in glucocorticoid-induced osteopenia. **Biochem Biophys Res Commun** 457: 407-412, 2014
- 4) Kaneko K, Ito M, Naoe Y, Lacy-Hulbert A, Ikeda K: Integrin αv in the mechanical response of osteoblast lineage cells. **Biochem Biophys Res Commun** 447: 352-357, 2014
- 5) Takeshita S, Fumoto T, Naoe Y, Ikeda K: Age-related marrow adipogenesis is linked to increased expression of RANKL. **J Biol Chem** 289: 16699-16710, 2014
- 6) Matsuoka K, Park K, Ito M, Ikeda K, Takeshita S: Osteoclast-derived complement component 3a stimulates osteoblast differentiation. **J Bone Miner Res** 29: 1522-1530, 2014
- 7) Fumoto T, Ito M, Ikeda K: Lanthanum carbonate stimulates bone formation in a rat model of renal insufficiency with low bone turnover. **J Bone Miner Metab** 32: 484-493, 2014
- 8) Ito M, Oishi R, Fukunaga M, Sone T, Sugimoto T, Shiraki M, Nishizawa Y, Nakamura T: The effects of once-weekly teriparatide on hip structure and biomechanical properties assessed by CT. **Osteoporos Int** 25: 1163-1172, 2014
- 9) Sone T, Ito M, Fukunaga M, Tomomitsu T, Sugimoto T, Shiraki M, Yoshimura T, Nakamura T: The effects of Once-weekly teriparatide on hip geometry assessed by hip structural analysis in postmenopausal osteoporotic women with high fracture risk. **Bone** 64: 75-81, 2014
- 10) Okazaki N, Chiba K, Taguchi K, Nango N, Kubota S, Ito M, Osaki M: Trabecular microfractures in the femoral head with osteoporosis: Analysis of microcallus formations by synchrotron radiation micro CT. **Bone** 64: 82-87, 2014
- 11) Nakamura T, Matsumoto T, Sugimoto T, Hosoi T, Miki T, Gorai I, Yoshikawa H, Tanaka Y, Tanaka S, Sone T, Nakano T, Ito M, Matsui S, Yoneda T, akami H, Watanabe K, Osakabe T, Shiraki M, Fukunaga M: Clinical Trials Express: Fracture Risk Reduction With Denosumab in Japanese Postmenopausal Women and Men With Osteoporosis: Denosumab Fracture Intervention Randomized Placebo Controlled Trial (DIRECT). **J Clin Endocrinol Metab** 99:

2599-2607, 2014

- 1 2) Sugimoto T, Matsumoto T, Hosoi T, Miki T, Gorai I, Yoshikawa H, Tanaka Y, Tanaka S, Fukunaga M, Sone T, Nakano T, Ito M, Matsui S, Yoneda T, Takami H, Watanabe K, Osakabe T, Okubo N, Shiraki M, Nakamura T: Three-year denosumab treatment in postmenopausal Japanese women and men with osteoporosis: results from a 1-year open-label extension of the Denosumab Fracture Intervention Randomized Placebo Controlled Trial (DIRECT). *Osteoporos Int* 26: 765-774, 2015

2. 学会発表

- 1) 池田恭治 : How osteoclasts talk to osteoblasts. Second Asia-Pacific Bone and Mineral Research Meeting 5月31日 Soel, Korea
- 2) Takeshita S: Osteoclast-secreted Coupling Factors. 第11回 Bone Biology Forum 8月23日 三島
- 3) Matsuoka K, Ikeda K, Takeshita S: Osteoclast-derived coupling factor Cthrc1 stimulates osteoblast differentiation through Rac1/PKCδ/ERK. The 36th Annual Meeting of the American Society for Bone & Mineral Research. 9月15日 Houston, Texas, USA
- 4) 池田恭治 : PTHrP to bone cell biology. AEB Metabolism Symposium 4月4日 Yale University, USA
- 5) 池田恭治 : What it takes to be an osteoclast. Daegu Univ Seminar 5月29日 Daegu, Korea
- 6) Nakamura Y, Kuroda T, Sugimoto T, Shiraki M, Nakano T, Kishimoto H, Ito M, Fukunaga M, Hagino H, Sone T, Nakamura T: Once-weekly teriparatide reduces vertebral fracture risk-Subgroup analysis from the teriparatide once weekly efficacy research (TOWER) trial. WCO-IOF-ESCEO 2014,2014.4.2, Seville
- 7) Nakano T, Nakamura T, Ito M, Hagino H, Hashimoto J, Tobinai M, Mizunuma H: Higher response with bone mineral density (BMD) increase and bone turnover reduction following treatment with monthly injectable ibandronate (IBN) for patients (pts) with osteoporosis in the MOVER study. WCO-IOF-ESCEO 2014,2014.4.2, Seville
- 8) Sakai A, Ito M, Tomomitsu T, Tsurukami H, Ikeda S, Fukuda F, Mizunuma H, Inoue T, Saito H, Nakamura T, e-ADVANCED Study Group: Eldecacitol, a second generation active vitamin D analog, increases lumbar spine BMD in osteoporotic patients treated with alendronate regardless of their pretreatment levels of bone turnover. The American Society for Bone and Mineral Research 2014 Annual Meeting, 2014.9.13, Houston
- 9) Hagino H, Nakamura T, Ito M, Nakano T, Hashimoto J, obinai M, Mizunuma H: The effect of monthly i.v. Ibandronate injections on Japanese patients with high-risk primary osteoporosis: Subgroup analysis of the phase III MOVER study. The American Society for Bone and Mineral Research 2014 Annual Meeting, 2014.9.13, Houston
- 1 0) Ito M: Microstructure analysis of bone strength. IOF Regionals 5th Asia-Pacific Osteoporosis Meeting, 2014.11.14, Chinese Taipei
- 1 1) Hagino H, Nakamura T, Ito M, Nakano T, Hashimoto J, Tobinai M, Mizunuma H: The effect of monthly i.v. ibandronate injections on Japanese patients with high-risk primary osteoporosis: subgroup analysis of the phase III Mover study. IOF Regionals 5th Asia-Pacific Osteoporosis Meeting, 2014.11.14, Chinese Taipei
- 1 2) Ito M, Nakamura T, Nakano T, Hagino H, Hashimoto J, Shinomiya K, Asao Y, Inoue T, Mizunuma H: The clinical efficacy of monthly oral ibandronate 100 mg in Japanese patients with

primary osteoporosis: the phase III MOVEST study. WCO-IOF-ESCEO 2015, 2015.3.27, Milan

- 1 3) 伊東昌子：新たな骨粗鬆症治療戦略ー活性型ビタミンD製剤とビスホスホネート製剤が果たす役割ー。第87回日本整形外科学会学術総会（ランチョンセミナー） 5月22日 神戸
- 1 4) 伊東昌子：骨密度・骨質からみた各種骨粗鬆症治療薬の効果 海綿骨・皮質骨構造 第34回日本骨形態計測学会（シンポジウム） 6月13日 札幌
- 1 5) 伊東昌子：ビスフォスフォネート製剤による皮質骨多孔化の抑制効果 第32回日本骨代謝学会（イブニングセミナー） 7月24日 大阪

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