

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

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ている。**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** ノックアウト( $\Delta$ OB)マウスの骨解析により骨形成と骨吸収の両方が共に低下し、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** 発現の減少を介して破骨細胞形成の低下が原因であることを突き止めた。破骨細胞特異的 **Cthrc1** cKO マウスと同様に  $\Delta$ OB 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)。現在、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** 抗体のスクリーニングを試みている。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** を同定したので、ノックアウトマウスを作成し生体内における機能解明を行っている。

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)

## 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する。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ている。

## B. 研究方法

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た。

ST2細胞をCthrc1で刺激するとシグナル伝達分子としてPKC $\delta$ 、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。骨芽細胞特異的KO ( $\Delta$ OB) 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 $\Delta$ OB 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 $\Delta$ OBマウスを評価することによりWaif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。

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。原因因子が骨代謝に関与するかどうか

うかを検討するためにマウス大腿骨にドリルを用いて穴を開け、骨回復時における原因因子の発現解析、およびタンパクの局在を解析した。さらに、CRISPR/Cas9法によりノックアウトマウスの作成を試みた。

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

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  $\delta$  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  $\Delta$ OB 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。 $\Delta$ OB 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。 $\Delta$ OB マウスのカップリング機能障害は、破骨細胞特異的 Cthrc1 コンディショナル KO 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が実証された。

Waif1 を介した Cthrc1 シグナル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 を認識するモノクローナル抗体をスクリーニングした。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)活性を促進する抗体を選出した。

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た。BMM の培養上清 500ml を濃

縮後、ST2 の migration 活性を指標とし陰イオン交換カラムである Qセファロースカラムを用いて分離・精製した。Migration 活性のあるフラクションを SDS-PAGE で展開し、各バンドを LC-MS/MS を用いて質量分析を行い、分泌タンパクである Emilin2 を見出した。Emilin2 の骨における発現解析を行い、マクロファージに発現特異性が高いことがわかった。また、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 活性を促進することからマクロファージの培養上清中に含まれる migration 促進活性は Emilin2 であることが示唆された。そこで、頭頂骨由来初代骨芽細胞で Emilin2 を過剰に発現させたところ骨芽細胞分化マーカーである Runx2 と osteocalcin の発現が上昇し、アリザリンレッド染色により石灰化の促進が認められた。また、前脂肪細胞株 3T3-L1 細胞で Emilin2 を過剰に発現させると脂肪細胞誘導が抑制された。マウス大腿骨に骨孔形成術を施すと一過的にマクロファージが増加し、それに伴って Emilin2 の発現上昇が認められた。すなわち、Emilin2 はマクロファージが産生し、骨芽細胞前駆細胞の走化性を促進するとともに骨芽細胞分化を促進することが判明した。そこで、現在、Emilin2 の生体内における骨代謝調節機能を解析するために CRISPR/Cas9 法を用いて Emilin2 ノックアウトマウスの作成を試みている。

#### 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** コンディショナル KO 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  $\Delta$ OB 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するために **Waif1** 欠損 **ST2**、及び **Waif1** 過剰発現 **ST2** 細胞株を樹立した。また、**Waif1** **sKO** マウスの頭頂骨由来骨芽細胞株を樹立した。これらの細胞株を用いてモノクローナル抗体をスクリーニングし、骨芽細胞分化を促進する抗体を取得した。**Waif1** の細胞外領域は N 末端からセリンに富む領域、N 末端キャップ構造、及び 8 つのロイシンに富む繰り返し領域から構成されている。**Cthrc1** が **Waif1** のどの領域に結合し骨芽細胞分化を促進するのかは今のところわかっていない。そこで、**Waif1** の各領域の欠失変異体を作成し、免疫沈降法を用いて **Cthrc1** の結合領域を解析中である。次いで、**Cthrc1** の結合する領域を認識するモノクローナル抗体をスクリーニングし、その中から骨芽細胞分化を促進するものを選出する予定である。

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、生化学的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 **migration** 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。今後、破骨細胞が産生する **Emilin2** が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れば、骨粗鬆症の治療薬開発の新たな切り口として注目されることが期待される。

#### E. 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 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 Apr 6. Doi: 10.1002/jbmr.3436.
- 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 Feb;32(2):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. 2017 Jun 6. Doi: 10.1007/s00774-017-0838-3.

### 2. 学会発表

- 1) 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 39<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Sep. 10, 2017, Denver, Colorado, USA
- 2) 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
- 3) 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

## 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