

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と骨強度及びしなやかさを保ちながら一定の骨量が維持されているが、骨粗鬆症に代表される代謝性骨疾患においてはこの制御が破綻することにより骨量が低下し骨が脆くなる病気である。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 *Wnt-activated inhibitory factor 1 (Wai1)* を同定した(JBMR 2018)。破骨細胞が産生する *Cthrc1* は骨芽細胞上の *Wai1* 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 *Wai1* ノックアウト(Δ OB)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 *Wai1* 欠損による *Cthrc1* 刺激が入らないことにより生じ、骨吸収低下の原因は *Wai1* 欠損により *Rankl* 発現の減少を介して破骨細胞形成が低下す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 *Wai1* Δ 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、*Wai1* 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、*Wai1* 抗体をマウスに投与することにより *in vivo* で骨形成を促進する抗体のスクリーニングを行なっている。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 (E2)* を同定し、ノックアウトマウスが低骨量を発症することを突き止めたので詳細な機能解析を行なっている。

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使用されているが、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、解明した新たなカップリング機構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カップリング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を同定し、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 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た種々のキナーゼ阻害剤を組み合わせ、Western blotting法とALP活性測定法により解析した。骨芽細胞特異的Waif1 KO (Δ 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Waif1 Δ 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Waif1 Δ OB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、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。得られたハイブリドーマをヌードマウスに投与し、腹水から抗体を大量に調整した。粗精製した抗体を10mg/kg、週3回、合計10回野生型C57/BL6マウス(n=8~10)に投与し、テトラサイクリン/カルセインの2重標識し、最初の抗体投与1ヶ月後に血清と骨を採取し、ELISA法により骨形成、及び骨吸収マーカーの測定、さらに、マイクロCTと骨形態計測法により骨解析を行う。

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細胞とマウス頭頂骨由来骨芽細胞を用いて遊走活性を測定した。次に、BMMの培養上清を大量に調整し、migration活性を指標とし陰イオン交換カラムを用いて活性成分を分離・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を作成し、マイクロCTによる骨解析を行なった。

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

カップリング因子 *Cthrc1* に結合する分子として同定した細胞膜タンパク *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を促進することがわかった。骨芽細胞特異的に *Waif1* を欠損した ΔOB マウスは、骨形成と骨吸収の両方が低下し低骨代謝回転型高骨量を発症した。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。骨芽細胞において *Waif1* 発現の消失により *Rank1* の発現が低下し、破骨細胞形成が減少し骨吸収が低下することを突き止めた。*Waif1* 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* 欠損は影響を与えなかったが、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、RANKL 投与 2 ヶ月後の骨量回復が顕著に遅延した。*Waif1* 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ためにリコンビナント可溶性 *Waif1* (s*Waif1*)を精製し、これを用いて s*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* を強発現する 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、得られた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 10 種類の抗体を選出した。2 種類のアイソタイプマッチ抗体を含め 12 種類のハイブリドーマをヌードマウスに摂取し、腹水から抗体を粗精製したので 3 ヶ月齢 C57/BL/6 雄マウスに投与し、1 ヶ月後に骨解析を行う予定である。

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 活性を指標に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 (E2)を見出した。E2 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 E2 (rE2)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 E2 であることが示唆された。そこで、マウス頭頂骨由来初代骨芽細胞で E2 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ことから E2 は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の可能性が示唆された。また、前脂肪細胞株 3T3-L1 細胞で E2 を過剰に発現させたところ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 E2 の発現上昇が認められた。さらに、E2 sKO マウスのマイクロ CT 解析を行ない、E2 欠損により低骨量を発症することが判明した。現在、E2 の生体内におけるカップリング機能を解析中である。

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ながらこの機構を制御する因子の実態については長らく不明であった。主任研究者らは、骨粗鬆症などの代謝性骨疾患をカップリング機構の破綻によると考え、カップリング因子の同定とその作用メカニズムを解明することにより新しい骨粗鬆症治療薬の開発へ応用することを目指している。

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、骨吸収している破骨細胞が一過的に産生し骨芽細胞に働き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 *in vivo* 評価系を組み合わせることにより世界で初めてカップリング因子であることを実証した破骨細胞が産生するサイトカイン(クラストカイン)である(JCI 2013)。破骨細胞特異的 Cthrc1 コンディショナル KO (Δ OC) マウスは骨形成が低下し低骨量を発症した。また、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、岐阜大学の秋山らは sKO マウスが低骨量を発症し、I 型コラー

ゲンプロモーターを用いて骨芽細胞で *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 *Cthrc1* は骨芽細胞上の *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 Δ OB マウスは、破骨細胞特異的 *Cthrc1* Δ OC マウスと同様にカップリング機能が障害されたことから *Waif1* が *Cthrc1* の機能的な受容機構に重要な細胞膜分子であることから骨代謝制御機構における両分子の重要性を明らかにした。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主任研究者ら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、マウスの腹水から大量に抗体を生成した。現在、得られた抗体をマウスに投与し *in vivo* で骨形成を促進するかどうかを検討中である。

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。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が開始されると考えられているが、マクロファージの役割などの詳細なメカニズムについては全くわかっていない。興味深いことに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* においてマクロファージが骨芽細胞分化を促進することが報告された。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 E2 を同定した。E2 は、*Cthrc1* と同様に C1q ファミリーに属する約 150kDa 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報告されているが、骨代謝における働きについては分かっていない。E2 は ST2 細胞の *migration* を促進し、骨芽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る。また、E2 欠損マウスは低骨量を発症することが明らかとなったので、現在、E2 がカップリング因子として働いているかどうかを調べるために KO マウスに RANKL を投与しカップリング機能を評価する実験を計画している。マクロファージが産生する新しいカップリング因子が骨リモデリングを制御することを実証できれば、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** 33:1500-1512, 2018
- 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** 32:875-887, 2018
- 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** 36:264-273, 2018

2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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・骨再生への橋渡し機構を探る」、2018年9月7日、博多

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