

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20655

研究課題名(和文)新規破骨細胞抑制モデルを用いた人為的骨代謝調節の検討

研究課題名(英文)A study of bone metabolism using an anti RANKL antibody-treated mouse model.

研究代表者

唐川 亜希子(Karakawa, Akiko)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：70552280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗RANKL抗体は成人で高い骨吸収抑制効果を示すが、小児への作用は不明である。本研究では抗マウスRANKL抗体の投与により時期特異的に破骨細胞活性を抑制できるモデルマウスを作製し、骨格形成期である胎児期から小児期・骨が成熟した成人期までの破骨細胞抑制の影響を解析した。胎児期の投与では新生仔は正常な外貌と体重で出産されたが、出生後24時間以内に死亡した。一方、生後1週齢での投与では一過性に破骨細胞分化が抑制され骨密度が上昇したが、体長・体重および歯牙は正常に発育し、成体では異常を認めなかった。以上の事から、抗RANKL抗体は小児期の骨疾患治療において高い安全性と骨への薬効を示すと考えられる。

研究成果の概要(英文)：An anti-bone-resorptive drug Denosumab, an anti-RANKL antibody, is used to treat adults' bone disease because of its inhibitory effect of osteoclast differentiation. However, the precise effect of anti-RANKL antibody in younger patients are unknown. In the present study, we analyzed the effect of anti-RANKL antibody on growth and bone metabolism in young mice. Newborn mice exposed to the antibody in utero were normally born, but died within 24 h after birth. Mice, which were treated with anti-RANKL antibody at 1-week-old, showed decreased osteoclastogenesis and increased bone mass at the age of 2 weeks. However, at the age of 8 weeks, mice showed normal body length, body weight and tooth development. These results suggest that an anti-RANKL antibody is safety and efficacious in young patients.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：抗RANKL抗体 デノスマブ 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を前にして、歯周病による咀嚼機能低下や関節症・骨粗鬆症などによる運動機能障害を防止し、QOLを維持することが世界的ニーズとなっている。成人の生理的骨代謝は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスによって維持され、異常な破骨細胞活性が骨粗鬆症や癌の骨転移などの骨疾患に繋がることから、多くの骨吸収抑制薬が開発され、治療に用いられている。

一方、胎児期から青年期にかけては骨格の形成期であり、成長期には、骨芽細胞による骨形成が破骨細胞による骨吸収を上回るといふ、成人とは異なる骨代謝を示す。この時期に発症する骨系統疾患の一つに、破骨細胞の分化・機能抑制による骨吸収障害を主徴候とする大理石骨病が挙げられる。その症状は異質性が高く発症の時期により副症状や予後が異なる。乳児期に発症する乳児悪性型は、骨髄機能不全や肝脾腫を発症し、生命予後は不良である。また、進行性難聴・視力障害などの副症状を引き起こす。後者の症状は未熟骨の吸収不全が原因だと説明されているが、実際には、骨格形態の異常と器官発生の連関によるものか、あるいは破骨細胞の形成不全により器官発生そのものに直接的な影響が出ているのかは解明されていない。一方で、小児期に発症する中間型、小児期～成人期に発症する遅発型では、貧血や低身長、顎骨骨髄炎や骨折などをきたすものの致死性は低い。このような症状の違いの一因として、骨格の正常な位置・形態形成が行われる発生期から成長期、あるいは骨代謝の恒常性を維持する骨格完成後の成熟期といった、時期特異的に破骨細胞が異なる役割を担う可能性が挙げられる。

大理石骨病の原因遺伝子には RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) をはじめ複数の遺伝子が同定されている。RANKL は破骨細胞分化に必須のサイトカインであり、RANKL 遺伝子の欠損マウスはヒトと同様に重篤な大理石骨病を呈し、時に胎生致死となる(Odgren et al., Connect Tissue Res. 2003)。また、RANKL は破骨細胞分化だけでなく、胸腺や乳腺の発達・乳がんの発症にも重要であることが報告されている(Hikosaka et al., Immunity. 2008; Fata et al., Cell, 2000; Schramek et al., Nature, 2010)。しかし、個体の発生から成熟までに一過的に RANKL 遺伝子の発現を制御するモデルマウスは未開発であり、破骨細胞の時期特異的な役割も、骨格系の発達と他器官との連関も不明な点が多い。また、大理石骨病の治療には破骨細胞を供給するための造血幹細胞移植や、RANKL のリコンビナント蛋白質の投与などが行われているが、近年の症例の追跡研究から発症年齢や治療開始年齢が予後に重要な影響を与えることが示唆されており、原因の解明と RANKL をターゲットとした治療開始年齢の決定には、時期特異的

な破骨細胞作用の解明が必要である。

2013年3月、抗 RANKL 抗体(一般名: デノスマブ)が成人の骨粗鬆症や多発性骨腫瘍・転移性骨腫瘍の薬として新たに認可され、従来使用されてきたビスフォスフォネート製剤に比べ高い臨床成績を上げている。抗 RANKL 抗体は小児の骨系統疾患にも有用な可能性が高いが、ビスフォスフォネート製剤と同じく長期投与で生じる副作用などが懸念されている。抗 RANKL 抗体は齧歯類などの小動物への交差性がないために、動物実験のデータが不十分なまま臨床応用が進んでおり、臨床における適応拡大のためには動物での基礎研究の充実が必須である。

2. 研究の目的

抗 RANKL 抗体は破骨細胞の分化因子である RANKL の活性を阻害し、破骨細胞の総数を減少させることで骨吸収抑制を示す。本薬剤は半減期がビスフォスフォネート製剤と比較して短く、作用が一過性である。また、RANKL リコンビナントタンパク質の投与によって任意の時期に回復させることが可能であることから、成長期のある特定の時期の破骨細胞活性を抑制することができると考えられる。本研究では、発生期から成長期を短い間隔で区切り骨代謝を解析できる新たな実験モデルを作成し、成長期および成長後の予後を解析することで、骨格および全身成長の様々な期間における破骨細胞作用の特異性を解明する。さらに、抗 RANKL 抗体の小児への作用や安全性、長期投与時の副作用に関する基礎的知見を充実させることで、現在は手探りで行われている小児骨疾患および成人の未承認の疾患への適応拡大を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 時期特異的破骨細胞抑制モデルマウスの作製: 一過性に破骨細胞活性を抑制する時期特異的破骨細胞抑制モデルマウスは、デノスマブのヒト投与同等量(5 mg/kg)、その10倍あるいは1/10量の段階的濃度で抗マウス RANKL 抗体を C57BL/6 マウス腹腔皮下に1回投与して作製する。侵襲性が低く未発達なマウスへの投与が可能である。胎生期(着床1週間後から出生まで、妊娠した母マウスに投与する。)、乳児期(生後1週齢)、

小児期(生後2週齢～5週齢)に投与を行うことで時期特異的破骨細胞抑制マウスを作成する。

(2) 時期特異的破骨細胞抑制モデルマウスの解析: 上記のモデルは投与後1週間毎に成熟期に至るまで、継時的に以下の解析を行い、成長期における OYCI の単回投与の効果の持続性を検討する。また、大理石骨病の症状所見から想定される他器官への影響(下記-)を指標に、破骨細胞活性が抑制された時期との関連性を明らかにする。

骨解析: μ CT 解析による大腿骨・頭蓋骨の

骨構造解析、脛骨・頭蓋骨・脊椎の非脱灰凍結切片を用いた骨芽細胞数や破骨細胞数といった静的パラメータ、骨形成率や骨吸収面といった動的パラメータ計測による骨形態の組織学的解析、胎児・新生児の骨格標本を用いた全身骨格解析により骨への影響を検討する。

骨髄細胞への影響の解析：骨髄幹細胞・骨髄細胞のポピュレーション変動（骨髄機能不全・肝脾腫）

大腿骨長や軟骨形成（低身長）

全身性・局所性炎症（顎骨骨髄炎）など。

(3) 歯周病による歯槽骨破壊への適応拡大を目指すモデルの作成と解析：抗 RANKL 抗体の投与が全身の骨恒常性に影響を与えずに、局所的な骨破壊の予防効果をもつ場合、歯周病の歯槽骨破壊をできる薬剤として適応拡大される可能性がある。マウス口蓋骨に局所的に抗 RANKL 抗体を投与した際の全身性の骨代謝への影響を検討する。

(4) 抗 RANKL 抗体の長期投与の検討：現行の臨床においてもデノスマブの長期投与は顎骨壊死や非定型骨折の発症リスクに関与すると懸念されるが、明確な期間は決定されていない。継続投与後の予後の検討により、長期投与の影響を検討する。

4. 研究成果

(1) 抗 RANKL 抗体投与による一過性骨吸収抑制モデルマウスを確立した：胎生 1 週、胎生 2 週、生後 1 日、生後 1 週、生後 2 週以降にそれぞれ抗 RANKL 抗体を投与し、マウスの発達と骨への影響を解析した。胎生 1 週群では新生仔は正常な外貌と体重で出産されたが、出生後 24 時間以内に死亡した。この時、母体の乳腺には萎縮が、仔の顎骨には骨量の増加が認められたことから、RANKL の乳腺形成への影響と出生時の顎骨への影響が明らかとなった(研究成果)。一方胎生 2 週、生後 1 日での投与では仔マウスは生存し、破骨細胞が全身発達において重要な役割を示すのが胎生 1 週-2 週の間であることが示唆された。また生後 1 週での投与後、マウスは通常環境下で正常な体長・体重の発育を示した。2 週齢時での大腿骨量増加と破骨細胞数減少が認められたが、8 週齢に発育後はいずれも対照群と同等に回復した。生後 2 週以降投与群でもと類似した結果が認められた。これらのことから、小児発達期の一過性骨吸収が成長後に影響を示さないことが明らかとなった。

(2) 歯周病による歯槽骨破壊モデルに抗 RANKL 抗体が有用であることを解明した：成体の C57BL/6 マウスの頭蓋骨に歯周病原菌の菌体成分 LPS と抗 RANKL 抗体をコラーゲンゲルで混合し、投与した。頭頂骨では LPS の作用により破骨細胞数と骨吸収窩が著しく増加したが、抗 RANKL 抗体の投与により破骨細胞活性が抑制された。また上顎臼歯を絹糸で結紮し作製した歯周病モデルマウスでは歯

槽骨破壊とそれに伴う歯根の露出が認められたが、抗 RANKL 抗体の腹腔内投与によりいずれも抑制された(研究成果)。本結果より、抗 RANKL 抗体の局所投与における有用性が明らかとなり、現在局所への最適な抗 RANKL 抗体投与方法を模索している。

(3) 長期投与モデルにおいて抗 RANKL 抗体が全身成長に影響を及ぼさないことを解明した：生後 1 週齢から 7 週間、毎週 1 回抗 RANKL 抗体を投与した長期投与モデルを作製し、脛骨および大腿骨の μ CT 解析・組織切片による破骨細胞解析を行った。成長後のマウスは正常な体長と体重を示したが、この時、大腿骨の海綿骨量が著しく増加し、破骨細胞抑制が認められた。顎骨においても同様に破骨細胞数は著しく減少したが、歯牙の萌出に異常は認められなかった。以上のことから、抗 RANKL 抗体は小児治療において高い安全性と骨への薬効を示すと考えられた。本結果は、現在論文投稿中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Kuritani M, Sakai N, Karakawa A, Isawa M, Chatani M, Negishi-Koga T, Funatsu T, Takami M. Anti-mouse RANKL Antibodies Inhibit Alveolar Bone Destruction in Periodontitis Model Mice. *Biol Pharm Bull*, 41, 637-643, 2018 (査読有). DOI: 10.1248/bpb.b18-00026

Okamatsu N, Sakai N, Karakawa A, Kouyama N, Sato Y, Inagaki K, Kiuchi Y, Oguchi K, Negishi-Koga T, Takami M. Biological effects of anti-RANKL antibody administration in pregnant mice and their newborns. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 491, 614-621, 2017 (査読有).

DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.07.154.

高見正道, 岡松伸明, 稲垣克記, 坂井信裕, 唐川亜希子. 特集 分子治療薬 標的治療薬 7) 抗 RANKL 抗体. 腎臓内科・泌尿器科. 腎臓内科・泌尿器科. 4, 61-67, 2016 (査読無).

<http://www.kahyo.com/item/N201607-041>

[学会発表](計 13 件)

井澤基樹、唐川亜希子 (他 5 名) 骨吸収抑制薬が若齢マウスの成長と歯の発育に及ぼす影響、第 55 回日本小児歯科学会大会、2017 年

井澤基樹、唐川亜希子 (他 5 名) 骨吸収抑制薬が若齢マウスの成長と歯の発育に及ぼす影響、第 338 回昭和大学学士会例会、2017 年

唐川亜希子、isphosphonate Inhibits Growth and Tooth Development of Young Mice,

第3回骨免疫学会、2017年

井澤基樹、唐川亜希子（他4名）、Effects of Anti-bone-resorptive Drugs on the Growth and Tooth Development of Young Mice、第35回日本骨代謝学会、2017年

井澤基樹、唐川亜希子（他3名）、骨吸収抑制薬が若齢マウスの成長と歯の発育に及ぼす影響、第59回歯科基礎医学会、2017年
栗谷未来、坂井信裕、根岸（古賀）貴子、唐川亜希子（他3名）、歯周病モデルマウスを用いた炎症性骨破壊に対する抗RANKL抗体の作用解析、第64回昭和大学学士会総会、2017年

Isawa M, Karakawa A（他6名）、Effects of Anti-RANKL Antibody and Zoledronate on Growth and Tooth Development in Young Mice、第65回国際歯科研究学会日本部会学術大会（国際学会）、2017年

Kuritani M, Sakai N, Karakawa A（他5名）、Anti-RANKL Antibody Administration Suppresses Bone Destruction Induced by LPS in Mice、第65回国際歯科研究学会日本部会学術大会（国際学会）、2017年

唐川亜希子、ゾレドロネートは若齢マウスの成長と歯の発育を阻害する、第37回日本歯科薬物療法学会学術大会、2017年

唐川亜希子、抗RANKL抗体が若齢マウスの骨に及ぼす影響、第58回歯科基礎医学会学術大会、2016年

井澤基樹、唐川亜希子（他5名）、抗RANKL抗体が若齢マウスに及ぼす影響について、日本小児歯科学会関東地方会第31回大会・総会、2016年

佐藤ゆり絵、坂井信裕、唐川亜希子（他3名）、骨吸収抑制活性を持つ抗RANKL抗体を投与した妊娠マウスおよびその新生仔の解析、第23回日本歯科医学会総会、2016年

仁科早貴、唐川亜希子（他7名）、骨吸収抑制薬ゾレドロネートが幼若マウスの骨代謝に与える影響、第23回日本歯科医学会総会、2016年

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：

権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
昭和大学学術業績リポジトリ
<https://meta.lilitory.showa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

唐川 亜希子 (KARAKAWA Akiko)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号：70552280

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()