

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04309

研究課題名(和文) 免疫グロブリン様受容体(IgLR)分子群を標的とした次世代骨吸収抑制薬の開発

研究課題名(英文) Development of antiresorptive therapy targeting immunoglobulin-like receptors

研究代表者

高畑 雅彦 (Takahata, Masahiko)

北海道大学・医学研究院・准教授

研究者番号：40374368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：既存の骨吸収抑制薬は、強力な破骨細胞抑制効果を示す反面、生理的な骨吸収や骨成長も阻害し骨の新陳代謝を著しく抑制する。そのため、本研究では骨リモデリングや骨成長などになるべく悪影響を及ぼさずに病的骨吸収を選択的に抑制する治療ターゲットの探索研究を行なった。破骨細胞分化、活性化に重要な免疫グロブリン様受容体分子(IgLR)の中でSiglec-15は骨リモデリングバランスが崩れる閉経後骨粗鬆症に対して治療効果を示すとともに、小児ステロイド性骨粗鬆症に対しても成長障害を起こすことなく治療効果を発揮することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

破骨細胞の分化や活性化に必須の免疫受容体チロシン活性化モチーフ(ITAM)依存性共刺激シグナル制御機構にはまだ不明な点が多い。本研究は、この経路を賦活化する複数の免疫受容体IgRLがそれぞれ異なる役割をもつことを示すと同時に、その中でSiglec-15がもっとも重要な役割をもつことを明らかにした。Siglec-15は高齢者に生じる骨粗鬆症だけでなく、ステロイドや先天性疾患などによって生じる小児骨粗鬆症に対しても適応可能なきわめて有望な治療ターゲットであることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：While existing bone resorptive agents have a strong inhibitory effect on osteoclasts, they inhibit physiological bone resorption and bone growth by strongly suppressing bone metabolism and bone resorption in the bone growth plate. In this study, we conducted an exploratory study of therapeutic targets that selectively suppress pathological bone resorption without adversely affecting bone remodeling and bone growth. Among the immunoglobulin-like receptor molecules (IgLR) that are important for osteoclast differentiation and activation, Siglec-15 has a therapeutic effect on postmenopausal osteoporosis in which the bone remodeling balance is disturbed, and also on pediatric steroid-induced osteoporosis without causing growth disorders.

研究分野：整形外科学 骨代謝学

キーワード：破骨細胞 骨吸収 免疫受容体 骨粗鬆症 骨破壊性疾患 Siglec-15

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

病的な骨吸収亢進によって生じる骨粗鬆症や転移性骨癌、炎症性骨破壊の治療には骨吸収抑制薬の使用が合目的であり、3000 億円を超える需要がある。すでに、ビスフォスフォネート(BP)や抗 RANKL 中和抗体といった骨吸収を強力に抑制する薬剤が臨床応用されているが、これらの薬剤は生理的な骨吸収や骨形成も抑制し、低カルシウム血症や非定型骨折(骨質異常)のリスクを上昇させるといった欠点がある。そのため、病的骨吸収だけを選択的に抑制する“次世代骨吸収抑制薬”の開発は多くの患者に恩恵をもたらすだけでなく、医療経済的にも大きな波及効果が期待される。

本研究では破骨細胞分化の第 3 の必須シグナルである免疫受容体チロシン活性化モチーフ(ITAM)依存性共刺激シグナルを賦活化する免疫グロブリン様受容体 IgLR 分子群に着目した。一つの経路(ITAM シグナル)を賦活化するために複数の IgLR が破骨細胞に発現する理由は未解明だが、IgLR を単独で欠損しても生理的な骨吸収は完全には障害されない。このことから、IgLR の機能はオーバーラップし、互いを補完するように働いていると予想される。一方、疾患や病態によって作動する IgLR が異なる可能性が示唆されていることから、IgLR をターゲットとした治療法は疾患あるいは部位特異的な副次的作用の少ない治療法となりうる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、IgLR の機能や役割、そしてそれらがどのような疾患に関わるかを明らかにするとともに、それらを標的とした治療の効果と副作用を検討し、次世代骨吸収抑制薬開発の研究基盤を構築することである。

3. 研究の方法

(1) 病的骨吸収に関与する IgLR の同定(標的分子ターゲットの絞り込み)

CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いて独自に作出した 4 系統の IgLR 遺伝子欠損マウスの表現型を確認した。

骨疾患モデルにおいて骨吸収抵抗性を示す IgLR を同定するため、上記の IgLR 遺伝子欠損マウス及び対照となる野生型 WT マウスを用いて骨疾患モデルを作成し、骨吸収あるいは骨破壊抑制効果を検証した。

(2) 内因性リガンド探索、同定

網羅的グリコーム解析技術を用いた IgLR の内因性糖鎖リガンドの同定を試みた。シグレック 15 及び MDL-1 のリガンドが発現していると推測される骨関連細胞における複合糖質糖鎖の発現動態を調査する。IgLR ごとリガンドを溶出して質量分析 MALDI-TOF MASS でリガンド糖鎖およびキャリアタンパクの同定実験を行った。

(3) 病的骨吸収に強く関与する IgLR の選択的遮断による治療効果

病態モデルを用いた効果検証実験

閉経後骨粗鬆症、小児骨粗鬆症モデル、転移性骨癌の 3 つの病態モデルに対する抗 IgLR 療法の治療効果を確認する。既存の骨吸収抑制薬との比較した。

4. 研究成果

(1) 病的骨吸収に関与する IgLR の同定

Siglec-15 遺伝子欠損マウスのみ破骨細胞の機能不全による軽度の大理石病を呈したが、MDL-1、TREM2 の遺伝子欠損マウスは野生型マウスと比較して骨に異常はみられなかった。In vitro でも破骨細胞分化能は正常であることを確認した。SIRP-β1 遺伝子欠損マウスは胎生致死であった。Siglec-15 は骨リモデリングにおいて中心的役割をになっており、骨リモデリングに異常をきたす閉経後骨粗鬆症などに対する治療標的と考えられた。

閉経後骨粗鬆症モデルである卵巣摘出を各マウスに行なったところ、MDL-1、TREM2 の遺伝子欠損マウスは野生型マウスと同様に骨量減少が生じた。Siglec-15 遺伝子欠損マウスではわずかな骨量減少しか生じず、治療効果を示す可能性があることを示した。

関節炎モデルにおける検証実験は 2018 年に起こった北海道胆振東部地震に伴う長期停電により冷凍、冷蔵保存されていた多くの研究試料や高価な試薬が失われたため予定の実験すべてを行うことができなかったが、Siglec-15 遺伝子欠損マウスおよび TREM2 遺伝子欠損マウスは炎症性骨軟骨破壊を有意には抑制できないことを確認した。一方、MDL-1 遺伝子欠損マウスは既報のように軽度炎症部位における破骨細胞誘導と骨破壊を軽度抑制した。

Siglec-15 のリガンド候補のひとつである腺がん糖鎖抗原シアリル Tn に注目し、シアリル Tn 糖鎖抗原を発現する乳癌骨転移モデルにおいて骨溶解が亢進するかどうかを検証した。予想に反してシアリル Tn 糖鎖抗原発現乳癌細胞のほうが非発現乳癌細胞よりも転移性骨癌成立率が低く、骨破壊が軽度であった。生化学的にはシアリル Tn 抗原は Siglec-15 と高い親和性を示すも

の、in vitro では破骨細胞分化，活性化促進作用は確認できなかった．さらにシアリル Tn 抗原は乳癌細胞のインテグリン $\beta 1$ を修飾し，骨基質との接着能を低下させるという副次的な知見をえた．すなわち，シアリル Tn 抗原発現乳癌細胞は骨基質との接着能が低下しているため骨転移が成立しにくいことが明らかとなった．

(2) 内因性リガンド探索，同定

シグレック 15 及び MDL-1 のリガンドが発現していると推測される前破骨細胞における複合糖質糖鎖の発現動態を調査した．シグレック 15 のリガンドと考えられるシアリル糖鎖で分化に伴う変動の大きな糖鎖構造を同定した．これらのキャリア蛋白の同定は今度の目標である．

(3) 病的骨吸収に強く関与する IgLR の選択的遮断による治療効果

治療ターゲットと考えられた抗 Siglec-15 中和抗体を用いた骨粗鬆症治療効果の検証を行なった．とくに成長期ラットでは成長障害を起こすことなく骨量を著明に増加させることを確認した．次にステロイド性骨粗鬆症成長期ラットモデルを作成した．このモデルにおいても成長障害を起こすことなくステロイド性骨粗鬆症を予防できるだけでなく既存の第一選択薬であるビスフォスフォネートよりも効果的に骨量を増加させることを確認した．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato D, Takahata M, Ota M, Fukuda C, Hasegawa T, Yamamoto T, Amizuka N, Tsuda E, Okada A, Hiruma Y, Fujita R, Iwasaki N.	4. 巻 135
2. 論文標題 Siglec-15-targeting therapy protects against glucocorticoid-induced osteoporosis of growing skeleton in juvenile rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bone.2020.115331	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujita Ryo, Hamano Hiroki, Kameda Yusuke, Arai Ryuta, Shimizu Tomohiro, Ota Masahiro, Sato Dai, Kobayashi Hideyuki, Iwasaki Norimasa, Takahata Masahiko	4. 巻 36
2. 論文標題 Breast cancer cells expressing cancer-associated sialyl-Tn antigen have less capacity to develop osteolytic lesions in a mouse model of skeletal colonization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical & Experimental Metastasis	6. 最初と最後の頁 539 ~ 549
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10585-019-09999-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Dai, Takahata Masahiko, Ota Masahiro, Fukuda Chie, Tsuda Eisuke, Shimizu Tomohiro, Okada Akiko, Hiruma Yoshiharu, Hamano Hiroki, Hiratsuka Shigetou, Fujita Ryo, Amizuka Norio, Hasegawa Tomoka, Iwasaki Norimasa	4. 巻 116
2. 論文標題 Siglec-15-targeting therapy increases bone mass in rats without impairing skeletal growth	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 172 ~ 180
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bone.2018.07.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sato Dai
2. 発表標題 Siglec-15-targeting therapy protects against glucocorticoid-induced osteoporosis of growing skeleton in juvenile rats.
3. 学会等名 The American Society for Bone and Mineral Research（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田 諒
2. 発表標題 乳癌細胞は癌関連糖鎖抗原シアリルTn発現により骨髄生着能が低下する mouse skeletal colonization modelを用いた検討
3. 学会等名 日本整形外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤大
2. 発表標題 小児ステロイド性骨粗鬆症に対するSiglec-15分子標的治療の有用性
3. 学会等名 日本骨代謝学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	須田 廣美 (木村 須田) (Kimura-Suda Hiromi) (00574857)	公立千歳科学技術大学・理工学部・教授 (20106)	
研究分担者	古川 潤一 (Junichi Furukawa) (30374193)	北海道大学・医学研究院・特任准教授 (10101)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	佐藤 大 (Sato Dai)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	藤田 諒 (Fujita Ryo)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関