

令和 2 年 5 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11000

研究課題名(和文)新規PAI-1阻害剤による骨代謝改善/骨壊死発症予防の実現

研究課題名(英文)Prevention of osteoporosis and osteonecrosis by novel PAI-1 inhibitor

研究代表者

古賀 大介 (Koga, Daisuke)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・非常勤講師

研究者番号：60422482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：閉経は骨粗鬆症の危険因子である。PAI-1は細胞の細胞老化を誘導する。本研究では、新たに開発されたPAI-1阻害剤(iPAI-1)を、マウス卵巣摘出モデルに経口投与し、骨代謝に対する影響を検証した。PAI-1阻害剤は、マウス卵巣摘出モデルにおいて骨形成を促進し、骨吸収を抑制することにより骨量低下を予防した。PAI-1阻害剤は、経口投与可能な骨粗鬆症の治療薬として有力な候補となりうることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在市場にある治療薬は、ほとんどが破骨細胞を標的とする骨吸収阻害剤である。これらは骨量を増加させるが、一方で骨代謝回転を抑制し、長期投与によって骨質を低下させる。実際に骨吸収阻害剤の長期投与に起因すると考えられる非定型骨折の発生が整形外科では問題となっている。PAI-1阻害剤は骨形成促進の効果を有し、骨質を改善する全く新しい骨粗鬆症治療剤として有望と予想される。この研究が順調に推進されれば、高齢者医療の現場が得られる恩恵はきわめて大きい。

研究成果の概要(英文)：Menopause is a potent risk factor of osteoporosis. In this study, we evaluated the therapeutic benefits of novel orally available small molecule PAI-1 inhibitor (iPAI-1) in an estrogen deficiency-induced osteoporosis model. Eight-week old C57BL/6J female mice were divided into three groups, including a sham+vehicle (Sham), ovariectomy (OVX)+vehicle (OVX+v), and OVX+iPAI-1 (OVX+i) group. Six weeks of iPAI-1 treatment prevented OVX-induced trabecular bone loss. Bone formation activity was significantly higher in the OVX+i group than the OVX+v group and sham group. Unexpectedly, OVX-induced osteoclastogenesis was partially, but significantly reduced. Bone marrow ablation analysis indicated that the remodeled trabecular bone volume was significantly higher in the iPAI-1-treated group than that in the control group. In conclusion, our results suggest PAI-1 blockade via a small molecule inhibitor is a new therapeutic approach for the anabolic treatment of postmenopausal osteoporosis.

研究分野：整形外科

キーワード：閉経 骨粗鬆症 PAI-1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

【骨組織の加齢変化と PAI-1】世界に先駆けて日本が超高齢者社会に突入しつつある現在、日本整形外科学会では、「加齢に伴い運動器の障害のために要介護となる危険の高い状態」を「ロコモティブシンドローム」と提唱し、高齢者の運動器障害を予防するべく啓蒙を行っている。骨粗鬆症は、ロコモティブシンドロームの原因疾患として克服すべき疾患に挙げられるが加齢と骨代謝の分子メカニズムは十分に解明されていない。サーチユイン遺伝子は近年同定された老化制御因子であり、哺乳類では SIRT1 ~ SIRT7 まで 7 種類のサーチユイン相同遺伝子が同定されている。我々はこれまで Sirt6 に注目して研究を行ってきた。Sirt6^{-/-}マウスは早期老化の表現型を呈するが、我々はその軟骨組織を組織学的に詳細に解析し、Sirt6 が軟骨の分化、増殖を促進すること、軟骨細胞の Senescence (老化) を抑制することを明らかにした (古賀、麻生、辻ら 2013 Scientific Reports 業績参照)。この成果は先進性を評価され、2013 年度米国骨代謝学会 (ASBMR) にて優秀ポスター賞を受賞した。我々は同時に、Sirt6^{-/-}マウスでは、骨組織、軟骨細胞の細胞において、細胞老化の指標である PAI-1 の発現が亢進していることを見出した (同上)。

【個体老化と PAI-1】PAI-1 は、serine protease inhibitors (serpin) に属し、凝固線溶系や線維化などの病態のみならず、虚血性心疾患、脳血管障害などの動脈血栓症や、静脈血栓症など多くの血栓性疾患に関与している。Kortlever RM らは、PAI-1 が単なる細胞老化のマーカーではなく、p53 の下流に位置し細胞の細胞老化を誘導するために必要十分な因子であることを示した (2006 Nat. cell. Biol.)。連携研究者の宮田らは、早期老化モデルマウスのひとつである Klotho マウスを用いた興味深い研究成果を報告した (2014 宮田ら PNAS 業績参照)。Klotho マウスでは血中や組織において PAI-1 発現が亢進するが、PAI-1 欠損マウスとの交配、あるいは PAI-1 阻害剤投与により PAI-1 発現を減少させると、Klotho マウスの早期老化の表現型が軽減し、寿命が延長した。この結果は、PAI-1 が個体老化の進行において重要な機能を有することを示唆している。

【骨粗鬆症と PAI-1】PAI-1 欠損マウスを用いて骨代謝異常における PAI-1 の機能について研究が進んでいる。PAI-1 欠損マウスは卵巣摘出による閉経後骨粗鬆症モデルでは骨量低下に抵抗性である。つまり閉経後骨粗鬆症には PAI-1 増加が重要であることが明らかとされた (Daci, E. ら 2000)。

【新規 PAI-1 阻害剤の開発と臨床応用】連携研究者の宮田らは、PAI-1 分子の新たな役割とその阻害剤の臨床応用を探索するため、低分子経口阻害剤を開発している。そのひとつである TM5275 は、対照薬とした臨床で抗血栓薬として最も使用されている clopidogrel と同等以上の確実な抗血栓作用を示し、なおかつ対照薬とは異なり出血時間を延長しないという長所を持ち、現在も低分子化合物の構造最適化が進められている。宮田らは最近、TM5509 が骨髄ニッチから造血幹細胞を離脱させ、造血細胞へと分化させることを発見 (2013 宮田ら Stem Cells 業績参照) し、臍帯血移植後の造血回復を目標に医師主導治験を進めている (UMIN000012853、000010686)。

2. 研究の目的

本研究ではマウスを用いた骨粗鬆症モデル、骨髄除去 (BMA) モデルを作成し、PAI-1 阻害剤を投与することにより、骨粗鬆症に対する予防効果、および骨のリモデリング、特に骨形成に対する PAI-1 阻害剤の投与効果を検証した。

3. 研究の方法

【**卵巣摘出モデル**】生後8週の雌C57BL6/Jマウス30匹を、Sham手術+溶媒投与群(S+V)、卵巣摘出+溶媒投与群(OVX+V)、卵巣摘出+PAI-1阻害剤投与群(OVX+P)に分けた(n=10)。手術直後からPAI-1阻害剤浮遊液、あるいは溶媒をゾンデにて経口投与した。術後2週で採尿しCTX-1濃度をELISAで計測した。術後6週で屠殺し、大腿骨をmicroCT、脛骨と腰椎を非脱灰組織解析にて解析した。骨髄細胞をFACSにより解析した。

【**骨髄除去モデル**】

生後8週の雌C57BL6/Jマウス20匹を、BMA手術+溶媒投与群(V群)、BMA手術+PAI-1阻害剤投与群(P群)に分けた(n=10)。大腿骨の骨髄を歯科用ドリルにより除去し、閉創後、手術直後から溶媒、あるいはPAI-1阻害剤浮遊液をゾンデにより経口投与した。骨形成期である術後7日に屠殺し、大腿骨を採取、海面骨量をmicroCTにより解析した。

4. 研究成果

【**卵巣摘出モデル**】大腿骨、脛骨、腰椎においてすべて、OVX+V群では有意に骨量が低下したが、OVX+P群では回復した。術後2週の尿中CTX-1濃度は、OVX+V群、OVX+Pにて共に増加し、両者間に有意差はなかった。骨形態計測の結果、骨形成の指標はSham+V群と比較してOVX+V群にて増加していたが、OVX+P群では更に増加していた。FACS解析の結果、骨髄中のSca-1およびCD140a陽性の間葉系幹細胞がPAI-1阻害剤により増加していた。

【**骨髄除去モデル**】

microCTによる解析の結果、術後7日目では、両群において除去された海面骨のリモデリングが認められたが、V群と比較して、P群においてより旺盛な新生海面骨形成が認められた。

【**結論**】

現在市場にある治療薬は、ほとんどが破骨細胞を標的とする骨吸収阻害剤である。これらは骨量を増加させるが、一方で骨代謝回転を抑制し、長期投与によって骨質を低下させる。実際に骨吸収阻害剤の長期投与に起因すると考えられる非定型骨折の発生が整形外科では問題となっている。したがって骨形成を促進し、骨代謝回転を阻害しない薬剤、および骨質を改善する薬剤の登場が待望されるが、現状では副甲状腺ホルモン製剤が唯一の薬剤である。しかし、これは注射薬であって服薬コンプライアンスに問題があり、かつ投与期間が1.5年~2年と限定されているという欠点がある。PAI-1は骨代謝回転を阻害せず、なおかつ開発中のPAI-1阻害剤は内服薬であることから良好なアドヒアランスが予想される。PAI-1阻害剤はマウス卵巣摘出モデルにおいて骨形成を刺激することにより骨量を回復させた。またマウス骨髄除去モデルにおいて、骨修復を促進した。すでにPAI-1阻害剤のヒトでの安全性は確認されており、骨粗鬆症の治療薬として有力な候補となりうる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Jin G, Aobulikasimu A, Piao J, Aibibula Z, Koga D, Sato S, Ochi H, Tsuji K, Nakabayashi T, Miyata T, Okawa A, Asou Y.	4. 巻 8(4)
2. 論文標題 A small-molecule PAI-1 inhibitor prevents bone loss by stimulating bone formation in a murine estrogen deficiency-induced osteoporosis model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 523-532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12390. eCollection 2018 Apr.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Jin G, Asou Y, Ishiyama K, Okawa A, Kanno T, Niwano Y.	4. 巻 83(4)
2. 論文標題 Proanthocyanidin-Rich Grape Seed Extract Modulates Intestinal Microbiota in Ovariectomized Mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Food Sci	6. 最初と最後の頁 1149-1152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1750-3841.14098. Epub 2018 Mar 26.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Jin Guangwen, Aobulikasimu Alkebaier, Piao Jinying, Aibibula Zulipiya, Koga Daisuke, Sato Shingo, Ochi Hiroki, Tsuji Kunikazu, Nakabayashi Tetsuo, Miyata Toshio, Okawa Atsushi, Asou Yoshinori	4. 巻 8
2. 論文標題 A small-molecule PAI-1 inhibitor prevents bone loss by stimulating bone formation in a murine estrogen deficiency-induced osteoporosis model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 523 ~ 532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12390	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Nham GTH, Zhang X, Asou Y, Shinomura T.	4. 巻 704
2. 論文標題 Expression of type II collagen and aggrecan genes is regulated through distinct epigenetic modifications of their multiple enhancer elements.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 6. 最初と最後の頁 Gene.	6. 最初と最後の頁 134-141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gene.2019.04.034.	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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Guangwen Jin、Jinying Piao、Zulipiya Aibibula、Daisuke Koga、Hiroki Ochi、Kunikazu Tsuji、Toshio Miyata、Atsushi Okawa、Yoshinori Asou
2. 発表標題 PAI-1 inhibitor treatment attenuates bone loss by stimulating bone formation in a mouse model of postmenopausal osteoporosis
3. 学会等名 Annual meeting for American Society for Bone and Mineral Research (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 麻生義則、金光文、alkebaier・aobulikasimu、Zulipiya・Aibibula、朴金瑛、越智広樹、宮田敏男、大川淳
2. 発表標題 閉経後骨粗鬆症モデルにおいて新規PAI-1阻害薬は骨形成を刺激して骨密度を回復させる
3. 学会等名 日本骨粗鬆症学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 alkebaier・aobulikasimu、金光文、Zulipiya・Aibibula、朴金瑛、越智広樹、宮田敏男、大川淳、麻生義則
2. 発表標題 新規PAI-1阻害剤はマウス骨髄除去モデルにおいて骨形成を促進する
3. 学会等名 日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金 光文(東京医科歯科大学 大学院整形)、朴 英瑛、段 孝、市村 敦彦、赤堀 浩司、宮田 敏男、越智 広樹、佐藤 信吾、大川 淳、麻生 義則
2. 発表標題 新規PAI-1阻害薬は閉経後骨粗鬆症モデルの骨密度を回復させる
3. 学会等名 日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Aidehamu Aihemaiti, Naoki Yamamoto, Alkebaier Aobulikasimu, Takuya Oyaizu, Hiroki Ochi, Shingo Sato, Kunikazu Tsuji, Toshio Miyata, Atsushi Okawa, Yoshinori Asou
2. 発表標題 PAI-1 accelerates sarcopenia and ageing-related osteoporosis.
3. 学会等名 Annual meeting for American Society for Bone and Mineral Research (国際学会)
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	辻 邦和 (Tsuji Kunikazu) (20323694)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座准教授 (12602)	
研究分担者	麻生 義則 (Asou Yoshinori) (50345279)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座教授 (12602)	