

令和元年6月7日現在

機関番号：33602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16686

研究課題名(和文)骨折の修復過程におけるJAKの機能の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of the function of JAK in the process of fracture repair

研究代表者

村上 康平(Murakami, Kohei)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：60791837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：JAK阻害薬が破骨細胞や骨芽細胞に与える影響をex vivoで調べた。JAK1/2選択的阻害薬バリシチニブと汎JAK阻害薬トファシチニブは骨吸収を担う破骨細胞の分化を抑制した。他方、これらJAK阻害薬は骨形成を担う骨芽細胞の石灰化も抑制した。骨粗鬆症モデルである卵巣摘出(OVX)マウスにバリシチニブを4週間投与したところ、バリシチニブは破骨細胞の分化に必須なRANKLの発現を抑制する一方で、骨芽細胞マーカーであるCol1a1やBglap1の発現もバリシチニブは抑制した。つまり、バリシチニブはRANKLの発現を抑制して骨吸収を阻害するとともに、骨形成も阻害すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Janus Kinase (JAK) は、JAK/STAT経路を担うリン酸化酵素である。現在、JAK阻害薬は強力な抗サイトカイン治療薬として注目されている。本研究は、すでに関節リウマチなどの治療薬として使用されているトファシチニブやバリシチニブがどのように骨吸収を抑制するかを示した。また、JAK阻害薬が骨形成を阻害する可能性をex vivoおよびin vivoで明らかにした。本研究成果は、治療薬として使用頻度が増えつつあるJAK阻害薬が、骨代謝に与える影響について示したものであり、今後集まる臨床データを解析・理解するうえ役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：The effects of JAK inhibitors on osteoclasts and osteoblasts were examined ex vivo. The JAK1/2 selective inhibitor baricitinib and the pan-JAK inhibitor tofacitinib inhibited osteoclast formation. On the other hand, these JAK inhibitors also suppressed the mineralization of osteoblasts.

In the ovariectomized (OVX) mouse, which is an osteoporosis model, when baricitinib (10 mg/kg/day, i.p., sid) is administered for 4 weeks, it suppressed the expression of RANKL, which is essential for osteoclast differentiation, but also the expression of osteoblast markers Col1a1 and Bglap1. Taken together, it seems that baricitinib suppresses bone resorption and also bone formation.

研究分野：骨代謝学

キーワード：JAK阻害薬 骨粗鬆症 破骨細胞 骨芽細胞 OVXモデル バリシチニブ トファシチニブ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景:

骨折は骨に対して外力が加わり、骨の構造上の連続性が絶たれた状態である。骨折の原因は大きく3つに分けられ、大きな外力によって生じる外傷性骨折、局所的に力が繰り返し加わることで引き起こされる疲労骨折、そして何らかの骨疾患により骨が脆弱化して、わずかな外力に対して骨の破壊が起こる病的骨折である。本邦では、骨粗鬆症に伴う大腿骨の病的骨折の発生率が増加し続けており（骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2015年版）、超高齢社会を迎えていることから、今後さらなる増加が見込まれた。高齢者における骨折は、寝たきりになるリスクを高め、1万人以上の調査によると1年以内の死亡率は10.1%に至る（J. Orthop. Sci. 11: 127, 2006）。従って、骨折の早期の治癒は重要なテーマと考えられた。

骨折の修復過程には、様々な因子が関与する。初期には、TNF- α など炎症性サイトカインが細胞を集簇させる。その後、BMP-2が軟骨細胞や骨芽細胞に仮骨を形成させ、Wntシグナルが骨芽細胞による骨形成を促進させる（Nat. Rev. Rheumatol. 11:45, 2015）。しかし、依然として未解明な部分が存在する。それが、破骨細胞の制御因子である。骨折の修復過程では、仮骨が形成された後、急激に破骨細胞が増加して骨リモデリングが亢進するが、何が制御しているか、まだ明らかではなかった。

Janus Kinase (JAK) はI型およびII型サイトカイン受容体の細胞質領域に結合し、JAK/STAT経路と称されるシグナル伝達を担うリン酸化酵素である。哺乳類のJAKはJAK1、JAK2、JAK3、Tyrosine Kinase 2 (TYK2)の4種類が知られている。これらは約50種類のサイトカインやホルモンのシグナルを伝達し、免疫や造血など様々な生体機構に関与する。また、関節リウマチや骨髄線維症などの病態においても、JAKは重要な役割を果たしており、これらの疾患ではJAKが治療標的として確立されている。しかしながら、骨代謝におけるJAKの機能に関する報告は限られていた。

2. 研究の目的

申請者が行った予備実験において、一部のJAK阻害薬が、破骨細胞の分化を抑制することを発見した。このことから、JAKは破骨細胞の分化に密接に関与する因子と考えられ、骨折修復過程で増加する破骨細胞にも寄与している可能性が高いと考えられた。骨折の修復過程におけるJAKの役割が明らかになれば、JAKを標的とした治療介入が可能になり、難治性の骨折や再骨折リスクの高い患者に対して、より早期に、より強固な骨折治癒が可能となる可能性が考えられた。さらに、破骨細胞とJAKの関連性が明らかになることで、将来的に他の骨代謝疾患の治療に応用することも期待された。本研究では、骨折の修復過程におけるJAKの機能を明らかにすることで、骨折修復を促進させるJAKを標的とした新たな治療法の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* で破骨細胞形成過程におけるJAKの機能を検討した。マウス骨髄細胞を共存培養法、またはMacrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF)とreceptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)で破骨細胞に分化誘導し、ここにJAK1/JAK2選択的阻害薬バリシチニブ、汎JAK阻害薬トファシチニブ、shRNAによるJAK1のノックダウン、shRNAによるJAK2のノックダウンの影響を観察した。またリアルタイムPCR、ウェスタンブロットティング、抗体アレイを用いて、破骨細胞の分化に関連する因子の発現を解析した。

(2) *in vitro* でマウス頭頂骨由来骨芽細胞を β グリセロリン酸、アスコルビン酸、組換えBMP2で分化を誘導した。この培養系に、JAK阻害薬バリシチニブ、トファシチニブをそれぞれ添加し、骨芽細胞分化におけるJAKの機能を検討した。

(3) 生理的な状態でのJAKの機能を確かめるために、野生型マウスにJAK阻害薬を投与した。C57BL/6Jマウス（8週齢、オス）にvehicle（5%DMSO/生理食塩水、 $n=3$ ）またはバリシチニブ（10 mg/kg、 $n=6$ ）を1日1回2週間経口投与し、大腿骨と脛骨を採材した。そしてマイクロCTとリアルタイムPCRによって骨量およびRANKL発現の変化を検討した。

(4) 病的な状態でのJAKの機能を確かめるために、骨粗鬆症モデルマウスにJAK阻害薬を投与した。まず野生型のC57BL/6Jマウス（8週齢、メス）に卵巣摘出術（OVX）を施した。翌日より、vehicle（2%DMSO/生理食塩水）、またはバリシチニブ（10 mg/kg）を1日1回4週間経口投与し、大腿骨と脛骨を採材した。そしてマイクロCTとリアルタイムPCRによって骨量およびmRNA発現の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) マウス頭頂骨由来の骨芽細胞は、活性型ビタミンD₃（1,25D₃）とプロスタグランジンE₂（PGE₂）存在下で骨髄細胞と共存培養することにより、破骨細胞の形成を誘導した。しかし、JAK1/JAK2選択的阻害薬バリシチニブまたは汎JAK阻害薬トファシチニブを添加することにより、破骨細胞の分化は阻害された。一方、M-CSFとRANKLで誘導する骨髄マクロファージから破骨細胞への分化をバリシチニブやトファシチニブは阻害しなかった。つまり、これらのJAK阻害薬は骨芽細胞に作用し、破骨細胞の分化を阻害す

ることが示唆された。

そこで、骨芽細胞が発現する破骨細胞分化制御因子の発現をリアルタイム PCR で測定した。1,25D₃ と PGE₂ により誘導される骨芽細胞の RANKL 発現は、バリシチニブやトファシチニブにより有意に抑制された。一方で、破骨細胞の分化に必須なもう一つのサイトカイン M-CSF の発現や RANKL のデコイ受容体である Osteoprotegerin の発現には影響しなかった。さらに、共存培養におけるバリシチニブやトファシチニブの破骨細胞分化抑制作用は、組換え RANKL の添加により完全に回復したが、M-CSF の添加では回復しなかった (図 1)。つまり、バリシチニブとトファシチニブは、骨芽細胞の RANKL 発現を抑制することで破骨細胞の分化を抑制することがわかった。

JAK ファミリーの中で、どの JAK が 1,25D₃ と PGE₂ で誘導する骨芽細胞の RANKL 発現を制御するのかを確かめるために、shRNA で JAK1、JAK2 それぞれのノックダウンを行った。興味深いことに、JAK1 単独、JAK2 単独いずれのノックダウンでも、骨芽細胞の RANKL 発現は mRNA レベルとタンパクレベルで有意に抑制され、共存培養における破骨細胞形成は有意に抑制された。このことから、1,25D₃ と PGE₂ で誘導する骨芽細胞の RANKL 発現において JAK1 と JAK2 の間に冗長性はなく、両方が必要であることが示唆された。

次に、共存培養系において 1,25D₃ と PGE₂ により誘導される因子をサイトカインアレイで網羅的に調べた。すると、JAK1 と JAK2 を介したシグナル伝達を行う因子として、インターロイキン-6 (IL-6)、IL-11 および白血病阻止因子 (LIF) の分泌が刺激されることがわかった。実際に、1,25D₃ と PGE₂ を骨芽細胞に処置すると Jak1 と Jak2 のリン酸化、その下流の Stat3 のリン酸化、そして JAK/STAT 経路の標的遺伝子 *Socs3* 発現の有意な増加が確かめられた。そしてこれらはバリシチニブにより抑制された。最後に、バリシチニブによる骨芽細胞の RANKL 発現抑制作用は、Stat3 活性化薬である Colivelin によって濃度依存的にレスキューされた。

これらの結果から、以下のことが示された (図 2)。1,25D₃ と PGE₂ は骨芽細胞から IL-6、IL-11、LIF の分泌を促進し、これらがオートクラインすることで、JAK1/2 を介して RANKL の発現が増加する。バリシチニブやトファシチニブは、骨芽細胞の JAK1/2 を抑制することで、RANKL の発現を抑制する。したがって、JAK1 と JAK2 は、骨粗鬆症や歯周病を含む炎症性骨疾患の新規治療標的と考えられた。

この結果を踏まえて、当初は骨折を標的として研究を始めたが、破骨細胞が悪玉として機能する骨粗鬆症を標的とした方が良いと考えた。また骨粗鬆症の治療こそが骨折の予防に結び付くと考えられた。そこで、JAK 阻害薬の骨粗鬆症治療薬としての有用性を検討するために、以下の実験を行った。

(2) 生後 1 または 2 日齢のマウス頭頂骨より、骨芽細胞を採取し、β グリセロリン酸、アスコルビン酸、組換え BMP2 で分化を誘導した。この培養系に、JAK 阻害薬バリシチニブ、トファシチニブを添加し、骨芽細胞分化における JAK の機能を検討したところ、これらの JAK 阻害薬は濃度依存的に骨芽細胞の分化を抑制した (図 3)。つまり JAK 阻害薬は破骨細胞形成だけでなく、骨芽細胞の分化も抑制することが示唆された。

(3) 野生型マウスに JAK1/2 阻害薬バリシチニブを 2 週間投与した。しかし、大腿骨の骨量に変化は認められなかった。また、脛骨における RANKL 発現も、vehicle 群とバリシチニブ群で同様であった。このことから、生理的な骨代謝において、少なくとも短期的に JAK はほとんど寄与しないと考えられた。

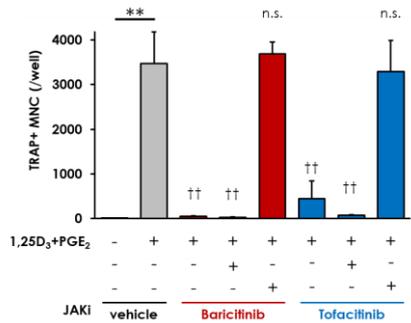


図 1 JAK 阻害薬の破骨細胞分化に対する影響と M-CSF または RANKL の添加による回復効果
** $P < 0.01$, independent *t*-test. †† $P < 0.01$, Dunnett 多重比較検定 (vs vehicle, 1,25D₃+PGE₂)

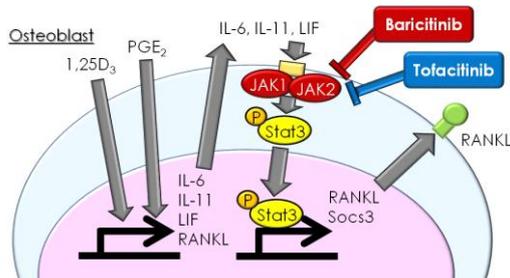


図 2 実験 1 で明らかになった JAK 阻害薬の破骨細胞分化抑制機序

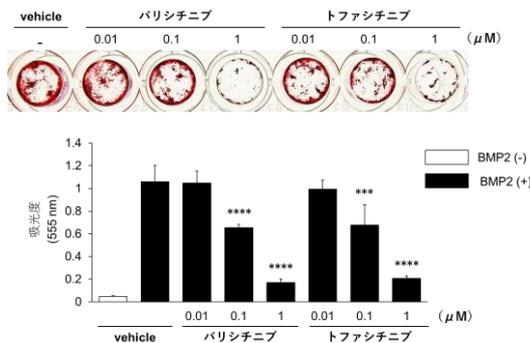


図 3 JAK 阻害薬の骨芽細胞分化に対する影響
アリザリンレッド染色 (上図) と CPC 法による定量結果 (下図)。
*** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, Dunnett の多重比較検定 (vs vehicle, BMP2+)

(4) 骨粗鬆所モデルとして卵巣摘出術 (OVX) を施したマウスに JAK1/2 阻害薬バリシチニブを 4 週間投与し、骨に与える影響を観察した。まず OVX 群では体重の増加と至急重量の減少が観察された。また、OVX により、マウスの大腿骨量は減少傾向を示した。この骨量の減少をバリシチニブは回復しなかった。そこで脛骨の mRNA 発現を調べた。OVX+vehicle 群では RANKL 発現が増加したが、OVX+バリシチニブ群ではこれを有意に抑制した。他方、OVX+vehicle 群では骨芽細胞マーカーである *Col1a1* や *Bglap1* の発現が増加したが、OVX+バリシチニブ群ではこれを有意に抑制した (図 4)。以上の結果より、JAK 1/2 阻害薬バリシチニブは、骨粗鬆症において RANKL を抑制して破骨細胞形成を阻害すると同時に、骨芽細胞を抑制して骨形成も阻害するため、低骨代謝回転になることで、骨量に変化が見られなかったと推察された。

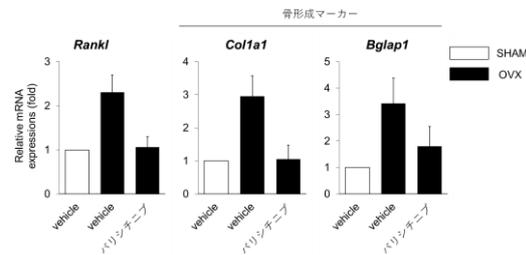


図4 OVX モデルマウスの脛骨 mRNA 発現に対するバリシチニブの影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 5 件)

- ① **Kohei Murakami**, Shingo Kikugawa, Yasuhiro Kobayashi, Shunsuke Uehara, Takako Suzuki, Hiroyuki Kato, Nobuyuki Udagawa, Yukio Nakamura, Olfactomedin-like protein OLFML1 inhibits Hippo signaling and mineralization in osteoblasts, *Biochemical and biophysical research communications*, 2018, 505; 419-425, 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.09.112
- ② Shunsuke Uehara, Nobuyuki Udagawa, Hideyuki Mukai, Akihiro Ishihara, Kazuhiro Maeda, Teruhito Yamashita, **Kohei Murakami**, Michiru Nishita, Takashi Nakamura, Shigeaki Kato, Yasuhiro Minami, Naoyuki Takahashi, Yasuhiro Kobayashi, Protein kinase N3 promotes bone resorption by osteoclasts in response to Wnt5a-Ror2 signaling, *Science Signaling*, 2017, ean0023, 査読有
DOI: 10.1126/scisignal.aan0023
- ③ Yukio Nakamura, Takako Suzuki, Mikio Kamimura, **Kohei Murakami**, Shota Ikegami, Shigeharu Uchiyama, Hiroyuki Kato, Vitamin D and calcium are required at the time of denosumab administration during osteoporosis treatment, *Bone Research*, 2017, 17021, 査読有
DOI: 10.1038/boneres.2017.21
- ④ Yukio Nakamura, Takako Suzuki, Mikio Kamimura, Shota Ikegami, **Kohei Murakami**, Shigeharu Uchiyama, Akira Taguchi, Hiroyuki Kato, Two-year clinical outcome of denosumab treatment alone and in combination with teriparatide in Japanese treatment-naive postmenopausal osteoporotic women, *Bone Research*, 2017, 16055, 査読有
DOI: 10.1038/boneres.2016.55
- ⑤ **Kohei Murakami**, Yasuhiro Kobayashi, Shunsuke Uehara, Takako Suzuki, Masanori Koide, Teruhito Yamashita, Midori Nakamura, Naoyuki Takahashi, Hiroyuki Kato, Nobuyuki Udagawa, Yukio Nakamura, A Jak1/2 inhibitor, baricitinib, inhibits osteoclastogenesis by suppressing RANKL expression in osteoblasts in vitro, *PLoS One*, 2017, e0181126, 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0181126

〔学会発表〕 (計 14 件)

- ① **村上康平**, Wnt アンタゴニスト Sfrp5 は骨芽細胞の分化を促進する, Wnt 研究会 2018-2019
- ② 山下照仁, 小出雅則, 上原俊介, **村上康平**, 小林泰浩, Sost 遺伝子レポーターマウスの骨における解析, Wnt 研究会 2018-2019
- ③ 小出雅則, 小林泰浩, 山下照仁, 上原俊介, **村上康平**, 高橋直之, 宇田川信之, 破骨細胞はスクレロスチン発現を抑制して海綿骨の骨形成を促進する, Wnt 研究会 2018-2019
- ④ 上原俊介, 山下照仁, **村上康平**, 小出雅則, 宇田川信之, 高橋直之, 小林泰浩, Wnt5a-Ror2 シグナルによる破骨細胞の骨吸収活性亢進機構, Wnt 研究会 2018-2019
- ⑤ Shunsuke Uehara, Teruhito Yamashita, **Kohei Murakami**, Masanori Koide, Takashi Nakamura, Shigeaki Kato, Nobuyuki Udagawa, Naoyuki Takahashi, Yasuhiro Kobayashi, Rho-Pkn3-c-Src pathways promote the bone-resorbing activity of osteoclasts under Wnt5a-Ror2 signaling pathways, Bone Biology Forum 2018
- ⑥ 小出雅則, 小林泰浩, 山下照仁, 上原俊介, **村上康平**, 高橋直之, 宇田川信之, 破骨細胞はスクレロスチン発現を抑制して海綿骨の骨形成を促進する, 2018 年 第 2 回オーラルサイエンス研究会

- ⑦ 小出雅則、山下照仁、小林泰浩、高橋直之、**村上康平**、上原俊介、宇田川信之、保田 尚孝、破骨細胞はスクレロステチン発現を抑制して海綿骨の骨形成を促進する、2018年 第87回 松本歯科大学学会
- ⑧ **Kohei Murakami**, New insight and perspective of canine polyarthritis, 2018年 XVIIIth ISACP Congress
- ⑨ 上原俊介、山下照仁、小出雅則、**村上康平**、中村貴、加藤茂明、宇田川信之、高橋直之、小林泰浩、Pkn3 阻害剤による破骨細胞の骨吸収抑制、2018年 第4回日本骨免疫学会
- ⑩ 上原俊介、山下照仁、**村上康平**、小出雅則、中村貴、加藤茂明、宇田川信之、高橋直之、小林泰浩、Wnt5a-Ror2 シグナルは、Daam2-Rho-Pkn3-c-Src 経路を介して破骨細胞の骨吸収を促進する、2018年 第36回 日本骨代謝学会学術集会
- ⑪ 上原俊介、**村上康平**、山下照仁、小出雅則、高橋直之、宇田川信之、小林泰浩、Wnt5a-Ror2 シグナルによる Pkn3 を介した破骨細胞機能促進、2018年 第3回日本骨免疫学会 ウィンターセミナー
- ⑫ **村上康平**、上原俊介、中村美どり、宇田川信之、小出雅則、山下照仁、小林泰浩、高橋直之、中村幸男、JAK1/2 阻害薬 baricitinib は骨芽細胞の RANKL 発現を抑制することで 破骨細胞の分化を阻害する、2017年 第85回 松本歯科大学学会
- ⑬ **村上康平**、上原俊介、高橋直之、宇田川信之、小林泰浩、JAK 阻害薬は骨芽細胞の RANKL 発現を抑制し、破骨細胞の分化を阻害する、2017年 第59回 歯科基礎医学会学術集会
- ⑭ **村上康平**、小林泰浩、上原俊介、鈴木孝子、宇田川信之、高橋直之、中村幸男、JAK1/2 阻害薬 baricitinib は骨芽細胞の RANKL 発現を抑制することで破骨細胞の分化を阻害する、2017年 第35回 日本骨代謝学会学術集会

〔その他〕

ホームページ等

松本歯科大学総合歯科医学研究所 最新論文紹介

<https://www.mdu.ac.jp/laboratory/upload/20171023-murakami.pdf>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：小林 泰浩

ローマ字氏名：Kobayashi Yasuhiro

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。