

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K15708

研究課題名（和文）骨形成不全症に対する骨カップリングを標的とした新規治療薬の開発

研究課題名（英文）Development of new therapy for osteogenesis imperfecta targeting bone coupling

研究代表者

大幡 泰久（Ohata, Yasuhisa）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20805460

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）：骨形成不全症(OI)は骨脆弱性を呈する先天性骨系統疾患である。OIでは骨カップリングに異常があり、破骨細胞による骨吸収が亢進し、病態を増悪していることが知られている。本研究では骨カップリング異常を標的としたOIに対する新規治療の開発を目的とした。本研究において我々はOIモデルマウスのoimマウスより骨髄を採取し、骨芽細胞分化を行い、網羅的に破骨細胞分化誘導に関わる分子をRNAseqを用いて同定した。本研究によりOIモデルマウスにおける骨評価を解析する実験系と骨芽細胞と破骨細胞を単離する方法も確立し、破骨細胞分化亢進があることも確認した。その破骨細胞分化亢進の原因となりうる候補分子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では骨形成不全症における破骨細胞機能亢進を惹起する候補分子の同定を行った。さらに候補分子を発現する細胞の特徴をシングルセルRNAseqで解析した。これまで骨形成不全症では病態特異的治療法がなく、特に重症患者においては既存の姑息的治療では、十分な効果が乏しく、QOLの改善につながっていないことが問題となっていた。本研究で見いだされた病態をさらに解明し、候補分子発現細胞を標的とした治療法を検討することにより、より骨形成不全症の病態に特異的な治療法の開発が進められることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Osteogenesis imperfecta (OI) is a congenital bone dysplasia with bone fragility. Previous studies have suggested that abnormalities in bone coupling accelerated bone resorption by osteoclasts, which exacerbate the OI pathology. The aim of this study was to develop a novel treatment for OI targeting bone coupling abnormalities. We extracted bone marrow from oim mice, an OI model mouse, and performed primary osteoblast culture. Then we comprehensively identified molecules involved in osteoclast differentiation using RNAseq. In this study, we established an experimental system for analyzing bone evaluation in OI model mice and a method for isolating osteoblasts and osteoclasts, and confirmed that osteoclast differentiation is actually enhanced in OI. Finally, we identified candidate molecules that could be responsible for enhanced osteoclast differentiation.

研究分野：骨系統疾患

キーワード：骨形成不全症

1. 研究開始当初の背景

骨は骨リモデリングと呼ばれる破骨細胞による骨吸収と、骨芽細胞による骨形成が恒常的に起こることで強度を維持している。骨リモデリングは骨量を至適に維持するために厳密に調整されており、その調整は破骨細胞と骨芽細胞の双方向性のカップリング機構により制御されている。その際に破骨細胞と骨芽細胞の間で受け渡される骨カップリング因子として、骨基質中に豊富に存在し、骨吸収の際に放出される Transforming Growth Factor- β (TGF- β)、Insulin-like Growth Factor-1 (IGF1)、Bone Morphogenetic Protein (BMP) などや、破骨細胞に発現する EphrinB2、collagen triple helix repeat containing 1 (Cthrc1)、sphingosin-1-phosphate (S1P)、セマフォリン 4D などが報告されている。また最近では細胞外分泌顆粒であるエクソソームに含まれる mi-RNA のうち、miRNA-146a や miRNA-214-3p などが骨カップリングを制御していることも報告されている (J.S. Holliday, et al. *Orthod Craniofac Res.* 2017)。

骨形成不全症 (osteogenesis imperfecta: OI) は、主に Ⅱ型コラーゲンの異常により骨強度が低下し、易骨折性や進行性の骨変形に加え歯牙 (象牙質) 形成不全をもたらす先天性疾患である。骨強度を改善するためにビスホスホネート製剤の投与が治療適応となっているが、姑息的治療であり、重症例には治療効果が乏しいというのが現状である。より効果的な治療法の開発が求められ、そのために OI の病態をより詳細に解明する必要がある。

OI における骨リモデリングについて、成人の OI 患者では骨代謝マーカーが上昇しているという報告がある (Vania Braga, et al. *Bone* 2004)。またモデルマウスを用いた先行研究では OI 由来の骨芽細胞と共培養することで破骨細胞形成能が増加することも報告されている (Haitao Li, et al. *Am J Pathol.* 2010)。これらの知見は OI 骨芽細胞が発現する異常 Ⅱ型コラーゲンが何らかの方法で破骨細胞に影響を及ぼし、OI 破骨細胞形成能にも異常をきたすということを示すものであるから、本疾患において骨カップリング異常が病態に寄与することを示唆するものであるが、OI における骨カップリングの異常の病態解析の報告はなく、その病態は不明であった。

2. 研究の目的

上記背景より OI の病態に未知の骨カップリング異常を介した破骨細胞機能を亢進させる病態があり、その機構が解明され、さらにその機構を抑制できる新規治療が開発できれば、ビスホスホネート治療を補完する治療になることが期待される。そこで本研究では OI における骨カップリングの異常を解明し、新規治療を開発することを目的とする。また OI の特徴的な症状の一つに歯牙形成不全がある。本病態に及ぼす新規治療法の効果判定を行うことも目的とする。

3. 研究の方法

OI モデルマウスである Col1a2^{oim} マウスを導入し、骨脆弱性を μ CT を用いて検討した。比較対照は野生型同胞マウスを用いた。生後 3 か月齢で全身麻酔化にマウスを安楽死させたうえで評価した。次にマウス骨髄を採取し、骨芽細胞初代培養と破骨細胞初代培養を行った。骨芽細胞初代培養は、播種した骨髄細胞を 1 日間培養し、翌日浮遊細胞を除去し、生着した細胞のみ利用した。この生着細胞を 10% FBS 含有 MEM に 10mM - Glycerophosphate、50 μ g/mL アスコルビン酸、1 μ M デキサメタゾン を添加した骨芽細胞分化培地で培養した。また破骨細胞初代培養は、播種した骨髄細胞を 1 日間培養し、翌日培地を 20%FBS 含有 MEM に 10 ng/mL MCSF と 50 ng/mL RANKL を添加した培地に交換したうえで 3 日間培養を行った。さらにその後 20%FBS 含有 MEM に 50 ng/mL RANKL を添加した培地に交換し、3 日間培養した。いずれも分化マーカーをウエスタンブロッティング法によりタンパクレベルで解析し、初代培養が正しく行われていることを確認した。骨芽細胞分化では Runt-related transcription factor 2 (RUNX2)、Ⅱ型コラーゲン (COL1A1)、osteoblast cadherin (OB-Cadherin)、アルカリホスファターゼ (ALP) の発現を確認した。一方で破骨細胞分化マーカーとしてはカテプシン K、Nuclear Factor of Activated T Cells 1 (NFATc1) の発現を確認した。また細胞組織染色により骨芽細胞は ALP 染色、破骨細胞は酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を行った。次に野生型マウス由来初代培養と OI モデルマウス由来初代培養における上記マーカーの発現比較することで、病態マウスにおける骨芽細胞、破骨細胞の特徴を検討した。また骨芽細胞初代培養細胞が病態特異的にどのような特徴を有しているか確認するため、RNAseq による網羅的解析を行い、野生型マウスと比較した。Quality 確認は FastQC の v0.11.7 を用いた。データのトリミングは fastq_quality_trimmer のバージョン 0.0.14

で行いマッピングは TopHat v2.1.1 と Bowtie2 のバージョン 2.3.4.1 を用いた。タグカウントは FeatureCounts プログラムのバージョン 1.4.6 で行った。その解析結果より破骨細胞機能亢進に寄与しうる分子を探索した。上記結果より探索した分子の遺伝子発現を Cyber Green システムによるリアルタイム qPCR で定量解析を行った。野生型マウス由来検体を対象とし CT 法を用いた。解析は Wilcoxon 検定を用いて 2 標本検定(正規近似)による有意差検定を行った。

4. 研究成果

Col1a2^{oim} マウス(ホモ接合性)における骨脆弱性を評価し、野生型マウスと比較して顕著に骨微細構造解析において異常を認めた。3 か月齢雄マウスにおける検討の結果、Col1a2^{oim} マウスは野生型(WT)マウスと比較して L5 海綿骨で有意に bone volume/ total volume (BV/TV)低値(Col1a2^{oim} マウス vs WT マウス : $16.8 \pm 5.02 \%$ vs $31.0 \pm 7.78 \%$, $p = 0.0089$)、bone surface/ bone volume (BS/BV)高値(Col1a2^{oim} マウス vs WT マウス : $49.0 \pm 5.40 /\text{mm}$ vs $38.3 \pm 6.30 /\text{mm}$, $p = 0.0164$)、Trabecular Thickness (Tb.Th)低値(Col1a2^{oim} マウス vs WT マウス : $41.2 \pm 4.46 \mu\text{m}$ vs $53.5 \pm 9.03 \mu\text{m}$, $p = 0.0371$)と Trabecular Number (Tb.N)低値(Col1a2^{oim} マウス vs WT マウス : $4.02 \pm 0.82 /\text{mm}$ vs $5.79 \pm 1.02 /\text{mm}$, $p = 0.0084$)、Trabecular separation (Tb.sp)高値(Col1a2^{oim} マウス vs WT マウス : $218.2 \pm 68.4 \mu\text{m}$ vs $123.7 \pm 40.0 \mu\text{m}$, $p = 0.0065$)であった。しかし骨密度は有意差を認めなかった(Col1a2^{oim} マウス vs WT マウス : $346.2 \pm 23.8 \text{ mg/cm}^3$ vs $364.3 \pm 35.7 \text{ mg/cm}^3$, $p = 0.57$)。次に大腿骨海綿骨で同様に比較したところ、BV/TV 低値(Col1a2^{oim} マウス vs WT マウス : $8.04 \pm 4.05 \%$ vs $22.5 \pm 8.28 \%$, $p = 0.0081$)、Tb.N 低値(Col1a2^{oim} マウス vs WT マウス : $1.72 \pm 0.60 /\text{mm}$ vs $4.33 \pm 0.43 /\text{mm}$, $p = 0.0007$)、Tb.Sp 高値(Col1a2^{oim} マウス vs WT マウス : $599.3 \pm 234.9 \mu\text{m}$ vs $205.2 \pm 120.1 \mu\text{m}$, $p = 0.0018$)は L5 と同じ結果であったが、BS/BV(Col1a2^{oim} マウス vs WT マウス : $46.0 \pm 8.67 /\text{mm}$ vs $41.2 \pm 8.73 /\text{mm}$, $p = 0.27$)、Tb.Th(Col1a2^{oim} マウス vs WT マウス : $44.7 \pm 8.22 \mu\text{m}$ vs $50.25 \pm 9.29 \mu\text{m}$, $p = 0.25$)においては有意な差を認めず、腰椎と大腿骨における骨微細構造異常出現機構に差があることが示唆された。骨密度は大腿骨においても有意差はなく(Col1a2^{oim} マウス vs WT マウス : $349.0 \pm 42.4 \text{ mg/cm}^3$ vs $360.9 \pm 48.0 \text{ mg/cm}^3$, $p = 0.88$)、L5 海綿骨と同等の結果であった。

骨芽細胞初代培養では RUNX2、COL1A1、OB-Cadherin、ALP を含む骨芽細胞マーカーの発現を認めたとうえで、COL1A1 や OB-Cadherin、ALP などの蛋白発現が Col1a2^{oim} マウス(ホモ接合性)では野生型マウスより低下していた。骨芽細胞分化を 8 日間と 15 日間行い、骨芽細胞分化前期マーカー(RUNX2)と後期マーカー(COL1A1、ALP)での発現の差が出現するか検討したが、いずれのタイミングにおいても同様の傾向、つまり Col1a2^{oim} マウス(ホモ接合性)では野生型マウスより発現が低下していた。一方で破骨細胞初代培養では、TRAP 染色陽性である多核の巨大細胞の分化に成功した。NFATc1 とカテプシン K を含む破骨細胞分化マーカーの発現をタンパクレベルで認めた。これら NFATc1 とカテプシン K のタンパクレベルでの発現が oim マウス由来細胞で増加していた。これらの結果は OI における骨芽細胞、破骨細胞の機能亢進と、骨リモデリングの亢進を示唆する結果であった。

さらに初代骨芽細胞において、培養 5 日目の時点で RNAseq による羅的解析を行った。FastqRecors は Col1a2^{oim} マウス vs WT マウス : 32572132 vs 29589555、MappingInput は Col1a2^{oim} マウス vs WT マウス : 32546133 vs 29566143、Mapped1 が Col1a2^{oim} マウス vs WT マウス : 31316157 vs 28503851(rate: 96.2% vs 96.4%)、Mapped2 が Col1a2^{oim} マウス vs WT マウス : 31246656 vs 28486315(rate: 96.0% vs 96.3%)であり、Pairmapped が Col1a2^{oim} マウス vs WT マウス : 30779886 vs 28045616 であった。その結果 Col1a2^{oim} マウスと野生型マウスで有意に発現量に差を認めた遺伝子群から、Gene Ontology を用いて破骨細胞分化亢進に寄与する候補分子 X を同定した。X の発現量が実際に Col1a2^{oim} マウス由来骨芽細胞で増加することを確認するためリアルタイム qPCR を N = 4 で WT マウス由来骨芽細胞と比較したところ有意に発現量の上昇を認めた(Col1a2^{oim} マウス vs WT マウス : 1.53 ± 0.31 vs 1.00 ± 0.00 , $p = 0.0108$)。X の発現に関わることが報告されているシグナル伝達に関わる分子の発現を確認したところ、やはり複数の分子で発現変動が生じていることが確認された(候補分子 A : logFC 1.14, logCPM 4.09, p value 0.00022, FDR 0.0050; 候補分子 B : logFC 1.64, logCPM 4.93, p value 7.72×10^{-8} ,

FDR 3.64×10^{-6})。これらの結果から、標的候補分子と、その発現変化をもたらす機序の解明が、OI 新規治療法の開発に寄与することが期待される。

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 2件）

1. 著者名 Takeyari Shinji, Kubota Takuo, Ohata Yasuhisa, Fujiwara Makoto, Kitaoka Taichi, Taga Yuki, Mizuno Kazunori, Ozono Keiichi	4. 巻 296
2. 論文標題 4-Phenylbutyric acid enhances the mineralization of osteogenesis imperfecta iPSC-derived osteoblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100027 ~ 100027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.014709	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 -

1. 著者名 Ohata Y., Takeyari S., Nakano Y., Kitaoka T., Nakayama H., Bizaoui V., Yamamoto K., Miyata K., Yamamoto K., Fujiwara M., Kubota T., Michigami T., Yamamoto K., Yamamoto T., Namba N., Ebina K., Yoshikawa H., Ozono K.	4. 巻 30
2. 論文標題 Comprehensive genetic analyses using targeted next-generation sequencing and genotype-phenotype correlations in 53 Japanese patients with osteogenesis imperfecta	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Osteoporosis International	6. 最初と最後の頁 2333, 2342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00198-019-05076-6	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 -

1. 著者名 Yamada Chieko, Kubota Takuo, Ishimi Takeshi, Takeyari Shinji, Yamamoto Kenichi, Nakayama Hirofumi, Ohata Yasuhisa, Fujiwara Makoto, Kitaoka Taichi, Ozono Keiichi	4. 巻 31
2. 論文標題 A novel COL1A1 deletion/insertion pathogenic variant in a patient with osteogenesis imperfecta	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Pediatric Endocrinology	6. 最初と最後の頁 205 ~ 208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1297/cpe.2022-0027	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7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yasuhisa Ohata, Shinji Takeyari, Taichi Kitaoka, Hirofumi Nakayama, Varoona Bizaoui, Yukako Nakano, Kenichi Yamamoto, Kei Miyata, Keiko Yamamoto, Takuo Kubota, Katsusuke Yamamoto, Toshimi Michigami, Takehisa Yamamoto, and Keiichi Ozono
2. 発表標題 Comprehensive Genetic Analysis by Targeted Next Generation Sequencing and Genotype-Phenotype Correlation of 55 Japanese Patients with Osteogenesis Imperfecta
3. 学会等名 American society for bone mineral research annual meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Ohata, T. Kitaoka, T. Ishimi, C. Yamada, Y. Nakano, K. Yamamoto, S. Takeyari, H. Nakayama, M. Fujiwara, T. Kubota, K. Ozono
2. 発表標題 Trabecular Bone Score and Bone Mineral Apparent Density Predict the Severity of Bone Fragility in Children and Adolescents with Osteogenesis Imperfecta. A Cross-sectional Study
3. 学会等名 American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------