

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 3 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17163

研究課題名（和文）骨吸収抑制剤が骨リモデリングに与える影響の2光子顕微鏡を用いた解析

研究課題名（英文）Analysis of the effect of anti-resorptive drugs on bone remodeling using 2-photon microscopy

研究代表者

松山 真理子（Matsuyama, Mariko）

東京大学・医学部附属病院・客員研究員

研究者番号：90738725

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：カテプシン阻害剤E64の骨リモデリングに対する影響を、生体外で骨リモデリングを再現可能な系を用いて検討した。2光子顕微鏡を用いて毎週観察を行った結果、無添加群では基質吸収とそれに引き続く再充填が見られたが、E64添加群では基質吸収が抑制され、再充填期には吸収窩以外の部位でも基質の増加がみられた。

また、画像を複数の領域に分割し、各領域における基質の増減を定量化することで、基質の吸収と再充填のカップリングについて検討を行った。無添加群では、吸収量と形成量に一定の相関、すなわちカップリングがみられたが、E64添加群では、吸収量と形成量の相関が見られず、カップリングが大きく乱れていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨吸収阻害剤であるカテプシン阻害剤とビスフォスフォネートが骨リモデリングに与える影響の違いを細胞レベルで明らかにすることができた。本研究で得られた所見は、よりよい骨粗しょう症治療薬の開発につながる知見をもたらすものであると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The effect of E64, an inhibitor for cathepsin, on bone remodeling was examined using a reconstitution system for bone remodeling ex vivo. By weekly observations using 2-photon microscopy, bone resorption and subsequent bone formation were observed in the control group. On the other hand, bone resorption was suppressed while bone was increased both inside and outside of the bone resorption sites. In addition, coupling of bone resorption and formation was examined by quantifying the change in the matrix in divided sub-ROIs. Correlation was observed between bone resorption and formation in the control group. On the other hand, no correlation was observed in the E64 group indicating the disturbance of the coupling.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨リモデリング イメージング 骨吸収阻害薬

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症の治療に一般的に用いられる、ビスフォスフォネートや抗 RANKL 抗体といった骨吸収阻害剤を使用中の患者における顎骨壊死は、難治性であること、骨粗鬆症治療薬を中止する必要があることなどから、口腔外科外来治療における大きな問題となっている。骨の恒常性は、骨吸収に引き続いて骨形成が生じるリモデリングと呼ばれる過程を通じて保たれているが、これらの骨粗鬆症治療薬による骨吸収の抑制は、引き続き生じるはずの骨形成の低下にもつながる。この骨リモデリングの低下が、顎骨壊死の発症に関与していると考えられており、これらに代わる、骨リモデリングを阻害しない治療法の開発が求められている。しかし、骨リモデリングの詳細が明らかにされていないことが新規治療法の開発における障害となっている。

カテプシン K は破骨細胞より分泌されるタンパク分解酵素であり、破骨細胞による骨吸収において重要な役割を果たしている。カテプシン K 欠損マウスでは骨吸収パラメーターの低下が見られるが、ビスフォスフォネート投与時とは逆に、骨形成パラメーターはむしろ増加する (Lotinun S et al. J Clin Invest. 2013)。これらの薬剤による骨代謝への影響の違いが生じる理由は、それぞれの薬剤の細胞動態や基質の変化に対する影響を既存の実験系で証明することは不可能であるため、不明である。

2. 研究の目的

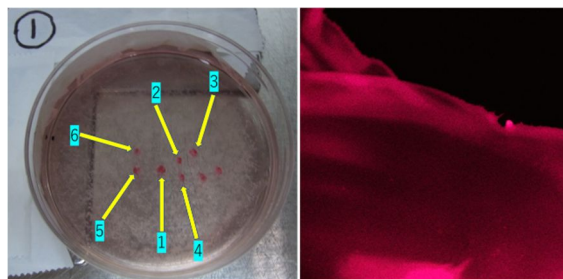
本研究では、申請者の所属する研究室で確立した、生体内の骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞と基質のネットワークを *in vitro* で再現し、2 光子励起顕微鏡を用いて観察する実験系 (Bone 2015) (図 1)を用いて、カテプシン K の欠損やカテプシン阻害剤、ビスフォスフォネート、プロトンポンプインヒビターが骨リモデリングに与える影響を比較することで、骨リモデリング機構の解明につながる知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

骨リモデリングを *in vitro* で再現し、観察する系において、カテプシン K 欠損マクロファージの導入や、カテプシン阻害剤、ビスフォスフォネート、プロトンポンプインヒビターの添加により、骨リモデリングにおける細胞動態と基質変化に生じる変化を解析、比較する。また、既存の組織学的手法を組み合わせることで系のバリデーションおよび生じている現象の再確認を行う。さらに、骨リモデリングへの関連が提唱されている分子の濃度変化の観察や、それらに対する阻害剤の添加による細胞動態の変化を観察することで、それぞれの薬剤の作用機序および骨リモデリングの分子機構の一端を明らかにする。

4. 研究成果

緑色蛍光蛋白質を全身に発現する EGFP マウスより採取した骨芽細胞を骨芽細胞分化培地 (- MEM、10% FBS、100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin、100 µg/mL ascorbic acid、5 mM Glycerophosphate、10 ng/ml BMP-2) で 4~6 週間培養し、石灰化結節を形成させた。次に RANK 発現細胞 (マクロファージや破骨細胞) で Cre リコンビナーゼを発現する RANK-Cre マウスと、Cre 依存性に赤色蛍光蛋白質 tdTomato を発現する ROSA-LSL-tdTomato マウスを掛け合わせたマウスから骨髓細胞を採取し、分化培養した骨芽細胞と共存培養培地 (- MEM、10% FBS、100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin、 10^{-6} M prostaglandin E2、 10^{-8} M 1,25-dihydroxyvitamin D3) で培養した。共存培養を 3 週間行い (吸収期) その後再び骨芽細胞分化培地でさらに 3 週間培養した (再充填期)。吸収期、再充填期を通じてカテプシン阻害剤 E64 あるいはビスフォスフォネート Zoledronate (ZOL) を添加、あるいは無添加の群を設定した。共存培養の 3 週間と再度の骨芽細胞分化培地での培養 3 週間、2 光子顕微鏡を用いて毎週同一部位の観察を行った。結果として、無添加群では破骨細胞が出現し、吸収窩が形成されたが、その後骨芽細胞により吸収窩が特異的に充填される様子が観察された、これに対して、E64 添加群においても破骨細胞が出現し、基質表面に広がっているものの、基質吸収窩の形成が抑制されていた。また再充填期には吸収窩以外の部位でも基質の増加がみられた。一方、ZOL 添加群では基質の吸収に加え

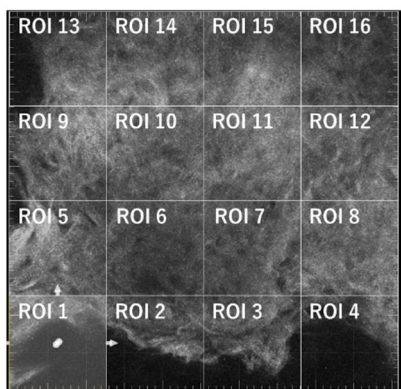


同一部位の観察のため、赤色サインペンでディッシュ底面をマーキングし、これを指標に観察部位を設定する

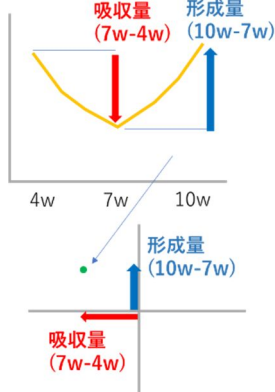
て再充填が抑制されていた。各観察時点におけるそれぞれの基質の量を画像解析ソフト IMARIS により定量化したところ、E64 添加群では吸収期における基質量の減少が抑制されたが、引き続き形成期における基質の増加は抑制されなかった。

さらに、E64 添加群と無添加群の培養上清について、ELISA により骨吸収マーカー CTX と骨形成マーカー PINP、Gla-Osteocalcin を定量化した。無添加群では共存培養開始後 CTX が上昇したが、E64 添加群では見られなかった。PINP は両群ともに共存培養開始後低下し、その後は低値のままであった。一方、Gla-Osteocalcin は両群とも共存培養開始後の低下と、再充填期の上昇が見られた。加えて、Cre リコンビナーゼのノックインによりカテプシン K が発現しない Ctsk-Cre ホモマウスと、その野生型同腹個体から骨髓細胞を採取、培養し、レトロウイルスを用いて tdTomato で標識した細胞のストックを作製した。

令和元年度は、平成 30 年度に行った、E64 および ZOL を添加した骨リモデリング系の観察をさらに行うとともに、イメージングで得られる位置情報を加味した定量方法の検討を行った。具体的には、画像解析ソフトウェア IMARIS において画像を複数の領域に分割し、それぞれの領域における基質の増減を定量化することで、基質の吸収と再充填のカップリングについて検討を行った。阻害剤



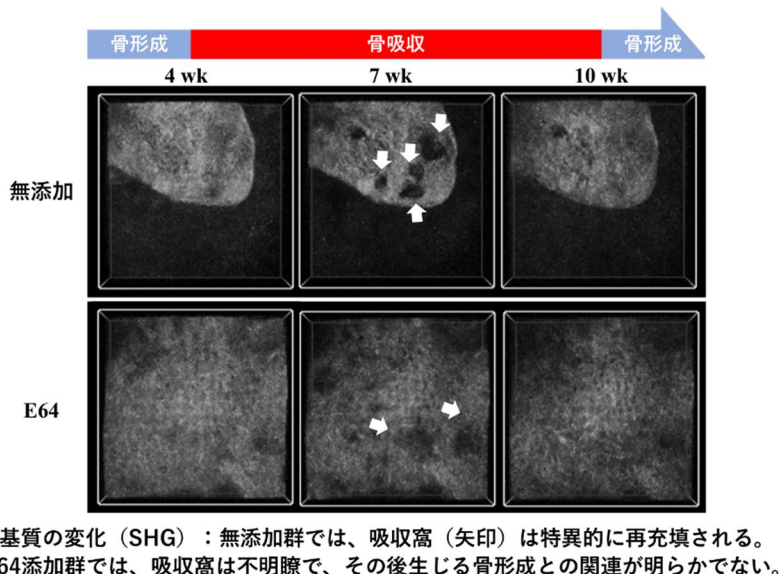
複数の領域に分割した画像における基質の増減の定量化



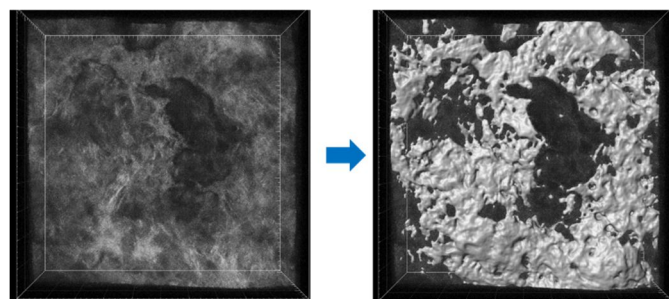
を入れない無添加群では、基質吸収が生じた部分について解析すると、吸収量と形成量に一定の相関、すなわちカップリングがみられた。一方、E64 添加群では、基質が減少した領域が少なく、吸収量と形成量の相関もほとんど見られなかった。このことから、カテプシンの阻害ではカップリングが大きく乱れていると考えられた。

令和 2 年度には、さらに解析を進め、基質変化と骨芽細胞の量および形態、破骨細胞量および破骨細胞の大きさについて、視野全体、および分割した領域ごとに定量化し、基質変化との関連を評価した。

本研究では、骨吸収阻害剤であるビスフォスフォネートとカテプシン阻害剤について、それぞれが基質の吸収、形成に与える違いを詳細に解析した。ビスフォスフォネートは吸収、形成ともに抑制するが、カテプシン阻害剤は形成を保持しつつ吸収を阻害することが可能であることが分かった。また、カップリングが大きく乱れることが示された。これらの所見は、骨リモデリング機構のさらなる理解を深めるものであり、よりよい骨粗鬆症治療薬の開発につながる事が期待される。



基質の変化 (SHG) : 無添加群では、吸収窩 (矢印) は特異的に再充填される。E64 添加群では、吸収窩は不明瞭で、その後生じる骨形成との関連が明らかでない。



SHG画像
IMARISでの解析画像
画像解析ソフトIMARISを用い、SHG陽性領域の体積を算出

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 疋田 温彦、坂本 朋昭、小口 修矢、星 和人
2 . 発表標題 2 光子顕微鏡を用いた骨評価
3 . 学会等名 第39回日本骨形態計測学会（招待講演）
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 小口修矢，星和人，疋田温彦
2 . 発表標題 作用機序の異なる骨吸収阻害薬存在下における骨リモデリングの in vitro 観察
3 . 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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