

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09617

研究課題名(和文)細胞骨格制御を基盤とした溶骨症治療の新戦略

研究課題名(英文) Novel therapeutic approach for osteolysis focusing on the regulation of cytoskeleton

研究代表者

江面 陽一 (Ezura, Yoichi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：50333456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：溶骨症における破骨細胞の遊走性亢進に着目し、生後4週齢で明瞭な溶骨性病変と骨格変形を来す遺伝子(Pfn1)改変マウスとして、破骨細胞特異的にアクチン分子重合制御因子Pfn1を欠損するマウスを用いた。このマウスの骨髄由来培養細胞は細胞融合および破骨細胞への分化を促進することなく、前駆細胞の遊走性を促進して骨吸収活性を高め、その遊走性亢進と骨吸収活性はArp2/3阻害薬で抑制された。5週齢の遺伝子変異マウスが8週齢に達するまでの、週2回のアレンドロネート投与(0.1 mg/kg体重)は長管骨および頭蓋骨の溶骨性病変を著明に改善し、骨格変形を一部改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

溶骨症は、慢性関節炎や感染症、骨腫瘍、人工関節周囲にも生じ、先天性の遺伝子変異や化学薬物への曝露によっても発症し、ときに深刻な臨床的問題を引き起こすが、このような溶骨症の治療について、病因別に考慮されることは少なかった。本研究において申請者らは、溶骨症の発症に関わる多くの炎症性サイトカインの誘導する破骨細胞の遊走性亢進に注目し、適切な治療薬による治療効果として、とくに若年期に発症する溶骨症に伴う骨変形への治療効果に注目して検討した。このような視点からの治療薬の効果判定は望ましい薬物療法開発への基盤として学術的に貢献できる意義がある。

研究成果の概要(英文)：Focusing on osteoclast migration in osteolytic disease, we used osteoclast specific conditional KO mice (Pfn1-cK0<OCL>) for Pfn1 gene, one of the regulators of actin molecular polymerization. This mutant line develops osteolytic skeletal deformities by the age of 4 weeks. Cultured bone marrow-derived cells lacking Pfn1 enhanced progenitor cell migration and bone resorptive activity without clearly enhancing cell fusion or accelerating osteoclast differentiation, and the enhanced migration and bone resorptive activity were suppressed by Arp2/3 inhibitors. Twice-weekly alendronate administration (0.1 mg/kg body weight) to the Pfn1-cK0<OCL> mice from 5 weeks to 8 weeks of age markedly improved osteolytic lesions in the long bones and skull and partially improved skeletal deformities.

研究分野：基礎整形外科学

キーワード：溶骨症 骨変形 骨吸収 細胞骨格 ビスホスホネート 治療薬

1. 研究開始当初の背景

溶骨症は、慢性関節炎や感染症、骨腫瘍、人工関節周囲に生じた炎症などを原因として発症するだけでなく、先天性の遺伝子変異や化学薬物への曝露によっても発症し、ときに深刻な臨床的問題を引き起こすことが知られている。様々な病因の異なる溶骨症の治療は、病因別に考慮されるべきであるが、従来の治療法においてそのような視点から考察されることは少なかった。

本研究において申請者は、溶骨症の発症に関わることの多い炎症性サイトカインの誘導する破骨細胞の分化および遊走性亢進に注目し、特に炎症性サイトカインシグナルから調節される破骨細胞前駆細胞の遊走性の重要性を考慮した。破骨細胞の遊走制御には多段階制御の要として細胞骨格分子アクチンの重合・脱重合制御が最重要と考えられる。

アクチン分子が重合して形成するアクチン線維の構築制御はいくつかの細胞内分子の協調により行われる。申請者は以前から、この機能を中心的に担うプロフィリン1分子に注目して、この分子を様々な骨系細胞に特異的に欠損する遺伝子改変マウス作成により検討した結果、とくに破骨細胞におけるこの分子の欠損が、生後4週目頃からの早期溶骨症を生じさせて成長期の骨格変形を来すことを明らかにしていた(2019年 JBMR-Plus)。

2. 研究の目的

上記の研究経緯に基づき、本研究では、破骨細胞特異的にプロフィリン1を欠損する遺伝子改変マウスをモデル実験系として、破骨細胞の細胞骨格制御への介入による溶骨症に対する治療効果について解明を目指した。なおヒトにおけるプロフィリン1遺伝子の一塩基のミスセンス変異が全身性の溶骨症性の病変を生じる骨パジェット病の原因となりうることは、2020年に国外の症例により初めて明らかにされた。

3. 研究の方法

破骨細胞でプロフィリン1を欠損する遺伝子改変マウスに、破骨細胞の細胞骨格制御を介して骨吸収を抑制すると考えられる薬物を投与して、溶骨症性の骨表現型の変化を解析した。今回使用した遺伝子改変マウスは、交配により生まれたマウスの半数が遺伝子欠損となり、残る半数が正常と変わらない遺伝子型となるように繁殖させ、生まれた同腹マウスを用いて候補治療薬投与3週間のうち、骨形態解析等の解析を行った。投与期間は生後5週齢に達した時点から8週に達する日までの3週間とした。なお検討した薬剤はヒト骨粗鬆症などの一般的治療薬として用いられるアレンドロネートの他2種類であった。

4. 研究成果

【2019年度】

まず破骨細胞およびその前駆細胞におけるプロフィリンの役割を明らかにするため、正常マウスの骨髄由来の破骨細胞前駆細胞においてプロフィリン1遺伝子をsiRNAによってノックダウンし、その影響を破骨細胞誘導系において明らかにした。同様にマクロファージ系培養細胞株RAW264.7細胞におけるプロフィリンノックダウン、また野生型マウス由来骨髄細胞と破骨細胞におけるプロフィリン1遺伝子欠損マウス由来の骨髄細胞における破骨細胞分化誘導系における検討から以下の影響を明らかにした。(1)分化誘導を促進するか...否 (2)分化速度を速めるか...否 (3)細胞融合を促進するか...わずかに促進 (4)細胞遊走を促進するか...促進 (5)骨吸収を高めるかについて...促進 次に生体レベルでの検証として、破骨細胞特異的にプロフィリン1遺伝子を欠損させたマウスを用いて、その溶骨症性の骨病変形成について発症様式を明らかにした。4週齢、8週齢マウスに加えて20週齢、34週齢マウスの大腿骨および頭蓋骨の形態変化について解析した。4週齢における発症から8週齢にかけての溶骨症および骨格変形の進行は著明であったが、その後の骨表現型は若齢期に生じた骨変形に起因する代償性もしくは変性性の変化が主体になると考えられた。

【2020-21年度】

上記知見を基盤として、本遺伝子変異マウスを実験的な溶骨症モデル系と捉え、細胞遊走性亢進に基づく溶骨性治療へ向けた新たな薬剤および治療法開発に資する知見を得ることを目指した。プロフィリン1遺伝子を破骨細胞で欠損する遺伝子変異マウス由来の骨髄細胞からの分化誘導系において、分枝状のアクチンフィラメント骨格の伸長に不可欠とされるARP2/3分子の阻害薬を加え、その細胞遊走性および破骨細胞による骨吸収活性の抑制効果を明らかにした。なお当初計画したコフィリン遺伝子などの遺伝子ノックダウンによる治療の効果は十分には検討できなかった。しかし細胞運動性と骨吸収活性の相関および細胞突起構造の形態学的変化の解析を時系列的な連続画像解析により集中的に行い、プロフィリン1遺伝子を欠損する破骨細胞前駆細胞もしくは小型の早期破骨細胞における突起構造の複雑性の増加が破骨細胞の遊走性の亢進と正の相関傾向を示すことを明らかに出来た(2022年 Journal of Bone and Mineral Metabolism)。プロフィリン1遺伝子欠損マウスを用いたインビボ解析としては、5週齢に達したマウスに薬剤

を週2回投与による3週間治療を行い、安楽死ののち骨表現型を解析した。アレンドロネート投与（体重kg当たり換算で0.1mg皮下投与）による3週間の治療は十分な骨量回復効果を示し、この間に生じる骨変形に対しても一定の改善効果をもたらした。しかし骨変形を詳細に定量的に評価すると、その効果は限定的であったとみなされた。アレンドロネートは破骨細胞の分化を阻害し、また破骨細胞の細胞骨格制御にも影響してその骨吸収活性を抑制する作用をもつことが知られているため、本モデルマウスが模倣する骨パジェット病においても有効な治療薬として用いられているが、骨吸収活性を十分に抑制することが出来たにもかかわらず、今回のプロトコルでは骨格変形に対しては十分には有効であったとは見なされなかった。病態発生機構により特異的な治療法の開発が望まれる。そこで次の検討として破骨細胞による骨吸収を抑制しながらそれに呼応する骨形成抑制を来さないと考えられるカテプシンK阻害薬について検討したが、事情により十分には実施されなかった。一方、本研究で注目した破骨細胞の遊走性に関わる細胞突起構造の改変亢進を有効に阻止できる薬剤として、Arp2/3阻害薬のマウスへの投与を行ない、有望な治療的効果を得ている。本薬剤による治療的効果の結論は、今後のさらなる追加検討によって明らかとする予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 Ling Zhu; Shuhei Kajikawa; Kunikazu Tsuji; Yoshinori Asou; Hideyuki Koga; Yoichi Ezura
2. 発表標題 Alendronate Improves The Osteolytic Bone Phenotype Of The Osteoclast-specific Mutant Pfn1-cK0 Ocl Mouse as A Model For Recently Identified Severe Form PDB
3. 学会等名 2021 Annual Meeting of Orthopedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 朱凌、江面陽一、辻邦和、麻生義則、関矢一郎、大川淳、古賀英之
2. 発表標題 プロフィリン1遺伝子変異を原因とする新型の骨パジェット病モデルマウスにおける溶骨症はアレンドロネートにより改善される
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梶川修平、伊豆弥生、中島和久、二藤彰、江面陽一
2. 発表標題 Profilin1は破骨細胞の分枝状アクチン線維形成を抑制することで遊走性を抑える
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会
4. 発表年 2020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	二藤 彰 (Nifuji Akira) (00240747)	鶴見大学・歯学部・教授 (32710)	

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