

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10395

研究課題名(和文) 成長発育過程における骨形成抑制因子スクレロスチンの役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of sclerostin in growth and development process of bone

研究代表者

中村 美どり (Nakamura, Midori)

松本歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：90278177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨組織における骨細胞の役割は永年不明であったが、近年、骨細胞はスクレロスチンというタンパク質を特異的に分泌していることが発見され、スクレロスチンには骨形成抑制作用があることが報告された。骨誘導因子Bone Morphogenetic Protein (BMP)は、骨基質中に存在し、異所性骨形成を誘導するタンパク質である。そこで、リコンビナントBMP-2誘導性異所性骨におけるスクレロスチンの発現を解析した。抗スクレロスチン抗体を用いた免疫染色の結果、軟骨細胞においてスクレロスチンの発現を認め、骨様組織中の骨細胞にもスクレロスチン陽性骨細胞の出現を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨のリモデリングとは、骨吸収と骨形成が絶え間なく繰り返されることにより、古い骨が新しい骨に置換(カップリング)されていくことである。この骨吸収と骨形成の量は、小児のような成長期においては、骨形成が骨吸収活性を凌駕する。本研究では、骨組織における骨形成抑制因子スクレロスチンの発現制御および骨誘導因子(BMP)誘導性の異所性骨形成モデルにおけるスクレロスチンの発現を解析した。骨細胞から骨芽細胞に向けての骨形成シグナルに関しては、骨代謝研究の中で大変注目されている分野であるが、骨の成長期における骨代謝共役を解明しようとする本研究は、大変重要なものである。

研究成果の概要(英文)：The role of bone cells in bone tissue has been unknown for many years, but in recent years, it has been discovered that osteocytes specifically secrete a protein called sclerostin, and it has been reported that sclerostin has an inhibitory effect on bone formation. Bone morphogenetic protein (BMP) is a protein that is present in the bone matrix and induces ectopic bone formation. Therefore, we analyzed the expression of sclerostin in recombinant BMP-2-induced ectopic bone. As a result of immunostaining using an anti-sclerostin antibody, expression of sclerostin was observed in chondrocytes, and appearance of sclerostin-positive bone cells was also observed in osteocytes in bone-like tissue.

研究分野：小児歯科学・骨細胞生物学

キーワード：破骨細胞 骨芽細胞 骨細胞 軟骨細胞 骨代謝カップリング スクレロスチン BMP RANKL

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 骨組織は、一生にわたり吸収と形成による改造現象(リモデリング)が行われているダイナミックな器官である。骨のリモデリングとは、骨吸収と骨形成が絶え間なく繰り返されることにより、古い骨が新しい骨に置換(カップリング)されていくことである。この骨吸収と骨形成の量は、小児のような成長期においては、骨形成が骨吸収活性を凌駕する。近年、リン代謝を調節する因子である FGF-23 が骨細胞において発現していることや、石灰化に重要な役割を果たしていると考えられてきた象牙質マトリックスタンパク 1 (DMP-1) がリン代謝に寄与する知見も報告され、内分泌器官としての骨細胞の役割も注目されてきた。さらに、骨細胞は骨量の維持に必要な分子として発見されたスクレロスチンを発現しており、スクレロスチンを介した骨代謝調節機構が明らかとなった。スクレロスチンは、Wnt のアンタゴニストとして LRP5/6 に結合し、Wnt シグナルを抑制することにより骨形成を制御すると考えられている。

(2) 我々は、破骨細胞の分化と骨吸収機能を制御する骨芽細胞に発現する RANKL のデコイ受容体であるオステオプロテゲリン(OPG)の重要性について解析してきた。OPG の遺伝子欠損マウス(OPG-/-マウス)は、骨吸収が著しく亢進し骨粗鬆症を呈するが、骨形成も亢進する大変興味深い骨代謝カップリングモデルマウスである(Nakamura M et al. *Endocrinology* 144:5441, 2003)。さらに我々は、OPG-/-マウスの歯槽骨吸収について解析した結果、OPG 遺伝子の欠損によって著しい歯槽骨吸収が惹起されることを見出した(*Endocrinology* 154:773, 2013)。この歯槽骨破壊は、骨粗鬆症治療薬として応用されている RANKL 中和抗体やリセドロネート(ビスホスホネート)によって防止できることを明らかにした。

(3) 野生型マウスの皮質骨や歯槽骨においては、骨細胞に OPG の発現が強く認められると共に、骨形成抑制因子であるスクレロスチン発現が強い。一方、OPG-/-マウスでは、スクレロスチン発現が低下していた(*J Bone Miner Res* 32:2074, 2017)。これらの実験結果から、石灰化組織の破壊吸収に関与する RANKL のデコイ受容体である OPG は、骨細胞が産生することによって石灰化組織の結晶化状態を保つ働きを担っている可能性が考えられた。

(4) 前述のように、骨細胞は、骨量を負に調節する因子スクレロスチンを分泌する。骨細胞のスクレロスチンの発現は、メカニカルストレスにより抑制される。骨形成促進シグナルである Wnt の作用を介する Lrp5 の遺伝子変異は、骨吸収亢進を呈する骨粗鬆症となる。一方、Wnt シグナルを抑制するスクレロスチン(SOST)遺伝子の機能不全は、骨密度の上昇を呈することが明らかとされた。骨細胞に発現するスクレロスチンは、メカニカルストレスや副甲状腺ホルモン(PTH)により発現抑制されることにより、骨形成を促進する可能性が考えられる。さらに、成長発育過程や歯科矯正治療の際の骨リモデリングの制御機構において、メカニカルストレスの関与が重要であることは言うまでもない。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、骨組織における骨形成抑制因子スクレロスチンの発現と発現制御および骨誘導因子(BMP)誘導性の異所性骨形成モデルにおけるスクレロスチンの発現を解析する。本研究は、小児の成長発育過程やメカニカルストレスが関与する歯科矯正治療による骨リモデリングの際に、骨細胞が産生する骨形成抑制サイトカインであるスクレロスチンの役割を解明することを目的としている。骨細胞から骨芽細胞に向けての骨形成シグナルに関しては、現在の骨代謝研究の中で大変注目されている分野であり、骨の成長期における骨代謝共役やメカニカルストレスとの関連を解明しようとする本研究は、大変重要なものである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 異所性骨形成モデルにおけるスクレロスチンの発現に関する解析

我々はこれまでに、大理石骨病を呈する M-CSF 遺伝子欠損マウス(op/op マウス)と正常マウス(C57BL/6J)の背筋筋膜下に骨誘導因子 Bone Morphogenetic Protein (BMP)含有のコラーゲンペレットを埋入し、異所性骨形成を誘導する実験を行ってきた。その結果、BMP 誘導性の異所性骨形成(骨密度)は op/op マウスにおいて正常マウスと比較して、約 3 倍の促進が認められ、op/op マウスにおける異所性骨の外面は大変粗雑な形態を呈していた。以上の実験結果は、破骨細胞の分化障害が認められる op/op マウスにおいては、BMP 誘導性の異所性骨形成の著明な亢進が惹起されることを示している。また、これらの異所性骨には形態学的異常が観察されたことより、骨形成の際に出現する破骨細胞が正常な骨の形態形成に重要な役割を果たしていることが示され、破骨細胞の存在の重要性がさらに深まった。

そこで、本研究において、正常マウスにおける BMP 誘導性異所性骨形成において、スクレロスチンの発現を解析し、異所性骨と実際の骨組織におけるスクレロスチン発現制御の違いとその生理的役割について明らかにする実験を行った。

#### (2) スクレロスチンの遺伝子欠損マウスにおける骨形成の解析

抗スクレロスチン中和抗体の投与は、卵巣切除ラット(Ominsky, *J Bone Miner Res.* 2014)および閉経後骨粗鬆症患者(Cosman, *N Engl J Med.* 2016)において MBBF を促進することが報

告されている。一方、スクレロステチンの遺伝子欠損マウスは、骨形成が亢進し骨量が増加する。そこで、我々が作製したスクレロステチンの遺伝子欠損マウス（スクレロステチン-GFP ノックインマウス）に抗 RANKL 中和抗体を投与し、骨吸収を抑制した条件における骨形成について解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 異所性骨形成モデルにおけるスクレロステチンの発現に関する解析

骨誘導因子 Bone Morphogenetic Protein (BMP) は、骨基質中に存在し、異所性骨形成を誘導するタンパク質である。そこで、リコンビナント BMP-2 誘導性異所性骨におけるスクレロステチンの発現を解析した。

BMP-2 を浸漬したコラーゲンペレットを生後 7 週齢雄の C57BL/6 マウスの右側大腿部内側の筋膜下に移植し、誘導された異所性骨を採取した。BMP 埋入後 10 日で回収した異所性骨では、マイクロ CT において、BMP ペレット外周に石灰化像を認めた。組織学的解析では軟骨様組織と骨様組織を認めた。また、アルカリホスファターゼ (ALP) 陽性の骨芽細胞と共に、トルイジンブルー染色で認識される軟骨基質中に多数の軟骨細胞を認めた。

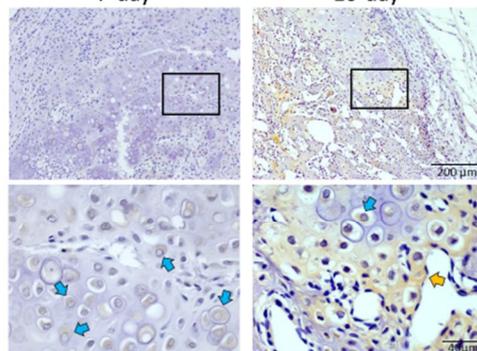
抗スクレロステチン抗体を用いた免疫染色では、軟骨細胞においてスクレロステチンの発現を認め、骨様組織中にもスクレロステチン陽性骨細胞の出現を認めた (図参照)。

BMP 埋入後 2 週間で回収した異所性骨ではマイクロ CT において、BMP ペレットを完全に取り囲む多孔質な石灰化像を認めた。

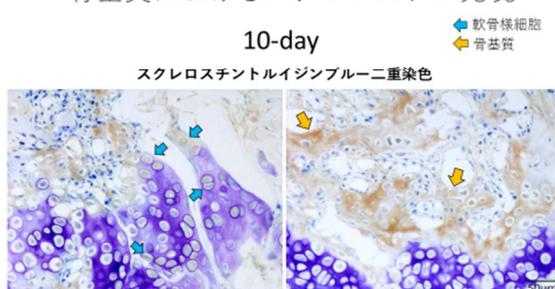
組織学的解析では、埋入後 10 日で認められた軟骨様組織はほぼ消失し、骨様組織が占めていた。ALP 染色では、骨芽細胞と軟骨細胞で陽性を示した。また、多孔質な石灰化組織に存在する骨細胞において、スクレロステチン発現が強く認められた。これらの骨細胞は、骨細胞の特異形質である Dentin matrix protein-1 (DMP-1) と Fibroblast growth factor-23 (FGF-23) の発現が認められた。

以上の実験結果から、BMP 誘導性異所性骨における骨細胞および軟骨細胞におけるスクレロステチンの発現が示された。

スクレロステチン発現



BMP誘導性異所性骨の骨基質におけるスクレロステチン発現



異所性骨におけるスクレロステチン陽性部位

	軟骨様細胞	骨基質	骨細胞
7-day	+		
10-day	+	++	+
2-week	+	+	++
4-week		-	++
6-week		-	++

##### (2) スクレロステチンの遺伝子欠損マウスにおける骨形成の解析

正常マウスと比較してスクレロステチン欠損マウスの海綿骨量は、 $\mu$ CT と組織形態計測の解析により、有意に高値を示した。

正常マウスにおける海綿骨中のスクレロステチン陽性骨細胞の数と脛骨のスクレロステチン mRNA 発現は、vehicle 投与群と比較して、抗 RANKL 抗体投与したスクレロステチン欠損マウスで有意に増加した。

抗 RANKL 抗体投与は、正常マウスとスクレロステチン欠損マウスの一次海綿骨量を増加させた。骨形態計測の解析による骨芽細胞数や骨石灰化速度の骨形成マーカーは、vehicle 投与群と比較して、抗 RANKL 抗体投与した正常マウスではほぼ完全に抑制された。一方、スクレロステチン欠損マウスでは抗 RANKL 抗体投与により、これらのパラメーターの約 2/3 が抑制された。

以上の実験結果は、抗 RANKL 抗体の投与が骨吸収を阻害し、骨細胞のスクレロステチン発現を増加し、海綿骨の骨形成を抑制することを示唆している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Udagawa N, Koide M, Nakamura M, Nakamichi Y, Yamashita T, Uehara S, Kobayashi Y, Furuya Y, Yasuda H, Fukuda C, Tsuda E	4. 巻 39
2. 論文標題 Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Bone Miner Metab	6. 最初と最後の頁 19-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-020-01162-6	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 Koide Masanori, Yamashita Teruhito, Murakami Kohei, Uehara Shunsuke, Nakamura Keigo, Nakamura Midori, Matsushita Mai, Ara Toshiaki, Yasuda Hisataka, Penninger Josef M., Takahashi Naoyuki, Udagawa Nobuyuki, Kobayashi Yasuhiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Sclerostin expression in trabecular bone is downregulated by osteoclasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70817-1	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 Kimura Shunsuke, Nakamura Yutaka, Kobayashi Nobuhide, Shiroguchi Katsuyuki, Kawakami Eiryo, Mutoh Mami, Takahashi-Iwanaga Hiromi, Yamada Takahiro, Hisamoto Meri, Nakamura Midori, Udagawa Nobuyuki, Sato Shintaro, Kaisho Tsuneyasu, Iwanaga Toshihiko, Hase Koji	4. 巻 11
2. 論文標題 Osteoprotegerin-dependent M cell self-regulation balances gut infection and immunity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-13883-y	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 前島 信也, 宇田川信之, 中西正人, 中村美どり, 山賀 孝之, 山下照仁, 川 茂幸, 矢ヶ崎 雅	4. 巻 274
2. 論文標題 新型コロナウイルスの抗体検査を用いた松本歯科大学学生・教職員の疫学調査	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 393-395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Kimura S, Nakamura Y, Kobayashi N, Shiroguchi K, Kawakami E, Mutoh M, Takahashi-Iwanaga H, Yamada T, Hisamoto M, Nakamura M, Udagawa N, Sato S, Kaisho T, Iwanaga T, Hase K	4. 巻 11
2. 論文標題 Osteoprotegerin-dependent M cell self-regulation balances gut infection and immunity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-13883-y	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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 鶴田敏博, 小出雅則, 中道裕子, 中村美どり, 宇田川信之, 北村和雄
2. 発表標題 RANKL-RANK-OPG シグナル研究の最前線」心血管保護因子としてのオステオプロテゲリン
3. 学会等名 歯科基礎学会学術大会 (第62回) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村美どり, 中村浩志, 大須賀直人, 宇田川信之
2. 発表標題 Siglec-15は破骨細胞による骨吸収活性と骨芽細胞の分化に重要な役割を果たす
3. 学会等名 日本小児歯科学会大会 (第58回)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nobuyuki Udagawa, Masanori Koide, Teruhito Yamashita, Midori Nakamura, Shunsuke Uehara, Yasuhiro Kobayashi, Naoyuki Takahashi
2. 発表標題 Importance of osteoclasts in osteogenic signals.
3. 学会等名 日本分子生物学会年会 (第42回) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇田川信之, 小出雅則, 上原俊介, 荒井敦, 溝口利英, 山下照仁, 中村美どり, 小林泰浩, 高橋直之, 熊倉誠一郎, 福田千恵, 津田英資
2. 発表標題 Siglec-15中和抗体による骨吸収抑制作用と骨芽細胞分化促進作用
3. 学会等名 日本再生医療学会総会 (第18回)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村浩志, 中村美どり, 平林厚二, 大須賀直人
2. 発表標題 小児用マウスガードの研究開発 第1報 材料学からのアプローチ
3. 学会等名 日本小児歯科学会大会 (第57回)
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	中村 浩志  (NAKAMURA Hiroshi)  (00278178)	松本歯科大学・歯学部・講師   (33602)	
研究分担者	宇田川 信之  (UDAGAWA Nobuyuki)  (70245801)	松本歯科大学・歯学部・教授   (33602)	
研究分担者	大須賀 直人  (OSUGA Naoto)  (80247535)	松本歯科大学・歯学部・教授   (33602)	

6. 研究組織（つづき）

	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	山下 照仁  (YAMASHITA Teruhito)  (90302893)	松本歯科大学・総合歯科医学研究所・准教授    (33602)	
研究分担者	上原 俊介  (UEHARA Shunsuke)  (90434480)	松本歯科大学・歯学部・講師    (33602)	

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