

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：33602

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22729

研究課題名(和文)骨代謝 脱共役機構の統合的解明を起点にした新たな骨および歯周疾患治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of new therapeutic agents for bone and periodontal diseases based on the bone metabolism-uncoupling mechanisms

研究代表者

小出 雅則 (Koide, Masanori)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・准教授

研究者番号：10367617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨リモデリングにおいて、破骨細胞、骨芽細胞および骨細胞の細胞間コミュニケーションが機能すると骨代謝共役が起こり、骨量が維持される。一方、この細胞間コミュニケーションの破綻は、骨量減少を引き起こす。しかし、加齢や炎症において、どのように細胞間のコミュニケーションが破綻し、骨代謝脱共役が起こるかは不明である。本研究では、骨代謝共役を破綻させる機構の解明に取り組み、骨代謝共役を回復しうる因子の役割を明確にした。骨粗鬆症や歯周疾患に対する治療戦略に貢献する情報を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老化細胞を除去した老化マウスの骨組織で発現する骨代謝-脱共役因子とそのシグナルを解明して、老化の原因遺伝子を同定を試みた。この加齢あるいは炎症に伴う骨量減少の原因因子の探索より、スクレロスチンが骨代謝へ及ぼす影響が重要であることを実証した。このスクレロスチンの抑制は骨吸収に依存しないモデリングベースの骨形成を促進させる。しかし、スクレロスチン欠損マウスでは、骨吸収をベースとしたリモデリングベースの骨形成が優勢であることを明らかにした。この成果は骨粗鬆症および歯周疾患に対する治療薬の適正な使用方法についての情報を提供する。

研究成果の概要(英文)：In bone remodeling, the functioning of cell-to-cell communication between osteoclasts, osteoblasts and osteocytes results in bone metabolism coupling and maintenance of bone mass. On the other hand, this disruption of cell-cell communication causes bone loss. However, it is unclear how cell-cell communication is disrupted and bone metabolism-uncoupled occurs during aging and inflammation. In this study, we worked to elucidate the mechanism that disrupts the regulation of bone metabolism and clarified the role of factors that can restore the regulation of bone metabolism. Information that contributes to treatment strategies for osteoporosis and periodontal disease was clarified.

研究分野：保存治療系歯学関連、歯周病、骨代謝

キーワード：骨 骨代謝共役 破骨細胞 骨芽細胞 骨細胞 歯周病

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 骨組織では、骨吸収につづいて骨形成が起こり、吸収された量の骨が再び添加される。これを骨リモデリングといい、破骨細胞と骨芽細胞、骨細胞の連携により担われている( )。これらの細胞間コミュニケーションが正常に機能すると、骨量が一定に保たれる。一方、この細胞間コミュニケーションの破綻は、骨代謝の脱共役として知られており、骨形成の低下と骨吸収の亢進をもたらす、骨量を減少させる( )。更に、RANKL のリバースシグナルが骨代謝共役シグナルであることが示された( )。破骨細胞と骨芽細胞間の骨代謝共役因子の解析は進んでおり、多数の因子が関与する可能性が示されている( )。しかし、加齢、炎症や癌の骨転移に伴い、どのように破骨細胞 骨芽細胞あるいは骨細胞間のコミュニケーションが破綻し、骨代謝の脱共役が起こるかは不明である。

### 2. 研究の目的

(1) 破骨細胞 骨芽細胞間以外の新たなネットワークとして破骨細胞由来の LIF が、骨細胞において Wnt 阻害因子であるスクレロステチンの発現を低下させ、Wntシグナルを亢進することで、骨形成を促進することを見出した( )。本研究の目的は、骨代謝共役を破綻させる機構をゲノム解析および歯周病モデル、骨吸収の抑制モデルを用いて解明し、骨代謝共役を回復しうる因子を同定する。その同定因子やスクレロステチン欠損マウスで骨形成を促進させるシグナルの役割を解析し、骨喪失疾患に対する治療戦略を開発することである。

### 3. 研究の方法

(1) 骨代謝共役の解析として、スクレロステチン欠損(遺伝子名: Sost、Sost-KO)マウスの骨形成は骨吸収に依存したリモデリングベースの骨形成(RBBF)と非依存的なモデリングベースの骨形成(MBBF)のどちらが優勢なのかを解析する。Sost-KOマウスにおいて、抗RANKL抗体を投与し骨吸収を抑制した。骨吸収依存的なRBBFが阻害される状態で、維持される骨形成(MBBF)の割合を評価した。

(2) 骨代謝共役における破骨細胞が発現するSiglec-15の役割を解析する。PTH投与による骨代謝の亢進状態に対して、抗Siglec-15抗体を投与し骨形成および骨吸収に及ぼす作用を解析した。

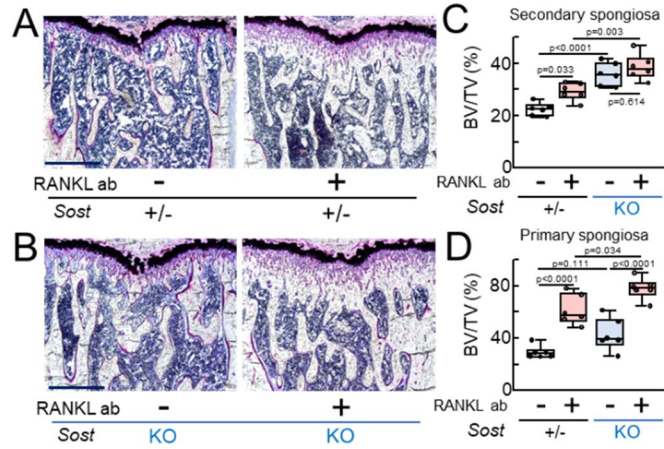
(3) 加齢および炎症を伴う骨代謝-脱共役因子の探索: 絹糸結紮による歯周病モデルを加齢マウスに施す。網羅的遺伝子発現解析により、加齢に伴ない亢進する因子を同定する。その因子の役割を遺伝子のノックダウンや強制発現により解析する。

### 4. 研究成果

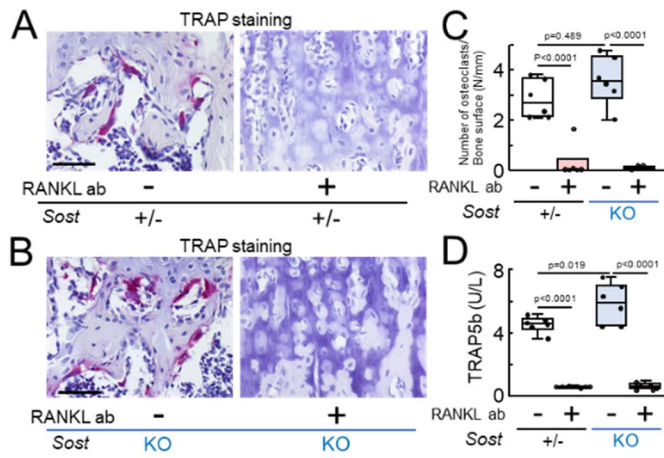
(1) 抗RANKL抗体の投与およびスクレロステチンの欠損は長管骨の海綿骨の骨量を増加させる。

我々は、新たに作製したSost-KOマウスの骨形成がどのように調整されているのか解析するため、骨代謝共役因子を消失させることが出来る抗RANKL抗体をSost-KOまたはSost+/-マウスに投与して、その骨形成がどの程度抑制されるか検討した。方法は、10週齢のSost-KOまたはSost+/-マウスに、抗マウス中和抗体(OYC1, Oriental Yeast; 5 mg/kg)を皮下に一回注射した。抗体投与の2週後にサンプルを回収して骨組織や血清中の骨代謝マーカーを解析した。遠位大腿骨の二次海綿骨量(BV/TV)は、抗RANKL抗体で処理されたSost+/-マウスの方が大きかった。以前に報告されたように、Sost-KOマウスのBV/TVは、Sost+/-マウスよりも大きかった。興味深いことに、Sost-KOマウスへの抗RANKL抗体の投与は、PBSを投与されたマウスと比較して、二次海綿骨のBV/TVを有意に増加させなかった。

そこで、我々は、抗 RANKL 抗体に対する海綿骨の応答が一次海綿骨と二次海綿骨で異なるかどうかを組織学的に調べた。抗体投与は、Sost<sup>+/-</sup>-マウスからの一次および二次海綿骨の領域で BV/TV を有意に増加させた（右図）。対照的に、抗体で処理された Sost-KO マウスの二次海綿骨ではなく一次海綿骨の BV/TV は、PBS で処理された Sost-KO マウスよりも大きかった。二次海綿骨の BV/TV は、Sost<sup>+/-</sup>-マウスと比較して、抗 RANKL 抗体の投与に関係なく Sost-KO マウスの方が大きかった。これらの結果は、二次海綿骨がスクレロステチン欠乏によって主に増加し、一次海綿骨が Sost<sup>+/-</sup>および Sost-KO マウスの両方で抗 RANKL 抗体に著しく反応したことを示唆している。これはおそらく、一次海綿骨の領域での高い骨吸収活性によると考えられる。実際、以前に報告されたように（ ）、破骨細胞は抗 RANKL



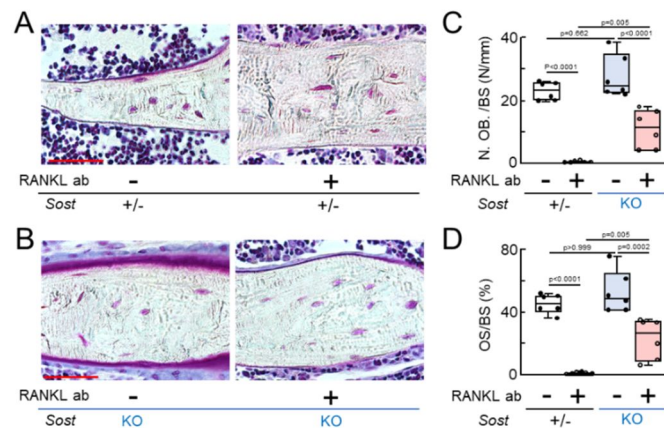
抗体で処理された Sost<sup>+/-</sup>-マウスと Sost-KO マウスの両方の一次海綿骨で消失した（右図 A-C）。血清 TRAP5b もこれらのマウスで著しく抑制された（右図 D）。これらの結果より、スクレロステチンの欠損は、主に二次海綿骨に影響し、抗 RANKL 抗体投与による骨吸収抑制は、主に一次海綿骨に作用することが示された。



## (2) Sost-KO マウスの骨形成に対する抗 RANKL 抗体投与の効果

抗 RANKL 抗体の投与は、骨形成と骨吸収を抑制することが報告されている（ ）。 Villanueva bone 染色による骨組織形態計測により、抗 RANKL 抗体の投与が Sost<sup>+/-</sup>または Sost-KO マウスの二次海綿骨の骨形成を抑制するかどうかを調べた。骨芽細胞 (N.ob/BS) および類骨表面 (OS/BS) は有意ではないが、Sost<sup>+/-</sup>-マウスと比較して

Sost-KO で増加傾向を示した（右図）。二次海綿骨の厚い類骨上のほとんどの骨芽細胞は、Sost<sup>+/-</sup>-マウスと比較して Sost-KO マウスで立方体の形状を示した（右図 A、B）。抗 RANKL 抗体投与は、Sost<sup>+/-</sup>-マウスの二次海綿骨の N.ob/BS と OS/BS の数を著しく減少させた。抗スクレロ



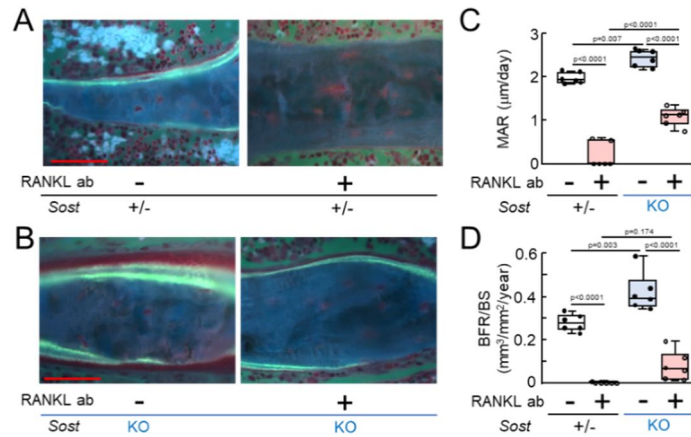
ステチン抗体の投与はラットの MBBF を強力に促進するため、抗 RANKL 抗体は骨芽細胞と類骨表面の数を減らすことができない可能性があると考えた（ ）。興味深いことに、これらのパラメー



ターの半分以上は、抗 RANKL 抗体を投与された Sost-KO マウスの二次海綿骨でも減少した。

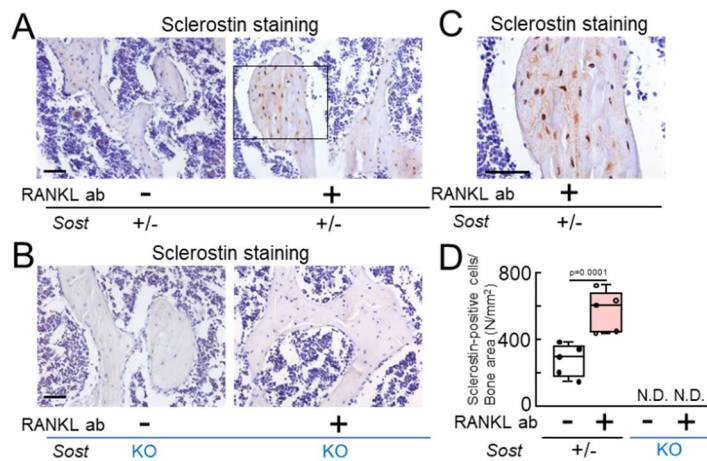
海綿骨上の二重蛍光色素ラベル間の距離は、Sost+/-マウスよりも Sost-KO の方が長かった (右図 A, B)。骨石灰化速度 (mineral apposition rate, MAR) と骨形成速度 (bone formation rate, BFR) は、Sost-KO マウスの方が高かった。これらの発見は、以前に報告されたように、骨形成が Sost-KO マウスで増強されたことを示唆する。

Sost+/-マウスへの抗 RANKL 抗体の投与は、PBS 注射した対照群と比較して、二次海綿骨の MAR および BFR をほぼ完全に抑制した。この結果は、Sost+/-マウスの骨形成が骨吸収に著しく依存していることを示唆する。抗 RANKL 抗体の投与は、Sost-KO マウスにおいて MAR の約 60% および BFR の 80% を抑制した。これらの結果は、Sost-KO マウスで観察された骨形成の半分以上が骨吸収に依存しており、骨吸収に依存しない骨形成である MBBF が Sost-KO マウスに確実に存在することを示した。



### (3) 抗 RANKL 抗体で治療された Sost+/-マウスにおけるスクレロスチン発現の増加

臨床研究および以前の研究では、骨吸収の抑制により、スクレロスチンの血清レベル ( ) およびスクレロスチン陽性骨細胞の数 ( 、 ) が増加したことが報告された。本研究でも免疫組織化学的染色を使用して、抗 RANKL 抗体を投与した Sost+/-マウスで大腿骨の海綿骨のスクレロスチン陽性骨細胞の数が増加するかどうかを調べた。一次および二次海綿骨のスクレロスチン陽性骨細胞の数は、PBS 処理された対照群と比較して、抗 RANKL 抗体を投与された Sost+/-マウスで有意に増加した (右図 A-D)。骨髄穿刺液中のスクレロスチンタンパク質および脛骨中の Sost mRNA も、抗 RANKL 抗体を投与したマウスで増加した。これらの結果は、抗 RANKL 抗体の投与が骨吸収を阻害し、スクレロスチンの発現を増加させ、その結果、海綿骨における骨形成を抑制することを示唆する。



(本研究の成果) 我々は 12 週齢の Sost+/-マウスの骨形成の大部分を骨吸収に依存する RBBF が占めているのに対し、Sost 欠損マウスの約 2/3 が RBBF であると推定されることを明らかにした。つまり、Sost 欠損マウスにおける骨形成は MBBF のみならず、RBBF も重要な役割を担っている。この成果は、骨粗鬆症に臨床応用されている Romosozumab (ヒト抗スクレロスチン抗体) の使用時期や使用方法に関する重要な情報を提供した。

この研究成果は、Bone に公表した (Koide M et al. Bone 160:116401, 2022.)。

#### その他の研究成果

- 骨代謝共役における破骨細胞が発現する Siglec-15 の役割の解析については、共同研究の成果として Bone に公表した (Tsuda E et al. Bone 155:116241, 2022.)。
- 加齢マウスの絹糸結紮による歯周病モデルの網羅的な遺伝子発現解析については、得られた結果を検討中である。

#### <引用文献>

Sims NA and Martin TJ, Annu Rev Physiol 82, 507-29, 2020.

Wein MN and Kronenberg HM. Cold Spring Harb Perspect Med. 1;8, a031237, 2018.

Udagawa N. et al. J Bone Miner Metab 39, 19-26, 2021.

Pignolo RJ. et al. JBMR Plus 5, e10488, 2021.

Ikebuchi Y. et al. Nature 561, 195-200, 2018.

Zhao C. et al. Cell Metab 4, 111-21, 2006.

Lotinun S. et al. J Clin Invest 123, 666-81, 2013.

Koide M. et al. J Bone Miner Res 32, 2074-86, 2017.

Koide M. et al. Sci Rep 10, 13751, 2020.

Ominsky MS. et al. J Bone Miner Res 29, 1424-30, 2014.

Gatti D. et al. J Bone Miner Res 27, 2259-63, 2012.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 4件）

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 該当する
1. 著者名 Mori Tomoki, Horibe Kanji, Koide Masanori, Uehara Shunsuke, Yamamoto Yoko, Kato Shigeaki, Yasuda Hisataka, Takahashi Naoyuki, Udagawa Nobuyuki, Nakamichi Yuko	4. 巻 161
2. 論文標題 The Vitamin D Receptor in Osteoblast-Lineage Cells Is Essential for the Proresorptive Activity of 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> In Vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 bqaa178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/endo/bqaa178	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 Maeda K, Kobayashi Y, Koide M, Uehara S, Okamoto M, Ishihara A, Kayama T, Saito M, Marumo K	4. 巻 20
2. 論文標題 The Regulation of Bone Metabolism and Disorders by Wnt Signaling.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International journal of molecular sciences	6. 最初と最後の頁 5525-5525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20225525.	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 該当する
1. 著者名 Tsuruda T, Funamoto T, Udagawa N, Kurogi S, Nakamichi Y, Koide M, Chosa E, Asada Y, Kitamura K	4. 巻 859
2. 論文標題 Blockade of the angiotensin II type 1 receptor increases bone mineral density and left ventricular	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European journal of pharmacology	6. 最初と最後の頁 172519-172519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.	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 該当する

1. 著者名 Ara T, Koide M, Kitamura H, Sogawa N	4. 巻 7
2. 論文標題 Effects of shokyo (Zingiberis Rhizoma) and kankyo (Zingiberis Processum Rhizoma) on prostaglandin production in lipopolysaccharide-treated mouse macrophage RAW264.7 cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PeerJ	6. 最初と最後の頁 e7725-e7725
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7717/peerj.7725.	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 該当する

1. 著者名 Koide M, Kobayashi Y	4. 巻 37
2. 論文標題 Regulatory mechanisms of sclerostin expression during bone remodeling.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Bone Miner Metab	6. 最初と最後の頁 9-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-018-0971-7.	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 該当する

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 松下雅衣, 小出雅則, 芳澤享子, 堀部寛治, 小林泰浩, 山下照仁, 中道裕子, 上原俊介, 宇田川信之
2. 発表標題 BMP 誘導性の異所性骨における骨形成抑制因子スクレロスチン陽性細胞の経時的観察
3. 学会等名 第62回歯科基礎学会学術大会
4. 発表年 2020年

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 心血管保護因子としてのオステオプロテグリン
3. 学会等名 第62回歯科基礎学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上原俊介, 山下照仁, 村上康平, 小出雅則, 宇田川信之, 小林泰浩
2. 発表標題 プロテインキナーゼN3 (Pkn3) 阻害剤は、卵巣切除に伴う骨量減少を骨吸収抑制により軽減する
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masanori Koide, Yasuhiro Kobayashi, Teruhito Yamashita, Kohei Murakami, Shunsuke Uehara, Hisataka Yasuda, Naoyuki Takahashi, Nobuyuki Udagawa
2. 発表標題 Osteoclasts promote trabecular bone formation through the suppression of sclerostin expression
3. 学会等名 The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masanori Koide, Yuki Ozaki, Yuriko Furuya, Hisataka Yasuda, Teruhito Yamashita, Yasuhiro Kobayashi, Naoyuki
2. 発表標題 The restorative effects of W9 peptide on alveolar bone loss in OPG-deficient mice
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 破骨細胞はLIF発現を亢進して、スクレロスチン発現を抑制する
3. 学会等名 第4回日本骨免疫学会ウインターセミナー
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 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
2. 発表標題 Pkn3阻害剤による骨吸収抑制
3. 学会等名 第4回日本骨免疫学会ウインターセミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小出雅則
2. 発表標題 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
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー「Wnt研究会2018-2019」
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 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上 康平, 宇田川 信之, 上原 俊介, 小出 雅則, 山下 照仁, 小林 泰浩
2. 発表標題 WntアンタゴニストSfrp5は破骨細胞の分化を抑制し、骨芽細胞の分化を促進する
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 智紀, 堀部寛治, 小出雅則, 高橋直之, 宇田川信之, 中道裕子
2. 発表標題 活性型ビタミンD3は、骨芽細胞のビタミンD受容体を介して骨吸収と軟組織の石灰化を促進する
3. 学会等名 第89回松本歯科大学学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 山下照仁, 小出雅則, 高橋直之 (分担執筆)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 3
3. 書名 副甲状腺・骨代謝疾患診療マニュアル, 改訂第2版	

1. 著者名 宇田川 信之, 小出 雅則, 中村 美どり, 守安 攝子, 吉成 伸夫 (分担執筆)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 先端医学社	5. 総ページ数 4
3. 書名 分子リウマチ治療 12(3) 骨代謝・骨免疫(第21回) 歯周病の免疫学・骨代謝学	

1. 著者名 小林 泰浩, 上原 俊介, 小出 雅則 (分担執筆)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医薬ジャーナル社	5. 総ページ数 7
3. 書名 Clinical Calcium 29(3) 【Wntシグナルと骨】Wntシグナルによる破骨細胞の制御	

〔産業財産権〕

〔その他〕

松本歯科大学 研究所ホームページ  
<https://www.mdu.ac.jp/laboratory/>  
 骨代謝学会 1st Author  
[http://www.jsbmr.jp/1st\\_author/430\\_mkoide.html](http://www.jsbmr.jp/1st_author/430_mkoide.html)  
 松本歯科大学 研究所  
<https://www.mdu.ac.jp/laboratory/>

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	小林 泰浩  (Kobayashi Yasuhiro)  (20264252)	松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授   (33602)	
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	村上 康平  (Murakami Kohei)  (60791837)	岡山理科大学・獣医学部・助教   (35302)	
研究分担者	尾崎 友輝  (Ozaki Yuki)  (10802902)	松本歯科大学・歯学部・助教   (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
---------	---------