

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592204

研究課題名(和文)骨代謝疾患治療における抗RANKL抗体の作用機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of action of anti-RANKL antibody for treatment of metabolic bone disease.

研究代表者

森崎 裕 (Morizaki, Yutaka)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30508099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：骨粗鬆症治療薬の抗RANKL抗体の作用機序についてin vivo、in vitroの系で解析した結果、破骨細胞分化を初期段階から強力に抑制し、また閉経後骨粗鬆症モデルマウスを用いて抗RANKL抗体及び強力な骨形成促進作用を有する副甲状腺ホルモン(PTH)との併用によって海綿骨及び皮質骨ともに相加的な骨密度増加効果が認められた一方、その相互作用を様々な時間軸で検証した結果、海綿骨と皮質骨ではその骨量増加効果に対して2剤の最適な投与間隔が異なる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Anti-RANKL antibody is one of the most successful therapeutics for osteoporosis. The aim of this study was to elucidate the effect of the individual and combined effects of PTH and anti-RANKL monoclonal antibody in ovariectomized mice. This study suggest that co-treatment PTH with anti-RANKL antibody may make additive effect in BMD and the possibility of difference in optimal duration and effective regions.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨・軟骨代謝学

### 1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は造血幹細胞由来の単球・マクロファージ系前駆細胞から分化し、それらの融合により形成される多核巨細胞であり、生体内で骨吸収を司る唯一の細胞である。これまでの研究から破骨細胞分化の分子メカニズムが詳細に解明されている。特に 1998 年に破骨細胞分化・活性化を担う中心的な物質として tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ファミリーの receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) が同定されたことによって、破骨細胞研究は急速な進歩を遂げた (Yasuda H et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3597-3602, 1998)。その後の *in vivo*, *in vitro* の解析によって、RANKL-RANK 系が破骨細胞分化・活性化にきわめて特異的な pathway であることが明らかになった。すなわち RANKL の過剰発現マウス、あるいは OPG のノックアウトマウスでは骨粗鬆症を来す。これらの基礎的研究を受けて、骨吸収・骨破壊が中心的病態となる閉経後骨粗鬆症、関節リウマチ、転移性骨腫瘍などを対象に RANKL-RANK 系をターゲットにした薬剤の開発が進みつつある。このうち現時点で欧米において最も臨床試験が進んでいる薬剤は、RANKL そのものをターゲットとした抗 RANKL 抗体 denosumab である。Denosumab は RANKL に対する IgG2 isotype の完全ヒト型抗モノクローナル抗体であり、骨芽細胞などで産生された RANKL と結合し、その活性を阻害することにより破骨細胞分化・活性化を抑制し、その結果骨吸収を抑制するとされている。denosumab の効果を検証する大規模臨床試験としては複数の報告があり、以下に代表的な例を挙げる。

一つは閉経後骨粗鬆症患者 7868 例を対象とした "FREEDOM" (Fracture Reduction Evaluation of Denosumab in Osteoporosis every 6 Months) 試験である。本試験では denosumab 60 mg の 6 か月毎の投与により 36 ヶ月後の新規椎体骨折のリスクがプラセボ群より有意に減少した (Cummings et al. : *N Engl J Med*, 2009)。また、既存の骨粗鬆症治療薬として現在広く使用されているビスフォスフォネートとの効果を比較した "DECIDE" (Determining Efficacy : Comparison of Initiating Denosumab vs. Alendronate) 試験では、閉経後骨粗鬆症患者 1189 例に denosumab 60 mg 皮下注群とアレンドロネート 70 mg 経口投与群を比較し、12 ヶ月後の骨密度が denosumab 投与群で有意に増加した (Brown et al. : *J Bone Miner Res*, 2009)。このような大規模臨床試験の結果から denosumab は欧米で閉経後骨粗鬆症および癌骨転移に対して臨床応用が始まっている。

しかしながら破骨細胞分化をいかなる段階でどの程度抑制しているのかなど、denosumab の生体レベルの作用機序には未解明な部分が多い。たとえば閉経後骨粗鬆症患者に対する denosumab とアレンドロネートと

の効果比較を行った臨床試験において、投与開始後 24 カ月で両薬剤を休薬すると、アレンドロネート投与群と比較し denosumab 投与群では骨密度の急激な低下と骨代謝マーカーである血清 CTx の急激な増加が生じたことが報告されている (Miller et al., *Bone* 2008)。このことは denosumab 休薬によってリバウンド現象が起きた可能性を示唆するが、その詳細な解析はなされていない。また RANKL の中和によって、どのようなタイミングで、どのような細胞が減少、あるいは増加しているのかなどについても、生体レベルでの詳細な解析はなされていない。臨床的な問題点として、既存の骨粗鬆症治療薬による治療が行われている閉経後骨粗鬆症患者において、denosumab を投与した場合、あるいは denosumab 投与患者に他の治療薬を投与する際の両薬剤間の相互作用については全く未解明である。

### 2. 研究の目的

マウス抗 RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand) 抗体による骨吸収抑制作用機序を *in vitro* および *in vivo* で明らかにするとともに、抗 RANKL 抗体と既存の骨粗鬆症治療薬との相互作用の検証を通じて、破骨細胞分化制御機構の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

抗 RANKL 抗体による破骨細胞分化抑制機構の解析：まず *in vitro* の系として破骨細胞としてはマウス骨芽細胞と骨髄細胞との共存培養によって形成された破骨細胞分化培養系細胞を用いる。具体的には野生型 DDY マウスから骨髄細胞を採取し、共存培養を行って成熟破骨細胞を得る。得られた破骨細胞を、抗体を添加しないコントロール群及び抗 RANKL 抗体を濃度別に添加したもの (抗体投与群) に分けて培養し、破骨細胞の形態学的特徴、生存能、分化を評価した。次に抗 RANKL 抗体が成熟破骨細胞の生存能にどのような影響を及ぼすか検証した。まずコラーゲンゲルでコートしたディッシュ上で既述の破骨細胞共存培養を行い、成熟した大量の破骨細胞を浮遊させた状態で得る。このようにして得られた成熟破骨細胞に抗 RANKL 抗体を濃度別に添加し、一定時間後 (0, 6, 12, 18, 24 時間) ごとのように、経時的に TRAP 染色を行うことで生存破骨細胞数をそれぞれカウントし、各時間の生存細胞数を実験開始時の細胞数で割ったものを生存率とし、抗 RANKL 抗体の破骨細胞に及ぼす生存能を評価した。

抗 RANKL 抗体と既存の骨粗鬆症治療薬との相互作用の検証：閉経後骨粗鬆症モデルとして卵巣摘出マウスを作成し、抗 RANKL 抗体投与と既存の骨粗鬆症治療薬との相互作用を検証する。副甲状腺ホルモン (PTH) は間欠投与によって強力な骨形成促進作用を有する新たな骨粗鬆症治療薬として、その臨床的効果が注目されている。一方でビスフォスフ

オネートなどの骨吸収抑制薬とPTHとの相互作用については未だ不明な点が多く、例えばビスフォスフォネートを先行投与した後にPTHを追加投与すると、PTHが本来有す骨形成作用が抑制されることが報告されている(Delmas et al. *Bone* 16, 1995)。本研究ではPTHと抗RANKL抗体との相互作用を、様々な時間・空間軸で検討した。C57/BL6 雌性マウスに卵巣摘出(OVX)を行い閉経後骨粗鬆症モデルマウスを作成した。薬剤については術後4週時点で抗RANKL抗体(5mg/kg)は単回投与し、またPTH(80 µg/kg/day)は同時点から4週間の間欠投与を行った。まず各薬剤の効果を比較検証するため、偽手術群、OVX群、抗RANKL抗体投与群、PTH投与群、2剤併用群を設定し、術後8週(各薬剤投与後4週)で骨密度測定、骨代謝マーカー測定、組織学的検討を行った。次に同様にC57BL/6マウス、雌性12週齢に対し各個体に両側卵巣摘出術(OVX)を行い、各薬剤の単独投与群をコントロールとして、術後4週時点で抗RANKL抗体を腹腔内に単回投与した。併用群を術後4週時点で抗RANKL抗体を単回投与した後にPTHを併用することとし、PTHの投与時期を変えてマウスを計4群、抗体投与後からそれぞれ0, 2, 4, 6週後よりPTHを4週間の間欠投与を行った。各群に対し卵巣摘出前、抗RANKL抗体の投与直前、PTH投与開始直前、終了の各時点で、X線撮影、骨密度測定、血清学的検査、組織学的検査を行い各群を比較しそれらの推移をとらえ抗RANKL抗体とPTHの経時的な相互作用の変化を解析した。血清学的検査は、骨吸収マーカーとしてCTx(C-terminal telopeptide crosslink of type collagen)及び骨形成マーカーとしてosteocalcinの血清濃度をELISA法により測定した。組織学的検査では、各時点のマウスより骨組織(大腿骨・脛骨及び脊椎)を採取し、パラホルムアルデヒドで固定、10% EDTA液にて脱灰した後、パラフィン包埋、ミクロトームを用いて組織切片を作製した。作製された切片は、破骨細胞が同定できるようにH-E染色やトルイジンブルー染色に加えTRAP染色を行った。

#### 4. 研究成果

抗RANKL抗体による破骨細胞分化抑制機構の解析：マウス骨芽細胞と骨髄細胞との共存培養によって形成された破骨細胞分化培養系細胞を用い、得られた成熟破骨細胞を、抗体を添加しない対照群及び抗RANKL抗体を濃度別に添加した抗体投与群に分けて培養し、破骨細胞の形態学的特徴、生存能、分化、機能を評価した。その結果、抗RANKL抗体を1~10 µg/mlの濃度で添加したところいずれにおいても破骨細胞形成が見られず、抗RANKL抗体は破骨細胞分化を強力に抑制することが示唆された。抗RANKL抗体が成熟破骨細胞に及ぼす影響：抗RANKL抗体が成熟破骨細胞の生存能に及ぼす影響を検証する。まずコラーゲンゲルで

コートしたディッシュ上で既述の破骨細胞共存培養を行い、成熟した時点から抗RANKL抗体を濃度別に添加し、一定時間後(0, 6, 12, 18, 24時間)に、生存破骨細胞数をそれぞれ計測して生存率を算出し、抗RANKL抗体の破骨細胞に及ぼす生存能を評価したところ対照群と有意な差はなく、抗RANKL抗体は成熟破骨細胞の生存能には影響を及ぼさない可能性が示唆された。

抗RANKL抗体と既存の骨粗鬆症治療薬との相互作用の検証：前述のような系で閉経後骨粗鬆症モデルマウスを作成した。薬剤については術後4週時点で抗RANKL抗体は単回投与し、またPTHは同時点から4週間の間欠投与を行った。まず各薬剤の効果を比較検証するため、偽手術群、OVX群、抗RANKL抗体投与群、PTH投与群、2剤併用群を設定し、術後8週(各薬剤投与後4週)で骨密度測定、骨代謝マーカー測定、組織学的検討を行ったところ2剤併用群は他群と比較し海綿骨を多く含む大腿骨遠位及び皮質骨が主である大腿骨骨幹部ともに優れた骨密度増加効果を認め、骨代謝マーカーは抗RANKL抗体投与群と同程度まで低下していた。また前年度までの結果から抗RANKL抗体投与後からPTHの投与開始までの間隔を、0, 2, 4, 6週とした4群及び各群に対する対照群を設定し、投与終了時に骨密度、組織学的検査にて比較検討した。その結果、2剤併用群では全ての投与間隔で抗体投与群より優れた骨密度増加効果を示したが、海綿骨を多く含む大腿骨遠位においては投与間隔0週群で骨密度増加率は最も高い一方、皮質骨が主である大腿骨骨幹部では0週群で骨密度増加率は最も低く、投与間隔6週群で最も高い結果だった。以上これまでの実験結果から、閉経後骨粗鬆症マウスモデルにおいて作用機序の異なる両薬剤の併用により、部位に関わらず相加的な骨量増加作用が認められた一方、海綿骨と皮質骨ではその骨量増加効果に対して、2剤の最適な投与間隔が異なる可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計1件)

Tokuyama N, Masuda H, Hirose J, Omata Y, Kadono Y, Furuya Y, Yasuda H, Tanaka S. Individual and combining effects of anti-RANKL monoclonal antibody and teriparatide in ovariectomized mice. The American society for bone and mineral research 2013 Annual Meeting. October 4-7, 2013. Baltimore, Maryland, USA.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

森崎 裕 (MORIZAKI YUTAKA)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30508099

(2)研究分担者

田中 栄 (TANAKA SAKAE)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：50282661

三浦 俊樹 (MIURA TOSHIKI)

東京大学・医学部附属病院・その他

研究者番号：20376479

門野 夕峰 (KADONO YUHO)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70401065