

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462385

研究課題名(和文) 関節リウマチに対する新規生物学的製剤の確立 Wnt非古典経路を標的として

研究課題名(英文) Establishment of novel biologics against rheumatoid arthritis. -As a target of Wnt noncanonical pathway-

研究代表者

前田 和洋 (MAEDA, KAZUHIRO)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：50548849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本申請者は、受容体型チロシンキナーゼRor2の下流で、Wnt5aにより活性化されるWnt非古典経路が、RANKLによる破骨細胞分化を促進することを報告した。さらに、それを阻害することで関節リウマチに対する新規治療薬の可能性を報告してきた。今回、Wnt非古典経路を阻害する事を目標としてRor2受容体を阻害する薬剤の作製を試みた。

Ror2を過剰発現するCHO細胞を大量に培養しタンパク質を回収し、抗体作製を試みたが計画通りにいかなかった。このため、方針を転換しWnt非古典経路を阻害する低分子化合物の検索を行った。その結果、ある転写因子を阻害する化合物はWnt5aが促進する破骨細胞分化を抑制した。

研究成果の概要(英文)：I reported that Wnt5a enhances RANKL-induced osteoclastogenesis through noncanonical Wnt signaling which is the downstream of receptor tyrosine kinase Ror2, previously. Furthermore, we reported the possibility of the novel therapeutic target for rheumatoid arthritis by inhibiting it. In this study, we try to generate Ror2 inhibitor to inhibit Wnt noncanonical pathway.

To try to generate the neutralizing antibody, we collected Ror2 protein using Ror2 overexpressing CHO cells, but failed. Because of this, we search for the low molecular compounds for inhibition of Wnt noncanonical pathway. As a result we found that the compound which inhibits some transcriptional factor suppressed wnt5a-enhanced osteoclastogenesis.

研究分野：整形外科

キーワード：破骨細胞 関節リウマチ Wnt

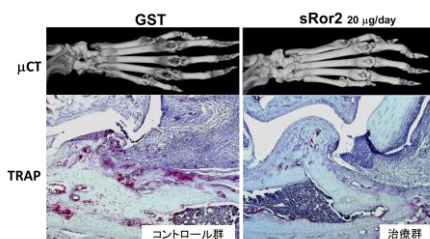
1. 研究開始当初の背景

(1) Wnt とシグナル伝達経路

Wntは分子量約4万の分泌型の糖蛋白であり、個体発生、形態形成および発癌など生命現象の様々な局面に関与するサイトカインである。線虫から哺乳類まで種を超えて保存されており、ヒトでは19種類のホモログが同定されている。そのシグナル経路は、 β -カテニンを介する古典経路と介さない非古典経路に大別される。その中でも、Wnt5aは、非古典経路を活性化するWntとして知られている。Wnt5aの遺伝子欠損マウスは、心肺の低形成で胎生18.5日で致死である。一方、Ror2は、受容体型チロシンキナーゼであり、Wnt5aの受容体と考えられている。Ror2の遺伝子欠損マウスも、やはり心肺の低形成で胎生18.5日で致死である。

(2) Wnt 非古典経路と関節リウマチ

そのような背景から、私たちは、組織特異的Wnt5a欠損マウス、組織特異的Ror2欠損マウスを作成し、その硬組織を解析した。その結果、1)Wnt5aが骨芽細胞、滑膜細胞より産生されること、2)Wnt5aは破骨細胞の分化を強力に促進すること、3)破骨細胞前駆細胞特異的にRor2を欠損させたマウスでは、骨吸収が低下することにより骨量が著しく増加することを報告した。さらに当時、Wnt5aは、関節リウマチ(RA)の滑膜に多く発現しているという報告が散見された。このことから、RA滑膜に発現するWnt5aが骨破壊に関与するのではないかという仮説を立て、RAモデルへのRor2デコイ受容体を投与する実験を行った。その結果、RAモデルへのRor2デコイ受容体を投与は、骨関節破壊を著しく抑制した(図1)。以上より、RAの病態



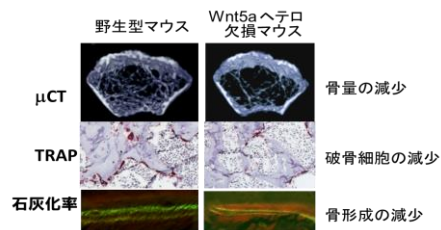
(図1)Ror2のデコイ受容体の投与はRAによる骨関節破壊を抑制する

において、Wnt5aは骨関節破壊に関与するということが明らかとなった。

2. 研究の目的

(1) 骨吸収・骨形成へのWnt5aの役割

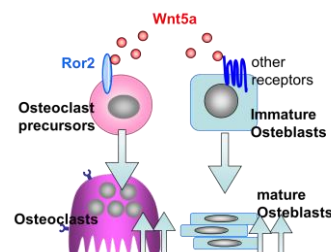
*in vitro*において、Wnt5aは破骨細胞分化を促進する。このことから、Wnt5a遺伝子ヘテロ欠損マウスは、破骨細胞の分化が抑制されることにより骨量が増えることが予想された。しかしながら、予想に反しWnt5a遺伝子ヘテロ欠損マウスは、骨量の減少が観察された。骨形態計測によりWnt5aは、骨吸収のみならず骨形成も抑制されることが明らかとなった(図2)。以上の結果より、Wnt5aは骨吸収、骨形成をともに促進する分子ということが考えられた。一方、Ror2遺伝子欠ヘテロ損マウスでは、骨形成は障害されず骨吸収のみ障害された。



(図2)Wnt5aのヘテロ欠損マウスは骨吸収・骨形成ともに障害される

(2) 治療標的としてのRor2

このことは、破骨細胞分化において、Wnt5aはRor2を受容体とするが、骨芽細胞分化においては、Wnt5aは他の受容体を必要とすることを示唆している(図3)。即ち、Ror2をターゲットとすれば、骨吸収のみ抑制する創薬が可能になると考えた。そこで、本研究ではWnt非古典経路を阻害し、破骨細胞分化を抑制する目的でRor2受容体を抑制する薬剤の作製を試みた。



(図3)Wnt5aは破骨細胞分化ではRor2受容体を介し骨芽細胞分化では他の受容体を介する

3. 研究の方法

(1) Ror2 タンパクの精製・純化

Ror2 を過剰発現する CHO 細胞を樹立、培養し、タンパク質を回収する。tag タンパクに対する抗体で免疫沈降し、Ror2 タンパクを大量に精製・純化する。

(2) Ror2 中和抗体の作製

上記①で得られた Ror2 タンパク質を用い、Ror2 に対する抗体を作製する。

(3) in vitro 実験

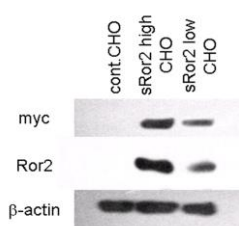
作製した抗 Ror2 抗体を破骨細胞培養系に添加し、Wnt5a の破骨細胞分化促進作用を阻害できるかどうかを検討する(図4)。



(図4)Ror2 中和抗体を用いた in vitro 実験の概要

4. 研究成果

Ror2 を過剰発現する CHO 細胞を樹立した(図5)。大量に培養しタンパク質を回収し、抗体作製を試みたが計画通りにいかなかった。このため、方針を転換し Wnt 非古典経路を阻害する低分子化合物の検索を行った。マウス骨髄マクロファージに、M-CSF と RANKL で誘導する破骨細胞培養系へ、Wnt5a を添加すると破骨細胞分化が促進する。本培養系に Wnt 非古典経路を阻害する可能性のある低分子化合物を各種添加した。その結果、ある転写因子を阻害する化合物Aは Wnt5a が促進する破骨細胞分化を仮説通り抑制した。しかし、意外なことに、同じ分



(図5)Ror2 過剰発現 CHO 細胞

子を阻害する化合物Bは、破骨細胞分化を促進した。なぜこのような違いが生

じたのかを明らかにしようと試みたが、その原因を特定するまで至らなかった。現在、もう一度立ち戻り、その分子が破骨細胞分化に本当に必要かどうか、阻害剤実験のみならず、RNA 干渉法を用い機能喪失実験検討を行うことを考えている。

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)

[雑誌論文] (計 3 件)

①前田和洋, 曾雌茂, 丸毛啓史; 【骨癒合の基礎と臨床】骨代謝における細胞生物学. 脊椎脊髄ジャーナル 29, 604-611, 2016

②Maeda K, Saito M, Marumo K; Wnt signals and bone metabolism. *J Phys Fitness Sports Med* 3: 341-345, 2014

③前田和洋, 斎藤充, 丸毛啓史;

WntシグナルとSclerostin. 腎と骨代謝 27:247-253, 2014

[学会発表] (計 13 件)

①前田和洋

骨粗鬆症診療におけるホームドクターの役割. 平成 29 年埼玉県整形外科医会 日整会教育研修講演 2017.3.11 浦和

②前田和洋

Wnt シグナルによる骨代謝制御. 第 35 回 ROD-21 研究会 2017.2.4 東京

③前田和洋

破骨細胞研究の新展開 - 歴史から臨床応用、現状の問題点まで -. 第 10 回 RA タワーミーティング 2016.11.30 東京

④前田和洋

骨巨細胞腫におけるヒストンバリエントのゲノム変異と解析. 第 19 回癌と骨病変研究会指定講演 2016.11.11 東京

⑤中村幸男, 前田和洋, 加藤博之, 宇田川信之, 高橋直之, 小林泰浩; 関節炎による Sfrp5 の低下は Wnt5a による骨吸収を亢進させる. 第 34 回日本骨代謝学会学術集会 2016.7.20 大阪

⑥前田和洋

骨粗鬆症スクリーニングにおける健診医の役割について. 平成 28 年度人間ドック健診専門医教育研修講演 2016.5.22 東京

⑦前田和洋

かかりつけ医のための骨粗鬆症診療の“コツ”. なでしこフォーラム in 東京

2016.4.9 東京

⑧前田和洋

RANKL の発見と破骨細胞分化について. 骨マネージメントフォーラム 2015.12.2 東京

⑨前田和洋

抗 RANKL 抗体による骨密度上昇についての考察. 骨粗鬆症治療セミナー 2015.1.14 東京

⑩岡本 正則、上原 俊介、前田 和洋、山下 照仁、薄井 雄企、羽二生 久夫、青木 薫、高梨 誠司、小林 伸輔、野村 博紀、田中 学、加藤 博之、齋藤 直人、高橋 直之、小林 泰浩

Wnt5a は Sp7 を介して LRP5/6 の発現を上昇させ、骨芽細胞分化を促進する. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会 2014.10.9 鹿児島

⑪岡本 正則、宇田川 信之、上原 俊介、前田 和洋、山下 照仁、中道 裕子、齋藤 直人、高橋 直之、小林 泰浩 ; Wnt5a は LRP5/6

の発現と古典経路を調節し、骨芽細胞分化を促進する. 第 32 回日本骨代謝学会 2014.7.24 大阪

⑫小林泰浩、前田和洋、中村幸男、加藤博之、宇田川信之、高橋直之 ; 関節炎において Sfrp5 の発現低下は骨破壊を増悪する. 第 1 回日本骨免疫学会議 2014.7.5 沖縄

⑬前田和洋

RANKL って何? - RANKL の発見がもたらしたこと -. 第 1 回かつしか骨の会 2014.6.24 東京

[図書] (計 7 件)

①前田和洋

B リンパ球における mTORC1 の活性化は β カテニンおよび RANKL/OPG の調節を介して破骨細胞形成を促進する. JBMR 日本語版 3(4):2-3, 2017

②前田和洋

小児および若年成人における WNT1 骨粗鬆症の骨特性. JBMR 日本語版 3(4):10-11, 2017

③前田和洋、齋藤充、丸毛啓史

酸化ストレスが骨質を劣化するメカニズムについて教えてください. ファーマナビゲーター・糖尿病と骨代謝. 松本俊夫、杉本利嗣編 メディカルレビュー社 大阪

④前田和洋

カニクイザルにおけるモデリングによる成人期の継続的な骨形成がデノスマブによる持続的 BMD 増加に関与している可能性がある. JBMR 日本語版 2(4):2-3, 2016

⑤前田和洋

25-ヒドロキシビタミン D および 1,25-ジヒドロキシビタミン D と骨密度、骨密度変化、新規非椎体骨折との関係. JBMR 日本語版 2(4):8-9, 2016

⑥前田和洋

骨折後の死亡率と BMI の関係 : 40 歳以上の男女の地域住民を対象とした研究. JBMR 日本語版 1(4):6-7, 2015

⑦前田和洋

最大 5 年間のデノスマブ投与が骨の組織、形態計測に及ぼす影響 : FREEDOM 延長試験. JBMR 日本語版 1(4):10-11, 2015

[その他]

ホームページ等

<http://jikeiseikei.com/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田和洋 (MAEDA KAZUHIRO)

東京慈恵会医科大学・整形外科科学講座・助教
研究者番号 : 50548849

(2) 研究分担者

齋藤充 (SAITO MITSURU)

東京慈恵会医科大学・整形外科科学講座・准教授
研究者番号 : 50301528