

令和元年9月2日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05144

研究課題名(和文) 骨代謝共役を担うクラストカイン-Wntシグナルネットワークの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the osteoclast-derived cytokine-Wnt signaling network responsible for coupling between bone resorption and formation.

研究代表者

高橋 直之 (Takahashi, Naoyuki)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・特任教授

研究者番号：90119222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞が分泌するクラストカインを解析した。(1)破骨細胞はLIFを分泌することで、骨細胞のスクレロスチン分泌を抑制し、骨代謝共役を実現した。(2)W9ペプチドは、破骨細胞の骨吸収活性を抑制し、骨細胞のスクレロスチン分泌を抑制し、歯槽骨量を増加させた。(3)Wnt5a-Ror2シグナルは、Daam2 Rho PKN3 cSrc/Pyk2を介して破骨細胞の骨吸収活性を誘導した。(4)破骨細胞は特異的にHtrA1を分泌した。HtrA1はOPGを効率よく分解した。以上のように、本研究より、破骨細胞は様々なクラストカインを分泌し骨代謝共役を担っていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来破骨細胞は骨吸収のみを行う細胞であると考えられてきた。しかし本研究より、破骨細胞は様々なクラストカインを分泌し、骨代謝とりわけ骨代謝共役を担っていることが示された。本研究結果は、破骨細胞がサイトカイン分泌細胞であるあるいは内分泌細胞であるという新しい考え方を示すことができたと考えられる。さらにLIFの作用を抑制する薬剤、W9ペプチド、HtrA1の阻害剤は特粗鬆症など代謝性骨疾患の治療薬となり得る可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Clastokines secreted by osteoclasts were analyzed. (1) Osteoclasts secreted LIF, which suppressed the secretion of sclerostin by osteocytes. Thus, osteoclasts promoted osteoblastic bone formation through the up-regulation of Wnt- catenin signals. (2) W9 peptides suppressed bone resorption activity of osteoclasts and suppressed sclerostin expression by osteocytes. Thus, W9 increased the alveolar bone mass. (3) Osteoclasts abundantly secreted Wnt5a. Wnt5a binds to its receptor, Ror2, which is expressed by osteoclasts. The Wnt5a-Ror2 signal in osteoclasts induced bone-resorbing activity through Daam2 Rho PKN3 cSrc/Pyk2 signals. (4) Osteoclasts specifically secreted HtrA1, which degraded OPG, suggesting that osteoclasts potentially prepare a microenvironment that is suitable for osteoclastogenesis. Thus, osteoclasts secrete various Clastokines that are involved in bone metabolism.

研究分野：生化学、骨代謝学

キーワード：破骨細胞 骨芽細胞 カップリング因子 クラストカイン スクレロスチン LIF HtrA1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞による骨吸収が骨芽細胞による骨形成を促進することはよく知られているが、どのような機序で骨形成を促進するかは不明である。骨粗鬆症治療において、副甲状腺ホルモン PTH 製剤が唯一の骨形成を促進する薬剤であるが、より効果的な骨形成促進薬の開発が望まれている。そのため、破骨細胞が分泌する骨形成促進因子の実態・作用機序の解明が期待される。

2. 研究の目的

骨吸収と骨形成は厳格に共役するが、共役メカニズムは不明である。そのため、骨代謝共役因子が想定される。一方我々は、Wnt 非古典経路を活性化する Wnt5a が破骨細胞の分化を促進することを明らかにしてきた。本研究では、破骨細胞が分泌するクラストカインを解析し、共役メカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 破骨細胞の分泌するカップリング因子の解析

OPG 欠損マウスの Wnt シグナルを、組織学的また生化学的に解析した。破骨細胞がスクレロステチン分泌を抑制する可能性を解析した。抗体アレイを用いて、破骨細胞が分泌するサイトカインを解析し、骨細胞のスクレロステチン分泌を抑制する因子の同定を試みた。OPG-欠損マウスの LIF (leukemia inhibitory factor) の発現を免疫染色法で解析した。

(2) W9 ペプチドの骨作用の解析

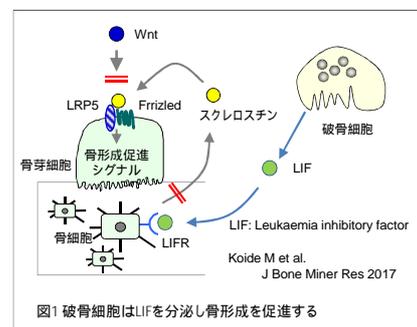
RANK (receptor activator of NF- κ B) 様ペプチドである WP9QY (W9) は、腫瘍壊死因子 I 型受容体を模倣して作製された 9 個のアミノ酸から構成される環状ペプチドである。OPG 欠損マウスに W9 ペプチドあるいは risedronate を投与し、歯槽骨を組織学的に解析した。

(3) 破骨細胞の機能を調節する Wnt5a-Ror2 シグナルの解析

Wnt5a 欠損マウス由来の破骨細胞の骨吸収活性を、象牙切片を用いて評価した。Wnt5a の受容体である Ror2 (受容体型チロシンキナーゼ様オーファン受容体 2) を破骨細胞特異的に欠損させたマウス (OC-Ror2-cKO マウス) を作製し、その骨組織を解析した。OC-Ror2-cKO マウス由来の破骨細胞の骨吸収能を解析した。Wnt5a-Ror2 下流シグナルとして、Daam2 (Disheveled activator of morphogenesis 2) および Rho シグナルを解析した。Pkn3 (protein kinase N3) 欠損 (Pkn3-KO) マウスの骨組織および Pkn3 の下流シグナルを解析した。Pkn3 阻害薬 (SB202190) を卵巣摘出マウスに投与し、卵巣摘出が誘導する骨量減少に対する効果を評価した。

(4) 破骨細胞が分泌する OPG 分解酵素の解析

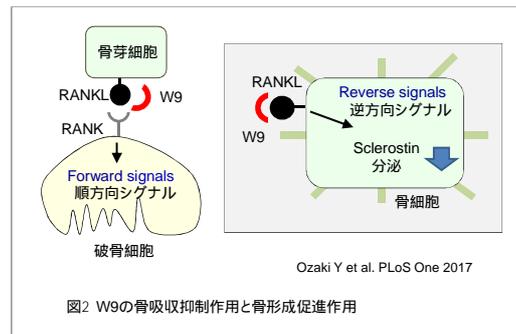
マウスの骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系で、OPG 分解活性を解析した。破骨細胞の培養上清の質量分析と破骨細胞の RNA シーケンス解析より、OPG 分解酵素として HtrA1 (high-temperature requirement A serine peptidase 1) を同定した。リコンビナント HtrA1 (rHtrA1) と質量分析を用い、OPG の分解過程を詳細に解析した。RANKL が誘導する RAW264.7 細胞の破骨細胞への分化に対する OPG と HtrA1 の作用を解析した。



4. 研究成果

(1) 破骨細胞の分泌するカップリング因子の解析

OPG 欠損マウスの骨組織では Wnt- β -catenin シグナルが著しく活性化されていた。破骨細胞は、骨細胞のスクレロスチン分泌を抑制する因子を分泌していた。破骨細胞の培養上清を抗体アレイで解析したところ、スクレロスチン分泌抑制因子は LIF であることを見出した。12 週齢の OPG 欠損マウスの脛骨における LIF の発現は高く、スクレロスチンの発現は抑制されていた。抗 RANKL 抗体を投与し、RANKL シグナルをブロックすると破骨細胞の減少に伴い LIF の発現は抑制され、スクレロスチンの発現は増加した。以上より、破骨細胞が分泌する LIF は Sclerostin の発現を抑制して、骨芽細胞の分化を促進していることが明らかとなった (図 1)。



(2) W9 ペプチドの骨作用の解析

OPG 欠損マウスに W9 あるいはリセドロネート

を投与したところ、ともに歯槽骨の破骨細胞数は有意に減少した。W9 投与は Wnt/ β -カテニンシグナル伝達を増強し、歯槽骨形成を誘導した。一方、リセドロネート投与では、そのような効果は認められなかった。リセドロネートによる処理は OPG 欠損マウスにおけるスクレロスチン発現を回復させたが、W9 処理はさらにスクレロスチン発現を抑制した。以上より、W9 は歯周炎における歯槽骨の減少を防ぐのに役立つ可能性が示された (図 2)。

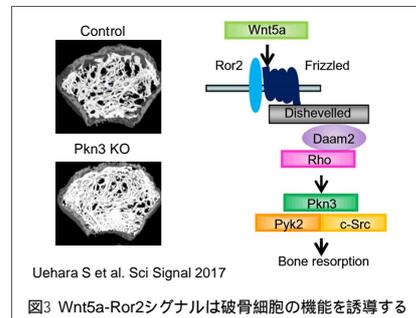
(3) 破骨細胞の機能を調節する Wnt5-Ror2 シグナルの解析

Wnt5a の発現は、破骨細胞前駆細胞である骨髄マクロファージは低く、破骨細胞は高かった。Wnt5a 欠損マウス由来の破骨細胞の骨吸収活性は低く、Wnt5a を添加すると、骨吸収活性は回復した。破骨細胞特異的に Ror2 を欠損させたマウス(OC-Ror2-cKO マウス)は、骨吸収が抑制されるため、骨量増加を示した。OC-Ror2-cKO マウスの破骨細胞は、骨吸収能が低下していた。

Ror2 に結合した Wnt5a は、Daam を介して細胞骨格の再編成に關与する Rho を活性化した。活性化された Rho は Rho エフェクターキナーゼ Pkn3 を活性化し、さらに c-Src の活性化を誘導した。また、Pkn3 のプロリンリッチ領域は c-Src との結合に必要であった。Pkn3 は c-Src および Pyk2 (proline rich kinase 2)と 3 量体を形成し、アクチンリング形成と骨吸収能を促進した。OCL-Ror2-cKO マウスに由来する破骨細胞の骨吸収およびアクチンリング形成の障害は、構成的に活性な RhoA の過剰発現によって救済された。OCL-Ror2-cKO マウスと同様に、Pkn3 欠損マウスの骨量な増加していた。Pkn3 欠損マウス由来の破骨細胞は骨吸収活性が低下していた。

Pkn3 阻害薬である SB2-2190 は破骨細胞のアクチン

リング形成と吸収窩形成を阻害した。また、SB2-2190 の投与は、卵巣摘出により誘導される骨量減少を防止した。以上より、Wnt5a-Ror2 シグナルは Daam2-Rho-Pkn3-c-Src 経路を介して破骨細胞の骨吸収を促進することが示された (図 3)。また、Pkn3 阻害薬は骨粗鬆症治療薬となり得る可能性が示された。



(4) 破骨細胞が分泌する OPG 分解酵素の解析

共存培養系を用いて、破骨細胞が OPG 分解酵素を分泌することを突き止めた。骨芽細胞や骨髄マクロファージは OPG 分解酵素をほとんど分泌していなかった。

破骨細胞の培養上清を OPG 分解活性に基づき分画し、質量分析により 42 種類のプロテアーゼを同定した。

一方、OPG 分解活性は骨髄マクロファージから破骨細胞に分化する過程で増加する。そこで、骨髄マクロファージと破骨細胞の RNA シーケンスより、破骨細胞の分化に伴って発現が上昇する分泌型プロテアーゼを 4 種類を同定した。質量分析と RNA シーケンスの結果から、OPG 分解酵素として HtrA1(High-temperature requirement A serine peptidase 1)を同定した。rHtrA1 と質量分析を用い、OPG の分解過程を詳細に解析した。rHtrA1 は OPG のジスルフィド結合を認識し、最初に Leu90 と Glu91 との間を切断した。次いで rHtrA1 は OPG を小さな断片に分解した。OPG は、RANKL が誘導する RAW264.7 細胞の破骨細胞への分化を強力に阻害した。一方、rHtrA1 で前処理された OPG は、その阻害活性が消失していた。以上より、破骨細胞は OPG 分解酵素 HtrA1 を分泌し、骨吸収に適した微小環境を作ることが示された (図 4)。この知見は、HtrA1 阻害薬が骨粗鬆症の治療薬になり得る可能性を示すものである。

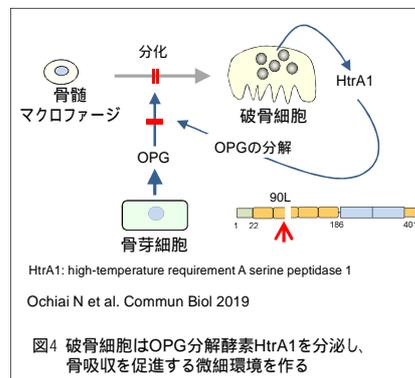


図4 破骨細胞はOPG分解酵素HtrA1を分泌し、骨吸収を促進する微小環境を作る

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

Takahashi N, Nakamichi Y, Udagawa N: How does vitamin D regulate osteoclastic bone resorption? in **Encyclopedia of Bone Biology**, in press, 2019 (査読有)

Takahashi N, Kobayashi Y, Udagawa N: Osteoclasts in **Principles of Bone Biology 4th Edition**, in press, 2019 (査読有)

Ochiai N, Nakachi Y, Yokoo T, Ichihara T, Eriksson T, Yonemoto Y, Kato T, Ogata H, Natsuko Fujimoto N, Kobayashi Y, Udagawa N, Kaku S, Ueki T, Okazaki Y, Takahashi N, Suda T: Murine osteoclasts secrete serine protease HtrA1 capable of degrading osteoprotegerin in the bone microenvironment. **Commun Biol** 2:86, 2019. (査読有)

Ozaki Y, Koide M, Furuya Y, Ninomiya T, Yasuda H, Nakamura M, Kobayashi Y, Takahashi N, Yoshinari N, Udagawa N: Treatment of OPG-deficient mice with WP9QY, a RANKL-binding peptide, recovers alveolar bone loss by suppressing osteoclastogenesis and enhancing osteoblastogenesis. **PLoS One** 12:e0184904, 2017 (査読有)

Yang M, Arai A, Udagawa N, Hiraga T, Lijuan Z, Ito S, Komori T, Moriishi T, Matsuo K, Shimoda K, Zahalka AH, Kobayashi Y, Takahashi N, Mizoguchi T: Osteogenic Factor Runx2 Marks a Subset of Leptin Receptor-Positive Cells that Sit Atop the Bone Marrow Stromal Cell Hierarchy. **Sci Rep** 7:4928, 2017 (査読有)

Uehara S, Udagawa N, Mukai H, Ishihara A, Maeda K, Yamashita T, Murakami K, Nishita M, Nakamura T, Kato S, Minami Y, Takahashi N, Kobayashi Y: Protein kinase N3 promotes bone resorption by osteoclasts in response to Wnt5a-Ror2 signaling. **Sci Signal** 10: 494, 2017 (査読有)

Koide M, Kobayashi Y, Yamashita T, Uehara S, Nakamura M, Hiraoka BY, Ozaki Y, Iimura T, Yasuda H, Takahashi N, Udagawa N. Bone Formation Is Coupled to Resorption Via Suppression of

Sclerostin Expression by Osteoclasts. **J Bone Miner Res** 32: 2074-2086, 2017 (査読有)

Nakamichi Y, Udagawa N, Horibe K, Mizoguchi T, Yamamoto Y, Nakamura T, Hosoya A, Kato S, Suda T, Takahashi N: VDR in osteoblast-lineage cells primarily mediates vitamin D treatment-induced increase in bone mass by suppressing bone resorption. **J Bone Miner Res** 32:1297-1308, 2017 (査読有)

Yamashita T, Udagawa N, Thirukonda GJ, Uehara S, Yamauchi H, Suzuki N, Li F, Kobayashi Y, Takahashi N: Platypus and opossum calcitonins exhibit strong activities, even though they belong to mammals. **Gen Comp Endocrinol** 246:270-278, 2017 (査読有)

Kobayashi Y, Uehara S, Udagawa N, Takahashi N: Regulation of bone metabolism by Wnt signals. **J Biochem** 159:387-92, 2016 (査読有)

Thirukonda GJ, Uehara S, Nakayama T, Yamashita T, Nakamura Y, Mizoguchi T, Takahashi N, Yagami K, Udagawa N, Kobayashi Y: The dynamin inhibitor dynasore inhibits bone resorption by rapidly disrupting actin rings of osteoclasts. **J Bone Miner Metab** 34:395-405, 2016 (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

Naoyuki Takahashi: 「How does vitamin D regulate osteoclastic bone resorption?」 17th Annual Meeting of Korean Association of Oral Science, Seoul, Korea November 9, 2018

高橋直之:「破骨細胞研究の歴史を振り返る」第 36 回日本骨代謝学会学術集会 長崎 2018 年 7 月 26 日

高橋直之:「須田先生と骨代謝研究」第 35 回日本骨代謝学会学術集会 福岡 2017 年 7 月 27 日

高橋直之:「Progress of osteoclast biology」第 2 回日本骨免疫学会ウィンターセミナー 軽井沢 2017 年 1 月 26 日

〔図書〕(計 7 件)

高橋直之:破骨細胞の起源と分化経路. ファーマナビゲーター抗 RANKL 抗体編 松本俊夫、田中 栄編 メディカルレビュー社 大坂、p28-35, 2016 年

中道裕子, 高橋直之, 宇田川信之: 歯髄細胞に関する分子生物学的研究. 腎と骨代謝 29:31-40, 2016

高橋直之: 歯周炎において歯槽骨吸収はどのように引き起こされるか. 日本歯科医師会雑誌 69:109-117, 2016

高橋直之, 中道裕子, 宇田川信之: ビタミン D による骨代謝調節. The Bone 30:323-328, 2016

高橋直之: 第 9 章 骨と脳・神経・臓器・筋肉の相互作用. 新骨の科学第 2 版, 須田立雄、小澤英浩、高橋榮明編、医歯薬出版 東京、p239-246, 2016

須田立雄、高橋直之、津田英資、福田千恵、刑部泰輔:「抗 RANKL 抗体」はどのようにして創薬されたか. 実験医学 36:106-111, 2018

山下照仁、小出雅則、高橋直之: カルシトニンと骨・ミネラル代謝. 副甲状腺・骨代謝疾患診療マニュアル 改訂版第 2 版 平田結喜緒 監修、診断と治療社 東京、p28-30, 2019

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等

松本歯科大学 <https://www.mdu.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：宇田川 信之

ローマ字氏名：UDAGAWA, Nbuyuki

所属研究機関名：松本歯科大学

部局名：歯学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 70245801

研究分担者氏名 小林 泰浩

ローマ字氏名：KOBOYASHI, Yasuhiro

所属研究機関名：松本歯科大学

部局名：総合歯科医学研究所

職名：教授

研究者番号(8桁): 20264252

研究分担者氏名：中村 浩彰

ローマ字氏名：NAKAMURA, Hiroaki

所属研究機関名：松本歯科大学

部局名：歯学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 50227930

研究分担者氏名：南 康博

ローマ字氏名：MINAMI, Yasuhiro

所属研究機関名：神戸大学

部局名：医学(系)研究科(研究院)

職名：教授

研究者番号(8桁): 70229772

研究分担者氏名：荒 敏昭

ローマ字氏名：ARA, Toshiaki

所属研究機関名：松本歯科大学

部局名：歯学部

職名：講師

研究者番号(8桁): 90387423