

令和元年5月31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：16H05508

研究課題名(和文)破骨細胞からの骨形成シグナルを利用した歯周病治療薬の応用開発

研究課題名(英文) Applied research of periodontal disease therapeutics using osteogenic signal from osteoclasts

研究代表者

宇田川 信之 (Udagawa, Nobuyuki)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：70245801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：オステオプロテゲリン(OPG)は、破骨細胞の分化を強く阻害する。我々は、オステオプロテゲリン(OPG)遺伝子欠損マウスを用いた実験結果から、骨細胞が産生するオステオプロテゲリン(OPG)およびスクレロスチンが皮質骨や歯槽骨の維持に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。また、破骨細胞由来のLIF(白血病抑制因子)が骨細胞におけるスクレロスチンの発現を低下させ、骨形成を促進する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

破骨細胞と骨細胞間のシグナル伝達解析は、骨代謝研究の中で現在最も注目されている研究である。破骨細胞からの骨形成促進シグナルを解明するという視点は、独創的であると考えられる。本研究は、新しい歯周病治療薬へ応用開発する糸口を見出すことを目的として計画され、今回得られた知見は、歯周病および骨粗鬆症治療に新しい指針を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：Osteoprotegerin (OPG) strongly inhibits osteoclast differentiation. We demonstrate that osteoprotegerin (OPG) and sclerostin produced by osteocytes is play an important role in the maintenance of cortical bone and alveolar bone, from experimental results using osteoprotegerin (OPG) gene-deficient mice. In addition, osteoclast-derived LIF (leukemia inhibitory factor) has been shown to reduce sclerostin expression in bone cells and to promote bone formation.

研究分野：口腔生化学

キーワード：破骨細胞 骨芽細胞 骨細胞 オステオプロテゲリン スクレロスチン 白血病抑制因子 骨吸収 歯周病

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

### 1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は高度に石灰化した骨組織を破壊・吸収する唯一の細胞である。その起源は、生体に広く分布するマクロファージ系の細胞である(Udagawa N et al. Proc Natl Acad Sci 87:7260, 1990)。破骨細胞とその前駆細胞は RANK を発現し、骨芽細胞との細胞間接触を介して破骨細胞分化因子である RANK ligand (RANKL) を認識し、破骨細胞に分化する。RANKL または RANK をノックアウトしたマウスでは破骨細胞が全く認められず、重篤な大理石骨病を発症することから、RANKL-RANK シグナル系は破骨細胞の分化に必須であることが証明された(Proc Natl Acad Sci 95:3597, 1998)。

歯周病は、人類史上最も感染者の多い疾患としてギネス世界記録にも登録されている。口腔は、消化管や気管の入り口にあたり、常在菌も多彩である。そして、口腔内ケアの怠りによりプラークが付着すると、歯と口腔粘膜上皮との結合は元来それほど強くないため、歯周ポケットが深くなり、歯周病原菌の増殖に適した環境となる。歯周病菌の外膜成分であるリポ多糖(LPS)は、各種の炎症性サイトカインの産生を促進し、結合組織を破壊し、より深い歯周ポケットを形成し、局所的に病的な骨吸収を誘導する。歯槽骨の破壊は歯の喪失に繋がり、患者のQOLを悪化させる。我々は、LPSによる歯槽骨吸収メカニズムについて永年にわたり研究を行ってきた。

一方、骨吸収と骨形成の量は、動的に均衡した共役状態に保たれており、骨吸収と骨形成は共役(カップリング)関係にある。そのため、骨吸収と骨形成を仲介する骨代謝共役因子の存在が想定されているが、その実態は不明である。我々は、OPG 欠損マウスを用いて、骨代謝共役機構の存在様式について研究してきた。さらに OPG 欠損マウスは歯周病における歯槽骨吸収のモデルであることを報告した(Endocrinology 154:773,2013)。また、骨粗鬆症治療薬として使用されているビスホスホネートや RANKL 中和抗体の投与により、OPG 欠損マウスの歯槽骨吸収が治癒可能であることも見出した(Endocrinology 154:773,2013)。

我々は、本研究計画を開始するにあたり、以下の知見を得ていた。OPG 欠損マウスは骨代謝共役が亢進したマウスであることを示した(Endocrinology 144:5441, 2003)。Wnt5a-Ror2 シグナルは破骨細胞の骨吸収機能を誘導すること(Nat Med 18:405, 2012)、骨芽細胞と破骨細胞が分泌する Wnt5a は骨吸収のみならず骨形成も調節する(Sci Rep 4:4493, 2013)。破骨細胞が骨形成抑制因子であるスクレロスチン発現を抑制する未知の因子を分泌することを見出した。

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。Sost 遺伝子から作られるスクレロスチンは、骨形成を促進する因子 Wnt の受容体である LRP5/6 に結合し、Wnt シグナルを抑制する。すなわち、スクレロスチンは Wnt のアンタゴニストとして作用する骨形成抑制因子である。

Wnt 受容体である Lrp5 遺伝子の機能喪失変異は、骨粗鬆症を呈する。一方、Sost 遺伝子の機能喪失変異は、Wnt シグナルが活性化され、骨量増加症を呈する。興味深いことに、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。また、骨形成を促進する副甲状腺ホルモン PTH は、スクレロスチンの分泌を抑制することで、骨形成を促進する。これらの知見は、骨細胞-Wnt シグナル系が骨リモデリングを調節していることを示す。

### 2. 研究の目的

本研究は、骨細胞の機能に焦点をあて、破骨細胞からの骨形成促進シグナルを解明し、新しい歯周病治療薬へ応用開発する糸口を見出すことを目的として計画された。

### 3. 研究の方法

#### (1) OPG 欠損マウスに対するカテプシン K 阻害剤の投与実験

OPG 欠損マウス(14週齢)にカテプシン K 阻害剤(L006235: Tocris Bioscience)を毎日4週間投与し、骨形態計測を行う。

#### (2) 破骨細胞が分泌するスクレロスチン抑制因子の発現様式の同定

破骨細胞の培養上清に存在するスクレロスチン発現抑制因子の同定を目指す。アッセイ系として、スクレロスチンを強く発現する骨芽細胞株 UMR106 細胞を使用する。

#### (3) 破骨細胞からの骨形成リバーシブルシグナルの解析

破骨細胞からの骨形成リバーシブルシグナルの存在様式とその分子機構について、RANKL 遺伝子欠損マウスを使用して解析する。

#### (4) Siglec-15 中和抗体の破骨細胞の分化と骨吸収機能に対する効果の検討

ITAM は、T 細胞や B 細胞の受容体と会合する細胞膜アダプター分子の細胞内ドメインに共通して見られるモチーフとして発見された。破骨細胞では、DAP12 と FcR の発現が高く、ダブル欠損マウスは大理石骨病を呈する。破骨細胞が多数出現するヒト巨細胞腫から、DAP12 と会合する免疫グロブリンスーパーファミリー分子として、シアル酸受容体タンパク質 Siglec-15 が同定された。Siglec-15 は破骨細胞の分化に伴って誘導される。Siglec-15 遺伝子欠損マウスは、骨吸収が抑制され骨量が増加するが、破骨細胞数は減少しない。この実験結果は、破骨細胞の存在が骨芽細胞の活性を支え、骨吸収と骨形成がカップリングしていることを示唆している。そこで、Siglec-15 中和抗体の効果について、マウス由来の細胞培養系において検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 破骨細胞が分泌するカテプシンKの阻害剤(オダナカティブ)は、骨形成活性を抑制することなく骨量を増加させることが示されている。OPG欠損マウス(14週齢)にカテプシンK阻害剤(L006235: Tocris Bioscience)を毎日4週間投与した結果、骨量増加作用が認められた。骨形態計測の結果、破骨細胞の分化は阻害せず、骨芽細胞の活性を促進させることにより、骨量増加作用を発揮する可能性が示された。

(2) 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)の遺伝子欠損マウス(OPG<sup>-/-</sup>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。また、OPG<sup>-/-</sup>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。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中和抗体ヤリセドロネート(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。また、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<sup>-/-</sup>マウスでは、スクレロスチン発現が低下した(J Bone Miner Res 32:2074, 2017)。

以上の実験結果から、石灰化組織の破壊吸収に關与する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。さらに、破骨細胞自身が発現・産生するLIF(白血病抑制因子)が骨細胞におけるスクレロスチンの発現を低下させ、骨芽細胞性の骨形成を促進する可能性を示した(J Bone Miner Res 32:2074, 2017)。

(3) 我々は、成熟破骨細胞は、RANKを表面に発現するエクソソームを分泌し、骨芽細胞内のRANKLに結合し、PI3K-Akt経路を活性化することにより、骨芽細胞活性を上昇させるといふパーシグナルの存在様式を証明した(Ikebuchi Y et al. Nature 561:195, 2018)。

(4) 骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系で形成された破骨細胞のアクチンリング形成をSiglec-15抗体は濃度依存的に阻害した。また、象牙質切片上の吸収窩形成を抑制した。骨髄細胞培養系にRANKLとM-CSFを添加し破骨細胞が誘導される条件で、Siglec-15抗体はTRAP陽性の多核破骨細胞の分化を阻害した。一方、アルカリホスファターゼ陽性の骨芽細胞が多数誘導された。この時、多核破骨細胞形成は完全に抑制されたが、単核TRAP陽性前破骨細胞の存在が認められた。骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系でRANK陽性の破骨細胞前駆細胞(qOP)が発現する。Siglec-15抗体はqOPの形成に対しては抑制効果を示さなかった。前述のように、破骨細胞由来のLIFがスクレロスチン産生抑制を介して、骨形成を促進させるカップリング因子である可能性がある。Siglec-15抗体で処理した破骨細胞においてカテプシンKおよびRANKの発現維持と同様に、LIF発現も維持されていた。

以上の結果から、Siglec-15抗体で処理した破骨細胞における骨形成の促進作用に、LIF発現の維持が關与する可能性が示された。Siglec-15抗体は多核破骨細胞の分化と骨吸収機能を阻害すると共に骨芽細胞の分化を促進する可能性が考えられる。

#### 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 9件)

Ikebuchi Y, Aoki S, Honma M, Hayashi M, Sugamori Y, Khan M, Kariya Y, Kato G, Tabata Y, Penninger JM, Udagawa N, Aoki K, Suzuki H.

Coupling of bone resorption and formation by RANKL reverse signalling.

Nature, 561:195-200, 2018 (査読有)

Nakamichi Y, Udagawa N, Suda T, Takahashi N

Mechanisms involved in bone resorption regulated by vitamin D.

J Steroid Biochem Mol Biol, 177:70-76, 2018 (査読有)

Uehara S, Udagawa N, Kobayashi Y

Non-canonical Wnt signals regulate cytoskeletal remodeling in osteoclasts. Cell Mol Life Sci, 75:3683-3692, 2018 (査読有)

Murakami K, Kikugawa S, Kobayashi Y, Uehara S, Suzuki T, Kato H, Udagawa N, Nakamura Y

Olfactomedin-like protein OLFML1 inhibits Hippo signaling and mineralization in osteoblasts.

Biochem Biophys Res Commun 28:419-425, 2018 (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: eaan0023, 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 )

Nakamura M, Nakamichi Y, Mizoguchi T, Koide M, Yamashita T, Ara T, Nakamura H, Penninger JM, Furuya Y, Yasuda H, Udagawa N

The W9 peptide directly stimulates osteoblast differentiation via RANKL signaling.

J Oral Biosciences 59:146-151, 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 )

Yang M, Arai A, Udagawa N, Hiraga T, Lijuan Z, Ito S, Komori T, Moriishi T, Matsuo K, Shimoda, K, Zahalka HA, 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 )

[学会発表](計 5件)

宇田川信之

臓器年齢と酸化ストレス-破骨細胞研究からの骨年齢

日本抗加齢学会総会 (第18回)(招待講演), 2018

宇田川信之

骨改造制御の新局面:骨吸収から骨形成・骨再生への橋渡し機構を探る-破骨細胞の骨形成シグナルにおける重要性-

歯科基礎医学会学術大会(第60回)(招待講演), 2018

小出雅則, 宇田川信之

歯槽骨の骨リモデリングにおける骨細胞の役割

日本骨代謝学会学術集会(第36回)(招待講演), 2018

Udagawa N, Koide M, 宇田川信之, Arai A, Mizoguchi T, Yamashita T, Nakamura M, Kobayashi Y, Takahashi N, Kumakura S, Fukuda C, Tsuda E

Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 15 (Siglec-15) plays important roles in the induction of both bone-resorbing activity of osteoclasts and osteoblast differentiation.

The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2018 Annual Meeting (国際学会), 2018

Udagawa N, Uehara S, Koide M, Arai A, Mizoguchi T, Nakamura M, Kobayashi Y, Takahashi N, Fukuda C, Tsuda E

Anti-Siglec-15 antibody inhibits bone-resorbing activity of osteoclasts and stimulates osteoblast differentiation.

The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2017 Annual Meeting (国際学会), 2017

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名: 小出 雅則

ローマ字氏名: KOIDE, Masanori

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: 講師

研究者番号: 10367617

研究分担者氏名：吉成 伸夫  
ローマ字氏名：YOSHINARI, Nobuo  
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：20231699

研究分担者氏名：中本 哲自  
ローマ字氏名：NAKAMOTO, Tetsuji  
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：30514989

研究分担者氏名：中村 美どり  
ローマ字氏名：NAKAMURA, Midori  
所属研究機関名：松本歯科大学  
部局名：歯学部  
職名：准教授  
研究者番号：90278177

研究分担者氏名：上原 俊介  
ローマ字氏名：UEHARA, Shunsuke  
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：90434480