

令和元年6月3日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08681

研究課題名(和文)骨カップリング因子Cthrc1の骨形成促進機構の解明と創薬への応用

研究課題名(英文)The mechanisms of Cthrc1 action in stimulating osteoblastogenesis as a coupling factor and application for drug development

研究代表者

竹下 淳 (TAKESHITA, Sunao)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・運動器疾患研究部・室長

研究者番号：50263009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：カップリング因子Cthrc1はWaif1と結合しPKC β -ERK-Rac1経路を介して骨芽細胞分化を促進した。骨芽細胞特異的Waif1 cKOマウスは、骨形成と骨吸収の両方が低下し高骨量を発症した。Waif1の発現はRanklの発現を介して破骨細胞形成を制御していた。Waif1 cKOマウスはCthrc1 cKOマウスと同様にカップリング機能が低下することからWaif1はCthrc1の受容体であることが示された。創薬開発を目指してCthrc1刺激をミミックするWaif1抗体を取得するためにWaif1抗体を作出し、ST2細胞のALP活性を指標にして骨芽細胞分化を促進する抗体を取得した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カップリング因子を骨粗鬆症の治療薬に応用する試みは例がない。Cthrc1のTgマウスは高骨量であることからCthrc1が骨形成を促進することは明白であり、生体における異常な機能なども報告されていない。Cthrc1を創薬のリード薬としての基盤を築くためにCthrc1の受容体としてWaif1を同定し、Waif1刺激抗体は骨代謝を改善する治療薬となる可能性が予想される。骨粗鬆症治療において、骨吸収抑制剤との併用により骨吸収を抑え同時にカップリング機能亢進により骨形成を促進することでネットの骨量を増やし骨質をも改善する新しい骨粗鬆症治療薬と革新的な治療法の開発に応用できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We found that Cthrc1 as a coupling factor stimulates osteoblastogenesis by PKC β -ERK-Rac1 activation through Waif1. Osteoblast-specific Waif1 cKO mice showed a high bone mass with reduction of both bone formation and resorption. Waif1 surface expression is required for Rankl expression and osteoclastogenesis. Waif1 cKO mice exhibited impaired bone mass recovery after RANKL injections, phenocopying osteoclast-specific Cthrc1 cKO mice. These results provide evidence for Waif1 on stromal/osteoblastic cells as a receptor of osteoclast-secreted Cthrc1, and suggest that Waif1 serves an important coupling function of bone resorption to formation. Then, in order to obtain Waif1 antibodies mimicking Cthrc1 stimulation, we established monoclonal antibodies using soluble Waif1 protein and found osteoblastogenesis-stimulating antibodies by monitoring ALP activity of ST2 cells culturing with them.

研究分野：骨細胞生物学

キーワード：カップリング因子 Cthrc1 Waif1 Wnt PKC RANKL

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

1. 研究開始当初の背景

骨リモデリングは、体を支え運動機能を発揮するだけでなく、生体に必須なミネラルやサイトカインの調節制御にも重要な役割を果たしている。骨リモデリングの中で骨吸収から骨形成へのカップリング機構は50年以上前に仮想されていたが、近年ようやくその実体が分子レベルで明らかにされつつある。カップリング因子は3つのグループに大別される。1つ目は、TGF- β や IGF などのように骨基質中に多く含まれ、破骨細胞による骨吸収により骨基質中から掘り出され、骨芽細胞に作用し骨形成を促進する。2つ目は、破骨細胞自身が産生するクラストカインと呼ばれるものでスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)や我々が同定した Cthrc1 がそれに当たる。3つ目のグループは、破骨細胞上で発現提示されるエフリンやセマフォリンなどであり、骨芽細胞上のそれぞれの受容体に作用し細胞間相互作用を介して骨形成を制御する。中でも我々が同定した Cthrc1 は破骨細胞が骨吸収時に特異的に発現上昇し骨形成を促進するという特徴を有している。

申請者らは、独自の材料、手法とアイデアを駆使しカップリング因子の探索を試み、Cthrc1 が骨吸収時に破骨細胞から特異的に発現・分泌され、骨芽細胞に作用し骨形成を促進することを *in vitro* の実験とマウスの遺伝学的手法を用いた loss-of-function と gain-of-function 実験から明らかにした。さらに、破骨細胞分化因子である RANKL をマウスに投与し骨カップリング機能を評価するアッセイ系を確立し、破骨細胞特異的 Cthrc1 コンディショナルノックアウト(OC)マウスを解析し骨吸収に引き続いて起こる骨形成が障害されていることを突き止め、Cthrc1 が骨代謝を制御するカップリング因子であることを世界で初めて実証した(JCI 2013)。Cthrc1 は、アディポネクチンと同じ C1q ファミリーに属する分泌糖タンパクであり、門脇らのアディポネクチン受容体を活性化する化合物(アディポロン)の発見(Nature 2013)により Cthrc1 も同様の手法を用いて創薬開発につながる研究が可能という発想に至った。

2. 研究の目的

骨粗鬆症の治療薬は骨吸収を抑えるビスホスホネート薬が主流であるが、骨折のリスクを抑えることができても骨量を増やしたり骨質を改善する効果は期待できないことから骨形成を促進する薬剤の開発が求められている。我々は、骨吸収から骨形成へのカップリング機構の解明が創薬開発につながると考え、カップリング因子の同定とその制御機構の解明を目指している。マイクロアレイを用いて活性化破骨細胞で特異的に発現上昇する遺伝子として Cthrc1 (collagen triple helix repeat containing 1) を見出し、種々のアッセイ法とカップリング機能の評価系の確立により Cthrc1 がマウスの生体内においてカップリング因子として働くことを実証した(Takeshita et al. JCI 2013)。本研究では、Cthrc1 の骨芽細胞分化を促進するシグナル伝達経路を解明し、骨粗鬆症治療薬の創薬開発に応用することを目的とする。

3. 研究の方法

Cthrc1 の受容体として Waif1(Wnt-activated inhibitory factor 1)を同定したので Cthrc1 刺激による骨芽細胞分化における Waif1 の役割を解析する。骨芽細胞株として ST2 細胞、及びマウス頭頂骨由来初代骨芽細胞を用いてリコンビナント Cthrc1 と種々のキナーゼ阻害剤の添加により Cthrc1 刺激で活性化するキナーゼを解析した。また、CRISPR/Cas9 法により Waif1 を欠損した ST2 細胞株を樹立し、シグナル伝達経路を解析した。生体内における Waif1 の機能を解析するために Osterix-cre マウスを用いて骨芽細胞特異的 Waif1

cKO (OB) マウスを作成した。KO マウスの血清を用いて生化学的解析、及び大腿骨と脛骨を用いたマイクロ CT 解析、及び骨形態計測法により骨代謝における Waif1 の機能を解析した。さらに、KO マウスに RANKL を投与することによりカップリング機能を解析した。His タグを付加した分泌型 sWaif1-His を発現する L 細胞株を樹立し、リコンビナント sWaif1-His タンパクを精製した。sWaif1-His をマウスに免疫し、常法に従ってモノクローナル抗体を作成し、ELISA と FACS により骨芽細胞表面で発現する Waif1 を認識する抗体を取得した。得られた精製抗体を用いて骨芽細胞分化に及ぼす影響を解析した。さらに、Cthrc1 刺激をミミックする抗体をマウスを用いてスクリーニングするためにそれぞれの抗体を大量に精製した。

4 . 研究成果

骨カップリング因子として同定したCthrc1による骨形成促進機構を解析する目的で受容体として同定したWaif1に着目し、Waif1欠損ST2細胞やWaif1 KOマウスから調整した頭頂骨由来初代骨芽細胞を用いてCthrc1刺激による骨芽細胞分化に及ぼす影響を解析し、Cthrc1が骨芽細胞上で発現するWaif1を介してPKC、ERK、Rac1およびJNKを活性化することで骨芽細胞分化を刺激し骨形成を促進することを明らかにした。骨芽細胞特異的コンディショナルWaif1 KO (OB)マウスは骨形成と骨吸収の両方が低下した低骨代謝回転型で高骨量を発症することが判明し、骨吸収低下の原因が骨芽細胞におけるRANKLの発現低下であることを突き止めた。OBマウスにRANKLを投与することでカップリング機能を評価したところ、RANKLによる骨吸収には差異は認められず、骨吸収後に起こる骨形成の活性化が低下し骨量回復が遅延し、OBマウスはカップリング機能が障害していることが明らかとなった。このカップリング機能障害は破骨細胞特異的Cthrc1 cKOマウスと同様な表現型であり、Waif1がCthrc1の受容機能を担っている重要な細胞膜タンパクであることが実証された。精製したsWaif1-Hisタンパクを抗原とし、マウスに免疫することによりモノクローナル抗体を作出した。Waif1欠損ST2およびWaif1高発現ST2細胞株を用いてモノクローナル抗体をスクリーニングし、細胞表面上のWaif1を認識する多数の陽性ハイブリドームを取得した。それらの中からALP活性を指標として骨芽細胞分化を促進するハイブリドーム10株を得た。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4件)

Matsuoka K, Kohara Y, Naoe Y, Watanabe A, Ito M, Ikeda K, Takeshita S. WAIF1 is a cell-surface CTHRC1 binding protein coupling bone resorption and formation. **J Bone Miner Res**. 査読有, 33, 1500-1512, 2018.
Doi: 10.1002/jbmr.3436.

Wang L, Iorio C, Yan K, Yang H, Takeshita S, Kang S, Neel BG, Yang W. A ERK/RSK-mediated negative feedback loop regulates M-CSF-evoked PI3K/AKT activation in macrophages. **FASEB J**. 査読有, 32, 875-887, 2018.

Takeshita S, Fumoto T, Ito M, Ikeda K. Serum CTX levels and histomorphometric analysis in Src versus RANKL knockout mice. **J Bone Miner Metab**. 査読有, 36, 264-273, 2018.

竹下 淳、骨吸収と骨形成のカップリング、特集「骨リモデリング制御と疾患」 医薬ジャーナル社 CLINICAL CALCIUM 査読無、27(12):1705-1711、2017年11月28日発行

〔学会発表〕(計 4件)

Kohara Y, Watanabe A, Ogiso N, Takehita S. Macrophage-secreted Emilin2 Stimulates Chemotaxis and Differentiation in Stromal/Osteoblastic Cells. The 40th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Sep. 28, 2018, Montreal, Quebec, Canada

竹下 淳、破骨細胞が産生するカップリング因子、第60回歯科基礎医学会 アップデートシンポジウム9「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」、2018年9月7日、博多

Kohara Y, Matsuoka K, Ito M, Ikeda K, Takehita S. Osteoclast-secreted Cthrc1 Regulates Bone Remodeling through Waif1, a Receptor on Stromal/Osteoblastic Cells. The 39th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Sep. 10, 2017, Denver, Colorado, USA

Takehita S, Fumoto T, Ito M, Ikeda K. Serum CTX levels and histomorphometric analysis in Src versus RANKL knockout mice. The 38th Annual Meeting of the American Society for Bone & Mineral Research. 2016年9月19日 Atlanta, Georgia, USA

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ncgg.go.jp/research/organization/undoki.html>

<http://www.ncgg.go.jp/research/department/bjd/kotutaisya.html>

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。