

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591679

研究課題名（和文）

ビスフォスフォネートによる破骨細胞の細胞死誘導および骨吸収抑制メカニズムの解明

研究課題名（英文）

Distinguishing the Proapoptotic and Antiresorptive Functions of Bisphosphonates in Murine Osteoclasts

研究代表者

大島 寧 (OHSIMA YASUSHI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50570016

研究成果の概要（和文）：骨粗鬆症治療薬ビスフォスフォネートの内、代表的な窒素含有型ビスフォスフォネート2剤の作用機序についてin vivo、in vitro の系で解析した結果、破骨細胞のアポトーシス誘導と骨吸収活性抑制が独立したシグナル経路で制御されていることが判明し、窒素含有型ビスフォスフォネートにより破骨細胞内で共通したシグナル変化が生じる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Nitrogen-containing bisphosphonates are one of the most successful therapeutics for osteoporosis. The aim of this study was to elucidate the functional mechanism of nitrogencontaining bisphosphonates. This study indicates that the antiresorptive effect of nitrogen-containing bisphosphonates is mainly mediated by the suppression of the bone-resorbing activity of osteoclasts and not by the induction of osteoclast apoptosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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

ビスフォスフォネートは強力な骨吸収抑制効果を有し、臨床においては骨粗鬆症治療薬の第一選択薬である。ビスフォスフォネートは生理的石灰化抑制物質であるピロリン酸のアナログで、当初はその石灰化抑制作用が注目され異所性骨化やPaget病などに使用

された。ところがその研究過程において投与濃度によっては骨吸収抑制作用があることが判明し、ビスフォスフォネート研究の焦点は骨吸収抑制作用へとシフトした。これまでビスフォスフォネートは破骨細胞のアポトーシスを誘導することで骨吸収抑制効果を持つと考えられてきた。しかし近年、窒素含

有型のビスフォスフォネートには破骨細胞のアポトーシスによらない骨吸収抑制効果があることが示され、注目を浴びているがそのメカニズムは未だ明らかとなっていない (Halasy-Nagy et al. *Bone*, 2001)。また2009年にはヒトへのアレンドロネート長期投与後の骨生検の結果が報告された (Weinstein et al. *N Eng J Med*, 2009)。その中で、アレンドロネートの累積投与量に比例して破骨細胞数が増加し、また骨から遊離した巨大破骨細胞が増加する、という奇妙な現象が報告された。従来そうであろうと考えられていた「ビスフォスフォネートは破骨細胞をアポトーシスさせることにより骨吸収抑制効果を持つ」という作用機序では説明のつかない現象に、窒素含有型ビスフォスフォネートの破骨細胞内での分子作用メカニズムが未だに解明されていないという事実が、あらためて浮き彫りになった。また破骨細胞はシーリングゾーンと呼ばれるアクチンフィラメントに富む構造を介して骨基質に接着する。シーリングゾーンの内部は波状縁と呼ばれる細胞膜構造を呈し、 $H^+$ 、 $Cl^-$ が波状縁下に輸送され酸性環境下で無機骨質のヒドロキシアパタイトが溶解する。またカテプシンK、マトリックスメタロプロテアーゼ9などの蛋白質分解酵素が波状縁から分泌される。ビスフォスフォネート投与により破骨細胞の波状縁が消失することが知られている。窒素含有型のビスフォスフォネートのターゲットとなる低分子G蛋白のうち、Rac1やRhoはシーリングゾーンの形成や骨吸収への関与が報告され、Rabは波状縁形成への関与が報告されている。しかし骨吸収抑制効果に関するビスフォスフォネートの低分子G蛋白ターゲットおよび細胞内シグナル伝達経路は未だ不明である。我々は、この問題の解決の糸口は、まずは窒素含有型ビスフォスフォネートによって生じる破骨細胞内でのシグナル伝達変化を、細胞死誘導と骨吸収抑制とで独立して明らかにすることにあると考えた。

## 2. 研究の目的

骨粗鬆症治療薬ビスフォスフォネートが破骨細胞の細胞死を誘導する分子メカニズムおよび骨吸収活性を抑制する分子メカニズムを解明し、破骨細胞の細胞死と骨吸収を独立して選択的にコントロールする方法を確立することを目指す。

## 3. 研究の方法

各種ビスフォスフォネート製剤による破骨細胞の細胞死誘導、骨吸収活性抑制のメカニズムを解明するため、*in vitro*での破骨細胞へのビスフォスフォネート投与実験、*in vivo*でのBcl-2 family 遺伝子欠損マウスへ

のビスフォスフォネート投与実験を行った。

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、およびマクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor, MCSF) およびRANKL 刺激によってマウス骨髄細胞から形成された破骨細胞様細胞を用いた。

遺伝子導入には、当教室で開発、確立されたウイルスを用いた導入法を用いた。破骨細胞前駆細胞に対してはレトロウイルスを用いた。ピューロマイシン耐性ベクターpMX-puroに標的分子をコードしたcDNAを組みこみ、パッケージング細胞はBOSCを用いた。前駆細胞とレトロウイルス液をM-CSFならびにポリブレンの存在下で6時間培養することでウイルス感染を成立させる (Kobayashi N et al. *EMBO J*, 20(6):1271-1280, 2001)。分化した破骨細胞に遺伝子を導入する場合には、非増殖型アデノウイルスを用いた。破骨細胞をウイルス液とともに1時間培養した後、通常の培養液で1晩培養することで導入したタンパクを発現した細胞を以後の実験で用いた (Miyazaki T et al. *J Bone Miner Res*, 15(1):41-51, 2000)。第2世代の代表としてアレンドロネート、第3世代の代表としてリセドロネートを選択、使用した。

DDY マウスから骨髄細胞を採取し、既述の共存培養を行って成熟破骨細胞を得た。各ビスフォスフォネート製剤を添加し、破骨細胞の骨吸収能を評価、経時的に蛋白およびmRNAを採取する。蛋白の発現はウェスタンブロットティング、mRNAの発現はリアルタイムPCR法にて解析した。

またビスフォスフォネートにより細胞死を誘導した破骨細胞のTUNEL染色、核のヘキスト染色を行って各ビスフォスフォネートによる細胞死がアポトーシスによるものであるか確認、また採取した蛋白を用いてウェスタンブロットを行い染色体DNAの断片化の有無をみることでさらに細胞死がアポトーシスによるものかどうかの確認をした。

さらにアポトーシスがミトコンドリア経路を介したものであるか、デスレセプター経路を介したものであるかを解析した。両経路において活性化されるイニシエーターカスパーゼが異なるため、これらのカスパーゼの蛋白発現確認を行った。またこれらのカスパーゼのブロッカーを投与し、細胞死誘導の抑制効果をみることでアポトーシスの主経路を確認した。またミトコンドリア経路を介したアポトーシスに重要な役割を果たしているBcl-2 familyの発現変化を蛋白レベル、mRNAレベルで確認する。レトロウイルスを用いてBcl-2およびBcl-xL遺伝子を安定導入してミトコンドリア経路を介したアポトー

シスを強力に抑制し、ビスフォスフォネートによる細胞死が抑制されるか確認する。Bcl-2 familyの中でBH-3 only proteinと呼ばれる一連の蛋白群はミトコンドリア経路を介したアポトーシスを促進する働きを持つ。細胞により、またアポトーシス刺激特異的に働く蛋白が異なる。当研究室より、破骨細胞の生存シグナル除去刺激によるアポトーシスにおいてはBimが重要な役割を果たすことを既に報告している (Akiyama T et al. *EMBO J*, 22:6653-64, 2003)。Bim遺伝子欠損破骨細胞は生存が延長するが、活性は落ち骨吸収が低下する。破骨細胞特異的Bcl-xL遺伝子欠損マウスの解析では、アポトーシスの促進と骨吸収の亢進が確認されている (Iwasawa M, et al. *J Clin Invest*, 119:3149-59, 2009)。

こうした一連の研究からBcl-2ファミリーが細胞死のみならず細胞の運動やエネルギー産生など、様々な生体機能に関与する可能性が明らかとなった。上記の各経路の解明が済んだところで、Bcl-2 family遺伝子欠損破骨細胞に対するビスフォスフォネート投与の効果を観察することで、破骨細胞内のシグナル伝達の統合的理解と、Bcl-2 familyによる破骨細胞活性制御のメカニズムが明らかにされると考える。具体的には野生型マウス、Bimノックアウトマウスから骨髓細胞を採取して既述の共存培養で成熟破骨細胞を得て、ビスフォスフォネートを添加、破骨細胞の生存能、骨吸収能、細胞形態変化を観察する。

#### 4. 研究成果

当研究は以下の3つのサブテーマについて遂行した。

- (1)各世代の代表的なビスフォスフォネート製剤による破骨細胞骨吸収活性抑制経路の解明。
- (2)各世代の代表的なビスフォスフォネート製剤による破骨細胞細胞死誘導経路の解明。
- (3)各種 Bcl-2 family 遺伝子欠損マウス由来の破骨細胞に対するビスフォスフォネート製剤投与効果の検証。

代表的なビスフォスフォネートとしてリセドロネートを選択し、(1), (2)を遂行した。その過程でリセドロネートによるアポトーシス誘導にBcl-2 familyのうちBimが重要な役割を果たしている事がわかり、(3)については主にBim遺伝子欠損破骨細胞およびBim遺伝子欠損マウスへのリセドロネートおよびアレンドロネート投与を行った。

結果、in vitro の系におけるシグナル解析により、リセドロネートが Erk/Bim 経路に作用して破骨細胞のアポトーシスを誘導し、Akt 経路に作用して破骨細胞の骨吸収活性を阻害することが明らかとなった。またBimノックアウトマウスへのリセドロネー

ト投与実験から、リセドロネートの作用機序が破骨細胞のアポトーシス誘導に依存しないことを明らかにした。アポトーシス誘導と骨吸収活性抑制が独立したシグナル経路によって制御されており、アポトーシス誘導効果の発現には骨吸収抑制効果の発現の100倍以上の濃度のリセドロネートが必要であることがわかった。生体内では破骨細胞は骨吸収に伴ってのみしかビスフォスフォネートを細胞内に取り込むことができないため、少量のリセドロネート取り込みによってsealing zone形成の障害が生じると、それ以上のリセドロネートを取り込むことができないと考えられた。

さらに同様の解析を、もう一つの代表的な窒素含有型ビスフォスフォネートであるアレンドロネートを用いて行った。Bim遺伝子欠損破骨細胞およびBim遺伝子欠損マウスへのアレンドロネート投与実験により、アレンドロネートによるアポトーシス誘導にBcl-2 familyのうちBimが重要な役割を果たしている事がわかった。in vitro の系におけるシグナル解析により、アレンドロネートがErk/Bim経路に作用して破骨細胞のアポトーシスを誘導し、Akt 経路に作用して破骨細胞の骨吸収活性を阻害することが明らかとなった。またBimノックアウトマウスへのアレンドロネート投与実験から、アレンドロネートの作用機序が破骨細胞のアポトーシス誘導に依存しないことを明らかにした。アレンドロネートにおいてもリセドロネートと同様に、アポトーシス誘導と骨吸収活性抑制が独立したシグナル経路によって制御されていることが明らかとなり、各種の窒素含有型ビスフォスフォネートによって破骨細胞内で共通したシグナル変化が生じている可能性が示唆された。本研究によって得られた知見は、新たなビスフォスフォネート薬の開発や新たな機序をもつ骨吸収抑制薬の創薬につながるものと考えられる。

#### 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1件)

Matsumoto T, Nagase Y, Iwasawa M, Yasui T, Masuda H, Kadono Y, Nakamura K, Tanaka S. Distinguishing the proapoptotic and antiresorptive functions of risedronate in murine osteoclasts: role of the Akt pathway and the ERK/Bim axis. *Arthritis and Rheumatism.*, Vol. 63, 2011, 3908-17

[学会発表] (計3件)

(1) Takumi Matsumoto, Yuho Kadono, Tetsuro

Yasui, Hironari Masuda, Kozo Nakamura,  
Stakae Tanaka. Segregation of  
pro-apoptotic and anti-resorptive  
functions of risedronate in vivo, 32<sup>nd</sup>  
Annual Meeting of the American Society  
for Bone and Mineral Research, Toronto,  
Canada, 2010.10.15-19

- (2) 松本卓巳、永瀬雄一、安井哲郎、増田裕也、門野夕峰、中村耕三、田中栄。リセドロンートの in vivo における骨吸収抑制効果は破骨細胞のアポトーシスに依存しない，日本骨代謝学会学術集会（第28回），東京，2010.7.21-23
- (3) Takumi Matsumoto, Yuho Kadono, Tetsuro Yasui, Hironari Masuda, Kozo Nakamura, Stakae Tanaka. Erk and Akt pathways are modulated by risedronate and reciprocally regulate apoptosis and activity of osteoclasts: insight into in vivo mechanism of action, 3<sup>rd</sup> International Conference on Osteoimmunology, Fira, Greece, 2010.6.20-25

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大島 寧 (OHSHIMA YASUSHI)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：50570016

### (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  
武富 修治 (TAKETOMI SHUJI)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：70570018