

## 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 10日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22689048

研究課題名（和文） 破骨細胞特異的システムの解明—歯の革新的保存法の確立を目指して

研究課題名（英文） Basic research for the understanding of osteoclast-specific systems

研究代表者

篠原 正浩（SHINOHARA MASAHIRO）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：60345733

研究成果の概要（和文）：

破骨細胞分化においてチロシンキナーゼ経路が破骨細胞分化・機能に重要であり、この経路を担う Btk を標的とすることが、歯槽骨喪失や関節リウマチ、骨粗しょう症といった破骨細胞性の骨破壊疾患治療に対する有望な新薬であることを示した。また、IA 型 PI3K シグナルが破骨細胞の骨吸収に必須であることを示すほか、IA 型 PI3K が制御する骨吸収メカニズムを分子レベルで明らかにし、破骨細胞における IA 型 PI3K シグナルが破骨細胞性骨疾患の治療標的になりうることを解明した。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was the establishment for a novel strategy of the treatment for osteoclast-associated bone diseases such as periodontitis-associated alveolar bone loss, rheumatoid arthritis and osteoporosis. We revealed that a novel Btk inhibitor suppressed osteoclast differentiation and function in vitro and in vivo. Furthermore, we also revealed that genetic inhibition of class IA PI3K in osteoclasts resulted in the inhibition of bone-resorbing activity of osteoclasts. Thus, this study showed that pathways that mediated by a tyrosine kinase Btk and a lipid kinase class IA PI3K in osteoclasts are good therapeutic targets in these diseases in this study.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2010年度 | 8,200,000  | 2,460,000 | 10,660,000 |
| 2011年度 | 5,600,000  | 1,680,000 | 7,280,000  |
| 2012年度 | 5,600,000  | 1,680,000 | 7,280,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 19,400,000 | 5,820,000 | 25,220,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：機能系基礎歯科学・口腔生化学

キーワード：破骨細胞、チロシンキナーゼ、PI3K、歯周病、関節リウマチ、骨粗しょう症

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病、う蝕や矯正治療における歯根吸収に伴う歯の喪失においては、破骨細胞による過度の歯槽骨吸収が大きな要因となっている。一方、歯の萌出には破骨細胞の機能が必

須であり、破骨細胞の機能不全により歯の萌出異常が認められる。これらは、歯科領域において破骨細胞を人為的な制御法の確立が、健全な歯の形成ならびに保全に非常に有効であることを示している。しかし、これらの

疾患に対する根本的な治療法は未だ確立されていないことから、病態理解に基づく新たな治療法開発に資する基礎研究が求められている。

## 2. 研究の目的

破骨細胞特異的な分化・吸収シグナルの本質的な解明を行い、病態解明や治療戦略に対する基盤を確立することで、新たな破骨細胞の人為的な制御法の開発を目指した。

## 3. 研究の方法

破骨細胞分化では、RANKL 刺激後に起こる Tec キナーゼや免疫グロブリン受容体と会合するアダプタータンパク等のチロシンリン酸化が必須であるため、破骨細胞において発現するチロシンキナーゼに関する解析を実施した。また破骨細胞の吸収メカニズムについて、PI3K 下流におけるプロテアーゼの細胞外分泌シグナルという観点から解明をした。さらに、メカニズムの解明から得られた知見をもとに、破骨細胞において特異的なシグナル伝達経路を標的とした薬剤を見出し、その破骨細胞性疾患モデルマウスを用いて治療効果について解析を実施した。

## 4. 研究成果

破骨細胞分化において、破骨細胞分化因子 RANKL の受容体 RANK、および共刺激シグナルを担う免疫受容体からのシグナルは分化過程におけるタンパク質のチロシンリン酸化を制御している。免疫受容体のひとつ Trem-2 の破骨細胞分化における機能を解明する目的で、Trem-2 ノックアウトマウスを用いた解析を行ったところ、Trem-2 はチロシンリン酸化タンパク質を介してβ-Catenin の活性を制御し、破骨細胞分化に重要な役割を果たしていることを解明した (J Immunol, 2012)。

RANK および共刺激シグナルを担う免疫受容体下流で重要な役割を果たしているチロシンキナーゼ Btk の新規阻害剤を米国の製薬会社と共同で開発、破骨細胞性骨疾患に対する治療効果に関する検証を行った。In vitro の解析から、新規 Btk 阻害剤は破骨細胞分化のマスター転写因子 NFATc1 の発現を抑制することで破骨細胞分化を抑制することを見出した。また、成熟破骨細胞に対しては、破骨細胞の骨吸収に必須の役割を果たす Src や FAK、Talin といった分子の発現を低下させることで骨吸収活性を抑制することも新たに明らかにした。さらに、RANKL 投与による骨粗しょう症マウスモデルにおいて、新規阻害剤は有意に骨破壊を抑制することを見出し、この阻害剤が将来的な破骨細胞性骨破壊疾患の新規治療薬になる可能性を明らかにした。(論文投稿準備中)。

IA 型 PI3K の破骨細胞骨吸収における機能解析のため、破骨細胞特異的 IA 型 PI3K ノックアウトマウスを用いた解析を実施した。このノックアウトマウスは、骨吸収に異常をきたし、重度の大理石骨病を発症した。このマウス由来の破骨細胞は骨吸収能を欠いており、電子顕微鏡解析からノックアウトマウスの破骨細胞では分泌小胞の異常な蓄積が認められ、破骨細胞において IA 型 PI3K は骨溶解のための酸やプロテアーゼを含む小胞の分泌に必須であることを解明した (J Bone Miner Res, 2012)。さらに詳細な分子メカニズムを解析したところ、PI3K の下流で Akt が重要なこと、また Akt は破骨細胞の骨吸収に必須であり大理石骨病の原因となる Plekhm1 のリン酸化を担うことを見出した。これらの結果は、IA 型 PI3K の下流で Plekhm1 という破骨細胞特異的な分子を制御してすることで、骨吸収という破骨細胞に特異的な機能を制御している可能性を示唆している。

また、破骨細胞におけるリソソームの重要性を考慮して、抗マラリア薬の一つでありリソソームの阻害剤としても知られているクロロキンの破骨細胞に対する影響についても解析を行った。予想通り、クロロキンは in vitro における破骨細胞の骨吸収能を抑制することを確認した。興味深いことにクロロキンは破骨細胞分化も抑制することを見出し、破骨細胞分化を担う RANKL シグナルにおいてリソソームは重要な役割を果たしていることを明らかにした。RANKL 投与による骨粗しょう症マウスモデルにおいて、クロロキンは有意に骨破壊を抑制することも示した。

(Inflamma Regener, 2012) クロロキンは抗炎症作用を示すことから、現在海外において関節リウマチなどの炎症性疾患に対する治療薬として使用押されているが、本研究成果は抗炎症作用のほかに、直接破骨細胞の分化・機能を抑制する効果があることを示しており、歯槽骨喪失や関節リウマチ、骨粗しょう症といった破骨細胞性の骨破壊疾患治療に対する治療薬への応用が期待される。

## 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 4 件)

原著論文

1, Al-Bari A, Shinohara M, Nagai Y, Takayanagi H, Inhibitory effect of chloroquine on bone resorption reveals the essential role of lysosomes in osteoclast differentiation and function, **Inflamma Regener**, 32, 222-231, 2012

2, Shinohara M, Nakamura M, Masuda H, Kadono Y, Iwasawa M, Nagase Y, Ueki K, Kadowaki T, Sasaki T, Kato S, Nakamura H, Nakamura K, Tanaka S, Takayanagi H, Class IA Phosphatidylinositol 3-kinases regulates osteoclastic bone resorption through Akt-mediated vesicle transport in mice, **J Bone Miner Res**, 27, 2464-2475, 2012

3, Otero K#, Shinohara M#, Zhao H#, Cella M, Gilfillan S, Colucci A, Faccio R, Ross FP, Teitelbaum SL, Takayanagi H, Colonna M. TREM2 and  $\beta$ -Catenin Regulate Bone Homeostasis by Controlling the Rate of Osteoclastogenesis. **J Immunol**, 188, 2612-2621, 2012 (#equal contributors)

4, Negishi-Koga T, Shinohara M, Komatsu N, Bito H, Kodama T, Friedel RH, Takayanagi H, Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. **Nat Med**, 17, 1473-1480, 2011

〔学会発表〕(計11件)  
招待講演

1, 「骨破壊抑制を目指す破骨細胞研究」、第33回日本炎症・再生医学会(シンポジウム)、博多、平成24年7月

2, 「破骨細胞を制御する分子群—シグナル伝達システムの理解と治療標的の探索—」、第54回日本リウマチ学会総会・学術総会(特別企画シンポジウム)、神戸、平成22年4月

一般発表

3, 永井裕介、篠原正浩、Al-Bari Md. Adbul Alim、高柳広、リソソームの酸性化は破骨細胞分化に必要なである、第30回日本骨代謝学会、東京、平成24年7月

4, 永井裕介、篠原正浩、高柳広、クロロキンによる破骨細胞分化抑制、第33回日本炎症・再生医学会、博多、平成24年7月

5, 古賀貴子、篠原正浩、高柳広、Suppression of bone formation by an axon guidance protein, semaphorin4D、第34回日本分子生物学会、横浜、平成23年12月

6, Al-Bari MD. Adlum Alim、篠原正浩、高柳広、Lysosomal function associated with osteoclast differentiation、第34回日本分

子生物学会、横浜、平成23年12月

7, Shinohara M, Tanaka S, Takayanagi H; The role of classIA PI3K in osteoclasts, 33th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, San Diego, USA, September, 2011

8, Negishi-Koga T, Shinohara M, Takayanagi H, Protection of bone loss by targeting semaphorin 4D expressed by osteoclasts, 33th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, San Diego, USA, September, 2011

9, 古賀貴子、篠原正浩、高柳広、セマフォリン4Dを介した破骨細胞による骨形成抑制制御、第28回日本骨代謝学会、大阪、平成23年7月

10, 篠原正浩、永井裕介、中村正樹、田中栄、高柳広、PI3K-Akt経路はPlekhm1のリン酸化を介して破骨細胞の骨吸収を制御する、第33回日本分子生物学会年会、神戸、平成22年12月

11, 篠原正浩、高柳広、破骨細胞の分化・機能を制御するシグナル伝達経路、高遠シンポジウム、長野県高遠町、平成22年8月

〔図書〕(計3件)

総説

1, 篠原正浩、高柳広、「骨免疫学の最前線」、腎と骨代謝、vol. 25, no. 2, 99-106(8ページ)、2012

2, 篠原正浩、高柳広、「骨免疫学」、炎症と免疫、vol. 20, no. 2, 105-108(4ページ)、2012

3, 篠原正浩、高柳広、「新規分子を標的とした抗破骨細胞療法」、炎症と免疫、vol. 18 no. 4, 26-34(9ページ)、2010

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

篠原 正浩 (SHINOHARA MASAHIRO)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・講師

研究者番号：60345733

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：