

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670663

研究課題名(和文) 質量顕微鏡法を用いた皮質骨の内分泌機能観察

研究課題名(英文) Mass microscopy imaging of bone

研究代表者

丸山 健太 (Maruyama, Kenta)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教

研究者番号：60724119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、副甲状腺ホルモン製剤(PTH製剤)の間欠的投与が骨形成を促進させることが明らかとなり、骨破壊抑制薬に変わる夢の新薬として脚光を浴びている。しかし、本製剤はその詳細な作用機序が明らかとなっていない上、医療経済的な問題を抱えている。本研究ではPTHをマウスに間欠投与した際の皮質骨を質量顕微鏡で観察することで骨代謝を制御する新規分子やシグナル伝達経路の推定を行った。その結果、PTH投与が皮質骨内部に特定の脂質を誘導する可能性が示唆された。また、同定された脂質は加齢などに伴う炎症性の骨形成低下を抑制することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Osteoporosis is a serious disease among elderly people in developed countries, which can lead to bone fractures. In the elderly population, spine and hip fractures are chronic diseases characterized by an abnormal balance in the activities of osteoclasts and osteoblasts. PTH drug is highly effective in the treatment of osteoporosis, but its mechanism of action is largely unknown. Here we report the Mass Microscopy analysis of cortical bone from PTH treated mice. PTH treatment induces certain kind of lipid in cortical bone area and such lipid may contribute to the prophylaxis of PTH drug.

研究分野：免疫学

キーワード：骨代謝

### 1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は骨芽細胞上に存在する RANKL がミエロイド細胞に働きかけてそれらの分化・融合が促進されることで形成される。現在汎用されているビスホスホネート製剤は破骨細胞にアポトーシスを誘導することで骨破壊を抑制するが、顎骨壊死や粘膜障害といった副作用を持ち、長期服用に伴う骨折リスクの増大や骨折治癒の遷延といった問題も顕在化しつつある。それゆえ、破骨細胞の生存だけを標的とせず、骨芽細胞を活性化する作用を持つことで骨量を増加させるような新たな薬剤の登場が切望されていた。副甲状腺ホルモン(PTH)は、骨細胞に働きかけて RANKL の発現を上昇させ破骨細胞分化を促進することで、間接的に骨代謝を骨吸収有意に傾かせる作用がある。そのため、原発性副甲状腺機能亢進症や腎不全による二次性副甲状腺機能亢進症の際には血中 PTH 濃度が持続的に高い状態となり、骨粗鬆症が進行する。しかしその一方で、PTH を健常者に 1 日 1 回皮下注するといった間歇投与を行うと、骨細胞の数や寿命が増大する結果骨形成が促進されることが明らかとなり、その骨密度増強効果はビスホスホネート剤を凌駕することが証明された。そこで、近年重篤な骨粗鬆症患者に限り PTH 製剤の間歇自己注射療法が保険適応となった。本治療は、半年程度で確実な骨密度上昇を期待できるため骨粗鬆症治療に革命をもたらすとまでいわれているものの、高額な薬価と連日の皮下注が必要である点、さらには一過性の高 Ca 血症に伴う悪心等の副作用などが普及のための障壁となっている。In vitro における骨芽細胞分化誘導培養系に PTH を加えて影響を報告している論文は数多く存在するが、細胞株や動物種によって結果がまちまちであり、分化を亢進させるのか或いは抑制させるのかという点はもちろんのこと、その分子メカニズムについてもコンセンサスが得られていない。

### 2. 研究の目的

PTH を間歇投与されたマウスの骨の中に埋まっている骨細胞およびその周辺において存在量が変化する低分子群を質量顕微鏡を用いて網羅的に同定し、骨形成制御作用の可能性のあるものを in vitro でスクリーニングした。また、有望な分子が同定された場合にはその作用メカニズムの解明と PTH にかわる治療分子としての応用を目指した基礎的検討を実施することを目的とした。

### 3. 研究の方法

これまで、骨髄や皮質骨といった硬組織の内部観察は特殊な固定法や薄切技術が必要であるため、そこから細胞内分子の生化学的情報を得る事は非常に困難であった。また、骨組織内部の細胞免疫染色などは再現性の担保が困難で、骨 in vivo 解析に関連した技術的課題の数々が骨生物学の歩みを阻む障壁となってきた。そこで本研究課題では質量分析によって得られる生化学的情報と、顕微鏡による構造解析から得られる形態学的情報を同時に知ることが可能である質量顕微鏡法を骨組織観察に応用した(図1)。本方法ではプローブや抗体が不要であるため予め標的分子を決める必要がなく、微小组織環境(最小で 10  $\mu\text{m}$  四方)で変化するものを網羅的に同定できるという強みがある。本研究では PTH または PBS を 1 日 1 回、30 日間皮下投与した老齢マウスの大腿骨・脛骨を  $\mu\text{CT}$ ・組織切片評価で観察し、骨芽細胞活性と骨量の評価を行った。その後、大腿骨をメチルセルロースに包埋してクライオスタットにてスライスし、皮質骨の一部を拡大したショットで質量顕微鏡像を撮影した(島津 IMScope, negative ion モードで撮像)。こうして得られたデータから、PTH 間歇投与群で発現の上昇している質量電荷比(m/z 比)が 1000 以下の分子に着目し、上位 30 分子を「PTH 関連骨形成制御候補分子」とした。分子推定は Scripps

Center for Metabolomics の METRIN database を用いて実施した。(netative charge mode, tolerance1Da)

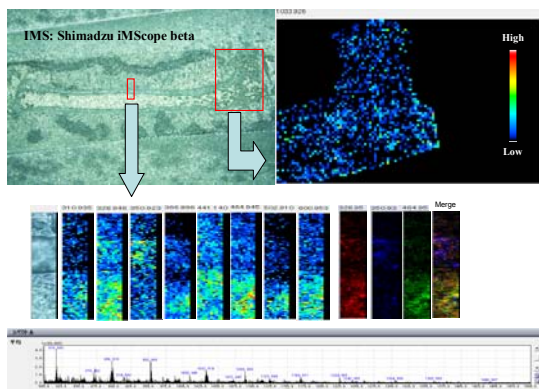


図1. 質量顕微鏡法による骨組織の観察 マウス大腿骨の質量分析イメージング例。川本法により 10  $\mu\text{m}$ 厚で薄切した大腿骨にマトリックスを塗布し (左上)、骨端部 (右上)、骨幹皮質骨部 (中央) を島津製 iMScope で解析した。骨組織の構造に従って異なる生体分子が検出されている。下は解析領域のマススペクトル。

#### 4. 研究成果

PTH の間歇投与はマウス皮質骨にホスファチジルセリン(PS)・ホスファチジルコリン(PC)に相当する  $m/z$  比の分子を誘導することが判明した(図2)。In vitro で骨芽細胞を PTH で刺激した際にはアポトーシスの亢進や当該分子の誘導はみられなかったことから、本現象は in vivo に特徴的な現象と推察された。近年、ホスファチジルセリン合成酵素 1 (PTDSS1)遺伝子の機能獲得性変異が全身性過骨症を呈するレンツ・マジュースキ症候群(LMS)の原因であることが報告された(Sergio et al, *Naure Genetics* 2014)。このことは、PS の過剰な合成が過骨症を惹起する可能性を示唆している。そこで、in vitro の骨芽細胞分化培養系に PS を加えて骨形成が亢進するかどうかを検討したが、変化はみられなかった。つぎに、40 終齢の老齢マウス骨組織における Senescence-associated Secretory Phenotype

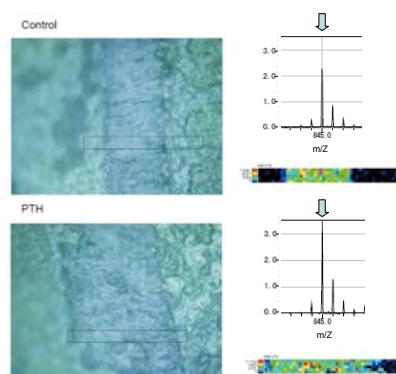


図2. PTH 間歇投与群と PBS コントロール群の大腿骨皮質骨部位における質量顕微鏡解析 PS/PCに相当する  $m/z$  比の分子が PTH 間歇投与群で上昇している。

(SASP) 因子である  $\text{IL}1\beta$  の発現を生後3終齢の若年マウスと比較したところ、前者で著大な上昇が認められた。また、興味深いことに  $\text{IL}1\beta$  は in vitro における骨芽細胞や間葉系幹細胞による骨形成を抑制した。一方、 $\text{IL}1\beta$  とともに PS を加えて培養実験を行ったところ、この抑制効果は消失したことから、PS は加齢に伴って上昇する  $\text{IL}1\beta$  のシグナルを抑制することで骨形成を阻害できる可能性が示唆された(図3)。そこで、現在 PS を用いたマウス加齢性骨粗鬆症や骨欠損モデルの治療実験を計画中である。

申請者らはこれに関連して、 $\text{IL}1\text{R}$  やその下流のアダプタータンパク質である MyD88 欠損マウスの骨再生能力が著しく亢進している

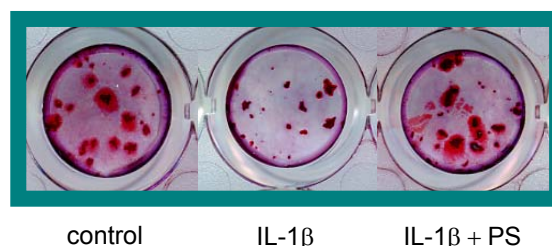


図3. In vitro マウス骨芽細胞分化培養系 に対する  $\text{IL}1\beta$  と PS の影響 石灰化を可視化するため Alizarin red で染色を行った。

ことを発見した。そこで、PS 以外にも IL1 シグナルをブロックする方法として MyD88 の阻害ペプチドを独自に開発し、当該ペプチドがマウス頭蓋骨損傷モデルの治癒を著明に促進させることを見出した (Martino, Maruyama et al, *Nature Communications* 2016)。

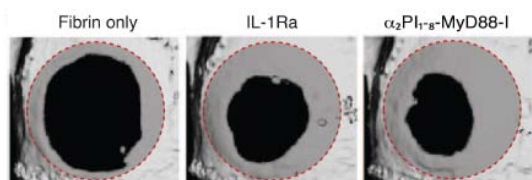


図4. IL-1R アンタゴニスト(IL-1Ra)ならびに MyD88 阻害ペプチド( $\alpha 2PII-8-MyD88-I$ )はマウス頭蓋骨欠損モデルの治癒を促進する。Martino, Maruyama et al, *Nature communications* 2016 より抜粋。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 6 件)

1. Mikaël M. Martino, Kenta Maruyama, Scott Stanger, Takashi Satoh, Osamu Takeuchi, Ralph Muller, and Shizuo Akira. "Inhibition of IL-1R1/MyD88 signaling promotes mesenchymal stem cell-driven tissue regeneration" *Nature Communications*, 7, 11051, 2016 doi:10.1038/ncomms11051 査読あり
2. Yukiko Kuroda, Kenta Maruyama, Hideki Fujii, Isamu Sugawara, Shigeru Ko, Hisataka Yasuda, Hidenori Matsui, and Koichi Matsuo. "Osteoprotegerin Regulates Pancreatic  $\beta$ -Cell Homeostasis upon Microbial Invasion" *PLOS One*, Vol.11, e0146544, 2016 doi:10.1371/journal.pone.0146544. 査読あり
3. \*Kenta Maruyama and \*Shizuo Akira. "Emerging molecules in the interface between skeletal system and innate immunity" *Pharmacological Research*, Vol.99, pp223-228, 2015 doi: 10.1016/j.phrs.2015.06.005. \*corresponding author (Invited Review) 査読

なし

4. Mikaël M. Martino, Priscilla S. Briquez, Kenta Maruyama, and Jeffery A. Hubbell. "Extracellular matrix-inspired growth factor delivery systems for bone regeneration" *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol.94, pp41-52, 2015 doi: 10.1016/j.addr.2015.04.007. 査読あり

5. \*Kenta Maruyama and \*Shizuo Akira. "New molecules in bone biology and their unexpected roles: from an "osteoinnate-immunological" point of view" *Musculoskeletal Regeneration*, Vol.1, No.1, 2015 doi: 10.104800/mr.857 \*corresponding author. 査読あり

6. \*Kenta Maruyama, Masahiro Fukasaka, Satoshi Uematsu, Osamu Takeuchi, Takeshi Kondo, Tatsuya Saitoh, Mikaël M. Martino, and Shizuo Akira. "5-azacytidine-induced protein 2 (AZI2) regulates bone mass by fine tuning osteoclast survival" *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 290, pp9377-9386, 2015 doi: 10.1074/jbc.M114.631374 \*corresponding author. 査読あり 表紙に採用

〔学会発表〕 (計 7 件)

1. Kenta Maruyama "Novel prophylactic targets of osteoporosis and pain: from Neuro-osteological point of view" 千里ライフサイエンス振興財団 第6回 産と学をつなぐ SENRI の会 千里ライフサイエンスセンター 大阪 (January 13, 2016)
2. Kenta Maruyama "Identification of the osteoclast fusion inhibitor" アステラス病態代謝研究会竹中奨励賞 受賞講演 東京工業倶楽部 東京 (October 17, 2015)
3. Kenta Maruyama "New players in skeletal system and their unexpected roles: novel molecules for novel therapies" The 4thCSI/JSI/KAI Joint Symposium Suzhou Jinling Guanyuan International Hotel, 中国

(September 19-21, 2015)

4. Kenta Maruyama “Novel therapeutic targets for bone destructive diseases” 第 33 回日本骨代謝学会学術集会日韓合同シンポジウム 京王プラザホテル 東京 (July 25, 2015)

5. Kenta Maruyama “骨自然免疫系制御メカニズムの解明” 第 301 回松本歯科大学大学院セミナー 松本歯科大学 長野 (November 23, 2014)

6. Kenta Maruyama “Novel insights into mechanisms controlling skeletal system” 第 11 回 Bone Biology Forum 富士教育研修会館 静岡 (August 23, 2014)

7. Kenta Maruyama “Identification of the novel therapeutic target for bone destructive diseases” 浜松医大分子解剖学セミナー 浜松医科大学 静岡 (April 22, 2014)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：組織損傷治療剤

発明者：丸山健太、ミカエルマルティノーエム、審良静男

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2016-036869

出願年月日：平成 28 年 3 月 16 日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山健太 (MARUYAMA, Kenta)

大阪大学免疫学フロンティア研究センター  
助教

研究者番号：60724119