

運動器疾患研究部

(1) 構成員

部長 池田 恭治

室長

骨代謝制御研究室 竹下 淳

骨細胞機能研究室 渡邊 研

流動研究員

松岡 和彦

M. Motiur Rahman

研究・事務補助員

鈴木 三恵

(2) 平成 26 年度研究活動の概要

近年、骨代謝を実行する破骨細胞と骨芽細胞の間を連携するシグナル分子に注目が集まっている。我々は、骨吸収から骨形成へのカップリング機構が骨リモデリングの基本原理であり、加齢による骨構造・機能の破綻もカップリング機能の低下が主因であると考え、破骨細胞から分泌される液性因子に焦点を絞ってカップリング因子の同定と機構解明を行ってきた。その成果として、遺伝子発現解析から *Cthrc1* を (Takeshita S et al. J Clin Invest 2013)、生化学的アプローチによって補体成分の C3a を同定した (Matsuoka K, Takeshita S et al. J Bone Miner Res 2014)。なかでも *Cthrc1* は破骨細胞が骨を吸収している最中に分泌され、細胞外カルシウムによってその遺伝子発現が誘導されるという特性を有している。竹下室長らは *Cthrc1* と結合す

る膜タンパク分子を同定し、細胞内シグナル伝達から作用メカニズムの解析も進んでいる。この作用を強めることによって、老化によるカップリング機能の低下を防ぐような手立てが生まれる可能性がある。

骨リモデリングの制御機構として、我々はいち早く骨細胞 *osteocyte* に注目し、石灰化した骨基質に埋め込まれた骨細胞が、骨の表面で骨代謝の実行にあたる破骨細胞や骨芽細胞の活性を制御することによって骨代謝全体を司令・統合するとの仮説を提唱した (Cell Metabolism 2007)。骨細胞の機能不全は加齢のみならずさまざまな病態に関与していることが判明しつつある。我々が作製した腎不全のモデルラットでは、骨細胞数の減少と、その特異的産物である SOST の上昇が観察され、これに炭酸ランタンを投与してリン過剰状態を是正すると、SOST 発現の上昇を緩和するとともに、低下した骨形成を改善し、とくに皮質骨に対して顕著なアナボリック作用を発揮することを見出している。透析の進歩によって腎不全患者の寿命は格段に伸びる一方で、高齢患者での骨折が問題になっているなか、腎不全病態における骨細胞の役割が明らかになることで新たな治療戦略の開発へつながるかもしれない。

麓 敏雄、池田 恭治

慢性腎臓病の骨代謝異常とリン吸着性ランタンの意義

【研究の背景】

慢性腎臓病（CKD）にはミネラル・骨代謝異常が合併するが、透析による延命によって高齢の CKD 患者が増加するにつれて、骨粗鬆症や骨折が大きな問題となっている。

CKD に伴うミネラル・骨異常の中核に高リン血症と FGF-23 の上昇があり、リンを効率良く吸着する炭酸ランタンはこれらの生化学異常の是正に効果があることが知られているが、骨代謝そのものへの影響についてはあまり正確な知見がない。

【目的】

CKD に伴う低回転・低骨形成型骨粗鬆症における炭酸ランタンの効果を動物実験で検証する。

【方法】

SD ラットで、5/6 腎摘（片側腎と対側の 2/3 切除）によって腎機能低下モデルを作製した。炭酸ランタンは食餌中に混合して（2% w/w）8 週間投与した。ミネラル・骨代謝に対する内因性 PTH の変動の影響を除外するために、実験開始前に甲状腺とともに副甲状腺を摘除し、皮下に移植した osmotic minipump から生理量の PTH を外因性に持続的に補充した。血清・尿の生化学検査、マイクロ CT による骨の 3 次元解析（長崎大学 伊東昌子教授に依頼）、骨形態計測の解析を行った。本研究は、バイエル薬品からの受託研究

として行った。

【結果】

炭酸ランタンの投与は、腎機能低下そのものには影響しなかったが、予想どおり尿中へのリンの排泄を顕著に抑制し高リン血症を改善した。腎機能低下に伴う PTH の上昇を抑えることにより、骨代謝回転が抑えられ、腰椎海綿骨における形態計測の結果、骨形成の抑制と骨吸収の低下が確認された。炭酸ランタンの投与により、骨形成が有意に回復し、骨吸収もさらに低下する傾向が認められた。炭酸ランタンのアナボリック作用は皮質骨で顕著であり、皮質骨量も回復した。炭酸ランタンによって、骨細胞の細胞死の抑制と上昇した SOST 遺伝子発現の回復が見られた。

【結論】

腎不全患者に投与される炭酸ランタンは、高リン血症の是正だけでなく、低骨形成型骨粗鬆症にも有効であり、とくに皮質への作用は骨折防止に寄与する可能性がある。

【論文発表】

Fumoto T, Ito M, Ikeda K: Lanthanum carbonate stimulates bone formation in a rat model of renal insufficiency with low bone turnover. **J Bone Miner Metab** 32: 484-493, 2014

松岡和彦、鈴木三恵、竹下 淳

破骨細胞が分泌し骨芽細胞に働くカップリング因子 Cthrc1 の作用機構とシグナル伝達経路の解析

【研究の背景】

骨粗鬆症をターゲットとしたこれまでにない創薬開発を目的として、破骨細胞から骨芽細胞へのカップリング機構に着目し、カップリング因子の同定と機能解明により新規治療薬の開発を目指している。我々が独自に同定したカップリング因子 Cthrc1 の受容体を含めたシグナル伝達機構の解明を試みた。

【目的】

Cthrc1 の細胞膜結合分子を骨芽細胞株の膜タンパクから生化学的に精製し、それを介したシグナル伝達機構を解明することにより創薬開発に応用する。

【方法】

骨芽細胞株 ST2 細胞の膜画分からリコンビナント Cthrc1 に結合するタンパクを分離・精製し、LC-MS/MS を用いて結合分子を同定した。さらに、同定した膜タンパクの機能解析と Cthrc1 刺激によるシグナル伝達機構の解析を行った。

【結果】

Cthrc1 の結合分子として細胞膜 1 回貫通の 5T4/Waif1 を同定した。Waif1 は Cthrc1 と同様に骨と脳に発現特異性を認めた。免疫沈降法により Cthrc1 は Waif1 と直接結合することがわかった。ST2 細胞で shRNA を用いて Waif1

をノックダウン (KD) すると Cthrc1 に対する結合能は低下し、Cthrc1 刺激による ALP 活性上昇も消失した。Cthrc1 は Wnt シグナルを制御することが報告されているので Wnt シグナルとの関連性を調べたところ、Cthrc1 は Waif1 を介して PKC δ と ERK を活性化することで骨芽細胞分化を促進することが明らかとなった。そこで、現在 Waif1 の生体内における機能を解明するために Osx1-cre マウスとの交配により骨芽細胞特異的 cKO マウスを作出し機能解析を行っている。

【結論】Cthrc1 に結合する膜タンパクとして Waif1 を同定し、Waif1 を介して PKC δ と ERK を活性化し骨芽細胞分化が促進されることが明らかになった。

【論文発表】

Matsuoka K, Park K, Ito M, Ikeda K, Takeshita S: Osteoclast-derived complement component 3a stimulates osteoblast differentiation. **J Bone Miner Res** 29: 1522-1530, 2014

Takeshita S, Fumoto T, Naoe Y, Ikeda K: Age-related marrow adipogenesis is linked to increased expression of RANKL. **J Biol Chem** 289: 16699-16710, 2014

腰部脊柱管狭窄症黄色靱帯のプロテオーム解析

腰部脊柱管狭窄症（LSS）は、腰椎脊柱管が狭小化することで馬尾や神経根を圧迫し、間欠跛行などの神経症状を呈する高齢者に好発し、ADL を著しく低下させる運動器疾患である。脊柱管の狭窄要因としては、主に黄色靱帯の変性肥厚（靱帯性）とそれ以外の狭窄要因（非靱帯性：脊柱管周囲の骨の変形など）があるが、十分な分子病態の理解には至っておらず、外科的手術による狭窄圧の除去以外にエビデンスで支持された治療法の選択肢は限られている。そこでLSSの主因の一つであると考えられている黄色靱帯変性肥厚に着目し、疾患に関与する黄色靱帯変性関連分子群の同定と分子レベルでの靱帯変性機構の検討を行った。

当センター倫理・利益相反委員会の承認のもと、LSS手術により除去された黄色靱帯をバイオバンクより提供受け、2-Dimensional Image Converted Analysis of LC-MS（2DICAL）法を用いたプロテオーム解析を行い、疾患群と対照群で増減を示す蛋白質の抽出を行った。対照群としては、腰部椎間板ヘルニア手術により除去される非変性黄色靱帯を用いた。

顕著な増減を示す蛋白質は主に細胞外マトリックス分子であり、弾性線維組織から変性・肥厚への変遷プロファイルを反映するものと考えられた。その中でも疾患群で有意に増加していたFINC、HTRA1、TENAならびに減少していたASPNについてはMRM法により定量解析を行い、臨床画像計測データとの解析から靱帯の厚さと相関していることを見いだした。これらのタンパク質全てがTGF β シグナルと関係があり、TGF β シグナル亢進の分子病態が推測された。HTRA1と、疾患群で低下していたMFAP4について共発現系を用いて相互作用解析を行ったところ、HTRA1の発現量の増加に依存してMFAP4の発現量が減少した。一方、HTRA1の活性中心であるSer328をAlaに置換したプロテアーゼ活性欠損変異体ではMFAP4の減少が見られなかったことから、HTRA1の酵素活性がMFAP4の減少に寄与している可能性が考えられた。疾患群で減少していたFBLN5同様、MFAP4は弾性線維形成に重要な分子であり、HTRA1の発現亢進によるMFAP4やFBLN5の分解が、LSS黄色靱帯における弾性線維の変性に関与する可能性を示唆している。

研究業績（運動器疾患研究部）

I. 論文発表

1. 原著

Fumoto T, Takeshita S, Ito M, Ikeda K:

Physiological functions of osteoblast lineage and T cell-derived RANKL in bone homeostasis.

J Bone Miner Res 29: 830-842, 2014

Fumoto T, Ishii K, Ito M, Berger S, Schutz G, Ikeda K:

Mineralocorticoid receptor function in bone metabolism and its role in glucocorticoid-induced osteopenia.

Biochem Biophys Res Commun 457: 407-412, 2014

Kaneko K, Ito M, Naoe Y, Lacy-Hulbert A, Ikeda K:

Integrin αv in the mechanical response of osteoblast lineage cells.

Biochem Biophys Res Commun 447: 352-357, 2014

Takeshita S, Fumoto T, Naoe Y, Ikeda K:

Age-related marrow adipogenesis is linked to increased expression of RANKL.

J Biol Chem 289: 16699-16710, 2014

Matsuoka K, Park K, Ito M, Ikeda K, Takeshita S:

Osteoclast-derived complement component 3a stimulates osteoblast differentiation. **J Bone Miner Res** 29: 1522-1530, 2014

Fumoto T, Ito M, Ikeda K:

Lanthanum carbonate stimulates bone formation in a rat model of renal insufficiency with low bone turnover.

J Bone Miner Metab 32: 484-493, 2014

2. 総説

池田 恭治 :

骨リモデリングの制御機構

日本臨床増刊号 “最新関節リウマチ学” 27: 112-115, 2014

竹下 淳 :

骨吸収から骨形成へのカップリング

実験医学増刊号“骨代謝制御—そのメカニズムと最新治療” 32: 126-132,
2014

池田 恭治 :

レニン-アルドステロン系と骨代謝

CLINICAL CALCIUM 特集“ホルモン、サイトカインと骨” 24: 83-89,
2014

Ikeda K, Takeshita S:

Factors and mechanisms involved in the coupling from bone resorption to
formation: how osteoclasts talk to osteoblasts.

J Bone Metab 21: 163-167, 2014

3. 著書

4. その他

5. 新聞・報道,等

6.特許申請、取得状況

II. 学会・研究会等発表

1. シンポジウム、特別講演

Ikeda K :

PTHrP to bone cell biology.

AEB Metabolism Symposium 4月4日 Yale University, USA

Ikeda K :

What it takes to be an osteoclast.

Daegu Univ Seminar 5月29日 Daegu, Korea

Ikeda K : How osteoclasts talk to osteoblasts. Second Asia-Pacific Bone and
Mineral Research Meeting 5月31日 Soel, Korea

Takeshita S:

Osteoclast-secreted Coupling Factors.

第 11 回 Bone Biology Forum 8 月 23 日 三島

池田 恭治:

体液調節系と骨代謝

第 2 回臨床骨ネットワーク研究会、2 月 15 日、東京

2. 国際学会発表

Matsuoka K, Ikeda K, Takeshita S:

Osteoclast-derived coupling factor Cthrc1 stimulates osteoblast differentiation through Rac1/PKCδ/ERK.

The 36th Annual Meeting of the American Society for Bone & Mineral Research. 9 月 15 日 Houston, Texas

3. 国内学会発表

4. その他、セミナー等

Ⅲ. 競争的資金獲得実績

1. 厚生労働省

2. 文部科学省

池田恭治（代表） 1,521 万円（総額 1,521 万円）

新学術領域 造血細胞から破骨細胞への分化転換のメカニズム

竹下 淳（代表） 182 万円（総額 182 万円）

挑戦的萌芽研究 破骨細胞の骨基質認識に関わる遺伝子群の網羅的機能解析

3. 財団、その他

竹下 淳（代表） 300 万円（総額 300 万円）

公益財団法人 大幸財団 平成 26 年度自然科学系学術研究助成

新しい骨代謝制御機構解明に関する研究

竹下 淳（代表） 100 万円（総額 100 万円）

公益財団法人 鈴木謙三記念医科学応用研究財団 第 34 回調査研究助成金

新しい骨代謝制御機構の解明と新規骨粗鬆症治療薬開発への応用

松岡和彦（代表） 340 万円（総額 340 万円）

上原記念生命科学財団 平成 26 年度上原記念生命科学財団海外留学助成金
骨肉腫の発症機構の解明