

## 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

麓 敏雄

松岡 和彦

開発研究員

兼子 佳子

特任研究員

印籐 頼子

研究・事務補助員

鈴木 三恵

### (2) 平成 23 年度研究活動の概要

骨の代謝制御においては、骨吸収相から骨形成相への転換のメカニズム、破骨細胞から骨芽細胞への連携シグナルとその作用機序の解明に向けて研究を行っている。破骨細胞分化の各段階における遺伝子発現解析という

手法に加えて、破骨細胞が分泌するタンパク活性をとらえ生化学的な方法で精製する技術も取り入れている。破骨細胞と骨芽細胞の共存培養系における連携シグナル活性の同定から、マウス遺伝子工学による生体レベルでの生理機能にいたるまで総合的に研究進めている。また、骨質の向上に役立つ生理活性の産生あるいは作用を増強するような化合物のスクリーニング系の開発にも取り組んだ。

骨代謝を制御する細胞機能としては、引き続き骨細胞 (osteocyte) に重点を置いて、骨芽細胞から骨細胞への最終分化のメカニズムと骨細胞の機能タンパクの探索に力を入れている。骨細胞機能を *in vitro* で再現する系の開発はほとんど不可能であるため、骨細胞機能を *in vivo* で制御できるようなモデルマウスの開発が目下の重要な課題である。

麓 敏雄、池田 恭治

## RANKL の骨における生理機能と病態への関与

【研究の背景】破骨細胞による骨破壊は、骨粗鬆症、関節リウマチ、歯周病、癌の骨転移などの病態の中核にある。破骨細胞の分化には TNF ファミリーのサイトカインである RANKL が必須であり、RANKL 遺伝子に変異をもつヒトおよびマウスは、成長不全と歯の萌出不全、大理石骨病を呈する。一方、閉経後骨粗鬆症では、RANKL 経路による破骨細胞の活性化により骨吸収の亢進と骨密度の低下が特徴で、RANKL の中和抗体であるデノスマブによる治療が 2008 年に FDA によって承認されている。我が国でも、癌の骨転移と多発性骨髄腫に対して 2012 年の 1 月に承認されており、近く骨粗鬆症にも適応が広がるものと予想される。骨に半永久的に残り、稀ではあるが有害事象が懸念されているビスフォスフォネート薬と異なり、可逆的な骨吸収の制御が可能となる点が RANKL 中和抗体の特徴である。

RANKL の骨における生理機能と病態への関与はよく知られているが、その作用機序については未解明の点が多い。RANKL は、骨代謝だけでなく、リンパ節の形成と免疫機能、授乳にそなえた乳腺の発達や中枢神経での体温調節など多様な機能をもっており、さまざまな細胞によって産生されている。破骨細胞形成に関しては、骨髄のストローマ細胞や骨芽細胞、T 細胞が産生する RANKL の役割が研究されているが、相対的な寄与、とりわけ *in vivo* における重要性と病態への関与につ

いてはあまり明らかになっていない。RANKL の産生細胞とその作用機序の解明は、我が国においても RANKL 中和抗体による治療が普及するにあたって理解すべき重要な点と考えられる。

【目的】そこで、生理的な骨代謝および病態における RANKL の機能を明らかにする目的で、特定の細胞で RANKL の産生を抑制できるマウスモデルを樹立した。

【方法】マウス RANKL 遺伝子のエクソン 3 と 4 をはさむように loxP 配列を挿入し、cre recombinase によって両エクソンを欠損させるような変異マウスを樹立した。CAG-cre、osterix-cre、CD4-cre マウスを交配することにより、全身、骨芽細胞系列、T 細胞でそれぞれ RANKL を欠損するようなマウスを作出した。マイクロ CT による海綿骨および皮質の骨量測定と構造解析（長崎大学 伊東昌子准教授による）、組織形態計測や生化学解析による骨の細胞機能の評価を行った。

【結果】骨芽細胞系列で RANKL を欠失すると、後肢では大理石骨病になり、卵巣摘除による骨量減少は完全に抑制された。一方、T 細胞で RANKL を欠失したマウスは、卵巣摘除に対する反応には影響なかったが、ベースラインの骨量は増加した。

【結論】骨芽細胞および T 細胞が産生する RANKL の生理機能およびエストロゲン欠乏性の骨量減少への関与が明らかになった。

## 渡辺 研

### 骨細胞由来のリン代謝関連分子のリン酸化に関する研究

【研究の背景】骨からのミネラル動員に主たる役割を担っているのは破骨細胞と考えられている。一方で、骨細胞は FGF23, PHEX, DMP1, MEPE といったリン代謝に関連する遺伝子の特異的に発現し、骨細胞がリン代謝に深く関わっていることが示唆されている。リン代謝制御ホルモンである FGF23 以外の遺伝子はリン代謝への関与を説明する詳細な分子機構は不明である。また、FGF23 の発現や分泌など骨細胞における制御も明らかでない。In vitro の骨細胞分化系の確立から、新たな骨細胞発現遺伝子として検出した機能未知の Dmp4/Fam20c が、最近、カドヘリンのリン酸化酵素として同定された FJX1 と一部相同性があることから、分泌蛋白質のリン酸化酵素である可能性が示唆された。SIBLING と総称される DMP1 や MEPE のファミリーの分泌タンパクは高度にリン酸化されていることが知られているが、そのリン酸化については不明である。

【目的】リン代謝が骨細胞機能の主要な機能の一つと位置づけ、DMP1 や MEPE の作用に関する分子機構の解明のため、Dmp4/Fam20c との関連 (SIBLING タンパクのリン酸化) について検討する。

【方法】DMP1, MEPE ならびに Fam20 ファミリーの遺伝子 (Fam20a, Fam20b, Fam20c, Fjx1) を細胞で発現させ、DMP1 ならびに MEPE のリン酸化について検

討を行った。

【結果】Fam20c の発現は、Dmp1 や Mepe 同様、骨細胞への分化が進むにつれて増加した。Fam20 ファミリーを 293 細胞で発現させ、免疫沈降法により単離し、リコンビナントの SIBLING タンパクを反応させたところ、顕著なリン酸化が検出された。293 細胞への共発現系の検討では、Fam20c との共発現系によりリン酸化は亢進するが、Fam20c が存在しなくてもリン酸化されていた。293 細胞は、低レベルの FAM20B を発現するが、FAM20A, FAM20C, FJX1 の発現は見られなかったことから、FAM20C 以外のメカニズムも DMP1 や MEPE などの SIBLING タンパクのリン酸化に関わっていることが示唆された。一方、脱リン酸化酵素による DMP1 や MEPE の脱リン酸化は ASARM と呼ばれるペプチド部分の分離が起こり、タンパクの安定性も低下した。このことから、DMP1 や MEPE のリン酸化が、タンパク質の安定性に関与している可能性が示唆された。最近、Fam20c の欠損マウスの表現型が発表され、Dmp1 欠損マウスと同様、FGF23 レベルの亢進と低リン血症様表現型となることが示された。

【結論】FAM20C はリン代謝に関わる DMP1 や MEPE のリン酸化酵素である可能性が示された。

竹下 淳、松岡和彦、鈴木三恵

## カップリング因子 Cthrc1 の破骨細胞における遺伝子発現制御機構の 解明と病態との関連性

【研究の背景】骨粗鬆症をターゲットとした創薬をめざして、活性化破骨細胞が特異的に分泌する遺伝子を探索し、骨形成に対して促進的に働く骨カップリング因子 Cthrc1 を同定することに成功した。マウスでカップリング活性を検出する新しいアッセイ系を確立し、Cthrc1 コンディショナル KO マウスを解析することで Cthrc1 がマウスの生体内でカップリング因子として機能することを実証した。そこで、破骨細胞における Cthrc1 の遺伝子発現制御メカニズムの解析を行った。

【目的】Cthrc1 の遺伝子発現制御機構を解明し、病態との関連性を調べる。

【方法】破骨細胞を種々の条件で培養し、Cthrc1 の発現が上昇する因子を見出した。マウスに破骨細胞分化因子である RANKL、骨吸収促進因子 PTH、骨吸収抑制薬アレンドロネートを投与した時の骨での Cthrc1 の発現を、加齢変化とともに解析した。

【結果】破骨細胞をハイドロキシアパタイト (HA) 上で培養すると象牙片上で培養するよりさらに3倍以上発現

上昇することが分かった。そこで、HAの主成分であるカルシウムを添加して破骨細胞を培養すると発現上昇することを突き止めた。また、弱いながらマグネシウムやリン酸にも発現上昇する活性があることが分かった。

HA 上での Cthrc1 の発現上昇は、アレンドロネート、プロトンポンプを抑制するバフィロマイシンや NEN、カルシトニンの全てで抑制されたことから Cthrc1 の発現は骨吸収により制御されることが明らかとなった。さらに、マウスに RANKL を投与すると骨での Cthrc1 の発現は上昇し、PTH でも上昇し、アレンドロネート投与で抑制することが明らかとなった。卵巣摘除によっても Cthrc1 の発現は上昇した。一方、マウスの加齢に伴う変化を見ると、2ヶ月齢までは発現が高く、その後徐々に発現低下することが分かった。

【結論】骨での Cthrc1 の発現は、骨 turnover の変化とよく一致することが明らかとなった。今後、Cthrc1 遺伝子の発現制御メカニズムを分子レベルで解明する予定である。

## 研究業績（運動器疾患研究部）

### I. 論文発表

#### 1. 原著

Kaneko K, Ito M, Fumoto T, Fukuhara R, Ishida J, Fukamizu A, Ikeda K: Physiological function of the angiotensin AT1a receptor in bone remodeling. J Bone Miner Res 26: 2959-2966, 2011

Watanabe K, Oue Y, Miyamoto Y, Matsuura M, Mizuno Y, Ikegawa S: Identification of a quantitative trait locus for spontaneous osteoarthritis in *STR/ort* mice. J. Orthop. Res. 30, 15-20, 2012.

Mitsutake S, Zama K, Yokota H, Yoshida T, Tanaka M, Mitsui M, Ikawa M, Okabe M, Tanaka Y, Yamashita T, Takemoto H, Okazaki T, Watanabe K, Igarashi Y: Dynamic modification of sphingomyelin in lipid microdomains controls development of obesity, fatty liver, and type 2 diabetes. J. Biol. Chem. 286, 28544-28555, 2011.

Shakor AB, Taniguchi M, Kitatani K, Hashimoto M, Asano S, Hayashi A, Nomura K, Bielawski J, Bielawska A, Watanabe K, Kobayashi T, Igarashi Y, Umehara H, Takeya H, & Okazaki T: SMS1-generated sphingomyelin plays an important role in transferring trafficking and cell proliferation. J. Biol. Chem. 286, 36053-62, 2011.

Mouri A, Sasaki A, Watanabe K, Sogawa C, Kitayama S, Mamiya T, Miyamoto Y, Yamada K, Noda Y, & Nabeshima T: MAGE-D1 regulates expression of depression-like behavior through serotonin transporter ubiquitylation. J. Neurosci. 32, 4562-4582, 2012.

#### 2. 総説

池田恭治：Sclerostin と骨形成、内分泌・糖尿病・代謝内科 32: 301-304, 2011

池田恭治：骨吸収・骨形成とミトコンドリア機能、日本臨床 特集/骨粗鬆症 69: 1203-1208, 2011

池田恭治（運動器疾患研究部）：目で見える Bone Biology “メカニカルストレスと骨”、骨粗鬆症治療 10: 1-4, 2011

池田恭治（運動器疾患研究部）：破骨細胞分化のメカニズム、“運動器疾患の予防と治療” p 127-132, 長寿科学振興財団 2011

#### 4. その他

Watanabe K: Classical models of senile osteoporosis. Duque G, Watanabe K. Eds. Osteoporosis Research: Animal Models. Springer-Verlag London Ltd., 2011

#### 5. 新聞・報道,等

なし

## 6.特許申請、取得状況

なし

## II. 学会・研究会等発表

### 1. シンポジウム、特別講演

池田 恭治：Between bone resorption and formation 第8回 Bone Biology Forum 8月19日 三島

池田恭治：運動器の加齢と対策 健康医療介護ビジネス研究委員会（三井業際研究所）、11月18日、名古屋市

竹下 淳：骨代謝の基礎と最近のトピックス、創薬生命科学特別講義 II、6月2日、名古屋市立大学

### 2. 国際学会発表

Takeshita S: An osteoclast-derived coupling factor. 2nd Asia-Pacific Osteoporosis and Bone Meeting. 9月7日 Gold Coast, Australia

Watanabe K, Ikeda K: An In Vitro Model for Osteocyte Differentiation. The 33rd Annual Meeting of the American Society for Bone & Mineral Research. 9月18日 San Diego, USA

Watanabe K, Sakai Y, Niida S, Harada A: Pax9, a transcription factor that is expressed in ligament cells derived from ligamentum flavum of patients with lumbar spinal canal stenosis. The 33rd Annual Meeting of the American Society for Bone & Mineral Research. 9月19日 San Diego, USA

### 3. 国内学会発表

兼子佳子、伊東昌子、石田純治、深水昭吉、池田恭治：アンジオテンシン受容体の骨代謝における生理機能、第84回日本生化学会大会 9月24日 横浜

## III. 公的研究費

### 1. 厚生労働省

渡邊 研（代表）393.8万円（総額393.8万円）

創薬基盤推進研究事業 H23 長寿科学研究者支援事業  
歯周病治療薬と歯槽骨再生方法の開発

## 2. 文部科学省

池田 恭治（代表） 2,106 万円（総額 2,106 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

池田 恭治（代表） 624 万円（総額 624 万円）

基盤研究(B)

骨代謝におけるRANKL遺伝子の機能解明

渡邊 研（分担） 130万円

基盤研究(A)

スフィンゴリエリン K0 マウスを用いた自己免疫疾患の発症機序の解明と免疫抑制剤の開発

竹下 淳（代表） 169 万円（総額 169 万円）

基盤研究(C)

骨吸収特異的転写制御機構の解明

## 3. 財団、その他

池田 恭治（代表） 112 万円（総額 112 万円）

バイエル薬品株式会社受託研究

腎不全に伴う低代謝回転型の骨異常モデル動物の作製

池田 恭治（代表） 726 万円（総額 726 万円）

バイエル薬品株式会社受託研究

腎機能低下に伴う骨ミネラル異常モデルラットにおける炭酸ランタンの効果

渡邊 研（代表） 250 万円（総額 250 万円）

長寿科学振興財団 H23 長寿科学研究者支援事業

変形性膝関節症関連遺伝子の同定

竹下 淳（代表） 250 万円（総額 250 万円）

長寿科学振興財団 H23 長寿科学研究者支援事業

骨再生を促進する因子の同定