

# 骨 Update

## 2022年春号 (第2号)

### 骨・軟骨・筋科学

#### REVIEW / レビュー

##### 骨系統疾患の現状と展望

大藪 恵一 (大阪大学大学院医学系研究科 小児科学)

##### 骨免疫学の最前線

橋本 恭子, 高柳 広 (東京大学大学院医学系研究科 免疫学)

#### TOPICS / トピックス

##### 破骨細胞制御機構に関する新知見

塚崎 雅之 (東京大学大学院医学系研究科 免疫学)

##### 後天性低カルシウム尿性高カルシウム血症の解析から明らかになった Gタンパク質共役受容体 (GPCR) の新たなシグナル調節機構

槇田 紀子 (東京大学医学部附属病院 腎臓・内分泌内科)

安藤 隆雄 (長崎大学病院 内分泌代謝内科) / 飯利 太郎 (聖マリアンナ医科大学 薬理学)

#### TECHNICAL NOTE / テクニカルノート

##### 遺伝統計学で骨代謝を理解する - 応用編 -

友藤 嘉彦, 岡田 随象 (大阪大学大学院医学系研究科 遺伝統計学)

#### BONE SUMMIT / 骨サミット

##### 骨密度以外の骨強度因子「骨質 New Era」

伊豆 弥生 (岡山理科大学獣医学部獣医学科 実験動物学講座)

上岡 寛 (岡山大学学術研究院医歯薬学域 歯科矯正学分野)

斎藤 充 (東京慈恵会医科大学整形外科学講座)

中野 貴由 (大阪大学大学院工学研究科マテリアル生産科学専攻 生体材料学領域)



骨の謎に迫る  
骨の病気に挑む

日本骨代謝学会

# 骨・軟骨・筋科学 Update

2022年  
春号(第2号)

## CONTENTS

### REVIEW レビュー 03

骨系統疾患の現状と展望 .....	3
骨免疫学の最前線 .....	7

### TOPICS トピックス 13

破骨細胞制御機構に関する新知見 .....	13
後天性低カルシウム尿性高カルシウム血症の解析から 明らかになった G タンパク質共役受容体 (GPCR) の 新たなシグナル調節機構 .....	16

### TECHNICAL NOTE テクニカルノート 19

遺伝統計学で骨代謝を理解する —応用編— .....	19
----------------------------	----

### BONE SUMMIT 骨サミット 22

骨密度以外の骨強度因子「骨質 New Era」 .....	22
オーバービュー .....	22
1. 生理的な成長と老化に伴う変化 .....	23
2. 骨質の制御因子は骨リモデリングだけなのか? .....	27
3. 骨質制御因子から見た治療の可能性とは .....	31
4. 今後の研究の抱負・展望 .....	31

# 骨系統疾患の現状と展望

## Author



大藪 恵一

大阪大学大学院医学系研究科 小児科学

昭和57年 大阪大学医学部卒業。卒業後、大阪大学小児科に入局して研修。骨カルシウム代謝に興味を持ち、平成元年 Baylor College of MedicineのPike教授の元で、ビタミンD受容体の作用機構について研究する。帰国後、大阪府立母子保健総合医療センター研究所環境影響部門 部長に就任。平成14年 大阪大学大学院小児科学教授に就任。小児骨疾患のtranslational researchに力を注いでいる。

窪田 拓生

大阪大学大学院医学系研究科 小児科学

小児科専門医・指導医、日本内分泌学会 内分泌代謝科(小児科) 専門医・指導医。専門分野：小児骨代謝学、小児内分泌学、小児腎臓病学。

大幡 泰久

大阪大学大学院医学系研究科 小児科学

小児科専門医・指導医、日本内分泌学会 内分泌代謝科(小児科) 専門医・指導医。専門分野：小児骨代謝・内分泌。

木村 武司

大阪大学大学院医学系研究科 小児科学

小児科専門医。専門分野：小児栄養消化器疾患、小児内視鏡検査、小児肝疾患、小児内分泌疾患。

## 要旨

最近、骨系統疾患に対する特異的治療法の開発が活発に行われている。代表的疾患である軟骨無形成症に対して、CNPアナログ製剤が欧州、北米において2021年承認された。CNPが成長に関わることは、ノックアウトマウスや遺伝性疾患により証明されており、その応用として軟骨無形成症への治療適用となった。また、FGF2を選択的に阻害する核酸薬アプタマーの開発に関わり、軟骨無形成症の治療薬としての評価実験の結果を昨年報告した。この他、FGFRインヒビター、スタチン、メクロジン、可溶性受容体なども開発されてきている。

## Keywords

- Achondroplasia (軟骨無形成症)
- FGFR3 (線維芽細胞増殖因子受容体3型)
- CNP (C型利尿ペプチド)
- RNA aptamer (RNAアプタマー)
- drug development (薬剤開発)

## 1 はじめに

骨系統疾患は、形態の異常や強度の異常などの骨の症状を主体とする疾患の総称で、全身性疾患の場合が多いが、局所的な疾患も含める。具体的には、骨量の異常と内軟骨性骨化の異常に大別される。最近の命名法では、461の疾患が20の疾患グループに分類される。この論文によると、437の責任遺伝子が同定されている<sup>1)</sup>。個々の疾患は、稀であることが多いが、骨系統疾患全体では10,000人に3人程度の発症率と報告されている<sup>2)</sup>。骨系統疾患に関しては、従来、整形外科的な治療が主体であったが、治療薬の開発が活発に行われている分野である。紙面の都合により、代表的な疾患の軟骨無形成症について概説する。

## 2 軟骨無形成症

軟骨無形成症 (achondroplasia: ACH) は近位肢節に優位な四肢短縮 (rhizomelia) と低身長を呈する骨系統疾患である<sup>3)</sup>。その発症頻度は10万人当たり4.6人とされており<sup>4)</sup>、先天性骨系統疾患の中では頻度が高く、四肢短縮型低身長を呈する代表的な疾患である。遺伝形式は常染色体顕性であるが、その約80%は新規突然変異によるものとされ、孤発例である<sup>3)</sup>。ACHでは内軟骨骨化が障害され、特徴的な顔貌、特異的な骨X線所見、大後頭孔狭窄、脳室拡大、脊柱管狭窄などの症状を呈する。筆者は長年、ACHの診療、研究に従事しており、ACHに関する日本の診療ガイドラインの策定にも携わった<sup>5)</sup>。さらに、国際的な専門家による会議にも

加わり、本症の医療的管理に関する総説を発表した<sup>6,7)</sup>。

ACHの多くは散発性であるが、家族性の発症もあり、家系のlinkage解析から、遺伝子座が決められた。ACHの責任遺伝子がFGFR3 (fibroblast growth factor receptor type 3) であることは1994年に報告された<sup>8,9)</sup>。Nature誌とCell誌に同時に発表されたことから見ても、インパクトの大きさが理解される。発見当時、FGFR3が軟骨の分化増殖に関与することは予想されておらず、発表後、FGFR3の生物学的な機能の解析が盛んに行われ、内軟骨性骨化の分子的理解が飛躍的に進んだ。

FGFR3は1回膜貫通型の受容体で、細胞外に免疫グロブリン構造、細胞内にチロシンキナーゼ (TK) 構造を持つ。FGFR3は4種類あるFGFRのうちの一つのタイプである。遺伝子座は4p16.3で、16.5kbの大きさがあり、19のエクソンからなる<sup>10)</sup>。ACHに見られる病的バリエーションは、非常に均質で380番目のグリシンがアルギニンに変換される。野生型受容体では、リガンドであるFGFに結合して、受容体のTK (tyrosine kinase) が活性化するが、ACHで見られる変異型受容体は恒常的に活性化している。FGFR3はリガンドが結合すると自己リン酸化し、STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1) の活性化を介してp21を活性化することや、FRS2 $\alpha$ からRAS/RAF/MEK/MAPK経路を通じてSOX9を活性化することで、軟骨細胞増殖・分化を抑制する。

### 3 軟骨無形成症の治療

我が国ではACHに対する成長ホルモン補充療法が1997年より保険収載されたことから、低身長に対する治療として広く行われている。成長ホルモン治療の成人身長での効果は、十分な治療効果があるとは言い難い。外科的な四肢延長術も行われているが、長期入院や合併症、術後の手術痕等のデメリットを伴う。

### 4 分子標的治療薬の開発

C型ナトリウム利尿ペプチド (CNP, C-type natriuretic peptide) はナトリウム利尿ペプチドファミリーに属し、内軟骨性骨化に重要な因子であることが2000年代に入り証明され

た<sup>11)</sup>。CNPはナトリウム利尿ペプチド受容体B (Natriuretic Peptide Receptor B; NPRB) と結合し、グアニル酸シクラーゼ領域が活性化されcGMPを産生し、cGMP依存性protein kinase (PKGII) を介してFGFR3シグナル系のMAP kinase伝達を抑制することにより軟骨の分化・増殖を調整している。低身長を呈するMaroteaux型のacromesomelic dysplasiaは、NPRBの機能喪失型変異である。一方、筆者らは、NPRBの機能獲得型変異による高身長家系を見出し、その後の症例と合わせて、三浦型Epiphyseal chondrodysplasiaと命名された<sup>12)</sup>。CNPは半減期が短いので、それを改善したアナログ製剤 (vosoritide) が開発され、治験成績も良好で、小児の本症に対する治療薬として2021年欧州および北米で承認された<sup>13,14)</sup>。

また、分子標的薬としては、可溶性のFGFR3、FGFRのTK阻害薬、スタチン、メクロジンの有効性も報告されている<sup>15,16)</sup>。

## 5 核酸薬アプタマーについて

アプタマーは、標的物質と特異的に結合する能力を持った合成核酸分子で、1990年に初めて報告された。3次元構造を持った核酸分子が標的の形状に合わせて物理的に結合することで薬効を発揮し、抗体医薬と同じ分子標的薬に分類される<sup>17)</sup>。2004年に滲出型加齢性黄斑変性症の治療薬として抗VEGFアプタマー (pegaptanib sodium) がアメリカで承認され、実臨床での有用性が認められている。

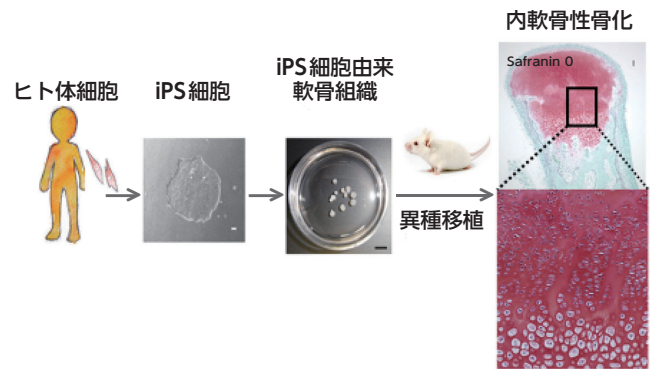
RBM-007はFGF2に特異的に結合するRNAアプタマーである。2016年に株式会社リボミックによって開発され、これまでに加齢性黄斑変性症や癌性疼痛に対する有効性が報告されている<sup>18)</sup>。RBM-007は36ヌクレオチドのRNAで構成される。5'末端に40kDaのPEGが付加されているため、マウスに経静脈投与した際の半減期は約29時間であり生体内で安定した動態を示す。

RBM-007はヒト・マウス・ラットのFGF2に高い特異性・親和性を持って結合できる。FGF2とFGFR1～4全ての結合を阻害することができる一方、他のFGFファミリーには影響を及ぼさない。

FGFR3のリガンドとしてはマウスでは軟骨膜から分泌され

るFGF9, 18が重要な役割を果たす。一方, ヒトの胎児から得られた成長板軟骨を用いた研究では, FGF1, 2, 17, 19が主に発現していること, 軟骨膜でのFGF18は認められないことが報告されている<sup>19)</sup>。

筆者らは, RBM-007の薬理試験として, モデルマウスを用いた投与実験と疾患特異的人工多能性細胞(ACH-iPS細胞)を用いた実験系で評価を行った(図)。ACH-iPS細胞は既報の軟骨分化誘導法では正常な軟骨組織を形成できないことが示されている<sup>15)</sup>。培養液中にRBM-007を添加し分化誘導を行った所, 軟骨細胞への分化が回復軟骨組織を形成することが出来た。次に, 得られたiPS細胞由来軟骨組織を免疫不全マウスの皮下に移植し, 内軟骨性骨化を観察する異種移植モデルでの効果を検討した<sup>20)</sup>。その結果, vehicle群と比較してRBM-007投与群では肥大軟骨細胞径が有意に増大していることが示された。モデルマウスとして, 軟骨特異的に変異FGFR3を発現させてACHの病態を再現したACHモデルマウスと, 全身性にヒトFGF2を発現させることで成長障害を来すFGF2過剰発現マウスを用いた。それぞれに生後3日から3週間, RBM-007を2日間隔/4日間隔に皮下投与を行い評価した。ACHモデルマウスではRBM-007投与によって体重・体長が増加し, 大腿骨・脛骨長の伸長, 組織学的にも成長板軟骨の形態異常の回復が認められた<sup>19)</sup>。FGF2は多くの組織で発現し, 幅広い機能を担っている。代表的なものとして創傷治癒を促進する効果が知られており,



#### 図 iPS細胞を用いた軟骨分化誘導と内軟骨性骨化モデル

健康ないし罹患者より体細胞を採取し, 山中因子を誘導して, iPS細胞を作成する(罹患者より得られた場合は疾患特異的iPS細胞と呼ぶ)。細胞培養系を用いて軟骨細胞に誘導し, 得られた軟骨組織を免疫不全マウスに皮下移植し, 得られた長管骨様組織を解析して, 内軟骨性骨化を評価する実験系である。

実際にFGF2が褥瘡・皮膚潰瘍治療薬として用いられている。RBM-007を全身投与した場合に, 副作用として創傷治癒の遅延等が生じないかどうかについても, 今後の検討課題である。

## 6 おわりに

ACHの治療薬の開発が複数行われているが, 中でも, RBM-007は, 日本発の新たな核酸医薬としてACH治療の新たな選択肢となることが期待されている。

### 参考文献

- Mortier GR, Cohn DH, Cormier-Daire V, et al. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2019 revision. *Am J Med Genet A*. 2019; 179 (12): 2393-2419.
- Stevenson DA, Carey JC, Byrne JL, et al. Analysis of skeletal dysplasias in the Utha population. *Am J Med Genet A*. 2012; 158A (5): 1046-1054.
- Ornitz DM, Legeai-Mallet L. Achondroplasia: Development, pathogenesis, and therapy. *Dev Dyn*. 2017; 246(4):291-309.
- Foreman PK, et al. Birth prevalence of achondroplasia: A systematic literature review and meta-analysis. *Am J Med Genet A*. 2020; 182 (10): 2297-2316.
- Kubota T, Adachi M, Kitaoka T, et al. 軟骨無形成症診療ガイドライン. 2019; [http://jspe.umin.jp/medical/files/guide2\\_20190111.pdf](http://jspe.umin.jp/medical/files/guide2_20190111.pdf)
- Hoover-Fong J, Cheung MS, Fano V, et al. Lifetime impact of achondroplasia: Current evidence and perspectives on the natural history. *Bone*. 2021; 146: 115872.
- Savarirayan R, Ireland P, Irving M, et al. International consensus statement on diagnosis, multidisciplinary management, and life-long care for individuals with achondroplasia. *Nature Rev Endocrinol*. 2021; doi: 10.1038/s41574-021-00595-x.
- Rousseau F, Bonaventure J, Legeai-Mallet L, et al. Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature*. 1994; 371 (6494): 252-254.
- Shiang R, Thompson LM, Zhu Ya-Zhen, et al. Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell*. 1994; 78 (2): 335-342.



10. Perez-Castro AV, Wilson J, Altherr MR. Genomic organization of the human fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) gene and comparative sequence analysis with the mouse *Fgr3* gene. *Genomics*. 1997; 41: 10-16.
11. Yasoda A, Komatsu Y, Chusho H, et al. Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nat Med*. 2004; 10 (1): 80-86.
12. Miura K, Namba N, Fujiwara M, et al. An overgrowth disorder associated with excessive production of cGMP due to a gain-of-function mutation of the natriuretic peptide receptor 2 gene. *PLoS One*. 2012; 7 (8): e42180.
13. Savarirayan R, Irving M, Bacino CA, et al. C-type natriuretic peptide analogue therapy in children with achondroplasia. *N Engl J Med*. 2019; 381(1): 25-35.
14. Savarirayan R, Tofts L, Irving M, et al. Once-daily, subcutaneous vosoritide therapy in children with achondroplasia: a randomised, double-blind, phase 3, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet*. 2020; 396 (10252): 684-692.
15. Yamashita A, et al. Statin treatment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes. *Nature*. 2014; 513 (7519): 507-511.
16. Matsushita M, et al. Meclozine facilitates proliferation and differentiation of chondrocytes by attenuating abnormally activated FGFR3 signaling in achondroplasia. *PLoS One*. 2013; 8 (12): e81569.
17. 望月昭典. 核酸アプタマーを用いた創薬および医療応用. 血栓止血誌. 2020年31巻1号 p.66-70.
18. Jin L, Nonaka Y, Miyakawa S, et al. Dual therapeutic action of a neutralizing anti-FGF2 aptamer in bone disease and bone cancer pain. *Mol Ther*. 2016; 24 (11): 1974-1986.
19. Kimura T, Bosakova M, Nonaka Y, et al. An RNA aptamer restores defective bone growth in FGFR3-related skeletal dysplasia in mice. *Sci Transl Med*. 2021; 13 (592): eaba4226.
20. Kimura T, Ozaki T, Fujita K, et al. Proposal of patient-specific growth plate cartilage xenograft model for FGFR3 chondrodysplasia. *Osteoarthritis Cartilage*. 2018; 26 (11): 1551-1561.

# 骨免疫学の最前線

## Author



橋本 恭子

東京大学大学院医学系研究科 免疫学

2018年に東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科細胞生理学分野(竹田秀教授/北川昌伸教授)・MD-PhDコース修了。医学博士。2020年に同大学医学部医学科卒業。同年より東京大学大学院医学系研究科免疫学教室・日本学術振興会特別研究員。

## Author



高柳 広

東京大学大学院医学系研究科 免疫学

1990年に東京大学医学部卒業。2001年に同大学大学院博士課程修了。医学博士。東京医科歯科大学教授などを経て、2012年より東京大学大学院医学系研究科免疫学教室・教授。

## 要旨

関節リウマチ骨破壊の研究から端を発した骨と免疫の相互作用に関する研究は、「骨免疫学」という新規学際領域を確立し大きな発展を遂げてきた。骨は免疫系の維持に重要な役割を果たしており、自己免疫疾患に限らず感染症やがんにおいても骨免疫学的視点が重要になってきている。最新の解析技術により今までよりも高い解像度で病態を解析することが可能になり、骨免疫学の裾野はさらに広がりつつある。

## Keywords

- RANKL
- 炎症性骨破壊
- 関節リウマチ
- 骨転移

## 1 はじめに

2000年、T細胞による破骨細胞分化制御機構を解明した論文<sup>1)</sup>に対する論評において「Osteoimmunology (骨免疫学)」という言葉が初めて用いられたのを契機として、骨と免疫の相互作用が注目を集めるようになった。骨は生体の支持や電解質調節を司るだけでなく、造血の場として免疫系の調節にも必須の臓器である。骨恒常性は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスが保たれることで維持されているが、関節リウマチなどの自己免疫疾患、感染症やがんの骨転移では骨恒常性が破綻し、骨破壊や骨量減少が引き起こされる。本稿では、骨免疫学と共に歩んできた関節リウマチ研究について振り返ると共に、最新の骨免疫学的知見を概説する。

## 2 関節リウマチと炎症性骨破壊

関節リウマチは最も罹患者数の多い自己免疫疾患であり、進行すると重篤な骨破壊を呈する。炎症滑膜には滑膜線維芽細胞の他に活性化T細胞や形質細胞、マクロファージなどが集積しているが、90年代後半、滑膜線維芽細胞がreceptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) を介し

て破骨細胞を活性化するという「滑膜線維芽細胞RANKL仮説」と活性化T細胞のRANKLが重要とする「T細胞RANKL仮説」が議論されていた<sup>2)</sup>。その後、ほとんどのT細胞はIFN- $\gamma$ やIL-4, IL-10などの破骨細胞分化抑制因子を放出する一方、唯一Th17細胞だけが主に間葉系細胞にRANKLを誘導し、破骨細胞分化を誘導できるサブセットであることが判明した。Th17細胞はIL-17を介してマクロファージなどの自然免疫系細胞を活性化し、炎症性サイトカインの分泌を促すことにより相乗的に破骨細胞分化を促進しており、炎症性骨破壊の司令塔を担う<sup>2)</sup>。また、特にFoxp3陽性細胞が分化転換したexFoxp3Th17細胞は、強力に骨破壊を誘導するT細胞であることも示された<sup>2)</sup>。最終的に、滑膜線維芽細胞特異的RANKL欠損マウスの解析から、滑膜線維芽細胞のRANKLが炎症性骨破壊の主要な誘導因子であることが証明された<sup>2, 3)</sup> (図1)。近年、滑膜線維芽細胞のシングルセル解析が行われ、IL-6などの炎症性サイトカインを多く分泌するサブセットやRANKLを発現し骨破壊を誘導するサブセットなど、非常にheterogeneityに富んだ細胞集団であることがわかった<sup>4)</sup>。また、Th17細胞は歯周炎に伴う歯槽骨破壊も誘導しており、Th17細胞が炎症性骨破壊を起こす疾患における共通の治療標的である可能性が示唆されている<sup>5)</sup>。

B細胞を標的とした抗CD20抗体は炎症抑制だけでなく骨

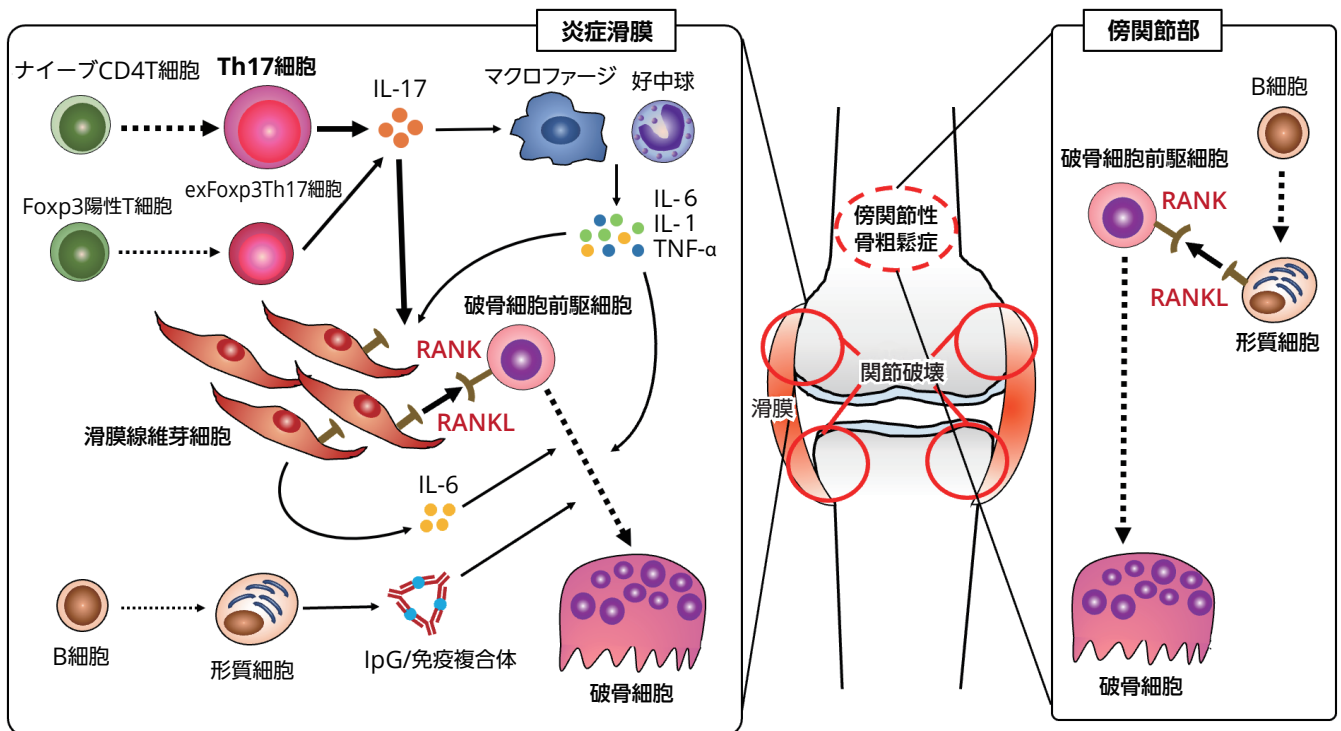


図1 関節リウマチ骨破壊のメカニズム

関節滑膜内に浸潤したTh17細胞及びexFoxp3Th17細胞は、IL-17産生を介して滑膜線維芽細胞のRANKL発現を誘導し、破骨細胞分化を促進し骨破壊を引き起こす。同時に、IL-17はマクロファージや好中球などの自然免疫系の細胞を活性化し、炎症性サイトカイン（IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$ ）の産生を促す。これらの炎症性サイトカインは、滑膜線

維芽細胞のRANKL発現を上昇させるだけでなく相乗的に破骨細胞分化を促進する。自己抗体や免疫複合体は、自然免疫系の細胞に作用し炎症を惹起するのみならず、直接的に破骨細胞分化を促進する。炎症関節近傍では形質細胞が増加し、形質細胞由来のRANKLにより破骨細胞分化が促進され、傍関節性骨粗鬆症を引き起こす。

破壊抑制効果を示すことが海外の治験で報告され、B細胞を介した骨破壊メカニズムが注目されている。IgGを含む免疫複合体は破骨細胞前駆細胞のFc受容体を介して破骨細胞分化を促進する<sup>6)</sup>。また、関節リウマチでは炎症部の関節破壊だけでなく、炎症関節の近傍や全身性の骨粗鬆症が起こるが、関節炎の炎症が起きる前から炎症関節近傍の形質細胞が増加し、骨量が減少する。B細胞特異的RANKL欠損マウスの解析により、関節近傍の骨量減少には形質細胞由来のRANKLが重要であることも明らかになった<sup>3)</sup> (図1)。

### 3 破骨細胞分化機構の最新知見

破骨細胞前駆細胞がRANKLの刺激を受けると、受容体RANKの下流でNF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B) やMAPKの活性化により破骨細胞分化のマスター転写因子NFATc1 (nuclear factor of activated T cell c1) が発現し、形態変化、細胞融合、骨吸収関連遺伝子群の発現が誘導される。ITAM (immuno-receptor tyrosine-based activation

moitif) 配列を持つアダプター分子DAP12 (DNAX-activating protein 12) とFcR $\gamma$ に会合する免疫グロブリン様受容体からのシグナルは、RANKシグナルに対する共刺激として働き、カルシウムシグナルを惹起してNFATc1を活性化する<sup>2)</sup>。RANKLをはじめ、NFATc1, ITAM因子などは免疫細胞での機能が先に知られていたシグナル伝達因子であり、それまで異なるカテゴリーと考えられていた破骨細胞と免疫細胞が驚くほど共通していることがわかった。他にも、神経ガイダンス因子として発見されたSemaphorin分子のうち、Sema6Dが破骨細胞分化を促進すること、Sema3Aが破骨細胞分化抑制と共に骨芽細胞分化を促進し、エストロゲンによる骨恒常性維持に寄与していることも明らかになった<sup>7)</sup> (図2)。

近年、最新技術を用いた破骨細胞分化メカニズムの解明が次々と報告されている。本研究室からは、*in vitro*培養系のシングルセルRNA-seq解析により、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への多段階的な分化経路が示され、転写調節因子Cited2が破骨前駆細胞から前破骨細胞への分化に重



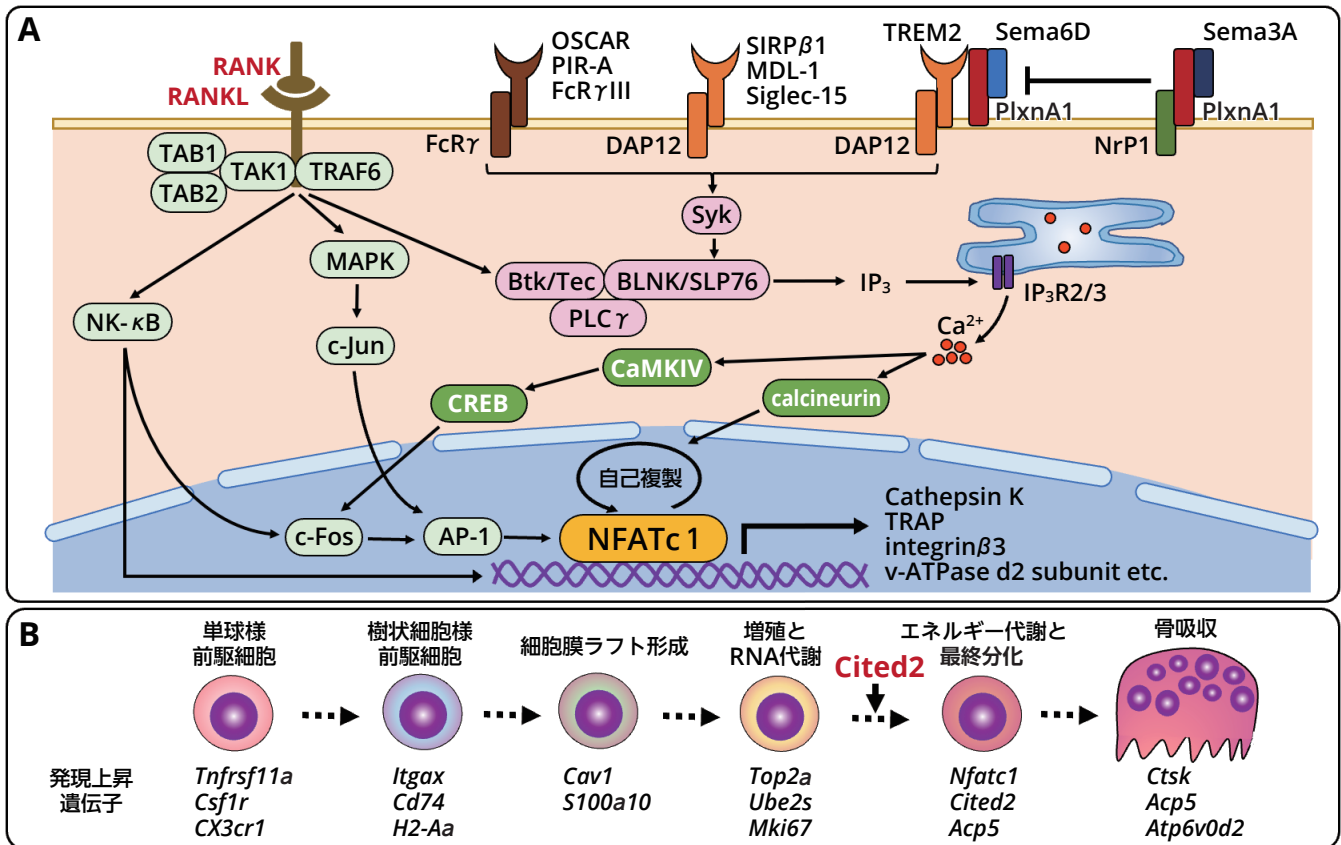


図2 RANKL刺激による破骨細胞分化経路

A. RANKL刺激により、受容体RANKの下流でTRAF6を介してNF- $\kappa$ BやMAPKが活性化され、マスター転写因子NFATc1の発現が誘導される。NFATc1はCathepsin KやTRAPなどの破骨細胞分化に特徴的な遺伝子群の発現を制御している。また、RANKシグナルによりチロシンキナーゼBtkおよびTecが活性化され、BLNKおよびSLP76と会合してホスホリパーゼC $\gamma$ のリン酸化が起こる。その結果としてカルシウムシグナルが惹起され、NFATc1の自己複製や転写活性が促進される。ITAM配列を持つアダプタータンパク質FcR $\gamma$ とDAP12と会合する免疫グロブリン様受容体 (OSCAR, PIR-A, SIRP  $\beta$ 1, TREM2など) からのシグナルは、RANKの共刺激受容体として機能し、カルシ

ウムシグナルを誘導する。セマフォリン6DはプレキシンA1-TREM2-DAP12複合体を介して破骨細胞分化を促進する。一方、セマフォリン3AはプレキシンA1-TREM2-DAP12複合体の形成を阻害し、破骨細胞分化を抑制する。

B. 機械学習アルゴリズムを用いた解析により、RANKL刺激下における破骨細胞前駆細胞から成熟破骨細胞への分化経路が予測された。Tnfrsf11a (RANK), Csf1r (M-CSFR) 陽性の単球様前駆細胞から、Ctsk (Cathepsin K), Acp5 (TRAP) 陽性の成熟破骨細胞まで多段階的な細胞分化をすることが示された。破骨細胞前駆細胞から前破骨細胞への分化を制御する因子として、新たにCited2が同定された。

要であることを報告した<sup>8)</sup> (図2)。破骨細胞前駆細胞の起源に関しては、fate-mappingマウスの解析から、胎生期ではerythro-myeloid progenitorに由来し、成体では骨髓造血幹細胞に由来することがわかった<sup>9)</sup>。また、炎症滑膜における破骨前駆細胞はCX3CR1陽性循環骨髓系前駆細胞に由来し、FoxM1 (forkhead box M1) によって分化が誘導される新たなマクロファージサブセット (関節炎関連破骨細胞形成性マクロファージ; AtoMs) であることも示された<sup>10)</sup>。さらに最近、生体イメージングを駆使した解析により、RANKL刺激下において破骨細胞が小さな娘細胞 (osteomorph) を経由して分裂と融合を繰り返し、リサイクルされているという報告もなされている<sup>11)</sup>。最新技術を駆使した破骨細胞分化機構の解

明は非常に目覚ましく、炎症性骨破壊の病態解明に大きく寄与している。

## 4 骨構成細胞による免疫制御

2003年に「骨芽細胞の数を増やすと造血幹細胞も増える」ことがNature誌に報告されたが、造血幹細胞維持に必要なstem cell factor (SCF), CXC chemokine ligand (CXCL) 12などの因子の骨芽細胞特異的欠損マウスでは、造血幹細胞数に大きな変化がなかった。それに対し、骨髓間葉系幹細胞であるLepR陽性CXCL12陽性細胞 (CAR細胞) や血管内皮細胞特異的に、SCFやCXCL12

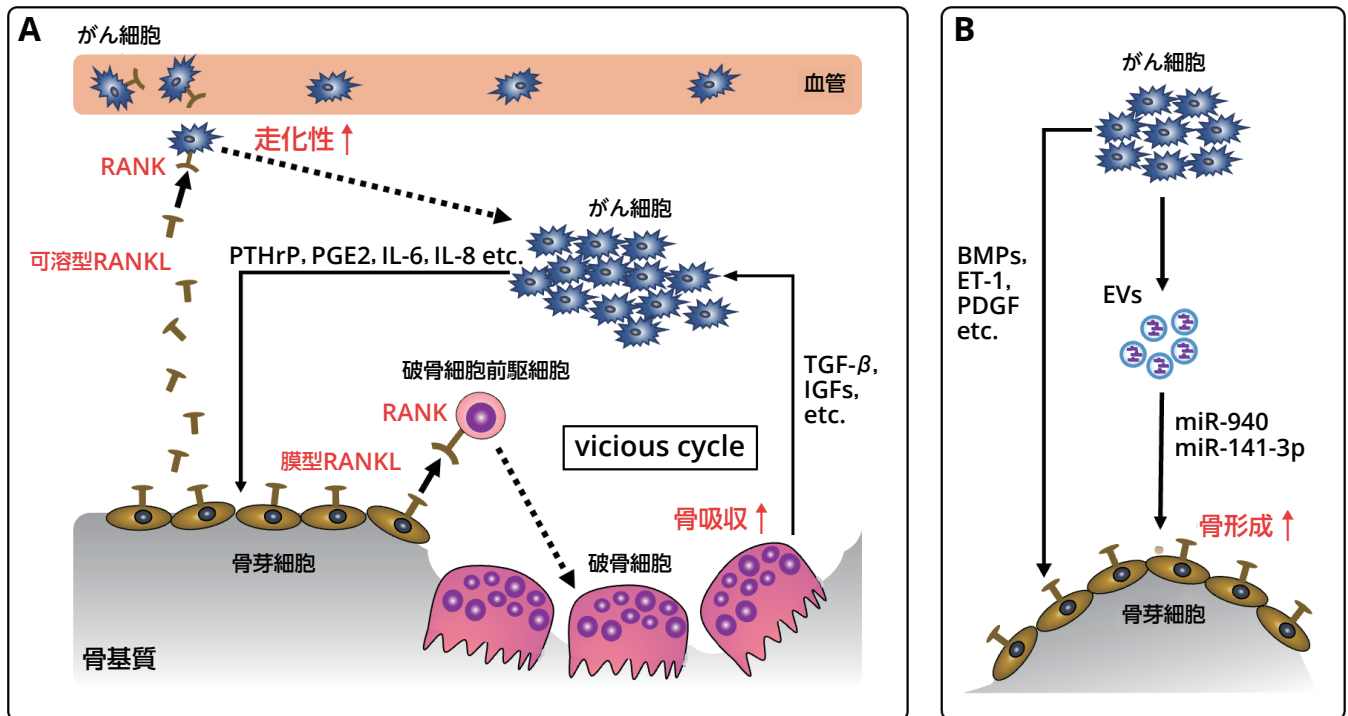


図3 RANKLの破骨細胞依存的・非依存的な骨転移増悪機構

A. 骨転移巣において、がん細胞はPTHrP, PGE2, IL-6, IL-8などの産生を介して骨芽細胞のRANKL発現を上昇させ、破骨細胞分化を促進し骨破壊を引き起こす。骨破壊により骨基質からTGF- $\beta$ やIGFsなどの成長因子が放出され、がん細胞の増殖が促進される。可溶性RANKLは破骨細胞分化への影響は限定的だが、RANKを発現するがん細胞の走化性を上昇させ、骨転移を促進する。

B. 造骨型骨転移では、がん細胞がBMPs, ET-1, PDGFなどを分泌し骨形成を促進する。さらに、造骨型がん細胞が分泌するエクソソームにはmiR-940やmiR-141-3pなどが多く含まれ、骨形成を促進している。

を欠損させたマウスでは造血幹細胞数が減少した。その後の研究により、成熟骨芽細胞はCXCL12, DLL4 (delta-like protein 4) を介してB細胞前駆細胞およびT細胞前駆細胞の維持に働くことがわかった。また、敗血症モデルマウスにおいて、骨芽細胞由来のIL-7が共通リンパ前駆細胞 (CLP) の維持に重要であることが明らかになった<sup>2)</sup>。一方、骨細胞はIL-19の産生を介して好中球前駆細胞の維持に寄与している<sup>12)</sup>。さらに最近、マウス胸骨における*in situ*マッピングが報告され、単球・樹状細胞系の前駆細胞はCsf1陽性血管内皮細胞の周囲に局在し、増殖・分化することが明らかになった<sup>13)</sup>。このように、間葉系幹細胞や血管内皮細胞、骨代謝細胞が様々な形で連携して骨髄の造血を担っている。

骨構成細胞は単なる造血の場というだけでなく、免疫応答や免疫異常に関与していることも明らかになっている。摂餌制限マウスではメモリーT細胞が骨髄に集積し、感染やがんに対する免疫応答が増強される<sup>14)</sup>。加齢に伴い、骨格幹細胞は骨形成能が低下した特徴的な間葉系細胞へ分化し、CSF1や炎症性サイトカインの分泌を介して破骨細胞分化を

促進するとともに、造血幹細胞の分化をミエロイド系に傾ける<sup>15)</sup>。また、骨芽細胞特異的なDicer1欠損マウスや $\beta$ カテニン活性化変異導入マウスでは、急性骨髄性白血病を発症する<sup>2)</sup>。近年、骨構成細胞による免疫系制御機構の報告が数多くなされており、骨の異常が免疫系の異常を引き起こしている可能性が示唆されている。

## 5 悪性腫瘍における骨免疫

近年、骨免疫と悪性腫瘍の関わりが注目されている。進行がんの骨転移巣では、がん細胞が分泌するPTHrP (parathyroid hormone-related protein) やサイトカインなどにより骨芽細胞のRANKL発現が上昇し、破骨細胞が活性化する。骨破壊により骨基質中のTGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) やIGFs (insulin-like growth factor) が放出され、がん細胞の増殖が促進する「vicious cycle」を形成する<sup>16)</sup>(図3)。近年、マウス前立腺がん細胞の大腿骨髄内移入モデルの解析により、骨破壊で放出されるTGF- $\beta$ が

骨髄内のTh1細胞分化を抑制していることが示され、vicious cycleが腫瘍免疫の観点からも重要であることが示唆された<sup>17)</sup>。RANKLには膜型RANKLと可溶型RANKLがあるが、可溶型RANKLのみを欠損したマウスでは、破骨細胞数は変化しないが骨転移が抑制される。骨転移指向性の高いがん細胞はRANKを発現しており、可溶型RANKLはがん細胞の骨への遊走を促進することで骨転移に寄与している。つまり、RANKLは破骨細胞依存のおよび非依存的経路の両方によって骨転移を増悪している<sup>18)</sup> (図3)。

前立腺がんなどでは造骨型骨病変を呈することが知られているが、その原因はがん細胞により骨芽細胞や間葉系細胞の骨分化が亢進することであると考えられている。造骨型のがん細胞で分泌が亢進している骨形成促進因子としてBMPs (bone morphogenetic proteins), ET-1 (endothelin-1), PDGF (platelet-derived growth factor) などが報告されている。加えて、造骨型の前立腺がん細胞由来のエクソソームに多く含まれるmiR-940は間葉系細胞の骨分化を促進し、造骨型骨病変を誘導する<sup>19)</sup>。また、骨転移のない肺がん患

者および肺がんモデルマウスにおいても骨芽細胞が活性化しており、SiglecF陽性好中球の分化および肺への遊走を促進し、腫瘍進展を増悪する<sup>20)</sup>。がん細胞と骨芽細胞の相互作用が骨免疫に与える影響やその意義に関する今後の研究が期待される。

## 6 おわりに

骨免疫学は関節リウマチの病態研究から始まり、骨代謝学、免疫学、血液学、腫瘍学などにまたがり発展してきた。他にも、交感神経・感覚神経による骨代謝調節などは以前から知られているが、最近、G-CSF刺激時の造血幹細胞の末梢動員への痛覚神経の関与がわかり、骨と神経、免疫の連関が注目されている。さらに、新生児骨髄や化学療法からの回復時に血管内皮細胞が骨芽細胞分化を促進していることなど、骨と血管系との連携も興味深い。このように分野横断的な視点を取り入れながら骨免疫学の理解がさらに深まり、様々な生命現象の解明に寄与していくことが期待される。

### 参考文献

1. Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, Takaoka A, Yokochi T, Oda H, Tanaka K, Nakamura K, Taniguchi T. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature*. 2000; 408: 600–605.
2. Okamoto K, Nakashima T, Shinohara M, Negishi-Koga T, Komatsu N, Terashima A, Sawa S, Nitta T, Takayanagi H. Osteoimmunology: The Conceptual Framework Unifying the Immune and Skeletal Systems. *Physiol. Rev*. 2017; 97: 1295–1349.
3. Komatsu N, Win S, Yan M, Huynh NC-N, Sawa S, Tsukasaki M, Terashima A, Pluemsakunthai W, Kollias G, Nakashima T, Takayanagi H. Plasma cells promote osteoclastogenesis and periarticular bone loss in autoimmune arthritis. *J. Clin. Invest.* 2021; 131. doi:10.1172/JCI143060.
4. Croft AP, Campos J, Jansen K, Turner JD, Marshall J, Attar M, Savary L, Wehmeyer C, Naylor AJ, Kemble S, Begum J, Dürholz K, Perlman H, Barone F, McGettrick HM, Fearon DT, Wei K, Raychaudhuri S, Korsunsky I, Brenner MB, Coles M, Sansom SN, Filer A, Buckley CD. Distinct fibroblast subsets drive inflammation and damage in arthritis. *Nature*. 2019; 570: 246–251.
5. Tsukasaki M, Komatsu N, Nagashima K, Nitta T, Pluemsakunthai W, Shukunami C, Iwakura Y, Nakashima T, Okamoto K, Takayanagi H. Host defense against oral microbiota by bone-damaging T cells. *Nat. Commun.* 2018; 9: 701.
6. Negishi-Koga T, Gober H-J, Sumiya E, Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, Suematsu A, Suda T, Sato K, Takai T, Takayanagi H. Immune complexes regulate bone metabolism through FcRγ signalling. *Nat. Commun.* 2015; 6:6637.
7. Hayashi M, Nakashima T, Yoshimura N, Okamoto K, Tanaka S, Takayanagi H. Autoregulation of Osteocyte Sema3A Orchestrates Estrogen Action and Counteracts Bone Aging. *Cell Metab.* 2019; 29: 627–637.e5.
8. Tsukasaki M, N. Huynh C-N, Okamoto K, Muro R, Terashima A, Kurikawa Y, Komatsu N, Pluemsakunthai W, Nitta T, Abe T, Kiyonari H, Okamura T, Sakai M, Matsukawa T, Matsumoto M, Kobayashi Y, Penninger JM, Takayanagi H. Stepwise cell fate decision pathways during osteoclastogenesis at single-cell resolution. *Nat Metab.* 2020; 2: 1382–1390.
9. Jacome-Galarza CE, Percin GI, Muller JT, Mass E, Lazarov T, Eitler J, Rauner M, Yadav VK, Crozet L, Bohm M, Loyher P-L, Karsenty G, Waskow C, Geissmann F. Developmental origin, functional maintenance and genetic rescue of osteoclasts. *Nature*. 2019; 568: 541–545.
10. Hasegawa H, Kikuta J, Sudo T, Matsuura Y, Matsui T, Simmons S, Ebina K, Hirao M, Okuzaki D, Yoshida Y, Hirao A, Kalinichenko V V, Yamaoka K, Takeuchi T, Ishii M. Identification of a novel arthritis-associated osteoclast precursor macrophage regulated by FoxM1. *Nat. Immunol.* 2019; 20: 1631–1643.

11. McDonald MM, Khoo WH, Ng PY, Xiao Y, Zamerli J, Thatcher P, Kyaw W, Pathmanandavel K, Grootveld AK, Moran I, Butt D, Nguyen A, Corr A, Warren S, Biro M, Butterfield NC, Guilfoyle SE, Komla-Ebri D, Dack MRG, Dewhurst HF, Logan JG, Li Y, Mohanty ST, Byrne N, Terry RL, Simic MK, Chai R, Quinn JMW, Youlten SE, Pettitt JA, Abi-Hanna D, Jain R, Weninger W, Lundberg M, Sun S, Ebetino FH, Timpson P, Lee WM, Baldock PA, Rogers MJ, Brink R, Williams GR, Bassett JHD, Kemp JP, Pavlos NJ, Croucher PI, Phan TG. Osteoclasts recycle via osteomorphs during RANKL-stimulated bone resorption. *Cell*. 2021; 184: 1330-1347.e13.
12. Xiao M, Zhang W, Liu W, Mao L, Yang J, Hu L, Zhang S, Zheng Y, Liu A, Song Q, Li Y, Xiao G, Zou Z, Bai X. Osteocytes regulate neutrophil development through IL-19: a potent cytokine for neutropenia treatment. *Blood*. 2021; 137: 3533-3547.
13. Zhang J, Wu Q, Johnson CB, Pham G, Kinder JM, Olsson A, Slaughter A, May M, Weinhaus B, D'Alessandro A, Engel JD, Jiang JX, Kofron JM, Huang LF, Prasath VBS, Way SS, Salomonis N, Grimes HL, Lucas D. *In situ* mapping identifies distinct vascular niches for myelopoiesis. *Nature*. 2021; 590: 457-462.
14. Collins N, Han S-J, Enamorado M, Link VM, Huang B, Moseman EA, Kishton RJ, Shannon JP, Dixit D, Schwab SR, Hickman HD, Restifo NP, McGavern DB, Schwartzberg PL, Belkaid Y. The Bone Marrow Protects and Optimizes Immunological Memory during Dietary Restriction. *Cell*. 2019; 178: 1088-1101.e15.
15. Ambrosi TH, Marecic O, McArdle A, Sinha R, Gulati GS, Tong X, Wang Y, Steininger HM, Hoover MY, Koepke LS, Murphy MP, Sokol J, Seo EY, Tevlin R, Lopez M, Brewer RE, Mascharak S, Lu L, Ajanaku O, Conley SD, Seita J, Morri M, Neff NF, Sahoo D, Yang F, Weissman IL, Longaker MT, Chan CKF. Aged skeletal stem cells generate an inflammatory degenerative niche. *Nature*. 2021; 597: 256-262.
16. Okamoto K. Role of RANKL in cancer development and metastasis. *J. Bone Miner. Metab.* 2021; 39: 71-81.
17. Jiao S, Subudhi SK, Aparicio A, Ge Z, Guan B, Miura Y, Sharma P. Differences in Tumor Microenvironment Dictate T Helper Lineage Polarization and Response to Immune Checkpoint Therapy. *Cell*. 2019; 179: 1177-1190. e13.
18. Asano T, Okamoto K, Nakai Y, Tsutsumi M, Muro R, Suematsu A, Hashimoto K, Okamura T, Ehata S, Nitta T, Takayanagi H. Soluble RANKL is physiologically dispensable but accelerates tumour metastasis to bone. *Nat Metab*. 2019; 1: 868-875.
19. Hashimoto K, Ochi H, Sunamura S, Kosaka N, Mabuchi Y, Fukuda T, Yao K, Kanda H, Ae K, Okawa A, Akazawa C, Ochiya T, Futakuchi M, Takeda S, Sato S. Cancer-secreted hsa-miR-940 induces an osteoblastic phenotype in the bone metastatic microenvironment via targeting ARHGAP1 and FAM134A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2018. doi:10.1073/pnas.1717363115.
20. Engblom C, Pfirschke C, Zilionis R, Da Silva Martins J, Bos SA, Courties G, Rickelt S, Severe N, Baryawno N, Faget J, Savova V, Zemmour D, Kline J, Siwicki M, Garris C, Pucci F, Liao HW, Lin YJ, Newton A, Yaghi OK, Iwamoto Y, Tricot B, Wojtkiewicz GR, Nahrendorf M, Cortez-Retamozo V, Meylan E, Hynes RO, Demay M, Klein A, Bredella MA, Scadden DT, Weissleder R, Pittet MJ. Osteoblasts remotely supply lung tumors with cancer-promoting SiglecF(high) neutrophils. *Science*. 2017; 358. doi:10.1126/science.aal5081.



# 破骨細胞制御機構に関する新知見

## Author



塚崎 雅之  
東京大学大学院医学系研究科 免疫学

2013年 昭和大学歯学部卒業, 2018年 東京大学大学院医学系研究科博士課程修了, 日本学術振興会特別研究員 (DC1, PD) を経て2020年より現職。骨組織の発生・維持・破壊に関わるメカニズム全般に興味を持ち研究を行っている。

## 要旨

破骨細胞は骨恒常性の維持において中心的な役割を担うが、その過剰な活性化は様々な疾患に伴う病的骨破壊の原因になる。我々は、シングルセル解析技術とマウス遺伝学を組み合わせた手法により、破骨細胞分化を抑制するOPG産生細胞の同定や、1細胞レベルでの破骨細胞分化経路の解明など、破骨細胞制御機構をこれまでにない解像度で理解すべく研究を進めてきた。本稿では我々の研究成果を中心に、破骨細胞生物学に関する新たな知見を概説する。

## Keywords

- 破骨細胞
- シングルセル解析
- OPG

## 1 研究の背景

破骨細胞は、単球・マクロファージ系前駆細胞に由来する生体で唯一の骨吸収細胞であり、破骨細胞支持細胞（骨細胞、骨芽細胞など）が産生するRANKLによって分化が誘導される。RANKLの機能は、そのデコイ受容体であるOPGによって負に制御されるが、生体内におけるOPGの産生源は不明であった<sup>1)</sup>。

1990年代後半に、マウス骨髓細胞をRANKLで刺激することで破骨細胞を試験管内で誘導する培養系が確立され、破骨細胞生物学は格段の進歩を遂げた。この培養系に対してマイクロアレイやRNA-seqなどのトランスクリプトーム解析をおこない、破骨細胞の形成前と形成後の培養系に存在する細胞集団の遺伝子発現を比較することで、破骨細胞の分化や機能発現に重要な多くの遺伝子が発見されてきた。しかしながら、この培養系は雑多な集団を含んでおり、ごく一部の細胞しか破骨細胞へと分化できないことが知られていた。培養系に含まれる不均一な細胞集団の正体や、破骨細胞の詳細な分化経路とそれに伴う遺伝子発現変動の全容は不明であった。

## 2 OPG産生細胞の同定

我々はまず、生体内におけるOPG産生源を同定するために、CRISPR/Cas9システムを用いてOPGのfloxマウスを作出した<sup>2)</sup>。David Scadden (Harvard University) らが2019年にCell誌に発表した骨構成細胞のシングルセルRNA-seqデータ<sup>3)</sup>を再解析したところ、OPGの発現はプロテオグリカンの一種であるDecorin (Dcn) を高発現する骨芽細胞クラスターで限局していた。興味深いことに、RANKLを産生する骨芽細胞 (Bglap陽性骨芽細胞) とOPGを産生する骨芽細胞 (Dcn陽性骨芽細胞) はそれぞれ別の集団としてクラスタリングされ、骨芽細胞に機能的な多様性が存在する可能性が示唆された<sup>2)</sup>。骨芽細胞系列で発現するSp7-Cre依存的にOPGを欠損したマウスを作成したところ、骨量が著名に減少した一方で、血中のOPG濃度は変化しなかった<sup>2)</sup>。以上から、骨芽細胞が局所的に産生するOPGが破骨細胞制御に重要であり、血中を循環するOPGは骨代謝に影響を及ぼさない可能性が考えられた (図1)。OPGを高発現するDcn陽性骨芽細胞が、真に骨芽細胞の新規サブセットといえるかどうかに関しては、今後さらなる検証が必要である。また、我々の報告と同時に、Charles A. O'Brien (University of Arkansas) らのグループもOPG-floxマウスを作出し、B細胞

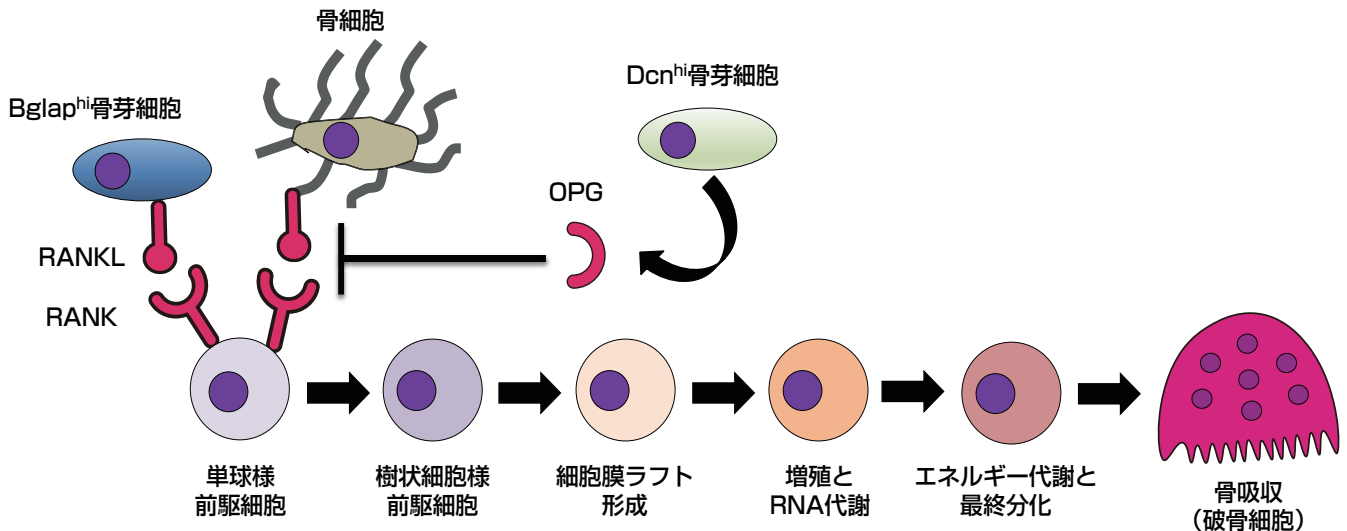


図1 シングルセル解析によって明らかになった破骨細胞の分化過程

や骨細胞ではなく骨芽細胞が局所的に産生するOPGが骨恒常性に必須の役割を持つことを報告した<sup>4)</sup>。

RANKL/RANK/OPGシステムは骨以外にも胸腺や腸管といった免疫組織で重要な働きを持つ。シングルセルRNA-seq解析およびOPGコンディショナルノックアウトマウスの表現型解析の結果から、胸腺においては胸腺髄質上皮細胞、腸管においてはM細胞がOPGの主要な産生源であり、いずれの臓器においても循環OPGではなく局所産生されたOPGが重要であることが示された<sup>2)</sup>。以上より、多彩なRANKLの機能がOPGにより局所的に厳密に制御されていることが明らかとなった。

### 3 破骨細胞分化経路のシングルセル解析

次に我々は、破骨細胞の分化過程を詳細に理解すべく、破骨細胞培養系を用いて、RANKL刺激の直前、RANKL刺激1日後、RANKL刺激3日後（破骨細胞形成後）の3つのタイムポイントから細胞を回収し、シングルセルRNA-seq解析をおこなった<sup>5)</sup>。得られたデータを用いて擬時間（pseudotime）解析により細胞分化経路の予測をおこなったところ、破骨細胞前駆細胞が一過的に樹状細胞様（細胞表面マーカーCD11cや抗原提示遺伝子群を発現する一方で共刺激分子は発現しておらず、樹状細胞と似ているものの非なる状態）の表現型を呈する可能性が示唆された<sup>5)</sup>。これまで、樹状細胞の古典的なマーカーであるCD11cを発現す

る細胞の一部が、試験管内や大理石骨病マウスへの移植条件下において破骨細胞へ分化するという報告がある一方で、成熟した樹状細胞を欠損するようなマウスでも破骨細胞の数は減少しないことが報告されており、破骨細胞分化における樹状細胞の役割に関しては統一した見解が得られていなかった。そこで、CD11c-Cre依存的にRANKを除去したマウスを作成したところ、当該マウスでは破骨細胞の数が減少し骨量が顕著に増加することが明らかとなり、pseudotime解析により予測された破骨細胞分化経路の生物学的妥当性が示された。また、破骨細胞前駆細胞が分化過程で一過的にCD11cを発現するという本知見により、過去の報告の矛盾（CD11c陽性細胞の一部が破骨細胞分化能を有する一方で、成熟樹状細胞は破骨細胞分化に必要な）が解消される可能性が考えられた<sup>5)</sup>。

さらに我々は、破骨細胞の分化経路に伴い発現が変化する転写因子・転写調節因子を探索し、破骨細胞分化のマスター転写因子であるNfatc1と同じ発現変動パターンを示す因子として、Cited2を同定した。RANK-Creを用いて破骨細胞前駆細胞でCited2を除去すると、増殖期の破骨細胞前駆細胞から細胞周期の停止した前破骨細胞への分化が阻害され、試験管内および生体内において破骨細胞の数が減少した<sup>5)</sup>。以上より、破骨細胞の運命決定を司る多段階的な分化プロセスの詳細が1細胞レベルで解明され、各ステージ間の進行が遺伝子レベルで厳密に制御されていることが明らかとなった（図1）。

## 4 今後の課題

シングルセル解析技術の進歩により、生命科学は新しい時代へと突入した。骨代謝に関わる細胞の生理と病理が1細胞解像度で語られつつあるが、同時に新たな疑問を生み出している。図2に著者が興味を持っている、破骨細胞生物学における今後の課題をまとめた。近年、破骨細胞の起源がライフステージによって異なることや、骨吸収能を持たない血管関連破骨細胞の存在、リウマチ骨破壊に関与する病的破骨前駆細胞の存在などが報告されており、破骨細胞およびその前駆細胞の不均一性が注目を集めている<sup>6-8)</sup>。由来の異なる前駆細胞同士が融合してひとつの破骨細胞を形成する現象も報告されており<sup>9)</sup>、破骨細胞の機能的多様性を理解するためには多核システムの制御機構、すなわち核同士の相互作用(あるいはヒエラルキー)の解明も重要な課題であろう。また従来、破骨細胞の寿命は2週間程度であり、骨吸収後はアポトーシスにより速やかに死滅すると考えられてきたが、破骨細

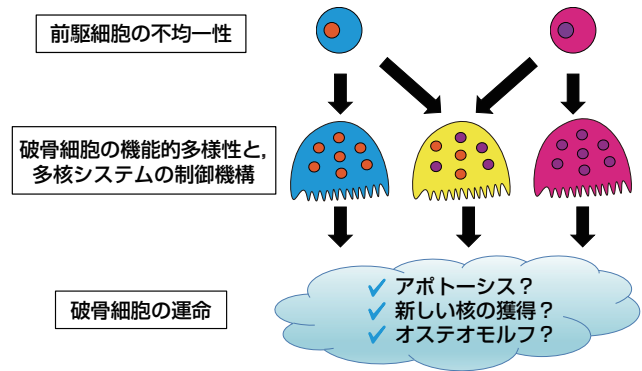


図2 破骨細胞生物学の今後の課題

胞が融合によって新たな核を獲得し長期間生存する可能性<sup>6)</sup>や、分裂して「オステオモルフ」と呼ばれる状態を経た後に再融合する可能性<sup>10)</sup>が報告されており、破骨細胞の運命に関する新たな仮説も生まれている。破骨細胞は何処からきて、何をして、何処にゆくのだろうか。まだまだ疑問は尽きない。

## 参考文献

1. Tsukasaki M, Takayanagi H. Osteoimmunology: evolving concepts in bone-immune interactions in health and disease (in eng). *Nat Rev Immunol.* 2019; 19: 626-42. doi:10.1038/s41577-019-0178-8.
2. Tsukasaki M, Asano T, Muro R, Huynh NC, Komatsu N, Okamoto K, Nakano K, Okamura T, Nitta T, Takayanagi H. OPG Production Matters Where It Happened (in eng). *Cell Rep.* 2020; 32:108124. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108124.
3. Baryawno N, Przybylski D, Kowalczyk MS, Kfoury Y, Severe N, Gustafsson K, Kokkaliaris KD, Mercier F, Tabaka M, Hofree M, Dionne D, Papazian A, Lee D, Ashenberg O, Subramanian A, Vaishnav ED, Rozenblatt-Rosen O, Regev A, Scadden DT. A Cellular Taxonomy of the Bone Marrow Stroma in Homeostasis and Leukemia (in eng). *Cell.* 2019; 177: 1915-32.e16. doi:10.1016/j.cell.2019.04.040.
4. Cawley KM, Bustamante-Gomez NC, Guha AG, MacLeod RS, Xiong J, Gubrij I, Liu Y, Mulkey R, Palmieri M, Thostenson JD, Goellner JJ, O'Brien CA. Local Production of Osteoprotegerin by Osteoblasts Suppresses Bone Resorption (in eng). *Cell Rep.* 2020; 32: 108052. doi:10.1016/j.celrep.2020.108052.
5. Tsukasaki M, Huynh NC, Okamoto K, Muro R, Terashima A, Kurikawa Y, Komatsu N, Pluemsakunthai W, Nitta T, Abe T, Kiyonari H, Okamura T, Sakai M, Matsukawa T, Matsumoto M, Kobayashi Y, Penninger JM, Takayanagi H. Stepwise cell fate decision pathways during osteoclastogenesis at single-cell resolution (in eng). *Nat Med.* 2020; 2: 1382-90. doi:10.1038/s42255-020-00318-y.
6. Jacome-Galarza CE, Percin GI, Muller JT, Mass E, Lazarov T, Eitler J, Rauner M, Yadav VK, Crozet L, Bohm M, Loyher PL, Karsenty G, Waskow C, Geissmann F. Developmental origin, functional maintenance and genetic rescue of osteoclasts (in eng). *Nature.* 2019; 568: 541-45. doi:10.1038/s41586-019-1105-7.
7. Romeo SG, Alawi KM, Rodrigues J, Singh A, Kusumbe AP, Ramasamy SK. Endothelial proteolytic activity and interaction with non-resorbing osteoclasts mediate bone elongation (in eng). *Nat Cell Biol.* 2019; 21: 430-41. doi:10.1038/s41556-019-0304-7.
8. Hasegawa T, Kikuta J, Sudo T, Matsuura Y, Matsui T, Simmons S, Ebina K, Hirao M, Okuzaki D, Yoshida Y, Hirao A, Kalinichenko VV, Yamaoka K, Takeuchi T, Ishii M. Identification of a novel arthritis-associated osteoclast precursor macrophage regulated by FoxM1 (in eng). *Nat Immunol.* 2019; 20: 1631-43. doi:10.1038/s41590-019-0526-7.
9. Yahara Y, Barrientos T, Tang YJ, Puvindran V, Nadesan P, Zhang H, Gibson JR, Gregory SG, Diao Y, Xiang Y, Qadri YJ, Souma T, Shinohara ML, Alman BA. Erythromyeloid progenitors give rise to a population of osteoclasts that contribute to bone homeostasis and repair (in eng). *Nat Cell Biol.* 2020; 22: 49-59. doi:10.1038/s41556-019-0437-8.
10. McDonald MM, Khoo WH, Ng PY, Xiao Y, Zamerli J et al. Osteoclasts recycle via osteomorphs during RANKL-stimulated bone resorption (in eng). *Cell.* 2021; 184: 1940. doi:10.1016/j.cell.2021. 03.010.

# 後天性低カルシウム尿性高カルシウム血症の解析から明らかになった Gタンパク質共役受容体 (GPCR) の新たなシグナル調節機構

## Author



### 槇田 紀子

東京大学医学部附属病院 腎臓・内分泌内科  
臨床で抱いた疑問をベンチで追求し、新しい普遍的現象を明らかにすべく、日々奮闘しています。

### 安藤 隆雄

長崎大学病院 内分泌代謝内科

ブラウン教授の講演が頭の片隅にあり診断できました。

### 飯利 太郎

聖マリアンナ医科大学 薬理学

いつまでも研究の熱い心を忘れず、日々考えをめぐらせています。

## 要旨

後天性低カルシウム尿性高カルシウム血症というまれな内分泌疾患において、カルシウム感知受容体 (CaSR) に対してバイアスに作動する (Gq/11シグナルは刺激、Gi/oシグナルは抑制) ユニークな自己抗体の発見は、biased agonismというコンセプトがわれわれの生体内で作動するという世界初の例であり、Gタンパク質共役受容体 (GPCR) の新しいシグナル調節機構を考える大きなヒントとなる。

## Keywords

- カルシウム感知受容体
- 後天性低カルシウム尿性高カルシウム血症
- biased agonism

## 1 CaSRの生理機構とヘテロな機能喪失性変異による家族性低Ca尿性高Ca血症 (FHH)

血中のカルシウム濃度は、カルシウム感知受容体 (CaSR) というGタンパク質共役受容体 (GPCR) を介して厳密にコントロールされている。細胞外カルシウムイオン濃度 ( $Ca^{2+}$ ) が上昇すると、上昇した  $Ca^{2+}$  は CaSR に対してアゴニストとして作用し、これを活性化する。CaSRは主に副甲状腺と腎臓 (ヘンレの太い上行脚の血管側) に発現し、CaSRが活性化されると、副甲状腺ではPTHの分泌が抑制され、腎臓では2価の陽イオン ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) の再吸収が抑制される。このCaSRのクローニングは、HarvardのBrownらのグループによりなされたが<sup>1)</sup>、彼らはほぼ同時期にCaSRのヘテロな機能喪失性変異は、家族性低Ca尿性高Ca血症 (FHH) の原因となることを明らかにした<sup>2)</sup>。CaSRシグナルの50%抑制によりPTH分泌は亢進し、PTH依存性の高Ca血症、そして腎でのCa再吸収の亢進により低カルシウム尿症をきたす。FHHでは通常高Ca血症は軽度で自覚症状がなく、治療は不要である。

## 2 CaSRに対するバイアスな自己抗体による後天性低Ca尿性高Ca血症 (AHH)

同じBrownらのグループから、CaSRに対するブロッキング型の自己抗体が、FHHと相同な疾患として、後天性低Ca尿性高Ca血症 (AHH) の原因となることが報告された<sup>3)</sup>。われわれは、臨床的にAHHと診断できる患者において、単なるブロッキング抗体ではなく、G<sub>q/11</sub>シグナルは亢進、G<sub>i/o</sub>シグナルは抑制するCaSRのユニークな活性型構造を安定化させる自己抗体を見出した<sup>4)</sup>。本例の高Ca血症は偶発的に同定されたものであり、経過で血清Ca値は変動したが、上昇しても無自覚な高Ca血症に留まり、治療介入は不要であった。われわれはこの1例だけの経験と、FHHとAHHという病名の相同性から、AHHもFHHと同様に治療の必要はない、と思いついていた。

## 3 AHHに対する特異的な治療と自己抗体の作用点

われわれは、その思い込みを是正する2例目のAHHを経



験した<sup>5)</sup>。食欲低下、体重減少を伴う重度な高Ca血症 (cCa 16.5 mg/dL) で、当初は悪性腫瘍に伴う高Ca血症と考えられゾレンドロン酸の定期投与で経過をみられていた。後に、低Ca血症によるテタニーを生じるようになり、われわれの施設を受診。低カルシウム尿症を呈していること、ゾレンドロン酸を中止してもCa 11 mg/dL前後であり、高Ca血症の臨床経過が変動することから、臨床的にAHHと考えられた。*in vitro*の検討で、CaSR自己抗体の存在が確認され、1例目に続き、その自己抗体はbiased allosteric modulatorとして作用することが分かった。その後再び高Ca血症が増悪。自己抗体の力価上昇が確認され、AHHの病勢悪化による高Ca血症と考えられた。治療として、AHHは自己抗体病であり、まずは副腎皮質ステロイド薬があげられる。実際にBrownのグループからの最初のケースはPSLが奏功している<sup>3)</sup>。しかし、同じグループから、PSLが奏効しなかったケースも報告されている<sup>6)</sup>。われわれはAHHに対する特異的な治療として、positive allosteric modulatorとして作用することが知られているシナカルセットが奏効するのではないかと考えた。実際に*in vitro*の系でシナカルセットは自己抗体の作用を乗り越えることが確認され、シナカルセットを導入。その後すみやかに高Ca血症はコントロールできた (図1) (図2)。シナカルセットが奏効したことを支持するデータとして、自己抗体の力価が依然高値のままであることも確認している。

また、AHHにおけるバイアスな自己抗体の発見は、PTH分泌制御にはG<sub>q/11</sub>シグナルだけではなく、G<sub>i/o</sub>シグナルも重要であることを示唆する (図2)。実際にヒト副甲状腺上皮細胞を用いた系で、患者自己抗体は、G<sub>i/o</sub>シグナルを切る百日咳毒素と相同な作用を呈することが確認された。つまり自己抗体によるG<sub>i/o</sub>シグナルの抑制がAHHの病態に寄与していることが追認された。

自己抗体の作用点もわかってきた。CaSRの細胞外ドメイン (ECD) に作用することはわかっていたが、ECDを構成するペプチドには反応せず、高次構造を認識する自己抗体と考えられた。自己抗体がCaSRの局在を変える可能性を検討する中、2例目のCaSR自己抗体は、CaSRの214-235アミノ酸残基を認識するマウスモノクローナル抗体と競合反応をすること、すなわち同部位 (Ca<sup>2+</sup>の結合部位の近傍) の高次構造を認識することを見出した。

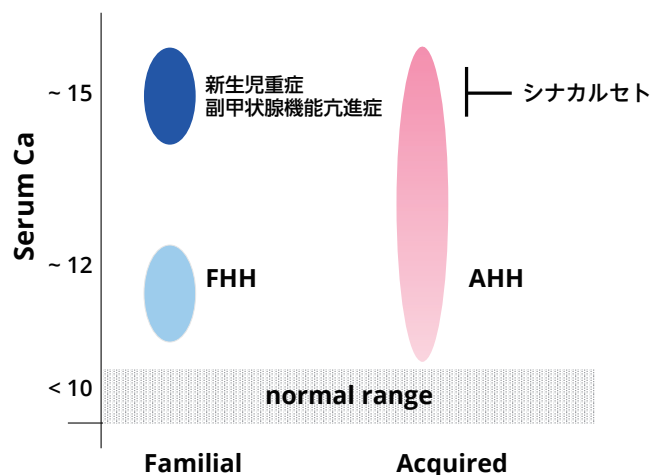


図1 CaSRシグナルの抑制による疾患

CaSRのgeneticな異常として、ヘテロの機能喪失はFHH、ホモあるいは2アレルのヘテロの機能喪失は重症新生児副甲状腺機能亢進症の原因となる。自己抗体によるAHHは、言葉のアナロジーからFHHと同様に高Ca血症は軽度で治療の必要がないとわれわれは思い込んでいたが、自己抗体の力価によって重症化してよいはずである。2例目の重症例に対して、シナカルセットの効果を*in vitro*で確認の上導入し、実際に奏効した。

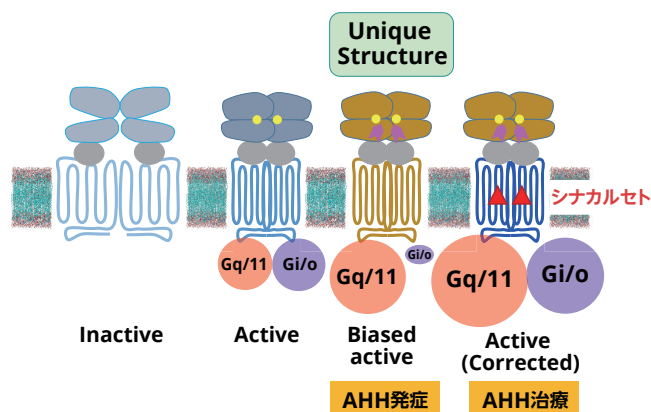


図2 AHHにおけるユニークな自己抗体が安定化するねじれたCaSRの構造と、シナカルセットがその抗体の作用を修正するイメージ図

CaSRは常にdimerで存在し、アゴニストCa<sup>2+</sup>が結合するとdimer形成が強まって共役するGタンパク質が活性化される。われわれが同定したAHHにおけるユニークな自己抗体が存在すると、Ca<sup>2+</sup>が結合したときG<sub>q/11</sub>を活性化、G<sub>i/o</sub>を抑制するようなねじれた構造を安定化する。シナカルセットはこのねじれた構造を修正することで、AHHの特異的な治療として奏功する。

## 4 AHH研究の今後

その後も臨床的にAHHと診断されうるケースが蓄積し、なぜか本邦で見出されるAHHにおいては、臨床像を説明するにはCaSRシグナルを抑制する自己抗体であるはずであるが、少なくともG<sub>q/11</sub>シグナルは亢進させるバイアスな抗体であることが分かってきた<sup>7)</sup>。現在論文revise中であるが、本邦におけ

るAHHに認められる共通項の1つである。なぜシグナルを逆方向に向かわせる自己抗体が本邦においてのみ同定されるのか、そのバックグラウンドは何か？さらにはこのユニークな自己抗体がどのようなCaSR受容体構造を安定化させているのか？このことは、CaSR研究に留まらず、望ましいシグナルのみをonとする受容体構造がどのような構造をとっているのかを知るヒントとなり、副作用のない創薬開発につながる可能性をわれわれは信じている。

### 参考文献

1. Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J, Hebert SC. Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature*. 1993; 366: 575-580.
2. Pollak MR, Brown EM, Chou YH, Hebert SC, Marx SJ, Steinmann B, Levi T, Seidman CE, Seidman JG. Mutations in the human Ca(2+)-sensing receptor gene cause familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Cell*. 1993; 75: 1297-1303.
3. Pallais JC, Kifor O, Chen YB, Slovik D, Brown EM. Acquired hypocalciuric hypercalcemia due to autoantibodies against the calcium-sensing receptor. *N Engl J Med*. 2004; 351: 362-369.
4. Makita N, Sato J, Manaka K, Shoji Y, Oishi A, Hashimoto M, Fujita T, Iiri T. An acquired hypocalciuric hypercalcemia autoantibody induces allosteric transition among active human Ca-sensing receptor conformations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104: 5443-5448.
5. Makita N, Ando T, Sato J, Manaka K, Mitani K, Kikuchi Y, Niwa T, Ootaki M, Takeba Y, Matsumoto N, Kawakami A, Ogawa T, Nangaku M, Iiri T. Cinacalcet corrects biased allosteric modulation of CaSR by AHH autoantibody. *JCI Insight*. 2019; 4 (8): pii126449. doi:10.1172/jci.insight.126449.
6. Pallais JC, Kemp EH, Bergwitz C, Kantham L, Slovik DM, Weetman AP, Brown EM. Autoimmune hypocalciuric hypercalcemia unresponsive to glucocorticoid therapy in a patient with blocking autoantibodies against the calcium-sensing receptor. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96: 672-680.
7. Makita N, Iiri T. Biased agonism: a novel paradigm in G protein-coupled receptor signaling observed in acquired hypocalciuric hypercalcemia. *Endocrine Journal*. 2014; 61: 303-309.

# 遺伝統計学で骨代謝を理解する 一応用編一

## Author



友藤 嘉彦

大阪大学大学院医学系研究科 遺伝統計学  
2018年東京大学医学部医学科卒業。医学部在学中はMD研究者育成プログラムにて免疫学教室に所属(高柳 広 教授主宰)。横浜労災病院、東京大学医学部附属病院を経て2020年より大阪大学医学部医学系研究科遺伝統計学(岡田 随象 教授主宰)在学中。

## Author



岡田 随象

大阪大学大学院医学系研究科 遺伝統計学  
2005年東京大学医学部医学科卒業。2年間の臨床研修を経て2011年東京大学大学院医学系研究科博士課程修了、博士(医学)取得。2012年日本学術振興会海外特別研究員として米国ハーバード大学およびブロード研究所へ留学。2013年東京医科歯科大学テニュアトラック講師。2016年より大阪大学教授。2021年より理化学研究所生命医科学研究センターのチームリーダーを兼任。

## 要旨

近年ではGWASの結果を臨床応用することが盛んに試みられている。ポリジェニック・スコアは個人の疾患・形質予測を可能にし、個別化医療の実装に資するだろう。メンデルランダム化は、形質・疾患間の因果関係の推定を可能とし、臨床的なエビデンスの構築に貢献する可能性がある。GWASの結果を利用したゲノム創薬によって、創薬プロセスを効率化することが出来る。

## Keywords

- ・ ポリジェニック・スコア
- ・ メンデルランダム化
- ・ ゲノム創薬

## 1 はじめに

遺伝統計学とは、統計学的手法を利用して、遺伝子と疾患・形質との関連を解き明かす学問である。遺伝的背景の疾患・形質への寄与を明らかにする上で、有用なアプローチの1つがゲノムワイド関連解析 (genome-wide association analysis; GWAS) である。前回の基礎編では、GWASについての概説及び骨代謝領域のGWASの現状について述べた。応用編となる今回は、GWASの結果を臨床応用していく上で重要な解析技術として、ポリジェニック・スコア (polygenic score; PGS), メンデルランダム化 (mendelian randomization; MR), ゲノム創薬について述べる。

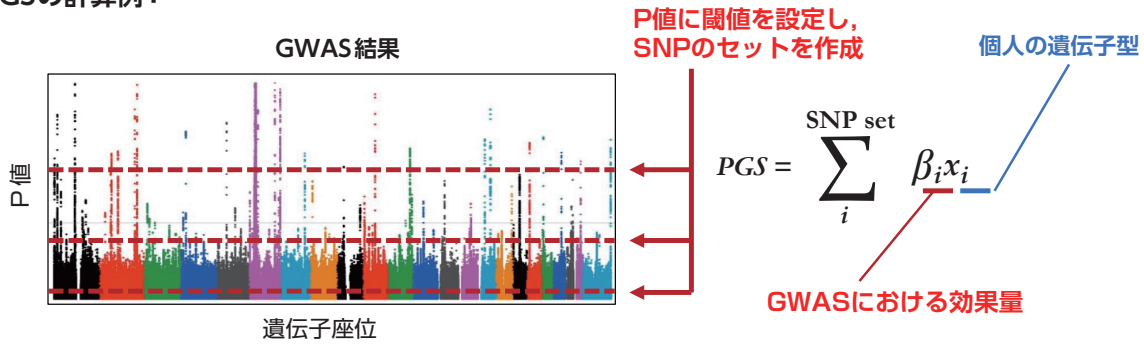
## 2 ポリジェニック・スコアによる形質予測

GWASによって、ヒトの形質に関連する遺伝子多型が網羅的に同定され、様々な形質の遺伝的背景の理解が進んできた。一方で、GWASによって同定された形質関連遺伝子多型の効果量は小さいことが多く、1つの遺伝子多型の情報を元に、形質の予測を行うことは困難である。そこで、考案されたのがPGSである。PGSは、個人のゲノムワイドな遺伝子多型情報と、GWASに基づいて推定されたSNPの効果量に

基づいて計算されるスコアである (図1)。PGSは形質の遺伝要因を反映したスコアであり、PGSを用いることで個々の形質予測を行うことができる。

骨代謝領域においては、骨密度のGWAS結果を用いて、PGSが構築されている。このPGSは実際の骨密度とよく相関しており ( $r^2 = 20 \sim 25\%$  程度)、喫煙や飲酒などの、Fracture Risk Assessment Tool (FRAX)に含まれる臨床項目よりも骨折リスクに寄与することが報告されている<sup>1)</sup>。また、PGSをFRAXに組み入れることで、比較的高価な骨密度評価を行うべき対象人数を減らし、医療経済を改善できる可能性が示唆されている<sup>2)</sup>。このように、PGSは今後の個別化医療への応用が期待される画期的な技術であるが、民族間移植性が必ずしも高くないことには注意が必要である<sup>3)</sup>。すなわち、ヨーロッパ人集団のGWASを元に構築したPGSを用いてヨーロッパ人の形質を精度よく予測できたとしても、同一のPGSを用いてアジア人の形質を予測すると、少なからず予測精度が低下してしまう可能性があるということである。現在存在している多くのGWASはヨーロッパ人集団を対象として行われたものであり、今後アジア人やアフリカ人などより多くの集団でGWASを行なっていくことが必要であると考えられている。

PGSの計算例：



骨密度におけるPGSの活用例：

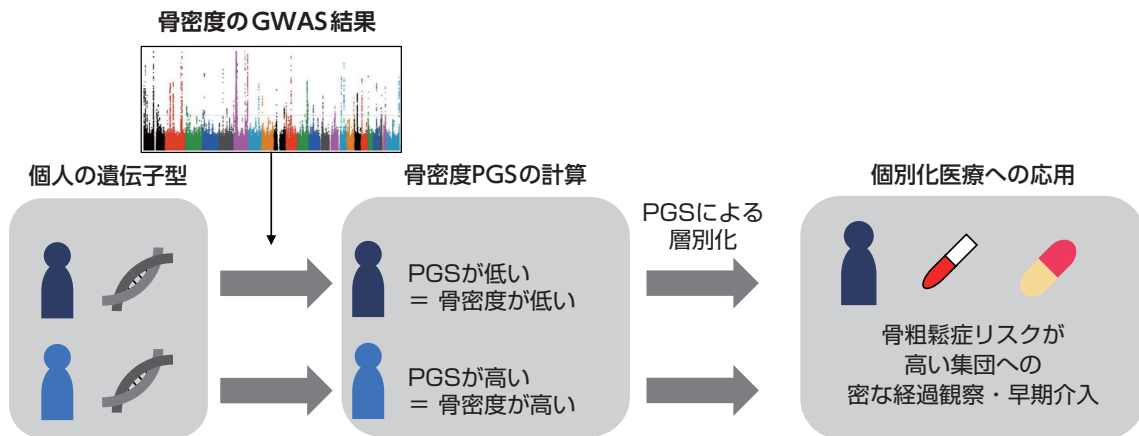


図1 ポリジェニック・スコア (PGS) の例

### 3 メンデルランダム化による形質間の因果関係の推定

形質同士の因果関係の理解は医学研究における一般的な課題である。しかし、形質同士の因果関係を理解するためには観察研究だけでは不十分であり、ランダム化比較試験が必要になる。しかしながら、ランダム化比較試験を行うためには多くの金銭的・人的コストが必要になり、またしばしば倫理的に許容されない介入を要するがために実行困難である。

GWASの結果に基づいたMRは、2つの形質についてのGWAS統計量を元に、2形質間の因果関係を推定する手法であり、観察研究の結果を用いて因果関係の推定を行えるという点で画期的な手法である(図2)。MRでは、遺伝子多型のランダムな子孫への遺伝を、ランダム化比較試験における無作為割り付けのように見立てることで、因果関係の推定を可能としている。骨代謝領域においては、喫煙と骨密度の関連が例として挙げられる。喫煙は骨密度と関連することが示唆されていたが、ランダム化比較試験において喫煙という

介入を行うことは非現実的であり、因果関係については不明であった。しかし、MRを利用した研究によって、喫煙が骨密度の低下に寄与することが明らかになった<sup>4)</sup>。

このようにMRは非常に強力な解析手法であり、また、個人データを必要とせず、共有が容易なGWASの統計量のみを利用して実施可能である点もMRの利点である。近年の大

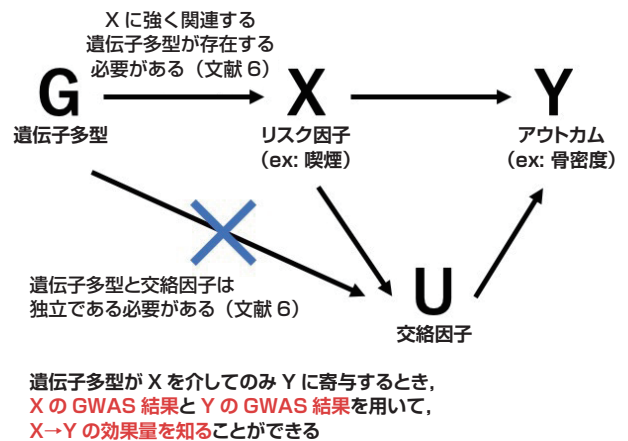


図2 メンデルランダム化 (MR)



規模バイオバンクによるGWASデータの提供や、解析プラットフォームの整備<sup>5)</sup>によって、MRは世界中で広く行われるようになってきている。一方で、MRには因果関係の逆転や勝者の呪いなどの問題もあり<sup>6)</sup>、MRで得られたP値が有意水準を下回ったからといって必ずしも仮説が正しいわけではないという点には注意が必要である。MRを行って有意義な結果が得られたとしても、結果を直ぐに鵜呑みにするのではなく、種々の感度分析を行うなどして結果を吟味する必要性があるだろう。

## 4 ゲノム創薬

創薬は多くの金銭的・人的コストを要し、時間がかかる一方で、多くの治療薬候補が開発途中で脱落する。そこで、ゲノム情報を用いることで創薬を効率的に行う試みがゲノム創薬である。最近、GWASの結果に基づいて有望な治療薬候補を絞り込むことで、開発途中で脱落を減らすことができるのではないかと期待されている。実際に、ヒトの遺伝子研究による裏付けがある分子を標的とする薬剤は、その開発の成功率が高いことが報告されている<sup>7)</sup>。また、既存の薬剤を従来の適用疾患以外の疾患の治療薬として使用する、すなわちドラッグリポジショニング (drug repositioning; DR) を

行うことで、薬剤の開発費を抑えつつ、疾患の治療選択肢を増やすことができるが、GWASはDRの効率化にも利用可能であると考えられている。実際に、当教室で開発されたgrep<sup>8)</sup>やTrans-Phar<sup>9)</sup>をはじめ、GWASの結果を元にDRを行うためのソフトウェアが世界中で開発されており、その有効性が示唆されている<sup>10)</sup>。骨代謝領域においても、既存の骨粗鬆症治療薬デノスマブの標的分子であるRANKLはGWASによる裏付けのある遺伝子であり、ゲノム創薬が骨代謝領域においても有用なアプローチである可能性が期待できる。

## 5 おわりに

本稿ではGWASの結果をどのように臨床医学に応用していくかに焦点を当て、代表的な手法・方法論について論じてきた。現在、世界中の大規模なバイオバンクやゲノム研究のコンソーシアムが、ゲノムデータを公開しており、全ての研究者が大規模なゲノムデータにアクセスすることが可能になった。これらの大規模データを医学・生物学研究に活用することは、遺伝統計学領域の研究者に限らず、全ての研究者にとって重要であると考えられる。本稿が様々な分野の研究者にとって、GWASの現在地を知る上での助けとなれば幸甚である。

### 参考文献

1. Lu T, Forgetta V, Keller-Baruch J, et al. Improved prediction of fracture risk leveraging a genome-wide polygenic risk score. *Genome Med.* 2021; 13: 16. doi:10.1186/s13073-021-00838-6.
2. Forgetta V, Keller-Baruch J, Forest M, et al. Development of a polygenic risk score to improve screening for fracture risk: A genetic risk prediction study. *PLoS Med.* 2020; 17: e1003152. doi:10.1371/journal.pmed.1003152.
3. Martin AR, Kanai M, Kamatani Y, et al. Clinical use of current polygenic risk scores may exacerbate health disparities. *Nature Genetics.* 2019; 51: 584–91. doi:10.1038/s41588-019-0379-x.
4. Guo R, Wu L, Fu Q. Is There Causal Relationship of Smoking and Alcohol Consumption with Bone Mineral Density? A Mendelian Randomization Study. *Calcif Tissue Int.* 2018; 103: 546–53. doi:10.1007/s00223-018-0452-y.
5. Hemani G, Zheng J, Elsworth B, et al. The MR-Base platform supports systematic causal inference across the human phenome. *Elife.* 2018; 7:e34408. doi:10.7554/eLife.34408.
6. Burgess S, Davey Smith G, Davies NM, et al. Guidelines for performing Mendelian randomization investigations. *Wellcome Open Res.* 2020; 4: 186–186. doi:10.12688/wellcomeopenres.15555.2.
7. Cook D, Brown D, Alexander R, et al. Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline: a five-dimensional framework. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2014; 13: 419–31. doi:10.1038/nrd4309
8. Sakaue S, Okada Y. GREP: genome for REPositioning drugs. *Bioinformatics.* 2019; 35: 3821–3. doi:10.1093/bioinformatics/btz166.
9. Konuma T, Ogawa K, Okada Y. Integration of genetically regulated gene expression and pharmacological library provides therapeutic drug candidates. *Human Molecular Genetics.* 2021; 30:294–304. doi:10.1093/hmg/ddab049.
10. Namba S, Konuma T, Wu K-H, et al. A practical guideline of genomics-driven drug discovery in the era of global biobank meta-analysis. *medRxiv.* 2021; 2021.12.03.21267280. doi:10.1101/2021.12.03.21267280.



骨・運動器領域のトップランナーが一堂に会し、国内外の動向、次の展望についてグローバルレベルに議論！

**BONE**  
**SUMMIT**  
今、そして次へ！



メンバー

**伊豆 弥生**  
岡山理科大学獣医学部獣医学科実験動物学講座  
講座長/准教授

**上岡 寛**  
岡山大学学術研究院医歯薬学域歯科矯正学分野  
教授

**斎藤 充 (司会)**  
東京慈恵会医科大学整形外科講座 教授

**中野 貴由**  
大阪大学大学院工学研究科マテリアル生産科学  
専攻生体材料学領域 教授

(五十音順)

## 骨密度以外の骨強度因子 「骨質 New Era」



斎藤 充 先生(司会)



中野 貴由 先生



上岡 寛 先生



伊豆 弥生 先生

### はじめに

**斎藤(司会)** 今回の座談会では、その骨質の制御についてミクロのレベルでどこまで解明されているか論じていただきました

と思います。そこで、骨基質や骨の細胞のご研究などで第一線でご活躍の先生方にご参集いただきました。まず私から

オーバービューをさせていただきますので、それを掘り下げていただけたらと思います。

### オーバービュー

**斎藤** スライドを共有します(図1)。骨強度は骨密度と骨質によって決まり、骨質は骨の材質特性と、その素材をもとに作り上げられた構造特性(微細構造)により規定されます。性ホルモンの欠乏や加齢によって骨吸収が亢進し、微細構造的な質の破綻と石灰化度の低下によって骨密度低下が起きます。一方では、性ホルモン欠乏や加齢や生活習慣病があるとコラーゲンの分子間架橋などに異常が起き、コラーゲンの配列異常が生じ、骨

強度に対して悪影響をもたらします。中野貴由先生との共同研究により、アパタイト配向性も異常をきたすことがわかっています。

構造学的な骨質因子については、X線を使ったDEXAを行い、Trabecular Bone Score (TBS) とかHip Structure Analysis (HAS) で解析したり、HR-pQCTでより精細な構造学的な特性を知ることができます。コラーゲンそのものの、その代表選手であるI型コラーゲ

ン(type I collagen)の異常については、X線を用いた測定装置で解析することはできません。しかし、コラーゲン老化産物の代表マーカーである終末糖化産物であるAGEsは、骨のペントシジン量と尿のペントシジン量が相関しますので、コラーゲン劣化型の骨折リスクを予測するマーカーになります。そのキットが保険適用に向けて数社から出て、エビデンスも重ねられ、A-TOPの試験でも有用性が見出されましたので、「骨粗鬆診療に

おける骨代謝マーカーの適正使用ガイドライン」に盛り込まれました。

コラーゲンを研究される先生ならご存知のかたが多い「コラーゲン実験法」(講談社1985)とか「コラーゲン代謝と疾患」(講談社1982)といった書で示されたように、コラーゲンが生合成されていく過程では、コラーゲンに翻訳後修飾の分子間架橋ができる前に、架橋前駆体のアミノ酸に水酸化が導入されるなど複雑な修飾がほどこされます。コラーゲン架橋には、骨芽細胞の能動的な石灰化過程を誘導し、かつ骨コラーゲンを弾力に富む組織にする善玉架橋と、骨芽細胞のアポトーシスを誘導し骨コラーゲンを過剰にむすびつけ硬くて脆くする悪玉の架橋にわけることができます。

今日は、コラーゲン架橋ができて石灰化が起きる過程の中で、I型コラーゲンが細胞から分泌されてから、配列し、機

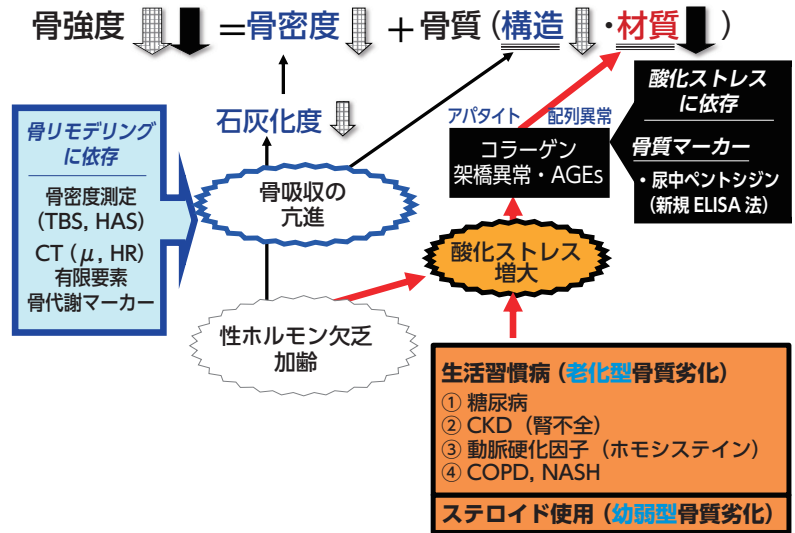


図1 骨脆弱化の機序 (引用文献以下)  
(Saito M, Marumo K. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporos Int*. 2010 Feb; 21(2): 195-214. doi: 10.1007/s00198-009-1066-z)

能を発揮する過程で生じるミクロのレベルでの骨質の制御について、中野先生、

上岡先生、伊豆先生にお話ししたいと思っています。

## 1. 生理的な成長と老化に伴う変化

**斎藤** まず、コラーゲン分子の並びの重要性について、生理的なところでどういことが起こっているかということや病

的なことについて、先生方が研究で明らかにされたことをご紹介いただきたいと思っています。中野先生、マクロの部分では、

細胞外に分泌されたコラーゲン分子とアパタイトの配列についてご紹介いただけますでしょうか。

### 骨のアパタイト／コラーゲン配向性の評価法の進化と骨質因子としての骨質配向性

**中野** 私は工学研究科の所属、さらにはもともと金属材料の研究をしていたこともあり、原子レベル、ならびに原子配列の異方性という観点から、医歯薬系の先生方のお知恵を借りながら骨の研究を展開しています。

例えば、日本が誇る鉄鋼材料である電磁鋼板の研究においては、電磁鋼板自体の磁性特性を引き出すために、原子・結晶の方向を特定に配列させます。また、高速に回転する航空機のタービンブレードのような高温・高強度に耐えられるような材料では、遠心力の方向に特に強い強度を実現できるように、その方向に原子を優先的に配列させます。こうした工学的観点からすると、骨の密度以外の指標ということで真っ先に思いつくのは、

原子がどのように配列しているかということです。特にアパタイトに関して言えば、六方晶系の結晶構造が数十ナノオーダーで微細な結晶として、I型コラーゲン (type I collagen) の周りに沈着し、走行したコラーゲン線維をテンプレートにしてアパタイトがc軸方向に平行に配列しています。そのc軸が高強度を発揮する方向になることから、三次元的にどの方向に優先的にアパタイトが配列、つまり配向するかということが一番のポイントになり、最終的に強度と密接に関わりやすいはずだということで、本日出席しておられる全先生方と共同研究をさせていただいています。

スライドを共有させていただきます (図2&図3)。図2に示した六角柱の模

式図がアパタイトの原子配列の最小ユニットで、原子配列はオングストロームレベルです<sup>1)</sup>。これがある固まりとして、小さな単結晶の宝石のように結晶子として同じ方向を向き、I型コラーゲンの走行方向に対してc軸が平行に並ぶというのがベースになると思います。七面鳥の石灰化腱はきれいに一軸に配向していますが、その状態と似ており、石灰化腱の方が一軸方向に強く配向していますが、骨では長管骨であってもそれほど配向度は強くありませんが一軸配向性を示します。長管骨の場合は、荷重骨であっても非荷重骨であっても一軸に優先配向するのは、筋力などの存在と関連深いためであると思います。骨が配向性を持つ一番重要な駆動力は、外部からの力にどれだ



け耐えられるかということだと考えられます。そのため、骨長手方向にコラーゲンとアパタイトが優先的に一軸に配列するような状況になるということです。頭蓋骨では二次元的に配列し、顎骨では咀嚼の影響を受ける部位では咀嚼方向に沿って局所的に強く配向し、少し離れたと近遠心方向の顎骨を支える方向に配向性が変化することになります<sup>1)</sup>。

骨は階層的にサイズオーダーに応じて様々な変化が見られますが、基本的に一番明確に骨微細構造の変化が認められるのは骨再生過程です。骨欠損部での骨再生が進む場合には、上岡先生が研究されている、オステオサイトの応力感受機能がとても重要です。オステオサイトはメカノセンサーとして必ずしも骨密度を決めるだけではなく、コラーゲン／アパタイトの配向性までも三次元的に決めていきます。上岡先生からお話があると思いますが、三次元ネットワークを組む骨細管内の液体流動によってそれが決まっています。外力に基づく液体流動と、それにレスポンスするインテグリンへの働きかけということになるのだと思います。

図3に老化架橋がないようなフレッシュな状態のラビットの尺骨を20mm欠損したモデルで再生した例を示します。rBMP-2を徐放しているので比較的ターンオーバーしやすい状況になっていますが、グラフに示したように24週になってやっとアパタイトの配向性も長手方向に揃います<sup>3)</sup>。再生初期では、単純な言い方をしますと軟弱な骨、つまり石灰化が十分なされていないような幼弱な骨ができますので、その状態では外部から一軸方向に力が負荷されても、実際にはその中に存在する、いわゆるメカノセンサーとしてオステオサイトが骨細管を通じての正常な応力を感じる事ができないので、最初は非常に低い配向性になってしまいます。かなり石灰化が進んで12週ぐらになると再生骨はモデリングしながら、荷重がかかってきますので、本来の破骨細胞による骨溶解が発生し、配向性がどんどん整っていきます。その配向化

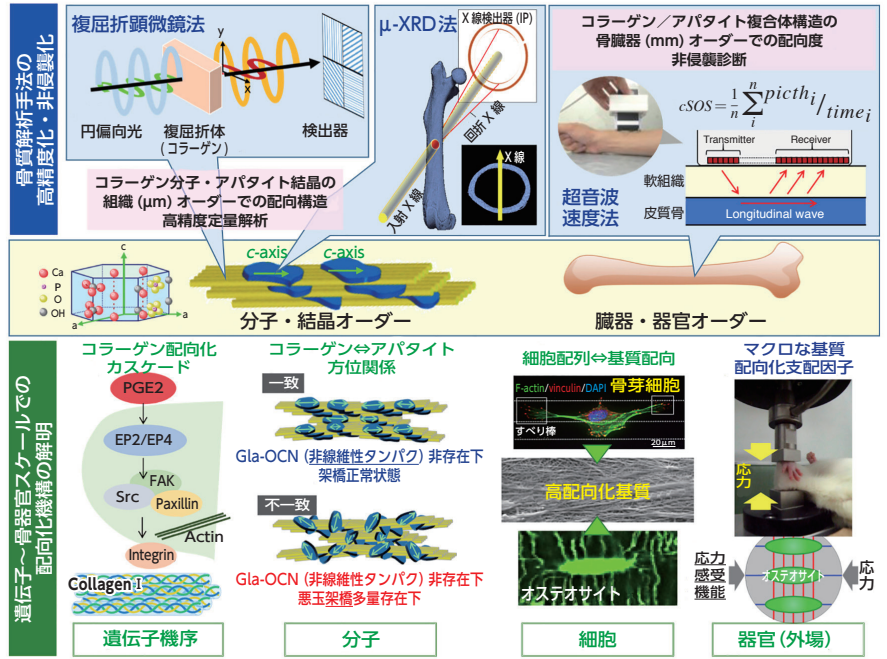


図2 骨質解析手法の高精度化・非侵襲化／遺伝子～骨器官スケールでの配向化機構の解明 (文献1と2から改変引用)

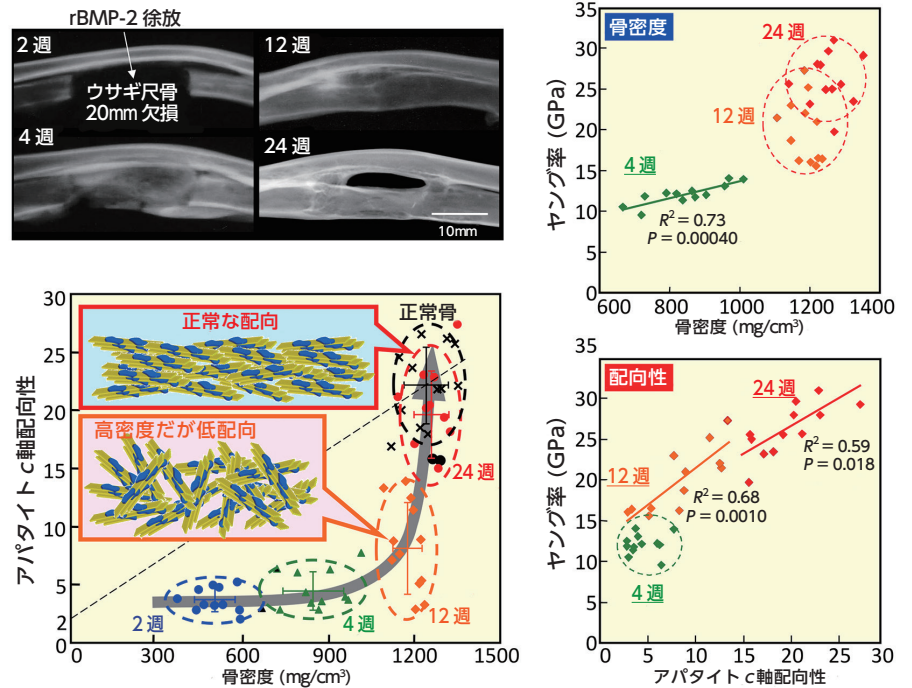


図3 骨基質配向性は重要な骨密度支配因子の1つであり骨再生時に顕著に表れる (文献3から引用)

の過程で再生骨の力学的な特性が変化しなければ、配向性を整えることに何ら意味がないことになります。ここで骨密度はアパタイトの量ですし、配向性はアパタイトのc軸が三次元の特定方向、この場合、骨長手方向に配列している度合

です。配向性は密度が高くならなくても、この場合には相対的に長手方向にどれだけ向いているかというもので、鉛筆が100本ある状態と10本ある状態でも、それぞれ同じ方向に80本向いている場合と同じ方向に8本向いている場合では



配向性は同じということになり、密度とは関係ありません。したがって、もちろん両者間での相互作用はありますが、骨密度と配向性は独立な指標として分離して考えることができます。

骨再生の場合はほとんど老化架橋がないことが予想されますので、非常にシンプルな例だと思います。初期の4週だけ骨密度が配向性を支配し、ばね定数である力学特性の代表例であるヤング率に対しては正の相関関係を示します。しかし、それ以降は骨密度とはほとんど関係がなくなり、12週、24週のヤング率と配向性の関係は配向性のほうが力学特性を強く支配するようになります。これを重回帰分析すると週齢によって程度は違いますが、4週から24週の週齢では約7割が配向性によって力学特性を支配し、骨密度の役割は約3割に留まります。骨再生過程では、骨配向性が力学特性に対し非常に敏感に効てきます。これが生理的な状態ではないかと考えますし、部位によっても異なるということになります。

また、1日10分ほど荷重をかけて配向性と骨密度と骨量の変化を見たところ、正常な状態から周波数を変えて荷重をかけて歪みを変えていくと、一番センシティブに配向性に反映しました<sup>4)</sup>。お

## 骨細胞の機能と骨質制御

**斎藤** ありがとうございます。中野先生のお話は上岡先生のご研究とも重なります。細胞配列から基質が生まれる過程での基質合成機序についてイメージも使って多くのことが明らかにされましたが、特にどのような制御を受けているのか、上岡先生にお教えいただけると幸いです。

**上岡** コラーゲンの配向性とアパタイトのc軸の件、ちょうど自分が準備していた内容と重なり、非常に興味深く聞きました。スライド(図4~6)を共有させていただきます。皆さんご存じのように、コラーゲンはきれいな配向性を示しているとともに積層化しています。図4で示したようなベニヤ板状積層がマイクロ単

そらく、非常に短い時間で機能適応しようとするときに、配向性は骨基質方向性を変化させるだけなので骨密度や骨体積に比べ、早期に対応できる状態ののだろうと考えられます。この際、オステオサイトの応力感受がやはり重要になりますので、オステオサイトの大家である上岡先生と共同研究を続け、昨年、先生と一緒に原著論文を発表させていただきました<sup>5)</sup>。

オステオサイトのラクナの形態は長く伸びるほど細管の多くをその垂直方向に伸ばしています。オステオサイトラクナが荷重方向に対して平行に、しかも長い形状で配列していればしているほど、細管に対する荷重が効率的に負荷され、垂直荷重を最も効率的に受けることができます。ですから、三次元方向にばらばらに細管を伸ばしていた場合、液体流動が発生した場所で、液体流動をストップさせるように周囲の配向性を変化させるといったメカニズムが起こる、つまり外部の異方的な荷重が内部では等方的な荷重へと変換されているということの意味しているのだと理解しています。それをさらに、効率的に検知できるようなセンサーとしての形態を持っているということ、上岡先生と証明いたしました<sup>5)</sup>。

位できれいな層になって骨ができています<sup>7)</sup>。おそらくこれが基質のメカニカルストレスと非常に関係しているのだろうと私も思っています。同じような配向性

オステオサイトの周囲にはほぼ垂直に伸展している骨細管と垂直になるように、コラーゲンがきれいに配列します。一方で、骨芽細胞からコラーゲンの産生を見ると、骨芽細胞が伸展した先端部の接着班内でインテグリンにコラーゲン線維がトラップされてコラーゲンの優先配列を作ります。これは人工的にも可能となりますし、生体内でも同様のことが起っているのだと考えています。要するに、骨基質を配向させたい方向に骨芽細胞の優先配列を決めて、細胞伸展方向に配向性が構築されるようなメカニズムがあり、自己組織化的な石灰化を含めてI型コラーゲンに対してアパタイトのc軸が平行配列していくのではないかと考えます。ですから、骨再生でお見せしたものは、実際にはオステオサイトの命令に基づきます。例えば、オステオサイトから分泌されることが良く知られている生理活性脂質PGE2をアンタゴニストで抑制すると、コラーゲンの配列が乱れてしまいます。ですから、オステオサイトが応力を感じてシグナルを出すときに極性をどうやって決めるかは難しいところですが、少なくともPGE2はコラーゲンの配向化に関与する1つの重要な因子であることは間違いなさそうです<sup>6)</sup>。

で並べると一定の方向からの力には弱くなるけれど、こういうふうに異方的な感じで積層していることが、硬いと言いますか、柔軟性のある骨を作るポイントに

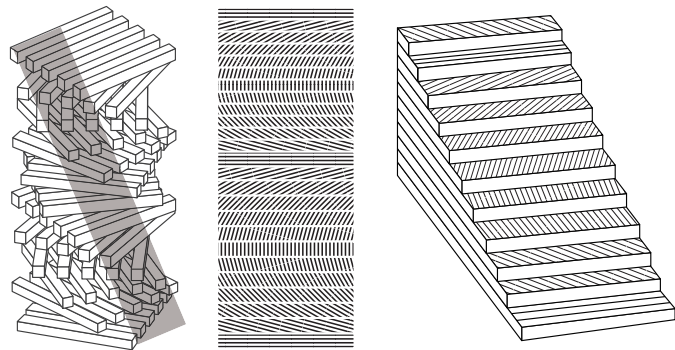


図4 コラーゲン細線維は積層構造をもち各層は一定の角度をもって重なっている (Giraud-Guille MM. Twisted Plywood-like architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons. *Calcif Tissue Int*: 1988より改変引用)

なっているのではないかと思います。

では、これにどうやってアパタイトの結晶化が関与してくるのかについて、後で中野先生に教えていただきたいのですが、その前に、実際に見られるコラーゲンの積層という現象を示します(図5)。骨芽細胞がコラーゲンを出すわけであって、勝手にコラーゲンが伸張するわけではないので、必ずこうして骨芽細胞が移動しているはず。普通に考えて、動かなければ不規則に堆積するだけであって、きれいな配向性の形成は、できた骨の内部で起きるといふより、骨の表面で先に起きていると考えるのが自然です。そうすると、この構造物ができるためには、一律に同じ方向に同周期で骨芽細胞が動き、またあるときに同じ方向に同じ周期で動くことを繰り返すことが必要になって来ます。このように(図4)、縞様に見えるのは、おそらく角度はそれほど大きく変わらなくても骨芽細胞の同調性があるからだと思えます。

このようにしてコラーゲンの構造物ができるわけですが、実際にコラーゲンが出ているところを見たくて超高圧電子顕微鏡で観察したところ、コラーゲンを産生している骨芽細胞は、下部の基質に全然くっついていない場所(図5①)と、非常に何かを出して骨基質との境界が不鮮明なほどくっついて見えるような場所(図5②)が必ずあります<sup>8)</sup>。この部位は沢山のミトコンドリアも見られて、何かが発能にできていることをエネルギー的にサポートしているように見えます。骨芽細胞から出ている1本のコラーゲン細線維をずっと追っていくと細胞からかなり離れたところまで追えるのです。産生されたコラーゲン細線維が勝手に伸びていくことは考えにくいので、骨芽細胞が一方方向性に動いていて、コラーゲン細線維を出していることが分かりました。

先ほど斎藤先生は、出来たてのコラーゲンは軟弱だと言われましたが、そのコラーゲンはどこまでできるかと言いますと、骨芽細胞の膜表面の鞘の中で生合成されたプロコラーゲンがペプチターゼ

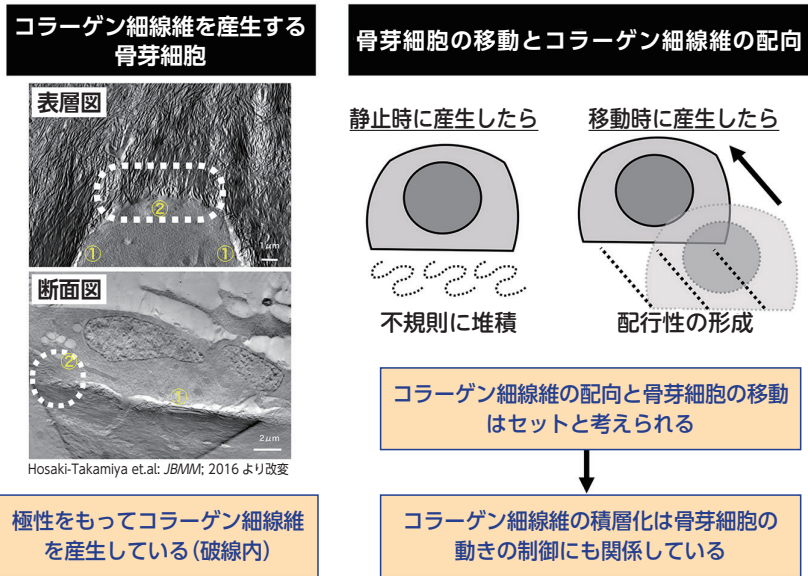
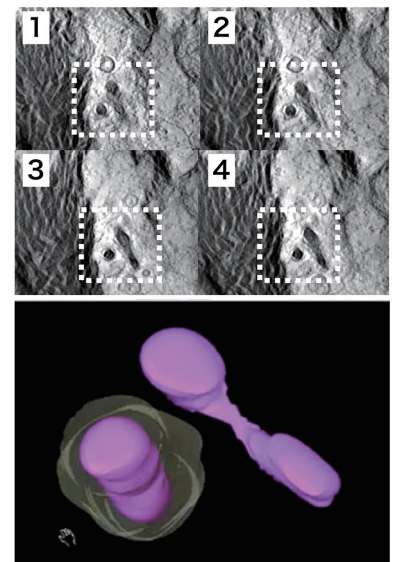


図5 骨芽細胞の移動およびコラーゲン細線維の産生・配向

によりコラーゲン分子となり線状化します。これがまさに鞘の中にあるコラーゲンの細線維です(図6)。ここからコラーゲン細線維はでて、お互い架橋されて強くなっていきます。このようにして産生されたコラーゲン細線維は骨芽細胞が同調して積層されていくところが非常に大きなポイントであり、そうした積層が骨基質の硬さ、柔軟性を作るための基盤になり、その基盤ができた段階で次にアパタイトが結晶化していくというふうになっています。

ただし、少し疑問もあります。骨芽細胞が移動するのであればどうやって骨細胞ネットワークは形成されているのか? 蛍光標識した骨細胞のネットワークを観察した場合には、骨細胞は骨表面から深部にわたって細胞突起で繋がっています。しかし、細胞同士が繋がったままでは骨芽細胞は移動できないですし、骨芽細胞が動くとネットワークは切れるはずですから、どうして骨は細胞性ネットワークを維持しながら積層構造を持つのか分かりません。積層構造がベニヤ板状に形成されるたびに、どこかで一定数の骨芽細胞は取り残されて骨細胞になります。しかし、それがどういうふうな機序で取り残されるかというのが分からないのです。確率的に、表面に6つの骨芽



Hosaki-Takamiya et.al: JBMM; 2016 より改変

下の図は1から4までの連続断層像を立体構築したコラーゲン細線維を産生する鞘状構造物

図6 骨芽細胞の細胞質に形成されているコラーゲン産生のための鞘状構造

細胞があったら、その下に1つの骨細胞が埋まっています<sup>9)</sup>。どうしてそのような選択が行われるのかが、この謎を解く一つのポイントになってくるのではないかと考えています。

**斎藤** ありがとうございます。骨質に関して一般的にコラーゲンのことで分かっていることに加えて、上岡先生に大事なことをお示しいただきました。骨の



コラーゲンは必ず積層構造になっていて、それぞれ90度まではいきませんが、それぞれかなり違う角度できれいに層板状に並んでいます。同じI型コラーゲンでも、伊豆先生も研究されたような腱は必ず一方向に並んでいます。アキレス腱を顕微鏡で見るとほとんどの面は同じ方向に向いていくわけです。骨の場合には、モデリングでもリモデリングの過程でも必ず違う角度でそれが達成できています。

応力によって一定方向のc軸方向にし

か配列しないのであれば、積層構造にはならぬので、骨においては応力のみならず、他の何らかの因子によって、腱のI型コラーゲンは違う配向性が制御されていると考えられますね。興味深いことに、非荷重骨も同じように積層化します。非荷重骨はIGという重力と骨周囲の筋収縮から得られるメカニカルストレスのみで荷重骨と同等の強度であり続けます。さらに同様の積層構造をとると考えられます。荷重骨はベッドレストした

だけで骨密度が下がっていきませんが非荷重骨は維持されます。私は、メカニカルストレスを研究している先生によく質問するのですが、非荷重骨には荷重ストレスがなくてもIGというもののだけで荷重骨と同じだけのものを作りなさいというスイッチがあり、荷重骨は逆に荷重がなくなったらもう駄目ですよというスイッチを組み込まれているのではないかと。これは荷重骨、非荷重骨を考える上で非常に重要ではないかと考えています。

## 2. 骨質の制御因子は骨リモデリングだけなのか？

**斎藤** コラーゲン産生細胞は、主たるI型コラーゲンのみならず、その周囲に

様々なタイプのコラーゲンを産生します。伊豆先生はXII型コラーゲンとVI型コラー

ゲンを研究されています。これらの機能についてご説明いただけますか。

### 骨運動器の非線維性コラーゲン (XII型, VI型) の機能と骨質

**伊豆** 骨の主なコラーゲンはI型コラーゲンですが、そのほかのコラーゲンも骨形成に関与していることがわかってきました。これまでに脊椎動物では28種類のコラーゲンが報告され、I型コラーゲンのように線維を形成するタイプはI型、II型、III型、V型、XI型、XXIV型、XXVIII型の7種類が知られています。一方で、線維を形成しない、非線維性コラーゲンと呼ばれているタイプがあり、その中でもVI型コラーゲンとXII型コラーゲんに私は着目しています。

画面を共有させていただきます(図7~9)。XII型コラーゲンはファシット(FACIT)コラーゲンというタイプであり、I型コラーゲンのそばにあってI型コラーゲン同士を架橋するという分子架橋のような役割を果たすことでI型コラーゲン線維の太さとか線維間の距離を制御していると言われています(図7)。VI型コラーゲンはビーズ状(Beaded filament)タイプと呼ばれているもので、マイクロフィラメントのネットワークを作ります(図7)。VI型コラーゲンはいろいろなところに発現しているのですが、XII型コラーゲンは骨や腱などメカニカルストレスがかか

りやすい部位に高発現するという特徴があります。XII型とVI型コラーゲンは遺伝子欠損により、骨や筋肉、腱が脆弱するといった類似した病態になります<sup>10)</sup>。

まず初めに、I型コラーゲンの生理学的な状態での成長のときに起こる線維形成について細かく機序が分かっていたので、それを少しお示しします。

I型コラーゲンが細胞の表面に分泌されてくることは知られていますが、その後ミオシンIIという分子により細胞内にI型コラーゲンが引き込まれ、それによって、先ほど上岡先生がお示されたように袋の中に閉じ込められ

ます。腱ではこれはフィブリポジター(fibripositor)と呼ばれています。これがメカニカルストレスのかかる方向に伸びていくことによって線維の方向性が決まっていることが分かってきました<sup>11)</sup>。ただ、この制御を骨で確かめることはとても難しく、骨ではどの方向に伸びていくかなど、詳細はまだそこまで分かっていないです。

先程、斎藤先生からもお話がありましたが、腱ではI型コラーゲン線維は一方向に平行に走行しています。一方、角膜ではある程度同じ方向に走行した後に垂直に90度曲がって走行します。骨の積

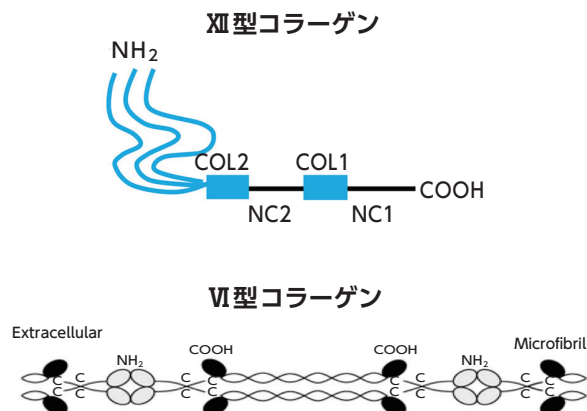


図7 XII型およびVI型コラーゲン構造

(Lampliet al. *J Med Genet.* 2005; Mienaltowski et al. *Adv Exp Med Biol.* 2014 より改変引用)

層構造と同様に、この制御についてもあまりよく分かっていませんが、このような臓器を使って方向性のスイッチング制御が分かれば骨の積層構造の解明にも応用できるのではないかと考えています。

XII型コラーゲンとVI型コラーゲンは、細胞表面に多く局在していることから、これらが細胞と細胞外環境を制御することで、I型コラーゲン線維形成制御に関係しているのではないかと考えて研究を進めています。細胞表面上でVI型コラーゲンとかXII型コラーゲンがなくなるとどのように見えるか、腱のデータをお示します(図8)。これは、野生型(WT)とノックアウト(Col12a1KO)の腱の横断像です。1個1個がI型コラーゲン細線維ですが、ノックアウトでは細線維間のスペースが拡大しているのがわかります。このため、XII型コラーゲンがコラーゲン線維間の距離を制御していると考えられます<sup>12)</sup>。骨ではこういう線維間の空いたところにアパタイトとか他のタンパク質が入って関与してくるのではないかと考えていますが、先生方に教えていただきたいと思っています。

腱細胞を電顕レベルで見ますと、生後4日の野生型では腱細胞が突起を伸ばしネットワーク構造を作っています。一方、ノックアウトでは明瞭な細胞突起が見られず、ネットワーク構造が壊れてしまい、細胞突起で囲まれるFiber domain (F, 線維)も形成できなくなります。30日齢でも腱細胞ネットワーク構造は認められません。この時、腱のStiffnessは増加し、硬くなり、切れやすくなってしまいます。腱も筋肉と同じで階層構造により伸縮性を獲得しているため、線維の区画化を形成する細胞間ネットワーク形成制御が力学的特性の獲得に重要だと考えられます。

すなわち、XII型コラーゲンは細胞外では線維間のスペーシングの場所を制御しているのではないかと、また、VI型コラーゲン欠損でもI型コラーゲン線維形成に障害が見られるので、細胞外周囲でこれを制御しているのではないかと、それ

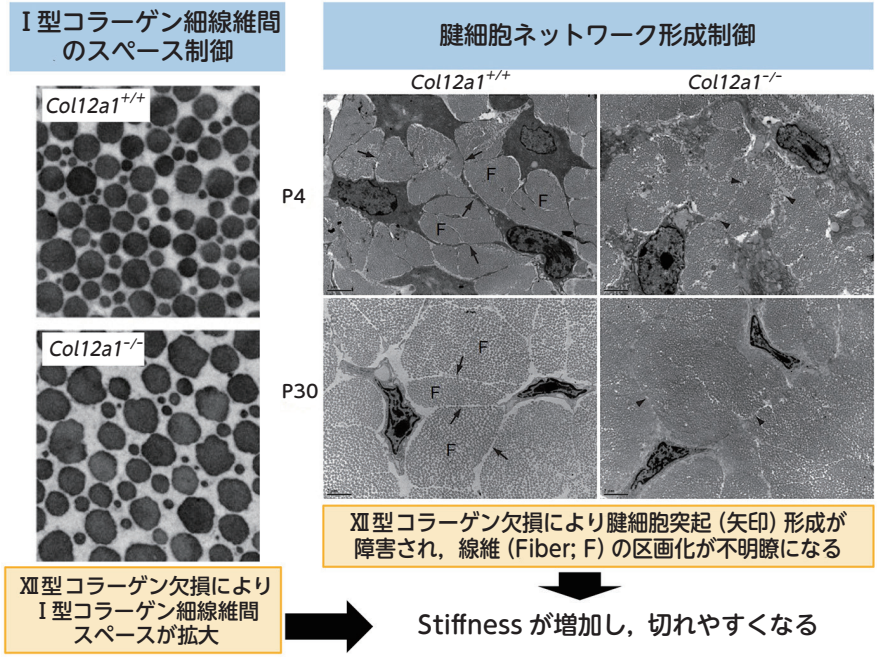


図8 XII型コラーゲンによる腱のコラーゲン線維形成と細胞制御 (Izu et al. Matrix Biol. 2020)

と同時に、XII型とVI型コラーゲンは腱細胞同士を繋ぐことによって区画化、線維の構造を制御し、それによって組織強度に関与しているのではないかと考えています<sup>12,13)</sup>。実際、VI型とXII型コラーゲンは細胞同士を物理的に結合させることも見出しています<sup>12)</sup>。

XII型コラーゲンは、骨では骨細胞には発現せず、骨芽細胞だけに発現します<sup>14)</sup>。図9で示した免疫染色では、皮質骨には発現しておらず、骨膜や骨芽細胞に局在しているのがわかります。XII型コラーゲンをノックアウトすると骨量が少なくなると骨強度も落ち、コラーゲン線維の配向性がおかしくなることが偏光顕微鏡所見でわかりました。また、ノックアウトではI型コラーゲンの量自体はあまり変わりませんが、骨基質タンパク、オステオカルシン、オステオポンチンは低下します。また、ファロイジン染色では、ノックアウトすると骨芽細胞の極性化や配列が乱れると同時に、骨細胞のネットワーク構造が全然取れなくなってしまいます(図9)。骨細胞数も増えます。VI型コラーゲンも同様な表現型を示します<sup>15)</sup>。このときコミュニケーションは保たれているかどうか、コネキシンと

かギャップジャンクションの機能を調べたところ、やはり落ちてしまっていますので、これにより骨におけるI型コラーゲンの配向性にも影響が出ているのではないかと考えています。こちらについては上岡先生も研究され先ほど指摘された細胞の同調性が、おそらくコミュニケーションがあることによってもたらされ、実はそこに、細胞外にいるマイナーなコラーゲンに関わることによって細胞間距離も制御され、それによって、中野先生がおっしゃっていた細胞の大きさとか、コラーゲンの配向性が決まってくるのではないかと考えています。

**斎藤** ありがとうございます。大分繋がってきました。腱のデータに関して1つ確認したいのですが、XII型コラーゲンはI型コラーゲンの1分子にそれぞれ1個ずつ付いているのですか。

**伊豆** 分子というよりはI型コラーゲン線維についているようですが、その数についてはまだ分かっていません。

**斎藤** 分子1個1個にXII型コラーゲンが付いて架橋し、分子1個と1個の間のXII型がそのコラーゲン分子の配列を乱すのであれば、腱のノックアウトでコラーゲン線維の太さは成長していたと思うのです。



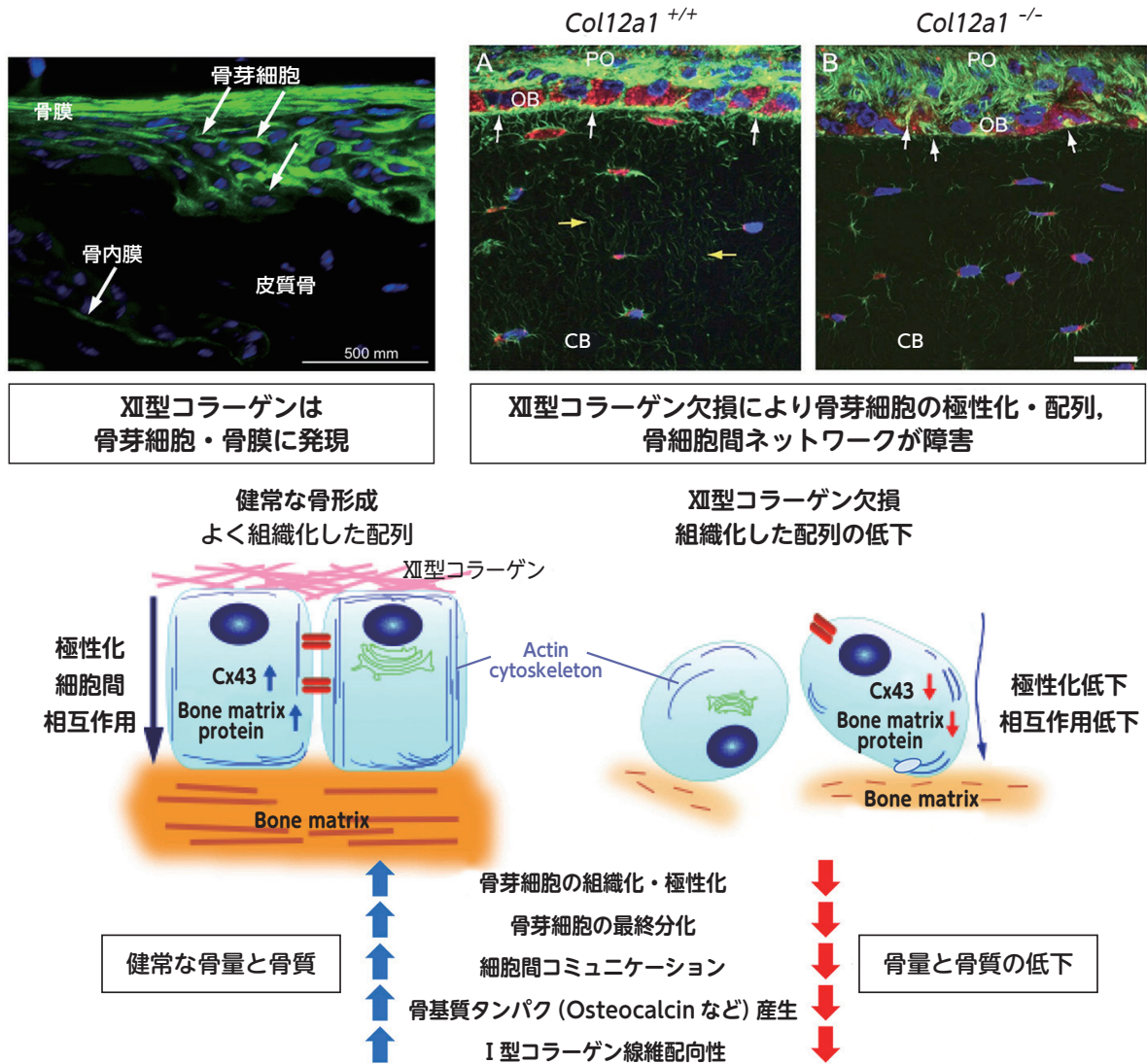


図9 XII型コラーゲンの細胞間コミュニケーション制御を介した骨量と骨質制御 (Izu et al. J Cell Biol. 2011)

**伊豆** そうですね。コラーゲン線維の太さ自体にはあまり変化は見られなかったです。

**斎藤** ステロイド投与したラットの腱を見ると、生理的な酵素依存性の善玉架橋がリジロキシダーゼという誘導因子となる酵素の分泌が低下し、コラーゲン線維が太く成熟できないことが分かりました。伊豆先生のデータではある程度、コラーゲンの線維径は太くなっていますが、線維と線維の間の空隙が結構多く、まさに線維と線維の間の距離を決めているというイメージだったのですが、そのような理解でよろしいですか。

**伊豆** そうですね。コラーゲン線維の断面が正円ではなく、少し凹凸がある部分がありますので、コラーゲン線維の重合

や融合障害もありますが、主にはスペーシングという線維間の距離を制御していると考えています。VI型コラーゲンについては、細胞周囲と細胞から遠い部分でも違いがありますので、もう少し詳細な研究が必要かと思います。

**斎藤** わかりました。さらに細胞と細胞をきれいに並べていく。細胞が並ぶこと自体がその先にあるコラーゲンの合成、配向性に直接関係してくると思われませんか。例えばメカニカルストレスに応じて細胞は形も変わりますし動くとも言われているので、それが上岡先生のおっしゃるように細胞が動いた方向にコラーゲン線維が配向することは興味深いですね。われわれ臨床家は細胞が動くという、破骨細胞の動画で戦車みたいに動く

ようなイメージを抱きますけれども、骨芽細胞はある程度動きながら積層化を誘導している可能性がありますね。その際にXII型コラーゲンはシャペロンのような働きをすると感じました。

コラーゲン分子の線維化を制御する因子として、小型のプロテオグリカンであるデコリンやバイグリカンといった、ロイシンリッチリピートプロテイン (Leucine-rich repeat protein) が知られています。

上岡先生にうかがいますが、XII型コラーゲンと細胞の配列と骨芽細胞に入っていくまでの過程を結び付けるような考察はございますか。

**上岡** 非線維性のコラーゲンが細胞間コミュニケーションに影響を与えるという

お話にはアツと思いました。私はずっと骨細胞のコミュニケーションを研究する中で、そこに影響を与えるファクターとして、骨リモデリングでは骨細胞周囲のpHが変わることや、カルシウム濃度が変わることが1つの要素であることを見てきました<sup>16)</sup>。これは破骨細胞が近くにきたような状態なので、カルシウム濃度が上がってpHが下がったときには、細胞間コミュニケーションが著しく低下するのです。逆に骨形成に働くPTHの

濃度が上がると今度は上昇するのです。そういうデータがあったので、伊豆先生がおっしゃったように基質そのものが直接細胞間コミュニケーションをコントロールしているということになると、そういうものが同調性と方向性をスイッチオン・オフする転機になるのではないかとということで非常に面白く聞かせていただきました。

また、先の図(図5①)でお示したように細胞から出たばかりのコラーゲン細

線維は結構カーブしていますが離れれば離れるほど真つすぐになっていることや、お互いがくっつき合っているのが観察されたので、何らかのメカニカルストレスでコラーゲン細線維が引っ張られていたからそうなのかと考えていました。そこにもう1つのファクター(Ⅻ型コラーゲン)が入って配向性をきちんと形作っているという報告を知ったのは非常によかったです。私にとっては、新発見です。  
**伊豆** ありがとうございます。

## アパタイトの成長過程に影響を及ぼすものについて

**斎藤** 腱では、メカニカルストレスをベースにしながら細胞が動いた方向にコラーゲン線維の配向性は規定されますが、骨の場合には積層構造をとらせるため細胞の挙動のみでは説明出来ない何らかの要素が必要になりますね。

中野先生にうかがいたいと思います。モデリングの場合、骨形成、骨欠損のモデルの場合には腱の再生と同じように、ある程度同じような感じでコラーゲンが配向していくと思いますが、リモデリングの過程でも、コラーゲンは積層しているけれどもアパタイトの配向性は測定上では一方向に配向性が整うようなことはあり得るのですか。必ずコラーゲンと平行なのですか。そのパラメーター、検証についてはいかがでしょうか。

**中野** コラーゲンに対するアパタイトの配向は基本的に正常な状態では平行だと思っていましたが、2020年に長崎大学の小守壽文先生と一緒にオステオカルシンノックアウトによる研究を行って考えが変わりました<sup>2)</sup>。

I型コラーゲンではコラーゲンホールゾーンにて核形成するといわれています。しかし、非常にサイズが大きい場所なので、そこに何らかの分子が存在しなければそれは難しいだろうと考えていました。実は金属材料でも似たような考え方をします。そこでオステオカルシンノックアウトマウスを検索したのですが、コラーゲンの配向に対しては全く影響がありません。長管骨ではきれいに骨

長手方向に配向しています。ところが、オステオカルシンをノックアウトしたマウスではアパタイトの配向性は完全に乱れていて、アパタイトc軸とコラーゲン配列は全く一致していないのです。伊豆先生のⅫ型コラーゲンのデータでも著明なオステオカルシンの濃度変化が示されていまして、コラーゲンだけではなく、コラーゲンに対する相対的なアパタイトのc軸の方向性付与も何らかの影響を受けるのではと思いつつ興味深く聞かせていただきました。

力学特性に及ぼす影響として、言い方は適切ではないですがアパタイトは最後に残る残骸みたいなものですが、それが強度を決めています。それで、斎藤先生と一緒に研究させていただいたときのよう、老化架橋ができればその配向性がきれいに乱れます<sup>17)</sup>。その相関がとてもきれいに出てきます。老化架橋と配向化形成の詳細なメカニズムについてはまだ分かっていませんが、老化架橋が配向性を乱す要因になっていますので、それが骨力学特性に影響を及ぼし、おそらくそこにオステオカルシンが絡んでいると現状では考えています。

**斎藤** ありがとうございます。今のお話を少しまとめてみたいと思います。コラーゲンが細胞から出て配向します。そして、ホールゾーンに石灰化が起きるわけですが、コラーゲン線維がきれいに並ぶためにはメカニカルストレスが必要であるということになります。Ⅻ型

コラーゲンが細胞と細胞の並びを整えるという制御が、その上流にあると言えると思います。I型コラーゲンが配列していく過程でホールゾーンに石灰化するという考え方は、第一次ミネラル化ということになります。第二次ミネラル化へと発展していく際には、第一次ミネラル化で生じたアパタイトの配向性を継承し素直に配向するとは限らないように思えます。例えばアパタイトに結合するようなビスホスホネートなどのキレート剤、もしくはコラーゲン結合タンパクが結合すれば、アパタイトの配向性は変化すると思いますが、いかがでしょうか。

**中野** 核形成では確かに方向性を決めるのにオステオカルシンが効いていますが、成長速度を見ると結晶のサイズが違うというデータもあります<sup>18)</sup>。我々のデータでは実は成長に対して効いていないのです。成長に関してはおそらく違うものが効いているのではないかと。以前、上岡先生ともディスカッションしたことがあるのですが、例えばエナメル質の配向を決めるアメロジニンが骨にあるので、そういった別のタンパクが効いているのかなど。そう思いつつまだ深く調べられていません。成長の段階については私の現在までの研究からはなんとも言えない状況です。

**斎藤** 分かりました。お話に出たAGEsについて言いますと、コラーゲンを構成するアミノ酸であるリジンやアルギニンにAGEsが誘導されますと、アパタイト

の配向性が悪くなる一つの理由として、本来の生理的な善玉架橋が誘導されずに、コラーゲン自体の配列が乱れます。

ミネラル化が起こるにしてもコラーゲンという足場の配列の乱れにより、アパタイトの配向も乱れると考えられますね。

こうした事象を説明するには、さらに上流で制御している細胞同士の繋がりを考える必要があります。

### 3. 骨質制御因子から見た治療の可能性とは

**斎藤** 少し話は変わりますが、病態・病気によって、こうすれば制御・治療できるかもしれないというサジェスションがありましたらうかがいたいと思います。上岡先生、何かございますか。

**上岡** 先のように、骨芽細胞の動きが骨を形作っていくことが治療の対象になってくるかもしれません。その動きを制御することで骨質のコントロールすることができるかもしれません。

**斎藤** 細胞が動いていくということでは、培養でも細胞が動きながらその方向に細胞を分泌しますか？

**上岡** それが見えるのかと思って観察しましたが、カルチャーディッシュ上ではほとんど動かないですね。カルチャーディッシュでは骨のような積層構造は作らないので、やはりメカニカルストレスが関与しているのだと思います。

**斎藤** 骨芽細胞様細胞であるMC3T3-E1細胞を培養しますと、コンフルエントに達した後にコラーゲンを多層化させることが知られています。しかし、培養では、コラーゲン線維の配向性は組織とは異なり綺麗な積層化はいたしません。私も、以前、MC3T3-E1細胞を培養しコラーゲン分析を行いました。細胞にメカニカルストレスとして重力負荷をかけたり低出力超音波パルス刺激を与えますと、コラーゲン架橋の形成が正常化して石灰化が促進されることを確認しています。総合して考えますと、骨芽細胞は、メカニカルストレスを感じて動きながらコラーゲンの配向を決めることは確かですね。

部位はどこであっても、その部位の要求に応じたコラーゲンの配向性を得るためにはメカニカルストレスが常にかかっていないといけません。これは腱でも同じだということでもよろしいですか、伊豆先生。

**伊豆** はい。いいと思います。

**斎藤** 中野先生のところでは、治療に関してお考えになっていることはありますか？

**中野** 分子、遺伝子でもある程度配向性に関わるものはありますので、遺伝子注入による治療もありえるかもしれませんが、それは大変な大仕事だと思います。他の機序もありますのでそれは置いておくとして、やはり応力応答が、上岡先生がおっしゃった通り一番重要だと思っています。配向性ができる方向は基本的には、最大主応力ベクトルと言われる剪断応力ではなく、軸応力が最大になる方向になりますので、荷重がかかりやすいようなところで軸応力をかけるような方向に配向させていくという方法が臨床的で使われています。

1例としては、2018年に京セラから出たデンタルインプラント製品FINESIAがあります。普通は溝を切るときにきれいに対称形になりますが、この製品ではホストボーンに対して主応力ベクトルが伝達されるように斜め方向に溝を切ります。そうすると初期から溝に沿って最大主応力がかかることで、予後は、配向性も含めて非常に良いというデータがあります。

また、去年4月にPMDAで承認され

た椎間スパーサー（UNIOS PL）があります。これは応力がかからない場合でも骨芽細胞を一方に配列させることができます。つまり一方に骨芽細胞を移動させることができます。そのためには配向溝を形成する、要するに骨芽細胞が検知して形状伸展や移動を決定する溝を作ってやることで、荷重がかかっていなくても自ずと必要な方向にコラーゲンを配列させます。脊椎は非常に複雑な配向をしているのですが、基本的には頭尾軸方向への一軸配向なので、椎間スパーサーにハニカムツリーインストラクチャー（200ミクロンの周期構造を持った配向溝）を導入すると、荷重がかかっていなくても初期の段階で頭尾軸に沿って骨芽細胞が配列しながら入っていきます。ヒンジのスタディでは通常はスパーサー内に自家骨を設置し、次にその自家骨が吸収され、さらにリモデリングされ、そこから配向化が始まるという3段階を取ります。新規のスパーサーは自家骨を吸収させずに、初期から高配向な新生骨を作ってしまうという戦略で、8週で3倍から4倍の引抜強度が発揮され、まさに爪楊枝が刺さってそれが高強度化するような骨基質を導入することができました。こうした、骨芽細胞の配列を基板の形状で制御しようということを金属3Dプリンターで造形することができます。

**斎藤** ありがとうございます。治療への可能性に関しましては更に研究が進むことを願います。

### 4. 今後の研究の抱負・展望

**斎藤** 今日は、細胞の制御のところから

基質になっていくメカニズムが見え、総

説の図などでお目にかかるような骨から



細胞までの一連の話が繋がって見えてきました。ミクロからマクロまで論じた今回の座談会は、いわば骨質オーバービューといったものとなり、私は改めて認識を新たにしました。これをきっかけに、骨質につながるような研究が盛んになればと思います。

そこで最後に、今後の研究の展望、夢、あるいは抱負ですとか、若い先生に向けたアドヴァイスなりを教えてくださいませんか。

まず、上岡先生、いかがでしょうか。

**上岡** 少しお話しましたが、骨がきちんとした微細構造物を作ることとネットワークを維持することは何か相反するような感じがしますが、そこにきちんとした骨が作られる一つのヒントがあるのではないかと思っています。やはり骨細胞が骨の中に生き残らなければ生きた骨とならないので、それをきちんと把握したいと思っています。

また、中野先生がおっしゃったメカニカルセンサーとしての骨細胞のことで、骨細管が非常に注目されています。細管内を流れる体液の移動が機械的刺激のトリガーとして考えられています。ただ、今日、結晶化というお話を聞いて、結晶化にはやはり水が抜けないといけないうらなうなと思いました。骨基質の主成分であるコラーゲンの間に存在する水分が抜けなければ骨が硬くならない。そうした水路のような役割が、骨細管が維持される理由の一つではないかと思っています。きちんと水路ができなければ硬い骨ができないのではないかと考えてみればこのことも骨質の重要なポイントではないかなと感じました。こうしたことを含め、絶えずシンプルな疑問を持ちながら研究を続けていくことが大事なのだろうと思っています。

**斎藤** ありがとうございます。コラーゲンとアパタイトの間に入る水分には結合水とフリー水があり、フリー水はコラーゲンの配向性を乱す悪玉の水と言えます。コラーゲンとアパタイトに結合する水分は必須であり、それがあること

によってコラーゲンはしっかり配向し、AGEsなどの秩序を乱す翻訳後修飾が誘導されないことが示されています。またそれはMRIで見ることができます。骨細管に繋がるような大きな空隙を作る水の流れの水分と、細胞から出てきた基質同士、有機物、無機物を繋げるような意味のある水分があるのです。水はなかなか研究が難しいので放置されがちですけども、今後非常に大切になってくるだろうと感じました。ありがとうございます。

伊豆先生、いかがでしょうか。

**伊豆** 今日は本当にいろいろな面白いお話が聞けて良い経験ができました。私の研究の展望を申しますと、一つは、骨の中にもI型コラーゲン以外の様々な非線維性コラーゲンがあり、そこで細胞周囲のマトリックス環境を整えることによって細胞自体もうまく働けるし、コミュニケーションも活性化して、その後の骨形成がうまくいくのではないかなと思いますので、掘り下げたいと思っています。また一つには、Ⅻ型コラーゲンは実はメカノセンサーとして働くとも言われたりしていて、その意味でもメカニカルストレスを最初に受容するのはマトリックス成分ではないかなとも思いますので、骨芽細胞周囲、骨細胞周囲のECM環境をもう少し掘り下げてメカニズムが分かってくると、本当の意味で骨全体のメカニズムが分かることになるのではないかと考えています。

**斎藤** ありがとうございます。確かにメカノセンシングという意味では、例えば地震で家が揺れて中にいる人、細胞がいろいろ動きますが、地面の振動を受ける基質がどういう反応をするかによって中に入っている細胞たちの挙動も変わってくると思います。我々は単に、細胞がメカニカルストレスを受けてこうなりましたと言いがちですが、最初の部分のブラックボックスが何も解かれていませんので、ぜひその解明をお願いできればと思います。ありがとうございます。

中野先生、いかがでしょうか。

**中野** いつも先生方のお話をうかがうと大変勉強になります。今日も非常に興味深くうかがいました。ありがとうございます。私の場合は、出来上がったものを解析することがメインで、なかなかメカニズムというところまでいかないことが多いのですが、若い人に対し一言申し上げるとすれば、ネットワークの重要さです。私は工学から飛び込んで先生方とお会いし、医歯薬工連携と言いますか、それぞれのエキスパートの先生方と直接的にご一緒させていただく中で、分からない部分を教えていただき、一緒に解釈までしていくということの繰り返しでした。そういう意味で、オステオサイトネットワークではないですけど、一番重要なのはネットワークだと思っています。私自身まだ分かっていないことばかりですが、一番知りたいところは異方性が構築される根源です。極性、方向性といったことを決めるのは、電子の移動方向、ベクトル性、濃度の勾配といった様々なことが関連すると思っていますが、私の中では今まだ繋がっていないので今後も研究を進めたいと思っています。極性に非常に興味があります。

それから私は今、骨芽細胞と破骨細胞とオステオサイトの相互間の関係性、伊豆先生のお話にもあったコネキシン43を介しての連結とか配向性も非常に効いているようですので、解明できればと思っています。例えば破骨細胞から骨芽細胞への命令は大理石骨病の場合にその配向性に非常に効いているようなので、破骨細胞がいなくて単独培養で骨芽細胞をするとあまり配向が整わないといったことも含めて細胞間ネットワークを工学的に解き明かし、先生方に解釈を加えていただいたり、サジェスチョンをいただいたり、共同研究をさせていただいたりできたらと思っています。私は今までそういう環境に恵まれましたが、これからも今まで以上に積極的にネットワークを広げ深めていくと未来が広がるかなと思っています。ありがとうございます。

**斎藤** ありがとうございます。今日は



先生方のご研究をもとにディスカッションをしていただいたことにより、細胞から基質の制御までの話が繋がり、骨質研究の新しい展望が見えました。こうした機会が日本の若手研究者を盛り上げる一つの糧になればと思います。また機会があれば先生方のご意見をいただきたいと思えます。どうぞよろしくお願ひいたします。(丁)

## 参考文献

- Nakano T\*, Kaibara K, Tabata Y, Nagata N, Enomoto S, Marukawa E, Umakoshi Y. Unique alignment and texture of biological apatite crystallites in typical calcified tissues analyzed by micro-beam X-ray diffractometer system. *Bone*. 2002; 31(4): 479-487.
- Moriishi T, Ozasa R, Ishimoto T, Nakano T, Hasegawa T, Miyazaki T, Liu W, Fukuyama R, Wang Y, Komori H, Qin X, Amizuka N, Komori T\*. Osteocalcin is necessary for the alignment of apatite crystallites, but not glucose metabolism, testosterone synthesis, or muscle mass. *PLoS Genetics*. 2020; 16 (5), e1008586.
- Ishimoto T, Nakano T\*, Umakoshi Y, Yamamoto M, Tabata Y. Degree of biological apatite c-axis orientation rather than bone mineral density controls mechanical function in bone regenerated using recombinant bone morphogenetic protein-2. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2013; 28 (5): 1170-1179.
- Nakano T\*. Bone Tissue and Biomaterial Design Based on the Anisotropic Microstructure, In book: *Advances in Metallic Biomaterials* (Ed. M. Niinomi et al.). Springer. 2015; Vol.3: 3-30. DOI: 10.1007/978-3-662-46836-4\_1
- Ishimoto T, Kawahara K, Matsugaki A, Kamioka H, Nakano T\*. Quantitative Evaluation of Osteocyte Morphology and Bone Anisotropic Extracellular Matrix in Rat Femur. *Calcified Tissue International*. 2021; 109 (4): 434-444.
- Matsuzaka T, Matsugaki A, Nakano T\*. Control of osteoblast arrangement by osteocyte mechanoreponse through prostaglandin E2 signaling under oscillatory fluid flow stimuli. *Biomaterials*. 2021; 279: 121203.
- Giraud-Guille MM. Twisted plywood architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons. *Calcif Tissue Int*. 1988; 42: 167-180. doi: 10.1007/BF02556330.
- Hosaki-Takamiya R, Hashimoto M, Imai Y, Nishida T, Yamada N, Mori H, Tanaka T, Kawanabe N, Yamashiro T, Kamioka H\*. Collagen production of osteoblasts revealed by ultra-high voltage electron microscopy. *J Bone Miner Metab*. 2016 Sep; 34 (5): 491-9. doi: 10.1007/s00774-015-0692-0.
- Kamioka H, Honjo T, Takano-Yamamoto T\*. A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy. *Bone*. 2001 Feb; 28 (2): 145-9. doi: 10.1016/s8756-3282(00)00421-x.
- Zou Y, Zwolanek D, Izu Y, Gandhi S, Schreiber G, Brockmann K, Devoto M, Tian Z, Hu Y, Veit G, Meier M, Stetefeld J, Hicks D, Straub V, Voermans NC, Birk DE, Barton ER, Koch M, Bönnemann CG\*. Recessive and dominant mutations in COL12A1 cause a novel EDS/myopathy overlap syndrome in humans and mice. *Hum. Mol. Genet*. 2014; 23 (9): 2339-2352.
- Kalson NS, Starborg T, Lu Y, Mironov A, Humphries S. M., Holmes DF, Kadler KE. Nonmuscle myosin II powered transport of newly formed collagen fibrils at the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Dec 3; 110 (49): E4743-E4752.
- Izu Y\*, Adams SM, Connizzo BK, Beason DP, Soslowsky LJ, Koch M, Birk DB. Collagen XII mediated cellular and extracellular mechanisms regulate establishment of tendon structure and function. *Matrix Biol*. 2020; 95: 52-67.
- Izu Y, Ansoerge HL, Zhang G, Soslowsky LJ, Bonaldo P, Chu ML, Birk DE\*. Dysfunctional tendon collagen fibrillogenesis in collagen VI null mice. *Matrix Biol*. 2011; 30 (1): 53-61.
- Izu Y, Sun M, Zwolanek D, Veit G, Williams V, Cha B, Jepsen KJ, Koch M, Birk DE\*. Type XII collagen regulates osteoblast polarity and communication during bone formation. *J. Cell Biol*. 2011; 193 (6): 1115-1130.
- Izu Y, Ezura Y, Mizoguchi F, Kawamata A, Nakamoto T, Nakashima K, Hayata T, Hemmi H, Bonaldo P, Noda M\*. Type VI collagen deficiency induces osteopenia with distortion of osteoblastic cell morphology. *Tissue Cell*. 2012; 44 (1): 1-6.
- Ishihara Y, Kamioka H\*, Honjo T, Ueda H, Takano-Yamamoto T, Yamashiro T. Hormonal, pH, and calcium regulation of connexin 43-mediated dye transfer in osteocytes in chick calvaria. *J Bone Miner Res*. 2008 Mar; 23 (3): 350-60. doi: 10.1359/jbmr.071102.
- Shinno Y, Ishimoto T, Saito M, Uemura R, Arino M, Marumo K, Nakano T, Hayashi M. Comprehensive analyses of how tubule occlusion and advanced glycation end-products diminish strength of aged dentin. *Scientific Reports*. 2016; srep19849. doi:10.1038/srep19849.
- Poundarik AA, Boskey Atharva A, Caren Gundberg C, Vashishth D. Biomolecular regulation, composition and nanoarchitecture of bone mineral. *Scientific Reports*. 2018; 8: 1191.

## 骨・軟骨・筋科学 Update 2022年春号 (第2号)

発行日：2022年3月31日

発行：JSBMR 一般社団法人日本骨代謝学会 The Japanese Society for Bone and Mineral Research

制作：国際医学出版株式会社