

# 研 究 報 告 書

## 「骨代謝」における破骨細胞の細胞融合と代謝制御」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：宮本 健史

### 1. 研究のねらい

骨粗鬆症に代表される骨代謝の恒常性破綻に起因する骨疾患患者数は、今や国内だけでも1000万人を突破しているとされ、骨粗鬆症を基礎疾患とする大腿骨頸部骨折の患者数も年間に14万人を超える事態となってきた。骨は、骨を吸収する破骨細胞と、骨を形成する骨芽細胞の微妙なバランスの上に骨量が規定されており、破骨細胞活性が相対的に強い場合には骨量が低下し、逆の場合は骨量が増加する。しかし、骨の代謝はこの吸収と形成の中に恒常性が制御されており、一方的な骨吸収抑制や骨形成促進は骨の恒常性破綻を招き、さらなる病的状態を誘発する。つまり、この骨吸収と形成による骨のリモデリングを止めることなく骨量増加が達成できれば、骨の恒常性に破綻を来すことなく、生理的に骨量を増やすことが期待される。

本研究では、解析の切り口として破骨細胞の細胞融合による多核化を取り上げた。破骨細胞は単核の細胞同士の細胞融合により多核化する極めてユニークな細胞であり、私は、この破骨細胞の細胞融合には DC-STAMP (dendritic cell specific transmembrane protein) が必須の分子であることを、遺伝子欠損マウスを用いて世界で初めて報告した。今回、この遺伝子欠損マウスならびに DC-STAMP の発現制御機構を切り口に、破骨細胞の細胞融合を標的とした骨代謝制御機構の解明ならびに新たな破骨細胞分化制御機構の解明に挑戦した。

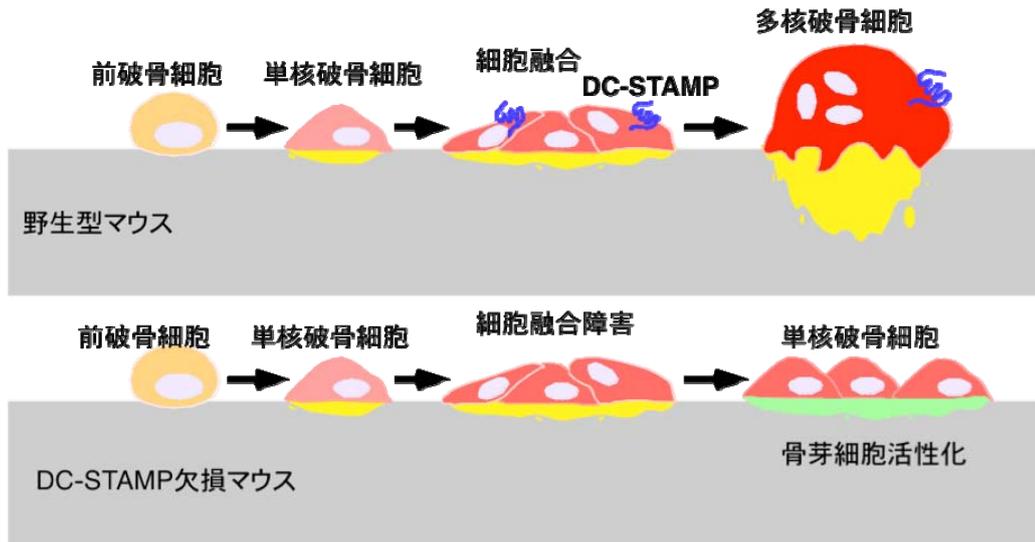
### 2. 研究成果

#### 破骨細胞の細胞融合による骨芽細胞制御

破骨細胞が細胞融合するのはなぜか、多核化にはどのような意義があるのか、ということについては、これまで破骨細胞の細胞融合のみが特異的に障害されるモデル動物が存在しなかったため不明であった。破骨細胞の細胞融合は分化の最終段階で起こるため、途中の分化段階に障害があっても、結果として細胞融合が起こらない。DC-STAMP 欠損マウス由来の破骨細胞は分化マーカーの発現は正常であることから、細胞融合のみが障害されている特異的なマウスであることが明らかとなった。そこで、多核の破骨細胞が存在しない DC-STAMP 欠損マウス、逆に DC-STAMP を過剰に発現することで巨大な破骨細胞を形成する DC-STAMP 過剰発現マウスを用いた解析により、破骨細胞の細胞融合が破骨細胞の骨吸収効率を上昇させること、さらに興味深いことに DC-STAMP を欠損した単核の破骨細胞は、野生型マウスや DC-STAMP 過剰発現マウス由来の多核化した破骨細胞より効率的に骨芽細胞による骨形成を誘導することを見出した。つまり、DC-STAMP を標的とすることで、破骨細胞の骨吸収効率低下と骨芽細胞による骨形成促進の二重の作用により、結果として骨量を増加させ得ることが示された。実際、DC-STAMP 欠損マウスでは骨量増加を、逆に DC-STAMP 過剰発現マウスは骨量低下を示した。このことは、DC-STAMP が破骨細胞の細胞融合を介して、DC-STAMP を発現していない骨芽細胞の活性をも制御すること、また DC-STAMP を標的とすることで、骨のリモデリングを止めることなく、骨量増加を果たすことが可能になることが示された。

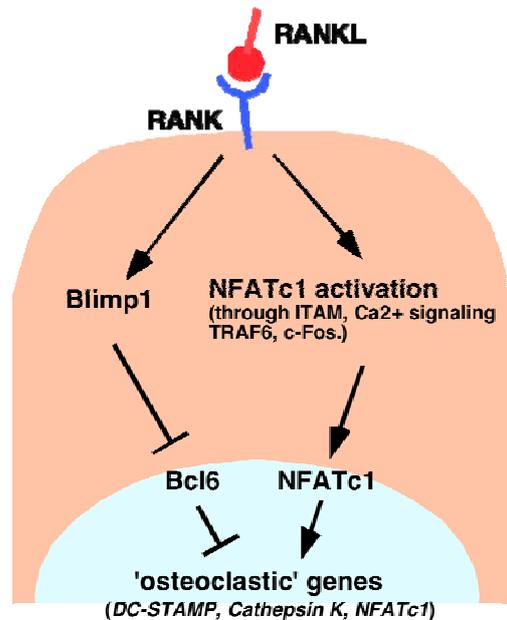
破骨細胞と骨芽細胞の相互作用は、coupling と呼ばれ、両細胞の活性が平行して動くことが知られている。すなわち、破骨細胞の活性が高い場合は骨芽細胞の活性も高くなり、逆に破骨細胞活性が下がった場合には骨芽細胞活性も低下する。しかし、両細胞の活性が高い場合は、破骨細胞による骨吸収側の表現型が強くなるため、結果として骨量が低下する。また、破骨細胞活性を強く抑制する薬剤は、骨形成をも抑制し、骨のリモデリングが停止することで、結果的には折れやすい骨になってしまう。今回の知見は、DC-STAMP を標的とすることで、骨の代謝状態を破骨細胞の活性は低く、骨芽細胞の活性は高くする、un-coupling の状態に導くことで骨量

を増加させる画期的な発見と言える。



### Blimp1-Bcl6 axis による破骨細胞分化制御

破骨細胞分化は、分化のマスター転写因子と言われる NFATc1 (nuclear factor of activated T cells 1) の発現により、NFATc1 の発現や活性化に至る様々な経路の研究が中心に行われてきた。しかし、この NFATc1 を抑制する阻害剤は、実は以前より臓器移植などの際の免疫抑制剤として生体に使われてきたが、薬剤の投与により骨量が低下することが知られていた。これは、NFAT の阻害により破骨細胞の形成は強力に抑制されるものの、その作用を上回る骨芽細胞活性の抑制により、結果として骨量低下を来すことが近年明らかにされた。つまり、NFATc1 に変わる、新たな制御機構の解明が待たれる状況であった。そこで、私は細胞融合因子である DC-STAMP の発現を制御する分子のスクリーニングを行い、転写抑制因子である Bcl6 (B cell lymphoma 6) を見出した。Bcl6 は DC-STAMP の転写制御領域上に直接結合し、DC-STAMP の発現を負に制御していた。さらに、Bcl6 は DC-STAMP ばかりではなく、NFATc1 や破骨細胞に特異的に発現する蛋白分解酵素である Cathepsin K の転写制御領域上に直接結合することで、これらの破骨細胞に特徴的な、すなわち破骨細胞の細胞融合、分化、蛋白分解、それぞれを制御する分子群: osteoclastic gene を直接負に制御する分子であることが明らかとなった。つまり、破骨細胞の分化や多核化、機能の発現に際しては、Bcl6 の発現が抑制されることが必要になる。実際、Bcl6 の発現は破骨細胞分化誘導因子 RANKL の添加により強く抑制されており、Bcl6 欠損マウスではこれらの分子の発現抑制がきかず、有意な破骨細胞分化亢進と骨量の低下を示した。そこで、さらに RANKL 刺激により Bcl6 の発現を抑制する分子の検索を行い、やはり転写抑制因子である Blimp1 (B lymphocyte-induced maturation protein-1) を同定した。Blimp1 は Bcl6 とは逆に、RANKL 刺激により発現が上昇した。Blimp1 欠損マウスは胎生致死であったため、破骨細胞特異的 Blimp1 欠損マウスを作製したところ、破骨細胞分化障害



と osteoclastic gene の発現の強力な抑制,さらに破骨細胞分化抑制による骨量増加を示した。さらに,Blimp1 欠損破骨細胞では,本来であれば RANKL 刺激により発現が低下するはずの Bcl6 の発現がむしろ上昇していたことから,Blimp1 が破骨細胞分化の過程で Bcl6 の発現を抑制するのに必須の分子であることが明らかとなった。Blimp1 は Bcl6 の転写制御領域に結合することも見出し, RANKL の下流で、RANKL-Blimp1-Bcl6-osteoclastic gene という axis が破骨細胞の分化,細胞融合および蛋白分解能を制御する必須のものであることを初めて報告した。この経路が骨代謝を制御する新たな標的であることが期待される。

### 3. 今後の展開

破骨細胞が示す最大の特徴の1つに,単核の細胞同士の細胞融合による多核化が挙げられる。この破骨細胞の細胞融合による多核化は,破骨細胞の定義ともされ,破骨細胞の骨吸収能の発揮に必須と考えられてきた。しかし,DC-STAMP 欠損マウスの解析により,‘単核’の破骨細胞が存在すること,破骨細胞の多核化は骨吸収効率を上昇させること,破骨細胞を単核化させることで骨芽細胞による骨形成を活性化し得ることが明らかとなった。今日,骨粗鬆症薬として承認されている薬の多くは,破骨細胞の活性を抑制するものであり,行き過ぎた破骨細胞の抑制は骨の大理石骨病化や大腿骨の非定型骨折,顎骨壊死など,様々な問題を呈することも報告されている。本研究に示すような,破骨細胞の活性を完全には抑制せず,しかも骨芽細胞を活性化し,骨代謝状態を un-coupling の状態にすることで,生理的な骨量増加を果たすことが可能になれば,骨粗鬆症のコントロールがさらに発展することが期待される。

DC-STAMP の発現を指標とした分子スクリーニングは,破骨細胞分化や骨恒常性を制御する分子基盤の解明において,大きな力を発揮することが明らかとなった。今後は,DC-STAMP がどのように細胞融合を制御するのか,また,破骨細胞の細胞融合がどのようにして骨芽細胞の活性を制御しているのか,といった点が課題になる。DC-STAMP を指標に同定されてきた分子群の機能やその制御機構の解析において新たに獲得してきた結果が,これらの課題解決のヒントになる。破骨細胞の細胞融合を指標とした骨代謝状態の un-coupling に基づく,生理的な骨量増加とその制御物質の創出に引き続き挑戦したい。

### 4. 自己評価

細胞融合因子 DC-STAMP を介した破骨細胞の細胞融合は,多核化にともなうダイナミックな細胞形質の変化をもたらすばかりではなく,破骨細胞の骨吸収効率を上昇させること,また,DC-STAMP を発現しない骨芽細胞の活性をも制御すること,DC-STAMP を標的とすることで骨の代謝状態を破骨細胞・骨芽細胞ともに骨量増加の方向へ制御できることを見出した成果は,当初目標とした破骨細胞の細胞融合から骨代謝制御機構を解明する目標にも合致した成果であると考えている。さらに,この DC-STAMP の発現制御機構の解析から DC-STAMP を含む破骨細胞に特徴的な遺伝子群の発現を制御する新たな分子機構として RANKL-Blimp1-Bcl6-osteoclastic genes の axis が存在すること,この機構が生理的な骨量を制御することを見出し,破骨細胞の細胞融合を基軸として,骨代謝の制御機構の解明を果たした点で,やはり本研究目標に合致した成果であると思われる。

### 5. 研究総括の見解

破骨細胞の分化,特に多核細胞形成に重要な因子である DC-STAMP を標的とすることで,破骨細胞の活性は低く,骨芽細胞の活性は高くすることで骨量を増加させることができることを明らかにした。更に,DC-STAMP の発現制御因子として Bcl6 と Blimp1 を発見し,RANKL-Blimp1-Bcl6-osteoclastic gene という,破骨細胞分化の新しい経路を明らかにした。これらの成果は,骨代謝の制御メカニズムの新たな分野を開くものであり,加えて,骨代謝を制御する新しい標的を示すものでもあり,高く評価できる。今後は,骨代謝を制御する化合物の探索や破骨細胞の分化過程等におけるメタボローム解析も取り入れて,研究を更に発展させるよう期待する。

## 6. 主要な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表(\* corresponding author)

1. Iwasaki R, Ninomiya K, Miyamoto K, Suzuki T, Sato Y, Kawana H, Nakagawa T, Suda T, <u>Miyamoto T*</u> . Cell fusion in osteoclasts plays a critical role in controlling bone mass and osteoblastic activity. <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> 377, 899–904, 2008
2. Miyamoto K, <u>Miyamoto T*</u> , Kato R, Yoshimura A, Motoyama N, Suda T. FoxO3a regulates hematopoietic homeostasis through a negative feedback pathway in conditions of stress or aging. <i>Blood.</i> 112(12), 4485–4493. 2008
3. Sakai S, Takaishi H, Matsuzaki K, Kaneko H, Furukawa M, Miyauchi Y, Shiraishi A, Saito K, Tanaka A, Taniguchi T, Suda T, <u>Miyamoto T*</u> , Toyama Y. 1-Alpha, 25-dihydroxy vitamin D3 inhibits osteoclastogenesis through IFN-beta-dependent NFATc1 suppression. <i>J Bone Miner Metab.</i> 27(6):643–652. 2009
4. Miyamoto K, Ninomiya K, Sonoda K, Miyauchi Y, Hoshi H, Iwasaki R, Miyamoto H, Yoshida S, Sato Y, Morioka H, Chiba K, Egarashi K, Suda T, Toyama Y, <u>Miyamoto T*</u> . MCP-1 expressed by osteoclasts stimulates osteoclastogenesis in an autocrine/paracrine manner. <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> 383(3):373–377. 2009
5. Miyauchi Y, Ninomiya K, Miyamoto H, Sakamoto A, Iwasaki R, Hoshi H, Miyamoto K, Hao W, Yoshida S, Morioka H, Chiba K, Kato S, Tokuhisa T, Saitou M, Toyama Y, Suda T, <u>Miyamoto T*</u> . The Blimp1-Bcl6 axis is critical to regulate osteoclast differentiation and bone homeostasis. <i>J Exp Med.</i> 207(4), 751–762, 2010

### (2) 特許出願

なし

### (3) その他

#### 招待講演

- 6<sup>th</sup> Meeting of Bone Biology Forum 平成 21 年 8 月 21–22 日 富士教育研修所  
Transcriptional Regulation of Osteoclastogenesis. Takeshi Miyamoto
- 第 8 回”Japan Conference on Bone & Joint Diseases”研究会 平成 22 年 1 月 23 日  
海運クラブ 破骨細胞分化を制御する新規因子 宮本健史
- 第 54 回 日本リウマチ学会 平成 22 年 4 月 22–25 日 神戸ポートピアホテル・神戸  
特別企画3「破骨細胞研究の最前線 あらたな治療戦略をめざして」細胞融合を標  
的とした破骨細胞制御機構の解明:DC-STAMP による破骨細胞制御 宮本健史
- 第 28 回日本骨代謝学会学術集会 平成 22 年 7 月 21–23 京王プラザ カレントコン  
セプト4「RANKL をめぐる最近の話題」 RANKL による新たな破骨細胞分化機構 宮  
本健史
- 第 28 回日本骨代謝学会学術集会 平成 22 年 7 月 21–23 京王プラザ シンポジウ  
ム2「オステオネットワーク」細胞融合の新たな展開 宮本健史

#### 受賞

- 日本整形外科学会 学会奨励賞 「DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in  
osteoclasts and foreign body giant cells」(2008 年 5 月 28 日)
- 日本軟骨代謝学会 学会賞 「活性酸素は内軟骨性骨化において軟骨の肥大化を  
誘導する」(2009 年 3 月 7 日)
- 日本骨代謝学会 研究奨励賞 「破骨細胞分化研究」(2009 年 7 月 24 日)
- 慶應義塾大学医学部三四会 北里賞 「破骨細胞分化と骨代謝制御機構の解明」  
(2010 年 6 月 12 日)