

# 10. オステオプロテゲリンによる 骨リモデリング制御

Bone-remodeling mechanism regulating by osteoprotegerin

中村 美どり・中道 裕子・小出 雅則・宇田川 信之

Midori Nakamura (准教授), Yuko Nakamichi (講師), Masanori Koide (講師), Nobuyuki Udagawa (教授)  
／松本歯科大学歯学部口腔生化学講座・総合歯科医学研究所硬組織疾患制御再建学部門

## key words

オステオプロテゲリン(OPG)  
RANKL  
破骨細胞  
骨粗鬆症  
カップリングファクター

オステオプロテゲリン(OPG)は、骨(オステオ)を護る(プロテクトする)という意味から命名されたサイトカインである。OPGは、破骨細胞分化因子であるRANKL分子のデコイ受容体として破骨細胞の分化と骨吸収機能を抑制する。骨組織においては、骨芽細胞および骨細胞がOPGの産生細胞であるが、近年、骨のリモデリングを制御する因子としてOPGが生体内において重要な役割を果たすことを示す実験結果が蓄積されてきた。

## はじめに

骨のリモデリングとは、骨吸収と骨形成が絶え間なく繰り返されることにより、力学的なストレスに耐えられる弾力性を有する新しい骨組織が常に形成されることである。この骨吸収と骨形成の量は、動的に平衡状態に保たれたカップリング現象を示す(図1A)。破骨細胞は高度に石灰化した骨組織を破壊・吸収する唯一の細胞である。その起源は、生体に広く分布するマクロファージ系の細胞である。1997年、破骨細胞の分化と骨吸収機能を制御する骨芽細胞に発現するRANKL (receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand) 分子とRANKLのデコイ受容体であるオステオプロテゲリン (OPG)

が同定された<sup>1)</sup>。

OPGの遺伝子欠損マウス (OPG<sup>-/-</sup>マウス)は、骨吸収が著しく亢進し重篤な骨粗鬆症を呈する<sup>2)3)</sup>が、骨形成も同時に亢進する骨代謝共役モデルマウスである<sup>2)3)</sup>。したがって、OPG<sup>-/-</sup>マウスは骨吸収マーカーのみならず、骨形成マーカーである血中アルカリホスファターゼ (ALP)活性が正常値の4倍も高い値を示し、組織学的にも骨形成の著しい活性化が認められる。

我々は、骨吸収と骨形成がともに亢進している高回転型骨粗鬆症を呈するOPG<sup>-/-</sup>マウスに対して骨吸収阻害薬であるビスホスホネートを投与した。その結果、骨吸収の阻害とカップルして、骨形成の亢進はビスホスホネート投与によって完全に正常化された

(図1B)<sup>4)</sup>。以上の実験結果より、骨組織においては、骨吸収と骨形成の共役現象がアクティブに行われていることが明らかとなった(図1)。本稿では、骨吸収能を担っている破骨細胞の分化と機能について、骨芽細胞に発現するRANKL分子を中心として、OPGが関与する骨リモデリング制御機構について概説したい。

## RANKL発現上昇ではなく OPG産生低下が骨リモデリングを 破綻させる

RANKL遺伝子強発現マウス (RANKL Tgマウス)はOPG<sup>-/-</sup>マウスと同様に骨粗鬆症を呈する<sup>5)</sup>。そこで、我々は、RANKLとOPGの骨リモデリ

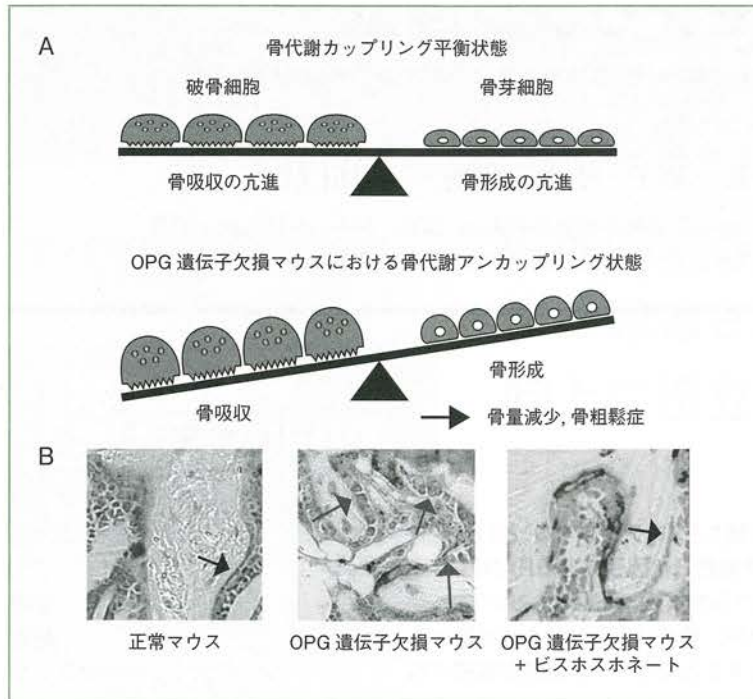


図1 破骨細胞と骨芽細胞による骨代謝カップリング平衡状態  
 A: OPG 遺伝子欠損マウスにおいては、骨吸収が骨形成を凌駕し、重篤な骨粗鬆症を呈する。  
 B: OPG 遺伝子欠損マウス (大腿骨) において認められる立方形大型の活性化骨芽細胞 (中央矢印) は、ビスホスホネート投与により消失する。

ングへの関与を明らかにするため、OPG<sup>-/-</sup>マウスとRANKL Tgマウスの歯槽骨を解析した。その結果、マイクロCT画像に示されるように、12週齢のOPG<sup>-/-</sup>マウスにおいて、歯根が露出するような歯槽骨の著しい吸収が観察された(図2)<sup>6)</sup>。また、OPG<sup>-/-</sup>マウスの下顎第一臼歯の根分岐部における歯槽骨は、著しい骨粗鬆化が認められた。一方、RANKL Tgマウスと野生型(WT)マウスにおいては、顕著な歯槽骨吸収は認められなかった(図2)。

次に、それぞれのマウスの歯槽骨における破骨細胞の出現とOPGタンパ

ク質の発現について検討した。その結果、OPG<sup>-/-</sup>マウスのみ歯槽骨が多孔質化し、骨の内部と表面で破骨細胞が顕著に増加した。一方、正常マウスやRANKL Tgマウスの歯槽骨は多孔質化せず、OPG陽性の骨細胞が明瞭に認められた<sup>6)</sup>。これらのマウスにおける大腿骨皮質骨の多孔質化とOPGの発現様式も歯槽骨と同様であった。しかしながら、大腿骨海綿骨におけるOPG陽性骨細胞はほとんど認められなかった。以上の結果より、骨細胞が産生するOPGが皮質骨や歯槽骨の維持に重要な役割を果たしていることが示され

た。また、OPGの発現低下は歯周病の進行にも関与する可能性が示唆される。

さらに、このOPG<sup>-/-</sup>マウスにおける歯槽骨吸収を抗RANKL中和抗体で抑制できるかを検討した。8週齢のOPG<sup>-/-</sup>マウスに、抗RANKL中和抗体を1回(5mg/kg)投与し、4週後に歯槽骨吸収を評価した。その結果、抗RANKL中和抗体投与により、OPG<sup>-/-</sup>マウスの歯槽骨吸収の亢進は著明に抑制され、歯根の露出が回復し、根間中隔における歯槽骨量は増大した<sup>6)</sup>。

### OPG遺伝子変異による骨代謝疾患

特発性高ホスファターゼ血症 (IH) の患者において、OPG遺伝子の変異が発見された<sup>7)8)</sup>。この患者においては、OPG<sup>-/-</sup>マウスと同様、破骨細胞とともに骨芽細胞が著しく活性化しており、骨形成と骨吸収が活発に行われている組織所見が認められる。また、血清ALP活性(骨形成マーカー)と尿中コラーゲン分解産物であるN-テロペプチド量(骨吸収マーカー)がともに高い値を示した<sup>7)8)</sup>。

一方、欧米において骨粗鬆症に次いで患者数の多い骨疾患である骨パジェット病は、破骨細胞の機能異常により限局した骨吸収の亢進が生じ、続いて骨形成が促進する疾患として知られているが、遺伝性若年性骨パジェット病(FPDB)の原因としてOPG遺伝子の完全な欠損が報告された<sup>9)11)</sup>。このOPG欠損患者の血清中には、OPGは検知できないが、興味深いことに可溶型

RANKLが高濃度で認められた。

以上の知見は、OPGの産生欠如がヒトにおいて骨吸収と骨形成の活性化を惹起し、結果的に骨代謝アンカップリングの状態となることを示している。

### OPG遺伝子欠損マウスに対する カテプシンK阻害薬の投与

破骨細胞が分泌するカテプシンKの阻害薬(オダナカチブ)は、骨基質の分解という破骨細胞の骨吸収機能のみが標的となる。作用機序は、カテプシンKの活性中心のシステインを阻害薬が共有結合することにより酵素活性を不活化する。これまでに得られた治験結果から、ビスホスホネートと異なり、骨形成活性を抑制することなく骨量を増加させることが示され、臨床応用も間近である(第7章参照)。我々は、OPG<sup>-/-</sup>マウスにカテプシンK阻害薬を投与する実験を行った(未発表)。

前述のOPG<sup>-/-</sup>マウスにビスホスホネートを毎日4週間投与するプロトコールと同様に、カテプシンK阻害薬(L006235: Tocris Bioscience)を毎日4週間経口投与した。その結果、カテプシンK阻害薬は、OPG<sup>-/-</sup>マウスにおいて骨量および骨梁数を増加させ、骨梁間隙を減少させた。また興味深いことに骨形態計測の結果から、カテプシンK阻害薬の投与は、破骨細胞数や骨芽細胞数に変化を与えず石灰化速度を促進させた。このことから、カテプシンK阻害薬の投与は、破骨細胞の分化誘導には影響を与えず、直接破骨細胞性の骨吸収活性を阻害し、骨芽細胞の活性

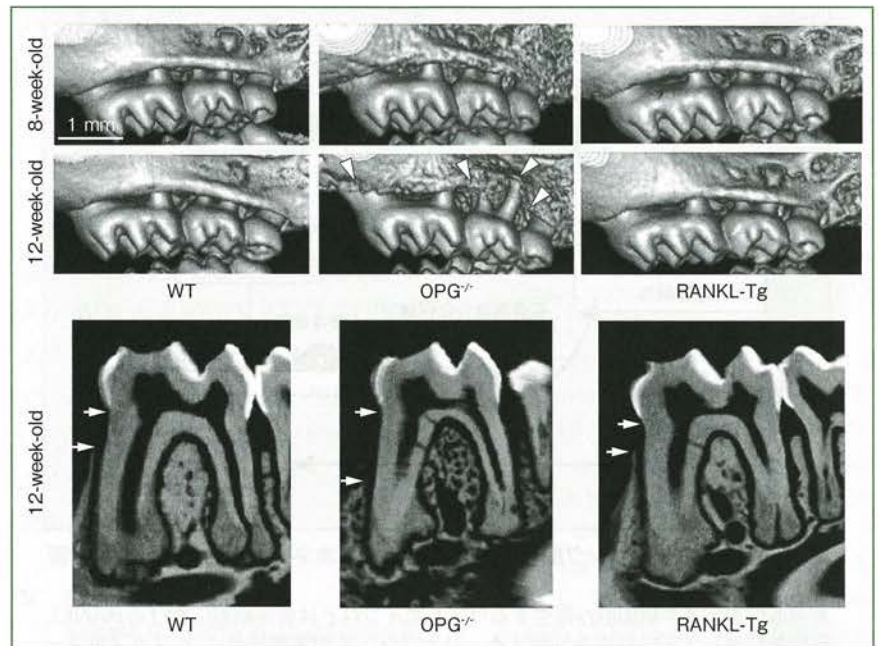


図2 OPG遺伝子欠損マウスにおける歯槽骨吸収の亢進

野生型マウス (WT, C57BL/6), OPG 遺伝子欠損マウス (OPG<sup>-/-</sup>), RANKL 遺伝子強発現マウス (RANKL Tg) の歯槽骨部分をマイクロCT装置で撮影した。OPG<sup>-/-</sup>12週齢において顕著な歯槽骨吸収が認められ(上段矢頭), 下顎第一臼歯の根分岐部における骨量低下およびセメントエナメル境から歯槽骨頂(CEJ:ABC)までの距離(下段矢印間)の増大が観察された。

を促進させることにより、骨量を増加させるメカニズムが示された(図3)。今後の詳しい解析が必要であるが、破骨細胞の存在が骨代謝回転を高く維持するために必要である可能性が考えられた。

### 破骨細胞前駆細胞由来の PDGF-BBは骨形成を促進する カップリングファクターである

Caoらのグループは、破骨細胞が形成されない大理石骨病マウス(CSF-1欠損マウス)において、TRAP陽性単核の破骨細胞前駆細胞の減少とパラレル

に、骨形成と血管形成が低下することに注目した<sup>12)</sup>。彼らは、CSF-1欠損マウスの細胞培養系を用いた実験から、破骨細胞前駆細胞は血小板由来成長因子(PDGF-BB)を産生し、間葉系幹細胞と血管内皮細胞前駆細胞を引き寄せることを示した。さらに、PDGF-BBを破骨細胞前駆細胞に欠損させたマウスを作製すると、骨形成および血管形成が低下した。そこで、カテプシンK遺伝子欠損マウスとカテプシンK阻害薬を投与したマウスにおいて、PDGF-BBの発現が上昇するかどうかを解析した。その結果、カテプシンKの抑制は、TRAP陽性の破骨細胞前駆細胞におけ

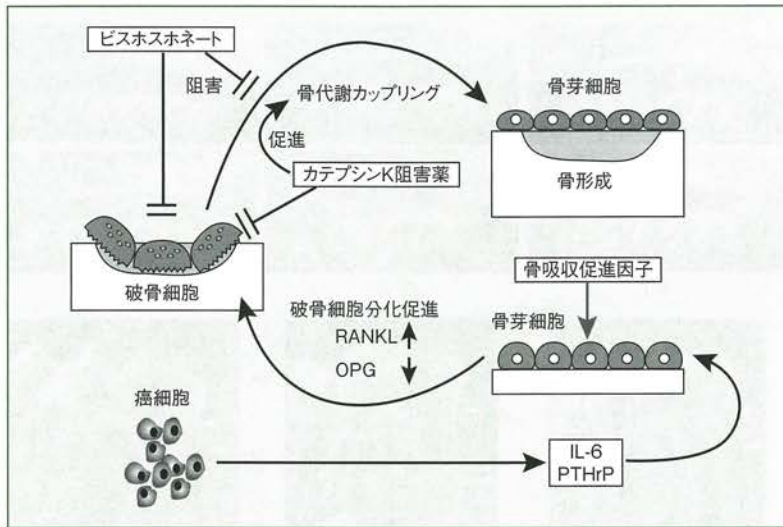


図3 骨代謝カップリング機構に対するビスホスホネートとカテプシンK阻害薬の作用

骨吸収促進因子や癌細胞が産生するサイトカインなどは骨芽細胞におけるRANKL発現を促進し、OPG産生を抑制する。カテプシンK阻害薬投与は、ビスホスホネート投与と異なり、骨形成活性を抑制することなく骨量を増加させる。

るPDGF-BBとVEGF (vascular endothelial growth factor)の発現を上昇させ、骨形成および血管形成を促進した。また、PDGF遺伝子欠損マウスでは、カテプシンK阻害薬による骨形成および血管形成の促進作用は認められなかった。さらに、卵巣摘出マウスへPDGF-BBを投与する実験を行った結果、血中および骨髄中のPDGF-BBは減少するが、カテプシンK阻害薬の投与によって骨形成と血管形成は促進された<sup>12)</sup>。

以上の実験結果は、骨形成を促進する活性を有するPDGF-BBは、破骨細胞由来のカップリングファクターとして、骨形成と血管形成を促進する可能性を示している(図4)。また、カテプシンK阻害薬の骨粗鬆症治療薬としての作用メカニズムを解明する上でも貴重な結果であろう。

### RANKLリバースシグナルの制御機構

Yasudaらは、骨芽細胞に発現するRANKLが破骨細胞分化のみならず、RANKLリバースシグナル(逆信号)として骨芽細胞自らによる骨形成に関与する可能性を提唱している<sup>13)</sup>(第11章参照)。一方、本間らは、RANKLの細胞内発現挙動について研究を行ってきた結果、骨芽細胞内でのRANKLリバースシグナルの存在を示した<sup>14)</sup>。破骨細胞は成熟過程において、RANKを表面に発現するエクソソームを分泌し、これら破骨細胞由来RANKエクソソームは骨芽細胞内のRANKLに結合する。RANKL-RANKリバースシグナルはその後、骨芽細胞において、PI3K

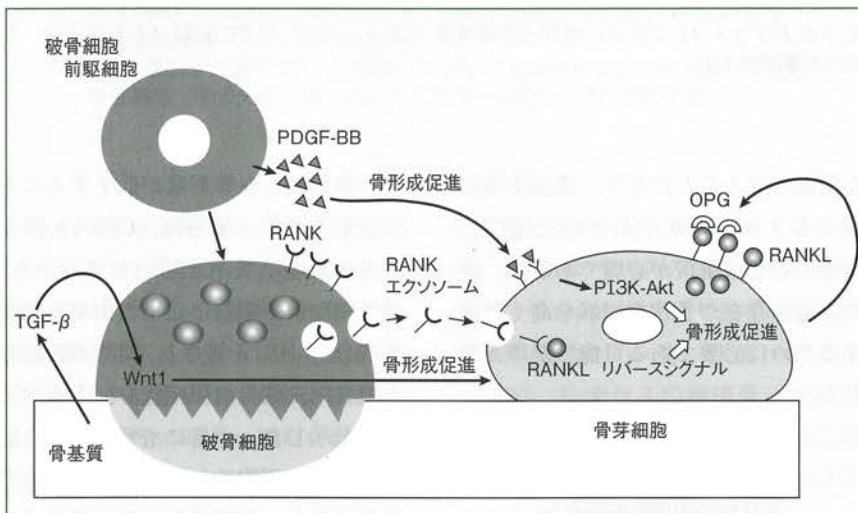


図4 破骨細胞から骨芽細胞活性化へのリバースシグナル

骨芽細胞が産生するOPGは自らに発現するRANKLに結合することにより、骨吸収の過剰な亢進をブロックする。

破骨細胞前駆細胞は、PDGF-BBを産生し、骨芽細胞においてPI3K-Akt信号を促進し骨形成促進に作用する。成熟破骨細胞はRANKを表面に発現するエクソソームを分泌し、骨芽細胞内のRANKLに結合し(リバースシグナル)、PI3K-Akt-mTORC1経路を活性化することにより、骨芽細胞活性を上昇させる。骨基質中から放出されたTGFβは破骨細胞に直接作用して、Wnt1分泌を促進させ、骨芽細胞に作用し骨形成を促進する。

(phosphoinositide 3-kinase) -Akt-mTORC1経路を活性化することにより、骨芽細胞活性を上昇させ、骨形成を促進する可能性が考えられている(図4)。

### TGFβのカップリングファクターとしての役割

骨のカップリングファクターとして古典的に知られているのは、骨基質に豊富に存在しているTGFβ (transforming growth factor β)であり、破骨細胞性の骨吸収により放出される。TGFβシグナルの異常は、マルファン症候群における骨形態異常や骨強度低下を惹起する。しかし、TGFβによる骨芽細胞分化促進作用は直接的ではない。Ourslerらは、TGFβは破骨細胞に直接作用して、Wnt1分泌を促進することにより、骨芽細胞性の骨形成を促進するとする実験結果を報告した<sup>15)</sup>(図4)。加齢により骨基質中のTGFβ量が減少することにより、破骨細胞の活性が低下し骨代謝共役が低下している<sup>15)</sup>。

TGFβの骨吸収における作用は複雑である。TGFβは、RANKL誘導性の破骨細胞分化に対して相乗的に促進作用を示す一方、骨芽細胞を用いた共存培養系では、骨芽細胞におけるRANKL発現を抑制し、破骨細胞分化を阻害する。また、TGFβをマウス骨膜下に投与すると、骨形成が誘導されるが、破骨細胞分化抑制と破骨細胞のアポトーシス促進といった結果も認められる。一方、骨芽細胞特異的に

TGFβを高発現させたマウスでは、破骨細胞性骨吸収が促進される。

### おわりに

骨量の減少は、破骨細胞の分化誘導、活性化および生存延長の主要な調節システムであるRANK-RANKL-OPGシステムに依存する。このシステムの中で、破骨細胞に対して負の作用を示すOPGによる骨カップリング制御機構の重要性について、今後のさらなる研究の発展を期待したい。

### 文 献

- 1) Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; **95**: 3597-602.
- 2) Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*. 1998; **12**: 1260-8.
- 3) Mizuno A, Amizuka N, Irie K, et al. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; **247**: 610-5.
- 4) Nakamura M, Udagawa N, Matsuura S, et al. Osteoprotegerin regulates bone formation through a coupling mechanism with bone resorption. *Endocrinology*. 2003; **144**: 5441-9.
- 5) Mizuno A, Kanno T, Hoshi M, et al. Transgenic mice overexpressing soluble osteoclast differentiation

factor (sODF) exhibit severe osteoporosis. *J Bone Miner Metab*. 2002; **20**: 337-44.

- 6) Koide M, Kobayashi Y, Ninomiya T, et al. Osteoprotegerin-deficient male mice as a model for severe alveolar bone loss: comparison with RANKL-overexpressing transgenic male mice. *Endocrinology*. 2013; **154**: 773-82.
- 7) Cundy H, Hegde M, Naot D, et al. A mutation in the gene TNFRSF11B encoding osteoprotegerin causes an idiopathic hyperphosphatasia phenotype. *Hum Mol Genet*. 2002; **11**: 2119-27.
- 8) Chong B, Hegde M, Fawcner M, et al. Idiopathic hyperphosphatasia and TNFRSF11B mutations: relationships between phenotype and genotype. *J Bone Miner Res*. 2003; **18**: 2095-104.
- 9) Whyte MP, Obrecht SE, Finnegan PM, et al. Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. *N Engl J Med*. 2002; **347**: 175-84.
- 10) Middleton-Hardie C, Zhu Q, Cundy H, et al. Deletion of aspartate 182 in OPG causes juvenile Paget's disease by impairing both protein secretion and binding to RANKL. *J Bone Miner Res*. 2006; **21**: 438-45.
- 11) Whyte MP, Singhellakis PN, Petersen MB, et al. Juvenile Paget's disease: the second reported, oldest patient is homozygous for the TNFRSF11B "Balkan" mutation (966\_969delTGACinsCTT), which elevates circulating immunoreactive osteoprotegerin levels. *J Bone Miner Res*. 2007; **22**: 938-46.
- 12) Xie H, Cui Z, Wang L, et al. PDGF-BB secreted by preosteoclasts induces angiogenesis during coupling with osteogenesis. *Nat Med*. 2014;

- 20 : 1270-8.
- 13) Furuya Y, Inagaki A, Khan M, et al. Stimulation of bone formation in cortical bone of mice treated with a receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL)-binding peptide that possesses osteoclastogenesis inhibitory activity. *J Biol Chem.* 2013 ; **288** : 5562-71.
- 14) 本間 雅, 林 円香, 池淵祐樹, 他. 骨芽細胞におけるRANKL逆シグナルの役割. 第33回日本骨代謝学会学術集会プログラム抄録集. 122, 2015.
- 15) Weivoda MM, Ruan M, Pederson L, et al. Osteoclast TGF  $\beta$  receptor signaling induces Wnt1 secretion and couples bone resorption to bone formation. *J Bone Miner Res.* 2016 ; **31** : 76-85.

**中村 美どり(Midori Nakamura)**

1986年 松本深志高等学校卒業  
1993年 松本歯科大学卒業  
1995年 松本歯科大学小児歯科学講座 助手  
2004年 松本歯科大学口腔生化学講座 助手  
2014年 松本歯科大学口腔生化学講座 准教授

日本小児歯科学会専門医

日本再生医療学会認定医

専門：骨吸収と骨形成のカップリング機構に関する研究

座右の銘：なんでもかんでもやりましょう！ Try everything！

