

ヒト破骨細胞の生存延命・骨吸収機能に対する
抗 Siglec-15 抗体の効果

小松 佐保

大学院歯学独立研究科 健康増進口腔科学講座
(主指導教員：八上公利教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士（歯学）学位申請論文

The effect of anti-Siglec-15 antibody on osteoclast
survival and osteoclastic bone resorption

Saho Komatsu

Department of Oral Health Promotion, Graduate School of Oral Medicine, Matsumoto
Dental University
(Chief Academic Advisor : Professor Kimitoshi Yagami)

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

要旨

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。そして、骨組織は骨吸収と骨形成のバランスにより調節されている。それらのバランス調節は、互いにあたかも連絡を取り合っているかのように見えるため、この現象は骨代謝共役（カップリング）と呼ばれている。

Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) は、T 細胞や B 細胞の受容体と会合する細胞膜アダプター分子の細胞内ドメインに共通してみられるモチーフとして発見された。破骨細胞では、DNAX-activating protein 12 (DAP12) と Fc receptor common γ subunit (FcR γ) の発現が高く、これらのダブル欠損マウスは骨吸収不全を呈する大理石骨病を惹起する。最近、DAP12 と会合する免疫グロブリンスーパーファミリー分子として、シアル酸受容体タンパク質である Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 15 (Siglec-15) が同定された。Siglec-15 は破骨細胞の分化に伴って誘導され、Siglec-15 遺伝子欠損マウスは骨吸収が抑制され骨量が増加するが、破骨細胞数はほとんど減少しない。また、骨形成に対しては、骨形態計測の結果から、骨芽細胞数や骨形成速度などの骨形成パラメーターが野生型正常マウスと較べ、ほとんど差が無いと報告されている。この実験結果は、破骨細胞の存在が骨芽細胞の活性を支え、骨吸収と骨形成がカップリングしていることを示唆している。本研究では、ヒト末梢血液由来の破骨細胞の分化と延命に対する抗 Siglec-15 中和抗体の効果について検討した。

健康人ボランティアより採取した末梢血から調製した単球を含む細胞画分から CD14 抗体ビーズを用いて CD14 陽性細胞を単離した。CD14 陽性のヒト単核細胞を、破骨細胞分化因子である receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) と

マクロファージコロニー刺激因子である macrophage colony-stimulating factor

(M-CSF) の存在下で、7日間培養することにより TRAP 陽性のヒト多核破骨細胞が形成された。培養7日目で形成された多核破骨細胞は、RANKL と M-CSF の非存在下で、その後死滅傾向を示すが、抗 Siglec-15 抗体を添加することにより、濃度依存的および経時的に破骨細胞の延命は阻害された。抗 Siglec-15 抗体によるヒト破骨細胞の生存延命阻害作用は、オステオプロテゲリン (OPG)、RANKL 中和抗体またはビスホスホネート (アレンドロネート) 処理ではほとんど認められなかった。

更に、単離した CD14 陽性細胞を RANKL と M-CSF の存在下において、象牙切片上で培養し、破骨細胞が形成された培養7日目にコントロール IgG、抗 Siglec-15 抗体もしくはビスホスホネート (アレンドロネート) をそれぞれ添加し、象牙切片上での破骨細胞の生存と吸収窩形成を解析した。その結果、抗 Siglec-15 抗体を添加した群は、象牙切片上の TRAP 陽性細胞数が減少し、ヘマトキシリン染色における吸収窩形成も阻害された。また、アレンドロネートを添加した群は、アポトーシスに至っていると考えられる TRAP 陽性多核細胞を認め、ヘマトキシリン染色における吸収窩は強く阻害された。

一方、RANKL と M-CSF によるヒト破骨細胞の分化過程においては、抗 Siglec-15 抗体は形成された TRAP 陽性多核細胞数を減少させなかった。

以上の実験結果から、抗 Siglec-15 抗体はヒト末梢血液由来の破骨細胞の分化誘導過程では阻害効果を示さなかったが、多核破骨細胞の延命と骨吸収機能には阻害活性を示した。

緒言

炎症性疾患である歯周病においては、炎症の増大と慢性化に伴って歯槽骨が吸収される。この局所における骨吸収には破骨細胞が必須である¹⁻³⁾。Receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) は、各種の骨吸収促進因子により骨芽細胞の細胞膜表面上に発現誘導される破骨細胞の分化に必須のサイトカインである⁴⁾。RANKL は、破骨細胞の前駆細胞および成熟破骨細胞に発現する受容体 RANK に結合し、この RANKL-RANK シグナルにより破骨細胞前駆細胞の破骨細胞への分化および破骨細胞の骨吸収活性が促進される⁵⁻⁸⁾。従って、RANK や RANKL の遺伝子欠損マウスは、破骨細胞を欠損し、大理石骨病を呈する。また、macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) は骨芽細胞から産生され、破骨細胞前駆細胞に作用して破骨細胞へ分化させるもう一つの重要なサイトカインであり、M-CSF の遺伝子変異を有する *op/op* マウスは破骨細胞の形成不全による歯の萌出が欠如した大理石骨病を呈することが示されている⁵⁻⁸⁾。これらのサイトカインに加え、歯周病に伴う IL-1, TNF および IL-6 をはじめとする炎症性サイトカインの亢進により、過剰に活性化した破骨細胞は歯槽骨の破壊の主因であることが明らかとなっている。また、オステオプロテゲリン osteoprotegerin (OPG) は、骨芽細胞、線維芽細胞、肝細胞など多様な細胞から産生される破骨細胞分化抑制因子であり、骨芽細胞に発現する RANKL と結合することによって、RANKL を介するシグナル伝達を阻害する⁹⁻¹²⁾。ヒト破骨細胞は、細胞培養系において、造血系細胞である CD14 陽性細胞(単球・マクロファージ系細胞)を前駆細胞とし、これらの細胞培養系に M-CSF と RANKL を添加することにより分化誘導される¹³⁾。

RANKL 誘導遺伝子の解析から、NFAT ファミリーに属する分子である NFATc1 は破骨細胞において RANKL により強く発現誘導される転写因子であることが明らかに

なった^{14,15)}。NFATファミリーは活性化したT細胞において重要な役割を果たす転写因子であると考えられてきたが、NFATc1は、生体レベルにおいても破骨細胞分化に必須である共刺激シグナルであることが証明された^{16,17)}。

カルシウムシグナルは破骨細胞分化において必須であるが、RANKはカルシウムシグナルを直接活性化することはできない。そこで、免疫系細胞においてカルシウムシグナルを惹起するITAMと呼ばれる配列をもつ分子に着目した研究から、DNAX-activating protein 12 (DAP12)とFc receptor common γ subunit (FcR γ)の二重欠損マウスでは破骨細胞分化が障害され、重篤な大理石骨病を呈することが報告された¹⁸⁾。この知見は、DAP12やFcR γ と会合する免疫グロブリン様受容体群を介したシグナルが、破骨細胞分化に必須であることを示している。すなわち、M-CSFの受容体であるc-FmsとRANKLの受容体であるRANKに続き、破骨細胞分化における新たな必須受容体として免疫グロブリン様受容体が明らかとされた。

破骨細胞において発現が高いDAP12とFcR γ は、immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)を有する。ITIMは、T細胞やB細胞の受容体と会合する細胞膜アダプター分子の細胞内ドメインに共通してみられるモチーフである。ITIMアダプター分子であるFcR γ 遺伝子欠損マウスは、骨組織に異常は認められないが、DAP12遺伝子欠損マウスは、軽い大理石骨病を呈する¹⁹⁾。前述のように、DAP12とFcR γ 遺伝子の二重欠損マウスは、重度の大理石骨病を呈する¹⁸⁾。DAP12は、破骨細胞の他、脳のマクログリアに発現が認められる。那須・ハコラ病 (Nasu-hakola disease)は、多発性骨嚢胞による病的骨折と白質脳症による若年性認知症を認め、DAP12またはTREM2遺伝子の変異に起因する常染色体劣性遺伝性疾患である²⁰⁾。

近年、DAP12と会合する免疫グロブリンスーパーファミリー分子として、シアル酸受容体タンパク質 sialic acid binding immunoglobulin-like lectin 15 (Siglec-15)が同定された^{21,22)}。Siglec-15は破骨細胞の分化に伴って発現が誘導されることも明らかと

なった。Siglec-15 は、細胞内に存在する DAP12 アダプタータンパク質と会合し、ITIM を介してシグナルを伝達する。このシグナルは RANKL シグナルと合流し、共刺激シグナルとして破骨細胞の形成を誘導することが証明された。近年作製された Siglec-15 遺伝子欠損マウスは骨吸収が抑制され、骨量が増加するが、破骨細胞数はほとんど変化しないことが報告されている^{23,24)}。なお、ヒトの Siglec-15 に関する遺伝子病は現在のところ報告されていない。

第一三共株式会社の研究グループは、ヒト巨細胞腫に特異的に発現する遺伝子の解析から Siglec-15 分子を同定し、マウス、ラット、サル、ヒトなどの Siglec-15 のシグナルを遮断する抗 Siglec-15 中和抗体を作製した。この抗 Siglec-15 抗体を、マウス骨髄細胞を用いた RANKL 誘導性の破骨細胞分化誘導系に添加すると、多核破骨細胞の形成を強く抑制することが報告されている。しかし、興味深いことに、単核の TRAP 陽性破骨細胞は多数残存していた²¹⁾。また、象牙質片上のマウス破骨細胞の骨吸収機能は、Siglec-15 シグナルをノックダウンさせることにより阻害された²²⁾。マウス由来の細胞培養系を用いた研究が進む一方で、ヒト由来の培養細胞を用いた Siglec-15 中和抗体の作用解析の詳しい実験は行われていない。

ビスホスホネートや RANKL 中和抗体などの骨吸収抑制薬は骨粗鬆症治療薬として大きな効果を示すが、骨吸収抑制とカップルして骨形成の阻害(骨リモデリングの抑制)が認められることが示されている。一方これらの薬剤を癌の骨転移患者の高カルシウム血症治療薬として投与すると、骨リモデリング(骨カップリング)の抑制による顎骨壊死が発症することが大きな問題となっている。今後は、骨リモデリングを抑制しない骨代謝疾患に対する新規の骨代謝治療薬の開発が求められている^{25,26)}。そこで、本研究においては、ヒト破骨細胞の分化や骨吸収機能における Siglec-15 の役割の解明を目指し、抗 Siglec-15 抗体を用いてヒト末梢血由来の成熟破骨細胞の生存延命に対する効果

の解析を行った。本研究は、Siglec-15 シグナル遮断を利用して、ヒト成熟破骨細胞の機能を制御することが可能であるか否かを検討したものである。

実験材料および方法

(1) ヒト CD14 陽性破骨細胞前駆細胞の調製

インフォームドコンセントを得た健康な男性ボランティアより末梢血を採取（ヘパリン採血）した。ヒト由来末梢血液材料を用いた本実験は、松本歯科大学研究等倫理審査委員会の審議と学長承認を得ている（承認番号：第 0101 号）。採取したヒト末梢血約 50ml を遠心分離することにより単核細胞を回収する。この単核細胞を抗 CD14 抗体ビーズカラムに通し、MACS 細胞分離装置を用いて CD14 陽性の単球細胞画分を単離する。CD14 陽性細胞は、血液 50ml あたり約 4.0×10^6 細胞を単離することができる。

(2) ヒト破骨細胞の生存延命に対する抗 Siglec-15 抗体の効果

単離した CD14 陽性細胞 3×10^5 細胞を細胞培養ディッシュ（48well プレート）に播種し、 $250 \mu\text{l}/\text{well}$ で培養する。M-CSF（100 ng/ml）（ロイコプロール，協和発酵キリン）とヒト可溶性リコンビナント RANKL（GST fusion protein）（100 ng/ml）（オリエンタル酵母工業）を添加し、二日おきに 10 % FBS を含む α -MEM を交換する。7 日後、分化誘導された破骨細胞にコントロール IgG もしくは各種濃度の抗 Siglec-15 抗体をそれぞれ添加する。添加後 1 日目、4 日目に 10% 中性ホルマリンとエタノール・アセトンにて細胞固定を行い、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ（TRAP）染色を行う（図 1）。赤く染色される TRAP 陽性細胞のうち、3 核以上の多核細胞を破骨細胞として計測した。

また、成熟破骨細胞に OPG，RANKL 中和抗体，ビスホスホネート製剤であるアレンドロネート（ALN）をそれぞれ添加して、抗 Siglec-15 抗体との比較実験を行った。

抗ラット Siglec-15 モノクローナル中和抗体, ヒトリコンビナント OPG は, 第一三共株式会社より供与された. アレンドロネートは SIGMA-ALDRICH より購入した. FBS (ウシ胎仔血清) は, SAFC Biosciences (Lenexa, KS, USA) から購入した. α -MEM (α -minimal essential medium) 培地は, Sigma (St. Louis, MO, USA) から購入した.

(3) ヒト破骨細胞の分化誘導に対する抗 Siglec-15 抗体の効果

単離した CD14 陽性細胞を 10 % FBS を含む α -MEM を用いて M-CSF (100 ng/ml) と RANKL (100 ng/ml) の存在下で, 48well プレート中 250 μ l/well で培養した. 培養開始と同時にコントロール IgG, 抗 Siglec-15 抗体 (200 ng/ml, 400 ng/ml) をそれぞれ添加し, 二日おきに培養液を交換した. 培養 7 日目に細胞を固定し, TRAP 染色に供した. 赤く染色される TRAP 陽性細胞のうち, 3 核以上の多核細胞を破骨細胞として計測した.

(4) TRAP 染色法

TRAP 染色液は, 基質として Naphthol AS-MX phosphate (SIGMA), 色素を Fast Red Violet salt (SIGMA) を使用した酒石酸を含む緩衝液を用いた. 細胞の固定は, 10%ホルマリン/PBS とエタノール・アセトン (1:1) を用いた.

(5) ヒト破骨細胞の骨吸収機能

単離した CD14 陽性細胞を 10 % FBS を含む α -MEM を用いて M-CSF (100 ng/ml) と RANKL (100 ng/ml) の存在下で, 96well プレート中の象牙切片上で 200 μ l/well で培養した. 培養 7 日目に形成されたヒト成熟破骨細胞に, コントロール IgG, アレンドロネート (ALN) もしくは各種濃度の抗 Siglec-15 抗体をそれぞれ添加し, M-CSF (100 ng/ml) と RANKL (100 ng/ml) の非存在下にて培養した. 培養 14 日目に TRAP 染色を行い, ヒト成熟破骨

細胞の存在を確認する。細胞を綿棒で取り除いた後、ヘマトキシリンで象牙切片上のそれぞれの吸収窩を染色し（紫色）、吸収窩の面積を NIH Image-J を用いて定量した。

(6) 統計学的解析

コントロール IgG 添加群に対する抗 Siglec-15 抗体等の添加群の破骨細胞数および吸収窩面積の実験値は、多群間ノンパラメトリック比較 (Shirley-Williams 法) により検定し、 $p < 0.05$ を有意とした。

結果

(1) ヒト破骨細胞の生存延命に対する抗 Siglec-15 抗体の効果

CD14 陽性のヒト単核細胞を RANKL と M-CSF の存在下で 7 日間培養することにより TRAP 陽性ヒト多核破骨細胞が形成された (図 2)。破骨細胞が形成された培養 7 日目に RANKL と M-CSF の非存在下において、抗 Siglec-15 抗体を添加し、添加後 1 日目、4 日目に TRAP 染色により破骨細胞の延命を評価した。

各種薬剤の添加後 1 日目では、無処理群では TRAP 陽性の赤紫色に染まる多核破骨細胞が多数生存していたが、抗 Siglec-15 抗体を添加した群では、核が凝縮しアポトーシスを起こし、破骨細胞の生存延命が阻害された。一方、コントロール IgG を添加した群は、無処理群と同様、多数の多核破骨細胞が存在していた。また RANKL と M-CSF を更に添加した群は、無処理群とほとんど差は認められなかった (図 2)。

抗 Siglec-15 抗体処理 4 日目では、無処理群およびコントロール IgG 群ではヒト TRAP 陽性多核破骨細胞は多数存在していたが、抗 Siglec-15 抗体処理群では、TRAP 陽性の細胞はほとんど死滅していた。RANKL と M-CSF 処理群では、無処理群に較べ更に破骨細胞の数が増加している傾向が見られた (図 3)。

また、培養 7 日後に形成されたヒト成熟破骨細胞に抗 Siglec-15 抗体を濃度別(25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml)に添加し、添加後 1 日目に TRAP 染色を行った。その結果、抗 Siglec-15 抗体は濃度依存的に破骨細胞の生存延命を阻害した(図 4)。

ヒト成熟破骨細胞に OPG (200 ng/ml), RANKL 中和抗体 (200 ng/ml), アレンドロネート (ALN 10 μ M) をそれぞれ添加して、試薬添加 2 日目に TRAP 染色を行い、抗 Siglec-15 抗体 (200 ng/ml) との差異を検証した。その結果、抗 Siglec-15 抗体処理群はこれまでと同様、核が凝縮してアポトーシスを起こしたが、OPG (200 ng/ml), RANKL 中和抗体 (200 ng/ml), アレンドロネート (ALN 10 μ M) 処理群は Control 群との差異を認められなかった(図 5)。

以上の結果より、抗 Siglec-15 抗体は濃度依存的および経時的にヒト破骨細胞の生存延命を阻害した。また、今回の実験条件においては、OPG, RANKL 中和抗体, アレンドロネートでは、ヒト破骨細胞の生存延命に対する抑制効果は認められないことが明らかとなった。

(2) 抗 Siglec-15 抗体のヒト成熟破骨細胞に及ぼす骨吸収機能への影響

単離した CD14 陽性細胞を 10%FBS 含有 α -MEM を用いて M-CSF と RANKL の存在下で、96well プレート中の象牙切片上で培養した。培養 7 日目に形成されたヒト成熟破骨細胞を M-CSF と RANKL の非存在下にて、コントロール IgG, アレンドロネートもしくは抗 Siglec-15 抗体をそれぞれ添加した。培養 14 日目に TRAP 染色を行い破骨細胞の分化を確認した結果、抗 Siglec-15 抗体を添加した群は、象牙切片上の TRAP 陽性細胞数が減少した(図 6)。一方、アレンドロネートを添加した群は、アポトーシスに至っていると考えられる TRAP 陽性多核細胞を多数認めた(図 6)。

同じ条件で培養した細胞による象牙切片上のそれぞれの吸収窩を染色し(図 7)、吸収窩の面積を NIH Image-J を用いて定量した(図 8)。その結果、抗 Siglec-15 抗体を

添加した群は濃度依存的に、TRAP 陽性細胞の数および象牙切片の吸収窩面積が減少した (図 7, 8). 一方、アレンドロネートを添加した群は TRAP 陽性細胞, およびヘマトキシリン染色における吸収窩はほとんど観察されなかった (図 7, 8).

(3) 抗 Siglec-15 抗体のヒト破骨細胞における分化誘導過程に及ぼす影響 (Fig. 9)

単離した CD14 陽性細胞を 10% FBS を含む α -MEM を用いて M-CSF と RANKL の存在下で培養した. 培養開始と同時にコントロール IgG, 抗 Siglec-15 抗体をそれぞれ添加し, 2 日おきに培養液を交換し, 添加後 7 日目に TRAP 染色を行った結果, 抗 Siglec-15 抗体を添加しても, IgG コントロール抗体と同様、ヒト破骨細胞の分化に対して影響を与えず, TRAP 陽性細胞数を減少させなかった.

考察

骨組織においては、破骨細胞による骨の吸収と骨芽細胞による骨の形成が絶え間なく繰り返されている^{25, 26)}。この骨吸収と骨形成のカップリングにより、力学的なストレスに耐えられ弾力性を有する新しい骨組織が形成される。近年、分子レベルで骨吸収と骨形成に関する研究が進み、さまざまなホルモン、サイトカイン、転写因子の作用機構の詳細が明らかにされ、骨カップリング制御機構を説明するための重要な実験結果が蓄積してきた。

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。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り、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。オステオプロテゲリン(OPG)の遺伝子欠損マウスは、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^{9, 10)}。したがって、オステオプロテゲリン(OPG)遺伝子欠損マウスは骨吸収マーカーのみならず、骨形成の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。骨吸収と骨形成が共に亢進している高回転型骨粗鬆症を呈するオステオプロテゲリン(OPG)遺伝子欠損マウスに対して骨吸収阻害薬であるビスホスネートを投与した実験によると、骨吸収の阻害とカップルして、骨形成の亢進はビスホスネート投与によって完全に正常化された²⁷⁾。以上の実験結果より、骨組織においては、骨吸収と骨形成のカップリング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。

小出ら²⁸⁾は、オステオプロテゲリン(OPG)遺伝子欠損マウスを用いた実験結果から、骨細胞が産生するオステオプロテゲリン(OPG)およびスクレロスチン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を明らかにした。また、破骨細胞由来のLIF(白

血病阻止因子) が骨細胞におけるスクロスチンの発現を低下させ、骨形成を促進する可能性を示した²⁷⁾。

古典的な骨リモデリング制御機構は、破骨細胞が骨基質中の TGF- β を掘り出し、骨芽細胞を活性化するというものである²⁵⁾。一方、破骨細胞自身が発現・産生する各種分子である S1P, ephrin B2, ephrin A2, Sema 4D, PDGF-BB, Wnt10b, Cthrc1, C3a, カテプシン K などの骨カップリング機構における作用機序が報告され、骨リモデリング機構を説明する画期的な新しい説 (破骨細胞から骨芽細胞活性化へのリバースシグナル) が続々と登場してきた²⁵⁾。

ITAM は、T 細胞や B 細胞の受容体と会合する細胞膜アダプター分子の細胞内ドメインに共通してみられるモチーフとして発見された。破骨細胞では、DAP12 と FcR γ の発現が高く、ダブル欠損マウスは大理石骨病を呈する¹⁸⁾。DAP12 と会合する免疫グロブリンスーパーファミリー分子として、シアル酸受容体タンパク質 Siglec-15 が同定された。Siglec-15 は破骨細胞の分化に伴って誘導される。Siglec-15 遺伝子欠損マウスは、骨吸収が抑制され骨量が増加するが、破骨細胞数は減少しない^{21, 22)}。一方、今回の実験結果は、抗 Siglec-15 抗体はヒト末梢血液由来の破骨細胞の分化誘導過程では阻害効果を示さなかったが、多核破骨細胞の延命を阻害した。破骨細胞の延命を阻害することにより骨組織の破骨細胞数は減少することが予想され、Siglec-15 遺伝子欠損マウスにおいて破骨細胞数が減少しないことと矛盾するとも考えられる。この点は、マウスの細胞培養系を用いた実験や抗 Siglec-15 抗体 in vivo 投与実験における詳細な解析が今後重要である。

抗 Siglec-15 抗体の効果について、マウス由来の細胞培養系において検討した結果が報告されている²⁹⁾。抗 Siglec-15 抗体は、骨髄マクロファージの培養系における RANKL と M-CSF 誘導性の多核破骨細胞形成を阻害した。骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系で RANK 陽性の破骨細胞前駆細胞 (qOP) が出現する。抗 Siglec-15 抗体は qOP の形成に対

しては抑制効果を示さなかった。さらに、抗 Siglec-15 抗体の破骨細胞の機能に対する効果を検討した結果、骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系で形成された破骨細胞のアクチンリング形成を、抗 Siglec-15 抗体は濃度依存的に阻害した。また、抗 Siglec-15 抗体はマウス由来の成熟破骨細胞による象牙質切片上の吸収窩形成を強く抑制した²⁹⁾。

骨髄細胞培養系に RANKL と M-CSF を添加し破骨細胞が誘導される条件で、抗 Siglec-15 抗体は TRAP 陽性の多核破骨細胞の分化を阻害すると共に、アルカリホスファターゼ (ALP) 陽性の骨芽細胞が多数誘導された。この時、多核破骨細胞形成は完全に抑制されたが、単核 TRAP 陽性前破骨細胞の存在が認められた²⁹⁾。前述のように、破骨細胞由来の LIF がスクロスチン産生抑制を介して、骨形成を促進させるカップリング因子である可能性がある²⁸⁾。抗 Siglec-15 抗体で処理した破骨細胞においてカテプシン K および RANK の発現維持と同様に、LIF 発現は維持されていた³⁰⁾。以上の結果から、抗 Siglec-15 抗体で処理した破骨細胞における骨形成の促進作用に、LIF 発現の維持が関与する可能性が示された。抗 Siglec-15 抗体は多核破骨細胞の分化と骨吸収機能を阻害すると共に、骨芽細胞の分化を促進する可能性が考えられる。

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。このシステムと連関する形で、骨カップリング制御機構が複雑に制御されている。抗 Siglec-15 抗体を正常マウスに投与することにより、骨密度を上昇させる実験結果が報告されている³¹⁾。また、卵巣摘出ラットとカニクイサルを用いた前臨床薬効薬理試験において、骨密度、骨質、骨強度の改善効果が確認されている^{32, 33)}。更に、抗 Siglec-15 抗体の薬効の特徴として、骨吸収の抑制と骨形成の維持というカテプシン K 阻害剤に類似した理想的な薬効プロファイルも前臨床試験と Ph1 試験で確認された³⁴⁾。今後、抗 Siglec-15 抗体を骨粗鬆症治療薬として臨床応用する際、顎骨骨髄炎の発症を含めた各種副作用の詳細な解析が必要であることは

言うまでもない。更なる骨カップリング機構の分子メカニズムの解明により、新しい骨粗鬆症治療薬開発を期待したい。

結論

抗 Siglec-15 抗体は、ヒト末梢血由来の多核破骨細胞の生存延命に対し、経時的および濃度依存的に阻害効果を示した。また、象牙切片上での骨吸収機能に対しても、濃度依存的に吸収窩形成を阻害した。しかし、分化誘導過程においては阻害効果を示さなかった。

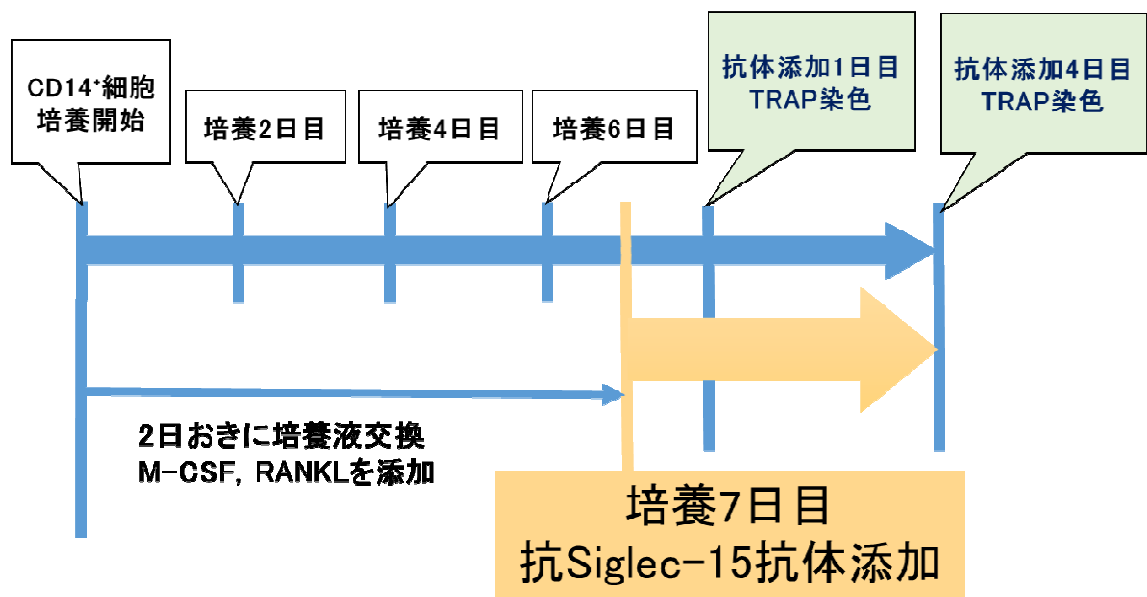


図1 ヒト破骨細胞の生存延命に対する抗 Siglec-15 抗体の添加実験のプロトコール

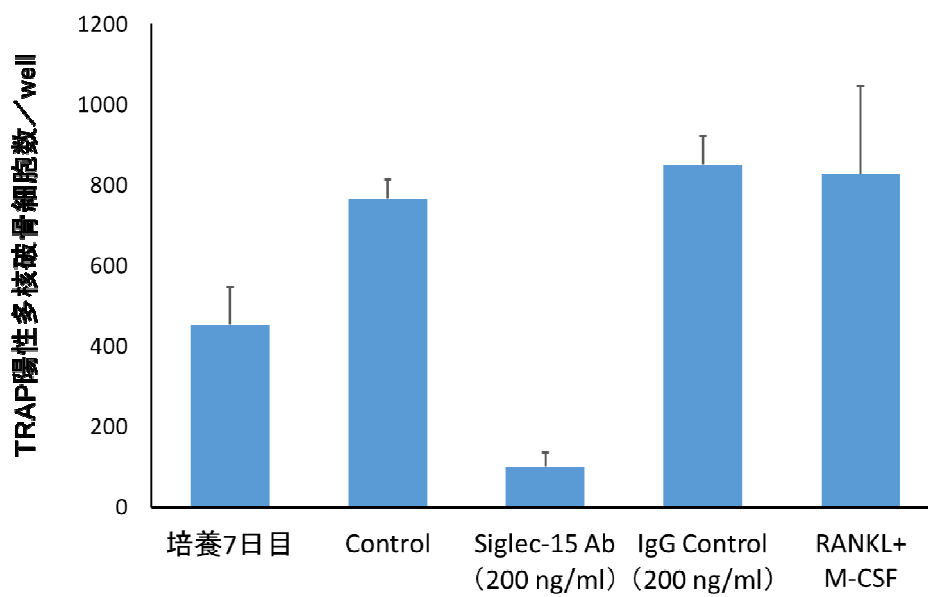
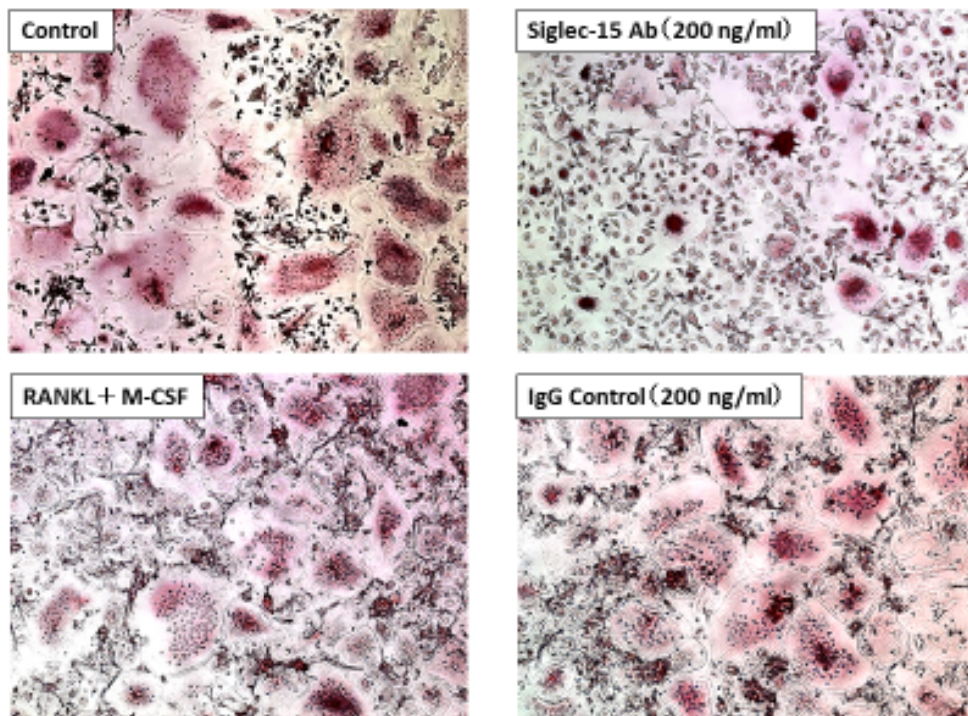


図2 ヒト破骨細胞の生存延命に対する抗 Siglec-15 抗体の効果 (培養 1 日目)

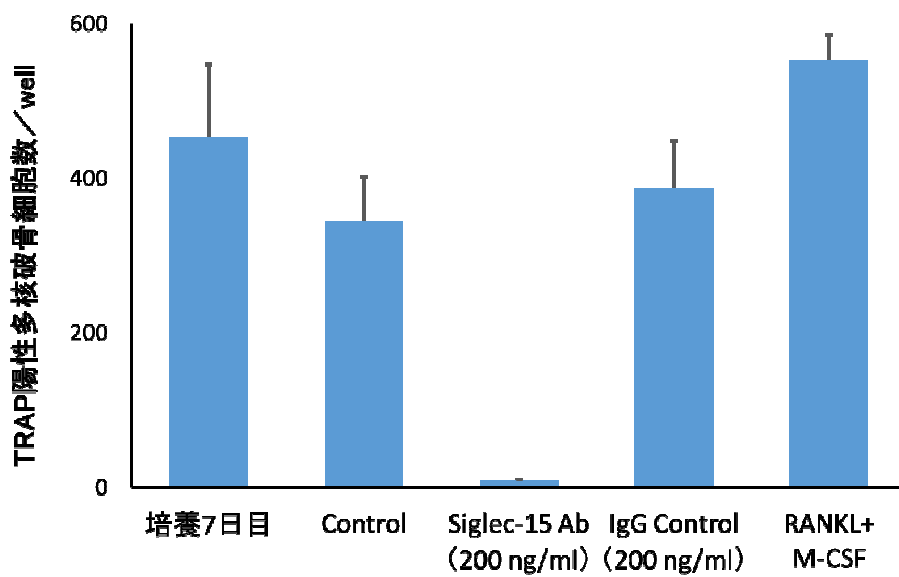
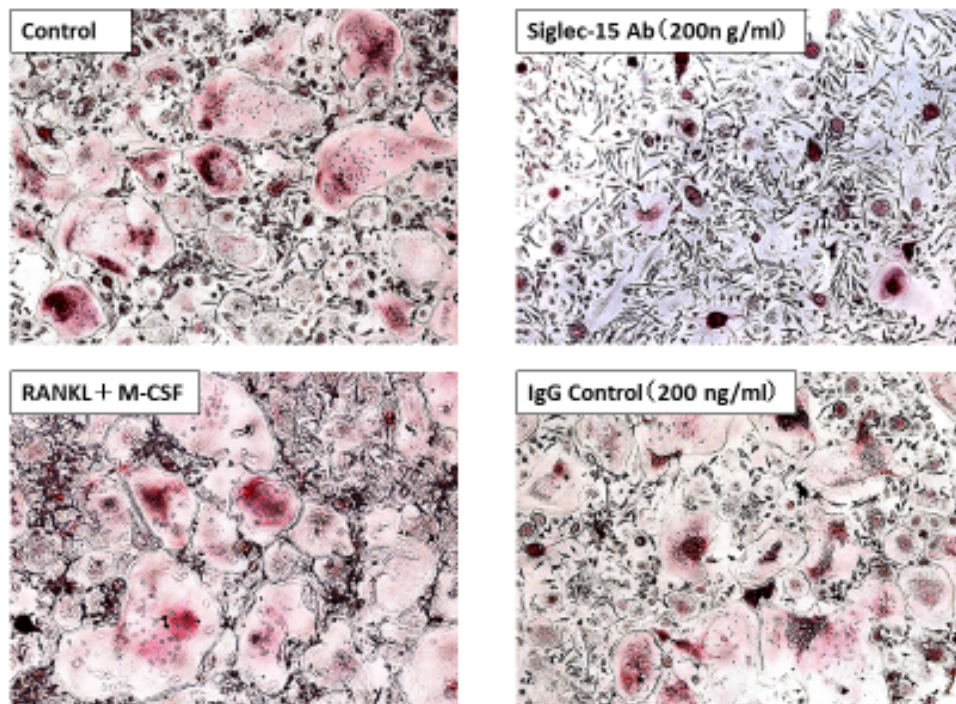


図3 ヒト破骨細胞の生存延命に対する抗 Siglec-15 抗体の効果 (培養 4 日目)

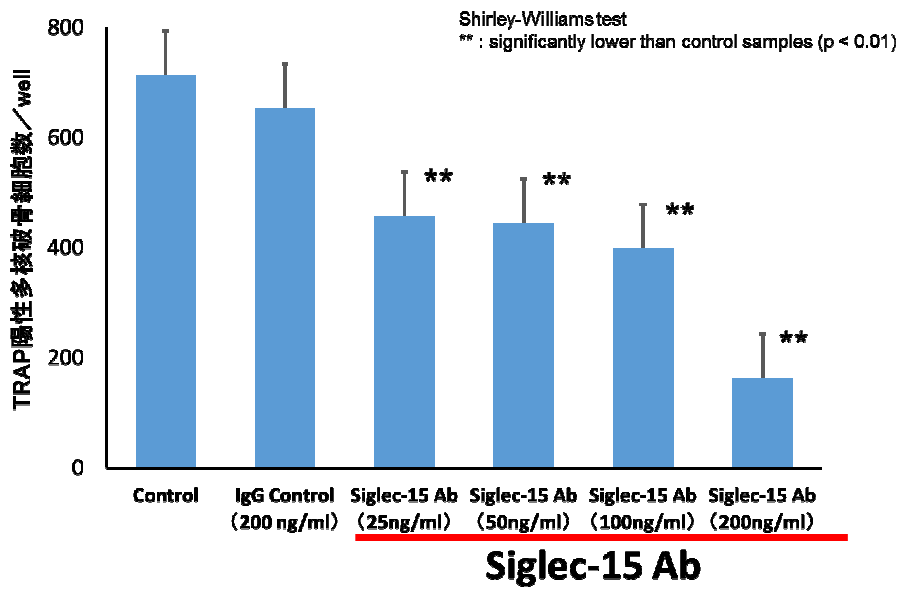
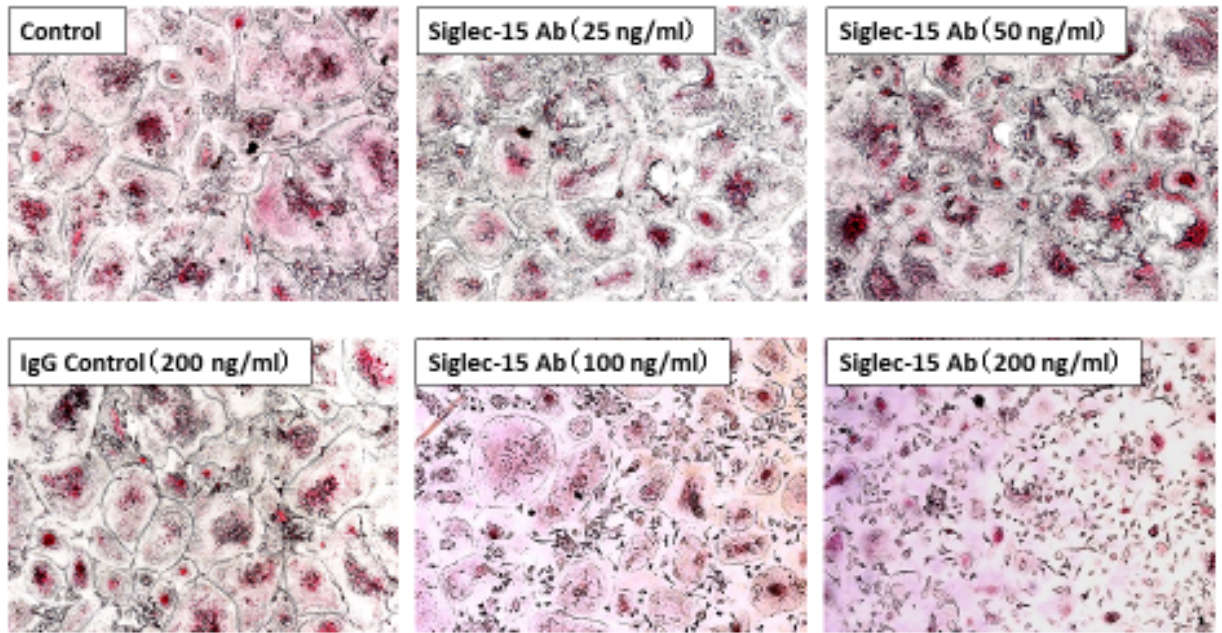


図4 ヒト破骨細胞の生存延命に対する各種濃度の抗 Siglec-15 抗体の効果 (培養 1 日目)

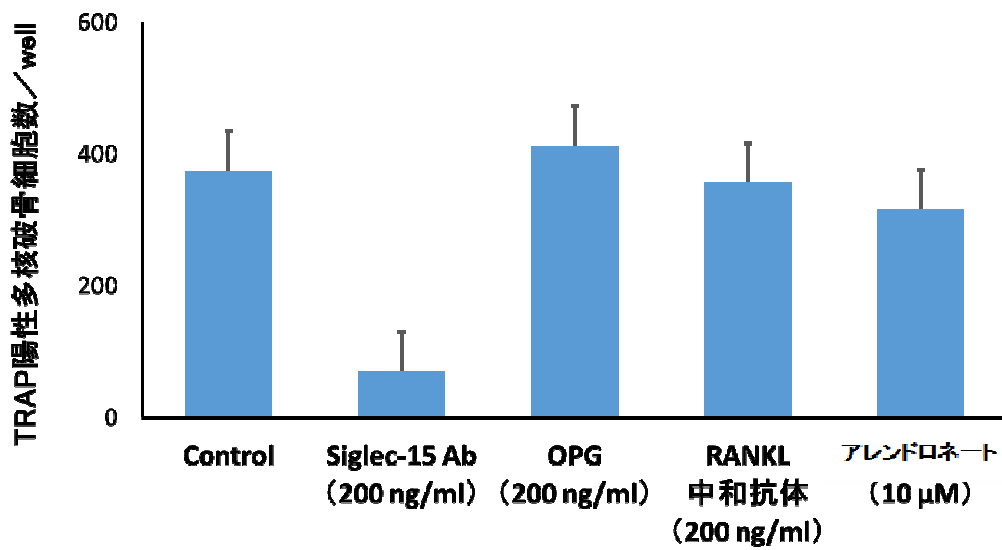
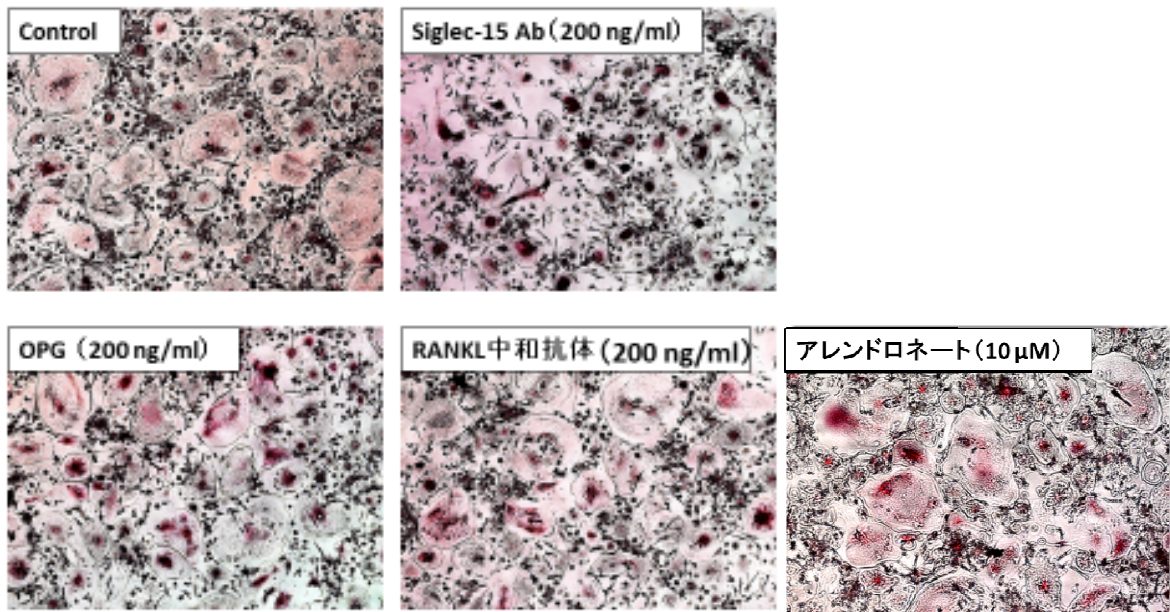


図5 ヒト破骨細胞の生存延命に対する抗 Siglec-15 抗体, OPG, RANKL 中和抗体, アレンドロネートの効果

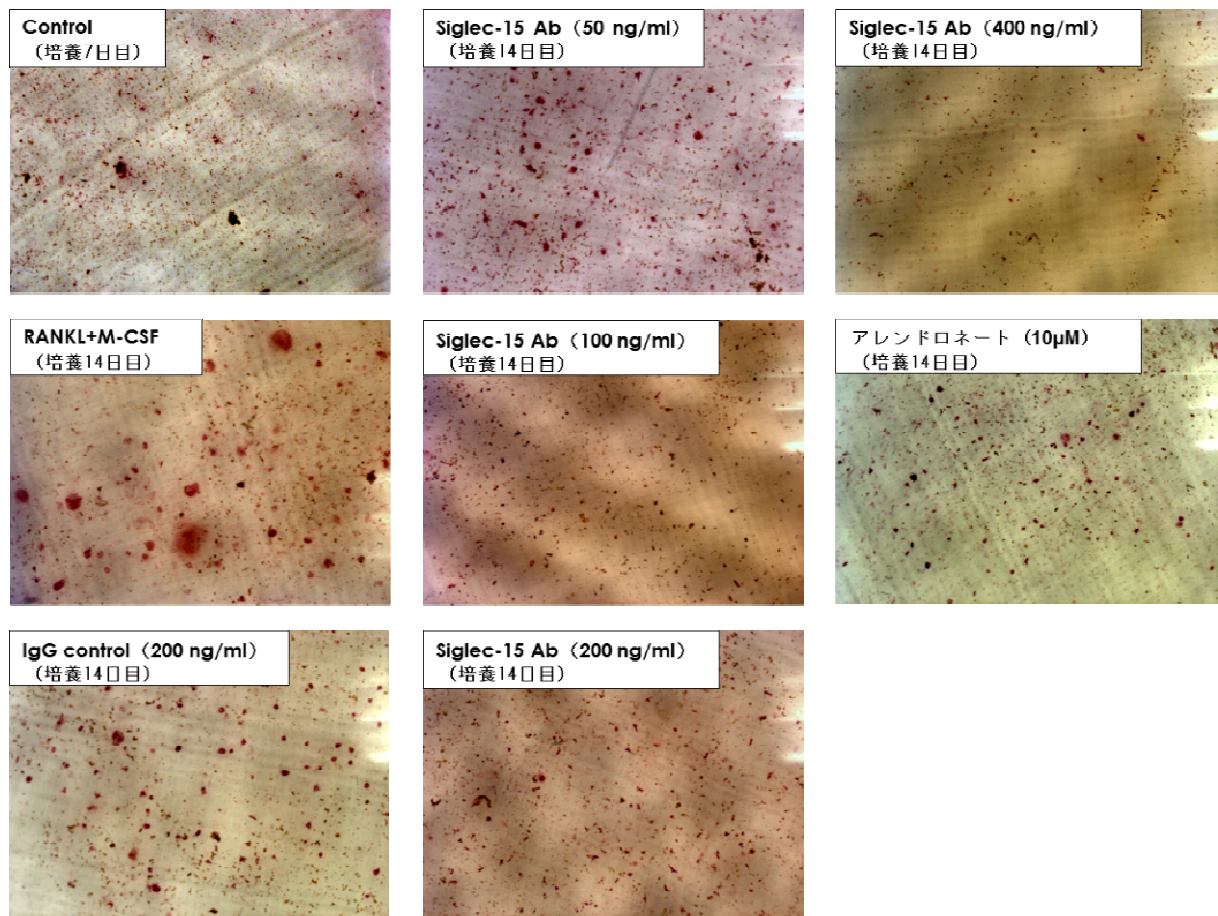


図6 抗 Siglec-15 抗体のヒト成熟破骨細胞に対する効果（象牙質切片上における TRAP 染色像）

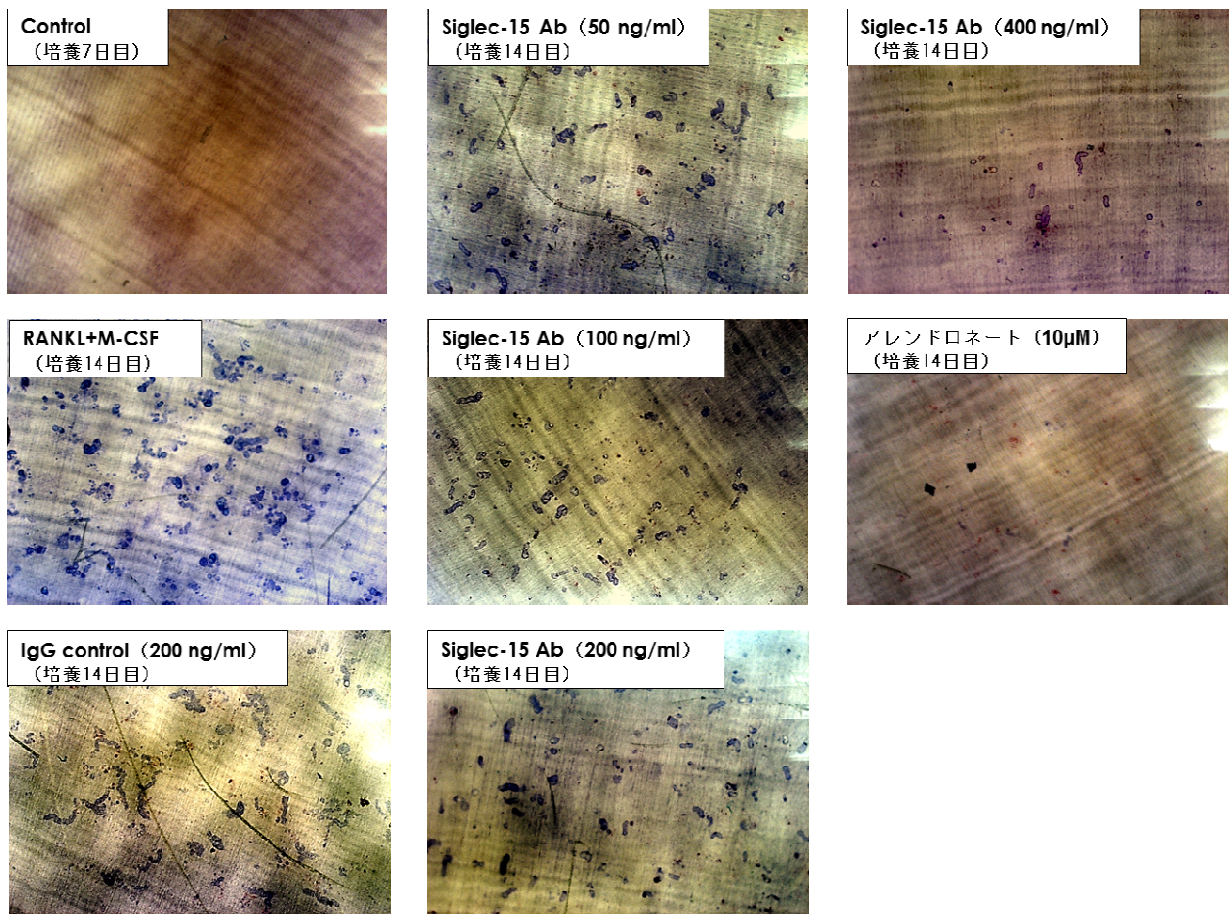


図7 抗 Siglec-15 抗体のヒト成熟破骨細胞による象牙質切片上の吸収窩形成に対する効果

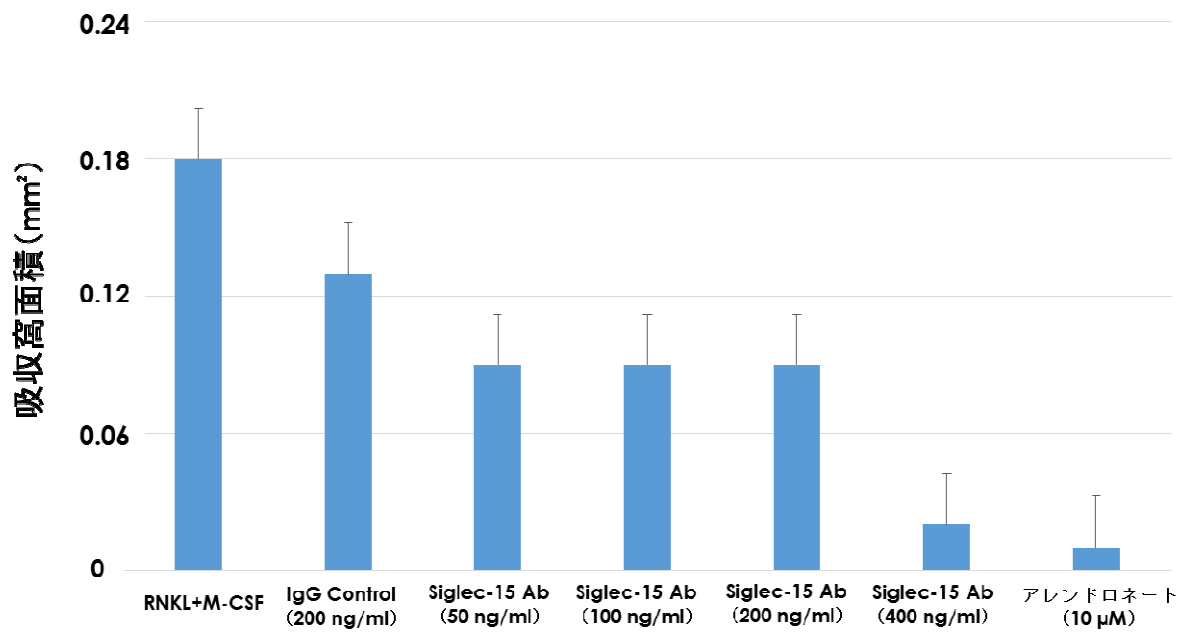


図8 抗 Siglec-15 抗体のヒト成熟破骨細胞による吸収窩形成に対する効果（定量化）

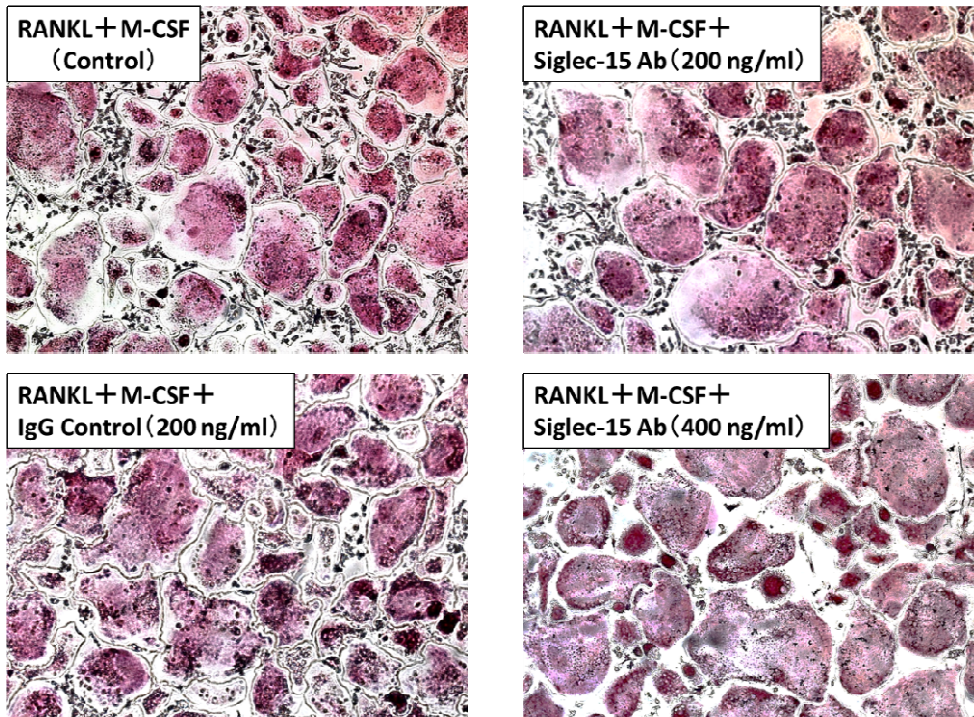


図9 抗 Siglec-15 抗体のヒト破骨細胞分化誘導過程に及ぼす影響

文献

- 1) Baron R, Neff L, Tran Van P, Nefussi JR and Vignery A (1986) Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts. *Am J Pathol* 122 : 363-78.
- 2) Ott SM (2002) Histomorphometric analysis of bone remodeling. In *Principles of bone biology*, Second edition, Volume 1. ed by Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. New York, Academic press, p303-319
- 3) 高橋直之 (2012) 破骨細胞の分化メカニズム. *医学の歩み* 242 : 649-654
- 4) Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N and Suda T (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand of osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 3597-602.
- 5) Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT and Martin TJ (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20 : 345-57.
- 6) Chambers TJ (2000) Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. *J Pathol* 192 : 4-13.
- 7) Boyle WJ, Simonet WS and Lacey DL (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423 : 337-42.
- 8) Teitelbaum SL and Ross FP (2003) Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4 : 638-49.

- 9) Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennet L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R and Boyle WJ (1997) Osteoprotegerin : a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89 : 309-19.
- 10) Mizuno A, Amizuka N, Irie K, et al : Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun* 247 : 610-615, 1998.
- 11) Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al : Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 12 : 1260-1268, 1998.
- 12) Udagawa N, Takahashi N, Yasuda H, Mizuno A, Itoh K, Ueno Y, Shinki T, Gillespie MT, Martin TJ, Higashio K and Suda T (2000) Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology* 141 : 3478-84.
- 13) Matsuzaki K, Udagawa N, Takahashi N, Yamaguchi K, Yasuda H, Shima N, Morinaga T, Toyama Y, Yabe Y, Higashio K, Suda T (1998) Osteoclast differentiation factor (ODF) induced osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 246 : 199-204.
- 14) Ishida N, Hayashi K, Hoshijima M, Ogawa T, Koga S, Miyatake Y, Kumegawa M, Kimura T, Takeya T. (2002) Large scale gene expression analysis of osteoclastogenesis in vitro and elucidation of NFAT2 as a key regulator. *J Biol Chem* 277 : 41147-56.

- 15) Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T and Taniguchi T (2002) Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* 3 : 889-901.
- 16) Asagiri M, Sato K, Usami T, Ochi S, Nishina H, Yoshida H, Morita I, Wagner EF, Mak TW, Serfling E, Takayanagi H. (2005) Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *J Exp Med* 202 : 1261-1269.
- 17) Aliprantis AO, Ueki Y, Sulyanto R, Park A, Sigrist KS, Sharma SM, Ostrowski MC, Olsen BR, Glimcher LH. (2008) NFATc1 in mice represses osteoprotegerin during osteoclastogenesis and dissociates systemic osteopenia from inflammation in cherubism. *J Clin Invest* 118 : 3775-3789.
- 18) Koga T, Inui M, Inoue K, Kim S, Suematsu A, Kobayashi E, Iwata T, Ohnishi H, Matozaki T, Kodama T, Taniguchi T, Takayanagi H, Takai T. (2004) Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature* 428 : 758-763.
- 19) Kaifu T, Nakahara J, Inui M, Mishima K, Momiyama T, Kaji M, Sugahara A, Koito H, Ujike-Asai A, Nakamura A, Kanazawa K, Tan-Takeuchi K, Iwasaki K, Yokoyama W, Kudo A, Fujiwara M, Asou H and Takai T. (2003) Osteopetrosis and thalamic hypomyelination with synaptic degeneration in DAP12-deficient mice. *J Clin. Invest.* 111, 323-332.

- 20) Kuroda R, Satoh J, Yamamura T, Anezaki T, Terada T, Yamazaki K, Obi T, Mizoguchi K. (2007) A novel compound heterozygous mutation in the DAP12 gene in a patient with Nasu-Hakola disease. *J Neurol Sci* 252 : 88-91.
- 21) Hiruma Y, Hirai T, Tsuda E. (2011) Siglec-15, a member of the sialic acid-binding lectin, is a novel regulator for osteoclast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 409 : 424-429.
- 22) Ishida-Kitagawa N, Tanaka K, Bao X, Kimura T, Miura T, Kitaoka Y, Hayashi K, Sato M, Maruoka M, Ogawa T, Miyoshi J, Takeya T. (2012) Siglec-15 protein regulates formation of functional osteoclasts in concert with DNAX-activating protein of 12 kDa (DAP12). *J Biol Chem* 287 : 17493-17502.
- 23) Kameda Y, Takahata M, Komatsu M, Mikuni S, Hatakeyama S, Shimizu T, Angata T, Kinjo M, Minami A, Iwasaki N. (2013) Siglec-15 regulates osteoclast differentiation by modulating RANKL-induced phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Erk pathways in association with signaling adaptor DAP12. *J Bone Miner Res* 28 : 2463-2475.
- 24) Hiruma Y, Tsuda E, Maeda N, Okada A, Kabasawa N, Miyamoto M, Hattori H, Fukuda C. (2013) Impaired osteoclast differentiation and function and mild osteopetrosis development in Siglec-15-deficient mice. *Bone* 53 : 87-93.
- 25) 中村美どり, 中道裕子, 小出雅則, 宇田川信之 (2016) オステオプロテゲリンによる骨リモデリング制御. *THE BONE* 30 : 175-180.
- 26) 小出雅則, 宇田川信之 (2016) スクレロスチンによる骨リモデリング制御. *THE BONE* 30 : 169-173.
- 27) Nakamura M, Udagawa N, Matsuura S, Mogi M, Nakamura H, Horiuchi H, Saito N, Hiraoka BY, Kobayashi Y, Takaoka K, Ozawa H, Miyazawa H, Takahashi N. (2003)

- Osteoprotegerin regulates bone formation through a coupling mechanism with bone resorption. *Endocrinology* 144 : 5441-5449
- 28) Koide M, Kobayashi Y, Yamashita T, Uehara S, Nakamura M, Hiraoka BY, Ozaki Y, Iimura T, Yasuda H, Takahashi N, Udagawa N. (2017) Bone formation is coupled to resorption via suppression of sclerostin expression by osteoclasts. *J Bone Miner Res* 32 : 2074-2086.
- 29) Udagawa N, Uehara S, Koide M, Arai A, Mizoguchi T, Nakamura M, Kobayashi Y, Takahashi N, Fukuda C, Tsuda E. (2017) Anti-Siglec-15 antibody inhibits bone-resorbing activity of osteoclasts and stimulates osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* 32 (Suppl 1) : 349.
- 30) Udagawa N, Koide M, Uehara S, Arai A, Mizoguchi T, Yamashita T, Nakamura M, Kobayashi Y, Takahashi N, Fukuda C, Tsuda E, Kumakura S. (2018) Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 15 (Siglec-15) plays important roles in the induction of both bone-resorbing activity of osteoclasts and osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* 33 (Suppl 1) : 381.
- 31) Stuibler M, Moraitis A, Fortin A, Saragosa S, Kalbakji A, Filion M, Tremblay GB. (2014) Mechanism and function of monoclonal antibodies targeting siglec-15 for therapeutic inhibition of osteoclastic bone resorption. *J Biol Chem* 289 : 6498-6512.
- 32) Fukuda C, Okada A, Karibe T, Hinuma Y, Kumakura S, Tsuda E. (2017) A novel bone formation-sparing anti-resorptive agent, DS-1501a, increased BMD and bone biomechanical properties of cortical bone in ovariectomized cynomolgus monkeys. *J Bone Miner Res* 32 (Suppl 1) : 112.

- 33) Fukuda C, Tsuda E, Okada A, Amizuka N, Hasegawa T, Karibe T, Hinuma Y, Takagi N, Kumakura S. (2017) Anti-Siglec-15 antibody reduced bone resorption while maintaining bone formation in ovariectomized (OVX) rats and monkeys. J Bone Miner Res 32 (Suppl 1) : 112.
- 34) Dishy V, Kang D, Warren V, Maxwell W, Levinson B, Kochan J, He L, Baz-Hecht M, Fukuda C, Koga J, Tsuda E, Watanabe K. (2017) A phase 1, subject and investigator blinded, sponsor unblinded, placebocontrolled, randomized, 2 part, sequential, single ascending dose study to assess the safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of DS-1501a in healthy young subjects and healthy postmenopausal woman. J Bone Miner Res32 (Suppl 1) : 107-108.

図の説明

- 図1 ヒト破骨細胞の生存延命に対する抗 Siglec-15 抗体の添加実験のプロトコール
- 図2 ヒト破骨細胞の生存延命に対する抗 Siglec-15 抗体の効果 (培養 1 日目)
- 図3 ヒト破骨細胞の生存延命に対する抗 Siglec-15 抗体の効果 (培養 4 日目)
- 図4 ヒト破骨細胞の生存延命に対する各種濃度の抗 Siglec-15 抗体の効果 (培養 1 日目)
- 図5 ヒト破骨細胞の生存延命に対する抗 Siglec-15 抗体, OPG, RANKL 中和抗体, アレンドロネートの効果

図6 抗 Siglec-15 抗体のヒト成熟破骨細胞に対する効果（象牙質切片上における TRAP 染色像）

図7 抗 Siglec-15 抗体のヒト成熟破骨細胞による象牙質切片上の吸収窩形成に対する効果

図8 抗 Siglec-15 抗体のヒト成熟破骨細胞による吸収窩形成に対する効果（定量化）

図9 抗 Siglec-15 抗体のヒト破骨細胞分化誘導過程に及ぼす影響