

骨保護から寝たきりを防ぐ 統合的研究

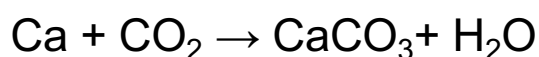
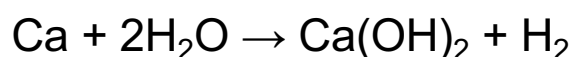
東京医科歯科大学
大学院医歯学総合研究科 システム発生・再生医学
科学技術振興機構 さきがけ
篠原 正浩

カルシウムとは



- 金属の1種(アルカリ土類金属)
- 導電性
- 低硬度

⚠ 地球上では非常に不安定な物質の一つ ⚠



地球上に存在する元素

地殻中

1	酸素(O)	約46%
2	ケイ素(Si)	約28%
3	アルミニウム(Al)	約8%
4	鉄(Fe)	約5%
5	カルシウム(Ca)	約4%

海水中

1	塩素(Cl)	約58%
2	ナトリウム(Na)	約32%
3	マグネシウム(Mg)	約4%
4	硫黄(S)	約3%
5	カルシウム(Ca)	約1%

海水中の2価陽イオン



1	H	1
2	Li	Be
3	Na	Mg
4	K	Ca
5	Rb	Sr
6	Cs	Ba
7	Fr	Ra

→ 約0.00000000006%

→ 約4%

→ 約1%

→ 約0.03%

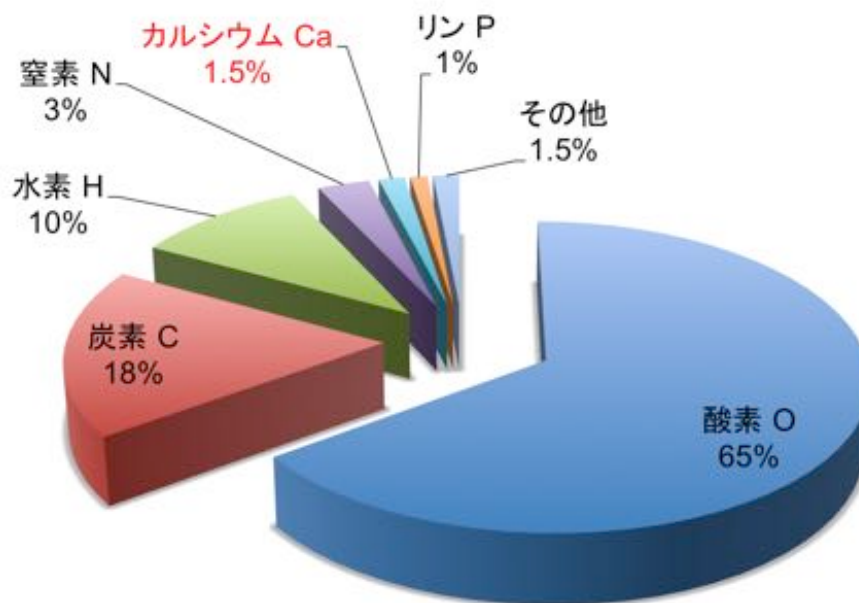
→ 約0.00005%

→ 約0.00000000000004%

カルシウムは比較的海水に多い2価のイオン

生物とカルシウム

人体を構成する元素の質量割合

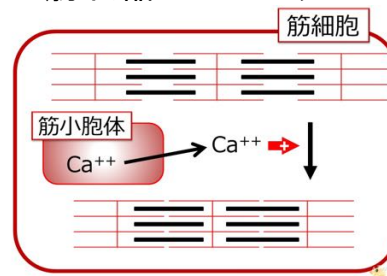
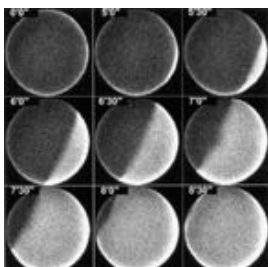


カルシウムの99%は骨や歯に存在

生命維持に不可欠なカルシウム



受精時のカルシウムウェーブ 筋収縮とカルシウム 血液凝固とカルシウム

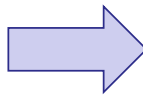


生物の進化と骨

脊椎動物の誕生
(約5億年前)



脊椎動物の陸上進出
(約3.6億年前)



水中	陸上
1/6 G	1 G
ミネラル摂取が容易	ミネラル摂取が困難

- 身体支持と歩行のために**骨**が発達
- ミネラルを**骨**に貯蔵

骨の役割

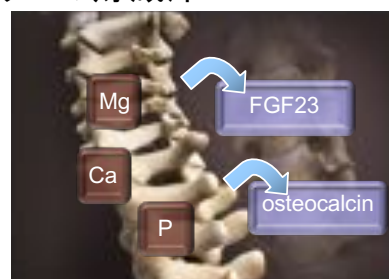
身体維持・運動機能の
中心的組織



主要臓器の保護組織
造血組織



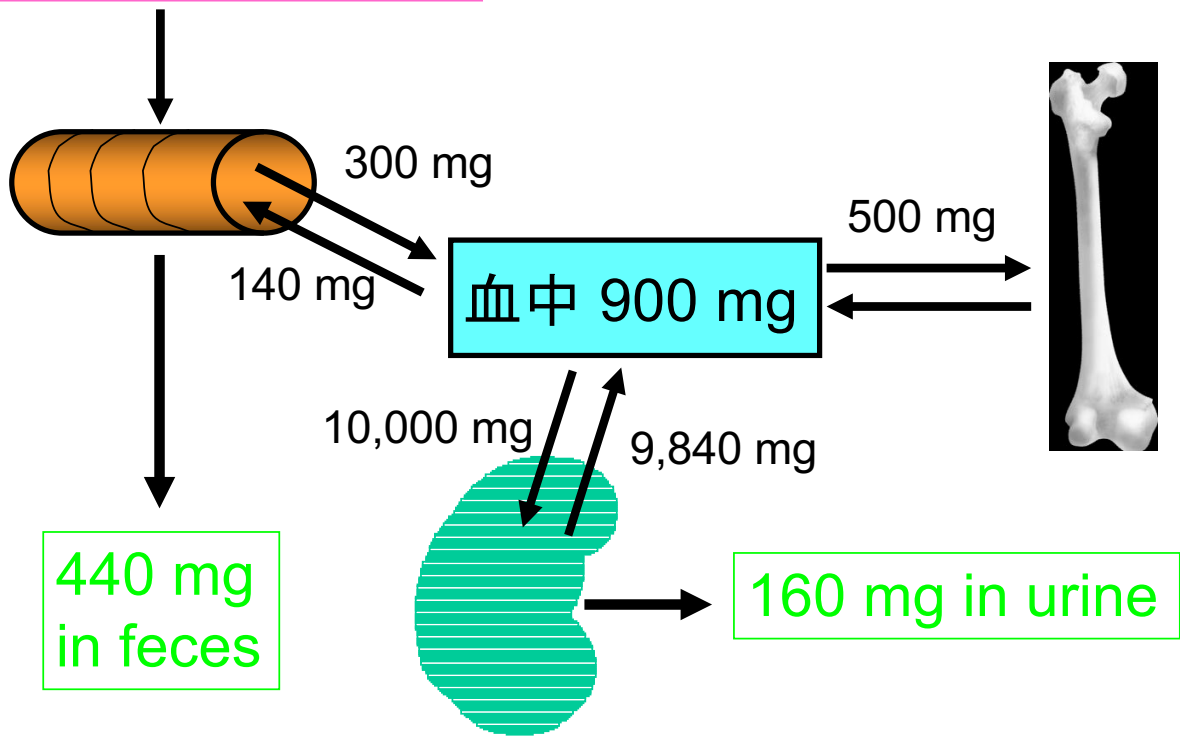
ミネラル・リンの貯蔵庫



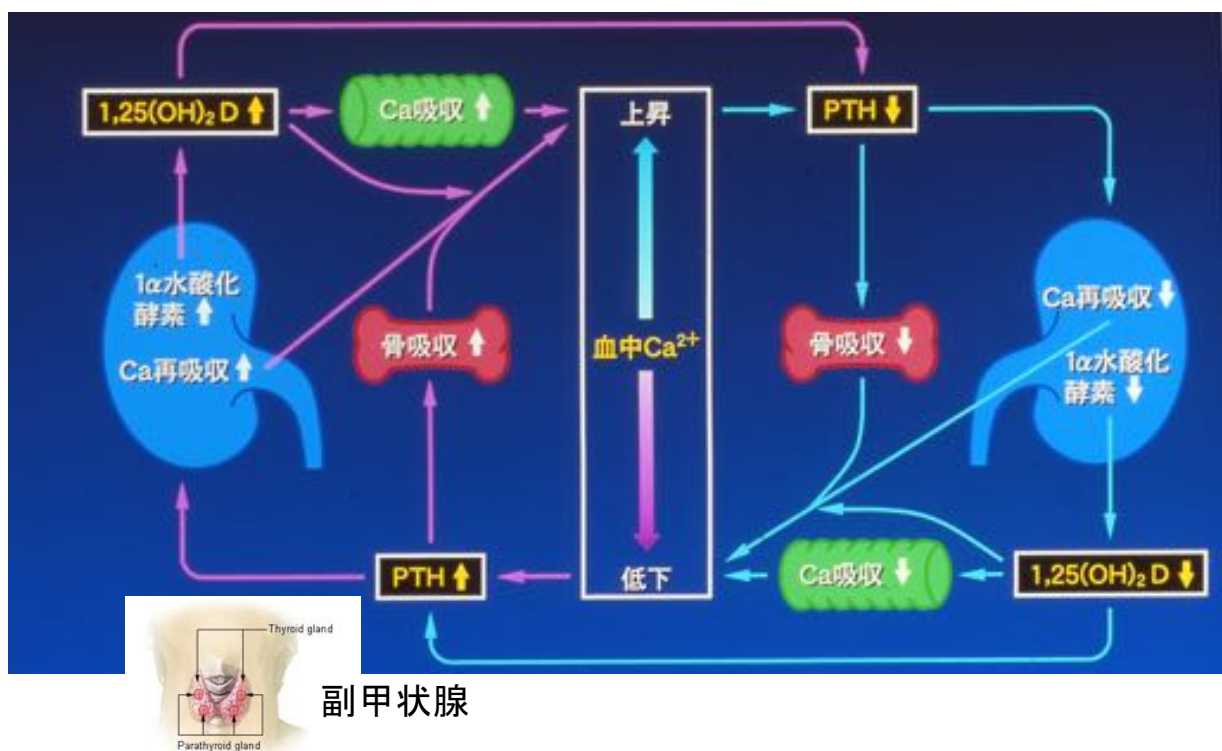
内分泌器官

カルシウムバランス

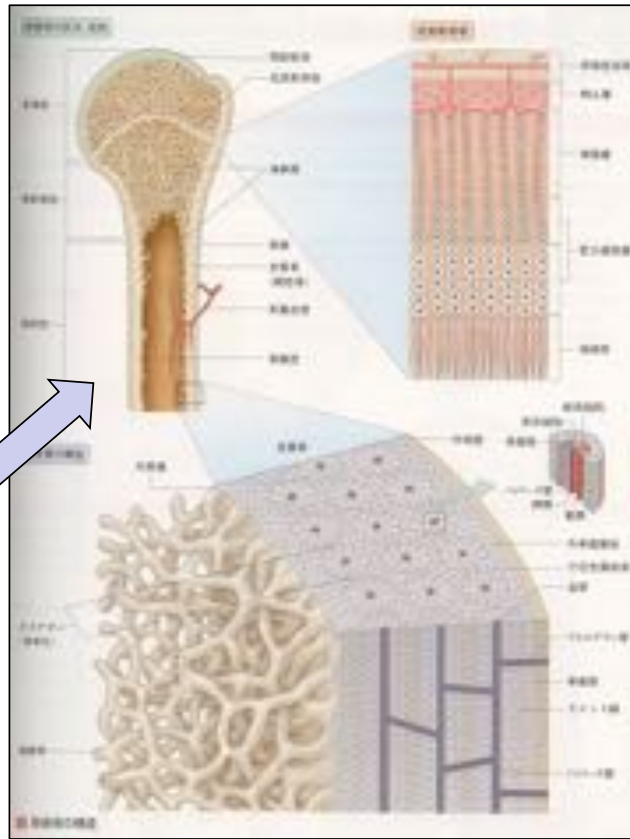
600 mg Ca in diet



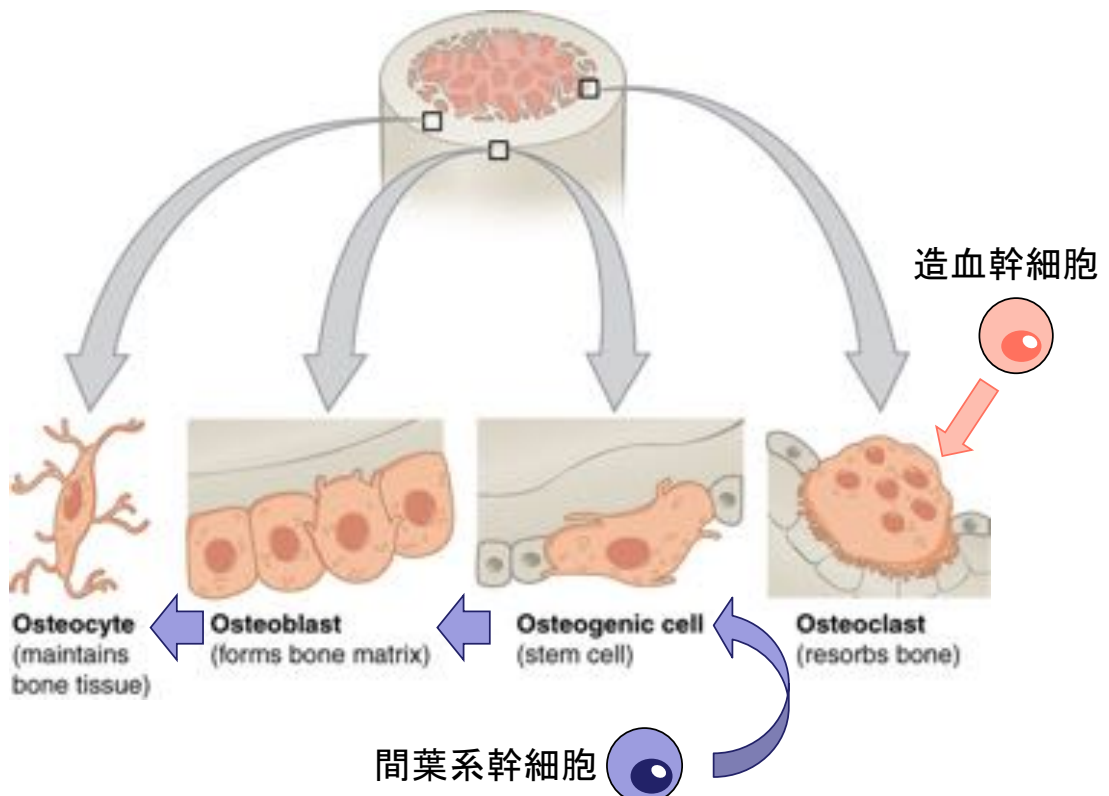
血中カルシウム量の制御



骨の構造



骨代謝を制御する細胞群



骨代謝恒常性と骨代謝細胞

古い骨は壊され、新しい骨が形成される

||

骨のリモデリング

骨の吸収: **破骨細胞** = 骨の形成: **骨芽細胞**



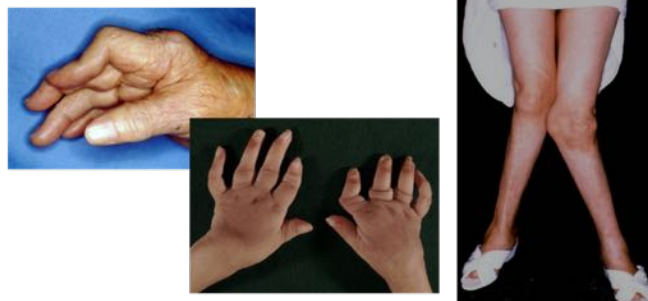
吸収と形成のバランスは骨組織の恒常性維持に重要

骨代謝の恒常性破綻と疾患

骨粗鬆症

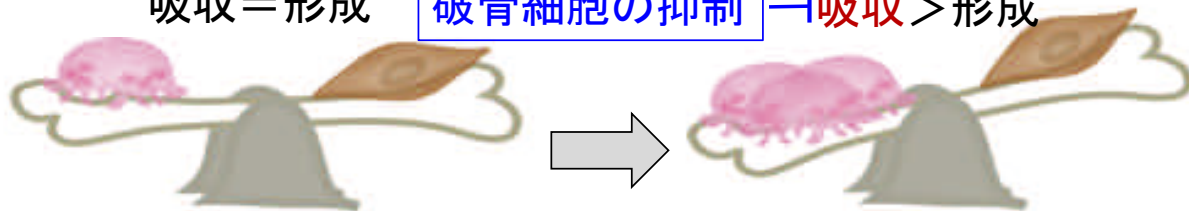


関節リウマチ

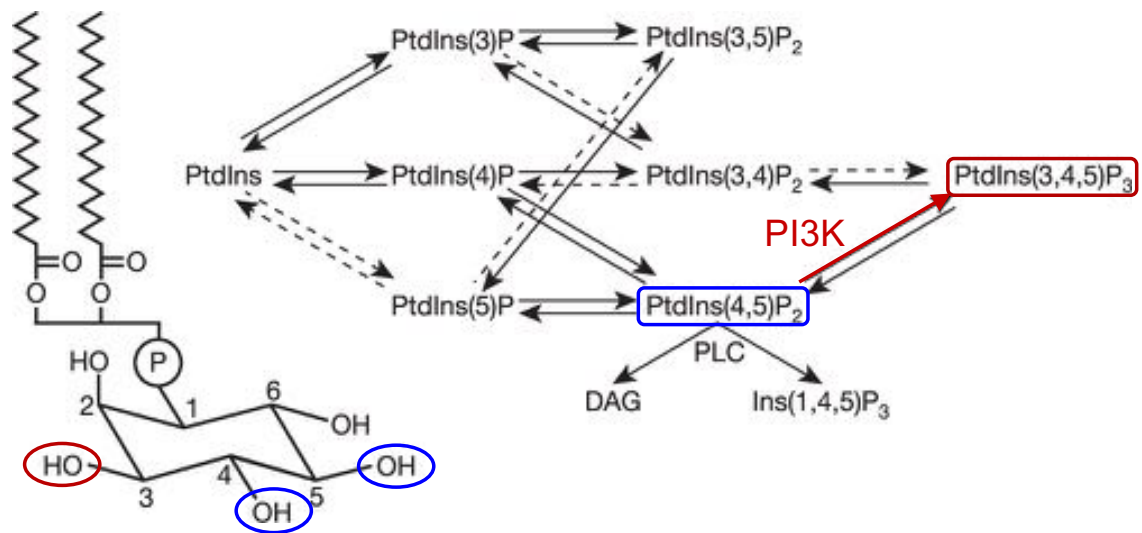


吸収 = 形成

破骨細胞の抑制 → 吸収 > 形成

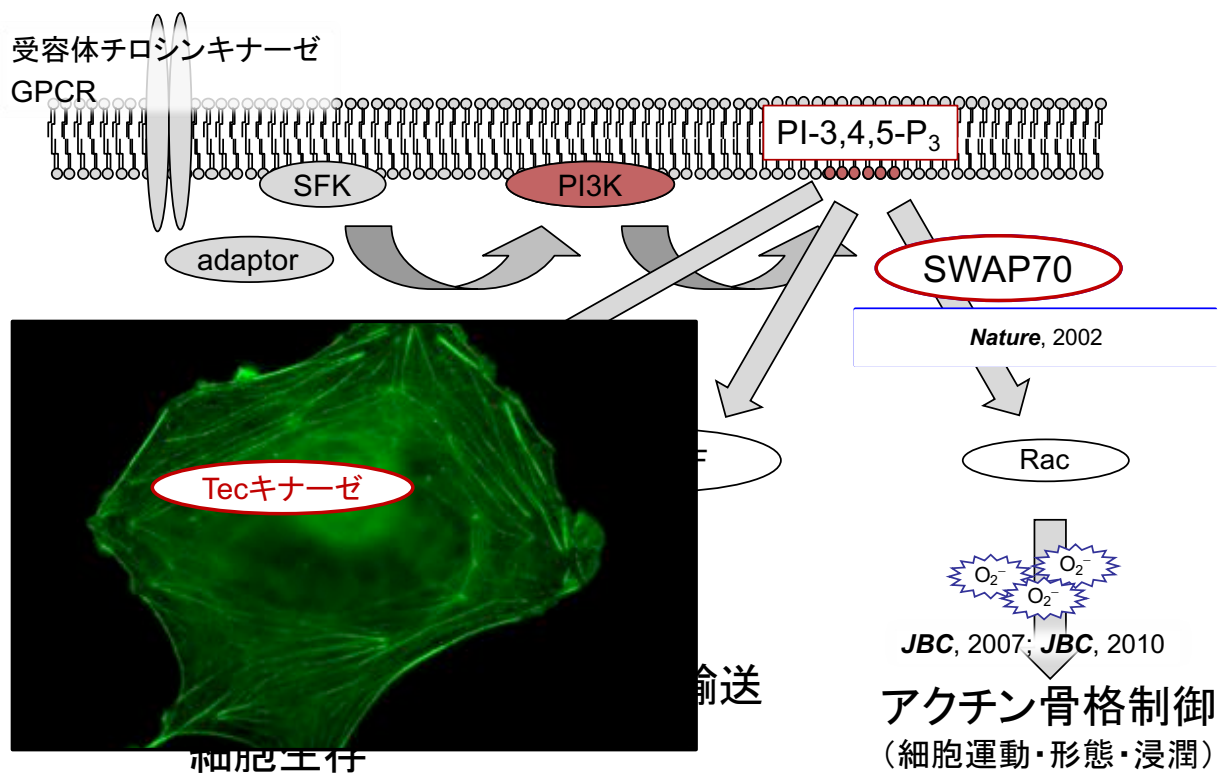


PI3Kとは？



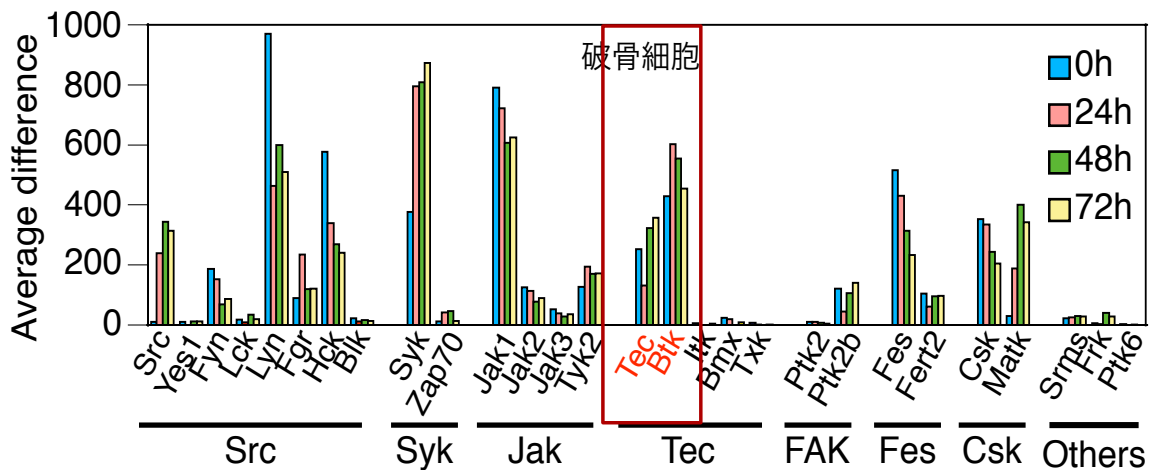
ホスファチジルイノシトール
(PI, PtdIns)

PI3Kのシグナル伝達の探索

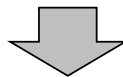


Tecチロシンキナーゼ

Tecチロシンキナーゼ: 免疫系で重要なチロシンキナーゼ



破骨細胞と破骨細胞前駆細胞ではBtkとTecが発現



破骨細胞(と前駆細胞)で重要な働き??

破骨細胞分化に必須なTecキナーゼ



Cell TecキナーゼBtkとTecの破骨細胞における必須性を解明

Tyrosine Kinases Btk and Tec Regulate Osteoclast Differentiation by Linking RANK and ITAM Signals

Masahiro Shinohara,^{1,2} Takako Koga,^{1,2} Kazuo Okamoto,^{1,2} Shinya Sakaguchi,⁴ Kimiko Arai,^{1,5} Hisataka Yasuda,⁷ Toshiyuki Takai,⁶ Tatsuhiko Kodama,⁸ Tomohiro Morio,³ Raif S. Geha,⁹ Daisuke Kitamura,¹⁰ Tomohiro Kurosaki,¹¹ Wilfried Ellmeier,⁴ and Hiroshi Takayanagi^{1,2,*}



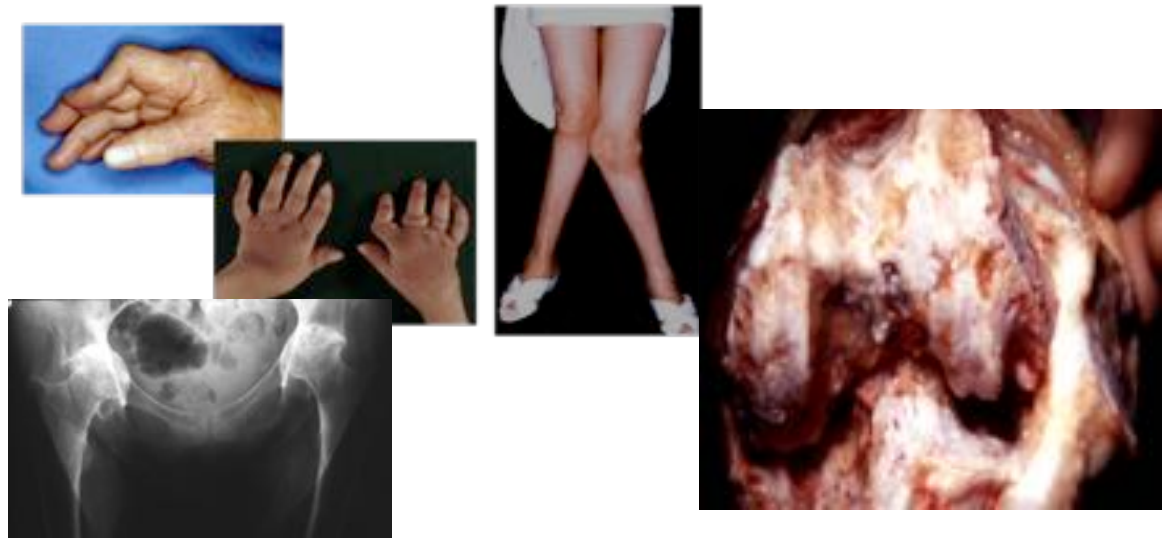
大腿骨遠位部の
海綿骨(CT画像)

0.5 mm



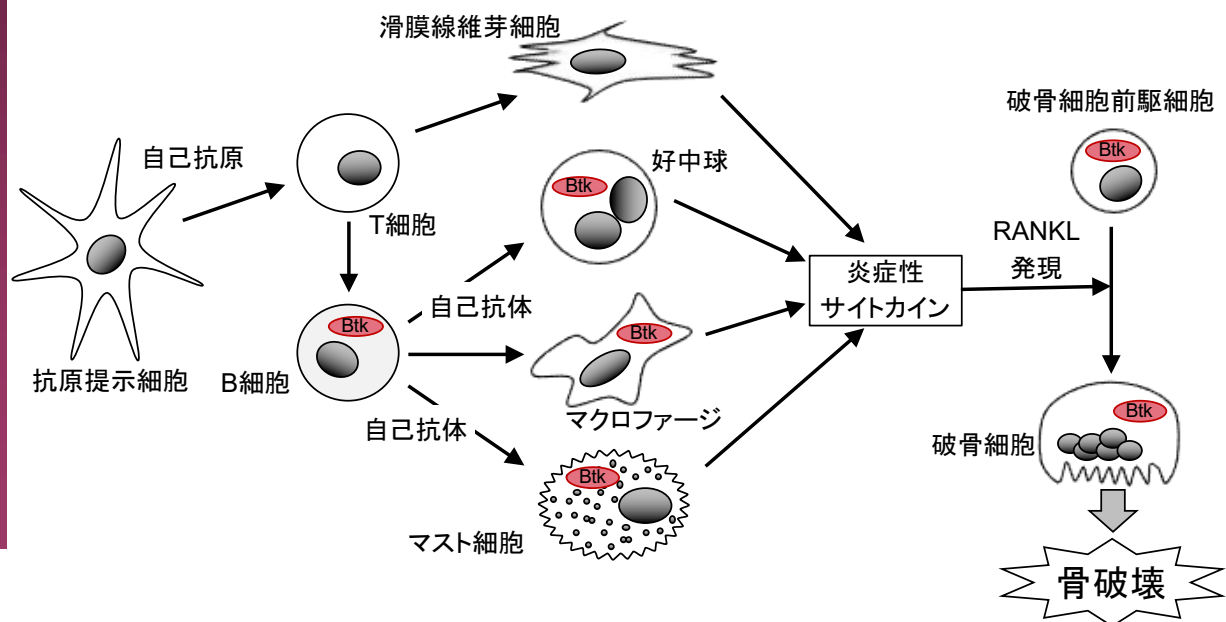
In vitro破骨細胞分化実験

関節リウマチ Rheumatoid Arthritis



- 多発性滑膜関節炎による骨関節破壊が特徴の全身性自己免疫疾患
- 30-50代女性に好発
- 全世界における罹患率は約1%（自己免疫疾患で最頻）、日本の患者数は70万人以上
- RAの真の発症原因は不明

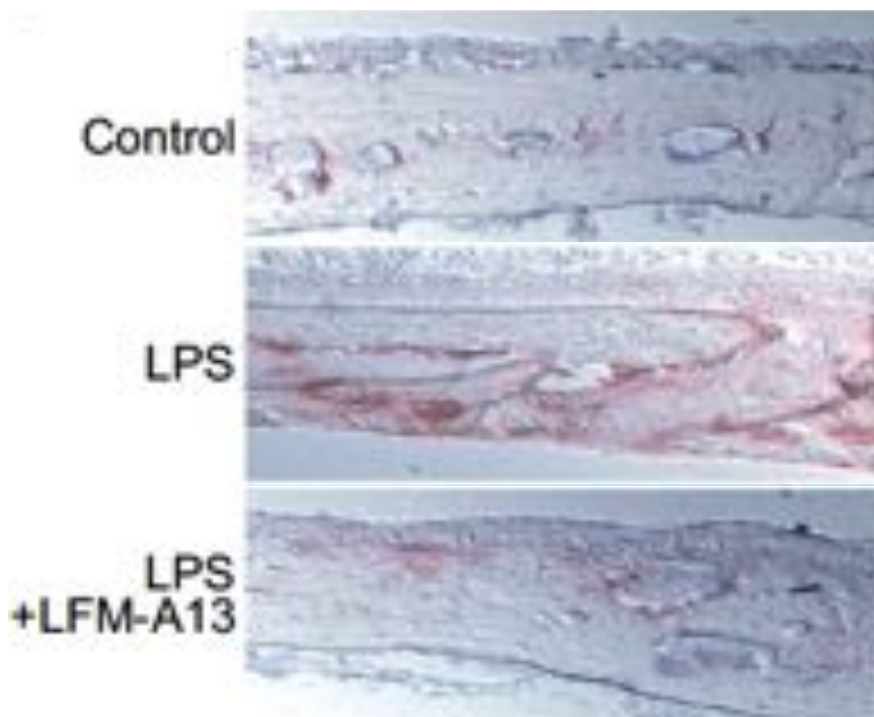
関節リウマチ骨破壊



Btkの阻害は関節リウマチの病態を
多段階で抑制する可能性

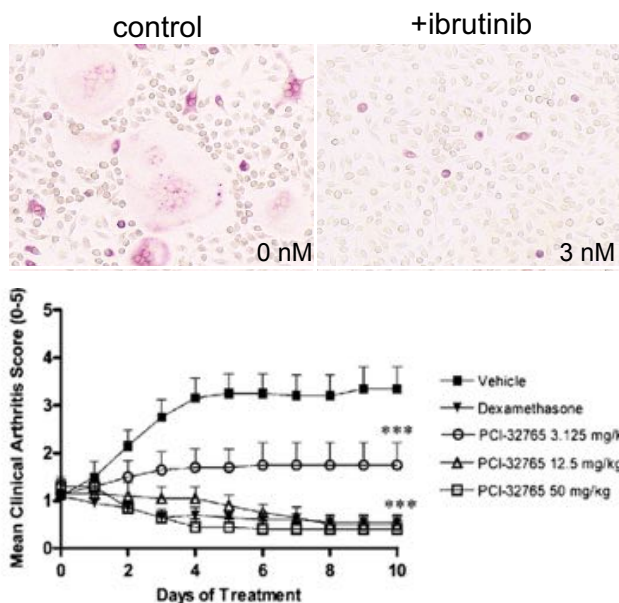
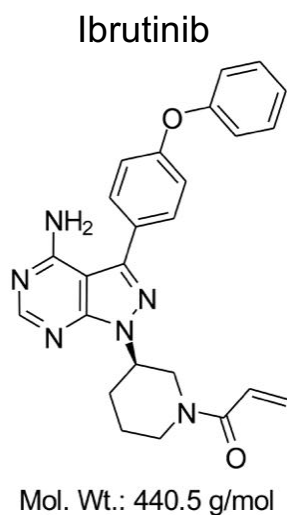
Btk阻害剤による炎症性骨破壊抑制

LPSによる炎症性骨破壊実験
(関節リウマチ骨破壊モデル)



新規Btk阻害薬の開発

米国製薬会社と共同で**新規Btk阻害薬ibrutinib**の
骨破壊疾患に対する治療効果を検討

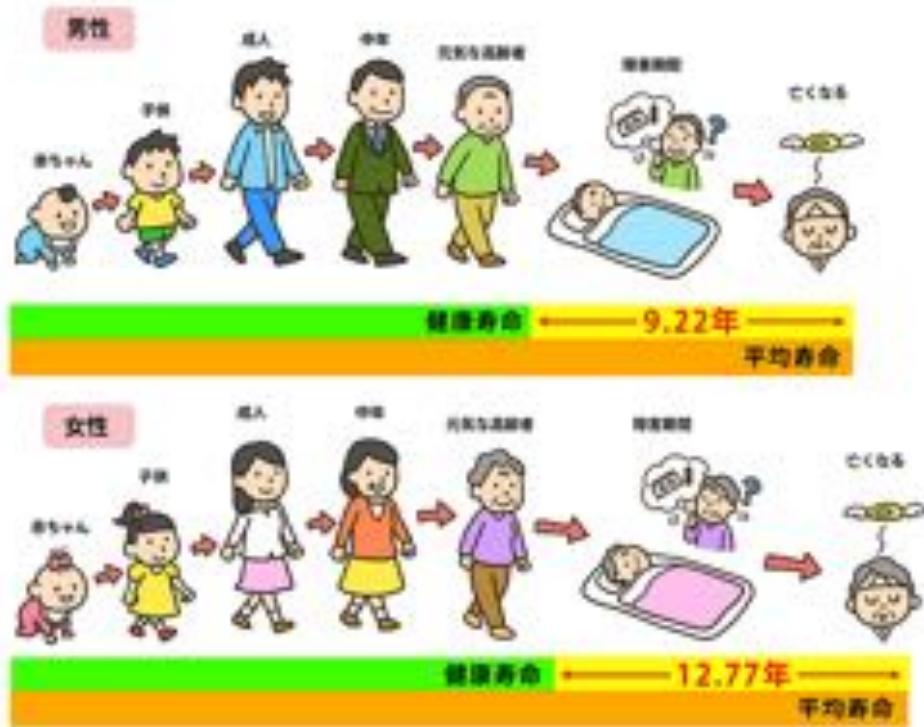


骨破壊性疾患治療薬として 期待されるIbrutinib



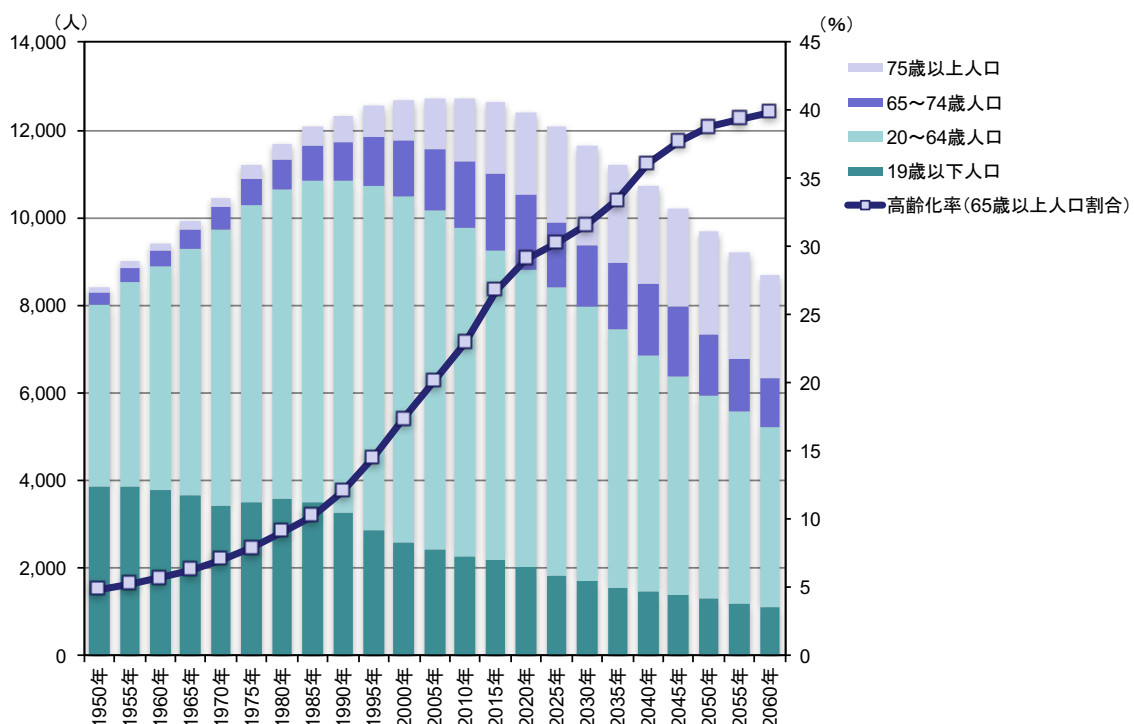
骨粗鬆症治療薬の開発へ

平均寿命と健康寿命



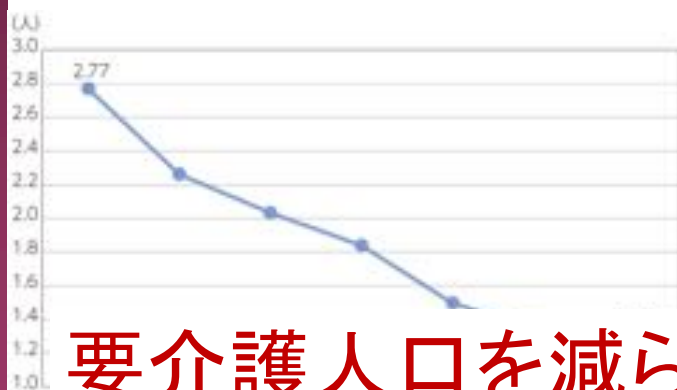
今後さらに要介護期間は延長

年齢別人口の推移と将来推計



さらに高齢化は加速する

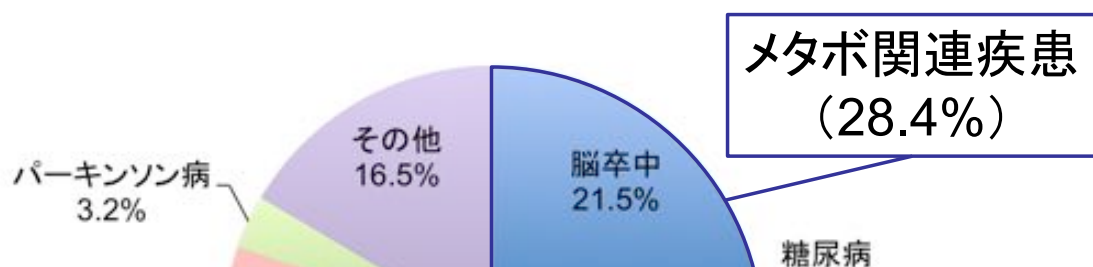
少子高齢化社会における介護



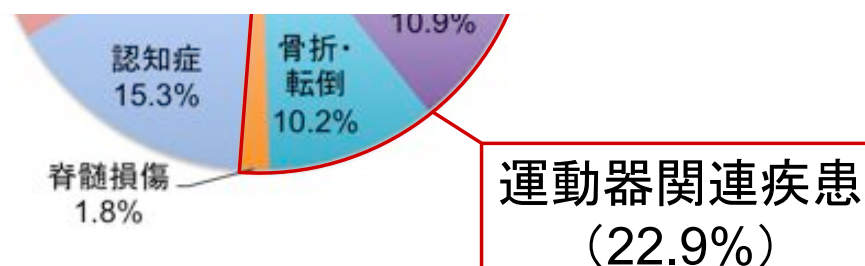
要介護人口を減らす努力が必要

経済的負担
肉体的負担
社会的負担

要介護となる原因



運動器疾患の治療・予防は
健康寿命の延長に重要



厚生労働省「国民生活基礎調査」2010より

ロコモティブシンドローム



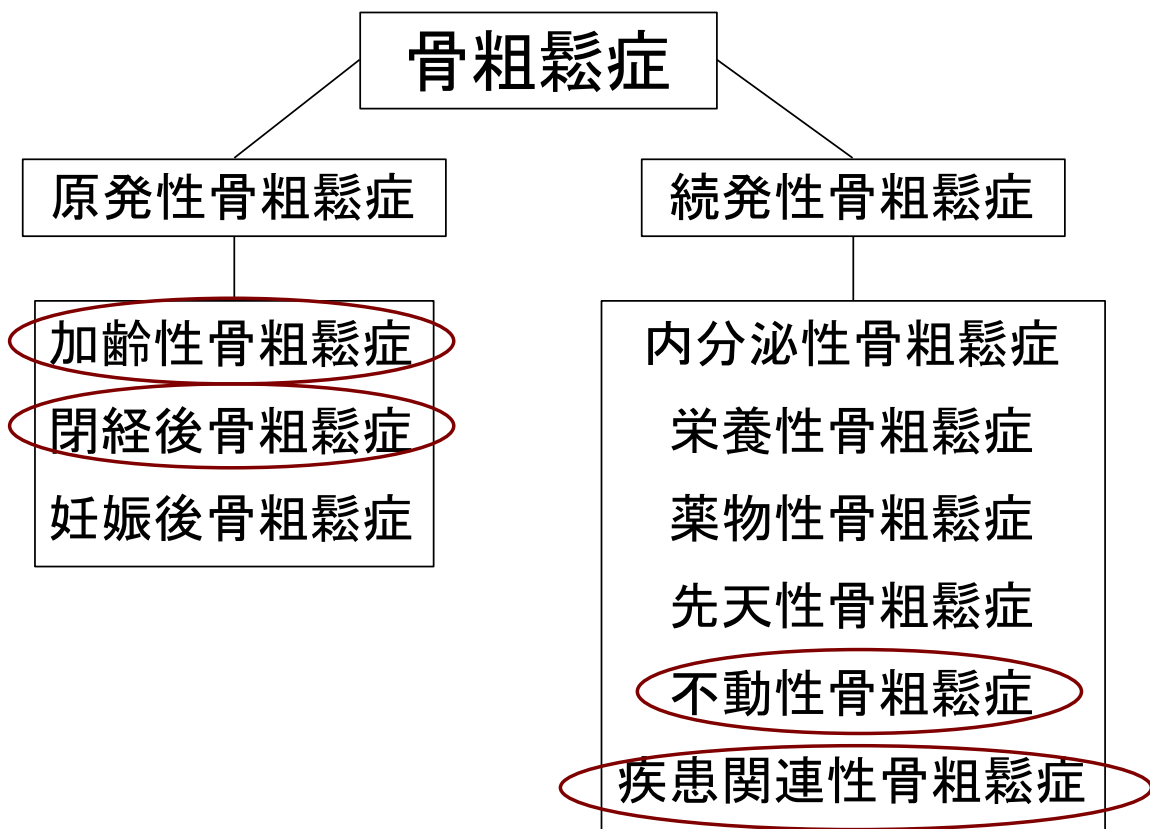
「Try! 40cm」プロジェクト



ロコモティブシンドローム予防啓発運動

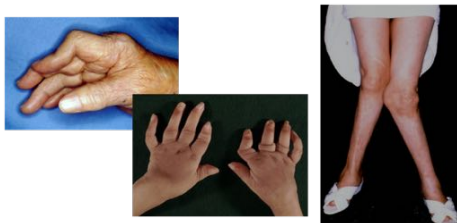


骨粗鬆症の分類



疾患関連性骨粗鬆症

関節リウマチ



炎症性サイトカインの上昇

慢性腎臓病(CKD)



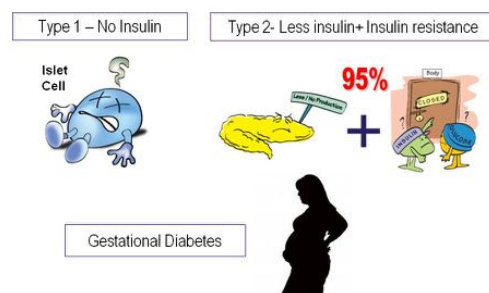
副甲状腺機能亢進

慢性肝疾患



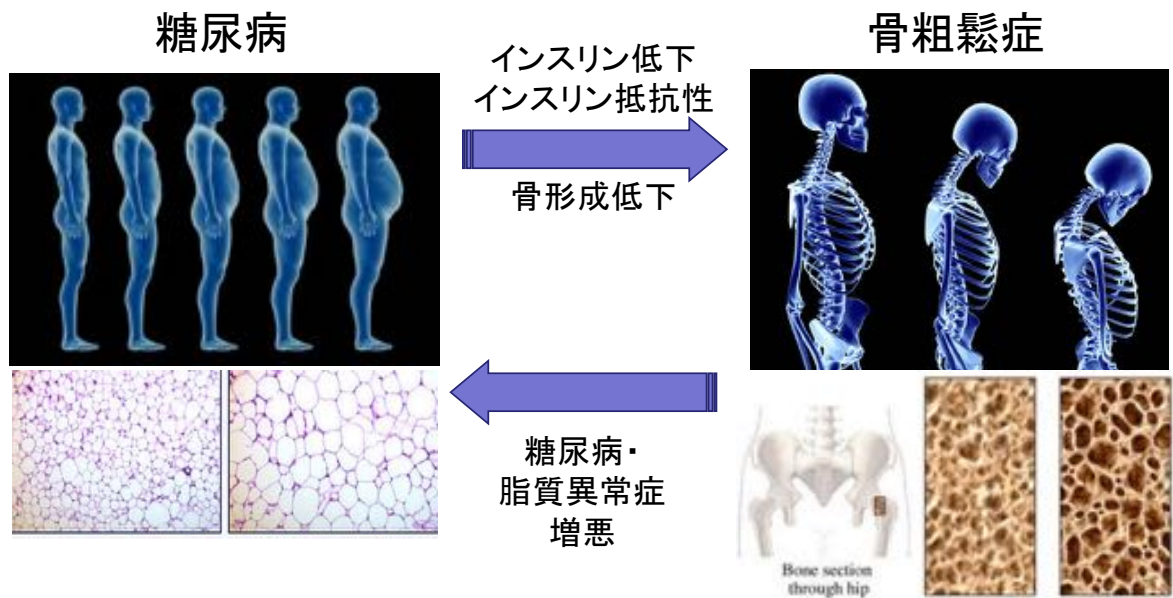
カルシウム吸収および
ビタミンD産生の低下

糖尿病



インスリンの機能低下

糖尿病と骨粗鬆症



骨粗鬆症における糖尿病・脂質異常症の増悪
をもたらす分子メカニズムは不明

新たな骨代謝制御メカニズムの解明

- 心血管疾患患者における骨折リスク上昇
- サルコペニア患者における骨折リスク上昇

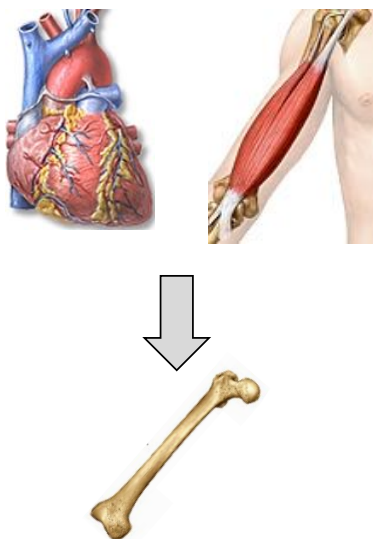
など

未知の制御メカニズム

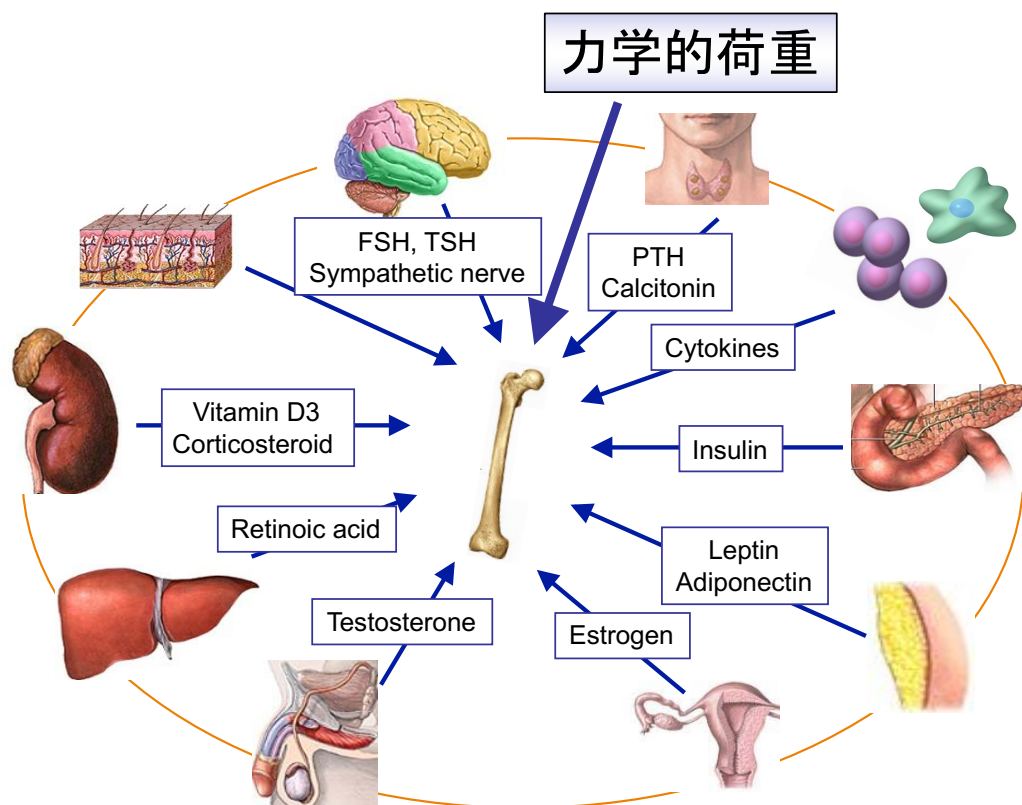
組織特異的KOマウス
疾患モデルマウス

骨組織解析

新たな骨組織恒常性維持の
メカニズム解明へ



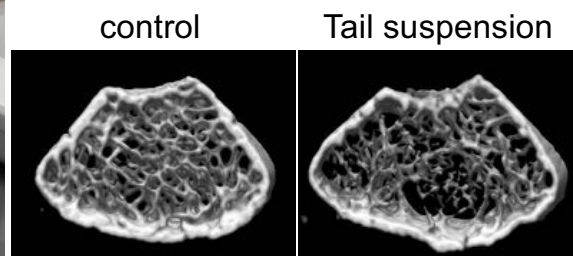
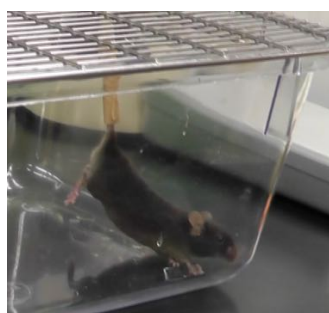
骨組織の制御システム



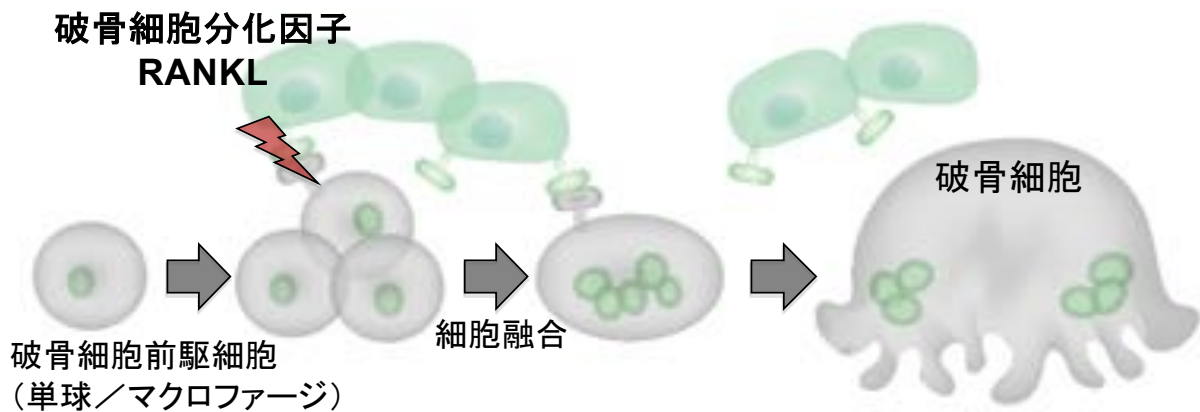
力学的荷重と骨



不動性骨粗鬆症



骨破壊の実行役と指令役

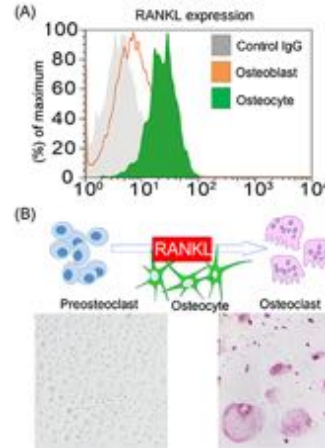
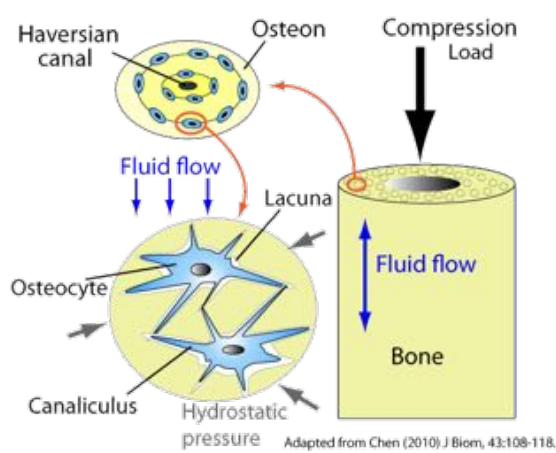


		RANKL発現細胞
生理的条件		骨芽細胞、骨細胞
骨疾患	関節リウマチ	T細胞、関節滑膜細胞
	閉経後骨粗鬆症	B細胞、T細胞

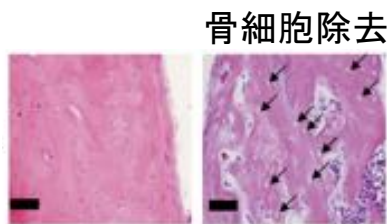
力学的荷重とRANKL発現細胞



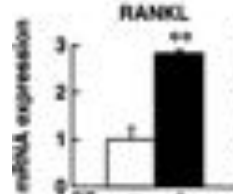
骨細胞と力学的荷重とRANKL



Nakashima et al., Nat Med, 2011



骨細胞除去

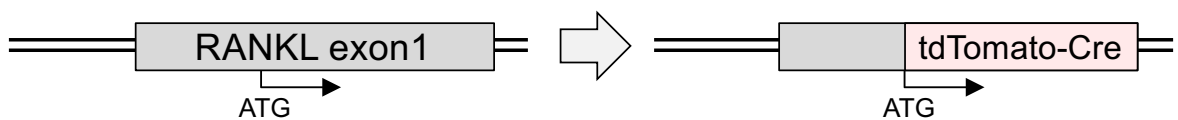


骨細胞がなくても
RANKL発現上昇

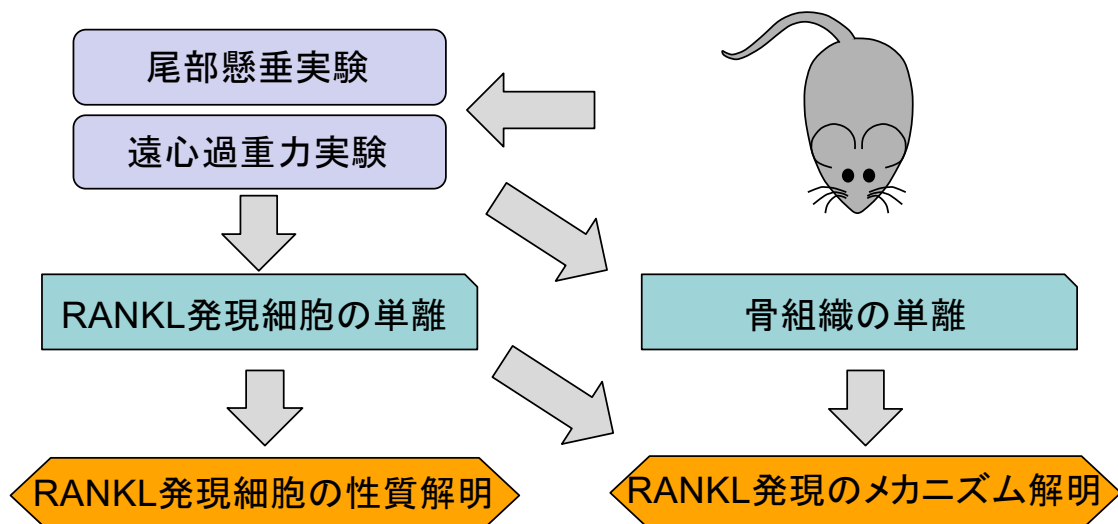
↓
骨細胞以外の細胞

Tatsumi et al., Cell Metab, 2007

RANKLレポーターマウス



RANKL promoter制御下でtdTomato-Creを発現



JAXA宇宙マウス実験



JAXA 国際宇宙ステーション「きぼう」利用テーマ
「マウスを用いた宇宙環境応答の網羅的評価」

(研究代表: 筑波大・高橋智先生)



日本実験棟「きぼう」



1Gを発生させる特殊飼育装置を開発

微小重力群／1G群

30日間の飼育

微小重力の影響

力学的荷重による恒常性維持メカニズムの解明

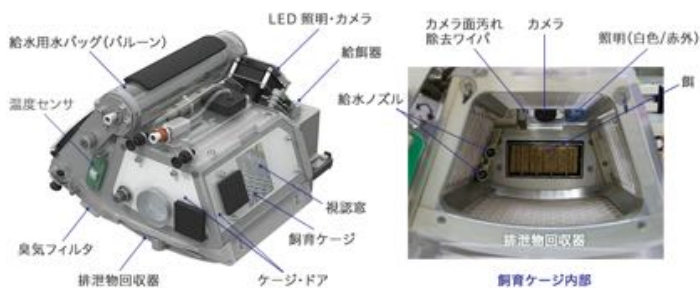
国際宇宙ステーションでの マウス実験



宇宙でのマウス飼育



- これまでは微小重力飼育群のみ
- 生きたままの帰還経験はなし
- 臓器等は全て宇宙で固定もしくは凍結

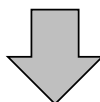


©JAXA

- 微小重力群と1G群の比較が可能
- 生きたままの帰還予定
- 地上で解剖が可能

宇宙実験における制約

実験は全て宇宙飛行士の手で行われる

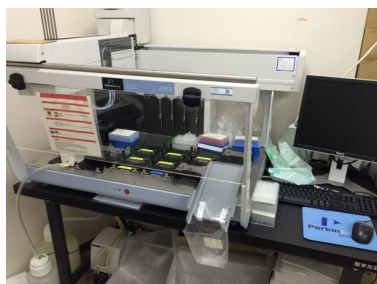


実験の種類に大きな制限

解決策として...



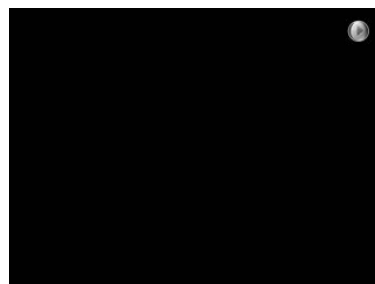
実験のオートメーション化



自動分注システム

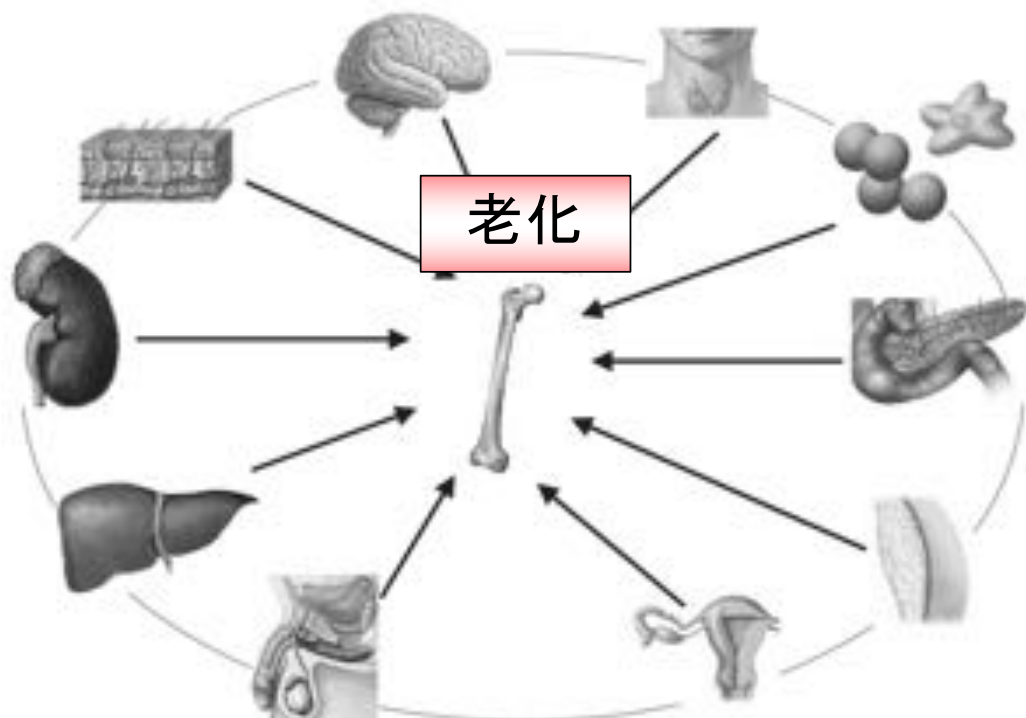


プレートスタッカー搭載
プレートリーダー



ヒト型実験ロボット
まほろ

加齢性骨粗鬆症

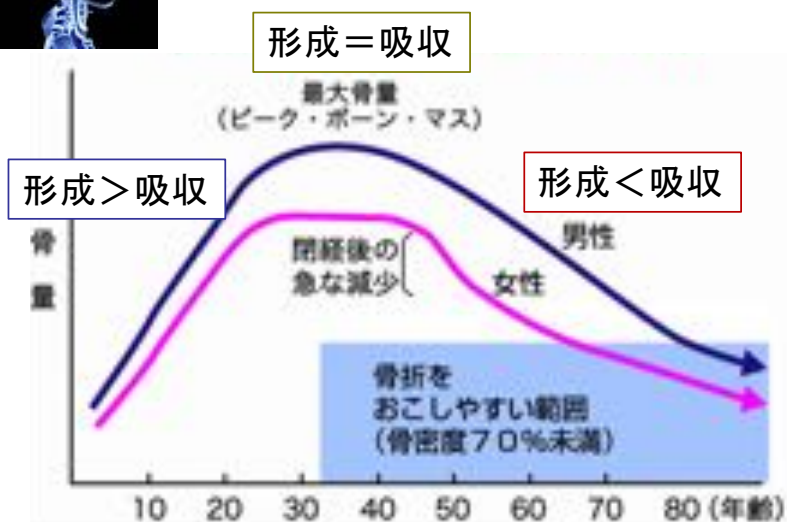


加齢によるBMD変動



加齢とともに骨格変形

加齢とともに
骨量減少



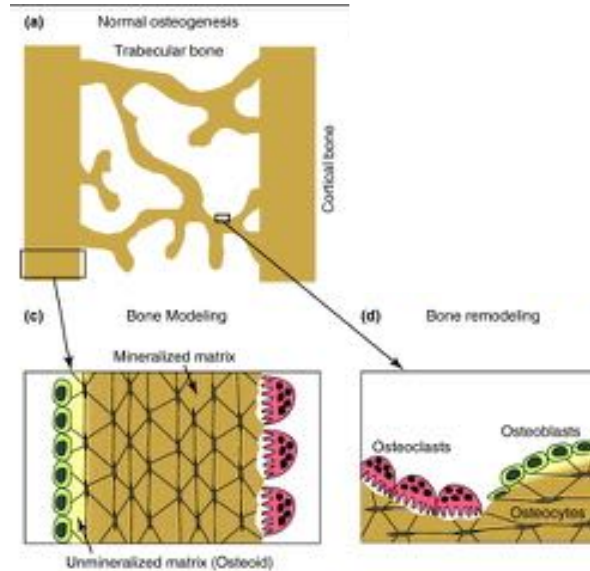
骨のモデリングとリモデリング

成長期...骨の長さは長くなり、太さは太くなる

(骨の内側が破壊され、外側に形成される)

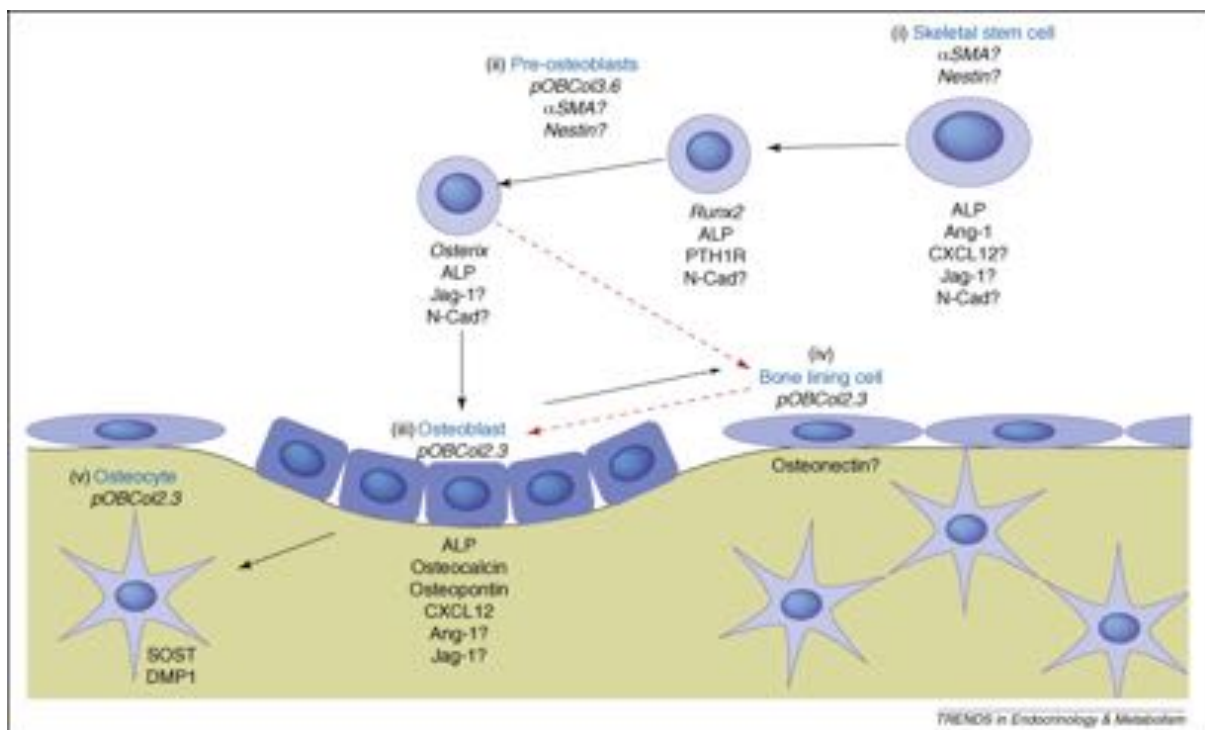
成長後...骨の長さ、太さは不変

(古い骨が破壊され、新しい骨が形成される)



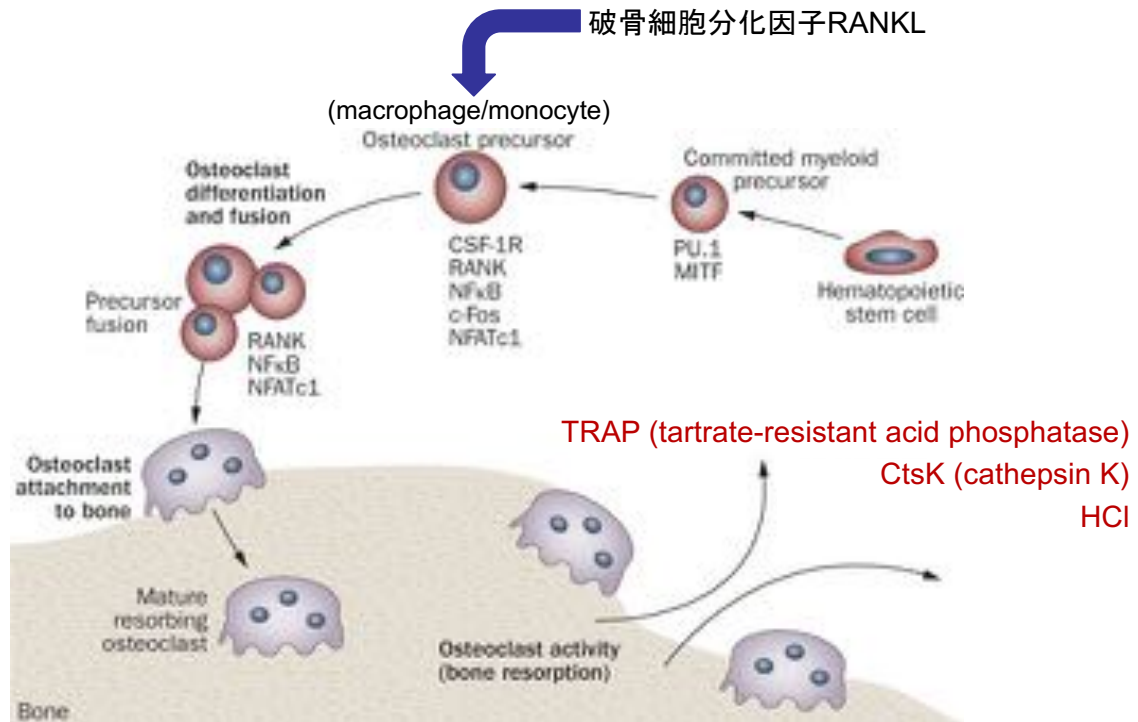
骨代謝細胞の分化

骨芽細胞・骨細胞

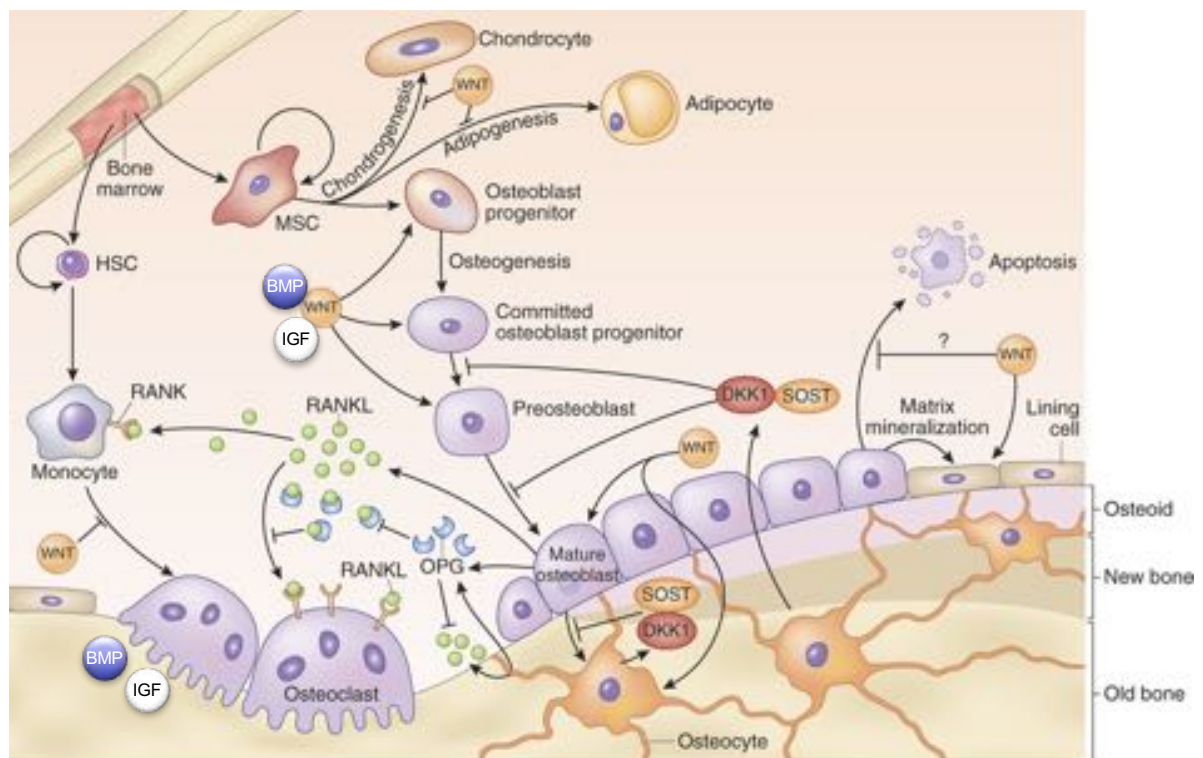


骨代謝細胞の分化

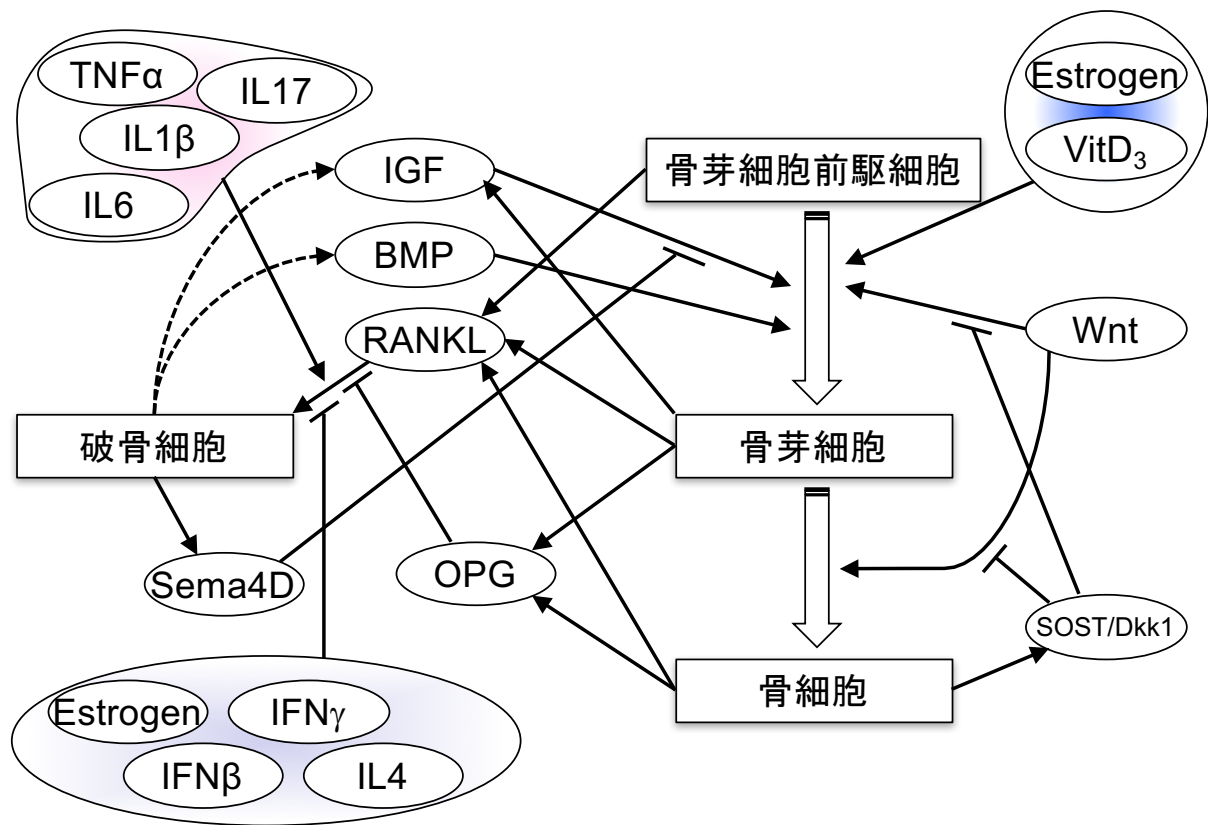
破骨細胞



骨代謝細胞間の制御



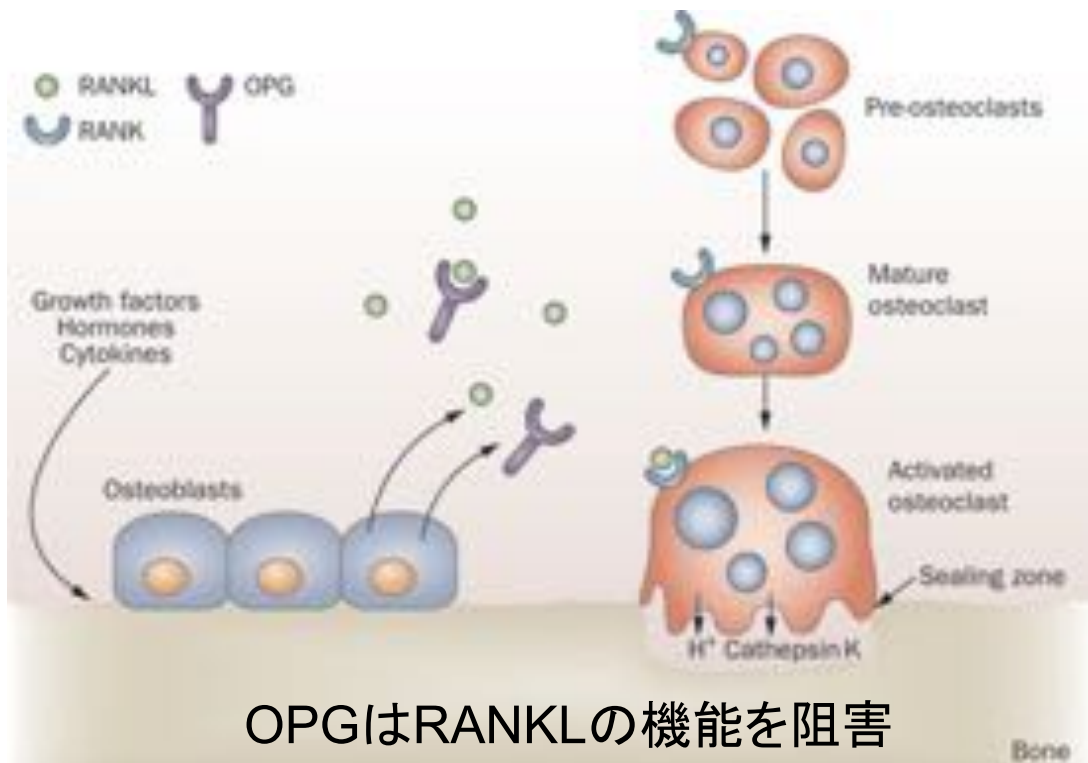
骨代謝細胞の制御因子



RANKLとOPG

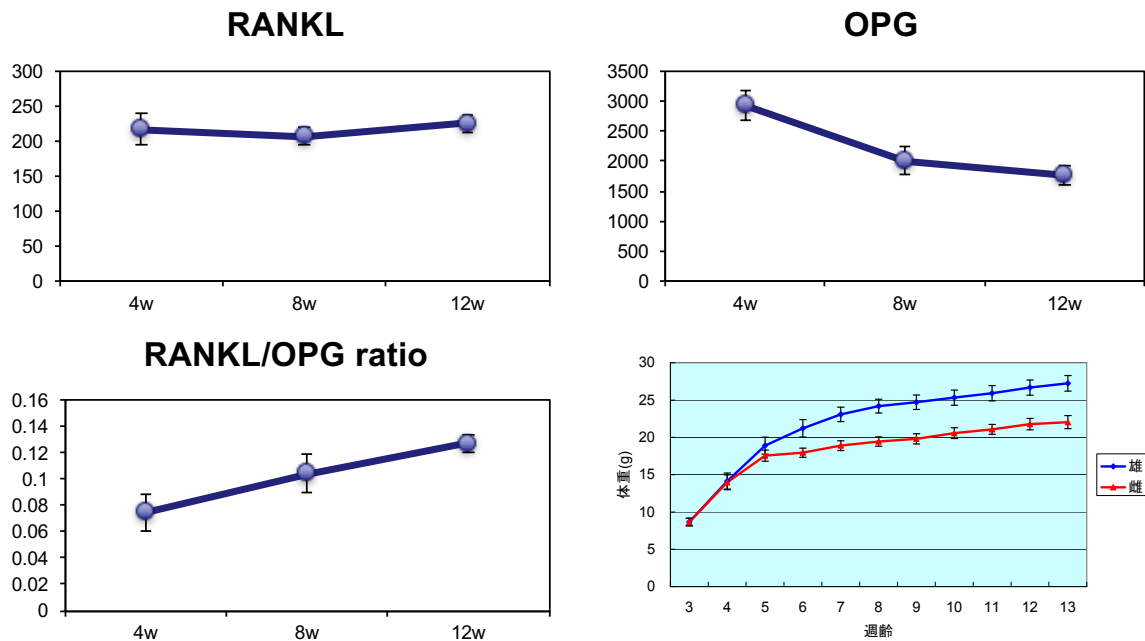
RANK: RANKL受容体

OPG: RANKLのおとり受容体



骨代謝マーカーの時間的変動

血清中のRANKL、OPG量(単位:pg/ml;n=5)

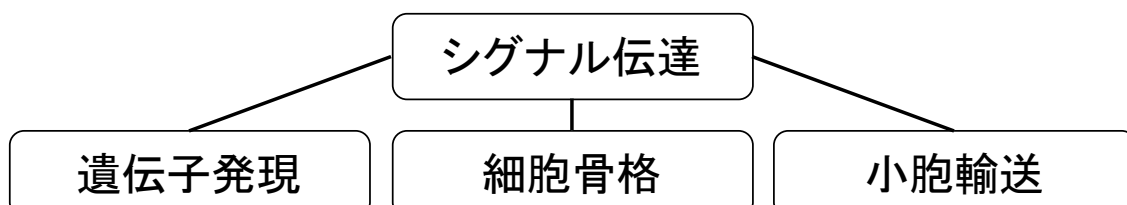
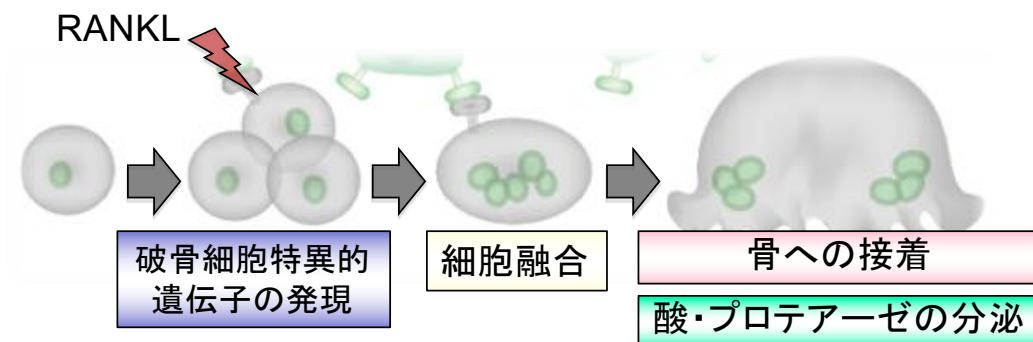


- RANKLに変化はないが、OPG量は減少する

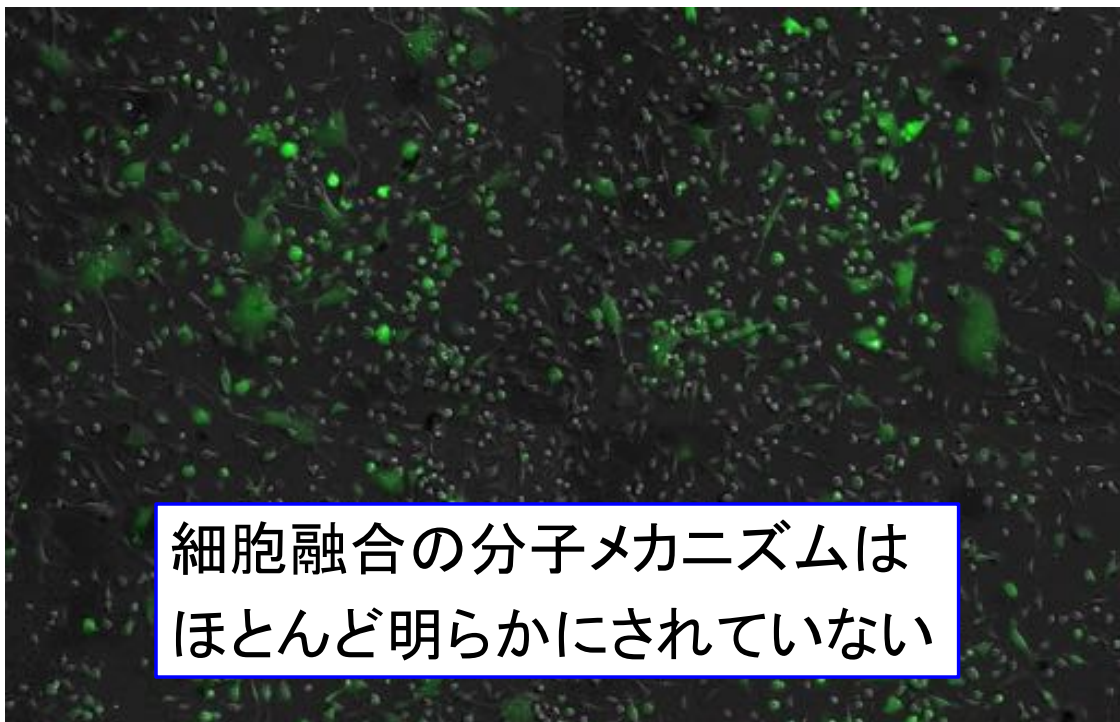
細胞特異的システムの解明

細胞特異的なシステムの理解は、副作用の低い薬剤開発につながる

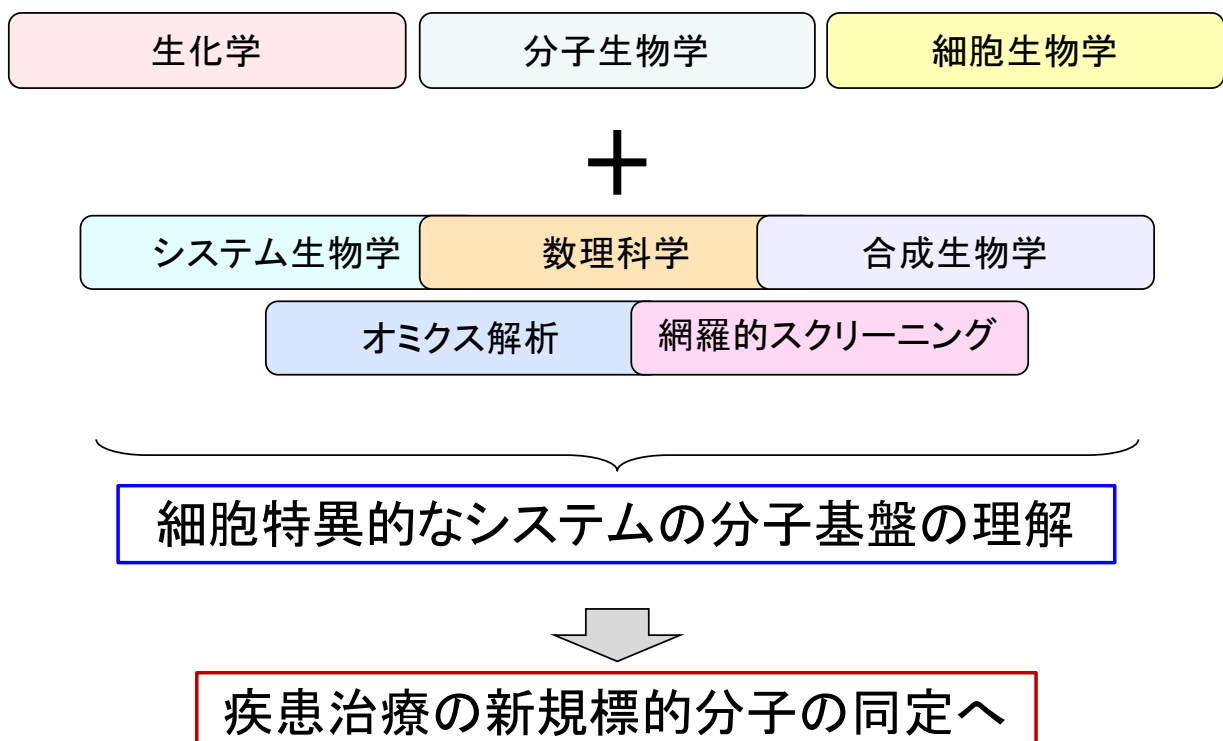
<破骨細胞の例>



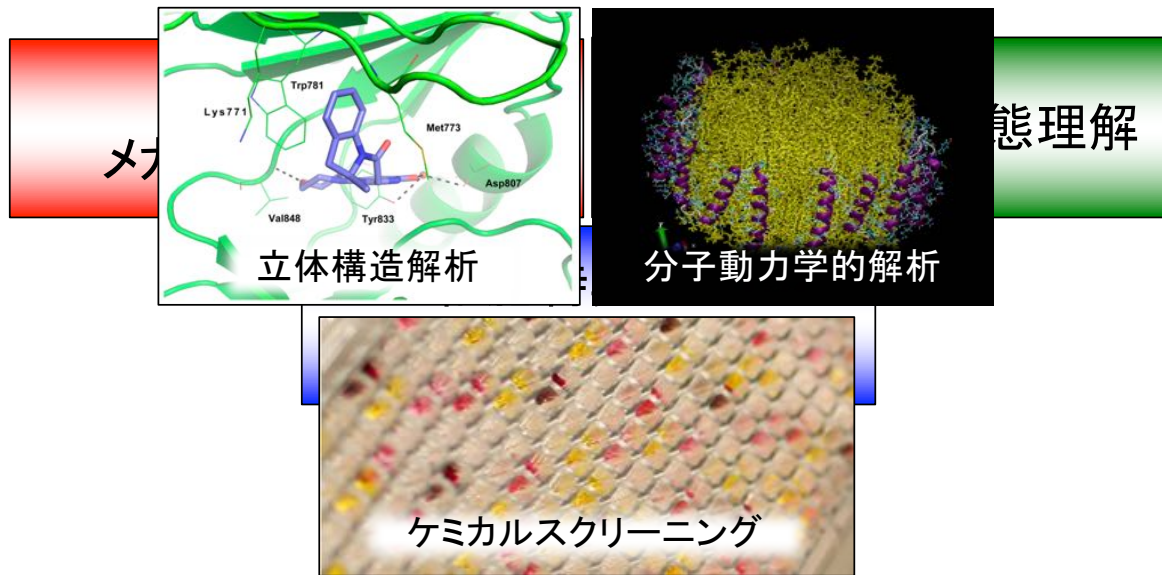
細胞融合の動作原理の解明



細胞特異的システムの解明



新たな疾患治療法の確立へ



運動器疾患に対する新規治療法の開発

骨粗鬆症の予防は可能？

強い骨を保つためには

骨粗しょう症の予防に必要な3つの要素

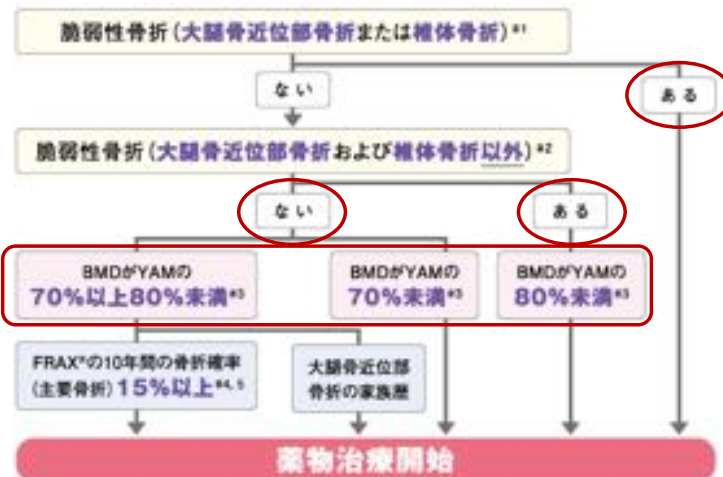


Ca 650~800mg
VitD, VitK
低リン食

骨粗鬆症の診断・治療開始基準

[illegible]

骨粗鬆症診断・治療開始基準の問題点



- 骨折した時には既に骨粗鬆症
- 骨折していないのなら、医療機関でBMD測定をしない
- 定期的なBMD測定は現実的に不可能
- BMDが変わらなくても、骨の状態が同じとは限らない

BMD測定に代わる骨代謝マーカー検査

骨代謝マーカー: 骨形成や骨吸収の活性を評価するための
血中または尿中の物質

＜骨形成マーカー＞

骨型アルカリホスファターゼ (BAP)
オステオカルシン (OC)
コラーゲン前駆体の断片 (P1NP)

＜骨吸収マーカー＞

酒石酸耐性酸ホスファターゼ (TRAP)
コラーゲン分解物 (CTX)

骨密度 (BMD)	骨代謝マーカー
骨粗鬆症の診断	骨粗鬆症の予知
過去の骨代謝の総決算	リアルタイムな骨代謝
局所骨の評価	全身骨の平均評価
治療効果の確認 1～2年	3～6ヵ月
施設の制限	簡便

血液検査、尿検査であれば年1回の健康診断で実施可能

骨代謝マーカーによる 骨粗鬆症の発症予測

- 骨吸収マーカーの高値は骨粗鬆症性骨折リスクを高める
(Yoshimura et al., Osteoporos Jpn, 2005)
- 骨折リスクの評価は骨吸収マーカーが有効である
(Ivaska et al., J Bone Miner Res, 2010など)

－問題点

- 骨代謝マーカー値から骨折を予測することは困難である
- 骨代謝マーカーによっては日内変動が大きい
- 単回測定では、発症時期の予測が不可能
- 骨粗鬆症が疑われた時に実施可能(保険適応外)

BMDと骨代謝の関係

BMDの時間的変化($\Delta\text{BMD}/\Delta t$)は、

$$\Delta\text{BMD}/\Delta t = k_{\text{ob}} \times [\text{BF}] - k_{\text{oc}} \times [\text{BR}] \times \text{BMD}$$

BF(骨形成) = (骨芽細胞の数) × (骨芽細胞の活性)

BR(骨吸収) = (破骨細胞の数) × (破骨細胞の活性)

<骨形成(BF)マーカー>

骨型アルカリホスファターゼ(BAP)

オステオカルシン(OC)

コラーゲン前駆体の断片(P1NP)

<骨吸収(BR)マーカー>

酒石酸耐性酸ホスファターゼ(TRAP)

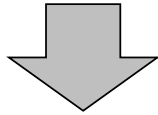
コラーゲン分解物(CTX)

骨代謝マーカーから骨粗鬆症発症の
予測・予防にむけて

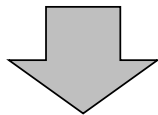


脱介護社会を目指して

運動器（骨、筋、腱・靱帯、関節）の
基礎研究



運動器疾患の治療と予防



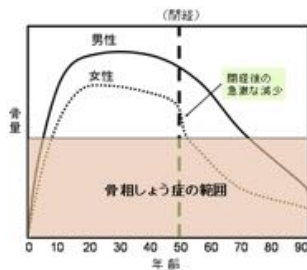
寝たきりゼロへ！



共同研究に向けて

骨粗鬆症発症予測のための 数理モデル構築

加齢による骨密度の変動



骨密度BMDの時間変化率がわかれば、
骨粗鬆症の発症時期を予測することが可能

治療開始時期のタイミングも予測可能

骨密度の時間変化率($\Delta BMD/\Delta t$)は、

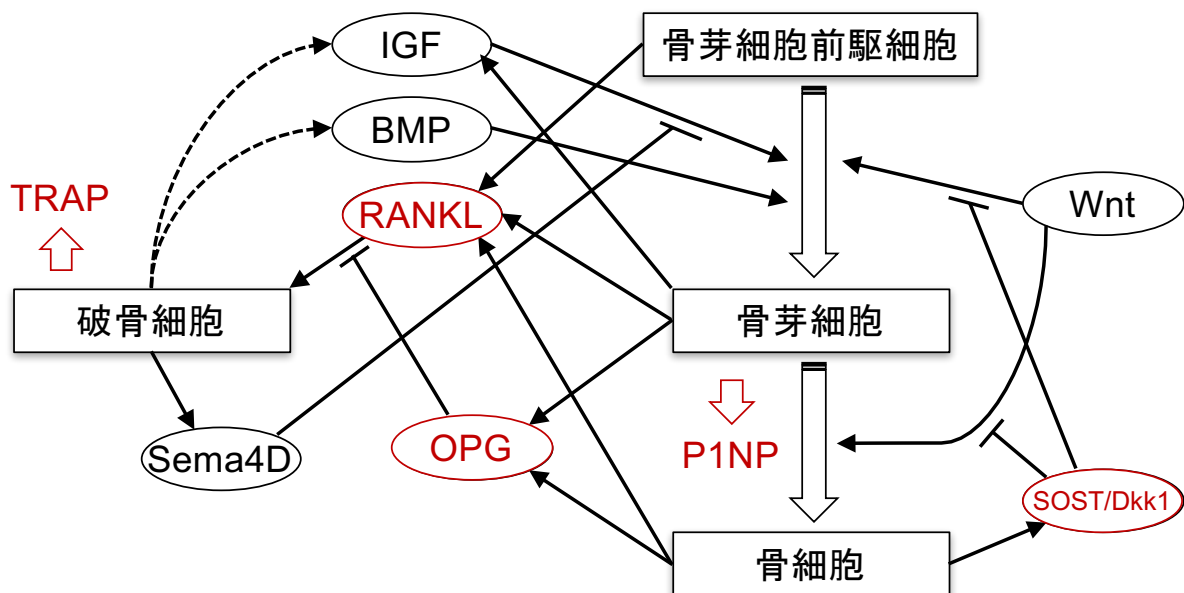
$$\Delta BMD/\Delta t = k_{ob} \times [BF] - k_{oc} \times [BR] \times BMD$$

(Peterson and Riggs, CPT Pharmacom Syst Pharmacol)

血中骨代謝マーカーの計測をもとに、
時間関数[BF]、[BR]および係数 k_{ob} 、 k_{oc} を決定

各種骨粗鬆症モデルマウスを用いた
骨粗鬆症発症予測の検証

骨代謝細胞の制御因子



血中濃度の測定が可能

CT解析による骨量変化の検証



CT画像

海綿骨構造解析

BV/TV、BS/BV、海綿骨の幅・数、海綿骨間の距離

皮質骨構造解析

皮質骨の幅・断面積・外径長・内径長、断面2次モーメント

骨塩量解析

骨単位体積あたりのミネラル量、骨髓のミネラル量、皮質骨のミネラル量

骨密度のほか、骨の大きさや厚さなどを計測することが可能

microCTで計測可能な項目

TBPf-SMI

■ TBPf

骨パターンファクター

TBPf(Trabecular Bone Pattern factor)

3D空間上で骨梁の表面近傍体積の変化に対する表面積の変化量を計算。

これより、従来の2次元TBPfではできなかった

3D凹面構造の定量化が可能。

凹面構造の多い骨梁は負となり凸面構造の多い骨梁は正となる。

$$\text{TBPf} = \Delta\text{BS} / \Delta\text{BV} \text{ (1/mm)}$$

■ SMI HILDEBRAND&RUEGSEGGERによる

ストラクチャーモデルインデックス

(Structure Model Index) : SMI

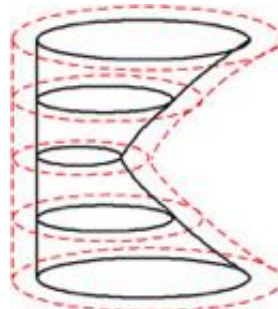
骨梁構造指標を理想的な板状のとき0、

棒状のとき3、

球状のとき4として

混合状態を中間値で表現する。

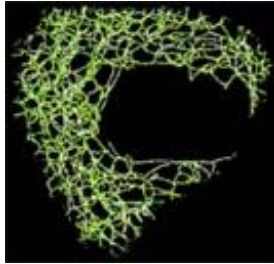
ストラクチャーモデルによる骨梁巾:thickness



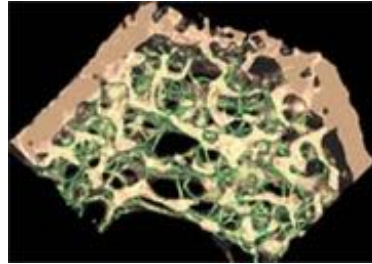
microCTで計測可能な項目

骨梁ネットワーク構造解析 Node-Strut

骨梁の骨格線ネットワークを抽出して、骨格線を端点接続状態で分類し、計測する。



Rat大腿骨全海綿骨の骨格線



Rat大腿骨海綿骨とNode-Strut

- 板状骨の個数
- 平均:厚さ
- 平均:幅
- 平均:長さ
- 平均:長さ
- 骨梁体積に占める棒状骨の割合
- 骨梁体積に占める板状骨の割合

- 骨梁幅の変化に対するトポロジー変化
- 板状骨に穴が発生する割合
- 棒状骨が切断する割合

Nd : 複数骨格線の結節点
Tm : 孤立端点
Ct : 皮質骨との結合点
TV : 計測対象組織体積

- 端点個数
- N.Nd N.Tm N.Ct

- 単位体積当りの端点数

- 骨格線個数
- N.NdNd N.CtNd N.NdTm

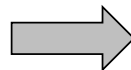
- 骨格線の平均長
- E(NdNd) E(CtNd) E(NdTm)

- 骨格線総長
- TSL

- 骨格線 構成比
- 総NdNd長/TSL
- 総CtNd長/TSL
- 総NdTm長/TSL

- 組織量に対する骨格線長
- TSL/TV
- 総NdNd長/TV
- Rat大腿骨海綿骨とNode-Strut総CtNd長/TV
- 総NdTm長/TV
- その他

宇宙マウス実験

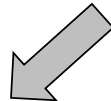


骨の摘出

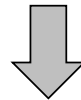


microCT解析
組織切片作成

骨髓細胞回収



骨組織

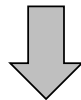


RNA回収

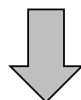


RNA-seq

破骨細胞培養

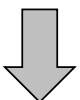


細胞回収



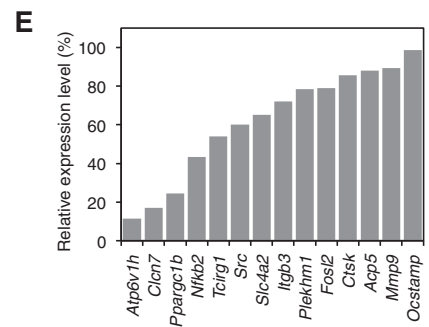
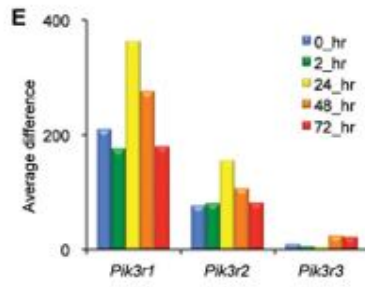
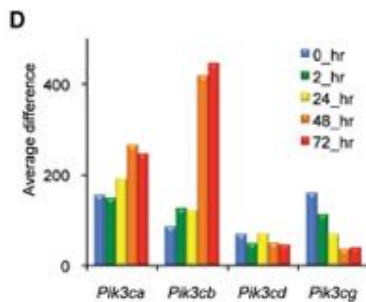
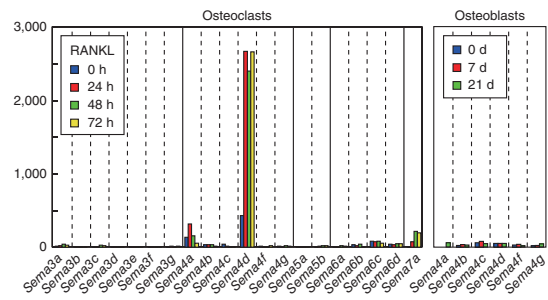
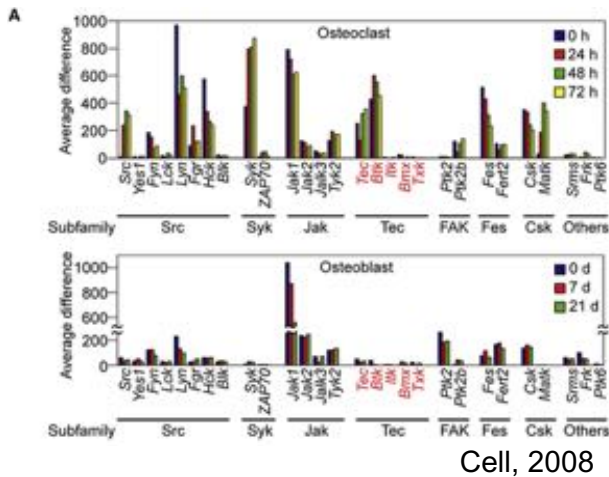
ChIP-seq

RNA回収

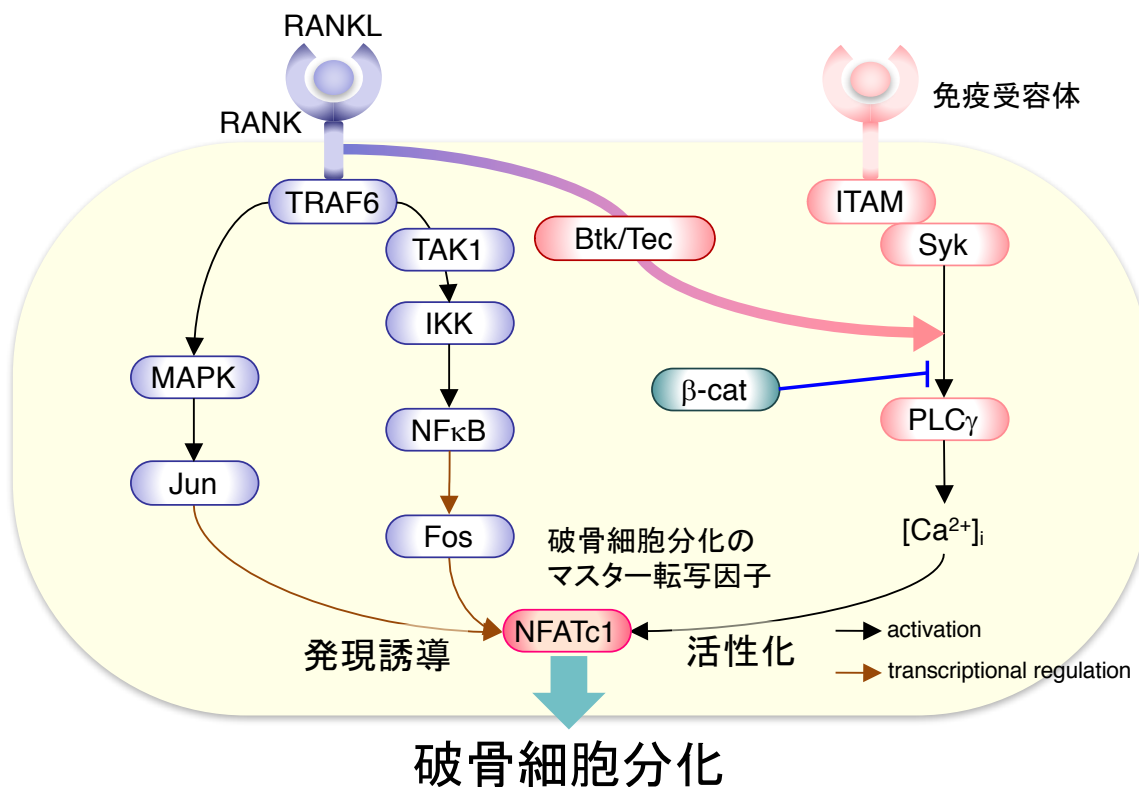


RNA-seq

ゲノムワイドな遺伝子発現解析

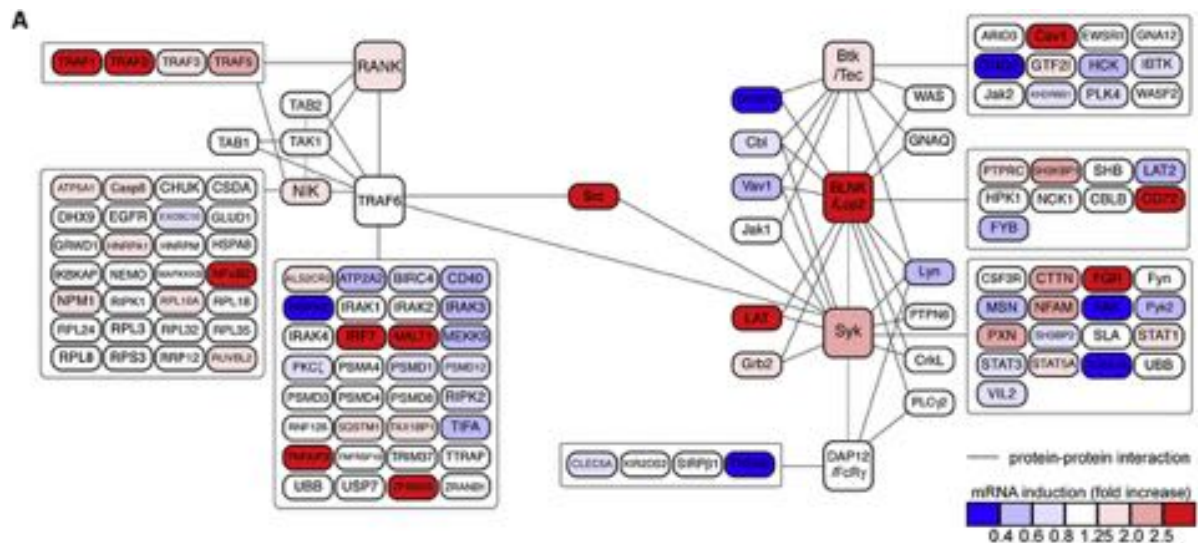


破骨細胞分化シグナル



経時的なシグナルネットワーク変動

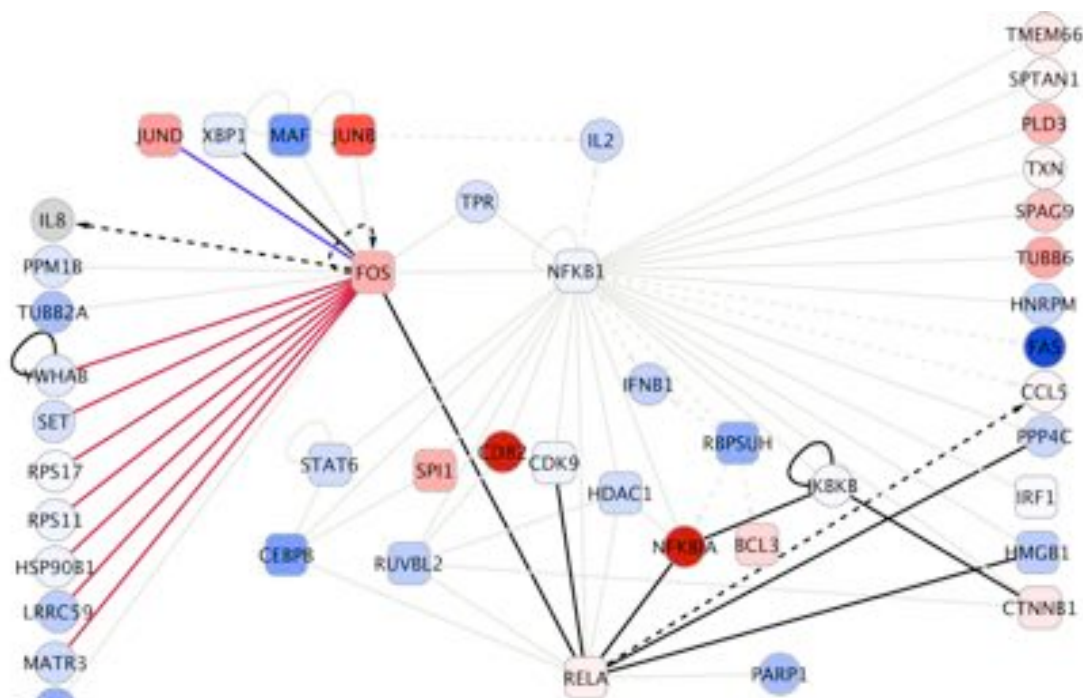
マイクロアレイ解析 × タンパク質間相互作用情報



Cell, 2008

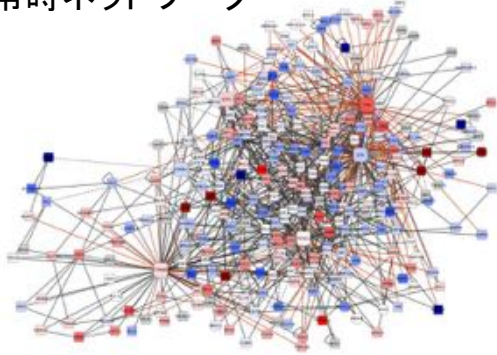
破骨細胞分化過程における動的転写ネットワーク

分化後72時間

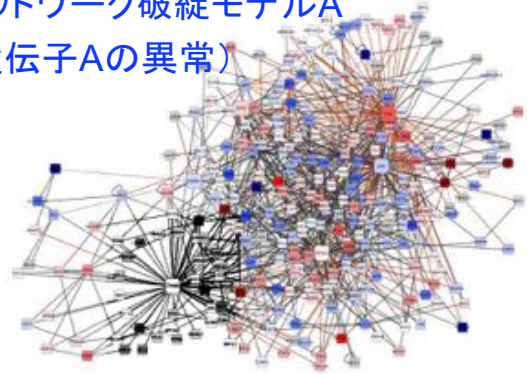


遺伝子機能とネットワークの破綻

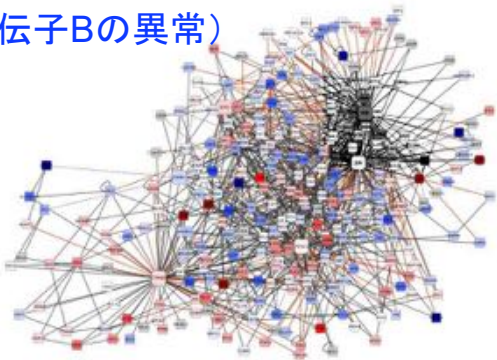
正常時ネットワーク



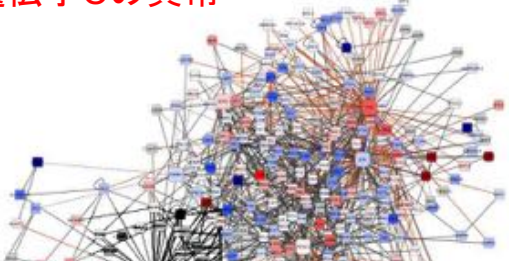
ネットワーク破綻モデルA
(遺伝子Aの異常)



ネットワーク破綻モデルB
(遺伝子Bの異常)



遺伝子Cの異常

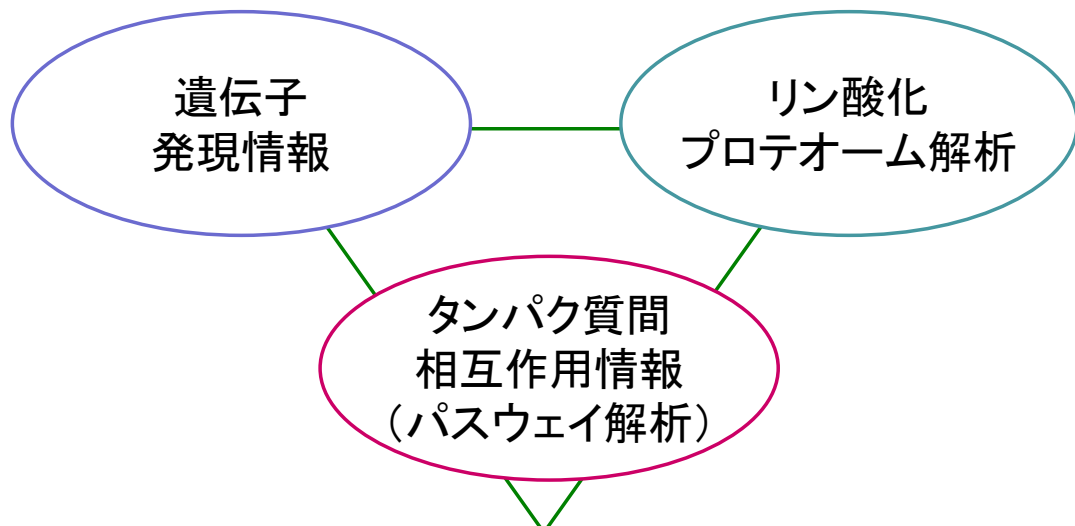


→AまたはAに到る経路の破綻と推定
→Aは治療標的の候補

破骨細胞分化の包括的理解へ

Q. RANKLだけが破骨細胞分化能を持つのはなぜ？

Q. RANKLシグナルの包括的理解は可能か？



破骨細胞分化シグナルの解明へ

A scenic sunset over the ocean. The sky is filled with large, dark clouds illuminated from below by the setting sun, creating a vibrant orange and yellow glow. The sun is a bright horizontal band of light on the horizon. In the foreground, the dark silhouette of a rocky coastline is visible, with a small boat anchored in the water. The overall mood is peaceful and majestic.

みなさまにご協力して頂ければ幸いです
宜しくお願いいたします

2017年骨免疫学会は石垣島で開催予定！