

明 細 書

発明の名称：骨形成促進剤

技術分野

[0001] 本発明は、骨形成促進剤や、骨疾患の予防・治療剤に関する。より詳細には、セマフォリン4DとプレキシシンB1との結合阻害物質を有効成分とする骨形成促進剤や、骨疾患の予防・治療剤に関する。

背景技術

[0002] 高齢化社会に伴い、骨折、骨粗しょう症、関節リウマチ、腰背痛などの骨疾患の患者が増加している。骨組織では、骨形成を担う骨芽細胞と、骨吸収を担う破骨細胞が協調して働き、骨形成と骨吸収とをバランス良く行うことによって、骨組織の機能を維持している。この骨代謝のバランスが、老化や卵巣機能の低下などの要因によって崩れ、骨形成が低下したり、あるいは骨吸収が異常亢進すると、骨量（骨密度）が低減して、様々な骨疾患が生じる。かかる骨疾患として、骨折、骨欠損、骨粗しょう症、骨軟化症、骨減少症、腰背痛、骨ペーজেット病、硬直性脊椎炎、関節リウマチ、変形性関節症などが知られている。特に高齢者が骨疾患を患うと、日常生活に必要なレベルの運動ですら困難となったり、場合によっては、そのまま寝たきりになる危険性もある。そのため、高齢化が進む現代社会において、骨疾患を予防・治療することには重要な意義がある。

[0003] 現在、骨疾患の治療剤として、活性型ビタミンD3剤、ビスホスホネート剤、カルシトニン製剤、エストラジオール含有のホルモン製剤、ビタミンK2剤などが一般に用いられている。また、副作用がより少なく、より効果的な治療剤として、エストラジオール誘導体、活性型ビタミンD3誘導体、ビスホスホネート誘導体などの開発が行われている（特許文献1参照）。しかし、ビタミンD3は血中のカルシウム濃度を高める作用を有しており、また、エストラジオールやビスホスホネートは骨吸収の阻害作用を有しているが、いずれも、骨芽細胞による骨形成を直接促進する作用はない。骨疾患、特

に骨代謝疾患の治療には、多剤併用療法が主流になってきていることから、従来の予防・治療剤とは異なる作用機作をもつ新規な予防・治療剤の開発が期待されている。

[0004] 骨は、骨の吸収段階と、それに続く、骨の形成段階を繰り返す骨リモデリング（骨再構築）と呼ばれる工程によって連続的に再生されている。各段階及び段階の移行は、破骨細胞－骨芽細胞間のコミュニケーションに関与する骨細胞から分泌されるか、或いは骨基質から放出される骨再構築因子によって細かく制御されなければならない。骨吸収の間に放出された $TGF-\beta$ 及び $IGF-1$ は、骨形成を刺激することが知られており、そのためカップリング因子と呼ばれている。骨リモデリングに重要な候補分子のインビトロデータが豊富なものにも係わらず、インビボの証拠は十分に提供されていない。

[0005] 軸索ガイダンス分子は、神経系の外側で広く発現しており、そこで細胞遊走、免疫応答、組織発達及び血管形成などを制御している（非特許文献 1 及び 2 参照）。近年の研究により、セマフォリン及びエフリン等の軸索ガイダンス分子が、破骨細胞と骨芽細胞間の細胞間コミュニケーションに関与していることが示唆されている（非特許文献 3～5 参照）。

[0006] セマフォリン 4 D（Semaphorin 4D）は、オリゴデンドロサイトから分泌され、中枢神経系において成長円錐の崩壊を誘導することが知られている。また、セマフォリン 4 D は、免疫応答及び免疫系のホメオスタシスの維持に重要であることが明らかとなっている。セマフォリン 4 D のレセプターの 1 つとして、プレキシン B 1（Plexin-B1）が知られている（非特許文献 6 参照）。さらに、非特許文献 7 には、破骨細胞由来のセマフォリン 4 D が、骨芽細胞分化抑制作用、および骨芽細胞を介した破骨細胞形成を促進する可能性が示唆されている。また、非特許文献 8 には、セマフォリン 4 D が骨芽細胞では検出されず、破骨細胞の表面に存在すること、及び、セマフォリン 4 D（Sema4D）をホモ欠損させた雌の $sema4D^{-/-}$ マウスで、野生型マウスと比較して骨量の増加が認められたことが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特表2005-509629号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：B. J. Dickson, Science 298, 1959 (Dec 6, 2002)

非特許文献2：A. B. Huber, A. L. Kolodkin, D. D. Ginty, J. F. Cloutier, Annu Rev Neurosci 26, 509 (2003)

非特許文献3：N. Takegahara et al., Nat Cell Biol 8, 615 (Jun, 2006)

非特許文献4：N. Irie et al., J Biol Chem 284, 14637 (May 22, 2009)

非特許文献5：C. Zhao et al., Cell Metab 4, 111 (Aug, 2006)

非特許文献6：I. Oinuma et al., Science, Vol. 305, no. 5685, pp. 862-865 (August 6 2004)

非特許文献7：石田真哉、金田利夫、武藤章弘、吉田正，日本骨代謝学会学術集会プログラム抄録集，25巻，266頁，2007年6月発行，「破骨細胞由来 s e m a p h o r i n 4 D の骨代謝における生理作用の解析」

非特許文献8：Romain DACQUIN, Chantal Domenget, Pierre Jurdic, Irma Machuca-Gayet, ASBMR 2010 Annual Meeting Abstracts, Presentation Number M00152, "Physiological Control of Bone Resorption by Semaphorin4D is Dependent on Ovarian Function"

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明の課題は、骨芽細胞による骨形成を直接促進する骨形成促進剤や、骨疾患の予防・治療剤を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、前述の背景技術に記載したような状況下、鋭意研究を行った結果、（a）破骨細胞由来のセマフォリン4Dが、骨芽細胞上のプレキシニンB1受容体に結合すると、骨芽細胞分化を阻害するスモールGタンパク質 R h o A を活性化して、I R S シグナル（骨芽細胞の分化を促進するシグナ

ル)を低下させ、骨芽細胞の分化を抑制することによって、骨形成を阻害すること、及び、(b)抗セマフォリン4D抗体や抗プレキシニンB1抗体等が骨芽細胞による骨形成を直接促進することを見だし、本発明を完成するに至った。

[0011] すなわち、本発明は、(1)セマフォリン4DとプレキシニンB1との結合阻害物質を有効成分とする骨形成促進剤や、(2)結合阻害物質が、抗セマフォリン4D抗体であることを特徴とする上記(1)に記載の骨形成促進剤や、(3)結合阻害物質が、抗プレキシニンB1抗体、又は、プレキシニンB1の細胞外領域を含むタンパク質であることを特徴とする上記(1)に記載の骨形成促進剤に関する。

[0012] また、本発明は、(4)セマフォリン4DとプレキシニンB1との結合阻害物質を有効成分とする骨疾患の予防・治療剤や、(5)結合阻害物質が、抗セマフォリン4D抗体であることを特徴とする上記(4)に記載の骨疾患の予防・治療剤や、(6)結合阻害物質が、抗プレキシニンB1抗体、又は、プレキシニンB1の細胞外領域を含むタンパク質であることを特徴とする上記(4)に記載の骨疾患の予防・治療剤や、(7)骨疾患が、骨折、骨欠損、骨粗しょう症、骨軟化症、骨減少症、腰背痛、骨ページェット病、硬直性脊椎炎、関節リウマチ、及び、変形性関節症から選択されることを特徴とする上記(4)～(6)のいずれかに記載の骨疾患の予防・治療剤に関する。

[0013] さらに、本発明は、(8)被検物質がセマフォリン4DとプレキシニンB1との結合阻害物質であるか否かを決定し、前記被検物質が前記結合阻害物質である場合に、前記被検物質を骨形成促進剤の有効成分の候補物質と判定することを特徴とする、骨形成促進剤の有効成分の候補物質の判定方法や、(9)被検物質がセマフォリン4DとプレキシニンB1との結合阻害物質であるか否かを決定する方法が、以下の工程(A)～(D)を有することを特徴とする、上記(8)に記載の判定方法：(A)被検物質の存在下に、セマフォリン4DとプレキシニンB1とを接触させる工程：(B)セマフォリン4DとプレキシニンB1との結合の程度を測定する工程：(C)上記工程(B)で測

定した程度を、被検物質非存在下のその程度と比較する工程：（D）上記工程（B）で測定した程度が、被検物質非存在下のその程度よりも低下した場合に、その被検物質を、セマフォリン4DとプレキシンB1との結合阻害物質と決定する工程：や、（10）上記（8）又は上記（9）に記載の判定方法を使用して、被検物質の中から骨形成促進剤の有効成分の候補物質を探索することを特徴とする、骨形成促進剤の有効成分の候補物質のスクリーニング方法に関する。

発明の効果

[0014] 本発明によると、骨芽細胞による骨形成を直接促進したり、骨疾患を予防及び／又は治療することができる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]マイクロCT（microcomputed tomography）（ μ CT）分析で測定した野生型（WT）マウス及びセマフォリン4Dノックアウト（Sema4d^{-/-}）マウスにおける骨量を示す図である。

[図2] μ CT分析で測定したWTマウス及びSema4d^{-/-}マウスにおける骨梁幅を示す図である。

[図3]4日毎のカルセイン二重標識を行ったWTマウス及びSema4d^{-/-}マウスにおける骨形態形成解析により測定した骨形成〔骨芽細胞表面積（左）、石灰化した骨表面積（中央）及び骨形成率（右）〕を示す図である。

[図4]WTマウス及びSema4d^{-/-}マウスにおける骨形態形成解析により測定した、破骨細胞表面積と細胞数（左及び中央）および骨吸収のパラメーター（右）を示す図である。

[図5]WTマウス又はSema4d^{-/-}マウスの骨髓細胞を養子免疫細胞移植したマウスの骨量を示す図である。左から2つのグラフは、WTマウスに移植した場合のそのマウスの骨量を示し、右から2つのグラフは、Sema4d^{-/-}マウスに移植した場合のそのマウスの骨量を示す。

[図6]骨形成条件下で培養した頭蓋冠細胞にFc-sema4D（IgG1のFc領域と融合した組み換えセマフォリン4D）を添加した際の骨結節数を示す図で

ある。

[図7]骨芽細胞分化中のプレキシシンB型及びcluster of differentiation 72 (CD72) のmRNAの発現を示す図である。

[図8]Fc-sema4Dを用いたプルダウン解析の結果を示す図である。右パネルはプルダウン前のサンプルの解析結果を表し、左パネルはプルダウン後のサンプルの解析結果を表す。

[図9] μ CT分析で測定したWTマウス及びプレキシシンB1ノックアウト (Plxnb1^{-/-}) マウスにおける骨量を示す図である。

[図10] μ CT分析で測定したWTマウス及びPlxnb1^{-/-}マウスにおける骨梁幅を示す図である。

[図11]骨形態形成解析で測定したWTマウス及びPlxnb1^{-/-}マウスにおける骨芽細胞表面積を示す図である。

[図12]骨形態形成解析で測定したWTマウス及びPlxnb1^{-/-}マウスにおける石灰化した骨表面積を示す図である。

[図13]骨形態形成解析で測定したWTマウス及びPlxnb1^{-/-}マウスにおける骨形成率を示す図である。

[図14]プレキシシンB1、GAPドメインに変異を有するプレキシシンB1のRAミュータント (R1661/1662/1968A)、及びPDZ結合ドメインが欠如している (Δ PDZ) プレキシシンB1の切断されたミュータントの概略を示す図である。

[図15] μ CT分析で測定したWTマウス (コントロールマウス) 及びドミナントネガティブRhoA (RhoA DN^{0B}) マウスにおける骨量を示す図である。

[図16] μ CT分析で測定したWTマウス及びRhoA DN^{0B}マウスにおける骨梁幅を示す図である。

[図17]骨形態形成解析で測定したWTマウス及びRhoA DN^{0B}マウスにおける骨形成 [骨芽細胞表面積] を示す図である。

[図18]骨形態形成解析で測定したWTマウス及びRhoA DN^{0B}マウスにおける骨形成 [石灰化した骨表面積] を示す図である。

[図19]骨形態形成解析で測定したWTマウス及びRhoA DN⁰⁸マウスにおける骨形成〔骨形成率〕を示す図である。

[図20]骨形態形成解析で測定した、卵巣摘出（OVX）マウス及び抗Sema4D抗体で処理したOVXマウスにおける骨芽細胞表面積を示す図である。

[図21]μCT分析で測定したOVXマウス及び抗セマフォリン4D抗体（抗Sema4D抗体）で処理したOVXマウスにおける骨量を示す図である。

[図22]骨形態形成解析で測定した、OVXマウス及び抗Sema4D抗体で処理したOVXマウスにおける骨形成〔骨形成率〕を示す図である。

[図23]μCT分析で測定したOVXマウス及び抗Sema4D抗体で処理したOVXマウスにおける骨梁間隔を示す図である。

[図24]図24の上パネルは、マウス骨芽細胞を、WTマウス又はSema4d^{-/-}マウスの破骨細胞、及び、抗Sema4D抗体の存在下で培養した場合の石灰化形成を調べた結果を示す図である。図24の下パネルは、マウス骨芽細胞を、Fc-sema4d及び／又は抗プレキシシンB1抗体の存在下で培養した場合の石灰化形成を調べた結果を示す図である。

[図25]ヒト骨芽細胞（HOS）を、破骨細胞若しくはその上清、及び／又は、抗Sema4D抗体等の存在下で培養した場合の石灰化形成を調べた結果を示す図である。

[図26]骨形態形成解析で測定した、卵巣摘出（OVX）マウス及びOVX処理後6週から抗セマフォリン4D抗体（抗Sema4D抗体）で処理したOVXマウスにおける骨芽細胞表面積を示す図である。

[図27]μCT分析で測定したOVXマウス及びOVX処理後6週から抗Sema4D抗体で処理したOVXマウスにおける骨量を示す図である。

[図28]骨形態形成解析で測定した、OVXマウス及びOVX処理後6週から抗Sema4D抗体で処理したOVXマウスにおける骨形成〔骨形成率〕を示す図である。

[図29]μCT分析で測定したOVXマウス及びOVX処理後6週から抗Sema4D抗体で処理したOVXマウスにおける骨梁間隔を示す図である。

発明を実施するための形態

- [0016] 本発明の「骨形成促進剤」や、本発明の「骨疾患の予防・治療剤」（以下、まとめて「本発明の剤」とも表示する。）としては、セマフォリン4 DとプレキシシンB 1との結合阻害物質（以下、単に「本発明における結合阻害物質」とも表示する。）を有効成分としている限り特に制限されず、また、かかる本発明における結合阻害物質としては、いずれかの脊椎動物のセマフォリン4 DとプレキシシンB 1との結合を阻害する物質である限り特に制限されないが、抗セマフォリン4 D抗体、抗プレキシシンB 1抗体、プレキシシンB 1の細胞外領域を含むタンパク質を好適に例示することができる。本発明における結合阻害物質は、破骨細胞由来のセマフォリン4 Dと、骨芽細胞上のプレキシシンB 1受容体との結合を阻害し、R h o Aの活性化阻害とI R Sシグナルの低下阻害を経て、骨芽細胞の分化抑制を阻害することによって、骨芽細胞による骨形成を促進すると考えられる。なお、本明細書において、「阻害」なる語と、「抑制」なる語は特に区別なく用いられる。
- [0017] 上記の抗セマフォリン4 D抗体や、抗プレキシシンB 1抗体（以下、「本発明の抗体」）は、ポリクローナル抗体であってもよいし、モノクローナル抗体およびその機能的断片のいずれであってもよいが、特異性が高いなどの点でモノクローナル抗体であることが好ましい。上記の抗セマフォリン4 D抗体や、抗プレキシシンB 1抗体は、セマフォリン4 DやプレキシシンB 1を用いて、従来公知の方法により作製することができる。本発明の抗体である機能的断片とは、本発明の抗体が特異的に結合する抗原であるセマフォリン4 DやプレキシシンB 1に対して、特異的に結合する抗体の断片を意味し、より具体的にはF（a b'）₂、F a b'、F a b、F v、disulphide-linked F V、Single-Chain F V（s c F V）およびこれらの重合体等が挙げられる（D.J.King, Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies, 1998 T .J. International Ltd）。このような抗体断片は慣用法、例えばパパイン、ペプシン等のプロテアーゼによる抗体分子の消化、あるいは公知の遺伝子工学的手法により得ることができる。なお、本発明の抗体には、抗体若しくは

その機能的断片の抗体結合能を妨げない限り、抗体若しくはその機能的断片にペプチド又はタンパク質を付加したのもも便宜上含まれる。

[0018] また、本発明の抗体は、ヒト抗体を含む。ここで本発明において「ヒト抗体」とは、ヒト由来の抗体遺伝子の発現産物である抗体を意味する。ヒト抗体は、ヒト抗体遺伝子座を導入し、ヒト由来抗体を産生する能力を有するトランスジェニック動物にセマフォリン4 DやプレキシシンB 1を投与することにより得ることができる。該トランスジェニック動物の例として例えばマウスが挙げられる。ヒト抗体を産生し得るマウスとして、例えば、内在性マウスIgMノグロブリン（Ig）重鎖及びマウスκ軽鎖を欠損しており、かつ、ヒトIg重鎖遺伝子を含む14番染色体断片（SC20）及びヒトIgκ鎖トランスジーン（KC05）を同時に保持するマウスを挙げることができる。このマウスはヒトIg重鎖遺伝子座を持つ系統Aのマウスと、ヒトIgκ鎖トランスジーンを持つ系統Bのマウスとの交配により作製される。系統Aは、内因性Ig重鎖及びκ軽鎖破壊の両者についてホモ接合体であり、子孫伝達可能な14番染色体断片（SC20）を保持するマウス系統（Tomizuka, et al., Proc Natl Acad Sci USA., 2000 Vol97:722）である。また、系統Bは内在性マウスIg重鎖及びκ軽鎖欠損の両者についてホモ接合体であり、ヒトIgκ鎖トランスジーン（KC05）を保持するマウス系統（Nat Biotechnol., 1996 Vol14:845）である。

[0019] 本発明のポリクローナル抗体は、例えば、以下に述べる方法によって製造することができる。セマフォリン4 DやプレキシシンB 1を、必要に応じて免疫賦活剤（Freund's Adjuvant等）とともに、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマ等の非ヒト哺乳動物に免疫することにより得られる。本発明のモノクローナル抗体は、免疫感作動物から得た抗体産生細胞と自己抗体産生能のない骨髓腫系細胞（ミエローマ細胞）からハイブリドーマを調製し、ハイブリドーマをクローン化し、免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを選択することによって取得することができる。該ハイブリドーマの調製は、ケーラーおよびミルシュタインらの方法（Natur

e, 1975 Vol. 256:495-497) およびそれに準じて行うことができる。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンのスクリーニングは、ハイブリドーマを、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖の見られたウェル中の培養上清の免疫抗原に対する反応性を、例えばELISA等の酵素免疫測定法、ラジオイムノアッセイ、蛍光抗体法などの免疫学的方法を用いて測定することにより行なうことができる。

[0020] ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の製造は、ハイブリドーマをインビトロで培養して培養上清から単離することができる。また、マウス、ラット、モルモット、ハムスターまたはウサギ等の腹水中等でのインビボで培養し、腹水から単離することもできる。また、ハイブリドーマ等の抗体産生細胞からモノクローナル抗体をコードする遺伝子をクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主（例えばチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞等の哺乳類細胞株、大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞など）に導入し、遺伝子組換え技術を用いて組換え型抗体を調製することができる（P. J. Delves, ANTIBODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES, 1997 WILEY、P. Shepherd and C. Dean, Monoclonal Antibodies, 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS、J. W. Goding, Monoclonal Antibodies: principles and practice, 1993 ACADEMIC PRESS）。

[0021] さらに、トランスジェニック動物作製技術を用いて目的抗体の遺伝子が内在性遺伝子に組み込まれたトランスジェニックなウシ、ヤギ、ヒツジまたはブタを作製し、そのトランスジェニック動物のミルク中からその抗体遺伝子に由来する抗体を大量に取得することも可能である。

[0022] 産生された抗体は、当該分野において周知の方法、例えばプロテインAカラムによるクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、硫酸塩析法、ゲル濾過、アフィニティクロマトグラフィー等を適宜組み合わせることにより精製することができる。

[0023] 前述のプレキシシンB1の細胞外領域を含むタンパク質は、セマフォリン4Dをトラップすることにより、セマフォリン4DとプレキシシンB1の結合を

阻害することができる。かかるタンパク質としては、プレキシシンB 1の細胞外領域を含むタンパク質である限り特に制限されないが、さらに、抗体の定常領域（好ましくは、任意のイムノグロブリンのFcフラグメント）と融合しているタンパク質を好適に例示することができる。

[0024] 上記のセマフォリン4 D、プレキシシンB 1、プレキシシンB 1の細胞外領域を含むタンパク質は、例えば、それらのタンパク質の配列情報に基づいて、その配列を含む発現ベクターを作製し、その発現ベクターを適当な宿主細胞に形質転換して細胞内で目的タンパク質を生成させ、その目的タンパク質を単離する方法などの従来公知の方法により入手することができる。例えばヒトのセマフォリン4 DのDNA配列（配列番号1）やアミノ酸配列（配列番号2）は、例えばGenBankのAccession Number NM_001142287に、また、ヒトのプレキシシンB 1のDNA配列（配列番号3）やアミノ酸配列（配列番号4）は、例えばGenBankのAccession Number NM_001130082 に開示されている。また、ヒトのプレキシシンB 1の細胞外領域は、前述のAccession Number NM_001130082のアミノ酸配列のアミノ酸番号1～1490に相当する。

[0025] ある物質がセマフォリン4 DとプレキシシンB 1との結合阻害物質であるかどうかは、例えば、その物質の存在下及び非存在下で、セマフォリン4 DとプレキシシンB 1との結合をイムノブロット解析などで測定し、その物質の存在下においてその結合が低下するかどうかを調べることによって、容易に確認することができる。

[0026] 本発明における骨形成促進効果とは、骨形成を促進する効果を意味し、より好適には、骨芽細胞の分化抑制を阻害することによって、骨芽細胞による骨形成を促進する効果を含む。ある物質が骨形成促進効果を有しているかどうかは、骨量が通常よりも低い脊椎動物（好ましくは、骨粗しょう症患者、骨粗しょう症モデル脊椎動物）にその物質を投与して、骨量が増加するかどうかを調べることによって確認することができる。

[0027] 本発明における骨疾患の予防・治療効果とは、本発明におけるいずれかの骨疾患を予防及び／又は治療する効果、あるいはその症状を改善する効果を

意味する。ある物質が骨疾患の治療効果を有しているかどうかは、骨疾患に罹患している患者又は脊椎動物（好ましくは、骨粗しょう症患者、骨粗しょう症モデル脊椎動物）にその物質を投与して、その骨疾患が治癒する、あるいは改善するかどうかを調べることによって確認することができる。

[0028] 本発明の剤は、本発明における結合阻害物質のみを含有していてもよいが、薬学的に許容される通常の担体、抗酸化剤、結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、pH緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤などの各種調剤用配合成分を添加してもよい。本発明の低減剤の剤型としては、粉末剤、顆粒剤、カプセル剤などの固形製剤であってもよいし、溶液剤、乳剤、懸濁剤などの液剤であってもよい。これらの製剤は、本発明における結合阻害物質について、常法にしたがった処理を行うことによって、適宜作製することができる。

[0029] 本発明の剤の投与方法としては、所望の骨形成促進効果や、所望の骨疾患の予防・治療効果が得られる限り特に制限されず、非経口投与であっても経口投与であってもよい。非経口投与の方法としては、血管内投与、筋肉内投与、皮下投与、経皮投与、経鼻投与、経肺投与等を例示することができ、中でも、血管内投与を好適に例示することができ、中でも、静脈内投与をより好適に例示することができる。また本発明の剤の投与量や投与回数や投与濃度は、投与対象の体重や、骨疾患の種類、骨疾患の症状の程度等に応じて、適宜調節することができる。

[0030] 本発明の剤の投与対象としては、脊椎動物を例示することができ、中でも、哺乳類に属する動物や、鳥類に属する動物を好適に例示することができ、中でも、ヒト、サル、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウシ、ブタ、ウマ、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、イヌ、ニワトリ、ウズラ等を好適に例示することができ、中でもヒトや家畜・家禽類をより好適に例示することができる。また、本発明の剤に含まれる本発明における結合阻害物質が、結合阻害作用を発揮するセマフォリン4Dや、プレキシシンB1の由来である脊椎動物の種類は、本発明の剤の投与対象となる脊椎動物の種類と一致して

いることが、より安定し、優れた骨形成促進効果や、骨疾患の予防・治療効果を得る観点から好ましい。なお、セマフォリン4Dの由来となる脊椎動物と、プレキシシンB1の由来となる脊椎動物の種類は同じであってもよいし、異なってもよい。

[0031] 本発明における骨疾患の種類としては、骨形成の低下を起因とする骨疾患あるいは骨形成の低下に関連する骨疾患である限り特に制限されないが、骨折、骨欠損、骨粗しょう症、骨軟化症、骨減少症、腰背痛、骨ページェット病、硬直性脊椎炎、関節リウマチ、変形性関節症、骨形成不全症、骨多孔症を好適に例示することができ、中でも、骨粗しょう症、骨軟化症、骨減少症、骨形成不全症をより好適に例示することができる。

[0032] 本発明の判定方法は、被検物質がセマフォリン4DとプレキシシンB1との結合阻害物質であるか否かを決定し、前記被検物質が前記結合阻害物質である場合に、前記被検物質を骨形成促進剤の有効成分の候補物質と判定することを特徴とする、骨形成促進剤の有効成分の候補物質の判定方法である。上記の判定方法において、被検物質がセマフォリン4DとプレキシシンB1との結合阻害物質であるか否かを決定する方法としては、以下の工程（A）～（D）を有する方法を好適に例示することができる。

（A）被検物質の存在下に、セマフォリン4DとプレキシシンB1とを接触させる工程：

（B）セマフォリン4DとプレキシシンB1との結合の程度を測定する工程：

（C）上記工程（B）で測定した程度を、被検物質非存在下のその程度と比較する工程：

（D）上記工程（B）で測定した程度が、被検物質非存在下のその程度よりも低下した場合に、その被検物質を、セマフォリン4DとプレキシシンB1との結合阻害物質と決定する工程。

[0033] 上記判定方法では、セマフォリン4Dとして、標識化した、セマフォリン4D細胞外領域やセマフォリン4D細胞外領域とイムノグロブリンFc領域等との融合タンパク質を、プレキシシンB1として、それが細胞表面に発現し

ているものを、それぞれ用いて結合の程度を測定してもよい。または、プレキシシンB 1として、標識化した、プレキシシンB 1細胞外領域やプレキシシンB 1細胞外領域とイムノグロブリンFc領域等との融合タンパク質を、セマフォリン4 Dとして、それが細胞表面に発現しているものを、それぞれ用いて結合の程度を測定してもよい。

[0034] 本発明の判定方法における被検物質としては特に制限されず、セマフォリン4 DとプレキシシンB 1との結合を阻害する活性を有する物質であることが予め判明している物質であってもよいし、かかる活性を有するかどうか不明である物質であってもよい。また、被検物質として、複数の被検物質を同時に用いてもよい。複数の被検物質を同時に用いる際は、単独の被検物質をそれぞれ別のサンプル内で同時に用いてもよいし、複数の被検物質を単一サンプル内で同時に用いてもよいし、複数の被検物質を用いる単一のサンプルを複数用意して同時に用いてもよい。複数の被検物質を単一サンプル内で同時に用いるときは、それらの被検物質のいずれがセマフォリン4 DとプレキシシンB 1との結合阻害物質であるかを1度の試験で決定することができない場合もあるが、被検物質を段階的に絞り込んで試験を複数回行えば、いずれの被検物質がその結合阻害物質であるかを決定することができる。本発明の判定方法は、被検物質の中から骨形成促進剤の有効成分の候補物質を探索することを特徴とする、骨形成促進剤の有効成分の候補物質のスクリーニング方法として使用することもできる。

[0035] なお、本発明の他の態様として、（a）上記の骨形成促進剤や骨疾患の予防・治療剤の調製における本発明における結合阻害物質の使用、（b）骨形成促進や骨疾患の予防・治療における使用のための、本発明における結合阻害物質、（c）本発明における結合阻害物質を、骨形成の促進や、骨疾患の予防・治療に使用する方法、（d）本発明における結合阻害物質を対象脊椎動物に投与することにより、骨形成を促進する方法、（e）本発明における結合阻害物質を対象脊椎動物に投与することにより、骨疾患を予防・治療する方法を挙げることができる。

[0036] 以下に実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1

[0037] [マウスと骨表現型の解析]

Sema4d^{-/-}、Plxnb1^{-/-}、プレキシシン B 2 ノックアウト (Plxnb2^{-/-})、CAT-RhoA DN 及び $\alpha 1$ (I)-Cre マウスの作製は、文献に記載された方法にしたがって行った (W. Shi et al., *Immunity* 13, 633 (Nov, 2000)、R. H. Friedel et al., *J Neurosci* 27, 3921 (Apr 4, 2007)、R. H. Friedel et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13188 (Sep 13, 2005)、K. Kobayashi et al., *J Neurosci* 24, 3480 (Apr 7, 2004)、R. Dacquin, M. Starbuck, T. Schinke, G. Karsenty, *Dev Dyn* 224, 245 (Jun, 2002))。全てのマウスは、C57BL/6 マウスと 8 回以上戻し交配 (backcross) させた。全てのマウスは、特異的病原菌のない状態で維持した。全ての動物実験は、東京医科歯科大学の動物実験委員会に承認され、関連ガイドライン及び法律に合致している。骨表現型はそれぞれの遺伝子改変マウスとその同腹マウスをコントロールとし、雌雄それぞれ 8 匹以上を解析した。三次元マイクロ CT (μ CT) 分析及び組織形態計測的分析は、文献に記載された方法にしたがって行った (K. Nishikawa et al., *J Clin Invest* 120, 3455 (Oct 1, 2010)、T. Koga et al., *Nature* 428, 758 (Apr 15, 2004))。

[0038] [骨髄キメラマウス]

骨髄キメラマウスの作製は、文献 (B. Zhao et al., *Nat Med* 15, 1066 (Sep, 2009)) に記載された方法を一部変更して行った。すなわち、野生型 Sema4d^{-/-} 同腹子マウスのドナー骨髄細胞 (C57BL/6-Ly5. 2 バックグラウンド) を採取し、各ドナーから得られた 2×10^6 細胞を、致死的な放射線を浴びた野生型レシピエントマウス (3 週齢、C57BL/6-Ly5. 1 バックグラウンド) 又は Sema4d^{-/-} マウスの尾静脈へ静脈内投与した。骨髄移植の 8 週後、高いレベルのドナー型キメリズム (>95%) が達成された。

[0039] [GeneChip 解析]

GeneChip解析は、文献 (K. Nishikawa et al., J Clin Invest 120, 3455 (Oct 1, 2010)) に記載された方法にしたがって行った。すなわち、全RNAを用いた逆転写によるcDNA合成を行った後、インビトロで転写させることによりビオチン化標識したcRNAを合成した。cRNAを断片化した後、マウスA430 GeneChip (Affymetrix社製) を用いたハイブリダイゼーションを、文献 (T. Koga et al., Nat Med 11, 880 (Aug, 2005)、H. Takayanagi et al., Dev Cell 3, 889 (Dec, 2002) の記載にしたがって行った。

[0040] [インビトロでの骨芽細胞への分化誘導]

インビトロでの骨芽細胞及び破骨細胞への分化誘導は、文献 (T. Koga et al., Nat Med 11, 880 (Aug, 2005)、H. Takayanagi et al., Dev Cell 3, 889 (Dec, 2002)) に記載された方法にしたがって行った。すなわち、頭蓋冠由来の細胞を骨形成培地 (50 μ Mのアスコルビン酸、10 nMのデキサメタゾン、及び10 mMの β -グリセロリン酸塩) 中で培養を行うことにより分化誘導を行い、分化誘導の確認は、アルカリ性ホスファターゼ (ALP) アッセイ (7日後) 及び骨結節形成解析 (21日後、アリザリンレッド染色) により行った。Fc-sema4D、抗Sema4d抗体及び抗プレキシニンB1抗体 (抗Plaxin-B1抗体) は、3日毎に添加した。破骨細胞上清は、核内因子 κ B活性化受容体リガンド (RANKL; Peprotech社製) 刺激後に野生型及びSema4d^{-/-}細胞の各培養液から回収した。培養破骨細胞を、コラーゲンコートディッシュ (IWAKI社製) で培養し、RANKL刺激の2日後にトリプシン処理により回収した。破骨細胞上清は、上記試薬を含む骨形成培地として使用され、3日毎に培養破骨細胞 (1 $\times$ 10⁵細胞/ウェル、24ウェルプレート) へ添加した。

[0041] [定量的リアルタイムRT-PCR解析]

定量的リアルタイムRT-PCRは、Light Cycler (Roche社製) 装置とSYBRGreen (TOYOBO社製) を用いて製品プロトコールに従って行った。以下のプライマーを使用した。

Plxnb1センス: 5' -tggggtcatgtgcagtagcat-3' (配列番号5)、

Plxnb1アンチセンス : 5' -cactgctctccaggttctcc-3' (配列番号 6) 、
 Plxnb2センス : 5' -aggggagcctctctacaagc-3' (配列番号 7) 、
 Plxnb2アンチセンス : 5' -tcgatcccttcatcctgaac-3' (配列番号 8) 、
 Plxnb3センス : 5' -atatgctgagcgtgccttct-3' (配列番号 9) 、
 Plxnb3アンチセンス : 5' -tgctgttgagcaaattggag-3' (配列番号 10) 、
 CD72センス : 5' -gccttctcctgtcctgtctg-3' (配列番号 11) 、
 CD72アンチセンス : 5' -cctcctggaactgctgagac-3' (配列番号 12) 、
 Alplセンス : 5' -aaccagacacaagcattcc-3' (配列番号 13) 、
 Alplアンチセンス : 5' -gcctttgagggtttttggtca-3' (配列番号 14) 、
 Bglapセンス : 5' -gcgctctgtctctctgacct-3' (配列番号 15) 、
 Bglapアンチセンス : 5' -accttattgccctcctgctt-3' (配列番号 16) 、
 Col1a1センス : 5' -gagcggagagtactggatcg-3' (配列番号 17) 、
 Col1a1アンチセンス : 5' -gttcgggctgatgtaccagt-3' (配列番号 18) 、
 Gapdhセンス : 5' -accagaagactgtggatgg-3' (配列番号 19) 、
 Gapdhアンチセンス : 5' -cacattgggggtaggaacac-3' (配列番号 20) 。
 mRNA発現のレベルは、Gapdh発現のレベルにより標準化した。

[0042] [アデノウイルス及びレトロウイルス遺伝子導入]

RhoA (Myc-V14Rho) 及び Rac1 (hRac1 V12) の構成的活性型 (CA) と、RhoA (Myc-N19Rho) 及び Rac1 (hRac1 V12) のドミナントネガティブ型 (DN) とを担持するアデノウイルスベクターの作製方法及びそれらの導入方法は、文献 (Bito, H. et al. A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axonoutgrowth in mammalian CNS neurons. Neuron 26, 431-441 (2000)) に記載された方法にしたがって行った。緑色蛍光タンパク質 (EGFP) と同時に 3 種類のプレキシン B1 (野生型 [Plexin-B1]、R-Ras の GTPアーゼ活性化を引き起こさないミュータント [Plexin-B1 RA] 及び RhoA を活性化することができないミュータント [Plexin-B1 DPDZ-EGFP]) が発現するレトロウイルスベクター (pMXs-Plexin-B1-EGFP、pMXs-Plexin-B1 RA-EGFP 及び pMXs-Plexin-B1 DPDZ-EGFP) の作

製は、pMXs-IRES-EGFPへそれぞれPlexin-B1、Plexin-B1 RA (I. Oinuma, Y. Ishikawa, H. Katoh, M. Negishi, Science 305, 862 (Aug6, 2004)) 及びPlexin-B1 DPDZ (V. Perrot, J. Vazquez-Prado, J. S. Gutkind, J Biol Chem 277, 43115 (Nov 8, 2002)) の c D N A 断片を挿入することにより行った。リコンビナントなレトロウイルスの作製は、文献 (S. Morita, T. Kojima, T. Kitamura, Gene Ther 7, 1063 (Jun, 2000)) に記載された方法にしたがって行った。すなわち、作製したレトロウイルスベクターを P l a t - E 細胞へ導入することにより、レトロウイルスのパッケージングを行った。

[0043] [O V X 誘導骨量減少に対する抗Sema4D抗体処理]

O V X (卵巣摘出) によって誘導された骨粗しょう症モデルマウスの作製は、文献 (M. Shinohara et al., J Biol Chem 282, 17640 (Jun 15, 2007)) に記載された方法にしたがって行った。すなわち、7 週齢のメスのマウスに卵巣摘出又は偽手術を行った。これらのモデルマウスでは、各グループ 6 匹を超えるマウスを検査した。骨量減少に対して予防効果があるかどうかを調べるために、以下に示す方法をしたがって検証した。すなわち、O V X マウスに、術後 3 日から 8 週まで、1 週間に 1 回尾静脈から、20 μ g の抗Sema4D抗体 (M B L 社製) 又は生理食塩水を静脈注入した。術後 8 週後に全てのマウスを犠牲にし、 μ C T 分析及び骨形態形成解析を行った。また、減少した骨量に対して促進効果があるかどうかを調べるために、以下に示す方法をしたがって検証した。すなわち、O V X の 6 週後、O V X マウスに 3 日毎に 3 週間尾静脈から 20 μ g の抗Sema4D抗体 (M B L 社製) 又は生理食塩水を静脈注入した。術後 9 週後に全てのマウスを犠牲にし、 μ C T 分析に供した。

[0044] [イムノブロット解析、プルダウン解析及び免疫蛍光染色]

頭蓋冠細胞を、骨形成培地 (50 μ M のアスコルビン酸、10 nM のデキサメタゾン、及び 10 mM の β -グリセロリン酸塩) で 2 日間培養し、その後 Fc-Sema4D で刺激した。精製したヒト I g G (F c 部分) (BECKMAN COULTER 社製) をプルダウン解析のネガティブコントロールに使用した (time 0)。表示された時点で細胞を採取し、抗Plexin-B1抗体 (clone A-8, Santa Cruz

社製)、抗PDZ-RhoGEF抗体(ポリクロナール、ProteinExpress社製)、抗LARG抗体(ポリクロナール、LIFESPAN CIOSCIENCES社製)、抗phospho-Akt抗体(Thr308)(ポリクロナール、Cell Signaling社製)、抗Akt抗体(ポリクロナール、Cell Signaling社製)、抗phosphor-ERK抗体(Thr202/Tyr204)(ポリクロナール、Cell Signaling社製)、抗ERK抗体(ポリクロナール、Cell Signaling社製)、抗Met抗体(clone 25H2)(Cell Signaling社製)、抗ErbB2抗体(clone 29D8)(Cell Signaling社製)、抗Rac1抗体(clone 102/Rac1)(BD Transduction laboratories社製)、抗RhoA抗体(clone55/Rho)(BD Transduction laboratories社製)、抗cadherin-11抗体(ポリクロナール、Invitrogen社製)、抗IRS1抗体(clone 58-10C-31)(MILLIPORE社製)、及び抗b-アクチン抗体(clone AC40)(Sigma-Aldrich社製)を用いたイムノブロット解析又はプルダウン解析を行った。プレキシンB1、Met、ErbB2及びIRS1のリン酸化は、それぞれに対する特異的抗体を用いた免疫沈降後に、抗ホスホチロシン抗体(4G10、Upstate社製)によって検出された。セマフォリン4Dに結合したプレキシンB1を検出するために、細胞溶解物はプロテインA-アガロースビーズに結合したFc-sema4D(500ng)とインキュベートし、抗Plexin-B1抗体を用いてイムノブロット解析を行った。GTPアーゼの活性化の検出は、文献(M. Shinohara et al., J Biol Chem 282, 17640 (Jun 15, 2007))の記載通りに行った。すなわち、頭蓋冠細胞をFc-sema4Dで処理し、表示された時点で採取した。細胞溶解物をグルタチオン-セファローズglutathione sepharoseに結合したGST-RBD(RhoA用)又はGST-PAK1(Rac1用)(2 μ g)とインキュベートし、それぞれ抗RhoA抗体又は抗Rac1抗体を用いたイムノブロット解析を行った。免疫蛍光染色用に、細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定した後、透過処理し、その後Alexa Fluor 488標識二次抗体及びローダミン共役ファロイジン(Molecular Probes社製)で染色した。

[0045] [フローサイトメトリー]

骨髓由来細胞及び頭蓋冠細胞を解析するために、骨髓及び頭蓋冠から調製

された単個細胞浮遊液を、8種類の蛍光色素がコンジュゲートしたモノクローナル抗体 [PerCP-Cy5.5がコンジュゲートした抗CD45.2抗体、FITCがコンジュゲートした抗CD45.2抗体 (clone 104)、eFluor450がコンジュゲートした抗CD11b抗体 (clone M1/70)、PEがコンジュゲートした抗CD105抗体 (clone MJ7/18)、Alexa Fluor 647がコンジュゲートした抗CD106抗体 (clone 4.29E+02)、APC-Alexa Fluor 750がコンジュゲートした抗CD44抗体、AC-Cy7がコンジュゲートした抗CD44抗体 (clone IM7)、及びAPCがコンジュゲートした抗Sca-1抗体 (clone D7) (eBioscience社製)] で染色した。その後、Diva software (BD Biosciences社製) でFACSCant IIを用いてフローサイトメトリー解析を行った。

[0046] [細胞増殖解析]

骨髓由来間質細胞を骨形成条件培地で培養し、骨芽細胞分化前 (Day 0) 又はセマフォリン4D刺激による骨芽細胞分化過程 (Day 14) における細胞増殖率を、ヒトIgGのFc部分又はFc-Sema4Dの存在下で細胞増殖ELISAキット (Roche社製) を用いて解析し、5-ブロモ-2' デオキシウリジン (BrdU) の取り込みを検出した。

[0047] [コロニー形成ユニット (CFU) 解析]

骨髓細胞を、24ウェルプレートに1ウェルあたり 3×10^6 細胞をプレーティングした後、10%ウシ胎仔血清含有 α -MEMで3日間培養し、その後骨形成条件培地に変えた。コロニー形成ユニット-アルカリホスファターゼ (CFU-ALP) が、7日目 (day 7) にALP陽性コロニーとして検出され、CFU-骨芽細胞 (CFU-Ob) が21日目 (day 21) にアルザリンレッド陽性コロニーとして検出された。コロニーの総数 (CFU-線維芽細胞 (CFU-F)) を7日目及び21日目にトルイジンブルー染色で検出した。

[0048] [統計的分析]

全てのデータは、平均 $\pm$ SEM ($n = 5$) で示す。統計的分析は、Student's t test ANOVAと、可能時にはBonferroni testを用いて行った (*

$p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$; n. s. , 有意でない)。結果は、4回以上の別個の実験の代表例である。

[0049] [結果]

軸索ガイダンス分子であるセマフォリン、エフリン、スリット及びネトリンが骨のリモデリングに関与しているかどうかを調べるために、破骨細胞及び骨芽細胞におけるmRNAのゲノムワイドなスクリーニングをGeneChip解析により行った。すなわち、20種類のセマフォリン、16種類のエフリン、6種類のスリット及び6種類ネトリンについて解析した結果、破骨細胞において、非常に高いセマフォリン4Dの発現が認められた。一方、骨芽細胞では、かかる発現は認められなかった。これらの結果は、破骨細胞形成過程において、セマフォリン4Dが選択的に発現誘導されることを示している。

[0050] 破骨細胞形成過程において、選択的に発現誘導されるセマフォリン4Dの機能を調べるために、Sema4d^{-/-}マウスを用いた骨格系の機能解析を行った。 μ CT及び骨形態形成解析により、Sema4d^{-/-}マウスにおける骨量(図1)及び骨梁幅(図2)は、野生型マウス(WTマウス)と比較して、著しく増加していることが示された。また、Sema4d^{-/-}マウスの骨芽細胞表面積(図3、左)、石灰化した骨表面積(図3、中央)及び骨形成率(図3、右)は、野生型マウスと比較してそれぞれ顕著に上昇したが、破骨細胞の骨吸収を示すパラメーター(破骨細胞表面積(図4、左)、破骨細胞数(図4、中央)及び侵食された骨表面積(図4、右))に変化はなかった。さらに、Sema4d^{-/-}細胞におけるインビトロの破骨細胞形成も、正常に観察された。この結果は、セマフォリン4Dは破骨細胞特異的に発現しているにもかかわらず、Sema4d^{-/-}マウスにおける高骨量の表現型は、骨芽細胞による骨形成の増加によることを示唆している。

[0051] Sema4d^{-/-}マウスの骨表現型が、骨髓細胞系列の異常に基づいたものかどうかを調べるために、破骨前駆細胞を含む骨髓細胞を用いて養子免疫細胞移植を行った。その結果、野生型マウスにSema4d欠損骨髓細胞を移植した場合、野生型骨髓細胞を移植した場合と比べ、骨量は増加していた(図5の左側2つ

のグラフ)。一方、Sema4d^{-/-}マウスに野生型骨髓細胞を移植した場合、Sema4d 欠損骨髓細胞を移植した場合と比べ、骨量は減少し正常に戻っていた(図5の右側2つのグラフ)。この結果から、Sema4d^{-/-}マウスにおける骨表現型は、破骨細胞を含む造血系細胞における異常が原因であることが示された。また、Sema4d^{-/-}頭蓋冠細胞の骨結節形成において、Sema4d^{-/-}頭蓋冠細胞の骨結節の明らかな増加は認められなかった。これらの結果は、破骨細胞において発現するセマフォリン4Dは、骨芽細胞による骨形成を阻害する骨のリモデリング因子として機能することを示唆している。

[0052] 骨芽細胞に対するセマフォリン4Dの阻害効果を詳細に調べるために、Fc-sema4D (I. Ishida et al., Int Immunol 15, 1027 (Aug, 2003)) を作製した後、かかるFc-sema4Dを骨形成条件下で培養した頭蓋冠細胞へ添加した。Fc-sema4Dの添加は、骨結節形成(図6)及び骨芽細胞マーカー遺伝子(ALPの活性化、オステオカルシン[Bglap]及びコラーゲンI型[Col1a1])の発現を濃度依存的に抑制した。これらの結果は、Sema4Dが骨芽細胞の分化誘導を阻害した結果、骨結節形成が阻害されたことを示している。さらに、破骨細胞由来のセマフォリン4Dが骨形成の調節へ関与しているかどうかを調べるために、破骨細胞の培養上清又は破骨細胞の存在下で、頭蓋冠細胞を培養した。野生型の破骨細胞の培養上清又は破骨細胞との共培養では、骨結節形成に影響はなかったのに対し、Sema4d^{-/-}破骨細胞の培養上清又はSema4d^{-/-}破骨細胞との共培養では、骨結節形成が顕著に促進された。これら結果から、破骨細胞は、少なくとも部分的に可溶性として生産されるセマフォリン4Dを介して骨形成を抑制することを示している。また、破骨細胞の上清には、骨形成を促進する1又は複数の因子が含まれていることも注目すべき点である。かかる因子による骨形成促進効果は、セマフォリン4Dが存在しない場合に発揮され则认为られる。

[0053] 骨芽細胞が発現するセマフォリン4Dレセプターを特定するために、非リンパ細胞及びリンパ細胞におけるセマフォリン4Dレセプターとして知られている(K. Suzuki, A. Kumanogoh, H. Kikutani, Nat Immunol 9, 17 (Jan,

2008)) プレキシシンB型及びCD72のmRNAの発現を、定量的リアルタイムRT-PCRにより解析した。その結果、プレキシシンB1発現量は、骨芽細胞分化中に顕著に増加していた(図7)。一方、プレキシシンB2の発現量はかなり低く、またプレキシシンB3及びCD72の発現はほとんど検出されなかった(図7)。また、Fc-sema4Dを用いたプルダウン解析を行った結果、セマフォリン4Dが、プレキシシンB1と相互作用することが示された(図8)。さらに、Fc-sema4Dは、プレキシシンB1のリン酸化を誘導することも示された。セマフォリン4Dは、プレキシシンB1と結合する際に、チロシンキナーゼErbb2と複合体を形成し、Erbb2がセマフォリン4D依存的に自身とプレキシシンB1とをリン酸化することが知られている。骨芽細胞において、Erbb2のキナーゼ活性を阻害した結果、プレキシシンB1のセマフォリン4D刺激依存的なリン酸化が減少した。これらの結果から、プレキシシンB1が骨芽細胞においてセマフォリン4Dの主要レセプターとして作用することが示唆された。そこで、Plxnb1^{-/-}マウスの骨表現型を解析した。Sema4d^{-/-}マウスと同様、Plxnb1^{-/-}マウスの骨量(図9)及び骨梁幅(図10)は、野生型マウスと比較して、骨芽細胞骨形成の上昇により著しく増加した。また、Plxnb1^{-/-}マウスの骨芽細胞表面積(図11)、石灰化した骨表面積(図12)及び骨形成率(図13)も、野生型マウスと比較してそれぞれ顕著に上昇したが、破骨細胞の骨吸収を示すパラメーター(破骨細胞表面積、破骨細胞数及び侵食された骨表面積)に変化はなかった。これらの結果から、Plxnb1^{-/-}マウスにおける高骨量の表現型は、Sema4d^{-/-}マウスの高骨量の表現型と同様に、骨芽細胞による骨形成の増加によるものであることが示唆された。Sema4d^{-/-}破骨細胞で認められた、野生型骨芽細胞による骨結節形成への刺激効果は、Plxnb1^{-/-}細胞では認められなかった。この結果は、プレキシシンB1は、主にセマフォリン4Dを介して骨芽細胞を認識していることを示唆している。

[0054] セマフォリン4D-プレキシシンB1はどのようにして、骨芽細胞において阻害シグナルへ変換するのか。セマフォリン-プレキシシンシステムは、主としてRhoファミリー低分子GTPアーゼを介して、アクチン細胞骨格の再編

成を調節することによって、細胞形態形成及び細胞遊走を調節することが知られている。また、セマフォリン4 DがプレキシンB 2に結合すると、チロシンキナーゼE r b B 2の存在下で、R h o A活性が刺激されるのに対し、セマフォリン4 Dは、他のチロシンキナーゼM e tの存在下では反対の作用を奏することが知られている (J. M. Swiercz, T. Worzfeld, S. Offermanns, J Biol Chem 283, 1893 (Jan 25, 2008))。そこで、セマフォリン4 DがR h o Aを活性化する可能性について調べた。骨芽細胞におけるE r b B 2とM e tの発現量を解析したところ、E r b B 2はM e tと比べ、かなり多く発現していることが示された。また、セマフォリン4 D刺激は、E r b B 2のリン酸化を誘導したが、M e tのリン酸化は誘導しなかった。さらに、イムノブロット解析及びプルダウン解析から、セマフォリン4 Dは、R h o AのG T P結合活性型を増加させ、この活性は、特にP Lxnb1^{-/-}細胞で抑制されることが示された。一方、別のR h oファミリーであるR a c 1の活性は、セマフォリン4 D刺激に影響されなかった。この結果と一致して、アデノウイルスを用いて構成的活性型R h o Aを導入した場合、頭蓋冠細胞における骨結節形成は抑制されたのに対し、ドミナントネガティブR h o Aを導入した場合、骨結節形成は促進された。一方、構成的活性型R a c 1やドミナントネガティブR a c 1は骨形成に影響を与えなかった。これらの結果から、R h o Aが、セマフォリン4 D-プレキシンB 1の骨形成への阻害効果を選択的に仲介することが示唆された。プレキシンB 1は2つのR h o G T Pアーゼ調節ドメイン、すなわちG T Pアーゼ活性化タンパク質 (G A P) ドメイン及びR h o-G E Fに結合するP D Zー結合ドメインを有する (I. Oinuma, Y. Ishikawa, H. Katoh, M. Negishi, Science 305, 862 (Aug 6, 2004)、J. M. Swiercz, R. Kuner, J. Behrens, S. Offermanns, Neuron 35, 51 (Jul 3, 2002)、V. Perrot, J. Vazquez-Prado, J. S. Gutkind, J Biol Chem 277, 43115 (Nov 8, 2002)、M. H. Driessens, C. Olivo, K. Nagata, M. Inagaki, J. G. Collard, FEBS Lett 529, 168 (Oct 9, 2002))。実際に、プルダウン解析及びイムノブロット解析から、R h o-G E Fとして知られているP

DZ-RhoGEFやLARG (leukemia associated RhoGEF) は、骨芽細胞においてもプレキシシンB1と結合することが示された。そこで、上記GAPドメイン及びPDZ-結合ドメインが、骨形成の抑制に重要であるかを判断するために、2種類のプレキシシンB1のミュータント (PlexinB1- Δ PDZ及びPlexinB1-RA) (I. Oinuma, Y. Ishikawa, H. Katoh, M. Negishi, *Science* 305, 862 (Aug 6, 2004)) を作製した (図14)。かかる2種類のプレキシシンB1のミュータントとコントロールである野生型プレキシシンB1 (WT-Plexin-B1) がそれぞれ過剰発現するPlxnb1^{-/-}頭蓋冠細胞を作製した後、Fc-sema4Dによって刺激し、骨芽細胞分化の阻害効果を評価した。Plxnb1^{-/-}細胞において、骨芽細胞マーカー (Alp1、Bglap及びCol1a1) のmRNA発現で示されるFc-Sema4dの阻害効果は、WT-PlexinB1及びPlexinB1-RAの過剰発現により回復したが、PlexinB1- Δ PDZの過剰発現では回復しなかった。これらの結果は、RhoAがセマフォリン4Dによる骨形成の阻害を特異的に媒介することを示唆する。

[0055] 骨芽細胞におけるRhoAのインビボでの役割を調べるため、CAT-RhoA DNトランスジェニックマウス (K. Kobayashi et al., *J Neurosci* 24, 3480 (Apr 7, 2004)) とコラーゲン $\alpha 1$ (I)-Creトランスジェニックマウス (R. Dacquin, M. Starbuck, T. Schinke, G. Karsenty, *Dev Dyn* 224, 245 (Jun, 2002)) とを交配して、骨芽細胞でドミナントネガティブRhoAが特異的に発現する (RhoA DN^{OB}) マウスを作製した。骨芽細胞による骨形成が促進したことにより、RhoA DN^{OB}マウスの骨量 (図15) 及び骨梁幅 (図16) は、野生型マウスと比較して増加した。また、RhoA DN^{OB}マウスの骨芽細胞表面積 (図17)、石灰化した骨表面積 (図18) 及び骨形成率 (図19) は、野生型マウスと比較して顕著に上昇したが、破骨細胞の骨吸収を示すパラメーター (破骨細胞表面積、破骨細胞数及び侵食された骨表面積) に変化はなかった。かかる骨表現型は、Sema4d^{-/-}及びPlxnb1^{-/-}マウスの骨表現型と同様であった。RhoA DN^{OB}の発現が骨芽細胞分化中に増加するにしたがって、骨結節形成及び骨芽細胞マーカー遺伝子 (Alp1、Bglap及びCol1a1)

の発現は、RhoA DN^{0B}マウス由来の頭蓋冠細胞で顕著に上昇した。また、RhoA DN^{0B}細胞において増加した骨結節形成は、Fc-sema4dによって抑制されないことから、RhoAがセマフォリン4 D-プレキシシンB 1の下流で阻害シグナルを媒介していることを示唆している。

[0056] Sema4dの機能阻害が、骨粗しょう症にとって有効であるかどうかを調べるために、OVX（卵巣摘出）処理した閉経後骨粗しょう症のモデルマウスを用いて検証した。すなわち、OVX処理後のマウスに抗Sema4d抗体を毎週静脈内投与し、骨量の減少に対して予防効果があるかどうかを調べた。骨組織を解析した結果、抗Sema4d抗体を投与しない場合、骨量が減少するのに対し、抗Sema4d抗体を投与することにより、骨形成の促進（骨芽細胞表面積（図20）、骨量の増加（図21）及び骨形成率（図22）の増加、並びに骨梁間隔の減少（図23））が認められた。一方、破骨細胞の骨吸収を示すパラメーター（破骨細胞数及び侵食された骨表面積）に変化はなかった。これらの結果から、抗Sema4d抗体処理によりセマフォリン4 Dの機能を阻害させると、骨粗しょう症における骨量低下を予防する効果があることが示された。さらに、セマフォリン4 Dの機能阻害が、既に減少した骨量の治療に対しても効果があるかどうかを調べた。すなわち、OVX処理後、骨量が減少した6週間後に抗Sema4d抗体を週に3日3週間、尾静脈より投与した。骨形成を示すパラメーター（骨芽細胞表面積、骨量の増加及び骨形成率の増加、並びに骨梁間隔の減少）を解析した結果、骨形成の促進（骨芽細胞表面積（図26）、骨量の増加（図27）及び骨形成率（図28）の増加、並びに骨梁間隔の減少（図29））が認められた。したがって、一度減少した骨は、上記OVX処理後、毎週抗Sema4d抗体を投与した場合と同レベルまで回復していることが明らかとなった。すなわち骨量低下を予防した場合と同程度の回復を認めた。一方、破骨細胞の骨吸収を示すパラメーター（侵食された骨表面積）に変化はなかった。また、セマフォリン4 DとプレキシシンB 1の機能阻害が骨結節形成に与える影響を調べた。マウス骨芽細胞とWTマウスの破骨細胞を用いた場合は、抗Sema4D抗体の濃度依存的に骨結節形成が促進された

(図24の上パネルの左から1番目から3番目までのプレート)。一方、Fc-sema4dによって抑制された骨結節形成は、抗プレキシシンB1抗体の濃度依存的に促進された(図24の下パネル)。これらの結果から、抗Sema4d抗体処理あるいは抗プレキシシンB1抗体処理により、セマフォリン4D-プレキシシンB1相互作用を阻害させると、骨粗しょう症における骨量低下を抑制するだけでなく、骨量増加を促す効果があることが示された。さらに、ヒト骨芽細胞におけるセマフォリン4Dの機能阻害が骨結節形成に与える影響を調べた。すなわち、ヒト末梢血単球由来のCD14陽性細胞から分化させた破骨細胞(図25、下段)やその培養上清(図25、上段)を用いて検証したところ、かかる破骨細胞やその培養上清に加えて抗Sema4d抗体を骨芽細胞へ添加すると、抗Sema4d抗体の濃度依存的に骨結節形成が促進された(図25)。この結果は、上記閉経後骨粗しょう症のモデルマウスにおける結果をヒト細胞においても支持するとともに、セマフォリン4D-プレキシシンB1相互作用を阻害することが、骨形成を増加するための新たな戦略となることを示している。

[0057] セマフォリン4Dの骨芽細胞分化阻害の作用点について、詳細に解析した。すなわち、フローサイトメトリー解析により、Sema4d^{-/-}マウスにおける骨髓中造血幹細胞(Sca-1+CD105+CD106+CD44+CD45⁺2-CD11b)数を野生型マウスと比較したところ、違いはなかった。また、細胞増殖解析を行ったところ、骨髓中の骨芽前駆細胞数は、骨芽細胞分化前にはSema4dによって若干増加するが(Day 0)、骨芽細胞分化過程においては、セマフォリン4D刺激によって変化しなかった(Day 14)。なお、CFU解析から、セマフォリン4D刺激によって、ALP発現やAlizarinで示される骨形成は抑制されている。これらの結果は、セマフォリン4Dが骨芽細胞分化段階に作用していることを示唆している。

[0058] Insulin-like growth factors (IGF)-1によるInsulin receptor substrate (IRS) シグナルは、骨芽細胞分化を促進することが知られている。そこで、セマフォリン4D刺激でIRSシグナルに関するAkt及びER

Kのリン酸化を調べたところ、かかるリン酸化レベルは低下していた。また、IRSの活性化指標となるTy rリン酸化も低下しており、これらの結果は、セマフォリン4 D刺激は、IRSシグナルを低下させることを示唆している。また活性化型R h o Aは、A k t 及びE R Kのリン酸化を低下させ、逆にR h o A阻害剤であるY-27632及びR K Iはこれらのリン酸化を亢進させることが明らかとなった。さらに、かかるR h o A阻害剤は、IRSシグナルにおける活性化型リン酸化の亢進を誘導することも明らかとなった。これらの結果から、セマフォリン4 DはR h o Aを活性化することによって、IRSシグナルの低下を誘導し、骨芽細胞分化を抑制することが示唆された。

[0059] [まとめ]

以上の実験により、破骨細胞由来のセマフォリン4 Dを、骨再構築における破骨細胞－骨芽細胞間の伝達に重要なメディエーターとして同定した。骨再構築は、3つの段階（破骨細胞による骨吸収の開始、骨芽細胞による新たな骨形成への移行、及び新しい骨の合成の終了（K. Matsuo, N. Irie, Arch Biochem Biophys 473, 201 (May 15, 2008)）からなるサイクルで行われる。破骨細胞において発現したSema4dは、破骨細胞吸収が完了するまで、骨芽細胞の分化が抑制される初期段階における骨形成の阻害因子として機能しうる。さらに、R h o Aの活性化が、インビボで骨芽細胞骨形成を阻害することも示した。移行段階に関与することが示されているE p h r i n B 2 / E p h B 4 は、骨形成を調節するためにR h o Aも利用し（C. Zhao et al., Cell Metab 4, 111 (Aug, 2006)）、R h oファミリー低分子G T Pアーゼが、骨再構築シグナル伝達のコーディネーターとして作用することを示唆している。GeneChip解析により、P D Z含有R h o A特異的G E F A r f g e f 1 2 (L A R G) (J. M. Swiercz, R. Kuner, J. Behrens, S. Offermanns, Neuron 35, 51 (Jul 3, 2002)、V. Perrot, J. Vazquez-Prado, J. S. Gutkind, J Biol Chem 277, 43115 (Nov 8, 2002)) が、骨芽細胞で高発現することも示された。この結果は、セマフォリン4 D-プレキシシンB 1-R h o A経路

の重要性を裏付けている。また、免疫蛍光染色による解析から、Fc-sema4D刺激後にカドヘリン11のダウンスレギュレーションが観察され、調節されたギャップ結合機能の関与が示唆された。間欠的な副甲状腺ホルモン（PTH）処理は、骨形成を増加させることが現在証明されている唯一の有効な方法である。開発中の抗Sost抗体は、新たな骨形成剤として注目されているのに対し、セマフォリン4D-プレキシニンB1-RhA経路に関わる因子をターゲットとする抗体、阻害剤等は、骨減少性疾患への新たな治療剤として期待できるとする。

産業上の利用可能性

[0060] 本発明は、骨形成の促進や、骨疾患の予防及び／又は治療の分野に好適に利用することができる。

請求の範囲

- [請求項1] セマフォリン4 DとプレキシシンB 1との結合阻害物質を有効成分とする骨形成促進剤。
- [請求項2] 結合阻害物質が、抗セマフォリン4 D抗体であることを特徴とする請求項1に記載の骨形成促進剤。
- [請求項3] 結合阻害物質が、抗プレキシシンB 1抗体、又は、プレキシシンB 1の細胞外領域を含むタンパク質であることを特徴とする請求項1に記載の骨形成促進剤。
- [請求項4] セマフォリン4 DとプレキシシンB 1との結合阻害物質を有効成分とする骨疾患の予防・治療剤。
- [請求項5] 結合阻害物質が、抗セマフォリン4 D抗体であることを特徴とする請求項4に記載の骨疾患の予防・治療剤。
- [請求項6] 結合阻害物質が、抗プレキシシンB 1抗体、又は、プレキシシンB 1の細胞外領域を含むタンパク質であることを特徴とする請求項4に記載の骨疾患の予防・治療剤。
- [請求項7] 骨疾患が、骨折、骨欠損、骨粗しょう症、骨軟化症、骨減少症、腰背痛、骨ペーজেット病、硬直性脊椎炎、関節リウマチ、及び、変形性関節症から選択されることを特徴とする請求項4～6のいずれかに記載の骨疾患の予防・治療剤。
- [請求項8] 被検物質がセマフォリン4 DとプレキシシンB 1との結合阻害物質であるか否かを決定し、前記被検物質が前記結合阻害物質である場合に、前記被検物質を骨形成促進剤の有効成分の候補物質と判定することを特徴とする、骨形成促進剤の有効成分の候補物質の判定方法。
- [請求項9] 被検物質がセマフォリン4 DとプレキシシンB 1との結合阻害物質であるか否かを決定する方法が、以下の工程（A）～（D）を有することを特徴とする、請求項8に記載の判定方法：
- （A）被検物質の存在下に、セマフォリン4 DとプレキシシンB 1とを接触させる工程：

(B) セマフォリン 4 D とプレキシシン B 1 との結合の程度を測定する工程：

(C) 上記工程 (B) で測定した程度を、被検物質非存在下のその程度と比較する工程：

(D) 上記工程 (B) で測定した程度が、被検物質非存在下のその程度よりも低下した場合に、その被検物質を、セマフォリン 4 D とプレキシシン B 1 との結合阻害物質と決定する工程：

[請求項10] 請求項 8 又は 9 に記載の判定方法を使用して、被検物質の中から骨形成促進剤の有効成分の候補物質を探索することを特徴とする、骨形成促進剤の有効成分の候補物質のスクリーニング方法。