

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

細胞遊走・ケモカインを標的とした

生体イメージングと数理シミュレーションを駆使した

新しい関節リウマチ治療薬の開発

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 石井 優

平成22(2010)年 4月

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

細胞遊走・ケモカインを標的とした

生体イメージングと数理シミュレーションを駆使した

新しい関節リウマチ治療薬の開発

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 石井 優

平成 22 (2010) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告	
細胞遊走・ケモカインを標的とした生体イメージングと 数理シミュレーションを駆使した新しい関節リウマチ治療薬の開発	----- 1
石井 優	
II. 分担研究報告	
1. 細胞遊走・ケモカインを標的とした生体イメージングと 数理シミュレーションを駆使した新しい関節リウマチ治療薬の開発	---- 6
石井 優	
2. 細胞遊走・ケモカインを標的とした生体イメージングと 数理シミュレーションを駆使した新しい関節リウマチ治療薬の開発	---- 9
佐伯 行彦	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 11
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 12

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
（総括）研究報告書

細胞遊走・ケモカインを標的とした生体イメージングと数理シミュレーションを駆使した
新しい関節リウマチ治療薬の開発

研究代表者 石井 優 大阪大学免疫学フロンティア研究センター特任准教授

研究要旨

近年、生物学的製剤が関節リウマチ(RA)の治療に革命的变化を齎したが、一方で次世代治療法開発のため、小分子化合物によるRA治療薬の開発が進められている。本研究では、特に免疫細胞の遊走およびそれを制御するケモカインに焦点を当て、小分子による新規RA治療薬の開発・臨床応用を目指している。特に最近、リンパ球遊走を制御する脂質メディエーターであるスフィンゴシン1リン酸(S1P)を標的とした免疫抑制薬が注目を集めており、研究代表者は、米国での共同研究によりS1P作動薬であるFTY720が強力な骨吸収抑制作用を併せ持ち、自己免疫と骨破壊を主徴とするRAに対する治療薬として極めて有用であることを示した。本研究では、その他のS1P作動薬の検索に加え、CXCL12, CCL3, CX₃CL1など、RA発症・病態形成に重要なケモカインを標的とした薬剤開発を行うため、従来の疾患モデルマウスを用いた解析に加え、生体内での複雑な細胞遊走制御を実体的に把握するため、「生体二光子励起顕微鏡イメージング」(実験動物を生かしたままで組織内での細胞の遊走・機能を観察する方法)の技術を駆使し、またこれらのデータを元に、薬効をin silicoでシミュレーションすることが可能な「細胞遊走ネットワークの数理モデル」を作成する。本年度は、ケモカイン標的創薬についての基礎的実験を行い、次年度以降はこれらのデータを元に、RAに対する有効性が示された化合物について臨床応用に向けての準備を行う。なお、臨床研究に際しては、関連諸法令を順守し、当施設の倫理審査委員会の承認の下、研究参加者から文書によるインフォームド・コンセントを得た上で遂行する予定である。

研究分担者

佐伯行彦
国立病院機構大阪南医療センター
臨床研究部長

A. 研究目的

最近、関節リウマチの治療のために、サイトカインを標的とした生物学的製剤の開発・臨床応用が隆盛を迎えているが、一方で、次世代の治療薬開発のため、小分子化合物による治療薬の開発が進められている。中でも免疫細胞の遊走機能に焦点を当てた創薬は現在極めて有望視されている。冬虫夏草から分離・同定された

新規の免疫抑制剤であるFTY720が、近年、リンパ球遊走を制御する脂質メディエーター(ケモカイン)であるスフィンゴシン1リン酸(S1P)の受容体作動薬であることが明らかにされて以来、細胞遊走が薬物の新しい作用点として注目を集めつつある。FTY720は既に米国で多発性硬化症などの自己免疫疾患に関して大規模臨床試験中であり、その他のS1P作動薬や、S1P分解酵素阻害薬であるLX2931なども現在臨床応用を目指しており、RAについても有効であるとの一部報告がなされている(ACR meeting, 2008)。S1P以外にも創薬

ターゲットとして有望なケモカインは数多く報告されつつあり、この分野の薬理研究は今後数年で大きな進歩を遂げることが期待される。

細胞遊走は複数の因子（ケモカイン）による複雑な制御を受けており、また同一因子でも濃度によって作用が異なるため、ケモカインを標的とした創薬では、各薬剤の生体内での薬効を正確に評価することが極めて重要である。本研究代表者は最近、2光子励起顕微鏡という特殊なイメージングシステムを駆使して、実験動物を生かしたままの状態免疫細胞の遊走能を可視化する実験系を立ち上げた。特に、この実験系を用いて骨組織・骨髄内での細胞の挙動を生きたまま観察することに世界に先駆けて成功し（Nature 458:524-8, 2009）、これによりFTY720などのS1P作用薬がRAにおいて骨破壊を起こす破骨細胞の遊走を制御し、従来知られていた免疫抑制作用に加えて強力な骨吸収抑制作用をもつことを明らかにした。従ってこれは、免疫異常と骨吸収の混合病態であるRAの治療薬としては極めて有望であることが分かった。

本研究の目的は、今後さらに一層の展開を示すことが期待される「細胞遊走を標的とした創薬」に注目し、S1Pに加えCXCL12やCCL3, CX₃CL1などの種々のケモカインを標的とした新しいRA治療薬の開発であるが、このために関節炎発症モデル動物を使った治療実験に加えて、本研究代表者が開発・使用している生体2光子励起イメージングを薬効評価系として活用して、より迅速かつ正確な評価が可能なシステムの構築を目指す（石井）。また、イメージングによって得られた詳細な時空間データを元に、RAにおける細胞遊走・ケモタキシスの制御機構に関する数理シミュレーターを作成し、「細胞遊走を標的とした創薬」のin Silicoでの薬効評価系の開発を目指す（石井）。これらの新規の研究手法と合わせて、RAの病態生理における脂質メディエーターやケモカインの意義を調べるため、RA患者より得た検体（血液・関節液および手術標本）を用いた臨床研究を遂行する（佐伯）。

B. 研究方法

①疾患マウスモデルを用いた治療実験：卵巣摘出による骨粗鬆症発症マウスに対して、抗コラーゲン抗体を投与して関節炎を誘導したマウス（OVX+CAIA）を用いて、FTY720など現存するS1P受容体作用薬に関するリード化合物による治療効果について検討する。

②生体2光子励起イメージングによる新規薬効評価系の確立：脂質メディエーターやケモカインによる細胞遊走を標的とした新規創薬の際の、迅速かつ正確な薬効評価のため、骨組織と炎症関節をそれぞれ生体2光子励起観察するシステムの開発を行う。

③薬効評価のための数理シミュレーターの作成：脂質メディエーターやケモカインを標的とした新規RA治療薬候補化合物を、まずin Silicoで迅速にスクリーニングするシステムを構築するため、これまで生体イメージングやin vitroでの細胞遊走アッセイにて得られた数値データを元に、簡便な数理シミュレーターを開発する。

④関節リウマチの病態における脂質メディエーターおよびケモカインの役割解明の臨床研究：実際のヒト関節リウマチにおける脂質メディエーター-S1Pおよび種々の炎症性ケモカインの果たす役割について検討するため、RA患者より採取した血清・関節液および、滑膜切除術や人工関節置換術を施した患者手術検体入手し、これらにおけるS1Pやケモカイン量の測定、および組織中での受容体発現の変化について検討する。

（倫理面への配慮）

実験マウスを用いた実験を行う本研究を遂行するにあたっては、「動物の愛護および管理に関する法律」「実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」「厚生労働省の所管する実験施設における動物実験等の実施に関する基本指針」など、関連法規・指針に従った必要な措置を講じ、同センターでの実験動物利用指針に準拠し、動物愛護上の観点に十分配慮した環境で行う。

C. 研究結果

①疾患マウスモデルを用いた治療実験：OVX + CAIA モデルマウスに対し、S1P 受容体作動薬である FTY720 (1mg/kg, 3mg/kg, 10mg/kg) と、vehicle のみ、および FTY720 の対照薬として副腎皮質ステロイド (prednisolone; PSL) を投与し (2週間)、それぞれの投与群において、関節炎の重症度と、骨塩量を同時に測定してその治療効果について検討した。この結果、FTY720 は、PSL とほぼ同等に CAIA による関節の炎症を抑制することができた一方、OVX による骨塩量低下をも抑制することができた。一方で、PSL は OVX による骨塩量低下を抑制できず、vehicle 投与群よりもさらに骨塩量を低下させることが分かった。

②生体 2 光子励起イメージングによる新規薬効評価系の確立：本研究代表者は 2 光子励起顕微鏡を用いて骨組織内を観察するイメージング法を世界に先駆けて開発しているが、本研究では、これをさらに改良して細胞遊走を制御する新規薬剤の薬効評価系として汎用性の高い観察システムとしての構築を目指している。平成 21 年度では、簡便に骨組織イメージングが可能な動物固定具および顕微鏡チェンバーを作成することに成功した。これにより比較的簡便に、候補薬剤のスクリーニングが可能となった。一方、これと合わせて RA 治療薬としての薬効評価のためのシステムとして、炎症関節 (手関節または膝関節) の 2 光子励起イメージングシステムの構築を目指しているが、これは現在進行中であり完成していない。

③薬効評価のための数理シミュレーターの作成：細胞遊走を標的とした新規薬物候補化合物の迅速な in Silico スクリーニングのための数理シミュレーターを作成するため、平成 21 年度に、まず第一段階として、脂質メディエーターやケモカインによる細胞遊走・ケモタキシスを記述する予備的数理モデルの作成を行った。具体的には、ケモカイン濃度勾配から細胞遊走の駆動力 (driving force) を記述する微分方程式を作成した。本研究は米国国立衛生学研究所 (NIH) との国際共同研究により行っている。

④関節リウマチの病態における脂質メディエーターおよびケモカインの役割解明の臨床研究：ヒト RA 発症における脂質メディエーター S1P および種々の炎症性ケモカインの果たす役割について検討するため、RA 患者より採取した血清・関節液および、滑膜切除術や人工関節置換術を施した患者手術検体を入手し、S1P やケモカイン量の測定、および組織中での受容体発現の変化について検討した。本研究の初年度である平成 21 年度では、まず本研究について十分なインフォームドコンセントを得るためのプロトコル作成を行った。これに基づき、数名の患者のエントリーを得たが、まだ十分な検体検査を施行していない。

D. 考察

①疾患マウスモデルを用いた治療実験：S1P 受容体作動薬である FTY720 は、免疫抑制作用と骨吸収抑制作用を併せ持つ、RA 治療薬としては極めて有望な薬剤であることが考察できる。

②生体 2 光子励起イメージングによる新規薬効評価系の確立：生体 2 光子励起観察を用いると、直視下で細胞の遊走能を観察することが可能であるため、薬効評価・判定が迅速にできるため、初期の候補薬スクリーニングには極めて有用である。

③薬効評価のための数理シミュレーターの作成：候補薬の in Silico スクリーニングのためのシミュレーター作成には、今回行った細胞遊走の予備的数理モデルに加え、細胞遊走の位置情報、薬物動態などをモデルに加えていく必要がある。

④関節リウマチの病態における脂質メディエーターおよびケモカインの役割解明の臨床研究：平成 21 年度には、十分な解析・検討結果が得られていないため、現時点では十分な考察が困難である。

E. 結論

S1P 受容体作動薬である FTY720 は、副腎皮質ステロイドと同様の免疫抑制作用を持つと同時に、骨吸収抑制作用を備えるため、炎症と骨

破壊を主徴とする RA の治療には極めて有望であることが分かる。さらには、骨粗鬆症をベースにもつ高齢者の RA 患者の治療薬として使用する場合、RA と骨粗鬆症の両方に対して「一石二鳥」の効果をもたらすことも希望される。今後の研究では、FTY720 に加え、現在開発中のその他の S1P 作用薬や、ケモカイン受容体作動薬についても、実験モデルマウスを用いた同様の解析を行うほか、生体イメージングや数値シミュレーターを用いた検討、および実際のヒト RA サンプルを用いた解析により、S1P やケモカインを標的とした RA に対する新規治療の有用性について検討が必要である。

F.健康危険情報

特記すべきことなし。

G.研究発表

1. 論文発表

1) **Ishii M**, Egen JG, Klauschen F, Meier-Schellersheim M, **Saeki Y**, Vacher J, Proia RL, Germain RN. (2009) Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature*, 458 (7237): 524-528.

2) Klauschen F, **Ishii M**, Qi H, Bajénoff M, Egen JG, Germain RN, Meier-Schellersheim M. (2009) Quantifying cellular interaction dynamics in 3-D fluorescence microscopy data. *Nature Protoc.*, 4(9): 1305-1311.

3) Mazzucchelli R, Warming S, Lawrence SM, **Ishii M**, Abshari M, Feigenbaum L, Washington AV, Warner AC, Sims DJ, Li WQ, Hixon JA, Gray DHD, Rich BE, Morrow M, Anver MR, Cherry J, Naf D, Sternberg LR, McVicar DW, Farr AG, Germain RN, Rogers K, Copeland N, Durum SK. (2009) Visualization and identification of IL-7 producing cells in reporter mice. *PLoS One*, 4(11): e7637.

4) 石井 優, 「破骨細胞前駆細胞の遊走・局在制御～二光子励起顕微鏡を用いた骨免疫イメージングより～, 「The Bone」 23 巻 4 号,

427-432 (2009)

5) 石井 優, 「脂質メディエーターによる破骨細胞前駆細胞の遊走・位置決め制御～生体二光子励起顕微鏡を用いた骨組織の in vivo イメージングより～」 「感染・炎症・免疫」 39 巻 3 号, 210-217 (2009)

6) 石井 優, 「骨組織のライブイメージングにより明らかとなった破骨細胞の遊走と位置決め制御」, 「最新医学」 64 巻 12 号, 2621-2626 (2009)

7) 石井 優, 「骨組織・骨髄内の 2 光子励起ライブイメージング」, 医学のあゆみ 232 巻 13 号, 1247-1252 (2010)

2. 学会発表

1) The 14th International Conferences on Endocrinology 2010 (ICE2010)・サテライトシンポジウム・招待講演 (2010 年 3 月 31 日・大阪)

2) The 14th International Conferences on Endocrinology 2010 (ICE2010)シンポジウム講演 (2010 年 3 月 26 日・京都)

3) 第 83 日本薬理学会年会・シンポジウム講演 (2010 年 3 月 16 日・大阪)

4) International Bone and Mineral Society (IBMS), Davos Workshops, 招待講演 (2010 年 3 月 14 日・ダヴォス (スイス)) 5) 第 31 日本分子生物学会大会・ワークショップ講演 (2009 年 12 月 12 日・横浜)

6) 第 39 日本免疫学会大会・シンポジウム講演 (2009 年 12 月 3 日・大阪)

7) 第 82 回・日本生化学会大会・シンポジウム講演 (2009 年 10 月 23 日・神戸)

8) 6th Bone Biology Forum・招待講演 (2008 年 8 月 21 日・静岡県裾野市)

9) 第 27 回・日本骨代謝学会・シンポジウムおよび Meet-the-Expert 講演 (2009 年 7 月 24 日)

10) 免疫サマースクール 2009・招待講演 (2009 年 7 月 16 日・淡路)

11) 第 3 回・GCOE 国際シンポジウム・招待講演 (2009 年 6 月 11 日・東京医科歯科大学)

12) PLM2009 (国際学会)・シンポジウム講演 (2009 年 5 月 27 日・東京)

H.知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

<出願中(1件)>

名称：新規骨吸収抑制剤のスクリーニング方法

発明者：石井 優

権利者：国立大学法人大阪大学

種類：特許権

番号：特願 2009-260655

出願年月日：2009年11月16日

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
（分担）研究報告書

細胞遊走・ケモカインを標的とした生体イメージングと数理シミュレーションを駆使した
新しい関節リウマチ治療薬の開発

研究代表者 石井 優 大阪大学免疫学フロンティア研究センター特任准教授

研究要旨

近年、生物学的製剤が関節リウマチ(RA)の治療に革命的变化を齎したが、一方で次世代治療法開発のため、小分子化合物による RA 治療薬の開発が進められている。本研究では、特に免疫細胞の遊走およびそれを制御するケモカインに焦点を当て、小分子による新規 RA 治療薬の開発・臨床応用を目指している。特に最近、リンパ球遊走を制御する脂質メディエーターであるスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) を標的とした免疫抑制薬が注目を集めており、研究代表者は、米国での共同研究により S1P 作動薬である FTY720 が強力な骨吸収抑制作用を併せ持ち、自己免疫と骨破壊を主徴とする RA に対する治療薬として極めて有用であることを示した。本研究では、その他の S1P 作動薬の検索に加え、CXCL12, CCL3, CX₃CL1 など、RA 発症・病態形成に重要なケモカインを標的とした薬剤開発を行うため、従来の疾患モデルマウスを用いた解析に加え、生体内での複雑な細胞遊走制御を実体的に把握するため、「生体二光子励起顕微鏡イメージング」(実験動物を生かしたままで組織内での細胞の遊走・機能を観察する方法)の技術を駆使し、またこれらのデータを元に、薬効を in silico でシミュレーションすることが可能な「細胞遊走ネットワークの数理モデル」を作成する。本年度は、ケモカイン標的創薬についての基礎的実験を行った。

A.研究目的

研究代表者は最近、リンパ球などの免疫細胞の遊走を調節する脂質メディエーター(ケモカイン)である S1P を標的とした薬剤である FTY720 が、骨吸収に関与する破骨細胞の遊走・位置決めを制御することにより骨吸収をも抑制することを示し、本治療薬が、免疫異常と骨破壊を併存する RA の病態の治療に極めて有用であることを示した(Nature, 2009)。本研究の目的は、これら S1P 受容体作動薬を始めとして、脂質メディエーターやケモカインを標的とした新規の RA 治療薬の開発、およびその迅速かつ正確な薬効評価系の確立である。

B.研究方法

①S1P 受容体作動薬を用いた治療実験：卵巣摘出術+関節炎誘導マウス(OVX+CAIA)を

作成し、S1P 受容体作動薬による治療効果について検討した。この際、関節炎スコアに加え、骨塩量変化についても検討する。

②細胞遊走を標的とした新規薬効評価系の確立：研究代表者が独自に開発した、生体 2 光子励起イメージングシステムやケモタキシスの数理モデルによる、S1P やケモカインを標的とした候補物質の薬効評価系を確立する。

(倫理面への配慮)

実験マウスを用いた実験を行う本研究を遂行するにあたっては、「動物の愛護および管理に関する法律」「実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」「厚生労働省の所管する実験施設における動物実験等の実施に

関する基本指針」など、関連法規・指針に従った必要な措置を講じ、同センターでの実験動物利用指針に準拠し、動物愛護上の観点に十分配慮した環境で行う。

C. 研究結果

①OVX+CAIA モデルマウスに対し、S1P 受容体作動薬である FTY720 と、vehicle のみ、および FTY720 の対照薬として副腎皮質ステロイド (prednisolone; PSL) を投与した結果、FTY720 は、PSL とほぼ同等に CAIA による関節の炎症を抑制することができた一方、OVX による骨塩量低下をも抑制することができた。一方で、PSL は OVX による骨塩量低下を抑制できず、vehicle 投与群よりもさらに骨塩量を低下させることが分かった。

②平成 21 年度では、簡便に骨組織イメージングが可能な動物固定具および顕微鏡チェンバーを作成することに成功し、これを用いた薬効評価系がほぼ完成した。また、脂質メディエーターやケモカインによる細胞遊走・ケモタキシスを記述する予備的数理モデルの作成を完了した。

D.E. 考察と結論

S1P 受容体作動薬は、免疫抑制作用と骨吸収抑制作用を併せ持つ、RA 治療薬としては極めて有望な薬剤であることが示され、今後の S1P や他のケモカインを標的とした RA 治療薬開発の重要性が示された。またそれら新規薬剤の薬効評価としては、生体イメージングや in Silico シミュレーションが重要なツールとなるため、今後の開発が必要不可欠である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) **Ishii M**, Egen JG, Klauschen F, Meier-Schellersheim M, Saeki Y, Vacher J, Proia RL, Germain RN. (2009) Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature*, 458 (7237): 524-528.

2) Klauschen F, **Ishii M**, Qi H, Bajénoff M,

Egen JG, Germain RN, Meier-Schellersheim M. (2009) Quantifying cellular interaction dynamics in 3-D fluorescence microscopy data. *Nature Protoc.*, 4(9): 1305-1311.

3) Mazzucchelli R, Warming S, Lawrence SM, **Ishii M**, Abshari M, Feigenbaum L, Washington AV, Warner AC, Sims DJ, Li WQ, Hixon JA, Gray DHD, Rich BE, Morrow M, Anver MR, Cherry J, Naf D, Sternberg LR, McVicar DW, Farr AG, Germain RN, Rogers K, Copeland N, Durum SK. (2009) Visualization and identification of IL-7 producing cells in reporter mice. *PLoS One*, 4(11): e7637.

4) 石井 優, 「破骨細胞前駆細胞の遊走・局在制御～二光子励起顕微鏡を用いた骨免疫イメージングより～」, 「The Bone」23 巻 4 号, 427-432 (2009)

5) 石井 優, 「脂質メディエーターによる破骨細胞前駆細胞の遊走・位置決め制御～生体二光子励起顕微鏡を用いた骨組織の in vivo イメージングより～」, 「感染・炎症・免疫」39 巻 3 号, 210-217 (2009)

6) 石井 優, 「骨組織のライブイメージングにより明らかとなった破骨細胞の遊走と位置決め制御」, 「最新医学」64 巻 12 号, 2621-2626 (2009)

7) 石井 優, 「骨組織・骨髄内の 2 光子励起ライブイメージング」, 医学のあゆみ 232 巻 13 号, 1247-1252 (2010)

2. 学会発表

1) The 14th International Conferences on Endocrinology 2010 (ICE2010)・サテライトシンポジウム・招待講演 (2010 年 3 月 31 日・大阪)

2) The 14th International Conferences on Endocrinology 2010 (ICE2010)シンポジウム講演 (2010 年 3 月 26 日・京都)

3) 第 83 日本薬理学会年会・シンポジウム講演 (2010 年 3 月 16 日・大阪)

4) International Bone and Mineral Society (IBMS), Davos Workshops, 招待講演 (2010 年 3 月 14 日・ダヴォス (スイス))

- 5) 第 31 日本分子生物学会大会・ワークショップ講演 (2009 年 12 月 12 日・横浜)
- 6) 第 39 日本免疫学会大会・シンポジウム講演 (2009 年 12 月 3 日・大阪)
- 7) 第 82 回・日本生化学会大会・シンポジウム講演 (2009 年 10 月 23 日・神戸)
- 8) 6th Bone Biology Forum・招待講演 (2008 年 8 月 21 日・静岡県裾野市)
- 9) 第 27 回・日本骨代謝学会・シンポジウムおよび Meet-the-Expert 講演 (2009 年 7 月 24 日)
- 10) 免疫サマースクール 2009・招待講演 (2009 年 7 月 16 日・淡路)
- 11) 第 3 回・GCOE 国際シンポジウム・招待講演 (2009 年 6 月 11 日・東京医科歯科大学)
- 12) PLM2009 (国際学会)・シンポジウム講演 (2009 年 5 月 27 日・東京)

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

<出願中 (1 件) >

名称：新規骨吸収抑制剤のスクリーニング方法

発明者：石井 優

権利者：国立大学法人大阪大学

番号：特願 2009-260655

出願年月日：2009 年 11 月 16 日

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
（分担）研究報告書

細胞遊走・ケモカインを標的とした生体イメージングと数理シミュレーションを駆使した
新しい関節リウマチ治療薬の開発

研究分担者 佐伯 行彦 国立病院機構大阪南医療センター 臨床研究部長

研究要旨

ヒト関節リウマチ（RA）の発症および病態形成におけるケモカインの役割についてはほとんど明らかにされていない。一方で最近、脂質メディエーターであるスフィンゴシン1リン酸（S1P）を標的とした免疫抑制薬である FTY720 などケモカインを標的とした治療が、RA を始めとする自己免疫疾患に対して有効であることが示されてきている。本研究では、ヒト RA の病態生理における脂質メディエーターS1P やケモカインの意義を調べるため、実際の RA 患者より採取した血清・関節液および手術標本を用いた解析を行う。十分なインフォームドコンセントにより RA 患者より採取した血清・関節液および、滑膜切除術や人工関節置換術を施した患者手術検体を用いて、これらにおける S1P やケモカイン（CCL3, 4, CXCL12, CX3CL1 など）量の測定、および組織中での受容体発現（S1P1, S1P2, CCR1, CCR2, CXCR4, CX3CR1 など）の変化について検討する。

本年度はまず、臨床研究プロトコールの作成に従事した。次年度以降はこれらのデータを元に、RA に対する有効性が示された化合物について臨床応用に向けての準備を行う。なお、臨床研究に際しては、関連諸法令を順守し、当施設の倫理審査委員会の承認の下、研究参加者から文書によるインフォームド・コンセントを得た上で遂行する予定である。

A. 研究目的

ヒト関節リウマチ（RA）の発症および病態形成におけるケモカインの役割についてはほとんど明らかにされていない。一方で最近、FTY720 などケモカインを標的とした RA を始めとする自己免疫疾患に対する治療の有効性が示されてきている。本研究では、ヒト RA の病態生理における脂質メディエーターS1P やケモカインの意義を調べるため、実際の RA 患者より採取した血清・関節液および手術標本を用いた解析を行う。

B. 研究方法

ヒト関節リウマチにおける脂質メディエーターS1P および種々の炎症性ケモカインの果たす役割について検討するため、十分なインフォームドコンセントにより RA 患者より採取した血清・関節液および、滑膜切除術や人工関節置換術を施した患者手術検体を用いて、これらにおける S1P やケモカイン（CCL3, 4, CXCL12, CX3CL1 など）量の測定、および組織中での受容体発現（S1P1, S1P2, CCR1, CCR2, CXCR4, CX3CR1 など）の変化について検討する。

(倫理面への配慮)

臨床研究においては、厚生労働省告示「臨床研究に関する倫理指針」「疫学研究に関する倫理指針」に従い、当該施設の倫理審査委員会の承認の下、研究参加者から文書(同意説明文書作成済み)によるインフォームド・コンセントを得た上で、個人情報保護に十分留意した上で遂行する。また、研究不参加による不利益・研究参加による報酬等はない。特定の企業より薬剤供与および情報提供を受ける場合、当センターのCOI委員会(外部専門委員を含む)の指示の下、十分な配慮を行う。

C.研究結果

本研究初年度である平成21年度では、まず本研究を遂行するにあたっての臨床研究プロトコルの作成に従事した。これに基づき、数名の患者のエントリーがあり、一部予備的な解析結果があるものの、まだ十分な解析には至っていない。

D.E.考察と結論

S1Pやケモカインを標的とした新規のRA治療薬の臨床応用のためには、ヒトRAの病態形成におけるそれらの役割を詳細に検討する必要があり、本研究による、ヒトRAサンプルを用いた解析が極めて有用であると考えられる。

F.健康危険情報

特記すべきことなし

G.研究発表

1. 論文発表

1) Ishii M, Egen JG, Klauschen F, Meier-Schellersheim M, **Saeki Y**, Vacher J, Proia RL, Germain RN. (2009) Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature*, 458 (7237): 524-528.

2) Kudo-Tanaka E, Nakatsuka S, Hirano T, Kawai M, Katada Y, Matsushita M, Ohshima S, Ishii M, Miyatake K, Tanaka T, **Saeki Y**. (2009) A case of Mikulicz's disease with Th2-biased cytokine profile: possible feature discriminable from Sjögren's syndrome. *Mod. Rheumatol.* 19(6): 691-695.

2. 学会発表

1) European League Against Rheumatism (EULAR), 2009 Congress, 一般演題 (2009年6月10日・コペンハーゲン(デンマーク))

2) 日本リウマチ学会・学術集会, 国際ワークショップ, 一般口頭発表 (2009年4月25日)

H.知的財産権の出現・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。3. その他

該当なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
石井 優, 佐伯行彦、他	Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis.	Nature	458・7237	524-528	2009
石井 優、他	Quantifying cellular interaction dynamics in 3-D fluorescence microscopy data.	Nature Protoc.,	4・9	1305-1311	2009
石井 優、他	Visualization and identification of IL-7 producing cells in reporter mice.	PLoS One	4・11	e7637	2009
佐伯行彦、他	A case of Mikulicz's disease with Th2-biased cytokine profile: possible feature discriminable from Sjögren's syndrome.	Mod Rheumatol	19・6	691-695	2009
石井 優	破骨細胞前駆細胞の遊走・局在制御～ニ光子励起顕微鏡を用いた骨免疫イメージングより～	The Bone	23・4	427-432	2009
石井 優	脂質メディエーターによる破骨細胞前駆細胞の遊走・位置決め制御～生体ニ光子励起顕微鏡を用いた骨組織のin vivoイメージングより～	感染・炎症・免疫	39・3	210-217	2009
石井 優	骨組織のライブイメージングにより明らかとなった破骨細胞の遊走と位置決め制御	最新医学	64・12	2621-2626	2009
石井 優	骨組織・骨髄内の2光子励起ライブイメージング	医学のあゆみ	232・13	1247-1252	2010

LETTERS

Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis

Masaru Ishii^{1,4,5}, Jackson G. Egen¹, Frederick Klauschen², Martin Meier-Schellersheim², Yukihiko Saeki⁵, Jean Vacher⁶, Richard L. Proia³ & Ronald N. Germain^{1,2}

Osteoclasts are the only somatic cells with bone-resorbing capacity and, as such, they have a critical role not only in normal bone homeostasis (called 'bone remodelling') but also in the pathogenesis of bone destructive disorders such as rheumatoid arthritis and osteoporosis¹. A major focus of research in the field has been on gene regulation by osteoclastogenic cytokines such as receptor activator of NF- κ B-ligand (RANKL, also known as TNFSF11) and TNF- α , both of which have been well documented to contribute to osteoclast terminal differentiation^{2,3}. A crucial process that has been less well studied is the trafficking of osteoclast precursors to and from the bone surface, where they undergo cell fusion to form the fully differentiated multinucleated cells that mediate bone resorption. Here we report that sphingosine-1-phosphate (S1P), a lipid mediator enriched in blood^{4,5}, induces chemotaxis and regulates the migration of osteoclast precursors not only in culture but also *in vivo*, contributing to the dynamic control of bone mineral homeostasis. Cells with the properties of osteoclast precursors express functional S1P₁ receptors and exhibit positive chemotaxis along an S1P gradient *in vitro*. Intravital two-photon imaging of bone tissues showed that a potent S1P₁ agonist, SEW2871, stimulated motility of osteoclast precursor-containing monocytoid populations *in vivo*. Osteoclast/monocyte (CD11b, also known as ITGAM) lineage-specific conditional S1P₁ knockout mice showed osteoporotic changes due to increased osteoclast attachment to the bone surface. Furthermore, treatment with the S1P₁ agonist FTY720 relieved ovariectomy-induced osteoporosis in mice by reducing the number of mature osteoclasts attached to the bone surface. Together, these data provide evidence that S1P controls the migratory behaviour of osteoclast precursors, dynamically regulating bone mineral homeostasis, and identifies a critical control point in osteoclastogenesis that may have potential as a therapeutic target.

Because of its role in controlling cell migration in other tissues, we initially focused on S1P and the S1P family of receptors (previously known as EDG receptors) responsive to this lipid mediator. The murine monocyte cell line RAW264.7, and mouse bone-marrow-derived M-CSF (colony stimulating factor-1, also known as CSF1)-dependent monocytes (termed BM-MDM), which can both differentiate into osteoclast-like cells on exposure to RANKL and represent widely used *in vitro* models of osteoclast precursors, each express messenger RNAs encoding two receptors for S1P (S1P₁ and S1P₂, encoded by *S1PR1* and *S1PR2*, respectively). The expression of *S1PR1* mRNA decreased after RANKL stimulation (Fig. 1a, b), and this transcriptional repression was dependent on NF- κ B (blocked by BAY11-7085) but not on NF-AT (also known as NFATC1; blocked by cyclosporin A) (Fig. 1b), both of which have been recognized as

crucial transcriptional factors for osteoclastogenesis¹⁻³. S1P₁ protein expression, as detected by immunocytochemistry, was also reduced by RANKL stimulation (Fig. 1c). In accord with these *in vitro* findings, strong immunoreactivity for S1P₁ could be detected in mononuclear cells in native bone tissues (Fig. 1d, arrowheads), whereas weaker staining was seen in large cells lining bone trabeculae (Fig. 1d, asterisks) that are probably mature osteoclasts (mean fluorescence intensities: 49.1 ± 5.8 and 19.4 ± 2.0 in mononuclear cells and attached cells, respectively; $P = 0.0003$). Both RAW264.7 (Fig. 1f) and BM-MDM (data not shown) cells showed positive chemotactic responses to an S1P gradient *in vitro*, and these responses were greatly attenuated by pretreatment with RANKL (Fig. 1f). This latter finding is concordant with the RANKL-dependent reduction in *S1PR1* gene expression (Fig. 1a). S1P-directed chemotaxis was blocked by pertussis toxin (PTX)⁶ and NSC23766 (ref. 7) (Fig. 1f), and S1P induced an increase in the GTP-bound, active form of Rac (GTP-Rac) (Fig. 1e), suggesting that Rac and the adenylyl-cyclase-inhibiting G protein G α_i are involved in the S1P₁ chemotactic signalling pathway in these cells, consistent with previous reports^{8,9}. *In vitro* chemotaxis of RAW264.7 was also examined using a dynamic imaging approach, in which cells could be observed vigorously migrating towards S1P-containing medium (Fig. 1g and Supplementary Videos 1 and 2). We also detected S1P-induced upregulation of integrins expressed in monocytoid cells, suggesting that S1P-mediated alterations in cell adhesion could contribute to chemotaxis *in vivo* (Supplementary Fig. 1).

To investigate whether osteoclast precursor migration is affected by S1P gradients *in vivo*, we performed intravital two-photon imaging of calvaria bone tissues^{10,11} and examined the migratory behaviour of monocytoid cells containing osteoclast precursors resident in the marrow spaces. We used two strains of mice expressing enhanced green fluorescent protein (EGFP) in subsets of myeloid cells: CX₃CR1-EGFP knock-in (heterozygous) mice^{12,13} and CSF1R-EGFP transgenic mice¹⁴. In both strains, haematopoietic monocyte-lineage cell types predominantly expressed EGFP^{12,13} and we confirmed that tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-positive mature osteoclasts expressed EGFP in these animals (Supplementary Fig. 2), suggesting that EGFP⁺ cells contain osteoclast precursor monocytes. Nearly two-thirds of CX₃CR1-EGFP cells and half of CSF1R-EGFP cells express RANK (also known as TNFRSF11A), a receptor for RANKL (Supplementary Table 1), suggesting that there is a capacity for many of the fluorescent cells to differentiate into mature osteoclasts.

CX₃CR1-EGFP-positive cells present in bone marrow stromal locations or at the bone surface and not in the blood sinusoidal spaces were generally stationary under control conditions (Fig. 2a, upper panels

¹Lymphocyte Biology Section, Laboratory of Immunology, ²Program in Systems Immunology and Infectious Disease Modeling, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, and ³Genetics of Development and Disease Branch, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892-1892, USA. ⁴Laboratory of Biological Imaging, WPI-Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan. ⁵Department of Clinical Research, National Osaka Minami Medical Center, Osaka 586-8521, Japan. ⁶Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Quebec H2W 1R7, Canada.

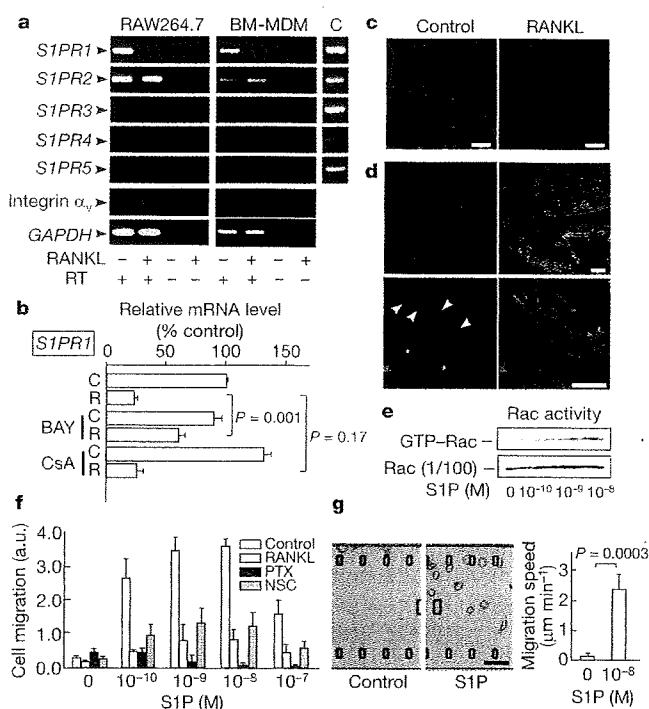


Figure 1 | Expression and function of S1P receptors in osteoclast precursor monocytes. **a**, Expression of mRNAs encoding 5 mammalian S1P receptors (S1P₁ to S1P₅, encoded by *S1PR1* to *S1PR5*) in RAW264.7 monocytes (left panels) and in mouse BM-MDM (middle panels), detected by RT-PCR. mRNAs for integrin α_v and *GAPDH* were also analysed as controls. Total complementary DNA isolated from mouse thymus was used for positive controls (C, right panels). RT, reverse transcription. **b**, qRT-PCR analysis of *S1PR1* mRNA expressed in RAW264.7 cells cultured in the absence (C) or presence (R) of RANKL. Cells were treated with BAY11-7085 (BAY; 10 μ M) or cyclosporine A (CsA; 1 μ M). Error bars represent s.e.m. **c**, Immunofluorescent detection of S1P₁ protein (green) in RAW264.7 cells cultured in the absence (left panel) or presence (right panel) of 50 ng ml⁻¹ RANKL. Nuclei were visualized with propidium iodide (red). **d**, Immunohistochemical analysis of S1P₁ in mouse femoral bone tissues at low (top) and high (bottom) magnification. Staining for S1P₁ (green; left two panels) and a merged image with staining for CD9 (red) and transmission (Nomarski image) (right two panels) are shown. Arrowheads represent S1P₁^{high} mononuclear cells adjacent to bone trabeculae (asterisk). Scale bars in **c** and **d**, 20 μ m. **e**, S1P-induced Rac stimulation. RAW264.7 cells were treated with various concentrations of S1P for 15 min and then analysed for GTP-Rac. **f**, *In vitro* chemotactic response of RAW264.7 to S1P gradient. Error bars represent s.e.m. ($n = 6$). **g**, *In vitro* S1P-directed chemotaxis of RAW264.7 dynamically visualized using EZ-Taxiscan. Cells were loaded onto the upper chamber and the lower chamber was filled either with normal medium (right panel; Supplementary Video 1) or with medium containing 10⁻⁸ M S1P (middle panel; Supplementary Video 2). Mean migration speed is shown in right panel. Error bars represent s.e.m. ($n = 8$). Scale bar represents 100 μ m.

and Supplementary Video 3). A subset of the labelled cells became motile shortly after the intravenous application of SEW2871 (refs 15 and 16; 5 mg kg⁻¹), a selective agonist for the S1P₁ receptor (Fig. 2a, lower panels, and Supplementary Video 4), with some of the mobilized cells entering the blood circulation (data not shown). A similar but less pronounced effect of SEW2871 on myeloid cell motility was observed in the bone marrow of CSF1R-EGFP transgenic mice (Supplementary Fig. 3 and Supplementary Videos 5 and 6). The difference in the fraction of cells mobilized by SEW2871 treatment in the two mouse strains is probably due to the fact that the EGFP-expressing subsets in these animals are not completely overlapping (Supplementary Table 1). Consistent with these findings, we also observed an increase in the percentage and absolute number of

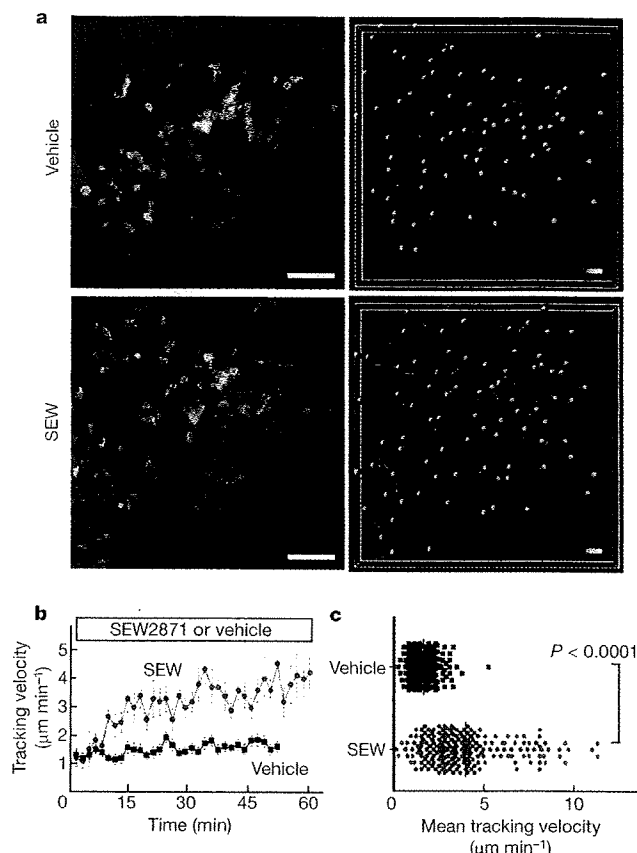


Figure 2 | *In vivo* S1P-mediated increase in motility of osteoclast precursor monocytes visualized using intravital two-photon imaging. **a**, Intravital two-photon imaging of mouse skull bone tissues of heterozygous CX₃CR1-EGFP knock-in mice, in the absence (top panels; Supplementary Video 3) or presence (bottom panels; Supplementary Video 4) of the S1P₁ agonist SEW2871 (SEW; 5 mg kg⁻¹). CX₃CR1-EGFP-positive cells appear green. The microvasculature was visualized by intravenous injection of 70 kDa dextran-conjugated Texas Red (red; left panels). The movements of CX₃CR1-EGFP positive cells were tracked for 10 min (right panels). Grey spheres represent cells and coloured lines show the associated trajectories. Scale bars represent 50 μ m. **b**, Quantification of CX₃CR1-EGFP-positive cell velocity. Tracking velocity over time after application of SEW2871 (red circle) or vehicle only (black square) are shown. Data points represent mean values \pm s.e.m. of cell velocities in the field at certain time points ($n = 15$ for vehicle and $n = 14$ for SEW2871). **c**, Summary of mean velocity of CX₃CR1-EGFP positive cells treated with SEW2871 (red circle) or vehicle (black circle). Data points ($n = 231$ for vehicle and $n = 210$ for SEW2871) represent individual cells compiled from five independent experiments.

monocytoid cells in peripheral blood, and their reciprocal decrease in bone marrow but not spleen or liver, after SEW2871 treatment as compared to vehicle controls (Supplementary Fig. 4 and Supplementary Table 2). These results suggest that bone-marrow-resident monocytes, including many osteoclast precursors, become motile and exit marrow spaces in response to S1P stimulation.

To evaluate the *in vivo* effect of S1P-directed chemotaxis of osteoclast precursors on bone homeostasis, we examined mice deficient in S1P₁. Because S1P₁ deficiency causes embryonic lethality¹⁷, we generated osteoclast/monocyte-specific S1P₁-deficient (*S1PR1*^{-/-}) mice by crossing animals bearing conditional S1P₁ knockout alleles (*S1PR1*^{loxP})¹⁸ to transgenic mice expressing Cre under the *CD11b* promoter¹⁹, which facilitates deletion of loxP-flanked sequences in monocyte-lineage myeloid cells including osteoclasts. *S1PR1* mRNA was essentially undetectable by conventional and real-time quantitative PCR with reverse transcription (qRT-PCR) analyses in CD11b⁺ myeloid cells purified from the *S1PR1*^{-/-} mice

(Supplementary Fig. 5a, b) and immunoreactivity for SIP_1 was greatly diminished in $SIPRI^{-/-}$ bone tissues (Supplementary Fig. 5c), indicating that there was almost complete ablation of SIP_1 expression in this lineage.

Morphohistometric analyses using micro-CT (μ CT) showed that femora of mice genotyped as $SIPRI^{loxP/loxP} CD11b-Cre (SIPRI^{-/-})$ were osteoporotic, compared with those of control ($SIPRI^{+/+} CD11b-Cre$) littermates (Fig. 3a, upper panels). Bone tissue density (bone volume/total volume) of $SIPRI^{-/-}$ mice was significantly lower than that of controls (Fig. 3b), and both trabecular thickness and trabecular density were decreased in $SIPRI^{-/-}$ bones (Fig. 3c). Mice genotyped as $SIPRI^{loxP/+} CD11b-Cre$ (heterozygous) were indistinguishable from controls, indicating that a single $SIPRI$ allele is sufficient to sustain normal SIP_1 -mediated functions.

Bone surface attachment of mature osteoclasts was evaluated by immunohistological examination. Both osteoclasts and bone matrices were visualized simultaneously by fluorescence-based staining for TRAP²⁰ and by collagen-derived second harmonic signals elicited by two-photon excitation²¹, respectively (Supplementary Fig. 6). Images were automatically segmented off-line using a custom software package (F.K., submitted manuscript). An 'osteoclast attachment ratio' (bone surface occupied by osteoclasts/total bone surface) was calculated automatically without manual intervention (Fig. 3a, lower panels and Supplementary Fig. 6). The computational analyses showed that osteoclast attachment to the bone surface was significantly enhanced in $SIPRI^{-/-}$ animals, as compared to controls (Fig. 3d), consistent with the decrease in bone density in $SIPRI^{-/-}$ mice (Fig. 3b, c). Because SIP has no measurable effect on *in vitro* osteoclast differentiation stimulated by RANKL (Supplementary Fig. 7), a reasonable interpretation of these data are that the loss of SIP_1 function alters the chemotactic behaviour of osteoclast precursors rather than their terminal maturation to osteoclasts or the bone-resorbing action of osteoclasts.

Because the concentration of SIP in blood is higher than in tissues, SIP -mediated chemotaxis of osteoclast precursors would thus be

expected to contribute to their recirculation from bone tissues to systemic blood flow, limiting formation of mature osteoclasts and reducing bone destruction. The present result showing the increased deposition of $SIPRI^{-/-}$ osteoclasts on the bone surface strongly supports the concept of SIP -driven precursor recirculation. It has already been reported that osteoclast precursor monocytes (RAW264.7) show positive chemotaxis *in vitro* towards CXCL12 (also known as SDF-1), a chemokine secreted from bone marrow stromal cells²², leading to a straightforward competitive model for the migration and positioning of osteoclasts (Supplementary Fig. 8). Monocyte-lineage osteoclast precursors come close to the bone surface attracted by CXCL12, however not all of the recruited cells undergo differentiation, and some of the precursors recirculate into the blood flow owing to attraction by SIP . Some osteoclast precursors may be directly derived within bone marrow spaces (Supplementary Fig. 8, dashed arrow), and they are also susceptible to SIP -driven 'circulation' into the systemic flow. During osteoclast differentiation induced by RANKL, the expression of SIP_1 is repressed (Fig. 1a) which ensures stable localization of the maturing cells on the bone surface. Regulation of osteoclast generation by competing chemokine pathways that attract precursors to and from the bone surface allows finely-tuned dynamic control of osteoclastogenesis during health and in various conditions such as inflammation and metabolic disorders. Bone surface CXCL12 expression has recently been shown to be regulated by sympathetic neuron stimulation²⁵, suggesting that there is an interesting interaction between circulating SIP and the autonomic nervous system for the regulation of osteoclast precursor mobilization.

This newly revealed role of SIP -directed recirculation of osteoclast precursor in bone homeostasis prompted us to examine possible therapeutic implications of this regulatory pathway. FTY720 (Fingolimod) is metabolized after administration to an agonist for four of the five SIP receptors, including SIP_1 (but not SIP_2), and has emerged as a clinically promising immunosuppressive drug^{24,25} that presumably acts by limiting effector lymphocyte egress from lymph nodes. FTY720 is at present being tested clinically in multiple sclerosis and allogeneic transplantation^{26,27}, but has not been examined for its effect on bone homeostasis. Here we show that FTY720 has a capacity to ameliorate bone loss in a model of postmenopausal osteoporosis.

Either ovariectomized or sham-operated mice were administered FTY720 ($3 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$) for 4 weeks after which excised femora were analysed by μ CT (Fig. 4a, b). FTY720 treatment significantly prevented bone density loss after ovariectomy, but had no effects under control (sham-operated) conditions. Computational morphometrical analyses showed that osteoclast attachment was increased after ovariectomy and partially restored to normal levels by FTY720 administration. We confirmed that FTY720 had no effect on oestrogen levels after ovariectomy (Supplementary Table 3). These results indicate that FTY720 relieves ovariectomy-induced bone loss by reducing osteoclast deposition onto bone surfaces. This effect correlated with an increase in circulating $CX_3CR1-EGFP^+ F4/80^+$ (Fig. 4c) and $CD11b^+$ monocytes (Supplementary Fig. 9), both of which populations include osteoclast precursors, and a concomitant decrease in monocytoid cells including osteoclast precursors in the bone marrow (Supplementary Fig. 9 and Supplementary Table 2). In addition, intravital two-photon imaging showed that FTY720 significantly stimulated motility of $CX_3CR1-EGFP^+$ monocyte-lineage cells (Fig. 4d and Supplementary Video 7). The short-term mobility change seen using FTY720 (as observed by intravital microscopy) was less prominent than that obtained with SEW2871 (Fig. 2). This difference may arise because SEW2871 is active after intravenous injection, whereas FTY720 needs to be metabolized (phosphorylated) before becoming functional (Supplementary Fig. 10). We cannot rule out, however, the possibility that phospho-FTY720 can activate SIP receptors other than SIP_1 that are expressed on other cell types, such as endothelial cells. FTY720 was shown to have no effects on the expression of RANKL or osteoprotegerin (data not shown). Taken together, these results

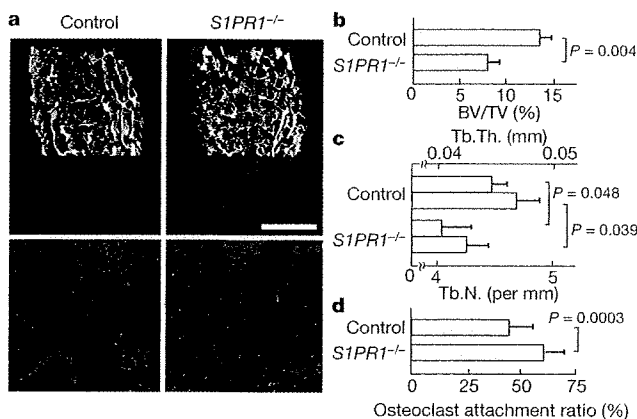


Figure 3 | *In vivo* effect of SIP_1 on bone mineral metabolism.

a, Morphohistometric analyses of control and $SIPRI^{-/-}$ ($SIPRI^{loxP/loxP} CD11b-Cre$) littermates. Femoral bone samples were analysed by cone-beam μ CT (top panels) and by histological examination combined with computational quantification for measuring the osteoclast attachment ratio to the bone surface (bottom panels; see also Supplementary Fig. 6 and Supplementary Information). Blue areas represent bone trabeculae (second harmonic fluorescence signal), red and green areas show TRAP-positive osteoclasts that are attached to or detached from bone trabeculae, respectively, and white areas show the area of osteoclast/bone attachment. Scale bar represents 1 mm. **b-d**, Summary of the data of (b) bone matrix density (bone volume/total volume, BV/TV), (c) trabecular thickness (Tb.Th; filled bars) and trabecular density (Tb.N; open bars) calculated from μ CT images, and (d) osteoclast attachment ratio calculated by computational segmentation analyses. Error bars represent s.e.m., $n = 3$ (b, c) and $n = 40$ (from 3 mice) (d) for each.

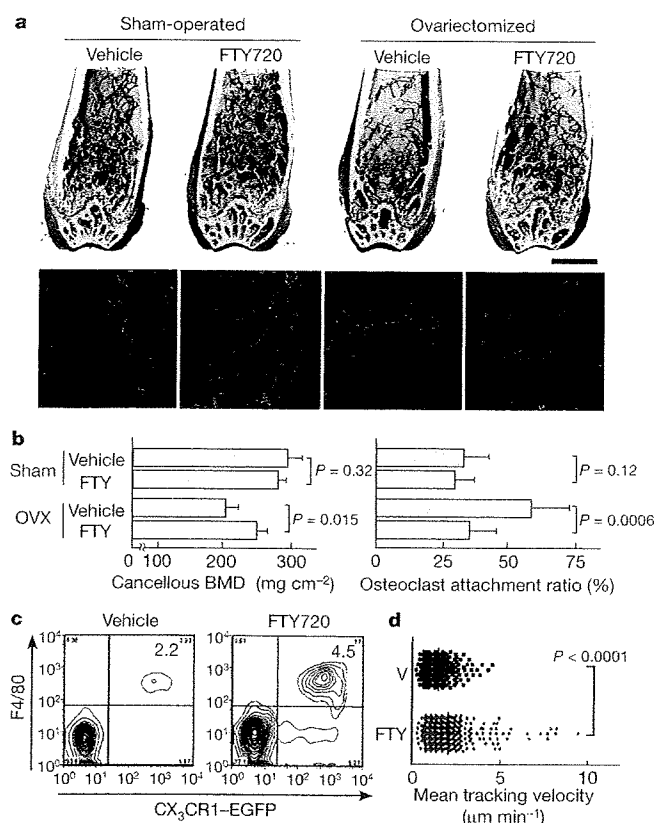


Figure 4 | Preventive effect of FTY720 on ovariectomy-induced osteoporosis. **a**, Effect of FTY720 on bone mineral metabolism. Femurs were collected from mice after four different treatments: sham-operated and vehicle treated, sham-operated and FTY720 treated, ovariectomized and vehicle treated, and ovariectomized and FTY720 treated. Bone samples were analysed by cone-beam μ CT (top panels) and by histological examination combined with computational quantification for measuring the osteoclast attachment ratio to the bone surface (bottom panels; see Supplementary Fig. 5). Scale bar represents 1 mm. **b**, Summary of the data of cancellous bone mineral density calculated from μ CT images (left panel) and of osteoclast attachment ratio (right panel). Error bars represent s.e.m., $n = 3$ (left panel) and $n = 20$ (from 3 mice; right panel) for each. **c**, Effect of FTY720 on the composition of PMCs. PMCs collected from CX₃CR1-EGFP knock-in mice administered vehicle or FTY720 were stained with anti-F4/80 (Alexa647). Absolute numbers of CX₃CR1-EGFP⁺ F4/80⁺ cells (per 10⁵ ml of peripheral blood) are described in the panels. **d**, Effect of FTY720 on the mobility of CX₃CR1-EGFP marked cells. Summary of mean tracking velocity of CX₃CR1-EGFP-positive cells treated with FTY720 (FTY, red circles) or vehicle (V, black circles). Data points ($n = 246$ for vehicle and $n = 339$ for FTY720) represent individual cells compiled from four independent experiments. Intravital two-photon images of mouse skull bone tissues of heterozygous CX₃CR1-EGFP knock-in mice treated with FTY720 are shown in Supplementary Video 7.

indicate that FTY720, a potent S1P₁ agonist, promotes the recirculation of osteoclast precursor monocytes from bone surface, an effect that counteracts ovariectomy-induced augmentation of osteoclastogenesis. This agonist effect of FTY720 on myeloid cells directly accessible to the blood circulation differs from the consequence of lymphocyte S1P₁ engagement by phosphorylated FTY720 within secondary lymphoid tissues, in which case downmodulation of the receptor results in functional antagonism of this pathway.

The present study provides evidence that S1P, as a circulation-attraction molecule, controls the migratory behaviour of osteoclast precursors, dynamically regulating bone mineral homeostasis in collaboration with bone-attraction molecules, such as CXCL12, and identifies a critical control point in osteoclastogenesis that has potential as a therapeutic target.

METHODS SUMMARY

The RAW264.7 cell line and mouse BM-MDM cells, which contains osteoclast precursor cells, were cultured and stimulated to differentiate using RANKL as previously described^{28,29}. *In vitro* chemotactic activity was evaluated using a modified Boyden's chamber³⁰ or with a visually-accessible chemotactic chamber, EZ-Taxiscan. *In vivo* S1P-directed chemotaxis of osteoclast precursor monocytes was visualized by intravital two-photon microscopy of mouse calvaria bone tissues of heterozygous CX₃CR1-EGFP knock-in mice¹² and of CSF1R-EGFP transgenic¹³ mice, according to a protocol modified from a previous report^{10,11}. The generation of the loxP-flanked S1P1 allele (S1P1^{loxP})¹⁸ and osteoclast/monocyte lineage-specific CD11b-Cre transgenic mice¹⁹ have been described previously. Histomorphometry of femurs from osteoclast/monocyte-lineage specific S1P₁ conditional knockout (S1P1^{-/-}) mice, as well as mice ovariectomized/sham-operated and treated with FTY720 or vehicle, were performed using μ CT. Assessment of osteoclast attachment to the bone surface was performed using a newly developed fully automated segmentation approach to analyse two-photon images of bone tissue sections in which osteoclasts and bone trabeculae were visualized with fluorescent TRAP staining³⁰ and second harmonic generation from collagen fibres²¹, respectively. To examine the composition of peripheral blood mononuclear cells (PMCs), the cells were stained with fluorophore-conjugated anti-F4/80, anti-CD11b and anti-CD3 using conventional methods. Flow cytometric data were collected on a FACSCalibur and analysed with FlowJo software. All mice were bred and maintained under specific pathogen-free conditions at the animal facility of the National Institutes of Health (NIH), according to NIH institutional guidelines under an approved protocol. For statistical analyses, the Mann-Whitney rank sum test was used to calculate *P* values for highly skewed distributions. For Gaussian-like distributions, two-tailed *t*-tests were used.

Full Methods and any associated references are available in the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Received 3 September; accepted 9 December 2008.

Published online 8 February 2009.

- Teitelbaum, S. L. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289, 1504–1508 (2000).
- Teitelbaum, S. L. & Ross, F. P. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nature Rev. Genet.* 4, 638–649 (2003).
- Karsenty, G. & Wagner, E. F. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev. Cell* 2, 389–406 (2002).
- Rosen, H. & Goetzl, E. J. Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nature Rev. Immunol.* 5, 560–570 (2005).
- Cyster, J. G. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 127–159 (2005).
- Bokoch, G. M., Katada, T., Northrup, J. K., Ui, M. & Gilman, A. G. Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 259, 3560–3567 (1984).
- Akbar, H., Cancelas, J., Williams, D. A., Zheng, J. & Zheng, Y. Rational design and applications of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Methods Enzymol.* 406, 554–565 (2006).
- Spiegel, S., English, D. & Milstien, S. Sphingosine 1-phosphate signaling: providing cells with a sense of direction. *Trends Cell Biol.* 12, 236–242 (2002).
- Takuwa, Y. Subtype-specific differential regulation of Rho family G proteins and cell migration by the Edg family sphingosine-1-phosphate receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1582, 112–120 (2002).
- Mazo, I. B. *et al.* Hematopoietic progenitor cell rolling in bone marrow microvessels: parallel contributions by endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule 1. *J. Exp. Med.* 188, 465–474 (1998).
- Mazo, I. B. *et al.* Bone marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8⁺ T cells. *Immunity* 22, 259–270 (2005).
- Jung, S. *et al.* Analysis of fractalkine receptor CX₃CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4106–4114 (2000).
- Niess, J. H. *et al.* CX₃CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307, 254–258 (2005).
- Burnett, S. H. *et al.* Conditional macrophage ablation in transgenic mice expressing a Fas-based suicide gene. *J. Leukoc. Biol.* 75, 612–623 (2004).
- Sanna, M. G. *et al.* Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor subtypes S1P₁ and S1P₃, respectively, regulate lymphocyte recirculation and heart rate. *J. Biol. Chem.* 279, 13839–13848 (2004).
- Wei, S. H. *et al.* Sphingosine 1-phosphate type 1 receptor agonism inhibits transendothelial migration of medullary T cells to lymphatic sinuses. *Nature Immunol.* 6, 1228–1235 (2005).
- Liu, Y. *et al.* Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J. Clin. Invest.* 106, 951–961 (2000).
- Allende, M. L. *et al.* G-protein-coupled receptor S1P₁ acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood* 102, 3665–3667 (2003).
- Ferron, M. & Vacher, J. Targeted expression of Cre recombinase in macrophages and osteoclasts in transgenic mice. *Genesis* 41, 138–145 (2005).

20. Filgueira, L. Fluorescence-based staining for tartrate-resistant acidic phosphatase (TRAP) in osteoclasts combined with other fluorescent dyes and protocols. *J. Histochem. Cytochem.* **52**, 411–414 (2004).
21. Stoller, P., Reiser, K. M., Celliers, P. M. & Rubenchik, A. M. Polarization-modulated second harmonic generation in collagen. *Biophys. J.* **82**, 3330–3342 (2002).
22. Yu, X., Huang, Y., Collin-Osdoby, P. & Osdoby, P. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) recruits osteoclast precursors by inducing chemotaxis, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, and collagen transmigration. *J. Bone Miner. Res.* **18**, 1404–1418 (2003).
23. Katayama, Y. *et al.* Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* **124**, 407–421 (2006).
24. Matloubian, M. *et al.* Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* **427**, 355–360 (2004).
25. Cyster, J. G. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 127–159 (2005).
26. Kappos, L. *et al.* Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **355**, 1124–1140 (2006).
27. Tedesco-Silva, H. *et al.* FTY720 versus mycophenolate mofetil in de novo renal transplantation: six-month results of a double-blind study. *Transplantation* **84**, 885–892 (2007).
28. Kobayashi, K. *et al.* Tumor necrosis factor α stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J. Exp. Med.* **191**, 275–286 (2000).
29. Ishii, M. *et al.* RANKL-induced expression of tetraspanin CD9 in lipid raft membrane microdomain is essential for cell fusion during osteoclastogenesis. *J. Bone Miner. Res.* **21**, 965–976 (2006).
30. Okamoto, H. *et al.* Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 9247–9261 (2000).

Supplementary Information is linked to the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Acknowledgements We thank U. H. von Andrian and I. B. Mazo for their help with the technique of intravital skull bone imaging. We also thank Y. Takuwa and N. Sugimoto for discussions, and P. M. Murphy and S. Venkatesan for their help in imaging *in vitro* chemotaxis using the EZ-Taxiscan. This work was supported in part by the Intramural Research Program of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH, US Department of Health and Human Services, and by a fellowship grant to M.I. from the International Human Frontier Science Program.

Author Contributions M.I. performed most of experiments, with the assistance of J.G.E. and Y.S. for two-photon microscopy and for the *in vitro* osteoclast culture system, respectively. F.K. developed the unsupervised segmentation software and performed the computational analyses used to quantify the osteoclast-bone surface interface, with the assistance of M.M.-S. J.V. and R.L.P. generated *CD11b-Cre* transgenic and *S1PR1^{loxP}* knock-in mice, respectively. R.N.G. helped M.I. in designing and interpreting experiments, as well as in writing the paper.

Author Information Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. Correspondence and requests for materials should be addressed to R.N.G. (rgermain@niaid.nih.gov).

METHODS

Cell culture. The RAW264.7 cell line and mouse BM-MDM cells, which contain osteoclast precursor cells, were cultured as previously described^{28,29}. To stimulate osteoclastogenesis, 50 ng ml⁻¹ RANKL (PeproTech) was added to the medium and the cells were incubated for 3 to 4 days.

Conventional and quantitative RT-PCR amplification. Conventional RT-PCR was performed as described previously²⁹. Primers used are listed in Supplementary Table 4. Relative quantification with real-time RT-PCR was performed using an ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems Inc.) with an Assay-on-Demand TaqMan probe and relevant primers, according to the manufacturer's instructions.

Determination of Rac activity. Pulldown assay methods to determine the GTP-bound active form of Rac have been described in detail previously³⁰.

In vitro chemotaxis chamber assay. Chemotactic migration of cells was measured in a modified Boyden chamber as described previously²⁷.

EZ-Taxiscan chemotaxis assay. Chemotaxis experiments were also conducted in an EZ-Taxiscan chamber according to the manufacturer's protocol (Effector Cell Institute). The EZ-Taxiscan is a visually-accessible chemotactic chamber, in which one compartment containing ligand (S1P) and another compartment containing cells are connected by a microchannel. Phase contrast images of migrating cells were acquired at 1 min intervals.

Mice. C57BL/6 mice, CX₃CR1-EGFP knock-in mice¹², CSF1R (M-CSF receptor)-EGFP transgenic mice¹¹, were obtained from The Jackson Laboratory. The generation of the loxP-flanked *S1PR1* allele (*S1PR1*^{loxP/loxP})¹⁸ and osteoclast/monocyte lineage-specific *CD11b-Cre* transgenic mice¹⁹ were described previously. *S1PR1*^{+/loxP} × *CD11b-Cre* and *S1PR1*^{loxP/loxP} × *CD11b-Cre* littermates were born at expected frequencies and were viable and fertile, but live *S1PR1*^{loxP/loxP} × *CD11b-Cre* littermates were obtained rarely (three viable *S1PR1*^{loxP/loxP} × *CD11b-Cre* out of 59 total mice), suggesting possible embryonic lethality as seen with global S1P₁ deficiency. All mice were bred and maintained under specific pathogen-free conditions at animal facilities of NIH. Mutant mice were genotyped by PCR^{18,19}. All mice were housed and handled according to NIH institutional guidelines under an approved protocol.

Immunohistochemistry. Immunohistological analyses were performed as described previously². Anti-mouse S1P₁ rabbit polyclonal antibody was purchased from Affinity Bioreagents. In some experiments, fluorescence-based staining for TRAP²⁰ with ELF 97 substrate (Molecular Probes) was used with some modifications.

Two-photon intravital bone tissue imaging. Intravital microscopy of mouse calvaria bone tissues was performed using a protocol modified from a previous report^{10,11}. Mice were anaesthetized with isoflurane (Baxter, 2.5% vaporized in an 80:20 mixture of oxygen and air), and the hair in the neck and scalp was removed with hair removal lotion (Nair). The frontoparietal skull was exposed and the mouse head was immobilized in a custom-made stereotactic holder. A catheter was placed into the tail vein with a 30-gauge needle attached to PE-10 tubing (Becton Dickinson). The imaging system was composed of an LSM510 NLO multiphoton microscope (Carl Zeiss) driven by a Chameleon XR

Ti:Sapphire laser (Coherent) tuned to 880 nm, and an inverted microscope (Axiovert 200; Carl Zeiss) equipped with a ×40 water immersion objective (Achromplan IR, NA 0.8; Carl Zeiss). Fluorescent cells were detected through a bandpass emission filter at 525/50 nm (for EGFP). Vessels were visualized by injecting 70 kDa Texas Red conjugated-dextran (detected using a 620/60 nm filter) intravenously immediately before imaging. Image stacks were collected at 3-μm vertical step size at a depth of 100–150 μm below the skull bone surface. For three-dimensional videos, four sequential image stacks were acquired at 3 μm z spacing to cover a volume of 154 × 154 × 9.0 μm. The time resolution was 1 min. Raw imaging data were processed with Imaris (Bitplane) with a Gaussian filter for noise reduction.

Ovariectomy and FTY720 treatment. Twelve 12-week-old female, ovariectomized or sham-operated, C57BL/6J mice were purchased from Charles River Laboratories. Mice were injected intraperitoneally either with FTY720 (3 mg kg⁻¹, Cayman Chemical) dissolved in a vehicle (PBS containing 5% acidified DMSO and 30% fatty acid-free BSA) or with vehicle only, daily for 4 weeks. The mice were then killed and femurs were excised and fixed. Uteri of all the animals were excised and were weighed to evaluate the effect of ovariectomy.

Bone histomorphometry. Trabecular bone morphometry within the metaphyseal region of distal femur was quantified using micro-CT (μCT40, Scanco Medical AG). Volumetric regions for trabecular analysis were selected within the endosteal borders to include the central 80% of vertebral height and secondary spongiosa of femoral metaphyses located ~6% of the total length from the growth plate. Trabecular morphometry was characterized by measuring the bone volume fraction (bone volume/total volume), trabecular thickness and trabecular number. To assess the attachment of osteoclasts to the bone surface, osteoclasts and bone trabeculae were fluorescently visualized in sections by two-photon microscopy. To identify osteoclasts, fluorescence based TRAP staining²⁰ was performed. Collagen-enriched bone matrices could be visualized using the second harmonic emission from collagen fibres excited by infrared lasers. Sections were examined using a two-photon laser microscope (laser was tuned to 780 nm). Fluorescence was detected through bandpass emission filters at 370–450 nm (for second harmonic emission from bone matrices) or 525/50 nm (for TRAP staining). Image analysis was performed using a fully automated segmentation approach (no manual tracing of cell/tissue boundaries or other user intervention required) and the 'osteoclast attachment ratio' was calculated as the ratio 'bone surface attached by osteoclasts/total bone surface' (F.K., submitted manuscript).

Flow cytometry. All reagents were purchased from BD PharMingen. To examine the composition of PMCs, blood was collected from the retro-orbital plexus with a heparinized glass pipette, from mice treated intraperitoneally 4 h previously with FTY720 (3 mg kg⁻¹) or vehicle (Fig. 4), or treated intravenously 1 h previously with SEW2871 (5 mg kg⁻¹) or vehicle (Supplementary Fig. 4). After removing the red blood cells using ACK lysis buffer (Invitrogen), cells were stained with Alexa647-conjugated anti-F4/80 (Fig. 4), or FITC-conjugated anti-CD11b and PE-Cy7-conjugated anti-CD3 (Supplementary Figs 4 and 9), using conventional methods. Flow cytometric data were collected on a FACSCalibur (Becton Dickinson) and analysed with FlowJo software (TreeStar).