

201023049A

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て
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22年度 総括・分担研究報告書

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 教授)

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 石井 優

平成23(2011)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
(資料) 資料名

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 ---- 7
石井 優
(資料) 資料名
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 ---- 10
佐伯 行彦
(資料) 資料名

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 12

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----

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、FTYのようなS1PR1アゴニストのみならず、S1PR2アンタゴニストなどのその他のS1P作動薬など、RA発症・病態形成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。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は、健常人および患者より採取したヒト破骨前駆細胞を用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。

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。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作動薬が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（OVX）や、さらにこれに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、S1P受容体作動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。また平成21年度の研究成果で新たに有望な創薬標的としてS1Pのタイプ2受容体（S1PR2）に対する阻害剤を発見したので、平成22年度以降はこの薬効評価についても詳細な検討を行った。

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：脂質メディエーター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、骨組織での骨吸収をリアルタイムで可視化する生体2光子励起観察するシステムの開発を行う。

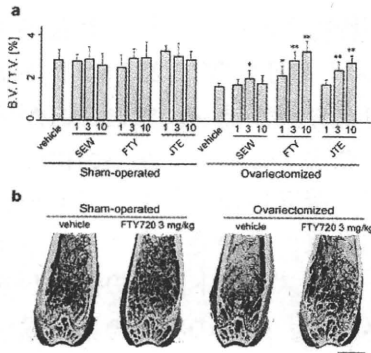
③薬効評価のための数理シミュレーターの作成：脂質メディエーターS1Pを標的とした新規RA治療薬候補化合物を、まずin Silicoで迅速にスクリーニングするシステムを構築するため、これまで生体イメージングやin vitroでの細胞遊走アッセイにて得られた数値データを元に、簡便な数理シミュレーターを開発する。

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などを標的とした創薬にむけての効果検討のため、健康人およびRA患者より採取した末梢血単球系細胞より破骨細胞・前駆細胞などを分化させ、上記でスクリーニングを行った薬剤の効果について検討を行う。

C. 研究結果

①疾患マウスモデルを用いた治療実験：まず、卵巣摘出骨粗鬆症モデルマウスにおいて、卵巣摘出と同時にSEW2871またはFTY720を投与し、4週間後に骨組織を解析したものは、SEW2871に関しては1 mg/kg, 3 mg/kg, 10 mg/kg投与群のいずれにおいても、明らかな治療効果は見られなかったが、FTY720投与群では1 mg/kgでは効果は十分でないものの、

3 mg/kg, 10 mg/kg 投与群では有意な骨吸収抑制効果が認められた(下図)。一方 3 mg/kg と 10 mg/kg 投与群では効果に有意な差は認めなかった。



さらに、本研究の平成 21 年度に、破骨細胞前駆細胞には S1P に対して遊走を起こす S1P1 受容体に加えて、これを抑制する S1P2 受容体が同時に発現していることを発見していたが、本研究ではこの負の受容体である S1P2 を抑制して、結果として S1P1 作用を強化することにより、骨吸収が抑制できないかについても解析した。現在、S1P2 受容体のアンタゴニストとして JTE013 が存在するが、本研究ではこれを卵巣摘出モデルマウスに投与する実験を行った。卵巣摘出骨粗鬆症モデルマウスにおいて、卵巣摘出と同時に JTE013 を投与し、4 週間後に骨組織を解析した。この結果、JTE013 投与群では 3 mg/kg, 10 mg/kg で有意な骨吸収抑制効果が認められた (Ishii et al., J Exp Med, 2010)。

また、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。

(Kikuta et al., Rheumatol. Int, 2010)。

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：本研究者は特殊なイメージング装置 (多光子励起顕微鏡) を用いてマウスの骨組織を生きたまま観察する実験系を最近世界に先駆けて立ち上げたが、この系を用いて、破骨前駆細胞に対する S1P1 アゴニストおよび S1P2 アンタゴニストに対する効果についても検討した。その結果、S1P1 アゴニスト SEW2871 および FTY720 の双方とも、破骨前駆細胞を含む単球系細胞の動きを大きく調節し、また S1P2 アンタゴニスト JTE013 も、S1P1 アゴニストよりは弱い、有意に動きを変化させる効果があることが示された。

さらにはこの可視化システムを元にして、平成 21 年度に開発した骨組織イメージングチェンバーをさらに改良して、簡便かつ定量性が高く安定したイメージング測定系の技術開発を行った。

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作成のため、破骨細胞遊走の基本的数理モデルを確立した。

④ヒト関節リウマチ治療への応用のための臨床研究：健康人ボランティア 3 名より、1 回 20ml の採血を 3 回に渡って行い、それぞれを① Sephadex G10 カラム ②CD14+ MACS beads ③CD11b+ MACS beads を用いて、ヒト末梢血単球細胞を分離した。これに human recombinant M-CSF (50 ng/ml) + human recombinant RANKL (100 ng/ml) を添加して 4 ~ 6 日間培養し、TRAP 染色を行い、多核化した成熟破骨細胞の数を定量した。その結果、①②ではほとんど破骨細胞分化が見られなかったが、③では少ないながらも TRAP 陽性細胞を観察することができた。上記より、ヒト末梢血細胞中では CD11b+ 分画に、破骨細胞前駆細胞が最も多く含まれていることが明らかになった。

次に、この細胞集団を用いて、新規骨吸収抑制剤として注目している S1P1 アゴニスト SEW2871 および FTY720 の代謝活性型の

FTY720-P、および S1P2 アンタゴニスト JTE013 について、その細胞遊走刺激効果について検討した。この結果、FTY720-P や JTE013 ではヒト CD11b+単球細胞においても効果が見られたが、SEW2871 については明らかな効果が得られなかった。これらより、ヒトの骨粗鬆症に対する新規薬剤候補としては、SEW2871 については適当ではない可能性が示唆された。

D. 考察

①疾患マウスモデルを用いた治療実験：S1P1 受容体作動薬である FTY720 に加え、S1P2 受容体阻害薬は、極めて強力な骨吸収抑制作用を持つ、RA を含めた骨吸収抑制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、さらに細胞遊走の位置・形態情報、薬物動態などをモデルに加えていく必要がある。

④ヒト関節リウマチ治療への応用のための臨床研究：平成 22 年度には、臨床検体の採取および条件検討について十分な結果を得た。この成果を元に、平成 23 年度には本格的な臨床研究の展開を目指す。

E. 結論

本研究では骨粗鬆症モデル動物を用いた実験により、S1P1 受容体アゴニストおよび S1P2 受容体アンタゴニストが骨吸収抑制に極めて有用であることが示された。特に、S1P2 は、S1P1 とは異なり発現が単球系細胞（破骨細胞）に比較的特異的であるため、副作用が少ない優れた薬剤として開発できる可能性がある。本研究代表者は国内の製薬メーカーと本研究成果

について打ち合わせをしており、今後 S1P2 アンタゴニストを主たる薬効とする新規骨粗鬆症治療薬の開発を行っていく計画としている。

一方で、健常コントロールから分離したヒト末梢破骨前駆細胞を用いた in vitro 評価系より、S1P1 アゴニストのうち SEW2871 はヒト細胞については十分な効果が見られないことが分かった。これは、このアゴニストが強力に受容体と結合するため、受容体がエンドサイトーシスされて脱活性化を受けていると考えられるが、この効果には、マウスとヒト間での差異がある可能性が示唆された。今後の実際の薬剤候補のスクリーニングの際には、マウスモデルだけではなく、可能な範囲でのヒト細胞を用いたアッセイを行い、候補薬剤のヒトでの薬効を検証する必要があると考えられる。

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, Kikuta J, Shimazu Y, Meier-Schellersheim M, Germain RN. (2010) Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling *in vivo*. *J. Exp. Med.*, 207: 2793 - 2798.

2) Kikuta J, Iwai K, Saeki Y, Ishii M. (2010) S1P-targeted therapy for elderly rheumatoid arthritis patients with osteoporosis. *Rheumatol. Int.* published online.

3) Murakami S, Suzuki S, Ishii M, Inanobe A, Kurachi Y. (2010) Experiments and simulation to develop a physiological model of G-protein control of muscarinic K⁺ channels in mammalian atrial cells. *Philos. Transact. A Math. Phys. Eng. Sci.*, 368: 2983-3000.

4) Ikushima M, Ishii M, Ohishi M, Yamamoto Y, Ogihara T, Rakugi H, Kurachi Y. (2010) Angiotensin II inhibits insulin-mediated production of PI-3,4,5-trisphosphates via a

a Ca^{2+} -dependent but PKC-independent pathway in the cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 299: H680-H689.

5) Ishii T, Kikuta J, Kubo A, Ishii M. (2010) Control of osteoclast precursor migration: A novel point of control for osteoclastogenesis and bone homeostasis. *IBMS BoneKey*, 7: 279-286.

6) Ishii T, Ishii M. (2010) Intravital two-photon imaging: A versatile tool for dissecting the immune system. *Ann. Rheum. Dis.*, 70 (Suppl 1): i113-115.

7) Ishii T, Shimazu Y, Nishiyama I, Kikuta J, Ishii M. (2011) The role of sphingosine 1-phosphate in migration of osteoclast precursors; an application of intravital two-photon microscopy. *Mol. Cells*, in press.

8) 石井 優 「骨組織の多光子励起顕微鏡によるライブイメージング」臨床整形外科 第45巻・第4号 p324-329 (2010.4.25)

9) 石井 優 「骨組織の2光子励起ライブイメージング」内分泌・糖尿病・代謝内科 第30巻・第5号 p478-483 (2010.5.28)

10) 菊田順一, 石井 優 「骨組織の生体イメージングによる骨吸収の新しい調節機構」炎症と免疫 第18巻・第4号 p 349-354 (2010.6.20)

11) 島津 裕, 石井 優 「生体2光子励起顕微鏡による骨組織ライブイメージング」実験医学 第28巻・第13号 p 2147-2153 (2010.8.1)

12) 石井 優 「脂質メディエーター・ケモカインを標的とした新しい骨吸収性疾患治療薬の開発～二光子励起顕微鏡を用いた生体骨イメージングより～」臨床リウマチ Vol 22, No. 3, p269-273 (2010. 9)

13) 藤森さゆ美, 石井 優 「生体イメージングによる骨代謝機能の解明」バイオインダストリー 第28巻・第1号 p23-27 (2011.1)

14) 菊田順一, 川村俊輔, 石井 優 「蛍光イメージングによる骨解析」細胞工学 第30巻・第3号 p 277-282 (2011.2.22)

15) 菊田順一, 川村俊輔, 石井 優 「骨組織の in vivo イメージングによる破骨細胞動態の解析」Clinical Calcium 第21巻・第3号 p 36-42 (2011.2.28)

16) 菊田順一, 小谷真奈斗, 石井 優 「破骨細胞遊走の制御機構」リウマチ科 第45巻・第2号 p 209-214 (2011.2.28)

17) 小谷真奈斗, 菊田順一, 大畑絵美, 石井 優 「二光子励起顕微鏡による骨髄・骨転移性癌の生体イメージング」Surgery Frontier 第18巻・第1号 p 44-49 (2011.3.1)

18) 賀川義規, 森 正樹, 石井 優 「生体イメージングによる癌の可視化」大腸癌 Frontier 第4巻・第1号 p 91-95 (2011.3.20)

2. 学会発表

1) 石井 優, 破骨細胞の遊走・位置決め of 制御機構: 関節リウマチに対する新しい治療法の可能性, 第54回日本リウマチ学会学術集会, 特別企画シンポジウム, 2010年4月24日, 神戸

2) 石井 優, 生体4Dイメージングによる細胞ダイナミクス研究の最前線, 第62回日本細胞生物学会, ランチョンセミナー, 2010年5月19日, 大阪

3) 石井 優, 過剰な骨吸収を制御する生理活性物質の発見とその機構の解明～骨組織のライブイメージングより～, 第15回国際食品素材/添加物展・会議 (ifiaJAPAN 2010), 「骨・関節の健康」セミナー, 2010年5月20日, 東京

4) 石井 優, 多光子励起イメージングで見る生体骨組織内の細胞動態～骨代謝の新しい調節作用点の発見～, 第19回骨代謝セミナー, 2010年6月4日, 東京

5) Masaru Ishii, Chemokine-mediated migration control of osteoclast precursors visualized by live bone imaging., 3rd International Conference of Osteoimmunology, Invited lecture, June 21st, 2010, Santorini/Greece.

6) 石井 優, 骨のライブ光イメージング: 破骨細胞の動きを制御する新しい骨粗鬆症治療薬の開発, 第9回大阪骨疾患治療研究会, 特別講演, 2010年7月8日, 大阪

7) 石井 優, 生体2光子励起イメージングで見る骨代謝・骨免疫学, 第28回日本骨代謝学会学術集会, カレントコンセプト, 2010年7月22日, 東京

8) Masaru Ishii, Dynamic live imaging of bone marrow cells by using intravital 2-photon microscopy., The 14th International Congress of Immunology, Lunchtime lecture, August 25th, 2010, Kobe/Osaka.

9) 石井 優, 生体多光子励起イメージング～生物の「生きたまま」での観察への挑戦, 第6回箱根カンファレンス, 特別講演, 2010年8月28日, 千葉

10) 石井 優, 生体多光子励起イメージング～生物の「生きたまま」での観察への挑戦, 第6回 Summer Vascular Conference, 招待講演, 2010年9月4日, 東京

11) 石井 優, 生体2光子励起バイオイメージングを用いた細胞組織化学研究の新展開, 第51回日本組織細胞化学会総会・学術集会, ワークショップ, 2010年9月5日, 東京

12) 石井 優, 多光子励起顕微鏡を駆使した生体内イメージング, 第69回日本癌学会学術総会, モーニングレクチャー, 2010年9月24日, 大阪

13) Masaru Ishii, Visualization of bone marrow cavity by using intravital two-photon microscopy, 22nd Annual Meeting of the Korean Society of Molecular and Cellular Biology, Symposium, October 7th, 2010, Seoul/Korea.

14) 石井 優, 生体多光子励起イメージング～生物の「生きたまま」での観察への挑戦, 2010年度免疫炎症モデル研究会, 招待講演, 2010年10月15日, 大阪

15) Masaru Ishii, Imaging the Mechanisms of Osteoclast Migration, Differentiation and Function. 2010 Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Meet-the-Professor session, October 17th, 2010, Toronto/Canada.

16) Masaru Ishii, Dynamic live imaging of bone marrow cells by using intravital 2-photon

microscopy. The CSI-IFReC Joint Symposium on Immunology, November 3rd, 2010, Hangzhou/China.

18) Masaru Ishii, Live imaging of cellular dynamics in bone marrow cavity by using intravital multi-photon microscopy. APRU Research Symposium 2010, November 25th, 2010, 京都

19) 石井 優, 生体多光子励起イメージングによる骨髄ダイナミクスの解明, 第33回日本分子生物学会年会・第33回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010), ワークショップ, 2010年12月10日, 神戸

20) 石井 優, 生体多光子励起イメージング～生物の「生きたまま」での観察への挑戦～, Kagawa Lifestyle Disease Seminar 2010, 特別講演, 2010年12月16日, 香川県高松市

21) 石井 優, 骨組織の生体ライブイメージング, 第22回中之島リウマチセミナー, 2010年12月26日, 大阪

22) 石井 優, 免疫組織の生体多光子励起イメージング, 第24回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, シンポジウム講演, 2011年1月9日, 茨城県つくば市

23) 石井 優, 免疫組織の生体多光子励起イメージング, 第24回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム(JSR11)サテライトミーティング, 2011年1月11日, 茨城県つくば市

24) 石井 優, 骨組織のライブイメージングによる破骨細胞動態解析, 千里ライフサイエンスセミナー・免疫・感染症シリーズ第3回, 2011年2月18日, 大阪府豊中市

H. 知的財産権の出願・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

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、FTY のような S1PR1 アゴニストのみならず、S1PR2 アンタゴニストなどのその他の S1P 作動薬など、RA 発症・病態形成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。

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。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

① 卵巣摘出による骨粗鬆症発症マウス(OVX)や、さらに関節炎を誘導したマウス(OVX+CAIA)を用いて、S1P 受容体作動薬や平成 21 年度の研究成果で新たに有望な創薬

標的として S1P のタイプ 2 受容体 (S1P2) 阻害剤の薬効評価について検討を行った。

②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、骨組織での骨吸収をリアルタイムで可視化する生体 2 光子励起観察するシステムの開発を行う。

③新規 RA 治療薬候補化合物のスクリーニングのため、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。

C. 研究結果

①卵巣摘出骨粗鬆症モデルマウスにおいて、S1P 受容体作動薬のうち SEW2871 は治療効果は見られなかった。FTY720 は 3 mg/kg, 10

mg/kg 投与群では有意な骨吸収抑制効果が認められた。S1P2 受容体阻害剤 JTE013 は 3 mg/kg, 10 mg/kg で有意な骨吸収抑制効果が認められた。(Ishii et al., J Exp Med, 2010)。OVX+CAIA モデルマウスでは、FTY720 は、ステロイドとほぼ同等に 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した (Kikuta et al., Rheumatol. Int, 2010)。

② S1P1 アゴニスト SEW2871 および FTY720 の双方とも、破骨前駆細胞を含む単球系細胞の動きを大きく調節し、また S1P2 アンタゴニスト JTE013 も、S1P1 アゴニストよりは弱い、有意に動きを変化させる効果があることが示された。また、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ーンバーを作成することに成功した。

③ 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

これらの結果から、S1P 作用を標的とする破骨細胞前駆細胞の遊走制御は、新しい RA 治療薬として極めて有望であることが示された。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. 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, Kikuta J, Shimazu Y, Meier-Schellersheim M, Germain RN. (2010) Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling *in vivo*. *J. Exp. Med.*, 207: 2793 - 2798.

2) Kikuta J, Iwai K, Saeki Y, Ishii M. (2010) *Rheumatol. Int.* published online.

S1P-targeted therapy for elderly rheumatoid arthritis patients with osteoporosis.

5) Ishii T, Kikuta J, Kubo A, Ishii M. (2010) Control of osteoclast precursor migration: A novel point of control for osteoclastogenesis and bone homeostasis. *IBMS BoneKey*, 7: 279-286.

6) Ishii T, Ishii M. (2010) Intravital two-photon imaging: A versatile tool for dissecting the immune system. *Ann. Rheum. Dis.*, 70 (Suppl 1): i113-115.

7) Ishii T, Shimazu Y, Nishiyama I, Kikuta J, Ishii M. (2011) The role of sphingosine 1-phosphate in migration of osteoclast precursors; an application of intravital two-photon microscopy. *Mol. Cells*, in press.

2. 学会発表

1) 石井 優, 破骨細胞の遊走・位置決め制御機構: 関節リウマチに対する新しい治療法の可能性, 第 54 回日本リウマチ学会学術集会, 特別企画シンポジウム, 2010 年 4 月 24 日, 神戸

2) 石井 優, 生体 4D イメージングによる細胞ダイナミクス研究の最前線, 第 62 回日本細胞生物学会, ランチョンセミナー, 2010 年 5 月 19 日, 大阪

3) 石井 優, 過剰な骨吸収を制御する生理活性物質の発見とその機構の解明~骨組織のライブイメージングより~, 第 15 回国際食品素材/添加物展・会議 (ifiaJAPAN 2010), 「骨・関節の健康」セミナー, 2010 年 5 月 20 日, 東京

4) 石井 優, 多光子励起イメージングで見る生体骨組織内の細胞動態~骨代謝の新しい調節作用点の発見~, 第 19 回骨代謝セミナー, 2010 年 6 月 4 日, 東京

5) 石井 優, 生体 2 光子励起イメージングで見る骨代謝・骨免疫学, 第 28 回日本骨代謝学会学術集会, カレントコンセプト, 2010 年 7 月 22 日, 東京

6) 石井 優, 多光子励起顕微鏡を駆使した生体内イメージング, 第 69 回日本癌学会学術総

会, モーニングレクチャー, 2010年9月24日,
大阪

7) 石井 優, 生体多光子励起イメージング~
生物の「生きたまま」での観察への挑戦, 2010
年度免疫炎症モデル研究会, 招待講演, 2010
年10月15日, 大阪

H. 知的財産権の出願・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

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、これら脂質メディエーターS1Pを標的とした治療薬をヒトRA治療への臨床応用に向けての基礎的検討を行うために、健常人および患者よりヒト破骨前駆細胞を分離し、候補化合物の有効性を検討する実験系を確立することを目的とする。3年計画の2年目である当該年度には、健常人ヒト末梢血より破骨前駆細胞を分離し、薬剤評価のシステム構築を行った。これらヒトサンプルを使用した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、動物疾患モデルやイメージング・シミュレーションを用いて得た基礎的研究成果を、ヒトRA治療へとつなげるために、健常人およびRA患者検体を用いた臨床研究を行うことを目的とする。

B. 研究方法

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などを標的とした創薬にむけての効果検討のため、健常人およびRA患者より採取

した末梢血単球系細胞より破骨細胞・前駆細胞などを分化させ、上記でスクリーニングを行った薬剤の効果について検討を行った。

C. 研究結果

ヒト関節リウマチ治療への応用のための臨床研究：健常人ボランティア3名より、1回20mlの採血を3回に渡って行い、それぞれを①Sephadex G10カラム ②CD14+ MACS beads ③CD11b+ MACS beadsを用いて、ヒト末梢血単球細胞を分離した。これにhuman recombinant M-CSF（50 ng/ml）+ human recombinant RANKL（100 ng/ml）を添加して4～6日間培養し、TRAP染色を行い、多核化した成熟破骨細胞の数を定量した。その結果、①②ではほとんど破骨細胞分化が見られなかったが、③では少ないながらもTRAP陽性細胞を観察することができた。上記より、ヒト末梢

血細胞中では CD11b+分画に、破骨細胞前駆細胞が最も多く含まれていることが明らかになった。

次に、この細胞集団を用いて、新規骨吸収抑制剤として注目している S1P1 アゴニスト SEW2871 および FTY720 の代謝活性型の FTY720-P、および S1P2 アンタゴニスト JTE013 について、その細胞遊走刺激効果について検討した。この結果、FTY720-P や JTE013 ではヒト CD11b+単球細胞においても効果が見られたが、SEW2871 については明らかな効果が得られなかった。これらより、ヒトの骨粗鬆症に対する新規薬剤候補としては、SEW2871 については適当ではない可能性が示唆された。

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) Kikuta J, Iwai K, Saeki Y, Ishii M. (2010) *Rheumatol. Int.* published online. S1P-targeted therapy for elderly rheumatoid arthritis patients with osteoporosis.

2. 学会発表

該当なし

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

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

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, 他	Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling in vivo.	Journal of Experimental Medicine	207・13	2793-2798	2010
石井 優, 佐伯行彦, 他	S1P-targeted therapy for elderly rheumatoid arthritis patients with osteoporosis.	Rheumatol. Int.	Published online		2010
石井 優, 他	Experiments and simulation to develop a physiological model of G-protein control of muscarinic K ⁺ channels in mammalian atrial cells.	Philos. Transact. A Math. Phys. Eng. Sci	368・1921	2983-3000	2010
石井 優, 他	Angiotensin II inhibits insulin-mediated production of PI-3,4,5-trisphosphates via a Ca ²⁺ -dependent but PKC-independent pathway in the cardiomyocytes.	Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.	299・3	H680-689	2010
石井 優, 他	Control of osteoclast precursor migration: A novel point of control for osteoclastogenesis and bone homeostasis.	IBMS BoneKey	7	279-286	2010
石井 優, 他	Intravital two-photon imaging: A versatile tool for dissecting the immune system.	Ann. Rheum. Dis.	70・Sup 1	I113-115	2010
石井 優, 他	The role of sphingosine 1-phosphate in migration of osteoclast precursors; an application of intravital two-photon microscopy.	Mol. Cells	Published online		2011

石井 優	骨組織の多光子励起顕微鏡によるライブイメージング	臨床整形外科	45・4	324-329	2010
石井 優	骨組織の2光子励起ライブイメージング	内分泌・糖尿病・代謝内科	30・5	478-483	2010
石井 優, 他	骨組織の生体イメージングによる骨吸収の新しい調節機構	炎症と免疫	18・4	349-354	2010
石井 優, 他	生体2光子励起顕微鏡による骨組織ライブイメージング	実験医学	28・13	2147-2153	2010
石井 優	脂質メディエーター・ケモカインを標的とした新しい骨吸収性疾患治療薬の開発～ニ光子励起顕微鏡を用いた生体骨イメージングより～	臨床リウマチ	22・3	269-273	2010
石井 優, 他	生体イメージングによる骨代謝機能の解明	バイオインダストリー	28・1	23-27	2011
石井 優, 他	蛍光イメージングによる骨解析	細胞工学	30・3	277-282	2011
石井 優, 他	骨組織のin vivoイメージングによる破骨細胞動態の解析	Clinical Calcium	21・3	36-42	2011
石井 優, 他	破骨細胞遊走の制御機構	リウマチ科	45・2	209-214	2011
石井 優, 他	二光子励起顕微鏡による骨髄・骨転移性癌の生体イメージング	Surgery Frontier	18・1	44-49	2011
石井 優, 他	生体イメージングによる癌の可視化	大腸癌 Frontier	4・1	91-95	2011

Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling in vivo

Masaru Ishii,^{1,2} Junichi Kikuta,¹ Yutaka Shimazu,¹
Martin Meier-Schellersheim,³ and Ronald N. Germain^{2,3}

¹Laboratory of Biological Imaging, WPI-Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan
²Lymphocyte Biology Section, Laboratory of Immunology, and ³Program in Systems Immunology and Infectious Disease Modeling, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892

Sphingosine-1-phosphate (S1P), a lipid mediator enriched in blood, controls the dynamic migration of osteoclast (OC) precursors (OPs) between the blood and bone, in part via the S1P receptor 1 (S1PR1) which directs positive chemotaxis toward S1P. We show that OPs also express S1PR2, an S1P receptor which mediates negative chemotaxis (or chemorepulsion). OP-positive chemotaxis is prominent in gradients with low maximal concentrations of S1P, whereas such behavior is minimal in fields with high maximal S1P concentrations. This reverse-directional behavior is caused by S1PR2-mediated chemorepulsion acting to override S1PR1 upgradient motion. S1PR2-deficient mice exhibit moderate osteopetrosis as a result of a decrease in osteoclastic bone resorption, suggesting that S1PR2 contributes to OP localization on the bones mediated by chemorepulsion away from the blood where S1P levels are high. Inhibition of S1PR2 function by the antagonist JTE013 changed the migratory behavior of monocytoïd cells, including OPs, and relieved osteoporosis in a mouse model by limiting OP localization and reducing the number of mature OCs attached to the bone surface. Thus, reciprocal regulation of S1P-dependent chemotaxis controls bone remodeling by finely regulating OP localization. This regulatory axis may be promising as a therapeutic target in diseases affecting OC-dependent bone remodeling.

Osteoclasts (OCs) are a specialized cell subset with bone-resorbing capacity that plays a critical role in normal bone homeostasis (bone remodeling), degrading old bones and facilitating new bone formation by osteoblasts (Teitelbaum, 2000). OCs are differentiated from monocyte/macrophage-lineage hematopoietic precursor cells, termed OC precursors (OPs), and previous studies have revealed key molecular signals, such as those mediated by M-CSF and RANKL, that regulate OC differentiation (Karsenty and Wagner, 2002; Teitelbaum and Ross, 2003). In contrast to the detailed information available concerning molecular signals for differentiation of OC, the factors controlling migration and localization of OPs onto the bone surface, the site of OC terminal differentiation, are less well analyzed. We have recently used intravital two-photon microscopy to visualize the bone cavity in live mice, and found that sphingosine-1-phosphate (S1P), a lipid mediator enriched in

blood, plays a critical role in controlling the residence stability of OPs on the bone surface via the cognate receptor S1P receptor 1 (S1PR1; also designated S1P₁ or Edg-1; Ishii et al., 2009; Klauschen et al., 2009). The mechanisms controlling the initial localization of OPs into the bone space or counteracting the tendency of S1P to promote movement of OPs from bone to blood, however, have not yet been clarified. In this paper, we show that bone attraction is also contributed to in part by S1P, through a distinct but related receptor, S1PR2 (also designated as S1P₂ or Edg-5).

Although both S1PR1 and S1PR2 belong to the heptahelical heterotrimeric G protein-coupled Edg receptor family, their signal

CORRESPONDENCE

Masaru Ishii:
mishii@ifrec.osaka-u.ac.jp
OR
Ronald N. Germain:
rgermain@niaid.nih.gov

Abbreviations used: OC, osteoclast; OP, OC precursor; S1P, sphingosine-1-phosphate; S1PR1, S1P receptor 1.

transduction pathways are completely different (Takuwa, 2002; Rosen and Goetzl, 2005). S1PR1 (via its associated $G_i\alpha$ subunit) activates the small G protein Rac and induces positive chemotaxis. In contrast, S1PR2 (signaling through $G_{12/13}\alpha$) activates another small G protein, Rho. Active Rho can inhibit activation of Rac, which can limit S1PR2-induced chemotaxis (Fig. 1 A). It was previously reported that S1PR2-expressing cells show reduced migration to S1P in vitro (Okamoto et al., 2000).

RESULTS AND DISCUSSION

We found that OPs express S1PR2 as well as S1PR1, and the positive migratory response to S1P was highly concentration dependent, being more vigorous at low S1P concentrations

(10^{-7} M) and less marked at higher concentrations (Fig. 1 B). In addition, blockade of S1PR1 signaling with pertussis toxin led to a reduction in migration below the basal level seen in the absence of S1P, suggesting that S1P could have a negative effect on cell migration under these conditions. We also found that S1PR2 deficiency enhanced positive S1P chemotaxis. To better analyze the effects of varying S1P concentrations on migration, we examined the dynamics of S1P chemotaxis in an in vitro image-based system (Fig. 1, C and D). In these experiments, cells were applied in the one chamber and S1P was added in the other chamber. In this device, a narrow plateau between the chambers generates a linear gradient experienced by the cells on the opposite side of the chemokine-filled chamber, and the motility of the cells can be assessed throughout

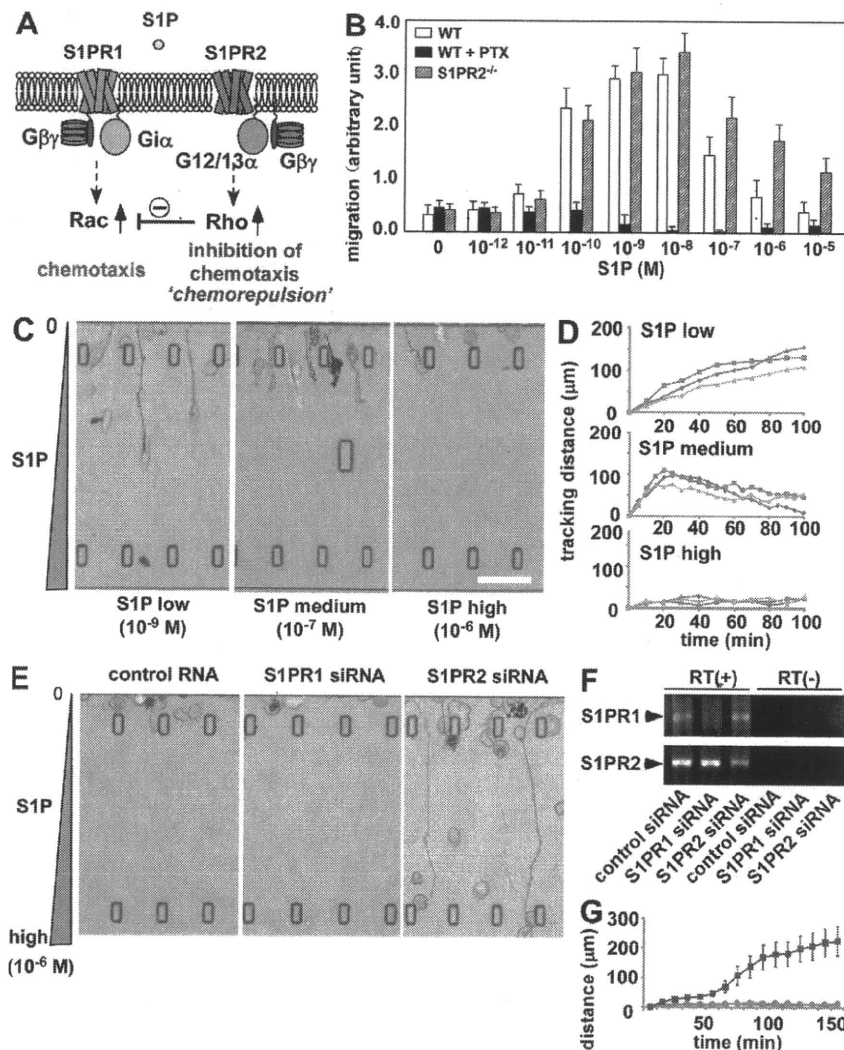


Figure 1. Reciprocal control of S1P chemotaxis by counteracting the receptors S1PR1 and S1PR2. (A) Scheme of function and signal transduction of S1PR1 and S1PR2.

(B) In vitro chemotactic response of BM-MDM isolated from wild-type and S1PR2-deficient mice. Before the chemotaxis assay, some cells were treated with 100 nM pertussis toxin (PTX). Error bars represent SD ($n = 6$, from three independent experiments). (C) In vitro S1P-directed chemotaxis of RAW264.7 cells dynamically visualized using EZ-Taxiscan.

Cells were loaded in one side of the chamber and the other side was filled with medium containing indicated concentration of S1P (Videos 1–3). Cells migrate into the terrace between the loading chambers. The height from floor to ceiling of the terrace is 8 μm . Bar, 100 μm . (D) Tracking courses from the start line of representative cells in low, medium, and high S1P conditions. Each curve shows the data from one experiment and represents the averaged tracking distance of multiple cells over time. The EZ-Taxiscan experiments were independently performed six times and the data were largely consistent, although the extent of the toward-and-away motions of cells in 10^{-7} M S1P was variable depending on the experiment. Obvious away motion could clearly be observed in five of the six experiments (62 in 83 total cells), and the cells simply stopped in the middle of the chamber without clear backward migration in one of the six experiments (11 in 83 cells). (E) In vitro S1P-directed chemotaxis of RAW264.7 cells treated with siRNAs. Cells pretreated with control RNA duplex, siRNA against S1PR1, or siRNA against S1PR2 (Videos 4–6) were loaded into the EZ-Taxiscan chamber filled with a high concentration of S1P (10^{-9} M) in the other side. (F) RT-PCR

detection of S1PR1 and S1PR2 in siRNA-pretreated RAW264.7 cells. Cells were pretreated with control RNA duplex (control siRNA), siRNA against S1PR1 (S1PR1 siRNA), or siRNA against S1PR2 (S1PR2 siRNA). (G) Migration distance data from microscopic analysis of control (red), S1PR1 knockdown (green), and S1PR2 knockdown (blue) cells. The experiments were independently performed three times and the data were largely consistent. Each dot represents the mean value of six independent cells and error bars represent SD.

their exposure to this chemokine gradient in the imaging chamber. RAW264.7 cells, which are often used as a model of OPs, readily migrated toward a low maximal concentration of S1P (10^{-9} M; Fig. 1, C [left] and D [top]; and Video 1) but not toward a high maximal S1P concentration (10^{-6} M; Fig. 1, C [right] and D [bottom]; and Video 3). Strikingly, at an intermediate concentration, cells first moved up the S1P gradient but then arrested this movement and began to migrate back in the opposite direction in nearly all cases (Fig. 1, C [middle] and D [middle]; and Video 2). These data reveal that at high S1P concentrations, RAW264.7 cells respond by chemorepulsion rather than chemoattraction.

RNA interference was used to examine the roles of S1PR1 and S1PR2 in these S1P concentration-dependent behaviors (Fig. 1, E and G). Cells were treated with siRNAs targeting S1PR1 or S1PR2 and put in a high S1P concentration field (10^{-6} M; Fig. 1, E and F). Although control cells and S1PR1 knockdown cells were hardly motile, as observed in Fig. 1 C (Fig. 1, E [left two panels] and G; and Videos 4 and 5), some of the cells treated with siRNA targeting S1PR2 could migrate vigorously, irrespective of the high S1P concentration (Fig. 1, E [right] and G; and Video 6). We also confirmed that S1PR2-deficient primary cultured OPs can efficiently move toward a high S1P concentration (Fig. S1), establishing that S1PR2 expressed on OPs is indeed functional and that this receptor is responsible for the chemorepulsive behavior of these cells (Fig. 1, B and C). These results clearly demonstrate that OPs express two counteracting receptors for S1P: forward movement, promoting S1PR1, and backward movement, promoting S1PR2. The migratory behavior of OPs is thus finely regulated by the balance of the reciprocal functions of these two receptors and their differential activity at distinct concentrations of S1P.

To investigate whether S1PR2 affects OP migration *in vivo* as these *in vitro* studies would imply, we performed intravital two-photon imaging of calvaria bones (Mazo et al., 2005; Ishii et al., 2009) and examined the migratory behavior of monocytoic cells resident in the marrow spaces, including OPs. We used CX₃CR1-EGFP knockin (heterozygous) mice (Jung et al., 2000; Niess et al., 2005), in which monocyte-lineage cell types predominantly expressed EGFP. We have previously confirmed that TRAP (tartrate-resistant acid phosphate)-positive mature OCs expressed EGFP in these animals (Ishii et al., 2009) and, in addition, we confirmed that EGFP⁺ cells (but not EGFP⁻) can efficiently differentiate into OC-like cells *in vitro* upon stimulation with RANKL (Fig. S2). Both of these results strongly suggest that EGFP⁺ cells contain OPs.

CX₃CR1-EGFP-positive cells present in BM stromal locations or at the bone surface were generally stationary under control conditions (Fig. 2 A, top; and Video 7). In contrast, a subset of the labeled cells became motile 2 h after the intravenous application of 3 mg/kg JTE013 (Osada et al., 2002), a potent antagonist of the S1PR2 receptor (Fig. 2 A, bottom; and Video 8), with some of the mobilized cells entering the blood circulation. The cell-mobilizing effect of JTE013 was

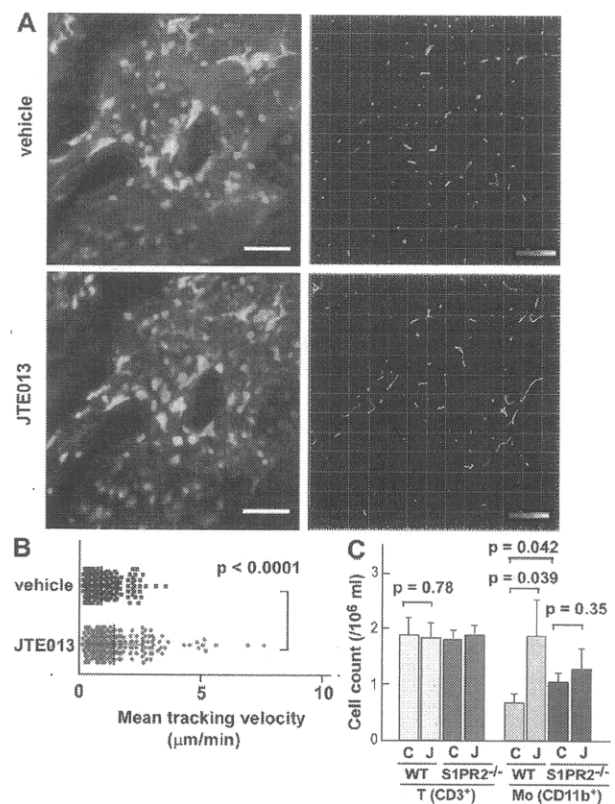


Figure 2. *In vivo* S1PR2-mediated migration control of OP monocytes visualized using intravital two-photon imaging. (A) Intravital two-photon imaging of mouse skull bone tissues of heterozygous CX₃CR1-EGFP knockin mice, in the absence (vehicle; Video 7) or presence (Video 8) of 3 mg/kg of the S1PR2 antagonist JTE013. CX₃CR1-EGFP-positive cells appear green. The microvasculature was visualized by intravenous injection of 70 kD dextran-conjugated Texas red (red; left). The movements of CX₃CR1-EGFP-positive cells were tracked for 10 min (right). Colored lines show the associated trajectories of cells. Bars, 50 μ m. (B) Summary of mean velocity of CX₃CR1-EGFP-positive cells treated with JTE (red circle) or vehicle (blue square). Data points ($n = 252$ for vehicle and $n = 237$ for JTE013) represent individual cells compiled from six independent experiments, and error bars represent SD. (C) Effect of the S1PR2 antagonist JTE013 on the composition of peripheral mononuclear cells. Peripheral mononuclear cells collected from wild-type and S1PR2^{-/-} mice administered vehicle (C) or JTE013 (J) were stained with anti-CD3 or anti-CD11b. Absolute numbers of CD3⁺ T cells or CD11b⁺ monocytoic cells are described in the figure. Each bar represents the mean value derived from three independent experiments and error bars represent SD.

less pronounced and took longer than was the case with the S1PR1 agonist SEW2871 (Ishii et al., 2009), although the effect was statistically significant (Fig. 2 B). Data collected using larger imaging fields revealed that there was a significant heterogeneity in cellular dynamics that correlated with location of the cells within the BM cavity (Fig. S2 and Video 9). CX₃CR1-EGFP⁺ cells positioned at the bone surface hardly move, suggesting that these cells have already committed to OC differentiation. In contrast, cells in the parenchyma move after application of JTE013 and, more importantly, the migratory

activities of cells around sinusoids are significantly higher than those of cells in the parenchyma around large collecting venules. Together, these findings suggest that sinusoids are the plausible locations for mobilization of these cells.

Consistent with these findings, we also observed an elevated percentage and absolute number of monocytoid cells in peripheral blood from JTE013-treated mice (Fig. 2 C). This phenomenon was largely absent in S1PR2-deficient mice, suggesting that the effect of JTE013 is exclusively mediated by S1PR2. These results are consistent with the idea that an S1PR2 antagonist can block OP chemorepulsion mediated by the high S1P concentration in blood vessels, facilitating the recirculation of OPs.

To evaluate the *in vivo* impact of such S1PR2-mediated chemorepulsion of OPs on bone remodeling, we examined mice deficient in S1PR2 (Kono et al., 2004). Morphohistometric analyses using μ CT showed that femora of mice genotyped as S1PR2 were moderately osteopetrotic, compared with those of control littermates (Fig. 3 A). Bone tissue density (Fig. 3 B, B.V./T.V.) of S1PR2^{-/-} mice was significantly higher than that of controls, and concordantly trabecular density (Fig. 3 B, Tb.N.) was increased in S1PR2^{-/-} bones. Conventional bone morphohistometrical analyses demonstrated a significant decrease in osteoclastic bone resorption (Fig. 3 C, E.S./B.S.) in S1PR2^{-/-} bones, whereas osteoblast formation was not significantly affected. These results clearly suggest that OC attachment to and function on the bone surface was impaired in S1PR2^{-/-} animals, leading to reduced

bone resorption and moderate osteopetrosis. Because the expression of S1PR2 is high in monocytoid OPs and is hardly detected in osteoblast-lineage cells (unpublished data), and because S1PR2 deficiency did not alter the capacity of OP to differentiate into OCs (Fig. S1), this result indicates that S1PR2-mediated chemorepulsion of OPs in response to the high blood S1P concentration contributes to their localization at the bone surface and promotes osteoclastogenesis *in vivo*.

This newly revealed role of S1PR2-mediated control of OP migration prompted us to examine their therapeutic implications. *i.p.* administration of RANKL induces substantial osteoporosis within 2 d (Tomimori et al., 2009). We added daily administration of 3 mg/kg of the S1PR2 antagonist JTE013 to this regimen and examined the effect on bone mineral density (Fig. 3 C). Addition of JTE013 significantly reversed the bone density loss induced by RANKL administration (Fig. 3 C, left) by limiting osteoclastic bone resorption (Fig. 3 C, right, E.S./B.S.). This therapeutic effect of JTE013 was absent in S1PR2-deficient mice, suggesting that the function of JTE013 is dependent on this receptor. We also tested the effect of JTE013 by using ovariectomized mice, a conventional model for postmenopausal osteoporosis, and confirmed the significant therapeutic potentials (Fig. S3).

We have previously shown that the S1P-S1PR1 axis contributes to recirculation of OPs into the blood stream (thus acting as a circulation-attractive factor), whereas bone-attractive factors have not been fully elucidated. In this study,

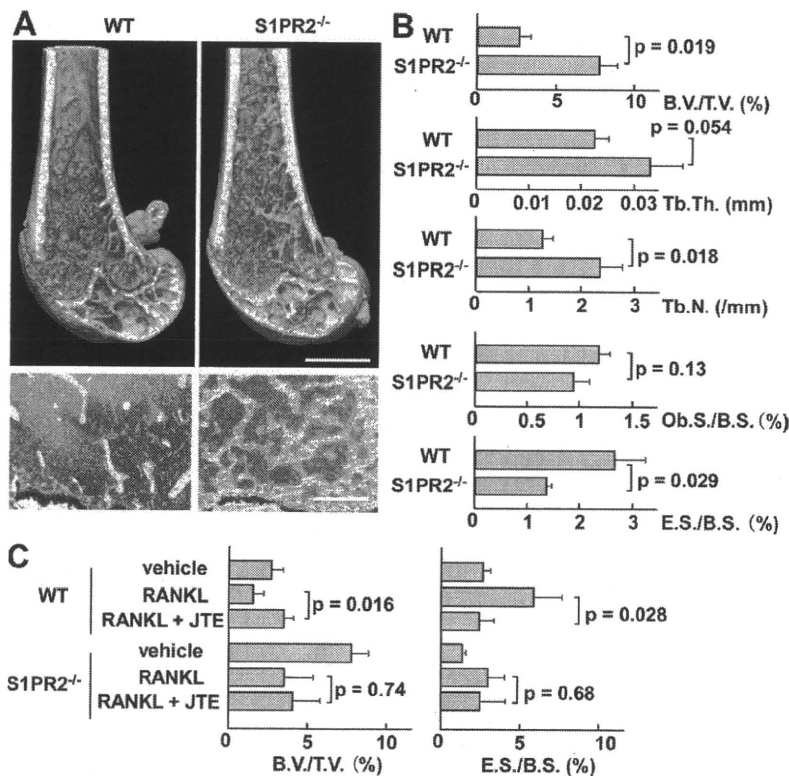


Figure 3. In vivo impact of S1PR2 on bone remodeling. (A) Morphohistometric analyses of control and S1PR2-deficient (S1PR2^{-/-}) littermates. Femoral bone samples were analyzed by cone-beam μ CT (top) and conventional histological examination (bottom). Bars: (top) 1 mm; (bottom) 200 μ m. (B) Summary of the data of bone matrix density (bone volume/tissue volume = B.V./T.V.), trabecular thickness (Tb.Th.), trabecular density (Tb.N.; calculated from μ CT images), osteoblast surface per bone surface (Ob.S./B.S.), and osteoclastic erosion surface per bone surface (E.S./B.S.; calculated by conventional morphohistometrical analyses). Error bars represent SD. $n = 3$ for each (from three littermates). (C) Therapeutic effect of S1PR2 antagonist JTE013 on osteoclastic bone resorptive changes. Femurs were collected from each mouse (wild-type and S1PR2^{-/-}) after three different treatments: PBS + vehicle, RANKL + vehicle, and RANKL + JTE013. RANKL was dissolved in PBS, and JTE013 was dissolved in a vehicle (PBS containing 5% acidified DMSO and 3% fatty acid-free BSA). Mice were *i.p.* injected with PBS or RANKL, and with JTE or vehicle, every day for 2 d. Bone samples were analyzed by cone-beam μ CT and conventional morphohistological examination. Data of bone matrix density (B.V./T.V.) calculated from μ CT images (left) and osteoclastic erosion surface per bone surface (E.S./B.S.) calculated by conventional morphohistometrical analyses (right) were shown. Error bars represent SD. $n = 3$ for each (from three littermates).