

201126010B

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21年度～23年度 総合研究報告書

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)

平成24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～23年度 総合研究報告書

研究代表者 石井 優

平成24(2012)年 4月

目 次

I. 総合研究報告

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. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----10

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 14

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）
（総合）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治験中であり、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に観察することに世界に先駆けて成功し、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、臨床応用に向けて、ヒト細胞系を用いた基盤的解析を行う（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など既存する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した。

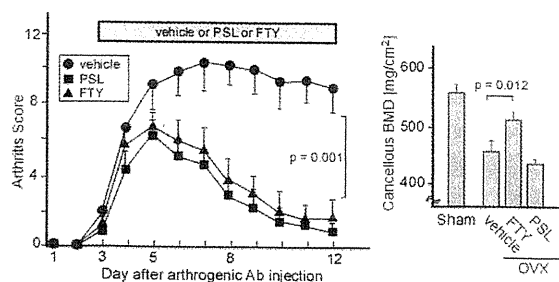
②生体2光子励起イメージングによる新規薬効評価系の確立：脂質メディエーターやケモカインによる細胞遊走を標的とした新規創薬の際の、迅速かつ正確な薬効評価のため、骨組織と炎症関節をそれぞれ生体2光子励起観察するシステムの開発を行った。

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した。

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った。

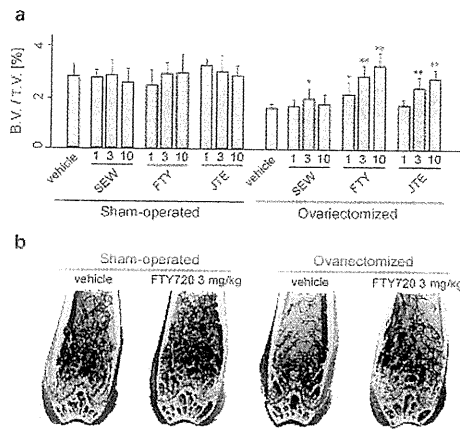
C. 研究結果

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（下図）。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（下図）。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, 2011）。

また、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 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（論文投稿中）。



さらに本研究者は、破骨細胞前駆細胞には S1P に対して遊走を起す 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

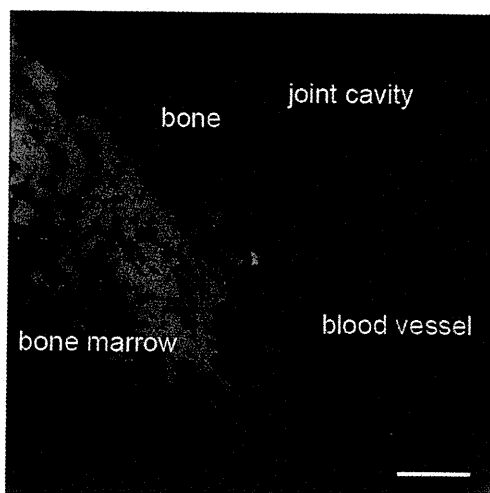
た。この結果、JTE013 投与群では 3 mg/kg, 10 mg/kg で有意な骨吸収抑制効果が認められた（Ishii et al., J Exp Med, 2010）。

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たが、本研究では、これをさらに改変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た。まず、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。さらにこの系を用いて、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。

さらに最終年度には、関節リウマチで問題となる骨破壊の過程をリアルタイムで可視化する系の開発に成功した。破骨細胞の骨破壊を特異的に可視化する蛍光リポーターマウスを作成し、生体骨イメージング系により生きた骨組織内での成熟破骨細胞による骨破壊をリアルタイムで可視化することに成功した。また、この系を用いて、活性化した T 細胞による骨破壊制御機構を解析し、種々の骨吸収抑制薬の効果を解析するために極めて強力なツールを完成した。これを用いて、炎症関節の生体 2 光子励起イメージング系を確立し、S1P 作動薬などの薬効を評価することができるよう開発を行った（Kikuta et al., in revision）。

加えて、関節リウマチにおける骨破壊をより実体的に解析するために、本研究で炎症関節（足・手関節）の生体 2 光子励起イメージング

系の確立に成功した（下図, in preparation）。



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、脂質メディエーターやケモカインによる破骨細胞の遊走・ケモタキシスを記述する基本的数理モデルの作成を行った。さらに、血中・組織の脂質メディエーター濃度、アゴニスト／アンタゴニスト、破骨前駆細胞数などのパラメーターを入れることにより、骨表面での成熟破骨細胞数、骨破壊を再構成するシステムを構築した。これは FTY720 などの S1P 作動薬の破骨細胞制御に対する薬効を評価するには非常に有効な系となる。

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+ 画面に、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 TY720-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。

また、最終年度にはこれらの成果を元に、生きた実験動物内の in vivo において、イメージング技術を用いてヒト破骨細胞の機能評価を行う系の確立を目指した。

一方で、S1P を標的とした初めての薬剤 FTY720 (fingolimod) が平成 23 年 9 月に本邦で製造販売承認がされ、多発性硬化症に対しての保険診療が可能となった。本研究では、当初の目的であった S1P 標的薬を用いた骨破壊抑制薬の臨床応用に向けて、FTY720 の関節リウマチに対する適応外使用の臨床研究に着手した。

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 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明らかとなった。さらには 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、今回行った細胞遊走の予備の数値モデルに加え、細胞遊走の位置情報、薬物動態などを今後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、今後本格的な臨床研究の展開を目指す。また、ヒト破骨細胞に対する効果を *in vivo* で検討するための、破骨細胞ヒト化マウスについては開発途上であるが、発展性が見込まれるデータを得ている。さらに、最近承認された S1P 作動薬 FTY720 については、骨破壊に対する治療効果について今後は介入的臨床研究を行っていく計画としている。

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期待される。

また、本研究では骨破壊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。今後 S1P2 アンタゴニストを主たる薬効とする新規骨疾患治療薬の開発を行っていく計画としている。

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) 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.

5) 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.

6) 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 Ca²⁺-dependent but PKC-independent pathway in the cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 299: H680-H689.

7) 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.

8) 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.

9) Tamai K, Yamazaki T, Chino T, Ishii M, Otsuru S, Kikuchi Y, Inuma S, Saga K, Nimura K, Shimbo T, Umegaki N, Katayama I, Miyazaki J, Takeda J, McGrath J, Uitto J, Kaneda Y. (2011) PDGFR α -positive cells in bone marrow are mobilized by HMGB1 to regenerate injured epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**(16): 6609-6614.

10) Kikuta J, Iwai K, Saeki Y, Ishii M. (2011) S1P-targeted therapy for elderly rheumatoid arthritis patients with osteoporosis. *Rheumatol. Int.* **31**: 967-969.

11) Kowada T, Kikuta J, Kubo A, Ishii M, Maeda H, Mizukami S, Kikuchi K. (2011) In vivo fluorescence imaging of bone-resorbing osteoclasts. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**(44):17772-17776.

12) Fukuhara S, Simmons S, Kawamura S, Inoue A, Orba Y, Tokudome T, Sunden Y, Arai Y, Moriwaki K, Ishida J, Uemura A, Kiyonari H, Abe T, Fukamizu A, Hirashima M, Sawa H, Aoki J, Ishii M*, Mochizuki N* (2012) The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice. *J. Clin. Invest.*, **122**(4): 1416-1426 (*corresponding author).

13) Kayama H, Ueda Y, Sawa Y, Jeon SG, Ma JS, Okumura R, Kubo A, Ishii M, Okazaki T, Murakami M, Yamamoto M, Yagita H, Takeda K. (2012) Intestinal CX3C chemokine receptor 1high (CX3CR1high) myeloid cells prevent T-cell-dependent colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**(13): 5010-5015.

14) 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*, **31**(5): 399-403.

15) Ishii M. (2012) How do contemporary

imaging techniques contribute to basic and clinical rheumatology? *Ann. Rheum. Dis.*, **71** (Suppl 2): i67-9.

16) Ishii T, Kawamura S, Nishiyama I, Kikuta J, Ishii M. (2012) Use of intravital microscopy and in vitro chemotaxis assays to study the roles of sphingosine-1-phosphate in bone homeostasis. *Methods Mol. Biol.*, **2012**; **874**: 129-139.

17) Saeki Y, Kudo-Tanaka E, Ohshima S, Matsushita M, Tsuji SI, Maeda YI, Yoshimura M, Watanabe A, Katada Y, Harada Y, Ichikawa K, Suenaga Y, Ohta Y, Tohma S; NHO iR-net Study Group. (2012) Baseline anti-citrullinated peptide antibody (ACPA) titers and serum interleukin-6 (IL-6) levels possibly predict progression of bone destruction in early stages of rheumatoid arthritis (ERA). *Rheumatol Int.* published online.

18) 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)

19) 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)

20) 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)

21) 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)

22) 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 Vol 22, No. 3, p269-273 (2010. 9)

23) 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)

24) 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)

25) 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)

26) 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)

27) 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)

28) 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)

29) 石井 優
「二光子励起顕微鏡による生きた組織の観察」**Medical Science Digest** 第37巻・第5号 p 7-8 (2011.5.25)

30) 菊田順一, 石井 優
「破骨細胞のイメージングと RANKL シグナル」**Clinical Calcium** 第21巻・第8号 p 73-78 (2011.7.28)

31) 石井 優
「概論—生体4Dイメージングの最前線: 見えないものを見て、新しい概念を切り拓く研究者の飽くなき挑戦」**実験医学** 第29巻・第16号 p 2582-2589 (2011.10.1)

32) 菊田順一, 久保厚子, 島津 裕, 石井 優
「免疫・血液系の多光子励起イメージング—”soft-wired network”の実体的解明」**実験医学** 第29巻・第16号 p 2602-2606 (2011.10.1)

33) 石井 優
「生体イメージングとスフィンゴ脂質」**セラミド—基礎と応用—** p 201-206 (2011.10.1)

34) 小林久隆, 石井 優, 瀬藤光利
「分子イメージング医学応用の近未来」**最新医学** 第66巻・第10号 p 7-22 (2011.10.10)

35) 島津 裕, 菊田 順一, 久保 厚子, 石井 優

「骨・免疫系の細胞動態イメージング」**最新医学** 第66巻・第10号 p 65-69 (2011.10.10)

36) 小谷真奈斗, 菊田順一, 石井 優
「蛍光イメージングで観察する破骨前駆細胞のトラフィック」**Clinical Calcium** 第21巻・第12号 p 85-92 (2011.11.28)

37) 賀川義規, 森 正樹, 石井 優
「がん幹細胞と細胞周期の生体イメージング」**実験医学・増刊号** 第29巻・第20号 p 75-80 (2011.12.15)

38) 石井 優
「骨組織の生体ライブイメージング」**リウマチ病セミナー XXII** p 155-161 (2011.12.20)

39) 石井 優
「生体多光子励起イメージング」**細胞** 第44巻・第1号 p 44-46 (2012.1.20)

40) 菊田順一, 石井 優
「破骨細胞のイメージング」**リウマチ科** 第47巻・第2号 p 195-199 (2012.2.28)

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)

13) 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

14) 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

15) 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

16) 第19回骨代謝セミナー, 2010年6月4日, 東京

17) The third International Conference of Osteoimmunology, Invited lecture, June 21st, 2010, Santorini/Greece.

18) 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

19) 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

20) The 14th International Congress of Immunology, Lunchtime lecture, August 25th, 2010, Kobe/Osaka.

21) 第6回箱根カンファレンス, 特別講演, 2010年8月28日, 千葉

22) 第6回 Summer Vascular Conference, 招待講演, 2010年9月4日, 東京

23) 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

24) 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

25) 22nd Annual Meeting of the Korean Society of Molecular and Cellular Biology, Symposium, October 7th, 2010, Seoul/Korea.

26) 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

27) 2010 Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Meet-the-Professor session, October 17th, 2010, Toronto/Canada.

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

29) APRU Research Symposium 2010, November 25th, 2010, 京都

30) 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

31) Kagawa Lifestyle Disease Seminar 2010, 特別講演, 2010年12月16日, 香川県高松市

32) 第22回中之島リウマチセミナー, 2010年12月26日, 大阪

33) 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

34) 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

35) 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

36) Advances in Targeted Therapies Meeting 2011, April 7, 2011, Dubrovnik/Croatia.

37) 第28回・日本医学会総会学術講演会, シンポジウム, 2011年4月10日, 東京都 (大震災の影響でウェブ上のみの開催)

38) 第84回・日本内分泌学会学術総会, 教育講演, 2011年4月22日, 兵庫県神戸市

39) 第6回・日本分子イメージング学会学術集会, シンポジウム, 2011年5月27日, 兵庫県神戸市

40) 第32回・日本炎症・再生医学会, シンポジウム, 2011年6月3日, 京都府京都市

41) 京都大学・ライカマイクロシステムズイメージングセンター開設記念セミナー, 2011年6月7日, 京都府京都市

42) 第29回日本骨代謝学会学術集会, カレントコンセプト, 2011年7月29日, 大阪国際会議

場, 大阪

- 43) 2011 FASEB Summer Research Conference "Lysophospholipid Mediators in Health & Disease, August 18th, 2011, Il Ciocco, Barga (Lucca), Italy.
- 44) 8th Bone Biology Forum, Lecture, August 19st, 2011, Shizuoka/Japan.
- 45) 第 13 回なにわ骨代謝・骨腫瘍研究会, 2011 年 8 月 27 日, 大阪
- 46) 平成 23 年度生理研研究会・神経活動の光操作, 2011 年 9 月 29 日, 自然科学研究機構岡崎カンファレンスセンター, 愛知県岡崎市
- 47) 第 70 回・日本癌学会学術総会, シンポジウム, 2011 年 10 月 4 日, 名古屋国際会議場, 愛知県名古屋市
- 48) CSB Science Talk, MGH Center for Systems Biology, November 3rd, 2011, Boston, MA, USA
- 49) Special Lecture, Harvard School of Dental Medicine, November 4th, 2011, Boston, MA, USA
- 50) Infliximab Topics Meeting in ACR2011, November 6th, 2011, Chicago, IL, USA
- 51) 第 61 回・日本アレルギー学会秋季学術集会, シンポジウム 6 「免疫細胞と組織構成細胞の接点」, 2011 年 11 月 11 日, 東京都
- 52) 第 61 回・日本アレルギー学会秋季学術集会, シンポジウム 2 「イメージング技術による免疫・アレルギーの新展開」, 2011 年 11 月 12 日, 東京都
- 53) 第 40 回・日本免疫学会学術集会, 国際シンポジウム, 2011 年 11 月 28 日, 幕張メッセ, 千葉県千葉市
- 54) 第 34 回・日本分子生物学会年会, ワークショップ, 2011 年 12 月 14 日, 横浜
- 55) 2011 年度東京大学医学部基礎統合講義, 2012 年 1 月 17 日, 東京大学
- 56) IFRc-SIgN Winter School on Advanced Immunology, January 19th, 2012, Awaji Island, Hyogo, Japan.

57) 熊本大学グローバルCOEリエゾンラボ研究会, 2012 年 2 月 8 日, 熊本大学

58) 第 85 回日本薬理学会年会シンポジウム, 2011 年 3 月 14 日, 京都

G. 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

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, 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
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、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	PDGFR α -positive cells in bone marrow are mobilized by HMGB1 to regenerate injured epithelia.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA	108 · 16	6609-6614.	2011
石井 優, 佐伯行彦, 他	S1P-targeted therapy for elderly rheumatoid arthritis patients with osteoporosis.	Rheumatol. Int.	31	967-969	2011
石井 優、他	In vivo fluorescence imaging of bone-resorbing osteoclasts.	J. Am. Chem. Soc.	33 · 44	17772-6	2011
石井 優、他	The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice.	J. Clin. Invest.	122 · 4	1416-1426	2012
石井 優, 他	Intestinal CX3C chemokine receptor 1 ^{high} (CX3CR1 ^{high}) myeloid cells prevent T-cell-dependent colitis.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA,	109 · 13	5010-5015	2012
石井 優、他	The role of sphingosine 1-phosphate in migration of osteoclast precursors; an application of intravital two-photon microscopy.	Mol. Cells	31 · 5	399-403	2011
石井 優、他	How do contemporary imaging techniques contribute to basic and clinical rheumatology?	Ann. Rheum. Dis.	71 · S2	I67-9	2012
石井 優、他	Use of intravital microscopy and in vitro chemotaxis assays to study the roles of sphingosine-1-phosphate in bone homeostasis.	Methods Mol. Biol.	874	129-139	2012

佐伯 行彦、他	Baseline anti-citrullinated peptide antibody (ACPA) titers and serum interleukin-6 (IL-6) levels possibly predict progression of bone destruction in early stages of rheumatoid arthritis (ERA).	Rheumatol Int.	Published online		2012
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
石井 優	二光子励起顕微鏡による生きた組織の観察	Medical Science Digest	37・5	7-8	2011
石井 優, 他	破骨細胞のイメージングとRANKLシグナル	Clinical Calcium	21・8	73-78	2011

石井 優	概論—生体4Dイメージングの最前線：見えな いものを見て、新しい概 念を切り拓く研究者の 飽くなき挑戦	実験医学	29・16	2582-2589	2011
石井 優, 他	免疫・血液系の多光子励 起イメージング” soft-wired network” の 実体的解明	実験医学	29・16	2602-2606	2011
石井 優	生体イメージングとス フィンゴ脂質	セラミド—基 礎と応用—		201-206	2011
石井 優, 他	骨・免疫系の細胞動態イ メージング	最新医学	66・10	65-69	2011
石井 優, 他	蛍光イメージングで観 察する破骨前駆細胞の トラフィッキング	Clinical Calcium	21・12	85-92	2011
石井 優, 他	がん幹細胞と細胞周期 の生体イメージング	実験医学	29・20	75-80	2011
石井 優	骨組織の生体ライブイ メージング	リウマチ病セ ミナー	XXII	155-161	2011
石井 優	生体多光子励起イメー ジング	細胞	44・1	44-46	2012
石井 優, 他	破骨細胞のイメージン グ	リウマチ科	47・2	195-199	2012

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.

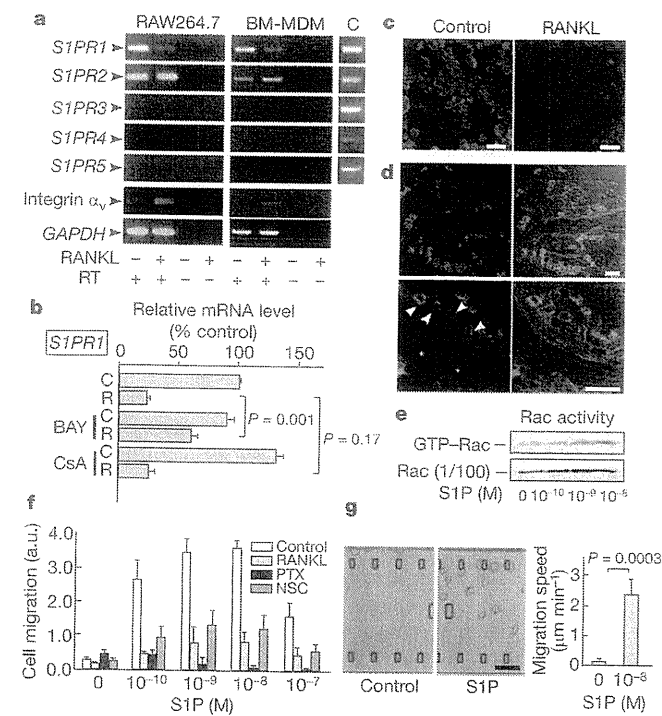


Figure 1 | Expression and function of S1P receptors in osteoclast precursor monocytes. **a**, Expression of mRNAs encoding 5 mammalian S1P receptors (S1P₁ to S1P₅, encoded by *S1PR1* to *S1PR5*) in RAW264.7 monocytes (left panels) and in mouse BM-MDM (middle panels), detected by RT-PCR. mRNAs for integrin 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 μM) or cyclosporine A (CsA; 1 μM). 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 μm . **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 μm .

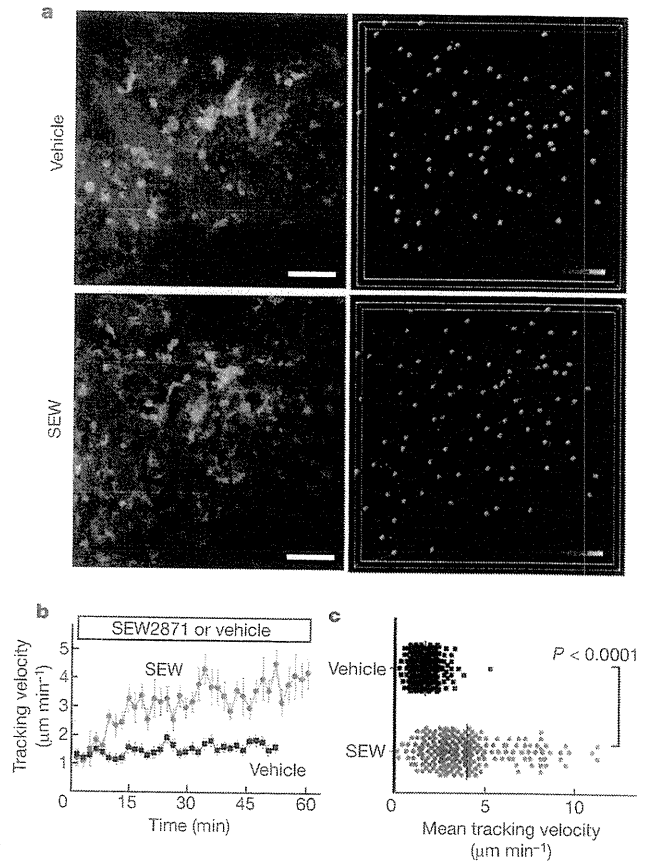


Figure 2 | *In vivo* S1P-mediated increase in motility of osteoclast precursor monocytes visualized using intravital two-photon imaging. **a**, Intravital two-photon imaging of mouse skull bone tissues of heterozygous CX₃CR1-EGFP knock-in mice, in the absence (top panels; Supplementary Video 3) or presence (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 μm . **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.

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

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 S1P₁ was greatly diminished in *S1PR1*^{-/-} bone tissues (Supplementary Fig. 5c), indicating that there was almost complete ablation of S1P₁ expression in this lineage.

Morphohistometric analyses using micro-CT (μ CT) showed that femora of mice genotyped as *S1PR1*^{loxP/loxP} *CD11b-Cre* (*S1PR1*^{-/-}) were osteoporotic, compared with those of control (*S1PR1*^{+/+} *CD11b-Cre*) littermates (Fig. 3a, upper panels). Bone tissue density (bone volume/total volume) of *S1PR1*^{-/-} mice was significantly lower than that of controls (Fig. 3b), and both trabecular thickness and trabecular density were decreased in *S1PR1*^{-/-} bones (Fig. 3c). Mice genotyped as *S1PR1*^{loxP/+} *CD11b-Cre* (heterozygous) were indistinguishable from controls, indicating that a single *S1PR1* allele is sufficient to sustain normal S1P₁-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 *S1PR1*^{-/-} animals, as compared to controls (Fig. 3d), consistent with the decrease in bone density in *S1PR1*^{-/-} mice (Fig. 3b, c). Because S1P 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 S1P₁ 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 S1P in blood is higher than in tissues, S1P-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 *S1PR1*^{-/-} osteoclasts on the bone surface strongly supports the concept of S1P-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 S1P. Some osteoclast precursors may be directly derived within bone marrow spaces (Supplementary Fig. 8, dashed arrow), and they are also susceptible to S1P-driven 'circulation' into the systemic flow. During osteoclast differentiation induced by RANKL, the expression of S1P₁ 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 stimulation²³, suggesting that there is an interesting interaction between circulating S1P and the autonomic nervous system for the regulation of osteoclast precursor mobilization.

This newly revealed role of S1P-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 S1P receptors, including S1P₁ (but not S1P₂), 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 mg kg⁻¹ 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 CX₃CR1-EGFP⁺ F4/80⁺ (Fig. 4c) and CD11b⁺ monocytes (Supplementary Fig. 9), both of which populations include osteoclast precursors, and a concomitant decrease in monocytoïd 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 CX₃CR1-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 S1P receptors other than S1P₁ 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

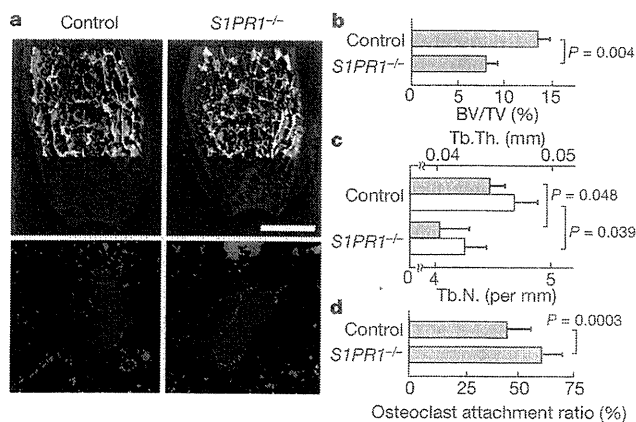


Figure 3 | *In vivo* effect of S1P₁ on bone mineral metabolism.

a, Morphohistometric analyses of control and *S1PR1*^{-/-} (*S1PR1*^{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.

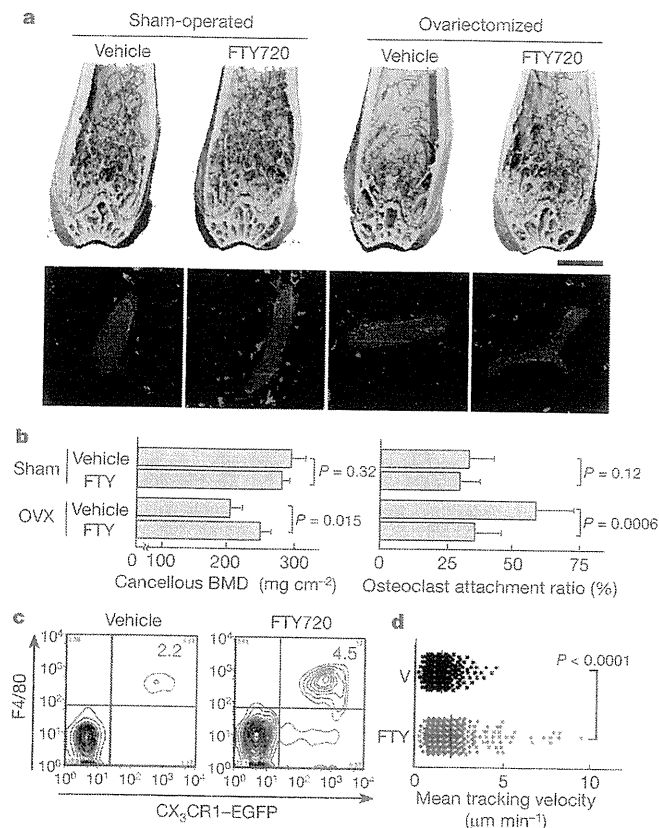


Figure 4 | Preventive effect of FTY720 on ovariectomy-induced osteoporosis. **a**, Effect of FTY720 on bone mineral metabolism. Femurs were collected from mice after four different treatments: sham-operated and vehicle treated, sham-operated and FTY720 treated, ovariectomized and vehicle treated, and 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* S₁P₁-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 transgenic¹⁴ mice, according to a protocol modified from a previous report^{14,11}. The generation of the loxP-flanked *SIP1R* allele (*SIP1R*^{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 (*SIP1R*^{-/-}) 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 staining²⁶ 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., Northup, 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. & Millsten, 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 S₁P₂, 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).