

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（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

関節リウマチ (RA) 患者の骨髄細胞異常と RA 特異的 iPS 細胞の樹立

研究分担者： 西本 憲弘 和歌山県立医科大学 免疫制御学講座 教授
(12月1日より東京医科大学医学総合研究所難病分子制御部門兼任教授)
中畑 龍俊 京都大学 iPS 細胞研究所 副所長
研究協力者： 越智 健介 京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター 助教
橋本 淳 国立病院機構大阪南医療センター 部長
島岡 康則 浜脇整形外科病院 副院長
行岡 正雄 行岡病院 院長

研究要旨

関節リウマチ (RA) の原因病巣は骨髄である可能性が示されている。そこで RA 患者の骨髄細胞における異常発現遺伝子をマイクロアレイとバイオインフォマティクスにより解析した。骨髄での免疫機能とアポトーシスの亢進が示された。また、骨格形成、筋肉形成に関わる機能分子の発現低下が見られ、RA 病態において骨髄細胞が骨格形成、筋肉形成にも関与している可能性が示唆された。RA の複数の家族歴を有する患者と未発症同胞より iPS 細胞の作製を試みた。末梢血単核球では、未発症コントロールからは 8 クローン、MTX 使用 RA 症例から 4 クローンが樹立できたが、トシリズマブ使用例からは 1 クローンしか樹立できなかった。RA 患者由来 iPS 細胞を用い、in vitro で単球系への分化誘導を試みた。Day 20 では、CD45+CD14+細胞は 61% に達し、しかもそのほとんどが CD11b (MAC-1 α 、インテグリン α M、CR3) も発現していた。in vitro で CD14+単球への分化誘導が確認されたことから、骨髄細胞の異常が、遺伝的背景に依存するのか、それとも骨髄環境に依存するのかを来年度の研究で明らかにしたい。

A. 研究目的

関節リウマチ (RA) 患者の骨髄細胞の異常活性化を昨年の研究で明かにした。今年度は症例数をさらに増やして、RA 患者の骨髄細胞機能の異常を詳細に解析した。また、RA 患者では、免疫担当細胞、骨芽細胞、破骨細胞、滑膜細胞の異常に加え、骨格を形成・支持する骨、軟骨、筋肉、脂肪組織に病変が見られ、これらの細胞はすべて骨髄の間葉系細胞から分化する。したがって、根治療法に結びつけるには、RA の原因病巣と考えられる骨髄での初期分化異常の有無を明らかにする必要がある。このような細胞の初期分化の異常を明かにするために、RA 特異的 iPS 細胞の樹立を行った。

B. 研究方法

① 28 例の RA 患者腸骨から採取した骨髄全血を用い Total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ (Agilent Whole Human Genome4x44K[®]) により網羅的な遺伝子発現解析を行った。対照には 11 例の健常人骨髄 (BioChain[®], 米国より購入) を用いた。発現異常を示した遺伝子の gene ontology に基づき、Expression Analysis Systemic Explorer[®] (EASE) バージョン 2.0 を用いて、骨髄細胞の機能異常を検討した。さらに免疫応答に関連する遺伝子の分子間相互作用を Ingenuity Pathways Analysis (IPA)[®]バージョン 7.5. を用いて解析した。

② インフォームドコンセントを得た、親子あるいは同胞内発症の RA 患者ならびに健常同胞の血液単核球ならびに皮膚線維芽細胞を用いて、RA 患者特異的 iPS 細胞の樹立を行った。

(倫理面での配慮) 患者検体の採取はヘルシンキ宣言を遵守し、各施設の倫理委員会の承認のもとに行った。患者情報に関しては、治療施設・氏名・生年月日・住所などの情報を削除し、匿名化した。患者の遺伝子情報の取り扱いに際しては、“ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針”、“疫学研究に関する倫理指針”“臨床研究に関する倫理指針”に沿って、人権の保護について、十分配慮しながら実験を行った。iPS 研究に関しては“臨床研究に関する倫理指針”、“組み替え遺伝子指針”、“ヒト ES 指針”に則って実験計画を提出し、それを遵守して研究を行った。

C. 研究結果

① RA 患者の骨髄全血細胞と健常骨髄 (米国より購入) の比較で、機能が分かっている 744 遺伝子の発現が増強し、838 遺伝子の発現が減少していた。これらの遺伝子の機能をバイオインフォマティクスで分類したところ、免疫応答関連分子は 166 あり、免疫応答の亢進が非常に強く描出された (有意性を示す EASE score 5.5×10^{-55})。それ以外に、ストレス反応 (5.4×10^{-15})、創傷治癒 (4.2×10^{-15})、アポトーシス (5.4×10^{-6})、細胞貪食機能の亢進が見られた。一方、遺伝子発現の低下は骨格形成、筋肉形成、DNA のパッケージング、細胞接着、細胞増殖、細胞移動に係る遺伝子群で見られ、これらの機能低下が示唆された。

② トシリズマブ使用中の 2 例、MTX 使用中の 1 例ならびに健常人コントロールから iPS 細胞の作製を試みた。末梢血単核球では、健常人コントロールからは 8 クローン、MTX 使用 RA 症例から 4 クローンが樹立できたが、トシリズマブ使用例からは 1 クローンしか樹立できなかった。RA 患者由来 iPS 細胞を用い、in

vitro で単球系への分化誘導を試みた。Day 20 では、CD45+CD14+細胞は 61%に達し、しかもそのほとんどが CD11b (MAC-1 α 、インテグリン α M、CR3) も発現していた。

D. 考察

網羅的遺伝子発現解析の結果、骨髄での免疫機能の亢進が再度確認された。細胞のアポトーシスの亢進が示され、死細胞を貪食するマクロファージの活性化とそれに続くインターフェロンの産生増強につながる可能性がある。この所見は、関節炎を発症する DNaseI/KO マウスと酷似しており、病因に係る可能性がある。

また RA 患者特異的 iPS の樹立に成功した。in vitro で CD14+単球への分化誘導が確認されており、どのステージで CD14+CD15+が出現するのか、それとも CD14+CD15+の出現は骨髄環境に依存するのか興味深い。また、IL-6 が iPS 細胞樹立に影響する可能性がある。現在、同じ症例の皮膚線維芽細胞からの iPS 細胞の樹立、別の家系での iPS の樹立を計画している。

E. 結論

RA 患者の骨髄細胞異常が確認された。また、RA 患者由来 iPS 細胞を樹立し、単球系細胞へ分化誘導できた。

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. Hoshi D, Nakajima A, Inoue E, Shidara K, Sato E, Kitahama M, Seto Y, Tanaka E, Urano W, Ichikawa N, Koseki Y, Momohara S, Taniguchi A, Nishimoto N, Yamanaka H. Incidence of serious respiratory infections in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab. *Mod Rheumatol* Feb;22(1):122-7, 2012

2. Ozaki S, Atsumi T, Hayashi T, Ishizu A, Kobayashi S, Kumagai S, Kurihara Y,

- Kurokawa MS, Makino H, Nagafuchi H, Nakabayashi K, Nishimoto N, Suka M, Tomino Y, Yamada H, Yamagata K, Yoshida M, Yumura W. Severity-based treatment for Japanese patients with MPO-ANCA-associated vasculitis: the JMAAV study. *Mod Rheumatol Jun*;22(3):394-404, 2012. Epub 2011 Sep 18.
3. Yamamoto M, Tabeya T, Naishiro Y, Yajima H, Ishigami K, Shimizu Y, Obara M, Suzuki C, Yamashita K, Yamamoto H, Hayashi T, Sasaki S, Sugaya T, Ishida T, Takano KI, Himi T, Suzuki Y, Nishimoto N, Honda S, Takahashi H, Imai K, Shinomura Y. Value of serum IgG4 in the diagnosis of IgG4-related disease and in differentiation from rheumatic diseases and other diseases. *Mod Rheumatol Jun*;22(3):419-25, 2012. Epub 2011 Sep 28.
 4. Mori S, Tokuda H, Sakai F, Johkoh T, Mimori A, Nishimoto N, Tasaka S, Hatta K, Matsushima H, Kaise S, Kaneko A, Makino S, Minota S, Yamada T, Akagawa S, Kurashima A; and the NTM-BIORA (NTM infection in Biologic-treated RA patients) Study Investigators. Radiological features and therapeutic responses of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease in rheumatoid arthritis patients receiving biological agents: a retrospective multicenter study in Japan. *Mod Rheumatol Sep*;22(5):727-37, 2012. Epub 2011 Dec 30.
 5. Okada Y, Shimane K, Kochi Y, Tahira T, Suzuki A, Higasa K, Takahashi A, Horita T, Atsumi T, Ishii T, Okamoto A, Fujio K, Hirakata M, Amano H, Kondo Y, Ito S, Takada K, Mimori A, Saito K, Kamachi M, Kawaguchi Y, Ikari K, Mohammed OW, Matsuda K, Terao C, Ohmura K, Myouzen K, Hosono N, Tsunoda T, Nishimoto N, Mimori T, Matsuda F, Tanaka Y, Sumida T, Yamanaka H, Takasaki Y, Koike T, Horiuchi T, Hayashi K, Kubo M, Kamatani N, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K. A Genome-Wide Association Study Identified AFF1 as a Susceptibility Locus for Systemic Lupus Erythematosus in Japanese. *PLoS Genet.* 2012 Jan;8(1):e1002455. Epub 2012 Jan 26.
 6. Terada M, Kawano F, Ohira T, Nakai N, Nishimoto N, Ohira Y. Effects of Mechanical Over-loading on the Properties of Soleus Muscle Fibers, with or without Damage, in Wild Type and Mdx Mice. *PLoS ONE* 2012;7(4):e34557. Epub 2012 Apr 16.
 7. Hirao M, Hashimoto J, Nishimoto N. Anti-cytokine agents to combat oxidative stress. In: Alcaraz MJ, Gualillo D, Sánchez-Pernaute O. *Oxidative Stress in Advanced Basic Research and Clinical Practice. Studies on Arthritis and Joint Diseases.* Springer (in press)
 8. Nishimoto N, Murakami M, Matsutani T. IL-6 blocker. In: Maurizio Cutolo eds. *Addressing Unmet Medical Needs in RA. the Future Science Group E-Books.*
 9. Murakami M, Tomiita M, Nishimoto N. Tocilizumab in the treatment of systemic juvenile idiopathic arthritis. *Open Access Rheumatology: Research and Reviews.* 2012:4
 10. Ogata T, Yamazaki H, Teshima T, Tsuchiya T, Nishimoto N, Matsuura N. Anti-IL-6 receptor antibody does not ameliorate radiation pneumonia in mice. *Exp Ther Med.* 2012 Aug;4(2):273-276. Epub 2012 May 18
 11. Schoels MM, van der Heijde D, Breedveld FC, Burmester GR, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Gabay C, Gibofsky A, Gomez-Reino JJ, Jones G, Kvien TK, Murakami M, Nishimoto N, Smolen JS. Blocking the effects of interleukin-6 in rheumatoid arthritis and other inflammatory rheumatic diseases: systematic literature review and meta-analysis informing a consensus statement. *Ann Rheum Dis.* 2012 Nov 10. [Epub ahead of print]
 12. Smolen JS, Schoels MM, Nishimoto N, Breedveld FC, Burmester GR, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Gabay C, Gibofsky A, Gomez-Reino JJ, Jones G, Kvien TK, Murakami M, Betteridge N, Bingham C 3rd, Bykerk V, Choy EH, Combe B, Cutolo M, Graninger W, Lanasa A, Martin-Mola E, Montecucco C, Ostergaard M, Pavelka K, Rubbert-Roth A, Sattar N, Scholte-Voshaar M, Tanaka Y, Trauner M, Valentini G, Winthrop KL, de Wit M, van der Heijde D. Consensus statement on blocking the

effects of interleukin-6 and in particular by interleukin-6 receptor inhibition in rheumatoid arthritis and other inflammatory conditions. Ann Rheum Dis. 2012 Nov 21. [Epub ahead of print]

13. Yokota S, Imagawa T, Mori M, Miyamae T, Takei S, Iwata N, Umebayashi H, Murata T, Miyoshi M, Tomiita M, Nishimoto N, Kishimoto T. Long-term treatment of systemic juvenile idiopathic arthritis with tocilizumab: results of an open-label extension study in Japan. Ann Rheum Dis. 2012 Nov 30. [Epub ahead of print]
14. 村上美帆, 西本憲弘. IL-6 阻害薬. 医薬ジャーナル. 医薬ジャーナル社. 2012;48(6):75-80
15. 村上美帆, 西本憲弘. IL-6 を標的とした RA 関節破壊の制御. 医学のあゆみ. 医歯薬出版. 2012 : 242 (9) : 764-769
16. 西本憲弘, 村上美帆. 抗体を用いた医療-血清療法から抗体医薬まで-「抗 IL-6 抗体」. 臨床と微生物. 2012 : 39(5):445-450
17. 村上美帆, 西本憲弘. 炎症性サイトカインと関節リウマチ. CLINICAL CALCIUM. 医薬ジャーナル社. 2012 : 22(11) : 107-116
18. 西本憲弘, 村上美帆. 炎症性自己免疫疾患における治療標的としての IL-6. 日本臨床増刊号「血管炎」. 日本臨床社. 2013 : 71 (増刊号 1) : 623-629
19. 西本憲弘. IL-6 標的薬. 特集/関節リウマチ治療における分子標的薬の進歩. 臨床薬理. 三原医学社. 2013 : 44 (1) : 9-14

2. 学会発表

1. Nishimoto N. Interleukin-6 as a therapeutic target in inflammatory autoimmune diseases. - From rheumatoid arthritis to vasculitis syndromes-. The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012. Tokyo, conference center. Tokyo, Japan. 2012.3.29
2. Nishimoto N, Lee HM, Murakami M, Aoki C, Li Y, Matsutani T. Expressions of immune response related genes were

normalised after Tocilizumab treatment in rheumatoid arthritis (RA) patients. EULAR 2012. Messe Berlin. Berlin. Germany. 2012.6.6-9.

3. 松谷隆治. 李 穎. 村上美帆. 李 慧敏. 青木千恵子. 西本憲弘. リンパ球サブセットの解析. 関西関節リウマチセミナー. ヒルトン大阪. 大阪. 2012.1.20
4. Lee HM, Aoki C, Murakami M, Matsutani T, Nishimoto N. Overexpressions of S100A4/A6/A9/A11/A12 in the patients with RA, SLE, and JIA and correlations of their expression levels with the local and systemic inflammatory biomarkers in RA patients. 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会・第 21 回国際リウマチシンポジウム. ポスター発表 1. グランドプリンスホテル新高輪. 東京. 2012.4.26-28
5. Nishimoto N. Advanced therapeutic strategy using anti-IL6 receptor antibody, tocilizumab, in RA. 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会・第 21 回国際リウマチシンポジウム. 第 21 回国際リウマチシンポジウム 3. グランドプリンスホテル新高輪. 東京. 2012.4.26-28
6. 西本憲弘. 免疫系におけるサイトカインの働きとリウマチ性疾患. 第 22 回日本小児リウマチ学会総会・学術集会 教育講演. ウィルあいち. 愛知. 2012.10.5-7
7. Nishimoto N. Discovery of IL-6 and its clinical application - The journey from IL-6 to tocilizumab-第 41 回日本免疫学会学術集会 International Symposium 12 Translational Research in Immunology 第 41 回日本免疫学会学術集会 シンポジウム. 神戸国際会議場. 2012.12.5-7

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得
特記すべきことなし。
2. 実用新案登録
特記すべきことなし。
3. その他
特記すべきことなし。

分担研究報告書

関節リウマチの病態を制御する末梢血単球分画の解析に関する研究

研究分担者氏名 桑名 正隆 慶應義塾大学医学部リウマチ内科 准教授
研究協力者氏名 瀬田 範行 慶應義塾大学医学部リウマチ内科 助教
堀内 行雄 川崎市立川崎病院 病院長
島岡 康則 浜脇整形外科病院 副院長
越智 健介 東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター 助教

研究要旨

昨年度の研究成果から、関節破壊の進行した関節リウマチ (RA) 患者の腸骨から末梢血に動員される CD14⁺CD15⁺CXCR4^{low} 細胞は関節を障害する単球で、骨芽細胞や軟骨芽細胞への分化能を有する単球由来多能性細胞の前駆細胞を多数含む末梢血 CD14⁺CD15⁻CXCR4^{high} 細胞は関節を保護する単球であることを見いだした。そこで、関節を障害する単球と保護する単球の量的バランスが健常人と RA では異なる可能性を着想した。本年度は本仮説の妥当性を検証するため、末梢血中の関節を障害する単球と保護する単球の比率を RA 患者と健常人で比較するとともに、この二つの細胞群の遺伝子発現プロファイルと比較した。RA 患者 16 例と健常人 14 例の末梢血単核球 (PBMC) を用いて CD14⁺単球中の CD15 と CXCR4 発現をフローサイトメトリーで解析し、CD14⁺CD15⁺CXCR4^{low} 単球と CD14⁺CD15⁻CXCR4^{high} 単球の比率を比較したところ、RA 患者では健常人に比べて有意に CD14⁺CD15⁺CXCR4^{low} 単球 (関節を障害する単球) へと偏奇していた ($p < 0.01$)。また、RA 患者 23 例と健常人 12 例の PBMC をそれぞれプールし、フローサイトメトリーを用いて関節を障害する単球と保護する単球を分離し、二つの細胞群における IL-1 α 、IL-6、IL-8、TNF α 、MCP-1、CCR1、CCR2、CCR5、CX3CR1 の遺伝子発現を半定量的 PCR または Real-time PCR で比較した。その結果、IL-6、TNF α 、CCR5 は関節を障害する単球で、CX3CR1 は関節を保護する単球で発現レベルが高かった。以上の結果から、RA の病態において関節を障害する単球と保護する単球が関与するという仮説の妥当性が今回の検討で検証され、ケモカイン受容体の発現パターンの違いから、この二つの細胞群は異なるケモカインにより動態が制御されている可能性が示唆された。

A. 研究目的

昨年度の本研究班において、関節リウマチ (RA) の病態を制御する可能性のある末梢血中の単球分画として CD14⁺CD15⁺CXCR4^{low} 単球と CD14⁺CD15⁻CXCR4^{high} 単球を同定した。さらに、関節破壊の進行した RA 患者の腸骨に多数存在し、腸骨から末梢血に動員される CD14⁺CD15⁺CXCR4^{low} 細胞は関節を障害する単球で、骨芽細胞や軟骨芽細胞への分化能を有する単球由来多能性細胞の前駆細胞を多数含む末梢血 CD14⁺CD15⁻CXCR4^{high} 細胞は関節を保護する単球であり、関節を障害する単球と保護する単球の量的バランスが健常人と RA では異

なる可能性を着想した。そこで、本仮説の妥当性を検証するため、本年度は末梢血中の関節を障害する単球と保護する単球の比率を RA 患者と健常人で比較するとともに、この二つの細胞群の遺伝子発現プロファイルと比較した。

B. 研究方法

RA 患者 16 名 (平均年齢 52.3 歳、男性 4 名) と健常人 14 名 (平均年齢 32.2 歳、男性 7 名) から得た末梢血から比重遠心法で末梢血単核球 (PBMC) を分離して CD14 (RM052)、CD15 (80H5)、CXCR4 (12G5) の発現をフローサイト

メトリーで解析した。そして、関節を障害する単球 (CD14⁺CD15⁺CXCR4^{low} 単球) と保護する単球 (CD14⁺CD15⁻CXCR4^{high} 単球) の比率を算出して、RA 患者と健常人で比較した。更に、別の RA 患者 23 名 (平均年齢 56.8 歳、男性 7 名) と健常人 12 名 (平均年齢 30.6 歳、男性 12 名) の PBMC をそれぞれプールし (RA:10⁹ 個、健常人:10⁹ 個)、フローサイトメトリー (MoFlo™) で関節を障害する単球 (CD14⁺CD15⁺CXCR4^{low} 単球) と関節を保護する単球 (CD14⁺CD15⁻CXCR4^{high} 単球) を分離した。そして、この二つの細胞群における IL-1 α 、IL-6、IL-8、TNF α 、MCP-1、CCR1、CCR2、CCR5、CX3CR1 の発現を半定量的 PCR または Real-time PCR で解析し、その発現を RA と健常人で比較した。半定量的 PCR では、バンドの強さを Image/J® software で測定し、GDPAH の発現量で補正した。

(倫理面への配慮)

ヘルシンキ宣言に従い、対象となる個人の擁護を優先し、プライバシーの保護、研究協力の任意性、提供を受けた検体の取り扱い方、得られる研究成果の医学的貢献度などについて研究協力者に十分説明した上で、検体採取前に文章による同意を得た。なお、本研究は事前に各共同研究施設の臨床研究審査委員会の承認を受けた。

C. 研究結果

1) 末梢血中の関節を障害する単球と保護する単球の比率の検討

フローサイトメトリーで CD14⁺細胞にゲートをかかけたのち、CD15 と CXCR4 で展開して、図 1 のように関節を障害する単球 (CD14⁺CD15⁺CXCR4^{low} 単球) と関節を保護する単球 (CD14⁺CD15⁻CXCR4^{high} 単球) の比率を算出した。

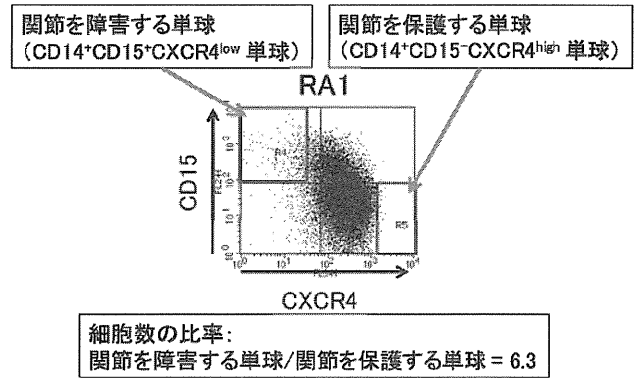


図 1 関節を障害する単球と保護する単球の比率 (代表例を提示)

関節を障害する単球/関節を修復する単球の比率を RA 患者と健常人で比較したところ、RA 患者で有意に高く、健常人に比べて関節を障害する単球へと偏奇していた ($p < 0.01$) (図 2)。

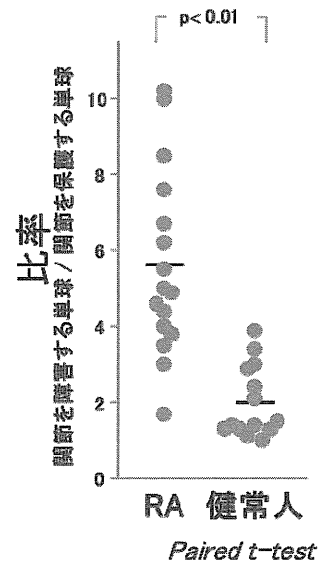


図 2 RA 患者と健常人の関節を障害する単球と保護する単球の比率の比較

2) 末梢血中の関節を障害する単球と関節を保護する単球の遺伝子発現プロファイルの検討

図 3 のようにフローサイトメトリー (MoFlo™) を用いて RA 患者および健常人の PBMC から関節を障害する単球 (CD14⁺CD15⁺CXCR4^{low} 単球) と関節を保護する単球 (CD14⁺CD15⁻CXCR4^{high} 単球) を高率に含む

分画を分離した。

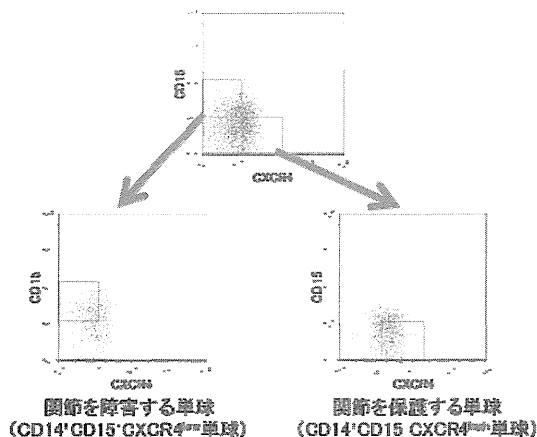


図3 フローサイトメトリーを用いたRA患者と健常人の関節を障害する単球と保護する単球の分離

まず、この二つの細胞群における遺伝子発現プロファイルを、健常人サンプルを用いて半定量的PCRで解析した。その結果、TNF α は関節を障害する単球で、IL-6とCX3CR1は関節を保護する単球で発現レベルが高かった(図4)。

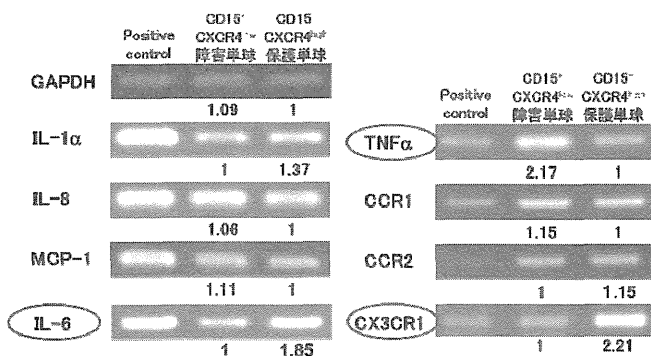


図4 健常人の関節を障害する単球と保護する単球の遺伝子発現プロファイル(半定量的PCR)

半定量的PCRで発現差のみられたTNF α 、IL-6、CX3CR1に、以前に行ったフローサイトメトリーの検討で健常人に比べて有意にRAで発現レベルが高かったCCR5を加えて、4つの遺伝子の発現をRA患者と健常人由来サンプルを用いてReal-time PCRで調べた(図5)。結果

は、半定量的PCRの結果と同様にTNF α は関節を障害する単球で、CX3CR1は関節を保護する単球で発現レベルが高かった。一方、IL-6の発現は半定量的PCRの結果と異なり、関節を障害する単球で発現レベルが高かった。CCR5の発現は、関節を障害する単球で発現レベルが高かった。TNF α 、IL-6、CCR5の発現レベルは、健常人に比べてRA患者で高い傾向を認めた。

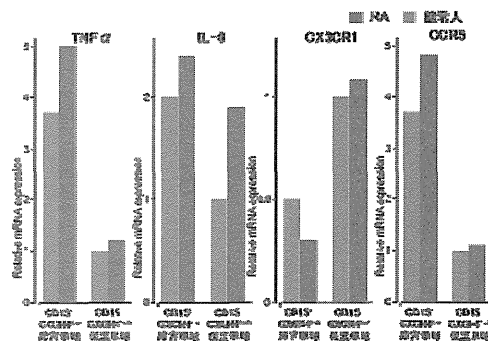


図4 RA患者と健常人の関節を障害する単球と保護する単球のTNF α 、IL-6、CX3CR1、CCR5の発現(Real-time PCR)

D. 考察

本研究結果より、末梢血中の関節を障害する単球と保護する単球の比率は、RA患者で関節を障害する単球へと偏奇していることが明らかになり、RAの病態において関節を障害する単球と関節を保護する単球が関与するという仮説の妥当性が確認された。また、関節を障害する単球と保護する単球の遺伝子発現プロファイルに明らかな差がみられた。特に、関節を障害する単球ではTNF α 、IL-6という炎症性サイトカインの発現が亢進していた。RAに対する分子標的治療薬の主要な標的分子が関節を障害する単球で発現レベルが高かったことより、関節を障害する単球そのものが今後の新たな治療標的になる可能性が考えられた。

一方、関節を障害する単球と保護する単球ではケモカイン受容体の発現レベルに差がみられた。関節を障害する単球ではCCR5の発現が高かった。CCR5のリガンドとしてMIP-1 α やRANTESが知られている。関節を保護する単球は障害する単球に比べて

fractalkine/CX3CL1 に対する受容体である CX3CR1 の発現レベルが高いことが判明した。RA 関節滑膜に存在するマクロファージ、線維芽細胞、血管内皮細胞、樹状細胞が fractalkine を発現して、単球やリンパ球の関節への浸潤を促すことで関節炎の病態に関わるという報告がある。また、骨芽細胞が fractalkine を高発現し、CX3CR1 を高発現する破骨細胞の前駆細胞を引き寄せ、破骨細胞への分化を誘導するという報告もある。従って、関節を保護する単球も骨芽細胞に発現する fractalkine が集簇する骨形成局所にリクルートされる可能性がある。さらに、単球自身が骨芽細胞へ分化し、関節の保護に寄与する可能性が想定された。

これまでの検討結果と合わせて以下の病態が想定される。RA の末梢血中には関節を障害する単球と保護する単球という異なる細胞群が存在し、関節を障害する単球は MIP-1 α や RANTES の受容体である CCR5 を高発現しており、関節を保護する単球は SDF-1 や Fractalkine の受容体である CXCR4 や CX3CR1 を高発現していることより、これら2つの細胞はそれぞれ異なるケモカインによって動態を制御されている(図6)。また、RA患者は健康人に比べて末梢血中の関節を障害する単球の比率が高かったことから、この2つの細胞群の量的バランスはRAと健康人の間で異なる(図7)。

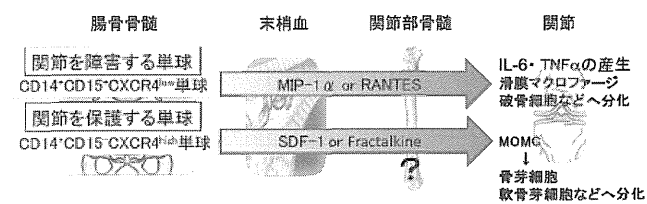


図6 RA病態における関節を障害する単球と保護する単球の動態と役割(仮説)

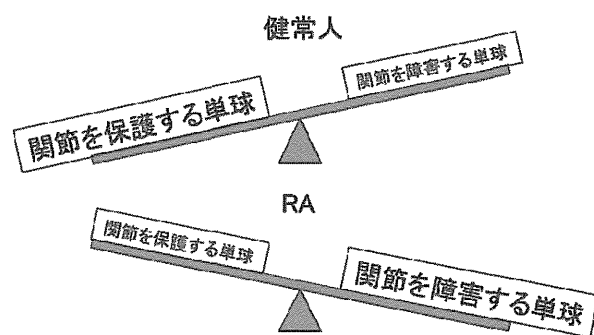


図7 健康人とRA患者における関節を障害する単球と保護する単球の量的バランス(仮説)

最後に、今回の結果では IL-6 の発現パターンが半定量的 PCR と Real-time PCR では異なっていたが、この理由は不明である。しかし、本検討は PBMC をプールして得た RA 患者と健康人由来のそれぞれ 1 サンプルのみを用いた検討であることより、今後は新たな対象者のプール検体を用いた再検討が必要と考えられた。

E. 結論

末梢血中にはRA病態を促進または抑制する単球サブセットが存在し、それらのバランスがRA病態を制御する可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Seta N, Okazaki Y, Izumi K, Miyazaki H, Kato T, and Kuwana M. Fibronectin binding is required for human circulating monocytes to acquire the mesenchymal/endothelial differentiation potential. Clin. Dev. Immunol. 2012; 2012: 820827.
2. Yamaguchi Y, and Kuwana M. Proangiogenic hematopoietic cells of monocytic origin: roles in vascular regeneration and pathogenic processes of systemic

sclerosis. Histol. Histopathol. 2013;
28(2): 175-183.

2. 学会発表

1. 桑名正隆: 強皮症における血管内皮前駆細胞異常とその是正を目指した新たな治療戦略. 第40回日本臨床免疫学会(東京). 2012. 9. (ワークショップ2: 免疫疾患における再生医学)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ヒト多能性幹細胞からの単球系細胞分化に関する研究

研究分担者 中畑 龍俊 京都大学 iPS 細胞研究所 教授・副所長

研究要旨

我々が開発したヒト iPS 細胞からの血球分化系(Niwa et al., PLOS one, 2011)を応用して、単球・マクロファージ・樹状細胞を分化させる系を構築した。この系を用いて、マクロファージ・樹状細胞の機能評価を行った。5 クローン of ヒト iPS/ES 細胞株から安定して誘導可能であった。また、単球系の純度は一貫して 60-90%程度であり、細胞純化を行わずに機能評価が可能であった。分化した単球をマクロファージに分化させ、さらに M1/M2 マクロファージへと分極させることへ成功した。

A. 研究目的

人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells: iPS 細胞)は、京都大学の山中らによって開発された細胞で、ヒト体細胞から誘導され、ES 細胞と同様の多分化能を有する。リウマチ性疾患では、自然免疫担当細胞が疾患形成に果たす役割は大きい。患者由来の血球細胞を用いた検討は、病気の活動性や治療薬による影響を受けやすいことから、問題が多い。患者由来 iPS 細胞を使用して、一定の条件下で分化させた免疫細胞同士を比較することにより、より精密な病態解析が行えることが期待できる。本研究班では前年度より開発中の iPS 細胞からの単球分化系の評価を引き続き行った。

B. 研究方法

我々が開発したヒト iPS 細胞からの血球分化系(Niwa et al., PLOS one, 2011)を応用して、単球・マクロファージ・樹状細胞を分化させる系を構築した。この系を用いて、マクロファージ・樹状細胞の機能評価を行った。

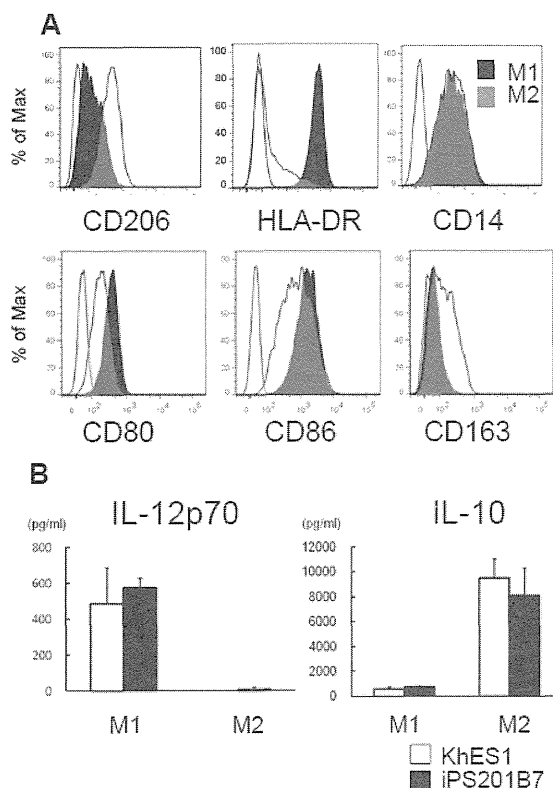
(倫理面での配慮)

本研究では個人情報に付随したヒト由来試料の取り扱いはない。組み替え遺伝子指針、ヒト ES 指針に則って実験計画を提出し、それを

遵守して研究を行っている。

C. 研究結果

単球系細胞分化系の評価として、クローン数を増やして検討したが、5 クローン of ヒト iPS/ES 細胞株から安定して誘導可能であった。また、単球系の純度は一貫して 60-90%程度であり、細胞純化を行わずに機能評価が可能であった。分化した単球をマクロファージに分化させ、さらに M1/M2 マクロファージへと分極させることが可能か検討したところ、マクロファージは刺激に対して M1/M2 それぞれに一致するサイトカイン分泌能を示した。したがって、ヒト多能性幹細胞から誘導したマクロファージは適切な刺激により分極が可能であることが判明した。



図：ヒト多能性幹細胞より誘導したM1/M2マクロファージの機能

D. 考察

本法で作製した単球系細胞は形態学的やサイトカイン産生能について、プライマリ血球細胞に類似していた。一方、樹状細胞のHLA-DR発現はプライマリ単球より誘導した樹状細胞より低く、アロT細胞の刺激能も低かった。概ね良好な分化系を樹立したと考えているが、さらなる検討が必要である。

E. 結論

単球分化系を経て成熟した樹状細胞・マクロファージを得ることが可能になった。引き続き、共同研究として慢性関節リウマチ患者さんからiPS細胞を樹立し、この系を用いて解析を進めていきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sakai H., Okafuji I., Nishikomori R., Abe J., Izawa K., Kambe N., Yasumi T., Nakahata T., Heike T.: The CD40-CD40L axis and INF-g play critical roles in Langerhans giant cell formation. *Int. Immunol.* 24(1):5-15,2012.
2. Izawa K., Hijikata A., Tanaka N., Kawai T., Saito M.K., Goldbach-Mansky R., Aksentijevich I., Yasumi T., Nakahata T., Heike T., Nishikomori R., Ohara O.: Detection of base substitution-type somatic mosaicism of the NLRP3 gene with >99.9% statistical confidence by massively parallel sequencing. *DNA Res.* 19(2):143-152,2012..
3. Hiejima E., Komatsu H., Takeda Y., Sogo T., Inui A., Okafuji I., Nishikomori R., Nakahata T., Fujisawa T.: Acute liver failure in young children with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis without macrophage activation syndrome: Report of two cases. *J. Pediatr. Child Health* 48(3):E122-5,2012.
4. Kawai T., Nishikomori R., Izawa K., Murata Y., Tanaka N., Sakai H., Saito M., Yasumi T., Takaoka Y., Nakahata T., Mizukami T., Nunoi H., Kiyohara Y., Yoden A., Mutara T., Sasaki S., Ito E., Akutagawa H., Kawai T., Imai C., Okada S., Kobayashi M., Heike T.: Frequent somatic mosaicism of NEMO in T cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia and immunodeficiency. *Blood* 119(23):5458-66,2012.
5. Tsumura M., Okada S., Sakai H., Yasunaga S., Ohtsubo M., Murata T., Obata H., Yasumi T., Kong X., Abhyankar A., Heike T., Nakahata T., Nishikomori R., Al-Muhsen S., Boisson-Dupuis S., Casanova J.,

- AlZahrani M., Shehri MA., ElGhazali G., Takihara Y., Kobayashi M.: Dominant-negative STAT1 SH2 domain mutations in unrelated patients with Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. *Human Mutation* 33(9):1377-87, 2012.
6. Tanaka T., Takahashi K., Yamane M., Tomida S., Nakamura S., Oshima K., Niwa A., Nishikomori R., Kambe N., Hara H., Mitsuyama M., Morone N., Heuse J.E., Yamamoto T., Watanabe A., Sato-Otsubo A., Ozawa S., Asaka I., Heike T., Yamanaka S., Nakahata T., Saito M.K.: Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. *Blood* 120(6):1299-308, 2012.
 7. Kawai T., Saito M., Nishikomori R., Yasumi T., Izawa K., Murakami T., Okamoto N., Mori Y., Nakagawa N., Imai K., Nonoyama S., Wada T., Yatie A., Oomori K., Nakahata T., Heike T.: Multiple reversions of an IL2RG mutation restore combined immunodeficiency patient. *J. Clin. Immunol.* 32(4):690-7, 2012.
 8. Morishima T., Nomura A., Saida S., Watanabe K., Yagi H., Matsumoto M., Fujimura Y., Heike T., Nakahata T., Adachi S.: Pediatric idiopathic TTP diagnosed with decreased ADAMTS13 activity. *Pediatr. Int.* 54(3):422-3, 2012.
 9. Nakazawa Y., Saito S., Yanagisawa R., Suzuki T., Toshiro Ito T., Ishida F., Muramatsu H., Matsumoto K., Kato K., Ishida H., Umeda K., Souichi Adachi S., Nakahata T., Koike K.: Recipient seropositivity for adenovirus type 11 is highly predictive of the development of hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* in press.
 10. Saida S., Watanabe K., Sato-Otsubo A., Terui K., Yoshida K., Okuno Y., Toki T., Wang RN., Shiraishi Y., Miyano S., Kato I., Morishima T., Fujino H., Umeda K., Hiramatsu H., Adachi S., Ito E., Ogawa S., Ito M., Nakahata T., Heike T.: Clonal selection in xenografted TAM recapitulates the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome. *Blood* in press.
 11. 斎藤潤、中畑龍俊：疾患特異的 iPS 細胞、再生医療 (Vol.12 No.1)、19-32、2013
- ## 2.学会発表
1. 中畑龍俊;特別講演：iPS 細胞研究の今、その可能性と将来展望. 第 115 回日本小児科学会学術集会 2012 年 4 月 20-22 日 (20 日) 福岡国際会議場
 2. 井澤和司、土方敦司、西小森隆太、小原収、田中尚子、河合朋樹、八角高裕、斎藤潤、中畑龍俊、平家俊男：次世代シーケンサーによる NLRP3 体制モザイクの診断. 第 115 回日本小児科学会学術集会 2012 年 4 月 20-22 日 (21 日) 福岡国際会議場
 3. 石田宏之、今井耕輔、本間健一、田村真一、今村俊彦、斎藤潤、大嶋宏一、伊藤雅文、中畑龍俊、野々山恵章：白血球減少、骨髄異形成とリンパ浮腫を呈する GATA-2 異常. 第 115 回日本小児科学会学術集会 2012 年 4 月 20-22 日 (21 日) 福岡国際会議場
 4. Yanagimachi M, Niwa A, Tanaka T Oshima K, Saito M Nakahata T: Differentiation of monocytic lineage cells from human iPS cells by using a serum and feeder free culture method. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June 13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.
 5. Morishima T, Watanabe K, Niwa A, Tanaka T, Saida S, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Matsubara K, Adachi S,

- Nakahata T, Heike T: Induced pluripotent stem cell model of severe congenital neutropenia with HAX1 gene deficiency. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.
6. Yokoyama K, Ikeya M, Nasu A, Tanaka T, Saito M, Umeda K, Nishikomori R, Nakahata T, Heike T, Toguchida J: Understanding the pathology of the arthropathy in chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome by using iPS cells technology. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.
 7. Tanaka T, Saito MK., Takahashi K, Yamanaka S, Nakahata T: Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.
 8. Niwa, Akira, Saito, Megumu, Oshima, Koich, Yanagimachi, Masakatsu, Tanaka, Takayuki, Kato, Itaru, Nakahata, Tatsutoshi: Human ESC/IPSC-Derived mesenchymal stroma can support hematopoietic progenitors. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.
 9. Manabe A, Kikuchi A, Kojima S, Tsuchida M, Hayashi Y, Koike K, Ohara A, Ishii E, Komada Y, Nakahata T: Long-term follow-up of more than 545 children with myelodysplastic syndrome (MDS) and myeloproliferative neoplasms(MPN). VI International Symposium on Myelodysplastic Syndromes and Bone Marrow Failures in Childhood, November 7-9, 2012, Prague
 10. Honda Y, Tsuchida M, Masunaga A, Yoshimi A, Kojima S, Ito M, Kikuchi A, Nakahata T, Manabe A: Clinic characteristics of 23 children with juvenile myelomonocytic leukemia who developed blast crisis: MDS Committee of LSPHO. VI International Symposium on Myelodysplastic Syndromes and Bone Marrow Failures in Childhood, November 7-9, 2012, Prague
 11. Hasegawa D, Chen X-j, Hirabayashi S, Ishida Y, Watanabe S, Zaike Y, Tsuchida M, Masunaga A, Yoshimi A, Hama A, Kojima S, Ito M, Nakahata T, Manabe A: Treatment outcome of 67 cases with refractory cytopenia of childhood(RCC): A Protective Registration Through The Japanese Society of Pediatric Hematology/Oncology(JSPHO). VI International Symposium on Myelodysplastic Syndromes and Bone Marrow Failures in Childhood, November 7-9, 2012, Prague
 12. 中畑龍俊:iPS細胞を用いた今後の医療の可能性、第23回小児科血液セミナー、2012年7月19日
 13. 中畑龍俊;特別講演:小児患者におけるiPS細胞の応用、第49回日本小児アレルギー学会 2012年9月15-16日(16日) 大阪国際会議場
 14. 中畑龍俊;特別講演:iPS細胞研究の進展、第59回日本臨床検査医学会学術集会 2012年11月29日~12月2日(11/30) 国立京都国際会館
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし
1. その他
なし

骨細胞ネットワークによる骨量調節機構に関する研究

研究分担者 小守壽文 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 教授
研究協力者 森石武史 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 技術職員

研究要旨

これまで、骨細胞死が骨吸収を引き起こすことから、骨細胞は破骨細胞分化・機能を抑制していると考えられてきた。また実験的にも、骨細胞を死滅させることによって骨細胞を欠損させ、骨細胞の機能は骨吸収を抑制し、骨形成を促進させることと結論づけられた。我々は、BCL2を骨芽細胞特異的に発現させたトランスジェニック(tg)マウスでは、75%の骨細胞死が起こるが、骨吸収を惹起しないことを見いだした。BCL2 tg マウスでは、骨細胞突起の数が減少し、骨細管が著減していた。骨細胞がアポトーシスを起こした場合、貪食されないため、二次性ネクロシスを起こし、骨細管を通して炎症惹起分子を骨髓腔に排出し、破骨細胞分化・活性の亢進および骨吸収を引き起こすが、BCL2 tg マウスでは、骨細管の著減のためそれが起こらないと考えられた。すなわち、これまで見てきた骨細胞機能は骨細胞のネクロシスによって惹起される反応を見ていたに過ぎないことが明らかとなった。このマウスを用い、骨細胞ネットワークの機能を解析した。骨細胞ネットワークは、生理的条件下では、骨芽細胞機能を低下させ骨形成を抑制、破骨細胞分化・活性を促進させ骨吸収を促進させることが明らかとなった。非荷重時には、骨細胞ネットワークは、骨細胞によるスクレロシン誘導による骨形成抑制および骨芽細胞での Rank1 発現誘導により破骨細胞分化・活性促進させ、骨吸収を増加、骨量を減少させることが明らかとなった。骨細胞ネットワークは、以前からメカニカルストレスの感知・応答システムと考えられてきたが、この tg マウスによりそれを証明することができた。

A. 研究目的

骨細胞は、骨の中で骨細管中を通る骨細胞突起によって連結し、骨細胞ネットワークを形成している。生体内の骨細胞機能は、骨細胞死が起きた時に骨にどのような変化が起こるかによって推測されてきた。すなわち、微小骨折等により骨細胞が死ぬと、その部位がリモデリングによって置き換えられるために、骨細胞は骨リモデリングに重要と考えられてきた。しかし、この骨リモデリングは、骨細胞死によって惹起された現象か骨細胞が消失したことによって起きた現象か区別する必要がある。これを区別するには、骨細胞死が必ず骨吸収を惹起するかを検討する必要があるが、骨吸収を惹起しない骨細胞死はこれまで報告されていなかった。今回、骨細胞突起および

骨細管の減少により骨細胞死を起こしたマウスを作製したので、このマウスを用いて骨細胞ネットワークの骨量調節における機能を明らかにすることにした。

B. 研究方法

BCL2 を骨芽細胞特異的に発現させた tg マウスでは、骨細胞突起の数が減少し骨細胞は徐々にアポトーシスにより死んでいった。骨細胞のない骨小腔が蓄積していき、4 ヶ月齢では骨細胞ネットワークがほぼ全域にわたって破綻していた。まず、BCL2 tg マウスの頭蓋冠由来細胞を用いて、野生型マウスの頭蓋冠由来細胞と骨芽細胞分化を比較した。次に、BCL2 tg マウスの頭蓋冠由来細胞と骨髓細胞を共培養し、破骨細胞分化を野生型マウス由

来細胞の共培養と比較した。さらに、BCL2 tg マウスのトランスジーン発現レベルをリアルタイム RT-PCR で測定、骨細胞死の頻度を TUNEL 染色で計測、骨量をマイクロ CT、骨形成、骨吸収を骨組織形態計測で測定し、4 者の関係を継時的に調べた。また、BCL2 tg マウスと野生型マウスで、尾部懸垂により後肢に非荷重状態を作り、骨量、骨形成、骨吸収をマイクロ CT と骨組織形態計測で測定した。また、骨形成、骨吸収に関わる遺伝子発現を荷重時と非荷重時でリアルタイム RT-PCR で比較した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、本学の動物実験委員会で承認されたものであり、国の「動物の保護および管理に関する法律」などに従い、動物愛護の観点に十分配慮して行った。マウスは麻酔薬で安楽死させた。

C. 研究結果

BCL2 tg マウスと野生型マウスの頭蓋冠由来細胞を用いて骨芽細胞分化を比較したが、両者に差を認めなかった。また、それぞれの頭蓋冠由来細胞と骨髄細胞を共培養し、破骨細胞分化を比較したが、差を認めなかった。したがって、BCL2 tg マウスの骨芽細胞は、その分化能および破骨細胞支持能において野生型と同レベルであると考えられた。トランスジーン発現レベルは 2 週齢で最も高く、以後漸減、4 ヶ月齢以降は低いレベルで推移した。TUNEL 陽性細胞の頻度は、5-6 週齢で 20%、10 週齢で 50%、4 ヶ月齢で 75% と最大に達し、8 ヶ月齢では、リモデリングにより 50% に低下した。マイクロ CT 解析で、BCL2 tg マウスの骨幹部皮質骨の厚さは、10 週齢から 4 ヶ月齢にかけて有意に上昇、4 ヶ月齢で骨形成率および血中オステオカルシンの上昇を見た。破骨細胞数は 2 週齢で増加、6 週齢移行は低下しており、血中 TRAP5b も 4 ヶ月齢で低下していた。尾部懸垂実験では、野生型マウスで骨量の減少、破骨細胞数の増加が認められたの

に対し、BCL2 tg マウスでは、両者ともに認められなかった。尾部懸垂において、野生型マウスでは、骨芽細胞で Rank1 の発現上昇が認められたが、BCL2 tg マウスでは認められなかった。また、通常の荷重状態でも BCL2 tg マウスの骨芽細胞での Rank1 発現は低下していた。スクレロスタチンの発現は、免疫組織染色にて、野生型マウスの脛骨後側で発現増加を認めたが、BCL2 tg マウスでは認められなかった。また、Western blot にて BCL2 tg マウスの骨芽細胞では β -catenin の増加を認めた。一方、TUNEL 陽性細胞頻度の低い 6 週齢の BCL2 tg マウスは、尾部懸垂で、野生型マウスと同程度の骨量減少を認めた。

D. 考察

BCL2 tg マウスでは骨細胞死を起こしても骨吸収の増加が認められず、逆に低下していた。これは、骨細胞死が必ず骨吸収を惹起するというこれまでの観察に反していた。BCL2 tg マウスでは、骨細胞突起が減少し、骨細胞突起が通る骨細管も当然減少していた。骨細胞は骨基質内に存在するため、アポトーシスを起こしてもマクロファージによって貪食されない。したがって、結局細胞膜は破綻し二次性ネクローシスを起こす。ネクローシスを起こすと、骨細管を通過して、HMGB1, S100, HSP, ATP, 尿酸等の炎症惹起分子は骨髄腔に排出されマクロファージを活性化、TNF- α , IL-6, IL1 等の破骨細胞分化活性化因子が放出され、破骨細胞による骨吸収が始まると考えられる。しかし、BCL2 tg マウスでは、骨細管が著明に減少していたため、二次性ネクローシスを起こしても炎症惹起分子は骨髄腔に排出されず、破骨細胞分化の亢進及び骨吸収が起こらなかったと考えられた。したがって、これまで、骨細胞死によって骨吸収が起きていた現象を、骨細胞が破骨細胞および骨吸収を抑制しているためと考えられてきたが、これは誤りで、骨吸収は骨細胞のネクローシスによって引き起こされていたと考えられる。骨細胞の機能としては、これまでの考えと逆に、破

骨細胞分化・活性を刺激していると考えられる。骨形成に関しても、これまでの考えと異なり、骨細胞は骨芽細胞の活性を抑制、骨形成を抑制していると考えられる。非荷重状態にすると、破骨細胞数が増加、骨形成が低下するが、骨細胞は、骨芽細胞での RANKL 発現を誘導し破骨細胞分化・活性を増強、骨吸収を促進させ、骨細胞におけるスクロステチンの発現を誘導、Wnt シグナルを阻害し骨芽細胞の機能を低下させると考えられる。

E. 結論

これまで、骨細胞死によって骨吸収が惹起されるのは、骨細胞が破骨細胞を抑制するためと考えられてきたが、これは、骨細胞の二次性ネクロシスによって起こることであり、骨細胞は本来、破骨細胞を活性化、骨芽細胞機能を抑制していることが明らかになった。また、骨細胞ネットワークはメカニカルストレスを感受、応答するシステムであることが証明された。さらに、骨細胞ネットワークの機能は非荷重状態ではさらに増強され、骨芽細胞における RANKL 誘導を介した破骨細胞分化・活性化の促進、骨細胞におけるスクロステチン誘導による骨芽細胞機能の抑制により、骨量減少を引き起こすことが明らかとなった。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Komori T. Function of the osteocyte network in the regulation of bone mass. Cell Tissue Res. in press.

2) Moriishi T, Fukuyama R, Ito M, Miyazaki T, Maeno T, Kawai Y, Komori H, Komori T. Osteocyte network; a negative regulatory system for bone mass augmented by the induction of Rankl in osteoblasts and Sost in osteocytes at unloading. PLoS One. 7(6):

e40143, 2012.

3) Masuyama R, Mizuno A, Komori H, Kajiya H, Uekawa A, Kitaura H, Okabe K, Ohyama K, Komori T. Calcium/calmodulin-signaling supports TRPV4 activation in osteoclasts and regulates bone mass. J Bone Miner Res. 27(8): 1708-1721, 2012.

2. 学会発表

森石武史：骨細胞ネットワークは骨形成を抑制し、骨芽細胞を介して骨吸収を促進する，第30回日本骨代謝学会学術集会，東京，2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

炎症惹起による Osteoprotegerin 産生誘導の解析

研究分担者 松尾光一 慶應義塾大学医学部 細胞組織学（教授）

研究要旨

Osteoprotegerin (OPG)は、RANKL による破骨細胞の活性化を抑制する可溶性タンパク質である。一般に、局所の炎症応答は、RANKL 産生を上昇させ、OPG 産生を抑制することにより、骨破壊を誘導すると考えられている。我々は、Toll 様受容体を介する全身性の炎症応答の際には、末梢血中の OPG 濃度が上昇することを見出した。この OPG 濃度の上昇は、リポ多糖体 (LPS) をマウスの腹腔内投与した時にも起こり、種々の微生物による感染時にも認められた。さらに、血中 OPG の上昇は、転写因子 AP-1 に依存的に増強されていた。これらのデータは、生体には、全身性の炎症に伴って OPG を産生する細胞が存在し、骨破壊や骨量減少に抗していることが示唆された。現在、全身性炎症時の主要な OPG 産生細胞の同定を進めている。

A.研究目的

関節リウマチにおける骨破壊は、破骨細胞の骨吸収によって起こる。一般に炎症の惹起により、TNF- α などの炎症性サイトカインが産生され、RANKL と、RANKL のデコイ受容体である osteoprotegerin (OPG)の発現比率が上昇し、破骨細胞の分化・活性化が亢進するものと考えられている。実際、マウスで、リポ多糖体 (LPS) などの炎症惹起物質を頭蓋骨に局所的に投与すると、破骨細胞による吸収窩が出現し、骨破壊が起こることが繰り返し報告されている。多くの臓器や培養細胞では、LPS 添加により RANKL の発現が増大し、OPG の発現は減少する。ところが逆に、LPS をマウスの腹腔内に投与すると、血中 RANKL 濃度は低下し、OPG の血中濃度が上昇する。この炎症惹起による OPG 産生の意義と機序は不明である。今回、われわれは全身性炎症の惹起による OPG 産生誘導の分子メカニズムを明らかにし、産生細胞を特定することを目指した。

B.研究方法

全身性の炎症惹起として、LPS などの PAMPS (pathogen-associated molecular patterns)と総称される、Toll 様受容体のリガンドを、野生型マウス

(C57BL/6J)の腹腔内に投与した。また、病原微生物(グラム陰性菌のサルモネラ、グラム陽性菌のブドウ球菌、結核菌、インフルエンザウイルス)を感染させたマウスも用意し、感染後に経時的に採血を行った。OPG の血中濃度は、ELISA キット (R&D)によって測定した。LPS 投与後の OPG の産生細胞・臓器を特定するために、種々の細胞・臓器について、LPS 曝露の有無で、OPG mRNA やタンパク質の発現量を比較した。さらに、免疫組織化学により、OPG 産生細胞を抗体染色で確認した。また、LPS 発現上昇のメカニズムを解明するために、AP-1 転写因子のひとつである Fra-1 を全身で高発現するトランスジェニックマウスと、やはり AP-1 転写因子である c-Fos を全身でノックアウトしたマウスを用い、さらに、AP-1 阻害剤を用いて、LPS による OPG 産生誘導を解析した。サルモネラの弱毒株の長期感染後に、骨密度をマイクロ CT や骨形態計測により測定した。

C.研究結果

試みたすべての種類の PAMPS を投与した後、および微生物による感染後に、血中 OPG 濃度が上昇した。特に毒性の低い病原微生物の場合には、長期間にわたって血中 OPG 濃度の上昇が

継続した。樹状細胞、好中球、リンパ節の内皮細胞などが LPS に応答して OPG を産生することが mRNA およびタンパク質レベルの解析で明らかになった。現在、最も主要な産生細胞の同定を試みている。さらにこの OPG の発現誘導は、(炎症応答が低く、骨形成が亢進している) Fra-1 トランスジェニックマウスで亢進し、(炎症応答が高い) c-Fos ノックアウトマウスで低下していた。サルモネラ弱毒株の感染後1~3週間後に、骨密度の上昇が認められた。

D. 考察

加齢や慢性炎症によって血中 OPG 濃度が上昇する場合があることが知られている。今回の実験で、LPS の投与により体内に炎症応答として OPG 産生が誘導される細胞が複数種類、存在することが明らかになった。このことは、全身の炎症や加齢に伴って、OPG を産生する細胞が活性化され、骨破壊や骨量減少に抗していることを示唆している。Fra-1 トランスジェニックマウスでは、NF- κ B レベルが低い状態になるものの、OPG の発現誘導は低下せず、むしろ亢進していたことから、転写因子としては NF- κ B ではなく、AP-1 が、OPG 遺伝子の転写活性化に働いていると考えられた。細胞の種類により、炎症惹起により OPG の産生上昇をきたすものと、産生低下を示すものの両方があることは興味深く、その分子機構と意義の理解、さらにその制御法の開発は、炎症時の骨破壊抑制に重要であると考えられる。

E. 結論

局所の炎症に伴う OPG 産生は、一般に低下するが、全身性の感染や炎症惹起物質投与により、血中 OPG 濃度を上昇させる細胞群が存在し、炎症性の骨破壊の阻止に働く。その誘導のメカニズムを解明し、OPG 誘導を促進することができれば、全身性の炎症疾患において骨破壊を阻止できる可能性がある。

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. Oikawa T, Oyama M, Kozuka-Hata H, Uehara S, Udagawa N, Saya H, and Matsuo K. Tks5-dependent formation of circumferential podosomes/invadopodia mediates cell-cell fusion. *J Cell Biol.* 2012;197(4):553-568.

2. Kuroda Y, Hisatsune C, Mizutani A, Ogawa N, Matsuo K, Mikoshiba K. Cot Kinase promotes Ca^{2+} oscillation/calcineurin-independent osteoclastogenesis by stabilizing NFATc1 protein. *Mol Cell Biol.* 2012;32(14):2954-2963.

3. Valverde-Franco G, Pelletier JP, Fahmi H, Hum D, Matsuo K, Lussier B, Kapoor M, Martel-Pelletier J. In vivo bone-specific EphB4 overexpression in mice protects both subchondral bone and cartilage during osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2012;64(11):3614-3625.

4. (和文総説) 松尾光一. 骨免疫から見た老化制御 *Clin Calcium.* 2013;23(1):59-64.

学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

出願番号: 特願 2008-515400

発明の名称: 炎症性疾患の検出並びに炎症性疾患の予防又は治療用組成物

出願人: 学校法人慶應義塾
オリエンタル酵母株式会社

欧州特許出願番号: 06746349.7

米国特許出願番号: 12/227.244

カナダ特許出願番号: 2, 651, 597

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

破骨細胞における Stat5 の機能に関する研究

研究分担者 田中 栄 東京大学医学部整形外科（教授）
研究協力者 廣瀬 旬 東京大学医学部整形外科（大学院生）

研究要旨

破骨細胞分化・生存・機能における Stat5 の機能を *in vivo*、*in vitro* の両面から解析した。破骨細胞特異的 Stat5 ノックアウトマウスは骨の粗鬆化を呈し、骨吸収の亢進を認めた。Stat5 のノックアウトにより破骨細胞の分化および生存に変化はみられなかったが、骨吸収活性の亢進がみられた。破骨細胞内の主要シグナルでは MAPK、中でも特に ERK の活性が亢進していた。MAPK の活性を調節している Stat5 の下流分子として Dusp1 および Dusp2 を同定した。さらに、破骨細胞において Stat5 の活性化を誘導する因子として IL-3 を同定した。IL-3 刺激により Stat5 が活性化されて Dusp1 および Dusp2 の発現が上昇し、これらによる MAPK、特に ERK 活性の抑制が破骨細胞の骨吸収活性を負に制御している可能性が示唆された。

A. 研究目的

骨は主に破骨細胞が担う骨吸収と骨芽細胞が担う骨形成を繰り返すこと、いわゆるリモデリングにより維持されている。この骨吸収と骨形成のアンバランスが骨粗鬆症や大理石骨病の原因となる。破骨細胞は生体内で唯一の吸収能を有する多核巨細胞であり、単球・マクロファージ系の前駆細胞にマクロファージコロニー刺激因子（macrophage colony-stimulating factor、M-CSF）および RANKL（receptor activator of NF- κ B ligand）が作用することにより分化することが知られている。近年、破骨細胞に関連する遺伝子やサイトカインを標的とした研究や治療が推し進められており、実際にこのような因子が少しずつ同定されている。それらの中には疾患治療の標的として臨床試験を行われているものもあり、注目を集めている。しかしながら、いまだ破骨細胞の分化メカニズムにも不明な部分は多く、活性化メカニズムに至ってはほとんど解明されていないと言っても過言ではない。

Stat (Signal transducers and activators of transcription) は様々なサイトカインや成長因子の刺激を細胞内に伝達し、下流分子の転写を促進あるいは抑制する転写因子である。この Stat の中でも Stat5 は体中の多くの組織で発現し、非常に多彩なサイトカインや成長因子によって活性化することが知られている。特に血球系の細胞において Stat5 は様々な機能を果たしていることが明らかになっているが、血球系の細胞である破骨細胞における機能についてはこれまでに報告がない。

本研究においては血球系由来の破骨細胞において Stat5 がその分化・生存・機能に関わっているのではないかと考え、破骨細胞における Stat5 の機能についての解析を行うこととした。

B. 研究方法

Stat5a および Stat5b の遺伝子を loxP 配列で挟み込んだ Stat5^{fl/fl} マウスと Cathepsin K のプロモーター領域に Cre リコンビナーゼ遺伝子をノックインさせた Cathepsin K-Cre ノックインマウスを交配させることにより、破骨細胞特異的 Stat5 ノックアウトマウス (Stat5 cKO マウス) を作成し、その表現型を解析した。

in vitro においては Stat5 のノックアウトが破骨細胞の分化・生存・機能に与える影響を調べ、さらに Stat5 が破骨細胞の機能を調節するメカニズムを、DNA microarray を用いた網羅的解析により調べた。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準(総理府告示)」、「東京大学医学部動物実験指針」に従って行った。

C. 研究結果

Stat5 cKO マウスは骨吸収の亢進による骨粗鬆症を呈した。Stat5 のノックアウトは破骨細胞の分化および生存に影響を与えなかったが、骨吸収活性を亢進させた。Stat5 ノックアウト破骨細胞においては MAPK 経路、中でも特に ERK 経路の活性化が亢進していた。Stat5 ノックアウト破骨細胞とコントロール細胞において DNA microarray および real-time PCR を行うと、Stat5 ノックアウト破骨細胞において MAPK 脱リン酸化酵素である *Dusp1* および *Dusp2* の発現が有意に低下していた。破骨細胞において Stat5 を強制発現させると *Dusp1* および *Dusp2* の発現は亢進した。破骨細胞に IL-3 を加えると Stat5 のリン酸化および核内移行が誘導され、*Dusp1* および *Dusp2* の発現が上昇した。IL-3 を破骨細胞に加えると、骨吸収活性が抑制された。

D. 考察

Stat5 cKO マウスは破骨細胞の骨吸収活性上昇に基づく骨量減少を示したが、これは、Stat5 が破骨細胞の骨吸収に対して抑制的に働くことを示している。これまで報告された Stat family の破骨細胞における機能としては、Stat1 が β -interferon の刺激を受けて RANKL による破骨細胞分化を抑制するとの報告や、Stat6 が IL-4 のシグナルを受けて破骨細胞の分化および骨吸収活性を負に調節しているとの報告がある。本研究においても Stat5 が破骨細胞に対して抑制的に作用するという点ではこれらの報告と同様であった。しかし今回の結果では、Stat1 や Stat6 とは違い、Stat5 は破骨細胞分化に対して重要ではないという結果で

あった。同じ Stat family でも member によってその機能は大きく異なること、時によっては他の member が代償的に働きことが知られる。したがって、本研究結果のように Stat5 が破骨細胞分化にとっては重要ではないが、成熟破骨細胞の活性化に対しては抑制的な機能を有するという可能性は十分に考えられた。Stat5 ノックアウト破骨細胞においては MAPK 経路、中でも特に ERK の活性が亢進していることが明らかとなった。ERK の破骨細胞における機能については古くから多くの報告があるが、近年、ERK1 および ERK2 のノックアウトマウスを用いた研究において、ERK1 が破骨細胞の分化および骨吸収活性に対して重要であることが明らかとなった。したがって、Stat5 ノックアウト破骨細胞の骨吸収活性亢進はこの ERK の活性亢進によるものと考えられた。分化に差が出なかった原因として、破骨細胞前駆細胞においては Stat5 のノックアウトによって ERK の活性化は変化せず、Stat5 は成熟破骨細胞においてのみ ERK の活性化を調節するものと考えられた。さらに、転写因子である Stat5 のノックアウトにより MAPK の活性が亢進しているメカニズムとして、Stat5 が MAPK のリン酸化に影響するような何らかの分子の発現を制御しているとの仮説をたて DNA microarray および real-time PCR を行ったところ、Stat5 ノックアウト破骨細胞において MAPK の脱リン酸化酵素である *Dusp1* および *Dusp2* の発現が有意に低下していることが明らかとなった。これまでに Dusp family の破骨細胞における機能については、*Dusp1* のノックアウトマウスが破骨細胞の骨吸収亢進によると考えられる骨密度低下を示したとする報告がある。*Dusp2* の破骨細胞における機能についての報告はいまだないが、*Dusp2* を破骨細胞において強制発現させると特に ERK の活性化が抑制されることから、*Dusp2* も *Dusp1* と同様、破骨細胞の機能に対して抑制的に作用すると考えられる。さらに、破骨細胞において IL-3 が Stat5 のリン酸化・核移行および *Dusp1*, *Dusp2* の発現を誘導する