

## B. 研究方法

- ① 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 患者と未発症同胞の血液単核球ならびに皮膚線維芽細胞を用いて、iPS 細胞の樹立を行った。
- ② ヒト iPS 細胞からの血球分化系 (Niwa et al. PLOS one, 2011) を応用して、RA 特異的 iPS 細胞から単球へ分化させた。FACS 解析により、各分化段階での細胞表面マーカーを健常人 (RA 特異的 iPS 細胞を樹立した患者の家族内未発症者) 由来の iPS 細胞と比較した。
- ③ RA 特異的 iPS 細胞から単球に分化させた後、RANKL を添加し、破骨細胞への分化誘導を検討した。

(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 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 細胞を作製した。末梢血単核球では、トシリズマブ使用例からはクローン樹立は困難であったが、皮膚線維芽細胞を用いることにより全員から樹立できた。
- ② RA 患者由来 iPS 細胞から単球への分化誘導 15 日目で、CD14+CD15+細胞が検出された。また RA 患者由来 iPS 細胞と未発症同胞ならびに他の健常人由来 iPS 細胞で CD14+CD15+細胞の割合を比較したところ RA が最も多かった。
- ③ iPS 細胞から分化した浮遊 CD14 陽性細

胞を M-CSF の存在下に RANKL のパルス刺激を行ったところ RANKL 濃度依存的な破骨細胞の形成が確認された。その際、破骨細胞に分化したのは、接着能を有する細胞のみであり、前述の CD14+CD15+細胞の分化能は低かった。

## D. 考察

RA 患者由来 iPS 細胞から単球系細胞へ *in vitro* で分化誘導する過程で、CD14+CD15+細胞の出現を確認した。この細胞分画は健常人由来 iPS 細胞からも誘導することが可能であり、分化過程で一過性に出現すると考えられる。さらに RA 患者由来 iPS 細胞では健常人由来 iPS 細胞に比べ、この細胞分画の出現頻度は高かったことから、RA の発症に関連している可能性が示唆される。現在、別家系の 3 例の RA 患者から iPS 細胞を作製しており、その結果と比較したい。また、この細胞分画の大きさは、骨髄環境すなわちストローマ細胞や越智らが同定した RA ナース細胞、そこから産生されるサイトカインの影響を受ける可能性が考えられることから、今後、ストローマ細胞との共培養や種々のサイトカイン存在下での検討を行う予定である。

また、単球に分化させた後、さらに破骨細胞への分化に成功した。CD14+細胞の中でも破骨細胞へ分化誘導可能なものは一部分であり、今後どのようなフェノタイプを持つ細胞が破骨細胞に分化するかを検討したい。

## E. 結論

RA 患者由来 iPS 細胞を単球系細胞へ分化誘導することにより CD14+CD15+細胞の出現を確認した。この細胞群は RA 患者に特徴的である可能性がある。また、iPS 細胞から破骨細胞へ分化させることができた。

## 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. Nishimoto N, Amano K, Hirabayashi Y, Horiuchi T, Ishii T, Iwahashi M, Iwamoto M, Kohsaka H, Kondo M, Matsubara T, Mimura T, Miyahara H, Ohta S, Saeki Y, Saito K, Sano H, Takasugi K, Takeuchi T, Tohma S, Tsuru T, Ueki Y, Yamana J, Hashimoto J, Matsutani T, Murakami M, Takagi N. Drug free REmission/low disease activity after cessation of tocilizumab (Actemra) Monotherapy (DREAM) study. *Mod Rheumatol*. 24(1):17-25. 2014.
2. Nishimoto N, Amano K, Hirabayashi Y, Horiuchi T, Ishii T, Iwahashi M, Iwamoto M, Kohsaka H, Kondo M, Matsubara T, Mimura T, Miyahara H, Ohta S, Saeki Y, Saito K, Sano H, Takasugi K, Takeuchi T, Tohma S, Tsuru T, Ueki Y, Yamana J, Hashimoto J, Matsutani T, Murakami M, Takagi N. Retreatment efficacy and safety of tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis in recurrence (RESTORE) study. *Mod Rheumatol*. 24(1):26-32 2014.
3. Fujita R, Kawano F, Ohira T, Nakai N, Shibaguchi T, Nishimoto N, Ohira Y. Anti-interleukin-6 receptor antibody (MR16-1) promotes muscle regeneration via modulation of gene expressions in infiltrated macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 15. pii: S0304-4165(14)00016-6. 2014.
4. 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*. 72(4):583-9. 2013
5. 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, Lanas 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*. 72(4):482-92. 2013.
6. 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*. 72(4):627-8. 2013.
7. Fiala M, Mizwicki MT, Weitzman R, Magpantay L, Nishimoto N. Tocilizumab infusion therapy normalizes inflammation in sporadic ALS patients. *Am J Neurodegener* 2(2):129-39. 2013.
8. Shimane K, Kochi Y, Suzuki A, Okada Y, Ishii T, Horita T, Saito K, Okamoto A, Nishimoto N, Myouzen K, Kubo M, Hirakata M, Sumida T, Takasaki Y, Yamada R, Nakamura Y, Kamatani N, Yamamoto K. An association analysis of HLA-DRB1 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in a Japanese population: effects of \*09:01 allele on disease phenotypes. *Rheumatology (Oxford)*. 52(7):1172-82. 2013.
9. Chang Q, Bournazou E, Sansone P, Berishaj M, Gao SP, Daly L, Wels J, Theilen T, Granitto S, Zhang X, Cotari J, Alpaugh ML, de Stanchina E, Manova K, Li M, Bonafe M, Ceccarelli C, Taffurelli M, Santini D, Altan-Bonnet G, Kaplan R, Norton L, Nishimoto N, Huszar D, Lyden D, Bromberg J. The IL-6/JAK/Stat3 Feed-Forward Loop Drives Tumorigenesis and Metastasis. *Neoplasia*. 15(7):848-62 2013.
10. 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. pp 297-309. 2013.

11. 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
12. 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
13. 松谷隆治, 村上美帆, 西本憲弘. 水銀による自己抗体産生誘導. 臨床免疫・アレルギー科. 科学評論社. 2013 : 59 (5) : 611-613
14. 西本憲弘, 村上美帆. 成人病発症Still病. 内科. 南江堂. 2013 : 112 (1) : 73-76
15. 西本憲弘. 技術革新で既存の治療法の枠組みを変える可能性. Medical ASAHI. 朝日新聞社. 2013 : 42 (10) : 16-18
16. 西本憲弘. キャッスルマン病と IL-6. 血液内科. 2013 : 67 (4) : 467-471
17. 西本憲弘. リウマチ性疾患 10.1 総論 1) 免疫・炎症に関与する細胞分子. 内科学第十版. (矢崎義雄編) 朝倉書店 : 東京 2013 : 1227-1231.
18. 西本憲弘, 村上美帆. BMS945429(P274)・Brodalumab (P277)・Ixezumab (P314)・Sarilimab (P346)・Secukinumab (P348)・Siltuximab (P351)・Sirukumab (P352)・Tocilizumab (P358). 免疫・アレルギー疾患の分子標的と治療薬事典 生物学的製剤、低分子化合物のターゲット分子と作用機序、薬効のすべて. (田中良哉編) 羊土社:東京 2013.
19. 西本憲弘, 村上美帆. 生物学的製剤使用時のWBC減少. リウマチ病セミナーXXIV. (監修 七川歡次) 永井書店. 2013 : 217

## 2. 学会発表

1. N. Nishimoto. A role of interleukin-6 pathogenesis and treatment in auto-immunology disorders . Shanghai-Tokyo Workshop on Rheumatology 2013 . Shanghai . 2013.3.30-31
2. Y. Terasaki, S. Ikushima, Y. Ichimura, M. Ujita, Y. Matsuzawa, M. Arita, K. Tomii, Y. Komase, I. Ohwan, T. Kawamura, S. Izumi, M. Murakami, H. Ishimoto, H. Kimura, M. Bando, N. Hada, N. Nishimoto, S. Matsui, T. Ogura. Comparison Of Pathological Features Of The Lung Lesions Of Systemic IgG4-Related Disease And Multicentric Castleman's Disease. American Thoracic Society 2013. Philadelphia. 2013.5.17-22
3. T. Matsutani, M. Murakami, M. Sekiguchi, K. Matsui, M. Kitano, M. Namiki, K. Ohmura, Y. Imura, T. Fujii, T. Kuroiwa, H. Nakahara, S. Hika, K. Maeda, Y. Nozaki, M. Funouchi, K. Murakami, T. Ikawa, S. Irimajiri, A. Nampei, T. Azuma, T. Sasaki, A. Yokota, S. Morita, Y. Kawahito, T. Mimori, H. Sano, N. Nishimoto. Abatacept treatment suppresses T CELL activation in anti-cyclic citrullinated peptide antibody (ACPA) positive RA patients but not in acpa negative RA patients. EULAR 2013. Madrid. Spain. 2013.6.12-15.
4. M. Murakami, T. Matsutani, M. Sekiguchi, K. Matsui, M. Kitano, M. Namiki, K. Ohmura, Y. Imura, T. Fujii, T. Kuroiwa, H. Nakahara, S. Higa, K. Maeda, Y. Nozaki, M. Funouchi, K. Murakami, T. Ikawa, S. Irimajiri, A. Nampei, T. Azuma, T. Sasaki, A. Yokota, S. Morita, Y. Kawahito, T. Mimori, H. Sano, N. Nishimoto. Changes in cytokine profiles in rheumatoid arthritis patients during abatacept treatment. EULAR 2013. Madrid. Spain. 2013.6.12-15.
5. S. De Vita, L. Quartuccio, M. Isola, L. Corazza, M. Ramos-Casals, S. Retamozo, R.M. Gaafar, M.N. Zoheir, E.-M.M. Abdel-Moneim, M. Salem. D. Sansonno, V. Conteduca, G. Ferraccioli, E. Gremese, A. Tzioufas, M. Voulgarelis, D. Vassilopoulos, C. Koutsianas, A. L. Zignego, T. Urraro, N. Pipitone, C. Salvarani, A. Ghinoi, L. Guillevin, B. Terrier, P. Cacoub, D. Filippini, F. Saccardo, A. Gabrielli, P. Fraticelli, M. Tomsic, C. Ferri, M. Sebastiani, A. Tavoni, E. Catarsi, C. Mazzaro, P. Pioltelli, N. Nishimoto, P. Scaini, G. Monti. M. Pietrogrande, M. Galli, S. Bombardieri. Preliminary results of the classification

- criteria for cryoglobulinemic vasculitis validation study. EULAR 2013. Madrid. Spain. 2013.6.12-15.
6. N. Nishimoto. Tocilizumab treatment in autoimmune diseases. 12th International Symposium on Sjogren's Syndrome. Luncheon Seminar 2. Kyoto Hotel Okura. Kyoto. 2013.10.9-12
  7. 西本憲弘. リウマチ性疾患におけるサイトカインの役割. 小児リウマチ研修会in OKINAWA イブニングセミナー. 沖縄市町村自治会館 2階. 沖縄. 2013. 3. 15
  8. 村上美帆、松谷隆治、李穎、關口昌弘、松井聖、北野将康、大村浩一郎、井村嘉孝、藤井隆夫、黒岩孝則、中原英子、前田恵治、村上孝作、森田智視、川人豊、三森経世、佐野統、西本憲弘. 抗環状シトルリン化ペプチド抗体陽性RA患者におけるT細胞の活性化. 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会. ポスター. 国立京都国際会館. 京都. 2013. 4. 18-20.
  9. 松谷隆治、李穎、村上美帆、關口昌弘、松井聖、北野将康、大村浩一郎、井村嘉孝、藤井隆夫、黒岩孝則、中原英子、前田恵治、村上孝作、川人豊、三森経世、佐野統、西本憲弘. 関節リウマチの治療 生物学的製剤(TNF阻害薬以外) アバタセプト治療は抗環状シトルリン化ペプチド抗体陽性RA患者の活性化T細胞を抑制する. 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会. 口頭発表. 国立京都国際会館. 京都. 2013. 4. 18-20.
  10. 藤井隆夫、關口昌弘、大村浩一郎、井村嘉孝、橋本求、前田恵治、中原英子、比嘉慎二、黒岩孝則、井川宣、三木健司、吉井一郎、波内俊三、村上孝作、尾本篤志、川人豊、西本憲弘、三森経世、佐野統、ABROAD研究グループ. 関節リウマチの治療 生物学的製剤(TNF阻害薬以外) アバタセプトによる生物学的製剤未治療関節リウマチ患者の寛解導入率とそれに影響を与える因子の検討(ABROAD試験). 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会. 国立京都国際会館. 京都. 2013. 4. 18-20.
  11. 吉川卓宏、松井聖、關口昌弘、北野将康、横田章、船内正憲、八田和大、東光久、新名直樹、樋上謙士、尾崎吉郎、日高利彦、竹内孝男、藤本隆、川人豊、藤井隆夫、西本憲弘、三森経世、佐野統、ABROAD研究グループ. 関節リウマチの治療 生物学的製剤(TNF阻害薬以外) 生物学的製剤未治療RA患者に対するBody Mass Index(BMI)とアバタセプト(ABT)の臨床的効果との関連(ABROAD試験の中間解析). 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会. 国立京都国際会館. 京都. 2013. 4. 18-20.
  12. 西本憲弘. IL-6阻害による関節リウマチの治療. 平成25年度日本内科学会生涯教育講演会. 大阪国際会議場. 大阪. 2013. 5. 19
  13. 西本憲弘. IL-6と炎症. 第34回日本炎症・再生医学会. 教育講演. 国立京都国際会館. 京都. 2013. 7. 2
  14. 西本憲弘. IL-6阻害による関節リウマチの治療. 平成25年度日本内科学会生涯教育講演会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2013. 9. 29
- 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。

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 免疫アレルギー研究分野)  
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亜分画に関する研究

研究分担者 桑名 正隆 慶應義塾大学リウマチ内科 准教授  
研究協力者 金子 祐子 慶應義塾大学リウマチ内科 助教

研究要旨

昨年度までの本班研究において末梢血単球亜分画が関節リウマチ (RA) の病態を制御する可能性を報告してきた。そこで、未治療 RA 患者の前向きコホート (SAKURA) データベースを用いて、診断時の末梢血単球分画と疾患活動性やその後の関節破壊進展との関連を追究した。SAKURA エントリー症例のうち、1年以上経過観察し、その間の関節破壊に関するデータが登録された 75 例を対象とした。RA 診断時に末梢血単核球を分離し、フローサイトメトリーにより CD14+CD19-CD3-、CD14+CD16+、CD14+CCR2+ (%) および CD14+単球における CXCR4、CCR2 の発現レベルを調べた。コントロールとして健常人 20 例を用いた。解析症例は年齢 59 ± 14 歳、罹病期間 0.6 ± 0.4 年、ステージ I/II が 91%、リウマトイド因子 76%、抗 CCP 抗体 73%であった。登録時の DAS28 は 4.5 ± 1.1、HAQ-DI は 0.79 ± 0.75、シャープ変法 (mTSS) による骨破壊は 9.6 ± 20 であった。1年後には DAS28 は 2.6 ± 1.0、HAQ-DI は 0.42 ± 0.53 と疾患活動性指標の改善を認めた。関節破壊進行例 ( $\Delta$ mRSS > 0.5/年) は 35 例 (47%) で、急速関節破壊進行例 ( $\Delta$ mRSS  $\geq$  5/年、RRP) は 19 例 (25%) であった。RA では健常人に比べて CD14+CD16+、CD14+CCR2+単球が増加し、CD14+単球における CXCR4 発現は低下、CCR2 発現は上昇していた。CD14+CCR2+は CRP と正の相関を示し、CD14+CD16+は MRI における骨びらん・骨髄浮腫と関連し、1年後の関節破壊進行および RRP と関連した。二項ロジスティック回帰分析では診断時 CD14+CD16+単球比率のみが関節破壊進行、特に関節裂隙狭小化の進行を予測する独立因子として抽出された。RA 末梢血中で増加している CCR2+単球は滑膜炎、CD16+単球は関節破壊と異なる臨床病態と関連していた。これら末梢血単球亜分画が個々の症例における関節炎の程度や関節破壊進行度の多様性を制御する可能性がある。末梢血中単球亜分画が予後不良を予測するバイオマーカーとして有用であるとともに、CD14+CD16+単球が RA の新たな治療標的として注目された。

A. 研究目的

関節リウマチ (RA) は関節滑膜の増殖と炎症により関節破壊をきたす全身性炎症性疾患である。その病態には T 細胞、B 細胞、破骨細胞、滑膜細胞などの多彩な細胞、ケモカイン、サイトカインなどの液性因子の関連が知られている。しかし、これまで単球・マクロファージ系細胞の病態への関わりについての報告は少ない。末梢血単球は抗原提示細胞、炎症細胞の前駆細胞であることが知られ

ているが、多彩な亜分画が存在し、それぞれが炎症惹起、免疫抑制、線維化など異なる機能を有する。昨年度は、CD14+CD15+CXCR4<sup>low</sup> 細胞は関節の炎症を惹起し関節障害を促進する単球分画で、CD14+CD15-CXCR4<sup>high</sup> 細胞は骨芽細胞や軟骨芽細胞への分化能を有し関節の再生を促して保護的に働く分画であることを示した。そこで、本年度は末梢血単球分画が RA 病態を制御することを検証するため、未治療 RA 患者の前向きコホート

(SAKURA) データベースを用いて、診断時の末梢血単球分画と疾患活動性やその後の関節破壊進展との関連を追究した。

## B. 研究方法

SAKURA は新規 RA 患者を対象とした前向きコホートで、平成 19 年 8 月より未治療 RA 患者（ほとんどが早期例）を連続して登録してきた。登録例のうち、1 年以上経過観察し、その間の関節破壊に関するデータが前向きに収集できた 75 例を対象とした。RA 診断時に関節所見、免疫・血清反応を含めた血液検査、関節 X 線、手関節 MRI、骨密度、頸動脈エコー、足関節 上腕血圧比 (ABI) を実施し、経時的に臨床情報を蓄積している。また、登録時に末梢血単核球を分離し、フローサイトメトリーにより CD14+、CD14+CD16+、CD14+CCR2+ (%) および CD14+単球における CXCR4、CCR2 の発現レベル (MFI index) を調べた。単球フェノタイプのコントロールとして健常人 20 例を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は学内倫理委員会で承認済みで、患者本人に対して研究内容を説明し、文書による同意を取った。

## C. 研究結果

対象 75 例は女性 84%、年齢  $59 \pm 14$  歳、罹病期間  $0.6 \pm 0.4$  年、ステージ I / II が 91%、リウマトイド因子 76%、抗 CCP 抗体 73%、HLA-DR 共有エピトープ 51% であった。登録時の DAS28 は  $4.5 \pm 1.1$ 、SDAI は  $15 \pm 11$ 、CDAI は  $15 \pm 9$ 、ESR は  $58 \pm 36$  mm、HAQ-DI は  $0.79 \pm 0.75$ 、シャープ変法 (mTSS) による骨破壊は  $9.6 \pm 20$  であり、罹病期間は短いものの関節破壊の進行が早い予後不良例を多く含んでいた。1 年後には DAS28 は  $2.6 \pm 1.0$ 、SDAI は  $5 \pm 5$ 、CDAI は  $5 \pm 5$ 、ESR は  $22 \pm 19$  mm、HAQ-DI は  $0.42 \pm 0.53$  と疾患活動性指標の改善を認めた。関節破壊進行例 ( $\Delta$ mRSS  $> 0.5$ /年) は 35 例 (47%) で、急速関節破壊進行例 ( $\Delta$ mRSS  $\geq 5$ /年、RRP) は 19 例 (25%) であった。

登録時の単球分画を RA75 例と健常人 20 例で比較した。RA では末梢血 CD14+CD19-CD3-単球比率が健常人に比べて減っていた ( $11.3 \pm 8.7\%$  vs  $15.0 \pm 3.7\%$ ,  $P = 0.03$ )。単球分画では、健常人に比べて RA では CD14+CD16+単球の増加 ( $25.2 \pm 16.7\%$  vs  $16.8 \pm 8.9\%$ ,  $P = 0.04$ )、CD14+CCR2+単球の増加 ( $53.7 \pm 16.2\%$  vs  $41.1 \pm 17.8\%$ ,  $P < 0.001$ ) を認めた。また、CD14+単球における CXCR4 発現は低下し ( $19.2 \pm 11.6$  vs  $28.4 \pm 11.0$ ,  $P = 0.003$ )、CCR2 発現は上昇していた ( $8.5 \pm 3.4$  vs  $5.8 \pm 1.4$ ,  $P < 0.001$ )。

次に登録時の活動性指標 (DAS28、ESR、CRP、MMP3) と末梢血 CD14+CD19-CD3-、CD14+CD16+、CD14+CCR2+単球の比率、CD14+単球における CXCR4 と CCR2 の発現レベルを比較した。その結果、CD14+CD19-CD3-は ESR、CRP と正の相関を示し ( $r = 0.21$ ,  $P = 0.04$ ;  $r = 0.27$ ,  $P = 0.009$ )、CD14+CCR2+は CRP と相関した ( $r = 0.33$ ,  $P = 0.001$ )。さらに、CD14+単球における CCR2 の発現レベルも CRP と正の相関を示した ( $r = 0.21$ ,  $P = 0.04$ )。一方、CD14+CD16+単球比率、CD14+単球における CXCR4 の発現レベルは活動性指標と相関しなかった。

さらに、登録時の MRI による関節破壊 (骨びらんまたは骨髓浮腫) の有無と末梢血中の CD14+CD19-CD3-、CD14+CD16+、CD14+CCR2+単球の比率、CD14+単球における CXCR4 と CCR2 の発現レベルを比較した。診断時に関節破壊を認めた例では認めなかった例と比較して CD14+CD16+単球比率が高かった ( $29.2 \pm 18.2\%$  vs  $19.3 \pm 29.2\%$ ,  $P = 0.003$ ) が、他の単球指標との関連はなかった。1 年間に関節破壊の進行 ( $\Delta$ mRSS  $> 0.5$ /年) を認めた 38 例では、認めなかった 53 例に比べて有意に CD14+CD16+単球比率が高かった ( $28.8 \pm 19.1\%$  vs  $21.5 \pm 13.1\%$ ,  $P = 0.04$ )。特に急速に関節破壊が進行した RRP の 20 例は、そうでなかった 71 例に比べて CD14+CD16+単球比率が高かった ( $32.9 \pm 20.5\%$  vs  $22.2 \pm 14.0\%$ ,  $P = 0.01$ )。mTSS を関節裂隙狭小化と骨びらんに分けて解析した。関節裂隙狭

小化進行例は非進行例に比べて CD14+CD16+ 比率が高かったが (29.5 ± 20.1 % vs 21.5 ± 12.7 %, P = 0.04)、骨びらん進行例と非進行例の間で統計学的な有意差はなかった (28.0 ± 16.6 % vs 23.0 ± 15.9 %)。

最後に関節破壊進行を予測する独立因子を検討した。単変量解析で関節破壊進行を予測する因子を調べると 12 ヶ月後の DAS28 と診断時 CD14+CD16+単球比率が得られた (P = 0.02, 0.04)。これら 2 項目に診断までの期間、抗 CCP 抗体、12 ヶ月までの生物学的製剤使用を加えて二項ロジスティック回帰分析を行ったところ、診断時 CD14+CD16+単球比率のみが関節破壊進行を予測する独立因子として抽出された (P = 0.02、オッズ比 1.8、95%CI 1.1-2.8)。同様の解析を関節裂隙狭小化、骨びらんの進行で行うと、関節裂隙狭小化の進行を予測する独立因子として診断時 CD14+CD16+単球比率 (P = 0.03、オッズ比 1.03、95%CI 1.004-1.062)、骨びらん進行を予測する独立因子として 12 ヶ月後の DAS28 が抽出された (P = 0.01、オッズ比 1.95、95%CI 1.2-3.2)。

したがって、末梢血 CD14+CD16+単球比率は関節破壊進行の早い予後不良例で増加し、かつ治療導入にもかかわらず関節破壊、特に関節裂隙狭小化の進行と関連することが明らかとなった。

#### D. 考察

未治療 RA 患者で末梢血単球の亜分画異常がみられた。当初想定していた CXCR4 の発現レベルは活動性指標、関節破壊と関連しなかった。一方、CD14+CD16+、CD14+CCR2+単球の比率が RA 患者末梢血中で増加し、CCR2+単球は滑膜炎、CD16+単球は関節破壊と異なる臨床病態と関連した点は興味深い。これら末梢血単球亜分画が個々の症例における関節炎の程度や関節破壊進行度の多様性を制御する可能性がある。末梢血単球は CD16 (FcγRIII) の発現により分類され、CD16+単球が炎症性サイトカインの分泌や Th17 分化促進を介して RA 病態に関与することが報告されて

おり、今後、関節破壊を誘導する機序のさらなる解明が必要である。

#### E. 結論

末梢血中単球亜分画が予後不良を予測するバイオマーカーとなる可能性が示された。また、CD14+CD16+単球が RA に対する新たな治療標的として注目された。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Mitsunaga S, Hosomichi K, Okudaira Y, Nakaoka H, Kunii N, Suzuki Y, Kuwana M, Sato S, Kaneko Y, Homma Y, Kashiwase K, Azuma F, Kulski JK, Inoue T, Inoko H. Exome-sequencing identifies novel rheumatoid arthritis-susceptible variants in the *BTNL2*. *J. Hum. Genet.* 2013; 58(4): 210-215.
2. Seta N, Okazaki Y, Miyazaki H, Kato T, Kuwana M. Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 is required for the transformation of circulating monocytes into multipotential cells. *PLoS One.* 2013; 8(9): e74246.

##### 3. 学会発表

1. 仁科直、金子祐子、亀田秀人、桑名正隆、竹内勤：初発関節リウマチ患者に対するメソトレキセート治療で血漿 IL-6 は低下し、治療後 IL-6 は関節破壊のバイオマーカーとなりうる。第 57 回日本リウマチ学会総会 (京都)。2013. 4.

#### 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



## RA における骨髓造血幹細胞分化異常の解析に関する研究

研究分担者 中畑龍俊

京都大学 iPS 細胞研究所 特定拠点教授

### 研究要旨

慢性関節リウマチ (RA) の発症には自然免疫担当細胞が関与していることが知られているため、iPS 細胞を用いた RA 研究には機能的な血球を効率的に分化させることができる分化系が必要である。本年度は、血球分化系の改善として、従来より開発している二次元の無血清、フィーダー細胞を用いない血球分化法を拡張し、新たなスキャフォールドを用いた 3 次元培養法を確立した。PET 線維で補強したコラーゲンスポンジを基材として用いることにより、従来の血球系と異なり、細胞クラスターでなく単一細胞を播種して血球分化を開始することが可能となった。また、この系には、長期間の培養が可能になり、電子顕微鏡による解析では、ニッシュ細胞と血球細胞が 3 次元スキャフォールド上でニッシュを構築していることが明らかになった。この系を応用することにより、ニッシュ細胞と血球細胞のマウスへの同時移植や、血球系細胞の大量培養が可能になると期待される。また、慢性関節リウマチ患者 2 名からの iPS 細胞樹立を行った。

### 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。これらの目的のためには、iPS 細胞より多くの血球系細胞を安定して確保することが必要であるが、従来の方法では限界があった。そこで、本年度は、既存の二次元培養法を拡張し、3 次元のコラーゲンスポンジ中で血球分化を行い、擬似的にスキャフォールド内でニッシュを構築する系を確立することを試みた。

### B. 研究方法

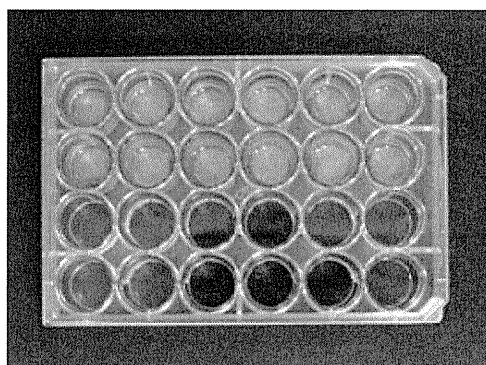
ヒト ES/iPS 細胞コロニーをコラーゲナーゼで解離し、非接着培養用に処理した培養皿で浮遊培養を行う。基礎培地としては主に臍帯血の *ex vivo* 増幅に用いられる無血清培地を用いる。サイトカインは主に ES/iPS 細胞の中胚葉分化に VEGF、造血分化に SCF, TPO, FL, IL3, EPO を用い、それらの濃度と投与期間を変えて検討した。3 次元スキャフォールドとして、PET 繊維補強コラーゲンスポンジ (PETcol-24W) を MedGEL CO., LTD から購入して使用した。

iPS 細胞の樹立については、血液及び皮膚線維芽細胞より、エピソーマルベクターを用いて行った。

(倫理面での配慮)

尚、iPS 細胞に関する本研究における患児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”及び文部科学省研究振興局長通知に定める細則に沿って、京都大学医の倫理委員会の審査

承認を受けている（実施責任者：中畑龍俊、当初承認日：平成20年6月4日、変更・追加承認日：平成24年7月19日）が、人権及び利益の保護について、十分配慮しながら実験を行った。患者からの疾患関連 iPS 細胞作製にあたり、「ヒト疾患特異的 iPS 細胞の作製とそれを用いた疾患解析に関する研究」について、京都大学医の倫理委員会の承認を頂いている（実施責任者：中畑龍俊、当初承認日：平成20年6月4日、変更・追加承認日：平成24年7月19日）。



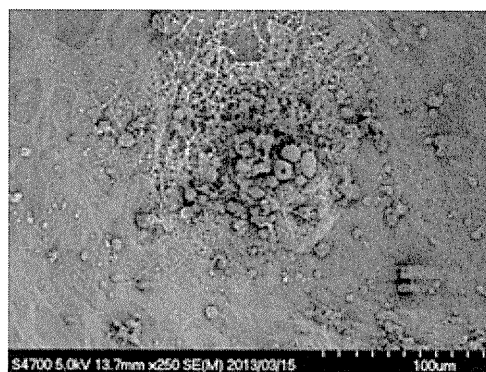
24穴プレートで培養中のCS

### C. 研究結果

最初に、我々が以前に開発した二次元・マトリゲル上の血球分化系（以下2D-MG系）を応用して、CS上の血球分化を行えるかを検討した。すると、従来と同様に、Day 6のflow cytometryでは、KDR+CD34+の中胚葉系の血球前駆細胞と考えられる分画が生じていた。その割合は、クローン毎に様々であったが、2D-MG法と同程度であった。

次に、上述の造血前駆細胞分画から各種血球細胞を得るために幾つかのサイトカインの組み合わせを用いて血球分化を行った。概ねday 20頃からスポンジから浮遊細胞の出現が顕著になり、wellの底に溜まっていく。これらの細胞は、スポンジを取り出して残りの培養上清を遠心することにより簡単かつ繰り返し回収することができる。得られた血球細胞の細胞表面マーカーと形態を観察すると、サイトカインカクテルの組み合わせによ

り、好中球系細胞、単球系細胞あるいは赤芽球系細胞を作り分けることが可能であった。中胚葉・血球分化系は共培養や胚様体形成が必要で、Single-cellに分離した状態からフィーダーフリーで血球分化させるのは困難である。しかし、分化能の定量化や手技の簡略化のためには、Single cellにしたPSCから分化が行えることが望ましい。そこで、接着しているiPS細胞を単一細胞に解離してCSに撒いて分化が可能かを検討した。この場合も、Day 6のflow cytometryでは、KDR low~+ CD34+の分画が出現していた。さらに、Day 20頃からCSから浮遊細胞が遊離してお



### ニツシェ細胞上の血球様細胞

り、これらはCD43+CD45+の血球系細胞であることが確認された。CSの内部構造を確認するため、走査電顕でCSを観察したところ、一部で、円柱あるいは扁平上皮が細胞集簇して平面を形成し、その一部から球形の細胞が敷石状に萌出している部分を認めた。また、PET繊維に円形の細胞が集団を形成している部分を認めた。

疾患特異的iPS細胞樹立については、2名の患者いずれもより、複数のクローン樹立に成功しており、現在性状評価中である。

### D. 考察

このような3次元スキャフォールドを用いた多能性幹細胞からの血球分化系は過去

に報告がない。この系では、ニッシュェを構成する基質と細胞が一塊となって形成され、血球分化を支持しているように見える。この分化系は、従来の 2D-MG 系などに比べて長期間維持が可能であることや、ニッシュェと血球系前駆細胞を一塊として可搬性のある基材上で誘導できることから、複数の CS を浮遊培養に持ち込むことにより大量の血球細胞を継続的に得ることが可能になるかもしれない。また、ニッシュェと血球系前駆細胞を一塊として免疫不全マウスに移植するという応用も考えられる。

もちろん現時点ではニッシュェの機能は不十分ではあるものの、今後改善を重ねて、系を改良することにより、より有用な系が開発できるものと期待される。

## E. 結論

慢性関節リウマチの解析や移植実験に有用な、新たな多能性幹細胞からの分化誘導系を開発することができた。樹立した疾患特異的 iPS 細胞をこれらの系を用いて自然免疫担当細胞へ誘導し、機能解析を行うことにより、新たな治療法開発へつながることが期待される。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Morishima T, Watanabe KI, Niwa A, Hirai H, Saida S, Tanaka T, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Saito MK, Matsubara K, Adachi S, Kobayashi M, Nakahata T, Heike T.: Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis. *Haematologica.* ; 99(1):19-27. 2014 Jan doi: 10.3324/haematol.2013.083873.
2. Saida S, Watanabe KI, Sato-Otsubo A, Terui K, Yoshida K, Okuno Y, Toki T,

Wang R, 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.*; 121(21):4377-87, 2013. May 23; doi: 10.1182/blood-2012-12-474387.

3. Yanagimachi MD, Niwa A, Tanaka T, Ozaki F, Nishimoto S, Murata Y, Yasumi T, Ito J, Tomida S, Oshima K, Asaka I, Goto H, Heike T, Nakahata T, Saito MK: Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell- free conditions. *PLoS ONE.* 4/3/ 2013; 8(4): e59243. doi:10.1371/journal.pone.0059243
4. Tomizawa D., Akio Tawa A., MD/PhD, Watanabe T., Saito A.M., Kudo K., Taga T., Iwamoto S., Shimada A., Terui K., Moritake H., Kinoshita A., Takahashi H., Nakayama H., Koh K., Kigasawa H., Kosaka Y., Miyachi H., Horibe K., Nakahata T., Adachi S.: Excess reduction of anthracyclines results in inferior event-free survival in core binding factor acute myeloid leukemia in children; a report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG). *Leukemia.* in press. doi:10.1038/leu.2013.153
5. 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 a highly predictive factor for the development of AdV11-induced hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 48:737-739, 2013.
6. Kodera Y, Yamamoto K, Harada M, Morishima Y, Dohy H, Asano S, Ikeda Y, Nakahata T, Imamura M, Kawa K, Kato S, Tanimoto M, Kanda Y, Tanosaki R, Shiobara S, Kim SW, Nagafuji K, Hino M,

- Miyamura K, Suzuki R, Hamajima N, Fukushima M, Tamakoshi A; for the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation, Halter J, Schmitz N, Niederwieser D, Gratwohl A.: PBSC collection from family donors in Japan: a prospective survey. Bone Marrow Transplant. 2013 Sep 30. doi: 10.1038/bmt.2013.147. in press.
7. 齋藤潤、中畑龍俊：疾患特異的 iPS 細胞。再生医療 12(1):19-29, 2013.

## 2. 学会発表

1. 中畑龍俊：特別講演、iPS 細胞研究が切り開く未来の医療。日本学会議公開学術講演会「未来社会を築く生命科学と医療のフロンティア」 2013 年 8 月 3 日 京都大学薬学部記念講堂
2. 中畑龍俊：教育講演、iPS 細胞の臨床応用。第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会。2013 年 11 月 29 日-12 月 1 日 (30 日) ヒルトン福岡シーホ
3. 中畑龍俊：基調講演、iPS 細胞を用いた今後の医療の可能性。日本製薬医学会第 4 回年次大会 2013 年 7 月 19 日 エーザイ株式会社本社 5 階ホール (塩野義製薬)
4. 中畑龍俊：基調講演、iPS 細胞を活用した医療の可能性と倫理。第 10 回 STS フォーラム「科学技術が拓く人間の未来」公開シンポジウム 2013 年 10 月 5 日 京都商工会議所ビル講堂
5. 横山宏司、西小森隆太、池谷真、那須輝、田中孝之、齋藤潤、梅田雄嗣、中畑龍俊、戸口田淳也、平家俊男：罹患者由来 iPS 細胞を用いた CINCA 症候群における関節病態の分子機構の解明。第 34 回日本炎症・再生医学会 2013 年 7 月 2-3 日 (ポスター) 国立京都国際会館
6. Hasegawa D., Hama A., Nozawa K., Salaguchi H., Yabe M., Ito E., Ito M., Kojima S., Nakahata T., Manabe A.: Hematological and morphological

characteristics of inherited bone marrow failure syndromes(IBMFS). The 75<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology 2013 年 10 月 11-13 日 (12 日) さっぽろ芸文館

7. Suzuki N., Hira A., Niwa A., Matsuo K., Takata M., Yabe M., Nakahata T., Saito M.: Mesodermal development from reprogrammed Fanconi anemia cells is affected by ALDH2 enzymatic activity. 11<sup>th</sup> Annual Meeting of international Society for Stem Cell Research (ISSCR). 7/12-7/15, Boston, MA, USA.
8. Honda Y., Tsuchida M., Masunaga A., Yoshimi A., Kojima S., Ito M., Kikuchi A., Nakahata T., Manabe A.: Clinical characteristics of 17 children with JMML who developed blast crisis. The 75<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (第 75 回日本血液学会学術集会) 2013 年 10 月 11-13 日 (12 日) 札幌市教育分化会館
9. 中畑龍俊：iPS 細胞による疾患モデル樹立と創薬への展望。日経バイオテクプロフェッショナルセミナー「次の 10 年間 iPS 細胞実用化をリードする iPS 細胞創薬の現状と課題」 2013 年 6 月 19 日 コクヨホール (東京) 日経 BP

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得  
特になし。
2. 実用新案登録  
特になし。
3. その他  
特になし。

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 免疫アレルギー研究分野)  
分担研究報告書

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 助教

研究要旨

骨細胞ネットワークが破綻した BCL2 トランスジェニックマウスを用いて、骨細胞によるメカニカルストレス応答の分子機構を探求した。非荷重時に、野生型マウスの骨芽細胞あるいは骨細胞で発現誘導され、再荷重時には発現低下する遺伝子で、BCL2 トランスジェニックマウスでは、非荷重・再荷重時での発現誘導および発現低下が起こらない遺伝子として Fkbp5 を同定した。Fkbp5 のノックアウトマウスでは、非荷重時に野生型マウスより強い骨量減少を認めた。また、Fkbp5 のノックアウトマウスは、グルココルチコイドに高い感受性を示し、強い骨量減少を認めた。Fkbp5 はグルココルチコイドの作用を調節するだけでなく、非荷重時の骨量減少にも関与することが示唆された。

A. 研究目的

骨細胞はその突起と骨細管を介して骨表面の骨芽細胞と連絡し、骨全体にネットワークを形成している。骨細胞ネットワークは、その構造からメカニカルストレスを感知、骨芽細胞・破骨細胞にシグナルを伝達し、骨量を調節していると推定されてきた。しかし、骨細胞機能を解明するためのモデルマウスが存在せず、これまで、その機能の証明は困難であった。今回、我々の作製した骨細胞ネットワークの破綻したマウスを用いて、骨細胞ネットワークが骨量調節を行っていることを証明するとともに、その分子メカニズムを明らかにすることを本研究目的とした。

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。この4ヶ月齢の BCL2 トランスジェニック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、骨芽細胞分画および骨細胞分画での遺伝子発現変化をマイクロアレイで比較した。野生型マウスで、非荷重時に発現が誘導され、再荷重でその発現が低下する遺伝子で、BCL2 トランスジェニックマウスでは、非荷重・再荷重時で、野生型マウスで見られた発現誘導および発現低下が起こらない遺伝子を選択した。リアルタイム RT-PCR で再現性を確認した。これにより選択された Fkbp5 のノックアウトマウスを作製、マイクロ CT により骨量解析を行った。また、8週齢マウスを用い1週間の尾部懸垂実験を行い、マイクロ CT 解析を行った。7週齢マウスに 1.25mg/kg/day あるいは 3.2mg/kg/day 用量のプレドニゾンペレットを植え込み、4週間後にマイクロ CT 解析を行った。デキサメタゾンを 2mg/kg/day、5mg/kg/day、10mg/kg/day で1日1回、4週間注射し、マイクロ CT 解析を行った。Glucocorticoid receptor (GR)、Androgen receptor (AR)、Prolactin receptor (PR)、estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ )、estrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ ) のレポーターベ

クターを用い、野生型および Fkbp5 のノックアウトマウスの初期培養骨芽細胞でレポーターアッセイを行った。また、野生型および Fkbp5 のノックアウトマウスの初期培養骨芽細胞の骨芽細胞分化をアルカリホスファターゼ染色で比較するとともに real time RT-PCR で骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現を検討した。

### C. 研究結果

非荷重実験で野生型マウスの骨芽細胞で誘導され、BCL2 トランスジェニックマウスの骨芽細胞では誘導されない遺伝子として Fkbp5 を同定した。Fkbp5 ノックアウトマウスを作製し、マイクロ CT で骨量を比較したところ、雌で有意な骨量低下を認めた。しかし、C57BL/6 に 6 回戻し交配したマウスでは、雌での骨量低下を認めたが、有意な低下ではなかった。尾部懸垂すると、Fkbp5 ノックアウトマウスでより強い骨量減少を認めた。特に雌での骨量減少が強かった。Fkbp5 は、グルココルチコイドレセプターと結合し、グルココルチコイドレセプターの核移行を抑制することが報告されている。高用量のプレドニゾロンペレット (3.2mg/kg/day) では、全例の Fkbp5 ノックアウトマウスが死亡した。低用量のプレドニゾロンペレット (1.25mg/kg/day) では、Fkbp5 ノックアウトマウスで、より強い骨量減少を認めた。特に雌での骨量減少が強かった。デキサメタゾンの連日注射でも、高用量で、雌の Fkbp5 ノックアウトマウスに多数の死亡例が観察された。やはり、Fkbp5 ノックアウトマウスで、より強い骨量減少を認め、特に雌での骨量減少が強かった。また、野生型マウスでは、グルココルチコイド投与早期に、Fkbp5 mRNA の上昇を認めた。レポーターアッセイでは、GR のレポーター活性が Fkbp5 ノックアウトマウス由来骨芽細胞で活性が上昇していた。Fkbp5 ノックアウトマウス由来の骨芽細胞は、野生型マウス由来の骨芽細胞と比較し、より低濃度のグルココルチコイドで骨芽細胞分化が阻害された。

### D. 考察

非荷重による骨量減少は、Fkbp5 ノックアウトマウスでより強く認められた。非荷重ストレスは、血中コルチゾールを増加させ、骨量減少を引き起こす可能性がある。しかし、血中コルチゾールは、野生型マウスでは非荷重時に増加したが、ノックアウトマウスでは増加しなかった。したがって、Fkbp5 ノックアウトマウスでは、非荷重時の骨量減少の増強に、グルココルチコイドレセプターシグナル以外の経路が関与したと考えられる。Fkbp5 ノックアウトマウスは、グルココルチコイドに対する感受性が高く、強い骨量減少を認めたが、特に雌で顕著であり、性差があることが示唆された。Fkbp5 ノックアウトマウスは、ステロイド性骨粗鬆症の病態解明のモデルマウスとなると考えられた。

### E. 結論

Fkbp5 はグルココルチコイドの作用を調節するだけでなく、非荷重時の骨量減少にも関与することが示唆された。

### F. 健康危険情報

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Moriishi T, Kawai Y, Komori H, Rokutanda S, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Asahina I, Komori T. Bcl2 Deficiency Activates FoxO through Akt Inactivation and Accelerates Osteoblast Differentiation. PLoS One. 9(1) : e86629, 2014.
2. Komori T. Functions of the osteocyte network in the regulation of bone mass. Cell Tissue Res. 352 :191-198, 2013.

#### 2. 学会発表

1. Osteocyte network and mechanical stress. Komori T. 第 22 回国際リウマチシンポジウム /2013
2. Osteocytes, Coordinator of the Bone.

Komori T. 2013 Seoul International  
Congress of Endocrinology and Metabolism  
/2013

3. 骨細胞ネットワークによるメカニカルス  
トレス応答 小守壽文. 第 55 回歯科基礎  
医学会学術大会・総会 /2013

#### 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

## 自然免疫系による Osteoprotegerin 産生誘導の解析

研究分担者 慶應義塾大学医学部 松尾光一 (教授)

### 研究要旨

Osteoprotegerin (OPG)は、RANKL による破骨細胞分化の活性化を阻害する。これまでの動物実験や臨床研究から、RANKL を阻害することで、関節リウマチにおける骨や軟骨の破壊を阻止できる可能性があることから、副作用なく OPG 産生誘導を起こす制御法の開発を最終目標とし、血中 OPG 濃度上昇に寄与している臓器・組織の特定を目指した。リポ多糖体 (LPS) を始めとする PAMPS (病原体関連分子パターン) をマウスに投与すると、末梢血中の OPG 濃度が上昇した。しかし、その産生細胞・臓器は明らかでないため、平成 25 年度は、ELISA 法と免疫組織化学的手法を駆使して、マウスの全身臓器において、LPS 投与により OPG の産生誘導のかかる臓器・組織を探索した。その結果、肝臓の中心静脈周囲などで特徴的な OPG 産生誘導が認められた。

### A. 研究目的

関節リウマチにおける炎症性骨破壊を抑制するために、自然免疫の賦活化時に起こる骨吸収抑制メカニズムを応用できるかどうかを探ることが本研究の目的である。炎症性サイトカインの作用を抑制する生物製剤が関節リウマチの治療に用いられている一方で、破骨細胞の骨吸収が起こらないマウスモデルでは、炎症存在下でも関節の骨破壊が起こらない。関節リウマチでは、破骨細胞分化を抑制する osteoprotegerin (OPG) の発現が低下し、TNF- $\alpha$ などの破骨細胞分化を促進する炎症性サイトカインの産生が上昇すると考えられている。我々は以前に、リポ多糖体 (LPS) などの Toll 様受容体のリガンドをマウスの腹腔内に投与すると、炎症時に伴い OPG 分泌を高めるメカニズムが働き出すことを報告した (Maruyama et al, 2006, J. Immunol.)。しかも、本分担研究で解析してきた、転写因子 Fra-1 を高発現するトランスジェニックマウスにおいては、野生型マウスと比較して、LPS 投与による OPG の血中濃度

上昇が亢進していることが見出され、逆に、Fos ノックアウトマウスでは、全身性の炎症が亢進しているだけでなく、OPG の血中濃度上昇が抑制されていた。このことは、OPG の産生制御に c-Fos や Fra-1 などの Fos ファミリーのタンパク質が寄与していることを示唆している。

そこで、OPG 産生誘導のメカニズムを理解し、骨破壊の抑制につなげることの分子基盤の解明を目標にした。平成 24 年度までに、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で血中の OPG 濃度が上昇すること、サルモネラワクチン株を感染させたマウスでは、OPG 濃度上昇に伴い骨量が増加することを見出し、さらに樹状細胞、好中球、リンパ節の内皮細胞、脂肪細胞などが LPS に応答して OPG を産生するかどうかを検討した。しかし、自然免疫系の惹起によって OPG を内分泌する臓器は不明のままである。今回、マウスに LPS を投与する実験系で、OPG 産生誘導のメカニズムにつ



いて詳細に解析した。

## B. 研究方法

LPS (1  $\mu\text{g/g}$  体重) を、野生型マウス (C57BL/6J) の腹腔内に投与した。LPS 投与後の OPG の産生臓器・細胞を特定するために、LPS 曝露の有無で、OPG の血中濃度と様々な臓器中のタンパク質濃度を ELISA キット (R&D) によって、遺伝子発現量は定量 RT-PCR によって測定した。さらに、パラフィン切片を用いて抗 OPG 抗体による免疫染色を行い、OPG 産生細胞を検索した。

(倫理面への配慮)

ヒト検体を用いた研究は行わない。マウスを用いた動物実験に関しては、慶應義塾動物実験委員会の承認を得た動物実験計画に従って行った (承認番号: 09208、09221)。

## C. 研究結果

LPS 投与後に、血中 OPG 濃度が上昇した。刺激前のリン酸緩衝塩類液 (PBS) 投与の対照マウスでは、胸腺の OPG (質量/組織総タンパク質量) が最も高かった。LPS 投与・非投与の OPG 比が ELISA 法で最も安定的に高かったのは肝臓で、臓器のサイズからも主要な OPG 分泌臓器であると考えられた。パラフィン切片の組織染色により、LPS 投与後に、肝臓の中心静脈周囲が濃染し、小葉間の「三つ組み」(動脈、肝門脈、胆管) 周囲は染色されなかった。OPG 欠損マウスの対照では染色されず、PBS 投与でもきわめて染色は薄かった。OPG 質量/組織総タンパク質量が比較的高い、肺や甲状腺では、LPS による明確で再現性のある発現上昇は観察されていない。

## D. 考察

今回の実験で、自然免疫を活性化すると肝細胞での OPG 発現が上昇し、中心静脈へ分泌されることが示唆された。LPS により OPG が増加しない臓器でも、増加分がすべて血中に放出されている可能性は否定できない。また、肝細胞における TLR の直接刺激により OPG が産生されるのか、TNF- $\alpha$ などの炎症性サイト

カインによる間接的な刺激が肝細胞に入るのかは不明である。

さらに骨外臓器の組織恒常性の維持に OPG が機能を持っているかどうかを OPG ノックアウトマウスなどを用いて解析することが必要である。

## E. 結論

肝実質細胞やクッパー細胞は、自然免疫賦活化により、血中 OPG 濃度を上昇させる主要な細胞であることが示唆された。OPG の内分泌を促進する分子機構の理解と制御により、骨粗鬆症における骨量減少や、関節リウマチなどの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

なし

## G. 研究発表

1. 論文発表  
(投稿準備中)

2. 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  
なし

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。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。さらに、破骨細胞を RANKL にて刺激することによって破骨細胞内における IL-3 の発現の誘導がみられ、IL-3 が RANKL による骨吸収活性亢進に negative feedback をかけている可能性も考えられた。

### 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- $\kappa$ 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が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

破骨細胞の生存および骨吸収能を調べるため、Stat5 ノックアウトマウスおよびコントロールマウスの長管骨から骨髓細胞を採取し共存培養を行った。骨芽細胞を除去した後に時間経過を追って生存率を調べることにより、破骨細胞の生存能に対する影響を調べた。また、象牙質切片上で 24 時間破骨細胞を培養の後、骨吸収窩を染色することによって骨吸収の程度を評価し、破骨細胞の骨吸収活性に与える影響を調べた。

Stat5 が破骨細胞の骨吸収活性を調節するメカニズムを調べるため、Stat5 ノックアウト破骨細胞およびコントロール細胞より採取したタンパクを用いてウェスタンブロッティングを行い、破骨細胞内の主要シグナルについて、活性化の状態を調べた。さらに、DNA microarray を用い、Stat5 のノックアウトにより発現に増減のある遺伝子を網羅的に調べた。また、破骨細胞において Stat5 を活性化させる因子を同定するため、他の細胞で Stat5 を活性化させることが知られている各種のサイトカインによる破骨細胞刺激後の Stat5 リン酸化を調べた。

(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 ノックアウト破骨細胞では骨吸収活性が有意に亢進していた。Stat5 ノックアウト破骨細胞にアデノウイルスベクターを用いて Stat5a および Stat5b を強制発現させたところ、Stat5 のノックアウトにより亢進した骨吸収活性は Stat5a および Stat5b の導入により回復した。以上の結果から *in vitro* において Stat5 が破骨細胞の骨吸収活性を負に制御していることが明らかとなった。Stat5 ノックアウト破骨細胞における骨吸収活性亢進のメカニズムを調べるため、破骨細胞内のシグナルの中でも活性化に関与すると考えられるシグナルである MAPK 経路、NFκB 経路、Akt 経路、Src 経路につき、その活性化をウェスタンブロッティング法によるリン酸化の検出により調べたところ、Stat5 ノックアウト破骨細胞において MAPK、特に Erk の活性が亢進していた。この結果より、破骨細胞において Stat5 は MAPK、特に Erk の活性化を抑制する働きをしていることが示唆された。次に、Stat5 により転写調節を受けている下流分子を同定するため、Stat5 ノックアウト破骨細胞とコントロール破骨細胞より採取した RNA か

ら cDNA を作成して DNA マイクロアレイに提出し、発現 profile の違いを解析した。Stat5 ノックアウト破骨細胞において発現量がコントロール破骨細胞の 1/2 未満に低下していた遺伝子群の中で MAPK のリン酸化に関与する遺伝子を抽出したところ、*Dusp* (*Dual specificity phosphatase*) 2 が同定された。Stat5 ノックアウト破骨細胞およびコントロール破骨細胞において real-time PCR を行い *Dusp* family 遺伝子の中でも MKP 活性を持つものの発現を調べたところ、*Dusp1* および *Dusp2* の発現が Stat5 ノックアウト破骨細胞において有意に低下していた。Stat5 ノックアウト破骨細胞で亢進した骨吸収活性は、*Dusp1* および *Dusp2* の導入により低下した。ここまでの結果から、Stat5 は破骨細胞において *Dusp1* および *Dusp2* の転写制御を介して MAPK の活性を抑制していると考えられた。

さらに、破骨細胞において Stat5 を活性化させる因子を同定するため、Stat5 を活性化することが知られている既知の因子である IL-2、IL-3、IL-5、GH、PRL、EGF にて破骨細胞を刺激したのちにタンパクを回収し、リン酸化 Stat5 の発現を調べた。IL-3 刺激後 5 分より Stat5 のリン酸化がみられ、この効果は 1 時間後まで持続していた。その他の因子による刺激ではリン酸化 Stat5 は検出されなかった。コントロール破骨細胞においては IL-3 刺激後 20 分で *Dusp1*、*Dusp2* の発現が上昇したのに対し、Stat5 ノックアウト破骨細胞ではこのような発現の上昇がみられなかった。以上の結果より、IL-3 の刺激により早期に *Dusp1*、*Dusp2* の発現が誘導され、この経路には Stat5 が関わっていることが示唆された。成熟破骨細胞を RANKL によって刺激し、時間経過を追って RNA を採取した。IL-3 の発現量の変化を real-time PCR にて評価したところ、RANKL 刺激後、1 時間、2 時間で IL-3 の発現が上昇することが確認された。

### D. 考察

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で 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* の発現を誘導することが明らかになったが、これは IL-3 が破骨細胞による骨吸収の亢進が原因となる疾患、例えば骨粗鬆症や関節リウマチにおける関節破壊の治療に応用できる可能性を示唆している。

## E. 結論

破骨細胞特異的 Stat5 ノックアウトマウスの解析、および Stat5 ノックアウト破骨細胞

の解析により、転写因子 Stat5 が破骨細胞において *Dusp1* および *Dusp2* の発現制御を介して破骨細胞の骨吸収活性に対して抑制的に作用することが示された。また、IL-3 は破骨細胞において Stat5 による骨吸収活性の抑制を誘導する因子の一つと考えられた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Hirose J, Masuda H, Tokuyama N, Omata Y, Matsumoto T, Yasui T, Kadono Y, Hennighausen L, Tanaka S. Bone resorption is regulated by cell-autonomous negative feedback loop of Stat5-Dusp axis in the osteoclast. *J Exp Med.* 211(1):153-63, 2014
2. Matsumoto T, Nagase Y, Hirose J, Tokuyama N, Yasui T, Kadono Y, Ueki K, Kadowaki T, Nakamura K, Tanaka S. Regulation of bone-resorption and sealing zone formation in osteoclasts occurs through Akt-mediated microtubule stabilization. *J Bone Miner Res.* 28(5):1191-202, 2013
3. Tanaka S Regulation of bone destruction in rheumatoid arthritis through RANKL-RANK pathways. *World J Orthop.* 18;4(1):1-6, 2013

### 2. 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

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし