

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：32622

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15538

研究課題名(和文)免疫グロブリン性骨疾患の理解と制御

研究課題名(英文)Bone metabolism by immune complexes

研究代表者

古賀 貴子(Koga, Takako)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：90451905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：IgGが破骨細胞の分化や機能を直接的に制御することを明らかにした。マウスには4種のIgGの受容体、FcγR1, FcγRIIB, FcγRIII, FcγRIVが存在し、このうち、FcγRIIBは他の3つの受容体に対して抑制的に働く。FcγRIIBの遺伝子欠損マウスは血漿中の免疫複合体が高値になり骨粗しょう症を呈することから、免疫複合体は骨を減らすことを明らかにした。また、妊娠マウスに抗RANKL抗体を投与して、骨をはじめ全身への影響を検討し、胎児の骨組織が増加するだけでなく、胎児が死亡するという結果を得た。抗RANKL抗体は母マウスの乳腺の発達や育児本能に影響を与えることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：I investigated whether ICs regulate bone metabolism directly. FcγR2b knockout mice lose bone upon the onset of a hypergammaglobulinemia or the administration of IgG1 ICs, which act mainly through FcγRIII. The IgG2 IC activates osteoclastogenesis by binding to FcγRI and FcγRIV, which is induced under inflammatory conditions. These results demonstrate a link between the adaptive immunity and bone, suggesting a regulatory role for ICs in bone resorption in general, and not only in inflammatory diseases. In addition, I investigated the effects of an anti-RANKL antibody on maternal and newborn health in mice and found that anti-RANKL antibody administration during pregnancy results in not only an undesirable increase in bone mass, but also has harmful effects on newborn survival.

研究分野：骨免疫学

キーワード：破骨細胞 RANKL 免疫複合体 骨代謝 骨粗しょう症

1. 研究開始当初の背景

Fc 受容体は、アレルギー・自己免疫疾患・炎症など様々な病態の発症に深く関与するため、これらの疾患に付随する骨破壊や骨代謝異常等の責任細胞である破骨細胞における直接的な役割に関する研究は難しいと考えられてきた。Fc 受容体をはじめとする免疫グロブリン様受容体に会合する DAP12 や FcRγ といった ITAM 分子は破骨細胞分化に必須の役割を果たす。(Koga, T. *et al.*, *Nature* 2004; Shinohara, M., Koga, T. *et al.*, *Cell* 2008; Koga, T. *et al.* *Immunological Review* 2009)。DAP12 と FcRγ の両欠損マウスは骨髄腔が骨で埋まる重度の大理石骨病を呈する(Koga, T. *et al.*, *Nature* 2004)。このことは FcRγ を介する Fcγ 受容体も破骨細胞分化に必須の役割を果たすことを示唆しているが、FcRγ 欠損マウスは骨形態に異常を示さないため FcRγ を介するシグナルの生理的意義や、機能的 Fcγ 受容体の実態及びその機序も不明である。申請者は破骨細胞分化過程においてマウスに発現する 4 種類の Fcγ 受容体のうち抑制型 FcγRIIB と活性型 FcγRIII が優位に発現し、FcγRIIB 遺伝子欠損マウスが骨粗鬆症を呈することを見出した。そこで、生理的あるいは病的環境下での破骨細胞上 Fcγ 受容体の意義を生体レベル・分子レベルで明らかにし、免疫グロブリンが関与する骨疾患の理解と制御法の分子基盤を提唱する目的で本研究計画に至った。

2. 研究の目的

超高齢社会を前にして、歯周病による咀嚼機能低下や関節症・骨粗鬆症などによる運動機能障害を防止し、QOL を維持することが世界的ニーズとなっている。関節リウマチ(RA)や全身性エリテマトーデス(SLE)などの自己免疫疾患はしばしば骨粗鬆症を併発する。また、多発性骨髄腫も骨融解局所のみならず全身性に骨粗鬆症を併発する。興味深いことは、前癌状態の意義未確定単クローン性免疫グロブリン血症(MGUS)においても骨量低下が観察されることである。これらは、高値の免疫グロブリンがこれらの疾患に共通する骨量低下に関与している可能性を示唆している。本研究は、免疫グロブリンが骨吸収の原因細胞である破骨細胞の分化や機能を直接的・決定的に制御するという仮定を生体レベルで証明し、また、責任分子を同定して分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

抑制性 FcγRIIB や活性型 FcγRIII の遺伝子欠損マウスの骨組織解析を行い、生理的骨代謝における Fcγ 受容体の意義を明らかにし、RANKL 共刺激シグナルである ITAM-カルシウムシグナルに着目して分子メカニズムを解明する。また、RA や SLE といった自己疾患モデルと高ガンマグロブリン血症モデル

マウスを用いて、過剰な免疫グロブリン G (IgG)の存在する病的条件下で、免疫グロブリンが Fcγ 受容体を介して直接的に破骨細胞分化を促進し全身性骨粗鬆症を引き起こすことを証明する。さらに IgG による骨吸収制御メカニズムの生理的・病的条件下における違いが抑制性 FcγRIIB と活性型 FcγRIII の発現バランスに依存することを *in vivo* および *in vitro* で証明する。以上に加え、本研究は RA や SLE モデルマウスに血漿交換療法を実施し、その有効性を提示し、自己免疫疾患治療や骨粗鬆症予防における IgG の意義に関する新たな視点の導入に繋げる。具体的には下記のとおりに進めた。

- (1) 自己免疫疾患発症と IgG 受容体 FcγRIIB 遺伝子欠損マウスの骨代謝との相関
過剰な自己免疫応答が骨量低下をもたらすか否かを明らかにするために、FcγRIIB 欠損マウスの生後から自己抗体産生が高値になる週令までを、同腹子マウスと比較して、その長管骨の単純 X 線撮影、μCT を用いた骨密度解析を行う。並行して、血清中の免疫グロブリン IgG の各サブタイプやリウマチ因子産生を ELISA 法にて経時的に計測することで、自己免疫疾患発症と骨代謝との相関を検討する。また、病理組織標本を作製して、破骨細胞数・破骨細胞面・骨吸収面などの骨吸収パラメータや骨芽細胞数・骨形成率等の骨形成パラメータを評価し、骨量低下の原因細胞が破骨細胞であることを証明する。
- (2) 自己免疫疾患性破骨細胞制御因子の同定
—免疫グロブリンによる破骨細胞直接制御の証明
高ガンマグロブリン血症に伴う骨量低下は免疫グロブリンが直接破骨細胞分化を制御するという仮定に基づき、各サブタイプの免疫グロブリン (IgG1, IgG2a, IgG2b) を上記培養系に用いてその効果を検討する。また、RA のリウマチ因子に代表されるように、自己抗体は免疫複合体を形成することを考慮し、トリニトロフェノール(TNP)-BSA と各サブタイプの抗 TNP-IgG 抗体を用いた免疫複合体を作成し、上記の検討を行う。
- (3) Fcγ 受容体を介した免疫グロブリンシグナルの分子メカニズムの解明
RA や SLE 患者の単球/マクロファージでは FcγRIII に対して FcγRIIB の発現が低下していることが明らかにされた(Hepburn *et al.*, *Rheumatology* 2004)。そこで、CIA モデルマウスや SLE モデルマウス(MRL/lpr マウス)の骨髄細胞を用いて、FcγRIII と FcγRIIB の mRNA 発現および細胞表面タンパク発現を解析し、過剰免疫複合体存在下における破骨細胞分化促進の理由を FcγRIII と FcγRIIB の発現バランスによって説明する。(*FcγRIII と FcγRIIB を識別できる抗体は入手可能である。)さらに、FcγRIIB の発現低下が破骨細胞

分化促進のメカニズムであると判明した場合、上記細胞の FcγRIII 発現を shRNA により低下させ、破骨細胞分化促進を抑制することを確認し、免疫グロブリンシグナルの責任分子であることを証明する。

(4) 高ガンマグロブリン血漿モデルマウスの作成と骨組織解析および血漿交換治療実験

TNP-BSA と抗 TNP-IgG 抗体を用いた免疫複合体をマウス尾静脈より投与し、高ガンマグロブリン血症モデルマウスを作成する。少量の免疫複合体は B・T 細胞活性化を介してさらなる抗体産生や炎症性サイトカイン産生といった免疫応答を引き起こす。逆に、臨床適応されているように、IgG 大量投与は免疫活性化抑制を促す。そこで、B・T 細胞を欠失する RAG1 欠損マウスを用い、投与開始直後からの血清中 IgG 量を ELISA にて数日おきに測定し、適当な IgG 高値を維持可能な投与スケジュールを検討する。また IgG によるマクロファージなどの自然免疫活性化の作用を考慮し、経時的に血中サイトカイン産生をモニタリングしながら、投与・解析スケジュールを決定する。作成したモデルマウスは投与開始後 2 週および 4 週後に長管骨を採取し、骨形態を計測する。また、当モデルマウスから採取した骨髓細胞や MGUS 患者の血清から採取した単球上の FcγRIII と FcγRIIB の発現バランスを解析し、上記研究計画(3)と同様に、高ガンマグロブリン血症に伴う骨粗鬆症の原因を分子レベルで説明する。

全身性骨粗鬆症を発症した CIA マウス及び SLE モデルマウスの血清中の IgG を除去する目的で、これらのマウスに血漿交換療法実験を実施する。具体的には、32G マウス用カテーテルシステム（ポリウレタンカテーテルチューブ内径 0.024 mm, 外径 0.012 mm）を伏在静脈から通して後大静脈に挿管し、この部位をシリコンラバーで腰筋に固定し、先端は皮下を通して頸まで導き皮膚に固定する (Reding et al., *Lab. Animals* 1988 を改変)。この方法により、実験期間中のマウスの行動を制限することなく任意のスケジュールで治療実験を実施することが可能となる。血漿交換は、ホローファイバーモジュールを用いた単純血漿交換法または Protein A カラムを併用して IgG を除去する免疫吸着法にて行う。

4. 研究成果

IgG 免疫グロブリンが破骨細胞の分化や機能を直接的に制御することを分子レベルで明らかにした。マウスには 4 種の IgG の受容体、FcγRI, FcγRIIB, FcγRIII,

FcγRIV が存在し、このうち、FcγRIIB は他の 3 つの受容体に対して抑制的に働く。FcγRIIB の遺伝子欠損マウスは自然発症的に自己免疫疾患を発症し、血漿中の免疫複合体が高値になっている。このマウスの骨組織を解析したところ、炎症や糸球体腎炎などの自己免疫症状はないけれど血漿中に免疫複合体が多く産生され始めた段階で、骨粗しょう症を呈することを明らかにした。このことは、免疫複合体が免疫系細胞の応答を介さずに直接的に骨代謝を調節していることを意味していた。In vitro の培養実験でも、FcγRIIB 欠損マウスの血清中の IgG 免疫複合体が破骨細胞分化を促進させることを証明した。関節リウマチや自己免疫疾患を発症している状態では、血清中の IgG 量が増加していることを鑑み、コラーゲン誘導性関節炎モデルマウスを作成し、免疫複合体による骨代謝制御を解析し、かつ、このモデルマウスの血清交換術により、骨量の減少が抑制できるか否かを検討した。これらの研究により、関節リウマチモデルマウスでは、血清中の IgG 免疫複合体が存在し、破骨細胞前駆細胞が活性化型 Fcγ受容体の発現量を増加させることによって、免疫複合体に反応しやすい状態になっていることを明らかにした。以上を Nature Communications に発表した。また現在までに、モデルマウスの血中 IgG 量を十分に下げる効果を得るまでには至っていないので、プロトコルを改定しつつ、再検討を行っている。

また、破骨細胞分化因子 RANKL に対する抗 RANKL 抗体はがん骨転移や骨病変に対する治療に用いられているが、げっ歯類などの小動物を用いた臨床前動物実験のデータは少ない。そのため、妊娠中の患者への投与は禁忌となっているものの、その詳細は不明のままであった。抗 RANKL 抗体を妊娠マウスに投与すると、母マウスともに子マウスの骨量は増加した。しかし、子マウスは出生後 2 4 時間以内に死亡した。RANKL は妊娠中の乳腺の発達に必要であるが、妊娠中の抗 RANKL 抗体投与により、乳腺発達が不十分になり、子マウスが育たなくなると考えられた。しかし抗 RANKL 抗体を投与された母から生まれた子マウスを健康な代理母に育児を託しても死亡したことから、抗 RANKL 抗体は骨代謝や乳腺の発達だけにとどまらない影響を及ぼすことが明らかになった。現在、論文投稿中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

古賀貴子、イムノグロブリンによる骨粗鬆症—新たな骨粗鬆症バイオマーカーの可能性、整形外科学、査読なし、印刷中、2017

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

古賀貴子、免疫系分子による骨代謝調節、骨粗鬆症治療、査読なし、1巻、p39-46、2017

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

〔学会発表〕(計 3 件)

岡松伸明、坂井信裕、古賀貴子、木内祐二、小口勝司、高見正道、抗 RANKL 抗体が妊娠マウスに与える影響、第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 15 日、長崎

(4)研究協力者 ()

古賀貴子 イムノグロブリンによる破骨細胞分化制御 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会 (招待講演、シンポジウム「骨代謝研究と骨粗鬆症研究の展開」) 2016 年 8 月 13 日、福岡

岡松伸明、古賀貴子、稲垣克記、小口勝司、高見正道、破骨細胞の分化を制御する新規遺伝子の解明 第 2 回日本骨免疫学会、2016 年 7 月 6 日、沖縄

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

古賀 貴子 (KOGA, Takako)
昭和大学・歯学部・講師
研究者番号：90451905