

令和元年6月6日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09915

研究課題名(和文) 関節炎病態における樹状細胞由来破骨細胞の作用メカニズムの解明

研究課題名(英文) The mechanism of dendritic cell-derived osteoclasts in the pathogenesis of arthritis.

研究代表者

花見 健太郎 (Hanami, Kentaro)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：50441853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：GM-CSF刺激の先行後、M-CSF及びRANKL刺激を加える事で、ヒト単球が抗原提示能と骨吸収能を有する多核細胞、樹状細胞由来破骨細胞(dendritic derived osteoclast; DCOC)へ分化する事が示され、関節リウマチ患者滑膜において、DCOCが存在し、通常破骨細胞を上回る骨吸収能を有するとともに、共刺激分子、MHC-class II、CD11c、CX3CR1を保持し、T細胞刺激能を有する事を示した。DCOCが炎症環境下にある関節リウマチ患者の関節で誘導され、破骨作用と抗原提示機能を併せ持つことで強力な炎症性骨破壊を増悪させている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

樹状細胞由来破骨細胞(dendritic derived osteoclast; DCOC)は骨破壊に重要な役割を担うと共に、炎症性病態における免疫応答にも関与している可能性が考えられる。本研究では、関節リウマチ患者滑膜にDCOCが存在する事を示し、DCOCの分化機序の解明、DCOC機能と関節破壊・関節炎の関連を解明した事で、関節炎病態に対するより有効的な治療戦略を展開出来ると考えられ、医学的にも多大な意義を持つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We reported that human DCs can differentiate into (dendritic derived osteoclast; DCOC) in the inflammatory lesion without being regulated by osteoblasts/osteocytes. DCOC possess not only the bone resorption ability but also the antigen-presenting function as DC. Actually, there were characteristic osteoclasts bearing costimulatory molecules in RA synovium, indicating that DCOC may play a pivotal role in the pathogenesis of RA by the maintenance of inflammation as well as joint destruction.

研究分野：臨床内科学

キーワード：樹状細胞 破骨細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨吸収と骨形成による継続的な骨リモデリングは正常な骨量の維持に必須のプロセスであり、破骨細胞は骨吸収において重要な役割を担う。一方で関節リウマチ、歯周病などの病態においては、炎症性細胞より産生されるサイトカインを介して活性化された破骨細胞が炎症性骨破壊に中心的な役割を果たす。

破骨細胞は単球・マクロファージ系の細胞に由来する多核巨細胞であり、*in vitro*においてマウス骨髄細胞由来マクロファージに M-CSF、RANKL 刺激後 72 時間に破骨細胞が形成される。その際にマクロファージの持つ貪食能や TNF- α 産生などの機能を失い、同時に骨吸収能を獲得している⁽¹⁾。樹状細胞は破骨細胞と前駆細胞を共有するものの、GM-CSF 刺激により誘導される単核の抗原提示細胞であり、破骨細胞とは形態、機能ともに異なる。しかし、Aymeric らは GM-CSF 刺激の先行後、M-CSF 及び RANKL 刺激を加える事で、ヒト単球が抗原提示能と骨吸収能を有する多核細胞、樹状細胞由来破骨細胞(dendritic derived osteoclast; DCOC)へ分化する事を示した⁽²⁾。

精神的ストレスが免疫系に影響する事は経験的に知られており、「**神経-免疫連関**」として研究がすすめられ、多くの神経伝達物質が免疫調整作用を有する事が明らかとなっている。我々は、ヒト単球樹状細胞由来のドパミンに注目して、細胞内 cAMP 濃度を上昇させるドパミン D1 様受容体を介して IL-6-Th17 軸を偏向し、さらにマウス関節炎モデルにおいて細胞内 cAMP 濃度を低下させるドパミン D2 様受容体阻害薬投与群では IL-6/IL-17 陽性細胞増加と共に軟骨破壊を招く事を明らかにした⁽³⁾。加えてヒト単球由来破骨細胞培養誘導系においてドパミン D2 様受容体シグナルが細胞内 cAMP・c-Fos・NFATc1 経路を抑制することで、ヒト破骨細胞分化・成熟を抑制する事を報告しており⁽⁴⁾、樹状細胞と骨破壊病態に関しての検討を行い、**神経と骨免疫のクロストーク**を解明してきた。

今回、興味深い性質を持つ DCOC に着目し、関節リウマチ患者滑膜における DCOC について予備的に検討を行ったところ、TRAP 陽性多核細胞のなかで 33%の細胞が CD86 を発現していた。関節リウマチの関節破壊病態において、骨吸収能と抗原提示能を有する DCOC が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

本研究では関節炎病態における DCOC 分化メカニズム、骨吸収能及び抗原提示能の解明、病態への影響に関しての検討を行った。

- (1) Yoshida, H., et al: The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 345 : 442-444, 1990
- (2) Aymeric, R., et al: Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment. *Blood* 104 (13), 4029-4037, 2004
- (3) Nakano K, et al: Antagonizing dopamine D1-like receptor inhibits Th17 cell differentiation: preventive and therapeutic effects on experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biochem Biophys Res Commun.* 373:286-91,2008
- (4) Hanami K, et al: Dopamine D2-like receptor signaling suppresses human osteoclastogenesis. *Bone* 56(1):1-8,2013

2. 研究の目的

関節炎病態における樹状細胞由来破骨細胞(dendritic derived osteoclast; DCOC)の役割を解明するため、研究期間内に以下のことを明らかにする。

- (1) ヒト単球、ラット骨髄細胞を用いた *in vitro* での解析
 - ・ TRAP 染色、特異的遺伝子カテプシン K・マスター転写因子 NFATc1 発現、象牙切片上骨吸収能を評価し、破骨細胞としての分化メカニズム、機能を明らかにする。
 - ・ 細胞表面 CD80/86 の発現、CD4 陽性 T 細胞との共培養による細胞増殖能を評価し、抗原提示細胞としての分化メカニズム、機能を明らかにする。
- (2) RA 患者検体を用いた解析
 - ・ 滑膜組織における DCOC 様細胞と、関節炎・関節破壊など臨床指標との関連を明らかにする。

以上の解析によって、DCOC が関節炎の維持、増悪に重要な役割を示している可能性を明らかとする。さらにそれぞれの解析において TNF 阻害薬・IL6 受容体抗体・CRLA41g などの既存 RA 治療薬による炎症病態・関節破壊の変化を解析して、炎症病態における DCOC の役割・作用メカニズムを明らかにするとともにその分化に重要な因子を探索する。これまでのリンパ球やサイトカインを標的とした治療から、増悪の根源である細胞を見出し、それを標的とすることで、既存治療では目指すことのできない関節リウマチ治療を目標とした治療の足がかりとする。

3. 研究の方法

- (1) GM-CSF 処理ヒト末梢血由来単球を M-CSF/RANKL 刺激後、樹状細胞由来破骨細胞(dendritic cell-derived osteoclast; DCOC)が分化誘導される。破骨細胞特異的遺伝子・骨吸収能を観察し、破骨細胞様性質を評価する。T 細胞の増殖等、細胞表面マーカー CD80/86 の病原性を観察し、樹状細胞様性質を評価する。さらに、電子顕微鏡を用い、DCOC 細胞形態を明

確にする。

- (2) 関節リウマチ(RA)滑膜に局在する DCOC を同定する。その後、DCOC が発現する細胞表面マーカーを調べ、関節破壊病態形成における役割を見出し、新規治療標的としての可能性を探索する。

4 . 研究成果

GM-CSF 刺激の先行後、M-CSF 及び RANKL 刺激を加える事で、ヒト単球が抗原提示能と骨吸収能を有する多核細胞、樹状細胞由来破骨細胞(dendritic derived osteoclast; DCOC)へ分化する事が示された。また、破骨細胞と比較して、DCOC は多核を有する事が示され、pit formation assay においては、高い骨吸収能が示された。関節リウマチ患者滑膜において、DCOC が存在し、通常破骨細胞を上回る骨吸収能を有するとともに、共刺激分子、MHC-class II、CD11c、CX3CR1 を保持し、T細胞刺激能を有する事が示された。更には、T細胞調整薬剤であるアバタセプト添加により破骨細胞分化、T細胞刺激能を抑制することが確認された。DCOC が炎症環境下にある関節リウマチ患者の関節で誘導され、破骨作用と抗原提示機能を併せ持つことで強力な炎症性骨破壊を増悪させている可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Effectiveness and safety of hydroxychloroquine therapy with or without corticosteroid in patients with systemic lupus erythematosus.

Miyagawa I, Nakano K, Nakayamada S, Iwata S, Hanami K, Fukuyo S, Kubo S, Inoue Y, Ueno M, Tanaka Y

International journal of rheumatic diseases 22(3) 434-442 2019年3月 [査読有り]

Relevance of interferon-gamma in pathogenesis of life-threatening rapidly progressive interstitial lung disease in patients with dermatomyositis.

Ishikawa Y, Iwata S, Hanami K, Nawata A, Zhang M, Yamagata K, Hirata S, Sakata K, Todoroki Y, Nakano K, Nakayamada S, Satoh M, Tanaka Y

Arthritis research & therapy 20(1) 240 2018年10月 [査読有り]

Comparison of efficacy of TNF inhibitors and abatacept in patients with rheumatoid arthritis; Adjusted with propensity score matching.

Kubo S, Nakayamada S, Nakano K, Sawamukai N, Hirata S, Hanami K, Saito K, Tanaka Y

Clinical immunology (Orlando, Fla.) 191 67-74 2018年6月 [査読有り]

Pleurisy Caused by Mycobacterium abscessus in a Young Patient with Dermatomyositis: A Case Report and Brief Review of the Literature.

Noguchi S, Hanami K, Miyata H, Torii R, Shimabukuro I, Kubo S, Obata H, Yoshii C, Yatera K

Internal medicine (Tokyo, Japan) 57(7) 997-1002 2018年4月 [査読有り]

Peripheral Immunophenotyping Identifies Three Subgroups Based on T Cell Heterogeneity in Lupus Patients.

Kubo S, Nakayamada S, Yoshikawa M, Miyazaki Y, Sakata K, Nakano K, Hanami K, Iwata S, Miyagawa I, Saito K, Tanaka Y

Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.) 69(10) 2029-2037 2017年10月 [査読有り]

Association of the multi-biomarker disease activity score with joint destruction in patients with rheumatoid arthritis receiving tumor necrosis factor-alpha inhibitor treatment in clinical practice.

Hirata S, Li W, Kubo S, Fukuyo S, Mizuno Y, Hanami K, Sawamukai N, Yamaoka K, Saito K, Defranoux NA, Tanaka Y

Modern rheumatology 26(6) 850-856 2016年11月 [査読有り]

〔学会発表〕(計1件)

花見健太郎、関節リウマチ(RA)における TNF 阻害薬(TNFi)とトシリズマブ(TCZ)の効果の比較 ~FIRST registry より~、第52回九州リウマチ学会、2016年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.uoeh-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：久保 智史

ローマ字氏名：Kubo Satoshi

所属研究機関名：産業医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：70461548

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。