

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09017

研究課題名(和文) 異物巨細胞の分化メカニズムの解明とその制御 -異物排除と寛容のスイッチを求めて

研究課題名(英文) Differentiation mechanism of foreign body giant cells

研究代表者

松原 全宏 (Matsubara, Takehiro)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40361498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：同一起源の多核巨細胞である破骨細胞との相同性・異質性に着目し、異物巨細胞の分化メカニズムおよび機能解析を行った。in vitro の異物巨細胞の培養法を見直し、革新的手法で誘導効率を高めることに成功した。破骨細胞分化に必要なモチーフを有する細胞膜タンパク分子のノックアウトマウスで、異物巨細胞も明らかに分化が抑制されることを明らかにした。次いで破骨細胞で重要とされる細胞内カルシウム振動に着目した。周波数に着目したカルシウム振動解析手法を開発した。さらに破骨細胞分化におけるカルシウム振動研究の歴史をまとめた。異物反応への理解が一層深まり、かつ生体親和性の高いインプラントのヒントが得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、異物巨細胞の分化メカニズムが明らかになった。異物反応への理解が一層深まり、かつ生体親和性の高いインプラントのヒントが多く得られた。異物反応の適切な理解に基づき、異物反応調整因子を搭載したインプラント開発に進めていく予定にしている。また基礎研究としても、特に免疫感染症領域において、異物が寛容されるメカニズムが生体内免疫拒絶反応を考える上で貴重なモデルとなりうる。学際的発展の可能性が高まったと自負している。

研究成果の概要(英文)：We analyzed differentiation of foreign body giant cells (FBGCs) and their function. The origin of FBGCs is monocyte, and is same as osteoclasts. We invented in vitro efficient culture system of FBGCs. With this culture system, we clarified differentiation of FBGCs were inhibited in Osteoclast's differentiation factor KO mice. Next, we focused on calcium oscillations (Ca oscillations), which is necessary for osteoclast differentiation. We made a review paper of Ca oscillations in osteoclast differentiation. In FBGCs differentiation, Ca oscillations were also important, because Ca oscillations were interfered directly with FBGCs' differentiation factors. We clarified an important mechanism of FBGCs differentiation. In addition, we got hints to improve bio-compatibility of implants through this study.

研究分野：整形外科・救急医療・骨代謝学

キーワード：異物巨細胞 異物反応

1. 研究開始当初の背景

生体内インプラント周囲には、多核巨細胞が存在する。1935年に初めて Sabin らが異物周囲の多核巨細胞の存在が報告して以来、単球マクロファージ由来の多核巨細胞が異物周囲に集簇し、その後組織の線維化に繋がること分かった。電子顕微鏡による詳細な観察の結果、異物巨細胞には特長的な膜様の構造を有す事も分かっている。異物巨細胞の現象論的理解は進んだが、分化メカニズム、機能の解明には程遠い。

異物巨細胞分化に必須なサイトカイン IL-4 は、組織修復に関わる M2 マクロファージ誘導サイトカインとして知られている。マクロファージ分極化現象は、ここ 10 年程で概念が確立した。マクロファージ融合により生じる異物巨細胞が、分化成熟で分極化のどこに位置付けられるのか、未解明なままである。そこで、同一の起源の多核巨細胞である、破骨細胞分化メカニズムについて、主に研究を行ってきた。破骨細胞分化制御と共通する因子を手がかりに、異物巨細胞の分化メカニズムに迫ろうと考えた。

これまで我々は、生体内異物投与モデルとして、マウス腹腔内スポンジ投与モデルを確立した。また、*in vitro* の実験としては、骨髓前駆細胞から GM-CSF, IL-4 投与による異物巨細胞形成誘導系を用いた。

異物巨細胞の分化メカニズムは明らかになっていない。生体内インプラント周囲には、多核巨細胞が存在する事は、古くから知られている。異物巨細胞は、単球マクロファージ由来であり、破骨細胞と起源が同じである。異物巨細胞の周囲には、線維化が誘導される。異物巨細胞について、現象論としての理解は進んでいるが、分化調整のしくみは解明されていない。我々は、共通起源の破骨細胞分化をヒントに、異物巨細胞の分化メカニズムに迫る。

また、異物巨細胞の機能は確定していない。これまで異物巨細胞は、生体内異物排除に関与すると考えられてきた。しかし骨溶解能に乏しく、異物排除の関与を否定する報告が出た。我々は、排除不能な異物を認知し寛容するメカニズムにおいて異物巨細胞が果たす役割を想定し、解析を進めている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、以下の2つである。異物巨細胞の分化メカニズムを理解する。異物巨細胞の機能解析を行う。

本研究の成果として、異物巨細胞分化の統合的理解が進み、異物排除と寛容を分けるチェックポイントの解明を目指す。

3. 研究の方法

我々は動物実験委員会の承認を得た上で、腹腔内スポンジ投与による *in vivo* マウス異物反応モデルを確立した。

腹腔内に留置したスポンジにはマクロファージをはじめとする細胞が十分に浸潤しやすく、異物反応を促しやすい。また、切片が作成しやすく組織学的検討が行いやすい。さらには、集まった細胞をコラゲナーゼで丁寧にはがし、生きた細胞をそのまま FACS 解析にかけることができる。*In vitro* の誘導系とともに、異物反応を総合して検証できる。

本研究では、破骨細胞分化に必須な分子に着目し、ノックアウトマウスを用いた異物巨細胞の分化誘導実験を行った。

また、細胞内カルシウム濃度の変動現象が、破骨細胞では重要なことが知られている。異物巨細胞でもカルシウム濃度変動が起こり、分化に必須なサイトカインによる調整を受けることが、細胞内カルシウム濃度測定試薬を用いた検討で初めて示した。

また、異物巨細胞が誘導されると、マクロファージ分極軸が変わることが、Real Time PCR を用いたメッセンジャー RNA 発現解析により示された。次世代シーケンサーを用いた網羅的解析で、異物巨細胞分化の新規マーカー確立を目指した。

4. 研究成果

同一起源の多核巨細胞である破骨細胞との相同性・異質性に着目し、本研究では異物巨細胞の分化メカニズムおよび機能解析を行った。*in vitro* の異物巨細胞の培養法を見直し、革新的手法で誘導効率を高めることに成功した。破骨細胞分化に必須なモチーフを有する細胞膜タンパク分子のノックアウトマウスで、異物巨細胞も明らかに分化が抑制されることを明らかにした。また発現遺伝子の網羅的解析を行い、従来想定されていた機能とは逆の炎症鎮静への関与が示唆される興味深い結果を得た。米国骨代謝学会、日本骨免疫学会、日本骨代謝学会での議論を踏まえて、現在、投稿準備中である。

次いで破骨細胞で重要とされる細胞内カルシウム振動に着目した。異物巨細胞誘導条件でのカルシウム濃度を測定した。新たに確立した周波数解析方法をもとに種々のノックアウトマウスを交えて検討を行い、これまで報告がなかった新たなカルシウム振動制御因子を見出した。周波数に着目したカルシウム振動解析手法について投稿し受理された (Okada H, et al. J Bone

Miner Res 2019)。さらに破骨細胞分化におけるカルシウム振動研究の総説も投稿し公開された (Okada H, et al. Int J Mol Sci 2021)。

得られた知見は当初の想定を上回った。異物反応への理解が一層深まり、かつ生体親和性の高いインプラントのヒントが多く含まれていた。今後、免疫領域において、異物反応研究がさらに発展する可能性を高めたのではないかと自負している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okada H, Kajiya H, Omata Y, Matsumoto T, Sato Y, Kobayashi T, Nakamura S, Kaneko Y, Nakamura S, Koyama T, Sudo S, Shin M, Okamoto F, Watanabe H, Tachibana N, Hirose J, Saito T, Takai T, Matsumoto M, Nakamura M, Okabe K, Miyamoto T, Tanaka S.	4. 巻 34
2. 論文標題 CTLA4-Ig directly inhibits osteoclastogenesis by interfering with intracellular calcium oscillations in bone marrow macrophages.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Bone Miner Res	6. 最初と最後の頁 1744-1752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbmr.3754	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okada Hiroyuki, Okabe Koji, Tanaka Sakae	4. 巻 22
2. 論文標題 Finely-Tuned Calcium Oscillations in Osteoclast Differentiation and Bone Resorption	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 180 ~ 180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22010180	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Okada Keita, Mori Daisuke, Makii Yuma, Nakamoto Hideki, Murahashi Yasutaka, Yano Fumiko, Chang Song Ho, Taniguchi Yuki, Kobayashi Hiroshi, Semba Hiroaki, Takeda Norihiko, Piao Wen, Hanaoka Kenjiro, Nagano Tetsuo, Tanaka Sakae, Saito Taku	4. 巻 10
2. 論文標題 Hypoxia-inducible factor-1 alpha maintains mouse articular cartilage through suppression of NF-B signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-62463-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Soma Tomoya, Iwasaki Ryotaro, Sato Yuiko, Kobayashi Tami, Nakamura Satoshi, Kaneko Yosuke, Ito Eri, Okada Hiroyuki, Watanabe Hisato, Miyamoto Kana, Matsumoto Morio, Nakamura Masaya, Asoda Seiji, Kawana Hiromasa, Nakagawa Taneaki, Miyamoto Takeshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Tooth extraction in mice administered zoledronate increases inflammatory cytokine levels and promotes osteonecrosis of the jaw	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-020-01174-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito Eri, Sato Yuiko, Kobayashi Tami, Nakamura Satoshi, Kaneko Yosuke, Soma Tomoya, Matsumoto Tatsuaki, Kimura Atushi, Miyamoto Kana, Matsumoto Hideo, Matsumoto Morio, Nakamura Masaya, Sato Kazuki, Miyamoto Takeshi	4. 巻 542
2. 論文標題 Treatment with an active vitamin D analogue blocks hypothalamic dysfunction-induced bone loss in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 48 ~ 53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.01.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeda Ryutaro, Yasui Tetsuro, Kasai Taro, Matsumoto Takumi, Matsubara Takehiro, Tanaka Sakae	4. 巻 11
2. 論文標題 Surgical Treatment of Pathological Tibial Shaft Fracture in Adult Patient With Gnathodiaphyseal Dysplasia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JBJS Case Connector	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2106/JBJS.CC.21.00005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 岡田寛之、鍛冶屋浩、小俣康徳、岡部幸司、宮本健史、田中栄
2. 発表標題 Dectin-2はFcR と会合し、カルシウム振動に干渉し異物反応を制御する
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田寛之、鍛冶屋浩、小俣康徳、岡部幸司、宮本健史、田中栄
2. 発表標題 破骨細胞分化初期の共刺激-カルシウムオシレーション-NFATc1 軸 ~特に共刺激周囲の補因子について
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田寛之、鍛冶屋浩、小俣康徳、岡部幸司、宮本健史、田中栄
2. 発表標題 Dectin-2, a Fc receptor gamma-harboring receptor, regulates foreign body reaction by interfering with intracellular calcium oscillation.
3. 学会等名 ASBMR 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田寛之、鍛冶屋浩、小俣康徳、進正史、岡本富士雄、廣瀬旬、岡部幸司、宮本健史、田中栄
2. 発表標題 CTLA4-Ig (Abatacept) Directly Inhibited Osteoclastogenesis by Interfering With Intracellular Calcium Oscillations via Fc receptor gamma
3. 学会等名 第97回日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田寛之、鍛冶屋浩、小俣康徳、斎藤琢、岡部幸司、宮本健史、田中栄
2. 発表標題 単球由来巨細胞の分化誘導スイッチ：カルシウムオシレーション
3. 学会等名 第5回日本骨免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田寛之、鍛冶屋浩、小俣康徳、斎藤琢、岡部幸司、宮本健史、田中栄
2. 発表標題 Calcium oscillations in early osteoclast differentiation
3. 学会等名 第20回運動器科学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	Hiroyuki Okada, Hiroshi Kajiya, Yasunori Omata, Takumi Matsumoto, Shunichi Sudo, Masashi Shin, Fujio Okamoto, Jun Hirose, Koji Okabe, Takeshi Miyamoto, Sakae Tanaka
2. 発表標題	CTLA4-Ig directly inhibited osteoclastogenesis by interfering with intracellular calcium oscillations in bone marrow macrophages
3. 学会等名	ASBMR 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	岡田寛之、鍛冶屋浩、小俣康徳、進正史、岡本富士雄、斎藤琢、岡部幸司、宮本健史、田中栄
2. 発表標題	ITAM受容体は破骨細胞分化初期のCalcium oscillationを巧みに調節する
3. 学会等名	第37回日本骨代謝学会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	岡田寛之、鍛冶屋浩、松本卓巳、廣瀬旬、岡部幸司、宮本健史、田中栄
2. 発表標題	CTLA4-Igによる破骨細胞形成直接抑制メカニズム
3. 学会等名	20th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress、第4回日本骨免疫学会(国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	岡田寛之、鍛冶屋浩、松本卓巳、廣瀬旬、岡部幸司、宮本健史、田中栄
2. 発表標題	Fine tuning of calcium oscillations by ITAM receptors regulates RANKL-induced osteoclast differentiation.
3. 学会等名	ASBMR 2018 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年	2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岡田 慶太 (Keita Okada) (50759173)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	
研究分担者	松本 卓巳 (Matsumoto Takumi) (70436468)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	
研究分担者	宮本 健史 (Miyamoto Takeshi) (70383768)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任教授 (32612)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	岡田 寛之 (Okada Hiroyuki)	東京大学・疾患生命工学センター臨床医工学・助教 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------