

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16164

研究課題名(和文) 病的な樹状細胞由来破骨細胞のみを標的とした新規骨破壊抑制法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel method for suppressing bone destruction targeting only pathological dendritic cell-derived osteoclasts

研究代表者

成澤 学 (Narisawa, Manabu)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：10553802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)の骨・軟骨組織の破壊原因として、動物実験では樹状細胞(DC)から分化する破骨細胞(DC-OC)が報告されていたが、ヒトでは詳細が分かっていなかった。DC-OCは一般的な単球由来破骨細胞(Mo-OC)よりも骨吸収能が高く、Mo-OCにはないDCの特徴を有し、免疫機能を司るT細胞を増殖させた。RA治療薬の一つであるCTLA-4IgはこのT細胞増殖を抑制した。さらに、RAと変形性膝関節症の滑膜を比較したところ、DC-OCはRAの滑膜内にしか存在しなかった。通常の骨代謝から逸脱したDC-OCが炎症の維持と関節破壊の双方に寄与している可能性を初めて明らかとし、論文として発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節や骨格機能に多大な影響を及ぼす慢性骨破壊性疾患である関節リウマチの骨病変において、破骨細胞が非常に重要な役割を担っている。生理的には単球を前駆細胞として分化・癒合する破骨細胞の中に、未成熟樹状細胞から破骨細胞に分化転換する亜集団を確認し、関節リウマチの病的な増殖滑膜にそのサブセットが存在することを証明した。樹状細胞由来破骨細胞が高い骨吸収能のみならず、樹状細胞に類似した免疫活性化作用も伴うことで病態の増悪に大きく関わっている可能性を初めて示すことができた。今後、この病的な樹状細胞由来破骨細胞を治療ターゲットとすることで、副作用を減らした上で骨・関節破壊を抑制できる可能性も広がったと考える。

研究成果の概要(英文)：As a cause of destruction of bone and cartilage tissue in rheumatoid arthritis (RA), osteoclasts differentiated from dendritic cells (DC-OC) have been reported in animal experiments, but the details have not been known in humans. DC-OCs had a high bone resorption capacity than conventional monocyte-derived osteoclasts (Mo-OC) and had characteristics of DC that Mo-OCs did not have, stimulating to T cell proliferation. It was possible to inhibit it by CTLA-4Ig which was one of therapeutic agents for RA. In addition, DC-OCs were found only in the synovial membrane of RA in comparison with that of osteoarthritis of the knee. DC-OCs had not only the high bone resorption capacity but also the function of T cell stimulation. For the first time, we clarified that DC-OCs deviated from normal bone metabolism may contribute to both the maintenance of inflammation and joint destruction.

研究分野：骨免疫学

キーワード：関節リウマチ 破骨細胞 樹状細胞 CTLA-4Ig アバタセプト T細胞 分化転換 滑膜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞(Mo-OC)は単球(Mo)からの分化が一般的であるが、関節炎ラットでは樹状細胞(DC)から分化する破骨細胞サブセットが報告されている。しかし、ヒトにおけるこの樹状細胞由来破骨細胞(DC-OC)の詳細はほとんど分かっていなかった。

2. 研究の目的

自己免疫疾患である関節リウマチ患者では、免疫寛容の破綻に伴い活性化された B 細胞および自己応答性 T 細胞により関節滑膜炎をきたし、破骨細胞と活性化線維芽細胞様滑膜細胞による骨・軟骨組織の破壊が生ずる。この骨破壊は単球から分化する破骨細胞(Mo-OC)によって生じるものとして特徴付けられているが、関節炎モデルマウスでは樹状細胞から分化する破骨細胞サブセットが報告されている。しかし、ヒトにおける樹状細胞由来破骨細胞(DC-OC)の詳細について不詳であるため、その機能と病的意義について明らかにすることとした。

3. 研究の方法

- (1) ヒト末梢血単球由来樹状細胞から DC-OC に分化転換させ、カテプシン K 陽性かつ TRAP 染色陽性である多核の破骨細胞様細胞であることを確認した。
- (2) 樹状細胞の特徴を評価するため、CD11c のみならず共刺激分子である CD80/CD86 に加え、MHC-class II (HLA-DR)等の免疫染色を行った。
- (3) 骨吸収および抗原提示能を評価するために pit-formation assay や T 細胞共培養を行った。
- (4) DC-OC が樹状細胞のフェノタイプを有していたことから抗原提示能に着目し、DC-OC を T 細胞と共培養するサイミジンの取り込み実験を用いた。
- (5) DC-OC に共刺激分子を介する T 細胞刺激能が認められたことから、CD28 を介した共刺激シグナルを阻害する CTLA-4Ig であるアバタセプトによる効果について、Mo-OC と比較し検討した。
- (6) 関節リウマチおよび変形性膝関節症(OA)患者の人工膝関節置換術により得られた滑膜組織を用いて、DC-OC の局在について評価した。

4. 研究成果

試験管内でヒト単球由来の未成熟な樹状細胞を M-CSF および RANKL で培養すると、cathepsin K 陽性かつ TRAP 染色陽性多核細胞に分化した(Fig. 1A-C)。この多核巨細胞は Mo-OC に比して、pit-formation assay において高い骨吸収能が認められた(Fig. 1D)。また DC-OC は CD11c 陽性を保持し、Mo-OC には認められない共刺激分子である CD80/86 と MHC-class II 分子の発現を伴っていた(Fig. 2)。ヒト生体内においては、関節リウマチ患者の増殖滑膜内に TRAP 陽性かつ共刺激分子を有

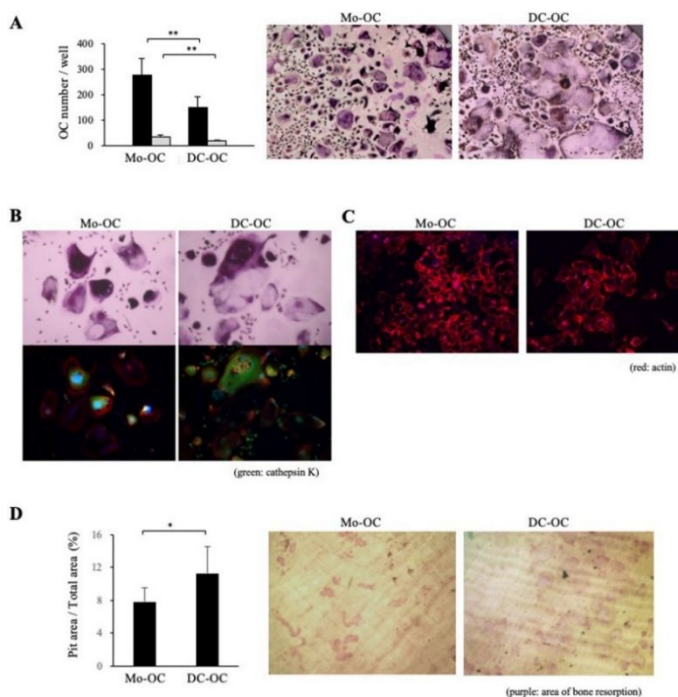


Fig. 1. 樹状細胞および単球由来破骨細胞の特徴. A. TRAP 染色 (グラフ: 黒色が5個以上の核, 灰色が3~4個の核). B. TRAP 染色 (上) およびカテプシン K の免疫染色 (下). C. アクチン環の免疫染色. D. Pit-formation assay.

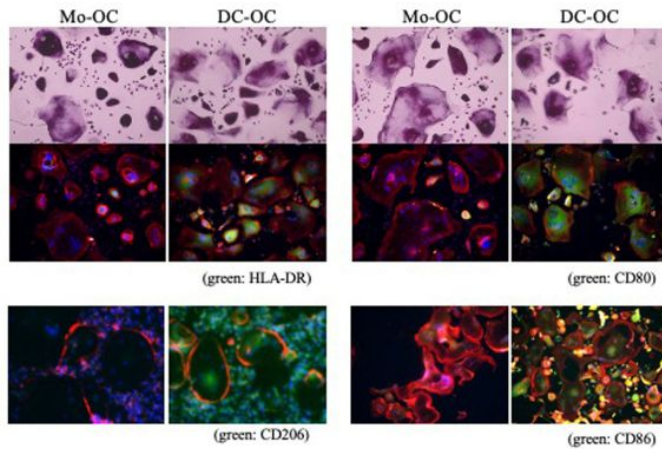


Fig. 2. 樹状細胞の破骨細胞上の樹状細胞表面マーカー. TRAP 染色 (上) および HLA-DR, CD80, CD86 および CD206 に対する免疫蛍光染色 (下).

する DC-OC の存在が確認され、これは変形性関節症の滑膜には見られなかった (Fig. 3)。さらに Mo-OC、DC-OC と T 細胞を各々共培養したところ、Mo-OC は T 細胞を増殖させなかったが、DC-OC との共培養により T 細胞は増殖した。この共培養にアバタセプトを併用したところ DC-OC の T 細胞刺激能が低下し、T 細胞増殖が抑制された (Fig. 4)。一方、アバタセプトは Mo-OC の分化を抑制したが、DC-OC に対する分化抑制は限定的であった。

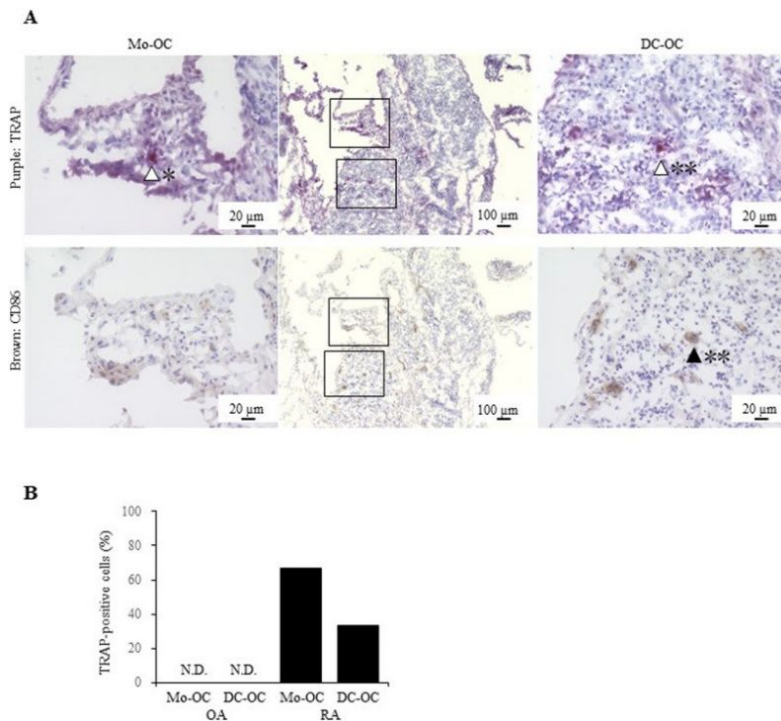


Fig. 3. 関節リウマチ患者の滑膜組織における樹状細胞由来破骨細胞 (DC-OC). A. TRAP 染色と滑膜組織の CD 86 に対する免疫染色. TRAP 陽性細胞および CD 86 陽性細胞は、それぞれ白および黒の三角形記号で表示. 単球由来破骨細胞 (Mo-OC) と DC-OC はそれぞれ*と**で表示. B. TRAP 陽性細胞に対する Mo-OC 及び DC-OC の割合.

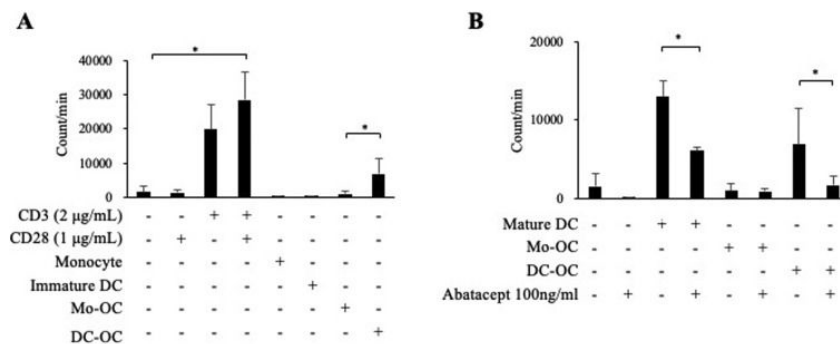


Fig. 4. CD4 陽性 T 細胞との共培養におけるサイミジン取り込み. A. 樹状細胞由来破骨細胞との共培養における T 細胞増殖の比較. B. アバタセプト追加での比較.

以上より、DC-OC が関節リウマチの骨破壊の病態形成にかかわっていることが明らかとなった。さらなる研究を進めたところ、Mo-OC に比して DC-OC が強い溶骨能を示した要因として、破骨細胞分化過程において Mo-OC に比して DC-OC は DC-STAMP が高いレベルで発現していた点が挙げられた。細胞融合に伴う多核化による破骨細胞形成が促進し、骨吸収が促進した可能性が考えられる。Cathepsin K の発現も DC-OC 細胞の方が高く、破骨細胞の成熟度が高く、生体内で積極的に骨破壊を進展していると予想される。また、DC-OC は T 細胞刺激に重要な CD80/86 に代表される共刺激分子の発現が見られ、T 細胞刺激能を有していた。一方、DC-OC が TRAP 陽性を示し、炎症性滑膜に存在する破骨細胞のうち 30 %程度を占めていた。これらの結果から DC-OC が免疫の活性化能と溶骨作用を併せ持つ病的なサブセットであると考えられる。この病的と考えられる DC-OC に対する治療アプローチとして、アバタセプトは DC-OC 細胞膜上の CD80/86 に結合して T 細胞の活性化を抑制したため、DC-OC による免疫活性化を抑制する新たな視点になるものと思われる。

本研究において、ヒト DC-OC が Mo-OC と異なり高い骨吸収能に加えて T 細胞刺激能を有していることを示した。この破骨細胞サブセットは関節リウマチ患者の炎症性滑膜に特異的に局在していることから、通常の骨代謝から逸脱して炎症の維持と骨破壊の双方に寄与している可能性が示唆された。関節リウマチ治療において、生理的な骨代謝を阻害することなく、骨・関節破壊進展を抑制することは非常に重要なことである。今回、病的な破骨細胞サブセットである DC-OC を見出したことで、関節リウマチの骨病変の新たな一面を解明したのみならず、本研究結果が、今後の関節リウマチ治療における新たなターゲットとなり、骨・関節破壊の抑制につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Narisawa Manabu, Kubo Satoshi, Okada Yosuke, Yamagata Kaoru, Nakayamada Shingo, Sakata Kei, Yamaoka Kunihiro, Tanaka Yoshiya	4. 巻 142
2. 論文標題 Human dendritic cell-derived osteoclasts with high bone resorption capacity and T cell stimulation ability	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115616 ~ 115616
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bone.2020.115616	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------