

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17906

研究課題名(和文) 関節リウマチにおける炎症細胞ダイナミクスの動的解析と新規治療法の最適化

研究課題名(英文) Analysis of cellular dynamics in arthritis and evaluation of drug mechanism

研究代表者

菊田 順一 (Kikuta, Junichi)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：60710069

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)は、炎症性骨破壊を来す難治性の自己免疫疾患である。近年、様々な分子標的治療薬が関節リウマチ治療において臨床応用され、その骨破壊抑制効果が示されているが、生体内に投与した分子標的治療薬が実際に、“いつ”、“どこで”、“どのようにして”効果を発揮するのか、その薬理作用の詳細については不明な点が多い。本研究では、生体関節の二光子励起イメージング技術を駆使して、関節破壊に関わる炎症細胞の動態を可視化し関節炎の発症機序を明らかにするとともに、RA治療において臨床応用されている分子標的治療薬の生体内動態・薬効発現メカニズムを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ライブイメージング技術の特徴を生かし、生体の炎症関節内における破骨細胞の動態や分子標的治療薬の体内動態を細胞レベルで時空間的に解明したもので、国際的にも独自性が高く、学術的に大きな意義がある。最先端のイメージング技術によって得られた基礎研究成果を臨床現場へ還元することにより、国内外のリウマチ医療へ貢献することができ、その社会的意義も極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease characterized by synovial joint inflammation and progressive bone destruction. In this study, we established an intravital imaging system to observe synovial tissues using a multiphoton microscopy and succeeded in visualizing pathological osteoclasts and their precursors at the pannus-bone interface. Combined with fluorescence-labeling of CTLA4-Ig, a biological agent used for the treatment of RA, we identified that CTLA4-Ig was distributed predominantly within the inflamed synovium and bound to CX3CR1+ macrophages and CD140a+ fibroblasts, but not to mature osteoclasts. Intravital synovial imaging system facilitates investigation of cellular dynamics in the pathogenesis of arthritis, and would thus be useful for evaluating drug mechanism and efficacy of biological agents within the synovial microenvironment in vivo.

研究分野：免疫学、細胞生物学

キーワード：生体イメージング 二光子励起顕微鏡 破骨細胞 関節破壊 分子標的治療薬

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は、全身の関節に慢性炎症を来す難治性の自己免疫疾患であり、関節内の滑膜組織が増生し、進行性に軟骨と骨が破壊される。近年、分子標的治療薬の登場により、従来の治療法では疾患活動性を十分にコントロールできなかった RA 症例においても、関節破壊の進行を強力に阻止し、病状を寛解に持ち込むことが可能となった。現在、抗 TNF $\alpha$  抗体、抗 IL-6 受容体抗体、T 細胞選択的共刺激調節剤 (CTLA4-Ig) など様々な分子標的治療薬が本邦の RA 治療において臨床応用され、その骨破壊抑制効果が示されている。RA 治療の現場は、「早期の診断と治療介入により寛解を目指す」というのが主な指針となっており、分子標的治療薬の需要は今後ますます広がると予想される。その一方で、生体内に投与した分子標的治療薬が実際に、「いつ」、「どこで」、「どのようにして」効果を発揮するのか、その薬理作用の詳細については不明な点が多い。

本研究者はこれまで、組織深部の観察が可能な二光子励起顕微鏡を活用して、動物個体を生かしたまま骨破壊が起きている骨の表面部分を詳細に可視化する系を独自に開発し、生きた破骨細胞による骨破壊過程をリアルタイムで観察することに世界に先駆けて成功した。その結果、破骨細胞には機能的に異なる 2 種類の細胞 (骨吸収期と休止期) が存在し、短期間で 2 つの状態を遷移していることを発見した (Kikuta, et al., *J Clin Invest*, 2013)。また、生体二光子励起イメージング技術を薬効評価系として活用し、現在 RA 治療の現場で使用されている各種分子標的治療薬が炎症によって誘導された破骨細胞に及ぼす効果を解析した結果、抗 TNF 抗体および抗 IL-6 受容体抗体は主に成熟破骨細胞、CTLA4-Ig は破骨前駆細胞に強く作用し、それぞれ異なる作用機序で骨破壊を抑制していることが明らかとなった (Matsuura, Kikuta, et al., *Ann Rheum Dis*, 2018)。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまでノウハウを蓄積してきた頭頂骨の生体二光子励起イメージング技術を炎症関節に応用して、関節破壊に関わる炎症細胞の動態を可視化し関節炎の発症機序を明らかにするとともに、RA 治療において臨床応用されている分子標的治療薬の生体内動態・薬効発現メカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 生体関節イメージング系による炎症細胞の動態解析

成熟破骨細胞および破骨前駆細胞を特異的に蛍光標識したマウス (成熟破骨細胞: TRAP-tdTomato マウス、破骨前駆細胞を含む単球・マクロファージ系細胞: CX<sub>3</sub>CR1-EGFP マウス) (C57B6/J 背景) を、関節炎に感受性が高い DBA/1J と戻し交配した。これらの蛍光標識レポーターマウスにコラーゲン誘導関節炎を作製した。吸入麻酔薬にてマウスを麻酔後、シェーバーおよび除毛クリームで手関節の毛を取り除き、皮膚を切開し、関節内部を二光子励起顕微鏡で経時的に観察した。また、関節炎モデルマウスの炎症滑膜組織から細胞を単離する手法を確立し、Flow cytometry や RNA-seq を用いて炎症滑膜に存在する CX<sub>3</sub>CR1-EGFP 陽性細胞のサブセット解析を行った。

#### (2) 分子標的治療薬の生体内動態・薬効発現機序の動的解析

本研究では、分子標的治療薬の中でも CTLA4-Ig に焦点を当て、市販の抗体標識キット (SAIVI Alexa Fluor 647 Antibody-Labeling Kit) を用いて CTLA4-Ig を蛍光標識した。関節炎を誘導した蛍光標識レポーターマウスに蛍光標識 CTLA4-Ig を投与し、炎症関節内部を生体二光子励起顕微鏡で観察し、CTLA4-Ig の生体内動態をリアルタイムで評価した。また、関節、骨髄、リンパ節、血液、脾臓を採取し、生体内における CTLA4-Ig 結合細胞 (AF647 陽性細胞) の割合を Flow cytometry で解析した。さらに、RNA-seq を用いて CTLA4-Ig 結合細胞の網羅的遺伝子発現解析を行い、CTLA4-Ig の直接的な作用メカニズムを解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 生体関節イメージング系による炎症細胞の動態解析

吸入麻酔管理下で、マウス手指の伸筋腱を切除し、滑膜と骨が接着する Bare area をイメージングする手法を開発した。本技術を用いて、成熟破骨細胞を特異的に蛍光標識したマウス (TRAP-tdTomato) の生体関節内部を観察した結果、健常マウスでは成熟破骨細胞が認められなかったのに対し、関節炎モデルマウスでは、たくさんの成熟破骨細胞の形成が認められた。さらに、破骨細胞が出す酸を感知して蛍光が ON となる pH 応答性蛍光プローブ (Maeda, Kikuta, et al., *Nat Chem Biol*, 2016) を用いて解析を行った結果、骨髄における生理的環境下とは異なり、炎症滑膜における環境下では、病的な破骨細胞がずっと骨破壊を行い、骨びらんを形成していることが分かった。

次に、破骨前駆細胞を含む単球・マクロファージ系細胞を特異的に蛍光標識したマウス (CX<sub>3</sub>CR1-EGFP) に関節炎を誘導し、炎症関節内部を生体二光子励起顕微鏡で観察した。その

結果、関節炎発症早期に、炎症滑膜に CX<sub>3</sub>CR1 陽性細胞が遊走してくることが分かった。さらに、炎症滑膜組織から CX<sub>3</sub>CR1 陽性細胞を単離し、Flow cytometry 解析を行った結果、これらの細胞が骨髄中には存在しないマクロファージのサブセット (CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup> Ly6C<sup>int</sup> F4/80<sup>hi</sup> I-A/I-E<sup>+</sup>) であること、著明な破骨細胞分化能を有することが明らかとなった (Arthritis-associated osteoclastogenic macrophage: AtoM と命名)。また、本細胞は滑膜常在性マクロファージではなく骨髄細胞に由来すること、関節炎モデルマウスだけでなく関節リウマチ患者の炎症滑膜にも存在することが分かった。さらに、RNA-seq を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った結果、AtoM を制御する転写因子として FoxM1 を同定するとともに、FoxM1 遺伝子欠損マウスや FoxM1 阻害剤の解析から、FoxM1 を標的とした治療が関節炎の改善につながることを明らかとなった。

## (2) 分子標的治療薬の生体内動態・薬効発現機序の動的解析

関節炎を誘導した蛍光標識レポーターマウスに、AF647 で蛍光標識した CTLA4-Ig を投与し、炎症関節内部を生体二光子励起顕微鏡で観察し、CTLA4-Ig の生体内動態を評価した。その結果、CTLA4-Ig 投与直後から炎症滑膜に CTLA4-Ig の強い集積を認め、特に CX<sub>3</sub>CR1 陽性の単球・マクロファージ系細胞への強い結合が認められた。一方、Bare area における成熟破骨細胞には CTLA4-Ig の結合を認めなかった。

次に、関節、骨髄、リンパ節、血液、脾臓を採取し、生体内における CTLA4-Ig 結合細胞を Flow cytometry で解析した。その結果、CTLA4-Ig 投与後 6 時間、24 時間、48 時間全てのタイミングにおいて、他組織と比較して炎症滑膜に CTLA4-Ig の強い集積が認められた。これは CD45 陽性細胞 (血球)、CD45 陰性細胞 (間葉系細胞) の両方で確認され、前者は CX<sub>3</sub>CR1 陽性の単球・マクロファージ系細胞に、後者は CD31<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup> の線維芽細胞に強く結合していた。さらに、RNA-seq を用いて CTLA4-Ig 結合細胞の網羅的遺伝子発現解析を行った結果、CTLA4-Ig と結合した CX<sub>3</sub>CR1 陽性細胞では、結合していない CX<sub>3</sub>CR1 陽性細胞と比較して、MHC class を含む多くの免疫関連分子の発現量の変動が認められた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hasegawa Tetsuo, Kikuta Junichi, Sudo Takao, Yamashita Erika, Seno Shigeto, Takeuchi Tsutomu, Ishii Masaru	4. 巻 10
2. 論文標題 Development of an intravital imaging system for the synovial tissue reveals the dynamics of CTLA-4 Ig in vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13480
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-70488-y	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 Ao Tomoka, Kikuta Junichi, Sudo Takao, Uchida Yutaka, Kobayashi Kenta, Ishii Masaru	4. 巻 32
2. 論文標題 Local sympathetic neurons promote neutrophil egress from the bone marrow at the onset of acute inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 727 ~ 736
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxaa025	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 Hashimoto Kunihiko, Kaito Takashi, Furuya Masayuki, Seno Shigeto, Okuzaki Daisuke, Kikuta Junichi, Tsukazaki Hiroyuki, Matsuda Hideo, Yoshikawa Hideki, Ishii Masaru	4. 巻 10
2. 論文標題 In vivo dynamic analysis of BMP-2-induced ectopic bone formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4751
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-61825-2	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 Morimoto Akito, Kikuta Junichi, Ishii Masaru	4. 巻 206
2. 論文標題 Intravital multiphoton microscopy as a novel tool in the field of immunopharmacology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmacology & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 107429
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pharmthera.2019.107429	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 Nishizawa Shino, Kikuta Junichi, Seno Shigeto, Kajiki Masahiro, Tsujita Ryuichi, Mizuno Hiroki, Sudo Takao, Ao Tomoka, Matsuda Hideo, Ishii Masaru	4. 巻 143
2. 論文標題 Thrombomodulin induces anti-inflammatory effects by inhibiting the rolling adhesion of leukocytes in vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 17~22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2020.01.001	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 Hasegawa Tetsuo, Kikuta Junichi, Sudo Takao, Matsuura Yoshinobu, Matsui Takahiro, Simmons Szandor, Ebina Kosuke, Hirao Makoto, Okuzaki Daisuke, Yoshida Yuichi, Hirao Atsushi, Kalinichenko Vladimir V., Yamaoka Kunihiro, Takeuchi Tsutomu, Ishii Masaru	4. 巻 20
2. 論文標題 Identification of a novel arthritis-associated osteoclast precursor macrophage regulated by FoxM1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 1631~1643
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-019-0526-7	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 該当する

1. 著者名 Minoshima Masafumi, Kikuta Junichi, Omori Yuta, Seno Shigeto, Suehara Riko, Maeda Hiroki, Matsuda Hideo, Ishii Masaru, Kikuchi Kazuya	4. 巻 5
2. 論文標題 In Vivo Multicolor Imaging with Fluorescent Probes Revealed the Dynamics and Function of Osteoclast Proton Pumps	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Central Science	6. 最初と最後の頁 1059~1066
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscentsci.9b00220	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5件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 菊田順一、石井優
2. 発表標題 骨破壊・免疫炎症の生体イメージング
3. 学会等名 第41回日本炎症・再生医学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菊田順一、石井優
2. 発表標題 骨免疫イメージングアップデート
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菊田順一、石井優
2. 発表標題 生体イメージングによる疾患・創薬研究
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kikuta Junichi、Ishii Masaru
2. 発表標題 In vivo visualization of immune cell dynamics and drug actions in rheumatic diseases.
3. 学会等名 The 8th East Asian Group of Rheumatology (EAGOR 2019)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊田順一、石井優
2. 発表標題 生体試料を見る
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

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