

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09425

研究課題名(和文) 抗炎症性マクロファージ由来因子と骨関連細胞に着目した新規骨粗鬆症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Exploration of novel mechanism of osteoporosis focusing on resolving macrophage-derived factors.

研究代表者

高橋 大介 (Takahashi, Daisuke)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：90528845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージ由来因子であるCardiotrophin Like Cytokine Factor 1 (CLCF1)が、骨粗鬆症や破骨細胞・骨芽細胞分化に与える影響を検証した。骨粗鬆症モデルマウスにCLCF1を投与したところ骨量減少の改善を示した。マウスの大腿骨組織標本においては、CLCF1投与によって破骨細胞分化抑制効果を示したが骨芽細胞の分化抑制効果は示さなかった。RNAseqによるメカニズム解析では、インターフェロンシグナル関連マーカーが上昇していた。以上からCLCF1はインターフェロンシグナル経路を介して破骨細胞の分化を抑制し、骨粗鬆症の新規治療ターゲットとなり得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨粗鬆症と脆弱性骨折は患者ADLを著しく低下させる疾患であり、現在様々な骨粗鬆症治療が開発・使用されているが、本邦での治療効果は十分とは言い難い。本研究では、免疫細胞であるマクロファージ由来因子が骨粗鬆症および骨微小環境内の細胞に及ぼす影響を明らかにした。免疫細胞を介した骨粗鬆症メカニズムの解析はこれまでにないアプローチであり、より有効かつ安全な骨粗鬆症治療薬開発の礎となる研究である。

研究成果の概要(英文)：We explored the functional role of CLCF1 in osteoclastogenesis and bone loss associated with osteoporosis. Surprisingly, the administration of recombinant CLCF1 repressed excessive bone loss in ovariectomized mice and prevented RANKL-induced bone loss in calvarial mouse model. Likewise, the addition of recombinant CLCF1 to RANKL-stimulated monocytes resulted in a significant suppression in the number of differentiated osteoclasts in vitro. At the same dosage, CLCF1 did not exhibit any detectable negative effects on the differentiation of osteoblasts. Mechanistically, the inhibition of osteoclast differentiation by the CLCF1 treatment appears to be related to the activation of interferon signaling (IFN) and the suppression of the NF- κ B signaling pathway. These collective findings point to a novel immunoregulatory function of CLCF1 in bone remodeling and highlight it as a potentially useful therapeutic agent for the treatment of osteoporosis.

研究分野：股関節外科 骨粗鬆症

キーワード：骨粗鬆症 破骨細胞 インターフェロンシグナル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症は、骨を形成する骨芽細胞に対して骨を吸収する破骨細胞が活性化することで生じる、骨強度低下により骨折をきたしやすくなった病態である。骨粗鬆症は、現在の治療法では完全に是正することは難しく、超高齢化社会の本邦で問題となっている。マクロファージなどの免疫細胞は、様々なメディエーターを放出することで骨代謝を制御している。Cardiotrophin-like cytokine factor 1 (CLCF1)は、IL-6 ファミリーに属する免疫細胞由来のサイトカインであり、CLCF1 の発現低下が、骨粗鬆症と関連していることが報告されていることから、CLCF1 が骨粗鬆症において重要な役割を担っていることが推察される。

2. 研究の目的

本研究では、CLCF1 が骨粗鬆症に対して治療効果を有するという仮説をたて、骨粗鬆症における CLCF1 の骨粗鬆症モデルマウスに対する治療効果、ならびに骨代謝関連細胞である破骨細胞、骨芽細胞に対する作用を検証し、その作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

卵巣摘出(OVX)骨粗鬆症モデルマウスを用いて、病的骨量減少に対する CLCF1 の効果を調べた。卵巣摘出後、CLCF1 (My BioSource, CA, USA)を投与して大腿骨を採取し、マイクロ CT(R_mCT2; Rigaku, Tokyo, Japan)で骨微細構造を評価した。さらに組織標本を作成し、TRAP 染色(Sigma, St. Louis, MO, USA)で破骨細胞分化について評価した。

次に、破骨細胞の分化に対する CLCF1 の影響を *in vitro* で検証した。RANKL で刺激したヒト単球に対して CLCF1 の投与のうえ TRAP 染色を行い、さらに象牙質切片で骨吸収領域について評価した。CLCF1 の作用メカニズム解明のため、RNA-seq による遺伝子発現解析とウエスタンブロットティング(WB)を行った。

CLCF1 の骨芽細胞への作用を検証するため、ヒト骨芽細胞(Cell Applications; San Diego, CA, USA)に CLCF1 を投与し、アリザリンレッド-S、BCIP/NBT (Wako)で染色した。さらに骨芽細胞分化に関連する遺伝子の発現について qPCR で評価した。

統計解析は、グループ間比較のために、One-way analysis of variance (ANOVA)と Tukey の多重比較検定を用いて、独立した 2 グループ間の比較には Student の t 検定を用いた (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)。結果は、平均値±標準誤差 (SEM)を示し、 $p < 0.05$ を統計的に有意差ありとした。

4. 研究成果

CLCF1 を投与した OVX マウスの大腿骨では、BV/TV, BS/TV, vBMD などの骨密度に関連したパラメーターや海綿骨梁数 Tb.N が増加し、海綿骨梁間隙 Tb.Sp が減少していた。このことから、OVX による骨量減少は CLCF1 により抑制されることが明らかになった (Fig. 1A-C)。大腿骨の組織学的評価に

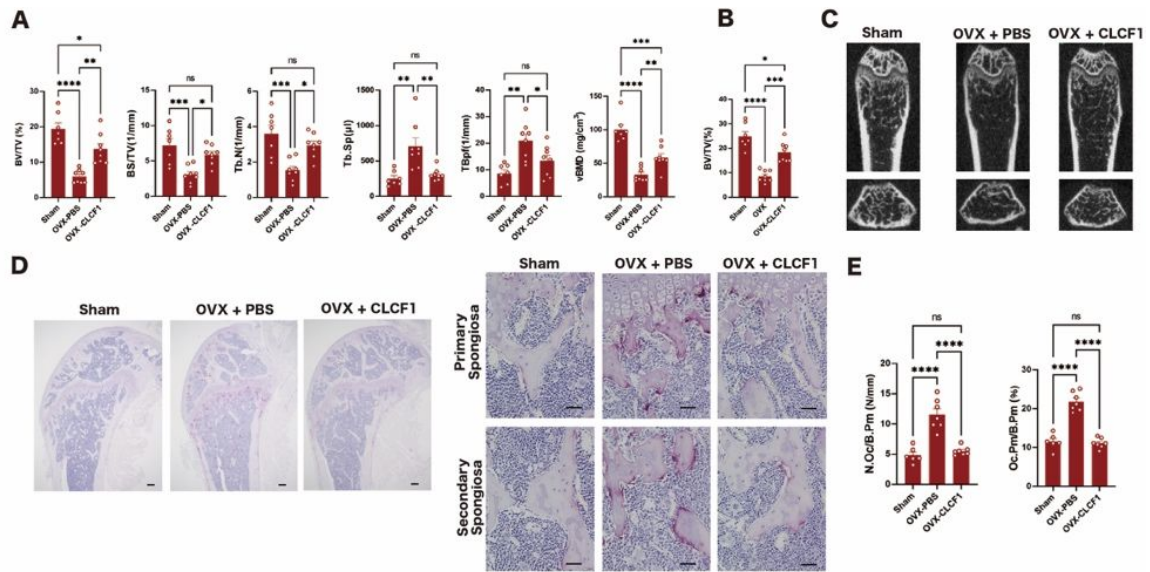


Figure.1 骨粗鬆症モデルマウスでのCLCF1治療効果検証

において、CLCF1を投与によりOVXで増加がみられたTRAP陽性細胞が有意に減少した(Fig. 1D, E)。これらの結果から、CLCF1は骨量減少や破骨細胞分化を抑制することで、病的骨吸収亢進に対して治療効果を有することが示唆された。

In vitro においてもCLCF1の投与により破骨細胞の分化が著しく阻害され(Fig. 2A)、象牙質切片における骨吸収面積は、CLCF1投与により有意に縮小した(Fig. 2B)。

骨芽細胞 TNF- α 投与群では染色による色濃度減少がみられたが、CLCF1投与群ではコントロールと同等であり(Fig. 2C)、骨芽細胞分化に関連する遺伝子発現についてはCLCF1投与によりわずかに増加していた(Fig. 2D)。

これらの結果から、CLCF1は骨芽細胞の分化に悪影響を与えないことが示唆された。

CLCF1を投与した破骨細胞に対してRNA-seqによる遺伝子発現解析を行い、発現変動遺伝子(DEG)(Fig. 3A)に対するパスウェイエンリッチメント解析を行った。その結果、RANKL投与により、破骨細胞分化とNF- κ Bシグナルの経路に集積がみられたが(Fig. 3B)、CLCF1投与により、NFATc1をはじめとしたRANKLによって誘導される破骨細胞分化に関連した転写因子の発現が低下し

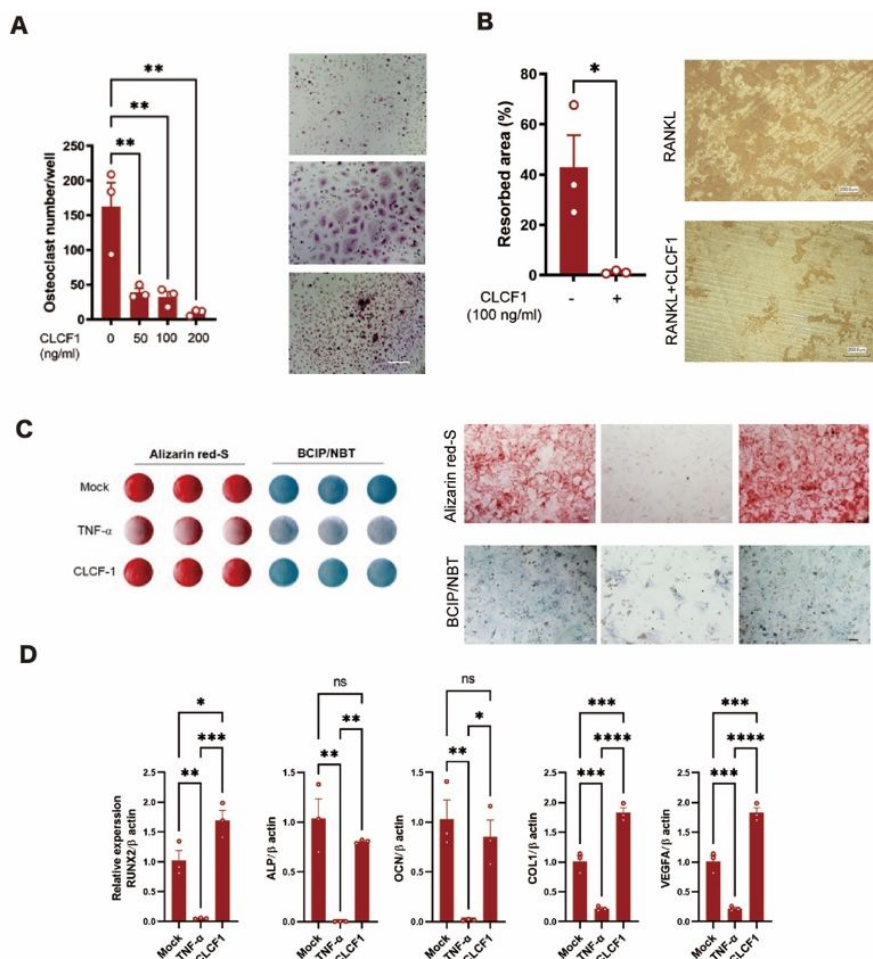


Figure.2 破骨細胞と骨芽細胞に対するCLCF1の作用検証

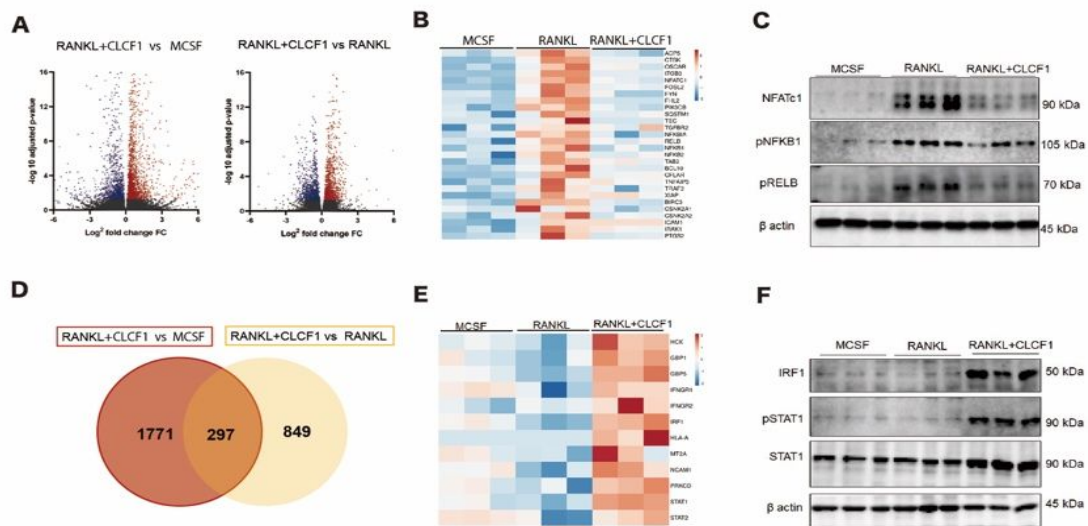


Figure.3 CLCF1の作用メカニズム検証

ていた(Fig. 3B、C)。さらに、CLCF1の抑制メカニズムを明らかにするために、CLCF1-RANKLが投与された細胞に含まれる297個のDEGをベン分析によって同定し、NET-GE分析を行ったところ、インターフェロン(IFN)シグナルでDEGが最も有意に発現しており、IFNシグナルで重要なSTAT1とIRF1のタンパク発現も上昇していた(Fig. 3D、E、F)。STAT1の阻害剤であるfludarabineを1時間前に投与すると、*in vitro*での破骨細胞分化に対するCLCF1の阻害効果が消失した。

これらの結果を総合すると、マクロファージ由来因子であるCLCF1はIFNシグナル経路の活性化を介して破骨細胞分化を抑制することで骨リモデリングに作用し、骨粗鬆症における骨量減少に対する治療効果を有することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shunichi Yokota, Gen Matsumae, Tomohiro Shimizu, Tomoka Hasegawa, Taku Ebata, Daisuke Takahashi, Cai Heguo, Yuan Tian, Hend Alhasan, Masahiko Takahata, Ken Kadoya, Alaa Terkawi, Norimasa Iwasaki	4. 巻 153
2. 論文標題 Cardiotrophin Like Cytokine Factor 1 (CLCF1) alleviates excessive bone loss and osteoclast differentiation through activating interferon signaling and repressing the nuclear factor- B signaling pathway.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 116140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bone.2021.116140	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 Tian Yuan, Terkawi Mohamad Alaa, Onodera Tomohiro, Alhasan Hend, Matsumae Gen, Takahashi Daisuke, Hamasaki Masanari, Ebata Taku, Aly Mahmoud Khamis, Kida Hiroaki, Shimizu Tomohiro, Uetsuki Keita, Kadoya Ken, Iwasaki Norimasa	4. 巻 11
2. 論文標題 Blockade of XCL1/Lymphotoxin Ameliorates Severity of Periprosthetic Osteolysis Triggered by Polyethylene-Particles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1720
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.01720	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shunichi Yokota, Gen Matsumae, Tomohiro Shimizu, Taku Ebata, Hend Alhasan, Daisuke Takahashi, M Alaa Terkawi, Norimasa Iwasaki
2. 発表標題 Cardiotrophin Like Cytokine Factor 1 (CLCF1) alleviates excessive bone loss and osteoclast differentiation through activating interferon signaling and repressing the nuclear factor- B signaling pathway.
3. 学会等名 ORS 2022 Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横田 隼一, 松前 元, 江畑 拓, 照川 ヘンド, 清水 智弘, 高橋 大介, 照川 アラー, 岩崎 倫政
2. 発表標題 CLCF1投与によるインターフェロニングナルの活性化を介した骨粗鬆症モデルマウスの骨量減少抑制効果について
3. 学会等名 第37回日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2022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	照川 アラー (Terukawa Alaa) (00723074)	北海道大学・医学研究院・助教 (10101)	
研究 分担者	清水 智弘 (Shimizu Tomohiro) (60784246)	北海道大学・大学病院・助教 (10101)	

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