

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09461

研究課題名(和文) ITAMモチーフとStat1による破骨細胞制御

研究課題名(英文) Osteoclast regulation by ITAM motif and Stat1

研究代表者

藤本 徹 (Fujimoto, Toru)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特定研究員

研究者番号：00433003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：人工関節や骨接合プレートなど、様々な骨設置型の医療用インプラントが使用されている。生体内骨留置インプラントでは、その周囲に起こる骨吸収がゆるみ等の原因となるが、インプラント周囲の骨吸収のメカニズムは明らかになっていない。本研究では、CTLA4-CD80/86シグナルを抑制するCTLA4-Fcが、インプラント周囲の骨吸収を担う破骨細胞分化に必須のサイトカインであるRANKLによるカルシウムオシレーションと破骨細胞分化に必須の転写因子であるNFATc1の発現を抑制し、破骨細胞分化を直接抑制することを見出した。また、このCTLA4の作用はITAMの1つである、FcR を介していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工関節などの骨設置型の医療用インプラントは、今日の医療に欠かせない。しかし、骨設置型の医療用インプラントの周囲で骨吸収が起こると、インプラントの抜去や再設置など、患者にとって極めて負担の大きな事態を余儀なくされることもしばしばであり、その対策は重要である。インプラント周囲の骨吸収は破骨細胞によって誘導されるが、本研究ではインプラントに反応して誘導される破骨細胞分化において、CTLA4がFcR を介してRANKLによる破骨細胞分化を直接抑制することを見出しており学術的意義がある。また今後のインプラントのゆるみ対策の一助となるなど、社会的意義もあると考えている。

研究成果の概要(英文)：Various bone-placed medical implants, such as artificial joints and bone-joint plates, are in use. Bone resorption around such in vivo bone implants causes loosening and other problems, but the mechanism underlying bone resorption around implants was not clear. In this study, we found that CTLA4-Fc, which suppresses CTLA4-CD80/86 signaling, directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing calcium oscillation and NFATc1 expression induced by RANKL, a cytokine essential for osteoclast differentiation that is responsible for bone resorption around implants. We also found that this action of CTLA4 is mediated by FcR, one of the ITAMs.

研究分野：整形外科学

キーワード：整形外科

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、関節軟骨変性などによる変形性関節症患者に設置される人工関節や、骨折の観血的治療に用いられる骨接合プレートやスクリュー、ネイルなど、様々な骨に設置される医療用インプラントを用いた医療が数多く実施される状況になっており、その増加傾向は今日も継続されている。この骨インプラントは骨という硬組織に強力に固定させることができるが、時にそれが緩むインプラントルースニングが問題となっていた。インプラントルースニングが生じると、人工関節の場合は入れ替えなどの再手術が必要となるほか、骨折治療の場合にも固定性不良からやはり再手術が必要となることが、今日においても課題である。このような骨設置型生体内留置インプラントのルースニングは、その周囲に起こる骨吸収がルースニングの原因となるが、このインプラント周囲の骨吸収のメカニズムは明らかではなかった。骨吸収を担う生体唯一の細胞としては、破骨細胞がその役割を担うことが知られていた。破骨細胞は造血幹細胞由来の単球・マクロファージ系の細胞で、骨吸収を担う専門の細胞である。破骨細胞分化には macrophage colony stimulating factor (M-CSF) と receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) という 2 つのサイトカインが必須であり、破骨細胞は前駆細胞の段階から、それぞれの受容体である c-Fms と RANKL によりその刺激を受けて、分化のみならず、生存や骨吸収を活性化させることが知られていた。しかし、このような生理的な破骨細胞分化とは異なり、インプラントのルースニングに関与する破骨細胞形成には、インプラント特有の他の要素が関与することが考えられた。そこで、我々は Immuno-tyrosine based activation motif (ITAM) シグナルに着目することとした。ITAM シグナルはインプラントなどの異物や寄生虫などを感知する受容体タンパク質のアダプターとして機能することが知られている他、破骨細胞分化にも Fc receptor gamma (FcR γ) や DNAX activation protein 12 (DAP12) が破骨細胞分化に必須の役割を担うことが報告されていた。

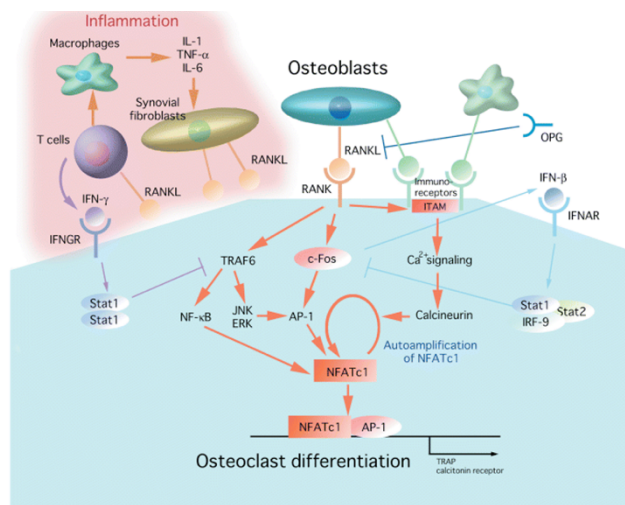


図1: RANKL-RANKによる破骨細胞分化制御機構
RANKL-RANKの下流において、ITAMシグナルによるカルシウム振動の活性化から、NFATc1の発現誘導と活性化を介して、破骨細胞分化を誘導する。

2. 研究の目的

本研究では骨設置型生体内留置インプラントのルースニングの原因である破骨細胞について、M-CSF と RANKL に加えて、ITAM シグナルにも着目し、インプラントのルースニングにおける破骨細胞分化機構を解明することを目的とした。

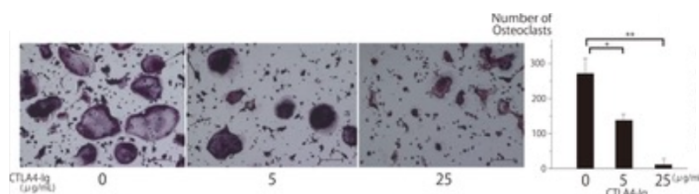


図2: CTLA4-Fcによる破骨細胞分化抑制
RANKL-RANKによるin vitroの破骨細胞分化系に、CTLA4-Fcを添加すると、破骨細胞分化が有意に抑制される(左: TRAP染色、右: 3核以上のTRAP陽性の破骨細胞数)。

3. 研究の方法

破骨細胞分化に関与する可能性のあるものとして、Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4)にも注目し、解析を行うこととした。CTLA4 は CD80/86 共受容体に結合することで、T細胞を活性化させることが知られていたが、この際、T細胞内でT細胞受容体からのカルシウムシグナルや転写因子である nuclear factor activate T cells (NFAT) の活性化に寄与することが知られていた。このT細胞におけるカルシウムシグナルやNFATの活性化が、破骨細胞分化における RANK の下流におけるカルシウムシ

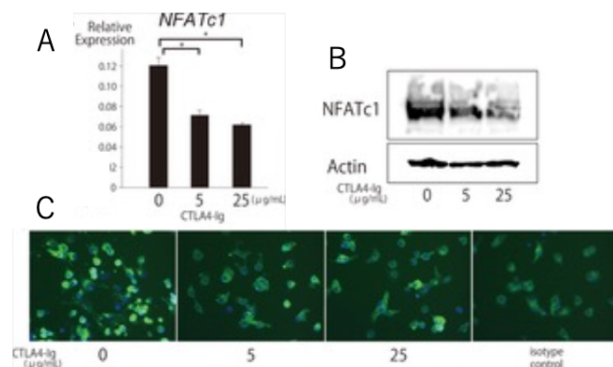


図3: CTLA4-Fcによる破骨細胞のNFATc1の抑制
RANKL-RANKによるin vitroの破骨細胞分化系に、CTLA4-Fcを添加すると、破骨細胞分化のマスター転写因子でありNFATc1がmRNAレベル (A) およびタンパク質レベル (B: western blot、C: 蛍光免疫染色) で有意に抑制される。

グナルや NFAT の活性化 (図 1) と共通していると考えた。そこで、in vitro の破骨細胞の培養系においては、M-CSF と RANKL に加えて、CTLA4-CD80/86 共受容体シグナルをブロックする CTLA4-Fc を添加した実験を行うこととした。破骨細胞分化はマウス骨髄細胞を M-CSF で 3 日間処理して誘導した前駆細胞を、M-CSF と RANKL でさらに 3~4 日ほど培養した。M-CSF と RANKL で培養する

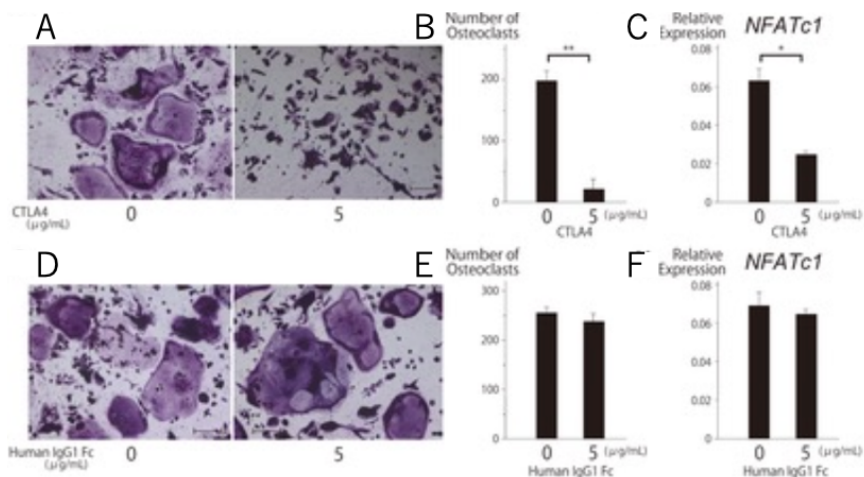


図4：CTLA4による破骨細胞分化とNFATc1の発現抑制
RANKL-RANKによるin vitroの破骨細胞分化系に、CTLA4-His (A, B, and C)もしくはHuman IgG1-Fc (D, E and F)を添加すると、CTLA4-Hisでは破骨細胞分化とNFATc1の発現抑制が誘導されるのに対し (A, B, and C)、Human IgG1-Fcではそのような抑制は見られない(D, E and F)。

るタイミングで CTLA4-Fc の添加を行った。破骨細胞分化は tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色を行い、破骨細胞が細胞融合により多核化することが知られていることから、TRAP 陽性の 3 核以上の細胞を破骨細胞として評価を行った。また ITAM シグナルがカルシウムシグナルに関与することが知られていたため、カルシウム振動についても評価を行った。また、ITAM シグナルの破骨細胞分化やカルシウムシグナルへの関与を明らかにするため、ITAM シグナル分子の 1 つである FcR γ の遺伝子欠損マウスを用いた解析を行った。

4. 研究成果

まず in vitro における M-CSF と RANKL による破骨細胞分化系に CTLA4-Fc を添加したところ、TRAP 陽性で 3 核以上の破骨細胞の形成が、CTLA4-Fc の容量依存性に抑制されることが明らかとなった (図 2)。この際、CTLA4-Fc が RANKL-RANK によるカルシウムシグナルへ干渉したとすると、その下流にある破骨細胞分化のマスター転写因子である NFATc1 の発現が低下することが考えられる。はたして、破骨細胞において M-CSF と RANKL によって誘導される NFATc1 の mRNA の発現が、CTLA4-Fc により有意に抑制されることを見出した (図 3A)。CTLA4-Fc による NFATc1 の発現抑制は、realtime PCR で評価する mRNA レベルだけではなく、western blot や蛍光免疫染色で評価するタンパク質レベルでも確認することができた (図 3B, 4C)。イムノグロブリンである Fc 部分は、Fc 受容体を介して破骨細胞分化に作用してしまう可能性があるため、CTLA4-Fc の Fc 部分を His tag に変えた CTLA4-His、あるいは逆に CTLA4 部分を外した Human IgG1-Fc を CTLA4-Fc に変えて添加してみると、CTLA4-His 添加時には破骨細胞分化と NFATc1 の発現の有意な低下が見られるのに対し (図 4A)、Human IgG1-Fc 添加時にはこのような抑制は認めなかったことから (図 4B)、CTLA4 は破骨細胞分化を直接抑制することが明らかになった。

CTLA4-Fc の作用により NFATc1 の発現が有意に抑制されたことから、細胞内でカルシウムシグナルが抑制されているかを検証することとした。RANKL 刺激により誘導されるカルシウム振動を calcium indicator である fura-2 を添加し、蛍光顕微鏡で観察することで検出した。RANKL 刺激によるカルシウム振動は Human IgG1-Fc では抑制されなかったが、CTLA4-Fc により抑制されたことから (図 5)、CTLA4-Fc は RANKL によるカルシウムシグナルに干渉することで、破骨細胞分化を有意に抑制することが明らかとなった。CTLA4-Fc は CTLA4-CD80/86 共受容体シグナルの阻害薬であることから、CTLA4-CD80/86 共受容体シグナルはカルシウムシグナルを活性化することで破骨細胞を活性化することを明らかにすることができた。

最後に、FcR γ 遺伝子欠損 (FcR γ KO) マウス由来の骨髄細胞を用いて、in vitro において CTLA4-Fc 添加時の破骨細胞分化への影響を評価した。すると、野生型マウス由来の骨髄細胞を用いた培養では CTLA4-Fc により有意に

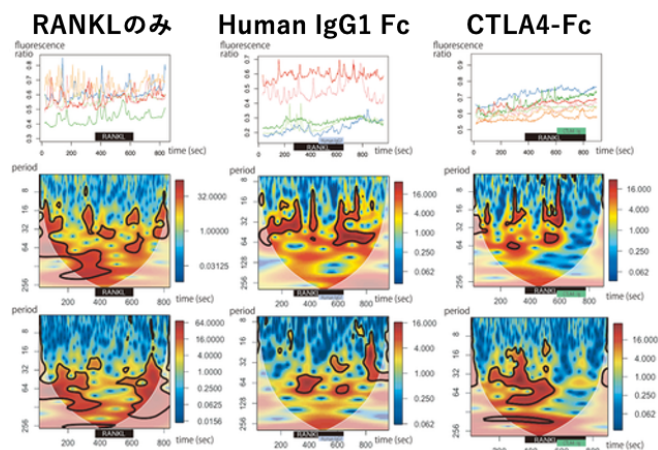


図5：CTLA4-FcによるRANKLによる破骨細胞のカルシウム振動抑制
RANKLによって破骨細胞に誘導されるカルシウム振動は (左列：RANKLのみ)、Human IgG1 Fcによっては抑制されないが (中列)、CTLA4-Fcによって抑制される (右列)。

抑制された破骨細胞分化は、FcR γ KO マウス由来の骨髄細胞を用いた解析では CTLA4-Fc による抑制がキャンセルされ、NFATc1 の発現抑制も起こらず、さらにカルシウム振動の抑制もなかった (図 6)。これらの結果から、CTLA4-CD80/86 共受容体シグナルは、さらに FcR γ を介して破骨細胞前駆細胞内のカルシウムシグナルを活性化することで、破骨細胞を活性化することが明らかとなった (図 7)。

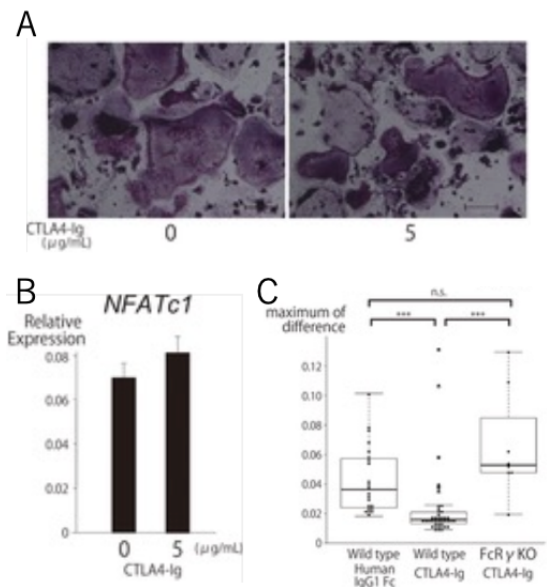


図6：FcR γ 欠損マウス由来細胞では、CTLA4-Fc によるRANKLによる破骨細胞のカルシウム振動抑制がキャンセルされる
野生型マウス由来細胞ではRANKLにより誘導される破骨細胞分化はCTLA4-Fcによって抑制されるが、FcR γ 欠損マウス由来細胞では抑制がキャンセルされる (A: TRAP染色)。同様に、CTLA4-FcによるNFATc1 mRNAの発現抑制や (B)、カルシウム振動抑制 (C) も、FcR γ 欠損マウス由来細胞ではキャンセルされる。

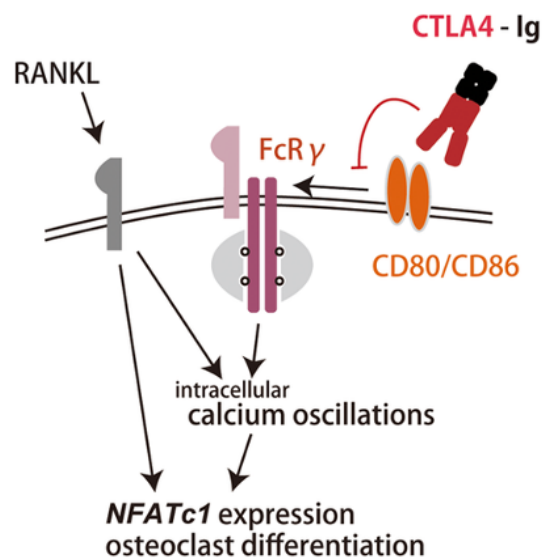


図7：CTLA4-FcR γ による破骨細胞分化、カルシウム振動、NFATc1発現制御

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tateyama M, Fujimoto T, Nakamura T, Miyamoto T	4. 巻 4
2. 論文標題 Meningeal Melanocytoma Occurring at Epidural Region of the Cervical Spine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Spine Surg Relat Re	6. 最初と最後の頁 377-379
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.22603/ssrr.2020-0027. eCollection 2020	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 Kimura A, Mitsukura Y, Oya A, Matsumoto M, Nakamura M, Kanaji A, Miyamoto T	4. 巻 11
2. 論文標題 Objective characterization of hip pain levels during walking by combining quantitative electroencephalography with machine learning	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	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/s41598-021-82696-1	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 Ito E, Sato Y, Kobayashi T, Nakamura S, Kaneko Y, Soma T, Matsumoto T, Kimura A, Miyamoto K, Matsumoto H, Matsumoto M, Nakamura M, Sato K, Miyamoto T	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 Biochem Biophys Res Commun	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 Ito E, Sato Y, Kobayashi T, Nakamura S, Kaneko Y, Soma T, Matsumoto T, Kimura A, Miyamoto K, Matsumoto H, Matsumoto M, Nakamura M, Sato K, Miyamoto T	4. 巻 534
2. 論文標題 Food restriction reduces cortical bone mass and serum insulin-like growth factor-1 levels and promotes uterine atrophy in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 165-171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.11.122	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 Tasaki M, Okada M, Yanagisawa A, Nomura T, Matsushita H, Ueda A, Inoue Y, Masuda T, Misumi Y, Yamashita T, Nakamura T, Miyamoto T, Obayashi K, Ando Y, Ueda M	4. 巻 -
2. 論文標題 Apolipoprotein AI amyloid deposits in the ligamentum flavum in patients with lumbar spinal canal stenosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Amyloid	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/13506129.2020.1858404	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 Ideo K, Tokunaga T, Shukunami C, Takimoto A, Yoshimoto Y, Yonemitsu R, Karasugi T, Mizuta H, Hiraki Y, Miyamoto T	4. 巻 15
2. 論文標題 Role of Scx+/Sox9+ cells as potential progenitor cells for postnatal supraspinatus enthesis formation and healing after injury in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	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) 10.1371/journal.pone.0242286. eCollection 2020	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 T, Iwasaki R, Sato Y, Kobayashi T, Nakamura S, Kaneko Y, Ito E, Okada H, Watanabe H, Miyamoto K, Matsumoto M, Nakamura M, Asoda S, Kawana H, Nakagawa T, Miyamoto T	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 J Bone Miner Metab	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 Kobayashi H, Nakamura S, Sato Y, Kobayashi T, Miyamoto K, Oya A, Matsumoto M, Nakamura M, Kanaji A, Miyamoto T	4. 巻 -
2. 論文標題 ALDH2 mutation promotes skeletal muscle atrophy in mice via accumulation of oxidative stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bone	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) 10.1016/j.bone.2020.115739	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 Kiyota Y, Muramatsu H, Sato Y, Kobayashi T, Miyamoto K, Iwamoto T, Matsumoto M, Nakamura M, Tateno H, Sato K, Miyamoto T	4. 巻 10
2. 論文標題 Smoking cessation increases levels of osteocalcin and uncarboxylated osteocalcin in human sera	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	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/s41598-020-73789-4	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 Nakamura S, Sato Y, Kobayashi T, Kaneko Y, Ito E, Soma T, Okada H, Miyamoto K, Oya A, Matsumoto M, Nakamura M, Kanaji A, Miyamoto T	4. 巻 10
2. 論文標題 Vitamin D protects against immobilization-induced muscle atrophy via neural crest-derived cells in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	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/s41598-020-69021-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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中村孝幸、杉本一樹、谷脇琢也、藤本徹、宮本健史
2. 発表標題 抗血小板薬が腰椎手術に与える影響の検討
3. 学会等名 第51回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村孝幸、杉本一樹、谷脇琢也、藤本徹、宮本健史
2. 発表標題 頸椎症性筋萎縮症患者における術前針筋電図と術後麻痺改善の程度との関連についての検討
3. 学会等名 第50回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高木寛、中村孝幸、呉屋亮太、杉本一樹、谷脇琢也、藤本徹、宮本健史
2. 発表標題 4歳Down症児の環軸椎亜脱臼に対して環椎後弓切除を行った一例
3. 学会等名 第141回西日本整形・災害外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富野航太、杉本一樹、中村孝幸、谷脇琢也、藤本徹、宮本健史
2. 発表標題 転移性脊椎腫瘍の治療経験
3. 学会等名 第142回西日本整形・災害外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤本徹、谷脇琢也、中村孝幸、杉本一樹、宮本健史
2. 発表標題 頸椎・頸胸椎移行部に発生した脊髄腫瘍における周術期合併症について
3. 学会等名 第140回西日本整形・災害外科学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020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	宮本 健史 (Miyamoto Takeshi) (70383768)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授 (17401)	

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