

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02716

研究課題名(和文)骨・関節破壊の病態生理の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of the pathogenesis of bone and joint destruction and development of novel therapies

研究代表者

菊田 順一(Kikuta, Junichi)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：60710069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨破壊を担う破骨細胞は、生理的な環境下では骨髄に存在し、骨の恒常性維持に重要な役割を果たす一方、関節炎などの病的状態では、滑膜を主座とする慢性炎症が破骨細胞の形成を促し、関節周囲の病的な骨破壊を惹起する。本研究では、独自の生体イメージング技術を用いて解析を行った結果、骨髄と炎症滑膜の二つの異なる局在・微小環境で形成された破骨細胞がその動き・機能の点で大きく異なることが分かった。さらに、炎症滑膜から細胞を単離しシングルセルRNA-seq解析を行った結果、病的な骨破壊に関わる破骨細胞の分化制御メカニズムが明らかとなった。今後、病的な破骨細胞を標的とした薬剤の開発の実現を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、従来の研究手法では解析が困難であった生体の炎症関節内における破骨細胞の骨吸収動態を可視化することに成功するとともに、病的骨破壊に関わる破骨細胞の分化制御メカニズムを明らかにしたもので、国際的にも独自性が高く、学術的に大きな意義がある。最先端のライブイメージング技術とオミクス解析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、国内外の医療への貢献も期待され、その社会的意義も極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：Osteoclasts are responsible for bone destruction. Under physiological conditions, osteoclasts exist in the bone marrow and play an important role in bone homeostasis. On the other hand, in pathological conditions such as arthritis, chronic inflammation in the synovium promotes osteoclast formation and induces bone destruction around joints. In this study, by means of intravital imaging techniques, we found that osteoclasts formed in two distinct localizations and microenvironments, bone marrow and inflamed synovium, were very different in terms of their movement and function. Furthermore, single-cell RNA sequencing analysis of cells isolated from inflamed synovial tissue revealed the regulatory mechanism of osteoclast differentiation involved in pathological bone destruction. These results would provide the basis for developing drugs that target pathological osteoclasts.

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 オミクス解析 炎症性骨破壊 破骨細胞 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は、単球系血液細胞から分化・成熟する多核巨細胞で、骨破壊を担う。生理的な環境下では「骨髄」にのみ存在し、骨形成を担う骨芽細胞と協調して働くことによって骨の恒常性維持に重要な役割を果たしている。一方、関節炎などの病的状態では、関節を包む「滑膜」を主座とする慢性炎症が、骨表面の破骨細胞の形成を促し、関節周囲の骨破壊を惹起すると言われている。これまでの破骨細胞研究の多くは、固定した骨・関節組織を切り出して顕微鏡で観察していた。この方法でも、骨が壊されている部位に多数の破骨細胞が集まっている様子は観察されたが、骨髄と炎症滑膜の二つの異なる局在・微小環境で形成された破骨細胞がどのような違いを持つのかはよく分かっていない。

従来、破骨細胞は環境に応じて異常に活性化すると考えられていたが、骨髄と炎症滑膜の二つの異なる環境下で分化する破骨細胞が、同じ分化経路を辿るのか検討を行った。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独自に確立し、網羅的遺伝子発現解析を行った結果、骨髄中には存在しないマクロファージのサブセット (CX₃CR1^{hi} Ly6C^{int} F4/80^{hi} I-A/I-E⁺) が炎症滑膜局所に存在することが分かった。また、この細胞は破骨細胞の関連遺伝子 (*Acp5*, *Ctsk*, *Atp6v0d2*, *Mmp9*) を高発現し、著明な破骨細胞分化能を有することから、炎症時における破骨前駆細胞であることが明らかとなった (Arthritis-associated osteoclastogenic macrophage: AtoM と命名) (Hasegawa, Kikuta, et al., *Nat Immunol*, 2019)。さらに、この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が分かり、従来の破骨前駆細胞とは起源が全く異なること、また細胞増殖に重要な転写因子である *Foxm1* を発現していることが分かった。

2. 研究の目的

本研究では、独自の骨髄・関節の生体二光子励起イメージング技術とオミクス解析技術を活用して、病的な骨・関節破壊に関わる破骨細胞の骨吸収動態や分化メカニズムを解析し、骨・関節破壊の本質を分子レベルで明らかにするとともに、この病的な破骨細胞を標的とした薬剤の開発の実現を目指す。

3. 研究の方法

(1) 生体イメージングによる炎症性破骨細胞の動態解析

成熟破骨細胞を特異的に蛍光標識したレポーターマウス (TRAP-tdTomato マウス) (DBA/1J 背景) にコラーゲン誘導関節炎を作製した。このマウスに、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) を投与し、動物個体を生かしたまま生体関節内部を二光子励起顕微鏡で経時的に観察した。得られたイメージング画像データを定量的に評価する系を確立し、病的な骨・関節破壊に関わる破骨細胞が、生理的な骨リモデリングに関わる破骨細胞と比較して、骨吸収動態にどのような違いがあるのかを解析した。

(2) 炎症性破骨前駆細胞の分化制御因子の解析

関節炎の病態形成には、滑膜マクロファージや滑膜線維芽細胞など多彩な細胞と、それらから産生される過剰な炎症性サイトカインやケモカインが関与することが報告されている。本研究では、炎症性破骨前駆細胞 AtoM の分化を制御する因子について探索を行った。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レポーターマウス (CX₃CR1-EGFP マウス) (DBA/1J 背景) にコラーゲン誘導関節炎を作製し、関節炎発症 10 日後に上述の独自のプロトコルを活用して炎症滑膜組織から細胞を単離し、シングルセル RNA-seq 解析を行った。R および主要なパッケージ (Seurat, Monocle 3) を用いて、AtoM の分化に関わる細胞やそれらが放出する液性因子について検討を行った。

(3) 他疾患における病的骨破壊の病態形成メカニズムの解析

本研究では、関節炎以外の病的骨破壊がおこる疾患として中耳真珠腫に着目し、その病態形成メカニズムについて解析を行った。手術時に患者から摘出した中耳真珠腫から細胞を単離し、シングルセル RNA-seq 解析を行い、病的な破骨細胞の分化に関わる細胞やそれらが放出する液性因子について検討を行った。

4. 研究成果

(1) 生体イメージングによる炎症性破骨細胞の動態解析

これまで独自に開発・応用してきた骨髄・関節の生体二光子励起イメージング技術を活用して、生理的な骨リモデリングに関わる破骨細胞と、病的な骨・関節破壊に関わる破骨細胞の骨吸収動態の経時変化を比較検討した。その結果、骨髄における生理的環境下では、「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」、「破骨細胞が覆っている骨の一部だけを溶かしていること」、「破骨細胞は隣の破骨細胞

と重なり合うことなく骨表面上を一様に酸性化していくこと」が分かった。一方、炎症関節における環境下では、「破骨細胞が骨びらんを形成し、長時間骨を壊していること」、「破骨細胞が覆っている骨の全体を溶かしていること」が示された。以上より、骨髄と炎症滑膜の二つの異なる局在・微小環境で形成された破骨細胞がその動き・機能の点で大きく異なることが示唆された。

(2) 炎症性破骨前駆細胞の分化制御因子の解析

本研究では、AtoM の特徴的な転写因子 *Foxm1* の発現を制御し得る様々な上流因子の中で、関節リウマチ (RA) の病態形成への寄与が報告されている TNF α に注目した。まず、*in vitro* の実験において、AtoM は TNF α と RANKL の共存在下で最も破骨細胞への分化が亢進することが分かった。次に、この TNF α を産生する細胞を同定するため、炎症滑膜組織内の単球・マクロファージ系細胞のシングルセル RNA-seq 解析を行った。その結果、CX₃CR1 陽性マクロファージの中に TNF α を高発現するサブセットを新たに同定した。また、このマクロファージは、低酸素応答遺伝子 *Hif1a* を高発現していることが分かった。以上の結果より、炎症滑膜内の低酸素に応答したマクロファージが TNF α を産生し *Foxm1* を高発現する AtoM を誘導することで、関節炎の病態形成に寄与する可能性が示唆された。

(3) 他疾患における病的骨破壊の病態形成メカニズムの解析

中耳真珠腫は骨を破壊しながら増大する疾患で、時に聴こえや平衡感覚を感じ取る内耳を破壊する。手術時に患者から摘出した中耳真珠腫に対してシングルセル RNA-seq 解析を行った結果、中耳真珠腫の組織内にアクチビ A を産生する線維芽細胞が存在することを発見した。また、中耳真珠腫では、炎症性サイトカインによって線維芽細胞のアクチビ A 産生量が増加し、破骨細胞の分化を促進することにより骨破壊が誘導されることが明らかとなった。さらに、中耳真珠腫モデルマウスを用いた実験において、線維芽細胞のアクチビ A の産生を抑制すると破骨細胞の数が減少したことから、線維芽細胞が産生するアクチビ A の阻害が中耳真珠腫の治療候補となり得ることが分かった。

現在の中耳真珠腫の有効な治療法は手術のみであるが、今後、薬剤により中耳真珠腫を保存的に治療する新たな選択肢が増えることが期待される。さらに、アクチビ A 産生線維芽細胞による骨破壊誘導メカニズムが明らかになったことで、他の病的骨破壊がおこる疾患の病態解明と新規治療法の開発にも役立つと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Shimizu K, Kikuta J, Ohta Y, Uchida Y, Miyamoto Y, Morimoto A, Yari S, Sato T, Kamakura T, Oshima K, Imai R, Yu-Chen L, Okuzaki D, Hara T, Motooka D, Emoto N, Inohara H, Ishii M	4. 巻 14
2. 論文標題 Single-cell transcriptomics of human cholesteatoma identifies an activin A-producing osteoclastogenic fibroblast subset inducing bone destruction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4417
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-40094-3	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 Sudo T, Yamashita E, Kikuta J, Ishii M	4. 巻 4
2. 論文標題 Protocol for live imaging of transferred mouse bone marrow cells by two-photon microscopy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 102654
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2023.102654	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 Yari S, Kikuta J, Shigyo H, Miyamoto Y, Okuzaki D, Furusawa Y, Minoshima M, Kikuchi K, Ishii M	4. 巻 43
2. 論文標題 JAK inhibition ameliorates bone destruction by simultaneously targeting mature osteoclasts and their precursors.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-023-00268-4	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 Koike T, Fujii K, Kometani K, Butler NS, Funakoshi K, Yari S, Kikuta J, Ishii M, Kurosaki T, Ise W	4. 巻 220
2. 論文標題 Progressive differentiation toward the long-lived plasma cell compartment in the bone marrow.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20221717
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1084/jem.20221717	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 Agemura T, Hasegawa T, Yari S, Kikuta J, Ishii M	4. 巻 42
2. 論文標題 Arthritis-associated osteoclastogenic macrophage, AtOM, as a key player in pathological bone erosion.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-022-00206-w	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 Uenaka M, Yamashita E, Kikuta J, Morimoto A, Ao T, Mizuno H, Furuya M, Hasegawa T, Tsukazaki H, Sudo T, Nishikawa K, Okuzaki D, Motooka D, Kosaka N, Sugihara F, Boettger T, Braun T, Ochiya T, Ishii M	4. 巻 13
2. 論文標題 Osteoblast-derived vesicles induce a switch from bone-formation to bone-resorption in vivo	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1066
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-28673-2	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 該当する

1. 著者名 Nishikawa K, Seno S, Yoshihara T, Narazaki A, Sugiura Y, Shimizu R, Kikuta J, Sakaguchi R, Suzuki N, Takeda N, Semba H, Yamamoto M, Okuzaki D, Motooka D, Kobayashi Y, Suematsu M, Koseki H, Matsuda H, Yamamoto M, Tobita S, Mori Y, Ishii M	4. 巻 22
2. 論文標題 Osteoclasts adapt to physioxia perturbation through DNA demethylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e53035
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202153035	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 Momiuchi Y, Motomura Y, Suga E, Mizuno H, Kikuta J, Morimoto A, Mochizuki M, Otaki N, Ishii M, Moro K	4. 巻 33
2. 論文標題 Group 2 innate lymphoid cells in bone marrow regulate osteoclastogenesis in a reciprocal manner via RANKL, GM-CSF and IL-13	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 573 ~ 585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab062	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 Tsukazaki H, Kikuta J, Ao T, Morimoto A, Fukuda C, Tsuda E, Minoshima M, Kikuchi K, Kaito T, Ishii M	4. 巻 152
2. 論文標題 Anti-Siglec-15 antibody suppresses bone resorption by inhibiting osteoclast multinucleation without attenuating bone formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 116095
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2021.116095	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 A, Kikuta J, Nishikawa K, Sudo T, Uenaka M, Furuya M, Hasegawa T, Hashimoto K, Tsukazaki H, Seno S, Nakamura A, Okuzaki D, Sugihara F, Ninomiya A, Yoshimura T, Takao-Kawabata R, Matsuda H, Ishii M	4. 巻 12
2. 論文標題 SLPI is a critical mediator that controls PTH-induced bone formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22402-x	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 Agemura T, Hasegawa T, Yari S, Kikuta J, Ishii M	4. 巻 45
2. 論文標題 Arthritis-associated osteoclastogenic macrophages (AtoMs) participate in pathological bone erosion in rheumatoid arthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunological Medicine	6. 最初と最後の頁 22 ~ 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/25785826.2021.1944547	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 T, Kikuta J, Ishii M	4. 巻 33
2. 論文標題 Imaging of bone and joints in vivo: pathological osteoclastogenesis in arthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 679 ~ 686
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab047	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 T, Kikuta J, Ishii M	4. 巻 11
2. 論文標題 The Effects of Vitamin D on Immune System and Inflammatory Diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1624
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom11111624	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14件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 菊田順一, 石井優
2. 発表標題 生体イメージングと骨代謝
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊田順一, 石井優
2. 発表標題 Intravital imaging technology dissecting cellular dynamics in inflammation and bone destruction in vivo
3. 学会等名 23rd Asia-Pacific League of Associations for Rheumatology Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊田順一, 石井優
2. 発表標題 ゼロから始める生体イメージング研究 ~ 病態解明と新たな治療を目指して ~
3. 学会等名 第31回日本リウマチ学会近畿支部学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菊田順一, 石井優
2. 発表標題 生体イメージング技術による免疫疾患治療薬のin vivo薬理作用の解明
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菊田順一, 石井優
2. 発表標題 生体多光子励起イメージングによる免疫疾患の病態解明
3. 学会等名 第50回日本臨床免疫学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2022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炎症性破骨細胞の動態・機能解析
3. 学会等名 第67回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菊田順一, 石井優
2. 発表標題 RANKLによる骨髓血管透過性制御機構の解明
3. 学会等名 第8回日本骨免疫学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菊田順一、石井優
2. 発表標題 生体イメージングで捉える炎症性骨破壊・線維化の動的実体
3. 学会等名 第44回日本炎症・再生医学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Junichi Kikuta
2. 発表標題 Intravital imaging of in vivo pharmacological actions of drugs on the immune system
3. 学会等名 The 9th China-Japan Joint Meeting of Basic and Clinical Pharmacology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菊田順一、石井優
2. 発表標題 RANKLによる生体骨髄内の血管透過性制御機構の解明
3. 学会等名 第41回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菊田順一
2. 発表標題 生体イメージング技術で捉えるRA治療薬のin vivo薬理作用
3. 学会等名 Rising Star Seminar（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菊田順一、石井優
2. 発表標題 生体二光子励起イメージングで解き明かすバイオミネラルリゼーション
3. 学会等名 第52回結晶成長国内会議（招待講演）
4. 発表年 2023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分子標的治療薬のin vivo薬理作用の解明
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菊田順一
2. 発表標題 生体イメージングを活用した再生医療研究
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2024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
---------	---------