

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09284

研究課題名(和文) ヒト破骨細胞分化を評価するための新規共存培養系の開発

研究課題名(英文) Development of a novel co-culture system to evaluate human osteoclast differentiation

研究代表者

佐藤 浩二郎 (Sato, Kojiro)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：10372434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト破骨細胞の*in vitro*分化系として、末梢血由来古典的単球を(i)M-CSF (ii)GM-CSF (iii)GM-CSF + IL-4 (iv)GM-CSF + TNFの存在下で培養した細胞を前駆細胞として用い、M-CSF+RANKL存在下で培養した。その際にGM-CSF、IL-4、TNFを添加し破骨細胞分化能に対する影響を調べた。TNFやGM-CSFが存在していても多核細胞の分化は観察されたがIL-4は破骨細胞分化を協力的に阻害した。従ってIL-4が破骨細胞前駆細胞の分化に関わっている場合、前駆細胞の分化環境と破骨細胞の分化環境とは完全に独立している必要があ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

関節リウマチ(RA)の病態において観察される破骨細胞分化はいくつかの点で生理的な破骨細胞分化と異なると考えられる。RAの治療にパラダイム・シフトをもたらしたTNF阻害薬が破骨細胞分化においてどのような役割を果たしているのかについては不明な点が多い。RAの病態において、GM-CSFが注目されている一方、GM-CSFは*in vitro*で破骨細胞分化を阻害することが報告されている。IL-4もまた破骨細胞分化を強力に阻害するが、破骨細胞前駆細胞の分化に関わっているという報告もある。今回の解析はそれらの臨床的な疑問点に一定の解答を提示する点で、学術的のみならず臨床的な意義も持っている。

研究成果の概要(英文)：As an *in vitro* differentiation system for human osteoclasts, peripheral blood-derived classical monocytes were cultured in the presence of (i) M-CSF (ii) GM-CSF (iii) GM-CSF + IL-4 (iv) GM-CSF + TNF as progenitor cells and further cultured in the presence of M-CSF+RANKL. By adding GM-CSF, IL-4, and TNF to the second step, the effects of these cytokines on osteoclastogenesis were also examined. Although multinuclear cell differentiation was observed in the presence of TNF and GM-CSF, IL-4 strongly inhibited osteoclastogenesis. This suggests that if IL-4 is involved in the differentiation of osteoclast progenitor cells, the environment must be completely independent of that of osteoclast differentiation.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：破骨細胞 RANKL TNF

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本研究着想の契機は、既に確立している骨芽細胞と、骨髄細胞の共存培養による破骨細胞分化系において、骨芽細胞の代わりに滑膜線維芽細胞を用いても破骨細胞分化が誘導できなかったという我々の経験である。この系においては、従来破骨細胞とその前駆細胞の生存に必須と考えられていた M-CSF が培養上清にほとんど検出できなかった。おそらくそのために、破骨細胞前駆細胞が培養中に消失してしまう。のみならず、培養上清中には可溶性 RANKL が検出できず、更に RANKL の機能を阻害する阻容体である OPG が大量に産生されていることが明らかとなった。一方、2010 年に報告された滑膜線維芽細胞の3次元培養系の報告(Kiener et al., Arthritis Rheum)では、滑膜線維芽細胞は球体の表面に単層をなして分布する。しかもこの系に単球を添加した場合、前述のように3週間後にも単球/マクロファージ系の細胞の存在が確認できる。この細胞は線維芽細胞の直下に、線維芽細胞と接する形で分布しており、相互作用していることが示唆される。2次元の培養系では消失する単球/マクロファージ系の細胞が3次元培養系であれば生存できる点が興味深い。更にこの系は、RANKL や TNF などのサイトカインや各種中和抗体を添加することで破骨細胞の分化研究に応用しうる実験系であると着想した。

### 2. 研究の目的

マウスの破骨細胞の場合は骨髄細胞を M-CSF 存在下で培養し、その後 RANKL を添加する系が確立している。これは元々、破骨細胞前駆細胞と骨芽細胞(あるいは骨髄ストローマ細胞)との共存培養により破骨細胞が *in vitro* で分化したという実験系から生み出されたものである。本研究の目的は、これらのマウスの培養系を応用し、特に関節リウマチの病態を反映するようなヒト破骨細胞の培養条件を定めることである。

### 3. 研究の方法

ヒトの場合は骨髄細胞の取得が困難であることから、ヒト末梢血由来の単核球から AutoMACS を用いて古典的単球(classical monocytes)を調整した。近年ヒト破骨細胞の前駆細胞として樹状細胞系の性質を持つ細胞がいくつかの論文で報告されている。この中で M-CSF ではなく GM-CSF および IL-4 の存在下で培養し破骨細胞前駆細胞として用いる方法が報告されていたため、

(i)M-CSF (ii)GM-CSF (iii)GM-CSF + IL-4 (iv)GM-CSF + TNF の存在下で培養した細胞などを前駆細胞として利用した。その後細胞を回収し、播種し直した後に M-CSF と RANKL 存在下で培養する 2-step の培養で TRAP 陽性多核細胞が得られるかを検証した。また骨吸収活性評価プレート上で培養することにより骨吸収能を評価した。その後ヒト由来滑膜線維芽細胞とヒト単核球の共存培養系の解析に取り掛かっている。

### 4. 研究成果

ヒト TRAP 陽性多核細胞はマウス破骨細胞と異なる点として、TRAP の染色が弱いこと、および多核化に要する培養期間が長いこと(生存時間も長いこと)が観察された。上記(i)-(iv)のいずれの条件においても M-CSF + RANKL 刺激下で培養すると TRAP 染色陽性多核細胞がえられ、骨吸収活性評価プレートにより骨吸収能を示した。ただし(iii)の条件においては M-CSF + RANKL の環境に移行する前に M-CSF 単独の存在下で培養することが必要であった。すなわちこの前駆細胞の場合は他の条件と異なり、2 step ではなく 3 step の培養法が必要であった。またいずれの条件でも 3 step の培養で最後の段階において IL-4 が低濃度であっても存在すると破骨細胞分化が阻害されることが明らかとなった。このことから、GM-CSF+IL-4 により誘導される前駆細胞が炎症性破骨細胞に分化する条件として、前駆細胞の分化環境と破骨細胞の分化環境とは完全に独立している必要があることが示唆される。一方で低濃度の TNF や GM-CSF が存在していても多核細胞の分化は観察されたため、病変局所で TNF や GM-CSF が存在していても破骨細胞は分化しうるということが確認された。

並行して進めた研究として、転写因子 Nfatc1 の short form 特異的ノックアウト(KO)マウスの解析が挙げられる。これは破骨細胞分化に必須である転写因子 Nfatc1 のアイソフォームの内、破骨細胞分化の過程で発現が著増するアイソフォームが最も短い mRNA を持つことからこれのみをノックアウトして破骨細胞分化を調べたものであり、この KO マウスは胎性致死であった。胎仔より造血幹細胞を *in vitro* で増殖させ、それを破骨細胞前駆細胞へ分化させて M-CSF + RANKL 存在下で培養したところ、対照(野生型)では TRAP 陽性多核細胞に分化したのに対して KO 細胞では多核細胞が得られなかった。トランスクリプトーム解析により Nfatc1 short form 特異的な転写標的を網羅的に探索したところ、KO 細胞でも Acp5, Ocstamp, Dcstamp, Ctsk などの破骨細胞のマーカー分子は著増を示していることが確認された。野生型と差が最も差があったのは Oscar や Calcr などのマーカーであった。KO 細胞が融合を示さなかった点については Ablm1 や Myo1d, インテグリンなどの発現が KO 細胞で落ちていることが原因である

可能性が示唆された。

更に解析中のヒト破骨細胞の共存培養系の実験では、ヒト単球を関節滑膜由来線維芽細胞と共存培養し、ビタミンDなどを加える培養を行ったところ、単球由来の多核細胞はTRAP染色にごく僅かに染まるのみであり、骨吸収能も非常に乏しいことが確認された。2次元培養ではヒト破骨細胞を分化させることは困難であることが確認され、現在3次元培養に移行している。

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kokuzawa Ayako, Nakamura Jun, Kamata Yasuyuki, Sato Kojiro	4. 巻 41
2. 論文標題 Potential role of type I interferon/IP-10 axis in the pathogenesis of anti-MDA5 antibody-positive dermatomyositis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Rheumatology	6. 最初と最後の頁 275 ~ 284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.55563/clinexprheumatol/em67zx	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 Wada Takuma Tsuzuki, Yokota Kazuhiro, Iida Shinichiro, Kanno Yuki, Shinozuka Nozomi, Sato Kojiro, Asanuma Yu Funakubo, Yamamoto Keiji, Mimura Toshihide	4. 巻 7
2. 論文標題 Transition from epoprostenol to selexipag in a patient with systemic sclerosis and pulmonary hypertension during the postoperative period of colon cancer surgery: A case report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Scleroderma and Related Disorders	6. 最初と最後の頁 NP4 ~ NP8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/23971983211063711	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 Nakamura Jun, Yanagida Mai, Saito Keisuke, Kamata Yasuyuki, Nagashima Takao, Iwamoto Masahiro, Sato Takeo, Sato Kojiro	4. 巻 6
2. 論文標題 Epstein-Barr virus encephalitis in a patient with rheumatoid arthritis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology Case Reports	6. 最初と最後の頁 160 ~ 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/mrcr/rxab045	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 Nakamura Jun, Yanagida Mai, Saito Keisuke, Kamata Yasuyuki, Nagashima Takao, Iwamoto Masahiro, Sato Takeo, Sato Kojiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Epstein-Barr virus encephalitis in a patient with rheumatoid arthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology Case Reports	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) 10.1093/mrcr/rxab045	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 Shima Natsuki, Kokuzawa Ayako, Saito Keisuke, Kamata Yasuyuki, Nagashima Takao, Sato Kojiro	4. 巻 61
2. 論文標題 Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome Associated with Pneumocystis jirovecii Pneumonia and Cytomegalovirus Colitis in a Patient with Rheumatoid Arthritis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 245 ~ 248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.7176-21	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 Aizaki Yoshimi, Yazawa Hiroaki, Sato Kojiro, Mimura Toshihide	4. 巻 39
2. 論文標題 Dual effects of interleukin-10 on natural killer cells and monocytes and the implications for adult-onset Still's disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Rheumatology	6. 最初と最後の頁 22 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.55563/clinexprheumatol/2vdem0	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 Omata Yasuhiro, Tachibana Hideyuki, Aizaki Yoshimi, Mimura Toshihide, Sato Kojiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Essentiality of Nfatc1 short isoform in osteoclast differentiation and its self-regulation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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/s41598-023-45909-3	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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 石澤 彩子
2. 発表標題 抗MDA-5抗体陽性皮膚筋炎におけるIP-10産生細胞についての検討
3. 学会等名 第67回日本リウマチ学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 竹内勤編集	4. 発行年 2022年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 348
3. 書名 関節リウマチ治療実践バイブル III章 6項	

〔産業財産権〕

〔その他〕

自治医科大学内科学講座アレルギー膠原病学部門 <a href="https://www.jichi.ac.jp/allie/">https://www.jichi.ac.jp/allie/</a> 自治医科大学内科学講座 アレルギー膠原病学部門 <a href="https://www.jichi.ac.jp/allie/">https://www.jichi.ac.jp/allie/</a>
---

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	小又 尉広  (Omata Yasuhiro)  (20644371)	自治医科大学・医学部・客員研究員   (32202)	

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