

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590460

研究課題名(和文)恒久的骨粗鬆症治療

研究課題名(英文)A therapy to eradicate osteoporosis

研究代表者

林 眞一 (HAYASHI, Shin-Ichi)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：50208617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は破骨細胞分化誘導を制御する細胞系譜の性質と存在部位について検討し、骨粗鬆症の発症を根治しうる治療法を開発する事を目的とした。破骨細胞分化には腹腔にのみ存在する細胞系譜と骨髄内のT細胞系譜の相互作用により制御されていた。この相互作用をそれぞれの段階で遮断すると、約50%の破骨細胞分化が抑制される。特に腹腔を低調処理することで一時的に腹腔細胞を除去したマウスにおいては1年以上にわたって骨髄細胞からの破骨細胞分化が減少した。本研究はこの3年間で、骨髄内のT細胞系譜の性質、各種変異マウスを用いた解析から、関与するシグナル伝達系も含めて多くの情報を得た。

研究成果の概要(英文)：In this study, to develop the novel therapy for osteoporosis, regulatory cells for osteoclastogenesis were characterized. A removal of regulatory cells in peritoneal cavity resulted in the reduction of the osteoclastogenesis from bone marrow cells for more than 1 year. A removal of T lineage cells expressing CD4, CD8a, or CD5, but not B220, CD11b, CD11c, NK1.1, or IL7Ra in the bone marrow also reduced the osteoclastogenesis of bone marrow cells. These observations were confirmed by using mutant mice lacking T cells or T and B cells. Moreover, mice carrying T cell antigen receptor-transgene but not Btk mutation were affected a hypotonic treatment in the peritoneal cavity. Taken together, the osteoclastogenesis is suggested to be regulated by two-related systems presented in extra-medullary and intra-medullary sites.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：免疫学 骨吸収 炎症 病理学 再生医学

1. 研究開始当初の背景

世界一の長寿国の我が国は、老人性疾患に多くの医療費が費やされ、Quality of Life など問題点がある。その代表的疾患、骨粗鬆症はほとんどの閉経後の女性に発症する。そのため、一定以上の年齢に達した女性を対象とした対策(予防法)が必要である。

2. 研究の目的

一定以上の年齢に達したすべての女性を対象とした骨粗鬆症対策(予防法)は(1)単純で安価なこと、(2)確実な効果があり、できれば、(3)一度の処置で恒久的に治療が完了するということが理想である。さらに、(4)副作用を伴うような強力なものではないことが望まれる。本研究は、基礎研究から破骨細胞分化効率を恒久的に減少させる可能性を見出し、その手法を骨粗鬆症治療へと応用することで、骨粗鬆症の発症を阻止することを目的とした。予防法として一般化できれば、その影響は医学分野に限らず社会的にも極めて大きい。

3. 研究の方法

腹腔を低張処理することで、骨髄細胞の破骨細胞分化が半減する。この現象を、検討するためにすでに、いくつかの予備実験を行ってきた。その結果、一回の低張処理で長期間その効果が持続すること、骨髄細胞中の CD5 陽性細胞がこの制御に関与していることが示唆された。以上から、この破骨細胞分化制御を司っている細胞群を明らかにすることをめざした実験を行う。

(1) 腹腔低張処理による骨髄細胞の破骨細胞分化誘導の減少の維持期間:

腹腔に 3 mL の滅菌蒸留水を注入して、低張処理を行うと、腹腔内の細胞がほとんどゼロになり、

回収されなくなる。この処置を行って、経時的に骨髄から細胞を回収し、M-CSF と RANKL を添加して、6 日間培養し、3 核以上の多核の酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ陽性の細胞を破骨細胞として検出し、効果の継続期間を検討する。

(2) 破骨細胞分化制御細胞の性格: 骨髄中の細胞画分:

破骨細胞分化を制御する細胞群が 2 群存在することが予想される。骨髄細胞から CD5 陽性細胞を除去することで、破骨細胞分化誘導が減少する。骨髄細胞中 CD5 陽性細胞は 3-4% である。CD5 陽性細胞は T 細胞と一部の B 細胞 (B1-B 細胞) に発現していると考えられているので、CD4、CD8a、CD45R (B220)、CD11b (Mac1)、IL7Ra 等に対する抗体を用いて、CD5 陽性の制御細胞の性格を検討する。

(3) 破骨細胞分化制御細胞の性格:

腹腔中の制御細胞画分: 未処理のマウス腹腔から回収した未分画細胞、CD5 陽性細胞、CD5 陰性の細胞を低張処理したマウスの腹腔へ戻し、骨髄の破骨細胞分化誘導を低張処理したマウスと比較し、回復の見られる画分を精製する。

(4) 各種変異マウスの反応からシグナル経路の探索:

T 細胞欠損、T、B 細胞欠損、Btk チロシンキナーゼ変異、T あるいは B 細胞抗原受容体トランスジェニックマウスを用いて破骨細胞分化を検討する。

4. 研究成果

(1) 骨髄細胞中に存在する制御細胞の特徴: マウスの腹腔に蒸留水 3ml を注入し低張処理を行うことで、その後、少なくとも 1 年以上にわたっ

て、骨髄細胞からの破骨細胞分化誘導が対照群に比べて 30-60%に有意に減少することを観察した。低張処理後、好中球の浸潤が一時的には見られるが、数週間ですべて元と同じ細胞系譜に戻っているため、腹腔外から供給される細胞系譜ではなく、腹腔内に維持されてきた細胞系譜だと思われる。骨髄細胞中から CD4、CD8a あるいは CD5 陽性細胞を除去すると、対照群に比べて 50%程度まで破骨細胞数が減少するが、腹腔低張処理マウスでは、この減少は観察されなかった。骨髄中に存在して破骨細胞分化を制御している細胞は、細胞表面分子の抗体を用いて除去する実験を行い、CD4、CD8a、または CD5 陽性細胞で、B220、CD11b、CD11c、NK1.1、IL7Ra 陰性の細胞であることが判明した。

(2) 変異マウスを用いた破骨細胞分化の変化の確認:

T細胞欠損の *Foxn1^{nu/nu}*、*Rag1-KO* マウスを用いて、抗体による除去の実験を確認したが、予想通り、CD4、CD8a、CD5 陽性細胞除去による変化は見られなかったし、腹腔低張処理の効果も見られなかった。

(3) T細胞抗原受容体トランスジェニックマウスを用いた破骨細胞分化の変化:

MHCクラスII/卵白アルブミンを認識するT細胞抗原受容体(TCR)遺伝子のトランスジェニック(Tg)マウス(DO11.10とOT-II)ではCD4あるいはCD8a陽性細胞除去しても変化しないが、腹腔低張処理では低下した。

(4) *Btk* 変異マウスを用いた破骨細胞分化の変化:

Btk^{kid} 変異はT細胞除去では低下し、腹腔低張

処理では変化しないことも見出した。これらの観察事実を基礎にして、破骨細胞分化制御にはいかなる機構が働いているのか明らかにできる段階にまで本研究は達していると思う。

低張処置という操作が突飛な感じを与えるようで、この再現性には多くのコメントを周辺の研究者からもいただいた。そのため、繰り返し繰り返し低張処理の実験を行ったが、驚く程、安定した効果を維持できることが確認できた。一度の処置で恒久的に治療が完了する可能性を示すために、効果の持続期間を検討してきたが、すでに1年を超えて効果が持続されている。マウスにおける1年間というのはヒトにとってどのくらいの期間に相当するのか、マウスで観察された作用をどうやってヒトへ応用するのか、さらなる検討が必要だと思う。標的細胞を除去する際に、副作用を伴うような強力な処置ではないことが望まれる。本研究では破骨細胞分化効率が正常の30%以下にはならないことを目標に研究を遂行する。実験系はいたって単純で、予備実験の結果、再現性には問題はないので、本実験の標的細胞を明らかにし、その機構を解析できると確信している。

骨粗鬆症の治療は対症療法が中心だが、本研究が成就すれば予防的、あるいは発症初期に処置することで、長期間の効果が期待できる。破骨細胞前駆細胞そのものではなく、その分化制御を司る細胞を標的とした点が革新的である。破骨細胞は血液細胞系譜のため、いくら除去しても、前駆細胞は恒常的に供給されるだろう。また、T細胞系譜も、一時的に骨髄から除去してもすぐに供給されてしまう。これでは、恒久的な治療は望めない。本研究は、腹腔という器官に特異的に維持されていると予想される細胞集団の存在に注目した点がポイントである。

現場での観察から見出した現象を、治療の標的器官は骨組織ではなく腹腔内にあるという発想の転換によって、革新的・独創的かつ挑戦的な研究として発展して行けると確信している。

この研究実施期間中に、ES 細胞からの破骨細胞分化誘導の培養法について報告した (Tsuneto et al. 2011)。破骨細胞への分化能をもったマクロファージ細胞株からの破骨細胞分化はその細胞集団の確率論的に選択された一部の細胞に生じる機構であることを示した (Hayashi et al. 2012)。さらに、B 細胞分化機構 (Okuyama et al. 2012)、抗原輸送機構 (Yoshino et al. 2012, 2013) などの研究も同時に発展できた。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

Yoshino, M., Murata, A., Shimoda, Y., Hikosaka, M., and Hayashi, S.I.: Dual system for the transport of self-antigens from the skin. *Curr. Res. in Immunology*, 7: 1-12 (2013) (査読無).

Komada, Y. Yamane, T., Kadota, D., Isono, K., Takakura, N., Hayashi, S.I., and Yamazaki, H.: Origins and properties of dental, thymic, and bone marrow mesenchymal cells and their stem cells. *PLoS One*, 7: e46436 (2012) (査読有). doi: 10.1371/journal.pone.0046436

Hayashi, S.I., Murata, A., Okuyama, K., Shimoda, Y., Hikosaka, M., Yasuda, H., and Yoshino, M.: Stochastic differentiation into an osteoclast lineage from cloned macrophage-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 428: 303-308 (2012) (査読有). doi: 10.1016/j.bbrc.2012.10.052

Yoshino, M., Okuyama, K., Murata, A., Tomura, M., and Hayashi, S.I.:

CCR7-independent transport of skin antigens occurs in the dermis. *Eur. J. Immunol.*, 42: 1459-1467 (2012) (査読有). doi: 10.1002/eji.201142114

Okuyama, K., Murata, A., Sudo, T., Yoshino, M., and Hayashi, S.I.: A checkpoint in B-lymphopoiesis related to Notch resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 417: 141-146 (2012) (査読有). doi: 10.1016/j.bbrc.2011.11.072

Yoshikawa, T., Nakatsugawa, M., Suzuki, S., Shirakawa, H., Nobuoka, D., Sakemura, N., Motomura, Y., Tanaka-Harada, Y., Hayashi, S.I., and Nakatsura, T.: HLA-A2-restricted glypican-3 peptide-specific CTL clones induced by peptide vaccine show high avidity and antigen-specific killing activity against tumor cells. *Cancer Sci.*, 102: 918-925 (2011) (査読有). doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01896.x, 2011.

Tsuneto, M., Yamane, T., and Hayashi, S.I.: Methods for investigation of osteoclastogenesis using mouse embryonic stem cells. In "Embryonic Stem Cell Therapy for Osteo-Degenerative Diseases". (Methods in Molecular Biology, Vol. 690), Ed. N.I. zur Nieden, A Humana Press Book, Springer Science+Business Media, pp 239-253 (2011) (査読無). doi: 10.1007/978-1-60761-962-8_16

[学会発表] (計14件)

Murata, A., Yoshino, M., Shimoda, Y., Hikosaka, M., Yagita, H., and Hayashi, S.I.: Cell adhesion mediated by Notch ligands; an implication for mast cell accumulation in

chronic inflammation. 3-J-W56-12-P 第 42 回
日本免疫学会学術集会 2013 年 12 月 13 日、
千葉

Hikosaka, M., Murata, A., Shimoda, Y.,
Yoshino, M., and Hayashi, S.I.:
Up-regulation of Aicda gene expression in IgE
producing hybridomas: a model of class switch
recombination in plasma cells. 2-H-W38-10-P
第 42 回日本免疫学会学術集会 2013 年 12 月
12 日、千葉

Yoshino, M., Murata, A., Shimoda, Y.,
Hikosaka, M., and Hayashi, S.I.: Analysis of
cells transporting skin self-antigens to regional
lymph nodes under CCR7-deficient conditions.
2-I-W39-19-P 第 42 回日本免疫学会学術集
会 2013 年 12 月 12 日、千葉

Murata, A., Yoshino, M., Shimoda, Y.,
Hikosaka, M., Okuyama, K., Yagita, H., and
Hayashi, S.I.: Notch ligands differentially
regulate the adhesion of immune cells.
2-D-W28-7-O/P 第 41 回日本免疫学会学術
集会 2012 年 12 月 6 日、神戸

Yoshino, M., Okuyama, K., Murata, A.,
Tomura, M., Shimoda, Y., Hikosaka, M., and
Hayashi, S.I.: Role of CCR7-independent
transport of skin self-antigens on skin immunity.
1-L-W21-3-O/P 第 41 回日本免疫学会学術
集会 2012 年 12 月 5 日、神戸

Yoshino, M., Okuyama, K., Murata, A.,
Tomura, M., Shimoda, Y., Hikosaka, M., and
Hayashi, S.I.: Presence of CCR7-independent
transport of skin antigens from the dermis.
European Congress of Immunology, Glasgow,
Scotland, 5-8 September, 2012.

Yoshino, M., Okuyama, K., Murata, A.,
Tomura, M., Shimoda, Y., Hikosaka, M., and

Hayashi, S.I.: CCR7-independent transport of
skin antigens occurs in the dermis. The 20th
International Symposium on Molecular Cell
Biology of Macrophages 2012 2012/6/15-16
東京

Murata, A., Okuyama, K., Egawa, Y., Sawada,
A., Shimoda, Y., Yoshino, M., and Hayashi,
S.I.: Function of Notch ligands as adhesion
molecules. 4T11pII-2 (3P-0549)第 34 回日本分
子生物学会年会, 2011 年 12 月 15、16 日、神
奈川

Egawa, Y., Okuyama, K., Murata, A., Sawada,
A., Shimoda, Y., Yoshino, M., and Hayashi,
S.I.: Characterization of CD16- NK cell
precursors in the bone marrow.
3-G-W58-3-O/P 第 40 回日本免疫学会学術
集会 2011 年 11 月 29 日、千葉

Murata, A., Okuyama, K., Egawa, Y., Sawada,
A., Shimoda, Y., Sakano, S., Yagita, H.,
Yoshino, M., and Hayashi, S.I.: Differential
regulation of cell adhesion by Notch ligands.
3-L-W68-15-P 第 40 回日本免疫学会学術集
会 2011 年 11 月 29 日、千葉

Okuyama, K., Murata, A., Egawa, Y., Sawada,
A., Shimoda, Y., Yoshino, M., and Hayashi,
S.I.: No tch 抵抗性を示す B 細胞分化段階
/Notch resistant checkpoint during
B-lymphopoiesis. 2-G-W37-9-P 第 40 回日本
免疫学会学術集会 2011 年 11 月 28 日、千葉

Sawada, A., Okuyama, K., Murata, A., Egawa,
Y., Shimoda, Y., Yoshino, M., and Hayashi,
S.I.: Description of T cell receptor selection
events with an in vitro culturing approach.
1-L-W22-6-O/P 第 40 回日本免疫学会学術
集会 2011 年 11 月 27 日、千葉

Yoshino, M., Okuyama, K., Murata, A.,

Egawa, Y., Sawada, A., Shimoda, Y., and Hayashi, S.I.: CCR7 非依存的に皮膚自己抗原を輸送する担当細胞の探索/Analysis of cells transporting skin self-antigens to regional lymph nodes in a CCR7-independent manner. 1-C-W4-11-P 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011 年 11 月 27 日、千葉

Yoshino, M., Okuyama, K., Murata, A., Egawa, Y., Sawada, A., Shimoda, Y., Hayashi, S.I.: Presence of CCR7-independent transport of skin antigens from the dermis. 76th Japanese Society of Interferon & Cytokine Research-19th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2011 Joint meeting. 25-27 May, 2011, Osaka, Japan.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ

<http://www.med.tottori-u.ac.jp/immunol/5983.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 眞一 (HAYASHI Shin-Ichi)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号: 50208617

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし