

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689075

研究課題名(和文) 炎症応答と骨破壊の両プロセスを包括して制御できる炎症性骨破壊治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of therapeutic strategies to comprehensively control inflammation and bone destruction in arthritis

研究代表者

岡本 一男 (Okamoto, Kazuo)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00436643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,300,000円、(間接経費) 6,390,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチなどの慢性炎症に伴う骨破壊疾患は、免疫異常による炎症と異常な骨破壊という二つの病的現象に依存している。これまで申請者は、転写制御因子 I κ B が Th17 細胞分化に関与すること、さらに骨代謝細胞でも有意に発現が認められることを見出している。本研究では、炎症性骨破壊治療における I κ B の分子標的としての有効性を、遺伝子改変マウスを用いて生体レベルで検証し、I κ B による炎症性骨破壊制御機構を明らかにする。さらに炎症と骨破壊の両プロセスを制御する新規標的細胞/因子の同定を目指す。本研究により、Th17 細胞性炎症応答と破骨細胞性骨破壊の両プロセスを包括して制御できる治療法の開発に繋げる。

研究成果の概要(英文)：The pathogenesis of bone destruction associated with chronic inflammation such as rheumatoid arthritis relied on two phases; abnormal immune responses and dysregulation of bone system. I've found that the transcription regulatory factor I κ B regulates Th17 development and is expressed in several bone cells. Thus, in this study, I attempted to determine the potential of I κ B as a therapeutic target for the treatment of inflammation-associated bone destruction, using genetically modified mice. Furthermore, I tried to identify a novel target cell/ factor that regulates both inflammation and bone destruction in arthritis. This study may provide the molecular basis for a new therapeutic strategy to block not only Th17-mediated inflammation but also osteoclastic bone destruction.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：骨代謝 関節リウマチ 破骨細胞 骨芽細胞 Th17細胞

1. 研究開始当初の背景

骨組織の恒常性は骨形成と骨吸収のバランスにより維持されるが、歯周病や関節リウマチなどの炎症性骨疾患では、破骨細胞性の骨吸収が過剰となり異常な骨量減少を生じる。その結果歯槽骨や関節骨が破壊され機能障害に至り、日常生活に著しい支障をきたすことから、その適正な制御法開発が求められている。こうした炎症性骨疾患は、『免疫異常による慢性炎症』と『破骨細胞による異常な骨破壊』という二つの病的現象に依存しているという点で、他の骨疾患とは異なる視点で考究しなくてはならない。歯周病では病原体感染による慢性炎症が引き金となり歯槽骨破壊が進行し、RA では自己免疫応答による慢性の滑膜炎に伴い骨破壊を生じる。即ちこれらの治療に向けて、『慢性炎症』と『骨破壊』という二つの誘導機序を細胞・分子レベルで統合的に理解し、両プロセスを包括的に制御できるアプローチを開発することが必要である。

RA などの自己免疫性炎症は、Interleukin (IL)-17 産生性のヘルパー T 細胞サブセット「Th17 細胞」によって引き起こされることが近年明らかとなってきた (Korn et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 2009)。Th17 細胞は、炎症性サイトカイン環境下にて未感作 CD4⁺T 細胞が抗原を認識し活性化することで分化が誘導される。Th17 細胞が産生する IL-17 は、血管内皮細胞や上皮細胞、マクロファージなどに働きかけて、炎症性サイトカインやケモカイン産生、好中球の動員を促し炎症応答を惹起する。また申請者らの過去の研究から、Th17 細胞は関節リウマチにおいて骨破壊誘導性 T 細胞として機能することが判明した (Sato, Okamoto et al., *J. Exp. Med.*, 2006)。関節滑膜内に浸潤した Th17 細胞は、IL-17 を産生することで滑膜マクロファージを活性化させ、IL-1・IL-6・TNF α などの炎症性サイトカインの産生を促す。さらに IL-17 は炎症性サイトカインと同様に滑膜線維芽細胞に作用することにより、破骨細胞分化因子 RANKL の発現を誘導し、その結果異常な骨吸収が引き起こされる。従って、慢性炎症期という異常な病的状況下で骨破壊を止めるには、『Th17 細胞による炎症応答』と『炎症性サイトカインによる破骨細胞活性化』の二つのフェーズを防ぐことが有効である。

最近申請者らは、転写制御因子 I κ B ζ が Th17 細胞分化の新規の制御因子であることを見出した (Okamoto et al., *Nature*, 2010)。I κ B ζ は I κ B ファミリーに属するものの、NF- κ B サブユニットと結合して特定の遺伝子発現を正に制御する核内因子である。申請者らは、Th17 細胞で I κ B ζ が *Il17* 遺伝子プロモーター上流の転写制御領域に直接結合して IL-17 の発現を誘導するという新しい制御機構を見出した。一方、I κ B ζ はマクロファージや線維芽細胞において、Toll 様受容体リガンド、IL-1、IL-17/TNF α 刺激

による *Il6* や *Il12* 遺伝子発現を制御していることも報告されている (Yamamoto et al., *J. Infect. Chemother.*, 2008)。さらに申請者は I κ B ζ が骨芽細胞でも有意に発現しており、リポ多糖(LPS)のマウス頭蓋冠投与による炎症性骨破壊モデルを I κ B ζ 欠損マウスに誘導させても、骨破壊が惹起されないことを認めた。以上より、I κ B ζ は T 細胞に限らず骨代謝細胞でも機能を果たしていることが想定された。

2. 研究の目的

I κ B ζ は Th17 細胞やマクロファージを介した免疫応答だけでなく、骨代謝細胞を介した骨破壊プロセスをもコントロールしていることが予測された。そこで本研究では、炎症性骨破壊における I κ B ζ の役割を、骨代謝細胞での機能を加味した上で検証し、炎症性骨破壊治療に対する I κ B ζ を標的とした制御法の有効性を検討する。且つ『Th17 細胞による炎症応答』と『炎症性サイトカインによる破骨細胞活性化』の二つのフェーズを防ぐアプローチとして、有効な分子標的を探索する。以上より、Th17 細胞による炎症応答に加えて、異常な破骨細胞性骨破壊をも直接防御できる効果的な治療アプローチを見出すことを目指す。

3. 研究の方法

(1) I κ B ζ ノックアウト(KO)マウスの骨表現型を解析し、骨代謝細胞における I κ B ζ の機能を明らかにする。特に、I κ B ζ による転写制御に焦点を当て、骨代謝細胞分化・機能に関わる I κ B ζ 標的遺伝子を探索し、その制御機構を検討する。

(2) I κ B ζ KO マウスならびに I κ B ζ KO マウス由来の骨髄キメラマウスを用いて、関節炎モデルを実施し、炎症性骨破壊における I κ B ζ 阻害が炎症応答プロセスおよび骨破壊プロセスの両側面で有効であることを生体レベルで検証する。さらに、I κ B ζ コンディショナルノックアウト (cKO) マウスを作製し、炎症応答プロセスおよび骨破壊プロセスにおける細胞種毎の I κ B ζ の機能解析を試みる。

(3) マウスの関節炎モデルを用いて、炎症応答プロセスおよび骨破壊プロセスの両側面に深く関わる Th17 細胞サブセットの解析を進め、炎症性骨破壊治療に有効な新規標的の同定に繋げる。

4. 研究成果

(1) I κ B ζ ノックアウト(KO)マウスの骨表現型を、1) μ CT と軟 X 線撮影を用いた脛骨・大腿骨における海綿骨・皮質骨の解析、2) 病理組織標本を用いた骨形態計測、3) カルセインダブルラベル法を用いた骨形成率解析、により検討した。そ

の結果 $I\kappa B\zeta$ KO マウスでは、破骨細胞数及び骨吸収の増加により、有意に骨量が減少していることが認められた。また $I\kappa B\zeta$ KO マウス由来の初代細胞を用いた *in vitro* 培養系 (M-CSF/RANKL 刺激による破骨細胞分化培養系・頭蓋冠由来初代細胞培養系)を用いて、破骨細胞及び骨芽細胞における $I\kappa B\zeta$ の機能を検討した。さらに、骨芽細胞と骨髄細胞との共存培養系を用いて、骨芽細胞による破骨細胞支持能に $I\kappa B\zeta$ が関与する可能性について検討した。

$I\kappa B\zeta$ による骨代謝細胞制御メカニズムを明らかにすべく、 $I\kappa B\zeta$ 欠損破骨細胞および骨芽細胞より RNA を調整し、 $I\kappa B\zeta$ 標的遺伝子を網羅的トランスクリプトーム解析より探索した。発現変動の認められた遺伝子に関して、過剰発現実験・RNAi 実験を行い、骨代謝細胞制御に関わる遺伝子を抽出した。さらに破骨細胞において抗 $I\kappa B\zeta$ 抗体、各種修飾ヒストン抗体、転写共役因子に対する抗体を用いて ChIP 解析を行い、 $I\kappa B\zeta$ 標的遺伝子のクロマチン構造変化を検討した。以上より、 $I\kappa B\zeta$ が骨代謝細胞分化・機能を制御する分子メカニズムを明らかにした。

(2). $I\kappa B\zeta$ KOマウスならびに $I\kappa B\zeta$ KOマウス由来の骨髄を用いた骨髄キメラマウスを作製し、コラーゲン誘導性関節炎を実施した。関節炎病態は炎症応答と骨破壊の両側面において、以下の通り評価した。1) 踵関節部の腫脹と発赤による炎症の評価、2) 炎症性サイトカイン、ケモカインならびに各 Immunoglobulin クラスの定量的測定、3) 病理組織標本を用いた組織学的評価、4) 病理組織標本解析と μ CT 解析による関節骨破壊および傍関節の骨粗鬆症の評価 以上の病態解析により、 $I\kappa B\zeta$ 遺伝子欠損が炎症性骨破壊に及ぼす影響を検証した。

また、細胞特異的に $I\kappa B\zeta$ 遺伝子を欠損させた cKO マウスを作製するため、欧州条件変異マウス作成プログラム (EUCOMM) にて C57BL6 background の $I\kappa B\zeta$ floxed ES 細胞株を導入し、キメラマウス作製した。Flp TG マウスと交配させ、Neo 耐性遺伝子を欠損させた $I\kappa B\zeta$ floxed マウスを作製した。さらに β -Actin Cre マウスとの交配により、片アレルのみ $I\kappa B\zeta$ 遺伝子を欠損させた *Nfkbiz*^{+/−} マウスを作製した。各種 Cre マウスとの交配により、破骨細胞特異的欠損マウス、骨芽細胞特異的欠損マウス、CD4⁺ T 細胞特異的欠損マウスを作製することで、上記の関節炎モデルにおいて細胞種毎の $I\kappa B\zeta$ の機能を明らかにすることが可能となった。

(4). 炎症性応答と骨破の両者を協力的に誘導する T 細胞サブセットを見出すべく、マウスのコラーゲン誘導性関節炎モデルを用いて、末梢リンパ組織と局所関節における T 細胞のサブセット解析を実施した。その結果、制御性 T 細胞 (Treg) のマスター転写因子である Foxp3

を発現する CD4⁺T 細胞が、IL-17 を強力に産生できる細胞に転換し、骨破壊局所にて集積することが認められた。この分化転換後の Th17 細胞 (exFoxp3Th17 細胞と呼ぶ) は RANKL を高く発現し、ナイーブ T 細胞から直接分化した Th17 細胞よりも破骨細胞誘導能が高いことが示され、関節炎の増悪に関わることを実証した (Komatsu et al., *Nature Med.*, 20: 62-8, 2014)。さらに、トランスクリプトーム解析・エピジェネティクス解析を通じて、exFoxp3Th17 細胞の特性を評価し、制御標的となりうる分子の解析を進めた。本成果により、exFoxp3Th17 細胞が関節リウマチの炎症と骨破壊を同時に制御できるターゲットとして有望であることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

Noriko Komatsu, Kazuo Okamoto, Shinichiro Sawa, Tomoki Nakashima, Masatsugu Oh-hora, Tatsuhiko Kodama, Sakae Tanaka, Jeffrey A. Bluestone and Hiroshi Takayanagi Pathogenic conversion of Foxp3⁺ T cells into T_H17 cells in autoimmune arthritis. *Nature Medicine*, 2014 20: 62-8 DOI: 10.1038/nm.3432 査読有り

Jun-ichi Furusawa, Kazuyo Moro, Yasutaka Motomura, Kazuo Okamoto, Jinfang Zhu, Hiroshi Takayanagi, Masato Kubo and Shigeo Koyasu Critical Role of p38 and GATA3 in Natural Helper Cell Function. *The Journal of Immunology*, 2013 191: 1818-26 DOI: 10.4049/jimmunol.1300379 査読有り

Kazuo Okamoto and Hiroshi Takayanagi Potential molecular targets for suppressing Th17 development *Inflammation and Regeneration*, 2011 31(4): 354-360 http://www.jsir.gr.jp/journal/Vol31No4/pdf/05_M3_354.pdf 査読有り

Erik Idrus, Tomoki Nakashima, Ling Wang, Mikihito Hayashi, Kazuo Okamoto, Tatsuhiko Kodama, Nobuyuki Tanaka, Tadatsugu Taniguchi and Hiroshi Takayanagi The Role of the BH3-only Protein Noxa in Bone Homeostasis *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, 410(3):620-5 DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.06.040 査読有り

Kazuo Okamoto and Hiroshi Takayanagi Regulation of bone by the adaptive immune system in arthritis *Arthritis Research & Therapy*, 2011, 13(3):219 DOI: 10.1186/ar3323 査読有り

Kazuo Okamoto and Hiroshi Takayanagi Osteoclasts in arthritis and Th17 development

International Immunopharmacology, 2011, 11: 543-548 DOI: 10.1016/j.intimp.2010.11.010 査読有り

〔学会発表〕(計 12 件)

Matteo Guerrini, 岡本一男, 中島友紀, 高柳広 RANKL expressed by T lymphocyte is needed for development of experimental autoimmune encephalomyelitis 第 42 回日本免疫学会学術集会, 213 年 12 月 12 日, 千葉

岡本一男 骨免疫学的視点からみた Th17 細胞の機能 日本小児リウマチ学会, 2013 年 10 月 12 日, 埼玉

Matteo Guerrini, 岡本一男, 中島友紀, 高柳広 T 細胞が発現する RANKL は実験的自己免疫性脳脊髄炎の病態形成に重要である 第 34 回日本炎症・再生医学会, 2013 年 7 月 2 日, 京都

岡本一男, 小松紀子, 高柳広 Study on the potential of IκBζ as a target for the treatment of inflammatory bone destruction 第 41 回日本免疫学会学術集会, 2012 年 12 月 6 日, 神戸

Matteo Maurizio Guerrini, 岡本一男, 中島友紀, 高柳広 RANKL expressed by T lymphocytes is needed for development of experimental autoimmune encephalomyelitis 第 41 回日本免疫学会学術集会, 2012 年 12 月 5 日, 神戸

Jun-ichi Furusawa, Kazuyo Moro, Yasutaka Motomura, Masato Kubo, Kazuo Okamoto, Hiroshi Takayanagi & Shigeo Koyasu Critical role of GATA3 in the differentiation and Th2 cytokine production of natural helper cell 第 41 回日本免疫学会学術集会, 2012 年 12 月 7 日, 神戸

岡本一男, 高柳広 骨リモデリングの制御機構—骨免疫学の視点から 日本食品免疫学会 2012 年度大会, 2012 年 10 月 16 日, 東京

Matteo Maurizio Guerrini, 岡本一男, Lynett Danks, 寺島明日香, 小松紀子, 中島友紀, 高柳広 RANKL expressed by T lymphocytes is required for full development of experimental autoimmune encephalomyelitis 4th International Conference on Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems, 2012 年 7 月 21 日, ギリシャ

小野岳人, 岡本一男, 岩倉洋一郎, 高柳広 マウス大腿骨骨損傷モデルにおける骨再生に対する IL-17 の作用 第 33 回日本炎症・再生医学会 2012 年 07 月 06 日, 福岡

岡本一男, 高柳広 転写制御因子 IκBζ による骨代謝と免疫システムの制御 平成 23 年度 東京大学医科学研究所共同研究拠点事業 共同研究成果報告会, 2012 年 3 月 13

日, 東京

岡本一男 関節炎における免疫システムと骨 第 10 回 Japan Conference on Bone & Joint Diseases (JCBJD) 研究講演会, 2012 年 2 月 18 日, 東京

岡本一男, 大洞将嗣, 高柳広 An essential role of IκBζ in the transcriptional program in Th17 development Bio-Rheumatology International Congress (BRIC) Tokyo, The 8th GARN Meeting, 2011 年 11 月 15 日, 千葉

〔図書〕(計 7 件)

岡本一男, 高柳広 骨の研究最前線 『骨免疫学』 HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY 2013 年, 第 79 号, 20 巻, p247-p254

岡本一男, 高柳広 T 細胞と骨破壊・骨形成 THE BONE 『骨代謝調節の新たな展開』 2013 年, 27 巻, p415-p421

岡本一男, 高柳広 南山堂 免疫学 update —分子病態の解明と治療への展開—第 IV 部 学術的免疫研究の展開 26. 骨免疫学の新展開, 2012 年, p217-p224

岡本一男 医歯薬出版株式会社 医学のあゆみ 骨免疫学-研究最前線 骨と免疫系のクロストーク 3. 転写因子 NFATc1 と破骨細胞, 2012 年, 242 巻, p655-p659

岡本一男, 高柳広 医薬ジャーナル社 CLINICAL CALCIUM 骨免疫学 — オーパービュー, 2012 年, 22 巻, p1641-1649

岡本一男, 高柳広: 転写制御因子 IκBζ による Th17 細胞分化制御 Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology, 2011 年, 5 巻, p53-p57

Kazuo Okamoto and Hiroshi Takayanagi Osteoclasts and interleukin-17-producing helper T cells in rheumatoid arthritis *Arthritis: Pathophysiology, Prevention and Therapeutics*, 2011 年, p75-p89

〔その他〕

ホームページ等

東京大学 大学院医学系研究科 免疫学 研究室ホームページ:

<http://www.immunol.m.u-tokyo.ac.jp/>

ライフサイエンス領域融合レビュー 骨免疫学の歴史と新たな展開:

<http://leading.lifesciencedb.jp/1-e003/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 一男 (KAZUO OKAMOTO)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 00436643

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし