

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670636

研究課題名(和文) 関節炎における破骨細胞誘導細胞の決定

研究課題名(英文) Identification of cells responsible for osteoclastogenesis in arthritis

研究代表者

高柳 広 (Takayanagi, Hiroshi)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20334229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：関節炎における破骨細胞誘導細胞を決定するため、T細胞、滑膜線維芽細胞、軟骨細胞それぞれ特異的に破骨細胞誘導因子RANKLを欠損させたマウスを作成し、これらのマウスにコラーゲン抗体誘導性関節炎を誘導し、骨破壊の評価を行った。組織化学染色とマイクロCTによる骨破壊の評価の結果、T細胞と軟骨細胞特異的にRANKLを欠損させたマウスではコントロールと同程度の骨破壊が認められた一方で、滑膜線維芽細胞特異的に欠損させたマウスでは骨破壊の抑制が認められた。このことから滑膜線維芽細胞が関節炎における破骨細胞を誘導する主たる細胞であることが支持された。

研究成果の概要(英文)：In order to functionally demonstrate in vivo which cell types drive pathogenic osteoclast differentiation we used *Tnfsf11a* floxed mice for the depletion of RANKL in T-cells and synovial fibroblasts during collagen antibody-induced arthritis (CAIA). The accurate assessment of the osteoclast erosions was performed by micro-CT analysis. Significant increases in osteoclast numbers and bone erosions were observed in the *Tnfsf11flox/ Lck-Cre* and *Tnfsf11flox/ Col2a1-Cre* groups during CAIA, however, the *Tnfsf11flox/ Col6a1-Cre* mice showed significant protection against osteoclast formation and bone erosions. Thus, it is suggested that RANKL expression by synovial fibroblasts rather than T-cells govern the osteoclast differentiation that leads to inflammation-associated joint destruction.

研究分野：骨免疫学

キーワード：破骨細胞

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(Rheumatoid Arthritis;RA)の病態では、滑膜の局所炎症が引き金となり破骨細胞が分化誘導することで骨破壊が生じると考えられている。実際、破骨細胞が存在しない遺伝子欠損マウスや先天性の破骨細胞機能不全により発症する大理石骨病患者でRAを発症した場合、滑膜炎は起こるものの骨破壊の進行が遅延することが報告されている。すなわち、RAにおける破骨細胞の分化誘導機構を明らかにすることは、RAの病態解明および新規治療戦略を考える上で大きな意味をもつと考えられる。

破骨細胞は単球・マクロファージ系の前駆細胞にRANKLのシグナルが伝わることで分化誘導される。現在、RAの関節部位における破骨細胞分化誘導機構に関して、2つの代表的な仮説が提示されている。RA関節病変に浸潤した活性化T細胞がRANKLを発現し、直接破骨細胞の分化を誘導するというT細胞仮説と、活性化T細胞が炎症性サイトカインを介して間接的に滑膜細胞のRANKL発現を亢進し、破骨細胞分化を誘導するという滑膜細胞仮説である。この論争の決着には、RANKLを細胞系譜特異的に欠損するマウスの開発が必要である。最近我々は、骨内部に存在する骨細胞が、正常時における骨破壊を担う主要な細胞であるということを示した(Nakashima et al. Nat. Med. 2011)。しかし、RAにおける骨破壊を担う細胞、即ち、破骨細胞を誘導する細胞は未だ不明であり、上記マウスの作成、解析により初めて明らかになると考えられた。

## 2. 研究の目的

種々の細胞系譜特異的RANKL遺伝子欠損マウスを世界に先駆けて作成し、関節炎の関節部位の骨破壊を引き起こす主要なRANKL発現細胞系列を決定することが、本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

本研究では、まず申請者らが独自に開発したRANKL<sup>flox</sup>マウスを用いて、リウマチ関節部位に存在する細胞に特異的に発現するCreマウスを交配させ、細胞系譜特異的RANKL遺伝子欠損マウスを作成した。具体的には、T細胞、軟骨細胞、滑膜細胞特異的Cre(それぞれLck-Cre, Col2-Cre, Col-6-Cre)マウスを用い、Cre-loxPシステムを利用したコンディショナルRANKL欠損マウスの作成を行った。次に、これらのマウスに関節炎を発症させ、関節炎の関節部位における破骨細胞分化や骨破壊のレベルをマイクロCT及び組織学的解析により評価した。これらの方法により、生体レベルで、関節炎において破骨細胞を誘導する主要な細胞系列の決定を

試みた。

## 4. 研究成果

関節炎における破骨細胞誘導細胞を決定するためのツールである、T細胞、滑膜線維芽細胞、軟骨細胞それぞれ特異的に破骨細胞誘導因子RANKLを欠損させたTnfsf11<sup>flox/Δ</sup>Lck-Cre、Tnfsf11<sup>flox/Δ</sup>Col6a1-Cre、Tnfsf11<sup>flox/Δ</sup>Col2a1-Creマウスの作成に成功した。これらのマウスにコラーゲン抗体誘導性関節炎を誘導し、骨破壊の評価を行った。組織化学染色とマイクロCTによる骨破壊の評価の結果、T細胞と軟骨細胞特異的にRANKLを欠損させたマウスではコントロールと同程度の骨破壊が認められた一方で、滑膜線維芽細胞特異的に欠損させたマウスでは骨破壊の抑制が認められた。T細胞依存性関節炎モデルであるコラーゲン誘導性関節炎においても同様の傾向が認められた。このことから滑膜線維芽細胞が関節炎における破骨細胞を誘導する主たる細胞であることが支持された。

## 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8件)

1. Danks L, Komatsu N, Guerrini MM, Sawa S, Armaka M, Kollias G, Nakashima T, Takayanagi H. RANKL expressed on synovial fibroblasts is primarily responsible for bone erosions during joint inflammation. Ann Rheum Dis. 2015 May 29. pii: annrheumdis-2014-207137. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-207137.
2. Takayanagi H. SnapShot: Osteoimmunology. Cell Metab. 2015 Mar 3;21(3):502.e1. doi: 10.1016/j.cmet.2015.02.001.
3. Komatsu N, Takayanagi H. Arthritogenic T cells in autoimmune arthritis. Int J Biochem Cell Biol. 2015 Jan;58:92-6. doi: 10.1016/j.biocel.2014.11.008
4. Takayanagi H. Osteoimmunology in 2014: Two-faced immunology-from osteogenesis to bone resorption. Nat Rev Rheumatol. 2015 Feb;11(2):74-6. doi: 10.1038/nrrheum.2014.219.

5.  
Guerrini MM, Takayanagi H.  
The immune system, bone and RANKL.  
Arch Biochem Biophys. 2014 Nov 1;561:118-23.  
doi: 10.1016/j.abb.2014.06.003.

6.  
Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, Nakashima T,  
Oh-hora M, Kodama T, Tanaka S, Bluestone JA,  
Takayanagi H.  
Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into  
TH17 cells in autoimmune arthritis.  
Nat Med. 2014 Jan;20(1):62-8. doi:  
10.1038/nm.3432.

7.  
Shinohara M, Chang BY, Buggy JJ, Nagai Y,  
Kodama T, Asahara H, Takayanagi H.  
The orally available Btk inhibitor ibrutinib  
(PCI-32765) protects against osteoclast-mediated  
bone loss.  
Bone. 2014 Mar;60:8-15. doi:  
10.1016/j.bone.2013.11.025

8.  
Danks L, Takayanagi H.  
Immunology and bone.  
J Biochem. 2013 Jul;154(1):29-39. doi:  
10.1093/jb/mvt049.

〔学会発表〕(計 40 件)

1.  
高柳広 骨免疫学  
第 50 回日本臨床分子医学会学術集会  
2013 年 4 月 12 日 東京国際フォーラム

2.  
H. Takayanagi Osteo immunology in RA  
第 57 回 日本リウマチ学会総会・学術集会/第  
22 回 国際リウマチシンポジウム  
2013 年 4 月 18 日 国立京都国際会館

3.  
高柳広 骨免疫学から見た関節リウマチ治  
療の進歩  
第 17 回奈良膠原病研究会  
2013 年 5 月 18 日 日航奈良ホテル

4.  
H. Takayanagi Novel antiresorptives -  
uncoupling or not?  
The European Calcified Tissue Society, Annual  
Congress 2013  
2013 年 5 月 21 日 ポルトガル、リスボン

5.  
高柳広 骨免疫学から見た関節リウマチの  
病態

第 31 回日本骨代謝学会学術集会・サテライ  
トシンポジウム  
2013 年 5 月 30 日 神戸国際会議場、ポートビ  
アホテル

6.  
H. Takayanagi Osteocytes and bone  
resorption  
国際骨代謝学会・日本骨代謝学会 第 2 回合  
同国際会議  
2013 年 6 月 1 日 神戸国際会議場、ポートビ  
アホテル

7.  
H. Takayanagi Osteocytes and Osteoclasts:  
Crosstalk in Osteoimmunology  
Annual European Congress of  
Rheumatology(EULAR)2013  
2013 年 6 月 13 日 スペイン、マドリッド

8.  
高柳広 関節リウマチ骨破壊と骨免疫学第  
28 回日本乾癬学会  
2013 年 6 月 29 日 ベルサール八重洲

9.  
高柳広 関節リウマチ骨破壊と骨免疫学  
OLIVE 研究会  
2013 年 6 月 7 日 リーガイロホテル大阪

10.  
H. Takayanagi Osteoimmunology The  
11th World Congress on Inflammation  
2013 年 9 月 23 日 ナタール、ブラジル

11.  
H. Takayanagi Osteoimmunology: The  
interaction of bone and immune  
systemsSimmelweis Symposium 2013  
2013 年 11 月 8 日 ブダペスト、ハンガリー

12.  
H. Takayanagi Bone cell communication  
factors Frontiers in Skeltal Biology  
2013 年 11 月 20 日 Garvan Institute of Medical  
Research シドニー、オーストラリア

13.  
高柳広 骨粗鬆症の標的としての  
RANK-RANKL 系  
第 28 回日本臨床リウマチ学会  
2013 年 11 月 30 日 幕張メッセ(千葉市)

14.  
高柳広 Osteoimmunology  
第 36 回日本分子生物学会年会 シンポジウム  
2013 年 12 月 2 日 神戸国際会議場

15.  
H. Takayanagi Osteoimmunology

第 42 回日本免疫学会学術集会  
2013 年 12 月 13 日幕張メッセ (千葉市)

16.  
H. Takayanagi Bone modeling or remodeling as a target for therapy  
IOF Regionals 4th Asia-Pacific Osteoporosis Meeting  
2013 年 12 月 14 日香港、中国 Hong Kong Convention and Exhibition

17.  
H. Takayanagi Bone Cell Communication Factors  
Gordon Research Conferences 2014 - Bones & Teeth  
2014 年 1 月 28 日 "Hotel Galvez Galveston, テキサス、アメリカ"

18.  
H. Takayanagi 骨免疫をつなぐ RANKL と Semaphorin  
RANMARK Symposium  
2014 年 1 月 24 日 ホテルグランヴィア京都

19.  
高柳広 Forefront of osteoimmunology  
歯・骨関連疾患のグローバル研究センター国際シンポジウム  
2014 年 2 月 17 日 東京医科歯科大学

20.  
高柳広 骨免疫学の最前線  
岡山免疫懇話会  
2014 年 3 月 5 日 岡山大学大学院

21.  
高柳広 RANKL シグナルと骨免疫学骨粗鬆症フロンティア  
2014 年 3 月 14 日 国立国際医療研究センター

22.  
高柳広 自己免疫性関節炎と骨免疫学大阪大学微生物病研究所アドバンスセミナー  
2014 年 5 月 12 日 大阪大学微生物病研究所、大阪

23.  
高柳広 骨免疫学から見た関節リウマチ・骨粗鬆症治療の進歩  
千葉リウマチ医の会  
2014 年 5 月 31 日 京成ホテルミラマーレ、千葉

24.  
H. Takayanagi Overview of Osteoimmunology  
The 2nd Bio Rheumatology International Congress(BRIC2014)

2014 年 6 月 6 日 AZIMUT Moscow Olympic Hotel, Russia

25.  
H. Takayanagi Cell communication in osteoimmunology  
"5th International Conference on Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems"  
2014 年 6 月 17 日 Kos, Greece

26.  
H. Takayanagi Autoimmune arthritis and osteoimmunology  
RIKEN IMS-JSI International Symposium on Immunology 2014  
2014 年 6 月 26 日 横浜ベイホテル東急、神奈川

27.  
H. Takayanagi Overview: Osteoimmunology  
第 35 回日本炎症・再生医学会  
2014 年 7 月 3 日 沖縄、万国津梁館

28.  
高柳広 関節炎における病原 T 細胞と骨免疫学  
阪大免疫塾  
2014 年 7 月 15 日 大阪大学医学部学友会館、大阪

29.  
高柳広 骨リモデリングの制御機構と新規治療法への展望  
第 32 回日本骨代謝学会学術集会  
2014 年 7 月 26 日 大阪、グランキューブ大阪 (大阪国際会議場)

30.  
H. Takayanagi Perspective on osteoimmunology  
Semaphorin osteonetwork meeting  
2014 年 8 月 10 日 Montreal, Canada

31.  
高柳広 骨免疫学の進歩  
BD 学術セミナー 2014  
2014 年 8 月 29 日 東京、マンダリンホテル

32.  
H. Takayanagi What Changes Has Osteoimmunology Brought About?ASBMR 2014 Annual Meeting  
2014 年 9 月 12 日 George R. Brown Convention Center, Houston, USA

33.  
高柳広 骨免疫学と関節炎治療の進歩日本脊椎関節炎学会 第 24 回学術集会

2014年10月4日 ナレッジキャピタルコン  
グレコンベンションセンター、大阪

34.

H. Takayanagi TH17 mediated control of  
bone

2nd IMMUNOBONE International Symposium  
2014年10月13日 Potsdam, German

35.

高柳広 骨免疫の最前線

第57回秋季日本歯周病学会学術大会

2014年10月19日 神戸、神戸国際展示場

36.

H. Takayanagi Immune complex and  
osteoclast

New York osteoimmunology conference

2014年10月30日 NY、アメリカ

37.

H. Takayanagi Bone cell communication  
and osteoimmunology

The 3rd Cold Spring Harbor Asia conference -  
Frontiers of Immunology in Health and Diseases

2014年11月5日 上海、中国

38.

高柳広 関節リウマチ骨破壊と骨免疫学日  
本関節病学会

2014年11月7日 虎ノ門ヒルズ、東京

39.

Lynett Danks H. Takayanagi

"RANKL expressed on synovial fibroblasts is  
primarily responsible for bone erosions during  
joint inflammation

""The Fourth Bizan Immunology Symposium at  
University of Tokushima (BISUT4)

"Immune System Development, Deviation, and  
Regulation"

2015年1月29日 徳島、徳島大学蔵本キャン  
パス 藤井メモリアルホール

40.

Lynett Danks、高柳広

RANKL expressed on synovial fibroblasts is  
primarily responsible for bone erosions during  
joint inflammation

第9回炎症・脂質代謝・メタボリサーチフォー  
ラム

2015年2月28日 東京大学

〔図書〕(計7件)

1.

高柳広

医歯薬出版社 別冊「医学のあゆみ」骨免疫  
学 研究最前線 2013年7ページ

2.

高柳広

メディカルレビュー社"THE BONE, 27(3),  
2013年2ページ

3.

小松紀子、高柳広

日本臨床社 日本臨床 増刊号、72(suppl.3):  
2014年5ページ

4.

小松紀子、高柳広

羊土社 実験医学、32(8):

2014年4ページ

5.

高場啓之、高柳広

医歯薬出版社 "医学のあゆみ

2014年1ページ

6.

寺島明日香、高柳広

医歯薬出版社 別冊医学のあゆみ 骨粗鬆  
症—研究と臨床の最新動向

2014年7ページ

7.

小野 岳人、高柳広

ライフメディコム 月刊カレントセラピー、  
32(10) 2014年7ページ

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

研究室 HP

<http://osteimmunology.com/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高柳広 (Takayanagi Hiroshi)  
東京大学大学院 医学系研究科 免疫学  
教授

研究者番号 : 20334229

(2)研究分担者  
なし ( )

研究者番号 :

(3)連携研究者  
( )

研究者番号 :