

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670780

研究課題名(和文)免疫調節膜表面分子Tim-3を介する病的骨破壊制御

研究課題名(英文)Regulation of pathological bone destruction via transmembrane immune regulator Tim-3

研究代表者

久木田 敏夫(Kukita, Toshio)

九州大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70150464

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):正常ラットに於けるTim-3の発現を検討したところ、破骨細胞とその前駆細胞でTim-3が発現することを見出した。リガンドであるガレクチン9の発現は骨髄の骨近傍に限局して認められた。アジュバント関節炎マウスの骨破壊部位でのTim-3とガレクチン9の発現はいずれも骨髄腔全域に渡って認められた。試験管内での破骨細胞分化系にガレクチン9を添加すると、破骨細胞形成が顕著に阻害された。アジュバント関節炎ラットの距腿関節近傍にガレクチン9を投与したところ、炎症性骨破壊が顕著に抑制された。Tim-3/ガレクチン9システムを介した炎症性骨破壊制御が可能であることが分かった。

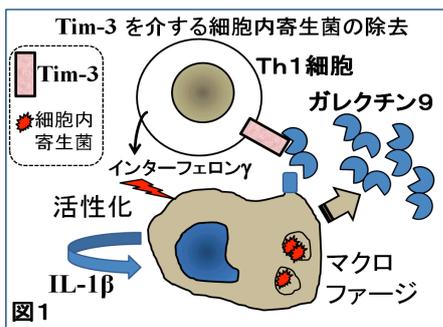
研究成果の概要(英文):The purpose of this study is to analyze the expressional change of the Tim-3 and its ligand galectin-9 in the process of inflammatory bone destruction. In normal rats, Tim-3 expression was well consistent with the location of osteoclasts and their mononuclear precursors. Expression of Tim-3 ligand galectin-9 was detected in the bone marrow periphery facing to the bone surface. In contrast, expression of Tim-3 and its ligand galectin-9 was detected in whole areas of marrow cavity. To know the function of Tim-3 in osteoclastogenesis, galectin-9 was added to the cultures of evaluating osteoclast differentiation in vitro. Galectin-9, markedly inhibited osteoclastogenesis. When galectin-9 was injected around the ankle joint of the rats with adjuvant-induced arthritis, inflammatory bone destruction was marketly suppressed. This research shows the possibility of developing a novel therapy using an new regulatory system of Tim-3/galectin-9.

研究分野：骨免疫学

キーワード：炎症性骨破壊 免疫制御 アジュバント関節炎 Tim-3 ガレクチン9 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

生体内でアポトーシスなどにより死滅した細胞はマクロファージなどの食細胞により速やかに処理される。また、感染により細胞内寄生菌を保有するマクロファージはヘルパーT細胞であるTh1細胞によって処理される。Tim-3 (T cell immunoglobulin and mucin domain 3) という分子がこのような生体防御において重要な働きを演ずることが分かってきた。Tim-3は細胞質領域にチロシンリン酸化部位を持つ膜表面分子である。この分子は炎症において重要な役割を担うTh1細胞が高発現する膜表面分子として発見され (Monnery et al. *Nature*, 2002)、Th1による免疫反応の負の制御因子として機能する分子であることが分かっている (Aanchez-Fueyo et al. *Nature Immunol*, 2003)。Tim-3の通常のリガンドはガレクチン9である。細胞内寄生菌を保有するマクロファージは活発にガレクチン9を分泌し周辺に



集まってきたTh1細胞を刺激し、Th1から分泌された因子により、そのマクロファージが活性化され細胞内寄生菌が除去される (図1)。また、癌の周囲に集積した樹状細胞にはTim-3が高発現されており、癌に対する自然免疫を調節している。この場合、癌細胞から放出されたDNA結合タンパク質HMGB1がTim-3のリガンドとして作用する (Chiba et al. *Nature Immunol*. 13:832, 2012)。歯周病や関節炎に伴う炎症性骨吸収や癌骨転移による病的骨吸収においてもTim-3を介した制御が関わっていると考えられる。申請者等は本研究の申請時に、ガレクチン9が破骨細胞分化を抑制することと破骨前駆細胞がTim-3を発現することに関するプレリミナリーなデータを得ていた。

2. 研究の目的

本研究では生体防御の鍵を握る膜表面分子であるTim-3とそのリガンドの病的骨破壊の現場における時間空間的発現変動を解析するとともに、Tim-3シグナル伝達のイメージング解析を行い、最終的にはTim-3を介し

た骨破壊制御を行うことを目的とする。

具体的には次の事柄を行う。1) 骨破壊 (関節炎及び癌の骨転移に伴う病的骨吸収) に伴うTim-3とそのリガンドの時間空間的発現変動解析。2) 破骨細胞分化におけるTim-3情報伝達の生細胞を用いたイメージング解析。3) Tim-3のチロシンリン酸化部位変異体を用いた制御。4) Tim-3リガンドの投与、及び遺伝子発現ノックダウンによる病的骨破壊制御。本研究によりTim-3を介した新しい骨吸収制御法が確立されるものと思われる。

3. 研究の方法

Tim-3とそのリガンドの病的骨破壊の現場 (関節炎モデル及び癌の骨転移モデル) における時間空間的発現変動についてイメージング解析を行う。試験管内での破骨細胞分化系においてもTim-3の発現を経時的に解析し、ガレクチン9などのリガンドによる分化及びアポトーシスに対する効果を検討する。試験管内でのTim-3特異的siRNAによるノックダウン解析を行った後、病的骨吸収の系を用いてTim-3の発現ノックダウンを行い、病的骨破壊の場でのTim-3の制御能を検討する。 μ CTによる骨形態計測及び分子組織学的な解析を行う。FRET解析を行うことにより破骨細胞分化におけるTim-3情報伝達を直接的に観察する。更に、情報伝達の特異性をTim-3のチロシンリン酸化部位変異体を用いて確認する。

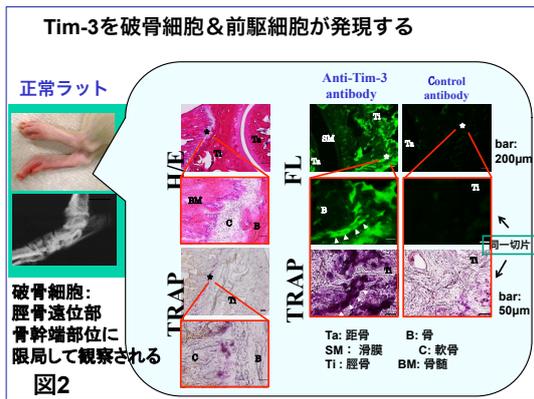
4. 研究成果

生体におけるTim-3・ガレクチン9の発現

本研究では炎症性骨破壊の場におけるTim-3の役割を分子組織学的に解析し、Tim-3及びそのリガンドを標的とした破骨細胞分化制御及び骨破壊制御について検討した。

アジュバント関節炎ラットの炎症性骨破壊部位においてTim-3陽性細胞が骨髓腔の広範囲に渡って観察され、骨破壊部位に多数のTim-3陽性細胞が集まっていることが分かった。正常ラットの同部位におけるTim-3の発現を検討したところ、破骨細胞にほぼ一致してTim-3の発現が認められた (図2)。一方、リガンドのガレクチン9の骨組織における局在性を検討したところ、関節炎ラットでは骨髓腔の全域に渡るガレクチン9の発現を確認することができた。正常ラットでは骨に

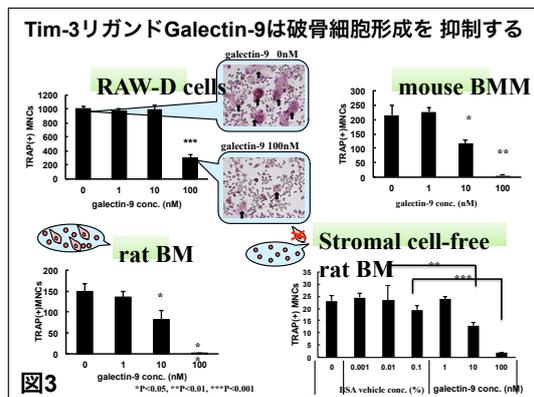
近い・狭い帯域でのガレクチン9の発現を認めた。これらの結果より、生体内に内在性の



制御システム Tim-3/ガレクチン9のシステムが存在することが強く示唆された。

試験管内破骨細胞分化系における Tim-3 の発現とガレクチン9による分化制御

免疫染色、定量的rtPCR法、ウェスタンブロットリング法を用いて、Tim-3の破骨細胞分化に伴う発現を試験管内分化系を用いて検討した。Tim-3の発現は培養初期の単核の前駆細胞から認められ、分化に伴い発現レベルが上昇した。多核の破骨細胞でも発現が認められた。この破骨細胞及び破骨細胞前駆細胞におけるTim-3の機能を推定するために、リ



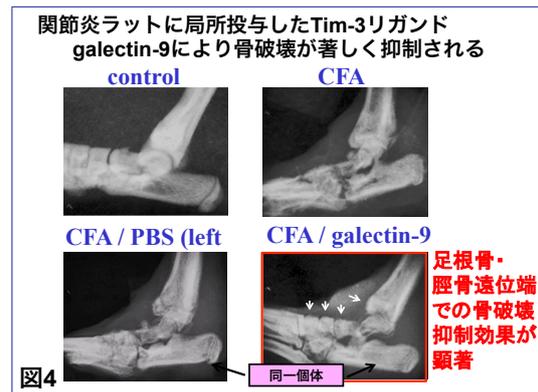
ガンドであるガレクチン9を試験管内破骨細胞分化系に添加したところ、破骨細胞の形成が著しく阻害された。マウス前駆細胞株RAW-D細胞、マウス骨髄細胞、ラット骨髄細胞のいずれの系においてもガレクチン9による同様な破骨細胞形成抑制が認められた(図3)。

尚、ガレクチン9による破骨細胞分化抑制のシグナルについては検討を続けており、興味深い知見が得られており、結果がまとまり次第、学術雑誌に投稿する予定である。

炎症性骨破壊のガレクチン9による制御

ヒト関節リウマチのモデルであるラットアジュバント関節炎の炎症性骨破壊の系を用いて、Tim-3リガンドであるガレクチン9の炎症性骨破壊に対する効果を検討した。

アジュバント関節炎により脛骨遠位端や足根骨には著しい骨破壊が起こるが、ガレクチン9を距腿関節周囲に投与すると、骨破壊が顕著に抑制された(図4)。



結論

生体内にTim-3/ガレクチン9の制御システムが存在することが分かった。Tim-3のリガンドのひとつであるガレクチン9を投与することにより炎症性骨破壊を効率良くブロックすることができた。

生体内に存在するTim-3/ガレクチン9のような免疫システムを利用した炎症性破壊の抑制が今後、可能になるものと思われる。

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 3件)

Kukita T., Takahashi A., Zhang J-Q., Kukita A. Membrane nanotube formation in osteoclastogenesis. In "Cell Fusion" Methods Mol Biol, Ed. Pfannkuche K. Springer N.Y. USA 1313:193-202, 2015.

Moriyama K., Kukita A., Li Y-J., Uehara N., Zhang JQ., Takahashi I., Kukita T. Regulation of osteoclastogenesis through Tim-3/galectin-9 system in the modulation of inflammatory bone destruction. Lab. Invest. 94:1200-1211, 2014.

Takano T., Li Y-J., Kukita A., Yamaza T., Ayukawa Y., Moriyama K., Uehara N.,

Nomiyama H., Koyano K, Kukita T.
Mesenchymal stem cells markedly suppress
inflammatory bone destruction in rats with
adjuvant-induced arthritis. Lab. Invest.
94:286-296, 2014.

[学会発表] (計 2件)

森山加奈子、久木田明子、上原範久、久木田敏夫. 免疫調節膜表面分子 Tim-3 の破骨細胞での発現と炎症性骨破壊制御. 第56回歯科基礎医学学会 (2014年9月、福岡)

森山加奈子、久木田明子、上原範久、久本由香里、高橋一郎、久木田敏夫. 免疫調節分子を介する炎症性骨破壊制御. 第32回日本骨代謝学会 (2014年7月、大阪)

[図書] (計 1件)

Qu P-F., Kukita A., Li Y-J., Moriyama K., Lei L., Kukita T. Involvement of deoxyadenosine and adenosine deaminase in the Methotrexate-induced suppression of inflammatory bone destruction. Chapter 5: In "Adenosine Receptors: Pharmacology, Functions and Therapeutic Aspects" Ed. Kasandra Warrick, NOVA hardcover edited collection (by Selected Invited only). 2915.

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久木田 敏夫

(九州大学大学院歯学研究院教授)

研究者番号：70150464

(2) 研究分担者

久木田 明子

(佐賀大学医学部准教授)

研究者番号：30153266

(3) 連携研究者

()

研究者番号：