

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25713063

研究課題名(和文) RANKL/Fasを介した関節リウマチにおける骨軟骨破壊機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of bone and cartilage destruction mechanism via RANKL/Fas signaling in rheumatoid arthritis

研究代表者

井澤 俊 (IZAWA, Takashi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号：30380017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はRANKLシグナルとFasシグナルのクロストークの解明から、破骨細胞の活性化・維持機構を明らかにするとともに、関節リウマチ(RA)病変へのRANKL/Fasシグナルクロストークが及ぼす影響の解明と新たなRA診断・治療法を開発することである。RA自然発症モデルマウスであるFas遺伝子欠損MRL/lprマウスを用いてその破骨細胞の機能解析を行い、同マウスでの破骨細胞の機能亢進が、骨および軟骨破壊を伴うRA病態で重要な役割を果たしていること、RANKL/Fasシグナルクロストークが破骨細胞の分化および活性化、S1Pを介した破骨細胞前駆細胞の遊走能機能を制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the functions of osteoclasts (OCs) from Fas-mutant MRL/lpr mice, murine model for rheumatoid arthritis (RA). In vitro and in vivo experiments showed hyperfunction of MRL/lpr OCs. Furthermore, the migratory response of MRL/lpr OC precursors to S1P was significantly enhanced. The hyper function of OCs in MRL/lpr mice play a potent role in the pathogenesis for RA with bone and cartilage destruction. Crosstalk between RANK/RANKL signaling and Fas/FasL signaling of OCs may regulate the differentiation and migratory function of OC precursors.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯学 歯科矯正学 免疫学 病理学 細胞・組織 シグナル伝達 関節リウマチ 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(Rheumatoid Arthritis: RA)は多発性関節炎を主徴とする原因不明の自己免疫疾患の一つで、顎関節においても高頻度に症状を伴うことが多い。特に成長期の患者において若年性 RA 患者においては成長中の下顎頭における骨・軟骨破壊が下顎の後退など顎変形症を誘発する原因となる可能性が指摘されその破壊機構を解明することが歯科臨床の一助となることから、その基礎的背景を明らかにすることがきわめて重要となる。近年 RANKL の発見によって破骨細胞の分化・活性化機構の解明が急速に進歩してきており免疫系細胞が RA における骨代謝や骨・軟骨破壊機構に密接に関与していることが報告されている。しかしながら、同疾患における全身の関節骨および軟骨破壊機構に関する検索は行われているものの、顎関節に関する詳細な検索は行われていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、RA の自然発症モデルとして知られる Fas 遺伝子欠損 MRL/ *lpr* マウスの破骨細胞のアポトーシス・細胞骨格・前駆細胞の遊走能などといった機能を詳細に解析するとともに、RA における顎関節病態と照らし合わせることで、病因論に基づいた、RA 診断・新規治療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 実験動物：MRL/ *lpr* マウスおよび対照マウス (MRL+/+) を用いた。
- (2) マイクロ CT 解析：MRL/ *lpr* マウスの下顎頭、膝関節を分離しマイクロ CT にてマウス間で顎関節を含む全身の関節および骨格の骨密度を詳細に解析し、生体内、特に骨代謝における Fas/FasL システムの意義を探索。
- (3) 病理組織学的解析：各種疾患モデルマウスの顎関節部を摘出・脱灰後、H&E 染色、TRAP 染色、サフラニン・トルイジンブルーによる染色を行い骨組織の形態解析を実施する。また各種免疫染色により顎関節における RA に関与する分子の同定を実施する。
- (4) マウス破骨細胞誘導：マウス大腿骨骨髓腔から骨髓細胞を採取し、洗浄後、10%FBS 含有 α -MEM にて 5×10^5 /ml の細胞濃度となるよう調節し、100 mm dish に播種した。マウスリコンビナント M-CSF を添加した培地にて、7 日間培養し、破骨細胞へと分化誘導した。
- (5) マウス破骨前駆細胞誘導：破骨細胞誘導と同様に、マウス骨髓細胞を採取し、M-CSF 添加培地にて 3 日間培養後、さらに M-CSF および RANKL 添加培地にて 3-4 日間培養し、破骨前駆細胞へと分化誘導

した。

- (6) 上記のプロトコールにより得られた試料をもとに、骨吸収活性測定 (Pit assay)、RT-PCR 分析、蛍光免疫染色を実施した。
- (7) 破骨細胞前駆細胞遊走能解析：マウス大腿骨骨髓腔から骨髓細胞を採取し、破骨細胞前駆細胞をトランスウエルメンブレン上に播種し、S1P に対して遊走した細胞がトランスウエルメンブレンを通過し、プレート上に移動した細胞数を蛍光プレートリーダーを用いて測定した。

4. 研究成果

(1) MRL/ *lpr* マウス下顎骨頭部のマイクロ CT 像：8 週齢および 16 週齢の MRL/ *lpr* では同週齢の対照マウスと比較して、下顎頭部での海綿骨密度や皮質骨厚が低下し、骨粗鬆症様の所見が認められた。また、骨密度、骨梁幅、骨梁数が有意に減少し、骨梁間隔が有意に増加した。また関節表面の粗造化がみられた。

(2) MRL/ *lpr* マウス下顎骨頭部の破骨細胞活性亢進：MRL/ *lpr* マウス顎関節部の TRAP 陽性破骨細胞数をカウントした結果、MRL+/+マウスと比較して著しい TRAP 活性亢進がみられ骨粗鬆症様の所見が確認された。さらに下顎頭部より抽出した RNA を解析したところ RANKL, MMP-9, VEGF の発現亢進を認めた。一方で OPG の発現は著しく低下しており RANKL/OPG 比は高い値を示した。これらの結果は下顎頭の下骨部免疫染色においても同様の傾向がみられた。

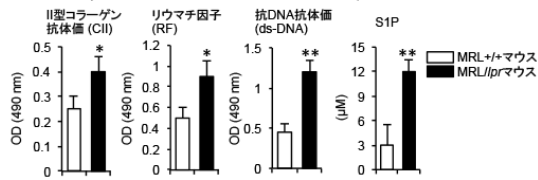
(3) MRL/ *lpr* マウス in vitro 破骨細胞形成能の上昇：MRL/ *lpr* マウス骨髓由来破骨細胞の分化能および骨吸収能：MRL/ *lpr* マウス由来破骨細胞の分化能は対照マウス MRL+/+マウス由来の細胞と比較して亢進しており、骨吸収能も亢進していた。破骨細胞の分化誘導に関わる遺伝子 (NFATc1, TRAP, Cathepsin K, c-Fos, Integrin α_3) の発現量は、MRL/ *lpr* マウス由来破骨細胞において有意に亢進していた。MRL/ *lpr* マウス由来破骨前駆細胞では RANKL 刺激により NF- κ B (pI B, p-p65) の強い核内への移行がみられた。

(4) MRL/ *lpr* マウス軟骨層の非薄化：MRL/ *lpr* マウス顎関節部の軟骨層をサフラニン O 染色にて解析したところ 8 週齢、16 週齢いずれにおいても軟骨層の非薄化を認めた。下顎頭軟骨部の免疫染色において MMP-13, ColIX の発現亢進、一方で Col2a1, aggrecan, Sox9 の発現低下が MRL/ *lpr* マウスにおいてみられたことより軟骨分化能の低下が示唆された。

(5) 自己免疫疾患などの炎症状態では血液中のスフィンゴリン脂質の一つ S1P 濃度が上昇することが報告されている。そこで MRL/ *lpr* マウス関節滑液中の S1P 産生量を ELISA 法に

て解析したところ MRL+/+マウスと比較し、抗 II 型コラーゲン抗体、リウマチ因子、抗 DNA 抗体の上昇とともに有意に上昇傾向が確認できた(図)。さらに下顎頭下骨部免疫染色において SphK1 および S1P₁ 発現の著しい亢進がみられた。

図: MRL/lprマウス滑液におけるS1P産生増加 (ELISA法)



(6)MRL/lpr マウス骨髄由来破骨細胞前駆細胞遊走能: MRL/lpr マウス由来破骨前駆細胞において S1P に対する細胞遊走能について解析を行ったところ対照マウス MRL+/+マウス由来細胞と比較して遊走能の著しい亢進を認めた。また S1P₁ および S1P₃ 拮抗薬である FTY720 にて前処理した MRL/lpr マウス由来破骨前駆細胞は S1P 刺激下においても遊走能の低下がみられ、S1P₃ 阻害薬である Suramin 前処理では変化を認めなかったため S1P₁ が MRL/lpr マウス由来破骨前駆細胞の遊走能に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

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4件)

1. Mansjur KQ, Kuroda S, Izawa T, Maeda Y, Sato M, Watanabe K, Horiuchi S, Tanaka E. The Effectiveness of Human Parathyroid Hormone and Low-Intensity Pulsed Ultrasound on the Fracture Healing in Osteoporotic Bones. *Annals of Biomedical Engineering* 査読有, 2016, in press. doi:10.1007/s10439-015-1533-y
2. Izawa T, Mori H, Shinohara T, Mino-Oka A, Hutami IR, Iwasa A, Tanaka E. Rebamipide attenuates mandibular condylar degeneration in a murine model of TMJ-OA by mediating a chondroprotective effect and by downregulating RANKL-mediated osteoclastogenesis. *PLoS One* 査読有, Vol. 11, 2016, e0154107. doi: 10.1371/journal.pone.0154107.
3. Izawa T, Rohatgi N, Fukunaga T, Wang QT, Silva MJ, Gardner MJ, McDaniel ML, Abumrad NA, Semenkovich CF, Teitelbaum SL, Zou W. ASXL2 Regulates Glucose, Lipid, and Skeletal Homeostasis. *Cell Reports* 査読有, Vol.11, 2015, pp1625-1637. doi:

10.1016/j.celrep.2015.05.019.

4. Mori H, Izawa T, Tanaka E. Smad3 deficiency leads to mandibular condyle degradation via the sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P3 signaling axis. *The American Journal of Pathology* 査読有, Vol.185, 2015, pp2742-2756. doi:10.1016/j.ajpath.2015.06.015.

[学会発表](計15件)

1. 井澤 俊、森 浩喜、篠原 丈裕、三野 彰子、塩田 智子、岩浅 亮彦、田中 栄二: 変形性顎関節症モデルマウスにおけるレパミピドの治療効果の検討. 第74回日本矯正歯科学会大会、2015年11月18-20日、福岡県福岡市(福岡国際会議場)。
2. 森 浩喜、井澤 俊、三野 彰子、岩浅 亮彦、内田 玲子、田中 栄二: S1P/Smad3 シグナルクロストークを介した変形性顎関節症の病態メカニズムの解明. 第74回日本矯正歯科学会大会、2015年11月18-20日、福岡県福岡市(福岡国際会議場)。
3. 三野 彰子、井澤 俊、篠原 丈裕、森 浩喜、森 博世、岩浅 亮彦、田中 栄二: マウス下顎頭軟骨の形成、維持における HIF-1 の機能解析. 第74回日本矯正歯科学会大会、2015年11月18-20日、福岡県福岡市(福岡国際会議場)。
4. 篠原 丈裕、井澤 俊、三野 彰子、森 浩喜、七條 なつ子、犬伏 俊博、田中 栄二: 実験的な変形性顎関節症モデルマウス下顎頭におけるヒアルロン酸の役割. 第74回日本矯正歯科学会大会、2015年11月18-20日、福岡県福岡市(福岡国際会議場)。
5. Mori H, Izawa T, Tanaka E. Smad3 deficiency leads to mandibular condyle degradation via the Sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P3 signaling axis. American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) Annual Meeting, Oct 9-12, 2015, Seattle, WA, USA (Washington State Convention Center).
6. 白井 愛実、川合 暢彦、森 博世、七條 なつ子、Bayarsaikhan Od、篠原 丈裕、井澤 俊、木内 奈央、田中 栄二: 徳島大学病院矯正歯科における顎変形症患者の臨床統計学的検討(第2報). 第58回中・四国矯正歯科学会大会2015年7月12日、香川県高松市(サンポートホール高松)。
7. 井澤 俊、森 浩喜、篠原 丈裕、岩浅 亮彦、田中 栄二: 変形性顎関節症モデルマウスにおけるレパミピドの治療効果の検討. 第28回日本顎関節学会総会・学術大会2015年7月4-5日、愛知県名古屋市(名古屋国際会議場)。
8. 森 浩喜、井澤 俊、田中 栄二: 変形性顎

- 関節症の病態形成における S1P/Smad3 シグナルの役割. 第 28 回日本顎関節学会総会・学術大会 2015 年 7 月 4-5 日、愛知県名古屋市 (名古屋国際会議場).
9. 森 浩喜、井澤 俊、田中 栄二：変形性顎関節症の病態形成における S1P/Smad3 シグナルの役割. 第 73 回日本矯正歯科学会大会、2014 年 10 月 21-22 日、千葉県千葉市 (幕張メッセ).
 10. Rohatgi N, Izawa T, Fukunaga T, Wang QT, Silva M, Gardner M, McDaniel M, Semenkovich C, Zou W, Teitelbaum S: ASXL2 regulates Skeletal, Glucose and Lipid Homeostasis. American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) Annual Meeting, Sep 12-13, 2014, Houston, Texas, USA (George R. Brown Convention Center).
 11. 森 浩喜、井澤 俊、田中 栄二：変形性顎関節症の病態形成における Smad3 の役割. 第 27 回日本顎関節学会総会・学術大会 2014 年 7 月 19-20 日、福岡県福岡市 (九州大学医学部百年講堂).
 12. 篠原 丈裕、渡邊 佳一郎、森 浩喜、井澤 俊、堀内信也、黒田晋吾、田中 栄二：顎関節内障を有する骨格性下顎前突症に対する矯正歯科治療の一治験例. 第 57 回中・四国矯正歯科学会大会 2014 年 7 月 3 日、山口県宇部市 (宇部市文化会館).
 13. 岩浅 亮彦、石丸 直澄、井澤 俊、徳永 律子、工藤 保誠、田中 栄二：アロマターゼ遺伝子欠損マウスにおけるシェーグレン症候群様病変と肥満との関連. 第 72 回日本矯正歯科学会大会、2013 年 10 月 8-9 日、長野県松本市 (松本市総合体育館).
 14. 井澤 俊、森 浩喜、堀内 信也、川合 暢彦、田中 栄二：ブタ下顎頭軟骨および関節窩軟骨の動的粘弾性特性解析. 第 26 回日本顎関節学会総会・学術大会 2013 年 7 月 20-21 日、東京都千代田区 (学術総合センター 一橋記念講堂).
 15. 森 浩喜、渡邊 佳一郎、内田 玲子、井澤 俊、黒田 晋吾、森 仁志、田中 栄二：圧迫骨短縮術を施したエナメル質形成不全を伴う骨格性開咬の一治験例. 第 56 回中・四国矯正歯科学会大会 2013 年 7 月 7 日、岡山県倉敷市 (倉敷市民会館).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井澤 俊 (IZAWA, Takashi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号：30380017