

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870468

研究課題名(和文)食細胞シグナル伝達異常症由来iPS細胞の樹立と骨リモデリングの解析

研究課題名(英文)Analysis of bone remodeling using iPS cells derived from the patients with phagocyte signal transduction defects

研究代表者

津村 弥来(Tsumura, Miyuki)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・研究員

研究者番号：80646274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：食細胞機能異常症であるIFN- R1およびSTAT1欠損症は、MSMDに分類される原発性免疫不全症である。多発性骨髄炎の合併はMSMDの80%でみとめられる臨床的特徴の一つで、経験した症例も骨髄炎とそれに伴った骨融解像を認めている。破骨細胞は多核の組織マクロファージであり、骨髄球系/単球系細胞から分化する。IFN- は破骨細胞形成の強力な抑制因子であるが、ヒトにおいて抑制の分子機序は明らかにされていない。本研究では、食細胞機能異常症由来の細胞を用いて、IFN- による破骨細胞の形成と機能への影響について解析し、IFN- による破骨細胞の抑制機構の破綻により骨病変を呈することが推測された。

研究成果の概要(英文)：The loss-of-function formed IFN- R1 and STAT1 deficiency presents mendelian susceptibility to mycobacterial diseases (MSMD). Osteomyelitis is a bone infection by bacteria and other microorganism, and is one of clinical features presented in more than 80% of patients with MSMD. Osteoclasts, bone-resorbing multinuclear cells, are derived from myeloid/ monocyte lineage. IFN- is known to strongly suppress osteoclast formation in mice. However, the mechanism and the function of IFN- still remains unclear. In this study, we analyzed the formation of osteoclasts and the function of osteoclast using the mononuclear phagocytes of IFN- R1 and STAT1 deficient patients. Our results strongly show the augmented osteoclast formation and their function in patients with MSMD through the deficiency to IFN- -STAT1 signal. The IFN- -STAT1 signal transduction system in mononuclear phagocytes may play an important role in the presentation of multiple bone lesions in MSMD patients.

研究分野：免疫不全

キーワード：食細胞異常 骨髄炎 破骨細胞 IFN- STAT1 IFN- R1

## 1. 研究開始当初の背景

メンデル遺伝型マイコバクテリア易感染症 (Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases; MSMD) は、BCG, 非結核性抗酸菌, 結核菌, サルモネラなどの細胞内寄生菌に対して易感染性を示す原発性免疫不全症である。MSMD は INF- $\gamma$ R1, INF- $\gamma$ R2, IL 12 p 40 および IL 12R $\beta$ 1, STAT1 などの INF- $\gamma$ , IL-12 産生とそのシグナル伝達に關与する分子の先天異常であり、常染色体劣性, 常染色体優性等, 種々の遺伝形式が報告されている。INF- $\gamma$  のシグナル伝達異常は主として単球/マクロファージ系: 食細胞で認められる。多発性骨髄炎の合併は MSMD の約 80% でみとめられる臨床的特徴のひとつであり、当科で経験した症例もすべて骨髄炎とそれに伴った骨融解像が認められた。

破骨細胞は骨リモデリングにおいて骨吸収を行う多核の組織マクロファージであり、骨髄球系/単球系細胞の分化・融合で産生される。INF- $\gamma$  は破骨細胞形成の強力な抑制因子として知られているが、ヒトにおいて抑制の分子機序は明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

MSMD 患者に認められる骨融解の機序として INF- $\gamma$  シグナル伝達が關与している可能性が考えられる。本研究では、食細胞機能異常症(常染色体優性遺伝型 INF- $\gamma$ R1 および STAT1 異常症)由来の骨髄および iPS 細胞を用いて、INF- $\gamma$  による破骨細胞の形成と機能への影響について解析し、ヒト破骨細胞における INF- $\gamma$ -STAT1 シグナルの役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 骨髄における TRAP 陽性破骨細胞局在の確認: 健常者および MSMD を発症した STAT1, INF- $\gamma$ R1 異常症患者より採取した骨髄生検で破骨細胞特異的のマーカーである TRAP 陽性多核細胞を觀察し、破骨細胞の存在を検討した。

(2) INF- $\gamma$  による破骨細胞の形成および機能への影響: 骨髄単核球を GM-SCF, IL-3, SCF 存在下メチルセルロース培地で 12 日間培養し、破骨細胞の前駆細胞の元となる CFU-GMs を形成させた。コロニーを回収し、M-CSF, RANKL を添加した 10%FBS 含有 MEM- $\alpha$  培地で破骨細胞に分化誘導した。この際、濃度依存的に INF- $\gamma$  で刺激し、破骨細胞の形成と機能への影響を検討した。TRAP 染色・活性および破骨細胞の主要転写因子である NFATc1 の発現動態により形成能を、象牙切片の吸収により機能を解析した。

(3) INF- $\gamma$  により制御を受ける破骨細胞内分子機構の解析:

TRAF6 蛋白質発現動態の検討; 破骨細胞

形成培養 0, 1, 3 日目の細胞を抽出し、ウエスタンブロットにて TRAF6 の蛋白発現を解析した。

c-Fms, RANK 遺伝子発現の検討; 破骨細胞形成培養 3 日目の細胞より RNA を抽出し、c-Fms および RANK の遺伝子発現をリアルタイム PCR で解析した。

(4) ヒト由来 iPS 細胞を用いた破骨細胞への分化誘導:

オンフィーダー培養系による破骨細胞の分化誘導: VEGF を添加した 10% FBS 含有 IMDM 培地でマウス AGM-3S フィーダー細胞上の iPS 細胞を造血系へと分化した。培養 12 日目に CD34 陽性細胞を採取し、GM-SCF, IL-3, SCF 存在下メチルセルロース培地で 14 日間培養し、CFU-GMs, CFU-Ms を形成させた。コロニーを回収し、M-CSF, RANKL を添加した 10%FBS 含有 MEM- $\alpha$  培地で破骨細胞に分化誘導した。

フィーダーレス培養系による破骨細胞の分化誘導: PLoS One., 8(4):e59243., 2013 を参考に、マトリゲルコーティング上で iPS 細胞を誘導させた。BMP4 を添加した mTeSR1 培地で 4 日間培養し、原始線条様細胞に分化誘導させ、その後 2 日間 VEGF, basic FGF, SCF を添加した StemPro-34 培地で培養し、KDR, CD34 陽性ヘマンジオブラスト様の細胞に誘導した。SCF, IL-3, TPO, M-CSF, Flt-3L 添加 StemPro-34 培地に於て一週間培養し、Flt-3L, GM-CSF 添加 StemPro-34 培地で約 5 日間培養後、CD14 陽性単球系細胞を採取し、M-CSF, RANKL 存在下破骨細胞へ分化誘導させた。

## 4. 研究成果

(1) 健常者では TRAP 陽性細胞はみとめられなかったが、STAT1 および INF- $\gamma$ R1 異常症の骨髄炎病巣では TRAP 陽性破骨細胞が存在していた。よって患者でみとめられる骨溶解像は破骨細胞の過形成によることが示唆された。

(2) TRAP 染色および培養上清中の分泌 TRAP 活性の検討から INF- $\gamma$  による破骨細胞形成への影響を調べた。健常者由来の破骨細胞は低濃度の INF- $\gamma$  で破骨細胞形成が抑制された。一方で INF- $\gamma$ R1, STAT1 異常症ともに破骨細胞形成の抑制が障害されており、抑制にはより高濃度の INF- $\gamma$  が必要であった。また破骨細胞の形成には主要転写因子である NFATc1 の発現上昇が不可欠であり、INF- $\gamma$  によりその発現は低下することが知られている。破骨細胞形成 3 日目の細胞で検討したところ、患者では INF- $\gamma$  による NFATc1 の発現低下が著名に障害されていた。象牙切片の骨吸収により破骨細胞の機能を評価したところ、患者由来破骨細胞は健常者と比べて高濃度の INF- $\gamma$  でも吸収促進がみとめられた。In vitro 実験系の結果から患者では INF- $\gamma$  に

対して破骨細胞形成抑制とともにその機能抑制も低下していることが明らかとなった。

(3) IFN- $\gamma$  により制御を受ける破骨細胞内分子メカニズムを明らかにするため、過去の報告を参考に検討した。

破骨前駆細胞に RANKL の刺激が入るとアダプター分子である TRAF6 を介して下流にシグナルが伝達され破骨細胞形成が促進する。Stat1 ノックアウトマウスの検討から、IFN- $\gamma$  刺激による Stat1 を介した TRAF6 蛋白の急速な分解により破骨細胞形成を抑制することが報告されている (Nature., 408:600-605., 2000)。ヒトでも同様の所見がみとめられるか健常者および患者由来の破骨細胞を用い、経時的・IFN- $\gamma$ 濃度依存的な TRAF6 蛋白発現量の変化を検討した。健常者、患者ともに IFN- $\gamma$ 刺激による TRAF6 蛋白発現の低下は認められなかった。従ってヒトにおいては IFN- $\gamma$  刺激による破骨細胞分化と機能の抑制に TRAF6 の関与するシグナル伝達系以外の抑制機構が存在している可能性が考えられた。

健常者末梢血 CD14 陽性細胞を用いた検討から、破骨細胞誘導に必須の M-CSF, RANKL のレセプターである c-Fms, RANK の遺伝子発現が IFN- $\gamma$ により低下することで破骨細胞形成が抑制されることが報告されている (J Immunol., 183:7223-7233., 2009)。同様の実験を行ったところ、IFN- $\gamma$ による c-Fms, RANK 発現低下は健常者と患者で同程度であり、両者に差は認めなかった。このことから、IFN- $\gamma$ R1 や STAT1 を介する別の破骨細胞抑制分子機構の存在が推測された。

(4) 研究期間内に患者由来の iPS 細胞の樹立できなかった。本研究では健常者由来の iPS 細胞を用いた破骨細胞への分化誘導法の確立を目指した。

当研究室では、iPS 細胞から好中球への分化誘導に成功しているため、同様の方法でマウス AGM-3S 上で iPS 細胞を誘導させ、CD34 陽性細胞を採取した。CFU-GMs の培養までは形態学的に成功しているようだったが、破骨細胞への分化誘導時に細胞内に巨大な空胞をみとめ、破骨細胞の特徴である細胞融合が生じなかった。

フィーダーレスで iPS 細胞から CD14 陽性単球系細胞から破骨細胞の誘導を試みたが、オンフィーダーの時と同様に細胞内に空胞をみとめる巨大な単核細胞に分化していた。

いずれも、破骨細胞というよりはマクロファージ様の細胞であり、サイトカインの選択や培養期間、細胞の採取時期等を工夫する必要がある。

本研究の結果から、IFN- $\gamma$ シグナル伝達障害患者では、IFN- $\gamma$ による破骨細胞の抑制機構の破綻により骨病変を呈することが推測

された。今後は、IFN- $\gamma$ -STAT1 シグナル制御下で働く破骨細胞形成抑制の細胞内分子を同定するために、網羅的な遺伝子発現解析等をおこなう予定である。また、破骨細胞の実験では相当数の破骨前駆細胞が必要であるため、iPS 細胞を用いた実験系を早急に確立したい。

## 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)

1. Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Hirata O, Minegishi S, Imai K, Hyakuna N, Muramatsu H, Kojima S, Ozaki Y, Imai T, Takeda S, Okazaki T, Ito T, Yasunaga S, Takihara Y, Bryant VL, Kong XF, Cypowyj S, Boisson-Dupuis S, Puel A, Casanova JL, Morio T, Kobayashi M., Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis., *J Leukoc Biol.*, 2014 Apr;95(4):667-76. doi: 10.1189/jlb.0513250. 査読有.

2. Deenick EK, Avery DT, Chan A, Berglund LJ, Ives ML, Moens L, Stoddard JL, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Tsumura M, Kobayashi M, Arkwright PD, Averbuch D, Engelhard D, Roesler J, Peake J, Wong M, Adelstein S, Choo S, Smart JM, French MA, Fulcher DA, Cook MC, Picard C, Durandy A, Klein C, Holland SM, Uzel G, Casanova JL, Ma CS, Tangye SG., Naive and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells., *J Exp Med.*, 2013 Nov 18;210(12):2739-53. doi: 10.1084/jem.20130323. 査読有.

3. Ives ML, Ma CS, Palendira U, Chan A, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Arkwright PD, Engelhard D, Averbuch D, Magdorf K, Roesler J, Peake J, Wong M, Adelstein S, Choo S, Smart JM, French MA, Fulcher DA, Cook MC, Picard C, Durandy A, Tsumura M, Kobayashi M, Uzel G, Casanova JL, Tangye SG, Deenick EK., Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mutations underlying autosomal dominant hyper-IgE syndrome impair human CD8(+) T-cell memory formation and function., *J Allergy Clin Immunol.*, 2013 Aug;132(2):400-11.e9. doi: 10.1016/j.jaci.2013.05.029. 査読有.

4. Hirata O, Okada S, Tsumura M, Kagawa R, Miki M, Kawaguchi H, Nakamura K, Boisson-Dupuis S, Casanova JL, Takihara

Y, Kobayashi M., Heterozygosity for the Y701C STAT1 mutation in a multiplex kindred with multifocal osteomyelitis., *Haematologica.*, 2013 Oct;98(10):1641-9. doi: 10.3324/haematol.2013.083741. 査読有.

5. Kobayashi Y, Matsui H, Kanai A, Tsumura M, Okada S, Miki M, Nakamura K, Kunishima S, Inaba T, Kobayashi M., Identification of the integrin  $\beta 3$  L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant thrombocytopenia with anisocytosis., *Br J Haematol.*, 2013 Feb;160(4):521-9. doi: 10.1111/bjh.12160. 査読有.

6. Kobayashi Y, Ishikawa N, Tsumura M, Fujii Y, Okada S, Shigematsu Y, Kobayashi M., Acute severe encephalopathy related to human herpesvirus-6 infection in a patient with carnitine palmitoyltransferase 2 deficiency carrying thermolabile variants., *Brain Dev.*, 2013 May;35(5):449-53. doi: 10.1016/j.braindev.2012.06.013. 査読有.

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 津村弥来, 平田修, 香川礼子, 岡田賢, 小林正夫, 本邦 3 家系の STAT1 異常症における臨床症状と機能解析, 第 76 回日本血液学会学術集会, 2014 年 10 月 31 日, 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

津村 弥来 (TSUMURA MIYUKI)

広島大学・医歯薬保健学研究院・研究員

研究者番号：80646274