

令和 3 年 4 月 13 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23967

研究課題名(和文) 関節炎における病理性破骨細胞の可視化と解析

研究課題名(英文) Identification and visualization of pathological osteoclasts in arthritis

研究代表者

長谷川 哲雄 (Hasegawa, Tetsuo)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：30773048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨破壊を担うユニークな多核細胞である破骨細胞は、「骨髄」で骨の恒常性維持に重要な役割を果たす一方、関節リウマチ(RA)では「関節」の病的な骨破壊を惹起する。これら二つの異なる微小環境における破骨細胞が、どのような違いを持つのか詳細な解析はなされていない。本研究は、申請者がこれまで応用してきた生体二光子励起イメージング技術を用いて、関節と骨髄の破骨細胞の動態・機能をin vivoで観察・比較することで、二つの局在における成熟破骨細胞の挙動の違いを明らかにした。さらに、本技術を用いて、近年RA治療に臨床応用されている生物学的製剤が生体内においてどの細胞を標的として作用しているか明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチは関節の慢性的な炎症をきたす代表的な自己免疫疾患で、最終的に「破骨細胞」と呼ばれる細胞が骨を破壊することで関節の機能を大きく低下させます。近年、関節リウマチに対する治療薬は大きな進歩を遂げた一方、いまだにいずれの治療薬にも反応しない難治性の患者さんが存在します。本研究により、関節破壊を惹起する病的な破骨細胞の特徴やその骨破壊のメカニズムが詳細に解析されることで、病的な破骨細胞のみを標的とした新規薬剤の開発につながる事が期待されます。

研究成果の概要(英文)：Osteoclasts are multinucleated cells with unique bone-destroying capacity. They play key roles in maintaining homeostatic bone remodeling inside the bone marrow (BM), while they are also involved in pathological bone destruction in arthritis. However, the difference between these osteoclasts in the two tissue settings have not been clarified. Here, we used two-photon microscopy to directly visualize the mature osteoclasts both in the BM and pannus-bone interface. This showed that pathological osteoclasts are actively resorbing the bone matrix in the tiny resorption pits without migrating on the bone surface. This contrasts with the physiological osteoclasts in the BM, which are in close contact with osteoblasts and slowly migrate on the bone surface. These results imply that the manner of bone resorption differs between the osteoclast populations in the two tissues, and this system can serve as a platform for exploring the dynamics of osteoclasts within the synovial microenvironment.

研究分野：リウマチ膠原病

キーワード：破骨細胞 関節リウマチ 生体イメージング

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は、日本国内に約 70 万人の患者を有する最も頻度の高い自己免疫疾患の一つである。申請者はこれまで、リウマチ内科医として、関節周囲の進行性骨破壊による身体障害のため日常生活に苦しむ RA 患者を数多く診療してきた。その中で、病的な骨破壊による関節機能障害の制御が、RA 治療の最大の課題であると感じてきた。

骨破壊を担うユニークな多核細胞である破骨細胞は、生理的環境下では「骨髄」にのみ存在し、骨形成を担う骨芽細胞と協調して働くことによって骨の恒常性維持に重要な役割を果たしている (骨リモデリング)。一方 RA 患者では、関節を包む「滑膜」を主座とする慢性炎症が、骨表面の病原性破骨細胞の形成を促し、関節周囲の骨破壊を惹起する。これまで数多くの研究が、関節炎モデルマウスの骨髄・脾臓・血液中の単球系細胞を探索し、病因に関わる破骨前駆細胞の同定が試みられてきたが、病変の主座である「炎症滑膜」における細胞の詳細な解析は、組織のサイズが小さいことに伴う技術的制約により困難であった。さらに、成熟破骨細胞は生体内で骨に強固に接着しているため骨組織から単離できず、*in vitro* で骨髄マクロファージから分化させた破骨細胞様細胞を研究対象に使用せざるを得ないという制限があった。よって、骨髄と炎症滑膜の二つの異なる局在・微小環境において分化する破骨細胞が、同じ分化経路を辿るのか、さらに結果的に形成された成熟破骨細胞が同一の機能を有する細胞であるのか、依然として謎に包まれている。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が独自に確立した関節炎モデルマウスの炎症滑膜組織を単離するプロトコルを用いて、炎症滑膜における破骨前駆細胞を同定し、その分化系譜を明らかにする。さらに、申請者が確立してきた骨の生体二光子励起イメージング技術を関節組織に適応することで、骨髄と炎症滑膜における各破骨細胞を生体内で解析・比較することで、RA において病的骨破壊が惹起されるメカニズムを統合的に解明する。

3. 研究の方法

炎症滑膜の破骨前駆細胞の同定

関節炎モデルマウスの炎症滑膜組織を単離するプロトコルを用いて、破骨細胞分化能が最も高い細胞集団を同定した。さらに、生体内において成熟破骨細胞へ分化する細胞数は非常に少数に限られるため、この特定のマクロファージ集団をシングルセル RNA-seq 解析することで、*in situ* で成熟破骨細胞へ分化する細胞集団を同定した。これらの細胞集団と、骨髄内の生理的な破骨前駆細胞の両者の特徴を抽出すると共に、その相違を分析した。

炎症滑膜の成熟破骨細胞の生体イメージング系を用いた動態解析

C57B6/J 背景の成熟破骨細胞を特異的に蛍光標識したレポーターマウス (TRAP-tdTomato) を、関節炎に感受性が高い DBA1/J と 10 世代以上戻し交配したマウスを作成した。このマウスにコラーゲン誘導関節炎 (CIA) を惹起し、吸入麻酔管理下で手指の関節内部を二光子励起顕微鏡で経時的に観察した。さらに、破骨細胞が出す酸を感知して蛍光が ON となる pH 応答性蛍光プローブを活用して骨破壊部位を *in vivo* で可視化し、生理的な骨リモデリングに関わる破骨細胞と、関節破壊に関わる病原性破骨細胞の機能的な違いを解析した。

炎症滑膜における生物学的製剤の*in vivo*の標的細胞の同定

日常臨床において RA の骨破壊を抑制する作用が認められている生物学的製剤 CTLA-4 Ig を、Alexa Fluor647 を用いて共有結合で蛍光標識し、生体内で毒性を示すアジド基を除去した。関節炎モデルマウスの生体内へ蛍光標識した CTLA-4 Ig を経静脈的に投与し、 で確立した炎症滑膜の生体イメージング技術と組み合わせることで、CTLA-4 Ig が病的な破骨細胞の分化過程のどの段階の細胞に結合し、骨破壊抑制作用を発揮するのか、二光子励起顕微鏡とフローサイトメトリーを用いて評価した。

4. 研究成果

炎症滑膜の破骨前駆細胞の同定

関節炎モデルマウスの炎症滑膜組織を単離するプロトコルを用いて、骨髄中には存在しない CX₃CR1^{hi}Ly6C^{int}F4/80^{hi}I-A/I-E⁺のマクロファージサブセットが著明な破骨細胞分化能を有することを明らかにした。この細胞分画を Arthritis-associated osteoclastogenic macrophage (AtoM) と呼称し、CX₃CR1-EGFP/TRAP-tdTomato のレポーターシステムを用いることで、AtoM と成熟破骨細胞が滑膜常在性マクロファージでなく骨髄細胞に由来すること、TNF と RANKL の共刺激により顕著に破骨細胞へ分化することが示された。AtoM のシングルセル解析では、約 1 割の細胞がさらに *Acp-5*、*Ctsk*、*Atp6v0d2* 等の破骨細胞マーカー遺伝子を高発現しており、一頭体に約 800 細胞存在するこの細胞集団が *in situ* で病原性破骨細胞へ分化することが明らかになった (Hasegawa et al., *Nat Immunol* 2019)。さらに、AtoM は骨髄中の生理的な破骨前駆細胞と異なり、抗原提示に関わる表面マーカー (CD80, CD86, I-A/I-E) や樹状細胞の表面マーカー (CD11c) を弱く発現することが示され、AtoM が炎症滑膜において抗原提示にも関与している可能性が示された。

炎症滑膜の成熟破骨細胞の生体イメージング系を用いた動態解析

成熟破骨細胞を特異的に蛍光標識したレポーターマウス (TRAP-tdTomato) にコラーゲン誘導関節炎 (CIA) を惹起し、骨髄内と手指の関節内部を二光子励起顕微鏡を用いて観察した。その結果、骨髄内に存在する生理的な破骨細胞は骨芽細胞と協調しながら骨表面を緩徐に遊走し骨表面を均一に吸収する一方 (Hasegawa et al., *Front Immunol* 2019)、滑膜の病的な破骨細胞は骨芽細胞とは解離して単独で一点の骨侵食を進めることで、50µm 大の微小な穴を多数形成する様子が観察された (Hasegawa et al., *Sci Rep* 2020, Hasegawa et al., *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2020)。さらに pH 応答性蛍光プローブを用いることで、成熟破骨細胞と関節骨の接触面において骨侵食が活動的になされていることが確認された。

炎症滑膜における生物学的製剤の*in vivo*の標的細胞の同定

関節炎を発症したマウスの生体内において、CTLA-4 Ig が炎症滑膜に強く集積する様子が上記で確立した生体イメージング技術で観察された。さらに、CTLA-4 Ig が滑膜-骨境界領域の成熟破骨細胞には結合せず、CX₃CR1 陽性細胞に選択的に結合することが生体イメージングとフローサイトメトリー解析の両方で確認され、CTLA-4 Ig による骨破壊抑制作用が成熟破骨細胞に対する直接的な作用でなく、破骨前駆細胞への結合を介した間接的な作用に起因することが明らかになった (Hasegawa et al., *Sci Rep* 2020)。本研究で確立した生体イメージング技術は、生きた骨・関節組織内の破骨細胞・前駆細胞の挙動や機能を時空間的に解析することができる

め、今後、関節リウマチの病態解明や新規治療薬の開発において強力な手段となることが強く期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hasegawa Tetsuo, Kikuta Junichi, Sudo Takao, Matsuura Yoshinobu, Matsui Takahiro, Simmons Szandor, Ebina Kosuke, Hirao Makoto, Okuzaki Daisuke, Yoshida Yuichi, Hirao Atsushi, Kalinichenko Vladimir V., Yamaoka Kunihiro, Takeuchi Tsutomu, Ishii Masaru	4. 巻 20
2. 論文標題 Identification of a novel arthritis-associated osteoclast precursor macrophage regulated by FoxM1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 1631 ~ 1643
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-019-0526-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 HASEGAWA Tetsuo, ISHII Masaru	4. 巻 96
2. 論文標題 Visualizing bone tissue in homeostatic and pathological conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the Japan Academy, Series B	6. 最初と最後の頁 43 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2183/pjab.96.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa Tetsuo, Kikuta Junichi, Ishii Masaru	4. 巻 10
2. 論文標題 Imaging the Bone-Immune Cell Interaction in Bone Destruction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.00596	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa T, Kikuta J, Sudo T, Yamashita E, Seno S, Takeuchi T, Ishii M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Development of an intravital imaging system for the synovial tissue reveals the dynamics of CTLA-4 Ig in vivo.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70488-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tetsuo Hasegawa
2. 発表標題 The origin of osteoclasts in pannus
3. 学会等名 17th International Congress of Immunology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuo Hasegawa
2. 発表標題 Identification of arthritis-associated osteoclast precursor macrophages in pannus
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuo Hasegawa
2. 発表標題 Identification of arthritis-associated osteoclast precursor macrophages in pannus
3. 学会等名 第6回JCRベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------