

令和 6 年 4 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03048

研究課題名（和文）破骨細胞に発現する免疫チェックポイント分子シグレック-15の機能と治療応用

研究課題名（英文）Function of Siglec-15, an immune checkpoint molecule expressed on osteoclasts

研究代表者

高畑 雅彦（Takahata, Masahiko）

北海道大学・医学研究院・准教授

研究者番号：40374368

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,390,000円

研究成果の概要（和文）：破骨細胞に発現しその分化に必須の共刺激経路を賦活化する免疫受容体シグレック-15を介した末梢性免疫寛容誘導機構の存在について検討した。その結果、破骨細胞に発現するSiglec-15は、T-cellの活性を抑制することを明らかにした。次に、破骨細胞の分化や機能が抑制されるSiglec-15欠損マウスにおいて関節炎モデルでは多数の破骨細胞が誘導され、炎症性骨破壊は抑制されないことを明らかにした。この機序のひとつとしてSiglec-15欠損破骨細胞では、過剰な破骨細胞が誘導されても、Siglec-15を介した免疫抑制がかからず、強い炎症が惹起されるためであることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Siglec-15は破骨細胞の最終分化を制御する免疫グロブリン様受容体であり、骨粗鬆症の治療標的候補のひとつである。Siglec-15は腫瘍関連マクロファージにも発現し免疫チェックポイント分子として抗腫瘍免疫応答を抑制することから、転移性骨がんにおいては骨の破壊抑制とともに、がん免疫賦活化効果も見込めるDual effectの期待できる治療標的といえる。しかし、炎症性骨破壊に対しては、本来過剰な骨破壊から骨を守るための機構と考えられ、これを治療標的としてしまうと免疫を抑制する効果が減弱することが示された。抗Siglec-15療法の開発、臨床応用を考える上で重要な事実を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We investigated the existence of a peripheral immune tolerance induction mechanism mediated by the immunoreceptor Siglec-15, which is abundantly expressed on osteoclasts and activates a co-stimulatory pathway essential for their differentiation. We found that Siglec-15 expressed on osteoclasts suppresses T-cell activity. Next, we found that in Siglec-15-deficient mice, in which osteoclast differentiation and function are suppressed, a large number of osteoclasts are induced in an arthritis model and inflammatory bone destruction is not suppressed. One of the mechanisms for this is that Siglec-15-deficient osteoclasts do not exhibit Siglec-15-mediated immunosuppression, even when an excess of osteoclasts are induced, and thus induce intense inflammation.

研究分野：骨代謝学

キーワード：Siglec-15 免疫チェックポイント

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Siglec15 が破骨細胞の分化に必須の共刺激経路を賦活化する免疫受容体であることは国内外の複数の研究グループによって証明され、コンセンサスが得られている。われわれは2007年に細胞表面のシアリル糖鎖が破骨細胞分化に関与することを発見、さらにシアリル糖鎖を認識する Siglec15 が免疫受容体チロシン活性化モチーフシグナルを賦活化することにより破骨細胞分化を促進することや遺伝子欠損マウスが大理石病様の表現型を呈することを明らかにしてきた。これらの発見を基盤として、われわれは骨粗鬆症治療薬として抗 Siglec15 療法の開発を進めてきた。

Siglec15 は正常細胞では破骨細胞と一部のマクロファージにしか発現していないため骨代謝以外では重要な役割はもっていないと考えられてきた。しかし、2019年に Wang らによって Siglec15 が腫瘍関連マクロファージに発現し、活性化 T 細胞を強力に抑制するという驚くべき報告がなされた。この発見は、がん免疫治療に革新的な進歩をもたらした抗 PD-1/PD-L1 抗体療法の成功に続く新たながん免疫チェックポイント分子探索研究過程で得られた知見であり、抗 Siglec15 療法は現在、がん治療薬としての開発が海外で急ピッチで進められている。

Siglec15 が活性化 T 細胞を抑制するという発見を受け、われわれが注目したのは「破骨細胞が Siglec15 を介してリンパ球の機能を抑制し免疫寛容を惹起する」可能性がある点である。すなわち、自己免疫性関節炎や慢性骨髄炎、がんの骨転移といった局所に誘導された破骨細胞と活性化 T 細胞が共存する病態では Siglec15 を介した免疫抑制が起きることを示唆している。免疫チェックポイント分子は、本来、自己に対する過剰な免疫反応を抑制する分子群であることから、破骨細胞に発現する Siglec15 は過剰な免疫反応による骨破壊から骨を守るためのネガティブフィードバック分子と捉えることができる。

そのため、この機構は同時に、骨髄炎やがん溶骨性骨転移など免疫抑制が望ましくない病態では、かえって炎症や感染の鎮静化を妨げたり、がんの進展を促す可能性がある。このような点から、破骨細胞に発現する Siglec15 が免疫にどのような影響を与えるのかは骨破壊性疾患の病態解明や治療法開発において重要な関心事といえる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、破骨細胞に発現する Siglec15 の免疫チェックポイント分子機能を明らかにするとともに骨破壊疾患への関与と治療応用について検討することである。

目的1：破骨細胞の Siglec15 が、活性化 T 細胞を抑制するかどうかを検証すること

目的2：腫瘍、関節炎などの骨破壊性疾患における破骨細胞および Siglec15 の免疫に対する影響を明らかにすること。

目的3：抗 Siglec15 療法による骨破壊抑制効果と免疫賦活化（抑制解除）効果を、骨髄炎およびがん溶骨性骨転移モデルで確認すること

3. 研究の方法

・ Siglec15 に対する T-cell 細胞増殖性と活性

破骨細胞膜上の Siglec15 が T 細胞活性を抑制するかどうかを検証するために、野生型マウス由来 Siglec15 発現破骨細胞またはノックアウトマウス由来 Siglec15 非発現破骨細胞と細胞透過性色素 CFDA-SE で蛍光染色した CD4+T (Th1, Th17)、CD8+T 細胞を共培養し、T 細胞の細胞増殖性とサイトカイン (IFN γ , IL-17A, IL-17F, IL-22) 分泌量を測定した。

・ アジュバント誘導関節炎、がん溶骨性骨転移モデルにおける破骨細胞 Siglec15 による免疫抑制効果の検証

a. 破骨細胞膜上 Siglec15 による活性 T-細胞抑制効果の検証

Siglec15 欠損マウスまたは野生型マウスを用い、アジュバント誘導関節炎、およびがん骨転移モデルを作成した。骨破壊の程度は micro-CT を用いて検討した。免疫組織学的検討およびフローサイトメトリーで罹患骨の破骨細胞数や骨髄中 CD4+T (Th1, Th17)、CD8+T 細胞の割合を比較した。

b. ヒト病理組織標本を用いた検討

がん溶骨性骨転移病変や骨巨細胞腫の組織標本ライブラリーを用いて、破骨細胞やそれに発現する Siglec15 の分布とリンパ球浸潤やそのサブセット (CD4+T [Th1, Th17]、CD8+T など) を検討した。

・ 関節炎モデルおよびがん溶骨性骨転移モデルに対する抗 Siglec15 療法の効果の解析

関節炎モデルおよび転移性骨腫瘍モデルに Siglec15 中和抗体を投与し、研究と同様の手法を用いて関節骨破壊の程度やがん進展 (= がん細胞数増加) がコントロール IgG を投与した場合と比べてどのように変化するか調査を試みた。

4. 研究成果

・ 破骨細胞が発現する Siglec15 の T 細胞の活性抑制効果

野生型マウス由来骨髄マクロファージから分化させた Siglec15 を高発現する破骨細胞または Siglec15 遺伝子欠損マウス由来骨髄マクロファージから II 型コラーゲンコートディッシュ上で培養した Siglec15 発現のない破骨細胞を用いて T 細胞との相互作用実験を行った。マウス Siglec15 発現破骨細胞または非発現破骨細胞と CFDA-SE で蛍光染色した CD4+T (Th1, Th17)、CD8+T 細胞を共培養したところ、T 細胞の細胞増殖性には明らかな差は生じなかったものの、Siglec15 発現破骨細胞は T 細胞からのサイトカイン (IFN γ , IL-17, IL-22) 分泌量を低下させた。ヒト末梢血単球由来破骨細胞共培養系を用いて Siglec15 高発現破骨細胞と Siglec15 ノックダウン破骨細胞とヒト T 細胞についても同様の実験を行い、破骨細胞由来の Siglec15 は T 細胞からのサイトカイン分泌量を低下させることを確認した。

・アジュバント誘導関節炎、がん溶骨性骨転移モデルにおける破骨細胞 Siglec15 による免疫抑制効果

野生型マウスおよび Siglec15 遺伝子欠損マウスに対して、アジュバント誘導関節炎モデルを作成した。本来、破骨細胞の最終分化が生じるはずの Siglec15 遺伝子欠損マウスでも骨関節破壊はまったく抑制されなかった。組織学的にも、Siglec15 遺伝子欠損マウスの膝関節には大量の多核巨細胞 (形態的に正常な破骨細胞) が誘導されており、リンパ球浸潤の程度も強かった。関節腫脹スコアは Siglec15 遺伝子欠損マウスのほうが野生型よりも高い傾向がみられた。大腿骨および脛骨から骨髄細胞を採取し解析したところ、リンパ球のサブセットや炎症に関わるサイトカイン応答シグナルが Siglec15 遺伝子欠損マウスでは増強していた。

転移性骨がんのモデルはマウス乳癌細胞株 E0771 およびルイス肺がん由来細胞株を野生型マウスおよび Siglec15 遺伝子欠損マウスに尾動脈経由で移植することにより作成した。免疫不全マウスに対し、尾動脈からヒト乳癌細胞 MDA-MB-231 を播種するモデルではほぼ全例で骨転移が形成されることを確認したが、同様の手技で行ってもマウス乳癌細胞株 E0771 およびルイス肺がん由来細胞株では骨転移の成立が 30%以下であった。骨転移成立率は野生型マウスと Siglec15 遺伝子欠損マウスでは差はなかった。骨転移が生じた個体について、骨破壊の程度を比較したところ、Siglec15 遺伝子欠損マウスでは骨破壊の程度を表す Mirel ' score が低かった。

・関節炎モデルおよびがん溶骨性骨転移モデルに対する抗 Siglec15 療法の効果

関節炎モデルおよび転移性骨腫瘍モデルに Siglec15 中和抗体および IgG コントロールを投与して骨破壊抑制効果や炎症あるいは腫瘍増生の程度に違いがあるか検証を試みたが、十分な効果をもった中和抗体の入手、作成が研究期間内には達成できず、最終的な結論をえることができなかった。この実験については今後も継続的に取り組む予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	村上 正晃 (Murakami Masa Masaaki) (00250514)	北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授 (10101)	
研究分担者	津田 真寿美 (Tsuda Masumi) (30431307)	北海道大学・医学研究院・准教授 (10101)	

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