

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 1日現在

機関番号：16101  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23659966  
 研究課題名（和文） 関節リウマチにおける RANKL/Fas シグナルを介した骨・軟骨破壊機構の  
 解明  
 研究課題名（英文） Mechanism of bone and cartilage deterioration in rheumatoid arthritis  
 via RANKL/Fas signaling  
 研究代表者  
 田中 栄二（TANAKA EIJI）  
 徳島大学・大学院ヘルスケアサイエンス研究部・教授  
 研究者番号：40273693

研究成果の概要（和文）：リウマチ自然発症 MRL/lpr マウスの破骨細胞の詳細な機能解析を行  
 った結果、同マウスでの破骨細胞の機能亢進が、骨破壊を伴う関節リウマチ病態で重要な役割  
 を果たしていることに加え、破骨細胞における Fas シグナルが破骨細胞の分化、機能に制御的  
 に関与していることが示唆されたと結論し、S1P/S1PR<sub>1</sub> シグナルの制御による破骨細胞遊走能  
 の制御が新たな関節リウマチの治療法となりう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  
 MRL/lpr mice, animal model for human rheumatoid arthritis (RA), bearing a mutant of Fas  
 gene. In vitro and in vivo experiments showed enhanced function of MRL/lpr OCs as  
 antigen-presenting cells to activate peripheral T cells. Furthermore, the migratory  
 response of MRL/lpr OCs to S1P was significantly enhanced. The hyperfunctions of OCs in  
 MRL/lpr mice play a potent role in the pathogenesis for RA with bone destruction. Fas  
 signaling of OCs may regulate the differentiation, activation, and migration of OCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科歯学の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：歯科矯正学

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は顎関節を含む全身の  
 関節の骨・軟骨破壊を主徴とする原因不明の  
 難治性自己免疫疾患で、顎関節症状を伴うこ  
 とが高頻度にみられ、特に若年性 RA 患者に  
 においては成長中の下顎頭の骨・軟骨破壊が顎  
 変形症を誘発する要因となる可能性が指摘  
 された。さらに、RANKL の発見によって、  
 破骨細胞および抗原提示細胞である樹状細  
 胞の分化・活性化機構の解明が急速に進歩し  
 てきており、免疫系が RA における骨代謝に  
 密接に関与していることが報告されてきた。  
 しかし、同疾患における全身の関節破壊機構  
 に関する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  
 られている Fas 遺伝子欠損 MRL/lpr マウス  
 の破骨細胞の機能を詳細に解析し、破骨細胞  
 および樹状細胞活性化因子として知られて  
 いる RANKL (Receptor activator of NF- $\kappa$ B  
 ligand) シグナルとアポトーシスシグナル分  
 子 Fas シグナルのシグナルクロストークの解  
 明による破骨細胞・免疫担当細胞の活性化・  
 維持機構を明らかにした上で、顎関節を中  
 心とした RA 関節病変への影響解明および新  
 たな RA 診断・治療法の開発を目的とした。

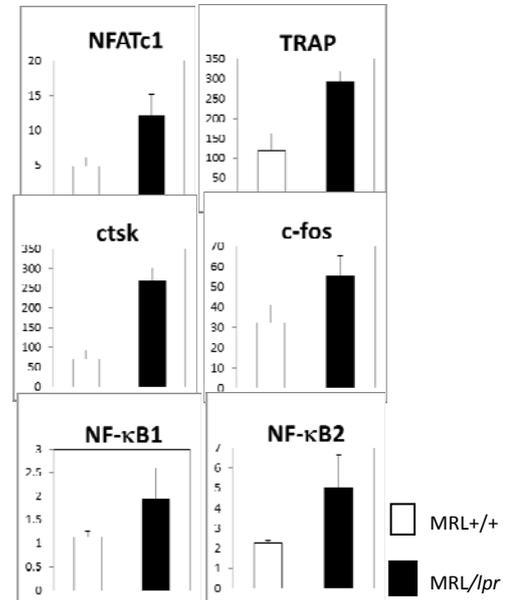
### 3. 研究の方法

- (1) 実験動物: MRL/lpr マウスおよび対照マウス (MRL/Mpjjms Slc +/+) を用いた。
- (2) 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  $\alpha$ -MEM にて  $5 \times 10^5$ /ml の細胞濃度となるよう調整し、100 mm dish に播種した。マウスリコンビナント M-CSF を添加し、3 日間培養後、細胞を回収した。その後、マウスリコンビナント RANKL 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。
- (3) 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、さらに M-CSF および RANKL 添加培地にて III-4 日間培養し、破骨前駆細胞へと分化誘導した。
- (4) 破骨前駆細胞移入: 生後 4 週齢のドナーマウスの骨髓から破骨前駆細胞を培養し、その細胞を生後 16 週齢のレシピエントマウス (MRL/lpr マウス) の膝関節内へ注射にて移入した。
- (5) 上記の実験により得られた試料をもとに、骨吸収活性測定 (Pitt assay)、病理組織学的解析、骨組織形態解析、RT-PCR 分析、経口免疫染色、フローサイトメトリー解析を実施した。
- (6) T 細胞と破骨細胞の共存培養: マウス大腿骨骨髓から骨髓細胞を採取し、破骨細胞を分化誘導した後、4 週齢の MRL/lpr マウス鼠径部リンパ節より採取した CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 細胞と共存培養を行った。培養開始から 3 日後に T 細胞を回収し、活性化状態の解析を行った。また、II 型コラーゲン (CII) を用いた抗原特異的な抗原提示能の解析を実施した。
- (7) 破骨前駆細胞遊走能解析: 上記と同様に培養した破骨前駆細胞をトランスウェ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ェ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 マウス大腿骨遠位骨端部のマイクロ CT 像: 16 週齢の MRL/lpr マウスでは同週齢の対照マウスと比較して、大腿骨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。さらに、大腿骨遠位骨端部では、MRL/lpr マウスにおいてのみ、経時的に骨吸収が進行していることが明らかとなった。
- (2) 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、ctsk、c-fos、NF- $\kappa$ B1、NF- $\kappa$ B2)

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。RANKL 刺激対照マウス由来破骨前駆細胞と比較して、RANKL 刺激 MRL/lpr マウス由来破骨前駆細胞では、NF- $\kappa$ B の各サブユニットの強い核移行を認めた。

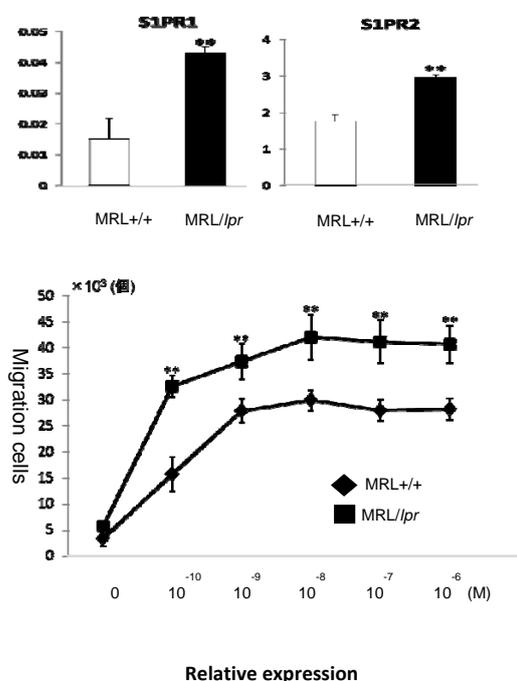


(3) MRL/lpr マウス由来破骨細胞および破骨前駆細胞の抗原提示能と T 細胞活性化への影響: RANKL 刺激後の MRL/lpr マウス由来破骨細胞および破骨前駆細胞において、MHC クラス II の発現を制御する転写因子である CII TA の遺伝子発現量が有意に増加した。また、MRL/lpr マウス由来破骨細胞表面の MHC クラス分子およびその共刺激分子 (CD80、CD86) の発現は認められるものの、対照マウス由来の細胞と比較して有意差は見られなかった。

破骨細胞と T 細胞の共存培養による T 細胞の活性化および増殖能を評価したところ、MRL/lpr 由来破骨細胞を用いた場合に、活性化 T 細胞の割合や T 細胞の増殖能の亢進が認められた。したがって、MRL/lpr マウス由来破骨細胞による抗原提示能および T 細胞活性化への影響が示唆された。さらに、MRL/lpr マウス由来破骨前駆細胞の移入により、CD44<sup>high</sup>、CD62<sup>low</sup> である活性化 T 細胞の活性化 T 細胞数が有意に増加し、鼠径部リンパ節 T 細胞の有意な活性化亢進とリンパ節腫脹が認められた。

(4) MRL/lpr マウス骨髓由来破骨前駆細胞遊走能: MRL/lpr マウス由来破骨前駆細胞において、S1P のレセプターである S1PR<sub>1</sub>、S1PR<sub>2</sub> 遺伝子の発現量が有意に増加した。また、S1P に対する細胞遊走能についても、MRL/lpr マウス由来破骨前駆細胞は対照マウス由来細胞と比較して遊走能が高かった。さらに、マウスの細胞運動性に関与する遺伝子の網羅的発現解析を行った結果、MRL/lpr マウス由

来破骨前駆細胞において著しく大きな発現量を示した遺伝子は、Caveolin1、MMP9であった。一方、特に小さな値を示した遺伝子のうち、SIPシグナルに関連する遺伝子としてRhoが検出された。



以上の結果より、MRL/lpr マウスでの破骨細胞の機能亢進が、骨破壊を伴う RA 病態で重要な役割を果たしていることに加え、破骨細胞における Fas シグナルが破骨細胞の分化、機能の制御に関与している可能性が示唆された。

##### 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3件)

1. Oura R, Arakaki R, Yamada A, Kudo Y, Tanaka E, Hayashi Y, Ishimaru N. Induction of rapid T cell death and phagocytic activity by Fas-deficient lpr macrophages. *Journal of Immunology* 査読有, Vol.190, No.2, 2013, pp578-585. doi: 10.4049/jimmunol.1103794
2. Izawa T, Kondo T, Kurosawa M, Oura R, Matsumoto K, Tanaka E, Yamada A, Arakaki R, Kudo Y, Hayashi Y, Ishimaru N. Fas-independent T-cell apoptosis by dendritic cells controls autoimmune arthritis in MRL/lpr mice. *PLoS One* 査読有, Vol.7, No.12, 2012, e48798. doi:

10.1371/journal.pone.0048798.

3. Nakamura T, Fujihara S, Yamamoto-Nagata K, Katsura T, Inubushi T, Tanaka E. Low-intensity pulsed ultrasound reduces the inflammatory activity of synovitis. *Annals of Biomedical Engineering* 査読有, Vol.39, No.12, 2011, pp2964-2971. doi: 10.1007/s10439-011-0408-0.

[学会発表] (計8件)

1. Iwasa A, Arakaki R, Yamada A, Kudo Y, Tanaka E, Ishimaru N. The dysfunction of the aromatase worsens the pathogenesis of Sjogren's syndrome. 第41回日本免疫学会学術集会、2012年12月5-7日、兵庫県(神戸国際会議場)。
2. 松本一真、新垣理恵子、山田安希子、田中栄二、林良夫、石丸直澄：関節リウマチ病態における破骨細胞の機能亢進。第40回日本免疫学会学術集会、2011年11月27-29日、千葉県(幕張メッセ)。
3. 岩浅亮彦、新垣理恵子、山田安希子、田中栄二、林良夫、石丸直澄：アロマターゼ遺伝子欠損マウスにおける自己免疫病変の解析第40回日本免疫学会学術集会、2011年11月27-29日、千葉県(幕張メッセ)。
4. 松本一真、石丸直澄、井澤俊、日浅雅博、大浦律子、岩浅亮彦、林良夫、田中栄二：関節リウマチモデルマウスにおける破骨細胞の機能亢進。第70回日本矯正歯科学会大会、2011年10月17-20日、愛知県(名古屋国際会議場)。
5. 中村竜也、藤原慎視、永田久美子、塩田智子、堀内信也、黒田晋吾、田中栄二：低出力超音波は関節滑膜炎の増殖性炎症を抑制する。第70回日本矯正歯科学会大会、2011年10月17-20日、愛知県(名古屋国際会議場)。
6. Matsumoto K, Ishimaru N, Izawa T, Hiasa M, Hayashi Y, Tanaka E. Hyperfunctions of osteoclasts in a rheumatoid arthritis model. 33rd Annual meeting of American Society of Bone Mineral Research (ASBMR), Sep 16-20, 2011, San Diego, CA, USA (San Diego Convention Center).
7. 松本一真、石丸直澄、井澤俊、日浅雅博、田中栄二、林良夫：関節リウマチモデルマウスにおける破骨細胞の機能解析。第29回日本骨代謝学会、2011年7月28-30日、大阪府(大阪国際会議場)。

8. 松本一真、石丸直澄、井澤 俊、大浦律子、岩浅亮彦、林 良夫、田中栄二：関節リウマチ病態における破骨細胞を介した T 細胞活性化機構の解析. 第 24 回日本顎関節学会、2011 年 7 月 23-24 日、広島県（広島県民文化センター）.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 栄二 (TANAKA EIJI)

徳島大学・大学院ヘルスハイサイエンス研究部・教授

研究者番号：40273693

(2) 研究分担者

黒田 晋吾 (KURODA SHINGO)

徳島大学・大学院ヘルスハイサイエンス研究部・准教授

研究者番号：40332796

日浅 雅博 (HIASA MASAHIRO)

徳島大学・大学院ヘルスハイサイエンス研究部・助教

研究者番号：90511337

藤原 慎視 (FUJIHARA SHINJI)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：70403706

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：