

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 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：2013～2014

課題番号：25893117

研究課題名(和文) 生体多光子励起イメージングによる関節リウマチの病態生理の解明

研究課題名(英文) The pathophysiology of rheumatoid arthritis elucidated by intravital multiphoton imaging

研究代表者

菊田 順一 (Kikuta, Junichi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60710069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、関節リウマチの病態生理を解明するために、生体多光子励起顕微鏡を駆使して関節炎・関節破壊の現場をin vivoで可視化するライブイメージング系を確立し、炎症関節内における生きた破骨細胞の動態を明らかにした。さらに、関節リウマチ治療において臨床応用されている分子標的治療薬が破骨細胞の骨吸収に及ぼす効果をin vivoで明らかにした。本研究で確立した生体イメージング技術は、今後、関節リウマチの発症メカニズムの解明だけでなく、新たな関節リウマチ治療薬の開発においても強力な手段となることが強く期待される。

研究成果の概要(英文)：Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease characterized by synovial joint inflammation and progressive cartilage/bone destruction. Arthritic bone destruction is considered to be mediated mainly by enhanced activation of osteoclasts at inflammatory sites. In this study, I established the advanced imaging system to visualize the cellular dynamics in arthritic joints with intravital multiphoton microscopy. By means of this system, I succeeded in visualization of abnormally activated osteoclasts in arthritic inflammation and bone destruction. Furthermore I revealed the in vivo effects of biologic agents on osteoclast function. This imaging approach would be beneficial for studying the pathophysiology of RA in vivo and would thus be useful for evaluating novel anti-rheumatic drugs.

研究分野：免疫学

キーワード：関節リウマチ 生体イメージング 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチは、日本の人口の約 0.5%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り、滑膜炎の炎症に伴う進行性の骨破壊を生じるため、患者の運動機能が著しく制限される。そのため、骨破壊による関節機能障害の制御が、リウマチ治療の最大の課題である。

関節リウマチにおける関節破壊は、関節を包む滑膜炎の炎症から始まる。炎症の進行に伴い滑膜炎は異常に増殖し、パンヌスが形成される。パンヌスには T 細胞、滑膜線維芽細胞、滑膜マクロファージなど多彩な細胞が存在し、炎症性サイトカインや関節組織を破壊する蛋白質分解酵素が大量に産生され、骨・軟骨が破壊される。また、活性化した滑膜細胞の増殖と過剰な炎症性サイトカインが、破骨細胞を誘導・活性化し、骨破壊の基礎的病態を形成する。

このように、関節リウマチの病態には多彩な細胞の関与が報告されている。しかしながら、従来の研究で用いられている *in vitro* 培養系や摘出して固定した関節の組織解析では、関節内に存在する細胞の種類や機能をある程度解析することはできたが、個々の細胞の“動き”の情報を得ることはできなかった。「炎症細胞が、いつ関節内に遊走し、どのようにして関節炎に関わるのか」という時間的挙動を明らかにするためには、“生きた”組織の中で“生きた”細胞を観察する必要がある。

研究代表者はこれまで、低侵襲で組織深部の観察が可能な“多光子励起顕微鏡”を駆使することにより、動物生体内で骨破壊が起きている骨の表面部分を詳細に可視化する系を独自に開発した。その結果、骨表面上での“生きた”破骨細胞による骨破壊過程をリアルタイムで観察することに成功し、成熟破骨細胞が骨吸収期と休止期を繰り返すこと、さらには関節リウマチの病因に関わる Th17 細胞が休止期の破骨細胞に直接作用して、骨吸収期へと移行させることにより、骨吸収を誘導することを発見した (Kikuta J, *J Clin Invest*, 2013)。

本研究では、研究代表者がこれまで行ってきた骨の生体多光子励起イメージング技術を応用することにより、従来の研究手法では観察が困難であった、関節リウマチの病態に関わる細胞動態の可視化を行い、関節リウマチの発症メカニズムの解明に取り組んだ。

2. 研究の目的

本研究では、“生きた”関節内における“生きた”細胞動態を経時的に観察する生体イメージング系を確立する。また、確立したイメージング技術を用いて、関節炎・関節破壊に関わる炎症細胞の動態を可視化することにより、関節リウマチの病態生理を明らかにする。

現在、様々な分子標的治療薬が開発され臨床現場で汎用されているが、薬剤が生体組織

内で実際にどのような効果を示すのか、生体内における薬理作用を細胞レベルで解析した報告は少ない。本研究では、分子標的治療薬が生体内において標的細胞に及ぼす効果や薬効発現の機序を実体的に解明する。

3. 研究の方法

(1) 関節炎モデルマウスの作成

本研究では、成熟破骨細胞を特異的に蛍光標識したマウス (a3-GFP マウス) を使用した。また、病態モデルとして、II 型コラーゲンを免疫することによって誘導される関節炎 (collagen-induced arthritis, CIA) を使用した。具体的には、a3-GFP マウス (8~12 週齢の雄) の尾の根元部分に、完全フロイトアジュバントでエマルジョン化した II 型コラーゲンを皮内注射した。3 週間後に同様の追加免疫を行い、関節炎を誘導した。免疫化 1 ヶ月後にライブイメージング実験を行った。

(2) 関節炎のライブイメージング系の確立

本研究では、生きたままの状態のマウスの炎症関節内部をリアルタイムで観察するライブイメージング系を確立した。具体的には、CIA を誘導したマウスを吸入麻酔下 (イソフルラン) で管理しながら、マウスの足の皮膚を切開し、炎症関節を手術的に露出させた。その後、本研究用に開発した自作の固定台上にマウスを移動させ、足関節を固定した。炎症関節内部を生体多光子励起顕微鏡で観察し、関節炎における生きた細胞の挙動を可視化した。得られたイメージング画像データは、画像解析ソフトウェアを用いて定量化を行い、細胞動態を統計学的に評価した。

(3) 分子標的治療薬の薬効評価

本研究では、既存の分子標的治療薬の中で、炎症性サイトカインである IL-6 を標的とした抗 IL-6 受容体抗体に注目し、生体イメージングによる薬効評価を行った。具体的には、成熟破骨細胞を特異的に蛍光標識したマウスに、LPS (5 mg/kg) を骨膜下に投与し炎症性骨破壊を誘導した。また、LPS 投与当日に、抗マウス IL-6 受容体抗体 (10 mg/kg) または vehicle (PBS) を腹腔内投与した。薬剤投与 5 日後に、マウスの骨組織内を生体多光子励起顕微鏡で観察し、生体内において薬剤が破骨細胞に及ぼす効果を *in vivo* で検討した。

4. 研究成果

(1) 炎症関節内における破骨細胞の動態の可視化

関節炎・関節破壊の現場を *in vivo* で可視化するべく技術開発を行い、生きたままの状態のマウスの足関節内部を観察し、“生きた”関節内における“生きた”細胞動態をリアルタイムで可視化するライブイメージング系を確立した。さらに、確立したイメージング技術を用いて、a3-GFP マウスの生体関節内部を経時的に観察した。その結果、健常なマウ

スでは関節内に破骨細胞がほとんど認められなかったのに対し、CIA 誘導 1 ヶ月後のマウスでは、骨表面上にたくさんの破骨細胞が認められた。さらに、画像解析ソフトウェアを用いて定量化を行った結果、誘導された破骨細胞のほとんどが骨吸収期であることが明らかとなった。

(2) 分子標的治療薬の薬効評価

炎症性骨破壊モデルマウスに、抗 IL-6 受容体抗体(10 mg/kg)または vehicle(PBS)を腹腔内投与し、5 日後にマウスの骨組織内を生体多光子励起顕微鏡で観察した。その結果、vehicle 投与群では、骨表面上にたくさんの骨吸収期の破骨細胞が認められたのに対し、抗 IL-6 受容体抗体投与群では、休止期の破骨細胞が増加していることが分かった。このことから、生体内において抗 IL-6 受容体抗体が、炎症によって誘導された破骨細胞の骨吸収を抑制し得ることが明らかとなった。

多光子励起顕微鏡を駆使した生体イメージング技術は、骨・関節内における様々な細胞の遊走動態をリアルタイムで観察することができるため、関節炎・関節破壊に関わる細胞動態の解明だけでなく、既存の薬剤の薬効評価も経時的に行うことができる。今後は、関節リウマチの発症機序を“細胞遊走”の視点から明らかにし、関節リウマチの病態生理の統合的な解明を行うとともに、本研究で確立した生体イメージング系を新たな薬効評価系として活用して、“細胞遊走”を標的とした新規 RA 治療薬のスクリーニング・開発を目指す

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 17 件)【全て査読有】

- 1) Sano H, Kikuta J, Furuya M, Kondo N, Endo N, Ishii M. Intravital bone imaging by two-photon excitation microscopy to identify osteocytic osteolysis in vivo. *Bone*, 74:134-9, 2015.
- 2) Sekimoto R, Fukuda S, Maeda N, Tsushima Y, Matsuda K, Mori T, Nakatsuji H, Nishizawa H, Kishida K, Kikuta J, Maijima Y, Funahashi T, Ishii M, Shimomura I. Visualized macrophage dynamics and significance of S100A8 in obese fat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112(16): E2058-66, 2015.
- 3) Murota H, Matsui S, Ono E, Kijima A, Kikuta J, Ishii M, Katayama I. Sweat, the driving force behind normal skin: An emerging perspective on functional biology and regulatory mechanisms. *J Dermatol Sci*, 77(1):3-10, 2015.
- 4) Iinuma S, Aikawa E, Tamai K, Fujita R,

Kikuchi Y, Chino T, Kikuta J, McGrath JA, Uitto J, Ishii M, Iizuka H, Kaneda Y. Transplanted Bone Marrow-Derived Circulating PDGFR α + Cells Restore Type VII Collagen in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa Mouse Skin Graft. *J Immunol*, 194(4):1996-2003, 2015.

5) Naito A, Yamamoto H, Kagawa Y, Naito Y, Okuzaki D, Otani K, Iwamoto Y, Maeda S, Kikuta J, Nishikawa K, Uemura M, Nishimura J, Hata T, Takemasa I, Mizushima T, Ishii H, Doki Y, Mori M, Ishii M. RFPL4A increases the G1 population and decreases sensitivity to chemotherapy in human colorectal cancer cells. *J Biol Chem*, 290(10):6326-37, 2015.

6) 宇佐見 潤, 繁田 浩功, 間下 以大, 黒田 嘉宏, 菊田 順一, 瀬尾 茂人, 石井 優, 松田 秀雄, 竹村 治雄, “グラフカットを用いた骨髄腔画像の領域分割”, 情報処理学会論文誌数理モデル化と応用, Vol.8, No.1, pp.18-27, 2015.

7) David M, Machuca-Gayet I, Kikuta J, Ottewell P, Mima F, Leblanc R, Bonnelye E, Ribeiro J, Holen I, Lopez Vales R, Jurdic P, Chun J, Clézardin P, Ishii M, Peyruchaud O. Lysophosphatidic acid receptor type 1 (LPA1) plays a functional role in osteoclast differentiation and bone resorption activity. *J Biol Chem*, 289(10):6551-6564, 2014.

8) Matsui S, Murota H, Takahashi A, Yang L, Lee JB, Omiya K, Ohmi M, Kikuta J, Ishii M, Katayama I. Dynamic Analysis of Histamine-Mediated Attenuation of Acetylcholine-Induced Sweating via GSK3 β Activation. *J Invest Dermatol*, 134(2):326-334, 2014.

9) Hatori R, Ando T, Sasamura T, Nakazawa N, Nakamura M, Taniguchi K, Hozumi S, Kikuta J, Ishii M, Matsuno K. Left-right asymmetry is formed in individual cells by intrinsic cell chirality. *Mech Dev*, 133:146-62, 2014.

10) Masahata K, Umemoto E, Kayama H, Kotani M, Nakamura S, Kurakawa T, Kikuta J, Gotoh K, Motooka D, Sato S, Higuchi T, Baba Y, Kurosaki T, Kinoshita M, Shimada Y, Kimura T, Okumura R, Takeda A, Tajima M, Yoshie O, Fukuzawa M, Kiyono H, Fagarasan S, Iida T, Ishii M, Takeda K. Generation of colonic IgA-secreting cells in the caecal patch. *Nat Commun*, 5:3704, 2014.

11) Maeda S, Wada H, Naito Y, Nagano H, Simmons S, Kagawa Y, Naito A, Kikuta J, Ishii T, Tomimaru Y, Hama N, Kawamoto K, Kobayashi S, Eguchi H, Umeshita K, Ishii H, Doki Y, Mori M, Ishii M. Interferon- α Acts on the S/G2/M Phases to Induce Apoptosis in the G1 Phase of an

IFNAR2-Expressing Hepatocellular Carcinoma Cell Line. *J Biol Chem*, 289(34): 23786-95, 2014.

12) Matsui S, Murota H, Ono E, Kikuta J, Ishii M, Katayama I. Olopatadine hydrochloride restores histamine-induced impaired sweating. *J Dermatol Sci*, 74(3): 260-1, 2014.

13) Kajita M, Sugimura K, Ohoka A, Burden J, Suganuma H, Ikegawa M, Shimada T, Kitamura T, Shindoh M, Ishikawa S, Yamamoto S, Saitoh S, Yako Y, Takahashi R, Okajima T, Kikuta J, Maijima Y, Ishii M, Tada M, Fujita Y. Filamin acts as a key regulator in epithelial defence against transformed cells. *Nat Commun*, 5:4428, 2014.

14) Kikuta J, Kawamura S, Okiji F, Shirazaki M, Sakai S, Saito H, Ishii M. Sphingosine-1-phosphate-mediated osteoclast precursor monocyte migration is a critical point of control in antibone-resorptive action of active vitamin D. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(17):7009-13, 2013.

15) Ueno M, Fujita Y, Tanaka T, Nakamura Y, Kikuta J, Ishii M, Yamashita T. Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat Neurosci*, 16(5):543-51, 2013.

16) Ishii M, Fujimori S, Kaneko T, Kikuta J. Dynamic live imaging of bone: opening a new era with 'bone histodynametry'. *J Bone Miner Metab*, 31(5):507-511, 2013.

17) Kagawa Y, Matsumoto S, Kamioka Y, Mimori K, Naito Y, Ishii T, Okuzaki D, Nishida N, Maeda S, Naito A, Kikuta J, Nishikawa K, Nishimura J, Haraguchi N, Takemasa I, Mizushima T, Ikeda M, Yamamoto H, Sekimoto M, Ishii H, Doki Y, Matsuda M, Kikuchi A, Mori M, Ishii M. Cell Cycle-Dependent Rho GTPase Activity Dynamically Regulates Cancer Cell Motility and Invasion In Vivo. *PLoS One*, 8(12):e83629, 2013.

〔学会発表〕(計 53 件)

1) 菊田順一: 蛍光生体イメージング技術による骨髄・免疫細胞の動態解析、日本リウマチ学会第1回アニュアルベーシックコースレクチャー、アキバプラザ、東京、日本、2014年10月25日

2) 菊田順一: 生体二光子励起イメージングによる骨代謝ダイナミクスの動的解析、第87回日本生化学会大会、国立京都国際会館、京都、日本、2014年10月16日

3) Junichi Kikuta, Mai Shirazaki, Masaru Ishii. Dynamic analysis of short-term effects of bisphosphonates by using intravital two-photon microscopy. The American Society for Bone and Mineral

Research 2014 Annual Meeting, George R. Brown Convention Center, Houston, Texas, USA, September 13th, 2014.

4) Junichi Kikuta, Masayuki Furuya, Toshiyuki Kowada, Kazuya Kikuchi, Masaru Ishii. Intravital imaging of osteoclast dynamics by using multiphoton microscopy. The 18th International Microscopy Congress, Prague Congress Centre, Prague, Czech Republic, September 10th, 2014.

5) 菊田順一: 生体多光子励起イメージングによる生きた細胞動態の解析、第33回日本医用画像工学会、東京慈恵会医科大学、東京、日本、2014年7月26日

6) 菊田順一、石井優: 2光子励起顕微鏡を駆使した骨髄イメージング、第32回日本骨代謝学会学術集会、大阪国際会議場、大阪、日本、2014年7月25日

7) 菊田順一: 骨吸収のダイナミクスーライブイメージング研究ー、第11回ビスフォスフォネート Update、大阪国際会議場、大阪、日本、2014年7月24日

8) 菊田順一、白崎舞、石井優: 生体二光子励起イメージングによるビスホスホネート製剤の短期的効果の検討、第32回日本骨代謝学会学術集会、大阪国際会議場、大阪、日本、2014年7月24日

9) 菊田順一、金子雄、石井優: 生体骨組織内における血管透過性の評価とその制御機構の解明、第1回日本骨免疫会議、万国津梁館、沖縄、日本、2014年7月4日

10) 菊田順一、石井優: Dynamic visualization of RANKL-mediated vascular permeability in living bones by intravital multiphoton microscopy、第58回日本リウマチ学会総会・学術集会、グランドプリンスホテル新高輪・国際館パミール、東京、日本、2014年4月26日

11) 菊田順一、石井優: 活性型ビタミンDはS1Pによる破骨前駆細胞の遊走制御機構を調整することにより骨吸収を抑制する、第58回日本リウマチ学会総会・学術集会、グランドプリンスホテル新高輪・国際館パミール、東京、日本、2014年4月25日

12) 菊田順一: Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function、The 8th Bone Research Seminar、東京コンファレンスセンター・品川、東京、2014年2月14日

13) 菊田順一: 骨のライブイメージングによる破骨細胞の動態解析、第7回骨・軟骨フロンティア、バルサール八重洲、東京、2013年11月30日

14) 菊田順一: ライブイメージングによる骨髄・免疫細胞の動態解析、第16回骨代謝研究会、慶應義塾大学医学部、東京、2013年11月30日

15) Junichi Kikuta, Fumie Okiji, Mai Shirazaki, Sadaoki Sakai, Hitoshi Saito,

Masaru Ishii. S1P-mediated osteoclast precursor monocyte migration is a critical point of control in antbone-resorptive action of active vitamin D. The American Society for Bone and Mineral Research 2013 Annual Meeting, Baltimore Convention Center, Baltimore, USA, October 6th, 2013.

16) 菊田順一: 生体多光子励起イメージングによる破骨細胞の動態解析、第 14 回運動器科学研究会、汐留コンファレンスセンター、東京、2013 年 9 月 14 日

17) 菊田順一: 生体多光子励起イメージングによる骨髄・免疫細胞の動態解析、第 37 回日本リンパ学会総会、アクロス福岡国際会議場、福岡、2013 年 6 月 15 日

18) 菊田順一: 二光子励起レーザー顕微鏡を用いた生体イメージング研究、第 10 回ビスフォスフォネート Update、神戸国際会議場、神戸、2013 年 5 月 30 日

19) Junichi Kikuta, Masaru Ishii. Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated control of osteoclast function. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Research, Kobe Portopia Hotel, Kobe, Japan, May 31th, 2013.

20) Junichi Kikuta, Manato Kotani, Michio Tomura, Masaru Ishii. Systemic circulation and bone recruitment of osteoclast precursors tracked by using fluorescent imaging techniques. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Research, Kobe Portopia Hotel, Kobe, Japan, May 31th, 2013.

〔図書〕(計 25 件)

1) 菊田順一, 石井優. イメージングを用いた骨代謝研究. *BIO Clinica* 30(1):23-27, 2015.

2) 菊田順一, 石井優. ビタミン D の免疫細胞への作用と感染防御. *Clinical Calcium* 25(3):359-365, 2015.

3) 菊田順一, 石井優. 骨代謝の in vivo イメージング. *Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌* 2015 152-159, 2015.

4) 水野紘樹, 菊田順一, 石井優. 生体イメージングによる炎症病態の機能的解析. 別冊 *BIO Clinica* 4(1):1-4, 2015.

5) 菊田順一, 石井優. 破骨細胞イメージングによる骨破壊メカニズムの解明. *Surgery Frontier* 22(1):28-33, 2015.

6) Kikuta J, Ishii M. Intravital multiphoton microscopy for dissecting cellular dynamics in arthritic inflammation and bone destruction. *Methods Mol Biol*, 1142:1-10, 2014.

7) 水野紘樹, 菊田順一, 石井優. ライブイメ

ージング. 遺伝子医学 MOOK 別冊細胞の 3 次元組織化—その最先端技術と材料技術 再生医療とその支援分野(細胞研究, 創薬研究)への応用と発展のために 354-358, 2014.

8) 水野紘樹, 菊田順一, 石井優. 骨髄環境のライブイメージング. *Clinical Calcium* 24(4):541-546, 2014.

9) 菊田順一, 石井優. 世界初 破骨細胞が骨を壊す様子の可視化に成功. 自動車技術 68(4):100-101, 2014.

10) 菊田順一, 古家雅之, 石井優. 骨組織における in vivo イメージング. 実験医学増刊 32(7):1054-1060, 2014.

11) 菊田順一, 石井優. 骨組織の生体多光子励起イメージング 日本臨牀増刊号 最新関節リウマチ学 1057:178-184, 2014.

12) 菊田順一, 石井優. 骨髄内細胞動態イメージング(2光子励起顕微鏡を用いて). *The bone* 28(2):185-190, 2014.

13) 菊田順一, 石井優. 4D イメージング. 整形・災害外科 57(7):921-926, 2014.

14) 菊田順一, 石井優. 免疫系と骨・血管関連. *Clinical Calcium* 24(7):1031-1036, 2014.

15) 菊田順一, 古家雅之, 石井優. 病態の最新知見—画像イメージングから. 整形外科 65(8):712-718, 2014.

16) 菊田順一, 石井優. S1P/S1P 受容体と骨粗鬆症. 骨粗鬆症治療 13(2):93-96, 2014.

17) 菊田順一, 石井優. 炎症の visualization. 実験医学増刊 32(17):2716-2720, 2014.

18) 菊田順一, 石井優. ライブイメージングから見る骨吸収・慢性炎症時のマクロファージ動態. 細胞工学 33(12):1267-1271, 2014.

19) 菊田順一, 石井優. 骨髄内イメージング—破骨細胞と骨動態—. 生体イメージング研究 Update 69-79, 2014.

20) 前田栄, 菊田順一, 石井優. 4D イメージングによる消化器疾患への応用. *G.I.Research* 21(4): 368 -375, 2013.

21) 菊田順一, 石井優. 骨組織の in vivo イメージング. 実験医学 31(6):862-869, 2013.

22) 菊田順一, 石井優. 破骨細胞研究の最前線. *BIO Clinica* 28(10):911-916, 2013.

23) 菊田順一, 石井優. 骨吸収のダイナミクス—ライブイメージング *Clinical Calcium* 23(11):1627-1633, 2013.

24) 菊田順一, 石井優. 破骨細胞のライブイメージング技術の開発. アンチ・エイジングシリーズ 3 骨研究最前線 249-256, 2013.

25) 菊田順一. 生体多光子励起イメージングによる骨髄・免疫細胞の動態解析. *リンパ学* 36(2):123-126, 2013.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊田 順一 (Junichi Kikuta)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：60710069

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし