

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10488

研究課題名(和文)キメラ培養系を利用したヒト破骨細胞共存培養分化系確立の試みと分化メカニズムの解析

研究課題名(英文) Attempt to establish chimeric osteoclast co-culture system and mechanistic analysis of osteoclast differentiation

研究代表者

佐藤 浩二郎 (SATO, Kojiro)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10372434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：キメラ培養系においてマウス骨髄由来単球系細胞は培養中に消失した。培養系にM-CSFを添加すると単球系細胞は生存したが、TRAP陽性多核細胞にはならなかった。このことからヒト滑膜線維芽細胞は破骨細胞の生存因子・分化因子を十分産生していないと考えられた。実際この培養系にM-CSFとRANKLを共に添加すると、TRAP陽性の多核細胞が誘導された。意外なことに滑膜線維芽細胞はM-CSFを骨芽細胞に遜色ないレベルで産生しており、M-CSF以外の生存因子の存在が示唆された。更に骨芽細胞・滑膜線維芽細胞共に高濃度のOPGを産生しており、これは異所性の破骨細胞分化を抑制するメカニズムの可能性もある。

研究成果の概要(英文)：Synovial fibroblasts cannot be substituted for osteoblasts in osteoclast differentiation. They apparently do not provide sufficient survival factor(s). They also do not provide enough RANKL. Instead, they produce a large amount of OPG. Thus, osteoclasts observed in the pannus may be dependent on RANKL from other sources, or may be differentiated by stimulation of cytokines other than RANKL, such as TNF- and IL-6. Mouse osteoblasts also produce a large amount of OPG, which may function as a mechanism for preventing ectopic osteoclastogenesis.

研究分野：免疫学

キーワード：破骨細胞 骨芽細胞 滑膜由来線維芽細胞 破骨細胞分化因子

1. 研究開始当初の背景

T細胞の産生する主要なサイトカインの1つである IFN- γ が破骨細胞分化を強力に阻害するという報告 (Takayanagi et al., Nature 2000)を受けて申請者らは「IFN- γ を産生しないタイプの T 細胞が破骨細胞分化を促進する」という仮説を立て、実際に破骨細胞分化を促進する T 細胞分画として、IL-17 産生性の Th17 細胞を同定した (Sato et al., J Exp Med. 2006)。IL-17 の破骨細胞分化促進作用は直接作用ではないという実験結果が得られたため、当時の作業仮説としては IL-17 が骨芽細胞に作用して破骨細胞分化因子 (RANKL) 発現を誘導することを想定していた。従って、関節リウマチ (RA) の場合は IL-17 が関節滑膜線維芽細胞に作用し同様に RANKL 発現を誘導することが予想された。しかし我々が RA 患者由来滑膜線維芽細胞のトランスクリプトーム解析を行ったところ、IL-17 刺激によって滑膜線維芽細胞には RANKL の mRNA はほとんど誘導されず、タンパクレベルでも発現が確認されなかった。強く誘導されたのは白血球遊走に関わる各種ケモカインと、炎症性サイトカイン IL-6 であった。この結果は RA 関節液中の好中球増多をよく説明するものであるが、破骨細胞分化促進メカニズムについては不明な点が残された。

2. 研究の目的

マウスの骨芽細胞・破骨細胞前駆細胞の共存培養は破骨細胞分化系として確立している。一方でヒト RA の骨破壊モデルとして、関節滑膜由来線維芽細胞と破骨細胞前駆細胞を用いた共存培養系は確立していない。そのような系があれば RA の骨破壊のメカニズムの理解が進むことが期待できる。本研究ではヒトに

おける破骨細胞共存培養系をつくり、その性質を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

RA 患者の関節置換術により得られる関節滑膜から調整したヒト滑膜由来線維芽細胞とマウス骨髄細胞由来単球系細胞を共存培養し、TRAP 陽性多核細胞の分化を評価した。また滑膜由来線維芽細胞を各種の刺激下で培養し、培養上清中に含まれる M-CSF, RANKL および RANKL の阻受容体である OPG の濃度を ELISA で測定し、マウス骨芽細胞における結果と比較した。

4. 研究成果

キメラ培養系においてマウス骨髄由来単球系細胞は培養中に消失した。培養系に M-CSF を添加すると消失しなかったが、TRAP 陽性多核細胞にはならなかった。このことからヒト滑膜線維芽細胞は M-CSF および RANKL を十分産生しないことが考えられた。実際、この培養系に M-CSF と RANKL を共に添加すると TRAP 陽性の多核細胞が誘導された。

培養上清中の M-CSF, RANKL と OPG 濃度については、意外なことにヒト M-CSF は骨芽細胞由来の M-CSF に遜色ない程度に産生されていた。また、予想通り骨芽細胞由来の RANKL は定量出来たが滑膜線維芽細胞由来の RANKL は定量出来なかった。更にこれも意外な結果であったが、骨芽細胞・滑膜線維芽細胞共に高濃度の OPG を産生していた。これらの結果から、骨芽細胞由来の破骨細胞生存因子は M-CSF 以外にも存在し、滑膜線維芽細胞はそれを供給していないこと、また骨芽細胞からも多量の OPG が産生され、可溶性 RANKL の多くは中和されていることが示唆された。これは骨芽細胞に接した前駆細胞

しか破骨細胞に分化できないこと、すなわち異所性の破骨細胞分化を阻害していることを意味するのかもしれない。また膜性RANKLの重要性も同時に示唆されたと考えている。今後共存培養系を半透膜で分離するなどの方法で更に検討を進める予定である。

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)

Araki Y, Aizaki Y, Sato K, Oda H, Kurokawa R, Mimura T. Altered gene expression profiles of histone lysine methyltransferases and demethylases in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. Clin Exp Rheumatol. 2018 Mar-Apr; 36(2): 314-316. Epub 2018 Jan 31. (査読有り)

Ikuma D, Yokota K, Sato K, Mimura T. A case of new-onset rheumatoid vasculitis becoming evident in the course of treatment for Pneumocystis jirovecii pneumonia. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi. 2017;40(1):78-82. (査読有り)

Miyoshi F, Sato K, Mimura T. Changes in the pattern of cytokine production from peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab and their relation to plasma arginase activity International Journal of Rheumatic Diseases
巻 : in press ページ : in press

First published: 12 May 2016

DOI 10.1111/1756-185X.12864 (査読有り)

Wada TT, Sato K, Mimura T. A case of systemic lupus erythematosus with multiple nodules in the bilateral lungs and vertebrae. Eur J Rheumatol. 2016 Mar;3(1):38-40. (査読有り)

Araki Y, Tsuzuki Wada T, Aizaki Y, Sato K, Yokota K, Fujimoto K, Kim YT, Oda H, Kurokawa R, Mimura T. Histone Methylation and STAT-3 Differentially Regulate Interleukin-6-Induced Matrix Metalloproteinase Gene Activation in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. Arthritis Rheumatol. 2016 May;68(5):1111-23. (査読有り)

Sumiya E, Negishi-Koga T, Nagai Y, Suematsu A, Suda T, Shinohara M, Sato K, Sanjo H, Akira S, Takayanagi H. Phosphoproteomic analysis of kinase-deficient mice reveals multiple TAK1 targets in osteoclast differentiation. Biochem Biophys Res Commun. 2015 Aug 7;463(4):1284-90. (査読有り)

[学会発表](計5件)

Sato K et al., Analysis of the function of Nfatc1 isoforms in the differentiation of osteoclasts and attempt to make short-form specific Nfatc1 knockout mice by CRISPR/Cas9 system
第46回日本免疫学会学術集会
2017/12/12-14

佐藤 浩二郎 他

TNF 依存性/RANKL 非依存性破骨細胞様細胞分化メカニズムの解析

第 1 回日本骨免疫学会 2015/07/01

Sato K et al.,

A NOVEL HIERARCHICAL
RELATIONSHIP BETWEEN IL-17A AND
IFN- α INDICATED BY ANALYSIS OF
MULTIPLE CYTOKINES IN THE
SERUM OF AOSD AND BD

EULAR 2017/06/16

柳澤 麻依子, 佐藤 浩二郎 他

キメラ培養系を用いたヒト破骨細胞培養系
確立の試み

第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会

2016/4/21

立花 秀介, 佐藤 浩二郎 他

破骨細胞分化における NFATc1 isoform にお
ける機能的差異の検討

第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会

2016/4/21

〔図書〕(計 2 件)

佐藤 浩二郎 他、診断と治療社、リウ
マチ病学テキスト、2016、489-492

佐藤 浩二郎 他、文光堂、リウマチ・
膠原病治療薬ハンドブック、2018、107-116

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/riuma
achi/index.html](http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/riuma
achi/index.html)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 浩二郎 (SATO, Kojiro)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10372434

(2)研究分担者

なし

研究者番号：

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

柳澤 麻依子 (YANAGISAWA, Maiko)

立花 秀介 (TACHIBANA, Hideyuki)

相崎 良美 (AIZAKI, Yoshimi)

矢澤 宏晃 (YAZAWA, Hiroaki)

荒木 靖人 (ARAKI, Yasuto)

三村 俊英 (MIMURA, Toshihide)