

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21189

研究課題名(和文) IFN- $\gamma$  シグナル伝達異常症で認める破骨細胞機能促進の分子病態解析研究課題名(英文) Augmentation of osteoclast formation and its function in patients with IFN- $\gamma$  signaling abnormality

研究代表者

津村 弥来 (Tsumura, Miyuki)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・研究員

研究者番号：80646274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：食細胞機能異常症である IFN- $\gamma$  R1 および STAT1 欠損症は、メンデル遺伝型マイコバクテリア易感染症 (MSMD) に分類され、細胞内寄生菌に易感染性を示す原発性免疫不全症である。

多発性骨髄炎とそれに伴う骨融解の合併は、MSMD の臨床的特徴の一つである。骨髄炎病巣に、TRAP 陽性の多核巨細胞を認めたため、骨融解像は破骨細胞の過形成によることが示唆された。

破骨細胞は、骨吸収を行う多核の組織マクロファージで、骨髄球系/単球系細胞の分化・融合で産生される。IFN- $\gamma$  は破骨細胞形成の強力な抑制因子であるが、ヒトにおける抑制の分子機序は不明である。

研究成果の概要(英文)：STAT1 plays an important role in host immune response against viral and intracellular pathogens by mediating IFN- $\gamma$  / and IFN- $\gamma$  signaling. Heterozygous loss-of-function mutations in IFNGR1 and STAT1 can be molecular cause of Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Diseases (MSMD) in human. These pathogenic mutations exert a dominant-negative effect on IFN- $\gamma$ -STAT1 signaling, leading to host susceptibility to mycobacteria. Chronic and multifocal osteomyelitis is one of the representative symptoms in patients with MSMD. The histopathology of biopsied specimen shows noncaseating granuloma with abundant number of osteoclasts. Osteoclasts, bone-resorbing multinuclear cells, are derived from myeloid/monocyte lineage. IFN- $\gamma$  is known to be a strong inhibitor of osteoclastogenesis through the IFN- $\gamma$ -STAT1 signaling in mice. In this study, we examined the effect of IFN- $\gamma$  on the formation and function of osteoclast derived from using the patients with AD IFNGR1 or STAT1 deficiency.

研究分野：免疫不全

キーワード：STAT1 IFNGR1 MSMD 原発性免疫不全症 破骨細胞 iPS細胞

### 1. 研究開始当初の背景

食細胞機能異常症である IFN- $\gamma$  R1 および STAT1 欠損症は、メンデル遺伝型マイコバクテリア易感染症 (Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases; MSMD) に分類され、BCG, 非結核性抗酸菌, 結核菌, サルモネラなどの細胞内寄生菌に対して易感染性を示す原発性免疫不全症である。

多発性骨髄炎の合併は MSMD の 80% でみとめられる臨床的特徴の一つで、われわれが経験した症例も全て骨髄炎とそれに伴った骨融解像を認めていた。骨髄炎病巣において破骨細胞特異的マーカーである TRAP 陽性の多核巨細胞を認めため、骨融解像は破骨細胞の過形成によることが示唆された。

破骨細胞は骨リモデリングにおいて骨吸収を行う多核の組織マクロファージであり、骨髄球系/単球系細胞の分化・融合で産生される。IFN- $\gamma$  は破骨細胞形成の強力な抑制因子であるが、ヒトにおいて抑制の分子機序は明らかにされていない。本研究では、IFN- $\gamma$  シグナル伝達障害に伴う破骨細胞形成の抑制障害が多発性骨髄炎を引き起こすという仮説のもと、iPS 細胞, 骨髄細胞を用いた破骨細胞への分化誘導実験を行い、IFN- $\gamma$  シグナル伝達が骨リモデリングに及ぼす影響とその分子基盤を検討した。

### 2. 研究の目的

MSMD 患者に認められる骨融解の機序として IFN- $\gamma$  シグナル伝達が関与している可能性が考えられる。本研究では、食細胞機能異常症 (常染色体優性遺伝型 IFN- $\gamma$  R1 および STAT1 異常症) 由来の骨髄および iPS 細胞を用いて、IFN- $\gamma$  による破骨細胞の形成と機能への影響について解析し、ヒト破骨細胞における IFN- $\gamma$ -STAT1 シグナルの役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト由来骨髄単核球を用いた、IFN- $\gamma$  による破骨細胞の形成および機能への影響: 骨髄単核球を GM-SCF, IL-3, SCF 存在下メチルセルロース培地で 12 日間培養し、破骨細胞の前駆細胞の元となる CFU-GMs を形成させた。コロニーを回収し、M-CSF, RANKL を添加した 10%FBS 含有 MEM- $\alpha$  培地で破骨細胞に分化誘導した。この際、濃度依存的に IFN- $\gamma$  で刺激し、破骨細胞の形成と機能への影響を検討した。TRAP 染色・活性および破骨細胞の主要転写因子である NFATc1 の発現動態により形成能を、象牙切片の吸収により機能を解析した。

健常者 3 名 (本研究課題採択時に 1 名追加)、MSMD 発症 IFN- $\gamma$  R1 異常症 1 名、MSMD 発症 STAT1 異常症 2 名 (本研究課題採択時に 1 名追加) および CMCD 発症 STAT1 異常症 1 名 (本研究課題採択時に陰性コントロールとして追加) の計 7 名の骨髄単核球を用

いて検討を行った。

\* \* MSMD 発症 STAT1 異常症および IFN- $\gamma$  R1 異常症で認めるヘテロ接合型遺伝子変異は、機能喪失性変異であり、IFN- $\gamma$  の刺激に対し GAS (gamma-activated sequence) 転写活性を優性阻害することで低下させる。一方、CMCD (慢性皮膚粘膜カンジダ症) 発症 STAT1 異常症で認める遺伝子変異は、MSMD と同様にヘテロ接合型変異だが、IFN- $\gamma$  の刺激に対し GAS 転写活性を増強させる機能獲得型変異である。

(2) ヒト骨髄単核球を用いた、IFN- $\gamma$  により制御を受ける破骨細胞内分子機構の解析:

TRAF6 蛋白質発現動態の検討: 破骨細胞形成培養 0, 1, 3 日目の細胞を抽出し、ウエスタンブロットにて TRAF6 の蛋白発現を解析した。

*c-Fms*, RANK 遺伝子発現の検討: 破骨細胞形成培養 3 日目の細胞より RNA を抽出し、*c-Fms* および RANK の遺伝子発現をリアルタイム PCR で解析した。

破骨細胞における IFN- $\gamma$  で誘導される遺伝子の発現変動: INF- $\gamma$  誘導性遺伝子に着目し、リアルタイム PCR で遺伝子発現変動を検討する事で、破骨細胞形成への関与を検討した。

(3) ヒト由来 iPS 細胞を用いた、破骨細胞への分化誘導:

オンフィーダー培養系による破骨細胞の分化誘導: VEGF を添加した 10% FBS 含有 IMDM 培地でマウス AGM-3S フィーダー細胞上の iPS 細胞を造血系へと分化した。培養 12 日目に CD34 陽性細胞を採取し、GM-SCF, IL-3, SCF 存在下メチルセルロース培地で 14 日間培養し、CFU-GMs, CFU-Ms を形成させた。コロニーを回収し、M-CSF, RANKL を添加した 10%FBS 含有 MEM- $\alpha$  培地で破骨細胞に分化誘導した。

フィーダーレス培養系による破骨細胞の分化誘導: PLoS One., 8(4):e59243., 2013 を参考に、マトリゲルコーティング上で iPS 細胞を誘導させた。BMP4 を添加した mTeSR1 培地で 4 日間培養し、原始線条様細胞に分化誘導させ、その後 2 日間 VEGF, basic FGF, SCF を添加した StemPro-34 培地で培養し、KDR, CD34 陽性ヘマンジオプラスト様の細胞に誘導した。SCF, IL-3, TPO, M-CSF, Flt-3L 添加 StemPro-34 培地に於て一週間培養し、Flt-3L, GM-CSF 添加 StemPro-34 培地で約 5 日間培養後、各種細胞表面マーカーを用いて、単球系細胞を採取し、M-CSF, RANKL 存在下破骨細胞へ分化誘導させた。

### 4. 研究成果

(1) TRAP 染色および培養上清中の分泌 TRAP 活性の検討から IFN- $\gamma$  による破骨細胞形成への影響を調べた。健常者由来の破骨細胞は低濃度の IFN- $\gamma$  で破骨細胞形成が抑制された。一方で MSMD 発症 IFN- $\gamma$  R1, STAT1 異常症ともに破骨細胞形成の抑制が障害されており、抑制にはより高濃度の IFN- $\gamma$  が必要であった。また、GAS 転写活性が亢進型する CMCD 発症 STAT1 異常症では、健常者より低濃度の IFN- $\gamma$  で破骨細胞形成が抑制された。

破骨細胞の形成には主要転写因子である NFATc1 の発現上昇が不可欠であり、IFN- $\gamma$  によりその発現は低下することが知られている。破骨細胞形成 3 日目の細胞で検討したところ、患者では IFN- $\gamma$  による NFATc1 の発現低下が著明に障害されており、より高濃度の IFN- $\gamma$  を添加しないと NFATc1 の活性は低下しなかった。象牙切片の骨吸収により破骨細胞の機能を評価したところ、患者由来破骨細胞は健常者と比べて高濃度の IFN- $\gamma$  でも吸収促進がみとめられた。In vitro 実験系の結果から MSMD 患者では IFN- $\gamma$  に対して破骨細胞形成抑制とともにその機能抑制も低下していることが明らかとなった。一方、CMCD 発症 STAT1 異常症では、健常者に比べより低濃度の IFN- $\gamma$  で NFATc1 遺伝子の発現低下および骨吸収能の低下することがわかった。

(2) IFN- $\gamma$  により制御を受ける破骨細胞内分子メカニズムを明らかにするため、過去の報告を参考に検討した。

破骨前駆細胞に RANKL の刺激が入るとアダプター分子である TRAF6 を介して下流にシグナルが伝達され破骨細胞形成が促進する。Stat1 ノックアウトマウスの検討から、IFN- $\gamma$  刺激による Stat1 を介した TRAF6 蛋白の急速な分解により破骨細胞形成を抑制することが報告されている (Nature, 408:600-605, 2000)。

ヒトでも同様の所見がみとめられるか健常者および患者由来の破骨細胞を用い、経時的・IFN- $\gamma$  濃度依存的な TRAF6 蛋白発現量の変化を検討した。健常者、患者ともに IFN- $\gamma$  刺激による TRAF6 蛋白発現の低下は認められなかった。

従ってヒトにおいては IFN- $\gamma$  刺激による破骨細胞分化と機能の抑制に TRAF6 の関与するシグナル伝達系以外の抑制機構が存在している可能性が考えられた。

健常者末梢血 CD14 陽性細胞を用いた検討から、破骨細胞誘導に必須の M-CSF, RANKL のレセプターである c-Fms, RANK の遺伝子発現が IFN- $\gamma$  により低下することで破骨細胞形成が抑制されることが報告されている (J Immunol., 183:7223-7233, 2009)。

同様の実験を行ったところ、IFN- $\gamma$  による

c-Fms, RANK 発現低下は健常者、MSMD および CMCD 患者で同程度であり、有意差は認めなかった。このことから、IFN- $\gamma$  R1 や STAT1 を介する別の破骨細胞抑制分子機構の存在が推測された。

破骨細胞形成において、MSMD 患者では同濃度 IFN- $\gamma$  による抑制が健常者に比べて弱く、逆に CMCD 患者では健常者より強い抑制が見られた。これまでのヒトにおける IFN- $\gamma$  による破骨細胞形成抑制の分子メカニズムは明らかにされていない。そこで、IFN- $\gamma$  誘導性の遺伝子に着目し、破骨細胞形成に関与しそうな遺伝子を探索した。その結果、遺伝子 X を同定することができた。遺伝子 X は、文献的にも破骨細胞形成時に重要な分子であった。

(3) 研究期間内に、技術的な問題で、凍結保存された患者由来骨髄単核球より iPS 細胞を樹立できなかった。本研究では、健常人から樹立した iPS 細胞を用いて、破骨細胞への分化誘導系の確立を試みた。

当研究室では、iPS 細胞から好中球への分化誘導に成功しているため、同様の方法でマウス AGM-3S 上で iPS 細胞を誘導させ、CD34 陽性細胞を採取した。CFU-GMs の培養までは形態学的に成功しているようだったが、破骨細胞への分化誘導時に細胞内に巨大な空胞をみとめ、破骨細胞の特徴である細胞融合が生じなかった。

フィーダーレス培養系では、KDR, CD34 陽性ヘマンジオプラスト様の細胞が約 20% の割合で採取できたが、骨髄を用いたときのように、GM-SCF, IL-3, SCF 含有メチルセルロース培地での培養からはほとんど CFU-GMs コロニーは形成されなかった。

よって、CD34 陽性細胞を採取するのではなく、単球の細胞を採取すべくそのまま分化培養をすることにした。メイ・ギムザ染色の結果から、好中球系の細胞が多く存在していたため、CD14 陽性単球系細胞をソーティングし、破骨細胞の誘導を試みたが、オンフィーダーの時と同様に細胞内に空胞をみとめる巨大な単核細胞に分化していた。いずれも、破骨細胞というよりはマクロファージ様の細胞であった。

これまでのヒト骨髄あるいはヒト末梢血からの in vitro 分化系を考察すると、骨髄単核球を用いた実験系で、CFU-GMs から効率よく破骨細胞が形成できること、また、末梢血 CD14 陽性細胞からは数%しか破骨細胞へ誘導できない。従って、iPS 細胞からの誘導系においても CD14 陽性細胞からでは破骨細胞を効率よく分化できないのではと考えた。より未熟な単球系細胞から培養すれば破骨細胞への誘導率があがるのではないかと考え、CD14 弱陽性あるいは CD14 陰性/c-fms 陽性/CD11b 陽性の細胞群を採取し、破骨細胞

胞を形成させた。その結果、CD14 強陽性細胞群からよりも効率よく破骨細胞へ分化誘導できることがわかった。今後は、サイトカインの選択や培養期間、細胞の採取時期等を工夫し、より効率よく iPS 細胞から破骨細胞を誘導する分化系の確立に取り組みたい。

本研究の結果から IFN- $\gamma$  シグナル伝達障害をもつ MSMD 患者では、IFN- $\gamma$  による破骨細胞の抑制機構の破綻により骨病変を呈することが推測された。一方、CMCD 患者では IFN- $\gamma$  による破骨細胞形成の抑制は障害されないことがわかった。IFN- $\gamma$  誘導性の遺伝子に着目したところ、破骨細胞形成に関わる重要な分子を同定することができた。

ヒト末梢血単核球からの破骨細胞形成率は数%未満であり、十分な検討はできない。一方、本課題で行った骨髄単核球からはより純度の高い破骨細胞形成ができるが、患者への負担を考慮せねばならない。今後、より詳細に検討をするためには、安定した細胞の確保が必須であるため、iPS 細胞からの分化誘導を確立しなければならない。

#### 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 7 件)

1. Kagawa R, Fujiki R, Tsumura M, Sakata S, Nishimura S, Itan Y, Kong XF, Kato Z, Ohnishi H, Hirata O, Saito S, Ikeda M, El Baghdadi J, Bousfiha A, Fujiwara K, Oleastro M, Yancoski J, Perez L, Danielian S, Ailal F, Takada H, Hara T, Puel A, Boisson-Dupuis S, Bustamante J, Casanova JL, Ohara O, Okada S, Kobayashi M.

Alanine-scanning mutagenesis of human signal transducer and activator of transcription 1 to estimate loss- or gain-of-function variants.

*J Allergy Clin Immunol.*, 2016, doi: 10.1016/j.jaci.2016.09.035. [Epub ahead of print] 査読有.

2. Hoshino A, Okada S, Yoshida K, Nishida N, Okuno Y, Ueno H, Yamashita M, Okano T, Tsumura M, Nishimura S, Sakata S, Kobayashi M, Nakamura H, Kamizono J, Mitsui-Sekinaka K, Ichimura T, Ohga S, Nakazawa Y, Takagi M, Imai K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Kojima S, Nonoyama S, Morio T, Kanegane H.

Abnormal hematopoiesis and autoimmunity in human subjects with germline IKZF1 mutations.

*J Allergy Clin Immunol.*, 2016, doi: 10.1016/j.jaci.2016.09.029. [Epub ahead of

print] 査読有.

3. Tajima G, Hara K, Tsumura M, Kagawa R, Okada S, Sakura N, Hata I, Shigematsu Y, Kobayashi M.

Screening of MCAD deficiency in Japan: 16years' experience of enzymatic and genetic evaluation.

*Mol Genet Metab.*, 2016, 19(4):322-328. doi: 10.1016/j.ymgme.2016.10.007. 査読有.

4. Hara K, Tajima G, Okada S, Tsumura M, Kagawa R, Shirao K, Ohno Y, Yasunaga S, Ohtsubo M, Hata I, Sakura N, Shigematsu Y, Takihara Y, Kobayashi M.

Significance of ACADM mutations identified through newborn screening of MCAD deficiency in Japan.

*Mol Genet Metab.*, 2016, 118(1):9-14. doi: 10.1016/j.ymgme.2015.12.011. 査読有.

5. Hayakawa S, Okada S, Tsumura M, Sakata S, Ueno Y, Imai K, Morio T, Ohara O, Chayama K, Kobayashi M.

A Patient with CTLA-4 Haploinsufficiency Presenting Gastric Cancer.

*J Clin Immunol.*, 2016, 36(1):28-32. doi: 10.1007/s10875-015-0221-x.

6. Kataoka S, Muramatsu H, Okuno Y, Hayashi Y, Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Kobayashi M, Sano C, Sato H, Oh-Iwa I, Ito M, Kojima D, Hama A, Takahashi Y, Kojima S.

Extrapulmonary tuberculosis mimicking Mendelian susceptibility to mycobacterial disease in a patient with signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) gain-of-function mutation.

*J Allergy Clin Immunol.*, 2016, 137(2):619-622.e1. doi:10.1016/j.jaci.2015.06.028. 査読有.

7. Hirata O, Okada S, Tsumura M, Karakawa S, Matsumura I, Kimura Y, Maihara T, Yasunaga S, Takihara Y, Ohara O, Kobayashi M.

Mosaicism of an ELANE mutation in an asymptomatic mother in a familial case of cyclic neutropenia.

*J Clin Immunol.*, 2015, 35(5):512-6. doi: 10.1007/s10875-015-0165-1. 査読有.

[学会発表](計 2 件)

1. 津村 弥来, 平田修, 香川礼子, 溝口洋子, 岡田賢, 小林正夫

Enhanced osteoclastogenesis is caused by the abnormal IFN-STAT1 signaling in MSMD patients.

第 77 回日本血液学会学術集会, 2015 年 10 月

16日～18日, 石川県立音楽堂, ANA クラウンプラザホテル, ホテル日航金沢, ホテル金沢, 金沢市アートホテル, もてなしドーム (石川県金沢市)

2. 津村弥来・岡田賢・小林正夫

Osteoclastogenesis is significantly enhanced in patients with MSMD through the impaired of IFN- $\gamma$ -STAT1 signaling.

第44回日本免疫学会学術集会, 2015年11月18日～20日, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市白石区)

〔図書〕(計 1件)

岡田賢・津村弥来・小林正夫, 科学評論社, 臨床免疫・アレルギー科, 2017年, 7ページ (p147-p153)

〔その他〕

ホームページ等

STAT1 遺伝子変異の病的意義を高度に予測するツール

<https://www.hiroshima-u.ac.jp/nesw/36849>

6. 研究組織

(1)研究代表者

津村 弥来 (TSUMURA MIYUKI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院

・研究員

研究者番号: 80646274