様　式　C－19、F－19－1、Z－19　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　2 年　6 月　9 日現在

機関番号：１２６０１
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2018～2019
課題番号：１８Ｋ１９４３８

研究課題名（和文）関節リウマチの骨破壊を抑制する革新的な治療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel therapies against bone erosion in rheumatoid arthritis

研究代表者
小松　紀子（Komatsu, Noriko）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・助教

研究者番号：２０５５３３５８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,800,000円

研究成果の概要（和文）：関節リウマチは関節の慢性的な炎症と骨破壊をおもな症状とする自己免疫疾患である。骨破壊における破骨細胞誘導細胞の同定は画期的な骨破壊治療法の開発につながるが、未だ行われていなかった。本研究では破骨細胞誘導因子をB細胞、滑膜線維芽細胞、T細胞でそれぞれ特異的に欠損するマウスを作製し自己免疫性関節炎を誘導したところ滑膜線維芽細胞が自己免疫性関節炎における主要な破骨細胞誘導細胞であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
関節リウマチは最も罹患率の高い自己免疫疾患のひとつであるがその病態形成のメカニズムは未だ不明な点が多い。生物学的製剤は全身性の免疫抑制による副作用や効果が認められない症例の存在などの問題を解決するような治療法の開発が喫緊の課題である。本研究より明らかとなった関節リウマチの骨破壊における破骨細胞誘導細胞の決定は長年のRA研究の命題を解決するものでありRA骨破壊のメカニズムの理解のみならず画期的な骨破壊制御法の確立に繋げるうえで学術的にも社会的にも意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Rheumatoid arthritis is anautoimmune disease which exhibits chronic inflammation and bone destruction.Osteoclasts are responsible for bone destruction in rheumatoid arthritis,however, osteoclast-inducers have not been identified yet. Here we generated newconditional knockout mice in which osteoclast differentiation factor isspecifically deleted in B cells, T cells and synovial fibroblasts. We foundsynovial fibroblasts are the major osteoclast-inducer cells. It will contributeto the development of new therapies against bone destruction.

研究分野：免疫学

キーワード：関節リウマチ

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

１．研究開始当初の背景

　関節リウマチは最も罹患率の高い自己免疫疾患のひとつであるが、その病態形成のメカニズムは未だ不明な点が多い。生物学的製剤は全身性の免疫抑制による副作用や効果が認められない症例の存在などの問題を解決するような治療法の開発が喫緊の課題である。
　関節リウマチでは、慢性的な炎症に伴って関節部位をはじめとして骨破壊が誘導される。関節リウマチの骨破壊は破骨細胞によって引き起こされ、破骨細胞の分化は破骨細胞誘導因子 RANKL によって誘導される。したがって破骨細胞誘導因子を発現する細胞は骨破壊を誘導する悪玉細胞であると考えられる。関節リウマチの骨破壊における破骨細胞誘導細胞の決定は長年の RA 研究の命題であるものの、未だ解明されていない。炎症関節に局在する悪玉細胞や特異的に発現する標的分子を同定することは、関節リウマチの骨破壊のメカニズムの理解のみならず画期的な骨破壊制御法の確立に繋がる。
　申請者は以前、関節リウマチのマウスモデルをもちいて、炎症の指標となる関節の腫脹スコアが同程度の条件下において、T 細胞と比較して滑膜繊維芽細胞のほうが関節の骨破壊における寄与が大きいことを報告した（Danks et al. Ann Rheum Dis. 2016）。一方で、他の研究グループによって関節リウマチの炎症滑膜において B 細胞でも RANKL 発現が報告されている。（Yeo, L. et al. Ann Rheum Dis.2011, Meednu, N. et al. Arthritis Rheumatol 2016, Ota, Y. et al. Arthritis Res Ther 2016）しかしながら、B 細胞の寄与を含めた生体レベルでの主要な RANKL 発現細胞の同定は未だ行われていなかった。

２．研究の目的

　上記の申請者の独自の知見に基づいて、本研究では、第一に関節炎の関節部位の骨破壊に寄与する細胞系譜の決定を行う。第 2 に病原性を司る分子基盤の解明ならびに分子マーカーの探索を行い、治療標的の開発に繋げることを目的とする。これらの研究を通して、長年の関節リウマチ研究の命題の決着と革新的な関節リウマチ骨破壊の抑制法に繋げることを目指す。

３．研究の方法

　申請者の研究室が独自に樹立した破骨細胞誘導因子 RAKNLflox マウスと Mb1-Cre(B 細胞), Col6-Cre(滑膜線維芽細胞)、Lck-Cre(T 細胞)マウスを交配して RANKL コンディショナルノックアウトマウスマウスを B6 背景にて作製した。B6 系統は関節リウマチのマウスモデルであり、自己免疫性関節炎として位置づけられるコラーゲン誘導性関節炎の抵抗性の系統として知られる。関節の炎症及び骨破壊における評価を包括的に行う目的で、コラーゲン誘導性関節炎感受性の DBA/1 背景への戻し交配を行うことで、DBA 背景のコンディショナルノックアウトマウスの樹立を試みた。
　DBA 背景の滑膜線維芽細胞、T 細胞、B 細胞特異的 RANKL コンディショナルノックアウトマウスにコラーゲン誘導性関節炎をそれぞれ誘導し、炎症スコアを評価するとともに関節破壊をマイクロ CT によって評価した。これらの研究方法により、関節炎の関節部位の骨破壊に寄与する細胞系譜の決定を試みた。さらに、RNAseq 解析やデータベース上のシングルセル RNAseq 解析などを活用して、破骨細胞誘導因子 RANKL を発現する細胞のサブセットに特異的発現因子の同定を試みた。

４．研究成果

　破骨細胞誘導因子 RAKNLflox マウスと Mb1-Cre(B 細胞), Col6-Cre(滑膜線維芽細胞)、Lck-Cre(T 細胞)マウスを交配して DBA 背景の RANKL コンディショナルノックアウトマウスの樹立に成功し、それぞれの細胞種で RANKL 発現が欠損していることを確認した。
　これらのマウスにコラーゲン関節炎を誘導したところ、すべての系統において関節の腫脹が最大レベルまで観察された。このことから B 細胞、T 細胞、滑膜線維芽細胞由来の RANKL は炎症の成立に寄与しないことが示された。この条件において関節破壊を評価したところ、T 細胞や B 細胞特異的な RANKL 欠損マウスではコントロールと同程度の関節破壊が認められなかったのに対し、滑膜線維芽細胞特異的 RANKL 欠損マウスではコントロールと比較して関節破壊の抑制が認められた。
　以上の結果より、滑膜線維芽細胞が自己免疫性関節炎における主要な破骨細胞誘導細胞であることが明らかとなった。RNAseq 解析により、骨破壊誘導性の滑膜線維芽細胞に高発現する遺伝子を複数同定した。

近年、関節リウマチのシングルセル解析などにより滑膜線維芽細胞は骨破壊誘導性のサブセットと炎症誘導性のサブセットに分類されることが報告された(Croft et al Nature. 2019)。この結果は申請者らの研究結果をサポートするものであると考えらえる。

今後は本研究で得られた知見をもとに研究を継続・発展させ遺伝子改変マウスや阻害抗体の作製により、革新的な RA 骨破壊の抑制法に繋げていく予定である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　1件）

１．著者名 Noriko Komatsu, Hiroshi Takayanagi	４．巻 194
２．論文標題 Immune-bone interplay in the structural damage in rheumatoid arthritis	５．発行年 2018年
３．雑誌名 Clinical and Experimental Immunology	６．最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cei.13188.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

〔学会発表〕　計7件（うち招待講演　3件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 小松　紀子
２．発表標題 骨破壊性T細胞による生体防御機構
３．学会等名 第36回日本骨代謝学会　学術集会（招待講演）
４．発表年 2018年

１．発表者名 小松　紀子、Lynett Danks，中島　友紀、高柳　広
２．発表標題 RANKLを発現する滑膜線維芽細胞の関節炎の骨破壊における意義
３．学会等名 第4回日本骨免疫学会
４．発表年 2018年

１．発表者名 小松　紀子
２．発表標題 骨破壊性T細胞による生体防御機構
３．学会等名 第19回運動器科学研究会
４．発表年 2018年

1．発表者名 小松　紀子
2．発表標題 骨破壊性T細胞による生体防御機構
3．学会等名 日本リウマチ学会 第5回ベーシックリサーチカンファレンス（招待講演）
4．発表年 2018年

1．発表者名 塚崎　雅之、小松　紀子、関　侑華、Warunee Pluemsakunthai、高柳　広
2．発表標題 骨外膜間葉系前駆細胞の機能に必須の遺伝子Hmtfの同定
3．学会等名 第4回日本骨免疫学会　ウインターセミナー
4．発表年 2019年

1．発表者名 小松　紀子
2．発表標題 Foxp3 + T細胞の分化可塑性と病理学的意義の解明
3．学会等名 第３回個体の中の細胞社会学ワークショップ（招待講演）
4．発表年 2019年

1．発表者名 小松　紀子
2．発表標題 自己免疫疾患を制御する新規T細胞サブセットの同定とその存在意義の解明
3．学会等名 第一回 日本医学会連合「Rising Star」リトリート
4．発表年 2019年

〔図書〕　計1件

1．著者名	4．発行年
小松　紀子、高柳　広	2019年
2．出版社	5．総ページ数
医歯薬出版株式会社	1277（1217-1222）
3．書名	
医学のあゆみ/関節リウマチにおける制御性T細胞	

〔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