

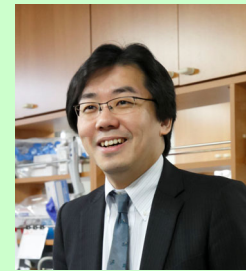
**炎症性骨破壊に関与する病原性破骨細胞の同定とその制御  
による新規治療法の開発**

Identification and control of pathogenic osteoclasts

課題番号：19H05657

石井 優（ISHII Masaru）

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授



研究の概要（4行以内）

破骨細胞はマクロファージから特殊に分化して骨を破壊・吸収するが、生理的環境下ではは傷んだ骨を吸収して骨のメンテナンスに関わるが、関節リウマチなどでは過剰に働くことで異常な骨破壊をきたす。本研究では炎症性骨破壊に関与する病的な破骨細胞を同定し、これを特異的に制御することで画期的な骨破壊治療法の開発を目指す。

研究分野：免疫学・リウマチ学・細胞生物学

キーワード：破骨細胞・マクロファージ・炎症・サブセット

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は単球・マクロファージから特殊に分化し、骨を破壊・吸収する細胞である。生理的環境下では破骨細胞は傷んだ骨を吸収して骨芽細胞による骨新生を促す正常な骨の新陳代謝のために必須の細胞であるが、一方では関節リウマチなどの骨吸収性疾患ではこの同じ細胞が過剰に働くことで異常な骨破壊をきたすと考えられてきた。しかし「これは本当に正しいのであろうか」というのが本研究者の当初の疑問であった。本研究者は世界に先駆けて生きた骨組織内部を観察する系を確立し、破骨細胞による骨破壊の様子をリアルタイムで可視化して解析することに成功してきた。当初は頭頂骨や長管骨における正常な骨代謝における破骨細胞を解析してきたが、最近では関節炎における破骨細胞の観察系を立ち上げ、世界で初めて炎症関節での骨破壊の様子を捉えることに成功してきた。その結果、関節破壊における炎症性破骨細胞は、その形態や機能などから正常な骨代謝を維持する恒常性破骨細胞とは明らかに異なることに気が付いた。そこから本研究者が抱いた疑問は、これら正常と病態の破骨細胞は、単に活性化状態の違いだけでなく、そもそも異なる細胞種ではないか、というものであった

2. 研究の目的

そこで本研究の当初の大きな目的は、

1) 炎症病態における病的破骨細胞、およびその前駆細胞を同定し、その性質を総合的に明らかにすること

2) 病的破骨細胞を特異的に抑制することで、正常の骨代謝への副作用がなく、かつ強力に骨破壊を抑制する新たな治療法を開発すること

であった。より具体的には、本研究者が当時すでに予備的に捉えていた「炎症性破骨細胞前駆細胞 (Arthritic Osteoclastogenic Macrophage: AtoM)」の詳細な解析を進め、この特徴的な細胞種の分化・機能・動態を統合的に解明するとともに、この細胞種を標的とした全く新しい骨破壊抑制薬を開発することである。既存の骨破壊抑制薬は、病的な骨破壊を担う破骨細胞だけでなく、通常の生理的骨代謝を維持する破骨細胞の機能も抑制してしまうので、あまり強力な治療はできない。今回の研究で、病的状態で骨破壊を誘導する異常な破骨細胞やその前駆細胞を同定し、それらを特異的に抑制する（正常の破骨細胞には影響を与えない）治療法ができれば、関節リウマチを始めとする炎症性骨破壊疾患や、病態が類似する癌転移による骨破壊に対する画期的な治療法の開発へとつながることが強く期待されていた。

3. 研究の方法

本研究者は、研究開始当初に、炎症関節局所から細胞を回収し解析することで、通常の破骨前駆細胞のマーカー表面分子 CX<sub>3</sub>CR1 を発現しつつも、炎症性マクロファージのマーカー分子 Ly-6C を中程度発現する特徴的な細胞集団 (CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup>Ly-6C<sup>int</sup>) が存在し、これが破骨細胞分化に必須のサイトカイン RANKL の受容体である RANK を高発現し、さらには in

vitro で破骨細胞に分化し得ることを見いだしていた (AtoM と名称)。本研究ではこれをもとに、以下の研究方法を策定してきた。

#### 1) AtoM の細胞特性の基礎的解析

AtoM のソーティング法を確立し、表面マーカーの網羅的解析のみならず、網羅的 RNA シークエンシングや、AtoM の分化ニッチを検討するため滑膜内細胞集団のシングルセル RNAseq 解析を行う。さらに AtoM に高発現する転写因子 FoxM1 に注目し、阻害効果や遺伝子欠損マウスを作成する。

#### 2) AtoM を標的とした炎症性骨破壊に対する新しい治療法の開発

正常な骨代謝を担う破骨細胞に影響しないで、病的骨破壊のみを抑制する新たな治療法開発のため、AtoM を標的とした治療法のスクリーニングを行う。具体的には転写因子 FoxM1 の既存の阻害剤の効果を検証し、さらにこの分子を標的としたより特異的な阻害剤のスクリーニングに取り組む。さらには、研究分担者とともに、ヒト関節滑膜からの細胞解析を進めて、AtoM に相当する細胞分画の同定・解析、および、その治療標的としての妥当性について検証する。

#### 4. これまでの成果

まず AtoM 上に発現する表面マーカーの解析を行った結果、CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup>Ly-6C<sup>int</sup>CD11b 以外にも、CD11c や MHC-Class II・CD80/86 といった抗原提示に関係する分子が高発現していることが分かった。また、AtoM を含む、炎症滑膜に存在する細胞群のシングルセル RNAseq 解析の実施により、AtoM が関節滑膜に含まれるマクロファージのうちの特定のサブセットであることが分かり、マクロファージの中でも Acp5 (TRAP) やカテプシン K などの発現が漸増しており、すでに破骨細胞分化にコミットしつつある細胞集団であることが明らかになった。また、この AtoM の分化・形質変化の機構について検討した結果、分化には M-CSF シグナルが関与することが示唆され、関節滑膜の微小環境 (ニッチ) が産生する M-CSF の機能が AtoM の生成に重要であることが示唆された。これらの成果をまとめて、炎症性 (病的) 破骨細胞の発見の第一報として論文発表を行った (2019 年 12 月 Nature Immunology 誌)。

一方で、AtoM を標的とした治療法については、AtoM の分化・機能に重要であることが示された転写因子 FoxM1 を標的とした治療の可能性について研究を行った。Streptomyces 属の細菌によって産生される抗生物質であり FoxM1 阻害活性を有するチオストレプトンが AtoM から炎症性破骨細胞の分化を抑制し、関節炎による骨破壊を抑制し得ることが明らかとなり、AtoM 標的治療の基本的な POC を得ることができた。

また、分担研究者との共同で、AtoM がヒト

関節炎破壊部位に存在するかについて解析を進めた。ヒトとマウスではマクロファージ上の表面マーカーが異なり、マウス AtoM を分離する際のマーカー Ly-6C はヒトには存在しない。このため surrogate のマーカーを検索した結果、HLA-DR および CD86 で分離できることを確認し、解析の結果、ヒト関節リウマチ患者の滑膜組織から AtoM 様細胞の同定に成功し、これが FoxM1 阻害効果のあるチオストレプトンで機能が抑制されることを発見した。

#### 5. 今後の計画

##### 1) AtoM の細胞特性の基礎的解析

関節滑膜に存在する AtoM 分化のニッチ細胞の同定のため、関節滑膜細胞のシングルセル RNAseq 解析を行うことで細分化し、ニッチとなる滑膜・間葉系細胞を同定する。炎症また、同じく病的骨破壊である骨転移性骨破壊での破骨細胞を同定する。このため、骨転移指向性のがん細胞 (乳がんおよび悪性黒色腫) を移植し、骨破壊部位の破骨細胞を、AtoM 同定と同様の手法で解析する。さらには AtoM で高発現する CD80/86 や MHC-Class II 分子に実際に抗原提示能があるかどうかを検証する。

##### 2) AtoM を標的とした新しい治療法の開発

FoxM1 の新規阻害化合物のスクリーニングを行い、得られた化合物を用いて阻害活性および治療効果を検証する。このヒト AtoM のより詳細な特徴の解析や、FoxM1 やその他の機能分子がヒトの系でも実際に機能しているかを検証する。さらに、RA のみならず、乾癬性関節炎 (PsA) や強直性脊椎炎 (SpA) などの類縁疾患においても、AtoM に相当するヒト細胞分画が存在するのか、またそれらは RA 同様に骨破壊を抑制する治療標的として有効であるかを、臨床検体を用いて検証する。

#### 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1) Hasegawa et al., Identification of a novel arthritis-associated osteoclast precursor macrophage regulated by FoxM1 *Nat Immunol*, 20(12):1631-1643, 2019.

2) Sudo et al., Group 2 innate lymphoid cells support hematopoietic recovery under stress conditions. *J Exp Med*, 218(5): e20200817, 2021.

3) Morimoto et al., SLPI is a critical mediator that controls PTH-induced bone formation. *Nat Commun*, in press, 2021.

令和 2 年 7 月 日本リウマチ学会・学会賞

令和 2 年 11 月 第 38 回 大阪科学賞

#### 7. ホームページ等

<http://www.icb.med.osaka-u.ac.jp>