

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590400

研究課題名（和文） 病的骨破壊をもたらす破骨細胞前駆細胞の解析と治療への応用

研究課題名（英文） Analysis of basic mechanisms of osteoclastogenesis to apply to clinical study

研究代表者

林 真一（HAYASHI SHIN-ICHI）

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：50208617

研究成果の概要（和文）：

本研究は破骨細胞分化誘導を制御する細胞系譜について検討する事を目的とした。骨吸収異常を持つマウスと正常の F1 マウスを用いて骨髄外と骨髄では破骨細胞前駆細胞の由来の比率が異なる事、また、腹腔細胞を低張処理にて除去する、或いは、骨髄細胞中に存在する T 細胞系譜の細胞を除去すると破骨細胞の分化誘導が減少する事を見出した。以上の結果は、破骨細胞前駆細胞は骨髄外からも由来し、骨髄内外に制御細胞系譜の存在を見出した。新しい骨疾患の治療の標的が示された。

研究成果の概要（英文）：

Bones are resorbed both in the steady and pathological states; however, it is not clear whether the regulation of osteoclastogenesis is same. Here, I detected the presence of the regulation of bone resorption from extramedullary sites. Intramedullary T lineage cells but also the cells in the peritoneal cavity might control the osteoclastogenesis. These results suggest that the novel therapy for bone diseases such as osteoporosis or arthritis will be opened.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：炎症、破骨細胞、免疫学、骨吸収、発生・分化、病理学、再生医学

1. 研究開始当初の背景

骨再構築など恒常的に行われている生理的な骨吸収と骨破壊をもたらす病的な骨吸収はともに破骨細胞によって行われるが、その機構の異同については、正確な情報は無い。

2. 研究の目的

骨吸収機能異常疾患を治療するために、骨吸収を司る破骨細胞の前駆細胞からの分化の制御機構、また前駆細胞自身の性格・分布を明らかにする。この結果、もたらされた情報から、治療への標的細胞を決定する。

3. 研究の方法

1) ヒト末梢血からの効率的な破骨細胞分化

誘導系の開発：マウスストロマ細胞株 ST2 を分化支持細胞として用い、効率を劇的に向上させることができた。

2) *Btk^{xid}* マウス破骨細胞前駆細胞を指標とした前駆細胞の由来と供給：C57BL/6 (B) マウスと *Btk^{xid}* 変異マウス CBA/N(N) の F1 マウスを作成し、(B♀ x N♂) (BN) F1 雄 (+/Y：正常コントロール) と NBF1 雄 (*Btk^{xid}/Y*)、さらにはそれぞれの F1 雌 BNF1 (+/*Btk^{xid}*) または NBF1 (*Btk^{xid}/+*) を用いた。

3) 腹腔細胞の除去とその影響：マウスに滅菌した蒸留水 3 ml を腹腔に注入し、経時的に骨髄細胞、脾臓細胞を回収し、その細胞を用いて、破骨細胞分化誘導を行った。マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) と破骨細胞分化因子 (RANKL) の添加で、6 日間培養にて判定した。

4. 研究成果

破骨細胞による骨吸収は、恒常的な骨再構築と骨破壊を伴う病的なものがある。この 2 つの機構を分離し、生理的骨再構築を阻害することなしに治療を目指す骨疾患治療法の開発の為に基礎的実験を試みるのが本研究の目的である。

1) ヒト末梢血からの効率的な破骨細胞分化誘導系の開発と疾患による破骨細胞前駆細胞：当大学医学部附属病院整形外科との共同研究で、ヒト関節リウマチと骨粗鬆症の患者の末梢血中の破骨細胞前駆細胞の性格を比較検討し、その異同について報告した (Nose, et al. 2009)。

2) *Btk^{xid}* マウス破骨細胞前駆細胞を指標とした前駆細胞の由来と供給の検討：破骨細胞分化が抑制されている細胞内チロシンキナーゼ *Btk* の変異 *xid* マウスの破骨細胞分化を指標に、BNF1 雄 (=正常コントロール) と NBF1 雄 (*xid* 変異マウス)、さらにはそれぞれの BNF1 雌または NBF1 雌の骨髄細胞からの破骨細胞誘導を M-CSF と RANKL のみの添加で多核の TRAP 陽性細胞数を比較した。その結果、BNF1 雄と BNF1 雌、NBF1 雌は同程度であったが、NBF1 雄は激減していた。単純に BNF1 雄と NBF1 雄を 1:1 で mix すると中間値を示した。この性質は X 染色体関連なので、破骨細胞前駆細胞のレベルで F1 の雌では骨髄においては正常型の X 染色体上の *Btk* が発現している細胞からなると予想される。同様の実験

をそれぞれの脾臓細胞で行うと、F1 雌は BNF1 雄と NBF1 雄の中間値を示した。以上の結果は、破骨細胞の前駆細胞が、骨髄外の脾臓では、同率に存在するが、骨髄内では正常のみが選択的に存在する事が示唆された。このマウスでは、B 細胞系譜は骨髄内では同率に脾臓では正常のみが存在するという結果と対称をなしており、もし、B 細胞が骨髄内で産生されるとするならば、破骨細胞前駆細胞は骨髄外で産生されるということになる。

3) 腹腔細胞の除去とその影響：腹腔に蒸留水を注入することで腹腔の細胞を低張処理するとそれ以降少なくとも 1 年間は、骨髄細胞から M-CSF と RANKL による破骨細胞分化誘導は半分以下に減少する事をこの研究で発見した (投稿準備中)。この減少は骨髄における破骨細胞の前駆細胞の頻度の減少ではなく、分化制御を司る細胞機構の変化によるものである事も示した。

4) 骨髄中に存在する T 細胞系譜の破骨細胞分化への関与：わずかに存在する骨髄細胞内 T 細胞系譜を Thy1.2、CD5、CD4、CD8a 等に対する抗体で除去することでも半減させられることを見出した。T 細胞除去による破骨細胞誘導の減少は、腹腔処理したマウスの骨髄では見出されなかったため、この腹腔処理と T 細胞による破骨細胞誘導制御の間には関連があることが示唆された。

以上、破骨細胞分化には、骨髄外の腹腔に存在する細胞系譜の制御、そして、骨髄内に存在する T 細胞系譜による制御により、骨吸収の量的・質的制御がなされている事を本研究が初めて示した。この結果により、骨髄内・外の 2 つの機構が理解でき、その制御の標的が明らかになったので、今後、関連する細胞系譜・分子機構を解析する段階に進むことができる。

この標的腹腔細胞を同定し、その特異的な除去法を開発することで、閉経期以降の女性に発症する骨粗鬆症予防を現実化できるのではと期待している。当初目標とした新しい破骨細胞制御機構の存在を明らかにすることが出来た。

この研究実施期間中に、慢性炎症をイメージした実験系で、Notch-Notch リガンドがシグナル分子としてだけではなく、接着分子として炎症の場に細胞を誘導・維持・放出する作用を持っている事 (Murata et al. 2010)、

さらには、ES細胞からの破骨細胞・骨芽細胞分化誘導法についても発表した (Tsuneto et al. 2011)。

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)

- ① Yoshikawa, T., Nakatsugawa, M., Suzuki, S., Shirakawa, H., Nobuoka, D., Sakemura, N., Motomura, Y., Tanaka-Harada, Y., Hayashi, S.I., Nakatsura, T.: HLA-A2-restricted glypican-3 peptide-specific CTL clones induced by peptide vaccine show high avidity and antigen-specific killing activity against tumor cells. *Cancer Sci.*, 102: 918-925 (2011).
- ② Murata, A., Okuyama, K., Sakano, S., Kajiki, M., Hirata, T., Yagita, H., Zúñiga-Pflücker, J. C., Miyake, K., Akashi-Takamura, S., Moriwaki, S., Niida, S., Yoshino, M., and Hayashi, S. I.: A Notch ligand, Delta-like 1 functions as an adhesion molecule for mast cells. *J. Immunol.*, 185: 3905-3912 (2010).
- ③ Nose, M., Yamazaki, H., Hagino, H., Morio, Y., Hayashi, S.I., and Teshima, R.: Comparison of osteoclast precursors in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis and osteoporosis patients. *J. Bone Miner. Metab.*, 27: 57-65 (2009).
- ④ Segawa, M., Fukada, S., Yamamoto, Y., Yahagi, H., Kanematsu, M., Sato, M., Ito, T., Uezumi, A., Hayashi, S.I., Miyagoe-Suzuki, Y., Takeda, S., Tsujikawa, K., and Yamamoto, H.: Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis. *Exp. Cell Res.*, 314: 3232-3244 (2008).
- ⑤ Kawaguchi, A., Chiba, K., Tanimura, Y., Motohashi, T., Aoki, H., Takeda, T., Hayashi, S.I., Shimizu, K., and Kunisada, T.: Isolation and characterization of Kit-independent melanocyte precursors induced in the skin of Steel factor transgenic mice. *Develop. Growth Differ.*, 50: 63-69 (2008).
- ⑥ Yoshino, M., Yamazaki, H., and Hayashi,

S.I.: Analysis of capturing skin antigens in the steady state using milk fat globule EGF factor 8-deficient skin-hyperpigmented mice. *Immunol. Lett.*, 115: 131-137 (2008).

[学会発表] (計13件)

- ① Yoshino, M., Okuyama, K., Murata, A., Egawa, Y., Sawada, A., Hayashi, S.I.: Distinct mechanisms of self-antigen transport from the epidermis and the dermis to regional lymph nodes. 14th International Congress of Immunology, 2010, 神戸.
- ② Okuyama, K., Murata, A., Egawa, Y., Sawada, A., Yoshino, M., Hayashi, S.I.: Detection of bone-marrow precursors given rise to B-lineage cells in the presence of delta-like 1. 14th International Congress of Immunology, 2010, 神戸.
- ③ Murata, A., Okuyama, K., Sawada, A., Egawa, Y., Sakano, S., Yagita, H., Zúñiga-Pflücker, J.C., Yoshino, M., Hayashi, S.I.: Function of Delta-like 1 as an adhesion molecule. 14th International Congress of Immunology, 2010, 神戸.
- ④ Yoshino, M., Okuyama, K., Murata, A., Egawa, Y., Sawada, A., Hayashi, S.I.: CCR7-independent trafficking of skin antigens to regional lymph nodes by cells in the dermis. 18th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2010: Macrophage Activation and Disease Process. 2010, 熊本.
- ⑤ Murata, A., Okuyama, K., Sakano, S., Yagita, H., Miyake, K., Wagatsuma, K., Moriyama, T., Yoshino, M., Hayashi, S.I.: A Notch ligand, Delta-like-1 functions as an adhesion molecule for mast cells. Immune Regulation: Present and Future. The First International Kishimoto Foundation Symposium. 2009, 大阪.
- ⑥ Murata, A., Okuyama, K., Wagatsuma, K., Moriyama, T., Sakano, S., Yagita, H., Miyake, K., Akashi-Takamura, S., Yoshino, M., Hayashi S.I.: A Notch ligand, Delta-like 1 functions as an adhesion molecule. 第39回日本免疫学会、2009、大阪.
- ⑦ Yoshino, M., Okuyama, K., Murata, A.,

Moriyama, T., Wagatsuma, K., Hayashi S.I.: CCR7非依存的に皮膚自己抗原を輸送する細胞の同定/Detection of dermal cells transporting skin antigens in CCR7-independent manner under steady state conditions. 第39回日本免疫学会、2009、大阪.

- ⑧ Okuyama, K., Murata, A., Moriyama, T., Wagatsuma, K., Yoshino, M., Hayashi, S.I.: B220⁺ Cd19⁺ Flt3⁺ Il7r α ⁺ bone-marrow precursors give rise to B-lineage cells in the presence of a Notch ligand, Delta-like 1. 第39回日本免疫学会、2009、大阪.
- ⑨ Wagatsuma, K., Okuyama, K., Murata, A., Moriyama, T., Yoshino, M., Hayashi, S.I.: Absence of “natural” IgM-secreting plasma cells in *Btk^{xid}* bone marrow. 第39回日本免疫学会、2009、大阪.
- ⑩ Yoshino, M., Osaka, M., Okuyama, K., Murata, A., Moriyama, T., Wagatsuma, K., Hayashi, S.I.: Effect of CCR7 on steady-state trafficking of skin dendritic cells to regional lymph nodes. The 10th International Symposium on Dendritic Cells. 2008, 神戸.
- ⑪ Yoshino, M., Osaka, M., Okuyama, K., Murata, A., Moriyama, T., Wagatsuma, K., Hayashi, S.I.: CCR7非依存的な皮膚自己抗原のリンパ節への輸送/ CCR7-independent trafficking of skin antigens to regional lymph nodes. 第38回日本免疫学会、2008、京都.
- ⑫ Okuyama, K., Murata, A., Osaka, M., Moriyama, T., Wagatsuma, K., Yoshino, M., Hayashi, S.I.: Flt3⁺ IL-7R⁺ B220⁺ BM precursors given rise to B-lineage cells in the presence of a Notch ligand, Delta-like-1. 第38回日本免疫学会、2008、京都.
- ⑬ Murata, A., Okuyama, K., Osaka, M., Moriyama, T., Wagatsuma, K., Sakano, S., Yoshino, M., Hayashi, S.I.: A novel function of a Notch ligand, Delta-like-1 as adhesion molecule for mast cells. 第38回日本免疫学会、2008、京都.

〔図書〕 (計1件)

- ① Tsuneto, M., Yamane, T., and Hayashi, S.I.: Methods for investigation of osteoclastogenesis using mouse embryonic stem cells. *In* “Embryonic Stem

Cell Therapy for Osteo-Degenerative Diseases”. (Methods in Molecular Biology, Vol. 690), Ed. N. I. zur Nieden, A Humana Press Book, Springer Science+Business Media, pp 239-253 (2011)

〔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

<http://www.med.tottori-u.ac.jp/smgkjm/29/2201.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 眞一 (HAYASHI SHIN-ICHI)
鳥取大学・医学部・教授
研究者番号：50208617

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし