

平成 22 年 5 月 27 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791579
 研究課題名 (和文) 顎関節における RANKL/Fas シグナルクロストークによる骨・軟骨破壊の制御
 研究課題名 (英文) Regulation of bone and cartilage destruction via RANKL/Fas signaling crosstalk in temporomandibular joint.
 研究代表者
 井澤 俊 (IZAWA TAKASHI)
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
 研究者番号：30380017

研究成果の概要 (和文)：本研究の目的は RANKL 刺激により活性化した樹状細胞を関節リウマチモデルマウスに移入し関節病態への影響を解析することである。In vivo における結果として、RANKL 刺激樹状細胞を関節炎モデルマウスに繰り返し移入すると T 細胞のアポトーシス亢進や自己免疫性関節リウマチの病態抑制効果がみられた。これらの結果より自己免疫性関節リウマチの病態形成機構に RANKL シグナルが重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：The aim of this study was to analyze the effect of dendritic cells (DCs) transfer stimulated with RANKL on the development of murine autoimmune arthropathy. Three times of RANKL-stimulated DCs transfer into arthritis model mice increased the T cell apoptosis in vivo, and protected the development of autoimmune arthritis. These data indicate that RANKL pathway plays a crucial role for immunomodulation of murine autoimmune arthropathy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	990,000	4,290,000

研究分野：矯正・小児系歯学

科研費の分科・細目：

キーワード：RANKL シグナル、Fas シグナル、樹状細胞、関節リウマチ、関節骨・軟骨破壊、アポトーシス、T 細胞、TRAIL シグナル

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis: RA)

の病態メカニズムについては未だ不明な点が多い。RANKL シグナルの発見後、急速に関節リウマチなどの病態を免疫学的観点か

ら解析する実験学的アプローチが発展した。しかしながら、関節リウマチの治療については抗 TNF (Tumor necrosis factor) 抗体など生物製剤が主流となっているが、その副作用に対する問題など残された課題は多い。一方で最近、腫瘍免疫の分野においては自己の血液由来細胞から分化、誘導した樹状細胞による免疫療法が実施されてきており良好な予後が得られたとの報告がある。そこで自己免疫性炎症疾患である関節リウマチに対する樹状細胞療法への応用を試みるとともに骨免疫学の視点 (Osteoimmunology オステオ免疫ロジー分野) から RA 病態メカニズムの解明を目指すこととした。

2. 研究の目的

関節リウマチは顎関節を含む全身の関節における骨破壊を主徴とする自己免疫疾患であるが、その病態形成機構については未だ不明な点が多い。近年、RANKL シグナルの発見によって関節リウマチ病態を免疫学的観点から解析する Osteoimmunology 分野が急速に発展してきている。最近、研究代表者らは RA マウスモデルである Fas 欠損 MRL/lpr マウスの病態形成において RANKL シグナルにより活性化した樹状細胞が重要な役割を果たすことを報告 (Izawa, T et al. Blood 2007) したが、RANKL により活性化した樹状細胞が RA 病態において T 細胞をどのように制御しているかは未だよくわかっていない。そこで RANKL 刺激により活性化した樹状細胞を RA モデルマウスに繰り返し移入し T 細胞の機能解析を行うとともに RA 病態への治療効果について詳細に検討することを研究の主な目的とするとともに、さらには自己免疫性関節リウマチなどといった炎症性骨・軟骨破壊に対する樹状細胞免疫療法の臨床応用への一助となることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 自己免疫性関節リウマチのモデルマウスである Fas 欠損 MRL/lpr マウスの骨髓細胞を分離し、recombinant IL-4、recombinant GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) 存在下に 7 日間培養し、骨髓由来樹状細胞を得た。さらに RANKL および bovine type II collagen (CII) 刺激にて活性化樹状細胞へと分化させた。

(2) Specific Pathogen Free (SPF) 下で飼育した 4 週齢の雌 MRL/lpr マウスの単徑部皮下に 1×10^6 個/200ul PBS の RANKL 刺激にて活性化させた樹状細胞を繰り返し 3 回移入し、移入後 4 週、8 週、12 週で免疫病理学的解析を行った。

(3) 移入した樹状細胞の生体内での分布状況の解析については CFSE 色素でラベルした樹状細胞を移入し移入後 24 時間、48 時間にてフローサイトメトリーによる (FACS) 解析を行った。

(4) 膝関節、顎関節の経時的な病理組織学的解析については HE 標本にて Edwards (J Immunol 1997) らの分類に準じて関節スコアの算定を行った。

(5) T 細胞、樹状細胞のアポトーシス、活性化、表面マーカーの解析などは Annexin V、抗 CD44、抗 Mel-14、抗 MHC-Class II、抗 CD86、抗 CD80、抗 TRAIL、抗 TRAIL レセプター抗体にてフローサイトメトリー、リアルタイム PCR アレイを用いて解析した。

(6) 脾臓および単徑部リンパ節からの T 細胞分画の分離については抗 CD4、抗 CD8 マグネット抗体あるいはナイロンウールカラムを用いた。

(7) RANKL 刺激により活性化した樹状細胞移入マウスより単離した T 細胞培養上清のサイトカイン測定には IL-2、IFN- γ 、IL-10、IL-4 ELISA kit を用い解析した。

(8) RANKL 刺激により活性化した樹状細胞移入マウスより単離した血清中サイトカインの測定については抗リウマチ因子測定アッセイキット、抗 DNA 抗体キット、抗 II 型コラーゲン抗体キットを用いた。

(9) 脾細胞および単徑部リンパ節細胞の T 細胞増殖試験については CD3 にて固相化した後、72 時間の培養にてチミジンの取り込みを培養最終 20 時間で液シンチレーションカウンターを使用し細胞増殖能の測定を実施した。

(10) RANKL 刺激により活性化した樹状細胞マウス移入群およびマウス対照群において骨髓細胞からの破骨細胞分化誘導能の比較としてマウス各群の骨髓細胞を分離し、RANKL および M-CSF 添加下に 1 週間培養し破骨細胞を TRAP assay および Pit formation assay により解析した。

(11) 実験各群の統計学的有為差の判定には Mann-Whitney *U* 検定、Student-*t* 検定を用いた。

(12) 動物実験に関しては徳島大学 動物倫理委員会の認可を得て実施した。

4. 研究成果

RANKL 刺激により活性化した樹状細胞を 4 週齢 RA モデル MRL/lpr マウスに移入すると MRL/lpr マウスの病理所見である脾腫や単径部リンパ節の腫脹の軽減がみられた。移入した樹状細胞を色素ラベルシフローサイトメトリーにより追跡したところ RANKL により活性化させた細胞ほど脾臓やリンパ節への蓄積率が上昇し、その割合は移入回数 (1 から 3 回移入) に相関していることが明らかとなった。また RANKL 刺激活性化樹状細胞を移入後 4 週、8 週、12 週で経時的に膝関節および顎関節の病理組織学的解析を行ったところ、関節局所へのリンパ球浸潤の減少、関節滑膜の肥厚の減少、骨・軟骨破壊の軽減など、関節リウマチ病態の緩解傾向を認めた。また RA に特徴的な血清中の抗体価である Rheumatoid Factor (RF)、抗 DNA 抗体、IgG2a/IgG1 比、抗 CII 抗体価についても改善傾向がみられた。さらに病態の改善メカニズムを解析する目的で各種免疫担当細胞のフローサイトメトリー解析を実施したところ CD4 陽性 T 細胞のアポトーシス亢進を認めた。さらに、どのようなアポトーシス関連分子が関与しているかを同定するためにリアルタイム PCR アレイにて RANKL 刺激による活性化 MRL/lpr マウス樹状細胞移入群と対照群の T 細胞をサンプルとしてアポトーシス関連分子を網羅的に解析したところ、TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) レセプター、TRAF (Tumor receptor associated protein) -3、Caspase 8 などのアポトーシス関連遺伝子発現が 2 倍以上増加していることが判明した。これらの結果より RA 病態における末梢での活性化樹状細胞による T 細胞維持機構には Fas シグナル非依存的に TRAIL-R/TRAIL シグナルを介した Activation induced cell death (AICD) によりアポトーシスを誘導する新規経路が存在する可能性が明らかとなった。

またこれらの結果より自己免疫性関節リウマチなどの炎症性骨・軟骨破壊に対する樹状細胞免疫療法への臨床応用に対する基礎的メカニズムが明らかになるとともに、より副作用の少ない治療戦略となりうることが示唆された。

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 4 件)

1. 井澤 俊、石丸 直澄、田中 栄二、林 良夫、RANKL と Fas シグナルクロストークによる樹状細胞の機能調節機構、臨床免疫・アレルギー科、52、471-477、2009、査読無し
2. Shingo Kuroda, Kotaro Tanimoto, Takashi

hi Izawa, Shinji Fujihara, J. H. Koolstra and Eiji Tanaka, Biomechanical and biochemical characteristics of the mandibular condylar cartilage. Osteoarthritis and cartilage, 17, 1408-1415, 2009、査読有り

3. Yukiko Kitase, Masahiko Yokozeki, Shinji Fujihara, Takashi Izawa, Shingo Kuroda, Kotaro Tanimoto, Keiji Moriyama and Eiji Tanaka, Analysis of gene expression profiles in human periodontal ligament cells under hypoxia: the protective effect of CC chemokine ligand 2 to oxygen shortage. Archives of oral biology, 54, 618-624, 2009、査読有り
4. Eiji Tanaka, Ryo Sano, Nobuhiko Kawai, Korfage A M J, Saika Nakamura, Takashi Izawa, Langenbach E J G and Kazuo Tanne: Regional differences in fiber characteristics in the rat temporalis muscle, *Journal of anatomy*, 213, 743-748, 2008、査読有り

[学会発表] (計 6 件)

1. Kazuma Matsumoto, Naozumi Ishimaru, Takashi Izawa, Rieko Arakaki, Ritsuko OURA, Eiji Tanaka and Yoshio Hayashi, Immunoregulatory effect via RANKL and Fas signaling of dendritic cells in murine autoimmune arthritis models. 日本免疫学会総会・学術集会、2009 年 12 月 3 日、大阪
2. Ritsuko OURA, Naozumi Ishimaru, Akiko Yamada, Rieko Arakaki, Takashi Izawa, Kazuma Matsumoto, Eiji Tanaka and Yoshio Hayashi, Immune Regulation by Macrophages through cross-talk between Fas and NF- κ B Signaling. 日本免疫学会総会・学術集会、2009 年 12 月 3 日、大阪
3. 松本 一真, 井澤 俊, 大浦 律子, 田中 栄二、RANKL/Fas シグナルを介した関節リウマチモデルマウスの骨・軟骨破壊機構の解析、日本矯正歯科学会・学術大会、2009 年 1 月 18 日、福岡
4. 松本 一真, 井澤 俊, 田中 栄二、RANKL シグナルを介した関節リウマチモデルマウスの骨・軟骨破壊機構の解析、日本顎関節学会総会・学術大会、2009 年 7 月 26 日、東京
5. 井澤 俊, 石丸 直澄, 新垣 理恵子, 大浦 律子, 田中 栄二, 林 良夫、Analysis of RANKL and Fas signaling through NF- κ B in dendritic cell activation in murine autoimmune arthritis models, 日本免疫学会総会・学術集会、2008 年 12 月 2 日、京都
6. 井澤 俊, 林 良夫, 田中 栄二: RANKL シグナルを介した関節リウマチにおける関節

骨・軟骨破壊機構の解析, 第67回日本矯正歯
科学会学術大会, 2008年9月18日、千葉

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井澤 俊 (IZAWA TAKASHI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研
究部・助教

研究者番号 : 30380017

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者