

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09429

研究課題名(和文) 自然免疫細胞と破骨細胞の骨免疫ネットワークの解明

研究課題名(英文) Osteoimmunology network between innate immunity and osteoclast

研究代表者

小俣 康德 (Omata, Yasunori)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：40570734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：骨代謝は骨に含まれる骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞によって制御されている。近年の分子細胞生物学的な研究により免疫細胞はこれらの細胞を繊細に制御しており、骨代謝に密接に関与していることがわかってきた。本研究では破骨細胞と免疫細胞の相互作用について焦点をあてて解析を行った。その結果、自然免疫細胞である2型自然リンパ球は破骨細胞分化を制御していることがわかった。2型自然リンパ球は産生するインターロイキンIL-4やIL-13の作用によって破骨細胞分化を抑え、骨代謝を制御していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

In this study we show that type 2 ILCs (ILC2) potentially inhibit the generation of bone resorbing osteoclasts in vitro as well as favorably influence bone homeostasis under steady state conditions in vivo using loss and gain of function models. The new insight will uncover the bone and immune biology.

研究成果の概要(英文)：While the role of T cells in the regulation of bone homeostasis is well defined, little is known about the role of innate lymphoid cells (ILCs) on bone. ILCs are innate immune cells that share cytokine expression patterns with T cells but lack the T cell receptor. In this study we show that type 2 ILCs (ILC2) potentially inhibit the generation of bone resorbing osteoclasts in vitro as well as favorably influence bone homeostasis under steady state conditions in vivo using loss and gain of function models. Furthermore, adoptive transfer of ILC2 completely abrogated ovariectomy-induced bone loss by significantly down-regulating osteoclast numbers in vivo.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：自然免疫細胞 破骨細胞

## 1. 研究開始当初の背景

わが国の骨粗鬆症患者数は1280万人(骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン)、関節リウマチ患者80万人(推計、厚生労働省報告書)と報告されている。その医療費や介護が社会経済に与える影響は甚大である。骨粗鬆症や関節リウマチに対する治療には、サイトカインや免疫細胞、骨関節構成細胞を標的とした分子生物学的治療製剤が開発されて臨床使用されてきているが、完全な疾患制御には繋がっておらず、治療に難渋することもしばしばみられる。近年骨と免疫の関連性が注目されており骨免疫学と呼ばれる研究領域が発展してきた。免疫には自然免疫と獲得免疫があり、前者は免疫反応の初期応答を司り、後者は抗原提示を受けた免疫細胞が応答する。自然免疫でT細胞に類似した機能を持つ自然リンパ球(Innate lymphoid cell: ILC)が発見され、免疫の初期応答を担う機能が明らかとなった。研究代表者らはILCによる関節炎制御機構について解析し、ILCの3つのサブセットの中でILC2がIL(Interleukin)-4, IL-5, IL-13を発現して早期の関節炎の制御に関わることを報告した(Cell Reports 24:169,2018)。本研究課題では、新たにILCによる骨代謝制御について焦点をあてて解析した。

## 2. 研究の目的

自然免疫細胞である自然リンパ球ILC2は関節炎に対して制御性に働くが、骨代謝に対する作用や制御機構については不明である。本研究では、ILCによる破骨細胞分化の制御について解析を行った。骨は力学的構成要素としての役割だけではなく、免疫細胞の分化や様々なサイトカイン産生のもとになっており、これまで骨の代謝機構と免疫細胞の関わりを解析する骨免疫学と呼ばれる分野が発展してきた。近年新たな自然免疫細胞である自然リンパ球ILCの発見に伴い、免疫細胞による骨関節の恒常性調節機構は一層複雑さを増している。その根本的な要因の一つとして、細胞の分化に伴って生じる個々の細胞の持つ多様性や異質性があげられる。これらの課題を克服すべく、本研究ではILCのサブセットが破骨細胞をどのように制御し骨代謝をコントロールするかを解析する。さらに骨粗鬆症等の病的環境下においてもILCによる破骨細胞の制御機構を解析する。本研究では、ILCサブセットの一つである2型自然リンパ球ILC2による骨代謝制御機構の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

研究代表者らはこれまで関節炎に対するILC2の作用について解析し、ILC2が産生するIL-4、IL-13がマクロファージに作用しIL-1やTNF- $\alpha$ などの発現を制御して、関節炎症に対して抑制的に働くことを明らかにした。そこで本研究課題では、ILC2による骨代謝制御機構について注目し、特に破骨細胞に対する作用の解析を行った。破骨細胞は、8週齢雌マウス下肢大腿骨及び脛骨骨髓を採取し、M-CSF30 ng/mLとRANKL50 ng/mL刺激によって成熟破骨細胞へと分化誘導した。ILC2は、mini circle vector IL-25とIL-33刺激によってマウス生体内で賦活化させ、FACSを用いて脾臓からソーティングして採取し、IL-2、IL-7、IL-25、IL-33、TSLP刺激培養下に増やして培養実験や養子細胞移植実験に用いた。

In vitroでの作用について解析するために、破骨前駆細胞とILC2を共培養して破骨細胞分化誘

導実験を行った。続いて生体内での作用について解析するために ILC2 が減少したマウス、並びに ILC2 が増加したマウスを作出し、 $\mu$ CT や組織染色によって評価した。さらに、ILC2 が産生する IL-4 や IL-13 の作用を解析するために IL-4/IL-13 ノックアウトマウスから採取した ILC2 を用いて評価を行い、ILC2 の破骨細胞を介した骨代謝への作用を解析した。マウス卵巢摘出モデル (OVX: Ovariectomy) を作成し、骨粗鬆症モデルにおける ILC2 の作用を解析した。また、IL-4、IL-13 下流の STAT6 シグナルの作用を解析するために、STAT6 ノックアウトマウス由来の破骨前駆細胞を用いて ILC2 の骨代謝に関わる作用を解析した。

#### 4 . 研究成果

破骨細胞分化に対する ILC2 の作用を明らかにするために、マウス骨髄由来単球細胞を M-CSF と RANKL で培養し、FACS でソーティングした ILC2 を添加して破骨細胞分化を評価した。TRAP 染色で成熟破骨細胞の評価を行った所、ILC2 添加群では破骨細胞数が有意に減少した。また、同様に破骨細胞の骨吸収能を評価すると、破骨細胞の骨吸収能は、添加した ILC2 の用量依存的に有意に低下した。これらのことから破骨細胞分化に対する ILC2 の直接的な抑制効果が示唆された。マウス大腿骨を用いた免疫組織標本解析では、ELF97 で染色された破骨細胞の近傍に ILC2 が存在することが明らかになった。ILC2 は破骨細胞の近傍に存在して骨代謝に作用していることが示唆された。

続いて生体内における ILC2 による破骨細胞への作用を調べるために、生体内における ILC2 が減少したマウスを解析した。その結果、ILC2 減少マウスではコントロールマウスと比べて破骨細胞数が増加していた。骨量は、ILC2 減少マウスでコントロールマウスと比較して減少傾向であった。これらのことから生体内においても ILC2 は骨に作用することが示唆された。

さらに、ILC2 を増加させたマウスモデルにおいても同様に検証した。ILC2 を野生型マウスに養子細胞移植して、マウス生体内での機能を解析した。免疫組織解析を行うと移入した ILC2 は骨髄内に移行することが確認された。また、ILC2 を移入されたマウスの脾臓では ILC2 が増加していたが、他の ILC サブセット ILC1 や ILC3 の分布に変化を及ぼさなかった。骨形態計測では、ILC2 の養子細胞移入群では破骨細胞数が有意に減少し、骨量は増加した。

卵巢摘出術 OVX による骨量減少に対する ILC2 作用を検証するために、OVX マウスに ILC2 を養子細胞移植して解析を行った。ILC2 が産生する主なサイトカインとして IL-4 と IL-13 があり、関節炎における ILC2 の作用は IL-4 や IL-13 の作用に依存することが確認されていたことから、正常 (コントロール) の ILC2 と IL-4/IL-13 欠損マウス (IL-4/IL-13 ノックアウトマウス) から採取した ILC2 をそれぞれ OVX マウスに移植した。OVX によって破骨細胞数は増加し、正常 ILC2 を移植すると OVX による破骨細胞形成促進作用は減少し、IL-4/IL-13 欠損 ILC2 の移植では逆に、OVX による破骨細胞増加は生じなかった。このことから、ILC2 の骨代謝に対する作用は、ILC2 が産生する IL-4 や IL-13 の作用によることが推察された。

破骨細胞に対する ILC2 の直接的な作用を調べるために、ILC2 と破骨細胞の共培養実験を行った。破骨前駆細胞を M-CSF と RANKL で刺激し破骨細胞へと分化誘導し、コントロール ILC2 または IL-4/IL-13 ノックアウト ILC2 と共培養した。コントロール ILC2 添加群では成熟破骨細胞数は減少したが、IL-4/IL-13 ノックアウト ILC2 添加群では、破骨細胞分化に影響を与えなかった。カテプシン K の発現も、IL-4/IL-13 ノックアウト ILC2 共培養群では変化がなく、コントロール ILC2 共培養群で破骨細胞は減少した。

さらに ILC2 のサイトカイン分泌が破骨細胞分化に与える影響を解析するために、培養上清液

を用いて検証した。ILC2 と破骨細胞共培養の培養上清を別の破骨細胞分化培地に添加した。コントロール ILC2-破骨細胞共培養上清のみが破骨細胞分化を抑制し、IL-4/IL-13 ノックアウト ILC2-破骨細胞の共培養上清は破骨細胞分化に作用しなかった。

IL-4 や IL-13 はそれぞれ細胞膜表面の受容体に結合して STAT6 を介して細胞内のシグナル伝達を行う。そこで、コントロール破骨前駆細胞または STAT6 ノックアウト破骨前駆細胞と ILC2 を共培養して、ILC2 による破骨細胞分化制御における STAT シグナルの関与について検証した。ILC2 との共培養において、コントロール破骨前駆細胞を用いた場合において破骨細胞数の減少が見られ、STAT6 ノックアウト破骨前駆細胞を用いた場合は破骨細胞数の減少は観察されなかった。ILC2 から産生された IL-4 や IL-13 が破骨前駆細胞において STAT6 介して分化制御していることが示唆された。

ILC2 は、これまで骨代謝や破骨細胞分化に関与していることは知られておらず、本研究によって ILC2 が *in vitro* および *in vivo* で破骨細胞を制御することが示された。ILC2 が減少したマウスでは 破骨細胞数が増加し、ILC2 の養子移植によって破骨細胞数は減少した。さらに、OVX に伴う骨量減少は、コントロール ILC2 によって抑制されたが、IL-4・IL-13 ノックアウト ILC2 では破骨細胞は抑制されなかった。破骨細胞に対する ILC2 の制御作用が、IL-4・IL-13 下流の STAT6 の活性化を介することを示すことが示された。

本研究によって、自然免疫細胞の一つである ILC2 が骨粗鬆症の病態において破骨細胞に作用して骨代謝を制御することがわかった。骨関節構成細胞には破骨細胞以外にも骨芽細胞、骨細胞、軟骨細胞などがあり、今後これらの細胞との連関の解析が必要と考えられる。ILC 以外の T 細胞、B 細胞などの免疫細胞との協調作用も示唆されることから、これらの細胞との町長した関係についてもさらなる詳細な解析が必要である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Watanabe Hisato, Okada Hiroyuki, Hirose Jun, Omata Yasunori, Matsumoto Takumi, Matsumoto Morio, Nakamura Masaya, Saito Taku, Miyamoto Takeshi, Tanaka Sakae	4. 巻 6
2. 論文標題 Transcription Factor Hematopoietically Expressed Homeobox Protein (Hhex) Negatively Regulates Osteoclast Differentiation by Controlling Cyclin Dependent Kinase Inhibitors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JBMR Plus	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm4.10608	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 -
1. 著者名 Omata Yasunori, Frech Michael, Saito Taku, Schett Georg, Zaiss Mario M., Tanaka Sakae	4. 巻 23
2. 論文標題 Inflammatory Arthritis and Bone Metabolism Regulated by Type 2 Innate and Adaptive Immunity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1104 ~ 1104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23031104	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 該当する
1. 著者名 Frech Michael, Omata Yasunori, Schmalzl Angelika, Wirtz Stefan, Taher Leila, Schett Georg, Zaiss Mario M., Sarter Kerstin	4. 巻 13
2. 論文標題 Btn2a2 Regulates ILC2-T Cell Cross Talk in Type 2 Immune Responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.757436	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 該当する
1. 著者名 Omata Yasunori, Frech Michael, Lucas Sebastien, Primbs Tatjana, Knipfer Lisa, Wirtz Stefan, Kadono Yuho, Saito Taku, Tanaka Sakae, Sarter Kerstin, Schett Georg, Zaiss Mario M.	4. 巻 136
2. 論文標題 Type 2 innate lymphoid cells inhibit the differentiation of osteoclasts and protect from ovariectomy-induced bone loss	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115335 ~ 115335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2020.115335	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 -

1. 著者名 Azizov Vugar, Dietel Katharina, Steffen Franziska, Frech Michael, Omata Yasunori, Tajik Narges, Knipfer Lisa, Tenbusch Matthias, Ramming Andreas, Steffen Ulrike, Nimmerjahn Falk, Linker Ralf, Wirtz Stefan, Herrmann Martin, Temchura Vladimir, Sarter Kerstin, Schett Georg, Zaiss Mario M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Ethanol consumption inhibits TFH cell responses and the development of autoimmune arthritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-15855-z	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 -

1. 著者名 Tajik Narges, Frech Michael, Schulz Oscar, Azizov Vugar, Steffen Franziska, Omata Yasunori, Luo Yubin, Gaipf Udo S., Frey Benjamin, Strowig Till, Sarter Kerstin, Bischoff Stephan C., Wirtz Stefan, Canete Juan D., Ciccia Francesco, Schett Georg, Zaiss Mario M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Targeting zonulin and intestinal epithelial barrier function to prevent onset of arthritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-15831-7	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 -

1. 著者名 Maenohara Yuji, Chijimatsu Ryota, Tachibana Naohiro, Uehara Kosuke, Xuan Fengjun, Mori Daisuke, Murahashi Yasutaka, Nakamoto Hideki, Oichi Takeshi, Chang Song Ho, Matsumoto Takumi, Omata Yasunori, Yano Fumiko, Tanaka Sakae, Saito Taku	4. 巻 36
2. 論文標題 Lubricin Contributes to Homeostasis of Articular Cartilage by Modulating Differentiation of Superficial Zone Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Research	6. 最初と最後の頁 792 ~ 802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbmr.4226	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamoto Hideki, Katanosaka Yuki, Chijimatsu Ryota, Mori Daisuke, Xuan Fengjun, Yano Fumiko, Omata Yasunori, Maenohara Yuji, Murahashi Yasutaka, Kawaguchi Kohei, Yamagami Ryota, Inui Hiroshi, Taketomi Shuji, Taniguchi Yuki, Kanagawa Motoi, Naruse Keiji, Tanaka Sakae, Saito Taku	4. 巻 -
2. 論文標題 TRPV2 is involved in induction of lubricin and suppression of ectopic endochondral ossification in articular joints	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arthritis & Rheumatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/art.41684	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 -

1. 著者名 Uto Sakura, Hikita Atsuhiko, Sakamoto Tomoaki, Mori Daisuke, Yano Fumiko, Ohba Shinsuke, Saito Taku, Takato Tsuyoshi, Hoshi Kazuto	4. 巻 -
2. 論文標題 Ear Cartilage Reconstruction Combining Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cartilage and Three-Dimensional Shape-Memory Scaffold	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part A	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ten.TEA.2020.0106	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 -

1. 著者名 Higuchi Junya, Yamagami Ryota, Matsumoto Takumi, Terao Tomohiro, Inoue Keita, Tsuji Shinsaku, Maenohara Yuji, Matsuzaki Tokio, Chijimatsu Ryota, Omata Yasunori, Yano Fumiko, Tanaka Sakae, Saito Taku	4. 巻 14
2. 論文標題 Associations of clinical outcomes and MRI findings in intra-articular administration of autologous adipose-derived stem cells for knee osteoarthritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 332 ~ 340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2020.04.003	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 -

1. 著者名 Kushioka Junichi, Kaito Takashi, Chijimatsu Ryota, Okada Rintaro, Ishiguro Hiroyuki, Bal Zeynep, Kodama Joe, Yano Fumiko, Saito Taku, Chung Ung-il, Tanaka Sakae, Yoshikawa Hideki	4. 巻 10
2. 論文標題 The small compound, TD-198946, protects against intervertebral degeneration by enhancing glycosaminoglycan synthesis in nucleus pulposus cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-71193-6	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5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小俣康徳
2. 発表標題 自然リンパ球ILC2による骨代謝制御機構の解明
3. 学会等名 第8回JCRベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小俣康徳
2. 発表標題 2型自然リンパ球による骨代謝制御機構
3. 学会等名 第22回日本骨粗鬆症学会/第38回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kosei Nagata, Taku Saito, Fumiko Yano, Hirnori Hojo, Yasuhide Iwanaga, and Sakae Tanaka.
2. 発表標題 Runx3 protects articular cartilage by direct induction of Prg4.
3. 学会等名 ASBMR 2020 Annual Meeting
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩永康秀、永田向生、千々松良太、矢野文子、田中栄、齋藤琢
2. 発表標題 Notchは最表層細胞の維持を介して関節軟骨の恒常性に貢献する
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金子泰三、千々松良太、矢野文子、堀内圭輔、田中栄、齋藤琢
2. 発表標題 Taceは変形性関節症を促進的に制御する
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年



〔図書〕 計2件

1. 著者名 小俣 康德	4. 発行年 2020年
2. 出版社 科学評論社、リウマチ科	5. 総ページ数 10
3. 書名 脊椎関節炎における適応免疫と治療への展望	

1. 著者名 小俣 康德、田中 栄	4. 発行年 2021年
2. 出版社 科学評論社、臨床免疫・アレルギー科	5. 総ページ数 7
3. 書名 自然免疫innate lymphoid cell (ILCによる骨代謝・関節炎の制御機構)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学医学部附属病院 整形外科・脊椎外科  <a href="http://www.u-tokyo-ortho.jp/">http://www.u-tokyo-ortho.jp/</a></p>
---

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
研究分担者	矢野 文子  (Yano Fumiko)  (80529040)	東京大学・医学部附属病院・届出研究員    (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ドイツ	Friedrich-Alexander University Erlangen			