

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591821

研究課題名（和文） RANKL 阻害薬による胸腺への影響に関する研究

研究課題名（英文）

The effect of RANKL inhibitor on thymic medulla formation

研究代表者

彦坂 雄（HIKOSAKA YU）

名古屋市立大学・大学医学研究科・助教

研究者番号：90534769

研究成果の概要（和文）：

胸腺髄質の分化、増殖には、胸腺細胞の positive selection に伴って発現する RANKL が胸腺上皮細胞の RANK レセプターを介して、シグナル伝達されることが、重要であることが、分かっている。本研究は、RANK-Fc 抗体を用い、RANKL シグナルを阻害することで、マウスの胸腺髄質への影響をみることを目的とした。野生型マウスに RANK-Fc 抗体投与し、その後、胸腺を摘出し、コントロール群と比較した。胸腺細胞の CD4-CD8 の割合、細胞数、ならびに胸腺上皮細胞の mTEC の割合、細胞数に有意差は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：

The cytokine RANK ligand (RANKL) was produced by positively selected thymocytes and regulated the cellularity of mTEC by interacting with RANK. In this study, we analyzed the effect of RANK-Fc on thymic medulla formation. At results, RANK-Fc protein did not affect the population of mTEC significantly.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：免疫学、胸腺、自己寛容、RANKL

1. 研究開始当初の背景

胸腺髄質は、組織特異的自己抗原を提示し、自己反応性 T 細胞を排除することで、中枢性自己寛容確立の場として、重要な役割を果たしている。近年、胸腺細胞と胸腺髄質上皮細胞のクロストークシグナルに着目され、胸腺

髄質形成に、正の選択に伴って胸腺細胞に発現する RANKL が必須のシグナルであり。胸腺細胞に発現する RANKL シグナルにより、AIRE 陽性細胞を含む胸腺髄質上皮細胞 (mTEC) の増殖をもたらし、胸腺髄質形成が制御されていることが明らかとなっている。(Y.

Hikosaka, T. Nitta, Y. Takahama et al. :The Cytokine RANKL Produced by Positively Selected Thymocytes Fosters Medullary Thymic Epithelial Cells that Express Autoimmune Regulator : *Immunity*, 2008)

一方で、現在ヒトにおいて、癌の骨転移抑制、関節リウマチや骨粗鬆症に対し、RANKL ヒトモノクローナル抗体 Denosumab が臨床応用されているが、RANKL シグナルを阻害する事で、胸腺髄質の低形成、さらには、自己寛容の破綻が危惧される。本研究の背景として、RANKL 阻害薬による胸腺髄質形成への影響について、実験動物を用いた基礎的データが、求められていると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、野生型マウスに RANKL 阻害薬である RANK-Fc 蛋白投与を行った後に、胸腺の組織解析および FACS 解析を行い、胸腺髄質への影響を明らかにしたい。さらには、胸腺髄質の低形成に伴う、自己免疫性疾患の有無についても調べたい。

3. 研究の方法

まず、RANKL 阻害薬として、RANK-Fc 抗体の作製を行った。RANK-Fc キメラ蛋白の遺伝子導入を行った BW5147 細胞を培養し、培養上清中の RANK-Fc 抗体を回収し、プロテイン A を用い精製した。得られた RANK-Fc 抗体を SDS-PAGE にて目的の蛋白であることを確認した。

次に 6~8 週齢の B6 野生型マウスに RANK-Fc を経静脈的に投与した。コントロールとしてヒト IgG 抗体を投与した群を用意した。RANK-Fc 抗体の投与量および投与回数は、100 μ g を投与し、1 週間後に 2 回目の投与を行った。さらに 1 週間後に胸腺の解析を行った。マウスから胸腺を摘出し、胸腺細胞の

FACS 解析 (CD4-CD8) および、胸腺細胞数を調べた。また、胸腺の酵素処理 (collagenase/dispase) を行い、胸腺上皮細胞 (CD45negative) の FACS 解析 (I-Ab (MHC classII)-UEA-1 (mTEC のマーカー)) を行った。mTE、cTEC の頻度、細胞数をコントロール群と比較した。

さらに胸腺の組織解析 (H-E 染色) を行い、髄質形成の影響を見た。

また、マウスに、関節炎等の自己免疫疾患の発現がないか観察を行った。

4. 研究成果

まず、胸腺細胞の CD4-CD8 の発現を FACS 解析にて調べたが、RANK-Fc 抗体投与群とコントロール群を比較したが、その発現頻度、細胞数とも有意な差はみられなかった (図 1)。

次に、胸腺上皮細胞の FACS 解析 (I-Ab-UEA-1) を行った。mTEC (胸腺髄質上皮細胞)、cTEC (胸腺皮質上皮細胞) の発現頻度、細胞数とも ANK-Fc 抗体投与群とコントロール群の間で有意差は認められなかった。(図 1、2)。

H-E 染色による組織解析においても髄質形成に差はみられなかった。

また、RANK-Fc 投与マウスに関節炎等の自己免疫疾患の兆候も認められなかった。

胸腺髄質形成において、RANKL シグナルが必須であることは、既に明らかとなっている。従って、RANK-Fc を投与することで、胸腺上皮細胞における mTEC の頻度、細胞数の低下や組織解析における胸腺髄質の低形成、さらには、negative selection の異常による自己免疫疾患の発症などが予想された。

しかし、今回の実験結果では、それらの予想とは異なり、RANK-Fc 投与を行っても、胸腺髄質形成において、有意な影響は認められ

なかった。

原因としては、RANK-Fc の投与量の問題、投与の期間、解析のタイミングなどが考えられる。投与量の増量、投与回数の増加、投与後の解析時期についての更なる検討、検証が必要と考えられた。

さらに追加の検討項目として、組織解析において、蛍光免疫染色による、Aire の発現の解析や、mTEC における Aire の mRNA の定量的解析などが考えられた。Aire 陽性の mTEC は胸腺上皮細胞が発現する RANKL によって、制御されているので、RANK-Fc 投与により、Aire の発現が低下する可能性が考えられる。

現在、実臨床において、ヒト型抗 RANKL モノクローナル抗体（デノスマブ）が、多発性骨髄腫による骨病変及び固形癌骨転移による骨病変に対し、認可され、使用可能となっている。これまでのところ、デノスマブ投与による、自己免疫性疾患発症の報告はないが、胸腺髄質への影響を考えると、引き続き、RANKL 阻害薬の胸腺への影響について、基礎的なデータが必要になると思われた。

図1 胸腺細胞の FACS 解析 (CD4-CD8)

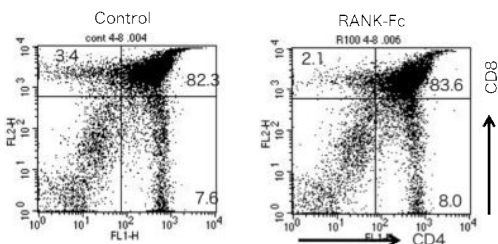


図2 RANK-Fc 投与マウスの胸腺上皮細胞 FACS 解析

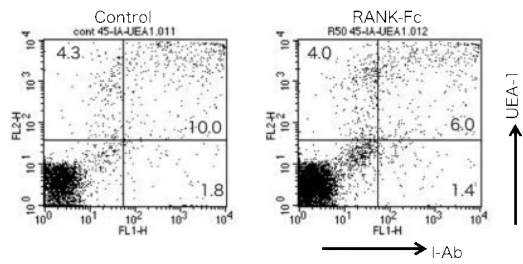
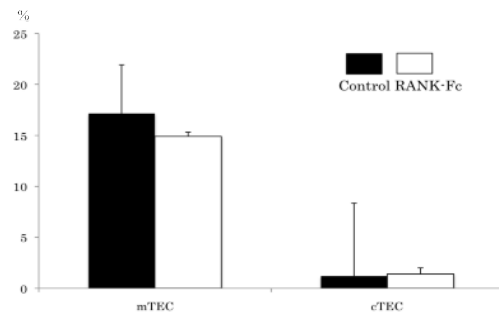


図3 RANK-Fc 投与マウスの胸腺上皮細胞 FACS 解析における mTEC、cTEC の頻度の比較



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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

彦坂 雄 (HIKOSAKA YU)
名古屋市立大学・大学医学研究科・助教
研究者番号：90534769

(2) 研究分担者

矢野 智紀 (YANO MOTOKI)
名古屋市立大学・大学医学研究科・准教授
研究者番号：40315883

佐々木 秀文 (SASAKI HIDEFUMI)
名古屋市立大学・大学医学研究科・准教授
研究者番号：00336695

森山 悟 (MORIYAMA SATORU)
名古屋市立大学・大学医学研究科・助教
研究者番号：50551264

(3) 連携研究者 該当者なし