

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08207

研究課題名（和文）RANKLが引き起こす細菌性肺炎の重症化機構の解明と治療への応用

研究課題名（英文）The mechanisms of RANKL-induced severe pneumonia

研究代表者

長谷川 喜弘（HASEGAWA, YOSHIHIRO）

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：90643180

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：破骨細胞は破骨細胞分化誘導因子（RANKL）によって分化誘導される骨吸収を担う多核巨細胞である。研究代表者はこれまでに、珪肺モデルマウスの肺内でRANKL依存性に破骨細胞様の多核巨細胞が分化誘導され、線維性肺病変の形成に寄与していることを報告した。本研究では、呼吸器感染症において肺内のRANKLが炎症の重症化に寄与しており、RANKLが治療標的になることを示すことを目指した。これまでに、肺ヒストプラズマ症モデルマウスの肺内においても、RANKLの発現が増加していることを示した。さらにRANKLを阻害することで肺における炎症が抑制されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、単球・マクロファージ系前駆細胞の分化を決定するサイトカインであるRANKLが、肺に存在することを見出した知見を発展させるものである。RANKLの阻害により、呼吸器の防御機構の主役である肺胞マクロファージへの分化を誘導するというのは新しい概念はと言える。抗RANKL抗体は、骨粗鬆症の患者に対する使用実績から、安全性に問題がないことが証明されている。本研究では、抗RANKL抗体を肺胞マクロファージへの分化を促す目的で用いるが、呼吸器感染症における治療効果を個体レベルで示すことができれば、速やかに臨床応用できることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Osteoclasts are multinucleated giant cells responsible for bone resorption that are induced to differentiate by RANKL. We have previously reported that osteoclast-like multinucleated giant cells are induced to differentiate in a RANKL-dependent manner in the lungs of a silicosis lung model mouse, contributing to the formation of pulmonary fibrosis. In this study, we aimed to show that RANKL expression is also induced in the lungs of respiratory infections and contributes to the severity of inflammation, and that RANKL is a therapeutic target. We showed that RANKL expression is also increased in the lungs of mouse models of pulmonary histoplasmosis. Furthermore, we showed that inhibition of RANKL suppresses inflammation in the lungs.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：RANKL 破骨細胞 肺胞マクロファージ 呼吸器感染症 ARDS

## 1. 研究開始当初の背景

呼吸器感染症の代表である肺炎は本邦の死因の第3位となっており、超高齢化社会を迎えるにあたり一段と重要性が増している。適切な抗菌薬による治療に加え、過剰な炎症を制御し急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) への移行を防ぐ補助療法が重要であるが、確立されたものはない。

骨の恒常性は骨吸収を担う破骨細胞と骨形成を担う骨芽細胞によって維持されている。腫瘍壊死因子 (TNF) サイトカインファミリーに属する破骨細胞分化誘導因子 (RANKL) は、破骨細胞分化誘導因子受容体 (RANK) に結合し、単球・マクロファージ系前駆細胞を多核巨細胞である破骨細胞へと分化させる。成熟した破骨細胞は骨表面に接着し、酸やタンパク分解酵素を分泌することで骨のミネラル成分や有機基質を溶解・分解し、骨吸収を担う。一方で、破骨細胞は貪食能や抗原提示能といった感染防御をつかさどる機能は乏しい。

肺胞微石症はナトリウムリン酸共輸送体遺伝子 (SLC34A2) 変異により、肺胞内にリン酸カルシウム結石が蓄積する稀少肺疾患である。研究代表者らは、肺胞微石症モデルマウス (SLC34A2 ノックアウトマウス) において、破骨細胞マーカーが陽性の多核巨細胞 (肺破骨細胞とする) が肺胞腔内に存在し、蓄積したリン酸カルシウム結石を分解することを発見した。以上の知見から、肺破骨細胞への分化はリン酸カルシウム結石に対して特異的なものではなく、肺胞腔内に存在する無機粒子へのステレオタイプな反応ではないかと思いついた。そこで、シリカ粒子の吸引による珪肺モデルマウスを作製したところ、気管支肺泡洗浄液中の RANKL 濃度が増加し、肺胞腔内に肺破骨細胞が出現することがわかった。さらに珪肺モデルマウスの腹腔内に抗 RANKL 抗体を投与したところ、肺破骨細胞への分化が抑制されただけでなく、線維性肺病変の形成が抑制された。以上より、シリカ粒子の吸引によって RANKL 依存性に肺破骨細胞への分化が誘導され、肺破骨細胞が分泌する酸やタンパク分解酵素が肺実質に損傷を与え、線維性肺病変の形成を誘導していると結論付けた。

これまでの研究を通じて、抗 RANKL 抗体を投与された珪肺モデルマウスでは、急性期の肺の炎症像が抑制されていることもわかった。病原微生物への暴露でも肺内に RANKL の発現が誘導され、RANKL を阻害することで過剰な炎症が制御できる可能性があると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、「RANKL が単球・マクロファージ系前駆細胞を肺胞マクロファージではなく、肺破骨細胞へ分化誘導することで、呼吸器感染症を重症化させている」という仮説のもと、RANKL の阻害により肺胞マクロファージへの分化を促し、病原体のクリアランス向上や抗炎症につなげるという新しい呼吸器感染症の治療を提唱することを目指す。

まず、呼吸器感染症においても RANKL 依存性に肺破骨細胞への分化が促されることを示す。そして、抗 RANKL 抗体で、単球・マクロファージ系前駆細胞から肺破骨細胞への分化を阻害し、成熟肺胞マクロファージへの分化を促すことで、病原微生物のクリアランス向上や抗炎症に繋がることを示す。

## 3. 研究の方法

呼吸器感染症モデルマウスを作製する。まずは共同研究者が用いてきた真菌感染症である肺ヒストプラズマ症モデルマウスを用いて、RANKL に着目した病態解析を行う。さらに肺炎球菌や肺炎桿菌を用いた細菌性肺炎モデルマウスを作製し、同様の検討を行う。また、呼吸器感染症モデルマウスに抗 RANKL 抗体を投与し、RANKL を標的とした治療法の有効性を明らかにする。

### (1) 肺破骨細胞の存在の証明

肺組織の破骨細胞関連遺伝子をリアルタイム PCR で定量する。また、肺組織を破骨細胞のマーカーである酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) で染色することにより、肺破骨細胞を可視化する。

### (2) 肺内の RANKL の証明

肺組織の RANKL 遺伝子をリアルタイム PCR で定量する。肺組織と気管支肺胞洗浄液中の RANKL をウェスタンブロットと ELISA で検出する。

(3) 肺における RANKL の産生細胞の同定

呼吸器感染症モデルマウスから分離した肺をコラゲナーゼ処理し、フローサイトメトリーで解析することで、肺における RANKL の産生細胞を同定する。

(4) 抗 RANKL 抗体による肺破骨細胞への分化阻害

抗 RANKL 抗体もしくはコントロール抗体を呼吸器感染症モデルマウスへ腹腔内投与する。肺組織の破骨細胞関連遺伝子定量と TRAP 染色により、抗 RANKL 抗体によって肺破骨細胞への分化が阻害されるか確認する。

(5) RANKL を標的とした治療の有効性の検討

呼吸器感染症モデルマウスに抗 RANKL 抗体またはコントロール抗体を腹腔内投与し、生存率、肺組織像、肺内菌量を比較することで治療効果を判定する。

#### 4. 研究成果

肺ヒストプラズマ症については、病原体の経気道投与により適切な疾患モデルマウスを作製することができた。しかし、条件設定に時間を要したため、細菌性肺炎モデルマウスにおける検討を行うことができなかった。

(1) 肺破骨細胞の存在の証明

肺ヒストプラズマ症モデルマウスの肺組織では破骨細胞関連遺伝子が増加していた。また、肺組織の TRAP 染色では肺胞腔内に肺破骨細胞が存在することがわかった。

(2) 肺内の RANKL の証明

肺ヒストプラズマ症モデルマウスの肺組織では RANKL 遺伝子が増加していた。また気管支肺胞洗浄液中の RANKL がタンパクレベルで増加することを ELISA で確認した。

(3) 肺における RANKL の産生細胞の同定

珪肺モデルマウスから分離した肺をコラゲナーゼ処理し、フローサイトメトリーで解析したところ、T リンパ球が RANKL を発現することがわかった。しかし、研究期間の問題により肺ヒストプラズマ症モデルマウスを用いた検討を行うことはできなかった。

(4) 抗 RANKL 抗体による肺破骨細胞への分化阻害

抗 RANKL 抗体を肺ヒストプラズマ症モデルマウスへ投与したところ、肺破骨細胞への分化が抑制されることがわかった。

(5) RANKL を標的とした治療の有効性の検討

肺ヒストプラズマ症モデルマウスに抗 RANKL 抗体を投与したところ、生存率、肺組織像、肺内菌量が改善した。本検討を繰り返すことで再現性の確認が必要と思われた。

#### 今後の展望

病原微生物の暴露によっても肺内に RANKL の発現が誘導され、肺破骨細胞への分化が促される可能性が示唆された。さらに細菌、ウイルスなど他の病原微生物による呼吸器感染症でも同様の現象が起こるのか検討する必要がある。また抗 RANKL 抗体により肺における炎症が軽減されることが示唆された。他の病原微生物による呼吸器感染症でも同様の現象が起こるのか確認する必要がある。機序としては、単球・マクロファージ系前駆細胞から肺破骨細胞への分化を阻害することで、肺胞マクロファージの極性が変化しているためではないかと推察しており、今後の検討課題である。抗 RANKL 抗体は、骨粗鬆症の患者に対する使用実績から、安全性に問題がないことが証明されている。呼吸器感染症における治療効果を個体レベルで示すことができれば、速やかな臨床応用が期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fujitani N, Uehara Y, Ariki S, Hashimoto U, Jo Mukai, Hasegawa Y, Takahashi M.	4. 巻 34
2. 論文標題 Site-specific glycosylation analysis of epidermal growth factor receptor 2 (ErbB2): exploring structure and function toward therapeutic targeting.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Glycobiology	6. 最初と最後の頁 cwad100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/glycob/cwad100.	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 Hashimoto U, Fujitani N, Uehara Y, Okamoto H, Saitou A, Ito F, Ariki S, Shiratsuchi A, Hasegawa Y, Takahashi M.	4. 巻 1868
2. 論文標題 N-glycan on N262 of FGFR3 regulates the intracellular localization and phosphorylation of the receptor.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta General Subjects	6. 最初と最後の頁 130565
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbagen.2024.130565.	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 Uehara Y, Tanaka Y, Zhao S, Nikolaidis NM, Pitstick LB, Wu H, Yu JJ, Zhang E, Hasegawa Y, Noel JG, Gardner JC, Koprass EJ, Haffey WD, Greis KD, Guo J, Woods JC, Wikenheiser-Brokamp KA, Kyle JE, Ansong C, Teitelbaum SL, Inoue Y, Altinisik G, Xu Y, McCormack FX	4. 巻 14
2. 論文標題 Insights into pulmonary phosphate homeostasis and osteoclastogenesis emerge from the study of pulmonary alveolar microlithiasis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1205-1222
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-36810-8.	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 Takahashi M., Fujitani N., Uehara Y., Hasegawa Y.	4. 巻 35
2. 論文標題 Site-specific analysis of N-glycans of receptor tyrosine kinases.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology,	6. 最初と最後の頁 E56-E60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Fujitani N, Ariki S, Hasegawa Y, Uehara Y, Takahashi M.	4. 巻 60
2. 論文標題 Integrated Structural Analysis of N-glycans and Free Oligosaccharides Allows for a Quantitative Evaluation of ER Stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1708-1721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.0c00969.	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 Saitou A, Hasegawa Y, Fujitani N, Ariki S, Uehara Y, Hashimoto U, Saito A, Kuronuma K, Matsumoto K, Chiba H, Takahashi M.	4. 巻 113
2. 論文標題 N-glycosylation regulates MET processing and signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1292-1304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15278.	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 Takahashi M, Hasegawa Y, Maeda K, Kitano M, Taniguchi N.	4. 巻 39
2. 論文標題 Role of glycosyltransferases in carcinogenesis; growth factor signaling and EMT/MET programs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Glycoconjugate Journal	6. 最初と最後の頁 167-176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10719-022-10041-3.	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 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 長谷川喜弘
2. 発表標題 肺サーファクタント蛋白質Dと受容体型チロシンキナーゼの糖鎖の相互作用
3. 学会等名 日本肺サーファクタント・界面医学会 第59回学術研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋素子, 岡本弘美, 藤谷直樹, 上原康昭, 橋本宇吉郎, 長谷川喜弘
2. 発表標題 線維芽細胞増殖因子受容体FGFR1の糖鎖の構造と機能
3. 学会等名 第42回日本糖質学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤谷直樹, 上原康昭, 長谷川喜弘, 橋本宇吉郎, 有木茂, 高橋素子
2. 発表標題 ErbB2 (HER2) の分子安定性に関するN-glycansの機能の評価
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 橋本宇吉郎, 藤谷直樹, 上原康昭, 長谷川喜弘, 有木茂, 高橋素子
2. 発表標題 FGFR3のN型糖鎖は細胞膜への発現と活性を制御する
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡本弘美, 藤谷直樹, 上原康昭, 長谷川喜弘, 橋本宇吉郎, 有木茂, 白土明子, 高橋素子
2. 発表標題 FGFR1のN型糖鎖はレセプターの細胞内輸送と自己リン酸化を制御する
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上原康昭, 藤谷直樹, 長谷川喜弘, 有木茂, 橋本宇吉郎, 高橋素子
2. 発表標題 RANK C175R変異はERストレスを誘導し大理石病を引き起こす
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yusuke Tanaka, Yoshihiro Hasegawa, Lori B. Pitstick, Huixing Wu, Elizabeth J. Koprass, Francis X. McCormack
2. 発表標題 A Novel Pleurodesis Method Using Hydroxyapatite Microspheres
3. 学会等名 American Thoracic Society International Conference (ATS 2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡本 弘美, 藤谷 直樹, 上原 康昭, 長谷川 喜弘, 橋本 宇吉郎, 有木 茂, 白土 明子, 高橋 素子
2. 発表標題 FGFR1の糖鎖の部位特異的構造解析と機能解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上原 康昭, 藤谷 直樹, 長谷川 喜弘, 有木 茂, 橋本 宇吉郎, 岡本 弘美, 高橋 素子
2. 発表標題 ヒトRANKの糖鎖による機能制御メカニズムの解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤谷 直樹, 上原 康昭, 長谷川 喜弘, 橋本 宇吉郎, 有木 茂, 高橋 素子
2. 発表標題 ヒトErbB2(HER2)の部位特異的糖鎖構造解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上原 康昭, 長谷川 喜弘, 高橋 素子, McCormack Francis X.
2. 発表標題 肺胞微石症における肺破骨細胞様細胞の機能解析
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshihiro Hasegawa, Yusuke Tanaka, Ciara M. Shaver, Kevin K. Brown, Charles Perkins, Lori B. Pitstick, Christopher G. McKnight, Huixing Wu, Elizabeth J. Koprass, Francis X. McCormack
2. 発表標題 Upregulation of circulating RANKL induces osteoporosis in the silicosis model mouse
3. 学会等名 American Thoracic Society International Conference (ATS 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshihiro Hasegawa, Yasuaki Uehara, Yusuke Tanaka, Lori B. Pitstick, Huixing Wu, Elizabeth J. Koprass, Francis X. McCormack
2. 発表標題 RANKL-dependent pulmonary fibrosis in the silicosis model mouse
3. 学会等名 The 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (APSR 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------