

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16144

研究課題名(和文) 肺泡微石症における破骨細胞様多核巨細胞の機能解析と治療への応用

研究課題名(英文) Insights into pulmonary phosphate homeostasis and osteoclastogenesis emerge from the study of pulmonary alveolar microlithiasis

研究代表者

上原 康昭 (Uehara, Yasuaki)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：40882907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：肺泡微石症患者肺のシングルセルRNA-seq解析では、肺泡単球に破骨細胞関連遺伝子の発現上昇認められた。微石に対する宿主応答において肺破骨細胞様細胞が果たす役割を検討した。微石の除去の機序を調べる中で、Npt2bが代替リン酸トランスポーター活性を通じて肺のリン酸ホメオスタシスを調節すること、微石がRANKL依存性に破骨細胞様細胞の分化と活性化を誘導すること、高リン酸食がOPGの発現を通じそれを抑制することが明らかになった。本研究により、Npt2bと肺破骨細胞様細胞が肺の恒常性維持に重要な役割を果たすことが明らかになり、肺疾患の治療における新たな治療標的の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では肺泡微石症における破骨細胞様細胞の解析を通じて、肺における破骨細胞様多核巨細胞の分化の機序や機能、さらに肺泡微石症の病態や微石のクリアランスへの影響を解明した。これらの研究結果は破骨細胞様多核巨細胞の機能に基づいた肺泡微石症の新たな治療開発の糸口となると考えられる。また珪肺やアスベスト肺、サルコイドーシス肺の肉芽腫病変などでも多核巨細胞は報告されておりそれらの呼吸器疾患の病態の解明や治療法の開発への応用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：The single cell transcriptomic analysis of a pulmonary alveolar microlithiasis lung explant showing a robust osteoclast gene signature in alveolar monocytes and the finding that calcium phosphate microliths contain a rich protein and lipid matrix that includes bone resorbing osteoclast enzymes and other proteins suggested a role for osteoclast-like cells in the host response to microliths. While investigating the mechanisms of microlith clearance, we found that Npt2b modulates pulmonary phosphate homeostasis through effects on alternative phosphate transporter activity and alveolar osteoprotegerin, and that microliths induce osteoclast formation and activation in a receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and dietary phosphate dependent manner. This work reveals that Npt2b and pulmonary osteoclast-like cells play key roles in pulmonary homeostasis and suggest potential new therapeutic targets for the treatment of lung disease.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：肺泡微石症 Npt2b RANKL 破骨細胞 OPG

1. 研究開始当初の背景

肺胞微石症では肺胞上皮の Npt2b 欠損により、肺胞マクロファージによって異化された肺サーファクタント中のリン酸塩が肺胞腔内に蓄積し、リン酸カルシウムからなる微石が形成され、肺線維症や緩徐に進行する呼吸不全が生じる。これまでに 1000 例以上の肺胞微石症例が報告されており、その多くは日本、トルコ、イタリアで報告されている。この疾患は中年以降に診断されることが多いが、乳児での呼吸不全発症例も報告されており予後は一般に不良である。現在、肺胞微石症に肺移植以外の有効な治療法は報告されていない。微石については、X 線分析によりカルシウムとリンで構成され、その比率は骨に含まれるハイドロキシアパタイトと類似していることが報告されているが、微石に対する免疫応答については現在までほとんど研究されていない。申請者はシンシナティ大学にて SLC34A2 遺伝子を欠失させた肺胞微石症モデルマウスの開発に携わり、リン酸制限食が肺胞における微石の蓄積を減少させることを報告した (Saito, Uehara et al. Sci Trans Med, 2015)。さらに微石が除去されるメカニズムを検討するために、肺におけるマクロファージの機能に注目し肺胞微石症患者肺の scRNA-seq を行い、患者肺では健常肺に比べ破骨細胞関連の遺伝子発現が上昇していることが明らかになった。これらの結果は肺内において微石を除去するメカニズムが存在することを示唆しており、その解明により肺胞微石症の病態解明及び治療に応用できると考え、微石のクリアランスにおける破骨細胞様細胞の機能に注目した。

2. 研究の目的

肺における破骨細胞様多核巨細胞の分化の機序や機能、さらに肺胞微石症の病態や微石のクリアランスへの影響は未解明である。これらを明らかにすることで肺における破骨細胞様多核巨細胞の新たな役割を明らかにすることを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

本申請研究では破骨細胞の分化と機能の活性化を促進する Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) に注目し、破骨細胞様多核巨細胞への分化における RANKL の役割を、抗 RANKL 抗体を用いて阻害することで破骨細胞様巨細胞への分化や微石のクリアランスへの影響を解析する。

破骨細胞様多核巨細胞への分化における RANKL の影響を解析するために肺胞微石症モデルマウスに週に 3 回、抗 RANKL 抗体を腹腔内投与する。治療開始から 4 週間後に肺を摘出し、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を行い肺組織中の TRAP 陽性多核巨細胞数を測定し isotype control 抗体投与群と比較する。また微石のクリアランスの評価は、経気管的にリン酸カルシウムに結合する近赤外蛍光プローブを投与し微石を標識した後に抗 RANKL 抗体を投与し、In Vivo Imaging System (IVIS) にて標識された微石量の変化を経時的に評価する。本研究より肺における破骨細胞様多核巨細胞の分化が RANKL 依存性であること、また破骨細胞様多核巨細胞への分化が微石の分解に必要なことを証明する。微石のクリアランスが RANKL 依存性であることが明らかになれば、RANKL 投与などによる破骨細胞様多核巨細胞の分化や活性化をターゲットとした治療の開発への足掛かりとなりうる。

4. 研究成果

(1) 肺胞微石症肺における破骨細胞様多核巨細胞の分化は RANKL 依存性である。

Npt2b^{-/-}マウスに抗 RANKL 抗体を週に 3 回、4 週間腹腔に投与した。その後肺を摘出し破骨細胞のマーカーである TRAP 染色を施行した(図 1a)。抗 RANKL 抗体投与群(RANKL ab)では isotype control 群(Control)に比べ、有意に 3 個以上の核を持つ多核細胞数が減少していることが示された(図 1b)。以上の結果より肺胞微石症肺における破骨細胞様多核巨細胞の分化が RANKL 依存性であることが示された。

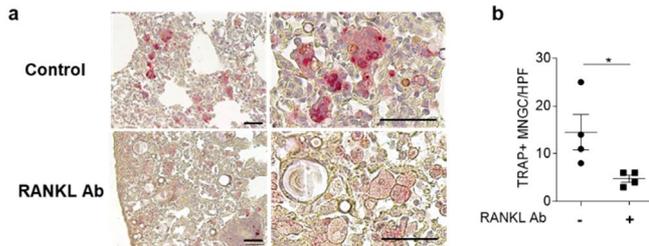


図1. 抗RANKL抗体は肺胞微石症肺における破骨細胞様多核巨細胞数を減少させた
Npt2b^{-/-}マウスに抗RANKL抗体(RANKL ab)またはisotype control(Control)を週に3回、4週間投与後、肺のTRAP染色を行い(a)TRAP陽性細胞数をカウント(b)した。
Scale bars, 50 μ m

(2) 肺胞微石症における微石の分解機構は RANKL 依存性である。

肺胞微石症肺における破骨細胞様多核巨細胞の機能を解明するために、Npt2b^{-/-}マウスに抗 RANKL 抗体(RANKL ab)または isotype control (Control)を週に3回、1週間投与後に微石に結合する OsteoSense750 蛍光プローブを経気管投与し微石をマーキングし、IVISにて蛍光強度を蛍光プローブ投与後12日まで測定した。抗 RANKL 抗体投与群(RANKL ab)では isotype control 群(Control)に比べ、蛍光強度の減衰が少なかった(図 2a)。蛍光プローブ投与3日目の蛍光強度を100%としたときの投与12日までの蛍光強度をグラフで示すと抗 RANKL 抗体投与群では isotype control 群に比べ有意に蛍光強度の減衰が遅くなっていることが示された(図 2b)。以上の結果より抗 RANKL 抗体の投与により微石の分解・除去が抑制されることが示された。

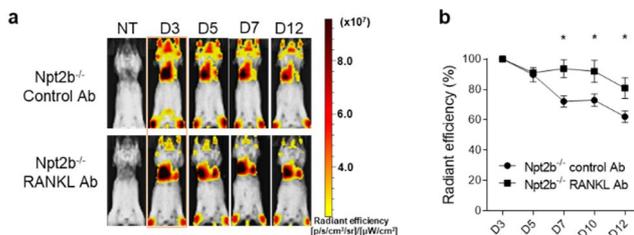


図2. 抗RANKL抗体は微石のクリアランスを減少させた
Npt2b^{-/-}マウスに抗RANKL抗体(RANKL ab)またはisotype control(Control)を週に3回、1週間投与後にOsteoSense750プローブを経気管投与し微石をマーキングした。a. IVISにて微石のクリアランスを評価した。b. またプローブ投与後3日目の蛍光強度(Radiant efficiency)を100%として、プローブ投与後12日までの蛍光強度を測定した。

以上の結果より肺胞微石症肺では RANKL 依存性に破骨細胞様多核巨細胞の分化・活性化が生じ微石のクリアランスに携わっていることが示唆された。本研究では肺における破骨細胞様の多核巨細胞が存在することを明らかにし、さらにリン酸カルシウムを主成分とする骨と類似した構造を持つ微石を分解する機能を持つことを明らかにした。これらの研究結果は破骨細胞様多核巨細胞の機能に基づいた肺胞微石症の新たな治療開発の糸口となることが期待される。本研究の成果は英国科学雑誌 Nature Communications 誌にて報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Uehara Yasuaki, Tanaka Yusuke, Zhao Shuyang, et al.	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
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

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

〔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
---------	---------