

## 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 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591167

研究課題名（和文）ランゲルハンス細胞組織球症に対する骨免疫学的視点からの病態解明

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenesis of Langerhans cell histiocytosis from the point of bone immunology

研究代表者

森本 哲（MORIMOTO AKIRA）

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：30326227

研究成果の概要（和文）：

LCH 細胞は未熟樹状細胞の性質を持ち、炎症環境下では、融合して破骨細胞に分化する。オステオポンチンは、炎症性サイトカインであるが、破骨細胞による骨吸収を促す機能も持つ。今回我々は、ランゲルハンス細胞組織球症（LCH）患者、特に予後不良である多臓器型リスク臓器浸潤陽性 LCH 患者において、血清 OPN 値が異常高値であることを明らかにした。これは、オステオポンチンが、病変の拡大、病勢に関与することを示唆する。また、培養実験では、未熟樹状細胞が破骨細胞に分化する際、オステオポンチン、特に切断型オステオポンチンが不可欠であることが明らかとなった。切断型オステオポンチンは、炎症惹起作用がより強いと言われ、LCH の病態に深く関与している可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

LCH cells have characteristics of immature dendritic cell (iDC), which differentiate into osteoclasts in inflammatory environment. Osteopontin has been known as a proinflammatory cytokine, which is involved in bone resorption by osteoclasts. Here we show that the serum osteopontin (OPN) levels in Langerhans cell histiocytosis (LCH) patients, especially with risk organ involvements positive multi-system disease were significantly high. It indicates that OPN is involved in the progression of disease and disease activity. We also found that OPN, especially cleaved-type OPN is essential for osteoclast formation from iDC in vitro culture system. Cleaved-type OPN which has a great potential to induce inflammation would be involved in the pathogenesis of LCH.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児血液学

## 1. 研究開始当初の背景

〔ランゲルハンス細胞組織球症（LCH）の概念〕骨髄由来の未熟樹状細胞の性質を持つ LCH 細胞が異常に増殖し組織破壊を起こす疾患である。LCH 細胞は本来、抗原刺激などにより成熟しランゲルハンス細胞に分化すべき細胞であるが、なぜ成熟せず増殖するのか、その病態は不明な点が多い。

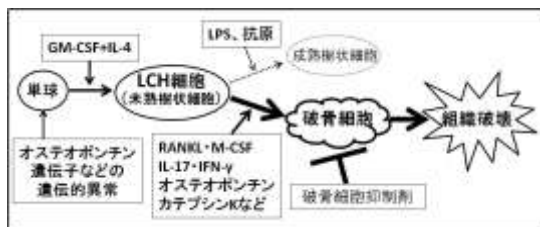
〔LCH の症状と予後〕骨、皮膚、リンパ節、中枢神経など病変は多岐にわたるが、溶骨性骨病変の頻度が最も高い。化学療法の進歩により予後は改善してきたが、肝・肺・造血器などの機能不全をきたし死亡する例が約 5%、再燃する例が約 50%、尿崩症などの不可逆的病変を残す例が約 15%に達する(Morimoto A, et al. *Pediatr Blood Cancer*. 50: 931-932, 2008.

Morimoto A, et al. Cancer, 107: 613-619, 2006.)。よって、LCH の病態生理に則した、より有効な治療法の開発が望まれている。

[LCH の骨免疫学知見] 近年、骨破壊機構の研究が急速に進み骨免疫学へと発展し、LCH に関連して以下のことが明らかとなってきた。

1. LCH 患者の末梢血中には樹状前駆細胞が増加し、樹状細胞へと分化誘導するサイトカインが上昇している (Rolland A, et al. J Immunol. 174: 3067-71, 2005)。
2. 未熟樹状細胞は単球よりも効率的に破骨細胞に分化する (Rivollier A, et al. Blood. 104: 4029-37, 2004)。
3. LCH 細胞はオステオポンチンを高発現し (Allen CE, et al. J Immunol. 184: 4557-67, 2010)、オステオポンチンは RANKL の発現を亢進させることにより破骨細胞を誘導する (Ishii T, et al. Biochem Biophys Res Commun. 316: 809-15, 2004)。
4. LCH 患者の血清中 RANKL は高値で骨病変数に相関する (Ishii R, et al. Pediatr Blood Cancer. 47: 194-199, 2006.)。
5. 骨の I 型コラーゲンの分解にかかわるカテプシン K は、樹状細胞の Toll-like receptor 9 (TLR9) のシグナルを制御し Th17 細胞を誘導する (Asagiri M, et al. Science. 319: 624, 2008)。
6. IL-17 により樹状細胞は融合し破骨細胞に分化する (Coury F, et al. Nature Med. 14: 81-7, 2008)。
7. LCH では、破骨細胞は骨病変のみならず皮膚やリンパ節病変部位にも存在し、組織破壊の主役となる (da Costa CE, et al. J Exp Med. 201: 687-93, 2005)。
8. 難治性で再燃を繰り返す LCH に対し破骨細胞を抑制するビスフォスフォネート製剤が有効である (Morimoto A, et al. Pediatr blood cancer. 56: 110-5, 2011)。

[LCH の病因と病態仮説] 骨免疫学的知見より以下のように仮説を立てた。



LCH を発症する患者においては、単球から破骨細胞への分化を促進するオステオポンチン遺伝子などに遺伝的な異常があり、以下のような機序で LCH を発症する。

① 単球の未熟樹状細胞 (LCH 細胞) への分化亢進 ② 未熟樹状細胞 (LCH 細胞) の成熟樹状細胞への分化減弱 ③ 未熟樹状細胞

(LCH 細胞) の破骨細胞への分化亢進 ④ 破骨細胞の機能亢進と組織破壊

[LCH の新規治療戦略]

①未熟樹状細胞から破骨細胞への分化阻止と②破骨細胞の抑制が、新たな LCH 治療のターゲットとなると考えられる。よって、骨粗鬆症の治療薬として使用・開発されているビスフォスフォネート製剤やカテプシン K 阻害剤、オステオポンチン抗体などは LCH 治療薬剤として臨床応用が期待される。

## 2. 研究の目的

LCH における骨破壊の分子病態を骨免疫学的に明らかにし、骨粗鬆症の治療薬として開発されている破骨細胞抑制薬を応用した LCH の新規治療戦略を検討する。

## 3. 研究の方法

### 1) 患者血清における Osteopontin の解析

1. インフォームドコンセントが得られた LCH 患者 48 例 (年齢中央値 3.0 歳、範囲 0.4-19.0 歳)、コントロール (病勢の安定した非炎症性疾患の患者) 26 例 (年齢中央値 4.0 歳、範囲 0.3 歳~17.0 歳) から、血清を採取し、-80℃で保存した。
2. LCH 患者は、病変の範囲によって、多臓器型と単一臓器型に分類し、さらに多臓器型はリスク臓器 (肝、脾、造血器) 浸潤陽性と陰性に分けた。
3. 血清全長型 OPN 濃度を human Osteopontin ELISA kit (R&D systems) で測定した。
4. マン・ホイットニー U 検定で、病型別に比較し、 $p < 0.05$  を有意差ありと判断した。

### 2) 未熟樹状細胞から破骨細胞分化における Osteopontin の役割の解明

#### 1. 単球から未熟樹状細胞、破骨細胞の分化誘導:

- a) 健康成人末梢血から単球を分離した。
- b) GM-CSF /IL-4 で刺激し、未熟樹状細胞への分化を誘導した。
- c) 未熟樹状細胞を RANKL/M-CSF で刺激し、破骨細胞への分化を誘導した。
- d) 破骨細胞特異的のマーカである酒石酸抵抗性産生フォスファターゼ (Tartrate resistant acid phosphatase: TRAP) を染色し、核は Hoechst33342 で染色し、TRAP 陽性かつ核が 3 つ以上の細胞を破骨細胞として数えた。

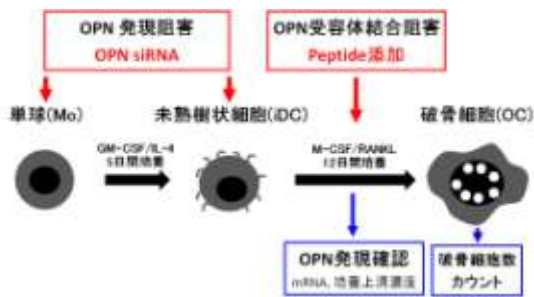
#### 2. 破骨細胞分化に伴う osteopontin (OPN) の発現の検討:

- a) 単球、未熟樹状細胞、破骨細胞分化 4 日目、8 日目、12 日目の RNA を抽出し、分化に伴い OPN mRNA が上昇するか real time RT-PCR を用い相対定量解析した。
- b) 細胞質内の OPN の発現は、蛍光免疫染色で確認した。
- c) 未熟樹状細胞分化 5 日目、破骨細胞分化 4 日目、8 日目、12 日目の培養上清を採取し、OPN 濃度を測定した。OPN には、全長型と切断型の 2 種類があり、そ

れぞれ human osteopontin ELISA kit (R&D systems)、human osteopontin N-half assay kits (IBL)で測定した。

3. 破骨細胞分化に伴う OPN 受容体の発現の検討: a) 未熟樹状細胞、破骨細胞における全長型 OPN 受容体  $\alpha\beta3$  および切断型 OPN 受容体  $\alpha9\beta1$  の発現を、real time RT-PCR、蛍光免疫染色で確認した。

4. OPN 阻害による分化抑制作用の検討: a) 単球または未熟樹状細胞に、OPN に対する short interference RNA (siRNA)を導入し、破骨細胞への分化が抑制されるかを、分化7日目に破骨細胞数を数え検討した。b) 未熟樹状細胞から破骨細胞分化の系に、全長型 OPN の受容体への結合を阻害する RGD peptide、切断型 OPN の受容体への結合を阻害する SVVYGLR peptide を添加し、破骨細胞への分化が抑制されるかを、分化7日目に破骨細胞数を数え検討した。

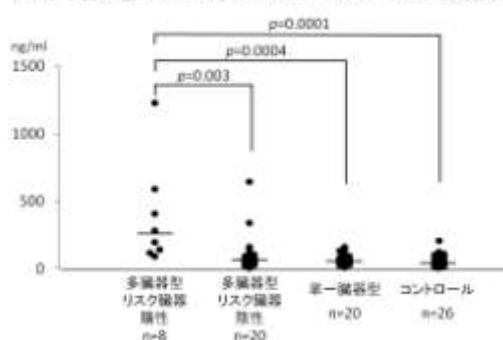


#### 4. 研究成果

##### 1) 患者血清における Osteopontin の解析

LCH 患者血清全長型 OPN 濃度 (中央値、四分位数範囲) は、多臓器型リスク臓器陽性 240.3 ng/ml (137.6-456.0 ng/ml)、多臓器型リスク臓器陰性 67.3 ng/ml (44.0-112.1 ng/ml)、単一臓器型 63.9 ng/ml (39.1-98.5 ng/ml)、コントロール 47.7 ng/ml (26.8-79.4 ng/ml)で、図1に示すとおり、多臓器型リスク臓器陽性が他と比較して有意に高値であった。

図1. LCH患者血清オステオポンチン濃度

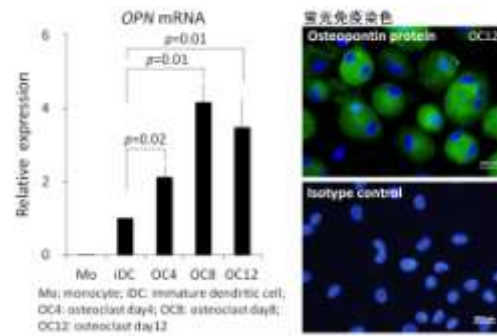


##### 2) 未熟樹状細胞から破骨細胞分化における Osteopontin の役割の解明

###### 1. 健康成人単球由来未熟樹状細胞が破骨細胞

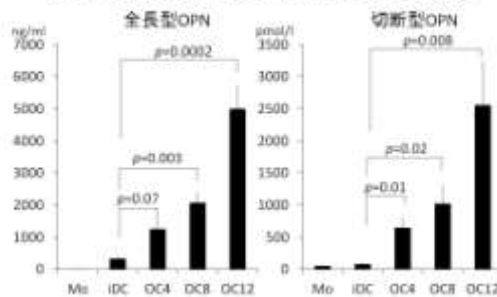
に分化する際、OPN mRNA は、図2に示すように有意に上昇した。細胞質内 OPN タンパクは、免疫染色で確認できた。

図2. 破骨細胞分化過程でのオステオポンチン発現



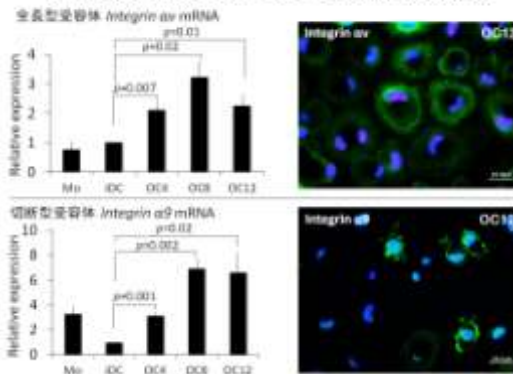
2. 破骨細胞分化に伴い、培養上清中の全長型および切断型 OPN は有意に上昇した (図3)。

図3. 培養上清 オステオポンチン濃度



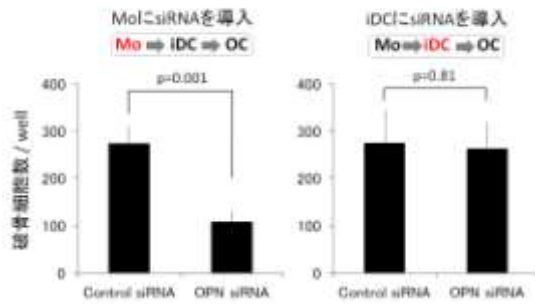
3. 破骨細胞分化に伴い、全長型 OPN 受容体  $\alpha\beta3$ 、切断型 OPN 受容体  $\alpha9\beta1$  共に、発現は有意に上昇した (図4)。

図4. オステオポンチン受容体の発現



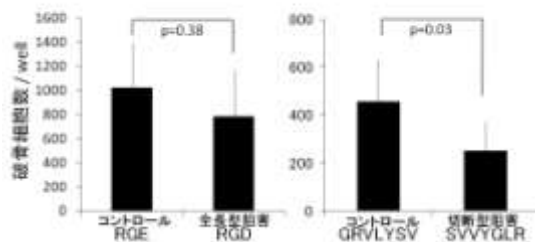
4. 単球に OPN siRNA を導入すると、破骨細胞分化は阻害された。しかし未熟樹状細胞に OPN siRNA を導入したところ、破骨細胞分化に影響はなかった (図5)。

図5. OPN阻害実験: OPN mRNA阻害



5. 未熟樹状細胞から破骨細胞分化の系に、全長型 OPN の受容体への結合を阻害する RGD peptide を添加した場合は、破骨細胞分化に影響はなかったが、切断型 OPN の受容体への結合を阻害する SVVYGLR peptide を添加したところ、破骨細胞分化は有意に阻害された (図 6)。

図6. OPN阻害実験: 受容体結合阻害



### 3) 研究成果まとめ

1. 多臓器型リスク臓器浸潤陽性 LCH 患者では、血清中全長型 OPN 値が有意に上昇していた。
2. 破骨細胞培養実験では、分化に伴い、全長型、切断型 OPN の発現が上昇した。
3. 単球が未熟樹状細胞に分化する段階で、OPN の発現を抑制すると、破骨細胞への分化は阻害された。
4. 切断型 OPN 受容体を阻害すると、破骨細胞への分化は抑制された。

### 4) 考察

オステオポンチンは、炎症性サイトカインであるが、破骨細胞による骨吸収を促す機能も持つ(Standal T, et al. Exp Oncol. 26: 179-184, 2004)。臨床検体の解析では、LCH の中でも予後不良群である多臓器型リスク臓器陽性において、血清 OPN 値が高値であった。これは、オステオポンチンが LCH におけるサイトカインストームの構成因子であり、さらに病変の拡大、病勢に関与することを示唆する。LCH 細胞は未熟樹状細胞の性質をもち、炎症環境下では、融合して破骨細胞に分化する(Rivollier A, et al. Blood. 104: 4029-37, 2004)。今回我々のおこなった実験では、未熟樹状細胞が破骨細胞に分化

する際、オステオポンチンが不可欠であり、特に切断型オステオポンチンが重要であることがわかった。切断型オステオポンチンは、全長型より炎症惹起作用が強く、関節リウマチの増悪因子として報告されている(Yamamoto N, et al. J Clin Invest. 112: 181-188, 2003)。LCH の病態にも切断型オステオポンチンが深く関与している可能性があり、今後臨床検体での解析も必要である。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Imamura T, Sato T, Shiota Y, Kanegane H, Kudo K, Nakagawa S, Nakadate S, Tauchi H, Kamizono J, Morimoto A. Outcome of pediatric patients with Langerhans cell histiocytosis treated with 2 chlorodeoxyadenosine: a nationwide survey in Japan. Int J Hematol 2010; 91: 646-651.
2. Imashuku S, Shioda Y, Tsunematsu Y, Imamura T, Morimoto A. VCR/AraC chemotherapy and ND-CNS-LCH. Pediatr Blood Cancer 2010; 55: 215-216.
3. Kudo K, Ohga S, Morimoto A, Ishida Y, Suzuki N, Hasegawa D, Nagatoshi Y, Kato S, Ishii E. Improved outcome of refractory Langerhans cell histiocytosis in children with hematopoietic stem cell transplantation in Japan. Bone Marrow Transplant 2010; 45: 901-906.
4. Imashuku S, Kudo N, Kaneda S, Kuroda H, Shiwa T, Hiraiwa T, Inagaki A, Morimoto A. Treatment of patients with hypothalamic-pituitary lesions as adult-onset Langerhans cell histiocytosis. Int J Hematol. 2011; 94: 556-560.
5. Morimoto A, Shioda Y, Imamura T, Kanegane H, Sato T, Kudo K, Nakagawa S, Nakadate H, Tauchi H, Hama A, Yasui M, Nagatoshi Y, Kinoshita A, Miyaji R, Anan T, Yabe M, Kamizono J; for the LCH Committee, the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. Nationwide Survey of Bisphosphonate Therapy for Children with Reactivated Langerhans Cell Histiocytosis in Japan. Pediatr Blood Cancer. 2011; 56: 110-115.
6. Murakami I, Oka T, Kuwamoto S, Kato M, Hayashi K, Gogusev J, Imamura T, Morimoto A, Imashuku S, Yoshino T. Tyrosine phosphatase SHP-1 is expressed higher in multisystem than in single-system Langerhans cell histiocytosis by immunohistochemistry. Virchows Arch. 2011; 459: 227-234.
7. Shioda Y, Adachi S, Imashuku S, Kudo K, Imamura T, Morimoto A. Analysis of 43 cases of Langerhans cell histiocytosis (LCH)-induced central diabetes insipidus registered in the JLSG-96 and JLSG-02 studies in Japan. Int J

Hematol. 2011; 94: 545-551.

8. Yuasa M, Fujiwara S, Oh I, Yamaguchi T, Fukushima N, Morimoto A, Ozawa K. Rapidly progressing fatal adult multi-organ langerhans cell histiocytosis complicated with Fatty liver disease. *J Clin Exp Hematop.* 2012; 52: 121-126.
  9. Kikkawa I, Aihara T, Morimoto A, Watanabe H, Furukawa R. Langerhans cell histiocytosis case with dense metaphyseal band sign. *Pediatr Int.* 2013; 55: 96-98.
  10. Murakami I, Morimoto A, Oka T, Kuwamoto S, Kato M, Horie Y, Hayashi K, Gogusev J, Jaubert F, Imashuku S, Al-Kadar LA, Takata K, Yoshino T. IL-17A receptor expression differs between subclasses of Langerhans cell histiocytosis, which might settle the IL-17A controversy. *Virchows Arch.* 2013; 462: 219-228.
  11. Morimoto A, Shimazaki C, Takahashi S, Yoshikawa K, Nishimura R, Wakita H, Kobayashi Y, Kanegane H, Tojo A, Imamura T, Imashuku S. Therapeutic outcome of multifocal Langerhans cell histiocytosis in adults treated with the Special C regimen formulated by the Japan LCH Study Group. *Int J Hematol.* 2013; 97: 103-108.
- [学会発表] (計 13 件)
1. 森本 哲, 島崎千尋, 高橋 聡, 吉川浩平, 黒田梨恵, 脇田 久, 小林 裕, 金兼弘和, 秋山聖子, 今宿晋作. JLSG-02 に登録された成人例の多病変型ランゲルハンス細胞組織球症 (LCH) の中間報告. 第 72 回日本血液学会, 横浜, 2010 年 10 月.
  2. Morimoto A, Nakamura S, Shioda Y, Imamura T, Oh Y, Imashuku S, Momoi M. Comprehensive analysis of serum cytokine/chemokine and growth factors in pediatric patients with Langerhans cell histiocytosis. 26th Annual Meeting of the Histiocyte Society, Boston USA, Oct 2010.
  3. Oh Y, Morimoto A, Itoh T, Kashii Y, Gunji Y, Momoi M. A case of case of Langerhans cell histiocytosis with a recurrent CNS mass lesion successfully treated with 2-chlorodeoxyadenosine. 26th Annual Meeting of the Histiocyte Society, Boston USA, Oct 2010.
  4. Kudo K, Morimoto A, Imamura T, Shioda Y, Sato T, Ishii E, Horibe K, Kinugawa N, Tsunematsu Y, Imashuku S. Outcome of poor responders at 6 weeks of induction therapy: JLSG-02 protocol study for multisystem Langerhans cell histiocytosis in Japan. 26th Annual Meeting of the Histiocyte Society, Boston USA, Oct 2010.
  5. 森本 哲. LCH の病態解明と治療の進歩. 第 52 回日本小児血液学会, 大阪, 2010 年 12 月
  6. Morimoto A. Recent advance in Langerhans cell histiocytosis. 52nd Spring Meeting of the Korean Society of Hematology Abstract, 2011. Seoul Korea, May 2011.
  7. Morimoto A, Shimazaki C, Takahashi S, Yoshikawa K, Kuroda R, Wakiya H, Kobayashi H, Kanegane H, Akiyama S, Tojyo A, Imamura T, Imashuku S. Multifocal LCH in adult patients treated with special C regimen of JLSG-02 protocol. 27th Annual Meeting of the Histiocyte Society. Vienna Austria, Oct 2011.
  8. Murakami I, Oka T, Hayashi K, Gogusev J, Jaubert F, Morimoto A, Imashuku S, Yoshino T. Gene expression profiling of PTPN6 (SHP-1) transfected Langerhans cell-like cell line (ELD-1) -compared with open data of LCH subtype (GSE16395). 27th Annual Meeting of the Histiocyte Society. Vienna Austria, Oct 2011.
  9. Morimoto A. Preliminary result of comparative study on Korean and Japanese patients with multisystem-LCH: Part 2. Treatment and outcomes. International Symposium of Rare Diseases, Seoul Korea, Dec 2011.
  10. Morimoto A, Shioda Y, Imamura T, Kudo K, Sato T, Shiohara M, Yasui M, Koga Y, Kobayashi R, Ishii E, Fujimoto J, Horibe K, Bessho F, Tsunematsu Y, Imashuku S. Intensified and prolonged therapy improved the outcome in multi-system Langerhans cell histiocytosis. 28th Annual Meeting of the Histiocyte Society. London UK, Oct 2012.
  11. Oh Y, Morimoto A, Itoh T, Masuzawa A, Kashii Y, Gunji Y, Momoi MY. A case of myelodysplastic syndrome after 2-chlorodeoxyadenosine therapy for recurrent Langerhans cell histiocytosis. 28th Annual Meeting of the Histiocyte Society. London UK, Oct 2012.
  12. 森本 哲. Intensified and prolonged therapy improved the outcome in multi-system Langerhans cell histiocytosis; results of JLSG-02 protocol study. 第 54 回日本小児血液・がん学会, 横浜, 2012 年 11 月
  13. 翁 由紀子, 森本 哲. ランゲルハンス細胞組織球症における血清オステオポンチンの解析. 第 35 回日本 LCH 研究会, 東京, 2013 年 3 月
- [図書] (計 1 件)
1. 村上一郎, 林 一彦, 森本 哲. ランゲルハンス細胞組織球増殖症. 青笹 克之ら (編), リンパ球増殖疾患 癌診療指針のための病理診断プラクティス, 東京, 中山書店, 2010: p295-303.



2. Imashuku S, Morimoto A. Management of Langerhans cell histiocytosis (LCH) -induced central diabetes insipidus and its associated endocrinological/ neurological sequelae. In: Kamoi K, ed. Diabetes Insipidus, Croatia: InTech - Open Access Publisher, 2011: p 1-10.
3. 翁 由紀子, 森本 哲. ランゲルハンス細胞組織球症. 堀部 敬三 (編), 小児がん診療ハンドブック, 大阪, 医薬ジャーナル社, 2011: p395-403.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

森本 哲 (MORIMOTO AKIRA)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 30326227

### (2)研究分担者

中村 幸恵 (NAKAMURA SACHIE)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 20382955

早瀬 朋美 (HAYASE TOMOMI)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 50433587

早川 貴裕 (HAYAKAWA TAKAHIRO)

自治医科大学・医学部・大学院生

研究者番号 : 60458312

(H22)

翁 由紀子 (OH YUKIKO)

自治医科大学・医学部・大学院生

研究者番号 : 30438650

(H22)

(3)連携研究者  
なし