

破骨細胞融合阻害活性を持つ液性因子の同定

大阪大学 免疫学フロンティア研究センター
丸山 健太

1. 目的

超高齢社会をむかえた本邦において、骨粗鬆症の解決は喫緊の課題である。自己免疫性機序によって手足の傍関節破壊をもたらす関節リウマチも増加の一途を辿っているが、これを治癒させる薬剤は未だ開発されていない。それ故、骨粗鬆症や関節リウマチによって惹起される骨破壊を阻止できる分子の探索は依然として重要な研究テーマである。研究代表者はこれまで、骨破壊と炎症を制御する新規分子の同定をめざした研究を展開してきた^{1,2,3,4,5}。今回、関節を構成する細胞の網羅的遺伝子発現情報解析の過程で、神経軸索ガイダンス因子である分子 X(未公開)が骨芽細胞と滑膜細胞に発現していることを発見した。分子 X は神経軸索の誘因/反発を制御する液性因子であり、中枢神経の正常な発生に必須であることが知られていたが、神経系以外におけるその機能は謎に包まれていた。興味深いことに、関節リウマチ患者の関節液において分子 X 濃度は著名に上昇しており、その濃度と関節リウマチの増悪因子である IL-17 濃度との間には正の相関が認められた。その一方で、1000pg/ml を超える高濃度の分子 X を関節液に含む患者では、1000pg/ml 以下の分子 X を関節液に含む患者と比べて骨破壊マーカーの濃度が有意に低いという結果を得た。さらに、変形性関節症患者の関節液においては、骨破壊マーカーと分子 X 濃度との間に負の相関が認められた。そこで本研究では分子 X が骨破壊を抑制しているとする作業仮説を立て、この仮説を実験的に検証することを試みた。

2. 方法

分子 X の様々な組織・細胞における発現を検討した。また、分子 X が破骨細胞に与える影響を *in vitro* で評価した上で、分子 X のノックアウトマウスの骨組織解析を行った。さらに、コラーゲン誘導性関節炎、加齢性骨粗鬆症モデルマウスに分子 X を投与し、その治療効果を判定した。

3. 研究成果

意外なことに、分子 X は中枢神経よりも関節においてその発現が高いことが判明した。また、分子 X の発現は血球系細胞では認められない一方、骨芽細胞や滑膜細胞で非常に強いことが明らかとなった。さらに、関節リウマチの増悪に関与しているとされるサイトカイン(IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-17)で骨芽細胞や滑膜細胞を刺激したところ、IL-17 がこれらの細胞からの分子 X 分泌を強力に誘導した。実際、コラーゲン誘導性関節炎マウスの関節では分子 X の発現が上昇しており、その誘導は IL-17 中和抗体の投与によって抑制された。次に、分子 X の生理機能を明らかにする目的で分子 X ノックアウトマウスの骨を解析したところ、骨量の減少と破骨細胞の巨大化が観察された。そこで、*in vitro* において分子 X が破骨細胞に与える影響を調べる目的で RANKL 誘導性の破骨細胞分化培養系に分子 X を加えたところ、破骨細胞形成が強力に阻止された。個々の破骨細胞の骨吸収活性と分化マーカーの発現状態は正常であったこ

とから、分子 X の破骨細胞に対する作用は融合阻害であると考えられた。さらに、分子 X は TNF- α や IL-4 誘導性のマクロファージ融合も阻害したことから、この分子は RANKL による破骨細胞融合のみならず、広くマクロファージの融合を阻害する液性因子であることも判明した。次に、分子 X がどのようなメカニズムで細胞融合を制御しているのかを理解するため、分子 X で処理した破骨細胞の動きや細胞骨格の変化を顕微鏡で観察した。その結果、分子 X は破骨細胞の運動性とアクチン重合を著明に抑制することが明らかとなった。また、アクチン重合を正に制御する Rac1 の活性化と、Rac1 を活性化する Vav3 のリン酸化は分子 X によって抑制されていた。その一方で、Vav3 の脱リン酸化を担う SHP-1 のリン酸化は分子 X 処理によって亢進していた。また、SHP-1 および分子 X の受容体である Y 受容体(未公開)の発現を sh-RNA によって抑制すると、分子 X による破骨細胞融合阻害効果は消失した。以上より、分子 X は Y 受容体を介して SHP-1 を活性化させ、その結果、Vav3-Rac1 シグナルが抑制されることで破骨細胞の融合が障害されることが明らかとなった。最後に、分子 X の薬理効果を調べる目的でマウス膠原病誘導性関節炎モデルおよび加齢性骨粗鬆症マウスに分子 X を投与したところ、骨破壊が著明に抑制された。興味深いことに、分子 X の投与は *in vivo* における破骨細胞融合を抑制するのみならず、骨形成を促進した。分子 X で処理した破骨細胞からは骨形成を促すサイトカインである BMP2 が誘導され、*in vitro* において分子 X で処理した破骨細胞の培養上清で骨芽細胞を培養すると、骨形成が亢進した。以上より、分子 X は破骨細胞の融合を抑制すると同時に骨形成を促進する薬理効果を持った液性因子であることが示された。

4. まとめ

分子 X は、本研究によって世界ではじめて同定された破骨細胞の融合を特異的に阻害する液性因子である。また、これまで IL-17 は関節リウマチの増悪因子であるとばかり考えられてきたが、本研究は IL-17 によって滑膜細胞や骨芽細胞から誘導されてくる液性因子の中に骨保護分子が含まれていることを示した最初の報告である。分子 X の投与は骨破壊を抑制するのみならず骨形成も促進したことから、分子 X もしくはその受容体である Y 受容体のアゴニストはこれまでにないユニークな作用機序を持った理想の骨破壊治療薬となることが期待される（尚、本研究は大阪大学免疫学フロンティア研究センター、京都大学医学部附属病院リウマチセンター、国立遺伝学研究所、東京大学大学院新領域創成科学研究科との共同研究で行われた）。

5. 発表

<論文>

本研究成果をまとめた論文は現在投稿中である。

<特許>

本研究に関連する 1 件の国内特許を申請中(Japan Patent 2013-235205)である。

<招待講演>

1. 丸山健太. “骨自然免疫系制御メカニズムの解明” 松本歯科大学大学院セミナー (松本歯科大学、長野/口演) November 6, 2014 日本語
2. 丸山健太. “Novel insights into mechanisms controlling skeletal system: new molecule, new therapy” 第 11 回 Bone Biology Forum (富士教育研修所、静岡/口演) August 22-23, 2014 英語
3. 丸山健太. “Novel therapeutic targets for bone destructive diseases; beyond RANKL inhibition” 第 15 回骨代謝研究会 (慶應義塾大学医学部 総合医科学研究棟ラウンジ、東京/口演) November 30, 2013 日本語

6. 参考文献

1. Maruyama, K., *et al.* The transcription factor Jdp2 controls bone homeostasis and antibacterial immunity by regulating osteoclast and neutrophil differentiation. *Immunity* **37**, 1024-1036 (2012).
2. Maruyama, K., Kawagoe, T., Kondo, T., Akira, S. & Takeuchi, O. TRAF family member-associated NF-kappaB activator (TANK) is a negative regulator of osteoclastogenesis and bone formation. *J Biol Chem* **287**, 29114-29124 (2012).
3. Maruyama, K., Sano, G., Ray, N., Takada, Y. & Matsuo, K. c-Fos-deficient mice are susceptible to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* **75**, 1520-1523 (2007).
4. Maruyama, K., *et al.* Receptor activator of NF-kappa B ligand and osteoprotegerin regulate proinflammatory cytokine production in mice. *J Immunol* **177**, 3799-3805 (2006).
5. Maruyama, K., *et al.* Strawberry notch homologue 2 regulates osteoclast fusion by enhancing the expression of DC-STAMP. *J Exp Med* **210**, 1947-1960 (2013).