戦略的創造研究推進事業 ERATO 追跡評価用資料

「高柳オステオネットワーク」プロジェクト (2009.10~2016.3)

研究総括:高柳 広

2022年3月

目次

要旨 1
まとめ図と展開図 3
第 1 章 プロジェクトの概要
1.1 研究期間
1.2 プロジェクト発足に至る科学技術や社会の背景
1.2.1 科学技術の背景
1.2.2 社会の背景
1.3 プロジェクトのねらい
1.4 研究体制7
1.5 プロジェクト終了時点での研究成果やその意義
1.5.1 オステオカインの同定
1.5.2 骨免疫学の深化・発展(骨-免疫の相互作用の解明)
1.5.3 骨形成制御、免疫制御に関する研究の進展28
第 2 章 プロジェクト終了から現在に至る状況 38
2.1 プロジェクトの終了後の状況に関する基礎データ
2.1.1 調査方法 38
2.1.2 競争的研究資金の獲得状況40
2.1.3 論文の発表状況 44
2.1.4 特許の出願・公開・登録状況47
2.1.5 招待講演
2.1.6 受賞状況
2.1.7 ベンチャー企業の設立状況48
2.1.8 報道関係
2.2 プロジェクトの進捗状況49
2.2.1 オステオカイン研究の展開49
2.2.2 骨免疫学の展開58
2.2.3 骨形成制御、免疫制御に関する研究の展開66
2.3 プロジェクト参加研究者の活動状況84
2.4 第2章まとめ86
第 3 章 プロジェクト成果の波及と展望88
3.1 科学技術への波及と展望88
3.1.1 新規な概念の提唱88
3.1.2 骨免疫学、オステオネットワーク領域への貢献89
3.1.3 科学技術への波及のまとめと展望90

3.2 社会経済への波及と展望	92
3.2.1 社会経済への貢献の可能性	92
3.2.2 社会経済への波及のまとめと展望	94
【引用文献】	95

要旨

本資料は、国立研究開発法人科学技術振興機構 (JST) における戦略的創造研究推進事業 ERATO「高柳オステオネットワーク」プロジェクト(2009 年 10 月~2016 年 3 月) (本プロジェクト)について、研究終了後一定期間を経過した後、副次的効果を含めて研究成果の発展 状況や活用状況などを明らかにし、当事業および事業運営の改善等に資するための追跡評価にむけて、追跡調査を実施し、その結果をまとめたものである。

骨は、脊椎動物に特異的な組織であるにもかかわらず、従来の医学、生物学においては、単に生体を支持し運動を可能とする硬組織としての認識にとどまってきた。しかし、骨は、単なる運動器の一部として働くだけでなく、外界や他臓器からの刺激に応答し、能動的に生体制御に関わる制御器官として捉え直す機運が出ていた。本プロジェクトは「骨免疫学」を提示した高柳広研究総括(研究総括)によって構想され、骨を司令塔とした他臓器を制御するネットワークを「オステオネットワーク」と名付け、その全貌を解明することで、脊椎動物が持つ生体高次機能の制御システムを新しい視点から理解し、将来のヒトの疾患治療法開発に役立つ知見を得ることを目的とした。

プロジェクト期間中、高いレベルにある遺伝子改変マウス作製技術、プロテオーム解析技術、トランスクリプトーム技術等を駆使して、セマフォリン(Sema)4D、Sema3A などのオステオカインを同定し、その作用機構を解明した。また、抗原・抗体複合体が骨粗しょう症を起こす機構を解明するとともに、関節の炎症や骨破壊を強力に引き起こす T 細胞を発見した。さらに、破骨細胞の分化誘導の分子機構の詳細を解明した。また、病原性 T 細胞による自己免疫疾患発症機構の解明や、自己免疫寛容に関わる転写因子 Fezf2 の発見は、自己免疫疾患を理解するための基盤を提供した。これらは、骨粗しょう症や、関節リウマチの発症、増悪の診断解析方法や新しい治療薬の開発に繋がることが期待される。一方、従来難しかった骨細胞を単離、培養する技術を開発し、骨細胞が破骨細胞分化因子 RANKL を産生して破骨細胞を育てるという新しい発見をした。

プロジェクト終了後も、研究総括や各グループリーダーを中心とした活発な研究活動が続けられた。従来明らかでなかったエストロゲンの骨に対する作用が Sema3A を介することを明らかにした。また、可溶型 RANKL が、がんの骨転移に重要な役割を担うことを見出し、低分子の RANKL 阻害剤をマウスに投与すると、がんの骨転移が抑制されることを確認した。また、T 細胞の口腔細菌感染防御への役割を解明するとともに、炎症性サイトカイン産生 T 細胞の誘導に関わる分子を同定した。さらに、RANKL が腸管免疫に関与する M 細胞を誘導することを発見した。また、エピジェネティックな制御による T 細胞の分化・維持機構を解明するとともに、クロマチン制御因子 Chd4 による自己抗原発現を制御する機構や、胸腺の線

¹ 研究総括らの、T 細胞と破骨細胞が RANKL と IFN-γ を介してクロストークするとの研究(Takayanagi H et al, Nature, 408, 600, 2000)の紹介の中で Arron と Choi が osteoimmunology「骨免疫学」の概念を提唱した(Arron JR, Choi Y, Nature, 408, 535, 2000)。

維芽細胞も T 細胞の選択に関わる自己抗原を提示する機構を明らかにした。これらにより、 中枢免疫寛容誘導のメカニズムの理解を大きく進展させた。

一方で、運動器官である骨の運動と機能の関係にアプローチして、メカニカルストレスに よる骨細胞の活性化や歯科矯正での歯の移動への破骨細胞の役割を解明した。

本プロジェクトと本プロジェクトから発展した研究成果は、国際的なトップジャーナルに掲載された。優れた研究水準を示しており、オステオネットワークという概念が国際的にも高く評価され、多方面の研究者を刺激した。戦略目標である「生命システムの動作原理の解明と活用のための基盤技術の創出」に資する十分な成果が得られた²。

また、本プロジェクトは、関節リウマチなど、骨に深刻なダメージを与える難治性自己免疫疾患の新規治療・診断法の開発、加齢ないし病的な要因による骨量減少の新しい治療・診断法の開発に繋がる新知見を明らかにし、さらに創薬ターゲットの同定へと発展した。今後、さまざまな臨床応用が展開されれば社会的にも貢献することが期待される。

研究総括自身は、プロジェクト終了後、科研費特別推進研究、AMED-CREST をはじめとする複数のプロジェクトを代表し、日本骨免疫学会を設立、初代理事長に就任した。グループリーダーや共同研究者は、さきがけ1件、AMED-PRIME3件、AME-CREST1件をはじめ、複数の研究助成プロジェクトの研究代表者として活躍し、それぞれ、本プロジェクトで培った基盤の上に、新たな研究プロジェクトに取り組んでいる。骨免疫学に基づくオステオネットワーク研究という新しい領域に多数の人材を供給したことも本プロジェクトの大きな成果としてあげられる。

https://www.jst.go.jp/erato/evaluation/posteriori/jigo/jigo2009_takayanagi.pdf

² 本プロジェクト 事後評価(最終評価)報告書。

まとめ図と展開図

ERATO「高柳オステオネットワークプロジェクト」プロジェクト まとめ図

戦略目標、達成目標 /プロジェクトの目標	インプット	アクティビティ /アウトプット	アウトカム (short/mid-term)	アウトカム(long-term) /インパクト
(ねらい)			~追跡調査時点 今後予想される展開	今後想定される波及効果
戦氏によっている。 は、このでは、このでは、このでは、このでは、このでは、このでは、このでは、こので	研高学教 プ足東大 研1. イン一男 オトネル友/深線広学) ジ〜医 スワル貴) スロプ) スマテー紀新京学 ウ13歯 ネ解(高 イグ本 サジグ島人) オー岡 オスス中幹郎 ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・	論文 80 発展論文数 36 36 36 36 36 36 36 3	イステオカイン研究の流れの形成	難病の治療法の開発と健康寿命への貢献・骨粗しょう症、関節リウマチ、変形性関節症などの新規治療法の開発・がん骨転移の治療法の開発・中枢免疫で変化の開発・加齢、メカノストレスの骨形成への影響の解明による運動機能の向上 学術研究への技術的貢献・細胞特異の治療をすっている。 ・細胞特異の治療法の応用

ERATO「高柳オステオネットワーク ~2008 2019 2020~ 2016 2017 2018 2013 2014 2015 2009 2010 2011 2012 プロジェクト」 展開図 AMED: RANKL低分子阻害剤による疾患制 AMED病態解明治療研究: 関節リウマチの病原性間葉系細胞 さきが(ナ・白己免疫性関節炎) 御の展開に向けた検証研究2015-17 サブセットを標的とした骨破壊治療法の開発2020-22 おける骨破壊の分子機構の解明 とその制御法の確立2001-04 ERATO (2009年~2015年) 高柳 オステオネットワークプロジェクト 特別推進研究: 骨免疫学の推進による新たな生体制御 AMED-CREST:組織修復型免疫細胞の解明と JST/SORST:破骨 戦略目標:生命システムの動作原理の解明と活用のための基盤技術の創出 システムの理解2015-19 その制御による疾患治療の開発2019-24 研究助成 細胞分化シグナルに プロジェクト 基づく自己免疫性関 基盤研究B: 膜型RANKLと可溶型RANKLの生理的・病理的機能の解明(岡本一男)2018-20 節炎の制御2005-0 基盤研究B: 超高齢社会のQCL向上に向けて骨一脳・神経系連関を解明する(古賀貴子)2017-19 挑戦的研究(開拓): 認知症と骨粗鬆症を同時に制御できる方法の開発基盤(古賀貴子)2020-22 さきがけ: 運動器の動的恒常性を司るロコモ・ **>**学術創生研究:骨免疫学の創成2005-09 サーキットの解明(中島友紀)2013-16 PRIME: 加齢に伴うオステオカインの変化がもたらす個体 AMED-CREST: 骨恒常性を司る骨細胞のメカノ・カスケードの解明(中島友紀)2015-20 機能低下機構の解明(林幹人)2019-22 高柳総括の期間前の研究 PRIME: 活性型自然リンパ球による腸管免疫實容に関す 期間中の成果 ERATO終了後の成果 1.5 る研究(澤新一郎)2019-22 ·RANKLと骨破壊·T細胞の関連の発見 1.オステオカイン研究の展開 骨免疫学の確立と骨-免疫-神経を結ぶオステオネットワーク研究の流れの形成 骨免疫学の提唱(高柳、日本臨牀,2002) ・エストロゲンによるSema3A発現制御と骨量維持(Hayashi et al, Cell Metab, 2019) (Takayanagi et al, Arthritis Rheum, 2000, 1 オステオカイノの 同定 ・がん骨転移における骨芽細胞が産生する可溶性RANKLの役割 Nature, 2000, Nature, 2002) ・Sema4D: 破骨細胞が産生する骨形成抑制因子(Negishi-Koga et al, Nat Med, 2011) (Asano et al. Nat Metab. 2019) ・Th17細胞が破骨細胞誘導性T細胞である ・Sema3A: 骨芽細胞が産生する骨リモデリング因子(Hayashi et al, Nature, 2012) ・RANKL低分子阻害剤による腫瘍の骨転移の抑制(Nakai et al, Bone Res, 2019) (Sato et al. JEM. 2006) ・IL-7: 骨芽細胞が産生する骨髄造血制御因子(Terashima et al. Immunity, 2016) ・Osteoprotegerinの骨、胸腺、腸での役割(Tsukasaki et al, Cell Rep, 2020) ・樹状細胞のカテプシンK・TLR9シグナルを介 ・その他多くのオステオカイン候補因子の同定 するTh17細胞の誘導 2.骨免疫学の展開 2.骨免疫学の深化・発展(骨-免疫の相互作用の解明) (Asagiri et al, Science, 2008) ・RANKL発現間葉細胞による腸管上皮M細胞の誘導 ・関節リウマチの発症の鍵となるT細胞(exFoxp3Th17細胞) ・破骨細胞分化でのBtkとTecの関与 (Nagashima et al. Nat Immun. 2017) (Shinohara et al. Cell. 2008) (Komatsulet al. Nat Med. 2014) ・exFoxp3Th17細胞の□腔細菌感染防御への関与 ・抗原・抗体複合体による骨粗しょう症発症のしくみ *calmodulin kinase-CREB経路による破骨細胞 (Tsukasaki et al. Nat Commun. 2018) (Negishi-Koga et al, Nat Commun, 2015) 0 の分化誘導 ・IL-17 産生 γ δ T細胞におけるチロシンキナーゼSykの関与 ・滑膜線維芽細胞が産生するRANKLによる骨破壊 ジャ・ブ (Sato et al, Nat Med, 2006) (Muro et al, J Clin Inv, 2018) (Danks et al, Ann Rheum Dis, 2016) ・TNFαによる破骨細胞の分化亢進メカニズム ・破骨細胞分化制御と骨吸収メカニズム(Nishikawa et al, PNAS, 2010など複数) 3.骨形成制御、免疫制御に関する研究の展開 $\vec{\mathcal{L}}$ ・JL-17 産生T細胞の骨再生イニシエーターとしての機能 ・歯列矯正における歯の移動機構(Shoji-Matsunaga et al, Scientific Rep, 2017) (Ochi et al, Proc Natl Acad Sci, 2007) (Ono et al. Nat Commun. 2016) ・メカニカルストレスが骨細胞を活性化する機構(Inoue et al, Scientific Rep. 2019) \overline{L} 本プロジェクトの目標 ・骨リモデリングのシミュレーション(Kameo et al, Science Advances, 2020) 3.骨形成制御、免疫制御に関する研究の進展 1.オステオネットワーク解析 ・アルギニンメチル化酵素のT細胞維持、NKT細胞分化における機能 ・骨を作りかえる指令細胞(骨細胞)の発見(Nakashima et al, Nat Med, 2011) オステオカインの同定、ドラッグディスカバリー (Inoue at al, Nat. Immun, 2018) ・骨形成脂肪代謝のバランスを制御する転写因子Maf 2 オステオイムノロジー ・プロテアソーム因子の遺伝子多型とシェーグレン症候群 (Nishikawa et al. J Clin Inv. 2010) 骨と免疫の相互制御機構の解明 (Nitta et al, Sci Immun, 2017) ・自己免疫疾患を引き起こす遺伝子ΙκΒξ (Okamoto et al, Nature, 2010) 3.オステオサイト・マウスジェネティクス ・クロマチン抑制因子Chd4が免疫疾患の発症を防ぐ ・自己免疫疾患を防ぐ転写因子 Fezf2 の発見(Takaba et al, Cell, 2015) メカニカルストレスと骨、 (Tomofuji et al, Nat Immun, 2020) ・病原性T細胞による多発性硬化症発症の仕組み(Guerrini et al, Immunity, 2015) 遺伝子改変マウスの作出 ・胸腺髄質線維芽細胞による中枢性免疫寛容(Nitta et al, Nat Immun, 2020) 3.1.1 オステオネットワーク分野確立への貢献 3.2.1 社会活動(研究成果の啓蒙) 3.1.2 学術研究への技術的貢献 展社 社会への貢献 骨-免疫-神経を結ぶオステオネットワーク研究の流れをつくった 骨粗鬆症、関節リウマチ、多発性硬化症等の治療法開発への道を開いた。 2011 「筑駒アカデメイア」 ・細胞特異的遺伝子改変マウスの作出 経 ・Sema4D抗体を骨形成促進剤として特許登録(米国ベンチャーとライセンス契約) 骨粗しょう症ロコモティブ症候 ・骨細胞の分離方法と新規細胞培養法の確立 済 2.骨免疫学の深化・発展(骨-免疫の相互作用の解明) ・組換えSema3Aを、骨量を増加させる組成物として特許出願 群を防ぐには 3.自己免疫疾患、がん骨転移等の発症の仕組みの解明 インパクト 3.1.3 ・破骨細胞活性化因子Btkの阻害剤の骨粗鬆症治療薬としての可能性(米企業と共同研究に発展) 2012,2013 「免疫ふしぎ末来」 研究者の育成 本PJから、特別推進研究、AMEDのPJなどに発展し、さらに、より ・関節リウマチに関わるTh17細胞の分化を抑制するための分子標的(IκBξ)の同定 (免疫学会) 広範なAMED-CRESTが設定された。 複数の研究員が学会で受賞し、教授、准教授、助教、特別 ・RANKL 低分子阻害薬の多発性硬化症、がん骨転移治療薬としての可能性(AMEDのPJに発展) 骨をこわす免疫のしくみ また、他の研究Gにも刺激を与え、関連のPJがつくられている。 研究員などのポスト獲得 2012 JST News 骨免疫学会の設立(2014) 高柳理事長 骨と免疫の新しい夜明け 日本学士院賞、上原賞、免疫学会賞、リウマチ学会賞など受賞 他の骨-他臓器ネットワーク研究の動向 RANKL: 破骨細胞分化因子の示唆(Takahashi et al, Endocrinology, 1988) ・骨産生FGF23が腎臓機能を制御(Fukumoto et al, Nature. 2006)、骨の因子が糖尿病などに影響(Lee et al, Cell, 2007) 破骨細胞抑制因子OCIF(Tsuda, BBRC 1997, Yasuda, Endcrinology 1998)、OPG(Simonet et al, Cell, 1997)=RANKL Karsentyら(Columbia U): オステオカルシンの 研究 膵臓でのインスリン産生、精子の産生、脳の発生に関与 XKarsenty et al, Cell, 2013, 2016) Pittetら(MGH): 骨芽細胞と肺がん細胞の関与(Engblomet al, Science, 2017) RANKLの破骨細胞への機能(Dougall et al, Genes Dev. 1999)→抗RANKL抗体 Sclerostinの発見(Winkler et al, EMBO J, 2003): Wnt阻害で骨再生を抑制(Li et al, JBC, 2005)→抗Sclerostin抗体 · 丸山ら(岡崎生理学研): 神経骨免疫、腸内細菌がセロトニンを介して骨量に関与(Takayama et al, Cell, 2020) · 片山ら(神戸大): 骨細胞による免疫・脂肪代謝の制御 (katayama et al, Cell Metab, 2013)、須田ら(熊本大)、長澤ら(京大): 骨と造血の関係 関連動向 骨相しょう症治療の開発:抗RANKL抗体の承認2010年米(Amgen社)、抗Sclerostin抗体の承認2019年米(Amgen社) 矢印枠は 研究助成 、基盤研究S:炎症性骨破壊に関与する病原性破骨細胞の同定とその制御によ ♪グローバルCOEプログラム: 歯と骨の分子疾患科学の国際教育研究拠点(野田政樹)2008-12 関節破壊機序の解明による新治療法開 プロジェクト 発に関する研究(中村耕三)1998-00 _ 🦯 ,-----水色は高柳参加 若手研究A: RANKL/Fasを介した関節リウマチにおける骨軟骨破壊機構の解明(井澤俊)2013-15 ▶基盤研究(S):骨・関節細胞のダイナミクスと免疫系の制御を包括した統合運動器学の確立(田中栄)2018-22 *、厚生科研費:関節リウマチの先端的治療に関する研究 ▼厚生料研費:関節リウマチの関節破壊機序の解明と関節破壊「ゼロ」を目指す治療法確立に関する研究 (西岡久寿樹) 2002-04 ・特定領域研究:発がん抑制に関する遺伝子 (田中良哉) 2011-13 >基盤研究(A): 造血幹細胞を維持する微小環境(ニッチ)の形成と作用の分子機構の解明(長澤丘司)2018-20 厚生科研費:関節リウマチ骨髄血中の疾患誘導因子解明と根治療法開発(越智隆弘)2008-10 **、**発現ネットワーク(谷口維紹) 2000-04 /FIRST: 免疫ダイナミズムの統合的理解と免疫制御法の確立(審良静男)2009-13 ・他に 神経骨免疫 系(丸山健太): 若手研究(A) 2015-17、基盤研究(B) 2018-20

第 1 章 プロジェクトの概要

本調査の対象である ERATO「高柳オステオネットワーク」プロジェクト(本プロジェクト) の概要を下記に示す。

1.1 研究期間

研究期間は 2009 年 10 月~2016 年 3 月。但し、最後の 1 年 (2015 年 4 月~2016 年 3 月) は特別重点期間として継続された。

1.2 プロジェクト発足に至る科学技術や社会の背景

1.2.1 科学技術の背景

骨は、脊椎動物の生体の要であるが、従来は運動器の一部として末梢の効果器のレベルに 位置づけられてきた。しかし、骨は内分泌系により制御されカルシウム・リンなどのミネラ ル代謝と密接に関わるだけでなく、造血幹細胞を維持し必要に応じて生体に動員する重要 な免疫器官でもある。

研究総括は、骨と免疫の共通制御メカニズムや相互作用を研究し、骨と免疫系の不可分な関係に基づく新たな生体理解を、骨免疫学という新たなパラダイムへと発展させることに貢献してきた 3 。本プロジェクトの前に、研究総括は世界に先駆け、関節リウマチ(RA)に伴う炎症性骨破壊が、破骨細胞分化因子 RANKL 4 の異常発現症であることを提唱し 5 、この RANKL 発現に関わる破骨細胞誘導性 T細胞が、Th17細胞であることを見出した 6 。さらに、ウイルス抑制因子 IFN- β が、破骨細胞分化を抑制し骨量を維持すること 7 や、T細胞で重要な転写因子 NFATc1が、破骨細胞分化のマスターレギュレーターであることを同定した 8 。また、破骨細胞分化に RANKL 受容体 RANK のシグナル以外に、免疫グロブリン様受容体からの共刺激が必要であること 9 、RANK と共刺激シグナルを繋ぐキナーゼが Tec/Btk であること 10 、これらの下流で CaMK 11 が重要な役割を果たすことも明らかにしている 12 。最近では、破骨細胞特異的プロテアーゼとされたカテプシン K が樹状細胞でも発現し To11 様受容体シグナルを制

³ 総説: Takayanagi H, Nat Rev Immunol, 7, 292, 2007.

⁴ RANKL:破骨細胞分化促進因子 (receptor activator of nuclear factor-κB ligand) TNF ファミリーサイトカインの一種。RANK (receptor activator of nuclear factor-κB)に結合するリガンド。RANKLの同定: Tsuda E et al, BBRC, 23, 137, 1997., Yasuda H, Endcrinology, 139, 1329, 1998., Simonet WS et al, Cell, 89, 309, 1997. 総説:保田尚孝, 日本臨床免疫学会誌, 36, 209, 2013.

 $^{^5}$ Takayanagi H et al, Arthritis Rheum, 43, 259, 2000., Takayanagi H et al, Nature, 408, 600, 2000.

 $^{^{\}rm 6}$ Sato K et al, J Exp Med, 203, 2673, 2006.

⁷ Takayanagi H et al, Nature, 416, 744, 2002.

 $^{^{8}}$ Takayanagi H et al, Dev Cell, 2002., Asagiri M et al, J Exp Med, 202, 1261, 2005.

⁹ Koga T et al, Nature, 428, 758, 2004.

¹⁰ Shinohara M et al, Cell, 132, 794, 2008.

¹¹ CaMK:Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase、カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ。

¹² Sato K et al, Nat Med, 12, 1410, 2006.

御していることを見出し、骨と免疫の共通分子の研究を発展させてきた¹³。以上のように研究総括は、骨と免疫との関係や共通制御機構の解明を進め、生体における骨の新たな位置づけを確立した。

一方、近年では、骨は免疫システムとの相互作用に限らず、全身制御をも司る器官であることが明らかになってきている。例えば、骨からは全身のエネルギー代謝の制御因子が産生され、糖尿病などのメタボリック症候群に影響を与えること¹⁴、全身のリン酸代謝を制御する鍵となる因子 FGF-23 が骨細胞から分泌されることが報告され¹⁵、骨を一種の分泌器官としてみなす動きが始まりつつある。しかし、運動や重力といったさまざまなメカニカルストレスは、骨によって感受されて生化学的な反応へと変換されるが、その感受機構や変換機構は不明である。また、骨において石灰化は正に制御される一方、血管をはじめとする全身の組織では負に制御されなければならないが、その制御機構も明らかになっていない。このように、骨による外界からの刺激感受機構や骨による全身制御は、脊椎動物を特徴づける新しい生体制御理解の枠組みとして大きな意義をもつと予想されるが、その制御システムの全貌や分子機構はほとんど明らかになっていない。

1.2.2 社会の背景

日本は世界から注目される高齢化先進国である。高齢化社会が進行する中、加齢に伴って増加する骨粗しょう症、関節リウマチ、変形性関節症、癌骨転移、寝たきりや運動器疾患(ロコモティブ症候群)のみならず、動脈硬化、メタボリック症候群、自己免疫疾患といった、全身の臓器が関わる疾患の予防や治療は非常に重要な医学的な課題の一つである。その中でも、日本における骨粗しょう症患者は推計 1,280 万人(うち女性 980 万人)16で、予備軍を含めると 2,000 万人といわれており、増加の一途をたどっている。また、関節リウマチの患者数は 60~100 万人17と推定されている。骨粗しょう症や、骨と免疫系の異常が関係する関節リウマチは、骨に深刻なダメージを与える代表的な疾患であり、その病態をより深く理解し、新規治療法を開発することが期待されている。

1.3 プロジェクトのねらい

本プロジェクトは、骨と免疫系の相互作用を明らかにする骨免疫学の推進と、骨免疫学 を さらに発展させ、骨を中心とした全身制御ネットワーク(オステオネットワーク)という新 たな概念を構築し、その全貌を解明することをねらいとした。

これまで、骨は脊椎動物に特異的な組織であるにもかかわらず、従来の医学、生物学においては、単に生体を支持し運動を可能とする硬組織としての認識にとどまってきた。しかし、 既に述べた通り、骨は単なる運動器の一部として働くだけでなく、外界や他臓器からの刺激

¹³ Asagiri M et al, Science, 319, 624, 2008.

¹⁴ Lee NK et al, Cell, 130, 456, 2007.

¹⁵ Feng JQ et al, Nat Genet, 38, 1310, 2006. Liu S et al, Am. J. Physiol Endocrinol Metab, 2006

¹⁶ 日本骨粗しょう症学会「骨粗しょう症の予防と治療ガイドライン 2015 年版」。

¹⁷ 厚生科学審議会疾病対策部会、リウマチ等対策委員会資料 2018 年 11 月。

に応答し、能動的に生体制御に関わる制御器官として捉え直す時代にさしかかっている。本プロジェクトは、オステオネットワークというユニークな発想により、これまでの生体における骨の役割を一転させるパラダイムシフトを導くものである。具体的には、骨と骨髄環境の相互作用、骨と他臓器との相互作用を多角的に検索し、骨による全身生体系の制御機構と運動器疾患や様々な全身性疾患の発症メカニズムを明らかにすることを目指した。さらに、骨が産生して全身を制御する因子をオステオカインと名付け、その存在の実証および機能解明を通して、最終的にはオステオネットワークの破綻が誘引するさまざまな全身性疾患に対する治療に向けた分子基盤の確立を目指した。また、骨は免疫系による制御だけでなく、外界からのストレスや全身制御系による作用に応じて、その恒常性を維持するように制御されているため、過剰なストレスや全身性疾患の発症は、骨の恒常性を破綻させる。そこで、ヒトのさまざまな疾患、例えばメタボリック症候群、炎症性疾患、異所性骨化、肝性骨異栄養症などに伴う骨異常の病態解明や、宇宙空間における無重力状態といったメカニカルストレスに対する骨制御機構の解明を通して、骨と他臓器に共存する多くの病態の解明や治療基盤の確立を目指した。

以上まとめると、本プロジェクトは、骨免疫学の推進、骨全身制御因子(オステオカイン)の同定、全身性疾患に伴う骨組織の細胞(骨構成細胞および骨髄構成細胞)を介した病態制御や骨異常メカニズムの解明を通じて、脊椎動物に特異的な組織である骨の観点からの生体高次機能を理解し、骨と骨髄環境ならびに他臓器との相互作用に関連する疾患群に対する新規治療戦略の分子基盤確立を目指した。

本プロジェクトは以下の3項目を柱として進めた。

- ・骨による全身制御ネットワークの解明(骨→全身)
- ・全身生体系による骨制御ネットワークの解明(全身/環境変化→骨)
- ・オステオネットワーク解明のための先駆的技術開発と革新的薬剤の開発

1.4 研究体制

本プロジェクトで主眼となっている、骨による全身制御ネットワークの解明では、骨と全身の他臓器との連関を検索するため、骨特異的な遺伝子改変マウスを用いて、種々の生体系に習熟したエキスパートとの協力による体系的な知識・実験技術を用いた広範なスクリーニングを必要とする。そのため、最先端のマウスジェネティックスを骨分野に応用し、従来の研究領域の枠組みを超えた研究体制を構築した。すなわち、異なる研究領域のエキスパートと密接な連携を図ることで、網羅的な骨髄環境や全身組織の解析を可能とし、オステオネットワーク解明を実現する。その為、本プロジェクトでは以下の3つの研究グループを設置した。

1. オステオネットワーク解析グループ

オステオカインの同定と、その標的細胞・組織における細胞間情報伝達機構や作用機序の分子レベルでの解明。

2. オステオイムノロジーグループ

骨と免疫・骨髄構成細胞に特化したオステオカインの同定とその機能解析による骨免疫 学の展開。

3. オステオサイト・マウスジェネティクスグループ

骨細胞分離とメカニカルストレスに対する骨の感受・応答の解析と、オステオカイン・オステオネットワークの生理的・病理学的意義を解明するための新規遺伝子改変マウスの作製。

表 1-1 研究グループと人員および実施場所

グループ名	オステオネット ワーク解析 グループ	オステオイム ノロジー グループ	マウスジェネ ティクス グループ	オステオサイ ト グループ	プロジェクト 事務所
実施場所	東京医科歯科大 学 (M&D タワー8 階) 2013 年から東京 大学医学部(教育 研究棟 10 階)	学 (M&D タワー8 (M&D タワー8 東京医科歯科 大学 13 年から東京 2013 年から東 学医学部(教育 2013 年から東 京大学医学部 2013 年から東 京大学医学部 (M&D タワー8 (M&D タワー8		(M&D タワー8	
リーダー	古賀 貴子/ 2015年3月から 高柳 広	岡本 一男	初期は2グループ統合リーダー: 中島 友紀(2013年度まで) 澤新 一郎 林 幹人		武内 昭二 (事務参事)
 研究員	最大3名	最大 5 名	2名		事務参事1名
技術員	最大2名	最大3名	最大3名		技術参事1名
研究補助員	0~1名	0~1名	0~1名		事務員1名
計	最大6名	最大6名	最大6名		
総計	最	3名			

1.5 プロジェクト終了時点での研究成果やその意義

1.5.1 オステオカインの同定

ヒト・マウス個体の全組織における発現パターン解析データベースと本プロジェクトで構築した骨構成細胞の網羅的遺伝子発現解析データを基に、骨芽細胞に由来するオステオカインの候補を17個、破骨細胞に由来する候補を3個に絞り込んだ。このうち、破骨細胞の分泌タンパク質と遺伝子発現の解析から破骨細胞に由来するオステオカインとしてセマフォリン 4D(Sema4D)を同定し、骨芽細胞培養上清の分泌タンパク質プロテオーム解析により Sema3A を、骨構成細胞除去マウスを用いたオステオカインの探索により、骨芽細胞が産生して骨髄造血制御にかかわる IL-7 を同定した。

(1) Sema4D:破骨細胞が産生する骨形成抑制因子[1]

破骨細胞が産生するオステオカインとして同定された Sema4D は、神経細胞が回路を作る 過程や免疫反応に関わることで知られるセマフォリンファミリーに属するタンパク質で、 破骨細胞の分化に伴って特異的に高発現することを見出したことから、骨組織の恒常性に 関わるオステオカインとして機能する可能性を検討した。

これまでの研究では、新しい骨の形成は古い骨の吸収がきっかけとなって始まることが知られている。一方で、骨を健常な状態に維持するためには、古くなった骨が確実に除去されるまで、新しい骨の形成は待機して始まらない仕組みが必要だと考えられるが、そのような仕組みがあるかどうかわかっていなかった。

本研究では、 $Sema4D^{18}$ が、破骨細胞 19 から多量に産生され、骨芽細胞 20 に働きかけることにより骨形成を抑制する仕組みを、マウスにおいて明らかにした(図 1-1)。

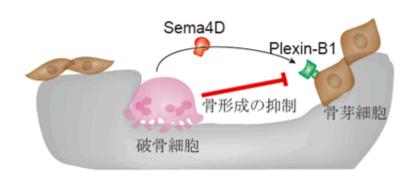


図 1-1 破骨細胞が産生する Sema4D は骨芽細胞上の Plexin-B1 を介して骨形成を抑制する21

骨芽細胞には Sema4D の受容体 Plexin-B1 が発現している。骨芽細胞上の Plexin-B1 に Sema4D が結合すると、Plexin-B1 はチロシンキナーゼ型受容体 ErbB2 によってリン酸化されて活性化し、RhoA のグアニンヌクレオチド交換因子である PDZ-RhoGEF や LARG を介して、 RhoA が活性化され、活性化した RhoA はエフェクタータンパク質 ROCK を介して、骨芽細胞が成熟 (分化) するために必須であるインスリン様成長因子 IGF 経路を阻害することで、骨芽細胞分化が抑制されることがわかった (図 1-2A)。

また、骨形成を行うにあたっては、骨芽細胞が骨形成を必要としている部位へ移動してくることが重要であると考えられている。本研究ではさらに、活性化した RhoA が、骨芽細胞

¹⁸ Semaphorin 4D(Sema4D):「セマフォリン」は、「セマドメイン」と呼ばれる特徴的なアミノ酸配列を持つ一群のタンパク質であり、神経線維の行き先を決めるシグナル分子。それぞれのセマフォリンには、特異的な受容体が存在し、神経細胞の軸索が伸びる過程に作用することが知られていた。Sema4Dはがんの増殖・転移の促進や免疫系の活性化などにも関与することがわかっている。

¹⁹ 破骨細胞: 単球/マクロファージ系前駆細胞由来の多核巨細胞であり、生体で骨を吸収する主要な細胞。 破骨細胞は骨表面に接着し、カテプシン K やマトリックスメタロプロテアーゼなどの基質分解酵素と 酸を放出することで骨基質を分解する。

²⁰ 骨芽細胞: 骨形成を担う間葉系幹細胞由来の細胞。骨芽細胞は骨基質表面で I 型コラーゲンなどの骨基 質タンパク質からなる類骨を形成し、基質小胞とアルカリフォスファターゼを分泌することで類骨を 石灰化し、骨を形成する。

 $^{^{21}}$ JST プレスリリース https://www.jst.go.jp/pr/announce/20111024/index.html 図 1。

の運動能を抑制して破骨細胞から離れた場所に骨芽細胞をとどまらせることによって、骨形成を抑制していることも明らかになった。これらの結果から、破骨細胞は骨吸収を行っている間、Sema4D を産生することによって、骨形成の開始を待機させることが明らかになった。

また、Sema4DやPlexin-B1遺伝子を破壊したマウスや、RhoAの機能を抑制したマウスを作出して調べたところ、骨芽細胞の数と骨形成率が増えて骨量も増加していることがわかった(図 1-2B)。これは、Sema4Dによる骨芽細胞の成熟(分化)の阻害ができなくなり、骨芽細胞が過剰に分化したためだと考えられ、正常な生体内では、Sema4D-Plexin-B1-RhoA経路が生体内の骨形成抑制に必須の役割を果たしていることがわかった。

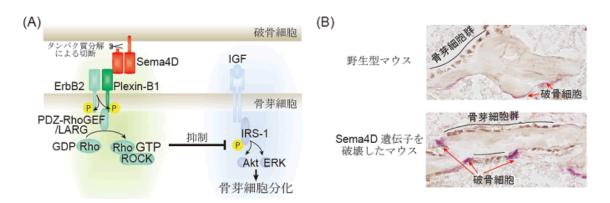


図 1-2 Sema4D は RhoA を活性化して、骨芽細胞の分化と遊走を抑制する²²

- (A) Sema4D-Plexin-B1-RhoA 経路による骨芽細胞分化抑制の分子メカニズム
- (B) Sema4D による細胞局在の制御

Sema4D 遺伝子を破壊したマウスの骨表面では、破骨細胞の近くに存在する骨芽細胞が多数観察された。赤矢印は破骨細胞、黒線は骨芽細胞群を示す。

さらに、卵巣を摘出する手術を行って骨粗しょう症を発症させたマウスに、Sema4D 経路を阻害する抗 Sema4D 抗体を投与すると骨量の回復が認められたが、骨幅の増大を伴い、骨形成が促進した結果であった(図 1-3 下段)。本研究から、Sema4D の働きを抑える物質は、骨粗しょう症や関節リウマチ、がんの転移による骨の破壊といった骨量減少性疾患に対する新薬の候補になることが示唆された。

²² JST プレスリリース https://www.jst.go.jp/pr/announce/20111024/index.html 図 2。

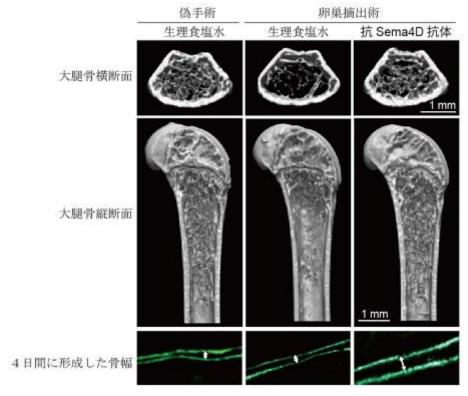


図 1-3 抗 Sema4D 抗体はマウスの骨粗しょう症における骨量減少を治療する²³ 卵巣を摘出したマウスでは、偽手術を行ったマウスに比べ8週間後には重度の骨粗しょう症を発症する(卵巣摘出術/生理食塩水群)。この骨粗しょう症モデルマウスに抗 Sema4D 抗体を投与すると、骨が再生された(上段右:卵巣摘出術/抗 Sema4D 抗体群)。下段:2 重蛍光ラベル間の両矢印は新しく形成した骨の幅を示す。

(2) Sema3A: 骨芽細胞が産生する骨リモデリング因子[2]

本研究では、骨芽細胞培養上清の分泌タンパク質プロテオーム解析により同定されたオステオカイン、Sema3A²⁴に関して、骨組織・骨リモデリングにおける意義を検討し、骨芽細胞自身と破骨細胞の両者に働きかけることにより、骨吸収の抑制と骨形成の促進という2つの作用を持つことをマウスにおいて明らかにした(図 1-4)。

²³ JST プレスリリース https://www.jst.go.jp/pr/announce/20111024/index.html 図3。

²⁴ Semaphorin 3A(Sema3A):「セマドメイン」と呼ばれる特徴的なアミノ酸配列を持つ分子群のセマフォリンに属し、元々は神経細胞軸索の行き先を決める分子として発見された。Sema3A は分泌型のタンパク質で、Nrp1 を介して Plexin-A を活性化することで、細胞内に情報を伝達する。これまでの知見で、Sema3A は免疫系の抑制などにも関与することがわかっている。

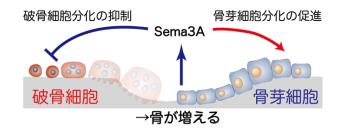


図 1-4 Sema3A による骨量増加作用25

骨芽細胞が産生する Sema3A が骨芽細胞・破骨細胞の両者に作用して、骨吸収を抑制し、骨形成を促進することで骨が増える。

解析の結果を要約すると、Sema3A は(1)破骨細胞および骨芽細胞上に発現する受容体 Neuropilin-1 (Nrp1)を介してPlexin-A に作用し、破骨細胞分化を抑制するとともに骨芽細胞分化を促進すること(図 1-5)、(2)破骨細胞分化に関わるシグナルの 1 つ ITAM 26 シグナルを抑制すること、(3)活性化した Plexin-A は破骨細胞の運動能に関わる RhoA シグナルを抑制し、破骨細胞が骨芽細胞に近づこうとする動きを妨げて Sema3A の供給源である骨芽細胞から遠ざけ、骨芽細胞と接することで誘導される破骨細胞の分化を抑制することを明らかにした(図 1-5(A))。一方、骨芽細胞では、Sema3A が Nrp1 を介して Plexin-A に作用し、骨芽細胞の分化に重要な働きをする古典的 Wnt/ β -カテニンシグナルを活性化し、この伝達系を介して骨芽細胞の分化を誘導する(図 1-5(B))。また、骨芽細胞と由来を同じくする脂肪細胞への分化は相対的に抑制されていることも明らかにした。

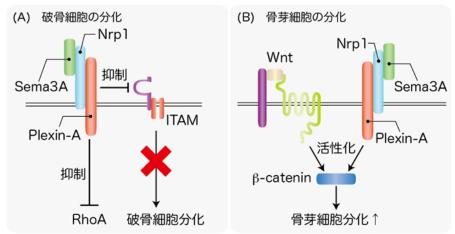


図 1-5 Sema3A による骨量増加作用のメカニズム²⁷

- (A)破骨細胞分化における Sema3A シグナル
- (B) 骨芽細胞分化における Sema3A シグナル

²⁵ JST プレスリリース https://www.jst.go.jp/pr/announce/20120419/index.html_図1。

²⁶ ITAM(immunoreceptor tyrosine-based activation motif):活性化型受容体やアダプター分子の細胞内 領域に存在し、モチーフ内のチロシン残基がリン酸化されることで活性化し、Syk キナーゼなどがリク ルートされることでシグナルを伝達する。

 $^{^{27}}$ JST プレスリリース https://www.jst.go.jp/pr/announce/20120419/index.html $_$ 図 2 $_{\circ}$

これらの結果から、骨芽細胞は Sema3A を産生することによって骨吸収の抑制と骨形成の 促進の双方を制御し、適切な骨量を維持していることが明らかになった。

Sema3A や Nrp1 遺伝子を破壊したマウスでは、破骨細胞の数と骨吸収が増えている一方、骨芽細胞の数と骨形成が低下し、それに伴って骨髄中の脂肪細胞の数が増え、骨量も著しく減少していた。これは、Sema3A の働きが失われたことで破骨細胞の分化抑制が行われず、さらに骨芽細胞の分化が促進されないためだと考えられる。さらに、Sema3A を正常なマウスに静脈注射によって投与すると顕著な骨量増加が認められた。

また、骨にドリルで穴を開けてその部位の骨の再生を観察するモデルにおいても、Sema3Aを局所投与することで、より早い骨の再生を誘導できることがわかった(図 1-6(A))。また、卵巣を摘出する手術を行って骨粗しょう症を発症させたマウスに Sema3A を投与すると、骨吸収抑制と骨形成促進がなされ、骨量の減少を食い止めることができることがわかった(図 1-6(B))。以上の多様な解析の結果から、Sema3A は、骨吸収と骨形成の共役(カップリング機構)を生じることなく、破骨細胞分化を抑制すると同時に骨芽細胞分化を促進することがわかり、カップリング機構の影響を受けにくい新たな治療薬のターゲットとなりうることを証明した。

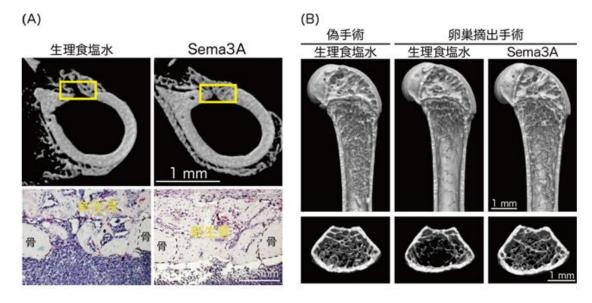


図 1-6 Sema3A は骨再生を促進する²⁸

(A) 骨再生モデルにおける Sema3A の効果

(上段)ドリルでマウスの骨に穴を開け(黄色の四角で囲まれた領域)、Sema3A を局所投与すると著しい骨再生の促進が観察された。(下段) 赤く染められた細胞が破骨細

(B) 卵巣を摘出したマウスでは、偽手術を行ったマウスに比べ4週間後に重度の骨粗しょう症を発症する。この骨粗しょう症モデルマウスに Sema3A を投与すると、骨の減少が抑制された(卵巣摘出手術/Sema3A 群)。

胞、Sema3A を投与したマウスでは骨の再生が促進し、破骨細胞数が低下していた。

²⁸ JST プレスリリース https://www.jst.go.jp/pr/announce/20120419/index.html 図 3。

さらに、老化して骨量が低下傾向にあるマウスでは、老化の進行に伴い血中の Sema3A タンパク質量が低下していることを観察し、血中の Sema3A の量が骨減少疾病診断のバイオマーカーとして利用できる可能性を示した。

本研究により、Sema3Aをはじめとして、Sema3A-Nrp1 経路を活性化する治療法が、骨粗しょう症などの骨関連疾患に対して強い治療効果を発揮すると期待される。実際に、マウスだけでなくヒトの細胞でも Sema3A が同様の作用を発揮することが確認されている。

(3) IL-7: 骨芽細胞が産生する骨髄造血制御因子[3]

骨髄造血制御に関わる骨構成細胞由来オステオカインの探索をするために骨構成細胞を 特異的に欠損する遺伝子改変マウスを作製した。骨芽細胞が一時的に除去されたマウスで は、多能性前駆細胞数の増加が観察され、同時にリンパ球前駆細胞が減少し、ミエロイド系 前駆細胞の増加が観察された。また、骨髄構成細胞群を分離し、骨芽細胞特異的に高く発現 する分泌因子を探索したところ、リンパ球共通前駆細胞の分化に関わるサイトカインとし て知られている IL-7 が骨芽細胞において高く発現していることを見出した。

敗血症は、細菌感染が引き金となり、血液中に病原体が入り込むことで全身に急性炎症反応が生じる疾患である。発症早期には、全身に広がった感染によって炎症反応が過剰になるが、炎症が治まった後には免疫力が低下する。その原因の一つに、T細胞やB細胞などを含むリンパ球の減少が考えられている。そこで本研究では、盲腸結紮穿刺により敗血症を誘導したモデルマウスを用いて、骨芽細胞が産生するIL-7の役割を解析した。

敗血症を起こしたマウスの免疫細胞を観察すると、リンパ球数が減少し、それとともに、 骨量が短期間で劇的に低下することが見出された(図 1-7A)。また、末梢血中のリンパ球数減少も観察された。骨髄を詳細に観察したところ、発症時の骨量減少は骨芽細胞数の激減によること(図 1-7B)、また骨髄ではリンパ球のもととなるリンパ球共通前駆細胞数が減少していることが明らかとなった(図 1-7C)。

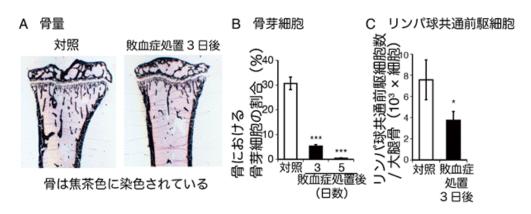


図 1-7 敗血症は骨芽細胞およびリンパ球共通前駆細胞を減少させる²⁹ 盲腸結紮穿刺により敗血症を誘導したマウスでは、(A)骨量、(B)骨芽細胞、(C)骨髄内のリンパ球共通前駆細胞数も減少した。*p<0.05; ***p<0.005。

²⁹ JST プレスリリース https://www.jst.go.jp/pr/announce/20160615/index.html 図 1。

次に発症時の骨髄中のサイトカインを測定したところ、IL-7 が低下していることがわかった(図 1-8A)。そこで、骨芽細胞から産生される IL-7 の役割を明らかにするため、骨芽細胞だけが IL-7 を産生できないようにした遺伝子改変マウスを作製して解析したところ、この遺伝子改変マウスでは敗血症モデルマウスで観察されたようなリンパ球数の減少が起きていた(図 1-8B)。

以上の結果から、定常状態では骨芽細胞が IL-7 を産生してリンパ球共通前駆細胞の分化 を維持しているが、敗血症のような全身性炎症を発症する状況では、炎症性サイトカインに より骨芽細胞が減少し、その結果リンパ球数も減少してしまうことが明らかとなった(図 1-8C)。

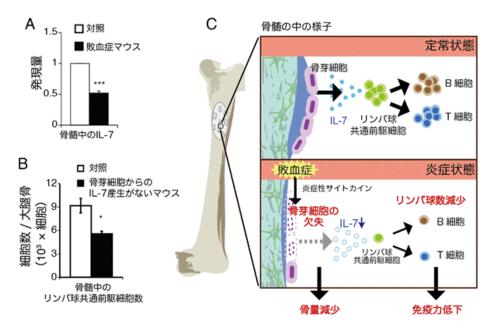


図 1-8 炎症下における骨構成細胞による免疫細胞分化制御の解明30

- (A) 敗血症では骨髄中でリンパ球維持に重要な IL-7 が低下している。
- (B) 骨芽細胞から IL-7 を産生しないマウスでは、リンパ球共通前駆細胞数が減少していた。* p<0.05; *** p<0.005。

したがって、骨芽細胞を増やせばリンパ球の数も回復すると考えられる。副甲状腺ホルモン(PTH)は骨芽細胞による骨形成を促進することが知られているが、実際に、PTH をマウスに投与すると、IL-7 を発現する骨芽細胞が増加し、リンパ球数が回復した(図 1-9A)。リンパ球数の減少は免疫力の低下となることから、骨芽細胞を除去したマウスでは敗血症の予後が悪化すると考えられるが、骨芽細胞除去マウスでは生存率が低下することを確認した(図 1-9B)。

³⁰ JST プレスリリース https://www.jst.go.jp/pr/announce/20160615/index.html 図2。

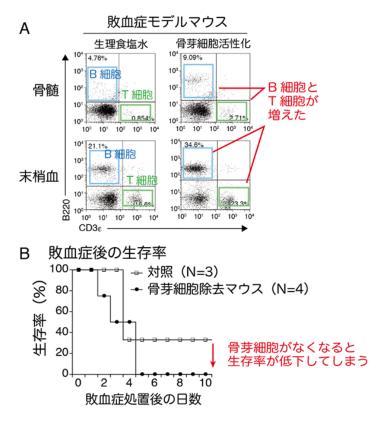


図 1-9 骨芽細胞は全身性炎症の新たな治療標的31

- (A) 青い四角で囲まれた部分は B 細胞を、緑の四角で囲まれた部分は T 細胞を示す。 敗血症モデルマウスに骨芽細胞を活性化する薬剤を投与するとリンパ球数が増えた。
- (B) 敗血症発症時に骨芽細胞を除去したマウスでは生存率の低下が見られた。

本研究により、マウスの敗血症発症後の免疫抑制の原因の一つは、全身性炎症による骨芽細胞の減少が引き起こすリンパ球共通前駆細胞数減少であることが明らかとなり、従来の発症早期の治療法と併せて、骨芽細胞を標的として発症後期の免疫力低下のコントロールを目指す新しい治療法開発の可能性が提示された。

1.5.2 骨免疫学の深化・発展(骨-免疫の相互作用の解明)

骨免疫学では、破骨細胞の分化を中心に研究が展開され、破骨細胞を強力に誘導して関節 リウマチの発症の鍵となる T 細胞 (exFoxp3Th17 細胞)の発見や、抗原・抗体複合体による破 骨細胞の誘導機構、滑膜線維芽細胞が産生する RANKL による破骨細胞の誘導が明らかにさ れた。さらに、破骨細胞の誘導に関与する受容体、リン酸化酵素、転写因子、破骨細胞の骨 吸収機構など破骨細胞分化制御と骨吸収メカニズムの解明が行われた。また、IL-17 産生 T 細胞が骨再生イニシエーターとして機能することを見出した。

³¹ JST プレスリリース https://www.jst.go.jp/pr/announce/20160615/index.html 図 3。

(1) 関節リウマチの発症の鍵となる T 細胞 (exFoxp3Th17 細胞) の同定[4]

関節リウマチは、自己の免疫系が自分自身の細胞を攻撃することによって起きる自己免疫疾患の中でも発症頻度が高く、関節の炎症と骨の破壊を主な症状とし、骨と免疫系の密接な関係が最も浮き彫りになる疾患である。このような自己免疫疾患は、免疫の司令塔であるT細胞のうち、自己に対する免疫応答を抑制するT細胞と促進するT細胞のバランスが破綻すると発症すると考えられている。しかし、関節リウマチの発症原因は不明な点が多く、また自己免疫疾患を促進するT細胞の発生メカニズムもこれまでよくわかっていないため、根本的な治療法の確立が難しい状況にあった。

本研究では、自己免疫疾患を促進する Th17 細胞³²は制御性 T 細胞が免疫抑制機能を担う 因子 Foxp3³³の発現を消失することで生じるという仮説を立て、関節リウマチのモデルであるコラーゲン誘導性関節炎を発症させたマウスを使ってこの検証に取り組んだ。

まず、Foxp3 を発現する T 細胞のうち、細胞表面分子 CD25³⁴の発現の低い細胞をマウスへ移入すると、関節炎の炎症環境下で Foxp3 の発現を消失し Th17 細胞 (exFoxp3Th17 細胞) に分化転換することを見出した。次に、Foxp3 発現 T 細胞の運命を追跡できるようなマウスを作製し、このマウスに関節炎を発症させたところ、Foxp3 発現 T 細胞から分化転換した exFoxp3Th17 細胞が炎症関節に多く集積することがわかった。さらに、DNA メチル化解析や発現マーカーの解析により、関節炎環境下で Foxp3 の発現を失った T 細胞は、もともと制御性 T 細胞としての性質を持っていたことが示された。これらの実験結果は関節リウマチのような炎症環境下では、免疫を抑制する T 細胞が Foxp3 の発現を消失し、免疫を促進する T 細胞へ転換することを意味する。また、Foxp3 発現 T 細胞から exFoxp3Th17 細胞への分化転換は、腫れた関節の炎症滑膜で増殖する滑膜線維芽細胞がサイトカイン IL-6 を産生することで引き起こされることがわかった。

これまで Th17 細胞の起源はナイーブ T 細胞であると考えられており、ナイーブ T 細胞から分化した Th17 細胞は関節リウマチの骨破壊を担う破骨細胞の分化を誘導することがわかっていた。今回新しく同定した、Foxp3 発現 T 細胞を起源とする Th17 細胞(exFoxp3Th17 細胞)は、これまで知られていた Th17 細胞よりも強力に破骨細胞を誘導することがわかった (図 1-10)。

³² Th17 細胞:局所炎症を促進するサイトカインであるインターロイキン(IL)-17 を産生するヘルパー T(Th)細胞。自己免疫疾患を引き起こす細胞と考えられている。

³³ Foxp3:制御性T細胞の分化や免疫抑制機能の発揮に必須のタンパク質。Foxp3を発現できないヒトやマウスでは致死性の自己免疫疾患を発症する。

³⁴ CD25: 細胞表面に発現するタンパク質。制御性 T 細胞を増やしたり、維持したりするのに必要なサイトカイン IL-2 の受容体を構成する要素の一つである。

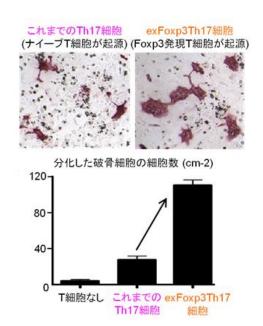


図 1-10 新しい病原性 Th17 細胞による破骨細胞の分化誘導³⁵ (上:赤く染色された破骨細胞の像、下:破骨細胞の数)

また、網羅的トランスクリプトーム解析³⁶の結果、exFoxp3Th17 細胞はこれまで知られていた Th17 細胞とは異なる遺伝子の発現パターンを示し、関節炎の発症に関わる遺伝子群を高く発現していることから、新規な関節炎誘導性の Th17 細胞であることが示唆された。さらに、自己抗原であるコラーゲンに反応する細胞を含む Foxp3 発現 T 細胞のうち、CD25 の発現が低い細胞をマウスに移入したうえで関節炎を誘導すると、Foxp3 の発現の消失に伴い関節の炎症と骨破壊が増悪化することが見出され、exFoxp3Th17 細胞の生体レベルでの関節炎誘導能が示された(図 1-11)。症状が進行した関節リウマチ患者の関節では Foxp3 と IL-17 の両方を発現する T 細胞が多く存在することから、関節リウマチ患者においても制御性 T 細胞が exFoxp3Th17 細胞へ転換する可能性が示された。

³⁵ JST プレスリリース https://www.jst.go.jp/pr/announce/20131223/index.html 図 1。

³⁶ トランスクリプトーム解析:細胞内の遺伝子転写産物の発現を体系的かつ網羅的に調べる解析方法。

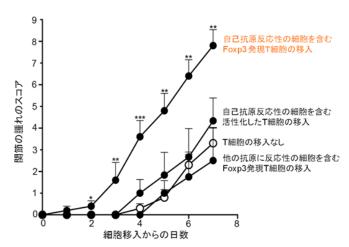


図 1-11 自己抗原反応性の Foxp3 発現 T 細胞の移入によるマウスの関節炎の増悪化³⁷ 自己抗原であるコラーゲンに反応性を示す細胞を含む Foxp3 発現 T 細胞のうち、CD25 の発現の低い細胞をマウスに移入した上で関節炎を誘導すると、exFoxp3Th17 細胞の発生に伴い関節炎の増悪が認められた。

以上の研究により、関節の炎症と骨破壊を強力に誘導する '悪玉' Th17 細胞 (exFoxp3Th17 細胞) が新しく同定され、この細胞が免疫を抑制すると考えられてきた '善玉' Foxp3 発現 T 細胞から分化転換することやユニークな遺伝子発現パターンを持つことが明らかになった。自己抗原を認識する T 細胞受容体をもつことや関節炎を誘導する免疫分子を高く発現することが exFoxp3Th17 細胞の高い病原性の基盤となっていると考えられる。健康な状態では免疫を抑制する T 細胞と促進する T 細胞の働きの均等がとれているが、このバランスが破綻すると自己免疫疾患が発症すると考えられる (図 1–12)。

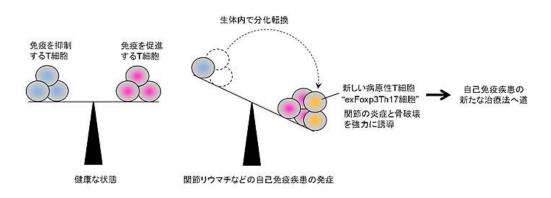


図 1-12 関節リウマチでの T 細胞バランスの変化(概念図)38

本研究により新たに発見された T 細胞は、関節リウマチだけでなく多発性硬化症や全身性エリテマトーデスなどのさまざまな自己免疫疾患の治療標的となる可能性を持っており、新しい治療薬や診断マーカーの確立に繋がることが期待される。

³⁸ JST プレスリリース https://www.jst.go.jp/pr/announce/20131223/index.html 図3。

19

 $^{^{37}}$ JST プレスリリース https://www.jst.go.jp/pr/announce/20131223/index.html $\,$ $\,$ $\,$ $\,$ $\,$ $\,$

(2) 抗原・抗体複合体による骨粗しょう症発症のしくみ[5]

破骨細胞は RANKL がその受容体 RANK に結合して分化する。関節リウマチでは炎症性サイトカインが関節滑膜細胞上の RANKL 発現を促進するため、破骨細胞の分化が促され骨が壊れる。しかし、関節リウマチにおいて関節炎症部位の骨の破壊だけでなく体の全体で骨粗しょう症が起こることや、他の自己免疫疾患でも骨粗しょう症が発症することについては、そのメカニズムが不明であった。本研究では、自己免疫疾患や炎症性疾患において増加した抗原と抗体複合体(免疫複合体³⁹)が直接破骨細胞の分化を促進することが、骨粗しょう症の一因であることを明らかにした(図 1-13)。

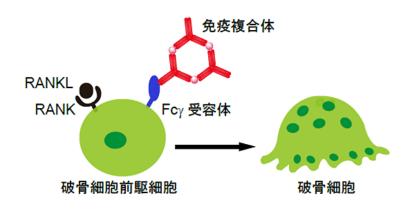


図 1-13 免疫複合体による破骨細胞の分化40

 $Fc \gamma$ 受容体 41 は、細胞を活性化させる活性化型と、その活性化を抑える抑制型の 2 つに大別される。マウスには 3 つの活性化型 $Fc \gamma$ 受容体と、1 つの抑制型 $Fc \gamma$ 受容体が存在し、これらのうち、破骨細胞では活性型の $Fc \gamma$ RIII 受容体と抑制型の $Fc \gamma$ RIIB 受容体が多く発現することを見出した。

抑制型 $Fc\gamma$ RIIB 遺伝子を欠損するマウスは糸球体腎炎や浮腫といった自己免疫疾患を自然に発症することが知られていたが、このマウスの骨組織では破骨細胞数が増加し、骨粗しょう症も発症していることを発見した。また、炎症や炎症性サイトカインは検出されないものの、抗体の量だけが増加している状態のマウスでも、骨粗しょう症が発症していた。このようなマウスの血中には、IgG 免疫複合体が多く含まれていることが判明し、血清から精製した IgG 免疫複合体が破骨細胞の分化を促していることがわかった。

3

³⁹ 免疫複合体:抗原と抗体の複合体。通常、補体の働きによりマクロファージなどの貪食細胞によって速やかに処理される。免疫複合体の過剰な形成、補体の機能異常、貪食細胞の機能低下などの病的状態では、排除されなかった免疫複合体は腎糸球体や血管壁に沈着して組織障害を引き起こす。全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、糸球体腎炎、強皮症、急性ウイルス肝炎、シェーグレン症候群、IgA腎症、悪性腫瘍(固形癌、リンパ系腫瘍)、細菌性心内膜症、クローン病、天疱瘡、潰瘍性大腸炎、伝染性単核症、多発性動脈炎、混合性結合組織病で上昇する。

⁴⁰ JST プレスリリース https://www.jst.go.jp/pr/announce/20150331-2/index.html 図 1。

 $^{^{41}}$ Fc 受容体は抗体の定常部分(Fc)を認識し、細胞表面に存在する。結合する抗体の種類によって、異なる受容体が存在する(たとえば、本研究で用いた IgG 抗体は Fc γ 受容体と結合する)。マウスやヒトの研究から、活性化型の Fc γ RI 受容体や Fc γ RII 受容体が RA の発症に重要であることや、抑制型の Fc γ RIIB 受容体の発現低下が発症頻度を高めることなどがわかっていた。

人工的に作製した IgG1 免疫複合体を野生型または $Fc\gamma RIIB$ 遺伝子を破壊したマウスの頭蓋冠下に投与すると、 $Fc\gamma RIIB$ 遺伝子を破壊したマウスでのみ破骨細胞が増加(図 1-14 下段中央、赤色) し、骨破壊の誘導が見られた。野生型マウスで骨破壊の誘導が見られないのは、IgG1 免疫複合体が活性型の $Fc\gamma RIII$ 受容体より抑制型の $Fc\gamma RIIB$ 受容体に強く結合するためであると考えられた。また、IgG2a 免疫複合体は、抑制型の $Fc\gamma RIIB$ 受容体よりも活性型受容体への結合が強いため、 $Fc\gamma RIIB$ 遺伝子を破壊したマウスだけでなく、野生型マウスにおいても破骨細胞による骨破壊の誘導が見られた(図 1-14 右)。この際、骨破壊部位に炎症性細胞の浸潤は見られず、免疫細胞が関与することなく、免疫複合体が直接的に破骨細胞の分化を促進することがわかった。

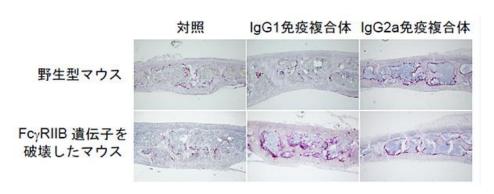


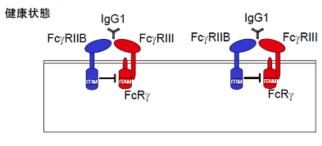
図 1-14 IgG 免疫複合体による破骨細胞を介した骨の破壊⁴²

また、IgG 免疫複合体を尾静脈から全身に回るように投与した場合も、マウスの四肢に多く見られる長管骨の骨量の低下が見られた。これらの処置を施したマウスにおいても、骨破壊部位への炎症性細胞の浸潤や血中の炎症性サイトカイン (TNF- α や IL-I β など)の濃度上昇は見られず、IgG 免疫複合体は炎症や免疫応答を介さずに直接的に破骨細胞の分化を促進して骨量を低下させることがわかった。

健康状態の破骨細胞前駆細胞では、主に活性化型 $Fc \gamma RIII$ 受容体と抑制型 $Fc \gamma RIIB$ 受容体が発現し、IgG1 抗体による活性化シグナルは $Fc \gamma RIIB$ 受容体によって抑制されるため、IgG1 抗体による破骨細胞の分化は起こらない。病的状態では、IgG1 抗体に加えて IgG2 抗体が増加し、これらが免疫複合体を形成するため、破骨細胞の分化を促進する。また、このような状況下での破骨細胞前駆細胞では抑制型 $Fc \gamma RIIB$ 受容体の発現が減少し、一方、活性化型 $Fc \gamma RIII$ 受容体と $Fc \gamma RIV$ 受容体の発現が増加するため、免疫複合体による分化の促進効果を受けやすい細胞になり、より分化が促進される(図 1-15)。

以上の結果から、IgG 免疫複合体は免疫細胞が関与することなく、破骨細胞の分化を直接的に促進することがわかった。また、自己免疫疾患などの病的状態では、(1) IgG 免疫複合体が増加すること、および(2) 活性化型と抑制型の $Fc\gamma$ 受容体の発現バランスが変化して破骨細胞前駆細胞が IgG 抗体による分化促進効果を受けやすい細胞になっていること、の2つが骨粗しょう症の一因となることが明らかになった。

⁴² JST プレスリリース https://www.jst.go.jp/pr/announce/20150331-2/index.html 図 2。



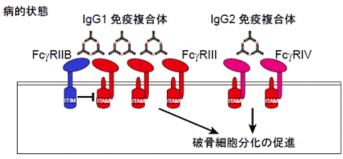


図 1-15 免疫複合体が破骨細胞の分化を促進するメカニズム⁴³ 健康状態(上)の破骨細胞前駆細胞と病的状態(下)の破骨細胞前駆細胞

ヒトの末梢血から単離した細胞もヒト IgG 免疫複合体によって破骨細胞前駆分化が促進されることを確認した。関節リウマチや全身性エリテマトーデス患者の単球(破骨細胞前駆細胞を含む)でも、抑制型受容体発現の低下や活性化型受容体発現の促進が観察されており、自己免疫疾患における骨粗しょう症の一因として考えることができる。

本研究は、抗体の骨における新しい役割を見出し、免疫複合体がさまざまな自己免疫疾患や炎症性疾患に伴う骨の破壊と骨粗しょう症を早期発見する有効なバイオマーカーになる可能性を示した。

(3) 滑膜線維芽細胞が産生する RANKL による骨破壊[6]

破骨細胞の分化を誘導する RANKL は骨組織において間葉系細胞だけでなく、多くの他の 細胞にも発現しており、以前から T 細胞が発現する RANKL が関節リウマチの骨破壊に関与 すると考えられてきた。また、T 細胞特異的な RANKL トランスジェニックマウスは、RANKL 欠損マウスとの交配により部分的な骨髄腔を出現させられることが報告されているが、T 細胞特異的な RANKL 欠損マウスでは、生理的条件下で骨組織への影響は見出されなかった(後出)[15]。

また、造血幹細胞の移植治療を受けた RANKL 依存性大理石骨病患者では、大理石骨病は改善されないが、T 細胞の RANKL は正常に誘導されることも知られていた。これらの知見を総合すると、生理的条件下の破骨細胞分化には T 細胞上の RANKL 発現では不十分で、間葉系細胞の発現する RANKL が生体レベルでの破骨細胞分化に重要であると考えられる。しかし一方で、試験管レベルでは固定した T 細胞が破骨細胞の分化を誘導することが知られてお

⁴³ JST プレスリリース https://www.jst.go.jp/pr/announce/20150331-2/index.html 図3。

り、また新規に同定した exFoxp3Th17 細胞は RANKL 発現量が高いことを見出していた^[4]。従って、関節リウマチなど骨破壊を呈する病態において生体レベルで T 細胞の RANKL と間葉系細胞の RANKL がいかなるバランスでその病態に寄与しているのかは、末解明のままであった。本研究で滑膜線維芽細胞、T 細胞などの各細胞種特異的に RANKL を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスを作製し、関節炎モデルの解析を通じて、その課題を明らかにすることを目指した。

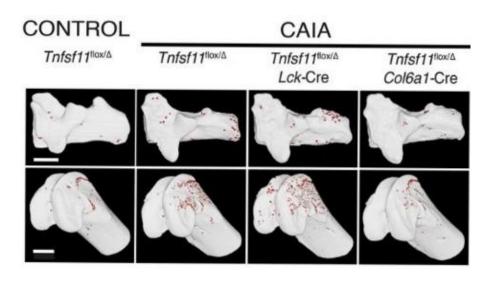


図 1-16 滑膜線維芽細胞特異的 RANKL 欠損マウスでは関節破壊が抑制される (赤は関節炎による骨破壊像を示す)⁴⁴

関節リウマチにおける RANKL 産生細胞を生体レベルで検討するため、まず抗コラーゲン抗体誘導性関節炎 (Anti-Collagen Antibody Induced Arthritis: CAIA) モデルを用いて検証を行った。RANKL floxed マウスを VI 型コラーゲン (ColVI) - Cre マウスと交配させ、滑膜線維芽細胞特異的 RANKL 欠損マウス ($Tnfsf1I^{Flox/\Delta}$ ColVI-Cre) を作製し、CAIA を誘導させたところ、対照群と同程度の発症率および病態重症度が認められたものの、骨-滑膜境界面における破骨細胞分化が誘導されず、関節部骨吸収面も抑制されることがわかった (図 1-16)。一方、T 細胞特異的 RANKL 欠損マウス ($Tnfsf1I^{Flox/\Delta}$ Lck-Cre) では、CAIA を発症させると対照群と同程度の発症率および病態重症度が認められる一方で破骨細胞分化および骨破壊も対照群とほぼ同程度に観察された。さらに関節リウマチの病態を模倣する自己免疫性関節炎であるコラーゲン誘導性関節炎を誘導しても CAIA と同様の傾向が認められた。

以上から、関節リウマチでは、T細胞ではなく滑膜線維芽細胞上に発現する RANKL が炎症性骨破壊に主導的な役割を果たすことが示唆された。滑膜線維芽細胞はヘテロな集団であることが知られている。RANKL を発現する骨破壊性の滑膜線維芽細胞サブセットの同定や滑膜線維芽細胞における RANKL 発現機構の解明は、関節リウマチの骨破壊の病態解明や新しい治療法の開発に繋がる今後の重要な課題であると考えられる。

⁴⁴ 東京大学大学院医学系研究科免疫学講座提供。

(4) 破骨細胞分化制御と骨吸収メカニズム[7], [8], [9], [10], [11], [12], [13]

破骨細胞の分化に関して、分化誘導に関わる受容体、分化のシグナルを伝達するタンパク 質リン酸化酵素、転写因子、細胞死の制御因子、骨吸収メカニズム等の幅広い研究が行われ た。以下には複数の研究(論文)の内容を要約する。

破骨細胞の分化に関与する受容体に関しては、破骨細胞の分化には RANKL 受容体を介するシグナルとともに他の受容体を介するシグナルが必要なことから NK レセプターファミリーの Ly49 に着目した。破骨細胞の分化過程で Ly49 ファミリーの発現を調べ、Ly49Q のみが RANKL 刺激依存的に発現が誘導されることを見出し、Ly49Q のノックダウンの解析により、Ly49Q が破骨細胞の分化を正に制御していることを明らかにした[7]。

RANKL の経路でシグナルを伝達するタンパク質リン酸化酵素に関しては、Tec チロシンキナーゼの Btk と Tec が破骨細胞の分化に必須であることを以前の研究で明らかにしていた。本プロジェクトでは米国の製薬会社が開発した新規 Btk 阻害剤 ibrutinib の破骨細胞分化に対する影響を調べ、ibrutinib が破骨細胞分化のマスター転写因子NFATc1 の発現を抑制し、破骨細胞分化を抑制するとともに、分化した破骨細胞の骨吸収活性を阻害することを明らかにした^[8]。

また、RANKL 経路が活性化することにより活性化されるタンパク質リン酸化酵素 TAK1 は転写因子 AP-1 と NF- κ B を活性化するため、破骨細胞の分化の重要な制御因子である と考えられていた 45 。この TAK1 の遺伝子欠損マウスを作製して解析することにより、このマウスは顕著な破骨細胞数の減少とともに、大理石骨病の病態を示すことがわかり in vivo で TAK1 の破骨細胞分化における機能の重要性が明らかになった $^{[9]}$ 。

破骨細胞分化のマスター転写因子 NFATc1 の発現を IRF8 や MafB が抑制することが知られていた。破骨細胞の分化過程ではこういった破骨細胞分化阻害因子の発現を抑制する必要があるが、分子機構は明らかになっていなかった。破骨細胞分化誘導系を用いて、破骨細胞の分化に伴い誘導される転写因子 Blimp1 を見出した。この Blimp1 を破骨細胞特異的に欠失したマウスを作出して解析した結果、Blimp1 の欠失に伴い、骨量の増加(図 1-17a)と破骨細胞数の低下が観察された。Blimp1 の破骨細胞分化における役割を検討した結果、Blimp1 は、IRF8 や MafB などの破骨細胞分化抑制因子の発現を直接阻害することで、分化を正に制御していることが明らかになった[10](図 1-17b)。

⁴⁵ Qi B et al, Sci Rep, 4, 7158, 2014.

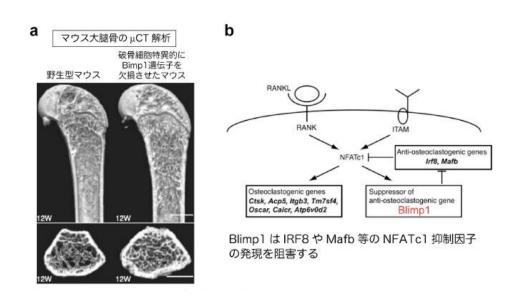


図 1-17 Blimpl による破骨細胞分化制御46

さらに、破骨細胞の分化に関与する転写因子の研究では、骨髄においてリンパ球前駆細胞が B 細胞と T 細胞に分化する段階での運命決定に必須の役割を果たす Leukemia/lymphoma-related factor (LRF)が、破骨細胞の分化初期には、NFATc1 の発現を抑制し、破骨細胞分化後期には NFATc1 と協調して NFATc1 の標的遺伝子の発現を促進するという二層性の制御を行うことを明らかにした[11]。

破骨細胞の寿命はヒトで約2週間弱と短く、RANKLなどのサイトカインが不足するとアポトーシスにより死滅する。閉経後骨粗しょう症や関節リウマチなどの骨量減少疾患において、破骨細胞のアポトーシスの減少が認められることから、破骨細胞のアポトーシス誘導に関わる因子を検索し、Bc1-2ファミリーのNoxaを見出し、Noxa欠損マウスの解析により、Noxaが破骨細胞のアポトーシスに関与することを明らかにした[12]。

破骨細胞の骨吸収過程では、フォスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K)の一つである I型 PI3K が重要であることが知られていた。この I型 PI3K のうち、破骨細胞で発現している PI3K は IA型であることをつき止め、破骨細胞特異的 IA型 PI3K 欠損マウスを作製して解析することにより、このマウスの破骨細胞では、細胞が骨表面に向けて形成している波状縁と呼ばれる、骨吸収に必須の細胞膜構造体が存在しない、または存在しても形状に異常があることがわかった。波状縁は細胞内小胞が骨表面付近に輸送され、細胞膜と融合して形成されることから、IA型 PI3K は破骨細胞内で小胞輸送の制御に必須の役割を果たしていることが示唆された[13]。

⁴⁶ 終了報告書 p74 図 2-9。

(5) IL-17 産生 T 細胞の骨再生イニシエーターとしての機能[14]

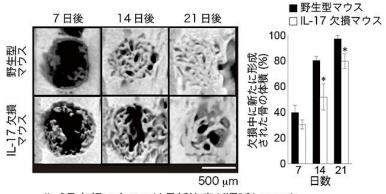
骨折治療では、折れた骨を元の位置に戻して固定し、安静に保つことで治癒を図る。固定期間は数ヶ月に及ぶこともあり、場合によっては日常生活や仕事に大きく支障を来すことがある。また、高齢患者の場合、長期間ベッド上で安静にすることが原因で筋力が低下し、寝たきりとなることも多い。患者の早期の社会復帰や寝たきり防止のためには、治癒期間の短縮が骨折治療における重要な課題となる。

骨折部位には免疫細胞やサイトカインが見いだされることから、これらを制御することによって治癒を促進できる可能性がある。しかし、骨折後どういった免疫細胞がどのような分子を産生し、どのように治癒を制御しているのか、不明な点が多く残されていた。骨折部位に集積する免疫細胞には T 細胞が含まれるが、どういった T 細胞がどのように治癒を制御するかも不明であった。

そこで本研究では、骨再生モデルとしてマウス骨損傷モデルを用いて、骨再生の観点から骨折治癒における免疫系の役割を検討した。この損傷モデルは、マウス大腿骨骨幹部の皮質骨にドリルで穿孔して損傷をほどこすもので、骨孔は約3週間で閉鎖する。

骨損傷に伴う T 細胞に関連するサイトカインの発現変動を検討したところ、 $IL-17^{47}$ の産生が損傷部局所で増加することが明らかになった。IL-17 遺伝子を欠損するマウスでは、野生型マウスと比べて骨折治癒が遅延した(図 1-18)。

骨欠損部の治癒過程のマイクロ CT による解析



⇒IL-17 欠損マウスでは骨折治癒が遅延していた。

図 1-18 IL-17 を欠損するマウスでは骨折治癒が遅延する 48 野生型マウスおよび IL-17 欠損マウスの大腿骨に手術により円形の骨欠損を形成し、治癒過程をマイクロ CT により評価した。手術後 14 日以降では、野生型マウスと比較して IL-17 欠損マウスに治癒の遅延が認められた。

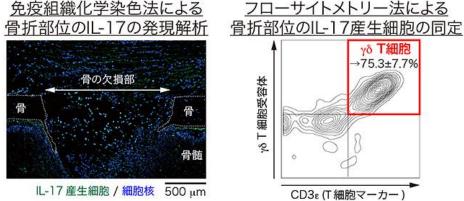
培養細胞系での実験により、IL-17 は骨折部位に含まれる間葉系幹細胞の増殖と骨芽細胞分化を促進することがわかった。IL-17 の産生源となる細胞の同定を行ったところ、骨折に

26

⁴⁷ IL-17:主に活性化した T 細胞が産生するサイトカイン。生体を構成する種々の細胞に作用し、炎症反応を誘導することにより、感染防御や自己免疫疾患における組織の破壊に関与することが知られている。

⁴⁸ JST プレスリリース https://www.jst.go.jp/pr/announce/20160311-2/index.html 図 1。

伴い骨欠損部位で IL-17 を産生する細胞が認められ、骨折部位の IL-17 産生細胞は主とし T_{γ} δ T であった (図 1-19)。 この γ δ T 細胞を欠損するマウスの骨折治癒は野生型マウスに 比べ遅延した。



⇒骨折部位に IL-17 産生細胞が 認められた。

⇒骨折部位の IL-17 産生細胞は 大半がγδ T細胞であった。

γδ T細胞 75.3±7.7%

図 1-19 骨折部位では γ δ T 細胞が IL-17 を発現する⁴⁹

- (左)骨の欠損部やその周囲に IL-17 産生細胞が認められた。
- (右) IL-17 産生細胞について T 細胞マーカー(CD3 ϵ) と γ δ T 細胞マーカー(γ δ T 細胞受 容体) の発現を解析した。IL-17 産生細胞の大半は両方のマーカーを発現する(図中の 赤い四角内)、 γ δ T 細胞だった。

以上より、骨折するとγδT細胞が損傷部に速やかに集積及び増殖して IL-17 を産生し、 IL-17 は損傷組織中の間葉系幹細胞に作用して増殖と骨芽細胞分化を誘導し、骨芽細胞によ り骨折部位に新たに骨組織が形成されて治癒に至ることが明らかになった(図 1-20)。

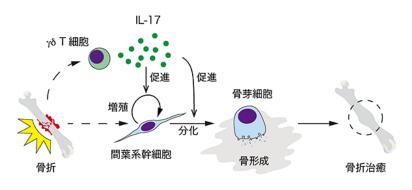


図 1-20 γ δ T 細胞が IL-17 を産生することにより骨折治癒を促進する 50

本研究により、IL-17を産生するγδT細胞が骨折治癒を促進するという、免疫系による 骨折治癒制御の新たなメカニズムが明らかになった。また、骨再生過程においては IL-17 が

27

⁴⁹ JST プレスリリース https://www.jst.go.jp/pr/announce/20160311-2/index.html 図2。

⁵⁰ JST プレスリリース https://www.jst.go.jp/pr/announce/20160311-2/index.html 図3。

関節リウマチにおける破骨細胞誘導とは全く異なる性質を示すことがわかった。今後、IL-17 や γ δ T 細胞を治療標的とした骨折治療法の開発が期待される。

1.5.3 骨形成制御、免疫制御に関する研究の進展

骨形成制御に関しては、骨細胞を高純度に分離する方法を開発するとともに、骨細胞が骨を作り変える司令細胞であることを発見した。また、転写因子の Maf が骨形成と脂質代謝のバランスを制御することを明らかにした。免疫制御に関しては自己免疫疾患に関わる研究を展開し、自己免疫疾患を引き起こす T細胞への分化を決定する転写制御因子 $I \kappa B \zeta$ や自己免疫疾患を防ぐ転写因子 Fezf2 を発見した。また、病原性 T細胞による多発性硬化症発症の仕組みを解明した。

(1) 骨を作りかえる指令細胞(骨細胞)の発見[15]

骨は破壊と形成によって常に新しく生まれ変わり、体を支えるだけでなく、カルシウムなどのミネラルの保管・補給をしている。骨が新しく作りかえられる場合、古い骨が破骨細胞によって破壊されなければならない。本研究では、破骨細胞の分化を誘導することで骨を作りかえる指令を出す細胞が、骨に埋め込まれた骨細胞であることを発見した。

骨細胞は、骨を構成する細胞の約 90%を占め、骨に埋め込まれた状態で存在する細胞で、神経細胞様の突起により網目状のネットワークを形成することで、骨内の骨細胞同士だけではなく、骨表面にいる破骨細胞や骨芽細胞とも密接に連結している(図 1-21A)。この特殊な環境状態からメカニカルストレスの感受や細胞間シグナルへの応答に関わり、骨リモデリングを制御する「指令細胞」の可能性が想定されていた。しかし、骨という特殊な硬組織に埋め込まれ、その機能はいまだ十分に理解されていなかった。本研究では、骨細胞だけを特異的に蛍光発色させる遺伝子(EGFP)を導入した遺伝子改変マウスを作出し、酵素処理とフローサイトメトリーによる細胞分離法を用いて、世界に先駆け、高純度の骨細胞を単離培養することに成功した(図 1-21)。

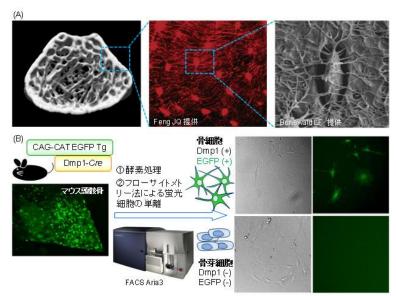


図1-21 骨に埋め込まれた骨細胞を単離培養することに成功51

- (A) 骨細胞の形成する網目状のネットワーク。
- (B) 骨細胞だけを特異的に蛍光発色(EGFP: 緑色) させる遺伝子改変マウスを作製し、このマウスの骨から酵素処理とフローサイトメトリーによるセルソーティングを用いて、高純度の骨細胞を単離して培養した。

単離された骨細胞は、これまで組織学的検討から骨細胞が発現することが明らかにされている Sost や Dmp1 遺伝子を発現しており、骨芽細胞に特異的に発現する遺伝子 Keratocanなどの発現は検出できなかった。破骨細胞の分化を誘導するためには、破骨細胞分化因子のRANKL が必須だが、骨組織内でどのような細胞が RANKL を発現して破骨細胞の分化を誘導して骨を新しく作りかえる指令を出しているかは、これまで不明だった。骨や骨髄に含まれる細胞集団の中で、骨細胞が最も高く RANKL を発現し、破骨前駆細胞を共に培養すると破骨細胞を強力に誘導することを見出した(図 1-22A、B)。さらに、骨細胞だけで RANKL 遺伝子が破壊されるマウスを作製したところ、重篤な大理石骨病を発症することが見出された(図 1-22C)。この大理石骨病は、生後直ぐには発症しておらず、成長に伴いその病状が悪化する。この表現型は、成長に伴い外界から受けるメカニカルストレスを骨細胞が感受し、RANKL を発現することが原因であると考えられた。

⁵¹ JST プレスリリース https://www.jst.go.jp/pr/announce/20110912/index.html 図 1。

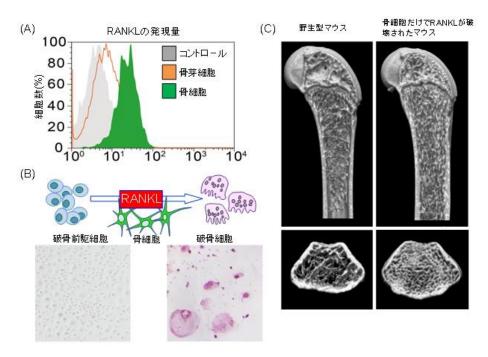


図 1-22 骨細胞の発現する RANKL が、生体において破骨細胞の分化を誘導する52

- (A) 骨細胞が RANKL を強力に発現している。
- (B) 骨細胞は破骨前駆細胞を破骨細胞へと分化させた(破骨細胞;酒石酸抵抗性ホスファターゼ陽性の多核な細胞:赤紫色に染色)。
- (C) 骨細胞だけで RANKL を破壊したマウスは、破骨細胞の分化を誘導することができず、 重篤な大理石骨病を発症した(右側)。

破骨細胞による骨の破壊と骨芽細胞による骨の新生が、絶妙なバランスにより保たれ、骨は常に新しく生まれ変わる。この骨リモデリングサイクルにおいて、RANKLを発現する骨細胞が破骨細胞を育て、骨を新しく作りかえる指令細胞であることが、明らかになった。骨細胞の発現する RANKL が、生体において破骨細胞を育てる概念図を図 1-23 に示した。

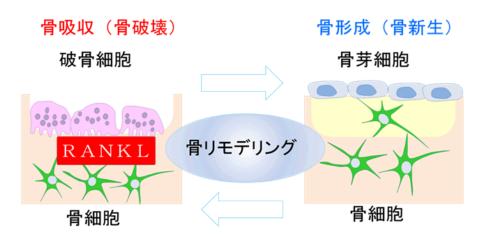


図 1-23 骨細胞が、破骨細胞を育て骨を新しく作りかえる指令細胞である53

⁵³ JST プレスリリース https://www.jst.go.jp/pr/announce/20110912/index.html 図3。

30

 $^{^{52}}$ JST プレスリリース https://www.jst.go.jp/pr/announce/20110912/index.html 図 2_{\circ}

骨細胞は、さまざまな骨疾患の標的細胞として注目されており、国際競争が激しい研究分野の一つであるが、本研究成果は被引用数820(2020年時点)と世界に注目された。なお、本研究は、オーストリア IMBA 研究所、スペイン国際癌センター、英国 Cambridge 大学、米国 Baylor 大学、米国 Missouri-Kansas City 大学、九州大学大学院工学研究院、東京大学先端科学技術センターなどの研究グループとの共同研究である。

(2) 骨形成脂肪代謝のバランスを制御する転写因子 Maf[16]

老人性骨粗しょう症の骨代謝異常のメカニズムは充分解明されていなかった。骨芽細胞と脂肪細胞は間葉系幹細胞に由来し、両細胞系列への分化は恒常的にバランスが保たれている。加齢に伴う骨粗しょう症には、骨髄腔内の脂肪細胞の増加を伴うことから、骨芽細胞および脂肪細胞の分化の振り分け機構の破綻がその基礎にあると考えられる。本研究では、加齢に伴いこの両細胞系列の振り分け機構の破綻を導く転写メカニズムを検討した。

マウス新生児頭蓋冠由来の骨芽細胞を用いて骨芽細胞分化過程におけるトランスクリプトーム解析を実施した。その結果、163 転写因子の中で、52 個の転写因子が、加齢に伴い半分以下に発現低下することが明らかとなった(図 1-24a)。52 個の転写因子の中で、高い発現量が観察された AP-1 スーパーファミリーに属する転写因子 Maf に注目した。生体での骨形成に対する Maf の役割を明らかにするために、Maf 欠損マウスを解析した結果、E17 日齢の胎児において骨形成の低下が観察された(図 1-24b)。この異常は、遺伝子欠損マウス由来の骨芽細胞の初代培養によって、骨芽細胞自律的な効果に起因することが明らかとなった。さらに、Maf は Runx2 と協調的に作用することで、オステオカルシン 54 の発現を正に制御することが明らかとなった。一方、老齢マウス(22 週齢)において、Maf 遺伝子のヘテロ欠損マウスは野生型マウスと比べて、骨髄中に顕著な脂肪髄の増加が認められた(図 1-24c)。Maf は脂肪細胞分化に対して抑制的な機能を有しており、Maf 以上の発現に重要である Maf は の転写活性を負に制御する制御因子であることが明らかとなった(図 Maf Ma

 $^{^{54}}$ オステオカルシン(osteocalcin): 骨の非コラーゲン性タンパク質として 25%を占めるタンパク質。タンパク質の γ -グルタミン残基に炭酸イオンが付加されている。鉱質形成やカルシウムイオンの恒常性維持に寄与していると考えられており、骨形成の負の制御因子であるともされている。ホルモンとしての作用もあり、膵臓の β 細胞に働いてインスリン分泌を促したり、脂肪細胞に働き、インスリン感受性を高めるタンパク質であるアディポネクチンの分泌を促進するとの報告がある。Karsenty G, 01son EN, Cell, 164, 1248, 2016.

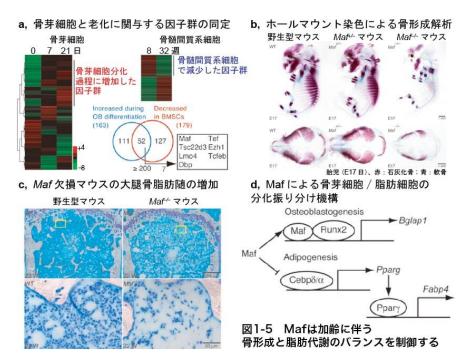


図 1-24 Maf は加齢に伴う骨形成と脂肪代謝のバランスを制御する55

本研究では、Maf ノックアウトマウスが骨量減少と脂肪髄の増加といった老人性骨粗しょう症様の症状を呈することを見出した。Maf は Runx2 や $Cebp\alpha/\delta$ の活性調節を介して、通常、骨芽・脂肪細胞分化のバランスを制御しているが、加齢に伴い Maf の発現が低下することで、分化振り分けの異常が生じると考えられる。Maf の発現は加齢に伴って減少することから、老化に伴う骨形成減少と脂肪髄増加の病態に深く関係する因子であることが示唆された。

(3) 自己免疫疾患を引き起こす T細胞の運命を決定する遺伝子 I κ B と [17]

近年 IL-17 を産生する新たなヘルパーT 細胞サブセット Th17 細胞が同定され、関節リウマチや多発性硬化症などの自己免疫病態の形成のほか、細胞外細菌や真菌に対する生体防御に重要であることが明らかとなった 56 。免疫バランス制御の新しいパラダイムが確立され、創薬展開に向けた Th17 細胞分化機序の解明は重要課題である。Th17 細胞分化にはマウスでは IL-6 と TGF β 刺激が必要であり、レチノイン酸受容体関連オーファン受容体(ROR)核内受容体(ROR γ t、ROR α) が分化必須因子として報告されているものの、Th17 細胞分化の分子機序には不明な点が多かった。

本研究では、T 細胞受容体下流で活性化される NF- κ B 経路に着目し、 $I\kappa$ B ファミリー分子の転写制御因子 $I\kappa$ B ζ が Th17 細胞で高発現していることを見出した。そこで Th17 細胞における $I\kappa$ B ζ の役割を検証するために、多発性硬化症のマウスモデルである実験的自己

⁵⁵ 終了報告書 p58 図 1-5。

 $^{^{56}}$ Korn et al, Annu Rev Immunol, 27, 485, 2009.

免疫性脳脊髄炎 (EAE: experimental autoimmune encephalomyelitis) 57 を、 $I_{\kappa}B$ ξ 欠損マウスを用いて実施した。すると、 $I_{\kappa}B$ ξ 欠損マウスで、EAE の発症率および重症度が共に顕著に抑えられることがわかった (図 1-25a)。同様の現象が $I_{\kappa}B$ ξ 欠損 ξ CD4+T 細胞を移入した Rag2 欠損マウスでも観察された。さらに ξ in ξ ritro分化誘導実験により ξ ritro分化が著しく障害されることが示され、 ξ ritro分化を制御していることが示唆された。また、 ξ ritro分化を制御していることが示唆された。また、 ξ ritro分化を制御していることが示唆された。また、 ξ ritro分化を制御となける ξ ritro分化を制御を解析したところ、 ξ ritro分と ξ

これまで未感作 CD4+T 細胞に ROR 核内受容体を単独で発現させても、IL-6/TGF- β 刺激がなければ IL-17 産生が強力に誘導されないことが他のグループにより報告されていた。そこで、ナイーブ T 細胞に I κ B ζ を過剰発現させ、Th17 細胞分化を検討したところ、ROR 核内受容体と同様に IL-6/TGF- β 刺激がなければ Th17 細胞分化は誘導されなかった。しかしながら、I κ B ζ を ROR 核内受容体と共発現させると、IL-6/TGF- β 刺激がなくても非常に高い Th17 細胞分化誘導 (40%以上) が認められた。また、レポーターアッセイおよび ChIP 解析により、I κ B ζ が IL17a 遺伝子プロモーター上流の転写制御領域に直接結合し、ROR 核内受容体と協調して IL-17 の発現を誘導することが明らかとなった(図 1-25b)。さらに、I κ B ζ は IL-17F や IL-23R 遺伝子の発現も誘導し、Th17 細胞分化に関わる転写プログラムを制御していることが明らかとなった。

⁵⁷ 実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE):ミエリンオリゴ糖タンパク質など、髄鞘の主要な構成タンパク質を 抗原としてマウスに投与することで、多発性硬化症に似た病状を誘導できる。投与した抗原に反応する T細胞が活性化され、やがて中枢神経組織内の髄鞘が攻撃を受け、炎症および組織損傷が起こる。多発 性硬化症の動物モデルとして広く用いられている。

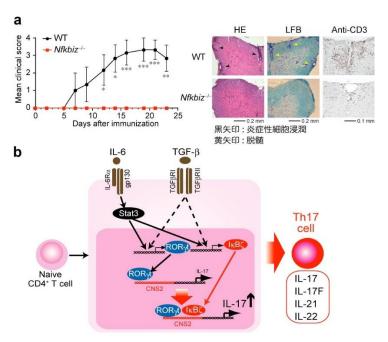


図 1-25 ΙκΒζ と ROR γ t は協調して Th17 細胞分化を誘導する⁵⁸

(4) 自己免疫疾患を防ぐ転写因子 Fezf2 の発見[18]

関節リウマチなどの自己免疫疾患の主な原因は、T細胞が自己の成分(自己抗原)を認識することによる過剰な免疫応答であると考えられている。T細胞は胸腺において分化・成熟する。その過程では、抗原を認識するタンパク質であるT細胞抗原受容体がランダムに作られるため、自己抗原に反応するT細胞が必然的に生まれてしまう。従って、自分の体を誤って攻撃してしまうことがないよう、自己反応性のT細胞は胸腺内で除去されている。この過程で胸腺髄質上皮細胞(medullary thymic epithelial cell; mTEC)が胸腺外の末梢抗原を特異的に発現することで、自己成分に応答するT細胞を除去する機能を担っている。mTECにおける末梢抗原発現調節因子としてAutoimmune regulator(Aire)が報告されていたが、Aire 非依存的に発現する遺伝子があることがわかり、Aire 非依存的に末梢抗原の発現を制御するシステムの存在が推測されたが、不明のままであった。

本研究では、mTECで転写因子のFezf2が選択的に高発現していることを見出し(図 1-26a)、遺伝子改変によりマウスの胸腺上皮細胞のみでFezf2を欠損させ、そのマウスの全身における表現型を解析したところ、加齢とともに、体の各臓器で炎症性細胞の浸潤や自己抗体の産生といった重篤な自己免疫疾患の症状が見られた(図 1-26b)。また、野生型マウスとFezf2欠損マウスのmTEC細胞を用いてFezf2によって制御される末梢遺伝子群を同定することにより、それらの遺伝子は、Aireによって制御される遺伝子群とは異なることが明らかになった。

mTEC の分化や成熟に、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリータンパク質が必要であること、その中で、RANK、CD40、LTβRの3つの受容体からのシグナルが免疫寛容の成立に必

⁵⁸ 終了報告書 p70 図 2-5。

須であり、RANK と CD40 の 2 つのシグナル経路が Aire 遺伝子の発現を制御していることが報告されていた。Fezf2 遺伝子の発現制御経路を明らかにするために、これら 3 つの受容体遺伝子の欠損マウスを作製して Fezf2 遺伝子の発現を調べたところ、LT β R が欠損した時にのみ、Fezf2 遺伝子の発現が低下したことから、Fezf2 遺伝子の発現には、LT β R シグナル伝達経路が関与することが明らかになった(図 1-26c)。

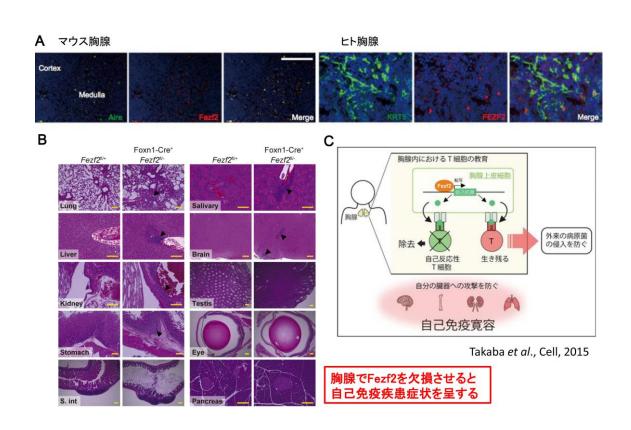


図 1-26 転写因子 Fezf2 による自己免疫寛容の制御59

- A. 転写因子 Fezf2 タンパク質はヒトやマウスの胸腺髄質上皮細胞に発現する。
- B. Fezf2 を胸腺上皮細胞で欠損させると自己免疫疾患症状を示す。
- C. まとめの図。Fezf2 は自己免疫寛容を制御する重要因子である。

本研究の結果は、Fezf2 がさまざまな自己免疫疾患の発症を抑えていることを示している。ここで解明された免疫寛容⁶⁰が成立するメカニズムは、高等生物の獲得免疫⁶¹システムの基本原理の理解につながることが期待される。また、現状では原因のわかっていない自己免疫疾患の発症機序の解明や新たな治療法の確立に役立つと考えられる。

⁵⁹ 東京大学大学院医学系研究科骨免疫学寄付講座提供。

⁶⁰ 免疫寛容:自己の成分に対して免疫応答が起こらない状態。

⁶¹ 獲得免疫:生まれたときには備わっておらず、後天的に獲得される免疫のこと。獲得免疫のシステムでは、自己と非自己を区別して、病原体などの非自己に対してのみ特異的な応答を引き起こす。一度抗原に遭遇すると記憶され、二度目の遭遇では素早く免疫応答が引き起こされる。

(5) 病原性 T 細胞による多発性硬化症発症の仕組み[19]

関節リウマチにおいて exFoxp3Th17 細胞が RANKL を高く発現していることを見出し、骨破壊への関与を明らかにしたが、他の自己免疫疾患と T 細胞上 RANKL の関係は不明であった。そこで、Th17 細胞の寄与の高い多発性硬化症に注目し検討を行った。

多発性硬化症は、脳や脊髄といった中枢神経系が免疫系によって攻撃を受ける自己免疫疾患であり、視力障害や運動麻痺などの神経症状が起きる難病で、いまだ根治療法が存在しない。健常状態では、中枢神経組織内に血液中の有害物質が侵入できないように、血液脳関門⁶²と呼ばれる特殊なバリア機構が存在するため、免疫細胞は簡単に侵入できない。しかし、多発性硬化症では、たくさんの炎症性細胞が中枢神経組織に侵入し集積してしまう。多発性硬化症で、炎症性細胞が血液脳関門を通り抜けて中枢神経組織に集まる理由は、これまでよくわかっていなかった。

本研究では、マウスの多発性硬化症モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の解析から、病原性 T 細胞 (Th17 細胞) が発現するサイトカイン RANKL が、中枢神経組織のアストロサイトを刺激してケモカインを放出させるため、多数の免疫細胞が呼び寄せられ、炎症が起こることを突き止めた (図 1-27)。

T 細胞特異的に RANKL 遺伝子を破壊したマウスを作製し、EAE モデルを解析したところ、発症率も病態の進行も強く抑えられることがわかった(図 1-28)。さらに、このマウスでは、Th17 細胞やマクロファージなどの炎症性細胞の中枢神経組織内への侵入や中枢神経組織の炎症、髄鞘破壊が強く抑制されていた。また、野生型マウスと比べて T 細胞特異的 RANKL 欠損マウスでは、EAE を誘導しても中枢神経組織内のケモカイン CCL20 の発現が高く誘導されなかった。

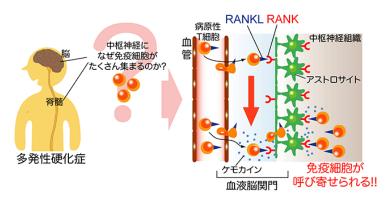


図 1-27 T細胞が発現するサイトカイン RANKL が、中枢神経組織に免疫細胞を呼び寄せる63

⁶² 血液脳関門:血液と脳・脊髄との間の物質輸送を制限する機構。中枢神経系の血管の内皮細胞、血管周皮の細胞およびアストロサイトによって形成されている。

⁶³ JST プレスリリース https://www.jst.go.jp/pr/announce/20151209/index.html 図 2。

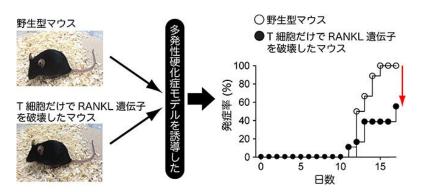


図 1-28 T細胞で RANKL 遺伝子を破壊したマウスは多発性硬化症に対して抵抗性を示す64

一方、中枢神経組織内のアストロサイトは、RANKL の受容体 RANK を発現しており、アストロサイト特異的に RANK を欠損させたマウスでも EAE の発症が抑えられることがわかった。さらに、RANKL 経路を阻害する低分子阻害剤をマウスに経口投与すると、EAE の発症率が抑えられた(図 1-29)。

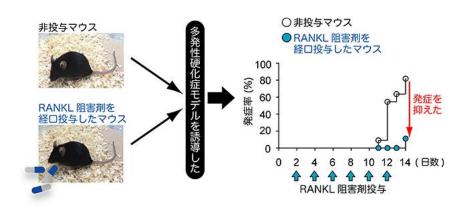


図 1-29 RANKL 阻害剤の投与により、多発性硬化症の発症が抑えられる 65 RANKL に対する低分子阻害剤を 2 日おきに経口投与したところ、多発性硬化症の発症率が強く抑えられた。

本研究の結果により、多発性硬化症で中枢神経系に炎症が引き起こされる仕組みが明らかになった。また、RANKLを標的とした治療法が多発性硬化症に対して強い効果を発揮する可能性が示された。

37

⁶⁴ JST プレスリリース https://www.jst.go.jp/pr/announce/20151209/index.html 図 1。

 $^{^{65}}$ JST プレスリリース https://www.jst.go.jp/pr/announce/20151209/index.html $\ \ \boxtimes \ 3_{\circ}$

第 2 章 プロジェクト終了から現在に至る状況

2.1 プロジェクトの終了後の状況に関する基礎データ

2.1.1 調査方法

調査は、文献調査(プロジェクト報告書、解説、原著論文など)、インターネットによる調査、各種データベースによる業績(論文・特許・受賞他)の調査からなる基礎データ調査と、プロジェクト関係者へのインタビュー調査を行った。これに基づき、本プロジェクト期間中の成果の発展状況および波及効果等について調査時点でまとめた。

(1) 基礎データ調査の方法

基礎データ調査については、基本的にプロジェクトメンバー⁶⁶を対象として、プロジェクトの研究に関連した成果の発展状況について、文献による成果の把握と、論文や研究助成金の獲得状況等のデータ調査を行った。各項目について利用したデータベースと調査範囲等を下記に記す。

①競争的研究資金の獲得状況

プロジェクトメンバーを対象として、本プロジェクトの研究内容に関連している研究課題について調べた。表 2-1 はその中で、競争的研究資金の総額が 1 千万円以上で研究代表者を務めるものを抽出して示した。

データベースとしては、調査対象者の所属する研究室や本人の WEB サイトおよび KAKEN 科学研究費助成事業データベース等の競争的研究資金に関する検索サイトと、補助的に Google 等の検索サイトを利用した。

②論文

本プロジェクト期間中の論文は、2009年~2016年に発表された論文およびプロジェクトの終了報告書に成果論文としてリストアップされている論文とした。成果論文リストの中で *in press, to be submitted*等と表記があり、その後発表されたものについても基本的には期間中の論文とした。以下、これらの論文を「成果論文」と定義する。

本プロジェクト終了後の論文は、2017 年 1 月以降に発表され、かつ本プロジェクトメンバーが著者になっている論文を収集した(ただし、期間中の論文は除く)。収集した論文の中で、本プロジェクトとの関連を Abstract、引用関係等で確認し、関連のあるものを関連論文としてリストアップした。以下、これらの論文を「発展論文」と定義する。

データベースは、エルゼビア社の Scopus を利用し、Scopus 内での文献タイプ、Article、 Review、Conference Paper 及び Letter に分類されるものを収集した。各論文についての評

⁶⁶ 研究総括、グループリーダー、研究員。

価の一つである FWCI (Field Weighted Citation Impact) ⁶⁷、および Journal の評価指標となる CiteScore ⁶⁸についても収集した。

③特許の出願・登録状況

本プロジェクト期間中の特許は、プロジェクト終了報告書の成果リスト記載の特許とした。本プロジェクト終了後の特許は2016年4月以降に出願され、かつ、プロジェクトメンバーが発明者の特許とし、データベースは、主にPatentSQUARE(パナソニック社)を利用し、補助的に特許情報プラットフォームとEspacenetを利用した。

4招待講演

研究総括およびグループリーダーの本プロジェクト終了後の招待講演を調査対象者の所属する研究室や本人のWEBサイトの調査、Google等の検索サイト、上記②で記述した文献データベースの会議録等を併せて収集し、かつインタビューの際およびその後メールにて主な招待講演について確認した。

⑤受賞

プロジェクトメンバーの本プロジェクト終了後の受賞を調査対象者の所属する研究室や本人のWEBサイトの調査、Google等の検索サイトで収集後、研究総括およびグループリーダーに確認した。学術集会での優秀演題賞、Travel Awardおよび助成金団体の研究助成は除外した。

⑥ベンチャー

インターネット検索やベンチャー情報の記載のあるデータベースを用いて検索した。

⑦報道

日経テレコンおよび、プロジェクト関係者の WEB サイトの情報を収集した。

⑧参加研究者の動静

終了報告書を元にプロジェクト参加研究者⁶⁹を特定し、プロジェクト参加時の職位および、 終了時の職位、現在の職位を検索した。

(2) インタビュー調査の方法

インタビュー調査は研究総括および、本プロジェクトの主なメンバーであるグループリーダーのうち、現在研究総括と独立したポジションを得て研究活動を展開している、東京医

⁶⁷ FWCI:1 文献あたりの被引用数を世界平均(年別・分野別・文献タイプ別に算出)で割った数値。

⁶⁸ CiteScore: ジャーナル評価指標(Web of Science の Impact Factor と同様の指標)。それぞれの論文の出版年についての CiteScore と、現在の最新(CiteScore 2019)を収集。

⁶⁹ プロジェクトメンバーに加えて、終了報告書に記載のある技術員、研究補助員等も含めている。

科歯科大学大学院医歯学総合研究科医歯学系専攻生体支持組織学講座分子情報伝達学教授中島友紀、九州大学生体防御医学研究所教授澤新一郎、および東京大学医科学研究所附属国際粘膜ワクチン開発研究センター特任准教授古賀貴子に順次WEBインタビューを実施した。東京大学大学院医学系研究科骨免疫学寄付講座特任准教授岡本一男は研究総括インタビュー時に同席した。プロジェクト関係者には、基礎調査で知り得た情報の本プロジェクトとの関連や、その後の展開等についての情報を収集した。

2.1.2 競争的研究資金の獲得状況

本プロジェクト期間中から現在までのプロジェクトメンバーも含めた競争的資金の獲得 状況を表 2-1 に示す。その中で、代表的なものを下記する。

高柳研究総括は、大型のプロジェクトとして、特別推進研究「骨免疫学の推進による新たな生体制御システムの理解」(2015年度~2019年度)、AMED-CREST「生体組織の適応・修復機構の時空間的解析による生命現象の理解と医療技術シーズの創出」の中で「組織修復型免疫細胞の解明とその制御による疾患治療の開発」(2019年度~2024年度)など複数の研究資金を得ている。

グループリーダーの競争的資金獲得状況を以下に記す。

古賀貴子は、科研費基盤研究(B)「超高齢社会のQOL 向上に向けて骨―脳・神経系連関を解明する」(2017年度~2019年度)、科研費挑戦的研究(開拓)「認知症と骨粗鬆症を同時に制御できる方法の開発基盤」(2020年度~2022年度)の研究資金を得ている。

岡本一男は、科研費若手研究(A)「新規カルシウムシグナルトランスデューサーによる生体制御機構の解析」(2015年度~2017年度)、科研費基盤研究(B)「膜型 RANKL と可溶型 RANKL の生理的・病理的機能の解明」(2018年度~2020年度)の研究資金を得ている。

中島友紀は、JST さきがけ研究領域「生体における動的恒常性維持・変容機構の解明と制御」の中で「運動器の動的恒常性を司るロコモ・サーキットの解明」(2013 年度~2016 年度)、および AMED-CREST「メカノバイオロジー機構の解明による革新的医療機器及び医療技術の創出」の中で「骨恒常性を司る骨細胞のメカノ・カスケードの解明」(2015 年度~2020年度)の研究資金を得ている。

澤新一郎は、AMED PRIME「微生物叢と宿主の相互作用・共生の理解と、それに基づく疾患発症のメカニズム解明」の中で、「新生児腸内細菌叢形成メカニズムの解明」(2016 年度~2019 年度)、また、AMED PRIME「健康・医療の向上に向けた早期ライフステージにおける生命現象の解明」の中で「活性型自然リンパ球による腸管免疫寛容に関する研究」(2019 年度~2022 年度)の 2 つの AMED-PRIME の研究資金を得ている。

林幹人は、AMED PRIME「全ライフコースを対象とした個体の機能低下機構の解明」研究領域の中で「加齢に伴うオステオカインの変化がもたらす個体機能低下機構の解明」(2019年度~2022年度)の研究資金を得ている。

研究員では、高場啓之、小松紀子、住谷瑛理子、寺島明日香らがそれぞれ研究代表者として科研費を得ている。

表 2-1 競争的資金の獲得状況

JST	科研費
AMED	文部科学省

研究 期間 (年 度)	研究種目	研究課題	研究代表者	0 1	0	0 1	2 0 1 3	1	0 1	0	0 1	1	0	0 2	0 2	0 2	0	2	金額 (億円)
2009 ~ 2015	ERATO	高柳オステオネッ トワーク	高柳 広																17. 40
2013 ~ 2016	科研費 基盤研究(B)	対称性ジメチル化 修飾による免疫細 胞シグナルと発 生・疾患制御	古賀 貴子																0. 17
2013 ~ 2016	JST さきがけ [生体におけ る動的恒常性 維持・変容機 構の解明と制 御]研究領域	運動器の動的恒常 性を司るロコモ・ サーキットの解明	中島 友紀																0. 43
2014 ~ 2016	科研費 若手研究(A)	メカニカルストレ スによって制御さ れる運動器による 免疫系の動的恒常 性と破綻	林 幹人																0. 24
2014 ~ 2017	科研費 若手研究(A)	関節炎における T 細胞分化可塑性の 意義の解明と治療 法の開発	小松 紀子																0. 24
2015 ~ 2017	戦略推進部 (難病研究課) 難治性疾患実 用化研究事済 病態解明治 研究分野 事 新的の開発を い り り は さ は の は の は の は の に の に の に の に の に の に の	RANKL 低分子阻害 剤による疾患制御 の展開に向けた検 証研究	高柳 広 (共同研究: 岡本 一男、 澤 新一郎)																0. 99
2015 ~ 2017	科研費 若手研究(A)	新規カルシウムシ グナルトランスデ ューサーによる生 体制御機構の解析	岡本 一男																0. 24
2015 ~ 2019	特別推進研究	骨免疫学の推進に よる新たな生体制 御システムの理解	高柳 広 (研究分担 者: 新田 剛、 澤 新一郎、 岡本 一男)																5. 18

研究 期間 (年 度)	研究種目	研究課題	研究代表者	0	0 1	2 0 1 2	0 1	1	0 1	2 0 1 6	1	0	1	2	2	0 2	2	0	金額 (億円)
2015 ~ 2020	AMED-CREST メカノバイオ ロジー機構の 解明による革 新的医療機器 及び医療技術 の創出	骨恒常性を司る骨 細胞のメカノ・カ スケードの解明	中島 友紀																3.86
2016 ~ 2017	文部科学省 科学技術関係 人材の育成・ 確保 卓越研 究員事業 医 歯薬学	卓越研究課題 医歯薬学	澤 新一郎																0.12 (最大)
2016 ~ 2018	科研費 基盤研究(B)	咀嚼・運動と高次 機能の連関クロス トークの解明	中島 友紀																0. 17
2016 ~ 2018	科研費 若手研究(A)	自己免疫疾患を抑制する因子の機能解析とT細胞の負の選択機構の理解	高場 啓之																0. 24
2016 ~ 2019	AMED PRIME 微生物叢と宿 主の相互作 用・共生の理 解と、それに 基づく疾患発 症のメカニズ ム解明	新生児腸内細菌叢 形成メカニズムの解明	澤 新一郎							***************************************									0.54
2017 ~ 2019	科研費 基盤研究(B)	超高齢社会の QOL 向上に向けて骨― 脳・神経系連関を 解明する	古賀 貴子																0. 18
2018 ~ 2020	科研費 基盤研究(B)	膜型 RANKL と可溶型 RANKL の生理的・病理的機能の解明	岡本 一男																0. 17
2018 ~ 2021	科研費 基盤研究(B)	新規 T 細胞サブセットを標的とした自己免疫制御法の確立	小松 紀子																0. 17
2018 ~ 2020	AMED 戦略推 進部(難病研 究課)難治性 疾患業 希少 難治性疾患の 克服組制研究 く独明研究 (若手枠)	進行性骨化性線維 異形成症における 免疫反応に着目し た異所性骨化メカ ニズム解明	寺島 明日香																0.26

研究 期間 (年 度)	研究種目	研究課題	研究代表者	0	0 1	0	2 0 1 2	0 1	0 1	1	1	0 1	0 1	2 0 1 9	0 2	2	0 2	0 2	2 0 2 4	金額 (億円)
2019 ~ 2022	AMED PRIME 全ライフコー スを対象とし た個体の機能 低下機構の解 明	加齢に伴うオステ オカインの変化が もたらす個体機能 低下機構の解明	林 幹人																	0.40 (最大)
2019 ~ 2022	AMED PRIME 健康・医療の 向上に向けた 早期ライフス テージにおけ る生命現象の 解明	活性型自然リンパ 球による腸管免疫 寛容に関する研究	澤 新一郎																	0.40 (最大)
2019 ~ 2022	科研費 基盤研究(B)	ILC3 による液性 免疫制御機構の解 明	澤 新一郎																	0. 17
2019 ~ 2024	AMED-CREST 生体組織の適 応・修復機構 の時空間的解 析による生命 現象の理解と 医療技術シー ズの創出	組織修復型免疫細胞の解明とその制御による疾患治療の開発	高柳 広																	3.00
2020 ~ 2022	AMED 戦略推進 部(難病疾 課, かず用 発 が 来 が 来 が 来 が れ を り た り た り た り た り た り た り た り た り た り	関節リウマチの病 原性間葉系細胞サ ブセットを標的と した骨破壊治療法 の開発	高柳 広							***************************************										0.45
2020 ~ 2022	科研費 挑戦的研究 (開拓)	認知症と骨粗鬆症 を同時に制御でき る方法の開発基盤	古賀 貴子																	0. 26
2020 ~ 2023	科研費 基盤研究(B)	自己免疫寛容を司 る T 細胞の選別原 理の解明	高場 啓之																	0. 18
2020 ~ 2023	科研費 基盤研究(A)	骨恒常性を司る骨 リモデリング制御 機構の解明と革新 的治療戦略の確立	中島 友紀																	0. 45

2020年11月13日時点

2.1.3 論文の発表状況

成果論文および発展論文の全論文の Field-Weighted Outputs in Top Citation Percentiles⁷⁰の論文数を表 2-2 に示す。

表 2-2 プロジェクトの論文投稿状況一覧

		平均			FWCI Top %		
	論文数	FWCI 値	10%圏外	10%以内			
		I WCI 恒	10%(色)グト	10705279	1%以内	0.1%以内	0.01%以内
成果論文	80	2.96	56	24	4	2	0
発展論文	36	1. 37	26	10	0	0	0

検索日: 2020年12月31日

(1) 本プロジェクト成果に直接関わる論文

研究終了報告書に挙げられている論文を中心に、本プロジェクトと直接関わると判断できる論文数をその被引用数の推移と共に図 2-1 に示す。また、被引用上位 5 報についての詳細を表 2-3 に示す。

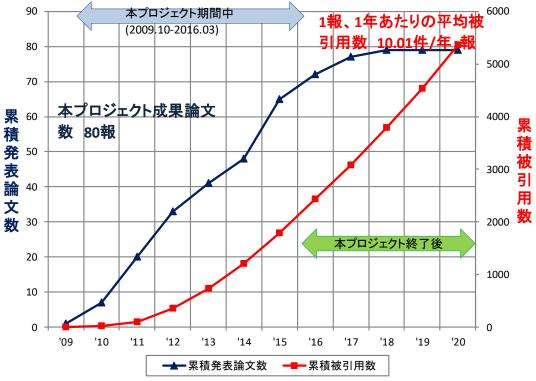


図 2-1 プロジェクトの成果論文の発表論文数と被引用数の推移 (検索 DB: Scopus 検索日: 2020 年 12 月 31 日)

⁷⁰ 出版年別の FWCI が世界全体の上位 X%に含まれる文献数/率。0.01%は、0.01%以内に含まれる論文の数を示し、0.1%は、0.01%より大きく、0.1%以内のものを示す。

表 2-3 プロジェクトの成果論文の内、被引用上位 5報の論文

No	著者名	タイトル	出版年	出版物名	巻	号	論文 番号 /ペー ジ	被引用数	DOI	文献 タイプ	FWCI	Cite Score *
1	Nakashima T., Hayashi M., Fukunaga T., Kurata K., Oh- Hora M., Feng J.Q., Bonewald L.F., Kodama T., Wutz A., Wagner E.F., Penninger J.M., Takayanagi H.	Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression	2011	Nat Med	17	10	1231- 1234	919	10.10 38/nm .2452	Article	23. 64	29. 0 (45. 9)
2	Komatsu N., Okamoto K., Sawa S., Nakashima T., Oh-Hora M., Kodama T., Tanaka S., Bluestone J.A.,	Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis	2014	Nat Med	20	1	62-68	511	10.10 38/nm .3432	Article	24. 48	31. 2 (45. 9)
3	Hayashi M., Nakashima T., Taniguchi M., Kodama T., Kumanogoh A., Takayanagi H.	Osteoprotecti on by semaphorin 3A	2012	Nature	485	7396	69-74	308	10.10 38/na ture1 1000	Article	5. 93	51. 0 (51. 0)
4	Takayanagi H.	Osteoimmunolo gy and the effects of the immune system on bone	2009	Nat Rev Rheumatol	5	12	667- 676	298	10.10 38/nr rheum .2009 .217	Review	7. 59	- (16. 5)
5	Negishi-Koga T., Shinohara M., Komatsu N., Bito H., Kodama T., Friedel R.H., Takayanagi H.	Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D	2011	Nat Med 松宏日・202	17	11	1473- 1480	281	10.10 38/nm .2489	Article	6. 41	29. 0 (45. 9)

(検索 DB: Scopus 検索日: 2020 年 12 月 31 日 FWCI、CiteScore2020 年 10 月 14 日時点) **CiteScore は出版年の値。()内は 2019 年の値。 本プロジェクトの成果論文数の被引用数は極めて多く、概して注目を集める論文を多く 出している。とりわけ中島らの骨細胞に関する論文は被引用数が900を超えていることが 特筆される。

(2) 本プロジェクトの成果の発展、または本プロジェクトから波及した研究内容の文献

本プロジェクトの成果の発展および波及に関する論文は計 36 報である。プロジェクト終了以降の発展論文と被引用数の推移を図 2-2 に示す⁷¹。また、被引用上位 5 報についての詳細を表 2-4 に示す。

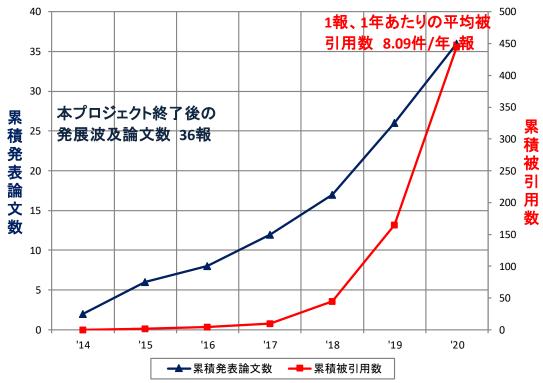


図 2-2 プロジェクト終了以降の発展論文の発表論文数と被引用数の推移 (検索 DB: Scopus 検索日: 2020 年 12 月 31 日)

⁷¹ 中島はプロジェクト途中から JST さきがけ研究員となり独立したため、その後の中島の論文はプロジェクト期間中であっても、発展波及論文として分類した。このため図 2-2 は 2014 年から始まっている。

表 2-4 プロジェクトの成果の発展波及論文の内、被引用上位 5報の論文

No	著者名	タイトル	出版年	出版物名	巻	号	論 番号 /ペ ジ	被引用数	DOI	文献 タイプ	FWCI	Cite Score *
1	Ono T., Nakashima T.	Recent advances in osteoclast biology	2018	Histochem Cell Biol	149	4	325- 341	73	10. 10 07/s0 0418- 018- 1636- 2	Review	5. 18	4. 5 (5. 8)
2	Nagashima K., Sawa S., Nitta T., Tsutsumi M., Okamura T., Penninger J.M., Nakashima T., Takayanagi H.	Identification of subepithelial mesenchymal cells that induce IgA and diversify gut microbiota	2017	Nature Immunol	18	6	675- 682	59	10. 10 38/ni . 3732	Article	4. 58	35. 4 (29. 0)
3	Tsukasaki M., Takayanagi H.	Osteoimmunol ogy: evolving concepts in bone-immune interactions in health and disease	2019	Nat Rev Immunol	19	10	626- 642	54	10. 10 38/s4 1577- 019- 0178- 8	Review	5. 56	62. 9 (62. 9)
4	Tsukasaki M., Komatsu N., Nagashima K., Nitta T., Pluemsakunthai W., Shukunami C., Iwakura Y., Nakashima T., Okamoto K., Takayanagi H.	Host defense against oral microbiota by bone-damaging T cells	2018	Nat Commun	9	1	701	52	10. 10 38/s4 1467- 018- 03147 -6	Article	5. 41	18. 1 (18. 1)
5	Hayashi M., Nakashima T., Yoshimura N., Okamoto K., Tanaka S., Takayanagi H.	Autoregulation of Osteocyte Sema3A Orchestrates Estrogen Action and Counteracts Bone Aging	2019	Cell Metab	29	3	627- 637	30	10.10 16/j. cmet. 2018. 12.02	Article	6. 17	37. 5 (37. 5)

(検索 DB: Scopus 検索日: 2020年12月31日 FWCI、CiteScore2020年12月31日時点)
**CiteScore は出版年の値。()内は2019年の値。

本プロジェクトの成果から発展したと分類できる論文の被引用数も図 2-2 に示すように順調に増加している。

2.1.4 特許の出願・公開・登録状況

本プロジェクトの期間中と終了後の調査時点に至るまでの特許出願状況を表 2-5 に示す。 期間中の出願が 2 件で、1 件が国内登録された。PCT 出願は 2 件である。 再表 2012/157237 (特許第 5925768 号、登録日 2016 年 4 月 28 日)「骨形成促進剤」(Sema4D 阻害剤)、PCT/JP2013/055555「骨量を増加させるための組成物」(Sema3A)

表 2-5 プロジェクトの特許出願状況一覧

	出願	件数	登録件数							
	国内	海外72	国内	海外						
プロジェクト期間中	1	2	1	1						
プロジェクト終了後	0	0	0	0						
合計	1	2	1	1						

検索日: 2020年11月17日

2.1.5 招待講演

本プロジェクトの研究内容に関連する招待講演について、プロジェクト期間中、国際学会 (国内での国際学会、外国での講演含む)85 件、国内学会 157 件、合計 242 件の招待講演が 行われた。うち、古賀貴子は6件、岡本一男は14件、中島友紀は24件、澤新一郎は2件、 林幹人は10件、その他研究員が7件で残りは研究総括が行った。

プロジェクト終了後 2020 年 7 月までに国際学会 32 件、国内学会 164 件、合計 196 件の招待講演が行われた。うち、古賀 3 件、岡本 19 件、中島 52 件、澤 9 件、林 3 件で残りは研究総括が行った。

2.1.6 受賞状況

本プロジェクトに関する受賞状況について、研究総括は IBMS-BONE(国際骨代謝学会)の Herbert A. Fleisch Award、日本免疫学会賞、日本医師会医学賞、上原賞、日本学士院賞など、期間中1件、プロジェクト終了後4件の大型の受賞がある。以下いずれも、期間中およびプロジェクト終了後の合計で、古賀貴子は1件、岡本一男は3件、中島友紀はIADR/AADRの William J. Gies Award を含めて6件、澤新一郎は1件、林幹人は2件の受賞がある。グループリーダー以外の研究員では、高場啓之が1件、小松紀子が2件、寺島明日香が1件、それぞれ受賞している73。

2.1.7 ベンチャー企業の設立状況

ベンチャー企業の設立はない。

2.1.8 報道関係

日経テレコンおよびプロジェクト関係者の WEB サイトの情報から、プレスリリースとメディア記事の総数は、プロジェクト期間中と終了後についてそれぞれ、92 件と 66 件、計158 件である。

このうち本プロジェクトおよび終了後の研究成果を直接紹介する報道は、内容の重複を除くと、期間中10件、終了後9件の計19件である。同じ研究成果の報道の重複に加え

⁷² 海外は国内出願に優先権主張をかけて、海外に出願した特許を示す。

⁷³ 学術集会での優秀演題賞、Travel Award および助成金団体の研究助成は除外した。

て、研究内容の紹介、学会報告の紹介、研究総括の日本学士院賞受賞、上原賞受賞の報道 などがあり、上記の総数となる。

一般メディアの報道以外では、本プロジェクト期間中の研究成果(論文)について、海外学 術雑誌に複数の解説記事で紹介されたことも特筆される⁷⁴。

2.2 プロジェクトの進捗状況

本プロジェクト期間中の研究は、1.5項に記載した。本項ではプロジェクト期間終了後の研究のうち、本プロジェクトの発展研究の主な成果をとり上げ、1.5項の項目に準じて記述した。

2.2.1 オステオカイン研究の展開

(1) エストロゲンによる Sema 3A 発現制御と骨量維持^[20]

本プロジェクト期間中の研究で、オステオカインとして Sema3A を同定し、Sema3A が骨形成を促進し骨吸収を抑制することで骨を保護することを示したが^[2]、Sema3A の発現制御機序はよくわかっていなかった。本研究では、Sema3A の発現を上昇させる因子を検索し、エストロゲンが濃度依存的に Sema3A の発現増強作用をもつことを明らかにした。

女性ホルモンの一種であるエストロゲンは骨吸収を抑制することが知られている。一方で、エストロゲンは骨芽細胞や骨細胞の生存を促進することで、骨密度低下の速度を抑える働きがある。閉経に伴いエストロゲンの分泌が低下すると骨細胞の細胞死が誘導され、急激に骨密度が減るため、閉経は主たる骨粗しょう症の要因の1つとなっている。骨密度の低下により骨の強度が低下し、結果的に大腿骨頸部や椎骨の骨折を来すと、寝たきり状態や慢性腰痛の原因となり、QOLを低下させ死亡率を高めることが知られている。しかしながら、これまでの研究において、エストロゲンが骨細胞を介してどのように骨の細胞を調節・統合しているかは不明であった。

本研究では先ず、さまざまな細胞外因子で骨細胞を刺激し、Sema3A の発現を上昇させるかどうかを調べたところ、エストロゲンが濃度依存的に発現増強作用を持つことがわかった。この増強は Sema3A タンパク質の細胞内輸送や安定性とは無関係であり、また、mRNA の発現の増加によるものでもなかったことから、マイクロ RNA (mi RNA) の関与の可能性を検討した。その結果、エストロゲンによる Sema3A 発現増強作用は、Sema3A タンパク質の発現を抑制する mi RNA の発現の抑制によることが明らかになった。また、実際に閉経後女性における Sema3A タンパク質の血中量を調べたところ、閉経前女性の血中量よりも有意に低いことがわかった。これは、エストロゲンがヒトでも Sema3A の遺伝子発現を調節していることを示している。

次に、骨芽細胞由来の Sema3A が閉経後骨粗しょう症に及ぼす影響を明らかにするため、 骨芽細胞系の細胞で特異的に Sema3A 遺伝子が欠損したマウスを作出し、その卵巣を摘出す

⁷⁴ Katrina Ray, Nat Rev Rheumatol, 10, 63, 2014.

参照: http://www.osteoimmunology.com/publication_4.html

ることにより閉経後骨粗しょう症モデルとなるマウスを作製した。これらのモデルマウスにエストロゲンを投与すると、Sema3A 遺伝子が欠損したマウスでは骨量維持効果が観察されなかったことから(図 2-3)、骨芽細胞系細胞由来の Sema3A がエストロゲン依存的な骨量維持作用に重要な役割を担っていることがわかった。

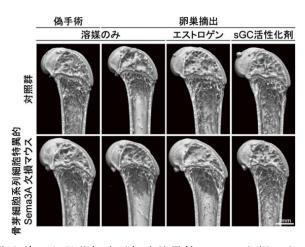


図 2-3 卵巣摘出手術を施した骨芽細胞系細胞特異的 Sema3A 欠損マウスに対するエストロゲンと sGC 活性化剤の効果⁷⁵

さらに、エストロゲンとともに骨密度の重要な決定要因である加齢における Sema 3A 発現量の変化を調べたところ、ヒトでもマウスでも加齢に伴って有意に低下することを見出した。そこで、高齢のマウスにおいて骨芽細胞特異的、もしくは骨細胞特異的な Sema 3A 欠損マウスの骨を解析したところ、骨芽細胞特異的 Sema 3A 欠損マウスでは骨量が正常であった一方、骨細胞特異的な Sema 3A 欠損マウスでは加齢に伴って極めて重篤な骨減少症を呈することが明らかになった。加えて、Sema 3A の受容体である Neuropilin-1 (Nrp1) を骨細胞でのみ欠損したマウスでも同様の重篤な骨減少症を示したことから、高齢マウスにおいては骨細胞が主に Sema 3A を産生し、細胞自体や周囲の骨細胞に対して骨量維持作用を発揮している可能性が示された。

また、骨細胞でのみ Sema3A が欠損した高齢マウスにおいて、どのような原因で骨量減少に至っているのかを解析したところ、これらのマウスの骨では骨細胞の数が著明に減少していることを見出した。骨細胞と骨芽細胞で発現量が大きく異なる mRNA を調べたところ、可溶型グアニル酸シクラーゼ⁷⁶(sGC)のサブユニットの発現が骨細胞で高いことがわかった。一方、エストロゲンによる骨芽細胞系細胞の生存延長作用は、sGC により産生された環状グアノシンーリン酸(cGMP)により活性化された cGMP 依存性タンパク質リン酸化酵素によることが知られていた。実際に、培養骨細胞を Sema3A で刺激すると、sGC が活性化され、産

⁷⁵ AMED プレスリリース https://www.amed.go.jp/news/release_20190118.html 図 1。

⁷⁶ 可溶型グアニル酸シクラーゼ(sGC):一酸化窒素の受容体で、グアノシン三リン酸を環状グアノシンーリン酸(cGMP)に変換する酵素。生成した cGMP はセカンドメッセンジャーとして機能し、さまざまなシグナルを活性化する。この酵素の刺激薬は慢性血栓塞栓性肺高血圧症や肺動脈性高血圧症の治療薬として使用されている(本報告では刺激薬ではなく活性化薬を用いた)。

生された cGMP を介して細胞の生存シグナルが活性化されることがわかった。さらに、骨芽細胞系特異的に Sema3A が欠損したマウスの卵巣を摘出した後、sGC-cGMP シグナルを活性化させる薬剤である sGC 活性化剤を投与すると、骨細胞の数が上昇し、卵巣摘出後の骨量減少を抑制させることが明らかになった(図 2-3)。

これらの結果から、骨細胞から産生される Sema3A は、特に高齢において重要で、骨細胞 自身に発現する Nrp1 を介して細胞の生存を維持し、自己制御ループを形成することで骨量 の維持に重要な役割を担っていることが明らかになった(図 2-4)。

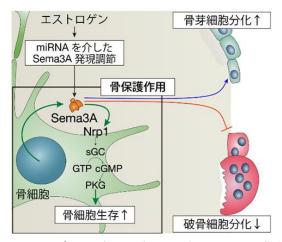


図 2-4 骨細胞の Sema3A を介した自己制御ループによる骨保護作用77

本研究により、骨細胞が発現する Sema3A がエストロゲンによって発現を制御され、その Sema3A が骨細胞自体に作用して細胞の生存を維持していることが明らかになった。 閉経後骨粗しょう症で誘導される骨密度の減少が、閉経前にはエストロゲンによって発現が維持されていた Sema3A の発現低下によって引き起こされている可能性が見出された。 閉経後骨粗しょう症のさらなる病態解明と、新たな分子機序の治療法開発への応用が期待できる。 また、Sema3A や Sema3A の下流で活性化する sGC を標的とした治療法が、骨細胞の生存を維持することで、骨粗しょう症などの骨関連疾患の治療につながる可能性が示唆された。

(2) がん骨転移における骨芽細胞が産生する可溶型 RANKL の役割[21]

本研究では、骨組織で産生された可溶型 RANKL がオステオカインとしてがん細胞に働きかけ、がんの骨転移を促進することを明らかにした。

骨は代表的ながん転移の標的臓器の一つであり、特に乳がん、肺がん、前立腺がん、悪性 黒色腫で骨転移の頻度が高いことが知られている。がん細胞は骨に転移すると骨芽細胞に 作用して RANKL の発現を高めるため、破骨細胞による骨吸収が亢進し、骨の破壊や脆弱化が 起こる。さらに、骨吸収が進むと骨基質から蓄えられている成長因子が放出され、その結果 がん細胞がさらに増殖する、という悪循環に陥る。

⁷⁷ AMED プレスリリース https://www.amed.go.jp/news/release_20190118.html 図 2。

現在、RANKL を阻害する抗体製剤デノスマブが、骨折などの骨転移に伴う症状を抑える薬として用いられているが、がん細胞が骨に転移するプロセス自体を阻害できる治療法は存在しない。また、抗 RANKL 抗体は、転移していない正常な骨の破骨細胞機能も阻害するため、低カルシウム血症等の副作用の懸念もある。一方、RANKL は破骨細胞分化に加えて、リンパ節や胸腺といった免疫組織の形成にも関わるため、全身で RANKL を欠損させたマウスでは、破骨細胞の欠損により骨量が異常に増加するだけでなく、免疫組織の形成不全も起こることが、過去の研究で明らかにされてきた。

RANKL は膜結合型タンパク質として細胞表面に発現した後、タンパク質分解酵素によって細胞外領域が切断されることによって、可溶型タンパク質としても産生される(図 2-5A)。本研究では、RANKL の細胞外領域にある酵素切断部位を欠失させ、選択的に可溶型 RANKL を欠損させたマウスを作製し、可溶型 RANKL の生体内の役割を調べた。その結果、可溶型 RANKL を欠損させたマウスでも正常に破骨細胞分化が起こり、野生型マウスと比べて骨量にも差がなかった(図 2-5B、C)。さらに、リンパ節や胸腺といった免疫組織の形成も正常であった(図 2-5D)。したがって、破骨細胞分化や免疫組織形成には膜結合型 RANKL が中心に働いており、可溶型 RANKL は必要ないことがわかった。

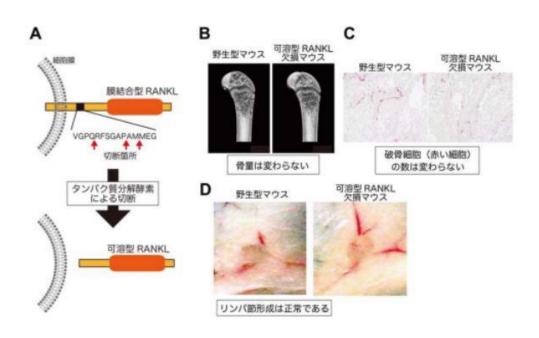


図 2-5 可溶型 RANKL は破骨細胞分化や免疫組織形成には必須ではない⁷⁸

- (A) 膜結合型 RANKL はタンパク質分解酵素によって切断されて、可溶型 RANKL になる。
- (B-D) 野生型マウスと可溶型 RANKL 欠損マウスにおける骨とリンパ節の解析。(B) 右足大腿骨の骨量、(C) 右足頸骨における破骨細胞の数、(D) 鼠径部のリンパ節形成。いずれにおいても、野生型マウスと可溶型 RANKL 欠損マウスとでは差を認めなかった。

次にがん骨転移における可溶型 RANKL の関与を検討するために、マウスの悪性黒色腫も しくは乳がん細胞を用いて、がん骨転移モデルを実施した。その結果、可溶型 RANKL を欠損

⁷⁸ 東京大学プレスリリース https://research-er.jp/articles/view/82130 図 1。

させたマウスでは、野生型マウスと比べて、有意に骨転移が抑制されることがわかった(図 2-6A、B)。一方で、骨転移部の破骨細胞の数には差がなかった(図 2-6C)。

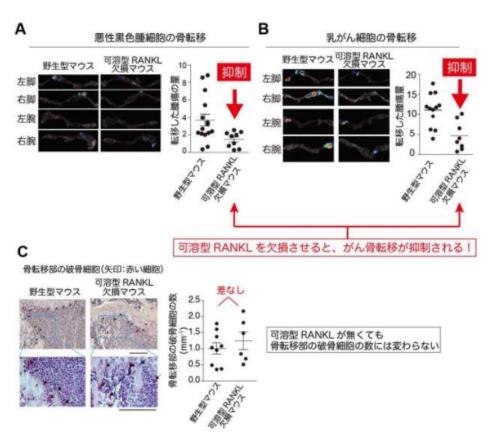


図 2-6 可溶型 RANKL はがん骨転移を促進する79

(A、B)発光する悪性黒色腫細胞(A)もしくは乳がん細胞(B)を用いたマウスのがん骨転移モデル。発光の強さは腫瘍の量を示す。四肢の長管骨への転移を比較したところ、可溶型 RANKL 欠損マウスでは転移が抑制されていた。(C)乳がん細胞の骨転移部における破骨細胞(矢印:赤い細胞)の数を評価した。可溶型 RANKL を欠損させたマウスでも、骨転移部の破骨細胞の数に変化はなかった。

したがって、可溶型 RANKL は骨転移部においても破骨細胞分化に関与していないことが示された。

乳がんや悪性黒色腫など骨に転移しやすいがん細胞の多くは、それ自身が RANKL の受容体 RANK を発現していることが知られている。こうした RANK を発現するがん細胞は、RANK により細胞遊走が促され、その結果、RANKL の濃度勾配に従ってがん細胞が移動することが報告されていた。

そこで、RANK を欠損させたがん細胞を使用して骨転移モデルで骨転移を検証したところ、可溶型 RANKL を欠損させたマウスでも野生型マウスでも骨への転移率が低下し、さらに両マウス間では転移率に差はなかった。すなわち、可溶型 RANKL は破骨細胞に働きかけるので

⁷⁹ 東京大学プレスリリース https://research-er.jp/articles/view/82130 図 2。

なく、がん細胞の RANK に作用することで、骨転移を誘導することが示された。さらに、卵巣や副腎へのがん転移は、野生型マウスと可溶型 RANKL を欠損させたマウスとで差は認められなかった。体の中では骨が主要な RANKL の産生臓器であることから、がん細胞は可溶型 RANKL によって骨へ引き寄せられ、骨転移が誘導されることが明らかとなった(図 2-7)。

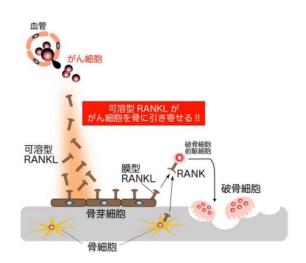


図 2-7 可溶型 RANKL はがん細胞に直接働きかけて、骨への細胞移動を引き起こす⁸⁰ 可溶型 RANKL は、がん細胞を骨へ引き寄せることで、骨転移を誘導する。一方、破骨細胞分化には、可溶型 RANKL ではなく、膜型 RANKL が中心となって働く。

本研究により、骨や免疫組織には可溶型 RANKL は必須ではなく、膜結合型 RANKL による細胞間接触を介した作用が重要であることがわかった。一方で、可溶型 RANKL はがん骨転移を促す機能を有することを見出した。本論文は、Nature Rev Endocrinology(doi: 10.1038/s41574-019-0264-9)に紹介された。

最近の臨床研究においても、血清中の可溶型 RANKL の濃度が、乳がん細胞の骨髄内播種および骨転移成立と相関することが報告されている。したがって、可溶型 RANKL は、骨転移を予測できる血中バイオマーカーとして有用であることが示唆される。また、可溶型 RANKL が破骨細胞分化には必要ではないことから、可溶型 RANKL のみを選択的に阻害する治療法が開発できれば、抗 RANKL 抗体よりも副作用の少ない骨転移の治療法に繋がることが期待される。

(3) RANKL 低分子阻害剤による腫瘍の骨転移の抑制[22]

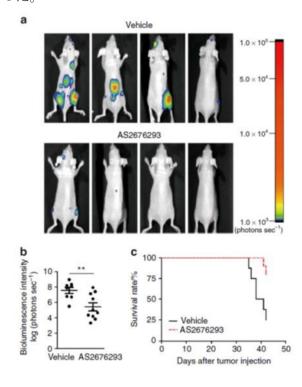
前項で述べたように、RANKL はがん骨転移の病態に深く関与しており、RANKL-RANK 経路は骨転移の有用な治療標的として考えられている。現在、RANKL の中和抗体であるデノスマブが破骨細胞の分化、活性化および生存を抑制することにより、低用量で骨粗しょう症および関節リウマチに伴う骨びらんの進行抑制に、高用量で、多発性骨髄腫による骨病変および固形癌骨転移による骨病変および、骨巨細胞腫に対する治療薬として承認されている。一方で、

⁸⁰ 東京大学プレスリリース https://research-er.jp/articles/view/82130 図 3。

RANKL を標的とする低分子阻害薬は治療薬の選択肢を増やし、医療費負担の軽減も期待できることから、その開発は重要な課題である。

本研究では、経口投与可能な RANKL 低分子阻害剤 AS2676293 81 の骨転移における効果について検証を行った。まず、AS2676293 は、 $in\ vitro$ において破骨細胞前駆細胞の増殖および生存には影響を与えず、RANKL による破骨細胞分化を阻害することを確認した。AS2676293 は RANKL 刺激による JNK(c-jun N-terminal kinase)、 $I\ \kappa$ B α (Inhibitor of κ B)および ERK(Extracellular Signal-regulated Kinase)のリン酸化には影響を与えないものの、破骨細胞分化に必要な転写因子 Nfatc1 および c-Fos の発現を有意に抑えた。したがって AS2676293 は RANKL に直接結合して作用するのではなく、RANKL-RANK 経路のシグナル阻害 剤として作用することが示された。

次に、溶骨性の骨転移を起こす乳がん細胞株を移植したマウスに AS2676293 を経口投与すると骨転移が有意に抑制され、マウスの生存日数も延長することが明らかになった(図2-8)。軟 X 線撮影では、in vivoイメージング解析で転移が観察された部位と相関して溶骨が認められたのに対し、AS2676293 の投与により溶骨が減少した。骨転移により二次海綿骨および骨端部皮質骨領域において破骨細胞数が増加したが、AS2676293 投与群では破骨細胞数が減少し、骨吸収も抑制された。一方、非溶骨性の骨転移を起こす悪性黒色腫細胞株を移植したマウスでは、AS2676293 は骨量および破骨細胞数に影響を与えずに骨転移を阻害した。in vitro の細胞走化性実験から、AS2676293 は RANKL による悪性黒色腫細胞の走化性を直接抑制することがわかった。



⁸¹ アステラス製薬(株)及び湧永製薬(株)で創製されたピリジニルピリミジン系低分子 RANKL 阻害剤。 Miyata J et al, Bioorg Med Chem Lett, 22, 5681, 2012.

55

図 2-8 AS2676293 は骨転移を抑制する82

- a, b 乳がん細胞株の骨転移への効果
- c 乳がん細胞投与マウスの生存曲線

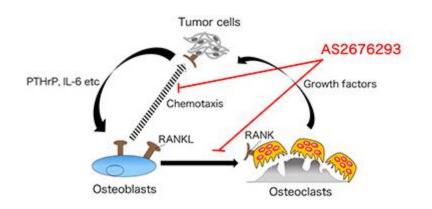


図 2-9 低分子 RANKL 阻害剤 AS2676293 による骨転移抑制の概念図⁸³ 腫瘍細胞は骨に転移すると、PTHrPや IL-6 等のサイトカインの産生を介して RANKL の発現を誘導して破骨細胞の分化を誘導し、骨吸収を促進する。その結果、骨基質中に含まれる増殖因子が放出され、腫瘍細胞の増殖が促進される。また可溶型 RANKL は RANK 発現腫瘍細胞に直接働きかけることで細胞走化性を高め、転移を促す。 AS2676293 は、これらの RANKL-RANK 経路を阻害することにより、腫瘍細胞の骨転移と骨吸収を抑制する。

以上より、AS2676293 は破骨細胞分化抑制および腫瘍の骨組織への走化性の阻害という 2 つの作用機序により、骨転移を抑制するとともに骨吸収を抑制することが明らかになった (図 2-9)。RANKL-RANK 経路は骨転移だけではなく、乳がんの発癌や肺転移にも関与していることが報告されている。低分子阻害剤による RANKL 阻害療法は、デノスマブの適応疾患だけでなく、RANKL-RANK 経路が関わる腫瘍疾患に対する新たな治療戦略としても期待できる。

(4) 骨免疫システムにおける Osteoproteger in の役割と産生源^[23]

RANKL は破骨細胞の分化と機能発現で中心的な役割を担うだけでなく、免疫系の発生や維持に必須のサイトカインである。血中に存在する Osteoprotegerin (OPG) は、RANKL のデコイ受容体⁸⁴として知られており、試験管内では骨芽細胞が作る OPG が破骨細胞の分化や機能を調節することが報告されている⁸⁵。また RANKL 及び OPG は、胸腺髄質上皮細胞(mTEC)や腸管 microfold cells (M 細胞) の分化制御にも必須の役割を担う。しかし、OPG はさまざまな組織で発現するとともに血中にも存在することから、OPG が産生された近傍で作用するだけなのか、血中の OPG が全身的に作用するのかは不明であった。本研究では、それぞれの組織

⁸² 文献[22] Fig. 2.

⁸³ 日本骨代謝学会 HP http://www.jsbmr.jp/1st_author/380_ynakai.html

⁸⁴ デコイ受容体: decoy receptor。特定のサイトカインなどと結合するが、結合しても何もシグナル伝達を行わない受容体(破骨細胞の RANK と結合して、RANKL を介するシグナル伝達を阻害する)。

⁸⁵ Udagawa N et al, Endocrinology, 141, 3478, 2000.

で OPG 産生細胞を探索し、その細胞で OPG 遺伝子を欠失したマウスを作出して OPG の作用 様式を解析した。

全身性に OPG を欠損させたマウス ($Tnfrsf11b^{\Delta/\Delta}$)では、骨量が著明に減少し、血中 OPG も 消失した(図 2-10)。試験管内では、骨芽細胞が RANKL と OPG の両方を発現することが知ら れていたが、骨組織のシングルセル RNA-seq 解析の結果から、OPG を産生する骨芽細胞と RANKL を産生する骨芽細胞は異なるサブセットに属する可能性が示唆された。 骨芽細胞を含 む全身の間葉系細胞で OPG を欠損させたマウス (Tnfrsf11bflox/flox Twist2-Cre[24])では、重度 の骨減少が起こり、血中の OPG 量が減少した。しかし、骨芽細胞で OPG を欠損させたマウス (Tnfrsf11b^{flox/flox}Sp7-Cre^[25])では骨量が著明に減少する一方で、血中の OPG 量には変化が なかった(図 2-11)。

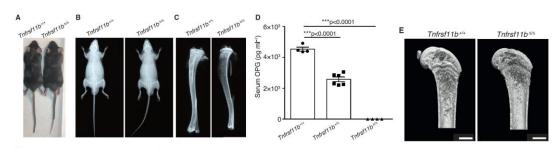


図 2-10 全身 OPG 欠損マウスの解析86

A, B, C 野生型と OPG 欠損マウスの比較:全身像、全身 X線像、脛骨

- 8週齢マウスの血中 OPG 量
- 野生型と全身 OPG 欠損マウスとの CT 解析像

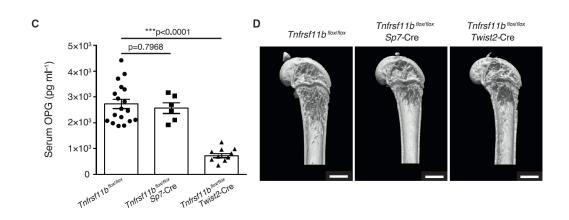


図 2-11 骨芽細胞、間葉系細胞特異的 OPG 欠損マウスの解析87

- C 8週齢マウスの血中 OPG 量
- D OPG 欠損マウスの CT 解析像

一方、胸腺で OPG を発現する細胞を検索したところ mTEC が最も OPG を高発現することが わかり、胸腺の上皮細胞特異的に OPG を欠損させたマウス作出したところ、このマウスでは

⁸⁶ 文献[23] Fig. 1から抜粋。

⁸⁷ 文献[23] Fig. 2から抜粋。

血中 OPG 量の変化はないが、mTEC の細胞数が増加した。この mTEC の増加は、血中 OPG が減少した間葉系細胞特異的 OPG 欠損マウス ($\mathit{Infrsf11b^{flox/flox}Twist2-Cre}$) では観察されなかった。

また、腸管では M 細胞が OPG を高発現していたことから、腸管上皮細胞で OPG 欠損するマウスを作出した。このマウスでは血中 OPG 量は変化しないが、M 細胞が増加した。

本研究の結果は、血中を循環している OPG でなく、局所で産生された OPG が、産生された 組織内で RANKL システムを制御することを示しており、RANKL システムの局所的な制御の重要性を示唆している(図 2-12 に概念図を示した)。

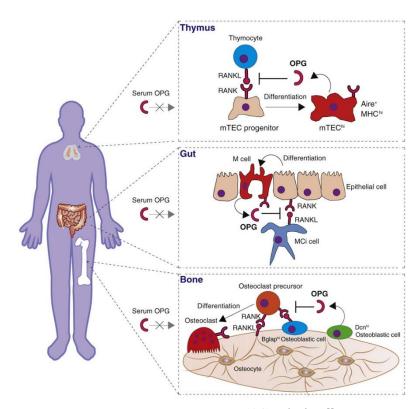


図 2-12 OPG の局所機能の概念図⁸⁸

2.2.2 骨免疫学の展開

(1) RANKL 発現間葉細胞による腸管上皮 M 細胞の誘導[24]

前項で述べたように破骨細胞の分化と機能発現で中心的な役割を担う RANKL は、腸管免疫系では M 細胞の分化を誘導する。腸管免疫系は、感染防御だけでなく腸内細菌叢の制御にも関与する。宿主の遺伝的な素因や環境要因が複合的に作用し、腸管免疫系による腸内細菌叢の制御機構が破綻すれば潰瘍性大腸炎やクローン病などの IBD (inflammatory bowel disease、炎症性腸疾患) に繋がる。また、IgA が腸管の感染防御と腸内細菌叢制御におい

⁸⁸ 文献[23] Graphical Abstruct.

て重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。IgA は炎症性腸疾患に関わるよう な有害な腸内細菌に優先的に結合し、有害な腸内細菌が腸管上皮に侵入することを阻害し 糞便中への排泄を促進する。しかし、腸内細菌に対する IgA の誘導機構は不明な点が多い。 従来の研究は血球系細胞の役割に焦点を当てたものが多く、上皮系細胞や間葉系細胞の IgA 産生における役割はほとんどわかっていなかった。

パイエル板を含む腸管リンパ組織(GALT89)は、IgA が誘導される主要な場である。GALT の 濾胞関連上皮は M 細胞を含んでおり、M 細胞は管腔の細菌抗原を取り込んで腸管リンパ組織 内の免疫系細胞に渡す機能を持つ。また、濾胞関連上皮の上皮細胞は多様なケモカインを産 生することで免疫系細胞を誘引する働きも持っている。

RANKL は腸管リンパ組織の M 細胞分化に必須の役割を果たすことが報告されていたが90、 RANKL 欠損マウスが腸内細菌に対する IgA 産生の大幅な低下を示すのに対して、M 細胞を欠 損するマウスでは特定の細菌に対する IgA 応答が減少するのみである。したがって、腸管リ ンパ組織において RANKL は M 細胞分化誘導以外の役割を持つ可能性がある。

本研究では、GALT において、腸内細菌への免疫応答が誘導される機序を明らかにするた めに、細胞種特異的に RANKL (およびその受容体 RANK) を欠損するマウスを作製し、腸内細菌 に対する免疫応答や腸内細菌叢を解析し、以下の結果を得た。

- (i)腸管上皮特異的に RANK を欠損するマウスの濾胞関連上皮を分析し、RANKL 刺激がケモ カイン CCL20 発現と M 細胞分化を誘導することを見出した。
- (ⅱ)可溶型 RANKL を特異的に欠損するマウスを作製したところ、濾胞関連上皮の CCL20 発 現や M 細胞分化に異常が認められなかったことから、膜結合型 RANKL の重要性が示唆され た。
- (iii)腸の主要な RANKL 発現細胞を同定するために、上皮下ドーム領域を組織学的に解析し たところ、濾胞関連上皮に接する間葉系細胞が RANKL を強く発現していた。さらに、フロー サイトメトリー法で単離した間葉系細胞は、腸管関連リンパ組織の既知の間葉系細胞とは 異なる遺伝子プロファイルを示したことから、新規の間葉系細胞であることが示された。
- (iv)間葉系細胞特異的 RANKL 欠損マウスでは、濾胞関連上皮の CCL20 発現が低下し M 細胞 分化が障害されていたが、血球系細胞特異的 RANKL 欠損マウスでは CCL20 発現・M 細胞分化 が正常であったことから、間葉系細胞から供給される RANKL が重要であることが示された。
- (v)間葉系細胞特異的 RANKL 欠損マウス⁹¹のパイエル板上皮下ドーム領域では M 細胞による ビーズの取り込みが減少しており、B 細胞と樹状細胞間の相互作用も減少していた。また、 孤立リンパ濾胞の成熟にも異常が認められた。
- (vi)腸内細菌に対する IgA 産生について検討したところ、間葉系細胞特異的 RANKL 欠損マ ウスのパイエル板では B 細胞の AID®の発現が減少しており、IgA へのクラススイッチの減 少が示唆された。小腸粘膜固有層では IgA 陽性形質細胞が著減しており (図 2-13a)、糞便中

⁸⁹ Gut Associated Lymphoid Tissue=GALT.

⁹⁰ Knoop KA et al, J Immunology, 183, 5738, 2009.

⁹¹ 間葉系細胞特異的 RANKL 欠損マウス Tnfsf11^{flox/A}Twist2^{+/Cre}。

⁹² AID:activation-induced cytidine deaminase、抗体遺伝子改変酵素。

や血中の IgA 濃度も大きく減少していた (図 2-13b)。 IgA の結合している腸内細菌の割合をフローサイトメトリー法で計測したところ、間葉系細胞特異的 RANKL 欠損マウスでは IgA 結合細菌の割合が低かった (図 2-13c)。また、経口投与したコレラ毒素に対する IgA 産生も減少していた (図 2-13d)。

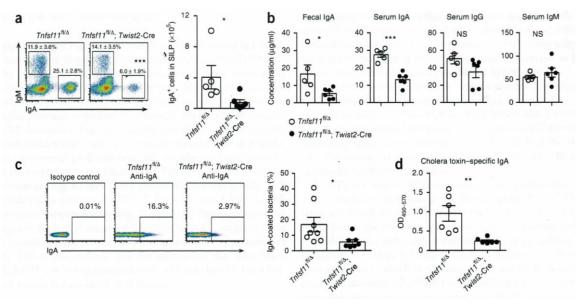


図 2-13 間葉系細胞由来の RANKL は腸管で細菌特異的 IgA 反応を誘発する⁹³

- a:遺伝子改変マウスの IgA と IgM
- b: 糞便の IgA と血中の IgA、IgG、IgM
- c: 糞便中の IgA で覆われた細菌のフローサイトメーター観察
- d:コレラ毒素特異的 IgA の ELISA 測定(本文略)
 - * Tnfsf11^{flox/4}: RANKL 欠損マウス
 - * Tnfsf11^{flox/4} Twist2^{_Cre}: 間葉系細胞特異的 RANKL 欠損マウス

(vii) 間葉系細胞の発現する RANKL の腸内細菌叢に与える影響を評価した。腸内細菌の 16S rRNA 遺伝子の解析により、間葉系細胞特異的 RANKL 欠損マウスの腸内細菌叢が変化していることが示された。特に腸内細菌叢の多様性の低下が顕著であることが明らかになった。

以上、本研究では腸の上皮下でRANKLを高発現する新規の間葉系細胞を発見し、この細胞が M 細胞誘導細胞として機能することを明らかにした。また、M 細胞は腸内細菌特異的な IgA 産生に関与し、産生された IgA により腸内細菌叢の多様性が維持されていることを明らかにした。M 細胞誘導細胞の同定は、IBD の病態解明・新規治療法開発やワクチン開発に繋がる可能性がある。

(2) exFoxp3Th17 細胞の口腔細菌感染防御への関与^[25]

本研究では、本プロジェクト期間中に破骨細胞誘導能が高いTh17 細胞として同定された、exFoxp3Th17 細胞の歯周炎における役割を解析した。

⁹³ 文献[24] Fig. 7.

消化管の入り口である口腔は、胃酸や消化酵素による選択を受けた細菌のみが生着する 腸管とは異なり、多種多様な外来微生物に暴露する機会を有するユニークな臓器である。ま た、歯が粘膜を貫通し顎骨に植立しているため、歯周組織は上皮連続性が破綻した極めて特 殊かつ脆弱なバリア部位であり、歯周病は人類史上最も罹患者数の多い感染症として知ら れている。歯周炎に伴い口腔細菌は血流に侵入し、感染性心内膜炎や動脈硬化、関節リウマ チ、糖尿病などさまざまな全身疾患に悪影響を及ぼすと考えられているが、口腔細菌に対す る免疫応答や生体防御機構に関しては不明な点が多い。そこで、口腔細菌に対する生体防御 機構を解明するために、マウスの歯周炎モデルを用いて解析を行った。

歯周炎を起こすと、CD4⁺T 細胞の中で Th17 細胞が特異的に、口腔粘膜や口腔リンパ節に集積することがわかった (図 2-14a)。これは、口腔粘膜で Th17 細胞が産生する、IL-17 や IL6 が高発現していることと合致していた。Th17 細胞の増加とは対照的に、Foxp3 陽性 T 細胞は有意に減少していた。歯周炎部位では、好中球は増加するが、他の免疫細胞 (マクロファージ、樹状細胞、B 細胞や γ δ T 細胞) は増加していなかった。これは炎症を起こした歯肉では Th17 細胞の応答が支配的であることを示している。広域スペクトラムの抗生物質投与で Th17 細胞の集積が抑制されることからも (図 2-14b、c)、この Th17 細胞の集積は口腔内細菌によることが示された。また、IL17 欠損マウス ($II17a^{-/-}II17f^{-/-}$) を作製して Th17 細胞の役割を検討したところ、歯周骨の減少は有意に IL-17 欠損マウスで抑制され (図 2-14d)、破骨細胞数も減少した (図 2-14e)。

この IL-17 欠損マウスの口腔内細菌数を調べたところ、細菌 DNA の総量は IL-17 欠損マウスで有意に増加していた (図 2-14f)。 さらに、16S リボソーム RNA の塩基配列解析から、口腔内細菌の種類分布が異なり (図 2-14g)、 γ プロテオ菌が増加していることがわかった (図 2-14h)。これらの結果は、Th17 細胞が骨破壊をするとともに、口腔内細菌の侵入に対して防御的な働きをすることを示している。

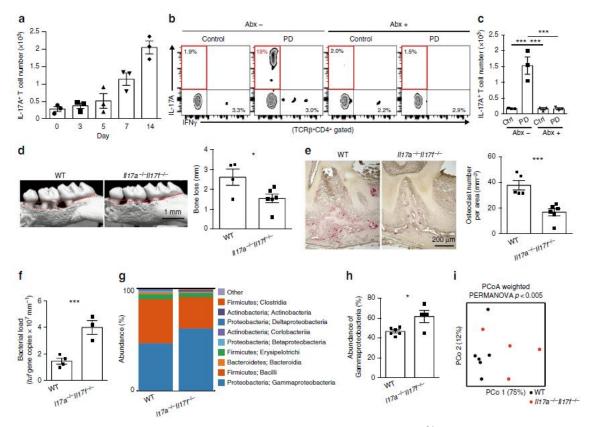


図 2-14 Th17 細胞は口腔細菌の侵入から防御する94

a: 口腔粘膜中の IL-17+CD4+TCR β +細胞数

b, c: 抗生物質カクテルの口腔粘膜中 Th17 細胞への効果

d: 野生型と、IL-17a および IL-17f 欠損マウスの歯周病歯根のマイクロ CT 解析

e:破骨細胞数の比較

f:リガチャ-歯周病誘発部の細菌数(野生型と遺伝子変異マウス)

g:口腔内細菌叢の分布 h:γプロテオ細菌の数

i:細菌群集の比較 PERMNOVA 解析95

Th17 細胞の由来を探索したところ、抑制性の Foxp3 陽性 T 細胞が IL-6 により Foxp3 を発現しない、exFoxp3Th17 へと変換していることが明らかになった。この exFoxp3Th17 細胞は破骨細胞を誘導する RANKL を高く発現しているが、歯槽骨吸収においてどの細胞の発現する RANKL が破骨細胞を誘導するか検討したところ、骨芽細胞や歯根膜細胞であった。IL-17が骨芽細胞や歯根膜細胞に RANKL 発現を誘導することが報告されている。したがって、exFoxp3Th17 細胞および Th17 細胞は IL-17 産生を介して口腔粘膜において抗菌ペプチドや好中球遊走因子の発現を誘導し、口腔細菌を量・質的に制御すると同時に、骨芽細胞や歯根膜細胞上に膜型 RANKL の発現を誘導し、破骨細胞による歯槽骨吸収を促進すると考えられる。

⁹⁴ 文献[25] Fig. 2.

⁹⁵ PERMNOVA 解析:生物群集の類似度を解析するための手法。

歯周炎を持続させたマウスでは口腔細菌による菌血症が生じたが、炎症性骨破壊に伴い 感染歯を脱落させたマウスでは、遠隔臓器の感染および口腔粘膜の炎症が終息した。

以上の結果から、歯周炎組織に集積する骨破壊性 T 細胞(exFoxp3Th17 細胞および Th17 細胞)は、粘膜免疫系を介した直接的な細菌制御と、骨免疫系を介した感染源(歯)の排除という 2 つの経路を介し、感染および炎症を終息へと導く「諸刃の剣」であることが明らかとなり、炎症性骨破壊は単なる炎症の副次的効果ではなく、口腔細菌感染に対する生体防御機構としての役割を持つ可能性が示唆された(図 2-15)。

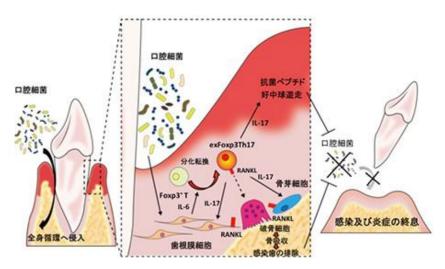


図 2-15 骨を壊して体を守る、口腔粘膜のユニークな感染防御機構%

以上、マウス歯周炎モデルを用いた解析から、歯周炎と同じく代表的な炎症性骨疾患である関節リウマチにおいて最強の悪玉と考えられてきた免疫細胞の亜集団が、口腔細菌依存的に歯周組織に集積し、感染制御に重要な役割を果たすことを明らかにした。

(3) IL-17 産生 γ δ T 細胞分化におけるチロシンキナーゼ Syk の関与 [26]

本プロジェクト期間中の研究で IL-17 産生 γ δ T(γ δ T17) 細胞が骨折の修復に関与することを明らかにしたが、本研究では γ δ T 細胞の運命を決定するシグナル経路の解析を行った。

 γ δ T 細胞は感染早期に炎症部位に出現し、自然免疫から獲得免疫への移行を円滑にすることが知られている。しかし、近年になって乾癬、がんの転移などに γ δ T 細胞が関与することが示され、治療標的としての有用性が注目されつつある。 γ δ T 細胞は胸腺で IL-17 産生型 γ δ T17 細胞または IFN γ 産生型 γ δ T1 細胞に分化する。 γ δ T17 細胞は胎仔期から新生仔期の短い期間でのみ分化し、その後、成長と共に γ δ T1 細胞が優位に分化するというユニークな特徴を持つ 97 。多くの遺伝子改変マウスを用いた解析によって、 γ δ T17 細胞の

⁹⁶ 日本骨代謝学会 HP http://www.jsbmr.jp/1st_author/312_mtsukazaki.html

⁹⁷ Bonneville M et al, Nature Rev Immunol, 10, 467, 2010., Carding SR et al, Nature Rev Immunol, 2, 336, 2002.

分化に必須の転写因子や液性因子が同定されたが、TCR シグナルがγδT 細胞のサイトカイン産生能獲得にどのような機能を担っているかは明らかでなかった。

 γ δ T 細胞は TCR 複合体の構造や TCR シグナル関連分子が α β T 細胞とは部分的に異なるという報告から 98 、本研究では γ δ T 細胞に特有の TCR シグナルが γ δ T 細胞の機能的分化を制御するという仮説のもとに、抗原受容体の近傍のチロシンキナーゼである Zap70 (Zeta chain of T cell receptor associated protein kinase 70) 99 と Syk (Spleen tyrosine kinase) 100 に着目し、 γ δ T 細胞における TCR シグナル伝達の分子メカニズムを理解することで、 TCR シグナルが γ δ T 細胞の機能決定に果たす役割を解明することをめざした。

1 日齢マウスの胸腺から精製した γ δ T 細胞に TCR 刺激してシグナルを誘導し、Zap70 および Syk のリン酸化を解析した結果、どちらの分子も γ δ TCR 刺激依存的にリン酸化された。次に CRISPR/Cas9 法を用いて作成した遺伝子改変マウス、Zap70 欠損 (Zap70^{-/-})、Syk 欠損 (Sykb^{-/-})、Zap70/Syk 両欠損 (Zap70^{-/-} Sykb^{-/-})マウスの胸腺 γ δ T 細胞の分化を評価した。野生型(WT)および Zap70 欠損マウスの胸腺 γ δ T 細胞数の有意な変化は認められなかった。一方、Syk 欠損マウスでは γ δ T 細胞数が WT の 25%程度に減少し、さらに、両欠損マウスでは 10%程度まで減少した(図 2–16A、B)。

これらのマウスの胸腺細胞を用いて TCR シグナルを誘導して ERK のリン酸化を測定すると、Zap70 欠損 γ δ T 細胞では WT マウス由来の細胞と同程度に ERK のリン酸化が誘導されたが、Syk 欠損 γ δ T 細胞では、ERK のリン酸が著しく障害されていた。また、両欠損 γ δ T 細胞では ERK のリン酸化が全く検出されなかった(図 2-16C、D)。一方、T 細胞の分化過程で発現される CD5 の発現量は Zap70 欠損による影響を受けず、Syk 欠損によって減少した。両欠損マウスでは CD5 を発現する γ δ T 細胞は全く検出されなかった(図 2-16E)。

これらのことから、Syk 依存的な TCR シグナルが胸腺 γ δ T 細胞の分化に中心的な役割を果たしていることが示唆された。

 $^{^{98}}$ Hayes SM et al, J Exp Med, 203, 47, 2006., Laird RM et al, J Immunol, 185, 6518, 2010.

⁹⁹ Zap70 はαβTCRのシグナル伝達に必要。Negshi I et al, Nature, 376, 435, 1995.

¹⁰⁰ Syk は B 細胞受容体(BCR) や Fc 受容体などの自然免疫シグナル伝達に必要。Turner M et al, Nature, 378, 298, 1995., Cheng AM et al, Nature, 378, 303, 1995.

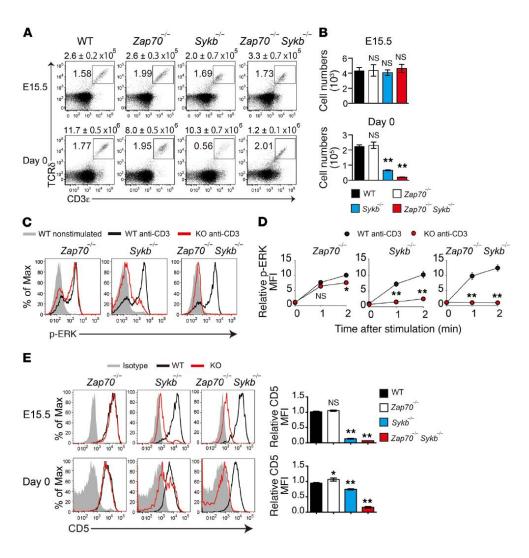


図 2-16 Syk は γ δ T 細胞シグナル伝達と γ δ T 細胞発生で主要な役割を持つ 101

A:フローサイトメトリーで観察した T 細胞群

B: γ δ T 細胞数

C,D: 胸腺 γ δ T 細胞における TCR 誘導性 ERK リン酸化

E: CD5 の発現

次に、 γ δ T 細胞の機能決定における TCR シグナルの役割を γ δ T17 細胞の分化について解析した。Zap70 欠損マウスでは γ δ T17 細胞の細胞数の 50%の減少が認められ、Syk 欠損マウスと両欠損マウスでは γ δ T17 細胞は全く検出されなかった。一方、 γ δ T1 細胞は、いずれのマウスでも検出された。さらに、Syk 欠損する骨髄キメラマウスやリンパ系列特異的に Syk 欠損するマウスでは、肺や脾臓に γ δ T17 細胞がほとんど検出されなかった。また、Syk 欠損するマウスでは、肺や脾臓に γ δ T17 細胞がほとんど検出されなかった。また、Syk で存活性化剤の Syk Syk の欠損によって耳介の肥厚が有意に減少し、炎症時における頸部リンパ節で γ δ T17 細胞はほとんど検出されなかった。

¹⁰¹ 文献[26] Fig. 1.

以上から、Syk によって仲介される TCR シグナルが、 γ δ T17 細胞への運命決定に必要であり、末梢組織における炎症応答の規模を決定づける重要な因子であることが示された。

Zap70 と Syk は Syk family に属し、構造的に近縁なチロシンキナーゼであることから、 Zap70 が Syk の機能を代替できるかを検証した。レトロウイルスを用いて Syk 欠損マウスに 由来する T 前駆細胞に Zap70 を過剰発現させたが、 γ δ T17 細胞は減少したままで、 γ δ T 細胞の分化において、 Zap70 は Syk の機能を相補することはできないことがわかった。

次に、Syk が制御するシグナル分子の解析を行った。B 細胞において、Syk が Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) 102 を活性化することで AKT 103 の活性化を誘導することが 知られていたことから、Syk が PI3K/AKT 経路の活性化を誘導することで γ δ T17 細胞の分化を誘導する可能性を検証した。

Syk 欠損 γ δ T 細胞に TCR 刺激を誘導しても、AKT の活性化は観察されなかった。また、PI3K 欠損 γ δ T 細胞は全く検出されなかった。一方で、PI3K 欠損 γ δ T 細胞では、TCR 刺激依存的な AKT のリン酸化は抑制されるものの、ERK 活性化にはほとんど影響はみられなかった。ERK 活性化には LAT (linker for activation of T) が必要であることが知られていることから TCR 刺激のシグナル系への LAT の関与を解析し、LAT の関与を確認した。以上の結果から、Syk は PI3K/AKT 経路と LAT/ERK 経路の活性化を制御し、 γ δ T17 細胞の分化を支持することが示された。

本研究の結果から、 γ δ T 細胞は初期分化段階において Zap70 よりも Syk に依存しており、 α β T 細胞よりもむしろ B 細胞に近いシグナル伝達機構を備え、炎症性 γ δ T 細胞の分化に Syk-PI3K シグナル経路が必須であるという新しい知見が得られた。将来的には人為的に γ δ T1 細胞や γ δ T17 細胞の分化や機能を制御し、自己免疫疾患や癌転移などを治療するための基礎理論の確立につながる可能性がある。

2.2.3 骨形成制御、免疫制御に関する研究の展開

(1) 歯列矯正における歯の移動機構[27]

本研究では、歯列矯正の実験モデルを用いて、メカニカルストレスに対する感受・応答による骨制御機構を解析した。

歯並び・噛み合わせの異常や顎の形や大きさの不調和は、食物の摂取や発音といった口腔機能の異常に繋がる。また、近年ではこういった異常が消化不良、顎関節症、睡眠時無呼吸症候群などの原因となることも明らかにされている。歯科矯正治療では、これらの口腔にとどまらない多様な機能異常を是正する目的で、歯の移動や顎の成長の誘導を行う。この歯列矯正のマウス実験モデルで加える力によって歯が移動するメカニズムについて研究を行った。

¹⁰² PI3K は AKT(alpha serine/threonine-protein kinase,プロテインキナーゼ B)の活性化を誘導する。

¹¹³k は Akt (alpha selfhe) threohine protein kinase, フロテイン・ア し By の に に を め い で は Murine Thymoma Viral Oncogene) = PKB(Protein Kinase-B): セリン・スレオニンキナーゼ の一種でがん遺伝子産物。

マウスにおいてバネで歯を引っ張る歯列矯正の実験モデルを作製し(図 2-17a)、歯の移動を観察すると、8日後に移動と(図 2-17b)、力が掛かる側の歯槽骨表面に破骨細胞の集積が確認された(図 2-17c)。

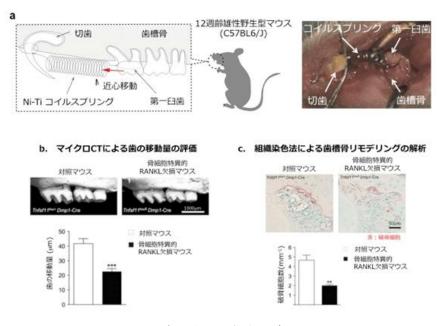


図 2-17 歯の移動の実験モデル104

a: 歯列矯正における歯の移動の図式

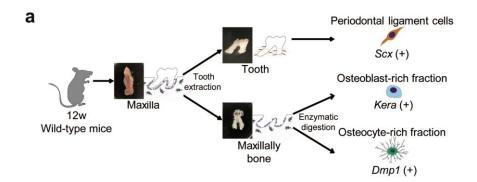
b:歯の移動と移動量の定量化

c: 歯槽骨リモデリングの解析と歯槽骨表面の破骨細胞数

この歯の移動への RANKL の関与を調べるために、RANKL のモノクローナル抗体 (OYC1) を類と蓋歯肉に注射したところ、歯の移動は抑制され、破骨細胞も減少した。このことから RANKL が歯の移動に対して促進的に働いていることが示唆された。

 $in\ situ$ ハイブリダイゼーションと免疫染色を組合せて RANKL を発現する細胞が検討され、RANKL は、歯周靭帯、骨芽細胞や上皮細胞など、さまざまな細胞から産生されることがわかっていたが、機能的に妥当な細胞がどれかは明らかではなかった。本研究では、図 2-18a に示したような、細胞単離の手法を用いて先ず歯と上顎骨を分離し、歯から歯周靭帯細胞を単離した。また上顎骨から、骨芽細胞リッチな細胞分画と骨細胞リッチな細胞分画と分離した。これらの分画のマーカーとして歯周靭帯細胞には、Scleraxis (Scx)を、骨芽細胞には Keratocan (Kera)を、骨細胞には Dentin matrix acidic phosphoprotein-1(DmpI)を用いた。細胞の各分画のこれらの遺伝子の発現と RANKL(TnfsfII)の発現を調べると、骨細胞で RANKL が高く発現していることがわかった(図 2-18b)。

¹⁰⁴ AMED プレスリリース https://research-er.jp/articles/view/62130 図1。



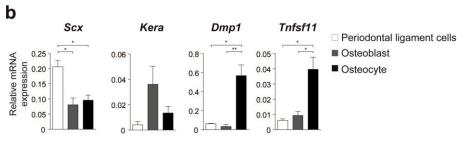


図 2-18 歯周組織における RANKL の発現¹⁰⁵

a:歯周組織からの細胞の単離

b: 歯周靭帯細胞、骨芽細胞、骨細胞における遺伝子発現

そこで、骨細胞特異的 RANKL 欠損マウスを作製して歯列矯正を行ったところ、歯の移動は、RANKL 欠損しないマウスでは見られたが、骨細胞特異的 RANKL 欠損マウスでは見られなかった(図 2-17b)。また、骨細胞特異的 RANKL 欠損マウスでは、力を受ける側の破骨細胞数が顕著に減少していた(図 2-17C)。同時に牽引側の骨芽細胞数も減少していることが見出された。

以上をまとめると、骨細胞が機械的力(圧力)のセンサーとなって RANKL を発現して破骨 細胞を誘導することにより歯槽骨リモデリングが惹起され、歯の移動が起こる(図 2-19)。

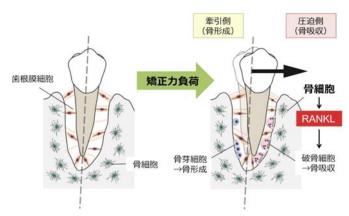


図 2-19 矯正力を負荷した時の歯の移動のメカニズム¹⁰⁶

¹⁰⁵ 文献[27] Fig. 3.

 $^{^{106}}$ AMED プレスリリース https://research-er.jp/articles/view/62130 図 2_{\circ}

(2) メカニカルストレスが骨細胞を活性化する機構 [28]

本プロジェクトのオステオサイト・マウスジェネティクスグループから独立した中島は、前項の研究をさらに独自に発展させ、メカニカルストレスが骨の形成・成長を誘導する機構について検討した¹⁰⁷。噛む力を発揮する咀嚼筋の活動性と下顎の骨の形に相関があることや、食習慣の異なる中世と現代とでは下顎の骨の形が大きく異なることから、噛む力と顎の形との間には密接な関係があることが古くから知られている。このため、咀嚼トレーニングにより適切な顎の成長を誘導できる可能性が指摘されているが、噛む力と顎の形を結ぶメカニズムはこれまで不明だった。また、噛むという刺激が顎の骨のどの部位にどのような影響を及ぼすかの研究も少なく、歯科矯正治療への応用が難しい状態であった。

本研究では、強く噛むことが顎の骨に含まれる骨細胞による IGF-1¹⁰⁸の発現上昇とスクレロスチン¹⁰⁹の発現低下を介して骨の形成を促進し、その結果、顎の骨の形が噛む力に耐えられるよう最適化されることを明らかにした。

硬い餌を与えることで咀嚼力を強化する新しいマウスモデルを作出し、噛む力の強化が 顎の骨に与える影響とそのメカニズムを解析した。通常マウスの飼育に用いる餌の栄養成 分を変えることなく硬度だけが高くなる餌を開発し、マウスに与えたところ、咀嚼回数と咀 嚼時間が増加し、咀嚼筋の一つである咬筋の幅径が増大していた。そして、咀嚼筋が発揮す る噛む力が顎の骨の形にどのような影響を及ぼすか明らかにするために、コンピューター シミュレーションを用いて解析をした結果、マウスの顎の骨に噛む力が加わることにより、 噛む力の強い個体に特徴的な、咬筋の腱付着部における骨の突出と下顎枝高の減少が予測 された(図 2-20a)。また、このような変化により、噛んだ時に顎の骨に生じる応力が減少し、 骨への負担が低下することが予測された(図 2-20b)。実際に硬い餌を与えた咀嚼強化モデル マウスの顎の骨を、マイクロ CT 解析で評価したところ、シミュレーションと一致した骨の 形の変化が観察された(図 2-20c)。

¹⁰⁷ 中島らの独立した研究であるが、前項の研究の発展として本調査報告に記載した。

¹⁰⁸ IGF-1 (insulin like grouwth factor-1): 骨形成を促進する作用が報告されている。

¹⁰⁹ スクレロスチン(sclerostin): 骨細胞が産生する生理活性物質の一つであり、骨芽細胞に作用して骨形成を抑制している。この作用機序を標的とした中和抗体医療の開発が進んでいる。Winkler DG et al, EMBO J, 22, 6267, 2003., Li X et al, JBC, 280, 19883, 2005., 抗体総説: Okazaki R, Clin Calcium, 21, 94, 2011.

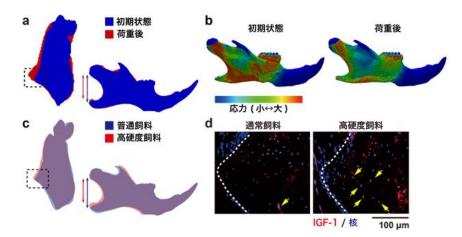


図 2-20 噛む力に伴う骨構造変化のシミュレーション予測解析と 咀嚼強化モデルマウスの顎骨解析¹¹⁰

- a. コンピューターシミュレーションを用いた噛む力に伴う顎骨変化の予測解析。初期状態 (青)と噛む力の荷重後(赤)の変化予測。左:断面図、右:側面図。
- b. 荷重により顎骨に生じる応力のシミュレーション予測。
- c. 顎骨のマイクロ CT 解析。コントロールマウスの顎骨(青)と高硬度飼料の顎骨(赤)の骨構造変化。左: 断面図、右: 側面図。シミュレーション予測と同様に咬筋腱付着部の骨形成の増加・突出(点線部分)と高さの減少が観察された(矢印:赤・青)。
- d. 荷重に伴う骨形成の増加部位の免疫組織学的解析。顎骨表層部(白点線)の内側に IGF-1 を発現する骨細胞が増加した(矢印: 黄)。

骨細胞はメカニカルストレスを受けるとサイトカインを放出することが知られていることから、ストレスにより増加するサイトカインを調べたところ、IGF-1(*Igf1*)の発現が増えることがわかった(図 2-20d、図 2-21a)。腱由来の細胞を IGF-1 存在下で培養すると骨芽細胞の分化が促進された。これとは逆に、骨芽細胞の分化を抑制するスクレロスチン(*Sost*)の発現がメカニカルストレスを受けた骨細胞で低下していた(図 2-21b)。

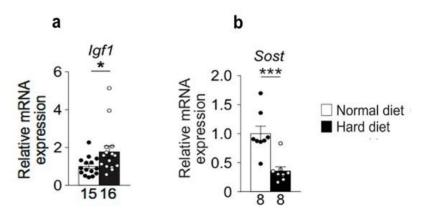


図 2-21 硬い餌を与えることで IGF-1 発現は増え、スクレロスチン発現は減る¹¹¹ a: 骨形成が起きている部分の骨細胞での IGF-1mRNA の発現、b: スクレロスチン mRNA の発現

¹¹⁰ AMED プレスリリース https://research-er.jp/articles/view/78271 図 1。

¹¹¹ 文献[28] Fig. 5, Fig. 7 から抜粋。

これらの結果から、強く噛むことにより顎の骨に含まれる骨細胞が分泌因子の発現を変化させることで、顎の骨の形を噛む力に耐えられるように造り変えることが示唆された(図 2-22)。

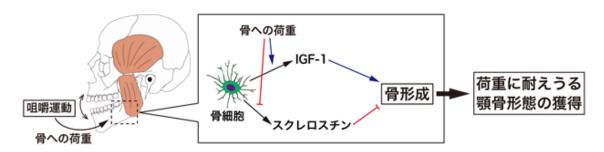


図 2-22 噛む力が顎の骨を造り変える分子メカニズム112

咀嚼時には咬筋をはじめとする咀嚼筋により顎骨に力が加わる。荷重部位では骨細胞による IGF-1 の産生が促進され、スクレロスチンの産生は抑制される。これにより、力の加わった部位では骨形成が促進され、荷重に耐えられるように顎骨が造り変えられる。

これまで、噛む力と顎の骨の形に関連があることはわかっていたが、因果関係の有無はわかっていなかった。研究グループはコンピューターシミュレーションによる予測と、咀嚼強化モデルマウスの解析を行うことで、噛む力自体が顎の骨の形に変化をもたらすことを発見した。さらに、噛むことによる骨の形の変化には、骨細胞の作る IGF-1 が重要であることを明らかにした。本研究より明らかにされた細胞・分子メカニズムの裏付けにより、顎の形や大きさの不調和に対する新しい歯科矯正治療法が開発されることが期待される。

(3) 骨再構築(リモデリング)のシミュレーション実験基盤を開発—骨疾患と薬物治療の効果の予測を目指して—^{[29],113}

中島らは京都大学ウイルス・再生医科学研究所教授安達泰治の研究グループと共同研究を行い、コンピュータ内に構築した仮想的な骨にさまざまな実験操作を加え、その再構築(リモデリング)の過程を詳細に観察できる骨リモデリングのシミュレーション実験基盤「V-Bone」を開発した。

網目状の海綿骨の力学的な荷重に応じてその構造を適応させるという古くから知られた現象に加え、骨粗しょう症や大理石骨病などの骨疾患の病態をコンピュータ内で再現することに成功した。また、特定のシグナル分子の発現を任意に変動させて骨代謝への影響を調べるコンピュータ内(*in silico*)実験が可能になった。さらに、臨床応用として V-Bone による *in silico* 投薬実験が、骨疾患に対するさまざまな薬物治療の効果の予測に有用であることを示した。

¹¹² AMED プレスリリース https://research-er.jp/articles/view/78271 図3。

¹¹³ 前項と同じく中島らの独立した研究であるが、Sema3A の効果をシミュレーションで検証するなど、本プロジェクトの発展として本調査報告に記載した。

先ず、大腿骨内部の網目状の海綿骨が、力学的な荷重に応じて変化する様子をコンピュータ内で再現することができた。この適応現象は、Wolffの法則¹¹⁴として古くからよく知られている。また、寝たきりや微小重力などの力学的な荷重の減少に起因する骨粗しょう症や、破骨細胞の分化のトリガーである RANKL 分子の発現異常に伴う骨粗しょう症、大理石骨病について、その病態を再現することに成功した。次に、V-Bone の妥当性を定量的に評価するため、骨吸収抑制と骨形成促進の両方の作用を持つ Sema3A 分子について、その発現を変動させる in silico 実験を行った。対応するマウスを用いた in vivo 実験との比較を通じ、in silico 実験と in vivo 実験の結果が定量的によく一致することを確認した(図 2-23)。このことから、in silico 実験は in vivo 実験を再現するだけでなく、これまで困難であった分子、細胞、組織の時空間的な挙動を同時に観察可能であることが示された。さらに、V-Bone の医療応用として、骨粗しよう症に対するさまざまな薬物治療の効果の予測を試みた。このような in silico 投薬実験は、一般的な薬剤評価の指標である骨量や骨代謝マーカーの変化に加え、骨質(骨微細構造)の時間変化が予測可能であり、臨床応用に向けた可能性が示唆された。

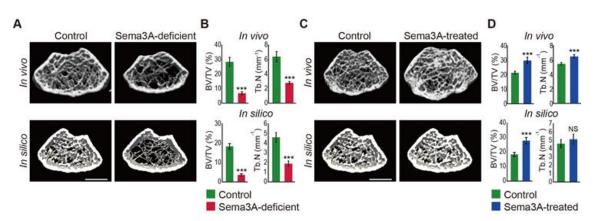


図 2-23 Sema3A 分子の発現を変動させる in silico 実験と対応する in vivo 実験の比較¹¹⁵

- (A) Sema3A 欠損マウスにおける海綿骨の構造。
- (B) Sema 3A 欠損マウスにおける骨体積分率(BV/TV) と骨梁数(Tb.N)。
- (C) Sema3A 治療マウスにおける海綿骨の構造。
- (D) Sema 3A 治療マウスにおける骨体積分率と骨梁数。

V-Bone を用いた in silico 実験は、従来の生体内実験や試験管内実験と並ぶ新たな研究 手法として、今後の骨代謝研究の発展を推進させると考えられる。また、網羅的な薬剤評価 や効果的な投薬方針の策定を促す臨床支援ツールとして、医療への貢献が期待される。

¹¹⁴ Wolff の法則:ドイツの解剖学者 Julius Wolff が提唱した「骨は加えられた力に応じて構造を変化させる」という法則。

¹¹⁵ AMED プレスリリース https://www.amed.go.jp/news/release_20200307.html 参考図。

(4) アルギニンメチル基転移酵素 PRMT5 による γ c ファミリーサイトカイン制御 [30]

T 細胞の維持や活性化には IL-2 や IL-7 などのサイトカインが深く関与し、そのシグナル 強度は様々なタンパク質翻訳後修飾により緻密に制御されている。近年、タンパク質のアルギニンメチル化が、転写やスプライシングなど幅広い生命現象に関わる翻訳後修飾として 注目を浴びている。しかし、T 細胞におけるアルギニンメチル化の生理的意義についてはほとんど明らかにされていなかった。

アルギニンは、側鎖のグアニジノ基に5つの水素結合供与体を持つため、DNAやRNA、タンパク質上の水素結合受容体との相互作用が生じやすいアミノ酸である。タンパク質のアルギニン残基にメチル基が導入されると、他のタンパク質との結合親和性が変化し、転写の促進や終結、pre-mRNAのスプライシングに影響を与える。アルギニンメチル化酵素PRMT (Protein arginine methyl transferase) は、ほ乳類では9つ報告されており、メチル化様式の違いから、非対称性ジメチル化を触媒する type I (PRMT1, 2, 3, CARM1, PRMT6, PRMT8)、対称ジメチル化を触媒する type II (PRMT5, 9)、モノメチル化を触媒する type III (PRMT7)の3つに分類される。そこでまず、T細胞ではどのアルギニンメチル基転移酵素 PRMTが関与しているか明らかにするために、ヒトの CD3 T細胞の活性化に伴う PRMTファミリー分子のmRNAの発現変動を解析した。抗 CD3/CD28 抗体による T細胞受容体(TCR)刺激により T細胞活性化すると、PRMT5 が最も高く発現することがわかった (図 2-24)。マウスの T細胞においても PRMT5 発現が増加し、対称性ジメチルアルギニンが顕著に増加した。

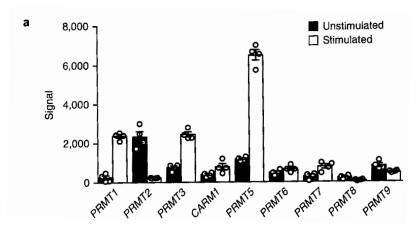


図 2-24 抗 CD3/CD28 抗体による TCR 刺激により、PRMT5 の発現が増加する116

アルギニンメチル化酵素 PRMT5 の T 細胞分化における役割を解明するために、T 細胞特異的に Prmt5 遺伝子を欠損するマウス (Prmt5 $^{flox/A}$ CD4 $^-$ Cre) を作成した。このマウスでは、胸腺の DP (double positive)、CD4 $^+$ T および CD8 $^+$ T 細胞数は正常であったが、脾臓やリンパ節における T 細胞数が顕著に減少していた。制御性 T (Treg) 細胞数も、胸腺では正常な一方、脾

¹¹⁶ 文献[30] Fig. 1a.

臓では著しく減少した。さらに invariant NKT(iNKT)細胞は、胸腺、脾臓および肝臓でほぼ 完全に欠失していた。

以上の結果から、PRMT5 は胸腺における iNKT 細胞の分化と、末梢の CD4⁺T および CD8⁺T 細胞、Treg 細胞の維持に重要であることが示された。

また、T 細胞特異的 Prmt5 遺伝子欠損マウス (Prmt5 欠損マウス)と野生型マウスの骨髄細胞を等量ずつ移入した混合骨髄キメラマウスでは、Prmt5 欠損マウスの骨髄細胞由来の iNKT、CD4⁺T および CD8⁺T 細胞のいずれも、野生型 (WT) 骨髄細胞由来の細胞より顕著に減少していた。これは PRMT5 が iNKT 細胞、CD4⁺T および CD8⁺T 細胞の細胞内部で機能することを示す。

次に、PRMT5 が iNKT 細胞のどの分化段階を制御するかを解析した。DP 細胞から正に選択された iNKT 細胞は、stage0、1、2、3 の分化段階を経る。Prmt5 欠損マウスの胸腺では、stage1、stage2、そして stage3 の細胞数がほぼ欠失していたため、stage1 における iNKT 細胞の分化が障害されていることが明らかになった。

iNKT 細胞分化に必須のサイトカインである IL-7 および IL-15 受容体の共通サブユニットである γ c¹¹⁷の発現と IL-7 受容体 α サブユニット(IL-7R α)の発現を解析した結果、Prmt5 欠損マウスの stage1 iNKT 細胞では、 γ c の発現が顕著に低下していた(図 2-25h)が、IL-7R α の発現の低下は観察されなかった(図 2-25i)。 γ c をコードする遺伝子の T 細胞特異的欠損マウスも同程度に iNKT 細胞が消失したことから、 γ c 発現の減少が Prmt5 欠損によるiNKT 細胞の分化障害を導くことが示唆された。

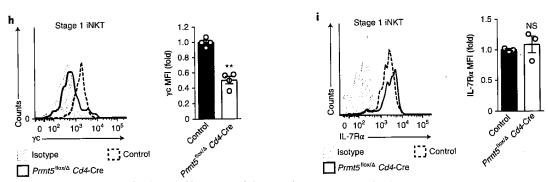


図 2-25 T 細胞特異的 Prmt5 遺伝子欠損マウスの T 細胞では γ c の発現が低下するが IL-7R α 発現は不変¹¹⁸

また、Prmt5 欠損マウスのナイーブ T 細胞を IL-2 存在下に抗 CD3/CD28 抗体で刺激しても CD4+T および CD8+T 細胞の増殖が認められず、死細胞の割合が有意に増加していたことから (図 2-26b)、PRMT5 は TCR 刺激に応じた CD4+T および CD8+T 細胞の増殖や生存に必須であることがわかった。また in vitro において、Prmt5 欠損ナイーブ CD4+T 細胞の induced Treg(iTreg)細胞への分化が激しく阻害され、特に IL-2 シグナル伝達が障害されていることが示唆された。

 $^{^{117}}$ γ c: IL-2 受容体の第 3 ユニットとして同定された。その後、IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、IL-21 などのサイトカインの共通受容体サブユニットであることが見出され、それらのサイトカインは γ c ファミリーとして区分される。

¹¹⁸ 文献[30] Fig. 4h, i.

また、Prmt5 欠損マウスの各 T 細胞分画では、 γ c の発現が有意に低下しているとともに、 TCR 刺激による JAK3 発現上昇がほとんど認められなかった。以上の結果から、PRMT5 は γ c と JAK3 の発現促進を介して、iNKT 細胞分化、T 細胞の維持や活性化に必要な γ c ファミリーサイトカインシグナルを制御することが考えられた。

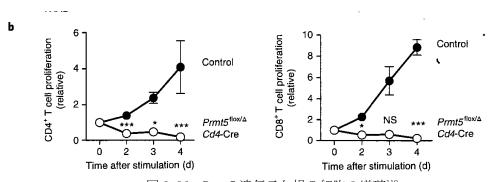


図 2-26 Prmt5 遺伝子欠損 T 細胞の増殖 119 ナイーブ T 細胞を抗 CD3/CD28 抗体、および IL-2 存在下で培養した。Prmt5 欠損 T 細胞は増殖が認められず、死細胞の割合が有意に増加していた。

最後に、PRMT5による γ cと JAK3の発現制御メカニズムを検証した。PRMT5によるメチル化の標的タンパク質を検証するために、正常 T 細胞と Prmt5 欠損 T 細胞でメチル化タンパク質を比較したところ、Prmt5 欠損 T 細胞では、スプライシングに関与する Sm タンパク質 120 の一つである SmD3 のアルギニンメチル化が認められず、 γ c と JAK3 の mRNA のスプライシングが障害されていた。すなわち、PRMT5 は SmD3 をアルギニンメチル化することにより、pre-mRNA のスプライシング制御を介して、 γ c と JAK3 の発現を促進することがわかった。以上より、PRMT5 を介したアルギニンメチル化は、 γ c と JAK3 の発現促進により γ c ファミリーサイトカインのシグナル強度を増強させ、iNKT 細胞の胸腺分化や末梢 T 細胞の維持に必須の役割を果たすことが明らかになった。本研究により、スプライシングを介した新たな γ c ファミリーサイトカインのシグナル制御機構の発見に繋がった。

本研究によって、T 細胞におけるアルギニンメチル化の生理的機能の一端が明らかになり、T 細胞の異常な活性化が起こる自己免疫疾患に対して、PRMT5 の阻害が抑制効果をもたらす可能性が考えられる。一方で、PRMT5 は、がんの免疫監視を担う iNKT 細胞や CD8⁺T 細胞に重要であることが示されたため、PRMT5 阻害剤は抗腫瘍活性を抑制する可能性があり、臨床への適用には注意が必要である。

(5) プロテアソーム因子の遺伝子多型とシェーグレン症候群[31]

本プロジェクト期間中の研究で、自己反応性 T 細胞の除去に関わる胸腺上皮細胞の自己 抗原の発現を制御するメカニズムの研究を行った。本研究では、自己抗原を細胞表面に提示

¹¹⁹ 文献[30] Fig. 5b.

¹²⁰ Sm タンパク質:リボ格タンパク質(ribonucleoproteins)。中核的なスプライシング装置を構成する。 SmD3 は、アルギニンメチル化されるとスプライソソーム形成が促進される。

する過程で機能するプロテアーゼ複合体(プロテアソーム)の構成因子の遺伝子多型と自己 免疫疾患との関連について研究を行った。

T細胞の分化と抗原受容体レパトア(レパートリー)は、胸腺において形成される。胸腺は、胸腺上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞などのストロマ細胞が三次元メッシュワーク構造を形成した独特の微小環境をもち、この微小環境によって未熟 T細胞にさまざまなシグナルが与えられ、有用 T細胞の選抜(正の選択)と自己反応性 T細胞の除去(負の選択)を経て、多様かつ自己に反応しない T細胞レパトアが形作られる¹²¹。この過程で自己のタンパク質はプロテアソームより分解されてペプチドになり、ペプチドはMHC¹²²クラス Iに提示され、ペプチドとMHC クラス I分子複合体を T細胞が認識することにより T細胞の選択が行われる。

多くの体細胞は触媒サブユニット β 1、 β 2、 β 5をもつ「標準型プロテアソーム」を発現するが、免疫細胞やウイルス感染細胞では触媒サブユニットが β 1i、 β 2i、 β 5i にそれぞれ置き換わった「免疫プロテアソーム」が形成される。また、胸腺の皮質上皮細胞は β 1i、 β 2i、 β 5t を含む「胸腺プロテアソーム」を形成する。これら触媒サブユニットのうち、 β 5、 β 1i、 β 5i、 β 5t は、MHC クラス I に提示される抗原ペプチドを切り出すためのキモトリプシン様活性をもつ。特に、 β 5t は胸腺の皮質上皮細胞に特異的な MHC クラス I 抗原ペプチドを産生することで、CD8T 細胞の正の選択に重要な役割を果たすと考えられている。

本研究では、ヒトゲノムデータベースと構造予測アルゴリズムを用い、全プロテアソームサブユニット遺伝子を対象として、damaging variation (機能に影響を与えうる遺伝的多様性)の数と頻度を調べた。その結果、 β 1i, β 5i, β 5t には、damaging variation が高頻度に存在することが明らかになった。これらは正常とは異なる MHC クラス I 抗原ペプチドを生成する可能性がある。とりわけ、 β 5t (PSMB11 遺伝子)の damaging variation の数は全プロテアソームサブユニット遺伝子の中で最も多かった。これらが CD8T 細胞の正の選択および抗原認識能を変化させる可能性を検証することを試みた。

 β 5t/PSMB11 遺伝子において特に頻度が高い3種類の damaging variation (G49S、S80Hfs、A208T) に着目し、CRISPR/Cas9 法を用いてそれぞれの変異をマウス β 5t/Psmb11 遺伝子に導入した(図 2-27A)。G49S は β 5t タンパク質の N 末端プロペプチドの切断に異常を生じ、A208T は β 5t タンパク質の発現量が低下していた。S80Hfs はフレームシフト変異のため β 5t タンパク質の発現が失われた。3 種類いずれのマウスも正常な胸腺発生と胸腺上皮細胞の分化を示したが、皮質上皮細胞における MHC クラス I 結合ペプチドが変化していた。さらに、3 種類の変異マウスは全て、胸腺における CD8T 細胞の分化が低下していた (図 2-27B)。これらの表現型は、過去に報告された β 5t 欠損マウスのそれと同じであり、今回調べた 3 種類の damaging variation はいずれも機能喪失型変異であると考えられた。

G49S は、複数の人種間に共通しており、特に日本人において高頻度(アレル頻度 3%)であるため、本研究では特に G49S に着目し、免疫系と疾患感受性に与える影響について調べた。 TCR トランスジェニックマウスを用いた解析から、G49S は特定の CD8T 細胞レパトアの正の

¹²¹ Nitta T & Suzuki H, Cell Mol Life Sci, 73, 1021, 2016.

¹²² 主要組織適合遺伝子複合体(MHC: major histocompatibility complex)。

選択を低下させることがわかった。さらに次世代シークエンス技術を用いて TCR レパトア への影響を定量的に解析した。G49S マウスでは野生型マウスに比べて、CDST 細胞における 特定の TCR の出現頻度が有意に低下しており、出現頻度が上昇した TCR は検出されなかった (図 2-27C)。

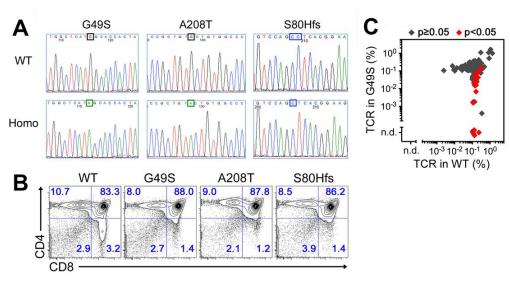


図 2-27 ゲノム編集による β 5t/Psmb11 遺伝子変異マウスの CD8T 細胞¹²³

したがって、G49S 変異は CD8T 細胞レパトアの多様性を低下させることが明らかになった。さらに、G49S とヒト疾患との関連を調べた。日本人集団において、G49S ホモ接合は自己免疫疾患の一つであるシェーグレン症候群のリスクと有意に関連することが明らかになった。

以上の結果より、ヒトゲノムに高頻度に存在する β 5t/PSMB11の多様性は、胸腺プロテアソームの機能を変化させ、本来とは異なる胸腺内自己ペプチドを生成することで、CD8T細胞レパトア形成と疾患感受性を変化させることが明らかになった(図 2-28)。CD8T細胞レパトアの変化がシェーグレン症候群のリスクを高めるメカニズムは不明であり、今後さらなる研究が必要である。

¹²³ 新学術領域「ネオ・セルフ」p.05 図 1 http://www.tokyomed.ac.jp/neoself/images/newsletter2.pdf

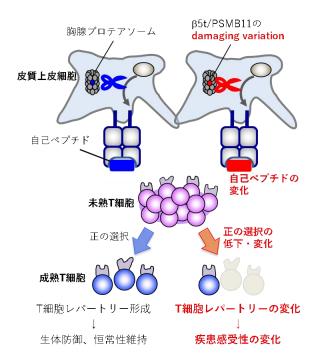


図 2-28 胸腺プロテアソームの遺伝子多様性による CD8T 細胞レパトアの変化¹²⁴

(6) クロマチン抑制因子 Chd4 が免疫疾患の発症を防ぐ[32]

前項で述べたように、T 細胞は T 細胞受容体 (TCR)を介して MHC に結合したペプチドを認識する。TCR は胸腺内で T 細胞の分化過程において、ランダムな遺伝子組み換えによって創出される。TCR はこの多様性ゆえに、多種多様な病原体を認識して免疫反応を起こすことになるが、一方で、しばしば自己を認識する TCR を持つ自己反応性 T 細胞ができてしまう。そのような自己反応性 T 細胞を除く過程で、全身のさまざまな組織で機能しているタンパク質を「末梢組織自己抗原」として異所的に発現する胸腺髄質上皮細胞 (mTEC:medullary thymic epithelial cell)が重要な役割を果たす。

mTEC において末梢組織自己抗原の発現を制御する分子として、転写制御因子 Aire が知られていた 125 。一方で、Aire 非依存的に発現している末梢組織自己抗原の存在が報告されていたことから、本プロジェクト期間中の研究で、Aire とは独立して末梢組織自己抗原の発現制御を行う転写因子 Fezf2 を見出した $^{[18]}$ (前出 1.5.3(4))。遺伝子発現プロファイル解析の結果から、Fezf2 と Aire が異なる末梢組織自己抗原遺伝子の発現制御に関与していることが明らかとなったが、それぞれの因子が遺伝子発現を制御する分子メカニズムの違いについてはわかっておらず、mTEC における末梢組織自己抗原遺伝子の発現制御機構の全貌は明らかになっていなかった。

¹²⁵ Nagamine K et al, Nat Genet, 17, 393, 1997.

¹²⁴ 新学術領域「ネオ・セルフ」p.05 図 2 http://www.tokyo-med.ac.jp/neoself/images/newsletter2.pdf

本研究では先ず、Fezf2 を欠損させた遺伝子改変マウスと、Aire を欠損させた遺伝子改変マウスの mTEC を使って RNA- seq^{126} を行い、Fezf2 により制御される遺伝子と Aire により制御される遺伝子は異なることを確認した。次に、その遺伝子リストを公共データベース上のエピジェネティクス情報 (ChIP- seq^{127} 、 $ATAC-seq^{128}$) と 1 細胞 RNA-seq のデータを統合して横断的オミクス解析を行った。

その結果、Fezf2により発現制御される遺伝子は、Aireにより発現制御される遺伝子よりも、クロマチンが活性化型修飾に富んでおり、mTECでのmRNAの発現量が高いことがわかった。このことから、Fezf2による遺伝子発現制御とAireによる遺伝子発現制御の間には、エピジェネティックなレベルで異なることが明らかとなった。

そこで、Fezf2 と協調的に働くエピジェネティック制御分子を探索するため、Flag タグ¹²⁹をつけた Fezf2 タンパク質を培養細胞株に大量発現させて、免疫沈降-質量分析法を行った。その結果、Fezf2 と結合するクロマチンリモデリング分子 Chd4 を同定した。さらに、実際に mTEC において Fezf2 と Chd4 が相互作用しているかどうかを調べるために、CRISPR-Cas9をもちいて Flag タグ付きの Fezf2 タンパク質を発現する遺伝子改変マウスを作成した。このマウスの胸腺を使って、免疫沈降-ウエスタンブロット法を行ったところ、Fezf2 と Chd4の相互作用が確認され、Fezf2 は NuRD 複合体¹³⁰として機能していることが明らかとなった。

次に、mTECでChd4を欠損する遺伝子改変マウス(Chd4 cKO)を作成し、Fezf2を欠損する遺伝子改変マウス(Fezf2 cKO)とともに、それぞれのマウスのmTECでの遺伝子発現プロファイル(RNA-seq)とクロマチンの状態(ATAC-seq)について検討した。その結果、どちらのマウスのmTECでもプロモーター領域のクロマチンのアクセシビリティが低下していた(図 2-29A)。このことから、Fezf2と Chd4 が協調的にプロモーター領域近傍のクロマチン構造を制御し、末梢組織自己抗原遺伝子の発現制御を行っていることがわかった。一方、Chd4と結合しない Aire により発現が誘導される遺伝子の30%以上が Chd4に依存して発現することから、両者の関係を調べたところ、Chd4と Aire は協調的にスーパーエンハンサー¹³¹のクロマチン構造を制御し、末梢組織自己抗原遺伝子の発現制御を行っていることが明らかとなった(図 2-29B)。すなわち Chd4は、Fezf2と Aireという2つの異なる転写制御因子に働きかけ、異なる遺伝子サブセットの発現制御に関わっていることが明らかとなった。mTECでChd4を欠損するマウスではmTECにおける末梢組織自己抗原の発現に異常が起きるため、胸腺での自己反応性 T 細胞の除去が妨げられることが予想されたが、実際に Chd4cKOマウス

¹²⁶ RNA-seq:細胞の中のmRNAの配列を網羅的に解読し、発現量の定量などを行う手法。

¹²⁷ ChIP-seq:ヒストンなどの特定の分子を認識する抗体を用いて免疫沈降し、その中から DNA 断片を抽出して、配列を網羅的に解読し、定量する方法。ヒストンメチル化などのエピジェネティックな修飾をゲノムワイドに調べることができる。

¹²⁸ ATAC-seq: クロマチンのアクセシビリティをゲノムワイドに評価する方法。オープンクロマチン領域 を網羅的に同定することができる。

¹²⁹ Flag タグ:人工的なポリペプチド標識。

¹³¹ スーパーエンハンサー領域:巨大なエンハンサー領域であり、H3K27ac などの活性化ヒストン修飾に対する ChIP-seq 解析などによって定義される。細胞種特異的遺伝子や疾患関連遺伝子の発現制御に関与していると報告されている。

の臓器では T 細胞の浸潤などの自己免疫疾患様症状が観察され、免疫寛容の破綻が起きていると考えられる(図 2-29C)。

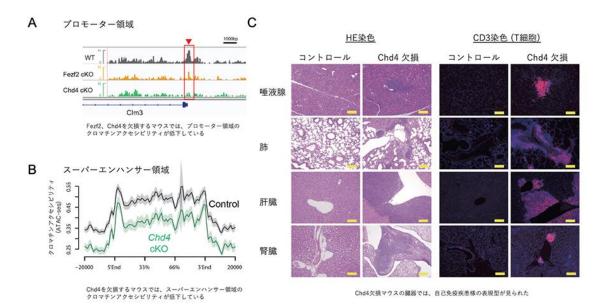
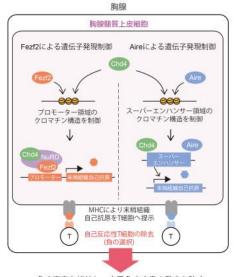


図 2-29 Chd4 は Fezf2、Aire と協調的に遺伝子発現を制御し、自己免疫疾患の発症を防ぐ¹³²

- A:欠損マウスの解析からFezf2とChd4はプロモーター領域で協調的に働いている。
- B: Chd4 欠損マウスの mTEC を用いて ATAC-seq 解析を行ったところ、スーパーエンハンサー領域でクロマチンアクセシビリティの低下が見られ、Chd4 はスーパーエンハンサー領域を介して Aire が制御する末梢組織自己抗原遺伝子の発現制御も行っている。
- C: 胸腺上皮細胞特異的 Chd4 欠損マウスでは、野生型マウス (コントロール) と比較して、炎症性細胞の浸潤(左)や T 細胞の浸潤(右)が見られた。

以上の結果から、クロマチン制御因子 Chd4 は転写因子 Fezf2 と結合して協調的にプロモーター領域のクロマチン構造を制御し、遺伝子発現制御を行う。一方で、Chd4 と転写制御因子 Aire はともにスーパーエンハンサー領域のクロマチン構造を制御し、遺伝子発現制御を行う。Chd4 は Fezf2 と Aire という 2 つの異なる転写制御因子それぞれに働きかけ、異なる末梢組織自己抗原サブセットの発現を制御し、自己免疫疾患の発症を防いでいることが明らかとなった(図 2-30)。

 $^{^{132}}$ AMED プレスリリース https://www.amed.go.jp/news/release_20200630-02.html 図 1_{\circ}



免疫寛容を維持し、自己免疫疾患の発症を防ぐ

図 2-30 胸腺内の T 細胞の選別に必須なタンパク質 Chd4 のはたらきのまとめ¹³³

(7) 胸腺髄質線維芽細胞による中枢性免疫寛容[33]

前項では、胸腺髄質上皮細胞がさまざまな組織で機能しているタンパク質を「末梢組織自己抗原」としてクロマチン制御因子 Chd4 により発現する機構が明らかにされたが、本研究では胸腺髄質の線維芽細胞が自己抗原を提示して中枢免疫寛容に関与することが明らかになった。

胸腺は、さまざまなストロマ細胞 134 が立体的なメッシュワーク構造を形成し、胸腺内の空間は、おおまかに外側の皮質と、内側の髄質に分けられ、それぞれの領域には胸腺上皮細胞 (皮質上皮細胞と髄質上皮細胞)が存在する。特に、髄質上皮細胞はさまざまな自己抗原を発現し、未熟 T 細胞に提示することで、自己反応性 T 細胞を細胞死によって取り除き (図 2-31A)、自己免疫を防ぐはたらきをもつことが知られている。

胸腺には、胸腺上皮細胞以外にも、血管内皮細胞や線維芽細胞といったストロマ細胞が存在する。線維芽細胞は、胸腺臓器の表面を覆う単層の皮膜と、髄質に局在する(図 2-31B)。 髄質の線維芽細胞は、髄質上皮細胞と同じような立体的なメッシュワーク構造をとるが、その機能は不明だった。これまでに線維芽細胞の機能を詳しく解析した研究は少なく、皮膜と 髄質の線維芽細胞を分けて単離することもできなかった。線維芽細胞は、従来、動物体内に 広く存在し、体を構成する個性のない細胞と思われてきたが、近年、臓器ごとに異なる性質 をもち、さまざまな生命現象に重要な役割を担うことが注目されるようになった。

そこで、胸腺の髄質に存在する線維芽細胞の性質を理解し、T細胞の選択における役割を明らかにすることをめざし、胸腺の皮膜と髄質の線維芽細胞を分離する手法を開発した。マウスの胸腺をタンパク質分解酵素で段階的に処理することで、外側に位置する皮膜線維芽細胞と、内側に存在する髄質線維芽細胞を物理的に分け、それぞれに発現する分子マーカー

 $^{^{133}}$ AMED プレスリリース https://www.amed.go.jp/news/release_20200630-02.html 図 2_{\circ}

¹³⁴ ストロマ細胞:間質細胞・実質細胞とも呼ばれ、組織の構造と機能を支える役割を果たす。

を探索した。その結果、DPP4 (Dipeptidyl Peptidase-4) が皮膜線維芽細胞に特異的に発現しているのを見出し、DPP4 の発現を指標にして、皮膜と髄質の線維芽細胞を区別できることがわかった(図 2-31C)。これによって、フローサイトメーターを用いて皮膜と髄質の線維芽細胞を識別・単離し(図 2-31D)、他の細胞との間で特徴を比較することが可能になった。皮膜と髄質の線維芽細胞の遺伝子発現を調べると、異なる発現パターンを示し(図 2-31E)、胸腺内の他のストロマ細胞や、他のリンパ組織の線維芽細胞とも異なる特徴をもつことがわかった。また、皮膜線維芽細胞はシャーレの上で平面培養できるのに対し、髄質線維芽細胞は培養できないこともわかった。

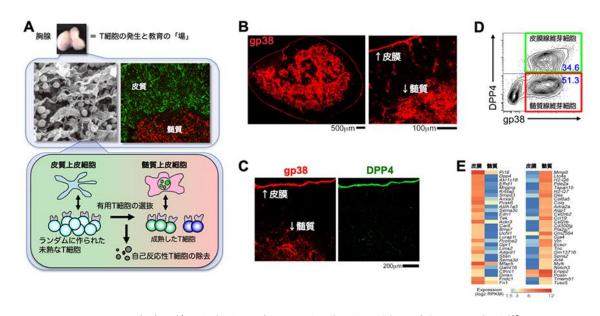


図 2-31 胸腺の線維芽細胞サブセット(亜集団)の単離と遺伝子発現解析135

- A. 胸腺は立体的なメッシュワーク構造をとるストロマ細胞からなる。(写真左はマウス胸腺の電子顕微 鏡像、写真右は皮質上皮細胞マーカー(CD205)と髄質上皮細胞マーカー(Keratin14)によるマウス胸 腺切片の免疫染色像)。
- B. 線維芽細胞マーカー(gp38)によるマウス胸腺切片の免疫染色画像。
- C. 皮膜と髄質の線維芽細胞を区別できるマーカー分子 DPP4(別名 CD26)を同定した。DPP4 は皮膜線維芽細胞に発現するが、髄質線維芽細胞には発現しない。
- D. フローサイトメーターで、gp38 と DPP4 の発現を指標として線維芽細胞サブセットを分離した。
- E. 皮膜と髄質の線維芽細胞は異なる遺伝子発現パターンを示した。

髄質線維芽細胞の機能成熟には、成熟 T 細胞が必要であることがわかった。成熟 T 細胞は TNF ファミリーリガンドであるリンホトキシンを発現しており、その受容体であるリンホトキシン β 受容体(LT β R) 136 は髄質線維芽細胞に高発現することを見出した。そこで、LT β R を線維芽細胞特異的に欠損するマウスを作製し、髄質線維芽細胞への影響を調べた。その結果、LT β R の欠損によって髄質線維芽細胞の数が減少し(図 2-32A)、髄質線維芽細胞に

¹³⁵ AMED プレスリリース https://www.amed.go.jp/news/release_20200825-01.html 図 1。

 $^{^{136}}$ LT β R: TNF ファミリーに属するサイトカインであるリンホトキシン(lymphotoxin)の受容体。リンホトキシンおよび LT β R は、リンパ節の発生に重要な役割を果たすことが知られている。

特徴的な遺伝子の発現が顕著に低下している (図 2-32B) ことがわかり、LT β R シグナルは髄質線維芽細胞の生成と機能成熟に重要であることがわかった。また、このマウスでは、末梢組織に対する自己抗体産生やリンパ球の浸潤といった自己免疫病態がみられた (図 2-32C)。さらに、これらのマウスでは、髄質線維芽細胞で発現が低下した遺伝子産物に対する自己抗体ができていることが示された (図 2-32D)。すなわち、髄質線維芽細胞は胸腺内の未熟 T 細胞に対して自己抗原を提示することで、自己反応性 T 細胞を除去し、免疫自己寛容を誘導していることが示唆された。また、線維芽細胞特異的 LT β R 欠損マウスでは髄質上皮細胞の数が減少していた (図 2-32E)。一方、髄質上皮細胞を欠損するマウスでは髄質線維芽細胞の数に変化がみられなかった。これらの結果から、髄質線維芽細胞は髄質上皮細胞よりも上位に位置するストロマ細胞であり、髄質上皮細胞の分化や維持を制御することが示唆された。

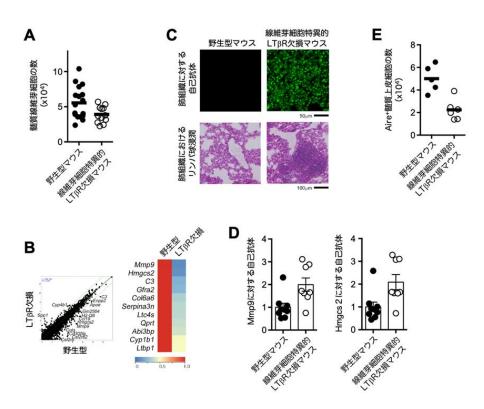


図 2-32 髄質線維芽細胞は自己免疫の抑制に重要137

- A. 線維芽細胞特異的 LT β R 欠損マウスでは、野生型マウスに比較して髄質線維芽細胞の数が減少する。
- B. 同LTβR欠損マウスでは、髄質線維芽細胞に特有の遺伝子群の発現が低下する。
- C. 同 LT β R 欠損マウスは、末梢組織において自己免疫病態を呈する。(上)緑色は血清中の自己抗体が 肺組織に結合。(下)紫色に染まったリンパ球が肺組織中に浸潤している。
- D. 同 LT β R 欠損マウスの血清中には、髄質線維芽細胞で発現が低下した自己抗原に対する自己抗体が増加している。
- E. 同 LT β R 欠損マウスでは、Aire 陽性髄質上皮細胞の数が減少する。Aire は髄質上皮細胞に発現する 転写調節因子であり、自己反応性 T 細胞の除去に重要な役割を果たす。

¹³⁷ AMED プレスリリース https://www.amed.go.jp/news/release_20200825-01.html 図 2。

本研究において、胸腺髄質の組織形成や T 細胞選択に関わる新たな胸腺ストロマ細胞として、髄質線維芽細胞を見出した。髄質線維芽細胞は、胸腺上皮細胞の分化を制御するとともに、胸腺上皮細胞とは異なる自己抗原を発現することで、自己反応性 T 細胞の除去に寄与することがわかった(図 2-33)。これらの知見は、胸腺の組織形成や T 細胞選択の基本原理の解明、さらには自己免疫疾患の原因解明や治療法開発につながると期待される。

髄質線維芽細胞は胸腺の基本構造を構成するストロマ細胞群のひとつであり、本研究成果は胸腺の発生や加齢・ストレスに伴う退縮のメカニズムの解明という観点からも重要である。また、本研究から得られた線維芽細胞の遺伝子発現や分化制御機構に関する知見は、生体内のさまざまなタイプの線維芽細胞の機能や関連疾患の治療研究にも応用できると期待される。

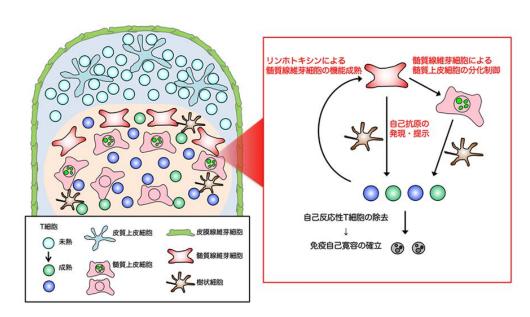


図 2-33 胸腺ストロマ細胞の全容と髄質線維芽細胞の機能の概念図138

2.3 プロジェクト参加研究者の活動状況

期限付きプロジェクトでは、研究終了時に多数のメンバーの雇用継続、就職先の確保が課題であるが、本プロジェクトではプロジェクト終了に向けて論文執筆を進め、数多くの評価の高い論文を発表しており、本プロジェクトに参加した多くの研究者が新たなアカデミックポジションを得ている。また、これら若手研究者の多くが、複数の研究助成金を得て研究活動を続けており¹³⁹、研究者の育成やキャリア支援においても十分に実績を上げている。

研究総括自身は、科研費特別推進研究「骨免疫学の推進による新たな生体制御システムの理解」(2015年度~2019年度)、AMED「RANKL 低分子阻害剤による疾患制御の展開に向けた検証研究」(2015年度~2017年度)、最近では、AMED-CREST「組織修復型免疫細胞の解明とその制御による疾患治療の開発」(2019年度~2024年度)、AMED 免疫アレルギー疾患実用化

 $^{^{138}}$ AMED プレスリリース https://www.amed.go.jp/news/release_20200825-01.html _ 図 3_{\circ}

¹³⁹ 本調査報告巻頭のまとめ図(展開図)参照。

研究事業「関節リウマチの病原性間葉系細胞サブセットを標的とした骨破壊治療法の開発」 (2020 年度~2022 年度)など複数のプロジェクトの研究代表者として本プロジェクトの発展 を含んだ研究を活発に続けている。

オステオネットワーク解析グループでは、古賀(根岸)貴子は、昭和大学歯学部講師として転出したあと、東京大学医科学研究所附属国際粘膜ワクチン開発研究センター特任准教授に就任した。現在、骨と脳神経系の連携の解明を目指して、科研費挑戦的研究(開拓)「認知症と骨粗しょう症を同時に制御できる方法の開発基盤」(2020年度~2023年度)に研究代表者として取り組んでいる。住谷瑛理子は、日本学術振興会特別研究員に採用された後、九州大学生体防御医学研究所助教(澤研究室)の職を得た。高場啓之は、東京大学大学院医学系研究科特任助教に就任後、東京大学大学院医学系研究科病因・病理学専攻免疫学講座助教に就任した。現在、科研費基礎研究(B)「自己免疫寛容を司る T 細胞の選別原理の解明」(2020年度~2023年度)などに研究代表者として取り組んでいる。

オステオイムノロジーグループでは、岡本一男は、東京大学大学院医学系研究科特任准教授に昇任後、同研究科の骨免疫学寄付講座の特任准教授に昇任し、独立の研究室を持ち、骨免疫学研究の発展を目指して、科研費基礎研究(B)「膜型 RANKL と可溶型 RANKL の生理的・病理的機能の解明」(2018 年度~2020 年度)などに研究代表者として取り組んでいる。寺島明日香は、日本学術振興会特別研究員に採用された後、東京大学大学院医学系研究科骨免疫学寄付講座特任助教に就任した。現在、AMED 難治性疾患実用化研究事業(若手枠)「進行性骨化性線維異形成症における免疫反応に着目した異所性骨化メカニズム解明」(2018 年度~2020 年度)に研究代表者として取り組んでいる。小松紀子は、東京大学大学院医学系研究科特任助教から、同研究科免疫学講座助教の職を得た。科研費挑戦的研究(萌芽)「関節リウマチの骨破壊の病態解明と画期的な治療法の開発」(2018 年度~2019 年度)などに研究代表者として取り組んだ。

オステオサイト・マウスジェネティクスグループの中島友紀は、本プロジェクトで骨細胞の分離培養とその機能の解明に貢献した後、プロジェクト途中の2013年に「さきがけ」に採用され、「運動器の動的恒常性を司るロコモ・サーキットの解明」(2013年度~2016年度)に取り組み、東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科生体支持組織学講座分子情報伝達学准教授から教授に昇進した。その後も、様々な骨疾患や全身性疾患の革新的な治療戦略を確立することを目指して、骨の動的な恒常性の維持機構と破綻メカニズムを理解し、骨を構成する細胞の機能を生体レベルで明らかにすることに取り組み、AMED-CREST「骨恒常性を司る骨細胞のメカノ・カスケードの解明」(2015年度~2020年度)に研究代表者として取り組んでいる。林幹人は、中島の研究室の助教のポストを得て、AMED PRIMEに「加齢に伴うオステオカインの変化がもたらす個体機能低下機構の解明」(2019年度~2022年度)が採択され、独自の研究に取り組んでいる。

澤新一郎は、本プロジェクトへの参加前から、腸管などの粘膜における自然免疫細胞 ILC に注目し ILC3 を発見していた。本プロジェクト終了後も、AMED-PRIME に「新生児腸内細菌 叢形成メカニズムの解明」(2016 年度~2019 年度)が採択され、腸内細菌叢の研究に取り組み、一時、北海道大学遺伝子病制御研究所准教授を経たあと、九州大学生体防御医学研究所

教授に就任した。その後も、ILC3 とヒトの疾患の関係の解明をめざして、AMED-PRIME「活性型自然リンパ球による腸管免疫寛容に関する研究」(2019年度~2022年度)、科研費基礎研究(B)「ILC3による液性免疫制御機構の解明」(2019年度~2022年度)に取り組んでいる。

2.4 第2章まとめ

本プロジェクト終了後の研究の発展を要約すると以下のようになる。

オステオカイン研究の展開では、エストロゲンによる Sema3A 発現制御機構と骨量維持について検討し、エストロゲンによって骨細胞の Sema3A の発現が制御され、その Sema3A が骨細胞自体に作用して細胞の生存を維持していることを明らかにした^[20]。

一方、がんの骨転移に RANKL が関与しているのではないかとの考察のもと、骨芽細胞が産生する可溶型 RANKL ががんの骨転移において重要な役割を果たし、がん細胞は可溶型 RANKL の刺激を受けることで、骨へ引き寄せられ、骨転移が誘導されることを示した^[21]。本研究の展開として、乳がん細胞株を移植したマウスに RANKL 低分子阻害剤 AS2676293 を経口投与すると、骨転移が有意に抑制され、マウスの生存日数が延長することを明らかにした^[22]。

また、骨芽細胞が作る RANKL のデコイ受容体として知られる Osteoprotegerin (OPG) が、胸腺では髄質上皮細胞により、腸では腸管上皮細胞により産生され、骨、胸腺、腸の局所で限定的に産生された OPG が、産生された組織内で RANKL システムを制御することを明らかにした[23]。

骨免疫学の展開では、RANKL を発現する間葉細胞によって腸管上皮 M 細胞が誘導されることを示し、M 細胞を誘導する新規間葉系細胞を見出し、M 細胞により腸内細菌叢への IgA 産生が誘導され、腸内細菌叢の多様性が維持されていることを明らかにした [24]。一方、マウス歯周炎モデルを用いた解析から、歯周炎と同じく代表的な炎症性骨疾患である関節リウマチにおいて悪玉と考えられてきた免疫細胞 exFoxp3Th17 細胞が、口腔細菌依存的に歯周組織に集積し、感染制御に重要な役割を果たすことを明らかにした [25]。また、IL-17 産生 T細胞におけるチロシンキナーゼ Syk の関与について詳しく調べ、 γ δ T17 細胞の分化に Syk-PI3K シグナル経路が必須であることを示した [26]。

骨形成制御に関する研究の展開として、歯列矯正における歯の移動機構について検討し、矯正の力学的ストレスにより骨細胞が RANKL を産生し、歯槽骨表面に破骨細胞が集中し骨のリモデリングが起こって歯が移動することを示した^[27]。また、強く噛むことにより顎の骨に含まれる骨細胞が生理活性物質の発現を制御することで、顎の骨の形を噛む力に耐えられるように造り変えること、すなわちメカニカルストレスが骨細胞を活性化する機構を明らかにした^[28]。さらに、システム系の研究者と共同で、骨のリモデリングの過程を詳細に観察できるシミュレーション実験基盤の開発を行った^[29]。

免疫制御に関する研究の展開として、アルギニンメチル化酵素 PRMT5 が RNA スプライシングの制御因子 SmD3 タンパク質をアルギニンメチル化修飾することで、 γ c 鎖と JAK3 の pre-mRNA スプライシングを制御していることがわかり、末梢 T 細胞の維持、iNKT 細胞分化において重要な機能を果たすことを示した [30]。

一方、自己免疫と中枢免疫寛容に関する研究を展開した。プロテアソーム因子の遺伝子多型に機能欠損型の variation が高頻度に存在し、それが CD8T 細胞レパトアと疾患感受性に影響を与えること、また、その一つがシェーグレン症候群と関係することを明らかにした [31]。最近では、クロマチン抑制因子 Chd4 が Fezf2 と Aire という 2 つの異なる転写制御因子と協調的に働くことによって、多様な末梢組織自己抗原の遺伝子発現を制御することにより中枢免疫寛容に関与し、自己免疫疾患の発症を防ぐことを明らかにした [32]。 さらに、胸腺の髄質線維芽細胞を分離し、線維芽細胞も自己抗原を発現することにより免疫寛容に関わるとともに、胸腺の髄質上皮細胞の分化にも関わることを発見し [33]、中枢免疫寛容に関する研究を大きく進展させた。

これらの成果は、プロテオーム解析技術、トランスクリプトーム解析技術等最先端技術を駆使して、網羅的な機能スクリーニングから特定の性質を持つことが示唆される分子を同定し、さらに、組織特異的、細胞特異的な遺伝子改変マウスの作製を短時間に成し遂げ、*in vivo* 検討を加えるという、プロジェクト期間中から一貫した一連の極めて高いレベルにある技術に支えられた。

以上まとめると、本プロジェクト期間中は骨免疫学に集中して成果を上げた後、プロジェクト期間終了後はより深く、骨と他臓器のネットワークに注目し、研究総括や各グループリーダーを中心として本プロジェクトの発展が図られ、オステオカイン研究の展開、がんの骨転移への展開、骨免疫学の展開、骨形成制御および免疫制御に関する研究の展開などで顕著な成果を上げた。骨を中心とした研究から RANKL や T 細胞の研究を通じて本格的な免疫学の問題にチャレンジして成果をあげ、また、腸管細胞や腸の細菌叢、口腔内細菌叢の研究に、また力学ストレスによる歯の移動や、骨細胞の活性化の研究に、また、がんの骨転移の研究に発展するなど、裾野の広い研究領域を構築した。

(注)なお、本調査終了後にNature Metabolism^[34]への論文掲載とその報道が2件あった。 高柳らは、個々の細胞の遺伝子発現を網羅的に解析できる「シングルセル解析技術」等を用いて、破骨細胞が形成される仕組みを1細胞レベルで解き明かすことに成功した。骨代謝システムの基本原理の理解を深めると同時に、骨粗しょう症やリウマチなどの骨破壊性疾患の原因解明や治療法開発につながることが期待される。

また、Journal of Bone and Mineral Metabolism に総説 2 報が^{140,141}、Frontiers in Immunology に総説が掲載された¹⁴²。

142 Nitta T and Tkayanagi H, Front Immunol, 2021. doi.org/10.3389/fimmu.2020620894.

¹⁴⁰ Takayanagi H, J Bone Miner Metab, 2021. doi.org/10.1007/s00774-020-01191-1.

¹⁴¹ Okamoto K, J Bone Miner Metab, 2021. doi.org/10.1007/s00774-020-01182-2.

第 3 章 プロジェクト成果の波及と展望

3.1 科学技術への波及と展望

3.1.1 新規な概念の提唱

運動器の主な構成要素である骨と筋肉はこれまで、さまざまな臓器や細胞が産生するホ ルモンやサイトカインなどの因子により、制御される受動的な臓器であると考えられてき た。研究総括らは 2000 年に T 細胞と破骨細胞が RANKL と IFN-γ を介してクロストークする という先駆的研究を発表し143、この研究を紹介、解説して、米・ロックフェラー大学の Arron と Choi が「骨免疫学」という新しい研究領域を示す用語を提唱141した。それ以来、研究総 括は骨免疫学を中心にして活発に研究を続け、その実績の上に立って、本プロジェクトを計 画し、新たに「オステオネットワーク」と名付け、骨免疫学の展開から骨と他臓器のネット ワークの解明を図った。プロジェクト終了後も研究をさらに深化させ、この新しい概念の研 究領域を発展させることに貢献している。

本プロジェクトおよび本プロジェクトから展開した研究によって、骨格系と免疫系はさ まざまな制御分子を共有する他、骨髄微小環境や関節リウマチにおける炎症滑膜など、生理 的および病的環境下において常に相互に影響し合う関係にあり、「骨免疫システム」と呼ぶ べき複雑な制御系を築き上げていることがわかってきた。

研究総括らは、脊椎動物が海から陸へと進出した際に、海水から供給されていたカルシウ ムを体内に蓄え、陸上で体を支え運動するために骨格系が発達したのと同時に、紫外線から 造血部位を保護しつつ、陸上病原体に対抗するために造血系・免疫系が骨髄中で高度に発達 したことにより、骨と免疫は進化的に結びついた可能性を提唱している(図 3-1)。骨免疫学 は、こうした免疫系と骨の相互作用や共通制御機構を扱う新規学際領域であり、研究総括ら によって、網羅的で総合的な総説が発表されている145。当領域の今後の発展が期待される。 研究総括らはこの一連の研究活動と概念のアウトリーチ活動として、学会発表の他、日本免 疫学会主催の一般公開シンポジウムなどでの講演や情報公開を行い、本プロジェクトの重 要性が認識された。また、2014年に日本骨免疫学会を新たに立ち上げ、理事長として活躍 している。

¹⁴⁴ Arron JR, Choi Y, Nature, 408, 535, 2000.

¹⁴³ Takayanagi H et al, Nature, 408, 600, 2000.

¹⁴⁵ Tsukasaki M, Takayanagi H, Nat. Rev. Immunology, 19, 626, 2019.

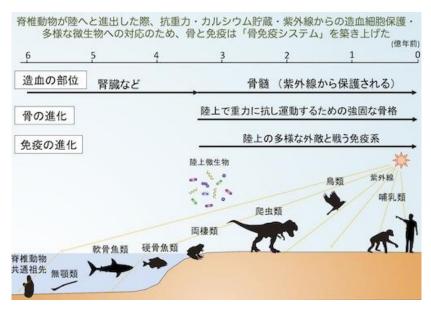


図 3-1 骨免疫システムの誕生と生命の進化146

本プロジェクトと並行して、近年、骨の産生分子オステオカルシンや筋肉が産生する分子種マイオカインが、全身のエネルギー代謝に関与し糖尿病や肥満などに関与したり、腎臓や腸管に作用し全身のミネラル代謝を制御したりすること、さらには摂食や高次脳機能にも直接作用することも明らかにされてきた。したがって、骨と筋肉を運動器の一部として考えるだけでなく、遠隔制御因子の産生臓器と位置づけ、生命システムの連環機構において能動的な役割を担って他臓器と相互作用していることを理解する取り組みが普及し、今後ますます重要になってくると考えられる。

3.1.2 骨免疫学、オステオネットワーク領域への貢献

本プロジェクト期間中には、従来極めて難しいとされてきた骨細胞の単離培養法を確立し、骨細胞が破骨細胞分化因子 RANKL を強力に発現していることを見出した。さらに、骨細胞特異的な RANKL 欠損マウスの作製から、骨細胞が破骨細胞を分化誘導し骨リモデリングの開始を司っていることを明らかにした[15]。この知見は、骨細胞と破骨細胞の細胞間ネットワークによって骨リモデリングが制御されていることを生体レベルで実証した報告であり、これまでの骨代謝学の概念を一新する研究成果として、国内外で注目されている^{147,148}。

また、これら骨形成系細胞(骨細胞、骨芽細胞)を大量培養することで得られる培養上清から、破骨細胞の機能解析を展開し新規の骨保護分子 Sema3A を同定した^[2]。 Sema3A は骨破壊を抑制し、骨形成を促進する骨保護作用を有することを明らかにし、国際的にも注目された 149,150。並行して、破骨細胞が産生する Sema4D が骨形成に抑制的に働くことを明らかにする

¹⁴⁶ 高柳研 HP http://www.osteoimmunology.com/index.html

¹⁴⁷ Wilson C, Nat Rev Endocrinol, 7, 693, 2011.

 $^{^{148}}$ Killock D, Nat Rev Rheumatol, 7, 619, 2011.

¹⁴⁹ Zaidi M, Iqbal J, Nature, 485, 47, 2012.

 $^{^{150}}$ Tse MT, Nat Rev Drug Discov, 11, 442, 2012.

など、新たなオステオカインの同定で成果を上げた。Sema3A タンパク質や抗 Sema4D 抗体の 臨床効果が期待できるまでの薬理効果を動物で確認し、骨量減少性疾患に対する新しい創 薬ターゲットを提示した。

また、骨と免疫のネットワークでは、炎症性骨破壊に関わる exFoxp3Th17 細胞の存在と関節リウマチにおける役割、骨芽細胞が産生する IL-7 によるリンパ球共通前駆細胞の維持、骨と脂肪代謝に介在する連関の解明など、病態理解に関わる重要な新発見を相次いで行った。

プロジェクト期間終了後も、研究総括や各グループリーダーを中心として骨免疫学の領域をより広く捉え、本プロジェクトの発展が図られ、2.4 第2章まとめに示したように、オステオカイン研究の展開、骨免疫学の展開、骨形成制御および免疫制御に関する研究を展開し、顕著な成果をあげた。骨を中心とした研究からT細胞の研究を通じて本格的な免疫学の問題にチャレンジして成果をあげ、中枢免疫寛容に関する多くの重要な発見をした。また、RANKLやT細胞の研究からがんの骨転移、腸管細胞や腸の細菌叢、口腔内細菌叢の研究および、力学ストレスによる歯の移動や、骨細胞の活性化の研究に発展するなど、裾野の広い研究領域を構築して多くの成果をあげた。

本プロジェクト期間中は骨免疫学と骨と免疫系のネットワークを中心に研究を行って成果をあげ、プロジェクト期間終了後はより深く、骨と他臓器のネットワークに注目し、より広範な問題の解明に取り組み、多くの顕著な成果をあげ、オステオネットワークの領域を充実させつつある。

3.1.3 科学技術への波及のまとめと展望

本プロジェクトは、従来、脊椎動物の運動器としての位置づけであった骨が、生体制御をはじめとする多様な生命現象に深く関わるという仮説のもとに、臓器間相互作用の制御を担うオステオカインの同定とその機能解析によるオステオネットワークの解明を目的とし、骨免疫学、骨代謝、免疫学領域の研究を展開した。海外でも骨の産生するタンパク質が神経細胞等に作用することが報告されるなど^{151,152}(表 3-1)、世界的にこの分野の競争が激しくなっている中、本プロジェクトで見出された新知見は、国際的なトップジャーナルに掲載され、骨を中心とする生体制御系への関心を高めた。

本プロジェクト期間中オステオネットワークに関する研究は、骨と免疫系に比較的限定されていたが、終了後の研究ではより広範な研究に広がりをみせ、オステオネットワークという新たな領域を開きつつある。また、本プロジェクト期間中および終了後の研究における中枢免疫寛容に関する分子、細胞の解明は、中枢免疫寛容の研究の進展に寄与し、これまでわかっていなかった自己免疫疾患の病因の解明にも貢献することが期待される。一連の研究で解析対象として浮かび上がった分子の多くは、多様な機能を持っており、本研究の成果は骨に留まらず、多様な組織・臓器の研究に影響を及ぼすとともに、関連する多様な研究領域の発展をもたらすことが期待される。

¹⁵¹ Karsenty G, Endocr Pract, 23, 1270, 2017.

¹⁵² Bonnet N, Calcif Tissue Int, 100, 174, 2017.

なお、本プロジェクトでの研究成果と関連・類似研究との対比および発展状況を、海外の関連医薬開発状況も含めて、表 3-1 に示した。

表 3-1 本プロジェクトでの研究成果と関連・類似研究との対比、発展

表 3- 項 目	1 本ノロンエクトでの研究成果と関連 本プロジェクトの研究	関連・類似研究技術、発展
他臓器ネットワーク	骨免疫学・オステオネットワーク全般 骨と免疫、骨と他臓器相互作用の提唱 研究総括による総説: Tsukasaki M, Takayanagi H, Nat Rev Immunol, 19, 626-42, 2019.	 ・骨の産生する制御因子が糖尿病などに影響を与える Lee NK et al, Cell, 130, 456, 2007. ・骨が産生する FGF23 が腎臓機能を制御する(東大・福本ら) Urakawa I et al, Nature, 444, 770, 2006. ・Osteocalcin 中心の臓器間コミュニケーションの研究: 総説 Karsenty G, Cell, 164, 1248, 2016. ・筋肉産生分子 Myokine と他臓器相互作用: 総説 Pedersen BK et al, Nat Rev Endocrinol, 8, 457, 2012. 総説 Pedersen BK, Nat Rev Endocrinol, 15, 383, 2019.
①オステオカインの研究	オステオカインの同定 ・Sema4D: 破骨細胞が産生する骨形成抑制因子 ・Sema3A: 骨芽細胞が産生する骨リモデリング因子 ・IL-7: 骨芽細胞が産生する骨髄造血制御因子 オステオカイン研究の展開 ・エストロゲンによる Sema3A 経由骨量維持・先行研究: 骨の RANKL ががんの骨転移を誘発(中島 Penninger の共同、Nature, 2006)・がん骨転移における骨芽細胞が産生する可溶型 RANKL の役割・RANKL 低分子阻害剤による骨転移抑制・Osteoprotegerin の骨、胸腺、腸での役割	 ・神経系で semaphorin の研究蓄積(大阪大・医・熊ノ郷淳) (共同研究)Hayashi M et al, Nature, 485, 69, 2012. ・感覚神経が Sema3A を通じて骨の健康維持に重要(慶応大・竹田ら) Fukuda T et al, Nature, 497, 490, 2013. ・Sclerostin の発見 Winkler DG et al, EMBO J, 22, 6267, 2003. ・抗 Sclerostin 抗体: 日米欧で 2019 年骨粗しょう症に承認(Amgen) 総説: Okazaki R, Clin Calcium, 21, 94, 2011. ・北-7 関係(京大ウイルス研・生田宏一) (共同研究)Terashima A et al, Immunity, 44, 1434, 2016. ・骨芽細胞が産生する osteocalcin を介する肺がんの促進 Engblom C et al, Science, 358, 6367, 2017. ・抗 RANKL 抗体: 骨粗しょう症等に 2010 年米欧で承認(Amgen) 2013 年に国内承認。保田, 日本臨床免疫学会誌, 36, 209, 2013. ・抗 RANKL 抗体は上記と独立に別名称、別用量で固形癌骨転移等の適応で 2012 年に国内承認を得た ・RANKL に対する低分子阻害剤: AMED プロジェクトとしてがん転移と多発性硬化症への薬効の確認などが得られたが、医薬の開発化合物としては完成度が高くなく中断 ・可溶性 RANKL のがん診断マーカーとしての利用: 可能性はあるがまだ研究段階
②骨免疫学の展開	骨免疫学の深化・発展 ・関節リウマチの発症の鍵となる T 細胞 (exFoxp3Th17 細胞) ・抗原・抗体複合体による骨粗しょう症発症 ・滑膜線維芽細胞が産生する RANKL による骨破壊 ・破骨細胞分化制御と骨吸収メカニズム (Btk が破骨細胞の分化に必須) ・IL-17 産生 T 細胞の骨再生イニシエーターとしての機能 骨免疫学の展開 ・RANKL 発現間葉細胞による腸管上皮 M 細胞の誘導 ・exFoxp3Th17 細胞の口腔細菌感染防御への関与 ・IL-17 産生 T 細胞におけるチロシンキナーゼ Sykの関与	・exFoxp3Th17 細胞の研究(米 UCSF・Bluestone) (共同研究)Komatsu N et al, Nat Med, 20, 62, 2014. ・免疫複合体 FC 受容体(東北大・高井俊行) (共同研究)Negishi-Koga T et al, Nat Commun, 6, 6637, 2015. ・RANKL の同定: Tsuda E et al, BBRC, 23, 137, 1997., Yasuda H, Endcrinology, 139, 1329, 1998., Simonet WS et al, Cell, 89, 309, 1997. ・RANKL 関係の一連の研究(オーストリア IMBA, Josef Penninger 共同研究 5 報) ・滑膜線維芽細胞の RANKL 産生(ギリシャ・フレミング研究所 George Kollia) (共同研究) Danks L et al, Ann Rheum Dis, 2016. ・炎症性破骨細胞前駆細胞の発見とその制御(大阪大学・石井優): Hasegawa T et al, Nat Immunol, 20, 1631, 2019. ・Btk 阻害剤 Ibrutinib: Celera→Pharmacyclics (Abbie) /J&J 白血病などに、米 2013 年、欧 2014 年、日 2016 年承認。 小野薬品、カルナバイオサイエンス等も Btk 阻害剤を開発中 ・Th17 細胞の誘導に関わる IL-12 と IL-23 の共通サブユニット p40を標的とした抗体製剤「usutekinumab」はカナダ 2008 年、米欧 2009 年、日 2011 年に承認、乾癬など(Centocor/Janssen-Cilag)・M 細胞の誘導に RANKL が関与: Mobbott NA et al, Mucosal Immun, 6, 666, 2013.

・粘膜での目然リンパ球 IL の発見	(澤らバスツール研 Eberl)Sawa S
et al, Science, 330, 665, 2010.	

・pre-TCRの情報伝達に Syk と ZAP-70 が関与: Cheng AM et al, Proc Natl Acad Sci usa, 94, 9797, 1997.

骨形成制御、免疫制御に関する研究の進展

- ・骨を作りかえる指令細胞(骨細胞)の発見
- ・骨形成脂肪代謝のバランスを制御する転写因 子 Maf
- ・自己免疫疾患を引き起こす遺伝子 I κ B ζ

成.

御

免

疫

制

御

に

関

す

研

究

മ

展

開

- ・自己免疫疾患を防ぐ遺伝子 Fezf2 の発見
- ・病原性 T 細胞による多発性硬化症発症の仕組み

骨形成制御、免疫制御に関する研究の展開

- ・歯形成制御における歯の移動機構
- ・メカニカルストレスが骨細胞を活性化する機構
- 骨リモデリングのシミュレーション
- ・アルギニンメチル化酵素のT細胞維持、NKT細胞分化における機能
- ・プロテアソーム因子の遺伝子多型とシェーグ レン症候群
- ・クロマチン抑制因子 Chd4 が免疫疾患の発症 を防ぐ
 - ・胸腺髄質線維芽細胞による中枢性免疫寛容

- ・骨細胞特異的 RANKL 欠損マウスが大理石病を呈する Xiong J et al, PLoS One, 10, e0138189, 2015.
- ・加齢により骨髄の細胞は骨芽細胞より脂肪細胞への分化に傾く: Gimble JM et al, J Cell Biochem, 98, 251, 2006.
- ・Aire は T 細胞の負の選択を制御する: Liston A et al, Nat Immunol, 4, 350, 2003.
- ・中枢神経組織への T 細胞の侵入にはケモカインの発現が必要: Reboldi A et al, Nat Immunol, 10, 514, 2009.
- ・矯正歯科治療における歯の移動に伴う骨吸収に骨細胞が関与する: Matsumoto T et al, J Dent Res, 92, 340, 2013.
- ・咬合負荷が少ないと下顎骨の骨量が減少する: Hichijo N et al, Plos One, 10, e0129290, 2015.
- ・骨リモデリングのシミュレーション(京大・安達泰治) (共同研究)Kameo Y et al, Sci Adv, 6, eaax0938, 2020.
- ・プロテアソームのサブユニットの変異が関節拘縮や筋萎縮を起こす: Agarwal A et al, Am J Hum Genet, 87, 866, 2010.
- ・Aire の結合因子が免疫寛容の制御に関与する: Abramson J et al, Cell, 140, 123, 2010.
- ・胸腺髄質上皮細胞が自己抗原を発現して中枢性免疫寛容に関与する: Takahama Y et al, Nat Rev Immunol, 17, 295, 2017.

本プロジェクトは世界に先駆けて、あるいは伍して、重要な研究成果を出し、時期を失せ ずトップジャーナルに発表している。

3.2 社会経済への波及と展望

3.2.1 社会経済への貢献の可能性

本プロジェクトの特徴のひとつとして、常に医療のニーズを把握した具体的研究テーマと、医薬創製の標的となり得る分子を対象として取り上げて研究を進め、応用可能性を論じていることがあげられる。以下にいくつかの例をあげる。

神経回路形成や免疫反応に関わることで知られていた Semaphorin family 分子のうち、 Sema4D が破骨細胞による骨芽細胞制御に関わること $^{[1]}$ 、また Sema3A は骨芽細胞から産生され、骨芽細胞自身と破骨細胞の両者に働きかけることで、骨吸収の抑制と骨形成の促進という 2 つの作用を有することを見出してきた $^{[2]}$ 。さらに、エストロゲン欠乏や加齢による Sema3A の骨量維持作用の低下が、閉経後骨粗しょう症や加齢性骨粗しょう症に寄与していることを明らかにした $^{[20]}$ 。 Sema4D や Sema3A は骨量減少疾患に対する新たな創薬ターゲットとして期待される。2 件の特許出願を行い、うち1 件は米国ベンチャーとライセンス契約した $^{[53]}$ 。

本プロジェクト以前に、研究総括らはチロシンキナーゼの Btk が破骨細胞の分化に必須であることを報告し¹⁵⁴、さらに本プロジェクト中で、米国で開発された Btk 阻害剤

¹⁵³ 終了報告書 p62。

¹⁵⁴ Shinohara M et al, Cell, 132, 794, 2008.

ibrutinib155が直接破骨細胞に作用することで骨吸収抑制することを示した[8]。現在、ibrutinib は慢性リンパ性白血病などリンパ腫白血病の治療薬として承認され発売されているが、将来関節リウマチ骨破壊の治療薬の候補になることも期待される。

Th17 細胞を標的とした抗体製剤や低分子阻害剤 156 が開発されているが、本プロジェクトでは、転写制御因子 $I \kappa B \zeta$ が Th17 細胞分化に重要であり、ROR 核内受容体との協調作用により IL-17 産生を誘導するという新規メカニズムを見出した $^{[17]}$ 。また、多発性硬化症のマウスモデルである実験的自己免疫生脳脊髄炎(EAE)の解析から、T細胞が発現する RANKL が、中枢神経組織への T細胞浸潤に重要であることを見出した $^{[19]}$ 。 Th17 細胞は RANKL を介して血管脳関門を構成するアストロサイトに作用することで、ケモカイン産生を誘導し、中枢神経組織へのさらなる免疫細胞浸潤を招くという機序を明らかにした。これらの研究成果から、RANKL に対する低分子阻害剤投与により EAE の発症が抑えられたため、RANKL を標的とした多発性硬化症を制御する医薬の開発が期待される。

近年 JAK に対する阻害剤が関節リウマチなどの自己免疫疾患に対する治療薬として注目を浴びている。本プロジェクトで見出したアルギニンメチル化酵素 PRMT5 は、RNA スプライシングの制御因子 SmD3 タンパク質をアルギニンメチル化修飾し、 γ c 鎖と JAK3 の pre-mRNA の効率的なスプライシングを促し、IL-2、IL-7、IL-15 といった T 細胞や iNKT 細胞に必須のサイトカインシグナルの強度を制御することから、PRMT5 は新しい創薬ターゲットになる可能性がある [30], 157。

また、自然免疫と獲得免疫の中間の役割を担う γ δ T 細胞の分化に Syk-PI3K シグナル経路が必須であることを見出したことから、Syk-PI3K 経路が炎症性疾患に対する有効な治療標的となる可能性がある [26], 158。

本プロジェクトでは、また、がんの骨転移に可溶型 RANKL が関与することを示し、一方、ヒトにおいて血清中の可溶型 RANKL の濃度が、乳がんの骨転移成立と相関することが報告されており、可溶型 RANKL は骨転移を予測できる血中バイオマーカーとして有用であることが示唆される。現在、RANKL に対する中和抗体が、骨粗しょう症や、がん骨転移による骨病変等の治療薬として用いられている¹⁵⁹。本プロジェクトでは RANKL の低分子阻害剤

Ibrutinib; Pharmacyclics 社(後に Abbie が買収)が創薬、J&J が開発、米国 2013 年、欧州 2014 年承認。国内は 2016 年承認販売(ヤンセンファーマ/Pharmacyclics)「イムブルビカ」、適応症は慢性リンパ性白血病、およびマントル細胞リンパ腫。

¹⁵⁶ Th17 細胞の誘導に関わっている IL-12 と IL-23 の共通サブユニットである p40 を標的とした抗体製剤「ustekinumab」は、カナダ 2008 年、米国・欧州 2009 年に承認された(Centocor/Janssen-Cilag)。国内は 2011 年承認販売(田辺三菱製薬)「ステラーラ」、適応:乾癬、クローン病、潰瘍性大腸炎。

¹⁵⁷ PRMT5 阻害剤は、GSK 社、Janssen Research 社などが、がんを対象に臨床試験を始めている(Clinical Trials.govによる)。

¹⁵⁸ Syk 阻害剤 Fostamatinib が、米国で 2018 年、特発性血小板減少性紫斑病: Idiopathic thrombocytopenic purpura(ITP)適応で承認された(Rigel Pharmaceuticals)。同機作のEntospletinib が血液がん対象に臨床試験を実施中(Gilead)。

¹⁵⁹ 抗 RANKL 抗体 Denosumab は米国で 2010 年、閉経後骨粗しょう症を適応として承認された (Immunex/Amgen)。その後国内では、低用量で「プラリア」(第一三共)として、骨粗鬆症および関節リウマチに伴う骨びらんの進行抑制に、高用量で「ランマーク」(第一三共)として、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および、骨巨細胞腫に対する治療薬として 2012 年に承認を受けている。総説:保田尚孝,日本臨床免疫学会誌,36,209,2013.

(AS2676293) が転移進行と骨組織の腫瘍進展を抑制することを明らかにした^[22]。がん免疫療法の開発が急速に進展する中、抗体製剤以外の RANKL シグナル標的薬も治療選択の幅を広げる一助となりうると考えられる。

3.2.2 社会経済への波及のまとめと展望

骨粗しょう症、関節リウマチは、骨に深刻なダメージを与える代表的な疾患であり、新規治療法の開発が切望されている。本プロジェクトでは、これらの疾患の新規治療・診断法の開発に繋がる病態解明を進め、創薬ターゲットが同定されており、臨床応用に近づくための成果が得られている。例えば、Sema4D に関しては、研究成果を基にした新規抗体医薬の開発が開始されている¹⁶⁰。また、老人性骨粗しょう症の発症・増悪に関わる因子がいくつか同定されている。一方、骨細胞の機能としてのメカニカルストレスセンサーの解明が進むことで、運動の効果や寝たきりの予防など、高齢化社会における健康寿命の改善に資することが期待できる。

骨形成促進剤、骨量増加に関する特許も出願されており、臨床応用への展開も視野にいれた研究を進めてきたと言える。自己免疫疾患分野での治療への貢献も期待でき、多発性硬化症や他の多くの疾患の治療へ繋がる可能性を持っている。

ただし、世界的には 2010 年に抗 RANKL 抗体、2019 年に抗スクレロスチン抗体¹⁶¹が骨粗しょう症を始めとするいくつかの疾患に承認を受け、現時点では実用化という観点からは先行を許している面がある。

日本は世界から注目される高齢化先進国であり、本プロジェクトから派生する高齢化対策、健康寿命の改善策は、新たな日本の産業力にも転換できるものと期待ができる。本プロジェクトは、当該分野の科学技術イノベーション創出に寄与していると判断できる。本研究成果が新たな疾患治療法・診断技術の開発や健康寿命延長に資することが大いに期待される¹⁶²。

¹⁶⁰ 抗 Sema4D 抗体については Vaccinex 社がハンチントン病、肺がん、アルツハイマー、多発性硬化症等を対象に治験を実施している (Vaccinex ホームページ)。

¹⁶¹抗 Sclerostin 抗体 Romosozumab, 日米欧で 2019 年に骨折の危険性の高い骨粗しょう症を適応として承認された (Celltech/UCB-Amgen)。国内では「イベニティ」(アステラス)。総説: Okazaki R, Clin Calcium, 21, 94, 2011.

¹⁶² 事後評価報告書から一部引用。

【引用文献】

- [1] Negishi-Koga T., Shinohara M., Komatsu N., Bito H., Kodama T., Friedel R.H., Takayanagi H.
 Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D
 Nature Medicine, 17 (11), pp. 1473-1480 (2011).
 DOI: 10.1038/nm.2489
- [2] Hayashi M., Nakashima T., Taniguchi M., Kodama T., Kumanogoh A., Takayanagi H. Osteoprotection by semaphorin 3A
 Nature, 485 (7396), pp. 69-74 (2012).
 DOI: 10.1038/nature11000
- [3] Terashima A., Okamoto K., Nakashima T., Akira S., Ikuta K., Takayanagi H. Sepsis-Induced Osteoblast Ablation Causes Immunodeficiency Immunity, 44 (6), pp. 1434-1443 (2016).

 DOI: 10.1016/j.immuni.2016.05.012
- [4] Komatsu N., Okamoto K., Sawa S., Nakashima T., Oh-Hora M., Kodama T., Tanaka S., Bluestone J.A., Takayanagi H.
 Pathogenic conversion of Foxp3 + T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis Nature Medicine, 20 (1), pp. 62-68 (2014).
 DOI: 10.1038/nm.3432
- Negishi-Koga T., Gober H.-J., Sumiya E., Komatsu N., Okamoto K., Sawa S., Suematsu A., Suda T., Sato K., Takai T., Takayanagi H.
 Immune complexes regulate bone metabolism through FcRγ signalling
 Nature Communications, 6, art. no. 6637, (2015).
 DOI: 10.1038/ncomms7637
- Danks L., Komatsu N., Guerrini M.M., Sawa S., Armaka M., Kollias G., Nakashima T., Takayanagi H.

 RANKL expressed on synovial fibroblasts is primarily responsible for bone erosions during joint inflammation

 Annals of the Rheumatic Diseases, 75 (6), pp. 1187-1195 (2016).

 DOI: 10.1136/annrheumdis-2014-207137
- [7] Hayashi M., Nakashima T., Kodama T., Makrigiannis A.P., Toyama-Sorimachi N., Takayanagi H.
 Ly49Q, an ITIM-bearing NK Receptor, Positively Regulates Osteoclast Differentiation
 Biochemical and Biophysical Research Communications, 393(3), pp. 432-438 (2010).
 DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.02.013
- [8] Shinohara M., Chang B.Y., Buggy J.J., Nagai Y., Kodama T., Asahara H., Takayanagi H.

 The orally available Btk inhibitor ibrutinib(PCI-32765) protects against osteoclast-mediated bone loss
 Bone, 60, pp. 8-15 (2014).

 DOI: 10.1016/j.bone.2013.11.025
- [9] Sumiya E., Negishi-Koga T., Nagai Y., Suematsu A., Suda T., Shinohara M., Sato K., Sanjo H., Akira S., Takayanagi H.
 Phosphoproteomic analysis of kinase-deficient mice reveals multiple TAK1 targets in osteoclast differentiation

Biochemical and Biophysical Research Communications, 463(4), pp. 1284-1290 (2015).

DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.06.105

[10] Nishikawa K., Nakashima T., Hayashi M., Fukunaga T., Kato S., Kodama T., Takahashi S., Calame K., Takayanagi H.

Blimpl-Mediated Repression of Negative Regulators is Required for Osteoclast Differentiation

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(7), pp. 3117-3122 (2010).

DOI: 10.1073/pnas.0912779107

- [11] Tsuji-Takechi K., Negishi-Koga T., Sumiyaa E., Kukita A., Kato S., Maeda T., Pandolfi P.P., Moriyama K., Takayanagi H. Stage-specific functions of leukemia/lymphoma-related factor (LRF) in the transcriptional control of osteoclast development Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109(7), pp. 2561-2566 (2012).

 DOI: 10.1073/pnas.1116042109
- [12] Idrus E., Nakashima T., Wang L., Hayashi M., Okamoto K., Kodama T., Tanaka N., Taniguchi T., Takayanagi H.
 The role of the BH3-only protein Noxa in bone homeostasis
 Biochemical and Biophysical Research Communications, 410(3), pp. 620-626
 (2011).
 DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.06.040
- [13] Shinohara M., Nakamura M., Masuda H., Hirose J., Kadono Y., Iwasawa M., Nagase Y., Ueki K., Kadowaki T., Sasaki T., Kato S., Nakamura H., Tanaka S., Takayanagi H.

 Class IA phosphatidylinositol 3-kinase regulates osteoclastic bone resorption through protein kinase B-mediated vesicle transport

 Journal of Bone and Mineral Research, 27(12), pp. 2464-2475 (2012).

 DOI: 10.1002/jbmr.1703
- [14] Ono T., Okamoto K., Nakashima T., Nitta T., Hori S., Iwakura Y., Takayanagi H. IL-17-producing γ δ T cells enhance bone regeneration Nature Communications, 7, art. no. 10928, (2016).
 DOI: 10.1038/ncomms10928
- [15] Nakashima T., Hayashi M., Fukunaga T., Kurata K., Oh-Hora M., Feng J.Q., Bonewald L.F., Kodama T., Wutz A., Wagner E.F., Penninger J.M., Takayanagi H. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression

 Nature Medicine, 17 (10), pp. 1231-1234 (2011).

DOI: 10. 1038/nm. 2452

- Nishikawa K., Nakashima T., Takeda S., Isogai M., Hamada M., Kimura A., Kodama T., Yamaguchi A., Owen M.J., Takahashi S., Takayanagi H.

 Maf promotes osteoblast differentiation in mice by mediating the age-related switch in mesenchymal cell differentiation

 Journal of Clinical Investigation, 120 (10), pp. 3455-3465 (2010).

 DOI: 10.1172/JCI42528
- [17] Okamoto K., Iwai Y., Oh-Hora M., Yamamoto M., Morio T., Aoki K., Ohya K., Jetten

A.M., Akira S., Muta T., Takayanagi H. I κ B η regulates TH 17 development by cooperating with ROR nuclear receptors Nature, 464 (7293), pp. 1381-1385 (2010). DOI: 10.1038/nature08922 Takaba H., Morishita Y., Tomofuji Y., Danks L., Nitta T., Komatsu N., Kodama [18] T., Takayanagi H. Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance Cell, 163 (4), pp. 975-987 (2015). DOI: 10.1016/j.cell.2015.10.013 [19] Guerrini M.M., Okamoto K., Komatsu N., Sawa S., Danks L., Penninger J.M., Nakashima T, Takayanagi H. Inhibition of the TNF Family Cytokine RANKL Prevents Autoimmune Inflammation in the Central Nervous System Immunity, 43 (6), pp. 1174-1185 (2015). DOI: 10.1016/j. immuni. 2015. 10.017 [20] Hayashi M., Nakashima T., Yoshimura N., Okamoto K., Tanaka S., Takayanagi H. Autoregulation of Osteocyte Sema3A Orchestrates Estrogen Action and Counteracts Bone Aging Cell Metabolism, 29 (3), pp. 627-637.e5(2019). DOI: 10.1016/j.cmet.2018.12.021 [21] Asano T., Okamoto K., Nakai Y., Tsutsumi M., Muro R., Suematsu A., Hashimoto K., Okamura T., Ehata S., Nitta T., Takayanagi H. Soluble RANKL is physiologically dispensable but accelerates tumour metastasis to bone Nature Metabolism, 1 (9), pp. 868-875 (2019). DOI: 10.1038/s42255-019-0104-1 Nakai Y., Okamoto K., Terashima A., Ehata S., Nishida J., Imamura T., Ono T., [22] Takayanagi H. Efficacy of an orally active small-molecule inhibitor of RANKL in bone metastasis Bone Research, 7 (1), art. no. 1, (2019). DOI: 10.1038/s41413-018-0036-5 [23] Tsukasaki M., Asano T., Muro R., Huynh N.C., Komatsu N., Okamoto K., Nakano K., Okamura T., Nitta T., Takayanagi H. OPG Production Matters Where It Happened Cell Rep. 32 (10), 108124 (2020). DOI: 10.1016/j.celrep.2020.108124. [24] Nagashima K., Sawa S., Nitta T., Tsutsumi M., Okamura T., Penninger J.M., Nakashima T., Takayanagi, H. Identification of subepithelial mesenchymal cells that induce IgA and diversify gut microbiota Nature Immunology, 18 (6), pp. 675-682 (2017). DOI: 10.1038/ni.3732 [25] Tsukasaki M., Komatsu N., Nagashima K., Nitta T., Pluemsakunthai W., Shukunami C., Iwakura Y., Nakashima T., Okamoto K., Takayanagi H.

Host defense against oral microbiota by bone-damaging T cells

Nature Communications, 9 (1), art. no. 701 (2018). DOI: 10.1038/s41467-018-03147-6 Muro R., Nitta T., Nakano K., Okamura T., Takayanagi H., Suzuki H. [26] γ δ TCR recruits the Syk/PI3K axis to drive proinflammatory differentiation program Journal of Clinical Investigation, 128 (1), pp. 415-426 (2018). DOI: 10.1172/JCI95837 [27] Shoji-Matsunaga A., Ono T., Hayashi M., Takayanagi H., Moriyama K., Nakashima Osteocyte regulation of orthodontic force-mediated tooth movement via RANKL expression Scientific Reports, 7 (1), art. no. 8753 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-09326-7 [28] Inoue M., Ono T., Kameo Y., Sasaki F., Ono T., Adachi T., Nakashima T. Forceful mastication activates osteocytes and builds a stout jawbone Scientific Reports, 9 (1), art. no. 4404 (2019). DOI: 10.1038/s41598-019-40463-3 [29] Kameo Y., Miya Y., Hayashi M., Nakashima T., Adachi T. In silico experiments of bone remodeling explore metabolic diseases and their drug treatment Science Advances, 6 (10), art. no. eaax0938 (2020). DOI: 10.1126/sciadv.aax0938 [30] Inoue M., Okamoto K., Terashima A., Nitta T., Muro R., Negishi-Koga T., Kitamura T., Nakashima T., Takayanagi H. Arginine methylation controls the strength of γ c-family cytokine signaling in T cell maintenance Nature Immunology, 19 (11), pp. 1265-1276 (2018). DOI: 10.1038/s41590-018-0222 [31] Nitta T., Kochi Y., Muro R., Tomofuji Y., Okamura T., Murata S., Suzuki, H., Sumida T., Yamamoto K., Takayanagi H. Human thymoproteasome variations influence CD8 T cell selection Science Immunology, 2 (12), art. no. eaan5165 (2017). DOI: 10.1126/sciimmunol.aan5165 [32]Tomofuji Y., Takaba H., Suzuki H.I., Benlaribi R., Martinez C.D.P., Abe Y., Morishita Y., Okamura T., Taguchi A., Kodama T., Takayanagi H. Chd4 choreographs self-antigen expression for central immune tolerance Nature Immunology, 21(8), pp. 892-901 (2020). DOI: 10.1038/s41590-020-0717-2 Nitta T., Tsutsumi M., Nitta S., Muro R., Suzuki E.C., Nakano K., Tomofuji Y., [33] Sawa S., Okamura T., Penninger J.M., Takayanagi H. Fibroblasts as a source of self-antigens for central immune tolerance Nature Immunology, 21(10), pp. 1172-1180 (2020). DOI: 10.1038/s41590-020-0756-8. [34] Tsukasaki M., Huynh N.C., Okamoto K., Muro R., Terashima A., Kurikawa Y., Komatsu N., Pluemsakunthai W., Nitta T., Abe T., Kiyonari H., Okamura T., Sakai M., Matsukawa T., Matsumoto M., Kobayashi Y., Penninger J.M., Takayanagi H.

Stepwise cell fate decision pathways during osteoclastogenesis at single-cell

resolution

Nature Metabolism, 2(12), pp. 1382-1390 (2020)

DOI: 10.1038/s42255-020-00318-y.