

学内グラント 報告書

平成24年度 学内グラント終了時報告書

関節リウマチにおけるTNF・IL-6により誘導される 破骨細胞様細胞の機能解析

研究代表者 横田 和浩（大学病院 リウマチ膠原病科）

緒 言

関節リウマチ(RA)は関節滑膜を主座とする炎症性滑膜炎であるが、それに続発された進行性の高度の骨・軟骨破壊が日常生活動作や生活の質を著しく損ない、生命予後の短縮に繋がることが臨床上、または社会上大きな問題となっている。

RAの病態は未だ不明であるが、腫瘍壞死因子(TNF)やインターロイキン-6(IL-6)などの炎症性サイトカインが慢性炎症性滑膜炎に重要な役割を演じていると考えられている。

TNF阻害療法は、活動性の高いRA患者の約60～70%において、臨床症状を改善することが示されている。さらに、骨破壊(骨びらん)の進行が抑制されただけではなく、骨破壊が修復された例も報告されており、炎症性滑膜炎の制御だけではなく、骨破壊にも関与していると考えられる。しかしながら、TNF阻害療法による骨破壊抑制・修復作用のメカニズムは十分に解明されていない。実際にはTNFが破骨細胞の分化・活性化を誘導しており、その過程をTNF阻害療法が遮断するために骨破壊が抑制されるという仮説が存在するが、*in vitro*において単球/マクロファージへのTNF単独刺激では破骨細胞を分化・活性化できない。

そこで我々は、TNFと他の液性因子との共刺激が単球/マクロファージから破骨細胞へ分化・活性化を誘導していると仮定のもと、マウス破骨細胞前駆細胞をTNF α ・IL-6で共刺激したところ、TNF α 、IL-6それぞれ単独刺激と比し、破骨細胞の特徴である酒石酸耐性酸フォスファターゼ(TRAP)染色陽性の多核巨細胞が確認された。また、象牙質上で培養すると破骨細胞のように骨吸収能を有していた。さらにマウス頭部皮下へのTNF α 、IL-6の注射投与においても、頭蓋骨にTRAP染色陽性細胞の増加と骨吸収の促進が確認された。このことからTNF α とIL-6刺激で誘導された新規破骨細胞様細胞は炎症性骨破壊に関与し、TNF

阻害療法がその分化誘導を制御することで関節破壊の一部を抑制している可能性が示唆された。

材料と方法

*in vitro*における破骨細胞様細胞の誘導

7～9週齢のC57BL/6J雌マウスの大腿骨から骨髓単球を取り出し、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)により破骨細胞前駆細胞へ誘導し、TNF α 、IL-6単独刺激、または共刺激で培養し、培養4日目にTRAP染色を行った。従来の破骨細胞分化誘導因子(RANKL)で誘導される破骨細胞とは分化メカニズムが異なることを確認するために、RANKLの decoy receptorであるosteoprotegerin(OPG)をRANKL刺激群、TNF α ・IL-6共刺激群に同時添加した。そして、顕微鏡下でTRAP陽性多核巨細胞数をカウントした。骨吸収能評価のために象牙質上で2週間培養し、骨吸収窩を電子顕微鏡で観察した。

*in vivo*における破骨細胞様細胞の誘導

*in vitro*の結果に基づき、*in vivo*の破骨細胞分化を評価するために、マウス頭部にTNF α ・IL-6を連日皮下注射投与した。6日後に頭蓋冠を取り出し、脱灰薄切し、TRAP染色を行いTRAP染色陽性細胞(破骨細胞様細胞)と骨吸収の程度を評価した。

TNF α ・IL-6で誘導される破骨細胞様細胞の分化誘導メカニズムの解析

破骨細胞の分化に重要な転写因子NFATc1についてはELISA(DNA結合活性測定キット)、ウエスタンブロット法で解析した。

統計

Mann-WhitneyのU-testにてp値<0.05を有意差ありと判断した。

結 果

マウス破骨細胞前駆細胞をTNF α とIL-6で共刺激するとTNF α 、IL-6それぞれ単独刺激と比し、巨大な

TRAP染色陽性多核細胞が確認された(Fig. 1)。OPGをRANKL刺激群、TNF α ・IL-6共刺激群に同時添加すると、RANKL刺激群では破骨細胞はほとんど誘導されないが、TNF α ・IL-6共刺激群では破骨細胞様細胞が確認されたことからRANKL非依存的な誘導であることが示された(Fig. 2)。また、象牙質上で培養すると、TNF α ・IL-6共刺激群はそれぞれの単独刺激群と比し、骨吸収窩が多数認められ、誘導された破骨細胞様細胞は骨吸収能を有していることが確認された(Fig. 3)。以上のことからTNF α ・IL-6で誘導された多核巨細胞はTRAP染色陽性、骨吸収能を有していたことから破骨細胞の特徴を呈していた。

この破骨細胞様細胞の分化誘導メカニズムを明らか

にするために、ELISAとウエスタンプロット法でNFATc1の活性と発現を確認したところ、TNF α ・IL-6共刺激72時間後において、それぞれの単独刺激に比し、NFATc1の活性と発現が有意に増加していた(Fig. 4)。このことからTNF α ・IL-6共刺激はNFATc1の活性化と発現を誘導することにより破骨細胞様細胞へ分化させることが示唆された。

*in vivo*における検討では、マウス頭部への5日間のTNF α ・IL-6の皮下注射投与により、頭蓋骨におけるTRAP染色陽性細胞の増加と骨吸収の促進が確認された(Fig. 5)。このことから生体内においても、TNF α ・IL-6共刺激により破骨細胞様細胞が誘導され、骨吸収に関与している可能性が示唆された。

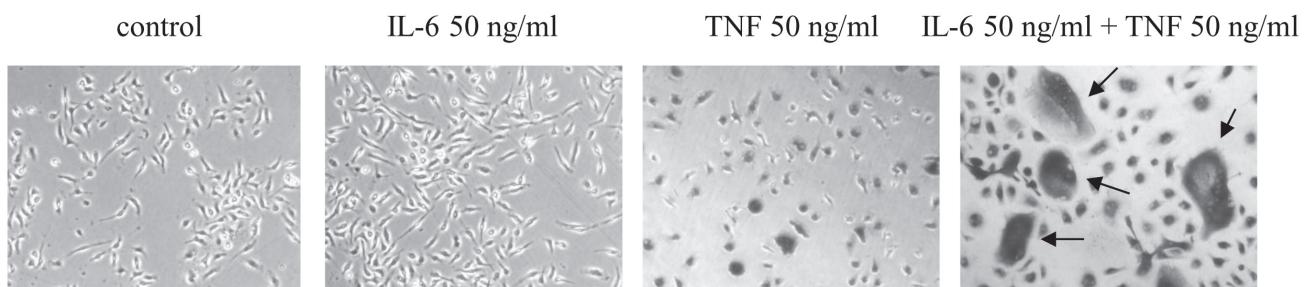


Fig. 1. The combination of TNF α and IL-6 induced TRAP positive osteoclast-like cells.

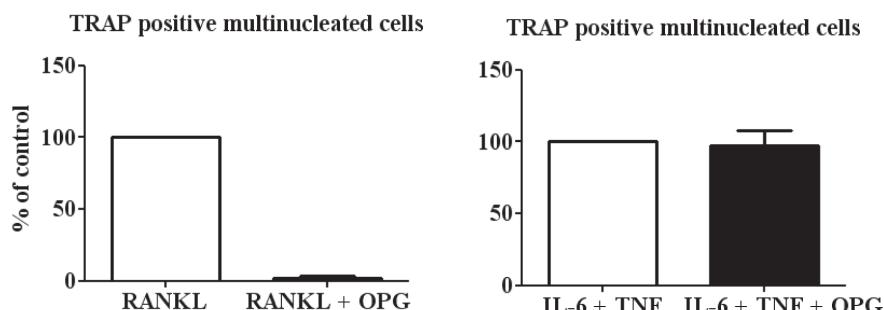


Fig. 2. TNF α and IL-6 induced osteoclast-like cells in a RANKL-independent manner.

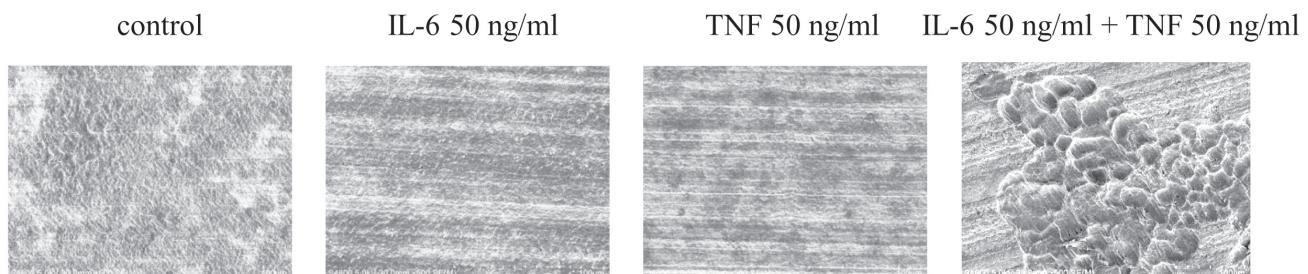


Fig. 3. Resorption pits on dentin slices were formed by the osteoclast-like cells.

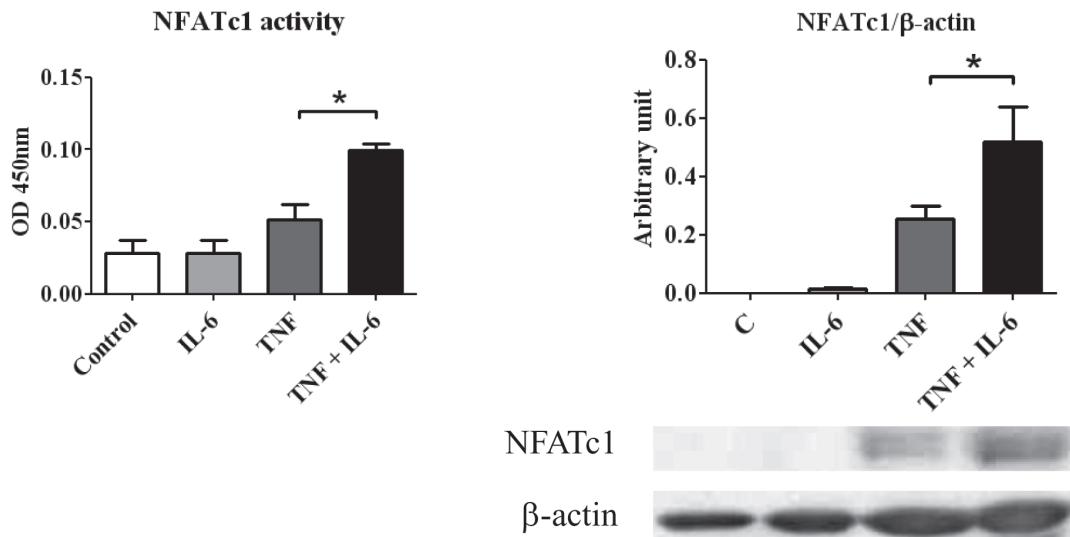


Fig. 4. Stimulation with TNF α and IL-6 significantly up-regulates the activities and expression level of NFATc1.

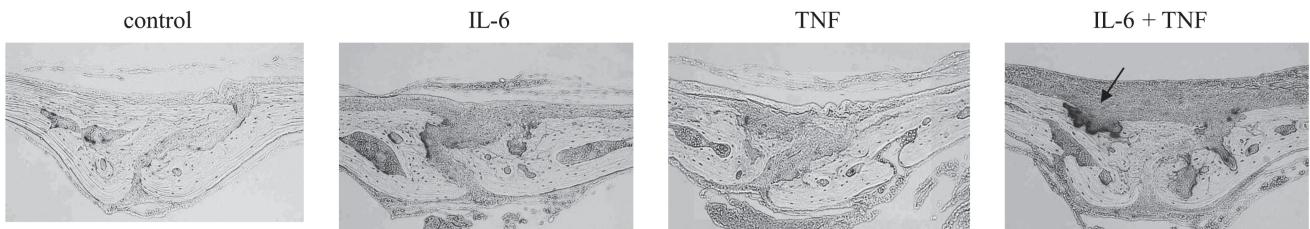


Fig. 5. TRAP positive cells and bone erosions on the calvariae in mice was significantly increased by the combination of TNF α and IL-6.

考 察

我々はマウス骨髓単球を従来のRANKL刺激ではなく、炎症性サイトカイン(TNF α ・IL-6)刺激によりTRAP陽性の多核巨細胞を誘導することに成功した。

現在、RAの治療はTreat to Target(T2T)という概念が提唱され、早期に疾患活動性を抑えて、関節破壊の進行を抑制することが重要であると推奨されている。しかしながら、関節破壊に重要である破骨細胞をターゲットとした治療法は確立していない。実際、RAに対する抗RANKL抗体の臨床試験において、抗RANKL抗体治療群でも半年間で関節裂隙の狭小化が進行してしまうことから、通常の破骨細胞を標的とした治療は何らかの理由によりRAには不向きなのかもしれない。それにもかかわらず、RA関節において破骨細胞の機能亢進がみられるることは間違いないことで、通常の破骨細胞に対する治療には反応しない破骨細胞機能とい

うこのギャップを説明する何らかの機序があると以前から我々は考えていた。

今回、我々が見出した、従来の破骨細胞ではなく、独創的なアイデアで見出された炎症性サイトカインにより誘導される破骨細胞様細胞は、「inflammatory osteoclast」として、RA治療の標的細胞となる可能性を秘めており、炎症を抑えるだけでなく、骨破壊を抑制する治療へと進展していくことが予想される。

謝 辞

本研究の施行にあたり、埼玉医科大学リウマチ膠原病科の三村俊英教授、佐藤浩二郎講師には多大なご指導をいただき、心より感謝申し上げます。また、埼玉医科大学リウマチ膠原病科の医局員および実験助手の方々には様々なご協力をいただき、感謝致します。

研究成果リスト

論文

- 1) Yokota K, Miyazaki T, Hemmatzad H, Gay RE, Kolling C, Fearon U, Suzuki H, Mimura T, Gay S, Ospelt C. The pattern-recognition receptor NOD1 promotes production of inflammatory mediators in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2012;64(5):1329-37.
- 2) 横田和浩. 破骨細胞分化における転写因子ATF4の役割. *リウマチ科* 2011;45:629-37.

学会発表

- 1) 横田和浩, 佐藤浩二郎, 三由文彦, 荒木靖人,

© 2013 The Medical Society of Saitama Medical University

梶山浩, 舟久保ゆう, 秋山雄次, 三村俊英, TNF α と液性因子Xにより誘導される破骨細胞様細胞の分化・機能の解析, 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会, 第22回国際リウマチシンポジウム, 2013年4月18日, 京都

2) 横田和浩, 佐藤浩二郎, 三由文彦, 梶山浩, 秋山雄次, 三村俊英. 炎症性サイトカインにより誘導される新規破骨細胞様細胞分化メカニズムの解析, 第3回彩の国骨フォーラム, 2012年6月29日, 埼玉

特許出願

該当なし

<http://www.saitama-med.ac.jp/jsms/>