

破骨細胞の遊走・位置決めを標的とした新しい骨吸収性疾患治療薬の開発

大阪大学 免疫学フロンティア研究センター

生体イメージング研究室

石井 優

1. はじめに

骨組織は、古い骨を壊して吸収する「破骨細胞」と、骨を新生する「骨芽細胞」のバランスの取れた働きにより新陳代謝が繰り返されているが、加齢や炎症により破骨細胞の機能が亢進するとバランスが骨吸収側に傾き、骨粗鬆症の発症につながる。また関節リウマチでは、関節炎局所に活性化破骨細胞が多数誘導され、骨破壊に関与している^{1,2)}。

破骨細胞は単球系血液細胞から分化・成熟する多核巨細胞であるが、これまでの研究成果により、骨髄間質細胞や骨芽細胞などによって産生されるM-CSF (macrophage colony stimulating factor) や RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) が、破骨細胞の分化・成熟に必須であること、RANKL 刺激はNF- κ BやNF-ATなどの転写因子群を介して破骨細胞の分化を誘導すること、などの知見が確立している^{3,4)}。その一方で、長らく解決されていなかった重要な謎があった。それは「破骨細胞(及びその前駆細胞)はどこから来て、どうやってどうやって骨表面に到達するのか」である。すなわち、「どのような分子機構が破骨細胞の遊走を調節しているのか」「一旦骨表面に達した破骨前駆細胞はすべて最終分化するのか(再び戻っていくことはあるのか)」など、破骨細胞の動きについて、これまではほとんど明らかにされてこなかった。

我々は、破骨前駆細胞がいかにして骨表面へ到達するのか、またその遊走・位置決めがどのように制御されているのかについて解明するために、種々のケモカインや脂質メディエーターについて、破骨前駆細胞を動かすかどうか *in vitro* の実験系でスクリーニングを行った。その結果、スフィンゴシン1リン酸を始めとした、いくつかの候補分子を得た。さらにこれらの候補分子が実際に *in vivo* で破骨前駆細胞を動かすかどうかを検証するため、二光子励起顕微鏡を用いて生きた骨組織内部を観察した。さらには、この「破骨前駆細胞の遊走・位置決め」が骨吸収抑制剤としての創薬ターゲットとして有効かどうか、種々の薬剤を用いて検討した。

2. 方法と結果, 研究成果

種々のケモカイン・脂質メディエーターを *in vitro* でスクリーニングした結果、破骨前駆細胞の遊走を刺激するいくつかの分子を得ていたが、中でも我々が注目したものは、現在リンパ球の遊走制御について重要な知見が得られているスフィンゴシン1リン酸(S1P)である^{5, 6)}。S1Pは主に赤血球や血小板によって作られるため血中に豊富に存在する。一方、組織にはS1Pを分解するS1Pリアーゼがユビキタスに発現しており、一般にS1Pは血中で高く、組織で低い濃度に保たれている。このため、S1Pに対するケモカキシスは、基本的には細胞が組織から血中へ還流する際に作用すると考えられている。

我々は、破骨前駆細胞がS1Pに対する受容体(S1P₁)を発現しており、*in vitro*でS1Pに対して強いケモタキシスが惹起されることを見出した。このS1Pに対する細胞遊走が*in vivo*でも見られるかどうかを確認するために、二光子励起顕微鏡を用いて骨組織内部の生体観察を行った^{7, 8)}。骨組織に存在する破骨前駆細胞を含む単球系細胞(CSF1R-EGFP+またはCX3CR1-EGFP+)は、定常状態ではほとんど動かなかったが、S1P₁受容体に対する強力なアゴニストであるSEW2871を経静脈的に投与すると、急速に動きが大きくなり、血管へと移行していく様子が観察された(参考文献7のsupplementary videosや、著者の研究室オリジナルHP<<http://bioimaging.ifrec.osaka-u.ac.jp>>参照)。これにより、*in vivo*の骨組織内でも、破骨細胞は確かにS1P受容体刺激に反応して遊走能が亢進することが証明された。

さらに我々は、この「S1Pに対する破骨前駆細胞の遊走」の生理意義を解明するために、破骨前駆細胞を含む単球系細胞(CD11b⁺)に特異的にS1P受容体(S1P₁)を欠損させたマウスの解析を行った。S1P₁を欠損した破骨前駆細胞は骨組織に留まりやすくなり、その結果として骨表面に接着する成熟破骨細胞の数が増加し、骨吸収側へと傾くことが分かった。S1Pの濃度が血中で高く、S1Pに対する遊走が一般に組織から血中への還流に寄与していることを考慮すると、以下の結論を得ることができる。

単球系の破骨前駆細胞は、血管から骨内部に流入するだけでなく、血中のS1Pに対して遊走することにより血中へ再還流するシステムが存在する。この流出入のバランスの上に骨表面に存在する前駆細胞数が決められており、一定数がRANKLの刺激を受け成熟する。これまで、RANKLなどの分化誘導因子やその下流にある転写制御が、破骨細胞研究の主要な課題であったが、この研究はその前の段階すなわち破骨前駆細胞が最終分化を遂げる場所(骨)へと遊走・位置決めを行うシステムが、破骨細胞分化・骨代謝の新たな制御点であるという新概念を提唱するものとなった。

3. 考察 まとめ

この新しい調節点は、骨吸収疾患に対する創薬ターゲットとしても極めて魅力的である。我々は骨粗鬆症の動物モデル(卵巣摘出マウス)を用いて、S1P受容体に対する強力なアゴニストの投与が、破骨前駆細胞を骨表面から引き剥がし血中へ再還流させ(結果として骨表面上の破骨細胞の数を減らし)、骨吸収を抑制することを示した。この結果は、S1Pによる破骨前駆細胞の遊走制御が、治療標的としても有望なものであることを示した⁷⁾。さらには、S1P作用のネガティブ作動受容体のアンタゴニストが、強力な骨吸収抑制作用を示すことを発見した⁹⁾。これらは、ビスホスホネート製剤など成熟破骨細胞を標的とした従来の骨吸収抑制剤とは異なった作用機序を持っているので、併用による相乗効果も期待できるため、今後の臨床応用が望まれている。

4. 発表論文、参考文献

発表論文:

Ishii M, Egen JG, Klauschen F, Meier-Schellersheim M, Saeki Y, Vacher J, Proia RL, Germain RN. Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. **Nature**. 458: 524-528, 2009.

Ishii M, Kikuta J, Shimazu Y, Meier-Schellersheim M, Germain RN. Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling *in vivo*. **J. Exp. Med.**, published online, 2010.

参考文献:

- 1) Teitelbaum SL: Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289: 1504-1508, 2000.
- 2) Teitelbaum SL, Ross FP: Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4: 638-649, 2003.
- 3) Takayanagi H: Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* 7: 292-304, 2007.
- 4) Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y: Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocr Rev* 29: 403-440, 2008.
- 5) Rosen H, Goetzl EJ: Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nat Rev Immunol* 5: 560-570, 2005.
- 6) Cyster JG: Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 23:127-159. 2005.
- 7) Ishii M, Egen JG, Klauschen F, et al., Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature*. 458: 524-528, 2009.
- 8) Klauschen F, Ishii M, Qi H, et al.: Quantifying cellular interaction dynamics in 3-D fluorescence microscopy data. *Nat Protoc*, 4:1305-1311, 2009.
- 9) Ishii M, Kikuta J, Shimazu Y, et al.: Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling in vivo. *J Exp Med*, published online, 2010.