

## 48. 生体骨髄イメージングによる免疫細胞分化の動的解明

石井 優

Key words : 生体イメージング, 骨組織, 免疫システム,  
マクロファージ, 破骨細胞

大阪大学 大学院医学系研究科  
感染免疫医学講座  
免疫細胞生物学教室

### 緒 言

免疫学や骨代謝分野の研究は、大きな変化の時期を迎えている。従来からの形態計測や代謝バイオマーカーを元にした解析においても、研究の上で様々な重要な情報を抽出することはできたが、それらは“静的”な情報であり、組織内の細胞・分子の“動的”な情報を得ることができなかった（従来は、動く「前」と「後」を比較することにより、「動き」を推定していたに過ぎない）。近年の光学イメージング技術の長足の進歩により、いまや骨組織や種々の免疫システム内で起きる現象を、時間軸を追って *in vivo* で捉えることが可能となってきた。3次元空間 (x/y/z) から4次元空間 (x/y/z/t) へ、一段上の次元の「高み」に登ると、これまで見えてこなかった風景が俯瞰できるようになってきた。これは基礎的な免疫システムや骨組織の研究を推進する上の重要性だけでなく、今後の創薬開発における新たな原動力として大きな可能性を秘めている。本研究では、これまで本研究者が先導して開発・実用化してきた生体イメージング技術をさらに改良・開発し、単に細胞の動態を追うだけでなく、特に骨の表面での細胞の分化・成熟や機能、多細胞間の相互作用を、生きた組織内で解析することを目的としていた。さらには、生体骨イメージング研究はいまや基礎的研究ツールとしては十分に成熟しているので、これらを元にした創薬や薬効評価の手段の確立も行った。

### 方法、結果および考察

#### 1. 破骨前駆細胞の動態制御機構の解明

本研究者は、生体骨イメージング系により、単球・マクロファージ系の破骨前駆細胞が骨組織内でどのように動き、骨表面に近づくのか、その動態制御機構をすでに解明していた。破骨前駆細胞が血管から骨髓腔内へ、また骨髓腔内から血管への移動を常に繰り返しており、この in/out バランスの中で一定数が骨に留まり成熟破骨細胞へと分化することを発見した。さらに、この血管内⇄骨髄内の動態制御が、血中に存在する生理活性脂質であるスフィンゴシン1リン酸 (SIP) によって動的に制御されていることを明らかにしたり。ここで新たに分かったことは、破骨前駆細胞はダイナミックに遊走しており、この遊走過程も、破骨細胞による骨吸収を制御する重要な調節作用点であるということである。それまでは破骨細胞の骨吸収を抑制する「骨吸収抑制薬」としては、破骨細胞の機能を抑制するビスホスホネートや、破骨細胞の分化を阻害する抗 RANKL 抗体が存在したが、このイメージングによって明らかになった“破骨前駆細胞の動態制御”という作用点も、新たな創薬標的として有用ではないかとの可能性が提起された。

そこで、この可能性を検証するために、本研究者は SIP の作用を調節する SIP 受容体作動薬（研究試薬）を用いて、疾患モデル動物を用いた治療実験を行った。その結果、破骨前駆細胞を骨から血中へと再灌流を促す SIPR 1 アゴニスト<sup>1)</sup>や、前駆細胞の骨の侵入をブロックする SIPR2 アンタゴニスト<sup>2)</sup>の投与によって、骨粗鬆症が有意に改善することを見出した。ところで、SIP はリンパ球の全身遊走を制御することが知られており<sup>3)</sup>、SIPR1 アゴニストであるフィンゴリモド (FTY720) は、新規の免疫抑制剤として、実際に多発性硬化症の治療薬としてすでに承認されている<sup>4)</sup>。本研究者らも、関節炎モデルマウスで本薬剤を使用すると、炎症と骨破壊の両方を抑制する効果を示しており<sup>5)</sup>、関節リウマチやそれに骨粗鬆症が合併したような高齢患者の治療には SIP 標的薬が有用であることが示唆された。そこで、実際に本研究者らは、SIP 調節薬などによる「破骨前駆細胞の遊走を制御する新たな薬剤」についてはスクリーニング

法の開発を含め、新たな創薬に取り組む計画を整えていたが、そんな中で「実は現在よく使用されている、ある馴染み深い薬剤が、この作用点に効いている」と分かったものが現れた。それが活性型ビタミンD製剤であった。

活性型ビタミンDは以前より骨保護作用があることは知られていた。実際に活性型ビタミンDアナログ製剤は骨吸収を抑制する薬剤として、臨床現場で広く使用されている。その一方で、この活性型ビタミンDの骨吸収抑制作用の実際の作用機序については不明な点が多く残されていた。その中でも大きな疑問（パラドックス）であったのが、活性型ビタミンDは *in vitro* の培養系で加えると、破骨細胞様細胞の分化を亢進させることであった<sup>6)</sup>。即ち、活性型ビタミンDは *in vitro* では骨破壊をより悪化させる方向に働く、がしかし *in vivo* で投与すると骨破壊を抑制するという。なぜこんな矛盾が起こるのか？この矛盾を解くカギは *in vivo* の系にあり *in vitro* の系には存在しない“missing piece”にあるはずである。そこで思い当るのが、破骨前駆細胞の遊走・骨へのリクルートの制御機構である。 *In vitro* の実験系では、一定数の破骨前駆細胞を培養皿の上に撒き、分化誘導を行っているのだから、細胞の分化や機能を評価することはできるが、破骨前駆細胞の遊走過程は評価できていなかった。しかしながら、 *in vivo* では破骨前駆細胞の遊走を制御することで、破骨細胞の分化の場へ到達する前駆細胞の数が調節されている。これより著者らは、活性型ビタミンDは、この「破骨前駆細胞の遊走」過程を調節している可能性がないかと考えて解析を行った。その結果、活性型ビタミンDの投与により、破骨前駆細胞を骨へと引き寄せるための受容体であるS1PR2の発現が低下することが分かった（図1）。

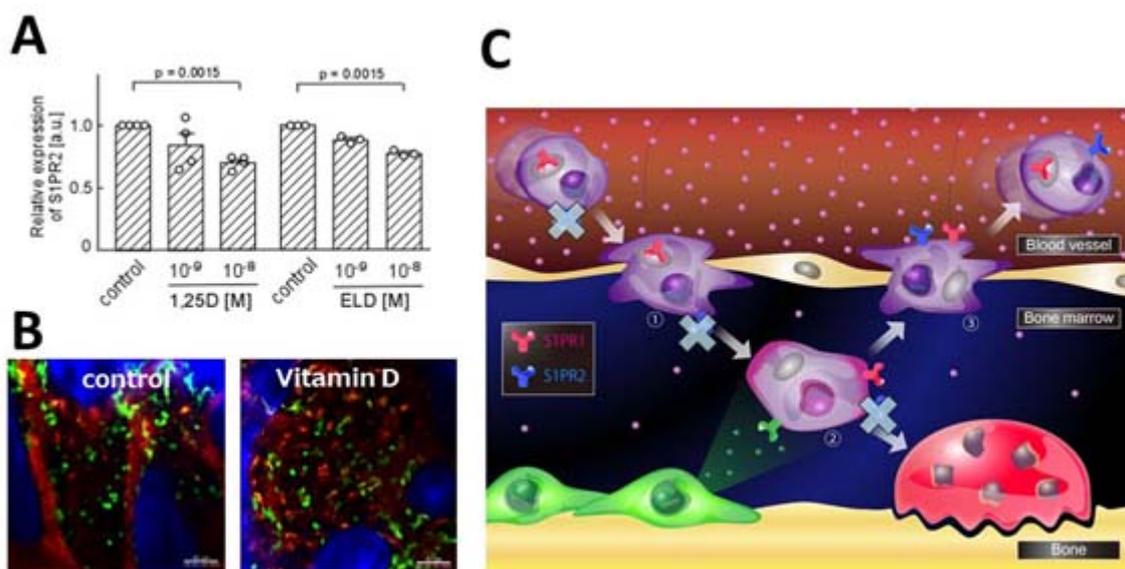


図1. 生体骨イメージングで見た活性型ビタミンDの骨吸収抑制作用。

A) 活性型ビタミンDの投与による破骨前駆細胞上でのS1PR2受容体の発現低下。B) 上記の変化に伴い、活性型ビタミンDを投与した状態では、骨組織内での破骨前駆細胞の動きが亢進し、骨へのリクルート・接着が低下していることが観察される。C) 図説。活性型ビタミンDは破骨前駆細胞が骨へと侵入するための受容体S1PR2を抑えることで、成熟破骨細胞の分化・骨吸収を抑制する。

これにより、活性型ビタミンD投与には、破骨前駆細胞は骨へ入りにくくなり、その結果として成熟した破骨細胞の数が減り、骨吸収を抑制していることが分かった<sup>7)</sup>。無論、ビタミンDは多様な作用をもつのでこれが唯一の骨への作用であるとは考えないが、活性型ビタミンDが骨吸収抑制作用を発揮することの一つの合理的根拠であると考えられる。

このように生体骨イメージングにより、見えなかったものが見えることで、新たな創薬標的が創出されるほか、作用機序が不明であった薬剤の実際の薬理作用が同定される観点からも、今後の創薬・薬剤開発にとって重要なツールと言える。

## 2. 成熟破骨細胞の骨破壊機構の解明

破骨細胞は単球系の前駆細胞が骨表面で融合してできる多核巨細胞であるが、培養皿で *in vitro* で分化誘導をすると、それらしい巨大な細胞が生じる。これらは「破骨細胞様細胞」と呼ばれ、これまでも様々な実験に用いられてきたが、実際の骨内にある成熟破骨細胞とどこまで近似したものであるかは疑問の余地がある。また、具体的に骨組織内でどのようにしてこの特徴的な細胞が機能するのか不明な点が多い。本研究者は、成熟破骨細胞のリポーターマウス (V-type H<sup>+</sup> ATPase α3 subunit-GFP knock-in) や酸分泌を可視化する蛍光プローブ (pH プローブ) を駆使した生体骨イメージング系を用いることで、生体骨組織内において骨吸収を行う破骨細胞の動態・機能を可視化することに成功した<sup>9)</sup>。これにより、骨表面に密着して静止し、実際に骨吸収を行っている破骨細胞 (R 型: resorbing type) と、骨表面上を移動し骨吸収をしていない破骨細胞 (N 型: non-resorbing type) に機能的に分類することが可能となった<sup>9)</sup>。

この系は各種の骨吸収抑制剤の実際の薬効を評価するために興味深い実験系である。現在、ビスホスホネートや抗 RANKL 抗体 (デノズマブ)、カテプシン K 阻害剤などの骨吸収抑制剤が存在するが、こういった薬剤の差別化を図るためには、それぞれが生体内で破骨細胞や骨吸収に対して具体的にどのように作用しているのか、その実体的な解析を行うことは意義があることである。また、臨床医や創薬研究者にとって、実際に自らが関わる薬剤が、生体内の細胞レベルでどのように効果を発揮しているかを見て取るように把握することは重要な意味をもつと考える。

例えば、本研究者は骨粗鬆症など骨吸収が亢進した状況では、破骨細胞の総数が増えるだけでなく、骨吸収を行う R 型の細胞の割合が増えることを観察しているが、この状況で骨吸収抑制薬を投与すると、①破骨細胞の総数を減らす効果と②R 型/N 型バランスを変化させる (R 型⇒N 型へ) 効果の 2 種類の効果が区別して解析できる (図 2)。

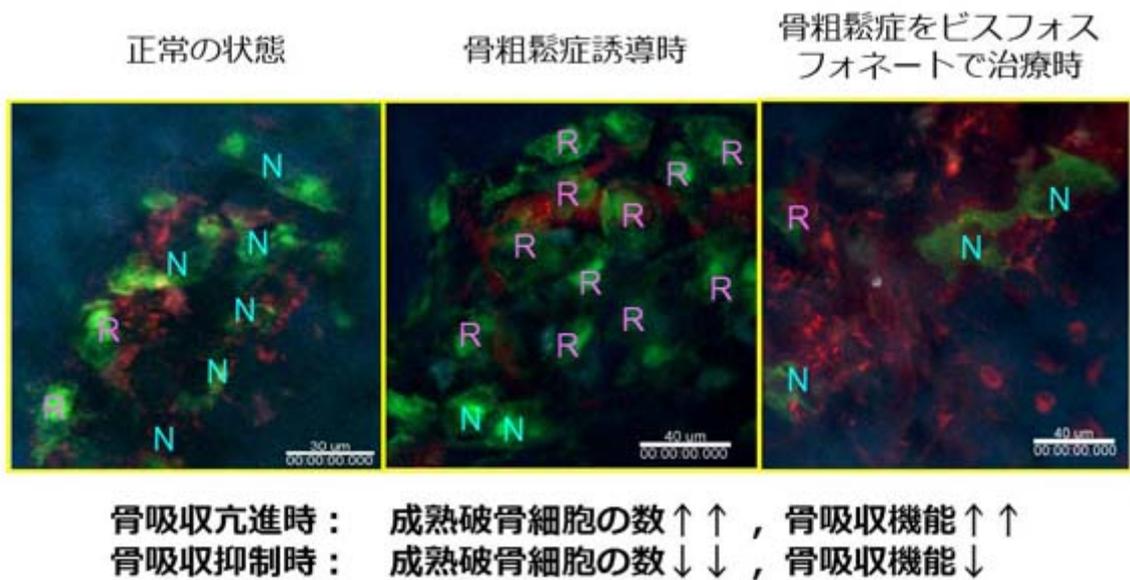


図 2. 成熟破骨細胞の骨吸収機能の生体骨イメージング。

正常の状態 (左)、骨粗鬆症 (中央)、ビスホスホネート治療時 (右) における生体骨イメージングによる成熟破骨細胞の可視化。骨表面に密着し骨を吸収する型 (R 型) と、骨吸収能を有するがこの時点では骨を吸収していない型 (N 型) の 2 つに機能的に分類することができる。骨吸収時には成熟破骨細胞の総数が増えるだけでなく、R 型の割合が増えている。

破骨細胞は骨吸収を行う犯人である一方、骨芽細胞による骨新生を促す観点から、骨リモデリングの観点からは重要な有益な役割を担っている。この観点から考えると、骨吸収抑制薬として望ましいプロファイルとしては、①の破骨細胞の総数を減らすのではなく、②でみられるような、破骨細胞の機能を R 型から N 型に変えてやる方がより望ましい治療と言えるかもしれない。N 型の破骨細胞は、骨芽細胞に骨新生を促すシグナルを伝えている可能性がある。ところが、破骨細胞の総数を減らしてしまうと、骨破壊は確かに減るが、骨リモデリングの刺激も減ってしまい、結果として骨は脆くなってしまふ。即ち、骨吸収抑制という観点からは、破骨細胞の「命」まで奪わなくても、単に「骨吸収」と

いう仕事だけ辞めてもらえればそれでよい訳である。現在進行中の研究があり、本稿ではどの薬剤が具体的にどうか、といった内容については記載ができないが、これから近い将来、様々な骨吸収抑制薬の「実際の」薬効を知ること、より適切な薬剤選択が可能となる時代が訪れることが期待される。

## 文 献

- 1) Ishii, M., Egen, J. G., Klauschen, F., Meier-Schellersheim, M., Saeki, Y., Vacher, J., Proia, R. L. & Germain, R. N. : Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature*, **458** : 524-528, 2009.
- 2) Ishii, M., Kikuta, J., Shimazu, Y., Meier-Schellersheim, M. & Germain, R. N. : Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling *in vivo*. *J. Exp. Med.*, **207** : 2793-2798, 2010.
- 3) Mandala, S., Hajdu, R., Bergstrom, J., Quackenbush, E., Xie, J., Milligan, J., Thornton, R., Shei, G. J., Card, D., Keohane, C., Rosenbach, M., Hale, J., Lynch, C. L., Rupprecht, K., Parsons, W. & Rosen, H. : Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science*, **296** : 346-349, 2002.
- 4) Cyster, J. G. : Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.*, **23** : 127-159, 2005.
- 5) Kikuta, J., Iwai, K., Saeki, Y. & Ishii, M. : S1P-targeted therapy for elderly rheumatoid arthritis patients with osteoporosis. *Rheumatol. Int.*, **31** : 967-969, 2011.
- 6) Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N. & Suda, T. : Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95** : 3597-3602, 1998.
- 7) Kikuta, J., Kawamura, S., Okiji, F., Shirazaki, M., Sakai, S., Saito, H. & Ishii, M. : S1P-mediated osteoclast precursor monocyte migration is a critical point of control in anti-bone-resorptive action of active vitamin D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **110** : 7009-7013, 2013.
- 8) Sakai, S., Endo, K., Takeda, S., Mihara, M. & Shiraishi, A. : Combination therapy with eldelcalcitol and alendronate has therapeutic advantages over monotherapy by improving bone strength. *Bone*, **50** : 1054-1063, 2012.
- 9) Kikuta, J., Wada, Y., Kowada, T., Wang, Z., Sun-Wada, G. H., Nishiyama, I., Mizukami, S., Maiya, N., Yasuda, H., Kumanogoh, A., Kikuchi, K., Germain, R. N. & Ishii, M. : Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function. *J. Clin. Invest.*, **123** : 866-873, 2013.