

骨免疫神経系制御因子による関節リウマチ病態形成メカニズムの解明

丸山健太

大阪大学免疫学フロンティア研究センター

【研究の背景】

申請者は破骨細胞の「寿命」を特異的に規定するシグナルにかかわる分子を同定することを目的としたスクリーニングを行った。その結果、IFN 産生に必須である TBK1 と結合する NAP1(別名:AZI2)が破骨細胞寿命を短縮させることを発見した。

【目 的】

NAP1 欠損マウスを作成したところ、*in vitro* における GM-CSF 誘導性樹状細胞分化の障害と重篤な骨粗鬆症を呈した。興味深いことに、当該マウスは熱刺激に対し野生型よりも過敏であった。そこで本研究では NAP1 欠損マウスの血液学的異常、関節リウマチモデルにおける異常の有無をスクリーニングした上で、その骨粗鬆症の原因の解明を目的とした研究を実施した。また、感覚制御分子としての NAP1 の機能評価ならびに分子機構の解明をめざした。

【方 法】

NAP1 欠損マウスの網羅的な組織観察、ならびに血液学・免疫学的解析を実施した。次に、血清誘導性関節炎を NAP1 欠損マウスに誘導し、臨床スコアを定量した。また、NAP1 の遺伝子欠損マウスの骨形態計測を実施し、骨粗鬆症の原因解明を目指した。最期に、電子 Von Fray 疼痛測定システムの立ち上げ、ならびに fMRI による疼痛定量システムの導入を行い、NAP1 欠損マウスの知覚機能分析を試みた。

【結 果】

NAP1 欠損マウス由来の骨髄細胞を GM-CSF で刺激すると、CD11c 陽性樹状細胞の形成が著明に抑制されていた。GM-CSF シグナルの障害は、肺胞マクロファージの形成異常をひきおこすことで肺胞蛋白症を惹起する。そこで、NAP1 欠損マウスの肺組織を観察したが、予想に反して肺胞蛋白の蓄積異常は見出されず、肺胞マクロファージの形成も正常であった。フローサイトメーターを用いた NAP1 の血液学的解析では免疫細胞のポピュレーションに異常はみられなかった。また、ミエロイド細胞系譜を様々な病原体構成成分で刺激し炎症性サイトカインやインターフェロンの産生を定量したが、異常はみられなかった。血清誘導性関節炎による臨床スコアも野生型と比較して差は検出されなかった。こうしたことから、NAP1 の自然免疫・獲得免疫機能は総じて異常がないという結論に至った。

次に、骨形態計測を実施したところ、NAP1 欠損マウスの骨では破骨細胞数の顕著な増加に起因する骨密度低下ならびに骨量減少が見出された。*in vitro* における骨芽細胞・破骨細胞の分化は正常であったが、破骨細胞寿命の著明な延長が観察された。一方で、NAP1 の過剰発現は破骨細胞寿命を短縮した。次に、破骨細胞寿命を規定する c-Src のリン酸化を定量したところ、NAP1 欠損破骨細胞で有意な亢進がみられた。そこで、c-Src 阻害剤を NAP1 欠損マウスに投与したところ、骨粗鬆症の改善がみられた。以上より、NAP1 は c-Src を抑制することで破骨細胞寿命を負に制御する因子であると考えられた。

続いて、NAP1 による破骨細胞寿命抑制の分子機序を解明するために NAP1 の結合パートナー探索をすすめたところ、Cdc37 を同定した。Cdc37 は Hsp90 と結合し、Hsp90 は c-Src の活性を抑制することが知られている。そこで Hsp90 の阻害剤

である 17-AAG を破骨細胞培養系に加えたところ、17-AAG は野生型破骨細胞の形成を促進させたが、NAP1 欠損破骨細胞の形成には影響を与えなかった。また、NAP1 欠損破骨細胞に NAP1 を発現させると破骨細胞形成が抑制されたが、Cdc37 をノックダウンすると NAP1 発現による破骨細胞形成の抑制はみられなかった。こうしたことから、NAP1 は Cdc37 および Hsp90 と複合体を形成することで c-Src を抑制していることが示唆された。これらの研究成果は学術誌 (**Maruyama et al, Journal of Biological Chemistry, 2015** 表紙に採用)や総説 (**Maruyama et al, Pharmacological Research, 2015, Maruyama et al, Musculoskeletal Regeneration, 2015**)として出版した。また、国内外のシンポジウムや研究会などで招待演者として発表をおこなった (**Kenta Maruyama. Seminar of Matsumoto Dental University (Nagano/Oral) November 6 2014, Kenta Maruyama. The 33rd Annual Meeting of the Japanese Society for Bone and Mineral Research, Japan-Korea Joint Symposium (Tokyo/Oral) July 25 2015, Kenta Maruyama. The 4th CSI/JSI/KAI Joint Symposium (Suzhou China /Oral) September 19-21 2015, Kenta Maruyama. Astellas Foundation for Research on Metabolic Disorders, Takenaka Award Lecture (Tokyo/Oral) October 17 2015**)。

NAP1 欠損マウスを 60°C のホットプレート上に乗せて飛び上るまでの時間を測定したところ、野生型と比べて有意に短縮していた。このことは熱刺激に対する感覚閾値が NAP1 欠損マウスで低下していることを示唆する。そこで、NAP1 欠損マウス由来の後根神経節ニューロンを摘出して TRP チャネル遺伝子群の発現を定量したが、異常は見られなかった。次に、電子 Von Fray 痛覚測定装置 (IITC Inc. Life Science, ALEMO 2450) を購入し、マウス疼痛測定システムを立ち上げた。このシステムを用いて NAP1 欠損マウス後脚の機械刺激に対する痛覚閾値を測定したところ、野生型との差は見られなかった。さらに、CFA を NAP1 欠損マウスの後脚に投与後の機械刺激に対する痛覚閾値を測定したが正常であった。現在、NAP1 欠損マウスの熱刺激やアロディニアに対する脳内血流変化を評価するため、野生型マウスを用いた fMRI の実験系構築を行っている。具体的には MION 磁性粒子造影剤を投与した後、マウスを麻酔下で MRI 装置に入れ、Von Fray filament でマウス後脚を刺激した際の MRI 出力データを採取している。データは Nifti に変換し、時系列データのリアライメント・標準脳へのレジストレーションを行っている。今後は一般線形モデル解析を行い、ImageJ を用いて解析結果を標準脳へスーパーインポーズして脳興奮マップとすることを目指している。

【考 察】

本研究により、NAP1 が破骨細胞寿命を抑制する分子であることが明らかとなった。NAP1 は Cdc37 と結合し、NAP1-Cdc37-Hsp90 複合体が c-Src を抑制することで、破骨細胞の適切な生存を調節している。NAP1 は破骨細胞分化に伴いその発現が減少するため、今後は NAP1 の発現制御機構の解明が重要である。当初の予想に反し、NAP1 欠損マウスの各種免疫機能や関節リウマチモデルの臨床スコア、炎症性サイトカイン産生は正常であったことから、NAP1 は破骨細胞で特異的に機能している分子であると考えられる。

研究代表者は、NAP1 の熱感知の閾値が野生型より低くなっている可能性を示唆するデータを得ている。現在 NAP1 欠損マウスの後根神経節ニューロンを摘出し、その遺伝子発現状態の解析をすすめている。興味深いことに NAP1 は中枢神経で強く発現している。そのため、NAP1 が中枢の感覚経路に関与している可能性もある。今後は疼痛生理学的解析系の導入をすすめることで、骨神経系制御因子としての NAP1 機能の全貌を明らかにしてゆく必要がある。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

NAP1 を特異的に誘導できる低分子化合物が得られれば、熱アロディニアと骨破壊を同時に抑制できるユニークな治療薬となる可能性がある。そのため、NAP1 は関節リウマチや骨粗鬆症の新規治療標的として有望な分子と考えられる。本研究の現時点における診断・治療学的観点からのヒト臨床への貢献は皆無である。

【参考文献】

1. ***Kenta Maruyama** and *Shizuo Akira. "Emerging molecules in the interface between skeletal system and innate immunity" *Pharmacological Research*, Vol.99, pp223-228, 2015 *corresponding author (Invited Review)

- 2.***Kenta Maruyama** and *Shizuo Akira. "New molecules in bone biology and their unexpected roles: from an "osteo-innate-immunological" point of view" *Musculoskeletal Regeneration*, Vol.1, No.1, 2015 *corresponding author (Invited Review)
- 3.***Kenta Maruyama**, Masahiro Fukasaka, Satoshi Uematsu, Osamu Takeuchi, Takeshi Kondo, Tatsuya Saitoh, Mikaël M. Martino, and *Shizuo Akira. "5-azacytidine-induced protein 2 (AZI2) regulates bone mass by fine-tuning osteoclast survival" *Journal of Biological Chemistry*, Vol.290, No.15, pp9377-9386, 2015 *corresponding author *This paper was selected as cover picture in Journal of Biological Chemistry.*
- 4.**Kenta Maruyama**, Satoshi Uematsu, Takeshi Kondo, Osamu Takeuchi, Mikaël M. Martino, Takumi Kawasaki, and Shizuo Akira. "Strawberry notch homologue 2 regulates osteoclast fusion by enhancing the expression of DC-STAMP" *Journal of Experimental Medicine*, Vol.210, No.10, pp1947-1960, 2013 *This paper was selected as cover picture in Journal of Experimental Medicine.*
- 5.**Kenta Maruyama**, Masahiro Fukasaka, Alexis Vandenbon, Tatsuya Saitoh, Takumi Kawasaki, Takeshi Kondo, Kazunari K. Yokoyama, Hiroyasu Kidoya, Nobuyuki Takakura, Daron Standley, Osamu Takeuchi, and Shizuo Akira. "The transcription factor Jun dimerization protein 2 controls bone homeostasis and antibacterial immunity by regulating osteoclast and neutrophil differentiation" *Immunity*, Vol.37, No.6, pp1024-1036, 2012
- 6.**Kenta Maruyama**, Tatsukata Kawagoe, Takeshi Kondo, Shizuo Akira, and Osamu Takeuchi. "TRAF family member-associated NF- κ B activator (TANK) is a negative regulator of osteoclastogenesis and bone formation." *Journal of Biological Chemistry*, Vol.287, No.34, pp29114-29124, 2012
- 7.**Kenta Maruyama**, Gen-ichiro Sano, Yasunari Takada, Neelanjan Ray, and Koichi Matsuo. "c-Fos-deficient mice are susceptible to Salmonella infection" *Infection and Immunity*, Vol.75, No.3, pp1520-1523, 2007
- 8.**Kenta Maruyama**, Gen-ichiro Sano, and Koichi Matsuo. "Murine osteoblasts response to LPS and IFN- γ similarly to macrophages" *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, Vol.24, No.6, pp454-460, 2006
- 9 **Kenta Maruyama**, Yasunari Takada, Neelanjan Ray, Yukiko Kishimoto, Josef M Penninger, Hisataka Yasuda, and Koichi Matsuo. "Receptor Activator of NF- κ B Ligand and Osteoprotegerin Regulate Proinflammatory Cytokine Production in Mice" *Journal of Immunology*, Vol.177, No.6, pp3799-3805, 2006 *This paper was highlighted in "IN THIS ISSUE" of Journal of Immunology.*