



Myeloid-derived suppressor cell-derived osteoclasts with bone resorption capacity in the joints of arthritic SKG mice

藤川, 良一

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8977号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100492486>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Myeloid-derived suppressor cell-derived osteoclasts with bone
resorption capacity in the joints of arthritic SKG mice

SKG マウス関節炎の関節局在 MDSC は破骨細胞分化能を有する

(指導教員：神戸大学大学院医学研究科医科学専攻 小川 渉 教授)

藤川 良一

【背景】

自己免疫疾患である関節リウマチは、関節の炎症と骨破壊を特徴とする慢性疾患である。近年、関節に炎症を引き起こす免疫機構に関わる多くの細胞やその役割などの究明が急速に進んでいる疾患であるが、解明に至っていないメカニズムは多く残されており、炎症関節局所における免疫制御に関しても不明な点が多い。一般に免疫制御に関わる細胞として制御性 T 細胞 (T reg) と骨髄由来抑制細胞 (Myeloid-derived suppressor cells: MDSC) が広く知られている。MDSC は腫瘍学においてはその免疫抑制細胞としての役割が多数研究・報告されているが、自己疾患、関節リウマチにおいても MDSC の関与は未だ不明な点が多い。

【研究目的】

当研究室では、これまでに SKG 関節炎モデルマウスで脾臓 MDSC の免疫抑制能を研究した。また SKG マウス自己免疫性の間質性肺炎モデルで間質性肺炎の早期には肺に MDSC が誘導され、間質性肺炎の stage 進行とともにより免疫抑制能を持った CD11b⁺Gr1^{dim} 細胞が誘導されることを突き止めた。MDSC は IMC (immature myeloid cells : 未成熟骨髄細胞) から分化される細胞であるが、マクロファージや顆粒球などの前駆細胞でもある未成熟な細胞であることから、局所における MDSC にはその刺激に応じて異なった細胞に分化する可能性がある。

関節炎モデルマウスにおける関節局在 MDSC の機能を解明することが、自己免疫性関節炎の炎症制御に貢献すると考えた。

【要旨】

MDSC (Myeloid-derived suppressor cells : 骨髄由来抑制細胞) は腫瘍をはじめとした多くの病態で免疫制御に関わる細胞である。MDSC は IMC (immature myeloid cells : 未成熟骨髄細胞) から分化される細胞であるが、マクロファージや顆粒球などの前駆細胞でもある成熟途中の細胞であることが知られている。単球様 MDSC (M-MDSCs) および好中球様 MDSC (G-MDSCs) の二つのサブグループに大別され、その詳細な働きについてこれまで多くの報告がある。しかし、自己免疫疾患における MDSC の働きについては、定まった見解が得られておらず、マウスモデルの研究でもそれは同様である。我々はこれまでの研究で関節炎モデルマウスの脾臓における MDSC には *in vitro* で関節炎を引き起こす T 細胞の分化を制御する役割があることを報告したが、同様のマウスモデルでは炎症関節内にも MDSC が脾臓と同程度の割合で分布を示していることが判明した。マウスモデル MDSC はフローサイトメトリーで CD11b⁺Gr1⁺ 細胞として広く認識されている。炎症期では関節組織から採取した有核細胞のうち 40~60% 以上が CD11b⁺Gr1⁺ 細胞であることから、MDSC が免疫抑制能のみを持つ細胞集団であるのか、細胞内刺激により他の機能を持った細胞へ分化しているかを突き止めることが、未だ自己免疫疾患において詳細な働きが判明していない MDSC の理解の一助になること、および関節の炎症の制御への理解に寄与すると考えた。

MDSC の働きを解明するために関節炎モデル SKG マウスの骨髓、脾臓、関節から CD11b⁺GR1⁺細胞を単離し、microarray による遺伝子解析を行った。関節から単離された MDSC では骨髓 IMC や脾臓 MDSC と比べて *Arg1* や *CD274* といった炎症制御に関わる遺伝子発現が上昇していた。また heat map 解析で関節内に発現が上昇していたクラスターに対して pathway 解析を施行したところ、脾臓由来の MDSC に比べて炎症や破骨細胞分化などに関わる NF- κ B パスウェイ上の遺伝子が多く認められた。qPCR でも DEG(differential expressed genes：発現変動遺伝子)である *CD274* や *Arg1* は関節 MDSC で有意にな上昇を認めた。in vitro において関節由来の CD11b⁺GR1⁺細胞は脾臓由来 CD11b⁺GR1⁺細胞と同様に naïve T 細胞の増殖や Th1 細胞や Th 17 細胞への分化を抑制した。

その一方で、先述の通り NF- κ B パスウェイには破骨細胞分化と関連する遺伝子が多数あることから、micro array の同一クラスターから破骨細胞分化に関わる DEG を抽出した。関節内 MDSC で強く発現している遺伝子は *Nfkb2* や *Relb* といった non-canonical NF- κ B パスウェイ上の遺伝子であり、NF- κ B2 や *Relb* はタンパク発現でも有意な上昇を認めた。前駆細胞である IMC は破骨細胞へ分化すること、顎骨壊死における顎骨内の MDSC が破骨細胞へ分化することが既報で知られていることから、関節局在 MDSC は破骨細胞へ分化する可能性があると考えた。in vitro で RANKL/M-CSF 刺激により IMC および関節局在 MDSC は破骨細胞へと分化する一方、脾臓 MDSC は破骨細胞分化能を有さなかった。また MDSC 由来破骨細胞はハイドロキシアパタイトとの共培養により骨破壊を促進した。

次に生体内での働きを検証するために、in vivo で炎症関節由来 MDSC を関節炎モデル SKG マウスの関節内に注射したところ、関節注射後 3 週間後に炎症関節は増悪し、micro CT および病理組織にて関節破壊の進行を認めた。このことより関節内局在の MDSC は免疫抑制能を持つ一方、破骨細胞化し骨破壊を促進することが示された。

IMC および脾臓、関節局在 MDSC はその表面マーカーでマウス MDSC と定義されている F4/80 や MHC2 は発現しておらず、まだ 3 臓器の MDSC は形態学的には同様に MDSC の特徴を有していることも分かった。

このことから、関節局在 MDSC は炎症下において骨髓 IMC から関節内へ誘導され、一部の MDSC (主に M-MDSC)は炎症環境下で破骨細胞へ分化し関節破壊を促進する可能性が示された。

関節内への MDSC の誘導阻害や関節局所での刺激の阻害などにより関節炎や骨破壊を抑制する治療への発展に期待する。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 3404 号	氏 名	藤川 良一
論文題目 Title of Dissertation	SKG マウス関節炎の関節局在 MDSC は破骨細胞分化能を有する Myeloid-derived suppressor cell-derived osteoclasts with bone resorption capacity in the joints of arthritic SKG mice		
審査委員 Examiner	主 査 中 村 誠 Chief Examiner 副 査 野 津 寛 太 Vice-examiner 副 査 勝 二 郁 夫 Vice-examiner		

（要旨は1，000字～2，000字程度）

自己免疫疾患である関節リウマチは、関節の炎症と骨破壊を特徴とする慢性疾患である。関節内の免疫制御に関わる細胞として制御性 T 細胞 (T reg) と骨髄由来抑制細胞 (Myeloid-derived suppressor cells: MDSC) が広く知られており、MDSC は腫瘍学領域でその免疫制御細胞としての役割が多数研究・報告されている。しかし、自己免疫疾患 MDSC の研究はヒト、マウスいずれの分野でも炎症を制御するのか促進するのかについて定まった見解が得られていない。発表者らの過去の研究で、関節炎モデル SKG マウスの脾臓 MDSC には T 細胞の分化抑制能があることを解明したが、関節 MDSC の機能の解析はできていなかった。炎症関節には MDSC が多く誘導されているにも関わらず、炎症や骨破壊が進展する。関節 MDSC の働きの研究が関節内の炎症のメカニズムを解明に寄与する可能性が示唆されたが、これまでそれを検討した報告はない。

今回の研究の目的は、関節炎モデルマウスにおける関節局在 MDSC の機能を解明することで、炎症局所における MDSC の役割を明らかにすることであった。

関節 MDSC の働きを解明するために、まず関節炎モデル SKG マウスの骨髄、脾臓、関節から CD11b+Gr1+細胞を単離し、microarray による遺伝子解析を行った。heat map において関節 CD11b+Gr1+細胞で発現が上昇していたクラスターでは、骨髄/脾臓 CD11b+Gr1+細胞と比べ *Arg1* や *CD274* などの炎症制御に関わる遺伝子発現が上昇していると同時に、炎症促進や破骨細胞分化に関わる NF- κ B パスウェイ上の遺伝子が多く認められた。qPCR においても *Arg1* や *CD274* は関節 CD11b+Gr1+細胞で有意な上昇を認め、*in vitro* で関節 CD11b+Gr1+細胞は naïve T 細胞の増殖や Th1 細胞や Th 17 細胞への分化を抑制した。表面マーカーや細胞形態と併せ、関節 CD11b+Gr1+細胞は MDSC であると結論付けた。

その一方で、先述の通り NF- κ B パスウェイには破骨細胞分化と関連する遺伝子が多数あることから、micro array の同一クラスターから破骨細胞分化に関わる発現変動遺伝子を抽出した。関節 MDSC で強く発現している遺伝子は *Nfkb2* や *Relb* といった non-canonical NF- κ B パスウェイ上の遺伝子であり、code されるタンパクである NF- κ B2 や RelB も有意な上昇を認めた。MDSC の前駆細胞である未成熟骨髄細胞(IMC)は破骨細胞へ分化すること、関節 MDSC が破骨細胞へ分化する可能性を考えた。*in vitro* で RANKL/M-CSF 刺激により IMC および関節 MDSC は破骨細胞へと分化した(Jo-MDSC-OC; 関節 MDSC 由来破骨細胞)が、脾臓 MDSC は破骨細胞分化能を有さなかった。また、Jo-MDSC-OC は人工骨を侵食したことから機能的に働く破骨細胞であることを確認した。

次に生体内での働きを検証するために、関節 MDSC 単離し SKG マウスの炎症関節内（片側の手足）に注射したところ、micro CT および病理組織にて関節破壊の進行を認めた。また、関節 MDSC を注射した側の関節では生理食塩水を注射した対側の関節と比較し破骨細胞が増加していた。

本研究は、関節 MDSC は試験管内では免疫抑制能を持つ一方、炎症関節局所では破骨細胞へ分化し骨破壊を促進するという重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。