

論文の内容の要旨

論文題目 Analysis of calcium oscillations in differentiation of bone marrow-derived giant cells

(骨髄由来巨細胞分化におけるカルシウムオシレーション解析)

氏名 岡田 寛之

骨髄細胞由来の多核巨細胞には、破骨細胞 osteoclast と異物巨細胞 foreign body giant cell (FBGC) の2種がある。

破骨細胞分化初期に、immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)受容体下流でカルシウムオシレーション (Ca oscillations) が起こる現象はよく知られている。しかし Ca oscillations の時系列データの定性的評価に留まり、2種類ある ITAM が下流の Ca oscillations に与える影響は切り分けて精査されていなかった。

近年、関節リウマチ治療薬 CTLA4(cytotoxic T-lymphocyte antigen 4)-Ig が破骨細胞分化を直接抑制する機序が報告された。分化に重要な Ca oscillations に与える影響は、検証されていなかった。

また破骨細胞と同一起源である FBGC 分化過程における、Ca oscillations の報告はなかった。

そこで、本研究の目的は、以下の3つとした。

1. 破骨細胞分化早期において、2種の ITAM 下流の Ca oscillations の違いを明らかにすること。
2. CTLA4-Ig が破骨細胞形成を直接抑制する機序を明らかにすること。
3. FBGC 分化誘導法を確立し、FBGC 分化における Ca oscillations の存在、ITAM の役割を検証すること。

本論文では、3つのテーマに分割し、議論を進めた。

1. 破骨細胞分化における ITAM 下流 Ca oscillations 解析
2. CTLA4-Ig(アバタセプト)が破骨細胞形成を直接抑制する機序
3. 異物巨細胞分化条件の検討、異物巨細胞分化における Ca oscillations

以下、順に各テーマごとに、研究背景、方法、結果、結論を述べた上で、全体を総括する。

1. 破骨細胞分化における ITAM 下流 Ca oscillations 解析

【背景】

ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) 受容体が、単球マクロファージ系には 2 種類ある。Fc receptor γ (FcR γ) および DNAX activating protein 12kDa (DAP12) である。

破骨細胞分化において、ITAM 受容体下流で RANKL 誘導性の Ca oscillations が起こると考えられてきた。Ca oscillations は定性的理解に留まっていた。また、2 種の ITAM による Ca oscillations 制御における違いは不明だった。さらに破骨細胞分化初期の Ca oscillations の検出は困難で検討されていなかった。

本研究では、破骨細胞分化初期における、2 種の ITAM 下流の Ca oscillations の違いを明らかにした。

【方法】

野生型、FcR γ KO、DAP12 KO、FcR γ +DAP12 double KO (ITAMs DKO) マウスを用いた。骨髄細胞を M-CSF 下で培養し、骨髄マクロファージを得た。M-CSF + RANKL 刺激にて破骨細胞を分化誘導した。

骨髄マクロファージをカバーガラス上に一晚静置し貼り付けた (day0)。2 日間 M-CSF, RANKL, M-CSF+RANKL 下に分化を誘導した (day2)。各タイミング条件のカバーガラスを Fura-2 で前処置し、蛍光強度を 2 波長同時測定し、細胞ごとに Ca 濃度を反映する蛍光強度比を求めた。得られた蛍光強度比時系列データから、Ca oscillations の周波数解析を行った。また Low frequency (0.01~0.03Hz), High frequency (0.03~0.10Hz) で周波数帯フィルタリング処理し、復元波の振幅を比較した。

【結果】

RANKL 刺激前の day0 の段階で、Ca oscillations は観察可能だった。ITAMs DKO マウスでは粗雑な大きな波が観察された。

Ca oscillations の周波数解析を行った。FcR γ KO 由来細胞は day 2 いずれの条件も oscillations の高周波にシフトをきたした。他方 DAP12 KO 由来細胞の oscillations は、day 2 で低周波シフトする傾向が見られた。

周波数フィルタリング後、Ca oscillations の振幅を評価した。M-CSF 刺激群では Low および High frequency ともノックアウトマウス由来細胞は全て振幅が減少した。一方 RANKL 刺激群は、Low frequency にて ITAM single KO マウスのみ振幅が減少した。

【結論】

破骨細胞分化初期の Ca oscillations 周波数解析法を確立した。oscillations は、M-CSF および RANKL 下流で、2 種の ITAM 分子が巧みに制御していた。

2. CTLA4-Ig(アバタセプト)が破骨細胞形成を直接抑制する機序

【背景】

炎症性疾患治療薬 Abatacept は、CTLA4(cytotoxic T-lymphocyte antigen 4)細胞外ドメインと IgG1 Fc 領域との融合蛋白 CTLA4-Ig である。抗原提示細胞表面の CD80/86 に結合して T 細胞活性化を阻害する。近年 IDO/Tryptophan 経路を介し、CTLA4-Ig が破骨細胞分化を直接抑制したとの報告があったが、作用機序の全貌は不明だった。

【方法】

骨髄細胞を M-CSF 下で培養し得た Bone marrow macrophages(以下 BMMs)を M-CSF + RANKL 存在下で培養する際に、recombinant CTLA-4/Fc Chimera Mouse(以下 CTLA4-Ig)を投与し、破骨細胞分化に対する CTLA4-Ig の影響および NFATc1 の発現変化をみた。

次にカルシウム振動に着目した。BMMs に対し、CTLA4-Ig 急性投与中ないし 1 日投与後の細胞内カルシウム濃度を Fura-2 の蛍光強度比から調べた。解析には R を用いた。

Oscillations を時系列に沿って周波数解析する際は、ウェーブレット解析を適用した。

さらに LPS 誘導性頭蓋骨溶解モデルを用い、in vivo での CTLA4-Ig の効果を検証した。

Ca oscillations の上流にある ITAM 受容体のうち、Fc receptor γ (FcR γ) KO マウスを用いて、同様の検討を行った。

【結果】

CTLA4-Ig 投与により、NFATc1 の発現は減少し、破骨細胞分化は抑制された。また、急性投与および 1 日投与後のいずれの条件下でも CTLA4-Ig は BMMs のカルシウム振動を抑制した。

FcR γ KO マウスでは、カルシウム振動への影響が見られず、破骨細胞分化も抑制しなかった。

LPS 誘導性の炎症性骨破壊は、CTLA4-Ig 局所投与により野生型マウスでは緩和されたが、FcR γ KO マウスでは緩和効果が見られなかった。

【結論】

CTLA4-Ig は、FcR γ を介して細胞内カルシウム振動に干渉し NFATc1 発現を抑制し、破骨細胞分化を抑制した。

3. 新たな異物巨細胞分化誘導法、異物巨細胞分化における Ca oscillations

【背景】

異物巨細胞 (foreign body giant cell, FBGC) は、破骨細胞と同じ単球マクロファージ系由来の多核巨細胞である。破骨細胞の分化メカニズムの解明が進む一方、異物巨細胞の分化誘導メカニズムの詳細は不明である。適切な in vitro 分化誘導法が確立していないことが一因である。異物巨細胞の分化には、インターロイキン 4 (IL-4) が必須因子である。異物巨細胞誘導系における Ca oscillations の存在は知られていない。

本研究では、FBGC 誘導条件を検討し、FBGC 分化における Ca oscillations の存在および ITAM の役割を検証した。

【方法】

野生型、FcR γ KO、DAP12 KO、FcR γ +DAP12 double KO (ITAMs DKO)マウスを用いた。骨髄細胞を M-CSF 下で培養し骨髄マクロファージを得る際に、GM-CSF ないし IL-4 を添加し前処置を行った。骨髄マクロファージを得た後は従来法通り、GM-CSF + IL-4 にて刺激し FBGC を分化誘導した。

In vivo 異物反応モデルとして、マウス腹腔内スポンジ投与を行った。

骨髄マクロファージをカバーガラス上に一晚静置し貼り付けた。2 日間各種サイトカイン刺激を追加し、Fura-2 にて前処置を行い、蛍光強度を 2 波長同時測定し蛍光強度比を求めた。周波数解析を行った。また周波数フィルタ後の振幅解析も追加した。解析には R を用いた。

【結果】

骨髄細胞を GM-CSF にて前処置を行った群では、小細胞が凝集した細胞塊が多数誘導された (M1 FBGC と定義)。一方骨髄細胞を IL-4 で前処置した群では、細胞質が透明に抜ける巨細胞が従前の方法より高い純度で誘導できた (M2 FBGC と定義)。M1 FBGC は各種ノックアウトマウス由来は全て減少した。M2 FBGC は、FcR γ KO、ITAMs DKO マウスからは誘導されなかった。

In vivo 異物反応モデルの検討の結果、ITAMs DKO マウスでは、スポンジ異物を囲む細胞層状構造が形成されなかった。

骨髄マクロファージが IL-4 に暴露されると Ca oscillations は高周波シフトした。一部の細胞は急性投与直後に周波数変動が起こった。また FBGC 誘導条件では、FcR γ が欠損すると低周波数帯の振幅が减弱した。

【結論】

新たな FBGC 分化誘導法を確立した。FBGC 分化には、2 種の ITAM のうち Fc R γ が重要だった。IL-4 は Ca oscillations の高周波シフトを催し、FcR γ には IL-4 による振幅减弱を緩和する効果があった。

3 つのテーマからなる本研究によって、骨髄細胞由来の巨細胞分化過程において、2 種の ITAM 下流で Ca oscillations の周波数が巧みに制御されていることが明らかとなった。本研究では、骨髄マクロファージのような非興奮性細胞における Ca oscillations 解析法を考案した。骨髄由来の巨細胞分化メカニズム研究の新たな展開につながるものと期待される。