

## 論文の内容の要旨

論文題目 関節リウマチにおける炎症および骨破壊の分子機構の解析

氏名 杉田拓也

関節リウマチは最も患者数の多い全身性自己免疫疾患の一つであり、関節滑膜の炎症と骨破壊を特徴とする。その患者数は世界人口の1%になるとも言われ、日本国内の患者数も60-100万人と推計されている。関節リウマチの発症には遺伝的要因と環境要因が関わっているが、その発症メカニズムは明らかになっていない。骨組織の恒常性は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成の適切なバランスによって維持される。関節リウマチでは、これらのバランスが破綻して骨吸収が過剰になるために骨破壊が生じる。

関節リウマチでは、何らかの要因でシトルリン化された自己抗原に対する免疫寛容の破綻がきっかけの一つと考えられている。免疫寛容の破綻により活性化したT細胞が関節滑膜に浸潤し、炎症が惹起される。炎症滑膜には特にTh17細胞が集積し、IL-17を介して滑膜線維芽細胞を刺激し、破骨細胞分化因子RANKL(receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand)の発現を誘導する。IL-17はマクロファージや好中球を刺激してIL-6、TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインの産生を促す。これらの炎症性サイトカインは滑膜炎を増悪させると同時に、滑膜線維芽細胞に作用してRANKL発現も誘導する。こうして滑膜で大量に産生されたRANKLにより破骨細胞分化が異常に亢進し、骨破壊が起こる。

近年、GWAS解析により新たな関節リウマチ関連遺伝子が明らかにされており、中には関節リウマチにおける病理的意義が不明のものもある。その一つである*WDFY4*の機能の解析により、関節リウマチの病態に関わる新たな分子機構を明らかにできると考えた。そのために、*Wdfy4*遺伝子欠損マウスを作製し、表現型の解析および関節炎モデルの評価を行った。

またRANKLについては、関節リウマチの骨破壊抑制のため抗RANKL抗体が治療薬として使用されているが、低カルシウム血症の副作用や休薬後に破骨細胞の分化抑制が解除されると急激な骨密度の低下(オーバーシュート)が起こるといった問題が残されている。RANKLは膜結合型と可溶性の2種類の形態をとるが、関節リウマチにおける膜結合型RANKLと可溶性RANKLの機能の違いについては理解が不十分であり、その解明がRANKLを標的とした治療法の改善につながると考えた。そこで可溶性RANKL欠損マウスおよび膜結合型RANKL欠損マウスを作製し、表現型の解析および関節炎モデルの評価を行った。

*Wdfy4*はB細胞や樹状細胞、破骨細胞や骨組織でも発現している。まずは*Wdfy4*<sup>-/-</sup>マウスの免疫学的表現型を解析したところ、骨髄におけるB細胞分化が障害されており、*Wdfy4*は骨髄におけるB細胞分化に関与していることが示された。

次に *Wdfy4*<sup>-/-</sup>マウスにおける骨の表現型を解析した。マイクロ CT による大腿骨の骨量と骨構造の評価、脛骨の組織学的評価において、*Wdfy4*<sup>-/-</sup>マウスでは *Wdfy4*<sup>+/+</sup>マウスと差異を認めず、*Wdfy4* は生理的条件下での骨格形成や骨リモデリングには寄与していないことが明らかとなった。

次に *Wdfy4* の関節炎への関与を知るため、コラーゲン誘導性関節炎モデル (CIA) の評価を行った。*Wdfy4*<sup>-/-</sup>マウスでは *Wdfy4*<sup>+/+</sup>マウスよりも発症後の炎症スコアが優位に高く、関節炎が増悪化することがわかった。以上の結果から、*Wdfy4* は CIA における関節炎病態を抑制していることが示された。

一方、RANKL について、可溶型 RANKL 欠損マウス (*Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup>マウス) ならびに膜結合型 RANKL 欠損マウス (*Tnfsf11*<sup>ΔM/ΔM</sup>マウス) を用いて、膜結合型 RANKL、可溶型 RANKL の炎症整骨破壊における重要性の解析に取り組んだ。*Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup>マウスは、RANKL の細胞外領域の酵素切断部位を含むアミノ酸領域 (VGPQRFSGAPAMMEG) を欠失させることで可溶型 RANKL を選択的に欠損させたマウスであり、既に所属研究室で作出済みである。一方、*Tnfsf11*<sup>ΔM/ΔM</sup>マウスとして、RANKL の細胞膜結合部位を含む N 末端部分を G-CSF シグナル配列に置換し、RANKL が細胞膜に結合できず、全て分泌型として産生されるように改変したマウスを作製した。

まず *Tnfsf11*<sup>ΔM/ΔM</sup>マウスにおける骨の表現型を解析した。RANKL 欠損マウスは、破骨細胞が完全に消失するため重篤な骨量の増加および歯の萌出不全を呈する。一方、*Tnfsf11*<sup>ΔM/ΔM</sup>マウスは正常な歯の萌出を認めた。マイクロ CT により大腿骨の骨量进行评估したところ、*Tnfsf11*<sup>ΔM/ΔM</sup>マウスは *Tnfsf11*<sup>+/+</sup>マウスと比較して骨量が上昇していた。大腿骨全体の骨構造を観察したところ、*Tnfsf11*<sup>ΔM/ΔM</sup>マウスでは骨幹部ならびに近位骨幹端部に骨髓腔が存在することがわかった。さらに脛骨近位部の TRAP 染色により、肥大軟骨層直下の一次海綿骨においては、*Tnfsf11*<sup>ΔM/ΔM</sup>マウスでは *Tnfsf11*<sup>+/+</sup>マウスよりも破骨細胞数、破骨細胞面が低下していた。一方、二次海綿骨では差を認めなかった。以上の結果から、骨代謝や破骨細胞分化には主として膜結合型 RANKL が必須であるが、位置によっては可溶型 RANKL の作用により破骨細胞が機能することが示唆される。

続いて *Tnfsf11*<sup>ΔM/ΔM</sup>マウスにおける免疫組織形成を解析した。リンパ節形成について、*Tnfsf11*<sup>ΔM/ΔM</sup>マウスでは、腋窩リンパ節、頸部リンパ節、腸間膜リンパ節、パイエル板は存在を確認できた。しかし鼠径部リンパ節は左右ともに肉眼では確認できないか *Tnfsf11*<sup>+/+</sup>マウスよりも著しく小さかった。また、胸腺細胞については、*Tnfsf11*<sup>ΔM/ΔM</sup>マウスでは *Tnfsf11*<sup>+/+</sup>マウスと比べて AIRE 陽性胸腺髄質上皮細胞の数が少なかった。以上の結果から、鼠径部リンパ節の形成および胸腺髄質上皮細胞の分化には膜結合型 RANKL が必要であることが示された。また、腸管パイエル板の M 細胞分化および雌マウスの妊孕性と妊娠時の乳腺発達については、*Tnfsf11*<sup>ΔM/ΔM</sup>マウスにおいて異常は認められなかった。腸管パイエル板の M 細胞分化および妊孕性と妊娠時の乳腺発達に膜結合型 RANKL

は必須でないことが示された。

最後に、関節リウマチの炎症性骨破壊における膜結合型 RANKL および可溶性 RANKL の重要性を評価するため、抗コラーゲン抗体誘導性関節炎モデル (CAIA)、CIA の評価を行った。関節の炎症スコアについては *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウス、*Tnfsf11*<sup>ΔM/ΔM</sup> マウスともに *Tnfsf11*<sup>+/+</sup> マウスと差はなかった。関節炎誘導後の腫の組織学的評価では、Safranin O 染色像において *Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウス、*Tnfsf11*<sup>ΔM/ΔM</sup> マウス、*Tnfsf11*<sup>+/+</sup> マウスでいずれも滑膜の炎症や軟骨の破壊を認めた。一方、マイクロ CT により大腿骨及び踵骨における骨破壊を評価したところ、*Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスと *Tnfsf11*<sup>+/+</sup> マウス間に有意な差は認められなかったが、*Tnfsf11*<sup>ΔM/ΔM</sup> マウスでは顕著に骨破壊が抑制されていた。さらに TRAP 染色像において、*Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスと *Tnfsf11*<sup>+/+</sup> マウスではいずれも顕著な滑膜増殖が認められ、骨破壊部に TRAP 陽性の破骨細胞を認めた。しかしながら、*Tnfsf11*<sup>ΔM/ΔM</sup> マウスでも著しい滑膜増殖は認められるものの、TRAP 陽性の破骨細胞は検出されなかった。*Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスに対して CIA を行った場合も CAIA の場合と同じく、*Tnfsf11*<sup>ΔS/ΔS</sup> マウスと *Tnfsf11*<sup>+/+</sup> マウスで関節の炎症スコア、骨破壊に差はなかった。以上の結果より、関節炎に伴う骨破壊には可溶性 RANKL ではなく膜結合型 RANKL が必要であることが示された。

本研究により、*Wdfy4* は骨髄における B 細胞分化に関与しており、骨代謝には寄与していないことが示された。また、*Wdfy4* は CIA における関節の炎症の悪化を抑制していることが示唆された。*Wdfy4* の関節炎抑制能を亢進する制御法を開発できれば、関節リウマチの治療にも応用できると考えられる。

また、生理的条件下での膜結合型 RANKL の機能については、骨代謝や破骨細胞分化には主として膜結合型 RANKL が必須であるが、骨組織内の位置によっては可溶性 RANKL の作用により破骨細胞が機能することを示した。腸管 M 細胞の分化、妊娠期の乳腺発達には膜結合型 RANKL と可溶性 RANKL のいずれの形態でも十分であることが示された。リンパ節については、今回確認したリンパ節のうちでは鼠径部リンパ節の形成にのみ膜結合型 RANKL を介した細胞同士の直接接触が必要であることがわかった。なぜ鼠径部リンパ節の形成にのみ直接接触が必要かは不明であるが、少なくともリンパ節の位置によって、RANKL による制御機構が異なることが想定される。

さらに、関節炎に伴う骨破壊には膜結合型 RANKL が必要で可溶性 RANKL は必要でないことが明らかになった。最近シングルセル解析によって、関節リウマチの炎症滑膜における滑膜線維芽細胞には RANKL を発現し骨破壊に関与する亜集団と、RANKL を発現せず骨破壊に関与しない亜集団があり、それぞれが滑膜の表層と下層に局在することが報告されている。本研究の結果と合わせると、関節炎における骨破壊の誘導には、滑膜の表層の線維芽細胞が膜結合型 RANKL を介して破骨細胞前駆細胞と直接接触することが重要であることが示唆され、局所制御の重要性が示唆される。

またヒトにおいては、骨破壊を認める患者では骨破壊を認めない患者より可溶性 RANKL 濃度が高いことが知られている。本研究において、関節炎に伴う骨破壊には膜結合型 RANKL が必要で可溶性 RANKL は骨破壊を直接誘導できないことが明らかになったことから、関節リウマチ患者における血清中可溶性 RANKL 濃度の上昇が直接骨破壊の原因になるとは考えられない。炎症条件下では MMPs の発現が上昇しており、RANKL は細胞外領域の切断部位が MMP-14 などによって切断されて可溶性 RANKL として分泌されることから、可溶性 RANKL は炎症の程度を反映している可能性がある。

本研究により、関節炎に伴う骨破壊における破骨細胞の活性化には膜結合型 RANKL が必要であることが明らかになった。一方で生理的条件下では *Tnfsf11*<sup>ΔM/ΔM</sup> マウスにおける骨量の増加や免疫組織形成の障害は RANKL 欠損マウスよりも軽度であった。関節リウマチにおいて、膜結合型 RANKL から可溶性 RANKL への変換を積極的に誘導することで膜結合型 RANKL の量を減らすことができれば、可溶性 RANKL を含むすべての RANKL を阻害するよりも、生理的な骨リモデリングを維持しながら骨破壊を効率よく抑制できることが期待できる。