



Title	JAK inhibition ameliorates bone destruction by simultaneously targeting mature osteoclasts and their precursors
Author(s)	鎗, 伸弥
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/93001
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

大阪大学大学院 生命機能研究科
博士論文

**JAK inhibition ameliorates bone destruction
by simultaneously targeting
mature osteoclasts and their precursors**

JAK 阻害剤は成熟破骨細胞と破骨前駆細胞の両方を
標的にすることで骨破壊を抑制する

大阪大学大学院生命機能研究科
免疫細胞生物学教室（石井 優 教授）

学籍番号：**32A19064**

鎗 伸弥

修了年月：**2023** 年 9 月 25 日

要旨

[Objective] Rheumatoid arthritis is characterized by chronic inflammation, and brings about cartilage/bone destruction. Recently, Janus kinase (JAK) inhibitor has been ameliorated arthritis-related inflammation and bone erosion, although the mechanisms of action remain unclear. Here, we investigated the effects of the JAK inhibitor on the functions and dynamics of osteoclasts under inflammatory conditions using intravital imaging with multiphoton microscopy.

[Methods] Inflammatory bone destruction was induced by local injection of lipopolysaccharides into transgenic mice carrying reporters for mature osteoclasts or their precursors. These mice were treated with the JAK inhibitor then performed intravital imaging with multiphoton microscopy. In addition, we conducted RNA sequencing (RNA-seq) analysis to elucidate the underlying mechanism of the effects of the JAK inhibitor on osteoclasts.

[Results] The JAK inhibitor blocked the function of mature osteoclasts and limited the migration behaviors of osteoclast precursors to bone surface, which is essential process for osteoclastogenesis, resulting that the JAK inhibitor suppressed bone destruction. Further, RNA-seq analysis revealed the molecular related the migration on osteoclast precursors was regulated in the JAK inhibitor-treated mice.

[Conclusion] We demonstrated the JAK inhibitor suppressed bone destruction through dual action of blocking the function of mature osteoclasts and limiting the migration of their precursors under inflammatory conditions.

目次

1. 序論	p 4-5
2. 実験材料・方法	p 6-10
3. 結果	p 11-14
4. 考察	p 15-16
5. 謝辞	p 17
6. 出典	p 18
7. 参考文献	p 19-22
8. 図表	p 23-32

1. 序論

骨は常に新しく生まれ変わるダイナミックな臓器である。骨を溶かす破骨細胞と骨を作る骨芽細胞が互いに協調して働くことで、骨の構造が緻密に形作られる。破骨細胞は、酸を放出し骨を溶かす骨吸収能を持つ。骨の再構築 (骨リモデリング) は、この破骨細胞が骨を溶かすことから開始する。その後、破骨細胞が骨吸収した領域に骨芽細胞がコラーゲン等の骨基質を分泌しカルシウムを沈着させ新しい骨を形成する。骨芽細胞は自ら産生した骨基質の中に次第に埋没し、骨細胞へと分化した時点で骨リモデリングが終了するとされる [1]。そして、骨基質に埋没した骨細胞は破骨細胞の分化に必須とされる **Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL)** を分泌し、破骨前駆細胞から破骨細胞への分化を誘導する [2, 3]。つまり、骨リモデリングは破骨細胞、骨芽細胞、骨細胞という3つの異なる細胞の協調的なコミュニケーションの上に成り立っており、これら細胞間コミュニケーションの破綻によって骨吸収性疾患が生じると考えられている。

破骨細胞は、単球/マクロファージ系の血球系細胞である破骨前駆細胞から分化する多核巨細胞である [4, 5]。破骨前駆細胞は血管腔から骨髓腔へ移動し、骨表面へ遊走する。骨表面に遊走した破骨前駆細胞は、互いに融合して成熟破骨細胞へと分化し骨吸収を行う。しかし、炎症によって破骨細胞が異常に活性化すると、激しい骨吸収により局所的な骨欠損が生じる [6]。特に関節リウマチは、関節滑膜に炎症が生じると炎症性骨破壊により関節の変形をもたらす。そのため、関節リウマチの治療には炎症性骨破壊の進行を抑制することが重要となる [7-9]。これまで私の所属する研究室では、生きたマウスの骨組織を可視化するために、二光子励起顕微鏡を用いた生体骨イメージング技術を独自に開発し、破骨前駆細胞と成熟破骨細胞の *in vivo* における動態を解析してきた。その結果、破骨前駆細胞の骨への遊走・位置決めが、血中に存在するスフィンゴシン 1 リン酸 (**Sphingosine-1-phosphate: S1P**) と、細胞自身に発現する **S1P 受容体 (S1PR1, S1PR2)** の相互作用によって制御されていることを明らかにした [10, 11]。さらに、生体骨イメージングにより成熟破骨細胞の骨吸収を可視化した結果、成熟破骨細胞には、骨に強固に接着して骨基質を積極的に溶解する骨吸収型 (**Resorption type: R-type**) と、骨に緩く接着して骨吸収能力が低い非骨吸収型 (**Non-resorption type: N-type**) の2つの異なる状態があることが明らかとなった [12, 13]。最近ではこれらの技術を応用し、破骨細胞と骨芽細胞が直接接触することで破骨細胞の骨吸収機能が抑制されるという破骨細胞と骨芽細胞の細胞間コミュニケーションの生理学的役割を解明した [14, 15]。一方で、骨細胞特異的に蛍光標識されたマウスが存在しないことや骨細胞の採取が困難であることから骨細胞を標的とした解析が難しい。そのため、破骨細胞-骨細胞、また骨芽細胞-骨細胞の細胞間コミュニケーションの生理学的役割に関しては議論の余地を多く残している。

近年、関節リウマチの分野において、多種多様な薬剤が開発され臨床応用されている。特に生物学的製剤は、従来から使用されるメトトレキサート等の抗リウマチ薬で関節破壊の進行をコントロールできなかった症例において、病状を寛解に持ち込むことが可能とな

った [16, 17]。現在、炎症性サイトカインである IL-6 受容体を阻害する抗 IL-6 受容体抗体や、TNF α の中和抗体である抗 TNF α 抗体、抗原提示による T 細胞の活性化を抑制する T 細胞選択的共刺激調節剤 (CTLA-4 Ig) など様々な生物学的製剤が臨床応用され、その骨破壊抑制効果が示されている。しかし、生体内におけるこれら生物学的製剤の破骨細胞に対する作用機序の差異については不明な点が多かった。私の所属する研究室では生体骨イメージング技術を駆使して、生物学的製剤の *in vivo* での薬理作用を解析した。その結果、抗 IL-6 受容体抗体と抗 TNF α 抗体は主に成熟破骨細胞の骨吸収機能に対して、CTLA-4 Ig は破骨前駆細胞の骨表面への遊走に対して作用することで骨破壊を抑制することが解明され、各薬剤で異なる作用点から炎症性骨破壊を抑制していることが明らかとなった [18]。

さらに最近、新規の関節リウマチ治療薬として、Janus kinase (JAK) 阻害剤が登場した。JAK 阻害剤は低分子化合物のため経口投与が可能でありながら、生物学的製剤と同等の治療効果があり、非常に注目されている薬剤である [19-24]。JAK は JAK1、JAK2、JAK3、tyrosine kinase 2 (TYK2) からなる 4 つのチロシンキナーゼのファミリーの総称である。JAK とその下流分子である signal transducer and activator of transcription (STAT) によるシグナル伝達経路は JAK-STAT シグナル伝達経路と呼ばれ、細胞の増殖や分化など、多くの重要な生物学的プロセスに関与する代表的な細胞内伝達経路である。サイトカインが細胞膜上の受容体に結合すると、受容体の細胞内領域に結合した JAK が活性化する。活性化した JAK は STAT をリン酸化し、リン酸化された STAT は核内へ移行することで、サイトカインなど炎症性分子の遺伝子発現パターンを制御する [25]。受容体の種類によって活性化する JAK の種類や STAT の組み合わせが異なり、シグナル伝達経路や発現が誘導される遺伝子が異なる [26]。JAK 阻害剤は JAK-STAT シグナル伝達経路の活性化を阻害することで、関節リウマチにより生じる骨・関節破壊を有意に抑制するが、JAK 阻害剤が生体内で破骨細胞の動態や機能をどのように制御して骨・関節破壊を抑制しているのかは不明である。さらに、骨細胞における JAK-STAT シグナル伝達経路の重要性は不明な点が多く、骨細胞が JAK 阻害剤の新たなターゲットとなるかどうかを含めて詳細な解析が必要である。

本研究では、生体イメージングと遺伝子発現解析を基に破骨細胞と骨細胞に焦点をあて、炎症性骨破壊における JAK 阻害剤の作用機序の解明を試みた。その結果、破骨細胞に対する JAK 阻害剤の作用機序が、破骨前駆細胞の骨表面への遊走阻害と成熟破骨細胞の骨吸収機能阻害の 2 点であることを明らかにした。加えて、骨細胞研究を進める上で必須である細胞回収方法や遺伝子発現解析などの実験系の確立を行い JAK 阻害剤が骨細胞へ与える影響を解析するための実験基盤を整えた。

2. 実験材料・方法

2-1 マウス

本研究では、野生型 C57BL/6J マウス (CLEA Japan)、CX₃C receptor 1-enhanced green fluorescent protein (CX₃CR1-EGFP) ノックインマウス (The Jackson Laboratory) [27]、Tartrate-resistant acid phosphatase-tandem Tomato (TRAP-tdTomato) トランスジェニックマウス (私の所属する研究室で作製) [12]、photoactivatable (PA) -GFP トランスジェニックマウス (The Jackson Laboratory) [28] を使用した。

2-2 薬剤処置

生体骨イメージングでは、phosphate-buffered saline (PBS) に溶解した Lipopolysaccharide (LPS; 10 mg/kg body weight; Sigma-Aldrich) を、イソフルラン麻酔下でマウスの頭頂骨骨膜下に投与し、炎症性骨破壊を誘導した。RNA sequencing (RNA-seq)、Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)、フローサイトメトリー解析では、LPS (20 mg/kg body weight) を頭頂骨骨膜下に投与した。LPS 投与日から、0.5% Hydroxypropyl methylcellulose (Alfa Aeser) と 0.08% Tween 80 (Sigma-Aldrich) に溶解した JAK1 選択的阻害剤 ABT-317 (60 mg/kg body weight; Abbvie, Inc.) または Vehicle を 1 日 2 回 5 日間経口投与した。また、成熟破骨細胞の骨吸収を可視化するために、PBS に溶解した pH 応答性蛍光プローブ (pHocas-3; 6 mg/kg body weight; Peptide Institute, Inc.) をイメージング前の 3 日間、TRAP-tdTomato マウスに皮下投与した。C-C motif chemokine receptor 1 (CCR1) アンタゴニストである J-113863 (3 mg/kg body weight; MedChemExpress, Cat# HY-103360) を、10% dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich), 40% polyethylene glycol 300 (Wako), 5% Tween 80 (Sigma-Aldrich) および 45% PBS に溶解し、5 日間腹腔内投与した。

2-3 生体骨イメージング

TRAP-tdTomato と CX₃CR1-EGFP のダブルトランスジェニックマウスおよび TRAP-tdTomato マウス (7-20 週齢) の骨組織を生体骨イメージングによって観察した。具体的には、イソフルランで麻酔後、バリカンと除毛クリーム (Kracie) で頭部を剃毛した。頭部の皮膚を切開し頭頂骨を露出させ、独自に作製した金属製の固定具を、軟組織接合用接着剤 (アロンアルファ A「三共」: Daiichi Sankyo Company, Limited) と生体用ボンド (Vedbond™: 3M) で頭頂骨に接着させた。PBS で頭頂骨を洗浄した後に、独自に作製した固定台に金属製の固定具を介してマウスを固定して、二光子励起顕微鏡で頭頂骨の骨髓腔内を観察した。また、撮影中はマウスの体温低下を防ぐため、ヒーターを用いてマウス固定台の温度を 36-37 °C に維持した。

pHocas-3 を投与した生体骨イメージングでは、20×水浸対物レンズ (Carl Zeiss, W Plan-Apochromat: Numerical Aperture, 1.0) とフェムト秒パルス赤外レーザー (Coherent, Inc., Chameleon Vision II Ti: Sapphire)を搭載した Carl Zeiss 正立型二光子励起顕微鏡 (LSM 780 NLO)を使用した。その他の生体骨イメージングでは、25×水浸対物レンズ (Nikon, CFI175 Apo 25XC W 1300: N.A, 1.1) とデュアルフェムト秒パルス赤外レーザー (Coherent, Inc., Chameleon Discovery)を搭載した Nikon 正立型二光子励起顕微鏡 (A1R MP+) を使用した。

Carl Zeiss 二光子励起顕微鏡による生体骨イメージングでは、専用の内部検出器によるスペクトルイメージングを行った。Second harmonic generation (SHG)、tdTomato、pHocas-3、自家蛍光の4つのシグナルを同時に励起するために、940 nm の励起波長を使用した。撮影条件は Zoom: 1.5、X-Y 解像度: 512×512、Time-interval: 5 分で、頭頂骨の骨髓腔側の表面から 50-150 μm の深さを 3 μm ごとに撮影して 3D 画像を取得した。得られたイメージング画像に対し、Spectral unmixing 処理を行った。Spectral unmixing 処理の条件は事前に決定した。具体的には野生型マウス、pHocas-3 を投与した野生型マウス、TRAP-tdTomato マウスの生体骨イメージングにより得られた画像から、ZEN software (Carl Zeiss) を用いて SHG、自家蛍光、pHocas-3、tdTomato に該当のピクセルを手動で選択し、各蛍光スペクトルの情報を取得した。これらのスペクトルライブラリを用いて Spectral unmixing 処理を行い、自家蛍光を除外しつつ SHG と tdTomato、pHocas-3 のみを抽出した画像を作成した。

Nikon 二光子励起顕微鏡による生体骨イメージングでは、Infrared-cut filter (DM685)、3つの Dichroic mirror (DM458, DM506, DM605)、3つの Emission filter (SHG: 492/SP, EGFP: 525/50, tdTomato: 583/22) を備えた外部検出器で、蛍光を検出し画像を取得した。励起波長は、SHG と EGFP を 880 nm, tdTomato を 1040 nm とした。スナップショット画像を得るために Zoom: 1.0、X-Y 解像度: 512×512 に設定し、頭頂骨の骨髓腔側の骨表面から深さ 90 μm までを、3 μm ごとに撮影することで 3D 画像を取得した。EGFP⁺ 細胞の平均速度および成熟破骨細胞の形態学的変化を解析するためのタイムラプスイメージングでは Zoom: 1.5、X-Y 解像度: 512×512、Time-interval: 30 秒で、頭頂骨骨髓腔側の骨表面から 6-9 μm の深さで 3 μm ごとに撮影して、3D のタイムラプス動画を取得した。

2-4 成熟破骨細胞の骨吸収活性の解析

成熟破骨細胞の骨吸収活性の解析では、画像解析ソフト NIS-Elements software (Nikon) を用いた。まず、シグナルとノイズの intensity 比を改善するために、全ての画像に一定の γ 補正を施した (tdTomato: $\gamma=0.9$, pHocas-3: $\gamma=2.5$)。得られた画像から Maximum Intensity Projection (MIP) 画像を作成した。MIP 画像から Otsu's thresholding method により tdTomato のシグナルを二値化し、自動で成熟破骨細胞の領域を抽出した。成熟破骨細胞面積あたりの細胞内 pHocas-3 シグナルの平均蛍光強度 (pHocas-3 のシグナル) と、成熟破骨細胞外領域面積あたりの細胞外 pHocas-3 シグナルの平均蛍光強度 (pHocas-3

のノイズ) を計測した。pHocas-3 のシグナルに対する pHocas-3 のノイズの比 (pHocas-3 signal / pHocas-3 noise) を、Bone resorbing index (BRI) と定義した。

2-5 成熟破骨細胞の面積の解析

成熟破骨細胞の面積を測定する解析では、NIS-Elements software を用いた。細胞抽出のために Thresholding Intensity の条件で二値化を行い、一視野あたりの細胞面積の合計を測定した。

2-6 成熟破骨細胞の形態学的変化の解析

細胞の形態は、NIS-Elements software を用いて解析した。t = 0 の細胞領域 (A+B)、5 分後 (t = 5) の細胞領域 (B+C)、および 5 分間で重なった細胞領域 (B) を抽出し、5 分間の面積変化 (A+C) を t = 0 の細胞領域 (A+B) で割った比率 (A+C) / (A+B) を Cell deformation index (CDI) と定義した [12]。

2-7 破骨前駆細胞の平均速度の解析

まず、NIS-Elements software の Align Current ND Document により視野のズレを補正した後、Spectral unmixing によりノイズを除き、GFP の蛍光シグナルのみを抽出した。次に、Imaris software (Bitplane) を用いて、直径 10 μm 以上の EGFP の蛍光シグナルを 1 つの細胞として検出させ、その細胞の軌跡を自動追跡して、平均速度を算出した。自動追跡の Tracking algorithm は autoregressive motion を用いた。

2-8 破骨前駆細胞の骨への接着率の解析

本解析では、CX₃CR1-EGFP/TRAP-tdTomato マウスを使用した。Imaris software の Surface tool を用いて、3D 画像から SHG⁺ の骨、tdTomato⁺ 成熟破骨細胞、EGFP⁺ 破骨前駆細胞の各領域を自動で抽出した。骨表面に付着して動かない成熟破骨細胞の 3D Object に合わせて、抽出された骨の 3D Object の threshold を調整した。体積が 50 μm^3 以下の EGFP⁺ 3D Object は細胞と考えにくいため、解析から除いた。次に、SHG⁺ 3D Object と EGFP⁺ 3D Object が共局在するボクセルを検出し、骨と破骨前駆細胞の接着領域として定義した。NIS-Elements software により EGFP⁺ 破骨前駆細胞領域と骨-破骨前駆細胞接着領域を Otsu's thresholding method を用いて二値化し、接着領域の総和と抽出された破骨前駆細胞領域の総和の比を算出した。

2-9 RNA-seq 解析

CX₃CR1-EGFP マウスの頭頂骨骨膜下に LPS を投与し、JAK 阻害剤または Vehicle を 1 日 2 回 5 日間経口投与した後に、頭頂骨を採取した。頭頂骨を Flow cytometry Buffer (1×PBS, 4% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid) に浸しつつ乳鉢ですり潰すことで骨髄の細胞を採取した。その後、Cell sorter (SH800,

SONY) を用いて、骨髄の細胞から CX₃CR1-EGFP⁺ 細胞を単離した。次に、採取した細胞を QIAzol (Qiagen) で消化し、total RNA を抽出した。TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit (Illumina) を用いて、ライブラリーを調製した。シーケンスは、75-base single-end mode の HiSeq 2500 platform (Illumina) で実施した。Base calling には Casava 1.8.2 software (Illumina) を使用した。バイオインフォマティクス解析は、Integrated Differential Expression and Pathway Analysis (iDEP) software (Version 94) [29] を使用した。

2-10 Flow cytometry 解析

上記 2-9 で単離した CX₃CR1-EGFP⁺ 細胞を anti-CD16/32 antibody (BD Biosciences, Cat# 553141) で 15 分間ブロックした後、anti-CD191 (CCR1)-phycoerythrin (PE) (BioLegend, Cat# 152507) または PE-conjugated Rat IgG2b, κ isotype control antibody (BioLegend, Cat# 400607) で 30 分間染色した。Flow cytometry で測定を行い、FlowJo software (TreeStar) を用いて解析した。

2-11 RT-qPCR 解析

上記 2-9 で単離した CX₃CR1-EGFP⁺ 細胞を QIAzol (Qiagen) で消化し、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出した後、Superscript III reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific) を用いて cDNA 合成を行った。RT-qPCR は、TB Green Premix EX Taq (Tli RNaseH Plus), Bulk (TaKaRa Bio), Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 (TaKaRa Bio) を用いて実施した。目的の mRNA の相対的な発現量は、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法を用いて算出した。mRNA 発現量はハウスキーピング遺伝子である *Gapdh* に対して正規化し、増幅産物の特異性は Dissociation curve から確認した。下記のプライマーを用いて解析を行った。(Forward および Reverse): *Gapdh* (5'-ACCACAGTCCCATGCCATCAC-3' および 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3')、*Ccr1* (5'-GTGTTTCATCATTGAGTGTGG-3' および 5'-GGTTGAACAGGTAGATGCTGTC-3')

2-12 破骨細胞近傍の光刺激

PA-GFP と TRAP-tdTomato のダブルトランスジェニックマウスの頭頂骨を、上記 2-3 同様に Nikon 二光子励起顕微鏡を用いた生体骨イメージングによって観察した。SHG と EGFP を 880 nm、tdTomato を 1040 nm の波長で励起した。スナップショット画像を得るために、Zoom: 1.0、X-Y 解像度: 512×512 に設定し、頭頂骨の骨髄腔側の骨表面から深さ 90 μ m までを、3 μ m ごとに撮影し 3D 画像を取得した。得られた 3D 画像から MIP 画像を作成し、Otsu's thresholding method により tdTomato のシグナルを二値化し、成熟破骨細胞の領域を自動で抽出した。抽出した領域に Dilate 処理、Close hold 処理を施し、光刺激を行う範囲として抽出した。抽出した領域を ROI に変換し ROI 内部を光刺激部位として定め、骨髄腔骨表面から 10 μ m ごとに骨組織内部を光刺激した。光照射時の波長は 840 nm、レーザーパワーは 100 %で行った。

2-12 骨細胞の採取と single cell RNA-seq 解析

オスの野生型マウス (9 週齢) 3 匹を使用した。PBS 15 mL で灌流して血管内の血液細胞を除去した後に、頭蓋骨を採取した。ハサミを用いて採取した頭蓋骨を大きさが 1 mm 角程度の骨片になるまで破碎した。Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (+) (nacalai) で溶解した Collagenase type2 (Worthington) 3 mg/mL を破碎した骨片に加え、37 °C で 25 分間インキュベートしたのち、上澄みを回収した (Collagenase 処理)。溶け残った骨片に対して同様の Collagenase 処理をさらに 2 回行った。Collagenase 処理後も残っている骨片に、さらに 1% BSA が含まれている 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を加え 37 °C で 25 分間インキュベートした後に EDTA 溶液を回収した (脱灰処理)。その後、さらに Collagenase 処理、脱灰処理、Collagenase 処理を順番に行った [30]。Collagenase 処理、EDTA 処理により回収した溶液中に含まれる細胞を遠心して回収し、anti-CD16/32 antibody (BD Biosciences, Cat# 553141) で 15 分間ブロッキングした。ブロッキング後、anti-TER119-biotin (BioLegend, Cat# 116204) で 15 分間、streptavidin-allophycocyanin (BioLegend, Cat# 405207) 、anti-CD31-allophycocyanin (BioLegend, Cat# 102409)、anti-CD45-allophycocyanin (BioLegend, Cat# 103112) で 30 分間染色した。Cell sorter を用いて、染色した細胞から CD31⁺CD45⁺TER119⁺ 細胞を単離した。単離した細胞の single cell RNA-seq は大阪大学微生物研究所に委託した。データ解析には Loupe Browser (10x Genomics) を用いた。

2-13 統計

本研究のデータは少なくとも 3 回以上の独立した実験の代表的なものである。全ての統計データは GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.) を用いた。2 群間の統計解析は unpaired two-tailed t-test もしくは the Mann–Whitney U test で行った。3 群間の統計解析は Kruskal-Wallis test with Dunnett's post hoc test and analysis of variance (ANOVA) with the Tukey's post hoc test で行った。全ての解析で、 $P < 0.05$ は統計学的有意差があると見なした。

3. 結果

JAK 阻害剤は破骨前駆細胞の骨表面への遊走を抑制する

まず、JAK 阻害剤が炎症性骨破壊モデルにおける成熟破骨細胞に及ぼす影響を生体骨イメージングにより解析した。成熟破骨細胞に特異的に発現する酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) のプロモーター下で赤色蛍光タンパク質 (tdTomato) を発現させ、成熟破骨細胞を蛍光標識したマウス (TRAP-tdTomato マウス) の頭頂骨の骨膜下に LPS を投与して炎症性骨破壊を誘導した [12, 18]。炎症性骨破壊モデルマウスに JAK 阻害剤を 1 日 2 回 5 日間経口投与したのち、生体骨イメージングを行った。その結果、炎症性骨破壊モデル群 (Vehicle 投与群) は定常状態と比較して、TRAP-tdTomato 陽性の領域が有意に増加しており、成熟破骨細胞数の増加が示唆された (Figure 1A, B)。一方で、JAK 阻害剤を投与した炎症性骨破壊モデル群では、Vehicle 投与群と比較して、TRAP-tdTomato 陽性の領域が有意差に減少していた (Figure 1A, B)。したがって、JAK 阻害剤は炎症に伴う成熟破骨細胞数の増加を抑制することが示唆された。

JAK 阻害剤は RANKL 誘導性破骨細胞分化に対して直接的な影響を与えないことが先行研究により示されている [31]。一方で、JAK 阻害剤が血管内から骨表面へと遊走する破骨前駆細胞へ与える影響に関しては十分な解析がなされていない。そこで、JAK 阻害剤が破骨前駆細胞の細胞動態に及ぼす影響を生体骨イメージングにより解析した。破骨前駆細胞を含む単球・マクロファージ系細胞に発現するケモカイン受容体 (CX₃CR1) のプロモーター下で緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を発現させたマウス (CX₃CR1-EGFP マウス) の頭頂骨の骨膜下に LPS を投与し、炎症性骨破壊を誘導した [10, 32, 33]。この炎症性骨破壊モデルマウスに JAK 阻害剤を 1 日 2 回 5 日間経口投与し、生体骨イメージングによって EGFP⁺ 細胞の動態を解析した。その結果、炎症性骨破壊モデル群 (Vehicle 投与群) は、定常状態と比較して EGFP⁺ 細胞の動きが抑制され骨表面に留まっている様子が観察されたが、JAK 阻害剤投与群は定常状態と同様に EGFP⁺ 細胞が骨髓腔内を動いている様子が観察された (Figure 1C)。破骨前駆細胞が骨組織に接着することは、成熟破骨細胞への分化に重要なステップと考えられることから、EGFP⁺ 細胞の平均移動速度を解析した [5]。Vehicle 投与群は定常状態と比較して、EGFP⁺ 細胞の平均移動速度が有意に低下していた (Figure 1D)。一方、JAK 阻害剤投与群は Vehicle 投与群と比較して、破骨前駆細胞の平均移動速度が有意に上昇した (Figure 1D)。さらに、画像解析により骨組織に接着している破骨前駆細胞の割合を算出し JAK 阻害剤が破骨前駆細胞の骨表面への遊走に与える影響を検討した (Figure 1E)。その結果、Vehicle 投与群で骨組織に接着した破骨前駆細胞が増加した一方で、JAK 阻害剤投与群は Vehicle 投与群と比較して、骨組織に接着した破骨前駆細胞の割合が有意に減少していた (Figure 1F, G)。これらの結果より、炎症環境下では破骨前駆細胞が骨表面へ接着し移動

速度が減少し、JAK 阻害剤は破骨前駆細胞が骨表面へ遊走し接着することを抑制していると示唆された。

JAK 阻害剤は破骨前駆細胞の *Ccr1* の発現を抑制する

破骨前駆細胞の骨表面への遊走を JAK 阻害剤が抑制する分子メカニズムを遺伝子発現解析により明らかにした。JAK 阻害剤を投与した LPS 誘導炎症性骨破壊モデルマウスの頭頂骨から CX₃CR1-EGFP⁺ 細胞を単離し、RNA-Seq を行った。Vehicle 投与群に対して JAK 阻害剤投与群で *Ocstamp*, *Dcstamp*, *Ctsk*, *Atp6v0d2* など破骨細胞分化に関連する遺伝子の発現が有意に減少しており、JAK 阻害剤の投与により破骨細胞分化が抑制されていることが示唆された (Figure 2A)。さらに、Gene Ontology pathway enrichment 解析の結果には Cell chemotaxis や Regulation of cell migration といった term が見出され、変動遺伝子の多くが細胞の走化性制御に関与することが示唆された (Figure 2B)。次に、代表的なケモカイン受容体および、破骨前駆細胞の骨表面への遊走に重要な役割を果たす S1P 受容体 (*S1pr1*, *S1pr2*) [10, 33] の遺伝子発現変動を抽出した (Figure 2C)。JAK 阻害剤投与群での *Ccr1* の発現量は、Vehicle 投与群に対して 2 倍以上かつ有意に減少していたことから *Ccr1* に着目した。JAK 阻害剤投与群での破骨前駆細胞の *Ccr1* の発現が、mRNA レベルおよびタンパク質レベルで有意に減少することを RT-qPCR と FACS 解析により確認した (Figure 2D, F)。以上の結果より、JAK 阻害剤が破骨前駆細胞の遊走を抑制する分子メカニズムに *Ccr1* が関与するとの仮説を立てその検証を行った。

CCR1 は炎症時に破骨前駆細胞の骨表面への遊走を制御する

CCR1 は単球、マクロファージ、未熟樹状細胞、ナチュラルキラー細胞などに発現する炎症性ケモカイン受容体であり、破骨前駆細胞の走化性を制御することが報告されている [35, 36]。したがって、炎症環境下で CCR1 が破骨前駆細胞の骨表面への遊走に関与するか検討を行った。炎症性骨破壊を誘導した CX₃CR1-EGFP マウスに、CCR1 アンタゴニストを 1 日 1 回 5 日間腹腔内投与したのち CX₃CR1-EGFP⁺ 破骨前駆細胞の生体骨イメージングを行った (Figure 3A)。CCR1 アンタゴニスト投与群は Vehicle 投与群と比較して、EGFP⁺ 細胞の平均移動速度が有意に上昇し、骨表面に接着している破骨前駆細胞の割合が減少した (Figure 3B, C, D)。また、TRAP-tdTomato マウスを用いた生体骨イメージングにより CCR1 アンタゴニスト投与群での成熟破骨細胞領域を測定したところ、Vehicle 投与群と比較して、TRAP-tdTomato 陽性の領域が有意に減少しており骨表面の成熟破骨細胞の数が減少していることが示唆された (Figure 3E, F)。これらの結果より、破骨前駆細胞の骨表面へ遊走を JAK 阻害剤が阻害する分子メカニズム

として、破骨前駆細胞の *Ccr1* の発現を低下させ骨表面への遊走を抑制し、骨表面における成熟破骨細胞数を減少させることが示された。

JAK 阻害剤は炎症により活性化した成熟破骨細胞の機能を抑制する

次に、成熟破骨細胞の機能に対する JAK 阻害剤の影響を生体骨イメージングで検討した。TRAP-tdTomato マウスの頭頂骨の骨膜下に LPS を投与して炎症性骨破壊を誘導し、JAK 阻害剤を 1 日 2 回 5 日間経口投与した [12, 18]。さらに、成熟破骨細胞の骨吸収活性を可視化するために、成熟破骨細胞が分泌する酸を感知して蛍光を生じる pH 応答性蛍光プローブ (pHocas-3) をイメージングの 3 日前から皮下投与した [13]。LPS 投与から 5 日後に生体骨イメージングを行い、成熟破骨細胞の骨吸収活性を定量的に評価した (Figure 4A, B)。その結果、定常状態と比較して、炎症性骨破壊モデル群 (Vehicle 投与群) では成熟破骨細胞の骨吸収活性が有意に上昇した (Figure 4C)。一方、JAK 阻害剤投与群では、Vehicle 投与群と比較して成熟破骨細胞の骨吸収活性が有意に減少した (Figure 4C)。

生体内の成熟破骨細胞には、細胞の形態変化が小さく骨吸収性が高い骨吸収型と細胞の形態変化が大きく骨吸収性が低い非骨吸収型という 2 つの異なる状態が存在する [12]。成熟破骨細胞の機能に対する JAK 阻害剤の効果をさらに検討するため、成熟破骨細胞の形態学的変化を解析した (Figure 4D)。その結果、炎症性骨破壊モデル群 (Vehicle 投与群) では、定常状態と比較して成熟破骨細胞の運動性が有意に低下しており、骨吸収型の成熟破骨細胞が増加していることが示された (Figure 4E)。一方、JAK 阻害剤投与群では、運動性が低下した Vehicle 投与群と比較して成熟破骨細胞の運動性が有意に増加しており、非骨吸収型の成熟破骨細胞が増加していることが示された (Figure 4E)。これらの結果から、JAK 阻害剤は炎症により活性化した成熟破骨細胞の骨吸収機能を抑制することが示唆された。

骨細胞など生体骨組織内の細胞を選択的に採取する方法の確立

JAK 阻害剤は炎症により活性化した成熟破骨細胞の骨吸収活性を抑制することを示したがそのメカニズムは未解明である。近年の研究により、骨細胞が放出する RANKL が破骨細胞の形成に重要であることが示された [2, 3]。さらに骨細胞は破骨前駆細胞と接触し RANKL 刺激を介して破骨細胞への分化を誘導することが示唆され、破骨細胞と骨細胞の細胞間コミュニケーションの生理学的役割に注目が集まっている [37, 38]。そこで、骨細胞が成熟破骨細胞の骨吸収を制御するのではないかと考え、JAK 阻害剤が骨細胞に与える影響を検証することとした。骨細胞は骨基質に埋没しており回収方法が確立されていないこと、また骨細胞の特異的な表面マーカー分子が同定されておらず骨細胞の単離が困難であることから、まず骨細胞の解析を進めるための実験基盤を構築した。

はじめに、骨組織内の細胞を採取する方法の条件検討を行った。コラゲナーゼによる組織の分散方法と、EDTAによる脱灰処理を交互に繰り返すことで骨組織を溶解し、溶解液から細胞を回収した [31]。この細胞回収法により採取され細胞を、single cell RNA-seqにより解析した (Figure 5A)。細胞は7つのクラスターに分類され、マーカー遺伝子の発現を基にクラスターのアノテーションを行った (Figure 5B)。クラスター1は *Cxcl12* を高発現していた。*Cxcl12* は CAR 細胞のマーカー遺伝子であることから、クラスター1は CAR 細胞であると判断した。加えて、クラスター4は *Bglap*, *Col1a1*, *Sp7* を高発現していた。これらの遺伝子は骨芽細胞が発現する特徴的な遺伝子であることから、クラスター4は骨芽細胞であると判断した (Figure 5B, C)。クラスター4には、骨芽細胞から骨細胞へと分化した直後の骨細胞から発現する *Dmp1*, *Phex*, *Pdpr* 遺伝子を発現する細胞や分化段階が進んだ骨細胞で高発現する *Dkk1* を発現した細胞が含まれており、骨細胞も回収できていると判断した (Figure 5B, D)。その他のクラスターは遺伝子発現情報だけではどの細胞種であるか判断することが出来なかった。

次に破骨細胞近傍の骨細胞のみを単離する方法が必要と考え、光刺激により標的細胞を蛍光標識できる PA-GFP マウスに着目した [28]。PA-GFP マウスの細胞は二光子励起顕微鏡で波長 840 nm のレーザー光を照射することで細胞を緑色に蛍光標識することができる [39]。私は新たに PA-GFP マウスと TRAP-tdTomato マウスを掛け合わせたマウスを作製し、破骨細胞の近傍にある骨細胞のみを緑色に蛍光標識する方法を検討した。生体骨イメージングにより骨表面に存在する破骨細胞を撮影し、MIP 画像を作成した。さらに作製した MIP 画像から二値化して TRAP-tdTomato⁺ 破骨細胞の領域を決定した。その領域内を光刺激することで破骨細胞近傍の骨細胞のみを選択的に標識することを可能にした (Figure 6A, B)。以上の結果より、骨細胞を解析する手段が概ね確立できたといえ、JAK 阻害剤が骨細胞に与える影響を解析する基盤が整ったと判断した。

4. 考察

JAK 阻害剤は、関節リウマチの炎症による関節破壊の進行を強力に抑制する [19-23]。本研究では、生体骨イメージングを用いて JAK 阻害剤が生体内の成熟破骨細胞と破骨前駆細胞の動態に対してどのような影響を与えるのか解析した。JAK 阻害剤は、成熟破骨細胞の骨吸収活性と破骨前駆細胞の骨表面への遊走の両方を阻害することで、炎症性骨破壊を抑制していることが明らかとなった。さらに、JAK 阻害剤の投与により破骨前駆細胞の *Ccr1* の発現が低下していたことから、CCR1 が破骨前駆細胞の骨表面への遊走を制御する因子であることも生体骨イメージングにより明らかとなった。

JAK 阻害剤は *Ccr1* の発現を介して破骨前駆細胞の骨表面への遊走を妨げることを明らかにした (Figure 1, 2)。これまで私の所属する研究室では、抗 IL-6 受容体抗体と抗 TNF- α 抗体が主に成熟破骨細胞の機能を、CTLA-4 Ig は主に破骨前駆細胞の骨表面への遊走を妨げることで、炎症性骨破壊を抑制していることを明らかにした [18]。その研究で行われた RNA-Seq のデータを再解析したところ、CTLA-4 Ig を投与した LPS 誘導炎症性骨破壊モデルマウスの破骨前駆細胞では、*Ccr1* などのケモカイン受容体の遺伝子発現に変動は認められなかった [18]。CTLA-4 Ig と JAK 阻害剤はいずれも、破骨前駆細胞の骨表面への遊走を阻害するが、その分子メカニズムは薬剤間で異なる可能性が示唆された。また、JAK 阻害剤は成熟破骨細胞の機能を阻害するメカニズムが、抗 IL-6 受容体抗体と抗 TNF- α 抗体による成熟破骨細胞の骨吸収機能を制御するメカニズムと異なる可能性がある (Figure 4)。今後のさらなる解析により、これら薬物間での分子メカニズムの違いが明らかなることを期待したい。

これまでに JAK 阻害剤が破骨細胞の分化に与える影響として、JAK 阻害剤トファシチニブが RANKL 誘導性の破骨細胞分化を直接制御しないことが報告されている [31]。一方で別の研究では、トファシチニブは IL-6 を介した破骨細胞分化の活性化を阻害することが示されている [40]。IL-6 は受容体に結合した後、JAK1 をリン酸化して JAK-STAT シグナル伝達経路を活性化するため、JAK 阻害剤が IL-6 を介した破骨細胞分化の活性化を抑制した可能性が考えられる [20]。本研究において、JAK 阻害剤は破骨前駆細胞の骨表面への遊走を抑制し、骨表面の成熟破骨細胞数を減少させることを明らかにした。また、JAK 阻害剤投与群の破骨前駆細胞では、*Ocstamp* や *Dcstamp* などの破骨細胞関連遺伝子の発現量が低下していたため、JAK 阻害剤は *in vivo* 環境下では破骨細胞の分化も阻害している可能性が示唆された (Figure 2)。また、本研究において JAK 阻害剤が *Ccr1* の発現を介して破骨前駆細胞の骨表面への遊走を阻害することを示した (Figure 2, 3)。*Ccr1* 欠損マウスの骨髄では、破骨細胞分化能を有する CD45⁺ CD11b⁺ CD115⁺ 細胞が減少し、破骨細胞形成能が低下することが報告されている [41]。文献の報告と本研究結果を考慮すると、*Ccr1* の遺伝子発現の低下が破骨前駆細胞の骨表面への遊走の阻害に加え、骨髄における破骨前駆細胞の減少、さらに破骨細胞分化の活性化を抑制することで、成熟破骨細胞数の増加を抑制させた可能性が示唆された。

本研究では、**JAK** 阻害剤が破骨細胞の骨吸収活性を抑制したメカニズムを解明するために破骨細胞近傍の骨細胞に着目した。骨細胞は骨組織からの採取・単離が困難であることから、**bulk RNA-seq** や **single cell RNA-seq** の報告はあるものの、解析された細胞数が少なく骨細胞の機能的多様性を明らかにできていない [42, 43]。本研究では **Collagenase** 処理と脱灰処理を繰り返すことで、骨組織に埋没する骨細胞を採取する方法を確立し、骨細胞の **single cell RNA-seq** が実施可能であることを示した。今後、詳細なデータ解析をすることで、未だ特定されていない骨細胞特異的な表面マーカー分子を同定することも可能である。さらに、本研究による **single cell RNA-seq** データには、**CAR** 細胞、骨芽細胞、骨細胞が含まれていた (**Figure 6**)。CAR 細胞は間葉系細胞の一つであり骨芽細胞への分化能を持つ [44]。加えて、骨芽細胞は骨細胞の前駆細胞であることから、確立した方法によって、CAR 細胞-骨芽細胞-骨細胞という同一の細胞系譜をたどる細胞群を同時に回収できることが考えられた。また、本研究により得られた **single cell RNA-seq** データを解析することで、CAR 細胞から骨細胞へと至る過程の遺伝子発現変動を詳細に解析できる可能性がある。

生理的な骨代謝では、破骨細胞と骨芽細胞は互いに集団を形成し混ざり合うことがないため、骨吸収領域と骨形成領域が厳密に制御する根柢のメカニズムが存在すると考えられる [14]。骨細胞は、**RANKL** を分泌することで破骨細胞の分化を制御することが報告されている [2, 3]。骨細胞は骨基質全体に均一に分布していることから、全ての骨細胞が **RANKL** を分泌すると仮定すると破骨細胞は骨表面全体に形成されると考えられる。しかし、実際には骨吸収領域は限定的であることから、一部の骨細胞のみが **RANKL** を発現し破骨細胞の局在や骨吸収を制御していると考えられる。このメカニズムや骨細胞の不均一性を検証するには、空間情報を保持した上での骨細胞の遺伝子発現解析が必須となる。本研究では **PA-GFP** マウスと生体骨イメージングを融合させることで、破骨細胞近傍の骨細胞を蛍光標識することに成功した (**Figure 6**)。PA-GFP と TRAP-tdTomato のダブルトランスジェニックマウスを用いることで、破骨細胞近傍の骨細胞と破骨細胞がない領域の骨細胞を選択的に採取することができ、さらに **single cell RNA-seq** を行うことにより破骨細胞の局在性や骨吸収機能を制御する骨細胞サブセットを明らかにすることが可能となった。これまで空間情報を保持した骨細胞の採取手法に関する報告はなく、本手法はこれからの骨代謝研究に有用なツールとなると考える。

本研究では、**JAK** 阻害剤が炎症環境下の成熟破骨細胞と破骨前駆細胞の両方に抑制的な影響を与えることで、関節炎における骨破壊を強力に抑制する可能性を示した。生体骨イメージングによる薬効評価系は今後、臨床現場で使用されている様々な **JAK** 阻害剤の薬理的差異を評価し、関節リウマチの薬物治療の最適化を検討するのに役立つと考えられる。加えて、**JAK** 阻害剤と骨細胞の関係を解析する目的で確立した骨細胞の回収法と標識法は、これからの骨代謝研究の重要な研究手段となることが期待できる。

5.謝辞

本研究を遂行するにあたりご指導・ご助言受け賜りました

大阪大学大学院 生命機能研究科/医学系研究科 免疫細胞生物学

教授 石井 優 博士

准教授 菊田 順一 博士

助教 内田 穰 博士

に深く感謝の意を表します。

また、日頃から多くのサポートをいただいた免疫細胞生物学教室の皆様に感謝します。

6. 出典

本研究は、Inflammation and Regeneration 誌に公開されています。

Yari S, Kikuta J, et al. JAK inhibition ameliorates bone destruction by simultaneously targeting mature osteoclasts and their precursors. *Inflamm Regen*. 2023 Mar 3;43(1):18.
doi: 10.1186/s41232-023-00268-4.

7. 参考文献

1. Bolamperti S, Villa I, Rubinacci A. Bone remodeling: an operational process ensuring survival and bone mechanical competence. *Bone Res* 2022;10:48.
2. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, *et al.* Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* 2011;17:1231–1234.
3. Xiong J, Onal M, Jilka R, *et al.* Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med* 2011;17:1235–1241.
4. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 2003;4:638–49.
5. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337–42.
6. Gravallesse EM, Harada Y, Wang JT, *et al.* Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* 1998;152:943–51.
7. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2011;365:2205–19.
8. Ødegård S, Landewé R, van der Heijde D, *et al.* Association of early radiographic damage with impaired physical function in rheumatoid arthritis: a ten-year, longitudinal observational study in 238 patients. *Arthritis Rheum* 2006;54:68–75.
9. Ostrowska M, Maśliński W, Prochorec-Sobieszek M, *et al.* Cartilage and bone damage in rheumatoid arthritis. *Reumatologia* 2018;56:111–20.
10. Ishii M, Egen JG, Klauschen F, *et al.* Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature* 2009;458:524
11. Ishii M, Kikuta J, Shimazu Y, *et al.* Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling *in vivo*. *J Exp Med* 2010;207:2793–8.
12. Kikuta J, Wada Y, Kowada T, *et al.* Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function. *J Clin Invest* 2013;123:866–73.
13. Maeda H, Kowada T, Kikuta J, *et al.* Real-time intravital imaging of pH variation associated with osteoclast activity. *Nat Chem Biol* 2016;12:579–85.
14. Furuya M, Kikuta J, Fujimori S, *et al.* Direct cell-cell contact between mature osteoblasts and osteoclasts dynamically controls their functions *in vivo*. *Nat Commun* 2018;9:300.
15. Morimoto A, Kikuta J, Nishikawa K, *et al.* SLPI is a critical mediator that controls PTH-induced bone formation. *Nat Commun* 2021;12:2136.
16. Smolen JS, Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:473–88.

17. Aletaha D, Smolen JS. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis: a review. *JAMA* 2018;320:1360–72.
18. Matsuura Y, Kikuta J, Kishi Y, *et al.* *In vivo* visualisation of different modes of action of biological DMARDs inhibiting osteoclastic bone resorption. *Ann Rheum Dis* 2018;77:1219–25.
19. van der Heijde D, Landewé RBM, Wollenhaupt J, *et al.* Assessment of radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis treated with tofacitinib in long-term studies. *Rheumatology* 2021;60:1708–16.
20. Emery P, Durez P, Hueber AJ, *et al.* Baricitinib inhibits structural joint damage progression in patients with rheumatoid arthritis-a comprehensive review. *Arthritis Res Ther* 2021;23:3.
21. Peterfy CG, Strand V, Friedman A, *et al.* Inhibition of Structural Joint Damage Progression with Upadacitinib in Rheumatoid Arthritis: 1-Year Outcomes from the SELECT Phase 3 Program. *Rheumatology* 2021:keab861.
22. Takeuchi T, Tanaka Y, Tanaka S, *et al.* Efficacy and safety of peficitinib (ASP015K) in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate: results of a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial (RAJ4) in Japan. *Ann Rheum Dis* 2019;78:1305–19.
23. Combe B, Kivitz A, Tanaka Y, *et al.* Filgotinib versus placebo or adalimumab in patients with rheumatoid arthritis and inadequate response to methotrexate: a phase III randomised clinical trial. *Ann Rheum Dis* 2021;80:848-858.
24. Westhovens R, Rigby WFC, van der Heijde D, *et al.* Filgotinib in combination with methotrexate or as monotherapy versus methotrexate monotherapy in patients with active rheumatoid arthritis and limited or no prior exposure to methotrexate: the phase 3, randomised controlled FINCH 3 trial. *Ann Rheum Dis* 2021;80:727–38.
25. Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, *et al.* The Janus kinases (Jaks). *Genome Biol* 2004;5:253.
26. Schwartz DM, Kanno Y, Villarino A, *et al.* JAK inhibition as a therapeutic strategy for immune and inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2017;16:843–62.
27. Jung S, Aliberti J, Graemmel P, *et al.* Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* 2000;20:4106–14.
28. Patterson GH, Lippincott-Schwartz J. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science* 2002;297:1873-7.
29. Ge SX, Son EW, Yao R. iDEP: an integrated web application for differential expression and pathway analysis of RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics* 2019;19:534.
30. Stern AR, Stern MM, Van Dyke ME, *et al.* Isolation and culture of primary osteocytes

- from the long bones of skeletally mature and aged mice. *Biotechniques* 2012;52:361-73.
31. LaBranche TP, Jesson MI, Radi ZA, *et al.* JAK inhibition with tofacitinib suppresses arthritic joint structural damage through decreased RANKL production. *Arthritis Rheum* 2012;64:3531–42.
 32. Kotani M, Kikuta J, Klauschen F, *et al.* Systemic circulation and bone recruitment of osteoclast precursors tracked by using fluorescent imaging techniques. *J Immunol* 2013;190:605–12.
 33. Koizumi K, Saitoh Y, Minami T, *et al.* Role of CX3CL1/fractalkine in osteoclast differentiation and bone resorption. *J Immunol* 2009;183:7825–31.
 34. Kikuta J, Kawamura S, Okiji F *et al.* Sphingosine-1-phosphate-mediated osteoclast precursor monocyte migration is a critical point of control in antibone-resorptive action of active vitamin D, *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:7009
 35. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004;25:677–86.
 36. Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, *et al.* CCR1 chemokines promote the chemotactic recruitment, RANKL development, and motility of osteoclasts and are induced by inflammatory cytokines in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2004;19:2065–77.
 37. Zhao S, Zhang YK, Harris S, *et al.* MLO-Y4 osteocyte-like cells support osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res* 2002;17:2068-79.
 38. Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, *et al.* RANKL subcellular trafficking and regulatory mechanisms in osteocytes. *J Bone Miner Res.* 2013;28:1936-49.
 39. Victora GD, Schwickert TA, Fooksman DR, *et al.* Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* 2010;143:592-605.
 40. Yokota K, Sato K, Miyazaki T, *et al.* Combination of tumor necrosis factor α and interleukin-6 induces mouse osteoclast-like cells with bone resorption activity both *in vitro* and *in vivo*. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:121–9.
 41. Hoshino A, Iimura T, Ueha S, *et al.* Deficiency of chemokine receptor CCR1 causes osteopenia due to impaired functions of osteoclasts and osteoblasts. *J Biol Chem* 2010;285:28826–37.
 42. Youten SE, Kemp JP, Logan JG, *et al.* Osteocyte transcriptome mapping identifies a molecular landscape controlling skeletal homeostasis and susceptibility to skeletal disease. *Nat Commun* 2021;12:2444.
 43. Wang JS, Kamath T, Mazur CM, *et al.* Control of osteocyte dendrite formation by Sp7 and its target gene osteocrin. *Nat Commun* 2021;12:6271.
 44. Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, *et al.* The essential functions of adipo-osteogenic

progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity* 2010;33:387-99.

8. 図表

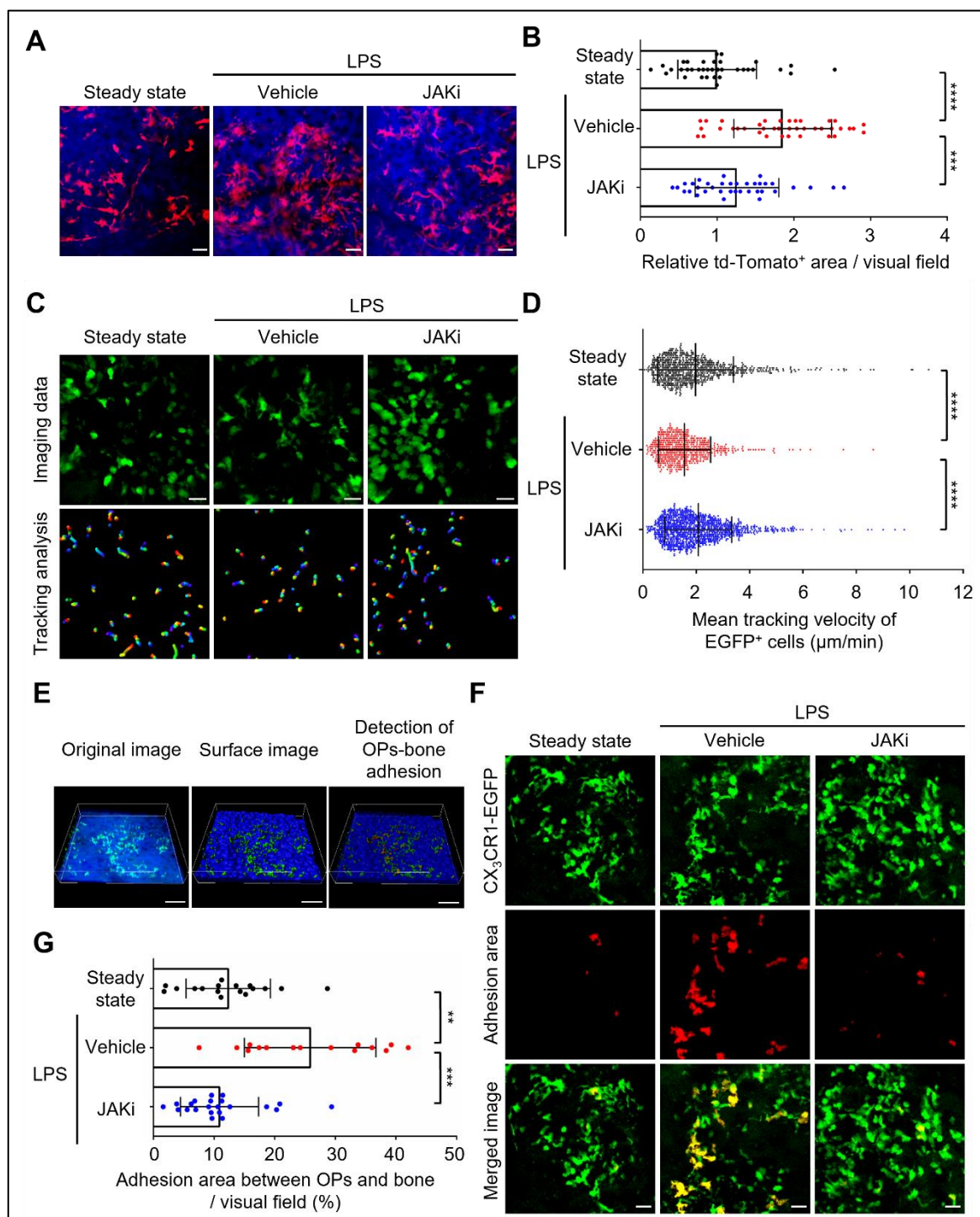


Figure 1. JAK 阻害剤は破骨前駆細胞の骨表面への遊走を抑制する

(A) LPS により炎症性骨破壊を誘導した TRAP-tdTomato マウスに JAKi を投与して頭頂骨の生体骨イメージングを行った。赤: TRAP-tdTomato⁺ 成熟破骨細胞、青: 骨 (SHG)。Scale bar: 50 μ m。(B) Steady state に対する TRAP-tdTomato⁺ 成熟破骨細胞の面積の解析結果。

(Steady state: n = 35 images、Vehicle: n = 39 images、JAKi: n = 36 images、各群 5 匹)。(C) LPS 投与により炎症性骨破壊を誘導した CX₃CR1-EGFP マウスに JAK 阻害剤 (JAKi) を投与して頭頂骨の生体骨イメージングを行った。緑: CX₃CR1-EGFP⁺ 細胞。Scale bar: 30 μm (上段)。EGFP⁺ 細胞の動きを 10 分間追跡した。Color line は細胞の軌跡を示す (下段)。(D) EGFP⁺ 細胞の平均移動速度を計測した結果。(Steady state: n = 795 cells、Vehicle: n = 570 cells、JAKi: n = 1091 cells、各群 5 匹)(E) 破骨前駆細胞と骨組織の接着領域の抽出方法。生体骨イメージングにより 3D イメージング画像を作成した。緑: CX₃CR1-EGFP、青: 骨 (SHG) (左)。3D イメージング画像から破骨前駆細胞領域と骨組織領域を抽出した (中)。破骨前駆細胞と骨組織が重なった領域 (赤色) を接着領域とした (右)。Scale bar: 100 μm。(F) 骨組織に接着している破骨前駆細胞の割合を解析した。上段は CX₃CR1-EGFP⁺ 細胞、中段は CX₃CR1-EGFP⁺ 細胞と骨組織の接着領域、下段は重ね合わせ画像を示す。緑: CX₃CR1-EGFP、赤: EGFP⁺ 細胞と骨組織の接着領域。Scale bar: 20 μm。(G) 骨組織に接着している破骨前駆細胞の割合の解析結果。(Steady state : 3 匹のマウスから n = 17 images、Vehicle: 3 匹のマウスから n = 15 images、JAKi: 4 匹のマウスから n = 22 images) Error bar は平均値 ± SD を示す。Kruskal-Wallis 検定により統計学的解析を行った。**: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$.

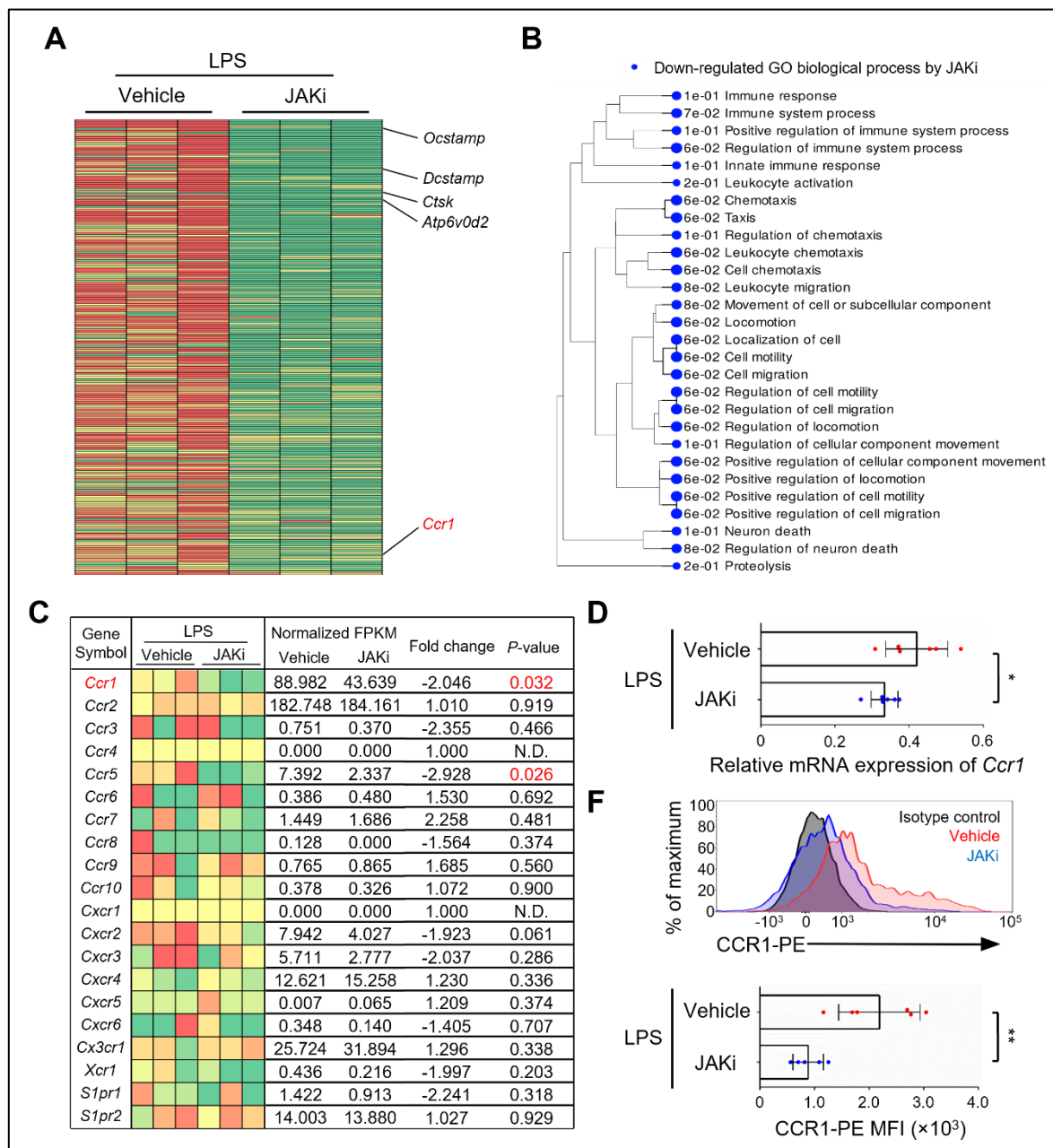


Figure 2. JAK 阻害剤は破骨前駆細胞の *Ccr1* の発現を低下させる

(A) JAK 阻害剤 (JAKi) または Vehicle を投与した LPS 誘導炎症性骨破壊モデルマウスから CX₃CR1-EGFP⁺ 細胞を単離し、RNA-seq で解析した。JAKi 投与群で発現量が低下した遺伝子の Heatmap を示す。(Fold change < -2, P < 0.05, 各群 3 匹) (B) JAKi 投与群で発現量が低下した遺伝子の enrichment gene ontology (GO) 解析の結果。ドットの大きさは P 値に比例する。(C) ケモカイン受容体および *S1pr1*, *S1pr2* の Heatmap。緑は遺伝子発現レベルの低下、赤は遺伝子発現レベルの上昇を示す。(各群 3 匹) (D) CX₃CR1-EGFP⁺ 細胞における *Ccr1* 発現を RT-qPCR で解析した。(各群 6 匹) (E) CX₃CR1-EGFP⁺ 細胞における CCR1 発現をフローサイトメトリーで解析した。代表的なヒストグラム (上段) および平均蛍光強度 (Mean fluorescent intensity: MFI) (下段) を示す。(Vehicle: n = 6 mice、

JAKi: $n = 5$ mice)。Error bar は平均値 $\pm$ SD を示す。Two-tailed Student's t -test により統計学的解析を行った。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

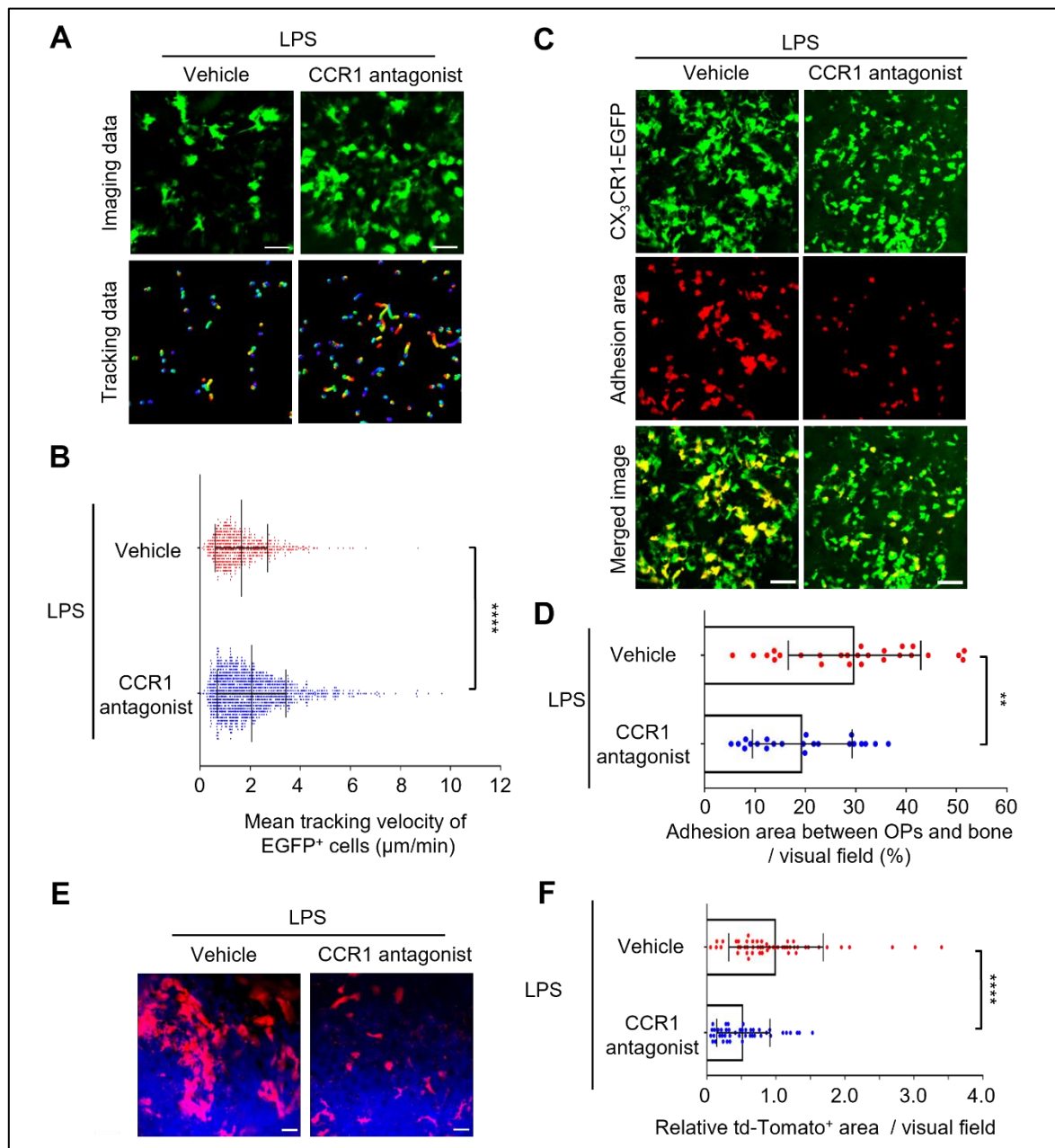


Figure 3. CCR1 は炎症時に破骨前駆細胞の骨表面への遊走を制御する

(A) LPS により炎症性骨破壊を誘導した CX₃CR1-EGFP マウスに CCR1 アンタゴニストを投与して頭頂骨の生体骨イメージングを行った。緑: CX₃CR1-EGFP⁺ 細胞。Scale bar: 30 μm (上段)。EGFP⁺ 細胞の動きを 10 分間追跡した。Color line は細胞の軌跡を示す (下段)。(B) EGFP⁺ 細胞の平均移動速度を計測した結果。(Vehicle: n = 589 cells、JAKi: n = 1281 cells、各群 6 匹) (C) 破骨前駆細胞と骨組織の接着領域を解析した。上段は CX₃CR1-EGFP⁺ 細胞、中段は CX₃CR1-EGFP⁺ 細胞と骨組織の接着領域、下段は重ね合わせ画像を示す。緑: CX₃CR1-EGFP⁺ 細胞、赤: EGFP⁺ 細胞と骨組織の接着領域。Scale bar: 20 μm。(E) 骨組織に接着している破骨前駆細胞の割合の解析結果。(Vehicle: n = 26 images、CCR1 antagonist: n = 22 images、各群 3 匹) (F) LPS により炎症性骨破

壊を誘導した TRAP-tdTomato マウスに CCR1 アンタゴニストを投与して生体骨イメージングを行った。赤: TRAP-tdTomato⁺ 成熟破骨細胞、青: 骨 (SHG)。Scale bar: 50 μ m。 (G) TRAP-tdTomato⁺ 成熟破骨細胞の面積の解析結果。 (Vehicle: n = 51 images、CCR1 antagonist: n = 44 images、 各群 6 匹)。Error bar は平均値 $\pm$ SD を示す。Kruskal-Wallis 検定により統計学的解析を行った。 **: $P < 0.01$, ****: $P < 0.0001$.

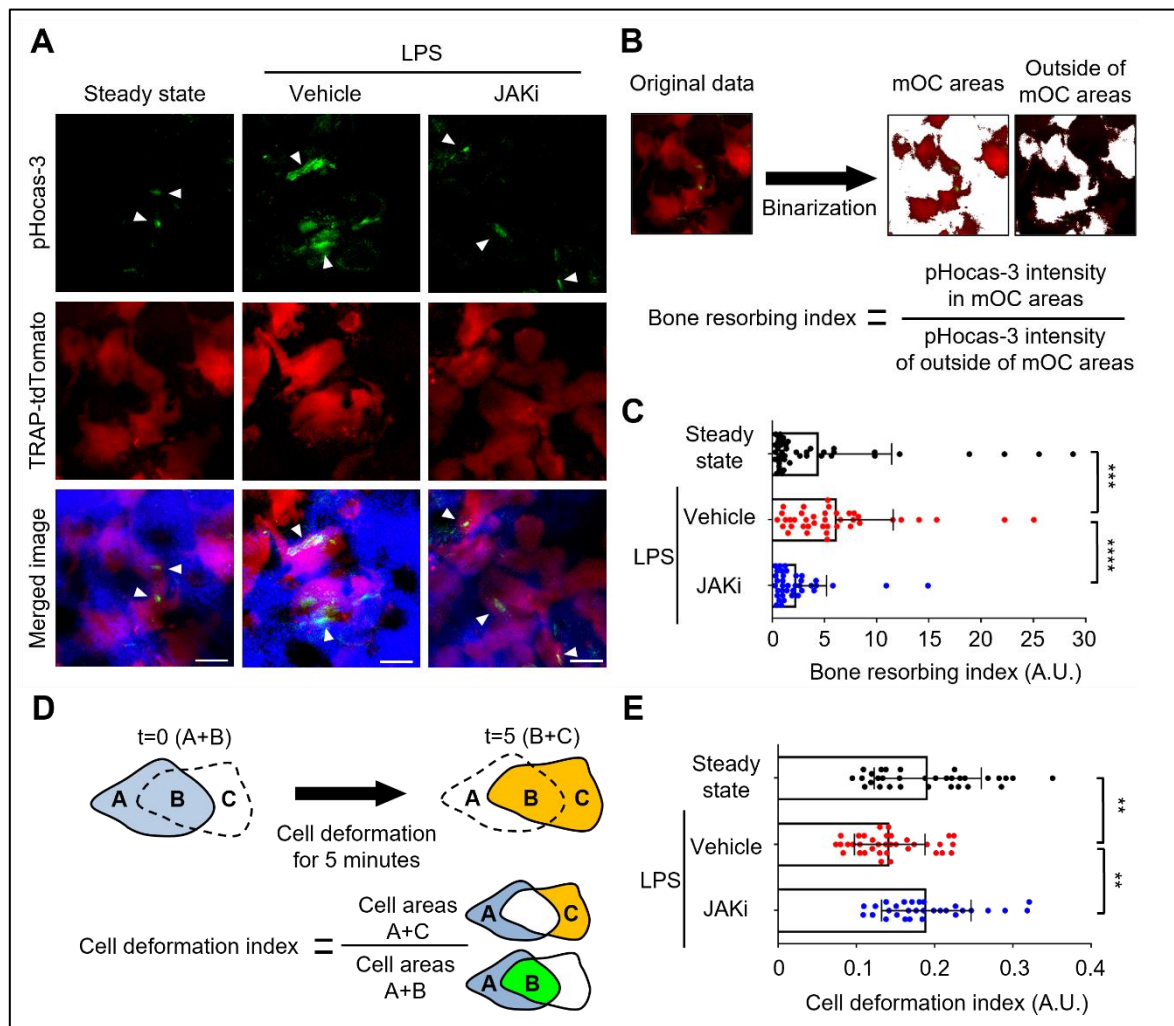


Figure 4. JAK 阻害剤は炎症により活性化した成熟破骨細胞の機能を抑制する

(A) LPS による炎症性骨破壊を誘導した TRAP-tdTomato マウスに JAK 阻害剤 (JAKi) と pH 応答性蛍光プローブ (pHocas-3) を投与して生体骨イメージングを行った。緑: pHocas-3、赤: TRAP-tdTomato⁺ 成熟破骨細胞、青: 骨 (SHG)。矢尻: 酸性領域。Scale bar: 30 μm 。(B) 成熟破骨細胞の骨吸収活性の評価方法。イメージング画像を二値化し成熟破骨細胞領域を抽出した。成熟破骨細胞領域の内側 (pHocas-3 のシグナル) と外側 (pHocas-3 のノイズ) でそれぞれ pHocas-3 の平均蛍光強度を測定した。骨吸収活性 (Bone resorbing index) は、pHocas-3 のシグナルと pHocas-3 のノイズの比として算出した。緑: pHocas-3、赤: TRAP-tdTomato⁺ 成熟破骨細胞。(C) 成熟破骨細胞の骨吸収活性の解析結果。(Steady state: n=43 images、Vehicle: n=40 images、JAKi: n=38 images、各群 5 匹)(D) 成熟破骨細胞の形態学的変化の解析方法。t = 0 の細胞領域 (A+B)、5 分後 (t = 5) の細胞領域 (B+C)、およびこれら 5 分間で重なった細胞領域 (B)を抽出し、5 分間の面積変化 (A+C) を t = 0 の細胞領域 (A+B)で割った比率 (A+C) / (A+B) を Cell deformation index と定義した。(E) 成熟破骨細胞の形態学的変化の解析結果。(Steady state: 3 匹のマウスから n = 32 cells、Vehicle: 3 匹のマウスから n = 36 cells、JAKi: 4 匹

のマウスから $n = 30$ cells)。Error bar は平均値 $\pm$ SD を示す。Kruskal-Wallis 検定により統計学的解析を行った。**: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$.

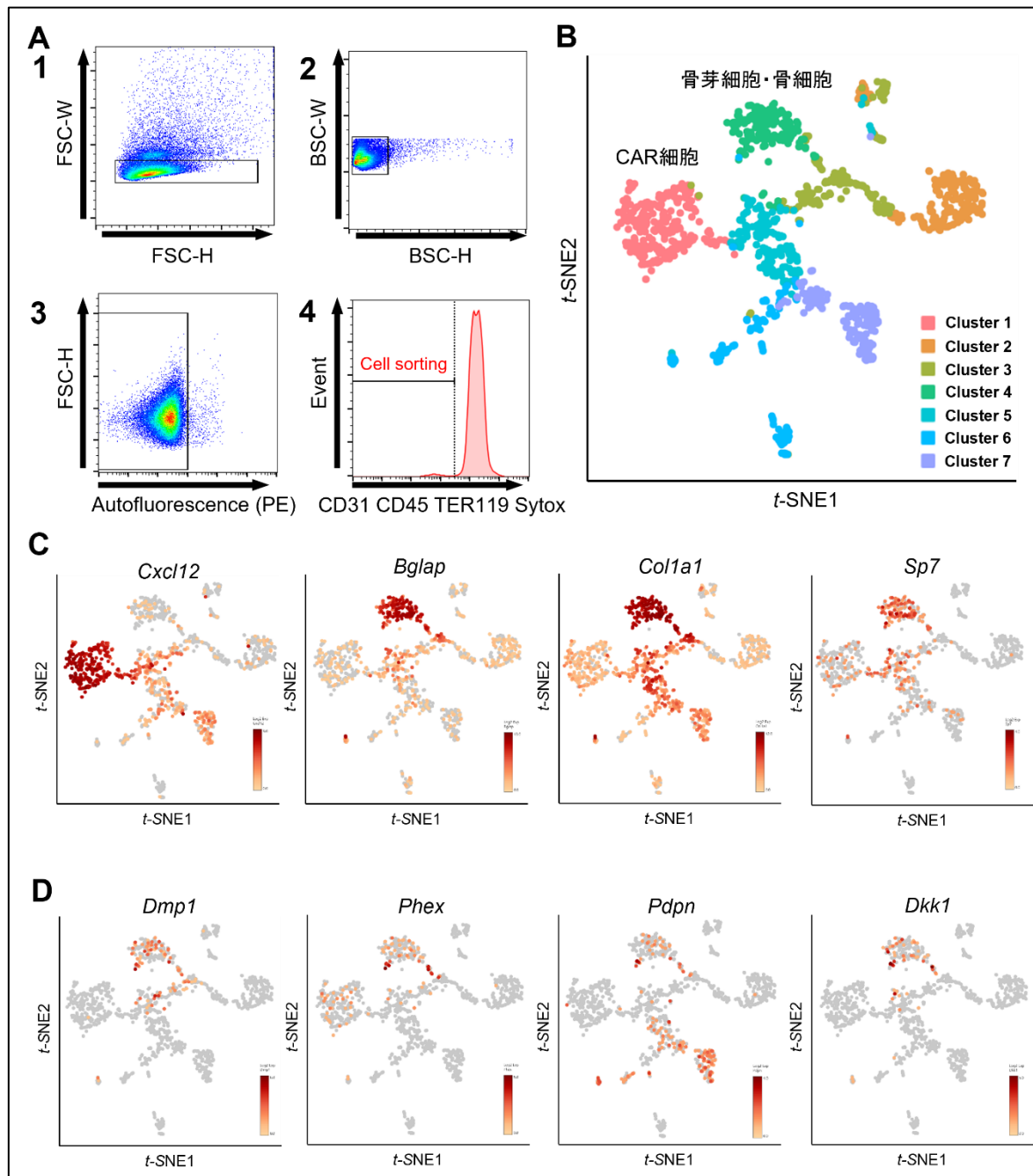


Figure 5. 骨細胞の採取方法の確立

(A) Collagenase 処理と脱灰処理で得られた細胞から singlet のみを gating して (1, 2)、骨片などが含まれる自家蛍光を除いた後に (3)、CD31⁺CD45⁺TER119⁺Sytox Red⁺ の細胞を単離して single cell RNA-seq を行った (4)。(B) single cell RNA-seq の t-SNE プロットの結果。7 つのクラスターに分類され、遺伝子の特徴から CAR 細胞、骨芽細胞、骨細胞が含まれることが分かった。(C) CAR 細胞および骨芽細胞のマーカー遺伝子の発現量を示したプロット。*Cxcl12*: CAR 細胞に特徴的な遺伝子。*Bglap*, *Col1a1*, *Sp7*: 骨芽細胞に特徴的な遺伝子。(D) 骨細胞に発現する特徴的な遺伝子の発現量を示したプロット。

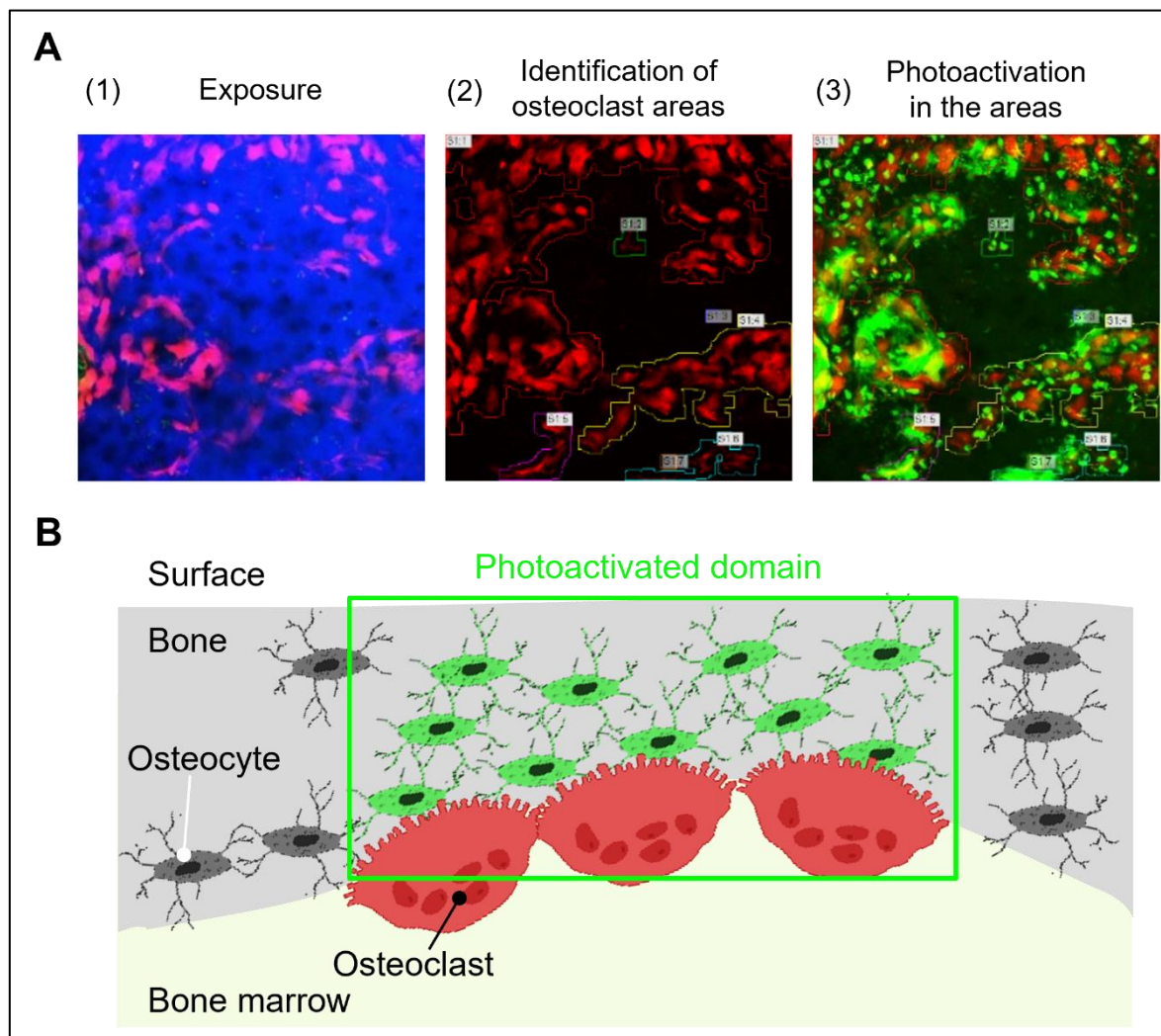


Figure 6. 破骨細胞近傍の骨細胞を選択的に標識する方法の確立

(A) 破骨細胞近傍の骨細胞を選択的に光刺激する方法。PA-GFP と TRAP-tdTomato のダブルトランスジェニックマウスの頭頂骨を生体骨イメージングで撮影し、MIP 画像を作成した (1)。得られた MIP 画像から dTomato のシグナルを二値化することで抽出し、Dilate 処理および Close hold 処理を行った (2)。領域内を光刺激することで破骨細胞近傍の細胞を蛍光標識した (3)。(B) 光刺激する領域を決定した後、破骨細胞の直下の骨基質を光刺激することで破骨細胞近傍の骨細胞を蛍光標識した。

業績

発表論文

1. Hashimoto R, Minoshima M, Kikuta J, Yari S, Bull SD, Ishii M, Kikuchi K. An Acid-Activatable Fluorescence Probe for Imaging Osteocytic Bone Resorption Activity in Deep Bone Cavities. *Angew Chem Int Ed Engl* 2020;59(47):20996-21000.
2. Agemura T, Hasegawa T, Yari S, Kikuta J, Ishii M. Arthritis-associated osteoclastogenic macrophages (AtoMs) participate in pathological bone erosion in rheumatoid arthritis. *Immunol Med* 2022;45(1):22-26.
3. Agemura T, Hasegawa T, Yari S, Kikuta J, Ishii M. Arthritis-associated osteoclastogenic macrophage, AtoM, as a key player in pathological bone erosion. *Inflamm Regen* 2022;42(1):17.
4. Koike T, Fujii K, Kometani K, Butler NS, Funakoshi K, Yari S, Kikuta J, Ishii M, Kurosaki T, Ise W. Progressive differentiation toward the long-lived plasma cell compartment in the bone marrow. *J Exp Med* 2023;220(2):e20221717.
5. Yari S, Kikuta J, Shigyo H, Miyamoto Y, Okuzaki D, Furusawa Y, Minoshima M, Kikuchi K, Ishii M. JAK inhibition ameliorates bone destruction by simultaneously targeting mature osteoclasts and their precursors. *Inflamm Regen* 2023;43(1):18.

学会発表

1. 鎗 伸弥, 菊田 順一, 執行 穂高, 石井 優. 生体骨イメージングによる JAK 阻害剤の *in vivo* 作用機序の解明. 第 6 回日本骨免疫学会. 2021 年 7 月 1 日.
2. 鎗 伸弥, 菊田 順一, 石井 優. 炎症性骨破壊における JAK 阻害剤の *in vivo* 作用メカニズムの解明. 第 7 回日本骨免疫学会. 2022 年 6 月 30 日.
3. Shinya Yari, Junichi Kikuta, Masaru Ishii. JAK inhibition ameliorates bone destruction by simultaneously targeting mature osteoclasts and their precursors. The 51st Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. 2022 年 12 月 9 日.