

**ウイルスセンサーMDA5 の
恒常的活性化による骨疾患の発症機構**

早田 信正

目次

| | |
|--|----|
| 要旨 | 5 |
| 略語一覧 | 6 |
| 第一章 序論 | 8 |
| 1-1 (1). 自然免疫 | |
| 1-1 (2). RIG-I 様受容体 (RIG-I-like receptor : RLRs) | |
| 1-1 (3). RIG-I /MDA5 によるシグナル伝達 | |
| 1-1 (4). インターフェロン | |
| 1-2 (1). RLR シグナル伝達の活性異常と自己免疫疾患の関連 | |
| 1-2 (2). 全身性エリテマトーデス (SLE) | |
| 1-2 (3). エカルディ・グティエール症候群 (Aicardi-Goutieres syndrome : AGS) | |
| 1-2 (4). シングレトン-マートン症候群 (Singleton-Merten Syndrome : SMS) | |
| 1-2 (5). I 型インターフェロノパシー関連遺伝子の変異マウス | |
| 1-2 (6). MDA5 G821S 変異マウス (<i>Ifih1^{gs/+}</i> マウス) | |
| 1-3 (1). 骨の役割と骨代謝 | |
| 1-3 (2). 破骨細胞 | |
| 1-3 (3). 骨芽細胞 | |
| 1-3 (4). 軟骨細胞 | |
| 1-3 (5). 骨と免疫 | |
| 1-4. 本研究の目的 | |
| 第二章 実験材料と方法 | 23 |
| 2-1. 使用マウス | |
| 2-2. マイクロ CT 解析 | |
| 2-3. 骨組織切片での組織学的解析 | |

- 2-4. 骨髄細胞採取
- 2-5. フローサイトメトリー
- 2-6. 細胞培養
- 2-7. RANKL による破骨細胞分化の誘導
- 2-8. *in vitro* 骨芽細胞実験
- 2-9. cDNA 作製
- 2-10. 定量的リアルタイム PCR
- 2-11. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)
- 2-12. 生化学検査
- 2-13. トファシチニブのマウスへの投与
- 2-14. 統計解析

第三章 結果.....29

- 3-1. *Ifih1*^{gs/+}マウスにおける骨密度の低下
- 3-2. *Ifih1*^{gs/+}マウスにおける骨形成機能の低下
- 3-3. 外在性サイトカインによる骨芽細胞機能の抑制
- 3-4. *Ifih1*^{gs/+}マウスの骨組織における破骨細胞数の低下
- 3-5. MDA5 G821S 変異による破骨細胞分化の抑制
- 3-6. I 型 IFN は骨疾患の発症のキーファクター
- 3-7. JAK 阻害薬の MDA5 G821S 変異マウスにおける骨疾患への治療効果

第四章 考察.....47

- 4-1. MDA5 変異と臓器特異性
- 4-2. MDA5-I 型 IFN シグナルの骨病態への関与
- 4-3. JAK 阻害薬の骨病態への治療効果
- 4-4. 他臓器の障害による骨病態への影響

- 4-5. 変異型 MDA5 の破骨細胞分化への影響
- 4-6. 炎症性サイトカイン TNF- α の骨病態への関与
- 4-7. 本研究の意義

参考文献.....**55**

謝辞.....**61**

要旨

細胞質に存在する RIG-I や MDA5 などの RIG-I 様受容体 (RLR) は、ウイルス由来の RNA を認識し、インターフェロン (IFN) 応答をはじめとする抗ウイルス応答を引き起こす。RLR の機能獲得型変異による恒常的活性化は、I 型 IFN や炎症性サイトカインの過剰発現を惹起し、全身性および臓器特異的な症状を呈する自己免疫疾患を引き起こす。このような I 型 IFN の過剰産生による疾患群は共通した症状を示し、その病態の類似性から、これらの自己免疫疾患の総称として『Type I Interferonopathy』という概念が提唱されている。その中で、シングレトン・マートン症候群 (SMS) は血管、歯および骨の形成異常を特徴とする、稀な先天性自己免疫疾患であり、近年、SMS 家系において RIG-I および MDA5 をコードする遺伝子のミスセンス点変異が同定された。

本研究室で樹立された MDA5 G821S 変異マウスは、MDA5 遺伝子に点変異をもち、全身の各臓器で I 型 IFN を高発現し、糸球体腎炎などの自己免疫疾患様の症状を呈する。G821S 変異マウスは骨格が小さく、四肢の骨において脆弱性を示すことに着目し、SMS 様の骨疾患モデルとなる可能性を見出した。本研究では骨の構造解析や、骨代謝を担う破骨細胞や骨芽細胞の解析を行うことにより、MDA5 の恒常的活性化による骨疾患の発症機構の解明を行なった。

マウス大腿骨でのマイクロ CT 解析により、G821S 変異マウスにおける骨密度の減少が認められた。また組織学的解析の結果、骨芽細胞による骨形成機能の低下および破骨細胞数の顕著な低下が認められ、骨代謝回転の低下を示した。また破骨細胞および骨芽細胞の *in vitro* 解析により、細胞内因性の破骨細胞分化の低下と、外因性サイトカインによる骨芽細胞の分化と機能の低下が認められた。さらに MDA5 G821S/ IFNAR1 欠損の二重変異マウスでは、G821S 変異マウスで認められた骨代謝異常が正常化し、骨密度が大幅に回復した。

以上の結果から、変異型 MDA5 によって産生される I 型 IFN が、破骨細胞および骨芽細胞の分化および機能を抑制し、骨代謝回転の低下を伴う骨密度と骨強度の低下などの骨形成異常を引き起こすことが明らかとなった。このことから、I 型 IFN シグナル阻害薬は SMS の骨病態に対して有効な治療効果を示すことが期待される。

略語一覽

| | |
|--------------|---|
| <i>Acp5</i> | acid phosphatase 5 |
| <i>ADAR1</i> | adenosine deaminase acting on RNA 1 |
| AGS | Aicardi-Goutières syndrome |
| ALP | alkaline phosphatase |
| BMM | bone marrow-derived macrophage |
| CARD | caspase activation and recruitment domain |
| cGAS | cyclic GMP-AMP synthase |
| CTD | C-terminal domain |
| <i>Ctsk</i> | cathepsin K |
| CXCL10 | C-X-C motif chemokine 10 |
| DDX58 | DEXD/H-box helicase 58 |
| DHX58 | DEXH-Box Helicase 58 |
| dsRNA | double-stranded RNA |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay |
| ENU | N-ethyl-N-nitrosourea |
| GWAS | Genome-Wide Association Study |
| <i>IFIH1</i> | interferon induced with helicase C domain 1 |
| <i>Ifit2</i> | interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 2 |
| IFN | interferon |
| IFNAR | interferon- α/β receptor |
| <i>Ihh</i> | Indian Hedgehog |
| IKKi | inducible κ B kinase |
| IL-6 | Interleukin-6 |
| IPS-1 | IFN- β promoter stimulator 1 |
| IRF | interferon regulatory factor |
| <i>Isg56</i> | IFN stimulated genes 56 |
| ISG | IFN stimulated genes |
| <i>Itgb3</i> | integrin subunit beta 3 |
| I κ B | inhibitor of NF- κ B |
| LGP2 | laboratory of genetics and physiology 2 |

| | |
|----------------|---|
| M-CSF | Macrophage colony-stimulating factor |
| MDA5 | melanoma differentiation-association protein 5 |
| MMP9 | Matrix Metalloproteinase 9 |
| MSC | mesenchymal stem cell |
| NFATc1 | Nuclear Factor Of Activated T-Cells 1 |
| Poly(I:C) | polyinosinic-polycytidylic acid |
| RANK | Receptor activator of nuclear factor kappa-B |
| RANKL | receptor activator of NF-κB ligand |
| RD | repressor domain |
| RIG-I | retinoic acid-inducible gene I |
| RLR | RIG-I like receptor |
| RUNX2 | runt related transcription factor 2 |
| <i>SAMHD1</i> | SAM and HD domain containing deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase 1 |
| SLE | systemic lupus erythematosus |
| SMS | Singleton-Merten syndrome |
| SNPs | single nucleotide polymorphisms |
| Sox9 | SRY-Box 9 |
| STING | stimulator of interferon genes |
| TBK1 | TRAF family member-associated NF-κB activator-binding kinase 1 |
| TLR | Toll-like receptors |
| <i>TMEM173</i> | transmembrane protein 173 |
| TNF | tumor necrosis factor |
| TRACP-5b | tartrate-resistant acid phosphatase-5b |
| TRAF | TNF-receptor associated factor |
| TRAP | tartrate-resistant acid phosphatase |
| <i>TREX1</i> | three prime repair exonuclease 1 |
| V-ATPase | Vacuolar-type H ⁺ -ATPase |
| αMEM | alfa minimum essential media |
| μCT | micro computed tomography |

第一章

序論

1-1 (1). 自然免疫

免疫系はヒトを含む高等動物において、真菌、寄生虫、細菌やウイルスなどの病原微生物の感染に対する生体防御機構として進化してきた。この免疫系は自然免疫と獲得免疫の2種類の機構からなり、この2つのシステムを協調的に機能させることにより、数多く存在する病原体に対し、宿主を守っている。自然免疫は宿主に生来的に備わっている感染が生じてから、即座に動員される一連の免疫応答である。また自然免疫は非特異的な防御であり、病原体に対して包括的な応答を行う。つまり様々な病原体に対してそれぞれ特異的に応答するのではなく、常に汎用的な方法で対処するがゆえに、効力を発動するまでの時間が短い。自然免疫において、病原体を認識する受容体群はいくつかのタンパク質ファミリーを構成しており、病原体に特有の分子を認識することにより、一連の自然免疫応答が惹起される。

1-1 (2). RIG-I 様受容体 (RIG-I-like receptor : RLRs)

2004年、細胞質内においてウイルスが複製課程で産生する二本鎖RNA (dsRNA) を認識し、I型IFN産生を誘導する分子としてRIG-Iが当研究室から同定された¹。RIG-I様受容体はRIG-I、MDA5、LGP2の3分子から構成され、それぞれDDX58、IFIH1、DHX58によってコードされる²。RIG-I、MDA5はN末端領域に2つのCARD、中央領域にDEXD/H型RNAヘリカーゼドメイン、C末端にCTDと呼ばれる3つのドメインから構成される(図1-1)。CARDは細胞内のシグナル伝達に必須であり、RNAヘリカーゼドメインはATP加水分解活性やRNAヘリカーゼ活性をもち、CTDはRNAとの結合に重要である。LGP2はCARDをもたず、DEXD/H型RNAヘリカーゼドメイン、C末端領域のCTDより構成される²。

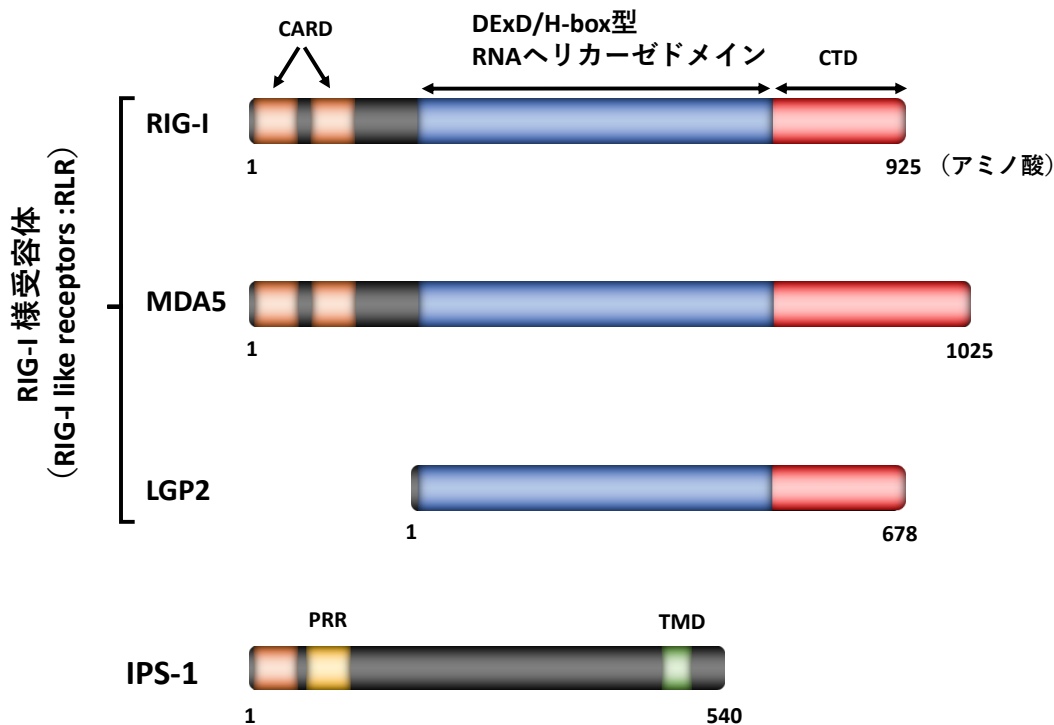


図 1-1 RIG-I 様受容体 (RLR) ファミリー分子とIPS-1のドメイン構造

RLRファミリーに属するRIG-I, MDA5, LGP2, ならびにRIG-I / MDA5シグナルにおける下流のアダプター分子であるIPS-Iのドメイン構造を示す。RIG-I /MDA5はよく似た構造をもち、N末端領域にシグナル伝達に必須であるCARD (caspase recruitment and activation domain) を2つ、中間領域にRNAヘリカーゼドメインをもち、C末端領域にCTD (C-terminal domain) とよばれる、RNAとの結合に重要なドメインをもつ。LGP2はCARDをもち、RNAヘリカーゼドメインとCTDから構成される。IPS-1は、N末端領域のCARDとPRR (proline-rich region)、C末端領域のTMDから構成される。IPS-1はTMD (transmembrane domain)により、ミトコンドリア外膜に結合している。

1-1 (3). RIG-I /MDA5 によるシグナル伝達

RIG-I および MDA5 の欠損マウスの解析から、RIG-I および MDA5 はそれぞれ異なった RNA ウイルスを認識ことが報告されている³。RIG-I および MDA5 はウイルス由来の dsRNA を認識し、dsRNA と結合すると ATP の加水分解に伴って、構造変化を引き起こす。その構造変化の際、CARD が露出され、活性型の構造をとり、活性型の RIG-I /MDA5 は多量体を形成する。RIG-I /MDA5 の CARD とミトコンドリアの外膜に局在するアダプター分子である IPS-1 が相互作用し、IPS-1 がプリオン様集合体の形成を誘導する⁴⁻⁶。IPS-1 は N 末端領域に CARD を有し、RIG-I /MDA5 の CARD と結合することによりシグナルを下流に伝える (図 1-2)。IPS-1 の C 末端領域には膜貫通ドメインが存在し、ミトコンドリア外膜に局在することがシグ

ナル伝達に必須である⁷⁻⁹。RIG-I /MDA5とIPS-1間のCARD同士の結合によりTRAF3、TBK1、IKK-iなどのシグナル伝達分子群が動員され、転写因子であるIRF3やIRF7がリン酸化を受ける。リン酸化により活性化されたIRF3やIRF7は、ホモまたはヘテロ二量体を形成し、核内へ移行することによりI型IFNの産生を誘導する¹⁰。一方で、RIG-I /MDA5とIPS-1の相互作用によりTRAF3などが動員され、IKK α / β / γ 複合体が活性化される。活性化されたIKK α とIKK β は、NF- κ Bの阻害因子であるI κ Bのセリン残基をリン酸化して分解する。I κ Bが分解することによって、NF- κ Bは核内へと移行し、TNF- α 、IL-6などの炎症性サイトカインの産生が誘導される。

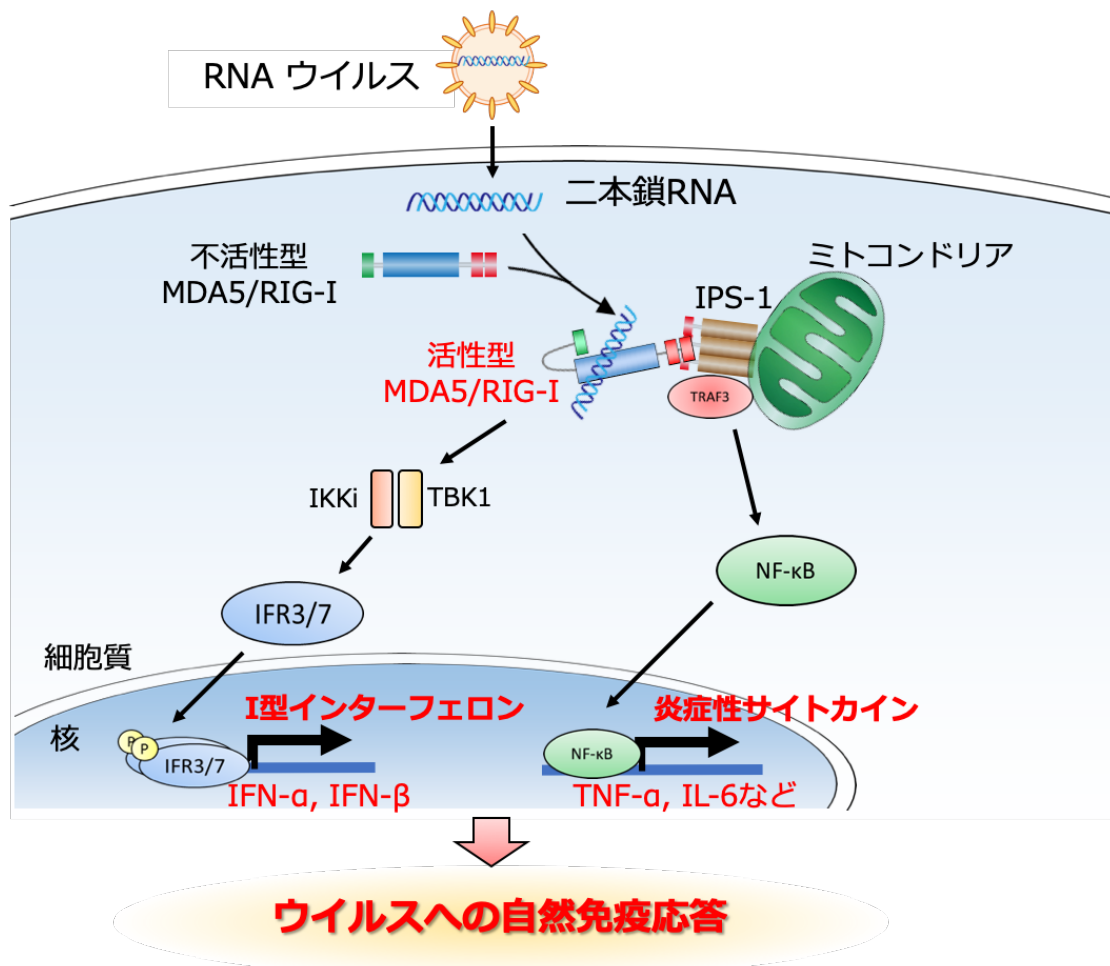


図1-2 RIG-I様受容体 (RLR) のシグナル伝達

RNAウイルスが細胞内に侵入すると、RIG-IやMDA5はウイルス由来のdsRNAを認識し、結合する。dsRNAの結合により活性化したRIG-IやMDA5はCARDを露出し、ミトコンドリア外膜に存在するIPS-1のCARDと相互作用することにより下流へシグナルを伝達させる。シグナルは最終的にIRF3やIRF7の二量化と核内移行によるI型IFNの遺伝子発現やNF- κ Bを介した炎症性サイトカインの発現を惹起する。

1-1 (4). インターフェロン

インターフェロン (IFN) はウイルス感染の刺激により、感染細胞から分泌されるウイルスの感染や増殖を抑制する因子として発見された。IFN は I 型、II 型、III 型と 3 種類に分類され、それぞれ独立して進化したものと考えられている。I 型と III 型の IFN はウイルス感染などによって誘導され、II 型 IFN は T 細胞の活性化や IL-18 により誘導される。そのため II 型 IFN はウイルス感染による応答ではなく、獲得免疫応答の調整因子として機能する。I 型 IFN は、抗ウイルス作用や抗腫作用をもち、ウイルスの増殖抑制や、免疫系および炎症の制御などを行う代表的なサイトカインである。I 型 IFN は、複数のサブタイプからなる IFN- α と単一の IFN- β によって構成され、樹状細胞や線維芽細胞、マクロファージなどの細胞で産生され、ウイルス感染時の自然免疫応答において重要な役割を果たす¹¹。II 型 IFN は IFN- γ のみからなり、主に活性化された T 細胞 (ナチュラルキラー細胞や CD4 陽性 Th1 など) から産生される。III 型 IFN は、IFN- λ の 3 つのアイソフォーム (IFN- λ 1、IFN- λ 2、IFN- λ 3) からなり、抗ウイルス応答や細胞増殖抑制能など、I 型 IFN と類似した共通の働きを持つと考えられる¹²。産生されたそれぞれの IFN は細胞外に分泌され、産生した細胞や近傍の細胞の細胞膜上に発現する IFN 受容体に結合し、IFN シグナルを活性化させる。I 型 IFN 受容体は IFNAR1 と IFNAR2 のヘテロ二量体によって構成されている。IFN の結合によりチロシンキナーゼである JAK1、Tyk2 が活性化され、転写因子 STAT1、STAT2 がリン酸化を介して、最終的に数百もの IFN 誘導遺伝子群 (Interferon stimulated genes : ISG) の発現を誘導し、強力な抗ウイルス応答を引き起こす。

1-2 (1). RLR シグナル伝達の活性異常と自己免疫疾患の関連

近年、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) を用いた研究により、*IFIH1* の SNPs が 1 型糖尿病や多発性硬化症、拡張型心筋症、乾癬性関節炎に対して強い関連性をもつことが明らかになっている¹³⁻¹⁷。MDA5 の機能喪失変異が 1 型糖尿病の発症に対して保護的にはたらくこと¹³、多発性硬化症において、発症のリスク因子となる *IFIH1* (MDA5 遺伝子)、*DDX58* (RIG-I 遺伝子)、*DHX58* (LGP2 遺伝子) の SNPs が存在することが報告されている¹⁵。さらに乾癬性関節炎においても *IFIH1* の遺伝子多型が発症要

因になることが報告されている¹⁶。RLRに関連する疾患の研究は、ここ数年間で新たな展開に発展している。自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス（Systemic Lupus Erythematosus: SLE）やエイカルディ-グティエール症候群（Aicardi-Goutieres Syndrome : AGS）、シングルトン・マートン症候群（Singleton-Merten Syndrome: SMS）の患者において *IFIH1*、*DDX58* の変異体が同定され（図1-3）、後の研究により、これらの変異はRLRシグナルの活性化異常を引き起こす機能獲得型変異であることが明らかとなった¹⁸⁻²¹。これらの疾患の原因としては、RLRの変異に伴う恒常的活性化による、IFNの過剰産生が発症の引き金になると考えられており、この過剰なIFN産生による疾患群は共通した表現型を示すことが知られている。これら病態の類似性から、これらの自己免疫疾患の総称として『I型インターフェロノパシー : Type I Interferonopathy』という概念が提唱されている²²。

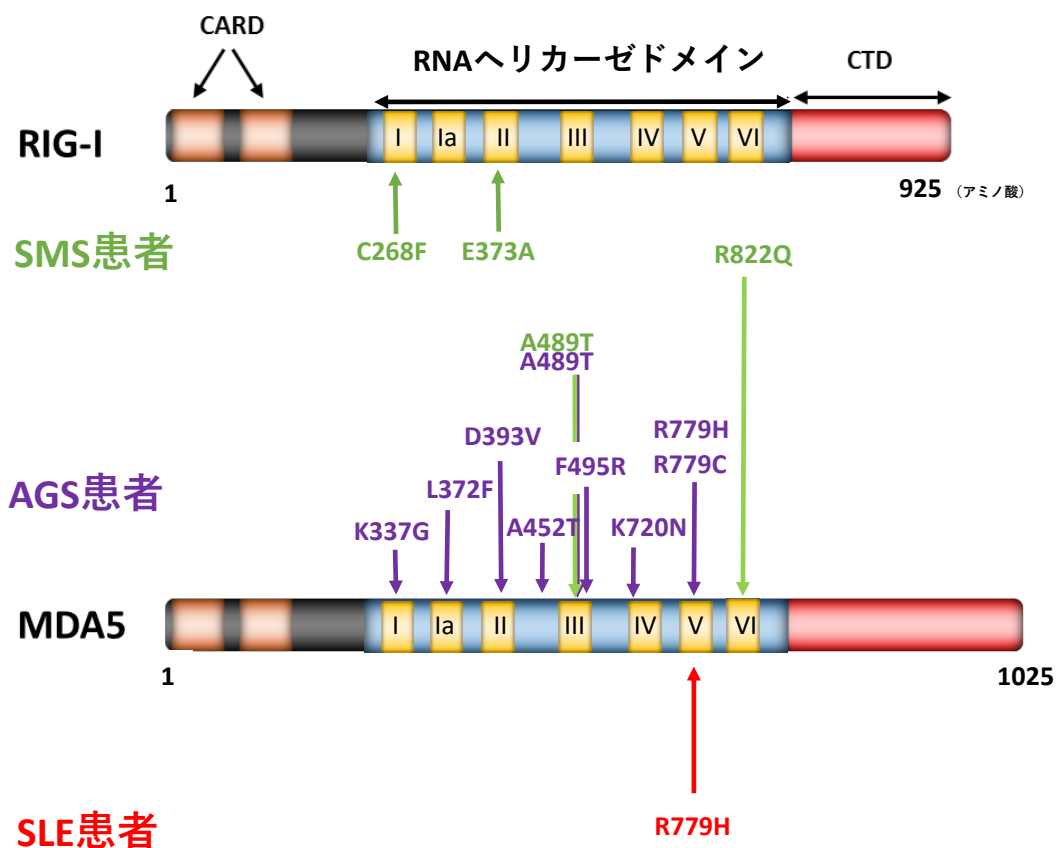


図1-3 RIG-I様受容体の変異と自己免疫疾患

SMS, AGS, SLE患者で同定されたRIG-I様受容体の変異体をそれぞれ示した。これまで報告された変異はすべてRNAヘリカーゼドメイン上に存在する。

1-2 (2). 全身性エリテマトーデス (SLE)

SLE は全身の炎症を伴う疾患であり、関節炎、皮膚症状、腎障害、中枢神経症状など多様な症状を呈する自己免疫疾患である。SLE 患者の血中では I 型 IFN の上昇や抗 dsRNA 抗体、抗核抗体（核に対する抗体）が検出される。近年、SLE に関するいくつかの遺伝子多型が報告されており、特に I 型 IFN 産生のシグナルに影響する遺伝子の多型が SLE 発症のリスクを高めることが明らかとなっている²³。IFIH1 の A946T 変異が SLE 患者において、抗 dsDNA 抗体の発現、I 型 IFN や ISG の発現上昇が認められる。さらに早期発症の IgA 欠損症を伴う重症な SLE 患者において IFIH1 の R779H 変異が同定され、MDA5 と SLE の関連性が明らかにされつつある¹⁹。

1-2 (3) エカルディ・グティエール症候群 (Aicardi-Goutieres syndrome : AGS)

AGS は高い致死性を示す、早期発症型の炎症性脳症である。特徴的な症状として、精神運動発達遅延、頭蓋内脳基底核の石灰化、脳脊髄液中の IFN- α 値の上昇などが認められる。AGS の発症に関して、細胞質内で核酸代謝に関わる遺伝子 *TREX1*、*RNASEH2A*、*RNASEH2B*、*RNASE2C*、*SAMHD1*、*ADAR1* が報告され、2014 年に責任遺伝子として *IFIH1* の変異が新たに同定された^{24,25}。これは自然免疫センサー自体の変異により引き起こされた自己免疫疾患の例として初の報告である。

1-2 (4). シングレトン・マートン症候群 (Singleton-Merten Syndrome : SMS)

1974 年 2 人のアメリカ人女性から、大動脈の石灰化、歯の形成異常および骨粗鬆症を呈する症候群が Singleton と Merten により報告された²⁶。シングレトン・マートン症候群と名付けられたこの疾患は、大動脈および大動脈弁の石灰化が小児期または思春期に生じ、早期死亡を生じうる自己免疫疾患である。症状として、歯芽低形成、歯根発達不全、侵襲性歯槽骨喪失などの口腔病変や大動脈弓、大動脈弁、僧房弁の石灰化などの循環器系の病変、緑内障、乾癬性皮膚病変、全身性筋衰弱、顔貌異常、低身長などが挙げられる。骨の特徴は、全身性または遠位四肢に限定的な骨粗鬆症、骨髓腔拡大、遠位四肢骨融解な

どである。

SMS は多様な症状を呈し、発症する症状は家系間、家系内で違いがある。同一家系内においても乾癬のみを認める軽度な例から、心病変、骨病変、口腔内病変のすべてを発症する重度な例が存在する。SMS は極めて稀な常染色体優性疾患であり、責任遺伝子として *DDX58* と *IFIH1* が報告されている^{20,21}。2015年、*DDX58* の RNA ヘリカーゼドメイン上の C268F 変異と E373A 変異、*IFIH1* の RNA ヘリカーゼドメイン上の R822Q 変異が報告された。後に炎症性脳症および、関節変形、早期の永久歯喪失などの骨格系の異常を示し、AGS と SMS の症状を合併する患者の家系から *MDA5* の A489T 変異が報告された²⁷。これらのミスセンス変異は機能獲得型変異であり、RIG-I および *MDA5* の恒常的活性化をもたらし、I 型 IFN や炎症性サイトカインの過剰産生を引き起こすことにより、様々な症候を引き起こすと考えられている。特に RIG-I の変異により自己免疫疾患を引き起こした報告例としては、SMS が初の疾患である。

1-2 (5). I 型インターフェロパシー関連遺伝子の変異マウス

I 型インターフェロパシーの発症機構を解明するため、I 型インターフェロパシー関連遺伝子に変異を有する様々な変異マウスが作製され、解析が行われた。*Trex1* 欠損マウスは cGAS-STING シグナル依存的な、心拡大や抗核抗体の発現などの自己免疫疾患様の表現型を示す²⁸⁻³¹。*Samhd1* 欠損マウスは脾臓での *Ifit2* と *Tnfa* の発現上昇を示したが、自己免疫疾患の表現型を示さないことが報告されている^{32,33}。さらに *Adar1* の欠損マウスは *MDA5*-MAVS シグナルに依存的な胎生致死を示す³⁴⁻³⁶。しかしこれまでの研究において、AGS の脳症や SMS の骨形成異常を再現した動物モデルの確立には未だ至っていない。

1-2 (6). *MDA5* G821S 変異マウス (*Ifih1^{gs/+}*マウス)

2014 年、*MDA5* に点変異をもち、SLE 様の病態を自然発症するマウスの研究が当研究グループにより発表された³⁷。N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) は、高頻度で突然変異を誘発できる化学変異原物質として用いられており、理化学研究所ゲノム科学総合センターでは大規模な ENU ミュータジェネシスが行われている。その中で、自己免疫疾患様の病態を呈するマウスが発見され、このマウスの遺伝

子解析の結果、この表現型の責任遺伝子が第 2 染色体 1.04Mb 領域に位置することが明らかとなった。この領域におけるすべての遺伝子のエクソンとスプライス部位のゲノム DNA シーケンスを行ったところ、マウス MDA5 をコードする *Ifih1* のエクソン 13 における、5'側から 2461 番目の塩基に一塩基置換（G が A に置換）があることが発見された（図 1-4）。この一塩基置換により、翻訳後の MDA5 では N 末端から 821 番目のアミノ酸がグリシン（G）からセリン（S）に変化する（G821S 変異）。以下、この *Ifih1* 上に G821S 変異ヘテロ接合体を有するマウスを *Ifih1*^{gs/+} マウスと表記する。G821S 変異ホモ接合体を有するマウス *Ifih1*^{gs/gs} マウスは胎生致死を示す。

Ifih1^{gs/+} マウスは顕著な発育遅滞や高い致死率を示し、主要な臓器の組織学的解析から、*Ifih1*^{gs/+} マウスは生後 6 週あたりから糸球体腎炎を発症することが明らかとなった（図 1-4B, C）。腎糸球体において免疫グロブリンの沈着が認められ、血清中において、IgG、IgA、IgM などの各種免疫グロブリン、抗核抗体、抗二本鎖 DNA 抗体の濃度がそれぞれ有意な上昇を示した（図 1-4D）。さらに腎臓において IFN-β、IL-6、CXCL10、ISG56 や TNF-α を含む炎症性サイトカインやケモカインの遺伝子発現が、WT マウスに比べ著しく上昇しており（図 1-4E）、その他の各臓器においても、IFN-β や IL-6 の発現上昇が認められた。

Ifih1^{gs/+} マウスの脾臓細胞を用いて、活性型 MDA5 の免疫細胞への影響をフローサイトメトリーにより解析したところ、古典的樹状細胞と形質細胞様樹状細胞、またマクロファージの数が有意に上昇しており、さらにそれらの活性化が認められた。さらにこれらの細胞を単離し、遺伝子発現を解析したところ、変異マウス由来の樹状細胞およびマクロファージにおいて、IFN-β、IL-6 またケモカインの一種である CXCL10 の発現上昇を示した。一方で、T 細胞と B 細胞においてはこれらの遺伝子発現の誘導は認められなかった。さらに骨髓細胞より *ex vivo* にて分化誘導させた樹状細胞とマクロファージでは IFN-β の mRNA 発現が上昇していたことから、MDA5 の恒常的活性化は、樹状細胞とマクロファージにおいて細胞内因性の活性化を引き起こすことが明らかとなった。さらにその他の免疫細胞では、脾臓中の T 細胞と B 細胞の数に変化はなく、ナイーブ T 細胞の減少とエフェクターおよびメモリー T 細胞数の有意な上

昇を示し、さらに CD4⁺T 細胞および CD8⁺T 細胞は活性化マーカーである CD69 の発現上昇が認められた。B 細胞においては CD69 や GL7 などの細胞表面マーカーの発現上昇は認められなかったものの、形質細胞の数は上昇を示したことから、この *Ifih1*^{gs/+} マウスにおいて形質細胞が自己抗体を産生している可能性が示唆される。

さらに MDA5 のシグナル伝達に必須のアプター分子である IPS-1 の欠損を MDA5 G821S 変異マウスに導入し、二重変異マウス (*Ifih1*^{gs/+}·*Ips-1*^{-/-} マウス) の病態を解析した結果、*Ifih1*^{gs/+} マウスに認められた糸球体腎炎や腎臓における IFN や炎症性サイトカインの遺伝子発現が完全に消失していた。さらに I 型 IFN の病態への関与を明らかにするため、*Ifih1*^{gs/+}·*Ifnar1*^{-/-} マウスの表現型解析を行ったところ *Ifih1*^{gs/+}·*Ifnar1*^{-/-} マウスは部分的な糸球体腎炎の回復および、腎臓での IFN-β と炎症性サイトカインの遺伝子発現の部分的な低減を示した。これらの結果から、I 型 IFN だけではなく、NF-κB を介した炎症性サイトカインも腎炎の病態形成に関与することが示唆される。

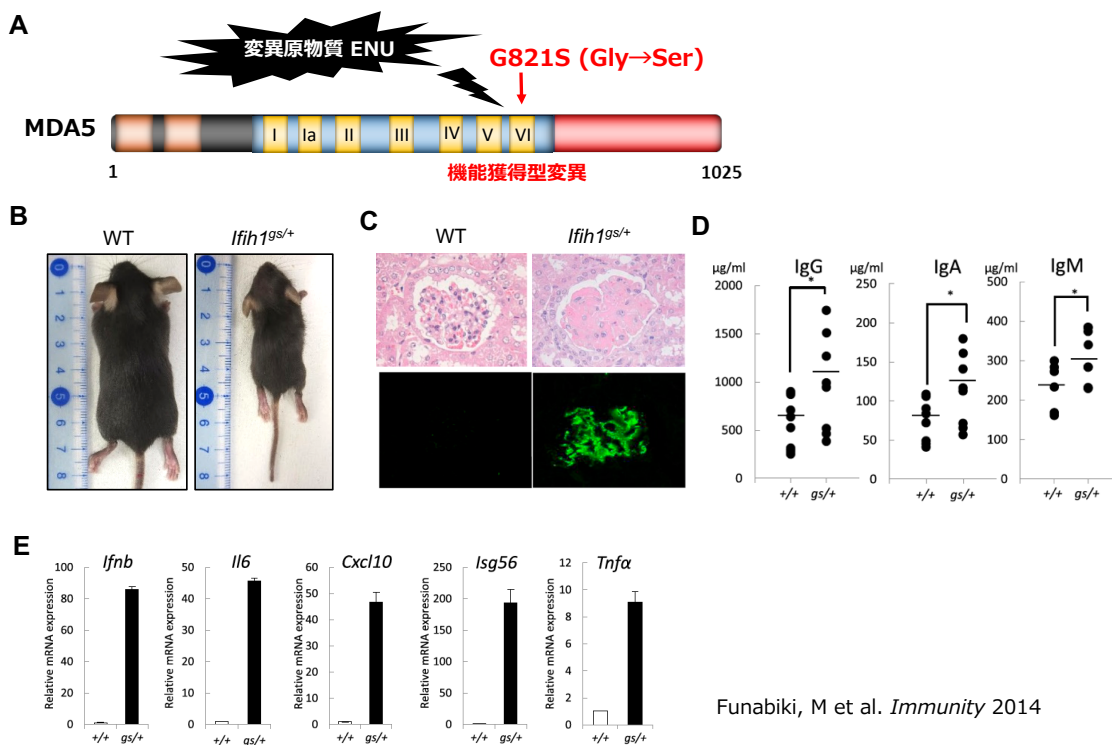


図1-4 MDA5 G821S変異マウス (*Ifih1*^{gs/+}マウス) は自己免疫疾患様の表現型を示す

(A) 変異原物質であるENUにより誘発されたMDA5のヘリカーゼドメイン上の点変異を示す。821番目のグリシンがセリンに置換されており、この変異によりMDA5が恒常的に活性化し、I型IFNや炎症性サイトカインが過剰に産生される。(B) 6週齢の*Ifih1*^{gs/+}マウスの写真、および8週齢の腎糸球体におけるHE染色(上) IgGの沈着(下)。(D) 血清中の各種免疫グロブリンの検出。(E) 定量的PCRによる*Ifih1*^{gs/+}マウス腎臓におけるIFN-β、IL-6、CXCL10、ISG56およびTNF-α mRNAの相対的発現量。

1-3 (1). 骨の役割と骨代謝

骨組織は、骨を構築する細胞（骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞、軟骨細胞）とそれらの細胞により形成された細胞外基質から構成される。細胞外基質には、コラーゲンを主成分とするタンパク質とミネラル（ヒドロキシアパタイト）が含まれ、頑強な構造をしている。骨は外部からの力学的負荷に耐えられるように複雑な三次元構造をとっており、身体を支え、臓器を保護し、筋肉と協調することにより運動機能を司る運動器官である。骨は生命維持に必須なカルシウムやリン、ミネラルの代謝器官であり、免疫系細胞の分化増殖の場となる造血器官でもある。骨における代謝の過程で、古い骨は新しい骨におきかえられる。破骨細胞は古くなった骨を壊し（骨吸収）、骨芽細胞は骨を新生される（骨形成）。骨の恒常性は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスにより保たれている³⁸。古くから骨形成と骨吸収は互いに連動（骨代謝回転）しながらその機能をはたすことが知られている。この現象は骨リモデリングと呼ばれている（図 1-5）。慢性炎症、閉経や加齢などにより、骨吸収と骨形成のバランスが崩れることにより、骨代謝疾患を発症する。骨吸収の活性が骨形成に対して相対的に優勢になると、骨密度が低下し骨の脆弱性を引き起こし、骨破壊や骨折の原因となる。

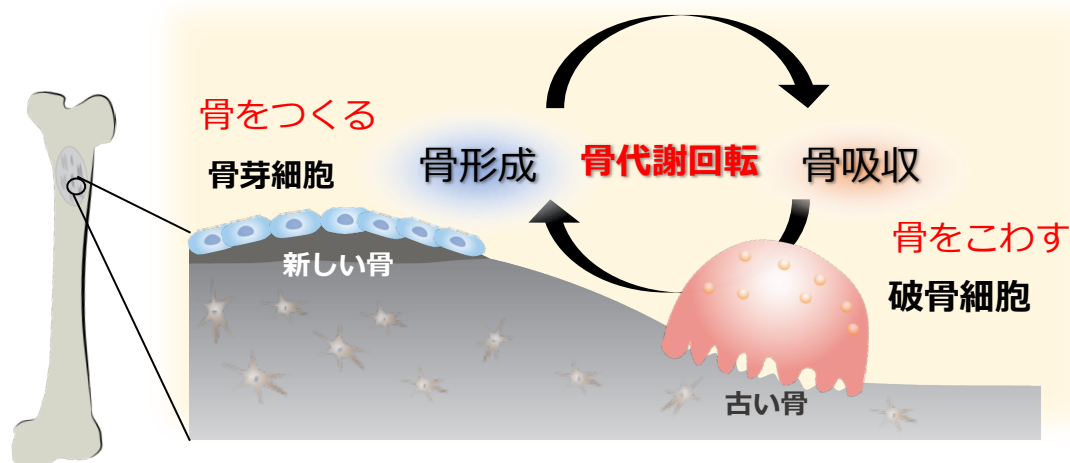


図1-5 破骨細胞と骨芽細胞による骨代謝

骨代謝の模式図を示した。骨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バランスにより保たれている。骨形成と骨吸収は互いに連動しており、骨代謝回転と呼ばれる。

1-3 (2). 破骨細胞

破骨細胞は、前駆細胞が融合することにより形成される大きさ 20~100 μm の巨大な多核細胞であり、骨の表面で骨吸収をおこなう。造血幹細胞から単球・マクロファージ系の細胞から破骨細胞前駆細胞を経て、成熟した破骨細胞へと分化する。造血幹細胞中の M-CSF 受容体を発現している細胞が M-CSF の刺激により、単球・マクロファージ系の破骨細胞前駆細胞へと分化し、これらの細胞膜上に RANK の発現が誘導される^{39,40}。RANK は TNF 受容体ファミリーに属し、破骨細胞前駆細胞および破骨細胞に発現している。RANK のリガンドとして機能する RANKL は破骨細胞分化に必須のサイトカインであり、膜結合型もしくは可溶型として存在する⁴¹。破骨細胞の分化と機能は、骨芽細胞、骨細胞などの骨芽細胞系列の間葉系細胞により制御されている。これらの骨芽細胞系細胞は恒常的に M-CSF を発現し誘導的に RANKL を発現する⁴²。破骨細胞前駆細胞において RANKL が RANK と結合することにより、アダプター分子である TRAF6 を介して、NF- κ B、c-fos、c-jun などの下流シグナルを活性化される。これらのシグナルは最終的に破骨細胞の分化におけるマスター転写因子である NFATc1 の発現を誘導する⁴³。RANKL の刺激によって初期誘導を受けた NFATc1 の発現は自己増幅し、高い発現量が維持される⁴⁴。活性化した NFATc1 は核内へ移行し、破骨細胞の分化・融合に必須の遺伝子発現を誘導する。骨との接着に必要なインテグリン β 3 サブユニット、骨基質の分解を行うタンパク質分解酵素であるカテプシン K などの破骨細胞の分化・機能に必要なタンパク質の発現を誘導する⁴⁵。成熟した破骨細胞においても RANK を高く発現し、RANK-RANKL のシグナルは破骨細胞における骨吸収活性を誘導する。RANKL の刺激を受けた破骨細胞では、NFATc1 により誘導された α _v β ₃ インテグリンによって骨の表面に接着し、波状縁を形成する⁴⁶ (図 1-6)。吸収窩においてマトリックスプロテアーゼ (MMP) やカテプシン K などのタンパク質分解酵素が合成、分泌され、コラーゲン線維を分解する。また V-ATPase とクロライドチャンネルにより H⁺ イオンと Cl⁻ イオンがそれぞれ分泌され、吸収窩において酸性環境が作り出され、酸によりヒドロキシアパタイト結晶が溶解することにより骨吸収がおこなわれる⁴⁷⁻⁴⁹。

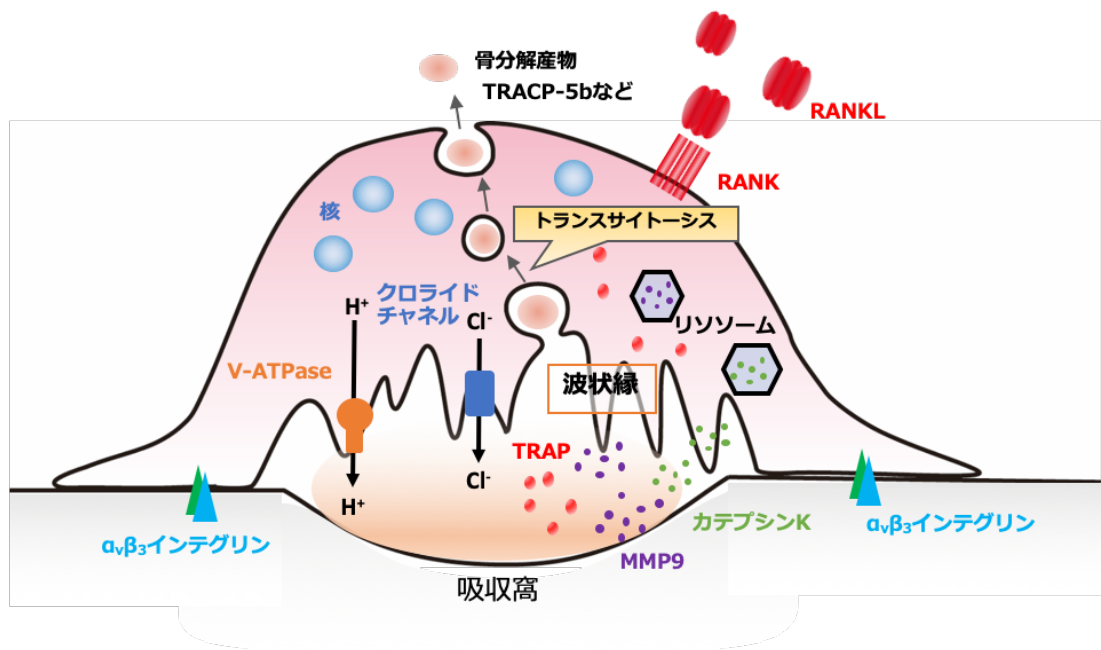


図 1-6 破骨細胞の形態と骨吸収

骨吸収を行なっている破骨細胞の形態を示す。破骨細胞は酸（HCl）とリソソーム酵素であるカテプシンKやMMP9（matrix metalloproteinase 9）を分泌し、ヒドロキシアパタイトの溶解とコラーゲンの分解をおこなう。また、骨の分解産物を波状縁から輸送小胞に取り込み、トランスサイトーシスにより細胞外へ分泌する。

1-3 (3). 骨芽細胞

骨芽細胞は間葉系幹細胞を起源とする細胞で、骨基質を構成する I 型コラーゲンを合成し、骨の石灰化に中心的な役割を果たす。骨芽細胞はアルカリホスファターゼを産生することにより石灰化の阻害因子であるピロリン酸を分解し、結晶の材料となるリン酸を供給する。カルシウムとリン酸はヒドロキシアパタイト $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ の形で結晶化し、I 型コラーゲン線維からなる骨基質上に沈着し、骨の石灰化が完了する。骨芽細胞の多くはアポトーシスにより死滅するが、一部は自ら産生した石灰化基質に埋め込まれ骨細胞へと分化する。骨芽細胞は活性型ビタミン D_3 、副甲状腺ホルモン、プロスタグランジン E_2 などの骨吸収因子の刺激を受け、骨芽細胞から RANKL の産生が誘導される。

1-3 (4). 軟骨細胞

軟骨細胞は未分化間葉系細胞から分化し、関節軟骨や鼻中隔のように身体の構造を支持する役割をは

たす。さらに軟骨細胞は骨格の成長において、重要な役割を担っており、特に体幹および四肢の骨は、軟骨内骨化と呼ばれる過程により形成される。軟骨内骨化は、脊椎動物にみられる 2 種類の骨形成過程のうちの一つである。軟骨内骨化のプロセスにおいて、軟骨細胞が骨端部の増殖軟骨細胞層から成長軟骨板の成熟軟骨細胞層、肥大化細胞層へと移動し、一連の成熟過程を経る。肥大軟骨細胞へと分化した軟骨細胞は自身が肥大化し、さらにその周囲の軟骨膜に含まれる細胞が骨芽細胞に分化し、軟骨組織が石灰化されることにより、骨組織へと置換される⁵⁰。骨格の成長、特に長管骨の長軸方向の成長は、軟骨細胞により構成される軟骨成長板において行われる。軟骨細胞は破骨細胞や骨芽細胞と同様に骨格形成に重要な役割を担っているため、軟骨細胞の異常は重篤な骨の変性疾患を引き起こす⁵¹。

1-3 (5). 骨と免疫

骨代謝と免疫系は、サイトカインや転写因子、シグナル伝達など多くの因子を共有しており、密接な関係にある。自己免疫疾患による免疫系の異常な活性化や免疫系の破堤は骨代謝に大きな影響を及ぼす。骨と免疫を関連づける最も典型的な病態として関節リウマチの炎症性骨破壊が挙げられる。関節リウマチは自己免疫疾患でありながら最も重大な症状が骨に現れる。関節リウマチにおける炎症性骨破壊の研究は骨と免疫系の相互作用や共通制御機構を扱う新規の学術領域として骨免疫学の発展をもたらした。現在では免疫系に関わる多くのサイトカインが骨代謝に関与することが明らかになっている。特に、骨と免疫系をつなぐ最も重要な因子である RANKL は T 細胞に発現する樹状細胞活性化因子として同定され、後に RANKL が破骨細胞分化の必須因子であることが明らかとなり、その発見は骨代謝と免疫系の関連性をより強固にした⁴⁵。破骨細胞の分化機構が解明されるにつれ、免疫系の細胞で重要な機能を担う、多くのサイトカインやシグナル伝達因子が破骨細胞の分化や機能に関与していることが明らかとなった。RANK-RANKL シグナルの最も上流に位置するアダプター分子 TRAF6 は TLR や RLR、IL-1 受容体のシグナル伝達の一部を担っており、TRAF6 欠損マウスは破骨細胞の機能不全により、重度の大理石骨病を呈する^{52,53}。抗ウイルス応答に重要なサイトカインである IFN や、いくつかの炎症性サイトカインは破骨細胞分化に影響を与える。IFN-β は破骨細胞の分化を促進する NFATc1 の発現を阻害することで破骨細胞の分化を抑制し、IFN-γ は TRAF6 の

分解を介して破骨細胞分化を抑制させる⁵⁴。炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-6 は破骨細胞分化や骨吸収を促進し^{55,56} この知見を基に、これらのサイトカインを標的とした治療法が開発されてきた。関節リウマチによる骨破壊の治療において、抗 TNF- α 抗体は臨床において最も長い実績をもつ生物学的製剤であり、抗 IL-6 受容体抗体は日本で開発され臨床応用に至った生物学的製剤である。このように免疫学と骨代謝学は互いに不可分な関係を築いている。

1-4. 研究の目的

RIG-I や MDA5 遺伝子の機能獲得変異によって発症する、SMS を特徴づける重要な症状として歯の形成異常、骨の形成異常などの骨病変が挙げられる。これらの病態は RLR シグナルの活性化異常が骨のリモデリングを破綻させることにより発症することが推察されるが、RIG-I や MDA5 の恒常的活性化が、どのように骨代謝を担う破骨細胞や骨芽細胞に影響を与えるかは未だ明らかになっていない。SMS 家系から MDA5 の R822Q 変異が同定されたが、これはマウス MDA5 における G821S 変異の隣のアミノ酸の一塩基置換であることから、これらの変異 MDA5 は類似した機能を示す可能性が高い。現在、唯一 MDA5 の機能獲得変異による自己免疫疾患モデルとして確立されている。*Ifih1^{gs/+}*マウスは骨格が小さく、四肢の骨の脆弱性を示すことに着目し、SMS 様の骨病変を呈する可能性が見出された。本研究では、*Ifih1^{gs/+}*マウスにおいて、マイクロ CT を用いた骨の構造解析、*in vivo* での骨組織における骨芽細胞、破骨細胞の解析、*in vitro* での破骨細胞と骨芽細胞の機能解析を行うことにより、MDA5 の恒常的活性化と骨形成異常の関連性の解明を目指した。

第二章

実験材料と方法

2-1. 使用マウス

MDA5 G821S 変異マウス (*Ifih1^{gs/+}*マウス) は *Ifih1^{gs/+}*マウスは理化学研究所の野田グループによる ENU ミュータジェネシスにより作製されたものを分与していただいた。DBA/2J バックグラウンドの *Ifih1^{gs/+}*マウスを二度、C57BL/6J の WT と体外受精することにより得られたマウスを、本研究の解析に用いた。解析に用いられた *Ifih1^{gs/+}*マウスと対象群である WT マウスは littermate である。*Ifnar1^{-/-}*マウス (C57BL/6J) は B&K Universal にて購入した。また使用したマウスはすべて SPF (specific pathogen free) 環境下で飼育した。なお、本研究における動物実験はすべて「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に基づいた「京都大学における動物実験の実施に関する規定」に遵守して行った。

2-2. マイクロ CT 解析

マウスから大腿骨を採取し脂肪や筋肉などの軟組織を取り除いたあと、70%エタノールで固定した。2 日齢のマウスは頭蓋骨を除く全身を 70%エタノールで固定した。ScanXmate-L090H (コムスキャンテクノ) を用い、解析ソフトとして TRI/3D-Bon (ラトックエンジニアリングシステム) を使用した。解析は昭和大学歯学部歯科薬理講座の高見博士と坂井博士に依頼した。

2-3. 骨組織切片での組織学的解析

マウスから脛骨を採取し脂肪や筋肉などの軟組織を取り除いたあと、70%エタノールで固定した。非脱灰 GMA (Glycidyl Methacrylate) 樹脂包埋切片を作製し、トルイジンブルー染色もしくは TRAP 染色を行った。染色された破骨細胞や骨芽細胞、類骨のパラメーターは光学顕微鏡 Axio Imager 2 (カールツァイス) と画像解析計測ソフトウェア WinROOF2013 (三谷商事) を用いて計測された。石灰化速度の計測として、マウスの屠殺 1 日、4 日前に二度、カルセイン (同仁化学) 20mg/kg を皮下投与した。破骨細胞、骨芽細胞に関するパラメーターの解析は株式会社医創蔵に依頼した。明視野観察・撮影は BZ-X710 (キーエンス)、蛍光観察・撮影は共焦点レーザー顕微鏡 SP 8 (Leica) を用いた。

2-4. 骨髄細胞採取

頸椎脱臼によりマウスを安楽死させた後、70%エタノールでマウスを十分に消毒し、後ろ足を切り出し、大腿骨と脛骨を摘出した。細胞培養用に調製した α -MEM と 27G 注射針、1mL シリンジを用いて骨髄腔より骨髄細胞を押し出し、十分にピペティングした後、40 μ m のセルストレーナーにて細胞をろ過し、骨髄細胞を回収した。

2-5. フローサイトメトリー

採取した骨髄細胞中の赤血球を Red Blood Cell lysis buffer (Biolegend) を用いて溶血させた後、anti-mouse CD16/32 antibody (BD Biosciences) でブロックし、anti-mouse CD3 ϵ (145-2C11, Biolegend)、anti-mouse CD11b (M1/70, Biolegend)、anti-mouse B220 (RA3-6B2, Biolegend)、anti-mouse CD115 (c-fms) (AFS98, Biolegend)、anti-mouse CD117 (c-kit) (2B8, Biolegend) で染色した。データは FACSVerseTM (BD Biosciences) で取得し、FlowJo software (Tomy Digital Biology) を用いて解析した。

2-6. 細胞培養

10%の FBS (fetal bovine serum) および抗生物質である Penicilin-Streptomycin (PM/SM) を α -MEM に添加した培地を調製した。細胞は CO₂ 濃度 5%において培養した。以下、特記なき場合はすべての細胞培養実験にてこの培地を用いた。細胞培養のプレートとして Bio Coat コラーゲン I カルチャーウェア (CORNING) を用いた。

2-7. RANKL による破骨細胞分化の誘導

10 ng/mL のリコンビナントマウス M-CSF を添加した培地で、 2×10^7 cells /dish (10cm dish) の骨髄細胞を 3 日間培養し、骨髄由来マクロファージ (Bone marrow derived macrophage: BMM) を分化させた。その後 0.05%トリプシン (SIGMA ALDRICH) および 0.02%EDTA を添加した PBS を用いて

細胞をはがし、 2×10^4 cells/well (96well plate) の BMM を播種し、10ng/mL のリコンビナントマウス M-CSF (R&D) および 40ng/mL のリコンビナントマウス RANKL (R&D) 存在下で 3-4 日間培養し、破骨細胞を分化させた。その際、2 日毎に培地を新しいものに交換した。形成された破骨細胞を PBS で洗浄し、4%のparaホルムアルデヒドで 5 分間室温にて固定した。その後、TRAP Staining Kit (コスモバイオ) をプロトコルに従って使用し、破骨細胞を TRAP 染色した。また TRACP & ALP Assay Kit (タカラバイオ) をプロトコルに従って使用し、形成された破骨細胞の溶解液中の TRAP の活性を測定した。

2-8. *in vitro* 骨芽細胞実験

生後二日齢のマウスを十分量の吸入麻酔薬イソフルラン (ファイザー) で安楽死させ、頭蓋骨から頭蓋冠 (calvaria) を採取し、PBS で洗浄した。終濃度 0.1%のコラゲナーゼ (WAKO)、0.2%のディスパーゼ (WAKO) を無血清の α -MEM に添加し、0.2 μ m のシリンジフィルター (sartorius) で滅菌ろ過した。1 本の 15ml 遠心チューブに 1 匹分のマウスの頭蓋冠を入れ、調製した 0.1%コラゲナーゼ、0.2%ディスパーゼの混合培地を 3mL 加え、37 $^{\circ}$ Cにて 5 分間振盪させた。その後上清を捨て、新しい 0.1%コラゲナーゼ、0.2%ディスパーゼの混合培地を 3mL 加え、37 $^{\circ}$ Cにて 10 分間振盪させ、上清を回収した (第一分画)。その後、同様に、新しい 0.1%コラゲナーゼ、0.2%ディスパーゼの混合培地を 3mL 加え、37 $^{\circ}$ Cにて 10 分間振盪させ、上清を回収した (第二分画)。同様の操作で第三分画まで回収した。第一分画、第二分画を合わせて 4 $^{\circ}$ C、1500rpm、5 分間遠心し、上清を捨て、ペレットを細胞培養用の α -MEM で懸濁し、1 匹分の細胞をすべて 1 ウェルに播種した (24 ウェルプレート)。この細胞を 3 日間培養し、得られた細胞を骨芽細胞の前駆細胞として実験に用いた。マウスから得られた骨芽細胞前駆細胞を 24 ウェルプレートもしくは 96 ウェルプレートに 1.0×10^4 cells/cm² で播種し、50 μ g/ml のアスコルビン酸 (ナカライテスク)、10 nM デキサメタゾン (和光純薬)、10 mM の β -グリセロリン酸 (Sigma)を添加した α -MEM (骨芽細胞分化誘導培地)にて 21 日間培養した。3 日毎に新しい培地に交換した。プレートにて石灰化された基質をアリザリンレッドにて染色するため、4%PFAにて 15 分固定した後、0.02 g/ml、pH 4.2 の Alizarin Red S (シグマアルドリッチ) で染色した。成熟骨芽細胞を染色するため、4%PFAにて 15 分固定した後、

BCIP/NBT solution kit (ナカライテスク) で 30 分反応させ、ALP 染色した。96 ウェルプレートで分化させた成熟骨芽細胞の ALP 活性を測定するため、TRACP&ALP Assay Kit (タカラバイオ) をプロトコルに従って使用した。

2-9. cDNA 作製

培地の上清を除き、培養細胞を PBS で洗浄し、1 mL の TRIzol Reagent (Invitrogen) を加え、よくピペティングした後、1.5 mL チューブに移し、-80℃で保存した。サンプルを溶かし、クロロホルム 200 μ L (ナカライテスク) を加え、混和した後 15,000 rpm, 4 °C で 15 分間遠心した。遠心後、上層を回収し、回収した上層と等量のイソプロパノール (ナカライテスク) を加え、共沈剤として 20 μ g/mL のグリコーゲン 0.5 μ L 加えた後、室温で 10 分間静置した。その後 15,000 rpm, 4 °C で 15 分間遠心し、上清を取り除き 70 %エタノール (ナカライテスク) を加え、再度 15,000 rpm, 4 °C で 5 分間遠心し、上清を除去した。沈殿を 15 分間風乾した後、DEPC 処理水 (ナカライテスク) を 39 μ L 加え、1 μ L の DNase 及び 10 μ L の DNase buffer とともに 37 °C で 1 時間反応させた。等量のフェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール 25 : 24 : 1 溶液 (ナカライテスク) を加え、ボルテックスで混合後、15,000 rpm, 4 °C で 10 分間遠心した。遠心後上層を回収し、終濃度 0.3 M の酢酸ナトリウムを添加したエタノールを用いてエタノール沈殿を行った。上清を取り除き 70 %エタノールを加え、再度 15,000 rpm, 4 °C で 5 分間遠心し、上清を除去した。沈殿を 15 分間風乾した後、DEPC 処理水 (ナカライテスク) を少量加え、RNA を得た。得られた RNA の濃度を測定し、そのうち 500 ng を High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems) を用い、逆転写反応により cDNA を作製した。

2-10. 定量的リアルタイム PCR

Step One Plus Real-time PCR system (Applied Biosystems) を用いて qPCR を行った。18S リボソーム RNA を内制的コントロールとして各 mRNA を標準化して定量した。*Ifnb 1*、*Tnfa*、*Il6*、*Il1b*、18S に対しては Taqman probe (Applied Biosystems) と Taqman Fast Advanced Master Mix

(Applied Biosystems) を用いた。その他の標的遺伝子に対しては下記のプライマーと Fast SYBR green Master Mix (Applied Biosystems) を用いた。

| 標的遺伝子 | Forward プライマー | Reverse プライマー |
|---------------|----------------------------|-----------------------------|
| <i>Nfatc1</i> | 5'-TCATCCTGTCCAACACCAAA-3' | 5'-TCACCCTGGTGTTCCTTCCTC-3' |
| <i>Ctsk</i> | 5'-CCAGTGGGAGCTATGGAAGA-3' | 5'-AAGTGGTTCATGGCCAGTTC-3' |
| <i>Itgb3</i> | 5'-GCTCATTGGCCTTGCTACTC-3' | 5'-CCCGGTAGGTGATATTGGTG-3' |
| <i>Acp5</i> | 5'-TTCCAGGAGACCTTTGAGGA-3' | 5'-GGTAGTAAGGGCTGGGGAAG-3' |

2-11. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

マウスの血清サンプルを用いて TRACP-5b (Tartrate-resistant Acid Phosphatase 5b) の血中濃度を測定した。MouseTRAP™ Assay (immunodiagnostic systems) のプロトコルに従った。

2-12. 生化学検査

血清中のカルシウムと無機リン濃度の測定を株式会社トランスジェニックに依頼した。カルシウム濃度の測定は、カルシウム E-HA テスト (和光純薬)、無機リン濃度は、デタミナー-L IP (協和メデック) を用いて測定された。

2-13. トファシチニブの Maus への投与

CP 690550 クエン酸塩 (トファシチニブ) (TOCRIS bioscience) を 0.5%メチルセルロース (和光純薬) /0.025% Tween 20 (ナカライテスク) で溶解し、30 mg/kg を 3 週齢から 6 週齢まで毎日一回、経口投与した。

2-14. 統計解析

有意差検定に関しては Student t 検定を用い、P 値を算出した。*は P<0.05、**は P<0.01、***は P<0.001、NS は有意差なしをそれぞれ表す。

第三章

結果

3-1. *Ifih1*^{gs/+}マウスにおける骨密度の低下

MDA 5 遺伝子にヘテロ接合体の G821S 変異を有する *Ifih1*^{gs/+}マウスは発育遅滞や四肢の骨の脆弱性を示す。成獣 *Ifih1*^{gs/+}マウスにおける骨の異常を調べるため、X 線解析により 6 週齢のマウス全身の骨格を観察した。X 線解析からは明らかな骨の変形などは特に認められなかったものの、全身の骨の大きさや骨量の低下が認められた (図 3-1A-C)。続いて、より詳細な骨の構造を調べるため、マイクロ CT を用いて 6-7 週齢におけるマウス的大腿骨を解析した。その結果、*Ifih1*^{gs/+}マウス的大腿骨において大腿骨周囲部の皮質骨の顕著な菲薄化が認められ、さらに大腿骨の骨塩量 (骨密度) が全体的に低下していることが明らかとなった (図 3-2A-D)。続いて、*Ifih1*^{gs/+}新生児マウスにおける骨の状態を調べるため、2 日齢の WT マウスおよび *Ifih1*^{gs/+}マウスの全身の骨 (頭蓋骨は除く) の骨構造解析をマイクロ CT により行った。その結果、*Ifih1*^{gs/+}仔マウスの海綿骨および皮質骨において骨塩量の低下が認められた (図 3-3A-C)。続いて、マウス成獣において、骨の恒常性維持に必要なミネラルであるカルシウムの無機リンの代謝の異常を調べるため、血清中でのそれぞれの濃度を測定したところ、*Ifih1*^{gs/+}マウスにおいてカルシウム濃度のわずかな低下が認められたが、正常なカルシウム濃度の範囲内であった (図 3-4)。さらに無機リンにおいては WT マウスと比べ有意は認められず、正常な無機リンの値を示した。この結果から *Ifih1*^{gs/+}マウスにおいて、骨のホメオスタシスの維持に必要なミネラルの代謝に異常はなく、骨代謝を司る骨芽細胞や破骨細胞の分化や機能の障害による、骨リモデリングのバランスに異常をきたしていることが推察される。

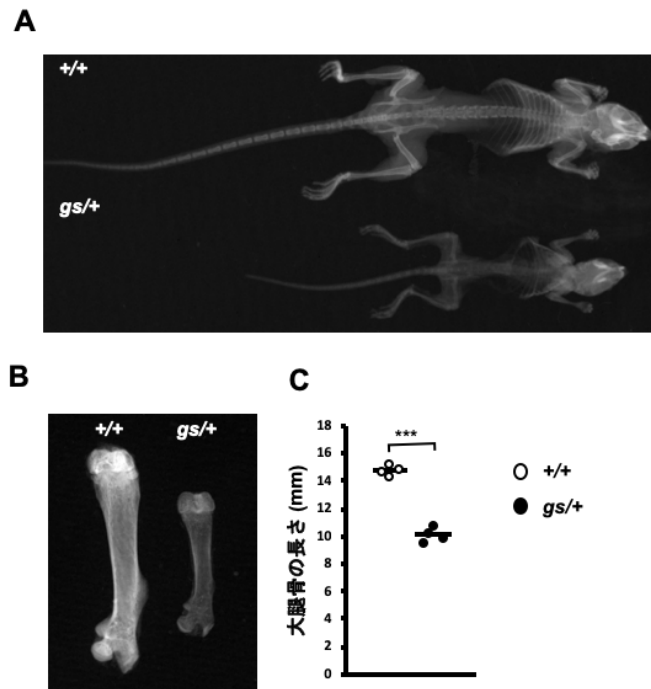


図3-1 *Ifih1^{gs/+}*マウスにおけるX線解析
 6週齢のWTマウスと*Ifih1^{gs/+}*マウスにおいて、X線画像を撮影した。(A) マウス全身の骨格 (B) 大腿骨 (C) 大腿骨の長さを示した (n=4)。

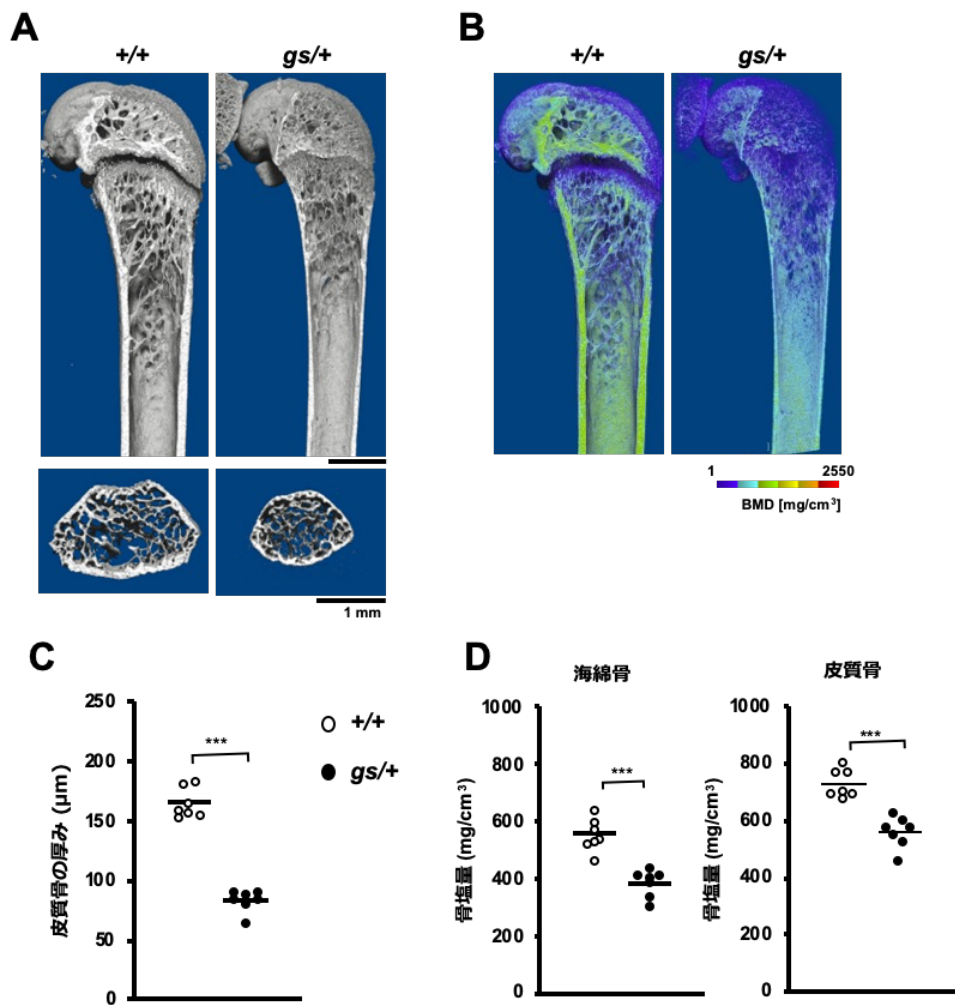


図3-2 *Ifih1^{gs/+}*マウスにおけるマイクロCT解析

(A) 6-7週齢のWTマウスと*Ifih1^{gs/+}*マウスの大腿骨遠位部において、マイクロCTを用いて三次元構造画像を撮影した。下は断面図。(B)ヒドロキシアパタイトの密度が低いと青、高くなるにしたがって緑、赤で表される疑似カラーの画像を作製し、骨塩量 (Bone Mineral Density) の分布を可視化した。(C)大腿骨の皮質骨における厚み (μm) を定量した。(D)大腿骨の海綿骨、皮質骨における骨塩量 (mg/cm³) を定量した (n=7)。

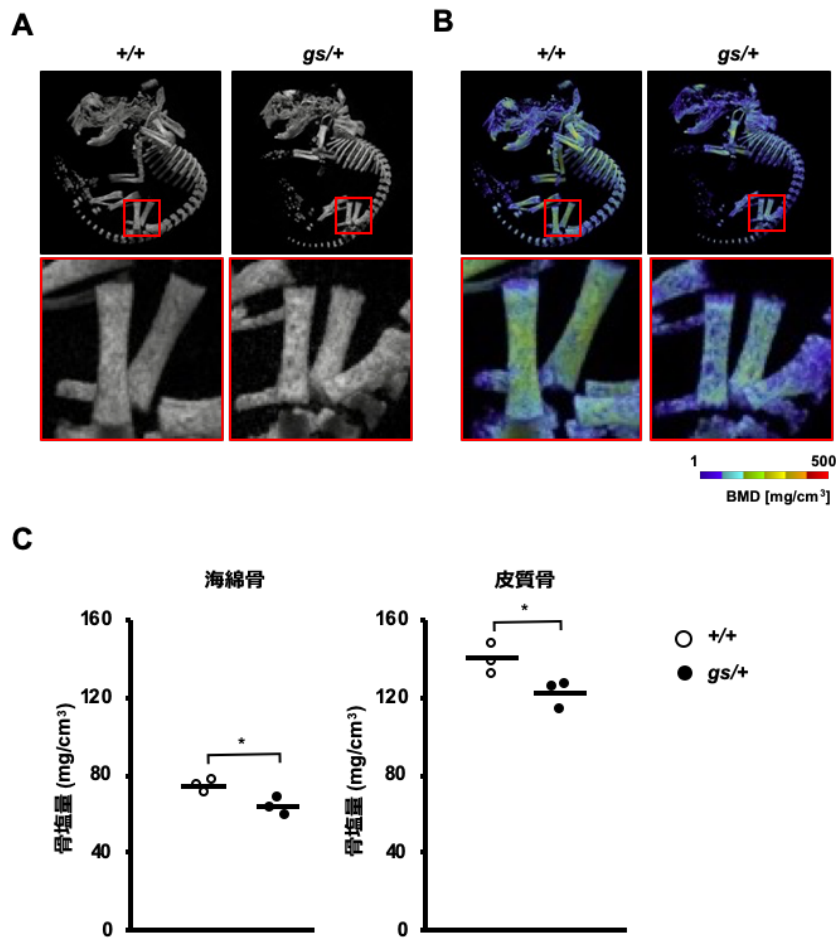


図3-3 *Ifih1*^{gs/+}マウス新生児のマイクロCT解析

(A) 2日齢の*Ifih1*^{gs/+}マウスにおいて、マイクロCTを用いて三次元構造画像を撮影した。(B)ヒドロキシアパタイトの密度が低いと青、高くなるにしたがって緑、赤で表される疑似カラーの画像を作製し、骨塩量の分布を可視化した。(C) マウス大腿骨部の海綿骨ならびに皮質骨における骨塩量 (mg/cm³) を定量した (n=3)。

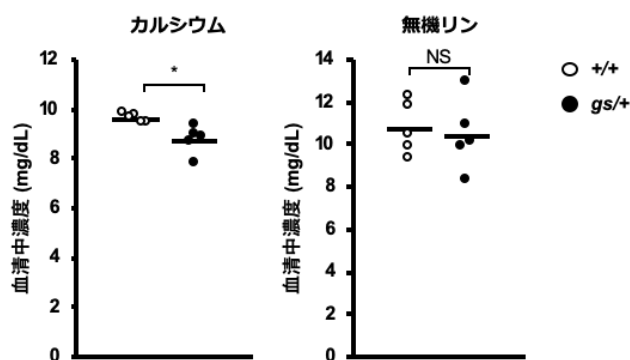


図3-4 血清中Caと無機リン量の定量
6-7週齢のWTマウスと*Ifih1^{gs/+}*マウスの血清中におけるカルシウムと無機リンの濃度 (mg/dL) を測定した (n=5)。

3-2. *Ifih1^{gs/+}*マウスにおける骨形成機能の低下

マイクロ CT 解析の結果から、*Ifih1^{gs/+}*マウスにおける骨芽細胞や破骨細胞の異常が示唆されたため、マウスの骨において組織学的解析を行った。骨組織切片のトルイジンブルー染色にて骨組織の形態を調べたところ、*Ifih1^{gs/+}*マウスにおいて、骨の長軸方向の成長を司る軟骨成長版の形態異常が認められた (図 3-5A)。そこで *Ifih1^{gs/+}*マウスの軟骨成長版の厚みを計測したところ、WT マウスに比べて、顕著な縮小が認められた (図 3-5B)。よって、*Ifih1^{gs/+}*マウスの骨格の成長遅滞はこの軟骨成長版の異常に起因していることが示唆される。また 6 週齢の WT マウスではほとんど認められなかった脂肪細胞が、*Ifih1^{gs/+}*マウスの骨組織では顕著に増加していた (図 3-5C)。この結果は間葉系幹細胞からの脂肪細胞への分化が亢進していることを示唆している。続いて、骨形成を行なっている骨芽細胞と類骨 (新しく生成され、未だ石灰化されていない骨基質) を観察したところ、*Ifih1^{gs/+}*マウスにおいて骨芽細胞数の低下と、類骨量の低下が認められた (図 3-6A, B)。さらに、新しく石灰化された骨基質を標識するためにマウスにカルセインを投与し、石灰化速度を計測したところ、*Ifih1^{gs/+}*マウスでの有意な石灰化速度の低下が認められた (図 3-7A, B)。これらの結果から、MDA 5 の恒常的活性化によって、*in vivo* での骨芽細胞の分化および、骨形成が抑制されることが明らかとなった。

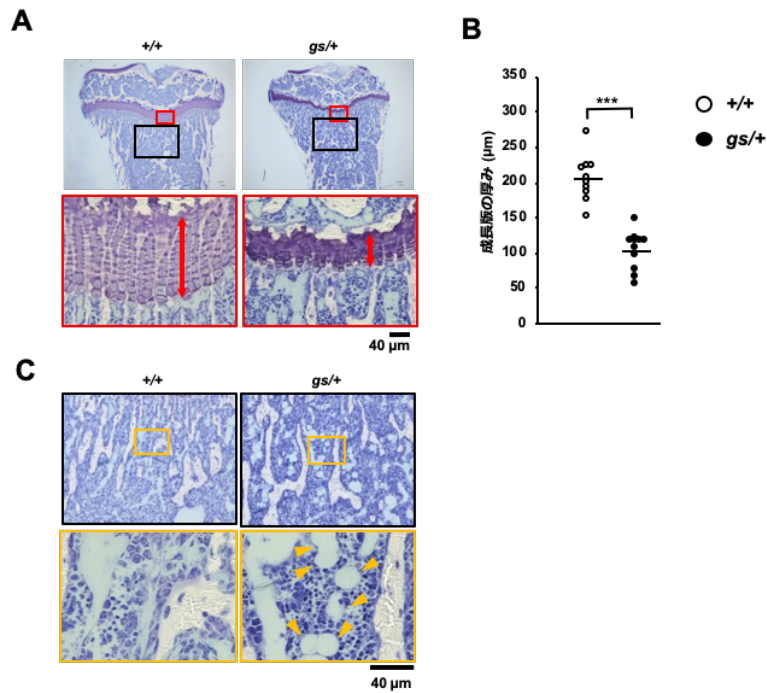


図3-5 骨の組織学的解析による軟骨成長版と脂肪細胞の解析
 6週齢のWTマウスと*Ifih1^{gs/+}*マウスの脛骨におけるトルイジンブルー染色の解析画像。(A) 赤枠は成長板軟骨の部分の拡大像を、両矢印は成長板の長さを示す。(B) 成長版の厚みを測定した (n=10)。(C) 黄色の矢印は脂肪細胞を示した。

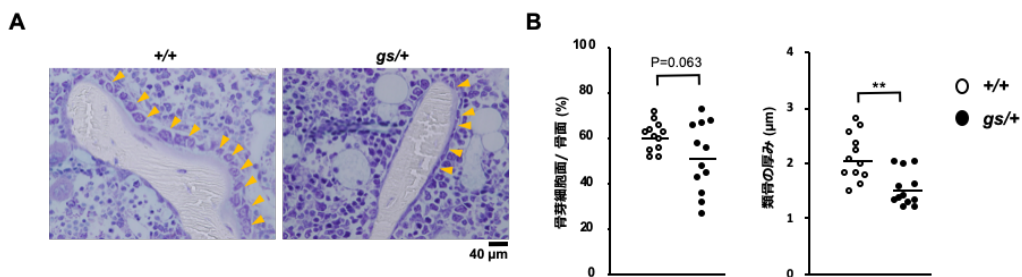


図3-6 組織学的解析による骨芽細胞の解析
 6週齢のWTマウスと*Ifih1^{gs/+}*マウスの脛骨におけるトルイジンブルー染色の解析画像を示した。(A) 黄色の矢印は骨形成している骨芽細胞を示した。(B) 骨芽細胞に関するパラメーターである骨芽細胞面/骨面 (%) および類骨の厚み (μm) を示した (n=13)。

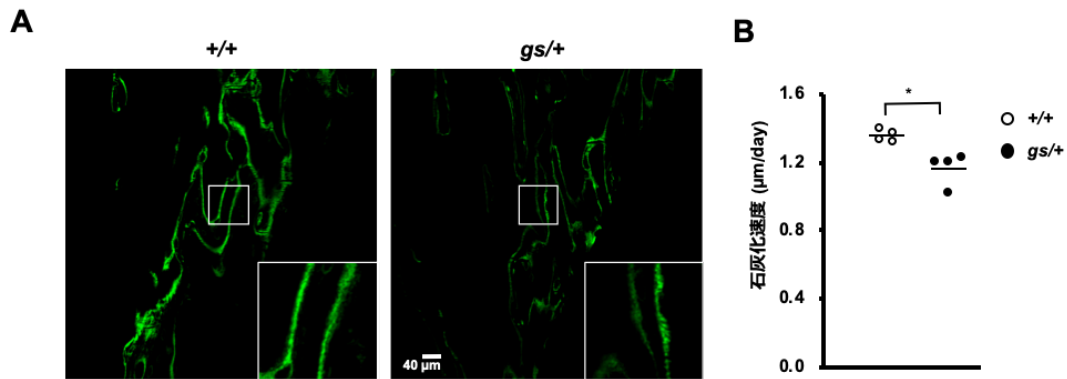


図3-7 カルセインによる骨形成機能の解析

(A) 6週齢のWTマウスと*Ifih1^{gs/+}*マウスにおいて屠殺4日前、前日にカルセインを投与し、石灰化された骨基質を標識した。石灰化速度は二本のラインの幅に依存する。(B) 二本の石灰化ラインに基づき、石灰化速度を算出した (µm/day) (n=4)。

3-3. 外在性サイトカインによる骨芽細胞機能の抑制

*Ifih1^{gs/+}*マウスの *in vivo* での骨形成の抑制が認められたので、より詳細なメカニズムを調べるためにマウスから骨芽細胞を調整して培養し、*in vitro* で解析を行った。培養した骨芽細胞を、骨芽細胞分化誘導培地 (osteogenic medium) で 21 日間培養し、骨形成を誘導した。その結果 WT と *Ifih1^{gs/+}*マウス由来の骨芽細胞において、骨芽細胞の分化や骨形成機能に有意な差は認められなかった (図 3-8A, B)。また WT と *Ifih1^{gs/+}*マウス由来の骨芽細胞における遺伝子発現の解析を行ったところ、IFN-βや TNF-αなどの発現の上昇はいずれも認められなかった (図 3-8C)。MDA5 は骨芽細胞にも発現しているにもかかわらず、*Ifih1^{gs/+}*マウス由来の骨芽細胞では MDA5 の活性化による恒常的なサイトカイン発現が誘導されなかった。よって骨芽細胞での MDA5 変異は、骨芽細胞自身への細胞内在的な影響を示さないことが示唆される。骨芽細胞への影響を与える因子として、骨の環境中で産生されたサイトカインが想定された為、骨髓細胞中の IFN-βや炎症性サイトカインの mRNA 発現量を解析したところ、*Ifih1^{gs/+}*マウスの骨髓細胞では IFN-βや TNF-α、IL-6 のサイトカインの上昇を示した (図 3-9)。これらの結果から、骨の環境中の免疫細胞によって産生された外からのサイトカインによって骨芽細胞の異常を引き起こすことが推察される。続いて *in vivo* で認められた骨形成の抑制を引き起こす因子を同定するため、MDA5 の活性化によって産生されるサイトカインを

実験的に骨芽細胞の培地中に添加し、骨形成に対する影響を検討した。先行研究から、TNF- α が骨芽細胞の分化を抑制することがよく知られているが⁵⁷⁻⁵⁹、TNF- α だけではなく IFN- β も骨芽細胞の分化や骨形成を抑制することが明らかとなった（図 3-10A, B）。これらの結果から、*Ifih1*^{gs/+}マウスにおける骨芽細胞において細胞内在的な要因ではなく、骨の環境中における免疫細胞によって産生された IFN- β や TNF- α などのサイトカインが骨形成を抑制することが示唆される。

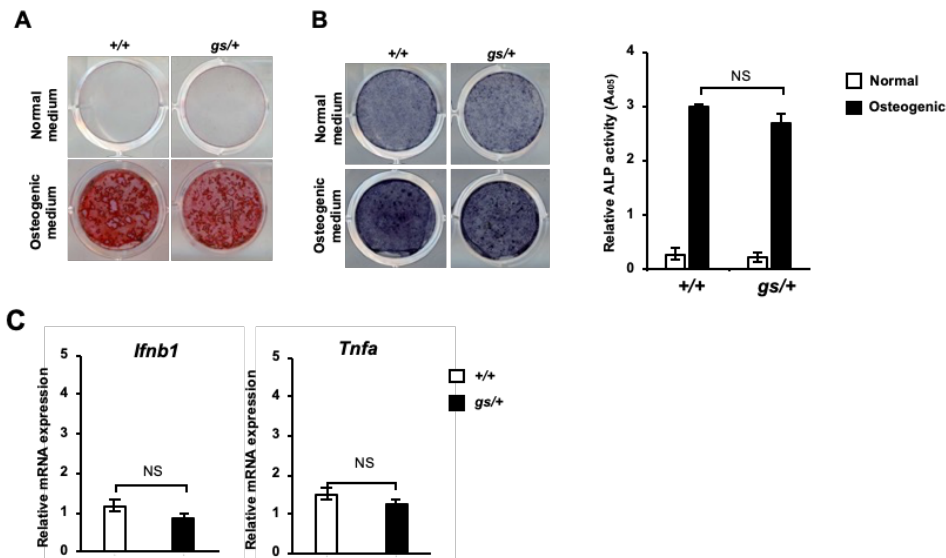


図3-8 骨芽細胞の*in vitro*解析

マウスの頭蓋骨から調整した培養骨芽細胞を、骨芽細胞分化誘導培地（osteogenic medium）で21日間培養し、骨形成を誘導した。（A）カルシウム成分の沈着をアリザリンレッドで染色した。（B）骨芽細胞マーカーのALPを染色し（左）、その活性を定量した（右）。（C）WTマウスと*Ifih1*^{gs/+}マウス由来の骨芽細胞にてIFN- β とTNF- α のmRNA発現量を定量的リアルタイムPCRにて定量した（n=3）。

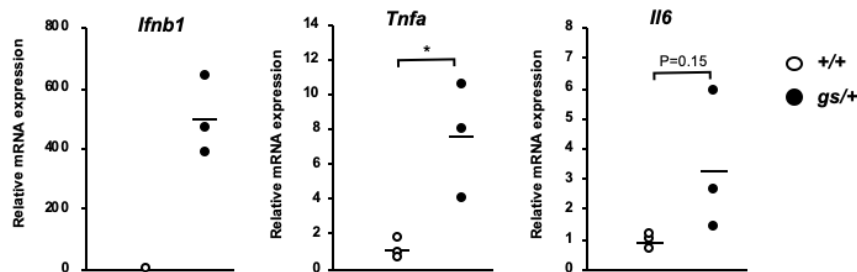


図3-9 *Ifih1*^{gs/+}マウスにおける骨髄細胞の解析

WTと*Ifih1*^{gs/+}マウスの骨髄細胞におけるIFN- β とTNF- α 、IL-6のmRNA発現量を解析した（n=3）。

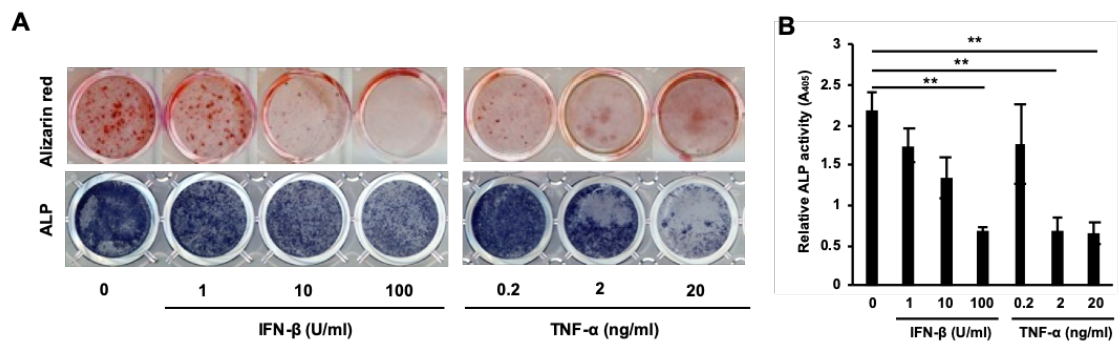


図3-10 骨芽細胞の*in vitro*解析

(A) WTマウスの頭蓋骨から調整した培養骨芽細胞を、マウスのリコンビナントIFN-βあるいはTNF-αを培地中に加え、骨形成を誘導した。カルシウム成分の沈着をアリザリンレッドで染色した。また骨芽細胞マーカーのALPを染色し、その活性を測定した (B) (n=3)。

3-4. *Ifih1*^{gs/+}マウスの骨組織における破骨細胞数の低下

Ifih1^{gs/+}マウスにおいて骨芽細胞による骨形成の抑制が明らかとなったので、続いて MDA5 の G821S 変異の *in vivo* での破骨細胞への影響を解析するために、*Ifih1*^{gs/+}マウスの組織切片上での破骨細胞を破骨細胞マーカーTRAPで染色し、TRAP陽性細胞破骨細胞の数を計測した。その結果、WTマウスに比較して、*Ifih1*^{gs/+}マウスの骨では破骨細胞数の顕著な減少が認められた (図 3-11A, B)。*Ifih1*^{gs/+}マウスの生体内での破骨細胞による骨吸収の活性を調べるため、骨吸収マーカーの一つであるTRACP-5bの血清中濃度をELISAにより測定した。その結果 *Ifih1*^{gs/+}の血清中において、WTマウスに比べ有意なTRACP-5bの値の低下が認められた (図 3-11C)。破骨細胞の分化は、造血幹細胞からマクロファージ系の破骨細胞前駆細胞への分化を介して成熟破骨細胞へ分化する。MDA5変異の破骨細胞の前駆細胞分化への影響を調べるため、*Ifih1*^{gs/+}マウスの骨髄細胞中の破骨細胞前駆細胞 (CD3ε⁻ B220⁻ CD11b^{low/-} c-kit⁺ c-fms⁺) の割合を調べた⁶⁰。その結果 WTマウスと *Ifih1*^{gs/+}マウスでは破骨細胞前駆細胞の割合に有意な差は認められなかった (図 3-12)。これらの結果から MDA5 の G821S 変異は破骨細胞の前駆細胞から破骨細胞への分化を抑制し、破骨細胞の数と骨吸収量が低下することが明らかとなった。

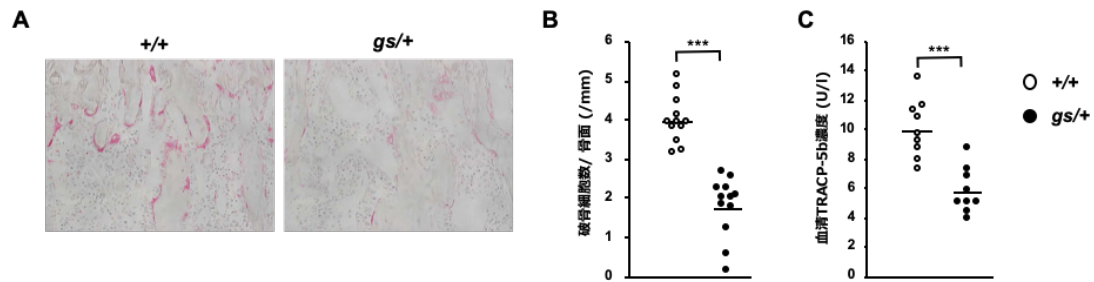


図3-11 *In vivo*での*Ifih1*^{gs/+}マウスにおける破骨細胞の解析

(A) WTマウスと*Ifih1*^{gs/+}マウスの脛骨の組織切片をTRAP染色した。赤色の細胞が破骨細胞である。(B) TRAP陽性の破骨細胞数を計測し、破骨細胞数/骨面 (/mm) を算出した。(C) 骨吸収マーカーTRACP-5bの血清中濃度 (U/L) をELISAで測定した (n=9)。

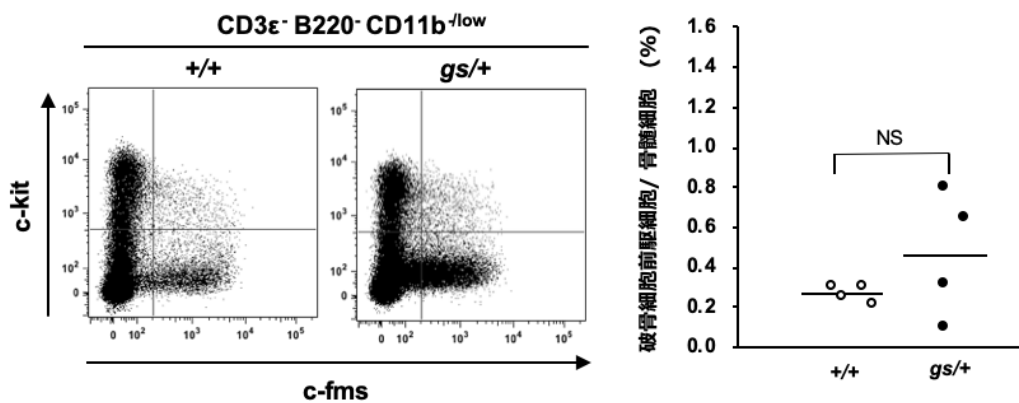


図3-12 *Ifih1*^{gs/+}マウス骨髄中の破骨細胞前駆細胞の解析

WTと*Ifih1*^{gs/+}マウスの骨髄細胞中における破骨細胞前駆細胞 (CD3ε⁻ B220⁻ CD11b^{low} c-kit⁺ c-fms⁺) を解析した (n=4)。

3-5. MDA5 G821S 変異による破骨細胞分化の抑制

先行研究から、IFN-βは破骨細胞分化のマスター転写因子 NFATc1 の発現を阻害することにより *in vitro* で破骨細胞の分化を抑制すること⁶¹、また MDA5 のリガンドとして知られる人工二本鎖 RNA である poly (I:C)は *in vitro* で破骨細胞の分化を抑制することが報告されている⁶²。MDA5 の G821S 変異の直接的な破骨細胞への影響を調べるため、破骨細胞の *in vitro* 解析を行った。*Ifih1*^{gs/+}マウスの骨髄細胞を採取し、M-CSF により BMM (骨髄由来マクロファージ) の分化を誘導した後、RANKL の刺激により破骨細胞

の分化を誘導した。その結果 *Ifih1^{gs/+}* マウス由来の細胞は WT マウス由来の細胞に比べて、TRAP 陽性の破骨細胞が減少し、破骨細胞の分化が抑制されることが明らかとなった（図 3-13）。さらに BMM での遺伝子発現を解析したところ、破骨細胞の抑制因子である IFN- β の mRNA 発現量の上昇と炎症性サイトカイン TNF- α 、IL-6、IL-1 β の mRNA の発現上昇が認められた（図 3-14）。次に RANKL による破骨細胞誘導時における、*Ifih1^{gs/+}* マウス由来の細胞での NFATc1 遺伝子発現を調べるため、*Nfatc1* 発現量の経時変化を、RANKL の刺激を加えた BMM で解析した。RANKL 刺激後、*Ifih1^{gs/+}* 由来の BMM において *Nfatc1* 発現量の有意な低下が認められた（図 3-15）。さらに NFATc1 によって発現が誘導される破骨細胞の分化、機能の維持に必須の分子をコードする遺伝子（破骨細胞特異的遺伝子群）の発現量を調べるため、同一の cDNA を用いて *Acp5*、*Itgb3*、*Ctsk* の発現量を解析した。その結果 *Ifih1^{gs/+}* の細胞において、これらの遺伝子の有意な発現量の低下を示した（図 3-15）。これらの結果から *Ifih1^{gs/+}* マウスの破骨細胞前駆細胞にて、恒常的に産生される IFN- β により *Nfatc1* の発現が抑制され、破骨細胞関連遺伝子群の発現が抑制されることにより、破骨細胞の分化が阻害されることが示唆された。

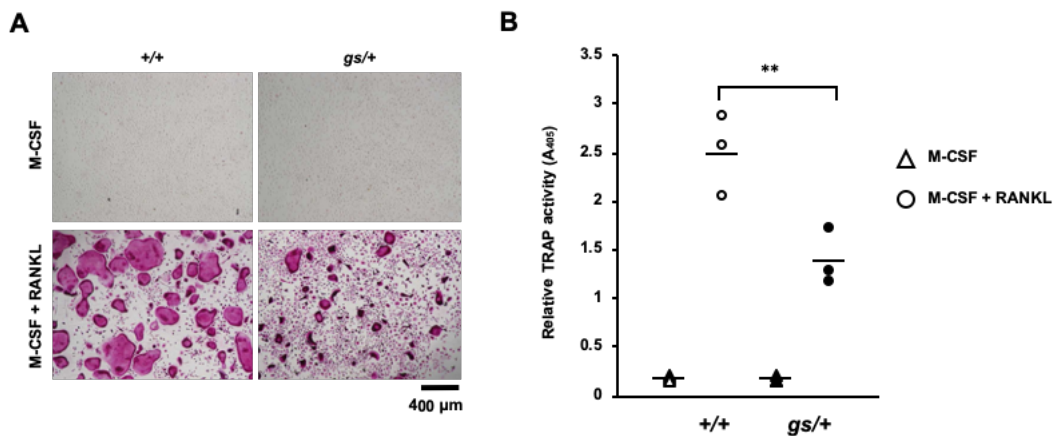


図3-13 *In vitro*における*Ifih1^{gs/+}*マウス破骨細胞の分化誘導

(A) WTと*Ifih1^{gs/+}*マウスの骨髄細胞をM-CSF存在下で培養し、BMMへ分化させた後、M-CSFとRANKLの刺激により破骨細胞へと分化誘導させた。形成された破骨細胞をTRAPで染色した。(B) また細胞を溶解させ、ライセート中のTRAPの活性を測定した (n=3)。

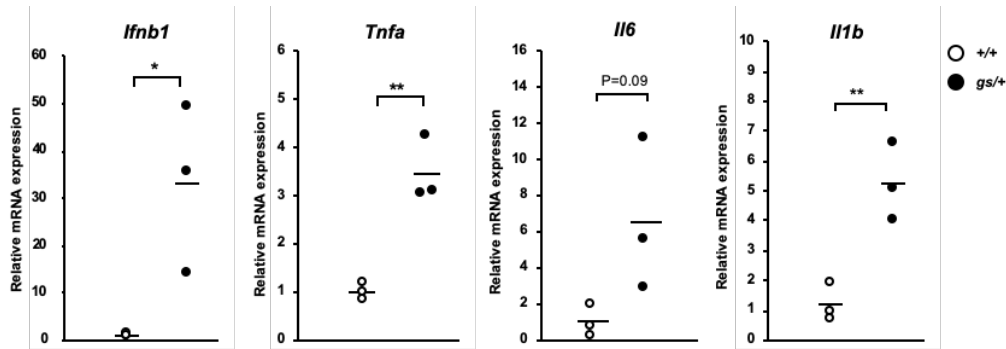


図3-14 *Ifih1*^{gs/+}マウスBMMにおける破骨細胞分化への関連因子の遺伝子解析
 7週齢マウスの骨髄細胞をM-CSFによりBMMへ分化させ、分化したBMMからcDNAライブラリーを作製し、破骨細胞の分化に関わる因子（IFN-β、TNF-α、IL-6とIL-1b）のmRNAの相対的発現量を定量的リアルタイムPCRにて定量した（n=3）。

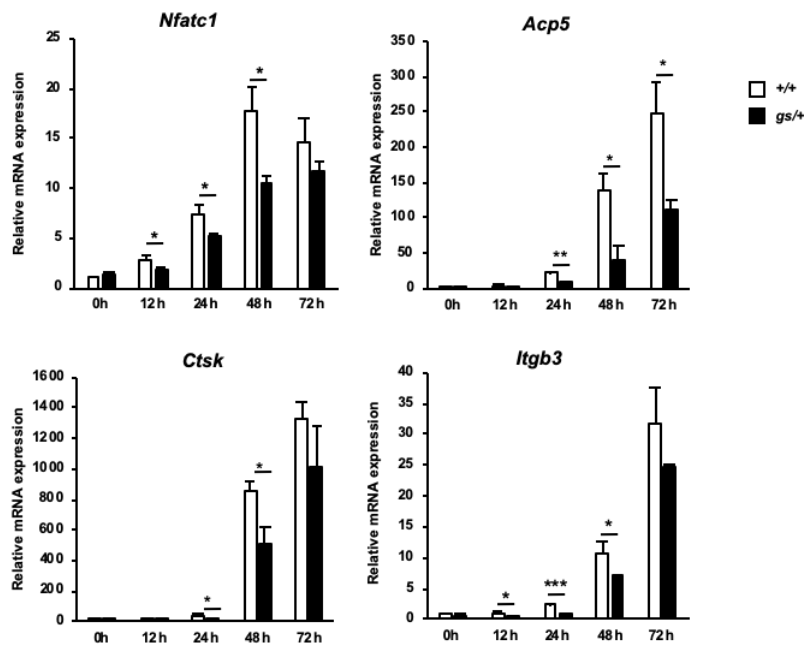


図3-15 BMMのRANKL刺激下における破骨細胞分化関連遺伝子の発現変化
 マウスの骨髄細胞をM-CSFによりBMMへ分化させ、分化したBMMをM-CSFとRANKLで刺激した。刺激0, 12, 24, 48, 72時間後における破骨細胞分化の関連遺伝子（*Nfatc1*、*Acp5*、*Ctsk*、*Itgb3*）のmRNAの相対的発現量を、定量的リアルタイムPCRにて定量した（n=3）。

3-6. I 型 IFN は骨疾患の発症のキーファクター

IFN- β は骨芽細胞および破骨細胞の分化や機能を阻害することが明らかとなった。そこで I 型 IFN の、*Ifih1*^{gs/+}マウスで認められた骨の病態への関与を明らかにするため、I 型 IFN 受容体の欠損マウス (*Ifnar1*^{-/-}マウス) を *Ifih1*^{gs/+}マウスに掛け合わせ、*Ifih1*^{gs/+}・*Ifnar1*^{-/-}マウスを作製し、骨の表現型を解析した。*Ifih1*^{gs/+}・*Ifnar1*^{-/-}マウスの大腿骨をマイクロ CT で解析したところ、*Ifih1*^{gs/+}マウスと比較して、大幅に骨の大きさや骨の厚み、骨塩量が大幅に回復することが明らかとなった (図 3-16A-D) 。また *Ifih1*^{gs/+}・*Ifnar1*^{-/-}マウスの骨の組織学的解析を行ったところ、*Ifih1*^{gs/+}マウスで認められた成長板軟骨の形態異常が *Ifih1*^{gs/+}・*Ifnar1*^{-/-}マウスでは認められず (図 3-17A) 、骨芽細胞の数や類骨の量は正常化を示した (図 3-17A, B) 。また *Ifih1*^{gs/+}・*Ifnar1*^{-/-}マウスでの破骨細胞数や骨吸収マーカの値は WT マウスと比較して正常であった (図 3-18A-C) 。さらに *Ifih1*^{gs/+}・*Ifnar1*^{-/-}マウス由来の骨髄細胞から破骨細胞は正常に分化した (図 3-18D, E) 。これらの結果から、I 型 IFN が骨代謝の異常を引き起こし、*Ifih1*^{gs/+}マウスの骨の病態を引き起こす重要な因子であることが明らかとなった。

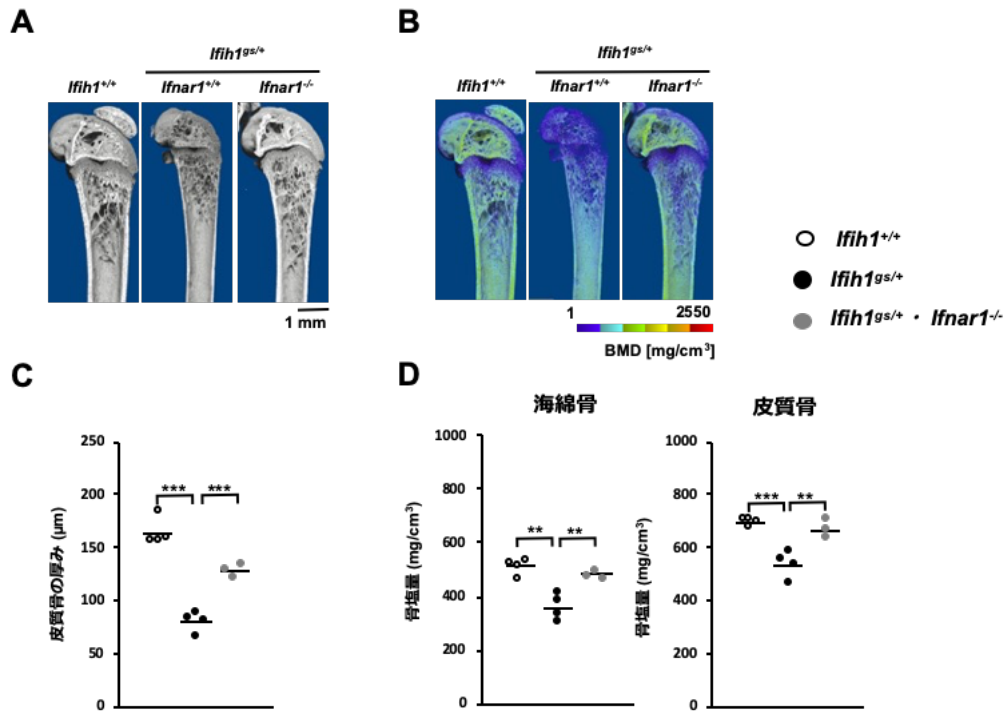


図3-16 *Ifih1^{gs/+} · Ifnar1^{-/-}*マウスのマイクロCT解析

(A) WTマウスと*Ifih1^{gs/+}*マウスに加えて*Ifih1^{gs/+} · Ifnar1^{-/-}*マウスの大腿骨において、マイクロCTを用いて三次元構造画像を撮影した。(B)ヒドロキシアパタイトの密度が低いと青、高くなるにしたがって緑、赤で表される疑似カラーの画像を作製し、骨塩量の分布を可視化した。(C)大腿骨の皮質骨における厚み (μm) を定量した。(D)大腿骨の海綿骨、皮質骨における骨塩量 (mg/cm³) を定量した (n=3) 。

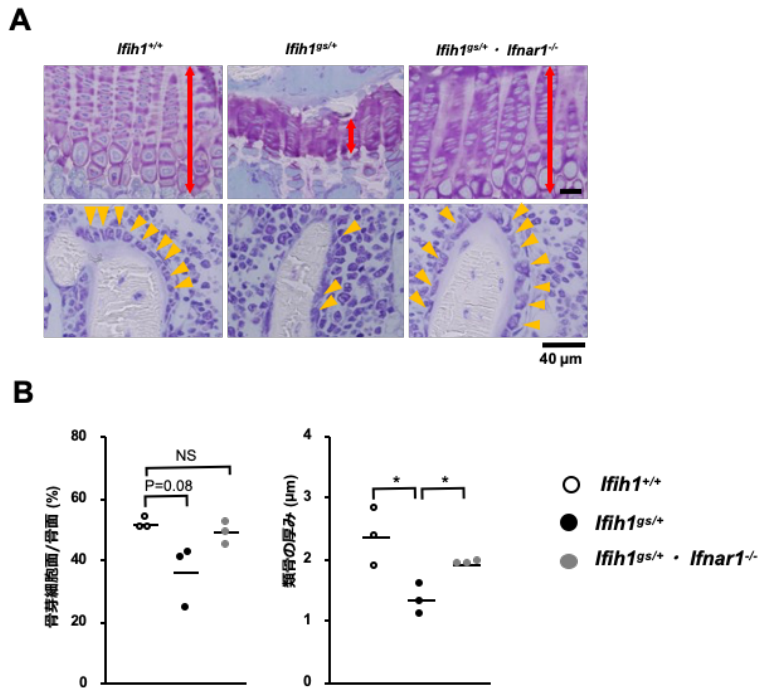


図3-17 *Ifih1*^{gs/+} · *Ifnar1*^{-/-}マウスの骨芽細胞解析

(A) WTマウスと*Ifih1*^{gs/+}マウスに加えて*Ifih1*^{gs/+} · *Ifnar1*^{-/-}マウスの脛骨におけるトルイジンブルー染色の解析画像。両矢印は軟骨成長板の長さを示す(上)。黄色の矢印は骨芽細胞を示している(下)。(B) 骨芽細胞に関するパラメーターである骨芽細胞面/骨面(%)および類骨の厚み(μm)を示した(n=3)。

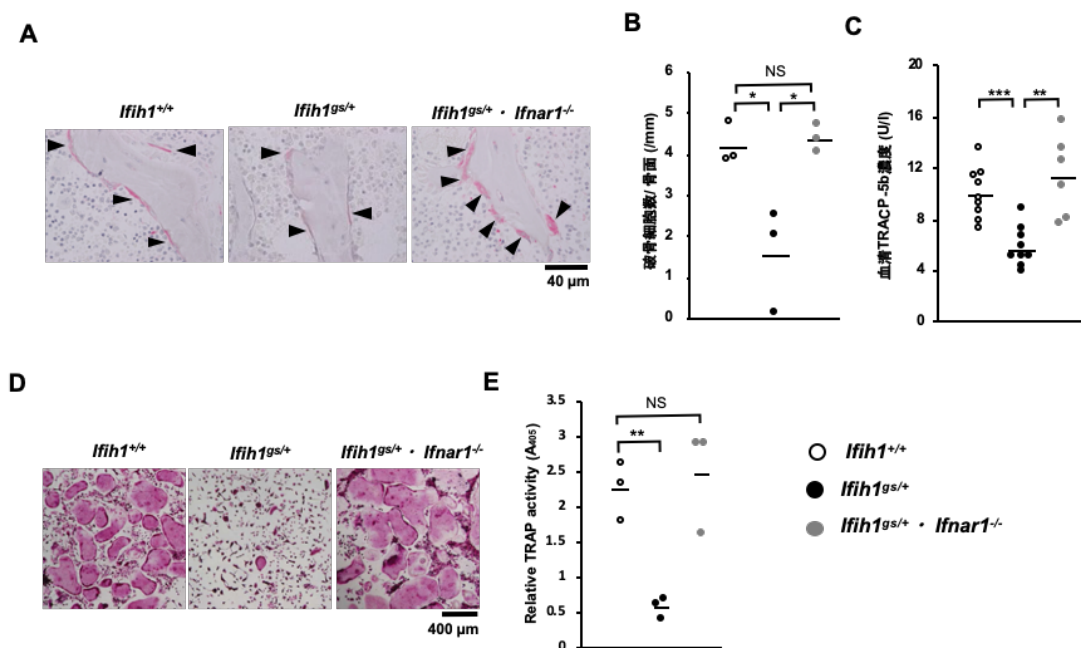


図3-18 *Ifih1*^{gs/+} · *Ifnar1*^{-/-}マウスにおける破骨細胞の解析

(A) WTマウスと*Ifih1*^{gs/+}マウスに加えて*Ifih1*^{gs/+} · *Ifnar1*^{-/-}マウスの脛骨の組織切片をTRAP染色した。(B) TRAP陽性の破骨細胞数を計測し、破骨細胞数/骨面 (/mm)を算出した。(C) 骨吸収マーカーTRACP-5bの血清中濃度 (U/L) をELISAで定量した。WTと*Ifih1*^{gs/+}および*Ifih1*^{gs/+} · *Ifnar1*^{-/-}マウスの骨髄細胞をM-CSF存在下で培養しBMMへ分化させた後、M-CSFとRANKLの刺激により破骨細胞を分化誘導させた。形成された破骨細胞をTRAP染色した (D)。また細胞を溶解させ、TRAPの活性を測定した (E) (n=3)。

3-7. JAK 阻害薬の MDA5 G821S 変異マウスにおける骨疾患への治療効果

I 型 IFN のシグナルが MDA5 変異による骨疾患の治療標的であることが示唆されたので、I 型 IFN のシグナルの要となる JAK-STAT シグナルを阻害することにより、骨疾患に対する治療効果が得られることが期待される。そこで選択的 JAK 阻害薬であるトファシチニブを *Ifih1*^{gs/+}マウスに投与し、その薬物の骨の表現型への影響を検討した。トファシチニブを 3 週齢の *Ifih1*^{gs/+}マウスに 1 日一回経口投与したところ、*Ifih1*^{gs/+}マウスの生存率および体重増加の改善が認められた (図 3-19A, B)。またトファシチニブの投与により、*Ifih1*^{gs/+}マウスの骨塩量が部分的に回復していた (図 3-19C, D)。これらの結果からトファシチニブの経口投与は MDA5 の変異による骨疾患の病態を改善する可能性が示唆される。

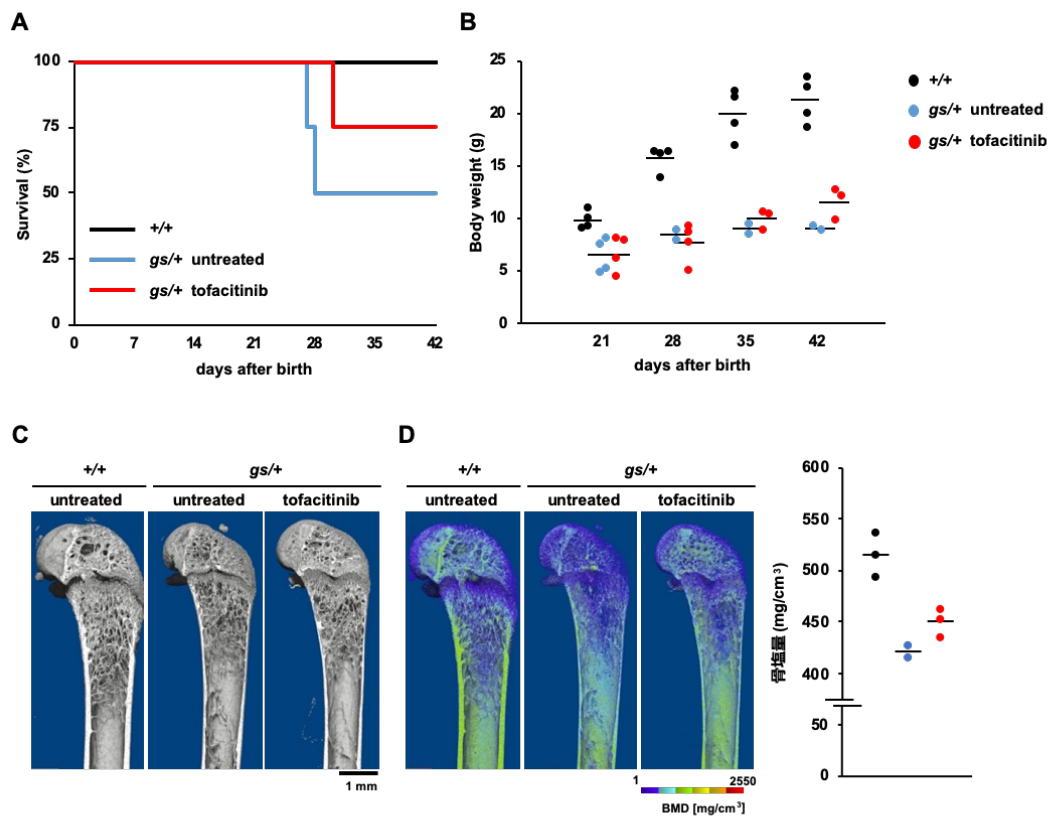


図3-19 JAK阻害薬トファシチニブの治療効果

3週齢 $Ifih1^{gs/+}$ マウスにおいてトファシチニブの経口投与を開始し、6週齢まで投与した。(A) 生存率を示した。(B) マウスの体重をモニターした。(C) マウスの大腿骨において、マイクロCTを用いて三次元構造画像を撮影した。(D) ヒドロキシアパタイトの密度が低いと青、高くなるにしたがって緑、赤で表される疑似カラーの画像を作製し、骨塩量の分布を可視化した。大腿骨の海綿骨における骨塩量 (mg/cm^3) を定量した ($n = 2$ or 3)。

第四章

考察

4-1. MDA5 変異と臓器特異性

RNA ウイルスセンサーである RIG-I や MDA5 の機能獲得変異によって発症する SMS は、骨粗鬆症や四肢の骨融解などの骨病変を呈する自己免疫疾患である。RLR の変異と骨疾患の関連性を対象とする基礎研究はこれまで行われておらず、SMS での骨病変を発症するメカニズムは明らかにされていないのが現状である。本研究では、MDA5 の機能獲得変異に伴う自己免疫疾患様の表現型を呈する *Ifih1^{gs/+}* マウスを用い、骨の微細な構造解析と骨代謝を司る破骨細胞や骨芽細胞を *in vitro* および *in vivo* で解析することにより、MDA5 の恒常的活性化が骨にもたらす影響を検討した。本研究により *Ifih1^{gs/+}* マウスは骨密度の低下（図 3-2）、骨形成速度の低下（図 3-7）、成長板軟骨の形成異常を伴う骨の発育遅滞を示した（図 3-5）。*Ifih1^{gs/+}* マウスは骨密度の低下や低身長など SMS と共通する表現型を示したことから、MDA5 の G821S 変異によって、*Ifih1^{gs/+}* マウスはループス腎炎だけではなく SMS に類似した骨病変を自然発症すると考えられる。SLE や AGS、SMS を含めた I 型インターフェロパシーの症状は全身性の炎症から、皮膚や腎臓、脳、骨、歯など臓器特異的な症状まで様々である^{63,64}。I 型インターフェロパシー患者から同定された、それぞれの MDA5 の変異体はヘリカーゼドメインに単一のアミノ酸置換が認められるが、変異箇所によって、症状が発現する臓器が異なるようである。異なる 4 家系の SMS 患者から MDA5 変異の R822Q の変異が同定されたという事実（そのうち一つは *de novo* 変異）は、この変異型が骨に症状を発現させやすいことを示唆している^{21,65}。種の違いはあるが、*Ifih1^{gs/+}* マウスは SMS を引き起こす MDA5 の R822 の隣のアミノ酸 G821 に変異を有するため、G821S 変異 MDA5 は、骨形成異常を呈する SMS 患者の MDA5 と同じような構造変化を起こし、SMS と類似した機序で骨の病態を引き起こした可能性は十分に考えられる。よって *Ifih1^{gs/+}* マウスの骨密度低下に関する病理学的機構が SMS の骨疾患の病理モデルであると考えられることは理にかなっている。G821 と R822 は共に MDA5 のヘリカーゼドメイン上の同一の ATP 結合モチーフに位置しており、この領域は骨の疾患を引き起こすホットスポットであるかもしれない。どのような変異が、ヒトにおいて腎炎や脳症あるいは骨病変を発症しやすいかを推定できるようにできれば、MDA5 変異に伴う I 型インターフェロパシーの診断や治療において大きな助けとなるはずである。

4-2. MDA5-I 型 IFN シグナルの骨病態への関与

SMS への有効な治療法に関する知見はこれまでに報告されておらず、I 型 IFN が骨の病態にどのように関与するかは未解明であった。本研究では *Ifih1^{gs/+}* において I 型 IFN シグナルの欠損が、骨代謝異常を正常化させ、骨密度を大幅に回復させた (図 3-16, 17, 18)。このことは MDA5 の恒常的活性化によって産生された I 型 IFN がマウスで骨の病態を引き起こす主要な因子であることを示している。*Ifih1^{gs/+}·Ifnar1^{-/-}* マウスの骨の表現型の劇的な回復を示したことから、*Ifih1^{gs/+}* マウスでの骨の異常において、I 型 IFN がキーファクターとして作用していることに疑いはないが、この結果は I 型 IFN 以外の他の因子が骨の病態に関与していないということを意味するものではない。その理由は以下の通りである。MDA5 遺伝子は I 型 IFN によって誘導される ISG (IFN 誘導遺伝子群) のひとつである。つまり MDA5 遺伝子の機能獲得変異に伴う MDA5 の恒常的活性化によって産生された I 型 IFN によって、MDA5 遺伝子の発現が誘導され、新たに変異型 MDA5 が産生される (図 4-1)。つまり MDA5 シグナルはポジティブフィードバックループにより増幅されるため、NF-κB を介した TNF などの炎症性サイトカインの産生も増幅される。よって I 型 IFN シグナルの欠損によって、MDA5-I 型 IFN-MDA5 の増幅機構も消失するため、炎症性サイトカインの産生量が減少する。実際に、*Ifih1^{gs/+}·Ifnar1^{-/-}* マウスでは、*Ifih1^{gs/+}* マウスに比べて TNF-α や IL-6 の mRNA 発現量が大幅に低く³⁷。*Ifih1^{gs/+}·Ifnar1^{-/-}* マウスの解析だけではこれら炎症性サイトカインの関与の有無を断ずることはできない。これら TNF-α や IL-6 の骨への病態への関与を検討するため、それらサイトカインシグナルの欠損マウスとの交配や、中和抗体の投与などの骨の病態への影響を解析することが今後の課題である。

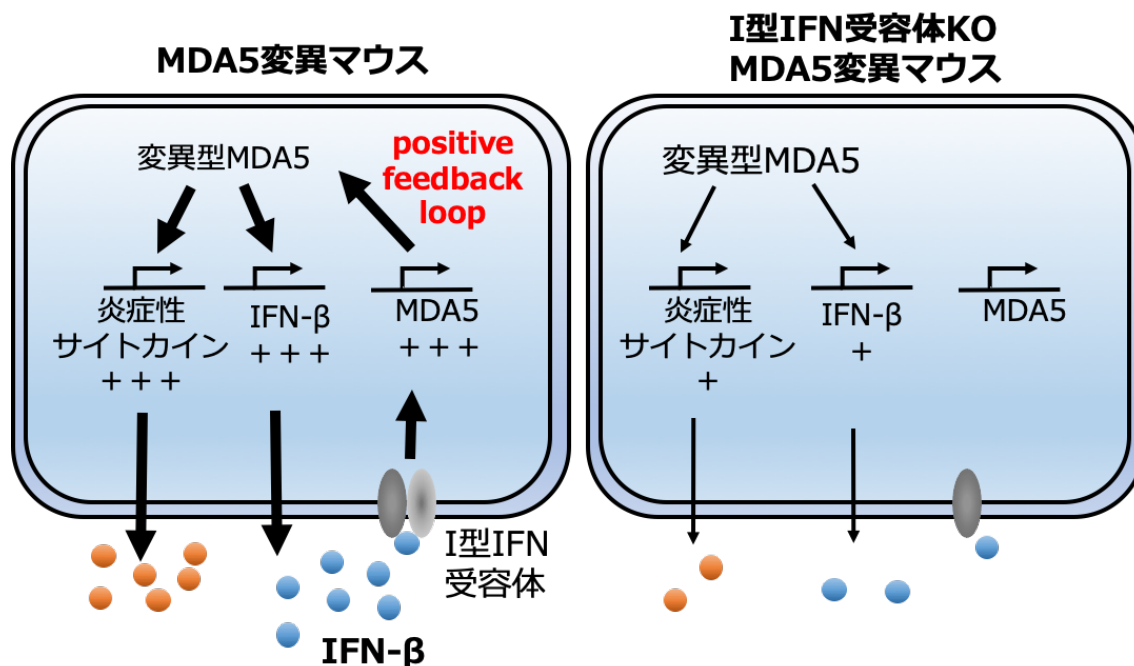


図4-1 I型IFNシグナルの欠損による炎症性サイトカイン量の低下

MDA5はIFN-βの刺激によって遺伝子発現の誘導を受ける。つまりMDA5の恒常的活性化によって産生されたIFN-βはpositive feedback loopによりMDA5のシグナル（I型IFNや炎症性サイトカインの発現）を増幅させる。しかしI型IFN受容体欠損・MDA5変異マウスはMDA5シグナルの増幅が起こらないため、MDA5変異マウスに比べ、炎症性サイトカインの発現量が低くなる。

4-3. JAK 阻害薬の骨病態への治療効果

MDA5 遺伝子 *IFIH1* は *TREX1* や *SAMHD1*、*ADAR1* などの I 型インターフェロパシー関連遺伝子に比べて、より強く I 型 IFN の誘導を受ける⁶⁶。よって MDA5 以外の遺伝子変異によって発症した I 型インターフェロパシーと比較して、MDA5 変異による I 型インターフェロパシーの治療においては I 型 IFN シグナル阻害がより有効に機能することが示唆される。しかし、本研究では *Ifih1^{gs/+}·Ifnar1^{-/-}* マウスの表現型の劇的な正常化を示したにもかかわらず、*Ifih1^{gs/+}* マウスへの JAK 阻害薬の効果は十分な治療効果を得られなかった（図 3-19）。選択的 JAK 阻害剤であるトファシチニブ・クエン酸（商品名：ゼルヤンツ）は関節リウマチの治療剤として FDA により承認されている。低分子化合物であるトファシチニブの半減期は短く、承認されているゼルヤンツの投与頻度は 1 日 2 回の経口投与である。本研究では仔マウスへの身体的負担などを考慮し 1 日 1 回の投与にとどめたことにより、十分な時間の薬効を示さなかったと考えられる。よって、マウスへの投

与頻度の改善により、より高い治療効果が得られる可能性が高い。さらにトファシチニブは JAK1 および JAK3 の阻害により、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-9、IL-15 および IL-21 など様々なサイトカインシグナルを阻害する。よってトファシチニブにより、正常な骨の代謝に必要なサイトカインシグナルをブロックしてしまい、*Ifih1^{gs/+}* マウスの骨代謝異常が増悪し、I 型 IFN シグナル阻害による骨代謝の回復効果が減弱してしまった可能性は否定できない。現在、I 型 IFN 受容体に対する中和抗体（アニフルマブ）が全身性エリテマトーデスへの治療薬として臨床試験が進められている。抗体製剤は低分子製剤より、薬効の持続時間が長く、ターゲットへの特異性が高いため、より高い治療効果が期待できる。今後の課題として、この抗体製剤の SMS 患者への適用の可能性を調べるため、I 型 IFN 受容体への抗体を MDA 5 変異マウスに投与し、骨の病態への治療効果を検討したい。

4-4. 他臓器の障害による骨病態への影響

骨は骨芽細胞によって産生された I 型コラーゲンを中心とした骨基質のタンパク質に、カルシウムとリンの結晶であるヒドロキシアパタイトが沈着することにより石灰化される。そのため、骨芽細胞による骨形成は血液中のカルシウムとリンの濃度に影響を受ける。ビタミン D は小腸におけるカルシウムの吸収を促進し、カルシウムの血中濃度を維持する。また骨細胞から産生される FGF23 (fibroblast growth factor 23) は腎臓でのリンの再吸収を抑制することにより、血中のリンの濃度を低下させ、骨と腎臓をつなぐリン代謝調節因子として機能する⁶⁷。すなわち、骨は腎臓や消化器官と密に関連しており、腎臓や腸の障害は骨代謝の異常を引き起こす。*Ifih1^{gs/+}* マウスは腎炎を自然発症する。詳細な解析は未だ行われていないが、*Ifih1^{gs/+}* マウスはしばしば下痢や血便が認められることから、腸炎など、腸管機能に障害を有する可能性がある。よって *Ifih1^{gs/+}* マウスの腎炎や腸炎が、骨形成機能低下の一因になっている可能性も十分に考えられる。しかしながら、本研究では腎炎や腸炎を発症していない *Ifih1^{gs/+}* マウスの新生児においても骨塩量の低下が認められたこと（図 3-3）、さらに *Ifih1^{gs/+}* マウスの血清中のカルシウムや無機リンの濃度は正常の範囲内であり、それらのミネラル代謝に異常は認められなかったことから（図 3-4）、*Ifih1^{gs/+}* マウスの骨形成の抑制は、腎炎や腸炎に非依存的であることが示唆される。*Ifih1^{gs/+}* マウスにおける、他臓器の障害と骨の病態の関連性を

検討することは、慢性炎症疾患と骨病変との関連性の解明という観点で重要な課題である。

4-5. 変異型 MDA5 の破骨細胞分化への影響

本研究では破骨細胞や骨芽細胞の分化、機能における外在性の要因を排除するために、*in vitro* での破骨細胞および骨芽細胞の分化培養実験を行なった。*Ifih1^{gs/+}*マウス由来の骨髄細胞からの破骨細胞分化は I 型 IFN シグナル依存的な抑制を受けていたことから（図 3-18）、破骨細胞前駆細胞において変異型 MDA5 によって恒常的に産生される IFN- β が破骨細胞分化を抑制することが明らかとなった。先行研究から、TNF- α は M-CSF 受容体の発現量を高め、さらに NF- κ B と NFAT のシグナル伝達を活性化することにより、破骨細胞の分化を直接的に増強することが知られている^{55,68}。また IL-6 も破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を高めることが報告されている^{56,69}。本研究の結果は、破骨細胞分化の際、TNF- α や IL-6 の破骨細胞分化亢進作用よりも、IFN- β の破骨細胞分化の抑制効果の方が優位に作用したことが示唆される。TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカインは破骨細胞前駆細胞を含めたマクロファージ系の細胞において、WT であっても比較的高いレベルで発現するため、TNF- α や IL-6 発現量における WT と G821S 変異の差は大きくはない。一方、IFN- β においては WT の細胞では発現レベルは低く抑えられている。MDA5 の活性化状態において IFN- β 発現の上昇幅は大きく、TNF- α や IL-6 の作用より強く影響を及ぼした結果、破骨細胞分化が抑制されたのかもしれない。

4-6. 炎症性サイトカイン TNF- α の骨病態への関与

TNF- α は骨芽細胞や軟骨細胞にも作用し、それらの分化や機能を阻害することが知られている^{57,70}。I 型 IFN の骨芽細胞への影響に関する知見はこれまで報告されていなかったが、本研究により IFN- β もまた、TNF- α と同じように、骨芽細胞の分化や骨形成を阻害することを明らかにした（図 3-10）。MDA5 の G821S 変異マウス由来の培養骨芽細胞においては IFN- β の発現誘導は認められず（図 3-8）、骨芽細胞の異常は認められなかったことから、骨の環境内で外在性のサイトカインにより骨芽細胞の骨形成が抑制されたことが示唆された。また骨の組織学的解析により、*Ifih1^{gs/+}*マウスでは骨組織での脂肪細胞の異常な増

加が明らかとなった（図 3-5）。骨芽細胞と脂肪細胞はともに間葉系幹細胞に由来する。骨芽細胞の分化の異常によって、間葉系幹細胞からの細胞分化の方向性がシフトすることにより脂肪細胞が増加し、骨芽細胞数が低下し、その結果、骨密度が低下することにより骨粗鬆症に陥ることが報告されている⁷¹⁻⁷³。*Ifih1^{gs/+}* マウスでは I 型 IFN や TNF- α などによって、間葉系幹細胞から骨芽細胞の分化が抑制された結果、脂肪細胞の分化が促進されたことが示唆される。また TNF- α は軟骨細胞に作用し、コラゲナーゼやプロテアーゼの産生を誘導することにより、軟骨破壊を誘導することが知られている⁷⁴。*Ifih1^{gs/+}* マウスでは骨端部で TNF- α が軟骨細胞へ影響し、軟骨成長板の形成異常が引き起こされているのかもしれない。軟骨細胞の解析に関して、成獣マウスから培養する技術が十分に確立されていない。そのため胎児や新生マウスから軟骨細胞を回収し、分化や生存などの解析さらには定量的リアルタイム PCR 法などを用い、軟骨細胞分化に関わる遺伝子（*Sox9*、*Ihh* など）をプロファイリングするより、軟骨成長板の形成異常の発症メカニズムが明らかになるかもしれない。また I 型 IFN の軟骨細胞への影響を調べた研究はこれまで報告されていないため、I 型 IFN の軟骨細胞の分化や機能への影響を解析することも今後の課題である。

4-7. 本研究の意義

本研究では MDA5 に機能獲得変異を有するマウスを用いて、SMS に類似した骨疾患の発症機構の解明を行った。MDA5 の活性化によって産生された I 型 IFN が、骨芽細胞の骨形成および破骨細胞の分化を抑制することにより、骨代謝回転が低下し、その結果、骨密度と骨強度が低下することを明らかにした（図 4-2）。この病理モデルは SMS の骨疾患の治療戦略を考える上で重要な足がかりになると考えられ、この病態には I 型 IFN シグナルを阻害する薬剤や、骨形成を促進し骨代謝回転を亢進させる薬剤が有効であることが示唆される。

今後、本研究がさらに発展し、MDA5 および RIG-I の恒常的活性化による骨疾患の全容が明らかになり、SMS の克服につながる治療法が開発されることを期待する。

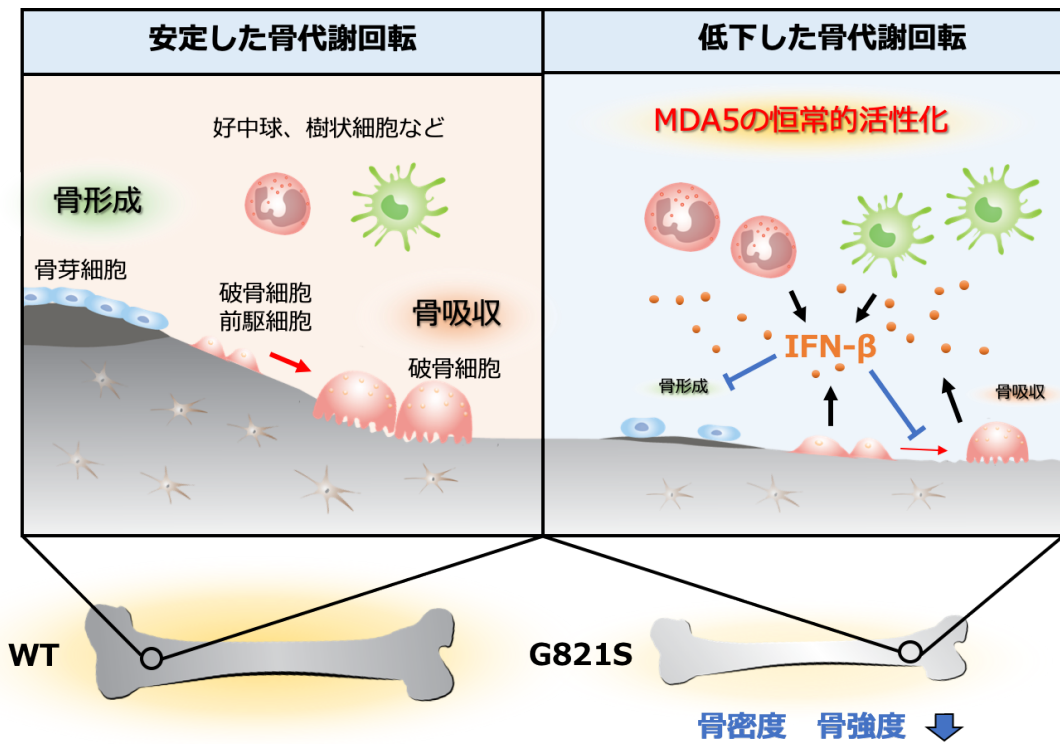


図4-2 MDA5 G821S変異マウスにおける骨病変の発症機構のモデル

マクロファージや好中球などの一部の免疫細胞において、MDA5の恒常的活性化により産生されたIFN-βが骨形成と破骨細胞の分化を阻害することにより、骨代謝回転が低下し、骨密度および骨強度が低下する。

参考文献

- 1 Yoneyama, M. *et al.* The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* **5**, 730-737, doi:10.1038/ni1087 (2004).
- 2 Yoneyama, M. & Fujita, T. Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. *Rev Med Virol* **20**, 4-22, doi:10.1002/rmv.633 (2010).
- 3 Kato, H. *et al.* Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441**, 101-105, doi:10.1038/nature04734 (2006).
- 4 Sun, Q. *et al.* The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses. *Immunity* **24**, 633-642, doi:10.1016/j.immuni.2006.04.004 (2006).
- 5 Kawai, T. *et al.* IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* **6**, 981-988, doi:10.1038/ni1243 (2005).
- 6 Meylan, E. *et al.* Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**, 1167-1172, doi:10.1038/nature04193 (2005).
- 7 Seth, R. B., Sun, L., Ea, C. K. & Chen, Z. J. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* **122**, 669-682, doi:10.1016/j.cell.2005.08.012 (2005).
- 8 Xu, L. G. *et al.* VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* **19**, 727-740, doi:10.1016/j.molcel.2005.08.014 (2005).
- 9 Hou, F. *et al.* MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell* **146**, 448-461, doi:10.1016/j.cell.2011.06.041 (2011).
- 10 Honda, K., Takaoka, A. & Taniguchi, T. Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* **25**, 349-360, doi:10.1016/j.immuni.2006.08.009 (2006).
- 11 Onoguchi, K. *et al.* Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism. *J Biol Chem* **282**, 7576-7581, doi:10.1074/jbc.M608618200 (2007).
- 12 Pestka, S., Krause, C. D. & Walter, M. R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* **202**, 8-32, doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x (2004).
- 13 Nejentsev, S., Walker, N., Riches, D., Egholm, M. & Todd, J. A. Rare variants of IFIH1, a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes. *Science* **324**, 387-389, doi:10.1126/science.1167728 (2009).
- 14 Zurawek, M. *et al.* Cumulative effect of IFIH1 variants and increased gene expression

- associated with type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* **107**, 259-266, doi:10.1016/j.diabres.2014.11.008 (2015).
- 15 Varzari, A. *et al.* Analysis of polymorphisms in RIG-I-like receptor genes in German multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* **277**, 140-144, doi:10.1016/j.jneuroim.2014.09.015 (2014).
- 16 Stuart, P. E. *et al.* Genome-wide Association Analysis of Psoriatic Arthritis and Cutaneous Psoriasis Reveals Differences in Their Genetic Architecture. *Am J Hum Genet* **97**, 816-836, doi:10.1016/j.ajhg.2015.10.019 (2015).
- 17 Nakashima, R. *et al.* The RIG-I-like receptor IFIH1/MDA5 is a dermatomyositis-specific autoantigen identified by the anti-CADM-140 antibody. *Rheumatology (Oxford)* **49**, 433-440, doi:10.1093/rheumatology/kep375 (2010).
- 18 Robinson, T. *et al.* Autoimmune disease risk variant of IFIH1 is associated with increased sensitivity to IFN- α and serologic autoimmunity in lupus patients. *J Immunol* **187**, 1298-1303, doi:10.4049/jimmunol.1100857 (2011).
- 19 Van Eyck, L. *et al.* Brief Report: IFIH1 Mutation Causes Systemic Lupus Erythematosus With Selective IgA Deficiency. *Arthritis Rheumatol* **67**, 1592-1597, doi:10.1002/art.39110 (2015).
- 20 Jang, M. A. *et al.* Mutations in DDX58, which encodes RIG-I, cause atypical Singleton-Merten syndrome. *Am J Hum Genet* **96**, 266-274, doi:10.1016/j.ajhg.2014.11.019 (2015).
- 21 Rutsch, F. *et al.* A specific IFIH1 gain-of-function mutation causes Singleton-Merten syndrome. *Am J Hum Genet* **96**, 275-282, doi:10.1016/j.ajhg.2014.12.014 (2015).
- 22 Crow, Y. J. Type I interferonopathies: a novel set of inborn errors of immunity. *Ann N Y Acad Sci* **1238**, 91-98, doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06220.x (2011).
- 23 Cunninghame Graham, D. S. *et al.* Association of NCF2, IKZF1, IRF8, IFIH1, and TYK2 with systemic lupus erythematosus. *PLoS Genet* **7**, e1002341, doi:10.1371/journal.pgen.1002341 (2011).
- 24 Oda, H. *et al.* Aicardi-Goutières syndrome is caused by IFIH1 mutations. *Am J Hum Genet* **95**, 121-125, doi:10.1016/j.ajhg.2014.06.007 (2014).
- 25 Rice, G. I. *et al.* Gain-of-function mutations in IFIH1 cause a spectrum of human disease phenotypes associated with upregulated type I interferon signaling. *Nat Genet* **46**, 503-509, doi:10.1038/ng.2933 (2014).
- 26 Singleton, E. B. & Merten, D. F. An unusual syndrome of widened medullary cavities of the metacarpals and phalanges, aortic calcification and abnormal dentition. *Pediatr Radiol* **1**, 2-7, doi:10.1007/bf00972817 (1973).
- 27 Bursztejn, A. C. *et al.* Unusual cutaneous features associated with a heterozygous

- gain-of-function mutation in IFIH1: overlap between Aicardi-Goutières and Singleton-Merten syndromes. *Br J Dermatol* **173**, 1505-1513, doi:10.1111/bjd.14073 (2015).
- 28 Stetson, D. B., Ko, J. S., Heidmann, T. & Medzhitov, R. Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell* **134**, 587-598, doi:10.1016/j.cell.2008.06.032 (2008).
- 29 Pereira-Lopes, S. *et al.* The exonuclease Trex1 restrains macrophage proinflammatory activation. *J Immunol* **191**, 6128-6135, doi:10.4049/jimmunol.1301603 (2013).
- 30 Gray, E. E., Treuting, P. M., Woodward, J. J. & Stetson, D. B. Cutting Edge: cGAS Is Required for Lethal Autoimmune Disease in the Trex1-Deficient Mouse Model of Aicardi-Goutières Syndrome. *J Immunol* **195**, 1939-1943, doi:10.4049/jimmunol.1500969 (2015).
- 31 Grieves, J. L. *et al.* Exonuclease TREX1 degrades double-stranded DNA to prevent spontaneous lupus-like inflammatory disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 5117-5122, doi:10.1073/pnas.1423804112 (2015).
- 32 Behrendt, R. *et al.* Mouse SAMHD1 has antiretroviral activity and suppresses a spontaneous cell-intrinsic antiviral response. *Cell Rep* **4**, 689-696, doi:10.1016/j.celrep.2013.07.037 (2013).
- 33 Rehwinkel, J. *et al.* SAMHD1-dependent retroviral control and escape in mice. *EMBO J* **32**, 2454-2462, doi:10.1038/emboj.2013.163 (2013).
- 34 Hartner, J. C. *et al.* Liver disintegration in the mouse embryo caused by deficiency in the RNA-editing enzyme ADAR1. *J Biol Chem* **279**, 4894-4902, doi:10.1074/jbc.M311347200 (2004).
- 35 Wang, Q. *et al.* Stress-induced apoptosis associated with null mutation of ADAR1 RNA editing deaminase gene. *J Biol Chem* **279**, 4952-4961, doi:10.1074/jbc.M310162200 (2004).
- 36 Wang, Q., Khillan, J., Gadue, P. & Nishikura, K. Requirement of the RNA editing deaminase ADAR1 gene for embryonic erythropoiesis. *Science* **290**, 1765-1768 (2000).
- 37 Funabiki, M. *et al.* Autoimmune disorders associated with gain of function of the intracellular sensor MDA5. *Immunity* **40**, 199-212, doi:10.1016/j.immuni.2013.12.014 (2014).
- 38 Nakashima, T., Hayashi, M. & Takayanagi, H. New insights into osteoclastogenic signaling mechanisms. *Trends Endocrinol Metab* **23**, 582-590, doi:10.1016/j.tem.2012.05.005 (2012).
- 39 Ross, F. P. & Teitelbaum, S. L. alphavbeta3 and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology. *Immunol Rev* **208**, 88-105, doi:10.1111/j.0105-

- 2896.2005.00331.x (2005).
- 40 Cao, H. *et al.* Activating transcription factor 4 regulates osteoclast differentiation in mice. *J Clin Invest* **120**, 2755-2766, doi:10.1172/JCI42106 (2010).
- 41 Yasuda, H. *et al.* Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3597-3602, doi:10.1073/pnas.95.7.3597 (1998).
- 42 Suda, T. *et al.* Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* **20**, 345-357, doi:10.1210/edrv.20.3.0367 (1999).
- 43 Asagiri, M. *et al.* Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *J Exp Med* **202**, 1261-1269, doi:10.1084/jem.20051150 (2005).
- 44 Koga, T. *et al.* Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature* **428**, 758-763, doi:10.1038/nature02444 (2004).
- 45 Nakashima, T. & Takayanagi, H. Osteoimmunology: crosstalk between the immune and bone systems. *J Clin Immunol* **29**, 555-567, doi:10.1007/s10875-009-9316-6 (2009).
- 46 Teitelbaum, S. L. The osteoclast and its unique cytoskeleton. *Ann NY Acad Sci* **1240**, 14-17, doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06283.x (2011).
- 47 Sobacchi, C., Schulz, A., Coxon, F. P., Villa, A. & Helfrich, M. H. Osteopetrosis: genetics, treatment and new insights into osteoclast function. *Nat Rev Endocrinol* **9**, 522-536, doi:10.1038/nrendo.2013.137 (2013).
- 48 Lee, B. S., Gluck, S. L. & Holliday, L. S. Interaction between vacuolar H(+)-ATPase and microfilaments during osteoclast activation. *J Biol Chem* **274**, 29164-29171, doi:10.1074/jbc.274.41.29164 (1999).
- 49 Weinert, S. *et al.* Lysosomal pathology and osteopetrosis upon loss of H⁺-driven lysosomal Cl⁻ accumulation. *Science* **328**, 1401-1403, doi:10.1126/science.1188072 (2010).
- 50 Colnot, C., Lu, C., Hu, D. & Helms, J. A. Distinguishing the contributions of the perichondrium, cartilage, and vascular endothelium to skeletal development. *Dev Biol* **269**, 55-69, doi:10.1016/j.ydbio.2004.01.011 (2004).
- 51 Foster, J. W. *et al.* Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* **372**, 525-530, doi:10.1038/372525a0 (1994).
- 52 Lomaga, M. A. *et al.* TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev* **13**, 1015-1024,

- doi:10.1101/gad.13.8.1015 (1999).
- 53 Naito, A. *et al.* Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice. *Genes Cells* **4**, 353-362, doi:10.1046/j.1365-2443.1999.00265.x (1999).
- 54 Takayanagi, H. *et al.* T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature* **408**, 600-605, doi:10.1038/35046102 (2000).
- 55 Kim, N. *et al.* Osteoclast differentiation independent of the TRANCE-RANK-TRAF6 axis. *J Exp Med* **202**, 589-595, doi:10.1084/jem.20050978 (2005).
- 56 Udagawa, N. *et al.* Interleukin (IL)-6 induction of osteoclast differentiation depends on IL-6 receptors expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors. *J Exp Med* **182**, 1461-1468, doi:10.1084/jem.182.5.1461 (1995).
- 57 Gilbert, L. *et al.* Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology* **141**, 3956-3964, doi:10.1210/endo.141.11.7739 (2000).
- 58 Gilbert, L. *et al.* Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2alpha A) is inhibited by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* **277**, 2695-2701, doi:10.1074/jbc.M106339200 (2002).
- 59 Gilbert, L. C., Rubin, J. & Nanes, M. S. The p55 TNF receptor mediates TNF inhibition of osteoblast differentiation independently of apoptosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**, E1011-1018, doi:10.1152/ajpendo.00534.2004 (2005).
- 60 Jacquin, C., Gran, D. E., Lee, S. K., Lorenzo, J. A. & Aguila, H. L. Identification of multiple osteoclast precursor populations in murine bone marrow. *J Bone Miner Res* **21**, 67-77, doi:10.1359/JBMR.051007 (2006).
- 61 Takayanagi, H. *et al.* RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta. *Nature* **416**, 744-749, doi:10.1038/416744a (2002).
- 62 Takami, M., Kim, N., Rho, J. & Choi, Y. Stimulation by toll-like receptors inhibits osteoclast differentiation. *J Immunol* **169**, 1516-1523 (2002).
- 63 Kato, H., Oh, S. W. & Fujita, T. RIG-I-Like Receptors and Type I Interferonopathies. *J Interferon Cytokine Res* **37**, 207-213, doi:10.1089/jir.2016.0095 (2017).
- 64 Lee-Kirsch, M. A. The Type I Interferonopathies. *Annu Rev Med* **68**, 297-315, doi:10.1146/annurev-med-050715-104506 (2017).
- 65 Pettersson, M. *et al.* Further evidence for specific IFIH1 mutation as a cause of Singleton-Merten syndrome with phenotypic heterogeneity. *Am J Med Genet A* **173**, 1396-1399, doi:10.1002/ajmg.a.38214 (2017).
- 66 Samarajiwa, S. A., Forster, S., Auchettl, K. & Hertzog, P. J. INTERFEROME: the database of interferon regulated genes. *Nucleic Acids Res* **37**, D852-857,

- doi:10.1093/nar/gkn732 (2009).
- 67 Ng, K. W. & Martin, T. J. New functions for old hormones: bone as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* **310**, 1-2, doi:10.1016/j.mce.2009.07.002 (2009).
- 68 Yao, Z. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha increases circulating osteoclast precursor numbers by promoting their proliferation and differentiation in the bone marrow through up-regulation of c-Fms expression. *J Biol Chem* **281**, 11846-11855, doi:10.1074/jbc.M512624200 (2006).
- 69 Roodman, G. D. Interleukin-6: an osteotropic factor? *J Bone Miner Res* **7**, 475-478, doi:10.1002/jbmr.5650070502 (1992).
- 70 Aizawa, T., Kon, T., Einhorn, T. A. & Gerstenfeld, L. C. Induction of apoptosis in chondrocytes by tumor necrosis factor-alpha. *J Orthop Res* **19**, 785-796, doi:10.1016/S0736-0266(00)00078-4 (2001).
- 71 Hu, L. *et al.* Mesenchymal Stem Cells: Cell Fate Decision to Osteoblast or Adipocyte and Application in Osteoporosis Treatment. *Int J Mol Sci* **19**, doi:10.3390/ijms19020360 (2018).
- 72 Li, C. J. *et al.* MicroRNA-188 regulates age-related switch between osteoblast and adipocyte differentiation. *J Clin Invest* **125**, 1509-1522, doi:10.1172/JCI77716 (2015).
- 73 Liao, L. *et al.* Redundant miR-3077-5p and miR-705 mediate the shift of mesenchymal stem cell lineage commitment to adipocyte in osteoporosis bone marrow. *Cell Death Dis* **4**, e600, doi:10.1038/cddis.2013.130 (2013).
- 74 Schuerwegh, A. J. *et al.* Influence of pro-inflammatory (IL-1 alpha, IL-6, TNF-alpha, IFN-gamma) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines on chondrocyte function. *Osteoarthritis Cartilage* **11**, 681-687, doi:10.1016/s1063-4584(03)00156-0 (2003).

謝辞

本研究を行うにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました京都大学大学院生命科学研究科の藤田尚志教授およびボン大学の加藤博己教授に深く御礼申し上げます。実験手法の御指導から、骨の構造解析、定期的な会議など、本研究全般にわたり多大なる御協力、御尽力ならびに御助言を賜りました昭和大学歯学部の高見正道教授と坂井信裕講師に、心より感謝の意を表します。

藤田研究室の皆様には研究の他、日常生活においても暖かい御支援いただき、深甚なる感謝を表します。また、これまで私を育て大学院まで進学することを応援し、支援してくれた父、母、姉、祖父と祖母にも深く感謝いたします。

最後に、本研究を行うにあたり、私が使用し犠牲となったマウスに対し、深く追悼の意を表します。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Nobumasa Soda, Nobuhiro Sakai, Hiroki Kato, Masamichi Takami and Takashi Fujita
Singleton-Merten Syndrome-like Skeletal Abnormalities in Mice with Constitutively Activated MDA5

The Journal of Immunology 2019, 203 (5) 1356-1368;