

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19595

研究課題名(和文) RANKL発現滑膜線維芽細胞に着目した新たな関節リウマチ治療戦略開発への挑戦

研究課題名(英文) Exploration of new therapeutic targets for rheumatoid arthritis focused on synovial fibroblasts expressing RANKL

研究代表者

松尾 祐介 (MATSUO, Yusuke)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00761206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチの病態において病原性分子の一つであるRANKLを高発現する病的な滑膜線維芽細胞と、発現の乏しい滑膜線維芽細胞の両者が存在するという仮説に基づき、その細胞群間の差異から新規治療標的候補を探索した。
I型コラーゲンを発現する細胞にGFPを標識した遺伝子改変マウスを導入し、関節炎下の滑膜線維芽細胞がGFPを発現していることを示した。さらに、免疫組織化学的に、増多した紡錘形の滑膜線維芽細胞様の細胞において、RANKLの発現が乏しい細胞群と高発現する細胞群の存在を示した。次に、フローサイトメーターを用いて、それらを分別して回収することを試みたが、系の確立に至っておらず、今後の課題であった。

研究成果の概要(英文)：RANKL is one of the pathogenic molecules in rheumatoid arthritis. Based on the hypothesis that both pathological synovial fibroblasts highly expressing RANKL and those poorly expressing RANKL are present, we explored new therapeutic targets from the difference between them. Col1-GFP transgenic mice that express GFP in collagen type I-producing cells were employed. We found that synovial fibroblasts were identified as GFP+ cells in the transgenic mice. In addition, immunohistochemical analyses suggested that both synovial fibroblast-like cells expressing RANKL highly and poorly were present in the arthritic synovial tissues. Next, although we attempted to sort their synovial fibroblast populations using a flow cytometer, we have yet to establish this assay.

研究分野：リウマチ学

キーワード：RANKL 滑膜線維芽細胞 関節リウマチ

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は、慢性炎症下で白血球や滑膜線維芽細胞がパンプスと呼ばれる増生滑膜組織を構築し、破骨細胞と共に軟骨や骨の破壊をきたす自己免疫性疾患である。RA の治療は、白血球や炎症性サイトカインを標的とすることで、これまで進歩を果たしてきた。しかし、標準治療薬のメソトレキサート (MTX) ナイブの RA 患者に MTX と TNF 阻害薬を併用した強力な治療を用いてもなお、RA の有効性の標準的な指標である ACR70 は、50% 程度の患者でしか達成できない (Takeuchi T, Ann Rheum Dis, 2014)。また、これらの併用は有効性を高めないにも関わらず、過度な免疫抑制による重篤な感染症のリスクを高めてしまう (Ramiro S, Ann Rheum Dis, 2014)。さらに、高価な薬剤による医療費の高騰のみならず、経済面で治療を受けられない患者がいるという問題点もある。そのため、白血球や炎症性サイトカインによらない新たな機序の開発が望まれる。

申請者の属する研究室では、軟骨や骨破壊をきたす滑膜線維芽細胞を標的細胞として捉え、その細胞周期を抑制することで、関節炎に対しての治療効果のみならず (Taniguchi, Nat Med. 1999, Sekine, J Immunol. 2008)、RA の臨床で用いられる生物学的製剤との併用が可能で、生物学的製剤の副作用として問題となる免疫抑制を増強しないことを示してきた (Hosoya T, Ann Rheum Dis, 2014)。この結果は、滑膜線維芽細胞が免疫抑制効果の少ない RA に対する治療標的細胞として有用であることを示している。

RA や RA モデルマウスの滑膜線維芽細胞は、正常状態の滑膜線維芽細胞と異なり、単なる滑膜組織の支持や炎症に関わるだけでなく、破骨細胞分化因子の RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) を介して骨破壊に中心的な役割を持つことが示されてきた (Danks L, Ann Rheum Dis, 2015)。しかし、

RANKL を産生する滑膜線維芽細胞の発現の差違による多様性について、まだわかっていない。

2. 研究の目的

本研究では、RA や RA モデルマウスの病態において病原性エフェクター分子の一つである RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) を高発現する病的な滑膜線維芽細胞と、発現の乏しい滑膜線維芽細胞の両者が存在するという仮説に基づき、その細胞群間の差異からエフェクター分子または転写因子を同定し、新規治療標的候補を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) I 型コラーゲン 2 鎖 (Col1a2) -GFP 遺伝子改変マウスに、RA モデルマウスである型コラーゲン抗体誘導性関節炎 (CAIA) を誘導した。具体的には、Day0 に型コラーゲン抗体 5mg を静注し、Day3 に LPS 25-50 μ g を腹腔内投与した。膝や足関節を回収し、凍結切片を作成し、免疫組織化学染色を行い、共焦点顕微鏡で観察した。

(2) Col1a2-GFP マウスや野生型マウスに CAIA や型コラーゲン誘導性関節炎 (CIA) を誘導した。CIA は、Day0 と Day21 に結核菌 500 μ g を尾根部に皮内注を行い、関節炎発症の 10 日後の膝や足関節を回収した。それらの関節の凍結切片やパラフィン切片を作成し、免疫組織化学染色を行い、光学顕微鏡や共焦点顕微鏡で観察した。

(3) 実体顕微鏡下で腫脹した関節滑膜組織を回収した。培養を経ない新鮮な滑膜線維芽細胞で解析するために、滑膜組織をコラゲナーゼ 1mg/ml で処理後、セルストレイナーを通して、細胞を単離した。溶血操作を経て、フローサイトメーターを用いて、滑膜線維芽

細胞の同定やソーティングを行った。

4. 研究成果

(1) 関節炎において滑膜線維芽細胞は細胞内分子で同定されることが多く、RANKLとの多重染色を行うことは困難であった。そこで、肝、肺や皮膚の線維症モデルにおいて、線維芽細胞のレポーターマウスとして報告されている1型コラーゲン2鎖産生細胞にGFPを発現するCol1a2-GFP遺伝子改変マウスを用いて、CAIAを誘導した。Day0に1型コラーゲン抗体を静注し、Day5から8までに関節炎がピークに達し、少なくともDay10まで持続し、骨破壊が生じていた。以降はDay20までにかけて関節炎が徐々に改善した。RANKL発現が既に生じていると考えられるDay10の膝関節を免疫組織学的に共焦点顕微鏡で観察した。

未処置群と比べ、CAIA誘導群では、GFP陽性細胞が増多していた(図1A)。次に、GFP陽性細胞は線維芽細胞マーカーであるvimentinを発現していた(図1B)。同様に、GFP陽性細胞はもう一つの線維芽細胞マーカーであるHsp47も発現していた(図1C)。また、CAIAを誘導した滑膜組織は、GFP陽性細胞と白血球マーカーであるCD45陽性細胞で占められていた(図1D)。これらの結果から、Col1a2-GFP遺伝子改変マウスの滑膜線維芽細胞はGFPを発現することが示唆された。

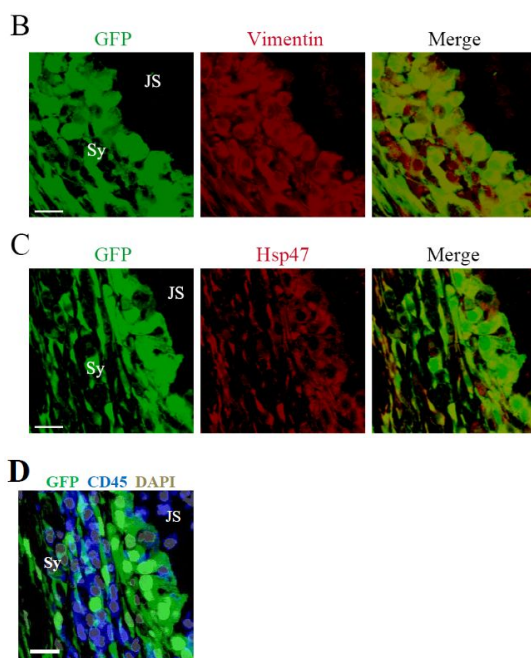
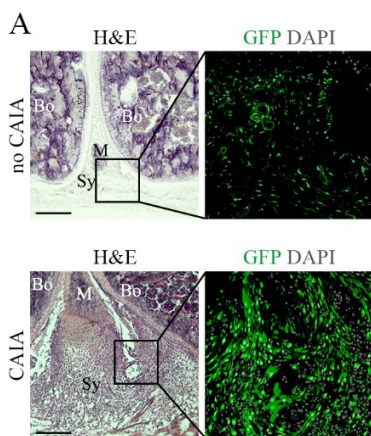


図1:(Col1a2)-GFPマウスの滑膜組織のGFP陽性細胞の評価(M:半月板、Sy:滑膜組織、Bo:骨、JS:関節腔。Scale bars = 200 μ m (A)、Scale bars = 10 μ m (B-D))

(2) 次に、滑膜線維芽細胞の中でも、RANKLを高発現する滑膜線維芽細胞群と、RANKLの発現が乏しい滑膜線維芽細胞群が存在するか否かを調べることを目的とした。これまで、滑膜線維芽細胞のRANKLの発現を免疫組織化学染色やフローサイトメトリーなどの蛋白レベルで示されることは困難であった。滑膜線維芽細胞の蛍光GFPを活かすために、非脱灰凍結切片でのRANKL発現を調べた。しかし、CAIAを誘導した滑膜組織に、蛍光抗体法でRANKL陽性細胞を同定できなかった。酵素抗体法を用いても、同様の結果であった。抗体濃度、抗原の賦活化、ブロッキングや抗体希釈液の条件検討を試みるも、RANKLの蛋白発現を認めることができず、さらなる検討を要する状態であった。バックアッププランとして、別のRAモデルである2型コラーゲン誘導性関節炎(CIA)を誘導し、滑膜組織のパラフィン切片を作成した。酵素抗体法による免疫組織化学染色を施行したところ、増多した紡錘形の滑膜線維芽細胞様の細胞に

において、RANKL 陽性の細胞群と陰性の細胞群の存在を一部に認めた（図2）。そのため、RANKL を高発現する病的な滑膜線維芽細胞と、RANKL の発現が乏しい滑膜線維芽細胞の両者が存在することが示唆された。今後、十分なサンプル数で確認し、GFP 陽性細胞の中で、RANKL 発現の有無を区別するために、GFP 蛍光を活かせる非脱灰切片での RANKL の発現を同定できるように取り組んでいく。

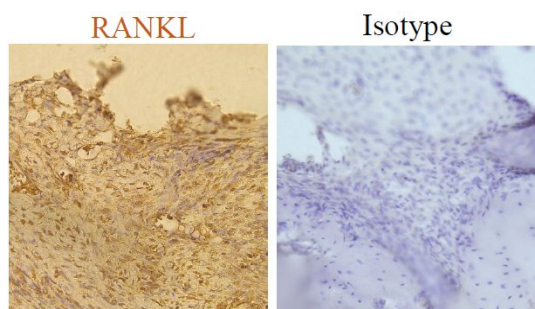


図2：関節炎滑膜組織における RANKL の発現

（3）次に、RANKL を高発現する滑膜線維芽細胞群と、RANKL の発現が乏しい滑膜線維芽細胞群を分別して回収を試みた。培養過程による滑膜線維芽細胞の形質変化を避けるために、回収直後の滑膜組織を用いた。フローサイトメーターにて、滑膜組織から単離操作した滑膜線維芽細胞を同定し、ソーティングを試みたが、その系の確立に至っていない。そのため、両細胞群間の差異からエフェクター分子または転写因子を同定し、新規治療標的候補を探索するにまだ至っていない。

5．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計0件）

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

5．主な発表論文等

(1)研究代表者 松尾 祐介(MATSUO, Yusuke)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00761206