

平成30年6月18日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21329

研究課題名(和文)自己免疫性疾患における全身性骨代謝異常の分子機構解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism of systemic bone metabolism abnormality in systemic autoimmune diseases

研究代表者

横田 和浩 (Yokota, Kazuhiro)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：20406440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,300,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)をはじめとする全身性自己免疫疾患は、骨粗鬆症を合併するが、その機序は不明である。本研究により、RA患者の末梢血単核球は健常人と比較し、骨吸収細胞(破骨細胞および破骨細胞様細胞)への分化誘導能が亢進していることが明らかになった。また、この骨吸収細胞への分化誘導能には、抗環状シトルリン化ペプチド抗体(抗CCP抗体)が関連し、抗CCP抗体高値例(40 U/mL以上)は、低値例(40 U/mL以下)と比較し、全身骨骨密度が有意に低下していることが示された。このことから、抗CCP抗体価はRAにおける新たな骨粗鬆症を予測する因子となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is well known that systemic autoimmune disease potentiates osteoporosis but the underlying mechanism is not known. In the current study, we revealed that differentiation potential of bone-resorbing cells, i.e., osteoclasts and osteoclast-like cells derived from the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis (RA), was significantly higher than that of healthy volunteers (both, n=6). In addition, we confirmed that the differentiation potential of bone-resorbing cells was most closely associated with the titer of the anti-cyclic citrullinated peptide antibody (ACPA). Furthermore, in RA patients with high ACPA titer (n=4, more than 40 U/mL), systemic bone mineral density was significantly lower than in RA patients with low ACPA titer (n=4, less than 40 U/mL). From the above, ACPA titer might be a new predictive factor of osteoporosis in patients with systemic autoimmune disease, such as RA.

研究分野：骨免疫学

キーワード：自己免疫性疾患 関節リウマチ 全身性骨代謝異常 骨粗鬆症 破骨細胞 破骨細胞様細胞 炎症性サイトカイン 抗環状シトルリン化ペプチド抗体

### 1. 研究開始当初の背景

免疫能と骨代謝は相互に関連していることから「骨免疫学：osteimmunology」という新たな研究領域へと発展している。

全身性自己免疫疾患の中で最も多い関節リウマチ (RA; rheumatoid arthritis) は、慢性滑膜炎とそれに伴う関節破壊を特徴とする。その原因は不明であるが、腫瘍壊死因子 (TNF; tumor necrosis factor) やインターロイキン-6 (IL-6; interleukin-6) などの炎症性サイトカインが炎症性滑膜炎の持続や関節破壊に重要な役割を演じている。申請者らはマウス骨髄単球を TNF $\alpha$  と IL-6 で刺激することにより、骨吸収能を有する破骨細胞と類似した特徴を持つ「破骨細胞様細胞」が分化誘導することを報告した (Yokota K, *et al.*, *Arthritis Rheumatol.* 2014; 66: 121-129)。このことから RA における関節破壊には、従来の破骨細胞と新規破骨細胞様細胞などの骨吸収細胞が関与していると考えられている (Adamopoulos, I.E., *et al.* *Nat Rev Rheumatol.* 2015; 11: 189-194)。

RA をはじめとする全身性自己免疫疾患は、関節破壊などの局所性骨代謝異常だけでなく、骨粗鬆症などの全身性骨代謝異常を合併することが知られているが、その機序は不明である。

この全身性自己免疫性疾患に合併した二次性骨粗鬆症は、圧迫骨折、大腿骨頸部骨折などを惹き起し、寝たきりになってしまうことが社会的にも問題となっている。

### 2. 研究の目的

全身性自己免疫性疾患 (RA) における全身性骨代謝異常 (全身骨骨密度低下) に関わる分子機構を明らかにするとともに、全身骨骨密度低下を予測する因子を同定することを目的とする。

具体的には、RA 患者および健常人の末梢血単核球を用い、破骨細胞・破骨細胞様細胞への分化誘導能を比較検討する。そして、破骨細胞・破骨細胞様細胞への分化誘導能と臨床評価項目・全身骨骨密度との関連を調べる。

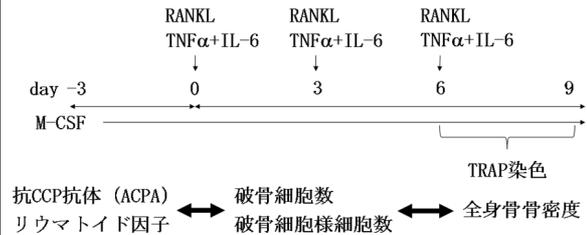
このことにより全身性自己免疫性疾患 (RA) に合併した二次性骨粗鬆症の発症機序が明らかになり、新規治療戦略へと発展していくことが期待される。

### 3. 研究の方法

(1) 申請者らは、抗環状シトルリン化ペプチド抗体 (抗 CCP 抗体) またはリウマトイド因子陽性の RA 患者由来末梢血から FicoII を用いて密度勾配遠心法にて単核球を分離した。この単核球に破骨細胞生存因子 (M-CSF; macrophage colony-stimulating factor) を添加した培養液で培養し、破骨細胞前駆細胞へ分化させ、TNF $\alpha$ +IL-6 または破骨細胞分化誘導因子 (RANKL; receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) をそれぞれ培養液に添加・刺激した。培養 6-9 日後に

破骨細胞の酵素マーカーである酒石酸耐性酸フォスファターゼ (TRAP; tartrate-resistant acid phosphatase) 染色を行い、顕微鏡下で観察し TRAP 染色陽性かつ 3 核以上の多核細胞を TRAP 陽性多核細胞とした。

この方法に基づき、RA 患者における末梢血単核球をそれぞれの刺激により TRAP 陽性多核細胞へ分化誘導させ、TRAP 陽性多核細胞数を顕微鏡下でカウントし、それぞれ 2 群間の比較を Mann-Whitney 検定にて統計解析を行った。



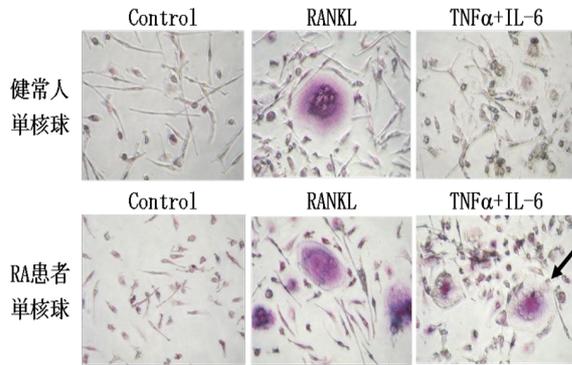
(2) 対象症例の RA 患者の疾患活動性スコア (DAS28; disease activity score 28) CRP、赤血球沈降速度、マトリックスメタロプロテアーゼ 3 (MMP-3; matrix metalloproteinase-3) 抗 CCP 抗体、リウマトイド因子および全身骨骨密度は保険診療下で測定されている数値を用いた。なお、本研究の研究計画書を作成し、埼玉医科大学病院 IRB 委員会へ申請し、承認されている (IRB 申請番号 15-129)。

なお、患者背景は以下の通りである。性別：男性 1 例、女性 7 例、平均年齢 62 歳 (55-74 歳) 罹病期間 10.3 年 (0.75-30 年) 平均抗 CCP 抗体価 149.1 U/ml (0.6-909) 平均リウマトイド因子抗体価 196.4 (5-1111) 平均 CRP 値 4.0 (1.12-7.22) DAS28-ESR(4) 5.9 (4.1-8.6)、治療歴メトトレキサート 6/8 例使用 (平均投与量 6.75mg/週) 副腎皮質ステロイド 2/8 例使用 (平均投与量 2.5mg/日) 従来型合成抗リウマチ薬 2/8 例使用。

### 4. 研究成果

(1) RA 患者末梢血単核球からの破骨細胞および破骨細胞様細胞への分化誘導

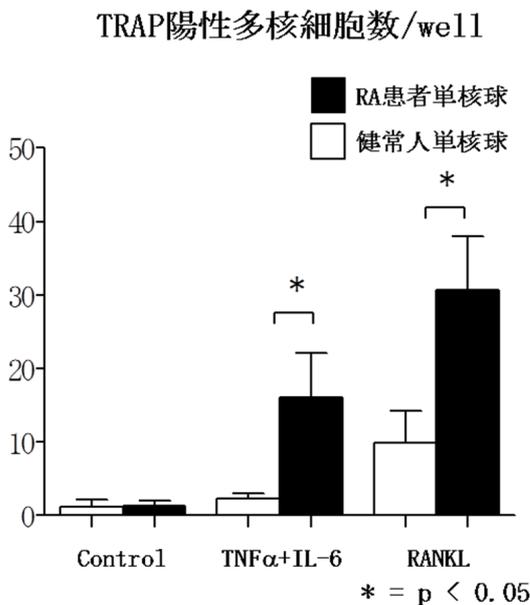
RA 患者および健常人末梢血から単核球を分離し、M-CSF を培養液に添加・刺激により破骨細胞前駆細胞へ分化させた。その結果、TNF $\alpha$ +IL-6 または RANKL を培養液に同時に添加・刺激したところ、刺激 6-9 日目に TRAP 陽性多核細胞が多数観察された。興味深いことに、健常人の単核球では、TNF $\alpha$ +IL-6 刺激では TRAP 陽性多核細胞が分化誘導されなかったが、RA 患者の単核球において、TRAP 陽性多核細胞が分化誘導された (次のページの写真を参照、矢印が RA 患者の末梢血単核球から TNF $\alpha$ +IL-6 刺激により分化誘導された TRAP 陽性多核細胞である)。



RA末梢血単核球からTNFα+IL-6刺激により分化誘導した破骨細胞様細胞 (矢印; TRAP染色 100倍)

(2) RA患者と健常人末梢血単核球における破骨細胞および破骨細胞様細胞への分化誘導能の違い

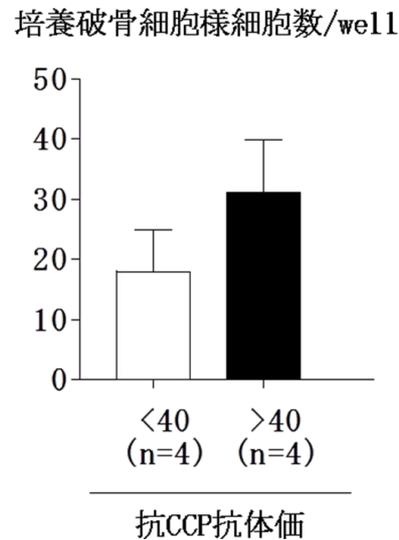
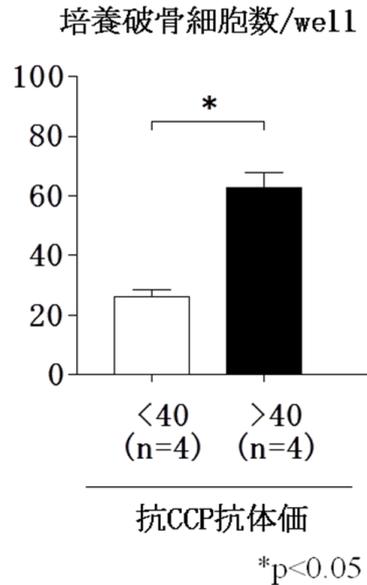
RA患者および健常人の末梢血単核球をTNF +IL-6またはRANKL刺激・培養し、刺激6-9日目にTRAP染色した。その結果、RA患者末梢血単核球をTNF +IL-6またはRANKL刺激・培養することにより、健常人と比較して、TRAP染色陽性多核細胞数が有意に増加していた (RA患者と健常人ともに n=6)。



(3) RA患者末梢血単核球からの破骨細胞・破骨細胞様細胞分化誘導能におよぼす抗CCP抗体価の影響

RA患者の末梢血単核球からの破骨細胞・破骨細胞様細胞への分化誘導能と関連する因子について、検索した。その結果、RA患者末梢血中の抗CCP抗体が高値例は、低値例と比較して、破骨細胞の分化誘導能が亢進していることが明らかになった。一方、破骨細胞様細胞の分化誘導能については、亢進している

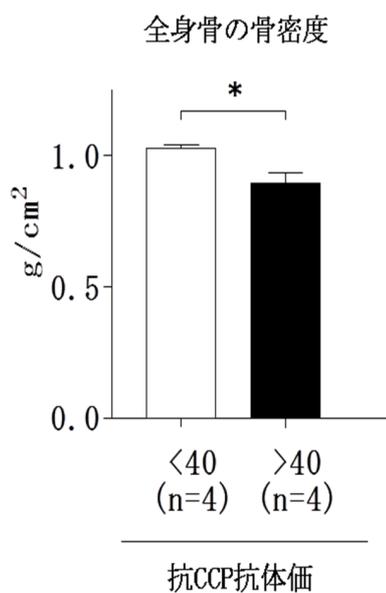
傾向があった。



その他のRA患者の疾患活動性スコア (DAS28)、CRP、赤血球沈降速度、MMP-3、リウマトイド因子については、RA患者の末梢血単核球からの破骨細胞・破骨細胞様細胞への分化誘導能との関連は認められなかった。

(4) RA患者の全身骨骨密度におよぼす抗CCP抗体価の影響

RA患者末梢血抗CCP抗体価と全身骨骨密度との関連性について調べた。その結果、RA患者末梢血中の抗CCP抗体高値例 (40 U/mL以上) は、低値例 (40 U/mL以下) と比較して、全身骨骨密度が減少していることが明らかになった (抗CCP抗体高値例、低値例ともにそれぞれ n=4)。



以上の結果から本研究の成果として、以下のことが明らかになった。

1. RA患者の末梢血単核球は、健常人と比較して骨吸収細胞（破骨細胞・破骨細胞様細胞）への分化誘導能が亢進していた。
2. RA患者において、抗CCP抗体高値例（40 U/mL以上）は、低値例（40 U/mL以下）と比較して、破骨細胞の分化誘導能が亢進していた。
3. 抗CCP抗体高値例（40 U/mL以上）は、低値例（40 U/mL以下）と比較して、全身骨骨密度が低下していた。

このことから全身性自己免疫性疾患（RA）の全身骨骨密度低下には、末梢血における破骨細胞および破骨細胞様細胞への分化誘導能亢進と抗CCP抗体価が関連していることが示された。以上より抗CCP抗体価はRAにおける新たな骨粗鬆症を予測する因子となる可能性が示唆された。今後、さらに症例数を重ねて検証する必要がある。

#### 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 5 件)

- (1) Detection of synovial inflammation in rheumatic disease using superb microvascular imaging: Comparison with conventional power Doppler imaging.  
Yokota K., Tsuzuki Wada T, Akiyama Y, Mimura T.  
Mod Rheumatol. 28(2):327-333, 2018.

査読有

DOI:10.1080/14397595.2017.1337288.

- (2) Inflammation and osteoclasts  
Yokota K.  
Jpn J Clin Immunol. 40(5):367-376, 2017. 査読無  
DOI:10.2177/jsci.40.367.
  - (3) A case of new-onset rheumatoid vasculitis becoming evident in the course of treatment for Pneumocystis Jirovecii pneumonia.  
Ikuma D, Yokota K., Sato K, Mimura T.  
Jpn J Clin Immunol. 40(1):78-82, 2017. 査読有  
DOI:10.2177/jsci.40.78.
  - (4) Yokota K., Kishida D, Kayano H, Yazaki M, Shimada Y, Akiyama Y, Mimura T. A Case of Abdominal Aortic Retroperitoneal and Mesenteric Amyloid Light Chain Amyloidoma. Case Rep Rheumatol. 2016:4146030, 2016. 査読有  
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/4146030>
  - (5) 横田和浩: リウマチ学会奨励賞受賞後の抱負～関節リウマチの骨破壊制御を目指して～「リウマチ」2016年52号 p.15 発刊日 2016年12月20日. 査読無
- 〔学会発表〕(計 8 件)
- (1) Kazuhiro Yokota, Shinya Tanaka, Kojiro Sato, Yoshimi Aizaki, Hiromi Oda, Toshihide Mimura. "Presence of RANK<sup>+</sup> Osteoclast-like Cells in the Bone of Patients with Rheumatoid Arthritis" 第62回日本リウマチ学会総会・学術集会 東京国際フォーラム 2018年4月28日
  - (2) Kazuhiro Yokota, Takanori Azuma, Hayato Nagasawa, Junji Hayashi, Kenji Takagi, Yuji Akiyama, Yoshihiro Yoshida, Hiroshi Kajiyama, Yu Funakubo Asanuma, Toshihide Mimura, "The Efficacy and Safety of Adding Low-Dose Prednisolone (PSL) Induction Therapy of Tocilizumab (TCZ) in Patients with Rheumatoid Arthritis (RA)." 第61回日本リウマチ学会総会・学術集会 福岡国際会議場 2017年4月22日
  - (3) 横田和浩, 相崎良美, 三村俊英: IL-6刺激によるヒト末梢血単核球から骨芽細胞様細胞への分化誘導機構の解析. 第3回日本骨免疫学会 ANA インターコ

ンチネンタル石垣リゾート 2017年6月  
28日

- (4) 横田和浩:関節リウマチにおける新規炎症性骨吸収細胞の発現・機能・分化誘導機構の解析. 次世代リーダーセッション 第3回ベーシックリサーチカンファレンス アキバプラザ 2016年10月15日
- (5) 横田和浩,相崎良美,秋山雄次,三村俊英:IL-6 刺激によるヒト末梢血単核球の骨芽細胞様細胞への分化誘導と機能解析. 第44回日本臨床免疫学会総会 京王プラザホテル 2016年9月9日
- (6) 横田和浩,相崎良美,三村俊英:TNFはヒト末梢血単核球から骨芽細胞様細胞を誘導する. 第2回日本骨免疫学会 ホテルモンテ沖縄スパ&リゾート 2016年7月6日
- (7) Kazuhiro Yokota, Yuji Akiyama, Kojiro Sato, Yoshimi Aizaki, Yasuto Araki, Hiroshi Kajiyama, Yu Funakubo Asanuma, Toshihide Mimura; TNF $\alpha$  Induces the Calcified Nodule Formations and Increased Osteoblastic Marker Expression in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells on Dentin Slices. 第60回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2016年4月23日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- (8) Kazuhiro Yokota, Kojiro Sato, Yoshimi Aizaki, Yasuto Araki, Hiroshi Kajiyama, Yu Funakubo Asanuma, Yuji Akiyama, Toshihide Mimura, "IL-1 Promotes Differentiation of Human Osteoclast-like Cells Induced by a Combination of TNF and IL-6 from CD14<sup>+</sup> Monocytes" 第60回日本リウマチ学会総会・学術集会 パシフィコ横浜 2016年4月21日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

埼玉医科大学リウマチ膠原病科ホームページ

<http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/riumachi/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

横田 和浩 (YOKOTA, Kazuhiro)  
埼玉医科大学・医学部・講師  
研究者番号:20406440

### (2)研究協力者

三村 俊英 (MIMUA Toshihide)  
埼玉医科大学・医学部・教授  
相崎 良美 (AIZAKI Yoshimi)  
埼玉医科大学・医学部・助手