

令和 3 年 8 月 19 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08414

研究課題名（和文）関節リウマチの骨破壊の病態における活性化血小板の役割

研究課題名（英文）The role of activated platelets in the process of bone destruction in rheumatoid arthritis

研究代表者

安岡 秀剛（Yasuoka, Hidekata）

藤田医科大学・医学部・教授

研究者番号：60365260

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000 円

研究成果の概要（和文）：関節リウマチ（RA）における血小板の形質を詳細に検討した。その結果RAの循環血液中では血小板が活性化され、血小板の形質変化と疾患活動性が関連した。さらに疾患コントロールとして強皮症において同様の検討を行なったところその活性化状態はRAとは異なった。さらにRAにおける血小板の生理的活性をNETosis誘導で検討した。その結果血管炎との違いを認め、疾患により血小板から放出される液性因子およびそれらにより誘導される現象に違いがあることが示された。活性化血小板は関節リウマチの疾患活動性のバイオマーカーとなるのみならず、関節リウマチの病態に関与している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチの病態における血小板の役割について追及し、その形質を明らかとしたこと、また血小板から放出されるCXCL4濃度の違いからはその放出能の違い、NETosis誘導の検討を通じて血小板が誘導する生理的現象の違いが明らかとなった。これらにより血小板の形質変化を介して膠原病の病態形成に寄与している可能性が考えられた。血小板による病態誘導の可能性、治療標的としての可能性が明らかとなり、学術的・社会的意義があるものとする。

研究成果の概要（英文）：Phenotype of platelets in RA patients were extensively analyzed including activation status and expression of surface molecules. In patients with RA, platelets were activated and showed altered phenotype based on the expression profile of surface molecules. Also the phenotypic alteration is associated with disease activity of RA, which is different from those in patients with scleroderma. Furthermore, physiological function of platelets were evaluated thorough release of the humoral factor in plasma and induction of NETosis detected by time-lapse image of DNA release from neutrophils induced by platelet. Concentration of CXCL4, a humoral factor which is abundant in platelets, was higher in both RA and vasculitis. Interestingly, NETosis is only detected by platelets from vasculitis patients, suggesting that alteration of platelet phenotype and contribution to the pathogenesis is different among connective tissue diseases. Platelets may associate with the pathogenesis of RA.

研究分野：リウマチ・膠原病

キーワード：血小板 関節リウマチ 膠原病

1．研究開始当初の背景

血小板は生理学的には止血に関与することが知られているが、最近の知見から内包する液性因子や様々な膜表面タンパクを介して近傍の細胞の活性化を誘導し、様々な病態に関与し、病態に寄与する可能性がある。

関節リウマチ（RA）は破壊性関節炎を特徴とする全身性慢性炎症性疾患で、滑膜における炎症性細胞の浸潤、滑膜細胞の増殖と肉芽“パンヌス”の形成、増殖滑膜を介した破骨細胞の活性化と骨破壊を特徴とする。しかしこの過程に寄与する個別の因子は同定されているが、単独では病態の全体像を説明できていない。また病態に関与する複数の液性因子群や内包する細胞ソースも未だ明らかでない。

血小板は血流を介し全身に分布、組織障害が生じると局所に最初に到達し止血に関与することが知られる。一方で、内包する液性因子の放出や細胞表面分子を介し、様々な病態に寄与する可能性が示されている（Semple J et al. NRI, 2011）。申請者は血小板に着目し、“病態へ寄与する可能性を示してきた。我々はこの知見を元には RA 患者由来血小板が RA の滑膜炎の病態に寄与すると仮説した。

2．研究の目的

本研究では、患者由来血小板の存在が滑膜細胞の活性化、破骨細胞への分化誘導に関わり、RA 病態に寄与する可能性を鑑み、RA 患者と健常人由来血小板の形質の相違を検討し、病態解明につなげることを目的とする。そこで本検討では関節リウマチ（RA）における血小板の活性化状態、膜表面分子の発現についてさらに詳細に検討し、バイオマーカーとしての可能性および病態への寄与の可能性について追究した。

3．研究の方法

(1)関節リウマチ患者における血小板形質の検討

対象は RA 57 例、健常人 16 例。血小板の活性化状態は CD41+血小板表面における CD62P (P-selectin) の発現およびマイクロパーティクル産生をフローサイトメトリーで、血小板の形質は膜結合型 TGF-beta、CD147 (emmprin)、CD142 (Tissue factor)、CD31 (PECAM-1) の発現をフローサイトメトリーで解析し、これらを発現する血小板サブセットの比率を 2 群間で比較した。さらに RA 患者の臨床情報とこれらサブセットの比率の相関を検討した。疾患コントロールとして全身性硬化症 (SSc) でも解析した。

(2)関節リウマチ（RA）における血小板の生理的活性についての検討

血小板のアルファ顆粒に豊富に存在し、放出されることが知られる血小板第 4 因子 (PF4, CXCL4) について、血漿中の濃度について検討した。また CXCL4 を介した好中球からの NETosis の誘導が知られていることから血小板による NETosis の誘導について、platelet-rich plasma と好中球の共培養により誘導される NETosis から platelet-poor plasma により誘導されるものを差し引いたものを Time-lapse image を用いて細胞外に放出された DNA を定量化することにより評価した。

4．研究成果

(1)関節リウマチ患者における血小板形質の特徴

RA では健常人と比較し、活性型血小板の比率 ($P < 0.001$)、MP の比率 ($P < 0.00001$) が高値であった。またいずれの比率も血清 CRP 値、赤沈値、SDAI と正の相関を認めた。さらに 6 例の未治療 RA 患者における治療前後での検討では治療後にかかるサブセットの比率が低下していた。活性化マーカー以外の表面分子の発現では、RA では健常人と比較し CD147+血小板の比率及び TGF- β +血小板の比率が高値で（それぞれ $P < 0.004$ 、 $P < 0.004$ ）、活性型血小板の比率との間に正の相関を認めた。以上より、RA の循環血液中では血小板が活性化されており、活性化による血小板の形質変化と疾患活動性が関連した。活性型血小板は関節リウマチの疾患活動性のバイオマーカーとなるのみならず、関節リウマチの病態にも関与している可能性が考えられた。

(2)疾患コントロールとしての全身性硬化症患者における血小板形質の特徴

疾患コントロールとして解析した全身性硬化症 (SSc) では、健常人と比較し、活性型血小板の比率が増加し、MP 産生も有意に亢進していた ($P < 0.05$)。これらのうち CD62P+血小板と MP 産生は正に相関していた ($r = 0.88$, $P < 0.05$)。しかしこれらは炎症反応とは関連せず、臨床特徴との比較では活性型血小板、MP 産生ともびまん皮膚硬化型で限局皮膚硬化型に比較し高値 (それぞれ $P < 0.05$, $P < 0.05$) で、スキンスコアとも正の相関を示した。以上より、RA の循環血液中では血小板が活性化され、血小板の形質変化および疾患活動性と関連した。その活性化機序は強皮症とは異なっていることが示された。

(3) 関節リウマチにおける血小板の生理的活性の特徴

さらに関節リウマチ (RA) における血小板の生理的活性について検討し、病態と関連する可能性について追及した。対象は RA12 例、健常人 20 例。血管炎患者 (ANCA 関連血管炎 22 例) を陽性コントロールとした。血漿中の CXCL4 は健常人と比較し RA で高値であった (RA: 48 ng/mL vs 健常人: 26 ng/mL, $p = 0.019$)。NETosis については健常人と比較し、差を認めなかった。興味深いことに NETosis が病態に関連するとされる血管炎 (ANCA 関連血管炎) では血漿 CXCL4 濃度が健常人と比較して上昇し (112 ng/mL, $p = 0.0010$)、NETosis も有意に誘導された (AAV 5.4 ng/mL vs 健常人 0.0026 ng/mL, $p = 0.025$)。疾患により血小板から放出される液性因子およびそれらにより誘導される現象に違いがあることが示された。血小板が疾患により形質や機能が異なり、病態の誘導に違いをもたらしている可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1 . 発表者名 安岡秀剛、坂田康明、吉本桂子、竹内勤
2 . 発表標題 活性型血小板は関節リウマチの活動性のバイオマーカーである
3 . 学会等名 第5回日本骨免疫学会
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 安岡秀剛、坂田康明、吉本桂子 、竹内勤
2 . 発表標題 関節リウマチの循環血中では、血小板が活性化し疾患活動性と関連する
3 . 学会等名 日本炎症再生学会
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Hidekata Yasuoka, Komei Sakata, Keiko Yoshimoto, Tsutomu Takeuchi
2 . 発表標題 Phenotype of Platelets Are Altered and Activated in Circulation of Patients with Systemic Sclerosis
3 . 学会等名 ASH2018（国際学会）
4 . 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------