

令和 4 年 9 月 6 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08921

研究課題名(和文) 強皮症における石灰沈着症の分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of calcinosis in systemic sclerosis

研究代表者

白井 悠一郎 (Shirai, Yuichiro)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：70528801

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)：強皮症患者で見られる皮下の石灰沈着症の機序について追究した。まず石灰沈着成分は染色でハイドロキシアパタイトであることを確認した。病理では、沈着病変周囲に単核球が集まり、骨芽細胞マーカーALPが陽性であった。病変組織を培養すると、CD90およびオステオカルシン陽性細胞が増殖した。石灰成分も自発的に増加し続け、その中にALP陽性細胞が点在した。従って、組織中の間葉系細胞が骨芽細胞に分化し、異所性に石灰成分を産生する機序が想定された。そこで、既存の治療薬を間葉系幹細胞から骨芽細胞へ分化させる培養系に添加したところ、石灰化沈着およびその成分の細胞外マトリックス関連遺伝子発現が抑制されることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

強皮症の皮下石灰沈着症は、組織中の間葉系の細胞が骨芽細胞に分化して異所性に石灰成分を産生し、病態を形成する機序であることが示唆された。これは、血管石灰化など他の異所性石灰沈着症と共通した分子機序を有し、本研究の成果は間葉系幹細胞分野の進歩の一助になりうる。また、既存の薬物治療の効果は乏しく、アンメットニーズとなっている。本研究で分子標的を明らかにすることで、有効性の高い治療薬の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism of subcutaneous calcification seen in scleroderma patients. First, it was confirmed by staining that the calcified component was hydroxyapatite. In pathology, mononuclear cells gathered around the deposited lesion and the osteoblast marker ALP was positive. When the calcified tissue was cultured, CD90 and osteocalcin-positive cells proliferated. The tissue also continued to increase spontaneously, and ALP-positive cells were scattered in it. Therefore, a mechanism was assumed in which the mesenchymal cells in the tissue differentiated into osteoblasts and ectopically produced the calcification component. Therefore, it was shown that when a well-used therapeutic agent was added to a culture system that differentiates mesenchymal stem cells into osteoblasts, calcification deposition and extracellular matrix-related gene expression were suppressed.

研究分野：強皮症

キーワード：強皮症 石灰沈着症 骨芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人体では、骨以外の軟部組織にカルシウム塩が非生理的に沈着することがあり、石灰沈着症と呼ばれる。石灰沈着症は、膠原病の中では全身性強皮症 (systemic sclerosis : SSc) で最も多く見られ、SScでの頻度は22%と、決して少なくはない。同症は激しい疼痛を伴ったり、沈着部位の炎症から化膿性病変・潰瘍形成を引き起こすことがあり、著しくQOLを低下させる。石灰沈着症は、組織障害、血管障害、虚血、年齢による組織変化等がその誘因と想定されているものの、SScにおける石灰沈着機序を分子生物学的に追究した基礎的研究は検索しえた限り皆無に近い。

SScは、皮膚および諸臓器の線維化と末梢循環障害を特徴とする全身の結合組織疾患である。その本態は、慢性的な組織障害、組織修復不全、そして線維芽細胞による代償的リモデリングである。申請者が所属する研究グループは、末梢血単球中の細胞集団が多分化能を有し、血管内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、骨芽細胞等の間葉系細胞へと分化転換する能力があることを見出してきた。SScの病変部では正常な組織修復機序が働かず、このような細胞集団が不完全に分化転換し、リモデリングの病態を形成していることを示してきた。一方、血管石灰化に関して、近年間葉系細胞である血管平滑筋細胞が骨芽細胞様へ形質転換することが報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、SScにおける異所性の石灰沈着症について、石灰沈着成分、産生細胞の由来、病態機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 材料

2013年の米国リウマチ学会/欧州リウマチ会議の分類基準を満たし、身体所見およびX線所見にて石灰沈着症の診断がなされたSSc患者4例の石灰沈着症病変外科的摘出検体

骨髄由来間葉系幹細胞 (PT-2501, Lonza)、間葉系幹細胞培養基本培地 (PT-3001, Lonza)、骨芽細胞誘導培地 (PT-3002, Lonza)

minocycline (富士フィルム和光純薬)

2) ハイドロキシアパタイト染色

摘出検体のスタンプ標本のAlizarin Red S染色とOsteoImage™染色 (PA-1503, Lonza) をキットの手順に従って行った。

3) 組織染色

摘出検体のパラフィン包埋標本を、H.E.染色およびALP (alkaline phosphatase) 抗体で染色した。

4) 細胞培養および細胞免疫染色

摘出検体を小組織片にカットし、DMEM培地で培養した。組織片から生じた初代培養細胞を、フィブロネクチンでコートしたチャンバースライド上で培養し、固定。CD34 (ab81289, abcam)、CD45 (ab10558)、CD90 (ab133350)、Osteocalcin (ab13418) の4種類の抗体でそれぞれ固定した細胞を染色した。

5) 間葉系幹細胞の骨芽細胞誘導

間葉系幹細胞を基本培地でコンフルエントになるまで培養。次に、骨芽細胞誘導培地に置き換える際、同時にminocyclineを0, 1, 5 µg/mLの3つの濃度に振って添加し、培養を継続した。10日目でmRNAを採取して遺伝子解析に使用し、21日目でAlizarin Red S染色を行い、染色の程度から石灰化成分の産生を評価した。

6) 遺伝子解析

採取したmRNAはcDNAに変え、PCR array (applied biosystems) を用いて網羅的遺伝子解析を行った。

4. 研究成果

1) 石灰沈着成分の同定

まず、本研究の前提として石灰沈着成分の同定を行った4例のSSc患者から摘出した石灰沈着

組織からスタンプ標本を作成し、Alizarin Red S と OsteoImage™ で染色したところ、本成分はハイドロキシアパタイトであることが確認された。

2) 石灰沈着部分の組織染色

通常の人体では石灰成分が生じえない箇所であるため、異所性に沈着していることになる。そこで、まずは4例のSSc患者由来の石灰沈着摘出組織のパラフィン標本を作成し、H.E.染色を行った。すると、どの組織の石灰沈着部分でも、ヘマトキシリン陽性のハイドロキシアパタイト沈着部分の周囲に、単核球の集簇を認めた(図1)。さらに、これらの単核球細胞はALPで染色された。

3) 石灰沈着組織摘出検体の初代培養細胞の細胞免疫染色

4例のうち1例では膝関節に石灰沈着があり、膝関節人工置換術時に皮膚、皮下脂肪、滑膜、腱、靭帯、半月板、骨、骨髄を膝関節の手術時に採取した。この摘出組織を組織片にカットして初代培養を行い、固定して間葉系マーカー(CD90) 血球マーカー(CD34、CD45) 骨芽細胞マーカー(Osteocalcin)で染色した。いずれもCD90が染色され、石灰化を伴った組織由来の培養細胞はOsteocalcinも染色された。

4) 石灰沈着組織摘出検体の初代培養細胞の石灰成分産生の確認

膝関節に石灰沈着を認めた1例から摘出組織のうち、半月板は石灰沈着がある部分とない部分を取ってきたため、両方の組織片を培養した。石灰沈着のある組織からの培養では、経時的に石灰沈着が蓄積していき、顕微鏡で拡大すると個々の細胞表面に沿って石灰の vesicle が沈着していることが見られた(図2)。一方、沈着のない部分からの培養では石灰沈着は認められなかった(図3)。さらに、石灰沈着のある組織由来の培養細胞でALP染色を行ったところ、染色される細胞が点状に観察された(図4)。しかし、それらの細胞は分裂・増殖をしないため、クローニングはできなかった。

5) 間葉系幹細胞からの骨芽細胞誘導に対する治療薬の効果の検討

間葉系の細胞から異所性に骨芽細胞のマーカーを発現する細胞が存在し、石灰成分が自発的に産生され続ける培養系にそれらが存在することが明らかとなった。そこで、そのモデルとして間葉系幹細胞からの骨芽細胞誘導系を用い、治療薬の1つである minocycline の添加による石灰化成分抑制効果を検討した。骨芽細胞誘導から21日目にAlizarin Red S染色で評価したところ、治療群の1 μ g/mLでは抑制効果は見られなかったが、5 μ g/mLでは0 μ g/mLと比較して抑制効果が見られた。また10日目に採取したmRNAを用いて網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、骨形成モジュールの中では、type I collagen 1 (GAPDH 補正 fold change 0.65)、SPP1 (fold change 0.71)、type I collagen 2 (fold change 0.78)と細胞外マトリックスの産生低下が示された。一方で、骨芽細胞分化の早い段階から発現し、これら細胞外マトリックスの主な上流のマスター遺伝子であるRUNX2 (fold change 1.09)、MSX1 (fold change 0.95)の発現には変化は見られなかった。

6) 考察

SScにおける異所性の石灰沈着症については、これまでほとんど基礎的な研究はなされていなかった。そこで、まず前提として石灰沈着成分について2種類の染色法で検討を行い、ハイドロキシアパタイトであることを確認した。次に、本来組織中に存在しないハイドロキシアパタイトが産生させる機序として、異所性に組織中の多分化能を有する幹細胞が、何らかの刺激によって骨芽細胞に分化する機序を想定した。まず病理組織を観察したところ、石灰成分の周囲に単核球の浸潤を認め、これらが骨芽細胞マーカーであるALP陽性であることを確認した。

次に、今回採取した病変部の石灰沈着組織の組織片を培養すると、自発的に石灰成分を産生し続けることを見出した。加えて、その中にALP陽性細胞が点在することを確認した。さらに、その組織が血球系由来から間葉系由来かを調べるため免疫染色を行ったところ、CD90陽性で間葉系であることがわかり、さらに石灰化成分を産生する細胞ではOsteocalcinが陽性であった。すなわち、間葉系由来でかつ骨芽細胞の形質を有する細胞が培養されたことが明らかとなった。従って、本来存在しない骨芽細胞が組織中で出現し、石灰化成分を産生することが示された。これは、組織中の多分化能を有する細胞集団が、外的刺激によって骨芽細胞様細胞に分化した可能性が考えられる。

そして、この病態を制御する治療標的を明らかにすべく、間葉系幹細胞からの骨芽細胞誘導培養系をモデルとして用い、治療薬の1つとして使用される minocycline の添加による石灰化成分産生抑制効果を検討した。Alizarin Red S染色の評価にて、5 μ g/mLでは0 μ g/mLと比較して抑制効果が見られた。また、骨芽細胞分化の最終生成物として知られる type I collagen や SPP1 といった細胞外マトリックス遺伝子の抑制は確認できた。一方で、骨芽細胞の早い分化段階から発現し、これらが、その上流のマスター遺伝子であるRUNX2、MSX1の発現抑制は確認できなかった。これらは遺伝子発現ではなく、リン酸化のような機能的な機序で下流の遺伝子発現を促進する可能性が示唆された。今後、これら2つのマスター遺伝子よりさらに上流の細胞内シグナル伝達に着目して病態を明らかにする必要があると考えられた。

7) まとめ

SScにおける石灰沈着症は、間葉系の細胞集団の一部が異所性に骨芽細胞に分化し、病態形成に寄与することが示された。

図1 SSc患者の石灰沈着膝関節の滑膜組織のH.E.染色(×40)。画像下半分にはヘマトキシリン陽性のハイドロキシアパタイトが沈着している。その周囲(画像上半分)には単核球の集簇が見られる。

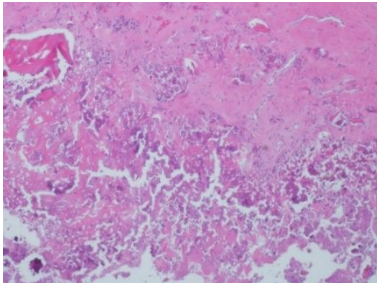


図2 SSc患者の石灰沈着膝関節の半月板由来の初代培養細胞、およびその細胞から自発的に産生される石灰成分(×100)

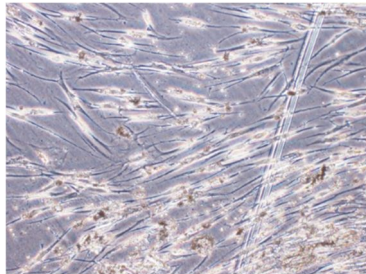


図3 SSc患者の石灰沈着膝関節の半月板で、石灰沈着のない組織片(左)と、石灰沈着のある組織片(右)の培養28日後の肉眼所見

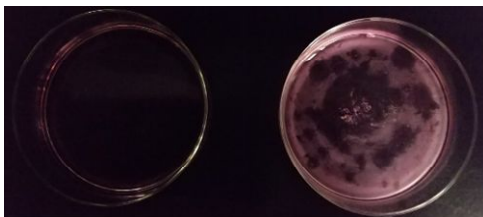
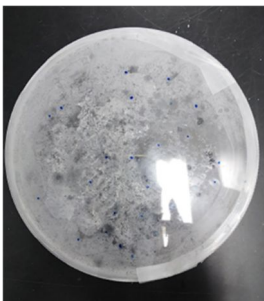


図4 図3の石灰沈着のある組織片を培養しALP染色後の肉眼所見



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shirai Yuichiro, Kawami Noriyuki, Iwakiri Katsuhiko, Kuwana Masataka	4. 巻 7
2. 論文標題 Use of vonoprazan, a novel potassium-competitive acid blocker, for the treatment of proton pump inhibitor-refractory reflux esophagitis in patients with systemic sclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Scleroderma and Related Disorders	6. 最初と最後の頁 57～61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/23971983211021747	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shirai Yuichiro, Fukue Ryosuke, Kaneko Yuko, Kuwana Masataka	4. 巻 11
2. 論文標題 Clinical Relevance of the Serial Measurement of Krebs von den Lungen-6 Levels in Patients with Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 2007～2007
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/diagnostics11112007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Isomura Yohei, Shirai Yuichiro, Kuwana Masataka	4. 巻 -
2. 論文標題 Clinical worsening following discontinuation of tocilizumab in diffuse cutaneous systemic sclerosis: a single-centre experience in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rheumatology/keac136	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida Akira, Gono Takahisa, Okazaki Yuka, Shirai Yuichiro, Takeno Mitsuhiro, Kuwana Masataka	4. 巻 -
2. 論文標題 Severe digital ischemia as an unrecognized manifestation in patients with antisynthetase autoantibodies: Case series and systematic literature review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Scleroderma and Related Disorders	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/23971983221090857	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Yuichiro Shirai, Masataka Kuwana
2. 発表標題 Clinical characteristics in patients with systemic sclerosis and symptomatic subcutaneous calcinosis
3. 学会等名 6th Systemic Sclerosis World Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白井 悠一郎, 福栄 亮介, 山崎 宜興, 竹内 勤, 桑名 正隆
2. 発表標題 全身性強皮症(SSc)に伴う間質性肺疾患(ILD)の進行予測に血清KL-6の経時的変化は有用でない
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kuster S, Jordan S, Elhai MD, ...Shirai Y, Distler O on behalf of EUSTAR
2. 発表標題 EFFECTIVENESS AND SAFETY OF TOCILIZUMAB IN PATIENTS WITH SYSTEMIC SCLEROSIS: A PROPENSITY SCORE CONTROL MATCHED OBSERVATIONAL STUDY OF THE EUSTAR COHORT.
3. 学会等名 Annual European Congress of Rheumatology 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Isomura Y, Yamasaki Y, Shirai Y, Kuwana M
2. 発表標題 OUTCOMES OF DOSE-REDUCTION OR DISCONTINUATION OF TOCILIZUMAB IN PATIENTS WITH EARLY DIFFUSE CUTANEOUS SYSTEMIC SCLEROSIS.
3. 学会等名 Annual European Congress of Rheumatology 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Isomura Y, Shirai Y, Kuwana M
2. 発表標題 CLINICAL WORSENING FOLLOWING TAPERING OR WITHDRAWAL OF TOCILIZUMAB IN PATIENTS WITH DIFFUSE CUTANEOUS SYSTEMIC SCLEROSIS: A REAL-WORLD EXPERIENCE
3. 学会等名 7th Systemic Sclerosis World Congress (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本リウマチ財団教育研修委員会、日本リウマチ学会生涯教育委員会	4. 発行年 2022年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 608
3. 書名 リウマチ病学テキスト(改訂第3版)	

〔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
---------	---------