

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17441

研究課題名（和文）包括的脂質メディエーター解析による関節リウマチの新規バイオマーカーの探索

研究課題名（英文）Comprehensive lipid mediator analysis to identify novel biomarkers of rheumatoid arthritis

研究代表者

明石 健吾（Akashi, Kengo）

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60792637

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：脂質メディエーター解析による関節リウマチの治療反応・予後予測を目的としていたが、新型コロナウイルス感染症拡大による影響で十分な症例収集が困難であった。そこで、関節炎モデルマウスを用いた包括的脂質メディエーター解析を行うこととした。SKGマウスにおいて、関節炎マウスはコントロールマウスと比較し、関節局所で多くの炎症惹起性脂質メディエーターと一部の炎症収束性脂質メディエーター濃度が上昇していた。炎症収束性脂質メディエーターであるResolvinD5は、試験管内においてT細胞分化と破骨細胞分化を抑制した。この結果から、炎症収束性脂質メディエーターは実際に関節炎に対し抑制的に働いているものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチ治療は飛躍的に進歩しているが、現在でも全例が寛解には至っておらず、また治療反応予測も十分とは言えない。本研究では慢性関節炎病態における炎症収束性脂質メディエーターの働きに着目し、実際にResolvinD5が、関節リウマチの病態にも関連しているT細胞や破骨細胞の分化を抑制することを証明した。今後はヒトの関節リウマチにおいて、炎症収束性脂質メディエーター測定による治療反応予測や、更には新規治療薬としての可能性についても検討したい。

研究成果の概要（英文）：The aim was to predict treatment response and prognosis in rheumatoid arthritis patients by lipid mediator analysis, but the impact of the COVID-19 pandemic made it difficult to collect sufficient patients. Therefore, we decided to perform a comprehensive lipid mediator analysis in a murine model of chronic arthritis. At joint sites in SKG mice, not only many proinflammatory lipid mediators but also some specialized pro-resolving mediators were elevated in arthritis mice compared with control mice. ResolvinD5, one of the specialized pro-resolving mediators, suppressed T-cell and osteoclast differentiation in vitro. These results suggest that pro-resolving lipid mediators act in an inhibitory manner against arthritis.

研究分野：膠原病およびアレルギー内科学

キーワード：関節リウマチ 脂質メディエーター 慢性炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は関節を首座とした自己免疫性炎症性疾患である。脂質メディエーターはサイトカイン等と並ぶ炎症関連物質であり、プロスタグランジンなど炎症を惹起するものがあるが、近年はレゾルビン (Rv) などの炎症収束性脂質メディエーターが急性炎症の収束における役割が明らかになってきている。RA のような慢性炎症病態が生じる一因として、炎症収束機構が不十分である可能性が示唆されており、脂質メディエーターにおいても炎症惹起性と炎症収束性のバランスが破綻している可能性を考えた。慢性関節炎疾患について、個々の脂質メディエーターが関連している報告は散見されるが、包括的な解析はこれまでにない。我々は、RA 患者の血清包括的脂質メディエーター解析を行うことで、RA 患者における特徴的脂質メディエータープロファイルの評価による新規診断マーカーの探索、脂質メディエーターによる生物学的抗リウマチ薬 (bDMARDs) / JAK 阻害剤 (tsDMARDs) への治療反応性予測、脂質メディエーターによる bDMARDs/tsDMARDs-free 寛解の予測、が可能ではないかと考えた。

研究開始当初は上記の如く RA 患者の検体を用いた研究を行う予定としていたが、新型コロナウイルス感染症の感染拡大により、十分な症例収集が困難であった。そこで、大幅に研究計画を変更し、関節炎モデルマウスを用いた包括的脂質メディエーター解析と新規バイオマーカーの探索を行うこととした。

2. 研究の目的

これまで RvD1 や RvD2 など数種の炎症収束性脂質メディエーターが、コラーゲン誘発関節炎モデルなど急性関節炎モデルマウスの病態に関与している報告がなされている。しかしながら、慢性関節炎との関与や、包括的脂質メディエータープロファイルを評価した報告はまだ無い。SKG マウスはヒトの RA と同様、慢性関節炎病態を有する関節炎モデルマウスである。今回我々は、SKG マウスの関節炎局所において、包括的脂質メディエータープロファイル解析を行い、特に炎症収束性脂質メディエーターに着目し、コントロールマウスとの比較を行った。更には、RA の病態に関与する、ヘルパー T 細胞、樹状細胞、マクロファージ、破骨細胞などの様々な免疫細胞において、炎症収束性脂質メディエーターが及ぼす影響についても検討を行った。

3. 研究の方法

本研究は神戸大学動物実験施設の許可 (実験番号 P170703) を得て、神戸大学動物実験規程に基づき、ARRIVE ガイドラインに準拠して施行した。SKG マウスは日本クレアから購入し、神戸大学動物実験施設で飼育した。フローサイトメトリーは FACS Verse (BD Bioscience) で測定し、FlowJo software (Tree Star) で解析した。定量的 RT-PCR は PikoReal system (Thermo Fisher Scientific) を用いて実施した。

SKG 関節炎モデル: 8~10 週齢の SKG マウスにザイモサン A 2mg/body を腹腔内に投与し関節炎を誘発した。ザイモサン A 投与後 56 日 (8 週間) または 112 日 (16 週間) に、コントロールおよび関節炎マウスを犠牲させ、関節組織を採取した。

関節炎の評価: 関節炎の重症度評価は下記の通り行った。0=関節腫脹なし、0.1=1 指の腫脹、0.5=軽度の前肢・後肢関節の腫脹、1.0=重度の前肢・後肢関節の腫脹。最大値は 5.8 である。

LC/MS/MS を用いた脂質メディエーター解析: 採取したサンプルは、島津製作所 LC-30AD HPLC システムを搭載した Q-Trap6500 (Sciex) を用いて、LC/MS/MS を施行した。

CD4 陽性 T 細胞の単離: SKG マウスの脾細胞からビオチン標識抗 CD4 抗体を用いて、manual MACS system (Miltenyi Biotec) で CD4 陽性 T 細胞を分離した。

Th17 細胞の分化: 単離した CD4 陽性 T 細胞を、Th17 細胞分化条件下で培養を行った (CD3 および CD28 を固定化し、IL-6 20ng/ml、TGF- β 0.5ng/ml、抗 IFN- γ 2.5 μ g/ml、抗 IL-4 抗体 2.5 μ g/ml を添加)。そこへ、RvD1、RvD3、RvD5、Maresin2 (1、10、100、または 500nM) を、0 日目から毎日添加した。3 日目または 5 日目にそれぞれ細胞を回収し、フローサイトメトリーで解析を行った。

T 細胞の増殖: 単離した CD4 陽性 T 細胞を CFSE で標識し、3 日間培養した。RvD5 (1、10、また

は 100 nM) を、0 日目から毎日添加し、3 日目に細胞を回収、フローサイトメトリーで解析を行った。

樹状細胞の分化と活性化: SKG マウスから骨髓細胞を単離した。樹状細胞分化実験のために、GM-CSF 20ng/ml および IL-4 10ng/ml で刺激し 5 日間培養した。RvD1 (100nM) および RvD5 (1, 10, 100nM) を 5 日間毎日添加した。樹状細胞の活性化については、LPS 1 μg/ml で刺激し、5 日目に RvD5 (1, 10, 100, 1000nM) を添加した。6 日目に細胞を回収しフローサイトメトリーで解析した。

GM-CSF 誘導骨髓マクロファージ (GM-DM) および M1 マクロファージの極性化: 骨髓細胞を、GM-CSF 10ng/ml で 3 日間培養し、4 日目に非付着細胞を回収、更に GM-CSF で刺激した。7 日目の時点でこれらの細胞を GM-DM とみなし、LPS 100ng/ml および IFN-γ 50ng/ml で刺激して M1 マクロファージへの極性化を行った。8 日目に付着細胞を回収し、RvD5 (1, 10, 100, 1000nM) を添加し培養した。RvD5 を 6 時間処理した後、フローサイトメトリーで細胞を評価した。

破骨細胞の分化: 骨髓細胞を 3 時間培養後、非付着細胞を収集した。2 日間培養した後、M-CSF と RANKL (50ng/ml) で 3 日間刺激した。その後、RvD5 (10, 100, 500nM) を毎日添加し、5 日目に細胞を回収した。酒石酸耐性酸性ホスファターゼ陽性多核細胞 (TRAP 陽性 MNC; ≥ 核 3 個以上) を、TRAP 染色キット (Cosmo Bio Co., Ltd.) を用いて可視化し、破骨細胞を顕微鏡で計数した。

4. 研究成果

1) 関節炎を起こした SKG マウスの関節組織では RvD5 が上昇している

関節炎を起こした SKG マウスと、コントロールの SKG マウスから、16 週目に関節組織を採取し、LC/MS/MS による包括的脂質メディエーター解析を行った。関節炎組織では、PGE2 などのアラキドン酸由来の炎症性メディエーターが、非関節炎組織と比較して有意に上昇していた。また、RvE3、RvD3、RvD5、Maresin2 などの炎症収束性脂質メディエーターも、関節炎組織で有意に増加した。これらの上昇した炎症収束性脂質メディエーターのうち、RvD5 のレベルは 112 日目の関節炎の疾患活動性と最も強い相関があった。また、これらの結果から、RvD5 が関節炎の病態に関与している可能性が示唆された。また、関節炎を起こす炎症惹起性脂質メディエーターと炎症収束性脂質メディエーターの比率は、非関節炎組織よりも関節炎組織で有意に高く、この結果は、脂質メディエーターのアンバランスが、SKG マウスの慢性持続性関節炎に関与している可能性を示唆した (図 1.)。

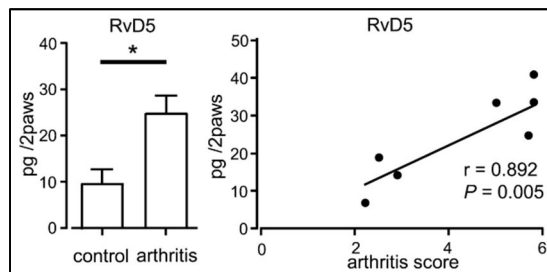


図 1. 関節炎と RvD5 との関連

2) RvD1 と RvD5 は、in vitro で Th17 細胞の分化を抑制し、制御性 T 細胞の分化を促進する

炎症収束性脂質メディエーターを添加し CD4 陽性 T 細胞を Th17 細胞分化条件下で培養し、フローサイトメトリーを行った。既報の通り RvD1 が Ror_t 陽性 Th17 細胞の分化を抑制し、Foxp3 陽性制御性 T 細胞の分化を促進することがわかったが、RvD5 の方が更に顕著な Th17 細胞分化抑制、制御性 T 細胞分化促進作用を示した (図 2.)。一方、RvD3 と Maresin2 は Th17 細胞と制御性 T 細胞の分化に影響を与えなかった。

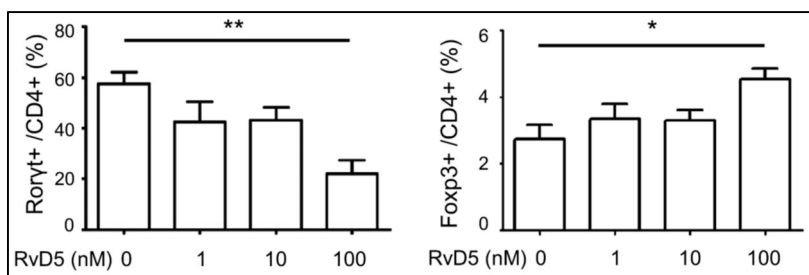


図 2. RvD5 の Th17 細胞分化抑制/制御性 T 細胞分化促進効果

3) RvD5 は CD4 陽性 T 細胞の増殖を抑制する

CD4 陽性 T 細胞の増殖に対する RvD5 の影響を調べたところ、実際に用量依存的に抑制されることがわかった。既報の通り RvD1 ではこの効果が見られないことを再確認し、また RvD3 や Maresin2 も CD4 陽性 T 細胞増殖に影響を及ぼさなかった。

4) RvD5 は in vitro では樹状細胞の分化・活性化、あるいは GM-DM の極性化に影響を与えない

可能性がある

RvD5 が骨髄系細胞に及ぼす影響について検討するため、SKG マウスの骨髄細胞を抽出し、樹状細胞への分化・活性化、ならびに GM-DM の M1 マクロファージへの極性化において、RvD5 を毎日添加した場合と添加しない場合を比較した。その結果、RvD5 は骨髄細胞の樹状細胞への分化を抑制せず、また樹状細胞活性化に対しても阻害効果を持たないことが分かった。マクロファージに対する RvD5 の効果を調べたが、RvD5 添加の有無による GM-DM から M1 マクロファージへの極性化に差は得られなかった。これらの結果は、RvD5 が骨髄系細胞に対していかなる影響も及ぼさない可能性を示唆している。

5) RvD5 は骨髄由来の破骨細胞の増殖を低下させ、破骨細胞形成を分子レベルで阻害する

破骨細胞は RA の骨破壊に極めて重要な役割を担っている。そこで、RvD5 添加の有無により骨髄由来破骨細胞の分化・活性化に差が無いか評価した。結果、RvD5 は用量依存的に RANKL 誘導 TRAP 陽性 MNC の形成を減少させた (図 3.)。この条件下で細胞生存率を調べたところ、RvD5 によって影響を受けないことがわかった。

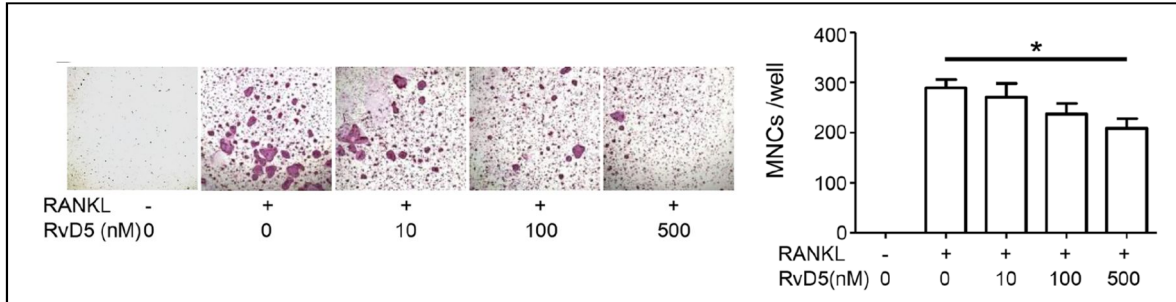


図 3. RvD5 による破骨細胞の分化抑制効果

次に、破骨細胞関連遺伝子の発現を調べた。破骨細胞分化のマスター転写因子として知られる nuclear factor of activated T cells c1a (NFATc1a) のレベルは、RvD5 添加により用量依存的に減少した。その他、破骨細胞関連受容体 (Oscar)、酸性ホスファターゼ 5 (Acp5)、カテプシン K (Ctsk)、破骨細胞刺激性膜貫通タンパク質 (Ocstamp)、樹状細胞特異的膜貫通タンパク質 (Dcstamp) といった破骨細胞形成に関わる多くの遺伝子も RvD5 添加により抑制された (図 4.)。これらの結果は、RvD5 が破骨細胞の分化を抑制することにより、RA の病態に関与している可能性を示唆する。

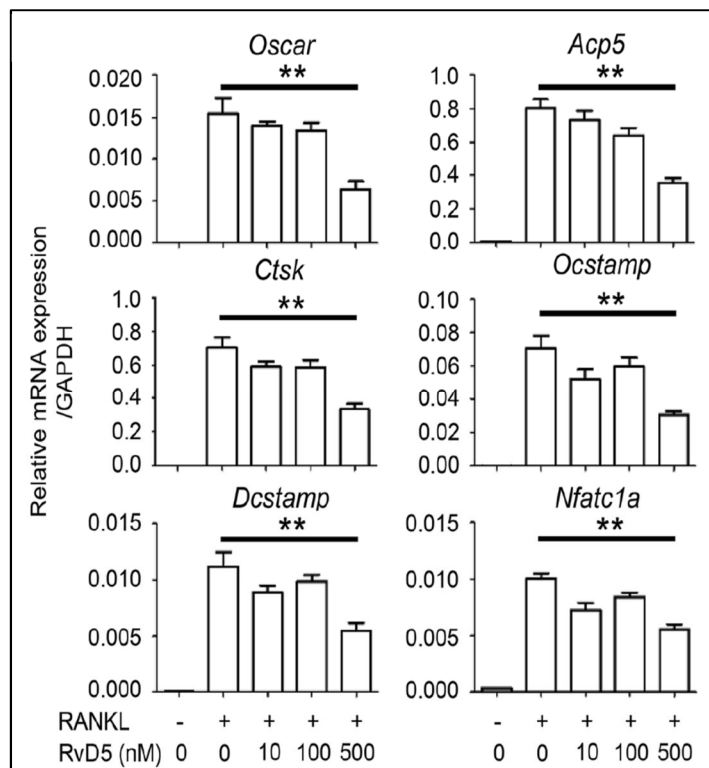


図 4. RvD5 による破骨細胞関連遺伝子発現の抑制効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamada H, Saegusa J, Sendo S, Ueda Y, Okano T, Shinohara M, Morinobu A.	4. 巻 11
2. 論文標題 Effect of resolvin D5 on T cell differentiation and osteoclastogenesis analyzed by lipid mediator profiling in the experimental arthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 17312
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-96530-1.	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 Uto K, Ueda K, Okano T, Akashi K, Takahashi S, Nakamachi Y, Imanishi T, Awano H, Morinobu A, Kawano S, Saegusa J.	4. 巻 61
2. 論文標題 Identification of plexin D1 on circulating extracellular vesicles as a potential biomarker of polymyositis and dermatomyositis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Rheumatology (Oxford)	6. 最初と最後の頁 1669-1679
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rheumatology/keab588.	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 Yamamoto Y, Okano T, Yamada H, Akashi K, Sendo S, Ueda Y, Morinobu A, Saegusa J.	4. 巻 23
2. 論文標題 Soluble guanylate cyclase stimulator reduced the gastrointestinal fibrosis in bleomycin-induced mouse model of systemic sclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arthritis research and therapy	6. 最初と最後の頁 133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13075-021-02513-y.	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yamada H, Saegusa J, Shinohara M, Sendo S, Ueda Y, Okano T, Fujikawa Y, Yamamoto Y, Nagamoto T, Ichise Y, Naka I, Akashi K, Onishi A, Morinobu A.
2. 発表標題 Resolvin D5 Modulates Th17/Treg cell Differentiation and suppresses osteoclastogenesis.
3. 学会等名 European League Against Rheumatism（国際学会）
4. 発表年 2020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
---------	---------