

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17447

研究課題名（和文）異所性骨分化を促す特異的滑膜線維芽細胞の同定と分化の解明

研究課題名（英文）Identification of specific synovial fibroblast leading to aberrant bone formation and analysis of synoviocyte differentiation

研究代表者

三浦 陽子（Miura, Yoko）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・研究員

研究者番号：60563517

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）：本研究は、関節炎後に生じる異所的な骨形成のメカニズムの解明を目的とし、関節炎モデル由来の滑膜線維芽細胞を単離し、検討を進めた。Flow cytometerで滑膜線維芽細胞をCD146とCD140aで展開し、CD146high陽性集団、CD146mid陽性集団、CD140a陽性集団、すべて陰性の4種類の集団を採取し、qPCRおよびRNAseqを行った。qPCRにより、CD146mid集団は他の集団と比べてCol10a1、Runx2、Sox9の遺伝子発現が上昇した。このため、CD146mid集団が組織像で確認していた最も肥大化軟骨細胞様の表現型を示すパンヌスの線維芽細胞である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、関節リウマチや変形性関節症を含む関節疾患は、関節局所でのパンヌスの形成や骨破壊等が知られ、炎症終焉時には異所的な骨性強直（骨過形成）を生じるが、パンヌス形成から骨破壊に至る過程には不明点が多かった。本研究では、関節炎モデル由来パンヌスの滑膜線維芽細胞を用いて、骨分化状況下にある細胞集団を同定した。関節リウマチでは免疫を主体とした研究が主に行われてきたが、本研究の成果は関節リウマチ研究の新たな学術的領域に貢献したと考えられる。また、CD146陽性集団を治療ターゲットとした炎症時からの治療介入は、その後生じる骨性強直を抑制できると予想され、社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：The mechanisms of bony ankylosis in rheumatoid arthritis is unknown. We constructed an arthritis model similar to that of human rheumatoid arthritis and found histologically that there are three different cell populations that exhibit osteo-differentiation in pannus. Therefore, we investigated the mechanism of ectopic bone formation in this study. Synovial fibroblasts were isolated from arthritis model pannus and cultured for 1 week. Synovial fibroblasts were examined by CD146 and CD140a on a Flow cytometer, and four different populations were collected: CD146high positive, CD146mid positive, CD140a positive, and all negative. qPCR revealed that the CD146mid population had elevated gene expression of Col10a1, Runx2, and Sox9 compared to the other populations. This suggested that the CD146mid population may be the pannus fibroblast with the most hypertrophic chondrocyte-like phenotype identified in the histology.

研究分野：膠原病

キーワード：関節リウマチ 骨性強直 滑膜線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチは免疫異常による多関節炎症で、関節局所でパンヌスの形成および骨破壊が生じる。一方、炎症終焉時には骨性強直（骨過形成）を示す。骨性強直が生じると、機能障害となり外見がよくないことから患者の Quality of life (QOL) 低下と密接に関係する。骨性強直を形成するメカニズムは不明点が多い。これは関節リウマチにおける研究の中心が、炎症時の免疫系の解析に重点がおかれ、骨性強直に関する研究が相対的に遅れているためと考えられる。加えて、骨性強直に至った関節リウマチの主たる治療法は、人工関節置換等の外科的な治療で、指などの小関節では外科的治療も困難である。

関節炎モデルは、Collagen adjuvant をリンパ節付近に投与する Collagen induced arthritis (CIA) モデルが一般的である。CIA モデルは関節炎を効率よく惹起できるが、急性関節炎を示し、慢性的な骨密度低下や骨性強直を示さない。我々は新たに Collagen type II promoter 下に murine B7.1 を配置した D1BC および、human CIITA を配置した D1CC トランスジェニックマウスを作製した。これらのマウスは、低濃度の Collagen adjuvant (通常 1/10~1/15 量) で慢性的な関節炎を誘導できる。また、これらのマウスは炎症終焉時に骨性強直を示すため、よりヒトにおける関節リウマチに類似した症状を呈するモデルである (図 1 参照)。

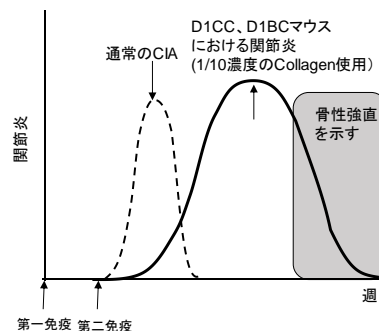


図1. 関節炎のスコア変動

2. 研究の目的

関節リウマチでみられるパンヌスは、マクロファージと線維芽細胞で構成される。一般に、線維芽細胞は間葉系幹細胞として、骨、軟骨を含む結合細胞の前駆体であることも知られる。間葉系幹細胞を用いた骨分化の検討において、間葉系幹細胞は直接的な骨細胞への分化と、軟骨細胞・肥大化軟骨細胞を経由する分化の 2 種類が知られる。我々は、D1CC、D1BC マウスの関節炎時のパンヌス内に骨・軟骨分化マーカーである 1) *Runx2*, *Sox9*, *Col10a1* 陽性、2) *Runx2* のみ陽性、3) すべて陰性の 3 つの細胞集団を見出した。また、この他に *Col2a1* および各導入遺伝子の発現、間葉系幹細胞マーカーの *Meflin* の発現も確認した (Miura *et al.*, 2019, JBMRplus)。すなわちパンヌスの滑膜線維芽細胞は、前肥大化軟骨細胞様、軟骨細胞様、骨細胞様、間葉系幹細胞様の多様な表現型を有することを意味する。炎症終焉時には組織学的に異所的な肥大化軟骨細胞を確認したため、パンヌスの骨分化は肥大化軟骨細胞を経由した分化であると考えられた。以上のことから、本研究では、関節炎を発症した D1BC マウス由来のパンヌスより滑膜線維芽細胞を単離し、骨分化能を示す滑膜線維芽細胞の検討を行った。

3. 研究の方法

1) 関節炎症時の滑膜線維芽細胞の採取および骨分化誘導の検討

麻酔下で D1BC マウス、D1CC マウスに通常 1/10 濃度の Bovine type II collagen の Adjuvant を作製し、免疫した。第二次免疫後から 3~6 週ほどで関節炎を生じることをモニタリングして確認した。肢全体が赤く腫れた段階で、炭酸ガスによる安楽死後、炎症部のパンヌスを無菌的に取り出し、酵素処理による細胞塊の破壊後、1 週間ほど培養した。培養後は、カウントし、実験使用時まで液体窒素内で保存した。滑膜線維芽細胞の骨分化誘導を行い、アリザニンレッド染色で骨分化状況をモニタリングした。

2) Flow cytometer による滑膜線維芽細胞の解析

採取した滑膜細胞の多様性を検討するため、線維芽細胞のマーカーとして、CD140a (Platelet derived growth factor receptor a, PDGFRa)、podoplanin、Thy1.2、Syncam1、幹細胞系マーカーとしても使用される CD146、マクロファージのマーカーとして、CD11b を使用し、Flow cytometer で解析を行った。

3) RNA 解析

骨分化状態にあるパンヌスの線維芽細胞集団を明らかにするため、間葉系細胞マーカーの Thy1.2、幹細胞系マーカーとしても使用される CD146、Sca1 を用いて、Flow cytometer で陽性と陰性に分離し、*Col10a1*, *Runx2*, *Sox9* の遺伝子発現を検討した。

上記の試験の結果、CD146 陽性細胞で *Col10a1*, *Runx2*, *Sox9* の遺伝子発現が上昇したため、Flow cytometer で滑膜線維芽細胞を CD146 と CD140a で展開し、CD146high 陽性集団、CD146mid 陽性集団、CD140a 陽性集団、すべて陰性の 4 種類の集団を採取し、RNAseq を行った。

4. 研究成果

1) 滑膜線維芽細胞の採取および骨分化誘導

関節炎モデル由来パヌスより採取した滑膜線維芽細胞は、骨分化誘導培地で培養後、7日ではアリザリンレッド陽性の細胞は確認できなかったが、14日目、21日目でアリザリンレッド陽性の骨細胞を検出した。

2) Flow cytometer による滑膜線維芽細胞の解析

パヌスはマクロファージ (type A) および、滑膜線維芽細胞 (type B) で主に構成される。採取した滑膜細胞集団のうち、約4%がCD11b陽性マクロファージであり、約40%がCD140a陽性滑膜線維芽細胞であった。Podoplanin陽性細胞は約20%であり、ほとんどはCD140aのdouble positiveの細胞であった。他の線維芽細胞マーカーであるThy1.2は約5%、Syncam1は約3%であり、パヌスにおける主要な滑膜線維芽細胞はCD140aであると考えられる。間葉系幹細胞マーカーのCD146は30%以下の存在だった(図2参照)。

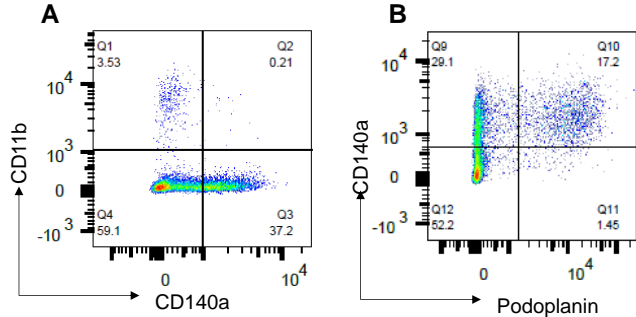


図2. 滑膜細胞のFlow cytometry解析

滑膜細胞集団のFlow cytometry解析を行った。(A) CD11b陽性マクロファージは約4%であり、CD140a陽性滑膜線維芽細胞は約40%であった。(B) CD140a陽性細胞のうち、約20%はPodoplanin陽性を示した。

3) RNA 解析

これまでの組織学的な検討により、骨分化状況下にある滑膜線維芽細胞は幹細胞様の表現型を示すことを見出している(Miura *et al.*, 2019, JBMRplus)。このため、骨分化状況下にある滑膜線維芽細胞はCD140aおよび、CD146の展開した細胞集団内に存在すると予想した。そこで、滑膜細胞集団のうち、CD11b陰性集団をCD140a、CD146で展開し、CD146high、CD146mid、CD140a、double Neg集団としてRNA発現の検討を行った。その結果、CD146mid集団が他の集団と比べて骨分化マーカーである*Col10a1*、*Runx2*、*Sox9*の遺伝子発現量がいずれも高い値を示した。このため、CD146mid集団が組織像で確認していた最も肥大化軟骨細胞様の表現型を示すパヌスの線維芽細胞である可能性が示唆された(図3参照)。

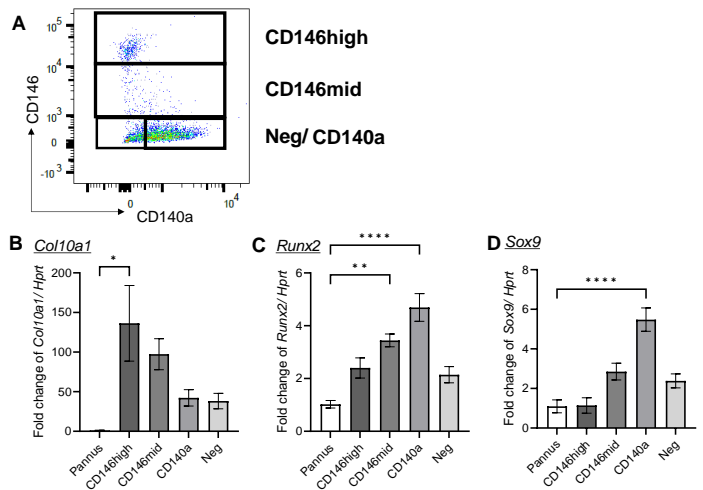


図3. 滑膜線維芽細胞における骨分化マーカー遺伝子発現量

(A) 滑膜線維芽細胞集団をFlow cytometryでCD140、CD146に展開してCD146high、CD146mid、CD140a、Negative集団として分取し、骨分化マーカーである(B) *Col10a1*、(C) *Runx2*、(D) *Sox9*の遺伝子発現量を検討した。値は平均値±標準偏差で示した(n=7)。**P*<0.05, ***P*<0.01, *****P*<0.0001

4) まとめ

本研究では、関節炎モデル由来パヌスの滑膜線維芽細胞を用いて、骨分化状況下にある細胞集団を同定した。関節リウマチでは免疫を主体とした研究が主に行われてきたが、本研究の成果は関節リウマチ研究の新たな異所性の骨分化に関する学術的領域に貢献したと考えられる。また、CD146陽性集団を治療ターゲットとした炎症時からの治療介入は、その後生じる骨性強直を抑制できると予想される。

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 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Miura Yoko, Lam Maggie, Bourke Jane E, Kanazawa Satoshi	4. 巻 5
2. 論文標題 Bimodal fibrosis in a novel mouse model of bleomycin-induced usual interstitial pneumonia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202101059
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lsa.202101059	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 該当する
1. 著者名 Miura Yoko, Ohkubo Hirotsugu, Niimi Akio, Kanazawa Satoshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Suppression of epithelial abnormalities by nintedanib in induced-rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ERJ Open Research	6. 最初と最後の頁 345
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1183/23120541.00345-2021	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 Yoko Miura, Satoshi Kanazawa	4. 巻 40
2. 論文標題 Osteochondrogenesis derived from synovial fibroblasts in inflammatory arthritis model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Miura Yoko, Isogai Shyuntaro, Maeda Shinji, Kanazawa Satoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 CTLA-4-Ig internalizes CD80 in fibroblast-like synoviocytes from chronic inflammatory arthritis mouse model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16363
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-20694-7	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 三浦陽子 磯谷俊太郎 前田伸治 金澤智
2. 発表標題 アバタセプトはリンパ節におけるB細胞を減少させ、抗体産生能を抑制する
3. 学会等名 第42回日本炎症・再生学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦陽子 金澤智
2. 発表標題 iUIPマウスモデル由来PCLS ex vivo培養を用いた線維化状態の比較検討
3. 学会等名 第61回 日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦陽子 磯谷俊太郎 前田伸治 金澤智
2. 発表標題 CTLA-4 Igはリンパ節におけるB細胞を減少させ、抗体産生能を抑制する
3. 学会等名 第44回分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦陽子 金澤智
2. 発表標題 ニンテダニブは抗炎症作用および抗線維化作用を有し、関節リウマチ関連肺疾患モデル（D1CC×D1BCマウス）でみられる線維化を抑制する
3. 学会等名 第41回日本炎症・再生学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三浦陽子 大久保仁嗣 新実彰男 金澤智
2. 発表標題 iUIPマウスモデルにおけるニンテダニブ投与の特発性肺線維症様病態に対する抑制効果検討
3. 学会等名 第60回 日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoko Miura, Hirotsugu Ohkubo, Akio Niimi, and Satoshi Kanazawa.
2. 発表標題 Nintedanib attenuates interstitial pneumonia in a mouse model with UIP features
3. 学会等名 ATS conference 2020 (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
---------	---------