

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 14 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591455

研究課題名(和文) 関節リウマチの関節破壊を促進する単球と関節修復に関わる単球の解析

研究課題名(英文) Analysis of monocytes involved in joint destruction and joint repair in rheumatoid arthritis

研究代表者

瀬田 範行 (seta, noriyuki)

東京歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：40338372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：研究成果の概要(和文)：末梢血中の関節を障害する可能性のあるCD14+CD15+CXCR4^{low}単球と保護する可能性のあるCD14+CD15-CXCR4^{high}単球の比率は関節リウマチ(RA)患者では健常人に比べて有意に関節を障害する単球へと偏奇していた。また、両細胞群間でサイトカインやケモカイン受容体の発現パターンの違いが見られた、異なる因子に制御されている可能が示唆された。一方、未治療RA患者では健常人に比べてCD14^{bright}CD16⁻(classical)単球の割合が多く、治療反応良好群ではその割合が有意に減少した。以上よりclassical単球も悪玉単球の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The number of circulating CD14+CD15-CXCR4^{high} monocytes (Mos) possibly involved in joint repair in RA decreased in RA patients compared with that in healthy donors. Moreover, the expression of IL-6, TNF alpha, and CCR5 were high in CD14+CD15+CXCR4^{low} Mos possibly involved in joint destruction in RA, and the expression of CX3CR1 was high in CD14+CD15-CXCR4^{high} Mos, indicating that these cell groups may be controlled by different factors. Furthermore, the number of circulating CD14^{bright}CD16⁻ (classical) Mos decreased in RA patients compared with that in healthy donors, and classical Mos were decreased in RA patients with a response to methotrexate after treatment. These results indicate that classical Mos also may involve in the joint destruction.

研究分野：リウマチ学

キーワード：関節リウマチ 末梢血単球

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで関節リウマチ (RA) 病態形成における末梢血 CD14⁺単球の役割を解明するため研究を行ってきた。その中で健常人末梢血にはほとんど存在しない CD14⁺CD15⁺CD34⁺細胞が RA 患者末梢血には有意に存在することを見出した。一方、骨芽細胞や軟骨細胞へ分化しうる単球由来多能性細胞の前駆細胞が多く含まれる CD14⁺CXCR4^{high}細胞が健常人と比べて RA 患者末梢血中では少なく、高活動性 RA 患者の末梢血で更に少ないことも見出した。この研究成果から、これら細胞がそれぞれ「関節破壊を促進する悪玉単球と関節修復に関わる善玉単球」であるという仮説を着想した。

2. 研究の目的

「末梢血 CD14⁺単球中には関節破壊を促進する悪玉単球と関節の修復に関わる善玉単球が存在する」という仮説を立証するために両細胞群間の数的および質的違いを明らかにして、RA 病態形成における末梢血単球の役割を明確にすること。

3. 研究の方法

文書による同意が得られた RA 患者 16 名 (平均年齢 52.3 歳、男性 4 名) と健常人 14 名 (平均年齢 32.2 歳、男性 7 名) から得た末梢血から比重遠心法で末梢血単核球 (PBMC) を分離して CD14 (RM052)、CD15 (80H5)、CXCR4 (12G5) の発現をフローサイトメトリーで解析した。そして、関節を障害する単球 (CD14⁺CD15⁺CXCR4^{low}単球) と保護する単球 (CD14⁺CD15⁺CXCR4^{high}単球) の比率を算出して、RA 患者と健常人で比較した。更に、別の RA 患者 23 名 (平均年齢 56.8 歳、男性 7 名) と健常人 12 名 (平均年齢 30.6 歳、男性 12 名) の PBMC をそれぞれプールし (RA: 10⁹個、健常人: 10⁹個)、フローサイトメトリー (MoFlo™) で関節を障害する単球 (CD14⁺CD15⁺CXCR4^{low}単球) と関節を保護する単球 (CD14⁺CD15⁺CXCR4^{high}単球) を分離した。そして、この二つの細胞群における IL-1 α 、IL-6、IL-8、TNF、MCP-1、CCR1、CCR2、CCR5、CX3CR1 の発現を半定量的 PCR または Real-time PCR で解析し、その発現を RA と健常人で比較した。半定量的 PCR では、バンドの強さを Image/J® software で測定し、GPAH の発現量で補正した。

また、メトトレキサート (MTX) による加療を受けた RA 患者 38 名から得られた PBMC における CD16、CD14 の発現をフローサイトメトリーで測定し、CD14^{bright} CD16⁺ (intermediate) 単球、CD14^{bright} CD16⁻ (classical) 単球、CD14^{dim} CD16⁺ (nonclassical) 単球の治療前後の変化を解析した。

4. 研究成果

1) 末梢血中の関節を障害する単球と保護

する単球の比率の検討

フローサイトメトリーで CD14⁺細胞にゲートをかけたのち、CD15 と CXCR4 で展開して、図 1 のように関節を障害する単球 (CD14⁺CD15⁺CXCR4^{low}単球) と関節を保護する単球 (CD14⁺CD15⁺CXCR4^{high}単球) の比率を算出した。

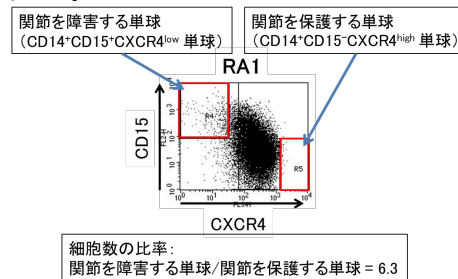


図 1 関節を障害する単球と保護する単球の比率 (代表例を提示)

関節を障害する単球/関節を修復する単球の比率を RA 患者と健常人で比較したところ、RA 患者で有意に高く、健常人に比べて関節を障害する単球へと偏奇していた (p < 0.01) (図 2)。

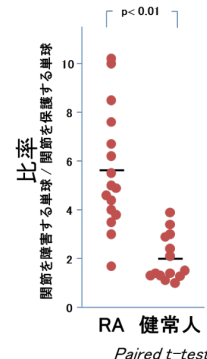


図 2 RA 患者と健常人の関節を障害する単球と保護する単球の比率の比較

2) 末梢血中の関節を障害する単球と関節を保護する単球の遺伝子発現プロファイルの検討

図 3 のようにフローサイトメトリー (MoFlo™) を用いて RA 患者および健常人の PBMC から関節を障害する単球 (CD14⁺CD15⁺CXCR4^{low}単球) と関節を保護する単球 (CD14⁺CD15⁺CXCR4^{high}単球) を高率に含む分画を分離した。

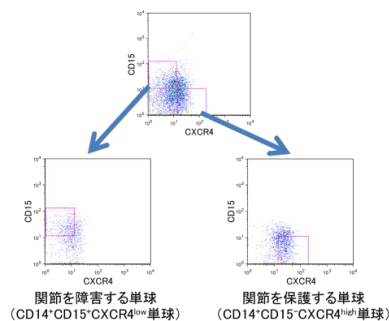


図 3 フローサイトメトリーを用いた RA 患者と健常人の関節を障害する単球と保護する単球の分離

まず、この二つの細胞群における遺伝子発現プロファイルを健常人サンプルを用いて半定量的 PCR で解析した。その結果、TNF α は関節を障害する単球で、IL-6 と CX3CR1 は関節を保護する単球で発現レベルが高かった (図 4)

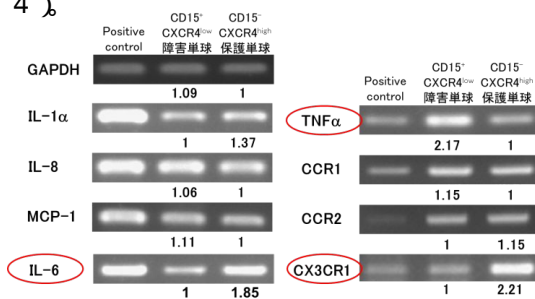


図 4 健常人の関節を障害する単球と保護する単球の遺伝子発現プロファイル (半定量的 PCR)

半定量的 PCR で発現差のみられた TNF α 、IL-6、CX3CR1 に、以前に行ったフローサイトメトリーの検討で健常人に比べて有意に RA で発現レベルが高かった CCR5 を加えて、4 つの遺伝子の発現を RA 患者と健常人由来サンプルを用いて Real-time PCR で調べた (図 5)。結果は、半定量的 PCR の結果と同様に TNF α は関節を障害する単球で、CX3CR1 は関節を保護する単球で発現レベルが高かった。一方、IL-6 の発現は半定量的 PCR の結果と異なり、関節を障害する単球で発現レベルが高かった。CCR5 の発現は、関節を障害する単球で発現レベルが高かった。TNF α 、IL-6、CCR5 の発現レベルは、健常人に比べて RA 患者で高い傾向を認めた。

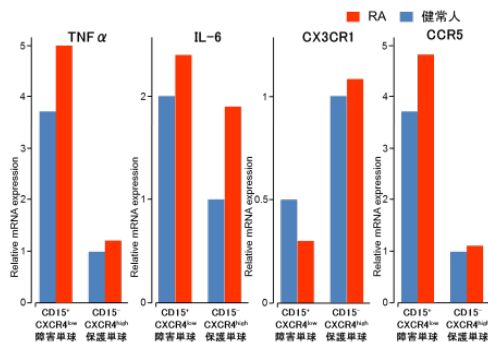


図 5 RA 患者と健常人の関節を障害する単球と保護する単球の TNF α 、IL-6、CX3CR1、CCR5 の発現 (Real-time PCR)

3) 末梢血 CD14⁺単球の亜集団の数的検討

CD14^{bright} CD16⁺ (intermediate) 単球は健常人と比較して RA 患者で明らかに多く (14.86 \pm 6.62% vs 7.59 \pm 1.75%) (p<0.001)、CD14^{dim} CD16⁺ (nonclassical) は逆に少なかった (70.96 \pm 9.22% vs 82.19 \pm 5.69) (p<0.001)。intermediate 単球の割合は MTX の治療前と後のいずれにおいても RA の疾患活動性指標である DAS28-ESR と有意な相関がみられ、疾患活動性が高いと intermediate 単球の割合が高いことが判明した (治療前 r=0.49、

p=0.003 治療後 r=0.47、p=0.006)。更に、MTX に対する治療反応性が良好だった群 (治療後に DAS28-ESR < 3.2 で治療前後で DAS28-ESR が 1.2 を超えて低下した患者) では治療前後で intermediate 単球の割合有意に低下していたのに対して、治療反応性に乏しかった群では有意な低下が見られなかった (p=0.004 vs 0.10)。

考察

本研究結果より、末梢血中の関節を障害する単球と保護する単球の比率は、RA 患者で関節を障害する単球へと偏奇していることが明らかになり、RA の病態において関節を障害する単球と関節を保護する単球が関与するという仮説の妥当性が確認された。また、関節を障害する単球と保護する単球の遺伝子発現プロファイルに明らかな差がみられた。特に、関節を障害する単球では TNF α 、IL-6 という炎症性サイトカインの発現が亢進していた。RA に対する分子標的治療薬の主要な標的分子が関節を障害する単球で発現レベルが高かったことより、関節を障害する単球そのものが今後の新たな治療標的になる可能性が考えられた。

一方、関節を障害する単球と保護する単球ではケモカイン受容体の発現レベルに差がみられた。関節を障害する単球では CCR5 の発現が高かった。CCR5 のリガンドとして MIP-1 α や RANTES が知られている。関節を保護する単球は障害する単球に比べて fractalkine/CX3CL1 に対する受容体である CX3CR1 の発現レベルが高いことが判明した。RA 関節滑膜に存在するマクロファージ、線維芽細胞、血管内皮細胞、樹状細胞が fractalkine を発現して、単球やリンパ球の関節への浸潤を促すことで関節炎の病態に関わるという報告がある。また、骨芽細胞が fractalkine を高発現し、CX3CR1 を高発現する破骨細胞の前駆細胞を引き寄せ、破骨細胞への分化を誘導するという報告もある。従って、関節を保護する単球も骨芽細胞に発現する fractalkine が集簇する骨形成局所にリクルートされる可能性がある。さらに、単球自身が骨芽細胞へ分化し、関節の保護に寄与する可能性が想定された。

これまでの検討結果と合わせて以下の病態が想定される。RA の末梢血中には関節を障害する単球と保護する単球という異なる細胞群が存在し、関節を障害する単球は MIP-1 や RANTES の受容体である CCR5 を高発現しており、関節を保護する単球は SDF-1 や Fractalkine の受容体である CXCR4 や CX3CR1 を高発現していることより、これら 2 つの細胞はそれぞれ異なるケモカインによって動態を制御されている (図 6)。また、RA 患者は健常人に比べて末梢血中の関節を障害する単球の比率が高かったことから、この 2 つの細胞群の量的バランスは RA と健常人の間で異なる (図 7)。

最後に、今回の結果では IL-6 の発現パターンが半定量的 PCR と Real-time PCR では異なっていたが、この理由は不明である。しかし、本検討は PBMC をプールして得た RA 患者と健常人由来のそれぞれ 1 サンプルのみを用いた検討であることより、今後は新たな対象者のプール検体を用いた再検討が必要と考えられた。

一方、CD14+単球の亜集団である CD14bright CD16+ (intermediate) 単球、CD14bright CD16- (classical) 単球、CD14dim CD16+ (nonclassical) 単球に着目した検討で、intermediate 単球は健常人と比較して RA 患者で明らかに多く、その割合は RA の疾患活動性と強く相関した。更に、intermediate 単球の割合は MTX に対する治療反応が良好であった患者群では有意に低下したのに対して治療反応性治療反応性に乏しかった群では有意な低下が見られなかったことから、intermediate 単球も RA の病態を促進している可能性が示唆された。

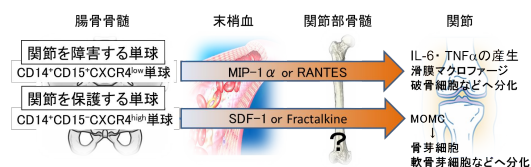


図6 RA 病態における関節を障害する単球と保護する単球の動態と役割 (仮説)

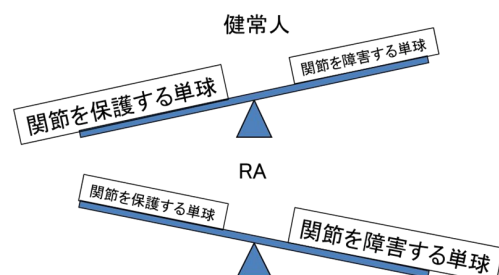


図7 健常人と RA 患者における関節を障害する単球と保護する単球の量的バランス (仮説)

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)

Nishimoto T, Seta N, Anan R, Yamamoto T, Kaneko Y, Takeuchi T, and Kuwana M. A single nucleotide polymorphism of TRAF1 predicts the clinical response to anti-TNF treatment in Japanese patients with rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol. 査読有、2014; 22(2):211-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24321457>

Seta N, Okazaki Y, Miyazaki H, Kato T, and Kuwana M. Platelet-derived

stromal cell-derived factor-1 is required for the transformation of circulating monocytes into multipotential cells. Plos one. 査読有、2013 Sep 16; 8 (9): e74246. doi: 10.1371/journal.pone.0074246. eCollection 2013.

Seta N, Okazaki Y, Izumi K, Miyazaki H, Kato T, and Kuwana M. Fibronectin binding is required for acquisition of mesenchymal/endothelial differentiation potential in human circulating monocytes. Clin. Dev. Immunol. 査読有、2012;2012:820827. doi: 10.1155/2012/820827.

[学会発表](計 7 件)

瀬田 範行、岡崎有佳、越智健介、島岡康則、堀内行雄、竹内勤、桑名正隆: 関節リウマチの骨髓と末梢血 CD14+単球のフェノタイプ解析. 第 56 回日本リウマチ学会総会 (東京). 2012.4.26(ポスター: 関節リウマチの病因・病態 1)

Nishimoto T, Seta N, Anan R, Yamamoto T, Kaneko Y, Kuwana M, Takeuchi T: A Single Nucleotide Polymorphism of Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 1 Predicts Clinical Response to Anti-Tumor Necrosis Factor Treatments in Japanese Patients with Rheumatoid Arthritis. The 76th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (Washington, D.C.). Nov 12th 2012.

6. 研究組織

(1)研究代表者

瀬田 範行 (SETA NORIYUKI)
東京歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 4 0 3 3 8 3 7 2

(2)研究分担者

桑名 正隆 (KUWANA MASATAKA)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号: 5 0 2 4 5 4 7 9