

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790994

研究課題名(和文) 関節リウマチにおける病的滑膜線維芽細胞の起源の同定と治療応用の検討

研究課題名(英文) Identification of the origin of pathogenic synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis

研究代表者

溝口 史高 (Mizoguchi, Fumitaka)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：60510360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチにおいて、関節組織に存在する滑膜線維芽細胞は様々なサイトカインやプロテアーゼを産生し、その病態の中心を担う。このような病的な滑膜線維芽細胞の起源とその形成過程を明らかにすることにより、関節リウマチに対する新たな治療法の開発へとつながることが期待される。そこで本研究では関節炎を形成する病的な滑膜線維芽細胞の前駆細胞がどのような細胞種に由来し、どこに存在するのかについて、関節炎モデルマウスを用いた検討により、明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Synovial fibroblasts play crucial role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. They produce inflammatory cytokines and proteinases to cause the joint destruction. However, it has not yet been clarified how such pathogenic synovial fibroblasts are formed in rheumatoid arthritis. Identifying the progenitor cells of the pathogenic synovial fibroblasts and the regulatory mechanisms could lead to the development of the new strategies to treat rheumatoid arthritis. In this study, we examined the origin of the pathogenic synovial fibroblasts by using murine model of arthritis. We identified the cell type and the localization of the progenitor cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：関節リウマチ 線維芽細胞 間葉系幹細胞 血球系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 関節リウマチに対する治療の現況と課題：

炎症性サイトカインや細胞表面分子を標的とした治療法の登場により、関節リウマチ(RA)の治療成績は大きく改善した。しかし、このような新たな治療法も共通した課題を依然抱えている。有効性の観点では、これらの治療によっても十分な疾患活動性のコントロールが可能となる患者は一部に過ぎない。また十分な疾患活動性のコントロールが可能であった場合にも、その薬剤の中断により多くの患者は再燃する。更に副作用の観点では、現在の RA 治療薬はいずれの薬剤も免疫抑制を作用機序とするために、感染症のリスクを避けることができない。これらの課題を克服するためには、これまでの薬剤とは異なる新たな作用機序による薬剤を開発することが必要である。

(2) RA の治療標的細胞としての滑膜線維芽細胞：

RA において滑膜線維芽細胞は様々なサイトカインやプロテアーゼを産生し、その病態の中心的役割を担う。申請者の属する研究室では滑膜線維芽細胞を標的細胞ととらえ、その細胞周期を抑制することにより、関節炎に対し劇的な治療効果が得られることを報告している。滑膜線維芽細胞を標的とした治療は、免疫細胞やサイトカインを標的とした治療戦略とは異なり、免疫抑制を直接の作用機序としないために、有効性のみならず、安全性の観点でも優れた治療戦略となる可能性が考えられる。

(3) 寛解の達成と安全性との両立を目指す新たな治療法開発のための我々の取り組み：病的滑膜線維芽細胞の「形成過程」を標的とした治療戦略の開発：

滑膜線維芽細胞を標的とした治療法の実現に向けた次のステップは、滑膜線維芽細胞を制御する適切な方法を同定することである。

RA 研究においては、RA 患者の滑膜組織より樹立した滑膜線維芽細胞株を用いた研究が広く行われている。本細胞を用いることにより、滑膜線維芽細胞の増殖・活性化を担う分子を同定することが可能となり、その分子を適切に阻害することにより、有効な RA 治療薬開発へとつながることが期待され、我々を始め複数の研究チームにより解析が進められている。しかしこの手法により期待される治療戦略は、既に形成された病的滑膜線維芽細胞の動きを抑制することが主な作用機序となるために、有効性と安全性の観点で有望な治療薬の開発へとつながる可能性はあるものの、寛解を目指した治療としては不十分であることも予想される。

関節炎の病態においては既存の滑膜線維芽細胞の増殖に加え、正常な滑膜線維芽細胞

とは異なる病的な形質をもった滑膜線維芽細胞が前駆細胞より分化し、滑膜炎組織を形成する過程が存在するはずである。このような病的な滑膜線維芽細胞の形成過程を明らかにし、その過程を適切に阻害することが可能となれば、寛解の達成をも可能な治療戦略となることが期待される。しかし、RA の病態において滑膜線維芽細胞がどのような細胞に由来し、どのように形成されるかについては依然不明なままである。

2. 研究の目的

本研究では、関節炎の病態を担う病的滑膜線維芽細胞の前駆細胞を同定し、その形成過程を明らかにすることにより、「病的滑膜線維芽細胞の形成」を標的とした新たな RA 治療戦略開発への端緒とすることを目的とし検討を行った。

3. 研究の方法

病的滑膜線維芽細胞の起源について、(1) 前駆細胞の細胞種の同定、(2) 前駆細胞が存在する場所と関節に生着する経路、の 2 つの観点から検討を行った(図)。

(1) 病的滑膜線維芽細胞前駆細胞の細胞種の同定：

組織修復や組織炎症の過程では間葉系幹細胞のみならず、血球系幹細胞に由来する間葉系細胞が存在することが報告されている。そこで血球系幹細胞と間葉系幹細胞のそれぞれが、関節炎の病態において病的滑膜線維芽細胞の形成にどのように寄与しているのかについて明らかにするため、線維芽細胞を GFP にて標識することのできる Col1-GFP マウスより採取した骨髓細胞を野生型マウスに移植し関節炎を誘導し、関節局所に存在する GFP 陽性細胞について評価を行った。

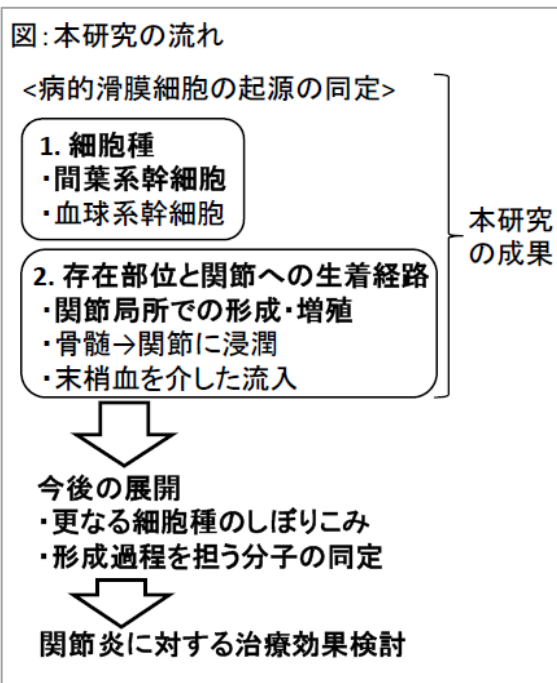
(2) 病的滑膜線維芽細胞前駆細胞が存在する場所と生着する経路の同定：

関節炎の病態において滑膜線維芽細胞は血流を介して他の関節に移動し得ることが報告されるなど、滑膜線維芽細胞はこれまで想定されていた以上に動的な細胞種であることが想定されている。関節炎において認められる線維芽細胞の増加は、その形成過程において、関節局所にもともと存在する線維芽細胞が炎症下で増殖する可能性、関節局所に存在する前駆細胞から新たに分化・形成される可能性、関節外より新たに線維芽細胞やその前駆細胞が関節内に移動する機序により形成される可能性、が考えられる。

そこで、関節外から新たに関節組織に流入する線維芽細胞やその前駆細胞の有無について検討するため、Col1-GFP マウスと野生型マウスとを併体結合し、相互の血流移動を可能とした後に関節炎を誘導し、野生型マウスの関節局所における GFP 陽性細胞を評価した。

この方法により、血流を介して関節内に生着し形成された線維芽細胞を GFP 陽性細胞として同定することが可能となる。

更に関節局所における線維芽細胞の増殖については細胞周期イメージングにより評価した。



4. 研究成果

(1) 病的滑膜線維芽細胞前駆細胞の細胞種の同定:

Col1-GFP マウスの骨髄細胞を移植したマウスに関節炎を誘導し、関節局所における GFP 陽性細胞を評価することにより、関節炎組織を形成する病的滑膜線維芽細胞の起源として、骨髄由来細胞、もしくは組織に存在する前駆細胞がそれぞれの程度寄与するのについて明らかにすることができた。

(2) 病的滑膜線維芽細胞前駆細胞の存在部位と生着経路:

Col1-GFP マウスと野生型マウスとを併体結合した後に関節炎を誘導し、野生型マウスの滑膜組織における GFP 陽性細胞の存在を観察することにより、関節炎において関節外から流入した細胞が滑膜線維芽細胞へと形成される過程の有無を明らかにした。

更に、関節局所に存在する線維芽細胞の増殖については、関節炎組織の細胞周期イメージングを用いて明らかにした。

(3) 他の検討事項・成果

マウス線維細胞培養系の確立:

血球系由来の線維芽細胞前駆細胞とされる線維細胞に注目し、その関節炎の病態への関与を念頭に検討を行った。これまでマウスを用いた線維細胞の同定や培養は難しい

とされていたが、培養条件の検討を行うことにより効率よく線維細胞を誘導する方法を確立した。(1)(2)の検討により、線維細胞が関節炎において病的滑膜線維芽細胞の前駆細胞となる可能性は低いと考えられたことから、本研究では更なる検討は行わなかったが、線維細胞が関与するとされている他の疾患の病態解明に、本手法は有用と考えられる。

炎症下における間葉系幹細胞の応答と関節炎への影響の検討:

炎症下における間葉系幹細胞の生体内における挙動と病態への関与を明らかにするため、GFP を恒常的に発現する間葉系幹細胞株を作成した。この細胞を様々な炎症性サイトカイン存在下での培養することにより、その刺激に応じて異なった応答を示すことを確認した。更に、これらの様々な炎症性サイトカイン存在下で培養した間葉系幹細胞株を、関節炎モデルマウスへ投与したところ、関節炎の重症度に対し異なった応答を示すことを確認した。

(4) 成果のまとめ

本研究により、関節炎モデルマウスにおいて滑膜炎を形成する滑膜線維芽細胞の起源を大きく絞り込むことができた。これらの実験結果は、論文として発表する準備を現在行っている。

今後本研究を発展させ、病的滑膜線維芽細胞の前駆細胞となる細胞種の更なる絞り込みと同定を試みる方針としている。また、同定した前駆細胞の制御機構を解明することにより、関節炎に対する新たな治療戦略の開発へとつなげることを目指し、検討を進めていく(図)。

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 1 件)

溝口 史高. RA 骨破壊のメカニズム. Journal of Rheumatology Clinical Research. 2(2), 89-93, 2013. 査読無

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 1 件)

溝口 史高. 骨に関わる主な疾病発症のメカニズム 第2章 関節リウマチ. 骨研究最前線 73-82, 2013.

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝口 史高 (MIZOGUCHI, Fumitaka)
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究
科・助教
研究者番号：60510360

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：