

平成30年6月19日現在

機関番号：20101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07096

研究課題名(和文) 関節リウマチで変性した滑膜は滑膜間葉系幹細胞を異常化させる足場となるのか？

研究課題名(英文) Do degenerated synovium with rheumatoid arthritis become scaffolds for abnormal synovial mesenchymal stem cells?

研究代表者

松村 崇史 (Matsumura, Takashi)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：90783465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：RA患者群，対照群(膝靭帯損傷患者など)から滑膜組織を採取し，免疫組織学的検討を行った．RAの滑膜には，リン酸化platelet-derived growth factor receptor- (pPDGFR)陽性FLSの蓄積を認めた．さらに，pPDGFR陽性細胞はアポトーシス抵抗性マーカーのBcl-2の発現が上昇，細胞周期抑制因子p16は発現が低下し，細胞増殖を停止できず，アポトーシスを誘導できずに細胞が蓄積している可能性が示唆された．

研究成果の概要(英文)：Synovial tissue was collected from RA patient group, control group (knee ligament injury etc.), and immunohistological examination was conducted. Accumulation of phosphorylated platelet-derived growth factor receptor- (pPDGFR) positive FLS was observed in the synovial membrane of RA. Furthermore, the expression of Bcl-2 of apoptosis-resistant marker was elevated in pPDGFR positive cells, p16 of cyclin-dependent kinase inhibitor was decreased. In RA synovium, it suggested that cell proliferation cannot be stopped, apoptosis is inhibited and cells might accumulate without apoptosis.

研究分野：関節リウマチ

キーワード：関節リウマチ 線維芽細胞様滑膜細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、Rheumatoid arthritis (RA) に対する治療は、抗リウマチ薬や生物学的製剤の開発によって多くの症例で寛解導入が可能となった。しかし、RAの真の成인은未だ明らかでなく、臨床的寛解導入にいたらない症例が全体の3-4割存在すること、さらに破壊された関節には関節固定術や人工関節置換術を施行せざるをえないなど大きな課題が残る。

関節は、あらゆる抗原が血流に乗って必ずいったんは通過するひとつの免疫臓器と考えられ、関節を構成する滑膜細胞は抗原提示能を有する特殊な間葉系細胞として知られる。この滑膜細胞は、炎症性サイトカインを産生して炎症を増悪させると同時に、滑膜細胞それ自体がパンヌスの構成要素として関節破壊を進展させる。滑膜細胞の異常活性化は必ずしも炎症の指標とは関連しないことが臨床的にも示されており、関節破壊には炎症そのものよりも間葉系細胞である滑膜細胞による関節破壊が主役といわれている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、RA患者群(RA)および対照群(Control)から採取した関節滑膜の間葉系細胞を解析し、RA滑膜由来間葉系細胞の異常活性化の特徴を明らかにし、RAの新たな病態解明と、破壊された関節に対する新規治療法の開発につなげることである。

3. 研究の方法

本研究は札幌医科大学臨床研究審査委員会の承認を得て行った(承認番号: 292-3303)。まず、RA患者と対照群の滑膜の性質を検討するために、RA患者および対象群から採取した滑膜組織を採取し、蛍光免疫染色により組織学的な解析を行った。対照群は、靭帯損傷などで関節鏡手術を必要とした患者とした。採取された滑膜組織は4% paraformaldehydeで固定後、20% スクロースに置換し、-80℃で凍結、8μmの切片を作成して用いた。

RAの滑膜では、滑膜炎の間葉系細胞の主体として線維芽細胞様滑膜細胞(Fibroblast-like synoviocytes: FLS)が報告されている。さらにRA患者のFLSは腫瘍様を増殖する invadosome formation となっており、その細胞はリン酸化血小板由来成長因子(phosphorylated Platelet-Derived Growth Factor Receptor $\alpha\beta$:pPDGFR $\alpha\beta$)陽性であると報告されている。本研究では、FLSのマーカである cadherin-11 (CDH11)とリン酸化血小板由来成長因子(phosphorylated Platelet-Derived Growth Factor Receptor $\alpha\beta$:pPDGFR $\alpha\beta$)の蛍光免疫染色を行い、総細胞数に対するpPDGFR

陽性率、CDH11陽性率を算出した。細胞の計測は滑膜のLining layerとSublining layerに分けて行った。Lining layerは滑膜表層に1-2層の細胞が密に並んでいる部分であり、Sublining layerはその下層に存在する血管を

含む疎な部分である。さらに、これらの細胞において、アポトーシス関連因子マーカーについて蛍光免疫染色を行い、それぞれの陽性率を算出し、統計学的解析を行った。

また、組織像で得られた結果を基に、pPDGFR陽性細胞とCDH11陽性細胞の表現型の違いを明らかにするために、滑膜組織からLiberaseを用いて滑膜細胞を採取した。滑膜細胞を培養、3回継代して接着細胞を採取することによってFLSを単離して使用した。さらに、培養されたFLSに対して、PDGF-BB、TGF- β によるサイトカイン刺激(2GF)を行い、In-Cell ELISAによってCDH11とpPDGFR $\alpha\beta$ のタンパク発現を評価した。

4. 研究成果

(1) RA患者滑膜のSublining layerでは、pPDGFR $\alpha\beta$ +が蓄積する

手術中に得られるRAおよびControlにおいてFLSを同定するため、免疫染色を行った。使用したサンプルは平均年齢59.4(25-83)歳、平均罹患年数10.9(2-40)年であった。RAとControlでFLSの発現タンパクおよび局在の違いがあるかどうかを確認するため、FLSの主要なマーカであるCDH11とpPDGFR $\alpha\beta$ で蛍光免疫染色を行った。RAの滑膜ではControlと比較してLining layerが肥厚し、総細胞数が顕著に増加したが、pPDGFR $\alpha\beta$ +CDH11-細胞、pPDGFR $\alpha\beta$ -CDH11+細胞、pPDGFR $\alpha\beta$ +CDH11+細胞の細胞の割合については差がなかった(図1)。一方、Sublining layerではRA群で明らかな細胞数の増加と、pPDGFR $\alpha\beta$ +CDH11-細胞の割合の増加が認められた(p=0.019; 図1)。pPDGFR $\alpha\beta$ -CDH11+細胞、pPDGFR $\alpha\beta$ +CDH11+細胞の割合には差がなかった(図1)。

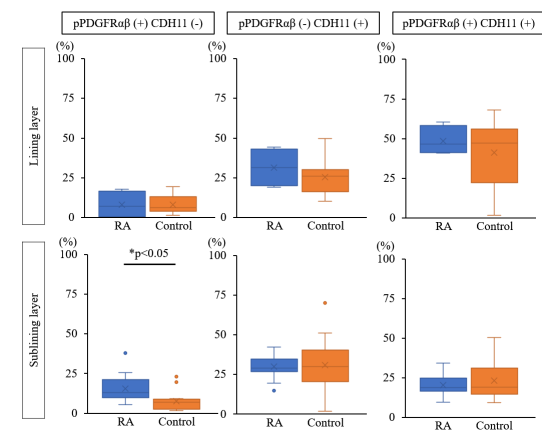


図1

蛍光免疫染色により、pPDGFR、CDH11の陽性細胞率を検討した。Lining layerでは、各細胞の割合に有意差は認められなかったが、Sublining layerでは、RA滑膜においてpPDGFR(+)CDH11(-)細胞の割合の増加が認められた(p=0.019)。

(2) RA患者滑膜で蓄積したpPDGFR+CDH11-

細胞の特徴

RA-SL-FLS で増加した pPDGFR+CDH11-細胞のキャラクターを明らかにするため、RA-SL にて pPDGFR+ CDH11-細胞、pPDGFR-CDH11+細胞、pPDGFR+ CDH11+細胞における Bcl-2, p16, p53 の発現を比較検討した。Bcl-2, p16, p53 は細胞死、細胞増殖を制御するタンパクである。pPDGFR $\alpha\beta$ + CDH11-細胞では pPDGFR $\alpha\beta$ - CDH11+細胞、pPDGFR $\alpha\beta$ + CDH11+細胞と比較して、p16 陽性細胞の割合が減少、bcl-2 陽性細胞の割合が増加した(図 2)。

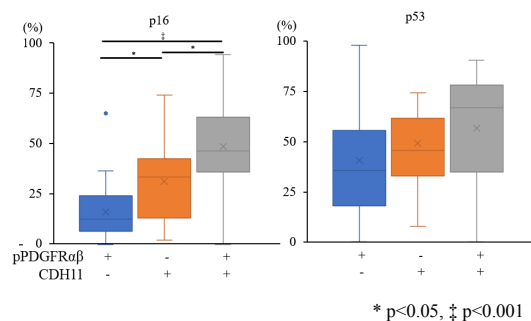


図 2

RA 滑膜の Sublining layer において、蛍光免疫染色により、pPDGFR $\alpha\beta$ 、CDH11 の発現によって分類し、p16、p53 の陽性細胞率を検討した。pPDGFR $\alpha\beta$ +、CDH11-細胞では、p16 発現細胞の割合が有意に少なく、pPDGFR $\alpha\beta$ + CDH11+細胞では有意に発現細胞数を多く認めた。p53 の陽性細胞率に有意差は認められなかった。

RA の滑膜では、pPDGFR $\alpha\beta$ +細胞の蓄積を認め、これらの細胞では、Bcl-2+でアポトーシス抵抗性を示した。この細胞では、細胞周期抑制因子である p16 の発現が少なく、細胞増殖を停止できないことが示唆された。

(3) RA-FLS に対する PDGF-BB, TGF- β 刺激の検討

pPDGFR $\alpha\beta$ + CDH11-細胞と pPDGFR $\alpha\beta$ -CDH11+細胞の表現型の違いを詳細に検討するために、in vitro での検討を行った。RA 環境で豊富に存在する PDGF-BB, TGF- β (2GF) によるサイトカイン刺激を行った。FLS に対する 2GF 刺激は、刺激なしと比較して、Water soluble Tetrazolium salts (WST) assay による生細胞数や、培地中の細胞毒性を示す lactase dehydrogenase (LDH) 活性では両群間に有意差は認められなかった (図 3)。

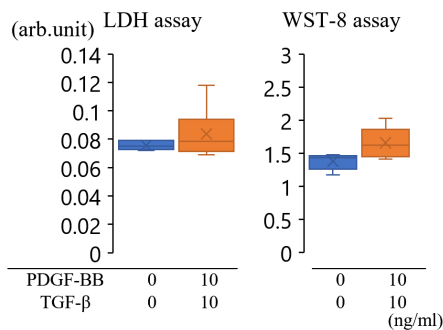


図 3

RA-FLS に対して、PDGF-BB, TGF- (2GF) によるサイトカイン刺激を行った。2GF 刺激を加えても、WST assay, LDH assay により有意差は認められなかった。

さらに、2GF 刺激による CDH11 と pPDGFR $\alpha\beta$ の発現比を検討するため、PDGF-BB, TGF- β の有無により、in-cell ELISA によって評価を行った。PDGF-BB 10ng/ml, TGF- β 10ng/ml の添加によって、pPDGFR $\alpha\beta$ /CDH11 比は刺激なしと比較して優位に減少して CDH11-rich となった。(図 4)

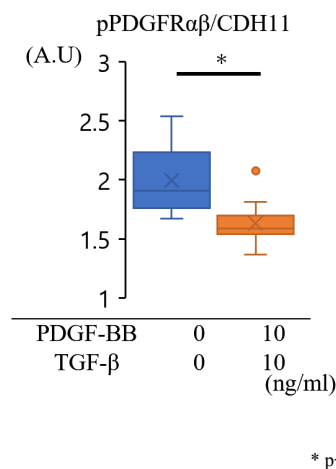


図 4

RA-FLS に対して、PDGF-BB, TGF- (2GF) によるサイトカイン刺激を行い、In-cell ELISA により pPDGFR $\alpha\beta$ 、CDH11 のタンパク発現を評価した。2GF 刺激によって、pPDGFR $\alpha\beta$ /CDH11 比の減少を認めた。

本研究では、RA の滑膜には pPDGFR $\alpha\beta$ +CDH11-細胞、pPDGFR $\alpha\beta$ +CDH11+細胞、pPDGFR $\alpha\beta$ -CDH11+細胞が蓄積し、特に、pPDGFR $\alpha\beta$ 単独陽性細胞が、RA 滑膜において蓄積し、細胞死抵抗性を獲得していることが示唆された。しかし、RA の滑膜で過剰発現が報告される、TGF および PDGF-BB の刺激により、pPDGFR $\alpha\beta$ 発現は減少し、CDH11+細胞が増加した。今後は、RA 滑膜で蓄積する pPDGFR $\alpha\beta$ +細胞の性質について、他のサイトカイン刺激や力学刺激等でも検討し、RA で蓄積する pPDGFR $\alpha\beta$ +細胞および

CDH11+細胞の性質解明と、RA 滑膜炎の治療法の解明へつなげる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Matsumura T, Chikenji T et al. Treatment of Collagen Induced Arthritis in Rat Using Preconditioned Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells with Fetal Appendage Extraction. Orthopedic Research Society 2017 Annual Meeting March 19, 2017, San Diego, CA, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔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

松村 崇史 (MATSUMURA, Takashi)

札幌医科大学医学部・研究員

研究者番号：90783465

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

千見寺 貴子 (CHIKENJI, Takako)

齋藤 悠城 (SAITO, Yuki)

藤宮 峯子 (FUJIMIYA, Mineko)

小笹 泰宏 (OZASA, Yasuhiro)

鈴木 智之 (SUZUKI, Tomoyuki)

寺本 篤史 (TERAMOTO Atsushi)

山下 敏彦 (YAMASHITA Toshihiko)