

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15513

研究課題名(和文) 関節リウマチではなぜDIP関節に滑膜炎が起こりにくいのか

研究課題名(英文) Why does rheumatoid arthritis synovitis rarely involve DIP joints?

研究代表者

寺尾 知可史 (TERAO, CHIKASHI)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：60610459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチの滑膜に発現するタンパクの分布が異なる可能性を考え、各関節部位の滑膜、特にDIP関節の滑膜の収集を試みたが、ヒトで検体を保持している施設はほとんど見られなかった。そこで、関節炎モデルにも用いられるマカクイザルを対象とすることとした(モデルではDIP滑膜はやはり影響を受けにくい)。新日本科学に依頼し計3匹の各関節(手足DIP, PIP, MP, 手関節、肩、肘、股関節、膝、足関節)から滑膜を取得した。サル関節滑膜からのRNA抽出の条件検討を行い、最適化の上で抽出を行った。ボストンのブロード研究所でRNAシーケンスを行って転写産物の網羅的データを得た。遺伝子転写産物の解析を現在行っている。

研究成果の概要(英文)：Based on the fact that rheumatoid arthritis rarely involve DIP joints, I assumed that a distribution of protein in synovial tissues might be greatly different between DIP joints and other joints. Although I had tried to obtain human synovial tissues from DIP joints, almost none of the institutions had DIP synovial tissues. Thus, I decided to use cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), which serve as a model of rheumatoid arthritis. I placed an order to Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd to obtain synovial tissues from hand and foot DIP, PIP, MP, shoulder, elbow, hip, knee and ankle in three monkeys. We optimized conditions of extracting RNA from synovial tissues and extracted RNA from the specimens. I placed an order to Broad Institute in Boston to conduct RNA sequencing for a total of 96 samples allowing duplicates. Based on the RNA seq data which is a quite good data source of RA analysis, I have been working on analyzing the gene expression profiles in synovial tissues.

研究分野：臨床遺伝学

キーワード：関節リウマチ

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)は有病率0.5から1.0%を示す最多の自己免疫性関節炎であり、骨破壊性をきたす関節滑膜炎をその特徴とする。

その滑膜炎は小関節に起こることが多く、特に手指のいわゆる第2,3関節に当たるPIP,MCP関節に起こるのが一般的であるが、一方で第1関節に当たるDIP関節に起こることはまれである。

その結果、RAの日常臨床で用いられる疾患活動性指標であるDAS28は、28関節の腫脹と疼痛をその計算要素とするが、両手のPIP,MCPの合計20関節は含まれるものの、DIP関節は含まれていない。

これまでのRAの研究は、RAと健常人を比較する研究がほとんどで、RAの中で関節部位ごとに解析して比較する研究は稀であり、さらに、DIPに着目して詳細に解析した研究はほとんどない。

滑膜炎の出現メカニズムを解析するにあたっては、滑膜炎が生じる条件(RA)でありながらも実際には生じていない部位(DIP)に着目するのが良い方法であると考えた。

申請者は、これまでRAの滑膜炎の罹患頻度が関節ごとに大きく異なること、滑膜炎の分布パターンに基づいて関節グループが2つに分かれること、MCPとPIP関節に滑膜炎が生じるリスクにリウマチ因子の有無及びその多寡が関連することを示してきた(Terao.et al, PLoS ONE 2013, ArthRheumatol 2015)。

これらの結果は、RAにおいては関節滑膜炎を生じさせるメカニズムが全関節共通ではなく、パターンごとに異なり、指関節には特異的なメカニズムが存在する可能性を示すものであ

る。

2. 研究の目的

本研究では、なぜRAにおける滑膜炎においてDIP関節が侵されにくいのかを明らかにすることを目的とする。

DIP関節にも滑膜は存在し、他の滑膜炎を呈する自己免疫性疾患である乾癬性関節炎ではしばしばDIPの滑膜炎が生じるため、RAにおけるDIP関節炎の頻度の極端な低さは、滑膜の体積などでは説明不能である。

この原因が解明できれば、RAの滑膜炎の根本的なメカニズムの解明につながり、新規治療法開発につながる可能性がある。

3. 研究の方法

これまでの経験を用いて、DIP特異的なRA滑膜炎が生じにくい因子がないかに着目して解析を行う。

ヒトDIP滑膜を所有している施設が無いが、DIPが侵される乾癬性関節炎の研究が盛んな施設を含む幅広い施設にコンタクトを取る。また、実際に整形外科や形成外科の手術の際に患者さんからDIP滑膜の採取可能性について探る。

RA滑膜炎モデル動物に用いられるカニクイザルを対象にDIP滑膜の検体を得る。

滑膜からRNAを抽出する。抽出RNAを次世代シーケンサーを用いて網羅的な塩基配列の決定を行い、transcript variantを含んだ遺伝子発現を滑膜ごとに評価する。

4. 研究成果

関節リウマチの滑膜に発現するタンパクの分布が異なる可能性を考え、各関節部位の滑膜、特にDIP関節の滑膜検体を保有している施設からの検体の譲渡を依頼することを考え、数多くの施設に問い合わせを行ったが、ヒトDIP滑膜検体を保持している施設はほとんど見られなかった。これは、整形外科や形成外科だけでなく、病理部まで対象を広げても同様であった。

DIPに症状を来す乾癬性滑膜炎を研究している施設においても、DIP滑膜を保存している施設はなかった。

新規にDIP滑膜を外科的手術の術中に採取可能かどうかの検討を行ったが、そもそも滑膜切除の外科手術自体が関節リウマチをはじめ、分子生物製剤の治療の目覚ましい発達によって近年は大きく減少傾向であり、難しいという結論に至った。

以上から、ヒトを対象としたDIP滑膜の採取は特に複数の検体となると非常に難しいというのが現状であると判明した。

そこで、関節炎モデルにも用いられるカニクイザル(図1)を対象とすることとした(関節炎モデルにおいてはカニクイザルでもDIP滑膜はやはり影響を受けにくい)。



図1. カニクイザルの写真(wikipediaより)

鹿児島県鹿児島市にある株式会社新日本科学に依頼し計3匹のカニクイザルの各関節(手足DIP,PIP,MP,手関節、肩、肘、股関節、膝、足関節)から滑膜を取得した。新日本科学はこれまでに多数のカニクイザルのRAモデルを用いた研究の実績があり、論文発表も多数行っている(Horai N. et al, BMC Musculoskelet Disord. 2013 Jul 9;14:205. など)。

滑膜炎を惹起した状態と非惹起の状態との比較を考えたが、一匹当たりのコストが高く、両方の状態で行うのは難しいことが判明した。そこで、もしタンパクの分布が関節部位ごとに異なるのであれば、その分布は炎症が起こっていない状態でも解析可能であるはずと考え、関節炎を起こしていない状態で滑膜を採取することとした(図2)。



図2. カニクイザル前肢の写真(比較対照にヒトの指と一緒に撮影)

サル関節滑膜からのRNA抽出の条件検討を行い、最適化の上で抽出を行った。特にRNAシーケンスを行うに当たっては高純度のRNAが必要であったため、この検討には長い時間を有した。その結果、滑膜検体からRIN>7を安定的に満たす高品質のRNA抽出に至る条件の確立に至った。

ボストンのブロード研究所でRNAシーケンス

を行って転写産物の網羅的データを得た。遺伝子転写産物の解析を現在行っている。

(4)研究協力者
()

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 0 件)

〔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

寺尾 知可史 (Terao, Chikashi)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命
医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：60610459

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：