

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09987

研究課題名(和文) 関節リウマチにおける単球系細胞に対するフラクタルカインの関与の解明

研究課題名(英文) Role of fractalkine in monocytes in patients with rheumatoid arthritis

研究代表者

南木 敏宏 (NANKI, TOSHIHIRO)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：00282749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：末梢血単球をフラクタルカイン(FKN)刺激し炎症性サイトカイン産生を解析したが有意な変化は認めなかった。単球をCD16+、CD16-に分離し各々をM-CSF+RANKLで刺激し破骨細胞への分化能を解析した。CD16+単球は破骨細胞へ分化しなかった。CD16-単球は破骨細胞に分化し、更にFKN刺激で破骨細胞分化は亢進した。FKN刺激により破骨細胞分化に関わるNFATc1の発現が上昇した。単球より分化した樹状細胞をM-CSF+RANKLで刺激すると破骨細胞に分化した。FKN刺激で破骨細胞分化は亢進した。FKNは関節リウマチにおいて炎症細胞の集簇だけではなく、骨破壊にも関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、抗フラクタルカイン(FKN)抗体による関節リウマチに対する治験が行われている。本研究結果は関節リウマチにおけるFKNの作用の一つを明らかにしたものであり、今後、抗FKN抗体が関節リウマチに使用できるようになった際には、その期待できる治療効果を予測したり、また適応患者の選択にも役立つ。

研究成果の概要(英文)：The roles of fractalkine (FKN) on rheumatoid arthritis was analyzed. FKN did not alter production of inflammatory cytokines by peripheral blood monocytes. FKN upregulated osteoclast differentiation from peripheral blood CD16- monocytes. Furthermore, FKN upregulated osteoclast formation from dendritic cells derived from peripheral blood CD16- monocytes. These results suggest that FKN might have roles of not only inflammatory cell accumulation, but also bone destruction, on rheumatoid arthritis.

研究分野：膠原病学

キーワード：関節リウマチ フラクタルカイン 単球 破骨細胞 樹状細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は、関節の滑膜組織での慢性炎症が特徴であるが、その炎症部位には、マクロファージ、T細胞、B細胞、樹状細胞などの著明な炎症細胞浸潤が見られる。炎症細胞の局所への浸潤・集簇にはケモカインが関与することが知られている。本研究代表者は、ケモカインの関節リウマチ病態形成への関与の解明と、その阻害による治療薬開発の研究を続けてきている。これまで多数のケモカインの作用を報告してきたが、その中でケモカインの一つであるフラクタルカイン (FKN) が RA 滑膜組織で過剰に産生され、またその受容体 CX3CR1 が滑膜細胞に発現していることを見出した。さらに、関節炎モデルマウスにおいて、抗 FKN 抗体を投与し FKN を阻害すると、マクロファージの滑膜組織への浸潤が抑制され、関節炎が軽減されることを報告した。これらの研究成果が元となり、FKN 阻害が RA に有用である可能性があり、抗 FKN 抗体による関節リウマチに対する治験が行われている。

2. 研究の目的

FKN は RA において、滑膜組織への炎症細胞浸潤、滑膜細胞の活性化、血管新生亢進など様々な作用があると考えられている。RA 病態への FKN の関与の中で、FKN の単球/マクロファージ系細胞への作用を明らかにすることを本研究の目的とした。

本研究結果は RA における FKN の作用をより詳細に明らかにするものであり、FKN 阻害による治療が可能になった際に、その治療効果や、副作用などの予測に役立つ可能性があり、また患者の選択にも役立つことが期待できる。

3. 研究の方法

健常者の末梢血単核球より、MACS ビーズを用いて CD14 陽性単球を単離した。さらにその末梢血単球を、MACS ビーズを用いて、CD16 陽性、CD16 陰性単球に分離した。

FKN による単球からの炎症性サイトカイン産生への影響を検討するため、末梢血 CD14 陽性単球を FKN で 24 時間刺激し、培養上清中の IL-6 濃度を ELISA で測定した。刺激時に、M-CSF、DBcAMP での共刺激も行った。

末梢血 CD16 陽性単球、及び、CD16 陰性単球を、M-CSF + RANKL で刺激し、破骨細胞に誘導した。その際に FKN 刺激を加え破骨細胞分化への影響を解析した。TRAP 染色を行い、TRAP 染色陽性で 3 核以上の多核の細胞を破骨細胞とした。また、カルシウムコートしたプレート上での培養も行い、カルシウム吸収能を解析した。破骨細胞分化に重要と考える NFATc1、インテグリン α 、インテグリン β の発現の変化を real-time RT-PCR にて解析した。

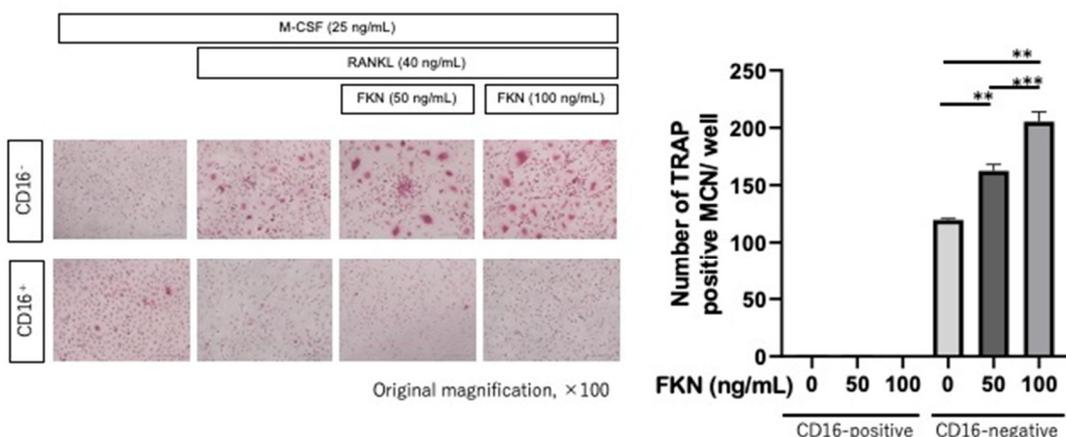
末梢血単球は、GM-CSF + IL-4 の刺激により樹状細胞に分化する。さらに、その樹状細胞を M-CSF + RANKL 刺激し、樹状細胞からの破骨細胞分化を観察した。TRAP 染色による破骨細胞の同定、NFATc1、インテグリン α 、インテグリン β の発現の変化を解析した。

4. 研究成果

健常者由来の末梢血単球を FKN で刺激し、培養上清中の IL-6 濃度を測定した。FKN 10-300 ng/ml 用いたが、上清中の IL-6 濃度に有意な変化は認めなかった。さらに、M-CSF、及び、DBcAMP との共刺激、DBcAMP + FKN、M-CSF + DBcAMP + FKN、を行った。いずれの刺激においても IL-6 濃度に明らかな変化はなく、FKN 刺激による効果も認められなかった。以上のことより、FKN は末梢血単球に対する直接的な炎症性サイトカイン誘導作用は認めないと考えられた。

次に、FKN による破骨細胞分化誘導作用を検討した。末梢血 CD14 単球を CD16 陽性、陰性に分離後に M-CSF + RANKL で刺激し、TRAP 染色陽性の 3 核以上の破骨細胞数を計測した。

図 1

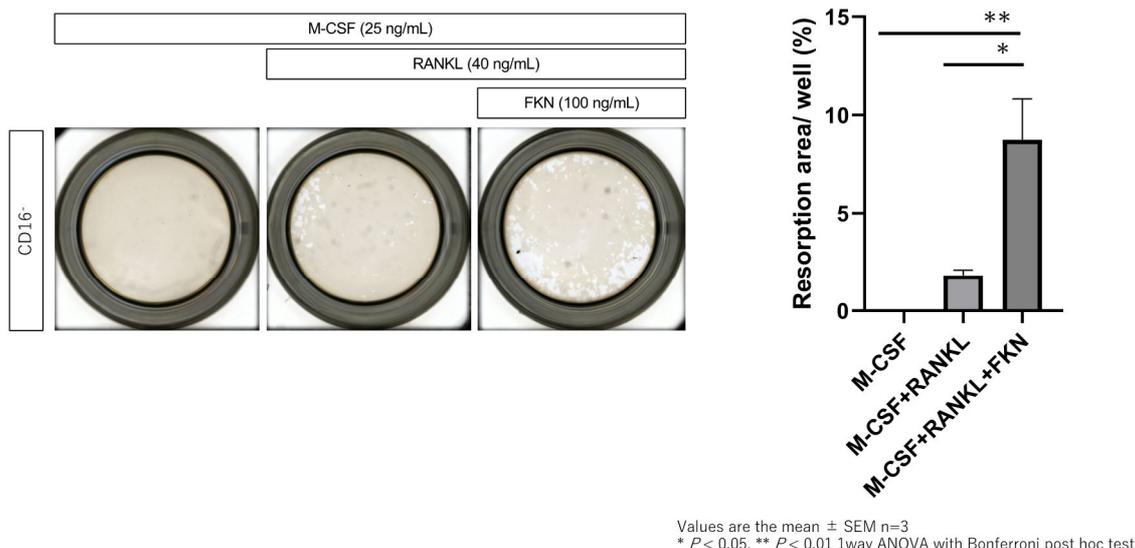


Values are the mean \pm SEM n=3

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 1way ANOVA with Bonferroni post hoc test

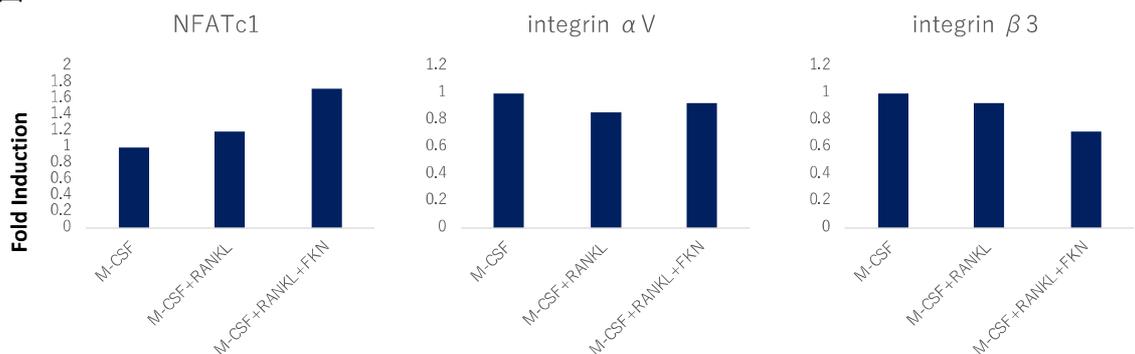
CD16 陽性単球は M-CSF + RANKL 刺激によっても破骨細胞への分化は認めず、さらに FKN 刺激を加えても破骨細胞分化はみられなかった。一方、CD16 陰性単球は M-CSF + RANKL 刺激により TRAP 染色陽性の破骨細胞への分化を認め、さらに FKN 刺激により破骨細胞数は有意に増加した (図 1)。

図 2



カルシウムをコートしたプレート上で同様に培養した。CD16 陰性単球は M-CSF + RANKL 刺激によりカルシウム吸収が見られるようになり、さらに FKN 刺激を加えることにより、吸収された面積は有意に拡大した (図 2)。これらの結果より、末梢血 CD16 陰性単球は破骨細胞に分化能を持つが、FKN はこの破骨細胞分化を亢進させることが見出された。

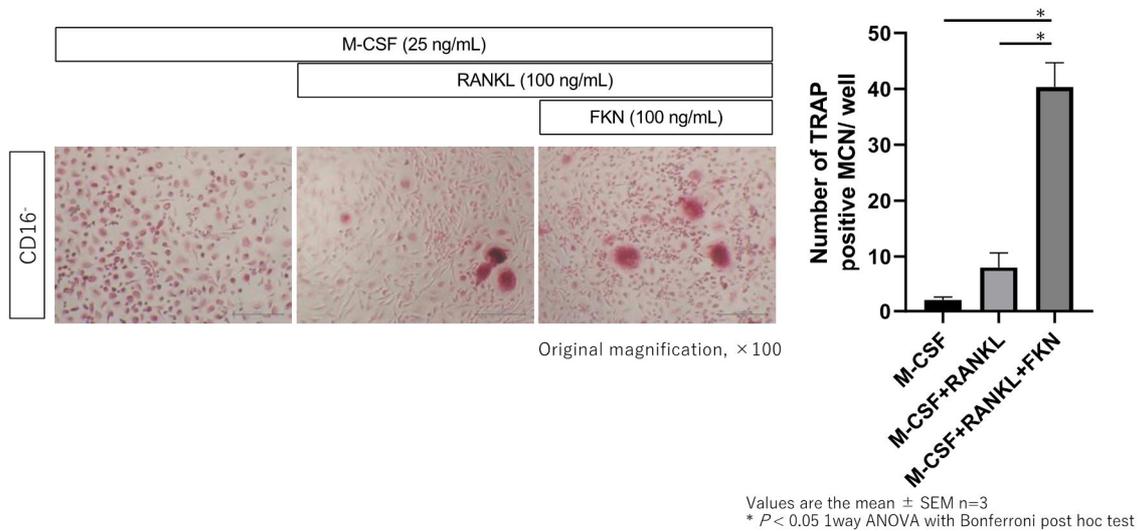
図 3



破骨細胞分化に重要な分子発現の変化を定量 RT-PCR 法により解析した (図 3)。NFATc1 は、M-CSF + RANKL 刺激により発現上昇したが、FKN 刺激により更に上昇した。インテグリン α V 発現には大きな変化を認めず、インテグリン β 3 は FKN 刺激によりむしろ減少した。FKN 刺激による破骨細胞分化亢進には NFATc1 の発現増加が関与している事が示唆された。

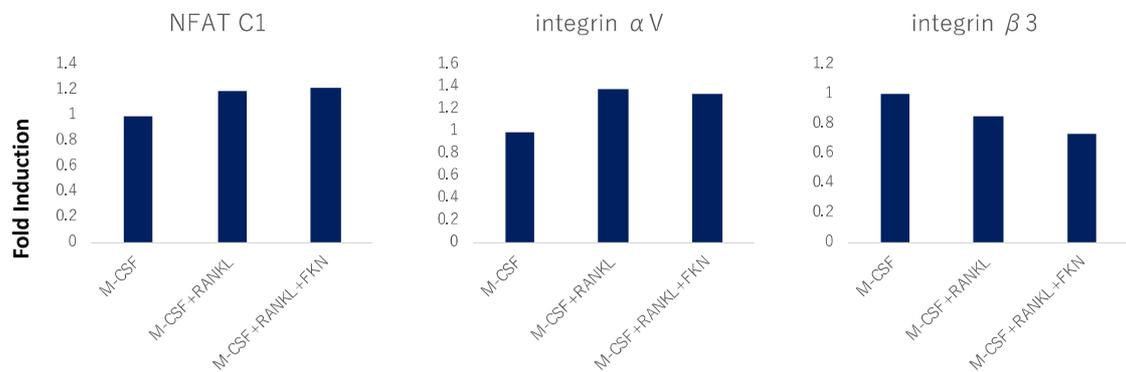
末梢血単球は GM-CSF + IL-4 刺激により樹状細胞に分化する。CD16 陰性単球を GM-CSF + IL-4 で刺激することにより、CD1a の発現上昇、CD14 の発現低下を認め、樹状細胞に分化していることを確認した。この末梢血 CD16 陰性単球から分化した樹状細胞を M-CSF + RANKL 刺激し、破骨細胞に分化させ、さらに FKN 刺激の影響を解析した。

図 4



末梢血 CD16 陰性単球から分化した樹状細胞も、M-CSF + RANKL 刺激により TRAP 染色陽性、多核の破骨細胞に分化した。さらに FKN 刺激により樹状細胞由来の破骨細胞分化も亢進した (図 4)。

図 5



樹状細胞からの破骨細胞への分化時における NFATc1、インテグリン V、インテグリン 3 の発現の変化を定量 RT-PCR 法にて解析した。M-CSF + RANKL 刺激により NFATc1 の発現は増加し、FKN 刺激によりさらに発現上昇がみられた。インテグリン V は M-CSF + RANKL 刺激により上昇したが FKN 刺激による変化は認めなかった。インテグリン 3 発現は M-CSF + RANKL 刺激により減少し FKN 刺激によりさらに減少した (図 5)。FKN 刺激による樹状細胞由来の破骨細胞分化時にも NFATc1 の発現増加が関与していると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 村岡成、金子開知、楠夏子、山田壯一、佐藤洋志、川合眞一、南木 敏宏
2. 発表標題 フラクタルカインによるヒト末梢血単球からの破骨細胞分化誘導亢進
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sei Muraoka, Kaichi Kaneko, Natsuko Kusunoki, Shinichi Kawai, Toshihiro Nanki
2. 発表標題 Fractalkine promotes differentiation into osteoclasts from human peripheral blood monocytes
3. 学会等名 ヨーロッパリウマチ学会（国際学会）
4. 発表年 2019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
研究分担者	楠 夏子 (KUSUNOKI NATSUKO) (10328924)	東邦大学・医学部・博士研究員 (32661)	