

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591270

研究課題名（和文） 関節リウマチの病態を促進する単球と抑制する単球の解析

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)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40338372

研究成果の概要（和文）：関節リウマチ（RA）の末梢血中では既にCD14<sup>+</sup>単球が活性化されていたが、関節修復に関わる可能性のあるCD14<sup>+</sup>CXCR4<sup>high</sup>単球は健常人より少なく、疾患活動性が高いRA患者ほど更に少なかった。一方、RAの腸骨骨髓中と末梢血中には関節破壊に関わる可能性のあるCD14<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>単球が多数存在したが、CD14<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>単球は健常人の末梢血中にも存在したため、CD14<sup>+</sup>CXCR4<sup>high</sup>単球とCD14<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>単球のバランスがRAの病態において重要である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Circulating CD14<sup>+</sup> monocytes in rheumatoid arthritis (RA) patients had been already activated, but the number of circulating CD14<sup>+</sup>CXCR4<sup>high</sup> monocytes (Mos) possibly involved in joint repair in RA decreased compared with that in healthy donors. Moreover, the number of circulating CD14<sup>+</sup>CXCR4<sup>high</sup> Mo in RA patients with high disease activity was lower than that in RA patients with low disease activity. On the other hand, CD14<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup> Mos possibly involved in joint destruction abundantly existed in both iliac bone marrow and peripheral blood of RA patients, although CD14<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup> Mos also existed in peripheral blood of healthy donors. These results indicated that the balance of the number of CD14<sup>+</sup>CXCR4<sup>high</sup> Mo and CD14<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup> Mo is important for development of RA.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,400,000 | 420,000   | 1,820,000 |
| 2010年度 | 900,000   | 270,000   | 1,170,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 総計     | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

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：末梢血単球、関節リウマチ、多分化能、リウマチ学、免疫学

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)の病因は未だ解明されていないが、従来の研究成果から病態の中心は滑膜マクロファージ・線維芽細胞の増殖、滑膜での血管新生、破骨細胞による過剰な骨吸収であることは明らかである。最近、申請者はRA類似関節炎モデルマウスを用いて、末

梢血単球が罹患関節組織に流入して破骨細胞、滑膜マクロファージ、ペリサイトに分化することを明らかにし、末梢血単球がRAにおいても関節炎病態形成に積極的に関与する可能性を示した。一方で、末梢血CD14<sup>+</sup>単球が骨芽細胞や軟骨細胞へと分化しえるという報告もあり、末梢血CD14<sup>+</sup>単球が関節の

再生にも関与している可能性が示唆されている。そこで、われわれは「末梢血 CD14<sup>+</sup>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」という仮説を着想した。

## 2. 研究の目的

「末梢血 CD14<sup>+</sup>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末梢血中に存在する悪玉単球と善玉単球の数的および質的違いを解析して、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

### 対象

文書による同意が得られた RA 患者 86 名（平均年齢 60.7 歳、男性 15 名）と健常人 32 名（平均年齢 27.2 歳、男性 21 名）から末梢血を提供して頂き解析に用いた。RA 患者 86 名中 9 名からは骨髄も提供して頂いた。診療情報の得られた RA 患者 86 名中 77 名は検体採取時の疾患活動性から低疾患活動性 (DAS28 < 3.2) と高疾患活動性 (DAS28 ≥ 3.2) に分類した。

### フローサイトメトリー

腸骨骨髄と末梢血から比重遠心法で単核球を分離して CD14 (RM052)、CD15 (80H5)、CD16 (3G8)、CD29 (MAR4)、CD31 (P2B1)、CD34 (AC136)、CD144 (55-7H1)、CCR1 (53504)、CCR2 (48607)、CCR4 (205410)、CCR5 (2D7/CCR5)、CCR6 (53103)、CXCR3 (49801)、CXCR4 (12G5)、CXCR5 (RF8B2)、VGEFR1 (49560) の発現をフローサイトメトリーで解析し、各分子を発現している CD14<sup>+</sup>単球の割合、または蛍光平均強度 (Mean fluorescence intensity: MFI) を用いて CD14<sup>+</sup>単球における各分子の発現を各群間で比較した。

## 4. 研究成果

### (1) RA 患者と健常人の末梢血 CD14<sup>+</sup>単球の解析

77 例の未治療 RA 患者と 26 例の健常人から得た末梢血を用いて、末梢血 CD14<sup>+</sup>単球の CD14、CD16、CD29、CD31、CD34、CD144、CCR1、CCR2、CCR4、CCR5、CCR6、CXCR3、CXCR4、CXCR5、VGEFR1 の発現を比較検討したところ、健常人と比べて RA 患者の方が有意に末梢血 CD14<sup>+</sup>単球中をしめる FcγRⅢa 発現細胞頻度が高く (p = 0.39)、末梢血 CD14<sup>+</sup>単球上の CCR2 発現強度が高い (p = 0.042) ことが判明した (図 1)。この結果は、RA の末梢血中では既に CD14<sup>+</sup>単球が活性化されており、CD14<sup>+</sup>単球が RA の病態形成に深く関与している可能性が示唆された。

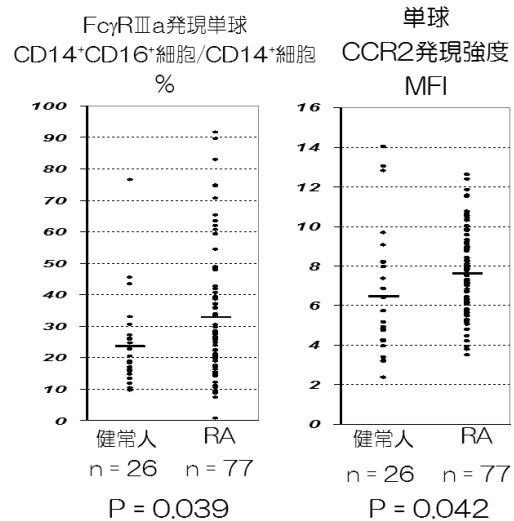


図 1: 健常人と RA 患者における末梢血 CD14<sup>+</sup>単球上の FcγRⅢa と CCR2 の発現比較

これまでの検討で末梢血 CXCR4<sup>high</sup>単球中に骨芽細胞や軟骨芽細胞への分化能を有する単球由来多能性細胞の前駆細胞が存在することが判明している。そこで、77 例の未治療 RA 患者と 26 例の健常人から得た末梢血を用いて、末梢血単球における CXCR4 の発現強度を比較したところ、健常人と比べて有意に RA 末梢血単球のほうが CXCR4 の発現強度が低いことが判明した (p = 0.0005)。また、RA の疾患活動性が高い群のほうが、低い群よりも末梢血単球の CXCR4 の発現が低いことも分かった (p = 0.017) (図 2)。この結果より、RA では CXCR4 高発現 CD14<sup>+</sup>単球 (善玉単球) が減少していることが判明した。

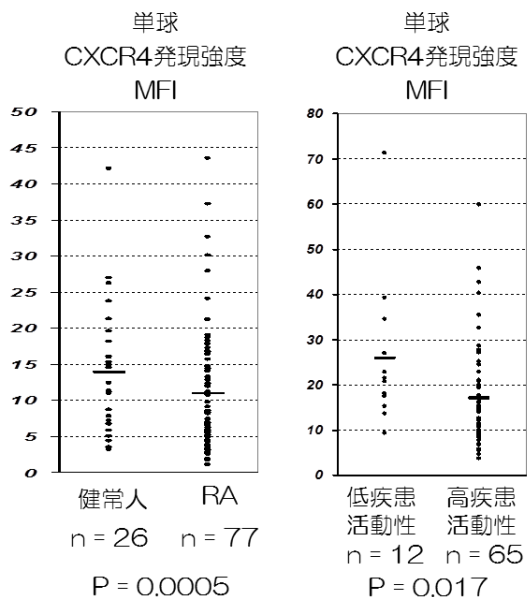


図 2: 健常人と RA 患者、低疾患活動性 RA 患者と高疾患活動性 RA 患者における末梢血 CD14<sup>+</sup>単球上の CXCR4 の発現比較

次に、健常人6例とRA患者9例の末梢血CD14<sup>+</sup>単球を用いてCD15の発現を解析したところ、全例で末梢血単核中にCD14<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>細胞が検出された(図3)。

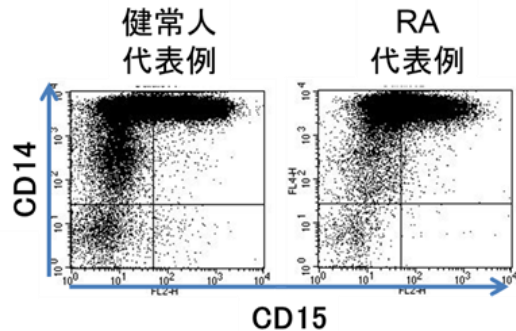


図3：健常人とRAの末梢血中のCD15<sup>+</sup>細胞の存在(代表例を各1例ずつ提示)

(2) RA患者の腸骨骨髓CD14<sup>+</sup>単球の解析  
RA患者9例の骨髓CD14<sup>+</sup>単球を用いてCD15の発現を解析したところ、全例でCD15の発現が見られた(28-60%)(図4)。

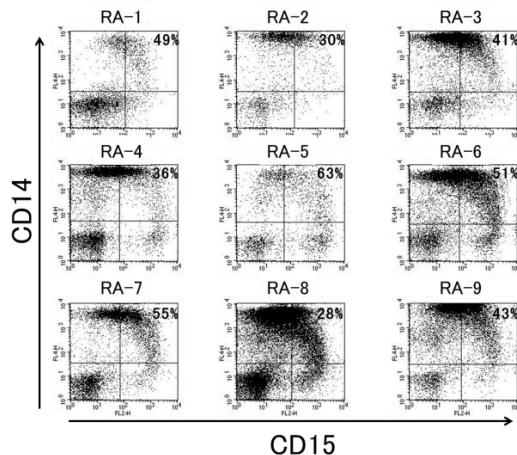


図4：RA患者の骨髓CD14<sup>+</sup>単球中のCD15発現の検討

#### 考察

RA患者の末梢血CD14<sup>+</sup>単球は健常人と比較してFcγRIIIaやCCR2を高発現しており、循環血液中で活性化されていた。これまでの検討で末梢血CXCR4<sup>high</sup>単球中に骨芽細胞や軟骨芽細胞への分化能を有する単球由来多能性細胞の前駆細胞が存在することが判明している。今回の検討では、末梢血単球のCXCR4の発現は健常人よりRA患者で低く、活動性が高いRA患者ほど低いことより、RA患者では活動性の上昇に伴い骨や軟骨の修復能が低下している可能性が示唆された。一方、RA患者の腸骨骨髓には癌特異的抗原を発現するCD15<sup>+</sup>単球が豊富に存在し、関節破壊との関連が示唆されている。本検討でも、RA患者全例(n=9)で骨髓CD14<sup>+</sup>単球にCD15の発現が見られ、以前に報告され

た骨髓CD15<sup>+</sup>単球の存在が再確認されたが、健常人とRA患者共に末梢血中にもCD14<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>細胞が存在していた。そこで、CD14<sup>+</sup>CXCR4<sup>high</sup>単球とCD14<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>単球のバランスがRAの病態において重要である可能性が考えられた(図5)。

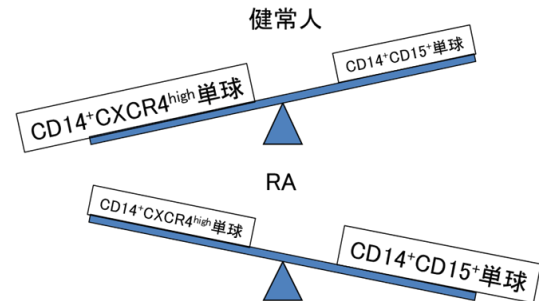


図5：健常人とRAにおけるCXCR4<sup>high</sup>単球とCD15<sup>+</sup>単球のバランス(仮説)

#### 結語

本研究では、RAの病態において関節破壊に関与するCD15<sup>+</sup>(CD34<sup>+</sup>)単球と、関節修復に関与するCXCR4<sup>high</sup>単球のバランスが重要であると考えられた。

#### 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4件)

- ① Seta N and Kuwana M. Potential Involvement of Human Circulating CD14<sup>+</sup> Monocytes in Tissue Repair and Regeneration. Inflammation and Regeneration. 査読有、2012; 32(1): 1-7.
- ② Yamaguchi Y, Okazaki Y, Seta N, Satoh T, Takahashi K, Ikezawa Z, and Kuwana M. Enhanced angiogenic potency of monocytic endothelial progenitor cells in patients with systemic sclerosis. Arthritis Res. Ther. 査読有、2010; 12(6): R205.
- ③ Seta N and Kuwana M. Derivation of multipotent progenitors from human circulating CD14<sup>+</sup> monocytes. Exp. Hematol. 査読有、2010; 38(7): 556-583.

[学会発表](計17件)

- ① 瀬田範行、金子祐子、安岡秀剛、佐藤隆司、竹内勤、桑名正隆：未治療関節リウマチ患者由来末梢血単核球のフェノタイプと血漿中液性因子の解析。第54回日

本リウマチ学会総会（神戸）. 2010. 4. 22-25(ワークショップ: RA の病因・病態 3)

- ② 瀬田範行、海江田信二郎、岡田保典、桑名正隆: マウス関節炎モデルにおける骨髓由来細胞の役割. 第 53 回日本リウマチ学会総会（東京）. 2009. 4. 23-26(ワークショップ: リウマチ性疾患の動物モデル)

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

なし

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)

なし

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

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

瀬田 範行 (SETA NORIYUKI)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号: 40338372

### (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: 50245479

### (3) 連携研究者

なし