

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：87105

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20023

研究課題名(和文) 関節リウマチ滑膜組織の新しい培養方法の開発とその有用性

研究課題名(英文) successful in vitro culture of rheumatoid arthritis synovial tissue explants and its usefulness as a analysis tool

研究代表者

櫻庭 康司(SAKURABA, Koji)

独立行政法人国立病院機構九州医療センター(臨床研究センター)・その他部局等・その他

研究者番号：00747579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)の慢性炎症性滑膜炎の病因は未だ不明である。さらに、これまで行われた関節炎動物モデルやヒト患者細胞などを用いた機能的解析は、滑膜組織の炎症病態を正確に再現できていない可能性がある。そこで本研究では、RA滑膜を組織片のまま気相と液相の境界に設置し培養する方法(ALI)を開発した。滑膜組織片をALI培養した所、滑膜炎の組織学的構造や炎症性サイトカインであるIL-6やIL-8産生が長期間維持し、これに抗TNF- $\alpha$ 抗体を加えるとIL-6とIL-8の産生が減少した。この様にALI培養はRA滑膜炎を長期間維持する事が可能であり、今後のRA病態解明の研究に大きく貢献する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The pathogenesis of chronic and multiple synovitis in Rheumatoid arthritis (RA) is unclear until now. To investigate this question, many physicians had examined some arthritis mice models or cell analyses from RA patients. However, these models may not refract the actual pathological condition of RA synovium. Therefore, we developed the method of culturing RA synovial explants as it is. To culture the explants in vitro, we employed the air-liquid interface (ALI) which put it on the interface between gas phase and liquid phase. In the histopathological analysis, ALI culture kept the construction of inflamed synovium long time. Production of the inflammatory cytokine Interleukin(IL)-6 and IL-8 were also maintained in ALI culture at a later time, but decreased when anti-TNF- $\alpha$  antibodies were added into this culture medium. Thus, it was suggested that ALI culture of RA synovial explants was useful not only to study the pathogenesis of RA synovium but also to check the effect of new DMARDs.

研究分野：臨床免疫学、リウマチ病学

キーワード：関節リウマチ 滑膜組織培養 in vitro培養 滑膜炎維持 IL-6産生維持 IL-8産生維持

### 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は原因不明の慢性滑膜炎により、破壊性の多関節障害を来す疾患である。近年、免疫抑制剤や生物学的製剤による強力な治療で予後は劇的に改善したが、不応例も認め、また治癒に至る症例は限られている。そのため、より疾患特異性が高い治療法の開発が望まれているが、これには RA のより詳細な病態理解と病因解明が欠かせない。

ところで、近年の抗サイトカイン抗体など生物学的製剤の導入は、RA の予後を変えただけではなく、標的分子の関与の直接的な証明でもあり、病態理解にも大きく貢献している。ここで興味深いことに、RA 病態解析に用いられている関節炎動物モデルとは、この点が一致しないことも少なくないことがわかってきた。例えば動物モデルでは IL-1 を標的にする方が TNF- $\alpha$  より治療効果が高いが (Joosten LA. et al, *Arthritis Rheum*, 1996)、ヒト RA では IL-1 阻害療法はあまり効果がない (Nam JL et al, *Ann Rheum Dis*, 2010)。その他の薬剤に関しても、非ステロイド性消炎鎮痛剤は実験的関節炎の発症を抑制するが (Anderson GD. et al, *J Clin Invest*, 1996)、ヒト RA については、鎮痛作用こそあれ、関節炎抑制作用は期待されない。これらはヒト RA とその動物モデルでは、関節炎病態に少なからぬ相違が存在することを示唆するが、動物モデルは一般に大量の自己抗原とアジュバントを投与することで誘導され、かつ急性発症であること等を考えると驚くべきことではない。実際に RA 患者の CD4T 細胞を解析した結果、ヒトと動物では関節炎発症に関わる T 細胞サイトカインも異なる可能性を指摘する報告もある (Yamada H. et al, *J Inflamm Res*, 2010)。

したがって、RA の病態理解には、やはりヒト滑膜組織を用いた研究が欠かせず、特に機能的な解析が重要である。最も一般的な方法は、コラゲナーゼなどを用いて滑膜組織を分解し、単離した構成細胞を培養する方法と思われる。これは比較的簡便でかつ、定量性にも優れており、またある程度長期間培養する事も可能である。そのため薬剤の効果判定にも用いられており、初の生物学的製剤となった抗 TNF- $\alpha$  抗体も、この解析系での結果を踏まえて、臨床試験が開始された (Feldmann M. et al, *Annu Rev Immunol*. 1996)。ただし本来の滑膜構築を必要とする、細胞間の空間的相互作用は、正しく評価できていない可能性がある。

そのため滑膜を組織片の状態でも培養する事が最良と思われ、確かにそのまま液内で培養を行っている報告もあるが、培養時間は 24 時間程度と限られている (Fraser A. et al, *Arthritis Rheum*, 2001)。少し古い論文を参照すると、培地中に高濃度酸素を

注入した培養法も試みられているが、特殊な装置が必要な事もあり、一般化はされていない (Smiley JD. et al, *J Clin Invest*, 1968)。

一方、最近はこれら *in vitro* での培養法より、Scid マウス等の免疫不全動物に滑膜組織を移植する方法が用いられることが多いようである。移植滑膜組織片では数カ月にもわたって炎症が持続しており、そこからの自己抗体の産生も検出されている (Iwaki-Egawa S. et al, *Ann Rheum Dis*, 2005)。即ち RA の特徴である慢性炎症の病態をも再現できる解析系と言える。しかし、少ない実験誤差で定量性をもって解析するには、多くのマウス個体に同時に移植する必要がある。そのため多数の実験動物を揃えておく必要があり、また実験手技的にも簡便とはいえないなどの問題もある。

そこで、申請者は、より簡便で定量的に解析できる新しい滑膜組織培養法を開発を試みることにした。

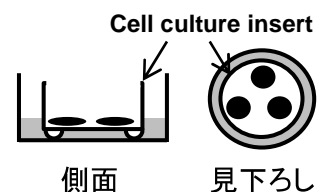
### 2. 研究の目的

RA 滑膜組織片の新しい培養方法を確立する。また、これまで確立されている培養方法と比較を行い、その有用性を実証する。さらに、現在臨床応用されている抗リウマチ薬を添加し、培養滑膜組織片が受ける影響や変化について検討を行い、病態解明や薬剤効果判定に有用な研究方法となる可能性があるのか検証する。

### 3. 研究の方法

今研究で用いた滑膜組織検体は、アメリカリウマチ学会の 1987 年診断基準を満たす RA 患者 10 症例から、関節手術を行った際に採取したものである。

新しい RA 滑膜組織培養方法は、胎仔胸腺器官培養を応用した気相液相界面 (ALI: air-liquid interface) 培養を採用した。胎仔胸腺器官培養は、*in vitro* で胎仔胸腺を組織のまま気相と液相の境界に設置し培養する方法であるが、胎仔胸腺分化を再現しており、胸腺内の T 細胞分化のメカニズムを解析できる優れた実験系である (Nitta T. et al, *Methods Mol Biol*, 2013)。実際の ALI 培養の方法について簡便に述べると、まず肉眼的に活動性滑膜炎を認めた部位を 3mm 径にカットし、無作為に 3 片ずつ選択した。選択した組織片を 0.45mm 径の気孔の cell culture insert (Millicell HA, Merck Millipore, Billerica, MA, USA) に乗せ、気相と液相の間に位置する様に設置し培養を行う (右下図)。培養液は 2 日目、1 週目、2 週目、3 週目に交換した。



側面

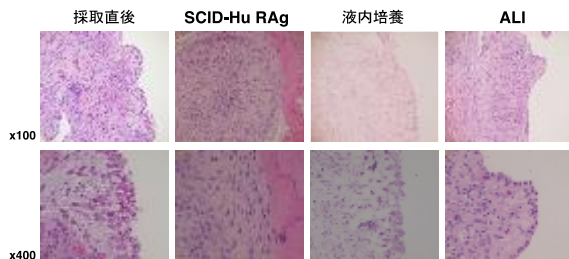
見下ろし

この新規培養方法を行った滑膜組織編片を、これまで報告のあった培養液内で培養を行ったもの（液内培養）や免疫不全マウスに移植したもの（Scid-Hu RAg）と比較し、特に、病理組織学的特徴やサイトカイン産生が長期間維持できているのか検討した。さらに、抗 TNF- $\alpha$  抗体である infliximab（田辺三菱製薬、日本）を培養液内に添加して、サイトカイン産生が抑制されるのか確認した。

#### 4. 研究成果

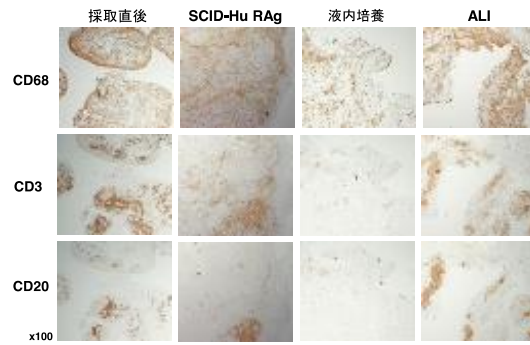
##### ① 病理学的評価

採取直後と3通りの培養を2週間行った滑膜組織片の病理組織像を下図に示す。RA滑膜炎の病理組織学的特徴は、採取直後の組織で見られる様に、表層細胞の過形成、実質への局所及びびまん性の細胞浸潤である。採取直後と2週間培養した滑膜組織片を比較したところ、ALI培養では浸潤細胞の膜表層重層化や滑膜内細胞集簇が大部分維持されていた。Scid-Hu RAgでも滑膜内浸潤細胞は維持されていたが、膜表層はマウス組織と癒着し重層化が消失していた。しかし、液内培養ではRA滑膜炎の全ての所見が消失していた。



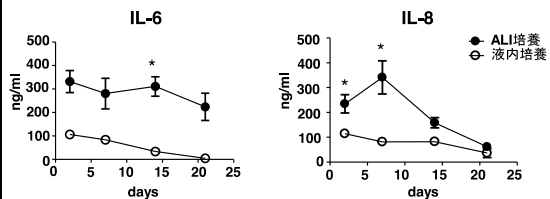
##### ② 免疫組織学的評価

次に、同様の滑膜組織片を用いて、単核細胞上の CD68、CD3、CD20 分子発現を免疫染色で確認した（右上図）。採取直後に認められるマクロファージ（CD68 陽性細胞）で構成される表層過形成は、2週間培養した滑膜組織片では ALI でのみ維持できていた。一方、実質内のマクロファージ浸潤は、ALI および SCID-Hu RAg で同程度維持できていた。また、採取直後の滑膜組織片で CD3 陽性 T 細胞の集簇が認められたが、RA 滑膜炎でしばしば見られる異所性リンパ節形成は全症例で認めなかった。CD20 陽性 B 細胞は常に CD3 陽性 T 細胞に共局在化していた。これら CD3 陽性 T 細胞及び CD20 陽性 B 細胞の集簇は ALI 培養でよく維持されていた。



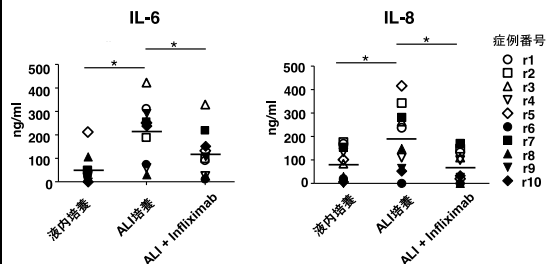
##### ③ 炎症性サイトカイン産生の維持

RA による慢性滑膜炎の特徴の一つに炎症性サイトカインの産生がある。そこで、採取した培養上清のインターロイキン-6 (IL-6) とインターロイキン-8 (IL-8) の濃度を継続的に測定したところ（下図：代表的な1症例を示す）、ALI 培養された滑膜片からは長期間 IL-6 産生が認められた。IL-8 は検出されるものの時間と共に減少していった。しかし、液内培養では両者共に培養直後から著明に低下していた。



##### ④ 機能的解析の可否の検討

さらに、2週目で回収した培養上清の IL-6 と IL-8 濃度について、全 10 症例を下図に示す。ここでも、ALI 培養は液内培養に比べ IL-6 と IL-8 の産生が有意に多いことが明らかとなった。この ALI 培養液中に抗 TNF- $\alpha$  モノクローナル抗体である infliximab を加えたところ、有意にこれら炎症性サイトカイン産生が減少していた。これは、ALI 培養した滑膜組織片には、関節ウマチによる滑膜炎の炎症メカニズムが保たれており、抗 TNF- $\alpha$  モノクローナル抗体によりこの病的滑膜炎の一部が抑制されたことが示唆されている。



この様に ALI は、滑膜組織片を長期間にわたり培養することが可能である事に加え、これまでの単離細胞培養や Scid マウスへの滑膜組織移植で克服することができなかった問題点を補う、理想的な解析手法であ

る可能性が示唆された。また、今後さらなる改良を加える必要があるものの、ALIは滑膜組織の機能的解析や薬剤効果判定などを行う上で、非常に有用な研究ツールとして確立されることが十分に期待できる。

#### 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 5 件)

- ① Haraguchi A., Nakashima Y., Miyahara H., Esaki Y., Okazaki K., Fukushi J., Hirata G., Ikemura S., Kamura S., Sakuraba K., Fujimura K., Akasaki Y., Yamada H. Minimum 10-year results of cementless total hip arthroplasty in patients with rheumatoid arthritis. *Modern Rheumatol.*, 査読有, in press, 2017, DOI: 10.1080/14397595.2016.1256024
- ② 美山和毅, 寺田和正, 小原伸夫, 宮崎清, 櫻庭康司, 宮原寿明 左下肢痛にて発症し偶発的に前駆Bリンパ芽球性リンパ種と診断できた一例. 整形外科と災害外科, 査読無, vol.66, 2017, pp62-66, DOI:なし
- ③ Sakuraba K., Oyamada A., Fujimura K., Spolski R., Iwamoto Y., Leonard WJ., Yoshikai Y., Yamada H. Interleukin-21-signaling in B cells, but not in T cells, is indispensable for the development of collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Res Ther*, 査読有, vol.18, 2016, pp188, DOI:10.1186/s13075-016-1086-y.
- ④ 原田知, 嘉村聡志, 大迫浩平, 藤村謙次郎, 櫻庭康司, 江崎幸雄, 宮原寿明. 関節リウマチに対して加療中の妊婦に生じた一過性大腿骨頭委縮症の一例. 九州リウマチ, 査読無, vol.32, 2016, pp101-105, DOI:なし
- ⑤ Sakuraba K., Fujimura K., Nakashima Y., Okazaki K., Fukushi J., Ohishi M., Oyamada A., Esaki Y., Miyahara H., Iwamoto Y., Yoshikai Y., Yamada H., Brief report: successful in vitro culture of rheumatoid arthritis synovial tissue explants at the air-liquid interface. *Arthritis Rheumatol*, 査読有, vol.67, No.4, 2015, pp887-892, DOI: 10.1002/art.39019.

[学会発表] (計 15 件)

- ① Kai K., Sakuraba K., Terada K., Kohara N., Miyahara H. Change in the surgical treatment for cervical spine disorders related to rheumatoid arthritis during recent 15 decades. 18th EFORT Congress, 2017年5月31日-6月2日, Vienna (Austria)

- ② 甲斐一広, 櫻庭康司, 藤村謙次郎, 嘉村聡志, 平田剛, 江崎幸雄, 寺田和正, 宮原寿明 当科における関節リウマチ頸椎病変に対する手術治療の変遷の検討. 第61回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2017年4月20-22日 (福岡)
- ③ 櫻庭康司, 寺田和正, 江崎幸雄, 嘉村聡志, 藤原稔史, 藤村謙次郎, 金堀将也, 宮原寿明 関節リウマチ脊椎病変の外科的治療と周術期管理. 第53回九州リウマチ学会 2017年3月11-12日 (宮崎)
- ④ 櫻庭康司, 宮原寿明, 山田久方 コラーゲン誘導関節炎の発症には B 細胞への IL-21 シグナルが重要な役割を果たす. 第21回リウマチフォーラム, 2017年1月28-29日 (横浜)
- ⑤ Koji Sakuraba, IL-21 signaling in B cells is critical for the development of collagen induced arthritis in mice, ACR/ARHP Annual Meeting, 2016年11月11-16日, Washington, DC (USA)
- ⑥ 櫻庭康司, 宮原寿明, 山田久方. コラーゲン誘導関節炎の発症には B 細胞への IL-21 シグナルが重要な役割を果たす, 第3回JCRベーシックリサーチカンファレンス, 2016年10月14-15日 (東京)
- ⑦ 櫻庭康司, 宮村知也, 嘉村聡志, 藤村謙次郎, 甲斐一広, 江崎幸雄, 宮原寿明 成人T細胞性白血病患者に HTLV-1 関連関節症を発症した1例, 第45回リウマチの外科研究会, 2016年8月26-27日 (福岡)
- ⑧ 中島康晴, 宮原寿明, 原口明久, 江崎幸雄, 平田剛, 嘉村聡志, 櫻庭康司, 藤村謙次郎, 岩本幸英 RA に対する cementless THA の 10 年以上の成績-術後 mortality と implant survival-. 第89回日本整形外科学会学術集会総会, 2016年5月12-15日 (横浜)
- ⑨ 山田久方, 近藤正一, 中島康晴, 岡崎賢, 福士純一, 水内秀城, 赤崎幸穂, 小山田亜希子, 原口明久, 江崎幸雄, 藤村謙次郎, 櫻庭康司, 宮原寿明, 岩本幸英, 吉開泰信 関節リウマチにおける CD4T 細胞サブセットの包括的解析, 第60回日本リウマチ学会総会・学術総会, 2016年4月21-23日 (横浜)
- ⑩ 櫻庭康司, 江崎幸雄, 嘉村聡志, 藤村謙次郎, 末田麗真, 宮原寿明 成人T細胞性白血病患者に HTLV-1 関連関節症を発症した1例. 第43回日本関節病学会, 2016年11月5-6日 (札幌)
- ⑪ 櫻庭康司, 藤村謙次郎, 小山田亜希子, 宮原寿明, 岩本幸英, 山田久方 コラーゲン誘導関節炎の発症には B 細胞への IL-21 シグナルが重要な役割を果たす, 第30回日本整形外科学会・基礎学術集会 2015年10月22-23日 (富山)
- ⑫ Sakuraba K., Fujimura K., Kamura S., Esaki Y., Miyahara H., Yamada H. IL-21 signaling in B cells is critical for

the development of collagen induced arthritis in mice, Annual European Congress of Rheumatology, 2015年6月10-13日, Rome (Italy)

- ⑬ 櫻庭康司, 藤村謙次郎, 小山田亜希子, 宮原寿明, 岩本幸英, 山田久方 コラーゲン誘導関節炎の発症には B 細胞への IL-21 シグナルが重要な役割を果たす, 第59回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2015年4月23-25日 (名古屋)
- ⑭ 嘉村聡志, 江崎幸雄, 平田剛, 櫻庭康司, 藤村謙次郎, 井浦広貴, 太田昌成, 牛尾哲郎, 宮原寿明 関節リウマチ手関節病変に対する遠位橈尺関節形成術後の X線変化についての検討 第59回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2015年4月23-25日 (名古屋)
- ⑮ 江崎幸雄, 井浦広貴, 藤村謙次郎, 嘉村聡志, 櫻庭康司, 太田昌成, 平田剛, 宮原寿明 関節リウマチ患者に生じた非定型大腿骨骨折の検討 第59回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2015年4月23-25日 (名古屋)

[図書] (計1件)

- ① 櫻庭康司, 山田久方, 科学評論社, リウマチ科, 55(1):108-114 2016

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

櫻庭康司 (SAKURABA, Koji)

国立病院機構九州医療センター・臨床研究センター・その他

研究者番号: 00747579

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし

### (4) 研究協力者

山田久方 (YAMADA, Hisakata)

岩本幸英 (IWAMOTO, Yukihide)

中島康晴 (NAKASHIMA, Yasuharu)

宮原寿明 (MIYAHARA, Hisaaki)

吉開泰信 (YOSHIKAI, Yasunobu)

江崎幸雄 (ESAKI, Yukio)

福士純一 (FUKUSHI, Jun-ichi)

大石正信 (OISHI, Masanobu)

小山田亜希子 (OYAMADA, Akiko)

藤村謙次郎 (FUJIMURA, Kenjiro)

甲斐一広 (KAI, Kazuhiro)

SPOLSKI Rosanne

LEONARD Warren J.