

令和元年6月10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09889

研究課題名(和文) 新規線維芽細胞サブセットを標的とした関節リウマチ治療法開発への挑戦

研究課題名(英文) Development of new therapeutic strategies targeting rheumatoid arthritis-associated fibroblast subset

研究代表者

溝口 史高 (Mizoguchi, Fumitaka)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60510360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：これまで私たちは関節リウマチ(RA)の病態において重要な役割を担う滑膜線維芽細胞が、機能的に異なる複数のサブセットから構成され、その中でCD34-THY1+という細胞表面分子の発現によって同定されるサブセットが増生し、病態に関与している事を明らかにしてきた。本研究では、これらのサブセットの機能の違いを詳細に解析し、CD34-THY1+サブセットは組織傷害に寄与し、更にCD34+サブセットは滑膜組織での炎症を引き起こす主要細胞としてRAの病態に関与していることを明らかにした。更に、サブセット間で発現レベルが異なる遺伝子に着目し、病的な線維芽細胞サブセットの増生や機能を調節する遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、RA関連滑膜線維芽細胞サブセットの機能や増生を抑えることを作用機序とする、新たな治療戦略の開発へとつながることが期待される。このような治療は既存の治療薬によっても改善が得られない患者や、合併症のために治療が困難な患者への選択肢として、RA診療の抱える課題の克服へとつながることが期待される。更に、線維芽細胞は間質性肺炎や肝硬変、慢性腎不全など数多くの炎症性疾患や慢性の臓器障害をきたす疾患において重要な役割を担うことが知られており、線維芽細胞による疾患制御という新たな領域を切り開く成果になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have reported that synovial fibroblasts consist of three major subsets with distinct functions. One fibroblast subset, characterized by CD34-THY1+, is expanded in patients with rheumatoid arthritis (RA) compared to those with osteoarthritis. These fibroblasts are proliferative, express high level of proteinases and RANKL, a crucial cytokine for osteoclastogenesis, and have a phenotype characteristic of invasive cells, indicating the pathogenic roles in RA. CD34+ subset is characterized by the high expression of inflammatory cytokines. To identify candidate target genes for the development of fibroblast-targeting therapy, we focused on the differentially expressed transcription factors (TFs) across fibroblast subsets. We performed in vitro assays using siRNAs to knock down the expression of the TFs, and found new TFs to regulate the fibroblast functions.

研究分野：膠原病・リウマチ内科学

キーワード：関節リウマチ 線維芽細胞 滑膜組織

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 関節リウマチ(RA)に対する治療の現状と課題:

分子標的治療の登場によりRAの治療は大きく改善した。しかしいずれの薬剤によっても十分な疾患活動性のコントロールが得られない患者も依然多い。更にこれらの治療薬は免疫・炎症を制御する分子を標的としていることから、免疫抑制による感染症のリスクを伴う。これらの課題を克服すべく、様々な分子を標的とした治療が開発され臨床試験が進められているが、既存の薬剤を上回る治療効果と安全性とを兼ね備えた薬剤は出てきていないのが現状である。このような限界を克服するためには、既存の手法とは異なる新たな方法による治療標的分子の同定が必要である。

(2) 新規治療法開発のための既存の手法とその限界:

RAを始めとする自己免疫疾患の治療法開発の手法として、免疫や炎症の制御に関する特定の分子に着目し、その発現量を患者の末梢血や組織検体にて確認し、さらにその機能や治療標的としての可能性を培養細胞や疾患モデル動物を用いて検証した後に、臨床試験に移行するのが代表的である。このような手法は様々な疾患の病態解明に貢献してきた一方で、前臨床段階では有効性が期待された薬剤であっても、臨床試験で有効性を示すことができる薬剤はわずかに過ぎず、その効率の低さが問題となっている。

このような問題点を克服する手法として、実際の患者検体や臨床データを対象とした網羅的解析は治療標的となる候補分子を同定するために有用と考えられる。ゲノムワイド関連解析によって100を超える疾患感受性遺伝子が同定されたことはその成功例と考えられるが、実際に治療標的分子の同定という観点では臨床応用へとつながる成果はまだ得られておらず、その候補を拾い上げることができたに過ぎない。患者検体を用いた別のアプローチとして、患者由来組織や細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析も行われているが、新たな疾患関連分子の同定や病態解明へとつながる成果は必ずしも得られていない。この原因として、検体に含まれる細胞の多様性のために病態の鍵となる個々の細胞における遺伝子発現変化の同定が困難であることが大きな一因と考えられる。

(3) 罹患組織からの新鮮単離細胞の解析による、新規治療標的の同定への挑戦:

新規治療法開発におけるこれらの限界を克服する新たなアプローチとして、私たちはRAの罹患組織である関節滑膜組織に存在する細胞を酵素処理により単離・回収し、個々の細胞のタンパク発現と遺伝子発現を培養を経ずに即座に解析する手法を確立した(Donlin et al. *Arthritis Res Ther.* 2018, Mizoguchi et al. *Nature Communications* 2018)。この手法により、既存の方法では同定が困難であった、実際の疾患の罹患組織局所における細胞機能とその特徴とを高い解像度で描き出すことが可能となる。本研究では、RAの滑膜組織において病態の中心を担う滑膜線維芽細胞を本手法により解析し、新たな治療標的となる細胞・分子を同定することを目指し検討を行った。

(4) RAの新たな治療標的としての線維芽細胞:

RAの新規治療戦略を考える上で、どの細胞種を標的とするかによって治療効果・安全性は大きく左右される。滑膜線維芽細胞はRAにおいて関節局所における炎症の増幅や骨・軟骨破壊、他の免疫細胞や血管新生の制御など多彩な役割を担っており、有望な治療標的細胞であると考えられる。更に、線維芽細胞を標的とした治療は免疫抑制を直接の作用機序としない、安全性をも兼ね備えた治療となることも期待される。

(5) 線維芽細胞のサブセット仮説:

これまで一般に、線維芽細胞は漠然と単一の細胞種として記述をされてきた。しかし、RAの病態において線維芽細胞は滑膜組織において多くの細胞種と相互作用し、様々なレベルで重要な役割を持っていることから、私たちは線維芽細胞もT細胞を始めとする他の免疫細胞と同様に、異なる機能を持った複数のサブセットから構成されているとの仮説を立て、検討を行った。線維芽細胞のサブセットを明らかにし、その中で病的サブセットを同定することができれば、有効な線維芽細胞標的療法へとつながることが期待される。

(6) 線維芽細胞の多様性の解明とRA関連線維芽細胞サブセットの同定:

私たちははこれまで、関節組織における線維芽細胞の多様性とサブセットの有無を検証するため、滑膜組織から採取した新鮮単離細胞中の線維芽細胞に発現する細胞表面分子をフローサイトメーターにてスクリーニングした。その結果、滑膜組織中の線維芽細胞に発現する細胞表面分子の発現パターンは様々であり、複数種類の細胞群に分けることができることを確認した(Mizoguchi et al. *Nature Communications* 2018)。これらの細胞群間の遺伝子発現を網羅的に解析し、遺伝子発現パターンの類似性に基づいて分類をしたところ、滑膜線維芽細胞はCD34-THY1-, CD34-THY1+, CD34+にて同定される3つの主要サブセットから構成されることが明らかとなった。これらのサブセット間でのサイトカイン・ケモカイン・プロテアーゼなどの発現レベルは大きく異なり、機能的にも異なることが明らかとなった。特にCD34-THY1+サブセットはRAの滑膜組織では血管周囲に増生し、組織傷害に寄与するMMPをはじめとする様々なプロテアーゼや、骨破壊を引き起こす破骨細胞の分化や活性化に重要なサイトカインであるRANKLを高発現しており、RAの病態に重要な役割を担っていると考えられた。

2. 研究の目的

本研究ではこの“RA関連線維芽細胞サブセット”の、形成や機能を制御する分子ネットワーク

を明らかにすることにより、新規治療標的分子の同定へとつなげるための基礎的データを得ることを目的に検討を行った。

3. 研究の方法

(1) RA 関連線維芽細胞サブセットの機能解析：

滑膜組織に存在する線維芽細胞の3つの主要サブセットが実際に機能的に異なることを確認するため、滑膜組織をコラゲナーゼにより酵素処理することにより単離した細胞を用いて検討を行った。細胞増殖能の違いは、Ki-67 染色により評価した。また、組織より単離した各線維芽細胞をサブセットを培養し、プロテアーゼ産生能、サイトカイン産生能、細胞外基質含有ゲルへの浸潤能、破骨細胞分化の促進能について評価を行った。

(2) RA 関連線維芽細胞サブセットの機能調節を担う候補遺伝子の同定：

新鮮単離滑膜細胞より得た線維芽細胞サブセットの網羅的遺伝子発現解析データをもとに、サブセット間で発現レベルの異なる遺伝子に着目し、RA 関連線維芽細胞サブセットの機能調節を担うと考えられる候補遺伝子を同定した。

(3) RA 関連線維芽細胞サブセットの機能調節を担うと考えられる候補遺伝子の機能解析：

RA 滑膜組織より樹立した滑膜線維芽細胞株を用いて検討を行った。RA 関連線維芽細胞サブセットの機能調節を担うと考えられる候補遺伝子の、RA 滑膜線維芽細胞株における発現を siRNA にてノックダウンし、サイトカイン・プロテアーゼ産生や、細胞増殖能、遊走能の評価を行った。

(4) 線維芽細胞サブセットの組織修復能の差異の検討：

滑膜線維芽細胞を標的とした治療戦略を開発するにあたり、その作用機序は滑膜線維芽細胞の病的機能を抑制し、更に組織修復能を高めることが理想的である。そこで、主要な3種類の滑膜線維芽細胞サブセットを培養下で増殖させた後に、軟骨・骨・脂肪細胞への分化条件で培養し、各細胞への分化能の違いを検討した。

4. 研究成果

(1) RA 関連線維芽細胞サブセットの機能解析：

滑膜組織より単離した線維芽細胞サブセットの Ki-67 陽性細胞の割合は CD34-THY1-サブセットと比較して、CD34-THY1+サブセットと CD34+サブセットにおいて高く、CD34-THY1+サブセットと CD34+サブセットは細胞増殖能が高いことが明らかとなった。

また、滑膜組織より単離した線維芽細胞サブセットを培養した後に、TNF 存在下で培養し、上清中のサイトカインを測定したところ、CD34+サブセットは他のサブセットと比べ IL-6 や CXCL12, CCL2 を多く産生することが確認された。

CD34-THY1+サブセットは CD34-THY-サブセットと比べ CXCL12 の産生能が高く、更に他のサブセットと比較して RANKL の発現が高値であった。そこで破骨細胞分化促進能の評価を行うため、末梢血単球と各線維芽細胞サブセットとを破骨細胞分化条件にて共培養したところ、CD34-THY1+サブセットでは CD34+サブセットと比較して形成された破骨細胞の数が多く認められた。また、組織への浸潤能を評価するため、細胞外基質含有ゲルへの浸潤能を評価したところ、CD34-THY1-サブセットと比較して、CD34-THY1+サブセットと CD34+サブセットは浸潤能が高かった。

一方、CD34-THY1-サブセットは TNF 存在下での MMP-1, MMP-3 の産生能が高かった。

これらの事から、私たちが同定した3つの線維芽細胞サブセットは機能的に異なり、CD34-THY1+サブセットは組織傷害に寄与し、CD34+サブセットは滑膜組織での炎症を引き起こす主要細胞として RA の病態に関与していると考えられた。この成果は Nature Communications 誌に発表を行った。

(2) RA 関連線維芽細胞サブセットの機能調節を担う候補遺伝子の同定：

RA もしくは変形性関節症(OA)患者の滑膜組織より単離した線維芽細胞サブセットの網羅的遺伝子発現データを用い、サブセット間で発現レベルの異なる転写因子を同定した。

(3) RA 関連線維芽細胞サブセットの機能調節を担うと考えられる候補遺伝子の機能解析：

RA 患者の滑膜組織から樹立した滑膜線維芽細胞株を用い、(2)で着目した転写因子の発現をそれぞれ siRNA を用いて低下させ、線維芽細胞機能の変化を解析した。その結果、炎症性サイトカインの発現制御など線維芽細胞機能制御に関わる新規転写因子を複数同定した。現在、更に多くの転写因子の寄与についてスクリーニングを行うとともに、機能解析を進めている。

また、RA 関連線維芽細胞サブセットに高発現する転写因子の発現と機能調節に関わる上流の受容体に対するリガンドが、炎症性サイトカインとの共存下では線維芽細胞の病的機能を促進することを見出し、現在その分子機構の解析を進めている。

(4) 線維芽細胞サブセットの組織修復能の差異の検討：

滑膜組織より単離した3種の滑膜線維芽細胞サブセットを培養下で増殖させた後に、軟骨・骨・脂肪細胞への分化条件で培養した。3種のサブセット間で、特定の細胞への分化能は異なり、現在その分子メカニズムの解明を進めている。

これらの成果は、線維芽細胞を標的とした新たな治療薬の開発へとつながると考えられ、研究を継続している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Zhang F, Wei K, Slowikowski K, Fonseka CY, Rao DA, Kelly S, Goodman SM, Tabechian D, Hughes LB, Salomon-Escoto K, Watts GFM, Jonsson AH, Rangel-Moreno J, Meednu N, Rozo C, Apruzzese W, Eisenhaure TM, Lieb DJ, Boyle DL, Mandelin AM 2nd; Accelerating Medicines Partnership Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus (AMP RA/SLE) Consortium, Boyce BF, DiCarlo E, Gravallese EM, Gregersen PK, Moreland L, Firestein GS, Hacohen N, Nusbaum C, Lederer JA, Perlman H, Pitzalis C, Filer A, Holers VM, Bykerk VP, Donlin LT, Anolik JH, Brenner MB, Raychaudhuri S. Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry. *Nat Immunol.* 2019. doi: 10.1038/s41590-019-0378-1. PubMed PMID: 31061532. 査読有

溝口史高. 滑膜組織と滑膜細胞の遺伝子発現解析による関節リウマチの病態解明 リウマチ科. 2018.12; 60 (6): 628-634. 査読無

Donlin LT, Rao DA, Wei K, Slowikowski K, McGeachy MJ, Turner JD, Meednu N, Mizoguchi F, Gutierrez-Arcelus M, Lieb DJ, Keegan J, Muskat K, Hillman J, Rozo C, Ricker E, Eisenhaure TM, Li S, Browne EP, Chicoine A, Sutherby D, Noma A; Accelerating Medicines Partnership RA/SLE Network, Nusbaum C, Kelly S, Pernis AB, Ivashkiv LB, Goodman SM, Robinson WH, Utz PJ, Lederer JA, Gravallese EM, Boyce BF, Hacohen N, Pitzalis C, Gregersen PK, Firestein GS, Raychaudhuri S, Moreland LW, Holers VM, Bykerk VP, Filer A, Boyle DL, Brenner MB, Anolik JH. Methods for high-dimensional analysis of cells dissociated from cryopreserved synovial tissue. *Arthritis Res Ther.* 2018;20(1):139. doi: 10.1186/s13075-018-1631-y. PubMed PMID: 29996944; PubMed Central PMCID: PMC6042350. 査読有

Mizoguchi F, Slowikowski K, Wei K, Marshall JL, Rao DA, Chang SK, Nguyen HN, Noss EH, Turner JD, Earp BE, Blazar PE, Wright J, Simmons BP, Donlin LT, Kalliolias GD, Goodman SM, Bykerk VP, Ivashkiv LB, Lederer JA, Hacohen N, Nigrovic PA, Filer A, Buckley CD, Raychaudhuri S, Brenner MB. Functionally distinct disease-associated fibroblast subsets in rheumatoid arthritis. *Nat Commun.* 2018;9(1):789. doi: 10.1038/s41467-018-02892-y. PubMed PMID: 29476097; PubMed Central PMCID: PMC5824882. 査読有

[学会発表](計 9 件)

溝口史高. シングルセル解析による線維芽細胞亜群の同定と関節リウマチの病態解析. 第46回日本臨床免疫学会総会 2018.11.09

溝口史高. 関節リウマチ滑膜病理の脱構築による病態解析. 第4回 JCR ベーシックリサーチカンファレンス 2017.10.13

溝口史高、小宮陽仁、上阪等. IL6 を高産生する線維芽細胞サブセットを制御する転写因子の同定. 第45回臨床免疫学会総会 2017.09.29

溝口史高. シングルセル解析による線維芽細胞サブセットの同定と関節リウマチの病態解析. 第35回日本骨代謝学会学術集会 2017.07.27

溝口史高. 単一細胞解析による関節リウマチの病態を担う線維芽細胞サブセットの同定. 第61回日本リウマチ学会総会・学術集会 2017.04.21

溝口史高. 関節リウマチの病態を担う新規線維芽細胞サブセットの同定. 日本臨床免疫学会 Midwinter Seminar XI 2017.02.24

Fumitaka Mizoguchi, Hisanori Hasegawa, and Hitoshi Kohsaka. Functional Screening of MicroRNAs Using the Inhibitor Library Identified MicroRNAs to Regulate Expression of MMP-3 and IL-6 in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. 2016 American College of Rheumatology/ Association of Rheumatology Health Professionals Annual Meeting 2016.11.14

溝口史高. シングルセル解析による関節リウマチの病態を担う線維芽細胞サブセットの同定. 第44回臨床免疫学会総会 2016.09.08

Fumitaka Mizoguchi, Kamil Slowikowski, Soumya Raychaudhuri, Michael B Brenner. Single cell transcriptomics and protein expression analysis define disease-specific fibroblast subsets in rheumatoid arthritis joint tissue. Second Osteoimmunology conference 2016.07.06

[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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。