

令和元年6月24日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09912

研究課題名(和文) CD163陽性M2マクロファージの関節炎における機能解析と治療への応用

研究課題名(英文) The involvement of M2 CD163 positive macrophages in the development of arthritis

研究代表者

海江田 信二郎 (kaieda, Shinjiro)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：20330798

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)：マウスコラーゲン誘導関節炎(CAIA)を用い、CD163 KOマウスで関節炎症が増悪し、CD163陽性マクロファージは関節炎症抑制的に作用することを明らかにした。CD163 KOマウスで関節炎局所への炎症細胞浸潤を著明に認め、ケモカインCXCL1の有意な上昇を伴うことからケモカイン産生を介した関節炎症誘導に關する可能性が考えられた。さらに炎症性サイトカイン産生に關して検討を行い、CD163 KOマウス関節炎局所でIL-6やIL-1などの発現亢進をRNAレベルで確認し炎症性サイトカイン産生抑制に作用する可能性が考えられる。研究成果を現在論文投稿中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

われわれはマウス関節炎実験で、CD163マクロファージ欠損による炎症性サイトカイン発現上昇を介した関節炎症増悪を確認し、CD163陽性マクロファージは関節炎症抑制的に作用することを明らかにした。CD163 KOマウスを用いた関節炎実験の報告はなく、本研究は独創的であり、マクロファージのM2分化調整を介した新規治療法開発への進展が期待される。マクロファージは生体内のすべての組織に存在し、その局所における環境因子により分化・成熟し、様々な病態・疾患(動脈硬化肥満腫瘍感染症など)に關与する。関節炎のみならず、他の疾患への治療応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：CD163 KO mice significantly exhibited the exacerbation of clinical scores during arthritis, when compared with control WT B6 mice. Histomorphometric quantification of the arthritic changes in the joint tissues confirmed the clinical assessment, with significant increases in inflammation and bone erosion scores in CD163 KO mice. CD163 deficiency exacerbates disease severity in an autoantibody-induced arthritis via up-regulation of synovial tissue IL-1 and IL-6. Further, CD163 positive macrophage deficiency induced neutrophil recruitment via up-regulation of CXCL1 in inflamed synovium. CD163-positive macrophages may play as an inhibitor in the pathogenesis of joint inflammation.

研究分野：リウマチ膠原病

キーワード：関節炎 CD163陽性マクロファージ ケモカイン 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

関節滑膜部マクロファージは、関節炎症部で活性化し、滑膜細胞の約 30-40%を占める主要細胞集団となり関節炎増悪に中心的な役割を果たす(N ENG J MED 365;2205-2219,2011)。TNF- α や IL-6 を標的とした生物学的製剤による優れた治療効果が示される一方で、約 30%の関節リウマチ患者は治療効果不十分もしくは治療による副作用のため、寛解に達することが不可能である。関節滑膜部における主要細胞集団、特にマクロファージを直接的に抑制する新規関節炎治療の確立が望まれる。マクロファージは TNF- α 、IL-1 β 、IL-6などを産生し、炎症促進的に作用する M1 型と IL-10 や TGF- β などのサイトカインを分泌する炎症抑制性の M2 型に分類される (Nat Immunol 11;889-896, 2010)。その病態関与について腫瘍、感染症、動脈硬化および肥満などで報告されているが、関節炎における詳細は明らかでない。CD163 陽性 M2 マクロファージの関節炎における詳細な役割は不明であり、骨破壊への影響、炎症性シグナルへの反応性について解析が必要である。

2. 研究の目的

M2 マクロファージの関節炎病態への関与についてメカニズム解析を行う。M2CD163 陽性マクロファージを標的とした関節炎に対する新規治療法確立を目標に本研究を立案した。

3. 研究の方法

(1) マウス関節炎モデルにおける M1/M2 マクロファージ発現解析

抗 type II collagen 抗体 500 μ g 経静脈投与を行い、3 日後 LPS 50 μ g 腹腔内投与し CAIA を誘導する。関節炎初期(day4)および完成期(day10-12)の関節局所 M2 マクロファージ(CD163 陽性細胞)発現を免疫化学染色により評価した。また RT-PCR 法を用い M1/M2 マクロファージの遺伝子マーカーについて発現を評価した。

(2) CD163 KO/WT マウスにおける骨破壊重症度の病理組織学的評価

CAIA 完成期に両側足関節を除去し、脱灰・ホルマリン固定を行う。H.E 染色を行い炎症細胞浸潤、骨びらんおよび骨破壊の重症度を病理組織学的にスコア化し、CD163 KO/WT マウスで比較、M2 マクロファージの骨破壊への関与について評価を行った。

(3) 骨髄由来 CD163 KO/WT マクロファージの炎症性シグナルへの反応性評価

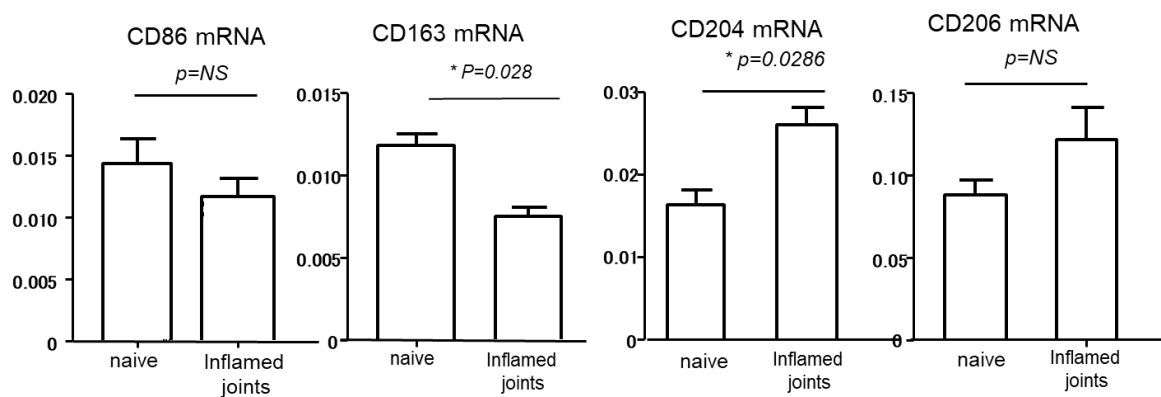
CD163KO/WT マウスの骨髄細胞から GM-CSF 刺激下でマクロファージを誘導した。免疫複合体刺激(IgG 固着化刺激)を行い、その活性化を培養液中サイトカイン(IL-6、TNF- α) ELISA 測定により評価した。

(4) 関節滑膜部から RNA を抽出し、炎症性サイトカインおよびケモカイン産生について RT-PCR 法により評価を行い CD163KO マウスにおける関節炎増悪メカニズム解析を行った。

4. 研究成果

(1) マウス関節炎モデルにおける M1/M2 マクロファージ発現解析

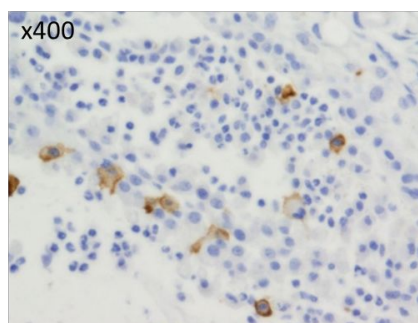
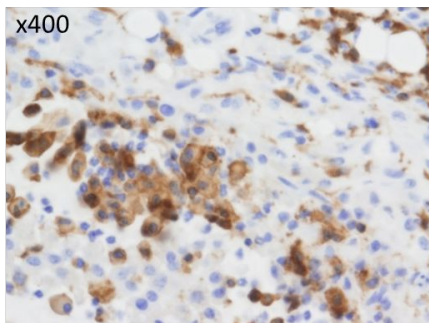
M1 マーカー-CD86 の有意な発現上昇は認めなかった。M2 マーカーでは CD204 mRNA は有意な上昇を認めたと CD163 mRNA は有意に低下し、一定の傾向は認めなかった。滑膜組織全体の遺伝子発現と比較したことが要因と思われる。



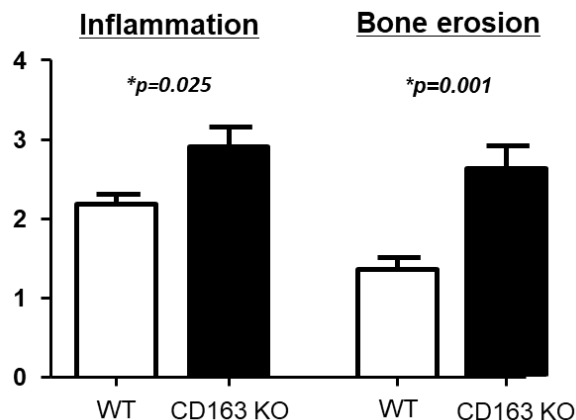
マウス関節炎組織で免疫染色を行い、関節組織で CD163 陽性マクロファージの増多を確認した。

Iba-1-positive(brown):macrophage

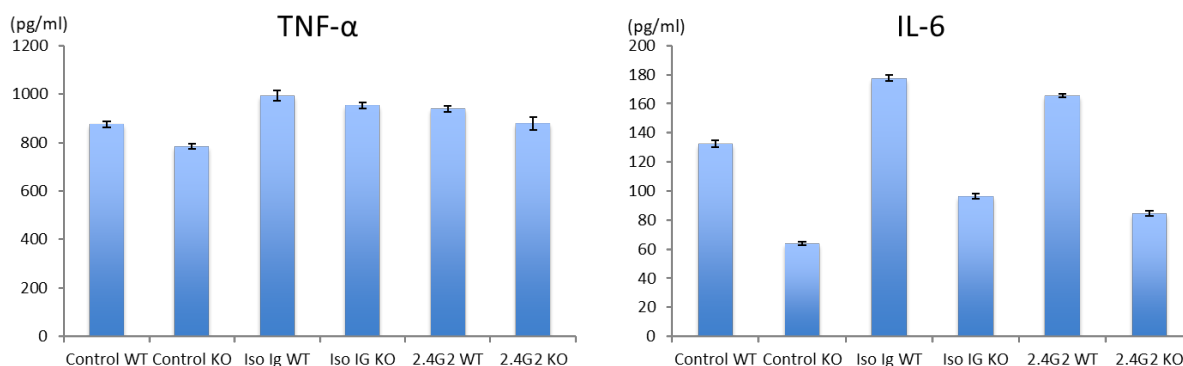
CD163-positive cells (brown)



(2) CD163 KO/WT マウスにおける骨破壊重症度の病理組織学的評価
 CD163KO マウスで炎症細胞浸潤や骨びらんを有意に強く認め、CD163 陽性マクロファージがそれらに抑制的に作用することを確認した。

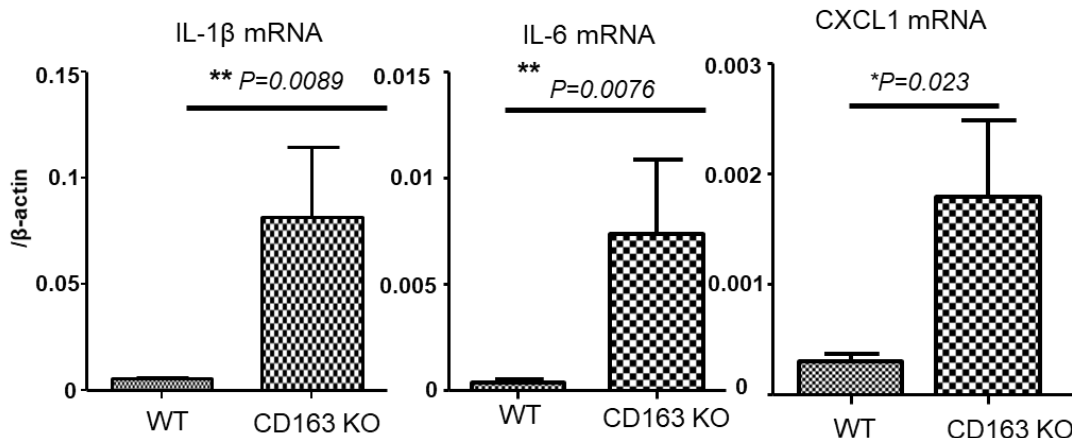


(3) 骨髄由来 CD163 KO/WT マクロファージの炎症性シグナルへの反応性評価
 IgG 固相化刺激を行い WT CD163 KO マクロファージの反応性の違いについて検討した。刺激後 TNF および IL-6 の産生を ELISA 法で測定を行った。しかし WT CD163 KO マクロファージにおいて有意な違いを認めなかった。しかし LSP 刺激では CD163KO マクロファージで有意な炎症性サイトカイン上昇を認めている (Komohara et al unpublished data)。



(4) 関節炎局所における炎症性サイトカインおよびケモカインの発現

CD163KO マウス関節炎局所における IL-1、IL6 および CXCL1 の有意な発現上昇をみとめた。病理組織学的検討に一致し、CD163 陽性マクロファージは IL-1、IL6 産生抑制的に作用し、骨びらんなどの骨破壊進展を軽減させることが示唆された。また CXCL1 の産生を抑制し、炎症細胞遊走を抑制し、関節炎に抑制的に作用することが明らかとなった。



これらの結果から CD163 陽性 M2 マクロファージは関節炎抑制的に作用するためマクロファージを M2 優位に分化誘導することで関節炎を抑制する新規治療法の確立が期待される。今後はマクロファージと滑膜細胞との機能的な関係性について in vitro 共培養実験でさらなる検討を行う予定である。この研究成果については現在論文投稿中である。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 20 件)

Okamoto M, Fujimoto K, Sadohara J, Furuya K, Kaieda S, Miyamura T, Suematsu E, Kitasato Y, Kawayama T, Ida H, Ichiki M, Hoshino T. A retrospective cohort study of outcome in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *Respir Investig.* 54:445-453, 2016(査読有)

Yoshida N, Okamoto M, Kaieda S, Fujimoto K, Ebata T, Tajiri M, Nakamura M, Tominaga M, Wakasugi D, Kawayama T, Kuwana M, Mimori T, Ida H, Hoshino T. Association of anti-aminoacyl-transfer RNA synthetase antibody and anti-melanoma differentiation-associated gene 5 antibody with the therapeutic response of polymyositis/dermatomyositis-associated interstitial lung disease. *Respir Investig.* ;55:24-32, 2017(査読有)

Tominaga M, Okamoto M, Kawayama T, Matsuoka M, Kaieda S, Sakazaki Y, Kinoshita T, Mori D, Inoue A, Hoshino T. Overexpression of IL-38 protein in anticancer drug-induced lung injury and acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Investig* 55:293-299, 2017(査読有)

Sato S, Masui K, Nishina N, Kawaguchi Y, Kawakami A, Tamura M, Ikeda K, Nunokawa T, Tanino Y, Asakawa K, Kaneko Y, Gono T, Ukichi T, Kaieda S, Naniwa T, Kuwana M; JAMI investigators. Initial predictors of poor survival in myositis-associated interstitial lung disease: a multicentre cohort of 497 patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2018, in press (査読有)

Sakamoto S, Kaieda S*, Okamoto M*, Fujimoto K, Nagata S, Tominaga M, Nakamura M, Zaizen Y, Nouno T, Koga T, Kawayama T, Kuwana M, Ida H, Hoshino T. Low positive titer of anti-melanoma differentiation-associated gene 5 antibody is not associated with a poor long-term outcome of interstitial lung disease in patients with dermatomyositis. *Respir Investig.* 56:464-472, 2018 (*Authors equally contributed to this work) (査読有)

Tajiri M, Tominaga M, Kinoshita T, Nakamura M, Kaieda S, Okamoto M, Ida H, Kawayama T, Hoshino T. Clinical Characteristics of Relapsing Polychondritis: A Report of 8 Cases in Japan. *Kurume Med J.* 16;65(2):47-53, 2019 (査読有)

Matsuoka M, Kawayama T, Tominaga M, Kaieda S, Tokunaga Y, Kaku Y, Imaoka H, Kinoshita T, Okamoto M, Akiba J, Hoshino T. Attenuated Airway Eosinophilic Inflammations in IL-38 Knockout Mouse Model. *Kurume Med J.* 16;65:37-46, 2019(査読有)

Nakamura M, Okamoto M, Fujimoto K, Ebata T, Tominaga M, Nouno T, Zaizen Y, Kaieda S, Tsuda T, Kawayama T, Hoshino T. A retrospective study of the tolerability of nintedanib for severe idiopathic pulmonary fibrosis in the real world. *Ann Transl Med.* 2019, in press(査読有)

Yoshida N, Kaieda S, Tomozoe K, Tajiri M, Wakasugi D, Okamoto M, Tominaga M, Ida H, Hoshino T. An Autopsy Case of Anti-melanoma Differentiation-associated Gene-5 Antibody-positive Clinical Amyopathic Dermatomyositis Complicated by Rapidly Progressive Interstitial Lung Disease. *Intern Med.* 55:1653-9, 2016(査読有)

Kaieda S, Yoshida N, Minezaki M, Ushijima S, Wakasugi D, Miura S, Uchiyama Y, Ida H, Hoshino T. The Successful Treatment of Myeloperoxidase Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-positive Hypertrophic Pachymeningitis in Patients with the Limited Form of Granulomatosis with Polyangiitis Using Methotrexate: Two Case Reports. *Intern Med.* 56:959-965, 2016(査読有)

Kaieda S, Okamoto M, Miura S, Ida H. Magnetic Resonance Imaging of Dermatomyositis with Bilateral Involvement of the Erector Spinae Muscle *The Ewha Medical* 39:93-94, 2016(査読有)

Koga T, Kaieda S, Okamoto M, Masuda K, Fujimoto K, Sakamoto S, Nakamura M, Tominaga M,

Kawayama T, Fujimoto K, Hoshino T, Ida H. Successful Treatment of Rapidly Progressive Unclassifiable Idiopathic Interstitial Pneumonia with Anti-melanoma Differentiation-associated Gene-5 Antibody by Intensive Immunosuppressive Therapy. Intern Med. 1;57:1039-1043, 2018(査読有)

Sugi S, Kaieda S, Irie KI, Ida H. Limbic Encephalitis in Association with Systemic Lupus Erythematosus. Intern Med. 57:3059, 2018(査読有)

Yaita K, Sugi S, Hayashi M, Koga T, Ebata T, Sakai Y, Kaieda S, Ida H, Watanabe H. The co-existence of Lemierre's syndrome and Bezold's abscesses due to Streptococcus constellatus: A case report. Medicine (Baltimore). 97(26):e11228, 2018(査読有)

藤崎可菜、松隈健、河野光一郎、久保沙代、那須洋紀、桃崎正啓、寺田貴武、西尾真、津田尚武、駒井幹、海江田信二郎、牛嶋公生：皮膚筋炎の診断を契機に子宮体癌が発見された腫瘍随伴症候群の1例：福岡産科婦人科学会雑誌 42：13 - 15, 2018(査読有)

Ito S, Tahara N, Hirakata S, Kaieda S, Tahara A, Maeda-Ogata S, Bekki M, Sugiyama Y, Honda A, Igata S, Kuromatsu R, Nakashima O, Fukumoto Y. Signal intensity of superb micro-vascular imaging associates with the activity of vascular inflammation in Takayasu arteritis. J Nucl Cardiol 2019, in press(査読有)

Yoshida Y, Kaieda S, Furuta T, Ida H. Juxta-vertebral Lesions Associated with Granulomatosis with Polyangiitis. Intern Med. 2019, in press(査読有)

海江田信二郎 Mast cell と関節リウマチ. アレルギーの臨床 35：446 - 449, 2016. (査読無)

海江田信二郎 Mast cell と関節炎. アレルギーの臨床 36:682-685, 2016. (査読無)

海江田信二郎 肥満細胞と炎症 リウマチ科 58:508-511, 2017. (査読無)

〔学会発表〕(計 17 件)

海江田信二郎、藤本京子、古賀琢真、林真樹子、吉田裕美、井田弘明 シェーグレン症候群に対するマスト細胞の関与 第 63 回日本リウマチ学会総会・学術総会. 2019.4.15-17 京都

古賀琢真、林真樹子、吉田裕美、海江田信二郎、井田弘明 抗 MDA5 抗体陽性皮膚筋炎合併間質性肺障害に対する IVCY 早期導入の意義 第 63 回日本リウマチ学会総会・学術総会. 2019.4.15-17 京都

林真樹子、藤本京子、古賀琢真、吉田裕美、海江田信二郎、井田弘明 当院における多発血管炎性肉芽腫症に対するリツキシマブの有効性と安全性の検討 第 63 回日本リウマチ学会総会・学術総会. 2019.4.15-17 京都

藤本京子、日高由紀子、吉田裕美、古賀琢真、林真樹子、海江田信二郎、山崎聡士、井田弘明 不明熱患者における 22 の自己炎症症候群疾患遺伝子の解析 第 63 回日本リウマチ学会総会・学術総会. 2019.4.15-17 京都

吉田裕美、杉鈴奈、古賀琢真、林真樹子、海江田信二郎、井田弘明 抗 TIF1 抗体陽性腫瘍随伴皮膚筋炎の臨床的特徴 第 63 回日本リウマチ学会総会・学術総会. 2019.4.15-17 京都

海江田信二郎、藤本京子、岡元昌樹、富永正樹、星野友昭、井田弘明. マスト細胞のシェーグレン症候群への関与. 第 62 回日本リウマチ学会総会・学術総会. 2018.4.26-28 東京都

古賀琢真、杉鈴奈、林真樹子、藤本京子、岡元昌樹、海江田信二郎、富永正樹、星野友昭、井田弘明. 抗 MDA5 抗体陽性筋炎合併間質性肺炎に対する免疫抑制療法における日和見感染対策. 第 62 回日本リウマチ学会総会・学術総会. 2018.4.26-28 東京都

林真樹子、藤本京子、海江田信二郎、吉田裕美、杉 鈴奈、古賀琢真、日高由紀子、星野友昭、井田弘明. 当院における多発血管炎性肉芽腫症に対するリツキシマブ治療効果の検討. 第 62 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2018.4.26-28 東京都

日高由紀子、山崎聡士、藤本京子、古賀琢真、吉田直実、中島宗敏、海江田信二郎、西小森隆太、井田弘明. 不明熱患者における自己炎症症候群 11 疾患遺伝子の網羅的解析. 第 62 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2018.4.26-28 東京都

藤本京子、日高由紀子、林真樹子、杉 鈴奈、古賀琢真、海江田信二郎、星野友昭、山崎聡士、井田弘明. 当科で経験した家族性地中海熱 22 例の検討. 第 62 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2018.4.26-28 東京都

古賀琢真、杉鈴奈、林真樹子、藤本京子、矢野千葉、内藤佳子、坂崎優樹、岡元昌樹、海江田信二郎、

富永正樹、星野友昭、井田弘明．抗 MDA-5 抗体陽性分類不能型特発性間質性肺炎の 1 例．第 55 回九州リウマチ学会 2018.3.3-4 那覇市

吉田裕美、古賀琢眞、藤本京子、杉鈴奈、林真樹子、海江田信二郎、星野友昭、井田弘明．子宮体癌と肝細胞癌を重複した抗 TIF1- 抗体陽性の腫瘍随伴皮膚筋炎の 1 例．第 55 回九州リウマチ学会 2018.3.3-4 那覇市

林真樹子、杉鈴奈、藤本京子、古賀琢眞、日高由紀子、海江田信二郎、星野友昭、井田弘明．難治性皮膚潰瘍を呈する悪性関節リウマチに対し IVCY が有効であった 1 例 第 55 回九州リウマチ学会 2018.3.3-4 那覇市

Shinjiro Kaieda, Hiroaki Ida, Tomoaki Hoshino. Involvement of CD163-Positive Macrophages in the Pathogenesis of Arthritis Via Modulation of Inflammatory Cytokine and Chemokine Expression in the Synovium of a Murine Model. 80th Annual Scientific Meeting on American College of Rheumatology, Washington D.C, USA. 2016.

Shinjiro Kaieda, Kyoko Fujimoto, Masaki Okamoto, Masaki Tominaga, Tomoaki Hoshino, Hiroaki Ida. Mast Cells Are Involved in the Pathogenesis of Sjögren Syndrome By Inducing Tissue Fibrosis. 81th Annual Scientific Meeting on American College of Rheumatology, San Diego, USA. 2017.

Shinjiro Kaieda, Naomi Yoshida, Takuma Koga, Kyoko Fujimoto, Hiroaki Ida, Tomoaki Hoshino. The Successful Treatment of Myeloperoxidase Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-positive Hypertrophic Pachymeningitis in Patients with the Limited Form of Granulomatosis with Polyangiitis Using Methotrexate: Two Case Reports. The 18TH International vasculitis and ANCA workshop. Tokyo Japan, 2017.

Shinjiro Kaieda, Kyoko Fujimoto, Masaki Tominaga, Masaki Okamoto, Tomoaki Hoshino, Hiroaki Ida. Involvement of Mast Cells in the Pathogenesis of Sjögren' s Syndrome By Induction of Tissue Fibrosis Via Fibroblast Collagen Synthesis. 82th Annual Scientific Meeting on American College of Rheumatology, Chicago, USA. 2018.

〔図書〕(計 2 件)

岡元昌樹、海江田信二郎、星野友昭：私の治療 2017-18 年度版「膠原病肺」．JMEDI 治療法便覧．2016； 36-38.

岡元昌樹、海江田信二郎、星野友昭：私の治療 2019-20 年度版「膠原病肺」．JMEDI 治療法便覧，2019，in press

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：星野 友昭

ローマ字氏名：(Hoshino, tomoaki)

所属研究機関名：久留米大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：261066

(2)研究協力者

研究協力者氏名：菰原 義弘

ローマ字氏名：(KOHARA, yoshihiro)

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。