

令和元年5月15日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09914

研究課題名(和文) 関節リウマチの発症・病態進展において革新的な14-3-3 の分子基盤解明

研究課題名(英文) Critical role of 14-3-3 eta in pathogenesis of rheumatoid arthritis

研究代表者

山形 薫 (YAMAGATA, KAORU)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：80533786

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)：関節リウマチ患者(RA)の関節液で14-3-3 が検出され、患部組織に炎症をもたらす。RA滑膜組織標本を用いて、免疫染色法によりマクロファージ(M ϕ)が14-3-3 の産生源であることを突き止めた。電子顕微鏡を用いた観察により、炎症性サイトカインTNF- α の刺激を受けたM ϕ は細胞膨張による特徴的な細胞死を示す。その後、ウェスタンブロッティング法により、14-3-3 が細胞外に放出される新規メカニズムを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

14-3-3 は生理的状況下で細胞内に局在するが、病的状況下で細胞外でも検出される。TNF- α による刺激を受けると、M ϕ がネクロトーシスを誘導し、細胞外に14-3-3 を放出する新規メカニズムの解明が、学術的意義である。

RAは働き盛りの年代において発症するが、必ずしも生物学的製剤が奏功するわけではない。本研究により見出されたメカニズムを介して細胞外に放出された14-3-3 は炎症惹起を齎すので、14-3-3 を標的にした薬剤の開発により治療応用へ展開する可能性があり、社会的意義が大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：Previous study shows that 14-3-3 is detected in the joint fluid of patients with rheumatoid arthritis, and induces inflammation. In this study, we found that macrophage (M ϕ) is a main source of extracellular 14-3-3. Further, TNF- α induced M ϕ to suffer from cell death like necroptosis characterized by expanded cell organelles and destroyed cell membranes. As a result, 14-3-3 was secreted into extracellular space. We found the novel mechanism in the affected tissues of patients with RA.

研究分野：リウマチ学

キーワード：関節リウマチ マクロファージ 14-3-3 PAD4 シトルリン化 TNF- α ネクロトーシス 関節液

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 代表的な自己免疫疾患である関節リウマチ(RA)は免疫異常に起因する滑膜炎と関節破壊を主病態とする。近年、RA患者の関節液において14-3-3 η の産生が高いこと、さらにそれはRA患者の疾患活動性と相関することが報告されている。

(2) 14-3-3 η で刺激した単球はIL-6、IL-1 β およびTNF- α 等、炎症性サイトカインの産生増加により炎症作用、およびRANKL発現誘導により破骨細胞分化を介した骨破壊を齎す可能性についてそれぞれ報告されている。しかしながら、14-3-3 η がRA病態と関連する他の細胞種に及ぼす影響、および14-3-3 η の産生源となる細胞種は依然として不明である。

2. 研究の目的

(1) 14-3-3 η が線維芽細胞様滑膜細胞(FLSs)に及ぼす、サイトカイン様の役割について検討する。14-3-3 η が間葉系幹細胞(MSCs)骨芽細胞分化を制御する可能性について検討する。14-3-3 η が単球破骨細胞分化を制御する可能性について検討する。

(2) 14-3-3 η の産生源(ソース)となる細胞種を探索する。14-3-3 η が細胞外に放出される機構を見出す。

3. 研究の方法

(1) RA患者の関節置換術により採取した滑膜からFLSsを準備する。つぎに、Vehicle、TNF- α 、14-3-3 η 組み換え体(1、10 ng/ml)でそれぞれ刺激する。そして24時間後総RNAを抽出し、qPCR法によりIL-6 mRNAを定量する。Lonza社から骨髄由来MSCsを購入する。つぎにVehicle、TNF- α または14-3-3 η 組み換え体(1、10 ng/ml)による各刺激のもと、骨芽細胞分化誘導培地(OIM)で10日または21日培養する。その後、アリザリンレッド染色により骨芽細胞分化について評価する。ヒト末梢血単核球(PBMCs)由来単球を準備する。つぎに、Vehicle、TNF- α または14-3-3 η 組み換え体(1、10 ng/ml)による各刺激のもと、M-CSF単独刺激3日、さらにM-CSFと可溶性RANKL(sRANKL)の共刺激で9日培養する。そして、M-CSFによる刺激10日後、TRAP染色により破骨細胞分化について評価する。

(2) まずRAおよび変形性膝関節症(OA)患者の滑膜標本を用いて、免疫組織化学(IHC)により14-3-3 η を検出する。つぎに、RA滑膜組織標本を用いて14-3-3 η とCD4(T細胞マーカー)、CD68(マクロファージマーカー)またはCD55(FLSsマーカー)の蛍光二重免疫染色を行う。そして14-3-3 η のソースを決定する。健康人PBMCs由来単球を準備し、M-CSFによる単独刺激6日でマクロファージへ分化させる。その後、マクロファージおよびRA患者由来FLSsをDiamide(グルタチオン阻害剤; ネクロプトーシス誘導剤)、IL-1 β 、IL-21、TNF- α で24時間刺激後、透過型電子顕微鏡を用いて細胞小器官、細胞膜を含む細胞内構造を観察する。

健康人由来のマクロファージをDiamide、IL-1 β 、IL-21、TNF- α (1、10 ng/ml)で24時間刺激後、培養上清をMicroconを用いた遠心で濃縮後、SDS-PAGEで展開し、抗14-3-3 η 抗体を用いてウェスタンブロッティング(WB)法にて14-3-3 η を検出する。

4. 研究成果

(1) RAの病態形成に重要な一連の細胞に対して、14-3-3 η がサイトカイン様の作用を齎す可能性について検討する。Vehicleに比してTNF- α にて刺激を受けたFLSsはIL-6 mRNAを発現誘導した。一方、濃度(1、10 ng/ml)と刺激時間(24、48時間)に関係なく14-3-3 η にて刺激を受けたFLSsはIL-6およびTNF- α mRNAを発現誘導しなかった。以上より、細胞外の14-3-3 η はFLSsの機能・活性を制御しないと考えられる。

(2) 骨髄由来MSCsをIL-1 β で刺激後、OIMで10日間培養した。Vehicleに比してIL-1 β 刺激MSCsはアリザリンレッド染色強陽性を示した。一方、MSCsを14-3-3 η で刺激後、OIMで10日および21日培養した。その結果、14-3-3 η にて刺激したMSCsは、Vehicleの場合と同様にアリザリンレッド染色陰性(10日)および陽性(21日)をそれぞれ示した。しかしながら、両群の染色強度において優位な差は示唆されなかった。以上より、14-3-3 η はMSCs骨芽細胞分化を制御しないことが明らかにされた。

(3) ヒト健康人由来単球をTNF- α 存在下、3日間M-CSF単独刺激後、さらにM-CSFとsRANKLにて共刺激を行い9日間培養した。Vehicleの場合と比較し、TNF- α にて刺激した単球はTRAP陽性細胞を示した。一方、14-3-3 η 存在下、同様に破骨細胞分化誘導を行い12日間培養した。その結果、Vehicleの場合と同様に14-3-3 η にて刺激した単球はTRAP陽性細胞を示した。しかしながら、両群のTRAP陽性細胞数において有意な差は示唆されなかった。以上より、14-3-3 η は単球破骨細胞分化を制御しないことを明らかにした。

(4) IHCにて、14-3-3 η はOA滑膜組織表層でのみ検出されるのに対し、RA標本では表層に

加え内部でも検出された。つぎに 14-3-3η と共局在する細胞種を蛍光二重免疫染色にて検討した。RA 滑膜にて CD4 陽性細胞が検出されたが、14-3-3η と共局在を示唆しなかった。一方、CD68 陽性細胞にて 14-3-3η が検出された。同様に、CD55 陽性細胞にて 14-3-3η が検出された。以上より、マクロファージおよび FLSs にて 14-3-3η は内在性に発現する。しかし RA 患者の関節液と血液で検出される 14-3-3η のソースはいずれであるのか明らかではない。

(5) FLSs またはマクロファージの細胞死後、細胞内の 14-3-3η が細胞外に放出される可能性について仮説を立てた。RA 病態形成に重要な TNF-α は細胞種に応じてアポトーシス、ネクローシス、ネクロプトーシスを誘導する。そこで我々は TNF-α に着目した。透過型電子顕微鏡で無刺激のマクロファージを観察すると、多くのひだを有する細胞膜が観察された。つぎにネクロプトーシス誘導因子 Diamide でマクロファージを刺激すると膨張した細胞小器官と歪な細胞膜が観察された。TNF-α で刺激すると、同様な細胞形態が観察された(図1)。対照的に IL-1β および IL-21 で刺激しても、無刺激のマクロファージと同じような細胞小器官と細胞膜が観察された。FLSs に上述の Diamide およびサイトカインで刺激しても無刺激の場合と類似した細胞小器官と細胞膜を示した。以上より TNF-α はマクロファージに作用してネクロプトーシスを誘導することが明らかにされた。

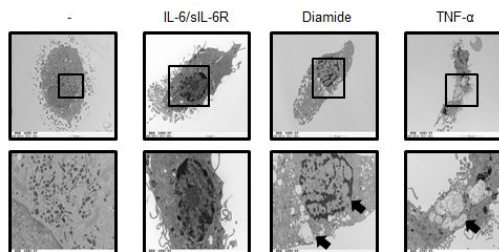


図1. TNF-α で刺激されたマクロファージはネクロプトーシス様形態を示す

(6) 無刺激の健常人 PBMCs 由来マクロファージの培養上清に 14-3-3η は全く検出されなかった。一方、Diamide でマクロファージを刺激すると、培養上清に 14-3-3η が高濃度に検出された。さらに TNF-α で刺激しても同様に検出された(図2)。しかしながら、IL-1β、IL-6/sIL-6R、IL-21 で刺激しても濃度に関係なく 14-3-3η は全く検出されなかった。以上より、TNF-α による刺激を受けたマクロファージはネクロプトーシスを受けて細胞外に 14-3-3η を放出したと考えられた。我々は RA 患者の関節液、血液に 14-3-3η が検出される重要なメカニズムを見出した。

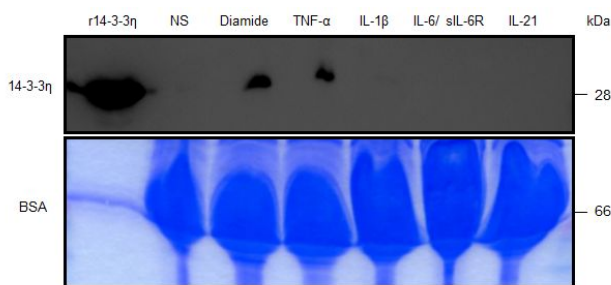


図2. TNF-α で刺激されたマクロファージは 14-3-3η を分泌する。

(7) まとめ；マクロファージが 14-3-3η の主な産生細胞である。炎症性サイトカイン TNF-α の慢性刺激を受ける病的状況下において、マクロファージはネクロプトーシスという特徴的な細胞死を誘導し、細胞外に 14-3-3η を放出する。我々は RA 患者の関節液で検出される 14-3-3η の産生機構を解明した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

Ma X, Nakayamada S, Kubo S, Sakata K, **Yamagata K**, Miyazaki Y, Yoshikawa M, Kitanaga Y, Zhang M, Tanaka Y. Expansion of T follicular helper-T helper 1 like cells through epigenetic regulation by signal transducer and activator of transcription factors.

Ann Rheum Dis.2018;77;1354-61.査読有

Kubo S, Nakayamada S, Sakata K, Kitanaga Y, Ma X, Lee S, Ishii A, **Yamagata K**, Nakano K, Tanaka Y. Janus Kinase Inhibitor Baricitinib Modulates Human Innate and Adaptive Immune System. Front Immunol.2018;9;1510.査読有

Ishikawa Y, Iwata S, Hanami K, Nawata A, Zhang M, **Yamagata K**, Hirata S, Sakata K, Todoroki Y, Nakano K, Nakayamada S, Satoh M, Tanaka Y. Relevance of interferon-gamma in pathogenesis of life-threatening rapidly progressive interstitial lung disease in patients with dermatomyositis. Arthritis Res Ther.2018;20;240.

Yamagata K, Nakayamada S, Tanaka Y. Use of mesenchymal stem cells seeded on the scaffold in articular cartilage repair. Inflammation and Regeneration.2018;38:4.

Miyagawa I, Nakayamada S, Nakano K, **Yamagata K**, Sakata K, Yamaoka K, Tanaka Y. Induction of Regulatory T Cells and Its Regulation with Insulin-like Growth Factor /Insulin-like Growth Factor Binding Protein-4 by Human Mesenchymal Stem Cells. J Immunol.2017;199:1616-25.

Sonomoto K, Yamaoka K, Kaneko H, **Yamagata K**, Sakata K, Zhang X, Kondo M, Zenke Y, Sabanai K, Nakayamada S, Sakai A, Tanaka Y. Spontaneous Differentiation of

〔学会発表〕(計 16 件)

Kaoru Yamagata, Shingo Nakayamada, Yoshiya Tanaka. Optimal application of a novel delivery system with mesenchymal stem cells (MSCs) treated with IL-6R seeded on PLGA nano-fiber in the repair of articular cartilage in RA. 第 62 回日本リウマチ学会. 2018 年

山形薫, 中山田真吾, 宮川一平, 上村芙美, 岩田慈, 加藤茂明, 田中良哉. CD4 陽性 T 細胞特異的に高発現する T 細胞受容体 (TCR) シグナル抑制因子 UBASH3A は関節リウマチ (RA) において発現が低下する. 第 4 回日本骨免疫学会. 2018 年

山形薫, 中山田真吾, 張童, 田中良哉. IL-6 受容体はヒト間葉系幹細胞軟骨細胞分化を促進し、欠損関節軟骨の修復をもたらす. 第 3 回 United Front against Rheumatism. 2018 年

山形薫, 中山田真吾, 張童, 田中良哉. IL-6 受容体は間葉系幹細胞軟骨細胞分化を促進し、損傷関節軟骨の修復をもたらす. 第 39 回日本炎症・再生医学会. 2018 年

山形薫, 中山田真吾, 張童, 田中良哉. 可溶性 IL-6 受容体は間葉系幹細胞軟骨細胞分化を促進し、欠損関節軟骨の修復をもたらす. 第 36 回日本骨代謝学会. 2018 年

Kaoru Yamagata, Shingo Nakayamada, Ippei Miyagawa, Fumi Uemura, Sigeru Iwata, Shigeaki Kato, Yoshiya Tanaka. Massive in silico studies identified UBASH3A as potential pathogenic factor that is dysregulated in CD4+ T cells of patients with rheumatoid arthritis. 第 47 回日本免疫学会. 2018 年

Kaoru Yamagata, Shingo Nakayamada, Yoshiya Tanaka. Efficient regeneration of cartilaginous tissue after application of IL-6R-stimulated mesenchymal stem cells with a novel delivering scaffold for the treatment of RA. 第 61 回日本リウマチ学会. 2017 年

山形薫, 中山田真吾, 近藤真弘, 田中良哉. RA 軟骨破壊の機序とその克服. 第 61 回日本リウマチ学会. 2017 年

山形薫, 中山田真吾, 田中良哉. バイオマテリアルと IL-6 受容体刺激間葉系幹細胞の共移植による関節リウマチの軟骨組織修復・再生の可能性. 第 3 回骨免疫学会. 2017 年

Kaoru Yamagata, Shingo Nakayamada, Yoshiya Tanaka. Regeneration of cartilage tissue after application of IL-6R-treated mesenchymal stem cells with a novel delivering scaffold for the treatment of RA. 第 7 回 EAGOR. 2017 年

山形薫, 中山田真吾, 近藤真弘, 田中良哉. IL-6 受容体刺激間葉系幹細胞とバイオマテリアルの共移植による関節リウマチの軟骨組織再生の可能性. 第 38 回日本炎症・再生医学会. 2017 年

Kaoru Yamagata, Shingo Nakayamada, Masahiro Kondo, Yoshiya Tanaka. Regeneration of cartilage tissue after application of IL-6R-treated mesenchymal stem cells (MSCs) with a novel delivering scaffold for the treatment of RA. 第 35 回日本骨代謝学会. 2017 年

Kaoru Yamagata, Shingo Nakayamada, Kazuhisa Nakano, Xiangmei Zhang, Jidong Zhao, Hiroaki Kaneko, Makoto Satake, Yuka Yamamoto, Kunihiro Yamaoka, Yoshiya Tanaka. Therapeutic application of human mesenchymal stem cells with a novel delivering scaffold for the treatment of rheumatoid arthritis. 第 60 回日本リウマチ学会. 2016 年

山形薫, 中山田真吾, 園本格士朗, 近藤真弘, 兼子博明, 中野和久, 田中良哉. ヒト間葉系幹細胞を用いた関節組織再生. 第 37 回日本炎症・再生医学会 (シンポジウム). 2016 年

山形薫, 中山田真吾, 宮川一平, 張香梅, 兼子博明, 中野和久, 田中良哉. ヒト間葉系幹細胞による免疫抑制の多彩なイベント. 第 37 回日本炎症・再生医学会 (シンポジウム). 2016 年

山形薫, 中山田真吾, 中野和久, 張香梅, 兼子博章, 山岡邦宏, 田中良哉. CIA モデルラットを用いた間葉系幹細胞 MSC とバイオマテリアルの共移植による RA 関節炎病態の制御. 第 34 回日本骨代謝学会. 2016 年

〔図書〕(計 2 件)

山形薫, 中山田真吾, 張香梅, 田中良哉. 動物 / 疾患モデルの作製技術・病態解析・評価手法: 関節リウマチにおける動物モデルの作製手法. 技術情報協会. 2017 年. 185-9.

山形薫, 中山田真吾, 田中良哉. 動物 / 疾患モデルの作製技術・病態解析・評価手法: 関節

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：軟骨組織修復方法
発明者：田中 良哉, 山形 薫, 中山田 真吾
権利者：同上
種類：治療方法特許
番号：特許願 2016-119273
出願年：平成 28 年
国内外の別：国内

○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
http://www.uoeh-u.ac.jp/kouza/1nai/intro_j.html

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：田中 良哉
ローマ字氏名：Tanaka Yoshiya
所属研究機関名：産業医科大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号(8桁)：30248562

(2)研究協力者

研究協力者氏名：グルジハン トリモバ
ローマ字氏名：Gluzhan Trimova

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。