

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19606

研究課題名(和文) 関節リウマチにおける破骨細胞と単核球・マクロファージサブセットに関する研究

研究課題名(英文) Osteoclastogenesis and subsets of monocytes and macrophages in rheumatoid arthritis

研究代表者

福井 翔一 (FUKUI, Shoichi)

長崎大学・保健・医療推進センター・助教

研究者番号：80770833

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)患者におけるM1単球、M2単球と破骨細胞分化能について検討した。RA患者40人と健常人20人の末梢血単核球からCD14陽性細胞を分離しM1単球とM2単球を計数し、同時にCD14陽性細胞を*in vitro*で破骨細胞へ分化させた。22人の患者(55%)は抗CCP抗体陽性であった。M1単球数、M2単球数、M1/M2比はRA患者と健常人で差はなかった。RA患者ではM1/M2比と破骨細胞数に有意な正の相関が見られた。抗CCP抗体陽性患者では陰性患者より有意にM1/M2比が高く、破骨細胞数が多かった。M1およびM2単球サブセットはRAの骨破壊に対する新しい治療標的となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated the relationships among M1 monocytes, M2 monocytes, osteoclast (OC) differentiation ability in patients with rheumatoid arthritis (RA). We investigated the number of M1 or M2 monocytes in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). We also cultured CD14-positive cells from PBMCs and differentiate to OC *in vitro*. Forty RA patients were included. Twenty-two patients had anti-citrullinated protein antibody (ACPA). There was a positive correlation between the M1/M2 ratio and the differentiated OC number in RA patients. The ACPA-positive patients had significantly higher M1/M2 ratios and greater numbers of OCs than the ACPA-negative patients. The M1/M2 ratio was the sole significant contribution factor to osteoclastogenesis by multivariable regression analysis. RA patients with M1/M2 ratios >1 had higher C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rates than RA patients with M1/M2 ratios ≤1. M1 and M2 monocyte subsets may become a new target of treatments for RA.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：関節リウマチ 破骨細胞 単球 炎症 IL-6

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

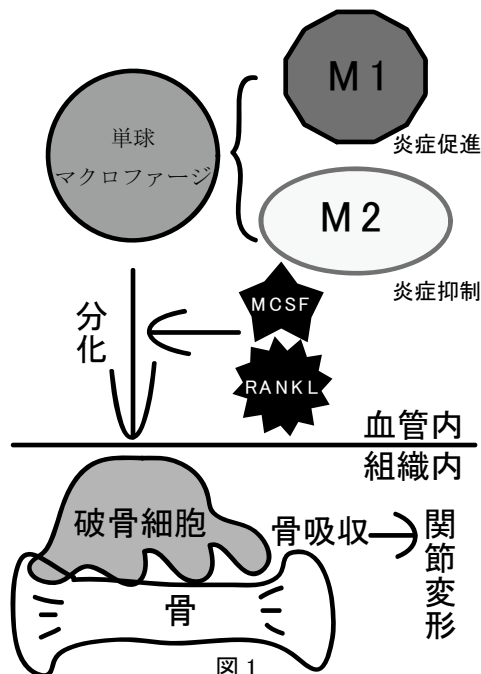
1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)は日本で約70-100万人の患者がいる代表的な自己免疫性疾患である。関節の滑膜組織に炎症が起こり関節や骨を破壊し変形を来す。変形により患者の日常生活動作は著しく損なわれ、30-40歳の働き盛りの年代での発症が多いこともあり、社会的・経済的損失も大きく、病因の解明が待たれる。

近年、Tumor Necrosis Factor α (TNF α) 阻害剤をはじめとした生物学的製剤の登場により、RA治療は劇的に発展し、多くのRA患者はその恩恵にあずかるようになったものの、生物学的製剤の治療効果が乏しく変形を来す患者も一定数存在することや患者背景に応じた薬剤選択や薬効予測など、臨床上的問題は山積しており、単球系細胞の制御など新たな視点による治療反応性予測や治療標的の探索が必要である。

関節リウマチにおいて骨破壊を来す破骨細胞は単球・マクロファージ系細胞から Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) や receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) の刺激により分化することが知られ、マクロファージには炎症性サイトカインを産生するM1マクロファージ(M1)と、炎症性サイトカインを抑制するM2マクロファージ(M2)が存在することが明らかとなっている。

また、このM1/M2サブセットについては組織中のみならず血管内の単球の段階でも存在することが報告されている。



2. 研究の目的

M1単球、M2単球とRAの病態や疾患活動性、臨床指標との関連を解析し、単球サブセットと破骨細胞という新たな視点から、RAの病態を探索する。

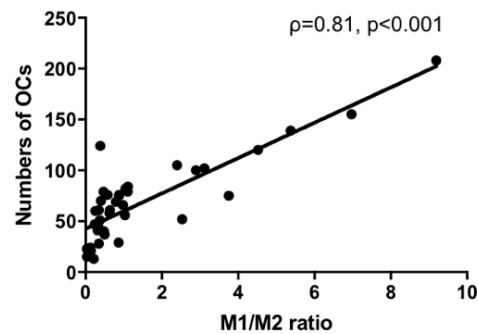
3. 研究の方法

RA患者と健常人を研究の対象として、末梢血を採取し、フローサイトメトリーを用いてM1/M2比を求める。M1/M2比を健常人や、RAの疾患活動性の高い状態と低い状態で比較し、治療による変化や、薬剤選択による変化の違い、治療反応予測因子、骨破壊予後との関連について明らかにする。

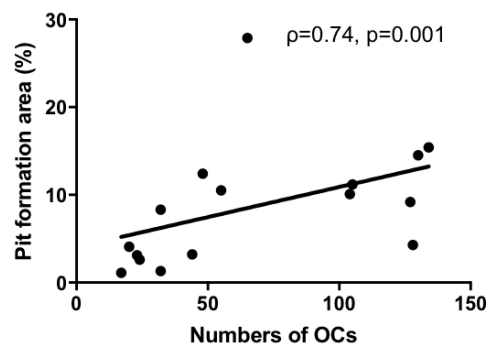
同時に末梢血CD14陽性細胞から破骨細胞への分化をin vitroで誘導し、破骨細胞数やピットアッセイを用いた機能評価を行い、臨床指標との関連を明らかにする。

4. 研究成果

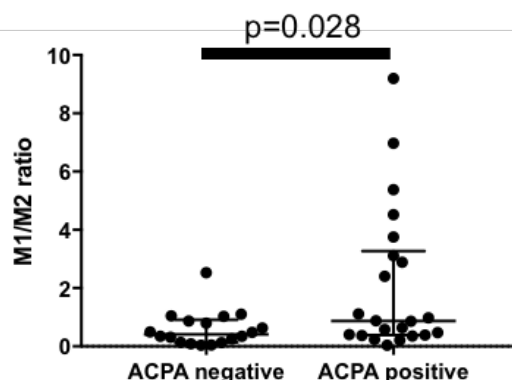
M1単球数、M2単球数、M1/M2比はRA患者と健常人で差はなかった。RA患者ではM1/M2比と破骨細胞数に有意な正の相関が見られた($\rho=0.81$, $p<0.001$)が、健常人では有意な相関はなかった。

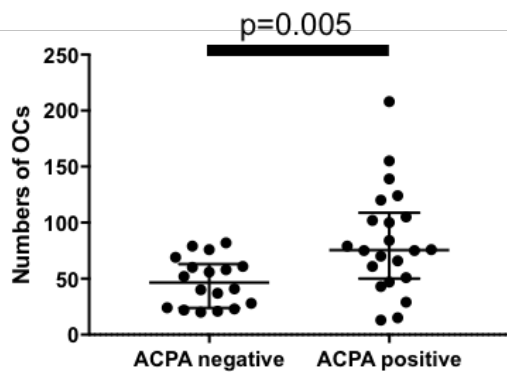


また、ピットアッセイを用いて評価した破骨細胞の骨食面積は破骨細胞数と有意に相関していた。



抗CCP抗体陽性患者では抗CCP抗体陰性患者と比較し、有意にM1/M2比が高く、破骨細胞数が多かった。

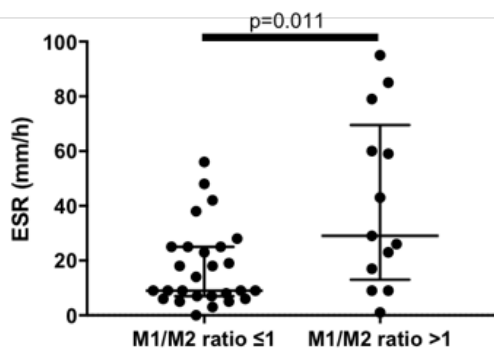
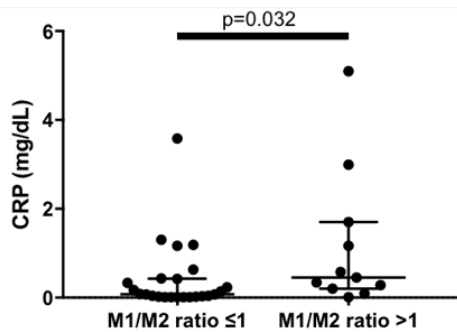




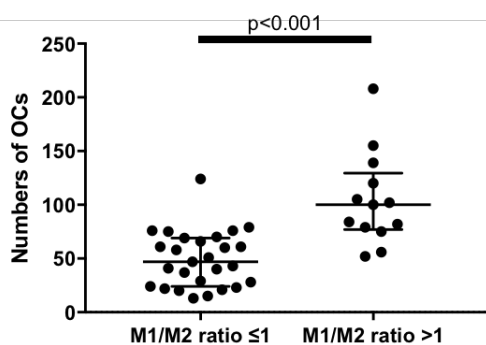
リウマチ因子で分けた2群では、M1/M2比ならびに破骨細胞数に有意な差異は認めなかった。手指足趾のX線での骨侵食の有無により分けた2群や、生物学的製剤の使用の有無により分けた2群では、M1/M2比ならびに破骨細胞数に有意な差異は認めなかった。

多変量解析では、M1/M2比が破骨細胞数に対する唯一の有意な寄与因子であった。

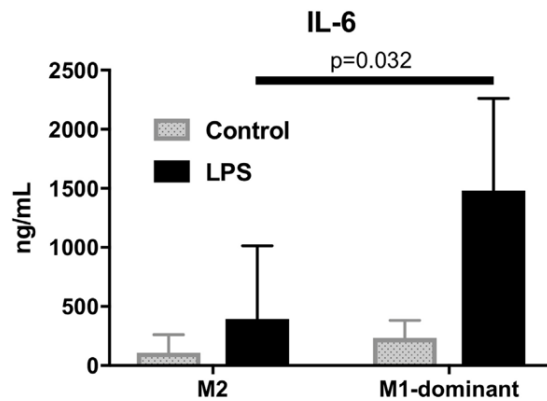
M1/M2比 >1 の(相対的にM1単球が多い)RA患者では、C反応性蛋白が高値で血沈が亢進していた。



また、M1/M2比 >1 では破骨細胞数も有意に多かった。



M1単球が直接に分離できないため、M2単球とM2単球以外(M1単球ドミナント)に分けてリポポリサッカライド(LPS)で刺激したところ、M1単球ドミナントでは、IL-6の産生がM2単球と比較して有意に多かった。



以上の結果から、単球には分化能やサイトカイン産生の異なるサブセットが存在し、関節リウマチにおいては、M1単球が多い状態が破骨細胞分化と関係していることが示された。また、病因として重要であると考えられている抗CCP抗体が陽性の関節リウマチ患者では、末梢血M1/M2比が高く、破骨細胞分化も多いことから、抗CCP抗体が単球サブセットと破骨細胞分化に関与している可能性が示された。

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1件)

Fukui, S., Iwamoto, N., Takatani, A., Igawa, T., Shimizu, T., Umeda, M., Nishino, A., Horai, Y., Hirai, Y., Koga, T., Kawashiri, S. Y., Tamai, M., Ichinose, K., Nakamura, H., Origuchi, T., Masuyama, R., Kosai, K., Yanagihara, K., Kawakami, A.: M1 and M2 Monocytes in Rheumatoid Arthritis: A Contribution of Imbalance of M1/M2 Monocytes to Osteoclastogenesis. *Front Immunol* 2017, 8:1958.

DOI: 10.3389/fimmu.2017.01958

査読あり

〔学会発表〕 (計3件)

- ① Shoichi Fukui et al. A NOVEL CONCEPT OF M1 AND M2 MONOCYTES IN RHEUMATOID ARTHRITIS: PRO-INFLAMMATORY MONOCYTE POLARIZATION IMBALANCE, ANTICITRULLINATED PROTEIN ANTIBODY AND OSTEOCLASTOGENESIS; Annual European

Congress of Rheumatology EULAR 2017,
2017

- ② Shoichi Fukui et al. A novel concept of M1 and M2 monocytes in rheumatoid arthritis; pro-inflammatory monocyte polarization imbalance, anticitrullinated protein antibody and osteoclastogenesis; the 61st Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology, 2017
- ③ Shoichi Fukui et al. Preferential Distribution of M1 Monocytes in Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibody Positive Patients with Rheumatoid Arthritis; 2016 ACR/ARHP Annual Meeting, 2016

〔図書〕（計0件）

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福井 翔一 (FUKUI, Shoichi)

長崎大学・保健・医療推進センター・助教

研究者番号：80770833

(2) 研究協力者

川上 純 (KAWAKAMI, Atsushi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・教授

研究者番号：90325639

岩本 直樹 (IWAMOTO, Naoki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・助教

研究者番号：80437897

玉井 慎美 (TAMAI, Mami)

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・講師

研究者番号：60380862