

平成21年 6月 1日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790690
 研究課題名（和文） 関節リウマチ滑膜A細胞特異的サブセットの機能解析と遺伝子発現プロファイリング
 研究課題名（英文） Functional analysis and gene profiling of a macrophage subset unique to rheumatoid arthritis synovium
 研究代表者
 田中 将志（TANAKA MASASHI）
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教
 研究者番号：60381167

研究成果の概要：関節リウマチ（RA）は関節の変形と破壊をもたらす慢性炎症性疾患である。2つの補体レセプター、Z39IgとCD11cを共に発現する滑膜A細胞（Z39Ig+CD11c+細胞）はRA滑膜に特徴的に出現する。本研究により、当該細胞は、破骨細胞に分化しやすいこと、マクロファージの新規サブセットであること、抗原提示分子を強発現していることを明らかにした。したがって、当該細胞は、高い破骨細胞分化能及び抗原提示能を介してRA病態に関わる可能性が明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度			
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
総計	3,100,000	630,000	3,730,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：リウマチ学、慢性炎症、マクロファージ、自己免疫疾患、滑膜A細胞、骨破壊、抗原提示

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ（RA）は関節の変形と破壊をもたらす慢性炎症性疾患である。RA滑膜では、滑膜表層に分布する滑膜A細胞（組織マクロファージ様細胞）の他に、様々なサブセットのマクロファージが混在する。これらのマクロファージは、炎症性サイトカインやタンパク質分解酵素の産生や、破骨細胞への分化により、RA病態に深く関与している。しかし、

滑膜A細胞については、そのマーカーが明らかでないため、このサブセットのRA病態への関与についての解析は進んでいない。

2. 研究の目的

滑膜A細胞のマーカーを明らかにし、RA滑膜において特異的に出現する滑膜A細胞サブセ

ットである Z39Ig+CD11c+細胞について、Z39Ig+CD11c-細胞との性状の相違を解析することで、Z39Ig+CD11c+細胞の特徴を明らかにし、当該細胞の RA 病態への関与について検討する。

3. 研究の方法

(1) RA 滑膜 A 細胞の細胞表面抗原について、マクロファージや樹状細胞の関連マーカー (HLA-DR、HLA-DQ、Z39Ig、CD11c、CD83、CD1a、CD163、CD14) を用いて明らかにする。まず、得られた滑膜組織からマクロファージを単離し、フローサイトメーターによる解析を行う。また、組織を用い、免疫蛍光組織学的解析を行う。

(2) 滑膜 A 細胞サブセット (Z39Ig+CD11c-細胞及び Z39Ig+CD11c+細胞) の炎症性滑膜での検索として、変形性関節炎、乾癬性関節炎、early RA の滑膜切片に対し、抗 Z39Ig 抗体及び抗 CD11c 抗体を用いて免疫蛍光組織学的解析を行う。出現率を算出し、RA との相違を検討する。

(3) Z39Ig+CD11c-細胞と Z39Ig+CD11c+細胞の性状について、RA 滑膜単核球集団から、フローサイトメーターにより各細胞を分取し、細胞内部の微細構造について電子顕微鏡レベルで明らかにすることで、細胞の活性化レベルを検討する。

(4) Z39Ig+CD11c-、Z39Ig+CD11c+各細胞の貪食能について解析する。まず蛍光標識パーティクルの取り込み反応を行い、次にフローサイトメーターにより、貪食した細胞の、集団における陽性率、及び、陽性細胞あたりのパーティクル量を求める。

(5) Z39Ig+CD11c-、Z39Ig+CD11c+各細胞の抗原提示能について、Z39Ig、CD11c、及び、HLA-DR または HLA-DQ に対する抗体を用いてフローサイトメーターによる 3 カラー解析を行う。

(6) Z39Ig+CD11c-、Z39Ig+CD11c+各細胞の破骨細胞分化能を解析する。まずフローサイトメーターにより RA 滑膜単核球集団から各細胞を分取する。次に各細胞を破骨細胞分化用培地に懸濁し、象牙スライス上で培養する。得られた骨吸収エリアの数、面積を解析

する。

4. 研究成果

(1) フローサイトメーターによる解析及び免疫蛍光組織学的解析により、Z39Ig 分子は滑膜 A 細胞のマーカーであることを世界で初めて明らかにした。これにより、これまで不可能だった、当該細胞の RA における役割の解析が可能になっただけでなく、変形性関節炎や乾癬性関節炎での当該細胞の役割を解明する研究が可能になった。

(2) 滑膜 A 細胞の中で、Z39Ig+CD11c+細胞は、変形性関節炎滑膜及び乾癬性関節炎滑膜の各表層ではほとんど検出されないのに対し、RA 滑膜表層では約 50%の出現率を示し、RA 滑膜に特徴的に出現することを初めて明らかにした。さらに、当該細胞は、early RA の滑膜表層では RA の場合と同レベルに出現することを明らかにした。これは、当該細胞は RA 病態に深く関わることを示すだけでなく、RA の病理学的診断にも有用であることを示す結果である。

(3) フローサイトメーターによる解析から、Z39Ig+CD11c+細胞は、Z39Ig+CD11c-細胞に比べ、より大きく、また、より複雑な細胞内構造を有することを明らかにした。さらに、電子顕微鏡による解析から、Z39Ig+CD11c+細胞は、Z39Ig+CD11c-細胞とは異なる状態のミトコンドリア、ライゾゾーム、細胞膜を有することを明らかにし、より活性化されている状態であることを見出した。したがって、本研究結果から、異常な活性化状態を示す Z39Ig+CD11c+細胞が、RA 病態に大きく関わる可能性が見出された。

(4) Z39Ig+CD11c-、Z39Ig+CD11c+各細胞の貪食能を解析した結果、両細胞には有意差はみとめられない結果が得られた。したがって、ホメオスタシスを維持するためのクリアランス能力という点で、RA 滑膜に特徴的に出現する Z39Ig+CD11c+細胞は、Z39Ig+CD11c-細胞と同程度であることが明らかとなった。一方、抗原提示に関わるタンパク質群の発現解析の結果、Z39Ig+CD11c+細胞は Z39Ig+CD11c-細胞よりも高い発現を有することが明らかとなった。したがって、Z39Ig+CD11c+細胞は、高い抗原提示能による高い T 細胞活性化能力を有することにより、RA 病態に関与する可能性が示された。これは、RA 病態改善のための新たな概念として、

Z39Ig+CD11c+細胞によるT細胞活性化の制御法を提案する成果である。

(5) Z39Ig+CD11c⁻、Z39Ig+CD11c⁺各細胞の破骨細胞分化能を解析することで、Z39Ig+CD11c⁺細胞由来破骨細胞が形成する骨吸収エリアは、Z39Ig+CD11c⁻細胞由来破骨細胞のものに比べ、有意に大きいことを見出した。これまで、RA滑膜では、滑膜表層に存在するマクロファージが破骨細胞に分化すると考えられてきたが、その前駆細胞は同定されていない。本研究成果は、当該前駆細胞を初めて同定したものであり、RA滑膜における骨破壊のメカニズムを明らかにするための鍵となる成果である。さらに、RA骨破壊制御のための新規標的細胞として、Z39Ig+CD11c⁺細胞を提案する成果である。本研究成果をもとに、Z39Ig+CD11c⁺細胞の遺伝子発現パターンを解析することで、骨破壊制御のための新たな分子の同定が可能となり、RA病態改善のための新たな研究を展開できる。

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 Tanaka M, Nagai T, Tsuneyoshi Y, Sunahara N, Matsuda T, Nakamura T, Tsuyama S, Hasui K, FitzGerald O, Matsuyama T.
Expansion of a unique macrophage subset in rheumatoid arthritis synovial lining layer.
Clin Exp Immunol. 2008. 154(1):38-47.
(査読有り) .
- ② Gushi A, Tanaka M, Tsuyama S, Nagai T, Kanzaki T, Kanekura T, Matsuyama T.
The 3G5 antigen is expressed in dermal mast cells but not pericytes.
J Cutan Pathol. 2008. 35(3):278-284.
(査読有り) .
- ③ Tanaka M, Nagai T, Nishimura T, Tsuneyoshi Y, Sunahara N, Matsuda T, Nakamura T, Tsukano M, Matsuyama T.
Analysis of Z39Ig+CD11c⁺ macrophages in inflammatory arthritis synovium.
Mod Rheumatol. 2008. 18(S): 125. (査読無し) .
- ④ Nagai T, Tanaka M, Matsuyama T.

Limited distribution of folate-receptor beta expressing inflammatory macrophages in murine tissues.

Mod Rheumatol. 2008. 18(S): S143-S144.
(査読無し) .

- ⑤ Tsuneyoshi Y, Nagai T, Ijiri K, Komiya S, Sunahara N, Matsuda T, Tanaka M, Matsuyama T.
Identification and characterization of the Lubricin-HA complex in synovial fluids of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients.
Mod Rheumatol. 2008. 18(S): S213. (査読無し) .

[学会発表] (計 4 件)

- ① Masashi Tanaka et al. Distribution of Z39Ig-expressing macrophages in murine normal tissues and diseased tissues. 日本免疫学会. 2008年12月1-3日. 国立京都国際会館(京都市)
- ② 田中将志 他. 関節リウマチ滑膜に出現するZ39Ig+CD11c⁺マクロファージサブセットの解析. 第52回日本リウマチ学会. 2008年4月20日-23日. ロイトン札幌他(札幌市)
- ③ Masashi Tanaka et al. Expansion of Z39Ig+CD11c⁺ macrophages in rheumatoid arthritis synovium. 日本免疫学会. 2007年11月21日. 東京
- ④ Masashi Tanaka et al. The Z39Ig: a specific marker of synovial A cells in RA synovium. The 5th International Symposium of Molecular Pathology. 2007年7月31日. 鹿児島

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

出願番号: 特願2008-130882

出願者: 松山隆美、永井拓、田中将志

出願日: 平成20年5月19日

発明の名称: がん関連マクロファージを標的とした固形がん治療剤

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 将志 (TANAKA MASASHI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60381167

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者