

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07431

研究課題名(和文) 三次元超微形態学的解析による関節リウマチの炎症慢性化の解明

研究課題名(英文) Ultra-Microscopic Analysis of Nursing Phenomenon in Synovial Tissue of Rheumatoid Arthritis

研究代表者

黒瀬 理恵 (Kurose, rie)

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：30423990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：電子顕微鏡観察の結果、関節リウマチ滑膜組織には3次的に多数の樹状形を示す細胞が存在しており、隣接する形質細胞やリンパ球と密接に関連していることが明らかとなった。この樹状形細胞は変形性関節症の滑膜組織や肉芽組織では殆ど認めず、関節リウマチの滑膜炎の程度と相関した。また免疫学的組織染色の結果、CD14陽性で、HLA-DRやCD68、ビメンチンにも陽性を示すことから、免疫応答細胞、貪食細胞、さらに間葉系細胞としての非常にユニークな性質を有することが示唆され、関節リウマチの炎症慢性化に関わる重要な細胞である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチの炎症については、これまで滑膜組織という場で炎症性サイトカインやその受容体などによって起きていると考えられていたが、本研究の結果、滑膜組織中にある樹状形細胞が関節リウマチの炎症慢性化に大きく寄与していることが示唆された。

近年の生物学的製剤を含む抗リウマチ薬の進歩によって、関節リウマチの疾患活動性をコントロールすることが可能となってきている一方で、未だに治療に抵抗し難渋する症例も少なくはない。CD14陽性樹状形細胞による関節リウマチの炎症慢性化の解明は、疾患の病態に迫るだけでなく、将来的に関節リウマチの新たな治療標的となり既存の薬物療法に抵抗性の症例に役立つ可能性も期待される。

研究成果の概要(英文)：In our study, electron microscopy showed that there were numerous dendritic-shaped cells in the synovial tissue of rheumatoid arthritis, which were closely related to adjacent plasma cells and lymphocytes. These dendritic-shaped cells were rarely observed in the synovial tissue of osteoarthritis and granulation tissue. Furthermore, number of dendritic-shaped cells correlated with the degree of synovitis in rheumatoid arthritis. In addition, results of immunohistochemical staining showed that they are CD14 positive and also positive for HLA-DR, CD68, and vimentin, suggesting that they have very unique properties as immune response cells, phagocytic cells, and even mesenchymal cells. Therefore, CD14 positive dendritic-shaped cells are important cells involved in the chronic inflammation of rheumatoid arthritis.

研究分野：リウマチ学

キーワード：関節リウマチ 滑膜組織 CD14

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチの炎症が何十年と持続するメカニズムについては未だ解明されていない。関節リウマチ滑膜組織の電子顕微鏡解析では、変形性関節症や外傷による炎症とは異なり、多彩な免疫細胞が確認できる。細胞や細胞同士の超微形態学的な研究はこれまで少なく、関節リウマチの複雑な病態を解明するためには、電子顕微鏡技術も有用と考える。また本研究の発展は、関節リウマチの炎症の慢性化メカニズムの解明につながることを期待される。

## 2. 研究の目的

これまで、関節リウマチの炎症は滑膜組織という場で、炎症性サイトカインやその受容体によって起きていると考えられてきた。本研究の目的は、電子顕微鏡を用いた三次元形態学的手法を用いて細胞や細胞同士の関係といったこれまでとは異なる観点から、関節リウマチの炎症慢性化の病態を解明することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 電子顕微鏡を用いた Nursing 現象に関与する細胞の形態学的な検討

関節リウマチ症例の関節手術の際に採取し得た滑膜組織を研究材料とし、電子顕微鏡用に試料を作成した。走査電子顕微鏡(SEM)による広域観察、集束イオンビームを用いた三次元再構築、2軸電子線トモグラフィ解析を行い、変形性関節症の滑膜組織や外傷による肉芽組織と比較検討した。

### (2) Nursing 現象に関与する樹状形細胞の機能について組織学的検討

樹状形細胞の機能について調べるために、免疫組織学的染色を行い検討した。

### (3) 樹状形細胞と組織学的滑膜炎、関節リウマチ疾患活動性との関連について統計学的検討

樹状形細胞の細胞数は顕微鏡に付随した画像解析ソフトを用いて CD14+細胞数を計測した。組織学的滑膜炎の程度は Krenn 滑膜炎スコアを用いた。関節リウマチの疾患活動性を表す臨床マーカーはデータを蓄積し統計学的に検討した。

## 4. 研究成果

### (1-1) 走査電子顕微鏡(SEM)による組織観察

図 1 は関節リウマチ(RA)、変形性関節症(OA)の滑膜組織、肉芽組織の HE 染色像、SEM 像である。RA の滑膜組織には多彩な免疫細胞(A、D)が見られ、SEM では多数の細長い突起を伸ばす樹状形細胞が見られる(G、H 中の D)。樹状形細胞(D)は形質細胞(P)やリンパ球と隣接し Nursing 現象を認める。OA(B、E)や肉芽組織(C、F)では Nursing 現象は殆ど認めない。

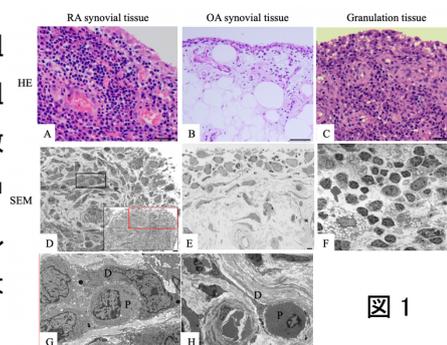


図 1

### (1-2) 集束イオンビームを用いた三次元再構築と 2 軸電子線トモグラフィ解析

集束イオンビームを用いた三次元再構築像では、樹状形細胞(D)は隣接する形質細胞(P)やリンパ球を多数抱え込み、立体的に庇護していることを細胞レベルで確認することができた(図 2)。ま

た 2 軸電子線トモグラフでは、樹状形細胞(D)と形質細胞(P)の一部の細胞膜同士で cell to cell contact(矢印)を生じていることが認められた(図 3)。

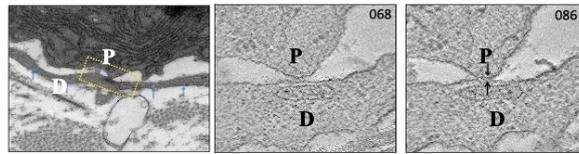
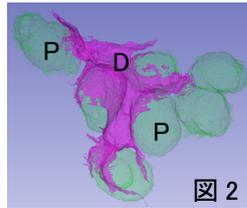


図 3

### (1-3) 樹状形細胞の組織間での比較

RA5 例、OA4 例、肉芽組織(Gt)1 例の電子顕微鏡レベルでの細胞数の割合を図 4 に示す。樹状形細胞は RA で多く見られ、OA や肉芽組織(Gt)では殆ど認めなかった。

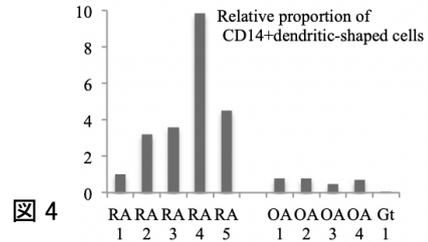


図 4

### (2) 樹状形細胞の免疫組織学的検討

樹状形細胞は、酵素電顕で CD14+を示した(図 5)。さらに RA における CD14+樹状形細胞は HLA-DR+、CD68+、Vim+であった(図 6)。このことから RA における CD14+樹状形細胞は、単球由来の細胞であるが、免疫応答能、貪食能、間葉系細胞といったユニークな性質を有する可能性があることが示唆された。

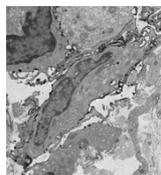


図 5 CD14 陽性細胞

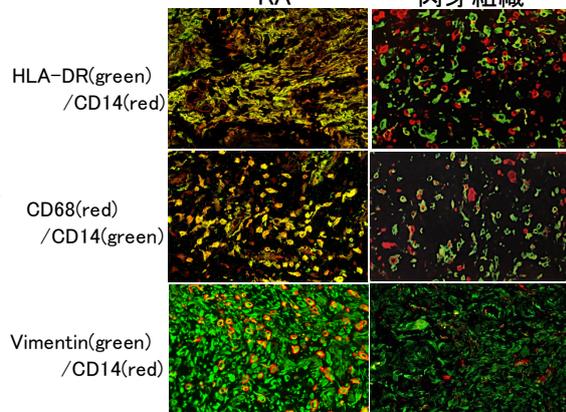


図 6

さらに CD14+樹状形細胞は、RA の滑膜組織の血管周囲で CD90 を発現した(図 7A-E)。OA(図 7F、G)や肉芽組織(図 7H、I)では見られなかった。このことは、CD14+樹状形細胞が未分化な細胞である可能性、また循環血液を經由して組織へ広がっている可能性などが示唆された。

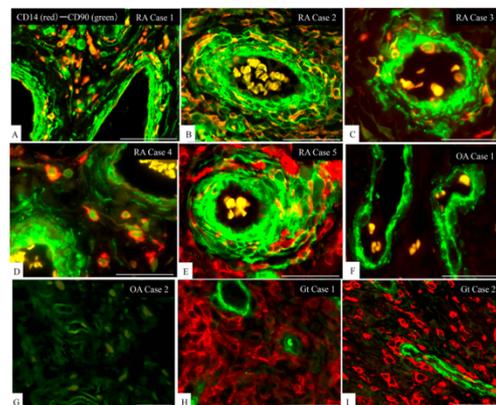


図 7

### (3) 樹状形細胞と組織学的滑膜炎の程度、RA 疾患活動性との関連

CD14+樹状形細胞数は、RA 滑膜組織で有意に多く、組織学的な滑膜炎の程度と相関した(図 8)。

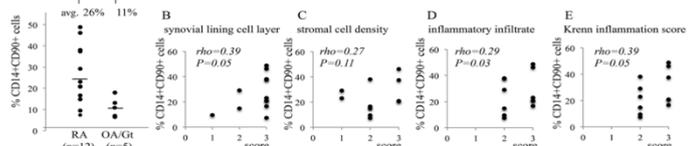


図 8

疾患活動性マーカーとの関連については、明らかに強い相関はなく今後症例数を増やした検討が必要と考える(図 9)。

	% CD14 <sup>+</sup> CD90 <sup>+</sup> cells	
	r	P
Age	0.62	0.02
Disease duration	-0.12	0.01
CRP	0.68	0.46
ESR	0.12	0.01
RF	0.14	0.02
anti-CCP antibody	0.17	0.03
MMP-3	0.13	0.01
DAS28CRP4	0.04	0.001
DAS28ESR4	0.16	0.02
SDAI	0.20	0.04
CDAI	0.03	0.001

図 9

### <引用文献>

Sawai T, et al., Microscopy 62: 317-20, 2013, Ochi T, et al., Mod Rheum 29:1-5, 2018, Murakami K, et al., J East Jpn Orthop Traumatol 23: 15-24, 2011, Krenn V, Histopathology 49: 358-64, 2006.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Rie Kurose, Takashi Satoh, Akira Kurose, Yo-Ichi Satoh, Yasuyuki Ishibashi, Yuji Wakai, Tomoyuki Sasaki, Kinji Ishida, Katsutoshi Ogasawara, Takashi Sawai	4. 巻 0
2. 論文標題 Association of CD90 Expression by CD14+ Dendritic-Shaped Cells in Rheumatoid Arthritis Synovial Tissue with Chronic Inflammation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACR Open Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/acr2.11440	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Rie Kurose, Takashi Satoh, Kenya Murakami, Akira Kurose, Yo-ichi Satoh, Yasuyuki Ishibashi, Kinji Ishida, Katsutoshi Ogasawara, Akinari Morikawa, Takashi Sawai	4. 巻 80
2. 論文標題 The Relationship between CD14 and Vimentin-Positive Synovial Dendritic-Shaped Cells and Synovitis in Rheumatoid Arthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ann Rheum Dis	6. 最初と最後の頁 1055
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Rie Kurose, Takahiro Ochi, Takashi Satoh, Miwa Uzuki, Kenya Murakami, Akira Kurose, Yo-ichi Satoh, Yasuyuki Ishibashi, Kinji Ishida, Katsutoshi Ogasawara, Akinari Morikawa, Takashi Sawai	4. 巻 78
2. 論文標題 ULTRA-MICROSCOPIC ANALYSIS OF NURSING PHENOMENON IN SYNOVIAL TISSUE OF RHEUMATOID ARTHRITIS	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Rheum Dis	6. 最初と最後の頁 A1524
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 8件）

1. 発表者名 黒瀬理恵, 字月美和, 石橋恭之, 澤井高志
2. 発表標題 関節リウマチ滑膜組織における CD14+VIM+細胞の意義
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会・学術集会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rie Kurose, Takashi Satoh, Kenya Murakami, Akira Kurose, Yo-ichi Satoh, Yasuyuki Ishibashi, Kinji Ishida, Katsutoshi Ogasawara, Akinari Morikawa, and Takashi Sawai
2. 発表標題 The Relationship between CD14 and Vimentin-Positive Synovial Dendritic-Shaped Cells and Synovitis in Rheumatoid Arthritis
3. 学会等名 Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rie Kurose, Takashi Satoh, Akira Kurose, Yo-ichi Satoh, Yasuyuki Ishibashi, Kinji Ishida, Katsutoshi Ogasawara, Takashi Sawai
2. 発表標題 CD14+ dendritic-shaped cells in synovial tissue of rheumatoid arthritis
3. 学会等名 APLAR 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒瀬理恵, 字月美和, 村上賢也, 石橋恭之, 澤井高志
2. 発表標題 関節リウマチ滑膜組織の超微形態学的解析
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会総会・学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Rie Kurose, Takashi Satoh, Miwa Uzuki, Kenya Murakami, Akira Kurose, Yo-ichi Satoh, Yasuyuki Ishibashi, Kinji Ishida, Katsutoshi Ogasawara, Takashi Sawai
2. 発表標題 Three-dimensional analysis of synovial dendritic-shaped cells by electron microscopy
3. 学会等名 APLAR 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒瀬理恵, 越智隆弘, 宇月美和, 村上賢也, 石橋恭之, 澤井高志
2. 発表標題 三次元電子顕微鏡解析を用いた関節リウマチの炎症慢性化の解明
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒瀬理恵, 佐藤孝, 黒瀬頭, 石橋恭之, 石田欣二, 小笠原勝利, 赤坂俊英, 越智隆弘, 澤井高志
2. 発表標題 三次元電子顕微鏡解析を用いた関節リウマチ炎症慢性化の解明
3. 学会等名 第6回JCRベーシックカンファ(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rie Kurose, Takahiro Ochi, Takashi Satoh, Miwa Uzuki, Kenya Murakami, Akira Kurose, Yo-ichi Satoh, Yasuyuki Ishibashi, Kinji Ishida, Katsutoshi Ogasawara, Akinari Morikawa, Takashi Sawai
2. 発表標題 Ultra-Microscopic Analysis of Nursing Phenomenon in Synovial Tissue of Rheumatoid Arthritis
3. 学会等名 Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2019(国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 澤井高志, 宇月美和, 村上賢也, 黒瀬理恵, 越智隆弘	4. 発行年 2020年
2. 出版社 北陵館	5. 総ページ数 5
3. 書名 別冊Bio Clinica	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	澤井 高志  (Sawai Takashi)  (00125577)	東北大学・医学系研究科・学術研究員   (11301)	
研究分担者	佐藤 孝  (Sato Takashi)  (20170756)	岩手医科大学・医学部・教授   (31201)	
研究分担者	黒瀬 顕  (Kurose Akira)  (70244910)	弘前大学・医学研究科・教授   (11101)	
研究分担者	石橋 恭之  (Ishibashi Yasuyuki)  (80292142)	弘前大学・医学研究科・教授   (11101)	

## 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

## 8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関