

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成21年度～平成22年度

課題番号：21790949

研究課題名（和文） 滑膜線維芽細胞の脂肪分化誘導によるリウマチ関節再構成の検証

研究課題名（英文） Regeneration of joint structure by adipogenesis induction of fibroblast synovial cell in rheumatoid arthritis.

研究代表者

山崎 聡士（YAMASAKI SATOSHI）

長崎大学・医歯（薬）学総合研究科・助教

研究者番号：30367388

研究成果の概要（和文）：

炎症性サイトカインは滑膜線維芽細胞と同様に、骨髄由来の間葉系幹細胞の脂肪分化抑制効果を発揮した。骨髄由来間葉系幹細胞は、脂肪分化誘導により IL-6 の産生が低下するとともに、細胞運動能が低下した。骨髄由来間葉系幹細胞は関節リウマチの初期病変である骨髄浮腫の構成細胞である可能性があり、類似形質を有する滑膜線維芽細胞と同期して脂肪分化を誘導することで、関節リウマチにおける炎症や関節破壊の環境を是正し、これを再構成する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Adipogenesis is clearly inhibited by various inflammatory cytokines in both MSC and FLS. The production of IL-6 is inhibited after adipogenesis in both MSC and FLS. Adipogenesis of MSC disrupt the actin structure, which leads to the less migration ability of the cell. Our results indicate that undifferentiated and proliferating MSC in “bone edema”, a recently recognized as inflammatory bone marrow lesion in early stage of rheumatoid arthritis, contribute to the progression of the disease, therefore, the adipogenic induction of MSC and FLS can regenerate a favorable joint environment for maintaining auricular structure.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成21年度	1,900,000	570,000	2,470,000
平成22年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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・アレルギー内科学

キーワード：①関節リウマチ②滑膜細胞③脂肪分化④RNA regulon⑤iPS

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞は間葉系細胞への分化ポテンシャルを有するとともに、免疫調整機能を有している事が知られている。旧来、関節リウ

マチにおいて滑膜細胞は関節固有の間葉系細胞として捉えられてきたが、(1), (2)の様にその分化能が発見され、これに伴う機能変換が解明されてきた。

(1) 線維芽滑膜細胞 (fibroblast-like synovial cells: FLS) の増殖は RA に特徴的な病理像であり、これがサイトカイン、ケモカイン、プロテアーゼの主要産生細胞である事から、最も重要な治療標的と見なされている。Lieden 大学 Luyten らのグループは滑膜線維芽細胞が骨髄中の間葉性幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) と同様に、骨・軟骨・脂肪・筋肉へと分化することを報告 (Arthritis Rheum. 2001)。

(2) 我々は FLS の脂肪細胞への分化による RA 治療の可能性を提唱 (Rheumatology. 2004)。この中で、脂肪化滑膜線維芽細胞では interleukin-6 (IL-6)、IL-8、MMP-2 の産生が低下する事を証明した。

これらの事実は、関節内の FLS を含む間葉性幹細胞が、脂肪分化を介して関節構造のホメオスタシス維持に関与し、このバランスが破綻したときには何らかの機序で関節リウマチの発症および進展へ影響を及ぼす事を示唆し、脂肪分化の人為的誘導が関節リウマチ治療ポテンシャルを有する事を示す。

2. 研究の目的

本研究では、未分化維持因子が FLS や MSC の脂肪分化を阻害、さらに分化阻害された FLS, MSC がサイトカイン、プロテアーゼの産生亢進を介して関節炎を促進するという仮説の検証を目的とする。

3. 研究の方法

(1) FLS および MSC の脂肪分化誘導は、ヒト間葉系幹細胞脂肪細胞分化培地キット (タカラバイオ) を使用。分化誘導期間は2週間で行なった。

(2) TNF α , IL-1 β , IL-6, soluble IL-6 receptor, TGF β , IL-11 (R&D) を使用し、これらのサイトカインの脂肪分化への影響を検証した。

(3) 培養上清中のサイトカインは、Antibody Array (Ray Biotech) および ELISA (R&D) にて測定した。

(4) Invasion Assay は分化誘導した FLS および MSC をマイクロピペットチップでスクラッチした後、12時間置きに写真撮影を行った。

(5) Kf14, Oct3/4, Sox2 の蛋白質発現をウェスタンブロットにて確認した。

(6) siRNA は dharmacon 社より購入し、oligofectamine (Invitrogen) を使用してトランスフェクトした。

4. 研究成果

(1) サイトカインは MSC の脂肪分化を抑制 MSC の脂肪分化誘導の過程で、TNF α , IL-1 β , IL-6+soluble IL-6 receptor, TGF β , を添加したところ、FLS と同様 (Rheumatology. 2004) に脂肪分化が抑制された (図 1)。

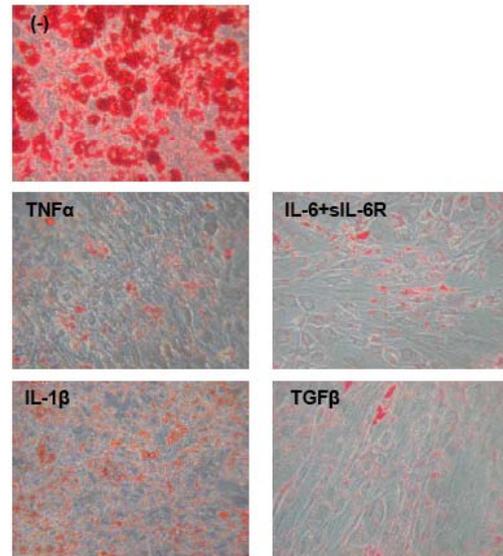


図 1 : サイトカインによる脂肪分化抑制

(2) 脂肪分化は MSC のサイトカイン分泌パターンを変換する

分化誘導した MSC と分化誘導を行なわなかった MSC の培養上清を (A) Antibody Array でスクリーニングを行ない、(B) ELISA で確認した。脂肪分化なし MSC (Adipogenesis (-)) と比較して、脂肪分化あり MSC (Adipogenesis (+)) では IL-6 産生が亢進し、IL-8 産生は抑制されていた (図 2A)。この結果は ELISA にても確認された (図 2B)。

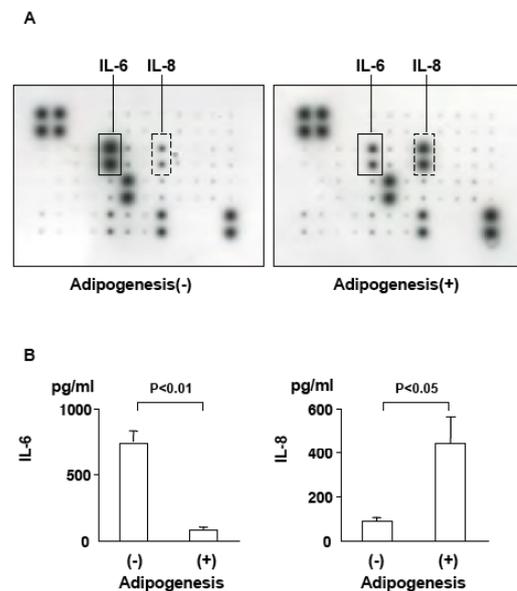
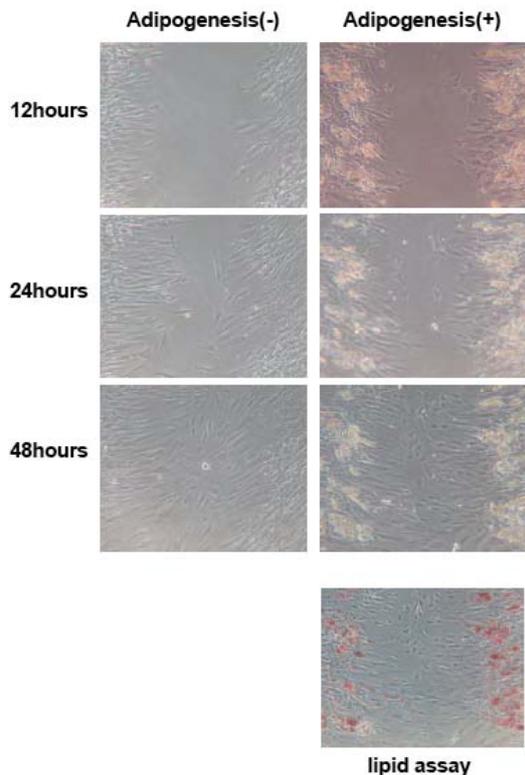


図 2 : 脂肪分化誘導による MSC のサイトカイン分泌パターンの変化。(A) Antibody Array (B) ELISA IL-6 (左) IL-8 (右)。Adipogenesis (+): 脂肪分化誘導あり Adipogenesis (-): 脂肪分化誘導なし

(3) 脂肪分化は MSC の運動を抑制する。
分化誘導した MSC と分化誘導を行なわなかった MSC の運動能を Invasion Assay で確認した。



脂肪分化なし MSC (Adipogenesis(-)) と比較して、脂肪分化あり MSC (Adipogenesis(+)) では運動能低下が確認された (図 3)。

図 3: 脂肪分化誘導による MSC 運動能の低下。脂肪分化誘導後、ピペットチップにて細胞をスクラッチし、12時間おきに写真撮影を行った。脂肪滴を有さない未分化 MSC は間隙へと移動し、これを埋めてしまうが脂肪滴を有する MSC は動かない。下の写真は脂肪滴を Oil Red O にて染色した。

Adipogenesis(+): 脂肪分化誘導あり
Adipogenesis(-): 脂肪分化誘導なし

(4) IL-11 による脂肪分化抑制モデルの検証
TNF α , IL-1 β , IFN γ と同様に、TGF β -1 が MSC の脂肪分化を抑制するが、同時に IL-11 の著明な誘導をもたらすことが判明した。TGF β -1 が脂肪分化抑制効果は、既知の脂肪分化抑制因子である IL-11 を介す可能性が示唆された。しかし、リコンビナント IL-11 は滑膜線維芽細胞の脂肪分化抑制効果を認めず、IL-11 中和抗体処理しても、TGF β -1 による滑膜線維芽細胞の脂肪分化抑制は解除されなかった。

以上の検証により、滑膜線維芽細胞の脂肪分化抑制メカニズムとして IL-11 モデルは否定的と判断した。

(5) iPS 誘導因子モデルの検証

滑膜組織での発現検討: iPS 誘導因子 (Oct3/4, Sox2, Klf14) の中で、Klf14 の発現を免疫染色にて確認した。培養滑膜細胞でも Klf14 の発現がウェスタンブロットで確認された。一方、Oct3/4, Sox2 の蛋白質レベルでの発現は確認できなかった。

siRNA を用いて、培養滑膜細胞の KLF4 のノックダウンを行い、蛋白質レベルでの発現抑制を確認した。この細胞を用いて、脂肪分化誘導を行なう実験を行なっている。これに先立ち、KLF4 ノックダウン滑膜細胞の培養上清中のサイトカインプロファイルを検証した所、上記の脂肪分化抑制性のサイトカインの上昇を認めているため、KLF4 のノックダウン滑膜細胞では脂肪分化抑制が起こる事が予想される。

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 16 件)

1. Functional Change of Bone Marrow derived Mesenchymal Stem Cell Through Adipogenesis. Akitomo Okada, Satoshi Yamasaki (2 番目/10 人). Clin Exp Rheumatol. 掲載確定。
2. Post-transcriptional regulation of IL-6 production by Zc3h12a in fibroblast-like synovial cells. Koga Tomohiro, Satoshi Yamasaki (2 番目/15 人) Clin Exp Rheumatol. 掲載確定。
3. In rheumatoid arthritis patients treated with tocilizumab, the rate of clinical disease activity index (CDAI) remission at 24 weeks is superior in those with higher titers of IgM-rheumatoid factor at baseline. Kawashiri SY, Yamasaki S (7 番目/14 人). Mod Rheumatol. 2011 Jan 155. [Epub ahead of print]

4. The power Doppler ultrasonography score from 24 synovial sites or 6 simplified synovial sites, including the metacarpophalangeal joints, reflects the clinical disease activity and level of serum biomarkers in patients with rheumatoid arthritis. Kawashiri SY, Yamasaki S (10 番目/13 人). *Rheumatology (Oxford)*. 2010 Dec 23. [Epub ahead of print]
5. Coparative study of the detection of joint injury in early-stage rheumatoid arthritis by MRI of wrist and finger joints and physical examination. Tamai M, Yamasaki S (12 番目/18 人). *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2010 Nov 15. [Epub ahead of print]
6. Anti-centromere antibody-seropositive Sjögren's syndrome differs from conventional subgroup in clinical and pathological study. Nakamura H, Yamasaki S (7 番目/9 人). *BMC Musculoskelet Disord*. 2010 Jul 1;11:140.
7. Regulation of disease susceptibility and mononuclear cell infiltration into the labial salivary glands of Sjögren's syndrome by monocyte chemotactic protein-1. Iwamoto N, Yamasaki S (11 番目/15 人). *Rheumatology (Oxford)*. 2010 Aug;49(8):1472-8.
8. A single centre retrospective analysis of AECG classification criteria for primary Sjogren's syndrome based on 112 minor salivary gland biopsies in a Japanese population. Nakamura H, Yamasaki S (5 番目/12 人). *Rheumatology (Oxford)*. 2010 Jul;49(7):1290-3.
9. Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression. Yamasaki S, Ivanov P, Hu GF, Anderson P. *J Cell Biol*. 2009 Apr 6;185(1):35-42. .
10. Proinflammatory cytokines synergistically enhance the production of chemokine ligand 20 (CCL20) from rheumatoid fibroblast-like synovial cells in vitro and serum CCL20 is reduced in vivo by biologic disease-modifying antirheumatic drugs. Kawashiri SY, Yamasaki S (9 番目/16 人). *J Rheumatol*. 2009 Nov;36(11):2397-402.
11. Low prevalence of ectopic germinal centre formation in patients with HTLV-I-associated Sjogren's syndrome. Nakamura H, Yamasaki S (6 番目/8 人). *Rheumatology (Oxford)*. 2009 Jul;48(7):854-5.
12. 山崎聡土, RNA granule. 炎症と免疫 vol. 19、no. 2、pp. 93-95. 2011 Feb 20.
13. 山崎聡土, 藤川敬太, 荒牧俊幸, 岩本直樹, 川尻真也, 玉井慎美, 中村

英樹, 井田弘明, 川上純, 江口勝美, 折口智樹、 関節リウマチの生物学的製剤投与中に発症した結核感染 3 症例 : 九州リウマチ、30 卷 1 号 Page43-48 (2010.03)

14. 山崎聡士, 川上純, 江口勝美、 関節リウマチ疾患活動性の評価法 : リウマチ科、43 卷 6 号 Page565-570, 2010.
15. 江口勝美, 山崎聡士, 川上純, 川尻真也, 折口智樹, 中村英樹、 リウマチ(膠原病)・アレルギー学、日本医事新報, 4476 : 10-20, 2010.
16. 江口勝美, 玉井慎美, 川上純, 藤川敬太, 有馬和彦, 山崎聡士, 荒牧俊幸, 折口智樹, 宇佐俊郎, リウマチ(膠原病)・アレルギー学、日本医事新報, 4425, 63-73, 2009.

[学会発表] (計 6 件)

1. Koga T, Yamasaki S, et al. Post-transcriptional regulation of IL-6 by Zc3h12a in fibroblast-like synovial cells. ACR/ARHP10 Scientific Meeting. November 6-11, 2010. Atlanta, GA.
2. Koga T, Yamasaki S, et al. Post-transcriptional regulation of IL-6 by Zc3h12a in fibroblast-like synovial cells. 14th congress of asia pacific league of associations for rheumatology July 11-15, 2010. Hong Kong.
3. Koga T, Yamasaki S, et al. Post-transcriptional regulation of IL-6 by Zc3h12a in fibroblast-like synovial cells. Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2010 June 16- 19, 2010. Rome, Italy.
4. 岡田覚丈、山崎聡士、中村英樹、井田弘明、折口智樹、川上純、江口勝美、 骨髄浮腫の細胞生物学的検討、第 54 回日本リウマチ学会総会、2010 年 4 月 22 日-25 日、東京。
5. 古賀智裕、山崎聡士 他、関節リウマチ滑膜線維芽細胞における Zc3h12a を介した IL-6 の転写後制御の可能

性 第 31 回日本炎症・再生医学会、2010 年 8 月 5 日-6 日、東京。

6. 古賀智裕、山崎聡士 他、関節リウマチ滑膜細胞における RNA 結合蛋白を介した IL-6 の転写後制御の可能性、第 54 回日本リウマチ学会総会、2010 年 4 月 22 日-25 日、東京。

[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]

特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 聡士 (YAMASAKI SATOSHI)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号 : 3036738