

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590302

研究課題名(和文)骨疾患の病態発症機構に果たす肥満細胞の役割の解析と新しい薬物治療方法の開発

研究課題名(英文)Pathophysiological role of mast cells on the bone homeostasis.

研究代表者

塩田 直孝 (Shiota, Naotaka)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号：60206050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：コラーゲン誘発関節炎モデルマウスを用いて肥満細胞の増殖活性化と関節炎の発症進展との関連性を明らかにし、更に肥満細胞を標的にした関節炎の新しい薬物治療方法を開発する事を目的に研究を実施した。関節炎を発症したマウスに、肥満細胞脱顆粒抑制薬を8週間、あるいはキマーゼ阻害薬を4週間投与すると、肥満細胞と破骨細胞の増殖活性化が抑制され、関節炎の発症進展が著明に抑制された。これらの結果から、肥満細胞の増殖活性化が、関節炎の発症機構に重要な役割を果たしていることが明らかに出来た。また、肥満細胞の増殖活性化を抑制する薬物が、関節リウマチの新しい治療薬として有効であることが証明出来た。

研究成果の概要(英文)：The number of mast cells was markedly increased in the inflamed paws of collagen-induced arthritis in mice, and mast cells were one of the major cells producing TNF-alpha. TNF-alpha positive mast cells were present extensively throughout the inflamed synovium of arthritic mice, and some of the mast cells were in close proximity of osteoclasts in the area of marked bone and cartilage destruction. Treatment with a mast cell membrane stabilizer for 8 weeks and chymase inhibitor for 4 weeks significantly reduced clinical and X-ray scores of collagen-induced arthritis, and decreased the number of TNF-alpha positive mast cells and the mRNA levels of TNF-alpha in the inflamed paws of arthritic mice. The number of osteoclasts was also decreased by treatment with a mast cell membrane stabilizer and chymase inhibitor. These observations suggest that mast cells may be involved in bone metabolism and pathogenesis of collagen-induced arthritis in mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：関節リウマチ 肥満細胞 慢性炎症

### 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチは患者数が非常に多い難病疾患である。近年、新しい治療薬が開発されて治療成績も向上しているが、重症例では治療効果が不十分な例も多く、また薬物の副作用の問題もあり十分に満足の出来る治療方法が未だに確立されていないのが現状である。そのため、全く新しい視点からの治療方法の開発が待たれている。関節リウマチの発症機構には、破骨細胞に加えてマクロファージやTリンパ球、活性滑膜細胞が中心的な役割を果たしていることが従来より良く知られている。一方で、関節リウマチを発症した患者の増殖滑膜組織内には、多数の肥満細胞が存在することが古くから報告されていたが、肥満細胞は特殊な染色を実施しないと同定出来ないこともあり、肥満細胞の存在自体が現在までに注目されることは殆どなかった。そのため、滑膜組織内で増殖活性化している肥満細胞の役割も未知のままであった。肥満細胞は、急性アレルギー性疾患に関わる炎症細胞であるが、TNF- $\alpha$  を初めとして様々なサイトカインや増殖因子、プロテアーゼなどの活性因子を産生する多機能炎症細胞であり、近年、様々な慢性炎症性疾患の発症機構にも関与することが明らかになってきている。このような背景の中で、関節リウマチを発症した時に骨関節組織中で増殖活性化してくる多機能炎症細胞である肥満細胞に注目することで、関節リウマチを初めとする骨代謝性疾患の病態発症機構を新しい側面より探求出来る可能性があると考えて、本研究課題を立案した。

### 2. 研究の目的

肥満細胞は、急性アレルギー性疾患の発症機構に関わることは古くから良く知られてきたが、慢性炎症性疾患の病態発症機構における肥満細胞の役割は殆ど解析されていない。本研究課題では、特に重要な慢性骨代謝性疾患である関節リウマチと骨粗鬆症に注目し、肥満細胞が骨疾患の発症機構に如何に関与しているかを明らかにすることを目的とする。また、肥満細胞の機能を抑制出来る薬物を、関節リウマチモデル動物あるいは骨粗鬆症モデル動物に投与し治療効果を検討することで、肥満細胞を標的にした全く新しい薬物治療方法の有用性を検討にすることも目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) コラーゲン誘発関節炎モデルマウスにおける肥満細胞の役割の解析と、肥満細胞を標的にした薬物トラニラストの有効性の検討

マウスに牛2型コラーゲンとアジュバントの混合物を投与して関節炎を誘発させた。関節炎の発症進行程度はクリニカルスコアとX線画像解析スコア並びに組織学的解析と

生化学的解析で評価した。関節炎を発症したマウスを2群に分けて、1群には効果の無い対照薬を、他群には肥満細胞脱顆粒抑制薬であるトラニラストを、関節炎発症後4週間の時点より8週間連続投与し治療効果を検討した。

(2) コラーゲン誘発関節炎モデルマウスにおける肥満細胞の役割の解析と、肥満細胞を標的にした薬物キマーゼ阻害薬の有効性の検討

関節炎を発症したマウスを2群に分けて、1群には対照薬を、他群には肥満細胞由来の特異的プロテアーゼであり種々の炎症性疾患の発症機構に関与することが示唆されているキマーゼに対する特異的阻害薬であるキマーゼ阻害薬を、4週間連続投与し治療効果を検討した。

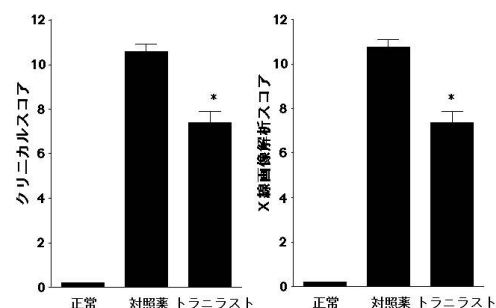
(3) 低カルシウム誘発骨粗鬆症発症モデルラットにおける肥満細胞の役割の解析と、肥満細胞を標的にした薬物トラニラストの有効性の検討

カルシウム欠損食をラットに8週間投与して、骨粗鬆症を誘発した。骨粗鬆症発症モデルラットを用いて肥満細胞の増殖活性化と骨粗鬆症発症の発症進展との関連性を検討した。また、肥満細胞脱顆粒抑制薬であるトラニラストを8週間連続投与し、骨粗鬆症の発症進展に及ぼす効果を検討した。

### 4. 研究成果

(1) 2型コラーゲンで自己免疫したマウスは、4週間後には手足の腫脹を認め関節炎を発症し始めた。この時点で、マウスを2群に分けて、1群には対照薬、他群にはトラニラストを8週間連続経口投与した。8週間のトラニラストの連続経口投与により、クリニカルスコアとX線画像解析スコアの著明な減少が認められ、関節炎の発症進展が肥満細胞の増殖活性化を抑制するトラニラストの投与により抑制できることが明らかになった(図1)。

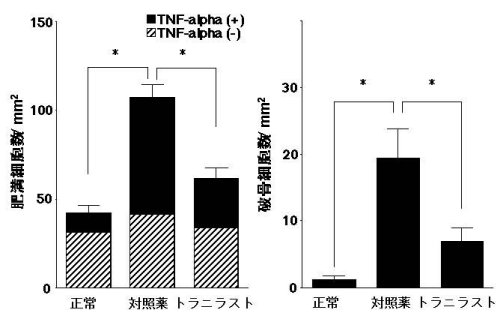
図1



関節炎を発症すると肥満細胞は増殖滑膜組織の中で著しく増殖する。正常のマウスでは、

肥満細胞の大半が TNF-alpha を発現していなかったが、関節炎発症後に滑膜組織中で増殖してくる肥満細胞は TNF-alpha を強く発現していた。この TNF-alpha を強発現している肥満細胞の増殖はトラニラストの投与により有意に抑制された (図 2)。また重要なことに、肥満細胞は破骨細胞の直ぐ近傍に多く存在していた。破骨細胞も関節炎の発症により骨破壊が進行すると数が著しく増加するが、この破骨細胞の増殖もトラニラストによって抑制された (図 2)。また、トラニラストの投与により、肥満細胞の特異的プロテアーゼであるキマーゼの発現も顕著に抑制された。更に病変部位での TNF-alpha の発現量も顕著に低下していた。これらの結果から、関節炎が発症すると、病変部位に TNF-alpha を強発現している肥満細胞が増殖し、この肥満細胞から分泌される TNF-alpha が近傍に存在する破骨細胞を活性化し、骨破壊が進行することが明らかになった。またキマーゼは、細胞外基質を分解したり、骨破壊に関わるメタロプロテアーゼを活性化する作用を有しており、肥満細胞が増殖活性化することで、肥満細胞由来のキマーゼによって骨基質の破壊が進行する可能性も明らかになった。

図 2



関節炎を発症したマウスでは、滑膜組織が増殖するが、この滑膜組織中で肥満細胞の遊走と増殖を誘導する stem cell factor の発現が著しく亢進していた。このことから、滑膜組織の増殖が肥満細胞の遊走と増殖を促進し、局所で増殖活性化した肥満細胞から分泌されたキマーゼが骨基質を破壊すると共に、TNF-alpha が破骨細胞を活性化し、骨破壊を更に増悪しているメカニズムを明らかに出来た。更に、肥満細胞の増殖活性化を抑制出来るトラニラストが、関節炎の発症進展を抑制出来たことから、肥満細胞を標的にした全く新しい関節リウマチの治療方法の可能性を明らかに出来たことは非常に重要な成果である。

(2) 肥満細胞の増殖活性化を抑制するトラニラストの投与により関節炎の発症進展が抑制できることが明らかになったが、肥満細胞由来の特異的プロテアーゼであるキマーゼ

の直接的な役割を明らかにするために、次に関節炎マウスに新規開発中のキマーゼ阻害薬を連続投与し、その治療効果を検討した。関節炎を発症したマウスを 4 週間の時点で 2 群に分けて、1 群には対照薬を、他群にはキマーゼ阻害薬は 4 週間連続で腹腔内に投与した。キマーゼ阻害薬の投与により、クリニカルスコアと X 線画像解析スコアが共に有意に減少し、キマーゼ阻害薬の投与により、関節炎の発症進展が抑制出来ることが明らかになった (図 3)。また、キマーゼ阻害薬の投与により、局所での TNF-alpha 陽性の肥満細胞数と破骨細胞数も著明に減少した (図 4)。

図 3

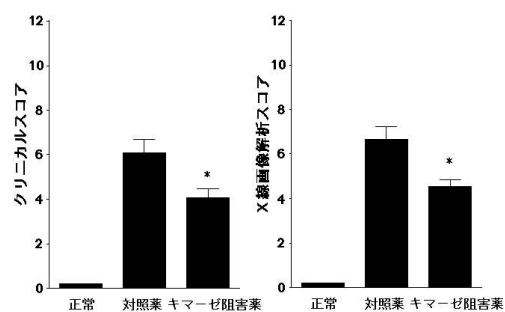
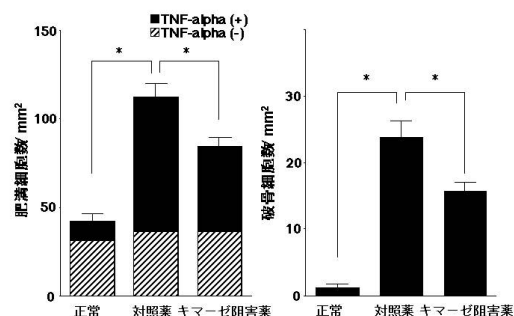


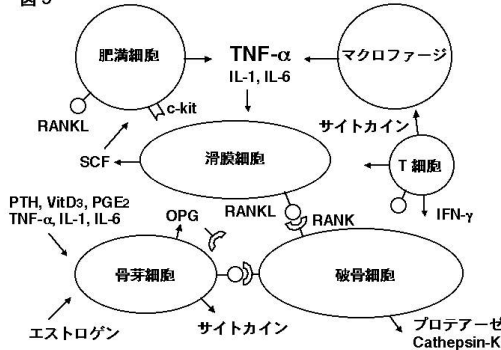
図 4



関節リウマチの発症機構に関しては、これまではマクロファージと T 細胞が主体的な役割を果たしていると認識されていた。今回の研究成果により、関節炎の病変部位で著しく増殖活性化する肥満細胞も、関節炎の発症機構に重要な役割を果たしていることが明らかになった (図 5)。肥満細胞は TNF-alpha やキマーゼだけでなく他にも様々な活性因子を放出する多機能炎症細胞であることから、肥満細胞が関節リウマチの病態発症機構に果たす役割も非常に広範囲に渡ると考えられる。この肥満細胞の機能全体を抑制できる治療薬は、最近の主流になっている分子標的薬よりも多様な治療効果を発揮することが期待できる。また、従来薬と肥満細胞の増殖活性化を抑制する新しい薬物との併用により、治療効果を更に上げながら副作用を軽減できる新しい治療法を開発出来るこ

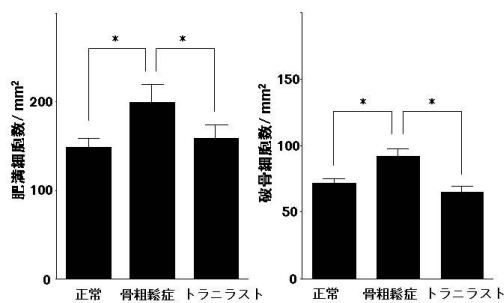
とも期待できる。関節リウマチの病態発症機構に、今まで注目されることがなかった肥満細胞が極めて重要な役割を果たしている可能性が今回の研究によって明らかに出来た。

図5



(3) 関節リウマチと並んで、重要な骨関連疾患が骨粗鬆症である。骨粗鬆症においても破骨細胞の活性化が重要な役割を担っている。この骨粗鬆症での破骨細胞の活性化にも、肥満細胞が関与しているのかを明らかにするために、カルシウム欠損食の投与によって骨粗鬆症モデルラットを作成し、肥満細胞と破骨細胞の動態を組織学的並びに生化学的に解析した。ラットにカルシウム欠損食を投与すると、1週間経過後より大腿骨の骨密度の低下が始まり、8週間経過後には著明な骨粗鬆症の発症進展が認められた。骨粗鬆症を発症したラットの大腿骨では、肥満細胞と破骨細胞の増殖が共に認められた。更に肥満細胞の増殖活性化を抑制できるトラニラストを骨粗鬆症ラットに8週間連続経口投与すると、肥満細胞と破骨細胞の増殖が有意に抑制された(図6)。このことから、骨粗鬆症の病態発症機構においても肥満細胞の増殖活性化が重要な役割を担っていることを明らかに出来た。

図6



骨芽細胞と破骨細胞の二つの主要な骨細胞の機能のバランスが綿密に保たれている時には、正常な骨形態が維持されるが、このバランスが崩れたときに様々な骨疾患が発症する。骨代謝のメカニズムは未知の部分が多いが、今回の研究成果により、これまで全く注目されることが無かった肥満細胞

が骨代謝に重要な役割を果たしていることを明らかに出来た。また、骨疾患の病態発症機構の解析や治療方法に新しい展開をもたらすことが出来ただけでなく、肥満細胞が急性アレルギー疾患のみならず、関節リウマチや骨粗鬆症といった慢性疾患の病態発症機構に関与していることも明らかに出来た。炎症免疫の分野で、肥満細胞は殆ど注目されることは無かったが、肥満細胞に注目することで、慢性炎症疾患などの難病の治療にも新しい展開をもたらせると期待している。

### 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)

[学会発表](計1件)

塩田 直孝、新堀 智子、奥西 秀樹、Pathophysiological role of mast cells in collagen-induced arthritis in mice. 日本薬理学会総会、2012年3月14日、京都

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

塩田 直孝 (SHIOTA, Naotaka)  
島根大学・医学部・准教授  
研究者番号：60206050

#### (2) 連携研究者

田中 徹也 (TANAKA, Tetsuya)  
島根大学・医学部・助教  
研究者番号：10346380

新堀 智子 (SHIMBORI, Chiko)  
島根大学・医学部・助教  
研究者番号：40437554