

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23659377

研究課題名（和文） 炎症性疾患克服に向けた線維芽細胞病理学開拓への挑戦

研究課題名（英文） Fibroblast pathology for suppression of inflammatory diseases

研究代表者

上阪 等 (KOHSAKA HITOSHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：00251554

研究成果の概要（和文）：

炎症局所の線維芽細胞は程度の差はあれ活性化している。従来、これはプロフェッショナル免疫細胞活性化の結果とみなされ、線維芽細胞を炎症の治療標的とする研究はなかった。本研究では炎症局所線維芽細胞の異なる活性状態を代表する2疾患（関節リウマチ[RA]、多発性筋炎[PM]）モデルをプロトタイプとして、炎症局所の線維芽細胞の由来・動員機序、活性化とその維持機構を解析することを目的とした研究を行った。

RAモデル研究においては、関節炎の主病態である滑膜炎を形成する滑膜線維芽細胞の起源と動態を明らかにし、新たな治療法を開発することを目的に検討を行った。線維細胞が病的滑膜線維芽細胞の起源である可能性や、滑膜炎の病態に関与する可能性につき明らかにするため、マウスの末梢血・骨髄細胞からの線維細胞の同定と培養系の条件を確立した。今後、この細胞を用いて、関節炎を発症したマウスより回収した線維細胞を、他のマウスに移入し、関節炎の発症過程への影響を検討することにより線維芽細胞病理学へとつなげることができる。

PMモデル研究においては、筋炎において、筋組織にリンパ球・マクロファージ・線維芽細胞などの遊走を起こす因子の同定を試みた。筋肉の壊死・再生過程や前駆細胞からの分化過程において、筋肉に発現する細胞遊走因子のスクリーニングの結果は、ある種のケモカインが細胞誘導に関与していることを示していた。

研究成果の概要（英文）：

Although fibroblasts are activated in many inflammatory diseases, they are rarely targeted in treatment. The present studies were carried out to disclose pathological roles in inflammatory diseases. An isolation method of pathological fibroblasts has been established for analyses in arthritic diseases. Studies of regeneration processes involved in myositis revealed that chemokines are produced by mesenchymal cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般

キーワード：内科、線維芽細胞、ケモカイン、関節リウマチ、筋炎

1. 研究開始当初の背景

近年、リンパ球、マクロファージ、樹状細胞などのプロフェッショナル免疫細胞の様々な炎症性疾患における病理作用が解明され、分子生物学的技術の発達も相まって、生物学的製剤などによる炎症制御法が開発されてきた。しかし、過度の免疫抑制を始め、その副作用も多い。

一方、炎症局所では、多かれ少なかれ線維芽細胞が活性化、増殖し、炎症性メディエーターを産生する。従来、この過程は、活性化プロフェッショナル免疫細胞由来の炎症性サイトカインによる受動的過程と理解され、線維芽細胞は炎症治療の標的とされてこなかった。しかし、関節リウマチ(RA)では線維芽細胞増殖による滑膜過形成が問題となる。また、多発性筋炎(PM)では、線維芽細胞の一過性活性化が筋線維再生を補助することが示唆されている。

申請者は、これまで、RA 滑膜線維芽細胞の増殖制御が炎症制御に有用であること(Nature Med 1999)、その増殖制御療法がプロフェッショナル免疫細胞を抑制せずに治療効果を及ぼすこと(J Immunol 2008)などを見いだした。

さらに、PM 研究では、PM 筋傷害病態を反映するマウスモデル (C-protein-induced myositis: CIM) (Arthritis Rheum 2007)を世界に先駆けて開発した。

2. 研究の目的

本研究では、組織過形成、組織破壊、組織修復という異なる線維芽細胞病理作用を示すRA、PMをモデルとして、線維芽細胞の由来・動員機序、活性化とその維持機構を解析し、免疫抑制の少ない制御方法を探索し、線維芽細胞病理学を確立することを目的とする。

これは、内科一般領域の炎症病態における線維芽細胞の作用の理解につながる。

(1) 炎症局所線維芽細胞の由来・動員機序の解明

RA 滑膜過形成に関わる線維芽細胞は、表層滑膜線維芽細胞が炎症性サイトカインによって増殖したものとされてきた。しかし、薬剤(ブレオマイシン)誘導性肺炎モデルでは、骨髄由来の線維細胞の肺への移動が指摘された。これらの機序の有無を探索し線維芽細胞増殖/動員因子を同定する。

(2) 炎症局所線維芽細胞の活性化とその維持機構の解明

RA 滑膜線維芽細胞は *ex vivo* 培養でも、その活性化形質を保持し、盛んに増殖し炎症性サイトカインを出す。つまり、線維芽細胞は特

定の形質を保持するように運命付けられている。その形質を調べる。

3. 研究の方法

炎症局所の線維芽細胞の由来・動員機序の解明

線維芽細胞の由来：炎症局所の線維芽細胞の起源として、①健全状態でその組織にある線維芽細胞、②骨髄の間葉系幹細胞

(Mesenchymal stem cells: MSC) ないし血球系幹細胞 (Hematopoietic SC: HSC) に由来する血行性前駆細胞(線維細胞)のふたつが候補となる。一方、マウス骨髄移植実験では、放射線照とその後の骨髄細胞移入によって、HSCがドナー由来細胞に置換され、レシピエント由来のMSCが残るとされる。そこで、全細胞が蛍光色素をもつEGFPマウスの骨髄を野生型マウスに移植して骨髄キメラマウスを作成し、RA、PMのモデルであるコラーゲン誘導性関節炎(CIA)、Cタンパク誘導性筋炎(CIM)の炎症局所でfibroblast specific protein 1発現細胞のEGFP発色を確認し、炎症局所の線維芽細胞がHSCに依存する割合を確認する。

炎症局所線維芽細胞の活性化とその維持機構の解明

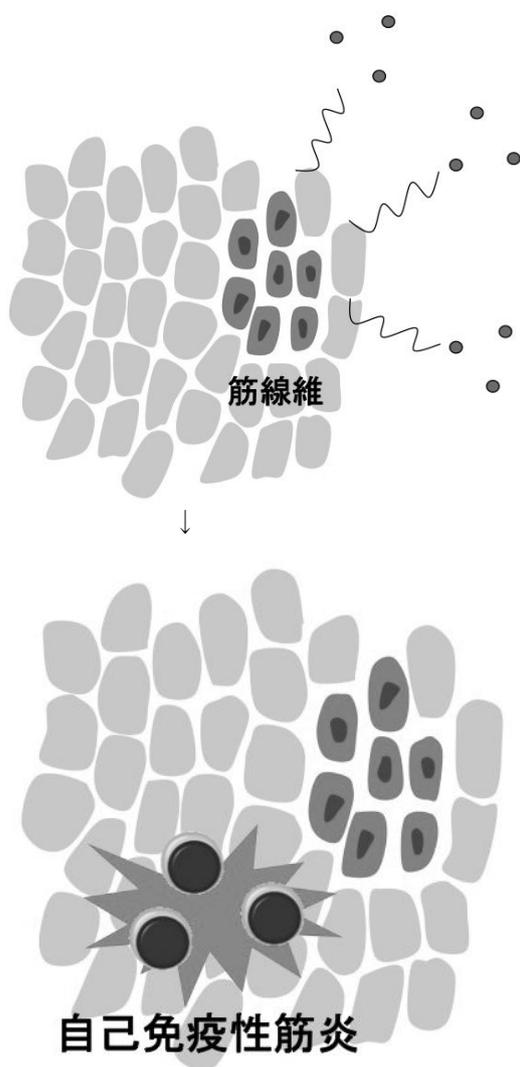
病変局所の線維芽細胞を *ex vivo* で分離培養する。ただし、PMモデルマウス筋組織に線維芽細胞は必ずしも豊富ではなく、単離に困難も予想される。その場合は、炎症筋組織をコラーゲンゼ処理して、間葉系細胞集団としての *mysphere* を分離培養し、この中に含まれる付着細胞を線維芽細胞として分離する。これらの細胞の増殖特性、炎症性メディエーター産生特性および刺激に対する応答特性を比較検討する。また、*ex vivo* の線維細胞刺激によって、線維芽細胞に病理特性を誘導するサイトカインも同定する。

4. 研究成果

線維細胞が病的滑膜線維芽細胞の起源である可能性や、滑膜炎の病態に関与する可能性につき明らかにするため、マウスの末梢血・骨髄細胞からの線維細胞の同定と培養系の条件を確立した。今後、この細胞を用いて、関節炎を発症したマウスより回収した線維細胞を、他のマウスに移入し、関節炎の発症過程への影響を検討することにより線維芽細胞病理学へとつなげることができる。

PMモデル研究においては、筋炎において、筋組織にリンパ球・マクロファージ・線維芽細胞などの遊走を起こす因子の同定を試みた。筋肉の壊死・再生過程や前駆細胞からの分化

過程において、筋肉に発現する細胞遊走因子のスクリーニングの結果は、ある種のケモカインが細胞誘導に関与していることを示していた(下図)。



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 11 件)

1. 上阪 等 膠原病の新しい風 内科 107(4), 562-564, 2011
2. 上阪 等, Peter Shane, 亀田秀人, 渥美達也 膠原病診療の現在と未来 -ステロイド・ファーストからステロイド・フリーへ- 107(4), 687-699, 2011
3. 上阪 等 多発性筋炎と皮膚筋炎 ドクターサロン 55(4), 294-297, 2011
4. 上阪 等 三科の診る多発性筋炎・皮膚筋炎 医学のあゆみ 239(1)1-5, 2011
5. 上阪 等 ここまでわかった自己免疫疾患 多発性筋炎/皮膚筋炎 臨床検査 55(11), 1150-1155, 2011
6. 上阪 等 生物学的製剤 T細胞活性化阻害薬 日本内科学会雑誌 100(10), 2979-2984, 2011
7. 上阪 等 炎症性筋疾患の病態と治療 「序」 炎症と免疫 20(1), 32-33, 2011
8. 木村直樹、上阪 等 多発性筋炎モデル動物による病態解析 炎症と免疫 20(1), 56-63, 2011
9. 上阪 等 滑膜線維芽細胞を標的とした治療法の開発 最新医学 67(2), 281-286, 2012
10. 上阪 等 関節リウマチはどのようにおこるのか からだの科学 273:16-19, 2012
11. 上阪 等 多発筋炎・皮膚筋炎 マウスモデル Clinical Neuroscience 30(3): 309-312, 2012

[学会発表] (計 2 件)

- ① Kimura N, Hirata S, Maeda A, Miyasaka N, Kohsaka H. Proinflammatory muscle fiber regeneration in autoimmune myositis. Gordon Research Conference on Myogenesis Aug 28 - Sep 2, 2011, Waterville Valley
- ② 上阪 等, 木村直樹, 沖山奈緒子, 宮坂信之 多発性筋炎における抗サイトカイン治療の標的-Seed and Soil Model- 第 39 回日本臨床免疫学会 平成 23 年 9 月 15-17 日 東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：特発性炎症性筋疾患の予防又は治療剤

発明者：上阪 等

権利者：東京医科歯科大学

種類：特許
番号：特願 2012-063595
出願年月日：2012年3月21日
国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上阪 等 (KOHSAKA HITOHI)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・准教授
研究者番号：00251554

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし