

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791522

研究課題名(和文) 微小粒子は、関節リウマチの形質細胞様樹状細胞を刺激し自然免疫反応を引き起こすか

研究課題名(英文) Does microparticles induce innate immunity with stimulation plasmacytoid dendritic cells in rheumatic diseases?

研究代表者

高窪 祐弥 (Takakubo, Yuya)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：80431641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：内因性物質の微小粒子は種々の細胞に作用し、リウマチ性疾患や、感染、心疾患、血栓症の病態形成に深く関与するとされる。本研究ではリウマチ性疾患の病態形成に深く関与する形質細胞様樹状細胞に対し、微小粒子がどのように作用するか検討した。ヒト唾液腺細胞株にアポトーシス(自己細胞死)を誘導し、微小粒子を遠心分離法により抽出した。抽出した微量粒子を形質細胞様樹状細胞と反応させ、Toll様受容体発現をqRT-PCR、ELISA法により測定した。Toll様受容体の発現は、微小粒子の添加で約2-3倍に増加した。微小粒子は形質細胞様樹状細胞を刺激し、Toll様受容体の発現を増加させた。

研究成果の概要(英文)：Rheumatic diseases are chronic and systemic autoimmune inflammatory diseases. However, the original causes of rheumatic diseases are unknown yet. Microparticles are complex structures composed of a lipid bilayer that contains transmembrane proteins and encloses soluble hydrophilic components derived from the cytosol of the donor cell, including DNA, RNA or nucleus proteins in themselves. Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) are an important role as innate inflammatory in rheumatic diseases. The aim of study is to assess the reaction of plasmacytoid DC by stimulating of MPs in rheumatic diseases.

Microparticles induced the expression of TLR7 and TLR9 on pDCs. MPs and ABs may play a role in the onset and maintenance of rheumatic disease via TLR pathways.

研究分野：関節リウマチ

キーワード：関節リウマチ 微小粒子 自然免疫 樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 関節リウマチは有病率 0.5-0.9%とされ、日本では約 70 万人が罹患しているとされます。関節リウマチは、原因不明の免疫異常を基礎とする全身性炎症疾患であり、免疫難病の一つです。近年、早期から生物学的製剤などの強力な薬物療法を導入することによって関節リウマチの予後が劇的に改善する可能性が示唆されていますが、いまだその病態は不明で根治的治療法は確立されていません。関節リウマチの原因を早期に特定し、その治療法を開発することが依然急務となっています。

(2) 近年、関節リウマチの病因として自然免疫系における細胞間相互作用の重要性が指摘されています。そして、自然免疫系反応を引き起こす内因性物質の一つとして、自己組織から発生する微小粒子の存在が明らかになってきました。微小粒子は、直径 0.05-3 μm の膜性の物質で、その内部に DNA、RNA、細胞内タンパクを含み、自然免疫反応に重要な Toll 様受容体に結合するリガンドの一つとしても注目されています。申請者らは、抗原提示細胞の一つであり、ウイルス感染防御において Toll 様受容体を介し自然免疫反応の中心的役割を担う形質細胞様樹状細胞が、関節リウマチにおいて数的、機能的異常を示すことを明らかにしてきました。

2. 研究の目的

(1) 本研究では微小粒子が、関節リウマチの病態形成に深く関与する形質細胞様樹状細胞にどのように作用するか、その反応機構を明らかにし、関節リウマチの発症機序の一端を明らかにすることです。

3. 研究の方法

(1) 対象は手術時に採取した関節リウマチ滑膜組織 40 例の新鮮凍結とパラフィン包埋組織標本を用いました。連続切片においてリ

ンパ球集簇における単位面積当たりの平均陽性細胞数を計測し、さらに共焦点レーザー顕微鏡を用い、免疫蛍光二重染色により Toll 様受容体陽性細胞の詳細を検討しました。

(2) ヒト唾液腺細胞株にアポトーシスを誘導し、微小粒子とアポトーシス小体を遠心分離法により抽出しました。遠心法の種類により、アポトーシス小体が豊富な集団 (ペレット 1)、アポトーシス小体と微小粒子 (ペレット 2)、微小粒子が豊富な集団 (ペレット 3) に分離しました。抽出した各ペレット 1、2、3 をヒト形質細胞様樹状細胞株と反応させ、Toll 様受容体の発現を reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法、ELISA 法により測定しました。RT-PCR 法は、各細胞群から total RNA を抽出し、RT-PCR 法により cDNA ライブラリーを作成後、Toll 様受容体の PCR を行いました。

4. 研究成果

(1) 関節リウマチ滑膜組織における Toll 様受容体陽性細胞の局在とその発現様式を明らかにし、微小粒子刺激によっておこる自然免疫反応が、生物学的製剤治療後も関節リウマチ滑膜組織における炎症を残存させる機構に関与している可能性を示しました。

(2) ヒト唾液腺細胞株から採取したアポトーシス小体と微小粒子を形質細胞様樹状細胞の細胞株から継代した細胞と共培養すると、炎症性サイトカインである TNF- α はアポトーシス小体群 (ペレット 1) 添加により 10 倍、微小粒子 (ペレット 3) 添加により 18 倍に増加しました。IL-6 は、アポトーシス小体群 (ペレット 1) の添加により 24 倍、微小粒子群 (ペレット 3) の添加により 65 倍でした。

以上より、微小粒子刺激によっておこる自然免疫反応が、関節リウマチ滑膜組織における炎症の発生に関与している可能性が示唆されました。

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 18 件)

Takakubo Y, et al. (9 人中 1 人目): Inflammatory immune cell responses and Toll-like receptor expression in synovial tissues in rheumatoid arthritis patients treated with biologics or DMARDs. Clin Rheumatol, 32: 853-861, 2013. doi: 10.1007/s10067-013-2209-3. 査読有.

Kaivosoja E, Takakubo Y, (8 人中 3 人目): Osteogenesis of human mesenchymal stem cells on micro-patterned surfaces. J. Biomaterial Appl, 27: 862-871, 2013. doi: 10.1177/0885328211428094. 査読有.

Nich C, Takakubo Y, (14 人中 2 人目) : Macrophages-Key cells in the response to wear debris from joint replacements. J Biomed Mater Res A, 101: 3033-3045, 2013. doi: 10.1002/jbm.a.34599. 査読有.

Yang S, Takakubo Y, (9 人中 2 人目): Minocycline-induced periarticular black bones found in inflamed joints underwent arthroplastic reconstruction. Clin Orthop Surg, 3: 181-7, 2012. doi: 10.4055/cios.2012.4.3.181. 査読有.

Koivu H, Takakubo Y, (6 人中 3 人目): RANKL in the loosening of total ankle replacement implants. Bone, 51: 546-52, 2012. doi: 10.1016/j.bone.2012.05.007. 査読有.

高窪祐弥、佐々木明子、高木理彰: リウマチ性疾患のジャックー関節症における病理

組織学的検討. 関節の外科, 39: 19-23, 2012 査読有.

Konttinen YT, Takakubo Y, (9 人中 9 人目): Sex Steroids in Sjögren's syndrome. J Autoimmun, 39: 49-56, 2012. doi: 10.1016/j.jaut.2012.01.004. 査読有.

Takakubo Y, et al. (7 人中 1 番目): Mid-term clinico-radiologic findings of an open label observation study of add on tacrolimus with biologics or non-biologic DMARDs. Rheumatol Int, 32: 3487-94, 2012. doi: 10.1007/s00296-011-2200-8. 査読有.

Takakubo Y, Yrjö T. Konttinen: Immune-Regulatory Mechanisms in Systemic Autoimmune and Rheumatic Diseases. Clin Develop Immunology, 941346, 2012. doi:10.1155/2012/941346. 査読有.

[総説] (計 3 件)

Takakubo Y, et al. (4 人中 1 人目): Role of innate immune sensors, TLRs and NLRP3, in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Journal of Long-Term Effects of Medical Implants, 24: 243-51, 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25747027>. 査読有.

[学会発表] (計 29 件)

Takakubo Y, Kan Sasaki, Hiroharu Oki, Yasushi Naganuma, Atsushi Narita, Tomoyuki Hirayama, Yasunobu Tamaki, Michiaki Takagi: Total Joint Arthroplasties for Rheumatoid Arthritis in Era of Biologics. ISTA, Kyoto International Conference, Kyoto: Sept, 2014

Takakubo Y, Hiroharu Ohki, Suran Yang, Akiko Sasaki, Kan Sasaki, Tomoyuki Hirayama, Yasunobu Tamaki, Yasushi Naganuma, Yukinari Kato, Michiaki Takagi. IS PODOPLANIN A NEW CANDIDATE OF INFLAMMATORY MARKERS FOR RHEUMATOID ARTHRITIS? European League Against Rheumatism 2014, Le Palais des congres de Paris, Paris, France; June, 2014

Takakubo Y, Hiroharu Ohki, Suran Yang, Akiko Sasaki, Kan Sasaki, Tomoyuki Hirayama, Yasunobu Tamaki, Yasushi Naganuma, Hiroshi Orui, Michiaki Takagi. THE CONCENTRATION OF SERUM INTERLEUKIN-6 BEFORE BIOLOGIC TREATMENT ARE RELATED TO CLINICAL RESPONSE IN THE PATIENTS OF RHEUMATOID ARTHRITIS. European League Against Rheumatism 2014, Le Palais des congres de Paris, Paris, France; June, 2014

Takakubo Y, Tamaki Y, Barreto G, Konttinen YT, Takagi M: Role of innate immune sensors in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. 8th COMBINED MEETING OF ORTHOPAEDIC RESEARCH SOCIETIES, San Servolo Island, Venice, Italy; October, 2013.

高窪祐弥, 佐々木明子、梁秀蘭、大木弘治、大類 広、長沼靖、佐々木幹、高木理彰: パネルディスカッション: 当科における生物学的製剤 (BIO) 使用のストラテジー - スイッチング症例の検討 - . 鹿児島市民文化ホール, 第 40 回日本関節病学会, 鹿児島; 2012 年 11 月

高窪祐弥, 玉木康信, 平山朋幸, 長沼靖, 梁秀欄, 大木弘治, 佐々木明子, 佐々木幹,

大類広, Yrjo T Konttinen, 高木理彰: 抗 tumor necrosis factor (TNF) 製剤による関節リウマチ滑膜組織におけるアポト - シスへの影響. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会, 名古屋国際会議場, 名古屋; 2012 年 10 月

高窪祐弥, 佐々木幹, 川路博之, 石井政次, 長沼靖, 大木弘治, 小林真司, 高木理彰: 人工股関節手術後の大腿骨ステム周囲骨折. 第 61 回東日本整形災害外科学会, 高崎ビューホテル, 群馬; 2012 年 9 月

高窪祐弥, 玉木康信, 梁秀蘭, 大木弘治, 平山朋幸, 佐々木明子, 長沼靖, 佐々木幹, 大類広, 高木理彰: 生物学的製剤 (BIO) 投与関節リウマチ (RA) 滑膜表層組織における Toll-like receptor (TLR) 陽性細胞の検討. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 品川プリンスホテル, 東京; 2012 年 4 月

Takakubo Y, Takagi M, Konttinen Y: Cell death and Rheumatology. Biomedicum Helsinki Autoimmunity meeting 2012, Biomedicum, Helsinki, Finland; 14, March, 2012.

〔図書〕(計 2 件)

Takakubo Y, Berce A, Tamaki A, Milošev I, Al-Samadi A, Tiainen VM, Sillat T, Konttinen YT: Wear-corrosion mechanisms. In: 9. LOOSENING OF TOTAL JOINT REPLACEMENT, Book of Bio-tribocorrosion in biomaterials and medical implants. Woodhead Publisher, pp. 74-110, 2013.

Takakubo Y, Pajarinen J, Konttinen YT, Trebse R, Coer A, Mackiewicz M, Takagi M, Gallo J: Does it exist something like long-term tolerance to an implant?

Aseptic loosening of total hip arthroplasty as a result of local failure of tissue homeostasis. In: Recent Advances in Arthroplasty. ISBN 978-953-307-990-5. Editor: Samo K. Fokter. InTech - Open Access Publisher, p. 324-327, 353-362, 2012.

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高窪 祐弥 (TAKAKUBO Yuya)

山形大学医学部整形外科学講座・講師

研究者番号：80431641