

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293236

研究課題名(和文) 関節リウマチ特異的iPS細胞を用いた骨髄間葉系細胞の分化と機能異常の解明

研究課題名(英文) Elucidation of differentiation and function abnormalities of bone marrow mesenchymal cells using human induced pluripotent stem cell cells derived from patients with rheumatoid arthritis.

研究代表者

西本 憲弘 (Nishimoto, Norihiro)

東京医科大学・医学総合研究所・兼任教授

研究者番号：80273663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)患者と健常人から樹立したヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)から単球へ分化させたところ、がんの表面マーカーを持つCD14+CD15+細胞が分化の初期に一過性に出現し、その割合は、RA由来iPS細胞から分化した細胞では、健常人由来iPS細胞に比べて有意に多かった。また、破骨細胞への分化能およびその機能異常の有無を検討したところ、RA患者由来iPS細胞から分化した破骨細胞は、健常人由来iPS細胞と比べ、細胞数、骨吸収能ともに有意に亢進していた。以上の結果より、RAでは単球系の分化異常があり、破骨細胞への分化能の亢進は、遺伝的因子に起因する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Loss of bone in rheumatoid arthritis (RA) is a result of excessive bone resorption by osteoclasts (OCs). However, how the generation of osteoclasts is enhanced in RA patients is unclear. To study the mechanism of enhanced osteoclastogenesis in RA patients, we need appropriate materials. Although osteoclast progenitor cells are able to be isolated from bone marrow of RA patients, the biopsies are invasive procedures in patients. Therefore, we generated induced pluripotent stem cells (iPSC) derived from RA patients and developed the in vitro culture system to differentiate iPSC to monocytic cells and then to OCs. We found that CD14+CD15+ cells appeared during the early differentiation of monocytes and their proportion was higher in RA patient derived-iPSC than that in healthy donor derived-iPSC. Furthermore, a number of OCs differentiated from RA patient derived-iPSC was higher than that from healthy controls.

研究分野：膠原病アレルギー内科学

キーワード：関節リウマチ 骨髄 単球 ヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞) 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) の治療は生物学的製剤の登場により長足の進歩をとげたが、根治にはほど遠い。RA の病因解明と根治療法の確立は多くの患者の悲願である。これまでの研究から、RA の原因病巣は骨髄である可能性が報告されてきた (Ochi et al. Arthritis Res Ther 2007 (review))。全身の大関節破壊が生じる RA 重症病型や急速に進行するムチランス型 RA 患者の骨髄には、白血病患者の骨髄に見られるような CD14+CD15+ の「まるで癌細胞」が存在する (Tomita et al. J Rheumatol 1997)。骨髄単球系と考えられるこの CD14+CD15+ 細胞は、骨髄ストローマ細胞の抱き込みによりアポトーシスを免れる。我々は、RA 患者の骨髄細胞における遺伝子発現を、DNA チップを用いて網羅的に解析し、バイオインフォマティクスの応用により、RA 患者骨髄において、インターフェロンを中心とするサイトカインネットワークの亢進に加え、HLA-E,F,G をはじめとする健常者では見られない HLA class I 分子の発現など免疫機能の異常を見出した (Lee HM, Nishimoto N et al. Arthritis Res Ther 2011)。また、前述の RA 患者骨髄に存在する CD14+CD15+ 細胞は HLA-G を発現していた (平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金 (免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業) 事業実績報告書)。さらに、RA 患者骨髄ではアポトーシスの亢進と、骨格・筋形成、DNA パッケージング、細胞接着、細胞増殖、細胞移動に関する機能低下が見られた。しかも、これら RA 患者骨髄における遺伝子発現プロファイルと細胞機能の異常は、RA 様の関節炎を呈する DNase KO マウス (Kawane et al. Nature. 2006) の骨髄細胞の異常と酷似しており、RA の関節炎が骨髄細胞の異常に起因する可能性が示唆される (manuscript in preparation)。一方、RA 患者の身体機能低下は、骨格を形成・支持する骨、軟骨、筋肉の病変に由来する。これらの骨格形成細胞に加え、免疫細胞、骨芽細胞や破骨細胞、滑膜細胞は、すべて骨髄間葉系細胞から分化する (Matsuo et al. Curr Opin Nephrol Hypertens 2009, Ogawa et al. Exp Hematol 2010)。もし、これらの骨格形成細胞や免疫担当細胞の異常が、骨髄間葉系細胞の初期分化に起因するならば、根治療法に結びつけるには、骨髄での初期分化異常を明らかにする必要がある。しかし、RA 患者の骨髄検体を得ることは容易ではなく、また、患者の血液細胞を直接用いた検討は、病気の活動性や治療薬による影響を受けやすい。ましてやそのような異常が遺伝的要因によるのか環境因子によるのかを解析することは不可能であった。そこでヒト人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells: iPS 細胞) に着目した。患者由来 iPS 細胞を使用して、一定の条件で分化させた免疫細胞同士を比較することにより、より精密な病態解析が可能になる。研究分担者の斎藤らは Feeder 細胞と血清に

依存せず、単球、マクロファージ、樹状細胞へ高純度に分化させる系を確立し (Niwa A et al. PloS ONE 2011)、Chronic infantile neurological cutaneous and articular (CINCA) 症候群の患者から作製した iPS 細胞を in vitro で単球に分化させ、この疾患の原因である NLRP3 の遺伝子異常が体細胞モザイクを生じていることを明らかにした (Tanaka et al. BLOOD 2012)。この系は RA の研究にも応用可能である。また、骨髄間葉系細胞から分化する骨格形成細胞や免疫担当細胞は、生体内では力学負荷を受けており、力学負荷に対する生体応答を解明することは、ロコモーター疾患である RA の病態と治療を考える上で重要である。研究分担者の中田らは、三次元培養系を用い、力学刺激環境下における細胞応答を解析することに成功した (Akamine Y et al. Int J of Oral Maxillofac Surg 2012)。三次元培養下では、細胞形態のみならず、力学刺激を含めた様々な生物学的刺激に対する応答が大きく異なることから、より生体内に近い培養環境として注目した。

2. 研究の目的

RA の主病巣は骨髄である可能性が示唆されており、骨髄間葉系細胞由来で骨格を形成・支持する骨・軟骨細胞、筋細胞、脂肪細胞ならびに免疫細胞の初期の増殖・分化の異常が RA の病態形成に関与する可能性がある。従って、根治治療に結びつけるには、骨髄での初期分化異常の有無を明らかにする必要がある。そこで、iPS 細胞の技術に着目した。RA 特異的 iPS 細胞を樹立し、in vitro で間葉系細胞への分化を誘導し、RA の骨髄間葉系細胞の分化と機能の異常がどの段階で生じるかを明らかにする。特に単球系細胞は、免疫システムのみならず骨代謝においても重要であり、その分化異常の有無を解明する。さらには異常を引き起こす遺伝的因子と環境因子を探求する。

3. 研究の方法

RA 患者の骨髄の異常に端を発した免疫担当細胞を含めた骨髄間葉系由来細胞の分化と機能の異常を、疾患特異的 iPS 細胞を用いて明らかにする。免疫細胞においては、特に単球系の細胞に着目した。RA 患者の皮膚ならびに末梢血から iPS 細胞を樹立し、種々のサイトカインを順次添加することで、in vitro で単球系細胞、さらには、破骨細胞に分化させた。単球系細胞の各分化段階において、分化のマーカーとなる細胞表面抗原を Flow cytometry で解析した。細胞分化における異常なサブセット CD14+CD15+ 細胞を同定し、その割合を健常人由来の iPS 細胞と比較した。さらに、単球を介して破骨細胞に分化させ、破骨細胞の数を健常人由来の iPS 細胞と比較するとともに骨吸収能についても比較を行った。更に、各ドナーの HLA の検索を行った。

RA の骨髄細胞の分化と機能異常から疾患病態に至るメカニズムを明らかにする。また、力学負荷が重要な意義を持つと思われる、軟骨分化、骨分化研究には、三次元培養系を用い、生体内足場構築研究として再生医療への応用を目指した。

4. 研究成果

RA の主病巣は骨髄である可能性が報告されている。実際に重症 RA 患者の骨髄では、健常人では殆ど見られない、癌特異的抗原を細胞表面に発現している CD14+CD15+ の表現型を有する単球系細胞が見られる。したがって、骨髄での単球分化の初期の増殖・分化の異常が RA の病態形成に関与する可能性がある。また、単球は RA 患者の関節破壊に関する破骨細胞の前駆細胞でもある。そこで、RA 特異的ヒト人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells: iPS 細胞)を樹立し、iPS 細胞から単球そして破骨細胞への in vitro での分化過程で、異常細胞の発現、分化能およびその機能異常の有無を検討した。

まず、疾患特異的 iPS 細胞の樹立を試み、RA 患者 5 例を含む 7 例のドナーから iPS 細胞の樹立に成功した。この iPS 細胞から単球への in vitro での分化過程で CD14+CD15+ 細胞が発現するか否かを検討した。サイトカイン刺激による単球への分化誘導から 15 日目に CD14+CD15+ 細胞が一過性に検出された。この CD14+CD15+ 細胞の割合は、健常人由来 iPS 細胞に比べて RA 由来 iPS 細胞で有意に多かった。このことから、CD14+CD15+ 細胞の出現は、RA 患者の遺伝的因子に起因する可能性が示唆された。

単球は RA 患者の関節破壊に関する破骨細胞の前駆細胞である。そこで、iPS 細胞から単球を介した破骨細胞への分化の過程に異常があるか否かを検討した。まず、iPS 細胞から分化させた単球に、M-CSF および RANKL 刺激を加え、破骨細胞へ分化させる実験系を確立した。単球分化過程の 15-28 日の単核球から、磁気細胞分離装置を用いて CD14 陽性分画を分取し、M-CSF および RANKL 刺激により破骨細胞への分化誘導を行ったところ、単球分化誘導 24-28 日目に採取した単球から分化させた TRAP 染色陽性の多核の破骨細胞が、他の単球分化誘導日に採取した単球を使用した時に比べ、最も多く出現した。そして、RA 患者由来 iPS 細胞から単球分化を介して分化した破骨細胞は、健常人由来 iPS 細胞と比べ、細胞数、骨吸収能ともに有意に亢進していた。また、RA 患者由来 iPS 細胞から分化した破骨細胞は健常人由来に比べ、破骨分化マーカーである Cathepsin K の発現が亢進していた。さらには、RA 患者由来 iPS 細胞から分化させた単球細胞では、健常人由来に比べ RANKL 受容体の遺伝子発現が亢進しており、RANKL 刺激によりさらに RANKL 受容体の遺伝子発現が亢進した。このことから、RA 患者由来 iPS 細胞は、RANKL 刺激により反応し、破骨細胞へ

の分化が進んだと考えられる。また、他の 2 家系の RA 患者由来 iPS 細胞においても同様に破骨細胞へ分化させ、同胞ではないが健常人のものと比較すると、RANKL 25 ng/mL 下では、RA 患者由来 iPS 細胞から分化させた破骨細胞数が有意に多かった。

RA は関節破壊を呈し、一方でシェーグレン症候群(SjS)は関節破壊がまれな自己免疫疾患であるが、RA と SjS は併発することも多い。そこで、SjS 患者由来 iPS 細胞から破骨細胞への分化実験を行った。RA 患者由来とその同胞である SjS 患者由来の iPS 細胞を破骨細胞への分化誘導をすると、RA 患者由来の破骨細胞数が多かったが、SjS 患者由来との有意差はなかった。

RA の病態形成に interleukin (IL)-6 が関与している。IL-6 阻害剤であるトシリズマブ(TCZ)は RA 患者の症状を改善するのみならず、関節破壊の進行を抑える。そこで、RA 患者の罹患関節内で過剰発現している IL-6 がどのように破骨細胞への分化に関与しているか調べた。RA 患者由来 iPS 細胞から単球へ分化させ、その後、単球から破骨細胞への分化誘導時の培養液中の IL-6 を測定したところ、RA 患者由来 iPS 細胞から分化させた単球および破骨細胞が、IL-6 を産生することが分かった。また、破骨細胞への分化過程に、IL-6 を添加したところ、核を 3 つ以上有する破骨細胞への分化を促進させる可能性があることが分かった。また、IL-6 は破骨前駆細胞の融合または巨大化を促進する可能性があることを見出した。しかし、可溶性 IL-6 受容体を添加すると、IL-6 依存性破骨前駆細胞の巨大化を阻害した。今後は、IL-6 および sIL-6R を添加した時の破骨細胞機能の骨吸収能の解析し、また、破骨細胞から sIL-6R が産生されるかどうかを検討する。更には、TCZ が RANKL 依存性破骨細胞への分化を阻害するかどうか調べ、IL-6 がどのように破骨細胞への分化に関与しているか更なる解析を進める。また、iPS 細胞はドナーの遺伝的背景を反映するので HLA を調べた。RA の発症および重症度に関連する代表的アリルである HLA-DRB1 *04:05 は、本研究に参加された RA 患者、対照群の SjS 患者ならびに健常人に共通に見られた。一方で HLA-C に RA 患者で共通な遺伝子が見られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(0 件)

〔学会発表〕(8 件)

伊藤真里、村上美帆、丹羽明、大澤光次郎、齋藤潤、中畑龍俊、西本憲弘、関節リウマチ患者由来 iPS 細胞から分化した単球は破骨細胞分化能が高い、第 36 回日本炎症・再生医学会、2015

M.N.Ito, M.Murakami, M.Saito, A.Niwa, M.Osawa, T.Nakahata, N.Nishimoto, Monocytes differentiated from iPS cells derived from rheumatoid arthritis patients express more mscf-receptor together with rank than those from healthy donors resulting in the accelerated osteoclastogenesis, EULAR 2015, 2015

M.N.Ito, M.Murakami, K.Ochi, Y.shimaoka, T.ochi, N.Nishimoto, Composition of dendritic cell and NK cell-related network with abnormally expressed glycosylation related molecules in the bone marrow cells from patients with rheumatoid arthritis, EULAR 2015, 2015

伊藤眞里、村上美帆、越智健介、島岡康則、越智隆弘、西本憲弘、関節リウマチ患者骨髄における糖鎖修飾異常の検討、第59回日本リウマチ学会総会・学術集会、2015

伊藤眞里、村上美帆、西本憲弘、関節リウマチ(RA)患者 iPS 細胞を用いた破骨細胞分化系の構築と分化能の検討、第59回日本リウマチ学会総会・学術集会、2015
伊藤眞里、村上美帆、丹羽明、齋藤潤、中畑龍俊、西本憲弘、疾患 iPS 細胞を用いた破骨細胞分化系の構築と分化能の検討、第1回日本骨免疫会議、2014

N.Nishimoto, M.Murakami, M.N.Ito, M.Saito, A. Niwa, T.Nakahata, Appearance of CD14+CD15+ population during the differentiation from RA-iPS cells into monocytes, EULAR 2014, 2014
福家有子、村上美帆、伊藤眞里、西本憲弘、RA 患者由来 iPS 細胞を用いた単球系細胞分化における CD14+CD15+細胞の異常発現の検討、第58回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況計 0件)

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西本 憲弘 (Nishimoto, Norihiro)
東京医科大学・医学部・兼任教授
研究者番号：80273663

(2) 研究分担者

村上 美帆 (Murakami, Miho)
東京医科大学 医学部・兼任講師
研究者番号：30595591

中田 研 (Nakata, Ken)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：00283747

齋藤 潤 (Saito, Megumu)
京都大学・iPS細胞研究所・准教授
研究者番号：90535486