

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860746

研究課題名(和文) 関節リウマチにおける間葉系幹細胞の病的意義

研究課題名(英文) Pathological roles of mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis

研究代表者

齋藤 鉄也 (Saito, Tetsuya)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：10360926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチにおいて、滑膜線維芽細胞は様々なサイトカインや組織分解酵素を放出し、骨・軟骨破壊に関与する。この病的滑膜線維芽細胞の由来については不明であり、骨髄由来細胞や滑膜の正常滑膜線維芽細胞が候補として考えられている。本研究では、病的滑膜線維芽細胞の由来が骨髄などの関節外ではなく滑膜に存在する間葉系細胞であるかを明らかにし、滑膜に局在する間葉系幹細胞はその候補であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In rheumatoid arthritis, synovial fibroblasts produce a variety of inflammatory cytokines and tissue-degrading enzymes, leading to cartilage and bone destruction. The origin of pathogenic synovial fibroblasts has not yet been elucidated, although bone marrow-derived cells and normal synovial fibroblasts are suspected to be a candidate. In this study, we revealed that resident mesenchymal cells in the synovial tissues are a progenitor of pathogenic synovial fibroblasts, indicating that synovial resident mesenchymal stem cells are a candidate of progenitors.

研究分野：膠原病、関節リウマチ

キーワード：関節リウマチ 滑膜線維芽細胞 間葉系幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)は関節滑膜組織の炎症と増生により、多関節炎とこれによる軟骨や骨の破壊を来す疾患である。近年、炎症性サイトカインや免疫担当細胞の細胞表面分子を標的とした生物学的製剤により、RAの治療にパラダイムシフトがもたらされた。しかしながら、いまだ生物学的製剤にも治療抵抗性を示す例が存在し、また、これらの薬剤の持つ免疫抑制作用による重篤な感染症の危険性が新たな問題となってきた。以上より、過度な免疫抑制作用を有さない、新たな機序のRA治療法の開発が必要とされている。これまで開発されてきたRAの治療薬の多くは、好中球やマクロファージが産生する炎症性サイトカインやT細胞、B細胞を標的としており、感染症のリスクを避けることができない。このような治療に対し、我々は滑膜線維芽細胞を標的とし、その細胞周期を抑制することにより、関節炎に対し劇的な治療効果が得られることを報告してきた。この結果は、滑膜線維芽細胞が免疫抑制によらない新たなRAの治療標的になりうることを示唆している。

関節滑膜は滑膜線維芽細胞と滑膜マクロファージの2種類の細胞からなる1-2層の膜様構造である。RAの滑膜組織では、滑膜線維芽細胞が幾層にも増生し、炎症性サイトカインや組織破壊酵素の産生を介して、軟骨や骨に浸潤し、これを破壊する。この病的滑膜線維芽細胞は、*in vitro*においてもその増殖能や浸潤能を保持しており、例えば免疫不全マウスにヒトRAの病的滑膜線維芽細胞と軟骨を移植すると、病的滑膜線維芽細胞は免疫担当細胞の助けなしに軟骨に浸潤する。病的滑膜線維芽細胞の起源としては、これまで正常滑膜線維芽細胞が炎症サイトカインなどの刺激により病的な形質を獲得すると考えられてきた。近年、間葉系幹細胞(MSC)に関する研究が進み、その多分化能や免疫抑制能に着目した再生医療や免疫抑制療法が、RAを含めたりウマ

チ・膠原病疾患にも応用されつつある。一方、これら“治療的”MSCとしてのMSCの良い側面に加え、MSCががんなどの病態に関与するというMSCの悪い側面(“病的”MSC)も明らかになりつつある。例えば、がん細胞の浸潤や転移にはcancer-associated fibroblast (CAF)と呼ばれる間葉系細胞がnicheとして重要であり、このCAFは骨髄やがん周囲の脂肪組織のMSCに由来することが報告されている。以上から、RAにおいても骨髄や滑膜に存在するMSCが免疫担当細胞などが放出する炎症性サイトカインなどにより“病的”MSCとなり、これが病的滑膜線維芽細胞の起源になるという仮説が考えられた。そこで本研究では、骨髄や滑膜に存在するMSCが病的滑膜線維芽細胞の起源であるとの仮説を検証し、この“病的”MSCを標的とした新規なRA治療法を開発することを目的とした。

## 2. 研究の目的

RAにおける病的滑膜線維芽細胞は滑膜や骨髄に存在するMSCがその起源であるとの仮説を立て、この仮説を検証し、“病的”MSCを標的とした新たなRA治療法を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、MSCのマーカ遺伝子のプロモーター下にGFPを発現するレポーターマウスを用いて、骨髄移植や併体結合により骨髄や滑膜由来のMSCが病的滑膜線維芽細胞になりうるかを検討した。また、“病的”MSCが関節炎の病態に重要であるか否かを調べるために、MSCのマーカ遺伝子のプロモーター下にジフテリア毒素受容体(DTR)を発現するマウスを用いて、MSCをdepleteすることを試みた。

## 4. 研究成果

MSCのマーカ遺伝子として既報のある

-smooth muscle actin (SMA)を検討した。SMA プロモーター下に GFP と DTR の融合タンパク質を発現する遺伝子改変マウスを用いて、GFP の発現およびジフテリア毒素 (DT) の至適投与量を調べた。マウスの関節や骨髄における GFP の発現を共焦点蛍光顕微鏡および免疫組織染色にて観察したところ、MSC と考えられる紡錘形の細胞でも一部発現を認められたが、血管平滑筋細胞と考えられる血管壁で発現が強かった。また、DT をマウスに投与したところ、少量でも致死性であった。以上、今回用いた SMA-GFP/DTR マウスは、MSC の解析には適さないことが判明した。そこで SMA にかわるレポーターマウスとして、I 型コラーゲンプロモーター下に GFP を発現する Col1-GFP マウスを用いて検討した。

Col1-GFP マウスの滑膜を共焦点蛍光顕微鏡および免疫組織染色にて観察したところ、滑膜線維芽細胞および MSC と考えられる vimentin 陽性の紡錘形の細胞が GFP 陽性であった。一方、CD45 陽性の血球細胞は GFP 陰性であった。また、Col1-GFP マウスに II 型コラーゲン誘導性関節炎 (CIA) または II 型コラーゲン抗体誘導性関節炎 (CAIA) を起したところ、病的滑膜において増加した滑膜線維芽細胞はすべて GFP 陽性であった。以上から、Col1-GFP が MSC を含む間葉系の細胞のレポーターマウスになることがわかった。

そこで次に、Col1-GFP マウスと野生型マウスを用いて、骨髄移植あるいは併体結合を施行し、CIA または CAIA を起した。Col1-GFP マウスの骨髄を移植した野生型マウスの関節炎滑膜に GFP 陽性細胞を認めなかった。また、Col1-GFP マウスと併体結合した野生型マウスの関節炎滑膜にも GFP 陽性細胞を認めなかった。以上から、関節炎滑膜において増加した滑膜線維芽細胞は骨髄などの滑膜外組織に局在している細胞ではなく、滑膜組織自体に局在している細胞に由来することがわかった。さらに、細胞増殖マーカーである

Ki67 の免疫組織染色および細胞周期インディケーターマウスである Fucci マウスを用いることで、滑膜組織に局在する MSC や滑膜線維芽細胞の細胞増殖が関節炎滑膜における増加した病的滑膜線維芽細胞の形成に重要であることも明らかにした。

本研究では、Col1-GFP マウスを用いて、関節炎における病的滑膜線維芽細胞は骨髄ではなく滑膜組織に局在している細胞に由来することを明らかにした。この候補としては正常滑膜線維芽細胞や MSC が考えられるが、適切なレポーターマウスがないために、本研究ではこれを明らかにすることはできなかった。最近、Gli1 が局所に存在する MSC のマーカー遺伝子として同定され、今後は Gli1 レポーターマウスを用いた検討が必要である。

## 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1件)

1. Matsuo Y, Mizoguchi F, Saito T, Kawahata K, Ueha S, Matsushima K, Inagaki Y, Miyasaka N, Kohsaka H. Local fibroblast proliferation but not influx is responsible for synovial hyperplasia in a murine model of rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016, 470, 504-9.

[学会発表](計2件)

1. 松尾祐介, 溝口史高, 齋藤鉄也, 川畑仁人, 宮坂信之, 上阪等. 骨破壊をきたす炎症性滑膜線維芽細胞は関節外に由来せず局所で増殖する. 第1回骨免疫学会, 沖縄宮古島市, 2015/7/1.
2. 松尾祐介, 溝口史高, 齋藤鉄也, 川畑公人, 上阪等. 関節リウマチモデルマウスにおける滑膜線維芽細胞は関節外に由来せず滑膜局所で増殖する. 第59回日本リウマチ学会, 名古屋, 2015/4/23.

〔図書〕(計 件)  
〔産業財産権〕  
出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 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

齋藤 鉄也 (SAITO, Tetsuya)

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究  
科・助教

研究者番号：10360926

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：