

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590423

研究課題名(和文) 生物学的製剤投与による関節リウマチの病理学的変化と疾患特異的な細胞

研究課題名(英文) Histological changes of synovium after biologics treatment for RA and disease specific cells

研究代表者

宇月 美和 (Uzuki, Miwa)

岩手医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50305992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ患者には、抗リウマチ薬(DMARDs)や生物学的製剤(Bio)による治療が行なわれる。滑膜組織でDMARDs治療群とBio治療群の基本的な病理学的特徴や種々の免疫染色の結果を比較し、Bio例では著効例と無効例の比較もおこなった。その結果、Bio例で炎症スコアが著しく低下し、著効例と無効例との比較では、著効例で減少率が大きかった。同一患者ではDMARDsよりもBio投与後の方が炎症スコアの改善度は大きく、MMP-3などの陽性細胞数の減少度も大きかった。DMARDsを投与後に炎症が増悪した症例では特に変化率が大きく、Bioは難治性RA症例に対し強い抗炎症効果を示すことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined histological and immunohistochemical changes of synovium before and after DMARDs or biologics (Bio) treatment for rheumatoid arthritis (RA). Synovial tissues were obtained from 52 RA patients. Twenty of them took DMARDs before Bio. In responder of Bio, the number of synovial cells, high endothelial venules and inflammatory cells decreased. In addition, the number of positive cells of MMP-3, TNF, CD68 and CD34 decreased, too. On the other hand, synovial inflammation worsened in non-responder of Bio and immunohistochemical findings showed opposite results to responder. The inflammatory and immunohistochemical scores decreased more massive after treatment by Bio than DMARDs. Especially, the effect of the biologics was massive in non-responder of DMARDs. The results suggest that Bio may stop the vicious circle in responder by decreasing the number of TNF positive cells and have stronger anti-inflammatory effects especially in non-responder of DMARDs.

研究分野：人体病理学

キーワード：関節リウマチ 生物学的製剤 滑膜組織 サイトカイン 線維芽細胞様滑膜細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 関節リウマチ (RA) はいまだに病因が不明の難治性疾患であるが、TNF などのサイトカインが病態形成の中心的な役割を担っていると考えられ、近年、サイトカインを標的とした生物学的製剤 (Bio) を用いた治療が確立されつつある。

(2) 本研究に関連する国内・国外の研究動向 は、Bio の効果について臨床的な解析が国内外で報告されつつあるが、病理学的な解析は十分な症例数を用いては行なわれていない。また、著効例と無効/増悪例の病理学的な特徴や、炎症の再燃例の特徴や再燃の原因も不明である。

(3) 一般的な RA の関節病変部における組織像は非特異的な炎症と免疫学的な機序を背景としたものであるが、病変部の特異的な細胞 (線維芽細胞様細胞) の由来についてはいまだに論争中である。この細胞は電子顕微鏡的にはライソゾームを持ち、マクロファージ的な性格を持つ一方で、突起を持ち蛋白分解酵素を産生する線維芽細胞系の性格を持つ、多機能な細胞であり、RA の病因と深く結びついていると考えられている。

(4) 申請者らのこれまでの研究成果 については、RA の病理組織像を中心に 20 年にわたって研究しており、特に RA 患者滑膜組織でのサイトカインや蛋白分解酵素の発現と骨破壊との関係について検討してきた。その結果、RA の病変部では上記サイトカインや蛋白分解酵素の産生が対照例に比較して高値であることが報告されている。また、骨破壊に関与する酵素のみならず、破壊される側の基質としてのヒアルロン酸の代謝についても多くの研究実績がある。さらに、滑膜線維芽細胞についての電子顕微鏡的解析、免疫組織化学的な解析、関節炎動物モデルを用いての検討を行い、報告している。

(4) これらの研究成果を発展させ、Bio 導入前と導入後の滑膜組織の比較を行い、Bio によ

る病理学的な変化の検討のみならず、詳細な作用機序を含め、RA の病因解析をおこなう。

## 2. 研究の目的

本研究では同一症例での Bio 導入前と導入後の滑膜組織の比較を行い、Bio による病理学的な変化の検討のみならず、詳細な作用機序を含め、RA の病因解析をおこなう。

(1) Bio の投与によって滑膜組織に病理学的 (特に線維芽細胞様細胞) にどのような変化がもたらされるか。

(2) Bio の投与によって、特殊染色などで滑膜組織 (特に線維芽細胞様細胞) に具体的にどのような形態学的、機能的変化があるか。

(3) Bio の著効した症例と無効/増悪した症例について、それぞれの群の投与前の滑膜組織の特徴や、投与後に変化あるいは不変であった所見。

(4) Bio 投与後に一旦、改善したものの、炎症が再燃した症例について、病理学的な特徴 (特に線維芽細胞様細胞)。

以上により RA の疾患特異的な細胞 (線維芽細胞様細胞) の検討、特定をおこない、 関節リウマチの病因や治療に結びつける。

## 3. 研究の方法

(1) 材料の採取: 整形外科的な手術の際に滑膜組織の採取を行い、同一患者より血清と関節液の採取もおこなう。治療歴については、Bio、DMARDs など治療薬剤を記録し、過去の手術歴がある場合にはその病理標本も検討に用いる。

(2) 滑膜組織での炎症スコアの検討: (1) の症例について、滑膜組織の炎症の程度を Rooney の histological index を用いてスコア化する。

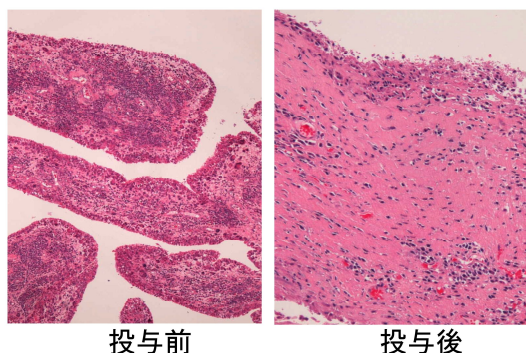
(3) 滑膜組織での各種マーカーの検討: (1) について、リンパ球や血管、マクロファージ、骨髄由来の細胞などのマーカーを用いて、具体的な構成細胞の特徴を

検討する。

- (4) 血清、関節液の解析：(1)について、RA患者の血清や関節液中のサイトカインや蛋白分解酵素について、ELISAにて定量的な解析をおこなう。
- (5) Bioの投与前と投与後で比較可能であった症例については、(2)(3)(4)の投与前後での変化、および著効例と無効例について組織学的な特徴を検討する。再燃例については、最初に効果があった際にも残存していた細胞(線維芽細胞様細胞)の特徴を組織学的に検討する。
- (6) その他に、疾患特異的な細胞(線維芽細胞様細胞)における様々な蛋白分解酵素や基質の合成、分解などについて、免疫組織科学や *in situ* hybridizationなどの方法により検討する。
- (7) Bioの治療効果について、著効例と無効例、DMARDs治療後の組織学的な特徴を検討する。臨床的なデータと病理組織像の関係について詳細に解析する。
- (8) 線維芽細胞様細胞と炎症の変化との関係について検討し、関節リウマチの発症に関わる細胞や因子について研究をすすめる。

#### 4. 研究成果

- (1) Bio例では特にリンパ球に関する炎症スコアが著しく低下し、線維化については増加していた。



- (2) 著効例と無効例との比較では、著効例での投与前後での変化率が大きく、リンパ球、

血管数、マクロファージ系細胞、腫大したCD34陽性紡錘形細胞、TNF やMMP-3の陽性細胞数も減少率が大きかった。

		滑膜細胞の多層化(層)	線維化の面積(%)	リンパ球diffuse(%)	血管(個/HPF)
投与前後での差の平均値	著効例	-35.9±20.7	170.2±345.1	-56.8±50.2	-61.5±18.6
	無効/増悪例	-6.0±40.8	37.6±70.5	57.1±218.8	-5.0±36.0

		紡錘形細胞(個/HPF)	CD68(個/HPF)	TNF-α(個/HPF)	MMP-3(個/HPF)
投与前後での差の平均値	著効例	-51.6±33.1	-59.9±36.5	-59.4±22.6	-62.9±40.3
	無効/増悪例	-11.9±20.1	-16.7±77.5	-18.4±55.4	70.0±192.4

- (3) 同一患者でDMARDs投与後とBio投与後の滑膜を比較できた症例では、DMARDs投与後よりもBio投与後の方が病理学的炎症スコアの改善度は大きく、MMP-3やTNF、CD68やCD34などの陽性細胞数もBio使用後の方が減少度が大きかった。また、TNFR- $\alpha$ 、TNFR- $\beta$ についても同様な傾向を示した。DMARDsを投与したにもかかわらず、炎症が増悪した症例では特に、変化率が大きく、組織学的に著明な改善がみられた。

#### 治療薬投与前後の変化率 (DMARDs/生物学的製剤の比較)

		滑膜細胞の多層化	線維化の面積	リンパ球diffuse	血管
投与前後での変化率の平均値(%)	DMARDs	12.8±36.1	58.5±121.3	17.8±67.9	-2.9±42.8
	生物学的製剤	-38.0±17.1	90.3±109.0	-62.6±26.8	-45.4±35.0

		紡錘形細胞	CD68	TNF-α	MMP-3
投与前後での変化率の平均値(%)	DMARDs	10.1±36.9	5.7±36.3	4.2±33.6	-3.8±51.2
	生物学的製剤	-56.6±22.9	-68.0±13.4	-56.3±17.2	-57.4±37.8

BioはDMARDsよりも強い抗炎症効果があることが組織学的に証明された。特にDMARDsで炎症が十分に抑制されなかった難治性RA症例でより強い効果を示すことが示唆された。

#### 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14件)

1. 原田真理, 宇月美和, 石黒直樹, 岩館克治, 澤井高志: 高分子ヒアルロン酸 (HA) による軟骨保護作用のメカニズムの解明. 臨床リウマチ 27(1), 51-63, 2015.(査読あり)
2. 宇月美和, 鎌滝章央, 石田欣二, 花坂智人, 松浦絵里, 小笠原勝利, 佐藤洋一, 遠山稿二郎, 越智隆弘, 澤井高志: 関節リウマチ (RA) の滑膜組織にみられる Nursing 現象の超微形態学的特徴について - ヒト疾患の病態解明に対する電顕利用の新しい展開 -. 医学生物学電子顕微鏡技術学会誌 . 28(1), 25-30, 2014. (査読あり)
3. Uzuki M, Sawai T, Ryan LM, Rosenthal AK, Masuda I: Upregulation of ANK protein expression in joint tissue in calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition disease. J Rheumatol. 41, 65-74, 2014.(査読あり)  
Doi: 10.3899/jrheum.111476.
4. 宇月美和, 鎌滝章央, 原田真理, 三浦康宏, 澤井高志: VI . 関節リウマチの検査・診断 . 検査 . 病理組織検査 ; 軟骨・骨破壊 . 最新関節リウマチ学□寛解・治癒を目指した研究と最新治療□ . 日本臨床 72 巻増刊号 3, 280-285, 2014.(査読なし)
5. 澤井高志, 村上賢也, 宇月美和, 原田真理, 松村 翼, 石田欣二, 土井田稔, 京極方久, 越智隆弘: IV . 関節リウマチの検査・診断 . 検査 . 病理組織検査 ; 線維芽細胞様滑膜細胞□関節リウマチ (RA)の滑膜組織における線維芽細胞様滑膜細胞(FLS)の形態学的ならびに機能的特徴□ . 最新関節リウマチ学□寛解・治癒を目指した研究と最新治療□ . 日本臨床 72 巻増刊号 3, 286-295, 2014.(査読なし)
6. 遠山稿二郎, 花坂智人, 松浦絵里, 小笠原勝利, 石田欣二, 宇月美和, 鎌滝章央, 澤井高志: 病理学における電顕技術のブレークスルー: 3D トモグラフィー法と反射電子像の活用 . 病理と臨床 . 32, 313-320, 2014.(査読なし)
7. 山部大輔, 村上秀樹, 宇月美和, 吉田知史, 山崎健, 嶋村正: 腰椎椎間関節軟骨変性の評価 病理組織像と T2 マッピング法 MRI との比較. 岩手医学雑誌 65 (4), 259-270, 2013. (査読あり)
8. Sawai T, Uzuki M, Miura Y, Kamataki A, Matsumura T, Saito K, Kurose A, Osamura YR, Yoshimi N, Kanno H, Moriya T, Ishida Y, Satoh Y, Nakao M, Ogawa E, Matsuo S, Kasai H, Kumagai K, Motoda T, Hopson N: World's first telepathology experiments employing the winds ultra-high-speed internet satellite, nickenemaed "KIZUNA". J Pathol Inform. 4:24 (27 September 2013), (査読あり)  
DOI:10.4103/2153-3539.119002, 2013.
9. Sawai T, Kamataki A, Uzuki M, Ishida K, Hanasaka T, Ochi K, Hashimoto T, Kubo T, Morikawa A, Ochi T, Tohyama K: Serial block-face scanning electron microscopy combined with double-axis electron beam tomography provides new insight into cellular relationships. Microscopy: 62(2), 317-320, 2013. (査読あり)  
Doi: 10.1093/jmicro/dfs069.
10. Mimata Y, Kamataki A, Oikawa S, Murakami K, Uzuki M, Shimamura T and Sawai T: Interleukin-6 upregulates expression of ADAMTS-4 in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. Int J Rheum Dis. 15, 36-44, 2012. (査読あり)  
Doi:10.1111/j.1756-185X.2011.01656.x

11. 宇月美和,村上賢也,鎌滝章央,窪田綾子,勝呂徹,澤井高志: 関節リウマチ(RA): 診断と治療の進歩. □病態. 1. 病理. 日本内科学会雑誌 101(10), 2830-2838, 2012. (査読なし)
  12. 茶谷彩華, 畑康樹, 宇月美和, 下川怜子: 軟骨肉腫との鑑別に Ki-67 染色, p53 染色が有用であった骨外軟骨腫の 1 例. 臨床皮膚科 66(10). 772-776, 2012. (査読あり)
  13. Nakayama I, Matsumura T, Kamataki A, Uzuki M, Saito K, Hobbs J, Akasaka T, Sawai T: Development of a teledermatopathology consultation system using virtual slides. Diagn Pathol. (査読あり) Doi:10.1186/1746-1596-7-177, 2012.
  14. 茶谷彩華, 田村 舞, 山本奈緒, 岡部圭介, 宇月美和, 畑 康樹: 末梢血好酸球増多を伴わず、後頭部に生じた木村病の 1 例. 臨床皮膚科. 66(8): 610-14, 2012. (査読あり)
- [学会発表](計 19 件)
1. 宇月美和, 澤井高志: GFP マウス由来骨髓細胞を移植したキメラマウスにコラーゲン関節炎を誘導した際の骨髓細胞の動態. 第59回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2015年4月23-25日、名古屋.
  2. 宇月美和, 鎌滝章央, 増田友之, 澤井高志: GFP マウス由来骨髓細胞を移植したキメラマウスにコラーゲン関節炎を誘導した際の骨髓細胞の動態. 第 104 回日本病理学会総会・学術集会. 2015 年 4 月 30-5 月 2 日
  3. 澤井高志, 宇月美和, 石田欣二, 遠山稿二郎, 佐藤洋一, 越智隆弘: 関節リウマチの慢性化炎症を持続させる滑膜、Nursing 現象の形態学的、機能的解析. 第 104 回日本病理学会総会・学術集会. 2015 年 4 月 30-5 月 2 日
  4. 澤井高志, 石田欣二, 花坂智人, 松浦絵里, 小笠原勝利, 遠山稿二郎, 宇月美和, 越智隆弘: 関節リウマチ (RA) にみられる Nursing 現象の超微形態学的特徴とその生物学的意義. 医学生物学電子顕微鏡技術学会 第 30 回学術講演会. 2014 年 5 月 23-25 日、大阪.
  5. 宇月美和, 窪田綾子, 中村卓司, 宮崎芳安, 勝呂 徹, 澤井高志: 生物学的製剤投与前後での滑膜組織の変化. 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2014 年 4 月 24-26 日、東京.
  6. 原田真理, 宇月美和, 石黒直樹, 澤井高志: 実験的変形性膝関節症に対するヒアルロン酸による軟骨リモデリングの可能性に関する病理学的検討. 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2014 年 4 月 24-26 日、東京.
  7. 宇月美和, 鎌滝章央, 原田真理, 佐々木喜子, 澤井高志: 関節リウマチにおける線維芽細胞様滑膜細胞の由来、特徴に関する研究. 第 103 回日本病理学会総会・学術集会. 2014 年 4 月 24-26 日、広島.
  8. 澤井高志, 鎌滝章央, 宇月美和: 膠原病にみられる肺高血圧症の病理学組織学的特徴. 第 2 回日本肺高血圧学会(JPHS) 第 3 回日本肺循環学会(JPCS)合同学術集会シンポジウム「強皮症の血管病変: 血管病変のひとつとしての PH」. 2014 年 10 月 5 日、東京
  9. 窪田綾子, 関口昌之, 宇月美和, 澤井高志, 勝呂 徹: 生物学的製剤 (Bio) 製剤による関節構成体の病理学的変化. 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会 / 第 22 回国際リウマチシンポジウム. 2013 年 4 月 18-20 日、京都
  10. 窪田綾子, 宇月美和, 澤井高志, 土田豊実, 勝呂 徹: トシリズマブ投与前後の関節リウマチにおける滑膜組織を用い

- た治療効果の検討 . 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会 / 第 22 回国際リウマチシンポジウム. 2013 年 4 月 18-20 日、京都
11. 宇月美和、原田真理、石黒直樹、岩館克治、澤井高志：実験的変形性関節症に対する高分子ヒアルロン酸と架橋型ヒアルロン酸の作用の病理学的検討 . 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会 / 第 22 回国際リウマチシンポジウム. 2013 年 4 月 18-20 日、京都
  12. 宇月美和、澤井高志：抗肺炎クラミジア (*Chlamydomphila pneumoniae*) 抗体の持続的陽性患者に発症した胸部大動脈瘤の一症例 . 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会 / 第 22 回国際リウマチシンポジウム. 2013 年 4 月 18-20 日、京都
  13. 宇月美和、原田真理、石黒直樹、岩館克治、澤井高志：実験的変形性関節症に対する高分子ヒアルロン酸と架橋型ヒアルロン酸の作用の病理学的検討 . 第 102 回日本病理学会総会. 2013 年 6 月 6-8 日、札幌
  14. 宇月美和、岩淵 將、城 謙輔、土屋善慎、佐藤壽伸、田熊淑男、茂泉善政、澤井高志：抗肺炎クラミジア (*Chlamydomphila pneumoniae*) 抗体の持続的陽性患者に発症した胸部大動脈瘤の一症例 . 第 102 回日本病理学会総会. 2013 年 6 月 6-8 日、札幌
  15. 窪田綾子、関口昌之、宇月美和、中村卓司、宮崎芳安、井形聡、塚越実、鈴木大輔、柘植新太郎、高松諒、土谷一晃：生物学的製剤による関節リウマチ滑膜組織の病理学的変化 . 第 41 回日本関節病学会. 2013 年 11 月 2 日-3 日、名古屋.
  16. 宇月美和、窪田綾子、中村卓司、宮崎芳安、勝呂 徹、澤井高志：一般的な抗リウマチ薬および生物学的製剤投与前後での滑膜組織の変化の比較 . 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2012 年 4 月 26 日-28 日、東京
  17. 宇月美和、窪田綾子、中村卓司、宮崎芳安、石井壽晴、勝呂 徹、澤井高志：一般的な抗リウマチ薬および生物学的製剤投与前後での滑膜組織の変化の比較 . 第 101 回日本病理学会総会. 2012 年 4 月 26 日-28 日、東京
  18. 鎌滝章央、石田欣二、宇月美和、遠山稿二郎、橋本隆仁、久保 貴、森川晃成、澤井高志：電子線トモグラフィーによる関節リウマチ滑膜組織にみられる pseudoemperipolesis の 3D 解析 . 第 101 回日本病理学会総会. 2012 年 4 月 26 日-28 日、東京
  19. 鎌滝章央、石田欣二、宇月美和、遠山稿二郎、橋本隆仁、久保 貴、森山晃成、澤井高志：関節リウマチ滑膜組織の炎症慢性化に関わる細胞の電子顕微鏡的解析 . 医学生物学電子顕微鏡技術学会 第 28 回学術講演会及び総会. 2012 年 5 月 11 日-13 日、盛岡
- 〔図書〕(計 1 件)
1. Yoshida W, Kamataki A, Uzuki M, Sawai T: Evaluation of *in vivo* proteolytic activity. In: Osteoarthritis -Diagnosis, Treatment and Surgery, ed.by Chen Q. InTech, Rijeka, Croatia. 265-274(2012,2)
- 6 . 研究組織
- 1)研究代表者
- 宇月 美和 (UZUKI MIWA)
- 岩手医科大学・医学部・准教授
- 研究者番号：50305992