

関節リウマチと変形性関節症の滑膜マスト細胞の比較

Comparison of features of synovial mast cells from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis

三嶋信太郎^{1), 2)}、豊島翔太^{1), 3), 4)}、坂本朋美^{1), 3), 4)}、李 賢鎬²⁾、齋藤 修²⁾、松本健治⁵⁾、岡山吉道^{1), 3), 4)}

Shintaro MISHIMA^{1), 2)}, Shota TOYOSHIMA^{1), 3), 4)}, Tomomi SAKAMOTO-SASAKI^{1), 3), 4)}, Hyunho LEE²⁾, Shu SAITO²⁾, Kenji MATSUMOTO⁵⁾, Yoshimichi OKAYAMA^{1), 3), 4)}

¹⁾日本大学医学部 免疫・アレルギー学プロジェクトチーム、²⁾日本大学医学部 整形外科、³⁾日本大学医学部 医学教育センター、⁴⁾日本大学医学部附属板橋病院 アレルギーセンター、⁵⁾国立成育医療センター研究所 免疫アレルギー研究室

[要旨]

関節リウマチ(RA)のマスト細胞は、変形性関節症(OA)のマスト細胞と比較するとが免疫複合体の刺激によってヒスタミン遊離量およびサイトカイン産生量には差がなかったが、過剰な PGD₂ を産生することが分かった。その原因として prostaglandin synthase 1 (PTGS1)、prostaglandin synthase 2 (PTGS2) mRNA の発現量は OA マスト細胞と比較して RA マスト細胞の方が有意に高かった。miRNA chip の結果、OA マスト細胞の方が、RA マスト細胞より 3 倍以上発現量が高い miRNA を 20 個見出した。これら 20 個の miRNA のうち PTGS2 の発現制御に寄与する miRNA は miR199a-3p であった。miR-199a-3p と PTGS2 の発現量の相関を調べたところ OA マスト細胞では相関がなかったが、RA マスト細胞では負の相関がみられたため miR199a-3p が PTGS2 の発現の制御に関与していることが示唆された。

[背景]

凝集 IgG が FcεRI と FcγRII を介してヒト滑膜マスト細胞を活性化し TNF-α を産生すること、¹⁾ さらに凝集 IgG 刺激による滑膜マスト細胞からの TNF-α の産生は IL-33 によって相乗的に増加すること、²⁾ 凝集 IgG 刺激によって滑膜マスト細胞から産生される substance P は同時に分泌される chymase によって分解され炎症の抑制にもマスト細胞は働いていること、³⁾ 滑膜マスト細胞は関節リウマチ(RA)の滑膜組織で IL-17A の主要な産生細胞ではないこと⁴⁾ を報告してきた。しかしながら、RA における滑膜マスト細胞の特徴は未だに明らかにされていない。

[目的]

RA の炎症の場におけるマスト細胞のフェノタイプの解析を行い、疾患特異的な分子の発現を解析する目的にて RA の病態に関連する分子を同定し、その分子の発現や活性化を制御する機序の解明を行った。

[対象及び方法]

(1) 倫理的考慮

生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている(RK-160112)。

(2) 細胞

ヒト滑膜マスト細胞は、RA および変形性関節症(OA)の滑膜組織から分離培養した。できるだけ新鮮な滑膜組織を採取後ただちに 2% FCS + 100 U/L streptomycin/penicillin + 1% fungizone を含んだ IMDM に入れ、はさみを用いてできるだけ細切した。collagenase と hyaluronidase を用いて細胞を酵素的に分散させた。赤血球を除去した後 SCF (200 ng/mL)と IL-6 (50 ng/mL)を含んだ無血清培地 (Iscove methylcellulose medium と IMDM)で培養した。42 日目に PBS で Iscove methylcellulose medium を洗浄し、SCF (100 ng/mL)と IL-6 (50 ng/mL)を含んだ IMDM で培養した。また、滑膜組織を酵素で細胞を分散後培養し、プレートに接着した線維芽細胞を採取した。

(3) マスト細胞の精製

滑膜組織から酵素的に分散してマスト細胞の精製は以下の抗体を用いて細胞を染色した後 FACS Aria IIu (BD Biosciences, San Diego, CA, USA)を用いて行った。Alexa 647 標識抗 FcεR1α モノクローナル抗体(クローン CRA1, eBioscience, San Diego, CA, USA)および PE 標識抗 Kit モノクローナル抗体(クローン YB5, B8, BD Biosciences)である。

(4) RT-PCR

マスト細胞の総 RNA は RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)を用いて抽出し精製した。500 μg/mL oligo (dT12-18) primer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)、10 mM dNTP mix (Invitrogen)、5 x first strand buffer (Invitrogen)、0.1 M DTT (Invitrogen)、SuperScript III RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen)および RNase OUT (Invitrogen)を用いて cDNA に逆転写を行った。PTGS1、PTGS2、LTC4S、TBXAS1、HPGDS、miR-199a-3p、RNU48 および GAPDH の primer と probe は Assays-on-Demand™ service (Applied Biosystems, Tokyo, Japan)のものを使用した。

(5) DNA chip 解析

OA マスト細胞と RA マスト細胞の発現遺伝子を DNA chip を用いて網羅的解析を行った。OA マスト細胞と RA マスト細胞から RNeasy Mini kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出し、前述の方法で cDNA に逆転写した。逆転写した cDNA と biotin 標識されたヌクレオチド 3 リン酸を用いて、ビオチン化相補的 RNA (Biotin-cRNA) を合成した。Biotin-cRNA と Human Genome U133 (Affymetrix) を 45°C で 16 時間反応させ、ハイブリダイゼーションした。その後、streptavidin-phycoerythrin (PE) と反応させ、Hewlett-Packard Gene Array Scanner (Palo Alto, CA, USA) を用いて蛍光強度を読み取った。各プローブの蛍光強度は、GeneChip Analysis Suite 5.0 (Affymetrix) で数値化した。数値化したデータを Genespring software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて解析し、RA マスト細胞における発現量が OA マスト細胞と比較して高かった遺伝子群を抽出した。

(6) miRNA の網羅的発現解析

OA および RA マスト細胞(それぞれ 3 ドナー)から miRNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて miRNA を抽出した。抽出した miRNA (100 ng) に、miRNA Splice-In solution (Agilent Technologies)、CIP Master Mix を添加し、37°C で 30 分間反応させ脱リン酸化させた。その後、DMSO を添加し、100°C で 10 分間反応させ氷上で冷却し反応を停止させた。脱リン酸化処理した miRNA 溶液に Cy3 を含んだ Ligation Master Mix (Agilent Technologies) を添加し 16°C で 2 時間反応させた。Cy3 でラベルした miRNA を精製し miRNA Complete Labeling and Hyb Kit (Agilent Technologies) と 55°C で 20 時間反応させハイブリダイゼーションさせた。その後 miRNA を抽出した。miRNA の網羅的発現解析はヒト miRNA Micro assay kit Release16.0 (Agilent Technologies) を用いて行った。

(7) マスト細胞の活性化

IgE 感作したマスト細胞を 0.1、1.0、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗 Fc ϵ RI α モノクローナル抗体 (クローン CRA1、eBioscience) あるいはカルシウムイオノフォア A23187 (10^{-6}M) で 30 分間刺激した。Fc γ RI の架橋は、マスト細胞を 1、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗ヒト Fc ϵ RI 抗体の F(ab') $_2$ fragments (F(ab') $_2\alpha$ Fc γ RI, clone 10.1) で 30 分間刺激した。コントロールとしてマウス IgG1 の F(ab') $_2$ fragments (F(ab') $_2$ mIgG1, Jackson Immune Laboratory, West Grove, PA) で 30 分間刺激した。細胞を 1 度洗浄後 Fc γ RI の架橋のため抗マウス IgG F(ab') $_2$ fragments のヤギ F(ab') $_2$ fragments (gF(ab') $_2\alpha$ mF(ab') $_2$, Jackson Immune Laboratory) を添加しさらに 30 分間刺激した。ヒスタミン遊離と PGD $_2$ 産生を測定するためその細胞上清あるいは細胞ペレットを回収した。

(8) OA マスト細胞と RA 線維芽細胞との共培養

OA マスト細胞と RA 線維芽細胞を collagen coating の 24 穴プレートを用いてマスト細胞培地で 96 時間共培養した。まず RA 線維芽細胞をプレートに線維芽細胞培地とともに加え、48 時間インキュベートしコンフルエントにした。その後培地をマスト細胞培地に置き換え、一穴につき 3×10^5 個ずつ OA マスト細胞を加えた。96 時間後マスト細胞のみ単離した。RA 線維芽細胞は底面に張り付くため弱くピペッティングすると OA マスト細胞のみ単離可能であった。

(9) 脱顆粒、PGD₂ 産生

ヒスタミン遊離と PGD₂ 産生は酵素免疫法を用いた。

(10) 統計解析

OA と RA の 2 群間の検定においては正規分布に従っていない分布の中心分布の差を検定するため、Mann-Whitney の *U* 検定を用いた。miR-199a-3p と PTGS2 の発現量の相関は Spearman の順位相関係数を用いて相関の強さを検定した。解析には、GraphPad Prism 6 (MDF, Tokyo, Japan)を用いた。 $p < 0.05$ を統計学的に有意差があるとした。

[結果]

DNA chip の結果、prostaglandin synthase 1 (PTGS1)、prostaglandin synthase 2 (PTGS2)、thromboxane synthase 1 (TBXAS1)、leukotriene C₄ synthase (LTC4S) mRNA の発現量は OA マスト細胞と比較して RA マスト細胞の方が有意に高かった。また、IgE 依存性刺激において PGD₂ 産生量は RA マスト細胞の方が有意に高かった。一方 LTB₄ 産生量は OA マスト細胞で有意に高かった。IgG 依存性刺激において PGD₂ 産生量は RA マスト細胞のほうが有意に高かった。したがって、OA および RA マスト細胞は、異なった性質を有していることが明らかになった。RA 線維芽細胞において PTGS1、PTGS2、TBXAS1、LTC4S mRNA の発現量は OA 線維芽細胞と同程度であった。OA マスト細胞を RA 線維芽細胞と共培養しても PTGS1、PTGS2、TBXAS1、LTC4S mRNA の発現量に変化は見られなかったことから、両マスト細胞の性質の違いは、線維芽細胞に起因しないことが示唆された。次に miRNA chip の結果、OA マスト細胞の方が、RA マスト細胞より 3 倍以上発現量が高い miRNA を 20 個見出した。これら 20 個の miRNA のうち PTGS2 の発現制御に寄与する miRNA は miR199a-3p であった。miR-199a-3p と PTGS2 の発現量の相関を調べたところ OA マスト細胞では相関がなかったが、RA マスト細胞では負の相関がみられた(図 1)。関節液中の PGD₂ 量は、RA の方が有意に高かったのに対し、PGE₂ 量は両群間に有意な差は見られなかった。

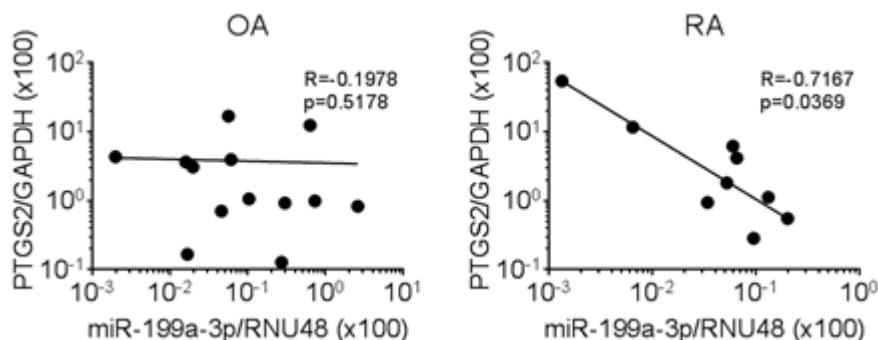


図1 OA と RA 患者の滑膜マスト細胞における miR-199a-3p と PTGS2 発現量の相関

[考察]

RA 患者の滑膜組織での PGD₂ 産生細胞はマスト細胞のみでなく滑膜線維芽細胞やマクロファージも産生細胞である。実際に関節滑液中の PGD₂ 量を測定すると、RA 患者で有意に高いことが分かった。PGD₂ 受容体および PGD₂ 合成酵素の欠損マウスを用いた研究から PGD₂、特に HPGDS 由来の PGD₂ は炎症の抑制効果を持つことが示されている。その機序としては①PGD₂ が樹状細胞表面の DP1 を介して樹状細胞の遊走と機能を抑制し、結果として T 細胞機能を抑制すること、⁵⁾ ②PGD₂ の分解産物である 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) が peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ 依存性および非依存性の系を介して好中球の遊走を抑制することによって炎症を抑制すること、⁶⁾ ③炎症の際に T 細胞と B 細胞から産生される IL-10 を増加させ、マクロファージから産生される炎症性サイトカイン TNF- α を低下させること⁶⁾ が示唆される。実際、関節炎マウスモデルにおいて、PGD₂ 受容体の阻害薬、⁷⁾ PGD₂ 受容体欠損マウスを用いた報告⁸⁾ からも PGD₂ は炎症抑制効果をもつことが示唆される。⁸⁾ これらの報告と本研究の結果から、RA 患者マスト細胞が免疫複合体の刺激によって過剰な PGD₂ を産生することにより、RA の炎症を抑制している可能性が示唆された。

[結論]

関節リウマチ(RA)のマスト細胞は、変形性関節症(OA)のマスト細胞と比較すると免疫複合体の刺激によって過剰な PGD₂ を産生することが分かった。その原因として prostaglandin synthase 1 (PTGS1)、prostaglandin synthase 2 (PTGS2) mRNA の発現量は OA マスト細胞と比較して RA マスト細胞の方が有意に高かった。

[参考文献]

¹⁾ Lee H, Kashiwakura J, Matsuda A, Watanabe Y, Sakamoto-Sasaki T, Matsumoto K, Hashimoto N, Saito S, Ohmori K, Nagaoka M, Tokuhashi Y, Ra C, Okayama Y: Activation of

human synovial mast cells from rheumatoid arthritis or osteoarthritis patients in response to aggregated IgG through FcγRI and FcγRII. *Arthritis Rheum.* 2013; 65 (1): 109-119.

²⁾ Yanagisawa M, Kashiwakura J, Lee H, Okamura Y, Sasaki-Sakamoto T, Saito S, Tokuhashi Y, Ra C, Okayama Y: IL-33 synergistically enhances immune complex-induced tumor necrosis factor-α and IL-8 production in cultured human synovium-derived mast cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013; 161(supple2): 32-36.

³⁾ Okamura Y, Mishima S, Kashiwakura J-I, Sasaki-Sakamoto T, Toyoshima S, Kuroda K, Saito S, Tokuhashi Y, Okayama Y: The dual regulation of substance P-mediated inflammation via human synovial mast cells in rheumatoid arthritis. *Allergol Int.* 2017; 66S: S9-S20.

⁴⁾ Kan J-I, Mishima S, Kashiwakura J-I, Sasaki-Sakamoto T, Seki M, Saito S, Ra C, Tokuhashi Y, Okayama Y: Interleukin-17A expression in human synovial mast cells in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Allergol Int.* 2016; 65(Suppl): S11-S16.

⁵⁾ Hammad H, de Heer HJ, Soullie T, Hoogsteden HC, Trottein F, Lambrecht BN: Prostaglandin D2 inhibits airway dendritic cell migration and function in steady state conditions by selective activation of the D prostanoid receptor 1. *J Immunol.* 2003; 17: 3936-3940.

⁶⁾ Rajakariar R, Hilliard MLawrence T, et al. Hematopoietic prostaglandin D2 γsynthase controls the onset and resolution of acute inflammation through PGD₂ and 15-deoxyDelta12 14 PGJ2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104: 20979-20984.

⁷⁾ Arimura A, Yasli K, Kishino J, Trivedi S, Colville-Nash P, Bellingan G, Fitzgerald D, Yaqoob MM, Gilroy DW: Prevention of allergic inflammation by a novel prostaglandin receptor antagonist, S-5751. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 298: 411-419.

⁸⁾ Tsubosaka Y, Nakamura T, Hirai H, Hori M, Nakamura M, Ozaki H, Murata T: A deficiency in the prostaglandin D₂ receptor CRTH2 exacerbates adjuvant-induced joint inflammation. *J Immunol.* 2014; 193: 5853-5840.