

## 関節リウマチ(RA)における滑膜マスト細胞による substance P を介する炎症の 二重制御機構

### The dual regulation of substance P-mediated inflammation via human synovial mast cells in rheumatoid arthritis

岡村佑紀<sup>1), 2)</sup>、三嶋信太郎<sup>1), 2)</sup>、柏倉淳一<sup>1), 3)</sup>、坂本朋美<sup>1), 4), 5)</sup>、豊島翔太<sup>1), 3), 4)</sup>、齋藤修<sup>2)</sup>、岡山吉道<sup>1), 4), 5)</sup>

Yuki OKAMURA<sup>1), 2)</sup>, Shintaro MISHIMA<sup>1), 2)</sup>, Jun-ichi KASHIWAKURA<sup>1), 3)</sup>, Tomomi SAKAMOTO-SASAKI<sup>1), 4), 5)</sup>, Shota TOYOSHIMA<sup>1), 4), 5)</sup>, Shu SAITO<sup>2)</sup>, Yoshimichi OKAYAMA<sup>1), 3), 4)</sup>

<sup>1)</sup>日本大学医学部 免疫・アレルギー学プロジェクトチーム、<sup>2)</sup>日本大学医学部 整形外科、<sup>3)</sup>北海道大学大学院 薬学研究院衛生化学研究室、<sup>4)</sup>日本大学医学部 医学教育センター、<sup>5)</sup>日本大学医学部附属板橋病院 アレルギーセンター

#### [要旨]

substance P は RA 罹患関節の関節液中に多量に存在し滑膜細胞の増殖、活性化による IL-1 や IL-6 産生などを惹起し、炎症に関与していることが報告されている。そこで RA と変形性関節症(OA)患者の滑膜組織マスト細胞に対する substance P の影響を検討したところ、両患者の滑膜組織マスト細胞は MrgX2 を介してヒスタミンを遊離し、PGD<sub>2</sub> を産生したが測定可能な量のサイトカインは産生されなかった。また MrgX2 陽性細胞数に関して両者に差はなかった。substance P の発現細胞を調べるため RA と OA 患者滑膜組織の免疫組織化学染色を行ったところマスト細胞は substance P を発現しておりその陽性数や発現頻度には有意差はなかったが、substance P の染色パターンが異なり、RA では 41%の、一方 OA では 7%のマスト細胞において substance P は細胞膜周辺に局在していた。FcεRI の架橋および凝集 IgG 刺激で刺激 2 時間以降に Tac1 mRNA が上昇したが、細胞上清中の substance P は測定感度以下であった。マスト細胞内には 700 pg/10<sup>6</sup>個が存在し、刺激 30 分後にその substance P 量は有意に減少した。substance P はマスト細胞プロテアーゼである chymase によって分解されることがわかった。活性化された滑膜マスト細胞は即座に substance P を分解し、これは RA において substance P を介する滑膜細胞の活性化を抑制していることが示唆された。このことは RA においてマスト細胞による substance P を介する 2 重の炎症の制御があることが示唆された。

## [背景]

Mrg 受容体は、脊髄後根神経節や感覚神経に発現し、痛覚に関与する G タンパク質共役型受容体に属する受容体ファミリーである。げっ歯類では 50 以上の遺伝子からなる 4 つの Mrg 受容体 subfamily が存在し、ヒトでは、MrgX1-X7 の 7 つの受容体が同定されている。<sup>1-3)</sup> MrgX1 と MrgX2 は、感覚神経細胞のみならず、臍帯血由来培養マスト細胞とマスト細胞腫のセルライン LAD2 にも発現している。<sup>4), 5)</sup> substance P、compound 48/80、cortistatin、somatostatin、pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide、dynorphin、vasoactive intestinal peptide (VIP)、抗菌ペプチド LL-37 が MrgX2 のリガンドである。<sup>4), 5)</sup> MrgX1 のリガンドは、bovine adrenal medulla peptide である。<sup>3)</sup>

関節リウマチ (RA) は、進行性の関節破壊により日常生活の活動制限を引き起こす全身性の慢性炎症性疾患であり、炎症性サイトカインである tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 、interleukin (IL)-1 や IL-6 が重要な役割を果たしている。<sup>6)</sup> 実験的関節炎ラットモデルの滑膜では substance P 濃度の有意な増加を認め、<sup>7)</sup> substance P の関節投与で炎症が増悪する。<sup>8)</sup> NK-1R 拮抗薬を用いると、炎症と痛みが減弱する。<sup>9), 10)</sup> また、RA 患者の関節滑液中の substance P 濃度は変形性関節症 (OA) 患者と比較して有意に高い。<sup>11)</sup> substance P の分泌細胞としては、神経細胞、<sup>12)</sup> 線維芽細胞<sup>13)</sup> および単球・マクロファージ<sup>14)</sup> が報告されているが、マスト細胞に関しての報告はない。RA における substance P による神経性炎症の役割についてはよく分かっていない。

## [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 recombinant human (rh) SCF (200 ng/mL, PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) と rhIL-6 (50 ng/mL, PeproTech) 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、rhSCF (100 ng/mL) と rhIL-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) 免疫化学組織染色と共焦点顕微鏡による解析

共焦点顕微鏡による解析はすでに報告した方法を用いて行った。滑膜組織を固定して、膜の穴あけをした後、Alexa Fluor® 488 標識マウス抗 tryptase モノクローナル抗体(clone AA1; DakoCytomation Inc., Carpinteria, CA, USA)、Alexa Fluor® 555 標識マウス抗 substance P モノクローナル抗体 (clone 266815; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、ウサギ 抗ヒト MrgX2 ポリモノクローナル抗体 (Abcam, Cambridge, UK) アイソタイプコントロール Alexa Fluor® 488 標識マウス IgG1 および Alexa Fluor® 555 標識マウス IgG1 およびウサギ IgG とインキュベートした。MrgX2 の染色のためには、ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体、Cy3 標識 streptavidin (Biolegend, San Diego, CA, USA) を用いた。核染色には DAPI を用いた。FV1000 型共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いた。

### (4) Flow cytometry

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。マウス抗ヒト MrgX2 モノクローナル抗体(clone 477533; R&D Systems)、マウス抗ヒト FcεRI α 鎖モノクローナル抗体(クローン CRA1, eBioscience, San Diego, CA, USA)、マウス抗ヒト tryptase モノクローナル抗体 (clone AA1; DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA)、PE 標識抗マウス IgG1 抗体および FITC 標識抗マウス IgG2 抗体を用いた。

### (5) 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。TAC1、TAC3、TAC4、MrgX2、IL-6、IL-8、osteopontin、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。

### (6) マスト細胞の活性化

IgE (0.5 µg/mL, Calbiochem, San Diego, CA, USA) で 30 分感作した OA および RA 患

者の滑膜マスト細胞を 0.1、1.0、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の抗 IgE ポリクローナル抗体 (DakoCytomation Inc.) で刺激した。Fc $\gamma$ RI および Fc $\gamma$ RIIA の架橋は、マスト細胞を 1、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の凝集ヒト IgG で刺激した。コントロールとして単量体ヒト IgG で 30 分間刺激した。また、substance P (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) あるいは calcium ionophore A23187 (Sigma-Aldrich) で刺激した。ヒスタミン遊離と PGD<sub>2</sub> 産生と substance P 分泌量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。

(7) 遺伝子発現抑制

レンチウイルスベクターを用いた shRNA 技術にてヒト滑膜組織由来培養マスト細胞の MrgX2 の発現抑制をおこなった。MrgX2 のコンストラクションに対する sense と antisense オリゴヌクレオタイド配列のレンチウイルス発現プラスミドは Sigma-Aldrich から購入した。

(8) 脱顆粒、PGD<sub>2</sub> 産生と substance P 分泌量の測定

ヒスタミン遊離と PGD<sub>2</sub> 産生と substance P 分泌量の測定は酵素免疫法を用いた。

(9) IL-6, IL-8, osteopontin 産生量の測定

IL-6, IL-8, osteopontin 産生量の測定には ELISA (R&D Systems) 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。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]**

RA と OA 患者滑膜組織の免疫組織化学染色を行ったところ両患者の滑膜組織マスト細胞は substance P を発現しておりその陽性数や発現頻度には有意差はなかったが、substance P の染色パターンが異なり、OA では細胞質全体にびまん性に存在し(図 1A 参照)、RA では 41%の(図 1B 参照)、OA では 7%のマスト細胞において substance P は細胞膜周辺に局在していた。Fc $\epsilon$ RI の架橋および凝集 IgG 刺激で刺激 2 時間以降に Tac1 mRNA が上昇したが、細胞上清中の substance P は測定感度以下であった。substance P はマスト細胞から分泌される chymase によって分解された。マスト細胞内には substance P が 700 pg/10<sup>6</sup> 個が存在し、刺激 30 分後にその substance P 量は有意に減少した。活性化された滑膜マスト細胞は即座に substance P を分解し、これは RA において substance P を介する滑膜細胞の活性化を抑制していることが示唆された。両患者の滑膜組織マスト細胞は MrgX2 を介してヒスタミンを遊離し、PGD<sub>2</sub> を産生したが測

定可能な量のサイトカインは産生されなかった。また MrgX2 陽性細胞数に関して両者に差はなかった。

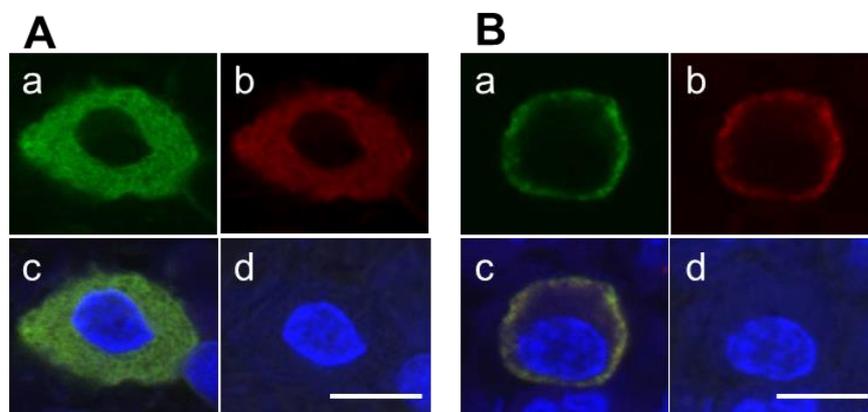


図1 RA (A) および OA 患者 (B) の滑膜組織におけるマスト細胞の substance P (赤, b)と tryptase (緑, a)の細胞内局在共焦点顕微鏡による解析を行った。青は DAPI による核染色である。c は a と b の merge 像、d は DAPI のみの像である。Bar = 5  $\mu$ m.

#### [考察]

substance P は滑膜マスト細胞上の MrgX2 を介しマスト細胞を活性化し炎症メディエーターを遊離させ炎症を惹起させた。RA の関節滑液中にも substance P は存在し SP-MrgX2 枢軸が両疾患の炎症の病態に関与していることが示唆された。substance P の発現細胞を調べるため RA と OA 患者滑膜組織の免疫組織化学染色を行ったところマスト細胞は substance P を発現しておりその陽性数や発現頻度には有意差はなかったが、substance P の染色パターンが異なり、RA では 41%の、一方 OA では 7%のマスト細胞において substance P は細胞膜周辺に局在していた。この局在はマスト細胞の活性化で惹起されたため RA ではマスト細胞の活性化が起こっていることが示唆された。活性化された滑膜マスト細胞は即座に substance P を遊離するが同時に遊離する chymase によって substance P を分解し、これは RA において substance P を介する滑膜細胞の活性化を抑制していることが示唆された。このことは RA においてマスト細胞による substance P を介する 2 重の炎症の制御があることが示唆された。

#### [結論]

関節リウマチ(RA)の神経性炎症にマスト細胞は、substance P の分泌と分解また、substance P による活性化機構が存在し、炎症の促進と抑制の二重の炎症制御機構を持っていることが示唆された。<sup>9)</sup>

## [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 Fc $\gamma$ RI and Fc $\gamma$ RII. *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- $\alpha$  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 D<sub>2</sub> 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 M, Lawrence T, et al: Hematopoietic prostaglandin D<sub>2</sub>  $\gamma$ synthase controls the onset and resolution of acute inflammation through PGD<sub>2</sub> and 15-deoxyDelta<sup>12</sup> 14 PGJ<sub>2</sub>. *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 D<sub>2</sub> receptor CRTH2 exacerbates adjuvant-induced joint inflammation. *J Immunol.* 2014; 193: 5853-5840.
- 9) 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.