

199800547A

平成10年度

厚生科学研究費補助金

慢性関節リウマチの骨・関節破壊機序の解明
による新治療法開発に関する研究

研 究 報 告 書

平成10年度
厚生科学研究費補助金

慢性関節リウマチの骨・関節破壊機序の解明
による新治療法開発に関する研究

研 究 報 告 書

慢性関節リウマチの骨・関節破壊機序の解明による新治療法開発に関する研究

主任研究者

中村耕三 東京大学大学院医学系研究科外科学専攻感覚運動機能医学講座整形外科学 教授

分担研究者

伊藤恒敏 東北大学大学院医学系研究科細胞生物学講座 教授

岩本幸英 九州大学医学部整形外科 教授

岡田保典 慶応義塾大学医学部病理学 教授

木村友厚 富山医科薬科大学整形外科 教授

高橋栄明 新潟大学医学部整形外科 教授

藤井克之 東京慈恵会医科大学整形外科 教授

研究協力者

井上 一 岡山大学医学部整形外科 教授

岩田 久 名古屋大学医学部整形外科 教授

加藤智啓 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター臨床遺伝部門

坂口志文 京都大学再生医科学研究所・生体機能調節学分野 教授

高橋直之 昭和大学歯学部生化学 助教授

富田哲也 大阪大学医学部整形外科

目次

- 慢性関節リウマチの骨・関節破壊機序の解明による新治療法開発に関する研究 (1)
東京大学大学院医学系研究科外科学専攻感覚運動機能医学講座整形外科学 教授 中村耕三
- 主任研究者
アデノウイルスベクターを用いた細胞内情報伝達系調節による関節炎骨破壊の制御に関する研究 (7)
東京大学大学院医学系研究科外科学専攻感覚運動機能医学講座整形外科学 教授 中村耕三
- 分担研究者
破骨細胞分化抑制および血管新生抑制による関節炎の骨関節破壊防止に関する研究 (10)
九州大学医学部整形外科 教授 岩本幸英
- 慢性関節リウマチにみられる破骨細胞によらない骨破壊一颗粒球関与の可能性 (13)
東北大学大学院医学系研究科医科学専攻細胞生物学講座発生生物学分野 教授 伊藤恒敏
- 関節破壊抑制を目的としたアポトーシス誘導療法と軟骨組織特異的遺伝子発現システム (16)
富山医科薬科大学整形外科 教授 木村友厚
- 慢性関節リウマチの骨・軟骨破壊機序の解明による新治療法に関する研究 (20)
東京慈恵会医科大学整形外科 教授 藤井克之
- 慢性関節リウマチ滑膜組織でのMMP-2活性化とペントサン硫酸によるTIMP-3産生調節 (21)
慶応義塾大学医学部病理学 教授 岡田保典
- 腸骨および関節周辺部における骨芽細胞・破骨細胞機能の定量的解析に関する研究 (24)
新潟大学医学部整形外科 教授 高橋栄明
- 研究協力者
慢性関節リウマチ関節浸潤T細胞の抗原を同定する方法論の確立 (27)
聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター臨床遺伝部門 加藤智啓
- 破骨細胞の機能を調節するインターロイキン1 (IL-1) の作用に関する研究 (31)
昭和大学歯学部生化学 助教授 高橋直之
- 慢性関節リウマチマース細胞による骨・関節破壊機序の解明に関する研究 (35)
大阪大学医学部整形外科 富田哲也
- 軟骨細胞のアポトーシスとその誘導因子の解明、これらをターゲットとした新しい治療法の開発 (38)
岡山大学医学部整形外科 教授 井上 一
- 細胞外マトリックス構成成分が細胞の代謝に与える影響—特にその疾病に関連した意義について— (39)
名古屋大学医学部整形外科 教授 岩田 久
- リウマチ様関節炎自然発症マウスの確立と、このモデルにおける関節破壊機序の解析 (40)
京都大学再生医科学研究所・生体機能調節学分野 教授 坂口志文

課題名 慢性関節リウマチの骨・関節破壊機序の解明による新治療法開発に関する研究

主任研究者 中村耕三

所属機関 東京大学大学院医学系研究科外科学専攻感覚運動機能医学講座整形外科学教授

研究要旨

慢性関節リウマチの骨・関節破壊の病態とそれを制御する因子を解明し、骨・関節破壊を抑制する新しい治療法を開発することを目的として、滑膜増殖の活性化、破骨細胞の活性化、関節軟骨組織・軟骨細胞自身の変化による組織破壊の誘導、骨髄での顆粒球機能亢進による骨破壊、局所での分解酵素の活性化について検討し、以下の結果を得た。

慢性関節リウマチ滑膜マクロファージの滑膜線維芽細胞をストローマ様細胞とした破骨細胞への分化、ビスフォスフォネート (YM-175) によるアジュバント関節炎の抑制、血管新生阻害剤 (MMP インヒビター: OPB-3206) によるアジュバント関節炎の骨・関節破壊の抑制、慢性関節リウマチ滑膜組織中のアクチビンレセプターの発現、Src キナーゼ系を負に調節する Csk 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターによる慢性関節リウマチ滑膜線維芽細胞の増殖と IL-6 産生の抑制および破骨細胞様多核細胞による骨吸収の抑制、apoptosis 誘導による滑膜の退縮、慢性関節リウマチそれ自体による全身性骨粗鬆症の発生、慢性関節リウマチでの幼若顆粒球の造血亢進と顆粒球による骨破壊、慢性関節リウマチナーズ細胞における抱き込み現象と IL-6, IL-8, GM-CSF, ヒアルロン酸, G-CSF の高値および cathepsin K, MMP-9 の mRNA の発現、慢性関節リウマチ関節炎軟骨細胞での c-fos の発現、軟骨組織特異的遺伝子発現システムによる軟骨への遺伝子導入、慢性関節リウマチ関節滑膜での proMMP-2 の活性化、膜型 MMP 阻害活性をもつ TIMP-3 の RA 滑膜表層細胞での発現およびペントサン硫酸処理による TIMP-3 産生の亢進。

今後、これらの機序解明を基礎に、動物実験系による治療実験を行い、慢性関節リウマチ患者への応用へ向かう足がかりを得た。

分担研究者	木村友厚 富山医科薬科大学整形外科教授	藤井克之 慈恵会医科大学整形外科教授
	岩本幸英 九州大学整形外科教授	伊藤恒敏 東北大学大学院医学系研究科細胞生物学講座教授
	岡田保典 慶應義塾大学医学部病理学教授	高橋栄明 新潟大学医学部整形外科教授
研究協力者	井上 一 岡山大学医学部整形外科教授	岩田 久 名古屋大学医学部整形外科教授
	高橋直之 昭和大学歯学部生化学助教授	坂口志文 京都大学再生医科学研究所生体機能調節学分野教授

A. 研究目的

現在の慢性関節リウマチの薬物治療法は主にその免疫反応や炎症反応を抑える目的で開発され、それらの抑制には一定の成果をあげているが、骨・関節破壊の進行については特に重症例

で抑制できておらず、これが慢性関節リウマチ患者の日常生活に多大な障害をもたらしているのが現状である。したがって骨・軟骨破壊の病態をより詳細に明かにし、この破壊に対する解決方法を探ることはまさに急務な研究課題であ

る。骨・軟骨破壊に対して新たに有効な治療法が開発されれば、疼痛と機能障害に苦しんでいる患者の福音となり、ひいては四肢機能障害者を著減でき、厚生行政の大きな課題のひとつの解決につながる。国民の保険・医療と福祉の向上に資することが強く期待できる。

慢性関節リウマチの骨・関節破壊の機序とその制御を考えるにあたっては、複数のアスペクトがある。組織破壊の面からは、すでに指摘されている滑膜増殖の活性化のほか、骨破壊の主役と想定されている破骨細胞の活性化、関節軟骨組織・軟骨細胞自身の変化による組織破壊の誘導、近年明らかになりつつある骨髄での顆粒球機能亢進とその顆粒球による骨破壊、さらに局所での分解酵素の活性化促進などがある。また、制御の方法としては、化学物質のほか、遺伝子治療など、多様なまた新しいツールが有効となりうる。

本研究は、慢性関節リウマチの骨・関節破壊の病態とそれを制御する因子を解明し、骨・関節破壊を抑制する新しい治療法を開発することを目的とし、関連する多方面の研究者、臨床家がチームを組み、平成 10 年度、以下の点について重点的に研究した。

(A) 骨・関節破壊に機能する滑膜、破骨細胞の活性化機序について

慢性関節リウマチ罹患関節では滑膜の著しい増殖と破骨細胞による活発な骨吸収がみられる。破骨細胞は骨組織に進入した滑膜（パンヌス）と骨との境界の他、骨と離れた滑膜内にも存在し、その形成メカニズムは解明されていない。また、滑膜炎での破骨細胞の分化や機能がいかなる因子により調節されているのかは不明の点が多い。そこで、以下の点を検討した。

- 1) 慢性関節リウマチ滑膜の破骨細胞誘導機序
- 2) 滑膜血管新生の抑制、破骨細胞分化の抑制による関節炎の骨・関節破壊防止
- 3) 遺伝子導入法を用いた細胞内情報伝達系制御による関節炎骨破壊の抑制
- 4) 滑膜に対するアポトーシス誘導療法による関節破壊抑制

(B) 慢性関節リウマチによる骨破壊、骨粗鬆化について

慢性関節リウマチに伴う骨粗鬆化には傍関節性と全身性とがある。全身性骨粗鬆症に関して慢性関節リウマチそのものの病変か、あるいは不動などの続発性の要因なのか明らかになっていない。そこで、以下の点を検討した。

1) 慢性関節リウマチに伴う骨粗鬆化の定量的解析

(C) 慢性関節リウマチにおける顆粒球機能亢進と骨破壊機序について

慢性関節リウマチの病巣として関節滑膜が主病巣と考えられてきたが、越智らは重症慢性関節リウマチ患者の罹患関節部及び腸骨骨髄中に異常な骨髄球系細胞を認め、さらにこれら骨髄球系細胞の支持機能を持つ間質細胞(ナース細胞)を樹立した。顆粒球造血機構解析、顆粒球や間質細胞(ナース細胞)の骨破壊機構への関与の解析が課題である。そこで、以下の点を検討した。

1) 顆粒球造血機構解析並びに顆粒球による骨破壊機構の解析

2) 慢性関節リウマチに特異的な間質細胞(ナース細胞)による病巣形成と関節破壊

(D) 関節軟骨細胞自身の変化による組織破壊誘導の機序について

従来多くの慢性関節リウマチ研究は滑膜異常を対象とし、軟骨細胞の重要性は国内外でようやく認識されつつあるにすぎない。そこで、本研究では軟骨細胞自身の変化にも焦点をあて、以下の点を検討した。

- 1) 軟骨細胞自体が示す遺伝子発現とその阻害による骨・軟骨破壊の抑制
- 2) 軟骨組織特異的遺伝子発現システムを用いた関節の破壊抑制と修復

(E) 関節局所での基質分解酵素の活性化促進と抑制機序について

関節軟骨をはじめとした組織の破壊に細胞外マトリックス分解は必須である。近年、細胞外マトリックス分解に関与するプロテアーゼの研究が大きな成果をおさめている。そこで、以下の点を検討した。

- 1) MMP (Matrix metalloproteinase) の活性化機構および TIMP (Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase) による破壊防止機序

B. 方法と結果

(A) 骨・関節破壊に機能する滑膜、破骨細胞の活性化機序について

1) 慢性関節リウマチ滑膜の破骨細胞誘導機序

慢性関節リウマチ患者から手術時に採取した滑膜細胞の初代培養系および、継代培養し滑膜線維芽細胞のみとなったことを確認した後、末梢血単核球との共存培養において、破骨細胞形成能について検討した。滑膜単独培養によって破骨細胞形成が誘導されたことから、初代培養系には破骨細胞前駆細胞のみならず、形成支持細胞が存在することが明らかとなった。また、共存培養系の結果から、慢性関節リウマチ滑膜線維芽細胞には破骨細胞形成支持能があり、破骨細胞に必要な微少環境を整えていることが明らかとなった。

2) 滑膜血管新生の抑制、破骨細胞分化の抑制による関節炎の骨・関節破壊防止

ビスフォスフォネート (YM-175) の関節炎骨破壊に対する抑制効果の検討を行った。YM-175 によりアジュバント関節炎の骨・関節破壊は濃度依存的に抑制され、組織学的には TRAP 陽性多核細胞数が濃度依存的に抑制された。ラット骨髄細胞培養系でも濃度依存的に TRAP 陽性多核細胞形成が抑制され、YM-175 の作用メカニズムとして破骨細胞分化の抑制を示唆する所見を得た。

滑膜の増殖に不可欠な血管新生を抑制することによる関節炎骨関節破壊防止の可能性をさぐる目的で、アジュバント関節炎ラットに血管新生阻害剤 (MMP インヒビター: OPB-3206) を投与しその影響を検討した。その結果パルス形成が抑制され骨・関節破壊が抑えられることから、血管新生抑制により慢性関節リウマチの骨・関節破壊が防止できる可能性が示唆された。

また、血管新生の抑制と骨形成促進の作用のあるアクチビンによる骨・関節破壊抑制の可能性を探るために、アクチビンレセプターの局在を検討し、慢性関節リウマチ滑膜の肉芽組織中の一部の細胞、血管内皮細胞、破骨細胞にアクチビンレセプターが発現していることを確認した。

3) 遺伝子導入法を用いた細胞内情報伝達系

制御による関節炎骨破壊の抑制

慢性関節リウマチ滑膜線維芽細胞および破骨細胞をターゲットとし、アデノウイルスベクターを用いてこれらの細胞の細胞内情報伝達系を調節することによって骨破壊を制御することを目的として研究を行った。アデノウイルスベクターによる滑膜細胞・破骨細胞活性化の情報伝達機構の制御のため、まず *in vitro* で滑膜細胞、破骨細胞に効率よく遺伝子が導入されることを確認した。ついで、Src キナーゼ系を負に調節する目的で Csk 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを用い、Csk が慢性関節リウマチ滑膜線維芽細胞の増殖と IL-6 産生を抑制すること、慢性関節リウマチ滑膜線維芽細胞と末梢血単核細胞の共存培養で形成された破骨細胞様多核細胞による骨吸収を強力に抑制することを観察した。

4) 滑膜に対するアポトーシス誘導療法による関節破壊抑制

SCID-HuRAg マウス (慢性関節リウマチ患者の骨・軟骨・滑膜組織を一塊として SCID マウスに移植した RA 動物モデル) に抗 Fas モノクローナル抗体あるいは Fas L (リガンド) 発現細胞を用いて apoptosis を誘導し、滑膜に著明な退縮効果が得られることを観察した。

(B) 慢性関節リウマチによる骨破壊、骨粗鬆化について

1) 慢性関節リウマチに伴う骨粗鬆化の定量的解析

50 歳から 64 歳における女性慢性関節リウマチ患者の脊椎圧迫骨折の合併頻度を骨ドック受診者を対照に調査し、圧迫骨折の頻度が 28% と対照群 (5.7%) に比べ有意に高く、また、非ステロイド剤投与群だけでも 20% と高率である結果を得た。原発性骨粗鬆症と慢性関節リウマチに伴う骨粗鬆化との相違を検討するため、閉経後女性慢性関節リウマチ患者 40 例 (46~74 歳) と年齢の一致した原発性骨粗鬆症 40 例を対照群として、腸骨の組織形態計測と骨梁構造解析を行った。その結果、慢性関節リウマチでは吸収期から形成期に移る逆転期が著しく延長すること、ステロイド剤非投与群でも骨梁の途絶が目立つことが明らかとなった。すなわち、骨芽細胞機能の低下と全身性骨粗鬆症が慢性関節リウマチ

それ自体でも引き起こされていることを示唆する所見を得た。

(C) 慢性関節リウマチにおける顆粒球機能亢進と骨破壊機序について

1) 顆粒球造血機構解析並びに顆粒球による骨破壊機構の解析

ラットの II 型コラーゲン関節炎 (CIA) の同一個体での経時的な検討を行った結果、関節炎発症前 (感作後 5~7 日) に末梢血で顆粒球の一過性の増多があり、関節炎発症に関与している可能性を示す所見を得た。また、慢性関節リウマチ患者の顆粒球造血動態と骨破壊との関係に着目し、flow cytometry 並びに形態学的検索、更に、慢性関節リウマチ患者末梢血顆粒球と骨を共培養し骨基質内のコラーゲン線維の変化を中心に電子顕微鏡による検索を行った。その結果慢性関節リウマチでは骨髄血、末梢血共に CD15⁺CD16⁻の幼若顆粒球の造血亢進が起こっていること、腸骨海綿骨梁の骨破壊には顆粒球が深く関与していることが確認された。

2) 慢性関節リウマチに特異的な間質細胞 (ナース細胞) による病巣形成と関節破壊

慢性関節リウマチナース細胞はヒト B 細胞 (MC/car)、ヒト T 細胞 (Molt17) に対して高率に特異的抱き込み現象を示すことを観察した。また、ナース細胞は骨髄由来では、IL-6, IL-8, GM-CSF 及びヒアルロン酸を、滑膜由来ではさらに G-CSF の産生が高値であった。また、ナース細胞において cathepsin K 及び MMP-9 の mRNA の発現を認めた。

(D) 関節軟骨細胞自身の変化による組織破壊誘導の機序について

1) 軟骨細胞自身が示す遺伝子発現とその阻害による骨・軟骨破壊の抑制

慢性関節リウマチ関節炎軟骨の検討で、変形性関節症と異なり軟骨細胞に c-fos が高率に発現していることを見だし、これがマトリックス代謝の恒常性の破綻、関節破壊の進行につながる可能性を示す所見を得た。また、カニクイザルにコラーゲン関節炎 (CIA) を作製し、慢性関節リウマチ患者と同様の抗体の上昇、関節炎、軟骨細胞での c-fos の発現を確認した。

2) 軟骨組織特異的遺伝子発現システムを用いた関節の破壊抑制と修復

軟骨特異的に発現している XI 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子 (Col11a2) 上の軟骨特異的発現にかかわる cis-element を明かにし、この遺伝子領域と膜融合リポソーム (HVJ-liposome) をベクターとして用い、マウスで in vivo 関節内遺伝子導入実験を行った。その結果、関節軟骨細胞の約 30%で遺伝子導入後 2 週間の経過後も、マーカー緑色蛍光タンパク遺伝子が発現していることを確認した。

(E) 関節局所での基質分解酵素の活性化促進と抑制機序について

1) MMP (Matrix metalloproteinase) の活性化機構および TIMP (Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase) による破壊防止機序

慢性関節リウマチ関節滑膜において proMMP-2 の活性化が効率よくおこっており、その活性化に MT1-MMP と MT3-MMP が関与することを初めて明らかにした。また、膜型 MMP 阻害活性をもつ TIMP-3 が RA 滑膜表層細胞で発現され、ペントサン硫酸処理により TIMP-3 産生が亢進することを確認した。このことはペントサン硫酸を慢性関節リウマチ関節破壊抑制薬として将来導入できる可能性を示唆した。

C. 考察

(A) 骨・関節破壊に機能する滑膜、破骨細胞の活性化機序について

滑膜血管新生の抑制、破骨細胞分化の抑制による関節炎の骨・関節破壊防止について、ビスフォスフォネートのアジュバント関節炎の骨・関節破壊抑制作用、アクチビンレセプターの慢性関節リウマチ滑膜での局在が明らかとなり、次年度以降、骨・関節破壊に対するビスホスホネートの詳細な評価、破骨細胞分化抑制作用による骨・関節破壊抑制、アクチビンおよびアクチビン関連蛋白投与の可能性を検討していく基礎的所見を得た。遺伝子導入法を用いた細胞内情報伝達系制御による関節炎骨破壊の抑制については、アデノウイルスベクターを用い Src キナーゼ系を負に調節することが骨・関節破壊防止の治療法につながりうる可能性を示す所見を得、また次年度以降、遺伝子導入法により他の情報伝達機構の制御による骨・関節破壊の防止の治

療法の開発を目指すための基本的知見も得られた。滑膜に対するアポトーシス誘導療法による関節破壊抑制について、apoptosis 誘導により慢性関節リウマチ関節炎の消退、ひいては関節破壊の抑制が出来る可能性が確認できた。

(B) 慢性関節リウマチによる骨破壊、骨粗鬆化について

慢性関節リウマチに伴う骨粗鬆化の定量的解析により、全身性骨粗鬆症が慢性関節リウマチそれ自体でも引き起こされていることを示唆する所見を得、次年度以降に向けて、慢性関節リウマチでは抗リウマチ療法と同時に骨代謝に対する治療が必要であることが確認された。

(C) 慢性関節リウマチにおける顆粒球機能亢進と骨破壊機序について

慢性関節リウマチでは幼若顆粒球の造血亢進が起こっており、腸骨海綿骨梁の骨破壊に顆粒球が深く関与しているとの所見を得、今後、顆粒球による骨破壊機構の制御による、新治療方法の開発の検討を行うための基礎的所見が得られた。また、慢性関節リウマチにおいてはナース細胞による病巣形成と関節破壊があることが明らかとなり、ナース細胞を中心とした細胞間のネットワークの解明、骨軟骨破壊への関与を解明していく足がかりが得られた。

(D) 関節軟骨細胞自身の変化による組織破壊誘導の機序について

慢性関節リウマチ関節炎の軟骨細胞に c-fos が高率に発現していることが明らかとなり、今後、c-fos 遺伝子の競合的阻害による骨・軟骨破壊への抑制の治療法の開発の検討を進めるための基本的所見を得た。軟骨組織特異的遺伝子発現システムによるマウスでの in vivo 関節内遺伝子導入実験では、増殖因子などの治療的遺伝子を in vivo で慢性関節リウマチ軟骨に導入することが可能であるとの所見を得、次年度以降に治療法開発の検討をおこなうことが可能となった。

(E) 関節局所での基質分解酵素の活性化促進と抑制機序について

ベントサン硫酸処理により TIMP-3 産生が亢進することを確認し、次年度以降、ベントサン硫酸の TIMP-3 産生亢進の分子機構の解析を行い、その治療法への展開を目指すことが可能となった。

以上、3年計画の研究のなかで、第1年目として組織破壊促進の病態とその抑制機序につい

て十分な成果を得た。また、一部の研究では既に新しい治療法の試みを行うことができた。従って、今後、各々の抑制機序を用いてまず動物実験系による治療実験を行い、慢性関節リウマチ患者への応用へ向かう足がかりをつくることが期待できる。

D. 結論

慢性関節リウマチの骨・関節破壊機序と新治療法開発に関する知見として以下の点が明らかとなった。

- 1) ビスフォスフォネート (YM-175) により TRAP 陽性多核細胞数が抑制され、アジュバント関節炎の骨・関節破壊が濃度依存的に抑制された。
- 2) 血管新生阻害剤 (MMP インヒビター: OPB-3206) により、アジュバント関節炎ラットのパンナス形成が抑制され、骨・関節破壊が抑えられた。
- 3) 慢性関節リウマチ滑膜の肉芽組織中の一部の細胞、血管内皮細胞、破骨細胞に血管新生抑制および骨形成促進の作用のあるアクチビンのレセプターが発現していた。
- 4) 慢性関節リウマチ滑膜において、滑膜マクロファージは滑膜線維芽細胞をストローマ様細胞として破骨細胞に分化しえた。
- 5) アデノウイルスベクターにより in vitro で滑膜細胞、破骨細胞に効率よく遺伝子が導入され、Src キナーゼ系を負に調節する Csk 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターにより、RA 滑膜線維芽細胞の増殖と IL-6 産生が抑制された。また、Csk 遺伝子導入は RA 滑膜線維芽細胞と末梢血単核細胞の共存培養で形成された破骨細胞による骨吸収を強力に抑制した。
- 6) SCID-HuRAg マウスにおいて、抗 Fas モノクローナル抗体あるいは Fas L (リガンド) 発現細胞による apoptosis 誘導は、滑膜を著明に退縮させた。
- 7) 腸骨の組織形態計測と骨梁構造解析の結果は、慢性関節リウマチそれ自体で骨芽細胞機能の低下と全身性骨粗鬆症が引き起こされることを示唆した。
- 8) ラットの II 型コラーゲン関節炎 (CIA) では、関節炎発症前 (感作後 5~7 日) に末梢血で顆粒球の一過性の増多があった。
- 9) 慢性関節リウマチでは骨髓血、末梢血共に CD15⁺CD16⁻の幼若顆粒球の造血亢進が起こって

いた。また、慢性関節リウマチ腸骨海綿骨梁の骨破壊には顆粒球の関与を示唆する形態所見があった。

10) 慢性関節リウマチナース細胞はヒト B 細胞 (MC/car)、ヒト T 細胞 (Molt17) に対して高率に特異的抱き込み現象を示した。また、ナース細胞は骨髄由来では、IL-6, IL-8, GM-CSF 及びヒアルロン酸を、滑膜由来ではさらに G-CSF の産生が高値であった。またナース細胞において cathepsin K 及び MMP-9 の mRNA の発現を認めた。

11) 慢性関節リウマチ関節炎軟骨では、軟骨細胞に c-fos が高率に発現していた。また、カニクイザルコラーゲン関節炎 (CIA) でも同様に軟骨細胞で c-fos が発現していた。

12) 軟骨組織特異的遺伝子発現システムを用い、マウスで *in vivo* 関節内遺伝子導入実験を試み、軟骨での遺伝子導入を確認した。

13) 慢性関節リウマチ関節滑膜では proMMP-2 の活性化が効率よくおこっており、その活性化に MT1-MMP と MT3-MMP が関与していた。

14) 膜型 MMP 阻害活性をもつ TIMP-3 が RA 滑膜表層細胞で発現しており、ペントサン硫酸処理により TIMP-3 産生が亢進した。

今後、これらの機序解明を基礎に、動物実験系による治療実験を行い、慢性関節リウマチ患者への応用に向かう足がかりをつくることのできた。

課題名 アデノウイルスベクターを用いた細胞内情報伝達系調節による関節炎骨破壊の制御に関する研究

主任研究者 中村耕三

所属機関 東京大学大学院医学系研究科外科学専攻感覚運動機能医学講座整形外科学教授

研究要旨

慢性関節リウマチ (RA) の骨破壊機序において、滑膜より形成される破骨細胞が関与することを、培養滑膜細胞系において明らかにした。また、RA 骨破壊において重要な役割をはたす滑膜細胞および破骨細胞に対してアデノウイルスベクターを用いて効率よく遺伝子導入が可能であることを示した。破骨細胞に対して上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子を導入して EGF 刺激をすることで、その活性調節が可能であった。また、Src 型チロシンキナーゼを標的とした細胞内情報伝達系調節によって、滑膜細胞の増殖・サイトカイン産生、破骨細胞の骨吸収活性を制御することに成功した。アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療により、RA 骨破壊をコントロールすることができる可能性が示唆された。

A. 目的

慢性関節リウマチ (RA) では滑膜の異常な増殖、滑膜細胞による炎症性サイトカインの分泌の亢進が認められ、また骨組織に進入した滑膜 (パンヌス) では破骨細胞による活発な骨吸収が観察される。関節炎において、破骨細胞は骨と離れた滑膜内にも存在することが報告されているが、その形成のメカニズムは十分には解明されていない。本研究では、破骨細胞形成における RA 滑膜線維芽細胞 (synovial fibroblastic cells, SFC) の意義を RA 滑膜細胞初代培養系、および SFC と末梢血単核球 (PBMC) との共存培養系を用いて検討した。次に、関節炎で重要な役割を果たす二つの細胞、滑膜細胞と破骨細胞の機能制御をアデノウイルスベクターによる遺伝子導入で制御する可能性を検討するため、マーカー遺伝子を用いて導入効率を検討した。さらに、破骨細胞に対して EGF 受容体の遺伝子を導入して機能調節の可能性を検討した。また、Src ファミリーは細胞増殖、サイトカインシグナル伝達、破骨細胞活性化など多彩な生理現象において重要な役割を果たしている非レセプター型のチロシンキナーゼである。Src ファミリーチロシンキナーゼの活性は C 末端側に存在するチロシンのリン酸化、脱リン酸化によって制御されており、このチロシン残基を特異的にリン酸化する Csk は Src ファミリーの活性を負に調節する細胞質型チロシンキナーゼであり、この遺伝子を導入することによって細胞増殖や破骨細胞活性を抑制

できる可能性がある。そこで、Csk 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを用いてこれらの細胞の細胞内情報伝達系を調節することによって骨破壊を制御することを目的として研究を行った。

B. 方法

1-① RA 滑膜細胞初代培養系における破骨細胞形成：RA 滑膜細胞の中には破骨細胞の前駆細胞だけでなく形成支持細胞が存在するかどうかを調べるために、RA 滑膜細胞を単独で、すなわち、破骨細胞形成支持能をもつ骨芽細胞やストローマ細胞を加えず培養して検討した。また、活性型ビタミン D₃、macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) を添加してその効果を調べた。

1-② SFC による破骨細胞誘導：RA 患者から手術時に採取した滑膜細胞を継代培養し、SFC のみとなったことを確認した後、活性型ビタミン D₃、M-CSF の存在下で末梢血単核球との共存培養を行い、破骨細胞形成を調べた。その際、細胞接触を阻害する膜フィルターを介在させることで、細胞間相互作用が必要かどうかを検討した。

2-① アデノウイルスベクターによる遺伝子導入：マーカー酵素である β -galactosidase を組み込んだ組換えアデノウイルス (AxCASLacZ) を用いて、アデノウイルスベクターによる SFC および破骨細胞への遺伝子導入効率を調べた。非増殖型の組換えアデノウイルスは、斎藤らの方法 (COS-TPC 法) に

従って作製した。すなわち増殖に必要な E1A, E1B の2つの遺伝子は欠損し、CAG (cytomegalo-virus IE enhancer + chicken β -actin promoter + rabbit β -globin poly(A) signal) プロモーターを持つほぼ全長のウイルスゲノムを含むコスミドカセットに目的遺伝子 (LacZ) を挿入し、293 細胞での相同組換えにより目的のアデノウイルスベクターを得た。SFC としては手術時に採取した RA 患者滑膜細胞を継代して用い、破骨細胞としてはヒト巨細胞腫より酵素処理によって単離した破骨細胞様多核細胞、およびマウス共存培養系において活性型ビタミンD₃の存在下で形成された破骨細胞様多核細胞を用いた。細胞における導入遺伝子の発現は、組換えアデノウイルス感染の2日後に X-gal を用いた酵素染色 (LacZ 遺伝子) で確認した。

2-② EGF 受容体ウイルス感染破骨細胞への EGF による作用：同様に作成した EGFR ウイルス (Ax1CAEGFR) を用いて、培養破骨細胞に遺伝子導入をおこなったのち、EGF による刺激を加え、細胞内チロシンリン酸化、骨吸収能、形態変化について検討した。遺伝子発現は EGFR 特異抗体による免疫染色、ウエスタンブロットによって確認した。破骨細胞の骨吸収能は、破骨細胞によって象牙質切片上に形成された吸収窩の面積を測定することによって定量した。

2-③ Csk 遺伝子導入による滑膜細胞の増殖、

IL-6 産生、破骨細胞性骨吸収への作用：Csk 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター (AxCATesk) を作成し、滑膜細胞および破骨細胞に遺伝子導入をおこなった。まず、キナーゼアッセイにより c-Src の活性の変化を検討した。さらに、SFC の細胞数の増加、interleukin-6 産生 (ELISA、Northern blot) および破骨細胞の骨吸収能への作用を検討した。

C. 結果

1-① 培養開始時の滑膜細胞は、滑膜 macrophage, SFC を含んでおり、TRAP 陽性多核細胞は含まれなかった。活性型ビタミンD₃と M-CSF を添加して3週間培養すると、滑膜線維芽細胞が主体の増殖が観察されるが、プロナーゼ E 処理で線維芽細胞を除去すると、TRAP 染色で陽性となる多核細胞が現れてくる (Fig. 1)。この TRAP 陽性多核細胞は、骨吸収能をもち、カルシトニン受容体陽性、アクチンリング形成といった破骨細胞としての条件を満たすものであった。活性型ビタミンD₃はこの破骨細胞形成

に必須であったが、M-CSF は必須ではなく、促進効果をもっていた (Fig. 2)。また、コントロールの OA 滑膜、正常滑膜では、活性型ビタミンD₃、M-CSF 存在下でもわずかの多核細胞しか形成されなかった。滑膜の初代培養系には破骨細胞前駆細胞のみならず、形成支持細胞が存在することが明らかになった。

1-② 活性型ビタミンD₃と M-CSF の存在下で3週間培養すると、多数の破骨細胞様細胞が形成された。一方、コントロールで行った正常ヒト皮膚線維芽細胞と末梢血単球の共存培養では、多核細胞の形成は全く見られなかった。RA 滑膜線維芽細胞には、破骨細胞形成支持能があり、破骨細胞形成に必要な微小環境を整えていることが明らかになった。さらに、膜フィルターを用いて細胞接触を阻害すると破骨細胞形成はみられなかった。

2-① LacZ 遺伝子を発現する組換えアデノウイルスを用いて破骨細胞への遺伝子導入効率を調べたところ、1 細胞あたりの感染粒子数 (multiplicity of infection, MOI) の上昇に伴って、X-gal によって強く青染される破骨細胞の割合が上昇した。AxCASLacZ は滑膜細胞、破骨細胞の両方においても効率よく β -galactosidase 遺伝子の発現を誘導し、MOI 100 では80%以上の細胞が強い β -galactosidase 活性を示した (Fig. 3)

2-② 破骨細胞には本来 EGF レセプターの発現は認められないが、EGF レセプターを発現する組換えアデノウイルスをマウス破骨細胞様細胞に感染させたところ、MOI100 にて明らかな EGF レセプターの発現が免疫染色およびウエスタンブロットで確認された。また EGF 刺激に伴って、EGF レセプターを含む数種の蛋白のチロシンリン酸化が認められた。EGF レセプターを発現した破骨細胞を EGF で刺激すると、数時間後より明らかな形態変化が観察され、細胞内に巨大な空胞が形成された。象牙質切片上での吸収窩の形成は EGF によって用量依存性に抑制された (Fig. 4)。一方コントロールウイルスを感染させた破骨細胞では EGF の効果は見られなかった。

2-③ RA 滑膜細胞において Csk の発現はごくわずかに認められるのみであるが、csk ウイルスの感染細胞においては、Western blot により用量依存性に Csk の発現の増加が確認された。組換えウイルスの感染により c-Src の発現量に変化はなかったが、c-Src キナーゼ活性の低下が認められた。Csk の発現により、滑膜細胞増殖率は急激に低下した。滑膜細胞による IL-6 産生は MOI100 で50%程度に抑制された。SFC と末梢血単核細胞の共存培養で形成された破骨

細胞様多核細胞による吸収窩の形成は、Csk の発現により用量依存性に強力に抑制された。

D. 考察

1. RA 滑膜細胞の単独培養、SFC と PBMC の共存培養において破骨細胞様細胞が形成されたことから、RA 滑膜において滑膜マクロファージが滑膜線維芽細胞(SFC)をストローマ様細胞として破骨細胞に分化しうることが示された。これは、RA における骨破壊に滑膜が細胞形成を通じて関与する可能性を強く示唆している。また、この際 SFC と前駆細胞の cell-to-cell interaction が必須であったことから、膜結合型の刺激因子の関与が示唆された。

2. ①アデノウイルスベクターが滑膜細胞および破骨細胞に対する遺伝子導入を効率よく行えることが示された。破骨細胞は増殖能のない最終分化した細胞であり、これまで外来遺伝子の導入は困難であった。本研究においてわれわれは、アデノウイルスベクターを利用することによって非常に効率良く破骨細胞に遺伝子導入が可能であることを初めて明らかにした。②アデノウイルスベクターによって導入された EGF レセプター遺伝子が破骨細胞において発現し、EGF によって機能調節が可能になることを明らかにした。③csk 遺伝子の組換えアデノウイルスは c-Src 活性を抑制することによって、*in vitro* において滑膜細胞の異常増殖、炎症性サイトカインの産生、破骨細胞の骨吸収機能の抑制効果がみられた。Src ファミリーをターゲットとした治療法が RA 骨破壊に対して有効であると考えられた。

E. 結論

関節炎性骨破壊には、活性化した滑膜細胞と骨吸収を担う破骨細胞が重要な役割をはたす。Csk による c-Src シグナルの阻害は関節炎および破骨細胞性骨吸収の抑制に有効であり、慢性関節リウマチ等の関節炎の遺伝子治療法としてアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入法が有用と考えられる。

文献

1. Takayanagi, H. et al. 1997. A new mechanism of bone destruction in rheumatoid arthritis: synovial fibroblasts induce osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 240:279-286.
2. Tanaka, S. et al. 1998. Modulation of osteoclast function by adenovirus vector-induced epidermal growth factor receptor. *J Bone Miner Res.* 13:1714-1720.

Fig. 1 RA 滑膜初代培養系にて形成された破骨細胞様細胞



Fig. 2 RA 滑膜初代培養系における破骨細胞形成における活性型ビタミンD₃、M-CSF の作用

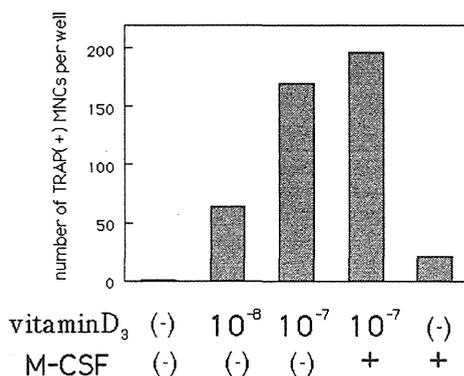


Fig. 3 アデノウイルスベクターによる破骨細胞への遺伝子導入効率

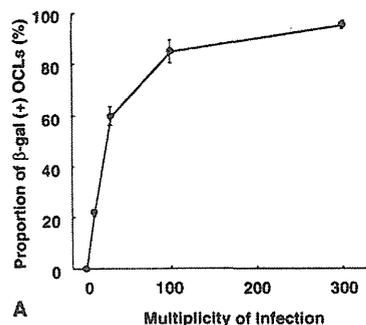
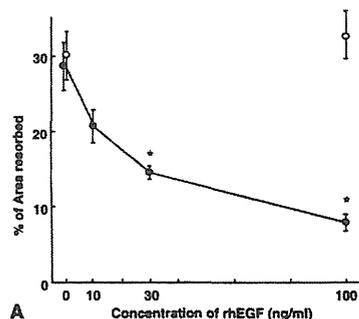


Fig. 4 EGFR 導入破骨細胞の骨吸収能に対する EGF の作用



破骨細胞分化抑制および血管新生抑制による関節炎の骨関節破壊防止に関する研究

分担研究者 岩本幸英

九州大学医学部整形外科学教室

研究要旨

これまでわれわれは慢性関節リウマチ(RA)の滑膜肉芽組織中に破骨細胞の前駆細胞が存在することや *in vitro* における RA 滑膜肉芽組織由来の細胞による骨吸収窩の形成がビスフォスフォネートにより抑制されることを報告し、RA の骨関節破壊に破骨細胞が関与している可能性を示してきた。今回、ラットのアジュバント関節炎(AA)における骨関節破壊に及ぼすビスフォスホネート YM-175 の影響とその作用機序を検討した。その結果、YM-175 は AA ラットの骨関節破壊部位の TRAP 陽性細胞数を減少させ骨関節破壊を抑制した。また、ラット骨髄培養系においても YM-175 は TRAP 陽性多核細胞の形成を濃度依存的に抑制した。ところで、RA のパンヌスの形成には血管新生が不可欠であるが、血管新生阻害剤である MMP インヒビターを投与することにより、AA ラットの関節炎及び骨関節破壊が抑制された。以上より、破骨細胞の分化や機能を制御するほかに、パンヌス形成に不可欠な血管新生をコントロールすることによる RA の骨関節破壊制御という新しい治療法開発の可能性が示唆された。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ(RA)の骨関節破壊制御の strategy として、1) 炎症の抑制、2) 滑膜増殖あるいはこれに不可欠な血管新生の抑制、3) 破骨細胞の分化あるいは活性化の抑制などが考えられる。これまで我々は RA の滑膜肉芽組織中に破骨細胞の前駆細胞が存在することや *in vitro* における RA 滑膜肉芽組織由来の細胞による骨吸収窩の形成がビスフォスフォネートにより抑制されることを報告し、RA の骨関節破壊に破骨細胞が関与している可能性を示してきた。また、ビスフォスフォネートの一種である YM-175 を投与することによりアジュバント関節炎(AA)の骨関節破壊が抑制されることを報告した。そこで、今回はビスフォスフォネートの一種である YM-175 による骨破壊抑制部位の詳細な組織学的検討及び培養系を用いた検討を行い、YM-175 の作用メカニズムとして破骨細胞の分化に及ぼす影響を調べた(実験-1)。また、RA の滑膜肉芽組織(いわゆるパンヌス)形成においては血管新生が不可欠である。ところで血管新生とは既存の血管から新しい血管が誘導、形成される現象であるが、この血管新生の最初のプロセスにおいて血管内皮細胞は内皮細胞下の基底膜を Matrix

Metalloproteinases (MMP) などの酵素を用いて分解しなければならない。MMP インヒビターにより血管新生を阻害すれば、パンヌス形成が抑制され、関節炎および骨関節破壊も抑制される可能性がある。そこで、血管新生抑制による関節炎における骨関節破壊防止の可能性をさぐるために AA ラットに血管新生阻害剤を投与し、骨関節破壊への影響を検討した(実験-2)。さらに、血管新生を抑制し骨形成を促進することが知られているアクチビンによる骨関節破壊抑制の可能性を探るために、アクチビンレセプターの発現と局在を RA 滑膜および AA の関節組織を用いて検討した(実験-3)。

B. 研究方法

【実験-1】 7~9 週齢の Lewis ラットに鉱物油に懸濁した *Mycobacterium butyricum* 乾燥菌体をラット尾根部皮下注射し、AA ラットを作成した。YM-175 投与による AA ラットへの影響を検討するため YM-175 (0.01, 0.1, 1 mg/kg) を菌体接種当日より連日皮下投与した。AA の評価としては、四肢関節の腫脹を関節炎スコア(5段階評価)で評価し、また後肢の Hindpaw volume を測定した。関節破壊の程度は組織および X 線像にて評価し、既報の方法に従って、

X線学的の関節破壊度数（Radiological index）を用いて点数化した。さらに組織のTRAP染色を行い、足関節周辺のランダムな10視野あたりのTRAP陽性細胞数をカウントした。YM-175の破骨細胞の分化への影響をin vitroの系で検討する目的で、ラット骨髄培養系にYM-175を投与し、TRAP陽性多核細胞の形成に及ぼす影響を検討した。

【実験-2】実験-1と同様に菌体を接種しAAラットを作成した。血管新生阻害剤としてMMPインヒビター：OPB-3206（40、110 mg/kg）を菌体接種日より連日腹腔内投与した。AAの評価としては、四肢関節の腫脹を関節炎スコア（5段階評価）と後肢のHindpaw volumeで、関節破壊の程度は組織およびX線像にて評価した。また、作成した組織標本の画像をNIHイメージソフトウェアを用いて画像解析を行い、パンヌスの面積を測定した。

【実験-3】関節炎組織におけるアクチビンレセプターの局在の検討としてRA滑膜およびAAの関節組織を用いてタイプIIアクチビンレセプター、アクチビンβAサブユニットの免疫組織染色を行った。血管内皮細胞の同定は第Ⅷ因子関連抗原に対する抗体を用いた免疫組織染色により行った。

C. 研究結果

【実験-1】AAにおける骨関節破壊と関節炎に対するYM-175の影響を検討した。まず、YM-175は用いたいずれの濃度においてもAAの発症には影響を及ぼさなかった。YM-175の投与によりAAの関節炎スコアはYM-175の濃度依存的に抑制された。Hindpaw volumeで評価しても同様にYM-175の濃度依存的に抑制されていた。X線学的検討でもYM-175の濃度依存的に足関節周辺の骨関節破壊が抑制され、1mg/kg投与群においてはほとんど骨関節破壊は見られなかった。Radiological indexもYM-175の濃度依存的に抑制された。菌体接種後6週目の足関節周辺の組織を光学顕微鏡の弱拡大で観察すると、YM-175の濃度依存的に骨関節の構築が温存されていた。同組織のTRAP染色では、YM-175の濃度依存的にTRAP陽性細胞数の減少

が見られ、YM-175の0.1あるいは1mg/kg投与群においてはTRAP陽性細胞の減少にあいまってTRAP陰性の単核細胞の増加が認められた。ラット骨髄細胞培養系では、YM-175の濃度に依存してTRAP陽性細胞の形成が抑制された。

【実験-2】次にAAにおける骨関節破壊に対する血管新生阻害剤OPB-3206の影響を検討した。OPB-3206の投与によりAAの関節炎スコアはOPB-3206の濃度依存的に抑制された。Hindpaw volumeで評価しても同様にOPB-3206の濃度依存的に抑制されていた。X線学的に、骨関節破壊は、OPB-3206の濃度依存的に抑制されていた。特に、110mg/kg投与群においてはほとんど骨関節破壊は見られなかった。組織学的にもOPB-3206投与群では対照群に比べ、パンヌスのサイズの有意な縮小が見られた。副作用の指標として、体重の変動を測定した。関節炎発症後は、いずれの群でも体重の減少が見られたが、OPB-3206投与群では、むしろ対照群に比べ体重の減少幅が小さく、OPB-3206投与によると思われる体重減少は見られなかった。

【実験-3】最後に、アクチビンによる骨関節破壊抑制の可能性を探るために、まずタイプIIアクチビンレセプターの発現と局在をRA滑膜及びAAの関節周囲組織を用いて検討した。まず、RAの滑膜組織においては血管内皮細胞に強くタイプIIアクチビンレセプターの発現を認めた。血管内皮細胞は、抗第Ⅷ因子関連抗原に対する抗体を用いた免疫染色で確認した。一部の滑膜表層細胞や滑膜深層にもアクチビンレセプター抗体で陽性に染まる細胞を認めた。また血管内皮細胞は、アクチビンβAサブユニットに対する抗体でも染まった。また、ラットの骨組織の免疫染色では破骨細胞にもタイプIIアクチビンレセプターが発現していた。AAの骨破壊の最前線では破骨細胞と思われるTRAP陽性の多核の細胞のほか、単核の細胞にもアクチビンレセプターの発現を認めた。さらにRAの滑膜肉芽組織と骨組織が接する部位に存在する破骨細胞と思われるTRAP陽性の多核の細胞もタイプIIアクチビンレセプター抗体に染まった。

D. 考察

YM-175によるAAの骨関節破壊抑制のメカニズムについては、破骨細胞系への作用メカニズムとして破骨細胞の分化の抑制、あるいは、アポトーシスの誘導、さらに機能発現の抑制などが考えられるが、今回われわれは *in vivo* のモデルとしてAA、*in vitro* のモデルとしてラット骨髄培養系を用いて、YM-175が破骨細胞の分化の抑制を介し、骨関節破壊を抑制している可能性を示した。YM-175の濃度依存的にTRAP陽性細胞の数の減少が見られ、YM-175の投与によりTRAP陽性細胞の減少にあいまってTRAP陰性の単核細胞の増加が認められた。これはYM-175によりTRAP陽性細胞への分化が抑制されるとともに、これと前駆細胞を共有する他の系統の細胞へと分化の方向が流れた結果であると解釈している。YM-175投与群において増加していたTRAP陰性の単核細胞が、いずれの系統の細胞であるかは今後の検討課題である。また、YM-175はAAの関節の炎症も抑制するという結果を示したが、この炎症の抑制の結果、骨関節破壊が抑制されたという可能性も否定できない。ビスフォスホネートの *in vivo* における効果発現の機序の解明は今後の課題である。

RAの骨関節破壊に重要な役割をしていると考えられるパニヌスの形成には血管新生が不可欠と考えられている。血管新生には先に述べたように基底膜破壊が必須であり、MMPインヒビターにより血管新生を阻害することにより、パニヌス形成が抑制されるという仮説を立てて本実験を行ったところ、MMPインヒビターはAAラットの関節炎、パニヌス形成及び骨関節破壊を抑制した。今回の結果から、血管新生をコントロールすることによるRAの骨関節破壊制御という新しい治療法開発の可能性が示唆された。

また、アクチビンレセプターの発現と局在をRA滑膜およびAAの関節組織を用いて検討し、プレリミナリーな結果を得たので最後に報告した。RAの滑膜組織においては血管内皮細胞に強くタイプIIアクチビンレセプターの発現を認め、血管内皮細胞は、アクチビン β Aサブ

ユニットに対する抗体でも染まった。過去の報告ではアクチビン結合蛋白質であるフォリスタチンにより *in vivo* での血管新生が促進される、つまりアクチビンが血管新生抑制に働いていることが示唆されており、アクチビンおよびアクチビンレセプターを介するシグナルは過剰な血管新生が起こらないようにこれを抑制するように働いていると想像される。RAの炎症性滑膜組織ではフォリスタチンの発現を誘導するbFGFなど血管新生促進因子が増加しており、RAの滑膜中ではアクチビンによる血管新生抑制シグナルが正常に働いていない可能性も考えられる。そこでわれわれは、アクチビンを外来性に投与した場合には、滑膜炎における血管新生を抑制し、その結果滑膜増殖の抑制が得られるという仮説を立て、現在研究を進めている。

血管新生の抑制により骨破壊の抑制が得られる可能性は、今回のMMPインヒビターの結果で示したように十分に考えられる。アクチビンはまた骨形成系細胞を刺激し骨形成を促進することが知られているので、それらのメカニズムによっても、骨破壊に対して防御的に働くことが期待される。

E. 結論

- 1) YM-175はAAラットの骨関節破壊部位のTRAP陽性細胞数を減少させ骨関節破壊を抑制した。
- 2) ラット骨髄培養系においてもYM-175はTRAP陽性多核細胞の形成を濃度依存的に抑制した。
- 3) 血管新生阻害剤の投与により、AAラットの関節炎及び骨関節破壊が抑制された。
- 4) RAの滑膜の血管内皮細胞と滑膜肉芽組織中の一部の細胞にタイプIIアクチビンレセプターが発現していた。
- 5) AAラットにおいては骨侵食部位の滑膜肉芽組織中の一部の細胞や破骨細胞にタイプIIアクチビンレセプターが発現が認められた。
- 6) 以上より、血管新生をコントロールすることによりRAの骨関節破壊を制御するという新しいstrategyの可能性が示唆された。

課題名 慢性関節リウマチにみられる破骨細胞によらない骨破壊—顆粒球関与の可能性

分担研究者 伊藤 恒敏

所属 東北大学大学院医学系研究科医科学専攻細胞生物学講座発生生物学分野

研究要旨

骨破壊を伴う慢性関節リウマチ (RA) 患者の腸骨骨髓動態並びに骨破壊機序を flow cytometry および形態学的に解析した。RA患者腸骨骨髓では著しい顆粒球造血の亢進、特に未熟顆粒球の増加が認められた。また、未熟顆粒球が骨梁表面に集積しており、その一部の細胞は rupture し、細胞内顆粒が骨表面や骨基質内に散在している像が認められた。更に、骨基質から 640 Å の周期構造を呈するコラーゲン線維が消失していた。RA患者末梢血顆粒球と骨を共培養したところ、基質の膠原線維間が拡大し、線維の周期構造も不明瞭となる傾向を呈した。以上の結果から、骨破壊を伴う RA 患者では顆粒球造血に亢進が起り、その顆粒球による骨破壊の可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、骨破壊を伴う RA 患者において骨髓造血亢進、特に顆粒球の造血亢進が報告されてきており、この顆粒球造血動態と RA 病態との関連性が注目されてきている。本研究では、RA 患者の顆粒球造血動態と骨破壊との関係に着目し、Flow Cytometry、並びに形態学的検索を行った。更に、顆粒球が骨破壊に直接関与する可能性を検討する目的で、RA 患者末梢血顆粒球と骨を共培養し、骨基質内のコラーゲン線維の変化を中心に電子顕微鏡による検索を行った。

B. 研究方法

Flow Cytometryによる解析: RA患者並びに非炎症性疾患患者(対照)の腸骨上後腸骨棘直下骨髓を採取し、塩化アンモニウムによる溶血後、anti-CD15mAb、anti-CD16mAbによる二重染色を施し、FACSCaliburを用いてCellQuestで解析を行った。

形態学的解析: RA患者並びに対象患者の手術時に得られた腸骨海綿骨を使用した。光顕用には、海綿骨を4% paraformaldehydeで固定、10% EDTAで脱灰し、パラフィンに包埋し、切片は、Hematoxylin-Eosin染色、あるいは酸性フォスファターゼ染色を行った。電顕用には海綿骨を1/2 Karnovsky液で固定、10% EDTAで脱灰、2% 四酸化オスミウムで後固定し、EPON 812に包埋した。光顕用切片はトリイジンブルー染色、電顕用切片は酢酸ウランークエン酸鉛で染色した。一部海綿骨は10% EDTA-PBSで脱灰後、顆粒球の myeloperoxidase 染色のため、diaminobenzidineで発色させ、2% 四酸化オスミウムで後固定後、EPON812に包埋した。厚さ1µmの光

学顕微鏡用切片はトリイジンブルー(TB)染色、電子顕微鏡用切片は酢酸ウランークエン酸鉛で染色した。

In vitroにおける顆粒球による骨破壊の解析: RA患者の末梢血を Polymorphprep を用いて多形核白血球 (PMN) と単核球 (MNC) を採取した。各々 10^5 個の細胞に、BALB/c マウス大腿骨骨片を加え10日間培養した。培養後、1/2 Karnovsky液で固定、10% EDTAで脱灰、2% 四酸化オスミウムで後固定し、EPON 812に包埋した。電子顕微鏡用切片は酢酸ウランークエン酸鉛で染色した。

C. 研究結果

Flow Cytometryによる解析: RA腸骨骨髓内での有核細胞数は平均 11.4×10^6 個/mlであり、対照群の 3.4×10^6 個/mlに比して有意に増加していた。検索した全症例において対照群ではCD15⁺CD16⁻細胞はRA群57.7%、対照群43.6%、また、CD15⁺CD16⁺細胞がRA群23.9%、対照群40.2%でRAにおいてCD15⁺CD16⁻の未熟顆粒球の有意な増加が認められた(図1)。

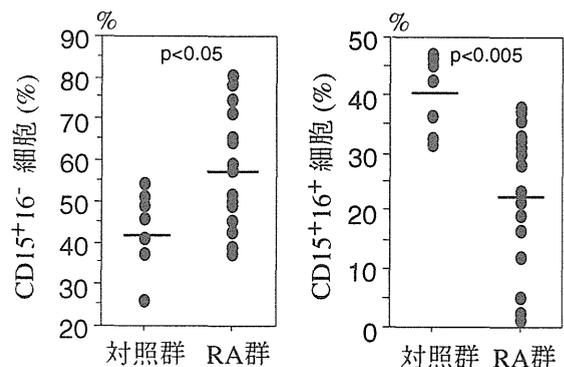


図1. 全症例における全顆粒球系細胞に対するCD15⁺CD16⁻細胞及びCD15⁺CD16⁺細胞の占める割合。

CD15⁺CD16⁻細胞の絶対数はRA群6.7 x 10⁶個/ml、対照群1.6 x 10⁶個/ml、CD15⁺CD16⁺細胞はRA群2.5 x 10⁶個/ml、対照群1.3 x 10⁶個/mlであり、絶対数でも未熟顆粒球の有意な増加が確認された(図2)。更にRA群では、CD15⁺CD16⁻/CD15⁺比の増加とLansbury Indexに有意な正の相関が認められた(図3)。これらの結果から、RA腸骨骨髄においては、顆粒球造血の亢進、特に未熟顆粒球の造血亢進が起こっていることが明らかとなり、この現象がRA病態に深く関与することが示唆された。

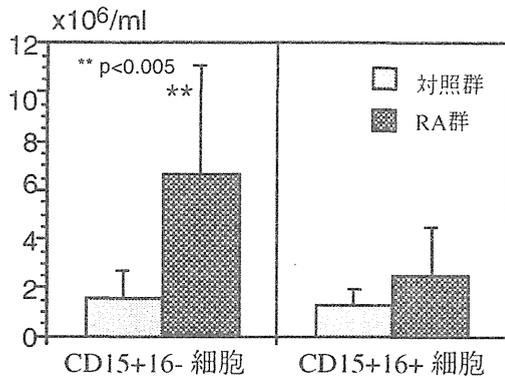


図2. 全症例におけるCD15⁺CD16⁻細胞及びCD15⁺CD16⁺細胞の絶対数。

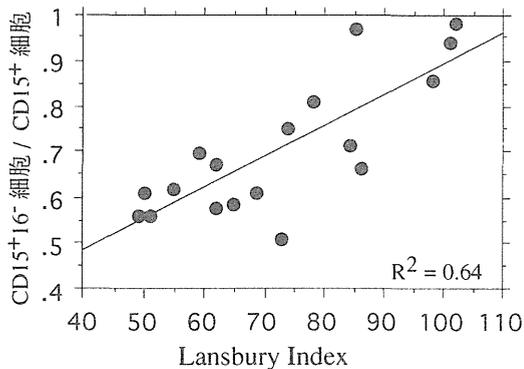


図3. 全顆粒球系細胞(CD15⁺細胞)に対するCD15⁺CD16⁻細胞の割合とLansbury Indexとの相関。

光学顕微鏡による解析:対照群腸骨海綿骨骨梁表面は大部分が平滑な面を呈しており(図4 A, C)、その骨表面の多くはbone lining cellsによって被われていた(図4 C)。また、骨髄腔は多数の脂肪細胞により満たされていた(図4 A, C)。それに対し、RA腸骨海綿骨骨梁表面は対照群に比して不整な面が多く(図4 B, D)、骨破壊が進行していると考えられた。また、bone lining cellsによって被われていない部位が顕著に認められた(図4 D)。更に、骨髄腔では多数の造血巣が認められ、対照群に比して活発に造血が営まれているのが形態学的にも確認された(図4

B)。しかも、腸骨海綿骨骨梁表面の不整面に多数の単核細胞が直接接している像が観察された。

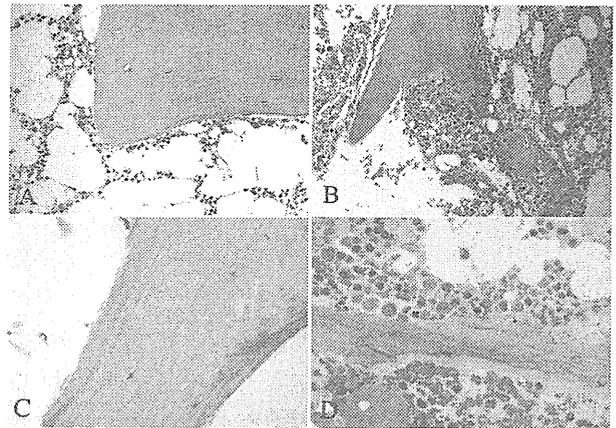


図4. 対照群(A, C)及びRA群(B, D)腸骨海綿骨梁所見。A, BはH-E染色。C, DはTB染色。対照群は骨梁表面が平坦であるのに対し、RA群では不整面を呈し、そこに多数の単核細胞が接している。

Myeloperoxidase染色を行ったRA腸骨海綿骨においても骨梁表面の不整面に多数の単核細胞が直接接している部位が認められた。この部位に集積している単核細胞はmyeloperoxidase陽性の顆粒を有しており、顆粒球であることが確認された(図5)。



図5. RA海綿骨骨梁のmyeloperoxidase(MP)所見。多数のMP陽性顆粒を有する単核細胞が骨に接している。

電子顕微鏡による解析:RA腸骨海綿骨骨梁不整面に集積する単核細胞及び骨基質の性状をより詳細に検討するため透過型電子顕微鏡による解析を行った。RA腸骨海綿骨骨梁表面の不整面に図4 A同様に核の分葉していない未熟顆粒球が多数集積している像が認められた。更に、骨表面において核の分葉していない未熟顆粒球がruptureしており、細胞内顆粒やミトコンドリアが骨表面に散在している像が認められた(図7 A)。次に、myeloperoxidase染色したRA腸骨海綿骨を電顕で観察したところ、多数のmyeloperoxidase陽性顆粒が骨表面や骨基質内に散在しているのが認めら

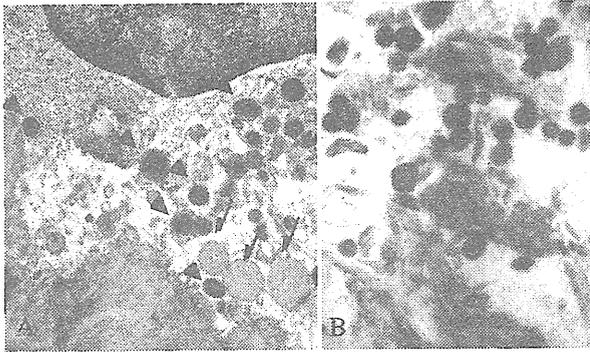


図7. RA腸骨海綿骨表面層の電子顕微鏡所見。(A) 通常電顕増。顆粒球は破裂しており細胞内顆粒(矢頭)やミトコンドリア(矢印)が骨表面に散在している。(B) Myeloperoxidase 所見。多数の Myeloperoxidase 陽性顆粒が骨基質表面や内部に認められる。

れた(図7B)。

また、別の部位で骨梁が不整に細くなり、骨基質のTB染色性が低下している部位(図8A)の骨基質を超微形態学的に検索すると、未熟顆粒球由来と考えられる顆粒が骨基質内に浸潤しており、且つ、この骨基質から640 Åの周期構造を呈するコラーゲン線維が消失しており、fine filaments と small granular materials から構成されているのが観察された(図8B, C)。更に、高倍で観察すると、顆粒周囲からは骨基質が消失しており、顆粒内の酵素による骨基質の分解が強く示唆された(図8D)。

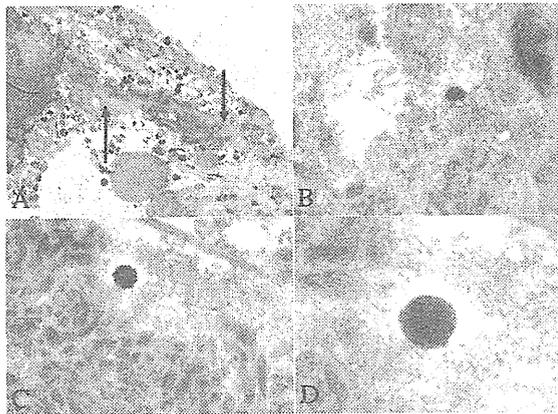


図8. RA腸骨海綿骨の光顕像(A)並びに電顕像(B, C, D)。(A) 骨梁が不整に細くなり、骨基質の染色性が低下している(矢印)。(B, C) 染色性の低下している部位の電顕所見。顆粒が骨基質内の存在し、その周囲からコラーゲン線維が消失している。(D) Cの拡大像。顆粒周囲が明るく抜けており、骨基質の消失が認められる。

In vitroにおける顆粒球による骨破壊の解析:PMNと骨片の10日間共培養では、一部に好中球が破裂した状態で認められるものの、viable cellは認められなかった(図9A)。骨基質においては、コラーゲン線

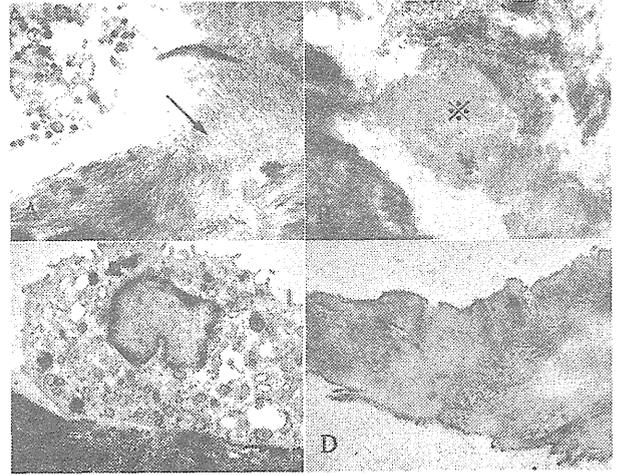


図9. 培養骨片の電子顕微鏡所見。(A, B) PMNと骨片との共培養像。コラーゲン線維間の拡大(矢印)や消失(*)が認められる。(C) MNCと骨片との共培養像。(D) 骨片単独培養像。共に骨基質に変化はない。

維間が拡大し、線維の周期構造も不明瞭となる傾向を呈したり(図9A)、全くコラーゲン線維が同定されない骨基質も一部認められた(図9B)。MNCと共培養した骨片、及び骨片単独培養では骨基質に変化は認められなかった(図9C, D)。

D. 考察

Flow Cytometryの結果から、RA腸骨骨髄では顆粒球造血亢進が起こっていることが明かとなり、この現象がRA病態に密接に関与していることが示唆された。また、RA腸骨海綿骨並びにin vitroの形態学的結果から、RA腸骨海綿骨梁の骨破壊には顆粒球が深く関与していることが示唆された。

E. 結論

RA腸骨骨髄をFlow Cytometry及び組織学的に、また、末梢血顆粒球と骨を共培養検索し以下の結果を得た。

1. 対照群に比して、RA群では著しい顆粒球造血亢進、特に未熟顆粒球の増加が認められた。
2. 対照群に比して、RA群では海綿骨骨梁表面に不整面が多く、骨破壊が進行していた。
3. RA群腸骨骨梁表面の不整面に多数の未熟顆粒球が直接接しており、一部の顆粒球はruptureし、細胞内顆粒が骨表面や骨基質内に散在していた。且つ、骨基質内からコラーゲン線維が消失していた。
5. 末梢血顆粒球と骨を共培養により、骨基質内のコラーゲン線維の消失が認められた。
6. 以上より、RAにおいて顆粒球の造血亢進で増加した未熟顆粒球が骨破壊に直接関与することが強く示唆された。

関節破壊抑制を目的としたアポトーシス誘導療法と軟骨組織特異的遺伝子発現システム

分担研究者：木村 友厚 共同研究者：松野 博明、遊道 和雄、中沢 不二雄、妻木 範行*、冨田 哲也*
越智 隆弘*

富山医科薬科大学整形外科、* 大阪大学医学部整形外科

研究要旨

慢性関節リウマチ (RA) の滑膜炎と関節破壊を抑制することを目的に、RA 患者の骨・軟骨・滑膜組織を一塊として SCIDマウスに移植した SCID-HuRAGモデル動物を用いて検討を加えた。その結果、抗 Fas 抗体によるアポトーシス誘導により RA滑膜に著明な退縮が起こることを確認した。さらにこの効果は、既存の様々な抗リウマチ薬に比べても著しく顕著なものであった。このことからヒト RA の滑膜増殖には Fas / Fas リガンド系を介したアポトーシスが深く関与しており、しかもアポトーシス誘導が RA の関節炎の消退、ひいては関節破壊を抑制する可能性があることが明らかとなった。一方、破壊を受ける側である軟骨そのものをターゲットとし、破壊抑制のための治療的遺伝子を導入発現させるために必要な DNA エlement を、XI型コラーゲン遺伝子の解析を通じて明らかにした。また実際に SCID-HuRAG モデルを用いてヒト RA 関節組織に *in vivo* でマーカー遺伝子を導入し、それを軟骨特異的に発現させることができることを確認した。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ (以下 RA) の骨・軟骨破壊には、増殖した滑膜による骨軟骨への直接の侵食が関与する一方で、滑膜あるいは軟骨細胞そのものに由来する種々の炎症性サイトカインやマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) も破壊に加担している。RA で見られる増殖滑膜組織では、その増殖を抑制する方向に働くアポトーシスが検出されることは既に知られている通りであるが、これはいわば滑膜の恒常性を維持すべく不十分ながら誘導されたアポトーシスであり、RA 関節局所においてはアポトーシス誘導を阻害するメカニズムも存在していると考えられる。従ってこの RA 滑膜に対して強制的にアポトーシスを誘導してやることができれば、それは滑膜の増殖を抑制するのみならず、軟骨・骨破壊そのものも抑制できる可能性が高いと考えられる。また滑膜での強制的アポトーシス導入効果を適切な動

物モデルを使って、「ヒト RA 滑膜・骨軟骨組織」で明らかにすることができれば、この新しい治療法の真の有用性を検討することができる。本研究では、まず松野らが開発した SCID-HuRAG モデル (ヒト RA 関節組織を SCID マウスに移植したモデル) を用い、抗 Fas モノクローナル抗体による *in vivo* でのヒト RA 滑膜・骨軟骨組織に対するアポトーシス導入治療の可能性を検討した。

一方、破壊を受ける側である軟骨側については、むしろ軟骨細胞のアポトーシスが破壊の促進に働いていることが考えられ始めている。従って軟骨組織そのものをターゲットとした破壊抑制手段の開発も欠くことができない。これには残存軟骨細胞のマトリックス合成能や修復能を増強させることに加えて、軟骨細胞のアポトーシスに関して滑膜とは逆にこれを抑制することが必須となる。このような軟骨側から破壊を抑制する新たな治療法開発を目的とし