

て、軟骨組織特異的に遺伝子を導入発現させるシステムの開発にも着手した。

## B. 研究方法

### 1) アポトーシス誘導療法による関節破壊抑制。

SCID-HuRAg マウスの作成には、手術時に骨・軟骨下骨を含む RA 滑膜組織の一定サイズを採取し、雄 SCID マウス (6-7 週齢) の背部に移植を行った。移植後 8 週の時点で抗ヒト Fas IgM モノクローナル抗体 (CH-11, Medical & Biological Lab., Nagoya) をマウス腹腔内に投与 (100 $\mu$ g/mouse) した。投与直後から投与後 4 週目まで定期的に屠殺して RA 滑膜組織を組織学的に観察するとともに、アポトーシスの出現を TUNEL 法その他で検討した。

### 2) 軟骨組織特異的遺伝子発現システムを用いた関節軟骨の破壊抑制と修復。

軟骨細胞をターゲットとして破壊抑制やアポトーシス抑制を目的とした治療的遺伝子を導入するためには、in vivo での使用が可能な適切なベクターが必要である。同時に軟骨の遺伝子治療では、関節内に投与された後に遺伝子が軟骨細胞でのみ特異的発現を行う安全な発現調節エレメントが必要となる。この調節 DNA エレメントを得るために、まず正常状態で軟骨に特異的に強く発現している分子である XI 型コラーゲン  $\alpha$ 2 鎖遺伝子 (*Col11a2*) を材料にして、この遺伝子上の軟骨特異的発現にかかわる領域を明らかにすることを試みた。種々の長さの *Col11a2* 遺伝子の調節領域断片にマーカーとして *LacZ* 遺伝子を繋いだ construct を作製し、トランスジェニックマウスを用いて in vivo での発現解析を行った。

続いてこの遺伝子領域と、さらに膜融合リポソーム (HVJ-liposome) をベクターとして用いることにより、in vivo アプローチによる関節内遺伝子導入実験を行った。マーカーとして緑色蛍光タンパク (GFP) の遺伝子を用い、これを SCID-HuRAg マウスの RA 組織周囲、あるいはマウスの関節内に in vivo で導入した。各組織の遺伝子導

入に引き続く GFP の発現を蛍光顕微鏡にて解析した。

## C. 研究結果

1) SCID マウスに移植されたヒト RA 組織は、その形態と性質を保ったまま全例が生着した。この SCID-HuRAg に対して抗 Fas モノクローナル抗体を投与した結果、投与前には TUNEL 陽性滑膜細胞が  $9.5 \pm 8.3\%$  (mean  $\pm$  SD) のみであったのに対し、投与後 8、16、36、72 時間においてそれぞれ  $20.3 \pm 8.5\%$ 、 $42.7 \pm 18.5\%$ 、 $73.5 \pm 23.6\%$ 、 $44.3 \pm 22.6\%$  となり、投与後 36 時間を頂点に著明なアポトーシスの出現を見た。コントロールの IgM 投与群では、TUNEL 陽性滑膜細胞の増多は認められなかった。

組織学的には TUNEL 陽性細胞の出現とともに滑膜細胞の消失があり、抗 Fas モノクローナル抗体の投与後 4 週目にはほとんどの滑膜組織は消退し、残存する骨軟骨組織はマウスの皮下脂肪組織でおおわれていた。

2) 軟骨特異的発現調節にかかわる遺伝子領域を明らかにするために、*Col11a2* 遺伝子の種々の長さの断片を *LacZ* 遺伝子に繋いだ construct を導入した多数のトランスジェニックマウスを作成した結果、*Col11a2* 遺伝子の第一イントロンとともに上流の -500~-530bp 間に含まれる 24bp の塩基配列が、軟骨特異的発現に必須であることが初めて明らかとなった。

続いてこの *Col11a2* 遺伝子の発現調節領域を用いて、マーカー遺伝子として GFP を使って実際に in vivo で遺伝子導入を行った (図 1)。その結果、ベクターとして HVJ-liposome を用いて効率良く in vivo で遺伝子導入ができることが確認された。また関節軟骨細胞の約 30% では遺伝子導入後 2 週間経過しても、マーカー遺伝子が発現していることが確認された (図 2)。しかもこの発現は軟骨細胞特異性が高く、滑膜や骨髄など他の部位での発現はほとんど存在しなかった。さらにその発現の程度は、正常軟骨マトリックスの部位より、変性が始まりか

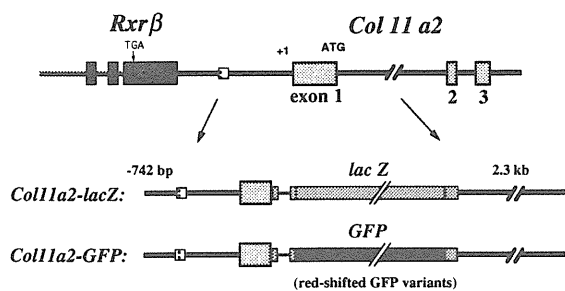


図1. DNA construct for in vivo gene transfer

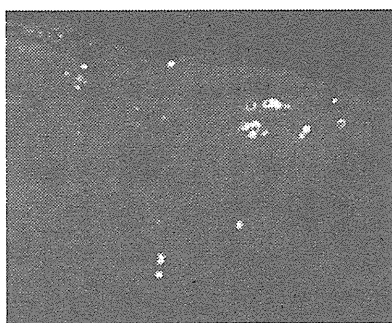


図2. GFP expression in RA cartilage

けている部位でより顕著に認められた。この結果は増殖因子や軟骨アポトーシス抑制因子などの治療的遺伝子についても、実際に in vivo でヒトの RA 軟骨に導入することが可能であり、しかもそれを安全に軟骨組織特異的に発現させることができる可能性を初めて示したものである。

#### D. 考察

今回の結果から、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の不全状態が深く関わっていることが明らかになるとともに、実際に抗 Fas 抗体によって SCID-HuRAg マウスにアポトーシスを誘導することにより、ヒトの滑膜の著明な退縮効果が得られることも明確となった。特筆すべきことは、この効果が SCID-HuRAg マウスを用いることにより、実際に in vivo でヒト滑膜に対して有効であり、しかもそれが種々の既存の抗リウマチ薬やあるいは IL-6 レセプターモノクローナル抗体などに比べても、ずっと顕著な効

果であったことである。従って RA の滑膜増殖と関節破壊には、Fas を介したアポトーシスが強く関与しているのみならず、これを制御することにより実際に RA 関節炎の消退が得られ、ひいては関節破壊の抑制が出来る可能性があることが明らかとなった。

一方、最近の軟骨変性における軟骨細胞アポトーシスの関与の研究から、増殖滑膜に対して非常に有効なアポトーシス誘導療法が、その誘導の時期や量あるいは方法が適切でなければ、軟骨に対してはむしろ変性を導く可能性が考えられる。同時に軟骨細胞そのものが産生する種々の炎症性サイトカインや MMP も軟骨の破壊に直接的に関与している。したがってこのような病態背景に基づけば、軟骨組織そのものをターゲットとした治療法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、あるいはアポトーシスに関しては滑膜とは逆にこれを抑制することが必須となる。この目的のためには、軟骨での組織特異的発現に必要な DNA エLEMENTの解析と軟骨に治療的遺伝子を導入するための適切なベクターが必要となる。今回の結果は、目的とする遺伝子を実際に in vivo でヒト RA 軟骨に導入することが可能であり、しかもそれを組織特異的に発現させることを示しており、今後の治療的遺伝子導入による軟骨破壊の抑制/軟骨修復に向けての治療戦略の第一歩となると考えられる。

#### 発表論文

1. Matsuno H, Sawai T, Nezuka T, Uzuki M, Tsuji H, Nishimoto N and Yoshizaki K: Treatment of RA synovitis with anti-reshaping human IL-6 receptor monoclonal antibody. -using a RA tissue implants in SCID mouse model-. Arthritis Rheum, 41: 2014-2021, 1998.
2. Sakai K, Matsuno H, Morita I, Nezuka T, Tsuji H, Shirai T, Yonehara S, Hasunuma and Nishioka K: Potential withdrawal of rheumatoid synovium by the induction of apoptosis using a novel in vivo model of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum, 41: 1251-1257, 1998.
3. Matsuno H, Sugiyama E, Muraguchi A, Nezuka T, Kubo T, Matsuura K and Tsuji H: Pharmacological effects of

- SA96 (bucillamine) and its metabolites as immunomodulating drugs -The disulfide structure of SA-96 metabolites plays a critical role in the pharmacological action of the drug-. *Int J Immunother*, 20: 295-304, 1998.
4. Tsumaki N, Kimura T, Tanaka K, Kimura JH, Ochi T and Yamada Y: Modular arrangement of cartilage- and neural tissue-specific cis-elements in the mouse  $\alpha 2(XI)$  collagen promoter. *J Biol Chem* 283: 22861-22864, 1998.
  5. Kimura T : Cartilage collagens and degenerative diseases of the joints and spine. In: *Extracellular Matrix-Cell Interaction*, (Eds, Ninomiya Y, Olsen BR and Ooyama T), pp.323-337, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1998.
  6. Matsui Y, Kimura T, Tsumaki N, Nakata K, Yasui N, Araki N, Hashimoto H, Uchida A and Ochi T: Splicing patterns of type XI collagen transcripts act as molecular markers for osteochondrogenic tumors. *Cancer Lett*, 124: 143-148, 1998.
  7. Sugimoto M, Kimura T, Tsumaki N, Matsui Y, Kawahata H, Yasui N, Kitamura Y, Nomura S and Ochi T, Differential in situ expression of  $\alpha 2(XI)$  collagen mRNA isoforms in the developing mouse. *Cell Tissue Res*, 292: 325-332, 1998.

## 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

分担研究者 藤井 克之

東京慈恵会医科大学 整形外科教授

我々は、これまでに、慢性関節リウマチ患者ではⅡ型コラーゲンに対する抗体が産生されており、この自己免疫応答の発現には、関節軟骨と軟骨下骨髄組織の細胞との間に生じる相互作用が起因となっている可能性のあること、また、ヒトRAの関節軟骨においてはc-fosが過剰発現しており、本遺伝子が、軟骨組織内の軟骨マトリックスの合成を抑制するのみならず、分解酵素とそのインヒビターとの不均衡をもたらすことによりRAの関節破壊の進行に重要な役割を演ずることなどを見い出してきた。今回、RAの病態モデルであるコラーゲン関節炎(CIA)に、AP-1ヌクレオチドを投与したところ、関節炎の発症ならびに関節破壊が抑制される事実が判明した。このことから、AP-1活性の亢進が、RA関節の骨・軟骨破壊の発症と進展に重要な役割を演じており、AP-1ヌクレオチドによるc-fos遺伝子の作用部位での競合的阻害は、RAおける骨・軟骨破壊を抑制する可能性が示唆された。

### A.研究目的

慢性関節リウマチ(RA)の関節破壊におけるc-fosの過剰発現の関与が指摘されている。我々は、これまでに、ヒトRAの関節軟骨においてもc-fosが過剰発現しており、本遺伝子が、軟骨組織内の軟骨マトリックスの合成を抑制するのみならず、分解酵素とそのインヒビターとの不均衡をもたらすことにより、RAの関節破壊の進行に重要な役割を演ずることを見い出してきた。今回は、RAの病態モデルであるコラーゲン関節炎(CIA)に、AP-1ヌクレオチドを投与し、c-fos遺伝子の作用部位での競合的阻害を試み、RA関節における骨・軟骨破壊の抑制治療への可能性を検討した。

### B.研究方法

Lewis系メスラット48匹にウシⅡ型コラーゲンを Freundの不完全アジュバントならびにMDP (N-acetylmuramyl dipeptide)とともに感作しCIAを作製した。2本鎖AP-1DNAオリゴヌクレオチドとして、(AP-1 oligo), 5' -GTGTTACCCGCTGAGTCAGAGGA GAA-3'、3' -AATGGGACTCAGTCTCCTCTT GGG-5'、また、対照としてAP-1部位のみランダムな同一長の2本鎖DNAオリゴヌクレオチド(control oligo) 5' -GTGTTACCCGCTAAGGAGGAGGA-3'、3' -AATGGGCGGATTCCTCCTCTTGGG-5' を作製した。これらオリゴの純度についてはポリアクリルアミド電気泳動法を用いて確認した。CIAラットは各8匹6群に分け、オリゴヌクレオチド投与群である3群には、感作1週目より週2回5週間連続で、1回5、25,100 $\mu$ gのAP-1オリゴを腹腔内に投与した。対照には、等量の生理食塩水あるいは25,100 $\mu$ gのcontrol oligoを腹腔内に投与する群を設定した。経時的に、paw volumeならびに血清中の抗Ⅱ型コラーゲン抗体価についてELISA法を用いて測定するとともに、膝・足・手関節

について組織学的に観察した。

### C.研究結果

まず、オリゴヌクレオチドの生体内投与後の分布と局在を検討するため、100 $\mu$ gのビオチンラベルしたAP-1オリゴを腹腔内に投与したところ、6ならびに24時間後の関節滑膜ならびに骨髄内にその局在が観察された。対照群のラットでは、感作後7日目にIgM型、次いで10日目にはIgG型の抗ウシⅡ型コラーゲン抗体価が上昇、感作後2週には関節炎が発症し、paw volumeの増加が観察された。これに対して、AP-1オリゴ投与群のうち5 $\mu$ g投与群では、対照群との間に有意の差は認められなかったが、25,100 $\mu$ g投与群では関節炎の発症は抑制され、抗Ⅱ型コラーゲン抗体価も対照群に比べわずかに低値を示した。対照群のラットの感作後4週目の膝・足・手関節には、滑膜の増生とパンヌス様組織による著しい関節破壊像が観察されたのに対してAP-1オリゴ25,100 $\mu$ g投与群では、滑膜に細胞浸潤を伴った軽度の炎症所見を認めるものの、関節軟骨ならびに軟骨下骨の破壊はわずかで関節の構築が保たれていた。

### D.考察

ラットCIAにAP-1ヌクレオチドを投与すると、関節炎の発症ならびに関節破壊が抑制される事実が判明した。このことから、AP-1ヌクレオチドによるc-fos遺伝子の作用部位での競合的阻害は、RAおける骨・軟骨破壊を抑制する可能性が示唆された。

### E.結論

AP-1活性の亢進が、RA関節の骨・軟骨破壊の発症と進展に重要な役割を演じることが示唆された。こうした知見は、RAの発症のメカニズムの解明のみならず、関節破壊の抑制を目的とした新たな治療薬を開発してゆくうえで有用と考える。

# 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

分担研究者 岡田保典

慶應義塾大学医学部 病理学教室

本研究課題では、RA関節滑膜でのproMMP-2活性化と膜型MMP(MT-MMP)の発現を調べるとともに、ペントサン硫酸のRA滑膜細胞への作用を検討した。その結果、proMMP-2の活性化は関節液中ではきわめて低率なのに対し、RA滑膜では強く活性化されていた。MT1-MMPとMT3-MMPのmRNA発現を認めたが、特にMT1-MMPの発現レベルは高く活性化と相関することから、MT1-MMPがproMMP-2活性化の主要酵素と推定された。また、ゼラチン分解活性はRA滑膜表層細胞層に認められ、RA滑膜が強い酵素活性を示すことを初めて示した。ペントサン硫酸は、MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 13やTIMP-1, 2, 4産生に影響することなくRA滑膜細胞でのTIMP-3産生を転写後のレベルで亢進する事を明らかにした。TIMP-3はRA滑膜表層細胞で発現し、RA滑膜組織のペントサン硫酸処理で表層細胞における産生亢進を認めた。以上のデータから、RA関節滑膜ではMT1-MMPによりproMMP-2が効率よく活性化されており、RA滑膜自身が酵素活性の強い組織であることが実証された。また、ペントサン硫酸はTIMP-3産生を亢進することでRA関節破壊抑制薬として有望であることを示した。

## A. 研究目的

慢性関節リウマチ(RA)の関節軟骨破壊は、滑膜由来酵素を含む関節液による分解、関節軟骨細胞自身による破壊、滑膜やパンス組織の直接浸食による破壊に分けて考えることが可能である。これまでの研究から、多種類のマトリックスメタプロテアーゼ(MMP)とそのインヒビターであるtissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)がRAの関節滑膜と関節軟骨で発現されることを我々は明らかにしてきた。また、RA滑膜に由来するMMPは関節液中にも検出され、そのレベルは変形性関節症(OA)よりも有意に高値であり、TIMPに比較しMMP優位となっていることを示してきた。一方、MMPは潜在型酵素(proMMP)として産生されることから、proMMPの組織内での活性化は酵素活性の発現に必須であり、酵素作用の律速段階となっている。本研究では、proMMP-2のRA関節滑膜での活性化を検討するとともに、その活性化酵素である膜型MMP(MT1, 2, 3, 4-MMP)の発現からproMMP-2活性化に関与するMT-MMP分子を同定することを目的とした。また、TIMPのうちでも細胞外マトリックスとの結合能を有する点で特異なTIMP-3について、RA関節滑膜組織での局在とペントサン硫酸による産生亢進作用の検討を行った。

## B. 研究方法

(1).RAとOA滑膜組織におけるproMMP-2活性化とMT1, 2, 3-MMP発現:RAとOAの滑膜組織の器官培養液と組織ホモジネートをゼラチンザイモグラフィで解析し、proMMP-2活性化率をcomputer-assisted densitometric analysisで解析した。また、関節液についても同様な方法で調べた。さらに、RA滑膜組織よりRNAを抽出し、MT1, 2, 3, 4-MMPのmRNA発現

を定量的RT-PCRで解析した。

2).RA滑膜組織におけるMT1-MMPとTIMP-3の局在:RA滑膜をPLP固定後パラフィン包埋した。パラフィン切片につき、MT1-MMPとTIMP-3に対する特異的モノクローナル抗体で免疫染色した。また、RA滑膜組織でのmRNA発現をanti-senseとsense RNAプローブを用いたin situ hybridizationを行った。同様に、ペントサン硫酸処理したRA滑膜細胞と滑膜組織につき、免疫染色とin situ hybridizationを行った。

(3).ペントサン硫酸処理によるMMPとTIMP産生への影響:RA滑膜培養細胞をIL-1 $\alpha$ (100U/ml)存在・非存在下でペントサン硫酸(0, 0.1, 1, 10  $\mu$ g/ml)処理し、培養液中へ分泌されたMMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 13とTIMP-1, 2量をサンドイッチイムノアッセイ法で測定するとともに、TIMP1, 2, 3, 4についてはイムノブロット法で産生量を定量化した。

(4).ペントサン硫酸処理によるTIMP-3遺伝子発現の検討:RA滑膜培養細胞をIL-1 $\alpha$ (100U/ml)存在・非存在下においてペントサン硫酸(0, 0.1, 1, 10  $\mu$ g/ml)で24時間処理後、total RNA を抽出しノーザンブロット法でTIMP-3のmRNA発現を調べた。

## C. 研究結果

1).RA関節滑膜でのproMMP-2活性化:RA、OAおよび正常の関節滑膜組織の器官培養液とホモジネートをゼラチンザイモグラフィで解析したところ、proMMP-2の活性化率はRAとOA滑膜培養液ではそれぞれ41.4 $\pm$ 18.9%と22.3 $\pm$ 10.7%であり、正常滑膜の14.8 $\pm$ 5.0%より有意に高値であった。同様なデータは関節滑膜のホモジネートにおいても得られた。一方、関節液中のproMMP-2活性化率はRAとOAでそれぞれ3.2 $\pm$ 3.4%と0.6 $\pm$ 1.0%と極めて低値であった。

2).RA滑膜でのMT1, 2, 3, 4-MMPの発現とproMMP-2活

性化との相関：RA関節滑膜におけるMT2-MMPとMT4-MMPの遺伝子発現は、RT-PCRでは全く認められなかった。一方、MT1-MMPとMT3-MMPが検出され、定量的RT-PCRではそれらの発現量はRA滑膜でOAや正常より有意に高値であった。また、RA滑膜でのMT1-MMPの発現量はMT3-MMPより平均値で11倍高値であった。また、RAの関節滑膜におけるMT1-MMPとMT3-MMPの発現レベルは、proMMP-2活性化率と正の相関を示した。MT1-MMPは、免疫組織化学とin situ hybridizationによりRA滑膜表層細胞に局在し、in situ zymographyでゼラチン分解活性が表層細胞層に一致して認められた。

3).TIMP-1, 2, 3による膜型MMPの阻害作用：RA関節組織で発現されるMT1-MMPとMT3-MMPを精製し、それらに対するTIMP-1, 2, 3の阻害活性を検討したところ、TIMP-2とTIMP-3はこれらの膜型MMPを阻害するのに対し、TIMP-1ではモル比で20倍過剰でも全く阻害活性は認められなかった。

4).ペントサン硫酸によるTIMP-3産生への影響：培養RA滑膜細胞をペントサン硫酸存在下で培養すると、容量依存的にTIMP-3産生は増加したが、MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 13, TIMP-1, 2の産生量は全く変化しなかった。Interleukin-1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ )刺激によりMMP-1, 2, 3, TIMP-1の産生は著しく増加したが、TIMP-3産生増強作用はほとんどみられなかった。しかし、IL-1 $\alpha$ とペントサン硫酸共存下では、TIMP-3産生は著しく増強した。一方、TIMP-3のmRNAレベルはIL-1 $\alpha$ 刺激で3.4倍増加を示したが、ペントサン硫酸単独では全く変化しなかった。このようなペントサン硫酸によるTIMP-3産生刺激は滑膜細胞の免疫組織化学でも証明された。

5).TIMP-3のRA関節滑膜での発現：TIMP-3はRA滑膜表層細胞に免疫組織学的に局在し、ペントサン硫酸存在下で器官培養されたRA滑膜では陽性細胞の数は有意に増加した。また、TIMP-3の滑膜表層細胞における遺伝子発現はin situ hybridization法で確認された。

#### D. 考察

本研究では、RA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。一方、RA関節液中での活性化がきわめて低率であることから、proMMP-2は関節液中の液性因子では活性化されないことを示している。MT1-MMPはRA滑膜の表層細胞に局在し、同部にゼラチン分解活性がin situ zymographyで証明されたことから、滑膜表層細胞層は酵素活性をもつ破壊性の強い組織であることが初めて実証された。このようなRA滑膜は関節軟骨へ直接接触し軟骨破壊に作用する可能性があると考えられる。本研究のもう一つの

重要な成果は、TIMP-3がペントサン硫酸処理により産生亢進される事実を見いだしたことである。TIMP-3は、TIMP-1と異なり膜型MMP阻害活性をもち、RA滑膜表層細胞で発現されることも初めて証明した。その産生亢進作用はmRNAレベルではないことから、転写後の調節機構であると推定され、今後の検討が必要である。TIMP-3はMMPの一般的なインヒビターであるのみならず、血管新生抑制作用、tumor necrosis factor  $\alpha$ -converting enzyme (TACE)阻害作用、アポトーシス誘導作用をもつことが最近報告されている。ペントサン硫酸によるTIMP-3産生亢進の分子機構の解析に加えて、ペントサン硫酸がRA滑膜でこのような薬理作用を来すかに関して研究する必要があると思われる。

#### E. 結論

ProMMP-2の活性化は関節液中ではきわめて低率なのに対し、RA滑膜では強く活性化されていた。MT1-MMPとMT3-MMPのmRNA発現を認めたが、特にMT1-MMPの発現レベルは高く活性化と相関することから、おそらくMT1-MMPがその活性化に主要な役割を果たしていると推定される。また、MT1-MMPにより活性化されたMMP-2活性はRA滑膜表層細胞層に認められ、RA滑膜が強い酵素活性を示すことを初めて実証できた。ペントサン硫酸は、MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 13やTIMP-1, 2, 4産生に全く影響することなくRA滑膜細胞でのTIMP-3産生を転写後のレベルで特異的に亢進した。また、TIMP-3はRA滑膜表層細胞で発現することを実証し、RA滑膜組織をペントサン硫酸処理すると表層細胞での産生亢進を認めた。したがって、ペントサン硫酸をRA関節破壊抑制薬として将来導入できる可能性があると考えられる。

#### F. 論文発表

- (1). Ohta S., Imai K., Yamashita K., Matsumoto T., Azumano and Okada Y.: Expression of matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) in human osteoarthritic cartilage. *Lab. Invest.* 78:79-87, 1998.
- (2). Kawashima-Ohya Y., Satakeda H., Kuruta Y., Kawamoto T., Yan W., Akagawa Y., Hayakawa T., Noshiro M., Okada Y., Nakamura S. and Kato Y.: Effects of parathyroid hormone and its related peptide on matrix metalloproteinases-2, -3 and -9 syntheses by growth plate chondrocytes. *Endocrinology* 139:2120-2127, 1998.
- (3). Azumano I., Fujimoto N., Teshima M., Yoshida S., Iwata K. and Okada Y.: A one-step monoclonal antibody-based sandwich enzyme immunoassay for human active matrilysin (MMP-7) and its complexes with TIMP-1 and TIMP-2. *Connect. Tissue* 30:23-28, 1998.
- (4). Yamashita K., Azumano I., Mai M. and Okada Y.: Expression and tissue localization of matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) in human gastric

- carcinomas. *Int. J. Cancer* 79:187-194, 1998.
- (5).Nakamura H., Fujii Y., Ohuchi E., Yamamoto E. and Okada Y.:Activation of the precursor of human stromelysin 2 and its interactions with other matrix metalloproteinases. *Eur. J. Biochem.* 253:67-75, 1998.
- (6).Kinoshita T., Sato H., Okada A., Ohuchi E., Imai K., Okada Y. and Seiki M.:TIMP-2 promotes activation of progelatinase A by membrane-type 1 matrix metalloproteinase immobilized on agarose beads. *J. Biol. Chem.* 273:16098-16103, 1998.
- (7).Kadono Y., Okada Y., Namiki M., Seiki M. and Sato H.:Transformation of epithelial cells with p60v-src induces expression of membrane-type 1-matrix metalloproteinase and invasiveness. *Cancer Res.* 58:2240-2244, 1998.
- (8).Fosang A.J., Last K., Fujii Y., Seiki M. and Okada Y.:Membrane-type 1 MMP (MMP-14) cleaves at three sites in the aggrecan interglobular domain. *FEBS Lett.* 430:186-190, 1998.
- (9).Yamamoto M., Tsujishita H., Hori N., Ohishi Y., Inoue S., Ikeda S. and Okada Y.:Inhibition of membrane-type 1 matrix metalloproteinase by hydroxamate inhibitors:An examination of the subsite pocket. *J. Med. Chem.* 41:1209-1217, 1998.
- (10).Kitagawa Y., Kunimi K., Ito H., Sato H., Uchiabayashi T., Okada Y., Seiki M. and Namiki M.:Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human urothelial carcinomas. *J. Urol.* 160:1540-1545, 1998.
- (11).Umehara F., Okada Y., Fujimoto N., Abe M., Izumo S. and Osame M.:Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in HTLV-I-associated myelopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57:839-849, 1998.
- (12).Tanaka M., Kyo S., Takakura M., Kanaya T., Sagawa T., Yamashita K., Okada Y., Hiyama E. and Inoue M.:Expression of telomerase activity in human endometrium is localized to epithelial glandular cells and regulated in a menstrual phase-dependent manner correlated with cell proliferation. *Am. J. Pathol.* 153:1985-1991, 1998.
- (13).Kawamoto T., Pan H., Yan W., Ishida H., Usui E., Oda R., Nakamasu K., Noshiro M., Kawashima-Oyha Y., Fujii M., Shintani H., Okada Y. and Kato Y.: Expression of membrane-bound transferrin-like protein p97 on the cell surface of chondrocytes. *Eur. J. Biochem.* 256:503-509, 1998.
- (14).Okada Y.:Matrix degradation in osteoclastic bone resorption under pathological conditions. In *Joint Arthroplasty*. Editors Imura S., Wada M. and Omori H., Springer-Verlag Tokyo, Tokyo, pp10-21, 1999.
- (15).Nakada M., Nakamura H., Ikeda E., Fujimoto N., Yamashita J., Sato H., Seiki M. and Okada Y.:Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2, 3 matrix metalloproteinases in human astrocytic tumors. *Am. J. Pathol.* 154:417-428, 1999.
- (16).Nakamura H., Ueno H., Yamashita K., Shimada T., Yamamoto E., Noguchi M., Fujimoto N., Sato H., Seiki M. and Okada Y.:Enhanced production and activation of progelatinase A mediated by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in human papillary thyroid carcinomas. *Cancer Res.* 59: 467-473, 1999.
- (17).Nakada M., Yamashita J., Okada Y. and Sato H.:Ets-1 positively regulates expression of urokinase type plasminogen activator (uPA) and invasiveness of astrocytic tumors. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, in press., 1999.

## 課題名 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

分担研究者 高橋 栄明 , 羽生 忠正

所属機関 新潟大学医学部整形外科 教授

研究要旨： RA 患者の脊椎椎体骨折の頻度は同年代の骨ドック検診者と比べて有意に高かった。原発性骨粗鬆症患者に比べ、RA 患者の骨粗鬆症は以下のような特徴が見られた。RA では骨梁単位壁幅 (W.Th) だけでなく骨梁幅 (Tb.Th) も年齢とともに減少した。吸収期から形成期に移る間の逆転期が著しく延長していた。これらの骨芽細胞機能低下はステロイド療法(ス剤)でさらに顕著となった。Node (Nd) 数の減少より Nd の連結性 (Nd.Nd/TV) の減少、すなわち骨梁の途絶が目立った。さらに皮質骨と Nd をつなぐ骨梁構造 (Ct.Nd/TV) および皮質骨幅が年齢ともに有意な減少を認めた。ス剤は骨梁の連結性ばかりでなく、Nd の消失を加速した。椎体圧迫骨折を認める症例は認めない症例に比べて、Nd.Nd/TV と Ct.Nd/TV が有意に減少していた。RA 患者に見られる全身性骨粗鬆症は RA それ自体でも引き起こされていることが示唆され、観血的骨生検操作が必要ではあるが、骨の質と強度とを知るためには strut 解析が有用なことが示された。抗リウマチ療法と同時に骨代謝に対する治療(骨芽細胞の活性化など)の必要性を痛感させられた。

### A. 研究目的

慢性関節リウマチ(RA)患者に伴う骨粗鬆症には傍関節性と全身性の骨粗鬆症とがある。後者の全身性骨粗鬆症に関しては RA そのものか、あるいは不動やステロイド剤(ス剤)などの続発性の要因なのか明らかになっていない。私たちは RA 患者の全身性骨粗鬆症の発症機序ならびに原発性骨粗鬆症との相違点を骨芽細胞・破骨細胞機能さらには構造解析を用い明らかにする。つぎに、動物実験モデルの1つである II 型コラーゲン関節炎(CIA)を用い、ヒトではとらえにくい関節炎発症前からの骨髓内の変化および吸収窩における破骨細胞と顆粒球系の細胞との関係を明らかにすることである。

### B. 研究方法

#### 1) 脊椎圧迫骨折の合併頻度調査

3か月の間に当科リウマチ外来を受診した50歳から64歳までの女性の活動性RA患者98例について同意を得て胸腰椎の側面X線撮影を行い、脊椎圧迫骨折の有無を調べた。対照群としては当科の骨ドックを受診した(1994.1~1995.4)女性88例のうち50と60歳代の70例のデータを使用した。なお、骨ドックを受診した理由の80%は腰部ないし背部痛であり、約半数の腰椎骨密度は若年成人平均骨量(YAM) -2.5SD以下であった。

#### 2) 組織形態計測学的検討

閉経後女性RA患者40例(46~74歳、平均59.4

歳)と年齢の一致した40例(45~74歳、平均60.9歳)を対照群として腸骨生検により得られた標本を用い、組織形態計測と骨梁をstrutとみなした構造解析とを2次元で行った(全例、説明と同意を得た)。対照群の選択は、原発性骨粗鬆症の診断マニュアルに従った。すなわち、X線上非外傷性椎体骨折を認めるか、椎体骨折がない場合には腰椎骨密度値がYAMの-2.5SD以下とした。

テトラサイクリンによる2回骨標識を行ってある。計測には半自動測定装置(システムサプライ、長野)を用いた。パラメーターは骨量(BV/TV)、骨梁幅(Tb.Th)、骨梁単位幅(W.Th)、骨梁数(Tb.N)、骨梁間隙(Tb.Sp)を使用した。

Strut解析はGarrhanらやMellishらの方法に準じ、骨梁の結合点をnode(Nd)、他の骨梁と結合していない終末点をterminus(Tm)とし、顕微鏡下にdigitizing systemを用い、海綿骨領域におけるこれらのstrutの長さや個数を求めた(図1)。さらに皮質骨の厚さ(Ct.Th)および皮質骨とNdをつなぐstrut(Ct.Nd)、皮質骨とTmをつなぐstrut(Ct.Tm)の長さを計測した。

#### 3) ラットCIAを用いた検討

成長期のラットCIAを用い関節炎が認められる足関節から脛骨遠位部と骨髓で連続している脛骨近位部とについて、感作直後から2日ごとに標本を作成し経時的な検討を行った。



## C. 研究結果

### 1) 脊椎圧迫骨折の頻度

圧迫骨折の頻度は RA 群で 28%, 対照群で 5.7% であり, RA 群でその頻度は有意に高かった。また, 非ス剤投与群 (60 例) だけでも, その頻度は 20% と高率であった。

### 2) ヒト腸骨における組織形態計測

原発性骨粗鬆症患者に比べ, RA 患者の骨粗鬆症は以下のような特徴が見られた。①原発性骨粗鬆症では骨梁単位壁幅 (W.Th) の減少が起こるが骨梁幅 (Tb.Th) は一定に保たれていた。しかし, RA では Tb.Th と W.Th とともに年齢とともに減少し, ス剤投与群 (23 例) はさらに顕著となった。②ス剤の有無に関係なく, 吸収期から形成期に移る間の逆転期が著しく延長し, 骨芽細胞機能の低下が疑われた。③非ス剤群でも骨梁の途絶が目立った (骨梁の連結性 (Nd.Nd/TV) の減少 > Nd 数の減少 (N.Nd/TV))。④非ス剤群で皮質骨と Nd をつなぐ骨梁構造 (Ct.Nd/TV) および皮質骨幅 (Ct.Th) が年齢とともに有意な減少を認めた。⑤ステロイド療法は骨梁の連結性ばかりでなく, Nd の消失を加速した。⑥椎体圧迫骨折を認める症例 (22 例) は認めない症例 (18 例) に比べて, Nd.Nd/TV と Ct.Nd/TV が有意に減少していた。

### 3) ラット CIA を用いた組織形態計測

中間報告ではあるが, 脛骨近位部の二次海綿骨領域の吸収窩にありかつ骨梁に接している細胞のうち 13% 前後はエラストラーゼ陽性顆粒を有していることがわかった。しかし, 関節炎群では 95% 以上が TRAP 陽性の多核細胞であった。関節炎部分および関節炎発症前のデータは解析中である。

## D. 考察

Recker らや今野らは閉経期骨粗鬆症患者の BV/TV, W.Th, Tb.N は加齢とともに減少し, Tb.Sp は増加するが, Tb.Th は一定であったと報告している。私たちの検討でも対照群のデータの年齢別推移は Recker らの報告と同じで, Tb.Th には有意な減少を認めなかった。しかしながら, BV/TV や Tb.N 値そのものは Recker らの報告よりも低かった。これらの違いは, 人種差や患者選択の差によるものと考えている。彼らは過去に骨折を有する患者を除外した “いわゆる postmenopausal women in good health” としたが, 私たちは RA に対する対照群なので前述したように椎体圧迫骨折の有無は問わなかった。W.Th, Tb.N が減少し, かつ Tb.Th は一定であるということは, 吸収窩が浅いので形成期間中に十分埋め戻すことが出

来ているためと考えられた。Tb.Sp の増加と Tb.N の減少でしかも Tb.Th が一定であるということは, 健全な閉経後の女性に見られる骨減少は骨梁幅が薄くなるよりもむしろ骨梁構造の消失からなっていることを示唆している。W.Th の減少は, 骨梁内に残る非改変骨 (介在骨) の量が加齢に伴って増加してくるという理由で, 骨のもろさにつながっているのかもしれない。この非改変骨には疲労骨折や微小骨折が蓄積しやすく, 結果として機械的強度の低下を招く可能性がある。

RA 患者における非ス剤群の W.Th は対照群より低く, ス剤群では W.Th と Tb.Th とともに低値をとっていた。さらに, ス剤の総投与量あるいは平均投与量との間には負の相関を認めた。なお, ス剤群のブレドニゾン換算一日平均投与量は  $8.0 \pm 4.2$  mg であった。RA での Tb.Th の減少の理由としては, 吸収窩が正常あるいはより深いために形成期間内では十分埋め戻すことが出来なためと考えられた。さらに, たとえス剤投与が比較的低用量であったとしても, 長期にわたると骨吸収から骨形成への coupling が休止してしまう過程も Tb.Th の減少に関与していると思われた。

Strut 解析の結果, 加齢に伴う骨減少は従来の組織形態計測パラメータの 1 つである BV/TV よりも, N.Nd あるいは Nd.Nd といった node 関連のパラメータとの間で高い相関性があった。今回の対照群である閉経後骨粗鬆症においては, Nd の消失が主体で, N.Nd/TV が加齢とともに有意な減少を認めた。一方, RA 患者群では, 加齢とともに N.Nd/TV の減少よりも Nd.Nd/TV や Ct.Nd/TV の減少すなわち Nd 間や皮質骨との連結性が失われていることを示していた。このことは RA 患者群で Tb.Th の激しい減少の上に骨梁の穿孔をおこす程の深い吸収窩の形成が起こっていることを示している。さらにその上に BV/TV と N.Nd/TV との間の相関係数がス剤群において最も高いことから, ス剤は Nd 間の連結性の低下ばかりでなく, Nd の数の減少をも加速していることが伺える。

それでは滑膜増殖の見られない, しかも関節から離れた腸骨や椎体で, どうしてこのような変化が起こるのだろうか? Bab らはラットの脛骨の骨髄を吸引除去した後下顎骨において骨形成の増加を観察し, 骨形成の全身性の増強が起こることを提唱した。骨欠損部位におけるリモデリング率は通常の組織修復力や局所の防衛反応より勝っている。この反応を regional acceleratory phenomenon (RAP) と記載し

たのは Dr. Frost である。Mueller らはこの骨形成の局所的な増強が骨代謝において全身的な影響を生むかどうかを調べるために、ラットの左脛骨にバーホールをよる欠損を作り局所修復過程の検討を行った。腸骨と第4腰椎椎体の両方で骨石灰化面、骨石灰化速度、骨形成速度の有意な増加を認めた。これらの結果に基づいて彼らは RAP に伴う systemic acceleratory phenomenon (SAP) があると結論づけた。したがって、RA の活動性が高いとよく見受ける全身性骨粗鬆症も関節局所における吸収系の亢進と骨形成系の抑制が RAP となって、腸骨や椎体の病態は SAP として現れていると推察した[3]。

ラットの CIA においてもヒトと同じく骨髄内の顆粒球系細胞の増多が報告されている。私たちは、今までに同一個体からの経時的な検討を行った結果、関節炎発症前に末梢血で顆粒球の一過性の増多を認めたこと[1]、過剰な消炎鎮痛剤(NSAID)などのストレスにより顆粒球および自己障害性のリンパ球の活性化が起こること[6,7]を明らかにした。これらの結果が、昨年報告した骨髄細胞中の骨原細胞の低下[5]やラット CIA における関節炎発症前から認められた骨芽細胞数の有意な減少ないし消失[2,4]を解く鍵になるのではと考えている。TRAP 染色とエラストラーゼ陽性顆粒染色とによる吸収窩にありかつ骨梁に接している細胞に関する検討のうち関節炎部分および関節炎発症前のデータ解析については次年度個体数を増やし最終結論を出したい。なお、ヒトの CD15 や CD34 抗体はラットでは交叉しなかったため、これに相当するラット用抗体の情報がないところである。次年度は抗体の入手可能なマウス CIA を用いて関節炎感作直後からの骨髄内での細胞の変化、吸収窩に接している細胞の同定とその定量化を進める予定である。

### E. 結論

RA 患者に見られる全身性骨粗鬆症は RA それ自体でも引き起こされていることが示唆され、観血的骨生検操作が必要ではあるが、骨の質と強度とを知るためには strut 解析が有用なことが示された。抗リウマチ療法と同時に骨代謝に対する治療（骨芽細胞の活性化など）の必要性を痛感させられた。

文献（現在の仕事に関連した私たちの業績一覧）

1. Arai K, Yamamura S, Hanyu T, et al: Functions and changes in granulocytes during the process inflammation of collagen-induced arthritis. Trans

combined ORS 3: S43, 1998

2. Hanyu T, Arai K, Hoshino K, et al: Bone turnover in the metaphysis of the proximal tibia during the early periods after type II collagen-induced arthritis in growing and matured rats. Trans combined ORS 3: S352, 1998.

3. Hanyu T, Arai K, Takahashi HE: Structural mechanisms of bone loss in iliac biopsies: Comparison between rheumatoid arthritis and postmenopausal osteoporosis. Rheumatol Int 1999. (in press)

4. Hanyu T, Chotanaphuti T, Arai K, et al: Histomorphometric assessment of bone changes in rats with Type II collagen-induced arthritis. Bone 1999. (in press)

5. 高橋栄明, 羽生忠正, 星野賢一, ほか: 慢性関節リウマチ患者の骨粗鬆症に関する研究: 1) 骨髄細胞中の骨原細胞の検討. 2) 成長期と成熟期ラット・コラーゲン関節炎モデルによる検討. 越智隆弘編, 平成9年度厚生省長期慢性疾患総合研究事業研究報告書. 厚生省: 東京, p18-21, 1998.

6. Yamamura S, Arai K, Hanyu T, et al: Suppressive effects of rebamipide, a novel anti-ulcer agent, on the number and function of granulocytes and extrathymic T cells in mice. Biom Res 18: 103-112, 1997.

7. Yamamura S, Arai K, Toyabe S, et al: Simultaneous activation of granulocytes and extrathymic T cells in number and function by excessive administration of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Cell Immunol 173: 69-77, 1996.

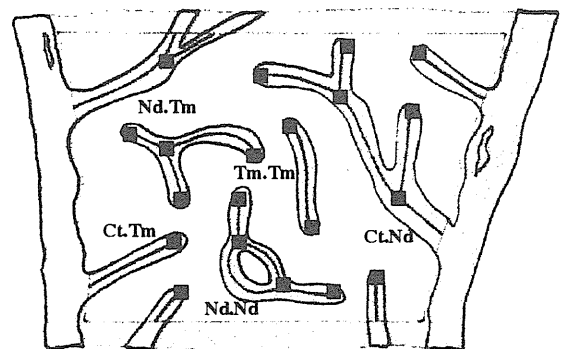


図1. Strut解析のパラメータと模式図

骨梁の接合点 node(Nd), 終末点 terminus(Tm), 骨皮質の厚さ(Ct.Th)など

課 題 名 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

氏 名 共同研究者 加藤 智啓

所属機関 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

慢性関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis, RA) の病因あるいは骨・関節破壊機序に対する T 細胞など細胞性免疫が関与を調べる目的で関節でクローナルに集積している T 細胞クローンタイプの抗原同定を試みた。一部はタイプ II コラーゲンを認識することが判明し、さらに抗原を同定する汎用的方法を確立する目的で T 細胞 1 個からの T 細胞レセプター遺伝子のクローニング法、MHC 分子のファージ上の発現を行った。両者を組み合わせたスクリーニングにより多くの抗原を同定が期待させる。

#### A. 研究目的

慢性関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis, RA) の病因あるいは骨・関節破壊機序は現在不明であるが、罹患関節には多くの T 細胞の浸潤があること RA の発症が特定の HLA ハプロタイプと相関するなど、T 細胞を中心とした細胞性免疫が関与していることが示唆されている。これまで、集積 T 細胞クローンの対応抗原は不明であり、これを同定することが細胞性免疫の役割については免疫学的治療法の開発に役立つと考えられる。しかし、一般的に抗原性未知の T 細胞の抗原同定は有効な方法がなく、方法論的な障害となっている。ここでは T 細胞の抗原同定法の確立をめざす。

#### B. 研究方法

- (1) RA 患者末梢血中の T 細胞をタイプ II コラーゲンで刺激し、増殖する T 細胞クローンタイプが集積 T 細胞のそれと一致するかどうかを T 細胞レセプター B 鎖遺伝子に関する SSCP 法で検討した。
- (2) 抗原ペプチドをランダムにコードする DNA、MHC クラス I 抗原をコードする遺伝子、 $\beta$  2 マイクログロブリンをコードする遺伝子を結合し、M13 ファージマイナーコート蛋白遺伝子に接続、ファージ上に抗原ペプチド付き MHC クラス I 抗原を発現させたライブラリーを作成

する。このためにまず、MHC クラス I 抗原がファージ上に発現されるかどうかを検討する。

- (3) 一方で、集積 T 細胞クローンを分離するために一個一個の細胞を個別に分離し、そこから cDNA を作成、T 細胞レセプターの  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖を本来の組み合わせを保ったまま PCR にて増幅する (single cell-PCR) 方法の確立を目指す。これにより生体内で集積する T 細胞の T 細胞レセプターを速やかな再構築が可能となる。
- (4) 再構築された T 細胞レセプターをプローブとして上記のランダム抗原ライブラリーをスクリーニングする。これは今後の課題となる。

### C. 研究結果

- (1) RA 患者末梢血中の T 細胞をタイプ II コラーゲンで刺激し、増殖する T 細胞クロナタイプを T 細胞レセプター  $\beta$  鎖遺伝子に関する RT-PCR-SSCP 法で検討した結果、15 人中 3 人で罹患関節集積 T 細胞のクロナタイプと一致するものがあることが判明した。
- (2) MHC クラス I 抗原のひとつである B5101 遺伝子を健常人末梢血単核球 cDNA から PCR 法を用いて増幅し、アミノ酸配列 (DDAKKDDAKKDDAKKDDAKK) をコードする DNA を介して、や

はり健常人末梢血単核球 cDNA から PCR 法を用いて増幅した抗  $\beta$  2 マイクログロブリン遺伝子と結合した。全体の遺伝子 (一本鎖 MHC クラス I 遺伝子) を M13 ファージの副外皮蛋白をコードする g 3P 遺伝子に接続し、大腸菌にてファージを発現させた。その結果、産生されたファージは抗クラス I 抗体、抗  $\beta$  2 マイクログロブリン抗体で認識されることが判明し、全体の構築物がファージ上に発現されていることが判明した。

- (3)  $V\alpha 12$  陽性 T 細胞 (ここでは SLE 患者末梢血を用いた。) を細胞分取解析装置を用いてマイクロタイタープレートに 1 ウェル 1 個の割合で分取した。そこから RNA 抽出溶液を加え RNA を抽出し、さらに cDNA を作成した。二段階 PCR 法にて T 細胞レセプターの  $V\alpha 12$  の  $\alpha$  鎖 CDR 3 領域を増幅し遺伝子配列を決定し、集積 T 細胞クロナタイプを同定した。さらにそのクロナタイプについて 20 種の  $V\beta$  鎖ファミリー特異的プライマーを用いて個別に CDR 3 領域遺伝子を増幅し、 $\beta$  鎖遺伝子配列を決定した。これにより本来の組み合わせを保ったまま T 細胞レセプターの同定。クローニングが可能となった。(single cell-PCR)

### D. 考察

RA の罹患関節には多くの T 細胞の浸

潤があること RA の発症が特定の HLA ハプロタイプと相関するなど、T 細胞を中心とした細胞性免疫が関与していることが示唆されている。また、タイプ II コラーゲン誘導性関節炎など免疫学的機序が明らかに働いている RA のモデルマウスなども T 細胞の重要性を示唆している。ヒト RA においてこれまでタイプ II コラーゲンなどいくつかの分子が自己抗原として報告されているが、実際にどのような働きをしているのか、たとえば、関節集積 T 細胞クロノタイプの対応抗原であるかどうかなどわかっていない。これに対し、我々はその一部がタイプ II コラーゲンを認識することを本研究で証明した。しかし、残る大部分の集積 T 細胞クロノタイプの対応抗原はなお不明である。これを同定する有効な方法が現在ないのである。

我々が立案した方法は RA 患者生体内で集積している T 細胞クロノタイプの抗原を解析できる有用な方法になる可能性がある。ここではそれを達成するための重要な 2 段階すなわち、患者血液サンプルから T 細胞レセプターを  $\alpha$  鎖  $\beta$  鎖の組み合わせを保ったままクローニングする single cell PCR 法の確立とファージに MHC 分子を発現させることを達成した。前者は T 細胞株の樹立なしではあるいはバルク T 細胞 cDNA からは従来できなかったことである。後者は T 細胞レセプターの抗原認識の重要な点に関するものである。T 細胞レセプターは抗原ペプチドのみは認識できず、MHC 分子に

搭載された抗原ペプチドを認識する。この意味で二者の結合ではなく三者の結合である。三者の結合の解析はむずかしいので我々は MHC 分子と一本鎖にすることにより、二者の結合に還元することを考えたわけである。今回、MHC クラス I 分子は  $\beta$  2 マイクログロブリンを含めると相当大きな分子であるが、それがファージ上に発現されることが確認され、ライブラリーの作成が可能であることを示唆した。今後、ランダム配列のペプチドをコードする DNA を組み込めば、スクリーニングの進むことができると考えられた。

#### 研究業績

1. Sekine T. Kato T. Masuko-Hongo K. Nakamura H. Yoshino S. Nishioka K. Yamamoto K. Type collagen is a target antigen of clonally expanded T cells in the synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* (In Press)
2. Kurokawa M. Furusawa H. Yabe T. Matsui T. Toda M. Hamada C. Yamamoto K. Nishioka K. Kato T. Frequency of clonally expanded T cells evaluated by PCR from a single cell. *Journal of immunological methods. Curr Opin Rhumatol* (In Press)
3. Hasunuma T. Kato T. Kobata T. Nishioka K. Molecular mechanism of immune response, synovial proliferation and apoptosis of rheumatoid arthritis. *Springer Seminars in Immunopathology* 581: 1-12, 1998

4. Tong JK. Masuko- Hongo K. Nishioka K. Kato T. Sugata F. Akaogi J. Iino S. A novel subfamily of hepatitis G virus / hepatitis GB virus C isolated from a Japanese patient: A sequence analysis of the envelope I (EI) region. (letter) J Clin Microbiol 36: 2797 - 2799, 1998

5. Nishioka K. Hasunuma T. Kato T. Sumida T. Kobata T. Apoptosis in rheumatoid arthritis: A novel pathway in the regulation of synovial tissue. Arthritis Rheum 41: 1-9, 1998

6. Masuko - Hongo K. Kato T. Suzuki S. Sekine T. Kurokawa M. Ueda S. Yamada A. Nishioka K. Yamamoto K. Frequent clonal expansion of peripheral T cells in patients with autoimmune disease: a novel detecting system possibly applicable to laboratory examination. J Clin Lab Anal 12: 162-167, 1998

7. Fujisawa K. Okamoto K. Asahara H. Hasunuma T. Kobata T. Kato T. Sumida T. Nishioka K. Evidence for autoantigens of Env/ Tax Proteins Human T cell leukemia Virus type I Env-pX Transgenic mice. Arthritis Rheum 41: 101- 109, 1998

# 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

高橋直之

昭和大学歯学部・助教授

IL-1は歯周炎、慢性関節リウマチ、骨粗鬆症の発症に関与する重要な炎症性サイトカインと考えられている。本研究では破骨細胞の機能を調節するIL-1の直接効果を解析した。IL-1は破骨細胞のNF- $\kappa$ Bを活性化し破骨細胞の融合と延命を促進した。更にIL-1は、破骨細胞の骨吸収活性を誘導した。これらのIL-1の作用は最近クローニングされたODFの破骨細胞に対する作用と極めて類似しており、TRAF6を介するシグナル系の重要性が示唆された。

## A. 研究目的

歯科領域における2大疾患は、齲蝕と歯周病である。齲蝕は歯質の崩壊によって歯としての正常な機能を喪失するが、歯周病になると歯を支える歯槽骨が病的に吸収されることによって歯は歯槽骨による支持を失い、たとえ健全な歯であっても正常な機能を発揮することができない。この歯槽骨の病的吸収には炎症性サイトカインによって破骨細胞の形成が促進したり、破骨細胞が活性化されることが要因になっていると考えられている。

IL-1は、この歯周炎をはじめ慢性関節リウマチ、骨粗鬆症などの骨吸収を促進する最も重要な炎症性サイトカインの一つと考えられているが、どの様に破骨細胞の形成と機能を調節しているか解明されていない。我々は、マウスの骨芽細胞と造血系細胞の共存培養系を用いて、破骨細胞の形成と機能を調節するIL-1の作用を解析してきた。IL-1は共存培養系において破骨細胞

の形成を促進するが、その効果はインドメタシンにより抑制される。このことは、IL-1はPGE<sub>2</sub>の産生亢進を促して破骨細胞の形成を促進するものと考えられる。本研究では、更に破骨細胞の機能をIL-1が調節するか否かを検討し、IL-1は破骨細胞に直接作用してその延命、融合、更に機能発現を促進することを見出した。

## B. 研究方式

マウス骨芽細胞と骨髄細胞をコラーゲンゲル上で6日間共存培養し、破骨細胞の形成を促した。形成された破骨細胞はコラーゲナーゼとプロナーゼ処理とPercoll密度勾配遠心法を用いて純化した。この純度の高い破骨細胞画分を用いて、破骨細胞の機能に及ぼすIL-1とマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)の作用を解析した。NF- $\kappa$ Bの活性化はゲルシフトassay法を用いて評価した。また、単核の酒席酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP、破骨細胞のマー

カー酵素) 陽性細胞はマウス骨芽細胞様細胞KS-4と骨髄細胞の共存培養系をechistatinで処理することにより純化・回収した。その純度は90%以上であった。TRAP-陽性単核細胞をプレートに蒔きその延融合(多核細胞形成)に対するIL-1とM-CSFの効果を検索した。更に、TRAP-陽性単核細胞あるいは純化した破骨細胞を象牙質切片上に蒔き、吸収窩形成に及ぼすIL-1M-CSFの効果を検索した。

### C. 研究結果

① 純化した破骨細胞はアポトーシスを起こし短時間内に死滅するが、骨芽細胞/ストローマ細胞が共存するとその細胞死は防御された。②純化していない破骨細胞画分を象牙質切片上に播くと24時間以内に多数の吸収窩の形成が認められるが、純化した破骨細胞は殆ど吸収窩形成能を示さなかった。③純化した破骨細胞に骨芽細胞/ストローマ細胞を添加すると、その骨吸収活性は著しく促進された。この破骨細胞の活性化には、骨芽細胞/ストローマ細胞との接触を介した相互作用が必要であった。④各種のサイトカインやホルモンを検索したところ、M-CSFとIL-1が破骨細胞のアポトーシスを抑制しその延命を促進した。⑤破骨細胞はI型のIL-1レセプターを発現しており、IL-1は破骨細胞のNF- $\kappa$ Bを活性化した。この活性化に伴いNF- $\kappa$ Bの核内移行が殆ど全ての核で認められた。一方、M-CSFは破骨細胞のNF- $\kappa$ Bを活性化しなかった。⑥プロテアソームの阻害剤はNF- $\kappa$ Bの活性化を抑制し、IL-1の延命効果も抑制した。⑦IL-1あるいはM-CSFは echistatin処理により純化したTRAP-陽性単核細胞(prefusion osteoclasts, pOCs)の延命を促し、その融合(多核化)を促進した。

⑦ IL-1が誘導するpOCsの延命と融合はIL-1レセプターアンタゴニストにより、また、M-CSFが誘導するpOCsの延命と融合はc-fms (M-CSFレセプター) に対する抗体で完全に抑制された。⑧ pOCsを象牙質切片上に蒔きIL-1とM-CSFの非存在下で24時間培養したところ、吸収窩は全く形成されなかった。一方、この系にIL-1を添加すると多数の吸収窩が形成された。M-CSFを添加しても全く吸収窩は形成されなかった。同様に、IL-1は 純化した破骨細胞の吸収窩形成を促進したが、M-CSFはそれを促進しなかった。以上の知見は、骨芽細胞/ストローマ細胞と全く同様に、IL-1は破骨細胞の延命と骨吸収活性を促進することを示している。このように炎症時に局所で産生されるIL-1は、破骨細胞の延命と活性化を誘導する強力な骨吸収因子であることが示された。

### D. 考察

我々は既に、(1)純化した破骨細胞は吸収窩形成能がないこと、骨芽細胞を同時に添加すると破骨細胞骨吸収活性を誘導できること、(2)純化した破骨細胞は極めて短時間内に死滅するが、IL-1とM-CSFは破骨細胞の死滅を防御することを既に報告した。本研究により、破骨細胞をIL-1で処理するとNF- $\kappa$ Bが活性化され、その延命を誘導すること、また、単核破骨細胞の延命、融合、活性化を促進することを見出した。破骨細胞の延命と融合を促進する効果はM-CSFにも認められたが、M-CSFは破骨細胞の窩形成能を誘導しなかった。以上の知見は、延命を促進することが破骨細胞の機能を誘導するために必須であるが十分ではないことを示唆する。最近クローニングされた破骨細胞分化因子(ODF)は膜結合性のTNF様因子であるが、IL-1と同様に破骨細胞のODFレセプター (RANK) に結合し、NF- $\kappa$ B



の活性化とその延命、機能発現を促す。この作用はIL-1の作用と極めて類似している。最近RANKのシグナル系が解析され、RANKにTNF receptor associated factor (TRAF)2, TRAF3, TRAF5, TRAF6が結合することが明らかにされた。従来より、IL-1レセプターのシグナルはTRAF6を介することが知られており、IL-1とODFはTRAF6のシグナル系を介して破骨細胞の延命と活性化を促進するものと考えられる。以上の知見は、炎症性骨吸収においてIL-1は破骨細胞の形成を促進するのみではなく、ODFと同様に破骨細胞の活性化を誘導することを示すものである。

#### E. 結論

歯周炎、慢性関節リウマチ、骨粗鬆症の骨破壊にはプロスタグランジンE (PGE) 類と共にIL-1が関与すると考えられてきたが、その作用機序は不明であった。我々は先にIL-1による破骨細胞の形成に促進はPGE<sub>2</sub>の産生が仲介することを報告した。本研究より、IL-1は破骨細胞に直接作用し破骨細胞の延命、融合更に骨吸収機能を誘導することが明らかとなった。炎症性の骨吸収においてIL-1は極めて重要な役割を有するものと考えられる。

#### F. 研究発表

- Jimi, E, Nakamura, I., Ikebe, T., Akiyama, S., Takahashi, N., & Suda, T: Activation of NF- $\kappa$ B is involved in the survival of osteoclasts promoted by interleukin-1. *J. Biol. Chem.* 273, 8799-8805 (1998)
- Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinoshita, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N. & Suda, T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3597-3602 (1998)
- Nakamura, I., Jimi, E., Duong, L.T., Sasaki, T., Takahashi, N., Rodan, G.A. & Suda, T. Tyrosine phosphorylation of p130Cas is involved in actin organization in osteoclasts. *J. Biol. Chem.* 273, 11144-11149 (1998)
- Matsuzaki, K., Udagawa, N., Takahashi, N., Yamaguchi, K., Yasuda, H., Shima, N., Morinaga, T., Toyama, Y., Yabe, Y., Higashio, K. & Suda, T. Osteoclast Differentiation Factor (ODF) induces Osteoclast-like Cell Formation in Human Peripheral Blood Mononuclear Cell Cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246, 199-204 (1998)
- Tsurukai, T., Takahashi, N., Jimi, E., Nakamura, I., Udagawa, N., Nogimori, K., Tamura, M. & Suda, T. Isolation and characterization of osteoclast precursors that differentiate into osteoclasts on calvarial cells within a short period of time. *J. Cell. Physiol.* 177, 26-35 (1998)
- Matsuzaki, K., Katayama, K., Takahashi, Y., Nakamura, I., Udagawa, N., Tsurukai, T., Nishinakamura, R., Toyama, Y., Yabe, Y., Hori, M., Takahashi, N. & Suda, T. Human osteoclast-like cells are formed from peripheral blood mononuclear cells in a co-culture with SaOS-2 cells transfected with the PTH/PTHrP receptor gene. *Endocrinology* 140, 925-932 (1999)
- Jimi, E., Nakamura, I., Duong, L.T., Ikebe, T., Takahashi, N., Rodan, G.A. & Suda, T. Interleukin 1 induces multinucleation and bone-resorbing activity of osteoclasts in the absence of osteoblasts/stromal cells. *Exp. Cell Res.* 247, 84-93 (1999)
- Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M.T. & Martin, T.J. Modulation of Osteoclast Differentiation and Function by Osteoblasts/Stromal Cells. *Endocrine Reviews*

in press, (1999)

9. Kotake, S., Udagawa, N., Takahashi, N., Matsuzaki, K., Itoh, K., Ishiyama, S., Saito, S., Inoue, K., Kamatani, N., Gillespie, M.T., Martin, T.J. & Suda, T. IL-17 detected in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclast formation via osteoclast differentiation factor (ODF) synthesis. *J. Clin. Invest.* in press, (1999)
10. Takahashi, N., Udagawa, N. & Suda, T. A new member of TNF ligand family, ODF/RANKL/TRANCE/OPGL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press, (1999)
11. Jimi, E., Akiyama, S., Tsurukai, T., Okahashi, N., Kobayashi, K., Udagawa, N., Nishihara, T., Takahashi, N. & Suda, T. Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. *J. Immunol.* in press, (1999)

## 慢性関節リウマチナース細胞による骨・関節破壊機序の解明に関する研究

研究協力者 富田 哲也、竹内 英二、金子 元春、史 賢林、高野 裕史、  
高橋康一郎、関 宏、越智 隆弘

大阪大学医学部整形外科

### 研究要旨

RA ナース細胞は、共存する造血系細胞を抱き込む能力 (pseudoemperipolesis 能) が特徴的であり、IL-6、IL-7、IL-8、GM-CSF、MMP-1、MMP-3 を産生したが、リンパ球を抱き込むことによりその産生は有意に上昇し、さらに RA ナース細胞単独では産生が認められない、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、G-CSF の産生も認められた。RA ナース細胞にはヒアルロン酸産生能も認められたが、その産生は pseudoemperipolesis 能と正の相関を示した。RT-PCR による解析では、RA ナース細胞に MMP-9、cathepsin K の発現が認められた。RA ナース細胞と RA 滑膜組織由来 B 細胞株を骨片上あるいは人工骨上で培養すると明らかな骨吸収像が認められた。Pseudoemperipolesis により活性化された RA ナース細胞が直接的に関節破壊に関与している可能性が示唆された。

### A. 研究目的

我々は、RA の原因病巣として骨髄に着目し、一般に主病巣と考えられている滑膜病巣は、骨髄病巣が二次的に関節内に形成されたものであると考え、RA の骨髄病態について解析してきた。RA では造血系骨髄である腸骨骨髄や罹患関節部骨端部骨髄において様々な異常が認められる。腸骨骨髄での単核細胞数の増加、リンパ球系細胞の活性化やアポトーシスの抑制、重症 RA における骨髄球系細胞の増加や悪性腫瘍細胞膜の特異抗原を有する骨髄球系細胞の存在、腸骨骨髄中で異常な骨髄球系細胞の誘導、罹患関節骨髄中へのフォーミング、罹患関節部骨髄中での高濃度の

IL-1 を含有する多形核白血球 (骨髄球系細胞の最終分化形) の存在、腸骨骨髄細胞の破骨細胞様細胞への分化誘導能亢進など、RA に特徴的な進行性の関節破壊や、骨粗鬆症の病態形成の場として骨髄が重要な役割を果たしていることを報告してきた。骨髄においてこれら様々な造血系細胞の分化・維持・活性化を支持しているのが骨髄間質細胞であることが近年明らかにされてきた。この間質細胞は共存する細胞を抱き込む能力が特徴的である。この現象は pseudoemperipolesis と呼ばれ、1980 年に Wekerle によりはじめてマウス胸腺中に見いだされ、胸腺ナ

ース細胞は胸腺細胞を抱き込みのその分化増殖維持に重要な役割を果たすと報告された。RA 骨髄由来間質細胞はヒト B、T 細胞を抱き込むことが明らかとなった。この特異な機能を有する間質細胞は RA 滑膜からも樹立され、骨髄、滑膜共通の病巣形成機能を持つと考えられている。しかしながら、RA 間質細胞の骨・関節破壊への関与は明らかでない。そこで本研究では RA 間質細胞による骨・関節破壊機序の解明を目的とした。

## B. 研究方法

RA 患者腸骨骨髄より得られた間質細胞でナース細胞としての機能 (pseudoemperipolesis 能) を確認した細胞株を RA ナース細胞とした。RA 滑膜組織よりナース細胞依存性に増殖する B 細胞株を樹立した。ヒト B 細胞株として MC/car を、T 細胞株として Molt17 を使用した。1x10<sup>4</sup> の RA 骨髄間質細胞を 48 時間培養し、培養上清中のサイトカイン濃度を ELISA にて測定した。さらに 3x10<sup>4</sup> の RA 骨髄間質細胞を overnight 培養し、1x10<sup>6</sup> の MC/car、Molt17 を添加し、pseudoemperipolesis を起こした状態で 5 日間培養し培養上清中のサイトカイン濃度を測定した。同様にヒアルロン酸産生についてはヒアルロン酸測定キットを用いて測定した。象牙切片上あるいは osteologic (人工骨) 上で RA ナース細胞 (5x10<sup>4</sup>/well) を 24 時間培養後、RA 滑膜由来 B 細胞株 (1x10<sup>6</sup>/well) を添加し、14 日間培養し、培養上清中の MMP-1、MMP-3 濃度を ELISA にて測定した。14 日間培養後象牙切片上あるいは osteologic 上のナース細胞および B 細胞

を剥離し、骨吸収窩の形成について検討した。破骨細胞の出現について検討する目的でチャンバースライドを用いて RA ナース細胞と B 細胞の供培養系を経時的に H&E 染色および TRAP 染色した。AGPC 法にて 1x10<sup>6</sup> のナース細胞より total RNA を抽出し、RT-PCR 法を用い RA ナース細胞における MMP-9、Cathepsin K の mRNA レベルでの発現について解析した。

## C. 研究結果

- ①RA ナース細胞によるサイトカイン、ヒアルロン酸産生：RA 骨髄由来ナース細胞は、IL-6, IL-8, GM-CSF 及びヒアルロン酸を、健常人骨髄あるいは健常人滑膜細胞より有意に多量に産生した。RA ナース細胞を MC/car、あるいは Molt-17 と共培養し pseudoemperipolesis を起こさせると IL-6, IL-8, GM-CSF の産生が有意に増加し、ナース細胞単独培養では認めなかった IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , G-CSF の産生も認められた (表 1)。サイトカイン及びヒアルロン酸の産生は抱き込み能に比例して増加した。
- ②RA ナース細胞による骨吸収：RA ナース細胞と B 細胞の供培養系では、象牙切片上、osteologic 上に骨吸収窩が認められた。RA ナース細胞単独ではこのような骨吸収窩は認められなかった。RA ナース細胞と B 細胞の供培養系を経時的に観察したが、多核細胞や TRAP 陽性細胞の出現は認められなかった。
- ③RA ナース細胞による MMP 産生：RA ナース細胞単独培養では MMP-1;216ng/ml、MMP-3;100ng/ml と産生は認められたが、B 細胞との供