

培養では MMP-1;333ng/ml、MMP-3;220ng/ml と有意にその産生は上昇した。MMP-9 は RA ナース細胞単独培養及び B 細胞との共培養でも検出限界以下であった。

④RA ナース細胞における MMP-9 および Cathepsin K の発現：RA ナース細胞による骨吸収の機序を探る目的で MMP-9 および Cystein 系蛋白分解酵素の一つで強力な collagen 分解能を有する Cathepsin K の発現を検討したところ、RA ナース細胞に MMP-9、Cathepsin K とともに mRNA の発現が認められた。

D. 考察

RA ナース細胞単独培養では、骨吸収窩が認められなかったが、B 細胞との共培養では骨吸収窩が認められたこと、また共培養中には多核細胞や TRAP 陽性細胞が出現しないことから pseudoemperipolesis により引き起こされる細胞間相互作用により RA ナー

ス細胞が活性化され直接骨破壊に関与している可能性が示唆された。RA ナース細胞による関節軟骨のマトリックス分解に作用する MMP-1、MMP-3 の産生も確認された。RA ナース細胞は IL-6、IL-8 を高濃度で産生し、リンパ球を抱き込むことにより IL-1 β 、TNF- α を産生することも明らかとなった。また高濃度に産生されたヒアルロン酸が粘稠な閉鎖空間を作り、サイトカインや MMP の局所的な濃度をさらに増強させる可能性が示唆された。

E. 結論

病巣局所でナース細胞が造血系細胞を抱き込むことによりこれら細胞の分化・維持・増殖・活性化に関与するのみならずナース細胞自身も活性化されサイトカイン、ヒアルロン酸、MMP 産生能が亢進し、直接的に骨・関節破壊に働くことが示唆された。

表1. RAナース細胞とリンパ球共培養でのサイトカイン産生

Cytokines in culture supernatant (pg/ml)								
Cell lines	IL-1 α	IL-1 β	IL-6	IL-7	IL-8	G-CSF	GM-CSF	TNF- α
Medium control	-	-	-	-	-	-	-	-
MC/car	-	-	-	-	-	-	-	-
Molt17	-	-	-	-	-	-	-	-
RA-BMNC-1	-	-	10655	-	1480	-	150	-
+ MC/car	-	320	48950	-	15960	755	915	275
+ Molt17	-	235	40705	-	10615	540	355	255
RA-BMNC-2	-	-	8950	-	2210	-	220	-
+ MC/car	-	540	27750	-	14750	515	450	860
+ Molt17	-	475	20500	-	17500	475	725	575

課題名 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

氏名 分担研究者 井上 一

所属機関 岡山大学医学部整形外科教授

研究要旨

関節炎において、軟骨細胞は自身もメカニカルストレスや各種炎症メディエーターに反応して軟骨破壊を進展させる。一酸化窒素 (NO) は軟骨細胞によって産生され、軟骨細胞死を誘導する一方で各種中性プロテアーゼの産生を通じて軟骨破壊に関与しており、病態形成過程でのNO阻害が新治療法のターゲットとなりうると思われる。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ (RA) では、主として増殖した関節滑膜で産生されるサイトカイン、中性プロテアーゼ、活性酸素などの炎症性メディエーターが骨・軟骨破壊を進展させる。一方、変形性関節症 (OA) においても、種々の因子が関わり合って複雑な病態を形成していることが遺伝子レベルで解明されつつある。軟骨変性においてはその初期段階で軟骨細胞増殖を来し、その後、数を減じ破壊が進行することが知られるが、その分子機構は解明されていない。他方、一酸化窒素 (NO) はその発現量により、生体防衛的にも障害的にも作用すると考えられる。本研究の目的は関節炎におけるNO産生と軟骨変性について、特に軟骨細胞のアポトーシスの面から組織学的に検討を加えることにある。

B. 研究方法

(1) ウサギ培養軟骨細胞をIL-1で刺激後、RNAを抽出、RT-PCRを用いて、NO合成酵素iNOSmRNAの発現を調べた。また、各種matrix metalloproteinase (MMP)産生量をゼラチンザイモグラフィで調べた。さらに、NO阻害剤であるNMA添加により、MMP-mRNAおよびbFGFmRNA発現量の変化を検討した。

(2) OA患者の全人工関節手術時に採取した骨軟骨棘を4%PFAで固定、EDTAで脱灰の後、組織切片を作成、アポトーシスの検出にはパラフィン切片を用いたTUNEL法および樹脂包埋した切片の透過電顕観察を行った。次にiNOSの局在を調べるために、抗iNOS抗体を用いた免疫染色ならびにinsitu hybridization法によるiNOSmRNAの検出を行った。さらに抗ニトロチロシン抗体を用いた免疫染色により、ペルオキシ亜硝酸イオン(ONOO-)生成を解析した。また、細胞周期に関する各種癌抑制遺伝子とアポトーシスの関連を調べるため、p53、p21、p27およびBcl-2、Baxに対する免疫組織学的検索を行った。

C. 研究結果

(1) iNOSmRNAの発現は、12時間でピークに達し、以後漸減した。IL-1非添加群では発現はほとんど認められなかった。MMP-2、9の産生量はMMP-2にはほとんど変化が認められなかったのに比して、MMP-9の産生はIL-1添加後12時間後から時間依存的に増加し、48-72時間でピークに達した。mRNAの発現量を調べると、MT1-MMPとMMP-9は比較的早期より増加し、以後漸減

した。NO阻害剤であるNMA添加により、MMP-mRNAおよびbFGFmRNA発現は抑制された。

(2) 肥大軟骨細胞層では35.4±6.9%のTUNEL陽性細胞が混在しており、電顕では核クロマチンの凝集、細胞質の膨化変性を特徴とするアポトーシス像が認められた。次にNO合成酵素であるiNOSに対する免疫染色ではRA滑膜組織に強い陽性像が見られた他、進行期OA軟骨の骨軟骨棘形成部位の肥大軟骨細胞層にも強い発現がみられた。さらにin situ hybridization法によるiNOSmRNA発現の検討でも同様の部位の軟骨細胞が陽性であった。一方、p53はほぼ全ての肥大軟骨細胞で発現が増強しており、p21は主に増殖細胞層に発現が認められた。

D. 考察

OA軟骨細胞はIL-1等のサイトカイン刺激により、NOを発現することが明らかとなった。一方、NOがスーパーオキシドと反応して生ずるONOO⁻は反応性が高く、その酸化作用が細胞内での脂質の過酸化、DNA損傷、ミトコンドリア機能の障害を介して細胞障害を引き起こす重要なメディエーターである。この他にもONOO⁻はMMPを活性化することにより炎症反応を増強することが知られており、軟骨破壊機序における役割は大きいと考えられる。

他方、癌抑制遺伝子p53はDNAに損傷を与える細胞内外の因子によって核内に集積し、細胞DNAの修復やゲノムの不安定性の抑制に重要な役割を果たしている。p53は細胞種によって細胞周期停止を誘導したり、アポトーシスを誘導するが、これらの選択にはp53、p21、Bax等の発現レベルやRBとE2Fのバランスが関与すると考えられている。本研究結果から、OA骨軟骨棘における軟骨細胞は、NOによるDNA障害の後、軟骨細胞死はp53による制御を受けていると考えられ、軟骨細胞の分化、細胞死は転写レベルで制御を受けていることを示唆している。

E. 結論

OA軟骨の破壊、修復機序にNOが重要な役割をはたす。NO産生に対しては抗酸化剤によNfκ-Bの核内への移行の阻害、iNOSmRNAに対するアンチセンスRNA投与、NO阻害剤等が効果を持つことが解っており、これらを用いた新しい治療戦略に繋がると考えた。また、同様の研究が各変性過程におけるOA、RA軟骨および関節滑膜においても不可欠であると考えている。

課題名 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-

研究協力者 岩田 久

所属機関 名古屋大学整形外科教授

研究要旨： 細胞外基質であるコラーゲン、プロテオグリカンあるいはその分解産物と細胞代謝の関連を検討する事を目的として研究を行い①軟骨細胞、滑膜細胞で TNF 刺激による転写因子 NF κ -B の活性化機構が高分子ヒアルロン酸の添加によって影響を受ける事を明らかにした。②フィブロネクチンの分解産物では転写因子 NF κ -B の活性化を伴う炎症性サイトカインの産生は軟骨・滑膜細胞には見られなかった。

A. 研究目的

関節外科領域では関節リウマチを初めとする関節炎疾患に対する治療法の一つとして関節洗浄が臨床的に有効であるとされている。細胞外基質とそこにある細胞との関連が関節炎疾患の慢性化の鍵を握ると考えた。細胞外基質またはその構成成分の状態が細胞の代謝に影響を与え、またはサイトカイン等の影響を修飾する事によって疾患の慢性化、さらなる基質破壊が起こる機序を証明することを目的として本研究を行った。

B. 研究方法

ヒト軟骨組織由来細胞株 HCS 2/8 と RA 患者より採取した滑膜細胞を用い、各種分子量 (3kD, 30kD, 200kD, 300kD, 900kD, 2000kD) のヒアルロン酸 1mg/ml を 20 時間作用させた後、TNF α 刺激を 10 時間おこない培養液を回収し、ELISA 法にて IL-8 を測定した。また TNF α 刺激を 1 時間おこなった後細胞を回収し、細胞核分画を利用して EMSA 法にて転写因子 NF κ -B の活性化を観察した。

C. 研究結果

ヒト軟骨組織由来細胞株 HCS2/8 では、どの分子量においても IL-8 の分泌量の明らかな変化はみられなかった、一方、高分子量の HA (900kD, 2000kD) を作用させた RA 滑膜細胞では TNF α 刺激による IL-8 の分泌量が低下する傾向が認められた。これは EMSA 法によって転写因子 NF

κ -B の活性化の抑制が高分子ヒアルロン酸に認められるためであると推論した。

D. 考察

各種細胞外マトリックスの正常な前駆体が、断片化することにより生物活性を発揮する可能性についてはいくつかの報告がある。コラーゲンの断片はマクロファージを活性化する。フィブロネクチンの断片は MMP の分泌量を促進するといった研究とともに、低分子量の HA はマクロファージ/単球系細胞において転写因子 NF- κ B の活性化を介して IL-8 を初めとする炎症性ケモカインの産生を促進するといわれている。しかし、HA の分子量の違いによる効果の違いについては明らかではない。高分子量の HA は、低分子量の HA との高次構造の違いやレセプターへの拮抗により、異なった細胞内シグナルの伝達を行っている可能性が考えられる。細胞外マトリックスの分子量の違いが細胞の代謝に影響を及ぼしうることを示したものである。今回の結果では、高分子量の HA が持つ関節軟骨の保護・代謝改善・修復促進作用に加えて、従来あまり明らかでなかった抗炎症効果の有無について、軟骨ではなく、滑膜に対して存在する可能性を示唆していると考えられる。

課題名 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

研究協力者 坂口志文

所属機関 京都大学再生医科学研究所・生体機能調節学分野

ヒトのリウマチ様関節炎と免疫病理学的に酷似した関節炎を、安定した表現型として自然発症するマウス系統を確立した。この SKG マウスの関節炎は生後 2 ヶ月頃からまず前肢指骨間関節に始まり、ほぼ左右対称性に前後肢大小関節に進む。慢性進行性の経過をたどり、8-12 ヶ月を過ぎれば関節硬直に到る。病理学的には、滑膜炎から、パンヌスの形成、軟骨・軟骨下骨組織の破壊に進む。間質性肺炎、唾液腺炎などの関節外病変、高力価の血清 RF、関節に特異的である II 型コラーゲンに対する自己抗体、結核菌熱ショック蛋白と反応する抗体、また B 細胞の多クローン性活性化による高ガンマグロブリン血症が高頻度にみられた。抗核抗体、抗 DNA 抗体の力価は有意ではなかった。

SKG マウスと正常マウス (C57BL/6) と交配して得た戻し交配第 1 世代 (N2 世代) を 6 ヶ月間飼育・観察し、関節炎発症マウスについてマイクロサテライトマーカー多型性を PCR で検出することにより、疾患原因遺伝子の染色体上マッピングを行なった。同時に疾患原因遺伝子以外の宿主関節炎感受性/抵抗性遺伝子についても検索した。その結果、この関節炎が単一遺伝子の異常であり、それ以外に有意な宿主関節炎感受性/抵抗性遺伝子は存在しないことを確認した。さらに、野生マウス (*Mus musculus castaneus*) との交配により原因遺伝子の位置を染色体上 1~2 cM 以内に絞り込んだ。

一方、SKG マウスの遺伝的異常について病理学的・免疫生物学的解析を行い、この異常が T 細胞系に発現され、関節抗原特異的 CD4 T 細胞を活性化すると結果を得た。また、微生物環境が関節炎発症に及ぼす影響を見るため、SKG マウスを SPF (Specific Pathogen-Free) 化したところ、関節炎発症率が有意に低下したが、SPF 環境から再び通常飼育環境に戻すと発症率はほぼ 100% となった。これらの結果は、SK

G マウスの自己免疫性関節炎の発症には遺伝子異常と環境因子が共に必要であることを意味する (換言すれば、環境因子が関節炎原因遺伝子の浸透率に有意に影響する)。この点で、このモデルはひとの RA をよく模している。

今後の重要課題は、原因遺伝子の染色体上での詳細なマッピングと、それに基づく原因遺伝子の位置クローニングである。

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

発行 平成11年3月
発行者 主任研究者 中村耕三
印刷 株式会社東大教材出版

