

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

目次

リウマチ膠原病部門

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	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	(351)
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関する研究	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	(354)
ビスフォスフォネート投与コラーゲン誘導関節炎マウスにおける骨破壊機序の解析に関する研究	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	(357)
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	岡山大学医学部整形外科 教授	井上 一	(360)
破骨細胞性骨吸収の抑制および血管新生抑制による関節炎の骨関節破壊制御に関する研究	九州大学医学部整形外科 教授	岩本 幸英	(363)
MMPの活性化調節因子に関する研究	慶應義塾大学医学部病理学 教授	岡田 保典	(366)
慢性関節リウマチの滑膜増殖と軟骨破壊予防	富山医科薬科大学整形外科 教授	木村 友厚	(368)
慢性関節リウマチナース細胞による軟骨破壊機序に関する研究	大阪大学医学部整形外科 助手	富田 哲也	(371)
AP-1スクレオチドによる慢性関節リウマチにおける骨・軟骨破壊の抑制に関する研究 -ラットコラーゲン関節炎を用いた検討-	東京慈恵会医科大学整形外科 教授	藤井 克之	(372)
慢性関節リウマチにおける滑膜増殖機構の解明と遺伝子治療による人為的制御	東京医科歯科大学第一内科 教授	宮坂 信之	(373)

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、骨関節破壊の基本病態である滑膜増殖、破骨細胞活性化、血管新生、軟骨と骨の破壊、骨髄病変、をターゲットとし、細胞周期、アポトーシス、細胞内シグナル伝達機構、基質分解酵素、一酸化窒素、核内転写因子、等の観点から検討を行い、サイクリン依存性キナーゼインヒビター遺伝子 (p16 遺伝子) の滑膜細胞への導入による関節破壊抑制、アポトーシス誘導による滑膜増殖制御、Ras-ERK 系の制御による破骨細胞と滑膜細胞の制御、ビスフォスフォネートによる破骨細胞の制御、新規血管新生阻害剤による血管新生の抑制、ペントサン硫酸による TIMP の産生促進、NO 合成酵素阻害剤による関節破壊抑制、AP-1 ヌクレオチドによる関節破壊抑制効果を明らかにし、臨床応用への道を開いた。さらに、関節破壊における骨髄病変の関与を明らかにし、今後の治療戦略の手段となる可能性を示唆する所見を得た。

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	井上一 岡山大学医学部整形外科教授
	岩本幸英 九州大学医学部整形外科教授	岡田保典 慶應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	富田哲也 大阪大学医学部整形外科助手
	藤井克之 東京慈恵会医科大学整形外科教授	宮坂信之 東京医科歯科大学第一内科教授
研究協力者	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	高橋直之 昭和大学歯学部助教授 羽生忠正 新潟大学医学部整形外科助教授

A. 研究目的

慢性関節リウマチ (RA) 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、以下の点について研究を行った。A) RA における滑膜増殖機構の解明とその制御について、A-1) サイクリン依存性キナーゼインヒビター (CDKI) 遺伝子導入による制御、A-2) アポトーシスから見た RA 滑膜増殖とその制御。B) 骨・関節破壊に機能する破骨細胞の活性化機序の解明とその抑制について、B-1) 細胞内情報伝達系制御による破骨細胞と滑膜細胞の制御、B-2) ビスフォスフォネートによる破骨細胞の制御、B-3) MMP と破骨細胞機能。C) 滑膜血管新生の抑制と骨・関節破壊の防止。D) 基質分解酵素

(MMP)、一酸化窒素 (NO) と骨・関節破壊について、D-1) MMP を介する骨・関節軟骨の細胞外マトリックス分解の機構とその制御、D-2) 一酸化窒素を介する関節軟骨破壊機序。E) 関節軟骨細胞の変化による組織破壊誘導の機序とその制御。F) 慢性関節リウマチにおける骨髄病変と骨破壊機序について、F-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、F-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。

B. 研究方法

A-1) CDKI 遺伝子である p16 遺伝子をクローニングし、アデノウイルスに組み込んだ。RA 患者より得られた滑膜細胞にこの遺伝子を導入し in

in vitro における IL-1, TNF などのサイトカイン誘導性滑膜細胞増殖を抑制できるか、in vivo において直接関節内移入によりアジュバント関節炎の滑膜増殖、軟骨・骨破壊を抑制できるかを検討した。A-2) RA 患者滑液中の可溶性 Fas (sFas) と可溶性 FasL (sFasL) の濃度を測定し、さらに各種の活性型 MMP を FasL を発現した L5178Y 細胞に添加して sFas の産生に関わる MMP について検索した。ヒト RA 滑膜組織を SCID マウスに移植したモデル (SCID-HuRA モデル) にヒト化抗 Fas モノクローナル抗体を投与し、RA 滑膜組織と軟骨を組織学的に観察した。B-1) Ras-ERK 系を負に調節するドミナントネガティブ型 Ras ウイルス (RasDN ウイルス)、および正に調節する恒常活性型 MEK1 (MEKCA ウイルス) を組み込んだアデノウイルスを作成し、これらの遺伝子の強制発現によるリウマチ滑膜線維芽細胞 (SFC) の増殖能、IL-1 による IL-6 産生能、破骨細胞のアポトーシスについて検討した。B-2) ビスフォスフォネート (YM-175) をアジュバント関節炎 (AA) 発症後に投与し、その効果を検討した。B-3) 破骨細胞で産生される主要酵素 proMMP-9 を HT1080 細胞培養液から精製し、カテプシン K による活性化の有無を検討した。C) 血管新生阻害剤 (MMP インヒビター: OPB-3206) の経口投与による rat corneal assay および bFGF 含有マトリゲルの皮下移植による新生血管侵入に対する効果を検討した。D-1) RA 滑膜細胞・関節軟骨細胞を培養し、ペントサン硫酸が MMP および TIMP の産生に及ぼす作用を検討した。D-2) RA 関節軟骨における NO 合成酵素 (iNOS) が発現を組織学的に検索した。iNOS ノックアウトマウスにコラーゲン関節炎が誘導できるか否かを検討した。マウスコラーゲン関節炎に対する、iNOS の選択的阻害剤 L-NIL の効果を検討した。E) c-fos 遺伝子の作用部位での競合的阻害を目的として、AP-1 スクレオチドをラットコラーゲン関節炎 (CIA) に投与し、関節破壊に与える影響について検討した。F-1) CIA マウスにおける骨髄での顆粒球造血亢進の有無を検索し、アミノビスフォスフォネート投与による骨破壊の有無と骨破壊機序について解析した。F-2) RA ナース細胞と B 細胞あるいは RA 骨髄単核細胞をヒト関節軟骨片上で共存培養し、軟骨破壊について検討した。

C. 研究結果

A-1) p16 遺伝子を滑膜細胞に導入することにより in vitro における IL-1, TNF などのサイトカイン誘導性滑膜細胞増殖を抑制することが可能であり、in vivo において直接関節内移入によりアジュバント関節炎の滑膜増殖、軟骨・骨破壊が抑制できた。A-2) RA 滑液中の sFas, sFasL 濃度が高値であり、滑液中の MMP-3 が sFasL 濃度と相関することから、RA では MMP-3 により shedding により Fas L から sFasL が分離産生され、その結果として滑膜増殖に対するアポトーシスが誘導されにくい状況が形成されている。ヒト化抗 Fas モノクローナル抗体滑膜炎の抑制効果はそのまま軟骨への影響が少くなることを観察した。B-1) RasDN ウイルスによる SFC の増殖抑制、IL-1 による IL-6 産生誘導の阻害、破骨細胞のアポトーシスによる細胞死の促進、MEKCA ウイルスによる SFC 増殖の促進、破骨細胞の survival の著明な延長、骨吸収能の増強の所見を得た。B-2) YM-175 が、アジュバント関節炎発症後投与でも関節炎を抑制でき、組織学的には TRAP 陽性細胞数の減少、形態の縮小を認めた。B-3) 破骨細胞で産生される proMMP-9 はカテプシン K により活性化されることが明らかになった。C) OPB-3206 経口投与は血管新生を抑制した。D-1) ペントサン硫酸による膜型 MMP 阻害活性をもつ TIMP-3 の産生亢進作用が RA 滑膜細胞のみならず関節軟骨細胞でも明らかになった。D-2) RA 関節軟骨に iNOS が発現し、その発現が TUNEL 陽性細胞の局在と一致していることを確認した。iNOS ノックアウトマウスではコラーゲン関節炎が誘導出来ないこと、マウスコラーゲン関節炎に対して、iNOS の選択的阻害剤 L-NIL 投与が関節炎を有意に抑制することが明らかになった。E) AP-1 オリゴを腹腔内に投与することによりコラーゲン関節炎の発症ならびに関節破壊が抑制された。F-1) CIA マウスにおいて骨髄での顆粒球造血亢進を確認し、このモデルでビスフォスフォネート投与による破骨細胞の関与しない、顆粒球による骨破壊が存在することを強く示唆する所見を得た。F-2) RA ナース細胞と RA 骨髄単核細胞の共存培養により著しい軟骨への侵食を生じた。

D. 考察

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、局所での分解酵素の活性化促進、軟骨細胞自身の変化による組織破壊の誘導、骨髄における顆粒球機能亢進と骨破壊、マース細胞による骨関節破壊促進などがある。これらを制御する方法としては、既知の化学物質のほか、新規の化学物質や生体内の活性因子、遺伝子による細胞周期や細胞内伝達機構の調節などがある。本年度は細胞周期をつかさどる CDKI 遺伝子導入、アポトーシスを誘導するヒト化抗 Fas モノクローナル抗体、滑膜細胞や破骨細胞の細胞内情報伝達を制御する RasDN ウイルス、ビスフォスフォネート YM-175、血管新生阻害剤 OPB-3206、TIMP 産生促進作用を有するペントサン硫酸、NO 合成酵素の選択的阻害剤 L-NIL、c-fos 遺伝子の競合的阻害作用を有する AP-1 ヌクレオチドが骨・関節破壊抑制の有望な治療手段となりうるようになった。次年度は、ヒトへの臨床応用に向けてさらに検討していく予定である。

E. 結論

RA 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。p16 遺伝子の導入により、アジュバント関節炎の滑膜増殖、軟骨・骨破壊が抑制できる。ヒト化抗 Fas モノクローナル抗体は軟骨に悪影響を及ぼさずに滑膜炎を抑制することが可能である。Ras-ERK 系を負に調節するにより、滑膜の増殖を抑制し、IL-1 による IL-6 産生誘導を阻害し、破骨細胞にアポトーシスを誘導できる。YM-175 はアジュバント関節炎を抑制できる。破骨細胞で産生される proMMP-9 はカテプシン K により活性化される。OPB-3206 経口投与は血管新生を抑制する。ペントサン硫酸は TIMP-3 の産生亢進作用を有する。iNOS の選択的阻害剤 L-NIL は関節炎を抑制する。AP-1 オリゴはコラーゲン関節炎の発症ならびに関節破壊を抑制する。CIA マウスにおいても、顆粒球による骨破壊が存在する。RA マース細胞は破骨細胞形成による骨、関節破壊にも重要な役割を果たす。本年度は動物モデルにおける RA の骨・関節破壊機序に対する種々のアプロ

ーチにより、RA 患者に対する臨床応用への足がかりを得た。

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

研究要旨

慢性関節リウマチ (RA) の骨破壊には滑膜細胞および破骨細胞の活性化が関与していることが報告されている。本研究においてわれわれはアデノウイルスベクターを用いて Ras-ERK系のシグナル伝達を調節することによってこれらの細胞の活性化を調節できることを明らかにした。炎症性サイトカインであるインターロイキン1 (IL-1) は滑膜線維芽細胞 (synovial fibroblastic cells, SFC) の ERK を速やかに活性化した。またドミナントネガティブ型 Ras (RasDN) の発現は SFC における IL-1 による ERK 活性化を抑制するとともに SFC の増殖を抑制した。また IL-1 は破骨細胞においても ERK の活性化を誘導し、その生存期間を延長すると共に骨吸収活性を促進した。一方 RasDN の発現は破骨細胞のアポトーシスを促進した。本研究より、アデノウイルスベクターを用いた Ras-ERK 系の抑制によって滑膜細胞および破骨細胞の活性化を抑制し、RA 骨破壊を抑制しうる可能性が示唆された。

A.目的 慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) は関節滑膜を病変の主座とする難治性の炎症性疾患である。病変が進行すると、軟骨、骨の著しい破壊を引き起こし、関節の機能低下を導く。このため RA は患者の ADL (activity of daily living) を障害し、その結果として QOL (quality of life) を低下させる疾患であるといえる。RA の病因には遺伝的素因、免疫異常、環境因子などが関与している可能性が指摘されているが、罹患関節において滑膜細胞の異常な増殖が見られ、滑膜細胞由来のサイトカインによって骨吸収を司る破骨細胞の活性化が引き起こされることから、滑膜細胞、及び破骨細胞の活性化が RA 骨破壊に重要な役割を果たすことが示唆されている。RA 滑膜細胞・破骨細胞活性化のメカニズムについてはこれまでも多くの研究が行われているが、その細胞内情報伝達機構の詳細は未だに明らかではない。われわれは前年度の本研究においてアデノウイルスベクターが RA 滑膜細胞、破骨細胞への遺伝子導入法としてきわめて有効であるこ

とを報告した。また Src ファミリーチロシンキナーゼが滑膜細胞、および破骨細胞の活性化に重要な役割を果たしていること、アデノウイルスベクターを用いて Src のキナーゼ活性に対して抑制的に働くチロシンキナーゼである Csk 遺伝子を滑膜細胞、破骨細胞に導入することにより、in vitro で滑膜細胞の増殖、サイトカイン産生、破骨細胞の骨吸収活性を抑制しうること、また in vivo でも関節炎モデルであるアジュバント関節炎ラットの足関節に Csk ウイルスを投与することによって関節炎症状、および骨破壊の抑制が可能であることを報告した。

古典的な MAP キナーゼ情報伝達系である Ras-Raf-MEK-ERK 系はさまざまな増殖因子、サイトカイン刺激、細胞接着などによって活性化され、細胞の増殖、活性化あるいは分化を誘導することがこれまでの研究によって明らかになっている。本年度はアデノウイルスベクターを用いて Ras-ERK 系の情報伝達を調節することによって、滑膜細胞の増殖、サイトカイン産生、および破骨細胞のアポトー

シスの抑制にこの pathway が関与していることを明らかにした。

B.方法 RA滑膜線維芽細胞 (synovial fibroblastic cells, SFC) はインフォームドコンセントの元に、手術時に採取した組織より酵素消化法によって得た。破骨細胞としては、マウス骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系において活性型ビタミンD3の存在下で得られた破骨細胞様細胞 (osteoclast-like cell, OCL) を用いた。組換えアデノウイルスベクターは東京大学医科学研究所の斎藤らの方法 (COS-TCP法) を用いて作成した。作成したアデノウイルスベクターは、Ras-ERK 伝達系を負に調節するドミナントネガティブ型 Ras ウイルス (RasDN ウイルス)、および正に調節する恒常活性型 MEK1 ウイルス (MEKCA ウイルス) である。まずこれらのウイルスによる SFC, OCL への遺伝子導入効率を、特異的な抗体を用いたウエスタンブロットによって調べた。次にこれらのウイルス感染によって実際に Ras-ERK 系の活性が変化していることを、ERK の活性を *in vitro* キナーゼアッセイ、および活性型の ERK のみを認識する抗リン酸化型によるウエスタンブロットによって検討した。これらの遺伝子の強制発現による SFC 増殖能の変化、インターロイキン6 (IL-6) 産生能の変化は細胞数のカウント、bromodeoxyuridine を用いた増殖アッセイ、ノーザンブロットを用いた IL-6 mRNA の発現の検討、ELISA を用いた細胞培養上清中に分泌された IL-6 量の測定によって調べた。破骨細胞生存率の変化は、マウス共存培養系において、破骨細胞の形成後に骨芽細胞を酵素処理によって取り除き、その後の破骨細胞の生存を TRAP 染色によって調べることによって行った。破骨細胞のアポトーシスは DNA ラダー形成、TUNEL 染色によって調べた。

C. 結果

① RasDN、および MEKCA の組換えアデノウイルスによって、SFC, OCL いずれの細胞においても効率良くそれぞれの遺伝子の導入が可能であった。
② IL-1 は非常に強力な SFC, OCL の活性化因子であるが、いずれの細胞においても IL-1 刺激によって ERK の活性化が速やかに誘導された。それと共に IL-1 は SFC における IL-6 の産生を転写レベルで促進した。また IL-1 は OCL の生存期間を著明に延長

した。

③ SFC においては RasDN の発現により細胞の増殖が抑制され、IL-1 による細胞内の ERK 活性も著明に抑制された。一方 MEKCA の発現は ERK 活性の恒常的な活性化を誘導し、細胞の増殖を促進した。また RasDN 発現により IL-1 による IL-6 転写促進効果も阻害され、培養上清中の IL-6 濃度も低下した。

④ OCL においては、RasDN の発現は OCL における ERK の活性を抑制し、アポトーシスによる細胞死を促進した。逆に MEKCA ウイルスは OCL における ERK の恒常的な活性化を誘導し、その survival を著明に促進した。

D. 考察 古典的な MAP キナーゼである ERK はさまざまな増殖因子、サイトカイン、接着刺激などで活性化されることが知られている。この中で最もよく研究されているのは Ras を介する pathway である。Ras は約 21 kD の GTP 結合蛋白であり、DTP と結合することによって活性型となる。Ras のシグナルは MAP キナーゼキナーゼの 1 つであるセリンスレオニンキナーゼ Raf に伝えられ、Raf は MEK をリン酸化することにより MEK を活性化し、MEK は ERK のチロシン・スレオニン残基をリン酸化することにより ERK を活性化する。Ras-ERK 系は細胞の増殖、分化、生存に重要な役割を果たしていることが報告されているが、われわれの今回の結果よりこの情報伝達が SFC の増殖、活性化および破骨細胞の survival に重要な役割を果たしていることが明らかになった。われわれは昨年 Csk 遺伝子の導入によって Src キナーゼを抑制することにより *in vitro*, *in vivo* で滑膜細胞、破骨細胞の活性化を抑制することができることを報告したが、これらのツールを単独、あるいは組み合わせて用いることにより、今回用いたようなウイルスベクター、あるいは特異的な阻害剤等による Ras-ERK 系情報伝達系の調節は、RA 骨関節破壊の新しい治療法になりうると考えられる。

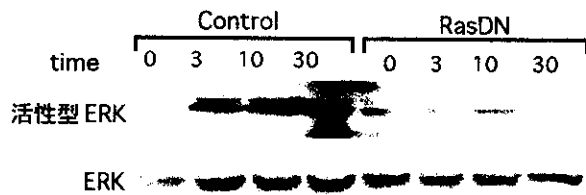


図1：ドミナントネガティブ型Rasの導入によるSFCにおけるIL-1-induced ERK activationの抑制

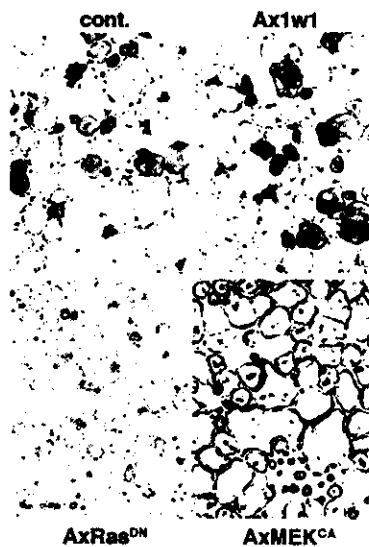
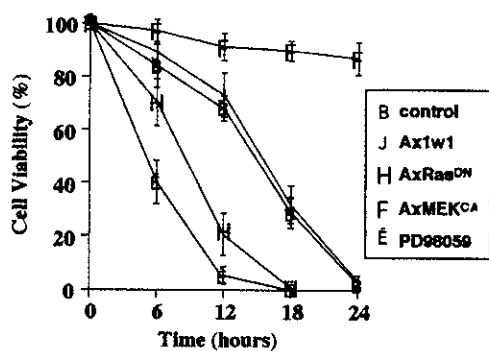


図2：Ras-ERK系の調節による破骨細胞の survival の変化。RasDNの導入は破骨細胞のアポトーシスを誘導し、MEKCAは生存期間を延長する。

文献

- 1) Miyazaki T., Katagiri H., Kanegae, Y., Takayanagi H., Sawada Y., Yamamoto A., Pando M. P., Asano T., Verma I. M., Oda H., Nakamura K., and Tanaka S, Reciprocal Role of ERK and NF- κ B pathways in survival and activation of osteoclasts. *J Cell Biol* 2000 148: 333-342.
- 2) Miyazaki T., Takayanagi H., Isshiki M., Takahashi T., Okada M., Fukui Y., Oda H., Nakamura K., Hirai H., Kurokawa T., and Tanaka S, In vitro and in vivo suppression of osteoclast function by adenovirus vector-induced csk gene. *J Bone Miner Res* 2000 15: 41-51.
- 3) Takayanagi H., Juji T., Miyazaki T., Iizuka H., Takahashi T., Isshiki M., Okada M., Tanaka Y., Koshihara Y., Oda H., Kurokawa T., Nakamura K., and Tanaka S. 1999 Suppression of arthritic bone destruction by adenovirus-mediated csk gene transfer to synoviocytes and osteoclasts. *J Clin Invest* 1999 104: 137-146.
- 4) Takayama Y., Tanaka S., Nagai K., and Okada M, Adenovirus-mediated overexpression of C-terminal Src Kinase (Csk) in type I astrocytes with cell spreading and attachment to fibronectin. A Correlation with tyrosine phosphorylation of paxillin and FAK. *J Biol Chem* 2000 274: 2291-2297.
- 5) Tanaka S., Takahashi T., Takayanagi H., Miyazaki T., Oda H., Nakamura K., Hirai H., and Kurokawa T, Modulation of osteoclast function by adenovirus-mediated epidermal growth factor receptor. *J Bone Miner Res* 1998 13: 1714-1720.

ビスフォスフォネート投与コラーゲン誘導関節炎マウスにおける骨破壊機序の解析

分担研究者 伊藤 恒敏

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

前年度までに我々は重症リウマチ性関節炎患者における骨破壊に顆粒球が深く関与する事を示した。本研究では、コラーゲン誘導関節炎モデルマウスに破骨細胞による骨破壊を特異的に抑制するアミノビスフォスフォネート (ABP) をコラーゲン感作前より投与し、その際の骨破壊の有無、また骨破壊機序について解析を行った。ABP投与群・非投与群共に骨破壊を伴う関節炎が認められ、ABP非投与群に比してABP投与群では炎症が悪化する傾向にあった。ABP非投与群では骨破壊部位に多数の破骨細胞が認められるのに対し、ABP投与群では好中球が骨表面に集積しており、その一部の細胞は rupture し、細胞内顆粒が骨周辺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。以上のことから、関節炎モデルにおいても顆粒球による骨破壊が起こりうる事が強く示唆された。

A. 研究目的

我々は昨年までの研究において、RA 腸骨骨髓では顆粒球造血亢進が起こっており、この現象が RA 病態に密接に関与していることを示した。更に、RA 腸骨海綿骨並びに好中球画分と骨との共存培養による骨の形態学的検索から、RA 腸骨海綿骨梁の骨破壊には好中球が深く関与していることを示した。一般に骨破壊は破骨細胞により生じると考えられている。そこで、本研究ではこの破骨細胞による骨破壊を特異的に抑制すると報告されているアミノビスフォスフォネート (ABP) をコラーゲン誘導関節炎モデル (CIA) に投与し、その時の骨破壊の有無と骨破壊機序について解析を行った。

B. 研究方法

動物

DBA/1 マウス (雌性 8 週齢) を使用した。

コラーゲン誘導関節炎モデルの作成

0.2% ウシ II 型コラーゲン水溶液 1 ml と等量のフロイドの完全アジュバントを混合し、50 μ l を 9 週齢マウス尾根部皮内に注射した。3 週間後、再度同液による二次感作を行い、その 1 週後より週 1 回四肢の発症程度を発赤・腫脹を基に arthritis score を用いて観察を行った。arthritis score は 0: 非発症、1: 軽度の発赤・腫脹、2: 中程度の発赤・腫脹、3: 重度の発赤・腫脹、4: ankylosis の 5 段階で評価した。

一部の関節炎マウスにはコラーゲン初期感作 1 週前より ABP (AHBuBP) を 1.6 μ mol/kg 毎週 1 回腹腔投与し、関節炎発症前より破骨細胞による骨破壊を抑

制した。

各マウスは二次感作 8 週後に屠殺し、以下の実験に使用した。

Flow Cytometry による解析

ABP投与・非投与群各マウスの脾臓並びに大腿骨骨髓から single cell suspension を作成し、TER119、或いは Gr-1, Mac-1 による二重染色後 FACSCalibur を用いて CellQuest で解析を行った。

形態学的解析

BP 投与・非投与群各マウスの膝関節部並びに足関節部を使用した。顕微鏡用には、試料を 4% paraformaldehyde で固定、10% EDTA で脱灰し、パラフィンに包埋した。切片は、Hematoxylin-Eosin 染色、あるいは酸性フォスファターゼ (ACP) 染色を行った。

電顕用には試料を 1/2 Karnovsky 液で固定、10% EDTA で脱灰後細切し、2% 四酸化オスミウムで後固定した後 EPON 812 に包埋した。

C. 結果

臨床所見

ABP投与群・非投与群共に二次感作 2 週以降炎症が悪化する傾向を呈した。観察期間中を通して arthritis score は ABP 投与群のほうが非投与群にくらべて高値を示す傾向にあった (図 1)。

Flow Cytometry による解析

ABP投与群・非投与群共に骨髓での Gr-1+Mac-1+顆粒球の増加が認められた (図 2)。更に、骨髓における TER119+赤血球前駆細胞の減少、脾臓における Gr-1+Mac-1+顆粒球の増加・TER119+赤血球前駆細胞

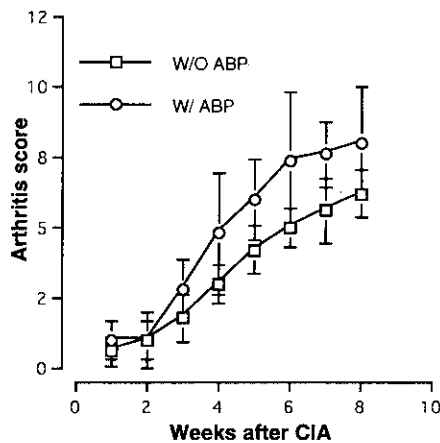


図1. ウシII型コラーゲン2次感作以降のABP投与(W/ABP)・非投与群(W/O)のArthritis score.

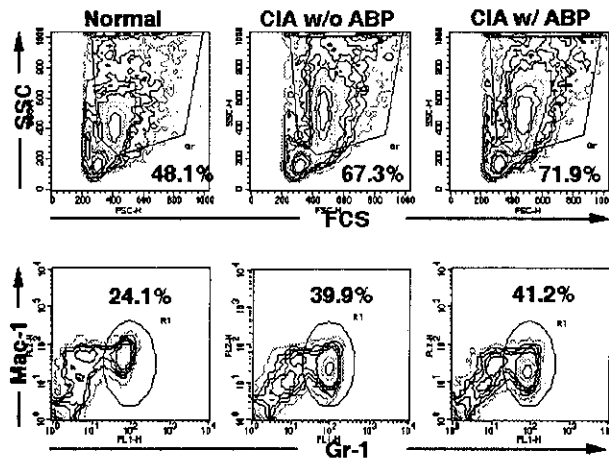


図2. ウシII型コラーゲン2次感作8週後のABP投与(W/ABP)・非投与(W/O ABP)群およびNormal (16週齢) DBA/1マウス骨髄のFACS解析像。

の増加が認められた。

形態学的解析

ABPが破骨細胞による骨吸収を抑制していることを確認するために、まず、最も破骨細胞による骨吸収が活発に行われている成長板軟骨部位の骨吸収抑制効果について検索を行った。ABP投与群では非投与群に比して明かな骨梁の残存が認められ、破骨細胞による骨吸収が抑制されていることが明かとなった(図3)。

関節炎症部位では、ABP投与群・非投与群共に炎症性細胞の滑膜・関節腔内への浸潤、パンヌス形成、関節軟骨及び骨の破壊が認められた(図4)。

次にこの骨破壊が破骨細胞によるものであるかどうかを検討するため、ACP活性の組織化学的検

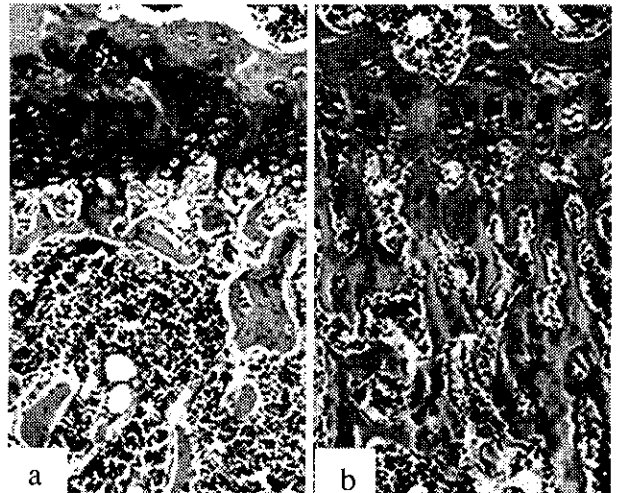


図3. ABP非投与群(a)と投与群(b)の脛骨近位成長板軟骨層のH-E染色像。ABP投与群で明らかな骨梁の残存が認められる。

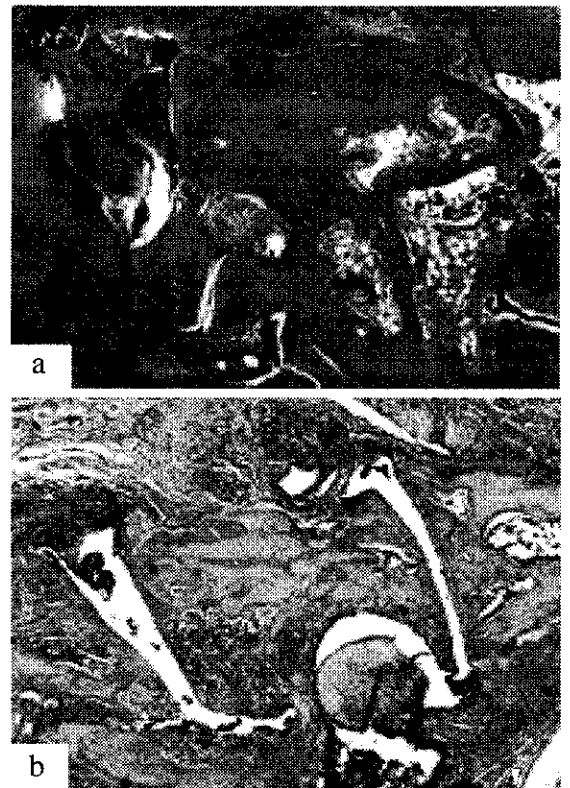


図4. ABP非投与群(a)と投与群(b)の足関節部のH-E染色像。両群ともにパンヌス形成、関節軟骨・骨の破壊が認められる。

討を行った。ABP非投与群では骨破壊部位に一致して多数のACP陽性の破骨細胞が多数認められるとともにACP陽性のcementing lineも認められ、破骨細胞による活発な骨吸収が営まれていることが明かとなった(図5a)。

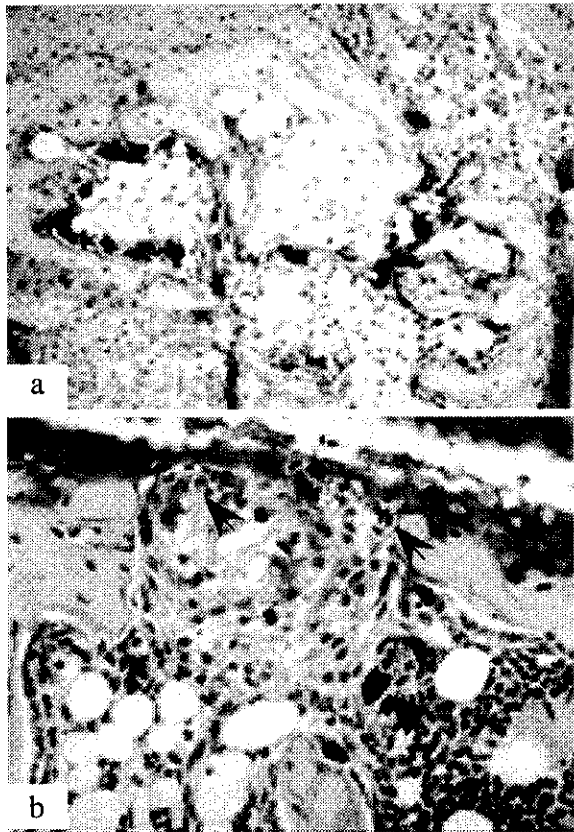


図5. ABP非投与群 (a)と投与群 (b)の足関節部位のACP染色像。(a)骨破壊部位に多数のACP陽性破骨細胞が認められる。(b)破骨細胞 (矢頭) は認められるが、骨から離れて存在する。多数の好中球が関節軟骨・骨破壊部位に認められる (矢印)。

ABP投与群では骨破壊部位付近にACP活性を有する破骨細胞は存在するものの細胞数は僅かであった。破骨細胞は骨表面より遊離して存在しており、また、ACP陽性cementing lineも認められなかった (図5b)。骨破壊部位には多数の好中球が接していた。

ABP投与群の骨破壊部位を電子顕微鏡で観察すると、光顕所見同様多数の好中球が骨破壊部位に接しており、一部の好中球は細胞膜が破裂し、細胞内顆粒が骨表面に散在している像も認められた (図6a, b)。破骨細胞は骨破壊部付近に僅かに認められるにもかかわらず、骨表面からは遊離した位置に存在し、clear zone、ruffled borderも認められなかった (図6a)。これらの結果は、破骨細胞が活発な骨破壊には関与していない事を示唆する。更に、好中球が近接する骨基質を観察すると、この部位640Åの周期構造を呈するコラーゲン線維が消失していた。

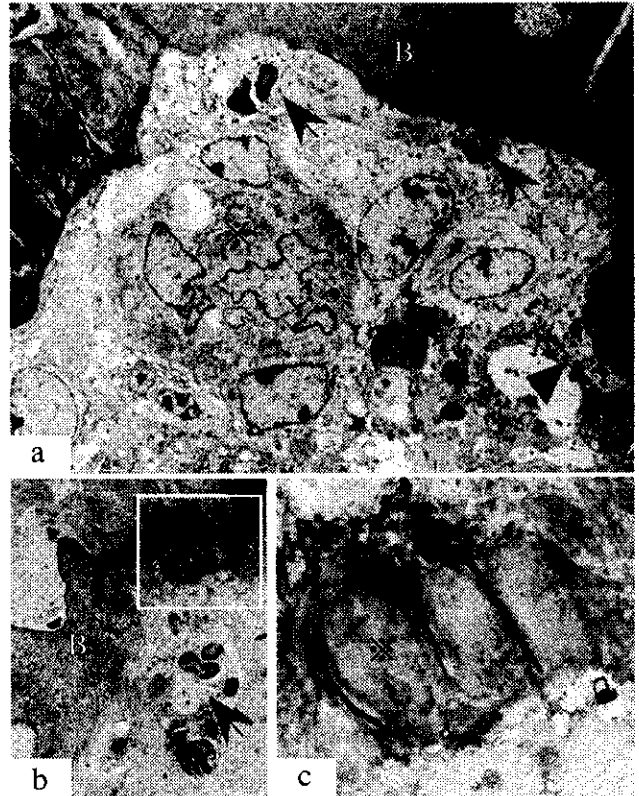


図6. ABP投与群の足関節骨破壊部位の超微形態像。

(a)骨 (B) 表面に好中球が直接接している (矢印)。多数の好中球細胞内顆粒が骨表面部位に散在している。破骨細胞 (*) は骨表面から離れており、clear zone、ruffled borderは認められない。(b)好中球 (矢印) が骨 (B) 表面に接している。(c) (b)の□で囲まれた骨基質部位の拡大像。骨基質内からコラーゲン線維が消失している (*)。

D. 考察

Flow Cytometryの結果から、重症RA患者同様CIAマウスにおいても骨髄で顆粒球造血亢進が起こっていることが確認された。また、形態学的結果から、ABP非投与群では従来の報告通り多数の破骨細胞による骨破壊像が認められるのに対し、ABP投与群では骨破壊部位に活発な骨吸収能を有する破骨細胞はなく、顆粒球が集積していた。更に、好中球細胞内顆粒の散在、骨基質内からのコラーゲン線維の消失から、重傷RA患者の場合と同様にABPを用いた関節炎モデルでも好中球による骨破壊が強く示唆された。

今回我々が示したABP投与CIAモデルは *in vivo*における好中球による骨破壊機構解析に非常に有効な方法であると考えられる。

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

分担研究者 井上 一

岡山大学医学部整形外科

研究要旨

慢性関節リウマチ (RA) の関節炎局所において、一酸化窒素 (NO) が誘導され、その反応生成物は関節滑膜、関節軟骨に強く発現していた。このことから、炎症下で発現誘導されるNO合成酵素 (iNOS) を制御することで関節炎の抑制が可能であると考え、コラーゲン誘導関節炎モデルマウスを用いたiNOS選択的阻害剤による治療効果の検討、至適用量の検討を行っている。

【A. 研究目的】

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。培養軟骨細胞を用いた研究により、軟骨細胞はIL-1, TNF- α 等のサイトカインに反応して、NOを誘導し、NO合成酵素阻害剤が*in vitro*でMMPの発現を抑制することを示してきた。また、実際にRAおよびOA患者の関節液および血清におけるNO濃度を測定すると、患者関節液および血清中NO値は共に正常人血清中のNO値に比して著しい高値を示しており、関節炎局所においてNO産生が亢進していると考えられた。さらに、近年では軟骨破壊に関するNOとアポトーシスの役割が注目されてきている。以上より、我々はRAによる多関節炎の発症・進展にNOが深く関与すると考えており、炎症下で発現誘導されるNO合成酵素 (iNOS) を制御することで関節炎の抑制が可能であると考え、検討を行っている。

【B. 研究方法】

(1) 組織学的検討

RA患者の人工関節置換術時に骨・軟骨組織を採取、固定、脱灰後パラフィン包埋、電顕用樹脂包埋した。抗iNOS抗体、抗nitrotyrosine抗体を用いた免疫染色、DNA断片化の検索に*in situ* nick end

labeling (TUNEL) 法を、アポトーシスの検索に透過型電子顕微鏡 (Hitachi H7100) を用いた。

(2) コラーゲン誘導関節炎 (CIA) マウスの作成: Chondrex社製モノクローナル抗体カクテル (mAbs) を用いた。DBA/1マウスにmAbs 2mg/kg (i.v.)後24時間でlipopolysaccharide (LPS) を腹腔内投与(i.p.)すると、さらに48時間後には全例に重篤な関節炎が惹起された。一方、コラーゲン関節炎抵抗性とされるC57Bl/6マウスでは、使用するmAbs量を2倍とし、さらにLPSを追加することで、全例に関節炎を惹起した。

(3) iNOSノックアウト (KO) マウスへの関節炎の誘導: iNOSが完全に抑制された場合の関節炎抑制効果を調べるため、BackgroundであるC57Bl/6に同様のプロトコール、およびmAbs量をさらに2倍 (8mg/kg) 投与することでCIA誘導を試みた。関節破壊の程度は H.E. および Safranin O 染色で、NOの関与はnitrotyrosineに対する免疫染色で、軟骨細胞のDNA断片化はTUNEL法で、軟骨破壊のマーカーとしてMMP-3, 9の局在を調べた。さらに血清中のIL-1 β 濃度はELISAにより測定、比較検討した。

(4) CIAマウスへの選択的iNOS阻害剤投与と効果: DBA/1マウスに発症せしめたCIAに対し、iNOSの選択的阻害剤であるL-NIL(30mg/kg/day, i.p.)を連日投与して、関節炎スコアを観察後、同様の組織学的検討を行った。

【C. 結果】

(1) ヒトRA滑膜・軟骨の組織学的検討：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る他、早期～進行期RA軟骨の表層付近で増殖した軟骨細胞および深層の肥大軟骨細胞に強い陽性像が認められた。さらにin situ hybridization法によるiNOS mRNA発現の検討でも同様の部位の軟骨細胞が陽性であった。早期～進行期RA軟骨の観察では、特に表層付近の増殖した軟骨細胞やクラスター形成した軟骨細胞の一部に、TUNEL陽性細胞が多く見いだされ、さらにその局在はiNOSを発現している軟骨細胞の局在と一致していた。また、nitrotyrosine生成も同様の部位に認められた。

(2) C57Bl/6 iNOS ノックアウトマウスでは、mAbs 4 mg/kgの投与量では関節炎を誘導することはできなかったが、mAbs 8 mg/kgで重篤な関節炎が発症した。一方、組織学的には軟骨破壊は著明に抑制されており、TUNEL陽性細胞、MMP-9陽性細胞出現率も有為に抑制されていた。他方、血清中IL-1 β 濃度には有意差を認めなかった。

(3) L-NIL 30 mg/kg/day 投与により、臨床的関節炎スコアは有為に抑制されたが、さらに関節腫脹、発赤といった炎症症状を完全に抑制することはできなかった。組織学的には軟骨破壊、nitrotyrosineの発現は抑制されていた。

【D. 考察】

ヒトRA滑膜・軟骨組織の検討により、in vivoでNOの発現が亢進していることが示され、RA関節炎抑制のターゲットの一つであることが示唆された。一方でNOは生体恒常性維持にも深く関与しており、合成酵素の非選択的抑制は中枢神経系、心血管系に重篤な副作用をもたらす危険性がある。炎症時にのみ誘導されるiNOSの選択的完全抑制効果は、そのKOマウスを用いたCIA誘導モデルの結果が示すように、臨床的関節炎症状を完全に抑制するものではなかったが、血清中IL-1 β に正のフィードバックをかけるものでもなく、むしろ関節軟骨破壊には抑制的に作用していた。さらにL-NILによる治療実験結果も、NOは軟骨細胞のII型コラー

ゲン、プロテオグリカン産生の抑制、細胞内シグナル伝達阻害や、MMPの活性化、軟骨細胞死を惹起して、軟骨破壊に関与していることを示唆するものとする。今後至適用量設定、投与経路、タイミングと期間についてさらに検討を行うとともに、iNOS活性、NO産生に与える影響について詳細な解析が必要であるとともに、臨床症状軽減のためのCOX-2選択的阻害剤の併用療法の検討も必要になってくると思われる。

【E. 結論】

選択的NO合成酵素阻害剤はRAの特に関節軟骨破壊を抑制できる新治療法となり得る可能性があると考えられた。

【F. 研究発表】

(1) 論文発表

1. 井上 一、西田圭一郎、土井 武、松尾真嗣、吉田 晶：軟骨変性と滑膜炎への対応。臨整外、Vol. 35, No.3: 125-132, 2000.
2. Nishida K, Doi T, Matsuo M, Shibahara M, Yoshida A, Inoue H. Involvement of nitric oxide-induced apoptosis of chondrocytes in chondro-osteophyte formation. Osteoarthritis Cartilage (accepted)
3. Nishida K, Doi T, Inoue H. The role of nitric oxide in arthritic joint - a therapeutic target? Review. Modern Rheumatol 2000; 1(2):(in press)

(2) 学会発表

1. 第72回日本整形外科学会シンポジウム
井上 一、西田圭一郎：軟骨変性と滑膜炎の対応。日整会誌 1999;72(2):S3.
2. 第72回日本整形外科学会シンポジウム
西田圭一郎、井上 一：関節炎における軟骨変性とNO。日整会誌1999;72(2): S295.
3. 第43回リウマチ学会総会・学術集會国際シンポジウム
K.Nishida, H.Inoue.

Chondrocyte apoptosis in osteoarthritis.

The RYUMACHI 1999;39(2):229.

4. 第13回日本軟骨代謝学会国際シンポジウム

K.Nishida, T.Doi, M.Matsuo, N.Shiota,

A.Toshida, H.Inoue.

The role of chondrocyte apoptosis in

chondro-osteophyte. 第13回日本軟骨代謝学

会プログラム・抄録集 2000:p14.

5. 4th World Congress of the OsteoArthritis

Research Society International; Workshop.

H.Inoue, K.Nishida, M.Matsuo, T.Doi,

H.Kato, N.Shiota, A.Yoshida.

Nitric oxide production and chondrocyte
apoptosis in human osteoarthritic cartilage.

破骨細胞性骨吸収の抑制および血管新生抑制による関節炎の骨関節破壊制御

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

これまでに我々は、破骨細胞による骨吸収を阻害することにより慢性関節リウマチ (RA) の骨関節破壊を制御できる可能性を示してきた。今回は、さらにアジュバント関節炎 (AA) 発症後にビスフォスフォネートのひとつである YM175 を投与したところ、関節点数、paw volume、X線学的、組織学的な骨関節破壊がいずれも抑制されることを明らかにした。また、RA のパンヌスの形成には血管新生が不可欠であるが、昨年我々は、新規血管新生阻害剤として開発された MMP インヒビターである OPB-3206 の全身投与によっても AA の骨関節破壊を防止できることを報告した。今回は、bFGF による in vivo での血管新生が、rat corneal assay および Matrigel assay のいずれにおいても、OPB-3206 の経口投与により抑制されることを示した。以上より、破骨細胞の分化や機能を制御するほかに、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。そこで、さらに新しい治療法の標的の候補として、破骨細胞による骨吸収および滑膜における血管新生の両者に共通する情報伝達物質として、vascular endothelial growth factor (VEGF) に注目した。RA 滑膜および AA 関節組織において VEGF レセプタータイプ I (flt-1) が、破骨細胞と血管内皮細胞に発現しており、これらが新しい治療法の標的になりうると考えられた。

A. 研究目的

これまでに我々は、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、この細胞を象牙切片上で培養した際に形成される吸収窩はビスフォスフォネート (BP) 処理により完全に抑制されること、さらに、アジュバント関節炎 (AA) における骨関節破壊も、BP の前投与により防止できることなどを示し、破骨細胞による骨吸収を阻害することにより RA の骨関節破壊を制御できる可能性を示してきた。そこで今回は、より臨床的状况を考慮し、AA の関節炎発症後に、第3世代のBPのひとつである YM175 (incadronate) を毎日あるいは週1回投与し、骨関節破壊を抑制できるか否か検討した (実験1)。

また、昨年我々は、新規血管新生阻害剤として開発された MMP インヒビターである OPB-3206 の全身投与により AA の骨関節破壊を防止できることを報告したが、今回は、強力な血管新生作用を有し、RA 滑膜で増加していることが知られている bFGF による in vivo での血管新生に及ぼす OPB-3206 の抑制効果を検討した (実験2)。

さらに新しい治療法の標的の候補をさぐる目的で、破骨細胞による骨吸収および滑膜における血管新生の両者に共通する情報伝達物質として、vascular endothelial growth factor (VEGF) に注目した。VEGF は RA の疾患活動性に相関して血中および関節液中に増加し、bFGF などとともに RA における血管新生に強く関与していると考えられてきた。また、VEGF は血管新生促進作用のみならず、破骨細胞の形成や生存にも関与することが、ごく最近報告された。今回は RA 滑膜および AA 関節周囲組織における VEGF レセプター (flt-1, flk-1) の発現と局在について検討し、これが新しい治療法の標的になりうるか否か検討した (実験3)。

B. 研究方法

(実験1) YM-175 を AA の関節炎発症後に連日あるいは週1回皮下投与し、四肢関節の腫脹を関節点数、paw volume で、関節破壊の程度は、足関節周辺を、X線および組織学的に (HE および TRAP 染色) 評価した。

(実験2) bFGF 含有ベレットのラット角膜内移植による血管新生 (rat corneal

assay)および bFGF 含有マトリゲルの皮下移植によるマトリゲル内への新生血管侵入(Matrigel assay)に対する、OPB-3206 経口投与の効果を検討した。

(実験3) VEGF レセプターの局在の検討としてタイプ I レセプター (flt-1) およびタイプ II レセプター (flk-1)の抗体を用いて、RA 滑膜あるいは AA ラットの関節周囲組織の免疫染色を行った。

C. 研究結果

(実験1)

AA 発症後に YM175 を毎日投与した場合も、関節点数、paw volume は YM175 の濃度依存的に抑制された。X線学的、組織学的な骨関節破壊も有意に抑制され、0.1~1mg/kg の YM175 は、強力に骨関節破壊を抑制した。組織学的には、YM175 投与群で TRAP 陽性細胞数の減少や TRAP 陽性多核細胞の形態の縮小、核の濃縮などが認められ、アポトーシス様形態変化と考えられた。AA 発症後に YM175 を毎週1回づつ投与した場合も、0.1~1mg/kg の YM175 は、濃度依存的に骨関節破壊を有意に抑制したが、その程度は毎日投与に比較すると弱かった。

(実験2)

Rat corneal assay では、bFGF 含有ペレットのラット角膜内移植により、周囲より侵入してきた新生血管が透見されるが、OPB-3206 の経口投与により、in vivo での血管新生が抑制された。また別の in vivo での血管新生の評価系として、Matrigel assay においても、bFGF 含有マトリゲルの皮下移植によるマトリゲル内への新生血管侵入が OPB-3206 の経口投与により有意に抑制された。

(実験3)

タイプ I VEGF レセプターである flt-1 は RA 滑膜の血管内皮細胞および破骨細胞と思われる TRAP 陽性多核細胞に発現されていた。また、AA の関節周囲組織においても、flt-1 は血管内皮細胞のほか、吸収窩を形成している破骨細胞に強く発現されていた。タイプ II VEGF レセプターである flk-1 は血管内皮細胞に発現されていた

が、破骨細胞と思われる TRAP 陽性多核細胞には発現されていなかった。

D. 考察

今回は、AA 発症後に、YM-175 を毎日投与しても、関節炎および骨関節破壊が著明に抑制されることを確認した。さらに、YM-175 を週1回投与した場合も関節炎および骨関節破壊が抑制された。ただし、YM-175 の週1回投与による抑制効果は、毎日投与に比較するとやや劣っており、YM-175 を週1回投与する場合の至適投与量についてさらに検討中である。

BP は高カルシウム血症や骨粗鬆症の治療薬として既に臨床の場で用いられておりその安全性も確立されているが、近年、悪性腫瘍の骨転移部位における骨破壊に対し進行防止効果があることが報告されてきている。骨転移部位における骨破壊には破骨細胞が強く関与していることや、腫瘍の発育には血管新生が必須であるなど、悪性腫瘍の骨転移巣における骨破壊と RA における骨破壊の機序には共通点が多い。そこで RA の骨破壊に対しても BP が有効である可能性が十分考えられる。これまでも RA 患者の骨吸収マーカーに対する BP 投与の影響などが検討され、短期間の抑制効果は既に報告されている。BP の RA の骨破壊に対する抑制効果が明らかになれば、現実的な臨床応用への最短距離であり、意義が大きいといえる。

一方、われわれはこれまでに、破骨細胞による骨吸収を制御するほかに、パル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を示してきた。血管新生は、腫瘍の発育に必須の現象であるが、RA 滑膜の増殖にも必須のプロセスであり、RA が、いわゆる"angiogenic disease"のひとつに分類される所以である。血管新生とは、RA をはじめとする炎症などの際に、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、その際血管内皮細胞は内皮細胞下の基底膜を MMP などの酵素を用いて分解し、遊走、増殖、新しい管腔形成というプロセスをたどる。

つまり、血管新生には基底膜破壊が必須であり、MMP インヒビターによりこのプロセスを阻害することにより、血管新生が抑制される。我々は、AA モデルを用いて、MMP インヒビターである OPB-3206 が、パンヌス形成を抑制し、骨関節破壊も抑制することを昨年報告した。今回は、強力な血管新生作用を有し、RA 滑膜で増加していることが知られている bFGF による *in vivo* での血管新生に対しても、OPB-3206 が強力な抑制効果を有することを示した。

血管新生は一般に多くの因子により制御されているが、なかでも、VEGF は、RA における血管新生に強く関与していると考えられている。さらに、VEGF は RA の疾患活動性に相関して、血中および関節液中に増加することも報告されている。我々は、VEGF のタイプ I レセプターである *flt-1* が RA 滑膜の血管内皮細胞および破骨細胞に発現されていることを見いだした。VEGF は血管新生作用のみならず、破骨細胞の形成や生存にも関与していることがごく最近報告され、この *flt-1* を介した VEGF の情報伝達の経路をブロックすることは、血管新生を抑制するのみならず、骨破壊において中心的な役割をしていると考えられる破骨細胞による骨吸収も同時にブロックできる可能性があり、RA の滑膜増殖および骨関節破壊防止につながる可能性があると考えられる。破骨細胞による骨吸収および滑膜における血管新生の両者に共通する情報伝達経路をブロックすることにより、骨関節破壊に重要な役割をしていると考えられるパンヌス形成と破骨細胞による骨吸収をとともに制御するという戦略が考えられる。

RA の主な病態は関節の慢性炎症とそれに続く骨関節の破壊である。骨関節の破壊は RA 患者の日常生活に多大な障害をもたらしている。現存する薬物療法は RA に伴う免疫反応や炎症反応の抑制を主目的としたものであるが、関節破壊を直接抑制する治

療薬はまだ臨床応用されていないのが現状であるがその開発は急務である。RA の骨関節破壊における血管新生および破骨細胞による骨吸収の調節のメカニズムを明らかにし、これを抑制する新しい薬物治療を開発することが本研究の目的であるが、このような新規に開発される薬剤には、重篤な副作用がないか、あるいはきわめて少ないことが不可欠である。ビスフォスフォネートは、骨組織に非常に親和性が強く、投与すみやかに骨組織に吸着され、残りは短時間で尿中に排泄されるため、副作用がきわめて少ないことが、既に臨床的に確認されている。また、血管新生は胎生期の器官形成に生理的に関与するほかは、腫瘍の増殖や、炎症などにおいて観察される現象であるため、血管新生の抑制を狙った治療も、重篤な副作用を伴わないことが推測される。

E. 結論

(1) AA 発症後に YM175 を投与しても、関節点数、paw volume、X線学的、組織学的な骨関節破壊がいずれも抑制された。

(2) bFGF による *in vivo* での血管新生は、rat corneal assay および Matrigel assay のいずれにおいても、血管新生阻害剤 OPB-3206 の経口投与により抑制された。

(3) VEGF のタイプ I レセプターである *flt-1* が RA 滑膜の血管内皮細胞および破骨細胞に発現されていた。

F. 研究発表

1. Zhao H, Shuto T, Hirata G, Iwamoto Y. Aminobisphosphonate (YM-175) inhibits bone destruction in rat adjuvant arthritis. *J Orthop Sci*, In press

2. Shono T, Yoshida S, Motoyama M, Tatsumi K, Ulbrich N, Iwamoto Y, Kuwano M, Ono M. A new synthetic matrix metalloproteinase inhibitor modulates both angiogenesis and urokinase type plasminogen activator activity. *Angiogenesis* 2: 319-329 1999

MMPの活性化調節因子に関する研究

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、慢性関節リウマチ(RA)関節滑膜細胞と関節軟骨細胞でのペントサン硫酸によるTIMP-3産生亢進作用機構を検討するとともに、カテプシンKによるproMMP-9活性化について調べた。その結果、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滑膜細胞と関節軟骨細胞での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。このことは、ペントサン硫酸がTIMP-3産生亢進によりRA関節軟骨破壊抑制剤として有望であることを示唆している。また、カテプシンKはproMMP-9を短時間で活性化することから、破骨細胞において両酵素が相互作用することで効率的な骨吸収に作用する可能性を示した。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ(RA)において組織破壊のターゲットになるのは関節軟骨と骨である。これら組織の破壊に細胞外マトリックスの分解は必須であり、マトリックスの分解亢進は組織構成細胞死を誘導し、進行性の組織破壊を引き起こす。関節軟骨細胞外マトリックスの分解は、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分解、滑膜やパニヌス組織の接触・浸食による破壊に分けて考えることが可能である。これまでの我々の研究から、多種類のマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)がこれら3つのルートを経てRAの関節軟骨破壊に関与することが明らかとなってきた。組織で発現されたMMPの活性は、潜在型MMP(proMMP)の活性化とインヒビターであるtissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)によって厳密に制御されている。RA関節滑膜ではproMMP-2は膜型MMP(MT-MMP)の1分子であるMT1-MMPにより活性化される。昨年度の本研究により、RA滑膜細胞においてペントサン硫酸がTIMP-3産生を特異的に亢進することを明らかにしたが、詳しい調節機構については不明である。また、関節軟骨細胞に対するペントサン硫酸の作用についても明らかになっていない。一方、RA関節においては、破骨細胞性の骨吸収亢進により骨破壊が進行し、骨の細胞外マトリックス分解にMMP-9とカテプシンKが作用すると考えられている。しかし、proMMP-9の活性化に関する情報は少ない。本研究では、ペントサン硫酸によるRA滑膜細胞のTIMP-3産生亢進作用機構を検討するとともに、関節軟骨細胞でのペントサン硫酸の作用について調べた。また、カテプシンKによるproMMP-9活性化の有無について検討した。

B. 研究方法

1). RA滑膜細胞におけるペントサン硫酸刺激によるMMPとTIMP産生作用 : Interleukin-1 α (IL-1 α ,

100U/ml)刺激・非刺激下の培養RA滑膜細胞を、ペントサン硫酸(0, 0.1, 1, 10 μ g/ml)含有無血清培地で5日間培養した。その培養液につき、MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 13, TIMP-1, 2産生量をサンドイッチイムノアッセイ法により測定した。また、TIMP-1, 2, 3, 4については、イムノブロット法によってもこれらの産生量を検討した。さらに、IL-1 α 刺激・非刺激下において、RA滑膜細胞をペントサン硫酸(10 μ g/ml)で刺激し、[³⁵S]-methionineで6時間ラベルした蛋白を抗TIMP-3抗体を用いて免疫沈降し、pulse-chase実験を行った。TIMP-3 mRNA発現を検討するために、細胞をIL-1 α 存在・非存在下においてペントサン硫酸(0, 0.1, 1, 10 μ 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検討した。

2). 関節軟骨細胞でのペントサン硫酸のTIMP-3産生作用 : 培養関節軟骨細胞をIL-1 α 存在・非存在下において、ペントサン硫酸(0, 0.1, 1, 10 μ g/ml)含有無血清培地で5日間培養し、TIMP-3産生刺激の有無をイムノブロット法で検討した。

3). ProMMP-9のカテプシンKによる活性化 : ProMMP-9をHT1080細胞培養液から精製し、精製したリコンビナントのカテプシンKと1:1-5 (モル比)、pH 5.5で10分~24時間インキュベートし、カテプシンKの活性をE64でブロック後、MMP-9酵素活性を合成基質を用いたアッセイとゼラチンゼイモグラフィーで検出した。

C. 研究結果

1). RA滑膜細胞におけるペントサン硫酸によるTIMP-3産生亢進機構 : RA滑膜細胞によるTIMP-3産生は、IL-1 α 刺激・非存在下において、いずれもペントサン硫酸の濃度依存的に増加した。この際、MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 13, TIMP-1, 2産生量に全く変化がみられないことから、ペントサン硫酸の作用はTIMP-3に特異的であった。TIMP-3のmRNAレベルはIL-1 α 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。一方、IL-1 α 刺激・非刺激下において、RA滑膜細胞をペントサン硫酸(10 μ g/ml)で刺激し、TIMP-3蛋白をpulse-chaseしたところ、ペントサン硫酸はTIMP-3蛋白の産生を亢進しており、細胞内での分解や細胞外への分泌に対しては作用しないことが明らかとなった。

2).関節軟骨細胞でのペントサン硫酸によるTIMP-3産生：培養関節軟骨細胞をIL-1 α 存在・非存在下でペントサン硫酸(0, 0.1, 1, 10 μ g/ml)で刺激したところ、TIMP-3産生刺激はペントサン硫酸濃度依存性に認められた。

3).ProMMP-9のカテプシンKによる活性化：精製したproMMP-9をリコンビナントカテプシンKとpH5.5で10分～24時間インキュベートしたところ、proMMP-9はカテプシンK(モル比 1:2.5)により10～20分以内で最高値に活性化され、分子量は92 kDaから83 kDaと67 kDaに低分子化した。

D. 考察

本研究は、RA滑膜細胞におけるペントサン硫酸によるTIMP-3産生亢進作用がTIMP-3に特異的であることを示した。また、このようなペントサン硫酸によるTIMP-3産生亢進は関節軟骨でも実証された。これらのことから、生体に投与されたペントサン硫酸は関節内へ到達すると関節滑膜細胞と軟骨細胞でのTIMP-3産生を亢進し、MMP活性の阻害により関節軟骨破壊抑制に働くことと推定される。ペントサン硫酸によるTIMP-3産生亢進にはmRNA発現レベルの変化がみられず、pulse-chase実験では細胞内でのTIMP-3合成亢進があり、細胞内での分解や細胞外への分泌に変化がないことから、ペントサン硫酸の作用は転写後調節機構によると考えられる。ペントサン硫酸は、現在欧米においてRAや変形性関節症患者の臨床治験に入っており、将来的にこれら疾患の関節破壊抑制治療薬としての可能性が期待される。

ProMMP-9の活性化については、セリンプロテアーゼであるトリプシンやカテプシンGが活性化することを我々は報告してきた。しかし、これらの酵素は破骨細胞には発現されず、破骨細胞でのproMMP-9活性化に関わる可能性はないと考えられる。それに対して、カテプシンKはMMP-9と並んで破骨細胞で産生される主要酵素である。今回我々が示したproMMP-9のカテプシンKによる活性化は、酸性条件下にある骨吸収窩でのproMMP-9活性化機構として重要であると推定される。現在、骨巨細胞種やRA骨においてカテプシンK阻害剤によりproMMP-9活性化が阻止されるかについて検討を進めている。

E. 結論

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滑膜細胞と関節軟骨細胞でのTIMP-3産生を転写後のレベルで特異的に亢進することを実証した。TIMP-3はRAの滑膜細胞や軟骨細胞で発現され、細胞外マトリックス成分に沈着することから、ペントサン硫酸をRA関節破壊抑制剤として将来導入できる可能性があると考えられる。破骨細胞による骨吸収にカテプシンKとMMP-9が関与することはこれまでの多くの研究から明らかにされている。本研究は、カテプシンKがproMMP-9活性化を通して両酵素が相互作用することを明らかにした。

F. 論文発表

- (1). 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.
- (2). Shimada T., Nakamura H., Ohuchi E., Fujii Y., Murakami Y., Sato H., Seiki M. and Okada Y.: Characterization of a truncated recombinant form of human membrane type 3 matrix metalloproteinase. Eur. J. Biochem. 262:907-914, 1999.
- (3). Harayama T., Ohuchi E., Aoki T., Sato H., Seiki M. and Okada Y.: Shedding of membrane type matrix metalloproteinase in a human breast carcinoma cell line. Jpn. J. Cancer Res. 90:942-950, 1999.
- (6). Okada Y.: Immunohistochemistry of MMPs and TIMPs. In: Methods in Biology-Matrix Metalloproteinase Protocols. Ed. by I Clark. Human Press Inc., Totowa, USA. 2000, in press.
- (7). Okada Y.: Proteinases and matrix degradation. In Textbook of Rheumatology. Ed. by Kelley W. N., Harris E. D., Jr., Ruddy S. and Sledge C. B. 6th edition, W. B. Saunders Company. Philadelphia, pp, 2000, in press.
- (8). Takizawa M., Ohuchi E., Yamanaka H., Nakamura H., Ikeda E., Ghosh P. and Okada Y.: Production of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 is selectively enhanced by calcium pentosan polysulfate in human rheumatoid synovial fibroblasts. Arthritis Rheum. 2000, in press.
- (9). Ikeda M., Hosoda Y., Hirose S., Okada Y. and Ikeda E.: Expression of vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors Flt-1, KDR and neuropilin-1 in synovial tissues of rheumatoid arthritis. J Pathol. 2000, in press.
- (10). Yoshihara Y., Nakamura H., Obata K., Yamada H., Hayakawa T., Fujikawa K. and Okada Y.: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. Ann. Rheum. Dis. 2000, in press.
- (11). Yamanaka H., Makino K., Takizawa M., Nakamura H., Fujimoto N., Moriya H., Nemori R., Sato H., Seiki M. and Okada Y.: Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2 and 3 matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. Lab. Invest. 2000, in press.
- (12). Okada Y.: Matrix-degrading metalloproteinases and their roles in joint destruction. Mod. Rheumatol. 2000, in press.

慢性関節リウマチの滑膜増殖抑制と軟骨破壊予防

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、片山理恵

所属機関：富山医科薬科大学整形外科

研究要旨

慢性関節リウマチ (RA) の滑膜の異常増殖とアポトーシス不全にかかわる要因の一つとして、Fas / Fas ligand 系に関連してそれらの可溶性の関節液中の存在と、可溶性の産生に働く MMP を解析した。さらに新たなヒト化抗 Fas モノクローナル抗体を用いて、RA 滑膜に対するアポトーシス誘導を試みた。これには RA 患者の骨・軟骨・滑膜組織を一塊として SCID マウスに移植したモデル動物を用い、その結果、抗 Fas 抗体によるアポトーシス誘導によって滑膜には著明な退縮が起こることを確認した。このことからヒト RA の滑膜増殖には Fas / FasL 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、ひいては関節破壊の抑制につながる可能性があることを確認した。さらにこのヒト化抗 Fas 抗体が関節軟骨などの他の組織にはアポトーシスを誘導せず、実際に臨床応用できる可能性が考えられた。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ (以下 RA) における骨・軟骨破壊には、増殖した滑膜に由来する滑液中の種々の炎症性サイトカインやプロテアーゼが関与する一方で、増殖滑膜による骨・軟骨への直接の侵食も破壊にかかわっている。この滑膜では、異常増殖とともにアポトーシスの不全状態があると思われ、そこではアポトーシス誘導を阻害する何らかのメカニズムが存在していることが考えられる。

われわれは RA 滑膜に浸潤したリンパ球ではテロメラーゼ活性が高く、ことに Th1 タイプのリンパ球では細胞寿命の延長が考えられ、これが滑膜増殖にも大きくかかわっている可能性を示してきた。そこで、もしこれらのリンパ球や 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重要な治療法として期待できる。さらには軟骨・骨破壊そのものも抑制できる可能性も考えられる。本研究では、まず

RA 関節に存在するアポトーシス不全状態のメカニズムの一端を、Fas ligand (Fas L) の可溶化の観点から解析した。さらに松野らが開発した 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 滑膜組織に対するアポトーシス導入治療の可能性を解析した。すでに昨年度までに抗 Fas 抗体治療の持つ大きな有効性について報告しているが、従来の抗体では滑膜アポトーシスが誘導される一方で、同時に関節軟骨変性をも進行させてしまう危険性があった。今回、新たに開発されたヒト化抗 Fas モノクローナル抗体を用い、この抗体治療による滑膜増殖抑制と軟骨への影響を検討した。

B. 研究方法

1) 滑膜のアポトーシス抑制機構 としての可溶性 Fas と FasL の役割。