

厚生科学研究研究費補助金
感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業

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

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中村 耕三

平成13（2001）年3月

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医科学専攻細胞生物学講座発生生物学分野 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 大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学 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 東京医科歯科大学大学院生体応答調節学、膠原病・リウマチ内科 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

目次

1	総括研究報告書	
	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 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	1
	主任研究報告	
	T細胞による破骨細胞分化制御と関節炎性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	4
2	分担研究報告	
(1)	好中球によるリウマチ性関節炎骨破壊の抑制機構の解析 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	8
(2)	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	11
(3)	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 九州大学医学部整形外科 教授 岩本幸英	14
(4)	軟骨におけるADAMTSの発現とADAMTS 4 (aggrecanase-1)のTIMPによる阻害 慶應義塾大学医学部病理学 教授 岡田保典	18
(5)	滑膜血管新生抑制による関節破壊制御に関する研究 富山医科薬科大学整形外科 教授 木村友厚	21
(6)	P21遺伝子導入による慢性関節リウマチ滑膜増殖の制御および関節破壊抑制効果の検討 大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学 助手 富田哲也	23
(7)	AP-1ヌ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	25
(8)	CDKI 遺伝子を用いた関節炎の遺伝子治療に関する研究 東京医科歯科大学大学院生体応答調節学、膠原病・リウマチ内科 教授 宮坂信之	27
3	研究協力報告	
(1)	軟骨細胞でのNF- κ B活性化抑制 —軟骨細胞代謝の特異性— 名古屋大学医学部整形外科 教授 岩田 久	29
(2)	慢性関節リウマチおよび変形性関節症患者におけるcartilage intermediate layer protein (CILP) に対する免疫応答に関する研究 聖マリアンナ医科大学・難病治療研究センター 助教授 加藤智啓	31

(3)	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 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	33
(4)	破骨細胞の機能を調節するリポ多糖(LPS)の作用に関する研究 昭和大学歯学部 助教授 高橋直之	34
(5)	関節周辺部および腸骨における骨芽細胞・破骨細胞機能の定量的解析に関する研究 新潟大学医学部整形外科 助教授 羽生忠正	37
4	研究成果の刊行に関する一覧	39
5	研究成果の刊行物・別刷	49

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、好中球による骨破壊をターゲットとし、細胞周期、アポトーシス、細胞間相互作用、細胞内シグナル伝達系、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った。その結果、サイクリン依存性キナーゼインヒビター遺伝子（p21 遺伝子）の滑膜細胞への導入による関節破壊抑制、T 細胞による破骨細胞分化制御と関節炎性骨破壊抑制、ビスフォスフォネートによる破骨細胞の制御、血管新生抑制による関節破壊抑制、AP-1 スクレオチドによる関節破壊抑制、NO 合成酵素阻害による関節破壊抑制、MMP インヒビターを用いた関節破壊抑制、好中球による関節炎性骨破壊の抑制について、臨床応用への道を開く成果を得た。

分担研究者	伊藤恒敏	東北大学大学院医学系研究科 細胞生物学講座発生生物学分野 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	大阪大学大学院医学系研究科 器官制御外科学助手
	藤井克之	東京慈恵会医科大学整形外科教授	宮坂信之	東京医科歯科大学大学院生体 応答調節学、膠原病・リウマチ 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制御について、A-1) アデノウイルスベクターを用いた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) HVJ-リボゾーム法を用いた CDKI 遺伝子導入による効果。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) T 細胞による破骨細胞分化制御機構の解明と破骨細胞分化抑制による関節

破壊抑制、B-2) ビスフォスフォネートによる破骨細胞の制御。C) 滑膜血管新生の抑制による骨・関節破壊の防止について、C-1) 強力な血管新生抑制物質であるエンドスタチンが関節破壊抑制に及ぼす効果、C-2) 血管新生を促進する VEGF 破骨細胞前駆細胞に及ぼす効果。D) 軟骨と骨の破壊について、D-1) AP-1 オリゴヌクレオチドによるコラーゲン関節炎の骨・軟骨破壊抑制、D-2) 軟骨細胞にアポトーシスを誘導する一酸化窒素の合成酵素阻害剤の効果、D-3) MMP インヒビターによる軟骨細胞外基質分解の抑制。E) 細胞外基質分解酵素阻害剤による好中球による関節炎性骨破壊の抑制。

B. 研究方法

A-1) CDKI 遺伝子である p21Cip1 遺伝子をアデノウイルスに組み込んだ。これをアジュバント関節炎ラットの膝関節内に感染後1週目から、1週毎に計3回関節内注入し、4週後の関節破壊の程度を組織学的に検討した。

A-2) RA 患者から採取した滑膜組織から培養した滑膜細胞に、HVJ-リポゾーム法を用いて p21 遺伝子を導入し、滑膜増殖に与える影響を検討した。ヒト RA 滑膜組織に同様の方法で p21 遺伝子を導入し、ヒト関節軟骨片とともに SCID マウスに移植し、4週後の軟骨破壊の程度について、組織学的に検討した。

B-1) 炎症性骨破壊における IFN- γ の意義を明らかにするため、IFN- γ 受容体欠損マウスにおいて LPS 誘導性骨破壊モデルにおける破壊の程度を検討した。活性化した脾臓 T 細胞を破骨細胞誘導因子 (RANKL) で刺激した骨髄マクロファージと共存培養し、破骨細胞形成への影響を検討した。同様の実験を IFN- γ 受容体欠損マウス由来の骨髄マクロファージについても行った。マウス骨髄マクロファージを用いた破骨細胞形成家に対する IFN- γ の効果を検討した。RANKL による細胞内シグナル伝達系に及ぼす IFN- γ の効果を検討した。

B-2) ビスフォスフォネート (YM-175) が RA 滑膜細胞の炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響を検討した。

C-1) RA 患者滑膜組織を SCID マウスに移植して作製した RA 疾患モデルに、強力な血管新生抑制作用を有する X Ⅷ型コラーゲン C 末端フラグメントであるエンドスタチンを投与し、その効果を検討した。

C-2) 破骨細胞前駆細胞である Raw 細胞を用いて、血管新生促進因子 VEGF の及ぼす効果を検討した。

D-1) c-fos 遺伝子の作用部位で競合阻害する作用を持つ AP-1 オリゴヌクレオチドをラットのコラーゲン関節炎に投与し、組織学的検討を行った。

D-2) マウスコラーゲン関節炎モデルを用いて、NO 合成酵素 (iNOS) の選択的阻害剤である L-NIL の効果を検討した。iNOS ノックアウトマウスについても同様の検討を行った。

D-3) 5種類の合成 MMP インヒビターを用いて、

培養軟骨細胞および培養軟骨組織におけるコラーゲン、プロテオグリカンの分解阻害効果を検討した。軟骨組織における、MMP 近縁分子である ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) 遺伝子ファミリーのうち、スロンボスポンジンモチーフを持つ ADAMTS 分子の発現について検討した。

E) コラーゲン関節炎マウスに MMP インヒビター、エラスターゼインヒビターを投与し、好中球による骨破壊に対する効果を検討した。

C. 研究結果

A-1) アデノウイルスを用いて p21 遺伝子を膝関節内の滑膜細胞に導入することにより、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) HVJ-リポゾーム法を用いて p21 遺伝子を導入することにより、in vitro における滑膜細胞増殖を抑制し、SCID マウスにおける軟骨破壊を抑制できた。

B-1) IFN- γ 受容体欠損マウスにおいて LPS による炎症性骨破壊は増悪し、破骨細胞形成が亢進していた。活性化 T 細胞は破骨細胞分化を抑制するが、IFN- γ 受容体欠損マウス由来のマクロファージにおいては、この効果はみられなかった。IFN- γ は破骨細胞前駆細胞に直接作用して、強力に破骨細胞分化を抑制した。IFN- γ の効果は、RANKL による細胞内シグナル伝達分子 (NF- κ B、JNK) の活性化を抑制することによること、この抑制効果はこれらの上流に位置するシグナル分子である TRAF6 蛋白の分解を亢進することによることが明らかになった。

B-2) YM-175 により、滑膜細胞の炎症性サイトカイン産生が強力に抑制された。

C-1) エンドスタチンは、滑膜組織の血管新生を阻害し、濃度依存性に移植した滑膜組織を退縮させた。

C-2) VEGF は破骨細胞前駆細胞の運動能を亢進させることが、明らかになった。

D-1) AP-1 オリゴヌクレオチドの投与により、ラットのコラーゲン関節炎の発症と進展が抑制された。

D-2) iNOS の選択的阻害剤は、関節炎の程度を有意に抑制するが、完全な抑制はできなかった。iNOS ノックアウトマウスを用いた分析では、臨床的関節炎は軽度抑制されるものの、軟骨細胞のアポトーシスおよび軟骨破壊は抑制できな

った。

D-3) MMP インヒビターは関節軟骨のコラーゲン分解を抑制したが、プロテオグリカン分解は抑制できなかった。軟骨には ADAMTS 分子が存在し、これがプロテオグリカン分解に関与している可能性が示唆された。

E) MMP インヒビター、エラスターゼインヒビターは、コラーゲン関節炎における好中球による骨破壊を抑制できず、これらの酵素以外の酵素系が関与していることが示唆された。

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。本年度の研究により、細胞周期をつかさどる CDKI 遺伝子をアデノウイルスあるいは HVJ-リボゾーム法を用いて導入することで関節破壊が抑制できること、滑膜細胞から破骨細胞が形成される過程は RANKL を介して促進され、活性化 T 細胞に由来する IFN- γ によって抑制されており、INF- γ 活性を促進することで関節破壊を抑制できること、ビスフォスホネート YM-175 は破骨細胞活性のみならず、炎症性サイトカインの産生も抑制すること、エンドスタチンは強力に血管新生を阻害することにより滑膜増殖を抑制すること、血管新生促進因子は破骨細胞前駆細胞の活性も促進していること、AP-1 オリゴヌクレオチドはコラーゲン関節炎の発症と進展を抑制すること、軟骨のアポトーシスには一酸化窒素以外の因子も関与すること、軟骨の基質分解には MMP 以外の酵素も関与していること、好中球による骨破には MMP やエラスターゼ以外の酵素が関与している可能性があることが明らかになった。これらは、いずれも *in vivo* の実験結果をもとにした成果であり、近い将来の臨床応用に近づく成果であると考えられる。

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。p21 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。IFN- γ は、滑膜細胞からの破骨細胞分化を抑制し、その効果は RANKL のシグナル伝達系を抑制することによる。YM-175 は、炎症性サイトカインの産生を抑制する。エンドスタチンは滑膜増殖を抑制する。AP-1 オリゴヌクレオチドはコラーゲン関節炎の発症、進展を抑制する。NO の制御のみでは、軟骨細胞のアポトーシスや軟骨破壊は抑制できない。軟骨の基質分解は、MMP の阻害のみでは抑制できず、ADAMTS 分子の阻害も必要である。好中球性骨破壊は、MMP やエラスターゼの阻害では、抑制できない。

T 細胞による破骨細胞分化制御と関節炎性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

アデノウイルスを用いた Csk 遺伝子の導入による破骨細胞機能の制御が関節炎性骨破壊の制御に有用であることから、リウマチ骨破壊において、破骨細胞が重要な役割を担っており、その分化や機能を抑制することが、治療上非常に有効であることが明らかとなった。本年度は、さらに、関節炎において T 細胞性免疫系の活性化が破骨細胞を誘導する機構を解析し、破骨細胞性骨破壊を特異的に制御するための新たな標的分子を検討した。

活性化 T 細胞の破骨細胞分化への作用は、産生するサイトカインの作用のバランスに依存しており、IFN- γ を産生する活性化 T 細胞は、RANKL による破骨細胞分化を強力に抑制した。また、IFN- γ 受容体欠損マウスでは、LPS 誘導性骨破壊が増悪することから、IFN- γ は、T 細胞の活性化に伴う炎症性骨破壊において、防御的な役割をもつことが明らかとなった。RA 滑膜の T 細胞は自ら RANKL を発現している上に、滑膜マクロファージを活性化して炎症性サイトカインを過剰産生させ、滑膜線維芽細胞や骨芽細胞の RANKL 発現を亢進して破骨細胞形成が促進するにもかかわらず、破骨細胞形成を抑制して骨破壊に保護的に作用する IFN- γ が存在しない。このバランスのくずれが RA 骨破壊の原因と考えられた。また、この IFN- γ の破骨細胞分化抑制の標的が TNF 受容体関連因子のひとつである TRAF6 であることが明らかになり、TRAF6 を抑制することで、骨破壊抑制に選択的な効果をもつ治療法の開発の道が開かれた。

A. 目的

慢性関節リウマチ (RA) 骨破壊においては、破骨細胞性骨吸収の亢進が重要な役割を果たす。その重要性は、すでに報告したように、Csk による Src の抑制や、OPG 投与などの破骨細胞を標的とした治療が実験的関節炎に奏効したことから明らかとなった。しかし、T 細胞を中心とする免疫系の活性化による破骨細胞分化誘導のメカニズムの詳細は明らかでない。我々は、RA 滑膜線維芽細胞が RANKL を発現して破骨細胞分化を誘導することを示したが、RA 滑膜に浸潤した T 細胞においても RANKL が発現しており、固相化した活性化 T 細胞に *in vitro* で破骨細胞形成誘導能があることが報告された。しかし、免疫系が活性化するたびに、破骨細胞分化が促進するとは考えにくいこと、さらに、通常骨以外では破骨細胞形成がみられないことなどを考えると、T 細胞は破骨細胞分化を促進するだけでなく、抑制する機構も有している可能性が示唆される。実際、活性化した T 細胞は、RANKL を発現する一方で、インターフェロン(IFN)- γ 、GM-CSF、IL-4 のような破骨細胞分化を抑制するサイトカインを産生することが知られている。われわれは、活性化 T 細胞の破骨細胞分化への作用が正負のどちらであるのか、また、

どのような因子が媒介しているのかを明らかにし、その作用機序を解明することで、炎症性骨破壊の新たな治療標的分子を同定することを目的とした。

B. 方法

①炎症性骨破壊における IFN- γ の意義を明らかにするため、IFN- γ 受容体欠損マウスにおいて、LPS 誘導性骨破壊モデルを用いてその破壊の重症度を検討した。②抗 CD3 抗体を用いて活性化した脾臓 T 細胞を、RANKL 刺激した骨髄マクロファージと共存培養し、破骨細胞形成への作用を検討した。さらに、IFN- γ 受容体欠損マウスの骨髄マクロファージを用いて、活性化 T 細胞の破骨細胞形成への作用を調べた。③マウス骨髄マクロファージを M-CSF および RANKL 刺激する破骨細胞形成系を用いて、IFN- γ の破骨細胞分化への直接作用を検討した。④ IFN- γ による破骨細胞分化抑制のメカニズムを明らかにするため、RANKL による NF- γ B および JNK の活性化に対する IFN- γ の作用を、ゲルシフトアッセイ、リン酸化 JNK 抗体によるブロッティングにより、検討した。さらに、IFN- γ 刺激下でのマクロファージにおける RANK 下流シグナル分子の発

現変化を Western blotting 等で検索した。なお、マウスを用いた実験に関しては、東京大学医学部動物実験施設の定める倫理規定に従って、実験を遂行した。

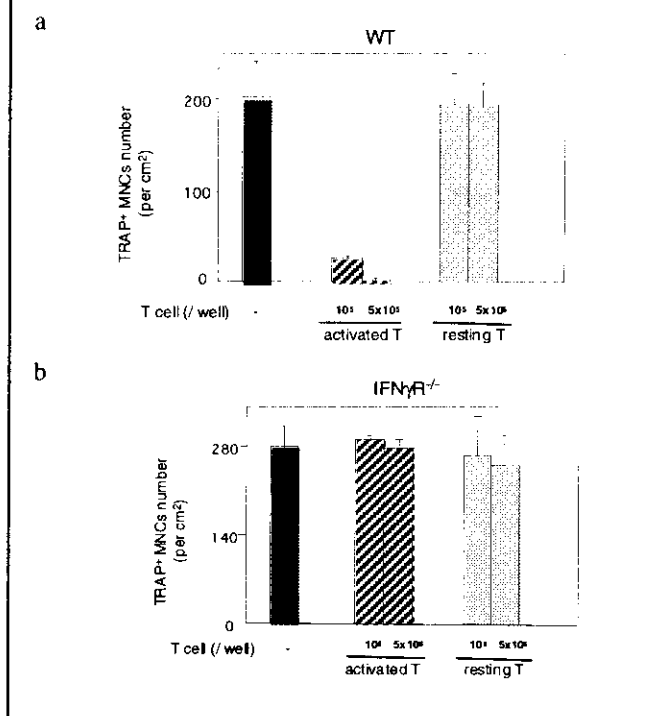
C. 結果

①IFN- γ 受容体欠損マウスにおいて、LPS による炎症性骨破壊は増悪し、破骨細胞形成の亢進が見られた。IFN- γ は、T 細胞性免疫反応による骨破壊において防衛的に作用していることが示唆された。②活性化 T 細胞は、細胞数に依存して破骨細胞分化を抑制した(図 1a)。IFN- γ 受容体欠損マウスのマクロファージに対しては、活性化 T 細胞による破骨細胞分化抑制効果は見られなかった(図 1b)。③IFN- γ は破骨細胞前駆細胞に直接作用して強力に破骨細胞分化を抑制した。④IFN- γ は、RANKL による NF- γ B および JNK の活性化をとともに抑制していた。これは、これらの上流に位置するシグナル分子である TRAF6 のタンパク発現量の低下に起因しており、レトロウイルスベクターによって TRAF6 を過剰発現させることによって IFN- γ による破骨細胞分化の抑制がレスキューされた。さらに、IFN- γ はユビキチン・プロテアソーム系を活性化することで、TRAF6 タンパク分解を促進していることが示された。

D. 考察

活性化 T 細胞の破骨細胞分化への直接作用は、産生するサイトカインに依存しており、IFN- γ を産生する活性化 T 細胞は、RANKL による破骨細胞分化を強力に抑制した。IFN- γ は、T 細胞の活性化に伴う破骨細胞性骨破壊において、防衛的な役割をもつことが明らかとなった。これは、IFN- γ 受容体欠損マウスでは、コラーゲン関節炎の骨破壊期が増悪することとも一致する。RA 滑膜の T 細胞は、急性炎症期の T 細胞と異なり、活性化マーカーを発現しているが、IFN- γ の産生が少ないことが報告されている。RA 滑膜の T 細胞は自ら RANKL を発現している上に、滑膜マクロファージを活性化して炎症性サイトカインを過剰産生させ、滑膜線維芽細胞や骨芽細胞の RANKL 発現を亢進して破骨細胞形成が促進するにもかかわらず、破骨細胞形成を抑制して骨破壊に保護的に作用する IFN- γ が存在しない。このバランスのくずれが RA 骨破壊の原因と考えられる。

(図 1) T 細胞による破骨細胞分化抑制



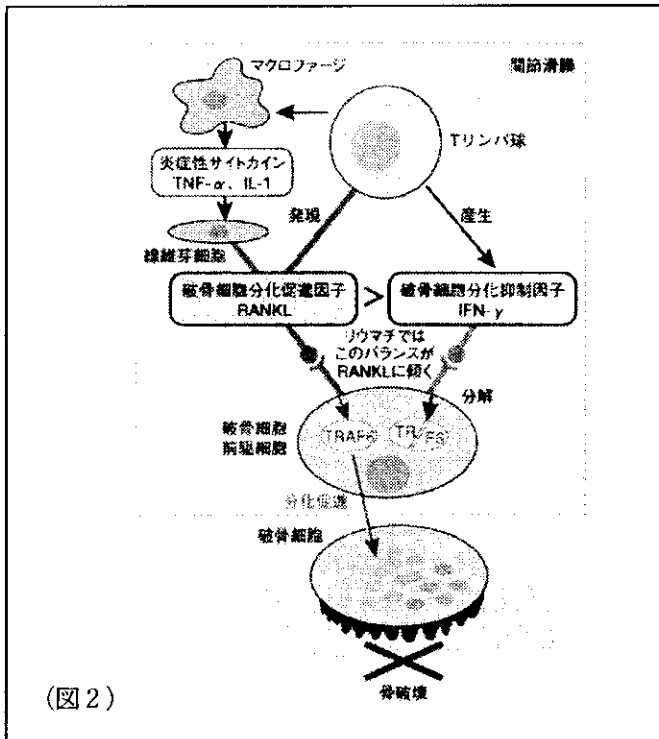
また、この IFN- γ の破骨細胞分化抑制の標的が TRAF6 の抑制であることが示され、IFN シグナルと TNF シグナルの新たなクロストークが明らかとなった。IFN- γ は、炎症性組織破壊に保護的に作用することが明らかとなったが、自己免疫性関節炎の発症期では免疫系の活性化に作用するため、治療に直接利用することは困難と考えられるが、TRAF6 を抑制することで、骨破壊抑制に選択的な効果をもつ治療法の開発が可能となると考えられる。

免疫系は複雑なサイトカインネットワークによって効率的に制御されているが、骨代謝に関わる細胞を制御する機構については、ほとんど明らかにされていなかった。ここでは、T リンパ球による破骨細胞分化制御機構を解明したが、この報告は、「Osteoimmunology (骨免疫学)」を開拓したと評され、リウマチに代表される免疫系による骨代謝制御異常を理解していくために、今後さらなる発展が期待される分野となってきた。免疫学と骨代謝学の接点をさらに解明することで、炎症性骨疾患への新たな治療アプローチが生まれる可能性が出てきた。

E. 結論

免疫系の活性化が骨吸収を促進する関節炎等の病態において、活性化 T 細胞上の破骨細胞分化因子 RANKL の関与が報告されていたが、われわれは、

IFN- γ を産生する T 細胞は破骨細胞分化を強く抑制することを示した。IFN- γ は、TRAF6 の分解を介して RANKL シグナルを阻害し、炎症時の過剰な骨吸収を抑制する骨防御因子であり、RANKL と IFN- γ のバランスの破綻が骨破壊をもたらすことが明らかとなった(図2)。炎症性骨破壊治療の標的として、破骨細胞を抑制するために、RANKL-TRAF6 経路が重要であることが示された。



F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, Takaoka A, Yokochi T, Oda H, Tanaka K, Nakamura K. & Taniguchi T. : T cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN- γ . *Nature* 408 : 600-605, 2000
- 2) Takayanagi H, Juji T, Miyazaki T, Tanaka S, Oda H, Nakamura K. : Amelioration of adjuvant arthritis by gene therapy suppressing Src activity. *Jpn. J. Clin. Immun.* 23 : 547-549, 2000
- 3) Nakagawa T, Tanaka S, Suzuki T, Takayanagi H, Miyazaki T, Nakamura K. and Tsuruo T. : Overexpression of the csk gene suppresses tumor

- metastasis in vivo. *Int. J. Cancer.* 88 : 384-391, 2000.
- 4) Miyazaki T, Takayanagi H, Isshiki M, Takahashi T, Okada M, Fukui Y, Oda H, Nakamura K, Hirai H, Kurokawa T, Tanaka S. : In vitro and in vivo suppression of osteoclast function by adenovirus vector-induced csk gene. *J. Bone Mineral Res.* 15 : 41-51, 2000.
- 5) Miyazaki T, Katagiri H, Kanegae Y, Takayanagi H, Sawada Y, Yamamoto A, Pando MP, Asano T, Verma IM, Oda H, Nakamura K, Tanaka S. : Reciprocal role of ERK and NF- κ B pathways in survival and activation of osteoclasts. *J. Cell Biology* : 333-342, 2000.
- 6) Miura T, Tnaka S, Seich A, Arai M, Goto T, Katagiri H, Asano T, Oda H, Nakamura K. : Partial functional recovery of paraplegic rat by adenovirus-mediated gene delivery of constitutively active MEK1. *Exp. Neurol.* 166 : 115-126, 2000.
- 7) 高柳広、田中栄、中村耕三 : RA と破骨細胞の活性化と制御。 *RA&セラピー* 6 : 40-49, 2000
- 8) 田中 栄、中村耕三 : 骨粗鬆症への分子生物学的アプローチ。 *Clinical Rehabilitation* 10 : 235, 2001
- 9) 織田弘美、田中栄、高柳広、十字琢夫、飯塚秀治、山本愛一郎、宮崎剛、門野夕峰、中村耕三 : 破骨細胞と骨関節破壊。 *最新医学*・2000年・別冊 : 122-131, 2000.

2. 学会発表

- 1) 中村耕三 : 慢性関節リウマチの骨・関節破壊—メカニズムと新しい治療の試み。第 28 回 愛媛リウマチ研究会、愛媛、2000.4.1
- 2) 十字琢夫、織田弘美、西川卓治、田中栄、山本基、清水学、中村耕三 : 慢性関節リウマチにおける膝関節破壊様式の検討。第 73 回 日本整形外科学会学術集会、神戸、2000.4.6-9
- 3) 中村耕三 : 骨形成因子の臨床応用について。第 73 回 日本整形外科学会学術集会、神戸、2000.4.5-9
- 4) 織田弘美、田中栄、高柳広、十字 夫、飯塚秀治、山本愛一郎、宮崎剛、門野夕峰、中村耕三、腰原康子 : 滑膜破骨細胞形成機構とその制御。第 44 回 日本リウマチ学会総会、横浜、2000.5.13-15
- 5) Juji T, Tanaka S, Takayanagi H, Miyazaki T, Oda H, Nakamura K. : Adenovirus vector-mediated csk gene transfer for the treatment of adjuvant arthritis. 第 44 回日本リウマチ学会総会、横浜、2000.5.13-15
- 6) 十字琢夫、織田弘美、清水学、田中栄、小田順二、中村耕三 : RA 患者における化膿性膝関節炎の

治療経験—抗生剤混入セメントビーズ、関節形成術が奏功した1例。第44回 日本リウマチ学会総会、横浜、2000.5.13-15

7) 宮崎剛、鐘ヶ江裕美、高柳広、十字 夫、門野夕峰、織田弘美、中村耕三、田中栄：NF- κ B pathway 阻害による破骨細胞活性化の制御。第44回日本リウマチ学会総会、横浜、2000.5.13-15

8) 高柳 広、十字琢夫、宮崎剛、飯塚秀治、山本愛一郎、門野夕峰、田中栄、織田弘美、谷口維紹、中村耕三：インターフェロンによる炎症性骨破壊の制御。第44回 日本リウマチ学会、横浜、2000.5.13

9) 高柳 広、十字琢夫、宮崎剛、飯塚秀治、門野夕峰、仲村一郎、田中栄、織田弘美、谷口維紹、中村耕三：活性化 T 細胞は IFN- γ を介して破骨細胞分化を抑制し炎症性骨破壊を制御する。第18回 日本骨代謝学会、広島、2000.7.22

10) 高柳 広、十字琢夫、宮崎剛、飯塚秀治、田中栄、織田弘美、中村耕三：csk 遺伝子導入による慢性関節リウマチの遺伝子治療。第28回 日本臨床免疫学会、シンポジウム、東京、2000.9.28

11) 高柳 広、十字琢夫、宮崎剛、飯塚秀治、山本愛一郎、門野夕峰、仲村一郎、田中栄、織田弘美、谷口維紹、中村耕三：活性化 T 細胞は IFN- γ を介し破骨細胞分化を抑制し炎症性骨破壊を制御する。第15回 日本整形外科学会基礎学術集会、京都、2000.9.28-29

12) 田中栄、織田弘美、中村耕三：破骨細胞・骨芽細胞の分化制御と骨粗鬆症。第15回日本整形外科学会基礎学術集会、京都、2000.9.28-29

13) 山本愛一郎、田中栄、片桐秀樹、宮崎剛、高柳広、門野夕峰、仲村一郎、田中良哉、織田弘美、中村耕三：慢性関節リウマチ滑膜細胞の活性化およびサイトカイン産生における Ras-MAP キナーゼ系の関与。第15回日本整形外科学会基礎学術集会、京都、2000.9.28-29

14) 門野夕峰、宮崎剛、織田弘美、中村耕三、田中栄、小林徳彦、内藤明日香、井上純一郎：TRAF6 を介した細胞内シグナルは破骨細胞分化に必須である。第15回 日本整形外科学会基礎学術集会、京都、2000.9.28-29

15) Takayanagi H, Tanaka S, Ogasawara K, Hida S, Nakamura K. and Taniguchi T. : Osteoclasts generated from synoviocytes : New therapeutical targets of arthritic bone destruction. Kennedy Institute of Rheumatology Oxford Seminar, UK, 2000.9.23

16) Oda H, Tnaka S, Juji T, Shimizu M, Nakamura

K. : effect of absorbable screws In Sauve-Kapandji procedure for rheumatoid wrist reconstruction. British Orthopaedic Association Japanese Orthopaedic Association Combined Congress, London, UK, 2000.10.3-6

17) Tajiri Y, Tnaka S, Oda H, Takayanag H, Nakamura K. : Salazosulfapyridineinhibits osteoclast-like cellformation and bone risorption in vitro.64th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, Philadelphia, USA, 2000.10.30-11.2

好中球によるリウマチ性関節炎骨破壊の抑制機構の解析

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並びに破骨細胞による骨吸収を特異的に抑制するアミノビスフォスフォネート (ABP) を投与したコラーゲン誘導関節炎マウスを用いた *in vivo*, *in vitro* における解析から好中球による骨破壊の可能性を示してきた。本研究では、好中球が持つ代表的な骨基質消化関連酵素 (MMP, elastase) に対する inhibitor を用いて骨破壊に対する抑制効果を *in vivo*, *in vitro* で解析した。ABP 投与コラーゲン誘導関節炎マウスへ inhibitor を投与しても arthritis score、滑膜増殖、骨・軟骨破壊には改善が認められなかった。一方、健常人の好中球と骨片との共存培養系においては RA 患者の時と同様に骨基質内のコラーゲン線維の消失が認められ、inhibitor 添加によりコラーゲン線維の消失が抑制された。以上から、コラーゲン線維の消化には elastase や MMP が関わっていることが明かとなったが、*in vivo* における骨破壊機構にはこれらの酵素以外の要因の関与が想定された。また、好中球による骨破壊は RA に特異的な現象でない可能性が考えられた。

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、特に骨破壊に密接に関与していることを示した。また、RA 患者末梢血好中球と骨片との共培養により、骨基質内のコラーゲン線維が消失する事も明かとした。更に、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) を投与し、その際の骨破壊の有無、また骨破壊機序についての解析を行った。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 投与群では骨破壊部位に多数の好中球が骨集積しており、骨基質からコラーゲン線維が消失していた。以上の結果から、関節炎モデルにおいても好中球による骨破壊が起こることが示された。好中球は細胞内顆粒に骨基質消化関連酵素 (elastase, MMP) を有しており、これらの酵素が骨破壊に関与することが考えられる。そこで、本研究では ABP 投与コラーゲン誘導関節炎マウスを用いて好中球が持つ骨基質消化関連酵素 (elastase, MMP) に対する inhibitor の骨・軟骨破壊抑制効果について検討を行った。また、好中球による骨破壊が RA に特異的かどうかを検討する目的で健常人の好中球と骨との共培養を行い、この時の骨基質の変化と inhibitor による基質変化の抑制効果を超微形態学的に検索した。

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 と等量のフロイン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 週間後より週 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: ankyrosis の 5 段階で評価した。

関節炎マウスにはコラーゲン初期感作 1 週間より 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。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。

抑制剤の投与

二次感作翌日より、マウスを 4 群 (1 群 5 匹) に分け、elastase inhibitor 或いは MMP inhibitor をそれぞれ 10mg/kg、50mg/kg の濃度で毎日 2 回マウス腹腔に投与した。

Group 1: inhibitor 投与なし

Group 2: elastase inhibitor 投与

Group 3: MMP inhibitor 投与

Group 4: 両者併用

Flow Cytometry による解析

各群マウスの大腿骨骨髓から 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

各群マウスの膝関節部並びに足関節部を使用した。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 (H-E 染色) を行った。

In vitro における顆粒球による骨破壊の解析

健常人の末梢血を Polymorphprep を用いて多形核白血球 (PMN) と単核球 (MNC) を採取した。PMN 1×10^5 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。elastase inhibitor、MMP inhibitor をそれぞれ 100ng/ml の濃度で添加した。培養後、1/2 Karnovsky 液で固定、10% EDTA で脱灰、2% 四酸化オスmium 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-クエン酸鉛で染色した。

C. 結果

1. コラーゲン誘導関節炎マウスに対する抑制剤の効果

臨床所見

arthritis score は elastase inhibitor 投与群 (Group 2)、MMP inhibitor 投与群 (Group 3) 或いは両者併用群 (Group 4) のほうが非投与群 (Group 1) に比べて低値を示す傾向を示したが、有意な差は認められなかった (図1)。

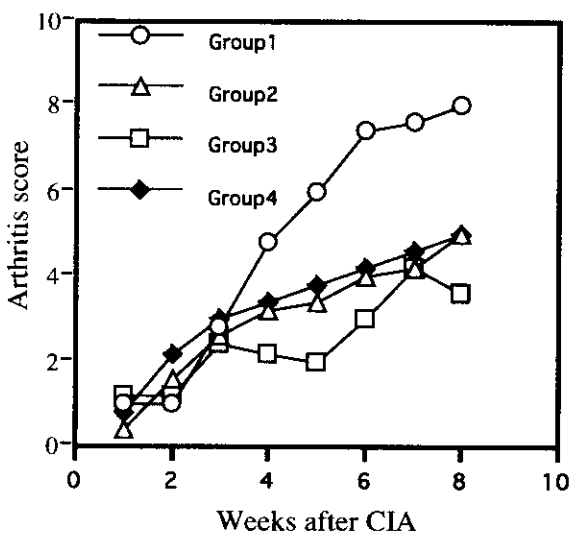


図1. ウシII 型コラーゲン2次感作以降の各Groupの Arthritis score. 阻害剤非投与群 (Group 1) に比して投与群 (Group 2, 3, 4) では低値を示すが有意差は認められない。

Flow Cytometry による解析

Group 1, Group 2, Group 3, Group 4 全ての group

表1. 骨髓における Gr-1⁺/Mac-1⁺ 細胞の動態

	Gr-1 ⁺ /Mac-1 ⁺	TER119 ⁺
Normal	21.9 ± 3.1	29.8 ± 5.3
Group 1	32.8 ± 5.7	22.2 ± 4.2
Group 2	31.3 ± 8.0	21.0 ± 5.4
Group 3	40.0 ± 4.3	18.6 ± 4.5
Group 4	41.3 ± 3.9	18.0 ± 5.8

Group 1, Group 2, Group 3, Group 4 間に有意差はない。

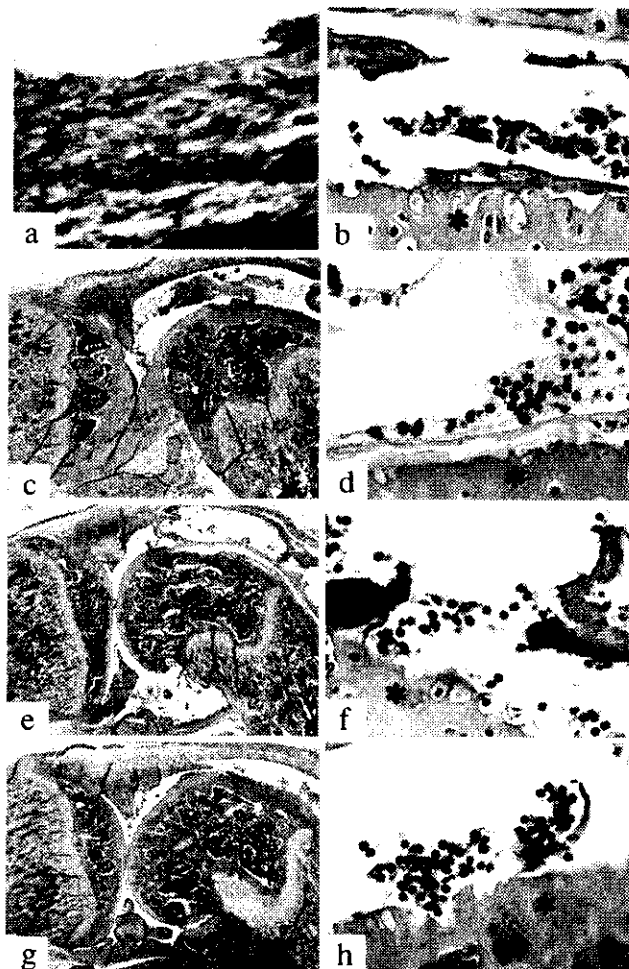


図2. コラーゲン関節炎マウス膝関節の H-E 染色像。(a, b) Group 1 (c, d) Group 2 (e, f) Group 3 (g, h) Group 4 全群において滑膜の増殖、関節腔内への好中球の浸潤、並びに関節軟骨・骨破壊が認められる。* : 関節軟骨

で正常時に比較して骨髓における Gr-1⁺Mac-1⁺ 顆粒球の増加・TER119⁺赤血球前駆細胞の減少が認められた。その傾向は Group 3, Group 4 で顕著であるが、各群間に有意な差は認められなかった (表1)。

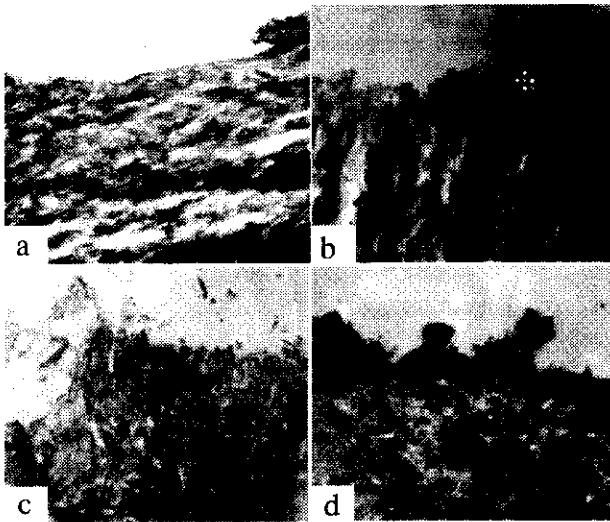


図3. 培養骨片の電子顕微鏡所見。(a) 骨片単独培養像。骨基質のコラーゲン線維に変化は認められない。(b) 好中球と骨片との共培養像。骨表層のコラーゲン線維(*)が細くなり、周期構造が不明瞭である。(c) elastase inhibitor 添加した好中球と骨片との共培養像。(d) MMP inhibitor 添加した好中球と骨片との共培養像。(c)、(d) 共にコラーゲン線維に変化は認められない。

形態学的解析

阻害剤非投与群 (Group 1) では、前年度の報告と同様に滑膜の増殖が認められ、また、ABP 投与にも関わらず関節軟骨・骨の破壊も認められた (図 2 a)。更に、関節腔内に好中球の浸潤も認められた (図 2 b)。浸潤した好中球の一部は関節軟骨表面に付着し、軟骨表層から軟骨基質を破壊している像が観察された (図 2 b)。elastase inhibitor 投与群 (Group 2) (図 2 c, d)、MMP inhibitor 投与群 (Group 3) (図 2 e, f)、更に両者併用群 (Group 4) (図 2 g, h) でも阻害剤非投与群同様に滑膜の増殖、関節軟骨・骨の破壊 (図 2 c, e, g) 並びに関節腔内への好中球の浸潤 (図 2 d, f, h) が認められ、各 Group において阻害剤投与による明らかな軟骨・骨破壊抑制は確認されなかった。

2. In vitro における好中球による骨破壊の解析

骨片の単独培養系では骨基質全層にわたり太いコラーゲン線維が認められ、コラーゲン線維に特徴的な周期構造が骨基質表層のコラーゲン線維においても明瞭に認められた (図 3 a)。健常人由来の好中球と骨片の10日間共培養では、前年度報告同様骨表層のコラーゲン線維が深層の線維と比較して細くなり、また、コラーゲン線維の周期構造も不明瞭となった (図 3 b)。この結果は好中球による骨破壊がリウマチ性関節炎以外でも起こる可能性を強く示唆する。elastase inhibitor 添加群 (図 3 c)、MMP inhibitor 添加

群 (図 3 d) においては、骨基質内のコラーゲン線維の変化は骨表層においても認められなかった。

D. 考察

ABP 投与コラーゲン誘導関節炎マウスに elastase inhibitor、MMP inhibitor を投与しても arthritis score、骨髄における好中球造血の亢進、関節軟骨・骨の破壊が抑制できなかった。しかしながら、好中球と骨片との共培養系においてはこれらの inhibitor 添加により、骨基質内のコラーゲン線維の消失が明らかに抑制された。以上の結果は、好中球が有する elastase や MMP が骨基質内のコラーゲン線維の消失に関与することは間違いないが、in vivo においてはこれら以外の要因、例えば他の骨基質分解酵素系が関与している可能性が考えられた。また、inhibitor が骨・軟骨破壊部位にどの程度の濃度で浸透しているか今回の研究では不明であり、inhibitor の投与濃度や投与方法についての検討も必要と考えられる。

また、健常人の好中球でも骨基質内のコラーゲン線維の消失を起こすことが出来たことから、好中球による骨破壊はリウマチ性関節炎時に特異的な現象ではないことが示された。

E. 結論

ABP 投与コラーゲン誘導関節炎マウスへ elastase inhibitor、MMP inhibitor を投与し、骨・軟骨破壊抑制に対する効果を検討すると共に、好中球と骨との共培養系におけるこれら inhibitor の効果を検討した。

1. 関節炎マウスにおいて、inhibitor 投与による arthritis score の改善は認められなかった。
2. 関節炎マウスにおける好中球造血亢進も inhibitor 投与による改善は認められなかった。
3. 関節部位の滑膜増殖、関節腔内への好中球の浸潤、骨・軟骨破壊も inhibitor 投与による改善は認められなかった。
4. 健常人由来好中球と骨片との共培養系において、好中球による骨基質内コラーゲン線維の消化が inhibitor 投与により抑制された。
5. 以上の結果から、関節炎時の骨破壊には elastase、MMP 以外の要因或いは他の酵素系の関与が示唆された。
6. 健常人の好中球によるコラーゲン線維の消化が示されたことより、好中球による骨破壊は慢性関節リウマチ以外の疾患でも起こることが考えられた。

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教授
西田圭一郎 同 附属病院助手

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、その反応生成物は軟骨障害に深く関与すると考えられる。ヒト OA 軟骨の免疫組織学的検討では、OA グレードは軟骨細胞のアポトーシス、ニトロチロシンおよびカスパーズ 3 および 9 陽性率に有為に関連していた。次に NO 合成酵素 (iNOS) を制御することで軟骨破壊の抑制が可能かどうかを調べるため、iNOS ノックアウトマウスにコラーゲン誘導関節炎を発症せしめ、組織破壊の程度を検討した。臨床的関節炎スコア、TUNEL 陽性細胞率、ニトロチロシン陽性細胞率ともに有為に抑制されており、iNOS の選択的阻害によりある程度軟骨破壊の防止が可能であると考えた。

【A. 研究目的】

我々のこれまでの検討でウサギ培養軟骨細胞は IL-1, TNF- α 等のサイトカインに反応して、nitric oxide (NO) を誘導した (Sasaki et al, J Biochem, 1998)。また ELISA 法による解析では RA 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、関節炎局所での NO 産生の亢進が示唆された。RA 患者軟骨組織における免疫染色では早期～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 NO 合成酵素である iNOS の強い陽性像が認められ、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。一方、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出され、iNOS 発現細胞の局在と一致していた。また、NO の反応生成物であるニトロチロシン生成も変性軟骨において認められた。以上の結果から、RA における軟骨破壊の過程で NO によって誘導される軟骨細胞のアポトーシスが関与すると考え、NO 産生抑制がコラーゲン関節炎モデル (CIA) マウスに与える効果を中心に検討を行った。

【B. 研究方法】

(1) NO による軟骨細胞アポトーシスの誘導機序の検討: RA 患者では DMARD 等の治療薬により軟骨細胞が強く装飾を受けていると考え、組織学的に同様の軟骨破壊様式を示す OA 軟骨につ

いて検討を行った。人工関節置換術時に骨・軟骨組織を採取 (n=18)、固定、脱灰後パラフィン包埋、電顕用樹脂包埋した。抗 caspase-3,-9 抗体、抗 nitrotyrosine (NT) 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。OA 軟骨の組織学的評価には modified Mankin score (0-13) を用いた。それぞれの陽性細胞率、OA グレードとの相関を統計処理した。

(2) iNOS ノックアウト (KO) マウスへの関節炎の誘導: 1) 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。

2) 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、iNOS ノックアウトマウス (KO 群) および Background である C57Bl/6 (wild type, WT 群) 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 および

NO濃度はELISA法により測定、比較検討した。

(倫理面への配慮) 実験動物はSPFコンディション下で愛護的に扱い、サンプル採取にあたってはエーテル麻酔下に脱血による安楽死を行った

【C. 結果】

(1) ヒト OA 軟骨の免疫組織学的検討: OA グレードは TUNEL、NT、活性型 caspase-3 陽性細胞率とそれぞれ有為に相関していた。また活性型 caspase-3 陽性細胞率も TUNEL、NT、caspase-9 陽性細胞率と高い相関を示した。

(2) CIA 抵抗性とされる C57Bl/6 では、mAbs 4mg/kg (i.v.)後 24 時間で LPS を腹腔内投与(i.p.)すると、72 時間後には全例に重篤な関節炎が惹起された。一方、KO 群では同様のプロトコールでは関節炎を誘導することはできなかった。さらに使用する mAbs 量を 8mg/kg (i.v.とすることで、臨床的に有為な関節炎を惹起することができた (n=20)。コントロールの WT 群 (n=16) にも mAbs 8 mg/kg (i.p.)を用いて比較検討した。関節炎誘導開始 2 週で四肢及び血液サンプルを採取した。四肢関節の臨床スコアは KO 群でより低値を示した。軟骨組織破壊は完全には抑制されなかったが、組織スコアは大腿骨側で WT 群:2.47±0.64;KO 群:1.44±0.85, 脛骨側で WT 群:2.73±0.46; KO 群:1.78±0.81 とそれぞれ iNOS KO マウスで有為に (p<0.005) 組織破壊が抑制されていた。TUNEL 陽性細胞数は大腿骨側で WT 群:34.5±15.5;KO 群:18.7±10.1, 脛骨側で WT 群:38.3±17.3;KO 群:20.8±7.4 とそれぞれ iNOS KO マウスで有為に (p<0.005) 減少した。ニトロチロシン陽性細胞数も大腿骨側で WT 群:39.0±10.7;KO 群:24.3±9.8, 脛骨側で WT 群:39.3±9.9; KO 群:27.8±8.4 とそれぞれ iNOS KO マウスで有為に (p<0.005) 減少した。ELISA 法による血中 NO 値は WT 群で 134±33.3pg/ml に比べ KO 群で 60.6±16.4pg/ml と有為に低値であったが、正常マウス (60.1±25.7pg/ml) より軽度高値を示した。また、血中 IL-1 濃度は正常群 (測定感度以下) より有為に高値を示したが、WT 群 (65.3±5.3mM)、KO 群 (62.2±9.9mM) 間に有意差を認めなかった。軟骨組織の MMP-3, 9 陽性細胞数には有意差を認めなかった。

【D. 考察】

in vitro においては NO が軟骨細胞の 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多くの報告がなされたきた。我々はヒト RA 滑膜・軟骨組織の検討から、in vivo で NO の発現が亢進していることから iNOS が RA における軟骨破壊抑制のターゲットの一つであると考えてきた。免疫組織学的検討から、NO によるミトコンドリアの障害はおそらく Bcl-2, Bax 等のアポトーシス関連蛋白の不均衡を誘導し、caspase-9、続いて caspase-3 の活性化を通じてアポトーシスを誘導すると考えられた。一方、iNOS KO マウスにおける CIA 誘導モデルの検討では臨床的関節炎症状が軽度の改善を示した他、軟骨組織破壊並びに軟骨細胞のアポトーシスは有為に抑制されていた。このことは iNOS の選択的阻害剤が RA の軟骨破壊に対してもある程度の抑制効果をもつことを示唆する。一方、iNOS KO は CIA 誘導において血清中 IL-1β には影響を与えないこと、KO 群においても軟骨マトリックスの破壊に重要な役割を持つ MMP3,9 の発現が同様に亢進していたことから、選択的 iNOS 阻害は炎症の増幅効果をもつ NO 産生抑制により軟骨破壊を抑制し得ても RA における主たる炎症のカスケードには影響を与えないことも明かとなった。従って、iNOS 選択的阻害のみでは制御が困難な発赤、腫脹といった臨床症状軽減のためには COX-2 選択的阻害剤等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】

NO により誘導される軟骨細胞のアポトーシスにカスパーゼ 3、9 が関与する可能性がある。選択的 NO 合成酵素阻害剤は RA の特に関節軟骨破壊をある程度抑制できる新治療法として期待できる。

【F. 健康危険情報】

本研究に関してありません。

【G. 研究発表】

(1) 論文発表

1. 西田圭一郎、井上 一、松尾真嗣、佐々木和浩、吉田 晶: 軟骨破壊における一酸化窒素の役割. 最新医学 別冊、リウマチ 2000: 88-99,

2000.

2. 松尾真嗣、西田圭一郎、井上 一：軟骨破壊と一酸化窒素. リウマチ科 24(3):396-404, 2000

3. 西田圭一郎：軟骨研究の最近のトピックス. 変形性関節症病態における一酸化窒素. THE BONE Vol.14, No.3: 67-69, 2000.

4. 西田圭一郎、松尾真嗣、加藤久佳、吉田 晶、井上 一：関節軟骨破壊と NO. 現代医療 Vol.33, No.5, 2001 (印刷中)

5. 西田圭一郎、松尾真嗣、井上 一：変形性関節症軟骨にみられる関節破壊機序. NEWMOOK 整形外科、特集/リウマチ類縁疾患. 越智隆弘、菊池臣一編、金原出版、2001 (印刷中) .

6. Nishida K, Doi T, Inoue H. The role of nitric oxide in arthritic joint - a therapeutic target? Review. Modern Rheumatol 2000; 1(2):63-67.

7. Nishida K, Doi T, Matsuo M, Shibahara M, Yoshida A, Inoue H. Involvement of nitric oxide in chondrocyte cell death in chondrocyte formation. Osteoarthritis Cartilage (in press)

8. Kato H, Nishida K, Yoshida A, Takada I, Murakami T, Inoue H. The effects of NOS2 deficiency on articular cartilage of collagen- induced arthritis (投稿中) .

9. Matsuo M, Nishida K, Yoshida A, Murakami T, Inoue H. Expression of caspase-3 and -9 relevant to cartilage destruction and chondrocyte apoptosis in human osteoarthritic cartilage (投稿中) . (2) 学会発表

1. 第44回日本リウマチ学会シンポジウム
西田圭一郎、井上 一：OA 関節破壊のメカニズムと軟骨細胞のアポトーシスリウマチ 2000;Vol.40, No.2: 260

2. 第21回日本炎症学会 加藤久佳、西田圭一郎、吉田 晶、井上一：iNOS ノックアウトマウスにおけるコラーゲン誘導関節炎.

【H. 知的財産権の出願・登録状況】

本研究に関してありません。

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教授

研究要旨

骨吸収阻害剤ビスフォスフォネートのひとつである YM175 (incadronate)は、RA の動物モデルであるラットアジュバント関節炎(AA)において、強力に骨破壊を抑制することを報告してきた。今回は、YM175 投与により AA 関節炎ラットの骨破壊のみならず関節軟骨の変性も抑制されることが明らかになった。(実験1)。続いて YM175 は、Raw 細胞および RA 滑膜線維芽細胞における TNF- α 、IL-6 等の炎症性サイトカインの産生を抑制することが明らかになり、YM175 の抗炎症作用はこれらの炎症性サイトカインの産生抑制を介したのものである可能性が示唆された(実験2)。破骨細胞前駆細胞様の形質を持つ Raw 細胞は、VEGF の I 型受容体である flt-1 を強発現し、VEGF により運動能が上昇したことから、破骨細胞前駆細胞の骨吸収、骨破壊局所への動員が VEGF によって制御されていることが示唆され、VEGF のシグナルをブロックすることにより血管新生のみならず破骨細胞性骨吸収も抑制するという新治療法の可能性が考えられた(実験3)。

A. 研究目的

われわれは、慢性関節リウマチ (RA) における骨関節破壊制御の戦略として、1) 骨破壊の主要と考えられる破骨細胞による骨吸収を制御することと 2) 骨関節破壊に先行して認められる増殖滑膜を栄養しそこへマクロファージ等の炎症細胞を動員するために不可欠な血管新生を制御することによる新しい治療法の可能性を検討してきた。強力な骨吸収阻害剤であるビスフォスフォネートのひとつである YM175 (incadronate)は、RA の動物モデルであるラットアジュバント関節炎(AA)において、強力に骨破壊を抑制したばかりでなく関節の炎症も抑制することを報告してきた。そこで今回は、まず Safranin-O 染色を用いて、AA 関節炎ラットの関節軟骨の染色性も YM175 により維持されているか否か検討した(実験1)。続いて YM175 による抗炎症作用のメカニズムを探る目的で、マクロファージおよび RA 滑膜線維芽細胞による TNF- α 等の炎症性サイトカインの産生に及ぼす YM175 の影響を検討し、その作用メカニズムに関しても検討を加えた(実験2)。また、RA 滑膜における血管新生に重要な働きをしていると考えられている Vascular endothelial growth factor (VEGF) は、破骨細胞の分化に必須の因子である Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF)の代用として破骨細胞の分化を促進することが近年報告された。VEGF のタイプ I レセプターである flt-1 の RA 滑膜における発現と局在を調べたところ、血管内皮細胞のほか破骨細胞と思われる細胞にも flt-1 が発現されていた。そこで今回は、まず flt-1 が破骨細胞前駆細胞に発現しているかを確認した。そのうえで VEGF が破骨細胞前駆細胞の走化性に及ぼす影響を調べた。さらに VEGF 受容体

の下流のシグナル伝達分子として、細胞運動や細胞形態の制御に深く関与していると思われる Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)及び Focal Adhesion Kinase(FAK)に注目し検討を加えた。以上により VEGF のシグナルをブロックすることにより血管新生のみならず破骨細胞性骨吸収も抑制するという新治療法の可能性を探った(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 X 線および組織学的 (HE、Safranin-O および TRAP 染色) に評価した。

(実験2)マウス骨髄球系細胞 Raw 細胞を LPS で刺激し培養上清中に検出される炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-1、IL-6)の濃度を ELISA を用いて測定し、これに及ぼす YM175 の影響について検討した。またそれぞれの遺伝子発現に及ぼす影響についても調べた。RA 滑膜線維芽細胞を用いて同様な検討を行った。YM175 の細胞内の作用メカニズムとしてメバロン酸経路の代謝産物あるいは阻害剤が TNF- α 産生あるいは転写因子 p38 のリン酸化に及ぼす影響も検討した

(実験3) Raw 細胞に Osteoclast differentiation factor (ODF)を作用させ、破骨細胞様細胞への分化を TRAP 染色、Pit formation assay、Phalloidin 染色による Actin ring 形成の有無によって確認した。Raw 細胞における VEGF レセプター (flt-1、flk-1)の発現を FACScan にて確認した。VEGF 添加による Raw 細胞の運動能の変化を Boyden chamber を用いた Chemotaxis 法にて検討を加えた。Raw 細胞に VEGF 添加後、Western blotting 法、免疫沈降法を用いて FAK

のチロシンリン酸化、FAK と PI3K の結合を解析した。PI3K の特異的な阻害剤である Wortmannin を VEGF と同時投与し、VEGF の作用の変化についても検討を加えた。

(倫理面への配慮) 研究に用いられた滑膜組織は人工股関節手術時にのみ採取され、術前に研究対象者にインフォームドコンセントを行っており倫理上の問題はないと考える。また実験動物の取り扱いに際しては、動物愛護上の配慮を十分に行った。

C. 研究結果

(実験 1) AA 発症後に YM175 を投与することにより、関節炎点数、paw volume、X線学的な骨破壊がいずれも著明に抑制された。組織学的には、YM175 投与群で TRAP 陽性細胞数の減少、TRAP 陽性多核細胞のアポトーシス様形態変化のほか、Safranin-O 染色において、関節炎対照群に認められる関節軟骨の染色性の低下が、YM175 投与群では認められず、その染色性が維持されていた。

(実験 2) Raw 細胞を LPS で刺激すると培養上清中に検出される TNF- α 濃度は約著明に増加した。YM175 処理により TNF- α 産生は強力に抑制された。YM175 処理による TNF- α 産生の抑制は、アミノ基含有ビスフォスフォネートにより抑制されることが報告されているメバロン酸経路の代謝産物である geranylgeraniol の添加により、解除された。IL-6 の産生も YM175 処理により著明に抑制された。RA 滑膜細胞を用いた検討でも同様の傾向が認められた。

(実験 3) Raw 細胞は ODF 添加により、約 3-5%の細胞が TRAP 染色陽性の多核巨細胞へと分化し、Actin ring を形成した。また、象牙片上での Pit の形成も確認された。FACSscan により、Raw 細胞は VEGF の I 型レセプターである flt-1 を強発現していた。血管内皮細胞などに見られる II 型レセプターである flk-1 の発現はほとんど認められなかった。VEGF の添加により Raw 細胞の Chemotaxis は用量依存性に上昇し、100ng/ml の VEGF により対照群に比べ約 2.5 倍に増加した。VEGF の添加後、約 120-130kDa の蛋白質のチロシンリン酸化が著明に亢進していた。さらに、抗リン酸化 FAK 抗体を用いた Western blotting により、VEGF 添加によるリン酸化 FAK の著明な発現増強を認めた。さらに、免疫沈降法により VEGF による PI3K と FAK との直接的な結合も証明された。VEGF 添加による FAK のリン酸化は、Wortmannin の投与により約 80%抑制された。また Chemotaxis も用量依

存的に阻害された。

D. 考察

これまで我々は、YM175 によって AA の骨破壊が抑制できることを報告してきたが、今回の Safranin-O 染色を用いた検討により、AA ラットの関節軟骨の染色性の低下は、YM175 投与群では認められず、YM175 投与により骨破壊のみならず関節軟骨の変性も抑制されたと考えられる。ビスフォスフォネート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いるが、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ビスフォスフォネートが有効である可能性が十分考えられる。ビスフォスフォネートの RA の骨破壊に対する抑制効果が明らかになれば、安全性は既に確認されているため、現実的な臨床応用への最短距離といえる。

以前より YM175 には関節炎抑制作用が見られることを報告してきたが、今回の検討により YM175 は、Raw 細胞および RA 滑膜線維芽細胞における TNF- α 、IL-6 等の炎症性サイトカインの産生を抑制することが明らかになり、YM175 の抗炎症作用機序の少なくとも一部を説明できるものと考えられる。

昨年われわれは、VEGF のタイプ I レセプターである flt-1 が、RA 滑膜において血管内皮細胞のほかに破骨細胞と思われる細胞にも発現されていることを報告した。今回は、破骨細胞前駆細胞様の形質を持つ Raw 細胞を用いて、VEGF が破骨細胞前駆細胞に及ぼす影響について検討した。Raw 細胞は、VEGF の I 型受容体である flt-1 を強発現し、VEGF により運動能が上昇したことから、破骨細胞前駆細胞の骨吸収、骨破壊局所への動員が VEGF によって制御されている可能性が考えられた。RA 滑膜に豊富に存在する VEGF は、強力な血管新生誘導活性のほかこのように破骨細胞性骨吸収にも関与していると考えられる。前回報告したように、flt-1 は RA 滑膜の血管内皮細胞と破骨細胞系細胞に、また flk-1 は RA 滑膜の血管内皮細胞に発現されており、VEGF のシグナルをブロックすることにより血管新生のみならず破骨細胞性骨吸収も抑制するという新治療法の可能性が示唆された。

E. 結論

(1) 関節炎対照群に認められる関節軟骨の Safranin-O 染色性の低下は、YM175 投与に

より抑制され、YM175 は骨破壊のみならず関節軟骨の破壊に対しても抑制的に作用することが示唆された。(2) YM175 処理により Raw 細胞および RA 滑膜線維芽細胞における TNF- α 等の炎症性サイトカインの産生は強力に抑制され、YM175 の抗炎症作用はこれらの炎症性サイトカインの産生抑制を介したのものである可能性が示唆された。(3) 破骨細胞前駆細胞様の形質を持つ Raw 細胞は、VEGF の I 型受容体である flt-1 を強発現し、VEGF により運動能が上昇したことから、破骨細胞前駆細胞の骨吸収、骨破壊局所への動員が VEGF によって制御されていることが示唆され、VEGF のシグナルをブロックすることにより血管新生のみならず破骨細胞性骨吸収も抑制するという新治療法の可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. Zhao.H, Shuto T, Hirata G, Iwamoto Y, Aminobisphosphonate (YM175) inhibits bone destruction in rat adjuvant arthritis. J. Orthop. Sci, 5(4) : 397-403, 2000
2. Fukushi J, Ono M, Morikawa W, Iwamoto Y, Kuwano M The activity of soluble VCAM-1 in angiogenesis stimulated by IL-4 and IL-13 J.Immunol.165:2818-2823,,2000
3. Kurata K, Uemura T, Nemoto A,Tateishi T, Murakami T, Miura H, Iwamoto Y, Mechanical strain effect on bone-resorbing activity and mRNA expressions of marker enzymes in isolated osteoclast culture. J.Bone.Miner Res,in press,2000
4. Takeda T, Morimoto N, Kinukawa N, Nagamine R, Shuto T, Iwamoto Y, Miyahara H Factors affecting emotional instability in female rheumatoid arthritis outpatients with limited functional disorder Mod Rheumatol.10:240-246,2000
5. Tanaka K, Matsumoto Y, Nakatani F, Iwamoto Y, Yamada Y, A zinc finger transcription factor, α A-crystallin binding protein1, is a negative regulator of the chondrocyte-specific enhancer of the α 1(II) collagen gene. Mol. Cell. Biol, 20(12):4428-4435, 2000
6. Mawatari T, Miura H, Higaki H, Moro-oka T, Kurata K, Murakami T, Iwamoto Y Effect of vitamin K2 on 3-D trabecular microarchitecture in ovariectomized rats. J. Bone Mineral Res, 15(9):1810-1817, 2000
7. Oda Y, Sakamoto A, Saito T,Kinukawa N, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M Expression of hepatocyte growth factor(HGF)/Scatter factor and its receptor c-MET correlates with poor prognosis in synovial sarcoma. Hum. Pathol,31(2) :185-192, 2000
8. Saito T, Oda Y, Sakamoto A, Tamiya S, Kinukawa N, Hayashi K, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M, Prognostic value of the preserved expression of the E-cadherin and catenin families of adhesion molecules and of β -catenin mutations in synovial sarcoma. J.Pathol,192:342-350,2000
9. Jingushi S, Lohmander.L.S, Shinmei.M., Hoerner.L , Lark.M.W, Sugioka Y, Iwamoto Y. Markers of joint tissue turnover in joint fluids from hips with osteonecrosis of the femoral head. J.Orthop. Res.18(5):728-733,2000
10. Oda Y, Sakamoto A, Saito T, Kawaguchi S, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. Molecular abnormalities of p53, MDM2,and H-ras in synovial sarsoma Mod. Pathol,13(9): 994-1004, 2000
11. Oda Y, Nka T, Takeshita M, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M Comparison of histological changes and changes in nm23 and c-MET expression between primary and metastatic sites in osteosarcoma;A clinicopathologic and immunohistochemical study. Hum. Pathol, 31(6) : 709-716, 2000
12. Harimaya K, Tanaka K, Matsumoto Y, Sato H, Matsuda S, Iwamoto Y Antioxidants inhibit TNF α -induced motility and invasion of human osteosarcoma cell:possible involvement of NF κ B activation. Clin Exp. Metastasis, 18 : 121-129, 2000