

13. Kawauchi S, Fukuda T, Oda Y, Saito S, Oga A, Takeshita M, Yokoyama K, Chuman H, Iwamoto Y, Sasaki K, Tsuneyoshi M, Prognostic significance of apoptosis in synovial sarcoma:Correlation with clinicopathologic parameters, cell proliferative activity and expression of apoptosis-related proteins. *Mod. Pathol*, 13 : 755-765, 2000
14. Miyanishi K, Yamamoto T, Iriya T, Yamashita A, Jingushi S, Noguchi Y, Iwamoto Y, A high LDL/HDL cholesterol ratio as a potential risk factor for corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Rheumatology*, 2000, in press
15. Nagamine R, Hanada Y, Kondo M, Fukumoto S, Shuto T, Nakashima Y, Hirata G, Katayama A, Iwamoto Y Quantification of bone volume on radiographs using NIH image *Jpn. Rheum Ass*, 2000, in press
16. Miyanishi K, Yamamoto T, Nakashima Y, Shuto T, Jingushi S, Noguchi Y, Iwamoto Y Subchondral changes in transient osteoporosis of the hip. *Skeletal Radiol*, 2001, in press
17. Sakamoto A, Oshiro Y, Itakura E, Nikaido O, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M Immunoexpression of ultraviolet photoproducts and p53 mutation analysis in atypical fibroxanthoma and superficial malignant fibrous histiocytoma. *Mod. Pathol*, 2001, in press
18. Sakamoto A, Oda Y, Adachi T, Tamiya S, Matsuda S, Tanaka K, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M, H-ras oncogene mutation in dedifferentiated liposarcoma: Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. *Am.J. Clin. Pathol*, 2001, in press

軟骨におけるADAMTSの発現とADAMTS4 (aggrecanase-1) のTIMPによる阻害

分担研究者 岡田保典
慶應義塾大学医学部 病理学教室 教授

本研究課題では、最近その実体が明らかになってきた"aggrecanase"活性をもつADAMTSの慢性関節リウマチ(RA)や変形性関節症(OA)関節軟骨組織での発現と局在を検討するとともに、ADAMTS1,4のプロテオグリカン分解活性とADAMTS4に対するTIMP-1,2,3,4の阻害活性について調べた。その結果、ADAMTS1,4はOAとRA関節軟骨細胞で発現され、ADAMTS4の局在はOA関節軟骨破壊の程度と正の相関を示した。また、ADAMTS4のアグリカン分解活性はTIMP-3で最も強く阻害されることが実証された。これらのデータより、ADAMTS1,4は関節軟骨破壊に重要な役割を果たすことが示唆され、TIMP-3はADAMTS4の組織内インヒビターとして働く可能性が考えられた。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ(RA)や変形性関節症(OA)における関節軟骨破壊に軟骨細胞外マトリックスの分解は必須である。これまでの我々の研究は、関節軟骨や滑膜に由来する多種類のマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)が関節軟骨破壊に関与することを示してきた。いっぽう、MMP近縁分子であるADAM (a disintegrin and metalloproteinase) 遺伝子ファミリーの存在が近年明らかとなり、これまでに30種類近くが同定されている。これらのうちスロンボスポンジンモチーフをもつADAMTS(ADAM with thrombospondin motif)分子については9種類がクローニングされており、ADAMTS4,5は軟骨の主要プロテオグリカン(アグリカン)分解能を有することから、それぞれaggrecanase-1,2と呼ばれ特に注目されている。しかし、ADAMTS分子の関節組織での発現はほとんど知られていない。また、その生化学的性質に関する情報も限られており、ADAMTS分子のインヒビターに関しては不明である。さらに、関節軟骨破壊におけるMMPとの役割分担についての研究はほとんどみられない。本研究では、主要なADAMTS分子であるADAMTS1~5のRAとOA関節軟骨組織での発現をまず調べ、軟骨での発現が確認されたADAMTS1,4のアグリカン分解活性を検討するとともに、MMPに対する共通のインヒビターであるTIMP(tissue inhibitors of metalloproteinases)のADAMTS4に対する阻害活性を解析した。

B. 研究方法

1). 合成MMPインヒビターによる軟骨細胞外マトリックス分解阻害: 5種類の合成MMPインヒビターを用いて、軟骨プロテオグリカン分解とコラーゲン分解に対する阻害活性を検討した。プロテオグリカン分解阻害活性は、インヒビター存在・非存在下で、ウサギ培養関節軟骨細胞により標識された³⁵Sの遊離とウサギ関節軟骨組織片からのプロテオグリカ

ンの遊離をそれぞれ放射活性とメチルメチレンブルーによる比色法でアッセイした。また、コラーゲン分解に対する阻害活性は、インヒビター存在・非存在下で、市販のヒト関節軟骨細胞を¹⁴C標識コラーゲンフィルム上で培養し、遊離してくる放射活性を測定した。また、ウサギ関節軟骨組織片の培養系で、組織片と培養液中のヒドロキシプロリン量の測定によって阻害活性を解析した。

2). RAとOA関節軟骨組織におけるADAMTS1~5の発現: 人工関節置換術時に得られた関節軟骨組織よりRNAを抽出し、ADAMTS1~5のmRNA発現をそれぞれの特異的なプライマーを用いてRT-PCRで調べた。同時にRNA抽出部位の軟骨より組織を採取し、組織学的に検討した。

3). 関節軟骨におけるADAMTS4の局在と産生: ADAMTS4のアミノ酸シーケンスから他の分子と相同性のない部位のペプチドを合成し、これを抗原にしてモノクローナル抗体を作成した。得られたクローンをイムノプロット法でスクリーニングし、リコンビナントADAMTS4を認識する特異的モノクローナル抗体を得た。また、本抗体を用いて、人工関節置換術時に得られたOAとRA関節軟骨組織パラフィン切片上での免疫組織学的局在を検討した。対照として、大腿骨頸部骨折患者の人工骨頭置換術時に得られた正常関節軟骨組織を用いて、同様に免疫染色した。また、RAとOA関節軟骨組織のホモジネートを作成し、イムノプロット法によりADAMTS4分子の産生を調べた。

4). ADAMTS1,4のプロテオグリカン分解活性: 精製したリコンビナントADAMTS4を用いて、アグリカンとインキュベート後、分解産物をネオエピトープを認識する抗体によるイムノプロット法で確認した。また、リコンビナントADAMTS1を精製し、同様にアグリカンとインキュベートし、分解産物のN末端アミノ酸シーケンスを決定した。さらに、リコンビナントADAMTS4を脳のプロテオグリカン(プレビカン)とインキュベートし、分解産物のN末端シーケンスを

行った。

5). TIMP-1,2,3,4によるADAMTS4活性阻害: リコンビナントADAMTS4を種々の量比でTIMP-1, 2, 3, 4と混合後2時間インキュベートし、アグリカン分解活性に対する阻害活性を検討した。アグリカン分解活性は、ADAMTS4により出現するアグリカンフラグメントをネオエピトープに対する抗体を用いたイムノブロット法で解析した。

(倫理面への配慮)

ウサギ関節軟骨組織片および関節軟骨細胞培養にあたっては、ウサギを麻酔下で屠殺し、膝関節軟骨組織を無菌的に採取した。一方、RA、OAおよび大腿骨頸部骨折患者の関節置換術時に、インフォームドコンセントのもとに、膝関節あるいは大腿骨頭より軟骨組織を無菌的に採取し、実験に用いた。

C. 研究結果

1). MMPインヒビターによる軟骨細胞外マトリックス分解阻害: 培養関節軟骨細胞と関節軟骨組織片におけるコラーゲン分解活性は、5種類のいずれのインヒビターでも低濃度で阻害された。これに対し、プロテオグリカン分解活性の方は、高濃度でも阻害はきわめて弱かった。

2). RAとOA関節軟骨組織におけるADAMTS1~5の発現: 関節軟骨組織におけるADAMTS1~5のmRNA発現をRT-PCRで調べたところ、OAではADAMTS1とADAMTS4は中等度破壊(Mankin score=5-9)の軟骨において発現されるのに対し、軽度破壊軟骨(Mankin score=2-4)ではほとんど検出されなかった。一方、ADAMTS5は恒常的に発現されており、ADAMTS2,3の発現は一定しなかった。非パンス部のRA関節軟骨では、ADAMTS1~5はいずれのサンプルにおいても発現していた。

3). 関節軟骨におけるADAMTS4の局在: ADAMTS4の特異的モノクローナル抗体を用いてOA関節軟骨での免疫組織学的局在を調べたところ、プロテオグリカン消失部位の関節軟骨細胞に免疫染色され、その染色率はMankin scoreと正の相関を示した($r=0.728$, $p<0.001$)。RA関節軟骨においても、ADAMTS4は関節軟骨細胞に局在した。また、RA関節軟骨組織のホモジネート中に分子量約69kDaの活性型ADAMTS4の存在がイムノブロット法により証明された。

4). ADAMTS1,4のプロテオグリカン分解活性: ADAMTS4でアグリカンをインキュベートすると、G1-G2間のGlu³⁷³-Ala³⁷⁴ボンドの分解により出現したG1ドメインを含む60kDaの特異的フラグメントがイムノブロット法で検出された。また、プレピカンの分解実験から、ADAMTS4はGlu³⁹⁵-Ser³⁹⁶ボンドを切断することがわかり、ADAMTS4はレクチカンファミリーのプロテオグリカンに共通したアミノ酸配列

部を切断することが明らかとなった。一方、ADAMTS1もアグリカンをADAMTS4による切断部位の一つ(Glu¹⁸⁷¹-Leu¹⁸⁷³)を含む3カ所で切断した。

5). TIMP-1,2,3,4によるADAMTS4の活性阻害: ADAMTS4によるアグリカン分解活性の検出にあたっては、アグリカン(100 μg)に対してADAMTS4(8 nM)を加え、0-24時間インキュベート後、Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ボンド切断で出現する60kDa特異的フラグメントをイムノブロットで検出した。その結果、12時間のインキュベーションが最適であることを決定した。次いで、0-1000 nMのTIMP-1, 2, 3, 4による阻害活性を検討したところ、いずれのTIMPによってもADAMTS4活性は阻害された。しかし、TIMP-3の阻害活性は最も強く(IC₅₀=7.9 nM)、IC₅₀値からTIMP-1, 2より少なくとも44倍以上、TIMP-4より250倍以上強いことが証明された。

D. 考察

合成MMPインヒビターを用いた本実験データは、関節軟骨のコラーゲン分解にはMMPが主役を演ずるものの、アグリカン分解には他のプロテアーゼが作用する可能性を示した。RAやOA関節液中にはMMPによるアグリカン分解フラグメントに加えて、それとは異なる部位で切断されたフラグメントが出現し、"aggrecanase"の存在が指摘されてきた。最近ようやく"aggrecanase"の一部はADAMTS分子であることが明らかにされた。MMPインヒビターを用いた本実験データは、アグリカン分解には"aggrecanase"がより重要であることを示唆している。そこで、本研究では"aggrecanase"の候補であるADAMTS1~5のRAとOAの関節軟骨での発現を検討した。その結果、ADAMTS1, 4の発現があり、ADAMTS4についてはアグリカン消失部位での軟骨細胞による産生と同部での活性化を証明した。また、ADAMTS1, 4のアグリカン分解活性を実証した。さらに、MMPインヒビターであるTIMP-1, 2, 3, 4のうちTIMP-3が最も強くADAMTS4活性を阻害することを明らかにした。TIMP-3のADAMTS4に対する阻害力は、MMPに対するインヒビター活性に匹敵することから、TIMP-3は生体内におけるADAMTS4インヒビターである可能性も考えられた。我々は昨年度の研究において、ペントサン硫酸によるTIMP-3の特異的産生亢進作用を報告しており、ペントサン硫酸はRAやOA関節軟骨破壊抑制剤として有望と推定される。

E. 結論

RAやOAの関節軟骨破壊におけるアグリカン分解にADAMTS1,4が重要であり、TIMP-3はADAMTS4とMMP活性阻害を通して軟骨破壊抑制の切り札になる可能性が示唆された。

F. 研究発表

- (1).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.* 43:812-820, 2000.
- (2).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.* 191:426-433, 2000.
- (3).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.* 59:455-461, 2000.
- (4).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.* 80:677-687, 2000.
- (5).Nakamura H., Fujii Y., Inoki I., Sugimoto K., Tanzawa T., Matsuki H., Miura R., Yamaguchi Y. and Okada Y.: Brevican is degraded by matrix metalloproteinases (MMPs) and aggrecanase-1 (ADAMTS4) at the different sites. *J. Biol. Chem.* 275:38885-38890, 2000.
- (6).Kuno K., Okada Y., Kawashima H., Nakamura H., Miyasaka M., Ohno H. and Matsushima K.: ADAMTS-1 cleaves a cartilage proteoglycan, aggrecan. *FEBS Lett.* 478:241-245, 2000.
- (7).Okada Y.: Proteinases and matrix degradation. In *Kelley's Textbook of Rheumatology*. Ed. by Ruddy S., Harris E. D., Jr. and Sledge C. B. 6th edition, W. B. Saunders Company. Philadelphia, pp55-72, 2001.
- (8).Okada Y.: Immunohistochemistry of MMPs and TIMPs. In: *Methods in Molecular Biology Volume 151- Matrix Metalloproteinase Protocols*. Ed. by I. M. Clark. Human Press Inc., Totowa, USA. 359-365, 2001.

滑膜血管新生抑制による関節破壊制御に関する研究

分担研究者 木村友厚、富山医科薬科大学整形外科学教室教授

松野博明、遊道和雄、中沢不二雄、片山理恵、富山医科薬科大学・整形外科

澤井高志、宇月美和、岩手医科大学・病理学

Olsen BR、ハーバード大学細胞生物学

山口典子、東京医科歯科大学・難治疾患研究所

研究要旨 慢性関節リウマチ (RA) の滑膜増殖と関節破壊に関わる重要な要因の一つに血管新生の異常亢進がある。この血管新生が滑膜増殖と直接に関連することを示し、さらにその結果に基づいて、血管新生を制御することにより、RA 滑膜増殖の抑制を引き起こすことができるかどうか、さらに関節破壊進行を抑制できるかを検討した。この目的のために、強い血管新生抑制作用を有する XVIII 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用い、RA 動物モデルでの治療実験を試みた。ヒト組み換えエンドスタチンを産生し、これをヒト RA 組織を移植した SCID マウス (SCID-HuRAg マウス) に投与した。その結果、著明な血管新生の抑制が認められた。さらに滑膜増殖の顕著な退縮とともに、炎症細胞も有意に減少した。また予備的結果で関節破壊を抑制する可能性が推定された。この結果は、エンドスタチンのような血管新生抑制分子を用いた RA 病態の制御が有効であり、実際に *in vivo* での新たな治療法として使用できる可能性を示すものである。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ (RA) の滑膜増殖には血管新生が深く関与していることが知られている。血管新生は促進因子と抑制因子のバランスの上に成り立っているが、通常は抑制因子が優位なため血管新生は抑えられている。しかし RA 滑膜では促進因子が優位となり血管新生が誘導されている所見が観察される。また RA の滑膜増殖過程においても血管新生が極めて重要な働きを持つことが既に証明されている。実際に RA 滑膜では、RA に特徴的な病理所見が完成される前の病早期から、すでに血管新生の所見が認められる。そこで我々は先ず主要な血管新生促進因子である Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) に関して、その刺激により誘導される血管の管腔形成の機序を検討した。さらに血管新生の抑制が RA の新しい治療になり得るかどうかを検討する目的で、強力な血管新生抑制作用を有する XVIII 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用い、RA 動物モデルの治療実験を試みた。

B. 研究方法

1) 培養血管内皮細胞に VEGF を添加し、血管の新生を三次元管腔形成モデルを用いて検討した。また血管内皮細胞によるマトリックス蛋白、インテグリンの発現を検討した。

2) RA の血管新生を抑制することにより、滑膜増殖制御と関節破壊抑制がどの程度可能か、また実際の RA の治療手段として用いることができるかどうかを検討する目的で、血管新生抑制作用を有するエンドスタチンを用いて SCID-HuRAg マウスによる治療実験を試みた。本モデルは SCID マウスに RA 患者組織を移植して作成される我々が新しく開発した RA 疾患動物モデルである。RA 組織は関節置換術時に採取したものをを用い、インフォームドコンセントを得た上で使用した。マウスの使用に際しては適切な苦痛軽減法を用いた実験計画を作成し、動物実験委員会による審査と承認を受けた上で実験を開始した。上記のモデルマウスにエンドスタチンを投与して血管新生抑制効果、さらには滑膜増殖・炎症の抑制効果を検討したが、エンドスタチンは 293-EBNA 細胞中で組み換えヒトエンドスタチンとして産生させたものを用い、10mg/kg または 50mg/kg を注射器で SCID-HuRAg マウスの背部皮下の RA 関節組織周囲に投与した。投与後のヒト RA 組織の退縮を検討するとともに、滑膜 T cell, B cell, マクロファージの変化、また IV 型コラーゲンならびに抗 vWF 染色により、滑膜血管形成抑制の程度を検討した。

C. 研究結果

1) 培養血管内皮細胞に VEGF を添加し、血管

新生を三次元管腔形成モデルを用いて検討したところ、VEGF 添加により培養血管内皮細胞は顕著な管腔形成を呈した。この過程で VEGF の刺激によって血管内皮細胞は増殖能と遊走能が亢進し、さらに細胞外基質の分解能を亢進するばかりでなく、新たなマトリックス蛋白を産生することが明らかとなった。また血管内皮細胞上に新生マトリックス蛋白のレセプターである avb3 インテグリンの発現も顕著に認められた。ここで avb3 は血管内皮のアポトーシス阻害インテグリンとして働いていた。

2) RA の血管新生を抑制することにより、RA 滑膜増殖の制御、さらには関節軟骨破壊の抑制につながる治療が成し得るかどうかを、SCID-HuRAg マウスを用いて解析した。このモデルマウスにヒト組み換えエンドスタチン 10mg/kg あるいは 50mg/kg をそれぞれ一回投与したところ、移植滑膜組織は濃度依存性に有意に退縮することが確認された。一方、RA 関節軟骨組織には破壊進行変化を認めなかった。また SCID-HuRAg マウス移植組織における血管の変化を抗 IV 型コラーゲン、あるいは抗 vWF 抗体を用いて組織学的に検討すると、滑膜組織中の血管数がエンドスタチン投与により著明に減少することが明らかとなった。さらに滑膜に浸潤している炎症性細胞数も有意に減少することが明らかとなった。免疫染色を行って減少した炎症性細胞を同定したところ、RA の病態形成に関与する CD4 陽性 T 細胞・マクロファージ・B 細胞数のいずれもが減少していた。さらにエンドスタチン投与により、滑膜細胞におけるアポトーシスが促進されていることも確認された。

D. 考察

RA の病態形成において、滑膜における血管新生は重要な役割を担っている。今回の結果は、この RA 滑膜増殖と血管新生との関与を確認し、さらに血管新生を抑制することが、滑膜増殖を制御できる有用な手段となることを明らかにしたものである。XVIII 型コラーゲン由来の血管新生抑制因子であるエンドスタチンについては、すでに腫瘍増殖制御の観点から様々な効果が報告されている。しかしながらその効果発揮には大量のエンドスタチンが必要とされる場合があり、血管新生抑制効果の程度に疑問が残っていた。今回われわれが作成して使用したヒト組

み換えエンドスタチンは、10mg/kg の低用量でも著明な血管新生抑制と滑膜退縮効果を示した。これは作用の強い組み換えヒト分子が得られた事とともに、このヒトエンドスタチンが実際に *in vivo* で RA をターゲットとして血管新生と滑膜増殖を強力に抑制することを示している。さらなる関節破壊抑制効果については長期の経過を観察中であるが、このような方法で RA の血管新生を抑制することは、RA 病態を抑える新しい治療法となると考えられる。

発表論文

- ・ Yudoh K, Matsuno H, Nakazawa F, Yonezawa T, Kimura T. Reduced expression of the regulatory CD4+ T cell subset is related to Th1/Th2 balance and disease severity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000 43: 617-627
- ・ Yudoh K, Matsuno H, Osada R, Nakazawa F, Katayama R, and Kimura T. Decreased cellular activity and replicative capacity of osteoblastic cells isolated from the periarticular bone of rheumatoid arthritis patients compared with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2000 43: 2178-2188
- ・ Matsuno H, Yudoh K, Watanabe K, Nakazawa F, Aono H, and Kimura T. Stromelysin (MMP-3) in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis has potential to cleave membrane bound Fas ligand. *J Rheum* 2001 28: 22-28

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

研究分担者 富田哲也 大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学

高野裕史、高樋康一郎、中瀬尚長、坪井秀規、吉川秀樹、越智隆弘¹⁾

大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学・同医工学治療学¹⁾

富田奈留也 同加齢医学

森下竜一、金田安史 同加齢医学

研究要旨 我々は慢性関節リウマチ滑膜増殖の機序として細胞周期に注目した。サイクリン依存性キナーゼの阻害蛋白である p21 の cDNA をリウマチ増殖滑膜に遺伝子導入し、その影響について検討した。P21 遺伝子導入により滑膜細胞は有意に G1 停止に移行し一部の細胞にはアポトーシスが誘導され、滑膜増殖も抑制された。ヒト関節軟骨細胞との共培養系で組織学的に p21 遺伝子導入により関節軟骨破壊は有意に抑制された。これらの結果は慢性関節リウマチにおける細胞周期制御による遺伝子治療の有用性を示唆するものと考えられた。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ(RA)の特徴的な病態の一つに滑膜の異常増殖があげられる。増殖滑膜は関節局所での骨・軟骨の変性破壊に関与していると考えられている。近年 RA 滑膜組織や培養滑膜細胞において癌抑制遺伝子 p53 の過剰発現が報告されている。p53 は DNA 損傷を ATM を介して認識し、G1 期停止とアポトーシスを誘導する機能を有すると考えられているが、RA 滑膜組織や培養滑膜細胞に発現している p53 遺伝子には変異が認められ、p53 が不活化され p53 依存性アポトーシスの欠損が滑膜の異常増殖の大きな原因になっていると推測されている。P21 はサイクリン依存性キナーゼの阻害蛋白質であり、p53 の下流に位置し、RB 蛋白質のリン酸化を阻害することにより G1 停止を引き起こす。最近 P21 は細胞周期の停止のみでなくアポトーシスの誘導にも関与する可能性が示唆されている。本研究では RA 滑膜増殖および関節破壊に対する p21 の影響について検討した。

B. 研究方法

RA 患者 5 名(女性 5 名)、平均年齢 55.2 歳(34~67 歳)を対象とした。越智の病型分類では全例多関節破壊型病型であった。患者の同意を得た上で、人工関節置換術時に滑膜組織を採取した。滑膜組織を酵素処理し得られた滑膜細胞を 3~5 継代したものを実験に使用した。Sra プロモーターを有するヒト p21 遺伝子を組み込んだ expression vector を作製した。コントロールとし

て p21 遺伝子を組み込まない vector を用いた。培養滑膜細胞に HVJ-リポソームを用いてヒト p21 遺伝子を導入し、2%FCS を含む DMEM にて 4 日間培養した後、以下の項目について検討した。P21 に対するモノクローナル抗体を用い、Western blotting 法にて p21 の培養滑膜細胞における発現を確認した。細胞増殖は細胞増殖測定キットを用い 450nm での吸光度を測定した。アポトーシスの誘導については、fluorescent DNA-binding dye を用い、核クロマチンの形態的特徴を観察した。また Hoechst 33342 による染色、DNA fragmentation を ELISA を用いて検討した。アポトーシスの誘導率については 400 個の細胞を顕鏡し明らかにアポトーシスを起こしている細胞数を数え検討した。細胞周期についてはフローサイトメトリーを用いて検討した。P21 遺伝子導入による関節破壊抑制効果を検討する目的で RA 滑膜組織に P21 遺伝子を HVJ-リポソーム法で導入し 24 時間培養後、ヒト関節軟骨片と共に SCID マウスに移植した。4 週後に滑膜・軟骨片を摘出し、組織学的に軟骨破壊について検討した。

C. 研究結果

p21 の蛋白レベルでの発現は p21 遺伝子を導入した滑膜細胞でコントロールに比べ上昇していた。細胞増殖キットにて測定した吸光度は、p21 遺伝子導入滑膜細胞群：0.363、コントロールベクター導入滑膜細胞：0.422 と、p21 遺伝子導入群で有意に細胞増殖は抑制されていた ($p<0.01$)。p21 遺伝子導入群の滑膜細胞には cell shrinkage、

membrane blebbing などアポトーシスに特徴的な所見が認められた (図 1)。DNA fragmentation は p21 遺伝子導入滑膜細胞群でコントロールベクター導入滑膜細胞群に比べ有意に増加していた ($p<0.05$)。フローサイトメトリーにて細胞周期を検討したところ p21 遺伝子導入滑膜細胞群では 73%の細胞が G1 停止期にありコントロールベクター導入滑膜細胞群 (41%) に比べ有意に高率に細胞周期が停止していた ($p<0.05$)。

p21 遺伝子導入滑膜組織による軟骨破壊はコントロールベクター導入あるいは未治療の滑膜組織にくらべ明らかに抑制されていた。

D. 考察および結論

今回の結果より p21 の RA 滑膜細胞に対する影響は、細胞周期を停止させ、細胞増殖を抑制するのみでなく、一部の細胞にはアポトーシスも誘導されることが明らかとなった。さらに細胞増殖抑制効果のみでなく関節破壊抑制効果も認められた。我々はこれまで HVJ-リボゾーム法を用い関節内滑膜組織に効率的に遺伝子を導入できることを明らかにしている。in vivo 関節内 p21 遺伝子導入は、局所の滑膜増殖を伴う RA においては、滑膜増殖を抑制し、関節局所での病態改善に有効な治療法となる可能性が示唆された。

E. 研究発表

学会発表

1. 富田哲也、他：p21 による遺伝子治療の可能性-慢性関節リウマチ滑膜細胞増殖の制御- 第 4 4 回日本リウマチ学会総会 2000 年 5 月横浜
2. Tomita T, et al.: p21 gene transfer into rheumatoid synovitis suppressed the articular cartilage degradation. American College of Rheumatology 64th Annual Scientific Meeting, October, 2000, Philadelphia

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—

分担研究者 藤井 克之 東京慈恵会医科大学整形外科教授

研究要旨 慢性関節リウマチ(RA)罹患関節では、関節破壊の初期より、関節軟骨深層の細胞ならびに軟骨下骨髄の多核巨細胞にc-fosが過剰に発現され、本遺伝子が、軟骨組織のマトリックス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、関節の破壊に密接に関与していると考えられる。そこで、本研究では、c-fos遺伝子の作用部位での競合的阻害を目的としたAP-1ヌクレオチドを、RAの病態モデルであるコラーゲン関節炎(CIA)に投与し、関節破壊に与える影響について検討した。CIAにおいては、明らかな関節破壊が生じる以前より、軟骨細胞のみならず軟骨下骨髄に集積する活性化された破骨細胞様の細胞とその前駆細胞と考えられる単核の細胞にもc-fosが強く発現し、本遺伝子がこれらの細胞の分化・活性化に関与していることが推察された。AP-1ヌクレオチドによる競合的阻害は、滑膜炎の抑制以上に、これらの細胞の分化・活性化、と軟骨細胞自身による軟骨破壊などを抑制することにより、関節炎の発症ならびに関節破壊を抑制する事実が観察された。

A.研究目的

我々は、これまでに、慢性関節リウマチ(RA)罹患関節では、関節軟骨の破壊は深層より始まり、これに接する軟骨下骨髄には多核巨細胞、マクロファージ、T cellなどが集積してくるを見出ししている。また、こうした関節破壊の初期には、関節軟骨深層の細胞ならびに軟骨下骨髄の多核巨細胞にc-fosが過剰に発現されていることを確認している。この癌遺伝子の1つであるc-fosは、軟骨マトリックスの分解酵素の発現を促進し、そのインヒビターの発現を抑制することから、関節の破壊に密接に関与していると考えられる。そこで、本研究では、c-fos遺伝子の作用部位での競合的阻害を目的としたAP-1ヌクレオチドを、RAの病態モデルであるコラーゲン関節炎(CIA)に投与し、関節軟骨と骨髄におけるc-fosの発現と関節破壊に与える影響について検討した。

B.研究方法

Lewis系メスラット72匹に、ウシII型コラーゲンをを用いてCIAを作製した。2本鎖AP-1オリゴヌクレオチドとして (AP-1 oligo), 5' -GTGTTACCCCTGAGT CAGAGGAGAA-3'、3' -AATGGGACTCAGTCTCC TCTTGGG-5'、また、対照としてAP-1部位のみランダムな同一長の2本鎖オリゴヌクレオチド (control oligo) 5' -GTGTTACCCGCCTAAGGAGGAGGA-3'、3' -AATGGGCGGATTCCTCCTCTTGGG-5' を作製し、これらオリゴの純度について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12匹6群に分け、オリゴ投与群である3群には、感作1週目より週2回5週間連続で、1回5,25,100μgのAP-1 oligo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25,100μgのcontrol oligoを腹腔内に投与する群を設定した。経時的に、Arthritic score,

血清中の抗II型コラーゲン (CII) 抗体価、脛骨骨髄内の酒石酸耐性酸フォスファターゼ(TRAP)陽性細胞数の変化を測定した。さらに、膝・足・手関節について組織学的観察を行った。

C.研究結果

昨年度報告したように、AP-1投与群の25ならびに100μg投与群では関節炎の発症と進展が抑制された。本年度はこうした作用のメカニズムをより詳細に検討するため、肉眼的な関節炎が発症する以前の組織学的変化を観察した。対照群では、未だ関節の構築が保たれているものの、一部の滑膜組織には表層細胞の立方化と同細胞でのc-fos発現が観察された。さらに、こうした滑膜の変化の有無に拘わらず、軟骨細胞ならびに軟骨下には単核あるいは多核のc-fos陽性細胞が観察され、これらの細胞のうち多核の細胞のほとんどがTRAP陽性、カルシトニンレセプター抗体陽性を示したが、RANKによる染色は極めて弱かった。軟骨細胞にもc-fos発現が観察された。同時期のAP-1投与群では、滑膜にわずかなc-fosの出現を認める関節が存在したものの、表層細胞には立方化は認められなかった。また、関節軟骨細胞のc-fos陽性細胞数は対照群に比べ明らかな差はなかった。しかし、対照群の軟骨細胞においては、c-fosの発現に伴ってMMP-1,MMP-3の強い発現とTIMP-1の発現の低下が認められのに対して、AP-1投与群では対照群に比べて、MMPの発現は軽度でありTIMP-1の発現が明瞭であった。軟骨下骨髄へのc-fos陽性細胞の集積は対照群に比べると有意に少なかった。

D. 考察

CIAでは、明らかな関節破壊が生じる以前より、軟骨細胞にはc-fosが発現しマトリックスの合成抑制と分解酵素とそのインヒビターとの間に不均衡が生じていた。同週齢の健常ラットの組織像ではこうしたc-fosの発現が観察されないことから、これらの変化はCIAの発症に先立つ現象と考えられた。さらに、軟骨下骨骨髓に集積する活性化された破骨細胞様の細胞とその前駆細胞と考えられる単核の細胞にもc-fosが強く発現していることから、本遺伝子がこれらの細胞の分化・活性化に関与していることが推察され、AP-1ヌクレオチドによる競合的阻害は、CIAにおいて滑膜炎の抑制以上に、これらの細胞の分化・活性化、と軟骨細胞自身による軟骨破壊などを抑制することにより、関節破壊を軽減したものと考えられた。

E. 結論

AP-1活性の亢進は、軟骨細胞自身によるマトリックス破壊および破骨細胞様細胞を分化・活性化することにより、RA関節の骨・軟骨破壊の発症と進展をもたらすことが見いだされた。したがって、このAP-1活性の亢進を抑制することは、RA罹患関節の破壊を抑制する新たな治療につながるものと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Michiko Tsuji, Yoshiaki Kato, Kazumi Hirakawa, Katsuyuki Fujii. : Possible role of c-fos expression in rheumatoid cartilage destruction. J. Rheum 2000; 27:1606-1621.

2) 辻 美智子、藤井克之 : RAにおける骨・軟骨破壊と軟骨細胞 リウマチ科 2000 ; 24(6):572-581

2. 学会発表

1) Fujii K, Tsuji M, Tajima M, Funaki K, Tanaka M: Rheumatoid Arthritis : A synovial Disease ? Annual European Congress of Rheumatology 2000 (June 22) ; Nice, France

2) 辻美智子, 舟木清美, 田中眞希, 田邊登崇, 向千恵美, 荒川雄一郎, 黒坂大三郎, 上野博嗣, 藤井克之 : AP-1オリゴ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—c-fos発現からみた作用機序の検討—

パネルディスカッション” 関節炎と関節破壊”

第15回日本整形外科学会基礎学術集会 2000 (9月29日) ; 京都

CDKI 遺伝子を用いた関節炎の遺伝子治療に関する研究

分担研究者 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

研究要旨 慢性関節リウマチ(RA)における遺伝子治療を開発する目的で、サイクリン依存性キナーゼインヒビター(CDKI)遺伝子 p21Cip1 をアデノウイルスベクターを用いてラットアジュバント関節炎の系に導入し、その効果を検討した。その結果、p21Cip1 も p16INK4a と同様に関節炎発症を有意に抑制したことから、関節選択的に p21Cip1 遺伝子を発現させることは RA において骨・関節破壊を防止するうえで有効な治療法となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

本研究の目的は、慢性関節リウマチ(RA)における滑膜細胞の増殖機構を細胞周期に関与する分子(特にサイクリン依存性キナーゼ(CDK)とそのインヒビター(CDKI)の面より多角的に検討し、骨関節破壊を防止しうる遺伝子治療法を開発することである。

B. 研究方法

1) サイクリン依存性キナーゼインヒビター(CDKI)遺伝子のクローニング: まず遺伝子療法に用いるための CDKI 遺伝子をクローン化するために、CDKI 遺伝子 p16INK4a, p21Cip1 cDNA を PCR 増幅してサブクローニングした遺伝子を得る。コントロールとして LacZ 遺伝子を用いる。2) ベクターへのサブクローニング: p16INK4a, p21Cip1 各遺伝子を E1A, E2B 領域を欠損するカセットコスミド(pAdex1 コスミド)にクローニングする。そして不活性化アデノウイルスと組み換えコスミドを 293 細胞へトランスフェクトして組み換えウイルスを作成する。また、insertion のないアデノウイルスとして Ax1w1 を用いる。3) 滑膜細胞への in vitro 遺伝子導入: RA 患者より得られた滑膜細胞と、前述の遺伝子を組み込んだアデノウイルスとを混合培養することにより遺伝子導入を行う。そして、IL-1, TNF α , PDGF などの炎症性サイトカインと滑膜細胞の培養系において滑膜細胞の増殖が抑制されるか否かを検討する。4) Lewis ラットを M.butyricum と鉱物油で免疫し、1週間後にヒト p21Cip1 遺伝子を含む組み換えアデノウイルス AxCAp21 を右膝に、LacZ 遺伝子を含むアデノウイルスを左膝に注射し、これを1週間おきに3回繰り返した。その後、関節

炎の進行を観察し、アジュバント投与4週間後に関節の組織学的検討を行う。

B. 研究結果

まず、In vitro においては、RA 由来滑膜細胞に p21Cip1 遺伝子を導入した際には、10%FCS 刺激下における滑膜細胞の増殖は用量依存的に抑制された。しかし Ax1w1 遺伝子導入ではこのような作用はみられなかった。また、p21Cip1 及び Ax1w1 遺伝子導入滑膜細胞につきアポトーシスの有無を Hoechst 33258 染色を用いて検討したところ、両者にアポトーシス誘導細胞数において有意差を認めなかった。

次に in vivo における遺伝子導入を行ったところ、AxCAp21 投与関節において、AxCALacZ 投与関節と比較して腫脹は著しく抑制されていた。また、この傾向は遺伝子導入を1回行うよりも3回行った場合により顕著に見られた。組織学的検討では、AxCAp21 投与関節は、滑膜増殖、単核球浸潤、骨びらん、軟骨破壊のいずれもが抑制されていた。これらの効果は p16INK4a を用いた遺伝子治療法の効果に匹敵するものであった。また、滑膜での PCNA 発現を検討したところ、AxCAp21 投与関節での発現は有意に抑制されていた。

D. 考察

In vitro においては、RA 由来滑膜細胞に P21Cip1 遺伝子導入により用量依存的に増殖抑制がみられたが、アポトーシス誘導は確認されなかったことから、今回の治療効果はアポトーシス誘導を介するものではないことが推測された。また、in vivo において AxCAp21 投与関節での PCNA 発現が抑

制されていたことから、p21Cip1 遺伝子導入により細胞周期抑制が実際に起こっていることが推測された。今後、p21Cip1 遺伝子によりどのような遺伝子発現が誘導されているのかについて DNA アレイなどを用いて現在、検討中である。

また、今回の検討では、p16INK4aのみならず p21Cip1 遺伝子の導入によってもほぼ同等の関節炎発症抑制効果がみられることが明らかとなり、滑膜細胞の細胞周期の制御により RA の新たな治療法が開発される可能性が示唆された。さらに、今回の知見から、生体内で CDKI 遺伝子発現を誘導できる化合物を発見できれば、これらも新たな RA の治療薬剤となる可能性も考慮されることである。現在、我々は *in vitro* における CDKI 遺伝子発現誘導系を確立し、新規合成化合物の検索を行っている。

E. 結論

p21Cip1 をアデノウイルスベクターを用いて遺伝子導入することにより、アジュバント関節炎の発症を阻止し、関節の軟骨・骨破壊を防止することができた。以上より、関節特異的な p21Cip1 は骨・関節破壊防止において有効な治療法となりうることを示された。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1. 論文発表

- 1) Nasu,K, Kohsaka,H, Nonomura,Y, Terada,Y, Ito,H, Hirokawa,K, Miyasaka,N: Adenoviral transfer of cyclin-dependent kinase inhibitor genes suppresses collagen-induced arthritis in mice. *J.Immunol*, 165:7246-7252, 2000.
- 2) Nonomura,Y, Kohsaka,H, Nasu,K, Terada,Y, Ikeda,M, Miyasaka,N: Suppression of arthritis by forced expression of cyclin-dependent kinase p21Cip1 gene into the joints. *Int.Immunol*, in press.

2. 学会発表

上阪 等、野々村美紀、長坂憲治、川嶋道子、那須公雄、宮坂信之：サイクリン依存性キナーゼインヒビター遺伝子発現の滑膜細胞へ及ぼす影響。第30回日本免疫学会総会
野々村美紀、上阪 等、長坂憲治、宮坂信之：

サイクリン依存性キナーゼインヒビター遺伝子 p21Cip1 遺伝子導入による RA 由来滑膜線維芽細胞の遺伝子発現の変化。第30回日本免疫学会総会

長坂憲治、上阪 等、野々村美紀、宮坂信之：サイクリン依存性キナーゼインヒビター遺伝子 p16INK4a 遺伝子導入による慢性関節リウマチ滑膜細胞の遺伝子発現への影響。第30回日本免疫学会総会

H.知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

研究協力者：上阪 等、野々村美紀、那須公雄

軟骨細胞での NF- κ B 活性化抑制 – 軟骨細胞代謝の特異性 –

研究協力者 岩田 久 名古屋大学医学部整形外科教授

研究要旨 各種関節疾患における関節軟骨の破壊には、様々な炎症起因物質が関与していることが判明しているが、軟骨破壊における軟骨細胞の細胞内の伝達機構に関しては未だ不明な点も多い。ヒト軟骨組織由来細胞株 HCS-2/8 において TNF- α による COX-2, MMP-1, 3 の遺伝子発現の増加は NF- κ B の活性化を介していること、この活性化は抗酸化剤では抑制されず、Proteasome inhibitor によって抑制された。この結果は、関節炎での軟骨破壊において軟骨細胞が重要な役割を担っており、その細胞内伝達経路の一つとして NF- κ B の活性化が関与していること、また軟骨細胞と骨芽細胞との比較で NF- κ B 活性化の機序が異なる可能性が示唆された。これは軟骨細胞特異的な治療法開発の糸口与えるものと期待している。

A. 研究目的

変形性関節症、慢性関節リウマチに代表される関節疾患における関節軟骨の破壊は、不可逆的な変化であるためその治療は非常に困難である。従来より炎症性細胞、滑膜細胞が主体であるとされているが、軟骨細胞自身による関与も示唆されている。軟骨細胞は軟骨組織における唯一の細胞種であり、軟骨基質の産生と分解を行うことで、成熟軟骨組織の恒常性を維持している。しかし、軟骨破壊における軟骨細胞の役割、細胞内の伝達機構に関しては未だ不明な点も多い。そこで、ヒト軟骨組織由来細胞株 HCS-2/8 を用いて、腫瘍壊死性因子 TNF- α による転写調節因子 NF- κ B の活性化の抑制及び、炎症や軟骨基質の破壊に関わる COX-2, MMP-1, 3 の遺伝子発現に対する抑制効果を調べた。同時に骨芽細胞との比較を行った。

B. 研究方法

ヒト軟骨組織由来細胞株 HCS 2/8 を用いて TNF- α を用い転写因子 NF- κ B の活性化し、これに各種抗酸化剤及び Proteasome inhibitor を作用させた。1 時間後細胞を回収し、細胞核分画を利用して EMSA 法にてを観察した。同様に TNF- α に抗酸化剤、Proteasome inhibitor を添加し細胞に 6 時間作用させ COX-2, MMP-1, 3 の遺伝子発現を Northern 法にて観察した。対象としてラット由来骨芽細胞様細胞 ROS を用いた。

C. 研究結果

HCS-2/8 細胞において、TNF- α によって活性化される NF- κ B は、p50-p65 heterodimer を形成

しており、TNF- α 濃度依存性に DNA 結合能は上昇した。

また COX-2, MMP-1, 3 の遺伝子発現も、TNF- α によって濃度依存性に増加した。

Proteasome inhibitor は、TNF- α による I κ B の分解を阻害し、NF- κ B の核内移行を妨げ、DNA 結合能の上昇を抑制することを、それぞれ Western blot, immunocytochemistry, EMSA 法を用いて、確認した。抗酸化剤にはこれら抑制効果は見られなかった。一方骨芽細胞様細胞 ROS では抗酸化剤による NF- κ B 活性化の抑制が見られた。COX-2, MMP-1, 3 の TNF- α による遺伝子発現の増加は、抗酸化剤によっては抑制されず、Proteasome inhibitor によって、著明に抑制された。骨芽細胞では抗酸化剤によるこれら遺伝子の発現抑制が観察された。

D. 考察

NF- κ B は Rel homology domain を持つ種々のサブファミリーよりなる 2 量体で、なかでも p50-p65 heterodimer が重要であるとされている。非刺激下においては、NF- κ B はその阻害因子である I κ B と結合した形で細胞質中に存在し、TNF- α 等の刺激により I κ B のリン酸化、さらにユビキチン化が起こり、蛋白分解酵素複合体である Proteasome により I κ B が分解され、NF- κ B が核内に移行する、これを NF- κ B の活性化と呼ぶ。核内に移行した NF- κ B は標的遺伝子上流の特異的結合部位に結合し、その遺伝子発現を増大させると考えられている。しかし、活性化される NF- κ B のサブユニットは細胞、組織により異なること、活性化に至る細胞内伝達経路が組織あるい

は刺激の違いによって異なるなど報告が錯綜している。抗酸化剤がNF- κ B抑制効果を持つことは関節組織の細胞種では滑膜細胞・骨芽細胞で明らかとされている。今回軟骨細胞では抗酸化剤による抑制が見られず、このことは軟骨細胞と骨細胞の代謝の違いを反映する所見と考えられた。Proteasome inhibitorはubiquitin-proteasome pathwayによる、NF- κ B阻害因子であるI κ Bの分解を阻害することによりNF- κ Bの活性化を抑制すると言われている。HCS-2/8細胞においても、Proteasome inhibitorは、TNF- α によるI κ Bの分解を阻害し、NF- κ Bの核内移行を妨げ、DNA結合能の上昇を抑制した。また、COX-2, MMP-1, 3のTNF- α による遺伝子発現の増加は、Proteasome inhibitorによって、著明に抑制された。関節炎での軟骨破壊において軟骨細胞が重要な役割を担っており、その細胞内伝達経路の一つとしてNF- κ Bの活性化が関与していることを示唆するものであると考えた。また軟骨細胞は滑膜細胞・骨芽細胞とは異なるNF- κ Bの活性化機序を持ち、これには酸化反応が関係していない可能性が示唆された。軟骨細胞が比較的酸素供給の乏しいと考えられる環境の組織に生活する細胞であることを考えると興味深い所見と思われた。

E. 結論

軟骨組織由来細胞においてTNF- α が、炎症性メディエーターや、軟骨基質破壊に関わる遺伝子の発現を増大させたことは、関節炎での軟骨基質破壊に、軟骨細胞自身が寄与していること、いわゆるChondrocytic chondrolysisを示唆するものと考えられた。その細胞内伝達経路の一つとしてNF- κ Bの活性化が関与する事、これの抑制には、滑膜細胞・骨芽細胞とは違って抗酸化剤は無効であることを示し、このことは軟骨細胞の特殊性に由来すると考えた。この知見は軟骨細胞に特異的な治療法開発の糸口を提示しうると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Naoki Ishiguro, Takayasu Ito, Kyosuke Miyazaki, Hisashi Iwata Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, and glycosaminoglycans in synovial fluid from patients

with rheumatoid arthritis J Rheumatol 26 : 34-40, 1999

Naoki Ishiguro, Takayasu Ito, Hideo Ito, Hisashi Iwata, Hitenishi Jugessur, Mirela Ionescu, A. Robin Poole Relationship of matrix metalloproteinases and their inhibitors to cartilage proteoglycan and collagen turnover Arthritis Rheum 42 : 129-136, 1999

Naoki Ishiguro, Takuya Shimizu, Takayasu Ito, Toshiki Kojima, Yusuke Iwahori, Hisashi Iwata The expression of matrix metalloproteinases and inhibitors in acute rupture of the anterior cruciate ligament Mod Rheumatol 10 : 95-102, 2000

Kazutoshi Kurokuchi, Fukushi Kanbe, Toyone Kikumori, Tadahiro Sakai, Devanand Sarkar, Naoki Ishiguro, Hisashi Iwata, Hisao Seo Effects of glucocorticoids on tumor necrosis factor α -dependent activation of nuclear factor κ B and expression of the intercellular adhesion molecule 1 gene in osteoblast-like ROS17/2.8 cells J Bone Miner Res 15 : 1707-1715, 2000

2. 学会発表

第72回日本整形外科学会 横浜 1999.4.8-4.11
石黒直樹、伊藤隆安、小嶋俊久、酒井忠博、滝川正春、岩田久 関節軟骨組織および軟骨細胞におけるマトリックスメタロプロテアーゼと基質合成

第14回日本整形外科学会 基礎学術集会 奈良 1999.10.7-10.8 小林健二、石黒直樹、酒井忠博、黒河内和俊、神部福司、岩田久、妹尾久雄 模擬微小重力環境が骨芽細胞様細胞のNF- χ B活性化に及ぼす影響

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

研究協力者 加藤 智啓 聖マリアンナ医科大学・難病治療研究センター

研究要旨 一般に非炎症性機序によるとされる変形性関節症（以下 OA）においても組織学的に比較的軽微な慢性滑膜炎が存在する。しかし、OA における免疫学的機序の関与の程度は不明である。これを解明する一助として最近報告された関節関連蛋白 cartilage intermediate layer protein (CILP) に対する免疫応答を OA 患者で検討した。その結果、OA 患者の約 10% が CILP に対する自己抗体を有していること、およびマウスへの免疫により比較的軽微な関節炎が出現することが判明した。これらより CILP に対する自己免疫反応が OA の病態に関わっている可能性があると考えられた。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ（RA）では持続性の激しい滑膜炎が特徴的である。一方、一般に非炎症性機序によるとされる変形性関節症（以下 OA）においても病因論的意義は不明ながら組織学的に軽微な慢性滑膜炎が存在する。これを誘導持続させる抗原としてタイプ II コラーゲンやアグリカンなどの関節特異的抗原に対する免疫反応の役割が注目されてきたがなお不明な点が多い。これを明らかにする一助として、最近報告された関節特異的蛋白である cartilage intermediate layer protein (CILP) に対する自己免疫応答と CILP の関節炎誘起性についてそれぞれ患者血清・末梢血リンパ球とマウスを用いて検討した。

B. 研究方法

CILP は 91.5kD の蛋白で後半部分は NTPPHase と高い相同性をもつ。我々は前半部分を 2 分割し（C1 及び C2）、それぞれを規定する cDNA を PCR 法でヒト軟骨細胞由来の cDNA から増幅した後、pTEX2-eHis に組み込み、組換え蛋白として大腸菌を用いて調整した。また、C2 を 3 分割した部分蛋白（C2F1, C2F2, および C2F3）を同様に調整した。これを用い ELISA またはウエスタンブロットにて患者血清（OA, 105; RA, 88）の反応性を検討した。また、C1/C2 をマウス（DBA/1J, ICR, C57BL/6, および BALB/c）に免疫し関節炎発症の有無を検討した。

（倫理面への配慮）

患者血清は本人への説明と理解の基に自由意思にて同意の上提供された。

C. 研究結果

CILP の C1 領域にはほとんどの血清が反応しなかったが、C2 領域に対しては OA 患者血清の 10.5%、RA 患者血清の 7.9% が陽性に反応した。陽性血清の C2F1, C2F2, および C2F3 に対する反応性を検討したところ、3 領域のすべてにエピトープが検出された。また、C1 と C2 の等量混合し、マウスに免疫したところ、上記 4 系統すべてで関節炎を発症した。特に ICR では滑膜への細胞浸潤と軟骨表面の不整化を伴った多発関節炎が認められた。

D. 考察

RA および OA の患者の一部に CILP に対する免疫反応が認められ、エピトープ検索の結果から交差反応でなく抗原誘導性の反応であることが示唆された。また、ヒト CILP のマウス免疫により多発関節炎を誘起できることが示された。これはヒト CILP に対する免疫反応がマウス CILP に対する自己免疫反応に進展した結果である可能性が考えられた。

E. 結論

CILP に対する免疫反応が多発関節炎を誘起する可能性と RA および OA 患者の一部において実際に CILP に対する免疫反応が存在することが示された。これらより CILP に対する自己免疫反応が OA の病態に関わっている可能性があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

1) Sakata,M., et al, Autoantibodies to Osteopontin in Patients with Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis. J Rheumatol.(in press)

2) Tsuruha,J., Masuko-Hongo,K., Kato,T., Sakata,M., Nakamura,H., Nishioka,K., Implication of cartilage intermediate layer protein (CILP)in cartilage destruction in subsets of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum.(in press)

2. 学会発表

1)変形性関節症（OA）における免疫系を介した骨・軟骨の破壊機序。増子佳世、中村洋、加藤智啓、西岡久寿樹。第44回日本リウマチ学会。2000年。

2) 軟骨由来蛋白質（YKL-39）による新規関節炎モデルマウス。阪田昌弘、増子佳世、加藤智啓、鶴羽淳一郎、中村洋、関根太一、西岡久寿樹。第44回日本リウマチ学会。2000年。

3) Cartilage intermediate layer protein : A potent arthritogenic autoantigen osteoarthritis and rheumatoid arthritis. Zhenyu,Yao., Masuko-Hongo,K., Kato,T., Kurokawa,M., Sakata,M., Tsuruha,J., Nakamura,H., Nishioka,K., 64th Annual Scientific Meeting.2000.

4) Pathogenic role of immune response toward human articular chondrocyte in osteoarthritis. Sakata,M., Tsuruha,J., masuko-Hongo,K., Nakamura,H., Kato,T., Nishioka,K., 64th Annual Scientific Meeting.2000.

5) Implication of immunity to YKL-39, a cartilage-derived protein, in arthropathy. 64th Annual Scientific Meeting.2000.

6) Cartilage Intermediate Layer Protein: A Potent Arthritogenic Autoantigen In Osteoarthritis And Rheumatoid Arthritis. Zhenyu,Yao., Kayo,Masuko-Hongo., Kato,T., Kurokawa,M., Sakata,M., Tsuruha,J., Nishioka,K., 第30回日本免疫学会。2000年

H.知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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 京都大学再生医科学研究所 教授

A. 研究目的

当研究室では、免疫病理学的にヒトのリウマチ様関節炎と酷似する慢性関節炎を自然発症するマウスモデルを確立し、その原因・発症機構を解析している。この関節炎は、正常関節抗原を認識・攻撃する $CD4^+$ T 細胞による自己免疫性関節炎である。その一次的原因は、常染色体劣性遺伝を示す単一遺伝子の異常である。その遺伝的浸透度には、マウスの維持環境が大きく影響する。遺伝的異常、環境因子ともに発症に寄与する点で、ヒト RA の良いモデルとなりうる。現在、発症に関与する遺伝因子、環境因子の解析を進めている。

B. 研究方法と結果

昨年度までに、関節炎原因遺伝子の染色体上マッピングから、YAC、BAC コンチグの作製、その塩基配列の決定に進み、SKG マウスの疾患原因遺伝子と、その構造変異を同定できた。現在、この変異が関節炎の原因であることを確定するため、正常遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作製し、SKG マウスと掛け合わせ、関節炎発症を阻止できるか検討している。同時に、この変異の生理的意味、特に胸腺での関節炎惹起能を持つ T 細胞の産生機構について解析を進めている。様々な TCR (T 細胞抗原レセプター) トランスジェニックマウスと SKG マウスを掛け合わせ、胸腺における T 細胞選択機構を解析した結果、SKG マウスには正・負の選択機構ともに異常が見られた。さらに、胸腺細胞、末梢 T 細胞ともに、TCR からのシグナル伝達が著しく低下していた。しかし、成熟胸腺細胞、末梢 T 細胞の α/β 鎖 V 領域サブファミリーの構成には、明らかな変異はみられなかった。

C. 考察及び結論

SKG マウスの T 細胞異常がどのようにして関節炎惹起能を持つ T 細胞、特に $CD4^+$ T 細胞の産生、活性化に繋がるのか、を知る必要がある。そのため、関節局所で実際に関節炎を媒介している T 細胞の抗原特異性の解析と平行して、SKG マウス胸腺での T 細胞産生・選択機構を解析していく必要がある。

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

研究協力者 高橋直之 昭和大学歯学部助教授

研究要旨 グラム陰性細菌の細胞表層構成成分であるリポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) は、歯周炎の発症に密接に関与すると考えられている。歯周炎に伴う歯槽骨の吸収亢進は歯牙の脱落を惹起する。本研究では、破骨細胞の機能を調節する LPS の直接作用を解析した。LPS は破骨細胞の NF- κ B を活性化し、破骨細胞の延命を促進した。更に LPS は、破骨細胞の骨吸収活性を誘導した。この LPS の作用は、他のサイトカイン産生亢進を介するものではなく、破骨細胞が発現する toll-like receptor 4 に LPS が直接作用した結果であると考えられた。また、破骨細胞に対する LPS の作用は RANKL や IL-1 の作用と類似しているため、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。一方、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り、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。グラム陰性細菌の細胞表層構成成分であるリポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) は、この歯周病の発症に密接に関与すると考えられている。

ショウジョウバエの Toll は微生物感染に抵抗性を発現するために必須な役割を担っている。最近哺乳類において、そのホモログである Toll-like receptor (TLR) ファミリーが発見された。TLR ファミリーの機構解析より、TLR4 は LPS のレセプターであることが証明された。実際に、LPS に対して不応性を呈する C3H/HeJ マウスに、TLR4 の変異が見いだされている。TLR の細胞内ドメイン構造は IL-1 レセプターのそれと相同性を持ち、シグナル系はともに MyD88、IRAK(interleukin 1 receptor-associated kinase)、TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) を利用する。我々は先に、IL-1 (interleukin 1) は破骨細胞に直接作用して、その延命、融合 (多核化) 更に骨吸収能を促進することを見出した。そこで本研究では、破骨細胞の機能を調節する LPS の直接効果を解析した。LPS は破骨細胞の NF- κ B を活性化し、その延命を促した。更に LPS は、破骨細胞の骨吸収活性を誘導した。破骨細胞に対する LPS の作用は、RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) や IL-1 の作用と類似しており、TRAF6 を介するシグナル系の重要性が示唆された。

B. 研究方式

実験には、ddY マウス (正常マウス)、C3H/HeJ マウスおよび TNFI 型レセプターノックアウトマウスを用いた。骨芽細胞と骨髄細胞を活性型ビタミン D の存在下で 6 日間共存培養し、破骨細胞の形成を促した。共存培養をプロナーゼで処理し骨芽細胞を除き、ディッシュ上に破骨細胞を純化した。また、骨芽細胞様株細胞 KS-4 と骨髄細胞を活性型ビタミン D の存在下で共存培養した後、プロナーゼ処理により骨芽細胞をのぞいた。更に、echistatin で処理し、ディッシュより破骨細胞を遊離させた。これらの純化された破骨細胞画分を用いて、破骨細胞の延命と機能に及ぼす LPS の効果を解析した。また、NF- κ B の活性化はゲルシフト assay 法を用いて評価した。更に、CD14、TLR4 の mRNA の発現を RT-PCR にて解析した。

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したが、LPS を添加すると破骨細胞の延命が認められた。②骨芽細胞と破骨細胞はともに CD14 と TLR4 を強く発現していた。③LPS は純化した破骨細胞の NF- κ B を活性化した。④LPS は C3H/HeJ マウス由来の破骨細胞に対しては延命効果を示さなかった。一方、RANKL と IL-1 は C3H/HeJ マウス由来の破骨細胞に対しても延命効果を示した。⑤マウス TNF α は、TNFI 型レセプターノックアウトマウスに由来する破骨細胞の延命を促進しなかったが、LPS はその延命を促進した。⑥Osteoprotegerin は RANKL が支持する破骨細胞の延命を完全に阻害したが、LPS が促進する破骨細胞の延命を全く抑制しなかつ

た。⑦IL-1 抗体は IL-1 が支持する破骨細胞の延命を完全に阻害した。一方、IL-1 抗体は、LPS が促進する破骨細胞の延命を一部抑制したが、完全には抑制しなかった。⑧ 純化した破骨細胞を象牙質切片上で培養しても吸収窩はほとんど形成されなかったが、IL-1 を添加すると、牙質切片上に多数の吸収窩が形成された。同様に、この系に LPS を添加しても吸収窩形成が認められた。

以上の知見は、IL-1 と全く同様に、LPS 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。歯周病を惹起する LPS は、破骨細胞の延命と活性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の骨吸収活性を誘導できること、(2)純化した破骨細胞は短時間内に死滅するが、IL-1 と M-CSF はその死滅を防御すること、(3)破骨細胞を IL-1 で処理すると NF- κ B が活性化され、その延命と活性化を促進すること、(4)破骨細胞分化因子(ODF/RANKL)は膜結合性の TNF 様因子で、破骨細胞の発現する RANK(ODF レセプター)に結合し、NF- κ B の活性化とその延命、機能発現を促すこと、を明らかにした。

本研究より、LPS は IL-1 と同様に、破骨細胞の延命と活性化を促進した。最近、LPS のレセプターが TLR4 であることが明らかにされた。更に、TLR4 の細胞内ドメインとシグナルの解析より、TRAF6 が結合することが示されている。従来より、IL-1 レセプターのを介するシグナルは TRAF6 に伝達されることが知られている。おり、IL-1 と LPS 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 LPS はプロスタグランジン E2(PGE2)産生や他のサイトカインを介して破骨細胞の形成を促進するのみではなく、IL-1 と同様に直接破骨細胞に作用しその活性化を誘導することを示するものである。歯周炎の発症に LPS が重要な役割を果たしていることが示唆された。

E. 結論

歯周炎の骨破壊には PGE 類、IL-1 とともに LPS

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 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を報告した。本研究では、破骨細胞は TLR4 を発現しており、LPS は破骨細胞に直接作用して、その延命と活性化を誘導した。細菌感染による炎症性の骨吸収において、LPS 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

1.Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Morinaga T, Higashio K, Martin TJ, Suda T: Tumor necrosis factor α stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med*, 191:275-286, 2000.

2.Suda T, Udagawa N, Takahashi N: The molecular mechanism of osteoclast differentiation and activation. *Dentistry in Japan* 36:42-46, 2000.

3.Tsurukai T, Udagawa N, Matsuzaki K, Takahashi N, Suda T: The Essential role of macrophage-colony stimulating factor and osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *J Bone Mineral Metab*, 18:177-184, 2000.

4.Itoh K, Udagawa N, Matsuzaki K, Takami M, Amano H, Shinki T, Ueno Y, Takahashi N, Suda T: Importance of membrane- or matrix-associated forms of M-CSF and RANKL/ODF in osteoclastogenesis supported by SaOS-4/3 Cells Expressing Recombinant PTH/PTHrP Receptors. *J Bone Miner Res* 15:1766-1775, 2000.

5.Udagawa N, Takahashi N, Yasuda H, Mizuno A, Itoh K, Ueno Y, Shinki T, Gillespie MT, Martin TJ, Higashio K, Suda T: Osteoprotegerin produced by osteoblasts in an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology* 141:3478-3484, 2000.

6.Takami M, K Suda K, Miyaura C, Takahashi N, Udagawa N, Woo JT, Nagai K, Suda T: Intracellular calcium and protein kinase C mediate expression of receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin in osteoblasts. *Endocrinology*, 141:4711-4719, 2000.

7.Takahashi N, Udagawa N, Takami N, Suda T: Cells of bone: Osteoclast generation. In *Principles of bone*

biology, ed by Raisz LG, Rodan GA, Bilezikian JP, Academic Press, San Diego, in press, 2001.

8. Kotake S, Udagawa N, Hakoda M, Mogi M, Yano K, Tsuda E, Takahashi K, Furuya T, Ishiyama S, Kim K-J, Saito S, Nishikawa T, Takahashi N, Togari A, Tomatsu T, Suda T, Kamatani N: Activated human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes: possible role of T cells in bone destruction in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum*, in press, 2001.

9. Quinn JMW, Itoh K, Udagawa N, Hausler K, Yasuda H, Shima N, Mizuno A, Higashio K, Takahashi N, Suda T, Martin TJ, Gillespie MT: Transforming growth factor β effects on osteoclast differentiation via direct and indirect actions. *J Bone Miner Res*, in press, 2001.

10. Itoh K, Udagawa N, Katagiri T, Iemura S, Ueno N, Yasuda H, Higashio K, Quinn JMW, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T & Takahashi N. Bone morphogenetic protein 2 stimulates osteoclast differentiation and survival supported by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand. *Endocrinology*, in press, 2001.