

- よる骨吸収の制御、治療学 37 1242-1246, 2003
- 8 奥村茂樹、宇田川信之、高橋直之 概論破骨細胞の分化・骨吸収調節機構、日本臨床 62(増刊 2) 90-96, 2004
 - 9 宇田川信之 中村美とり 高橋直之 破骨細胞分化因子 RANKL 日本臨床 62 (増刊 2) 97-101, 2004
 - 10 中道裕子、高橋直之 骨のリモデリングと骨粗鬆症 カレントセラピー 22 214-217, 2004
- 原著論文
- 1 Nakamichi Y, Shukunami C, Yamada T, Aihara K, Kawano H, Sato T, Nishizaki Y, Yamamoto Y, Shindo M, Yoshimura K, Nakamura T, Takahashi N, Kawaguchi H, Hiraki Y, Kato S Chondromodulin I is a bone remodeling factor *Mol Cell Biol* 23 636-644, 2003
 - 2 Itoh K, Udagawa N, Kobayashi K, Suda K, Li X, Okahashi N, Nishihara N, Takahashi N LPS promotes the survival of osteoclasts via Toll-like receptor 4, but cytokine production of osteoclasts in response to LPS is different from that of macrophages *J Immunol* 170 3688-3695, 2003
 - 3 Takahashi N, Sasaki T, Tsouderos Y, Suda T Strontium ranelate inhibits osteoclastic bone resorption *J Bone Miner Res* 18 1082-1087, 2003
 - 4 Takami M, Suda K, Sahara T, Itoh K, Nagai K, Sasaki T, Udagawa N, Takahashi N Involvement of vacuolar H⁺-ATPase in specific incorporation of risedronate into osteoclasts *Bone* 32 341-349, 2003
 - 5 Takahashi N, Udagawa N, Tanaka S, Suda T Generating murine osteoclasts from bone marrow *Methods Mol Med* 80 129-144, 2003
 - 6 Nakagawa H, Takami M, Udagawa N, Sawae Y, Suda K, Sasaki T, Takahashi N, Wachi M, Nagai K, Woo JT Destruxins, cyclodepsi-peptides, block the formation of actin rings and prominent clear zones and ruffled borders in osteoclasts *Bone* 33 443-455, 2003
 - 7 Li X, Udagawa N, Takami M, Sato N, Kobayashi Y, Takahashi N p38 MAPK is crucially involved in osteoclast differentiation but not in cytokine production, phagocytosis or dendritic cell differentiation of bone marrow macrophages *Endocrinology* 144 4999-5005, 2003
 - 8 Nakamura M, Udagawa N, Matsuura S, Mogi M, Nakamura H, Horiuchi H, Saito N, Hiraoka BY, Kobayashi Y, Takaoka K, Ozawa H, Miyazawa H, Takahashi N Osteoprotegerin regulates bone formation through a coupling mechanism with bone resorption *Endocrinology* 144 5441-5449, 2003
 - 9 Suda K, Udagawa N, Sato N, Takami M, Itoh K, Woo JT, Takahashi N, Nagai K Suppression of osteoprotegerin expression by PGE₂ is crucially involved in LPS-induced osteoclast formation1 *J Immunol* 172 2504-2510, 2004
- 2 学会発表
- 1 高橋直之 p38 MAPK-mediated signals are crucially involved in osteoclast differentiation (シンポジウム 第 76 回日本薬理学会 第 80 回日本生理学会同一会、福岡、2003 年 3 月 25 日)
 - 2 高橋直之 骨吸収の分子メカニズム (シンポジウム 第 26 回日本医学会総会、福岡、2003 年 4 月 5 日)
 - 4 Takahashi N Regulatory mechanism of osteoclast differentiation and function (招待講演 3rd Yonsei Dental Symposium、Seoul、韓国 2003 年 1 月 21 日)
 - 5 高橋直之 破骨細胞の骨吸収を抑制するカルシトニンの作用機構 (オーバービュー 第 3 回カルシトニン/副甲状腺ホルモン研究会 東京、2003 年 12 月 13 日)
 - 6 高橋直之 破骨細胞を調節するシグナル伝達系と骨 歯周疾患における骨破壊 (特定領域研究「骨格系の制御プログラムと疾患」班会議 2004 年 1 月 23 日)
- H 知的財産の出願・登録状況
特記事項無し。

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防 治療研究事業）
分担研究報告書

ヒト破骨細胞誘導系の確立と破骨細胞特異的遺伝子の探索に関する研究

分担研究者 鈴木 隆二 所属機関名 職名 国立相模原病院臨床研究センター・室長
研究協力者 前田 朋子 所属機関名 職名 塩野義製薬創薬研究所 工席研究員

研究要旨 我々は、関節リウマチ(rheumatoid arthritis, RA)患者の骨髄および滑膜組織にナース細胞(RA ナース細胞)が高率に存在する事 細胞間相互作用(pseudoemperipolesis)によりリンパ球を活性化し、ナース細胞自身もサイトカインの産生の亢進など活性化が起こる事を報告してきた。今回 我々は RA に特徴的に存在する RA ナース細胞の単核球への影響を観る目的で 健康人末梢血単核球と RA ナース細胞との共培養を試みた。RA ナース細胞非存在下で健康人末梢血単核球は死滅するか、共培養を行った細胞は細胞質に富み、3ヶ月以上にわたり RA ナース細胞上で増殖し 酒石耐性酸フォスファターゼ(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)陽性であった。RA ナース細胞との共培養で単核球から増殖し変化したこの TRAP 陽性単核球を純粋に分離した後、IL-3,IL-5,IL-7 および GM-CSF の添加により速やかに(72 時間)多核の破骨細胞に分化成熟した。以上から 我々は RA ナース細胞上でヒト破骨細胞前駆細胞の純粋培養と分離に成功した。さらに これら前駆細胞から RANKL+M-CSF 誘導系以外の骨吸収能を有する細胞の分化成熟系を見出す事に成功した。純粋分離された破骨細胞前駆細胞の性状解析および純粋な成熟破骨細胞の分化成熟系は、今まで不可能であったヒト破骨細胞の分子レベルでの解析を可能にした。そこで それぞれの分化段階で発現している遺伝子の解析を行い、ヒト破骨細胞に選択的に発現する新規遺伝子の探索を可能とした。今回、テトラスハンファミリーに属する新規分子を同定し それに対する抗体の作成に成功した。以上から、ヒトの破骨細胞の多様性を明らかにするとともに、破骨細胞特異的マーカーの探索に成功し、これらを用いた新たな細胞生物学的検討が新規診断および治療に可能性を開いた。

A 研究目的

我々は RA における高度な骨-関節破壊の発症・進行機序を明らかにするために、RA 患者関節液および健康人末梢血単核球より破骨細胞前駆細胞の単離と純粋培養系を確立し そのサイトカインによる成熟破骨細胞への分化系を解析し、破骨細胞の多様性の存在を確認するとともに 破骨細胞特異的遺伝子の検出と解析を行い、ヒトにおける破骨細胞の多様性の存在と RA における骨-関節破壊における破骨細胞の生物学的意義を検討した。

B 研究方法

RA ナース細胞 RA 患者の関節滑膜を酵素処理して得られた線維芽細胞様細胞は D-MEM 培地にて培養した。培養され

た細胞は pseudo emperipolesis 能を有する RA ナース細胞である。

破骨細胞前駆細胞の純培養 RA 患者由来滑液および健康人末梢血由来単核球は CD14 マイクロビーズにより CD14 陽性単核細胞として単離した。これら細胞は RA ナース細胞の単層培養と共培養した。培養後 2~3 週間後 増殖した単核球について TRAP 染色 FACS によるマーカーの検出を行った。

成熟破骨細胞の分化 RA ナース細胞上で増殖した単核球は半浮遊で弱く RA ナース細胞と接着し 比較的簡単に純粋単離する事が可能である。これら細胞について各種サイトカインを添加することにより成熟破骨細胞へと分化誘導が惹起されるか検討を行った。分化誘導された成熟破骨細胞については 既知のマーカーの検出と破骨能

の検討を行った。

特異的遺伝子の解析 関節炎由来 CD14 陽性単核細胞 破骨細胞前駆細胞および成熟破骨細胞から mRNA を回収し、differential display により各細胞が特異的に発現する遺伝子の解析を行った。

(倫理面への配慮)

本実験に給した臨床サンプルは 全て説明と同意の上入手した。

C 研究結果

1 RA ナース細胞による CD14 陽性細胞の維持 RA ナース細胞との共培養で増殖する細胞は分離直後の CD14 陽性細胞と比較して細胞質に蓄んだ単核球に変化する。これらの単核球(様細胞)は 3 ヶ月以上にわたりナース細胞上で増殖し TRAP 陽性で 食食能を有していたか単核球とは明らかに異なる細胞に分化し CD14 陽性ではあるか RA ナース細胞との共培養下で CD11a,CD35,CD86 など陰性に成る事か確認された。また CD11a,CD83 陰性であり樹状細胞とも異なる細胞であることか示唆された RA ナース細胞との共培養後約 3 週間で、98%以上の単核球由来細胞がこのような分化を遂げる事か明らかになった。

2 TRAP 陽性単核球の破骨細胞様細胞への分化 TRAP 陽性単核球は破骨細胞前駆細胞の可能性か考えられた。本細胞を共培養系から単離し 種々のサイトカインによりこの細胞を刺激する事により単独培養下において多核細胞へと分化するか否かを検討した。TRAP 陽性単核球は IL 3,IL 5,IL 7あるいは GM-CSF の存在下に全ての細胞が多核巨細胞へと分化した。これらサイトカインにより分化した多核巨細胞は 象牙切片上において吸収能を有していた。これらの分化は各サイトカイン特異的中和抗体や 各サイトカイン受容体に対する抗体存在下に阻害された。また 近年 マウスの破骨細胞系で極めて重要とされている RANKL(receptor activator of NF- κ B)と M-CSF の共存条件下では 上記サイトカインと比較して約 50%程度の fusion index を認めるにとどまった。また この破骨細胞はアクチンリンクを有し カルシトニン受容体や

MMP-9,carbonic anhydraseII など 従来破骨細胞にあるとされる分子の存在も確認された。以上から RA ナース細胞との共培養で分化増殖する CD14 陽性 TRAP 陽性単核細胞はヒト破骨細胞前駆細胞であり上記サイトカインの存在かて成熟破骨細胞に分化することか明らかになった。

3 我々の破骨細胞と従来破骨細胞の相違 破骨細胞の機能として MMP 産生について検討を行った。我々が記載した破骨細胞は MMP 9 と MMP-12 を高産生していることか確認された。方 RANKL+M-CSF 誘導破骨細胞は MMP 9 は発現しているが MMP-12 の発現は確認されなかった。そこで RA 患者の骨破壊部位の連続組織切片を作成し、MMP 9 と MMP-12 について免疫組織染色を行った。その結果、MMP 12 陽性および MMP 12 陰性の染色像を示す破骨細胞の存在を確認した。以上から、破骨細胞の多様性もしくは RA 患者においては異なる破骨細胞の存在か示唆された。

4 破骨細胞特異的遺伝子の探索 上記の解析結果から 我々は、ヒト破骨細胞系の全てを純粋培養系として試験管内で操作する事か可能となった。従来から破骨細胞の同定に必要な特異的マーカーは存在していない。そこで これら破骨細胞前駆細胞成熟破骨細胞に特異的に発現する遺伝子の発現を differential display 法により行った。その結果、既知 新規遺伝子合わせておよそ 20 の成熟破骨細胞特異的遺伝子、および 15 の破骨細胞前駆細胞特異的遺伝子を見出した。このうち 新規であった 4 回膜貫通型の膜タンパク 7-44 に関してさらに解析を行ったところ 本遺伝子は成熟破骨細胞にのみ特異的に発現し 末梢単核球や破骨細胞前駆細胞には発現か確認されない事 他の組織にも殆ど全く発現か観察されない事か確認されたため 7-44 コートする膜タンパクに対しポリクローナル抗体を作成した。この抗体はヒトおよびマウスの破骨細胞を特異的に認識する事かウエスタンブロットングおよびヒト骨破壊部位における免疫組織染色で確認された。

D 考察

RA において、このような破骨細胞前駆細胞が大量に存在し これが RA 特有な線維芽細胞である RA ナース細胞によって維

持され、RA の炎症時に存在するサイトカインのみで最終分化できるという知見は、今までのマウスを中心とする骨代謝の流れとは異なる。我々は、RA 病態の観察から RA ナース細胞の存在と、その病態形成と慢性化に伴う病態維持にその細胞の重要性を指摘してきた。今回、我々は RA の骨破壊に関わる破骨細胞の誘導機構について検討を行った結果、ヒトにおいては破骨細胞誘導系に多様性があり、従来マウス系でよく理解された RANKL+M-CSF 誘導系以外にも、既知のサイトカインで最終分化誘導ができる事を明らかにした。さらに、本実験系により、従来未解決であった単球-前駆破骨細胞-成熟破骨細胞の各分化段階を詳細に解析し、特異的遺伝子を見出す事が可能となったと同時に、RA 骨関節破壊の病態解明にも新たな知見を加えることができるものがある。今後はより多くの新規破骨細胞特異的遺伝子を見出すための解析が可能である。

E 結論

RA 病態の形成とその維持に重要に関わる RA ナース細胞は、T 細胞、B 細胞、骨髄球と特徴的な細胞間相互作用を示すことを報告してきた。今回、RA ナース細胞は RA の高度な骨関節破壊に関与する破骨細胞の分化と成熟に深く関わる事を明らかにした。さらに、ヒト破骨細胞系の全分化段階を試験管内で操作することを可能とした結果、ヒト破骨細胞に特異的に発現する新規 4 回膜貫通型レセプターの単離に成功した。

F 健康危険情報

特記事項なし。

G 研究発表

1 論文発表

Tsuboi H, Y Matsui, K Hayashida, S Yamane M Maeda-Tanimura A Nampei J Hashimoto R Suzuki, H Yoshikawa and T Ochi

Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) positive cells in rheumatoid synovium may induce the destruction of articular cartilage

Annals of Rheumatic Diseases 2003 Mar 62(3) 196-203

Yoshida, T, Y Tsuruta M Iwasaki S Yamane, T Ochi and R Suzuki

SRCL/CL-P1 Recognizes GalNAc and a Carcinoma-Associated Antigen Tn Antigen
J Biochem 1 2003 Mar 133(3) 271-7

Takano, H T Tomita, T Toyosaki-Maeda M Maeda-Tanimura H Tsuboi, H Yoshikawa T Takahashi, R. Suzuki and T Ochi

Comparison of the activities of multinucleated bone-resorbing giant cells derived from CD14-positive cells in the synovial fluids of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patient

Rheumatol in Press 2004 Feb 3

2 学会発表 末

H 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

- 1 特許取得
なし
- 2 実用新案登録
なし
- 3 その他
特になし

関節リウマチにおける osteoclastogenesis に関わる分子に関する研究

研究協力者 佐伯 行彦 所属機関名 職名 国立大阪南病院 臨床研究部長

研究要旨

骨吸収性疾患の原因分子のひとつとして注目されている、オステオポンチン（OPN）の関節リウマチ（RA）における osteoclastogenesis への関与を明らかにするために、RA の疾患モデルであるマウスコラーゲン誘導関節炎（CIA）を用いてその osteoclastogenesis への OPN の関与を検討した。CIA を誘導したマウスの関節炎局所から分離した細胞を 7 日間培養すると過去の報告のとおり spontaneously に活性化した破骨細胞（TRAP 陽性、Pit assay 陽性）が誘導された。一方 CIA を誘導しなかったマウスでは誘導されなかった。この関節炎局所から分離した活性化破骨細胞を誘導する細胞においては RANKL の発現の亢進がみられ OPG の発現は低下していた。さらに OPG を添加することによってこの in vitro の osteoclastogenesis は抑制された。このことから この CIA の関節炎局所では RANKL/OPG 系の osteoclastogenesis が存在することか示唆された。さらに この関節炎局所から分離した活性化破骨細胞を誘導する細胞においては OPN の産生の亢進が認められ、OPN の中和抗体により この osteoclastogenesis は抑制された。そして、CIA を誘導した OPN ノックアウトマウス由来の細胞に OPN を加えると濃度依存的に osteoclastogenesis は増進した。また、ストローマ細胞（ST-2）に OPN 存在下で培養すると活性化 VitD/デキサメサゾンと同程度 RANKL の発現の亢進がみられ、OPG は低下した。以上のことから 関節炎局所では osteoclastogenesis が亢進し、関節局所で産生された OPN はこの osteoclastogenesis に対して positive に作用していることが明らかになった。また この OPN の osteoclastogenesis に対する positive 作用の一部は RANKL/OPG 系を介したものであることか示唆された。

A 研究目的

関節リウマチ（RA）において臨床上最も重大な問題である骨破壊は病理学的検討などから破骨細胞による骨吸収の亢進が主たる原因と考えられている。したがって、RA における破骨細胞の誘導 活性化（osteoclastogenesis）の分子機構を明らかにすることは、骨破壊の診断・治療の開発に不可欠である。今年度は、骨吸収性疾患の原因分子のひとつとして注目されている オステオポンチン（OPN）の RA の osteoclastogenesis への関与を明らかにするために RA の疾患モデルであるマウスコラーゲン誘導関節炎（CIA）を用いて osteoclastogenesis における OPN の影響を検討した。

B 研究方法

(1) CIA の関節炎局所での in vivo osteoclastogenesis の評価、鈴木らの方法（J Rheumatol 25 1154-60,1998）に従い、CIA を誘導したマウスの関節炎を惹起している部位より細胞を分離 7 日間 in vitro で培養し、活性化した破骨細胞（TRAP 染色陽性で Pit assay 陽性の細胞）の数を測定した。

(2) OPN の定量は ELISA 法（OPN-ELISA kit, IBL）を用いた。

(3) RANKL, OPG (osteoprotegerin) の mRNA の定量は、定量的 real time PCR 法を用いた。

（倫理面への配慮）

マウスの実験においては、国立大阪南病院動物実験指針に従い実施した。

C 研究結果

(1) 関節局所での osteoclastogenesis の亢進, CIA を誘導したマウスの関節局所では、活性化した破骨細胞 (TRAP 陽性、Pit assay 陽性) が存在した。一方、CIA を誘導しなかったマウスの関節では、活性化された破骨細胞は存在しなかった。また、関節炎を惹起している部位から分離した細胞では、RANKL の発現が亢進し、OPG の発現の低下が認められた。この実験系において、OPG の添加により濃度依存的に活性化した破骨細胞の数は減少した。

(2) 関節炎局所での OPN 産生の増加と OPN の osteoclastogenesis における positive 効果, 関節炎を惹起している部位から分離した細胞の培養上清中には OPN が有意に増加していた。OPN の中和抗体の添加により濃度依存的に活性化した破骨細胞は有意に減少した。また、OPN ノックアウトマウス由来の細胞に OPN を添加すると濃度依存的に活性化した破骨細胞は有意に増加した。

(3) OPN はストローマ細胞において RANKL の発現を亢進し OPG の発現を低下させる, ストローマの cell line (ST 2) に OPN 存在下で培養すると、活性化 VitD/デキサメサゾンと同程度、RANKL の発現が亢進し OPG の発現は低下した。

D 考察

関節炎局所では osteoclastogenesis が亢進している。OPN は関節炎局所で産生され osteoclastogenesis に対して positive に作用している。この OPN の osteoclastogenesis に対する positive 効果の一部は RANKL/OPG system を介したものである。

E 結論

OPN は関節炎の osteoclastogenesis において positive 因子である。

F 健康危険情報

特記すべきことなし。

G 研究発表

1 論文発表

- 1 Yamaguchi N, Saeki Y et al (8,last) Synergistic effect on the attenuation of collagen induced arthritis in tumor necrosis factor receptor I (TNFRI) and interleukin 6 double knockout mice J Rheumatol 30(1) 22-7, 2003 Jan
- 2 Ishii T, Saeki Y et al (8,last) A case of multicentric Castleman's disease demonstrating severe eosinophilia and enhanced production of interleukin-5 Eur J Haematol 70(2) 115-8, 2003 Feb
- 3 Ishii M, Saeki Y et al (9,last) Possibility of preventive treatment for EBV associated NK cell-lineage proliferative disorders Intern Med 42(3) 250-4, 2003 Mar
- 4 Saeki Y, et al (20,1st) Enhanced production of osteopontin (OPN) in multiple myeloma (MM) Clinical and pathogenic implications Br J Haematol 123(2) 263-70, 2003 Oct
- 5 Ishii T, Saeki Y et al (12,last) Mice with osteopontin deletion remain predisposed to collagen-induced arthritis Arthritis Rheum 2004 Feb;50(2) 669-71
- 6 Ishii T, Saeki Y et al (12,last) Osteopontin(OPN) as a positive regulator in the osteoclastogenesis of arthritis Biochem Biophys Res Commun (in press)

2 学会発表

- 1 第 47 回 日本リウマチ学 H15 4 24 東京
美馬 亨、大島至郎、石井泰子、石田哲士、前田 晃、小松原良雄 七川勸次、行岡止雄 南平昭象 橋本英雄 吉本一臣、片田圭宣 清水止敏 川瀬一郎、佐伯行彦
W 27-2-O/P
ムチランス型関節リウマチ (RA) の骨髄におけるオステオポンチン (OPN) 産生の亢進
- 2 67th American College of Rheumatology 2003, Oct Orland, USA

Tabunoki Y, Edano T,
Murakami K, Kobayashi H,
Koshi T, Ohkuchi M, Ohshima S,
Mima T, Ishii T, Hattori Y, Saeki Y
Anti-arthritis Effects of a Novel
Anti-cytokine Low Molecular Weight
Compound, K 832 Arthritis Rheum
48(9) S555, 2003

3 Ishii T, Ohshima S, Ishida T,
Mima T, Tabunoki Y, Kobayashi H,
Maeda M, Uede T, Liaw L, Kinoshita
N, Kawase I, Saeki Y
Osteopontin(OPN) Deletion Remains
Predisposed to Collagen-Induced
Arthritis(CIA) Arthritis Rheum
48(9) S555, 2003

(発表誌名巻号 頁 発行年等も記入)

H 知的財産権の出願 登録状況 (予定を含む。)

1 特許取得

1 抗オステオポンチン抗体

出願番号 特願 2001 107578

特願 2001-290700

PCT/JP02/03382

2 ミエローマ系腫瘍予防・治療剤
及びその診断法

出願番号 特願 2002-076501

PCT/JPO3/03314

3 オステオポンチン産生抑制方法

60 490 950 (米国仮出願)

2 実用新案登録

特記すべきことなし。

3 その他

特記すべきことなし。

研究要旨 関節リウマチ(rheumatoid arthritis, RA)においては滑膜の異常な増殖が認められ、RAにおける骨破壊に重要な役割を果たしている。Type B 細胞とも呼ばれている滑膜線維芽細胞(synovial fibroblastic cells, SFCs)はさまざまな炎症性サイトカインを分泌し、RA 滑膜炎において重要な役割を果たしている。本研究においてわれわれは SFCs にアデノウイルスヘクターを用いて遺伝子導入することにより SFCs に軟骨細胞分化を誘導可能であることを明らかにした。

A 研究目的

RA は多発性の関節炎を特徴とする慢性炎症性疾患である。炎症関節では異常に増殖した滑膜組織が IL-1、TNF- α などの炎症性サイトカイン、そしてマトリックスメタロプロテアーゼやカテプシンなどのプロテアーゼを産生し、骨軟骨破壊に関与していることが明らかになっている(Firestein, 2003 #27)。このような滑膜組織の活性化メカニズムは明らかではないか、未知の自己抗原により活性化された T リンパ球とマクロファージとの間の直接、あるいは間接的な相互作用が重要な役割を果たすと考えられている。近年 RA における骨破壊を直接担うのは破骨細胞であることが明らかになってきたか、われわれは以前に RA SFCs では破骨細胞分化因子である receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL) の発現が著しく亢進していることを明らかにした。RANKL の発現が炎症性サイトカインによって誘導されることを考え合わせると、RA 骨関節破壊メカニズムの一端は、細胞-細胞間の反応によって産生された炎症性サイトカインが SFCs における RANKL の発現を促し、その結果破骨細胞が分化・活性化されることか原因であると考えられる。また越智らは SFCs がナース細胞様の活性を有し、B 細胞の生存を促進するこ

とを明らかにしている。つまり RA 関節炎において滑膜はカタホルミックな役割を演じ、したかつて SFCs の増殖・活性化の制御が重要な RA 治療戦略になる。

このようなカタホルミックな作用の一方で、滑膜が軟骨の修復過程にも関与していること、すなわち関節のホメオスタシスに対してアナホルミックな役割をも担うことがさまざまな研究から明らかになってきた。Huzinker らは関節軟骨の部分欠損動物モデルを用いて、滑膜細胞が欠損部位に migrate し、未熟ではあるが修復組織を形成することを報告した。西村らは家兎膝関節から採取した滑膜組織が TGF- β の存在下で培養すると軟骨の形質を有するようになることを示した。最近 De Bari らは滑膜組織から多分化能を持つ間葉系細胞を分離することが可能であり、この細胞はさまざまな刺激の下で骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、筋芽細胞などに分化可能であることを明らかにした。また滑膜細胞の良性腫瘍性病変であり、臨床上きわめて興味深い病態として、滑膜性骨軟骨腫をあげることもできる。本疾患の原因は不明であるが、滑膜組織に由来すると考えられる遊離体か、関節内に多数出現するか特徴である。この遊離体を組織学的に検討すると、免疫染色において軟骨後期分化マーカー

てあるX型コラーゲンの発現が認められる。すなわち本疾患の病態は、滑膜組織において何らかの影響で軟骨分化過程が進行したものと考えられる。このような事実は、滑膜組織中に未分化間葉系細胞に類似した細胞を含み、これらの細胞は何らかの刺激により軟骨細胞や骨芽細胞へと分化誘導可能であること、そして滑膜組織滑膜細胞が関節の修復過程に関わっている可能性を示している。したがって滑膜組織を治療ターゲットと考えた場合、そのカタホリックな作用の抑制と同時に、骨芽細胞・軟骨細胞分化を誘導することは再生医学的な見地からも重要なポイントになると考えられる。本研究においてわれわれは RA SFCs にアデノウイルスヘクターによって活性化型 ALK (activin receptor-like kinase) 3 遺伝子を導入することによって軟骨細胞分化を誘導することか可能であることを明らかにした。

B 研究方法

1) 滑膜線維芽細胞の採取 培養

滑膜線維芽細胞 (SFC) は書式によるインフォームトコンセントを得た患者より人工膝関節全置換手術時に得た滑膜組織から酵素消化法にて採取した (Takayanagi, 1999 #4)。得られた細胞は 10% fetal bovine serum (FBS) 入りの alpha-modified minimum essential medium (MEM) 中で培養した。3-5 代の継代の後、細胞はほぼ均一な線維芽細胞様の形態を示した。これを SFC として使用した。

2) アデノウイルスヘクターの作成

TGF- β /BMP レセプターシグナルを調節する遺伝子を組み込んだアデノウイルスヘクターは東京大学医科学研究所の齋藤 泉博士らの方法に準じて作成した (COS-TPC 法)。使用したアデノウイルスは以下の遺伝子を含むものであ

る。

HA-tagged constitutively active ALK3, 5, and 6 (ALK3^{ca}, ALK5^{ca}, ALK6^{ca})

constitutively active MKK6 (MKK6^{ca})

Flag-tagged Smad1 and Smad6

β -galactosidase (LacZ)

3) SFC への遺伝子導入

SFC への遺伝子導入は以下のごとく行った。SFC を少量のウイルス液の存在下で 2 時間培養後、10 倍量のウイルスを含まないメティウムで希釈した。遺伝子の発現は特異的な抗体を用いたウエスタンブロットあるいは免疫染色によって確認した。使用した抗体は以下の通りである。

抗 p38 MAPK 抗体 抗 phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) 抗体 (Cell Signaling Inc., Cummings Center, Beverly, MA)

抗 Flag 抗体 (SIGMA CHEMICAL Co., St Louis, MO, USA)

抗 HA 抗体 (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA)

抗 phospho-Smad1/5/8 抗体、抗 phospho-Smad2 抗体 (Cell Signaling Inc., Cummings Center, Beverly, MA)

抗 type II コラーゲン抗体 (Oncogen, Boston, MA, USA)

抗 type X コラーゲン抗体 (LSL Co., Cosmo Bio, Tokyo, Japan)

4) 遠心管培養法

SFC の遠心管培養は以下のごとく行った。ウイルス感染 24 時間後、細胞をトリプシン処理により回収し、 5×10^5 個の細胞を 15 分間 500 x g で遠心し、ペレットにする。これを MEM + 10% FBS 中で培養すると 2-3 日で浮遊するペレットを得ることができる。2-3 日に一度メティウム交換を行い培養を続ける。

5) RT-PCR, real time PCR

培養細胞からの RNA 回収は Isogen を用いて行った。PCR に用いたプライマーは表1の通りである。PCR の条件は下記のことくである(表1)。
Initial denaturation 10 分間 94°C 40 cycles (94°C 15 秒、anealing 60°C 1分)

6) 組織学的検討

遠心管培養した細胞を 3.7%ホルマリンで固定後、パラフィンに包埋し、4 mm の切片を作成した。切片は Alizarin red, Alcian blue, Toluidine blue 染色 および II 型コラーゲン X 型コラーゲン抗体による免疫染色によって検討した。

7) ノートマウスへの移植

3日間遠心管培養を行った細胞をノートマウス皮下に移植することによって in vivo での軟骨分化を検討した。移植細胞は toluidine blue 染色、II 型コラーゲン免疫染色によって検討した。

C 研究結果

1) 遺伝子の発現

抗 HA 抗体、抗 Flag 抗体を用いたウエスタンブロットによって SFC における恒常活性型 ALK3, 5, 6 および Smad1, 6 の発現が確認された。また MKK6CA による p38 の活性化は抗 phospho-p38 抗体を用いたウエスタンブロットで、ALK3^Δ, ALK6^Δ による Smad1/5/8 の活性化、および ALK5^Δ による Smad2 の活性化はそれぞれのリン酸化抗体によって確認された。

2) SFC の軟骨細胞分化

RT-PCR および real-time PCR による検討から ALK3^Δ ウイルスか SFC において著明な Sox9, II 型コラーゲン、アクリカンの発現上昇を誘導する

ことが明らかになった(図 1)。ALK6^Δ ウイルスにも弱いながら同様の効果は認められたか、lacZ ウイルス、ALK5^Δ ウイルスは効果を示さなかった。ALK3^Δ ウイルスによる軟骨細胞分化は Alcian blue staining, II 型コラーゲン免疫染色によっても確認された。ALK3^Δ ウイルスによる軟骨細胞分化は抑制型 Smad である Smad6 の発現、あるいは p38 の阻害剤である SB203580 によって完全に抑制された。また ALK3^Δ ウイルスと Smad1 ウイルスとの共感染によって相乗的な効果は認められた。一方 MKK6^Δ による p38 の強制活性化は Sox9 および II 型コラーゲンの発現を誘導するか、その誘導は一時的であり、速やかな発現減少、そしてそれと同時に X 型コラーゲンの誘導が認められ、軟骨細胞が肥大化している可能性を示唆した。また組織学的検討からも Alizarin red 染色陽性、X 型コラーゲン陽性染色像など肥大化を示唆する所見が得られた。

3) ノートマウスへの移植

ノートマウスに遠心管培養細胞を移植後3週間してからこれを回収し、組織学的に検討したところ ALK3^Δ 発現細胞において明らかな toluidine blue 染色陽性像 II 型コラーゲン染色陽性像が認められた(図2)。

D 考察

滑膜線維芽細胞は軟骨細胞や骨芽細胞と同様に未分化間葉系細胞に由来するか、Hunziker らの報告から関節軟骨の修復過程にも関与することから示唆されている(Hunziker, 1996 #7)。本研究においてわれわれは滑膜線維芽細胞 RA SFCs へ ALK3^Δ 遺伝子の導入によって軟骨細胞へと分化することを明らかにした。この作用は抑制 Smad あるいは p38 阻害剤によって完全に阻害されること、Smad1 が相乗的な作用を有すること

から Smad pathway, p38 pathway の双方の関与が重要であることが示された。またこのような ALK3^Δ ウイルスの作用はヌートマウスに移植した細胞でも認められ、in vivo においても軟骨細胞分化能を有することか明らかになった。一方 MKK6^Δ ウイルスによって p38 pathway のみを強制的に活性化すると軟骨細胞分化は肥大化まですすんでしまうことが示された。変形性関節症においては軟骨細胞の肥大化が観察されること (von der Mark, 1995 #2) また軟骨の変性に関与すると考えられているインターロイキン1や tumor necrosis factor- α が p38 pathway を強力に活性化することを鑑みると、p38 の過度の活性化は軟骨の肥大化とそれともなう変性を誘導する可能性を示唆する。今後 p38 pathway, Smad pathway を適切に調節するような薬剤の開発により、あらたな RA 治療薬の開発が期待される。

E 結論

ALK3 系の活性化によって RA SFCs の軟骨分化誘導が可能であった。今後このようなシグナル伝達系を調節する治療法の開発が期待される。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

1 論文発表

- 1) Miyazaki T, Neff L, Tanaka S, Horne WC, Baron R Regulation of cytochrome *c* oxidase activity by *c*-Src in osteoclasts *J Cell Biol* 2003, 160 709-718
- 2) Houle LF, Rousseau S, Morrice N, Iuc M, Mongrain S, Turner CF, Tanaka S, Moreau P, Huot J ERK mediates phosphorylation of tropomyosin-1 to promote cytoskeleton remodeling in response to oxidative stress Impact on membrane blebbing *Mol Biol Cell* 2003, 14 1418-1432
- 3) Kawaida R, Ohtsuka T, Okutsu J, Takahashi T, Kadono Y, Oda H, Hikita A, Nakamura K, Tanaka S, Iurukawa H Jun Dimerization Protein 2 (JDP2), a Member of the AP-1 Family of Transcription Factor, Mediates Osteoclast Differentiation Induced by RANKL *J Exp Med*, 2003, 197 1029-1035
- 4) Yamamoto A, Fukuda A, Seto H, Miyazaki T, Kadono Y, Sawada Y, Nakamura I, Katagiri H, Asano T, Tanaka Y, Oda H, Nakamura K, Tanaka S Suppression of arthritic bone destruction by adenovirus-mediated dominant negative ras gene transfer to synoviocytes and osteoclasts *Arthritis Rheum* 2003, 48 2682-2692
- 5) Kim H-H, Chung WJ, Lee SW, Chung P-J, You JW, Kwon HJ, Tanaka S, Lee ZH Association of Sustained ERK Activity with Integrin β 3 Induction during Receptor Activator of Nuclear Factor KappaB Ligand (RANKL)-directed Osteoclast Differentiation *Exp Cell Res* 2003, 289 368-377
- 6) Arany I, Megyesi JK, Kaneto H, Tanaka S, Safirstein RI Activation of ERK or inhibition of JNK ameliorates hydrogen peroxide-cytotoxicity in mouse kidney proximal tubular cells *Kidney Int*, In press
- 7) Akiyama T, Bouillet P, Miyazaki T, Kadono Y, Chikuda H, Chung U, Fukuda A, Hikita

- A, Seto H, Okada T, Inaba T, Sanjay A, Baron R, Kawaguchi H, Oda H, Nakamura K, Strasser A, Tanaka S Regulation of Osteoclast Apoptosis by Ubiquitination of Proapoptotic BH3-only Bcl-2 Family Member Bim *Embo J* 2003, 22, 6653-76664
- 8) Ohazama A, Courtney J-M, Naito A, Tanaka S, Inoue J, Sharpe PT Traf6 is essential for murine tooth cusp morphogenesis *Dev Dyn* 2004 229, 131-135
- 9) Seto H, Kamekura S, Miura T, Yamamoto A, Chikuda H, Ogata T, Hiraoka H, Oda H, Nakamura K, Kurosawa H, Chung U, Kawaguchi H, Tanaka S Distinct Role of Smad Pathways and p38 Pathways in Cartilage-specific Gene Expression in Synovial Fibroblasts *J Clin Invest* 2004, 113, 718-726
- 10) Miyazaki T, Sanjay A, Neff L, Tanaka S, Horne WC, Baron R Src kinase activity is essential for osteoclast function *J Biol Chem*, 2004 Jan 22 [Epub ahead of print]
- 4) 第 18 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2003 10 16-17) 小倉 シンポジウム1 関節軟骨変性の分子メカニズムから治療へ「遺伝子導入を用いた軟骨再生」
- 5) 第3回 HAP Working Seminar Consensus Meeting(2003 11 7) 東京 「骨代謝異常の基本的な捉え方」
- 6) リウマチフォーラム(2004 1 10)東京「破骨細胞アポトーシスの分子メカニズム」
- 7) 第3回 Biomatrix Forum(2004 1 17)東京「滑膜線維芽細胞の軟骨細胞分化メカニズムとヒアルロン酸の作用」
- 8) The 12th International Rheumatology Symposium (2003 4 24-26) Tokyo Regulation of synovial cell function by adenovirus vector-mediated gene transduction
- 9) The 1st Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Society (2003 6 3-7) Osaka Plenary Lecture 2, Molecular mechanisms regulating life and death of the osteoclast
- 10) 3rd World Congress of the Global Arthritis Research Network (GARN) International Arthritis Summit (2003 9 14-17) Miyazaki Topic Symposium (3) Locomotor of Science, Regulation of synovial cell function by adenovirus vector-mediated gene transduction
- 2 学会発表
- 1) 日本医師会生涯教育講座認定 学術講演会 特別講演(2003 4 18)前橋 「骨代謝調節の分子メカニズム」
- 2) 第 47 回 日本リウマチ学会学術集会 (2003 4 24-26)東京 シンポジウム12 RA における胸 腰椎圧迫骨折 「関節リウマチにおける骨粗鬆症の分子メカニズム」
- 3) 第2回リウマチと骨代謝研究会(2003 9 4) 東京 「破骨細胞をターゲットにした骨代謝疾患治療」
- H 知的財産権の出願 登録状況
特になし。

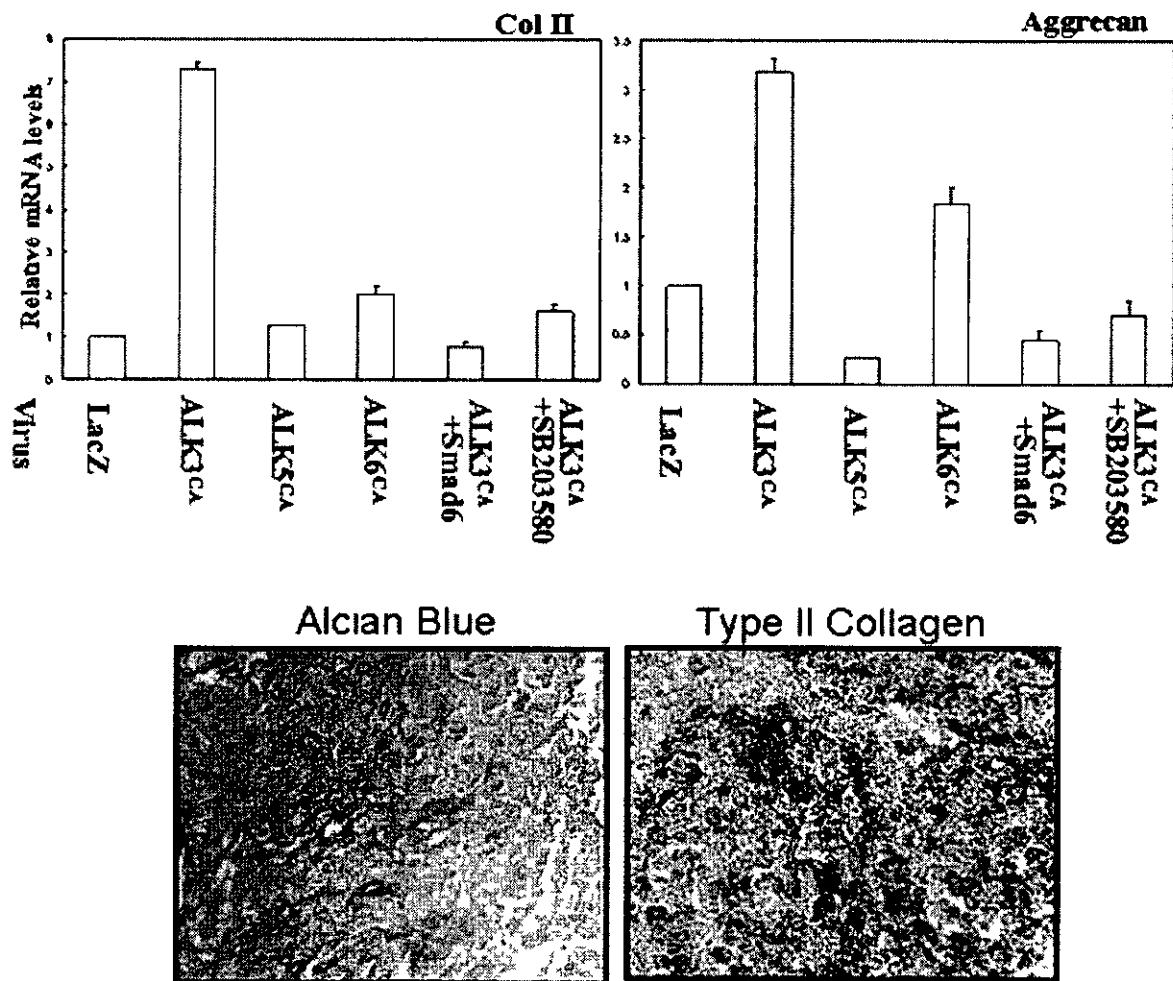


図1 ALK3CAウイルスによる滑膜線維芽細胞の軟骨細胞分化

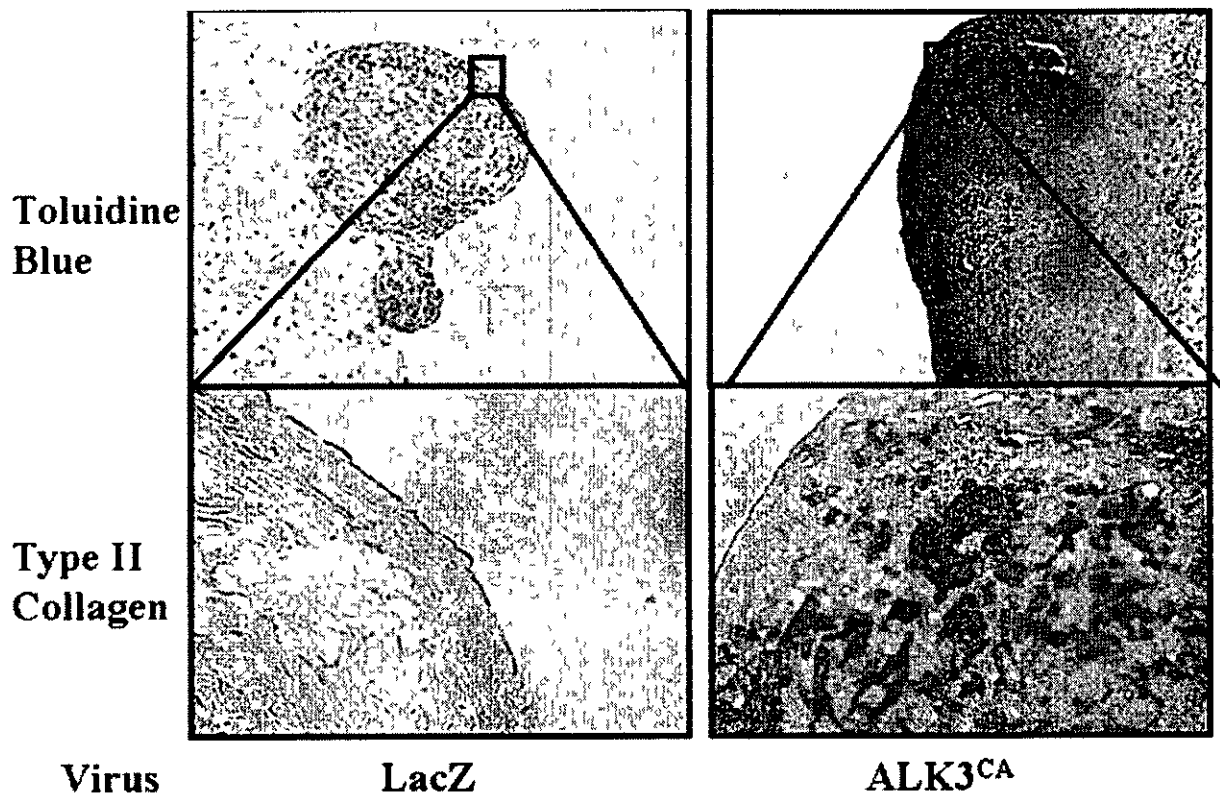


図2 遠心管培養細胞のヌードマウスへの移植

関節リウマチ病態と骨髄脂肪蓄積細胞に関する研究

分担研究者 下村 伊 郎 大阪大学大学院生命機能研究科 教授

研究要旨

- ① 変形性関節症および関節リウマチ患者膝関節部の骨髄海綿骨片から 脂肪蓄積細胞を分離する技術を確立した。骨髄脂肪蓄積細胞が発現する遺伝子の網羅的解析を準備中である。
- ② 関節リウマチ患者由来のナース様細胞か、未分化間葉系細胞の骨芽細胞 脂肪細胞への分化に及ぼす影響を解析中である。

A 研究目的

ヒト骨髄内には多数の脂肪蓄積細胞が存在し、それら脂肪蓄積細胞数の増加と骨量の低下には相関がみられる。本研究においては、骨髄脂肪蓄積細胞の増加が関節リウマチや骨粗鬆症の病態形成に関わっているとの仮説に基づき、①骨髄脂肪蓄積細胞が産生する分泌因子を明らかにし、関節リウマチや骨粗鬆症など病態への関与を明らかにする。②骨髄脂肪蓄積細胞の増加過程に ナース様細胞が関与するのかを明らかにする。

B 研究方法

- ①大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学において、変形性関節症あるいは関節リウマチ患者から摘出された海綿骨片をコラゲナーゼで消化し、トリプシン処理 遠心分離や洗浄を行うことで脂肪蓄積細胞分画と間葉系細胞分画を分離回収した。また 回収した細胞分画より total RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて発現遺伝子を解析比較した。
- ②関節リウマチ患者由来のナース様細胞と未分化間葉系細胞 C3H10T1/2 を共培養し 骨芽細胞、脂肪細胞へ分化する細胞の割合に変化がみられないか、分化マーカーの発現や細胞染色により評価した。

（倫理面への配慮）

上記器官制御外科において人工膝関節置換術を施行する患者に限定して、術前に書面にて研究目的 内容を説明し、同意・承諾を得た上で、術中に取り除かれる骨片を研究材料として用いた。

C 研究結果

- ①骨代謝に関連する 30 種弱の遺伝子に関して 脂肪蓄積細胞分画と間葉系細胞分画間で発現量に差がみられるのか RT-PCR 法により解析した。その結果 BMP シグナルと拮抗する分泌タンパク質の発現量か、脂肪蓄積細胞分画で高かった。
- ②細胞間接着の有無や添加因子など 骨芽細胞、脂肪細胞への分化スイッチングを評価する最適な共培養の条件を検討中である。

D 考察

- ①RT-PCR 法による比較の結果、骨代謝への関与が考えられるシグナル分子の発現量に差がみられた。今後さらに RNA サンプルの例数を集め、マイクロアレイ解析により、骨髄脂肪蓄積細胞において発現量の多い遺伝子、特に分泌されるシグナル分子を網羅的に同定する。
- ②関節リウマチ患者由来のナース様細胞が骨・関節破壊に関与することは示されてきたか、骨髄内細胞への影響はいまだ明らかではない。最適な分化スイッチングの評価には 検討すべき培養条件が多く さらなる検討が必要である。

E 結論

- ①ヒト骨髄脂肪蓄積細胞は骨代謝に影響を及ぼすシグナル分子を積極的に生産している可能性がある。
- ②骨髄脂肪細胞分化亢進に対するナース様細胞の関与を明らかにすることで、骨脆弱性を来す疾患の病態解明および治療法への糸口を見つける。

F 健康危険情報

G 研究発表

H 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
現在 上記 3 項目に該当する事項はない。

III) RA の病因解明研究

関節リウマチ滑膜の血管新生における骨髄の役割に関する研究

分担研究者 広畑俊成 所属機関名 帝京大学医学部 職名 助教授

研究要旨 関節リウマチ (RA) における滑膜増殖においては血管新生が極めて重要な役割を果たすと考えられている。本研究においては、RA 滑膜増殖における骨髄の役割を解明するために、RA 骨髄 CD34+細胞からの血管内皮細胞への分化能及び VEGF や soluble VCAM-1 (sVCAM-1) の産生能について検討した。骨髄 CD34+細胞を SCF+GM-CSF で 2 週間培養した際 vWF+細胞および CD31+/vWF+細胞への分化が RA において対照群に比して有意に亢進していた。CD34+細胞を SCF+GM-CSF にて 4 週間培養した際 RA においては対照群に比して VEGF 及び sVCAM-1 の産生が有意に亢進していた。以上より、RA 関節滑膜における血管新生及び血管内皮細胞の活性化において、骨髄 CD34+細胞の異常に深く関与することか示唆された。

A 研究目的

関節リウマチ (RA) における滑膜増殖においては血管新生が極めて重要な役割を果たすと考えられている。これまでこうした血管新生は 既存の血管より分枝する angiogenesis と考えられていたが 新たな血管内皮細胞の供給による vasculogenesis の関与が近年指摘されている。我々は、これまで RA において骨髄の異常な病態に深く関与することを示してきた。近年、骨髄 CD34+細胞は SCF+GM-CSF に反応して血管内皮細胞にも分化することか示されている。本研究においては、RA 滑膜増殖における骨髄の役割を解明するために、RA 骨髄 CD34+細胞からの血管内皮細胞への分化能及び VEGF や soluble VCAM-1 (sVCAM-1) の産生能について検討した。

B 研究方法

インフォームドコンセントの得られた RA 患者及び対照として変形性関節症 (OA) 患者より 人工関節置換術の術中に腸骨骨髓液を採取した。骨髓液より比重遠心法で単核球を分離し、磁気ヒースによる positive selection により CD34+細胞を分離した。CD34+細胞は、SCF (10 ng/ml) と GM-CSF (1 ng/ml) の存在下に 2~4 週間平底 24 穴プレートにて培養した (1×10^5 /well)。2 週間培養後 細胞の表面抗原の発現 (CD14 HLA-DR、CD31 von

Willebrand factor [vWF]) をフローサイトメトリーにて解析した。培養上清中の TNF- α 、VEGF、sVCAM-1 の濃度は ELISA にて測定した。

(倫理面への配慮)

患者には研究内容及び検体採取の方法危険性を説明し インフォームドコンセントを文書で取得した上で検体の提供を受けた。検体については連結匿名化にてプライバシーの保護をはかる。

C 研究結果

骨髄 CD34+細胞を SCF+GM-CSF で 2 週間培養した際、vWF+細胞および CD31+/vWF+細胞への分化が RA において対照群に比して有意に亢進していた (図 1)。骨髄 CD34+細胞からの vWF+細胞への分化能は、TNF- α や VEGF の産生能とは相関しなかった (図 2)。CD34+細胞を SCF+GM-CSF にて 4 週間培養した際、RA においては対照群に比して VEGF 及び sVCAM-1 の産生が有意に亢進していた (図 3)。VEGF 産生と sVCAM-1 産生の間には有意の相関がみられた。

D 考察

以上より、RA 患者においては骨髄 CD34+細胞から A 型滑膜細胞の基になる CD14+/HLA-DR+細胞を滑膜内に recruit する上で必要な vasculogenesis の基盤となる血管内皮細胞の分化が亢進していることか示唆された。この血管内皮細胞への分化

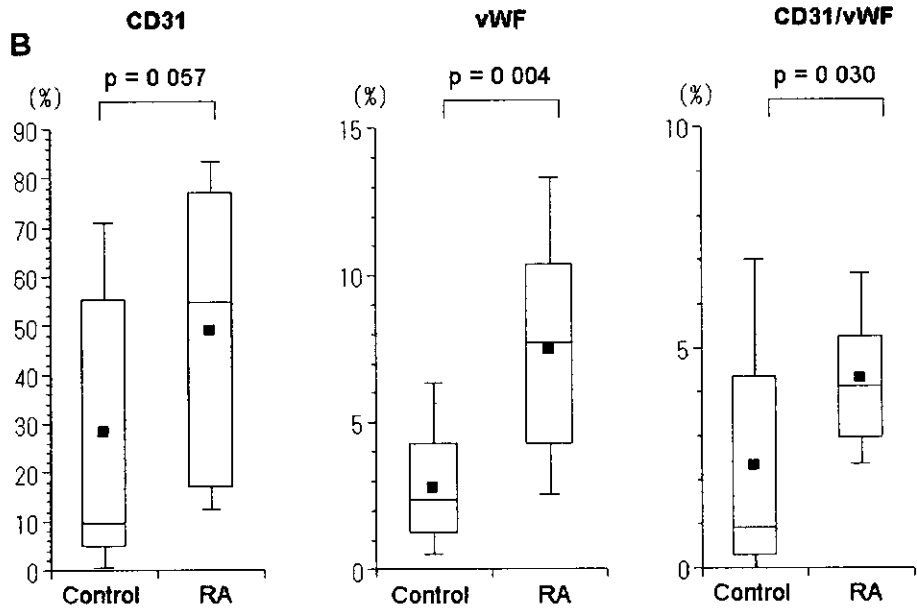


図 1 骨髓 CD34+細胞からの血管内皮細胞の分化

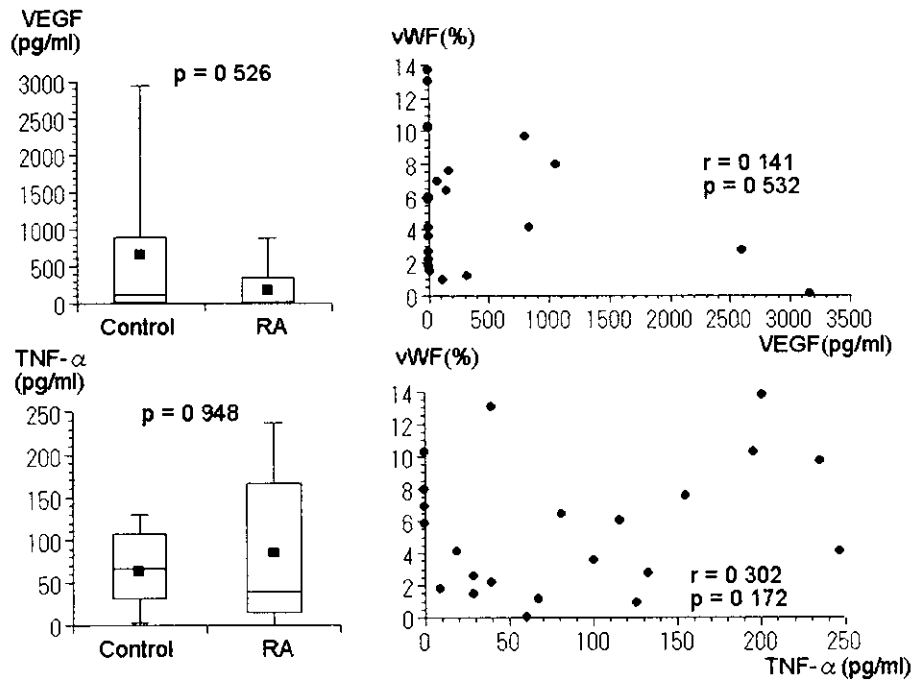


図 2 骨髓 CD34+からの vWF+細胞の分化と上清中サイトカインの関係 (培養 2 週間)

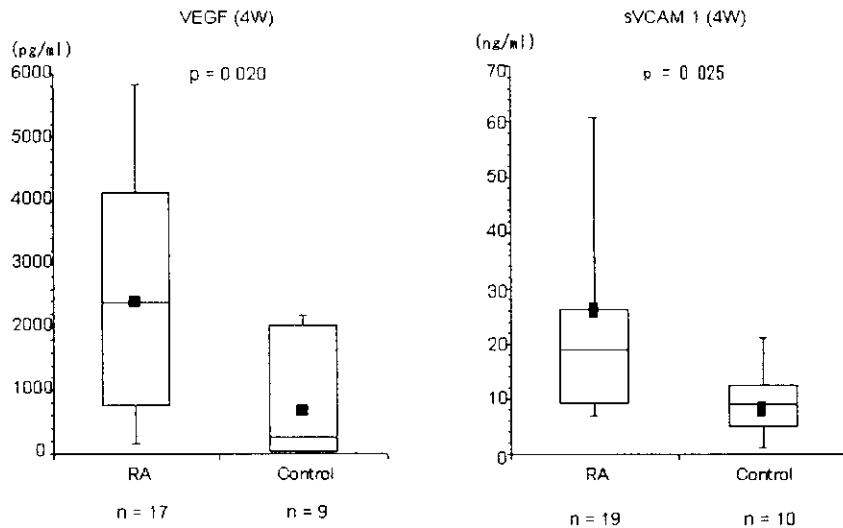


図3 骨髄 CD34+細胞を SCF+ G-CSF で 4 週間培養した際の上清中の VEGF と sVCAM 濃度

の亢進のメカニズムとしては、TNF- α や VEGF などのサイトカインの産生の亢進の可能性は考えにくい。RA 骨髄 CD34+細胞は TNF- α に対する反応性の異常を示すことかこれまで明らかにされている。従ってそのような CD34+細胞の内因性の異常か血管内皮細胞への分化亢進に関与している可能性が十分考えられる。また 血管内皮細胞の活性化の指標となる sVCAM-1 の骨髄 CD34+細胞による産生も増加していたことから RA 関節滑膜における血管新生及び血管内皮細胞の活性化において、骨髄 CD34+細胞の異常が深く関与することか示唆された。

E 結論

以上の結果より、RA 骨髄 CD34+細胞レベルでの異常か RA 関節滑膜の病態の種々の側面において重要な役割を果たしていると考えられる。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

1 論文発表

Shibuya H, Nagai T, Ishii A, Yamamoto K, Hirohata S. Differential regulation

of Th1 responses and CD154 expression in human CD4+ T cells by IFN- α . Clin Exp Immunol 132: 216-224, 2003

Takizawa K, Takeuchi F, Nabeta H, Hirohata S, Takeuchi A, Matsumura Y, Yamamoto K. Association of transporter associated with antigen processing genes with Behcet's disease in Japanese. Autoimmunity 36: 161-165, 2003

Iwai M, Harada Y, Ishii M, Tanaka S, Muramatsu A, Mori T, Nakashima T, Okanoue T, Hirohata S. Autoimmune hepatitis in a patient with systemic lupus erythematosus. Clin Rheumatol 22: 234-236, 2003

Takayanagi M, Haraoka H, Kikuchi H, Hirohata S. Myocardial infarction caused by rheumatoid vasculitis: histological evidence of the involvement of T lymphocytes. Rheumatol Int 23: 315-318, 2003

広畑俊成. 免疫血清検査の最新情報と輸血過誤防止および輸血の最新情報 第4章自己免疫疾患検査の最新情報 4 膠原病の検査—特に最近の進歩を中心として—臨床病理レビュー 124: 76-80, 2003

広畑俊成. 解説 ACR より新たに提唱された SLE の精神神経症状の分類リウマチ科