

(1) 症例 40歳 男性

主訴：発熱・全身倦怠

既往歴：耐糖能機能異常

家族歴：祖母：大腸癌，父：前立腺癌。肝疾患等の家族内集積はなし。

職業：広告代理店勤務（デスクワーク）

嗜好：飲酒：週3回中程度，喫煙：50本/日20年間。

明らかなアレルギー歴はなし。

現病歴：平成14年6月1日頃より微熱，咽頭痛などの感冒様症状が出現し，同4日から38℃台の発熱を認めたため近医を受診し“急性上気道炎疑い”で抗生剤等の処方を受けたが改善しないため，6月8日に他院を受診した。血液検査所見で肝・胆道系酵素の上昇を認め，薬剤変更で経過観察を指示された。その後も発熱，全身倦怠感等の症状が改善しないため，6月19日当院消化器内科外来受診し，血液検査所見上，炎症反応高値，肝機能障害，黄疸徴候を認めたため精査加療目的で入院となった。

(2) 入院時現症 (6/19)

身長：175 cm 体重：76 kg 血圧：136/90 mmHg

脈拍：108 bpm 体温：40℃

体表面：表在リンパ節触知せず，皮膚黄染（+）皮疹（-）

口腔内：両側扁桃腫大（Ⅲ度）発赤（+）Erosion（+）白苔（-）

頭頸部：甲状腺腫大（-）

胸部：心音・呼吸音清

腹部：肝腫大あり（右季肋下に肝を3横指触知）

脾腫大顕著ではない

神経：神経学的所見異常なし

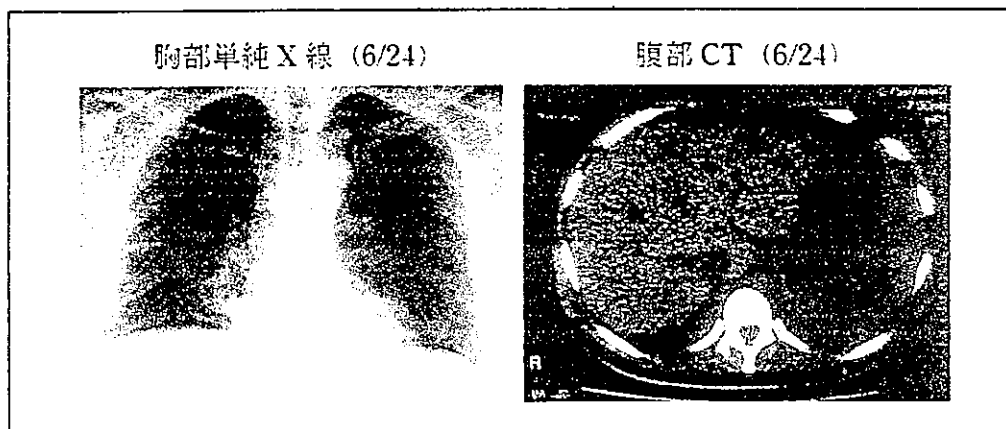
な異常はなく，生化学ではT-Bilが8.1，D-Bilが6.32と黄疸を認め，ASTが80，ALT 153，ALP 1280， γ -GTP 143と肝・胆道系酵素の上昇を認めました。腎機能，電解質には異常は認めないものの，CRPが9.2と高値を示しておりました。またフェリチンも651と中等度上昇を示しておりました。

(4) 次に画像所見です。入院時の胸部単純写真では右肺野に葉間胸水を認めます。また，腹部CTでは肝脾腫を認めます。同時期に行った腹部超音波でも

入院時検査所見 (6/19)

WBC (/L)	<u>23600</u>	T-Bil (mg/dl)	<u>8.1</u>	Na (mmol/l)	136
Myelo (%)	1	D-Bil (mg/dl)	<u>6.32</u>	K (mmol/l)	4.2
Band (%)	30	AST (U/L)	<u>80</u>	Cl (mmol/l)	99
Seg (%)	7	ALT (U/L)	<u>153</u>	Ca (mg/dl)	8.4
Eosino (%)	6	LDH (U/L)	<u>418</u>	ESR (1 hr) (mm)	6
Mono (%)		ALP (U/L)	<u>1280</u>	CRP (mg/dl)	<u>9.2</u>
Lympho (%)	11	LAP (U/L)	<u>134</u>	T-cho (mg/dl)	116
Aty. LY (%)	<u>45</u>	γ -GTP (U/L)	<u>143</u>	TG (mg/dl)	353
RBC (/L)	534	BUN (mg/dl)	16.2	BS (mg/dl)	121
Hb (g/dl)	15.6	Cr (mg/dl)	0.95	CEA (ng/ml)	3.1
Ht (%)	45	TP (g/dl)	5.5	CA19-9 (ng/ml)	13.6
Plt ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	<u>11.7</u>	Alb (g/dl)	3.1	Ferritin (ng/ml)	<u>650.9</u>
PT% (%)	92			IgG (mg/dl)	833
APTT (sec)	38			IgM (mg/dl)	129
HPT (%)	97			IgA (mg/dl)	224
Fibrinogen (ng/dl)	195				
FDP ($\mu\text{g/ml}$)	10.3				
D-Dimer ($\mu\text{g/ml}$)	4.3				

画像所見



様の所見でした。

発熱・咽頭痛などの臨床症状と、血液検査所見上、異型リンパ球の出現、肝機能障害を認めることから当初EBウイルスと細菌の混合感染と考え、補液と

(5) 血液検査所見 (ウイルス関連)

EBV 関連 :

EBVCA IgG 640 (< 10)

EBVCA IgM < 10 (< 10)

EBNA 10 (< 10)

CMV 関連 :

CMV IgG 8.1 (< 2.0)

CMV IgM 8.42 (< 0.80)

CMV (C7-HRP) 陽性

(陽性細胞数 94/45000)

HIV 関連 :

HIV (-) HIV RNA 定量 (-)

抗生剤による加療を開始しました。入院当初から血小板が低値 ($10.7 \times 10^9/\mu\text{L}$) を示していたため、DIC の存在を想定し評価を行ったところ DIC score 3 点でありましたが、入院当日から FOY の使用を開始しました。以上のような治療内容によって血液検査所見上、肝機能は改善傾向を示し CRP も改善傾向を示しておりましたが、白血球数が 3 万から 4 万の間で推移し、異型リンパ球も依然高値のままで推移しました。臨床症状も発熱、食思不振が持続しておりました。

(5) 次に、入院時提出した各種ウイルスマーカーの結果をお示しします。EBV は既感染パターン、CMV に関しては IgM が陽性を示しており、追加で提出した CMV アンチゲネミアも陽性であったことから、一連の臨床症状、血液の検査異常の原因は CMV 感染によるものと考え、第 13 病日から 4 日間 CMV γ グロブリンを使用しました。

(6) また同じ日に黒色便を認め、Hb の急激な低下 (6.5 g/dl) を示したため、緊急上部消化管内視鏡を施行したところ、胃体中部後壁に露出血管を伴った潰瘍を確認し、止血術を行いました。また、濃厚赤血球の輸血を行っております。胃粘膜で CMV の DNA を検索したところ陽性でした。

(7) CMV 感染に対する治療によって、臨床徴候および肝機能も改善し、退院

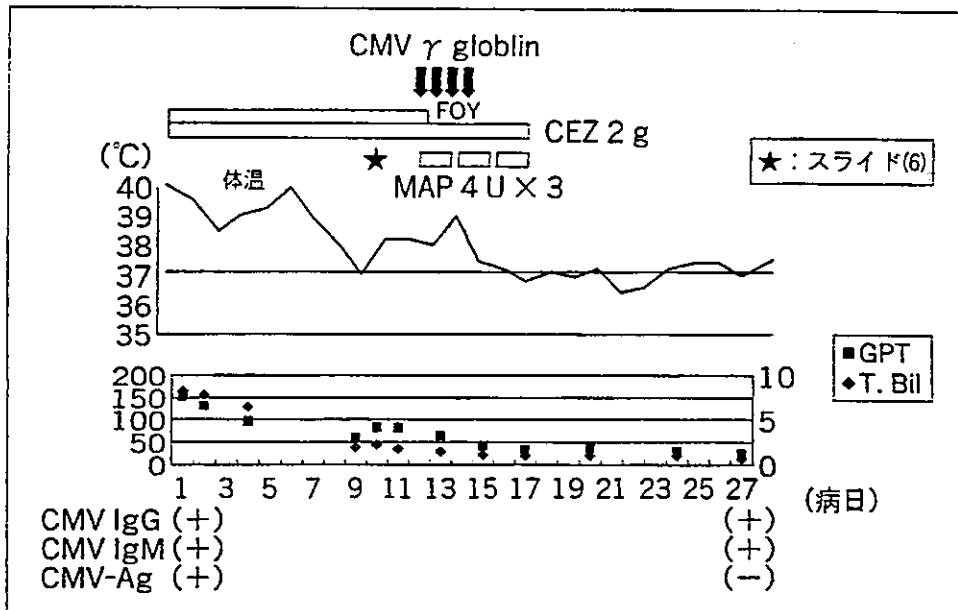
(6)

緊急上部消化管内視鏡検査



(7)

臨床経過 (前半)

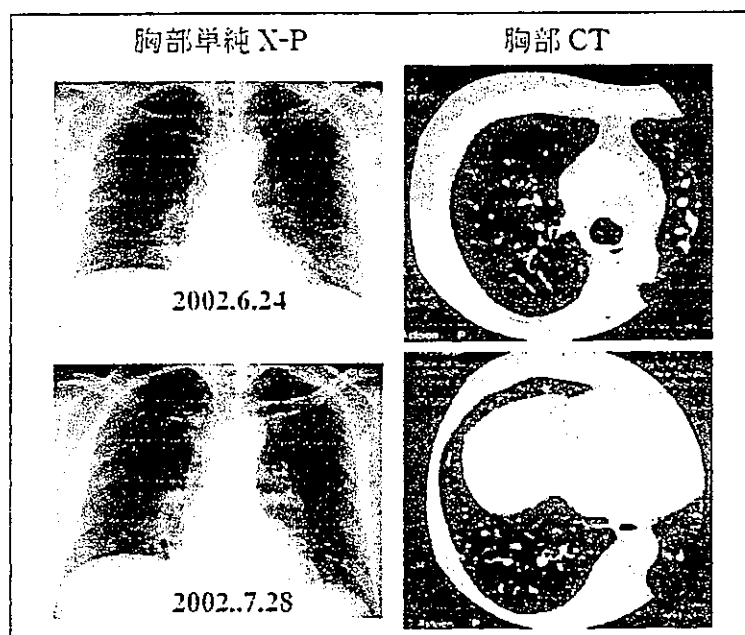


も考慮に入れたお話もしておりましたが、 γ グロブリン投与12日後、第28病日頃から乾性咳嗽、呼吸苦の訴えを認め、当初抗生剤の経口投与を開始しましたが、徐々に呼吸状態が悪化傾向を示してまいりました。

(8) 胸部単純X線では両側下肺野に網状粒状影を認め、同時に行った胸部CTでもびまん性の間質影を認め、血液検査上高度の好酸球増多を認めました。呼吸器内科にコンサルトしPIE症候群が強く疑われ、第41病日である7月29日に肺生検術を施行、同じ日にステロイドのセミパルス療法を施行いたしました。

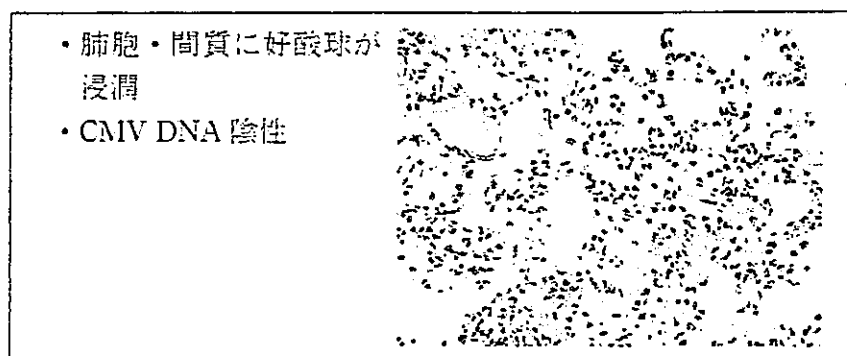
(8)

画像所見



(9)

肺病理所見



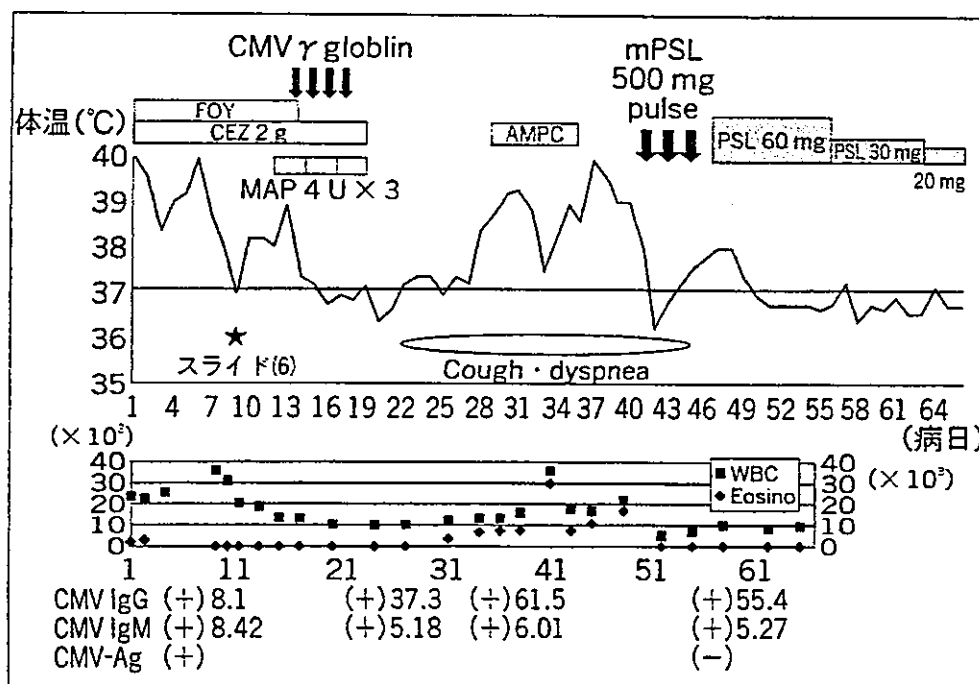
た。

(9) 後日報告された肺生検の病理結果では、気管支壁、肺胞に好酸球の浸を認め、病理所見上は PIE 症候群に矛盾しない病理所見でした。また、サイメガロウイルス感染を示唆するような細胞質封入体や核封入体は見られませんでした。採取された検体での CMV DNA は陰性でした。

(10) 入院中の臨床経過ですが、第 41 病日からステロイドのセミパルス療を施行し、後療法としてプレドニンを 60 mg から導入してから咳嗽、呼吸苦状も改善し、血液ガス分析でも改善傾向を示しました。また画像所見上も当

(10)

臨床経過



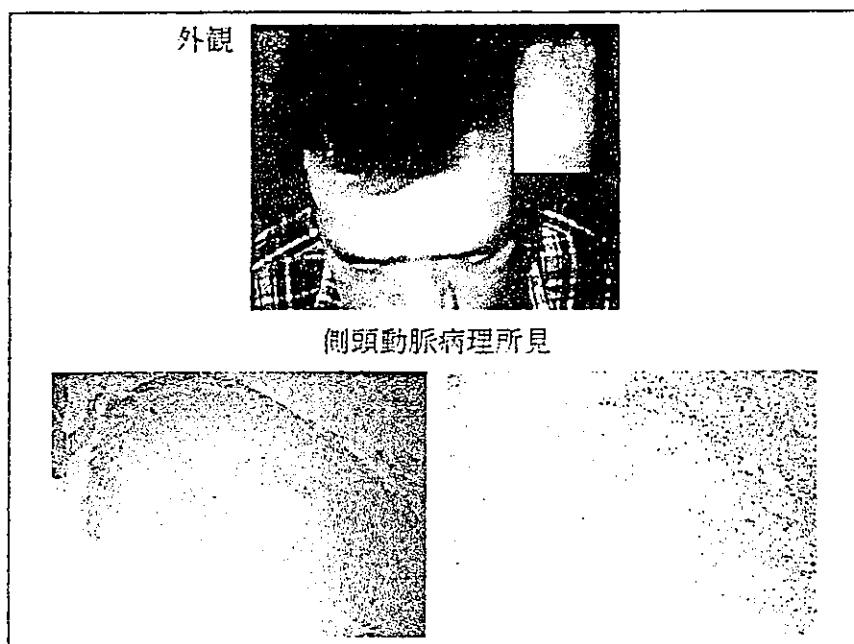
見られた全肺野にわたる間質性の陰影も消失したため、プレドニンを最終 20 mg まで減量し、第 66 病日である 8 月 23 日に退院となりました。

(11) 退院後しばらくプレドニンの内服を継続しながら、当院内科外来を通院しておりましたが、退院約 1 カ月後頃より両側の前額部付近の頭痛を自覚されました。しばらく外来で経過観察されていましたが、平成 15 年 4 月頃には写真に示すように、左の前額部の血管の怒張を認めるようになり、当院脳神経外科で側頭動脈の生検術を施行しました。ここにそのときの病理組織を示しますが、血管の内腔は血栓で閉塞し、血管の中膜および外膜に炎症細胞の浸潤を認め、巨細胞の出現は確認できないものの側頭動脈炎の所見に矛盾しないとのコメントでした。側頭動脈炎の診断後から外来で 10 mg まで減量していたプレドニンを 20 mg に増量し、その直後から頭痛等の症状は改善傾向を示し、現在も当科外来を定期通院しております。現在も定期的に CMV の抗体価を測定しておりますが現在も CMV の IgM が低力価ながら陽性を示しているものの、全身状態は良好です。

考察です。今回われわれはサイトメガロウイルス感染による肝機能障害を発

(1)

側頭動脈所見



端にして、PIE 症候群と側頭動脈炎という二つの異なった病態を発症した症例を呈示しました。

まず、入院時にみられた肝機能障害についてですが、はじめはその原因としてEB ウイルスによるものと考え対症的に加療を行っておりました。これだけでは病勢が抑えられず、サイトメガロのアンチゲネミアが陽性であることを確認したうえで加療を行ったところ効果が得られました。

次に、CMV に対する治療を開始した時期に黒色便を認め、出血を伴った胃潰瘍を確認しましたが、潰瘍部分から得られた胃粘膜の組織検体でCMV のDNA を調べてみたところ陽性の結果が得られたため、CMV 感染に関連した胃潰瘍、上部消化管出血と考えられました。入院時からNSAIDs を常用しておりましたのでNSAID が潰瘍の原因あるいは増悪因子として関与していた可能性も否定できないと思われます。

次に、入院経過の後半に発症した好酸球性肺炎についてですが、胸部単純撮影で間質性の強い陰影を伴うことから鑑別疾患として当初、CMV 肺炎を考慮に入れましたが、肺生検で得られた病理組織では好酸球の浸潤が顕著であった

点や、血液の所見などから否定的と思われました。薬剤性の好酸球性肺炎については発症当時使用していた薬剤についてDLSTを施行しましたが陰性の結果を得ており、薬剤性の要素も否定的です。PIE症候群とCMV感染の関連性については、肺生検組織中のCMVのDNAに関しては陰性であり、病理組織所見で巨細胞を認めない点から懐疑的ですが、否定する根拠は得られていません¹²⁾。

最後に退院後に発症した側頭動脈炎についてですが、こちらは特徴的な臨床所見から外来主治医が精査を推めて確定診断されました。病理所見では巨細胞の存在が確認できませんでしたが、側頭動脈炎に矛盾しない所見でした。本症例では側頭動脈生検組織からCMVのDNAは検出されず、両者の関連性については不明ですが、海外の文献では側頭動脈炎の生検組織中に有意にCMVのDNAが検出されたとの報告もあり、PIE症候群の場合と同様に完全に否定する証拠は得られていないと思われま³⁾。

〔文 献〕

- 1) Ballotta, M. R., Borghi, L., Borin, P.: An unusual case of cytomegalovirus infection. *Pathologica*, 87 (6) : 682-684, 1995.
- 2) Crowley, B., Dempsey, J., Olujohungbe, A., Khan, A., Mutton, K., Hart, C. A.: Unusual manifestations of primary cytomegalovirus infection in patients without HIV infection and without organ transplants. *J. Med. Virol.*, 68 (2) : 237-240, 2002.
- 3) Helweg-Larsen, J., Tarp, B., Obel, N., Baslund, B.: No evidence of parvovirus B19, *Chlamydia pneumoniae* or human herpes virus infection in temporal artery biopsies in patients with giant cell arteritis. *Rheumatology*, 41 (4) : 445-449, 2002.

〔質疑応答〕

座長 (三崎) それまで健康だった40歳の男性例で起こった、興味深いエピソードと経過の報告です。ご討議お願い致します。

金子 (順天堂大学医学部附属順天堂浦安病院内科) 確認させていただきたいのは、病初期でサイトメガロウイルスのIgM抗体陽性、C7-HRP陽性より、要するにウイルス血症が起きたという判断で γ -globulinだけの治療を行ったのか、ガンシクロビルを含めた抗ウイルス療法を行ったのかを聞かせてくださ

い。

演者 この時点では、ガンシクロビル等は使用しておりません。その理由ですが、他のウイルス感染等の細菌感染がすべて否定されていなかったということで、まず γ -globulinから使用開始しました。

金子 経過中、CD4陽性T細胞数などをおわれましたか。

演者 1回行っていたと思いますが、顕著な低下はなかったと思います。

座長 経過表では少し分かりにくかったのですが、末梢の好酸球数が肺の症状が出るとともに好酸球が増多しているようにお見受けしました。何パーセント、あるいは何個ぐらいまで増えたのか。あるいは、次に側頭動脈炎の症状が出たときにも、やはり好酸球の増多があったのかについてお伺いしたいのですが。

演者 PIEが出現する病初期は、WBC 1万2000～3000のうち、70～80%ぐらいで好酸球が見られました。側頭動脈炎を発症した当時は、eosinoに関しては上昇を認めておりません。

座長 ANCAはいかがですか。

演者 ANCAは、p-ANCA、c-ANCAとも陰性でした。

座長 DLST陰性ということですが、PIE様の肺病変が出たとき、薬は何を使っていたらっしゃいましたか。

演者 H₂ブロッカー、粘膜保護剤と、抗生剤でサーシリンが入っていたのですが、既に好酸球が上がってきた後に使い始めたものですから、関連性は薄いと思っています。

座長 DLSTで陽性が出ることのほうが逆に少ないと思いますので、DLST陰性だけを根拠に「否定的」と言い切るのは、少し難しいかと思います。

演者 そうですね。また、ステロイドパルス直後の血液で行っていますので、先生おっしゃるように断定はできないと思います。

越智 (東京医科歯科大学学生体応答調節学) まず1点ですが、側頭動脈炎やPIE症候群が、サイトメガロとの関連が否定し切れないとおっしゃっていましたが、今後、側動脈炎やPIE症候群で再燃が見られたときには、ステロイド単

独で治療をされるのか、それともサイトメガロのIgM陽性が続いているということで、今後はガンシクロビルの使用も考えていらっしゃるのかをお聞かせください。

演者 IgMのみでサイトメガロがかかわっているかどうかの判断は難しいと思います。アンチゲネミア等、諸々の検査を行った上で検討したいと思います。

越智 もう1点は、病理組織所見の箇所です。サイトメガロのDNAで判定をされたと言われましたが、普通は封入体で見ると思います。封入体と比べ、そのDNAの特異度や感度がどの程度かについて教えてください。

演者 特異度、感度に関しては、調べておりません。

越智 それが陽性であれば、サイトメガロ腸炎を強く疑うということではよろしいのでしょうか。

演者 と、解釈しております。

越智 サイトメガロの腸炎だと、アンチゲネミアが陽性になることは少ないと思います。今後、側頭動脈炎が再燃したときには、やはりもう1回内視鏡を行い、DNAを判定するということになりますか。

武井（共同演者） 先生がおっしゃるように、サイトメガロウイルスの感染かどうか、それが原因かどうかということは、バイラルロードをリアルタイムPCRで測り、そのバイラルロードの数によって判定する方法があります。この症例のときには、まだリアルタイムPCRが私たちのところで可能ではなかったのと、保険適用でないことから検討しておりません。ただ、今後はバイラルロードを測り、その可能性を判断して治療の選択を行うことになるかと思えます。

ヘルペスウイルス感染症の制御—Epstein-Barr
ウイルス感染と免疫機構を支える遺伝子 (SAP/SH2D1A)

武井 正美¹⁾ 石渡 哲義³⁾ 三田村 巧¹⁾ 山上 賢治¹⁾
澤田 滋正^{1,2)}

¹⁾ 日本大学医学部内科学講座血液膠原病内科部門

²⁾ 日本大学医学部練馬光が丘病院内科

³⁾ 協和発酵工業東京研究所

日 大 医 学 雑 誌

第 63 卷 第 7, 8 合併号

(2004 年 7 月 1 日発行)

総説

特集：ウイルス感染症の制御をめざして

ヘルペスウイルス感染症の制御—Epstein-Barr
ウイルス感染と免疫機構を支える遺伝子 (SAP/SH2D1A)武井 正美¹⁾ 石渡 哲義³⁾ 三田村 巧¹⁾ 山上 賢治¹⁾
澤田 滋正^{1,2)}¹⁾日本大学医学部内科学講座血液膠原病内科部門²⁾日本大学医学部練馬光が丘病院内科³⁾協和発酵工業東京研究所Herpes Virus Infection, Epstein-Barr Virus, Signaling Lymphocytic-Activation
Molecule associated protein (SAP/SH2D1A)Masami TAKEI¹⁾, Akiyoshi ISHIWATA³⁾, Ko MITAMURA¹⁾,
Kenji YAMAGAMI¹⁾ and Shigemasa SAWADA^{1,2)}¹⁾Division of Hematology and Rheumatology, Department of Medicine, Nihon University School of Medicine²⁾Department of Internal Medicine, Nerima Hikarigaoka Hospital³⁾Tokyo Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co.

Herpes virus group viruses include cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV), herpes simplex virus 1 or 2 (HSV), varicella zoster virus (VZV), and human herpes virus-6, 7, and 8. These herpes viruses are transmitted by human contact, cause primary infection, and may exist for several years in a latent state in healthy individuals. These viruses may be reactivated by the dysregulation of the host immune system or possibly by virus mutation. In the present paper, we describe the treatment and diagnosis of HSV, VZV, CMV, and EBV infection and discuss possible future treatments. Our proposed therapy is based on SAP (signaling lymphocytic-activation molecule associated protein) or SH2D1A (Src homology 2 domain-containing protein). SAP (or SH2D1A), an adaptor-like molecule expressed in immune cells, is composed almost exclusively of a Src homology 2 (SH2) domain. In humans, SAP is mutated and either absent or non-functional in X-linked lymphoproliferative (XLP) syndrome (Duncan disease), a disease characterized by an inappropriate response to EBV infection. SAP is essential for late B cell help and the development of long-term humoral immunity. The regulation of this molecule (SAP) could become the basis of a new therapeutic approach to the treatment of infections caused by the herpes virus group.

Key words: signaling lymphocytic-activation molecule associated protein (SAP)

ヘルペスウイルス感染症, Epstein-Barr ウイルス

E-mail: numtakei@med.nihon-u.ac.jp

(J. Nihon Univ. Med. Ass., 2004; 63 (7, 8): 299-304)

I. 臨床的意義

近年、小児期での生活衛生環境の改善などから成人でのヘルペスウイルス感染の重症化、HIV 感染症、臓器移植や抗癌剤治療、膠原病リウマチ疾患などへの免疫抑制薬の使用によるヘルペスウイルス関連疾患の発症が日常の臨床の場でも直面することが多くなっている。例えば移植後ウイルス感染症の多くは移植後 180 日以内に生じる。時期は、3 つに区分することができ、移植後 0-30 日の早期は単純ヘルペスウイルス (HSV: Herpes simplex

virus) の再活性化が生じる。30-180 日の中間期は、ドナーの臓器、血液製剤によるウイルス再活性化がある。インフルエンザウイルス、RS ウイルス (Respiratory syncytial virus)、アデノウイルス、パラインフルエンザウイルスなどの市中ウイルス感染症や EB ウイルス (EBV: Epstein Barr virus)、サイトメガロウイルス (CMV: Cytomegalovirus) 水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV: Varicella zoster virus) はこの時期に発生が一度ピークとなる。また、180 日以降の後期にも CMV 感染症は再び発生のピークがある。この時期に EBV 関連の移植後リ

ンパ球増殖性疾患 (PTLD: post-transplant lymphoproliferative disorder) も見られる。この稿では臨床の場で遭遇する機会の多いヘルペスウイルス群の HSV, CMV, EBV, VZV について解説する。

II. ウイルスの特徴 ヘルペスウイルス群

ヘルペスウイルスは二本鎖 DNA ウイルスで、20 面体構造を形成し、細胞膜由来のエンベロープを有する。潜在感染し、時に再活性化しウイルスを再産生することがある。HSV, VZV は神経根に潜伏感染し、リンパ球に EBV と CMV は潜在感染する。

A. HSV

HSV には2つの型があり、HSV-1 は主に口腔と結膜、HSV-2 は性器ヘルペスを起こす。高熱、嚥下障害、有痛性の歯肉口内炎が特徴的で、歯肉は潰瘍を形成することもある。頬口蓋粘膜、舌に水疱性病変をきたし、急速に3~5日間でピランを形成し10日位で癒痕化する。所属リンパ節の腫大、角膜、口唇周囲皮膚に及ぶことがある。内臓病変としては肝炎が最も多く髄膜炎、脳炎、肺炎も起こす。

B. CMV

CMV は DNA ウイルスで、日本人の90%以上が小児期に感染する。感染後体内に潜在化し、免疫抑制状態で再活性化されることがある。CMV は、HIV 感染症、固形臓器移植後の最も多いウイルス感染症で予後に影響を与える。移植後では1~3カ月の間に発症するが、免疫抑制薬の維持量決定後の6カ月以降にも発症する可能性がある。症状は、発熱、間質性肺炎、肝炎、脈絡膜炎、単核球症、大腸炎があり、時には消化管に潰瘍を起し消化管出血を来すこともある。間質性肺炎は、生命の予後を左右する。CMV 感染は、初感染と再活性化がある。

C. EBV

EBV は伝染性単核球症の原因として知られ、主にBリンパ球に感染し、Burkittリンパ腫や上咽頭癌を引き起こす。その他にもEBV 関与の腫瘍は多く報告されており、Hodgkin 病、B-lymphoproliferative disease、Oral hairy leukoplakia、EBV 関連胃癌などがある。日本人成人では80%以上既感染となる。EBV は固形臓器移植後の重要な病原体であり、単核球症、リンパ腫、PTLD を引き起こす。PTLD は、術後1年目に起こるが、移植後数年で起こる遅発例もある。関節リウマチや多発性硬化症、小児のEBV の重篤な感染を特徴とする免疫不全症候群(X連鎖リンパ球増殖症候群: XLP または、Duncan 病) などや慢性活動性EBV 感染症も知られており、重篤な血球貪食症候群を起こすこともある。通常の急性感染症状は発熱、浸出性扁桃炎、リンパ節腫大、肝脾腫、白血球減少、異型リンパ球などがある。

D. VZV

VZV は初感染では空気感染により水痘として発症し、局所リンパ節で増殖後、肝脾臓などで増殖する。その後全身の皮膚の毛細血管内皮細胞や皮膚上皮細胞で増殖する。夏での水痘の流行は少ない。水疱を形成し、膿疱、痂皮化して治癒する。水痘罹患後知覚神経から三叉神経節や脊髄後根神経節神経細胞で潜伏感染する。再活性化されたウイルスは皮膚の神経分布領域に水疱を形成し帯状疱疹となる。帯状疱疹後神経痛 (post herpetic neuralgia, PHN) が時に生じる。外耳道炎、顔面神経麻痺、耳鳴、難聴、めまいを症状とする耳の帯状疱疹に Ramsay-Hunt 症候群がある。帯状疱疹は5日ほどで痂皮形成する。痂皮になるまで人に伝染能力がある。再発率は4%以下である。

III. 診断法・治療法 (Table 1)

A. HSV

a. 診断

病変部の細胞診断で非特異的な風船状の細胞が認められる。ウイルス分離のため48時間の組織培養をする。初感染ではベア血清による抗体価の上昇を見る。IgM 抗体が上昇していれば再活性化、初感染の証拠となる。

b. 治療

1. アシコルビン (ゾビラックス®)

アシコルビンはヘルペス感染症の第一選択である。眼部病変には眼軟こうが用いられるが、口唇口腔、性器病変や脳炎髄膜炎など内臓病変には全身投与が行なわれる。重症時では薬用量5-10 mg/kg/8 hr で、静注で7日間とする。皮膚粘膜ヘルペスは、1000 mg を1日5回で5日間経口投与する。

2. ビダラビン (アラセナーA®)

ヌクレオシド誘導体の抗ウイルス剤。ビダラビンはHSV 脳炎、皮膚感染症、口の感染症、内臓感染症に対して使用されている。局所の皮疹のみでは軟膏の使用で効果があり、脳炎では10-15 mg/kg で1日1回7~10日間点滴静注する。

B. CMV

a. 診断

CMV の診断は、HSV と同じく血清抗体検査、培養によるウイルス同定(シェルバイヤル法)、組織内のウイルスDNA の存在を調べるための単クローン性抗体による感染細胞の検出(アンチゲネミヤ法)、polymerase chain reaction (PCR) 法、in situ ハイブリダイゼーション法や組織、塗抹組織でウイルスの封入体を示すことが必要である。ウイルス培養では無症候性にCMV を排出するため非特異的に陽性となる場合があり病理組織検査は重要である。再活性化は抗CMV-IgM 抗体検査が有効である。

Table 1 Therapy of Herpes virus infection

作用	一般名	商品名	一般的な使用法	副作用	禁忌
抗ヘルペスウイルス薬 ウイルスのDNAポリメラーゼ を選択的に阻害する。	ビダラビン	アラセナーA	単純ヘルペス脳炎でアシクロビル 無効時1日10~15 mg/kgを10日、 免疫抑制患者の帯状疱疹1日5~10 mg/kgを5日間5%糖、生食500 ml を40度以上に加温後、その10 ml をとり300 mgを加え15秒振盪し 懸濁液をもとの輸液に戻し40度以 上で5分間時々振盪溶解させ冷や してから使用する。	精神神経障害 ショック	過敏症既往
	ガンシクロビル	テノシン	AIDSのサイトメガロウイルス網膜 炎に3000 mgを1日3回でまたは、 3時間毎1日6回 AIDSでサイトメ ガロウイルス網膜炎の予防3000 mg 1日3回で経口投与、重篤な場合5 mg/kgを12時間毎1日2回14日間 点滴維持療法で5 mg/kgを1日1回 7日間。	チエナムと併用しない(けいれん) 消化管出血 骨髄造血能低下 深在静脈血栓症 腎不全 敗血症 肺炎 昏睡錯乱 けいれん	妊婦 好中球数500/mm ³ 未満 または血小板数25000/mm ³ 未満 の患者 ガンシクロビルまたは 類似化合物(アシクロビル等)に 対する過敏症
	アシクロビル	ゾピラックス	発病初期5日以内 内服 単純へ ルペス、100 mgを1日5回 5日 まで 骨髄移植時単純ヘルペス予 防 1000 mgを1日5回で移植7日 前から移植後35日まで、帯状疱疹 は4000 mgを1日5回、7日まで、 重症時1回5 mg/kgを8時間毎で1 日3回 7日間点滴静注する。	急性腎不全 ショック 血小板 減少性紫斑病 DIC呼吸抑制 間質性肺炎 けいれん 幻覚 妄想 てんかん発作	本剤薬剤過敏症 妊婦
	塩酸バラシクロビル	バルトレックス	3000 mgを1日3回 帯状疱疹皮 疹出現5日以内 7日投与	アシクロビルに準ず	本剤薬剤過敏症 妊婦
	フォスカーネット	ホスカビル	AIDSでのCMV網膜炎でガンシク ロビルが無効または使用できない 場合、フォスカーネット60 mg/kg を8時間おきに14-21日間静注し、 90 mg-120 mg/kg 1日1回点滴静注 で維持する。	腎障害 血清K, Mg, Ca, Na低下 口周囲しびれ 知覚異常 けいれ ん 横紋筋融解 心不全 血栓性 静脈炎 イレウス 敗血症	ペンタミジン投与患者

武井正美 研修医必携 2004 改訂

b. 治療

アシクロビル、ガンシクロビルやフォスカーネットのような抗ウイルス剤、高力化免疫グロブリン製剤によるCMVの予防、治療は、臓器移植患者の生存率を改善した。

1. アシクロビル (ゾビラックス®)

CMV感染症の予防にアシクロビル大量療法が効果があるとの報告がある。例えば、腎臓移植後に、3200 mg/日のアシクロビルあるいは偽薬を経口で投与し、アシクロビルの有効性が高かったとの報告や、骨髄移植患者にCMV予防としてアシクロビル 500 mg/m²を8時間毎に点滴静注したほうが移植後100日以内の生存期間がよかったなどである^{2,3)}。

2. ガンシクロビル (デノシン®)

グアニンの誘導体で、アシクロビルの構造と類似している。5 mg/kgを12時間毎に点滴し、14~21日間続ける。維持療法は5 mg/kg 1日1回を週7回必要である。CMV網膜炎については眼注による直接投与も考えられている。アルカリ性が強く注意を要する。抗CMV高力化免疫グロブリン2.5~5 g/日、3日間の点滴静注を併用することもある。ガンシクロビルの経口投与(1000 mgを1日3回、28日間)が、維持治療として検討されている。

3. フォスカーネット (ホスカビル®)

ガンシクロビルが無効または使用できない場合、フォスカーネット 60 mg/kgを8時間おきに14~21日間点滴静注し、90 mg-120 mg/kg 1日1回点滴静注で維持する。

C. EBV

a. 診断

EBVの抗体検査は種類があり、それぞれに意味がある。抗ウイルスカプシド抗体 IgG, IgM (VCA: Viral Capsid Antigen) が有り、IgM抗体が最初出現し、IgG抗体が上昇し存続する。一時的に抗ウイルス早期抗原抗体 (EA: Early Antigen) が認められ、抗EBV関連核蛋白抗原 (EBNA: EBV Associated Nuclear Antigen) 抗体が検出される。抗EBV-VCA IgM抗体が陽性で、抗EBNA抗体が陰性の場合、初感染を示す。EBVの再活性化では、抗EBV-VCA IgG抗体と抗EBV-EA抗体の高値、慢性活動性感染では抗EBNA抗体の低値が認められる。ウイルスの検出には、培養、検体細胞核のEBNAの検出、in situ ハイブリダイゼーション法 (特にウイルス由来コピー数が多く感度が高い EBER: EBV encoded small nuclear RNA 検出法) やPCR法によるウイルスゲノムの検索が行なわれる。末梢血の異型リンパ球やPaul-Bunnell反応はEBV感染の診断の参考になる。

b. 治療

EBV関連PTLD患者には、重症度により免疫抑制剤の減量、抗ウイルス剤、インターフェロン、化学療法も一般に用いられるが、一定の結論は出ていない。最近の

報告ではEBV特異的細胞障害性T細胞を誘導してPTDの治療が試みられている⁴⁾。原則的にはEBV感染症は無治療だが、重篤な嚥下困難や溶血性貧血、血球貪食症候群などがある場合には、副腎皮質ステロイド薬やエトボシド (ラステット®)⁵⁾などの化学療法などが考えられるが、今後の検討が待たれる。

D. VZV

a. 診断

診断は特徴的な臨床経過と皮疹から比較的容易になされる。診断に確信がもてない場合はベア血清による抗体価の動きか再活性化の場合はIgMクラスの抗体の上昇をみて判断する。水疱内にウイルスが存在するためウイルスの分離も必要なら施行する。

b. 治療

1. アシコルビン (ゾビラックス®)

アシコルビンはヘルペス感染症の第一選択である。帯状疱疹は経口で4000 mgを1日5回、7日まで。重症時1回5 mg/kgを8時間毎で1日3回7日間点滴静注する。

2. 塩酸バラシクロビル (バルトレックス®)

3000 mgを1日3回、帯状疱疹皮疹出現5日以内7日経口投与する。

3. 高齢者への水痘ワクチンの接種は帯状疱疹の発症を予防できる。

IV. 将来の展望

生体は体内に進入した外来微生物を記憶し、再度の侵入に対して免疫記憶の機構を駆使して即座に反応して防御を果たしている。この長期免疫機構を支える新しい遺伝子の発見がなされ、近年その機能の解析が報告されつつある。この免疫を長期記憶して液性免疫による感染制御を行っている遺伝子がSAP (signaling lymphocytic activation molecule associated protein: SLAM associated protein) と呼ばれている。この遺伝子の欠損は小児のEBウイルスの致死的な感染症を特徴とする免疫不全症候群 (X連鎖リンパ球増殖症候群: XLP または Duncan 病) を惹起することで初めて報告された⁶⁾。我々はこの報告に先立ちIgA腎症の疾患特異的遺伝子の解析をFDD (fluorescein differential display 法) で網羅的行った際この遺伝子を発見し、クローニングを行い国内、国際特許の出願 (国際公開番号 WO98-24899) をしている。我々は関節リウマチ (RA) で直接的なEBウイルスとの関与を報告してきたが⁷⁾、SAP遺伝子の発現がRA末梢T細胞で低いことを発見し (出願番号 PH11-154625)⁸⁾、そのプロモーター領域に変異があることを見出している。

SAPはSH2ドメインのみを有するアダプター蛋白質 (128アミノ酸) で進化の過程で生き残ってきた natural regulator ともいえるもので、シグナル伝達の制御ポイントとして重要な役割を果たしている。T細胞とNK細胞

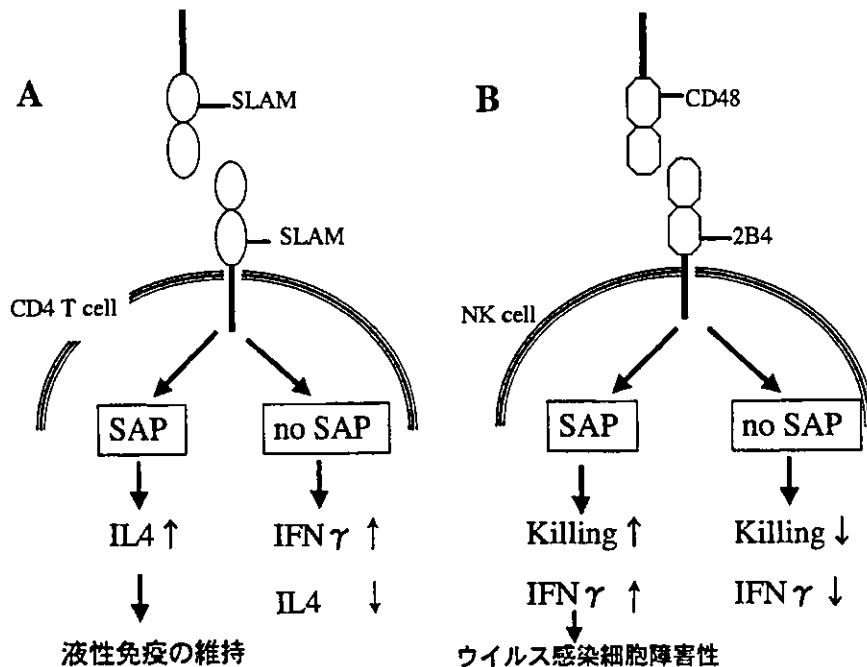


Fig. 1 SAP is essential for development of long-term humoral immunity and killing of viral infected cells.

のみで選択的に発現し、SLAM (signaling lymphocytic activation molecules, CD150)-family receptor (CD2 サブファミリー; SLAM, 2B4 (CD244), LY9 (CD229), CD84, NTB-A) の細胞内リン酸化チロシン (TYYXXV) に結合し、SRC キナーゼのリクルートによる SLAM (CD150)-family receptor のシグナル伝達を制御している^{9,10)}。SLAM は、麻疹ウイルスのレセプターであり、関節リウマチや多発性硬化症にも関与していることが報告されている。SAP は、細胞内において Dok1 (RAS-GAP, CSK, NCK と相互作用する) とも会合し、NF- κ B の活性化に関与していることも報告された¹⁰⁾。

更に、SAP は長期的な体液性免疫を維持するために必要であることが最近発見された。長期間生存するプラズマ細胞やメモリー B 細胞は長期的な体液性免疫の主要な細胞成分であり、またそれ自体ほとんどのワクチンがもたらす防護作用にとって極めて重要なものである。SAP ノックアウトマウスのモデル系を使って免疫反応における SAP の役割が解析されている。SAP の発現を欠くマウスでは、ウイルス感染の後、激しい急性の IgG 抗体反応は起こるが、ウイルス特異的な長期生存プラズマ細胞およびメモリー B 細胞がほぼ完全に欠失していることが判明している。養子移入実験では、SAP 欠損 B 細胞は正常であり、欠陥は CD4+T 細胞にあることが示されている。SAP は、初期段階における B 細胞に対する補助やクラススイッチには不要であるが、後期段階の B 細胞に対する補助や長期的な体液性免疫の成立には不可欠であることがわかっている。このように SAP は、免疫記憶の発達に中心的な役割を果たしている¹¹⁾(Fig. 1)。

また、SAP は Th1 への分化を抑制し、Th2 への分化

を誘導すると報告された。SAP のノックアウトマウスでは、CD4+T 細胞からの IFN- γ 産生が高まり、いわゆる Th1 細胞への分化が観察された。一方、SAP のトランスジェニックマウスでは、IL-4 産生が高まり、Th2 細胞への分化が認められた¹²⁾。以上から SAP は、ヘルパー T 細胞機能の重要な役割を担っていると考えられる。

また、SAP には dual functional role が報告されており、フォスファターゼ SHP-2 に対して SAP の SH2 ドメインの phosphotyrosine-binding motif を介して SLAM の細胞内ドメインのチロシンリン酸化部位で阻害因子としての役割と SAP の SH2 ドメインの phosphotyrosine-binding motif とは異なる second region を介して FynT の SH3 ドメインと相互作用し、FynT (PTK) の SLAM へのリクルートを促進するアダプターとしての役割 (SLAM-SAP-FynT complex を形成 → FynT のリン酸化機能の構造的なマスキングが解除、リン酸化機能が活性化され下流にシグナル伝達) を果たしている¹³⁻¹⁶⁾。

HSV や CMV などのヘルペスウイルス急性感染症に対する治療は前述したように抗ウイルス薬や免疫グロブリンでの治療が確立されているが、EBV に対する治療法はまだ、確立されたものがなく、様々な EBV 関連疾患治療法は今後の研究が待たれている。

EBV 関連疾患は悪性リンパ腫や胃癌から血球貪食症候群、臓器移植後日和見腫瘍、膠原病 (RA, 全身性エリテマトーデス, Sjogren 症候群など) の治療予防に深く関わる可能性があり、XLP (Duncan 病) の疾患原因遺伝子 (SAP) の発見から端を発した体液性免疫記憶の機序の解析はこれら疾患の新たな治療の開発につながるものと考えられる。具体的な方法としては SAP 遺伝子を造血幹細

胞や血液細胞に導入する遺伝子治療や SLAM (CD150)-family receptor (SLAM, 2B4, CD48, LY9, CD84) のシグナル伝達を +/- に制御する薬剤 (Th1/2 バランス制御薬), 有効なウイルス薬が無いなかで, ワクチンの効果を維持したり高めたりする薬剤, SAP 機能の促進剤は, ヘルパー T 細胞からの IL-4 の産生を高めナイーブ Th0 細胞の Th2 細胞への分化を誘導し, Th1/Th2 バランスを Th2 へ傾ける薬剤となり, 液性免疫の強化剤, EBV 関連腫瘍の治療薬, 予防薬としての開発が考えられる. 我々がこの感染防御に関わる遺伝子 (SAP) の知的財産権を主張できる立場を世界に先立ち有していることはこの分子を利用した新たな治療法の開発に優位な状況にあると考える.

文 献

- 1) Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 1998; **338**: 1741-1751.
- 2) Balfour HH Jr. Management of cytomegalovirus disease with antiviral drugs. *Rev Infect Dis* 1990; **12** Suppl 7: S849-S860.
- 3) Meyers JD, Reed EC, Shepp DH, et al. Acyclovir for prevention of cytomegalovirus infection and disease after allogeneic marrow transplantation. *N Engl J Med* 1988; **318**: 70-75.
- 4) Heslop HE, Ng CY, Li C, et al. Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nat Med* 1996; **2**: 551-555.
- 5) 花井將彰, 武井正美, 山崎哲夫, 等. 小腸病変より発症し慢性 EB ウイルス感染症による再発性の血球貧食症候群をエトボシド間歇投与によりコントロールしえた一例. *臨床血液*, 1997; **38**: 682-688.
- 6) Sayos J, Wu C, Morra M, et al. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 1998; **395**: 462-469.
- 7) Takei M, Mitamura K, Fujiwara N, et al. Detection of Epstein-Barr virus-encoded small RNA 1 and latent membrane protein 1 in synovial lining cells from rheumatoid arthritis patients. *Int Immunol* 1997; **9**: 739-743.
- 8) Takei M, Mitamura K, Ishiwata T, et al. Decreased expression of signaling lymphocytic-activation molecule associated protein (SAP) transcripts in T cells from patients with rheumatoid arthritis. *Int Immunol* 2001; **13**: 559-565.
- 9) Sayos J, Martin M, Chen A, et al. Links Cell surface receptors Ly-9 and CD84 recruit the X-linked lymphoproliferative disease gene product SAP. *Blood* 2001; **97**: 3867-3874.
- 10) Bottino C, Falco M, Parolini S, et al. NTB-A [correction of GNTB-A], a novel SH2D1A-associated surface molecule contributing to the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *J Exp Med* 2001; **194**: 235-246.
- 11) Crotty S, Kersh EN, Cannons J, et al. SAP is required for generating long-term humoral immunity. *Nature* 2003 **16**; **421**: 282-287.
- 12) Wu C, Nguyen KB, Pien GC, et al. SAP controls T cell responses to virus and terminal differentiation of TH2 cells. *Nat Immunol* 2001; **2**: 410-414.
- 13) Chan B, Lanyi A, Song HK, et al. SAP couples Fyn to SLAM immune receptors. *Nat Cell Biol* 2003; **5**: 155-160.
- 14) Li C, Iosef C, Jia CY, et al. Dual functional roles for the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SAP/SH2D1A in signaling through the signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) family of immune receptors. *J Biol Chem* 2003; **278**: 3852-3859.
- 15) Latour S, Roncagalli R, Chen R, et al. Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signalling in immune regulation. *Nat Cell Biol* 2003; **5**: 149-154.
- 16) Engel P, Eck MJ, Terhorst C. The SAP and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**: 813-821.



Distinct roles of Smad pathways and p38 pathways in cartilage-specific gene expression in synovial fibroblasts

Hiroaki Seto,^{1,2} Satoshi Kamekura,¹ Toshiki Miura,¹ Aiichiro Yamamoto,¹ Hiroataka Chikuda,¹ Toru Ogata,¹ Hisatada Hiraoka,¹ Hiromi Oda,¹ Kozo Nakamura,¹ Hisashi Kurosawa,² Ung-il Chug,³ Hiroshi Kawaguchi,¹ and Sakae Tanaka¹

¹Department of Orthopaedic Surgery, Faculty of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan. ²Department of Orthopaedics, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan. ³Division of Tissue Engineering, University of Tokyo Hospital, Tokyo, Japan.

The role of TGF- β /bone morphogenetic protein signaling in the chondrogenic differentiation of human synovial fibroblasts (SFs) was examined with the adenovirus vector-mediated gene transduction system. Expression of constitutively active activin receptor-like kinase 3 (ALK3^{CA}) induced chondrocyte-specific gene expression in SFs cultured in pellets or in SF pellets transplanted into nude mice, in which both the Smad and p38 pathways are essential. To analyze downstream cascades of ALK3 signaling, we utilized adenovirus vectors carrying either Smad1 to stimulate Smad pathways or constitutively active MKK6 (MKK6^{CA}) to activate p38 pathways. Smad1 expression had a synergistic effect on ALK3^{CA}, while activation of p38 MAP kinase pathways alone by transduction of MKK6^{CA} accelerated terminal chondrocytic differentiation, leading to type X collagen expression and enhanced mineralization. Overexpression of Smad1 prevented MKK6^{CA}-induced type X collagen expression and maintained type II collagen expression. In a mouse model of osteoarthritis, activated p38 expression as well as type X collagen staining was detected in osteochondrocytes and marginal synovial cells. These results suggest that SFs can be differentiated into chondrocytes via ALK3 activation and that stimulating Smad pathways and controlling p38 activation at the proper level can be a good therapeutic strategy for maintaining the healthy joint homeostasis and treating degenerative joint disorders.

Introduction

Injury to the articular cartilage occurs under various pathological conditions such as trauma, inflammation, and aging (1), and cartilage injury is followed by osteoarthritic changes of the affected joints. Osteoarthritis is the most common degenerative joint disorder, affecting nearly half of the elderly population. Osteoarthritis is characterized by degradation of articular cartilage and overgrowth of cartilage and bone, known as osteophytes, at the periphery of the articular surface, which results in pain and loss of joint function (1, 2). Microscopically, loss of proteoglycan and fibrillation of the articular surface are observed at the early stage of arthritis. At later stages, clefts are formed, and at the end stage, erosive changes in the articular cartilage appear. The high prevalence of this disease results in high costs for treating patients, and therefore the development of good therapeutics for osteoarthritis is a matter of great urgency. Because of the limited capacity of spontaneous healing, the regeneration of intact articular cartilage is one of the most challenging issues in the orthopedic field (3, 4). Transplantation of autologous chondrocytes or mesenchymal progenitor cells and autogenous osteochondral transplantation (mosaicplasty) have been successfully utilized for the repair of focal osteochondral defects (3, 5–11). However, the application of these

technologies is limited to small defects due to the difficulty of obtaining a sufficient amount of cells or tissues.

Synovium is a thin tissue lining the nonarticular surfaces of diarthrodial joints (12). Synovial tissues contain various types of cells, including type A cells, macrophage lineage cells, and type B cells, which are specialized synovial fibroblasts (SFs). It is now widely recognized that synovial tissues are involved primarily in the pathogenesis of arthritic joint disorders such as rheumatoid arthritis by producing the matrix-degenerating enzymes cysteine proteases and matrix metalloproteinases (MMPs) and the proinflammatory cytokines interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) (12). We previously reported that SFs express a high level of receptor activator of NF- κ B ligand, the osteoclast differentiation factor belonging to the TNF- α superfamily (13). In contrast to such catabolic actions, there is accumulating evidence that synovial cells have anabolic effects, leading to bone and cartilage production. Hunziker and Rosenberg reported that synovial cells can migrate into partial-thickness articular cartilage defects, where they proliferate and subsequently deposit a scar-like tissue (14). Nishimura et al. (15) demonstrated SFs show chondrogenic differentiation after being cultured in the presence of TGF- β , and de Bari et al. recently demonstrated that multipotent mesenchymal stem cells could be isolated from human synovial tissues, which differentiated into chondrocytes as well as osteoblasts, adipocytes, and myotubes under proper culture conditions (16, 17). Another dramatic clinical manifestation of the chondrogenic potential of synovial tissues is synovial chondromatosis, a tumor-like disorder characterized by the formation of multiple cartilaginous nodules, which is believed to be benign reactive metaplasia of synovial cells (18). These observations

Nonstandard abbreviations used: anterior cruciate ligament (ACL); bone morphogenetic protein (BMP); constitutively active activin receptor-like kinase 3 (ALK3^{CA}); constitutively active MKK6 (MKK6^{CA}); hemagglutinin (HA); matrix metalloproteinase (MMP); medial meniscus (MM); osteoarthritis (OA); receptor-regulated Smad (R-Smad); synovial fibroblast (SF); TGF- β -activating kinase 1 (TAK1).

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Citation for this article: *J. Clin. Invest.* 113:718–726 (2004). doi:10.1172/JCI200419899.



lead us to speculate that synovial tissues contain multipotent cells with chondrogenic potential that might be involved in the repair process of articular cartilage defects and therefore might provide a good source for engineering articular cartilage.

There is accumulating evidence that TGF- β superfamily cytokines play an essential role in bone and cartilage development. Wozney and coworkers (19) reported that bone morphogenetic proteins (BMPs) induce early cartilage formation, and various studies have shown that TGF- β induces chondrocytic differentiation of undifferentiated mesenchymal cells (20–22). In the present study, we analyzed the role of TGF- β /BMP signaling on chondrogenic differentiation of human SFs by using the adenovirus vector-mediated gene transduction system. The introduction of an activated mutant of ALK3 (constitutively active activin receptor-like kinase 3 [ALK3^{CA}]), also known as BMP type IA receptor, induced chondrocyte-specific marker expression in the cells. ALK3 signaling involves two different downstream cascades, the Smad pathway and the p38 MAP kinase pathway. We used a combination of adenoviral gene delivery and chemical inhibition to analyze the role of these two signaling cascades in inducing differentiation of SF cells toward a chondrocyte phenotype and found that both pathways are essential for chondrogenic differentiation. Interestingly, activation of p38 pathways alone induced markers of terminal chondrocyte differentiation, type X collagen expression and mineralization, which was suppressed by Smad1 coexpression. These results suggest that both the Smad and p38 pathways are necessary for chondrogenic differentiation of SFs and that the balance between these two pathways determines the stage of differentiation.

Methods

Chemicals and antibodies. Alpha-modified minimum essential medium (α -MEM) was purchased from Gibco BRL, Life Technologies Inc. (Rockville, Maryland, USA), and fetal bovine serum (FBS), from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Anti-p38 MAPK and anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) were obtained from Cell Signaling Inc. (Cummings Center, Beverly, Massachusetts, USA). Anti-Flag was purchased from Sigma-Aldrich, and anti-hemagglutinin (anti-HA) was from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, California, USA). Anti-phospho-Smad1/5/8, which recognizes the phosphorylated form of Smad1, Smad 5, and Smad8, and anti-phospho-Smad2 were from Cell Signaling Inc. Anti-type II collagen was purchased from Oncogen (Boston, Massachusetts, USA) and anti-type X collagen was from LSL Co. (Cosmo Bio, Tokyo, Japan). Other chemicals and reagents used in this study were of analytical grade.

Isolation of SFs from human synovial tissues. Synovial cells were obtained as previously described (13, 23, 24). In brief, with enzymatic digestion, human synovial cells were isolated from synovial tissues of the knee joints of ten rheumatoid arthritis patients (37–75 years of age; mean, 60.3 years of age) at the time of total knee arthroplasty operations. Written informed consent for subsequent experiments was obtained from each patient. Cells were suspended in α -MEM containing 10% FBS and were cultured in monolayers. After three to five passages, subcultured cells were composed of morphologically uniform fibroblastic cells (SFs) that were free of macrophages. They were infected with adenovirus vectors and cultured in pellets (“pellet culture”). Primary chondrocytes were obtained from articular cartilage resected during the surgeries. Cartilage was minced finely in phosphate-buffered saline (PBS), and chondrocytes were isolated by sequential digestion at 37°C with

0.25% (weight/volume) trypsin for 30 minutes and with 2 mg/ml of clostridial collagenase in α -MEM containing 10% FBS and antibiotics (penicillin at 100 μ g/ml and streptomycin at 100 μ g/ml) overnight on an orbital shaker. Cells were isolated by centrifugation and were resuspended in α -MEM with 10% FBS. Cells were cultured in monolayers for 1 day and then subjected to RNA isolation.

Constructs and gene transduction. The recombinant adenovirus vectors carrying various molecules that modulate TGF- β superfamily signaling pathways, that is, HA-tagged constitutively active TGF- β /BMP type I receptors (ALK3^{CA}, ALK5^{CA}, and ALK6^{CA}), constitutively active MKK6 (MKK6^{CA}), Flag-tagged Smad1 and Smad6 with CAG [cytomegalovirus IE enhancer + chicken β -actin promoter + rabbit β -globin poly(A) signal] promoter, were generated by the DNA-terminal protein complex method (25–27). SFs were infected with adenovirus vectors following a method previously described (13). In short, subconfluent SFs were incubated with a small amount of medium (α -MEM without serum) that contained the recombinant adenoviruses for 2 hours at 37°C at the indicated multiplicity of infection (MOI) and then with 10 times more medium to which 10% FBS had been added. Infected cells were cultured for additional 3 days for assessment of chondrogenic gene expression or were subjected to pellet culture 24 hours after the infection for histological examination.

Pellet cultures of isolated SFs. After 24 hours of viral infection, adherent cells were trypsinized and cells numbers were ascertained. Aliquots of 5×10^5 cells were spun down at 500 g in 15-ml polypropylene conical tubes in 5 ml of α -MEM with ascorbate 2-phosphate (0.1 mM) and 10% FBS. The cells were incubated at 37°C in 5% CO₂. Within 24 hours after incubation, the cells formed a single, free-floating pellet. The medium was changed every 2–3 days, and duplicate pellets were harvested after 3 and 7 days for real-time-PCR and Northern blotting and after 3 and 5 weeks for histological and immunohistochemical analysis. For visualization of the chondrogenic differentiation *in vivo* pellets were transplanted subcutaneously into *nu/nu* BALB mice (nude mice) after 3 days of pellet culture. Mice were sacrificed 5 weeks after transplantation and the pellets were recovered and subjected to toluidine blue staining as well as immunostaining with anti-type II collagen.

Immunoblotting. All the extraction procedures were performed at 4°C or on ice. Cells were washed with PBS and then lysed by the addition of TNE buffer (1% NP-40, 10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM Na₂VO₄, 10 mM NaF, and 10 μ g/ml aprotinin). Lysates were prepared by centrifugation at 10,000 g for 20 minutes. An equal amount (15 μ g) of proteins was separated by electrophoresis on 10% SDS-polyacrylamide gels. After electrophoresis, proteins were electronically transferred onto a nitrocellulose membrane. Immunoblotting with specific antibodies was performed with ECL Western blotting reagents (Amersham Co., Arlington Heights, Illinois, USA) according to the conditions recommended by the supplier.

Histology and immunostaining. Pellet cultures were fixed with 3.7% formaldehyde, embedded in paraffin, and cut into sections 4 μ m in thickness. Representative sections were subjected to Alcian blue staining, Alizarin red staining, and immunohistochemistry. Alcian blue staining was performed according to the protocol described previously (28). Briefly, after deparaffinization, sections were stained with 0.5% Alcian blue 8GX (Wako, Osaka, Japan) in 0.1 N HCl for 1 hour. Mineralization was assessed by Alizarin red staining. In brief, sections were immersed in Alizarin red solution (40 mM, at pH 4.0) for 8 minutes at room temperature, and nonspecific staining was removed by several washes in distilled water. For immunostaining with anti-type

II collagen or anti-type X collagen, we utilized a CSA Kit (DAKO, Carpinteria, California, USA) following the manufacturer's protocol.

Total RNA extraction and real-time PCR. Total RNA was isolated from SFs with ISOGEN (Wako) following the supplier's protocol. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1 µg of total RNA with the Superscript II reverse transcriptase kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). For real-time PCR, the ABI Prism Sequence Detection System 7000 was used. Primers were designed based on sequences obtained from GenBank and amplicons of 50–250 base pairs with a melting temperature of between 55 °C and 60 °C were selected. Aliquots of first-strand cDNA (1 µg) were amplified with the QuantiTect SYBER Green PCR Kit (Qiagen, Valencia, California, USA) under the following conditions: initial denaturation for 10 minutes at 94 °C followed by 40 cycles consisting of 15 seconds at 94 °C and 1 minute at 60 °C. Data analysis consisted of fold induction, and the expression ratio was calculated from the differences in threshold cycles at which an increase in reporter fluorescence above a baseline signal could first be detected among three samples and was averaged for duplicate experiments. The primers we utilized in real-time PCR to detect sox9, type II collagen, type X collagen, osteocalcin, osteopontin, and GAPDH were as follows: sox9, 5'-AGAAG-GACCACCCGGATTAC-3' and 5'-AAGTCGATAGGGGGCTGTCT-3'; type II collagen, 5'-GGTGGCTTCCATTTCAGCTA-3' and 5'-TACCGGTATGTTTCGTGCAG-3'; type X collagen, 5'-AGGAAT-GCCTGTGTCTGCTT-3' and 5'-ACAGGCCTACCCAAACATGA-3'; osteocalcin, 5'-GTGCAGAGTCCAGCAAAGGT-3' and 5'-CGATAG-GCCTCCTGAAAGC-3'; osteopontin, 5'-ACAGCCAGGACTC-CATTGAC-3' and 5'-ACACTATCACCTCGGCCATC-3'; and GAPDH, 5'-GAAGGTGAAGGTCCGGAGTCA-3' and 5'-GAAGATG-GTGATGGGATTTC-3'.

Northern blotting. Equal amounts (15 µg) of RNA were denatured in formaldehyde, separated by 1% agarose gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane (Hybond N⁺) (Amersham Pharmacia, Piscataway, New Jersey, USA), followed by ultraviolet cross-linking. ULTRAHyb hybridization solution (Ambion, Austin, Texas, USA) was used according to the manufacturer's protocol. The blots were hybridized with a cDNA probe labeled with [α -³²P]dCTP using Ready-To-Go DNA Labeling Beads (Amersham Pharmacia). Rabbit type II collagen and aggrecan probes were generously provided by Yoshiyasu Iwamoto (Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania, USA). Membranes were washed in 2x SSC for 15 minutes at 42 °C and then in 0.1x SSC for 30 minutes at 65 °C. For visualization, X-ray film was exposed to membranes overnight at -80 °C.

Osteoarthritis model mice. Osteoarthritic changes were developed in the knee joint by transection of the anterior cruciate ligament (ACL) and medial meniscus (MM) in C57BL/6 mice (mean age, 8 weeks) (29, 30). Briefly, after mice were anesthetized with ketamine and xylazine, a medial parapatellar skin incision was made. The subcutaneous tissues were incised and retracted, along with the articular capsule. The medial compartment of the knee joint was visualized and the ACL and MM were transected with a scalpel, and thereafter the capsule, medial retinaculum, and skin were sutured. Mice were housed in regular individual cages and allowed to exercise. Eight weeks after the surgery, the mice were sacrificed and paraffin-embedded sections of the affected joints were immunostained with anti-type X collagen and anti-phospho-p38 (Cell Signaling Technology Inc).

Results

Adenovirus-mediated gene transduction modulates the Smad and p38 pathways in SFs. We previously reported that adenovirus vectors can effi-

ciently transduce foreign genes into synovial cells both in vitro and in vivo and that adenovirus infection itself does not affect the phenotypes of the cells (13). We constructed adenovirus vectors to analyze the role of ALK signaling as well as the Smad pathways and p38 pathways, which lie downstream of ALK signaling. SFs were infected with adenovirus vectors carrying various signaling molecules that modulate TGF- β superfamily signaling pathways, that is, HA-tagged constitutively active ALK3, ALK5, and ALK6 constitutively active MKK6, and Flag-tagged Smad1 and Smad6, as well as a control virus carrying the β -galactosidase gene (LacZ virus), and gene expression was determined by immunoblotting with specific antibodies. As shown in Figure 1, clear induction of the genes encoding ALK3^{CA}, ALK5^{CA}, and ALK6^{CA} was observed by immunoblotting with anti-HA (Figure 1A), and Smad1 and 6, by anti-Flag (Figure 1B). ALK3^{CA} or ALK6^{CA} overexpression induced phosphorylation of Smad1, Smad5, and Smad8 in SFs, and ALK5^{CA}-transduced cells showed Smad2 phosphorylation (Figure 1A). MKK6^{CA} virus infection specifically activated p38 pathways in SFs, and the pathways were also activated in ALK3^{CA}-transduced cells as determined by Western blotting with anti-phospho-p38 (Figure 1C). The increased p38 phosphorylation induced by either ALK3^{CA} or MKK6^{CA} overexpression was suppressed by the p38-selective inhibitor SB203580.

Induction of chondrocyte-specific gene expression by ALK3^{CA} transduction in pellet cultures of SFs. To determine the effects of these transduced gene products on chondrocyte-specific gene expression in SFs, we subjected infected cells to pellet culture. After 7 days of culture, clear induction of type II collagen and aggrecan genes was observed in ALK3^{CA}-transduced cultures by both Northern blot analysis (Figure 2A) and real-time PCR (Figure 2, B and C). Expression of these genes was also observed in ALK6^{CA}-transduced cultures, albeit less efficiently, as shown in Figure 2, B and C, by real-time PCR. Contrary to the strong chondrogenic effects of ALK3^{CA} virus, expression

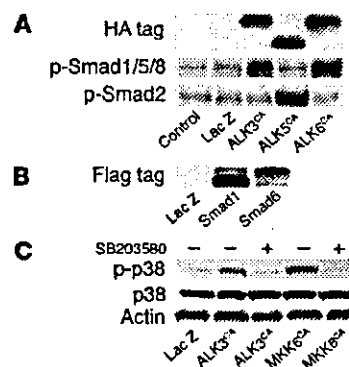


Figure 1 Modulation of intracellular signaling pathways by adenovirus vector-mediated gene transduction into SFs. (A) SFs at passage 3 were transduced with HA-tagged constitutively active ALK3, ALK5, and ALK6, and the expressed products were detected by immunoblotting after 2 days of viral infection. Expression of these genes was detected by immunoblotting with anti-HA and phospho-Smad1, -Smad 5, and Smad8 (p-Smad1/5/8) was observed in cells expressing ALK3^{CA} or ALK6^{CA}, and p-Smad2, in cells expressing ALK5^{CA}. (B) Expression of Smad1 and 6 in SFs was determined by anti-Flag. (C) Adenovirus vector-mediated ALK^{CA} or MKK6^{CA} expression specifically activated p38 pathways in SFs, as determined by Western blotting with anti-phospho-p38 (p-p38). The increased p38 phosphorylation induced by ALK3^{CA} or MKK6^{CA} overexpression was suppressed by the p38-selective inhibitor SB203580.