

and VLA-4-VCAM-1 (vascular adhesion molecule 1) adhesion pathways appear to be involved [17, 27, 40]. Recently, Burger *et al.* [27] reported that, for pseudoemperipolosis, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) and CXCR4 were involved. However, CXCR4 was not expressed on our B-cell clones, suggesting that another regulation system might be contributing to the pseudoemperipolosis observed in this study (Figs 3 and 4) (Fig. 4)

Determining the antigen that antibodies generated by B-cell clones recognize might be a clue to the immunopathogenesis of RA. Efforts were made to detect antigen(s) recognized by B cells by western blotting, but none showed specific signals. Since modification of Fc region might have possibly weakened the affinity of autoantibodies produced by the B-cell clones, we did not use any labelled immunoglobulins which might have been useful in analysing antigen specificity. We did find, by the immunoprecipitation method, that the RA45 antibody recognized a 48-kDa molecule. Further work will be needed to define the antigens recognized and to delineate their role in the immunopathogenesis of RA.

Numerous studies have been done which have noted the accumulation of B cells in the inflamed synovium of RA. With the development and spread of molecular biology techniques, these B cells have been shown to be oligoclonal [41, 42], with hypersomatic mutation and extension of the N region in the VH gene [43-45]. It is known that GC B cells develop into memory cells which show increasing affinity to antigen through numerous somatic mutations of the VH gene of the CDR region. Most likely, the same mechanism applies to B-cell clones established from the synovium. However, our established B cells appear to be unique in terms of surface antigen pattern and the somewhat low R/S ratio of the CDR region. All antibodies secreted by these B cells recognize self-antigen. This suggests the existence of another mechanism by which self-reactive B cells are activated/maintained in the presence of RA-NLC.

Further questions to be studied include whether or not autoreactive B cells are the only cell subset that proliferates in the presence of RA-NLC. In order to answer this question, it is necessary to compare VH repertoires of peripheral B cells and B-cell clones obtained from identical RA patients. Although more detailed studies on the interaction between B cells and RA-NLC are required, we observed that RA-NLC support spontaneous growth of B cells with very limited VH repertoires. The antigen-specificity of these B cells is under study in our laboratory.

Conclusion

RA-NLC are indispensable for the generation and the activation of autoreactive B cells of patients with RA. Our results provide a novel insight into the involvement of RA-NLC in the immunopathogenesis of RA.

Acknowledgements

This work was supported in part by a Health Science Research grant-in-aid from the Ministry of Health and Welfare of Japan. We are thankful to Dr Mary Co (Center for Infectious Disease and Vaccine Research, University of Massachusetts Medical School) for critical reading of the manuscript and helpful comments.

The authors have declared no conflicts of interest.

References

1. Harris ED Jr. Rheumatoid arthritis: Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med* 1990;322:1277-89.

2. Randen I, Mellbye OJ, Forre O, Natvig JB. The identification of germinal centres and follicular dendritic cell networks in rheumatoid synovial tissue. *Scand J Immunol* 1995;41:481-6.
3. Reparon-Schuijt CC, van Esch WJ, van Kooten C, Levarht EW, Breedveld FC, Verweij CL. Functional analysis of rheumatoid factor-producing B cells from the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 1998;41:2211-20.
4. Wernick RM, Lipsky PE, Marban-Arcos E, Maliakkal JJ, Edelbaum D, Ziff M. IgG and IgM rheumatoid factor synthesis in rheumatoid synovial membrane cell cultures. *Arthritis Rheum* 1985;28:742-52.
5. Hassfeld W, Steiner G, Hartmuth K *et al.* Demonstration of a new antinuclear antibody (anti-RA33) that is highly specific for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1989;32:1515-20.
6. Tarkowski A, Klareskog L, Carlsten H, Herberts P, Koopman WJ. Secretion of antibodies to types I and II collagen by synovial tissue cells in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1989;32:1087-92.
7. Ronnelid J, Lysholm J, Engstrom-Laurent A, Klareskog L, Heyman B. Local anti-type II collagen antibody production in rheumatoid arthritis synovial fluid. Evidence for an HLA-DR4-restricted IgG response. *Arthritis Rheum* 1994;37:1023-9.
8. Blass S, Engel JM, Burmester GR. The immunologic homunculus in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999;42:2499-506.
9. Tanaka M, Ozaki S, Osakada F, Mori K, Okubo M, Nakao K. Cloning of follistatin-related protein as a novel autoantigen in systemic rheumatic diseases. *Int Immunol* 1998;10:1305-14.
10. Sekine T, Masuko-Hongo K, Matsui T *et al.* Recognition of YKL-39, a human cartilage related protein, as a target antigen in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2001;60:49-54.
11. Krenn V, Konig A, Hensel F *et al.* Molecular analysis of rheumatoid factor (RF)-negative B cell hybridomas from rheumatoid synovial tissue: evidence for an antigen-induced stimulation with selection of high mutated IgVH and low mutated IgVL/lambda genes. *Clin Exp Immunol* 1999;115:168-75.
12. Schroder AE, Greiner A, Seyfert C, Berek C. Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:221-5.
13. Souto-Carneiro MM, Krenn V, Hermann R, Konig A, Muller-Hermelink HK. IgVH genes from different anatomical regions, with different histopathological patterns, of a rheumatoid arthritis patient suggest cyclic re-entry of mature synovial B-cells in the hypermutation process. *Arthritis Res* 2000;2:303-14.
14. Gause A, Gundlach K, Zdehavska M *et al.* The B lymphocyte in rheumatoid arthritis: analysis of rearranged V kappa genes from B cells infiltrating the synovial membrane. *Eur J Immunol* 1995;25:2775-82.
15. Tomita T, Takeuchi T, Toyosaki-Maeda T *et al.* Establishment of nurse-like stromal cells from bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: indication of characteristic bone marrow microenvironment in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 1999;38:854-63.
16. Takeuchi E, Tomita T, Toyosaki-Maeda T *et al.* Establishment and characterization of nurse cell-like stromal cell lines from synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999;42:221-8.
17. Wolf ML, Buckley JA, Goldfarb A, Law CL, LeBien TW. Development of a bone marrow culture for maintenance and growth of normal human B cell precursors. *J Immunol* 1991;147:3324-30.
18. Shimaoka Y, Attrep JF, Hirano T *et al.* Nurse-like cells from bone marrow and synovium of patients with rheumatoid arthritis promote survival and enhance function of human B cells. *J Clin Invest* 1998;102:606-18.
19. Schroeder HW Jr, Hillson JL, Perlmutter RM. Early restriction of the human antibody repertoire. *Science* 1987;238:791-3.
20. Cuisinier AM, Gauthier L, Boubli L, Fougereau M, Tonnel C. Mechanisms that generate human immunoglobulin diversity operate

- from the 8th week of gestation in fetal liver. *Eur J Immunol* 1993;23:110-8.
21. Schroeder HW Jr, Mortari F, Shiokawa S, Kirkham PM, Elgavish RA, Bertrand FE 3rd. Developmental regulation of the human antibody repertoire. *Ann N Y Acad Sci* 1995;764:242-60.
 22. Matsuda F, Honjyo T. Organization of the human immunoglobulin heavy-chain locus. *Adv Immunol* 1996;62:1-29.
 23. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA *et al*. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-24.
 24. Matsutani T, Yoshioka T, Tsuruta Y, Iwagami S, Toyosaki-Maeda T, Suzuki R. Quantitative analysis of the usage of human T-cell receptor alpha and beta chain variable regions by reverse dot-blot hybridization. *Methods Mol Biol* 2000;134:81-101.
 25. Miyashita EM, Yang B, Lam KM, Crawford DH, Thorley-Lawson DA. A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B cells in vivo. *Cell* 1995;80:593-601.
 26. Casali P, Notkins AL. CD5+ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire. *Immunol Today* 1989;10:364-8.
 27. Burger JA, Zvaifler NJ, Tsukada N, Firestein GS, Kipps TJ. Fibroblast-like synoviocytes support B-cell pseudoemperipolesis via a stromal cell-derived factor-1- and CD106 (VCAM-1)-dependent mechanism. *J Clin Invest* 2001;107:305-15.
 28. Brezinschek HP, Brezinschek RI, Lipsky PE. Analysis of the heavy chain repertoire of human peripheral B cells using single-cell polymerase chain reaction. *J Immunol* 1995;155:190-202.
 29. Stollar BD. The expressed heavy chain V gene repertoire of circulating B cells in normal adults. *Ann N Y Acad Sci* 1995;764:265-74.
 30. Huang SC, Jiang R, Hufnagle WO, Furst DE, Wilske KR, Milner EC. VH usage and somatic hypermutation in peripheral blood B cells of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* 1998;112:516-27.
 31. Kim HJ, Berek C. B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2000;2:126-31.
 32. Kasaiian MT, Ikematsu H, Casali P. Identification and analysis of a novel human surface CD5- B lymphocyte subset producing natural antibodies. *J Immunol* 1992;148:2690-702.
 33. Pfater-Zyberk C, Brown CM, Andrew EM, Maini RN. CD5+B in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 1992;651:540-50.
 34. Casali P, Schettino EW. Structure and function of natural antibodies. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;210:167-79.
 35. Wang F, Gregory C, Sample C *et al*. Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. *J Virol* 1990;64:2309-18.
 36. Dechanet J, Merville P, Durand I, Bancheau J, Miossec P. The ability of synovial germinal centers to support terminal differentiation of activated B cells may explain plasma cell accumulation in rheumatoid synovium. *J Clin Invest* 1995;95:456-62.
 37. Kim HJ, Krenn V, Steinhauser G, Berek C. Plasma cell development in synovial germinal centers in patients with rheumatoid and reactive arthritis. *J Immunol* 1999;162:3053-62.
 38. Itoh K, Meffre E, Albesiano E *et al*. Immunoglobulin heavy chain variable region gene replacement as a mechanism for receptor revision in rheumatoid arthritis synovial tissue B lymphocytes. *J Exp Med* 2000;192:1151-64.
 39. Lindhout E, van Eijk M, van Pel M, Lindeman J, Dinant HJ, de Groot C. Fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients have intrinsic properties of follicular dendritic cells. *J Immunol* 1999;162:5949-56.
 40. Reparon-Schuijt CC, van Esch WJ, van Kooten C *et al*. Regulation of synovial B cell survival in rheumatoid arthritis by vascular cell adhesion molecule 1 (CD106) expressed on fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheum* 2000;43:1115-21.
 41. Lee SK, Bridges SL Jr, Kirkham PM, Koopman WJ, Schroeder HW Jr. Evidence of antigen receptor-influenced oligoclonal B lymphocyte expansion in the synovium of a patient with long-standing rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1994;93:361-70.
 42. Shiokawa S, Matsumoto N, Nishimura J. Clonal analysis of B cells in the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2003;32:12-8.
 43. Williams DG, Taylor PC. Clonal analysis of immunoglobulin mRNA in rheumatoid arthritis synovium: characterization of expanded IgG3 populations. *Eur J Immunol* 1997;27:476-85.
 44. Bridges SL Jr, Lee SK, Johnson ML *et al*. Somatic mutation and CDR3 lengths of immunoglobulin kappa light chains expressed in patients with rheumatoid arthritis and in normal individuals. *J Clin Invest* 1995;96:831-41.
 45. Itoh K, Patki V, Furic RA *et al*. Clonal expression is a characteristic feature of the B-cell repertoire of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2000;2:50-8.

リウマチの破骨因子

■新たなリウマチの破骨細胞分化誘導系

関節リウマチ(RA)の罹患者は日本国内で約80万人ともいわれ、これらの患者の機能障害をいかに軽減するかは医療福祉上・医療経済上重要な問題である。RAは四肢の関節破壊を主徴とするが、これに伴って加齢によるものよりはるかに高度な骨粗鬆症が生じ、これも患者の機能を大きく損ねる要因である。しかし高度な骨粗鬆の病態は解明されていない部分が多く、その予防・治療の方法はまったく確立されていないといっても過言ではない。

RAでは関節腔内からも骨破壊が進行するのが

特徴的である。関節滑膜組織内に破骨細胞様の形態をとる多核巨細胞が存在することは以前より知られており、これが関節内からの骨吸収に関与する可能性も示唆されていた。われわれはRA関節腔内に前駆破骨細胞が存在することを予測し、RA患者関節液中に大量のCD14陽性単球様細胞の存在と、これらがサイトカインの刺激により骨吸収能を持つ成熟破骨細胞に分化することを見出し、前駆破骨細胞であるCD14陽性単球様細胞は、健康人末梢血単球とは異なる表面抗原プロファイルを有しており、分化段階の異なる細胞であることが示唆された⁵⁾。

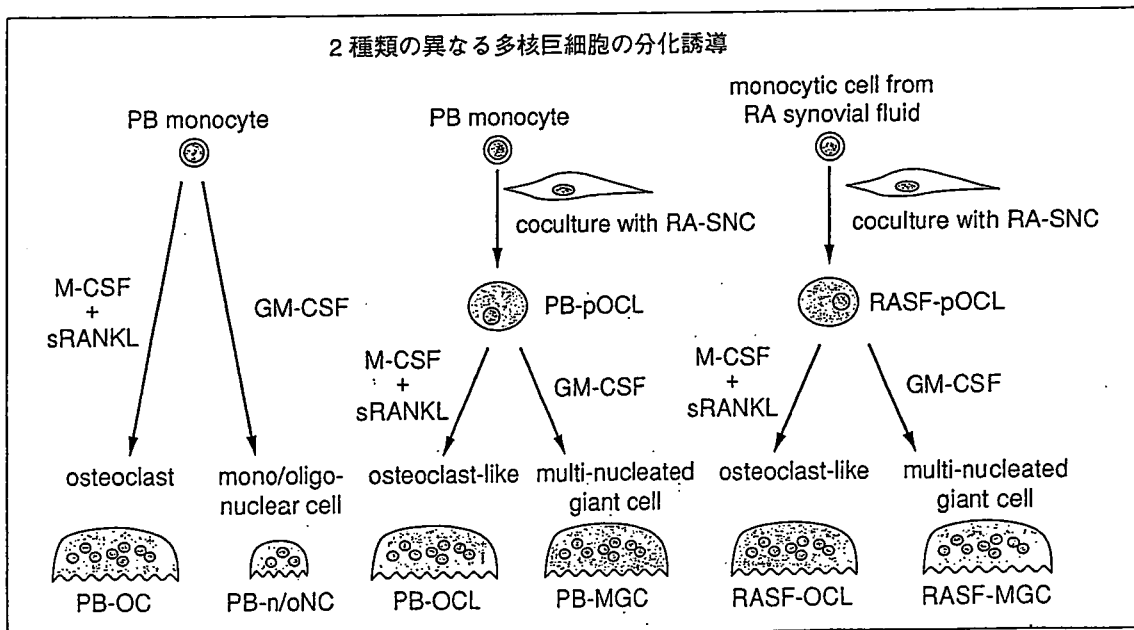
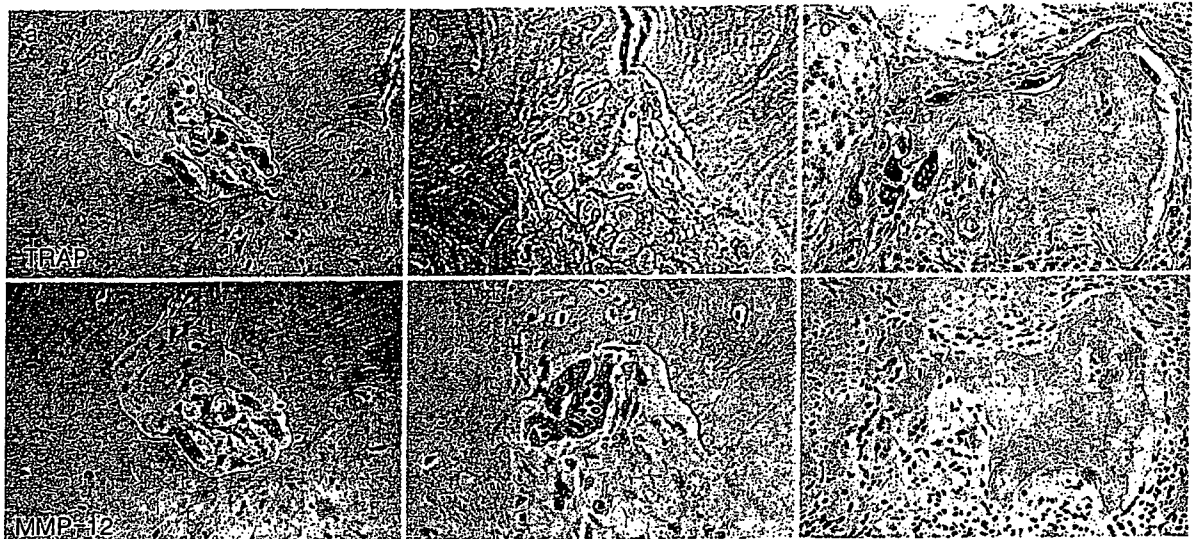


図1 M-CSF+RANKL 依存性破骨細胞と M-CSF+RANKL 非依存性破骨細胞

PB monocyte : 末梢血単球 M-CSF : マクロファージコロニー刺激因子
 OCL : 破骨細胞 RASF : リウマチ滑膜線維芽細胞
 RANKL : NF-κB 活性化受容体リガンド

リウマチ骨吸収部位における MMP-12 の発現



健常な成人の骨・軟骨においては MMP-12 の発現は認められない。

図 2 RA 罹患部に存在する MMP-12 陽性の破骨細胞(文献 1)

- a : TRAP⁺ MMP12⁺の破骨細胞
- b : TRAP⁻ MMP12⁺の破骨細胞
- c : TRAP⁺ MMP12⁻の破骨細胞

従来、破骨細胞はその分化および成熟のすべての過程において骨髄の間質細胞や骨芽細胞などの支持細胞が必要であるとされてきた。また近年、支持細胞の代わりに支持細胞の発現する分子(M-CSF, RANKL)を使用する破骨細胞誘導系も報告されている。一方、筆者らが RA 関節滑液から発見した RA 患者由来 CD14 陽性単球様細胞は、前駆破骨細胞としての性状を有しながらも、このような支持細胞や M-CSF+RANKL を必要とせず、サイトカイン(IL-3, IL-5, IL-7 または GM-CSF)の刺激のみによって成熟破骨細胞へと分化する(図 1)。この分化に関わるこれらサイトカインは、RA 患者の関節液中に高頻度・高濃度に存在するものであることから、われわれが発見した CD14 陽性単球様細胞は関節腔内で直接的に破骨細胞に分化するものと推測される。

この仮説を実証することは、RA における骨吸収の新たなメカニズムを示すことになるが、いままですらこれに類した報告は見当たらない。この方法

は RA 患者から前駆破骨細胞を得る方法であり、培養前駆細胞は 98%以上の純度で繰り返し大量に実験に使用することが可能である。また、この方法では、末梢血単球から直接に破骨細胞を誘導してしまう M-CSF+RANKL の実験系では得られない、前駆破骨細胞の性状解析と、前駆細胞から成熟破骨細胞への分化機序の解明が可能になると考えられる。

このような方向からの破骨細胞形成過程の解明は、われわれが RA 患者滑液から見出した方法以外のアプローチでは困難と考えられる。従来の実験系では解明できなかった、末梢血単球—前駆破骨細胞—成熟破骨細胞への分化過程と、各ステージに特異的な遺伝子産物の発現を明らかにすることができる。さらに得られた結果をもとに、骨代謝を各ステージ特異的に制御できる治療法を開発することが可能と考えている。

■RA 関節組織の免疫化学的検討

RA 患者の関節組織を免疫化学的に解析した結果、酒石酸耐性酸フォスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase ; TRAP) 陽性の単核球と多核巨細胞が滑膜組織と軟骨下骨付近に見出され、これらの関節滑膜組織中に存在していた TRAP 陽性単核球と多核巨細胞からは MMP (macrophage metalloelastase)-2 と MMP-9 が検出された。さらに TRAP 陽性多核巨細胞から MMP-12 と MMP-14 も検出された。RA 関節由来の TRAP 陽性単核球は、*in vitro* で軟骨組織中のプロテオグリカンを切断することも確認された。RA と変形性関節症 (OA) の関節液に見出される CD14 陽性前駆破骨細胞の性状と機能を比較するために、各疾患の患者の関節液の初代培養から得た CD14 陽性前駆破骨細胞を IL-3, IL-5, IL-7 または GM-CSF により刺激し、破骨細胞への分化誘導を行った。その結果、RA, OA それぞれの関節液由来前駆破骨細胞が破骨細胞へと分化したが、破骨細胞ごとの核数、単核細胞から多核細胞への融合率、骨吸収能のいずれにおいても RA 由来前駆破骨細胞によるもののほうが大きかった。このことより、RA 関節腔においては OA のそれより強く活性化された前駆破骨細胞が存在し、関節破壊に関与している可能性が示唆された²⁾。

RA 患者において、組織マクロファージが関節滑膜組織中に集簇する機序を明らかにするため、われわれが以前からその存在を報告してきた RA 滑膜組織に特異的に存在する間質細胞 (RA ナース細胞)^{3,4)} の培養上清による末梢血単球の遊走を測定したところ、RA ナース細胞培養上清は対照群である OA 由来間質細胞や皮膚由来線維芽細胞の培養上清と比較し、有意に単球の遊走を刺激する結果を得ている。さらに MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) と IL-8 に対する中和抗体により単球遊走が阻害されたため、MCP-1 および IL-8 が RA ナース細胞における単球遊走に関与することが示唆された。また、TNF α 刺激により RA

ナース細胞によるこれらの遊走因子産生が増強されることを見出している。

■今後の課題

RA 患者関節液の初代培養から CD14 陽性かつ破骨細胞特異的酵素である TRAP 陽性の単核球を見出し、その表面抗原プロファイルが健常人 CD14 陽性末梢血単球と異なることを発見した。また、これら CD14 陽性 TRAP 陽性単核球が IL-3, IL-5, IL-7 あるいは GM-CSF の存在下、支持細胞を必要とせずに強い骨吸収能を有する成熟破骨細胞へと分化することを確認している。前駆破骨細胞は高純度で長期にわたり維持され、最長 8 カ月まで繰り返し本誘導実験系に使用できることも明らかにした。さらに、健常人からの CD14 陽性単球を RA 滑膜ナース細胞と共培養することにより、正常末梢血由来単球は TRAP 陽性の前駆破骨細胞に分化し、IL-3, IL-5, IL-7 あるいは GM-CSF により関節液由来の前駆細胞同様、成熟破骨細胞へ分化することが判明した。また、RA に特異的に存在する RA ナース細胞が RA における破骨細胞の誘導に重要な関与をすることが示唆されてきた。

現在、RA 罹患部の免疫組織学検討から、M-CSF+RANKL で誘導される破骨細胞が保有しない MMP-12 陽性の破骨細胞が RA 患者にのみ特徴的に存在することから (図 2)、RA における破骨細胞は、われわれが新たに見出した M-CSF+RANKL 非依存性の分化経路による破骨細胞が、RA の骨破壊に関与している可能性を示唆したと考えている。

われわれの研究ではまず、RA 患者の関節における RA ナース細胞による前駆破骨細胞ならびに、これから分化誘導される破骨細胞に特異的に発現する遺伝子を現在探索中である。既に、この探索から見出された未解明の遺伝子に関しては、現在、これらがコードするタンパクの特異性の検討ならびに機能を解析中である。RA の骨破壊に

関与すると予想される同定されたタンパクのうち、破骨細胞の分化あるいは機能(骨吸収能)発現に関与するものをターゲットとして、その抑制による骨粗鬆の抑制を試みる事が可能となっている。

以上はRAの骨破壊に関わるわれわれ独自の発見であるが^{5,6)}、最近、米国・韓国・日本で複数のグループによっても、本実験系がRA病態を反映し、骨・関節破壊治療法開発に有用であると報告されたが、本実験系による破骨細胞分化解析はわれわれが先行している。先進各国における社会の高齢化を鑑みても、骨代謝の中心的役割を担う破骨細胞の分化・機能制御が医療福祉上極めて重要な課題であることは間違いないと考えている。

文 献

- 1) Kerkela E, Bohling T, Herva R, et al: Human macrophage metalloelastase (MMP-12) expression is induced in chondrocytes during fetal development and malignant transformation. *Bone* 29: 487-493, 2001
- 2) Takano H, Tomita T, Toyosaki-Maeda T, et al: Comparison of the activities of multinucleated bone-resorbing giant cells derived from CD14-positive

cells in the synovial fluids of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Rheumatology (Oxford)* 43: 435-441, 2004

- 3) Takeuchi E, Tomita T, Toyosaki-Maeda T, et al: Establishment and characterization of nurse cell-like stromal cell lines from synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 42: 221-228, 1999
- 4) Tomita T, Takeuchi E, Toyosaki-Maeda T, et al: Establishment of nurse-like stromal cells from bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: indication of characteristic bone marrow microenvironment in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 38: 854-863, 1999
- 5) Toyosaki-Maeda T, Takano H, Tomita T, et al: Differentiation of monocytes into multinucleated giant bone-resorbing cells: two-step differentiation induced by nurse-like cells and cytokines. *Arthritis Res* 3: 306-310, 2001
- 6) Tsuboi H, Matsui Y, Hayashida K, et al: Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) positive cells in rheumatoid synovium may induce the destruction of articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 62: 196-203, 2003

鈴木隆二

独立行政法人国立病院機構相模原病院 臨床
研究センター 診断・治療研究室
〒228-8522 神奈川県相模原市桜台 18-1

INFORMATION

第16回 日本臨床スポーツ医学会 開催のお知らせ

会 期: 2006年11月5日(土), 6日(日)
会 場: 東京プリンスホテル(東京都港区芝公園3-3-1)
会 長: 阪本桂造(昭和大学教授)
連 絡 先: 昭和大学医学部整形外科学教室内(阪本教授室)
〒142-8666 東京都品川区旗の台1-5-8
TEL (03)3784-8697/FAX (03)3784-0788
E-mail a.sayako@med.showa-u.ac.jp

関節リウマチにみられる特異な破骨細胞分化機序

鈴木隆二*, 越智隆弘** (独立行政法人国立病院機構相模原病院 *臨床研究センター診断・治療研究室, **院長)
前田朋子 (塩野義製薬株式会社創薬研究所フロンティア創薬部門)

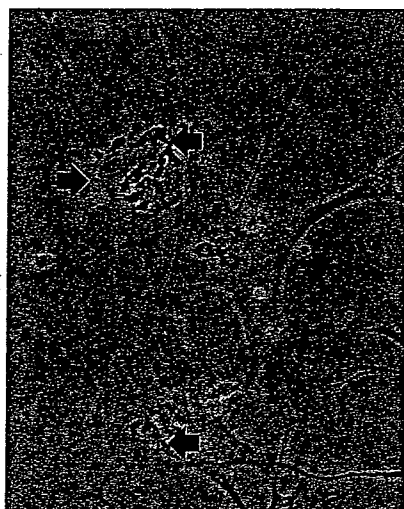
はじめに

関節リウマチ (RA) は、四肢の関節に炎症性滑膜増殖と骨・軟骨破壊を伴う全身性自己免疫疾患である。RA の罹患者は国内で約 80 万人ともいわれ、現代の発達した医療技術と知識をもってしても、治療に抵抗し進行する関節破壊の防止は困難である。さらに、高齢化社会を迎え関節機能障害は医療福祉上・医療経済上重要な問題となっている。RA においては加齢に伴うものよりさらに高度な骨粗鬆が生じ RA 患者の機能を大きく損ねる要因となっている。RA における高度な関節破壊の病態は解明されていない部分が多く、その予防・治療の方法は未だに確立されていない。本疾患における関節破壊の病態研究から、関節内腔からも骨破壊が進行することが知られ、また、関節滑膜組織内に破骨細胞様の形態をとる多核巨細胞が存在しており、これが関節内からの骨吸収に関与する可能性も示唆されていた。われわれは、RA 病態形成に特徴的な細胞として、RA 罹患関節部および骨髄中には、ナース機能を有する間葉系細胞 (RA ナース細胞) が存在することを報告し、本細胞が RA の病態形成に深く関与することを明確にしてきた (図 1)^{1,2)}。

RA 患者の罹患関節部、骨髄中に破骨細胞様細胞、あるいはその前駆細胞が多く存在することを示唆する報告がいくつかのグループにより示されている。これらの細胞が関節破壊に深く関与することは確実と思われるが、その出現機構に関しては未だに不明な点が多い。破骨細胞は造血幹細胞より CFU-c (骨髄球系コロニー) を経て分化し、その全過程には骨芽細胞や骨髄ストローマ細胞 (骨髄間質細胞) などの支持細胞が必要である。本稿では、破骨細胞誘導において、われわれがその存在を明らかにした RA ナース細胞との細胞間相互作用を中心に RA 患者の骨代謝変化を解説する。

1. 骨髄・滑膜ナース細胞

われわれは、RA 患者の骨髄・滑膜組織より pseudoemperipolesis 能を示す RA ナース細胞が高率に得られることを報告してきた^{1,2)}。RA ナース細胞は、ヘテロな集団である骨髄液および滑膜組織のなかのポピュレーションの一つである。従来、RA において、滑膜細胞は線維芽細胞様、マクロファージ様、という二種類に分類されているが、RA ナース細胞は形態学的には付着系で扁平な細胞で、線維芽細胞



- Both synovial and bone marrow nurse-like cells produced BST-1, which can support growth of pre-B cells
- Autologous mixed lymphocyte (T and B cells) reaction were induced by synovial/bone marrow nurse cells

← Lymphocytes crawled beneath RA-synovial nurse-like cells (pseudoemperipolesis)

図 1 RA 患者に特徴的なナース細胞

様滑膜細胞に近く、機能的には抗原提示能を有し、IL-6やIL-8を産生能を有しマクロファージ様滑膜細胞と類似な性状を有している。RA ナース細胞はT、B細胞それぞれに対して、抗原特異的免疫応答を誘導し、これらリンパ球の apoptosis の抑制作用を有しており、RA 病態形成と慢性化維持に重要に関与することが示唆されている。また、RA 患者の骨髓液や関節液中のサイトカインプロファイルから、炎症の進行に継続する関節破壊には、むしろ顆粒球や単球系の細胞が大きな役割を担っていると考えられる。

2. RA における破骨細胞様の多核巨細胞

われわれは、RA ナース細胞の単球への影響をみる目的で、健康人末梢血単球 (CD14 陽性) と、RA ナース細胞との共培養を試みた。末梢血単球は、共培養により、半浮遊の状態に生存し、3 ヶ月以上にわたり RA ナース細胞上で増殖し、酒石酸耐性酸フォスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase: TRAP) 陽性であった。この TRAP 陽性細胞は表層抗原の解析から、末梢血単球とは異なる細胞に分化していることが明らかとなった。この共培養で分化し

た TRAP 陽性細胞を単離して、種々のサイトカインにより刺激することにより、単独培養下において多核巨細胞へと分化するかどうかを検討した。TRAP 陽性単核細胞は、IL-3、IL-5、IL-7 あるいは GM-CSF の存在下に、ほとんどすべてが多核巨細胞へと分化した。以上から、RA ナース細胞上で増殖する CD14 陽性末梢血単球は、破骨細胞前駆細胞であることが明らかとなった。これら多核巨細胞は、象牙切片上において吸収窩を形成し、骨吸収能を有した。この破骨細胞様細胞はアクチンリングを有し、カルシトニン受容体や MMP-9, carbonic anhydrase II など、従来、マウスの破骨細胞研究においてその存在が証明されている分子を発現している。この TRAP 陽性細胞は、RA 患者の滑液に存在していることも確認している (RA 患者由来 CD14 陽性単球様細胞³⁾。

3. RA に特徴的な破骨細胞

従来、破骨細胞はその分化および成熟のすべての過程において骨髓の間質細胞や骨芽細胞などの支持細胞が必要であるとされてきた。また近年、支持細胞の代わりに支持細胞の発現する分子 (M-CSF・RANKL) を使用する破骨細胞誘導系も報告されてい

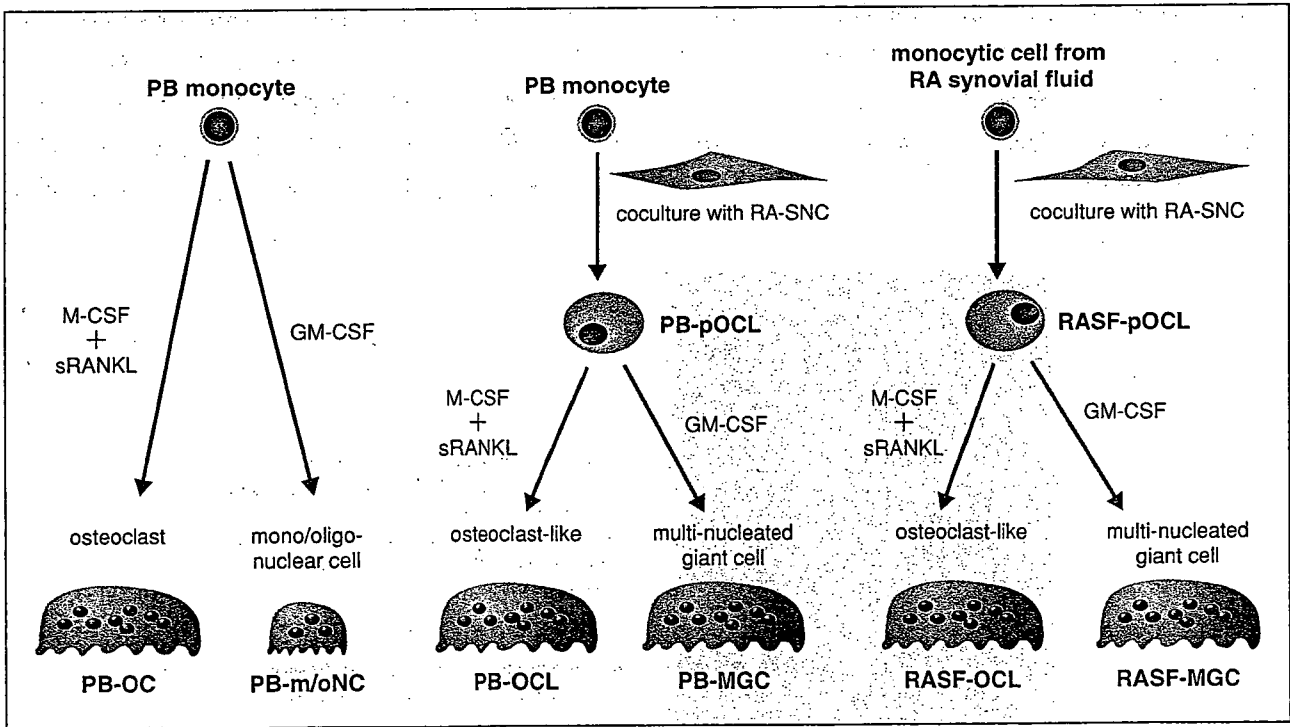


図2. M-CSF + RANKL 依存性破骨細胞と M-CSF + RANKL 非依存性破骨細胞

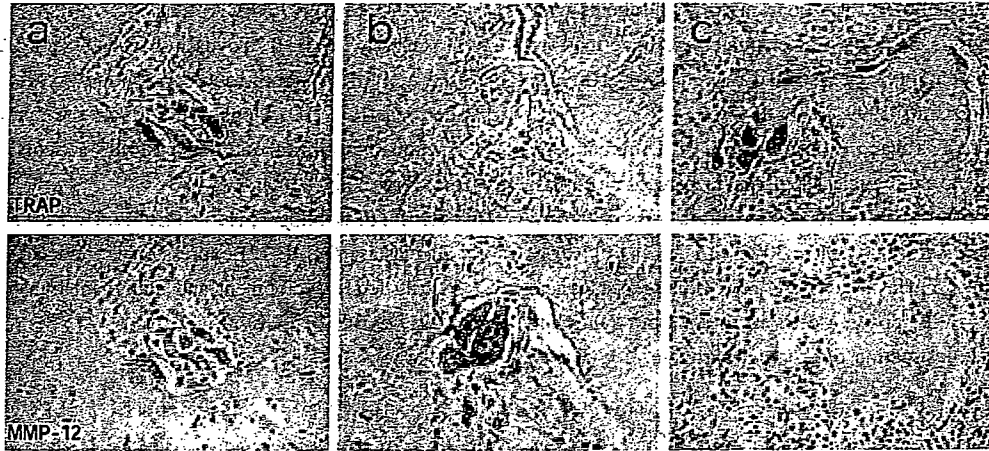


図3 RA罹患部に存在するMMP-12陽性の破骨細胞

健康な成人の骨・軟骨においてはMMP-12の発現は認められない。

る。一方、われわれがRA関節滑液から発見したRA患者由来CD14陽性単球様細胞は、前駆破骨細胞としての性状を有しながらも、このような支持細胞やM-CSF + RANKLを必要とせず、サイトカイン(IL-3, IL-5, IL-7またはGM-CSF)の刺激のみによって成熟破骨細胞へと分化する(図2)³⁻⁵⁾。分化に関わるこれらサイトカインは、RA患者関節液中に高頻度・高濃度に存在するものであるので、われわれが発見したCD14陽性単球様細胞は関節腔内で直接的に破骨細胞に分化するものと推測される。この仮説を実証することは、RAにおける骨吸収の新たなメカニズムを示すことになるが、いままでこれに類した報告は見当たらない。この方法はRA患者より前駆破骨細胞を得る方法であり、培養前駆細胞は98%以上の純度で繰り返し大量に実験に使用することが可能である。この方法では末梢血単球から直接破骨細胞を誘導してしまうM-CSF + RANKLの実験系では得られない、前駆破骨細胞の性状解析と、前駆細胞から成熟破骨細胞への分化機序の解明が可能になると考えられる。

さらに、RA患者関節組織を免疫化学的に解析した結果、TRAP陽性の単核球と多核巨細胞を滑膜組織と軟骨下骨付近に見出され、これらの関節滑膜組織中に存在していたTRAP陽性単核球と多核巨細胞からはMMP-2とMMP-9が検出された。さらにTRAP陽性多核巨細胞からMMP-12とMMP-14も検

出された。

結語

このような方向からの破骨細胞形成過程の解明は、われわれがRAナース細胞との共培養から見出した方法以外のアプローチでは困難と考えられる。従来の実験系では解明できなかった、末梢血単球-前駆破骨細胞-成熟破骨細胞への分化過程と各ステージに特異的な遺伝子産物の発現を明らかにすることができる。さらに、得られた結果をもとに、骨代謝をstage specificに制御できる治療法を開発することが可能と考えている。RAに特異的に存在するRAナース細胞がRAにおける破骨細胞の誘導に重要に関与することが示唆されてきた。RA罹患部の免疫組織学検討から、M-CSF + RANKLで誘導される破骨細胞が保有しないMMP-12陽性の破骨細胞が特徴的に存在することから(図3)⁶⁾、RAにおける破骨細胞は、われわれが新たに見出したM-CSF + RANKL非依存性の分化経路による破骨細胞がRAの骨破壊に関与している可能性を示唆したと考えている。

文献

- 1) Takeuchi E, Tomita T, Toyosaki-Maeda T, *et al.* Establishment and characterization of nurse cell-like stromal cell lines from synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999, 42(2): 221-228.
- 2) Tomita T, Takeuchi E, Toyosaki-Maeda T, *et al.* Establishment

- of nurse-like stromal cells from bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: indication of characteristic bone marrow microenvironment in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 1999, 38(9): 854-863.
- 3) Toyosaki-Maeda T, Takano H, Tomita T, *et al.* Differentiation of monocytes into multinucleated giant bone-resorbing cells: two-step differentiation induced by nurse-like cells and cytokines. *Arthritis Res* 2001, 3(5): 306-310.
 - 4) Tsuboi H, Matsui Y, Hayashida K, *et al.* Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) positive cells in rheumatoid synovium may induce the destruction of articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 2003, 62(3): 196-203.
 - 5) Takano H, Tomita T, Toyosaki-Maeda T, *et al.* Comparison of the activities of multinucleated bone-resorbing giant cells derived from CD14-positive cells in the synovial fluids of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Rheumatology (Oxford)* 2004, 43(4): 435-441.
 - 6) Kerkela E, Bohling T, Herva R, *et al.* Human macrophage metalloelastase (MMP-12) expression is induced in chondrocytes during fetal development and malignant transformation. *Bone* 2001, 29(5): 487-493.



LIGHT induces cell proliferation and inflammatory responses of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via lymphotoxin α receptor.

Journal:	<i>The Journal of Rheumatology</i>
Manuscript ID:	2007-0918
Manuscript Type:	Manuscript
Date Submitted by the Author:	23-Aug-2007
Complete List of Authors:	Ishida, Satoru; SHIONOGI & CO., LTD., Discovery Research Laboratories; Sagamihara National Hospital, Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology Yamane, Shoji; Sagamihara National Hospital, Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology; SHIONOGI & CO., LTD., Discovery Research Laboratories Nakano, Saori; Sagamihara National Hospital, Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology Mori, Toshihito; Sagamihara National Hospital, Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology Juji, Takuo; Sagamihara National Hospital, Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology Fukui, Naoshi; Sagamihara National Hospital, Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology Itoh, Tsunetoshi; Tohoku University School of Medicine, Department of Immunology and Embryology Suzuki, Ryuji; Sagamihara National Hospital, Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology Ochi, Takahiro; Sagamihara National Hospital, Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology
Keywords:	Inflammation, Synoviocytes, Rheumatoid arthritis

Title page

Title of full-length article: LIGHT induces cell proliferation and inflammatory responses of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via lymphotoxin β receptor.

Satoru Ishida^{1,2}, Shoji Yamane^{1,2}, Saori Nakano¹, Toshihito Mori¹, Takuo Juji¹, Naoshi Fukui¹, Tsunetoshi Itoh³, Ryuji Suzuki¹, and Takahiro Ochi¹

1: Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology, National Hospital

Organization, Sagamihara National Hospital, Sakuradai 18-1, Sagamihara, Kanagawa
228-8522, JAPAN

2: Discovery Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd., 3-1-1, Futaba-cho, Toyonaka,
Osaka 561-0825, JAPAN

3: Department of Immunology and Embryology, Tohoku University School of Medicine,
2-1 Seiryō-Machi, Aoba-ku, Sendai 980-8575, JAPAN

Address reprint requests to Satoru Ishida (Corresponding author)

E-mail: satoru.ishida@shionogi.co.jp

Tel: +81-42-742-8311 Fax: +81-42-742-7990

Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology, National Hospital

Organization, Sagami National Hospital, Sakuradai 18-1, Sagami, Kanagawa

228-8522, JAPAN

A short running footnote: synovial activation of LIGHT

Key Indexing Terms: TNFSF14 Rheumatoid Arthritis

Fibroblasts-like synoviocytes Lymphotoxin beta Receptor

Abstract

Objective. To investigate the effects of LIGHT on the proliferation and gene expression of fibroblast-like synoviocytes (FLS) from patients with rheumatoid arthritis (RA).

Methods. We measured LIGHT levels in RA synovial fluids (SF) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and compared them with those in osteoarthritis (OA) SF. The expression levels of LIGHT and its receptors in RA FLS and synovium were assessed using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and real-time RT-PCR. RA FLS proliferation was examined by a bromodeoxyuridine (BrdU) assay. The expression of interleukin-8 (IL-8), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) was examined by real-time PCR, ELISA, and flow cytometry. The effects of LIGHT on NF- κ B activation were investigated using immunofluorescence and Western blotting.

Results. LIGHT was upregulated in both SF and synovium of RA compared with those of OA. Herpes virus entry mediator (HVEM) and lymphotoxin β receptor (LT β R), but not LIGHT, were detected in RA FLS. LIGHT significantly promoted RA FLS proliferation and induced expression of MCP-1, IL-8 and ICAM-1 by RA FLS. Additionally, LT β R small interfering RNA (siRNA), but not HVEM siRNA, inhibited

these effects of LIGHT. LIGHT induced I κ B α degradation and NF- κ B translocation, and an NF- κ B inhibitor suppressed the effects of LIGHT on RA FLS.

Conclusions. Our findings suggest that LIGHT signaling via LT β R plays an important role in the pathogenesis of RA by affecting key process, such as the proliferation and activation of RA FLS. Regulation of LIGHT-LT β R signaling may represent a new therapeutic target for RA treatment.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease characterized by synovial hyperplasia and progressive destruction of cartilage and bone. Fibroblast-like synoviocytes (FLS), an important component of the synovial lining in joints, aggressively proliferates to form a pannus causing irreversible joint damage in patients with RA. In RA synovial tissue, activated FLS and infiltrating macrophages and lymphocytes produce inflammatory cytokines, including tumor necrosis factor alpha (TNF α), interleukin-1 β (IL-1 β), and IL-6, which play important roles in the pathogenesis of RA (1,2). These cytokines have been shown to not only directly promote FLS proliferation leading to pannus formation (3), but also induce the expression of inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules, which further recruit inflammatory leukocytes and perpetuate inflammatory responses.

LIGHT (lymphotoxin-like, exhibits inducible expression and competes with herpes simplex virus glycoprotein D for herpes virus entry mediator, a receptor expressed by T lymphocytes) is a recently identified type-2 transmembrane glycoprotein of the TNF ligand superfamily (TNFSF14) (4). LIGHT is expressed on activated T lymphocytes (4,5), monocytes (6), granulocytes (6) and immature dendritic cells (7). LIGHT signaling is transduced via two members of the TNFR family, herpes virus entry mediator (HVEM,

TNFRSF14) and lymphotoxin β receptor (LT β R, TNFRSF3). HVEM is expressed prominently on monocytes, dendritic cells and lymphocytes (5,8-10), whereas LT β R is expressed on many cell types with the exception of lymphocytes (4,6,11). LIGHT has been shown to regulate cell proliferation (7,12,13) and apoptosis (6,14), to induce the secretion of various cytokines, and to augment the expression of adhesion molecules (12,15-17). Recently, Fava et al. reported that LT β R-Ig protein blocked the induction of experimental arthritis in mice (18). Moreover, LIGHT induced the expression of inflammatory cytokines in macrophages from RA synovial fluid (19). These studies have suggested that LIGHT may be an important inflammatory cytokine in the development of RA. However, the effect of LIGHT on RA FLS has not yet been analyzed.

The aim of this study was to clarify the role of LIGHT in the proliferation and inflammatory response of RA FLS. We demonstrated that the levels of LIGHT in both synovial fluid and synovium were higher in patients with RA than in those with osteoarthritis (OA). In addition, LIGHT signaling via LT β R, but not HVEM, enhanced RA FLS proliferation and induced the expression of inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules in RA FLS through an NF- κ B-dependent signal transduction pathway. We suggest that activation of RA FLS by LIGHT/LT β R signaling may play an important role in the pathogenesis of RA

Patients and Methods

Chemicals. Recombinant human LIGHT and EGF were obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN). Monoclonal antibodies (mAb) against human actin and NF- κ B p65 were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis MO) and BD Biosciences (Palo Alto, CA), respectively. The mAb against I κ B α was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA).

Patients and tissue samples. All patients with RA fulfilled the 1987 American College of Rheumatology (formerly, the American Rheumatism Association) criteria (20) for the diagnosis of RA. Patients with RA ranged in age from 41 to 74 years (mean \pm SD 66.0 \pm 12.0 years). Patients with OA ranged in age from 39 to 90 years (mean \pm SD 64.1 \pm 14.7 years). All patients were women. Synovial tissues were obtained from 27 patients with RA and 11 patients with OA at the time of knee prosthetic replacement surgery. RA FLS were established from the synovia of RA patients according to a previously reported procedure (21). RA FLS were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal calf serum, penicillin, streptomycin and L-glutamine. RA FLS from passages 4-9 were used for each

experiment. Synovial fluids were obtained by arthrocentesis from 23 RA patients and 10 OA patients, and after centrifugation at $20,000 \times g$ for 10 minutes, the supernatants were collected and frozen at -80°C until used. All specimens were obtained from patients who gave written informed consent, according to the protocol approved by the institutional review board of the National Hospital Organization, Sagamihara National Hospital.

LIGHT in synovial fluids. The amount of LIGHT in synovial fluids was measured using an ELISA kit (R&D systems) according to the manufacturer's instructions. The minimum and maximum detection levels of the ELISA were 7.8 pg/ml and 2,000 pg/ml, respectively.

RNA extraction, cDNA synthesis and RT-PCR. Total RNA was extracted from synovium and FLS using an RNeasy Micro kit (Qiagen). cDNA was generated from RNA using the Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen). Amplification was performed with 0.5 units of Ex Taq (Takara) in a total reaction volume of 20 μl containing 1 \times reaction buffer, 200 μM of each dNTP and 10 pmoles of each primer. The sequences of primers used for PCR were as follows: for GAPDH, 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3' and 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGT-3'; for LIGHT, 5'-TCACGAGGTCAACCCAGCAG-3' and 5'-CCCAGCTGCACCTTGGAGTAG-3'; for HVEM, 5'-TTTGCTCCACAGTTGGCCTAATC-3' and

5'-CAATGACTGTGGCCTCACCTTC-3'; for LT β R, 5'-
 ATGCTGATGCTGGCCGTTTC-3' and 5'-AGGCTCCCAGCTTCCAGCTA-3'. PCR
 conditions were as follows: initial denaturation at 95 °C for 1 minute, then 30 cycles of
 95°C for 5 seconds, 60°C for 30 seconds, and 72°C for 20 seconds. Ten microliters of the
 PCR products and 2 μ l of loading buffer were run on 2% agarose gels and visualized by
 staining with ethidium bromide.

Quantitative real-time PCR analysis. cDNA was used for real-time quantitative
 PCR on a LightCycler (Roche Diagnostics). PCR was performed using SYBR Premix Ex
 Taq (Takara). The primers used for real-time PCR were follows: for IL-6,
 5'-AAGCCAGAGCTGTGCAGATGAGTA-3' and
 5'-TGTCCTGCAGCCACTGGTTC-3'; for IL-8, 5'-
 ACACTGCGCCAACACAGAAATTA-3' and
 5'-TTTGCTTGAAGTTTCACTGGCATC-3'; for GM-CSF, 5'-
 CATGATGGCCAGCCACTACAA-3' and 5'-ACTGGCTCCCAGCAGTCAAAG-3';
 for MCP-1, 5'-GCTCATAGCAGCCACCTTCATTC-3' and
 5'-GGACACTTGCTGCTGGTGATTC-3'; for RANTES, 5'-
 ACCAGTGGCAAGTGCTCCAAC-3' and
 5'-CTCCCAAGCTAGGACAAGAGCAAG-3'; for MIP-1 α , 5'-