

200802027A

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患予防等・治療研究事業

関節リウマチ骨髄血中の疾患誘導因子解明と根治療法開発研究

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 越智 隆弘

平成 21 (2009) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患予防等・治療研究事業

関節リウマチ骨髄血中の疾患誘導因子解明と根治療法開発研究

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 越智 隆弘

平成 21 (2009) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

関節リウマチ骨髄血中の疾患誘導因子解明と根治療法開発研究

大阪警察病院 院長 越智 隆弘

II. 分担研究報告

1. Green fluorescent protein (GFP)マウス由来骨髄細胞を移植したマウスに関節炎を誘導した際の骨髄細胞の動態

岩手医科大学医学部 病理学第一講座 講師 宇月 美和

2. 関節リウマチ骨髄血中の疾患誘導因子解明と根治療法開発研究

国立大学法人大阪大学医学系研究科 整形外科学 教授 吉川 秀樹

3. RAに対する脂肪細胞分泌因子（アディポネクチン）の抗炎症・骨吸収抑制作用検討と治療薬開発に関する研究

国立大学法人大阪大学医学系研究科 内分泌代謝内科学
教授 下村 伊一郎 准教授 前田 和久

4. 関節リウマチの重症度(病型)予後診断法としてのClq値に関する研究

行岡医学研究会 行岡病院 副院長 島岡 康則

5. 関節リウマチにおけるヒスタミンの病態生理学的役割とH4-受容体の関与に関する研究

国立大学法人大阪大学医学系研究科 保健学専攻 教授 大和谷 厚

6. 関節リウマチ骨髄血液の疾患誘導因子解明と根治療法開発研究
抗ヒトSHPS-1モノクロー抗体の作成

国立相模原病院 臨床研究センター 研究室長 鈴木 隆二

7. RA骨髄細胞から関節リウマチ関連疾患候補遺伝子の選択とその解析研究

大阪警察病院 院長 越智 隆弘

8. DNAマイクロアレイとバイオインフォーマティクスを用いたRA関連遺伝子の解析
- S100ファミリー分子の発現と関節破壊との関連-

和歌山県立医科大学 免疫制御学 教授 西本 憲弘

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）

総括研究報告書

関節リウマチ骨髄血中の疾患誘導因子解明と根治療法開発研究

研究代表者 越智 隆弘 大阪警察病院長

研究要旨 主任研究者らは病因未解明のRAに関して「主病巣は骨髄」という仮説をたて病因・病態研究を進めてきたが、平成20年度の内容を以下に記す。(I) RA骨髄病態を反映する動物実験系開発研究。(II) 従来は“RA病態とは無関係”と考えられていたアディポネクチン(Adipo)、75KDオステオポンティン(OPN)、ヒスタミン(His)などによるRA病態抑制効果解明と治療薬開発研究。そして抗C1qモノクロー抗体を用いた重症化予後診断薬開発研究。(III) 新鮮RA骨髄細胞からの病因遺伝子解明目的で選択したTnfsf14、Granulin、SHPS-1、Sirpaの4遺伝子と、MMP12とEF1- α そしてCCAR1、CXCL5とOLR1、各遺伝子の蛋白合成、モノクロー抗体作成、ELISA系作成によりRA病態解明研究を進めた。病因解明目的で各遺伝子改変マウスを作成して研究を進めた。更に、(IV) RA患者末梢血細胞遺伝子発現の網羅的解析プロフィールから選択したS100A4の解析を進めた。

研究分担者 吉川 秀樹 国立大学法人大阪大学医学系研究科
整形外科学 教授
下村 伊一郎 国立大学法人大阪大学医学系研究科
内分泌・代謝内科学 教授
西本 憲弘 国立大学法人大阪大学医学系研究科 リウマチ学 教授
大和谷 厚 国立大学法人大阪大学医学系研究科 保健学専攻 教授
鈴木 隆二 国立相模原病院 臨床研究センター 研究室長
宇月 美和 岩手医科大学医学部 病理学第一講座 講師
島岡 康則 行岡病院 リウマチ臨床研究センター 副院長
前田 朋子 塩野義製薬株式会社 医薬開発研究本部 創薬研究所 主任研究員

研究協力者 澤井 高志 岩手医科大学医学部 病理学第一講座 教授
鎌滝 章央 岩手医科大学医学部 病理学第一講座 助教
中田 研 国立大学法人大阪大学医学系研究科
整形外科学 講師
前田 和久 国立大学法人大阪大学医学系研究科
内分泌・代謝内科学 助教
蛭名 耕介 国立大学法人大阪大学医学系研究科 整形外科学 医員
武 靖浩 国立大学法人大阪大学医学系研究科 整形外科学 医員

A, 研究目的

「RA 主病巣は骨髄」という仮説に基づき、RA による骨吸収と骨破壊亢進機序解明と根治療法開発研究を進める目的である。内容は

(I) RA 骨髄病巣説を裏付ける動物実験系の開発。(II) Adipo、OPN、His からの治療薬、C1q からの検査薬開発、抗 C1q mAb を用いての重症化診断薬開発 (III) 新鮮な RA 骨髄細胞から選択された新規遺伝子からの病因物質解明、更に、(IV) RA 患者末梢血細胞遺伝子発現の網羅的解析プロフィールから選択された S100A4 遺伝子解析研究である。

B, 方法

I) RA 骨髄病巣説を裏付ける動物実験系開発；放射線照射 C57BL/6 マウスに GFP transgenic 由来の骨髄細胞を移植、生着確認後に関節炎を発症させヒト RA と比較した。

II) Adipo、OPN、C1q、His の治療薬開発研究；①Adipo；コラーゲン関節炎マウスに対する Adipo の抗炎症・骨吸収抑制作用を調べた。更に RA 患者の血中動態を検討した。②OPN；RA 滑膜細胞の IL-6 産生能、BL 抱き込み能に対する OPN の効果を遺伝子導入により評価した。また、OPN 中和抗体による抑制効果も評価した。③C1q；抗 C1q 抗体の認識エピトープに対するモノクロー抗体作成と、阻止反応で測定する ELISA 系を抗エピトープ抗体を用いたアッセイ系作成を進めた。

④His；破骨細胞への分化促進機能に対する His の効果を解析した。

III) 新鮮な RA 骨髄細胞から選択された新規遺伝子；Tnfsf14、Granulin、SHPS-1、Sirpa、MMP12、EF1- α 、CCAR1、CXCL5、OLR1 の各遺伝子に対して①蛋白を合成し、モノクロー抗体作成、ELISA系作成、RA患者血中濃度を測定し、

RA病態との関連性を解析研究した。②各遺伝子に関して、TGマウス作製、F1マウスを作製、ノックアウトマウス作製、解析を進めた。

IV) RA 遺伝子発現の網羅的解析プロフィールからの帰納法的な病態解析；RA などの mRNA の発現量を健常人と比較して RA 選択的に発現する分子の同定を試みた。

C, 結果

I) 動物実験系開発；関節炎を誘導した GFP マウス由来骨髄細胞移植マウスの関節病変部に緑色蛍光を有する GFP マウス由来細胞が多数認められ、CD14、CD34、CD11b、CD106 陽性細胞が確認された。

II) Adipo、OPN、C1q、His の治療薬開発研究；①Adipo；Adipo過剰発現マウスでは明瞭な免疫反応抑制が認められ関節炎発症あるいは重症化が抑制された。RA女性患者の血中Adipo濃度は有意に高値で、全身の関節破壊数と有意な正の相関を示した。②OPN；血液B細胞(BL)と共培養するRA滑膜細胞にOPNを過剰発現させるとIL-6産生が上昇し、OPN siRNA導入によりIL-6産生は有意に減少した。このOPNによる機能はOPN中和抗体により抑制された。③C1q；抗C1qモノクロー抗体(mAb)を用いたELISA系により測定したRA患者血中C1q値は患者の破壊関節数と有意に関連し重症化予後診断指標になる。それらのmAbを共通認識しているエピトープに対する適切なmAbは現段階では作成出来ていない。④His；HisによりRA滑膜細胞のMMP3遺伝子発現が用量依存性に抑えられ、またCD14+細胞からM-CSFとRANKLで分化誘導される破骨細胞様細胞分化が抑制された。

III) 新鮮なRA骨髄細胞から選択された新規遺伝子；①病態解析；Granulin、SHPS-1はRA関節滑膜の線維芽細胞様細胞やマクロファ-

ジなどに発現し破骨細胞様細胞の分化、増殖活性を示した。LIGHT/TNFSF14にはRA特異的(RANKLに依存しない)破骨細胞様細胞分化誘導能が明確に認められた。SHPS-1に対するmAb作成に成功した。Anti-SHPS-1mAbを関節炎マウスに投与すると、骨髄細胞の破骨細胞形成を有意に抑制し、リンパ球からのIL-1 β 、IL-2、IL-12、IFN- γ 、TNF- α を有意に抑制したことから、治療薬開発を視野に入れている。② 遺伝子改変マウス作成； i) LIGHT/TNFSF14のTGマウスは致死的であり作成が出来ていない。ii) GranulinのTGマウスの作成が出来ず、ベクター構築を再検討中である。iii) SHPS-1/SIRP-AについてはファウンダーからF1作成中である。iv) hu-sulf-1とのTGマウスはF1が誕生している。v) EF-1 α のTGマウスは作成が完了し、hu-sulf-1とEF-1 α のダブルTGマウスの作成中である。vi) MMP-12についてはKOマウスの作成中である。CCAR1、CXCL5、OLR1についてもTGマウスを作成中である。

IV) RA 遺伝子発現の網羅的解析プロフィールからの帰納法的な病態解析；S100ファミリーの中で polyJIA と RA で発現が増加し骨破壊の強い S100A4 を選択した。

D、考察

I) GFP 骨髄細胞を用いたマウスでの実験系は RA で実証できない骨髄病態に始まる諸病理的動態解析を進める実験系として期待できる。II) Adipo、OPN ともに RA 病態で重要なマース細胞機能抑制、細胞性免疫抑制が示され、His も骨吸収抑制機序が明瞭で創薬できる可能性が大きい。抗エプトープ抗体は困難として、抗 C1q mAb を用いて測定できる血中 C1q 値は予後評価検査薬として有用であり診断約開発へと進める。III) 新鮮な RA 骨髄細胞から選択された新規遺伝子； Tnfsf14、

Granulin、SHPS-1、Sirpa、MMP12、EF1- α 、CCAR1、CXCL5、OLR1 は順次病態的新知見が得られ、病因解明への手がかりが得られそうだ。特に LIGHT/TNFSF14 は RA 特異的な骨細胞誘導を促進している点でも鍵を握る因子のひとつである。平成 21 年度以降の病因解明研究の新展開に期待が大きい。IV) 従来と異なった帰納法的な病態解析から選択された S100A4 についても遺伝子改変マウスを用いて病因・病態解明を進めている。

E、結論

- I) 開発中の動物実験系は RA 患者骨髄病巣の詳細研究に対して有用である。
- II) Adipo、OPN、His は有力な抗 RA 治療薬に、抗 C1q 抗体は検査薬として開発を進める。
- III) 病因解明目的で選択した RA 骨髄細胞からの新規遺伝子は根治療法開発研究に繋がってゆく期待が大きい。
- IV) 新たな発想である帰納法的解析研究により選択した S100A4 にも期待は大きい。

F、健康危険情報

なし

G、研究発表

- 1、論文発表 33 件
- 2、学会発表 26 件

H、知的財産権の出願・登録状況

- 1、特許取得 なし
- 2、実用新案特許 なし
- 3、その他 なし

II. 分担研究報告

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

Green fluorescent protein (GFP) マウス由来骨髄細胞を移植したマウスに関節炎を誘導した際の骨髄細胞の動態
分担研究者 宇月美和 岩手医科大学病理学講座先進機能病理学分野 講師

研究要旨 関節リウマチ(RA)の病変部での骨髄由来細胞の関与について検討するため、モデル動物を用いた。通常の C57/B6 マウスに放射線を照射して、骨髄抑制状態にした後に、GFP transgenic マウス由来の骨髄細胞を移植した。その後、同マウスにⅡ型コラーゲン関節炎を発症させると、GFP transgenic マウス骨髄由来の細胞は、炎症性滑膜組織やパンスヌスにも認められ、形態学的には円形細胞や顆粒球の他にも、紡錘形の線維芽細胞様細胞も含まれていた。この細胞の一部は CD14, CD34, CD11b, CD106 などが陽性であり、ヒト RA 滑膜に浸潤する細胞 (fibroblast like synovocyte : FLS) に類似した特徴を示していた。

1. 研究目的

関節リウマチ(RA)の病変部でより特異的とされる線維芽細胞様細胞(fibroblast like cell: FLC)では、これまでの検討によって、CD68 や CD11b などのマクロファージ系や CD14 の骨髄系など多彩なマーカーが陽性となり、電子顕微鏡的にも 1) 線維芽細胞様、2) マクロファージ系、3) 両者の中間の細胞であることが示されている。今回は関節炎モデル動物を用いて、FLC の由来についてより詳細に検討する。また、これまでの検討で RA の病変形成に重要である可能性が示唆されたリウマチ関連遺伝子について、トランスジェニックマウスやノックアウトマウスの組織学的な検討を行う

2. 研究方法

- (1) 放射線照射後の C57BL/6 マウスに GFP トランスジェニックマウス由来の骨髄細胞を移植し、Flowcytometry で生着を確認後に関節炎カクテルを投与し、関節炎を発症させた。その後、関節(滑膜組織、骨破壊部)を観察し、移植された骨髄由来細胞の分布を検討した。
- (2) 上記の細胞の細胞学的な特徴を検索するため、各種細胞マーカーを用いて細胞同定を行ない、ヒト RA との比較をおこなった。
- (3) RA の病変形成に重要である可能性が示唆されたリウマチ関連遺伝子の一部(Granulin, SHPS-1)についてヒト RA での陽性細胞の分布を検討するとともに一部の遺伝子(EEF1 α)についてはトランスジェニックマウスの組織学的な検討を行ない、さらにはこのマウスにコラーゲン関節炎を誘導した際の反応性(発症率など)の変化を検討する。

3. 研究結果

- (1) GFP マウス由来の骨髄細胞を移植したマウスの系では、関節炎誘導マウスの滑膜組織内や骨破壊部(パンスヌス)に緑色蛍光を有する細胞が多数認められ、形態学的には円形や紡錘形など多彩な像を示していた。関節炎を起

していない対照群では生着した骨髄細胞と末梢血中の細胞と思われる顆粒球のみが陽性であった。

- (2) 関節炎誘導マウスの炎症性滑膜やパンスヌスでの GFP 骨髄由来の細胞について蛍光標識抗体を用いて検索をおこなったところ、CD14, CD34, CD11b, CD106 などが陽性となった。
- (3) ヒト RA 滑膜組織でのリウマチ関連遺伝子については、Granulin は滑膜表層細胞で陽性となるが発現の程度は RA>OA であり、その他に線維芽細胞様細胞やマクロファージファージ、血管壁なども陽性となっていた。SHPS-1 については Granulin の分布と類似していたものの、特にマクロファージ系の細胞での陽性が目立ち、多核巨細胞や泡沫細胞、破骨細胞などで強陽性となっていた。
- (4) EEF1 α トランスジェニックマウスについては EEF1 α は多彩な細胞で陽性となるが、検索対象とした個体数がまだ少数であるため、今後も検討を加える必要がある。

4. 考察

GFP を用いたマウスでの実験系では、炎症性滑膜組織やパンスヌス内で増生する細胞が骨髄由来のものであることが証明されたが、細胞マーカーによる検索でもこれらはヒト RA の関節炎病変部にみられる線維芽細胞様細胞 (FLC) と類似した特徴を持つ事が示され、線維芽細胞系あるいはマクロファージ系、またはその中間の特徴を持つ、様々な方向に分化しうるものであると思われる。

5. 結論

FLC は、形態学的にも機能的にも由来の同定が難しい細胞であるが、今回の GFP を用いたマウスでの実験結果から、様々な方向に分化しうる骨髄由来の細胞であることが明らかになった。

6. 健康危険情報

なし

7. 研究発表

1. 論文発表

宇月美和、佐々木喜子、澤井高志：RAにおける骨・軟骨破壊の病理学的特徴。Rheumatology Clinical Update. 15: 7-10 (2008)

宇月美和、澤井高志：免疫染色・in situ hybridization. エラスチン-構造・機能・病理。伊藤 浩行：編。日本エラスチン研究会。大阪，9-22 (2008)

鎌滝章央、宇月美和、佐々木信人、澤井高志：加齢および肺高血圧症に伴う肺動脈幹の変化-組織計測を用いた解析。エラスチン-構造・機能・病理。井藤 浩行：編。日本エラスチン研究会。大阪，264-275 (2008)

澤井高志、宇月美和、佐々木喜子、金 仁順：第2章 病理・病態生理。病理-滑膜の炎症から骨破壊まで。最新医学別冊 新しい診断と治療のABC8。関節リウマチ(宮坂信之：編)。最新医学社。26-41 (2008)

澤井高志、三浦康宏、宇月美和：学会発表講座 リウマチ性疾患における病理組織画像のプレゼンテーション。Frontiers in Rheumatology&Clinical Immunology. 48(168)-53(173) (2008)

澤井高志、宇月美和：関節リウマチにおける関節炎の破壊に関する最近の病理学的話題。Clinical Calcium 19: 325-338 (2009)

2. 学会発表

Kamataki A, Oikawa S, Mimata Y, Uzuki M, Sawai T: The effect of cytokine on hyaluronan metabolism of chondrocyte. 2008World Congress on Osteoarthritis. Sep 18-21, 2008: Rome, Italia.

Uzuki M, Ryan LM, Sawai T, Masuda I: Up-regulated expression of ANK in joint tissue from patients with calcium pyrophosphate dehydrate crystal deposition disease(CPPD). 2008World Congress on Osteoarthritis. Sep 18-21, 2008: Rome, Italia.

Uzuki M, Sasaki Y, Tokunaga S, Kamataki A, Nomi K, Kitagawa H, Kaiyama J, Sawai T: Activity and expression of hyaluronidases associated with hyaluronan synthases expression and change of molecular weight of hyaluronan in the joint fluid. 2008World Congress on Osteoarthritis. Sep 18-21,

2008: Rome, Italia.

Sasaki Y, Uzuki M, Noumi K, Kitagawa H, Ikemi M, Komagamine M, Shimamura T, Sawai T: Determination of serum hyaluronic acid molecular weight in patients with rheumatoid arthritis. 13th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Medical-Expo 2008 in APLAR' s World. Sep 23-27, 2008: Yokohama, Japan.

Itoh Y, Uzuki M, Sawai T, Kamataki A: Connective tissue growth factor(CTGF), a key cytokine that induces synovial cell growth, especially in early stage of RA. 13th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Medical-Expo 2008 in APLAR' s World. Sep 23-27, 2008: Yokohama, Japan.

宇月美和、佐々木喜子、澤井高志：関節リウマチ(RA)におけるヒアルロン酸(HA)の動態。(第97回日本病理学会総会 2008年5月15-17日、金沢)

佐々木喜子、宇月美和、能見健司、駒ヶ嶺正隆、嶋村 正、澤井高志：関節リウマチ患者血清中のヒアルロン酸分子量の測定法に関する検討。(第52回日本リウマチ学会総会・学術集会 2008年4月20-23日、札幌)

宇月美和、佐々木喜子、嶋村 正、駒ヶ嶺正隆、石塚正人、佐藤克巳、澤井高志：滑膜線維芽細胞様細胞の特徴。(第52回日本リウマチ学会総会・学術集会 2008年4月20-23日、札幌)

鎌滝章央、宇月美和、佐々木喜子、澤井高志：サイトカインによる軟骨細胞におけるヒアルロン酸代謝への影響の解析。(第52回日本リウマチ学会総会・学術集会 2008年4月20-23日、札幌)

宇月美和、村井一範、石田陽治、佐々木喜子、越智隆弘、澤井高志：Green fluorescent protein(GFP)マウス由来骨髄細胞を移植したマウスに関節炎を誘導した際の骨髄細胞の動態。(第18回日本リウマチ学会 北海道・東北支部学術集会 2008年11月22-23日、福島)

8. 知的財産権の出願・登録状況
なし

関節リウマチ骨髄血中の疾患誘導因子解明と根治療法開発研究

研究分担者 吉川秀樹

大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学（整形外科）教授

研究要旨

関節リウマチでは、関節の炎症、破壊に IL-6 などサイトカインが重要な役割を持つが、滑膜細胞とリンパ球との接触によりこれらサイトカイン産生が知られている。一方、オステオポンチンは関節リウマチ患者の関節液中での上昇や関節炎との関わりが指摘されている。本研究では関節リウマチ患者滑膜細胞由来の疾患特異的オステオポンチン発現、リンパ球との接着、IL-6 産生につき検討し、関節リウマチ患者滑膜細胞において疾患特異的翻訳後修飾をうけたと考えられるオステオポンチンの発現がみられ、この疾患特異的オステオポンチンは、関節リウマチ患者滑膜細胞膜上に存在しリンパ球との細胞接着を介して IL-6 産生を誘導していることを新たに示した。本研究結果は、関節リウマチ病態を解明する上で意義深く、また、疾患特異的オステオポンチンの発現を抑える事で IL-6 発現が抑制されることから、疾患治療示す研究成果として有用である。

A. 研究目的

関節リウマチ（RA）では滑膜細胞がリンパ球抱き込み現象によるサイトカインの産生が知られている。一方、オステオポンチン（OPN）は RA 関節液中での上昇や関節炎との関わりが指摘されている。本研究では RA 滑膜細胞由来のオステオポンチン（OPN）発現、B 細胞との接着、IL-6 産生につき検討した。

B. 研究方法

RA および非 RA それぞれ 4 患者由来の初代培養滑膜細胞（Sy）（4～10 継代）と、B 細胞株（BL）として MC/Car を実験に使用した。Sy の OPN 発現をウェスタンブロットにて評価した。Sy 単独培養、

Transwell あり・なしでの Sy と BL の共培養を行ない、培養上清の IL-6 濃度を ELISA にて測定した。共培養状態で IL-6 に対する免疫蛍光染色を行ないその局在を観察した。Sy の細胞表面での OPN 発現をウェスタンブロットにて評価した。Sy に OPN 遺伝子導入により過剰発現、または、siRNA 導入による OPN 発現抑制下で、BL との共培養、培養上清の IL-6 濃度を測定した。Sy に OPN 中和抗体を投与し、BL との共培養を行ない、抱きこまれた BL の細胞数を計測した。

（倫理面への配慮）

患者データなどの個人情報および解析結果は、各施設で厳重に管理保管し秘密を厳守した。ヒトゲノム・遺伝子解析

研究に関する倫理指針（平成13年文部科学省・厚生労働省告示第1号）疫学研究に関する倫理指針（平成14年文部科学省・厚生労働省告示第2号）臨床研究に関する倫理指針（平成15年厚生労働省告示255号）および、申請者、研究分担者が所属する研究機関が定めた倫理規定を遵守して行った。研究参加は参加を許諾した場合でも拒否した場合でも全く同質の治療が行われることを説明した上で、患者の任意によりインフォームドコンセントを得て行われた。

C. 研究結果

ウェスタンブロットではRA滑膜細胞に約75kDaの特異的なOPN発現を認めた。これらの滑膜細胞とBLとの細胞接触を伴う共培養では培養上清中のIL-6の有為な上昇を認め（ $>10\text{ng/mL}$ ）、一方、BLとの接触を伴わないTranswellありの共培養ではIL-6の上昇は認められなかった（ $<2\text{ng/mL}$ ）。75kDOPN陽性SyにOPNを過剰発現させ、BLと共培養したところ、IL-6産生が上昇したが、75kD陰性Syでは過剰発現によるIL-6産生の変化は認めなかった。OPN siRNA導入SyとBL共培養培養では上清中のIL-6濃度は有意に減少した（ $p<0.001$ ）。Syの細胞表面タンパク分画のウェスタンブロットにて $>200\text{kD}$ のOPNの発現を認めた。OPN中和抗体により、抱き込まれたBL数は有意に減少し（ $p<0.001$ ）、IL-6発現は減少した。

D. 考察

OPNは、蛋白翻訳後に様々な修飾を受

け、細胞接着やCa接着などの機能をもつとともに、最近ではOPNノックアウトマウスでコラーゲン誘導関節炎が発症しないことやRA患者関節液中で高濃度であることなど関節炎との関わりが示されている。一方、RA滑膜細胞はリンパ球の抱き込みとそれによる炎症性サイトカインの発現がみられるが、本研究でRA滑膜細胞においてRA特異的翻訳後修飾をうけたと考えられるOPNの発現がみられ、このRA特異的OPNは、RA滑膜細胞膜上に存在しB細胞との細胞接着を介してIL-6産生を誘導していることが新たに示された。本研究結果は、RAの病態を解明する上で意義深いのみならず、RA特異的OPNの発現を抑える事でIL-6発現が抑制されることから、RA疾患治療の可能性を示す研究成果として非常に有用である。

E. 結論

RA患者の滑膜細胞では、RA特異的な翻訳後修飾を受けるOPNが発現し、細胞表面に存在することによりB細胞の抱きこみ現象のkey moleculeとして、IL-6分泌を誘導していることが初めて明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Arimitsu, S., Sugamoto, K., Hashimoto, J., Murase, T., Yoshikawa, H., Moritomo, H.: Analysis of radiocarpal and midcarpal motion in stable and unstable rheumatoid wrists using 3-dimensional computed tomography. Journal of Hand Surgery, 33A:189-97, 2008.

2) Hattori, T., Hashimoto, J., Tomita, T., Kitamura, T., Yoshikawa, H., Sugamoto, K.: Radiological study of joint destruction patterns in rheumatoid flatfoot. Clin Rheumatology, 27:733-737, 2008.

3) Iwai, T., Murai, J., Yoshikawa, H., Tsumaki, N.: SMAD7 inhibits chondrocyte differentiation at multiple steps during endochondral bone formation and down-regulates p38 mapk pathways. Journal of Biological Chemistry, 283: 27154-27164, 2008.

4) Nampei, A., Hashimoto, J., Koyanagi, J., Ono, T., Hashimoto, H., Tsumaki, N., Tomita, T., Sugamoto, K., Nishimoto, N., Ochi, T., Yoshikawa, H.: Characteristics of fracture and related factors in patients with rheumatoid arthritis. Modern Rheumatology, 18:170-176, 2008.

5) Nomura, K., Kuroda, S., Yoshikawa, H., Tomita, T.: Inflammatory osteoclastogenesis can be induced by GM-CSF and activated under TNF immunity. Biochem Biophys Res Commun, 367:881-887, 2008.

6) Otsuru, S., Tamai, K., Yamazaki, T., Yoshikawa, H., Kaneda, Y.: Circulating bone marrow-derived osteoblast progenitor cells are recruited to the bone-forming site by CXCR4/SDF-1 pathway. Stem Cells, 26:223-34, 2008.

7) Shimizu, H., Nakagami, H., Osako, M., Hanayama, R., Kunugiza, Y., Kizawa, T., Tomita, T., Yoshikawa, H., Ogihara, T., Morishita, R.: Angiotensin II accelerates osteoporosis by activating osteoclasts. FASEB Journal, 22:2465-2475, 2008.

8) 吉川秀樹, 玉井宣行, 名井陽: 人工骨による骨・関節疾患の治療, 日本医事新報, 4403:53-56, 2008.

2. 学会発表

1) RA 滑膜細胞発現のオステオポンチ

ン: B細胞の抱きこみ現象とIL-6産生刺激 第40回日本結合組織学会 2008 5月 東京

2) RA 滑膜細胞表面のオステオポンチはB細胞の抱きこみ現象とIL-6の産生を刺激する 武 靖浩, 中田研, 吉川秀樹, 越智隆弘 第23回日本整形外科基礎学術集会, 2008. 10月 京都

3) Cell Surface Osteopontin Expressed by Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synoviocyte Induces IL-6 Production by Supporting Cell-Cell Interaction with B-lymphocyte. Take Y., Nakata K., Ochi T., Yoshikawa, H 55th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, 2009 Feb. Las Vegas, Nevada, USA

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

研究課題： 関節リウマチ・骨粗鬆症の重症化防止治療法開発に関する研究

RAに対する脂肪細胞分泌因子（アディポネクチン）の抗炎症・骨吸収抑制作用検討と治療薬開発に関する研究

分担研究者： 下村 伊一郎 大阪大学内分泌代謝内科学教室

研究要旨：脂肪細胞分泌因子であるアディポネクチンをアデノウイルスによりコラーゲン誘導性関節炎モデルマウスの肝臓で過剰発現させ血中濃度を上昇させると、関節炎の発症・重症化および傍関節骨吸収が有意に抑制された。免疫染色よりこのモデルでは関節軟骨での免疫複合体が形成されているにも関わらず、免疫複合体への補体C1q・C3の沈着や炎症細胞の浸潤が有意に抑制されていた。In vitro・ex vivoでの検討ではアディポネクチンは免疫複合体と補体の結合や、血中抗II型コラーゲン抗体価・補体価・リンパ球増殖能などには影響を与えないことより、アディポネクチンは関節局所での様々な抗炎症メカニズムを介して間接的に関節内での補体活性化を抑制していると考えられた。一方、血中アディポネクチン濃度は健常者と比較してRA患者で有意に高値であり、また破壊関節数による重症度と有意に相関していることが明らかとなった。以上よりRA患者においてアディポネクチンはRA病態に対する生理的反応として上昇している可能性が示唆され、また血中・局所濃度をさらに上昇させることでRA病態を改善させ得る可能性が示された。

A 研究目的

RAに伴う骨髄の脂肪化は広く知られている。また、脂肪組織分泌因子であるアディポネクチンは様々な細胞に対して抗炎症作用を発揮することが報告されている。本研究の目的はアディポネクチンと、RAおよびそれに伴う骨粗鬆症の病態との関係を解明し、RAの重症化防止治療薬開発に役立てることである。

B 研究方法

①コラーゲン誘導性関節炎モデルマウスに対してアデノウイルスを用いて肝臓でアディポネクチンを過剰発現させ、血中濃度を上昇させることで抗炎症・骨吸収抑制作用を検討した。関節組織を免疫染色や遺伝子発現で評価した。

②コラーゲン誘導性関節炎モデルマウスの関節軟骨で形成される免疫複合体を擬似的にプレート上に固着化し、補体C1q・C3との結合を検出するELISAの系を構築し、アディポネクチンによる結合阻害効果を検討した。またex vivoの系で血中抗II型コラーゲン抗体価・補体価やリンパ球の増殖を定量した。

③2005年に大阪大学医学部付属病院にて加療中であった罹病期間5年以上のRA女性患者106人の血中アディポネクチン濃度を測定し、RA重症度や各種パラメーターとの相関を検討した。

C 研究結果

①コラーゲン誘導性関節炎モデルマウスにアディポネクチンを過剰発現させると関節炎の発症及び重症化が有意に抑制された。また、関節炎に伴う傍関節の骨吸収も抑制された。組織学上は関節炎発症群で認められる関節軟骨へのC1q・C3沈着と炎症細胞浸潤がアディポネクチン過剰発現群で有意に抑制されていた。関節での炎症性サイトカインや接着分子の遺伝子発現は有意に抑制されていた

②アディポネクチンはin vitroでは免疫複合体とC1q・C3の結合に直接的影響は与えなかった。またex vivoでは血中抗II型コラーゲン抗体価・補体価・リンパ球増殖能などには影響を与えなかった。

③血中アディポネクチン濃度は健常者と比較してRA患者で有意に高値であり、また破壊関節数による重症度と有意に相関していることが明らかとなった。

D 考察

アディポネクチンは関節局所での様々な抗炎症メカニズムを介して間接的に関節内での補体活性化とその後の炎症細胞浸潤を抑制していると考えられた。

E 結論

アディポネクチンはマウス関節炎の重症化抑制効果を発揮することより、RAとそれに伴う骨粗鬆症に対して有効な治療方策となり得る可能性が示唆された。

G 研究発表

学会発表

2008年4月20-23日 第52回 日本リウマチ学会総会・学術集会

「関節リウマチにおける全身の破壊関節数は血中アディポネクチン濃度と相関する」 蛇名耕介

2008年6月11-14日 EULAR 2008 Barcelona
"SERUM CREATINE KINASE ACTIVITY IS INVERSELY CORRELATED WITH PHYSICAL DISABILITY, INFLAMMATORY ACTIVITY, RHEUMATOID FACTOR TITER, AND PREDNISOLONE DOSE IN FEMALE PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS." Kosuke Ebina

2008年10月23-24日 第23回日本整形外科学会基礎学術集会

「関節リウマチ患者において血清クレアチンキナーゼ活性は機能障害度(Steinbrocker Class分類)と逆相関する」 蛇名耕介

8 知的所有権の取扱い・所得状況(予定を含む)
特記事項なし

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）
総合研究報告書

関節リウマチの重症度(病型) 予後診断法としてのC1q値に関する研究

分担研究者 島岡 康則 行岡医学研究会 行岡病院 副院長

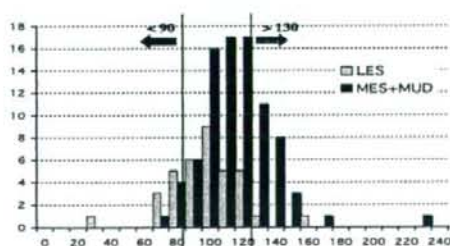
関節リウマチの重症度、とくに骨破壊の指標を得ることは重要である。以前よりC1q値と関節破壊の重症度に関連がある(越智ら)ことは指摘されていたが、測定のための抗体がポリクローナル抗体であったり、モノクローナル抗体であっても認識部位、測定方法の不安定などの理由により、良い結果が再現されなかった。平成19年度までの研究で、ハイブリドーマを作成し、10種類のモノクローナル抗体と2種のポリクローナル抗体を得た。それぞれの抗体により抗体固相を調整し、C1q検出・定量する新たなサンドイッチ法を開発した。さらに、ここから有用な4種の抗体を選択し、RA患者血清135検体を解析した。いずれの抗体についても、RA軽症型病型と、RA重症型病型で有意に異なる値を示すことがわかった。

このように、優れた抗C1q抗体を用いることにより、RAの関節破壊の重症度を知ることができることから、これらの抗体の認識エピトープが、RA重症度と関連する重要部位だと考えられた。平成20年度は、このエピトープの解析を行い、RA重症度に、より関連する部位に対する特異的な抗体を作成することを目的とした。

A. 研究目的

関節リウマチの重症度、とくに骨破壊の指標を得ることは重要である。昨年までの研究で、他の臨床検査値に影響されず安定した値を示す4種の抗体によりC1q検出・定量する新たなサンドイッチ法を開発した。RA患者血清135検体を解析した結果、RA軽症型病型と、RA重症型病型で有意に異なる値を示すことがわかった。

<病型別C1q値の度数分布>



このように優れた抗C1q抗体を用いることにより、RAの関節破壊の重症度を知ることができることから、抗C1q抗体の認識エピトープが、RA重症度と関連する重

要部位だと考えられた。本年度は、このエピトープの解析を行い、RA重症度に、より関連する部位に対する特異的な抗体を作成、測定系を確立することを目的とした。

B. 研究方法

抗C1q抗体の認識エピトープを想定した合成ペプチド(R2)を作成する。この合成ペプチド-KLH(R2-KLH)でマウスを免疫し、この合成ペプチドに対するモノクローナル抗体(抗R2-KLHモノクローナル抗体)を作成する。さらに合成ペプチド-OVA(R2-OVA)を固相化したプレートに作成された抗体(抗R2-KLHモノクローナル抗体)と患者血清を加えて、阻止反応で測定するELISAの系を作成する。発色は抗マウスHRPラベル抗体で行う。

(倫理面への配慮)

患者に文書で同意を得るとともに、各検体は無記名にて番号のみで管理し、コンピュータ上でのみ、臨床データと照合できるように配慮した。

C. 研究結果

今回作成された抗R2-KLHモノクロ

ーナル抗体は4種類であった。抗体サブクラスはIgM抗体が3種類(抗体No. 3, No4, No5)、未定が1種類(抗体No. 1)であった。

固相化したR2-OVAとの反応では、いずれの抗体もR2-OVAを認識していることが確認された。

抗体Lot	抗体濃度			
	x 10	x 100	x 1000	blank
No.1	0.042	0.22	0.008	0.016
No.3	1.120	0.589	0.501	0.492
No.4	0.379	0.441	0.167	0.186
No.5	0.352	0.129	0.156	0.129



この系にフリーの合成ペプチド(R2)を加えることで、少ないながらも抗体No. 3, No5で阻止反応が観察された。

抗体Lot	抗体濃度			
	x 100	x 1000	x 10000	0
No.1	0.042	0.22	0.008	0.051
No.3	1.120	0.579	0.501	0.559
No.4	0.379	0.441	0.167	0.382
No.5	0.352	0.129	0.156	0.142



阻止反応が認められたことから、患者血清中のR2エピトープ相当部位を測定できると考えた。135検体のRA患者血清につき阻止反応を測定したが患者血清による阻止反応(抑制率)は、いずれも、0.922-1.078であり、患者血清での有為な測定はできなかった。

抗体Lot	抑制率
No.3	0.931 ~ 1.038
No.5	0.922 ~ 1.078



D. 考察

越智らによるRA病型分類は、RAの骨破壊の重症度をもとにした分類であり、本研究でのC1q値もRA骨破壊の重症度の指標となると考える。

今回、新たに開発された抗C1q抗体、および、その測定法は、これまで臨床に使われてきた検査(CRP, MMP-3, RF, 赤沈など)に比較して、格段にRA重症度判定に有効であった。

投薬内容や、変動する臨床検査値(CRPなど)に左右されない、RA重症度の指標が確立されることは、患者の予後判定をする上で非常に重要な知見であると考えられる。

これらの抗体の認識エピトープが、RA重症度と関連する重要部位だと考えられる。

今回の研究では、有効なエピトープ

の決定には至らなかったが、合成ペプチドの設計、および抗体作成の見直しを行い、RA重症度に、より関連する部位を特定し、検査法を確立することは、非常に重要であると考えられた。

E. 結論

優れた抗C1q抗体を用いることにより、RAの関節破壊の重症度を知ることができることから、これらの抗体の認識エピトープが、RA重症度と関連する重要部位だと考えられる。本年度の研究では、このエピトープの解明には至らなかったが、この部位の解明はRAの病態に重要なキーであると考え、さらに解明を続けたい。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書に記載とする。)

G. 研究発表

1. 論文発表

1)

Nakamura N, Shimaoka Y, Tougan T, Onda H, Okuzaki D, Zhao H, Fujimori A, Yabuta N, Nagamori I, Tanigawa A, Sato J, Oda T, Hayashida K, Suzuki R, Yukioka M, Nojima H, Ochi T.

Isolation and expression profiling of genes upregulated in bone marrow-derived mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients.

DNA Res. 2006 Aug 31;13(4):169-83.

2)

Toyosaki-Maeda T, Takano H, Tomita T, Tsuruta Y, Maeda-Tanimura M, Shimaoka Y, Takahashi T, Itoh T, Suzuki R, Ochi T.

Differentiation of monocytes into multinucleated giant bone-resorbing cells: two-step differentiation induced by nurse-like cells and cytokines.

Arthritis Res. 2001;3(5):306-10.

- 3) Hayashida K, Shimaoka Y, Ochi T, Lipsky PE. Rheumatoid arthritis synovial stromal cells inhibit apoptosis and up-regulate Bcl-xL expression by B cells in a CD49/CD29-CD106-dependent mechanism. *J Immunol.* 2000 Jan 15;164(2):1110-6.
- 4) Shimaoka Y, Attrep JF, Hirano T, Ishihara K, Suzuki R, Toyosaki T, Ochi T, Lipsky PE. 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 Aug 1;102(3):606-18.
- 5) Miyashita T, McIlraith MJ, Grammer AC, Miura Y, Attrep JF, Shimaoka Y, Lipsky PE. Bidirectional regulation of human B cell responses by CD40-CD40 ligand interactions. *J Immunol.* 1997 May 15;158(10):4620-33.
- 6) Imanaka T, Shichikawa K, Inoue K, Shimaoka Y, Takenaka Y, Wakitani S. Increase in age at onset of rheumatoid arthritis in Japan over a 30 year period. *Ann Rheum Dis.* 1997 May;56(5):313-6.
- 7) Tomita T, Shimaoka Y, Kashiwagi N, Hashimoto H, Kawamura S, Lee SB, Nakagawa S, Shiho O, Hayashida K, Ochi T. Enhanced expression of CD14 antigen on myeloid lineage cells derived from the bone marrow of patients with severe rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1997 Mar;24(3):465-9.
- 8) Tomita T, Kashiwagi N, Shimaoka Y, Ikawa T, Tanabe M, Nakagawa S, Kawamura S, Denno K, Owaki H, Ochi T. Phenotypic characteristics of bone marrow cells in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1994 Sep;21(9):1608-14.
- 9) Tanabe M, Ochi T, Tomita T, Suzuki R, Sakata T, Shimaoka Y, Nakagawa S, Ono K. Remarkable elevation of interleukin 6 and interleukin 8 levels in the bone marrow serum of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1994 May;21(5):830-5.
- 10) Ochi T, Tomita T, Kimura T, Azuma F, Owaki H, Wakitani S, Shimaoka Y, Ono H. A concept to make schedules of therapies based on the natural courses of patients with rheumatoid arthritis. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi.* 1994 Jan;68(1):50-61.
- 11) Owaki H, Yukawa K, Ochi T, Shimaoka Y, Ono K. Facs analysis of myeloid differentiation stages in epiphyseal bone marrow, adjacent to joints affected with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 1991;20(2):91-7.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
主任研究者の指示のもとに検討中である。
 2. 実用新案登録
主任研究者の指示のもとに検討中である。

関節リウマチにおけるヒスタミンの病態生理学的役割と H₄受容体の関与に関する研究

分担研究者 大和谷 厚 大阪大学医学系研究科教授

研究要旨

関節リウマチ(Rheumatoid Arthritis, RA)では、関節滑膜の慢性的な炎症、関節軟骨や骨の破壊が引き起こされる。ヒスタミンは、炎症や急性過敏反応時において重要なメディエーターであり、mast cell(MC)や好塩基球の脱顆粒によって遊離し、全身に分布している。RAでは、ヒスタミンやその受容体が関節滑膜組織や関節液中に存在することが知られており、RAの病態に何らかの役割を果たしていると考えられる。本年は、RA患者の関節破壊に対してヒスタミンやその受容体がどのように関与しているのかを調べるために、軟骨破壊に関して、RA滑膜細胞にTNF- α で刺激し、MMP3遺伝子の発現上昇に対して、ヒスタミンの影響を検討した。また、骨破壊に関して、CD14+細胞に、M-CSF, RANKLで刺激することによって誘導される破骨細胞様多核細胞形成に対するヒスタミンの影響を検討した。ヒスタミンは、TNF- α 刺激によるRA滑膜細胞のMMP3遺伝子発現上昇を抑制し、さらに、M-CSF, RANKLによるCD14+細胞の破骨細胞様多核細胞形成を抑制した。以上の結果より、RA患者の関節破壊に対してヒスタミンは抑制的に機能する可能性が示唆された。

A. 研究目的

ヒスタミンは、肥満細胞や好塩基球に貯蔵され、炎症や即時型アレルギー反応を含む種々の刺激によって遊離する炎症のケミカルメディエーターである。また、肥満細胞やヒスタミン受容体が関節滑膜組織に存在することは古くから知られている。

関節リウマチでは、関節滑膜の慢性的な炎症、関節軟骨や骨の破壊が引き起こされる。関節リウマチの関節軟骨では肥満細胞の活性化や脱顆粒が起こること、滑膜組織において肥満細胞の数が増加すること、そして、関節液中ヒスタミンが増加することが報告されており、関節リウマチの病態においてヒスタミンが何らかの役割を果たしていることが想定される。特に、近年新たに発見されたヒスタミン H₄受容体は好酸球の走化性などに関与していることが知られており、この受容体の関節リウマチにおける病態生理学的役割についても興味を持たれる。

本研究では、ヒスタミンが関節リウマチ患者における関節破壊にどのように関与し

ているのかを、関節破壊を強く起こすとされるナース細胞との関連性を含めて、関節軟骨破壊、骨破壊の両面から検討した。

B. 研究方法

1. 滑膜ナース細胞の抱き込み(pseudoemperipolexis)能に対するヒスタミンの影響

ナース細胞は、関節リウマチ患者の関節滑膜組織から分離した。ナース細胞とB細胞リンパ腫のセルラインであるMC/Carを共培養し、そこへヒスタミン(10⁻¹²M-10⁻⁶M)を添加した場合の抱き込み能の変化を顕微鏡下で観察した。

2. TNF- α 刺激による関節リウマチ滑膜細胞のマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)3の発現上昇に対するヒスタミンの影響

関節リウマチ患者の関節滑膜由来滑膜細胞(passage 3-5)を24 well細胞培養プレートに5x10⁵ cells/mlの濃度で播き、その24時間後に炎症性サイトカインであるTNF- α (10ng/ml)を添加して刺激した。刺

激から 3 時間後、ヒスタミン (10^{-12}M ・ 10^{-6}M) を加え、その 24 時間後に mRNA を抽出し、オリゴ dT プライマー法により cDNA を合成し、RT-PCR 法により MMP3 の遺伝子発現を定量した。データは、GAPDH の mRNA に対する比として求めた。

3. マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) によって、ヒト CD14+ 細胞から誘導される破骨細胞様多核細胞形成に対するヒスタミンの影響

健康人の末梢血より、フィコール法にて末梢血単核球を分離し、磁気ビーズを用いて CD14+細胞を精製した。CD14+細胞から mRNA を抽出し、オリゴ dT プライマー法により cDNA を合成して、ヒスタミン受容体の遺伝子発現を RT-PCR 法にて確認した。

次に、96 well 細胞培養皿に、健康人末梢血由来 CD14+細胞を 6×10^5 cells/ml の濃度で播き、M-CSF (100ng/ml) と RANKL (160ng/ml) で刺激して 1 週間後に TRAP 染色を行った。ヒスタミンの TRAP 陽性細胞形成に対する影響を調べるために、播きこみと同時にヒスタミン (10^{-6}M , 10^{-8}M) を M-CSF、RANKL と併せて投与し、1 週間後に TRAP 染色を行った。TRAP 陽性細胞は、核が 3 つ以上のものを破骨細胞様多核細胞とした。

4. 倫理面への配慮

関節リウマチ患者および健康人からの末梢血、関節リウマチ患者からの骨髓血取得には、研究実施施設における研究倫理委員会において事前に承認を受け、十分なイン

フォームドコンセントの下で検体の提供を受けた。

C. 研究結果

1. 滑膜ナース細胞の抱き込み能に対するヒスタミンの影響

ヒスタミン投与群は、コントロール群と比較して、ナース細胞の抱き込み能に有意な差は見られなかった。

2. TNF- α 刺激による RA 滑膜細胞の MMP3 発現上昇に対するヒスタミンの影響

TNF- α を RA 滑膜細胞に投与すると、MMP3 遺伝子の発現が有意に上昇した。ヒスタミンを投与すると、 10^{-12}M 、 10^{-10}M では変化はなかったが、 10^{-8}M 、 10^{-6}M では MMP3 遺伝子の上昇が有意に抑えられた。

4. マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、RANKL によって、ヒト CD14+ 細胞から誘導される破骨細胞様多核細胞形成に対するヒスタミンの影響

CD14+細胞には、ヒスタミン H1、H2、H4 受容体すべての遺伝子が発現していることを確認した。CD14+細胞から M-CSF と RANKL で分化誘導させると、破骨細胞様多核細胞が形成されるが、ヒスタミンを投与すると、 10^{-8}M 、 10^{-6}M において有意に破骨細胞様多核細胞の数が減少した。

D. 考察

ヒスタミンは関節リウマチ患者の関節滑膜の MMP3 遺伝子発現を減少させることにより、滑膜による軟骨破壊に対し、抑制的に働くことが示された。これは、TNF- α のシグナル伝達経路で重要な役割を果た

している NF- κ B に対して、ヒスタミンが抑制的に働くことによって起こる可能性を示している。

また、ヒスタミンが健常人末梢血由来 CD14+細胞の破骨細胞様多核細胞形成に抑制的に働くことが示されたが、どのようなメカニズムで抑えられているか、関節リウマチ患者から得られた CD14+細胞ではどのような変化が起こるのかなど、今後の課題が残る。

さらに、CD14+細胞にはヒスタミン H1、H2、および H4-受容体が発現していたが、今回得られた現象がどの受容体を介しているかについて、今後、特異的な遮断薬および作動薬を用いてさらに検討を進める必要がある。

従来、ヒスタミンは炎症を促進するメディエーターとして考えられていたが、今回の実験結果から、ヒスタミンが関節リウマチにおける関節破壊に対して抑制的に働く可能性という興味ある結果が得られ、これが H4-受容体を解するか否かについてさらに追求したい。

E. 結論

1. ヒスタミンは関節リウマチ滑膜ナース細胞の抱き込み能に影響しない。

2. ヒスタミンは TNF- α によって上昇する、関節リウマチ滑膜細胞の MMP3 遺伝子発現に対して抑制的に働く。

3. ヒスタミンは健常人末梢血由来 CD14+細胞から M-CSF、RANKL で分化、誘導させた破骨細胞様多核細胞形成に対して抑制的に働く。また、CD14+細胞にはヒスタミン H1、H2、H4-受容体すべての遺伝子を発現している。