

2009 34014A

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

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 越 智 隆 弘

平成22（2010）年3月

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

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 越 智 隆 弘

平成22(2010)年3月

目 次

I. 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……………7
大阪警察病院 院長 越智 隆弘

II. 分担研究報告書

(i) 主病巣は骨髄か……………15

- ① GFPトランスジェニックマウスを用いた骨髄細胞の動態解析に関する研究
 - ② 関節リウマチ (RA) の炎症の慢性化機序とこれに関与する細胞の特徴、特に骨髄細胞との関連について
 - ③ 関節リウマチ滑膜における血管新生因子 Bv 8 /Prokineticin 2 の発現に関する研究
 - ④ 関節リウマチ患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞に対する IL-6 刺激による蛋白分解酵素 ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の発現に関する研究
 - ⑤ 遺伝子組換えマウスを用いた関節リウマチ発症に関わる遺伝子の検討
岩手医科大学医学部 病理学講座 教授 澤井 高志
2. アポトーシスと関節炎に関する研究
国立大学法人京都大学大学院医学系研究科 遺伝学 教授 長田 重一
 3. 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
- 関節リウマチ患者由来骨髄細胞移入マウスの病理学的検討-
国立相模原病院 臨床研究センター 研究室長 鈴木 隆二

(ii) ナース様細胞抑制など……………39

1. 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
2. 関節リウマチ疾患特異的分子オステオポンチンによる病態の機能解析
国立大学法人大阪大学大学院医学系研究科 整形外科学 教授 吉川 秀樹
3. 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
行岡病院 リウマチ臨床研究センター 副院長 島岡 康則
4. 関節リウマチにおけるヒスタミンの病理生理学的役割と 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

(iii) 病因物質の遺伝子探求……………51

1. RA ナース細胞により惹起される自己反応性リンパ球の増殖に関する研究
国立相模原病院 臨床研究センター 研究室長 鈴木 隆二
塩野義製薬株式会社 創薬研究所 主任研究員 前田 朋子
2. 関節リウマチ・骨粗鬆症の重症化防止治療開発研究
国立大学法人熊本大学生命資源研究・支援センター 教授 山村 研一

(iv) RA 患者骨髄細胞遺伝子……………57

1. 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
-RA 患者骨髄細胞における免疫機能関連分子の遺伝子発現異常とネットワーク解析-
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……………63

IV. 研究成果の刊行物・別刷……………71

I.平成21年度 総括研究報告書

(関節リウマチ骨髓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

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 21 年度の内容を以下に記す。(I) 主病巣は骨髄か；放射線照射 C57BL/6 マウスに GFPTg マウス由来骨髄細胞を移植、生着後に関節炎を発症させ、骨髄細胞が病巣部に移行してヒト RA 様病態を形成している細胞病態解析が進められている。また、DNase II 欠損マウスに於いて未分解の細胞核蓄積により骨髄 Mφ のアポトーシスが障害されたマウスは自然発症的に RA に酷似した関節炎を発症し、重要な知見を得た。(II) ナース様細胞抑制など；RA 病巣形成しての主病因となるナース様細胞の抑制因子としてアディポネクチン(Adipo)および 75KD オステオポンティン(OPN)の解明が進められた。ヒスタミン(His)による病態抑制、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も進められた。(III) 病因物質の遺伝子探求；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 病態解明研究が進められた。(IV) RA 患者骨髄細胞遺伝子；RA 患者骨髄細胞遺伝子の機能的解析から骨髄において免疫機能発現機能亢進が示された。発現の網羅的解析プロフィールから選択した S100A4 の解析から TRAP(-)破骨細胞発現を見出した。平成 22 年度研究で課題をまとめる方向で研究が進められている。

研究分担者 澤井 高志 岩手医科大学医学部 病理学第一講座 教授
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 和歌山県立医大 免疫制御学 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
長田 重一 国立大学法人京都大学医学系研究科 遺伝学 教授
山村 研一 国立大学法人熊本大学生命資源研究・支援センター 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
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 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
鎌滝 章央 岩手医科大学医学部 病理学第一講座
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
武 靖浩 国立大学法人大阪大学医学系研究科 整形外科学

A, 研究目的

主任研究者らは今までの厚生労働科学研究として続けてきた RA 病態研究成果を基に、「RA 主病巣は骨髄」という仮説をたて、RA 重症化の原因となる骨吸収亢進と骨破壊拡大機序解明研究を進めてきた。本研究の目的は (I) RA 骨髄病巣説を動物実験系を用いての裏づけ研究、(II) RA 病巣形成の最重要細胞と考えられるマース様細胞の抑制物質、疾患予後予測因子などの検討、(III) 病因物質解明目的で RA 骨髄細胞から選択された新規遺伝子の解析、(IV) RA 患者骨髄血細胞遺伝子発現の網羅的解析プロフィールから帰納法的な病態解析と、選択された病因物質から病態解明・根治療法開発を進めることである。

B, 方法

I) 動物実験による RA 骨髄病巣説の裏づけ；
1) 放射線照射 C57BL/6 マウスに GFPTg マウス由来骨髄細胞を移植、関節炎発症に伴う骨髄由来細胞の動態解析 (澤井研究分担者)。2) 重症 RA 患者骨髄細胞の免疫不全マウスへの移入実験 (鈴木研究分担者)。3) DNase II 欠損 M ϕ のマウス関節炎モデルを用いた多発関節炎マウス解析研究 (長田研究分担者)。
II) RA 発症に関わる重要因子；特にマース様細胞の抑制因子として、1) アディポネクチン (Adipo) の機序解明研究 (下村研究分担者)、2) オステオポンティン (OPN) の機序解明研究 (吉川研究分担者)、3) RA 予後予測因子としての C1q モノクロー抗体を用いての解析研究 (島岡研究分担者)、4) ヒスタミン (His) RA 抑制機序解明研究 (大和谷研究分担者)
III) 新鮮な RA 骨髄細胞から選択された新規遺伝子解析研究；病因物質解析研究目的で新鮮な RA 患者骨髄細胞 RNA の遺伝子発現研

究。Tnfsf14、Granulin、SHPS-1、Sirpa を初め、MMP12、EF1- α 、CCAR1、CXCL5 and OLR1 を研究対象にしている。1) 遺伝子改変マウス作成 (山村研究分担者)；EEF1 α 1、Sulfatase、OLR1 については順調にトランスジェニック (Tg) マウスは作製され、児が生まれなかった Tnfsf14、Granulin、Sirpa の Tg マウス作成法を変えて試みている。2) 遺伝子改変マウスの病態解析研究 (澤井研究分担者)；Tg マウスが得られた EEF1 α 1、Sulfatase、OLR1、CXCL5 に関して順次、加齢に伴う膝関節の病理学的変化と、カクテル抗体を用いた関節炎惹起に伴う変化を観察している。

IV) RA 患者の新鮮な骨髄単核球から Total RNA を抽出し、54679 遺伝子オリゴ DNA 搭載マイクロアレイを用いて網羅的に測定し、発現が変動している遺伝子機能を EASE 解析により、更に「免疫」に関与する分子群の分子間相互作用を IPA v7.5. を用いて解析した。

C, 結果

I) 動物実験による RA 骨髄病巣説の裏づけ；1) ホストマウスには、GFP 陽性細胞は 4 日目から関節組織内に認められ始め、順次、滑膜組織内、骨破壊病巣に認められた。2) RA 患者骨髄細胞注入 4 週後のマウス、4 匹中 2 匹のマウスの膝関節に変化が観察された。3) 骨髄内に細胞核を消化しきれず apoptosis 機能を抑制された M Φ が集積し、IL-6、TNF α 産生亢進に陥り、RA 様の骨破壊を伴う多発関節炎が進行した。
II) RA 発症に関わる重要因子；1) Adipo は濃度依存性にマース細胞機能を抑制したが、免疫反応に対する直接的作用は認めなかった。2) OPN は RA 滑膜細胞では

200kD の分子として細胞表面に偏在し、RA 特異な機能は 75kD のものに認められた。

3) 抗 C1q モノクロー抗体による RA 患者血清の ERISA アッセイ値は RA 患者関節破壊の予後と有意に相関した。4) RA 単核細胞内の TNF α mRNA 発現レベルはヒスタミンにより有意に抑制され、予め H4R アンタゴニスト添加によって用量依存的に阻害された。

III) 新鮮な RA 骨髄細胞から選択された新規遺伝子 ; 1) 遺伝子改変マウス作成 ; EEF1 α 1、Sulfatase、OLR1、CXCL5 に関して順次、Tg マウスが作成されて 2) の研究が行われている。Tnfsf14 に関しては胎児死亡が起きるので、CLIP promoter-cre-ERT2 を作成中である。CEG promoter-lox-CAT-lox と Tnfsf14 を接続中である。MMP12 ノックアウトマウスを C57BL/6-Tg(CAG-Cre) と MMP12-floxed マウスを交配し作成し、最初の世代のマウスが産まれている。

2) 遺伝子改変マウスによる解析 ; 順次長期経過も含めて病態観察中である。

IV) RA 骨髄の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 患者の骨髄に「免疫」に関わる分子発現が有意に増加し、「免疫」機能に関わる分子群のネットワーク活性増加などが示唆された。

D, 考察と E, 結論

I) 動物実験による RA 骨髄病巣説の裏づけ GFPTg マウス骨髄細胞移入 C57BL/6 マウスでの関節炎発症病態は多発関節炎発症における骨髄病巣の重要性を示している。特に、DNase II 欠損 M ϕ のマウス関節炎モデルは M ϕ の apoptosis 抑制という重要なヒントを示している。

II) 関節炎発症に関わる重要因子

RA 病態形成の重要因子であるナース様細胞の抑制は難問であったが、Adipo や OPN などの生理的物質が強い抑制活性を持つことが判明し治療薬開発への途が開ける。治療指針決定や経過観察に、予後因子として抗 C1q 抗体を用いての血清 C1q 値が活用できることが判明して、検査薬開発への途が開ける。従来未知であった His による RA 病態抑制が認められ RA 治療への新しい攻め口が出来てきた。

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 $\cdot\alpha$ 、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 特異的な骨髄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 22 年度には結果が得られるが、病因解明研究の新展開に期待が大きい。

IV) RA 骨髄の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により免疫機能亢進が証明されたことは、免疫担当細胞の源である骨髄において既に抗原提示に基づく特異的免疫応答が亢進していることを示し、RA 患者の骨髄異常を支持する所見である。

F, 健康危険情報

なし

G, 研究発表

- 1、論文発表 54 件
- 2、学会発表 68 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.平成21年度 分担研究報告書

(i) 主病巣は骨髄か

1. ① GFPトランスジェニックマウスを用いた骨髄細胞の動態解析に関する研究
 - ② 関節リウマチ (RA) の炎症の慢性化機序とこれに関与する細胞の特徴、特に骨髄細胞との関連について
 - ③ 関節リウマチ滑膜における血管新生因子 Bv8/Prokineticin 2 の発現に関する研究
 - ④ 関節リウマチ患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞に対する IL-6 刺激による蛋白分解酵素 ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の発現に関する研究
 - ⑤ 遺伝子組換えマウスを用いた関節リウマチ発症に関わる遺伝子の検討
2. アポトーシスと関節炎に関する研究
3. 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
- 関節リウマチ患者由来骨髄細胞移入マウスの病理学的検討-

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）
分担研究報告書

GFP トランスジェニックマウスを用いた骨髄細胞の動態解析に関する研究

分担研究者	澤井高志	岩手医科大学医学部 病理学講座 教授
研究協力者	宇月美和	東邦大学医学部医学科 病理学講座 助教
研究協力者	鎌滝章央	岩手医科大学医学部 病理学講座 助教
研究協力者	村上賢也	岩手医科大学医学部 整形外科学講座 大学院生

研究要旨

GFP トランスジェニックマウスを用いて骨髄由来細胞の関節炎形成への関与について検討を行った。GFP トランスジェニックマウスの骨髄を移植した C57BL/6 マウスに関節炎を誘導し、末梢血細胞、骨髄細胞、関節組織を解析した結果、末梢血に先行して骨髄での好中球の増加がみられた。また、末梢血に GFP 強陽性細胞が認められた。4 日目から類円形や紡錘形の形態を示す GFP 陽性細胞が関節域に認められた。7 日目、11 日目には滑膜組織内に多数の GFP 陽性細胞がみられ、内皮細胞、線維芽細胞、破骨細胞であることが形態的特徴から示唆された。一方、関節炎を誘導した GFP トランスジェニックマウスの骨髄細胞を注入した研究では、滑膜の増生や炎症性細胞の浸潤はみられず、関節域に GFP 陽性細胞を認められなかった。関節炎モデルで早期にあらわれる骨髄由来細胞の特徴を明らかにし、同様の細胞のヒト関節リウマチでの動態を解明することは病態解明に寄与すると考える。

A. 研究目的

関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) の滑膜は浸潤性のリンパ球や滑膜細胞の増殖による炎症を示すが、滑膜で炎症がおこる理由や初期変化が如何なる形で起こるかは明らかにされていない。最近の研究で形態的に紡錘形や類円形の細胞が骨髄から滑膜へ移動してくることが確認されているため、本研究では GFP トランスジェニックマウスの骨髄細胞を移植した C57BL/6 マウスに関節炎を発症させ、あるいは関節炎誘導した GFP トランスジェニックマウスの骨髄細胞を注入することで、骨髄細胞の動態を解析した。

B. 研究方法

GFP トランスジェニックマウスの骨髄を移植した C57BL/6 マウスに関節炎を誘導する研究では、放射線照射して骨髄抑制状態にした C57BL/6 マウスに GFP トランスジェニックマウスの骨髄を一匹あたり 1.3×10^7 尾静脈注射し、2 週間後に末梢血の血球をフローサイトメトリーで解析して骨髄が生着していることを確認した。関節炎惹起用 5 クローンモノクローナル抗体カクテルを 3mg 尾静脈投与し、さらに 3 日後に LPS を 50 μ g 腹腔内投与して関節炎を誘導した。関節炎誘導後 4, 7, 11 日目にマウスを解剖して関節 (膝、足) の標本を作成した。また解剖の際に骨髄と末梢血を採取し、フローサイトメトリーで細胞分画を解析した。コントロールとして放射線照射や骨髄移植を行わない C57BL/6 マウス (コントロール 1) と GFP トラ

ンスジェニックマウスの骨髄を移植して関節炎未誘導 (コントロール 2) を用いた。

関節炎を誘導した GFP トランスジェニックマウスの骨髄細胞を注入した研究では、GFP トランスジェニックマウスに関節炎惹起用 5 クローンモノクローナル抗体カクテルを 3mg 尾静脈投与し、3 日後に LPS を 50 μ g 腹腔内投与して関節炎を誘導した翌日に骨髄を回収し、C57BL/6 マウスに 1×10^7 尾静脈注射した。注射後 3 日後、7 日後に解剖して関節の標本を作成した。

C. 研究結果

GFP トランスジェニックマウスの骨髄を移植した C57BL/6 マウスに関節炎を誘導した研究の結果 関節炎誘導しないコントロール 1 と 2 の骨髄細胞を比較した結果、好中球 : リンパ球 : 単球の比率はコントロール 1 で 8 : 1 : 8、コントロール 2 で 6 : 1 : 10 であった。なお、放射線照射後の骨髄細胞の残存数は部位によって異なり、ほとんどの骨髄細胞が消失したものからかなり残存するものまで様々であった。

末梢血分画

関節炎誘導後 4 日目に好中球の割合が約 10 倍に増加した。7 日目も増加したままだったが、11 日目には元に戻った。リンパ球と単球では変化は認められなかった。また、誘導後 4 日目にリンパ球分画で GFP 強陽性の細胞が出現し、GFP 弱陽性の細胞とともに二峰性のピークを形成した。7 日目には強陽性のピークが、11 日目には弱陽性のピークがそれぞれ優位となり、末

別紙①

梢リンパ球の性質に変化が生じていることが示された。好中球と単球での GFP 陽性細胞の比率には変化は認められなかった (図 1)。

骨髄分画

関節炎誘導後 4 日目に好中球分画が約 1/3 に減少し、リンパ球分画がコントロール 2 に比較して約 4 倍に増加した。単球には変化が認められなかった。7 日目には好中球は増加してそれぞれ元にもどり、リンパ球は減少し、単球は約 1/4 に減少した。11 日目には好中球はコントロール 2 と比べ約 2 倍に増加し、リンパ球はコントロール 2 と同じ程度、単球は減少したままであった (図 2)。

関節組織標本

HE 染色標本の光学顕微鏡による観察では、関節炎誘導後 7 日目で滑膜組織の増生や炎症性細胞浸潤が認められ、11 日目には骨破壊像が認められた。未染色標本の蛍光顕微鏡による観察では、GFP 陽性細胞は関節炎誘導 4 日目から関節組織内に小数認められ、類円形や紡錘形の形態を示していた。さらに 7 日目、11 日目には滑膜組織内に多数認められた。これらは類円形や紡錘形で大小様々な形態を示しており、その構造と位置から内皮細胞、形態学的特徴から線維芽細胞と破骨細胞であることが示唆された (図 3)。

GFP トランスジェニックマウスに関節炎を誘導した後骨髄を注入した研究の結果

関節組織の HE 染色標本の観察では、3 日目、7 日目とも滑膜の増生や炎症性細胞の浸潤は認められなかった。また、未染色標本の蛍光顕微鏡による観察でも GFP 陽性細胞は認められなかった (図 4)。

D. 考察

滑膜の変化に先行して好中球の滑髄での減少、末梢血での増加が起こることが明らかになった。このことは関節炎の惹起による骨髄の好中球の急激な誘導を反映している可能性がある。細胞分画の解析から、関節炎誘導の 1 週間前後で骨髄の変化はおさまり、主病巣が滑膜へ移っていることが示唆される。関節炎誘導モデルマウスの場合では炎症は約二週間で終わる点がヒト RA と異なり、モデル動物では好中球からリンパ球のスイッチ後の補給が続かない。ヒト RA の場合には病初期の主役が好中球という点ではモデル動物と同じだが、その後、リンパ球が主役になっている。その理由は不明で、今後の研究課題である。フローサイトメトリーによる末梢血分画と骨髄分画の解析では関節炎の発症に伴い関節炎誘導後の 4 日目、7 日目には末梢のリンパ球で GFP 強陽性細胞が出現した。この細胞がどのような細胞かは不明であり、これも今後の研究対象の一つである。関節炎発症マウスの病変に骨髄移植した GFP 由来の細胞が証明されたが、早期に関節内に出現する骨髄由来細胞の同定には 4 日

以内が適当あると考えられた。問題はこの時期に現れる骨髄由来細胞の特徴を解明することであり、今後いかなる細胞系がどのような形で分化するかについて蛍光二重染色を利用して検討していきたい。

E. 結論

関節炎の誘導実験では骨髄の変化が先行し、誘導後 4 日目くらいから GFP 陽性の骨髄由来の細胞が関節域に出現することが証明された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yoshida W, Uzuki M, Nishida J, Shimamura T, Sawai T: Examination of *in vivo* gelatinolytic activity in rheumatoid arthritis synovial tissue using newly developed *in situ* zymography and image analyzer. Clin Exp Rheumatol. 27: 587-593. 2009

村上賢也、鎌滝章央、佐々木信人、澤井高志：関節リウマチ (RA) における関節破壊の病理組織学的特徴. 日本臨床増刊「関節リウマチ」(in press)

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话题. Clinical Calcium. 19: 325-338. 2009

2. 学会発表

宇月美和、村井一範、石田陽治、佐々木喜子、越智隆弘、石井壽晴、澤井高志：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 98 回日本病理学会総会, 京都, 5 月

黒瀬理恵、一戸貞文、堀内三郎、黒瀬 顕、澤井高志、嶋村 正：変形性膝関節症の関節液由来間葉系細胞による軟骨修復に向けた検討. 第 24 回日本臨床リウマチ学会, 盛岡, 11 月

宇月美和、佐々木喜子、越智隆弘、澤井高志：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 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 東京, 4 月

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特になし

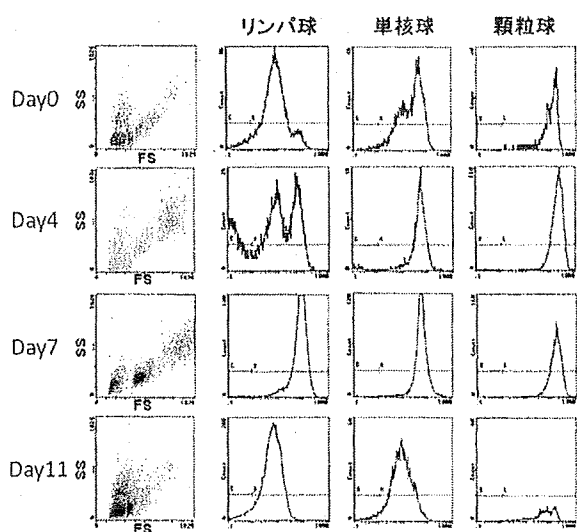


図1. 末梢血細胞分画および蛍光強度の解析
前方散乱光 (FS) と側方散乱光 (SS) で細胞を分画し、それぞれの細胞の GFP の蛍光強度を示した。

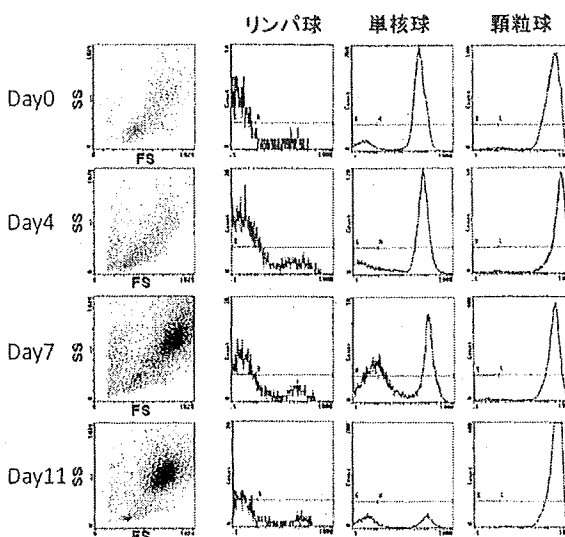


図2. 骨髄細胞分画および蛍光強度の解析
前方散乱光 (FS) と側方散乱光 (SS) で細胞を分画し、それぞれの細胞の GFP の蛍光強度を示した。

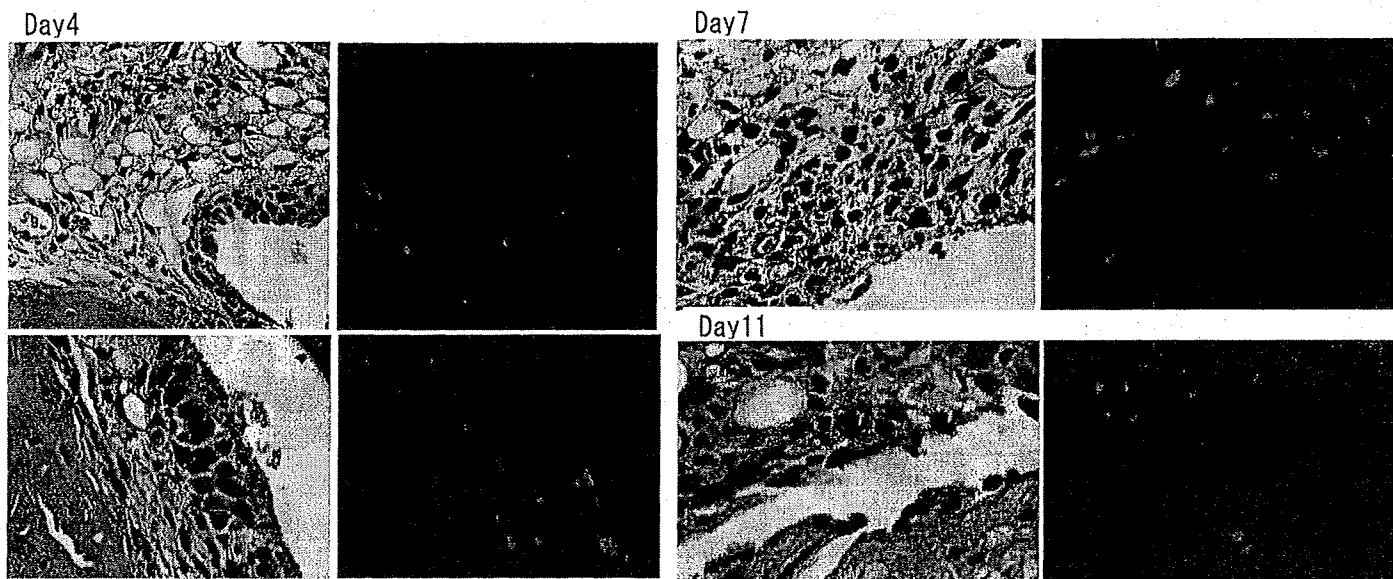


図3. GFP マウス骨髄移植マウスの関節炎誘導後の滑膜病変



図4. 関節炎誘導 GFP マウス骨髄細胞注射 7 日後のマウスの関節

関節リウマチ (RA) の炎症の慢性化機序とこれに関与する細胞の特徴、 特に骨髄細胞との関連について

分担研究者 澤井高志 岩手医科大学医学部 病理学講座 教授
研究協力者 鎌滝章央 岩手医科大学医学部 病理学講座 助教
研究協力者 村上賢也 岩手医科大学医学部 整形外科学講座 大学院生

研究要旨 関節リウマチ (RA) の滑膜組織にみられる線維芽細胞様滑膜細胞 (FLS) は、形態学的に紡錘形を示すが、細胞マーカー的には CD14、HLA-DR、CD68 など多彩な像を示し、場合によっては、CD14 を中心として複数のマーカーを発現している可能性が示された。このなかで、CD14 を発現する紡錘形細胞と類円形細胞の cell to cell contact あるいは Nursing 現象は RA の滑膜において特異的な像であり、変形性関節症 (OA) や外傷性炎症の滑膜ではほとんどみることができず、RA の慢性化炎症に結びつく現象ではないかと思われた。なお、これら FLS と骨髄との関係も現在、検討中であるが、RA では症例によって CD14、HLA-DR 陽性細胞の増加している骨髄もみられ、今後の検討課題である。

A. 研究目的

関節リウマチ (RA) は非特異的な炎症像をとるにも関わらず、炎症が慢性化し、症例によっては10年あるいは20年以上も継続する。したがって、その滑膜のなかにはこれを支持する機構が内蔵されていることが予想される。私たちは以前の実験結果から繊維芽細胞様滑膜細胞 (FLS) が関与する Nursing 現象に着目し、RA の炎症を慢性化させる原因の一つの現象ではないかと考えてきた。そこで、今回、この RA の FLS について、同じ非特異的な炎症性変化を示す慢性滑膜炎や変形性関節症 (OA) の滑膜と比較し、その特異性を明らかにすると同時に FLS の起源を明らかにするために骨髄にみられる細胞との関係を検討した。

B. 研究方法

RA、OA、非 RA の慢性の滑膜炎を光学顕微鏡、電子顕微鏡、免疫組織学的に解析した。光学顕微鏡、酵素抗体ならびに蛍光抗体法による免疫組織学的な解析では、検体を採取後 4%パラフォルムアルデヒドで 4 時間固定し、パラフィンに包埋した。その後、免疫組織学的な扱いでは、一次抗体、二次抗体を用いて反応し、DAB で発色した。カウンター染色としてヘマトキシリンを用いた。なお、酵素抗体法、蛍光抗体法には凍結切片を使用した。

電子顕微鏡的観察は、検体を採取後、2.5%グルタルアルデヒド、1%オスミウム酸で固定後、エポキシに包埋し、薄切したのち鉛とウランの二重染

色を施行したのち観察した。

C. 研究結果

光学顕微鏡的に、RA の滑膜では、表層滑膜細胞の多層化、血管の増生、リンパ球の浸潤、集簇を含む多彩な炎症性細胞の浸潤が認められたが、このなかで今回、研究の対象とする FLS も多数認められた。このなかで、形態学的に紡錘形細胞は滑膜の深部に多く、表層には多形性、類縁形の細胞が目立った (図 1)。

電子顕微鏡学的には滑膜組織での多彩な細胞像が示されたが、特に紡錘形細胞と類円形細胞の cell to cell contact の像、Nursing 現象が RA では特徴的であった (図 2、3)。後述するが紡錘形細胞は CD14 陽性細胞、HLA-DR 陽性細胞であり、類円形細胞は T、B あるいは粗面小胞体の発達した形質細胞であった (図 4、5)。

免疫組織学的にも多彩な反応性を示したが、リンパ球を除いてもっとも目立ったのは CD14 陽性細胞 (図 6)、HLA-DR 陽性細胞 (図 7)、CD3 陽性細胞であり、さらにこれについてマクロファージマーカーを有する CD68 陽性細胞 (図 8) が多数を占め、これらの細胞がリンパ球と並んで数量的には RA 炎症の主体をなしており、また同一細胞もこれらのマーカーを示していることが示唆された。なお、RA の滑膜組織では紡錘形の FLS が特徴的であるが、マーカーからみるとこれら FLS は CD14 (図 9)、HLA-DR (図 10)、CD68 が陽性となり、いわゆる FLS といわれる細胞も多彩な機

能を示すことが明らかになった。

一方、上記マーカーは紡錘形細胞以外でも陽性となり、細胞の形態とマーカーが示す機能との間に一致が明らかにできなかった。滑膜細胞で多数を占める CD14 陽性細胞と HLA-DR 陽性細胞について酵素電顕を施行した。その結果、いずれのマーカーでも紡錘形細胞、類円形細胞いずれも陽性となった。この結果、細胞形態とマーカーは必ずしも一致しないことが明らかになった。FLS については、単球系の CD14 陽性細胞、免疫系の HLA-DR 陽性細胞、マクロファージ系の CD68 陽性細胞など多機能を有することが明らかになった。

なお、蛍光抗体二重染色では、CD14 と CD68 がいずれも陽性となり、これらの細胞が両者のマーカーを発現していることが明らかになった (図 10)。この蛍光染色については現在、ほかのマーカーとも併せてなお検討中である。

一方、OA、外傷性炎症による非特異的肉芽組織では紡錘形を呈する FLS の数が究めて少数であり (図 11)、免疫組織学的にもこれらの細胞は証明されなかった。特に慢性滑膜炎の組織では炎症性細胞もかなり多いのにもかかわらず、紡錘形の FLS や CD14 陽性細胞や HLA-DR 陽性細胞は少なく、CD68 のマクロファージが認められた。したがって、RA の滑膜と慢性滑膜炎との大きな違いは、いずれも非特異的炎症像といわれ、細胞数はそれほど変わらないものの、RA 滑膜では FLS が多く cell to cell の Nursing 現象が目立ち、非 RA 滑膜炎ではこれらのような現象が少ないことであった。特に RA の滑膜で特徴的なのは、CD14 陽性細胞、HLA-DR 陽性細胞対類円形細胞の cell to cell の Nursing 現象であった。また、このような点から考えると、OA とは細胞の数、質からみても大きな違いが示された。

最後に、この FLS と骨髄との関係を検討した。その結果、骨髄に FLS は目立たなかった。また、CD14 陽性、HLA-DR 陽性細胞についても、OA ではあまり目立っていなかった。RA では症例によっては異なり、CD14 陽性、HLA-DR 陽性細胞の目立つ症例、目立たない症例が存在した。

D. 考察

今回の結果から示される問題点をいくつかあげてみた。まず、FLS は如何なる特徴をもつ細胞かが形態学的にも機能的にも大きな問題点である。ほかの問題点は FLS で認める Nursing 現象は RA で特有なのかあるいは他の関節障害でもみられるかどうか、また、Nursing 現象とは何を行っているのか、そして、この細胞の骨髄との関係はどうかである。

今回の結果では、Nursing を呈している紡錘形の

細胞は CD14 陽性、HLA-DR 陽性そして CD68 陽性細胞であった。このことから FLS が一種類の細胞ではなく、いくつかの機能を有する細胞の集団であることが証明された。造血幹細胞から生じる末梢血中の CD14 陽性単球はマクロファージや樹状細胞、破骨細胞などへの分化能を持つことが知られており、また、線維芽細胞様の形態の多分化能をもつ CD14 細胞の存在も報告されている¹⁾。CD14 陽性細胞からの分化として、サイトカイン産生の盛んな CD14 陽性、CD16 陽性細胞がケモカインによって遊走すること^{2,3)}や CD14 陽性細胞から TNF- α によって樹状細胞が誘導されるという報告もある⁴⁾。一般に分化した樹状細胞は CD14 陰性であるが、それとは異なるものも存在するのかもしれない。

病変部に存在する FLS にみられた機能は類縁形の細胞でも発現されており、形に関係なかった。したがって、FLS と一口にいても形態的にも様々な種類の細胞から成り立っていることが示された。一つのマーカーを基準にして観察すると、あるマーカーが陽性な細胞でも、その形は紡錘形であったり類円形であったり多彩であった。

Nursing 現象は一体如何なる機能を有しているかという点については不明であるが、RA の nurse 様細胞が B 細胞の反応性の亢進に機能することが示唆されていることから⁵⁾、おそらく細胞間での情報交換ではないかと思われる。RA ではかなり高頻度に見られるのに対し、OA あるいは、RA と同じ非特異的炎症と称される non-RA の慢性滑膜炎にみられないというのも興味のある現象である。なお、この Nursing 現象を起こしている二つの細胞を電子顕微鏡的に観察すると二つの細胞が融合 (fusion) しているようにみえる。immunological synapse における細胞膜融合の報告があることから⁶⁾、同様の現象が Nursing を呈している FLS とリンパ球の間におこっているのか、現在、この点について連続切片の電子顕微鏡画像を解析中である。

最後にこの滑膜組織にみられる FLS と骨髄との関係である。FLS の多くが CD14 を発現することからこの細胞の起源が骨髄にあることは十分考えられる。しかし、数例の RA 患者の骨髄組織について CD14、HLA-DR、CD68 などで免疫染色を施行してもあまり大きな違いは認められなかった。但し、2 例ほどで CD14 陽性細胞、HLA-DR 陽性細胞が明らかに増加している骨髄組織があった。これは、患者の炎症状態が亢進している可能性もあるが、今後の課題である。一般には骨髄で CD14 陽性細胞が増えているという事実は証明されない。やはり、この点については stem cell からの分化というものを観察していく必要があると

思われる。そのなかに RA の滑膜に増加する CD14 陽性細胞、HLA-DR 陽性細胞の元になる細胞が増加している可能性がある。現在、CD14 から次の分化としては CD16 などが考えられているが、これは分化過程であるが、一連の細胞動態として興味ある現象であり、今後、これらのラインに沿って骨髄細胞からの分化、滑膜への浸潤などをモデル動物を用いながら検討していく予定である。

E. 結論

RA の滑膜組織にみられる FLS は、細胞マーカー的には CD14、HLA-DR、CD68 など多彩な像を示し、CD14 を中心として複数のマーカーを発現している可能性が示された。CD14 を発現する紡錘形細胞と類円形細胞の cell to cell contact あるいは Nursing 現象は OA や外傷性炎症の滑膜ではほとんどみることができない RA 滑膜特異的な像であった。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshida W, Uzuki M, Nishida J, Shimamura T, Sawai T: Examination of *in vivo* gelatinolytic activity in rheumatoid arthritis synovial tissue using newly developed *in situ* zymography and image analyzer. Clin Exp Rheumatol. 27: 587-593(2009)
2. 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话题。Clinical Calcium. 19(3): 33(325)-46(338)(2009)
3. 澤井高志：関節と結合組織の構造と機能。改訂第7版 内科学書 Vol.2 (小川 聡；編)：136-8(2009)
4. Oikawa S, Kamataki A, Mimata Y, Shimamura T, Sawai T: Expression of BV8 in synovium from rheumatoid arthritis patients. Ann Rheum Dis. 68(suppl 3): 731(2009)
5. Mimata Y, Kamataki A, Oikawa S, Shimamura T, Sawai T: Expression of ADAMT-4 and ADAMT-5 by IL-6 stimulation in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 68(suppl3): 730(2009)

2. 学会発表

1. 菅野祐幸、澤井高志：Epstein-Barr

virus(EBV)陽性NK細胞株による培養血管内皮細胞傷害。第53回日本リウマチ学会総会・学術集会。4月。東京(2009)

2. 及川伸也、鎌滝章央、三又義訓、西田 淳、嶋村 正、澤井高志：関節リウマチ患者滑膜における Bv8 の遺伝子発現の検討。第53回日本リウマチ学会総会・学術集会。4月。東京(2009)
3. 三又義訓、鎌滝章央、及川伸也、西田 淳、嶋村 正、澤井高志：関節リウマチ患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞に対する IL-6 刺激による蛋白分解酵素 ADAMTS-4, ADAMTS-5 の発現動態。第53回日本リウマチ学会総会・学術集会。4月。東京(2009)
4. 宇月美和、佐々木喜子、越智隆弘、澤井高志：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53回日本リウマチ学会総会・学術集会。4月。東京(2009)
5. 佐々木喜子、宇月美和、能見健司、西田 淳、駒ヶ嶺正隆、嶋村 正、澤井高志：関節リウマチ患者の血中ヒアルロン酸分子量。第53回日本リウマチ学会総会・学術集会。4月。東京(2009)
6. 三又義訓、鎌滝章央、及川伸也、西田 淳、嶋村 正、澤井高志：関節リウマチ患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞に対する IL-6 刺激による蛋白分解酵素 ADAMTS-4、ADAMTS-5 の発現動態。第53回日本リウマチ学会総会・学術集会。4月。東京(2009)
7. 宇月美和、村井一範、石田陽治、佐々木喜子、越智隆弘、石井壽晴、澤井高志：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98回日本病理学会総会。5月。京都(2009)
8. 澤井高志：RA における関節破壊の病理学的特徴。第46回新潟リウマチ研究会。10月。新潟(2009)
9. 及川伸也、鎌滝章央、三又義訓、嶋村 正、澤井高志：関節リウマチ滑膜における Bv8 の発現の検討。第16回岩手県自己免疫疾患研究会。11月。盛岡(2009)
10. 三又義訓、鎌滝章央、及川伸也、嶋村 正、澤井高志：関節リウマチ患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞に対する Interleukin-6 刺激による蛋白分解酵素 ADAMTS-4, ADAMTS-5 の発現の変化の解析。第16回岩手県自己免疫疾患研究会。11月。盛岡(2009)
11. 黒瀬理恵、一戸貞文、堀内三郎、黒瀬 顕、澤井高志、嶋村 正：変形性膝関節症の関節液由来間葉系細胞による軟骨修復に向けた検

討. 第 24 回日本臨床リウマチ学会. 11 月.
盛岡(2009)

H. 知的財産権の出願、登録状況
特になし

I. 参考文献

1. Seta N, Kuwana M: Human circulating monocytes as multipotential progenitors. *Keio J Med.* 56: 41-47(2007)
2. Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, Morita Y, Okamoto A, Kawashima M, Iwahashi M, Ueno A, Ohmoto Y, Makino H: CD14⁺, CD16⁺ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arth Rheum.* 46: 2578-86(2002)
3. Yano R, Yamamura M, Sunahori K, Takasugi K, Yamana J, Kawashima M, Makino H: Recruitment of CD16⁺ monocytes into synovial tissues is mediated by fractalkine and CX3CR1 in rheumatoid arthritis patients. *Acta Med Okayama.* 61: 89-98(2007)
4. Iwamoto S, Iwai S, Tsujiyama K, Kurahashi C, Takeshita K, Naoe M, Masunaga A, Ogawa Y, Oguchi K, Miyazaki A: TNF- α drives human CD14⁺ monocytes to differentiate into CD70⁺ dendritic cells evoking Th1 and Th17 responses. *J Immunol.* 179: 1449-57(2007)
5. 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.* 102: 606-618(1998)
6. Rechavi O, Goldstein I, Vernitsky H, Rotblat B, Kloog Y: Intercellular transfer of oncogenic H-Ras at the immunological synapse. *PLos One* 11: e1204(2007)

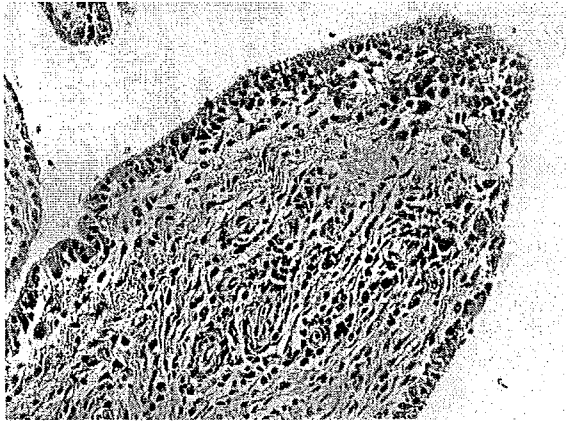


図 1. RA 滑膜の HE 染色像。
 表層滑膜細胞の多層化、血管の増生、リンパ球の浸潤、
 集簇を含む多彩な炎症性細胞の浸潤が認められた。形
 態学的に紡錘形細胞は滑膜の深部に多く、表層には多
 形性、類縁形の細胞が目立った。

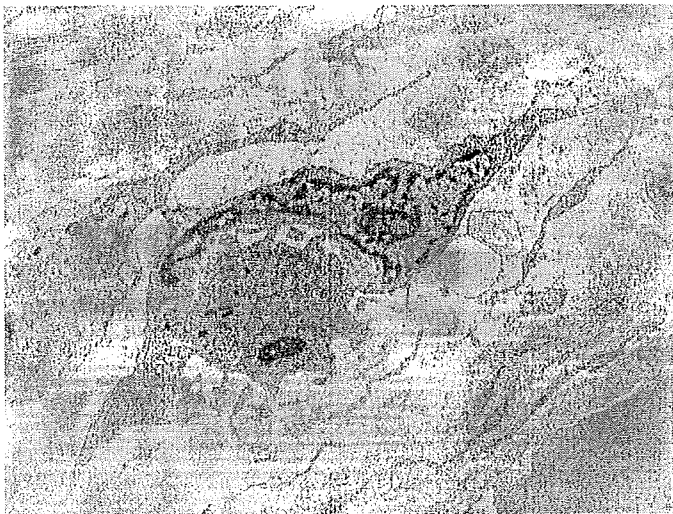


図 2. 電子顕微鏡による RA 滑膜の Nursing 現象。(弱
 拡大)



図 3. 電子顕微鏡による RA 滑膜の Nursing
 現象 (強拡大)



図 4. 酵素電顕像。CD14 陽性細胞
 RA 滑膜を酵素電顕により観察すると、紡錘形
 細胞は CD14 や HLA-DR が陽性となった。

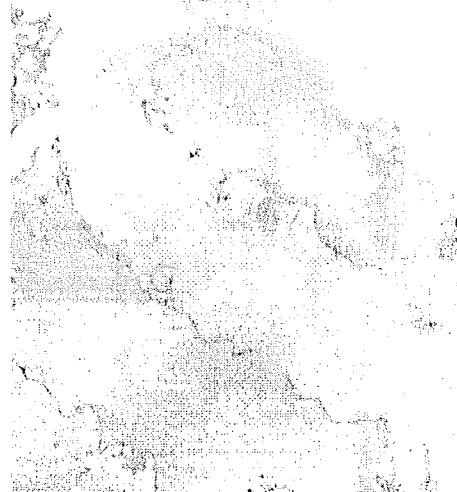


図 5. 酵素電顕像。HLA-DR 陽性細胞

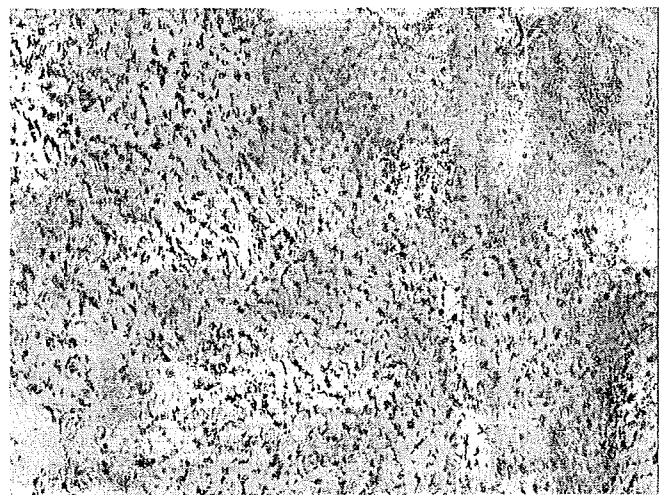


図 6. RA 滑膜の免疫染色。CD14。

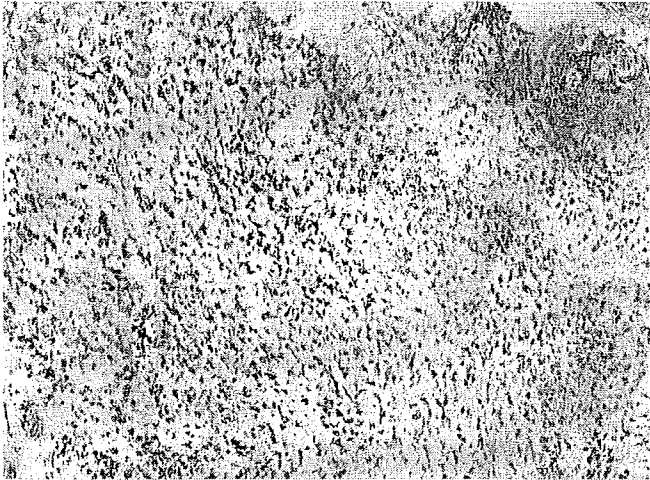


図 7. RA 滑膜の免疫染色。HLA-DR

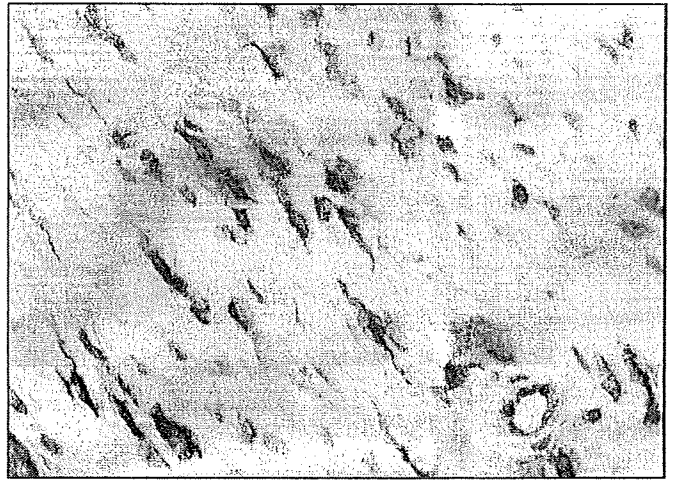


図 10. RA 滑膜の免疫染色。HLA-DR

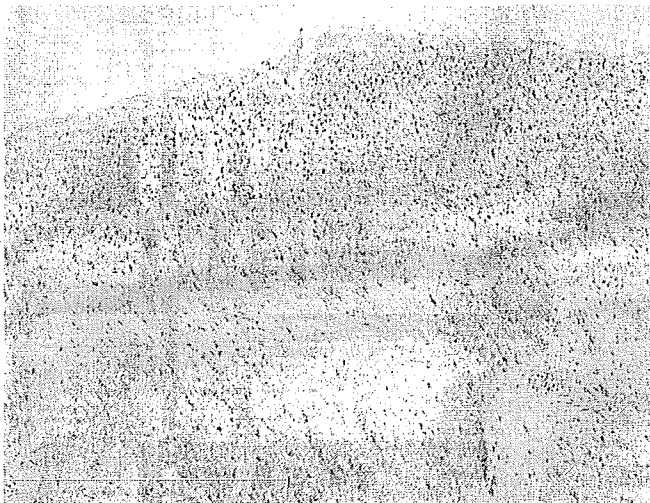


図 8. RA 滑膜の免疫染色。CD68

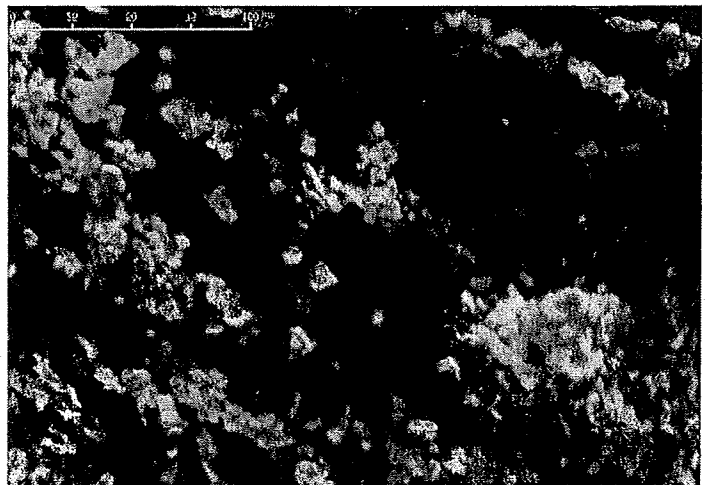


図 11. 蛍光二重染色。CD14 と CD68
CD14-Alexa488 と CD68-Alexa568 により二重染色を行うと両者を発現する細胞を認めた。

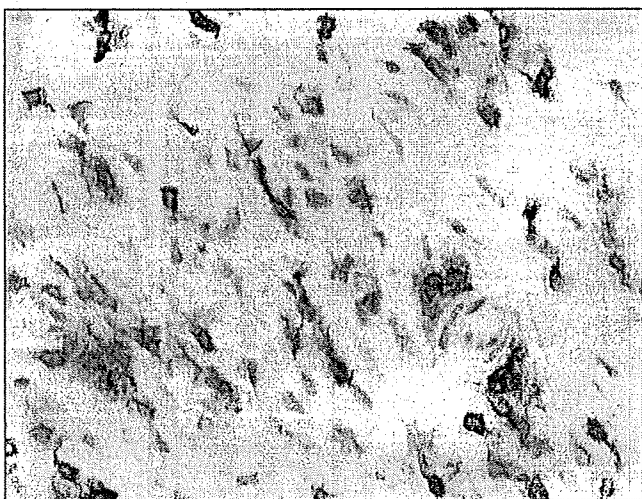


図 9. RA 滑膜の免疫染色。CD14。(強拡大)
FLS は CD14 や HLA-DR が陽性となる。

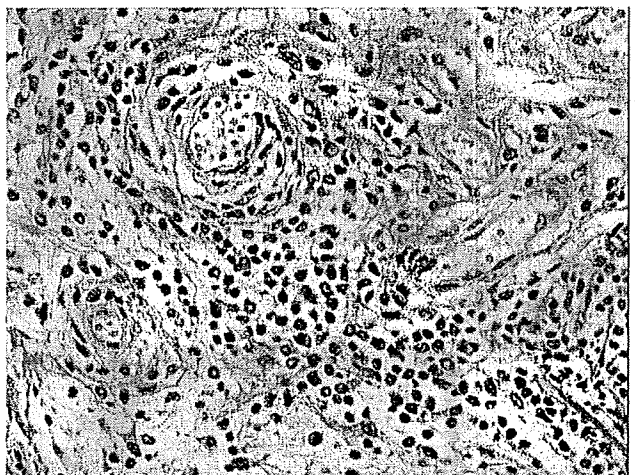


図 12. OA が原因の慢性滑膜炎。HE 染色像。
類円形細胞が目立ち、FLS は極めて少数であった。

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)
分担研究報告書

関節リウマチ滑膜における血管新生因子 Bv8/Prokineticin 2 の発現に関する研究

分担研究者	澤井高志	岩手医科大学医学部	病理学講座	教授
研究協力者	鎌滝章央	岩手医科大学医学部	病理学講座	助教
研究協力者	及川伸也	岩手医科大学医学部	整形外科科学講座	大学院生

研究要旨

血管新生因子 Bv8 の関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) 滑膜での発現を検討した。in situ hybridization、免疫組織化学染色の結果、RA 滑膜の sublining layer の多彩な細胞が陽性であった。また、RA、変形性関節症、外傷後滑膜群間での Bv8 mRNA の発現量を real-time PCR 法を用いて比較したところ、RA 群で有意に高く発現していた。Bv8 が血管新生等の機能を介して RA の病態に寄与している可能性が示された。

A.研究目的

軟骨の関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) は病理学的には、滑膜細胞の多層化、炎症性細胞浸潤、軟骨・骨破壊、血管新生等の特徴がある。新生血管はパルスへの酸素や栄養分の供給路、炎症性細胞や炎症性サイトカインなどの到達路となることで、炎症を継続させパルスの増殖を支えており、重要な役割を担っている。Bv8 は Prokineticin 2 とも呼ばれ、近年血管新生因子としての機能を持つことが報告されたタンパクである。最初にモルモットの小腸を収縮させる機能が報告され、その後、神経新生、サーカディアンリズムの調節、ホルモン放出、血管新生などにも働くことが明らかにされている。Bv8 と関節炎の関連について、関節炎モデルマウスの滑膜と骨髄に Bv8 が高く発現しているという報告はあるものの、ヒトの RA と Bv8 との関連を示した報告はまだない。本研究では RA と Bv8 との関連を明らかにすることを目的として、RA 滑膜における Bv8 の発現と局在を解析した。

B.研究方法

対象は RA (18 例)、変形性膝関節症 (osteoarthritis; OA) (13 例)、膝外傷後 (9 例) 患者膝滑膜で、RA と OA 滑膜は人工膝関節全置換術、膝外傷後滑膜は関節鏡視下手術の際に採取した。

1) in situ hybridization (ISH)

プローブは DIG 標識 RNA プローブを合成して使用した。ISH ではベンタナ HX システム ディスカバリー (Roche, Ltd., Basel, Switzerland) を使用した。標準的なプロトコルを用い、プローブ濃度は 50ng/slide、ハイブリダイゼーション条件は 61°C、6 時間とした。プローブを検出するために、1 次抗体として HRP 標識抗 DIG 抗体、2 次抗体としてビオチン標識抗 HRP 抗体を反応させた後、NBT/BCIP で発色

した。

2) 免疫組織化学染色

採取した滑膜を固定した後、パラフィン切片を作製した。1 次抗体として Prokineticin 2 Antibody (Novus Biologicals, Littleton, USA)、2 次抗体としてビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体を使用した。DAB で発色した。

3) real-time PCR

各滑膜組織から total RNA を抽出し、cDNA を合成した。それを鋳型にして real-time PCR を行ない、各群での Bv8 mRNA の発現量を比較した。内在性コントロール遺伝子として β -actin を使用した。

4) 統計処理

有意差検定は Mann-Whitney's U test with Bonferroni 検定を用い、 $p < 0.05$ 以下を有意差ありと判定した。

倫理面への配慮

本研究は岩手医科大学倫理委員会の承認ならびに十分なインフォームドコンセントの上、書面による患者の同意を得て採取した検体を使用した。

C.研究結果

1) ISH の結果、低倍率では表層よりやや深層の sublining layer から深層にかけて陽性細胞を認めた (図 1 A)。高倍率では陽性細胞はマクロファージ様の大型の細胞や紡錘細胞、好中球と思われる細胞であった (図 1 D, E)。新生血管周囲の細胞や内皮細胞での発色は認めなかった。OA や外傷後滑膜でも同様の検討を行なったが、陽性細胞はほとんどみられなかった。

2) 免疫組織化学の結果、低倍率では、ISH と同様に sublining layer から深層に発色を認め (図 2 A)、高倍

別紙①

率では多彩な細胞での発色を確認できた (図 2 C, D)。3)real-time PCR の結果を OA 群の平均値を 1 として比較検討した。外傷後群で中央値 0.38(0.15-0.93)、OA 群で中央値 0.78 (0-2.82)、RA 群で中央値 2.05 (0.22-97.35)であった。外傷後群では全体的に発現が低かった。一方、RA 群では外傷後群 ($p=0.005$) や OA 群 ($p=0.029$) と比較して有意に高い Bv8 の発現がみられた (図 3)。

D. 考察

Bv8 は RA 滑膜の sublining layer の多彩な細胞で発現しており、さらに外傷後滑膜や OA 滑膜と比較して RA 滑膜で有意に高く発現していることが示された。RA 滑膜における VEGF や Angiopoietin 等の血管新生因子は、表層の滑膜細胞、マクロファージ様細胞、紡錘形細胞と血管内皮細胞や血管内皮細胞の周囲で発現していると報告されている。Bv8 はこれらとは異なった局在を示しており、新生血管に対して Bv8 が VEGF や Angiopoietin とは違った機能をもつ可能性が考えられる。real-time PCR による検討により、RA 群の滑膜で外傷後群や OA 群と比較して有意に高く Bv8 が発現していることが明らかになった。しかし、RA の症例間で発現量に大きな差異がみられた。この要因を検討するために症例の組織学的評価、臨床的評価を行なったが、明確な発現量との関連性は認められなかった。症例数を増やすことで何らかの傾向を見出すことができる可能性があるが、この点は今後の検討課題である。本研究により Bv8 が RA の病態に血管新生などを介して機能している可能性が示された。

E. 結論

RA 滑膜に Bv8 が高く発現しており、血管新生などの機能を介して RA の病態に寄与している可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

及川伸也, 鎌滝章央, 三又義訓, 村上賢也, 澤井高志. 関節リウマチにおける Bv8 の発現. 岩手医学雑誌 62(1); 2010: (in press)

Oikawa S, Kamataki A, Mimata Y, Shimamura T, Sawai T: Expression of Bv8 in synovium from rheumatoid arthritis patients. Ann Rheum Dis. 68(Suppl3): 731. 2009

2. 学会発表

及川伸也, 鎌滝章央, 三又義訓, 西田 淳, 嶋村 正, 澤井高志: 関節リウマチ患者滑膜における Bv8 の遺伝子発現の検討. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 東京, 4 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし