

201023002B(1/2)

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20年度～平成22年度 総合研究報告書

(1/2分冊)

研究代表者 越 智 隆 弘

平成23(2011)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20年度～平成22年度 総合研究報告書

(1 / 2分冊)

研究代表者 越 智 隆 弘

平成23 (2011) 年3月

目 次

I. 総合研究報告書

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	
関節リウマチ慢性化の責任細胞に関する研究	14
岩手医科大学医学部 病理学講座 教授 澤井高志	
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	22
京都大学大学院医学研究科 遺伝学 教授 長田 重一	
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	25
大阪大学大学院医学系研究科 内分泌代謝内科学 教授 下村伊一郎	
関節リウマチの疾患誘導因子の解明	26
大阪大学大学院医学系研究科 整形外科学 教授 吉川秀樹	
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	31
行岡医学研究会 行岡病院 副院長 島岡 康則	
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	35
大阪大学医学系研究科 教授 大和谷 厚	
RA 患者骨髄液の網羅的解析から選択された LIGHT/TNFSF14 の病態形成への関与	38
国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 室長 鈴木 隆二	
関節リウマチ・骨粗鬆症の重症化防止治療開発研究	40
熊本大学生命資源研究・支援センター 教授 山村 研一	
DNA マイクロアレイとバイオインフォマティクスを用いた RA 関連遺伝子の解析	43
和歌山県立医科大学 免疫制御学講座 教授 西本憲弘	

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総合研究報告書

(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

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）
（総合）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。平成 20-22 年度の内容を以下に記す。Ⅰ) 動物実験による RA 骨髄病巣説の裏づけ研究；(i)放射線照射 C57BL/6 マウスに GFPTg マウス由来骨髄細胞を移植、生着後に発症するヒト RA 様多発関節炎の細胞病態解析が進められた。(ii) SCID マウスに重症 RA 患者の骨髄を移入して観察したが、軽度の関節炎にとどまっている。(iii)DNase II 欠損マウスに於ける自然発症関節炎研究。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た。TNF-α、IL-6 は発症に必須であるが、リンパ球は関節炎の抑制に働くことが示唆された。Ⅱ) RA 骨髄中の CD14(+)単球・マクロファージ系細胞による病態解明研究；RA 患者の骨・軟骨浸蝕部位の滑膜部位の免疫電顕写真にて、リンパ球を抱きこんでいるナース様細胞は CD14+細胞であることが示された。Ⅲ) RA 特異的なナース細胞抑制機能をもつ根治療法開発研究；RA 病巣形成の主病因となるナース様細胞に対する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。更に、抗 C1q モノクロー抗体が結合するエピトームを含む低分子ペプチドの関節炎発症を抑制することが示された。Ⅳ) RA 骨髄細胞から選択された新規遺伝子解析研究；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。Ⅴ) RA 骨髄細胞遺伝子の機能解析研究；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亢進の引き金が引かれている可能性が示された。

研究分担者 澤井 高志 岩手医科大学医学部 病理学講座先進機能病理学分野 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研究科 分子生物学 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
研究協力者 鎌滝 章央 岩手医科大学医学部 病理学講座先進機能病理学分野 助教
橋本 淳 国立大学法人大阪大学医学系研究科 整形外科学 准教授

桑名 正隆 慶応義塾大学医学部 リウマチ内科 准教授
 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
 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
 梶座 康夫 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 骨髄病巣説に関する動物実験系による裏づけ研究、(II) RA 病巣形成の最重要細胞と考えられるナース様細胞の抑制物質、疾患予後予測因子などの創薬開発研究、(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研究、(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研究などにより、病態解明・根治療法開発を進めることである。

B, 研究方法

I) 動物実験による RA 骨髄病巣説の裏づけ研究

- (i) GFP トランスジェニック (Tg) マウス由来骨髄細胞を用いての研究 (澤井研究分担者); 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、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、ヒト RA との比較を行った。
- (ii) 重症 RA 患者骨髄細胞のマウスへの移入実験 (鈴木研究分担者); IC の

上で重症活動期の RA 患者から採取した骨髄細胞を C.B-17/Icr-scidJcl マウスに移入し、経時的な関節病態変化を観察した。

- (iii) DNase II 欠損マウスによる自然発症関節炎の機序解明研究 (長田研究分担者); 長田研究分担者らによって開発された DNase II 欠損マウスでは骨髄に未分解の細胞核蓄積により骨髄マクロファージ [CD14(+)] のアポトーシスが障害され自然発症的に関節炎が起きることが見出されていた。この関節炎発症機序解明のために IL-6, TNF α 遺伝子欠損マウス、あるいはリンパ球が産生されない Rag2 遺伝子欠損マウスなどの掛け合わせや、IL-1 受容体抗体投与などの条件で発症機序解明が進められた

II) RA 骨髄中の CD14(+) 単球・マクロファージ系細胞による病態解明研究、

- (i) RA 滑膜および骨髄中の CD14(+) 特異的線維芽細胞様細胞 (ナース) 細胞の病態解明; RA の滑膜と骨髄血クロットの免疫組織化学と電顕酵素抗体法により OA と比較解析した (澤井研究分担者)。
- (ii) 破骨細胞分化の多様性について; S100 ファミリーの内、S100A4 を選択して破骨細胞病態に対する機能を解析した (西本研究分担者)。

III) RA 特異的なナース細胞抑制機能をもつ根治療法開発研究

- (i) アディポネクチン (Adipo); 前期迄に関節炎抑制効果が見出されていた Adipo と、構造類似の補体 C1q の直接的な結合、血液中の補体活性化に対する作用を解析した (下村研究分担者)。
- (ii) オステオポンチン(OPN); RA と非 RA 患者の線維芽細胞様細胞 (FLS) と、B 細胞株 MC/Car を用い、OPN 発現を評価した。また、FLS の細胞表面での OPN 発現をウェスタンブロットにて、FLS 培養上清の IL-6 濃度を ELISA にて評価した。FLS 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、B 細胞との共培養、培養上清の IL-6 濃度を測定した (吉川研究分担者)。
- (i) C1q; 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 の系により定量し、RA の重症度との関連を解析した (島岡研究分担者)。
- (ii) 上記の抗 C1q 抗体が結合するエピトープ解析から新規低分子ペプチドを合成し、コラーゲン関節炎ラットを用いて関節炎抑制効果を調べた (吉川研究分担者)。
- (iii) ヒスタミン(His); マウス活性型マクロファージ株 RAW264.7 細胞内の TNF α mRNA 発現レベルのヒスタミンによる影響を調べて、この作用に対する His 拮抗薬の効果を検討した (大和谷研究分担者)。

IV) RA 骨髄細胞から選択された新規遺伝子

解析研究

(鈴木研究分担者、越智主任研究者)。

- (i) SHPS-1/SIRP-A の遺伝子からの蛋白とモノクローナル抗体を作成し、特にヒト CD14(+)細胞 (単球) 由来破骨細胞誘導系における効果を解析した (鈴木研究分担者)。
- (ii) 遺伝子改変マウス作成; EEF1 α 1、Sulfatase、OLR1 については通常の方法でトランスジェニック (Tg) マウスは作製された。Tnfsf14、Granulin、Sirpa の Tg マウスではファウンダーが得られないか、もしくは精巣が萎縮して次世代が得られなかったが、手法を変えて進めてきた (山村研究分担者)。
- (iii) 遺伝子改変マウスによる解析; 順次得られた遺伝子改変マウスに関して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た (澤井研究分担者)。

V) RA 骨髄細胞遺伝子の機能解析研究

- (i) 9 例の 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 (Affymetrix 社 Genechip®) を用いて網羅的に測定し、10 例の OA 患者のそれと比較してバイオインフォーマテックス・ツールで比較検討した (西本研究分担者)。
- (ii) 同手法によって、DNase II 欠損マウスの関節炎発症に関連する遺伝子ネットワークの機能的解析を進めた (西本研究分担者、長田研究分担者)。

(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。

C. 研究結果

I) 動物実験による RA 骨髄病巣説の裏づけ研究

- (i) GFP トランスジェニック (Tg) マウス由来骨髄細胞を用いての研究；GFPTg マウス由来骨髄細胞移入のマウスに関節炎誘導後 4 日目から骨髄中の骨髄球系細胞、リンパ球系細胞の急激な誘導が認められた。GFP 陽性細胞は 4 日目から関節組織内に認められ始め、7 日目には多数が滑膜組織内に認められ、11 日目には骨破壊病巣に骨髄由来細胞が認められた。
- (ii) 重症 RA 患者骨髄細胞のマウスへの移入実験；RA 患者骨髄細胞注入 4 週後のマウスにおいて、4 匹中 2 匹のマウスの膝関節に滑膜肥厚、軟骨変性、骨粗鬆化が観察された。
- (iii) DNase II 欠損マウスによる自然発症関節炎の機序解明研究；DNase II 欠損マウスに於いて多発関節炎が起きる機序は骨髄に集積した M ϕ [CD14(+)細胞] に未分解の細胞核が蓄積したことによるアポトーシ

ス障害が主病態であった。このマウスに自然発症的に起きる多発関節炎は IL-6, TNF α 遺伝子欠損マウスと掛け合わせた時、また、IL-1 受容体抗体投与などの条件では関節炎発症は抑えられた。一方、リンパ球が産生されない Rag2 遺伝子欠損マウスなどとの掛け合わせでは関節炎は悪化し、リンパ球による関節炎抑制効果が示唆された。

II) RA 骨髄中の CD14(+)単球・マクロファージ系細胞による病態解明研究、

- (i) RA 滑膜および骨髄中の CD14(+)特異的線維芽細胞様細胞（ナース）細胞の病態解明；RA 病巣には CD14(+)細胞や HLA-DR (+)細胞が多く認められた。CD14(+)細胞の免疫電顕写真の中にはリンパ球を抱き込んだナース様細胞も認めた。非特異的肉芽組織にはこれらの細胞を認められなかった。
- (ii) 破骨細胞分化の多様性について；RA モデルマウスにおいて破骨前駆細胞から破骨細胞形成まで S100A だけが終始強発現していた。SiRNA により S100A4 発現阻害により破骨前駆細胞からの細胞融合・巨核化が阻害された。

III) RA 特異的なナース細胞抑制機能をもつ根治療法開発研究。

- (i) アディポネクチン (Adipo)；Adipo と C1q は濃度依存性の結合が認められた。しかし、固相化した免疫複合体に C1q が結合する反応には Adipo の直接的抑制効果は認められず、補体活性化以外の抑

- 制機序によるものと考えられる。
- (ii) オステオポンティン(OPN);全ての FLS で 54kD に OPN の double band が検出されたほか、全ての RA 患者由来の FLS と、3 例の非 RA 患者由来の FLS で、75kD の band が検出された。OPN 発現ベクターの導入後に B 細胞と共培養したところ、75kdOPN+ FLS では OPN 過剰発現により有意に培養上清中 IL-6 濃度が上昇した ($p<0.001$) が、75kdOPN- FLS では有意な差を認めなかった。さらに 75kdOPN+ FLS に OPN siRNA またはコントロール siRNA を導入し同様に培養上清中 IL-6 を測定したところ、OPN ノックダウンにより有意な低下を認めた ($p<0.001$)。
- (iii) C1q ; 新たに得た抗 C1q モノクロー抗体を用いた ELISA により、重症 RA 患者患者の血中濃度は軽症 RA 患者に比して有意の高値 ($P=0.0022$) を示した。他の臨床検査値とは相関しないユニークな値を示し、RA の重症度予後診断可能と考えられた。
- (iv) 抗 C1q 抗体が結合するエピトープ解析から新規低分子ペプチドを合成しコラーゲン関節炎ラットの発症処置後 12 日目から腹腔内に投与すると関節炎発症の抑制、特に骨破壊病変部での Reactive oxygen species、MCSF の抑制に伴って破骨細胞分化が抑制された。
- (v) ヒスタミン(His) ; マウス M ϕ 株、

RAW264.7 細胞内の TNF α mRNA 発現レベルは His により濃度依存性に有意に抑制され、この作用は予め H4R アンタゴニストの JNJ7777120 を添加することによって用量依存的に阻害された。His が M ϕ の H4 受容体を介して TNF α 発現を抑制するためと考えられた。

IV) RA 骨髄細胞から選択された新規遺伝子解析研究

- (i) SHPS-1/SIRP-A 遺伝子関連の病態解析から治療薬開発へ ; ヒトの SHPS-1/SIRP-A に対するモノクローナル抗体をヒト破骨細胞誘導を用量依存性に抑制する抗体を 2 個、破骨細胞形成増強効果を示す抗体を 2 個得た。抑制効果を示すモノクロー抗体は SHPS-1 の 40 番目の D から 145 番目の R までを認識していた。
- (ii) 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病態解析研究が行われてきた。Tnfsf14 に関しては、CLIP promoter-cre-ERT2 と、CEG promoter-lox-CAT-lox とを作成し夫々のトランスジェニックマウスを作り、交配させる、tamoxifen を投与すると Tnfsf14 が発現ようになる。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。殖やして骨・軟骨形成・破壊機序解析へと進めた。

- (iii) 遺伝子改変マウスによる解析；他の遺伝子改変マウスではまだ明瞭な変化を確認できていないが、CXCL5 Tg マウスでは全般に滑膜組織の軽度の多層化、脾腫大などを認めた。その中の雄 1 匹に明瞭な滑膜炎を認めた。関節炎発症の素因に成り得ると考えられた。

V) RA 骨髄細胞遺伝子の機能解析研究

- (i) RA 患者の骨髄に発現が有意に増加している分子は「免疫」「細胞内シグナルカスケード」「蛋白のリン酸化」等などに関わる分子で、これらの機能異常が示唆された。次に「免疫」機能に関わる分子群のネットワーク解析から IFN 等が一つのネットワークとして描出され、その周辺部には IFN で誘導される分子群が見られ、RA 骨髄における IFN の活性増加が示唆された。MHC class I に分類される分子の発現が増加し、抗原提示機能の亢進が示唆された。
- (ii) この手法で、DNase II 欠損マウスの関節炎発症に伴う骨髄血遺伝子を解析したところ、RA 患者骨髄と同様に、IFN で誘導される分子群と MHC class I 分子群の発現が増加していた。

D, 考察

I) 動物実験による RA 骨髄病巣説の裏づけ研究；GFP トランスジェニック(Tg)マウス由来骨髄細胞の研究でも DNase II 欠損マウスによる自然発症関節炎でも多発関節炎発症の原因病巣として骨髄が示された。重症 RA 患者骨髄細胞のマウスへの移入実

験では host mouse に軽度の変化を生じたのみであったが、host の条件を検討する必要性が考えられた。

II) 骨髄中の CD14(+)細胞には、免疫電顕像によりナース様細胞も認められ、ナース様細胞が CD14(+)細胞由来であることが示唆された。ナース様細胞は我々が RA で見出した報告 (JCI 1998) に続いて、米国グループが白血病にも認め(Blood 2000)、CD14(+)に由来するらしいと報告(Blood 2002)した。RA においてもナース様細胞は多様な CD14(+)細胞の機能分化の 1 つと考えられた。また、DNase II 欠損マウスに発症する多発関節炎が骨髄における CD14(+)細胞のアポトーシス抑制により誘導される分子群により発症していることが示された。更にリンパ球は関節炎発症には関与せず、むしろ抑制的に働いていることが示された。骨髄における CD14(+)細胞の病態により多発関節炎が起きることが示された画期的な研究と考えている。

III) ナース細胞機能に関連する新規物質としてアディポネクチン、オステオポンティン、Clq 構造中の低分子ペプチド、ヒスタミンレセプターなど、RA 病態との関連を予測していなかった物質にナース様細胞や破骨細胞分化などの抑制効果があり、治療薬開発に向けての候補物質である。

IV) RA 骨髄細胞から選択された新規遺伝子の中で、SHPS-1/SIRP-A の分子構造中の部位によって、破骨細胞への機能的抑制効果と増強効果のシグナルを発信しており、分子構造を選択すれば治療薬開発の可能性が大きい。CXCL5、Tnfsf14、CCAR1、CXCL5 Tg マウス、MMP12KO マウス病態研究は続行中である。新たに選択された

S100A ファミリーは骨細胞分化の各ステージにおいて異なった発現パターンと機能を示すようだ。

V) RA 骨髄の遺伝子機能発現のプロフィールから RA 患者の骨髄細胞で免疫機能ネットワーク亢進の引き金がひかれることによって全身の免疫亢進が誘発される異常パターンが示されたことは、RA 患者の骨髄異常を示唆する所見である。DNase II 欠損マウスによる自然発症関節炎においても、RA 骨髄中と同様の遺伝子変化が認められたことは、RA 骨髄の主病巣説を強めると共に、DNase II 欠損マウスが RA のモデル動物として最適なものであることが示唆された。

E, 結論

- I) 多発関節炎モデル動物で示され、ヒトの腸骨遺伝子機能から示唆されたように、RA の主病巣は骨髄にあるという仮説が強く支持された。
- II) RA 骨髄や滑膜病巣に多数認められる CD14(+)細胞にはマース様細胞も含まれ、多彩な病態を形成する重要な病因細胞であることが示された。
- III) Adipo, OPN, His さらに C1q 分子の一部である低分子ペプチド、SHPS-1/SIRP-A などは有力な治療薬となり得る物質と判明した。

F, 研究発表

- 1、 論文発表 113 件
- 2、 学会発表 150 件

G, 知的財産権の取得状況

- 1、特許取得 国名：米国 出願日：2010 年 9 月 1 日
発明の名称：Method of screening a blood coagulation modulator

出願人：京都大学なし

- 2、実用新案特許 なし
- 3、その他 なし

関節リウマチ慢性化の責任細胞に関する研究

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	村上賢也	岩手医科大学医学部	整形外科講座	大学院生

研究要旨

関節リウマチ（rheumatoid arthritis, RA）では、長期にわたって炎症が持続するが、その責任細胞は明らかではない。本研究では RA 滑膜に多数存在する CD14 陽性（CD14⁺）細胞に着目し、その形態や機能を免疫化学染色、蛍光二重染色、電子顕微鏡を用いて解析した。また、責任細胞が骨髄細胞由来であると考え、GFP トランスジェニックマウスの骨髄移植マウスに誘導した関節炎での GFP 陽性細胞や、RA 患者由来骨髄細胞の SCID マウスへの注入の影響を解析した。その結果、骨髄細胞は関節炎に伴い様々な細胞に分化すること、RA 滑膜の CD14⁺細胞は様々な形態と機能を有しており RA における炎症の慢性化の中心的細胞の一つである可能性が示された。

A. 研究目的

関節リウマチ（rheumatoid arthritis, RA）は、病理学的には非特異的炎症に分類される。しかし、同様に非特異的炎症に分類される一般的な瘰癧などの肉芽組織と異なり数十年も炎症が持続する。このような長期にわたる炎症の持続が RA の病態の特徴であるが、どのような細胞がこのような炎症の持続に関与しているかについては明らかではない。本研究室でのこれまでの研究により、RA 滑膜組織に CD14 陽性（CD14⁺）細胞が数多く存在することが示されている。また、RA 患者骨髄では CD14⁺細胞の分化が亢進していることや、血中の CD14⁺単球は貪食細胞以外への多分化能をもつことも報告されている。そのため、CD14⁺細胞に由来する様々な細胞が RA の炎症に関わり、RA の炎症を特徴づけると考え、RA における CD14⁺細胞の役割を明らかにすることを目的とした。

また、RA の病態形成における骨髄由来細胞の滑膜での役割を明らかにすることや、RA の病態形成に関わると予想された遺伝子の関与について遺伝子組換えマウスを用いて明らかにすることも目的とし、研究を行った。

B. 研究方法

(1) RA 患者から得られた滑膜組織について非特異的肉芽組織を対照に用いて、免疫組織化学染色、蛍光二重染色、電子顕微鏡観察、免疫電顕を行い、CD14⁺細胞の形態と機能を解析した。

(2) 骨髄由来の細胞が病態形成に関連することを確認するために放射線照射後の 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、生着を確認後にカクテル抗体を用いて関節炎を誘導した。その後、骨髄、末梢血、滑膜組織の GFP 陽性細胞を解

析した。また、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 C57BL/6 マウスに注入し、関節炎を誘導するか解析した。

(3) RA 患者由来の骨髄細胞を SCID マウスに注射し、SCID マウスの関節に変化がどうかを解析した。

(4) RA と変形性関節症（OA）の骨髄や滑膜組織で発現の異なる遺伝子のうち、RA の病態と関係があると推測される遺伝子（EEF1A1, SULF1, OLR1, CXCL5, MMP12）の遺伝子組換えマウスの加齢あるいは関節炎誘導での関節の変化を野生型と比較検討し、遺伝子の過剰発現や欠損が病変形成に影響するか解析した。

（倫理面への配慮）

提供者に使用目的、データ管理について説明し、同意が得られた場合にのみ検体の提供をうけた。解析時や発表時には検体番号で扱い、個人名が第三者に知られないように配慮した。

動物実験については不必要に苦痛をあたえないように配慮した。

C. 研究結果

(1) RA 滑膜では非特異的肉芽組織と比較して類円形や紡錘形など様々な形態を示す CD14⁺細胞を多数認めた

（図 1, 2）。CD14 と CD68 あるいは HLA-DR の蛍光二重染色の結果、RA 滑膜における CD14⁺細胞の 32~52%で CD68 の発現が認められ、40~58%で HLA-DR の発現が認められた。それに対し、非特異的肉芽組織ではそれぞれ 11~24%、12~35%であった。このことから RA では多機能性を有する細胞の割合が著しく高いことが示された。電子顕微鏡による解析では、RA 滑膜では類円形や紡錘形細胞が混在し、多彩な像を示しており、至る所で

nurse-like cell (NLC)を認めた(図3)。一方、非特異的肉芽組織では、類円形細胞が主体をしめており、類円形細胞と紡錘形細胞の両方が存在している部位でもNLCは認めなかった。免疫電顕の結果、NLCの一部にはCD14の発現が認められた。また、電子顕微鏡像を詳細に検討した結果、類円形細胞とNLCが一部で融合している像を見ることができた。

(2) GFPマウス由来の骨髄細胞を移植したC57BL/6マウスに関節炎を誘導した結果、末梢血に先行して骨髄での好中球の増加が認められた(図4,5)。末梢血では誘導後4日目に好中球の割合が高くなり、リンパ球分画にGFP強陽性の細胞が認められた。関節域では4日目から類円形や紡錘形の形態を示すGFP陽性細胞がみられ、7日目、11日目には内皮細胞、線維芽細胞、破骨細胞になっていることが形態的に示唆された(図6)。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実験では、滑膜増生や炎症性細胞の浸潤は認められず、関節域にGFP陽性細胞も認めなかった(図7)。

(3)RA患者骨髄細胞をSCIDマウスに注入した実験では、疾患活動性が高い患者由来の骨髄細胞でのみ滑膜増生が認められたが、その頻度は低かった。放射線照射したSCIDマウスを用いた場合には、滑膜増生を誘導する頻度は照射しないものに比べ高くなった(図8)。

(4)関節炎誘導と加齢でEEF1A1トランスジェニックマウスおよびSULF1トランスジェニックマウスと野生型マウスとの間で著しい違いは認められなかった。OLR1トランスジェニックマウスの加齢による違いは認められなかった。CXCL5トランスジェニックマウスは脾臓が野生型に比べ大きく、肺や肝臓や腎臓で組織球の集簇が認められた。また雌1例でのみ顕著な滑膜増生が認められた(図9)。MMP12ノックアウトマウスは現在解析中である。

D.考察

RAは非特異的炎症ではあるものの通常的肉芽組織とは異なる特徴を持ち、CD14⁺細胞がRAの炎症を特徴づける中心的細胞であることが示唆された。この中にはNLCも含まれており、NLCと類円形細胞の相互作用や直接的な物質の移動によりRAに特徴的な炎症が引き起こされる可能性が示された。

一方、関節炎誘導実験では関節域に誘導された骨髄由来細胞が様々な細胞に分化することが示され、このことから骨髄由来細胞がCD14⁺細胞になり、関節域に到達し、特徴的な病変の形成に働くことが推測された。

RAの病態形成に関連すると思われる遺伝子のうち、CXCL5では組織球の集簇が認められ、1例で滑膜増生もみられたことから、病変が形成されやすい状態にあると考えられる。通常ではC57BL/6に関節炎を誘導でき

ない弱い誘導刺激を加えた実験でその点が確認できると考えている。

E.結論

RAにおいては骨髄由来のCD14⁺細胞が病態形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1. 論文発表

(国内)

1. 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)
2. 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。9-22(2008)
3. 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-。伊藤 浩行：編。日本エラスチン研究会。264-75(2008)
4. 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)
5. 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. 2(3): 168-73(2008)
6. 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): 325-338(2009)
7. 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)
8. 三又義訓、鎌滝章央、及川伸也、村上賢也、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とADAMTS-5の発現の変化の解析。岩手医学雑誌。62(2): 85-94(2010)
9. 及川伸也、鎌滝章央、三又義訓、村上賢也、澤井高志：関節リウマチ滑膜におけるBv8の発現。岩手医学雑誌。62(1): 37-45(2010)
10. 石黒直樹、岩館克治、澤井高志：実験的変形性膝関節症に対する高分子量ヒアルロン酸(平均分子量270万HA)スベニールと架橋型ヒアルロン酸(Hylan G-F20)SYNVISCの作用比較。関節外科。29(12): 112-124(2010)

11. 佐々木信人、鎌滝章央、澤井高志：全身性強皮症および類似疾患、肺病理。日本胸部臨床。69(3): 224-233(2010)
 12. 村上賢也、鎌滝章央、佐々木信人、澤井高志：関節破壊の病理組織学的特徴。日本臨床 68 (増刊号5)「関節リウマチ (第2版) -寛解を目指す治療の新時代-」: 65-70(2010)
 13. 菅野祐幸：臨床リウマチ医のための基礎講座 免疫担当細胞のクロナリティ。臨床リウマチ。22: 257-9(2010)
 14. 宇月美和、鎌滝章央、佐々木喜子、徳永勢二、澤井高志：関節リウマチにおけるヒアルロン酸の合成と分解について。臨床リウマチ。22: 337-43(2010)
 15. 菅野祐幸：第3章 全身におよぶ病態 2. 免疫・アレルギー疾患。症例 351 発熱、リンパ節腫脹、紅斑。ダイナミック病理学-365 症例からのアプローチ (鈴木利光、山川光徳、吉野 正監修)。西村書店。1004-5(2010)
 16. 澤井高志：第3章 全身におよぶ病態 2. 免疫・アレルギー疾患。症例 352 下肢の痛みおよび腫脹。ダイナミック病理学-365 症例からのアプローチ (鈴木利光、山川光徳、吉野 正監修)。西村書店。1006-7(2010)
 17. 菅野祐幸：第3章 全身におよぶ病態 2. 免疫・アレルギー疾患。症例 353 倦怠感および両手指の腫脹。ダイナミック病理学-365 症例からのアプローチ (鈴木利光、山川光徳、吉野 正監修)。西村書店。1008-9(2010)
 18. 澤井高志：第3章 全身におよぶ病態 2. 免疫・アレルギー疾患。症例 354 全身筋痛。ダイナミック病理学-365 症例からのアプローチ (鈴木利光、山川光徳、吉野 正監修)。西村書店。1010-11(2010)
 19. 澤井高志：第3章 全身におよぶ病態 2. 免疫・アレルギー疾患。症例 355 関節の痛みと変形。ダイナミック病理学-365 症例からのアプローチ (鈴木利光、山川光徳、吉野 正監修)。西村書店。1012-13(2010)
 20. 菅野祐幸：第3章 全身におよぶ病態 2. 免疫・アレルギー疾患。症例 356 発熱、末梢神経障害、血行障害。ダイナミック病理学-365 症例からのアプローチ (鈴木利光、山川光徳、吉野 正監修)。西村書店。1014-15(2010)
 21. 澤井高志：第3章 全身におよぶ病態 2. 免疫・アレルギー疾患。BOX2-1 薬剤アレルギー。ダイナミック病理学-365 症例からのアプローチ (鈴木利光、山川光徳、吉野 正監修)。西村書店。1016-17(2010)
 22. 澤井高志：第3章 全身におよぶ病態 2. 免疫・アレルギー疾患。症例 357 Raynaud 現象。ダイナミック病理学-365 症例からのアプローチ (鈴木利光、山川光徳、吉野 正監修)。西村書店。1018-19(2010)
 23. 菅野祐幸：第3章 全身におよぶ病態 2. 免疫・アレルギー疾患。症例 358 発熱、多彩な全身症状。ダイナミック病理学-365 症例からのアプローチ (鈴木利光、山川光徳、吉野 正監修)。西村書店。1020-23(2010)
 24. 菅野祐幸：第3章 全身におよぶ病態 2. 免疫・アレルギー疾患。症例 359 口腔粘膜アフタ性潰瘍、皮疹、下血。ダイナミック病理学-365 症例からのアプローチ (鈴木利光、山川光徳、吉野 正監修)。西村書店。1024-25(2010)
 25. 菅野祐幸：第3章 全身におよぶ病態 2. 免疫・アレルギー疾患。症例 360 発熱、発疹、粘膜の発赤、頸部リンパ節腫脹。ダイナミック病理学-365 症例からのアプローチ (鈴木利光、山川光徳、吉野 正監修)。西村書店。1026-27(2010)
 26. 佐々木信人、山内広平、長島広相、古和田浩子、中館俊英、中村 豊、内海 裕、鈴木奈緒美、秋山貞親、小林 仁、井上洋西、澤井高志：アレルギー性血管炎における血管リモデリングに対するイマチニブの効果。日本呼吸器学会雑誌。48: 158(2010)
 27. 澤井高志、鎌滝章央、佐々木信人、畠山 明：混合性結合組織病 (MCTD) にともなう肺高血圧 (PH) に関連する抗内皮細胞抗体 (AECA) に関する研究。厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「混合性結合組織病の病態解明と治療法の確立に関する研究」平成 21 年度総括・分担研究報告書: 22-24(2010)
 28. 澤井高志：関節リウマチにおける軟骨・骨破壊の病理学的解析。東日本震災会誌。22(3): 269(2010)
- (海外)
1. Mimata Y, Kamataki A, Oikawa S, Shimamura T, Sawai T: Expression of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 by IL-6 stimulation in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 68(Suppl3): 730(2009)
 2. 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)
 3. 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)
 4. Takamiya M, Fujita S, Niitsu H, Aoki Y, Kanno H, Sawai T: A Case of Takayasu arteritis

complicated by right atrium perforation and injuries of the right common iliac artery and vein caused by cannulation for percutaneous cardiopulmonary support. *Am J Forensic Med Pathol.* 31(1):72-6(2010)

5. Yamauchi K, Sasaki N, Niisato M, Kamataki A, Shikanai T, Nakamura Y, Kobayashi H, Suwabe A, Kanno H, Sawai T and Inoue H: Analysis of pulmonary allergic vasculitis with eosinophil infiltration in asthma model of mice. *Exp Lung Res.* 36: 227-36(2010)
6. Kurose R, Ichinohe S, Tajima G, Horiuchi S, Kurose A, Sawai T, Shimamura T: Characterization of human synovial fluid cells of 26 patients with osteoarthritis knee for cartilage repair therapy. *Int J Rheum Dis.* 13(1):68-74(2010)
7. Mimata Y, Kamataki A, Oikawa S, Murakami K, Shimamura T, Sawai T: Tocilizumab suppresses ADAMTS-4 gene expression in fibroblast-like synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 69(Suppl3): 663(2010)

2.学会発表 (国内)

1. 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／第17回国際リウマチシンポジウム。4月。札幌(2008)
2. 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／第17回国際リウマチシンポジウム。4月。札幌(2008)
3. 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／第17回国際リウマチシンポジウム。4月。札幌(2008)
4. 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。5月。金沢(2008)
5. 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。11月。福島(2008)
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. 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)
8. 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)
9. 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)
10. 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)
11. 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)
12. 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)
13. 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)
14. 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)
15. 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)
16. 澤井高志：RAにおける骨・軟骨破壊の病理。(教育講演)第54回日本リウマチ学会総会・学術集会。第19回国際リウマチシンポジウム。4月。神戸(2010)
17. 村上賢也、澤井高志、鎌滝章央、嶋村 正：関節リウマチの慢性化機構における CD14陽性細胞の役割。第54回日本リウマチ学会総会・学術集会。第19回国際リウマチシンポジウム。4月。神戸(2010)
18. 三又義訓、鎌滝章央、及川伸也、嶋村 正、澤井高志：IL-6 刺激により RA 患者由来の線維芽細胞

- 様滑膜細胞における ADAMTS-4 の発現が亢進した。第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会。第 19 回国際リウマチシンポジウム。4 月。神戸(2010)
19. 宇月美和、澤井高志、益田郁子：CPPD 結晶沈着症患者の関節組織における ANK 陽性細胞の特徴。第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会。第 19 回国際リウマチシンポジウム。4 月。神戸(2010)
 20. 及川伸也、鎌滝章央、三又義訓、嶋村 正、澤井高志：Bv8 の関節リウマチ滑膜における発現解析。第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会。第 19 回国際リウマチシンポジウム。4 月。神戸(2010)
 21. 中川倫代、菅野祐幸、澤井高志：EB ウイルス小 RNA 発現 T 細胞株の培養血管内皮への接着。第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会。第 19 回国際リウマチシンポジウム。4 月。神戸(2010)
 22. 菅野祐幸、中川倫代、澤井高志：EB ウイルス小 RNA 発現 T 細胞株の培養血管内皮への接着。第 99 回日本病理学会総会。4 月。東京(2010)
 23. 三浦康宏、千葉隆史、二宮由香里、澤井高志：Sjögren 症候群の小唾液腺組織の炎症学的指標と臨床検査項目との検討。第 99 回日本病理学会総会。4 月。東京(2010)
 24. 鎌滝章央、及川伸也、三又義訓、澤井高志：新規血管新生因子 Bv8 の関節リウマチ滑膜での発現の検討。第 99 回日本病理学会総会。4 月。東京(2010)
 25. 佐々木信人、山内広平、長島広相、古和田浩子、中館俊英、中村 豊、内海 裕、鈴木奈緒美、秋山貞親、小林 仁、井上洋西、澤井高志：アレルギー性血管炎における血管リモデリングに対するイマチニブの効果。第 50 回日本呼吸器学会学術講演会。4 月。京都(2010)
 26. 澤井高志：RA における骨・軟骨破壊の病理学的機序。第 18 回リウマチ診療研究会。9 月。仙台(2010)
 27. 澤井高志：関節リウマチにおける軟骨・骨破壊の病理学的解析。第 59 回東日本整形災害外科学会。9 月。盛岡(2010)
 28. 澤井高志：炎症性関節炎におけるヒアルロン酸の動態。第 37 回日本肩関節学会。10 月。仙台(2010)
 29. 澤井高志：関節疾患におけるヒアルロン酸の動態－関節リウマチを中心に－。東北関節疾患研究会。11 月。仙台(2010)
 30. 村上賢也、鎌滝章央、嶋村 正、澤井高志：関節リウマチにおける CD14 陽性細胞の役割－蛍光二重染色および電子顕微鏡学的解析－。第 17 回自己免疫疾患研究会。11 月。盛岡(2010)
 31. 鎌滝章央、石田睦子、村上賢也、宇月美和、澤井高志：ゼラチンコートフィルムを用いた関節液の包括的なゼラチン分解活性測定法の開発。第 25 回日本臨床リウマチ学会。11 月。東京(2010)
 32. 澤井高志：関節リウマチにおける骨・軟骨破壊。第 62 回宮城リウマチ外科研究会。2 月。仙台(2011)。
- (海外)
1. Kamataki A, Oikawa S, Mimata Y, Uzuki M, Sawai T: The effect of cytokine on hyaluronan metabolism of chondrocyte. 2008World Congress on Osteoarthritis. Sep. Rome.
 2. 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. Rome.
 3. 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. Rome.
 4. 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 Medial-Expo 2008 in APLAR's World. Sep. Yokohama.
 5. 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 Medial-Expo 2008 in APLAR's World. Sep. Yokohama.
 6. Oikawa S, Kamataki A, Mimata Y, Murakami K, Shimamura T, Sawai T: Angiogenetic factor, BV8, is highly expressed in synovium of rheumatoid arthritis, and experimentally up-regulated by TGF- β . Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2010. June. Rome.
- H.知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

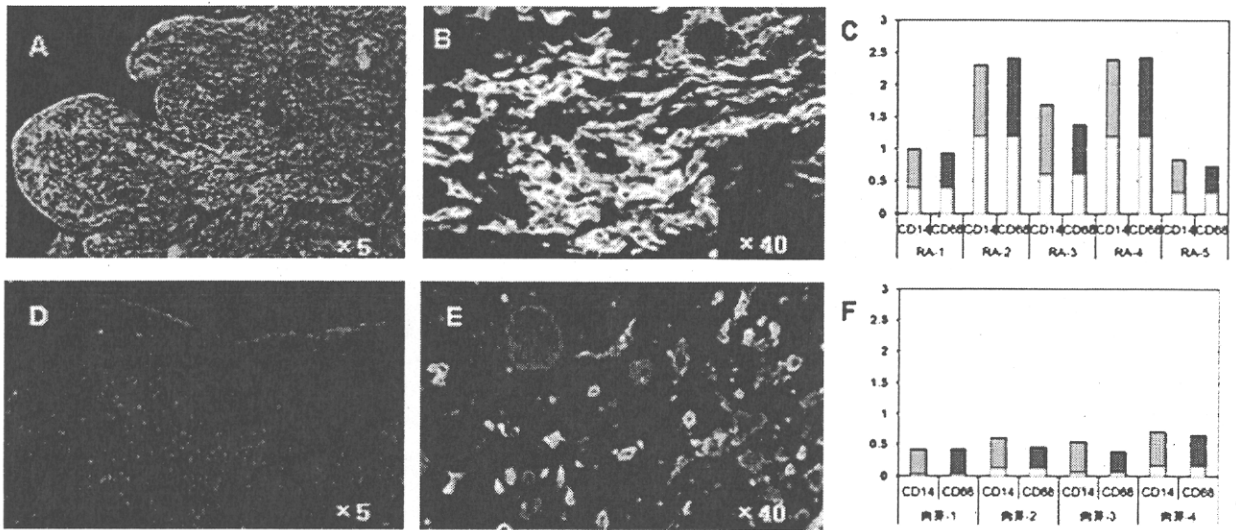


図1 蛍光二重染色によるCD14, CD68 共陽性細胞の解析
RA 滑膜 (A-C) と非特異的肉芽 (D-F) における CD14 (緑) や CD68 (赤) 陽性細胞の形態 (A,B,D,E) および共陽性細胞の割合 (C,F) を解析した。

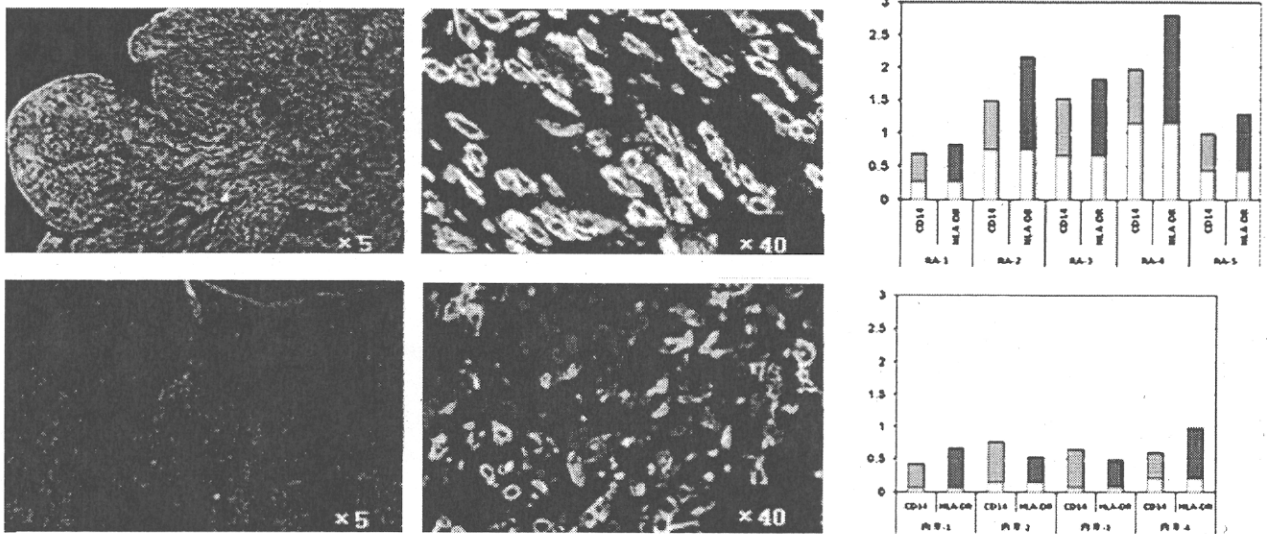


図2 蛍光二重染色によるCD14, HLA-DR 共陽性細胞の解析
RA 滑膜 (A-C) と非特異的肉芽 (D-F) における CD14 (緑) や HLA-DR (赤) 陽性細胞の形態 (A,B,D,E) および共陽性細胞の割合 (C,F) を解析した。

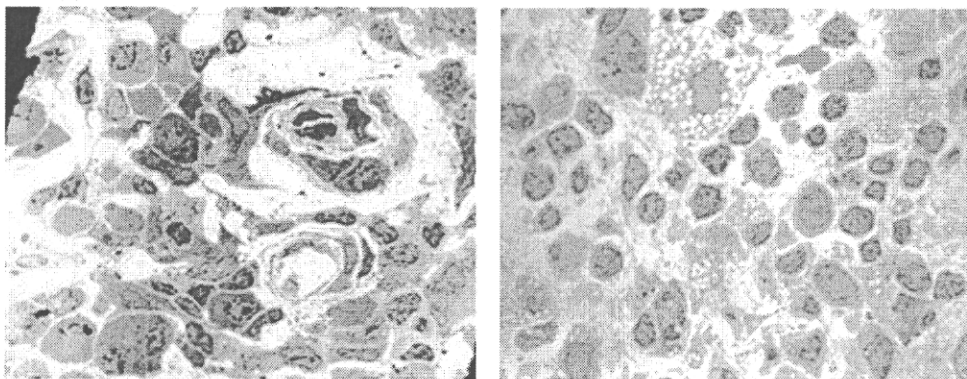


図3 電顕像
RA 滑膜組織 (A) には類円形細胞を抱え込む NLC が認められるが、非特異的肉芽組織 (B) には見られない

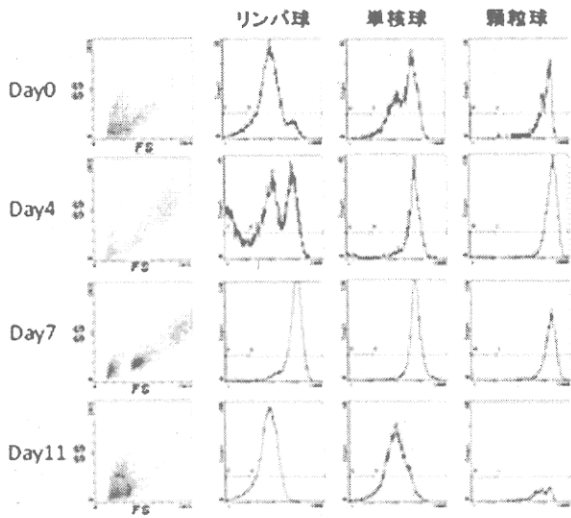


図4 末梢血の細胞分画および蛍光強度の解析
前方散乱光 (FS) と側方散乱光 (SS) で細胞を分画し、それぞれの細胞の GFP の蛍光強度を示した。

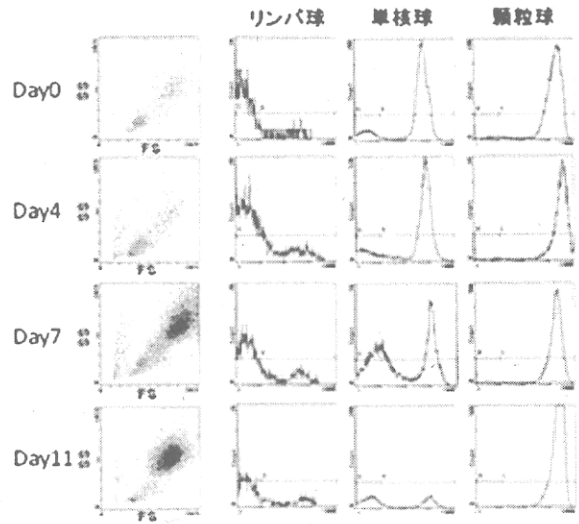
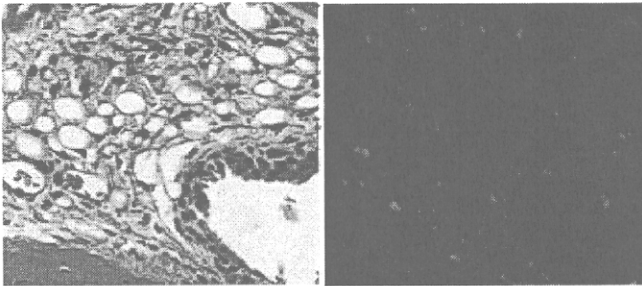
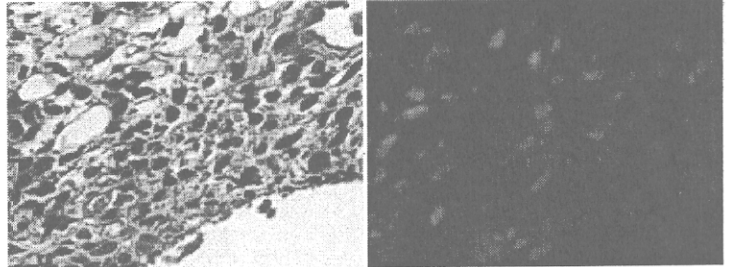


図5 骨髄の細胞分画および蛍光強度の解析
前方散乱光 (FS) と側方散乱光 (SS) で細胞を分画し、それぞれの細胞の GFP の蛍光強度を示した。

Day4



Day7



Day11

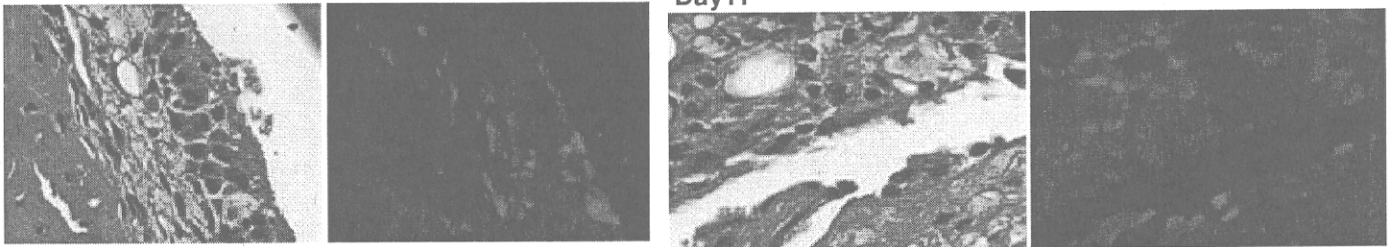


図6 GFP マウス骨髄移植マウスの関節炎誘導後の滑膜病変

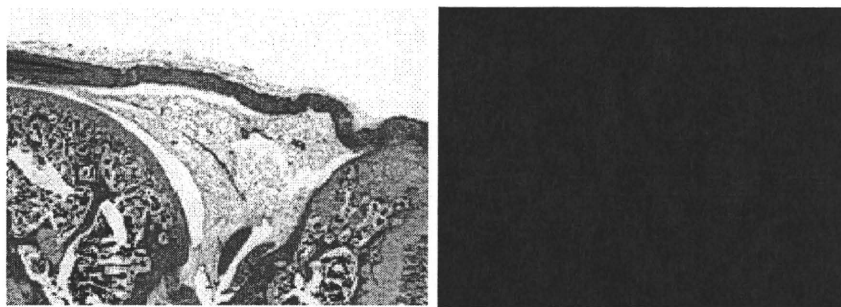


図7 関節炎誘導 GFP マウス骨髄細胞注射 7日後のマウスの関節

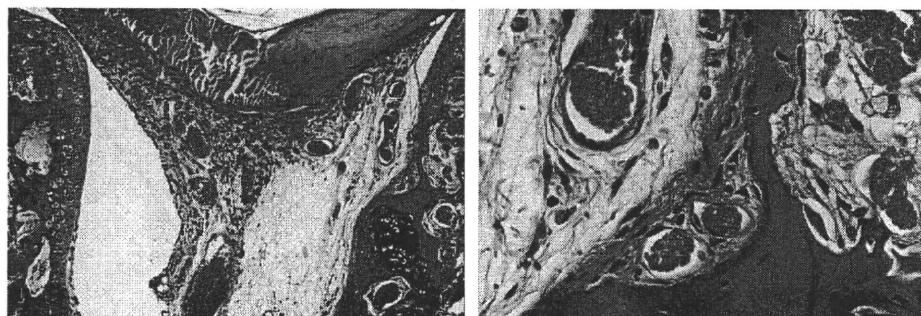


図8 RA 患者骨髄細胞注入して5日後のSCID マウスの関節

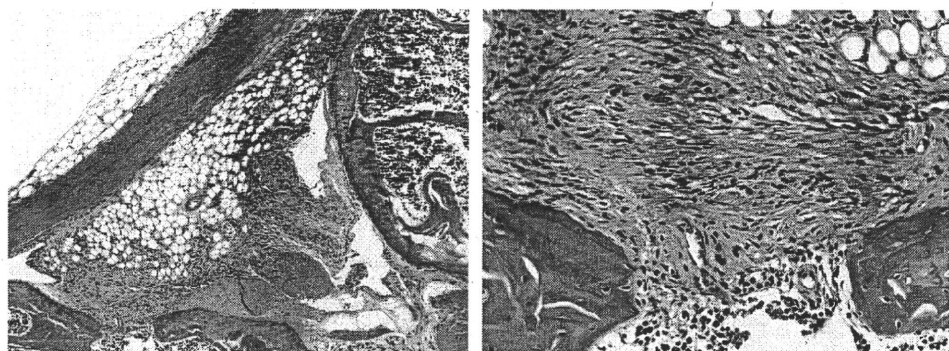


図9 CXCL5-Tg 1例で認められた関節病変

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）
総合研究報告書

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

主任研究者 越智 隆弘 大阪警察病院 病院長

研究要旨 死細胞はマクロファージによって貪食・分解される。死細胞の DNA が分解されないとマウスはヒトのリウマチに似た関節炎を発症する。今回、発症した関節では炎症性サイトカインが強く発現していること、関節炎の発症はリンパ球に依存せず、骨髓由来の細胞のみで起こりうることを示した。

研究分担者氏名：長田 重一
所属機関名：京都大学大学院医学研究科
職名：教授

A. 研究目的

アポトーシスは細胞の凝縮と断片化、染色体 DNA の分解を伴う過程であり、カスパーゼと呼ばれるタンパク質分解酵素によって進行する。アポトーシス細胞はマクロファージによって貪食・分解されるが、死細胞の DNA はリソソームに存在する DNase II によって分解される。また、赤血球の分化過程で核が排出されるがこの核もマクロファージによって貪食され、DNase II によって分解される。DNase II を発現しないマクロファージはアポトーシス細胞や赤血球からの核を貪食するが DNA を分解できず、大量の未分解 DNA を蓄積する。そのためマクロファージは IFN β を産生、この因子の作用によりマウスは発生途上で死滅する。一方、DNase II 遺伝子と IFN タイプ I 受容体遺伝子とともに欠損するマウスは一見、正常に誕生するが年とともに慢性関節炎を発症する。同じような関節炎は DNase II 遺伝子をマウスの生後、欠損させても観察される。本研究はこのような背景をもとに、DNase II 欠損マウスでの関節炎発症の分子機構を解析した。

B. 研究方法

(1) DNase II 欠損マウス胚由来繊維芽細胞(MEF)にアポトーシスを起こした胸腺細胞を貪食させるとこの細胞は IFN β を分泌する。この過程に関与する分子を同定するため、400 個のグループに分けたマウス cDNA library (20000 のクローン) を MEF に導入、アポトーシス細胞を貪食させた後、上清中の IFN β を測定、IFN β の分泌を上昇させる遺伝子を探索した。

(2) 関節炎を発症する DNase II 欠損マウスと種々のサイトカイン遺伝子欠損マウス、リンパ球欠損マウスを掛け合わせ、これら遺伝子の関節炎発症に及ぼす影響を検討した。また、関節炎を発症した DNase II 欠損マウスに種々の薬剤を投与し、その効果を検討した。

C. 研究結果

(1) MEF から調製した cDNA ライブラリーから死細胞由来の DNA に応答して IFN β 遺伝子を活性化させる分子として EYA (Eyes absent) を単離した。この分子は本来、転写因子として同定されたが、数年前、チロシン脱リン酸化の活性を持つことが報告された。EYA の組み替え体を動物細胞で作成し、その生化学的解析から、EYA にはチロシン脱リン酸化活性ばかりでなく、スレオニン脱リン酸化活性も存在することを見いだした。この因子は死細胞 DNA ばかりでなく、ウイルスの RNA による IFN β 遺伝子の活性化も促進した。

(2) DNase II 欠損マウスを IL-6, TNF α 遺伝子欠損マウスと掛け合わせるとその関節炎の症状は完全に消失した。また、抗 IL-1 受容体抗体を投与しても関節炎の発症は抑えられた。この際、関節での炎症性サイトカイン遺伝子の発現はほぼ完全に抑えられた。一方、DNase II 欠損マウスの血清中には高濃度の IL-18 が認められるが IL-18 遺伝子を欠損させても関節炎は抑制できなかった。また、リンパ球が産生されない Rag2 遺伝子欠損マウスと掛け合わせると関節炎は悪化した。この際、関節では炎症抑制に作用する IL-10 遺伝子の発現が顕著に減少していた。さらに、ヒトリウマチ患者に用いられている TNF α , IL-1, IL-6 の作用を抑制する抗体やメトトレキシレートは DNase II 欠損マウスの関節炎にも有効であった。

D. 考察

DNase II 遺伝子を欠損したマクロファージでは