

I) 関節リウマチの原因を求めての流れ・・・行政からの支援

厚生省が政策的に RA 撲滅を目指して研究費を予算化し“リウマチ調査・研究事業”を開始したのは平成 2 年(1990 年)度のことであった。当時の評価委員会(塩川優一委員長)による審議をもとに初回は主任研究者指名の形で病因解明、病態解明、早期診断法開発、内科的治療開発、外科的治療開発、QOL 向上などを課題とする研究班体制が決められ、全国規模の本格的なリウマチ調査・研究事業が始まった。以後、厚生(労働)行政の変遷や、リウマチ研究の進捗の中で基本構成が変えられながら、全国組織によるリウマチ研究は引き継がれてきた。筆者は平成 2 年(1990 年)に病態研究班の主任研究者に指名され、評価委員会から「これまで多くの研究者によって、“どのようにして RA 患者に進行性の関節破壊が起きるのか”の解明を目指して色々な角度から研究が進められてきた。先入観を捨てて、種々の考え方をもう一度広く網羅して調べ直して解明へと進めて欲しい。」という御指示を頂いた。その方針に従って、平成 2 年に病態解明研究班開始時点での分担研究者は、諸説を代表する研究者諸氏に御願いして多角的な解析を進めた。研究内容は毎年の評価を頂き軌道修正しながら、そして研究班構成は 3 年毎の公募をもとに研究者も主課題も改組されてきた。そのような過程で引き続き研究が続けられた課題の一つは筆者自身が主体的に追いつけた RA 骨髄病態解明研究であった。

II) 滑膜より更に重要なリウマチの原因病巣が在るのではないかと・・・

臨床現場からの疑問

少し昔の話になるが、「RA の原因は関節内の滑膜(図 1)に在る」という定説をもとに、RA の主要な治療手技であった滑膜切除術は RA の疾患予後を改善する治療法として長年にわたって広く行われていた。筆者らも活動性の続く RA 患者には滑膜切除術を推奨して、多くの関節に増殖する滑膜塊を次々と徹底的に切除した。滑膜切除術後の関節局所の炎症は鎮静化して腫れや痛みは軽減した。しかし、滑膜切除手術後経過を詳細に観察すると、手術をしていない対側関節と同じように破壊が進むことも判明した(9)。また、多くの罹患関節に滑膜切除術を行った患者にも全身的な RA 炎症は依然として続き、滑膜を切除した関節内にも再び滑膜増殖が認められるようになった。**滑膜が RA の重要病巣であることは事実であるが、他に更に重要な原因病巣があるに違いないと考えた。**

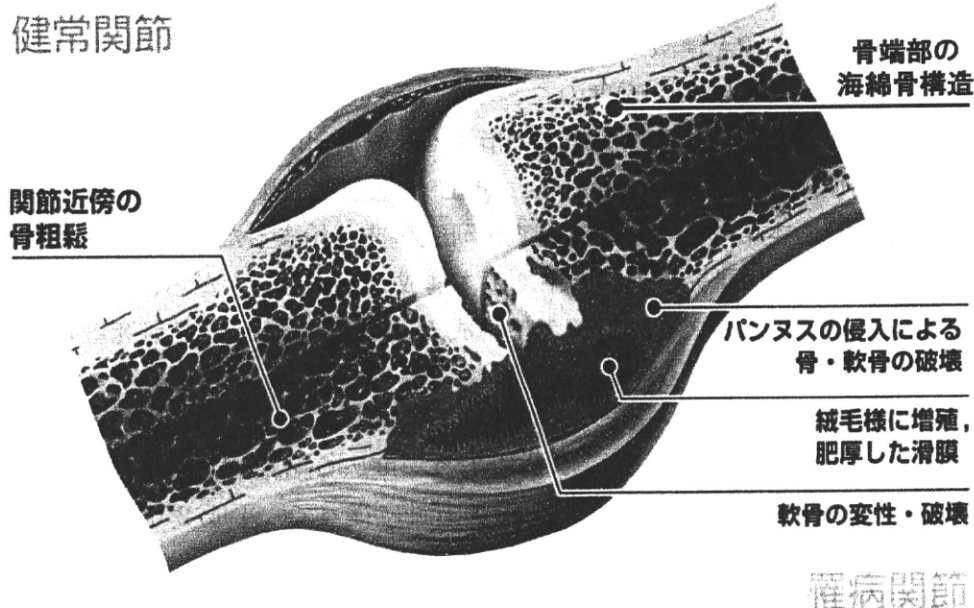


図 1、関節部の断面像 上半分は健常人関節の、そして下半分は関節リウマチ(RA)患者の関節の断面像；健常人関節では骨端部（骨の端）の関節面は軟骨に包まれている。関節内（関節腔）で軟骨以外の部分は光沢のある薄い膜（滑膜）で覆われている。関節部の（骨端部の）骨の中は骨梁で区切られた海綿骨になっている。この海綿骨の区画の中に小血管が縦横に走り関節部（骨端部）骨髄を形成している。RA 患者の関節（下半分）では滑膜が増殖して表面は絨毛様と表現されるひだ状の肉芽組織（パンヌス）を形成し、軟骨や骨を侵蝕（骨びらん；erosion）して骨・軟骨破壊が進んでゆく。骨端部の骨内部の骨梁は薄く海綿骨の区画は粗になり、骨粗鬆症の状態に陥る。（図は参天製薬の御協力を頂いた）

Ⅲ）骨髄病巣を示唆した関節炎モデル動物

1、思いがけず遭遇した多発関節炎マウス・・・原因病巣は骨髄？

「RA 患者には滑膜以外に重要な病巣があるのではないか。他の部位に病巣があるとすれば、どこだろう。」そんなことを考えていた筆者は、1975 年頃に思いがけず大阪大学医学部細菌学教室の田辺鎮雄博士から声をかけられた。「おい越智よ、俺のところ面白いマウスが居るよ、おもしろいぞ。〇〇君が骨肉腫の C3H/He マウスに対して、BALB/c マウスの胸腺リンパ球を移植すれば延命効果があるかを調べたいというのが譲った純系マウスだ。彼が来ないので、わしがマウスに水や餌をやりながら見ていると足が腫れてきているよ。〇〇君に何をしたらのか尋ねたら、わしが譲った BALB/c マウスの胸腺細胞を C3H/He マウスの腹腔内に注入しただけらしい。〇〇君自身はマウスの関節炎には興味が無いと言っているが、お前、調べてみないか？」 第一線病院に勤務中なので研究に長時間を割くことは出来ないが、動物実験の病理学的解析なら病院業務を終えてからでもできると思い、このマウスの関節炎の原因を調べることにした。この C3H/He と BALB/c の二種のマウスはともに、1970 年頃に田辺博士が海外から得た純

系マウスを大阪大学微生物病研究所の動物舎で兄妹交配によって維持し、既に 50 代以上経ているという動物であった。これらのマウスを用いて、確かに多発関節炎が起きることを確認して (1)、田辺博士の御力を得て動物実験を行った。

BALB/c マウスの胸腺細胞をアイソトープ (^3H - thymidine) で標識して C3H/He マウス腹腔内に注入 (同種胸腺細胞移植) して注意深く観察したが、標識のある細胞は関節内の滑膜や軟骨表面には見出せなかった。標識のある細胞は数時間以内に骨髓内に集まり、骨髓内の未分化細胞の分化が始まった。意外なことに、骨髓内の未分化細胞は先ず骨髓球系細胞様に変化した (図 2 右)。観察を続けると 5 日後には、驚いたことに骨髓内に充満した細胞は関節軟骨端と関節包付着部の間に露出した骨 (ベアゾーン) にある小孔を通して関節腔内へ入り始めた (図 3-A の円内矢印を中心にした拡大が図 3-B)。そして、3 週間後には RA の関節病変そっくりの炎症性滑膜組織が出来上がった (図 4)。

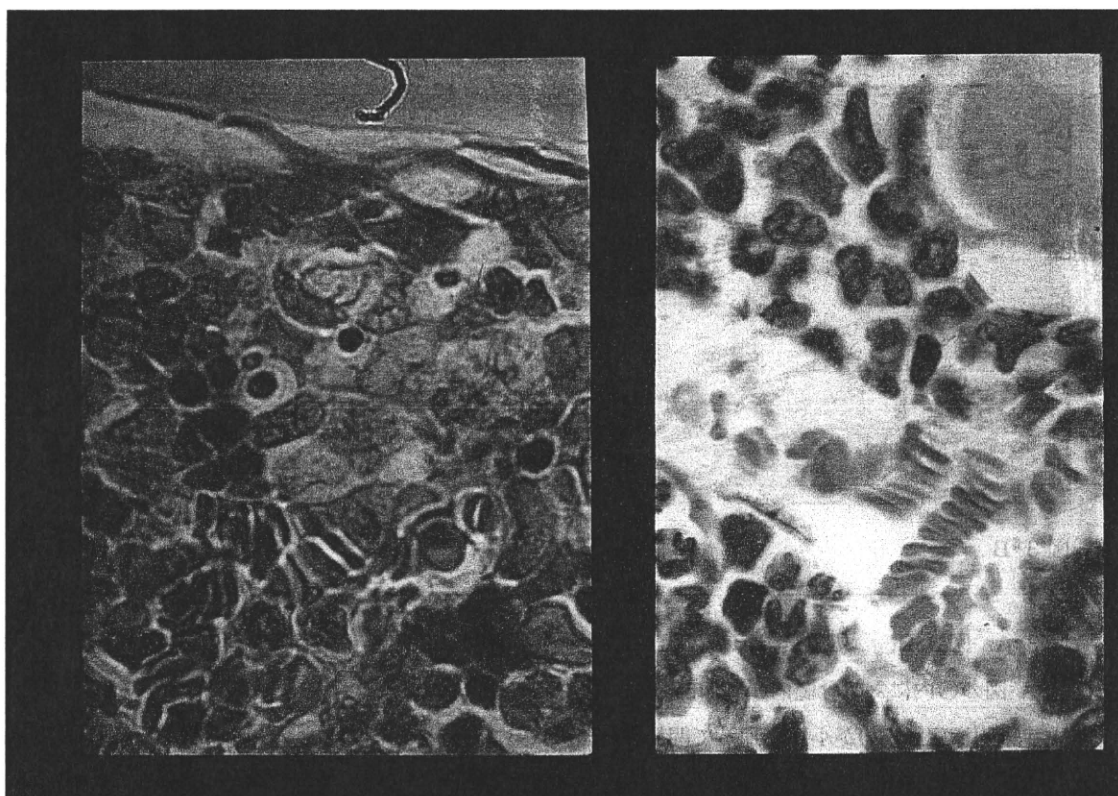


図 2、C3H/He マウスの骨髓病理像； 左は処置前の正常骨髓病理像、右は関節炎発症処置後数時間の骨髓病理像で小血管周辺は骨髓球系細胞で満たされた。

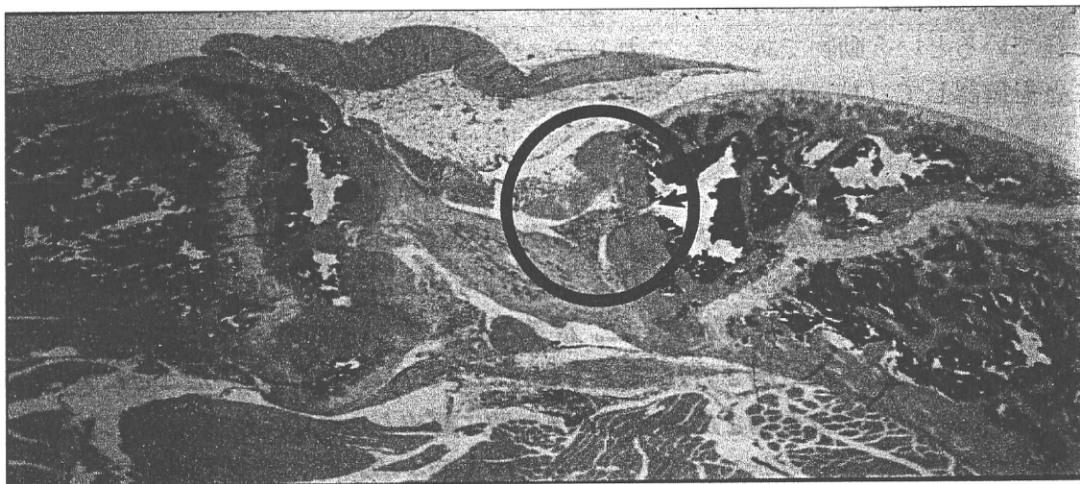


図 3・A

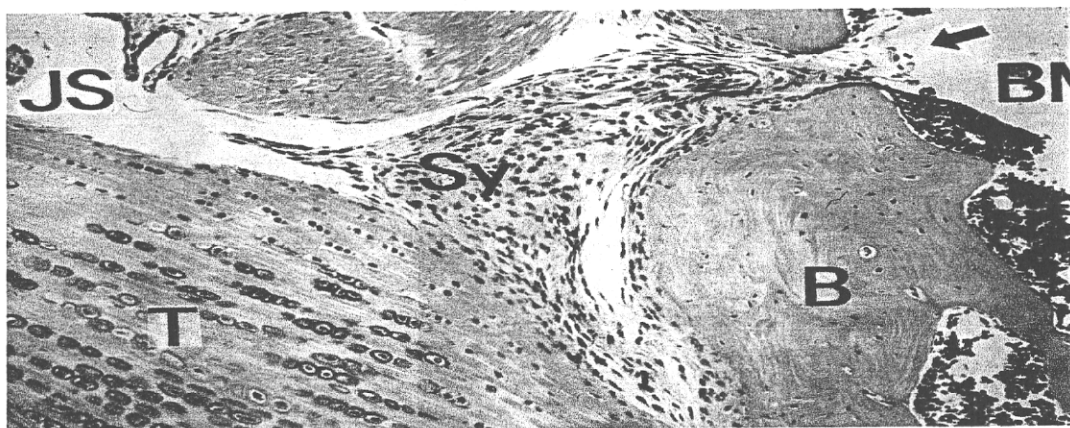


図 3・B

図 3・A、図 3・B、 処置後 5 日の C3H/He マウス関節部骨髓像； 関節腔内はほとんど正常であるが、図 3・A 図の○内にある骨髓内の矢印部分の拡大である図 3・B では、骨髓内の矢印部分から小血管を伴う線維芽細胞様組織(Sy)が小孔を通過して関節内(JS)に入っているのが認められる。 BM; 骨髓、B; 骨、Sy; 滑膜、JS; 関節腔、T; 腱

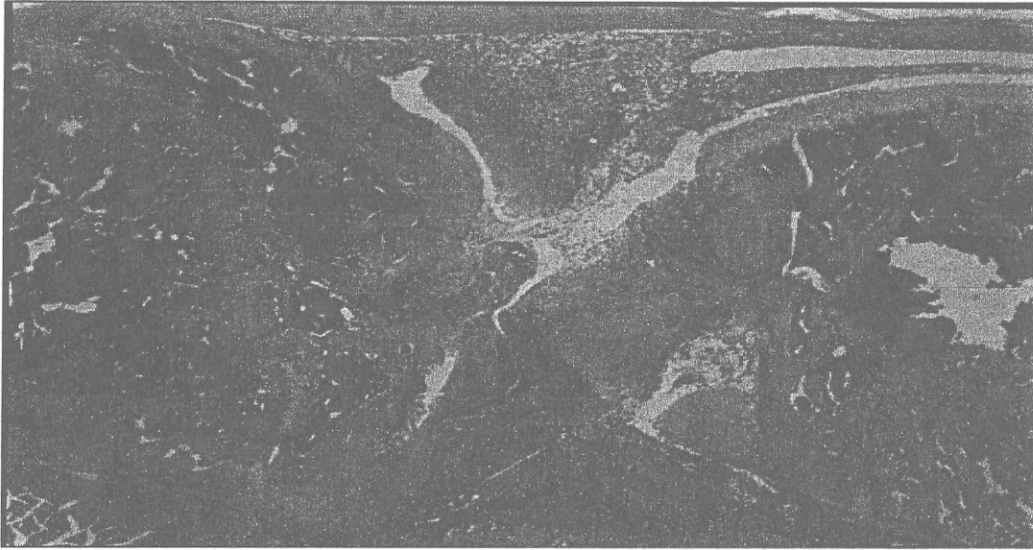


図4、処置後3週間の C3H/He マウス関節部骨髓像； 関節腔内には滑膜増殖、炎症細胞浸潤、滑膜による骨・軟骨浸蝕が認められ、骨髓内には単核細胞の増殖を認める。RA の関節と類似の病理像である。

ここまでの経過では、このマウスにおける関節炎発症は骨髓での病態変化によるものといえた。次に関節炎を重症化（増悪）させてみようと考え、関節炎を発症している C3H/He マウスの腹腔に再び、アイソトープで標識した BALB/c マウスの胸腺細胞を注入した。正常の C3H/He マウスの腹腔に注入した時には標識細胞を関節腔内に認め得なかったが、関節炎発症マウスの腹腔に注入した時には骨髓内はもとより、関節滑膜の小血管周辺にも標識細胞が多数集積した。そして引き続き、細胞浸潤と細胞増殖が誘発されて病巣が拡大し、関節炎が重症化して骨・関節破壊が急速に進んだ（図5）。関節軟骨表面からの滑膜侵蝕（図5黒矢印）に加えて、骨髓内からの骨破壊（図5白矢印）も認められた。C3H/He マウスに引き起こされた反応は強い移植免疫反応であり、標識のある細胞は腹腔内に注入された胸腺細胞そのものではなく、標識された胸腺細胞の核をとりこんだ貪食細胞と考えている。以上の病態から、このマウスの関節炎発症は骨髓の病態変化によって引き起こされ、そして関節炎重症化には骨髓のみでなく関節滑膜も重要な病態変化の場となっていた。

このマウスの関節炎病態を RA 患者のものと同一視できないが、少なくとも「RA 患者に滑膜以外の重要病巣があるとすれば骨髓であろう」というヒントを得ることができた。

予想もしなかった結果で興奮したが、兄妹交配で 50 代以上経たマウスは繁殖力が乏しく、研究用のマウスが得られなくなった。実験動物販売会社から BALB/c と C3H/He とともに購入して同様の処置(1)を試みたが関節炎は発症しなかった。なぜ田辺博士に頂いたマウスに関節炎が発症したかは不明である。他の研究者に動物を譲渡し追試をお願いすることが出来ないと分かって論文発表を諦めたので、ここで詳しくご紹介した。

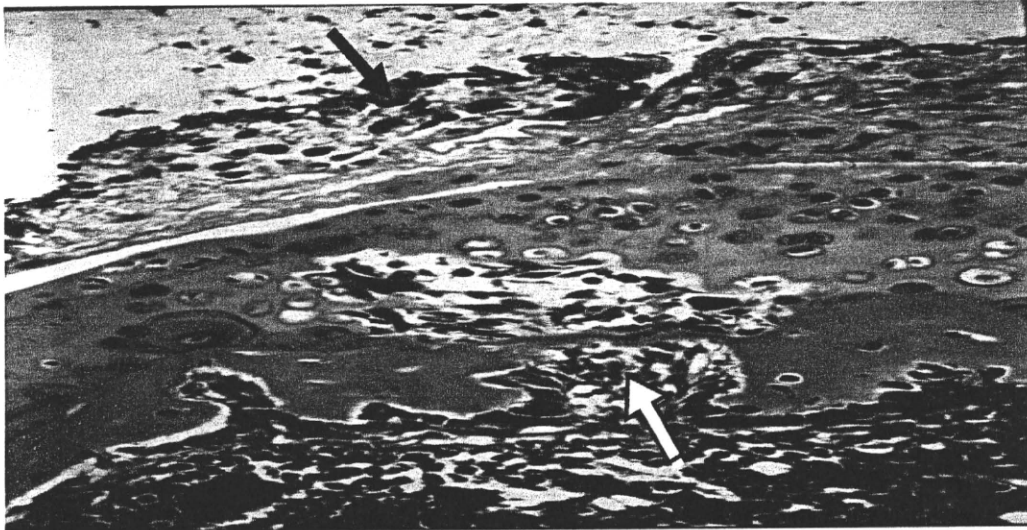


図5、関節炎が重症化したマウスの関節部骨内； 関節軟骨表面からの滑膜浸蝕（黒色矢印）に加えて、骨髄内からの骨・軟骨破壊（白色矢印）も認められる。

2、多発関節炎モデル動物骨髄中の活性因子の変化

筆者が大阪大学に勤め、臨床業務の傍らで研究に携わることが可能になったので、「RA 患者に滑膜以外の重要病巣があるとすれば骨髄であろう」というヒントについて調べはじめた。一般的な関節炎モデルラット（コラーゲン関節炎やアジュバンド関節炎など）を用いて関節炎発症に伴う骨髄血の変化を末梢血と比較検討した(6,10,12)。関節炎誘導処置を施すと、先ず骨髄細胞の分化・増殖が始まった（図6）。これは前記の関節炎マウスと同様であった。数日後には炎症性活性因子（サイトカイン）の活性上昇が骨髄血で認められ、比較的軽度になるが末梢血にも認められ始めた。

RA の炎症と密接な関係が報告されているインターロイキン-1 (IL-1) とインターロイキン-6 (IL-6) の活性の変化を調べた。骨髄血中では IL-1 の活性は、コラーゲン関節炎誘発処置後 7 日目から上昇が始まり、関節炎を認めなくなった 8 ヶ月後には検出できなかった。この経過中、末梢血中には IL-1 活性を検出出来なかった（図7）(6,12)。骨髄血中の IL-6 活性は関節炎誘発処置 4 日後より上昇が認められ、処置後 14 から 21 日にピーク値に達し、関節炎を認めなくなった 8 ヶ月後には検出できなくなっていた。末梢血中の IL-6 活性は骨髄中と同傾向の変化であったが、比較的低い活性であった（図8）。アジュバンド関節炎の骨髄血でも、コラーゲン関節炎と同傾向の変化を認めた（図9）(10)。いずれも関節炎発症と骨髄との関連が強く示唆される結果であった。そのようなラットの関節炎発症研究からも骨髄病巣が重要な役割を果たしているとの結果を得て、RA 患者を対象にした骨髄研究を模索し始めた。尚、臨床的な軽症または重症 RA の分類は最終項(XI)に記した内容に基づいた。

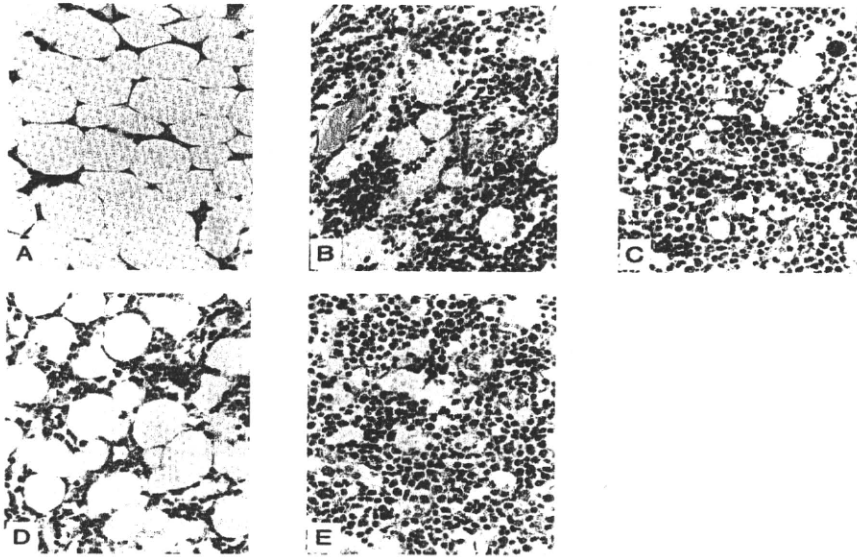


図 6、関節炎ラットの関節部骨髓内； A； 未処置ラット骨端部骨髓内には脂肪組織の間隙に少数の骨髓細胞が散在する。B； アジュバンド関節炎誘発処置 4 日後、C； アジュバンド関節炎誘発処置 21 日後、D； コラーゲン関節炎誘発処置 4 日後、E； コラーゲン関節炎誘発処置 21 日後夫々の骨髓内。(10)より。

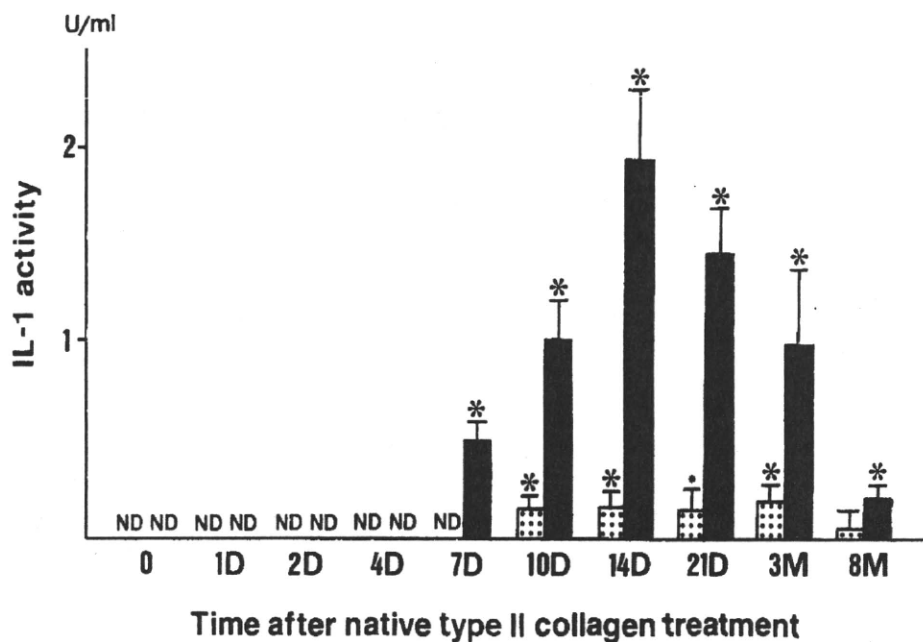


図 7、コラーゲン関節炎ラットの末梢血中と骨髓血中の IL-1 活性の変化； 縦軸は IL-1 活性(U/ml)、横軸はコラーゲン関節炎誘発処置後の日数(D)または月数(M)を示す。■ は骨髓血、▨ は末梢血。(12)より。

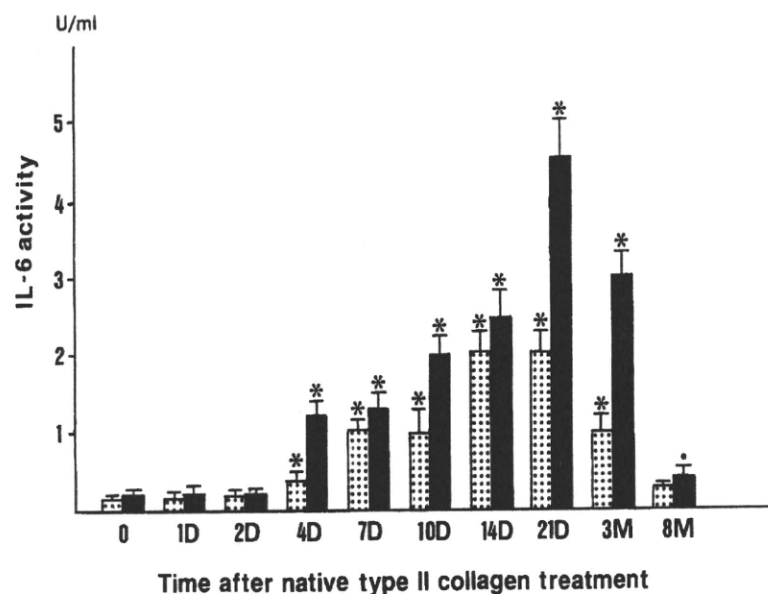


図 8、コラーゲン関節炎ラットの末梢血中と骨髄血中の IL-6 活性の変化； 縦軸は IL-6 活性(U/ml)、横軸はコラーゲン関節炎誘発処置後の日数(D)または月数(M)を示す。■は骨髄血、▨は末梢血。(12)より。

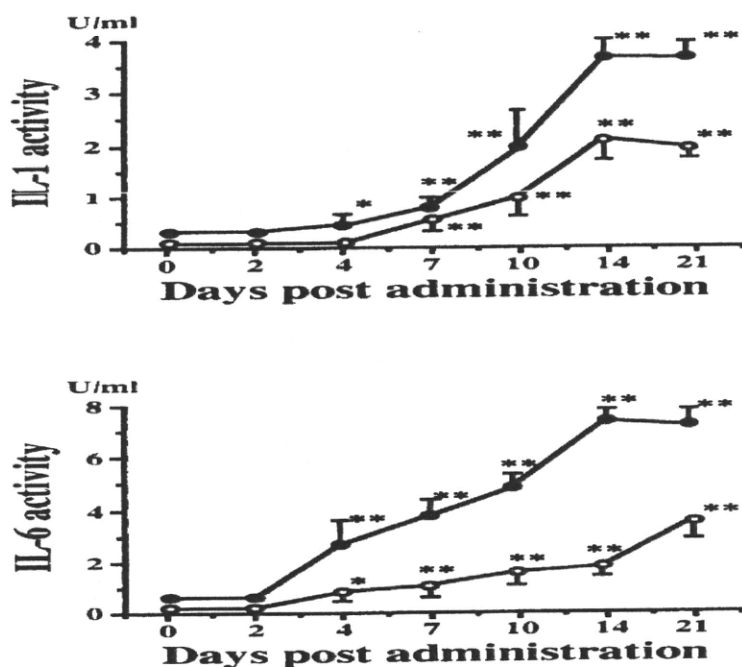


図 9、アジュバンド関節炎ラット (●) とコラーゲン関節炎ラット (○) の骨髄血中の IL-1 活性(U/ml) (上図) と IL-6 活性(U/ml) (下図) の変化； 縦軸は活性(U/ml)、横軸は関節炎誘発処置後の日数を示す。(10)より。

IV) RA 患者特異的な骨髓細胞の変化

RA 患者の骨髓を重要病巣と考え得るだろうか。骨髓は多種の血液細胞成分が混在する場所なので、仮に RA の病的な細胞があったとしてもそれを識別する適切なマーカーが要る。そんなマーカーがあるのだろうかと思いながら、開き直って素人っぽく考えた。「RA は色々な薬物治療によって抑えきれず進行し続ける、まるで癌のような疾病だ。骨髓に混在する多様な細胞のなかから“まるで癌細胞”という細胞を探してみよう」

1、重症 RA 特異的な CD14 (+) 骨髓球系細胞

A) RA 罹患関節部骨髓中の CD14 (+) 骨髓球系細胞

米国ワシントン州立大学の箱守教授から“まるで癌細胞”という細胞に反応する抗体、即ちヒトの胃癌や大腸癌（腺癌）細胞表面の癌特異的糖鎖構造に反応する 2 種の抗体（FH2 と FH4）を頂いた。抗体を標識して、RA 患者（軽症 RA、重症活動性 RA、重症燃え尽き [burned out] RA）と非 RA 対照として変形性関節症（OA; osteoarthritis）患者、感染性関節炎患者の膝関節手術時に関節部（骨端部）骨髓血を調べた（図 10）。活動期の重症 RA の骨髓血中には FH2 および FH4 抗体に細胞膜が反応する“まるで癌細胞”が見出されたが、軽症 RA および非 RA 対照には見出せなかった。

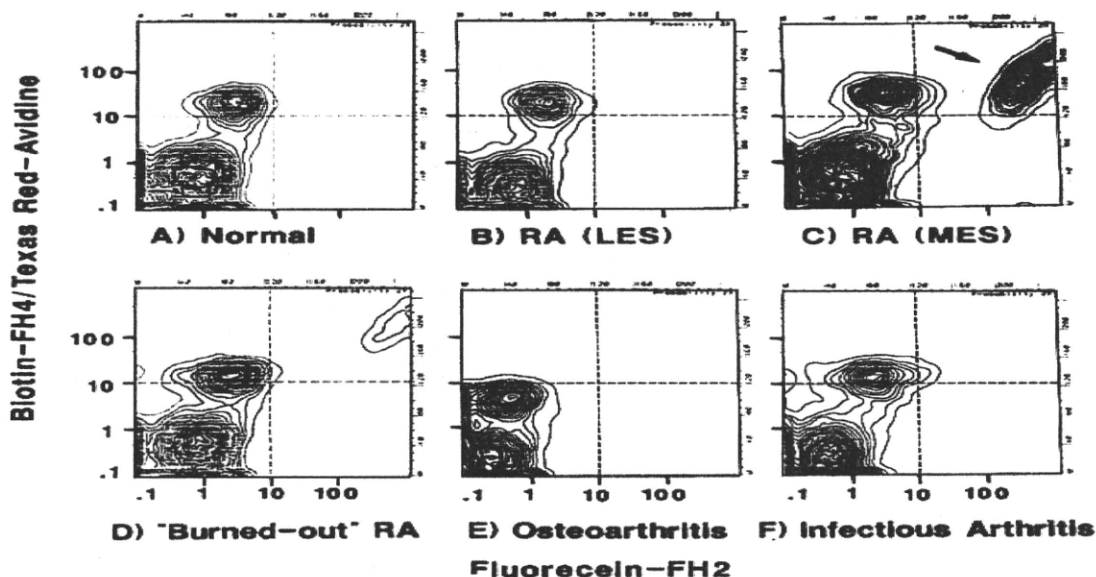


図 10、癌特異的糖鎖構造保有の（FH2 と FH4 抗体と反応する）関節部骨髓中の細胞。A) 正常対照（疾患を持たない外傷患者）、B) 軽症 RA (LES)、C) 重症 RA (MES)、D) 燃え尽き RA (burned out)、E) 変形性関節症 (OA)、F) 感染性関節炎 (infectious arthritis)、横軸は FH2 抗体との反応強度を、縦軸は FH4 抗体との反応強度を示す。C) の矢印に FH2 抗体と FH4 抗体と共に強く反応する細胞を示す。(4)より。

抗体をペルオキシダーゼラベルして免疫電顕で検討した。重症 RA 骨髓に特異的に認められる“まるで癌細胞”は細胞表面に CD14 構造と癌特異的糖鎖構造をもつ骨髓球系細胞で（図 11）(4)、この糖鎖構造が病態に関連しているらしいこと (13) も判明した。

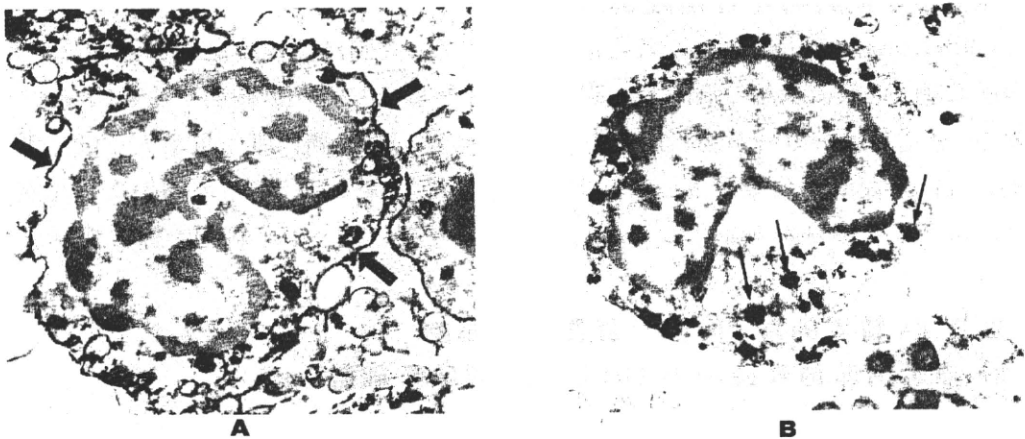


図 11、腸骨髄白血球中の“まるで癌”細胞の免疫電顕写真で形態的に骨髄球系細胞である。A は FH4 抗体を反応させたもので、矢印は FH4 抗原を保有する細胞膜を示している。B は抗体なしのもので、矢印はペルオキシダーゼ陽性顆粒を示している。(16) より。

この話に関連する細胞マーカーを簡単に確認したい。腸骨髄にある白血球を構成する細胞の中で、骨髄球系細胞は CD15 陽性、即ち CD15(+)で、これは成熟すると多形核白血球(PMN; polymorphonuclear neutrophile)に分化する。単球・マクロファージは CD14 陽性、即ち CD14(+)で表される。両者を区別する時は、正常の骨髄球系細胞は CD14(-)CD15(+)と表現し、単球・マクロファージは CD14(+)CD15(-)と表現する。

重症 RA 患者特異的と言えるこの FH2 と FH4 を保有する、“まるで癌細胞”の骨髄球が一般的な細胞マーカーで表現できないかと検討した。この骨髄球系細胞は CD14(+)も保有し、骨髄球系細胞としては異常であるが CD14(+)CD15(+)細胞と表現された。CD14(+)CD15(+)細胞が見出された関節部骨髄には、やや未分化な細胞(8)も増殖因子も見出された(7)こともあり、“まるで癌細胞”骨髄球の存在は関節部骨髄局所での異常と考えていた。

この異常な骨髄球系細胞が RA 病態としてどのような役割を果たしているのか。骨髄球は多形核白血球に分化する細胞なので、**“まるで癌細胞”が存在する膝関節部骨髄の多形核白血球を調べた(5,17)。重症 RA 患者の末梢血中の単核細胞中や多形核白血球中に、RA に伴う組織破壊活性に重要と知られる $IL-1\alpha$ 、 β が異常に高濃度に認められ(17)、高度の組織破壊機能亢進が示唆された。**特にムチランス型といわれる最重症 RA 患者の関節部骨髄の多形核白血球中には際立って高濃度の $IL-1\alpha$ 、 β を認めた。重症 RA 関節部骨髄における骨髄球系細胞の異常な活性化が示唆された。

B) RA 患者腸骨骨髓における特異的な CD14(+) 骨髓球系細胞の分化

骨髓球系細胞の存在を認めた RA 患者関節部骨髓に対する対照という考えで、同じ患者の造血器官である腸骨骨髓も併せて調べた(16)。RA 患者の腸骨骨髓中には一見正常の CD14(-)CD15(+) 骨髓球系細胞とともに、“まるで癌細胞”の CD14(+)CD15(+) 骨髓球系細胞(矢印に示した細胞群)が多数存在していた(図 12 左下矢印)。

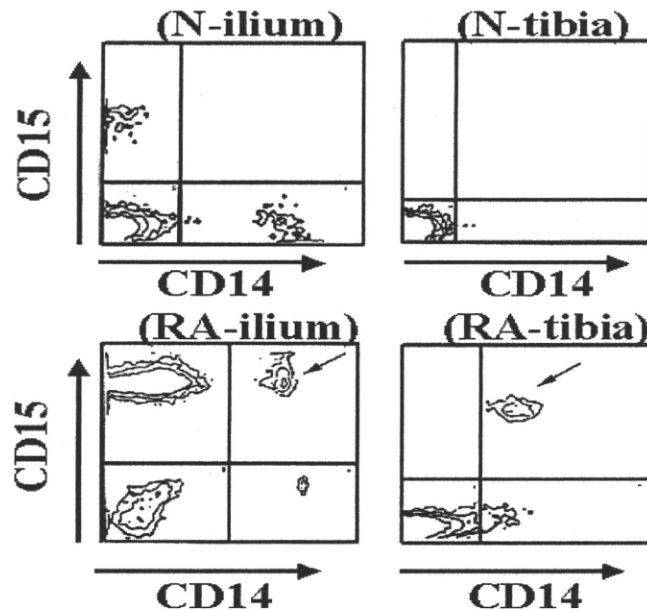


図 12、非 RA 対照(上段)と RA 患者(下段)の腸骨骨髓と膝関節部骨髓白血球のフローサイトメトリーで骨髓球系細胞[CD15(+)]を解析したもの。縦軸は CD15 抗体に対する反応、横軸は CD14 抗体に対する反応。右側上図は非 RA 対照の膝関節部骨髓血で、骨髓球系細胞を認めない。左側上図は非 RA 対照の腸骨骨髓血で正常[CD14(-)CD15(+)]の骨髓球系細胞のみ。右側下図は重症 RA 膝関節部骨髓血で、“まるで癌”骨髓球系細胞(→)のみが認められる。左側下図は重症 RA 腸骨骨髓血で正常骨髓球系細胞とともに“まるで癌”骨髓球系細胞(→)が認められる。

重症 RA 患者腸骨骨髓中の一見正常の CD14(-)CD15(+)骨髓球系細胞を採取して培養すると、“まるで癌細胞”の CD14(+)CD15(+)細胞へと分化し、培養中に活性因子(IL-1 β または、GM-CSF)を加えると顕著な促進活性を認めた(25)。前項 A)に述べたように同部の(骨髓球系細胞が成熟した)多形核白血球が異常に多量の IL-1 を産生していることから、この作用により更に“まるで癌細胞”が増してゆく増悪サイクルがあると考えられた。一方、このような重症 RA 患者の細胞培養液中から T 細胞(CD2 細胞)を除けば“まるで癌細胞”である CD14(+)CD15(+)細胞数が明らかに(P=0.0133)増加した。即ち、この細胞の分化に T 細胞が抑制機能をもつことが示された。重症 RA 関節部骨髓には CD14(+)CD15(+)細胞(図 13 右下矢印)のみで前駆細胞の CD14(-)CD15(+)細胞が認められないことから、“まるで癌細胞”は前駆細胞である CD14(-)CD15(+)細胞が在る腸骨骨髓で造られ末梢に移動したと考えられた(図 13)。

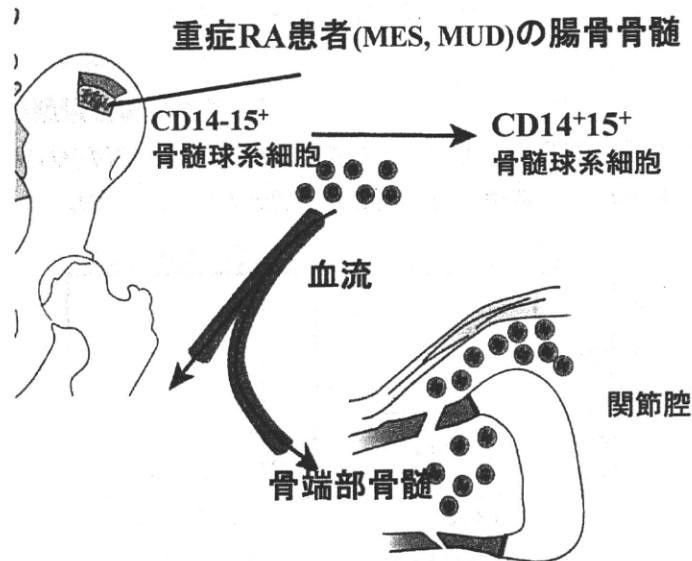


図 13、“まるで癌細胞”と表現できる重症 RA 患者に特異的な CD14(+)骨髓球系細胞は造血器官である腸骨骨髓で造られ、末梢に移動し関節部骨髓に集積していることが考えられた。

2、RA 腸骨骨髓中に認められる白血球細胞（単核細胞）の変化

重症 RA の腸骨骨髓には“まるで癌細胞”も集積して骨吸収機能が亢進していることが示されたが、現実には腸骨内の骨梁は骨粗鬆症状態で非常に薄くなっている（図 14）。

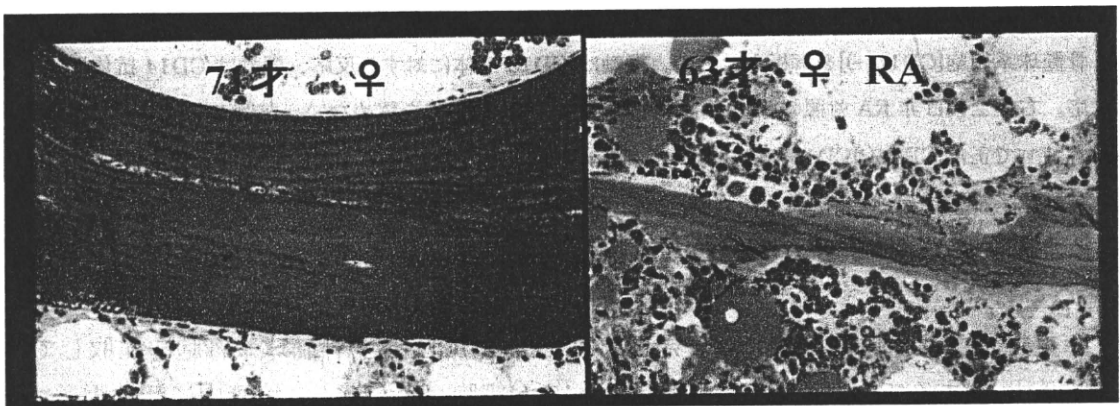


図 14、腸骨骨梁と周辺の骨髓細胞。左図は非 RA 対照とした高齢[71 歳] 婦人の骨梁、右図は重症 RA[63 歳]の骨梁；病理標本は旧東北大学医学部第 3 解剖学教室 伊藤恒敏教授により作成されたもの。

このような腸骨骨髓の白血球細胞の中で RA 患者に異常所見が認められるのは前述の骨髓球系細胞だけであろうか。もう一度研究を見直す気持ちで、腸骨骨髓血、膝関節部（骨端部）骨髓血そして末梢血を対象にして白血球（単核細胞；MNC；mononuclear cell）全体の構成を調べた(16)（表 1）。末梢血中の白血球(MNC)数を比べると RA 患者と非 RA 対照との間に明瞭な差を認めなかったが、腸骨骨髓血中の白血球細胞総数を比べると RA 患者では非 RA 対照に比べて約 3 倍近くに増加しており、腸骨骨髓白血球に

病態的変化が起きていることが示唆された。腸骨骨髓血の白血球を構成する各細胞分画（リンパ球や単球等々）夫々が同じような比率で増加しているため、各分画の細胞数の白血球細胞全体に対する構成比率には RA 患者と非 RA 対照との差を認めなかった。腸骨骨髓中の白血球すべての細胞分画に夫々同じような比率の細胞数増加が認められ、白血球全体の病態的変化が起きていることが示された。

Table 1. Cell marker studies on bone marrow aspirates and peripheral blood from 56 patients with RA and 7 non-RA controls

	Peripheral Blood		Iliac Bone Marrow		Tibial Bone Marrow	
	Controls	RA	Controls	RA	Controls	RA
No. of MNC/mm ³	974±167	1401±162	1245±311	3122±225*	952±138	1625±212
Myeloid cells						
% CD15+CD16-	2.9±0.5	6.5±1.5	19.0±3.5	24.4±1.7	6.8±2.0	5.8±0.9
T cells						
% CD4	43.2±3.3	29.5±1.8**	17.4±3.3	17.6±1.1	15.7±6.9	28.0±1.7
% CD8	25.2±2.4	21.2±1.6	20.9±4.4	15.1±0.9	15.1±3.6	23.3±1.5
% DR+CD4+/CD4	10.9±1.8	14.1±1.5	12.7±3.4	18.7±1.6	15.4±2.1	15.3±1.4
% DR+CD8+/CD8	13.7±2.8	27.7±2.1**	14.1±4.1	33.2±2.3**	13.1±2.4	28.8±2.7**
CD4/CD8 ratio	1.84±0.34	1.71±0.17	0.91±0.1	1.2±0.1	0.95±0.20	1.30±0.08
B cells						
% CD20	10.4±2.7	10.3±1.0	10.8±2.4	9.8±0.8	9.3±3.2	13.4±1.8
NK cells						
%CD16	17.3±2.2	15.7±1.6	10.8±2.3	8.2±0.7	8.9±2.0	16.3±1.5

Results are expressed as mean ± SEM.

* p < 0.01 as compared with the non-RA controls.

** p < 0.05 as compared with the non-RA controls.

表 1、末梢血(Peripheral Blood)、腸骨骨髓 (Iliac Bone Marrow)、関節部骨髓(Tibial Bone Marrow)、夫々の白血球総数(No of MNC/mm³)と、総数に対する白血球各分画の構成比率 (平均値±SEM) Myeloid cells; 骨髓球系細胞(CD15+CD16-)、CD4; ヘルパーT 細胞、CD8; サプレッサーT 細胞、DR+; HLA-DR+で活性型を表す。B cells; B 細胞、NK cells; ナチュラルキラー細胞、 * ; 高度の有意差あり、** ; 有意差あり。

末梢血中では T 細胞に RA の特徴的変化が認められたが(16)、先ず、ここで最低必要な T 細胞関係のマーカーについて確認しておきたい。T 細胞のうちでヘルパーT 細胞と分類される免疫機能のアクセル役の細胞数は CD4 細胞と呼ばれる。そして、サプレッサーT 細胞と分類される免疫機能のブレーキ役の細胞は CD8 細胞と呼ばれる。いずれも機能亢進状態になっている活性型細胞は HLA-DR(+)のマーカーが付記される。

末梢血 T 細胞の変化は以下の様なものである。ヘルパーT 細胞、即ち CD4 細胞は腸骨骨髓や関節部骨髓では非 RA 対照と明らかな差を認めないのに、末梢血では非 RA 対

照の平均値 43.2%に対して RA 患者では平均値 29.5%と明瞭に減少し、関節内などの末梢器官に高率に移行していることが示唆された。一方、サプレッサーT細胞、即ち CD8 細胞は骨髓血においても末梢血でも、RA 患者と非 RA 対照ともに総細胞数に対する構成比率には明確な差を認めなかった。しかし、CD8 細胞の中で活性型を示す HLADR(+) CD8 細胞の比率は腸骨骨髓血、関節部骨髓そして末梢血骨髓、いずれもが高値を示しているのも特徴的であった。腸骨骨髓白血球中の T 細胞、即ち CD4 細胞、CD8 細胞の細胞数の中で活性型を示す HLA-DR(+)細胞の比率が図 15 に示されている。CD4 細胞の中の HLADR(+)細胞の比率は夫々の間に差を認められなかったが、CD8 細胞中の HLADR(+) CD8細胞の構成比率はRAの関節破壊長期経過で分類した3病型(最終項、XI) (3)と関連した。罹病早期から関節破壊が急速に広がるムチランス型(MUD)の最重症 RA 患者では HLADR(+) CD8 細胞の構成比率は増加しなかった。**サプレッサーT細胞の活性型である HLADR(+) CD8 T細胞は骨・関節破壊の重症化に対して抑制機能があると考えられた。**

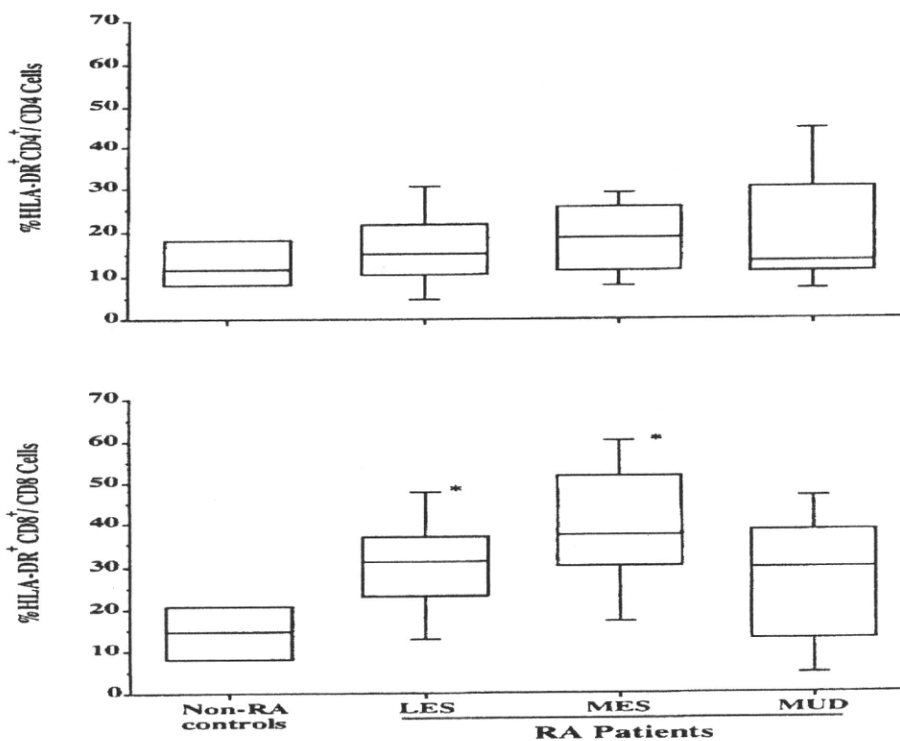


図 15、腸骨骨髓白血球中の CD4(ヘルパー)あるいは CD8(サプレッサー)T 細胞中の活性型(HLA-DR+)T 細胞の比率 (%)。 Non-RA control; 非 RA 対照、LES; 軽症 RA、MES; 重症 RA、MUD; 重症 RA の中でも骨破壊が顕著なムチランス型 RA。

3、RA 腸骨骨髓中の活性因子

RA の腸骨骨髓が白血球細胞増加を引き起こすだけでなく、RA の諸病態を引き起こす活性因子の重要な供給源になっているのではないかと考えて、RA 患者の腸骨および

膝関節部骨髓血中の IL-6 および IL-8 蛋白量を調べた。IL-6 は滑膜増殖を促進するなどの作用で重要な活性因子であり、IL-8 は CD14(+)単球などを病巣局所に集積する作用で重要な活性因子である。**RA 患者の膝関節部骨髓中 IL-6 および IL-8 蛋白量ともに高値を示したが末梢血中と同程度であった。一方、RA 患者の腸骨骨髓中では両因子とも常に末梢血や関節部に比べて高値が認められ、重要病巣であることが示唆された (15)。**

今まで RA 患者の病態解明研究の対象になっていなかった骨髓血中には重要な病因・病態物質が存在しているに違いないと考え、人工関節挿入時に漏出する関節部骨髓血からの細胞を集めた。このような RA 骨髓血、そして更に骨髓腫患者の骨髓血中の細胞がマウスの B 細胞株増殖を促す増殖因子を作っていることが平野教授らに見出され BST-1(後に CD157 と命名された)および BST-2 と名づけられた(11,14,19)。この物質は RA の骨髓および滑膜の線維芽細胞様細胞の他に、臍帯血管内皮細胞や骨髓球系細胞などの種々の細胞にも産生が認められ、また RA 患者の血清中には非常に高単位が認められる例もあった(24)。その後、BST-1/CD157 は RA 病態形成の重要な鍵とも言えるナース細胞様細胞(RA-NLC)細胞膜の重要な構成物質と判明した(33)。

V) RA の骨髓および滑膜に見出されたナース様細胞

1、ナース様細胞の存在

新たに見出された“まるで癌細胞”の CD14(+)骨髓球系細胞の維持・増殖を試みた。この細胞が集積する関節部骨髓血清を培養液中に加えても“まるで癌細胞”の長期培養はできなかった。試行錯誤の末に“まるで癌細胞”が集積する部位の線維芽細胞様細胞を加えて培養すると、“まるで癌細胞”を長く培養できた。そのような経過もあり、RA 患者の病態に重要な機能を示す線維芽細胞様細胞を見出し、ナース細胞と同様の機能をもつ細胞と知った。ナース細胞は、1980 年に Wekerle H らがマウスやラットの胸腺の線維芽細胞様細胞は胸腺 T 細胞を“抱き込み(pseudoemperipolesis)”、生き長らえさせる機能があることを見出してナース細胞(nurse cell)と名づけて報告した。その後、ヒトの皮膚にもナース細胞同様の細胞が報告された(Iwagami et al, 1994)。

Wekerle H, Ketelsen UP. 1980. Nature. 283: 402

Wekerle H, et al. 1980. J Exp Med. 925

Iwagami S, et al, 1994. J Immunol. 153: 2927

我々は RA 患者の滑膜や骨髓にはリンパ球を抱きこんで維持、増殖させる、即ち Wekerle らが見出したナース細胞と同様の機能をもつ線維芽細胞様細胞が多数存在することを見出し、ナース様細胞 (nurse-like cell; NLC) として報告し詳細な研究を進めた (33,35,36, 57)。免疫機能亢進を誘導するリンパ球などの病的細胞だけでは短期の疾患に終るはずなのに、ナース様細胞は病的細胞を活性化し生き長らえさせて疾患の慢性化と増悪を導いている“悪役細胞”と分かってきた。治療上の重要な標的である。

Wekerle らがマウスやラットの胸腺で見出したナース細胞と同様に、ヒトの T 細胞株(Molt-17)を接着し抱きこむ(pseudoemperipolesis; adhesion and transmigration)線維芽細胞様細胞が RA の骨髓および関節滑膜から見出され、RA のナース様細胞 (RA nurse-like stromal cell; RA-NLC)として樹立された(35,36) (図 16)。この細胞 (RA-NLC) の形態はやや大型であるが通常の線維芽細胞と同様に間質細胞の特徴を備えていた。モノクロー抗体で調べたナース様細胞表面の抗原構造でもヒトの皮膚や変形性関節症の滑膜表面から分離した線維芽細胞と類似して判別困難であった。次項に記すが、ナース様細胞培養中に IFN- γ を加えると細胞表面の CD106 および CD157 の発現が増すことが特徴的と分かり、皮膚などの線維芽細胞との区別ができた(33)。

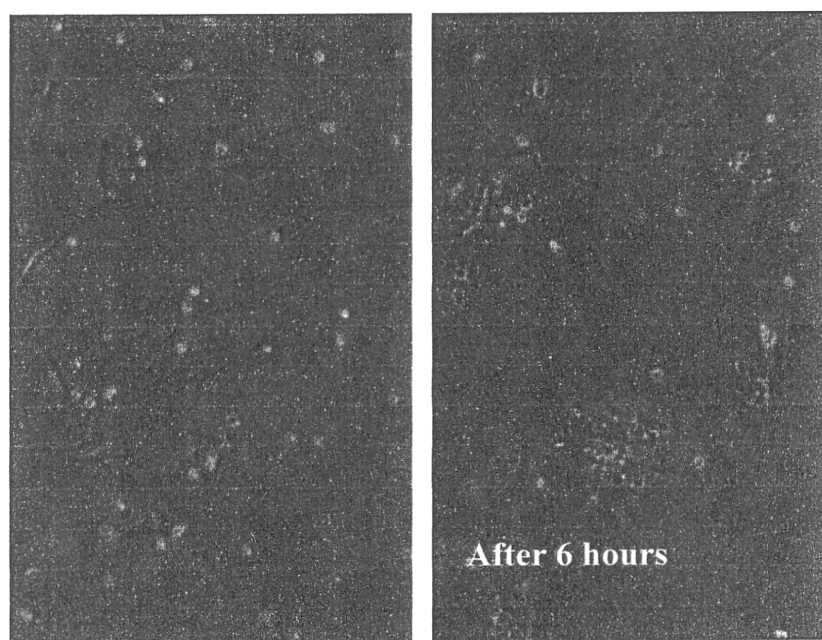


図 16、腸骨骨髓血から樹立したナース様細胞。予めナース様細胞をシャーレで培養し、そこに B 細胞を加えた (左図)。6 時間後 (右図) にはナース様細胞の下に B 細胞が潜り込んでいるのが観察された。

2、ナース様細胞による B 細胞の活性化・・・免疫反応亢進機序

T 細胞を抱きこむ機能に依って樹立したナース様細胞(NLC)であったが B 細胞も抱きこみ、免疫機能亢進に重要な働きを示すナース細胞機能が認められた(33,35,36)。ナース様細胞が B 細胞を抱きこんだ時の活性因子産生亢進と B 細胞からの免疫グロブリン産生亢進が調べられた (表 2)。骨髓由来でも、滑膜由来でも同様であるが、ナース様細胞は単独でも炎症関連細胞の増殖や集積に働く IL-6、IL-8、GM-CSF などの活性因子を産生する。特に IL-6、IL-8 の産生亢進は顕著である。ナース様細胞培養中に B 細胞を加えて抱きこみ (pseudoemperipolesis) が起きると IL-6、IL-8、G-CSF、GM-CSF などの活性因子産生が著明に亢進するとともに、単独培養では検出できなかった RA 病態の根幹的な活性因子である IL-1 β や TNF α も検出されるようになった。それとともに抱きこまれた B 細胞からの免疫グロブリン (IgM) (RA 患者血清中のリウマチ因子な

ど)の産生も著明に亢進した。RA 病巣において、抱き込んだナース様細胞とともに抱きこまれたB細胞も共に増殖・機能亢進を示し、雪だるま式にRAの免疫亢進機序が進んでゆく病態が示唆された(35,36)。

Cytokine production from RA-SNCs and Ig production from B cells in coculture.

Condition	Cytokines in cell culture supernatant, pg/ml †								IgM μ g/ml †	
	IL-1 α	IL-1 β	IL-6	IL-8	G-CSF	GM-CSF	TNF α	TNF β	Exp.2	Exp.3
RA-SNC	<5.0	<10.0	2,200	4,300	460	40	<5.0	<5.0	<1.5	<1.5
B cell	<5.0	<10.0	<10.0	<10.0	<10.0	<2.5	<5.0	<5.0	1.8	2.7
B cell + RA-SNC(separated) ‡	<5.0	<10.0	1,800	3,900	510	30	<5.0	<5.0	<1.5	<1.5
B cell + RA-SNC	<5.0	153	15,900	34,500	2,400	740	690	<5.0	5.6	8.6

* B cell clones (1×10^5) and RA-SNC3 (5×10^4) were cultured under the indicated conditions for 3 days in 24-well plates.

† The amount of each cytokine and IgM in the culture supernatant was measured with an enzyme-linked immunosorbent assay kit.

‡ B cell clones were cultured in a Millicell culture insert.

表 2、ナース様細胞が B 細胞を抱きこみによる活性因子産生量(pg/ml)と B 細胞からの免疫グロブリン(IgM)産生量(μ g/ml)亢進。RA-NLC; RA のナース様細胞。Separated; 両細胞を通さない膜で隔てた培養。

RA のナース様細胞成分が自己抗原となり自己免疫反応が起きている可能性を考えて、滑膜のナース様細胞に特異的に反応する CD4(+)T 細胞クローンを樹立した。T 細胞クローンが認識したナース様細胞の自己抗原は分子サイズが 25 または 50-kd であり、HLA-DR 型が一致する抗原提示細胞、即ち CD14(+)単球が共存している状態でのみ T 細胞の自己抗原認識が認められた。RA のナース細胞との共存に依って長期間にわたって維持されている B 細胞クローンが産生する免疫グロブリンにはナース様細胞などの細胞構成物質に反応する抗体(自己抗体)も含まれ、独得のグロブリン構造が認められた(53)。自己免疫反応誘導にも CD14(+)単球が重要であることが示された(37)。

3、ナース様細胞機能の仕組み

B 細胞単独で培養した時の細胞数に比べて、ナース様細胞共存で培養したときの B 細胞数の減少は明らかに抑えられた(40)(図 17)。生体組織では各細胞の代替わりが行われて若い細胞によって機能的恒常性が保たれているが、代替わりに伴って古い細胞が自然に死んでゆく現象はアポトーシス(apoptosis)と呼ばれている。ナース様細胞と接触した B 細胞が長く維持される現象は B 細胞に起きるはずのアポトーシスが抑制されるためと示され、この抑制機序には Bcl-xL と名づけられた蛋白質の機能が重要であることが示された(40)。

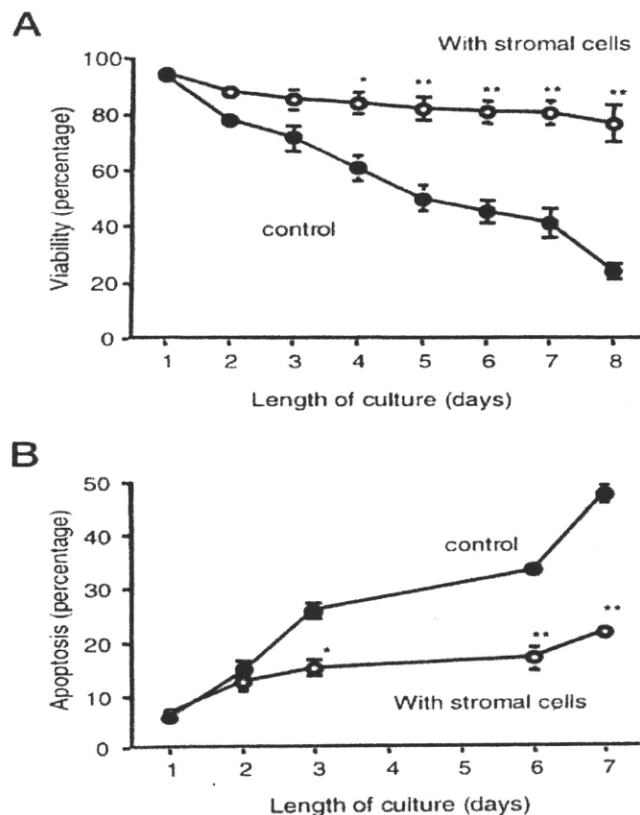


図 17、滑膜由来のナース様細胞と共に培養したときの末梢血 B 細胞の生存細胞数 (%) (図 A) とアポトーシスの割合 (%) (図 B) の変化。●は B 細胞単独での培養、○は B 細胞をナース様細胞と共に培養した結果を示す。横軸は培養日数 (日) を示す。文献(40)より。

RA 腸骨骨髓由来のナース様細胞株 (クローン) RA-NLC91BM を用いて、B 細胞の抱き込みに伴うアポトーシス抑制機能とナース様細胞膜の CD106 および CD157 構造の関連を検討した。B 細胞単独では培養 5 日後の細胞数が培養初日に比べて 17.6% に減少する培養条件で、ここにナース様細胞株 (RA-NLC91BM) を共培養した。培養 5 日後ではアポトーシスは明らかに抑えられ、B 細胞数は培養初日に比べて 45.2% と細胞数減少は抑えられた。この現象に関連するナース様細胞の CD106 あるいは CD157 の機能を調べるために培養中に夫々に対する抗体を加えたところ、細胞数は再び明らかに減少した。**ナース様細胞膜にある CD106 および CD157 構造はナース様細胞のもつアポトーシス抑制機能に必要で、抱きこまれた細胞の維持に重要であることが示された (33)。**

ナース様細胞機能の特性は “抱きこみ(pseudoemperipolesis)” “であるが、これは接着[adhesion]する段階と潜り込み[holding beneath]が起きる段階の二つに分けることが出来る。RA 滑膜から樹立したナース様細胞株 (クローン) の一つである RA-SNC77 を用いて抱き込み(pseudoemperipolesis)現象を解析した。ナース様細胞とヒトの B 細胞株 (MC/car) を共培養すると 15 分で接着が始まり 30 分で接着細胞数はほぼ一定になる。それに引き続きナース様細胞に B 細胞が潜り込み始めるが、潜り込む細胞数は

約 2 時間でピーク値に達する。そこで B 細胞を、ナース様細胞への接着は起きるが潜り込みは起きなくするために予め阻害因子 (C3 transferase : Rho-specific inhibitor) と反応させて、ナース様細胞と共培養した。この状態でもナース様細胞からの IL-6 および IL-8 産生には、通常の B 細胞と共培養したときと同様の産生亢進が認められた。即ち、ナース様細胞が B 細胞と接着すれば (潜り込みが起きなくても) 通常の IL-6 と IL-8 産生亢進は誘導されることが示された(46)。

4、ナース様細胞は血液疾患にも関連する細胞か(他研究グループの報告)

我々はリウマチ患者の骨髓や滑膜病巣で B 細胞などの白血球細胞の維持・増殖に働くナース様細胞を見出して 1998 年に初めて報告し(33)、この細胞はリウマチ患者に特異的な間葉系間質細胞と考えていた(57)。ところが**ナース様細胞が白血病(慢性 B 細胞性白血病; CBL) 患者の血液中に存在して、白血病 B 細胞を維持・増殖させていることが 2000 年に米国の研究室から発表された**。白血病(CBL)患者の白血球細胞を培養すると大型の丸い線維芽細胞様細胞が現れてくる。この細胞に骨髓細胞によって作られる因子が働けば、接着した白血病 B 細胞のアポトーシスが抑制されて細胞の寿命が延び慢性化してゆくという(Burger et al, 2000)。また同グループは**ナース様細胞は CD14 (+) 系の細胞であり、その分化誘導には白血病 B 細胞との共存という病的な細胞環境が必要らしいと報告した**。(Tsukada et al, 2002)。更に、同グループは RA 患者の滑膜組織中のナース様細胞の存在を確認し、その機能発現のためには活性因子 (SDF-1; stromal cell- derived factor-1) と細胞表面の CD106 構造との両者が必要であることを示した(Burger et al, 2001)。RA のナース様細胞と同様の細胞が白血病にも認められたという報告で、**RA の病態解明の視野を白血病も含めての造血系骨髓の疾患という観点到に広げべきと教えられた**。

Burger JA et al, Blood 2000; 96: 2655

Burger JA et al. JCI 2001; 107: 305

Tsukada N et al, Blood 2002; 99:1030

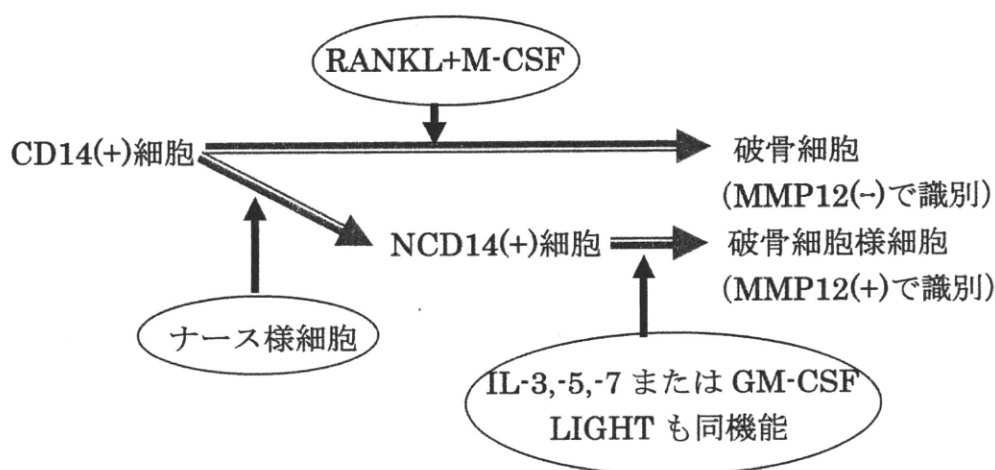
RA 病態の鍵と思われるナース様細胞はどこから来たのであろうか。骨髓に在る造血幹細胞から分化してくる CD14(+)細胞 (単球) はマクロファージなどの貪食細胞の前駆細胞と考えられている。Seta N & Kuwana M は CD14(+)細胞に由来する、或る未熟な (胎生幹細胞のマーカーである Nanog や Oct-4 を特異的に発現する) 細胞を見出し MOMCs(monocyte- derived multipotential cells)と名づけた。MOMCs は培養中では線維芽細胞様の形体で CD14, CD45, CD34 を発現しているという。MOMCs はヒトの造血系細胞に接着すると種々の造血促進因子を産生して細胞増殖を促進し、免疫機能にも関わっているという。このような報告を見ていると、RA 病因解明に繋がるナース様細胞分化機序は造血系幹細胞までの広い視野から、遠からず解明されると実感している。

Seta N, Kuwana M Experimental Hematology 2010 ; 38 ; 557

VI) RA 特異的な“破骨細胞様細胞”(ナース様細胞と CD14(+) 細胞との反応)

1、ナース様細胞による TRAP 陽性単球 (NCD14+細胞) への分化

ナース細胞はラットの胸腺 T 細胞を抱き込む機能を持った線維芽細胞様細胞として、Wekerle らによって見出された。我々は RA の骨髓および滑膜に同様の機能をもつ線維芽細胞様細胞 (ナース様細胞) を見出し、T 細胞だけでなく B 細胞をも抱き込み活性化することを示した。それではナース様細胞と CD14(+) 単球・マクロファージを共に培養すればどうだろうと考えた。この細胞は機能的には B 細胞からのリウマチ因子産生促進、破骨細胞への分化などに重要な細胞と知られているが、更に新しい知見が見られる未解明の細胞で本報告書では以後、単に CD14(+) 細胞という呼称で進める。



ナース様細胞の培養中に CD14(+) 細胞を加えて抱き込みの有無を調べた。CD14(+) 細胞だけを培養すると細胞数が自然に減少してゆく。しかし、**CD14(+) 細胞の培養中にナース様細胞を混ぜるとナース様細胞は予期通り CD14(+) 細胞を抱きこんだ。第2週から CD14(+) 細胞数の減少は抑えられ、第4週には CD14(+) 細胞は豊富な細胞質をもつ細胞形態に変化した(43) (図 18)。**CD14(+) 細胞がナース様細胞との接触によって誘導されたこの細胞を本報告書では **NCD14(+)** と呼ぶことにする。

NCD14(+) 細胞の組織化学的解析では骨吸収に働く破骨細胞に特徴的と考えられてきた TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase)を産生し、TRAP(+) 単球と表現できる(43)。また、NCD14(+) 細胞は分化段階で考えると後述の“破骨細胞様細胞”の前駆細胞であるが既に、軟骨基質の分解酵素として知られる MMP-2(matrix metalloproteinase 2; gelatinase A)や MMP-9(matrix metalloproteinase 9; gelatinase B)を産生し、細胞培養中のシャーレに入れた軟骨組織を分解する組織破壊活性が認められた(48)。一方、CD14(+) 単球を抱き込んだナース様細胞からは、B 細胞を抱きこんだときのように、IL-6, IL-8 産生が顕著に亢進した(51)。