

平成 21 年 4 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2005～2008
課題番号：17591054
研究課題名(和文) 関節リウマチにおける滑膜細胞の異常増殖機構の解明とその制御
研究課題名(英文) Elucidation and regulation of abnormal growth of synovial cells from patients with rheumatoid arthritis
研究代表者 亀田 秀人(KAMEDA HIDETO) 埼玉医科大学・医学部・講師 研究者番号：00265795

研究成果の概要：関節リウマチ(RA)患者由来の滑膜細胞が増殖因子刺激により腫瘍様増殖を示す点に注目し、生理的条件に近いコラーゲンをを用いた3次元培養系を確立した。RA滑膜細胞は無刺激では球形に近い形態をとるが、増殖因子刺激によりシグナル分子の活性化とアクチン再構成を介して突起の著明な伸長を示して増殖し、それらは増殖因子受容体阻害薬イマチニブで阻害された。また、滑膜細胞の増殖はTリンパ球との共培養で促進された。以上より、RAの病態における増殖因子とリンパ球浸潤の役割、ならびにイマチニブのRA新規治療薬としての有用性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	1,100,000	0	1,100,000
2006年度	900,000	0	900,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,400,000	420,000	3,820,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：内科・膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：関節リウマチ、滑膜細胞、PDGF、アダプター蛋白、3次元培養

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)患者滑膜の特徴は、血管新生、炎症細胞浸潤、および滑膜細胞の異常増殖である。この滑膜細胞の異常増殖は培養系に移しても認められ、さらに SCID (severe combined immunodeficient) マウスに RA 患者滑膜組織を移植しても、移植組

織が軟骨の浸潤を示すことから、RA において滑膜細胞は単なる活性化ではなく、腫瘍様の transformation を生じていると考えられている。近年、このことを支持する知見として、RA 滑膜細胞の細胞形態学的変化、血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor; PDGF) の存在下での anchorage 非依存性の増

殖や接触阻止 (contact inhibition) 喪失、oncogene の活性化、monoclonal あるいは oligoclonal な増殖などの報告が蓄積されている。かかる細胞の transformation 過程においては、増殖因子刺激の伝達経路における異常が重要なステップとして位置づけられている。

アダプター蛋白は細胞内シグナル伝達を円滑で効率的に行うのに必須な分子群であり、腫瘍性疾患においては増殖因子受容体などの増殖シグナル分子の量的・質的発現異常が数多く報告されている。しかしながら、アダプター蛋白の発現異常に関してはこれまで検討されていなかった。

さらに、従来の2次元培養では細胞のシグナルが生体内とは異なる可能性が考えられていた。

2. 研究の目的

RA滑膜細胞がanchorage非依存性の腫瘍様増殖を示す点に注目し、滑膜細胞の3次元培養系を確立し、RAにおける滑膜細胞の増殖異常を *in vivo* に近い *in vitro* の培養条件下で詳細に解析する事とした。この3次元培養により、従来の平面培養では困難であった正常滑膜細胞との差別化が容易となり、RA滑膜細胞に内在する異常が浮き彫りとなる。この系において、RA滑膜細胞を特徴づけるanchorage非依存性増殖に関与する増殖刺激因子の同定、およびその増殖因子受容体の下流に存在する刺激伝達系のどこに正常滑膜細胞との相違が認められるかを検討する。RAの滑膜にはT細胞の浸潤が特徴の1つとして認められることから、T細胞が滑膜細胞の増殖に及ぼす影響も検討する。

また、本研究ではRA滑膜細胞におけるアダプター蛋白の発現や機能を調べることで、RA滑膜細胞が増殖異常を生じている分子メ

カニズムを解明することも目的とした。

さらにこの3次元培養系により、これまでに作用機序の不明であったRA治療薬の作用機序の検討、ならびに新たな治療薬のスクリーニングも行う。

さらに我々は低分子化合物の先駆的分子標的薬である imatinib mesylate のRAに対する治療応用を考え、3次元培養における基礎的な検討も行う。従来の2次元培養では *in vitro* と *in vivo* の作用にしばしば乖離が生じていたが、3次元培養により一致性を高めることが期待できる。

こうした滑膜細胞の3次元培養を用いた多面的な研究により、RAの病態解明および新規治療スクリーニングに大きく貢献することを、本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 滑膜細胞の採取

施設の倫理委員会の承認を得て、RAその他の患者から文書同意を取得して人工関節置換術施行時に採取された滑膜をコラゲナーゼ処理することで、滑膜細胞を得た。2-5 継代での培養細胞を以下の実験に用いた。

(2) 滑膜細胞におけるアダプター蛋白の発現と、その活性化における役割

滑膜線維芽細胞を PDGF で刺激し、細胞の融解液を免疫沈降法と蛋白プロット法を用いて、アダプター蛋白の発現とチロシンリン酸化を検討した。PDGF 刺激は 10 ng/ml で行い、imatinib は 0.3-10 μ M、メトトレキサートは 0.1-10 μ M、タクロリムスは 0.1-10 nM でそれぞれ用いた。

(3) 滑膜細胞とT細胞のコラーゲンゲル中での3次元共培養 24穴プレートのコラーゲンゲル中でRA滑膜線維芽細胞を 4×10^4

cells/ml にて 10-14 日間培養した。一部の well では T 細胞株である Loucy 細胞を 2×10^5 cells/ml で共培養した。

(4) 滑膜細胞のアクチン骨格の変化

4%パラホルムアルデヒドで固定、0.5% triton X-100 で細胞膜を透過性とした後に、rhodamine-phalloidin によるアクチンの染色を行い、薄く切り出したゲルをプレパラートにのせ、蛍光顕微鏡で観察した。

(5) 滑膜細胞の増殖定量

コラーゲングル中で RA 滑膜線維芽細胞を培養し、コラーゲナーゼ処理でゲルを可溶化して細胞を回収、抗 CD90 抗体を用いた FACS で細胞数を定量した。

4. 研究成果

(1) RA と外傷あるいは変形性関節症 (OA) の滑膜細胞の相違

外傷あるいは OA のために膝関節置換術を施行された患者から滑膜を採取し、2-5 継代培養した得られた滑膜線維芽細胞は、コラーゲングル中でも軟寒天ゲル中と同様に球形をしめず細胞が多く、一部が軽度紡錘状の伸長を示した。しかしながら、手術時に関節炎の活動性が残存していた RA 患者由来の滑膜線維芽細胞は、軟寒天ゲル中では球形であったがコラーゲングル中では 0.5%と低濃度の血清中においても紡錘状の形態を示すものが多く見られた。プレートにおける 2 次元培養ではいずれも紡錘状の形態となるため、コラーゲングルによる 3 次元培養だけが形態学的に滑膜線維芽細胞が RA 由来か否かある程度鑑別しうる方法であり、RA の病態を解析する上で有用な細胞培養法であると考えられた。

(2) 3 次元培養において RA 滑膜細胞の増殖を制御する因子の検討

まず、2 次元培養および軟寒天ゲルにおける 3 次元培養において、PDGF $10 \mu\text{g/ml}$ 刺激において増殖促進効果が確認され、特に 3 次元培養においては 20%の血清刺激に匹敵した (Kameda H, et al. Clin Exp Immunol 2006)。そして、コラーゲングルによる 3 次元培養下では、PDGF 刺激により RA 由来滑膜線維芽細胞はさらに著明な紡錘状の形態伸長と突起の伸長を示した。そしてコラーゲナーゼ処理によりゲルを融解し、回収した細胞を洗浄して抗 CD90 抗体を用いた fluorescence-activated cell sorting (FACS) 解析により細胞数を測定したところ、PDGF 刺激によるコラーゲングル中での滑膜線維芽細胞の増殖促進が確認された。この効果は外傷や OA 患者由来の滑膜線維芽細胞においても認められた。

次に、RA の滑膜においては特に病初期に T 細胞の浸潤が認められることから、T 細胞株 Loucy 細胞との共培養をコラーゲングル中で行った。Loucy 細胞の共存により由来を問わず滑膜線維芽細胞の増殖は促進され、しかもこの効果は PDGF 刺激の効果と相加または相乗的であったことから、PDGF 以外のサイトカインを介するものと考えられた。インターロイキン (IL) -17 には滑膜線維芽細胞の増殖促進効果が認められなかったことから、他のサイトカインあるいは直接的な細胞接着が必要な可能性が示唆された。

(3) RA 滑膜線維芽細胞の増殖異常におけるアダプター蛋白の役割

RA 滑膜線維芽細胞の腫瘍様増殖は PDGF 刺激において顕著となるため、PDGF 受容体の下流に見られるアダプター蛋白の発現スクリーニングを行った。RA 滑膜細胞には Gab1、Gab2、Nck、Shc のアダプター蛋白の発現が見られた。7 例の RA 患者における検討では、明らかな発現異常は見いだされなかった。

しかし、いずれのアダプター蛋白も PDGF-BB 10 ng/ml 刺激後 1 分以内にチロシンリン酸化され、この反応は抗 PDGF-BB 抗体あるいは imatinib mesylate 1 μ M の前投与によりほぼ完全に抑制されたことから、PDGF 刺激による細胞の活性化に参与していることが示唆された。アダプター蛋白のリン酸化を PDGF 刺激と上皮増殖因子 (EGF) 刺激とで比較したところ、前者でより強い作用を示し、増殖促進効果に合致していた (Kameda H, et al. Clin Exp Immunol 2006)。

(4) 3 次元培養系における既存抗リウマチ薬の作用検討

既存の抗リウマチ薬の中で有効性が特に高いとされている MTX と、中等度とされるタクロリムス (T 細胞のカルシニューリンの活性を阻害することが主な作用) とを、コラーゲンゲルにおける滑膜線維芽細胞の増殖抑制効果において比較した。すると、MTX は用量依存性に増殖を抑制し、既知の活性化 T 細胞の抑制作用以外に、部分的には滑膜細胞の増殖抑制作用も有効性に参与していることが明らかとなった。一方、タクロリムスには明らかな抑制作用を認めなかった。従って、このコラーゲンゲルによる 3 次元培養の系は、抗リウマチ薬の新たなスクリーニングに有用である可能性が示唆された。

(5) imatinib mesylate の滑膜細胞増殖に対する抑制効果の検討

新たなカテゴリーの抗リウマチ薬として期待されているのが、免疫系への最小限の関与で滑膜細胞の増殖を阻害する薬剤である。imatinib mesylate はすでに保険適応を有する慢性骨髄性白血病を合併した RA 患者における投与で、関節炎に対して有効であったことが複数報告されている。また、関節炎の動

物モデルにおける有効性も報告された。我々も、2 次元培養、および軟寒天ゲルにおける 3 次元培養で imatinib が PDGF 刺激による RA 滑膜線維芽細胞の増殖を比較的低用量で、用量依存性に抑制することを見いだした (Kameda H, et al. Clin Exp Immunol 2006)。その後、コラーゲンゲルにおける 3 次元培養でも、imatinib が用量依存性に PDGF 刺激による RA 滑膜線維芽細胞の増殖を抑制することを明らかにした。imatinib は T 細胞株の共存による滑膜線維芽細胞の増殖には影響を及ぼさなかったため、その効果は非特異的な細胞毒性ではないことが確認された。また、imatinib は PDGF 刺激による RA 滑膜線維芽細胞の紡錘状の形態変化もほぼ完全に阻害したことから、その作用機序として細胞骨格蛋白への寄与が示唆された。そこで rhodamine-phalloidin 染色によるアクチンの変化を検討したところ、PDGF 刺激によるアクチンの再構成が imatinib により完全に阻害され、このことが形態変化や増殖に対する影響に関連していると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 62 件)

Sekiguchi N, et al. (13 人中 9 番目)
Messenger RNA expression profile in peripheral blood cells from RA patients following treatment with an anti-TNF α monoclonal antibody, infliximab. Rheumatology 2008;47:780-788. 査読有り

Kameda H, Suzuki M, Takeuchi T.
Platelet-derived growth factor as a therapeutic target for systemic autoimmune diseases. Drug Target Insights 2007;2:239-247. 査読有り

亀田秀人. メシル酸イマチニブの膠原病

治療薬としての可能性. 日本臨床免疫学会
会誌 2007;30(3):165-173. 査読無し

Kameda H, et al. (9人中1番目)
Development and validation of handy
rheumatoid activity score with 38 joints
(HRAS38) in rheumatoid arthritis patients
receiving infliximab. Mod Rheumatol 2006;
16: 381-388. 査読有り

Kameda H, Ishigami H, Suzuki M, Abe T,
Takeuchi T. Imatinib mesylate inhibits
proliferation of rheumatoid synovial
fibroblast-like cells and phosphorylation
of Gab adapter proteins activated by
platelet-derived growth factor. Clin Exp
Immunol 2006;144:335-341. 査読有り

Sekiguchi N, Kameda H, Amano K, Takeuchi
T. Efficacy and safety of bucillamine, a
d-penicillamine analogue, in patients
with active rheumatoid arthritis. Mod
Rheumatol 2006;16:85-91. 査読有り

〔学会発表〕(計 52 件)

Kameda H, (11人中1番目). The
comparison of efficacy and safety between
etanercept (ETN) plus methotrexate (MTX)
combination therapy and ETN monotherapy in
MTX-refractory Japanese patients with
rheumatoid arthritis: 52-week clinical
results from the JESMR study. 72th Annual
Scientific meeting of ACR, October 2008,
San Francisco, USA.

Kameda H, et al. (11人中1番目) The
comparison of efficacy and safety between
etanercept (ETN) plus methotrexate (MTX)
combination therapy and ETN monotherapy in
MTX-refractory Japanese patients with
rheumatoid arthritis: 24-week results
from JESMR study. Annual European Congress
of Rheumatology (EULAR 2008). 2008年6月、

パリ.

Kameda H, Suzuki M, Ishigami H, Sakai
H, Abe T, Takeuchi T. Morphological
alteration and proliferation of synovial
fibroblast-like cells in 3-dimensional
culture are induced by platelet-derived
growth factor and inhibited by imatinib
mesylate. . 71th Annual Scientific meeting
of ACR, November 2007, Boston, USA.

亀田秀人, 鈴木美由紀, 石上浩庸, 酒井
宏哉, 安倍達, 竹内勤. 関節リウマチの滑
膜細胞増殖に及ぼすT細胞の影響. 第28回
日本炎症・再生医学会. 2007年8月, 東京.

亀田秀人, 鈴木美由紀, 石上浩庸, 酒井
宏哉, 安倍達, 竹内勤. 関節リウマチの滑
膜細胞増殖に及ぼすT細胞の影響. 第28回
日本炎症・再生医学会. 2007年8月, 東京.

Kameda H, Suzuki M, Ishigami H, Sakai
H, Abe T, Takeuchi T. Proliferation of
synovial fibroblast-like cells is
synergistically enhanced by the
infiltration of T lymphocytes and the
stimulation with platelet-derived growth
factor. 70th Annual Scientific meeting of
ACR, November 2006, Washington DC, USA.

Nagasawa N, et al. (8人中2番目)
Association of the joint destruction in
patients with rheumatoid arthritis (RA) by
the indicators of clinical disease
activity and the patient's quality of
life (QOL). The 12th APLAR Congress, August
2006, Kuala Lumpur, Malaysia

Kameda H, Ishigami H, Suzuki M, Abe T,
Takeuchi T. Involvement of Gab adaptor
proteins in the proliferative signaling
through platelet-derived growth factor
receptor in rheumatoid synovial
fibroblast-like cells and their

regulation by imatinib mesylate. Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2005, 2005年6月, ウィーン

小川祥江、他(9人中2番目)インフリキシマブ投与前後の関節リウマチ患者血清における GRO の発現検討.第49回日本リウマチ学会総会・学術集会、2005年4月、横浜

〔図書〕(計 14 件)

Kameda H. Lung disease in EBV infection. ed. by Michaela Bilic. Encyclopedia of Molecular mechanisms of Diseases. Springer, Heidelberg (in press).

亀田秀人, 竹内勤: 関節リウマチ. 石黒直樹, 川合眞一, 森田育男, 山中寿 編. ファーマナビゲーター COX-2 阻害薬編. メディカルレビュー社 東京 112-121, 2006.

亀田秀人, 竹内勤: 多発性筋炎/皮膚筋炎. 小池隆 亀田秀人、竹内勤: 関節リウマチ. 山本一彦 編. 臨床免疫学 基礎研究の進歩と最新の臨床 日本臨床社, 大阪, 261-266, 2005.

亀田秀人、竹内勤: 治療. 能勢真人, 尾崎承一 編. 治療. 膠原病の病理診断マニュアル(病理と臨床臨時増刊号), 文光堂, 東京, 48-52, 2005.

6. 研究組織

(1)研究代表者

亀田 秀人 (KAMEDA HIDETO)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号: 00265795