

平成21年6月10日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007年度～2008年度

課題番号：19590390

研究課題名（和文） 関節滑膜間葉系細胞の自己免疫性関節炎における異常

研究課題名（英文） Abnormality of synovial mesenchymal cells in autoimmune arthritis

研究代表者

石原 克彦（ISHIHARA KATSUHIKO）

川崎医科大学・教授

研究者番号：10263245

研究成果の概要：遺伝子改変関節炎発症型マウスの滑膜組織より間葉系細胞株のクローンを樹立した。表面抗原は骨髄間質細胞と類似しており、骨髄細胞からマクロファージ系細胞の発生を支持する機能を有した。これらの細胞株は間葉系細胞、滑膜線維芽細胞、骨芽細胞に特徴的な遺伝子を発現していた。HTLV-1の*pX*遺伝子を過剰発現するマウス由来の滑膜線維芽細胞株では、破骨細胞分化誘導能が亢進していた。これらの滑膜線維芽細胞に関する基礎的解析結果は、関節リウマチの病態の理解につながる重要な知見を提供した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：疾患モデル動物、滑膜線維芽細胞、関節リウマチ

1. 研究開始当初の背景

(1) 申請者は、IL-6ファミリーサイトカインに共通する受容体 gp130 の信号伝達経路に異常を持つノックインマウス gp130F759 が、関節リウマチ様自己免疫性関節炎を発症することを発見した。リンパ球が必須である gp130F759 の関節炎発症には宿主の環境因子即ち非造血系細胞における gp130Y759F 変異が必要十分条件である。この実験結果は、免疫細胞の機能異常が非造血系細胞により受動的に惹起されるという自己免疫疾患発症機構の新たな捉え方をもたらした。

(2) 近年、間葉系においても骨芽細胞、脂

肪細胞、筋線維芽細胞、軟骨細胞に分化する能力を持つ幹細胞の存在が示唆されている。間葉系細胞における滑膜線維芽細胞固有の特徴は明らかでない。

2. 研究の目的

自己免疫性関節炎の病態を理解するために、gp130F759 の自己免疫性関節炎において増殖している滑膜間葉系細胞のクローンを樹立し、その表面抗原・遺伝子発現と機能を野生型と対比して詳細に解析し、滑膜間葉系細胞亜集団を識別する。特に関節局所における非造血系細胞の血液系細胞(リンパ球、マクロファージ、破骨細胞)支持機能

を解析する。

3. 研究の方法

(1) マウス関節滑膜細胞株の樹立と解析
関節炎発症型マウス；gp130F759およびpX-トランスジェニック(Tg)/gp130F759と対照野生型マウスの滑膜組織由来の間葉系細胞株のクローンをそれぞれ5-10クローンずつ作製し、表面抗原および遺伝子の発現により細胞系譜および亜集団を識別する。

(2) マウス関節滑膜細胞株の血液細胞制御機能の解析
血液系細胞機能制御を指標に滑膜細胞の機能変化を解析する。基本的には野生型マウスの骨髓細胞を用いて、野生型および関節炎発症型マウス由来の滑膜細胞株の機能を対比し、その差異を明らかにする。

①血液細胞分化支持能：滑膜線維芽細胞株上に骨髓細胞を限界希釈法により撒き、一週間後に出現するコロニーの細胞系譜をフローサイトメーターで解析し、血液細胞分化支持能を評価する。

②破骨細胞分化誘導能：滑膜線維芽細胞株を撒いたウェルに、TRAP(酒石酸耐性酸フォスファターゼ)-GFP-RAW細胞(鳥取大学林眞一博士より恵与)を撒き、蛍光顕微鏡下にGFP陽性すなわちTRAP陽性の破骨細胞の出現頻度を解析する。

4. 研究成果

(1) マウス関節滑膜細胞株の樹立とその解析

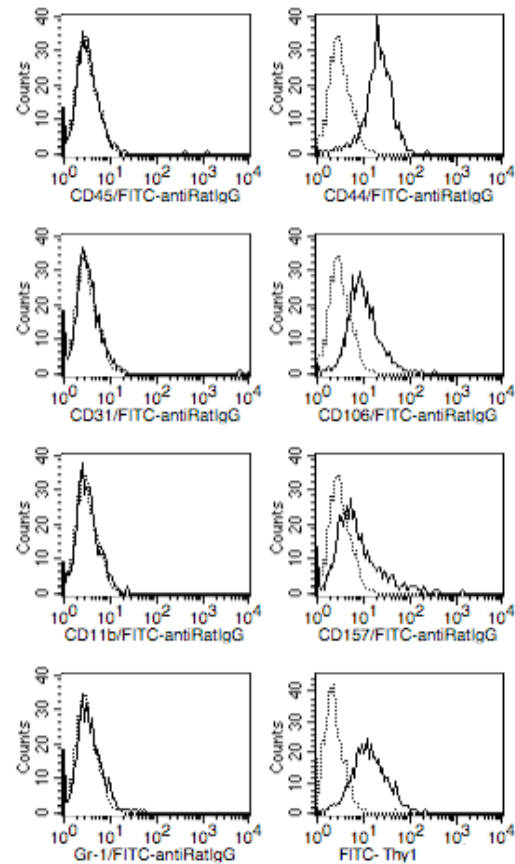
滑膜組織由来の間葉系細胞株のクローンを関節炎発症型マウス；gp130F759より15クローン、pX-トランスジェニック(Tg)/gp130F759より8クローン、そして対照野生型マウスより20クローン作成した。これらの表面抗原は、CD45, CD31, CD11b陰性、CD44, CD106, CD157陽性であり骨髓間質細胞と似ていた(図1)。Thy1が陽性であることは、ヒト滑膜線維芽細胞の特徴と共通する。

これらの細胞株の増殖は接触阻害を受けるので、1-2週間安定したフィーダー細胞として機能しうると考えられた。

pX-Tg/gp130F759の関節滑膜培養からは、間質細胞よりはマクロファージに近い形態でCD11bを発現する細胞のクローン化を試みている。これらの細胞株は、関節滑膜を構成する細胞の系譜や機能の解析に有用であり、さらなる細胞株の樹立と詳細な

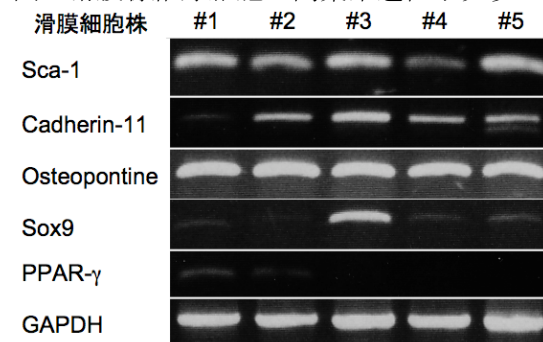
解析を継続する。

図1. 滑膜線維芽細胞の表面抗原(典型例)



さらに樹立したマウス関節由来の滑膜線維芽細胞株における間葉系細胞の系譜特異的遺伝子の発現をRT-PCR法により解析した。野生型、HTLV-1pX-トランスジェニック(pX-Tg)、gp130F759、いずれの由来であっても*Sca-1*, *Cadherin-11*の発現が認められたことから、間葉系であり滑膜線維芽細胞株であることが確認された。さらにコラーゲン1 α 及びオステオポンチンも発現していたことから骨芽細胞としての特徴を持つ可能性が示唆された。

図2 滑膜線維芽細胞の間葉系遺伝子発現



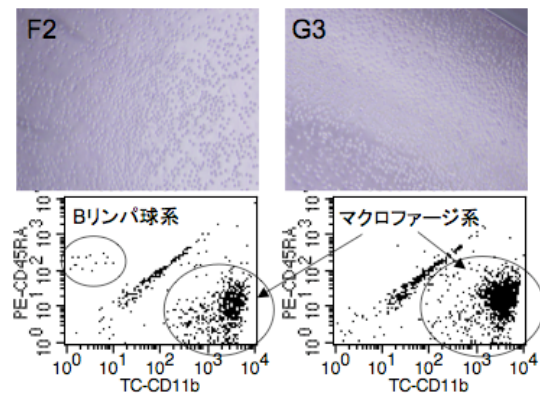
pX-Tg (#4) と *gp130F759* (#5) 由来の滑膜細胞株においては、脂肪細胞分化マーカー *peroxisome proliferators-activated receptor γ* (*PPAR γ*) の発現は無く、軟骨細胞分化マーカー *Sox9* はごく微量の発現であった。しかし野生型の3つの細胞株 (#1-3) の間で *PPAR γ* と *Sox9* の発現量に差異が認められた。これらの解析結果より、間葉系マーカー遺伝子の発現の異なるクローンを樹立することができれば、滑膜細胞の系譜、分化段階移行とその制御機構の研究に有用と考えられた。

(2) マウス関節滑膜細胞株の血液細胞制御機能の解析

①血液細胞分化支持能

樹立した滑膜細胞株の形態と表面抗原が骨髄間質細胞と類似していたことから、機能として血液細胞の分化支持能に的を絞り、*pX-Tg/gp130F759* 由来の滑膜細胞を用いて予備実験を行った。96ウエルプレートに *pX-Tg/gp130F759* 由来の滑膜細胞を蒔き込み一定期間培養した後に、野生型マウスの骨髄細胞を1ウエルあたり100, 50, 10個ずつ蒔き込んだ。1週間後には、CD11b陽性細胞のコロニーが出現した。頻度は遥かに少ないもののCD19陽性細胞コロニーを含むウエルも認められた。

図3. 滑膜線維芽細胞の造血支持能



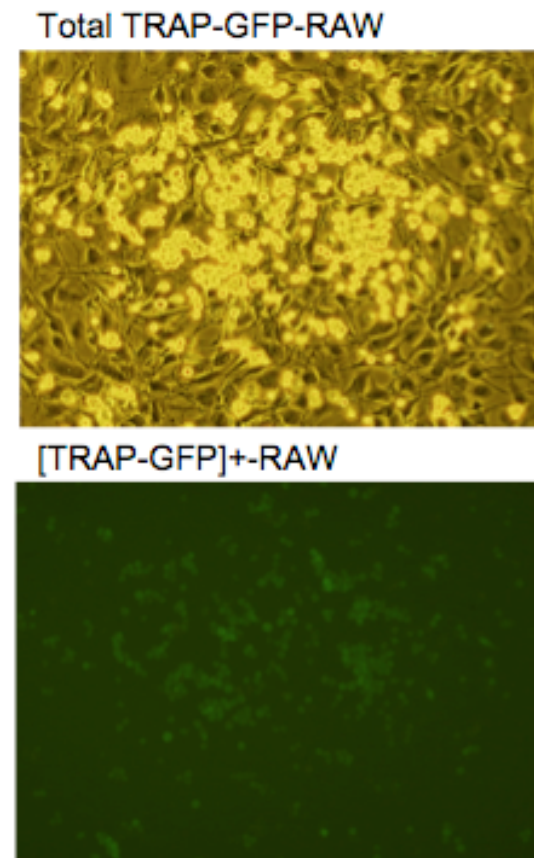
この結果は、*pX-Tg/gp130 F759* 由来の滑膜細胞が骨髄系細胞の造血支持能を有することを示唆する。対照野生型の滑膜細胞およびST2やPA6といった確立された骨髄間質細胞と対比することにより、滑膜細胞の機能異常を造血支持能から評価し、その分子機構の解明および関節炎発症における影響を解析できる可能性が開けたと言える。まだ試験的な解析結果であるが、野生

型骨髄細胞からの血液系コロニー誘導能は滑膜線維芽細胞株が野生型と *pX-Tg* との間で差を認めなかった。

②破骨細胞分化誘導能

TRAP-GFP-RAW 細胞を用いた滑膜線維芽細胞株の破骨細胞分化支持能の解析では、野生型、*pX-Tg*、*gp130F759*、*pX-Tg/gp130F759* の各マウス由来の滑膜線維芽細胞株上での共培養2日後に破骨細胞への分化が誘導された

図4. 破骨細胞分化誘導能の解析例



GFP+の細胞の割合は、それぞれ51, 75, 50, 78%であった。*pX*の過剰発現が滑膜細胞の破骨細胞分化支持能を亢進させている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

①Tsuji F, Yoshimi M, Katsura O, Takai M, Ishihara k, Aono H. Point mutation of tyrosine 759 of the IL-6 family cytokine receptor, gp130, augments collagen-induced arthritis in DBA/1J mice. *BMC Musculo-skelet Dissord* 10:23, 2009. 査読あり

② Yoshitake F, Itoh S, Narita H, Ishihara K, Ebis S. Interleukin-6 directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing receptor activation of NF-kappa B signaling pathway. *J.Biol.Chem.* 238:11535-11540, 2008. 査読あり

〔学会発表〕(計1件)

① Katsuhiko Ishihara, Hideya Igarashi, Toshiyuki Fukada, Masaaki Murakami and Toshio Hirano、Search for cell-intrinsic abnormalities of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis、第37回日本免疫学会学術集会、11/20-22/2007、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原 克彦 (ISHIHARA KATSUHIKO)

川崎医科大学・免疫学・教授

研究者番号：10263245

(2) 研究協力者

五十嵐 英哉 (IGARASHI HIDEYA)

川崎医科大学・免疫学・准教授

研究者番号：40291538