

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591653
 研究課題名（和文） BMP シグナルによる滑膜線維芽細胞の軟骨細胞分化と炎症性サイトカインの作用
 研究課題名（英文） Regulation of chondrogenic differentiation of synovial fibroblasts by BMP signaling and the effect of proinflammatory cytokines
 研究代表者：
 中山 修一（NAKAYAMA SHUICHI）
 東京大学医学部附属病院 助教
 研究者番号：80401066

研究成果の概要：

関節リウマチ患者の滑膜線維芽細胞は BMP-2 刺激、あるいは ALK3CA 遺伝子の導入によって軟骨細胞特異的のマーカーを発現するようになる。炎症性サイトカインである TNF- α は滑膜線維芽細胞の軟骨細胞分化を強力に抑制する。この抑制効果の一部は p38 MAP キナーゼを介していると考えられた。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,100,000	0	1,100,000
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	690,000	4,090,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学系臨床医学・整形外科学

キーワード：滑膜線維芽細胞, bone morphogenetic protein, tumor necrosis factor - α 、p38 MAP キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(Rheumatoid Arthritis; RA)は人口の約 0.5～1%が罹患する比較的発症率の高い病因不明の疾患である。遺伝的背景、ウイルス感染、環境要因などのさまざまな要素がその発症に関与する多因子疾患であり、関節病変を主徴とする全身の異常を伴った炎症性疾患で自己免疫疾患の1つと考えられている。特に病勢が進行すると、多関節に及ぶ疼痛・変形により著しい QOL、ADL の低下が認められる。また、関節破壊の進行した症例では、多関節に対し炎症性滑膜切除術や人工関節置換術をはかるなど

して ADL の向上を目的とした外科的治療が行われている。近年の薬物療法の進歩に伴って RA 患者の平均寿命は延長しており、今後 RA の外科的治療症例は更に増加していくと考えられる。RA の本態は炎症性滑膜増殖であり、その結果として軟骨・骨破壊につながっていく。一方で、滑膜線維芽細胞(synovial fibroblast-like cells;SFC)は軟骨細胞へと分化する potential を有することも報告されている。われわれはこれまでに、RA 患者 SFC にアデノウイルスベクターを用いて、BMP 型受容体の 1 つである activin receptor-like kinase 3(ALK3)の恒常活性型変異

体遺伝子を導入し、その細胞内情報伝達系を調節することによって軟骨細胞に分化誘導されることを報告している (Seto et al., J Clin Invest.2004)。すなわち SFC からの軟骨分化は BMP(Bone Morphogenetic Proteins)シグナルによって誘導されると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、RA の SFC に対する BMP シグナル伝達経路を介した軟骨細胞分化、そしてこの過程に対する炎症性サイトカインの働きを明らかにすることであった。

3. 研究の方法

あらかじめ書面による同意を得た RA 患者の人工膝関節全置換術時に採取した滑膜組織を酵素消化法によって分散培養し、初代培養滑膜細胞を得る。初代培養滑膜細胞はマクロファージなどの免疫を担当する A 細胞と線維芽細胞様の B 細胞 (SFC) を含むヘテロな細胞集団であるが、3~5 代継代を行うことによって A 細胞は除去され、ほとんどの細胞がホモジェナスな SFC となる。BMP のレセプターである ALK3 の恒常活性化型 (ALK3^{CA}) を発現させることによって SFC の軟骨分化がみられる (Seto et al., J.Clin Invest.2004)。本研究では ALK3 のリガンドである BMP-2 の刺激によって SFC を軟骨分化させることが可能か、また現在の RA の病態形成に重要な炎症性サイトカインは、SFC の軟骨分化に対してどのような作用を及ぼすのかを検討した。具体的には

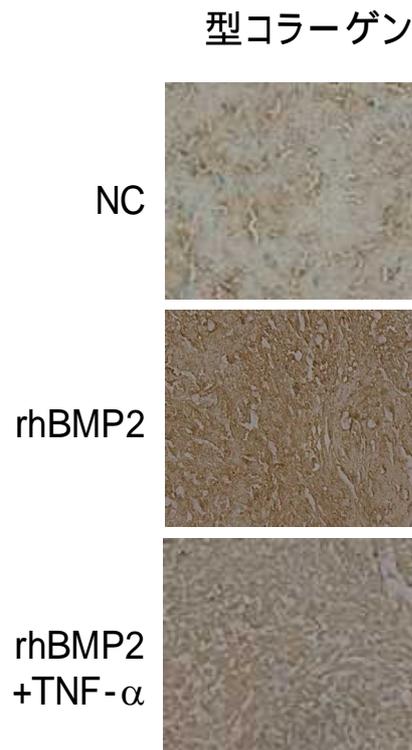
1) SFC を BMP 刺激した際の細胞内シグナル伝達経路の検討、2) BMP-2 刺激による軟骨分化マーカーの発現・組織染色による軟骨分化の検討、3) ALK3^{CA} 遺伝子導入、あるいは BMP-2 刺激による軟骨細胞分化に対する炎症性サイトカイン IL-1, TNF- α の作用、を主として in vitro の系を用いて行った。

4. 研究成果

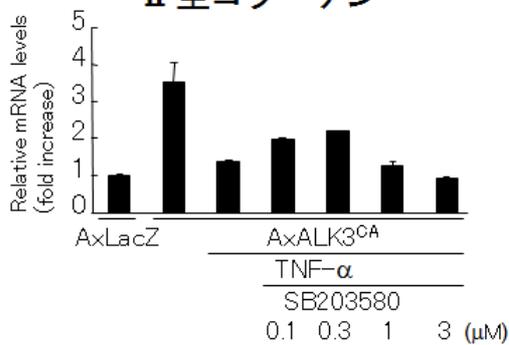
RA 患者より採取した SFC を BMP-2 で刺激、あるいは ALK3^{CA} をアデノウイルスによって強制発現すると II 型コラーゲンやアグリカンなどの軟骨細胞特異的抗原の発現が認められたが、これらの発現を TNF- α は濃度依存性に抑制した (図 1)。P38 MAP キナーゼ特異的阻害薬である SB203580 を用いると、TNF- α による軟骨分化促進作用抑制が部分的に回復した。しかし p38 シグナルを完全に抑制すると増殖軟骨分化促

進作用の回復を認めなくなるだけでなく、肥大化軟骨への分化も抑制され、軟骨分化経路自体が制御されると考えられた (図 2)。一方 p38 以外の TNF- α 下流シグナルである ERK, JNK, NF- κ B は軟骨分化への作用を認めなかった。以上より、SFs の増殖軟骨分化に p38 シグナルの活性化は必要であるが、TNF- α によって p38 シグナルの活性が強力になりすぎると増殖軟骨にとどまらずに肥大化軟骨への分化が促進されると考えられた。すなわち、抗 TNF- α 療法と BMP-2 投与治療を組み合わせることにより、RA の損傷関節の修復に有効的に働く可能性があるのではないかと考えられた。

図 1: II 型コラーゲン抗体による免疫染色。リコンビナントヒト BMP-2 は関節リウマチ滑膜線維芽細胞における II 型コラーゲンの発現を誘導する。TNF- α は BMP-2 による II 型コラーゲン発現を抑制した。



II型コラーゲン



アグリカン

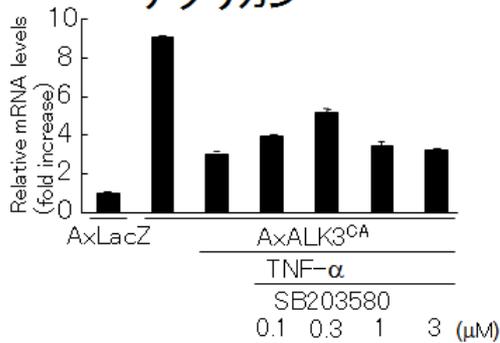


図2: ALK3^{CA}導入によるII型コラーゲン、アグリカン遺伝子発現はTNF- α によって強力に抑制される。P38 MAPキナーゼ阻害薬SB203580はTNF- α による抑制を部分的に回復させた。

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 12 件)

1. 松本卓巳(東京大学 医学部整形外科), 田中栄 骨吸収を標的にした関節リウマチ治療戦略 リウマチ科(0915-227X)41 巻 1号 Page127-133(2009.01)
2. Nakagawa T, Takeda H, Nakajima K, Nakayama S, Fukai A, Kachi Y, Kawano H, Miura T, Nakamura K. Intraoperative 3-dimensional imaging-based navigation-assisted anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction. Arthroscopy. 2008, 24:1161-1167.
3. Okuma-Yoshioka C, Seto H, Kadono Y, Hikita A, Oshima Y, Kurosawa H, Nakamura K, Tanaka S. Tumor necrosis factor-alpha inhibits chondrogenic differentiation of synovial fibroblasts through p38 mitogen activating protein kinase pathways. Mod Rheumatol. 2008;18(4):366-378.
4. Oshima Y, Akiyama T, Hikita A, Iwasawa M,

Nagase Y, Nakamura M, Wakeyama H, Kawamura N, Ikeda T, Chung UI, Hennighausen L, Kawaguchi H, Nakamura K, Tanaka S. Pivotal role of Bcl-2 family proteins in the regulation of chondrocyte apoptosis. J Biol Chem. 2008, 283(39):26499-26508.

5. 田中栄 RAにおける破骨細胞分化と関節破壊 ~ RANKL dependent ~ Rheumatology Clinical Update 15:15-17, 2008.
6. 田中栄【骨研究のフロンティア】炎症・免疫と破骨細胞 内分泌・糖尿病科 27:249-252, 2008.
7. 田中栄 次世代の生物学的製剤 デノスマブ 分子リウマチ治療 1:130-133, 2008.
8. 田中栄【骨研究の最前線】破骨細胞のアポトーシスと機能制御 最新医学 63:2182-2186, 2008.
9. 田中栄, 廣瀬 旬【目でみる診療基本手技】診療手技 穿刺および生検法 関節腔穿刺法 Medicina(0025-7699)45 巻 13号 Page135-138(2008.12)
10. Kono SJ, Oshima Y, Hoshi K, Bonewald LF, Oda H, Nakamura K, Kawaguchi H, Tanaka S. Erk pathways negatively regulate matrix mineralization. Bone. 2007, 40:68-74.
11. Wakeyama H, Akiyama T, Takahashi K, Amano H, Kadono Y, Nakamura M, Oshima Y, Itabe H, Nakayama KI, Nakayama K, Nakamura K, Tanaka S. Negative feedback loop in the Bim-caspase-3 axis regulating apoptosis and activity of osteoclasts. J Bone Miner Res 2007, 22:1631-1639.
12. Nakagawa T, Hiraoka H, Fukuda A, Kuribayashi S, Nakayama S, Matsubara T, Nakamura K. Fluoroscopic-based navigation-assisted placement of the tibial tunnel in revision anterior cruciate ligament reconstruction. Arthroscopy. 2007, 23:443.e1-4.

(学会発表) (計 7 件)

1. 田中栄 第52回日本リウマチ学会総会・学術集会 ランチョンセミナー13 (2008.4.22)、札幌。「骨吸収を標的にした関節リウマチ治療戦略」
2. 中山修一 2008 JOSKAS(6/13-14 東京・高輪)「Fluoroscopy based navigation ガイド

下ACL再建術後に生じた deep roof impingement phenomenon」

3. 田中 栄 第26回日本骨代謝学会学術集会(2008.10.30) 大阪 ミニシンポジウム 6 リウマチと骨 「骨破壊を標的にした関節リウマチ治療」
4. 中山修一 2007 JOSKAS (6/14-16 北海道・札幌)「脛骨側での膝内側側副靭帯度損傷の治療」ポスター
5. 中山修一 2007 ISAKOS (5/27-31 Florence, Italy)「Fluoroscopic Navigation assisted ACL reconstruction」
6. 田中 栄 第22回日本整形外科学会基礎学術集会(2007.10.25)浜松 シンポジウム2 骨免疫学「関節リウマチにおける骨破壊の機序」
7. 中山修一 2006 JOSKAS(6/8-10 沖縄・宜野湾市)「Navigation assisted ACL reconstruction」

〔図書〕(計 3 件)

1. 田中 栄 骨吸収 最新整形外科学大系1 運動器の生物学と生体力学 中村利孝、吉川秀樹編 中山書店 東京 pp38-43, 2008.
2. 須田立雄 小澤英浩 高橋榮明 田中栄 中村浩彰 森 諭史: 新骨の科学 須田立雄 小澤英浩 高橋榮明 田中栄 中村浩彰 森 諭史 編 医歯薬出版株式会社 東京 330 頁、2007
3. 田中 栄: 骨粗鬆症 今日の治療指針 山口徹、北原光夫、福井次矢編 医学書院 東京 pp762-763, 2007.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

中山 修一(NAKAYAMA SHUICHI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号:80401066

(2)研究分担者

田中 栄(TANAKA SAKAE)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号:50282661
門野 夕峰(KADONO YUHO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号:70401065

(3)連携研究者

なし