

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860299

研究課題名(和文) 関節リウマチにおける破軟骨細胞の解析

研究課題名(英文) Analysis of chondroclasts in rheumatoid arthritis

## 研究代表者

鎌滝 章央 (Kamataki, Akihisa)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：60360004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞に形態が似て軟骨組織の近傍にあるため破軟骨細胞と呼ばれている細胞の関節リウマチ(rheumatoid arthritis; RA)における役割を解明することを目的とした。患者組織を用いた研究の結果から破軟骨細胞は軟骨組織を分解する酵素を産生すること、培養細胞を用いた研究の結果から特定のサイトカインの存在下で破軟骨細胞に分化する細胞があらわれることが明らかになり、RAでは破軟骨細胞が軟骨の破壊に働き関節破壊に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to reveal the character of chondroclasts in rheumatoid arthritis (RA), so-called from the location near cartilage. The analysis using tissue from RA patients revealed that chondroclasts produce the enzymes which degrade extra cellular matrix of cartilage. The analysis of cultured cells revealed that a particular cytokine induce the differentiation into chondroclasts. Thus, it is suggested that chondroclasts are involved in cartilage degradation and joint destruction in RA patients.

研究分野：分子生物学

キーワード：炎症 関節リウマチ

### 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) は、関節の滑膜組織の炎症と増殖、それに続く軟骨や骨組織の破壊が特徴的な全身性の炎症性疾患である。関節破壊により不可逆的な機能障害を生じることから、RA の治療においては、軟骨や骨の侵食を防ぐことが重要と考えられている。軟骨の破壊には軟骨細胞や線維芽細胞様滑膜細胞 (fibroblast-like synoviocyte; FLS) が、骨の破壊には破骨細胞が主に関わると考えられているが、不明な点も多い。

破骨細胞は、単球・マクロファージ系列の前駆細胞から分化してできる多核の細胞である。破骨細胞は蛋白質分解酵素と酸を産生し骨を構成する骨基質蛋白質である I 型コラーゲンとヒドロキシアパタイトを分解する。破軟骨細胞は、破骨細胞と同様の形態を示し、軟骨周囲に存在し、軟骨の分解に関わると考えられている細胞であるが、その特性は不明である。

関節軟骨は軟骨細胞と軟骨基質から構成されている。軟骨基質は型コラーゲン、ヒアルロン酸、プロテオグリカンからなり、関節軟骨での主なプロテオグリカンはアグリカンである。関節軟骨の破壊はアグリカンの分解から始まる。アグリカン分解は主に、MMP と a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) の二種類の蛋白質分解酵素が関与している。ADAMTS-4 と ADAMTS-5 は、関節リウマチ患者や変形性関節症患者の軟骨組織や滑膜組織において高く発現していること、関節液中に ADAMTS-4, ADAMTS-5 によるアグリカン断片が存在すること、MMP-3 に先立ってアグリカンを分解していることが報告されたことから、近年注目されている。

我々の研究室では、RA 病変部における ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の発現を免疫染色で明らかにした<sup>1)</sup>。その際、FLS だけではなく、破軟骨細胞でも ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の発現が認められた。そのため、この RA でみとめられた多核巨細胞は、軟骨を分解する機能を有すると考えられた。通常の破骨細胞も ADAMTS-4, ADAMTS-5 を発現するか確認するため、破骨細胞前駆細胞を macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) と receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) 刺激によって分化させ、ADAMTS-4, ADAMTS-5 の発現を RT-PCR および real-time PCR で解析した結果、破骨細胞のマーカーである Cathepsin K の発現は、分化に伴って誘導されたものの、ADAMTS-4 は破骨細胞前駆細胞の段階から発現しており、ADAMTS-5 は破骨細胞への分化後でも発現が認められなかった。また、免疫染色で破骨細胞様細胞が ADAMTS-4 強陽性であったのに対し、培養破骨細胞での ADAMTS-4 の発現は低かった。これらの結

果から、RA 病変部に認められた ADAMTS 陽性の破軟骨細胞は、通常の破骨細胞とは異なる性質の細胞であることが示唆された。現在までの RA における破骨細胞の研究により、RANKL 以外の tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) や TNF ligand superfamily 14 (TNFSF14) といった刺激も破骨細胞への分化を誘導することや、そのような刺激により分化した破骨細胞が通常の破骨細胞とは異なる性質を備えていることが示唆されている<sup>2, 3)</sup>。また、FLS と共培養することで単球が様々な MMP を発現する破骨細胞へ分化することも報告されている<sup>4)</sup>。

### 2. 研究の目的

本研究は、破軟骨細胞による骨・軟骨破壊の機序の解明を最終的な目的とした。RA 病変部で認められた ADAMTS-4, ADAMTS-5 を発現する多核巨細胞の特徴の解析と、様々な条件での末梢血単球から破骨細胞様細胞への分化誘導による ADAMTS-4, ADAMTS-5 の発現の変化についての解析を行った。

### 3. 研究の方法

同意の上で入手した関節置換術を施行した RA 患者検体を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、Et-OH で脱脂、EDTA で脱灰し、パラフィンに包埋した。2  $\mu$ m 厚に薄切し、抗 ADAMTS-4 抗体や抗 ADAMTS-5 抗体を用いた免疫染色や酒石酸耐性アルカリホスファターゼ (TRAP) 染色を行った。

破骨細胞研究によく用いられるマウス単球系細胞株 RAW264.7 を使用し、破骨細胞分化誘導時にさらにサイトカインを添加した状態での ADAMTS-5 の発現変化を検討した。破骨細胞分化誘導条件としては、可溶性 RANKL (50 ng/ml) を培地に添加し、追加するサイトカインとしては、TNF- $\alpha$  (25 ng/ml)、TNFSF14 (25 ng/ml)、IL-1 $\beta$  (10 ng/ml)、TGF- $\beta$  (10 ng/ml) を選択した。5 日間培養後、RNA を抽出し、cDNA 合成後、RT-PCR あるいは real-time PCR を行った。また、分化誘導していない RAW264.7 にサイトカインを添加した条件での ADAMTS-5 の発現変化も検討した。破骨細胞に分化後の RAW264.7 にサイトカインを添加する条件の実験も行い、分化誘導 5 日後にサイトカインを添加し、24 時間後に細胞を回収した。

ヒト末梢血単核球を用い、RAW264.7 と同様に、破骨細胞への分化時にサイトカインを添加することで軟骨を分解する性質を示すかを調べた。ヘパリン採血し密度勾配遠心により分離した末梢血単核細胞を可溶性 RANKL (50 ng/ml) と M-CSF (25 ng/ml) の条件で破骨細胞へ分化させ、TGF- $\beta$  (10 ng/ml) で刺激した。分化誘導後 3 日ごとに培地を交換し、21 日目に細胞を回収し、RNA 抽出 cDNA 合成後、RT-PCR を行った。

#### 4. 研究成果

免疫染色の結果、病変部の破軟骨細胞において、軟骨の細胞外基質を構成するプロテオグリカンであるアグリカン分解する酵素ADAMTS-4 および ADAMTS-5 の発現が認められた。また、これらの細胞は破骨細胞のマーカーである TRAP が陽性だった。マウス単球細胞株である RAW264.7 に様々なサイトカインを添加した状態で破骨細胞への分化誘導を行ったところ、TGF- $\beta$  により ADAMTS-5 mRNA の発現が顕著に亢進することが RT-PCR および real-time PCR により明らかになった (図)。破骨細胞への分化後に TGF- $\beta$  で刺激した場合には発現量の増加はわずかであり、未分化の RAW264.7 を TGF- $\beta$  で刺激した場合には発現変化は認められなかった。ヒト末梢血単核球を用いて破骨細胞分化誘導時にサイトカインを添加した実験では、RT-PCR の結果、RAW264.7 ほど顕著ではなかったものの TGF- $\beta$  刺激でのみ ADAMTS-5 のバンドが検出できた。

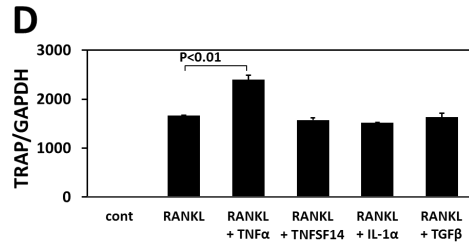
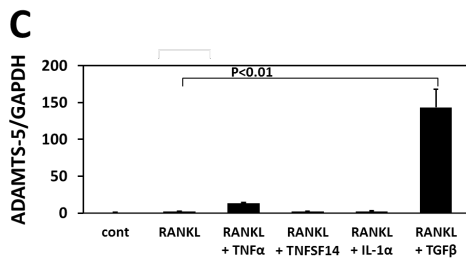
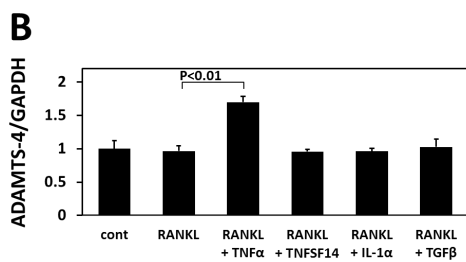
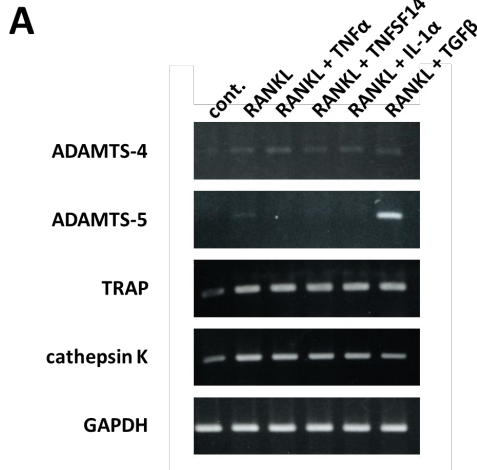


図 RAW264.7 の破骨細胞分化誘導時のサイトカイン添加による ADAMTS-4, ADAMTS-5 の発現変化 (A) RT-PCR, (B-D) real-time PCR

これらの結果から、関節リウマチにおいて軟骨を分解する性質をもつ特殊な多核巨細胞である破軟骨細胞への分化がおこること、この細胞は軟骨の分解と骨吸収にはたらく関節破壊に与与することが示唆された。

#### < 参考文献 >

- Mimata Y, Kamataki A, Oikawa S, et al., Int J Rheum Dis. 15, 36-44, 2012.  
 Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, et al., J Exp Med. 191, 275-86, 2000.  
 Ishida S, Yamane S, Nakano S, et al., Immunology. 128, e315-24, 2009  
 Tsuboi H, Matsui Y, Hayashida K, et al., Ann Rheum Dis. 62: 196-203, 2003

#### 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 6 件)

- Kamataki A, Ishida M, Komagamine M, Yoshida M, Ando T, Sawai T. Zymographic analysis using gelatin-coated film of the effect of etanercept on the extracellular matrix-degrading activity in synovial fluids of rheumatoid arthritis patients. Int J Rheum Dis. 査読有 . 印刷中 . (ア) DOI:10.1111/1756-185X.12197.

宇月美和, 鎌滝章央, 原田真理, 三浦康宏, 澤井高志. 関節リウマチの検査・診断 検査 病理組織検査 軟骨・骨破壊 日本臨床 査読無 .72 巻 2014 年 280-285

- Sawai T, Uzuki M, Miura Y, Kamataki A, Matsumura T, Saito K, Kurose A, Osamura YR, Yoshimi N, Kanno H, Moriya T, Ishida Y, Satoh Y, Nakao M, Ogawa E, Mtsuo S, Kasai H, Kumagai K, Motoda T, Hopson N. World's first telepathology experiments employing WINDS ultra-high-speed internet satellite, nicknamed "KIZUNA". J

Pathol Inform. 査読有 .4 巻 .2013 年 .  
(ア)DOI:10.4103/2153-3539.119002

Sawai T, Kamataki A, Uzuki M, Ishida K, Hanasaka T, Ochi K, Hashimoto T, Kubo T, Morikawa A, Ochi T, Tohyama K. Serial block-face scanning electron microscopy combined with double-axis electron beam tomography provides new insight into cellular relationships. Microscopy (Oxf). 査読有 .62 巻 .2013 年 . 317-20  
(ア)DOI:10.1093/jmicro/dfs069.

遠山稿二郎, 花坂智人, 松浦絵里, 小笠原勝利, 石田欣二, 宇月美和, 鎌滝章央, 澤井高志. 電子顕微鏡から読み解く病理学(第12回)病理学における電顕技術のブレークスルー 3D トモグラフィ法と反射電子像の活用. 査読無 .32 巻 .2014 年 . 313-320

鎌滝章央, 澤井高志. 膠原病の診断と病理検査の意義. 査読無 .31 巻 .2013 年 . 723-726

〔学会発表〕(計5件)

鎌滝章央, 澤井高志. 関節リウマチにおける破骨細胞様細胞の軟骨分解への関与の解析. 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会/第23回国際リウマチシンポジウム. 2014年4月26日. 東京

宇月美和, 鎌滝章央, 原田真理, 佐々木喜子, 澤井高志. 関節リウマチにおける線維芽細胞様滑膜細胞の由来、特徴に関する研究. 第103回日本病理学会総会. 2014年4月25日. 広島

鎌滝章央, 澤井高志. 関節リウマチにおける破骨細胞の解析. 第102回日本病理学会. 2013年6月7日. 札幌

松村翼, 宇月美和, 鎌滝章央, 三浦康宏, 佐藤孝, 黒瀬顕, 菅野祐幸, 吉見直己, 澤井高志. 情報病理学のアップデートバーチャルスライド画像を用いた遠隔カンファランスシステムの有用性について. 第102回日本病理学会. 2013年6月8日. 札幌

鎌滝章央, 石田睦子, 駒ヶ嶺正隆, 吉田昌明, 安藤貴信, 澤井高志. ゼラチンコートフィルムを用いたエタネルセプト治療前後の関節リウマチ患者関節液の細胞外マトリックス分解活性の検討. 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2013年4月18日. 京都

〔図書〕(計1件)

Kamataki A, Uzuki M, Sawai T. "Histopathological change of esophagus related to dysphagia in mixed connective tissue disease" in "Dysphagia". InTech. 2015年. 印刷中

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
無

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鎌滝章央 (Kamataki, Akihisa)  
岩手医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 60360004