



Title	Establishment and Characterization of Nurse Cell-Like Stromal Cell Lines from Synovial Tissues of Patients with Rheumatoid Arthritis
Author(s)	竹内, 英二
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41716
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	竹 内 芙 二
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 4 3 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 11 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	Establishment and Characterization of Nurse Cell-Like Stromal Cell Lines from Synovial Tissues of Patients with Rheumatoid Arthritis. (慢性関節リウマチ患者滑膜組織からのナース細胞様ストローマ細胞株の樹立とその特性)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 遠山 正彌
	(副査) 教 授 宮坂 昌之 教 授 越智 隆弘

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

関節滑膜は慢性関節リウマチ（以下 RA）における主要な慢性炎症の場であり、サイトカインや蛋白分解酵素の產生亢進などが確認されているが、RA の病因、病態については依然として不明な点が多い。ナース細胞は Wekerle らによって初めて報告された細胞で、共培養したリンパ球をもぐり込ませること、すなわち pseudoemperipolesis を特徴とし、マウスの胸腺におけるリンパ球の分化に関与することが確認されている。また、ヒトの皮膚組織由来のナース細胞様細胞株も樹立され、局所における免疫機構への関与が報告されている。このようなナース細胞様の細胞は、他の組織にも存在し局所における免疫機構あるいは病態形成に関与している可能性がある。そこで、本論文では、RA 滑膜組織からのナース細胞様細胞株（RA-SNC）の樹立を試み、その機能について解析し、検討をくわえた。

【方法】

RA 10 例、変形性膝関節症（OA）5 例、健常人外傷患者 5 例から滑膜組織を採取し、酵素処理の後、10% FCS 含有 DMEM で初代培養を開始し、長期培養を行うことにより滑膜ストローマ細胞株を樹立した。また、期せずして RA 滑膜ストローマ細胞により維持される B 細胞の存在を見いだし、限界希釈法にてクローニングを行い、解析に使用した。

滑膜ストローマ細胞を 12 穴プレートにまきこみ ($2 \times 10^4/\text{well}$)、48 時間培養した後、MOLT-17 (ヒト T 細胞)、MC/car (ヒト B 細胞)、L 1 (マウス T 細胞) の各リンパ球系細胞株 ($1 \times 10^6/\text{well}$) との共培養 6 時間後に位相差顕微鏡下に観察し、3 個以上のリンパ球を抱き込んでいるものを陽性として pseudoemperipolesis 陽性率を算出した。

滑膜ストローマ細胞株および RA 滑膜由来 B 細胞クローンの細胞表面抗原の解析をフローサイトメトリーにて行い、ナース細胞様機能が確認された RA 患者由来滑膜ストローマ細胞（RA-SNC）についての形態学的観察を行った。

RA-SNC ($5 \times 10^4/\text{well}$) および RA 滑膜由来 B 細胞クローン ($1 \times 10^6/\text{well}$) の単独培養あるいは共培養を行い、72 時間後の培養上清中のサイトカイン濃度 (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, G-CSF, GM-CSF, TNF- α , TNF- β)、免疫グロブリン (Ig) 濃度を ELISA 法を用いて測定した。

0.5 μCi の $^3\text{H}-\text{thymidine}$ でパルスした RA 滑膜由来 B 細胞クローン ($1 \times 10^6/\text{well}$) の単独培養あるいは

Mitomycin C処理 RA-SNC (5×10^4 /well)との共培養を行い、 ^3H -thymidineの取り込み量をシンチレーショングカウンターで計測した。

【成績】

OAあるいは健常人外傷患者の滑膜由来のストローマ細胞では pseudoemperipoleisis 現象は観察されなかつたが、RA滑膜由来のストローマ細胞は高率に pseudoemperipoleisis 陽性であった。pseudoemperipoleisis は MOLT-17, MC/car, L1 のどの細胞株に対しても陽性であった。

細胞表面抗原の解析において、RA-SNC は CD44, CD54 (ICAM-1) 陽性、CD106 (VCAM-1), CD58 (LFA-3) 弱陽性、CD1a, CD18 (LFA-1), CD56 (NCAM) は陰性であった。HLA-DR は無刺激では陰性であったが、IFN- γ で刺激することによって陽性となつた。

RA-SNC は単独培養で IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF を産生していた。RA滑膜由来B細胞クローンとの共培養において、これらのサイトカインの産生量は顕著に増加し、単独培養では検出限界以下であった IL-1 β , TNF- α が検出可能レベルまで増加した。また、このB細胞クローンは RA-SNC との共培養において増殖活性が増加し、Ig 産生量も増加した。非接触条件下での共培養では顕著なサイトカインの産生上昇あるいはB細胞活性化は認められなかつた。

【総括】

RA-SNC は種々のリンパ球細胞株に対して抱き込み (pseudoemperipoleisis) 能を持つという点において OA あるいは健常人由来滑膜ストローマ細胞株と明らかに異なつた性質を有していた。すなわちマウスのT細胞株だけではなく、ヒトのBおよびT細胞株に対しても抱き込みがみられたが、これはヒト皮膚由来ナース細胞 (HSNC) およびマウス胸腺ナース細胞株 (IT-79MTNC3) に共通してみられる現象であった。

RA-SNC 株を樹立する際に、期せずして RA-SNC との共培養で維持され、増殖する B 細胞クローンを得ることができた。この B 細胞は、その表面抗原 (CD19, CD20, CD38, CD43 陽性) から、成熟した B 細胞で滑膜に浸潤していたものと考えられた。

我々の樹立した RA-SNC は炎症性サイトカインの産生能を持っており、滑膜由来 B 細胞クローンとの共培養によりさらにサイトカイン産生の上昇が認められた。また、RA-SNC との共培養により、滑膜由来 B 細胞クローンの増殖および免疫グロブリン産生が促進された。RA滑膜組織において RA-SNC と局所に浸潤した B 細胞は接触依存性の刺激によって互いに活性化され、慢性炎症病態を形成していたものであると考えられる。このように RA-SNC は RA 滑膜の微小環境の中で、炎症の遷延化、増悪において重要な役割を果たしていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

慢性関節リウマチ (RA) において、主要病巣である関節滑膜においては著明な炎症細胞浸潤がみられ、リンパ球を主体とした異常な免疫反応が生じていると考えられている。しかし、RAの病因、病態は依然として不明な点が多い。本研究では、共培養したリンパ球をもぐり込ませること、すなわち pseudoemperipoleisis 能を特徴とするナース細胞が RA 滑膜組織に存在することを初めて証明した。さらに炎症性サイトカインの産生や、滑膜由来 B 細胞の増殖および免疫グロブリン産生を促進させる機能を有することを明らかにした。本研究は RA の病態解明に新しい観点を確立した点において非常に意義深いものであると考えられる。したがって学位の授与に値するものと認める。