



| | |
|--------------|---|
| Title | Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) positive cells in rheumatoid synovium may induce the destruction of articular cartilage |
| Author(s) | 坪井, 秀規 |
| Citation | 大阪大学, 2003, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/43931 |
| 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 | 坪 井 秀 規 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (医 学) |
| 学 位 記 番 号 | 第 1 7 6 7 1 号 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 15 年 3 月 25 日 |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻 |
| 学 位 論 文 名 | Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) positive cells in rheumatoid synovium may induce the destruction of articular cartilage. (関節リウマチ滑膜中酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ陽性細胞による 関節軟骨破壊の関与の検討) |
| 論 文 審 査 委 員 | (主査) 教 授 吉川 秀樹 (副査) 教 授 越智 隆弘 教 授 大藺 恵一 |

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

関節リウマチ（以下 RA）は、滑膜の増殖を伴った、原因不明の全身性の慢性炎症疾患であり、進行性の関節破壊すなわち、軟骨及び骨破壊が、関節機能障害、日常生活動作の低下をもたらし、臨床上也つとも問題となる。RA の関節破壊の特徴は、著明に増殖した滑膜組織であり、パンヌスを形成し、関節軟骨や骨組織を浸食、破壊する。現在までの研究、報告により、骨破壊に関しては破骨細胞が中心的役割を果たすと考えられている。一方、軟骨破壊に関しては、滑膜中の様々な細胞や軟骨細胞自身が関与していると考えられているが、不明な点が多い。

我々はこれまでに、*in vitro*で、RA 培養滑膜細胞と供存培養することにより、末梢血 CD14 陽性細胞が、破骨細胞のマーカー蛋白の一つである、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ（Tartrate resistant acid phosphatase ; TRAP）陽性単核細胞へと分化し、さらに支持細胞非存在下でサイトカイン刺激にて骨吸収能を持つ TRAP 陽性多核細胞へと誘導することを確立している。一方、近年、RA 滑膜中で TRAP 陽性細胞の存在が報告されており、また RA 滑膜による破骨細胞の誘導能亢進の可能性が示されている。

そこで、本研究の目的は、RA 滑膜中 TRAP 陽性細胞が骨吸収に関わるだけでなく、軟骨破壊に関与する可能性に関して、この *in vitro*の系を用いて、RA 滑膜中 TRAP 陽性細胞の関節軟骨破壊への関与を検討し、病態への関わりを明らかにすることである。

【方法】

in vitro TRAP 陽性単核及び多核細胞（以下、それぞれ TPMoC、TPMuC）における、軟骨破壊に必要である蛋白分解酵素（matrix metalloproteinase ; MMP）の発現を検討した。MMP1、2、3、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17 の遺伝子レベルでの発現を Northern blot 法で検討した。遺伝子レベルで発現が認められた MMP について、蛋白レベルでの発現を免疫細胞化学染色法、および手術時に採取した RA 患者組織中の TRAP 陽性細胞における発現を、免疫組織染色法にて検討した。さらに、³⁵S ラベル軟骨を用いた軟骨破壊を定量評価する実験系を用いて、

TPMoC の軟骨破壊活性の検討を行った。牛鼻中隔軟骨を用いて軟骨 disc を作成し、 ^{35}S ラベルし、 ^{35}S ラベル disc と TPMoC を 1 週間培養した。 ^{35}S ラベル disc が変性、破壊されると disc 中のグルコサミノグリカンが培養上清中に遊離し、 ^{35}S が取り込まれたグリコサミノグリカンが全体のどれだけ遊離したかで評価した。また、表面が部分的に変性した軟骨に対する影響をみるために、コラゲナーゼ前処理した ^{35}S ラベル disc と TPMoC を培養した。さらに、培養上清中の MMP 濃度を、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) にて測定し、これらの MMP に対する特異的阻害剤を用いて、軟骨破壊の抑制実験を行った。

【成績】

Northern blot 法にて、TPMoC では、MMP2、9、14 の発現が、TPMuC では、MMP2、9、12、14 の発現が認められた。これら以外の MMP は、発現が認められなかった。TPMoC、TPMuC における MMP2、9、12、14 の発現を免疫細胞化学染色法にて検討したところ、TPMoC では、MMP2、9 の発現が、TPMuC では MMP2、9、12、14 の発現が認められた。これらの MMP の発現を RA 組織中で免疫組織染色法にて検討したところ、TRAP 陽性細胞で MMP2、9 の発現が認められた。しかし、MMP12、14 の発現は認められなかった。 ^{35}S ラベル軟骨を用いた軟骨破壊実験において、TPMoC はコラゲナーゼ前処理した ^{35}S ラベル disc に対し破壊活性を示した。しかし、コラゲナーゼ前処理しない ^{35}S ラベル disc に対しては、破壊活性は示さなかった。また、ELISA にて、この軟骨破壊実験における培養上清中には、高濃度の MMP2、9 が検出され、この軟骨破壊は、MMP2/9 特異的阻害剤にて抑制された。

【総括】

本研究により、RA 滑膜中 TRAP 陽性細胞は MMP2、9 を産生分泌し、軟骨破壊に関与している可能性が示唆された。MMP2、9 は、ゼラチナーゼ群に分類される蛋白分解酵素であり、主に変性軟骨であるゼラチンを基質とする。従って、MMP2、9 だけでは、正常な軟骨を破壊することは困難であることから、RA 関節軟骨破壊病巣においては、RA 滑膜から分泌される他の蛋白分解酵素と協調的に作用することにより関節軟骨破壊に関与しているものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

RA は進行性の関節破壊すなわち、軟骨及び骨破壊が、関節機能障害をもたらし、臨床上もつとも問題となる。RA での関節破壊の特徴は、著明に増殖した滑膜組織であり、関節軟骨や骨組織を浸食、破壊する。現在までの報告により、骨破壊に関しては破骨細胞が、軟骨破壊に関しては、滑膜中の様々な細胞に関与していると考えられている。近年、RA 滑膜中で破骨細胞のマーカー蛋白の一つである、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (Tartrate resistant acid phosphatase ; TRAP) 陽性細胞の存在が報告されており、これらの細胞は破骨細胞へと分化することが示唆されているが、この細胞が関節破壊にどのように関わるかは不明である。そこで、本研究は、RA 滑膜中 TRAP 陽性細胞が、関節破壊、特に関節軟骨破壊に関与するかを検討したものである。方法は、*in vitro* で誘導された TRAP 陽性細胞をもちいて、軟骨基質の破壊に必要である蛋白分解酵素発現 (matrix metalloproteinase ; MMP) を遺伝子レベル、蛋白レベルで検討した。次に、手術時に採取した RA 患者組織中の TRAP 陽性細胞における MMP の発現を、免疫組織染色法にて検討した。さらに、*in vitro* で誘導された TRAP 陽性細胞が軟骨を破壊するかの検討を ^{35}S ラベル軟骨を用いた軟骨破壊を定量評価する実験系を用いて検討した。*in vitro* で誘導された TRAP 陽性細胞は遺伝子レベルで、MMP2、9、12、14 を発現しており、蛋白レベルでも発現が認められた。RA 患者組織中の TRAP 陽性細胞では、MMP2、9 の発現が認められた。さらに、*in vitro* で誘導された TRAP 陽性細胞は ^{35}S ラベル軟骨に対する破壊活性があり、その活性は、MMP2/9 阻害薬にて抑制された。従って、この細胞は MMP2、9 を産生分泌することにより関節軟骨破壊に関与していることが示された。従来、破骨細胞は骨組織を破壊する細胞であるが、軟骨破壊への関与について詳細に検討された報告はなく、本研究結果は全く新しい知見である。また、これらの細胞が RA 関節破壊に関与することをふまえると、その機能を抑制することは骨だけでなく、軟骨破壊をも抑制する可能性が示唆され、こ

これらの阻害薬は関節破壊全体を抑制する効果が期待できる。研究結果にも示されているように、MMP2/9 阻害薬がこれらの細胞の機能を抑制することから、臨床においてもこの阻害薬が関節破壊抑制するものと期待できる。以上、本研究は、RA 関節破壊における新たな関節破壊機序を解明したものであり、また、阻害効果についても追究し、その結果臨床においても関節破壊抑制効果が期待できることを見出した。すなわち、RA の新たな病態解明だけでなく、臨床応用にまで追究した研究結果であり、学位の授与に値するものと考えられる。