csk 遺伝子導入による慢性関節リウマチの遺伝子治療

高 柳 広^{1,2*}

十字 琢夫^{1*}・宮 崎 剛^{1*}・飯 塚 秀 治^{1*}
田 中 栄^{1*}・織 田 弘 美^{1*}・中 村 耕 三^{1*}

Jpn. J. Clin. Immun., 23 (6) : 547~549, 2000.

Amelioration of adjuvant arthritis by gene therapy suppressing Src activity

Hiroshi Takayanagi^{1,2*}

Takuo Juji^{1*}, Tsuyoshi Miyazaki^{1*}, Hideharu Iizuka^{1*}
Sakae Tanaka^{1*}, Hiromi Oda^{1*} and Kozo Nakamura^{1*}

Department of Orthopaedic Surgery^{1} and Immunology^{2*}, Faculty of
Medicine and Graduate School of Medicine*

I. 緒 言

慢性関節リウマチ (RA) は、自己免疫性の慢性炎症性疾患であり、増殖した滑膜が活発に骨軟骨へと侵入し、多発性の関節破壊をもたらす。しかし、この関節破壊を予防する有効な治療法は確立されていない。関節破壊の病態の解明がすすむにつれ、関節破壊に直接的に関与する細胞は、免疫反応により活性化した滑膜細胞と骨吸収を司る破骨細胞であることが明らかになってきた。最近、RA 滑膜や関節炎モデルの骨破壊部では破骨細胞分化誘導因子である RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) が高発現しており、滑膜での破骨細胞形成を促進して骨破壊に関与することを示す報告があいついでなされた¹⁻⁴⁾。われわれは、破骨細胞機能に不可欠であると同時に、滑膜細胞の増殖や転写亢進に重要な役割をはたす Src 型チロシンキナーゼに注目し、その活性を負にコントロールするチロシンキナーゼである Csk をアデノウイルスを用いて遺伝子導入することで、Src の細胞内シグナル伝達系をブロックし、関節炎性骨破壊を抑制することに

成功した⁵⁾。また、Amgen 社のグループは、RANKL の可溶性阻害受容体である OPG を用いて破骨細胞分化を抑制することで、関節炎性骨破壊を防ぐことを示した¹⁾。このように破骨細胞を標的とした治療が実験的関節炎に奏効することから、関節炎性骨破壊における破骨細胞の重要性が確立されたと考えられる。ここでは、滑膜における破骨細胞形成と活性化のメカニズムを述べ、滑膜細胞と破骨細胞の Src 型チロシンキナーゼをターゲットとした RA 遺伝子治療の試みを示す。

II. RA 滑膜細胞の増殖と活性化

活動期の RA 滑膜は腫瘍様に増殖し、周囲の組織を破壊していく。RA 滑膜細胞は形態的变化や、異常な増殖活性を示すため、しばしば transformed phenotype と形容されるが、実際は、T 細胞性の免疫反応が過剰な生体反応を引き起こした結果、滑膜細胞の細胞内情報伝達系が異常に活性化している状態と考えられる。増殖や炎症性メディエーターの転写に関与するさまざまな刺激伝達系路の活性化が知られ、特に MAPK 系のキナーゼカスケードや NF- κ B, AP-1 等の転写因子の活性化が報告されている⁶⁾。その結果、

東京大学医学部整形外科^{1*}、同 免疫学^{2*}

炎症性・骨吸収性サイトカイン (IL-1, IL-6, TNF- α), 増殖因子 (FGF-2, PDGF) 等の産生が亢進し, MMP やカテプシンなどの基質分解酵素の産生が誘導される。このような活性化した滑膜細胞の増殖が, 骨破壊の基礎的病態を形成するが, 骨破壊に直接関与する細胞は明らかにされていなかった。

III. RA 滑膜における破骨細胞形成

RA における骨破壊部, 特に, 増殖した滑膜が, 骨内へと侵入していく最前線には多数の多核巨細胞が観察される。ここで見られる酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色陽性の多核巨細胞が, 骨吸収を直接担う唯一の細胞と考えられている破骨細胞である。破骨細胞は, マクロファージ・単球系前駆細胞が骨芽細胞・ストローマ細胞等の形成支持細胞との接触刺激を受けて形成される。我々は, RA 滑膜細胞培養系をもちいて, 滑膜マクロファージが滑膜線維芽細胞の支持のもとで破骨細胞に分化することから, 滑膜線維芽細胞は, 破骨細胞形成に必要な微小環境を整えて破骨細胞形成を促進し, 骨破壊に関与していることを明らかにした⁷⁾。つまり, RA 滑膜組織は, 破骨細胞の前駆細胞 (滑膜マクロファージ), 形成支持細胞 (滑膜線維芽細胞), 誘導因子・活性化因子 (IL-1, IL-6, TNF) がすべて共存しているために, 非常に効率よく破骨細胞を形成する組織であると考えられる。

IV. 関節炎性骨破壊における RANKL と破骨細胞形成機構

1998 年, 骨芽細胞・ストローマ細胞等の破骨細胞形成支持細胞に発現する破骨細胞分化誘導分子 ODF/OPGL が同定された^{8,9)}。この分子は, すでに T リンパ球上に発現する dendritic cell 活性化因子として報告されていた TNF リガンドファミリーに属する膜貫通型タンパク, RANKL¹⁰⁾ と同一であった。滑膜線維芽細胞に破骨細胞分化誘導能があることから, われわれは RA 滑膜および滑膜細胞においても RANKL が発現していると考えてその検索を行った。実際, RA 滑膜組織では, RANKL が多量に発現しており, RA 滑膜線維芽細胞の破骨細胞分化誘導は, RANKL を介していることが明らかになった²⁾。RA 滑膜線維芽細胞の RANKL 発現は, RA 滑膜で産生される炎症性サイトカインによって, 誘導されることから, RA 滑膜における破骨細胞形成機構は, 以下のようにまとめられる。すなわち, 滑膜に浸潤した T 細胞がマ

クロファージ系細胞を活性化し, 炎症性・骨吸収性サイトカインである IL-1, IL-6, TNF- α 等の産生を促進し, その刺激により, 滑膜線維芽細胞・骨芽細胞の RANKL 発現が亢進する。そして, この RANKL により, 滑膜マクロファージの破骨細胞分化が誘導されると考えられる。一方, Amgen 社のグループは, RA 滑膜に浸潤した T 細胞上にも RANKL が発現することを報告し, ホルマリン固定すれば *in vitro* でも T 細胞に破骨細胞誘導能があることを示した¹¹⁾。しかし, 正常な免疫反応の際には, 骨組織以外での破骨細胞形成が見られない点, および T 細胞は破骨細胞分化を抑制する IFN- γ を産生することなどを考えると, T 細胞上に発現した RANKL の生体内での意義に関してはさらなる検討が必要であろう。しかし, この Kong らの報告は, RANKL の抑制因子である OPG がアジュバント関節炎の骨破壊を強く抑制し, 関節炎性骨破壊が破骨細胞を標的とした治療によって防止できることを示した点で非常に画期的であった。

V. Src 型チロシンキナーゼの RA 病態への関与

Src 型チロシンキナーゼは, 前癌遺伝子産物 c-Src をはじめとする非受容体型チロシンキナーゼ群であり, Fyn, Yes, Lck, Lyn などのメンバーから成る。細胞の増殖, 接着, 増殖因子・サイトカインのシグナル伝達, T リンパ球受容体や B リンパ球受容体のシグナル伝達といった非常に広範囲な細胞応答に関与している¹¹⁾。しかも, c-Src, このノックアウトマウスは, 破骨細胞性骨吸収が阻害され大理石骨病を呈することから, c-Src は破骨細胞機能に不可欠であることが示されている¹²⁾。このため, 細胞の異常増殖, 免疫反応の活性化, サイトカイン産生の亢進, 破骨細胞の活性化を特徴とする RA の病態においても多くの役割を担っていると考えられ, Src 型チロシンキナーゼの活性を変化させることで発症の抑制や症状の改善ができる可能性がある。

VI. Csk による滑膜細胞と破骨細胞の活性化抑制は関節炎性骨破壊を防止する

Src 型チロシンキナーゼの活性は, C 末端部の活性制御部位 (Tyr 527) のチロシンリン酸化状態によって調節されている。この部位を特異的にリン酸化する細胞質型チロシンキナーゼが Csk である¹³⁾。Csk が Tyr 527 をリン酸化すると, Src のコンフォメーション

ンが変化し、酵素活性部位がかくれて不活性化される。

Csk アデノウイルスを RA 滑膜細胞に感染して Csk を過剰発現すると、滑膜細胞増殖率は急激に低下し、滑膜細胞による IL-6 産生にも抑制効果がみられた。また、滑膜細胞から誘導された破骨細胞による骨吸収活性は Csk の発現により用量依存性に強力に抑制された。実際に、ラットアジュバント関節炎に対して Csk ウイルスを足関節内投与して、治療効果を検討したところ、足関節浮腫、関節炎スコアは有意に改

善し、病理組織およびレントゲン像においても骨破壊の抑制効果が示された⁵⁾。

VII. おわりに

RA の真の病因は不明であり、根治的治療を早期に実現することは難しい。そこで、組織破壊に関与する effector 細胞を標的とした治療法の開発も重要な意味をもつ。免疫系による骨代謝制御をさらに解明することで、リウマチ骨破壊への新たなアプローチの展開が期待される。

文 献

- 1) Kong, Y.Y., Feige, U., Sarosi, I., et al.: Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*, 402: 304~309, 1999.
- 2) Takayanagi, H., Iizuka, H., Juji, T., et al.: Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 43: 259~269, 2000.
- 3) Gravallesse, E.M., Manning, C., Tsay, A., et al.: Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum*, 43: 250~258, 2000.
- 4) Romas, E., Bakharevski, O., Hards, D.K., et al.: Expression of osteoclast differentiation factor at sites of bone erosion in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 43: 821~826, 2000.
- 5) Takayanagi, H., Juji, T., Miyazaki, T., et al.: Suppression of arthritic bone destruction by adenovirus-mediated csk gene transfer to synoviocytes and osteoclasts. *J Clin Invest*, 104: 137~146, 1999.
- 6) Firestein, G.S. & Manning, A.M.: Signal transduction and transcription factors in rheumatic disease. *Arthritis Rheum*, 42: 609~621, 1999.
- 7) Takayanagi, H., Oda, H., Yamamoto, S., et al.: A new mechanism of bone destruction in rheumatoid arthritis: synovial fibroblasts induce osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 240: 279~286, 1997.
- 8) Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., et al.: Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 3597~3602, 1998.
- 9) Lacey, D.L., Timms, E., Tan, H.L., et al.: Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 93: 165~176, 1998.
- 10) Anderson, D.M., Maraskovsky, E., Billingsley, W.L., et al.: A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 390: 175~179, 1997.
- 11) Thomas, S.M. & Brugge, J.S.: Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13: 513~609, 1997.
- 12) Soriano, P., Montgomery, C., Geske, R., et al.: Targeted disruption of the c-Src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell*, 64: 693~702, 1991.
- 13) Nada, S., Okada, M., MacAuley, A., et al.: Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60^{c-src}. *Nature*, 351: 69~72, 1991.