骨芽細胞と破骨細胞における接着分子発現と 細胞間相互作用

——慢性関節リウマチの骨破壊における関与——

神宮政男・橋本 通^{*1)}、諫山哲郎^{*2)}、腰原康子^{*3)}、
黒木健文^{*1)}、直野 敬^{*3)}、延永 正^{*1)}

The role of adhesion molecules in bone destruction in rheumatoid arthritis mediated by osteoblasts-osteoclasts interaction

The role of adhesion molecules in cultured human osteoblasts (OB) and osteoclasts (OC) in bone destruction was studied. OB and OC were obtained from human periosteum and human bone marrow. Adhesion molecules were quantified by cell ELISA using monoclonal antibodies (mab). Ca release was estimated by ⁴⁵Ca release assay.

In OC, both ICAM-1 and VCAM-1 were expressed and strongly enhanced by IL-1 β , TNF- α and mildly by IL-6. LFA-1, Mac-1 and VLA-4 were also expressed and enhanced by IL-1 β and TNF- α . In OB, both ICAM-1 and VCAM-1 were highly expressed. OC strongly adhered to IL-1 β -stimulated OB, and released Ca from OB. ICAM-1 mab did not abolish the adhesion and Ca release. The results obtained suggest that OB-OC cell interaction and OC-matrix interaction play important roles in OC-mediated bone resorption and that not only ICAM-1/LFA-1 (Mac-1) adhesion pathway but also other adhesion pathways mediate cell-cell or cell-matrix interaction in bone.

Masao Shingu・Michi Hashimoto^{*1)},
Tetsurou Isayama^{*2)}, Yasuko Koshihara^{*3)},
Tatehumi Kuroki^{*1)}, Takashi Naono^{*3)},
Masashi Nobunaga^{*1)}

**key words : Osteoblasts, Osteoclasts, ICAM-1,
LFA-1, VLA-4**

骨固有細胞として骨代謝を司る骨芽細胞・破骨細胞は骨吸収、石灰化抑制に重要な役割を演じているとされる。慢性関節リウマチ (RA) における

骨破壊はインターロイキン 1 (IL-1) による骨吸収および骨芽細胞石灰化抑制などに起因するものと思われるが^{1,2)}、その際、接着分子の関与についてはほとんど検討されていない。

intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) は血管内皮細胞 (EC) や滑膜細胞などの細胞膜に発現され、リンパ球・単球などに発現される LFA-1 (CD 11 a/CD 18) ないしは Mac-1 (CD 11 b/CD 18) および VLA-4 をそれぞれリガンドとして、炎症細胞の血管外浸出ないしは滑膜浸潤に重要な役割を演じる接着分子である^{3,4)}。VLA-4 はコラーゲンなどのマトリックス (基質) に結合する接着分子でもあり、このような cell to cell interaction のみならず cell to matrix interaction も炎症における組織破壊に関与するとされる。IL-1 などの作用により滑膜細胞が増殖し、軟骨組織へ浸潤していく過程 (パンヌス形成) において滑膜細胞の VLA-4 などのいわゆるインテグリンファミリーに属する接着分子が軟骨のコラーゲン・プロテオグリカンなどの基質に接着する。その結果、滑膜細胞ないしは軟骨細胞由来のメタロプロテアーゼ (MMP) やスーパーオキシドラジカルなどによる軟骨基質破壊が起こる^{5~7)}。

このような慢性関節炎症の結果、徐々に軟骨破壊とともに軟骨下骨の骨びらんが起こる。骨破壊機序として IL-1 による骨吸収¹⁾、石灰化抑制²⁾、破骨細胞の誘導⁸⁾ および骨芽細胞の増殖抑制・コラーゲン合成抑制があげられるが、いずれの現象も骨芽細胞および破骨細胞による骨代謝調節障害により惹起され、IL-1 の関与が示唆されている。IL-1 は骨細胞や骨髄の単球系細胞においてサイトカインを産出させる。tumor necrosis factor α

^{*1)} Department of Clinical Immunology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University 69 九州大学生体防御医学研究所臨床免疫学部門

^{*2)} Department of Orthopedics, Beppu National Hospital 国立別府病院整形外科

^{*3)} Department of Pharmacology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology 東京都老人研究所

図1 Effects of cytokines on ICAM-1 expression and sICAM-1 production in osteoclast-like cells

Osteoclast-like cells were cultured in 96-well dishes with cytokines for 24 hr, fixed and measured for ICAM-1 expression by cell ELISA using specific mab. The supernatants were measured for sICAM-1 by ELISA. Data expressed as mean $\pm$ SD. ** $P < 0.02$, *** $P < 0.01$, **** $P < 0.001$ vs control.

(TNF- α)も軟骨細胞のMMP遊離増強⁹⁾および骨吸収惹起作用などIL-1様の作用を示す。一方、IL-6は単球、滑膜細胞および軟骨細胞などから産生され、肝細胞からCRP、アミロイド蛋白、 α_1 -アンチトリプシンなどの急性期蛋白産生やBリンパ球分化など生体防御作用を示すほか、ミエロマ細胞の増殖など(14)に関与するサイトカインであるが、IL-1と異なりRAにおける関節破壊には関与しない可能性が高い¹⁰⁾。

RAの骨破壊の詳細な機序については不明なことが多く、特に、骨破壊における接着分子の関与についての検討は少ない。そこで、RA患者骨髄より培養した破骨細胞様細胞(OC)ならびに培養ヒト骨芽細胞(OB)につき、接着分子発現とサイトカインによるその制御、および骨吸収における接着分子の関与につき検討した。

材料と方法

(1) 骨芽細胞の培養

OBは健康者periosteumから培養した¹¹⁾。これは高いアルカリフォスファターゼ(ALP)活性

を示し、Ca/P比が2.19に近く、hydroxyapatite結晶を産出し、von Kossa染色にて強く染まることからOBと同定された。

(2) 破骨細胞の培養

OCは骨髄より培養した。RA患者の人工膝関節または股関節置換術施行時、腸骨より採取したヘパリン加骨髄から得た単核球¹²⁾(1×10^6 /ml)を10%牛胎児血清(三菱油化)、抗生物質を含む α -MEMに浮遊させ、培養用シャーレ(ファルコン3002, 3003)にて1~2カ月間培養、multilayer細胞をさらに1.25 dihydroxy-vitamin D₃(10^{-8} M)存在下で継代培養し、confluencyに増殖するまで培養した(2代目)¹³⁾。2~3代目の細胞を実験に用いた。骨髄より培養した細胞につき酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色(TRAP染色)(白血球酸フォスファターゼA, シグマ)および骨吸収活性(⁴⁵CaラベルヒトOBを用いた⁴⁵Ca release法)を調べたところ、陽性であったことからOC様細胞であることが示唆された。

(3) サイトカイン

リコンビナント(r)ヒトIL-1 β (2×10^7 U/mg,

図 2 Effects of cytokines on VCAM-1 and VLA-4 expression in human osteoclast-like cells

Ostoclast-like cells were cultured in 96-well dishes with cytokines(U/ml) for 24 hr. fixed and measured for VCAM-1 and VLA-4 expression by cell ELISA using specific mab. *P<0.05, **P<0.02, ***P<0.01, ****P<0.001 vs control (Data=mean±SD).

図 3 Effects of cytokines on Mac-1 and. LFA-1 expression in human osteoclast-like cells

Ostoclast-like cells obtained from bone marrow mononuclear cells of RA patients were cultured in 96-well dishd with cytokines for 24 hr, fixed and measured for Mac-1 and LFA-1 by cell ELISA using specific mab. Data expressed as mean±SD. *P<0.05, ***P<0.01 vs control.

表 1 Adhesion of osteoclast-like cells to IL-1B-stimulated osteoblasts

Osteoblasts	Number of adherent osteoclasts mean±SD/HPF
Unstimulated	22± 6(n=4)
Pre-cultured with IL-1B	45±11(n=4)**

**P<0.02 vs unstimulated

1×10⁶ U/ml) (大塚製薬提供), r-ヒト TNF-α (3.2×10⁷ U/mg) (Genzyme), r-ヒト IL-4 (1×10⁵ U/ml) (Genzyme) および r-ヒト インターフェロン γ (IFN-γ) (大塚製薬提供), GM-CSF (1.25×10⁶ U/ml) および r-ヒト IL-6 ¹⁴⁾(大阪大学平野博士提供, 5×10⁶ U/mg)を用いた.

表 2 ^{45}Ca release from pre-labelled osteoblast cultured with osteoclasts

Osteoclaststs	^{45}Ca radioactivity after 48 hrs	^{45}Ca radioactivity at starting culture
Osteoclasts(-)	586 $\pm$ 49 (n=4)	
Osteoclasts(+)	893 $\pm$ 84 (n=4) ***	326 $\pm$ 33 (n=4)
Osteoclasts(+) ICAM-1 mab(+)	956 $\pm$ 97 (n=4) ****	

P<0.01, *P<0.001 vs osteoclasts(-)

(4) 接着分子発現の定量

OB または OC をゼラチンコート 96 穴プレートに培養, confluency に達したのち, 培養液を新鮮培養液 0.1 ml と交換し, これに各サイトカイン 0.02 ml を加え, 16 h 培養, プレートを 1 回洗浄後固定した. この場合, 1.25 hydroxyvitamin D₃ は添加していない. 対照としてサイトカイン無添加ウェルを準備した. 固定したプレートを 2 回洗浄後, 抗ヒト ICAM-1 モノクローナル抗体 (mab) (マウス, British Bio-technology), VCAM-1, LFA-1, Mac-1, および VLA-4 各 mab (Immunotech) を用いた cell ELISA 法でそれぞれの接着分子発現を定量した¹⁵⁾. ブランクとして mab のかわりにマウス IgG および細胞のないゼラチンウェルを用いた. OC は RA 患者 1 例から得られたものを用い, 各実験系は 4 穴ずつ設けた.

(5) Ca 遊離活性

24 穴プレートに OB を培養し, confluency に達してから ^{45}Ca (2 μCi) を加え 16 h 培養することによりラベル, OB 層に洗浄後新鮮培養液 0.4 ml を加え, OC ($1\times 10^6/\text{ml}$) 0.1 ml を添加 (final $2\times 10^5/\text{ml}$), 6 h 培養後の上清 0.1 ml につき放射活性を測定した²⁾.

(6) 細胞接着の測定

24 穴プレートで培養した OB に IL-1 β (final 100 U/ml) を加え, 16 h 培養, 上清を新鮮培養液 0.4 ml と交換し, これに OC 浮遊液 ($1\times 10^6/\text{ml}$) 0.1 ml を加え, 1 時間培養後, 洗浄し固定, 1000 倍で鏡検した範囲を 1 視野とし, 接着した OC 数を計測, 4 視野の平均値で接着細胞数を示した.

(7) 統計学的検定

統計学的有意差検定は t 検定により行った.

結 果

OC では ICAM-1, VCAM-1 が発現され, IL-1 β , IFN- γ により増強され, IL-6 も軽度増強した. LFA-1, Mac-1, VLA-4 の発現もみられ, いずれも IL-1 β , IFN- γ により増強された (図 1, 図 2, 図 3). OB では ICAM-1, VCAM-1 発現が強く, 前者は IFN- γ で, 後者は IL-1 β , IL-6 で増強された. IL-1 β 刺激 OB に OC を添加するとほとんどすべての OC が OB に著明に接着したが, この接着は ICAM-1 mab 添加 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) では抑制されなかった (表 1). さらに, ^{45}Ca ラベル OB に OC を添加・培養する実験から, OC は Ca 遊離活性を示した. この際, ICAM-1 mab を添加しても骨吸収は抑制されなかった (表 2).

考 察

RA 患者滑膜組織の血管内皮細胞, 滑膜細胞は ICAM-1 抗原強陽性であり, IL-1 β などのサイトカインにより増強される. これら液性因子によって, 接着分子発現を獲得もしくは増強した血管周囲には, いわゆる memory or activated T cell が浸潤し, CD4, CD29, HLA-DR 以外に LFA-1, VLA-4 などの接着分子発現を示すことが知られている¹⁶⁾.

サイトカインは骨細胞にも作用し, 骨代謝に関与する OB や OC の機能調節はこれらの細胞が存在する局所で行われ, TNF- α や IL-1 β は OB に作用し, OC 活性化因子を産出させ, OC が骨吸収を起こす. 生理学的および病態的な骨形成には多くのサイトカインが関与するが, ラット, マウスおよびヒト由来 OB ないしはラット calvaria を用いた *in vitro* の実験で, IL-1 および TNF- α は OC による骨吸収の調節や骨形成の制御に重要な役割を演じるのみでなく, OB によるコラーゲンのような骨基質蛋白の合成および OB による

ALP 産生を抑制することが示された。IL-1 β は OC の形成にも重要である。

OC, OB の接着分子発現をみると, OC では ICAM-1, VCAM-1 が強く発現され, IFN- γ , IL-1 β により増強された。LFA-1, Mac-1, VLA-4 も発現し, IFN- γ , IL-1 β で増強された。一方, OB では ICAM-1, VCAM-1 が発現され, IFN- γ , IL-1 β で増強された。IL-1 β 刺激 OB に OC は強く接着し, この際, 別個の実験にて骨吸収が起こることが示唆された。この接着および骨吸収は ICAM-1 mab では抑制されなかった。OB 層の Ca 濃度は hydroxyapatite 結晶量と関連することから, ラベルした放射性 Ca が OB 層から遊離したことは, OB による石灰化が抑制されたか, または沈着した石灰(Ca)の遊離(骨吸収)を示唆する。サイトカイン添加培養により細胞数には変動はみられなかったことから, サイトカインは OB に傷害的に作用したのではない。

筆者らの検討では, IL-6 の骨形成抑制作用ないしは OB に対する作用は, IL-1 β にくらべると弱い。TNF- α , IL-1 β は ^{45}Ca ラベル OB に作用し, ^{45}Ca 遊離を促進したのに対し, IL-6 は促進せずむしろ抑制したことは, IL-6 は逆に骨破壊を防御することを示唆する²⁾。筆者らは IL-1 依存性の軟骨基質破壊に対し IL-6 は軟骨細胞のコラゲナーゼ産生を抑制し, tissue inhibitor of MMP (TIMP)産生を増強することにより防御的に作用するとした¹⁰⁾。OB, OC における接着分子発現を IL-6 は増強したことから, 接着分子の点からは IL-6 の作用は骨破壊的であることが示唆された。TNF- α ないしは IL-1 の作用により OB から産生される PGE₂ は autocrine の機序で骨代謝において重要な役割を演じ, OB の増殖・分化および石灰化に関与することから, TNF- α ないしは IL-1 β が OB による石灰化を抑制した現象においては, OB の内因性 PGE₂ が重要なメディエーターの一つであることが推測された⁸⁾。

本成績から, OC による骨吸収には OB-OC cell interaction が重要な役割を有し, この際, ICAM-1/LFA-1(Mac-1)接着経路のみでなく, VCAM-1/VLA-4 やそのほかの経路も関与していることが示唆された。したがって, OC-matrix interaction も, 骨吸収において病的に重要であるこ

とが示唆された。ICAM-1 mab は接着または OC による Ca 遊離を抑制しなかったことは paradoxical に思えるが, 筆者らの検討では ICAM-1 mab は他の接着分子を増強することが示され, この点, 接着分子環境には一種のカスケードがあり, 接着分子同士がお互いに関連しあひながら調節されていることが示唆される¹⁷⁾。

OC の形成には OB-OC の direct contact が必要である。これまで OB, OC の接着分子は腫瘍細胞株や動物における組織染色で検討されており, OC には LFA-1, VLA-2¹⁸⁾, VLA-4, ICAM-1¹⁹⁾, CD44, vitronectin receptor²⁰⁾ などの接着分子が発現されるという。一方, OB には NCAM (CD 56), Fibronectin receptor, VLA-2 などの発現が示唆されている。OB では IL-1 β による ALP 誘導には β integrin が必要とされる²¹⁾。

今回のようなヒト OB, ヒト OC のような単離細胞にて接着分子を検討した報告はなく, しかも各種サイトカインの影響を定量的に検討した報告はない。

本研究は, 文部省科学研究員補助金(No. 05670425), および厚生省リウマチ調査研究事業病態研究班(班長 越智隆弘教授)の援助により行われた。研究の遂行に当り, 援助いただいた研究室 河野江利子嬢, 伊藤真由美嬢, 朝倉真理子嬢に感謝致します。

文 献

- 1) Gowen, M., Mundy, G. R. : Actions of recombinant interleukin 1, interleukin 2 and interferon- γ on bone resorption *in vitro*. J. Immunol. 136 : 2478-2482, 1986.
- 2) Kuroki, T., Shingu, M., Koshihara, Y., Nobunaga, M. : Effects of cytokines on alkaline phosphatase and osteocalcin production, calcification and calcium release by human osteoblastic cells. Brit. J. Rheumatol. 33 : 224-230, 1994.
- 3) Marlin, S.D., Springer, T. A. : Purified intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen(LFA-1). Cell 51 : 813-819, 1987.
- 4) Smith, C. W., Marlin, S. D., Rothlein, R., Toman, C., Anderson, D. C. : Cooperative interaction of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils *in vitro*. J. Clin.

- Invest. 83 : 2008-2017, 1989.
- 5) Dayer, J. M., DeRochemoneix, B., Burrus, B., Demczuk, S., Dinarello, C. A. : Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells. J. Clin. Invest. 77 : 645-648, 1986.
 - 6) Dodge, G. R., Poole, A.R. : Immunohistochemical detection and immunochemical analysis of type II collagen degradation in human normal, rheumatoid and osteoarthritic articular cartilage and in explants of bovine articular cartilage with interleukin 1. J. Clin. Invest. 83 : 647-661, 1989.
 - 7) Tawara, T., Shingu, M., Nobunaga, M., Naono, T. : Effects of recombinant human IL-1 β on production of prostaglandin E2, Leukotriene B4, NAG, and superoxide by human synovial cells and chondrocytes. Inflammation 15 : 145-157, 1991.
 - 8) Akatsu, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Imamura, K., Yamaguchi, A., Sato, K., Nagata, N., Suda, T. : Role of prostaglandins in interleukin-1-induced bone resorption in mice *in vitro*. J. Bone. Miner. Res. 6 : 183-190, 1991.
 - 9) Ahmadzadeh, N., Shingu, M., Nobunaga, M. : The effect of recombinant tumor necrosis factor α on superoxide and metalloproteinase production by synovial cells and chondrocytes. Clin. Exp. Rheumatol. 8 : 387-391, 1990.
 - 10) Shingu, M., Nagai, Y., Isayama, T., Naono, T., Nobunaga, M., Nagai, Y. : The effects of cytokines on metalloproteinase inhibitors (TIMP) and collagenase production by human chondrocytes and TIMP production by synovial cells and endothelial cells. Clin. Exp. Immunol. 94 : 145-149, 1993.
 - 11) Koshihara, Y., Kawamura, M., Oda, H., Higaki, S. : *In vitro* calcification in human osteoblastic cell line derived from periosteum. Biochem. Biophys. Res. Commun. 145 : 651-657, 1987.
 - 12) 神宮政男, 江崎一子, 山本政弘, 野中史郎, 延永 正 : 慢性関節リウマチ患者由来単核球のリウマトイド因子および免疫グロブリン産生. 日臨免疫学会誌 15 : 224-231, 1992.
 - 13) Takahashi, N., Yamana, H., Yoshiki, S., Roodman, G. D., Mundy, G. R., Jones, S. I., Boyde, A. : Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. Endocrinology 122 : 1373-1382, 1988.
 - 14) Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, T., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, T., Kishimoto, T. : Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. Nature 324 : 73-76, 1986.
 - 15) Hashimoto, M., Shingu, M., Ezaki, I., Nobunaga, M., Minamihara, M., Kato, K., Sumioki, H. : Production of soluble ICAM-1 from human endothelial cells induced by IL-1 β and TNF α . Inflammation 18 : 163-173.
 - 16) Haynes, B. F., Hale, L. P., Denning, S. M., Le, P. T., Singer, K. H. : The role of leukocyte adhesion molecules in cellular interactions : implications for the pathogenesis of inflammatory synovitis. Springer Semin. Immunopathol. 11 : 163-185, 1989.
 - 17) Shingu, M., Hashimoto, M., Nobunaga, M. : The effects of intercellular adhesion molecule-1 monoclonal antibody (MAB) on the expression of adhesion molecules in synovial cells (SC). Arthritis Rheum 36(Suppl) : s155, 1993.
 - 18) Horton, M. A., Chamber, T. J. : Human osteoclast-specific antigens are expressed by osteoclast in a wide range of non-human species. Brit. J. Exp. Pathol. 67 : 95-104, 1986.
 - 19) Athanasou, N. A., Quinn, J. : Immunophenotypic differences between osteoclasts and macrophage polykaryons : Immunohistological distribution and implications for osteoclast ontogeny and function. J. Clin. Pathol. 43 : 997-1003, 1990.
 - 20) Argraves, W.S., Suzuki, S., Arai, H., Thompson, K., Piersbacher, M. D., Ruoslahti, E. : Amino acid sequence of the human fibronectin receptor. J. Cell. Biol. 105 : 1183-1190, 1987.
 - 21) Dedhar, S. : Signal transduction via the β_1 integrins is a required intermediate in interleukin-1 β induction of alkaline phosphatase activity in human osteosarcoma cells. Exp. Cell Res. 183 : 207-214, 1989.