滑膜細胞の増殖・活性化とその制御

檜 垣 恵*

review article

JAPANESE JOURNAL OF INFLAMMATION

Regulation of synoviocytes proliferation and activation

Synovial cell proliferation and activation is one of the major feature of rheumatoid arthritis, and articular tissue destruction is mediated by a granulation tissue (pannus) composed of macrophage-like type A synoviocytes and fibroblast-like type B synoviocytes. Monokines such as IL-1, TNF α , and PDGF produced by type A synoviocytes stimulate the proliferation and activation of type B synoviocytes. We have employed antisense oligonucleotides to inhibit the production of cytokines including IL-1 and TNF α . And the inhibition of synoviocytes growth with vitamin D3 and a site-specific cAMP analogue was studied. Furthermore the regulation of transcription factor including AP-1, CREB and NF- κ B in synoviocytes was discussed in this review.

Rec. 12/24, 1994, pp 9~16

Megumu Higaki*

key words : synoviocytes, cytokine, MMP, transcription factor, cell cycle

慢性関節リウマチの病態形成

慢性関節リウマチ(RA)は、関節滑膜を炎症の主座として軟骨・骨の破壊を引き起こす原因不明の慢性炎症性疾患である。さらに、免疫異常を背景に自己反応性T細胞および自己抗体であるリウマトイド因子の産生も認められる。炎症関節滑膜には血管新生、リンパ球浸潤とともに滑膜細胞の増殖・活性化(パンヌス形成)が認められ、マトロプロテアーゼ(MMP)、サイトカイン、プロスタグランジン(PGs), ロイコトリエン(LTs)などの種々のケミカルメディエーターの産生・遊離により軟骨・骨の破壊が引き起こされる^{1,2)}(図1)。

パンヌス形成

慢性の炎症性関節炎の持続過程で滑膜の増殖によるパンヌスには、マクロファージ様のA型滑膜

(文献¹⁾より引用)

* Institute of Medical Science, St. Marianna University School of Medicine 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター

Offprint requests to : Megumu Higaki, Institute of Medical Science, St. Marianna University School of Medicine, 2-16-1, Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki, Kanagawa 216, Japan

図1 慢性関節リウマチの病態

表 1 滑膜B型細胞増殖に関するサイトカイン

サイトカイン		アンカー非依存性増殖	アンカー依存性増殖(血清添加)
血小板由来成長因子	(PDGF)	+++	+++
線維芽細胞成長因子	(FGF)	++	++
上皮細胞成長因子	(EGF)	+/-	+
インターロイキン 1	(IL-1)	-	+/-
腫瘍壊死因子 α	(TNF α)	-	+/-
インターフェロン γ	(IFN γ)	-	+/-
トランスフォーミング成長因子 β	(TGF β)	-	多様
インシュリン様成長因子	(IGF-1)	-	+/-

(文献³⁾より引用) 図 2 滑膜B型細胞増殖機構 (文献³⁾より)

図 3

細胞とともに、線維芽細胞様のB型滑膜細胞の増殖が著明である³⁾。A型滑膜細胞は貪食能やHLA-DR, FcR, および単球系細胞の表面抗原を有し、インターロイキン(IL)-1, 腫瘍壊死因子(TNF α), IL-6, 血小板由来増殖因子(PDGF), 線維芽細胞増殖因子(FGF), トランスフォーミング成長因子(TGF β), PGE₂, およびリゾチームを産生する細胞である。

一方、B型滑膜細胞はICAM-1, VCAM-1などの接着分子を発現し、ゴルジ装置が発達して、コラーゲン、フィブロネクチン、コラゲナーゼインヒビター (Tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP), プロテオグリカンのほかにコラゲナーゼ、ゲラチナーゼ、ストロメリジンなどのMMP, そして顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF), IL-6, TGF β を分泌する細胞である。A型滑膜細胞は末梢血単球のリク

ルートメントにより増加し、B型滑膜細胞はA型滑膜細胞などの産生するモノカインに反応して増殖・活性化すると考えられている(図2)³⁾。

一方、Zvaiflerらはpannocyteという特殊な細胞集団を定義している⁴⁾。

B型滑膜細胞増殖因子

B型滑膜細胞の増殖因子としてはPDGF, FGF, IL-1, TNF α などが考えられている(表1)。筆者らも滑膜細胞の器官培養上清中にPDGFおよびIL-1 β を検出している(図3)⁵⁾。

無血清下でもアンカー非依存性に増殖活性を示すPDGFが増殖にもっとも重要と考えられるが、酸性および塩基性FGFもある程度の増殖活性を示す。一方、IL-1はインドメタシン存在下でプロスタグランジン合成を抑制したときのみ血清存在下で高い増殖活性を示す。IL-1はB型滑膜細胞

の PDGF を誘導し、PDGF は IL-1 レセプターの発現を増強させることにより相乗的に働いている可能性もある。TNF α の増殖活性は弱い(高濃度では抑制的?)が IL-1 と相乗的に働く。TNF α の増殖活性に関してはインターフェロン(IFN) γ が抑制的に働くという報告もある⁹⁾。TGF β は濃度により 2 相性の作用をするといわれる。

B 型滑膜細胞自身も酸性 FGF, TGF β , GM-CSF, IL-1 β を産生してオートクラインの増殖が引き起こされる⁷⁾。

フィブロネクチン, サブスタンス P, T 細胞リンフォカインの滑膜細胞増殖活性も報告されている。増殖抑制因子としてはヒアルロン酸, プロスタグランジンのほかに IL-1 レセプターアンタゴニスト, TNF インヒビターが産生され, 増殖のバランスが保たれており, IFN β , IFN γ も PDGF 作用に拮抗するといわれる。

B 型滑膜細胞の活性化

(1) 表面抗原

活性化した B 型滑膜細胞は HLA クラス I, II 抗原および接着分子の LFA-3, ICAM-1, VCAM-1 を発現する。滑膜細胞の HLA クラス II 抗原の発現亢進により, 抗原提示能が増強し, 局所での免疫応答が促進される。

IFN γ は, B 型滑膜細胞の HLA-DR 抗原の亢進を特異的に引き起こし, GM-CSF は A 型滑膜細胞の HLA クラス II 抗原の発現を亢進させている。IL-4, TNF α にも弱い HLA-DR 発現亢進活性がある。一方, 滑膜細胞の接着分子発現の亢進は, リンパ球の保持および相互の活性化に重要である。

B 型滑膜細胞の ICAM-1 は, IFN γ , TNF α , IL-1 β により発現が亢進する⁹⁾。VCAM-1 の発現も同様に引き起こされ, 浸潤リンパ球の VLA-4 と結合すると考えられる¹⁰⁾。

(2) ケミカルメディエーター

B 型滑膜細胞は種々のサイトカインおよび成長因子の影響で浸潤増殖性の性質をもつ細胞になり腫瘍遺伝子(*c-fos*)を発現するとともに蛋白分解酵素, 活性酸素, ホスホリパーゼ A2, MMPs, エラスターゼ, およびサイトカインを産生して組織破壊を引き起こす。IL-1 は B 型滑膜細胞を刺激

図 4 REGA モデル (文献¹³⁰⁾)

してコラゲナーゼ, PGE₂ の分泌を引き起こし, さらに IL-6, GM-CSF, IL-8, TGF β のほかに IL-1 β , TNF α などのサイトカイン産生も誘導して, 複雑なサイトカインネットワークを形成する。

また, MMP としてコラゲナーゼ, ゲラチナーゼ, ストロメリジンを産生する。一方, I 型コラーゲン, フィブロネクチン, TIMP, プロテオグリカンなどの細胞間マトリックスも産生される。滑膜組織には IL-1 レセプターアンタゴニストも存在しており, TGF β とともに IL-1 の作用を阻害して病態を修飾している。

さらに, B 型滑膜細胞は, IL-6 を構成的に発現して, IL-1 の発現亢進に働いているが IL-6 自身は PGE₂ およびコラゲナーゼ産生を引き起こさず, IL-1 誘導による PGE₂ 産生を阻害する炎症抑制的なサイトカインとも考えられる。TNF α にも IL-1 と同様な働きがあり, コラゲナーゼおよび PGE₂ 産生を引き起こす。この TNF α の作用に対しては IFN γ が抑制的に働く。

図 5
Effects of VD₃ analogs on the growth
of RA-FLS

(3) マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)

MMP は 10 のマルチジーンファミリーからなり、活性部位に亜鉛を有し、中性 pH, Ca²⁺存在下で細胞外マトリックスの変性を引き起こす蛋白分解酵素である。RA 滑膜では IL-1, EGF, PDGF, TNF α が産生を誘導するコラゲナーゼ (MMP-1)・ストロメリジン (MMP-3) およびゲラチナーゼ (MMP-2, MMP-9) の役割が重要である¹²⁾。

(4) REGA モデル (図 4)

自己免疫疾患における自己抗原および自己反応性の T 細胞クローンの発生を非特異的な免疫応答であるサイトカインネットワークの活性化によるプロテアーゼ産生から説明しているのが、REGA (remnant epitope generates autoimmunity) モデルである¹³⁾。病原因子により活性化されて産生された IL-1, TNF, IFN γ などの炎症性サイトカインおよび局所で二次的に産生された MCP (単球走化因子)-1, IL-8 などのケモカインの働きにより滑膜組織に浸潤・活性化した炎症細胞は、MMP-2, MMP-9, グランザイムなどの酵素を産生して IV 型コラーゲンなどを破壊し、炎症細胞の局所浸潤をさらに促進するとともに、組織特異的な MMP の産生により自己抗原となるコラーゲ

図 6 Expression of cyclin D1 in
synoviocytes (Northern Blot.)

ン断片ペプチドを生じて自己反応性 T 細胞および自己抗体を誘導するという考えである。同時に、抗炎症性サイトカインである IFN α , IFN β , TGF β , 抗体産生を導く IL-6, MMP インヒビターである TIMP などの産生も認められ、サイトカインおよび酵素活性のバランスにより病態が修飾されるというモデルである。

滑膜細胞増殖の制御

抗リウマチ薬のなかでは金チオリンゴ酸ナトリウム塩、オーラノフィンなどの金剤、D-ペニシラミン、ブシラミンなどの SH 化合物、ロベンザリット 2 ナトリウム、メトトレキサート、ミゾリビン、サラゾスルファピリジンに滑膜細胞増殖抑制活性があると報告されている。

筆者らは、活性型ビタミン D₃ (VD₃) および部位特異的 cAMP アナログに滑膜細胞増殖抑制活性があることを見出した。VD₃ はヒト滑膜細胞特異的に炎症性サイトカイン抑制とともに 10~50 nM で 50% の増殖抑制を示した (図 5)。

VD₃ は、滑膜細胞のチロシリン酸化に影響せず、C18/C2 セラミドにも増殖抑制作用が認められなかったが、後述するように、核内転写因子 AP-1 の活性を抑制して作用していると考えられる。フローサイトメトリーによる細胞周期の解析では、G1 期での停止が認められ、ノザンプロットでサイクリン D1 の発現低下を認めた (図 6)。増殖抑制により滑膜細胞に分化が誘導されているか、アポトーシスが引き起こされているのか、現在検討中である。

一方、A キナーゼ調節サブユニット RII に特異的に作用する cAMP アナログの 8-C1-cAMP は 20 μ M で滑膜細胞増殖を 100% 抑制した。この際には、分子量の異なる核内転写因子 CREB の誘導

図 7

a : Inhibition of IL-1β production in synovial cells by antisense or sense ODNs.

b : Dose-dependent inhibition of IL-1β production.

が認められ、A キナーゼ依存性の遺伝子発現が影響を受けて増殖抑制が引き起こされていると考えられた。

滑膜細胞のサイトカイン産生の抑制

RA の炎症滑膜で重要な役割を果たす IL-1, TNF の作用に対して、TGFβ や IL-1 レセプターアンタゴニスト、IFN, IL-4 が抑制的に働くことが知られている。また、合成ペプチドによるサイトカインのレセプターへの結合阻害による抑制や、IL-1β の活性化に重要な IL-1β 変換酵素に対する阻害薬の開発も行われている。さらに、後述するような転写因子レベルでの産生制御も可能になると考えられる。

一方、アンチセンス DNA/RNA は特定の遺伝

子のメッセンジャー RNA, そのプロセッシングに必要な配列, または DNA 遺伝子自体の相補的な配列にハイブリダイズすることにより, その遺伝子産物の合成を抑制・減少させる。

筆者らは, IL-1β, TNFα に対するホスフォロサイオエート型アンチセンス DNA を合成して滑膜細胞のサイトカイン産生に対する影響を検討した。AUG 転写開始領域に対するアンチセンスがもっとも強い抑制効果を示し, 20 μM で 40% の産生抑制がみられた (図 7)¹⁴⁾。

MMP の合成および酵素活性の抑制¹⁵⁾

MMP 活性を阻害するものとして α2 マクログロブリンのほかに TIMP が知られ, TIMP-1 は MMP-9 前駆体と, TIMP-2 は MMP-2 前駆体と複合体を合成する。トランスレチノイン酸, レチノイド, TGFβ, IL-6, IL-11, オンコスタチン M が TIMP の産生を亢進させる。また, Zn⁺⁺ イオンのキレート作用をもつテトラサイクリンおよびドキシサイクリン, ミノサイクリンは MMP-1, MMP-2 を, アンストラサイクリンは MMP-2, MMP-9 活性を阻害する。

一方, MMP 酵素合成の阻害剤としては, TGFβ, トランスレチノイン酸, レチノイド, デキササゾンがある。レチノイド, デキサメタゾンは, 後述する転写因子の AP-1 部位に作用して転写阻害することが示唆されているが, 筆者らも活性型ビタミン D3 に同様に作用を認めている。さらに, IL-1, 上皮細胞成長因子 (EGF) 刺激時には, MMP mRNA の安定性が増して産生増強が起こることが知られ, この過程を阻害するリボザイムなどの開発も進められている。

転写因子レベルでの検討

滑膜細胞の細胞増殖・活性化のシグナル伝達は近年注目されている。サイトカインおよび血清による増殖シグナルは, 増殖因子の結合によるレセプター・チロシンキナーゼの活性化にはじまり, Ras ; Raf-1 キナーゼ, MAP キナーゼ・キナーゼ (MAPKK) ; MAP キナーゼ (MAPK) という蛋白質リン酸化カスケードの活性化により伝達される。血清添加により MAPKK は細胞質内にとどまっているが, MAP キナーゼは 15 分から 6 時間

図 8 滑膜細胞内シグナル伝達

で細胞質から核内に移行する。そして、転写因子 Elk-1, Jun, Myc の発現を引き起こす(図 8)。

DNA-RNA という転写調節段階は遺伝子発現調節のもっとも中心的な段階で、このときに DNA エLEMENT に働きかけて RNA を産生するためのコンポーネントが転写因子である。転写因子の役割は RNA 合成を引き起こす役割と、RNA 合成をさまざまな状況に応じてコントロールする役割がある。

(1) AP-1(activator protein-1)は、プロトオンコジーン *jun* と *fos* の遺伝子産物から構成されるロイシンジッパーファミリーの DNA 結合蛋白であり、TPA などの発癌プロモーターに反応して、特定の DNA 配列(TGACTCA): TPA responsive element(TRE)に結合し遺伝子の発現を制御する因子で、増殖因子、サイトカイン、紫外線によっても活性化される。滑膜細胞ではコラゲナーゼおよび IL-6 産生に結びついていると考えられる。

筆者らは、IL-1 および TPA で刺激した滑膜細胞での AP-1 の誘導が、VD3 でデキサメサゾンと同様に抑制されることをゲルシフト法で明らか

図 9 Nuclear factor of IL-1 β stimulated RA-sac

図 10 cAMP 誘導体による用量依存的な滑膜細胞の増殖抑制

にした(図 9)。

(2) CREB(cAMP response element 結合蛋白質)は、A キナーゼ経路で機能する転写因子として知られ、ロイシンジッパーと塩基性アミノ酸クラスターからなる DNA 結合ドメインを有している。細胞内 cAMP が上昇すると PKA が活性化され触媒サブユニットが核内に移行して P ボックスの Ser133 がリン酸化されると転写活性が上がる。筆者らは、cAMP アナログ(8-Cl-cAMP)添加による滑膜細胞増殖抑制の際に新しい CREB が誘導され、増殖抑制を引き起こすことを見出している(図 10)。

(3) NF- κ B は、真核生物の免疫系に深く関与している転写因子の一つで、種々の刺激物質、

- arthritis. Vascular cell adhesion molecule-1 expression in synovium and on fibroblast-like synoviocytes. *J. Immunol.* 149 : 1424-1431, 1992.
- 11) Tranbandt, A., Aicher, W. K., Gay, R. F. et al. : Spontaneous expression of immediate-early response gene *c-fos* and *egr-1* in collagenase-producing rheumatoid synovial fibroblast. *Rheumatol. Int.* 12 : 53-59, 1992.
 - 12) Sorsa, T., Konttinen, Y. T., Lindy, O., Ritchlin, C., Saari, H., Suomalainen, K., Eklund, K. K., Santavirta, S. : Collagenase in synovitis of rheumatoid arthritis. *Seminars in Arthritis and rheumatism* 22 (1) : 44-53, 1992.
 - 13) Opdenakker, G., Damme, J. V. : Cytokine-regulated proteases in autoimmune diseases. *Immunology Today* 15(3) : 103-107, 1994.
 - 14) 檜垣 恵 : アンチセンスオリゴヌクレオチドによるサイトカインの産生抑制. *臨床免疫* 26(2) : 182-189, 1994.
 - 15) Vincenti, M. P., Clark, I. M., Brinkerhoff, C. E. : Using inhibitors of metalloproteinases to treat arthritis. *Arthritis Rheum.* 37(8) : 1115-1126, 1994.
 - 16) Baeuerle, P. A., Henkel, T : Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 12 : 141-179, 1994.
 - 17) Kopp, E., Ghosh, S. : Inhibition of NF- κ B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 265 : 956-959, 1994.