細胞周期制御分子を介する滑膜増殖の制御

上 阪 等*

review article

JAPANESE JOURNAL OF INFLAMMATION

Cell cycle control of rheumatoid synovial cells

Pathology of rheumatoid arthritis is characterized by lymphocyte and macrophage infiltration and subsequent proliferation of synovial fibroblasts. The proliferative synovial tissue is called pannus, which destroys cartilage and bones of the affected joints. Most of the previous studies to develop new therapeutic approaches addressed how the synovial lymphocytes and macrophages are activated. We attempted to reveal abnormality of cell cycle control of the synovial cells and found that cyclin-dependent kinase inhibitors p16^{INK4a} and p21^{Cip1} are readily inducible in the rheumatoid synovial fibroblasts. These inhibitors negatively regulate cell cycle of the mature cells, and actually suppressed proliferation of the synovial fibroblasts when their genes were adenovirally transferred. *In vivo* gene delivery of these genes into the joints of animals affected with experimental RA models suppressed pathology of the arthritis. The results showed that induction of CDKI in the synovial tissues could be a new therapeutic approach to treatment of rheumatoid arthritis.

Rec. 10/5/2000, pp 649~655

Hitoshi Kohsaka*

key words : *rheumatoid arthritis, cyclin dependent kinase inhibitors, gene therapy, cell cycle*

慢性関節リウマチ(RA)は、なんらかの外的因子と遺伝因子が重なって発症する自己免疫性の関節炎と考えられている。しかし、他の自己免疫疾患が標的臓器の破壊を特徴とするのに対して、RAでは、炎症の主体である滑膜が著しく増生し、その結果、周囲の骨や関節が破壊される。

増生滑膜における主な病態は、炎症性細胞の浸潤と滑膜線維芽細胞の増殖である。炎症性細胞の浸潤は未知の自己抗原に反応するTリンパ球が引き起こすものと考えられているが、いったん炎症が起きた後は、マクロファージ系の細胞の活性

化が主になり、腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor: TNF)- α やインターロイキン(interleukin: IL)-1, 6など炎症性サイトカインが大量に滑膜内に分泌される。滑膜線維芽細胞は、この炎症性サイトカインに反応して増殖しパヌス組織を形成する。パヌス組織は蛋白分解酵素を分泌し、またこれらの炎症性サイトカインなどが破骨細胞を活性化させることにより、骨・軟骨を破壊して罹患関節に不可逆的障害をもたらす。このように、RAの病理は、炎症、滑膜増生、関節破壊の三つの段階に分けて考えることができる。

いうまでもなく、RA治療の最終目標は関節破壊の阻止である。しかし、従来の治療は主に炎症の是正を目的としてきた。新たに試されようとしている抗T細胞療法(シクロスポリン, FK 506など)や抗サイトカイン療法なども同様である。ところが、炎症には多数の因子が関与し、一つの経路

* Department of Bioregulatory Medicine and Rheumatology, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University 東京医科歯科大学大学院生体応答調節学(第一内科)

Offprint requests to : Hitoshi Kohsaka, Department of Bioregulatory Medicine and Rheumatology, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku Tokyo, 113-8519 Japan

図1 細胞周期とサイクリン・CDK 複合体
G1, S, G2, M 期を繰り返す細胞周期において、サイクリン・CDK 複合体は特定の時期に活性化される。

の抑制が他の経路の活性化を促すためか、治療薬剤の効果が長続きしないことがある。そのため、従来の治療法では最終的に関節破壊を阻止できないことが危惧される。そこで、筆者らは、滑膜線維芽細胞の増殖機構を調べ、炎症の抑制によらず、滑膜線維芽細胞の細胞周期を直接抑制してその増殖を抑えることで、効果的に関節破壊を阻止できないかと考えた。

細胞周期

細胞周期は真核生物の細胞が増殖・分裂するときを経る過程である。分裂前の細胞が染色体DNAを複製する時期は、S(DNA synthesis)期とよばれ、2倍になった染色体を分裂後の細胞に配分するのはM(mitosis)期とよばれる。細胞はこの二つを繰り返して増殖するが、真核生物では、S期、M期の前にそれぞれの準備状態が存在し、G1期、G2期とよばれる。細胞は、このG1→S→G2→M→G1というサイクルを厳密に繰り返して決して逆もどりしない。なかでも、G1→Sの移行が起きると細胞は必ず、G2, M期に進行し再びG1期に帰ってくるので、この移行は細胞周期にとって大事なポイントであり、特にR(restriction)点ともよばれる。なお、G1期の細胞は、S期に進む他に静止期(G0期)に入る道があり、また分化、老化、細胞死への決断もこの細胞期になされる。

G1/Sの制御に重要な役割を演じるのが、癌抑制遺伝子として有名なp53である。p53は分子量53 kDaの転写因子で、放射線照射や化学物質など

によりDNA鎖が損傷を受けると発現誘導され、かつリン酸化を受けて活性化される。活性化されたp53は、サイクリン依存性キナーゼ阻害分子(cyclin-dependent kinase inhibitors: CDKI)のひとつp21^{Cip1}の発現を誘導する。p21^{Cip1}は、サイクリンとサイクリン依存性キナーゼ(CDK)の複合体に結合してその活性を抑制する。サイクリン・CDK複合体は細胞周期の特定の時期に活性化され、細胞周期を押し進めることが知られている(図1)。p21^{Cip1}の標的となるものは、すべてのサイクリン/CDK複合体であるが、特にサイクリンD1/CDK4を阻害すると網膜芽細胞腫Rb蛋白のリン酸化を抑制しS期の遺伝子転写に重要なE2Fが機能するのを抑制する。このp21^{Cip1}は、DNAポリメラーゼの複製活性を促進するPCNA(proliferating cell nuclear antigen)も抑制する。さらに、やはりPCNAに結合して機能を抑制するGadd45の転写も促し、これらが相乗的にG1期停止の誘導に役立っているものと考えられる。このほか、p53は細胞をアポトーシスに導くBax遺伝子も誘導する。なお、p21^{Cip1}は、特殊な状況下ではサイクリン/CDK複合体の形成を助けてキナーゼ活性を上昇させる場合があり、また、特定の細胞ではアポトーシスによる細胞死を引き起こすことも知られている¹⁻³⁾。

G1期での細胞周期制御に重要なもう一つの分子がCDK1p16^{INK4a}である。この分子はサイクリンD1/CDK4,6と結合して、p21^{Cip1}と同じようにG1期への進行を阻止する。この遺伝子の異常は、数多くのヒト悪性腫瘍細胞で見いだされてい

図2 滑膜組織と増殖抑制したRA滑膜線維芽細胞およびその他のヒト線維芽細胞におけるCDKIの発現

A: 3検体のRA滑膜と正常滑膜におけるCDKIおよびCDK4の発現を検討した。p27^{Kip1}はすべての滑膜で発現していたが、p15^{INK4b}、p16^{INK4a}、p21^{Cip1}は発現を認めなかった。B: 滑膜線維芽細胞、正常皮膚線維芽細胞とヒト胎児肺線維芽細胞であるWI-38におけるCDKIの発現を示した。対数増殖期(log)、放射線照射(IR)、高密度培養(HD)、低濃度血清培地による培養(LS)、老化静止(SN)細胞から取り出した蛋白をウェスタンブロット法で解析した。すべての線維芽細胞で増殖抑制によりp21^{Cip1}の発現が誘導され、p27^{Kip1}の発現が増加した。p16^{INK4a}の発現はRA滑膜線維芽細胞だけに認められた。p15^{INK4b}の発現はどの細胞でも認められなかった。

ることから、p53と並んで細胞周期のコントロールにきわめて重要なものと考えられる^{4,5)}。しかも、この遺伝子は、これ以上分裂しない終末分化した細胞や老化した細胞で発現することが知られ、“老化遺伝子”ともよばれている。

一方、G2/M期の制御は、cdc2キナーゼ活性を通じて行われる。この酵素はサイクリンBと結合して活性化されるが、このサイクリンBの発現はG2/Mに最大となる。しかし、ふだんcdc2キナーゼは、Mik1やWee1とよばれるキナーゼによるリン酸化により不活化されている。そのため、S期への進行にはcdc25ホスファターゼによる脱リン酸化も必要である。さらに、活性化にはWee1キナーゼなどがリン酸化する部位とは別の部位がCAK(cdc2 activating kinase)によりリン酸化されることが必要である。したがって、これらのホスファターゼやキナーゼの活性化もM期進行に必要である。

この他にも、さまざまな分子が細胞周期制御に関与することが知られている。p15^{INK4b}やp27^{Kip1}とよばれるCDKIもあり、それぞれ、p16^{INK4a}やp21^{Cip1}と同様のCDKを抑制する。一般に細胞は、分裂を秩序立てて行いながらも、DNA損傷など

の危機に際してはこれを次世代の細胞に引き継がないように分裂前に修復しなくてはならず、細胞周期を制御する分子が幾重にも作用しあっている原因と考えられる。

筆者らは、増殖するRA滑膜細胞の細胞周期制御の異常を検討し、RAの新たな治療を模索してきている^{6,7)}。

RA滑膜における細胞周期制御蛋白発現異常

(1) 正常およびRA滑膜におけるCDKIの発現

RA滑膜細胞の効果的な増殖抑制方法をさぐることを目的とし、活動性の高いRA患者の滑膜組織と関節に外傷を受けた患者の膝関節由来の正常滑膜組織におけるCDKI p15^{INK4b}、p16^{INK4a}、p21^{Cip1}、p27^{Kip1}蛋白の発現を検討した。これらのCDKIは、成熟した細胞において細胞周期を制御しているものである。その結果、すべての組織で、p27^{Kip1}が発現し、p15^{INK4b}、p16^{INK4a}、p21^{Cip1}は発現していなかった。この発現パターンは変形性骨関節症(OA)におかれた滑膜組織でも同じだった(図2A)。RA滑膜で、特定のCDKIの発現が減弱していれば、これが増殖の一因と考えることができるが、RAの病態にかかる単純な図式はあて

図 3

A: LacZ 遺伝子をもつ組換えアデノウイルス感染によるラット罹患滑膜におけるペーターガラクトシダーゼの発現. アジュバント関節炎を発症させたラット膝関節に AxCALacZ を注射した. 滑膜を取り出し, その切片をペーターガラクトシダーゼ基質である X-gal で染色した. B: アジュバント関節炎を発症させたラットの膝関節をアデノウイルスベクターで遺伝子治療した. 右膝には p16^{INK4a} を, 左膝には LacZ を導入した. C, D: 治療したラットの膝関節, 滑膜の増殖がわかるように周囲組織を除去した標本の前面 (C) とその断面 (D) を示した.

はまらないことが明らかとなった.

(2) 増殖抑制刺激下における滑膜線維芽細胞の CDKI 発現

CDKI は細胞周期の進行を抑制している分子であり, 細胞増殖が止まるべき状況で発現誘導される. この誘導に異常があっても無秩序な増殖は起きるはずである. そこで筆者らは, 滑膜から線維芽細胞を単離, 培養し, いくつかの方法で増殖を抑制して, CDKI の発現の変化を検討してみた.

まず, RA 滑膜由来の滑膜線維芽細胞を, 放射線照射, 高密度培養, 低濃度血清培地による培養, 老化静止するまでの継代の繰り返によりその細胞増殖を抑制し, 各細胞から得られた蛋白における p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p21^{Cip1}, p27^{Kip1} の発現を

解析した. その結果, 対数増殖期にあり増殖抑制を受けていない細胞は, 滑膜組織と同じ CDKI を発現していたが, 細胞が老化すると p27^{Kip1} の発現は増加し, p16^{INK4a}, p21^{Cip1} の発現が誘導されることがわかった. しかし, 放射線照射, 高密度培養, 低濃度血清培地による培養で増殖を抑制した滑膜線維芽細胞でも, 同様に p16^{INK4a} と p21^{Cip1} の発現誘導が認められた. なお, p15^{INK4b} の発現はどの条件でも認めなかった.

正常滑膜ないし皮膚由来のヒト皮膚線維芽細胞とヒト胎児肺線維芽細胞である WI-38 を放射線照射, 高密度培養, 低濃度血清培地による培養で処理したところ, p21^{Cip1}, p27^{Kip1} 発現は誘導されたものの p16^{INK4a} は誘導されなかった. このよう

図4 アジュバント関節炎に対する $p16^{INK4a}$ 遺伝子治療の病理組織学的治療効果. 膝蓋骨周囲の滑膜
A: 正常ラット (p: 膝蓋骨, s: 滑膜, t: 膝蓋骨腱, f: 大腿骨顆). B: 生理食塩水を注射したアジュバント
関節炎発症ラット (A, B ヘマトキシリン, エオジン染色). C, E: AxCALacZ を注射したアジュバント関節
炎発症ラット (C: ヘマトキシリン, エオジン染色, E: アルシアンブルー染色). D, F: AxCAp16 を注射し
たアジュバント関節炎発症ラット (D: ヘマトキシリン, エオジン染色, F: アルシアンブルー染色).

に RA 滑膜線維芽細胞で認められる増殖抑制による $p16^{INK4a}$ の発現誘導は、他の細胞には認められなかった。RA 滑膜線維芽細胞では、CDKI 誘導の低下が認められず、むしろ CDKI のひとつが誘導されやすいことが明らかとなった(図2B)。

(3) 増殖抑制した滑膜線維芽細胞の再刺激

次に、誘導された $p16^{INK4a}$ の機能を検討すると

めに滑膜線維芽細胞を低血清培地や放射線照射で増殖抑制した後、再び高濃度血清培地で培養した。その結果、トリチウムサイミジンの取り込みを認めず、 $p16^{INK4a}$ を発現した細胞は再刺激に反応しないことがわかった。

$p16^{INK4a}$ を発現しなかった正常皮膚線維芽細胞と WI-38 肺線維芽細胞を同じ方法で処理したと

図 5 CIA の進行における p16^{INK4a} または p21^{Clp1} 遺伝子治療の効果
 AxCAp 16 (黒丸), AxCAp 21 (白三角), AxCALacZ (白菱形) または生理食塩水 (黒四角) を二度注入 (矢印, 21 日目と 31 日目) (A, B と C) あるいは関節炎の発症後に一度注入 (矢印, 31 日目) (D, E と F) することにより, CIA マウスを治療した. 足関節の横径 (A と D), 後足の横径 (B と E) および関節炎スコア (C と F) は, グラフ上に記した日に測定した. グラフ中の値は, 一群 7 匹における平均値と標準誤差を示している. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (AxCAp 16 治療群 vs. 生理食塩水治療群); # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ (AxCAp 21 治療群 vs. 生理食塩水治療群)

ころ, 再刺激によりトリチウムサイミジンの取り込みが増加した. これらから, 滑膜線維芽細胞に誘導された p16^{INK4a} は p21^{Clp1} と異なり恒久的に細胞増殖を抑制することがわかる.

CDKI 発現誘導を目指す滑膜炎の遺伝子治療

(1) p16^{INK4a} 発現誘導による治療

p16^{INK4a} の発現誘導が滑膜線維芽細胞に特徴的であることから, 薬物などを用いて人為的に滑膜線維芽細胞に p16^{INK4a} 遺伝子の発現を誘導する可能性がある. そこで, p16^{INK4a} による細胞増殖抑

制が真に関節炎治療に有効かどうかを検討するために, ヒト p16^{INK4a} 遺伝子をもつ組換えアデノウイルス (AxCAp 16) をアジュバント関節炎を発症させたラットの関節内に注入して p16^{INK4a} 遺伝子治療を試みた.

治療は, ラットをアジュバントで免疫して, AxCAp 16 ベクターを右関節に, 同量の β ガラクトシダーゼ組換えアデノウイルス (AxCALacZ) を同じ個体の左関節内に注射することで行った. 遺伝子発現は, 表層の滑膜細胞と一部の間質滑膜細胞に認められ, 注射後 14 日続いた (図 3 A). そこ

で、遺伝子導入は1週ごとに3回繰り返した。別途、2匹のラットの関節に生理食塩水を繰り返し注射し、すべてラットの関節を4週間後に評価した。

その結果、AxCAp 16 治療側では、明らかに腫脹が抑えられていた(図3B~D)。組織学的検討でも、p16^{INK4a}遺伝子を導入した関節では滑膜の肥厚が明らかに抑えられていた(図4A~D)。軟骨の非薄化や硝子化と単核球の浸潤、パンヌスの形成も抑えられていた。軟骨のプロテオグリカンを実質性アルシアンブルー染色した結果でも、AxCALacZで治療した側とは対照的に、p16^{INK4a}治療側ではプロテオグリカンがよく保存されていた(図4E, F)。

(2) p21^{INK4a}発現誘導による治療

次に、RA 滑膜細胞に誘導できるもう一つのCDKIであるp21^{INK4a}による細胞増殖抑制も行ってみた。前述のごとく、p21^{INK4a}は、一般に多種のサイクリン/CDK 複合体キナーゼ活性を抑制し、PCNAも抑制するが、時に、キナーゼ活性を増強したり、アポトーシスを招いたりする。そこで、滑膜でp21^{INK4a}を誘導することが関節炎に及ぼす効果は、p16^{INK4a}の効果と異なる可能性がある。一方で、p21^{INK4a}は、p16^{INK4a}と異なり、すでにさまざまな薬剤で発現誘導できることが知られている。そのため、p16^{INK4a}と同様の効果が得られるとすれば、RA 滑膜にp21^{INK4a}発現を誘導させる薬剤の開発はより容易かもしれない。

そこで、AxCAp 16 ベクターないし p21^{INK4a}を組み込んだ AxCAp 21 ベクターで、ヒト RA 滑膜細胞に p16^{INK4a}ないし p21^{INK4a}遺伝子を導入したところ、両者とも滑膜細胞の増殖を阻止した。この際には、ともにアポトーシス誘導を認めず、増殖抑制の機序は両者で類似していた。さらに、マウスをII型コラーゲンで免疫して得られるコラーゲン誘導関節炎の治療を AxCAp 16 ベクターないし AxCAp 21 ベクターでした。その結果、CDKI 遺伝子治療群は、生理的食塩水や AxCALacZ で

治療した群と比して、関節炎が著明に抑制されていた(図5)。

アジュバント関節炎、コラーゲン誘導関節炎という二つの RA 動物実験モデルで、CDKI 遺伝子療法が有効であったわけである。

活動性の RA 滑膜から得られた線維芽細胞は、*in vitro* の増殖抑制によって p16^{INK4a}や p21^{INK4a}を発現しやすい。このうち、p16^{INK4a}発現は RA 滑膜線維芽細胞に特徴的であった。さらに、アデノウイルスベクターにより *in vivo* に導入された p16^{INK4a}遺伝子や p21^{INK4a}遺伝子は、RA 動物モデルの関節炎を効果的に改善させた。

RA 滑膜で誘導されやすい CDKI 遺伝子発現を人為的に誘導することが RA モデルの治療に役立つという知見は、今後の治療法の開発に大いに役立つものと思われる。

文 献

- 1) LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF et al.: New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* 11: 847-862, 1997.
- 2) Li R, Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B: Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature* 371: 534-537, 1994.
- 3) Sheikh MS, Rochefort H, Garcia M: Overexpression of p21 WAF1/CIP1 induces growth arrest, giant cell formation and apoptosis in human breast carcinoma cell lines. *Oncogene* 11: 1899-1905, 1995.
- 4) Nobori T, Miura K, Wu DJ et al.: Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 368: 753-756, 1994.
- 5) Kamb A, Gruis NA, Weaver, Feldhaus J et al.: A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264: 436-440, 1994.
- 6) Taniguchi K, Kohsaka H, Inoue N et al.: Induction of p16^{INK4a} senescence gene as a new therapeutic strategy for the treatment of rheumatoid arthritis. *Nature Medicine* 5: 760-767, 1999.
- 7) Nasu K, Kohsaka K, Nonomura K et al.: Adenoviral transfer of cyclin-dependent kinase inhibitor genes suppresses collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol(in press)*.