炎症性関節炎滑膜病変における peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)の発現とその意義

遠藤平仁・ラナ美代子・栗原タ子^{*1)}、西村明人^{*2)}、近藤啓文^{*1)}

Expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) in synovial tissues of inflammatory arthritis

Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) is transcription factors belong to the nuclear receptor gene family and binds to specific response elements termed PPARE, thus regulating the expression of target genes. PPAR γ triggers adipocyte differentiation in adipose tissue and inhibits the cytokine production in macrophage. We analyzed the expression of PPAR γ in human synovial tissues of patient with rheumatoid arthritis (RA) or osteoarthritis (OA). PPAR γ mRNA strongly expressed in synovial tissues with active RA synovitis more than that of OA. Immunohistological analysis demonstrated PPAR γ localized in nuclear area of synovial lining macrophages and vascular endothelial cells in RA synovial tissues. PPAR γ expression correlated with the rate of macrophage infiltration and hypervascularization in synovial tissues. We measured the expression of PPAR γ mRNA in rat arthritic synovial tissues. RT-PCR analysis demonstrated the strong expression of PPAR γ in rat arthritic joints.

PPAR γ ligand, antidiabetic thiazolidinediones (troglitazone) inhibited the synovitis of adjuvant arthritis. These data suggest PPAR γ ligands may have therapeutic application in inflammatory arthritis, such as RA.

Rec. 8/4/2000, Acc. 9/22/2000, 71~77

Hirahito Endo・Miyoko Rana・Yuko Kurihara^{*1)},
Akito Nishimura^{*2)}, Hirobumi Kondo^{*1)}

key words : peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ),
rheumatoid arthritis, adjuvant arthritis

PPAR(peroxisome proliferator-activated receptor)は、1990年に同定された核内レセプターである¹⁾。ステロイドホルモンレセプタースーパーファミリーに属する核内転写因子であり生体内に広範囲に分布する。種々の刺激により誘導されてその活性化により細胞の機能に劇的な作用を誘導する^{2,3)}。各PPARに対するリガンドと結

合したPPARは9-シスレチノイン酸をリガンドとするRXR(retinoid X receptor)とヘテロ二量体を形成し、プロモーター領域のPPRE(peroxisome proliferator response element)に結合し、その下流域に存在する遺伝子発現を制御する。PPARには α 、 β 、 γ という3種類のアイソフォームが知られている³⁾。PPAR α は脂肪酸の合成、輸送、分泌、細胞内のATP産生、細胞周期の調節に関与する。PPAR β の働きは不明である。PPAR γ の機能は脂肪組織、細胞の分化、増殖が主であるが炎症抑制機能にも関係している⁴⁾。動脈硬化病変にもPPARが強く発現しており血管内皮細胞

^{*1)} Department of Internal Medicine, ^{*2)} Department of Orthopedics Kitasato University School of Medicine ^{*1)} 北里大学医学部内科学教室, ^{*2)} 同 整形外科教室

Offprint requests to : Hirahito Endo, Department of Internal Medicine, Kitasato University School of Medicine, 1-15-1 Kitasato, Sagami-hara 228-8555, Japan

が動脈平滑筋細胞マクロファージに発現し、動脈硬化プラークに関与している。Prostaglandin D₂ (PGD₂)の代謝物の15-deoxy $\Delta^{12,14}$ PGJ₂ (15 dPGJ₂)や糖尿病治療薬のチアゾリジン誘導体⁴⁾や非ステロイド系抗炎症剤(NSAID)もPPAR γ のリガンド⁵⁾になることが報告されている。

慢性関節リウマチ(RA)をはじめとする炎症性関節炎の炎症性滑膜炎病変でのPPAR γ 発現と、その役割についてRA患者滑膜組織およびRAの動物モデルのラットアジュバント関節炎を用いて検討した。

方 法

① ACR診断基準を満足する慢性関節リウマチ(RA)18例、変形性関節症(OA)6例の滑膜組織を用いた。

滑膜組織を手術時採取(膝関節人工関節置換術21例、関節鏡下滑膜切除3例)した。なお、インフォームド・コンセントに基づき手術標本の使用につき患者本人より承諾を得ている。

滑膜組織は採取後ただちに4%パラホルムアルデヒドにて、1晩固定水洗いし、10%サッカロース溶液に置換後、OCT-Compound(Sakura Finetechnical社)内で液体窒素にて固定し、-80°C冷蔵庫内で保存した。連続した滑膜組織にIsogen reagent(日本ジーン)添加しポリトロンでホモゲナイズしたのちにクロロホルムを添加し、guanidium thiocyanate/phenol/chloroform法でtotal RNAを分離した⁶⁾。

② オスLewisラット、体重200~250gを用いた。Mycobacterium butyricum(Difcolabo社)を5mg/mlの濃度でmineral oil(Sigma)に混合し、ラット尾根部皮下に100 μ l投与した。18日後関節炎は100%発症した。関節炎点数は既報の方法に基づき0~4で評価し、後肢足関節で最大8点として評価した⁷⁾。免疫18日後にエーテル麻酔下にて屠殺し足関節皮膚および関節周囲を除去後実体顕微鏡下で滑膜組織分離した。ラットを24匹実験に用いた。任意に4群に分けmineral oilのみ投与(陰性コントロール)、mineral oil+M. butyricum投与(陽性コントロール)を各5匹使用した。

Troglitazone 30 mg/kg 体重、3 mg/kg 体重1日2回各6匹ずつ投与した。Troglitazoneはカルボキシメチルセルロースに混合し、ラット用胃ポンプを用いアジュバント投与9日目より10日間1日2回投与した。Troglitazoneは三共製薬より供与を受けた。18日後まで連日関節腫脹などの関節所見を観察し関節炎指数(arthritis index)を計測した。組織学的変化は屠殺後下肢滑膜組織を4%パラホルムアルデヒド固定後、OCT-compound包埋後薄切し連続切片を作成し、免疫染色およびヘマトキシリンエオジン染色を行い観察した。

③ RT-PCR(reverse-transcription polymerase chain reaction)

ヒトおよびラット滑膜組織total RNAよりcDNAを作製した⁸⁾。Total RNA 1 μ gとRV2 reverse transcriptase(タカラ酒造)25 U, random primer, RNase inhibitor, dNTP mixture 2.5 μ Mを混合し、42°C 1時間反応させ、cDNAを作製した。

PCRはhuman PPAR γ のsense primer 5'-ATTCCCTAATGATGGGAGAAGAT-3'(933-954), anti-sense primer 5'-TGCAGCAGGTTGTCTTGTCTTGGATGTC-3'(1343-1324)⁹⁾, rat PPAR γ sense primer 5'-ATTTTCAAGG-GTGCCAGTTTTCG-3'(976-996 bp), anti-sense primer 5'-TGCAAGCAGGTTGTCTTGGATGTC-3'(1374-1355 bp)¹⁰⁾の各プライマーを用いて、Tag DNA polymeraseを用い、Thermal cycler(タカラ酒造)にて94°C 1 min 58°C 1 min, 72°C 3 min, 35サイクルPCRを行った。また肉因性コントロールとして β -actin(sense 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA-3' antisense 5'-CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC-3')を用い94°C 1 min, 55°C 1 min, 65°C 3 minで30サイクルPCRを行った。PCR産物は2%アガロースゲル電気泳動後ethidium bromide染色にて観察した。またUV-light box imaging system(Atto社)を用いて蛍光発色のintensityを測定し、PPAR γ mRNA/ β -actin mRNA比を求めた。

④ 免疫染色

免疫染色は Vector stain kit (Vector Labo 社) を用いて行った¹¹⁾. 抗 PPAR γ 抗体は Santa cruz 社より購入した. ラット, ヒト滑膜組織はクリオスタット 5 μ m 凍結切片を作製し, ペプシン 40 mg/ml 溶液で 37°C 10 分処理後免疫染色を行った³⁾. 連続切片組織を抗 CD 14 抗体, 抗 CD 68 抗体, 抗 CD 4 抗体, 抗 CD 8 抗体, 抗第 VIII 因子様抗体 (おののの Dako 社製) を用い染色を行った. 関節滑膜組織変化は病理学的活動性指数 (pathological activity index) として計測した. Activity index は滑膜重層化, 単球浸潤, 血管新生, リンパ球浸潤および線維芽細胞の増生を連続切片上の免疫染色標本と比較しおののの grade 0=few, 1=medium, 2=severe, 3=very severe の段階に評価しその合計 15 を最大とする指数で評価した. おののの 3 サンプルずつ測定し平均 $\pm$ 標準偏差を求めた. 組織変化は 2 名の測定者が顕微鏡下 400 倍の倍率で 1 視野あたり 3 回計測, 20 視野測定した.

⑤ 統計解析

データは平均 $\pm$ 標準偏差で表し有意差判定は T 検定を用い $p < 0.05$ を有意として判定した. 相関関係は回帰分析を用い回帰係数を求め $p < 0.05$ を有意として判定した.

結 果

■滑膜組織における PPAR γ の発現

RT-PCR により RA 18 例および OA 4 例の滑膜組織の PPAR γ mRNA 発現を示す. OA 滑膜に PPAR γ の発現は乏しく RA 18 例中 15 例に PPAR γ mRNA の発現を強く認めた. RA 滑膜で PPAR γ mRNA の発現は OA 滑膜の発現より多く認められた. 発現の乏しい図 1 B の RA 5 の滑膜組織は線維化のみの組織であった (図 1 A, B). また免疫組織学的に PPAR γ の発現とその分布を観察した. 表層滑膜細胞や線維芽細胞, マクロファージの核に PPAR γ が強く発現していた. 滑膜組織内の浸潤リンパ球に PPAR γ は陰性であった (図 2 A). また血管内皮細胞核内にも強い陽性所見を認めた (図 2 B). この PPAR γ の発現の多い組織は CD 68 陽性マクロファージの分布

図 1 慢性関節リウマチ (RA) 滑膜および変形関節症 (OA) 滑膜組織における PPAR γ mRNA の発現

- A. RA 18 例, OA 6 例滑膜組織の mRNA 発現量を RT-PCR で測定し β -actin mRNA の発現量をコントロールとして計測した. アガロース電気泳動後 ethidium bromide 染色を行い蛍光の intensity を測定し PPAR γ mRNA/ β actin mRNA ($\times 100$) 比を測定した. RA : $38 \pm 12.4\%$, OA : $9.8 \pm 6.8\%$ と有意に RA 滑膜で PPAR γ mRNA の発現が多かった. (* $p < 0.01$)
- B. RA 4 例および OA 2 例の滑膜組織より RNA を分離し, RT-PCR 法により PPAR γ mRNA の発現を測定した. コントロールとして β actin mRNA 同一サンプルを用いて測定した. RA 3 例で PPAR mRNA の強い発現を認め, OA 2 症例の滑膜 PPAR γ mRNA 発現は僅少であった.

の多い RA 組織および血管の分布の多い組織であった. 組織内 PPAR γ の分布量を定量し CD 68 陽性マクロファージの分布量と比較するとほぼ正の相関を示した (図 3 A, B). また第 VIII 因子様抗原陽性血管内皮細胞の分布を比較すると同様に正の

図 2 慢性関節リウマチ滑膜炎における PPAR γ の発現(免疫組織学的解析)

- A. RA 滑膜炎における PPAR γ の発現. PPAR γ は滑膜表層細胞核内に強く発現していた. また線維芽細胞やマクロファージ様細胞にも強く発現していた. 一方リンパ球に発現は認められなかった. (倍率 $\times$ 400)
- B. RA 滑膜の血管新生が著明な組織を示す. 血管内皮細胞の核の中に PPAR γ の強い発現を認めた. (倍率 $\times$ 400)

相関関係が確認された.

以上より滑膜細胞のなかでマクロファージや血管内皮細胞に PPAR γ が強く発現しており, 滑膜炎の強さと関連し増加していると考えられた.

ラットアジュバント関節炎組織における PPAR γ の発現を RT-PCR によりアジュバント関節炎滑膜組織の PPAR γ の発現を測定した. 関節炎の発現に並行して PPAR γ mRNA は発現していた(図 4 A). コントロールラット滑膜に PPAR γ mRNA の発現は少なかった. 免疫組織学的に抗 PPAR γ 抗体で染色すると, ヒト RA 滑膜と同様に浸潤マクロファージや内皮細胞の核が陽性であった.

PPAR γ リガンド troglitazone をラットアジュバント関節炎モデルに投与しその変化を計測した. Arthritis index は troglitazone 30 mg/kg 体重投与群と 3 mg/kg 体重投与群, 陽性 control 群間を比較した. コントロールと 30 mg/kg 体重の両群において投与後 16 日から 18 日目では関節炎の有意な抑制作用が認められた(図 4 B). またア

ジュバント投与 18 日の足関節滑膜の組織学的変化はラット陽性 control と troglitazone 30 mg/kg 体重投与群の間では滑膜の炎症所見が有意に改善を示した(pathological activity index, 陽性コントロール 12.8 ± 2.2 : 30 mg/kg 体重群 8.2 ± 3.4 $p < 0.01$). 3 mg/kg 体重群とコントロール群の間に差はなかった.

考 察

PPAR γ は RA 滑膜増殖肥厚している表層部特にマクロファージが浸潤し, 増殖が著明な組織内の細胞核内発現量が顕著であった. また血管内皮細胞でも PPAR γ は発現しており, 小血管の増生の著しい組織では同様に PPAR γ の発現を強く認めた. しかし線維芽細胞の増殖している線維化の強い滑膜での発現が少なかった. PPAR γ は初代培養の血管内皮細胞平滑筋細胞, マクロファージに発現していることが証明されている¹²⁾. 特に PPAR γ は分化マクロファージに発現を示した¹³⁾. PPAR γ リガンドは, 分化過程にある骨髄由

図3 RA滑膜組織のCD68陽性細胞とPPAR γ の発現との関係

- A. 活動性滑膜組織でのCD68陽性細胞の分布を示す。(×200)
- B. RA 18例の滑膜組織のPPAR γ 陽性細胞分布量とCD68陽性細胞の分布量は正の相関を示した。 $R=0.87$, $p<0.01$ (HPF: high power field×400)

図4 ラットアジュバント関節炎におけるPPAR γ のPPAR γ アゴニスト(troglitazone)の効果

- A. RT-PCRにおけるラット滑膜炎病変におけるPPAR γ の発現。関節炎(-): mineral oilのみ投与18日後。関節炎(+): M. Butyricum, mineral oilの投与18日後
- B. ラットにアジュバント投与後7日後よりPPAR γ アゴニスト(troglitazone)を1日2回30 mg/kg, 3 mg/kg, 溶媒(CMC)のみの投与の3群に分け胃ゾンデを用いて投与をした。関節炎指数は関節の腫脹, 発赤, 可動制限の3項目について計最大8点として関節炎指数として評価した。各群6匹ずつ投与し後肢足関節のみ計12関節の評価を行った。平均±標準偏差を計算した。30 mg/kg投与群は16日目以降3 mg/kg投与群, 溶媒投与群と比較して有意に関節炎を抑制した。(* $p<0.05$)

来単球継代細胞株やヒト末梢血より分離した単球において CD 14 発現を誘導する¹²⁾。この効果は PPAR α リガンドでは認められない。マクロファージ系滑膜表層細胞 A タイプは骨髄から遊走し CD 14, CD 68 を発現し滑膜内で増殖を示している。滑膜内へのマクロファージ系細胞の浸潤増加に並行して PPAR γ の発現は増強していると考えられた。また血管内皮細胞に PPAR γ は発現しており、小血管の増生の著しい組織では同様に PPAR γ の発現が強い。

以上より RA 滑膜では関節炎の活動性に並行して滑膜 PPAR γ の発現は増加すると考えられた。

ラットアジュバント関節炎の滑膜病変でも、炎症性関節炎の発症後に滑膜組織の PPAR γ の発現は増加していた。Troglitazone を関節炎発症後のラット関節炎モデルに投与すると関節炎は抑制された。この抑制効果について二つの機序が想定された。一つは炎症細胞や血管のアポトーシス誘導であり、他方は炎症性サイトカイン産生抑制である。PPAR γ 刺激は活性化分化マクロファージのアポトーシスを誘導することが報告されている¹³⁾。また血管新生に対する作用も考えられる。PPAR γ のリガンド 15-dPGJ₂ はヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞のアポトーシスを促進することも示されている。この作用は PPRE デコイレセプターによりアポトーシスが抑制されることより、アポトーシス誘導作用は PPAR γ と PPRE との結合を介していることが示された¹⁴⁾。また、PPAR γ 活性化薬は内皮細胞の血管形成誘導も阻害した。作用機序として血管内皮細胞増殖因子レセプター Flt-1, Flk/KDR mRNA により血管形成を抑制していると考えられた¹⁵⁾。

PPAR の炎症病態形成に関与する遺伝子発現制御機序は NF- κ B (nuclear factor κ B) および AP-1 (activator protein-1)¹⁶⁾、JNK-SAPK (jun kinase-signal transducer and activator of transcription)¹⁸⁾ などの転写因子に作用してこれらの転写因子活性を抑制することによって考えられている。PPAR γ リガンドは濃度依存的にエンドセリン-1 の分泌¹⁸⁾、血管内皮細胞の plasminogen

activator inhibitor-1 の発現誘導¹⁹⁾ また iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) 誘導を抑制し NO 産生を低下させた⁴⁾。以上のように炎症関連因子の転写段階での抑制が関節炎抑制作用機序の一つであると想定された。

今回の投与量では関節炎の抑制効果は部分的であった。関節炎抑制効果において PPAR リガンドの効果は糖尿病治療に用いる投与量において効果は乏しくより大量の投与量が必要と考えられる。しかしこの場合薬剤の毒性が作用の前面に出て効果の判定が困難になると予想される。NSAID も PPAR のリガンドになると報告されているが、COX を抑制する NSAID 濃度より高濃度が必要である⁵⁾。しかしより大量の投与は他の副作用を惹起する可能性がある。15 d PGJ₂ など他の PPAR γ リガンドの効果も試みる必要があると考えられた。

生理的な内因性リガンドの解明、特に炎症局所で作用するリガンドの解明が必要である。このような特異的リガンドを用いることにより RA 滑膜の PPAR γ に対する選択的抗炎症療法が可能ではないかと考えられ、新たな RA の治療法が期待される。

なお本研究は第 20 回日本炎症学会において報告した。

文 献

- 1) Issemann I, Green S : Activation of a number of the steroid hormone receptor superfamily by peroxidase proliferator. *Nature* 347 : 645-650, 1990.
- 2) 藤井 博 : PPAR と炎症作用. *細胞* 31 : 229-234, 1999.
- 3) Braissant O, Fufelle F, Scotto : Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) : Tissue distribution of PPAR- α , - β , - γ in adult rat. *Endocrinol* 137 : 354-365, 1996.
- 4) Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK : The peroxisome proliferator activated receptor- γ is a negative of macrophage activation. *Nature* 391 : 79-82, 1998.
- 5) Lehmann JM, Lenhard JM, Oliverly BB, Ringold GM, Kliewer SA : Peroxisome proliferator-activated receptor α and γ are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 272 : 3406-3410, 1997.
- 6) Siegling A, Lehman M, Platzer C, Emmrich F, Volk

- HD: A novel multispecific comoetitor fragment for quantitative PCR analysis of cytokine gene expression in rat. *J Immunol Method* 177: 23-28, 1994.
- 7) Connor JR, Manning PT, Settle SL, Moore WM, Jerome GM, Webber RK, Tjoeng FS, Currie MG: Suppression of adjuvant-induced arthritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthetase. *Eur J Pharm* 273: 15-24, 1995.
 - 8) Kimmel AR, Berger SR: Preparation of cDNA and the generation of cDNA libraries: overview. *Method Enzymol* 152: 307-316, 1987.
 - 9) Greene ME, Blumerg B, McBride OW, Yi HF, Kronquit K, Kwan K, Hsieh L, Greene G, Nimer SD: Isolation of the human peroxidase proliferator activated receptor γ : expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr* 4: 281-299, 1995.
 - 10) Zhu Y, Alvarez K, Huang Q, Rao SM, Reddy JK: Cloning of a new member of the peroxisome proliferator activated receptor gene family from mouse liver. *J Biol Chem* 268: 26817-26820, 1993.
 - 11) Hus S, Raise L, Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex(ABC)in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody(PAP)procedures. *J Histo Chem* 29: 577-580, 1990.
 - 12) Tontnoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thmazy VA, Evans RM: PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93: 241-252, 1998.
 - 13) Chienetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Steals B: Activation of proliferator-activated receptor α and γ induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* 273: 25573-25580, 1998.
 - 14) Bishop-Bailey D, Hla T: Endothelial cell apoptosis induced by the peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR)ligand 15-deoxy Δ 12, 14-prostaglandin J2. *J Bio Chem* 274: 17042-17048, 1999.
 - 15) Xin X, Yang S, Kowalski J, Gerritsen ME: Peroxisome proliferator-activated receptor γ are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 274: 9116-9121, 1999.
 - 16) Poynter ME, Daynes RA: Peroxisome proliferator-activated receptor α activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor- κ B signaling, and reduced inflammatory cytokine production in aging. *J Biol Chem* 273: 32833-32841, 1998.
 - 17) Satoh H, Tsukamoto K, Hashimoto Y, Togo M, Hara M, Maekawa H, Isoo Y, Kimura S, Watanabe T: Thiazolidinediones Suppress Endothelin-1 secretion from bovine vascular endothelial cells: A new possible role of PPAR γ on vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun* 254: 757-763, 1999.
 - 18) Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Najib J, Duriez P, Staels B: Peroxisome proliferator-activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ Res* 85: 394-402, 1999.
 - 19) Kato K, Satoh H, Endo Y, Yamada D, Midorikawa S, Sato W, Mizuno K, Fujita T, Tsukamoto K, Watanabe T: Thiazolidinediones down-regulate plasminogen activator inhibitor type-1 expression in human vascular endothelial cells: a possible role for PPAR γ in endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun* 258: 431-435, 1999.