

(岡田 覚丈) 論文内容の要旨

主 論 文

Adipogenesis of the mesenchymal stromal cells and bone oedema
in rheumatoid arthritis

(間葉系間質細胞の脂肪化と関節リウマチにおける骨髄浮腫)

岡田覚丈、山崎聡士、古賀智裕、川尻真也、玉井慎美、折口智樹、中村英樹、
江口勝美、川上純

Clinical and Experimental Rheumatology
2012 May-Jun;30(3):332-337

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：川上純教授)

緒 言

骨髄浮腫は関節リウマチ (rheumatoid arthritis: 以下 RA) における組織学的変化の一つであり、MRI により検出できる。骨髄は脂肪組織により大部分を占められているが、骨髄浮腫の病巣では脂肪組織が単球、線維芽細胞、破骨細胞などに置換されていることが近年明らかになった。骨髄浮腫は RA 関節破壊の進展に重要と考えられているが、その病巣がどのように形成され、病態にどう影響するかは不明である。骨髄には間葉系間質細胞 (mesenchymal stromal cells: 以下 MSC) が存在し、この細胞は骨芽細胞、脂肪細胞などへの分化能を有する。MSC は組織形成以外に、免疫抑制に働くといわれているが、逆に RA の病因となる可能性を示唆する報告もある。

RA の関節破壊に主要な役割を持つとされているのは滑膜細胞であるが、この細胞は炎症性サイトカインやプロテアーゼを産生し、関節周囲へ浸潤することで関節破壊をきたす。滑膜組織内には線維芽細胞様滑膜細胞 (Fibroblast-like synovial cells: 以下 FLS) が存在するが、その形態や分化能など、MSC と様々な類似点がある。FLS の脂肪化を誘導するといくつかの炎症性サイトカインやプロテアーゼ産生は低下する。これらの結果から、脂肪化による細胞性状の変化は、局所の炎症に影響することが示唆される。我々は骨髄 MSC の脂肪化が、骨髄局所の炎症すなわち骨髄浮腫に対し抑制的に作用すると考えた。MSC 脂肪化を骨髄浮腫の *in vitro* モデルと捉え、これに対するサイトカインの作用を解析した。

対象と方法

①MSCの脂肪化誘導培養

ヒト骨髄由来 MSC を用い、MSC 脂肪化誘導キット (Lonza, MD) を用いて培養を行った。Tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin-6 (IL-6)、IL-1 β 、transforming growth factor- β (TGF- β) 各々の存在下と非存在下で脂肪化誘導培養を行い、オイルレッド染色で脂肪化の程度を評価した。

②Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法による脂肪化マーカー発現の評価

脂肪化誘導した細胞からトリゾール (Invitrogen, CA) により RNA を抽出し、ReverScript III (Wako Pure Chemical Industry, Japan) を用いて cDNA を回収した。Light Cycler (Roche Diagnostics, Germany) で SYBR Green real-time PCR を行い、脂肪化マーカーである peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ)、脂肪酸結合蛋白 (fatty acid binding protein 4: FABP4)、リポ蛋白リパーゼ (lpl)、I 型コラーゲン $\alpha 1$ (colla1) の mRNA 発現を定量した。

③サイトカイン産生の解析

MSC を脂肪化誘導し、上清を回収した。上清中のサイトカインを Human Inflammation Antibody Array 3 assay (RayBiotech, Inc., GA) でスクリーニングした。IL-6 と IL-8 に関しては、ELISA 法で定量的に評価した。

④スクラッチテスト

MSC 培養プレートをピペットにより搔破し、細胞を一部除去した。その後維持培養を行い、同部位へ遊走する細胞を確認した。脂肪化はオイルレッド染色で確認した。

⑤細胞染色

細胞遊走能に関連する蛋白である平滑筋アクチンと F アクチンの発現を、それぞれ免疫染色 (抗 α 平滑筋アクチン抗体、DAKO)、phalloidin 染色 (Lonza, MD) で評価し、脂肪化の有無で比較した。

結 果

①TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、TGF- β の存在下では、MSC の脂肪化は抑制された。TNF- α 、IL-6、TGF- β の存在下では脂肪化マーカーの mRNA 発現も低下していた。

②MSC 脂肪化により IL-6 産生は著明に低下した。

③MSC のスクラッチテストにおいて、脂肪化した細胞は遊走が見られなかった。

考 察

炎症性サイトカインは MSC 脂肪化を抑制することが示された。また脂肪化により MSC の IL-6 分泌能と遊走能が低下することが示された。MSC は IL-6 を分泌し、また IL-6 は MSC 脂肪化を抑制することより、IL-6 と骨髄浮腫との関連が示唆されるが、in vivo で確認する必要がある。未分化 MSC は脂肪化した細胞より遊走能が高く、IL-6 産生も高度であった。FLS 同様に、MSC もその遊走能と IL-6 分泌により関節破壊に寄与する可能性がある。MSC の脂肪化抑制が骨髄浮腫を誘導する可能性があり、RA の病態と治療を考える上で、間葉系細胞の分化と骨髄浮腫は重要と思われた。