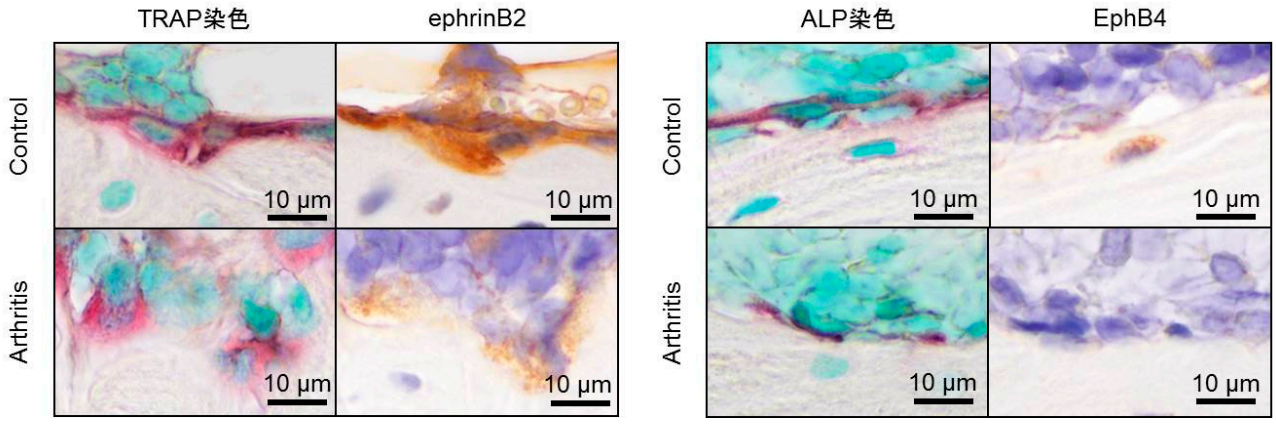
199　関節リウマチにおける破骨細胞／骨芽細胞カップリング	永田　友貴

【目的】関節リウマチは関節滑膜における滑膜炎が主な病態であるが、その炎症が近傍の骨組織へ波及し、破骨細胞活性化による骨吸収の亢進および骨芽細胞分化・骨形成の抑制が惹起され、骨・軟骨破壊や二次性骨粗鬆症が進行する。骨リモデリングでは破骨細胞／骨芽細胞間のカップリング因子を介し、骨吸収と骨形成の均衡が保たれるが、上述の通り関節リウマチにおいてはこのバランスが崩れていることは明らかである。しかし関節炎における炎症性サイトカインが破骨細胞／骨芽細胞カップリング因子に与える影響に関しては、未だ明らかにされていない。本研究では、関節リウマチにおける主たる炎症性サイトカインである TNFα によって、破骨細胞／骨芽細胞 ephrinB2／EphB4 カップリング因子発現変化とそれに伴う骨代謝への影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】自然発症関節炎マウスにラミナリン 30 mg を腹腔内投与した群を関節炎群として、骨組織の検討を行った。脛骨における TRAP 陽性細胞での ephrinB2 発現および ALP 陽性細胞での EphB4 発現を免疫組織化学法にて解析した。マウス長管骨より遊離した骨芽細胞およびマウス単核球より作製した破骨細胞様細胞、その両者の共培養において、TNFα を添加した。それらのサンプルを用いて、破骨細胞様細胞における ephrinB2、NFATc1、CathepsinK、骨芽細胞における EphB4、ALP 発現をウエスタンブロッティング法によって解析した。

【結果】関節炎マウス骨組織において、コントロール群と比較して、破骨細胞の指標となる TRAP 陽性細胞で ephrinB2 発現は低下し、骨芽細胞の指標となる ALP 陽性細胞では EphB4 発現の低下が認められた。*In vitro* において、WT マウス単球由来の破骨細胞様細胞に TNFα 添加すると、NFATc1 発現が軽度上昇したのに対し、ephrinB2 発現は低下した。骨芽細胞の初代培養においても、TNFα 添加すると、ALP 発現とともに EphB4 発現も低下した。破骨細胞／骨芽細胞共培養でも同様の結果であった。以上より関節リウマチでは炎症性サイトカインによる破骨細胞の活性化と骨芽細胞分化抑制が起こることに加え、破骨細胞／骨芽細胞カップリングの低下により骨破壊や傍関節性骨粗鬆症が促進される可能性が示唆された。

関節炎マウスにおける破骨細胞／骨芽細胞カップリング因子 EphrinB2／EphB4 発現



199. 関節リウマチにおける破骨細胞／骨芽細胞カップリング

永田　友貴

大阪市立大学 大学院医学研究科 代謝内分泌病態内科学

Key words：関節リウマチ，破骨細胞／骨芽細胞，カップリング因子，EphrinB2／EphB4

緒　言

関節リウマチは関節滑膜における滑膜炎が主な病態であるが、炎症が近傍の骨組織へ波及することで、骨・軟骨破壊が続発性に進行する。その病態としては、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子（Tumor Necrosis Factor：TNF）等が重要な役割を果たしていると考えられており、それらは破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を促進し、骨吸収が亢進する。さらに、TNF は骨芽細胞の分化や骨形成を阻害することで、骨破壊や骨粗鬆症が進行すると考えられている。これらの機序によって、関節リウマチでは骨吸収が優位となる結果、関節の骨びらん、骨破壊像および二次性骨粗鬆症を呈すると考えられてきた［1］。骨リモデリングは、破骨細胞による骨吸収の後に、骨芽細胞によって新たな骨が再度形成されるという、破骨細胞／骨芽細胞カップリングが平衡状態を保持することで成立している。破骨細胞／骨芽細胞にそれぞれに存在する細胞表面の分子の ephrin および Eph 受容体は、シグナルを双方向性に伝達し、カップリングの主な因子のひとつである。破骨細胞は ephrinB2 を発現し、その受容体の EphB4 が骨芽細胞に発現している。破骨細胞において ephrinB2 を介して伝達されるシグナルは、破骨細胞形成および骨吸収を抑制する。一方、骨芽細胞において EphB4 を介して伝達されるシグナルは、骨芽細胞分化および骨形成を促進する。これらの ephrinB2／EphB4 の双方向性シグナルによって、破骨細胞／骨芽細胞は骨リモデリングを調節していることが示されている［2］。関節リウマチでは上述の通り、破骨細胞優位の二次性骨粗鬆症を呈し、破骨細胞／骨芽細胞カップリングの均衡が崩れていることは明らかであるが、骨吸収と骨形成の双方に重要な役割を果たすと考えられるカップリング因子 ephrinB2／EphB4 の変化に関しては明らかにされていない。本研究では、関節リウマチにおける主たる炎症性サイトカインである TNFαによって、破骨細胞／骨芽細胞 ephrinB2／EphB4 カップリング因子発現変化とそれに伴う骨代謝への影響を明らかにすることを目的とした。

方　法

1.　関節炎モデルマウスを用いた誘導性関節炎の惹起

1)　コラーゲン誘発性関節炎モデルマウス（CIA マウス）

6 週齢の C57BL6N 雌マウスにチキンⅡ型コラーゲンを免疫して関節炎を誘発した。Chicken type Ⅱ コラーゲン（Sigma-Aldrich）を 10 mM acetic acid で溶解し、2 mg/mL の溶液を調製した。その後、Freud's complete adjuvant（Difco）と 1 対 1 で混合し、エマルジョンを作製した。マウス 1 匹あたり 0.1 mL のエマルジョンを尾根部皮内に少量ずつ分けて注入した。2 週間後に同様の追加免疫を実施し、コラーゲン誘発性関節炎を発症させた。本マウスより骨髄を採取し、単核球を分離して破骨細胞様細胞を作製した（作製方法の詳細は下記を参照）。

2)　自然発症関節炎モデルマウス（SKG マウス）

自然免疫を抗原非特異的に活性化すると、慢性関節炎が全例に惹起される、T 細胞シグナル伝達因子 ZAP-70 の C 末端よりの SH2 ドメインに点突然変異を認める関節炎モデルマウス［3］。本マウスにおいて、SPF 環境下では関節炎が惹起されにくいことから、6 週齢時に滅菌した PBS 投与群をコントロール群として使用し、ラミナリン 30 mg を腹腔内投与した群を関節炎群とし、2 週間毎に関節腫脹のスコア（Arthritis Score）を評価した［3］。12 週齢時に左脛骨および両大腿骨を採取し、断端を切断後、骨髄を生理食塩水にて完全に排除した。タンパク抽出のため、それらの骨検体

を破砕後に RIPA 溶解液を加え、不溶性物質を除去するために遠心分離し、上清を回収した。右脛骨に関しては 4% PFA にて固定、10% EDTA にて脱灰後にパラフィン包埋し、薄切切片を作製した。

2. *In vitro* における初代培養の骨芽細胞および誘導した破骨細胞様細胞を用いた検討

骨芽細胞の初代培養として、C57BL6J マウスから採取した大腿骨を 20%ウシ胎仔血清（FBS）添加α-Minimum Essential Medium（α-MEM）（Gibco）に 100 U/mL ペニシリンおよび 100 μg/mL ストレプトマイシン（Gibco）を添加した培地中で培養し、遊走した細胞を使用した。単核球の初代培養から破骨細胞様細胞を誘導するために、6～10 週齢の C57BL6N 雌マウスの大腿骨から骨髄を採取し、Histopaque 1083（Sigma-Aldorich）を用いて比重遠心法により単球分画を得た。分離した単球にマクロファージコロニー刺激因子（Macrophage Stimulating Factor : M-CSF）20 ng/mL を添加し 3 日間培養した後、破骨細胞分化誘導因子（Receptor activator of NF-κB ligand : RANKL）50 ng/mL を添加して 4 日間培養し、破骨細胞様細胞を誘導した。破骨細胞／骨芽細胞共培養では、上記にて誘導した破骨細胞様細胞をセルスクレイパーを使用して剥離し、$2～3×10^4$/mL で播種した。翌日に骨芽細胞をトリプシン EDTA によって剥離後に $1×10^5$/mL で播種し、実験に使用した［4］。上記の培養系を用いた TNFα による添加実験はそれぞれ 48 時間行い、PBS 洗浄後に RIPA 溶解液にてタンパク抽出を行った。

上記の 1、2 で得られたサンプルを用いて、骨組織における TRAP および ALP 染色と ephrinB2／EphB4 の免疫組織化学染色を施行すると共に、骨組織から抽出したタンパク、破骨細胞様細胞における ephrinB2、NFATc1、CathepsinK および骨芽細胞における EphB4、ALP 発現をウエスタンブロッティング法によって解析した。

結　果

1. 関節炎モデルマウスにおける誘導性関節炎と破骨細胞／骨芽細胞カップリング因子 ephrinB2／EphB4 発現の変化

SKG マウスはラミナリン投与後、ほぼ左右対称性に手関節および足関節や指骨関節の関節腫脹を呈した。時間依存的に関節炎スコアの有意な増加を認め、投与 6 週後には関節炎群において、全例に慢性関節炎惹起が確認された（図 1A、図 1B）。コントロール群および関節炎群において、12 週齢時に体重に有意な差はなかった（コントロール群 vs. 関節炎：22.8±1.2 g、22.0±1.1 g：p ＝ 0.846）。上記マウス脛骨組織において、関節炎群ではコントロール群と比較して、破骨細胞の指標となる TRAP 陽性細胞で ephrinB2 発現は低下し（図 1C）、骨芽細胞の指標となる ALP 陽性細胞では EphB4 発現の低下が認められた（図 1D）。また、上記マウスの骨抽出液を用いた検討でも、関節炎群において ephrinB2／EphB4 発現の低下が認められた（図 1E）。

2. 破骨細胞および骨芽細胞での ephrinB2／EphB4 発現と TNFα による影響

CIA マウス骨髄から抽出した単球を用いて作製された破骨細胞様細胞において、ephrinB2 発現は低下を認めた（図 2A）。また、WT マウス単球由来の破骨細胞様細胞に TNFα 10 ng/mL を 2 日間添加して培養すると、NFATc1 発現が軽度上昇したのに対し、ephrinB2 発現は低下した（図 2B）。骨芽細胞の初代培養においても、TNFα 1、10 ng/mL を 2 日間添加し培養すると、ALP 発現とともに EphB4 発現も低下を認めた（図 2C）。破骨細胞／骨芽細胞共培養においては、TNFα 10 ng/mL の 2 日間添加によって破骨細胞数は増加を認めた（図 2D）。共培養の細胞抽出液において、TNFα 添加によって、ephrinB2／EphB4 発現は共に低下した。また同検体では ALP 発現は低下し、CathepsinK 発現は増加を認めた（図 2E）。

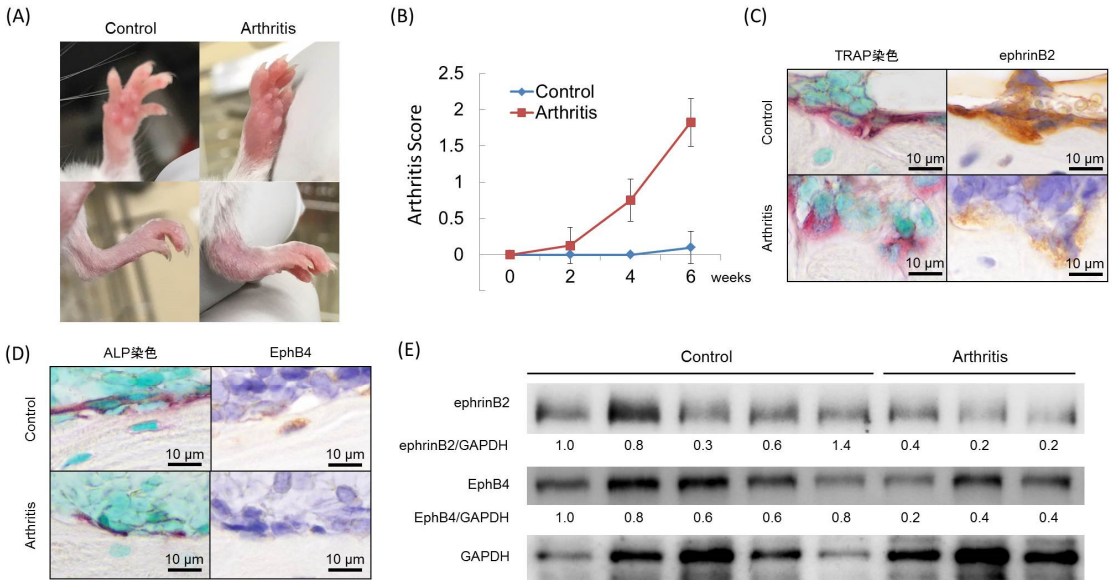


図 1. 関節炎マウス（SKG マウス）における破骨細胞／骨芽細胞カップリング因子 EphrinB2／EphB4 発現

（A）12 週齢コントロール群（PBS 投与）および関節炎群（ラミナリン投与）手足関節像。

（B）コントロール群、関節炎群における関節炎誘導後の Arthritis Score の推移。

（C）骨組織における TRAP 染色陽性細胞と ephrinB2 発現。

（D）骨組織における ALP 染色陽性細胞と EphB4 発現。

（E）骨抽出液での ephrinB2／EphB4 発現（ウエスタンブロッティング法）。

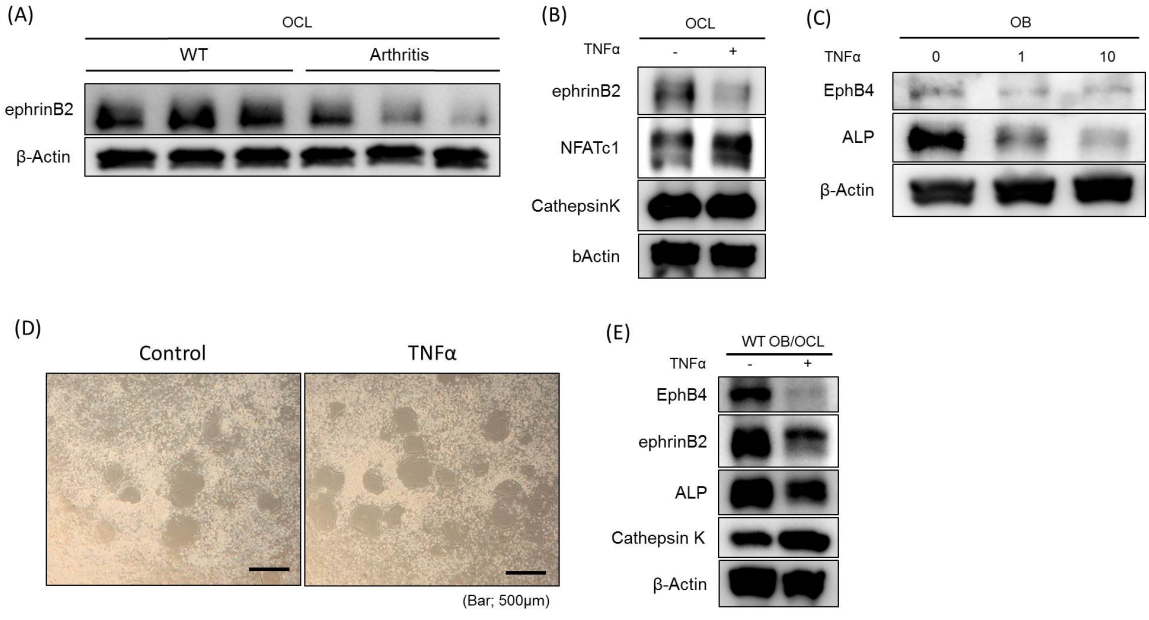


図 2. 破骨細胞／骨芽細胞における ephrinB2／EphB4 発現への TNF α の影響

（A）WT およびコラーゲン誘導性関節炎マウス骨髄より作製した破骨細胞様細胞における ephrinB2 発現。

（B）WT マウス骨髄より作製した破骨細胞様細胞での ephrinB2 発現と TNF α の影響。

（C）骨芽細胞初代培養における EphB4 および ALP 発現と TNF α の影響。

（D）破骨細胞／骨芽細胞共培養への TNF α と光学顕微鏡像。

（E）（D）における ephrinB2／EphB4 発現の検討。

考　察

関節炎を誘導したモデルマウスにおいて、破骨細胞／骨芽細胞カップリング因子 ephrinB2／EphB4 発現は低下を認めており、本マウスでは炎症性サイトカインによって破骨細胞活性が亢進し、骨吸収増大しているにも関わらず、骨形成作用が低下するといった骨リモデリングの障害が示唆される。実際、活動性 RA 患者の血清骨吸収マーカーは一般的に上昇しており、炎症性サイトカインによる骨吸収亢進および炎症局所の傍関節部の骨破壊を示している［5］。また、*in vitro* での検討では、破骨細胞において、TNFαは NFATc1 や CathepsinK 発現の増大といった破骨細胞活性を上昇させる直接的作用の他に、破骨細胞に発現する ephrinB2 を低下させる作用が認められた。CIA マウス単球由来の破骨細胞様細胞において、ephrinB2 発現は低下を認めることから、破骨細胞に分化する以前の単球の段階ですでに炎症性サイトカインの影響を受けていることが考えられた。さらに、骨芽細胞においても TNFαによって ALP 発現低下に示される直接的な骨芽細胞分化の阻害だけでなく、EphB4 発現の低下が認められた。ephrinB2／EphB4 は細胞同士の接触によりシグナル伝達が行われるため、破骨細胞／骨芽細胞共培養を行った。既報と一致して、TNFα添加により破骨細胞形成の増加を認め、それらの検体において破骨細胞活性増大および骨芽細胞分化の低下を認めるとともに、*in vivo* と一致して ephrinB2／EphB4 発現の低下が認められた。これらの結果から、関節リウマチにおいては異常に活性化されたリンパ球や滑膜線維細胞からの炎症性サイトカインの直接作用によって、破骨細胞が活性化されると同時に骨芽細胞分化が低下することが示された。さらに、本来なら破骨細胞分化促進と共に増加し、骨形成を誘導する ephrinB2／EphB4 シグナルは低下しており、骨吸収後に骨形成を伴う骨リモデリング機構が TNFαにより障害されることで、関節リウマチにおける骨破壊や傍関節性骨粗鬆症を促進する可能性が示唆された。

謝　辞

最後に、本研究に御支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文　献

1） Inaba M, Nagata M, Goto H, Kumeda Y, Kobayashi K, Nakatsuka K, Miki T, Yamada S, Ishimura E, Nishizawa Y. Preferential reductions of paraarticular trabecular bone component in ultradistal radius and of calcaneus ultrasonography in early-stage rheumatoid arthritis. Osteoporos Int. 2003 Aug;14(8):683-7. Epub 2003 Jul 22. PMID: 12879221 DOI: 10.1007/s00198-003-1427-y

2） Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T, Suda T, Matsuo K. Bidirectional ephrinB2/EphB4 signaling controls bone homeostasis. Cell Metab. 2006 Aug;4(2):111-21. PMID: 16890539 DOI: 10.1016/j.cmet.2006.05.012

3） Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S, Sakihama T, Matsutani T, Negishi I, Nakatsuru S, Sakaguchi S. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. Nature. 2003 Nov 27;426(6965):454-60. PMID: 14647385 DOI: 10.1038/nature02119

4） Teramachi J, Nagata Y, Mohammad K, Inagaki Y, Ohata Y, Guise T, Michou L, Brown JP, Windle JJ, Kurihara N, Roodman GD. Measles virus nucleocapsid protein increases osteoblast differentiation in Paget's disease. J Clin Invest. 2016 Mar 1;126(3):1012-22. doi: 10.1172/JCI82012. Epub 2016 Feb 15. PMID: 26878170 DOI: 10.1172/JCI82012

5） Furumitsu Y, Inaba M, Yukioka K, Yukioka M, Kumeda Y, Azuma Y, Ohta T, Ochi T, Nishizawa Y, Morii H. Levels of serum and synovial fluid pyridinium crosslinks in patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 2000 Jan;27(1):64-70. PMID: 10648019