



メソトレキサートによるRA滑膜線維芽細胞の細胞死誘導に関する研究

田村, 和哉
佐浦, 隆一

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 61(4):83-88

(Issue Date)

2001-03

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00044699>



メソトレキサートによる RA 滑膜線維芽細胞の 細胞死誘導に関する研究

田 村 和 哉*, 佐 浦 隆 一*

神戸大学医学部整形外科科学教室
(指導: 水野耕作教授)

連絡先: 田 村 和 哉
神戸大学医学部整形外科科学教室
兵庫県神戸市中央区楠町7-5-1
TEL: (078)382-5985, FAX: (078)351-6930

(平成12年11月15日受付)

要 約

関節滑膜に初発する慢性肉芽腫性炎症である慢性関節リウマチ (Rheumatoid arthritis; RA) は増殖した滑膜組織 (パンプス) がその病態形成に重要な役割を演じている。

免疫抑制剤であるメソトレキサート (Methotrexate; MTX) は近年, 本邦でも用いられるようになってきたが, その作用機構には不明な点が多い。そこで本論文ではMTXによるRA滑膜線維芽細胞のアポトーシス誘導に関する研究結果をもとに, RA滑膜線維芽細胞の増殖抑制機序を介したMTXの抗リウマチ作用について考察した。

まず, RA滑膜線維芽細胞にIL-1 β を添加すると濃度依存性に細胞増殖は亢進し, 逆にアポトーシスは抑制された。すなわち, RA関節液中で高濃度に検出されるIL-1 β は, 滑膜細胞の細胞増殖とアポトーシス抑制を介して, パンプス形成に重要な役割を演じている可能性が示唆された。

一方, MTXをRA滑膜線維芽細胞の培養系に添加すると, IL-1 β とは逆にアポトーシスの誘導と細胞増殖抑制が観察された。これまで, RA滑膜線維芽細胞のアポトーシスにはBcl-2 蛋白およびFas抗原が関与していると報告されているが, 本研究よりMTXはRA滑膜線維芽細胞内のBcl-2 蛋白の発現とFas抗原発現量を抑制することも明かとなった。

すなわち, MTXはアポトーシスを調節する因子であるBcl-2 蛋白および可溶性Fas抗原の発現量を調節する結果, RA滑膜線維芽細胞の増殖を抑制し抗リウマチ作用を発現している可能性が大きいと考えられた。

緒 言

関節滑膜に初発する慢性肉芽腫性炎症である慢性関節リウマチ (Rheumatoid arthritis; RA) では免疫異常を背景に増殖した滑膜組織が肉芽組織 (パンプス) を形成し, 骨関節破壊に重要な役割を演じている。

RA滑膜炎では, HLA-DR 4 などの特定のMHC Class II 抗原に拘束性をもつTリンパ球が関節内の未知の自己抗原に対する自己免疫を誘導し¹⁾, 関節炎が発症する。その結果, 滑膜内に浸潤してきた炎症細胞がInterleukin-1 β (IL-1 β) や Tumor necrosis factor α (TNF α) などの炎症性サイトカインを産生し滑膜線維芽細胞の増殖を引き起こす。一方, RA滑膜炎類似の病態を示すHTLV-1 (ヒト細胞白血病ウイルス-1) 関連関節症では, HTLV-1 由来のTax 蛋白による核内転写因子 (NF-kB) の活性化を介した滑膜細胞の自律的な炎症性サイトカイン産生亢進が報告されている²⁾。

癌遺伝子であるc-fosのトランスジェニックマウスを用いた実験関節炎ではc-fosの異常発現の結果, 関節炎局所への炎症細胞の浸潤を伴うことなく滑膜細胞内のサイトカインやコラゲナーゼなどのAP-1 結合サイトをもつ遺伝子が活性化されることが明らかとなっている³⁾。さらに, RAにおけるパンプス形成機序として関節液中に大量に存在する可溶性Fas抗原による滑膜細胞のFas依存性アポトーシスの拮抗的阻害⁴⁾やTGF- β , IL-1 β による滑膜細胞のFas依存性アポトーシスの抑制を介した滑膜増殖機構も報告されている⁵⁾。

このようにRA関節炎では遺伝子レベルでの調節による滑膜細胞の自律的な増殖, 代謝亢進やサイトカイン刺激によるアポトーシスの抑制によるパンプスの自

律的な形成機序の存在が示唆される。そして、この増殖したパンススは骨、軟骨を障害するばかりでなく、最終的に関節滑膜の線維化と関節拘縮の要因となりRA患者に著しい機能障害をもたらす。

以上、増殖した滑膜組織がRAの関節破壊に重要な役割を演じていることが明らかとなったが、炎症性サイトカインの主要な産生部位である増殖滑膜の切除(滑膜切除術)により術後CRP値が低下し、血液中のCD4/CD8が改善すること⁶⁾などから、RA滑膜組織の増殖抑制が関節破壊の進行を抑制するばかりでなく全身の炎症活動を改善させる可能性もある。

さて、メソトレキサート(Methotrexate; MTX)は免疫抑制剤であるが、欧米ではRAに対する有効性から抗リウマチ薬として認可されている。このMTXの作用機序として種々の抗炎症作用あるいは抗リウマチ作用が報告されているが、詳細な機序については不明である。そこで本論文ではMTXによるRA滑膜線維芽細胞のアポトーシス誘導に関する研究結果をもとに、RA滑膜線維芽細胞の増殖抑制機序を介したMTXの抗リウマチ作用について考察する。

材料と方法

1. RA滑膜線維芽細胞の培養

RA滑膜線維芽細胞はRA膝に対する鏡視下滑膜切除術あるいは全人工膝関節置換術時に患者の同意のもとに得られた滑膜組織からコラゲナーゼ処理にて採取した。分離された細胞成分を10%仔牛血清(FCS)を含むDulbecco's Modified Eagle Medium(10%FCS-DMEM)を用いて2~3代単層継代培養し付着性の細胞をRA滑膜線維芽細胞として以下の実験に供した。

2. RA滑膜細胞の増殖能の測定

細胞増殖能は10%FCS-DMEMを用いてRA滑膜線維芽細胞を72時間培養し、細胞内へのチミジン(³H-TdR)の取り込みを指標として測定した。一方、MTXの増殖能に及ぼす影響は、MTXのDNA合成阻害の作用点がジハイドロフォレートリダクターゼ(dihydrofolate reductase: DHFR)の阻害であり、デオキシウリジン-1 磷酸からチミジン-1 磷酸への転換抑制を介していることから、³H-TdRのかわりにデオキシウリジン(³H-UdR)の細胞内への取り込みを指標とした⁷⁾。

3. RA滑膜細胞の細胞死(アポトーシス)の測定およびFas抗原量/Bcl-2 蛋白の発現量の測定

RA滑膜細胞のアポトーシス誘導はIL-1 β あるいはMTXの存在下に2%FCS-DMEMを用いてRA滑膜

線維芽細胞を96時間培養後、ELISA法を用いて細胞内および培養液中の断片化DNA量を測定し、アポトーシス誘導の指標とした。同時にMTXによるRA滑膜線維芽細胞のアポトーシス誘導機序する目的で、RA滑膜線維芽細胞内外のアポトーシスのシグナルであるFas抗原量およびアポトーシス抑制蛋白であるBcl-2 蛋白の発現をELISA法を用いて測定した。

4. 統計学的検討

統計学的解析はunpaired Student's t-testを用いて独立した4あるいは6検体の平均値を検定し、P<0.05を統計学的有意差ありとした。

結 果

(1) RA滑膜線維芽細胞の増殖およびDNAフラグメンテーションに及ぼすIL-1 β の影響

RA関節液中では炎症性サイトカインであるIL-1 β が高濃度に検出され、RAの病態形成に重要な役割を演じている。そこでこのIL-1 β のRA滑膜線維芽細胞の増殖およびDNAフラグメンテーションに及ぼす影響について検討した。

RA滑膜線維芽細胞にIL-1 β を添加し、72時間培養したところ、細胞内への³H-TdRの取り込みは添加したIL-1 β の濃度に依存して増加し、10U/mlのIL-1 β の刺激により有意な細胞増殖の亢進がみられた(図1-a)。また、このときアポトーシスの指標となる

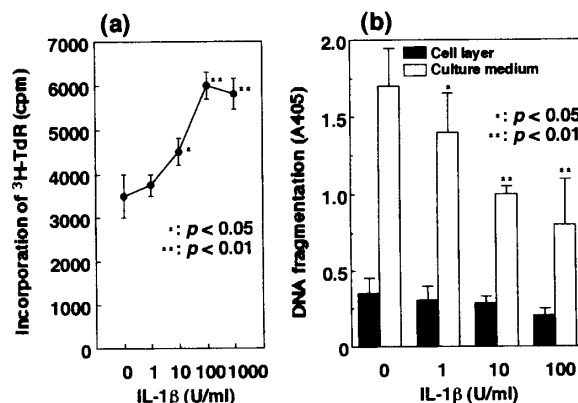


図1 RA滑膜線維芽細胞の増殖およびDNAフラグメンテーションに及ぼすIL-1 β の影響

(a) 1.0×10^4 個/wellのRA滑膜線維芽細胞を96 multiwell plateに播種しIL-1 β を添加後、72時間培養した。細胞内への³H-TdRの取り込みはIL-1 β の濃度に依存して増加した。

(b) 1.0×10^6 個/wellのRA滑膜線維芽細胞を24 multiwell plateに播種しIL-1 β を添加後、96時間培養した。DNAのフラグメンテーション量は細胞内および培養液中とも添加したIL-1 β の濃度に依存して減少した。

DNAのフラグメンテーション量を測定すると、細胞内および培養液中のDNAフラグメンテーション量は添加したIL-1 β の濃度に依存して減少していた(図1-b)。すなわち炎症性サイトカインであるIL-1 β の添加によりRA滑膜線維芽細胞の細胞増殖は亢進し、アポトーシスは抑制されることが明らかとなった。

(2) IL-1 β により誘導されるRA滑膜線維芽細胞の増殖およびDNAのフラグメンテーションに及ぼすMTXの影響

まずIL-1 β によるRA滑膜線維芽細胞の増殖に及ぼすMTXの影響について検討した。種々の濃度のMTXを100U/mlのIL-1 β の刺激下にRA滑膜線維芽細胞に添加すると、MTXは ^3H -UdRの細胞内への取り込みを濃度依存性に抑制し、 10^{-8}M のMTXの添加によりIL-1 β の刺激下、非刺激下とも統計学的に有意なRA滑膜線維芽細胞の増殖抑制がみられた(図2-a)。また、IL-1 β によるRA滑膜線維芽細胞のアポトーシス抑制に対するMTXの影響を検討したところ、培養液中のDNAフラグメンテーション量は添加したMTXの濃度に依存して増加し(図2-b)、 10^{-7}M のMTXの添加により統計学的に有意なDNAフラグメンテーション量の増加が認められた。すなわち、MTXはIL-

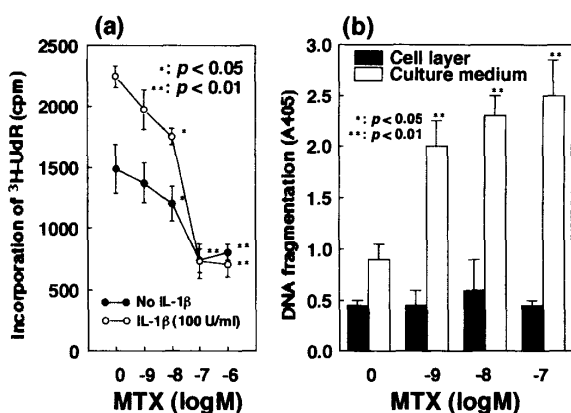


図2 IL-1 β によるRA滑膜線維芽細胞の増殖およびDNAフラグメンテーションに及ぼすMTXの影響

- (a) 96 multiwell plate に播種した 1.0×10^4 個/well の RA 滑膜線維芽細胞を IL-1 β (100U/ml) の刺激下に、MTX を添加し 72 時間培養した。MTX は IL-1 β の刺激下、非刺激下とも ^3H -UdR の取り込みを濃度依存性に抑制した。
- (b) 24 multiwell plate に播種した 1.0×10^6 個/well の RA 滑膜線維芽細胞を IL-1 β (100U/ml) の刺激下に、MTX を添加後 96 時間培養した。培養液中の DNA フラグメンテーション量は添加した MTX の濃度に依存して増加した。

1 β による RA 滑膜線維芽細胞の細胞増殖を抑制し、同時に IL-1 β により抑制されるアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

(3) IL-1 β による RA 滑膜線維芽細胞の Bcl-2 蛋白の発現に及ぼす MTX の影響

リンパ球系細胞のアポトーシスを抑制する Bcl-2 蛋白は RA 滑膜細胞にも局在することが報告されている⁸⁾。そこで MTX による RA 滑膜線維芽細胞のアポトーシス誘導機序を検討する目的で、RA 滑膜線維芽細胞の Bcl-2 蛋白の発現に及ぼす MTX の影響を検討した。100U/ml の IL-1 β を含む 2 % FCS-DMEM を用いて MTX の存在下に RA 滑膜線維芽細胞を 96 時間培養後細胞内の Bcl-2 蛋白量を測定したところ、添加した MTX の濃度に依存して Bcl-2 蛋白量は減少していた(図3)。すなわち、MTX による滑膜組織の増殖抑制機構として MTX が滑膜細胞のアポトーシス抑制因子である Bcl-2 蛋白量を減少させる結果、IL-1 β により抑制される滑膜線維芽細胞の細胞死が誘導され、滑膜細胞の増殖が抑制される可能性が大きい。

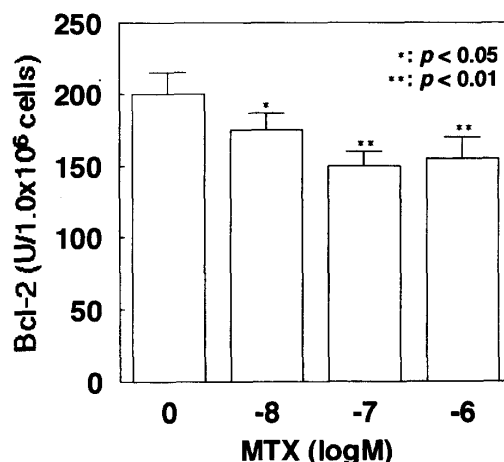


図3 IL-1 β による RA 滑膜線維芽細胞の Bcl-2 蛋白の発現に及ぼす MTX の影響

MTX 存在下に 1.0×10^6 個/well の RA 滑膜線維芽細胞を 100U/ml の IL-1 β を含む 2 % FCS-DMEM を用いて 96 時間培養後、Bcl-2 蛋白量を測定した。細胞内の Bcl-2 蛋白量は添加した MTX の濃度に依存して減少していた。

(4) IL-1 β による RA 滑膜線維芽細胞の Fas 抗原発現に及ぼす MTX の影響

近年、IL-1 β により滑膜細胞表面の Fas 抗原量が減少し、滑膜細胞と炎症細胞の Fas-Fas リガンド (FasL) 系が抑制されることにより滑膜組織内での滑膜細胞のアポトーシスが抑制される可能性が報告されている⁹⁾。そこで、IL-1 β の刺激下に 2 % FCS-DMEM を用いて RA 滑膜線維芽細胞を 96 時間培養後、細

胞内および培養液中のFas抗原量を測定し、IL-1 β のRA滑膜線維芽細胞のFas抗原発現に及ぼす影響を検討した。RA滑膜線維芽細胞の細胞内および培養液中のFas抗原量は添加したIL-1 β の濃度に依存して増加した(図4-a)。

次に、IL-1 β 刺激下におけるRA滑膜線維芽細胞のFas抗原発現量に及ぼすMTXの影響を検討したところ、細胞内および培養液中のFas抗原量とも添加したMTXの濃度に依存して減少していた(図4-b)。すなわち、IL-1 β の刺激により滑膜細胞内で増加したFas抗原は、細胞膜より遊離し可溶性Fas抗原となり滑膜細胞のFas-FasL系に抑制的に作用している可能性が大きい。そしてMTXはこのRA滑膜線維芽細胞内のFas抗原発現量を抑制する結果、滑膜細胞外への可溶性Fas抗原の放出を抑制し、滑膜細胞のアポトーシスを誘導している可能性が示唆される。

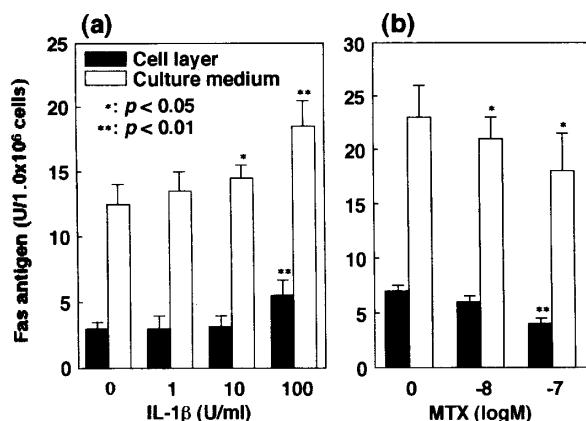


図4 IL-1 β によるRA滑膜線維芽細胞のFas抗原発現に及ぼすMTXの影響

- (a) 1.0×10^6 個/wellのRA滑膜線維芽細胞をIL-1 β を含む2% FCS-DMEMを用いて96時間培養後、細胞内及び培養液中のFas抗原量とも、添加したIL-1 β の濃度に依存して増加していた。
- (b) MTX存在下に 1.0×10^6 個/wellのRA滑膜線維芽細胞を100 U/mlのIL-1 β を含む2% FCS-DMEMを用いて96時間培養後、細胞内および培養液中のFas抗原量を測定した。MTXは、RA滑膜線維芽細胞の細胞内及び培養液中のFas抗原量を濃度に依存して減少させた。

考 察

MTXは1948年に合成された葉酸代謝拮抗剤であり、主として悪性腫瘍の治療に用いられてきた。1980年代に入り米国を中心にRAに対する5~15mg/週の間欠的低用量MTX療法が行われ、疾患修飾性抗リウマチ薬(Disease modifying antirheumatic drugs:

DMARDs)としての臨床的有用性が高く評価されるようになった。

MTXの作用機序としてDHFR阻害によるDNA、RNA合成阻害やアミノ酸代謝阻害を介した免疫抑制作用が数多く報告されている。また、MTXが抗炎症作用あるいはRAの関節破壊の進行遅延など抗リウマチ作用を発現することが報告されているが、RAに対するMTXの作用機序は不明な点も多く残されている。

平田らはMTXによる血管内皮細胞の増殖抑制とウサギ角膜モデルを用いた血管新生抑制作用について検討し、低濃度のMTXが炎症局所における血管新生を抑制することから抗炎症作用を発現することを報告⁷⁾している。また、MTXの抗リウマチ作用の作用機序として炎症局所におけるアデノシン産生の促進を介した抗炎症作用の発現機序も報告されている¹⁰⁾。

さらに関節破壊の面から見ると、MTXが関節軟骨の破壊に重要な役割を演じるコラゲナーゼやストロメリンなどのマトリックスメタロプロテアーゼの滑膜細胞¹¹⁾や軟骨細胞¹²⁾からの産生を抑制することにより関節破壊を抑制する可能性も示唆される。

RAでは増殖滑膜が関節破壊を引き起こしたり関節拘縮の原因となるため、滑膜組織の増殖抑制が治療戦略上、非常に重要である。

近年、RAにおける滑膜増殖機序として滑膜細胞のアポトーシスの抑制が注目されている⁹⁾。他のDMA RDs¹³⁾と同じくMTXもRA滑膜線維芽細胞の増殖を抑制することが報告¹⁴⁾されているが、今回の検討よりその一部は炎症性サイトカインであるIL-1 β による滑膜線維芽細胞のアポトーシス抑制を阻害することにより引き起こされることが明らかとなった。また、このMTXのアポトーシスの抑制阻害は滑膜細胞内のアポトーシス抑制蛋白であるBcl-2蛋白の産生抑制を介している可能性もある。

一方、MTXがIL-1 β による細胞外へのFas抗原の遊離を抑制したことから、MTXの作用機序として、MTXがRA関節炎における滑膜組織や関節液中への可溶性Fas抗原の遊離を抑制する結果、Fas-FasL系の抑制阻害を介した滑膜細胞のアポトーシス誘導が考えられる。

以上、MTXは免疫抑制作用を示しRAの免疫異常を改善するばかりでなく、様々な面から抗炎症あるいは抗リウマチ作用を呈している。特に今回の検討からMTXは滑膜細胞に対してアポトーシスの誘導を介して細胞増殖を抑制することが明らかとなった。このMTXによるアポトーシス誘導に関する機序についてはさらに検討が必要であるが、MTXは滑膜細胞の増殖抑制を介してパンヌス形成を阻害し、関節破壊を抑制

している可能性が大きい。

謝 辞

この研究に対して多くのご教示を頂いた整形外科学講座の水野耕作教授に深甚なる謝意を表します。

文 献

1. Wordsworth, B. P., Lanchbury, J. S., Sak-kas, L. I., Welsh, K. I., Panayi, G. S., Bell, J. I.: HLA-DR4 subtype frequencies in rheumatoid arthritis indicate that DRB1 is the major susceptibility locus within the HLA class II region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86 : 10049-10053, 1989.
2. Nakajima, T., Aono, H., Hasunuma, T., Yamamoto, K., Maruyama, I., Nosaka, T., Hatanaka, M., Nishioka, K.: Overgrowth of human synovial cells driven by the human T cell leukemia virus type I tax gene. *J. Clin. Invest.* 92 : 186-193, 1993.
3. Shiozawa, S., Tanaka, Y., Fujita, T., Tokuhisa, T.: Destructive arthritis without lymphocyte infiltration in H 2 -c-fos transgenic mice. *J. Immunol.* 148 : 3100-3104, 1992.
4. Hasunuma, T., Kayagaki, N., Asahara, H., Motokawa, S., Kobata, T., Yagita, H., Aono, H., Sumida, T., Okumura, K., Nishioka, K.: Accumulation of soluble Fas in inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 40 : 80-86, 1997.
5. Kawakami, A., Eguchi, K., Matsuoka, N., Tsuboi, M., Kawabe, Y., Aoyagi, T., Nagataki, S.: Inhibition of Fas antigen-mediated apoptosis of rheumatoid synovial cells in vitro by transforming growth factor beta 1. *Arthritis Rheum.* 39 : 1267-1276, 1996.
6. Nakamura, H., Yoshino, S., Ishiuchi, N., Fujimori, J., Kanai, T., Nishimura, Y.: Outcome of radical multiple synovectomy as a novel surgical treatment for refractory rheumatoid arthritis : implication of HLA-DRB1*0405 in postoperative results. *Clin. Exp. Rheumatol.* 15 : 53-57, 1997.
7. Hirata, S., Matsubara, T., Saura, R., Tateishi, H., Hirohata, K.: Inhibition of in vitro vascular endothelial cell proliferation and in vivo neovascularization by low-dose methotrexate. *Arthritis Rheum.* 32 : 1065-1073, 1989.
8. Matsumoto, S., Muller, Ladner. U., Gay, R. E., Nishioka, K., Gay, S.: Ultrastructural demonstration of apoptosis, Fas and Bcl-2 expression of rheumatoid synovial fibroblast. *J. Rheumatol.* 23 : 1345-1352, 1996.
9. Tsuboi, M., Eguchi, K., Kawakami, A., Matsuoka, N., Kawabe, Y., Aoyagi, T., Maeda, K., Nagataki, S.: Fas antigen expression on synovial cells was downregulated by interleukin 1 beta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218 : 280-285, 1996.
10. Cronstein, B. N.: The mechanism of action of methotrexate. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* 23 : 739-755, 1997.
11. Firestein, G. S., Paine, M. M., Boyle, D. L.: Mechanisms of methotrexate action in rheumatoid arthritis. Selective decrease in synovial collagenase gene expression. *Arthritis Rheum.* 37 : 193-200, 1994.
12. 丸井隆, 水野耕作, 松原司, 伊東宏 : 低用量メソトレキサート (MTX) による軟骨細胞由来のメタロプロテアーゼ活性の抑制効果. *臨床リウマチ*, 6 : 195-202, 1995.
13. 薩摩真一, 松原司, 広畑和志 : 抗リウマチ剤によるヒト滑膜線維芽細胞増殖の抑制. *臨床リウマチ*, 3 : 285-293, 1990.
14. Mayer, F. A., Yaron, I., Mashiah, V., Yaron, M.: Methotrexate inhibits proliferation but not interleukin 1 stimulated secretory activities of cultured human synovial fibroblasts. *J. Rheumatol.* 20 : 238-242, 1993.

Anti-rheumatic effect of Methotrexate through Apoptosis of Rheumatoid Synovial Fibroblasts.

Kazuya Tamura, Ryuichi Saura

Department of Orthopaedic Surgery, Kobe University School of Medicine

(Supervisor : Professor Kosaku Mizuno)

ABSTRACT

In order to investigate the mechanism of antirheumatic action of methotrexate (MTX), antiproliferative effect of MTX on synovial fibroblasts obtained from rheumatoid arthritis (RA) patients were investigated. To examine the effect of MTX on DNA synthesis, total radioactivity of ^3H -deoxyuridine (^3H -UdR) incorporated into the synovial fibroblasts was measured. Also quantification of DNA fragmentation of synovial fibroblasts in the cultured supernatant and cell associated Bcl-2 protein, Fas antigen which is suspected of modulating apoptosis, were performed with enzyme-linked immunosorbent assay.

MTX suppressed synovial fibroblast proliferation in a dose dependent fashion. Significant inhibition ($P < 0.01$) was attained at the concentration of more than 10^{-8}M of MTX. Also, induction of DNA fragmentation which is characteristic of apoptosis were observed at over 10^{-9}M MTX over 96 h-incubation significantly, which might be due to the suppression of Bcl-2 expression and decreasing IL-1 β induced soluble Fas antigen release by MTX. These results, therefore, suggest that MTX may suppress the growth of rheumatoid pannus by inhibition of synovial fibroblast proliferation through the induction of apoptosis of synovial fibroblast with modulating Bcl-2 expression and soluble Fas antigen release in situ.

Key Words : Rheumatoid arthritis, Methotrexate, Apoptosis, Interleukin-1, Bcl-2, Fas