

急速破壊型股関節症(RDC)病変部位局所における T細胞の破骨細胞活性化サイトカイン産生能

提供者：久留米大学医学部

玉井 誠

〔伊丹〕次に、久留米医大の玉井先生、お願いいたします。

〔玉井〕初めに、この研究に助成金をいただき、また、このような発表の機会をお与えくださいました、伊丹康人理事長に深くお礼申し上げます。

〔序 論〕

急速破壊型股関節症、以下RDCと略しますが、その臨床像につきましては、この会にご参加の先生方はよくご存じのことと存じますが、その病態及び発症機序につきましては、いまだほとんど解明されておられません。

1973年に、Bobeckoがウサギを用いて、Chondrolysisの発症機序につき、免疫学的見地から実験的研究を行い、関節内に遊離した軟骨片に対する自己免疫反応がChondrolysisを発症させるのであろうと考えました。そして、この反応には、関節の所属リンパ節と局所のリンパ球の関与が証明されました。また、このChondrolysisがRDCの発症の引き金と考えられてきました。

大腿骨頭と臼蓋の双方に破壊が起こるというRDCの特徴は、関節液を介して骨破壊を起こす何らかの生理活性物質、あるいはそれを産生する細胞成分の存在の可能性を示唆するものであります。1990年、小宮

らは、RDCの関節液内にIL-1やmatrix metalloproteinase(MMP)が存在し、これらが骨吸収活性を持つことを報告いたしました。

近年の分子生物学的研究から、さまざまな骨疾患において、その病態に種々のサイトカインの関与が明らかとなってきました。骨吸収性サイトカインとしては、IL-1、IL-6、TNF- α 、TGF- α などが知られており、これらの骨吸収性サイトカインの多くは、破骨細胞活性化因子として働き、破骨細胞に作用して骨吸収を促進します。

1991年の股関節研究セミナーにおきまして、進藤らは、RDCの骨頭に多数の破骨細胞が認められることを報告しています。我々の研究におきましても、同様の所見を認めており、その1例をスライドに示します。(図1)

骨頭の破壊部中央には、このように壊死に陥った骨梁を多数の破骨細胞が吸収している像が認められ、またその周囲には多数の単核球浸潤が認められます。その周辺部におきましては、壊死に陥っていない骨梁がやはり同様に多数の破骨細胞によって吸収されています。

Osteoclast-like Multinuclear Cells at the Site of Destruction in the RDC Femoral Head

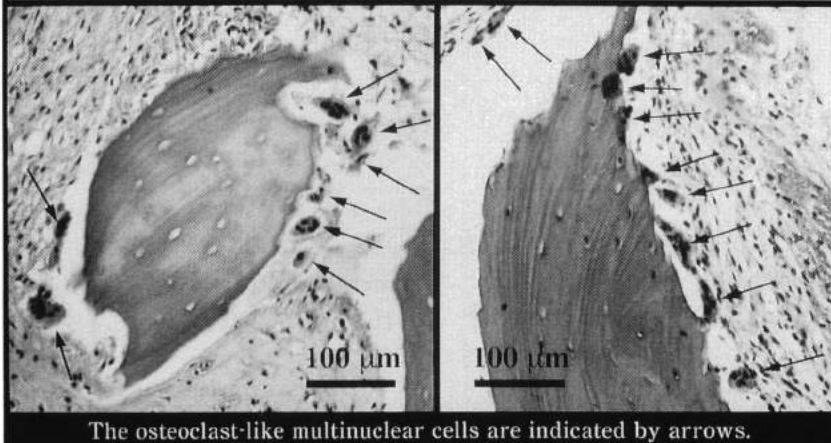


図1 RDC骨頭の病理組織像

- 左) : 破壊の中央部においては壊死に陥った骨梁を多数の破骨細胞が吸収している所見が認められる。
- 右) : 辺縁部においては壊死に陥っていない骨梁も多数の破骨細胞によって吸収されている。また周囲には多数の単核球浸潤が認められる。

そこで我々は、RDCの股関節局所におけるT細胞と、これから産生される破骨細胞活性化サイトカインに注目し、RDC患者の股関節組織から樹立したT細胞ライン(TCL)のサイトカイン産生能について検討いたしましたので、その結果を報告いたします。

【方法】

対象はRDCと診断された11症例であり、いずれも飲酒歴、ステロイド使用歴はありませんでした。全例、3カ月から1年の間に、高度に一側股関節破壊を来しております。

これらのうちの5症例から、人工股関節

置換術時に摘出した大腿骨頭及び滑膜を細切して、磷酸緩衝液中で洗浄し、これら局所に浸潤したリンパ球を採取しました。また、患者末梢血及び3例の健常人末梢血から、密度勾配遠心分離法を用いて、リンパ球を採取しました。これらのリンパ球を96穴プレートに、1プレートに100個ずつ散布し、IL-2とフィーダー細胞の存在下にCO₂インキュベーター内で培養しました。増殖の認められた細胞は、蛍光抗体法にて膜マーカーを確認し、CD3と、CD4あるいはCD8が陽性のものをTCLとしました。最終的に大腿骨頭から53、滑膜から29、患者末梢血から46、また3例の健常人末梢血から22、計150のTCLの樹立に成

功しましたので、これらを用いて、以下の研究を行いました。

まず、無作為に選出した10個のTCLからRNAを抽出し、RT-PCR法を用いて、各サイトカインのmRNAの発現を調べましたところ、そのほとんどにIL-6、TNF- α のほか、さまざまなサイトカインのmRNAの発現を認めました。(図2)このことは、樹立したTCLがこれらのサイトカインを産生する能力を持っていることを示しています。そこで、次に、TCLによる各種サイトカインの産生量について検討いたしました。

樹立したTCLを1wellに、 5×10^5 個づつ48穴プレートに散布し、フィーダー細胞を加えずに18時間培養して得られた培養上清中のIL-6、IL-1 α 、TNF- α 含

有量をELISA法を用いて測定しました。

【結果】

その結果、大腿骨頭から樹立したTCLによるIL-6産生量は他の群と比較して有意に高値でありました。(図3)また、滑膜および患者末梢血から樹立したTCLによるIL-6産生量は、健常人末梢血と比較して有意に高値でありました。

大腿骨頭から樹立したTCLによるIL-1 α 産生量は、他の群と比較して有意に高値でありました。また、滑膜から樹立したTCLによるIL-1 α 産生量は、健常人末梢血と比較して有意に高値でありました。

大腿骨頭から樹立したTCLによるTNF- α 産生量は、健常人末梢血と比較して有意に高値でありました。また、患者末梢

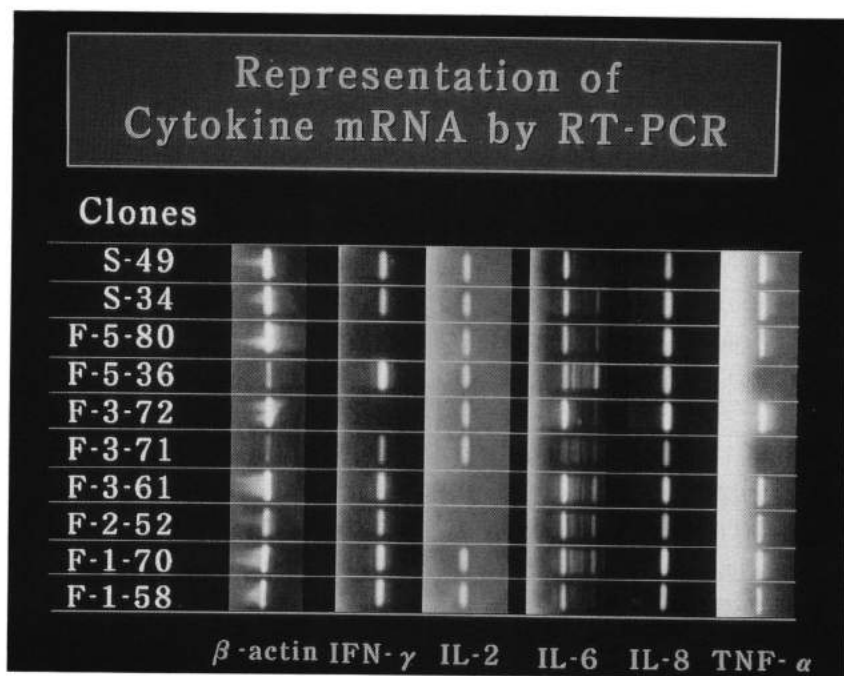


図2 TCLにおける各種サイトカインmRNAの発現

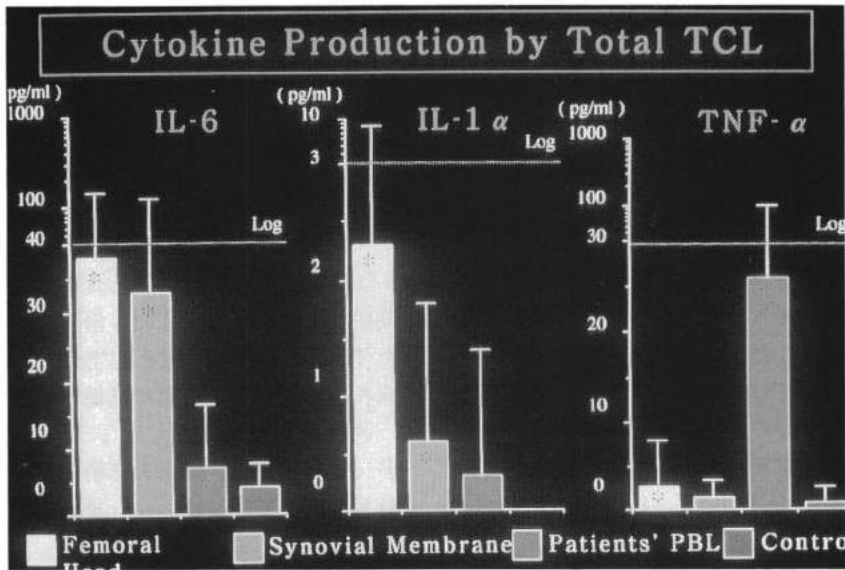


図3 樹立したTCLからのIL-6、IL-1 α 、TNF- α 生産量—
それぞれ左から、大腿頭骨 (n=53)、滑膜 (n=29)、
患者末梢血 (n=46)、健常人末梢血 (n=22)。

血から樹立したTCLによるTNF- α 産生量は、滑膜及び健常人末梢血と比較して有意に高値でありました。

次に、血漿中のこれらのサイトカインの値を、RDC11例、RA11例、変形性股関節症4例、健常人23例において比較検討いたしましたところ、RDC患者におけるIL-6、IL-1 α 、TNF- α の値は変形性股関節症、健常人と大差なく、またRAと比較して有意に低値でありました。

(図4) この結果から、RDCはRAのような全身性の免疫疾患とは異なり、そのサイトカイン産生量の増加は、股関節局所に限局していると考えられます。

実際に血漿中と関節液中のサイトカイン値を比較してみますと、関節液中のIL-6は、血漿と比較して有意に高値でありま

した。

〔考 察〕

今回行いましたTCLを用いた実験におきましては、果たしてin vitroにおいて樹立されたTCLがin vivoにおける機能を反映しているのかといったことが問題になるかと思えます。他の疾患における同様の手技を用いた研究で、例えば癌病変の局所から樹立されたTCLはMHC拘束性及び癌特異的に抗腫瘍活性を發揮します。川崎病患者の末梢血から樹立されたTCLは、血管炎誘導作用を持つTNF- α を産生しております。Bechet病の眼房水から樹立されたTCLは、好中球走化因子であるIL-8を産生しております。また、HTLV-1ブドウ膜炎の眼房水から樹立されたT

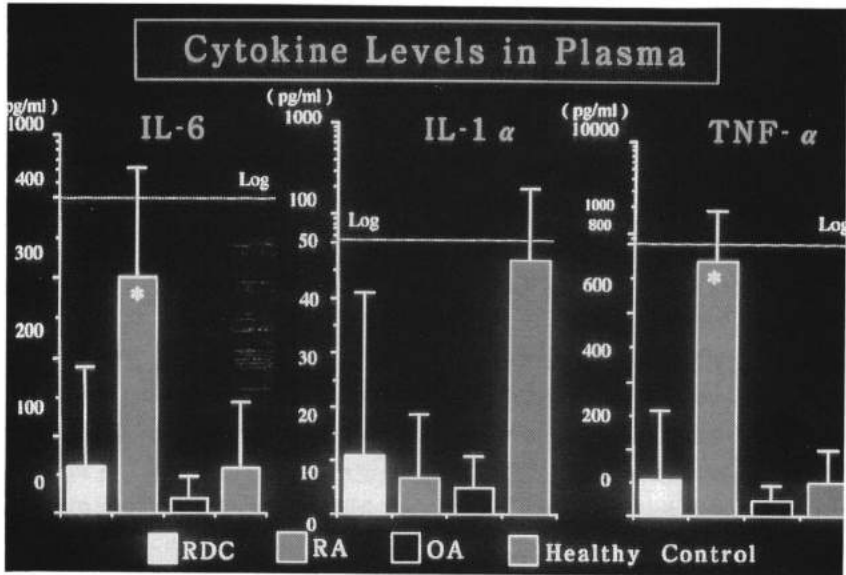


図4 血漿中のサイトカイン値

それぞれ左から、RDC (n=11)、RA (n=11)、OA (n=4)、健常人 (n=23)

CTLは、さまざまな炎症惹起性サイトカインを多量に産生しております。このように限界希釈法により、in vitroにおいて樹立されたTCLは、その機能を保持していると考えられ、その疾患の病態を反映しているものと思われます。

このような観点から、RDCにおいては、局所のT細胞によるIL-6、IL-1 α といった破骨細胞活性化サイトカインの産生がその特徴であると考えられ、これらのサイトカインが破骨細胞を活性化することにより、RDCの発症に関与している可能性が示唆されました。

〔謝 辞〕

最後になりましたが、この研究のために貴重な献体をご提供くださいました、和歌山医大の玉置教授、奈良県立医大の大根田講師、奈良県御所済生会病院の庄野先生、熊本整形外科病院の坂口先生、久留米第一病院の田平先生、社会保険田川病院の金江先生に心よりお礼申し上げますとともに、研究を直接ご指導くださいました井上明生教授、免疫学講座伊東恭悟教授にも深謝いたします。

ご清聴ありがとうございました。

＜ 討 論 ＞

〔伊丹〕 どなたか、サイトカインにつきましてご質問、ご討論、ございませんでしょうか。

〔林〕 昭和大学藤が丘の整形の林です。お聞きしたいのですけれども、最初に、PCRでメッセージ材料を確認していましたが、あれでIL-8の提示もあったと思うのですが、先生のご研究で、IL-8も単独レベルでも上がっているのですか。

〔玉井〕 実際の産生量を見てみますと、IL-8とそのほかにIFN- γ も調べていますけれども、それぞれの群においては、部位別には有意差は認められていません。

〔林〕 もう一つお聞きしたいのは、組織ですけれども、組織で先生がやられているようなIL-1とかIL-6が免疫センサーでT細胞に染まってくるのでしょうか。

〔玉井〕 実際にそれをやってみようと思ったのですが、あいにくホルマリン固定標本しかありませんで、なかなかうまく染まらず、いずれ固定方法を変えてやってみようかと思っておりますが、まだ確認はしておりません。

〔増原〕 大阪大学整形外科の増原です。非常に興味深い研究を続けておられると思うのですが、今お聞きした範囲では、これはRDCですので、かなり骨頭臼蓋の破壊が進んだ、その時点でのすべて標本というふうに解釈させていただいてよろしいですね。ですから、血清は今のご検討のとおり難しいようですので、なかなか大変とは思いますが、例えば臼蓋骨頭側の軟骨がすつとなくなってしまったような時点で、関節液であるとか、あるいは難しいと思いますが、骨髄血をとられて、その時点で果たして今言われたような病態が最初からあるのかということについてご検討していただいたら、かなり興味深いかなという気がするのですが、

〔玉井〕 ぜひ機会がありましたらやってみたいと思います。

〔増原〕 今検討されておられるのはかなりレイトステージというような感じですね。

〔石黒〕 名古屋大学整形外科の石黒です。非常に興味深い研究だと思うので、ちょっと教えていただきたいのですが、先生、末梢血と局所では、T細胞のクロナリティーがどうも違いそうだということの結果として言いたかったのだと思うのですが、そのクロナリティーについて何か検討されているのでしょうか。

〔玉井〕 実際この後、T細胞リセプターのクロナリティーを検索して、それがどのようになっているかというのをやってみる予定だったのです。ちょっと時間がなくて、今回間に合いませんでしたので、いずれ機会がありましたらやってみたいと思っています。

〔石黒〕 それは最終的に特異的なものをとらえている可能性があるというふうにお考えでしょうか。それとも、さっき阪大の先生が言われたように、要するに事後処理みたいな感じなのか。

〔玉井〕 期待としてはT細胞リセプターのクロナリティーがモノクロナルであって、特異的なものをとらえて、そういった反応が起こってというふうに持っていきたいのですが、それに関しては何とも言いかねます。

〔石黒〕 もしも、ここから先は全くスペキュレーションだと思うのですが、先生のインプレッションとして、では、もしそのクロナリティーが特異的なものだとすると、RDCで何をとらえているのでしょうか。

〔玉井〕 それはわかりません。

〔石黒〕 そのRDCの病態論になりますね。要するに特別なものができるという考え方になりますと。それは何も今のところわかっていないと。

〔玉井〕 全くわからない状態です。

〔伊丹〕 どうもありがとうございました。