

人工関節のゆるみとサイトカインに関する研究

北海道大学医学部整形外科

鈴木 孝治

[伊丹] 午後の部に入りまして、「研究助成金による研究成果報告」をお願いしたいと思います。

まず最初に、人工関節のゆるみとサイトカインに関する研究を、北大の鈴木孝治先生にお願いします。

[鈴木] 人工関節において避けることができない主な合併症として、感染、脱臼、Aseptic Loosening が挙げられる。

Aseptic Loosening は、人工関節の長期成績を悪化させる最大の要因で、ゆるみを起こした関節の周囲組織には、HDPを中心としたparticle wear debrisが多数観察され、また、これらがマクロファージ系の細胞に貪食されている事実より、マクロファージが骨吸収活性を持つサイトカインを反応性に放出し、ゆるみのイニシエーターの1つとなっていることが推測される。これら液性因子の中には、interleukin-1とか、prostaglandin E2、tumor necrotising factorなどが報告されている。

マクロファージ遊走阻止因子（以下MIF）は初めlymphokineとして発見され、マクロファージの機能に多くの影響を与えることが報告された。その作用として、炎症部位からマクロファージの遊走を防ぐ、接着性を亢進する、NOの産生を刺激する、抗菌、抗腫瘍活性を増すなどで、今日ではマクロファージの主要な活性化因子の1つとして認識されつつある。人工関節のゆるみのメカニズムにおいて、マクロファージが活性化状態にあることは極めて重要と思われるが、これまでゆるみの組織において、こうした活性化因子の検討は余りなされていない。

Macrophage Migration Inhibitory Factor(MIF)

- 1) Tcell より生産されるリンフォカインとして発見
 - 2) マクロファージの機能を修飾
 - ・炎症部位からのマクロファージ遊走を防ぐ
 - ・接着性
 - ・monophosphate oxidation
 - ・抗菌・抗腫瘍活性
- マクロファージを潜在的に活性化

本研究では、MIFがゆるみ組織において検出されるか否か、ほかのサイトカインのごとく、particleの貪食がMIFの分泌を促すかどうか、また、貪食、骨吸収においてMIFのなす役割があるかどうかについて検討した。

<方法>

ゆるみ人工関節の再置換術時に得られた症例の再生関節包滑膜及び骨セメント間の膜様組織を用いて、免疫組織染色及びRT-PCR法によって、組織のMIFとそのmRNAを検出した。また、マクロファージ様細胞株であるRAW256.7を用いて、in vitroの実験を行った。MIFの骨吸収については、マウスの骨髄を用いて検討した。

免疫染色の方法を簡単に示すと、新鮮凍結組織をcryostatを用いて、6μm厚に薄切し、アセトン固定後、10%正常ヤギ血清にて非特異結合をブロックし、ヒトMIFポリクローナル抗体による一次抗体反応後、内因性プロキシターゼを0.6%のH₂O₂でブロックして、ビオチン化したヤギ抗ウザギIgG及びABC複合体によって順次反応させて、DA

B染色によってABC結合部位を可視化して、ヘマトキシリンで対比染色を行った。

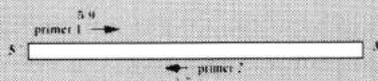
Immunohistochemical Staining

- 1) 6 μ m cryostat section
- 2) Fix with acetone and treat with goat serum
- 3) Add anti-human MIF polyclonal antibody
- 4) 0.6% H_2O_2
- 5) Add biotinized anti-rabbit IgG
- 6) Streptavidin-biotin-immunoperoxidase complex
- 7) Visualize by DAB staining

RT-PCR法は、再置換手術時に得られた各組織及び対照として、膝の腫瘍の際得られた正常の股関節の滑膜、及び変形性関節症の股関節滑膜より全RNAを抽出して、2 μ gのRNAより random primer を用いて相補的DNAを逆転写した。ヒトMIFの塩基配列に相当する5'及び3'末端のヌクレオチドをプライマーとして、94度1分の変性、53度2分のアニーリング、72度1分の伸展を30回繰り返して得られたPCR産物を電気泳動した。115basepairに泳動されるbandがMIFに相当することになる。

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

1) Primers



Primer 1 : 5'-CCATAAGCCGAGTTCATGTAACA-3'
Primer 2 : 3'-GCCGTTCGGCCGTGTCATGTG-5'

2) Amplification

変性	94	1min
アニーリング	53	2min 30cycles
伸展	72	1min

in vitroの実験として、マウスマクロファージ様細胞核のRAW 264.7を 3×10^6 に調整、3時間後、非付着細胞を除去、蛍光

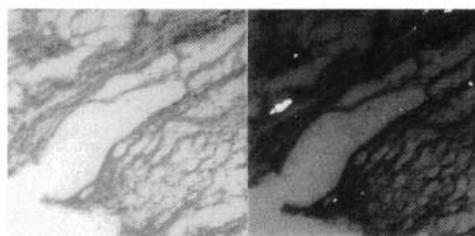
標識した latex beads を各濃度加え、12時間培養後、上清のMIF濃度をELISA法にて測定した。また、同様の条件下で、time course をとって、その放出を見た。また、phagocyte されていることについては、FAC Scan を用いて検討した。

in-vitro experiment

- RAW264.7
 3×10^6 /dish
 Change medium after 3 hours
 Add various doses of latex beads
 → Examine phagocytosis by FAC Scan
 → Measure MIF by ELISA
 Add various doses of MIF
 → Examine phagocytosis by MIF
 → Examine phagocytosis by FAC Scan

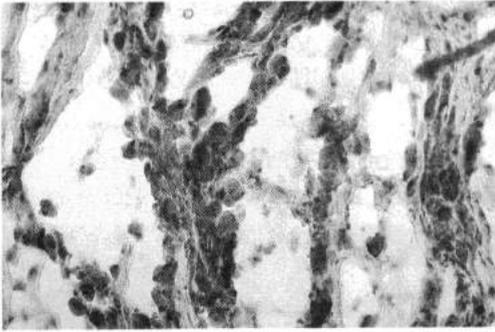
<結果>

免疫染色では、検討した6例全例で、MIFの陽性所見が得られた。偽滑膜は、茶褐色に結節状に染まっている部分がMIFの抗体に対する反応陽性部位で偏光顕微鏡で、poly ethylene wear が存在していることが判る。

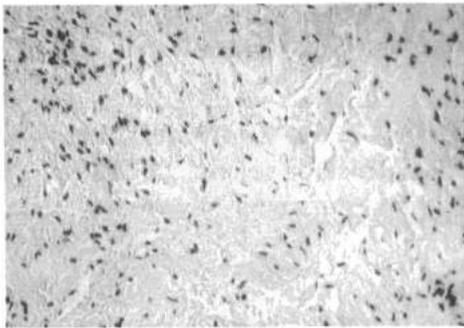


Positive staining in the synovium-like membrane

強拡大した像では、比較的円形の細胞の胞体内に選択的に染まっていることが観察された。連続切片をマクロファージ様細胞に特異的な抗CD68モノクローナル抗体で染色すると、反応陽性部位は、MIFにおけるそれとほぼ一致していて、MIF陽性細胞はマクロファージ系の細胞が主である。



一方、間質系の細胞では、染色は認められなかった。

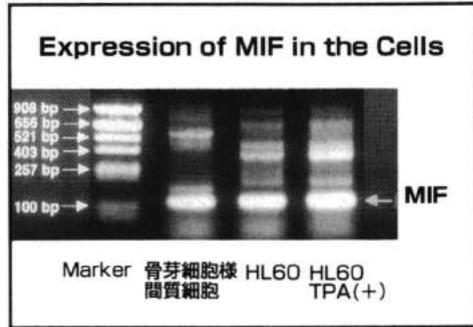


RT-PCRによる各種組織におけるMIF mRNAの発現を示す。MIFのメッセージRNAに相当する115 base pair付近にbandの出現が認められ、特に偽滑膜においては、対照として用いた正常やOA滑膜より明らかに強く出現していることがわかる。

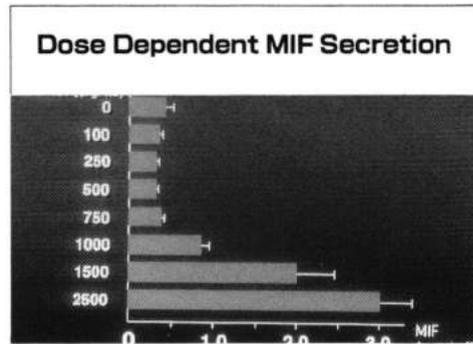


細胞におけるMIF mRNAの発現を検討した。HL60は、ヒト急性前骨髄性白血病由来の単球細胞核で、TPA刺激によってマクロファージ様細胞へと分化する。いずれにおいても、MIF mRNAが発現しており、また

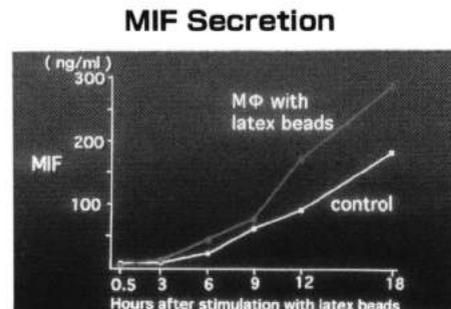
calvariawy得られた骨芽細胞様間質細胞においても、発現が認められた。



ポリスチレン製の latex beads で刺激したRAW264.7から放出されたMIFの培養上清中の濃度を示す。1000 μ g/ml以上の濃度のbeadsによってMIFの放出が増加されることがわかる。

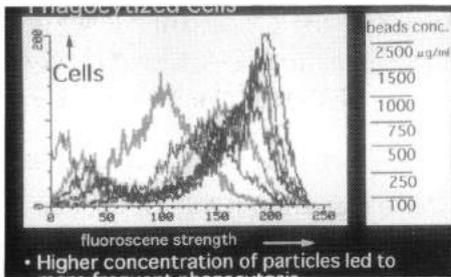


2,500 μ g/mlのbeadsですると、上清中のMIF濃度は経時的に増加してきた。コントロールでも濃度の増加が認められるが、刺激した方が明らかに増加が著しいことがわかる。



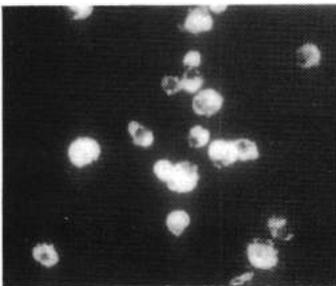
このとき同時に細胞を回収して、FAC Scanによって各細胞集団の蛍光強度を比較した。縦軸が細胞数でして、横軸は核細胞集団の傾向強度をあらわしている。加えられたdoseが多いほど、蛍光強度が高い。つまり、右方に行っていることがわかる。即ち、たくさんの細胞を貪食していると、fluorescenceが強くなり右方に行くので、少ない濃度では左方にあるピークが濃度の濃いbeadsで培養すると、右側の方に移動していく。

FACScan Analysis of Particulate Phagocytized Cells



なお、このときの細胞の状態をを観察すると、胞体内部にbeadsを取り込んでいることがわかる。

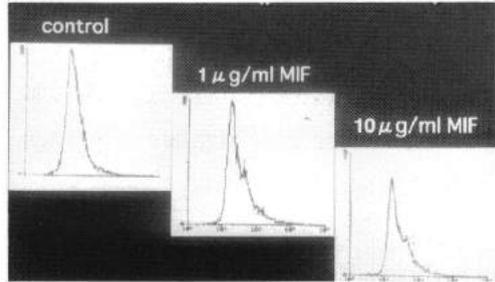
Macrophages with Latex Bead



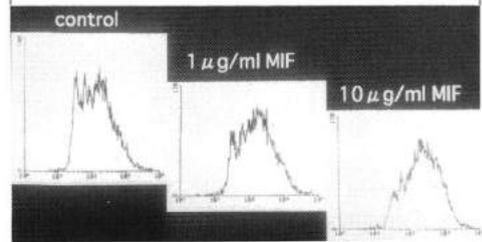
次に、exogenousに添加したMIFが、細胞の貪食能に影響するか否かをFAC Scanにて検討した。前処置20分を行い検討したが、蛍光が右方にある細胞が若干増加したように見える。特に、10 μgで、蛍光強度が強くなった。

前処理120分では、蛍光が左方にある細胞が減少している。10 μg/mlの刺激でピークの左方への移動が明らかに認められる。

Effect of MIF on Phagocytosis of Latex Beads(pretreat 20 min)



Effect of MIF on Phagocytosis of Latex Beads(pretreat 120 min)

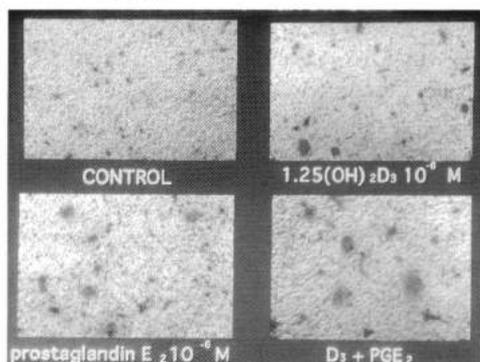


続いて、マウスの頭蓋冠由来の骨芽細胞の上に、脛骨から採取した骨髄細胞を共存培養して、酒石酸耐性酸フォスファターゼ陽性の多核細胞の形成について検討した。ビタミンDやPGE2を加えると、多核細胞が形成された。

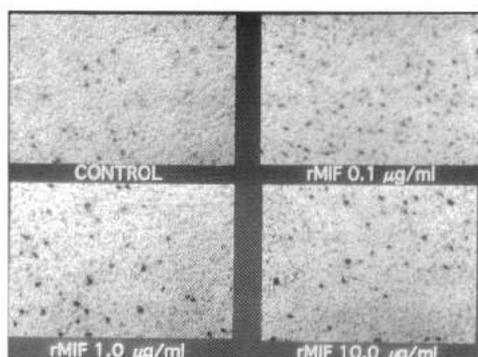
同じ系にヒトの recombinant MIFを加えて検討したが、貪食の際に効果が認められた10 μg/mlまで加えても、変化は認められなかった。

破骨細胞と思われる多核細胞を象牙切片の上に培養して、MIF及びMIFの抗体を加えて骨吸収に変化があるかどうかを検討してみたが、加えた濃度では変化は認められなかった。以上より、MIFが骨吸収系の細胞に作用があるとは言えなかった。

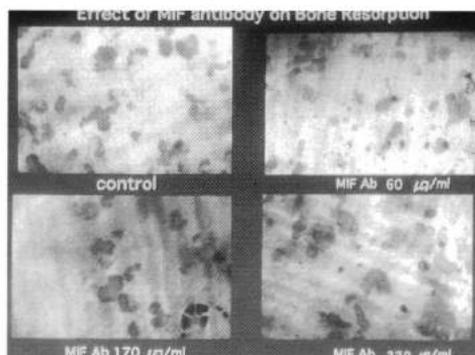
Effect on Bone Marrow Cells



Effect of MIF on Bone Marrow Cells



Effect of MIF antibody on Bone Resorption



<考 察>

MIFはこれまでリウマチの滑膜、炎症皮膚の毛細血管、ニワトリの胎児のレンズなどで存在が報告され、その役割は、慢性炎症や細胞性免疫との関連において論じられてきた。

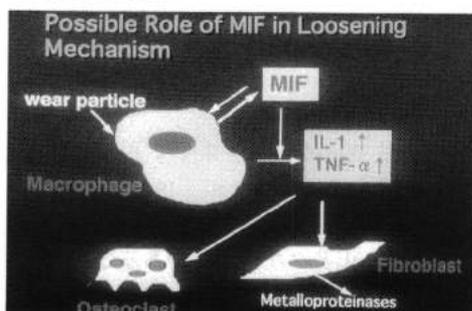
これまでにはMIFを産生する細胞はTcellのみと考えられていたが、1994年、Bucalaらは、マクロファージがMIFの標的であると同時に、重要な産生細胞であることを示しており、我々の研究でも、ゆるみ組織におけるMIF陽性細胞は、主にマクロファージであると思われる。

1992年、Poztweiserらは、ヒト抹消血単球をMIFで刺激すると、TNF α 、インターロイキン1 β が分泌されることを報告しており、これらがサイトカインのゆるみにおいて重視されている炎症性サイトカインであることを考えると、興味深い。

以上のことから、ゆるみにおいて、MIFがいかなる役割をしているかということはまだはっきりわかってはいないが、その標的細胞としてマクロファージ自身、破骨細胞や繊維芽細胞などを考えて検討している。今回の実験では、マクロファージ自身に作用するということはわかったが、これまでのdataでははっきり破骨細胞に作用したとは言い切れなかった。

MIFからみたゆるみのメカニズムを考えると、図のようになる。wear particleがマクロファージによって貪食されると、マクロファージがMIFを産生し、そのMIFは、マクロファージに作用して、インターロイキン1とかTNF α の分泌を促進するのではないか。産生されたMIF自身が、パロクラインあるいはオトクライン的に局所にあるマクロファージを刺激して、wear particleの貪食を促すということで、悪循環となって、ここで産生されるインターロイキン1とかTNF α が、破骨細胞や繊維芽細胞に働いて、骨吸収に起こると推測している。MIFがインシエーターとして、これらのサイトカインのネットワークに絡んでいる可能性がある

Possible Role of MIF in Loosening Mechanism



考えている。

<結論>

①人工関節置換術の際に得られた組織にMIFが存在し、産生されていることが、免疫染色とRT-PCR法によって示された。②マクロファージの培養細胞は、パーティクルの貪食とともにMIFを産生することが明らかとなった。③MIFが貪食を促すことにより、ゆるみの機序のイニシエーターの1つと考えられた。しかし、MIFの骨吸収への関与は明らかにはならなかった。

ありがとうございました。

<討論>

〔伊丹〕ありがとうございました。

大変いいチャンスですから、この機会に、ゆるみとサイトカインについてちょっと質問しておきたい、お尋ねになりたい方がありましたら。

〔三枝〕神戸大学の三枝と言いますが、RT-PCRで、リビジョンの組織の方が多いということでしたけれども、マクロファージの数は検討されていますでしょうか。

〔鈴木〕先生のご指摘は、組織の中にある cell population が異なることによって、MIFの生産が変わるのではないかということですけれども、それを否定することはできません。基本的には、組織も内側の層を割くようにして取ってきていますから、滑膜の内膜の方に存在するマクロファージ系の細胞が多いとは思いますが。

〔田中〕近畿大学の田中です。インターロイキンや、TNF α がMIFによって出てきたというデータはお持ちではないですね。

〔鈴木〕MIFで、インターロイキンが増えるか否かを組織より得た細胞で調べる予定です。

〔伊丹〕ありがとうございました。これで終わりたいと思います。どうもありがとうございました。