

関節リウマチの滑膜マクロファージにおける最終糖化産物受容体 (RAGE) の発現亢進

砂堀克枝^{a,c*}, 山村昌弘^b, 山名二郎^c, 高杉幸司^c, 横野博史^c

^a岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学, ^b愛知医科大学 リウマチ科,
^cハーバード大学ベイスラエル病院 リウマチ科

キーワード：関節リウマチ (RA), 最終糖化産物受容体 (RAGE), マクロファージ, HMGB-1, S100A12

緒言

RAGE (receptor for advanced glycation endproducts) は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜型受容体で、最終糖化産物 (AGE; advanced glycation endproducts) の受容体として同定された。糖尿病や動脈硬化性病変では、VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule-1) などの接着分子の発現を誘導し、血管内皮細胞の増殖の促進、動脈硬化部位での発現増強などが報告されており、これらの酸化ストレスを伴う慢性炎症性疾患での病態に関与する可能性が示唆されている^{1,2)}。

また、RAGE は、multi-ligand receptor として認識されており、内因性の物質として、主に単球、好中球の細胞質に存在し Ca-binding protein family に属する

EN-RAGE (extracellular newly identified RAGE binding protein; S100A12, calgranulin C, p6), 全ての細胞の核内に存在し、敗血症性ショックなどで後期メディエーターとして認識されている HMGB-1 (high mobility group box chromosomal protein-1) などリガンドとされている³⁾。関節リウマチ (RA) の関節液及び血清では、疾患活動性に伴い、AGE⁴⁾のみならずこれらの内因性リガンド^{5,6)}が上昇するとの報告があり、RAGE を介して RA における慢性炎症の持続に関与している可能性がある。

今回、我々は RA 滑膜及び末梢血単球における RAGE の発現について検討を行った。

対象と方法

1. 対象

RA 患者14人 (男性1人, 女性13人; 平均年齢63.0歳), 変形性関節症 (OA) 7人 (男性1人, 女性6人; 平均年齢68.3歳)。

2. 免疫染色

RA または OA 滑膜に抗 CD68 抗体 (マウス IgG1), ポリクローナル抗 RAGE 抗体 (ヤギ) を反

平成19年9月受理

*Department of Rheumatology, Beth Israel Deaconess Medical Center 4 Blackfan circle, HIM-238, Boston, MA02115
電話: 617-667-0765 FAX: 617-975-5299
E-mail: ksunahor@bidmc.harvard.edu

プロフィール



砂堀 克枝

平成12年、岡山大学医学部卒、同年岡山大学第三内科 (現腎・免疫・内分泌代謝内科学) 入局及び岡山大学大学院医学研究科 (内科学第三講座) 入学。呉共済病院での初期研修終了後、横野博史教授、山村昌弘助教授 (現愛知医科大学リウマチ科教授) の指導の下、関節リウマチにおける最終糖化産物受容体 (RAGE) およびそのリガンド蛋白に関する研究に従事する。同研究内容は、2004年、2005年のアメリカリウマチ学会にて発表、2006年 Arthritis & Rheumatism に投稿され、2006年3月、岡山大学大学院を卒業し、学位を取得した。

2006年3月に、アメリカサンタフェで行われた Clinical Immunology Society (CIS) 主催の2006 Spring School on Systemic Autoimmune Diseases に参加。同研究内容を発表した際、議長として参加されていた現ハーバード大学ベイスラエル病院リウマチ科 George. C. Tsokos 教授の講演を拝聴する機会を取得し、この会が縁となり、2007年4月より、同科の research fellow として留学中である。

応させた後、ロダミン-抗ヤギ抗体、FITC-抗マウス IgG1 抗体の二次抗体で染色した。RAGE 及び CD68 陽性マクロファージの面積を OPTIMAS ソフトウェアで測定し、相対的発現を解析した。

3. 末梢血単球の分離

健康成人より採取した末梢血より比重遠心法により分離した末梢血単核細胞 (PBMC) を、抗 CD3, CD7, CD16, CD19, CD56 及び CD123 抗体磁気ビーズを用いたネガティブ・セレクションで単球を分離した。

4. RNA の抽出とリアルタイム PCR

RA 滑膜細胞を抗 CD14 抗体免疫ビーズおよび抗 CD4 抗体免疫ビーズで分離し、RT-PCR 法及びリアルタイム PCR 法により RAGE mRNA の発現レベルを半定量化した。OA 滑膜全細胞、ヒト大動脈内皮細胞 (HAEC) 及び RA 関節液中の全細胞についても mRNA の発現を検討した。

RA 線維芽細胞を TNF- α (10ng/ml), IL-1 β (1 ng/ml), 72時間後回収した RA 滑膜全細胞培養上清 (20%希釈) で3時間刺激し、RNA 抽出後、RT-PCR 法にて RAGE mRNA の発現を検討した。

健康成人末梢血単球を、各々 TNF- α (10ng/ml), IL-1 β (1 ng/ml), IFN- γ (1 ng/ml), IL-10 (10ng/ml) 及び RA 滑膜全細胞培養上清 (20%希釈) で3時間刺激、RAGE mRNA の発現量をリアルタイム PCR 法で検討した。

5. フローサイトメトリー

健康成人末梢血単球を無刺激あるいは RA 滑膜全細胞培養上清 (20%希釈) 存在下で24時間培養した後に回収した。抗 RAGE 抗体で染色し、洗浄後 FITC-抗ヤギ抗体で染色し、FACScan を用いて細胞表面上の発現を測定し、上清による誘導を検討した。

結 果

1. RA 滑膜における RAGE 発現の増強とその分布

RA では OA と比較し、滑膜組織における RAGE の発現が増強しており、血管内皮細胞と滑膜表層の CD68陽性マクロファージでの強い発現が特徴的であった (図 1 A)。RAGE 陽性細胞の面積は、滑膜組織全体における比率、CD68陽性細胞における比率とも、RA で有意に大きかった (図 1 B)。

2. RA 滑膜組織の RAGE mRNA 発現検討

滑膜細胞の RAGE mRNA の検討では、OA と比較

して、RA で発現が亢進しており (図 2 A), 特に CD14 陽性マクロファージで高発現を認めた (図 2 B)。線維芽細胞では、炎症性サイトカインによる刺激を加えても、有意な RAGE mRNA の発現亢進を認めなかった (図 2 C)。

3. サイトカイン及び RA 滑膜細胞上清刺激による末梢血単球上の RAGE 発現の誘導

末梢血単球表面の RAGE の発現は RA 滑膜全細胞の培養上清で刺激することにより誘導され (図 3 A), RAGE mRNA の解析では炎症性サイトカインである TNF- α や IL-1 β による刺激で発現が増強された。IL-10によっても発現が軽度増強された (図 3 B)。

考 察

従来の報告より、RAGE は多様なリガンドと結合し、NF- κ B や MAP キナーゼを介して VCAM-1, ICAM-1 などの接着因子や炎症性サイトカインであ

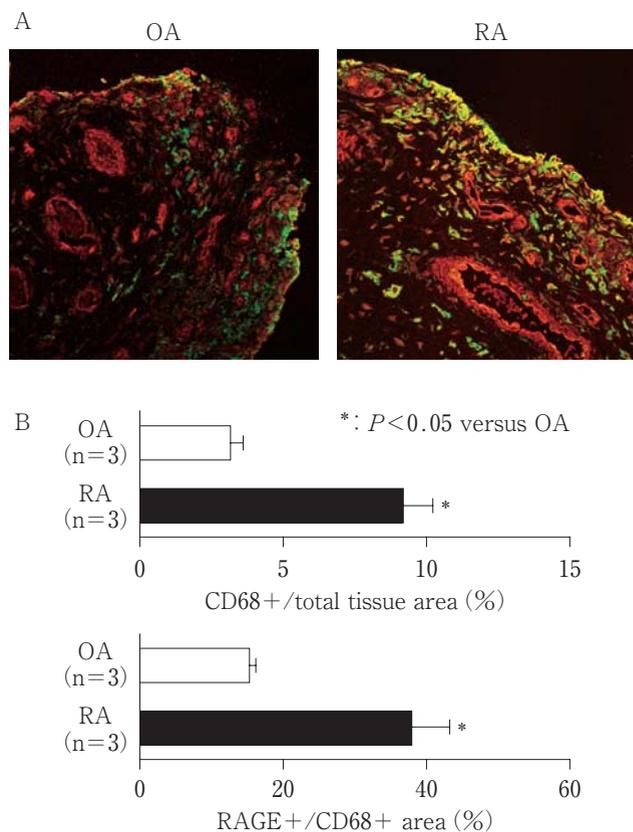


図1 関節リウマチ滑膜における RAGE の発現
A: 関節リウマチ (RA) と変形性関節症 (OA) の滑膜組織を抗 CD68抗体 (FITC: 緑) 及び抗 RAGE (Rhodamin: 赤) 抗体で二重染色した。
B: RAGE 陽性細胞及び CD68陽性マクロファージの面積を OPTIMAS ソフトウェアで測定し、相対的発現を解析した。

る TNF- α 、IL-1 β の発現誘導が起こることが知られている⁷⁾。また、RAGE 遺伝子の promoter 領域には少なくとも二つの NF- κ B 結合部位があることから、NF- κ B を活性化する因子は RAGE 発現を誘導する因子となりうる⁸⁾。糖尿病の血管障害やアルツハイマー病では RAGE リガンドが蓄積した病変部に RAGE の発現亢進を認め、RAGE リガンドが RAGE 発現を誘導する主要な因子とされる。

RA の滑膜ではリンパ球やマクロファージなど多様な細胞が浸潤し、病変部では多くの炎症性サイトカインの過剰発現を認める。特に、TNF- α と IL-1 β は慢

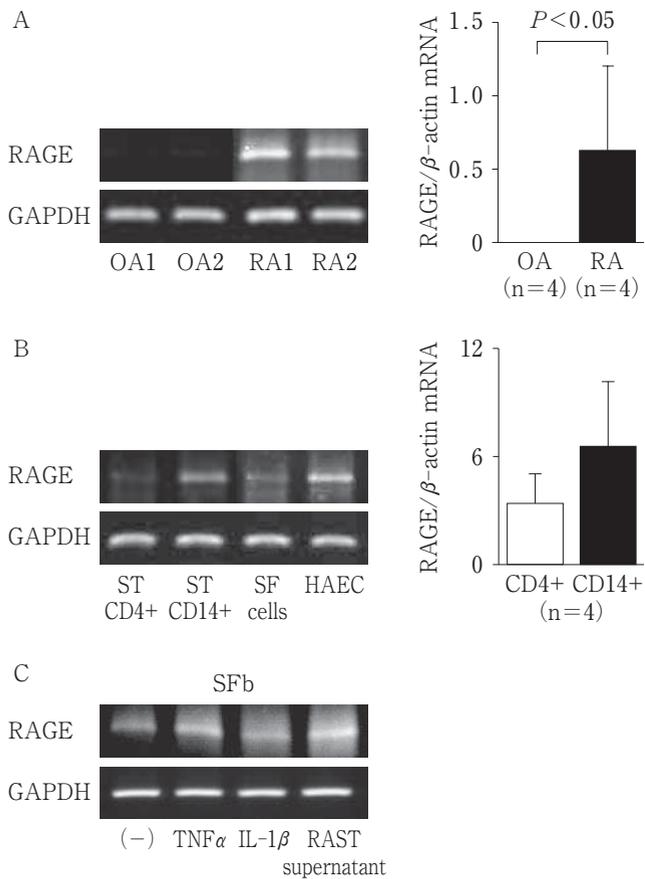


図2 関節リウマチ滑膜における RAGE mRNA の発現
 A：RA 及び OA 滑膜組織より RNA を分離し、RAGE mRNA の発現レベルを RT-PCR 法で確認し、リアルタイム PCR 法により半定量化した。
 B：RA 滑膜 (ST) 中の CD4 陽性 T 細胞、CD14 陽性単球系細胞 (免疫ビーズ法で分離)、RA 関節液中の全細胞 (SF cell) 及びヒト大動脈内皮細胞 (HAEC) についても、同様の方法で RAGE mRNA の発現レベルを解析した。
 C：RA 線維芽細胞 (SFb) を TNF- α (10ng/ml)、IL-1 β (1 ng/ml)、72 時間後回収した RA 滑膜全細胞培養上清 (20% 希釈) で 3 時間刺激し、RNA 抽出後、RT-PCR 法にて RAGE mRNA の発現を検討した。

性炎症と関節破壊に密接に関与するサイトカインである⁹⁾。これらのサイトカインは NF- κ B などの炎症性シグナルを活性化することで、RAGE の発現を増強し、また HMGB-1 をはじめとする内因性リガンドを細胞外に放出させることで、リガンドによる RAGE の活性化を増強するものと考えられる⁶⁾。また、滑膜の血管内皮上の RAGE 発現も亢進していることから、発現誘導された接着因子はさらにマクロファージ等の細胞浸潤を増強し、炎症の持続につながるものと考え

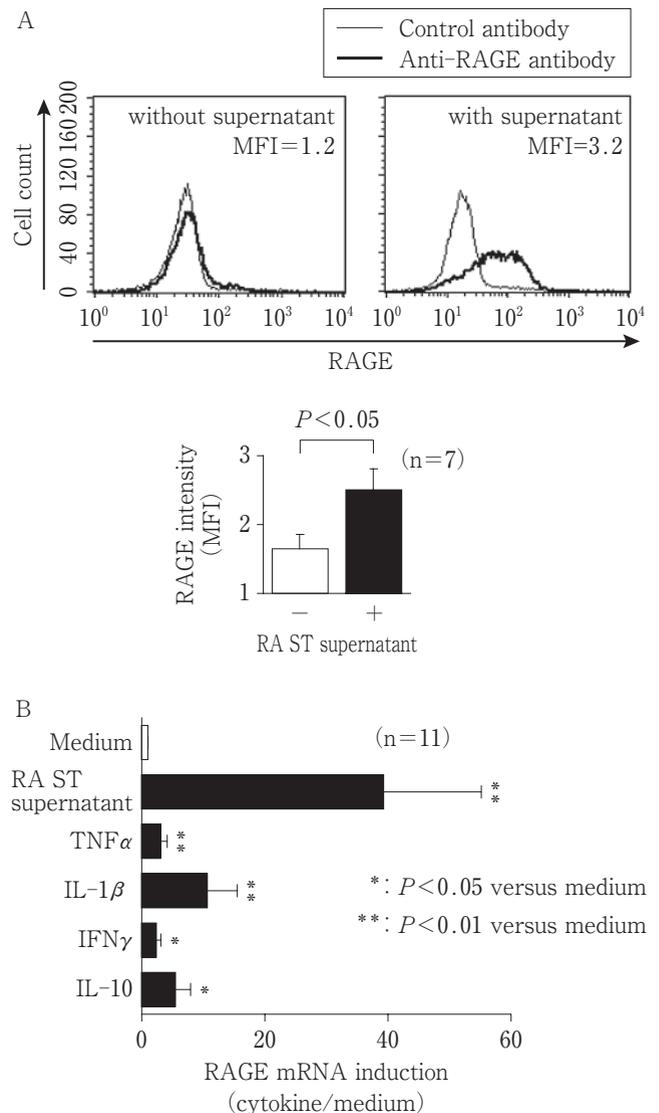


図3 単球/マクロファージ上の RAGE の発現誘導
 A：健康成人末梢血単球を RA 滑膜全細胞培養上清 (20% 希釈) で 24 時間刺激し、細胞表面上の RAGE 発現を FACS 法にて解析した。
 B：健康成人末梢血単球を、TNF- α (10ng/ml)、IL-1 β (1 ng/ml)、IFN- γ (1 ng/ml)、IL-10 (10ng/ml) 及び RA 滑膜全細胞培養上清 (20% 希釈) で 3 時間刺激、RAGE mRNA 発現をリアルタイム PCR 法により半定量化した。

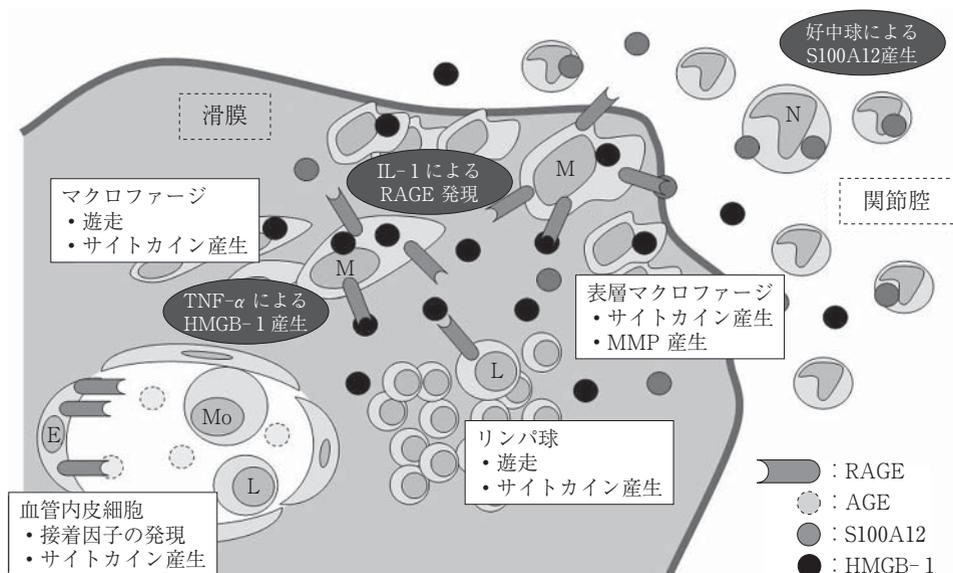


図4 RAGE-RAGE リガンド系と関節リウマチの病態
E：血管内皮細胞，L：リンパ球，Mo：単球，M：マクロファージ，N：好中球

られる (図4)。

我々の検討では TNF- α などの炎症性サイトカインだけではなく、抗炎症性サイトカインである IL-10も末梢血単球における RAGE の発現を誘導した。我々は、IL-10は Toll 様受容体 2 (TLR2) を強発現した CD16陽性成熟マクロファージへの分化を促進することを報告しており¹⁰⁾、向炎症性作用も持つサイトカインと考えている。RAGE の発現に関しては向炎症性に作用し、炎症の増幅に関与しているものと思われた。

結 論

RA では、炎症性サイトカイン及び RAGE のリガンドが豊富に存在する滑膜、関節腔内において、血管内皮細胞及び滑膜表層マクロファージ上の RAGE 発現の亢進を認めた。RAGE-RAGE リガンド系と炎症性サイトカイン間には正のフィードバック機構が存在し、RA の炎症過程を促進することが推察された。

謝 辞

この研究に関して、臨床検体の供与をはじめ、ご指導ご鞭撻賜りました岡山大学整形外科教室、西田圭一郎先生、阿部信寛先生にこの場をお借りして深謝致します。

文 献

1) Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM: The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin*

Invest (2001) **108**, 949-955.

- 2) Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, et al.: Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res* (1999) **84**, 489-497.
- 3) Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, et al.: Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem* (1992) **267**, 14987-14997.
- 4) Miyata T, Ishiguro N, Yasuda Y, Ito T, Nangaku M, Iwata H, et al.: Increased pentosidine, an advanced glycation end product, in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and its relation with inflammatory markers. *Biochem Biophys Res Commun* (1998) **244**, 45-49.
- 5) Foell D, Kane D, Bresnihan B, Vogl T, Nacken W, Sorg C, et al.: Expression of the pro-inflammatory protein S100A12 (EN-RAGE) in rheumatoid and psoriatic arthritis. *Rheumatology, Oxford* (2003) **42**, 1383-1389.
- 6) Taniguchi N, Kawahara K, Yone K, Hashiguchi T, Yamakuchi M, Goto M, et al.: High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum* (2003) **48**, 971-981.
- 7) Basta G, Lazzarini G, Massaro M, Simoncini T, Tanganelli P, Fu C, et al.: Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation* (2002) **105**, 816-822.

- 8) Li J, Schmidt AM : Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem* (1997) **272**, 16498-16506.
- 9) Feldmann M, Brennan FM, Maini RN : Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* (1996) **14**, 397-440.
- 10) Iwahashi M, Yamamura M, Aita T, Okamoto A, Ueno A, Ogawa N, et al. : Expression of Toll-like receptor 2 on CD16+ blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* (2004) **50**, 1457-1467.