慈恵医大誌 2007；122：305-12.

関節リウマチの滑膜増生における結合組織成長因子（CTGF）の関与

伊　藤　吉　賢

東京慈恵会医科大学整形外科学講座

（受付　平成 19 年 9 月 6 日）

CONNECTIVE TISSUE GROWTH FACTOR INDUCES SYNOVIAL CELL GROWTH IN RHEUMATOID ARTHRITIS

Yoshitaka ITOH

Department of Orthopaedic Surgery, The Jikei University School of Medicine

The purpose of this study was to determine the role of connective tissue growth factor (CTGF) associated with inflammation and perpetuation of rheumatoid arthritis (RA). Synovial tissues used in this study were obtained at surgery from the knee joints of 8 patients with early RA (disease duration, less than 1 year; Steinbroker class 1) and 10 patients with advanced RA (disease duration, more than 5 years, Steinbroker class 3). The expression and localization of CTGF in the synovia of patients with various stages of RA were examined with immunohistochemical studies, *in situ* hybridization, and the real-time polymerase chain reaction. Furthermore, to determine the effects of CTGF on the growth of fibroblast-like synoviocytes (FLSs), FLSs cultured with recombinant (r) CTGF alone or with both rCTGF and anti-CTGF monoclonal antibodies were examined with the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt, assay. In early RA, both CTGF protein and CTGF mRNA were expressed at high levels in FLSs, vascular endothelial cells, and macrophages. However, in advanced RA, expressions was less prominent. The number of FLSs was significantly increased by rCTGF, and this effect was neutralized by anti-CTGF antibodies. These findings strongly suggest that CTGF promotes neovascularization and synovial-cell proliferation in RA and play an important role in the early stages of pannus formation.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2007; 122: 305-12)

Key words: connective tissue growth factor, vascular endothelial growth factor, synovial tissue, rheumatoid arthritis

I. 緒　　　言

関節リウマチ（RA）は全身の関節炎を主体とした慢性炎症性疾患であり，最終的には関節の骨・軟骨破壊を引き起こす．リウマチ発症早期に滑膜に見られる特徴的な変化としては，滑膜線維芽細胞の増殖，リンパ球を中心とした炎症性細胞浸潤，毛細血管の増生などがあげられる[1]．炎症細胞は接着分子の作用により毛細血管の内皮細胞に付着し，内皮細胞間を通り抜けて血管外に遊走し，活性化されて炎症を持続させる[2]．また，絨毛状に増殖した滑膜組織は炎症を含んだ肉芽組織（パンヌス）となり，マトリックスメタロプロテアーゼ（matrix metalloproteinases, MMPs）などの蛋白分解酵素を発現して関節破壊を引き起こす[3)-5]．RA の滑膜組織では様々なサイトカインや増殖（成長）因子が産生，活性化されており，CTGF も CCN ファミリーに属する新たな成長因子とし

て最近，注目されているが，その発現動態や機能についてはいまだ明らかにされていない[6)7)]．そこで今回は，血管新生および線維芽細胞増殖に関与するCTGFの発現とその役割を明らかにするために，免疫組織化学的方法にてCTGF蛋白，*in situ* hybridization，real time quantitative PCR法 にてmRNAの発現について解析した．さらにMTS assayを用いてCTGFの培養滑膜細胞の増殖に及ぼす影響についても併せて検討した．

II. 対 象 と 方 法

1. 患者

早期RA患者滑膜8例（発症1年以内，Steinblocker class 1），進行期RA患者滑膜10例（発症5年以上，Steinblocker class 3）を手術にて採取した．正常コントロールとして外傷患者滑膜5例を使用した．採取した滑膜の一部を4％パラホルムアルデヒドで固定した後，パラフィン包埋し薄切切片を作製，免疫組織染色および*in situ* hybridizationに使用した．また残りの滑膜は液体窒素ですみやかに凍結し，RNA抽出に供した．なお本人および家族に対し，研究の目的，方法を十分に説明し組織使用の同意を得た．

2. 免疫組織染色と発現の半定量的解析

Histofine Kit（Nichirei, Tokyo, Japan）を用いて作製した薄切切片の免疫組織染色（SAB法）を行った．一次抗体として，CTGF, TGF-β, VEGF, factor VIII, CD68のモノクロナール抗体（Nichirei, Tokyo, Japan）を使用し，DAB発色で検出した．標本を400倍で10視野鏡視して，滑膜表層および間質での発現を以下の5段階評価にて半定量した．0：全く染まっていないもの，1：わずかに染まっているもの（1-5％），2：まばらに染まっているもの（6-20％），3：中等度染まっているもの（21-50％），4：高度に染まっているもの（51-100％）[8)]．

3. *In situ* hybridization

オリゴヌクレオチド（CTGF：5′-TCT TCA TGC TGG TGC AGC CAG AAA GCT CAA ACT TGA TAG GCT TGG-3′）の3′にdigoxigenin（DIG）をラベルしたプローブを作製しMicroProbe staining system（Fisher Scientific, Pittsburgh, PA）を用いて*In situ* hybridizationを行った．発色にはmixed chromogen system（Stable Fast Red TR/Stable Naphtol Phosphate, Research Genetics）を使用した[9)-11)]．

4. Real-time quantitative PCR

凍結した滑膜組織からRNAをISOGEN（Nippon Gene, Tokyo, Japan）を用いて抽出した．得られたRNAにThermoScript RT（Invitrogen）とrandom hexamerを加えて逆転写反応を行い，cDNAを作製した．Primer Express software（ABI/Perkin Elmer Biosystems）を用いてreal-time quantitative PCR用のプライマーとプローブを設計した（forward primer 5′-CCT GTC CCT GCC ATT ACA ACT-3′；reverse primer 5′-TCT CTC ACT CTC TGG CTT CAT GC-3′；TaqMan Probe 5′ FAM-CGG AGA CAA TGA CAT CTT TGA ATC GCT G-TAMURA-3′）．ABI Prism 7700 detection system（ABI/Perkin Elmer Biosystems, Foster City, CA）を用いてreal-time quantitative PCRを行い，得られたcycle threshold value（C_T）よりCTGF mRNA量を求め，GAPDH mRNA量でサンプル間の補正を行った．

5. 滑膜組織の一次培養

手術によって無菌的に採取した膝関節滑膜をメスで細断し，10％ fetal bovine serum（FBS），antibiotics-antimycotic reagent, 1 mg/ml clostridial collagenase（Sigma, St. Louis, MO）入りのDulbecco's modified Eagle medium（DMEM；IWAKI, Funabashi, JAPAN）で一次培養した．2日後に細胞を遠心分離し，洗浄後DMEMで単層培養し，滑膜細胞様細胞（Fibroblast like synoviocytes, FLS）をえた．

6. 細胞増殖試験および阻害試験

FLSをϕ3.5 cm培養皿に5×10^4個播種し，無血清のDMEMで24時間培養後，様々な濃度のrCTGFを培地に添加し，rCTGFの至適濃度（30 ng/ml）を決定した．次いでFLSを3×10^3個ずつ96-well platesに播種し10％FBSを含むDMEMで24時間培養後，培地を交換し（① 0.5％ FBSと30 ng/ml rCTGFを含むDMEM，② 0.5％ FBSと30 ng/ml rCTGFおよび25 μg/ml anti-CTGF antibodyを含むDMEM，③

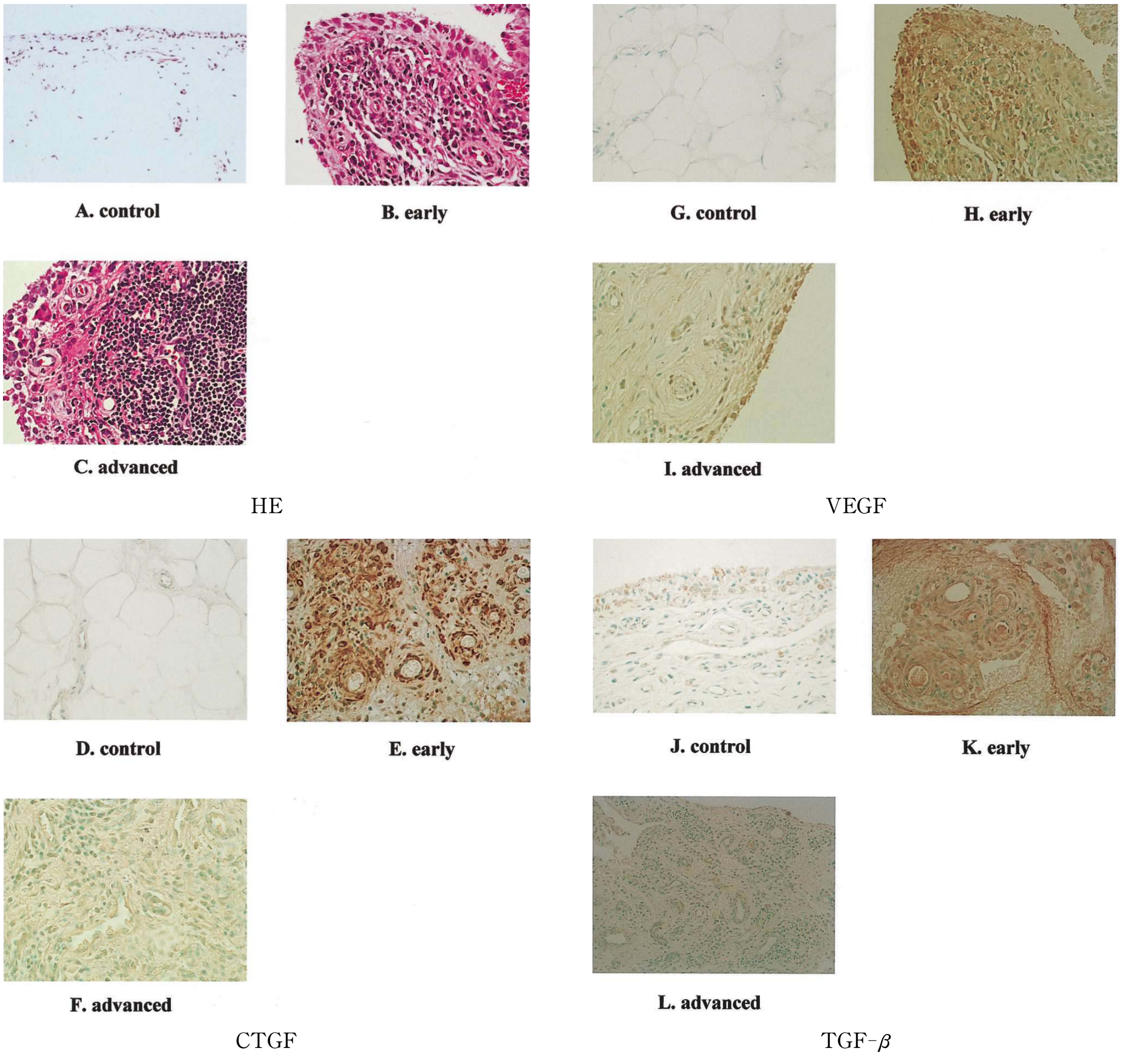

Fig. 1. Histological features and immunohistochemical analysis of growth factors in synovial tissues from normal control (A, D, G and J) and patients with RA in early stage (B, E, H and K) and those in advance stage (C, F, I and L). Hematoxylin-eosin (HE) stain (A through C). Immunolocalization of CTGF (D, E, F), VEGF (G, H, I) and TGF-β (J, K, L). CTGF was detected in FLS, macrophages and vascular endothelial cells in early stage (E), but not detected in normal control (D) and advanced stage of RA (F). VEGF was expressed on FLS and vascular endothelial cells more strongly in advanced stage (H) than in early stage (I). TGF-β was detected in FLS and macrophages in early stage (K) but not detected in normal control (J) and advanced stage (L). (Original magnification, ×100 in A through C and H through L; ×400 in D through G).

0.5% FBS と PBS を含む DMEM），さらに 3 日間培養後 CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation assay (promega) を用いて MTS assay を行い，rCTGF による細胞増殖および抗 CTGF 抗体による増殖阻害を検討した．

7. 統計分析

2 群間の有意差検定は，Mann Whitney's U-test を，3 群間の有意差検定には Student's t-test を用い $p<0.05$ を有意差ありとした．

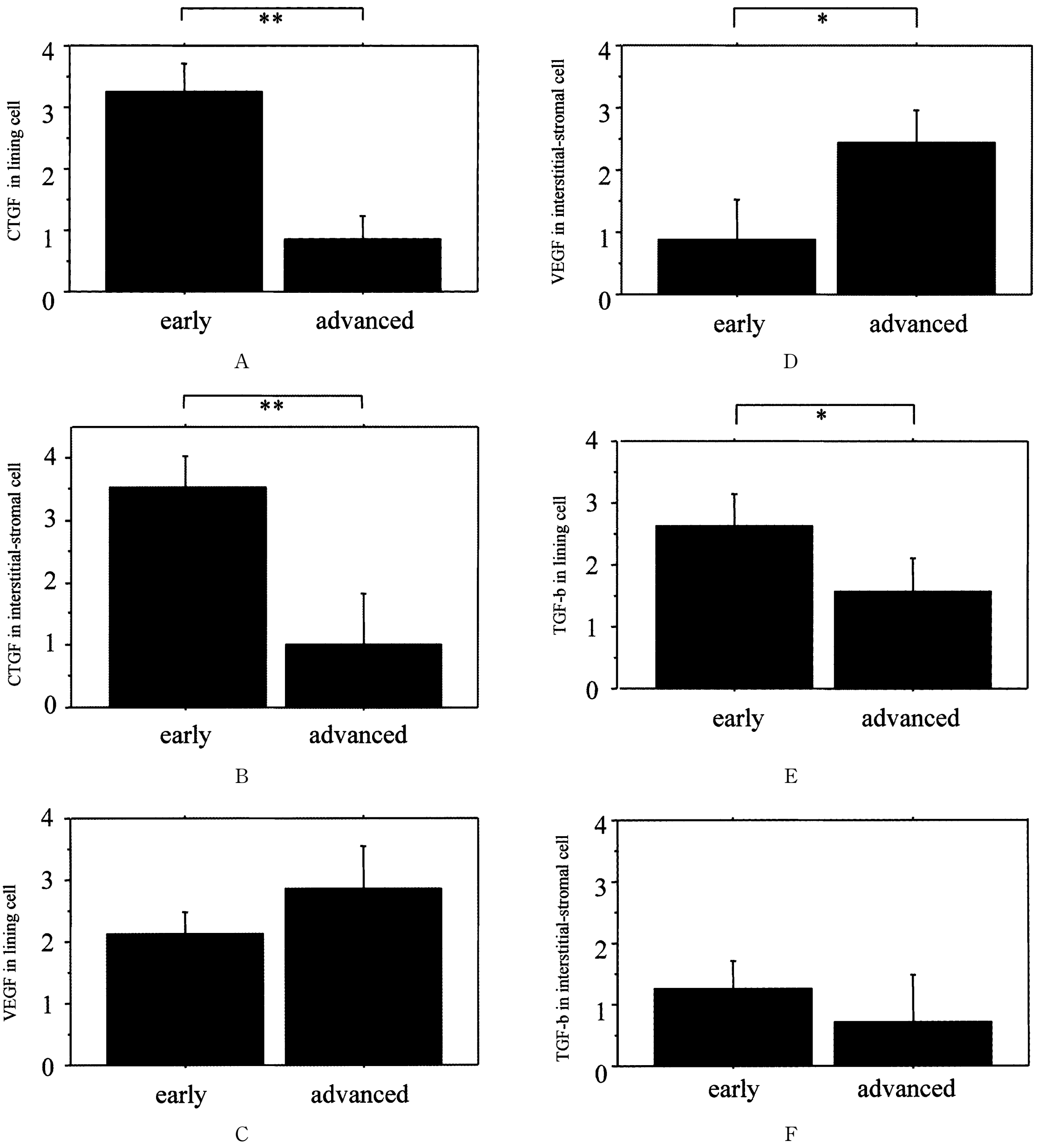

Fig. 2. Semiquantitative immunohistochemical analysis of CTGF (A and B) and VEGF (C and D) and TGF-β (E and F) in the lining cells (A, C and E) and interstitial-stromal cells (B, D and F) of RA synovial specimens. The expression levels were quantified using a 0-4 scale; 0, no staining; 1, 1-25 (%); 2, 26-50(%); 3, 51-75(%); 4, 76-(%), as described in Patients and Methods. Values are the mean and SD. (**$p<0.01$, *$p<0.05$)

III. 結　果

1. RA 滑膜における CTGF, VEGF, TGF-β の発現

早期および進行期 RA 滑膜における CTGF の発現を免疫組織染色にて確認し，血管新生の強力なサイトカインである VEGF，重要な線維芽細胞増殖因子である TGF-β の発現と比較した．VEGF, TGF-β と比較して早期 RA 滑膜では，線維芽細胞，血管内皮細胞，マクロファージに

CTGFが強く発現していた（Fig. 1E, H, K）．一方，進行期RA滑膜では，CTGFの発現をほとんど認めず，一部の滑膜表層細胞にわずかな発現を認める程度であり（Fig. 1F），CTGFの発現は病期の進行とともに減少していた．またコントロールに用いた外傷滑膜では，CTGF, VEGF, TGF-βいずれの発現も認められなかった（Fig. 1D, G, J）．RAの炎症時期からみた内皮細胞と線維芽細胞の単位面積中のCTGF, VEGF, TGF-β陽性細胞の数をグラフにしたのがFig. 2である．RAでは内皮細胞，線維芽細胞いずれにおいても初期のほうが進行期に比べてCTGF陽性細胞数が有意に多い（Fig. 2A, 2B）．これに対してVEGFでは逆に進行期のほうが初期に比べて陽性細胞数が多くなっていた（Fig. 2C, 2D）．またTGF-β陽性細胞は，滑膜表層細胞において有意に初期のほうが多くなっていた．

2. *In situ* hybridization によるRA滑膜のCTGF mRNAの解析

早期および進行期RA滑膜におけるCTGF mRNAの発現を *in situ* hybridization法にて検討した．免疫組織染色と同様に，早期RA滑膜では，線維芽細胞，血管内皮細胞，マクロファージにCTGF mRNAが強く発現していたが，進行期RA滑膜および外傷滑膜では，ほとんどCTGFの発現を認めなかった（Fig. 3）．

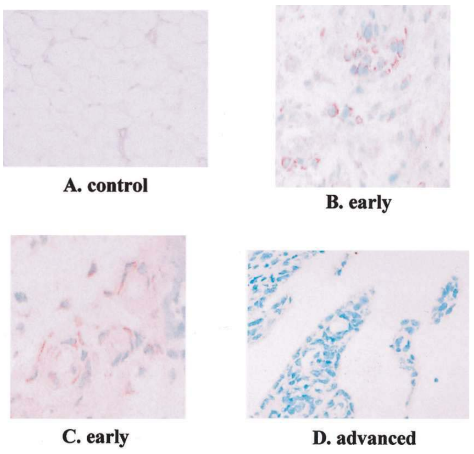

Fig. 3.　*In situ* hybridization for CTGF in synovial section from normal control (A), patients with RA in early stage (B and C) and those in advance stage (D). Red staining indicates CTGF positive cells. Methyl green was used as counterstain. CTGF mRNA was expressed in FLS (C), vascular endothelial cells (C) and macrophage (B) in early stage of RA. No CTGF mRNA expression was detected in advance stage of RA as well as in normal control (A and D). (Original magnification ×400 in A, B, C, D).

3. Real-time quantitative PCR法によるCTGF mRNAの測定

in situ hybridization法にて早期RA滑膜に高度にCTGF mRNAが発現していることが判明したので，real-time quantitative PCR法を用いて発現量を定量的に解析した．採取した凍結組織から抽出したRNAからcDNAを作製し，cycle threshold value (C_T) にて比較した．各組織中のCTGF mRNA量はGAPDH mRNA量で補正した．その結果，早期RA滑膜中のCTGF mRNA量は進行期RA滑膜と比較して約7倍の高い発現を認めた（Fig. 4）．

4. CTGFおよび抗CTGF抗体の培養滑膜細胞の増殖に与える影響

Recombinant (r) CTGF添加における滑膜培養細胞の増殖をMTS assayを用いて計測した．培養滑膜細胞を様々な濃度のrCTGF添加無血清培地で培養したところ，滑膜細胞は濃度依存的に増加した．50 ng/mlのrCTGF添加にて最大の効果が得られた（Fig. 5）．滑膜培養細胞を①rCTGF（50 ng/ml）添加群，② rCTGF（50

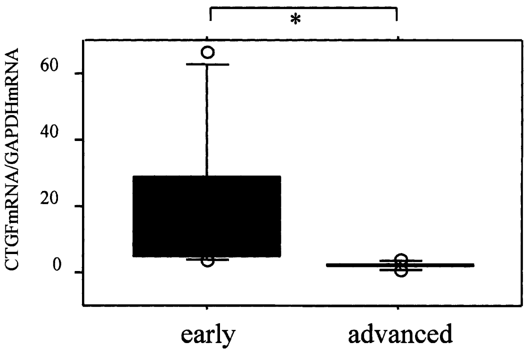

Fig. 4.　Quantification of CTGF mRNA expression in early ($n=8$) and advanced ($n=10$) stages of synovial tissues. The mRNA level of CTGF was measured by real-time PCR and was normalized to those of GAPDH. Relative mRNA expression of CTGF was about 7 times higher in early stage than advanced stage. (*$p<0.05$)

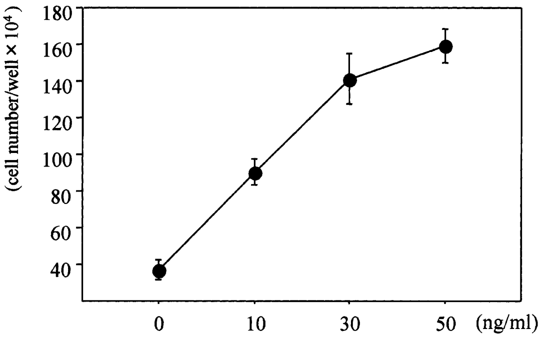

Fig. 5. Effect of rCTGF on the proliferation of FLS *in vitro*. FLS were cultured in serum-free DMEM for 24 hours. Cells were then stimulated with different concentrations of rCTGF (10 to 50 ng/ml) for 72 hours before cell numbers were counted. Stimulation of CTGF caused a dose-dependent proliferation of FLS. Mean±SD of 10 experiments.

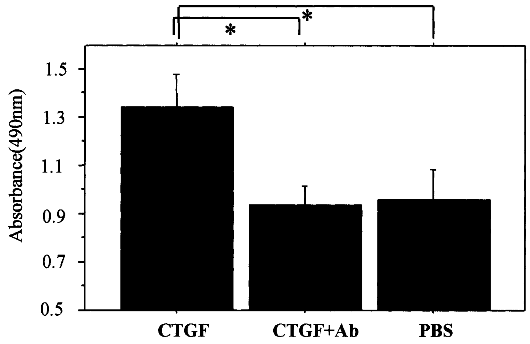

Fig. 6. Neutralization of CTGF effect on FLS proliferation by anti-CTGF antibody. FLS were cultured with rCTGF (50 ng/ml) and/or anti-CTGF antibodies (IgG, 25 μg/ml) for 5 days. The proliferation of FLS was measured by MTS assay. Anti-CTGF antibody neutralized the effect of CTGF on FLS proliferation. Bars represent the mean±SD of 25 experiments. (*$p<0.001$)

ng/ml）および抗 CTGF 抗体（IgG, 25 μg/ml）添加群，③ PBS（コントロール）のみ添加した群の 3 群に分けて培養し MTS assay にて比較したところ rCTGF（50 ng/ml）添加群で有意に細胞増殖を認めたのに対し，rCTGF（50 ng/ml）および抗 CTGF 抗体（IgG, 25 μg/ml）添加群は有意に細胞増殖が抑制され，細胞数はコントロール群と同等であった（Fig. 6）．

IV. 考　　察

近年，CTGF が様々な組織における線維化や血管新生あるいは軟骨の分化に関与しているという報告がみられるが[12)13)]，RA の病態に関与しているという報告は多くない[14)]．今回の研究では，早期 RA の滑膜組織の毛細血管内皮細胞と FLS に CTGF が高度に発現していることを証明した．CTGF の発現は成人の血管には認められないが，マウスの胚や成長期の血管内皮細胞には CTGF タンパクおよび mRNA の発現が認められる[15)]．さらにはアテローム硬化した動脈の血管内皮細胞や，ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）の培養液中にも CTGF が認められている[16)]．我々の以前の実験でも培養したヒト大動脈内皮細胞（HAEC）とヒト脳血管内皮細胞（HBMEC）では，CTGF が VEGF と比較して有意に高く発現していることがフローサイトメトリーで証明されている[17)]．さらに CTGF の機能の面からみると，HBMEC 培養液中に CTGF を添加すると強力に細胞を増殖させることや[17)]，20-50 ng/ml の CTGF 添加で血管内皮細胞の接着，増殖，遊走が増強されることも報告されている[18)]．滑膜組織中の毛細血管の内皮細胞を培養することは困難であり，CTGF 添加による滑膜組織の内皮細胞増殖の解析は不可能であったが，HBVEC と同様，CTGF は滑膜の毛細血管も増殖させることが予測される．本研究では，CTGF が早期 RA で強く発現するのに対し，強力な血管新生因子である VEGF は，CTGF とは異なり RA の早期には発現が弱く，病勢が進む進行期に強く発現することが明らかにされた．これらのことから早期には，滑膜表層下にみられる丈の低い毛細血管の増生に CTGF が関与するのに対し，血管の分化，成熟には VEGF がアンギオポイエチンなど他の因子と共に関与している可能性が示された．

CTGF は，血管新生のみならず細胞増殖にも関わることが報告されている[12)19)]．本研究において，培地に rCTGF を添加することにより FLS の増殖を促進すること，抗 CTGF 抗体の添加によりこの効果が中和されることを明らかにした．このことは，RA 病変形成に重要な役割を担うパンヌスの形成に CTGF が関与していることを示唆して

いる．

TGF-β は 25 kD のポリペプチドであり，個体発生，創傷治癒，線維化など様々な作用を持つ[23]．CTGF との関係では，TGF-β1 が CTGF mRNA を高度に誘導することが明らかになっており，線維芽細胞において CTGF は TGFβ の下流にある調節因子として作用することが証明されている[20]．今回の実験で，早期 RA 滑膜において CTGF は TGFβ と同様に滑膜線維芽細胞，血管内皮細胞に強く発現し，進行期の RA 滑膜では TGFβ と同様に減弱していることが明らかになった．このことは RA の病変部においても TGFβ が CTGF の上流で CTGF の発現を制御していることを示唆している．早期から進行期にかけて RA 滑膜で CTGF が徐々に減少していく原因は不明である．TNF-α は表皮線維芽細胞，動脈血管内皮細胞などにおいて TGF-β によって誘導された CTGF を強力に抑制する[21)22)] ことから RA の進行に従い増加する TNF-α が CTGF の発現減少の一因かもしれない．また本研究により，毛細血管を形成する内皮細胞だけでなく，滑膜線維芽細胞にも CTGF の強い発現を認めたことから，血管内皮細胞，線維芽細胞が CTGF を産生し，パラクライン，オートクライン的に血管新生，滑膜増生さらにはパンヌスの形成に関与している可能性が示唆された．CTGF の上流に位置する TGF-β を抑制すると線維化の促進作用も抑えるものの TGF-β が本来もっている免疫抑制作用まで抑えることになり，RA による炎症をますます高度にしてしまう危険もある[23]．そのため，選択的に線維芽細胞増殖および血管新生作用をともに制御する事が期待できる CTGF は RA 治療の新しいターゲットになりえると考える．

V．結　　語

早期 RA 滑膜の線維芽細胞と血管内皮細胞に CTGF が高度に発現していることを証明した．また CTGF 添加によって，培養滑膜細胞が増加を示した．以上より，CTGF が RA の病状の進行に深く関わっており，早期にこの CTGF を抑制することは，RA の進行を抑制する上で重要であると思われた．

稿を終えるにあたり，本研究に際しご指導を賜りました東京慈恵会医科大学整形外科学講座前教授 故藤井克之先生，同講座教授　丸毛啓史先生に深謝します．また，本研究を行うにあたり直接ご指導，ご鞭撻いただいた岩手医科大学第一病理学講座教授 澤井高志先生，宇月美和先生，黒瀬顕先生，鎌滝章央先生に厚く御礼申し上げます．

文　　献

1) 伊藤吉賢，澤井高志，関節炎の病理学的基礎：関節炎の画像診断，臨床画像 2002；18：203-43.
2) 伊藤吉賢，高橋幸洋，澤井高志，関節リウマチの成因と病態生理　病理学的特徴，日臨 2005；63：(増 1)：96-9.
3) Muller-Ladner U, Gay RE, Gay S. Activation of synoviocytes. Curr Opin Rheumatol 2000；12：186-94.
4) Pap T, Shigeyama Y, Kuchen S, Fernihough JK, Simmen B, Gay RE, et al. Differential expression pattern of membrane-type matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2000；43：1226-32.
5) Lemaire R, Huet G, Zerimech F, Grard G, Fontaine C, Duquesnoy B, et al. Selective induction of the secretion of cathepsins B and L by cytokines in synovial fibroblast-like cells. Br J Rheumatol 1997；36：735-43.
6) Bork P. The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. FEBS Lett 1993；327：125-30.
7) Lau LF, Lam SC. The CCN family of angiogenic regulators：the integrin connection. Exp Cell Res 1999；248：44-57.
8) Cunnane G, Bjork L, Ulfgren AK, Lindblad S, FitzGerald O, Bresnihan B, et al. Quantitative analysis of synovial membrane inflammation:a comparison between automated and conventional microscopic measurements. Ann Rheum Dis 1999；58：493-9.
9) Reed JA, Manahan LJ, Park CS, Brigati DJ. Complete one-hour immunocytochemistry based on capillary action. Biotechniques 1992；13：434-43.
10) Montone KT, Brigati DJ. in situ molecular pathology：instrumentation, oligonucleotides, and viral nucleic acid detection. J Histotech 1994；17：195-201.
11) Montone KT, Hondinska RL, Salhany KE, Lavi E, Rostami A, Tomaszewski JE. Identifi-

cation of Epstein-Barr virus lytic activity in post-transplantation lymphoproliferative disease. Modern Pathol 1996 ; 9 : 621-30.

12) Takigawa M. CTGF/Hcs24 as a multifunctional growth factor for fibroblasts, chondrocytes and vascular endotherial cells. Drug News Perspect 2003 ; 16 : 11-21.

13) 潘　立華，澤井高志．線維化肺と connective tissue growth factor（CTGF）．分子呼吸器 2000 ; 4 : 89-91.

14) Bira Y, Tani K, Nishioka Y, Miyata J, Sato K, Hayashi A, et al. Transforming growth factor beta stimulates rheumatoid synovial fibroblasts via the type II receptor. Modern Rheumatol 2005 ; 15 : 108-13.

15) Ivkovic S, Yoon BS, Popoff SN, Safadi FF, Libuda DE, Stephenson RC, et al. Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. Development 2003 ; 130 : 2779-91.

16) Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR. Connective tissue growth factor : a cystein-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC induced immediate early gene product CEF-10. J Cell Biol 1991 ; 114 : 1285-94.

17) 小林哲人，黒瀬　顕，別府高明，荒井啓史，澤井高志，神経膠腫における connective tissue growth factor（CTGF）の発現とその血管新生への関与．岩手医誌 2003 ; 55 : 125-33.

18) Shimo T, Nakanishi T, Nishida T, Asano M, Kanyama M, Kuboki T, et al. Connective tissue growth factor induces the proliferation, migration, and tube formation of vascular endothelial cells *in vitro*, and angiogenesis *in vivo*. J Biochem (Tokyo) 1999 ; 126 : 137-45.

19) Nakanishi T, Nishida T, Shimo T, Kobayashi K, Kubo T, Tamatani T, et al. Effects of CTGF/Hcs24, a product of a hypertrophic chondrocyte-specific gene, on the proliferation and differentiation of chondrocytes in culture. Endocrinology 2000 ; 141 : 264-73.

20) Ihn H. Pathogenesis of fibrosis : role of TGF-β and CTGF. Curr Opin Rheumatol 2002 ; 14 : 681-5.

21) Grotendorst GR, Okochi H, Hayashi N. A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene. Cell Growth Differ 1996 ; 7 : 469-80.

22) Oemar BS, Wermer A, Garnier JM, Do DD, Godoy N, Nauck M, et al. Human connective tissue growth factor is expressed in advanced atherosclerotic lesions. Circulation 1997 ; 95 : 831-9.

23) Blom IE, Goldschmeding R, Leask A. Gene regulation of connective tissue growth factor : new targets for antifibrotic therapy ? Matrix Biol 2002 ; 21 : 473-82.