

- Characterization of tissue outgrowth developed in vitro in patients with rheumatoid arthritis; involvement of T cells for the development of tissue outgrowth. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 121(1):68-79, 2000.
- 2) 下山義博、岳野光洋、永渕裕子、鈴木 登、坂根 剛：ベーチェット病患者における自発的サイトカイン産生 炎症 日本炎症学会 20 (2) : 157-164, 2000.
- 3) 坂根 剛、永渕裕子：インドメタシンと痙攣. この薬のこの副作用 (松田重三編) 医歯薬出版、54-55、2000.
- 4) 坂根 剛、永渕裕子：全身性エリテマトーデスの病態形成に関する分子群 転写因子 臨床免疫 34 (4) : 483-486, 2000.
- 5) 坂根 剛、永渕裕子：播種性好酸球性膠原病. 日本臨床 (2000 年増刊号 免疫症候群)、32:602-604, 2000.
- 6) 坂根 剛、永渕裕子：ベーチェット病. 朝倉書店、東京、(印刷中)
- 7) 永渕裕子：Itk 欠損マウス 臨床免疫 (印刷中)
- 2.学会発表
国際学会
- 1) Sakane, T., Nagafuchi, H., and Suzuki, N. **block symposium** The role of Txk, a member of tec family non-receptor tyrosine kinase, in Th1 cell development and interferon- γ production by human T lymphocytes. Immunology 2000. The American Association of Immunologists and Clinical Immunology Society Joint Annual Meeting, Seattle, Washington, 2000
- 2) Nagafuchi, H., Suzuki, N., and Sakane, T. **block symposium** Defective recombination activating gene expression of human anti-DNA antibody secreting cells in systemic lupus erythematosus. Immunology 2000. The American Association of Immunologists and Clinical Immunology Society Joint Annual Meeting, Seattle, Washington, 2000
- 3) Tsukasa Miyagi, Hiroko Nagafuchi, JunMing Ye, Noboru Suzuki and Tsuyoshi Sakane. NOVEL THERAPEUTIC TARGET, TXK, A MEMBER OF TEC FAMILY NON-RECEPTOR TYPE TYROSINE KINASE, OF T HELPER 1 CELL ASSOCIATED AUTOIMMUNE DISEASES. *Arthritis Rheum.*, 43(9, suppl.): S362, 2000.
- 4) Hiroko Nagafuchi, Noboru Suzuki, Masako Mizoguchi, Shoso Yamamoto and Tsuyoshi Sakane. EXCESSIVE TXK EXPRESSION LEADS TO THE SKEWED T HELPER 1 CELL RESPONSE IN PATIENTS WITH BEHCET'S DISEASE *Arthritis Rheum.*, 43(9, suppl.): S1776,

2000.

5) Hiroko Nagafuchi, Noboru Suzuki, and Tsuyoshi Sakane. Relation of receptor editing mechanism to failure of peripheral self-tolerance in mature B cells in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Arthritis Rheum.*, 43(9, suppl.): S1037, 2000.

6) Mitsuhiro Taleno, Hiroko Nagafuchi, Yuko Takeba, Noboru Suzuki, and Tsuyoshi Sakane. The pathogenic role of autoreactive T cells specific for the human heat shock protein 60kD-derived peptide in Behcet's disease. *Arthritis Rheum.*, 43(9, suppl.): S345, 2000.

国内学会

1) 永瀨裕子, 鈴木 登, 坂根 剛. 慢性関節リウマチ (RA) 患者におけるプロモクリプチン (BRM) 治療の妥当性. 第 97 回日本内科学会講演会 2000 年 4 月 京都

2) 永瀨裕子, 鈴木 登, 坂根 剛. 全身性エリテマトーデス (SLE) 患者抗 DNA 抗体産生 B 細胞における Recombination activating gene (RAG) 発現異常. 第 44 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2000 年 5 月. 横浜

3) 永瀨裕子, 鈴木 登, 坂根 剛. SLE 患者 B 細胞における Recombination activating gene (RAG) の発現異常と抗 DNA 抗体産生. 第 21

回日本炎症学会, 2000 年 7 月. 東京

4) 永瀨裕子, 鈴木 登, 坂根 剛. ベーチェット (BD) 病患者の Th1 型炎症の維持における T_H1 の重要性. 第 21 回日本炎症学会, 2000 年 7 月.

5) 永瀨裕子, 鈴木 登, 坂根 剛. T_H1 のインターフェロン (IFN) γ 遺伝子発現機構. 第 65 回日本インターフェロン・サイトカイン学会, 2000 年 7 月 仙台

6) 永瀨裕子, 鈴木 登, 坂根 剛. ベーチェット (BD) 病患者の Th1 型炎症の維持における T_H1 の役割. 第 28 回日本臨床免疫学会総会. 2000 年 9 月. 東京

7) 坂根剛, 永瀨裕子, 鈴木登. 新規の Th1 型特異的転写因子 T_H1 による IFN γ 遺伝子活性化機構. 第 30 回日本免疫学会総会・学術集会 2000 年 11 月. 仙台

8) 宮城 司, 永瀨裕子, 青木治人, 浅井富明, 金子敦史, 坂根剛. 慢性関節リウマチ (RA) の Th1 型炎症における T_H1 の役割. 第 30 回日本免疫学会総会・学術集会 2000 年 11 月. 仙台

9) 葉 俊明, 永瀨裕子, 溝口昌子, 坂根剛. ベーチェット病 (BD) の Th1 型炎症における T_H1 の役割. 第 30 回日本免疫学会総会・学術集会 2000 年 11 月. 仙台

H. 知的財産権 なし

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

T 細胞膜分子 6C2 の慢性関節リウマチの病態における役割

分担研究者：森本 幾夫 東京大学医科学研究所・教授

研究要旨：慢性関節リウマチ(RA)などの関節疾患の病態の詳細は未だ明らかではない。我々は慢性関節リウマチの病態をさらに解析するため、CD45RO メモリー T 細胞サブセットと選択的に反応する抗 6C2 抗体を開発した。本年はその対応抗原である 6C2 分子の性格及び 6C2 陽性 T 細胞の機能及びこの T 細胞サブセットが慢性関節リウマチの免疫病態に関与しているかどうかを検討した。

1)ヒト末梢血 T 細胞を用いた場合抗 6C2 抗体は 0-acetyl-GD3 である CDw60 への抗体の反応性とほぼ同様の反応パターンをとった。(2)慢性関節リウマチ患者からのほとんどの滑液 T 細胞は 6C2 陽性 (>70%) であり、また 6C2 陽性 T 細胞は、単層血管内皮細胞上で強い細胞遊走能を示し、この細胞遊走は抗 6C2 抗体前処置により抑制された。(3)抗 6C2 抗体は、薄層クロマトグラフィーで分離した 0-acetyl-GD3 とは反応せず、GD3 と特異的に反応した。(4)抗 6C2 抗体の反応性は、Namalwa 細胞表面上に GD3 合成酵素の cDNA をトランスフェクトした時のみ誘導できた。

我々は 6C2 分子はデシアロガングリオシドの GD3 分子であることを同定した。さらに 6C2/GD3 分子は慢性関節リウマチ患者からの滑液 T 細胞に強発現し、抗 6C2 抗体前処置により T 細胞遊走能も抑制されることから、6C2/GD3 分子及び 6C2 陽性 T 細胞は T 細胞遊走のみならず慢性関節リウマチの炎症にも重要な役割を演じていることが明らかになった。

A 研究目的

ヒト CD4T 細胞は免疫反応の中心的役割を果たし、機能的に多様性に富み、大きく CD4+CD45RA+ ナイーブ、CD4+CD45RO+メモリー T 細胞に分けられる。特にメモリー T 細胞は生体防御や炎症反応の key となる T 細胞サブセットである。

さて慢性関節リウマチなどの慢性炎症疾患では、局所炎症部位で CD45RO メモリー T 細胞が増加し、また in vitro のシステムでも単層血管内皮細胞間を遊走する T 細胞はメモリー T 細胞であり、炎症の

エフェクター T 細胞としても重要である。我々は慢性関節リウマチの病態をさらに解析するため、CD45RO メモリー T 細胞サブセットと選択的に反応する抗 6C2 抗体を開発した。今回その対応抗原である 6C2 分子の性格及び 6C2 陽性 T 細胞の機能及びこの T 細胞サブセットが慢性関節リウマチの病態に関与しているかどうかを検討することを目的とした。多発関節痛、関節炎をもたらす RA などの関節疾患は高齢者の日常的な活動性を低下させ、介

護の必要を増加させるため、RA の原因や病態解明と予防治療法の開発は高齢者の生活の質の改善と、高齢者社会の活性化にも必須である。

B 研究方法

1) リンパ球の分離

ヒト末梢血単核細胞は **Fcoll-Hypaque** 法にて健康人及び RA 患者から分離した。同様に滑液中単核細胞は 8 名の RA 患者を用いてヘパリン含有滑液から分離した。全ての RA 患者は 1987 年 ACR の基準を満たしていた。マクロファージは 1 時間プラスティックディッシュに培養した後、ディッシュに接着させて除き、T 細胞は羊赤血球とのロゼット法にて分離した。

2) 単クローン抗体の産生

抗 6C2 抗体は IgM 型で以前に確立した。UM4D4 抗体は CDw60 抗体の代表なもので、9-O-acetyl-GD3 と反応し、DFox 氏 (ミシガン大学) から供与された。

3) ヒト細胞株

遺伝的白血球接着欠損症患者から確立した EBV-転換 B 細胞株は峰岸博士 (東北大学) より供与された。さらにコントロールの EBV-転換 B 細胞株は健康人より確立した。これらの細胞株及び H9T 細胞白血球株は 10%FCS-RPMI1640 メディアにて培養した。

4) フローサイトメトリーによるリンパ球集団の解析

リンパ球集団のフローサイトメトリーによる解析は直接及び間接免疫蛍光染色法にて行い、EPICS-XLにて行った。

5) 細胞増殖アッセイ

末梢血リンパ球は 96 穴丸底プレートにて様々な濃度の単クローン抗体の組合わせや、PHA により刺激し 10%FCS-RPMI1640 メディアにて CO₂ インキュベーターで培養した。培養 3 日後に、1 μ Ci の 3H.thymidine を培養液に加え 18 時間後にリンパ球を回収し、ベーターカウンターにてリンパ球に取り込まれた 3H.thymidine を測定した。

6) 薄層クロマトグラフィー(TLC)にて分離されたガングリオシドのウエスタンブロット

抗 6C2 抗体及び抗 UM4D4 抗体のガングリオシドへの反応性は薄層クロマトグラフィー(TLC)により展開されたガングリオシドへのウエスタンブロット法による解析により行なった。

7) sialyl 及び fucosyl トランスフェラーゼ cDNA のトランスフェクション及びその発現

ヒトバーキットリンパ腫 Namalwa 株の垂株である KJM-1 細胞に発現ベクターの pAMo のみあるいは GD3 synthase、ST3、ST4、fucosyl トランスフェラーゼの FT3、4、6、7 の cDNA を含む pAMo ベクターをトランスフェクトした。トランスフェクタントはフローサイトメーターにて 6C2 分子の発現を調べた。

8) Transendothelial 細胞遊走及び内皮細胞への接着アッセイ

血管内皮細胞での細胞遊走は 2-チャンバーカルチャープレートを用いて行った。ヒト臍帯血管内皮細胞(HUVEC)は I 型コラーゲンを coat したプレートで E-STIM 内皮細胞培養メディアにて維持した。Transendothelial 細胞遊走アッセイのため HUVEC は I 型コラーゲンを coat した BIOCOAT インサート上に 2 日間培養した。コンフルエントになった HUVEC は 0.6%BSA を含む RPMI1640 メディアに浮遊した T 細胞といろいろな時間培養した。遊走及び非遊走 T 細胞は血球計算器にて数え、さらにこれらの T 細胞のフェノタイプはフローサイトメーターにて解析した。T 細胞の内皮細胞への接着は T 細胞をゲラチンをひいたプレート上に接着させた単層 HUVEC への接着により調べた。接着 T 細胞は EDTA にて剥がし、血球計算器でカウントした。

9) 倫理面での配慮

血液、関節液を含む生体サンプルの実験について患者には研究目的や趣旨を十分説明し、インフォームドコンセントを得た上で行った。さらに患者のプライバシーに関する情報の守秘義務を徹底するため個々の研究者は検体と ID 番号のみを用いて解析し、患者のプライバシーに関する情報が守られるように注意した。

C 研究結果

1) 抗 6C2 抗体の LFA-1 欠損細胞との反応性

6C2 抗体はかつてユニークな LFA-1 のエピトープと反応する抗体ではないかと言われていた。そこで EBV で転換した LFA-1 欠損 B 細胞と正常人からの B 細胞を用いてその反応性を検討した。この結果、コントロールの LFA-1 抗体は LFA-1 欠損 B 細胞とは反応しないが EBV でトランスフォームした正常人からの B 細胞のみに反応したが 6C2 抗体は LFA-1 欠損及び正常人 B 細胞ともに反応した。この結果から 6C2 抗体は LFA-1 以外の分子と反応することが強く示唆された。

2) 6C2 分子と CDw60 分子との比較

6C2 抗体は CD4 メモリー T 細胞サブセットと反応することを以前に報告したが、対応分子が LFA-1 分子でない可能性が高いことから非蛋白分子であることが示唆された。非蛋白分子である CD 分子は糖脂質が多くその中で、CDw60 分子がヒト T 細胞に発現している。そこで CDw60 と 6C2 分子の T 細胞上での発現を検討した。抗 6C2 は約 28% の T 細胞と反応したが CDw60 への抗体である UM4D4 抗体は約 39% の T 細胞と反応した。さらに 6C2 陽性 T 細胞の 2/3 は CDw60 T 細胞に含まれていた。次に CDw60(O-acetylated GD3) の一つの特徴として CDw60 抗体は T 細胞ヘマイトジェンとして働くことが言われている。抗 UM4D4 抗体は報告のように T 細胞に対してマイトジェニックであったがしかし、抗 6C2 抗体にはマイトジェニックな作用はなく、6C2 は CDw60 と異なる分子かあるいは UM4D4 抗体が反応するエピトープとは異なる可能性が示唆された。

3) 6C2+T 細胞の RA 患者滑液への蓄積

抗 6C2 抗体は CD4 メモリー T 細胞と選択的に反応し、また CDw60 は RA 患者からの滑液 T 細胞に多く発現していることから、6C2 陽性 T 細胞は RA の慢性炎症に関与しているかどうか検討した。正常人末梢血 T 細胞では 30% が 6C2 陽性であったが 8 例の RA 患者末梢血 T 細胞では 31% が 6C2 陽性であった。一方、RA 患者からの滑液 T 細胞の 78% は 6C2 陽性であった。このように 6C2+T 細胞は RA

患者滑液に蓄積する可能性が強く示唆された。

4) 6C2 分子と関連する Transendothelial 細胞遊走能

6C2 陽性 T 細胞が RA 患者滑液中に多いことから 6C2 陽性 T 細胞の *in vitro* での *transendothelial migration* 能について検討した。6C2 陽性 T 細胞は HUVEC への非接着及び接着細胞ともに検出されなかったが、HUVEC 中を遊走した T 細胞の 95% 以上は 6C2 陽性であることから 6C2 陰性 T 細胞と比較して 6C2 陽性 T 細胞は非常に *transendothelial migration* 能が高いことが明らかになった。次に 6C2 分子そのものが細胞遊走に関係しているかどうか検討した。ニューラミニダーゼは *sialic acid* を除くことで知られているがこの酵素で T 細胞を処理したところ、LFA-1 の発現は変わらないが 6C2 分子の発現は消失した。このことから 6C2 分子はニューラミニダーゼに感度が高いことが明らかになった。さらに抗 6C2 抗体処理により T 細胞の *transendothelial migration* は減少し、またニューラミニダーゼ処理によっても T 細胞 *migration* は減少した。上記の結果から *transendothelial migration* には 6C2 分子が重要であることが示唆された。

5) 6C2 抗体は GD3 と反応するが O-acetylated GD とは反応しない

6C2 抗体は O-acetylated ganglioside に近い分子あるいは CDw60 分子とは異なる分子などの可能性が存在することから TLC により分離された gangliosides の反応性を免疫プロットで解析した。サルの脳から得た gangliosides 中で 6C2 抗体は GD3 とのみ反応した。一方 UM4D4 抗体はサルの脳からの gangliosides とは反応せず、O-acetylated GD3 とのみ反応した。このことから 6C2 抗体は GD3 を特異的に認識する抗体であることが示唆された。

6) 6C2 抗体の細胞表面に発現させた GD3 の反応性について

次に Namalwa 株の KJM-1 細胞に GD3 synthase を含む *sialyl transferase*(ST3, ST4, GD3 synthase)の cDNA 及び 4 つの *fucosyl transferases*(FT3, FT4, FT6 及び FT7)の cDNA をトランスフェクトして各分子を発現させた。6C2 抗体は GD3 synthase 活性を誘導した

ときにのみ反応したことから 6C2 抗体が認識する細胞表面分子は GD3 であることが明らかとなった。

D. 考察

今回の研究で我々は単クローン抗体 6C2 抗体が認識する細胞表面構造は T 細胞サブセットに選択的に発現する disialoganglioside の GD3 であり、さらに 6C2/GD3 分子は単層血管内皮細胞間の遊走及び慢性関節リウマチ(RA)の炎症に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

6C2 分子は CDw60 分子と T 細胞での分布が似通っていたが、CDw60 抗体は T 細胞へのマイトジェニックな作用が存在していたが 6C2 抗体にはこの作用が存在していなかったことから 6C2 は CDw60 のユニークなエピトープかあるいは CDw60 とは異なる分子である可能性が示唆された。

TLC で分離した gangliosides の免疫プロットによる解析により 6C2 分子は O-acetylated gangliosides に関連しているものの異なっていることが明らかになった。O-acetylated GD3 を含む 12 種類の gangliosides 中、6C2 抗体は disialoganglioside の GD3 とのみ反応したが CDw60 抗体の代表である UM4D4 抗体は従来報告されているように O-acetylated GD3 とのみ反応した。さらに 3 つの sialyltransferase 及び 4 つの fucosyltransferase の cDNA を Narnalwa KJM-1 にトランスフェクションした実験により 6C2 抗体の反応性は GD3 synthase をトランスフェクトしたときのみ得られたことから、6C2 抗体と反応する分子は GD3 であることを証明した。

6C2/GD3 を発現している T 細胞は血管内皮細胞間を非常に遊走しやすい細胞で、血管内皮細胞に強く接着している細胞は 6C2/GD3 陰性であることから 6C2/GD3 陽性 T 細胞は 6C2/GD3-陰性 T 細胞と比較して血管内皮細胞にはあまり接着しないが、血管内皮細胞からより有効に遊走する可能性が強くと示唆された。

さらに細胞遊走は 6C2 抗体処理や neuraminidase 処理で 6C2 の発現を減少させると遊走が減少することから 6C2/GD3 分子そのものが遊走に関与していることが明らかになった。また末梢血 T 細胞と

比較して RA 患者滑液中の T 細胞のほとんどが 6C2/GD3 を発現していることから、6C2/GD3+T 細胞が炎症部位に遊走しやすい細胞集団であることを強く示唆した。

GD3 分子の構造と機能をさらに研究することにより、T 細胞遊走の詳細なメカニズムや RA の病態を一層理解することにつながり、またこのことは RA の新しい治療法の開発にもつながることが示唆された。

E. 結論

6C2 分子はデアロガングリオシドの GD3 分子であることを同定し、transendothelial migration assay にて細胞遊走能をもつ T 細胞サブセット上に有意に存在することが明らかとなった。6C2/GD3 分子は慢性関節リウマチ患者からの滑液 T 細胞に強発現し、さらに抗 6C2 抗体前処置により T 細胞遊走能も抑制されることから、6C2/GD3 分子及び 6C2 陽性 T 細胞は T 細胞遊走のみならず慢性関節リウマチの炎症にも重要な役割を演じていることが明らかになった。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. Ohtsuki T, Tsuda H, Morimoto C. Good or evil: CD26 and HIV infection. *J Dermatol Sci* 2000, 22:152-60
2. Sato K, Kawasaki H, Nagayama H, Enomoto M, Morimoto C, Tadokoro K, Juji T, Takahashi TA. TGF-beta 1 reciprocally controls chemotaxis of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells via chemokine receptors. *J Immunol.* 2000, 164:2285-95.
3. Morimoto S, Kanno Y, Tanaka Y, Tokano Y, Hashimoto H, Jacquot S, Morimoto C, Schlossman SF, Yagita H, Okumura K, Kobata

- T. CD134L engagement enhances human B cell Ig production: CD154/CD40, CD70/CD27, and CD134/CD134L interactions coordinately regulate T cell-dependent B cell responses. *J Immunol.* 2000;164:4097-104.
4. Iwata S, Ohashi Y, Kamiguchi K, Morimoto C. Related Articles. Beta 1-integrin-mediated cell signaling in T lymphocytes. *J Dermatol Sci.* 2000;23:75-86.
 5. Nagayama H, Sato K, Kawasaki H, Enomoto M, Morimoto C, Tadokoro K, Juji T, Asano S, Takahashi TA. IL-12 responsiveness and expression of IL-12 receptor in human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2000;165:59-66.
 6. Qing Y-W, Kitagawa M, Higashi M, Ishii G, Morimoto C, Harigaya K. Activation of mitogen-activated protein kinase through $\alpha 5 \beta 1$ Integrin is required for the cell cycle progression of B progenitor cell line, Feh, on human marrow stromal cells. *Exp. Hematol.* 28:1147-1157, 2000.
 7. Munakata Y, Iwata S, Dobers J, Ishii T, Nori M, Tanaka H, Morimoto C. Novel in Vitro effects of bucillamine: Inhibitory effects on proinflammatory cytokine production and transendothelial migration of T Cell. *Arthr. and Rheum.* 43:1616-1623, 2000.
 8. Ikushima H, Munakata Y, Ishii T, Iwata S, Terashima M, Tanaka H, Schlossman SF, Morimoto C. Internalization of CD26 by mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor contributes to T cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:8439-8444, 2000.
 9. Sato K, Kawasaki H, Nagayama H, Enomoto M, Morimoto C, Tadokoro K, Juji T, Takahashi TA. Chemokine Receptor Expressions and Responsiveness of Cord Blood T Cells. *J Immunol.* 2001;166:1659-1666.
 10. Sato K, Kawasaki H, Nagayama H, Enomoto M, Morimoto C, Tadokoro K, Juji T, Takahashi TA. Signaling events following chemokine receptor ligation in human dendritic cells at different developmental stages. *Int Immunol.* 13:167-179, 2001.
 11. Homma T, Hosono O, Iwata S, Ando S, Sasaki K, Nishi T, Kawasaki H, Tanaka H, Morimoto C. Recognition of cell surface GD3 by monoclonal antibody anti-6C2 in rheumatoid arthritis synovial fluid. *Arthr. & Rheum.* In press.
- H. 知的財産権の出願登録状況
特になし

厚生省科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

高齢者慢性関節リウマチ患者治療のための作用分離型グルココルチコイドの開発

分担研究者：田中 廣壽 東京大学医科学研究所・助教授

研究要旨：高齢者への慢性関節リウマチの新規治療法開発をめざし、作用分離型グルココルチコイドレセプター (GR) 作動薬開発の分子システムを構築することを目的とした。胆汁酸製剤として現在臨床現場で使用されているウルソデオキシコール酸は GR を DNA 結合型に活性化して核に移行させるものの転写活性化作用を誘導しなかった。しかし、UDCA は GR 依存性に抗 NF- κ B 作用を有していた。したがって、UDCA の詳しい作用機構を究明することは作用分離型 GR 作動薬開発に貢献する可能性があることが示唆された。

A. 研究目的

副腎皮質ステロイドであるグルココルチコイドは、視床下部-下垂体-副腎系のエフェクター分子として、免疫系、糖脂質代謝、心血管系、水電解質代謝など多くの生体系の生理機能の制御にきわめて重要な働きをしている。ヒトにおいて殆どすべての有核細胞に存在するグルココルチコイド受容体 (GR) と結合することでその作用を発現する。GR は核内受容体ファミリーの代表的タンパクであり、DNA と結合して転写を正に調節する以外に、タンパク-タンパク相互作用など様々な方法で他の細胞内情報伝達系と密接にクロストークしている。ここで、免疫抑制作用、抗炎症作用をはじめとする薬理学的に重要なグルココルチコイド作用の多くはこのような転写レベルにおけるタンパク-タンパク相互作用からも理解が可能である。とりわけ、AP-1 や NF- κ B と GR の相互作用はグルココルチコイドによる情報伝達系と増殖因子、サイトカイン、接着分子などによる情報伝達系のクロストークの分子機構を理解するうえで重要といえる。

ステロイド薬は炎症の強い慢性関節リウマチ (RA) 患者などに主として抗炎症作用を得る意味で用いるが、長期使用により骨粗鬆症、動脈硬化、易感染症などさまざまな副作用を引き起こす。

特に高齢者の慢性関節リウマチ患者では少量ステロイドがたびたび用いられるため上記の副作用の監視が必須である。グルココルチコイド作用は欠如するが、抗炎症作用を持つ副作用を解離する GR-selective modulator の開発ができれば理想である。この点についてわれわれはすでに、胆汁酸製剤であるウルソデオキシコール酸 (UDCA) が GR をリガンド非存在下においても核に移行させることを見い出している。そこで、UDCA をプロトタイプ化合物として、グルココルチコイドのこれらの薬理作用を副作用と解離して選択的に発現させる薬剤の開発を目指すための分子システムを構築することを目的とした。

B. 研究方法

GR の DNA 結合実験はグルココルチコイド応

答性 DNA 配列 (GRE) を含むオリゴヌクレオチドをプローブとしたゲルシフトアッセイによった。GR と hsp90 の相互作用は免疫沈降法によって解析した。GR の細胞内局在は、免疫蛍光抗体法、green fluorescent protein (GFP)融合タンパク発現系を用いて検討した。GR の転写活性化作用は GRE 配列の下流にルシフェラーゼの cDNA を有するレポータープラスミドを用いたトランジェントトランスフェクションによって測定した。GR の抗 NF- κ B 作用はフォーポールミリステートエステル(PMA)刺激下の NF- κ B 応答性レポーター遺伝子の発現に与える影響から解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は培養動物細胞および試験管内実験を用いたものであり、その点で倫理面への配慮は特に必要無いものと思われる。さらに、遺伝子組み換え実験に関して機関承認を得ていることを付記する。

C,D. 研究結果・考察

1. UDCA は GR を核内に移行させ、その作用は濃度依存性であった。200 μ M の場合約 6 時間で約 70% の細胞において GR は核内に局在した。
2. UDCA 存在下で核内移行した GR は DNA 結合型であった。UDCA の GRE 依存性転写活性に与える効果は、合成グルココルチコイドであるデキサメタゾンに比してきわめて弱かったが、抗 NF- κ B 作用はデキサメタゾンとほぼ同等であった。
3. UDCA による抗 NF- κ B 作用機序を解析した結果、I κ B α のリン酸化とユビキチン-プロテアソーム依存性タンパク分解、p65/p50 の核移行、p65/p50 のタンパク量には変化がなかった。
4. UDCA における抗 NF- κ B 作用発現にあたっては GR 依存性と非依存性の二つの経路があることが本研究により示唆された。GR 依存性経路に関し、UDCA は核において GR と NF- κ B の相互作用に何らかの影響を与える可能性が

示唆された。

5. 各種 GR の変異体を用いた解析から、UDCA の作用部位は GR のリガンド結合領域であることが分かったが、デキサメタゾンの作用部位とは明らかに異なっていた。

E. 結論

UDCA は作用選択的 GR 作動薬のプロトタイプであり、その作用機構を今後解析することによってグルココルチコイドの副作用を解離できる薬剤の開発に貢献できる可能性があり、これらの薬剤は特に高齢者の RA 治療には有用と思われる。

F. 健康危険情報：特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Pilar Carrero, Kensaku Okamoto, Pascal Coumilleau, Sallyann O'Brien, Hirotoshi Tanaka, and Lorenz Poellinger
Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-Binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1 α .
Mol. Cell. Biol. 2000; 20(1): 402-415.

2) Hirotoshi Tanaka, Yuichi Makino, Kensaku Okamoto, Takahisa Iida, Noritada Yoshikawa, Takanori Miura.
Redox regulation of the nuclear receptor.
Oncology 2000;59(suppl 1):13-18.

3) Takahisa Iida, Yuichi Makino, Kensaku Okamoto, Noritada Yoshikawa, Isao Makino, Tetsuya Nakamura, Hirotoshi Tanaka.
Functional modulation of the mineralocorticoid receptor by cisdiamminedichloroplatinum(II)
Kidney Int. 2000;58(5):1450-1460

4) Hetti Poukka, Ulla Karvonen, Noritada Yoshikawa, Hirotoshi Tanaka, Jorma J. Palvimo, Olli A. Janne.

The RING finger protein SNURF modulates nuclear trafficking of the androgen receptor
J. Cell. Sci. 2000;113(11):2991-3001

5) Kiyoshi Migita, Hirotoshi Tanaka, Kensaku Okamoto, Noritada Yoshikawa, Yasufumi Ichinose, Satoshi Urayama, Satoshi Yamasaki, Hiroaki Ida, Yojiro Kawabe, Atushi Kawakami, Katsumi Eguchi. FK506 augments glucocorticoid-mediated cyclooxygenase-2 down-regulation in human rheumatoid synovial fibroblasts.
Lab. Invest. 2000;80(2):135-141.

6) Noriaki Shimizu, Kotaro Sugimoto, Jianwei Tang, Takeyuki Nishi, Iwao Sato, Masaki Hiramoto, Shin Aizawa, Mamoru Hatakeyama, Reiko Ohba, Hideaki Hatori, Tatsufumi Yoshikawa, Fumiko Suzuki, Akira

Oomori, Hirotoshi Tanaka, Haruma Kawaguchi, Hajime Watanabe, Hiroshi Handa.

High-performance affinity beads for identifying drug receptors.

Nature Biotechnology 2000;18(8):877-881

7) Naoki Maruyama, Fuminori Hirano, Noritada Yoshikawa, Kiyoshi Migita, Katsumi Eguchi and Hirotoshi Tanaka

Thrombin Stimulates Cell Proliferation in Human Fibroblast-like Synoviocytes in Nuclear Factor- κ B Activation and Protein Kinase C Mediated Pathway
J Rheumatol 2000;27(11):2777-85

H. 知的財産権の出願登録状況：特になし

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

1) 書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|-----------------------|--|---|---|----------------------------------|--------------------------|------|----------|
| Sakane T, Suzuki N | Behcet's disease. | A. N. Theofilopoulos and C. A. Bona | The Molecular Pathology of Autoimmunity (Second Edition) | Gordon and Breach Science | Pensyl- vania, USA | 2001 | in press |
| 鈴木 登 | 原発性免疫不全症候群 | 水島 裕、西岡久寿 樹監修、星 恵子、 下条貞友編集 | 在宅介護のための 難病ガイド | 日本医学出版 | 東京 | 2001 | 印刷中 |
| 鈴木 登 | 好酸球増多症候群 | 水島 裕、西岡久寿 樹監修、星 恵子、 下条貞友編集 | 在宅介護のための 難病ガイド | 日本医学出版 | 東京 | 2001 | 印刷中 |
| 鈴木 登 | 自己抗体産生Bリンパ球にお けるRAG発現異常 | 自己抗体と自己免疫 シンポジウム事務局 | 自己抗体と自己免 疫2000 | (株)医学生 物学研究所 | 名古屋 | 2000 | 31-8 |
| Sakane T, Suzuki N | Neuro-endocrine-immune axis in human rheumatoid arthritis. | | Autoimmunity | Kluwer Academic Publishers | Wroclaw, Poland | 2001 | in press |

2) 雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻名 | ページ | 出版年 |
|---|---|---|-----|----------|------|
| Takeba Y, Suzuki N, Wakisaka S, Takeno M, Kaneko A, Asai T, Sakane T | Involvement of cAMP responsive element binding protein (CREB) in the synovial cell hyperfunction in patients with rheumatoid arthritis. | Clin. Exp. Rheumtol. | 18 | 47-55 | 2000 |
| Wakisaka S, Suzuki N, Nagafuchi H, Takeba Y, Kaneko A, Asai T, Sakane T | Characterization of tissue outgrowth developed in vitro in patients with rheumatoid arthritis; involvement of T cells for the development of tissue outgrowth. | Int. Arch. Allergy Immunol. | 121 | 68-79 | 2000 |
| Sakane T, Suzuki N | Possible correction of abnormal rheumatoid arthritis synovial cell function by jun D transfection in vitro. | Arthritis Rheum. | 43 | 945-946 | 2000 |
| Sakane T, Takeno M, Suzuki N | Behcet's disease. | N. Engl. J. Med. | 342 | 588-589 | 2000 |
| Sakane T, Suzuki N | Neuro-endocrine-immune Axis in human rheumatoid arthritis. | Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis | 48 | 417-427 | 2000 |
| Yokoe T, Suzuki N, Minoguchi K, Adachi M and Sakane T. | Analysis of IL-12 receptor β 2 chain expression of circulating T lymphocytes in patients with atopic asthma. | Cell. Immunol. | | in press | 2001 |
| 下山義博、岳野光洋、永淵裕子、鈴木登、坂根剛 | ベーチェット病患者好中球における自発的なサイトカイン産生 | 炎症 | 20 | 157-164 | 2000 |
| 鈴木登 | 特殊型重症ベーチェット病の治療 | 今月の治療 | 8 | 533-535 | 2000 |
| 星野孝、坂根剛、鈴木登、玉木京子 | 神経・内分泌・免疫系の変動よりみた癌免疫療法-現状と将来 | 癌治療と宿主 | 12 | 40-52 | 2000 |
| 鈴木登、坂根剛 | Th1細胞分化とTecファミリー非レセプター型細胞内チロシンキナーゼTxk | Annual Review 免疫 2001 | | 65-72 | 2000 |
| 坂根剛、鈴木登 | 全身性エリテマトーデスにおける自己抗体産生の分子免疫学的機序 | 日本臨床免疫学会雑誌 | 23 | 499-504 | 2001 |
| 鈴木登 | 医学と医療の最前線. 膠原病と神経・内分泌・免疫系の関わり | 日本内科学会雑誌 2001 | | 印刷中 | 2001 |
| 武半優子、鈴木登 | 神経ペプチドによる炎症の制御 | 臨床免疫 | | 印刷中 | 2001 |
| Ohtsuki T, Tsuda H, Morimoto C | Good or evil: CD26 and HIV infection | J Dermatol Sci | 22 | 152-60 | 2000 |
| Sato K, Kawasaki H, Nagayama H, Enomoto M, Morimoto C, Tadokoro K, Juji T, Takahashi TA | TGF-beta 1 reciprocally controls chemotaxis of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells via chemokine receptors | J Immunol | 164 | 2285-95 | 2000 |
| Morimoto S, Kanno Y, Tanaka Y, Tokano Y, Hashimoto H, Jacquot S, Morimoto C, Schlossman SF, Yagita H, Okumura K, Kobata T | CD134L engagement enhances human B cell Ig production: CD154/CD40, CD70/CD27, and CD134/CD134L interactions coordinately regulate T cell-dependent B cell responses | J Immunol | 164 | 4097-104 | 2000 |
| Iwata S, Ohashi Y, Kamiguchi K, Morimoto C | Beta 1-integrin-mediated cell signaling in T lymphocytes | J Dermatol Sci. | 23 | 75-86 | 2000 |
| Nagayama H, Sato K, Kawasaki H, Enomoto M, Morimoto C, Tadokoro K, Juji T, Asano S, Takahashi TA | IL-12 responsiveness and expression of IL-12 receptor in human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. J Immunol | J Immunol | 165 | 59-66 | 2000 |

| | | | | | |
|---|--|----------------------|-----|-----------|----------|
| Qing Y-W, Kitagawa M, Higashi M, Ishii G, <u>Morimoto C</u> , Harigaya K | Activation of mitogen-activated protein kinases through $\alpha 5 \beta 1$ integrin is required for the cell cycle progression of B progenitor cell line, Reh, on human marrow stromal cells | Exp. Hematol | 28 | 1147-57 | 2000 |
| Munakata Y, Iwata S, Dobers J, Ishii T, Nori M, Tanaka H, <u>Morimoto C</u> | Novel in Vitro effects of bucillamine: Inhibitory effects on proinflammatory cytokine production and transendothelial migration of T Cell | Arthr. and Rheum | 43 | 1616-23 | 2000 |
| Ikushima H, Munakata Y, Ishii T, Iwata S, Terashima M, Tanaka H, Schlossman SF, <u>Morimoto C</u> | Internalization of CD26 by mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor contributes to T cell activation | Proc. Natl. Acad. S | 97 | 8439-44 | 2000 |
| Sato K, Kawasaki H, Nagayama H, Enomoto M, <u>Morimoto C</u> , Tadokoro K, Juji T, Takahashi TA | Chemokine Receptor Expressions and Responsiveness of Cord Blood T Cells | J Immunol | 166 | 1659-66 | 2001 |
| Sato K, Kawasaki H, Nagayama H, Enomoto M, <u>Morimoto C</u> , Tadokoro K, Juji T, Takahashi TA | Signaling events following chemokine receptor ligation in human dendritic cells at different developmental stages | Int Immunol | 13 | 167-79 | 2001 |
| Homma T, Hosono O, Iwata S, Ando S, Sasaki K, Nishi T, Kawasaki H, <u>Tanaka H</u> , <u>Morimoto C</u> | Recognition of cell surface GD3 by monoclonal antibody anti-6C2 in rheumatoid arthritis synovial fluid | Arthr. & Rheum | | | in press |
| Pilar Carrero, Kensaku Okamoto, Pascal Coumilleau, Sallyann O'Brien, <u>Hirotoishi Tanaka</u> , and Lorenz Poellinger | Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-Binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1 α | Mol. Cell. Biol | 20 | 402-15 | 2000 |
| <u>Hirotoishi Tanaka</u> , Yuichi Makino, Kensaku Okamoto, Takahisa lida, Noritada Yoshikawa, Takanori Miura | Redox regulation of the nuclear receptor | Oncology | 59 | 13-8 | 2000 |
| Takahisa lida, Yuichi Makino, Kensaku Okamoto, Noritada Yoshikawa, Isao Makino, Tetsuya Nakamura, <u>Hirotoishi Tanaka</u> | Functional modulation of the mineralocorticoid receptor by cisdiamminedichloroplatinum(II) | Kidney Int | 58 | 1450-60 | 2000 |
| Hetti Poukka, Ulla Karvonen, Noritada Yoshikawa, <u>Hirotoishi Tanaka</u> , Jorma J. Palvimo, Olli A. Janne | The RING finger protein SNURF modulates nuclear trafficking of the androgen receptor | J. Cell. Sci | 113 | 2991-3001 | 2000 |
| Kiyoshi Migita, <u>Hirotoishi Tanaka</u> , Kensaku Okamoto, Noritada Yoshikawa, Yasufumi Ichinose, Satoshi Urayama, Satoshi Yamasaki, Hiroaki Ida, Yojiro Kawabe, Atushi Kawakami, Katsumi Eguchi | FK506 augments glucocorticoid-mediated cyclooxygenase-2 down-regulation in human rheumatoid synovial fibroblasts | Lab. Invest | 80 | 135-41 | 2000 |
| Noriaki Shimizu, Kotaro Sugimoto, Jianwei Tang, Takeyuki Nishi, Iwao Sato, Masaki Hiramoto, Shin Aizawa, Mamoru Hatakeyama, Reiko Ohba, Hideaki Hatori, Tatsufumi Yoshikawa, Fumiko Suzuki, Akira Oomori, <u>Hirotoishi Tanaka</u> , Haruma Kawaguchi, Hajime Watanabe, Hiroshi Handa | High-performance affinity beads for identifying drug receptors | Nature Biotechnology | 18 | 877-81 | 2000 |

| | | | | | |
|--|---|-------------|----|---------|------|
| Naoki Maruyama, Fuminori Hirano, Noritada Yoshikawa, Kiyoshi Migita, Katsumi Eguchi and <u>Hiroto</u> shi Tanaka | Thrombin Stimulates Cell Proliferation in Human Fibroblast-like Synoviocytes in Nuclear Factor- κ B Activation and Protein Kinase C Mediated Pathway | J Rheumatol | 27 | 2777-85 | 2000 |
|--|---|-------------|----|---------|------|

V. 平成12年度班員名簿

平成12年度 長寿科学総合研究事業

| | | | |
|-----------------------|------------------------|----------------------------------|-------|
| 研究分野 | 骨関節 | | |
| 研究課題名 | 関節疾患の原因の解明及び発症の予防・治療方法 | | |
| 課題番号 | H12-長寿-031 | | |
| 区 分 | 氏 名 | 所 属 | 職 名 |
| 主任研究者 | 坂 根 剛 | 聖マリアンナ医科大学・免疫学・ 病害動物学 | 教 授 |
| 主任研究者 (平成13.1.10～) | 鈴 木 登 | 聖マリアンナ医科大学・免疫学・ 病害動物学 | 助 教 授 |
| 分担研究者 | 森 本 幾 夫 | 東京大学医科学研究所・先端医療 研究センター・免疫病態分野 | 教 授 |
| 分担研究者 | 田 中 廣 壽 | 東京大学医科学研究所・先端医療 研究センター・免疫病態分野 | 助 教 授 |
| 分担研究者 | 永 淵 裕 子 | 聖マリアンナ医科大学・ 難病治療研究センター | 助 手 |