

20000597

リウマチ性疾患の克服に関する研究

(研究課題番号：H12-免疫-001)

平成12年度厚生科学研究費補助金

感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業 研究報告書

研究代表者： 西岡久寿樹

聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター

目 次

西岡久寿樹 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター	1
岩倉洋一郎 東京大学医科学研究所ヒト疾患モデルセンター	5
越智 隆弘 大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学	10
加藤 智啓 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター	13
鎌谷 直之 東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター	16
坂根 剛 聖マリアンナ医科大学医学部免疫学・病害動物学教室	17
田中 栄 東京大学医学部整形外科学教室	23
戸山 芳昭 慶應義塾大学医学部整形外科学教室	26
中島 利博 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター	27
中西 徹 岡山大学歯学部口腔生化学講座	30
開 祐司 京都大学再生医科学研究所生体組織工学	33

宮坂 信之	
東京医科歯科大学大学院生体応答調節学	38
森下 竜一	
大阪大学大学院医学系研究科分子治療学	40
森本 幾夫	
東京大学医科学研究所先端医療センター免疫病態分野	41
山本 一彦	
東京大学医学部アレルギーリウマチ内科	46
吉川 秀樹	
大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学教室	48
吉田 勝美	
聖マリアンナ医科大学医学部予防医学教室	50

リウマチ性疾患の克服に関する研究

主任研究者

西岡 久寿樹

聖マリアンナ医科大学教授 難病治療研究センター長

研究要旨

人口の動態の変化や社会環境の変化に伴い、国民生活に直接的・間接的に重大な影響を及ぼすと考えられるリウマチ性疾患は、今後増加の一途にあると考えられる。こういったリウマチ性疾患を克服するために、その病変の主座である運動器の障害機構の解明とその機能再生のための創薬、分子・遺伝子制御及び再生医療の研究を推進する事を目的とした。この目的を達成するために、第1に運動器を構築する骨・軟骨の増殖・再生にかかわる分子及び遺伝子群の関与を検討した。その結果、形態形成遺伝子の一つや関節形成の遺伝子が明らかになってきた。第2に関節炎及び骨破壊発症の機構及び進展の解明と制御のため、先端的治療を推進している。すなわち、分子制御及び遺伝子制御の立場からその基礎的検討を行ない、IL-1Ra, γ -インターフェロンなど一定の生物製剤の顕著な効力が確認された。第3に、リウマチ性疾患による骨・関節破壊の障害を運動器科学の分野に位置づけ治療目標を設定した。第4に、リウマチ性疾患の医療費に及ぼす実態を把握し、その社会的損失を評価する計量化モデルを作成した。以上の研究成果により、いわゆる費用対効果の面から詳細な解析を行ない、医療福祉・経済面からもその妥当性を検証した。

分担研究者

岩倉洋一郎（東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター 教授）

越智 隆弘（大阪大学大学院医学系研究科医工学治療学教室 教授）

加藤 智啓（聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター 助教授）

鎌谷 直之（東京女子医科大学付属膠原病リウマチ痛風センター 教授）

坂根 剛（聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター 教授）

田中 栄（東京大学医学部整形外科教室 助手）

戸山 芳昭（慶応義塾大学医学部整形外科教室 教授）

中島 利博（聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター 助教授）

中西 徹（岡山大学歯学部口腔生化学講座 助教授）

開 祐司（京都大学再生医科学研究所 教授）

宮坂 信之（東京医科歯科大学医学部第一内科 教授）

森下 竜一（大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学教室 助教授）

森本 幾夫（東京大学医科学研究所 教授）

山本 一彦（東京大学医学部アレルギーリウマチ内科 教授）

吉川 秀樹（大阪大学大学院医学系研究科器管制御外科学教室 教授）

吉田 勝美（聖マリアンナ医科大学医学部予防医学教室 教授）

A. 研究目的

リウマチ性疾患は、筋骨格系といった日常生活に直結する運動器が系統的に侵襲される疾患である。そのために患者の日常生活活動を中心とする生活の質（QOL）は著しく低下し、またそれによる社会的損失は著しい。先進諸国では、社会環境の変化や人口の高年齢化といっ

た要因により、こういったリウマチ性疾患は増加の一途である。本邦では、今後10年以内はその罹患患者数は、2,000万人以上にも達し、人口構成上からも米国での成績から推定すると、リウマチ性疾患による社会的損失額はGDPの1.1%近くになると考えられる。従ってリウマチ性疾患の発症機構の解明とその制圧は、国民

保健上からも緊急性を要する課題である。本研究班は、①リウマチ性疾患に伴う難治性炎症の制御を目的とした創薬研究とその臨床的適応の推進、②骨・軟骨の変性の分子機構の解明により、その制御手段を開発、③再生医学の手段を用いた運動機能の回復、の3本を重要な研究課題として、以下の研究を遂行した。

B. 研究方法

本研究計画を達成するための研究目標

- ① 創薬・遺伝子制御を中心とする先端的治療研究領域
- ② 筋・骨格系障害の制御、とくに骨・軟骨変性の再生
- ③ リウマチ性疾患に対する医療経済モデルの確立

以上の三つの研究を主軸として、これを国民の保健・医療及び福祉の面から評価するため、研究目標達成によって得られる費用対効果の検討を行なう。このために現在第一線で研究活動を行っている分担研究者を選定し、それぞれの戦略目標を立てた。

C. 研究結果

- 1) 先端的研究
 - ① 既存の抗リウマチ剤の評価を、患者の遺伝子多型性の解析に基づいて、その効果、適正な治療計画を確立するためのデータベースが、整備された。
 - ② 病態形成にかかわる炎症性分子や骨破壊分子とそれを標的とした生物製剤の開発が進展しており、その前臨床準備がすすめられている。
 - ③ 難治性リウマチに対する遺伝子治療の基礎的成果に基づき、臨床応用へ向けた研究が展開されている。
 - ④ 転写異常に伴う病態制御のための鍵となる分子が幾つか明確になった。
 - ⑤ 発生工学に基づく抗リウマチ剤の開発のための動物モデルが5系統ほど確立された。
- 2) 筋骨格系を中心とする障害運動器の修復と再生医療
 - ① 骨・軟骨破壊の分子機構の解明とその制御が進み、特に IL-1Ra, γ -インターフェロンの強力な効果が動物モデルで確認された。
 - ② 成長因子による軟骨再生の基礎的・臨床的研究が着実に進んでいる。

- ③ ヒト胚性幹細胞を用いた骨・軟骨の分化・誘導とそれを用いた再生医療への著しい検討が行われている。
- ④ 運動器障害の修復のためのロボシステムを用いたナビゲーターオペレーションが確立され臨床応用に一定の目途がついてきた。
- ⑤ 運動器科学からリウマチ性疾患の制御目標が確立された。
- ⑥ リウマチ性疾患の国民医療費に対する計量的評価とその克服によって得られる経済効果の予測モデルが確立されて、そのデータベースが構築されている。

D. 考察

これまで、申請者らを中心とした慢性関節リウマチを主とした厚生省のリウマチ調査研究事業は、疫学調査を通して実態を解明してきた。免疫異常の解明を通じて、リウマチ病因・病態解明・新しい治療手段開発など数多くの成果を挙げてきた。このことは、国内の治療研究はもとより、国際的にも常にリウマチ研究をリードしてきた。その成果は国内外から高い評価を受けている。

これらの慢性関節リウマチの成因及び治療研究の開発を通じて得られた成果は、現在、国民病とまで言われている変形性関節症等を代表とするリウマチ性疾患の制圧に向けて、大きな一歩を本格的に踏み出した。すなわち、生物製剤や遺伝子治療による難治性炎症の制御、骨・軟骨の破壊機序の解明とその制御に目標をおいた研究が、一年間の間に大きな成果を挙げ、海外のトップクラスの Journal に数多くの論文が発表された。

今年度の研究班では、リウマチ性疾患による運動器障害に対して、運動器再生・機能再生を企て新しい治療戦略を構築し、現在着実に進展している。

また運動器科学という新しい分野の構築に基礎をおいた、リウマチ性疾患の病因病態解明・治療戦略の構築を試みた独創的な研究である。また、今回リウマチ性疾患の罹患による社会的損失の計量的評価地域別に検討する評価モデルを作成したが、これも本邦では、初めての試みである。

E. 結論

リウマチ性疾患に対する疫学的研究から病因・病態・治療戦略について、これでは本研究

班の構成員は国際的にも第一線の研究開発活動を行ってきた。これまでの成果に基づいて、数多くの新しい制圧戦略が確立した。また、新たに生物製剤・遺伝子制御などによる先端治療研究を遂行してきた。その結果は次の通りである。

- ① 難治性炎症の制御のための新規生物製剤臨床へ向けた開発が遂行されている。
- ② アポトーシスの制御を遺伝子レベルで調節する先端的な治療戦略の研究開発を展開してきている。
- ③ リウマチの病因の1つに、関節や四肢の形態形成遺伝子の関与を解明した。またこれらは再生治療の方向性を示し、関節形成に主要な役割を荷なっている遺伝子を解析している。
- ④ 軟骨破壊の分子機構とその再生のために成長因子ペプチドや胚細胞を用いた研究、自家軟骨移植など新しい試みが遂行されている。
- ⑤ 生物活性を有する骨・軟骨破壊の予防薬の臨床応用に向けた基礎的研究及び臨床が進展している。
- ⑥ 遺伝子多型性に基づいた薬効予測及び創薬開発の研究が行われている。
- ⑦ 転写機能の異常が、新たにこれらのリウマチ性疾患に関与していることが明らかにされ、そのモデルマウスが確立された。これらを制御することにより、低分子化合物による創薬開発の研究が進んでいる。
- ⑧ リウマチ性疾患の医療経済効果の面から検討が進んでいる。
- ⑨ ロボシステムを用いた医療技術開発が進んでいる。

F. 研究発表

1. M. Sakata, K. Nishioka, et al. Antibody to osteopontin in arthritic patients. 2001 J. Rheumatol. (in press)
2. Guohua Yuan, K. Nishioka, et al. Chemokine/chemokine receptor expression in OA chondrocytes. 2001 Arthritis Rheum. (in press)
3. N. D. Khoa, K. Nishioka, et al. Potential Role of Hoxd-9 is in Synoviocyte Proliferation. 2001

Arthritis Rheum. (in press)

4. J. Tsuruha, K. Nishioka, et al. Immune responses to CLIP in OA patients. 2001 Arthritis Rheum. (in press)
5. T. Nakajima, K. Nishioka, et al. APECED protein AIRE has transcriptional transactivating properties and interacts with common co-activator CBP. 2001 J. Biol. Chem. (in press)
6. Weihong Yin, K. Nishioka, et al. Synovial hyperlasia in HAAP is induced by TNF α produced by HTLV-I infected CD68+ cells. 2001 J. Rheumatol. (in press)
7. H. Asahara, K. Nishioka, et al. NF- κ B and NO in RA synoviocytes. 2001 J. Rheumatol. (in press)
8. X. Yu, T. Matsui, M. Otsuka, T. Sekine, K. Yamamoto, K. Nishioka, and T. Kato. Anti-CD69 autoantibodies cross react with low density lipoprotein receptor-related protein 2 in systemic autoimmune diseases. 2001 J. Clin. Invest. (in press)
9. M. Kurokawa, K. Nishioka, et al. Fas-dependent apoptosis caused by cisplatin in Squamous cell carcinoma. 2001 Cancer Ltrs. (in press)
10. T. Matsui, K. Yamamoto, K. Nishioka and T. Kato. Autoantibodies to CTLA-4 Enhance T cell Proliferation. 2001 J. Rheumatol. (in press)
11. T. Nakajima, K. Nishioka, et al. APECED protein AIRE has transcriptional transactivation properties and interacts with common co-activator CBP. 2001 J. Biol. Chem. (in press)
12. T. Kobayashi, K. Okamoto, T. Kobata, T. Hasunuma, T. Kato, H. Hamada and K. Nishioka. Novel gene therapy for rheumatoid arthritis by FADD gene transfer: Induction of apoptosis of rheumatoid synoviocytes but not chondrocytes. 2000 Gene Therapy 7: 527-533
13. T. Kobayashi, K. Okamoto, T. Kobata, T.

- Hasunuma, T. Kato, H. Hamada and K. Nishioka. Differential regulation of Fas-mediated apoptosis of rheumatoid synoviocytes by Tumor Necrosis Factor α and basic Fibroblast Growth Factor is associated with the expression of apoptosis-related molecules. 2000 *Arthritis Rheum.* 43: 1106-1114
14. K. Okamoto, T. Kobayashi, T. Kobata, T. Hasunuma, T. Kato, T. Sumida and K. Nishioka. Fas-associated death domain protein is a Fas-mediated Apoptosis Modulator in Synoviocytes. 2000 *Rheumatology* 39: 471-480
15. U. Mueller-Ladner and K. Nishioka. P53 in rheumatoid arthritis: friend or foe? 2000 *Arthritis Res.* 2: 175-178
16. N.D. Khoa, T. Hasunuma, T. Kobata, T. Kato and K. Nishioka. Expression of Murine Hoxd-9 During Embryonic Joint Patterning and in HILV-I tax Transgenic mice with Arthropathy Resembling RA. 1999 *Arthritis Rheum.* 42: 686-696
17. T. Kobayashi, K. Okamoto, T. Kobata, T. Hasunuma, T. Sumida and K. Nishioka. Tumor Necrosis Factor α Regulation of the Fas-Mediated Apoptosis-Signaling Pathway in Synovial Cells. 1999 *Arthritis & Rheum.* 42: 519-526
18. T. Kato, M. Kurokawa, K. Masuko-Hongo, H. Sasakawa, T. Sekine, S. Ueda, K. Yamamoto and K. Nishioka. T cell clonality in synovial fluid of a patient with rheumatoid arthritis: persistent but fluctuant oligoclonal T cell expansions. 1998 *J. Immunol.* 159: 5143-5149
19. K. Fujisawa, K. Okamoto, H. Asahara, T. Hasunuma, T. Kobata, T. Kato, T. Sumida and K. Nishioka. Evidence for autoantigens of env/tax protein in HILV-I env-pX transgenic mice. 1998 *Arthritis Rheum.* 41: 101-109
20. K. Okamoto, H. Asahara, T. Kobayashi, H. Matsuno, T. Hasunuma, T. Kobata, T. Sumida and K. Nishioka. Induction of apoptosis in the rheumatoid synovium by Fas ligand gene transfer. 1998 *Gene Therapy* 5: 331-338
21. T. Hasunuma, T. Kato, T. Kobata and K. Nishioka. Molecular mechanism of immune response, synovial proliferation and apoptosis in rheumatoid arthritis. 1998 *Springer Semin Immunopathol.* 20: 41-52
22. H. Aono, K. Fujisawa, T. Hasunuma, S. J. Mariott and K. Nishioka. Extracellular human T cell leukemia virus type I tax protein stimulates the proliferation of human synovial cells. 1998 *Arthritis & Rheum.* 41: 1995-2003
23. T. Hasunuma, T. Sumida and K. Nishioka. Human T cell leukemia virus type-1 and rheumatoid arthritis. 1998 *Int. Rev. Immunol.* 17: 291-307
24. J. K. Tong, K. Masuko-Hongo, K. Nishioka, T. Kato, F. Sugata and S. Iino. Strain from a novel subfamily of hepatitis G virus/hepatitis GB virus C isolated from a Japanese patient: sequence analysis of the envelope 1 (E1) region (letter). 1998 *J. Clin. Microbiol.* 36: 2797-2799
25. T. Sumida, T. Hasunuma, H. Asahara, T. Maeda and K. Nishioka. Rheumatoid arthritis and apoptosis (review). 1998 *Intern Med.* 37: 184-188
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

慢性関節炎におけるサイトカインの役割

岩倉洋一郎（東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター教授）

研究要旨

関節リウマチの病因を明らかにする試みの1つとして、関節炎における炎症性サイトカインの役割について検討してきた。本年度はIL-1レセプターアンタゴニスト (ra) 欠損マウスにみられる自己免疫性関節炎の解析を行い、関節炎発症がT細胞の異常によること、T細胞ではCD40L、OX40などの副シグナルの発現が異常になっていること、関節炎が正常骨髄細胞の移植によって治療できることを明らかにした。

A. 研究目的

我々は先にHTLV-Iの*tax*遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (HTLV-I-Tgマウス) を作製し、このウイルスがヒトの慢性関節リウマチによく似た慢性関節炎を引き起こすことを示した。これまでの解析から、このマウスの関節炎の発症にはT細胞に依存した自己免疫が関与すること、IL-1やIL-6などのサイトカインが病態形成に関与していること、を明らかにした。本研究では、そのうちIL-1の果たす役割について検討した。

IL-1は炎症のメディエーターとして知られているが、他にも免疫系の調節や、中枢神経系の調節、内分泌系の調節など、生体の中で多面的な役割を果たしているものと考えられている。IL-1には α 、 β の二種の分子種が知られており、同じレセプターに結合する。一方、IL-1raは同じレセプターに結合し、IL-1の作用を阻害することから、その調節因子と考えられている。我々は個々のIL-1ファミリー遺伝子を欠

損させたマウスを作製したところ、IL-1ra遺伝子欠損マウスが自己免疫性の関節炎を発症することを発見した。今年度はこのマウスの関節炎発症機構を解析した。

B. 方法

ノックアウト (KO) マウス: IL-1 α 、およびIL-1 β は、それぞれエクソン5およびエクソン3-5内にハイグロマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子を挿入して失活させた。また、IL-1 α/β ダブルKOマウスは、ES細胞の段階で両遺伝子に上記の変異を導入し、作製した。IL-1raKOマウスは、エクソン1-4をネオマイシン耐性遺伝子で置換することにより作製した。

これらのマウスはいずれもBALB/cAマウスに6世代以上戻し交配し、実験に供した。なお、マウスの飼育は全てSPF環境下で行った。

骨髄移植実験はX線照射した受容体マウスにT細胞を除去した骨髄細胞 1×10^7 細

胞を同系マウスに移植した。T細胞移植には脾臓、及びリンパ節よりT細胞をMACSで精製し、 2×10^7 細胞をBALB/c-nu/nuマウスに移植した。

C. 結果

1. IL-1KOマウスはSRBCに対する免疫応答が低下しており、逆にIL-1raKOマウスは亢進していた。この結果、IL-1が免疫応答の調節因子として重要な役割を果たしていることが示された。

2. OVA特異的なTCR遺伝子を導入したDO11.10トランスジェニックマウスとIL-1KOマウスとを掛け合わせ、免疫応答におけるIL-1の役割を検討したところ、CD40リガンドやOX40などの副シグナル伝達分子の発現を制御していることが分かった。

3. 昨年度、BALB/c背景のIL-1raKOマウスは100%関節炎を発症する事を示したが、これらのKOマウスの骨髄細胞を放射線照射した同系のマウスに移植すると関節炎を発症することが分かった。逆に正常骨髄細胞を移植すると、関節炎を治療できることがわかった。また、脾臓T細胞を精製してヌードマウスに移植したところ、やはり関節炎を発症することが分かった。

D. 考察

以上の結果は、IL-1raKOに発症する関節炎において、T細胞が主要な役割を果たしていることを示している。また、IL-1raKOマウスにみられるT細胞の異常が、T細胞の分化・成熟を促す環境の問題ではなく、T細胞自身の問題であることが示された。IL-1がT細胞とAPC間の相互作用に重要な役割を果たす、副シグナル伝達分子の発現を制御していたことから、IL-1raKOマウスにおいてはT細胞上の

IL-1raがないために、APCからのIL-1シグナルが過剰にT細胞を活性化し、その結果、これらのマウスは自己免疫性の関節炎を発症するものと考えられる。従って、IL-1とIL-1raとのバランスが免疫系の恒常性を維持するためにきわめて重要であることが示された。

E. 結論

我々は、IL-1が発熱やグルココルチコイドの分泌においても重要な役割を果たしていることを既に報告した。今回、IL-1が免疫調節因子としても重要であることがわかった。炎症のメディエーターであるIL-1が同時に免疫系を調節することはきわめて合理的である。さらにこれらの結果から、慢性関節炎の治療に骨髄移植が有効であることが示唆された。

F. 研究発表

1. Hino, A., Igarashi, O., Tagawa, Y., Iwakura, Y., and Nariuchi, H. Interferon- γ priming is not critical for IL-12 production of murine spleen cells. *Cytokine*, **12**, 12-20 (2000).
2. Horai, R., Saijo, S., Tanioka, H., Nakae, S., Sudo, K., Okahara, A., Ikuse, T., Asano, M., and Iwakura, Y. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *J. Exp. Med.*, **191**, 313-320 (2000).
3. Tagawa, Y., Matthys, P., Heremans, H., Dillen, C., Zaman, Z., Iwakura, Y., and Billiau, A. Bimodal role of endogenous interleukin-6 in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *J. Leukocyte Biology*, **67**, 90-96 (2000).
4. Miyazato, A., Kawakami, K., Iwakura, Y.,

- and Saito, A. Chemokine synthesis and cellular inflammatory changes in lungs of mice bearing p40tax of human T-lymphotropic virus type 1. *Clin Exp Immunol.*, **120**, 113-124 (2000).
5. Nishihori, H., Tsuji, H., Wang, H., Tahara, H., Akiyama, M., Ogawa, Y., Matsushima, K., Iwakura, Y., and Mukaida, N. Participation of endogenously produced IFN- γ in interleukin 4-mediated tumor rejection. *Human Gene Therapy*, **11**, 659-668 (2000).
 6. Ohkusu, K., Yoshimoto, T., Takeda, K., Ogura, T., Kashiwamura, S., Iwakura, Y., Akira, S., Okamura, H., and Nakanishi, K. Potentiality of interleukin-18 as a useful reagent for treatment and prevention of *Leishmania major* infection. *Infect Immun.*, **68**, 2449-2456 (2000).
 7. Sasaki, S., Nishikawa, S., Miura, T., Mizuki, M., Yamada, K., Madarame, H., Tagawa, Y., Iwakura, Y., and Nakane, A. Interleukin-4 and interleukin-10 are involved in host resistance to *Staphylococcus aureus* infection through regulation of gamma interferon. *Infect Immun.*, **68**, 2424-2430 (2000).
 8. Yamada, H., Mizuno, S., Horai, R., Iwakura, Y., and Sugawara, I. Protective role of interleukin-1 in mycobacterial infection in IL-1 alpha/beta double-knockout mice. *Lab Invest.*, **80**, 759-67 (2000).
 9. Uetani, N., Kato, K., Ogura, K., Mizuno, H., Kawano, K., Mikoshiba, K., Yakura, H., Asano, M., and Iwakura, Y. Impaired learning with enhanced hippocampal long-term potentiation in PTP δ -deficient mice. *EMBO J.*, **19**, 2775-2785 (2000).
 10. Serizawa, S., Ishii, T., Nakatani, H., Tsuboi, A., Nagawa, F., Asano, M., Sudo, K., Sakagami, J., Sakano, H., Ijiri, T., Matsuda, Y., Suzuki, M., Yamamori, T., Iwakura, Y., and Sakano, H. Mutually exclusive expression of odorant receptor transgenes. *Nature Neuroscience*, **3**, 687-693 (2000).
 11. Ohta, A., Sekimoto, M., Sato, M., Koda, T., Nishimura, Si., Iwakura, Y., Sekikawa, K., and Nishimura, T. Indispensable role for TNF-alpha and IFN-gamma at the effector phase of liver injury mediated by Th1 cells specific to hepatitis B virus surface antigen. *J Immunol.*, **165**, 956-961 (2000).
 12. Kawakami, K., Koguchi, Y., Qureshi, M. H., Miyazato, A., Yara, S., Kinjo, Y., Iwakura, Y., Takeda, K., Akira, S., Kurimoto, M., and Saito, A. IL-18 contributes to host resistance against infection with *Cryptococcus neoformans* in mice with defective IL-12 synthesis through induction of IFN-gamma production by NK Cells. *J Immunol.*, **165**, 941-947 (2000).
 13. Tanaka, J., Ozaki, H., Yasuda, J., Horai, R., Tagawa, Y., Asano, M., Saijo, S., Imai, M., Sekikawa, K., Kopf, M., and Iwakura, Y. Lipopolysaccharide-induced HIV-1 expression in transgenic mice is mediated by tumor necrosis factor- α and interleukin-1, but not by interferon- γ nor interleukin-6. *AIDS*, **14**, 1299-1307 (2000).
 14. Kido, M., Asano, M., Iwakura, Y., Ichinose, M., Miki, K., and Furukawa, K. Presence of a higher molecular weight β -1, 4-galactosyltransferase in mouse liver. *Acta Histochem. Cytochem.* **33**, 215-221 (2000).
 15. Miura, T., Nishikawa, S., Sasaki, S., Yamada, K., Hasegawa, S., Mizuki, D.,

- Mizuki, M., Hatayama, I., Sekikawa, K., Tagawa, Y., Iwakura, Y., and Nakane, A. Roles of endogenous cytokines in liver apoptosis of mice in lethal *Listeria monocytogenes* infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **28**, 335-41 (2000).
16. Yamaguchi, K., Motegi, K., Iwakura, Y., and Endo, Y. Involvement of interleukin-1 in the inflammatory actions of aminobisphosphonates in mice. *Br. J. Pharmacol.*, **130**, 1646-1654 (2000).
17. Igarashi, I., Asaba, U., Xuan, X., Omata, Y., Saito, A., Nagasawa, H., Fujisaki, K., Suzuki, N., Iwakura, Y., and Mikami, T. Immunization with recombinant surface antigens p26 with Freund's adjuvants against *Babesia rodhaini* infection. *J. Vet. Med. Sci.* **62**, 717-723 (2000).
18. Mun, H.-S., Aosai, F., Norose, K., Chen, M., Hata, H., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Byun, D.-S., and Yano, A. *Toxoplasma gondii* Hsp70 as a danger signal in *Toxoplasma gondii*-infected mice. *Cell Stress & Chaperones* **5**, 328-335 (2000).
19. Sugawara, I., Ymamada, H., Mizuno, S., and Iwakura, Y. IL-4 is required for defense against Mycobacterial infection. *Microbiol. Immunol.*, **44**, 971-979 (2000).
20. Hayashi, K., Natsume, W., Watanabe, T., Abe, N., Iwai, N., Okada, H., Ito, Y., Asano, M., Iwakura, Y., Habu, S., Takehama, Y., and Satake, M. Diminution of the AML1 transcription factor function causes differential effects on the fates of CD4 and CD8 single positive T cells. *J. Immunol.*, **165**, 6816-6824 (2000).
21. Horai, R., Saijo, S., Nakae, S., Sudo, K., Asano, M., and Iwakura, Y. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *Eur. Cytokine Netw.*, **11**, 203 (2000).
22. Nakae, S., Asano, M., Horai, R., and Iwakura, Y. IL-1 enhances T cell-dependent antibody production and T cell-priming through induction of CD40L and OX40 on T cells. *Eur. Cytokine Netw.*, **11**, 203, pp.14 (2000).
23. Naruse, C., Asano, M., and Iwakura, Y. Eph-A2 mutant mice revealed Eph-A2 and ephrin-A1 involved in formation of the tail notochord. In "*Mouse Molecular Genetics*", (eds. R. Behringer, C. Birchmeier, M. Bucan, R. Harvey), Cold Spring Harbor Lab., pp. 127 (2000).
24. Hayakawa, Y., Smyth, M. J., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Kakuta, S., Iwakura, Y., Yagita, H., Okumura, K., and Takeda, K. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nature Medicine*, **7**, 94-100 (2001).
25. Fukamauchi, F., Aihara, O., Wang, Y. J., Akasaka, K., Takeda, Y., Horie, M., Kawano, H., Sudo, K., Asano, M., Watababe, K., and Y. Iwakura TAG-1-deficient mice have marked elevation of adenosine A1 receptors in the hippocampus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **281**, 220-226 (2001).
26. Seino, K., Fukao, K., Muramoto, K., Yanagisawa, K., Takada, Y., Kakuta, S., Iwakura, Y., Van Kaer, L., Takeda, K., Nakayama, T., Taniguchi, M., Bashuda, H., Yagita, H., and Okumura, K. Requirement for NKT cells in the induction of allograft tolerance. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.*, **98**,

- 2577-2581, (2001).
27. Ishii, T., Serizawa, S., Kohda, A., Nakatani, H., Shiroishi, T., Okumura, K., Iwakura, Y., Nagawa, F., Tsuboi, A., and Sakano, H. Projection of three subsets of olfactory neurons expressing the odorant receptor transgene and the two cognate endogenous alleles. *Genes to Cell*, 6, 71-78 (2001).
28. Seino, K., Fukao, K., Muramoto, K., Yanagisawa, K., Takada, Y., Kakuta, S., Iwakura, Y., Van Kaer, L., Takeda, K., Nakayama, T., Taniguchi, M., Bashuda, H., Yagita, H., and Okumura, K. Requirement for NKT cells in the induction of allograft tolerance. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.*, 98, 2577-2581, (2001).
29. Ishii, T., Serizawa, S., Kohda, A., Nakatani, H., Shiroishi, T., Okumura, K., Iwakura, Y., Nagawa, F., Tsuboi, A., and Sakano, H. Projection of three subsets of olfactory neurons expressing the odorant receptor transgene and the two cognate endogenous alleles. *Genes to Cell*, 6, 71-78 (2001).
30. Morita, Y., Maravei, D. V., Bergeron, L., Wang, S., Tsutsumi, O., Taketani, Y., Asano, M., Horai, R., Korsmeyer, S. J., Iwakura, Y., Yuan, J., and Tilly, J. L. Caspase-2 deficiency rescues female germ cells from death due to cytokine insufficiency but not meiotic defects caused by *Ataxia Telangiectasia-mutated (Atm)* gene inactivation. *Endocrinology*, in press.
31. Naruse-Nakajima, C., Asano, M., and Iwakura, Y. Involvement of EphA2 in the formation of the tail notochord via interaction with ephrinA1. *Mechanisms of Development*, in press.
32. Yoneto, T., Waki, S., Takai, T., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Mizuguchi, J., Nariuchi, H., and Yoshimoto, T. A critical role of Fc receptor-mediated antibody-dependent phagocytosis in the host resistance to blood-stage *Plasmodium berghei* XAT infection. *J. Immunol.* in press.
33. Ozaki, H., Watanabe, Y., Takahashi, K., Kitamura, K., Tanaka, A., Urase, K., Momoi, T., Sudo, K., Sakagami, J., Asano, M., Iwakura, Y., and Kawakami, K. *Six-4*, a putative *myogenin* gene regulator, is not essential for mouse embryonal development. *Mol. Cell. Biol.* in press.

G. 知的所有権の取得状況

なし

慢性関節リウマチ間質細胞の機能に関する分子機構に関する研究
分担研究者 越智 隆弘
大阪大学整形外科

研究要旨

ナース細胞(RA77)とリンパ球(MC/car)間の相互作用に関する分子機構について解析した。両細胞間の接着および pseudo-emperipolesis にはインテグリン VLA4 (CD49d/CD29)を介した経路が優位に働いていること、低分子量 G タンパク質 Rho を介したシグナル伝達が pseudo-emperipolesis 現象に関して重要であることが示唆された。また、リンパ球の接触刺激によるナース細胞からの IL-6、IL-8 の産生上昇はこれら VLA4 以外の接触依存性経路によって制御されていることが明らかになった。

A. 研究目的

我々は in vitro においてリンパ球を抱き込む能力すなわち pseudo-emperipolesis 能のある間質細胞が、慢性関節リウマチ(以下 RA)患者の滑膜及び骨髄に共通して存在していることを見だし、これらをナース細胞とよんでいる。ナース細胞はリンパ球と強く相互作用し、互いに活性化する機能を持つこと、すなわち、IL-6、IL-8 をはじめとした炎症性サイトカイン産生の上昇、リンパ球系および骨髄球系細胞の維持、活性化、B 細胞からの抗体産生上昇などが確認され、RA の病態に深く関与する細胞であると考えている。ナース細胞とリンパ球間の相互作用に関する接着分子について解析すること、さらにナース細胞とリンパ球との相互作用がサイトカイン産生におよぼす影響について明らかにすることが RA の病態の解明や治療ターゲットの選択の一助につながる可能性がある。細胞間相互作用に不可欠である接着分子や細胞接着、細胞移動などの制御に関する低分子量G蛋白質 Rho の関与を明らかにすることを本研究の

目的とした。

B. 研究方法

RA 患者滑膜組織から滑膜ナース細胞株を樹立し、その中で強い pseudo-emperipolesis 能を有する滑膜ナース細胞株 RA77 を用いて実験を施行した。2 日間培養したナース細胞株 RA77 と B cell line である MC/car との共培養を行い、細胞接着、pseudo-emperipolesis、サイトカイン産生に対する抗接着分子中和抗体および Rho inhibitor (C3 酵素)の効果を判定した。抗接着分子モノクローナル抗体は接着阻害活性が確認されたクローンを選択し、使用した。RA 滑膜ナース細胞株、MC/car とともに 30 分の抗体の前処理を行い、抗体共存下での共培養における影響について検討した。また、MC/car を C3 で 48 時間前処理した影響について検討した。adhesion assay は蛍光ラベルした MC/car 細胞を 1 時間共培養し、接着した細胞の蛍光強度を測定する方法を用いた。pseudo-emperipolesis は 6 時間の共培養後、位相差顕微鏡下に観察して 3 個以上の MC/car 細胞の抱

き込みがみられるものを陽性細胞として陽性率を算出することにより評価した。さらに種々の条件下での培養 48 時間後の上清中 IL-6 および IL-8 濃度を ELISA kit を用いて定量した。

(倫理面への配慮)

滑膜は人工関節手術時にインフォームドコンセントを行ったうえ、同意を得て採取した。

C. 研究結果

細胞接着はコントロールを 100% として抗 CD29(インテグリン β 1)抗体で 82.7、抗 CD49d(インテグリン α 4)抗体で 61.8%と有意に抑制された。抗 CD11a (LFA-1 α)、抗 CD18(インテグリン β 2)、抗 CD44、抗 CD49e(インテグリン α 5)、抗 CD54 (ICAM-1)、抗 CD106 (VCAM-1)、抗 α 4 β 7 抗体では抑制効果は認められなかった。pseudo-emperipolesis は抗 CD29 および抗 CD49d 抗体でそれぞれ 46.7%、30.6%に抑制された。抗 CD11a (LFA-1 α)、抗 CD18(インテグリン β 2)、抗 CD44、抗 CD49e (インテグリン α 5)、抗 CD54 (ICAM-1)、抗 CD106 (VCAM-1)、抗 α 4 β 7 抗体では抑制効果は認められなかった。Rho inhibitor では細胞接着に対する阻害効果は認められなかったが、処理濃度依存性に pseudo-emperipolesis は有意に抑制された。IL-6、IL-8 とともに MC/car との共培養によって、ナース細胞単独培養時の 5-8 倍の産生量の増加が確認されたが、これらのサイトカインの産生増強は抗 CD49d 抗体あるいは Rho inhibitor の処理では抑制されなかった。

D. 考察

今回の実験の結果、抗 CD49d および抗 CD29 抗体により細胞接着および pseudo-emperipolesis が抑制されたことから、この両細胞間の接着および pseudo-emperipolesis には CD49d-CD29 のヘテロダイマーで形成されるインテグリン、すなわち VLA4 を介した経路が優位に働いていることが示唆された。一方、VLA4 のナチュラルリガンドである CD106 に対する抗体処理では阻害効果は認められず、MC/car 上の VLA4 はフィブロネクチンあるいはナース細胞上の未知のリガンドを認識して機能することが推察された。Rho は細胞接着、細胞移動などに関与する低分子量 G タンパク質のひとつであるが、Rho inhibitor 処理の結果から Rho を介したシグナル伝達は細胞接着には関与しないが、pseudo-emperipolesis 現象に関しては重要であることが示唆された。また、MC/car の接触刺激によるナース細胞からの IL-6、IL-8 の産生上昇は抗 CD49d 抗体あるいは Rho inhibitor 処理で抑制されず、これら以外の接触依存性経路によってサイトカイン産生は制御されていると考えられた。

E. 結論

RA ナース細胞とリンパ球間の相互作用において以下のことが示唆された。

- ①VLA4 を介した経路が adhesion, pseudo-emperipolesis において優位に働いている
- ②Rho を介した細胞内シグナル伝達が pseudo-emperipolesis 機構に関与し

ている

③IL-6、IL-8の産生上昇には他の接着シグナルを介した経路が働いている

F.健康危険情報

1.論文発表

2.学会発表

第13回日本整形外科基礎学術集会
(1998年)

慢性関節リウマチ間質(ナース)細胞の
機能に關与する分子機構

竹内英二 富田哲也 高野裕史 金子元春
宮坂昌之 越智隆弘

第42回日本リウマチ学会総会(1998年)

慢性関節リウマチ(RA)ナース細胞-
リンパ球間相互作用に關与する分子
機構

竹内英二 富田哲也 橋本英雄 金子元春
高野裕史 越智隆弘

American College of Rheumatology 62nd
National Scientific Meeting (1998)

ADHESION MOLECULES INVOLVED
IN THE INTERACTION BETWEEN
RA SYNOVIAL NURSE CELLS AND
LYMPHOCYTES.

Eiji Takeuchi, Tetsuya Tomita, Motoharu
Kaneko, Hiroshi Takano, Tomoko
Maeda*, Ryuji Suzuki*, Masayuki
Miyasaka and Takahiro Ochi.

H.知的財産権の出願・登録状況

変形性関節症における免疫応答の役割に関する研究

加藤 智啓 (聖マリアンナ医科大学・難病治療研究センター)

研究要旨

荷重や年齢による変性疾患として捉えられている変形性関節症においても組織学的には滑膜炎などの炎症が認められる。我々は変形性関節症の病因病態における免疫学的応答の関与を解明する目的で関節関連蛋白である cartilage intermediate layer protein (CILP) および YKL-39 について自己免疫応答と関節炎誘起性について検討した。

その結果、両蛋白についてそれぞれ 10% 前後の変形性関節症患者が自己免疫応答を有することが判明した。また、マウスに両蛋白を免疫すると、比較的弱い関節炎を誘起することが判明した。これらより、CILP および YKL-39 に対する免疫反応が変形性関節症患者の比較的軽度関節炎の誘導持続に関与している可能性が考えられた。

A. 研究目的

従来より変形性関節症は荷重や年齢による変性疾患として捉えられ、その病因病態に対する免疫学的応答の関与はあまり検討されてこなかった。しかし、慢性関節リウマチほど激しくはないが変形性関節症関節においても組織学的には滑膜炎が認められ、それが病因病態に関与している可能性も考えられる。以前に我々は変形性関節症患者滑膜に浸潤する T 細胞の解析を行い、そこへの T 細胞集積はオリゴクローナルであること、すなわち、特異抗原感作の結果であると考えられることを報告した。従って、変形性関節症患者滑膜炎を誘導する抗原に興味を持たれる。この今回、変形性関節症患者における関節関連抗原への免疫応答を調べる目的で、最近報告された cartilage intermediate layer protein (CILP) および YKL-39 について自己免疫応答と関節炎誘起性について検討した。

B. 研究方法

CILP は 91.5kD の蛋白で関節軟骨に特異的に存在する。CILP の後半領域は他の NTPPHase と相同性があり、NTPPHase 活性をもつが、前半部分は特に他の蛋白との相同性はない。我々はこの CILP の前半部分を 2 分割し (C1 及び C2)、それぞれを規定する

cDNA を PCR 法でヒト軟骨細胞由来の cDNA から増幅した。C1 は 999 塩基で 333 アミノ酸残基を規定し、C2 は 1056 塩基で 352 アミノ酸残基を規定する。その後、蛋白発現ベクターである pTEX2-eHis に組み込み、組換え蛋白として大腸菌を用いて調整した。また、C2 を 3 分割した部分蛋白 (C2F1, C2F2, および C2F3) を同様に調整した。C2F1、C2F2、および C2F3 はそれぞれ、132 アミノ酸残基、133 アミノ酸残基、および 117 アミノ酸残基を規定する。これを用い ELISA またはウエスタンブロットにて患者血清 (変形性関節症患者、105 例; 慢性関節リウマチ患者、88 例) の反応性を検討した。また、C1/C2 をマウス (DBA/1J, ICR, C57BL/6, および BALB/c) に免疫し関節炎発症の有無を検討した。また、YKL-39 についても全長蛋白を組換え蛋白として、同様の手法で作成し解析した。

C. 研究結果

ELISA 法にて CILP 及び YKL-39 に対する自己抗体を検出した。CILP に対しては変形性関節症患者血清の 10.5%、慢性関節リウマチ患者血清の 7.9% が陽性に反応した。抗 CILP 抗体陽性血清はさらにウエスタンブロットティングで確認した。エピトープを同定す

る目的で陽性血清の C2F1, C2F2, および C2F3 に対する反応性を検討したところ、3 領域のすべてにエピトープが検出された。また、C1 と C2 の等量混合し、マウスに免疫したところ、上記 4 系統すべてで関節炎を発症した。特に ICR マウスでは滑膜への細胞浸潤と軟骨表面の不整化を伴った多発関節炎が認められた。ヒト CILP に対する免疫反応は関節炎を誘起することが示された。一方、YKL-39 に対する自己抗体は ELISA 法にて変形性関節症患者血清の 11.1%、慢性関節リウマチ患者血清の 11.8% で陽性であり、CILP 同様マウスを免疫することにより関節炎を誘起しえた。ただし、典型的な抗原誘導性関節炎であるコラーゲン誘導性関節炎モデル (CIA) に較べると CILP 関節炎は軽度であり、YKL-39 関節炎はさらに軽微であった。

D. 考察

CILP 及び YKL-39 に対する自己免疫反応が変形性関節症患者及び慢性関節リウマチ患者の約 1 割に認められた。CILP のエピトープ解析の結果は CILP に対する免疫反応が交差反応ではなく抗原誘導性の反応であることを示している。

CILP 及び YKL-39 ともマウスの免疫により関節炎が誘起されることが示され、CILP 及び YKL-39 に対する免疫反応が上記 2 疾患の患者の一部で滑膜炎等関節内炎症の誘導抗原になっている可能性があると考えられた。

E. 結論

CILP および YKL-39 に対する免疫反応が変形性関節症患者の比較的軽度関節炎の誘導持続に関与している可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tsuruha, J., Masuko-Hongo, K., Kato, T.,

Sakata, M., Nakamura, H., Nishioka, K., : Implication of cartilage intermediate layer protein (CILP) in cartilage destruction in subsets of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* (in press)
2) Sekine, T., Masuko-Hongo, K., Matsui, T., Asahara, H., Takigawa, M., Nishioka, K., Kato, T., : YKL-39, a human cartilage-related protein, is recognized as a target antigen in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. Jan; 60(1)49-54, 2001

2. 学会発表

1) 変形性関節症滑膜浸潤細胞の T 細胞受容体 CDR3 領域の解析。中村洋、鶴羽淳一郎、阪田昌弘、増子佳世、加藤智啓、吉野慎一、西岡久寿樹。第 44 会日本リウマチ学会。2000 年。

2) 変形性関節症(OA)における免疫系を介した骨・軟骨の破壊機序。増子佳世、中村洋、加藤智啓、西岡久寿樹。第 44 会日本リウマチ学会。2000 年。

3) 軟骨由来蛋白質(YKL-39)による新規関節炎モデルマウス。阪田昌弘、増子佳世、加藤智啓、鶴羽淳一郎、中村洋、関根太一、西岡久寿樹。第 44 会日本リウマチ学会。2000 年。

4) 慢性関節リウマチ(RA)および変形性関節症(OA)患者における軟骨細胞。鶴羽淳一郎、増子佳世、阪田昌弘、中村洋、加藤智啓、西岡久寿樹。第 44 会日本リウマチ学会。2000 年。

5) Cartilage intermediate layer protein: A potent arthritogenic autoantigen in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. Zhenyu, Yao., Masuko-Hongo, K., Kato, T., Kurokawa, M., Sakata, M., Tsuruha, J., Nakamura, H., Nishioka, K., 64th Annual Scientific Meeting, 2000

6) Pathogenic role of immune response toward human articular chondrocyte in osteoarthritis. Sakata, M., Tsuruha, J.,

Masuko-Hongo,K., Nakamura,H.,
Kato,T., Nishioka,K., 64th Annual
Scientific Meeting, 2000

7) Implication of immunity to YKL-39 a
cartilage-derived protein, in arthropathy.
Sakata,M., Tsuruha,j., Masuko-Hongo,K.,
Nakamura,H., Kato,T., Nishioka,K., 64th
Annual Scientific Meeting, 2000

8) Cellular immune response toward
human articular chondrocytes from
osteoarthritis. Sakata,M., Tsuruha,j.,
Masuko-Hongo,K., Nakamura,H.,
Kato,T., Nishioka,K., 第30回日本免疫学
会、2000

9) Cartilage Intermediate Layer Protein: A
Potent Arthritogenic Autoantigen In
Osteoarthritis And Rheumatoid Arthritis.
Zhenyu,Yao., Masuko-Hongo,K., Kato,T.,
Kurokawa,M., Sakata,M., Tsuruha,J.,
Nishioka,K.,第30回日本免疫学会、2000

H.知的財産権の出願・登録状況（予定も 含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

RA 治療におけるメトトレキサートの有効性、副作用発現に対する methylenetetrahydrofolate reductase 遺伝子多型の影響に関する研究

分担研究者 鎌谷直之 東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター所長

研究要旨：5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR)は葉酸代謝経路の重要な酵素で C677T、A1298C の 2 か所の SNPs が知られている。この SNPs と RA における MTX 治療の副作用発現や有効性との関連について検討した。C677T では T allele を持つ症例で副作用が有意に多かった。A1298C では C allele を持つ症例で有効性との関連が認められた。これらの SNPs は MTX の効果、副作用を予測する因子として有用であると考えられた。

A. 研究目的

近年、遺伝子多型が疾患や薬物の効果・副作用に及ぼす影響が注目されている。5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) は葉酸代謝経路の重要な酵素であり、C677T、A1298C の 2 か所の SNPs (single nucleotide polymorphisms) がある。今回、我々は MTHFR の SNPs と慢性関節リウマチ (Rheumatoid arthritis, RA) におけるメトトレキサート(methotrexate、MTX) 治療の副作用発現や有効性との関連について検討した。

B. 研究方法

当センター外来通院中の RA 患者で MTX 服用歴のある 106 名 (男性 13 名、女性 93 名) を対象とした。インフォームドコンセントを得た後、末梢血を採取し、ゲノム DNA を抽出した。MTHFR 遺伝子の遺伝子多型は PCR-RFLP により決定した。

C. 研究結果

1. MTHFR の C677T 多型と A1298C 多型

C677T と A1298C は連鎖不平衡にあった。

2. MTX の副作用との関連

本検討対象者 106 例の 19%に MTX による副作用を認めた。C677T では T allele を有する例で、副作用発現が有意に高頻度であった ($p < 0.05$) が、A1298C では関連を認めなかった。

3. MTX の有効性との関連

MTX を 5mg/週で開始された症例において開始前と開始 3 ヶ月後の疼痛・腫脹関節数、血沈、CRP の改善率を比較したところ、A1298C では疼痛・腫脹関節数については差は認めなかったが、血沈、CRP の改善率は C allele を持つ症例群で有意に高かった ($p < 0.05$)。MTX を 5mg/週で開始し 7.5mg/週へ増量された症例数は C allele を持つ症例群で有意に少数であり ($p < 0.05$)、C allele を持つ症例では MTX

がより少量で有効である可能性が示された。C677T については有効性との関連は認められなかった。

D. 考察

RA における MTX の効果は葉酸投与により減弱することから、その作用機序に葉酸代謝が重要であると考えられる。今回検討した多型においては、いずれの変異も MTHFR の活性を低下させ、その程度は C677T の T allele においてより高い。今回の結果はこれらの変異が葉酸代謝と関連して MTX の有用性に関与することを示唆するものと考えられる。MTHFR の C677T・A1298C 多型は RA に対する MTX 治療の効果・副作用を予測する因子として臨床的に有用であると考えられた。

E. 結論

MTHFR 遺伝子の C677T 多型では T allele を有する症例で副作用発現が有意に高頻度であったが有効性との関連は認められなかった。一方、A1298C 多型では C allele を有する症例で有効性との関連が示唆され、副作用とは関連がなかった。

F. 健康危険情報：特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表：Urano W, et al: Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses. Arthritis Rheum submitted for publication.

2. 学会発表：仙道和子、他：RA に対する MTX の有効性および副作用発現と MTHFR 遺伝子多型との関連 リウマチ 40:395、2000

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（感覚器及び免疫・アレルギー等研究事業）

リウマチ性疾患の克服に関する研究班

分担研究報告

マウス胚性幹細胞からの軟骨細胞の分化誘導と

軟骨細胞分化に関わる転写因子の解析

分担研究者	坂根 剛	（聖マリアンナ医大 免疫学・病害動物学）
共同研究者	鈴木 登	（聖マリアンナ医大 免疫学・病害動物学）
	岳野光洋	（聖マリアンナ医大 免疫学・病害動物学）
	武半優子	（聖マリアンナ医大 免疫学・病害動物学）
	永淵裕子	（聖マリアンナ医大難病治療研究センター）

慢性関節リウマチ(RA)や変形性関節症(OA)などの関節疾患の原因解明と予防・治療法の開発を目指して、今回、マウスの胚性幹(embryonic stem cell; ES)細胞から軟骨細胞を分化誘導する実験系を用いて軟骨細胞に発現される転写因子と軟骨細胞分化・増殖との関連を検討した。軟骨細胞分化には、Sox-9 や Hox 遺伝子、 scleraxis などの軟骨細胞特異的転写因子の発現を認めた。これら転写因子発現の程度と軟骨細胞数はおおよそ相関した。この成績は軟骨細胞が発現する特異的転写因子を標的として、軟骨細胞特異的にその機能調節が可能であることを示す。さらに ES 細胞から分化誘導した軟骨細胞そのものが関節疾患の治療に応用可能であると考えられる。

A.研究目的

多発性の関節痛をもたらす慢性関節リウマチ(RA)や変形性関節症(OA)などの関節疾患は患者の日常的な活動性を低下させ、介護の必要度を増加させる。多発性関節疾患の原因解明と予防・治療法の開発が望まれている。ここでは従来の内科的治療では効果が期待できない進行した破壊性の関節病変に対する新たな治療的アプローチとして、RA、OA 罹患関節の新規治療法の確立をめざす。

マウス胚性幹(embryonic stem cell; ES)細胞は様々な細胞・組織への分化能を有し、多くの領域でその応用が期待されている。ここでは in vitro の胚性幹細胞からの軟骨細胞の分化誘導を行い、この軟骨細胞の分化・増殖に関わる転写因子の発現を検討する。さらに軟骨の再生による治療は、進行した破壊性の関節病変に対しても有用な手段となると期待される。そこで、ES 細胞由来の軟骨細胞を移植することで関節炎モデルマウ