

スでの再生治療法を開発する。

B. 研究方法

マウス ES 細胞は胎児線維芽細胞と leukemia inhibitory factor(LIF) と共培養することで多分化能を維持したまま継代できる。この ES 細胞をゲラチンコートディッシュ、あるいはフィブロネクチンコートディッシュ上で BMP-2、BMP-4 とともに培養した。

軟骨組織に特異的に発現する転写因子 Sox9、Hox 遺伝子、scleraxis と II 型 collagen の mRNA は逆転写酵素を用いて PCR 法で増幅した。アルシアンブルー染色は常法に従った。II 型 collagen の蛋白発現は免疫組織染色を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、実験前の飼育、実験中、実験後にいたるまで科学的かつ倫理的に対処し、動物の苦痛を排除するための麻酔による安楽死等の手法を用いた。

C. 研究結果

1. エンブリオイド体 (embryoid body; EB) の形成

マウスの ES 細胞株はマイトマイシン C 処理を行ったマウス胎児線維芽細胞上で leukemia inhibitory factor (LIF) と共に培養し継代維持した。20%FCS を含む分化誘導用の培養液中で 2~4 日間培養することで、浮遊状態で球状の ES 細胞塊、EB を作成することができた。これをさらに

数日培養することで EB は囊状の構造を示すまでに分化した。

一部の試験では、球状の ES 細胞塊、EB を 0.1%ゲラチンをコートしたプレートに移した後、bone morphogenetic protein (BMP)-2 あるいは BMP-4 を添加し、28 日間培養した。BMP 存在下に数日培養することで、EB の一部はプレートに付着するようになった。

培養 2 週間目の EB では、軟骨細胞に特異的と考えられるアルシアンブルー陽性領域が出現した。それ以降培養を継続することで、EB のアルシアンブルー陽性領域は増大した。

2. 軟骨細胞特異的転写因子の解析

これまでの成績から BMP 存在下に培養した EB が培養数週間で軟骨細胞に分化誘導されることが分かり、その分化誘導はサイトカインの影響下にあることが示された。そこでこれらの EB あるいは分化誘導した軟骨細胞から mRNA を回収し、RT-PCR 法で検討した。BMP 存在下に培養した EB では軟骨細胞特異的な転写因子である high-mobility-group (HMG) box 蛋白である Sox-9、Hox 遺伝子、basic-helix-loop-helix (bHLH) 蛋白である scleraxis の発現を認めた。BMP 非存在下ではこれら転写因子の発現はほとんど認められない。さらに BMP 存在下に培養した EB では軟骨細胞特異的な II 型コラーゲンと IX 型コラーゲンの mRNA 発現を認めた。一部の試験では、BMP により分化誘導した ES 細胞を付着細胞と浮遊して

いる非付着細胞に分けて実験を行った。付着細胞は軟骨細胞特異的な転写因子の mRNA を発現したが、非付着細胞はこれらを発現せず、ES 細胞から分化誘導した軟骨細胞は付着細胞として存在し、その中で軟骨細胞特異的な転写因子を発現することが示された。

3. II型コラーゲン蛋白発現の検討

EB を NUNC 社チャンバースライド上で培養した。一部は EB をトリプシン/EDTA 処理後、サイトスピン標本作製した。その後、ラビット抗マウス II 型コラーゲン抗体を用いて免疫細胞染色を行った。この方法で II 型コラーゲン陽性細胞を軟骨細胞と計測することで、軟骨細胞分化誘導を定量的に評価することが可能になった。ゲラチンをコートしたプレートを用いて ES 細胞を培養すると軟骨細胞は分化誘導されたが、フィブロネクチンをコートしたプレートを用いると軟骨細胞は全く分化誘導されなかった。ゲラチンプレート上で BMP-2 4 ng/ml と BMP-4 4 ng/ml を添加した培養系では、約 30~40% が軟骨細胞に分化誘導された。

D. 考察

マウス 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。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考えられる。今回の検討では、およそ 3 分の一の細胞が軟骨細胞に分化したが、この分化誘導をさらに

高効率で行うことができれば *in vitro* で ES 細胞から軟骨細胞を分化誘導し、これを用いた治療が視野に入ってくる。実際、今回の検討から ES 細胞由来の軟骨細胞を移植することで関節疾患モデルマウスでの治療研究が可能になった。

一方、転写因子は各種遺伝子の転写を調節することで、様々な細胞の機能調節に働く。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法を開発するため、軟骨細胞の転写因子発現に着目した。今回の検討では軟骨細胞特異的な転写因子として Sox-9, Hox 遺伝子, bHLH 蛋白 が発現されていた。これらの発現は TGF ファミリーのサイトカインである BMP により増強した。これら転写因子を標的として軟骨細胞特異的にその機能を調節することが可能と考えられ、このシステムは新規治療薬のスクリーニングに応用可能と考えられる。

今回の検討はマウスでの成績だが、今後は正常若年者、正常高齢者軟骨細胞及び OA 患者軟骨細胞での転写因子発現を検討する必要がある。高齢者や OA 患者での軟骨細胞ではこれらの転写因子発現が低下している可能性が高い。さらには BMP が高齢者での軟骨細胞でこれら転写因子発現を増強できる可能性があり、今後の検討が必要である。

E. 結論

マウス ES 細胞から BMP 存在下に

分化誘導した軟骨細胞では Sox-9, Hox 遺伝子, bHLH 蛋白 が発現されており、軟骨細胞の分化誘導においてこれらの転写因子が重要に働いていることが示された。BMP は軟骨細胞の増殖に関わる転写因子を誘導し、軟骨細胞分化誘導とその増殖に陽性の作用を示すことが示された。

F. 健康危機情報
特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

英文著書 (book)

- 1) Sakane T, Suzuki N: Behçet's disease. The Molecular Pathology of Autoimmunity (Second Edition) (Ed. by A. N. Theofilopoulos and C. A. Bona), Gordon and Breach Science Publishers, Pennsylvania, USA, 2001 (in press)
- 2) Sakane T, Suzuki N: Neuroendocrine-immune axis in human rheumatoid arthritis. "Autoimmunity" by Kluwer Academic Publishers, Wroclaw, Poland, 2001 (in press)
- 3) Sakane T, Takeno M: Behçet's disease-Etiopathology: immunological aspects. The Clinical Understanding of Behçet's disease (Ed. by S Lee, D. Bang and E. S. Lee), Springer-Verlag, Germany, 2001 (in press)
- 4) Takeno M, Shimoyama Y,

Sakane T: Spontaneous production of cytokines by neutrophils from patients with Behçet's disease. The proceedings of 8th and 9th International Conference on Behçet's disease. 2001 (in press)

英文論文

- 1) Sakane T, Suzuki N: Neuroendocrine-immune axis in human rheumatoid arthritis. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 48, 417-427, 2000.
- 2) Sakane T, Takeno M, Suzuki N: Behçet's disease [letter]. *N Engl J Med* 342, 588-589, 2000.
- 3) Sakane T, Suzuki N: Possible correction of abnormal rheumatoid arthritis synovial cell function by jun D transfection in vitro [letter]. *Arthritis Rheum* 43, 945-946, 2000.
- 4) 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.
- 5) 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.

英文総説

- 1) Sakane T, Takeno M: Current therapy in Behçet's disease. Skin Therapy Lett. 5, 3-5, 2000.
- 2) Sakane T, Takeno M: Interferon therapy in Behçet's disease. Internal Med. 39, 604-605, 2000.
- 3) Sakane T, Takeno M: Novel approaches to Behçet's disease. Expert Opin. Invest. Drugs 9, 1993-2005, 2000.
- 4) Takeno M, Sakane T: Vascular involvement in Behçet's disease. Internal Med. 40, 3-4, 2001.

和文著書

- 1) 坂根 剛、岳野光洋：慢性関節リウマチの病態形成とサイトカイン。サイトカインと疾患（編集 今西二郎）、医歯薬出版株式会社、東京、pp.26-30, 2000.
- 2) 坂根 剛：ベーチェット病（内科）。今日の治療指 2001（多賀須幸男、他 総編集）、医学書院、東京、pp.638-639, 2000.
- 3) 坂根 剛、岳野光洋、鈴木登：ベーチェット病。リウマチナビゲーター（山本一彦編）、メディカルレビ

ュー 2001、東京、pp198-199, 2000.

- 4) 坂根 剛、岳野光洋：Behçet（ベーチェット）病の診断と治療。year note 2001 別冊 SELECTED ARTICLE(岡庭 豊 編)、メディックメディア、東京、pp.881-897, 2000.
- 5) 坂根 剛、岳野光洋：Behçet 病。リウマチ類縁疾患。NEWMOOK 整形外科（越智 編）、金原出版、東京（印刷中）
- 6) 坂根 剛、岳野光洋：ベーチェット病。看護のための最新医学講座（編）、中山書店、東京（印刷中）
- 7) 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.

和文論文

- 1) 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.

和文総説

- 1) 坂根 剛、岳野光洋：リウマチ性疾患—免疫と炎症とその制御、リウマチ性疾患治療最新の知見。Behçet 病。内科 86, 342-346, 2000.
- 2) 坂根 剛、岳野光洋：Behçet 病。免疫症候群、日本臨牀（2000 年別冊）、361-364, 2000.

2. 学会発表

- 1) Takeno M, Nagafuchi H, Takeba

Y, Suzuki N, and Sakane T. The pathogenic role of autoreactive T cells specific for the human heat shock protein 60 kD-derived peptides in Behçet's disease. American College of Rheumatology, 64th Annual Scientific Meeting, October, 2000, Philadelphia (USA)

H.知的財産権の出願・登録状況
特記事項なし

骨破壊の分子機構とその制御に関する研究

分担研究者 田中 栄

東京大学医学部附属病院整形外科助手

研究要旨

慢性関節リウマチ (RA) の骨破壊には滑膜細胞および破骨細胞の活性化が関与していることが報告されている。これまでにわれわれはRA破壊関節より採取した滑膜細胞から破骨細胞様細胞が分化すること、RA滑膜組織に破骨細胞分化因子であるreceptor activator of NF- κ B ligand/ Osteoclast differentiation factor (RANKL/ODF)が大量に発現しており、RA滑膜における破骨細胞形成に重要な役割を果たしていることを報告してきた。本研究においてわれわれはレトロウイルスベクターを用いた破骨細胞分化系においてRANKL/ODFのレセプターであるRANKの下流で働くシグナル分子TNF receptor associated factor (TRAF) 6が破骨細胞分化に必須であること、またTRAF6のRING finger domainが破骨細胞活性化に重要であることを明らかにした。

【研究目的】慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) は多関節炎を特徴とする全身性の炎症疾患である。症状が進むと罹患関節の破壊をおこし患者のADLを著しく損なう。従ってその治療の究極的な目的は関節炎症状の緩和のみならず骨関節の破壊を制御し、患者のADLを高めることであると考えられる。最近RAの骨破壊においても破骨細胞が重要な役割を果たすことが明らかになってきた。これまでにわれわれはRA破壊関節より採取した滑膜細胞から破骨細胞様細胞が分化すること、RA滑膜組織に破骨細胞分化因子であるreceptor activator of NF- κ B ligand/ Osteoclast differentiation factor (RANKL/ODF)が大量に発現していること、破骨細胞の機能を抑制する遺伝子である *csk* 遺伝子の導入によってアジュバント関節炎ラットの骨関節破壊を抑制できることを報告し

てきた。TRAF (TNF receptor associated factor) はTNFレセプターファミリーと結合して働く分子として同定され、現在までに6種類が知られている。この中でTRAF6はCD40, インターロイキン1(IL-1)レセプターと共にRANKにも結合することが報告されている。昨年AMGENのグループおよびわれわれはTRAF6 KOマウスが大理石骨病様の病態を呈することを報告したが、興味深いことにKOマウス脾細胞においてはマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF), RANKL/ODF刺激による破骨細胞分化能が著しく阻害されていた(Naito et al., 1999)。本研究においてわれわれは、レトロウイルスベクターを用いてTRAF6の全長、あるいはそのdeletion mutantをKOマウス由来の線維芽細胞、破骨細胞前駆細胞に導入することにより、TRAF6を介したシグナル、特にNF- κ B, JNKシグナルの破

骨細胞分化における役割を検討した。

【方法】今回使用したレトロウイルスベクターは次の6種類である。①TRAF6遺伝子全長(T6)、②RINGフィンガーのみ欠損(DR)、③RINGフィンガーとZnフィンガーの1つまでが欠損(Z1)、④RINGフィンガーと3つのZnフィンガーが欠損(Z3)、⑤RINGフィンガーと5つのZnフィンガーすべてが欠損(Z5)、⑥ベクターのみ(V)。これらのウイルスをTRAF6 KOマウス由来の線維芽細胞に感染させ、IL-1刺激によるNF- κ Bの活性化、JNKの活性化をゲルシフトアッセイ、in vitroキナーゼアッセイで解析した。次にこれらのウイルスをTRAF6欠損マウスの脾細胞に感染させ、M-CSFとRANKL/ODF存在下で培養を行い破骨細胞形成の有無を調べた。また象牙切片上で、ウイルスを感染させたTRAF6 KOマウスの脾細胞と正常マウスの骨芽細胞との共存培養を行い、骨吸収能を調べた。

【結果】TRAF6 KO線維芽細胞においてはIL-1刺激によるNF- κ B、JNK活性化が著しく低下しているが、T6発現細胞(T6 cell)ではこれらの活性化が正常に認められた。Deletion mutantにおいては、JNKの活性化はDR、Z1 cellにおいて弱いながら認められ、NF- κ Bの活性化はDR、Z1、Z3 cellにT6 cellと同程度に認められた。Z5 cellではNF- κ B、JNKの活性化はいずれも著しく減弱していた。TRAF6 KOマウス由来の脾細胞はM-CSF、RANKL/ODFの存在下でも破骨細胞に分化しないが、T6発現により分化が認められ、これらの細胞は正常な骨吸収能を有した。DR、Z1の発現によっても破骨細胞形成は認められたが、これらの細胞の骨吸収能は著しく低下していた。Z3、Z5には破骨細胞分化をrescueする能力はな

かった(図1参照)。

【考察および結論】TRAF6 KOマウス脾細胞では破骨細胞への分化の障害が認められる。今回の研究において、①正常なNF- κ B活性化能、弱いJNK活性化能を有するDR、Z1では破骨細胞への分化はrescueされたがこれらの骨吸収能は低下していたこと、②NF- κ B活性化能のみを有するZ3では破骨細胞分化がrescueされなかったことから、少なくともJNKの正常な活性化が破骨細胞分化、とりわけ骨吸収能の獲得に必須である可能性が示唆された。今後TRAF6の役割のさらなる解明が破骨細胞分化の分子メカニズムを明らかにする上で重要であると考えられる。

ることによりin vitro, in vivoで滑膜細胞、破骨細胞の活性化を抑制することができることを報告したが、これらのツールを単独、あるいは組み合わせて用いることにより、今回用いたようなウイルスベクター、あるいは特異的な阻害剤等によるRas-ERK系情報伝達系の調節は、RA骨関節破壊の新しい治療法になりうると考えられる。

文献

- 1) Kobayashi, N., Y. Kadono, A. Naito, K. Matsumoto, T. Yamamoto, S. Tanaka, and J.-I. Inoue. 2001. Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis. *EMBO J.* 20:1271-1280.
- 2) Nakagawa, T., S. Tanaka, H. Suzuki, H. Takayanagi, T. Miyazaki, K. Nakamura, and T. Tsuruo. 2000. Overexpression of the csk gene suppresses tumor metastasis in vivo. *Int J Cancer.* 88:384-391.
- 3) Miura, T., S. Tanaka, A. Seichi, M. Arai, T. Goto, H. Katagiri, T. Asano, H. Oda, and K.

- Nakamura. 2000. Partial Functional Recovery of Paraplegic Rat by Adenovirus-Mediated Gene Delivery of Constitutively Active MEK1. *Exp Neurol*. 166:115-126.
- 4) Miyazaki, T., H. Katagiri, Y. Kanegae, H. Takayanagi, Y. Sawada, A. Yamamoto, M.P. Pando, T. Asano, I.M. Verma, H. Oda, K. Nakamura, and S. Tanaka. 2000. Reciprocal role of ERK and NF-kappaB pathways in survival and activation of osteoclasts. *J Cell Biol*. 148:333-342.
- 5) Miyazaki, T., H. Takayanagi, M. Isshiki, T. Takahashi, M. Okada, Y. Fukui, H. Oda, K. Nakamura, H. Hirai, T. Kurokawa, and S. Tanaka. 2000. In vitro and in vivo suppression of osteoclast function by adenovirus vector-induced csk gene. *J Bone Miner Res*. 15:41-51.
- 6) Yoshida, Y., S. Tanaka, H. Umemori, O. Minowa, M. Usui, N. Ikematsu, E. Hosoda, T. Imamura, J. Kuno, T. Yamashita, K. Miyazono, M. Noda, T. Noda, and T. Yamamoto. 2000. Negative Regulation of BMP/Smad Signaling by Tob in Osteoblasts. *Cell*. 103:1085-1097.
- 7) Takayanagi, H., H. Iizuka, T. Juji, T.

Nakagawa, A. Yamamoto, T. Miyazaki, Y. Koshihara, H. Oda, K. Nakamura, and S. Tanaka. 2000. Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 43:259-269.

学会発表

- 1) Eighth Workshop on Cell Biology of Bone and Cartilage in Health and Disease (2000.4.1-4) タボス Reciprocal role of ERK and NF-kB pathways on survival and activation of osteoclasts.
- 2) 第44回日本リウマチ学会総会(2000.5.13-15) 横浜 バイポーラ型人工肩関節の展望
- 3) 動物への遺伝子導入とその応用の開発研究会 第24回定例会 (2000.6.7) 東京 破骨細胞機能発現の分子メカニズム
- 4) Advances in Tissue & Genetic Engineering for the Treatment of Arthritic Diseases (2000.9.11-12) ポストン Suppression of arthritic bone destruction by adenovirus vector-mediated gene transfer6)
- 5) 第15回日本整形外科学会基礎学術集会 (2000.9.28-29) 京都 シンポジウム「臨床応用のための運動器細胞の分化と機能の制御」破骨細胞・骨芽細胞の分化と骨粗鬆症

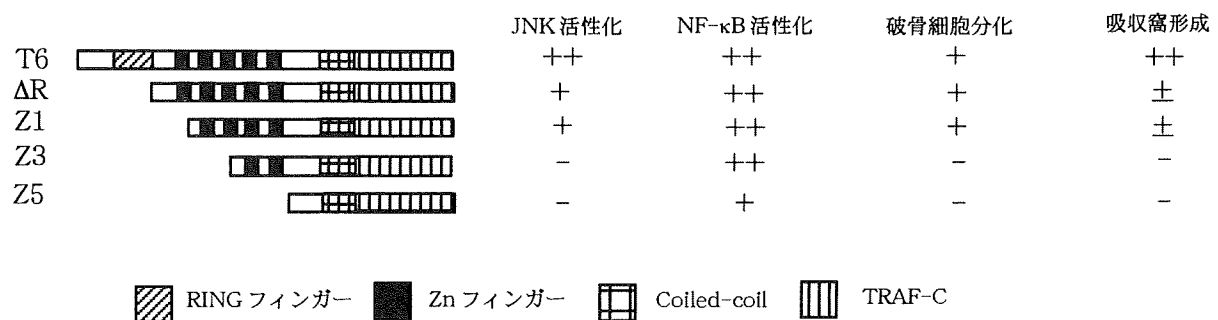


図1 : TRAF6 のさまざまな変異体とその機能

研究要旨

慢性関節リウマチ、変形性関節症など広範囲軟骨欠損の症例に対し、軟骨細胞移植の治療法は難しいのが現状である。その原因として移植細胞数の確保が困難であることが挙げられる。また、ステロイド長期投与の慢性関節リウマチ患者は骨密度の著名な低下を示し、骨折を起こした場合、観血的治療において強固な固定が得られず偽関節に陥りやすい。われわれはこのような骨折、広範囲軟骨欠損に対し、骨髄間質細胞を用いて治療する研究を行っており、骨髄間質細胞の細胞治療薬としての有効性を検討している。

A.研究目的

マウス、ヒトの間葉系細胞（骨髄間質細胞、脱分化軟骨細胞）を用いて、骨軟骨細胞への分化誘導を行い、骨髄間質細胞の細胞治療薬としての有効性を検討した。

B.研究方法

慶應義塾大学医学部病理学教室の梅澤らの樹立したマウス骨髄間質細胞株を用いて、骨形成能力を持つ成熟骨芽細胞株(KUSA/A1)を樹立し、*in vitro*における細胞性質の決定；カルシウム沈着能、アルカリフォスファターゼ活性、骨芽細胞の特異的マーカーである Bone gla protein(BGP)の測定を行った。また、*in vivo*における細胞の性質の決定；ヌードマウスへの細胞移植を行った。

ヒト骨髄間質細胞、脱分化軟骨細胞においては、*in vitro*にて軟骨細胞への分化誘導を試みた。2000万 cells/ml の細胞密度の状態にて micromass culture 法を用い2次的細胞凝集を行った後、高度の細胞環境を保つ細胞球体(Spheroid)の形成を行い、軟骨への分化を行った。

(倫理面への配慮)

今回用いたヒト骨髄間質細胞はすべて内科的疾患による骨髄生検の際採取されたものを使用しており、患者の許可を得て行われている。また、ヒト脱分化軟骨細胞は Clonetics 社の正常軟骨細胞を用いた。

C.研究結果

マウス骨髄間質細胞株である KUSA/A1 は、今までの代表的なマウス細胞株 MC3T3-E1 と比較し、アルカリフォスファターゼ活性、石灰化、BGP 産生量は遥かに高く検出された。また、ヌードマウスにその細胞を移植したところ、僅か3日間でマトリックスの形成、移植後3週間にて骨髄を形成した骨組織を認めた。

軟骨細胞への分化誘導においては、ヒト骨髄間質細胞はタイプ2コラーゲンの発現を認め初期軟骨分化を確認した。また同様の方法にて脱分化軟骨細胞の細胞球体の形成を行うと、球体全体が軟骨組織として軟骨再分化することが判明した。

D.考察

KUSA/A1 細胞株は、成熟骨芽細胞の典型的な細胞株であり、この細胞より得られた細胞表面マーカーを用いて、成人骨髄より骨芽細胞採取法の確立を目指している。また、この細胞は骨折における骨欠損補填や骨癒合促進といった細胞治療薬として期待できるものと思われる。

ヒト骨髄間質細胞、脱分化軟骨細胞は、増殖能力が高いことが知られており、今回行った方法にて軟骨へ分化させることにより広範囲軟骨欠損症例に対して必要な細胞数の確保が可能となるものと考えている。

E.結論

骨軟骨細胞移植に対し、骨髄間質細胞は有用な細胞供給源となり、また、この細胞自体が細胞治療薬となりうる可能性を持っている。

F.研究発表 現在検討中である。

G.知的財産権の出願、登録の状況

今回行った軟骨分化法においては軟骨移植法を含めて特許の可能性を検討している。

厚生科学研究費補助金（リウマチ研究事業）
研究報告書

転写統合装置を用いたリウマチ制圧法の開発に関する研究

研究要旨

私たちを含む幾つかの研究グループによりCBP(CREB binding protein)をはじめとする転写コアクチベーターの機能解析が進められた(Cell 1996&1997など)。さらに、転写コアクチベーター分子が複数のシグナル伝達系の協調・拮抗の最終ターゲットとして存在し、シグナル伝達の多様性・巧緻性を規定していること。また、細胞増殖・分化・アポトーシスなどの非常に多くの生物学的現象に関与していることが示された。これらのことより、わたしたちは転写コアクチベーターをコンピュータの集積回路(IC)に相当すると考え転写統合装置と命名した(Nature 1996)。

これらの研究成果に基づき、転写コアクチベーターの統合装置機能を利用し、慢性関節リウマチなどの難治性疾患の病巣を形成する細胞を規定する、もしくは病態に関与する核内因子(群)を同定・機能解析した。CBP結合因子のスクリーニングはyeast 2 hybrid法、およびFar-western法にて行った。

その結果、リウマチ滑膜細胞よりNotch-1が得られた。さらに腫瘍壊死因子(TNF- α)による滑膜細胞の増殖にNotch経路が関与することが明らかとなった(A&R in press)。また、自己免疫疾患APECED(autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy)の原因遺伝子産物AIRE(autoimmune regulator)が転写因子として作用し、かつCBPとの複合体形成がその機能発現に必須であることを報告した。従って、上記アプローチはリウマチ性疾患などの難治性疾患の病因・病態の解明・解析に有効である。

中島 利博・聖マリアンナ医科大学
難病治療研究センター 第三部門
部門長/助教授

A. 研究目的

ほとんどすべての転写因子と結合するCREB結合タンパク質(CBP)に代表される転写コアクチベーター作用を利用し、慢性関節リウマチ症を規定する、もしくはその病態に関与する核内因子を同定することを一義的目的とする。さらに得られた因子群の機能解析を通じリウマチ性疾患制圧法の開発を行う。

B. 研究方法

滑膜切除術により得られた慢性関節リウマチ症、及び骨関節症患者由来の病巣組織・培養滑膜細胞を用いた。転写統合装置と種々の核内因子間の結合はyeast 2-hybrid法、Far-western法などを用い

た。細胞の増殖は ^3H -thymidine uptake法、3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolylblue) assay (MTT法)により測定した。

(倫理面への配慮)

上記臨床検体は聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター・西岡久寿樹 教授/センター長より供与されたものであり。当大学倫理規定に従い得られたものである。

C. 研究結果

リウマチ滑膜細胞よりCBP結合因子としてNotch-1が得られた。さらに腫瘍壊死因子(TNF- α)による滑膜細胞の増殖によりNotch経路の活性化、すなわちNotchの核内移行が生じることが明らかとなった。その上、Notchの核内移行を抑制することにより、TNF- α による滑膜細胞増殖作用を選択的に遮蔽可能だった。また、自己免疫疾患APECED(autoimmune polyendocrinopathy candidi

asis ectodermal dystrophy)の原因遺伝子産物AIRE(autoimmune regulator)が転写因子として作用し、かつCBPとの複合体形成がその機能発現に必須であることを報告した(JBC 2000)。

D. 考察

米国で始まった生物製剤などリウマチ性疾患の治療薬の標的として注目されているTNF- α シグナルの下流にNotch経路がリウマチ滑膜細胞で存在し、活性化されていることが本研究により初めて明らかにされた。今後、この発見をもとに独自の抗リウマチ薬の開発を目指したい。

E. 結論

上記アプローチはリウマチ性疾患などの難知性疾患の病因・病態の解明・解析に有効である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. M. Nakazawa, H. Ishii, H. Aono, M. Takai, T. Honda, S. Aratani, A. Fukamizu, H. Nakamura, S-I, Yoshino, T. Kobata, K. Nishioka, **T. Nakajima** "Role of Notch-1 intracellular domain in activation of rheumatoid synoviocytes." *Arthritis and Rheumatism in press.*
2. S. Aratani, R. Fujii, T. Oishi, H. Fujita, T. Amano, T. Ohshima, M. Hagiwara, A. Fukamizu, and **T. Nakajima**. "Dual roles of RNA helicase A on CREB-dependent transcription." *Mol.Cell.Biol. in press*
3. Nguyen Dinh Khoa, Minako Nakazawa, Tomoko Hasunuma, **Toshihiro Nakajima**, Hiroshi Nakamura, Tetsuji Kobata, Kusuki Nishioka. Potential role of HOXD9 in synoviocyte proliferation. *Arthritis and Rheumatism in press.*
4. KP. Sarker, M. Nakata, T. Tokioka, I. Kitajima, **T. Nakajima**, I. Maruyama. Inhibition of Caspase-3 Activation by SB203580, p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitor in Nitric Oxide-Induced Apoptosis of PC-12 Cells. *Journal of Molecular Neuroscience in press.*
5. R Fujii, M Okamoto, S Aratani, T Oishi, T Ohshima, K Taira, M Baba, A Fukamizu, **T. Nakajima** "A role for RNA helicase A in TAR-dependent transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus type 1" *J Biol Chem. 276 : 5445-5451 2001.*
6. Ohshima T, Yoshida Y, **Nakajima T**, Yamagami K, Fukamizu A. "Effects of interaction between parvovirus minute virus of mice NS1 and coactivator CBP on NS1-and p53-transactivation." *International Journal of Molecular Medicine 7: 49-54 2001.*
7. Nakazawa M, Ishii H, Nakamura H, Yoshino S, Fukamizu A, Nishioka K, **Nakajima T**. "NFkB2(p52) promoter activation via Notch signaling pathway in rheumatoid synoviocytes." *International Journal of Molecular Medicine 7: 31-35 2001.*
8. Shimohata T, **Nakajima T**, Yamada M, Uchida C, Onodera O, Naruse S, Kimura T, Koide R, Nozaki K, Sano Y, Ishiguro H, Sakoe K, Ooshima T, Sato A, Ikeuchi T, Oyake M, Sato T, Aoyagi Y, Hozumi I, Nagatsu T, Takiyama Y, Nishizawa M, Goto J, Kanazawa I, Davidson I, Tanese N, Takahashi H. Tsuji S. "Interaction of expanded polyglutamine stretches associated with CAG repeat diseases and hTAFIII30 interferes with CREB-dependent transcription." *Nature Genetics 26: 29-36 2000*
9. Miyagishi M, Fujii R, Hatta M, Yoshida E, Araya N, Nagafuchi A, Ishihara S, **Nakajima T**, Fukamizu A. "Regulation of Lef-mediated transcription and p53-dependent pathway by associating β -catenin with CBP/p300." *J Biol Chem. 275: 35170-35175 2000.*
10. Pitkanen J, Doucas V, Sternsdorf T, **Nakajima T**, Aratani S, Jensen K, Will H, Vahamurto P, Ollila J, Vihinen M, Scott HS, Antonarakis SE, Kudoh J, Shimizu N, Krohn K, Peterson P. "APECED protein AIR2 has transcriptional transactivating properties and interacts with common co-activator CBP." *J.Bol. Chem. 275: 16802-16809 2000.*
11. Miyagishi, M. **Nakajima T**. Fukamizu A. "Cell type-dependent transactivation or repression of mesoderm-restricted basic helix-loop-helix protein, POD-1/Capsulin." *Molecular and Cellular Biochem. 205: 141-147 2000.*
12. M. Miyagishi, T. Ohshima, J-I. Ishida, R. Fujii, **T. Nakajima**, A. Fukamizu "Molecular characterization of mesoderm-restricted basic helix-loop-helix protein, POD-1/capsulin." *International Journal of Molecular Medicine 5: 27-31 2000.*

13. Nakazawa m. Hasunuma T. Ohshima T. Tanaka Y. Nishioka k. **Nakajima T.** "CBP: a target molecule of HTLV-1 Tax in synovocyte activation." *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 269: 584-590 2000

14. K. P. Sarker, T. Uchimura, **T. Nakajima**, M. Sorimachi, I. Kitajima I. Maruyama. "Inhibition of Nitric oxide (NO)-induced Neuronal Cells Death by Epinephrine." *Neurosci. Res. Commun.* 26: 27-39 2000.

2. 学会発表

1. 中澤美奈子、石井博泰、西岡久寿樹、**中島利博** 慢性関節リウマチ滑膜細胞におけるNFkB2活性化機構 第44回日本リウマチ学会総会 2000.

2. Minako Nakazawa, Kusuki Nishioka, **Toshihiro Nakajima** Implication of transcriptional coactivator/cointegrator CBP complexes in rheumatoid synovocyte. American college of rheumatology 2000 basic research conference 米国 2000.

3. 中澤美奈子、八田光世、渡辺眞一、吉野槇一、西岡久寿樹、**中島利博**. RA滑膜細胞における核内アセチル化亢進 第30回日本免疫学会総会

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
特にありません。
2. 実用新案登録
特にありません。
3. その他
特にありません。

リウマチ性疾患の克服に関する研究

マイクロアレイの解析によるリウマチ病因遺伝子の解析

中西 徹

岡山大学歯学部口腔生化学講座助教授

研究要旨 慢性関節リウマチ(RA)の原因遺伝子解明のため、マイクロアレイ法その他によって RA で特異的に発現する遺伝子および遺伝子産物の同定および解析を行った。RA と変形性関節症(OA)の滑膜細胞における遺伝子発現をマイクロアレイ法で比較した結果、OA では STAT などの発現が上昇しており、逆に RA では CDC25, RHO などの発現が上昇していた。また、軟骨においては、熱ショック蛋白質の一種が RA で特異的に作用していることを見出した。

A 研究目的

慢性関節リウマチ(RA)は滑膜細胞の異常な増殖を主体とする疾患で、それに伴うリンパ球の浸潤によって骨、軟骨の破壊に至る。この滑膜細胞異常増殖の原因は未だ明らかではない。最近、遺伝子レベルにおいては、正常と異常増殖を起こす滑膜細胞における遺伝子発現の違いが目ざされているが、今回、マイクロアレイ(cDNA 発現アレイ)を用いて、この遺伝子発現の差を網羅的に解析することにより、リウマチ病因遺伝子の解明を試みた。また RA 軟骨細胞で多く発現される抗原蛋白質についても、その性質について解析した。

B 研究方法

RA および OA における人工膝関

節置換術時に滑膜を採取した。これを細片化および酵素処理して滑膜細胞とし、4代継代培養した後、全 RNA を抽出した。これらの RNA から poly(A)+ RNA を精製し、逆転写によって cDNA プローブを合成した。このプローブを Atlas cDNA アレイにハイブリダイズさせ、その発現パターンをアレイゲージ解析システムを用いて解析した。また特定の遺伝子発現の有無については RT-PCR により解析を行った。さらに RA 軟骨細胞における抗原蛋白質の同定は、Western blot により行った。

(倫理面への配慮)

RA および OA における滑膜細胞の採取については、インフォームドコンセントを得、試料から得られる遺伝子発現情報についても匿名化等の措置を

行った。

C 研究結果

cDNA 発現アレイを用いて RA と OA 各々の滑膜細胞における遺伝子発現の比較を行った。Atlas Human Array の I と II を用いて解析を行ったところ、OA では RA に比較して STAT, PKC, caspase などの遺伝子発現が上昇しており、逆に RA では、CDC25, RHO あるいは c-fos および c-jun の発現が上昇していた。現在これらの遺伝子発現について RT-PCR 等による確認を行っている。また、上記の滑膜細胞についてテロメラーゼの発現を検討したところ、最も活性に重要な TRT の発現は検出されなかった。さらに、軟骨細胞について RA に特徴的な蛋白質を探索したところ、コラーゲンの輸送などに関わっていると考えられている、熱ショック蛋白質の一種が同定された。また軟骨特異的遺伝子産物が、RA あるいは OA 組織に多く分布することがわかり、この蛋白質の RA あるいは OA 組織の修復、再建における役割について解明を行っている。

D 考察

今回、cDNA 発現アレイを用いることにより、多数の遺伝子について

OA と RA 間の発現量の差を比較検討することが可能となった。今回の結果、遺伝子発現に変化の認められた遺伝子は RA 滑膜の異常増殖に何らかの形で関わっていることが考えられ、今後さらに例数も増やして、詳細に検討を行いたい。また今後、より遺伝子規模の大きい DNA チップについても検討を行う予定である。さらに RA 特異的あるいは RA と OA に多くみられる蛋白質については、コラーゲンの産生および分解も含めた、RA 初期における抗原提示との関わり、あるいは RA, OA 等組織の修復、再建における応用の可能性について今後研究を行う予定である。

E 結論

マイクロアレイ (cDNA 発現アレイ) を用いて、RA 滑膜で発現の変動がみられ、RA 滑膜の異常増殖に関わっていると考えられるいくつかの遺伝子を単離した。また RA における抗原提示や OA, RA 組織の修復に関わっていると予想される蛋白質を見出した。

G 研究発表

1 論文発表

Effects of CTGF/Hcs24, a product of a hypertrophic chondrocyte-specific gene,

on the proliferation and differentiation of chondrocytes in culture.

Nakanishi T., Nishida T., Shimo T., Kobayashi K., Kubo T., Tamatani T., Tezuka K., Takigawa M. :
Endocrinol. 141 : 264-273, 2000.

Rheumatoid arthritis related antigen 47 kDa (RA-A47) is a product of *colligin-2* and acts as a human HSP47.

Hattori T., Kubota S., Nakanishi T., Takigawa M. : J. Bone Miner. Metab. 18: 328-334, 2000.

Change in cellular localization of a rheumatoid arthritis-related antigen (RA-A47) with downregulation upon stimulation by inflammatory cytokines in chondrocytes.

Hattori, T., Kubota, S., Yutani Y., Fujisawa T., Nakanishi T., Takahashi, K., and Takigawa, M.:
J. Cell. Physiol. 186: 268-281, 2000.

Overexpression of connective tissue growth factor/hypertrophic chondrocyte specific gene product 24 (CTGF/Hcs24) decreases bone density in adult mice and induces dwarfism.

Nakanishi T., Yamaai, T., Asano, M., Nawachi, K., Suzuki, M., Sugimoto, T., and Takigawa, M.:

Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001 in press

Japan may seek embryo cells from overseas.

Nakanishi T.:
Nature 405: 882, 2000.

2 学会発表

結合組織の増殖因子

中西 徹

第 37 回日本組織培養学会シンポジウム 2000.9.7 岡山大学医学部

マイクロアレイの解析によるリウマチ病因遺伝子の解析

中西 徹

厚生省厚生科学研究公開シンポジウム 2000.1.29 虎の門パストラル

軟骨由来成長因子 CTGF/Hcs24 の単離とその生理機能の解明

中西 徹

平成 12 年度日本軟骨代謝学会学会賞受賞講演 2001.3.10 長良川国際会議場

リウマチ性疾患の克服に関する研究
(分担研究課題：増殖因子による軟骨修復機構)

分担研究者 開 祐司 京都大学再生医科学研究所教授

軟骨は無血管の特殊な結合組織で、胎生期の骨形成予定領域に軟骨性骨原基として広く出現する。しかし、軟骨性骨原基はやがて周囲組織からの血管の侵入をうけ、骨に置換される。そのため、成熟個体の骨格では関節軟骨として骨端にわずかに残るのみとなる。一般に高い再生能力を有する骨に比べて、その表面を覆う関節軟骨は再生能力の極めて乏しい組織である。関節軟骨が一旦損傷や壊死に陥ると進行性に組織破壊が起こる。そこで、本研究では、軟骨幹細胞株 ATDC5 細胞の *in vitro* 増殖・分化シグナルネットワークをモデルに、関節軟骨全層欠損における *in vivo* 軟骨再生モデルでの再生修復の分子基盤とこれを応用した再生誘導技術を開発する。

本年度までの研究により、関節軟骨全層欠損における軟骨修復においては、骨髄から供給される間葉系幹細胞の組織欠損部位への遊走ないし移動と欠損部における軟骨前駆細胞の活発な自己複製能の維持がその後の軟骨再生を誘導する決定的な要因であることが明らかとなった。まず、欠損部に集積する間葉系幹細胞の自己複製能力は、欠損周囲の骨組織から供給される FGF-2 並びにオートクリン形式による FGF-2 シグナルに依存していることが明らかになった。さらに、欠損部に集積した幹細胞は軟骨分化へのネガティブな制御シグナルである PTH/PTHrP シグナルに応答できる前駆軟骨細胞に相当する分化段階に達していることが判明した。また、欠損部における軟骨分化誘導段階において間歇的に分化抑制負荷と脱抑制により分化コンピーテントな幹細胞の散逸的な減少を阻止して軟骨再生能を高い状態に維持できることが明らかになった

A. 研究目的

軟骨は無血管の特殊な結合組織で、間葉系細胞の軟骨分化により胎生期の骨形成予定領域に広く出現する。このようにして形成された軟骨性骨原基は、やがて周囲組織からの血管の侵入をうけると共に、骨に置換される。そのため、成熟個体の骨格では関節軟骨として骨端にわずかに残る。一般に高い再生能力を有する骨に比べて、その表面を覆う関節軟骨は再生能力の極めて乏しい組織である。関節軟骨が一旦損傷や壊死に陥ると進行性に組織破壊が起こる。そこで、胎生期の軟骨・骨形成シグナルネットワークをモデルに、関節軟骨の再生修復制御の分子基盤を確立する。軟骨組織が間葉系の組織中では例外的に無血管である。このような血管系の乏しい組織においては、一般的にその自己修復ないしは再生能力は十分でない。そこで、間葉系幹細胞に由来する軟骨幹細胞の増殖維持と分化制御のシグナルを明らかにして、関節軟骨の再生修復を誘導するための分子細胞生物学的技術を開拓する。

B. 研究方法

1) マウス EC 由来クローン化細胞株 ATDC5 の *in vitro* 培養系における軟骨マーカー遺伝子発現パターンを指標に、軟骨初期分化から後期分化（軟骨肥大化・石灰化）に至る多段階軟骨分化モデル系を確立した。そこで、これを駆使して軟骨分化を制御する増殖分化因子シグナルネットワークを解析する。

まず、未分化 ATDC5 細胞を播種して、 $10 \mu\text{g/ml}$ インスリンと 5% FBS を含む

DME/F-12 培地にてコンフルエントに達するまで 3 日間培養した。さらに、種々の増殖分化因子を添加して、II 型コラーゲン遺伝子の発現を Northern blot により検出して、軟骨初期分化誘導に対する作用を評価した。細胞分化による軟骨結節の形成を Alcian Blue 染色によって可視化した。

2) 成熟家兎の大腿骨膝蓋窩表面から電気ドリルで深さ 4 mm の円柱状の欠損を作成した。欠損は、軟骨自己修復が起こらない 5 mm 径と、自己修復可能な 3 mm 径の 2 種類のモデルを作成した。次いでオスモティックポンプを用いて欠損中央部より生理食塩水に溶解させたヒト PTH(1-84) を 25 ng/hr ($0.5 \mu\text{l/hr}$) の用量で注入した。欠損作成後、1 週、2 週、4 週、8 週間後に修復組織を採取し、組織学的検索を行った。また、修復組織に集積した未分化細胞における PTH/PTHrP 受容体の発現ならびに PCNA の発現を免疫組織化学的に検索した。本研究では、オスモティックポンプを使って欠損部中央から組換えヒト PTH(1-84) (25 ng/hr) を持続的あるいは 10 時間ごとに間歇的に注入した。欠損部の組織修復を safranin-O 染色により組織化学的に検索した。欠損部内に遊走する未分化細胞の細胞増殖動態を免疫組織学的に PCNA を経時的に検出することにより評価した。また、修復組織に遊走した細胞の PTH 応答能を抗 PTH/PTHrP 受容体抗体を用いた免疫組織染色により評価した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、京都大学

再生医科学研究所の動物実験委員会に提出・審査を経た実験計画に基づき、「京都大学動物実験に関する指針」に従って実施された。

C. 研究結果

1) コンフルエントに達して増殖を停止した未分化 ATDC5 細胞培養系の DNA 合成は、FGF-2 によって促進された。これに対して、BMP-4 は培養系の DNA 合成には促進的にも抑制的にも作用しなかった。しかし、II 型コラーゲン遺伝子の発現は特異的に誘導され、培養系に軟骨分化が誘導されたことは細胞形態や Alcian Blue 染色からも確認できた。逆に、ドミナントネガティブ BMP 受容体を発現する ATDC5 細胞クローンでは、いずれも細胞凝集領域の形成は誘導されたが、これに続く軟骨細胞への分化は起こらなかった。

次に、PTH(1-34) は未分化 ATDC5 細胞の増殖ならびに細胞形態に影響を与えなかったが、分化した ATDC5 細胞培養系に添加すると細胞分化が停止するのみならず、PTH/PTHrP 受容体の発現する直前の段階にまで分化状態は戻った。この分化抑制作用は可逆的であった。

2) ウサギ大腿骨膝蓋窩に作成した関節軟骨全層欠損は、関節軟骨の自然治癒が誘導される直径 3 mm の系における修復組織の PCNA 陽性細胞率は $58.8 \pm 10.6\%$ と高値を示したのに対して、軟骨修復が誘導されない直径 5 mm の欠損においては $14.8 \pm 3.0\%$ と有意に低値を示した。直径 5 mm の欠損においても FGF-2 の投与により軟骨修復が誘導される実験条件では、PCNA 陽性細胞

率は直径 3 mm の欠損と同様の高値を示した。すなわち、関節軟骨全層欠損における軟骨組織修復能は、欠損分に遊走する軟骨組織幹細胞の旺盛な増殖能の維持と相関することが明らかとなった。

これに対して、軟骨の自然修復が誘導されるはずの直径 3 mm の欠損であっても、PTH を投与すると修復組織内における軟骨分化誘導が著明に阻害されることが明らかとなった。このとき、修復組織の PCNA 陽性細胞率は $60.3 \pm 4.9\%$ と高値を示した。さらに、PTH/PTHrP 受容体の免疫組織学的検索により、修復組織内に遊走した未分化細胞は明らかに PTH/PTHrP 受容体を発現していた。このことは、胎生期にみられる軟骨多段階分化モデルの上では、細胞凝集領域の形成に伴って出現する PTH/PTHrP 応答性の軟骨前駆細胞が欠損分の修復組織を構成していることを示唆していた。PTH 投与により軟骨分化が阻害されると欠損部は、4 週間までに PTH/PTHrP 受容体陰性の繊維組織により充填された。

D. 考察

関節軟骨全層欠損における軟骨再生誘導には、一定のサイズの前駆軟骨細胞集団が欠損部に存在することが不可欠である。PTH/PTHrP シグナルは、幹細胞の軟骨分化に対して分化抑制シグナルとして機能している。本年度の実験により、1) 分化コンピーテントな前駆軟骨細胞は PTH/PTHrP 受容体を発現していること、2) 欠損作成後 4 週間を過ぎると、この分化コンピーテンスは

失われること、3) 分化コンピーテントな前駆細胞群に対する間歇的な分化抑制 - 脱抑制刺激は、再生刺激として作用することが判明した。

E. 結論

関節軟骨全層欠損における軟骨修復機序において、骨髄より供給される間葉系幹細胞の組織欠損部位への遊走ないし移動と欠損部における軟骨前駆細胞の活発な自己複製能の維持が、その後の軟骨再生を誘導する決定的な要因であることが明らかとなった。本年度までに、欠損部に集積する間葉系幹細胞の自己複製能力は、欠損周囲の骨組織から供給される FGF-2 並びにオートクリン形式による FGF-2 シグナルに依存していることが明らかになった。さらに、欠損部に集積した幹細胞は軟骨分化へのネガティブな制御シグナルである PTH/PTHrP シグナルに応答できる前駆軟骨細胞に相当する分化段階に達していることが判明した。また、欠損部における軟骨分化誘導段階において間歇的に分化抑制負荷と脱抑制により分化コンピーテントな幹細胞の散逸的な減少を阻止して軟骨再生能を高い状態に維持できることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) S. Kudo, H. Mizuta, Y. Otsuka, K. Takagi, and Y. Hiraki (2000) J. Bone Miner. Res., 15, 253-260; Inhibition of chondrogenesis by parathyroid hormone in vivo during repair of

full-thickness defects of articular cartilage.

2) C. Shukunami, H. Akiyama, T. Nakamura, and Y. Hiraki (2000) FEBS Lett., 469, 83-87; Requirement of autocrine signaling by bone morphogenetic protein-4 for chondrogenic differentiation of ATDC5 cells.

3) H. Akiyama, C. Shukunami, T. Nakamura, and Y. Hiraki (2000) Cell Struct. Funct. 25, 195-204; Differential expressions of BMP family genes during chondrogenic differentiation of mouse ATDC5 cells.

2. 学会発表

1) Kudo S., Mizuta H., Takagi K., Hiraki Y. (2001) 47th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society (February 25-28, 2001, San Francisco, California); Regeneration of articular cartilage defects is induced by transient PTH treatment started immediately after creating the defects.

2) H. Chuma, H. Mizuta, K. Takagi, and Y. Hiraki (2001) Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies of the USA, Canada, Europe and Japan (June, Greece); The effect of a limited and transient administration of FGF-2 on regeneration of articular cartilage defects.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし