

認識する自己抗原 cDNA クローンを、Young と Davis の方法に準じたブランクプロット法によりスクリーニングした。陽性クローンは希釈してスクリーニングを繰り返し精製した。分離されたクローンより cDNA インサートを M13mp18 または mp19 RF DNA に組み換えて、塩基配列をシーケンシングし、塩基配列および推定アミノ酸配列を遺伝子データベース (GenBank) とのホモロジーサーチによりコードされる蛋白分子を決定した。

2. リウマチ疾患患者血清のスクリーニング

クローニングされた自己抗原 cDNA を含む λ gt11 ファージは大腸菌 Y1089 株に感染させ、32°C で増殖するが 42°C では増殖しないライソゲン化コロニーを得た。このコロニーより発現させた抗原蛋白 (β -ガラクトシダーゼ融合蛋白) を用いた免疫ブロット法により、RA (72例) および他のリウマチ疾患患者血清 (SLE 36、強皮症 18、PM/DM 18例) をスクリーニングし、各自己抗原と反応する自己抗体の陽性率を求めた。

3. カルパスタチンの精製

抗 CS 抗体の定量的検出法の開発のため、リコンビナントヒト CS の発現と分離を行った。CS をコードする全長 cDNA を pET28a ベクターに組換え、大腸菌 BL21 株で N 末端 His-Tag を付加した全長 CS を発現させた。これをコバルトキレートカラム (TALON 社) に吸着させ、イミダゾールで溶出して精製した。精製された CS の純度と抗原特異性をモノクローナル抗 CS 抗体および RA 患者血清を用いて確認した。

C. 研究結果

1. RA 自己抗原とリウマチ疾患患者血清の反応性

RA 患者血清が認識する自己抗原として CS の他に、ubiquitin-conjugating enzyme (UBC-5)、cytokeratin (CK)-18、myc far upstream sequence element binding protein (myc FUSE-BP、または DNA helicase V (DH-V))、 γ -synergin がクローニングされた。一種類の抗原 (RA-2) のみが DNA データベースと一致せず、未同定であった。これら自己抗原の大腸菌発現産物に対する患者血清の反応性を免疫ブロット法で検索したところ、RA における各自己抗体陽性率は、未同定蛋白 (RA-2) に対する抗体 17%、抗 CS 抗体 57%、抗 CK-18 抗体 15%、抗 myc FUSE-BP/DH-V 抗体 13%、抗 γ -synergin 抗体 36% であった。これらはいずれも RA 以外でも検出されたが、SLE での陽性率が高かった RA-2 を除き、いずれも RA での陽性率が最も高かった (表 1)。

2. リコンビナントカルパスタチンの発現と精製

ヒト CS 全長 cDNA から大腸菌に発現させ、キレートカラムで精製したリコンビナント CS を 7.5% SDS-PAGE で分画後、免疫ブロット法で抗体反応性を確認した。精製 CS は 110kDa 附近に泳動され、従来の報告と一致した。この CS は各ドメインに特異的なモノクローナル抗 CS 抗体および抗 CS 抗体陽性 RA 血清と反応したが、健常人血清とは反応しなかった (図 1)。また、精製 CS はウサギ m-カルパインによるカゼインの蛋白分解活性を抑制し、生理活性が保たれていることが確認された。

D. 考察

我々は RA に出現する新たな自己抗体を見だし、その対応抗原遺伝子のクローニングにより、カルシウム依存性中性プロテアーゼ (カルパイン) に特異的な内在性阻害蛋白である CS であることを報告

してきた。カルパインは RA 患者の滑膜や関節液中に増加し、RA の関節破壊に関与すると考えられる。カルパインは、IL-1 α の活性化と分泌、白血球遊走活性の誘導、プロテインキナーゼ C 活性化などを通じて炎症の惹起に関与する可能性があり、また軟骨基質プロテオグリカンを分解すると報告されている。したがって、RA 患者血清中の抗 CS 抗体が CS 活性を抑制するならば、カルパインを相対的に上昇させ、RA の発症や進展に関与する可能性がある。我々は、抗 CS 抗体陽性 RA 患者 IgG が CS 活性を抑制してカルパイン活性を上昇させることを見だし、CS に対する自己抗体の産生が RA の病態と深く関与する可能性を示唆してきた。

CS 以外にも RA 患者血清が認識する自己抗原が多数クローニングされた。これらの抗原と反応する自己抗体は CS を含めて必ずしも RA に特異的ではなかったが、RA での陽性率が最も高頻度であるものが多かった。ここでクローニングされた CS 以外の RA 自己抗原 (UBC-5、CK-18、myc-FUSE-BP/DH-V、 γ -synergin) の生理活性と RA の病態との関連は未だ明らかではないが、抗体出現と RA の病期や活動性、重症度との関連を今後追及する必要がある。

これらの自己抗体の定量的検出法を開発する目的で、まず CS の精製を試みた。CS 全長 cDNA を pET28a ベクターに組換え、N 末端 His-Tag 付加蛋白として発現させ、コバルトキレートカラムより溶出精製した CS は SDS-PAGE で 110kDa 附近に泳動される単一蛋白であった。ヒト CS の推定分子量は 72,000 であるがアミノ酸組成の特殊性から 110kDa に泳動されることが報告されている。この CS は各ドメイン特異的モノクローナル抗 CS 抗体および抗 CS 抗体陽性 RA 血清と反応し、カルパイ

ンの蛋白分解活性を抑制し、構造と生理活性が保たれていることが確認された。この精製 CS を用いた ELISA 法を現在開発中であり、早期 RA および診断未確定関節炎患者における陽性率を追跡する予定である。

今回クローニングした RA 自己抗原の他に、国内外で多くの自己抗原が報告されている。特に従来 RA に特異的とされたいわゆる「抗ケラチン抗体」および抗核周因子の対応抗原が Filaggrin であることが近年つきとめられ、その RA における意義が注目されている。この抗 Filaggrin 抗体の測定系が開発されているので来年度以降に合わせて同様の検討を予定している。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 三森経世. プロテアーゼインヒビターに対する自己抗体と病態形成への意義. 臨床免疫 36 (5): 806-811, 2001.
- 2) 三森経世, 田中真生. 慢性関節リウマチの新しい自己抗体. 炎症と免疫 10 (1): 78-83, 2002.

2. 学会発表

- 1) 三森経世. 膠原病と自己抗体. 第100回日本皮膚科学会教育講演, 東京, 2001年4月
- 2) 三森経世ほか. 慢性関節リウマチの病原的自己抗体と対応抗原. シンポジウム「新しい自己抗体と臨床的意義」, 第45回日本リウマチ学会, 東京, 2001年5月
- 3) 野島崇樹, 三森経世ほか. 慢性関節リウマチにおける抗 c-myc FUSE 結合蛋白に対する自己抗体の検索. 第45回日本

リウマチ学会，東京，2001年5月

- 4) 三森経世. 自己抗体研究の進歩. 第29回
日本臨床免疫学会教育講演，大阪，
2001年12月

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

cDNA	自己抗原	自己抗体陽性率			
		RA (72)	SLE (36)	SSc (18)	PM/DM (18)
RA-2	?	17%	27%	11%	0%
RA-3	UBC5	17	13	0	0
RA5-4	CK-18	15	0	0	6
RA-6	calpastatin	57	27	38	24
RA9-2	myc FUSE-BP/DH-V	10	4	0	0
RA21-3	γ -synergin	36	25	11	22

表1. 自己抗原 cDNA 発現産物に対する患者血清反応性 (免疫ブロット法による)

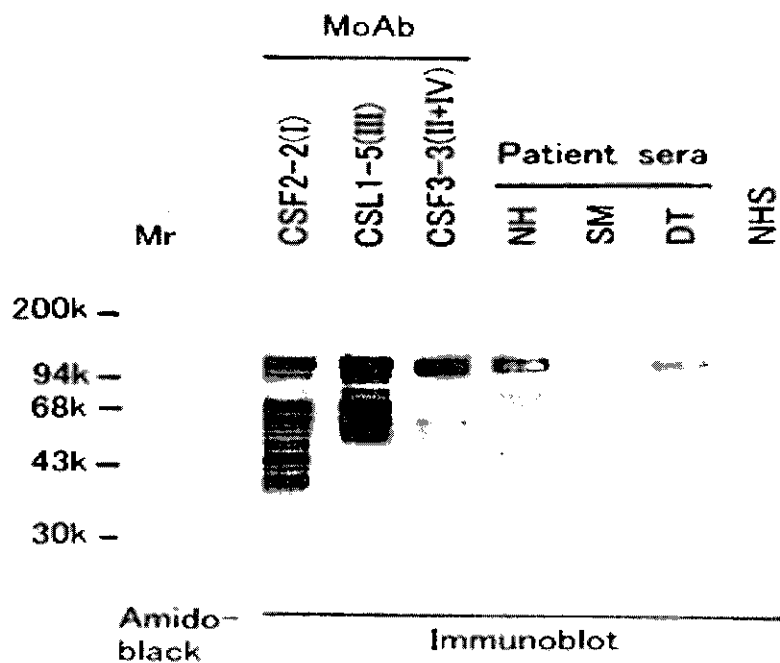


図1. リコンビナントヒトカルパスタチンの各種抗反応性

NKT 細胞による慢性関節リウマチの早期診断・制御に関する研究

分担研究者 住田孝之
筑波大学臨床医学系内科 教授

研究要旨

NKT 細胞は、NK マーカーと TCR とをあわせ持つユニークな第四のリンパ球であり、マウスでは、自己免疫応答をネガティブに制御する調節性 T 細胞として機能している。本研究では、慢性関節リウマチにおける NKT 細胞を定量し、早期診断、治療に応用することを目的とした。結果として、1) NKT 細胞の定量方法を確立し、2) 慢性関節リウマチでは NKT 細胞が減少していること、3) NKT 細胞減少のメカニズム、を明らかにした。

A. 研究目的

NKT 細胞は NK 細胞マーカー (NKR-PIA; CD161) と T 細胞の抗原受容体 (TCR) とをあわせ持つユニークなリンパ球である。その特徴として、単一の TCR α 鎖 (ヒトでは TCRAV24AJ18 遺伝子) を有し、多形性の無い CD1 分子に結合した糖脂質、 α -galactosylceramide (α -GalCer) を認識している。いくつかの自己免疫病マウスモデル (MRL-lpr、(NZBxNZW) F1、NOD マウスなど) において、自己免疫の発症後に NKT 細胞が減少していることや、NKT 細胞の TCR に対する抗体を投与することにより、NKT 細胞が減少し、結果として自己免疫現象が増悪することから、NKT 細胞が自己免疫反応をコントロールする調節性 T 細胞として機能している可能性が指摘されてきた。さらに、最近、 α -GalCer の投与により NOD や EAE において病気の発症が予防されることが報告された。そこで、本研究では、1) 慢性関節リウマチ (RA) において、NKT 細胞が減少しているのか？ 2) その機序は何か？ 3) RA の活

動性と NKT 細胞量と関連しているか？ 4) 抗原の一つである α -GalCer により NKT 細胞を増幅することが可能か？ 5) RA の動物モデルであるコラーゲンタイプII誘導マウス (CIA) において、 α -GalCer により関節炎を予防、治療することができるか？、について検討し、NKT 細胞による RA の早期診断、新しい治療戦略を探究することを目的とする。

B. 研究方法

(1) RA：1) RA 患者の末梢血リンパ球 (PBL) を対象として、5カラーを用いたフローサイトメトリーにより TCRAV24AJ18+BV11+DN NKT 細胞を定量する。2) in vitro で PBL を α -GalCer とともに培養し、NKT 細胞の増殖能を検討する。3) APC と NKT 細胞を用いた criss-cross の実験で α -GalCer 不応答例の機能異常を明らかにする。4) 抗原提示能力低下例について可溶性 CD1d 分子などの抑制因子について検討する。

(2) CIA：2 μ l の α -GalCer を CII のブー

スター前後に数回投与して、関節炎に対する影響を検討する。

C. 研究結果

(1) NKT 細胞をフローサイトメトリーにより定量する方法を確立した (図1)。

(2) RA: 1) RA 末梢血において、NKT 細胞は減少していた (図2)。2) *in vitro* の増殖実験より、 α -GalCer 応答群と不応答群の2群が存在した (図3)。3) 不応答群では、NKT 細胞の機能異常が示唆された (図4)。4) さらに、不応答群では、抗原提示能を抑制する CD1d variants が存在することが判明した。

(2) CIA: α -GalCer 投与により関節炎は増悪した。マウスの NKT 細胞 (TCRAV14AJ281+細胞) は肝臓で有意に減少していた。

D. 考察

RA において NKT 細胞が減少していることから、RA の早期診断として NKT 細胞の測定が有用であると考えられる。疾患活動性と NKT 細胞量との関係や疾患特異性などが今後の課題であろう。

NKT 細胞が RA で減少しているメカニズムとして、1) *in vivo* での抗原量の不足、2) NKT 細胞自身の機能異常、3) 抗原提示能力の低下、が明らかになった。これらの原因を改善する戦略により RA の制御が可能となることも期待される。

関節炎治療の予備実験では、RA のモデルマウス (コラーゲンタイプII誘導関節炎) では、 α -GalCer 投与により関節炎は増悪した。しかし、このマウスでは、NKT 細胞が減少していたことも判明したため、今回の α -GalCer 投与プロトコールでは、NKT 細胞を増加させることができなかつ

たことにより関節炎がむしろ増悪したと理解された。現在、 α -GalCer 投与方法、量の至適条件について、*in vitro*、*in vivo* において検討している。従って、現時点では、 α -GalCer の治療応用としては、*in vivo* への直接投与より *ex vivo* により増加した NKT 細胞の細胞移入について解析が期待される。

E. 結論

自己免疫応答を制御する NKT 細胞は、RA の末梢血において著明に減少しており、RA の早期診断に有用であろう。NKT 細胞を増加させる RA の治療戦略が今後期待される。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kojo S, Adachi Y, Tsutsumi A, Sumida T. Alternative splicing forms of human CD1D gene in mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun* 276: 107-111, 2000.
- 2) Kojo S, Adachi Y, Keino H, Taniguchi M, Sumida T. Dysfunction of TCR AV24AJ18+ BV11+ double negative regulatory NKT cells in autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* 44: 1127-1138, 2001.
- 3) Oishi Y, Sumida T, Sakamoto A, Kita Y, Kurasawa K, Nawata Y, Takabayashi K, Takahashi H, Yoshida S, Taniguchi M, Saito S, Iwamoto I. Selective reduction and recovery of invariant Va24JaQ T cell receptor T cells in correlation with disease

activity in patients with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 28: 275-283, 2001.

- 4) Keino H, Takeuchi M, Kojo S, Suzuki J, Sakai J-I, Nishioka K, Sumida T, Usui M. Identification of regulatory T cells among in vivo expanded ocular T cells in mice with experimental autoimmune uveoretinitis. Clin Exp Immunol 124: 1-8, 2001.

2. 学会発表
なし

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

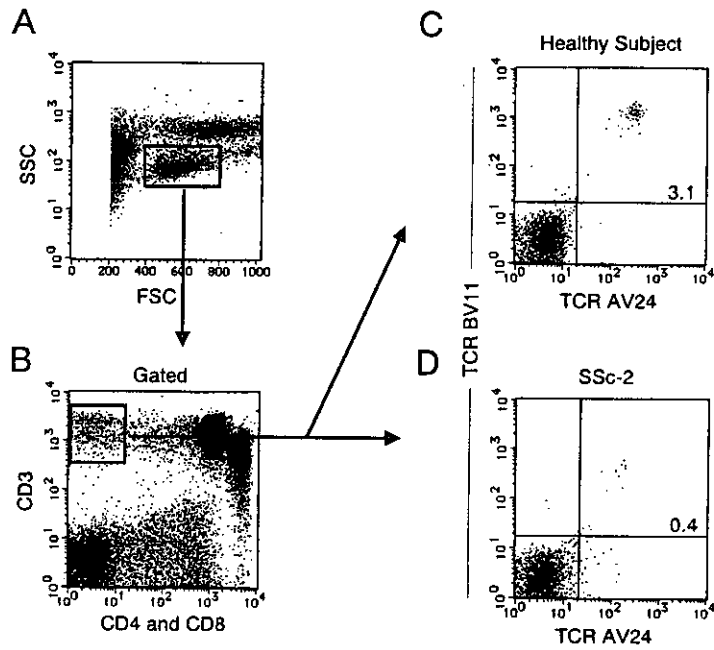


図1 フローサイトメトリーによる NKT 細胞の定量方法

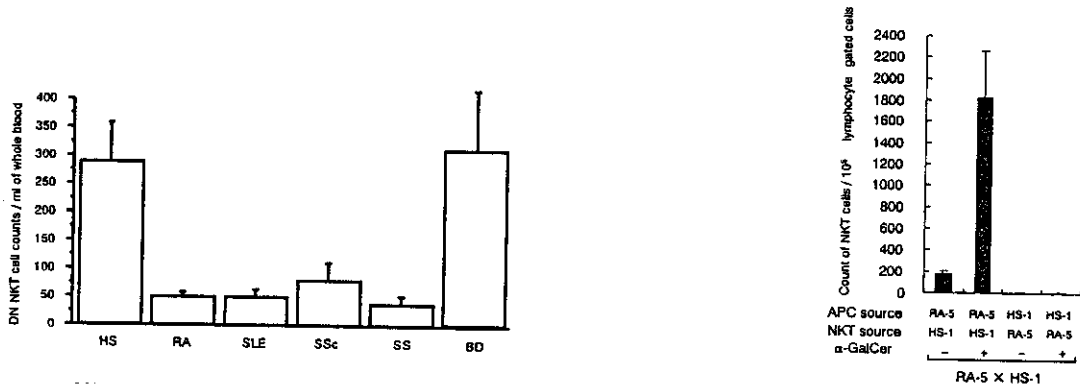


図2 RA・膠原病患者末梢血における NKT 細胞

図4 RA の NKT 細胞は機能異常

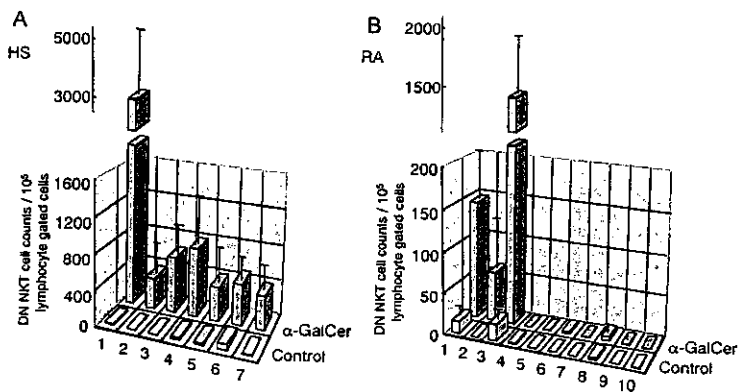


図3 α-GalCer に対する NKT 細胞の増殖反応

滑膜線維芽細胞の間葉系幹細胞への分化と 脂肪分化に注目した病態への関与と治療への応用に関する研究

主任・分担研究者 江口 勝 美
長崎大学医学部分子統御医学講座免疫内分泌代謝病態制御学分野 教授

研究要旨

関節に存在する滑膜線維芽細胞 (FLS) と骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) はいくつかの類似点を有している。FLS を MSC と同様の条件で分化誘導とを行うと、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞へと分化誘導することが判明した。さらに、脂肪分化誘導によって、滑膜線維芽細胞から産生されるサイトカインやプロテアーゼが減少した。早期慢性関節リウマチにおいて滑膜線維芽細胞が増殖を開始する時期をとらえ、炎症関節部位で滑膜線維芽細胞を脂肪細胞へと分化誘導することで、炎症関節における滑膜線維芽細胞による高サイトカイン、高プロテアーゼの環境の出現を未然に防ぎ、RA の進行を防ぐことができるのではないかと考えられる。今後の課題として、①早期 RA 関節組織中の脂肪に着目した組織学的評価を行い、関節の骨、軟骨病変出現前に、脂肪組織の変化がおこっている可能性を検討する。②滑膜線維芽細胞の脂肪化を制御する因子を検討する。これらの研究によって早期RAの診断と治療に結び付けていきたいと考えている。

A. 研究目的

RA 炎症滑膜では、増殖した滑膜細胞が慢性炎症と骨、軟骨破壊の中軸をなしている。近年、骨髄由来の間葉系幹細胞が骨、軟骨、脂肪などの間葉系細胞に分化する能力を有し、再生医療の分野で研究がすすめられている。我々は同様に滑膜線維芽細胞の分化を誘導することに成功し、さらに内科的治療、特に早期治療への応用を考慮して脂肪細胞への分化に着目した。

B. 研究方法

1. 関節手術時に得られた滑膜組織を酵素処理して滑膜細胞を単離。5継代後の細胞を滑膜線維芽培養細胞として使用。
2. 滑膜線維芽培養細胞を合成 PPAR γ lig-

and であるトログリタゾン10 μ M を含んだ培養液で3週間培養し脂肪細胞への分化を誘導。 β -glycerophosphate 10mM を含んだ培養液で3週間培養することにより骨芽細胞への分化を誘導。ペレット状にした滑膜線維芽培養細胞を TGF- β 3 を含んだ培養液で3週間培養することにより、軟骨細胞への分化を誘導。脂肪分化は oil red O 染色、骨芽細胞分化は von Kossa 染色、軟骨分化は Alcian blue 染色にて確認した。

3. 骨芽細胞と脂肪細胞へと分化誘導した細胞と、未分化細胞の培養上清中の IL-6 や IL-8、脂肪細胞へと分化誘導した細胞では MMP-3 も測定した。

C. 研究結果

1. 滑膜線維芽培養細胞は間葉系幹細胞と

同様の方法で骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞などの間葉系細胞へ分化誘導された(図1)。

2. 骨芽細胞、脂肪細胞へと分化誘導した培養細胞上清中において、IL-6は減少していた。IL-8は脂肪細胞への分化を誘導した場合のみに減少した(図2)。脂肪細胞へと分化した細胞ではMMP-3の産生も減少していた(図3)。

D. 考察

滑膜線維芽細胞の中には骨、軟骨、脂肪などの間葉系細胞に分化する能力を有する未分化な細胞が含まれると考えられた。一方、脂肪分化を誘導で、滑膜線維芽細胞から産生されるサイトカインやプロテアーゼが減少したため、一部の分化能を有する滑膜線維芽細胞を脂肪細胞に分化誘導することで、その性質を変化しうると考えた。

E. 結論

滑膜線維芽細胞を脂肪細胞へ分化誘導により、滑膜線維芽細胞からのサイトカインやプロテアーゼの産生を抑制できることを示した。早期RAにおいて滑膜線維芽細胞の増殖開始時期をとらえ、滑膜線維芽細胞を脂肪細胞へと分化誘導することで、炎症関節での滑膜線維芽細胞による高サイトカイン、高プロテアーゼの環境を未然に防ぎ、RAの進行を防ぐことができるのではないかと考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamasaki S, Kawakami A, Nakashima T, Nakamura H, Kamachi M, Honda S, Hirai Y,

Hida A, Ida H, Migita K, Kawabe Y, Koji T, Furuichi I, Aoyagi T, Eguchi K.

Importance of NF- κ B in rheumatoid synovial tissues: in situ NF- κ B expression and in vitro study using cultured synovial cells. *Ann Rheum Dis* 60 (7): 678-684, 2001.

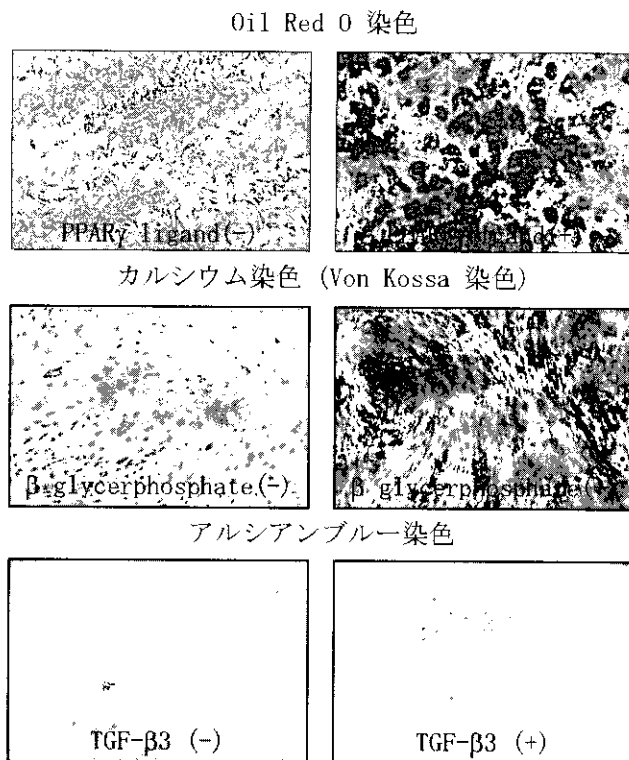
- 2) Migita K, Yamasaki S, Kita M, Ida H, Shibatomi K, Kawakami A, Aoyagi T, Eguchi K. Nitric oxide protects cultured rheumatoid synovial cells from Fas-induced apoptosis by inhibiting caspase-3. *Immunology* 103: 362-367, 2001.
- 3) Honda S, Migita K, Hirai Y, Origuchi T, Yamasaki S, Kamachi M, Shibatomi K, Fukuda T, Kita M, Hida A, Ida H, Aoyagi T, Kawakami A, Kawabe Y, Oizumi K, Eguchi K. Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in rheumatoid synovial cells. *Clin Exp Immunol* 126: 131-136, 2001.
- 4) Migita K, Tanaka F, Yamasaki S, Shibatomi K, Ida H, Kawakami A, Aoyagi T, Kawabe Y, Eguchi K. Regulation of rheumatoid synoviocyte proliferation by endogenous p53 induction. *Clin Exp Immunol* 126: 334-338, 2001.
- 5) Migita K, Eguchi K. FK506-mediated T-cell apoptosis induction. *Transplant P* 33: 2292-2293, 2001.
- 6) Hashimoto Y, Matsuoka N, Kawakami A, Tsuboi M, Nakashima T, Eguchi K, Tomioka T, Kanematsu T. Novel immunosuppressive effect of FK506 by augmentation of T cell apoptosis. *Clin Exp Immunol* 125: 19-24, 2001.
- 7) Hirai Y, Migita K, Honda S, Ueki Y, Yamasaki S, Urayama S, Kamachi M, Kawakami A, Ida H, Kita M, Fukuda T, Shibatomi K, Kawabe Y, Aoyagi T, Eguchi K. Effects of nitric oxide on matrix metalloproteinase-2 production by rheumatoid synovial cells. *Life Sci* 68: 913-920, 2001.
- 8) Migita K, Yamasaki S, Shibatomi K, Ida H,

- Kita M, Kawakami A, Eguchi K. Impaired degradation of serum amyloid A (SAA) protein by cytokine-stimulated monocytes. *Clin Exp Immunol* 123: 408-411, 2001.
- 9) Shibatomi K, Ida H, Yamasaki S, Nakashima T, Origuchi T, Kawakami A, Migita K, Kawabe Y, Tsujihata M, Anderson P, Eguchi K. A novel role for interleukin-18 in human natural killer cell death. *Arthritis Rheum* 44 (4): 884-892, 2001.
- 10) Migita K, Eguchi K. Induction of apoptosis: How do tacrolimus and cyclosporin compare? Mechanistic differences of cornerstone immunosuppressants 14-19, 2001.
- 11) Kawakami A, Eguchi K. Role of HTLV-I infection in the pathogenesis of Sjogren's syndrome and rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 11: 87-90, 2001.
- 12) Nagayama Y, Kita-Furuyama M, Nakao K, Ando T, Eguchi K, Niwa M. A novel murine model of Graves' hyperthyroidism with intramuscular injection of adenovirus expressing thyrotropin receptor. *J Immunol*, in press, 2002.
- 13) Apoptosis in autoimmune disease. *Internal Med* 40 (4): 275-284, 2001.
- 14) Yamasaki S, Nakashima T, Kawakami A, Migita K, Eguchi K. Functional change of rheumatoid fibroblast-like synovial cell through activation of PPAR γ -mediated signaling pathway. *Clin Exp Immunol*, in press, 2002.
- 15) 川上純, 山崎聡士, 宮下賜一郎, 飛田あゆみ, 江口勝美. NF- κ B と炎症. 炎症と免疫 9 (6): 77-84, 2001.
- 16) 川上純, 江口勝美. T 細胞特異的 NF- κ B 阻害薬によるコラーゲン誘発関節炎発症阻止. 臨床免疫 36 (3): 444-448, 2001.
- 17) 川上純, 江口勝美. A20欠損マウスにおける TNF 誘導 NF- κ B 発現およびアポトーシス異常. 臨床免疫 36 (5): 802-805, 2001.
- 18) 江口勝美. 炎症における HTLV-I 感染の役割. 血液・免疫・腫瘍 6 (2): 61-71, 2001.
- 19) 江口勝美. 自己免疫疾患におけるアポトーシス. *MINOPHAGEN MEDICAL REVIEW* 46: 309-330, 2001.
- 20) 川上純, 江口勝美. 血管内皮細胞. 臨床免疫 35 (1): 69-74, 2001.
- 21) 川上純, 江口勝美. HTLV-I 感染によるシェーグレン症候群・慢性関節リウマチの発症機序. 臨床リウマチ 13 (1): 11-17, 2001.
- 22) 右田清志, 江口勝美. RA 治療における新しい免疫抑制薬 (レフルノミド、シクロスポリン、タクロリムス). *Pharma Medica* 19 (7): 67-72, 2001.

H. 知的財産権の出願・登録

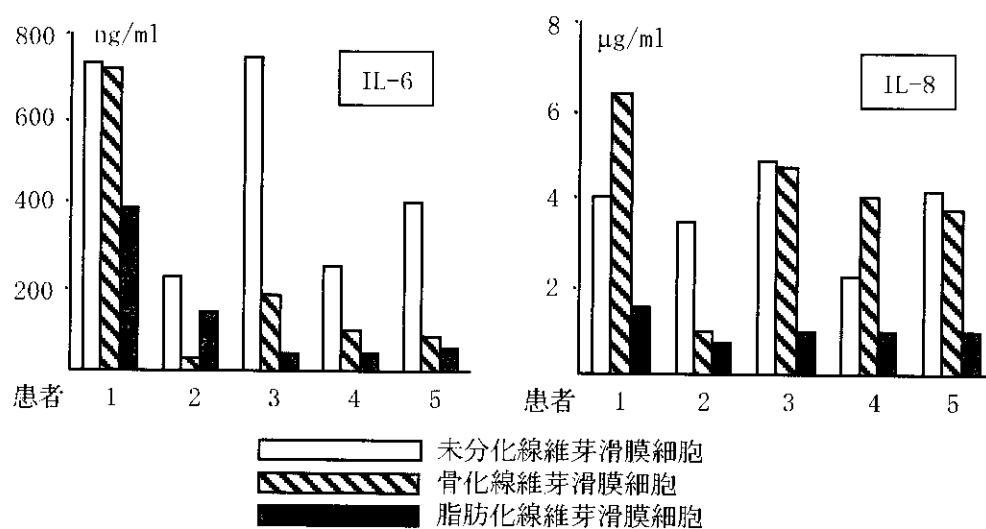
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図1. 滑膜線維芽培養細胞の間葉系細胞 (脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞) への分化誘導



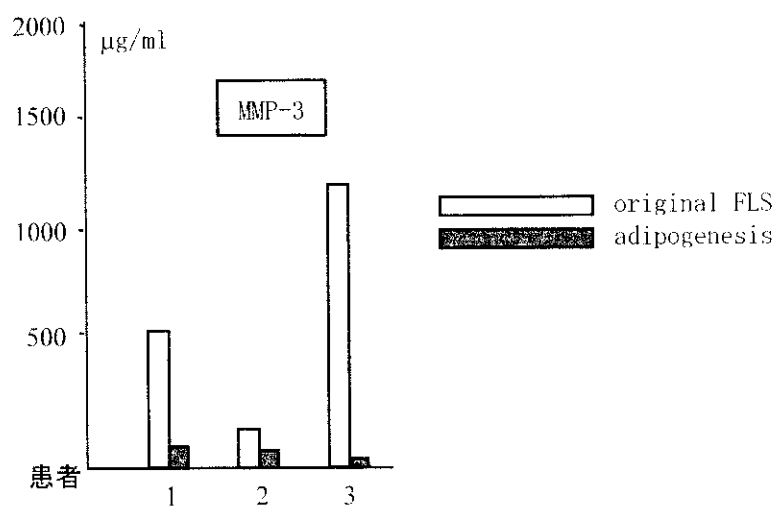
合成 PPAR γ ligand による脂肪細胞への分化誘導 (上段)
 β -glycerophosphate による骨芽細胞への分化誘導 (中段)
 TGF- β 3による軟骨細胞への分化誘導 (下段)

図2. 骨芽細胞、脂肪細胞への分化誘導によるサイトカイン産生能の変化



骨芽細胞と脂肪細胞へと分化誘導した細胞と、未分化細胞の培養上清中の IL-6 や IL-8を測定した。骨芽細胞、脂肪細胞へと分化誘導した培養細胞上清中において、IL-6は減少していた。IL-8は脂肪細胞への分化を誘導した場合のみに減少した。

図3. 脂肪細胞への分化誘導による MMP-3産生能の変化



脂肪細胞へと分化誘導した滑膜線維芽滑膜細胞では MMP-3の産生が減少していた。

慢性関節リウマチ (RA) 患者由来関節滑膜細胞の 遺伝子発現プロファイルに関する研究

分担研究者 岡本 尚

名古屋市立大学医学部分子医学研究所分子遺伝部門 教授

研究要旨

慢性関節リウマチ (RA) の滑膜細胞の異常増殖特性の遺伝子発現レベルでの背景を明らかにするために、市販の cDNA アレー (588個の細胞増殖関連遺伝子を網羅) を用いて遺伝子発現プロファイル解析を実施した。結果は real time RT-PCR で確認した。その結果、PDGFR α 、PAI-1、SDF1の遺伝子発現が、対照とした健常滑膜細胞に比べて RA 患者の滑膜細胞で明らかに増加していた。また、実際に RA 滑膜細胞は PDGF による増殖促進効果の感受性が有意に増加していた。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ (RA) は全身性の炎症応答を背景にして特に関節局所の慢性持続性かつ破壊性の炎症を呈することを特徴とする。我々は以前より炎症・免疫応答関連遺伝子を制御する転写因子 NF- κ B に関わる研究を進め、RA におけるその病因論的意義や治療の分子標的としての妥当性について報告をしてきているが、このような研究を通して、従来より知られている RA 滑膜細胞の異常な増殖特性に着目するに至った。この特異な滑膜細胞の様相は tumor-like growth もしくは mesenchymal transformation などということばで欧米の病理学者によって表現されているが、滑膜細胞レベルでの異常の背景については明らかではない。そこで、本研究計画では、RA 患者より得られた滑膜細胞の遺伝子発現プロファイル解析を包括的に実施することにより、滑膜細胞自体に epigenetic な変化が起こっているか否かを検証することを目的とした。

B. 研究方法

RA および対照例の関節滑膜細胞 (それぞれ RSF および NSF と略す) 5例ずつ用い

て cDNA array による遺伝子発現プロファイル解析を行った。発現量の増加していた遺伝子についてはさらに real-time RT-PCR を用いて mRNA 量の定量を実施した。さらに、これらの結果を培養細胞系にもどしてその生物学的意義を調べた。

C. 研究結果

継代3-5 passage の RA および対照例の関節滑膜細胞それぞれ5例ずつより mRNA を抽出し、³²P 標識 cDNA プローブを合成し、これらを用いて市販の cDNA array (Human Cancer cDNA expression array, Clontech) にハイブリダイゼーションし、遺伝子発現プロファイルを検索した。遺伝子発現量の定量には phosphoimager (BAS2500, Fuji) を用い、Arraygaufe ソフトウェアで解析を行った。その結果、IGFBP5、PDGF receptor α (PDGFR α)、decorin、PAI-1、SDF1の mRNA が RSF で 1.7倍以上に増えていた。NSF の方で1.7倍以上に発現量を増加している遺伝子は見いだされなかった。これらの遺伝子について real-time detection RT-PCR 法を用いて厳密な定量を実施した結果、実際に mRNA 増加の確認できたものは PDGFR α 、

PAI-1、SDF1のみであった。この内、PAI-1と SDF1の産生亢進はすでに報告され、生物学的意義の検索が実施されていたので、PDGFR α についてさらに詳細に調べたところ、RSF では蛋白レベルでも産生が亢進していた。そこで、PDGF に対する増殖反応性を調べた。RSF では NSF に比べていずれも PDGF に対する増殖応答が亢進していたことが確認できた。

D. 考察

今回検索できた対象遺伝子数は588個と限られていたが、新たに PDGFR α の発現亢進が確認され、実際に RA 滑膜細胞で PDGF に対する増殖応答が亢進していることがわかった。ケモカインである SDF1の産生亢進が RSF において選択的に亢進している事とあわせて、これらの事実は RSF は炎症環境を除いても、明らかに正常の滑膜細胞とは異なる性質を獲得していることが明らかになった。今後は、さらに多数の遺伝子を対象とした cDNA array 解析を進めていくと共に、これらの結果を総合的に踏まえ、RA の病態形成過程を明らかにしてゆくと共に、これらの考察に基づいた新たな RA 治療戦略についても試みてゆく予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Uranishi H, Tetsuka T, Yamashita M, Asamitsu K, Shimizu M, Itoh M, Okamoto T. Involvement of the pro-oncoprotein TLS (Translocated in lipo-sarcoma) in nuclear factor- κ B p65-mediated transcription as a coactivator. *J Biol Chem* 276: 13395-13401, 2001.
- 2) Senoo M, Tsuchiya I, Matsumura Y, Mori T, Saito Y, Kato H, Okamoto T, Habu S. Transcriptional dysregulation of the p73L/p63/p51/p40/KET gene in human

squamous cell carcinomas: expression of Np73L, a novel dominant-negative isoform, and loss of expression of the potential tumour suppressor p51. *Br J Cancer* 84: 1235-1241, 2001.

- 3) Ando T, Kawabe T, Ohara H, Ducommun B, Itoh M, Okamoto T. Involvement of interaction between p21 and PCNA for the maintenance of G2/M arrest after DNA damage. *J Biol Chem* 276: 42971-42977, 2001.
- 4) Matsumoto S, Imaeda Y, Umemoto S, Kobayashi K, Okamoto T. Cimetidine increases survival of colorectal cancer patients with high levels of sialyl Lewis-X and sialyl Lewis-A epitope expression on tumor cells. *Br J Cancer*, in press, 2002.
- 5) Kawabe T, Sukanuma M, Ando T, Kimura M, Hori H, Okamoto T. Cdc25C interacts with PCNA at G2/M transition. *Oncogene*, in press, 2002.
- 6) Maki M, Matsukawa N, Yuasa H, Otsuka Y, Yamamoto T, Akatsu H, Okamoto T, Ueda R, Ojika K. Decreased expression of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein mRNA in the hippocampus in alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, in press, 2002.
- 7) Sarol LC, Imai K, Asamitsu K, Tetsuka T, Barzaga NG, Okamoto T. Inhibitory effects of IFN- γ on HIV-1 replication in latently infected cells. *Biochem Biophys Res Commun*, in press, 2002.

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 遺伝子発現情報を基礎とした慢性関節リウマチ滑膜の病態の解析

分担研究者 土屋尚之

東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学教室 助教授

研究要旨

慢性関節リウマチ (RA) の病因・病態を明らかにする目的で、differential display (DD) 法を用いて、変形性関節症 (OA) と比較して、RA 滑膜において発現が亢進する遺伝子を検討した。見出された遺伝子のうち、病態における関連が想定された Id ファミリー遺伝子群、fos ファミリー遺伝子群に注目した。RA13例、OA6例の滑膜を用いた半定量的 RT-PCR により、RA における Id1、Id3 の発現増強が確認され、免疫組織染色により、血管内皮細胞における局在が観察された。また、fos ファミリーである *FOSB* 遺伝子は、RA 滑膜で発現が増強していたことに加え、その splicing isoform である $\Delta FOSB$ の mRNA 相対発現量が減少していた。これらの遺伝子が、RA 滑膜における血管新生や増殖に関与する可能性が示唆された。また、RA における疾患感受性候補遺伝子の一つである *BCMA* の多型スクリーニングと関連解析を行い、多数の多型部位を見出したが、RA との関連は検出されなかった。

A. 研究目的

近年進歩の著しいヒトゲノム研究からのアプローチにより、慢性関節リウマチ (RA) の病因・病態を明らかにし、新たな治療法の開発、発症予防に貢献しうる知見を得ることを目的とする。具体的には、滑膜組織における遺伝子発現プロファイルから見出される発現の亢進する遺伝子を見出し、その RA の病態における機能的役割を検討し、さらに、疾患感受性との関連を探る。さらに、候補遺伝子アプローチにより、新たな候補遺伝子のゲノム多型を見出し、RA との関連を検討する。

B. 研究方法

1) RA および変形性関節症 (OA) 滑膜から採取した RNA をテンプレートとした differential display (DD) RT-PCR 法により、両者において発現レベルが有意に異なる遺伝子断片を同定し、塩基配列を決定し、

データベース検索により、遺伝子を同定した。検出された遺伝子のうち、特に病態上興味深いと考えられたものにつき、半定量的 RT-PCR 系を作製し、RA 滑膜13検体、OA 滑膜6検体をもちいて、発現レベルを比較した。発現上昇が認められた Id1、Id3 については、免疫組織染色を用いて、発現細胞の局在を検討した。

2) *BCMA* (*TNFRSF17*) を候補遺伝子と考え、ゲノム DNA を用いて、翻訳領域全長、5'および3'非翻訳領域 (UTR)、プロモータ領域 (-431bpまで) について、PCR-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) および direct sequencing 法を用いて多型スクリーニングを行い、見出された多型について、SLE 160例、RA 205例、健康者 224例の遺伝子型を決定し、疾患感受性との関連を統計学的に解析した。
(倫理面への配慮)

滑膜の遺伝子発現プロファイル、疾患

感受性遺伝子研究それぞれについて、東京大学大学院医学系研究科研究倫理審査委員会の承認を受けて行われた。検体は匿名化され、個人情報と完全に切り離された形で研究に用いられた。

C. 研究結果

1) DD の結果、RA において発現亢進が認められた遺伝子が20種検出された。データベース検索から、既知の遺伝子と一致したもののなかで、Id ファミリー分子は、血管新生や細胞増殖への関与が知られ、RA の病態との関連に特に興味を持たれたため、Id ファミリーの主要な構成員である Id1、Id3 について、半定量的 RT-PCR 系を作製し、RA13例、OA6例における発現レベルを検討した。図1に示すように、ID1、ID3ともに、mRNA レベルは RA において有意に増加していた。

次に、滑膜組織における局在を、免疫組織化学染色にて検討したところ、Id1、Id3ともに、血管内皮細胞に強い染色が検出された(図2)。

また、発現レベルが異なる他の断片の一つとして、fos ファミリーに属する FOSB 遺伝子が検出され、半定量的 RT-PCR により、RA における FOSB 発現の上昇が見出された。これに対し、やはり fos ファミリーに属する Fra-1、Fra-2では、差が認められなかった。また、RA2例、OA2例の比較から、RA における、FOSB に対する Δ FOSB の相対的な発現量低下が示唆された。

2) BCMA の翻訳領域に2箇所(いずれも同義置換)、プロモータ領域に2箇所、5'UTR に2箇所、3'UTR に1箇所の多型部位と、全体で4箇所の頻度の低い変異を検出した(図3)。多型部位の組み合わせにより、BCMA は4種の主要ハプロタイプを形成して存在することが見出された(表1)。RA 感受性との有意な関連は見出されなかった(表2)。

D. 考察

Id ファミリー分子は、近年、分化制御、血管新生との関連で注目される分子群で、RA滑膜における発現を見出したのは本研究が初めてである。血管内皮細胞に強い発現が検出されたことから、本分子が RA における血管新生に何らかの役割を果たすこと、ひいては、本分子の発現あるいは活性の制御により、RA の血管新生を制御しうる可能性が示唆された。

FosB は、すでに RA における発現上昇が知られている c-fos 同様、fos ファミリーに属する遺伝子である。今回の研究から、FOSB 発現亢進が見られた一方で、Fra-1、Fra-2の発現に OA との差が見られなかったことから、これらの遺伝子が滑膜において異なる発現制御を受けていることが示唆された。また、 Δ FOSB 産物の機能については未確立であるが、c-fos、FosB に対して抑制的に働く可能性が示唆されており、RA において FosB に対して相対的に発現低下が認められたことは、RA における滑膜増殖に splicing 制御異常が関与する可能性を示唆するとともに、 Δ fosB の強制発現が将来的に治療効果を持ちうる可能性を示唆する知見と考えられる。

BCMA は、近年、RA のみならず、全身性エリテマトーデス (SLE)、Sjögren 症候群などにおいて関連が注目されている BlyS の受容体の一つであり、今回、プロモータ領域を含め、多数の多型部位が見出されたことは、今後の研究上有用な知見である。RA 感受性との遺伝的な関連は見出されなかったものの、今後、BLYS、BAFF-R などの多型解析を進める予定である。

E. 結論

RA 滑膜血管内皮細胞における Id ファミリー分子の発現亢進を初めて検出した。また、RA 滑膜組織における FOSB 遺伝子

の発現亢進と、その splicing isoform である $\Delta FOSB$ の相対的な発現低下を検出した。*BCMA* 遺伝子に多数のゲノム DNA 多型を検出したが、RA 感受性との関連は見出されなかった。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

- 1) Ohashi J, Yamamoto S, Tsuchiya N, Hatta Y, Komata T, Matsushita M, Tokunaga K. Comparison of statistical power between 2 x 2 allele frequency and allele positivity tables in case-control studies of complex disease genes. *Ann Hum genet* 65: 197-206,2001.
- 2) Mitsui H, Tsuchiya N, Okinaga S, Matsuta K, Yoshimura K, Nishimura A. Expression of membrane-type metalloproteinases in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Mod Rheumatol* 11: 34-39,2001.
- 3) Wakui M, Yamaguchi A, Sakurai D, Ogasawara K, Yokochi T, Tsuchiya N, Ikeda Y, Tokunaga K. Upregulated genes in the early phase of murine graft-versus-host reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 282: 200-206, 2001.
- 4) Hagiwara K, Yamaguchi A, Tsuchiya N, Kitamura S, Iwadare J, Sahara R, Yamamoto K, Tokunaga K. Identification of genes differentially expressed in the inflamed colonic lesions of Croh's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 283: 130-135, 2001.
- 5) Sakurai D, Yamaguchi A, Tsuchiya N, Yamamoto K, Tokunaga K. Expression of ID family genes in the synovia from patients with rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun* 284: 436-442, 2001.
- 6) Kawasaki A, Tsuchiya N, Fukazawa T, Hashimoto H, Tokunaga K. Presence of four major haplotypes in human *BCMA* gene: Lack of association with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 2: 276-279,2001.
- 7) Tsuchiya N, Kawasaki A, Tsao BP, Komata T, Grossman JM, Tokunaga K. Analysis of the association of HLA-DRB1 and TNFA promoter polymorphisms with SLE using transmission disequilibrium test. *Genes Immun* 2: 317-322, 2001.
- 8) Miyamasu M, Sekiya T, Ohta K, Ra C, Yoshie O, Yamamoto K, Tsuchiya N, Tokunaga K, Hirai K. Variations in the human CC chemokine eotaxin gene. *Genes Immun* 2: 461-463, 2001.
- 9) Sato M, Ohashi J, Tsuchiya N, Tadokoro K, Juji T, Hanaoka K, Tokunaga K, Yabe T. Identification of novel single nucleotide substitutions in the NKp30 gene expressed in human natural killer cells. *Tissue Antigens* 58:255-258,2001.
- 10) Sirikong M, Tsuchiya N, Chandanayingyong D, Bejrachandra S, Suthipinittharm P, Luangtrakool K, Srinak D, Thongpradit R, Siriboonrit U, Tokunaga K. Association of HLA-DRB1*1502—DQB1*0501 haplotype with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais. *Tissue Antigens*, in press.
- 11) Kyogoku C, Dijkstra HM, Tsuchiya N, Hatta Y, Kato H, Yamaguchi A, Fukazawa T, Jansen MD, Hashimoto H, van de Winkel JGJ, Kallenberg CGM, Tokunaga K. Association of Fc γ receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus: Contribution of FCGR2B to the genetic susceptibility to SLE. *Arthritis Rheum*, in press.

2.学会発表

- 1) 京極千恵子、土屋尚之、徳永勝士、山口晃弘、深沢徹、橋本博史:ヒト Fc γ 受容体IIB (FCGR2B) 多型と全身性エリテマトーデスの関連. 日内会誌

- 90(Suppl.): 175, 2001.
- 2) 土屋尚之、徳永勝士：候補遺伝子アプローチによる SLE 感受性遺伝子の検討。リウマチ41: 336, 2001.
 - 3) 市川奈緒美、小竹茂、箱田雅之、樋上謙士、川崎綾、土屋尚之、徳永勝士、鎌谷直之：日本人慢性関節リウマチ (RA) 患者における TNF γ -promoter 領域の多型について。リウマチ41: 484, 2001.
 - 4) 山口晃弘、土屋尚之、山本一彦、徳永勝士：慢性関節リウマチ患者滑膜における Id 遺伝子の発現。リウマチ41: 507, 2001.
 - 5) 川崎綾、土屋尚之、深沢徹、橋本博史、徳永勝士：BCMA (TNFRSF17) の変異解析と SLE および RA との関連の検討。リウマチ41: 509, 2001.
 - 6) 京極千恵子、土屋尚之、山口晃弘、深沢徹、橋本博史、徳永勝士：ヒト Fc γ 受容体 IIB (FCGR2B) 多型と全身性エリテマトーデス(SLE)の関連。リウマチ41: 510, 2001.
 - 7) 氷上光輝、土屋尚之、屋部登志雄、徳永勝士：ヒト NKG2-A 遺伝子の変異解析とリウマチ性疾患との関連の検討。リウマチ41: 510, 2001.
 - 8) Kawasaki A, Tsuchiya N, Fukazawa T, Hashimoto H, Tokunaga K: Presence of four major haplotypes in human BCMA gene: lack of association with SLE and RA. Presented at "B cells & Autoimmunity: New concepts & therapeutic perspectives" 19th-21st July, Bergen, Norway. Abstract 48, p109.
 - 9) Kuroki K, Tsuchiya N, Tsao BP, Grossman JM, Fukazawa T, Kano H, Iwata T, Hashimoto H, Tokunaga K. Association of CD19 polymorphisms with SLE in Japanese. Presented at "B cells & Autoimmunity: New concepts & therapeutic perspectives" 19th-21st July, Bergen, Norway. Abstract 29, p71.
 - 10) Kyogoku C, Dijstelbloem HM, Tsuchiya N, Hatta Y, Kato H, Yamaguchi A, Fukazawa T, Jansen MD, Hashimoto H, van de Winkel JGJ: Association of Fc γ receptor IIB polymorphism with the susceptibility to human systemic lupus erythematosus (SLE). Presented at "B cells & Autoimmunity: New concepts & therapeutic perspectives" 19th-21st July, Bergen, Norway. Abstract 30, p73.
 - 11) Kawasaki A, Tsuchiya N, Fukazawa T, Hashimoto H, Tokunaga K: Lack of association of human BCMA polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. Scand. J. Immunol. 54, Supplement 1, Tue512, 2001.
 - 12) Kyogoku C, Dijstelbloem HM, Tsuchiya N, Hatta Y, Kato H, Yamaguchi A, Fukazawa T, Jansen MD, Hashimoto H, van de Winkel JGJ: Association of Fc γ receptor IIB polymorphism with the susceptibility to human systemic lupus erythematosus (SLE). Scand. J. Immunol. 54, Supplement 1, Tue523, 2001.
 - 13) Hikami K, Tsuchiya N, Yabe T, Tokunaga K: New variations of human NKG2 and CD94 gene: lack of association with RA or SLE. Scand. J. Immunol. 54, Supplement 1, Tue532, 2001.
 - 14) Kuroki K, Tsuchiya N, Tsao BP, Grossman JM, Fukazawa T, Kano H, Iwata T, Hashimoto H, Tokunaga K. Association of CD19 polymorphisms with SLE in Japanese. Scand. J. Immunol. 54, Supplement 1, Tue534, 2001.
 - 15) 氷上光輝、土屋尚之、屋部登志雄、徳永勝士：ヒト NKG2/CD94 遺伝子の変異スクリーニングと、リウマチ性疾患との関連の解析。日本人類遺伝学会第46回大会、p89, 2001.
 - 16) 櫻井大祐、山口晃弘、土屋尚之、山本一彦、徳永勝士：慢性関節リウマチ患者滑膜における FOSB 遺伝子の発現。日本人類遺伝学会第46回大会、p146,

2001.

- 17) 京極千恵子、Deijstbloem HM, 土屋尚之、八田陽子、加藤仁、山口晃弘、深沢徹、Jansen MD, 橋本博史、van de Winkel JGJ, Kallenberg CGM, 徳永勝士：日本人全身性エリテマトーデスにおけるFc γ 受容体遺伝子群多型の解析：FCGR2BとFCGR3の関連。日本人類遺伝学会第46回大会、p151, 2001.
- 18) Tokunaga K, Tsuchiya N: Search for susceptibility genes to SLE. The fourth cardiovascular genomics symposium. P19. 2001. 10.26. (Seoul)
- 19) Kyogoku C, Dijstbloem HM, Tsuchiya N, Hatta Y, Kato H, Yamaguchi A, Fukazawa T, Jansen MD, Hashimoto H, van de Winkel JGJ, Kallenberg CGM, Tokunaga K: Association of Fc γ receptor gene polymorphisms in the Japanese patients with SLE: Independent contributions from FCGR2B and FCGR3A. Arthritis Rheum 44 (Suppl.): S179, 2001.
- 20) Sakurai D, Yamaguchi A, Tsuchiya N, Yamamoto K, Tokunaga K: Expression of ID family genes in the synovia from patients with rheumatoid arthritis, Arthritis Rheum 44 (Suppl.): S181, 2001.
- 21) 関谷剛、宮増美里、義江修、土屋尚之、徳永勝士、羅智靖、松島綱治、山本一彦、平井浩一：CCL17:TARC(thymus and activation-regulated chemokine) & CCL22:MDC(macrophage-derived chemokine)の遺伝子多型解析。日本免疫学会総会学術集会記録31: 32, 2001.
- 22) 櫻井大祐、山口晃弘、土屋尚之、山本一彦、徳永勝士:慢性関節リウマチ患者滑膜におけるFOSB遺伝子の発現。日本免疫学会総会学術集会記録31: 57, 2001.
- 23) 川崎綾、土屋尚之、深沢徹、松多邦雄、橋本博史、徳永勝士：BCMA(TNFRSF17)、BLyS(TNFSF13B)の変異解析とSLEおよびRAとの関連の検討。日本免疫学会総会学術集会記録31: 59, 2001.
- 24) Kyogoku C, Dijstbloem HM, Tsuchiya N, Yamaguchi A, Fukazawa T, Jansen MD, Hashimoto H, van de Winkel JGJ, Kallenberg CGM, Tokunaga K: Fc γ receptor gene polymorphisms in the Japanese patients with SLE: Association of FCGR2B and FCGR3A. 日本免疫学会総会学術集会記録31: 66, 2001.
- 25) Kuroki K, Tsuchiya N, Fujimoto M, Tsao BP, Grossman JM, Fukazawa T, Hashimoto H, Tokunaga K: Association of dinucleotide repeat polymorphism within the CD19 3'UTR with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Japanese. 日本免疫学会総会学術集会記録31: 73, 2001.

H. 知的財産権の出願・登録

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし