

患治療における分子生物学的アプローチ」

- 6) 第 75 回 日本内分泌学会学術総会
(2002.6.28-30) シンポジウム8 骨疾患とシ
グナル伝達「破骨細胞の分化と活性化の
細胞内シグナル」
- 7) 第3回 運動器科学研究会(2002.8.30-31)
淡路島 破骨細胞アポトーシスの細胞内シグ
ナル
- 8) 第8回 人工関節基礎研究会(2002.9.6)東
京 破骨細胞をターゲットにした骨関節疾患
治療戦略
- 9) 第1回 広島整形外科先端医学セミナー
(2002.9.11)広島 破骨細胞をターゲットにし
た骨代謝疾患治療
- 10)第17回 日本整形外科基礎学術集会
(2002.10.11-12)青森 シンポジウム15 骨
形成と骨吸収 骨吸収の分子メカニズム
- 11)第75回 日本生化学会大会
(2002.10.14-17)京都 シンポジウム 3S39-2
骨格系細胞の分化制御機構 オーガナイザ
ー 西村理行 田中 栄
- 12)第51回 東日本整形災害外科学会
(2002.10.24-25)郡山 シンポジウム1 整形
外科基礎研究と臨床の接点 関節炎におけ
る骨関節破壊
- 13)第2回 カルシトニン/副甲状腺ホルモン研
究会(2002.12.7)東京 破骨細胞の細胞内シ
グナルとカルシトニン
- 14)第9回 九州骨軟骨研究会(2003.1.11)長崎
破骨細胞の活性化とアポトーシスの分子メカ
ニズム

H. 知的所有権の取得状況

特になし

厚生科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
分担研究報告書

関節リウマチ・骨粗鬆症患者の疫学、病態解明と治療法開発に関する研究

分担研究者 下村 伊一郎 大阪大学大学院生命機能研究科 教授

研究要旨：変形性関節炎、および関節リウマチ患者の大腿骨骨髓海綿骨片から、骨髓脂肪細胞をコラゲナーゼ消化により純粋に分離する技術の確立中である。

A. 研究目的

ヒト骨髓に存在する脂肪細胞を単離する技術を確立し、骨髓脂肪細胞の有する基本的性質、ならびに関節リウマチや骨粗鬆症といった病態との関連を明らかにする。

B. 研究方法

大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科において、変形性関節炎あるいは関節リウマチ患者から摘出された海綿骨片、ならびに皮下脂肪組織をコラゲナーゼにより消化し、遠心分離と洗浄を繰り返すことで液上面に浮かぶ脂肪細胞分画と沈殿する間葉系細胞分画を分離回収した。

(倫理面への配慮)

器官制御外科にて人工関節置換術を施す患者に限定して、術前に書面にて研究目的・内容を説明し、同意を得た上で術中に取り除かれる骨片と皮下脂肪組織を研究材料として用いた。

C. 研究結果

ヒト大腿骨骨髓の海綿骨片を、コラゲナーゼで消化する際の諸条件を比較検討

した。また回収された脂肪細胞分画から、十分量の total RNA を抽出する方法に関しても検討を加えた。現在のところ、コラゲナーゼによる消化がまだ十分ではなく、浮遊する脂肪細胞分画に脂肪細胞以外の細胞が混入した。

D. 考察

骨髓脂肪細胞分画への他細胞の混入は、その後の機能解析結果に重大な影響を及ぼすと予想される。コラゲナーゼの種類や濃度、トリプシン消化の追加など、まだ検討を加えていない条件が残されており、今後検討する必要がある。

E. 結論

ヒト骨髓海綿骨片からの骨髓脂肪細胞分離は、技術的な困難を伴うが、諸条件の最適化により達成されうるものと考えられる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

F、G、H に関して、現在のところ該当するものはない。

RA 由来 B 細胞の性状解析

越智 隆弘 国立相模原病院長

研究要旨：われわれは、RA 患者の骨髄および滑膜組織よりナース細胞(RA ナース細胞)が高率に得られる事を報告してきた。RA ナース細胞はリンパ球や顆粒球、単球などを活性化する機能を有し、自らもその特徴的な細胞間相互作用(Pseudoemperipolesis)により活性化し、サイトカイン、ヒアルロン酸などの産生が亢進する。今回、われわれは、RA 患者の滑膜および骨髄から RA ナース細胞に依存性増殖活性を有する B 細胞株の樹立に成功した。これら B 細胞は多量の自己抗体を産生していた。これら自己抗体産生 B 細胞とそれが産生している免疫グロブリンの性状を解析した。

<p>A. 研究目的</p> <p>RAの骨髄・滑膜からRAナース細胞が高率に得られ、この細胞がB細胞の活性化とApoptosisの抑制に関与する事を報告してきた。これらの結果はRA罹患部における濾胞形成を伴うRA病態形成を説明可能とした。今回、RA骨髄・滑膜組織の長期培養中にRAナース細胞依存性増殖活性を有するB細胞の樹立を複数患者の組織から成功した。これら樹立されたB細胞の性状解析を行い、罹患部に浸潤しているB細胞のRA病態における関与を解明する事を目的に以下の検討を行った。</p> <p>B. 研究方法</p> <p><u>B細胞の樹立</u>：手術時に採取されたRA滑膜については酵素処理後に単一細胞とし、骨髄についてはFicoll Paqueで分離後、10%FCS加DMEMで培養を行った。培養経過中にB細胞の増殖が認められる検体について以下の解析を行った。</p> <p><u>B細胞解析</u>：FACSで表層マーカーの解析と免疫グロブリン遺伝子解析を行った。</p> <p><u>B細胞株の産生する免疫グロブリン解析</u>：免疫グロブリンの定量とアイソタイプ</p>	<p>を検討し、認識する分子の同定を行った。自己抗体産生の有無については、HE p-2を用いた免疫染色にて決定した。さらに、RA患者および健常人の末梢血中に本自己抗体が認識する自己抗原の有無についてはELISA系を構築し評価した。</p> <p>C. 研究結果</p> <p>①RA患者由来組織の長期培養からは、複数の患者からB細胞の増殖が確認された(6例)。全培養の20%程度にB細胞の樹立が確認された。これらB細胞の産生する免疫グロブリンのアイソタイプはγ/κ(6例中4例)が殆どであったが、$\mu/\kappa, \alpha/\lambda$(それぞれ1例)のものがあった。樹立されたB細胞は同時に樹立されたRAナースと細胞間相互作用(接着、Pseudoemperipolesis)を示し、その増殖にはRAナースの存在を必要としており、RAナース細胞依存性増殖を示した。また、樹立されたB細胞は全てEBV陽性であることが判明した。これらB細胞株の表層マーカーの解析からCD19,CD20,CD40陽性で、さらにGerminal centerに存在が確認されてCD38,CD39も陽性であった。ま</p>
---	---

た、接着に関与する CD11a,CD49 も陽性であったが、CXCR4 は陰性であった。

②これら B 細胞の産生する抗体について Hep-2 を用いた自己抗体の検出から、全ての B 細胞が抗細胞質抗体を産生していた。また、RF との異同を検討したが RF ではなかった。

③B 細胞の免疫グロブリン遺伝子解析の結果から、これら B 細胞の使用している免疫グロブリン遺伝子はその殆どが胎児期肝での使用が報告されているものに限定されていた。

④これら B 細胞が認識する自己抗原の一つが EF-1 α であることを明らかにし、RA 患者の末梢血中において EF-1 α の発現が健常人に比較して有意に亢進している事が判明した。

D. 結論

RA 患者由来の罹患部(滑膜・骨髄)の長期培養から RA ナース細胞に依存性増殖能を有する B 細胞の樹立が可能であり、その全てが、自己抗体を産生していた。これら B 細胞の産生する免疫グロブリンは RA ナース細胞との共培養で増加亢進した。また、これら B 細胞は免疫グロブリン遺伝子として、偏ったレパトアを使用しており、その殆どが胎児期肝での使用が確認されているものであった。これら自己抗体を産生 B 細胞が認識する自己抗原の一つは EF-1 α であり、その発現は健常人に比較して RA 患者で病態の進行に随伴し有意に亢進している事が示唆された。

E. 考察

RA 病態における B 細胞の関与と自己抗体の存在は無視できない。今回、われわれは、RA 病態形成に RA ナース細胞の重要性を B 細胞のレベルで検証した。RA 罹患部に存在する B 細胞は RA ナース細胞依存性増殖能を有し、培養上清中に自己抗体を多量に産生する。RA における自己抗体の性状は不明な点が多いが、今回、われわれは、その一つとして EF-1 α を同定し、RA の自己抗原である可能性を示唆した。また、これら B 細胞の殆どが EBV 感染しており、EF-1 α とウイルス潜伏感染との関連性を考慮すると、RA における B 細胞の活性化を考える上で興味深い。さらに、胎児期肝で使用されるレパトアを有しており、本来、胎児期に偏ったレパトアを有する B 細胞の選択を考慮した B 細胞分化成熟の過程が RA のような自己免疫疾患の成立に如何に関与するか、今後、詳細に検討を予定している。

F. 研究発表

1. 論文発表

limited VH gene usage in B cell clones established with nurse-like cells from patients with rheumatoid arthritis.

In preparation

G. 知的所有権の取得状況
検討中

厚生労働科学研究費補助金 (免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業)
分担研究報告書

関節リウマチの骨髄変化に関する研究

分担研究者 広畑俊成 帝京大学 医学部 内科 助教授

研究要旨 関節リウマチ(RA)における滑膜の異常増殖においては血管新生が重要な役割を果たすことが明らかになっている。今回我々は、RA 骨髄幹細胞が血管新生において如何なる役割を果たすかについて検討を行なった。その結果、RA 骨髄においては幹細胞から血管内皮細胞への分化が亢進していることが明らかになった。この機序としては、RA 骨髄細胞において血管内皮の前駆細胞が増加している可能性と、RA 骨髄細胞による VEGF などの血管新生に関わるサイトカインの産生能が亢進している可能性が考えられる。

A. 研究目的

関節リウマチ(RA)においては滑膜の異常増殖により関節破壊が惹起される。この滑膜の異常増殖においては血管新生が重要な役割を果たすことが明らかにされている。一方、RA においては骨髄の異常が病態形成上重要な役割を果たすことをこれまでに我々は明らかにしてきた。近年、血管新生においても骨髄が深く関与することが明らかになっている。今回我々は、RA 骨髄幹細胞が血管新生において如何なる役割を果たすかについて検討を行なった。

B. 研究方法

1. 対象

RA 患者 7 例、OA 患者 3 例につき、関節置換術の際に採取した骨髄液(腸骨骨髄・大腿骨髄)を用いた

2. 骨髄 CD34+細胞の分離と培養

骨髄血より Ficoll 法で単核球分画を得、これより magnetic beads (Dynabeads,

Dynal 社)を用いて CD34+細胞を分離した。得られた細胞を stem cell factor (SCF) (10 ng/ml) + GM-CSF (1 ng/ml) の存在下に 1 週間培養した。

3. Von Willebrand 因子 (VWF) の発現の解析

骨髄 CD34+細胞を 1 週間培養後、FITC 標識抗 VWF 抗体(ヤギ)にて染色し、フローサイトメトリーにて解析した。

(倫理面への配慮)

患者には研究内容及び検体採取の方法・危険性等を説明し、インフォームドコンセントを文書で取得した上で検体の提供を受けた。検体については連結匿名化にてプライバシーの保護をはかる。

C. 研究結果

SCF+GM-CSF で 1 週間刺激後の骨髄由来細胞における VWF の発現比率は、RA 群で $14.97 \pm 5.60\%$ 、OA 群で $6.21 \pm 1.88\%$ (mean \pm SD)であり、RA 群で有意に上昇し

ていた ($p=0.016$)。しかしながら、SCF+GM-CSF で培養4週後にはRA群とOA群でVWF発現細胞の比率には有意差は見られなかった。

D. 考察

以上の結果より、RA骨髄においては幹細胞から血管内皮細胞への分化が亢進していることが明らかになった。この機序としては、RA骨髄細胞において血管内皮の前駆細胞が増加している可能性と、RA骨髄細胞によるVEGFなどの血管新生に関わるサイトカインの産生能が亢進している可能性が考えられる。今後、症例を増やしてこの点について検討を加えてゆく必要がある。

E. 結論

RAにおいては骨髄CD34+細胞からの血管内皮細胞への分化能が亢進しており、これにより滑膜における血管新生を支持することにより滑膜の増殖を促進している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1.論文発表

・Hirohata S, Ohshima N, Yanagida T, Aramaki K. Regulation of human B cell function by sulfasalazine and its metabolites. *Int Immunopharm* 2: 631-640, 2002.

・Hirohata S, Yanagida T, Tomita T, Yoshikawa H, Ochi T. Bone marrow CD34+ progenitor cells stimulated with stem

cell factor and GM-CSF have the capacity to activate IgD⁻ B cells through direct cellular interaction. *J Leukoc Biol* 71: 987-995, 2002.

・Matsuda T, Ohno S, Hirohata S, Miyanaga Y, Ujihara H, Inaba G, Nakamura S, Tanaka S, Kogure M, Mizushima Y. Efficacy of Rebamipide as Adjunctive Therapy in the Treatment of Recurrent Oral Aphthous Ulcers in Patients with Behcet's Disease: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Drugs R D* 4:19-28, 2003.

2.学会発表

・Shibuya H, Nagai T, Yamamoto K, Ishii A, Hirohata S. Differential regulation of Th1 responses and CD154 expression in human CD4+ T cells by IFN- α . 66th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, New Orleans, Arthritis Rheum (Suppl.): S248, 2002.

・Nagai T, Shibuya H, Yamamoto K, Hirohata S. Antiribosomal P protein antibody reacts with activated human monocyte-lineage cells and enhances their expression of vascular endothelial growth factor. 66th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, New Orleans, Arthritis Rheum (Suppl.): S280, 2002.

・Kikuchi H, Aramaki K, Isshi K, Hirohata S. Low dose weekly methotrexate therapy for progressive neuro-Behcet's syndrome: a follow up study for 4 years. 66th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, New Orleans, Arthritis Rheum (Suppl.): S325,

2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

該当なし

2.実用新案登録

該当なし

3.その他

該当なし

厚生労働省科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）

（分担）研究報告書

関節リウマチの EB ウイルス制御機構の検討

（分担）研究者 武井 正美 日本大学内科学講座内科一部門外来医長、助手

研究要旨：関節リウマチ (RA) 口腔由来野生株の Epstein Barr ウイルス (EBV) の関連蛋白 EBV associated nuclear antigen 3c (EBNA3c) の塩基配列に正常ではほとんど見られない変異が共通してみられ、ペプチドのミスセンス変異を伴っていた。骨髓 CD34 細胞と正常 EBV 未感染 B 細胞との共存培養して得られた EBV 陽性 B 細胞株の EBNA3c の配列がこの変異を持っており、この RA 患者口腔由来野生株の EBNA3c の配列と一つの塩基を除いて一致し、RA 骨髓の CD34 陽性細胞分画に EBV の感染を引き起こす機序が存在することを示唆した。RA 骨髓の GM-CSF, E-CSF コロニー形成能は OA に比し大きな差はなく、その分化した細胞群には EBV 関連 LMP2 領域を 50 コピー検出できる realtimePCR で検出されなかった。

共同研究者: 山上賢治 1、三田村巧 1、大久保陸洋 1,2、澤田滋正 1,2、森俊仁 3、広畑俊成 4
1 日本大学内科学教室内科一部門、2 日大練馬光が丘病院内科、3 国立相模原病院整形外科、4 帝京大学内科

A. 研究目的

これまで Epstein-Barr ウイルス (EBV) と関節リウマチ (RA) の関連を明らかにするため、polymerase chain reaction (PCR)、in situ hybridization 法、組織染色を用いて、RA の滑膜細

胞に EBV が存在する事を証明した (Inter Immunol 9, 739, 1997)。EBV 感染細胞は正常の免疫機能を有していればその再活性化は抑制され潜在感染として維持され疾患の発症は起こらない。上咽頭癌の様にウイルスに変異があり免疫監視機構から逃れている可能性や、RA で EBV 特異的 CTL 活性が低いとの報告もあり、RA 滑膜でこのような細胞の存在を許している可能性もある。我々は EBV 関連疾患としても知られている IgA 腎症の末梢白血球の RNA を用いた fluorescein

differential display 法による解析で偶然にこの遺伝子を発見し全 cDNA の sequence を行った (国際公開番号: WO98-24899, H 8, 1 2, 5)。この遺伝子が 1998 年 1 2 月に Nature で Sayo らの報告した小児期に EBV の致死感染症を起こすことで知られている X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP) の原因遺伝子と全く同一のものであった。我々は、この SAP/SH2D1A mRNA の発現が RA 患者 T 細胞で低いことを報告し、SAP/SH2D1A cDNA に XLP のような変異が存在しないことを報告した (Inter Immunol 1 3, 5 5 9, 2 0 0 1)。また、SAP/SH2D1A の promotor 領域と思われる 5' 上流に存在する CAAT ボックス近傍に単遺伝子変異が存在する可能性を見出し、RA で EBV に対する感染防御機構が異常を起こす原因として、SAP/SH2D1A 分子の機能異常がその原因の一つとして関与する可能性のあることを見出した。この研究では、これまでの発見に基づき RA に特異的な EBV の存在する可能性の検討と RA の骨髄に EBV による滑膜細胞への感染を引き起こす機構の存在の可能性の検討を目的とした。

B. 研究方法

1. RA 由来 EBV の採取

RA、正常者の口腔を綿棒でくまな

く擦過し、2 ml の生理食塩水に懸濁、DNA を抽出するまで -20 度で凍結保存した。EBV 陰性正常者由来 B 細胞と RA 骨髄 CD34 陽性細胞との共培養で樹立した B 細胞株の DNA を抽出し、この細胞株の EBV が RA 骨髄由来であることを解析した。

2. EBNA3c の DNA 配列の検討

EBV 産生株として広く知られている B95-8 で EBNA3c が 3 9 ヌクレオチドの 3 回の繰り返し構造が存在し、その繰り返し数がウイルス株により異なっていることが報告されている。この部位の DNA 配列を検討するため EBNA3c 領域の DNA 配列を PCR 産物のダイレクトシーケンシング法にて ABI 社 DNA シーケンサー 3 7 7 (PE Applied Biosystems Inc., CA, USA) を使用し検討した。使用したプライマーは 5'-acgctcctctggatttaagttaca (100621-100645), 5'-catatcctggat-atgaagatgattgg (100796-100821) でシーケンシングプライマーも同じものを使用し BigDye, Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (PE Applied Biosystems Inc., CA, USA) を使用し添付文書に従い DNA 配列を両方向で決定した。

3. RA 骨髄のコロニー形成

RA や変形性関節症 (OA) の骨髄を人工関節置換術時に文書にてインフォームドコンセント後採取し、21G の注射針で骨髄細胞の固まりをほぐし、

LSM 細胞分離液にて単核球を分離する。分離後 $1 \times 10^6 / \text{ml}$ に調整した骨髓単核細胞液 0.3ml を 3ml のメチルセルロース培地 (Methocult HF4434 ;Stem-Cell Technologies) に攪拌し 1.1ml を 35mm 培養皿 (3005) で、 37°C 、5% CO_2 、湿度 100% で培養し、14 日後 BFU-E、CFU-GM を目視にてカウントしコロニーを分離回収した。

4. EBV 関連 LMP2 の Realtime PCR

前記した骨髓由来細胞コロニーを採取し、DNA を抽出、ABI 社 7700 遺伝子増幅装置 (PE Applied Biosystems Inc., CA, USA) を使用し、定量 PCR を行った。感度は 50 コピー以下で行った。

C. 結果

RA 由来 EBV の EBNA3c

RA の口腔由来 EBNA3c 領域の 39ヌクレオチドの繰り返し数は OA のものと比較し偏りはなかった ($\text{RA} 7.0 \pm 1.3$, $\text{OA} 6.7 \pm 0.8$)。この部位の塩基に RA で変異が認められそのアミノ酸にミスセンス変異によりこれまでの報告されていない異なったアミノ酸の配列が起こることが判明した (図 1)。RA 骨髓由来 CD34 細胞と EBV 陰性末梢血由来 B 細胞と共培養し樹立された EBV 陽性 B 細胞株が HLA の遺伝子型の比較で正常者由来であることが分かった。その EBV の EBNA3c の DNA 配列が

RA 患者口腔由来のものとは 1 つの塩基変異を除いて他は全て一致し、その繰り返し構造の数も一致した。

RA の骨髓コロニー形成能

RA と OA でのコロニー形成能の違いをみるために GM-CFU, E-BFU の数を比較した。この結果 OA の患者と比較して RA の患者では E-BFU/GM-CFU 形成能に大きな相違はなかった。また、全体のコロニー数に関しても差は認められないと思われた。(図 2)。

RA 骨髓 GM-CFU, E-BFU の EBV の検出—Real time PCR 法

RA 4 例、OA 4 例の骨髓より得られた GM-CFU, E-BFU のコロニーでは LMP-2 のコピーは全て感度以下 (50 コピー) であった。

D. 考察

EBV はヘルペスウイルス群に属し、DNA ウイルスである。DNA ウイルスはレトロウイルスなどの RNA ウイルスと違いその配列に変異をあまり起こさないとされている。EBV ではタイプが 2 つ知られており RA 由来悪性リンパ腫ではその偏りが報告されている。また、EBV 関連蛋白である latent membrane protein(LMP-1)の配列に欠失が存在することが上咽頭癌で報告されたが、その後正常者由来の EBV にもその欠失の存在が報告され病因との関連は不明である。今回発見された

EBNA3c 領域の RA に偏った DNA の変異はアミノ酸レベルでもミスセンス変異を起こしているが、その生体内における影響はまだ不明である。SLE や RA で以前より EBNA-1 の分子相同性による抗体が病態に結びつく可能性が議論されている。また、EBNA3c 領域は細胞傷害性 T 細胞の認識するエピトープが存在する部位でもあり RA の滑膜中に EBNA3c に対する抗体が高頻度に存在することも知られている。このようなアミノ酸変異が RA での EBV 制御に影響を及ぼす可能性も検討されなければならない。

RA の骨髓由来細胞が EBV の感染に大きな役割を果たす可能性が Hirohata 等 (Rheumatol Int. 2000;19:153) や Shimaoka 等 (J Clin Invest. 1998;102:606) により報告されている。我々は広畑博士との共同研究で骨髓 CD34 陽性細胞分画が RA 由来の EBV 感染に重要な役割を果たしている可能性を見出した。この知見をさらに検討するため骨髓での CFU の形成能を検討した。少数例であるが、骨髓幹細胞の両者への分化能には差を認めなかった。このコロニーに EBV が維持され得るかを調べたがその存在を証明することはできなかった。現在この分化の過程での EBV 感染能力の有無を検討し、RA 骨髓での EBV 感染の場の提供に幹細胞が関わっているか否かの検討を進める予定である。

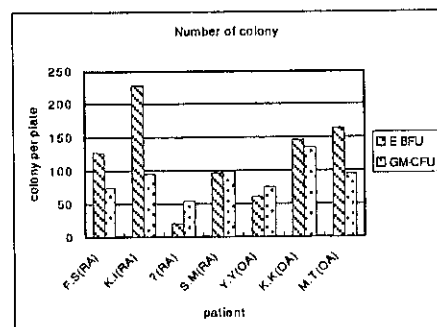
E. 結論

1. RA 由来 EBV 株には正常者と相違するものが存在する可能性があり EBNA3c 領域にアミノ酸変異を伴う塩基配列の相違が見出された。
2. EBV 陰性正常者由来 B 細胞と RA 骨髓 CD34 陽性細胞との共培養で樹立した B 細胞株の解析でこの EBV が RA 骨髓由来の可能性のあることを見出した。
3. 骨髓幹細胞の E-BFU/GM-CFU 形成能は RA と OA では大きな差はなく、そのコロニーに EBV の維持もされていないと考えられた。

図 1. RA 由来 EBV 野生株の EBNA3c のアミノ酸ミスセンス変異

	AA 3Pro置換	AA2Arg置換	AA11Gln置換
Nr	1/6	1/6	0/6
RA	5/6	5/6	4/6

図 2. RA と OA の骨髓コロニー形成能



F. 研究発表

1. 論文発表

1) S Sawada, **M. Takei** : Sjogren's syndrome. Yes Autoreactive lymphocytes, Why? virus or gene? Internal Medicine 41(2), 75-76, 2002

2) Azuma T, **Takei M**, Yoshikawa T, Nagasugi Y, Kato M, Otsuka M, Shiraiwa H, Sugano S, Mitamura K, Sawada S, Masuo Y, Seki N.: Identification of candidate genes for Sjogren's syndrome using MRL/lpr mouse model of Sjogren's syndrome and cDNA microarray analysis. Immunol Letter 81(2), 171-6, 2002.

(The first two authors equally contributed)

3) 白岩秀隆、山口美樹、佐藤真記、堀越昶、細川芳文、澤田滋正、逸見明博、佐貫栄一、武井正美、三田村巧、大久保陸洋、堀江孝至：壊死性血管炎を伴う溶血性連鎖球菌感染後反応性関節炎の一例

4) 澤田滋正 龍順之助 武井正美：慢性関節リウマチ最新治療ー抗 TNF- α 抗体、抗 IL-6 抗体療法 日大医学雑誌 60(10) 439-441, 2002

5) 武井正美、三田村巧、大久保陸洋、澤田滋正：Epstein-Barr ウイルスと慢性関節リウマチ リウマチ科 27 (3) 255-260, 2002

6) 武井正美、澤田滋正：シェーグレン症候群の治療戦略のポイント「シェーグレン症候群への strategy」pp 14-19, 先端医学社、東京、2002

7) 武井正美、三田村巧、澤田滋正：リウマチ科診療マニュアルーリウマチ性疾患における免疫検査法 サイトカイン リウマチ科 科学評論社 vol 27, pp352-359、2002

8) 三田村巧、武井正美、澤田滋正：リウマチ科診療マニュアルーリウマチ性疾患における免疫検査法リンパ球サブセットと可溶性表面マーカー リウマチ科 科学評論社 vol 27 pp347-351、2002

9) 関直彦、東孝典、吉川勉、増保安彦、武井正美、澤田滋正：リウマチ科診療マニュアルー検査の意義と検査成績の読み方・考え方 cDNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析 リウマチ科 科学評論社 vol 27 pp360-367、2002

2. 学会発表

1) Shiraiwa H, **Takei M**, Yoshikawa T, Azuma T, kato M, Otsuka M, Mitamura K, Okubo T, Saito I, Hayashi Y, Horie T, Msuho Y, Seki N, Sawada S: Isolation of candidated genes for Sjogren's syndrome using NFS/sld and MRL/lpr mice. animalmodels for primary and ssecondary Sjogren's syndrome by cDNA microarry. The 8th Interantional Symposium on Sjogren's syndrome Kanazawa, Japan, 2002, 5, 16-18

2) 西成田進、青木正紀、清水貴子、北村登、三田村巧、武井正美、松川吉博、堀江孝至：ANCA 関連血管炎 18

例の臨床像 日本内科学会 平成14年3月28日 名古屋

3) Y.Nakamoto, MS; I.Fukunishi, MD, PhD, FAPM; M.Takei, MD; M.Ishiburo, BA; M.Miwa, BA; Y. Matsukawa, MD; K. Mitamura, MD; T.Horie, MD; S.Sawada, MD; K.Nakamura, MD; M.Yoshii, MD: Peripheral-type Benzodiazepine Receptors as a Biological Marker for Screening the Degrees of Anxiety: Implications for Consultation-Liaison Psychiatry 49th Academy of Psychosomatic Medicine. Arizona, Tucson USA Nov 21 to 24, 2002

4) 白岩秀隆、武井正美、吉川勉、東孝典、加藤真樹、三田村巧、増保安彦、齋藤一郎、林良夫、大塚基之、大久保隆洋、堀江孝至、関直彦、澤田滋正：DNAチップによるマウス自己免疫性唾液腺炎モデルの遺伝子発現変動の検討 シェーグレン症候群市川セミナー2002 市川 2002年4月27日

5) 神戸栄美子、池田多聞、平沼久人、相川真吾、清水貴子、三田村巧、武井正美、松川吉博、白岩秀隆、大久保隆洋、澤田滋正、堀江孝至：多発斑状陰影を呈した皮膚筋炎に伴うBOOPの一例 第13回日本リウマチ学会関東支部学術集会 東京 2002年12月14日

6) 小野瀬輝、北村登、山上賢治、岡秀昭、松川吉博、清水貴子、三田村巧、

武井正美、西成田進、澤田滋正、堀江孝至：EBウイルス持続感染後、難治性血球貪食症候群を起し末梢性T細胞性リンパ腫が疑われた1例 第46回日本リウマチ学会 2002、4月

7) 竹井和大、大久保隆洋、武井正美、堀江孝至、白岩秀隆、細川芳文、堀越昶、澤田滋正：ループス腸炎を来したSLEの一例 第5回東京リウマチ膠原病研究会、東京、10月5日、2002年(平成14年)

8) Nakamoto Y, Fukunishi I, Takei M, Ishiburo M, Miwa M, matsukawa Y, Mitamura K, Horie T, Sawada S, Nakamura k, Yoshii M: Peripheral-type Benzodiazepine receptors as a biological maker for screening the degrees of anxiety: Implications for consultation-liaison psychiatry. 32 nd. Annual Meeting Society for Neuroscience Orland, Florida USA 2002. Aug.

9) 武井正美、三田村巧、大久保隆洋、白岩秀隆、広畑俊成、堀江孝至、澤田滋正：慢性関節リウマチとEBウイルス 第46回日本リウマチ学会、神戸、4月22日、2002

10) 白岩秀隆、武井正美、吉川勉、東孝典、加藤真樹、三田村巧、増保安彦、齋藤一郎、林良夫、大久保隆洋、堀江孝至、関直彦、澤田滋正：二次性 Sjogren 症候群 (SjS) モデル MRL/lpr と原発性 SjS モデル NFS/sld 唾液腺の遺伝子発現の検討-cDNA マイクロア

レイによる 第46回日本リウマチ学会、名古屋、4、2002

11) 大久保隆洋、武井正美、白岩秀隆、細川芳文、逸見 明博、澤田滋正：ホジキン病（HD）を合併した慢性関節リウマチ（RA）の一例 第46回日本リウマチ学会、名古屋、2002、4

12) 大久保隆洋、田平和宣、金子元英、山上賢治、清水貴子、北村登、白岩秀隆、三田村巧、武井正美、松川吉博、澤田滋正、堀江孝至：パルボウイルス感染症を伴った全身性エリテマトーデスの2症例 第43回関東リウマチ研究会、東京、6月22日、2002

厚生科学研究費補助金 (免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業)
(分担) 研究報告書

発現特化型トランスクリプトーム解析による慢性リウマチ原因遺伝子の探索に関する研究
(主任又は分担者) 研究者 野島 博

研究要旨: 本年度は健常人血液細胞発現特化型 cDNA 群 (*PREB*: predominantly expressed in blood cells) の包括的単離を行い、単離を目指している、ほぼ全てに相当する 320 種類の *PREB* 遺伝子をクローニングすることに成功した。

分担研究者氏名・所属施設名及び 野島 博・大阪大学微生物病研究所
所属施設における職名 教授

<p>A.研究目的 慢性リウマチ患者の血液細胞発現特化型 cDNA マイクロアレイを作製し、それを用いた選択的トランスクリプトーム解析を行う形での血液診断治療システムを構築する。</p> <p>B.研究方法 健常人の血液細胞から mRNA を精製して作製した cDNA ライブラリーから繊維芽細胞由来の mRNA を差し引いた差分化 cDNA ライブラリーを作製し、段階的サブトラクション法によって健常人血液細胞発現特化型 cDNA 群を全て包括的に単離する。各部局で倫理委員会の承認を受け、健常人および患者の血液採取は全て書面によるインフォームド・コンセントをとることで倫理面に配慮した。</p> <p>C.研究結果 これまでに 3 次分化まで終了した時点でほとんど同じ cDNA しか採れなくなったので段階的サブトラクションは完了したと判断した。この時点で単離した 320 種類はノーザンブロット解析によって繊維芽細胞には殆どバンドが見られないが血液細胞には強いバンドが見られた遺伝子である。</p> <p>D.考察</p>	<p>単離した <i>PREB</i> 遺伝子のうち約半数は機能解析がまったく行われていない未知遺伝子であった。癌遺伝子である <i>v-yes</i> が大量に発現していたのは意外であった。</p> <p>E.結論 3 次差分までで 320 種類もの <i>PREB</i> 遺伝子が単離できたことにより段階的サブトラクションは有用であると結論できた。</p> <p>F.健康危険情報 なし</p> <p>G.研究発表 1. 論文発表 Fujii, T. et al., EMBO Rep. 3(4):367-372, 2002. 2. 学会発表 日本分子生物学会 (横浜) 2002.12 月</p> <p>H.知的財産権の出願・登録状況 1. 特許取得 抹消血液細胞に示差的に発現されている遺伝子群、およびそれを用いた診断方法とアッセイ方法 (特許出願中) 2. 実用新案登録 なし 3. その他 なし</p>
--	--

Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表

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
Takahashi N, Udagawa N, Takami N, Suda T	Osteoclast generation.	Raisz LG, Rodan GA, Bilezikian JP	Principles of bone biology	Academic Press	San Diego	2002	109-126
宇田川信之、 須田幸治、 高橋直之	サイトカインによる破骨細胞の分 化.	奥村 康、 平野俊夫、 佐藤昇志	Annual Review 免 疫 2003	中外医学社	東京	2002	93-104
Takahashi N, Udagawa N, Tanaka S, Suda T	Generation of osteoclasts from murine hemopoietic cells.		Bone Research Preotocol's	Humana Press	Towowa	2003	in press
広畑俊成	第VI章治療 up date 第3節全身 性エリテマトーデスの活動性評価 と治療	竹原和彦、 桑名正隆、 宮地良樹	新・膠原病	診断と治療社	東京	2002	258-259
広畑俊成	第VI章治療 up date 第17節妊 娠出産時における膠原病の治療	竹原和彦、 桑名正隆、 宮地良樹	新・膠原病	診断と治療社	東京	2002	302-303
広畑俊成	Part B 診断基準と診断のポイント 32.Behcet 病	住田孝之	ESSENCE 膠原病・リウ マチ	診断と治療社	東京	2002	90-91
武井正美、 澤田滋正	シェーグレン症候群の治療戦略の ポイント	住田孝之、 竹内勤、 山本一彦	シェーグレン 症候群への strategy	先端医学社	東京	2002	pp 14-19

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
中山久徳 松井利浩 杉井章二 小澤義典 當間重人	末期関節リウマチにおける骨粗鬆症および椎体骨折	臨床リウマチ	14(3)	139-147	2002
Tsuboi H, Matsui Y, Hayashida K, Yamane S, Maeda-Tanimura M, Nampei A, Hashimoto J, Suzuki R, Yoshikawa H, Ochi T,	Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) positive cells in rheumatoid synovium may induce the destruction of articular cartilage	Ann Rheum	62	196-203	2003
Katagiri T, Takahashi N	Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation.	Oral Diseases	8(3)	147-159	2002
Li X, Udagawa N, Itoh K, Suda K, Murase Y, Nishihara T, Suda T, Takahashi N	p38 MAP kinase-mediated signals are required for inducing osteoclast differentiation but not for osteoclast function.	Endocrinology	143(8)	3105-3113	2002
Udagawa N, Kotake S, Kamatani N, Takahashi N, Suda T	The molecular mechanism of bone destruction in rheumatoid arthritis.	Arthritis Research	4(5)	281-289	2002
宇田川信之、小竹茂、 鎌谷直之、高橋直之、 須田立雄	骨吸収におけるTNF関連サイトカインの役割—慢性関節リウマチにおける骨吸収機構の解明を目指して—	リウマチ	42(1)	3-12	2002
宇田川信之、高橋直之	破骨細胞の分化と機能発現におけるRANKLの役割.	日本臨床	60 (Suppl 3)	672-678	2002
宇田川信之、高橋直之	破骨細胞の分化と骨吸収のメカニズム—歯周病における骨吸収機構の解明を目指して—	炎症と免疫	10(3)	229-238	2002
小林泰浩、宇田川信之、 高橋直之	破骨細胞の形成と機能を調節する炎症性サイトカインとリポ多糖(LPS)の作用機構.	実験医学	20(17)	2482-2487	2002
高橋直之	最新用語解説「OPG」.	骨粗鬆症治療	1(1)	56-57	2002
高橋直之	「三次元断層画像にみる骨構造に及ぼすリゼドロネートの作用」.	骨粗鬆症治療	1(1)	2月3日	2003
Katagiri T, Imada M, Yanai T, Suda T, Takahashi N, Kamijo R	Identification of a BMP-responsive Element in the Id1 gene.	Genes Cells	7(9)	949-960	200

Nakamichi Y, Shukunami C, Yamada T, Aihara K, Kawano H, Sato T, Nishizaki Y, Yamamoto Y, Shindo M, Yoshimura K, Nakamura T, Takahashi N, Kawaguchi H, Hiraki Y, Kato S	Chondromodulin I is a bone remodeling factor.	Mol Cell Biol	23(2)	636-644	2003
Itoh K, Udagawa N, Kobayashi K, Suda K, Li X, Okahashi N, Nishihara N, Takahashi N	LPS promotes the survival of osteoclasts via Toll-like receptor 4, but cytokine production of osteoclasts in response to LPS is different from that of macrophages.	J Immunol	170(7)	3688-3695	2003
Takami M, Suda K, Sahara T, Itoh K, Nagai K, Sasaki T, Udagawa N, Takahashi N	Involvement of vacuolar H ⁺ -ATPase in specific incorporation of risedronate into osteoclasts.	Bone	in press		2003
宇田川信之、高橋直之	図説:ビスフォスホネートの作用機序.	日本臨床	61(2)	178-179	2003
妻木範行、中瀬尚長、 宮地高弘、越智隆弘、 吉川秀樹	軟骨形成におけるBMPの役割	骨・関節・靭帯	15	255-260	2002
吉川秀樹	BMPの応答制御機構の解析	The Bone	16	85-89	2002
富田哲也、高樋康一郎、 越智隆弘、吉川秀樹	IL6, 病型と関節破壊予測因子	Medical Practice	19	1149-1151	2002
玉井宣行、西川昌孝、 名井陽、吉川秀樹	新規人工骨の開発と骨組織のTissue engineeringの試み	関節外科	21	1272-1278	2002
吉川秀樹、名井陽、 玉井宣行、西川昌孝、 海渡貴司	骨軟骨の再生医学	ゲノム医学	2	651-656	2002
玉井宣行、名井陽、 富田哲也、中瀬尚長、 吉川秀樹	連通気孔構造を有する新規多孔体ハイドロキシアパタイトセラミックスーその優れた微細構造と骨伝導能	Orthopaedics Ceramic Implants	21	21-24	2002
Tamai, N., Myoui, A., Tomita, T., Nakase, T., Tanaka, J., Ochi, T., Yoshikawa, H.	Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo	Journal of Biomedical Material Research	59	110-117	2002
Tomita, T., Nakase, T., Kaneko, M., Shi, K., Takahi, K., Ochi, T.,	Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer enhances production of matrix metalloproteinases	Arthritis and Rheumatism	46	373-378	2002

Yoshikawa, H.	in rheumatoid arthritis				
Tsumaki, N., Nakase, T., Miyaji, T., Kakiuchi, M., Kimura, T., Ochi, T., Yoshikawa, H.	Bone morphogenetic protein signals are required for cartilage formation and differently regulate joint development during skeletogenesis	Journal of Bone and Mineral Research	17	898-906	2002
Nakase, T., Ariga, K., Meng, W., Iwasaki, M., Tomita, T., Myoui, A., Yonenobu, K., Yoshikawa, H.	Distribution of genes for parathyroid hormone (PTH)-related peptide, Indian hedgehog, PTH receptor and patched in the process of experimental spondylosis in mice	Journal of Neurosurgery	97	82-87	2002
Takahi, K., Hashimoto, J., Hayashida, K., Shi, K., Takano, H., Tsuboi, H., Matsui, Y., Nakase, T., Tomita, T., Ochi, T., Yoshikawa, H.	Early closure of growth plate causes poor growth of long bones in collagen-induced arthritis rats	Journal of Musculoskeletal Neuronal Interaction	2	344-351	2002
Takahi, K., Tomita, T., Nakase, T., Kaneko, M., Takano, H., Myoui, A., Hashimoto, J., Ochi, T., Yoshikawa, H.	Tumor necrosis factor- α converting enzyme expression in the joints of rheumatoid arthritis patients	Journal of Musculoskeletal Research	6	63-71	2002
Higuchi, C., Myoui, A., Hashimoto, N., Kuriyama, K., Yoshioka, K., Yoshikawa, H., Itoh, K.	Continuous inhibition of MAPK signaling promotes the early osteoblastic differentiation and mineralization of the extracellular matrix	Journal of Bone and Mineral Research	17	1785-1794	2002
Kuriyama, K., Higuchi, C., Tanaka, K., Yoshikawa, H., Itoh, K.	A novel anti-rheumatic drug, T-614, stimulates osteoblastic differentiation in vitro and bone morphogenetic protein-2 induced bone formation in vivo	Biochemical and Biophysical Research Communications	299	903-909	2002
Mochizuki T, Asai A, Saito N, Tanaka S, Katagiri H, Asano T, Nakane M, Tamura A, Kuchino Y, Kitanaka C, Kirino T	Akt protein kinase inhibits non-apoptotic programmed cell death induced by ceramide.	J Biol Chem	277	2790-2797	2002