

患に対して治療効果を発揮出来ることを確かめる。

本年度はこの中の後半、すなわち II 型コラーゲン特異的 T 細胞レセプターを用いて、抗原特異的な抑制性 T 細胞を構築し、生体での効果を検証することを行った。

### C. 研究結果

DBA/1 由来 II 型コラーゲン特異的 T 細胞レセプターは、既に報告されている配列情報を用いて合成オリゴヌクレチドを用いたヘテロデュプレックス PCR 法にてクローニングした。これらの  $\alpha$ 、 $\beta$  鎖の T 細胞レセプター全長 cDNA を、昨年と同様に pMX ベクターに組み込み、PLAT-E パッケージング細胞に導入することで感染性のレトロベクターを作成した。次にこれらを DBA/1 マウスの脾臓細胞に導入したところ、II 型コラーゲンに対する細胞増殖反応を示したことから、抗原特異性を構築できたことを確認した。

今回は抑制分子として IL-10 を選択し、これを第 3 の遺伝子として導入した。3 つの遺伝子ともに発現している CD4 陽性の T 細胞は全体の約 10% であることが判明した。この 3 遺伝子導入再構築細胞を II 型コラーゲン誘導関節炎モデルマウスの誘導操作と同時に細胞導入したところ、コントロールと比べて有意に関節炎を抑制することが判明した。

### D. 考察

従来 T 細胞の研究では、T 細胞クローンや T 細胞ハイブリドーマを樹立する方法が行われてきたが、クローン樹立までに大きな労力を要し、試験管の中での人為的バイアスがあり、実際の治療には不向きなことなどの問題点がある。

リンパ球集団で発現している T 細胞レセプター遺伝子の検出で現在用いられているのは、CDR3 領域の核酸の長さを分析する方法 (CDR3 length analysis) が欧米を中心に行われている。これは、我々の SSCP 法を用いるクロノタイプ分析法と似ているが、一つ一つの T 細胞クローンの区別をすることは出来ず、従って本研究のような方向に向かって

進展することは難しい。従って、本研究は今までの研究成果に立脚した独自の方法論の確立であり、極めて独創的なものである。

生体内の一つの細胞から 2 つの異なる遺伝子情報を獲得する方法は、過去に我々の研究室で試行が繰り返され、単一細胞分離法を中心として複数技術を確立しつつある。レトロウイルスを用いた T 細胞レセプターの遺伝子導入に関しては、アメリカのチームが一つのベクターに  $\alpha$ 、 $\beta$  鎖の cDNA を組み込み細胞株に導入しているが、効率が悪く細胞表面に有意な量を検出できていない。一方、我々のチームは、2 つのベクターに別々に組み込んだ cDNA を用いて、通常のマウス脾臓細胞に遺伝子導入し、内因性の T 細胞レセプターの発現にうち勝ち 40% 以上の高率で両遺伝子を発現させ、さらに試験管内および生体内で機能を発現させることに成功している。

最近欧州でのレトロウイルスベクターを用いた、血液幹細胞への遺伝子導入によりリンパ腫の報告がなされている。我々が確立しつつある方法もレトロウイルスを用いるものであり、今後慎重に推移を見守る必要はあるが、末梢血への遺伝子導入ではこのような報告はないことと、将来的には自殺遺伝子をはじめ数種の安全システムを内蔵させておくことで安全性を高めることが可能であることから、研究の継続は問題ないと判断する。

以上の点から、本研究の目標である「生体内の情報を利用した抗原特異的機能性 T 細胞の試験管内再構築とリウマチ疾患の制御法の確立」は大筋実現可能であると考えられる。

### E. 結論

T 細胞遺伝子導入の手法を用いて、II 型コラーゲン特異的抑制性 T 細胞を構築し、コラーゲン誘発関節炎モデルの抑制が可能であることを示した。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

## 1. 論文発表

- 1) Kawahata K. Misaki Y. Yamaguchi M. Tsunekawa S. Setoguchi K. Miyazaki J. and Yamamoto K. Peripheral tolerance to a nuclear autoantigen:dendritic cells expressing a nuclear autoantigen lead to persistent anergic state of CD4+ autoreactive T cells after proliferation. *J Immunol.* 168:1103-1112, 2002
- 2) Kawahata K. Misaki Y. Yamauchi M. Tsunekawa S. Setoguchi K. Miyazaki J. and Yamamoto K. Generation of CD4+CD25+ regulatory T cells from autoreactive T cells simultaneously with their negative selection in the thymus and from nonautoreactive T cells by endogenous TCR expression. *J Immunol.* 168:4399-4405, 2002
- 3) Kono H. Suzuki T. Yamamoto K. Okada M. Yamamoto T. and Honda Z. Spatial raft coalescence represents an initial step in Fc  $\gamma$ R signaling. *J Immunol.* 169:193-203, 2002
- 4) Takahama H. Masuko-hongo K. Tanaka A. Kawa Y. Ohta N. Yamamoto K. Mizoguchi M. Nishioka K. and Kato T. T-cell clonotypes specific for dermatophagoides pteronyssinus in the skin lesions of patients with atopic dermatitis. *Human Immunol.* 63:558-566, 2002

## 2. 学会発表

特になし

## H. 知的財産権の出願・登録

特になし

## 関節リウマチの病態におけるアダプター蛋白の役割に関する研究

分担研究者 亀田秀人

埼玉医科大学総合医療センター 第2内科 助手

研究要旨 関節リウマチ (RA) の滑膜細胞は腫瘍様の異常増殖を示す。そこで正常線維芽細胞が多段階的変化により腫瘍細胞へ transform していく *in vitro* transformation モデルを用いてアダプター蛋白の発現と機能変化を検討した。RA 滑膜細胞に酷似した増殖因子依存性 anchorage-independent growth を示す段階で Gab1 の発現異常が見られ、RA の病態にもアダプター蛋白の発現・機能異常が関与している可能性が示唆された。

### A. 研究目的

関節リウマチ (RA) の病態は炎症性サイトカインの役割を中心に次第に理解されつつあるが、滑膜細胞の腫瘍様増殖の分子機構など未解明の問題が多い。このことに関連して近年の RA 治療は免疫・炎症の非特異的な抑制療法が主体であり、治療効果の向上とともに重篤な感染症などの副作用が問題となっている。そこで RA の病態解明に基づくより選択性の高い治療の開発が必要とされている。

アダプター蛋白は細胞内シグナル伝達を円滑で効率的に行うのに必須な分子群であり、腫瘍性疾患においては増殖因子受容体などの増殖シグナル分子の量的・質的発現異常が数多く報告されている。しかしながら、アダプター蛋白の発現異常に関してはこれまで検討されていなかった。そこでアダプター蛋白の発現異常も腫瘍性疾患や RA 滑膜細胞の腫瘍様の増殖に関与する可能性を考えて、正常の線維芽細胞が発癌物質などの環境因子刺激を受けて多段階的変化により腫瘍細胞へ transform していく *in vitro* transformation モデルを用いてアダプター蛋白 Gab1 の発現と機能変化を検討した。

### B. 研究方法

受精 13 日目の Syrian hamster embryo から得た線維芽細胞を用いた *in vitro* transformation の培養系に

おいて見られる細胞の transformation の過程を図 1 に示す。細胞を発癌物質アスベストスに 24~48 時間暴露して継代培養を続け、transformation の各段階における細胞をそれぞれクローニングし、以後の実験に用いた。

### C. 研究結果

#### 1) SHEF 細胞の transformation と細胞のクローニング

まず細胞の形態変化が表れ、ついで不死化 (senescence の喪失) が生じた。この段階の細胞は前腫瘍段階 (preneoplastic stage) にあると考えられ、ヌードマウスに細胞を皮下注射しても腫瘍性増殖を示さない。この段階にある細胞のうち細胞ハイブリッド法により腫瘍細胞の腫瘍原性を抑制する (癌抑制遺伝子を保持した) 細胞と、この性質を喪失した細胞をそれぞれクローニングした。前者に属する 10W+8 細胞よりも後者に属する 10W-1 細胞はやや transformation の進んだ過程に位置すると考えられた。さらに腫瘍原性を獲得し、ヌードマウスの皮下で腫瘍性増殖を示す段階に到達した細胞として 10W2T 細胞をクローニングした。

#### 2) クローニングした細胞の増殖能の検討 (表 1)

ヌードマウスの皮下で細胞が腫瘍性増殖を示す tumorigenicity は、軟寒天中でのコロニー形成能とよ

く相関することが知られている。腫瘍細胞である BP6T は 63.4% と高いコロニー形成率を示した (10W2T も同様)。これに対して前腫瘍段階にある 10W+8 や 10W-1 細胞はいずれも 10% 血清以外の増殖因子刺激を加えなければ、コロニー形成は認めなかった。しかし、より早期の transformation 過程にある 10W+8 細胞が、代表的な増殖因子である epidermal growth factor (EGF) +insulin で 3.9% のコロニー形成を示すにとどまったのに対して、次の段階である癌抑制遺伝子を喪失した 10W-1 のうち passage 15 位までの E, early 細胞は両者の刺激で 7.4% とやや上昇、passage が 25 以上に進んだ 10W-1L, later 細胞では 26.4% のコロニー形成率を示した。また、EGF は insulin より高いコロニー形成刺激活性を有しており、両者に相乗効果が見られた。

### 3) SHEF 細胞の transformation に伴う Gab1 の発現変化

アダプター蛋白 Gab1 は約 100 kDa の位置に電気泳動され、N 末端の PH ドメインを特徴とするため、insulin receptor substrate-1 などと分子ファミリーを形成おり、この PH ドメインはイノシトールリン酸などの細胞膜由来のリン脂質との結合に重要とされ、Gab1 の細胞内局在に重要な役割を果たす可能性が示唆されている。この Gab1 の発現を、前腫瘍段階にある 10W+8 と 10W-1E および 10W-1L 細胞で検討した (図 2)。上段は免疫沈降とウェスタンプロットによる蛋白発現の解析、下段はノザンプロットによる mRNA の解析の結果を示す。10W+8 細胞では 100 kDa の Gab1 蛋白を発現しており、10W-1 細胞も passage 15 位まで (10W-1E) はほぼ同様の発現パターンであった。しかし passage 25 以降 (10W-1L) になると、この 100 kDa 蛋白の発現が低下し、87 kDa の蛋白発現が明らかとなった。mRNA でもこれと一致した結果で、10W+8 細胞では 5.2 kb を中心とした幅広いシグナル、10W-1 細胞も継代が少ない時はほぼ同様であったが、継代が進むと 4.6 kb の強い鮮明なシグナルが出現していた。10% の血清刺激に対する反応を見ても、100 kDa の蛋白と 5.2 kb

の mRNA は血清刺激で発現低下、逆に 87 kDa 蛋白と 4.6 kb の mRNA は発現増強しており、それぞれの蛋白と mRNA が対応していることが強く示唆された。

### 4) 抗 Gab1 抗体反応性 87 kDa 蛋白のクローニング

そこで 10W-1L 細胞より作成した cDNA library を用いて、100 kDa のハムスター Gab1 の cDNA と、87 kDa 蛋白の cDNA を RACE 法によりクローニングした。ハムスター Gab1 は既にクローニングされたヒトやマウスの Gab1 と 92% のアミノ酸相同性を示した。一方 87 kDa 蛋白に相当すると考えられる cDNA は coding region の最初の 72 塩基を欠損し、代わりに未同定の塩基配列が挿入されており、以下は 3' 末端まで同一の配列であった (図 3)。これが翻訳されると、オリジナル蛋白の N 末端から 104 番目のアミノ酸から始まることとなり、細胞膜リン脂質との相互作用に重要な PH ドメインのほとんどを欠損した蛋白となると推定された。そこでこの新たに見出された cDNA が 10W-1 細胞に特異的であることを確認するため、全長 Gab1 に特異的な 5' primer (-14F) と Gab1<sup>Δ1-103</sup> に特異的な配列に相当する 5' primer (LSP) をそれぞれ用いた RT-PCR を行った (図 4)。全長 Gab1 に相当する cDNA は 10W+8 および継代の少ない 10W-1E 細胞で同等に発現しており、継代の進んだ 10W-1L 細胞では低下していた。一方 Gab1<sup>Δ1-103</sup> に相当する cDNA は 10W+8 細胞では全く発現が見られず、10W-1E で初めて認められ、継代の進んだ 10W-1L 細胞では非常に強い発現が見られた。これは先に示したウェスタンやノザンの成績に合致していた。

### 5) Gab1<sup>Δ1-103</sup> による SHEF 細胞の transformation

最後にこの 2 つの cDNA をそれぞれ 10W+8 細胞に遺伝子導入して蛋白を強制発現させ、10W+8 細胞の軟寒天中コロニー形成能が変化するかどうか検討した (図 5)。いずれの細胞も親細胞の 10W+8 と同様、10% 血清のみではコロニー形成を示さなかった。ベクターのみの mock-transfection を行った細胞

が EGF 刺激で 7.8%のコロニー形成率であったのに対して、Gab1 の強制発現ではむしろやや低下していた。一方、Gab1<sup>Δ1-103</sup> を強制発現させた 10W+8 細胞は 22.2%とコロニー形成率が約3倍となっていた。従って先に示した 10W-1L 細胞の増殖因子刺激依存性のコロニー形成は主として Gab1<sup>Δ1-103</sup> の発現によると考えられた。

#### D. 考察

上記の結果はアダプター蛋白の発現異常が細胞の transformation に関与する可能性を初めて示すと同時に、RA の滑膜細胞においてもかかる増殖刺激伝達分子の発現・機能異常が存在する可能性を示唆している。

RA の滑膜細胞は、単に豊富なサイトカインにより刺激を受けて可逆的な活性化を生じているのみならず、おそらくはそうした持続的な刺激の結果として、細胞自身がある意味で非可逆的な transformation を生じていると思われる知見が蓄積されている。まず形態学的に紡錘状で大きな核と豊富な核小体が見られる。そして特に血小板由来増殖因子(PDGF)の存在下では、平面培養で contact inhibition を示さずに重層しながら増殖を続け、軟寒天培養で anchorage-independent な増殖を示す。ここで、完全に transform した細胞と異なり、anchorage-independent な増殖には PDGF 刺激や 20%という比較的高濃度の血清刺激を要することが、今回の SHEF 細胞を用いた検討で 10W-1L細胞が示した性質と酷似している。また early growth response gene-1 (*egr-1*), *c-fos*, *c-jun*, *c-myc*, *c-H-ras*, *c-sis* などの proto-oncogene の活性化が報告されている。最も重要な知見は、RA 患者由来の滑膜線維芽細胞を正常軟骨とともに SCID マウスに移植したところ、前述の形態学的変化を保持したまま軟骨への浸潤を示した報告であろう。このことは RA の滑膜細胞はすでに T 細胞非依存性に増殖・浸潤を生じ、滑膜細胞自身に非可逆的な変化が生じていることを証明した。OA 患者由来あるいは健康人由来の細胞ではかかる現象は見られなかった。

アダプター蛋白はこれまで T 細胞のシグナル伝達

を中心に研究が進められており、RA の滑膜組織や滑膜細胞においてどのような分子の発現あるいは発現異常があるのかについては全く報告がない。また、増殖因子やサイトカイン刺激による RA 滑膜細胞の増殖シグナルにおけるアダプター蛋白の役割も全く不明である。本研究で RA 滑膜細胞の腫瘍様増殖の分子機構にアダプター蛋白の発現・機能異常が関与している可能性が示されたことから、今後 RA 滑膜細胞におけるアダプター蛋白の量的・質的発現異常を調べていくことが必要と考えられた。

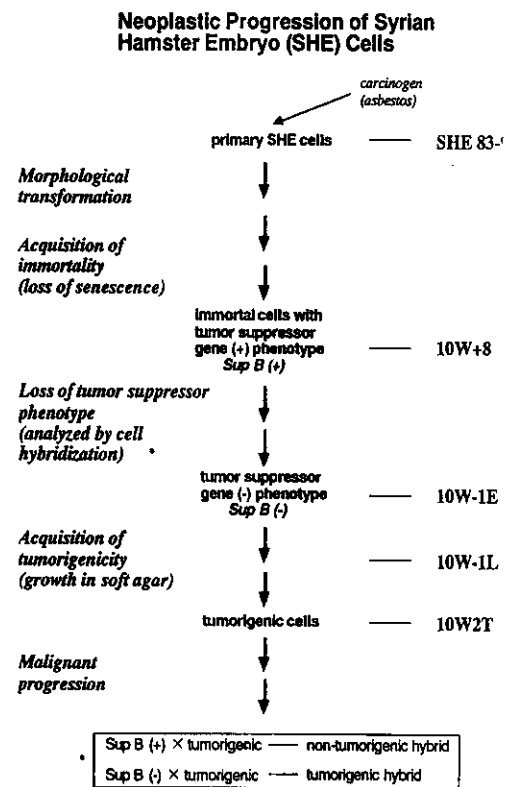
#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

・H. Kameda, J. I. Risinger, B-B. Han, S. J. Baek, J. C. Barrett, W. C. Glasgow and T. E. Eling. Expression of Gab1 lacking the preckstrin homology domain is associated with neoplastic progression. *Mol. Cell. Biol.*,



2001, 21 (6895-6905).

・H. Kameda, J. I. Risinger, B-B. Han, S. J. Baek, J. C.

Barrett, W. C. Glasgow and T. E. Eling. Identification of the EGFR-Gab1-SHP-2 complex formation and its functional loss during neoplastic cell progression. *Cell Growth Differ.*, 2001, 12 (307-318).

・H. Ikawa, H. Kameda, H. Kamitani, S. J. Baek, J. B. Nixon, L. C. Hsi and T. E. Eling. Effect of PPAR activators on cytokine-stimulated cyclooxygenase-2 expression in human colorectal carcinoma cells. *Exp. Cell Res.*, 2001, 267 (73-80).

・H. Kamitani, H. Kameda, U. P. Kelavkar and T. E. Eling. A GATA binding site is involved in the regulation of 15-lipoxygenase-1 expression in human colorectal carcinoma cell line, caco-2. *FEBS Lett.*, 2000, 467 (341-347).

・R. Hui, H. Kameda, J. I. Risinger, J. Angerman-Stewart, B. Han, J. C. Barrett, T. E. Eling and W. C. Glasgow. The linoleic acid metabolite, 13-HpODE augments the phosphorylation of EGF receptor and SHP-2 leading to their increased association. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 1999, 61 (137-143).

・亀田秀人: アダプター蛋白. *臨床免疫* 37(2): 173-178, 2002

・亀田秀人, 瀬戸山由美子, 竹内勤: T 細胞シグナル伝達におけるアダプター分子の役割. *炎症と免疫* 10(5): 581-586, 2002

・亀田秀人: アレルギー反応における Gab2 の役割. *臨床免疫* 38(2): 209-212, 2002

## 2. 学会発表

・亀田秀人, 竹内勤, 安倍達: 第 45 回日本リウマチ学会総会, 2002 年 5 月. *リウマチ* 41(2): p372, 2002 年 5 月.

・亀田秀人, 竹内勤, 安倍達: 第 22 回日本炎症・再生医学会, 2001 年 7 月. *炎症・再生* 21(4): p490, 2001 年 7 月.

H. 知的財産権の出願・登録  
無し

図 1. SHEF 細胞の *in vitro* transformation

transformation の各々の段階からクローニングされた細胞を示す。

TABLE 1. Colony forming efficiency of carcinogen-transformed SHE cells in soft agar and the effect of additional growth factor stimulation on it

Cell	Growth factors additional to 10% serum	Colony forming efficiency
10W+8	(-)	0.0 %
	EGF <sup>a</sup> + Insulin <sup>b</sup>	3.9 %
10W-1E	(-)	0.0 %
	EGF	1.3 %
	Insulin	0.0 %
	EGF + Insulin	7.4 %
10W-1L	(-)	0.2 %
	EGF	13.6 %
	Insulin	7.7 %
	EGF + Insulin	26.4 %
BP6T	(-)	63.4 %

<sup>a</sup>EGF: 50 ng/ml  
<sup>b</sup>Insulin: 1 mg/ml

表 1. transformation の各段階よりクローニングされた細胞の軟寒天培養でのコロニー形成能と増殖因子刺激に対する反応性の相違

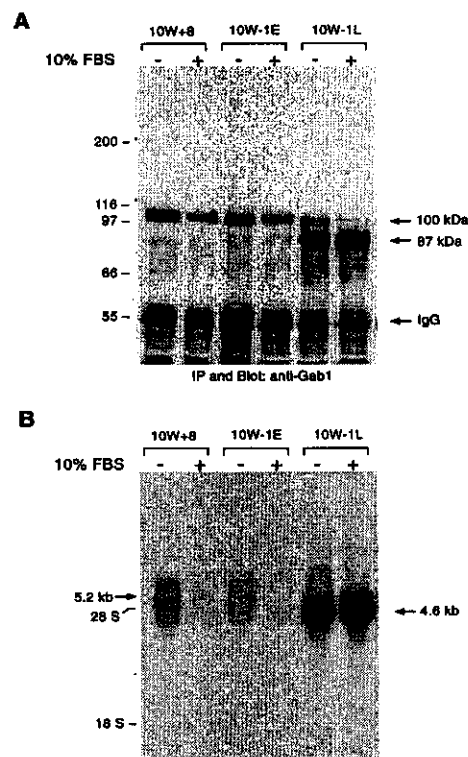


図 2. SHEF 細胞の transformation の過程における 87-kDa の新たな抗 Gab1 抗体反応性蛋白の発見

A は蛋白の発現を、B は mRNA の発現をそれぞれ示す。

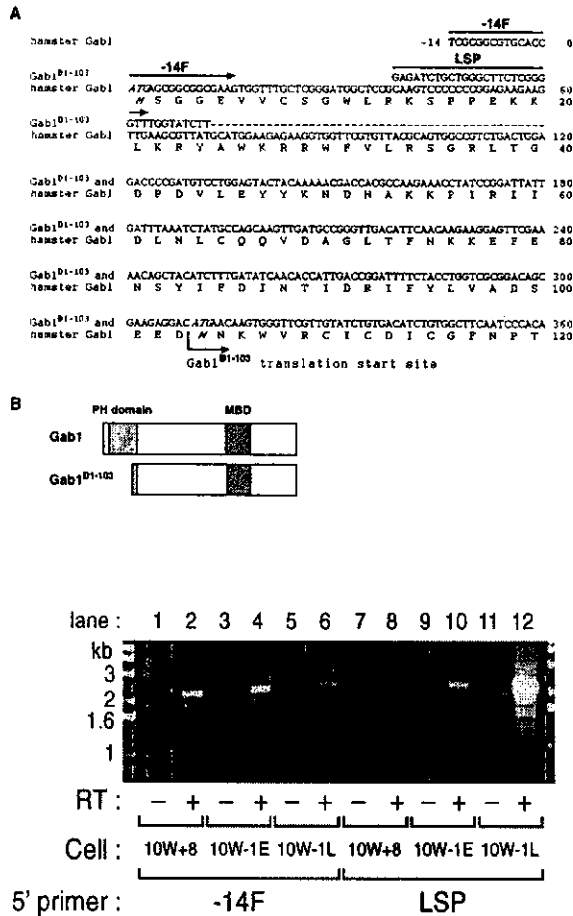


図 3. 10W-1L 細胞より得られた 2 つの Gab1 関連 cDNA の塩基配列の比較

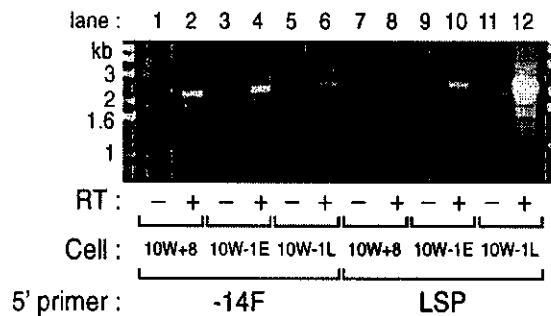
図 4. 各細胞における Gab1 と Gab1<sup>Δ1-103</sup> をコードする mRNA の発現の RT-PCR による比較

TABLE 2. Effect of exogenous expression of Gab1 and Gab1<sup>D1-103</sup> on colony forming efficiency of 10W+8 cells in soft agar

Cell	EGF 50 ng/ml additional to 10% serum	Colony forming efficiency
10W+8, mock	(-)	0.0 %
	(+)	7.8 %
10W+8, Gab1	(-)	0.0 %
	(+)	3.1 %
10W+8, Gab1 <sup>D1-103</sup>	(-)	0.0 %
	(+)	22.2 %

表 2. Gab1<sup>Δ1-103</sup> の強制発現による 10W+8 細胞の transformation

Gab1<sup>Δ1-103</sup> の遺伝子発現により表 1 で示した 10W-1L と同様の増殖因子に対する反応性を獲得した。



## 関節リウマチの病態形成における LIGHT-HVEM 系の関与に関する研究

分担研究者	原まさ子	東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター	教授
研究協力者	針谷正祥	東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター	講師
研究協力者	伊藤美紀	東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター	助手

**研究要旨** 【背景および目的】私達は昨年度の班研究でRA滑膜組織にはLIGHTおよびその受容体であるHVEMが発現し、炎症性サイトカイン産生に関与していることを報告した。本年度はLIGHT-HVEM系がどのような細胞内情報伝達系を介してサイトカイン産生を誘導するかについて検討した。【方法および結果】RA患者由来滑膜浸潤T細胞はCD154およびLIGHTを発現し、滑膜細胞はCD40およびHVEMを発現していた。Recombinant soluble LIGHT (rsLIGHT) 刺激により6例のRA症例で滑膜マクロファージのTNF- $\alpha$ 産生が増加し、rsLIGHT+interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 刺激によりTNF- $\alpha$ 産生はさらに亢進した。IL-12産生は1例を除いてrsLIGHT刺激のみでは認められず、rsLIGHT+interferon- $\gamma$ 刺激により6例中4例で認められた。滑膜マクロファージをrsCD154+IFN- $\gamma$ またはrsLIGHT+IFN- $\gamma$ により刺激5、15、30分後のextracellular-regulated protein kinase (ERK) 1/2およびp38のリン酸化をWestern blotで検討したところ、いずれの刺激によってもERK1/2およびp38のリン酸化が認められた。ERKのリン酸化酵素であるMEK1/2活性化阻害剤(U0126)およびp38活性化阻害剤(SB202190)は、rsCD154+IFN- $\gamma$ およびrsLIGHT+IFN- $\gamma$ 刺激によるCD14陽性滑膜細胞のTNF- $\alpha$ 産生を有意に抑制した。さらに、初代培養滑膜細胞にこれらのMAPK活性化阻害剤を添加したところ、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ の産生が有意に抑制された。【結論】LIGHT-HVEM系はMAPK活性化を通じて滑膜組織における炎症性サイトカイン産生に寄与している。

### A. 研究目的

関節リウマチ(RA)の治療薬物としてメソトレキサートに代表される疾患修飾性抗リウマチ薬および抗サイトカイン療法が挙げられる。これらの薬物によりRA患者の50-70%は比較的良好に疾患活動性をコントロールできることが報告されている。しかし、これらの薬物に反応性の低いあるいは無反応の患者群が存在し、かかる患者群に対する新規治療法の開発が望まれている。RA滑膜組織には活性化CD4陽性T細胞が浸潤し、炎症の進展・増悪に重要な働きをしていることから、私達はRAに対する新規治療法の標的候補分子としてT細胞表面機能分子に着目し、研究を進めてきた。活性化CD4陽性T細胞は、CD154あるいはLIGHTなどのさまざまな細胞表面分子を発現する。私達はこれまでに、RA滑膜浸潤T細胞がCD154を発現し、滑膜マクロファ-

ジ上のCD40と相互作用を行い、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、Interleukin(IL)-1 $\beta$ の産生を誘導することを報告してきた。

LIGHT (a cellular ligand for herpes virus entry mediator and lymphotoxin receptor)は新規に同定されたTNFファミリー分子であり、樹状細胞などの抗原提示細胞に発現しT細胞活性化における副刺激分子として作用すると共に、活性化T細胞にも発現する。昨年度の本研究でRA滑膜組織にはLIGHTおよびその受容体であるHerpes virus entry mediator (HVEM)が発現し、LIGHT-HVEM系がTNF- $\alpha$ 、IL-12産生に関与していることを報告した。本年度は、CD154-CD40



系および LIGHT-HVEM 系がどのような細胞内情報伝達系を介してサイトカイン産生を誘導するかに焦点を当てて検討した。

## B. 研究方法

滑膜組織における CD154、CD40、LIGHT、HVEM の発現は免疫組織染色、western blot により検討した。LIGHT cDNA の 5'末端に分泌シグナルおよび flag epitope を付加し pcDNA3.1 plasmid に組み込んだ。この recombinant soluble LIGHT (rsLIGHT)発現プラスミドを遺伝子導入した HEK293 細胞培養上清から抗 flag 抗体カラムを用いて、rsLIGHT を精製した。rsCD154 は Immunex Corporation より供与された。CD14 陽性滑膜細胞は抗 CD14 抗体標識磁気ビーズおよび MACS システムを用いて初代培養滑膜細胞より精製し、この分画を滑膜マクロファージとして用いた。培養上清中のサイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-12)は ELISA 法にて測定した。Mitogen activated protein kinase (MAPK)の活性化は抗リン酸化 MAPK 抗体を用いた western blot にて検討した。

(倫理面への配慮)

手術時に不要となる滑膜組織を研究に用いることについて、使用目的・方法などを説明し、手術患者の同意を得たのち、実験に供した。

## C. 研究結果

RA 患者由来滑膜浸潤 T 細胞は CD154 および LIGHT を発現し、滑膜細胞は CD40 および HVEM を発現していた。rsLIGHT 刺激により 6 例全例の RA 症例で滑膜マクロファージの TNF- $\alpha$ 産生が増加し、rsLIGHT + interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )刺激により TNF- $\alpha$ 産生はさらに亢進した (図 1)。IL-12 産生は 1 例を除いて rsLIGHT 刺激のみでは認められず、rsLIGHT + IFN- $\gamma$ 刺激により 6 例中 4 例で認められた (図 1)。滑膜マクロファージを rsCD154 + IFN- $\gamma$ または rsLIGHT + IFN- $\gamma$ により刺激 5、15、30 分後の extracellular-regulated protein kinase (ERK) 1/ERK2 および p38 のリン酸化を Western blot で検討したところ、いずれの刺激によっても ERK1/2 および p38 のリン酸化が認められた (図 2)。MAPK は細胞内でカスケードを構成し、各 MAPK にはそれぞれをリン酸化する MAPK kinase (MAPKK)が存在する。U0126 は ERK のリン酸化酵素である MAPK/ERK kinase (MEK) 1/MEK2 の活性化阻害剤である。一方、SB202190 は p38 活性化阻害剤である。rsLIGHT、rsCD154 による RA 滑膜マクロファージの TNF- $\alpha$ 産生における MAPK の重要性を検討するため、上記の阻害剤の効果を検討した。U0126 および SB202190 は、rsLIGHT + IFN- $\gamma$ および rsCD154 + IFN- $\gamma$ 刺激による RA 滑膜マクロファージの TNF- $\alpha$ 産生を有意に

抑制した。さらに、初代培養滑膜細胞の分離直後に U0126、SB202190 を添加し、48 時間培養後、上清中のサイトカインを測定したところ、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ の産生が有意に抑制された。

## D. 考察

LIGHT の名称は Lymphotoxin に相同性を有し、その発現が誘導され(Inducible expression)、単純ヘルペスウィルスの Glycoprotein D と競合的に Herpes virus entry mediator (HVEM)に結合し、ゲノムデータベースでは TNFSF14 と命名されていることに由来する。LIGHT の受容体として HVEM、lymphotoxin  $\beta$  receptor (LT  $\beta$  R)および TR6 の 3 分子が知られている。これまでに LIGHT は腫瘍免疫、宿主対移植片反応 (GVHD)などに関与することが報告されてきた。昨年および本年度の我々の研究により、LIGHT-HVEM 系が RA においても重要な働きをしている可能性が示された。

Western blot および MAPK 阻害剤を用いた実験結果から、LIGHT-HVEM 系および CD154-CD40 系は MAPK 特に ERK および p38 活性化を通じて滑膜組織における TNF- $\alpha$ 産生に寄与していると考えられた。CD40、HVEM とともに TNF 受容体ファミリー分子であり、それぞれの細胞内部分が TRAF ファミリー分子と結合することが知られている。CD40 のシグナル伝達における ERK および p38 活性化誘導は、細胞株等を用いた実験で報告されているが、RA 滑膜マクロファージを用いた報告は本研究が最初である。一方 HVEM のシグナル伝達については、AP-1、NF- $\kappa$ B 活性化が報告されているものの、ERK、p38 活性化の報告はない。今回の研究結果により滑膜浸潤 T 細胞と滑膜マクロファージの相互作用における MAPK 経路の重要性が初めて示された。また、In vivo のサイトカイン産生におけるこれらの MAPK の重要性は初代培養滑膜細胞による ex vivo 実験により検証された。すなわち、U0126 および SB202190 は初代培養滑膜細胞による TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 産生を有意に抑制した。

LIGHT には TNF- $\alpha$ 、CD154 などの他の TNF ファミリー分子と同様に可溶性分子の存在が知られている。可溶性 LIGHT 分子が RA 罹患関節内で液性因子として作用する可能性も十分考えられる。

## E. 結論

以上の研究結果は、滑膜浸潤 T 細胞と滑膜マクロファージの相互作用の阻害あるいは MAPK 経路の阻害が RA 滑膜組織によるサイトカイン産生を抑制する可能性を示唆している。生体内における MAPK 経路の重要性・普遍性を考慮すると、MAPK 経路阻害剤の薬剤としての可能性には疑問がある。より疾患または病態特異的な T 細胞表面機能分子である

LIGHT、CD154 を標的とした治療法の可能性を今後追求していく予定である

F. 健康危険情報  
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 新規 TNF ファミリー分子 LIGHT と慢性関節リウマチ (特集 炎症とサイトカイン—病態から治療応用へ—) 最新医学 57(4):885-889, 2002
- (2) LIGHT と免疫異常 (特集 あらたな TNF/TNF 受容体ファミリーと疾患) 医学のあゆみ 203(7):471-475, 2002
- (3) TNF レセプターの多様性とシグナル伝達機構

治療学 36(12):1243-1247, 2002

- (4) 新規 TNF ファミリー分子 LIGHT の滑膜における発現とその役割 リウマチ科 29(1):73-78, 2003

2. 学会発表

Nakagawa M, Harigai M, Hara M, et al: LIGHT, a costimulatory molecule for T cells, and its receptors are expressed in synovial tissue from rheumatoid arthritis patients and contribute to TNF-alpha and interleukin-12 production. American College of Rheumatology, 64<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting.

H. 知的財産権の出願・登録

特記事項なし

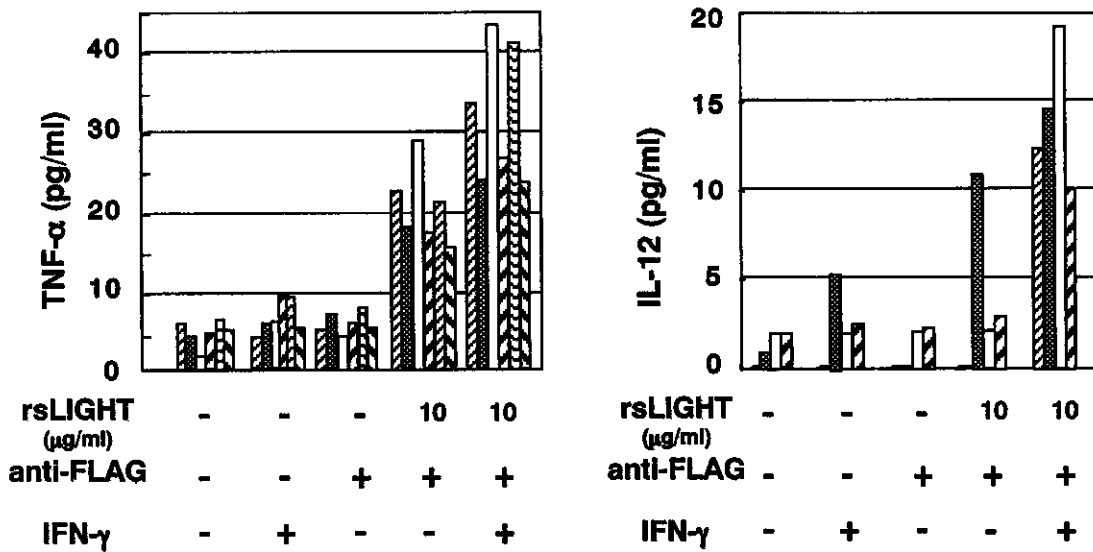


図1 recombinant soluble LIGHT による TNF-α、IL-12 の誘導

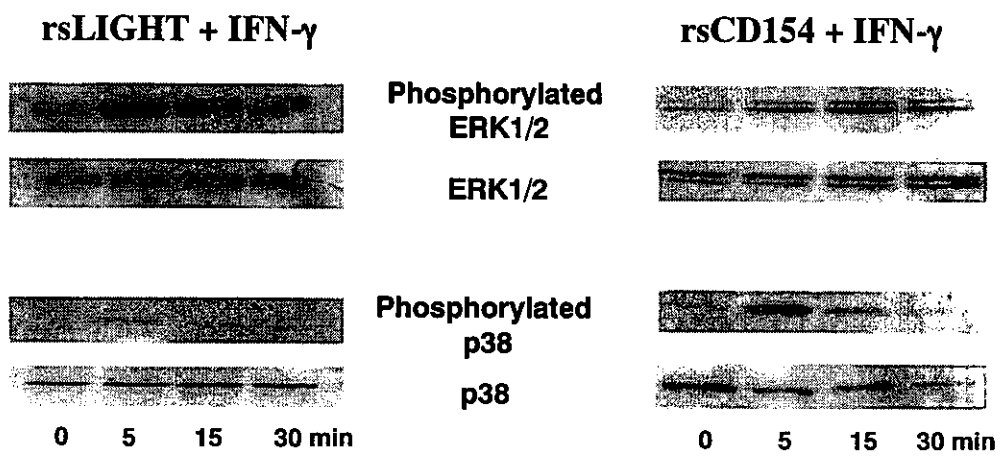


図2 recombinant soluble LIGHT、recombinant soluble CD154 による ERK1/2、p38 のリン酸化

## 関節リウマチの難治性病態に対する新規治療法の開発に関する研究

分担研究者 右田清志 国立病院長崎医療センター、臨床研究センター、免疫研究部長

### 研究要旨

新規免疫抑制剤で、抗リウマチ作用をもつレフルノミドの薬理作用について検討した。その結果、レフルノミドは、活性化 T 細胞に作用し、p53 を発現させ細胞周期を制御する作用が認められた。また RA 滑膜細胞に作用して、MAP キナーゼに属する JNK のリン酸化を阻害することで、MMP-13 の産生を抑制する作用を有することが示唆された。レフルノミドは活性化 T 細胞の細胞周期制御、滑膜細胞の MMP-13 産生抑制を介して、抗リウマチ効果を示すことが示唆された。

### A. 研究目的

関節リウマチ (RA) の現在の治療方針として、RA 発症早期より積極的に抗リウマチ薬 (DMARDs) の投与を行い、定期的な効果判定を行い、効果が不十分な症例に対しては、メトトレキサートを含めた DMARDs の併用を行うことが考えられている。さらにこれらの治療に抵抗性を示す症例には、免疫抑制剤 (シクロスポリン、タクロリムスなど)、生物学的製剤を追加すること考えられている。新規免疫抑制剤である、レフルノミドは、メトトレキサートと同様の抗リウマチ作用を有していることが示唆されており、今後、難治性 RA の治療薬剤の候補として考えられている。レフルノミドの抗リウマチ作用を解明する目的で、活性化 T 細胞の細胞周期、RA 滑膜細胞マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) 産生に対する影響について検討した。

### B. 研究方法

#### 1 レフルノミドの活性化 T 細胞の細胞周期に対する影響

Balb/c マウスに細菌性スーパー抗原である SEB(50 $\mu$ g) を投与した後、レフルノミド (25 mg/Kg) を経口

投与した。12 時間後、SEB 反応性 V $\beta$ 8 陽性 T 細胞を脾臓より分離し、細胞周期制御蛋白の発現をイムノプロットで測定した。

#### 2 レフルノミドの RA 滑膜細胞マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) 産生に対する影響

培養滑膜細胞を IL-1 $\beta$  で刺激し、MMPs の産生を誘導した。この培養系にレフルノミドの活性体である、A77 1726 (5~100 $\mu$ M) を添加し、48 時間培養し、培養上清中の MMPs をゲラチンゼイモグラフィー、特異抗体を用いたイムノプロットで測定した。また、A77 1726 で前処置した RA 滑膜細胞を IL-1 $\beta$  で刺激し、MAP キナーゼの活性化を、リン酸化抗体を用いたイムノプロットで解析した。

#### (倫理面への配慮)

マウスを用いた実験は、長崎大学医学部の倫理委員会の承認をすでに得ている。RA 滑膜組織は、インフォームドコンセントの得られた RA 患者から、治療目的で施行した滑膜切除術の際、採取した。

## C. 研究結果

### 1. レフルノミドの活性化 T 細胞の細胞周期に対する影響

レフルノミドの経口投与は、SEB で活性化された Vβ8 陽性 T 細胞に p53 の発現を誘導した。さらにこれら細胞では、細胞周期が、G1 から S 期に移行する際に発現する PCNA 抗原、Cyclin E の発現が抑制されていた。

### 2. レフルノミドの RA 滑膜細胞マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) 産生に対する影響

RA 滑膜細胞を IL-1β で刺激すると MMP-13 の産生が誘導された。A77 1726 は、IL-1β で誘導される RA 滑膜細胞の MMP-13 の産生を、濃度依存性に抑制した。RA 滑膜細胞を IL-1β で刺激すると、MAPK キナーゼ (ERK 1/2, p38, JNK) のリン酸化が誘導された。A77 1726 は、この IL-1β で誘導される、p38 の活性化を軽度抑制したが、JNK の活性化はほぼ完全に抑制した。

## D. 考察

レフルノミドには、細胞周期の進行に必要な核酸合成を阻害し、細胞増殖抑制作用を有していることが考えられている。今回の検討で、レフルノミドは核酸合成が亢進している活性化 T 細胞に作用して、p53 を発現させ、細胞周期を制御する可能性が示唆された。MMP-13 は MMP の中でも、関節軟骨の細胞外マトリックスの主成分である 2 型コラーゲンを分解することより、RA の関節破壊に中心的役割を果たしている。MMP-13 の発現には、転写因子、AP-1 の活性化が必要である。AP-1 は、FOS、Jun のダイマーから形成されており、AP-1 の活性化には MAP キナーゼによる Jun のリン酸化が必要と考えられている。レフルノミドの抗リウマチ作用としては、ピリミジン合成阻害による滑膜細胞の細胞周期制御が考えられているが、今回の

検討で、レフルノミドはサイトカイン刺激による JNK のリン酸化をブロックすることで、MMP-13 の誘導を抑制し、RA の関節破壊を阻止する作用がありことが示唆された。

## E. 結論

新規免疫抑制剤レフルノミドは、活性化 T 細胞の細胞周期の制御、および IL-1β で誘導される RA 滑膜細胞の JNK 活性化、MMP-13 の産生を阻害することで、抗リウマチ作用を示すことが示唆された。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし。

### 2. 学会発表

なし。

## H. 知的財産権の出願・登録

なし。

## 関節リウマチに対する白血球除去療法の治療効果の検討

分担研究者 橋本 博史 順天堂大学 医学部 膠原病内科 教授

研究要旨： 関節リウマチの治療の一つに血漿交換療法があり、その治療法の一つである白血球除去療法は疾患の炎症反応に関与する白血球を除去する治療法である。この治療法を関節リウマチ患者に対し施行しその治療効果を ACR コアセットを使用し検討。ACR コアセット 20%を認めたのは 60%の患者で、治療後には症状の改善を認め、白血球除去療法の有効性が示唆された。

### A. 研究目的

関節リウマチの治療の一つに血漿交換療法が位置し、その中の従来からの治療法である二重膜濾過法や吸着療法は液性免疫能を対象とする方法である。一方で細胞性免疫能の中の白血球は、関節リウマチにおいて重要な役割を占めることが知られている。今回我々が注目した白血球除去療法は、この白血球を血液から除去する方法である。この研究の目的は、細胞性免疫能を対象とする白血球除去療法を関節リウマチ患者に施行し、その治療効果を検討することにある。また、本年の研究では、治療としてメトトレキサートが無効、あるいは副作用で使用できない症例を選択し検討した。

### B. 研究方法

アメリカリウマチ学会の診断基準を満たし、今までの治療において、メトトレキサートを使用しても効果が認められない、あるいは副作用で使用できないリウマチ患者 5 人 (男性 1 例、女性 4 例、年齢 31~64 才; 平均 48.2 才) を選択 (表 1)。ただし、本研究開始 1ヶ月前からこの研究期間中の内服治療等の変更は行わないこととした。治療方法として白血球除去療法を週 1 回の間隔で白血球除去療法を計 5 回施行 (治療期間 5 週間)。白血球除去フィルターはセルソーバ (旭メディカル社製) を使用。治療中の抗

凝固剤はメシル酸ナファモスタットを 40 mg/時にて使用。1 回の血液処理量は全血で 3000 ml。治療効果の判定は ACR コアセットを使用し、治療前から治療終了後 4 週間の間で ACR コアセット 20%を満たすものを効果ありとした。

### (倫理面への配慮)

患者に対し、治療前に具体的な治療方法、除去膜の作用機序、起こりうる副作用に関して説明を行い、承諾を得た上で治療を行う。また、治療中に患者本人の意思で治療の継続を望まない場合には、患者の希望に従うこととする。

### C. 研究結果

5 人の患者の内、3 例 (治療有効群・グラフ参照) において ACR コアセット 20%の治療効果を認め、治療効果は 60%であった。2 例では効果を認めず (治療無効群・グラフ参照)。この内、コアセットを満たす効果の発現時期は、治療 4 回目が 1 例、治療終了 1 週後が 1 例、治療終了 1 週後が 1 例であった。治療無効群でも関節疼痛と腫脹関節の改善を認めたが、全般活動性評価 (VAS) の改善を認めず、ACR コアセット 20%は満たさなかった。治療有効群において、CRP の低下と MMP-3 高値の症例で、治療で MMP-3 値の低下を示す症例を認めた。血沈、RF、

IgG に関しては治療有効・無効群共に変化は認めず。

#### D. 考察

今回の研究では白血球除去療法によりメトトレキサートによる治療で効果が得られない、または副作用のために使用できない関節リウマチ患者において症状の改善を認め、治療の有効性が示唆された。しかし、今回の研究では症例数が少なく、治療効果もこの治療・観察期間内では60%にとどまった。一方で、治療無効群にても疼痛関節数や腫脹関節痛の改善を多少認めており、治療効果が遅れて出現することも考えられるため、追跡調査・観察の必要があると思われる。

#### E. 結論

現在、白血球除去療法は潰瘍性大腸炎に対し保険適用のある安全性の確立された治療方法であるが、関節リウマチに対しても有効性のあることが示唆された。今後、症例数を増やし、治療期間後の観察期間を延長し研究する予定である。

#### F. 健康危険情報

一般的に、白血球除去療法での副作用としては、体外循環に基づく一過性の低血圧、発熱、気分不快などがあるが、今回の研究においては、治療中と治療後に副作用は認められなかった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 鈴木王洋、松本泰憲、佐川昭、小川洋史、天野国幹、津田裕士、橋本博史、鈴木満、古賀伸彦、山本昭夫、東威：悪性関節リウマチに対するリンパ球除去療法の有用性確認試験、日アフエレス会誌 15：303-319、1996
- 津田裕士、宮方了、河西利昭、松田幸博、木田一成、山路健、金井美紀、高崎芳成、橋本博史：慢性関節リウマチに対するアフエレス療法、日アフエレス会誌 17：173-175、1998
- Y Kanai, M Sugiyama, K Yamaji, T

Kawanishi, H Tsuda, H Hashimoto, S Hirose: Changes in viscosities of blood and plasma due to lymphocytapheresis in patients with rheumatoid arthritis, Jpn J Apheresis 14: 119-121, 1995

□ Tsuda H, Yokoyama M, Sato M, Yamagata J, Hashimoto H, Hirose S, Kato H, Nishimura T, Ide K : New trial of lymphocytapheresis combined with Double-filtration by using of "Sepacell" (Leukocyte Removal Filter) in the treatment of rheumatoid arthritis, Therapeutic Plasmapheresis 5: 919-923, 1985

□ Kanai Y, Kawanishi T, Fujita S, Tourny M, Yokoyama M, Tsuda H, Hashimoto H, Hirose S : Prognosis for patients with rheumatoid arthritis treated by Plasmapheresis, Therapeutic Plasmapheresis 8: 69-73, 1990

□ 山形寿太郎、塩沢克史、津田裕士、橋本博史、湯浅晋治、塩川優一：膠原病・リウマチに対する血漿交換療法—matched control study による血漿交換療法の評価の試み、人工臓器 11:724-727、1983

□ 津田裕士、金井美紀、松田幸博、高崎芳成、橋本博史：疾患とアフエレス（膠原病とアフエレス）、臨床透析 15 (6) : 29-33、1999

□ Yamaji K, Yang K, Tsuda H, Hashimoto H: Fluctuations in the Peripheral Blood Leukocyte and Platelet Counts in Leukocytapheresis in Healthy Volunteers, Therapeutic Apheresis 6(6):402-412, 2002

##### 2. 学会発表

- “慢性関節リウマチに対する白血球除去療法の治療効果の検討”  
2002年、第22回日本アフエレス学会学術大会
- “慢性関節リウマチに対する白血球除去療法の治療効果の検討”  
2002年、第40回日本人工臓器学会大会

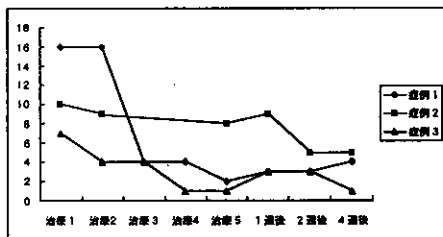
H. 知的財産権の出願・登録  
特になし。

表1. <患者プロフィール>

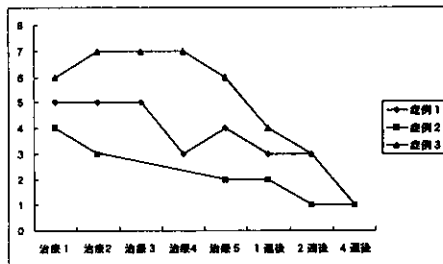
患者	年齢	性別	治療内容
症例1	64	♂	リドーラ、フルカム、PSL5mg/日。過去にリウマトレックス6mg/週で肝障害
症例2	56	♀	リウマトレックス6mg/週、ハイベン
症例3	53	♀	アザルフィジンEN、PSL10mg/日、リウマトレックス8mg/週、ロキソニン
症例4	37	♀	リマチル。リウマトレックス6mg/週とアザルフィジンEN 過去に無効。
症例5	31	♀	PSL6mg/日、リマチル、モーバー、ロキソニン。過去にMTX7.5mg/週とリウマトレックス6mg/週で効果なし。

治療有効群

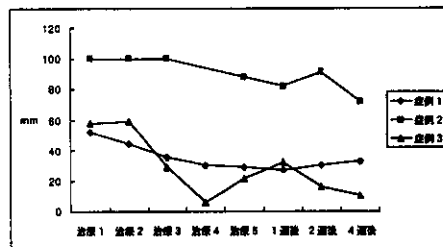
疼痛関節数



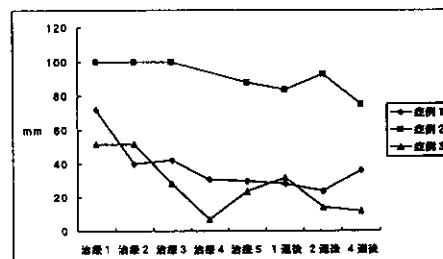
腫脹関節数



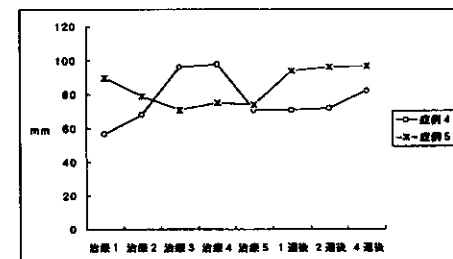
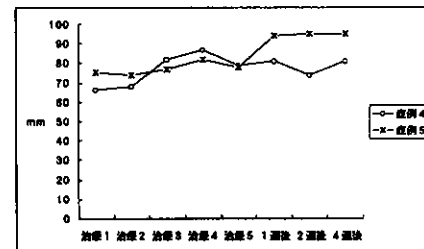
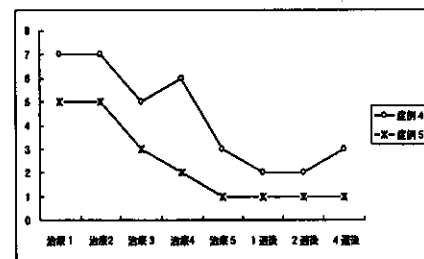
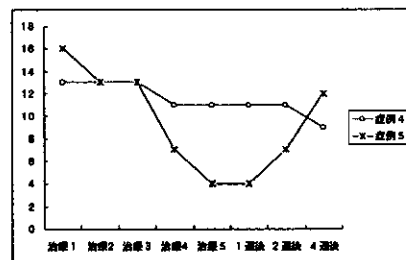
患者による疼痛評価 (VAS)



患者による全般活動性評価 (VAS)



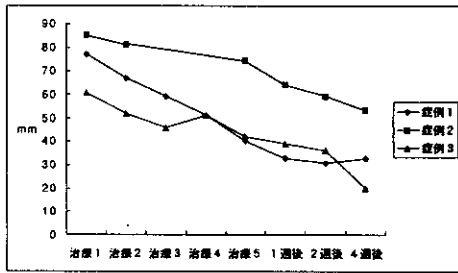
治療無効群



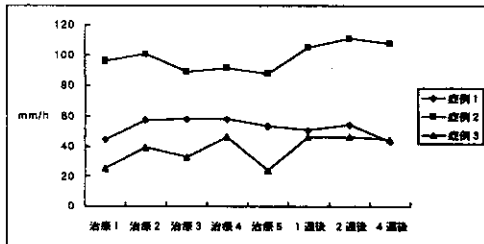


治療有効群

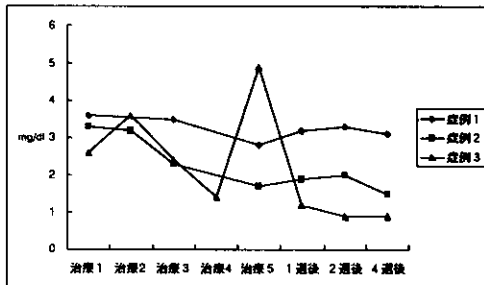
医師による全般活動性評価 (VAS)



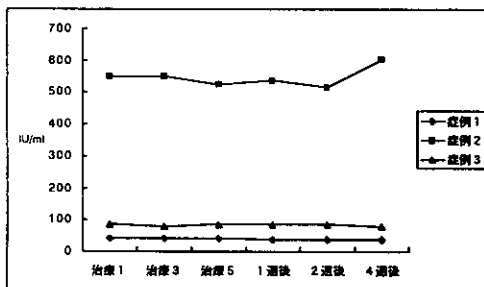
血沈



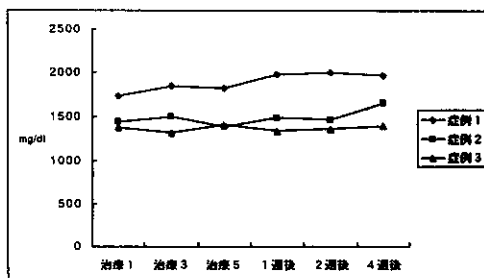
CRP



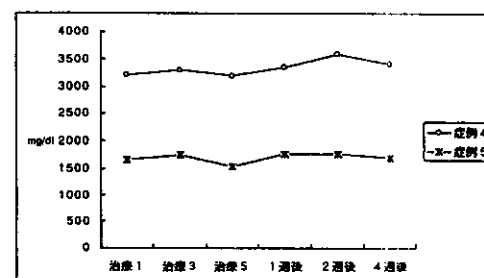
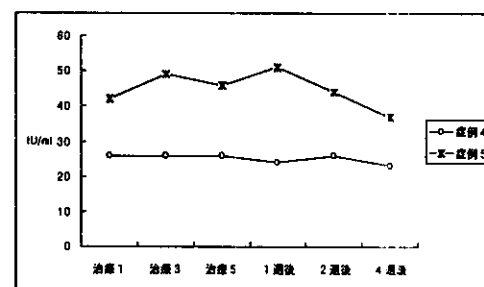
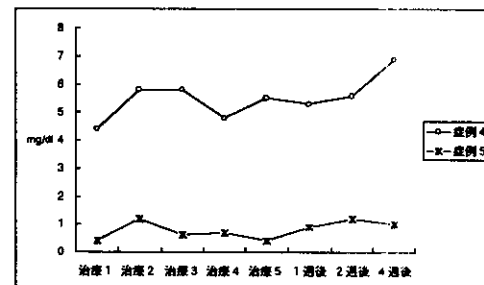
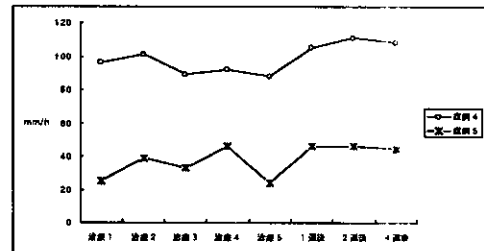
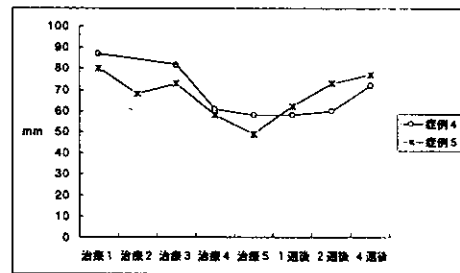
RF



IgG

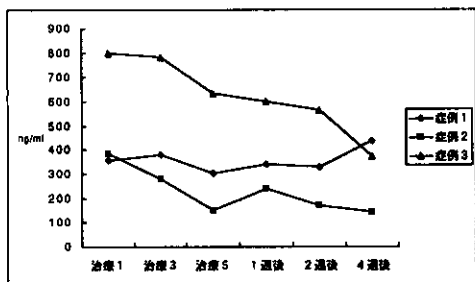


治療無効群

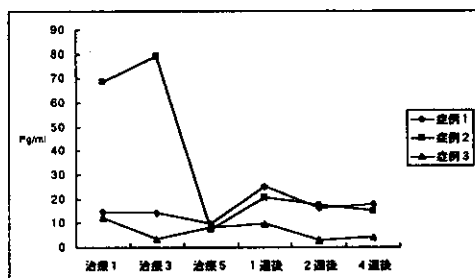


治療有効群

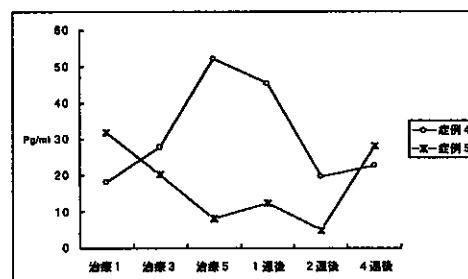
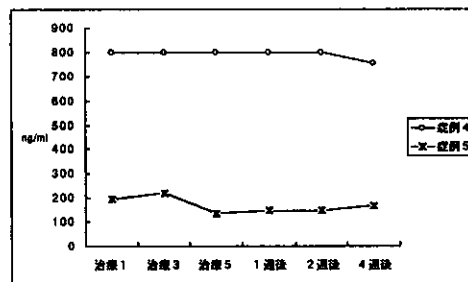
MMP-3



IL-6



治療無効群



## p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子による細胞周期制御療法の抗炎症効果に関する研究

分担研究者 上阪 等 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 助教授  
研究協力者 宮坂 信之 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 教授  
野々村美紀 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 リサーチレジデント  
長坂 憲治 東京医科歯科大学 医学部 膠原病・リウマチ内科 医員

研究要旨 p21<sup>Cip1</sup> などの CDKI による関節への遺伝子治療は関節リウマチ(RA)のモデル動物の関節炎を改善させ、滑膜増生のみならずリンパ球浸潤、炎症性サイトカイン産生、骨軟骨破壊を抑制した。また、昨年度報告した様に、p21<sup>Cip1</sup> 強制発現は RA 滑膜由来線維芽細胞(RSF)における type I IL-1 receptor (IL-1R1)や一部の炎症性メディエーター発現を抑制し、さらに IL-1 と TNF $\alpha$ で刺激した RSF からの多数の炎症性メディエーター発現を低下させた。本年度はこの現象の背景をさらに詳細に解析した。【方法】RSF に p21<sup>Cip1</sup> アデノウイルスもしくは挿入遺伝子のないコントロールアデノウイルスを感染させた。3日後、IL-1 $\beta$ ないし TNF $\alpha$ で刺激後、培養上清の ELISA を行った。無刺激もしくは LPS 刺激をした RSF でも同様の解析を行い、その全細胞抽出蛋白の c-Jun N-terminal kinase (JNK)とその活性および核蛋白の activator protein (AP)-1, nuclear factor (NF)- $\kappa$ Bp50, p65 転写因子活性を検討した。【結果】p21<sup>Cip1</sup> は、IL-1 刺激による IL-6, -8, macrophage chemotactic protein (MCP)-1, macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$ , matrix metalloproteinase-1, -3 分子の発現を抑制したが、TNF $\alpha$ 刺激によるこれらの分子の発現は抑制しなかった。また、p21<sup>Cip1</sup> は無刺激下の RSF における MCP-1 やカテプシン B, K の発現も抑制した。そこで、p21<sup>Cip1</sup> が IL-1R1 の発現低下を介さずに細胞内シグナル伝達系を直接抑制するかどうかを検討するために、RSF を lipopolysaccharide (LPS)で刺激したところ、p21<sup>Cip1</sup> は LPS 刺激による炎症性メディエーターの発現も抑制した。なお、IL-1 receptor antagonist を添加しても無刺激時や LPS 刺激による MCP-1 や IL-6 の発現に変化はなかった。また、p21<sup>Cip1</sup> は無刺激下や LPS 刺激下の RSF における AP-1 や NF- $\kappa$ B 活性を抑制した。この際、JNK に p21<sup>Cip1</sup> が結合していること、JNK 活性が抑制されることも認められた。【結論】p21<sup>Cip1</sup> は IL-1R1 依存적および非依存적にも炎症性メディエーターの発現を抑制する。p21<sup>Cip1</sup> は、細胞周期抑制のみならず、これらの機構により関節炎の治療効果に関与していると考えられる。

### A. 研究目的

細胞周期制御分子であるサイクリン依存性キナーゼインヒビター(CDKI)遺伝子p21<sup>Cip1</sup>などのCDKIによる関節への遺伝子治療は、関節リウマチ(RA)のモデル動物の関節炎を改善させ、滑膜増生のみならず炎症の残存した滑膜組織の部位でのリンパ球浸潤、TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6などの炎症性サイトカイン産生、骨軟骨破壊を抑制した。また、昨年度報告した様に、p21<sup>Cip1</sup>強制発現はRA滑膜由来線維芽細胞(RSF)におけるtype I IL-1

receptor (IL-1R1) や, macrophage chemotactic protein (MCP)-1, カテプシン B, カテプシン Kなどの分子の発現が減少していた。また、p21<sup>Cip1</sup>を強制発現させたRSFにおいては、IL-1 $\beta$ とTNF- $\alpha$ との刺激によるIL-6, IL-8, macrophage inflammatory protein (MIP)-3 $\alpha$ , matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3の産生が抑制されていた。本年度は、この現象の背景であるp21<sup>Cip1</sup>によるシグナル伝達分子や転写因子への影響をさらに詳細に検討し、p21<sup>Cip1</sup>細胞周期制御療法の治療効果の分子機

構を解析した。

## B. 研究方法

RSF に p21<sup>Cp1</sup> アデノウイルスもしくは挿入遺伝子のないコントロールアデノウイルスを感染させた。3 日後、細胞数をそろえて継代、IL-1 $\beta$  もしくは TNF $\alpha$  で刺激し、24 時間後、培地上清を回収して ELISA を行った。無刺激もしくは lipopolysaccharide (LPS) 刺激をした RSF でも同様の解析を行い、その全細胞抽出蛋白の c-Jun N-terminal kinase (JNK) とそのキナーゼ活性および核蛋白の activator protein (AP)-1, nuclear factor(NF)- $\kappa$ Bp50, p65 転写因子活性を検討した。

### (倫理面への配慮)

本研究においては、患者組織由来の培養細胞を使用するが、各患者より書面にてインフォームドコンセントを得た。また、本実験の概要は東京医科歯科大学倫理審査委員会で審議され、承認されたものである。

## C. 研究結果

昨年度、p21<sup>Cp1</sup>による無刺激のRSFにおけるIL-1R1の発現低下を確認した。このIL-1R1の発現低下が炎症性メディエーターの発現低下に関与しているかを検討した。p21<sup>Cp1</sup>はIL-1刺激によるIL-6, MCP-1は抑制したが、TNF $\alpha$ 刺激による産生は抑制しなかった。(図1 A, B) つまり、p21<sup>Cp1</sup>は、IL-1R1の発現低下によりIL-6産生を抑制すると考えられた。しかし、p21<sup>Cp1</sup>は培地上清中のIL-1濃度がELISAの検出感度以下であった無刺激のRSFにおいてもMCP-1の発現を抑制した(図1B)。そこで、p21<sup>Cp1</sup>がIL-1R非依存的にもMCP-1産生を抑制するか検討するため、IL-1と細胞内シグナル伝達分子の多くを共有するLPSにてRSFを刺激したところ、p21<sup>Cp1</sup>はLPS刺激によるMCP-1の発現も抑制した(図1C, D)。なお、LPSによるIL-1産生が関与していないか確認するためにIL-1 receptor antagonistを添加したが、これらの発現に変化はなかった(図1B)。また、p21<sup>Cp1</sup>は、LPS受容体であるtoll-like receptor 4の発現を抑制しなかった。つまり、p21<sup>Cp1</sup>はIL-1R非依存的に、IL-1と

LPSに共通の細胞内シグナル伝達分子を介してこれらの発現を抑制していると考えられた。同様に、p21<sup>Cp1</sup>は、IL-1刺激によるIL-8, MIP-3 $\alpha$ , MMP-1, -3分子の発現を抑制したが、TNF $\alpha$ 刺激によるこれらの分子の発現は抑制しなかった。また、昨年度示したように、p21<sup>Cp1</sup>は無刺激下のRSFにおけるMCP-1やカテプシンB, Kの発現も抑制した。ところでMCP-1、カテプシンB, Kの発現は、AP-1やNF- $\kappa$ Bなどの転写因子を介して調節されている。そこで、RSFにアデノウイルスを感染させて3日後、AP-1 とNF- $\kappa$ BのDNA結合アッセイを行った。すると、p21<sup>Cp1</sup>は無刺激のRSFにおいてAP-1のDNA結合活性を抑制した。NF- $\kappa$ Bp50, p65に関しては有意差はなかった。LPS刺激をしたRSFにおいては、p21<sup>Cp1</sup>は、AP-1のみならず、NF- $\kappa$ Bp50, p65の活性化も抑制した(図2A)。

さらに、RSFにおいてAP-1の上流のmitogen activated protein kinaseを抑制するか確認するため、p21<sup>Cp1</sup>を強制発現させたRSFをLPSで刺激後、抗JNK抗体で免疫沈降して、p21<sup>Cp1</sup>ウエスタンブロットを行った。すると、p21<sup>Cp1</sup>が抗JNK抗体によって共沈した(図2B)。また、おなじサンプルでJNK kinase assayを行うと、p21<sup>Cp1</sup>によりキナーゼ活性が低下した(図2C)。

## D. 考察

関節炎に対するp21<sup>Cp1</sup>細胞周期制御療法において、p21<sup>Cp1</sup>は滑膜細胞の増殖を抑制するのみならず、IL-6などの炎症に関与するサイトカイン、MCP-1, IL-8, MIP-3 $\alpha$ などのケモカイン、IL-1R1などのサイトカインレセプター、カテプシンB, K, MMP-1, -3などの組織傷害性プロテアーゼなどのRAの病態に関与すると言われる炎症性メディエーターの発現を抑制する。これらの遺伝子の発現抑制には、p21<sup>Cp1</sup>によるIL-1R1の発現低下によるIL-1への反応低下が関与している。また、p21<sup>Cp1</sup>はJNKと結合してJNKキナーゼ活性を低下させ、最終的にAP-1やNF- $\kappa$ Bの活性抑制により、IL-1R1非依存的にも、これらの遺伝子の発現を抑制していることを示唆した。