

図4 TNF 添加後の遺伝子発現プロファイルのクラスタ分析

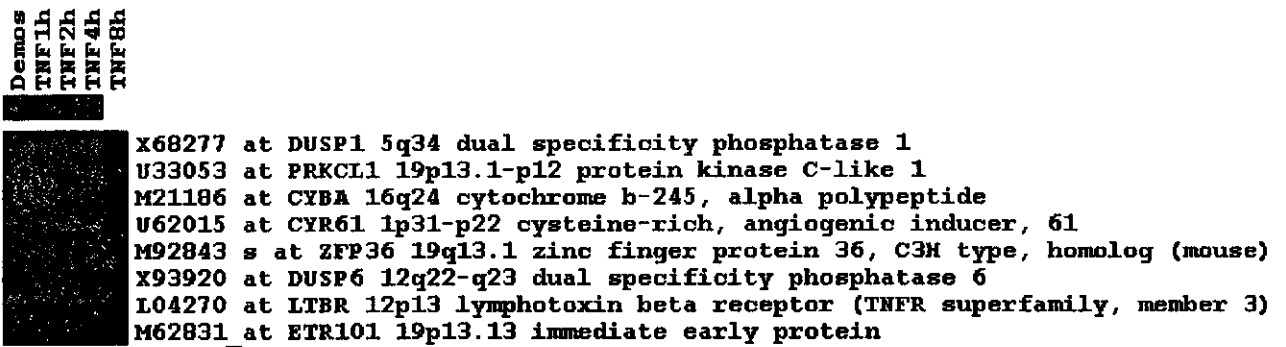
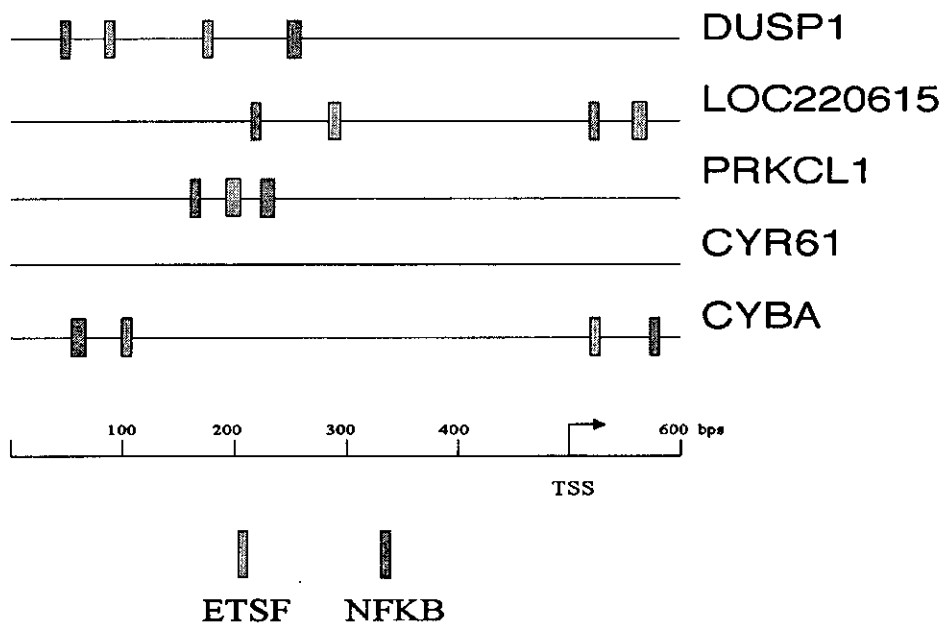


図5 TNF α 刺激 1 時間後に発現誘導される遺伝子の調節領域



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

○ 抗リウマチ薬代謝酵素の遺伝子多型を用いたテーラーメイド医療への展開

分担研究者 山中 寿（東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター・助教授）
研究協力者 田中栄一・浦野和子・谷口敦夫・鎌谷直之
（東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター）

研究要旨

RA 患者に対する抗リウマチ薬療法がテーラーメイド医療のプロトタイプとなる可能性を検討するために、抗リウマチ薬メトトレキサート(MTX) とスルファサラジン(SASP)の代謝酵素の diplotype 型と薬剤による副作用の頻度を検討した。その結果、MTX の副作用は MTHFR の 677T アレルを有する症例で有意に高頻度であり、SASP の副作用は NAT-2 遺伝子の slow acetylator ハプロタイプのホモ接合体で有意に高頻度であった。すなわち、抗リウマチ薬の代謝に関連した特定の遺伝子多型の検討は治療の最適化に有用であり、テーラーメイド医療への展開が可能であることが示された。

A. 研究目的

関節リウマチ(RA)の薬物治療上の問題点として、1) 経過・予後に大きな個体差がある、2) 抗リウマチ薬投与開始前に治療反応性の予測が困難、3) 十分な有効性が得られないと予後不良、4) DMARD の副作用発現率が高い、5) 新規薬剤（生物製剤）が高価などがある。RA 患者にとって的確な抗リウマチ薬の選択は、患者予後の改善、副作用の防止、医療費削減などの多方面から重要である。我々は、抗リウマチ薬の薬剤反応性や副作用発現が薬剤代謝関連酵素のハプロタイプにより規定される可能性を臨床的に検証し、個体差に着目した最適化医療であるテーラーメイド医療のプロトタイプを作成することを目的として検討した。

B. 研究方法

メトトレキサート製剤 (MTX) については葉酸代謝の主要な酵素である 5,10-

Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)、スルファサラジン製剤 (SASP) については代謝酵素の一つである N-acetyltransferase-2 (NAT2) のハプロタイプと各薬剤の副作用発現率を検討した。

本研究は東京女子医科大学ゲノム倫理審査委員会において、「慢性関節リウマチ患者の病態、予後、治療への反応などへの影響を与える遺伝子の同定」として承認されており、そのプロトコールを遵守して対象患者に外来通院時にインフォームドコンセントを取得後、採血、DNA の抽出、先程述べた PCR-RFLP 法による diplotype 型の決定を行った。

さらに、当センターに通院治療中で臨床経過が詳細に記録されている RA 患者のなかから、抗リウマチ薬投与により反応性や副作用が特徴的であった 200 名を対象に薬剤反応性や副作用発現に関連すると事が予測される 56 の遺伝子の 200SNP を検討した。

C. 研究結果

MTX の副作用発現を MTHFR 遺伝子型別に検討すると、C677T 多型で 677T アレルを有する症例で副作用の発症が有意に高頻度であった ($p < 0.05$) が、A1298C 多型との間には有意な関係は認められなかった。ハプロタイプとの関連では 677T-1298A ハプロタイプが有意に高頻度であった ($p < 0.05$)。

一方、SASP の副作用発現を NAT-2 遺伝子多型との関連を検討したところ、S/S すなわち slow acetylator ハプロタイプである M1, M2, M3 のホモ接合体は、R/R あるいは R/S すなわち rapid acetylator ハプロタイプである wild type を有する個体に比べ、有意に副作用発現の頻度が高かった。さらに、入院を要する重篤な副作用発現も高頻度であった。

現在、さらに多数例における検討を行うために、抗リウマチ薬投与により反応性や副作用が特徴的であった 200 名を対象に 56 の遺伝子の 200SNP を検討中である。SNP に関しては Invader 法を用いてデータを集積中である。

D. 考察

少なくとも特定の抗リウマチ薬においては治療効果や副作用発現に影響する遺伝子多型が存在する。MTX や SASP 投与開始前に代謝酵素遺伝子の diplotype 型を解析することにより、副作用発現の頻度を著明に減少させる可能性が示唆された。現在我々は、抗リウマチ薬投与により反応性や副作用が特徴的であった 200 名を対象に薬剤反応性や副作用発現に関連すると事が予測される 56 の遺伝子の 200SNP を検討中であるが、治療開始前にこれらを検討することは、治療効果・安全性ともに高めうると考えられ、医療の最適化をめざすテーラーメイド医療のプロトタイプとなりうると考えられた。

E. 結論

RA 患者における抗リウマチ薬治療はテイラ

ーメイド医療のプロトタイプとなりうると考えられた。

F. 健康危険情報

当研究は健康被害を最小限に留めることを目的とするものであるが、当該研究の実施過程における健康被害は生じていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Urano W, Taniguchi A, Yamanaka H, Tanaka E, Nakajima H, Matsuda Y, Akama H, Kitamura Y, Kamatani N: Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses. *Pharmacogenetics* 12:183-190, 2002.
2. Tanaka E, Taniguchi A, Urano W, Nakajima H, Matsuda Y, Kitamura Y, Saito M, Yamanaka H, Saito T, Kamatani N: Adverse effects of sulphasalazine in rheumatoid arthritis patients are associated with diplotype configuration at N-acetyltransferase 2 gene. *J Rheumatol.* 29:2492-2499, 2002
3. Tanaka E, Yamanaka H, Matsuda Y, Urano W, Nakajima H, Taniguchi A, Saito T and Kamatani N: Comparison of the Rau method and the Larsen method in the evaluation of radiographic progression in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 29:682-687, 2002
4. 谷口敦夫、浦野和子、田中栄一、赤真秀人、山中 寿、鎌谷直之：抗リウマチ薬の pharmacogenetics. *日本臨床* 60：2339-2344, 2002

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

関節リウマチ患者骨髄幹細胞における遺伝子発現の異常に関する研究

分担研究者	小林茂人	(順天堂大学医学部膠原病内科	講師)
研究協力者	池田 真	(順天堂大学医学部膠原病内科	研究生)
	田嶋美智子	(順天堂大学医学部生化学第二	助手)
	田村直人	(順天堂大学医学部膠原病内科	講師)
	橋本博史	(順天堂大学医学部膠原病内科	教授)
	野沢雅彦	(順天堂大学医学部整形外科	助教授)
	前沢克彦	(順天堂大学医学部整形外科	助手)
	松田圭二	(順天堂大学医学部整形外科	助手)
	黒澤 尚	(順天堂大学医学部整形外科	教授)
	安田勝彦	(静岡県厚生連中伊豆温泉病院	内科医長)
	勝部定信	(静岡県厚生連中伊豆温泉病院	院長)

研究要旨

関節リウマチの炎症の主座は関節であるが、骨髄細胞の異常がその病因・病態に関与していることが推定されている。我々はCD34+骨髄幹細胞に注目し、その機能解析として、cDNAアレーを用い、遺伝子発現の差異をRAとOAの患者から得られたRNAを比較することで検討した。具体的な方法として、大腿骨頭人工置換術施行時に大腿骨より骨髄液を抽出し、マグネティックビーズを用いて、CD34+細胞を分離、RA患者20例、OA患者35例のRNAをプールし、クオンテックcDNAアレーを用いて、約3600個の遺伝子発現プロファイルを検索した。結果、kinesin related protein、calgranulin Cがそれぞれ約15倍、10倍と遺伝子発現の増強を認めた。今後、SLE3例、大腿骨頭壊死症3例、外傷6例のプールRNAを用いて、さらにRA、OA個々の症例についても定量的PCR法にて、これらの遺伝子発現の増強の確認をし、機能的役割等、考察していく方針である。

A.研究目的

慢性関節リウマチ(RA)の炎症の主座は、関節滑膜であるが、その免疫学的異常が骨髄細胞にあることが従来推定されている。その骨髄細胞の遺伝子の異常を検討することは、末梢血、関節滑膜などの免疫異常と深く関わりと考へ、検討を開始した。

B.研究方法

RA患者20例から関節手術時骨髄液を採取、マグネットビーズ法にてCD34陽性細胞を分離した後、RNAを抽出し、cDNAアレー法にて骨髄細胞における遺伝子の発現状況を解析した。また、対照群として、外傷6例、変形性関節炎35例、大腿骨頭壊死症3例、SLE3例、シェーグレン症候群2例、強直性脊椎炎2例の骨髄細胞を解析し、RA

の特異的遺伝子発現を検討する。また、定量的PCR法にても遺伝子発現を確認する。

C. 研究結果

骨髄細胞よりCD34陽性細胞を分離した後、RNAを抽出し、個々のRNAは非常に量が少ないので、プールして、cDNA Array法を用いてRA群、OA群とを比較し遺伝子発現異常を検索した。カルグラニューリンCがRAで14.2倍、キネシンRPが13.94倍OAに]比べて発現が高く認められた。コントロールはβアクチンで補正した。

D. 考察

カルグラニューリンはカルシウムバインディングプロテインであり、カルグラニューリンAやBと相同性を持つため、炎症性の分子として注目されている。カルグラニューリンA、BはRAのマクローフェージに発現しているという報告があり、骨髄内での不顕性炎症の存在を示唆する可能性がある。KRPはモータープロテインとして、細胞の動きを決める分子である。すまわち細胞内における運動現象(細胞質分裂、顆粒の輸送、食食作用、仮足形成、核分裂、軸索流等)を調節する役割を担っている。モータープロテインの中でKRPは微小管系の働きに関与しており、紡錘体の形成や維持に関与しているものもあり、細胞分裂などに直接関与しているといわれている。KRPの研究がカビの分裂異常の変異体から新しい発見があるなど、今回の結果がRAの骨髄細胞の分化異常とつながる可能性を期待している。

現在は他の疾患群との比較を検討すべく、定量的PCRの準備をしている。さらに、今後は骨髄幹細胞の分化成熟の段階でこれらの遺伝子がどのように変化していくのかみたいと考えている。

E. 結論

カルグラニューリンC、KRPがRAの骨

髄異常の主体である可能性が考えられる。今後、さらに個々の症例の治療経過など、臨床データと併せて健闘を進める方針である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kobayashi S, Yano T, Ebisuka T, Yoshioda M, Nakabayashi K, Matsumoto Y, Hashimoto H. Recent clinico-epidemiological manifestations of primary vasculitides. Intern Med. 2002;41; 49-51.
- 2) Tamura N, Kobayashi S, Hashimoto H. Anticardiolipin antibodies in post-streptococcal reactive arthritis. Ann Rheumatic Dis 61:374,2002
- 3) Kobayashi S, Tamura N, Ichikawa G, Hashimoto H. Reactive arthritis induced by tonsillar Chlamydia trachomatis and streptococcal infection. Clin Exp Rheumatol 20:732,2002
- 4) Haruta K, Kobayashi S, Tajima M, Yui R, Tamura N, Nagaoka I, Hashimoto H. Lysenin, a sphingomyelin-binding protein: its role in the activation of platelets. Biomed Research 23:153-159,2002
- 5) Asakawa J, Torikoe Y, Kondo I, Yasuda M, Kobayashi S, Hashimoto H. Reactive arthritis after pharyngeal infection: report of two siblings. Mod Rheumatol 12:182-185,2002.
- 6) Bando H, Tamura N, Kobayashi S, Ohyanagi Hara M, Ichimura Y, Tajima M, Haruta K, Hashimoto K. Endothelial cell-binding antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. Mod Rheumatol (in press).
- 7) Bando H, Kobayashi S, Matsumoto T, Tamura N, Yamanaka K, Yamaji C, Takasaki C, Takasaki Y, Hashimoto H. Acute acalculous cholecystitis induced by mesenteric inflammatory veno-occlusive (MIVOD) in systemic lupus erythematosus. Clin Rheumatol (in press).
- 8) Kobayashi S, Yano T, Matsumoto Y, Numano F, Nakajima N, Yasuda K, Yutani C, Tamakoshi A, Kawamura T, Ohno Y, Inaba Y, Hashimoto H.

Clinical and epidemiological analyse of giant cell (temporal) arteritis from a nationwide survey in 1998 in Japan: The first government supported nationwide survey. *Arthritis Care Res* (in press).

9) Tsuchiya N, Kyogoku C, Kawasaki A, Dijtelbloem HM, Fukasawa T, Kobayashi S, Hashimoto S, Kallenberg CG, Tokunaga K. Search for susceptibility genes to systemic lupus erythematosus and ANCA-associated vasculitis using candidate gene approach. *J Rheumatol* (in press).

10) Takaya M, Tamura N, Kobayashi S, Tajima M, Hara M, Yan K-S, Tsuda H, Hashimoto H. CD154 expression and mRNA stability of activated CD4 positive T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol* (in press).

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1). Kobayashi S, Yano T, Matsumoto Y, Numano F, Nakajima N, Yasuda K, Yutani C, Tamakoshi A, Kawamura T, Ohno Y, Inaba Y, Hashimoto H. Clinical and epidemiological analyse of giant cell (temporal) arteritis from a nationwide survey in 1998 in Japan: The first government supported nationwide survey. The 10th International vasculitis and ANCA Workshop. April 27, Cleveland, 2002.

2). Kobayashi S, Yano T, Matsumoto Y, Numano F, Nakajima N, Yasuda K, Yutani C, Tamakoshi A, Kawamura T, Ohno Y, Inaba Y, Hashimoto H. Clinical and epidemiological analyse of giant cell (temporal) arteritis from a nationwide survey in 1998 in Japan: The first government supported nationwide survey. 2002. 26th International Congress of Internal Medicine, May Kyoto, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

新規 IkappaB キナーゼ阻害薬の滑膜細胞機能におよぼす影響および
コラーゲン関節炎に対する治療効果に関する研究

沢田哲治（東京大学医学部附属病院 アレルギー・リウマチ内科）

研究要旨

今年度は、新規に開発・合成された一連の Ikappa-B kinase (IKK) -beta 阻害薬が、抗リウマチ薬として有用か否かに関する基礎実験の結果について報告する。関節リウマチ (RA) の治療は、TNF-alpha 阻害療法の導入により大きく変わりつつある。Nuclear factor-kappa B (NF-kB) は TNF-a による細胞内シグナル伝達に重要な転写因子であり、RA をはじめとする炎症性疾患の治療ターゲットとして注目されている。NF-kB は阻害タンパクである Ikappa-B と会合した不活性型として細胞質に存在する。TNF-a など細胞外刺激により、活性化された IKK は Ik-B をリン酸化することで Ik-B 分解を誘導する。この結果、NF-kB は活性化され核内へ移行し、一連の標的遺伝子の転写を促進する。本研究では、Computer-aided drug design により IKK-beta 阻害薬として同定された候補化合物の中から、in vitro において RA 滑膜細胞のサイトカイン産生抑制 (ELISA) に優れた化合物を最初に選択した。この化合物は in vitro における RA 滑膜細胞の増殖、TNF-a により誘導される NF-kB 活性 (EMSA) や IKK 活性 (Western blot による IkB のリン酸化および、免疫沈降した IKK 複合体を用いた In vitro kinase assay) を microM の濃度で抑制した。また、細胞周期解析では、この化合物により、滑膜細胞の増殖は G0/G1 期から S 期への進行が抑制され、DNA アレイを用いた検討でも、細胞周期に関連した一連の遺伝子発現が抑制されていた。次に、これらの化合物が in vivo において関節炎抑制効果があるか否か検討するため、マウスコラーゲン関節炎への影響を検討したところ、1~3 mg/kg の用量でマウスコラーゲン関節炎の発症を抑制した。これらの化合物が関節リウマチの治療に臨床応用されるには安全性など解明すべき課題はあるが、今後の進展が期待される。一方、TNF-a による細胞内シグナル伝達に NF-kB を介する経路は重要であり、この化合物によって変動する滑膜細胞の遺伝子群が、RA の病因や TNF-a 阻害療法の反応性に関連する遺伝子研究の候補遺伝子として有用である可能性もあると考えられる。

A.研究目的

関節リウマチ (RA) は関節滑膜を病変の主座とする原因不明の慢性炎症性疾患である。RA の治療体系は、生物学的製剤を用いた TNF (tumor necrosis factor) -alpha 阻害療法の導入により大きく変わりつつある。すなわち、抗 TNF-alpha 抗体 (infliximab) と可溶性 TNF-alpha 受容体 (etanercept) は、従来の RA 治療の Gold

standard である低用量メトトレキサート療法に抵抗性の RA に対しても優れた有効性を発揮する。しかし、生物製剤は高価であり、感染症などの副作用や煩雑な投与方法 (点滴静注や週 2 回の皮下注射) が問題であり、今後、TNF-alpha のシグナル伝達を阻害することにより、リウマチ滑膜炎を沈静化できる新規の薬剤の開発が望まれている。

Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) は TNF- α による細胞内シグナル伝達に重要な転写因子のひとつである。NF- κ B は慢性炎症に深く関与していると考えられている。これまでに NF- κ B 阻害薬として dominant negative IKK、I κ B の遺伝子導入や NF- κ B decoy 法が行われてきた。また、低分子化合物としては、アスピリンやサリチル酸など NSAID が IKK を直接阻害することにより、NF- κ B 活性を抑制するが、その抑制活性発現には高濃度の NSAID が必要とされるのが問題であった。炎症における IKK 活性の発現には、IKK-beta (IKK-b) が重要であることが知られている。本研究では、Computer-aided drug design により新規に創出された IKK-b 阻害薬が、抗リウマチ薬として有用か否かに関する基礎実験を行った。

B. 研究方法

IKK 阻害薬の存在下で滑膜細胞を TNF- α にて刺激し、培養上清中に遊離される炎症性サイトカイン量を ELISA 法にて測定した (IL6、IL8、MCP-1)。また、滑膜細胞の増殖に与える影響を BrdU の取り込みにより検討した。

TNF- α により刺激された滑膜細胞の NF- κ B 活性に与える IKK 阻害薬の効果をレポーターゼンアッセイ、ゲルシフトアッセイ、in vitro キナーゼアッセイ (滑膜細胞を TNF- α にて刺激 10 分後に細胞をスクレーパーで回収し、細胞質分画から抗 IKK- α 抗体を用いて IKK 複合体を免疫沈降し、P32-ATP とともに基質であるリコンビナント I κ B と反応させる)、ウエスタンブロット (TNF- α 刺激により滑膜細胞内の I κ B は \sim 15 分後には I κ B degradation により検出できなくなるが、薬剤添加により degradation が阻害される) により検討する。

また、マウス・コラーゲン関節炎に与える IKK 阻害薬の予防効果を検討した。オスの DBA/1 (II-Aq) マウスを CFA とともにウシ・コラーゲンで免疫し、3 週後に IFA で追加免疫し、コラーゲン関節炎を誘導する。一連の IKK 阻害薬は予防的に第 1 回免疫時より薬剤 (生

理食塩水に懸濁させた薬剤) を 48 時間おきに腹腔投与した。第 2 回免疫後連日 \sim 隔日で状態を観察し、関節炎スコア (発赤・腫脹・変形) を測定する。最後にマウスを sacrifice し、病理学的検討を行った。

C. 研究結果

in vitro において RA 滑膜細胞のサイトカイン産生抑制 (TNF- α 刺激による IL6、IL8、MCP-1) に優れた化合物 (IC50 が数 μ M である化合物) を最初に選択した。

この化合物は in vitro における RA 滑膜細胞の増殖を濃度依存性に抑制し、その IC50 が 1 μ M を下回るものもあった。また、細胞周期解析では、この化合物により、滑膜細胞の増殖は G0/G1 期から S 期への進行が抑制され、DNA アレイを用いた検討でも、細胞周期に関連した一連の遺伝子発現が抑制されていた。

TNF- α に NF- κ B 活性 (EMSA) や IKK 活性 (Western blot による I κ B のリン酸化と degradation および、免疫沈降した IKK 複合体を用いた In vitro kinase assay) が誘導されたが、これらの化合物は、NF- κ B 活性や IKK 活性を μ M の濃度で抑制した。

これらの化合物がマウスコラーゲン関節炎に与える影響を検討したところ、1 \sim 3 mg/kg (48 時間おきの腹腔投与) の用量でマウスコラーゲン関節炎の発症を抑制した。また、mock 処理に比して、関節炎スコアも病理スコアも有意に軽減されていた。

D. 考察

Computer-aided drug design により IKK-b 阻害薬として創薬されたこれらの化合物は μ M の濃度で、TNF- α 刺激により RA 滑膜細胞から遊離される炎症性サイトカイン量を抑制した。同時に滑膜細胞における IKK と NF- κ B の TNF- α による活性化を抑制した。即ち、これらは滑膜細胞において TNF- α から炎症性サイトカイン産生におけるシグナル伝達系を阻害することが示された。理論上 IKK-b

上の ATP 結合部位に作用する化合物であるので、分子標的は IKK-b である可能性が高いと考えられるが、今後、生化学的検討により IKK-b 阻害薬としての特徴を明らかにしていく必要がある。また、これらの化合物は比較的低用量でマウス関節炎の発症を抑制した。In vitro および in vivo の結果から、これらの化合物が、RA の治療に有効である可能性がある。

一方、TNF-a による細胞内シグナル伝達に NF-kB を介する経路は重要であり、この化合物によって変動する滑膜細胞の遺伝子群が、RA の病因や TNF-a 阻害療法の反応性に関連する遺伝子研究の候補遺伝子として有用である可能性もあると考えられる。

RA をはじめとする慢性炎症性疾患の治療のターゲットとして、NFk-B は近年、最も注目されてきた分子のひとつである。従来、創薬は天然化合物または合成化合物のライブラリーの中から標的分子の活性に影響を与える化合物をスクリーニングすることにより行われることが一般的であった。しかし、ライブラリーのスクリーニングは、high through-put の系を用いたとしても繁雑であり、時間と労力を有するのが問題である。本研究では、新しい創薬法である Computer-aided drug design により得られた化合物を用いている点の特徴である。本研究により、Computer-aided drug design により創出された新規 IKK 阻害薬の中から、RA 治療薬の候補となりうる薬剤を同定しうる点で、本研究の薬学的な意義は大きいと言える。また、本研究により TNF-a から IKK および NF-kB を介して伝達されるシグナル経路が、ヒト RA 滑膜細胞の機能（転写因子活性・サイトカイン産生能・接着分子発現）やコラーゲン関節炎の病態形成に果たす役割をさらに明らかにできる点で、免疫学的・リウマチ学な意義も大きいと考えられる。さらに、NFk-B はアレルギーや炎症性腸疾患を含む免疫疾患のみならず、腫瘍性疾患から糖尿病などの代謝性疾患まで多くの疾患の病態形成に関与することが知られており、本研

究の成果はこのような様々な疾患の病態解明にも有用であると考えられ、臨床的意義は広範囲に及ぶ可能性がある。

E. 結論

これらの化合物が RA の治療に臨床応用されるには安全性など解明すべき課題はあるが、今後の進展が期待される。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表
投稿準備中
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

抗 fractalkine 抗体による関節炎抑制効果の検討

分担研究者 南木敏宏（東京医科歯科大学 生体応答調節学）

研究要旨

関節リウマチ(RA)炎症滑膜組織への炎症細胞浸潤に fractalkine (FKN)の関与が示唆されているが、関節炎モデルマウスに抗 FKN 抗体を投与することにより、その関節炎が抑制された。このことより、FKN/CX3CR1 相互作用を阻害することが、RA の新たな治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

A.研究目的

関節リウマチ(RA)は、原因不明の多発性関節炎を主症状とする難治性の慢性炎症性疾患であり、罹患関節滑膜組織には著明な炎症細胞浸潤がみられる。その炎症細胞浸潤にはケモカイン・ケモカインレセプター相互作用が深く関与していると考えられているが、どのケモカイン・ケモカインレセプターが RA の病態形成に重要であるかについては不明な点が多い。RA に関与するケモカイン・ケモカインレセプターを解明し、そのケモカイン・ケモカインレセプターと RA に対する治療との関連を解析することにより、治療薬の選定、および新規治療薬の開発につながることを期待される。

昨年の本研究事業において、RA 滑膜組織への T 細胞浸潤における fractalkine (FKN: CX3CL1)/ CX3C chemokine receptor-1 (CX3CR1) 相互作用の重要性について報告した。今回、関節炎モデル動物を用いて、抗 FKN 抗体による関節炎に対する治療効果を解析し、新たな治療ターゲットとしての可能性を検討した。

B.研究方法

関節炎モデル動物として、コラーゲン誘導関節炎マウスを用いた。DBA/1J マウス（雄、

8 週令）に、bovine type II collagen と complete Freund's adjuvant (CFA) のエマルジョンを皮内投与し、その 3 週間後に再度同様に bovine type II collagen + CFA を投与した。2 回目の免疫時を day 0 とし、day 0 より day 15 まで、抗マウス FKN 抗体、またはコントロール抗体を 500 μ g ずつ週 3 回腹腔内投与した。その間、関節炎の程度を関節炎スコア（両手・両足関節を関節炎の程度に応じて 0-4 点に評価し、その総和）で評価した。Day 15 に、マウスの ankle joint を HE 染色、および抗 CD3 抗体による免疫組織染色を施行。また、day 15 に血清中の抗コラーゲン抗体価を ELISA を用いて測定した。

コントロールマウス（正常のマウス）、およびコラーゲン誘導関節炎マウスの関節 (ankle joint) 組織からの FKN の発現を western blot で解析した。また、コントロールマウス、およびコラーゲン誘導関節炎マウスの関節組織での CX3CR1 の発現を免疫組織染色で解析した。

動物実験においては、動物愛護などに配慮して行った。

C.研究結果

コントロールマウス（正常マウス）、およびコラーゲン誘導関節炎マウスの関節組織に

おける FKN の発現を比較したところ、関節炎をおこした関節組織において FKN の発現が亢進していた (図 1A)。また、コラーゲン誘導関節炎マウスの関節組織に浸潤している炎症細胞において、CX3CR1 の発現が認められた (図 1B)。

コラーゲン誘導関節炎マウスに対し、2 回目の免疫時(day 0)より抗マウス FKN 抗体を投与し、day 15 まで四肢の関節炎の程度を関節炎スコアを用いて評価した。抗マウス FKN 抗体投与群では、コントロール抗体投与群と比較し、関節炎スコアは有意に低値であった (図 2)。

Day 15 に、関節組織を組織学的に解析したところ、コントロール抗体投与群では多数の炎症細胞浸潤がみられたが、抗マウス FKN 抗体投与群では明らかにその炎症細胞浸潤が抑制されていた (図 3)。また、コントロール抗体投与群では関節組織に CD3 陽性 T 細胞の浸潤がみられたが、抗マウス FKN 抗体投与群ではほとんど CD3 陽性 T 細胞は認められなかった。

Day 15 に血清中の抗コラーゲン抗体価を ELISA にて測定したところ、コントロール抗体投与群と抗マウス FKN 抗体投与群に、有意差は認められなかった (図 4)。

D. 考察

RA 患者において、末梢血 CX3CR1 陽性 T 細胞は、IFN- γ 、TNF- α などの type 1 型のサイトカイン、および granzyme A、perforin などの細胞障害性分子を発現する特異な細胞であり、FKN により RA 滑膜組織に浸潤していることを我々は報告した。今回、関節炎モデルマウスにおいて、抗 FKN 抗体が関節炎を抑制することを見出した。この結果は、FKN/CX3CR1 相互作用阻害剤が RA に対する新規治療薬となる可能性があることを示唆した。

抗 FKN 抗体投与群では、コントロール抗体投与群と比較し有意にコラーゲン誘導関節炎が抑制された。また、関節局所への炎症細胞の浸潤も明らかに抑制された。しかしなが

ら、抗コラーゲン抗体の産生には、抗 FKN 抗体は影響しなかった。このことは、コラーゲン免疫に対する反応には抗 FKN 抗体は影響せず、関節組織への炎症細胞の浸潤を抑制することにより、関節炎を抑制したと考えられた。

RA 滑膜組織では、T 細胞のみならず、マクローファージ様滑膜細胞、樹状細胞様滑膜細胞からも CX3CR1 の発現が報告されている。抗 FKN 抗体はそれらの細胞浸潤も抑制した可能性がある。また、FKN は滑膜組織での血管新生への関与も報告されており、抗 FKN 抗体は血管新生を抑制することにより、炎症細胞浸潤を抑制している可能性もある。また、RA 線維芽細胞様滑膜細胞が CX3CR1 を発現し、FKN 刺激により matrix metalloproteinase の発現を増強していることも報告されている。抗 FKN 抗体は線維芽細胞の活性化の抑制にも関与した可能性がある。

FKN/CX3CR1 相互作用阻害剤は、炎症細胞浸潤の抑制のみならず、滑膜細胞の活性化抑制などの作用も加わり、関節炎抑制効果があるものと考えられ、RA に対する新規治療薬としての可能性があると考えられる。

E. 結論

FKN/CX3CR1 相互作用阻害剤は、RA に対する新規治療薬として有用である可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

* Toshihiro Nanki, Toshio Imai, Kenji Nagasaka, Yasuyo Urasaki, Yoshinori Nonomura, Ken Taniguchi, Kenji Hayashida, Jun Hasegawa, Osamu Yoshie, Nobuyuki Miyasaka. Migration of CX3CR1-positive T cells producing type 1 cytokines and cytotoxic molecules into the synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 46(11): 2878-2883, 2002.

* Hermann J. Girschick, Amrie C. Grammer, Toshihiro Nanki, E Vazquez, Peter E. Lipsky. Expression of recombination activating genes 1 and 2 in peripheral B cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 46(5): 1255-1263, 2002.

2. 学会発表

* Toshihiro Nanki. A role for chemokine and chemokine receptor interactions for T cell migration into RA synovium. University of Texas San Antonioにて seminar. 2002/10/25.

* 南木敏宏、今井俊夫、長坂憲治、野々村美紀、谷口顕、林田賢治、長谷川潤、義江修、宮坂信之。CX3CL1/CX3CR1 相互作用による慢性関節リウマチ(RA)滑膜組織への T 細胞浸潤。第 67 回日本インターフェロン/サイトカイン学会。2002。

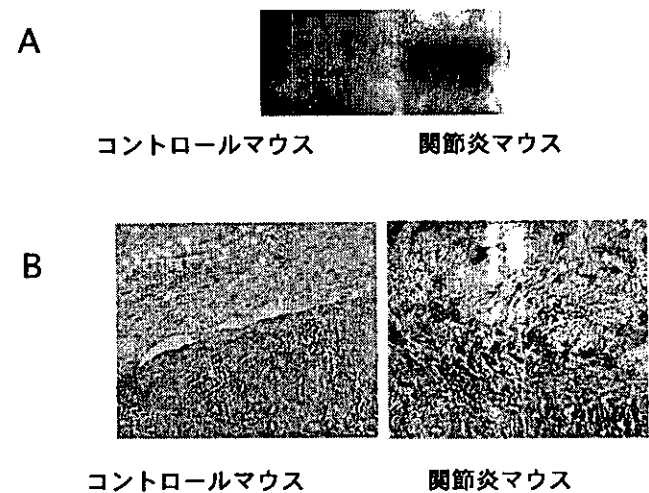
* 南木敏宏、今井俊夫、Peter E. Lipsky、宮坂信之。慢性関節リウマチ滑膜組織への T 細胞浸潤に關与するケモカインの解析。第 23 回日本炎症・再生医学会。2002。

* Toshihiro Nanki. A role for chemokine and chemokine receptor interactions for T cell migration into RA synovium. NIHにて seminar. 2002/2/25.

* 南木敏宏、今井俊夫、長坂憲治、野々村美紀、谷口顕、林田賢治、長谷川潤、宮坂信之。CX3CL1/CX3CR1 相互作用による慢性関節リウマチ(RA)滑膜組織への T 細胞浸潤。第 46 回リウマチ学会総会。2002。

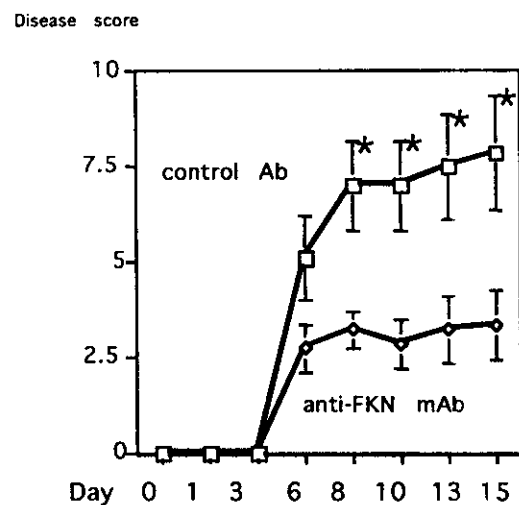
H.知的財産権の出願・登録状況
特になし。

図 1 コラーゲン誘導関節炎マウスの滑膜組織からの FKN, CX3CR1 の発現



コントロールマウス (正常マウス)、およびコラーゲン誘導関節炎マウスの関節 (ankle joint) 組織からの FKN の発現を western blot で (A)、CX3CR1 の発現を免疫組織染色で解析(B)。

図 2 コラーゲン誘導関節炎に対する抗 FKN 抗体による治療効果 (関節炎スコア)



コラーゲン誘導関節炎マウスに、抗 FKN 抗体、またはコントロール抗体を投与し、関節炎の程度を関節炎スコアで評価した(* $p < 0.05$)。

図3 コラーゲン誘導関節炎に対する抗 FKN 抗体による治療効果 (滑膜組織)



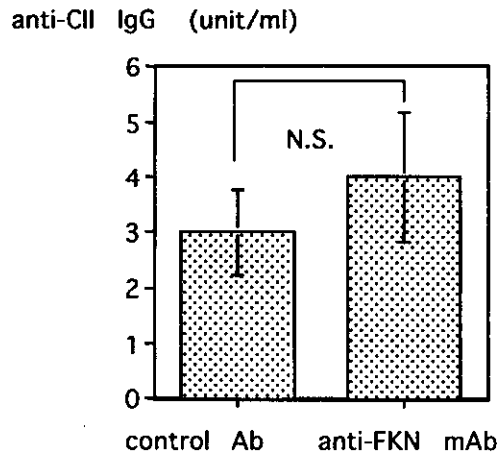
コントロール抗体



抗FKN抗体

コラーゲン誘導関節炎マウスに、抗 FKN 抗体、またはコントロール抗体を投与し、day 15 に ankle joint を HE 染色した(x200)。

図4 血清中の抗コラーゲン抗体産生に対する、抗 FKN 抗体の影響



コラーゲン誘導関節炎マウスに、抗 FKN 抗体、またはコントロール抗体を投与し、day 15 に血清中の抗コラーゲン抗体価を ELISA にて測定。

滑膜細胞の TRAIL 誘導性アポトーシスの検討に関する研究

分担研究者 川上 純（長崎大学医学部内科学第一講座助手）

研究要旨

昨年度の検討で滑膜細胞には tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) 誘導性アポトーシスが惹起されることがわかった。本年度は滑膜細胞 TRAIL 誘導性アポトーシスのシグナル伝達機構を検討した。滑膜細胞の TRAIL 誘導性アポトーシスはミトコンドリア膜電位の低下を誘導するとともに、この過程では caspase-3/-8/-9 の活性化が検出された。このアポトーシスは PI-3K/Akt 活性化の抑制で顕著に増大したが、MEK/ERK 活性化を抑制してもその効果は軽度であった。Platelet-derived growth factor (PDGF) は Akt と ERK をリン酸化し滑膜細胞の TRAIL 誘導性アポトーシスを著明に抑制したが、PDGF のアポトーシス抑制作用も PI-3K/Akt 活性化の関与が大きく、MEK/ERK 活性化の関与は軽度であった。これらの結果より、滑膜細胞の TRAIL 受容体を介するアポトーシス刺激は、caspase-8 活性化によるミトコンドリア経路で細胞死を誘導するが、これを抑制するシグナル伝達分子としての PI-3K/Akt の重要性が示唆された。

A.研究目的

TRAIL は抗炎症・アポトーシス誘導作用があり、その作用は TRAIL 受容体を介して伝達される。コラーゲン誘発関節炎が TRAIL シグナル遮断により増悪する事実より、関節リウマチ (RA) と TRAIL シグナルとの関連性が示唆される。RA 滑膜組織には種々のサイトカイン・成長因子が検出されることや滑膜細胞アポトーシス感受性はこれら液性因子により修飾されることが今までに報告されており、滑膜細胞の TRAIL 誘導性アポトーシスシグナル伝達も正または負の制御を受けることが考えられる。本年度は、RA 滑膜組織での滑膜細胞 TRAIL 誘導性アポトーシスの制御機構を考察するために、kinase inhibitor および PDGF による修飾を検討した。

B.研究方法

実験に使用したサンプルはすべてインフォームドコンセント下に採取した。培養 RA 滑膜細胞（滑膜線維芽細胞）は整形外科手術時に得られた滑膜組織を細切して得た。滑膜細胞の膜型 TRAIL レセプターの発現は DR4、DR5（機能性レセプター）、decoy receptor 1 (DcR1) および DcR2（デコイレセプター）を FACS にて評価した。培養滑膜細胞に soluble TRAIL (sTRAIL) を添加しアポトーシスを誘導し、アポトーシスは 1. DiOC6 によるミトコンドリア膜電位の低下 ($\Delta\Psi_m$) 2. Caspase 活性化 (caspase-3: DEVDase、caspase-8: IETDase、caspase-9: LEHDase) で評価した。また、LY294002 (PI-3K 阻害剤)、PD98059 (MEK 阻害剤) および PDGF で前処理し、滑膜細胞アポトーシス感受性の変化を検討し

た。滑膜細胞の Akt と ERK 活性化は各々のリン酸化抗体を用い、ウエスタンブロットで評価した。

C. 研究結果

FACS による解析では、滑膜細胞には DR4、DR5、DcR1、DcR2 すべての TRAIL レセプターの発現が認められたが、DR4 の発現は他のレセプター発現に比べ軽度であった。TRAIL 添加により滑膜細胞にはアポトーシスが誘導され、 $\Delta\Psi_m$ とともに caspase-3/-8/-9 活性化が検出された。TRAIL 添加により滑膜細胞の ERK リン酸化は明確に、また、Akt リン酸化は軽度に認められた。Kinase inhibitor による検討では、LY294002 前処置で TRAIL で誘導される $\Delta\Psi_m$ と caspase-3/-8/-9 活性化はともに顕著に増大したが、PD98059 の効果は軽度にとどまった。PDGF は滑膜細胞の Akt と ERK を顕著にリン酸化し TRAIL 誘導性アポトーシスを著明に抑制したが、PDGF の抑制効果は PD98059 ではなく LY294002 添加により消失した。

D. 考察

TRAIL は主に DR5 を介して滑膜細胞にアポトーシスを誘導するが、この過程では caspase-8→ミトコンドリア→caspase-9→caspase-3 の経路が働いていると考えられた。これら TRAIL 誘導性アポトーシスを制御する kinase cascade としては、MEK→ERK 経路より PI-3K→Akt 経路が重要と思われ、PDGF による滑膜細胞 TRAIL 誘導性アポトーシスの抑制効果も主に後者の経路で惹起されていることが示唆された。

E. 結論

滑膜細胞には TRAIL/TRAIL 受容体 (DR5) 相互作用により、ミトコンドリアを介してア

ポトーシス刺激が伝達されることがわかった。またこの刺激は PI-3K/Akt 活性化により負に制御されることも示唆され、PDGF など滑膜細胞における成長因子の作用機序の一つに、PI-3K/Akt 活性化による TRAIL 誘導性アポトーシスの抑制効果が考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamasaki S, Kawakami A (3 番目、他 6 名) Functional changes in rheumatoid fibroblast-like synovial cells through activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ -mediated signalling pathway. Clin Exp Immunol 129 (2): 2002, 379-384

2. Kawakami A (筆頭著者、他 10 名)

Modulation of the expression of membrane-bound CD54 (mCD54) and soluble form of CD54 (sCD54) in endothelial cells by glucosyl transferase inhibitor: possible role of ceramide for the shedding of mCD54. Biochem Biophys Res Commun 296 (1): 2002, 26-31

3. Kawakami A, Eguchi K (筆頭著者)

Involvement of apoptotic cell death in autoimmune diseases. Med Electron Microsc 35 (1): 2002, 1-8

4. Migita K, Kawakami A (7 番目、他 7 名)

The role of peroxynitrite in cyclooxygenase-2 expression of rheumatoid synovium. Clin Exp Rheumatol 20 (1): 2002, 59-62

5. Kamachi M, Kawakami A (2 番目、他 11 名)
Regulation of apoptotic cell death by cytokines in
a human salivary gland cell line: distinct and
synergistic mechanisms in apoptosis induced by
tumor necrosis factor α and interferon γ .

J Lab Clin Med 139 (1): 2002, 13-19

6. Kambara C, Kawakami A (5 番目、他 6 名)
Ichinose K, Shirabe S, Eguchi K. Increased
sialyl Lewis(x) antigen-positive cells mediated by
HTLV-1 infection in peripheral blood CD4(+) T
lymphocytes in patients with HTLV-1-associated
myelopathy.

J Neuroimmunol 125 (1-2): 2002, 179-184.

7. 川上 純、江口勝美 (筆頭著者、他 4 名): ア
ポトーシス誘導療法、内科 89: 309-312, 2002.

8. 川上 純、江口勝美 (筆頭著者): カスパ
ーゼカスケード、炎症と免疫 10: 106-107, 2002.

9. 宮下賜一郎、川上 純 (2 番目、他 2 名):
OPG/OPG リガンド、臨床免疫 37: 191-196,
2002.

10. 川上 純 (筆頭著者、他 13 名): 治療抵抗
性関節リウマチに対するシクロスポリンとタ
クロリムスの有効性、臨床リウマチ 14: 219-
223, 2002.

2. 学会発表

1. 山崎聡士、川上 純 (5 番目、他 2 名): 滑
膜線維芽細胞における NF- κ B の制御。第 46
回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集
p303、2002.

2. 川上 純 (筆頭演者、他 8 名): HTLV-I Tax
Tax による抗アポトーシス作用の検討。
第 46 回日本リウマチ学会総会・学術集会

抄録集 p305、2002.

3. 川上 純 (筆頭演者、他 8 名): サイトカイン
による唾液腺細胞アポトーシスの制御。第
46 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集
p321、2002.

4. 田中史子、川上 純 (6 番目、他 7 名): IL-18
による血清アミロイド A 蛋白 (SAA) の誘導。
第 46 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄
録集 p323、2002.

5. 右田清志、川上 純 (6 番目、他 1 名): 免
疫抑制剤のミトコンドリアに対する作用—シ
クロスポリン・タクロリムスの対比—。第 46
回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集
p360、2002.

6. 折口智樹、川上 純 (4 番目、他 7 名): Sjögren
症候群の発症における IL-10 遺伝子多型の関
与。第 46 回日本リウマチ学会総会・学術集
会抄録集 p396、2002.

7. 山崎聡士、川上 純 (5 番目、他 5 名): PPAR γ
による滑膜細胞の制御。第 46 回日本リウマ
チ学会総会・学術集会抄録集 p424、2002.

8. 宮下賜一郎、川上 純 (2 番目、他 7 名):
滑膜細胞の TRAIL 誘導性アポトーシスの検
討。第 46 回日本リウマチ学会総会・学術集
会抄録集 p450、2002.

9. 井田弘明、川上 純 (4 番目、他 4 名):
Granzyme B leakage induced NK cell death。第
46 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集
p451、2002.

10. 井田弘明、川上 純 (5 番目、他 8 名):
Granzyme B leakage induced cell death (GLCD):
新しいタイプの activation induced cell death
(AICD)。第 32 回日本免疫学会総会・学術集
会記録 p81、2002.

11. 川上 純 (筆頭演者、他 8 名): PDGF に
よる滑膜細胞 TRAIL 誘導性アポトーシスの
抑制。第 32 回日本免疫学会総会・学術集会
記録 p294、2002.

12. Kawakami A (筆頭演者、他 9 名):

Examination of anti-apoptogenic property of salivary infiltrating T cell: Possible association with HTLV-I infection. Arthritis Rheum 46 (Supple), S3

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌 (竹内 勤)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tsuzaka T, Onoda N, Yoshimoto K, Zhang L, Pang M, Abe T, and Takeuchi T.	T cell receptor ζ mRNA with an alternatively spliced 3' untranslated region is generated predominantly in the peripheral blood T cells of systemic lupus erythematosus patients	Modern Rheum	12	167-173	2002
Pang M, Setoyama Y, Tsuzaka K, Yoshimoto K, Amano K, Abe T, and Takeuchi T.	Defective expression and tyrosine phosphorylation of the T cell receptor zeta chain in peripheral blood T cells from systemic lupus erythematosus patients	Clin Exp Immunol	129	160-169	2002
Takeuchi T, Tsuzaka K, and Abe T.	Altered expression of the T cell receptor-CD3 complex in systemic lupus erythematosus.	Int Rev Immunol	In press		
Tsuzaka K, Fukuhara I, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, and Takeuchi T.	Forced expression of TCR ζ mRNA with alternatively spliced 3' untranslated region found in SLE patients lead to decreased production and cell surface expression of TCR ζ and TCR-CD3 complex	J Immunol	In press		
竹内 勤	リウマチ性疾患の組織障害機序	リウマチ科	27	27(1): 84-92	2002
宮坂信之 小池隆夫 竹内 勤 山本一彦	膠原病治療の現況と問題点 臨床雑誌	内科	89(2)	317-335,	2002
竹内 勤	T細胞シグナル伝達分子機構	炎症と免疫	10(3):	321	2002
竹内 勤	炎症とサイトカイン -病態から治療応用へ-序論	最新医学	57(4)	829-830	2002
竹内 勤	抗リウマチ剤の注意すべき副作用 -特徴と対応-	第 46 回リウマチ学会総会・学術集会 ランチョンセミナー 25			2002
竹内 勤	全身性エリテマトーデス	総合臨床	151(7)	2122-2128	2002
竹内 勤	膠原病治療薬としての生物製剤	総合臨床	51(7):	2116-2118	2002

竹内 勤	自己免疫疾患のモノクローナル抗体治療	Medical Science digest	28(8)	330-333	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):	83-88	2002
宮坂信之、江口勝美、竹内 勤	関節リウマチの治療の現状と展望 (座談会)	竹内 勤：最新医学別冊 関節リウマチ		231-244,	2002
宮坂信之、山本一彦、竹内 勤 河合眞一	抗サイトカイン生物製剤の現状と未来 (座談会)	治療学	36(12)	1291-1303	2002