

表 1. LIR1 細胞外領域ハプロタイプと関節リウマチとの関連

グループ	SE	LIR1 (.01/.01)	RA (n=559)	(%)	健常者 (n=409)	(%)	odds ratio (OR)	95%CI
A	+	+	59	(10.7)	18	(6.0)	3.77	2.17-6.54
B	+	-	320	(57.9)	101	(33.6)	3.64	2.67-4.98
C	-	+	34	(6.1)	21	(7.0)	1.86	1.01-3.34
D	-	-	140	(25.3)	161	(53.5)	1.0	

SE: HLA-DRB1 shared eiptope, CI: confidence interval

SE 陽性群 A vs B: $\chi^2=0.013$, P=0.91, OR=1.04, 95% CI: 0.57 – 1.87

SE 陰性群 C vs D: $\chi^2=4.36$, P=0.037, OR=1.86, 95% CI: 1.04 – 3.34

表 2. RA および SLE における BLYS、BAFF-R 多型の組み合わせ

	BLYS -871T positive						BLYS -871T negative					
	RA (n=132)	(%)	SLE (n=102)	(%)	control (n=149)	(%)	RA (n=64)	(%)	SLE (n=47)	(%)	control (n=68)	(%)
<i>BAFF-R c.*120T>C</i>												
T/T	108	(81.8)	87	(85.3)	120	(80.5)	59	(92.2)	31	(66.0)	50	(73.5)
T/C	23	(17.4)	15	(14.7)	29	(19.5)	4	(6.2)	15	(31.9)	16	(23.5)
C/C	1	(0.8)	0	(0)	0	(0)	1	(1.6)	1	(2.1)	2	(2.9)
C+	24	(18.2)	15	(14.7)	29	(19.5)	5	(7.8) ^a	16	(34.0)	18	(26.5)

^a P=0.006 (Fisher's exact test) vs. control.

表 3. *HLA-DRB1* shared epitope の有無によって層別化し RA および健常対照群の Fc 受容体遺伝子型

	<i>FCGR2A</i> -H131R		<i>FCGR2B</i> -I232T		<i>FCGR3A</i> -F176V		<i>FCGR3B</i> -NA1/2				
SE positive											
RA n=270/379 (71.2%)											
R/R	13	(4.8)	I/I	151	(55.9)	F/F	151	(55.9)*	2/2	31	(11.5)
R/H	86	(31.9)	I/T	103	(38.2)	V/F	100	(37.1)	1/2	137	(50.7)
H/H	171	(63.3)	T/T	16	(5.9)	V/V	19	(7.0)	1/1	102	(37.8)
健常者 n=118/301 (39.2%)											
R/R	6	(5.1)	I/I	66	(55.9)	F/F	49	(41.5)	2/2	18	(15.3)
R/H	39	(33.0)	I/T	44	(37.3)	V/F	58	(49.2)	1/2	61	(51.7)
H/H	73	(61.9)	T/T	8	(6.8)	V/V	11	(9.3)	1/1	39	(33.0)
SE negative											
RA n=109/379 (28.8%)											
R/R	7	(6.4)	I/I	70	(64.2)	F/F	53	(48.6)	2/2	12	(11.0)
R/H	24	(22.0)	I/T	32	(29.4)	V/F	47	(43.1)	1/2	58	(53.2)
H/H	78	(71.6)	T/T	7	(6.4)	V/V	9	(8.3)	1/1	39	(35.8)
健常者 n=183/301 (60.8%)											
R/R	5	(2.7)	I/I	115	(62.8)	F/F	95	(51.9)	2/2	24	(13.1)
R/H	54	(29.5)	I/T	60	(32.8)	V/F	73	(39.9)	1/2	83	(45.4)
H/H	124	(67.8)	T/T	8	(4.4)	V/V	15	(8.2)	1/1	76	(41.5)

* Shared epitope 陽性群においてのみ、*FCGR3A*-F176V の遺伝子型分布 (2 x3 分割表、P=0.03)、*FCGR3A*-176F/F 遺伝子型 (2 x2 分割表、P=0.009) と RA との有意な関連が検出された。

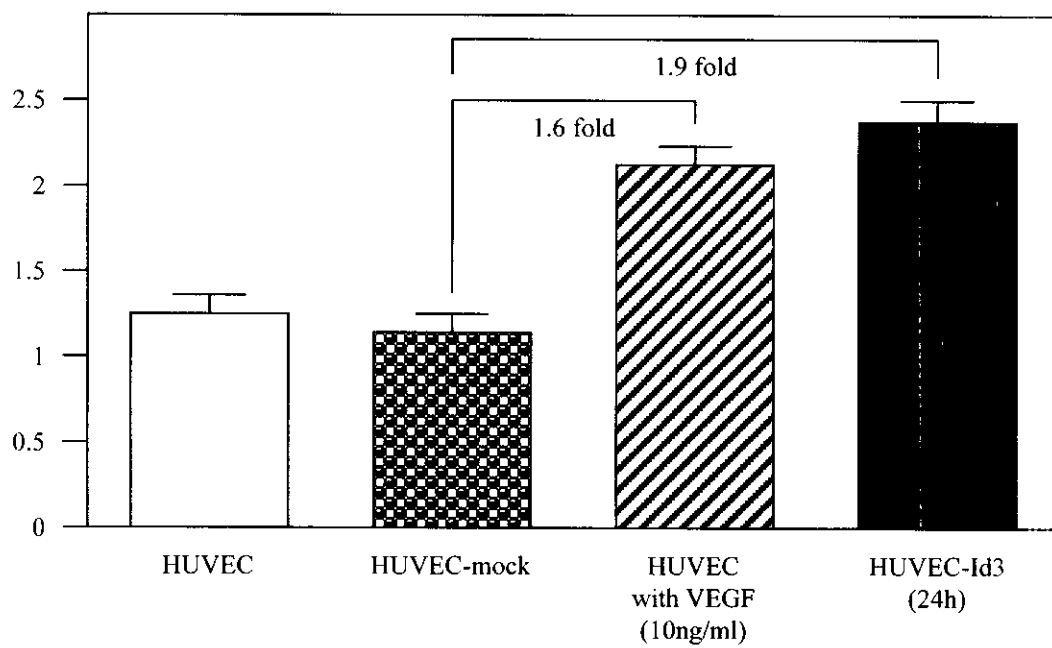
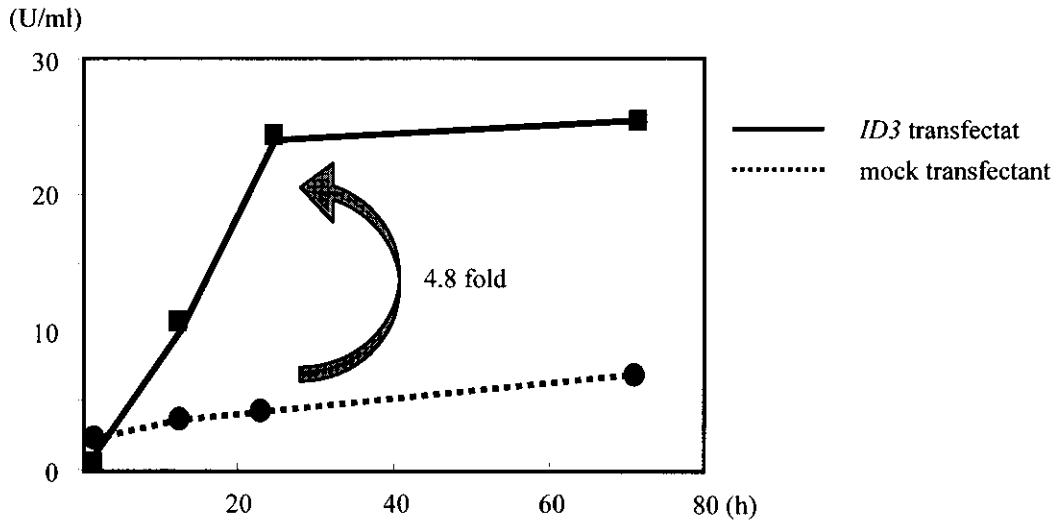


図1. Id3強制発現による HUVEC の増殖誘導。Id3 transfectant は、陽性対照である VEGF 刺激 HUVEC 同等以上の増殖を示した。

(A) ICAM-1 mRNA レベル



(B) 細胞表面 ICAM-1発現レベル

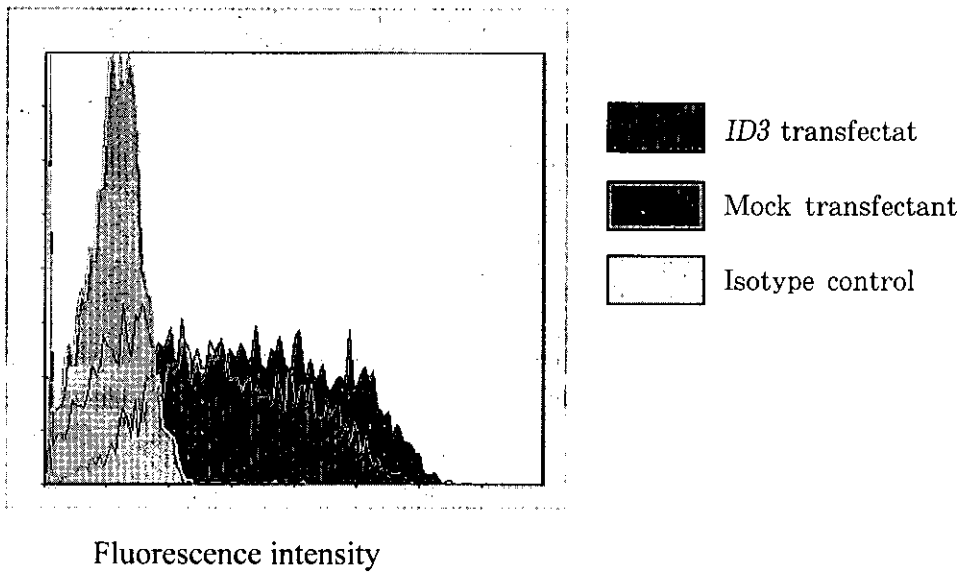
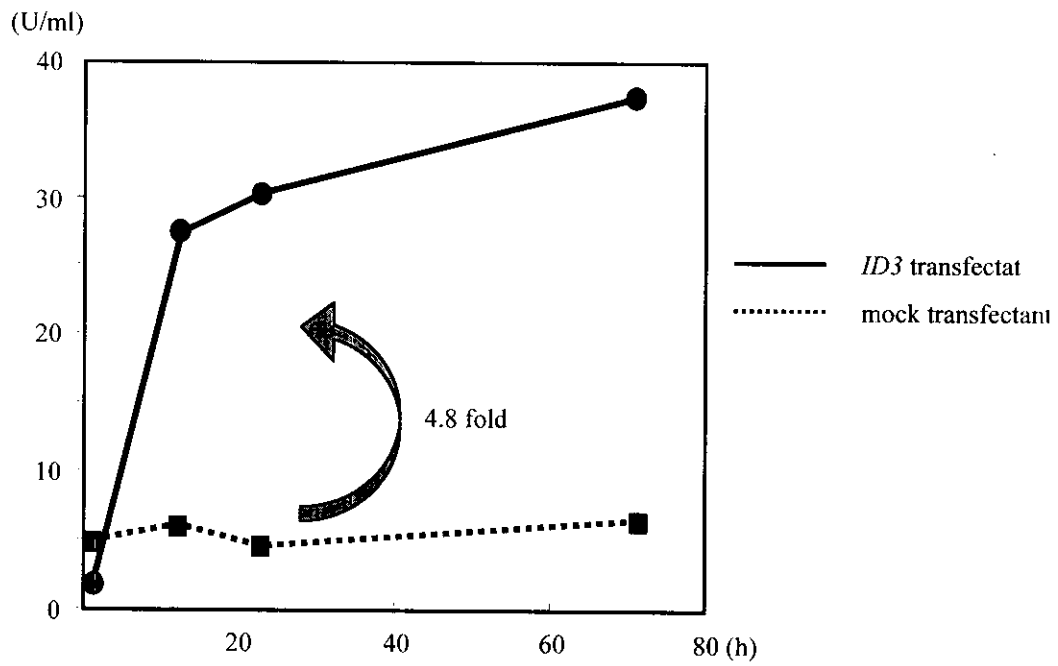


図2. Id3強制発現による HUVEC の CD54 (ICAM-1) 発現誘導

(A) E-selectin mRNA レベル



(B) 細胞表面 E-selectin 発現レベル

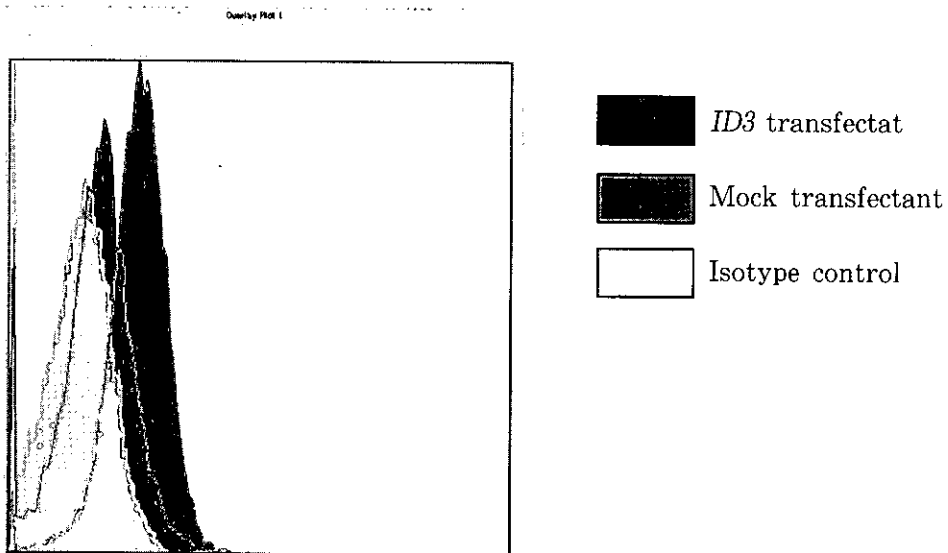


図2. Id3強制発現による HUVEC の CD62E (E-selectin) 発現誘導

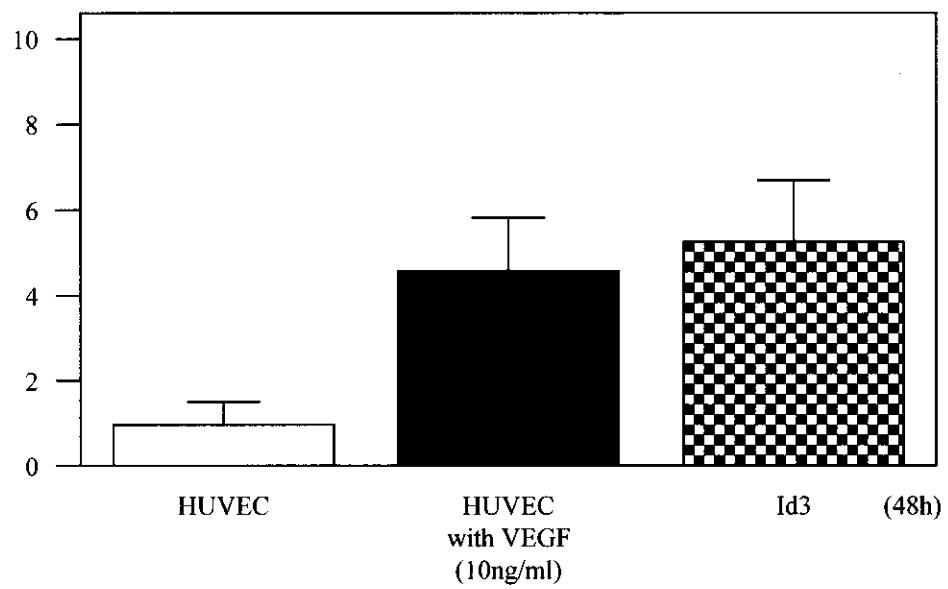


図4. HUVEC の VEGF 刺激による Id3 発現誘導

VEGF 刺激後48時間後に、HUVEC の Id3 mRNA レベルを RT-PCR にて測定した。陽性対照の Id3 transfectant に匹敵する量の Id3 mRNA の発現が検出された。

関節リウマチの多因子遺伝に関わる疾患感受性遺伝子の 同定に関する研究

分担研究者：塩 澤 俊 一
神戸大学医学部保健学科 教授

研究要旨

私どもはすでに関節リウマチ (RA) の疾患遺伝子が3つあることを指摘し、それぞれの疾患遺伝子候補について報告してきた。今回、私達は、第1染色体に位置する RA の疾患遺伝子 death receptor 3 (DR3) 遺伝子多型 (遺伝子変異) に関わる臨床的特徴を調べると、この疾患遺伝子多型 polymorphism は RA の発症ではなく疾患の増悪に関わる疾患遺伝子であることが示された。さらに第8染色体に位置する RA の疾患遺伝子がアンギオポエチン-1 (Ang-1) 遺伝子多型であることを新たに見出した。また、X染色体の疾患遺伝子 Dbl についてはその遺伝学的分布を確実にし、生化学的作用機構を掘り下げたところ、多因子遺伝に関わる疾患遺伝子の実体は、日常の細胞機能に関わる重要な遺伝子の変異であり、日常の ADL に関わるわずかな個性的差異が疾患保有者の免疫学的な個性を形作っていることが明らかになった。

A. 研究目的

関節リウマチ (RA) などの膠原病はその原因が不明で、発症には遺伝素因と環境要因の二つが関与すると考えられている。今回私達は、第1染色体に位置する RA の疾患遺伝子 death receptor 3 (DR3) 遺伝子多型 (遺伝子変異) に関わる臨床的特徴を明らかにし、さらに第8染色体に位置する RA の疾患遺伝子がアンギオポエチン-1 (Ang-1) 遺伝子多型であることを新たに見出した。また、X染色体の疾患遺伝子 Dbl についてはその遺伝学的分布を確実にし、生化学的作

用機構を掘り下げた。

B. 研究方法

RA の多発家系のゲノムワイド解析とシーケンスにより同定された疾患遺伝子について、(1) 遺伝学的分布を家系数を約千名に増やして確実性を期した。(2) 遺伝子保有の有無による臨床的特徴を調べた。(3) 疾患遺伝子の分子作用機構をさらに検討した。

C. 研究結果

第1染色体 D1S214/253 上の疾患遺伝

子すなわち *RA1* 遺伝子としてアポトーシスを誘導する death receptor *DR3* 遺伝子が、既知の *DR3* エキソンマップ上における nt564(A→G);Asp159Gly、nt630+622 (del14)、nt631-538 (C→T)、nt631-391 (A→T)、nt631-243 (A→G) の SNP4 箇所および核酸欠損1箇所の変異体であることを基盤に、これをミニジーンに組み換えて *DR3* 遺伝子を発現させた結果、遺伝子変異の結果読み枠がシフトしてストップコドンが早期に出現し、death domain を欠く変異体が疾患特異的に見出された。変異型 *DR3* は、正常 *DR3* 分子とヘテロ三量体を形成し、変異 *DR3* 分子は正常型 *DR3* によるアポトーシスをドミナントネガティブに抑制した。培養細胞に発現させると、正常型 *DR3* はアポトーシスを誘導したが、変異型 *DR3* は誘導しなかった。変異型 *DR3* による抑制はドミナントネガティブであった。変異は多発家系の RA 例で 6/60 (10%)、孤発 RA で 21/1166 (1.8%)、健常対照者で 3/550 (0.55%) に見出された。変異 *DR3* をもつ患者リンパ球には、抗 *DR3* 抗体でアポトーシスが生じなかった。疾患遺伝子は RA の関節手術例の 8/42 (19%) にみられたが対象の OA の関節手術例は 0/59 (0%) であった。病歴を確認できた 715 例のうち 31 例が *DR3* 遺伝子変異陽性を示したが、*DR3* 変異例は手術頻度が高く 2 回以上の手術例が多く、発症から 20 年以内に一回以上関節手術を受けた例を比較すると、*DR3* 変異例は 11/31 (35%)、変異なし例は 127/638 (19%) と変異陽性例に手術例が有意に多

かった。二回以上手術を受けた例は変異例 5/31 (16%)、変異なし例 24/684 (4.0%) とやはり変異陽性例に多かった ($p<0.033$)。滑膜切除術例を除いて関節置換術例に限ると、変異例 9/31 (29%)、変異なし例 81/684 (12%) と *DR3* 変異例に多かった ($p=0.024$)。なお、変異例の発症年齢は変異なし例に比してとくに変化がなかったことを合わせると、*DR3* は発症でなく増悪に関わる疾患遺伝子と考えられた。

RA2 遺伝子であるアンジオポエチン-1 (*Ang-1*) 遺伝子変異は 269Gly を伴う 3 塩基 GGT 挿入変異体で、RA の 83/335 (24.7%) および健常対照者 30/383 (7.8%) に見出された。末梢血の *Ang-1* mRNA を定量すると RA で有意に低下しており ($p<0.01$)、*in vitro* 遺伝子発現系でみると、この変異型遺伝子を導入した場合にはヒト血管内皮の遊走が有意に促進されることが判明した (東北大佐藤研と共同研究)。本遺伝子の対応型はマウスの疾患遺伝子としても見出されており (愛媛大能勢研との共同研究)、アンジオポエチン 1 の遺伝子多型の種を超えての影響が推定される。

RA3 遺伝子は *Dbl* 遺伝子 3'端近くの 223bp (第 23、24 エキソン) のエキソンスキッピング変異で、DNA レベルでは、nt2522+394 (C→T)、nt2632+106 (T→G)、nt2632+211 (A→C) の変異が RA 家系に有意に見出された。*Dbl* 支配下の低分子量 G 蛋白 *cdc42* に対する GEF 機能および活性酸素生成能が有意に低下していた。

D. 考察

今後、見出された3つの疾患遺伝子の病態への寄与を臨床的および分子生物学的に解明すると共に、多因子遺伝の遺伝様式を解明してゆく必要があると思われた。

E. 結論

RAの疾患遺伝子を3つ同定しその分子遺伝学的作用様式と臨床的特徴の一部を解明した。3つの疾患遺伝子すべてが細胞機能にとって大変に重要なシグナル分子であることは、慢性疾患の遺伝素因を考える上で示唆に富む所見であると思われた。

F. 健康危険情報

研究結果からは健康に害となる情報は得られていないが、なかでも第一染色体に位置する疾患遺伝子 *DR3* 変異が存在すると疾病が増悪する傾向が示されているので、当該遺伝子の有無は、個々人の個性すなわちテーラーメイド医療の視点からは、今後国民生活上の重要性を増すものと思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Komai K, Okayama R, Kitagawa M, Yagi H, Chihara K, Shiozawa S. Alternative splicing variants of the human DBL (MCF-2) proto-oncogene. *Biochem Biophys Res Commun* 299 (3): 455-8, 2002.
- 2) Shiozawa K, Hino K, Shiozawa S.

Alternatively-spliced EDA-containing fibronectin in synovial fluid as a predictor of rheumatoid joint destruction.

Rheumatology 40 (7): 739-742, 2001.

- 3) Kawasaki H, Komai K, Ouyang Z, Murata M, Hikasa M, Ohgiri M, Shiozawa S. c-Fos/activator protein-1 transactivates wee 1 kinase at G1/S to inhibit premature mitosis in antigen-specific Th1 cell. *EMBO J* 20 (16): 4618-4627, 2001.
- 4) Goto M, Hanyu T, Yoshio T, Matsuno H, Shimizu M, Murata N, Shiozawa S, Matsubara T, Yamana S, Matsuda T. Intra-articular injection of hyaluronate (SI-6601D) improves joint pain and synovial fluid prostaglandin E2 levels in rheumatoid arthritis: a multicenter clinical trial. *Clin Exp Rheumatol* 19: 377-383, 2001.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

国際出願 PCT/JP03/00089

慢性関節リウマチの疾患感受性遺伝子、そのタンパク質、それらを利用した慢性関節リウマチの発症可能性の判定方法および判定キット、並びに、慢性関節リウマチの治療方法及び治療薬剤

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

RA アミロイドーシスの発症要因に関する研究 —アポリポ蛋白 E の検討—

分担研究者：中野正明
新潟大学医学部保健学科 教授

研究要旨

RA の合併症としては反応性 AA アミロイドーシスが代表的である。一般に重篤な合併症と考えられているが、多数例で予後を解析した成績はまれである。その合併要因の解明は、早期発見・早期治療の面からもきわめて重要であり、RA アミロイドーシスの予後及び発症要因の解明を目的に検討した。76 例を対象にした予後の解析では、75%、50%、25%生存期間はそれぞれ 30、67、100 ヶ月であり、5 年及び 10 年生存率はそれぞれ約 55%、約 22%であり、きわめて予後不良であることが明らかにされた。発症要因については、アポリポ蛋白 E (ApoE) の表現型、遺伝子型について、アミロイドーシス合併 45 例、非合併 49 例を対象に解析した。その結果、合併群、非合併群の順に、ApoE4 ホモ接合体が 3 例、4 例、ApoE4 ヘテロ接合体が 20 例、6 例、非 ApoE4 接合体が 22 例、39 例であり、両群で有意に異なる分布を示した。同様に $\epsilon 4$ の出現頻度は、合併群 (28.9%) で非合併群 (14.3%) より有意に高率であり、RA アミロイドーシスの発症要因として ApoE4 の存在が重要であることが解明された。

A. 研究目的

アミロイドーシスは RA の代表的合併症であるが、上部消化管の粘膜生検によるスクリーニングでは 7~10%程度で認められ、何らかの死因による剖検例での合併率は 20~25%と高率である。腎障害や消化管障害、循環器障害などをきたし一般に重篤な合併症と考えられているが、多数例で予後を解析した成績はまれであり、今回予後解明の目的で検討した。

また、RA におけるアミロイドーシス

の合併要因の解明は、早期発見・早期治療の観点からもきわめて重要であり、これについても検討した。すなわち、脳アミロイドーシスの一種であるアルツハイマー痴呆や透析アミロイドーシスでは、アポリポ蛋白 E (ApoE) 4 との関連が報告されており、今回は RA アミロイドーシスにおける ApoE4 の関連性の有無を検討した。

B. 研究方法

予後調査の対象は新潟大学第二内科で加療した RA 76 例で、性別は男性 9 例、女性 67 例、RA 発症年齢は 20 歳～65 歳、平均 46 歳、アミロイドーシス診断までの罹病期間は 2 年～53 年、平均 15 年、アミロイドーシス診断時の年齢は 28 歳～79 歳、平均 61 歳であった。アミロイドーシス検出の組織生検部位は、上部消化管 52 例、腎臓 23 例などであった (重複あり)。2002 年 10 月 1 日時点での予後調査し、累積生存率を Kaplan-Meier 法により解析した。

合併要因の解明に関しては、同科の RA 症例の血清を用いて ApoE の表現型、遺伝子型を分析した。方法は、2001 年に新たに発売された ApoE4/Pan-ApoE ELISA キット (MBL 社) によった。この方法は、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト ApoE4 モノクローナル抗体による ApoE4 の定量と、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト ApoE ポリクローナル抗体による ApoE 総量の定量を同一 ELISA プレートで行い、ApoE4 の定量値と ApoE 全体の定量値の比を求め、両者の比が 1 であれば ApoE4 のホモ接合体、0.5 であれば ApoE4 ヘテロ接合体、0 であれば非 ApoE4 接合体と判定する測定キットである。

C. 研究結果

(1) 予後調査結果

最終時点での生存は 28 例、死亡が 48 例であった。末期腎不全に至り血液透析に導入された症例は半数の 38 例であった。76 例のアミロイドーシス合併判明後

の 75%、50%、25%生存期間は順に 30 カ月、67 カ月、100 カ月であり、5 年及び 10 年生存率は順に約 55%、約 22%であった (図 1)。さらに、76 例をアミロイドーシス合併診断年で 1992 年末までの 29 例と 93 年以後の 47 例に分けて比較した。その結果、前者の 75%、50%、25%生存期間は順に 21 カ月、64 カ月、81 カ月であり、後者の 75%、50%生存期間は順に 28 カ月、82 カ月であった。すなわち、92 年までの群の 25%生存期間と 93 年以後の群の 50%生存期間がほぼ類似しており、最近の症例で予後が改善している可能性が示唆された (表 1)。ちなみに、1992 年までの群は 1 例を除きすでに死亡していたが、1993 年以降の群では半数以上の 27 例が未だ生存中であった。

(2) ApoE の検討結果

ELISA 法での ApoE 表現型の検討は、アミロイドーシス合併 45 例と非合併 49 例を対象とした。合併群、非合併群の順に、ApoE4 のホモ接合体が 3 例、4 例、ApoE4 ヘテロ接合体が 20 例、6 例、非 ApoE4 接合体が 22 例、39 例であり、両群で有意に異なる分布を示した ($p=0.0022$) (図 2)。なお、MBL 社による健常人 135 例での検討では、ApoE4 のホモ接合体、ヘテロ接合体、非 ApoE4 接合体の順に 3 例、19 例、113 例であり、この分布は合併群とは有意差を認めたが ($p<0.0001$)、非合併群とは差がなかった ($p=0.174$)。さらに合併群と非合併群とで $\epsilon 4$ の出現頻度を比較した結果、合併群 (28.9%) が非合併群 (14.3%) より有意に高かった ($p=0.0145$) (図 3)。MBL 社の健

常人 135 例での $\epsilon 4$ の陽性頻度は 9.3% であり、合併群の頻度はこれより有意に高かったが ($p=0.0145$)、非合併群と健常人とでは差がなかった ($p=0.1661$)。

D. 考察

今回の検討により、最近やや改善はあるものの、RA アミロイドーシスの予後が未だ不良であることが改めて確認された。RA アミロイドーシスの予後は、RA におけるアミロイドーシス合併の認識の広まり、胃や十二指腸などの上部消化管粘膜生検によるアミロイドーシス合併早期発見例の増加、合併例に対するステロイドや免疫抑制薬の積極的使用などにより改善傾向にあると思われる。メトトレキサートの使用拡大や今後の各種生物製剤の導入による改善も期待され、アミロイドーシスに関する調査研究班では、RA アミロイドーシスの治療抵抗例を対象に、抗 IL-6 受容体抗体の有用性を確認する多施設研究を予定している状況である。加えて、RA におけるアミロイドーシスの合併要因が解明されれば、さらなる予後の改善が期待されるため、この方面の研究はきわめて重要と思われる。

今回検討した ApoE には 2、3、4 の表現型があり、その対立遺伝子は $\epsilon 2$ 、3、4 であるが、脳アミロイドーシスであるアルツハイマー痴呆では $\epsilon 4$ の陽性頻度が高く、非 ApoE4 接合体、ApoE4 ヘテロ接合体、ApoE4 ホモ接合体の順に、発病年齢が若年化するなど、アミロイドーシス発症と ApoE4 との濃厚な関連性が明らかにされている。病態としては、ApoE4

は前駆蛋白の凝集促進やアミロイド物質の線維化促進と関連すると考えられており、ApoE4 はアルツハイマー痴呆発病の危険因子あるいは促進因子と考えられている。透析アミロイドーシスと ApoE4 との関連も報告されており、ApoE4 はこれらのアミロイドーシスの発症要因として重要と考えられている。

RA アミロイドーシスの発症要因に関しては、1980 年代より HLA の検討がいくつか行われたが、意義深い結果は得られていない。我々は 1996 年、等電点電気泳動により ApoE について検討し、ApoE4 との関連を報告した。他の施設での追試の結果は一定ではないが、今回の結果からは ApoE4 の存在がやはり重要と考えられた。ただし、今回の検討を含めて、RA アミロイドーシスにおける ApoE の関連を検討したこれまでの報告は、アミロイドーシス合併群、非合併群とも 50 症例前後の少数例での検討であり、結果が一致しないのは少ない症例数が関係している可能性も十分考えられる (表 2)。

RA アミロイドーシスの発症要因としては、他に前駆蛋白である血清アミロイド A 蛋白 (SAA) の主たるサブタイプである SAA1 のプロモーター領域 -13T アリルの重要性が報告されている。これについては、いくつかの追試でも類似した成績が報告されており、きわめて注目すべき知見と思われる。

今回の結果を踏まえて、共同研究を含めて検討症例数を増やすこと、ApoE 表現型や遺伝子型とアミロイドーシスの病

型や重症度との関連を検討すること、ApoE 表現型、遺伝子型と SAA1-13T アリルとの相互関係を検討することなどが今後の課題として挙げられる。

E. 結論

RA アミロイドーシス 76 例の予後を調査し、RA アミロイドーシスの予後が不良であり、アミロイドーシスが RA における重篤な合併症であることが確認された。さらに、アミロイドーシス合併 RA 45 例、非合併 RA 49 例を対象に ApoE の表現型、遺伝子型を検討し、RA におけるアミロイドーシスの合併要因として ApoE4 の存在が重要であることを確認した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 黒田 毅, 原田 隆, 村上修一, 伊藤 聡, 中野正明, 下条文武. アミロイドーシス合併 RA の治療と予後の解析. 新潟医学会誌 (印刷中).

2. 学会発表

1) 黒田 毅, 原田 隆, 村上修一, 伊藤 聡, 中野正明, 下条文武. 関節リウマチ 最近の進歩 アミロイドーシス合併例の治療と予後の解析. 第 584 回新潟医学会発表 (2002 年 10 月).

2) 中野正明, 原田 隆, 村上修一, 長谷川尚, 黒田 毅, 伊藤 聡, 下条文武. RA アミロイドーシスの発症要因に関

する研究—アポリポ蛋白 E の検討—
第 9 回動脈硬化症成因治療研究会発表
(2003 年 3 月).

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1. 累積生存率と観察期間

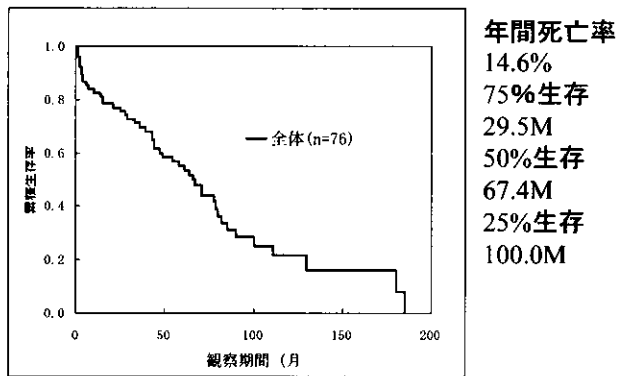


表1. アミロイドーシス診断年代別の生存率の比較

検討日	1992年まで (n=29)	1993年以降 (n=47)
75%生存	21ヶ月	28ヶ月
50%生存	64ヶ月	82ヶ月
25%生存	81ヶ月	

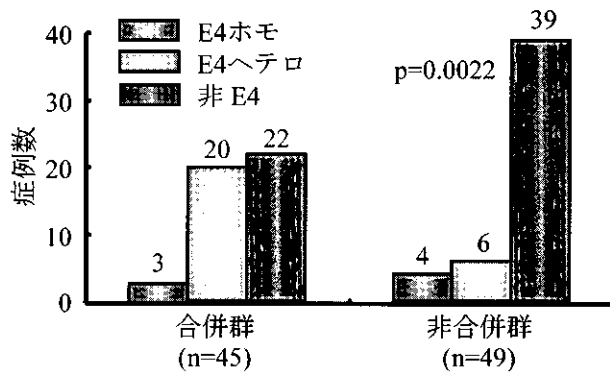


図2. ELISA 法による検討結果

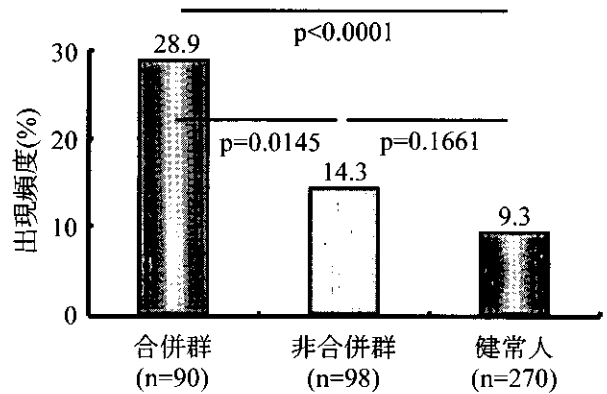


図3. 各群のε4の出現頻度の比較

表2. 既報におけるアミロイドーシスの有無による ApoE の allele frequency の比較

報告者	群	ε 2	ε 3	ε 4	p
Hasegawa (1996)	合併群 (n=35)	3	81	16	<0.05
	非合併群 (n=65)	3	90	7	
Korpela (1998)	合併群 (n=27)	6	81	13	n.s.
	非合併群 (n=71)	3	77	20	
奥田 (1999)	合併群 (n=61)	5	85	10	n.s.
	非合併群 (n=51)	8	86	6	
Maury (2001)	合併群 (n=55)	5	73	23	<0.05
	非合併群 (n=55)	2	86	13	

NKT 細胞による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

本研究では、1) 関節リウマチ (RA) における早期診断の指標として NKT 細胞がなりうるかどうか？ 2) RA における NKT 細胞低下の原因は何か？ 3) NKT 細胞を介した関節炎の制御が可能かどうか？ を明らかにすることを目的とした。結果として、1) RA 患者末梢血では、NKT 細胞は有意に低下しているが、活動性と相関している症例も見られる。2) 可溶性 CD1d 分子の低下と NKT 細胞の減少に関連性が認められた。3) コラーゲン誘導関節炎モデルマウスでは、NKT 細胞の抗原を投与することにより、IL-4 産生が優勢となり結果として関節炎が制御された。以上より、NKT 細胞が RA の早期診断、分子治療の標的と成りうることが示唆された。

A. 研究目的

自己免疫病モデルマウスの研究から、NKT 細胞は自己免疫病をネガティブに制御する調節性 T 細胞であることが示唆されている。昨年までの研究により、フローサイトメトリー法を用いてヒトの NKT 細胞を測定する方法を確立し、関節リウマチ (RA) において NKT 細胞が減少していることを明らかにしてきた。さらに、その減少の機序として、1) 抗原量の不足、2) NKT 細胞の機能異常、3) 可溶性 CD1d 分子などのバリエーションの存在、を明らかにしてきた。そこで、本研究では、1) NKT 細胞が RA の早期診断のマーカーに成りうるか否かを検討すること、2) NKT 細胞と可溶性 CD1d 分子

との関連を検討すること、3) NKT 細胞を介した RA の治療が可能か否かを検討することを目的とした。

B. 研究方法

1) RA と健常人の末梢血中 double negative (DN) TCR α V24⁺ β V11⁺NKT 細胞数を 5 カラーのフローサイトメトリーを用いて定量した。さらに、NKT 細胞量と RA の活動性との関連を検討した。
2) RA と健常人の血清中の可溶性 CD1d 分子を TaqMan PCR 法を用いて mRNA レベルで定量した。さらに、蛋白レベルで可溶性 CD1d を測定するために、ウサギにキャリア蛋白をつけた合成ペプチド (QDLWTSQSGSQDFSPG) を免疫しポリク

ローナルな抗体を作成した。Western ブロット法あるいは ELISA 法にて可溶性 CD1d 分子を測定するシステムを開発する。

3) RA の動物モデルであるコラーゲンタイプ II 誘導関節炎モデルマウス (CIA) を用いて、免疫時に α -GalCer20 μ g を投与することにより関節炎への影響、IL-4、IFN- γ 産生、NKT 細胞数について検討した。

C. 研究結果

1) 6 名の RA 患者について 1 年後の末梢血中 NKT 細胞量について解析した結果、活動性の低下した 1 例の RA 患者において、NKT 細胞は増加していた (18.6 \rightarrow 44.4 $\times 10^5$ リンパ球)。

2) TaqMan PCR 法を用いた mRNA の定量では、血清中の可溶性 CD1d 分子は RA において (2.0 \pm 0.33)、健常人 (6.9 \pm 2.08) と比較して優位に減少していた ($p < 0.05$)。可溶性 CD1d 分子に対するポリクローナル抗体を Western ブロット法にて検定したところ、可溶性 CD1d に特異的に反応することが判明した。現在蛋白レベルで可溶性 CD1d を測定するために、ELISA のシステムをセットアップしている。

3) CIA において、コラーゲンタイプ II と同時に α -GalCer を免疫すると、関節炎の発症率が 90% から 60% に減少した。また、病理学的解析である関節係数は、軽度改善していた。in vitro の解析では、 α -GalCer 投与により、IL-4 産生が上昇し、IFN- γ 産生は低下していた。Taq-Man

PCR 法を用いた NKT 細胞 (TCR α V14⁺NKT 細胞) の量的解析では、 α -GalCer 投与マウスにおいて、NKT 細胞がむしろ減少していた。

D. 考察

NKT 細胞は RA の活動性と相関している症例がいることが判明した。可溶性 CD1d 分子は RA で減少していることから、通常 NKT 細胞を増加する機能を有し、その低下により NKT 細胞の減少を誘導していると考えられる。蛋白での定量解析が待たれる。CIA モデルマウスにおいては、NKT 細胞の抗原である α -GalCer の投与により IL-4 産生が優位となり関節炎を抑制することが判明した。

E. 結論

NKT 細胞は一部の RA 症例において活動性と関連し、減少の一原因は可溶性 CD1d 分子の低下であると考えられた。マウスモデルでは、 α -GalCer 投与による関節炎の制御が可能であった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Shimizudani N, Murata H, Keino H, Kojo S, Nakamura H, Morishima Y, Sakamoto T, Ohtsuka M, Sekisawa K, Sumida M, Sumida T, and Matsuoka K. Conserved CDR3 region of TCR β V gene in bronchoalveolar

lavage fluid lymphocytes from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Clin Exp Immunol 129: 140-149, 2002.

- 2) Murata H, Matsumura R, Koyama A, Sugiyama T, Sueishi M, Shibuya K, Tsutsumi A, and Sumida T. T cell receptor repertoire of T cells in the kidney from patients with lupus nephritis. Arthritis Rheum 46: 2141-2147, 2002.
- 3) Ohnishi Y, Tsutsumi A, Sakamaki T, Sumida T. T cell epitopes of type II collagen in HLA-DRB1*0101 or DRB1*0405-positive Japanese patients with rheumatoid arthritis. Int J Mol Med 11 (3): 331-335, 2003.
- 4) Yoshida K, Tsutsumi A, Onishi Y, Akimoto T, Murata H, and Sumida T. T cell epitopes on prothrombin in patients with antiphospholipid syndrome. Ann Rheum Dis, in press.
- 5) Koji S, Tsutsumi A, Goto D, Sumida T. Low expression levels of soluble CD1d gene in patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol, revising.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

間葉系幹細胞としての滑膜線維芽細胞についての研究 —RA 早期診断と早期治療への応用—

主任研究者：江口勝美

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 病態解析・制御学講座 (第一内科) 教授

研究要旨

関節に存在する滑膜線維芽細胞は骨髄由来間葉系幹細胞といくつかの類似点を有している。滑膜線維芽細胞は骨髄由来間葉系幹細胞と同様な条件下で分化誘導を行うと、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞様細胞へと分化誘導させることができた。滑膜線維芽細胞は PPAR γ アゴニスト刺激で脂肪細胞様細胞へ分化誘導されるが、この分化誘導は関節リウマチ、変形性関節症、正常者由来のいずれの線維芽滑膜細胞でも同様に検出された。滑膜線維芽細胞は脂肪細胞様細胞へ分化することにより、NF- κ B 活性化及び IL-6、IL-8 と MMP-3 産生は著しく低下した。PPAR γ アゴニスト刺激による滑膜線維芽細胞の脂肪細胞様細胞への分化は C/EBP 活性化が重要な役割を果たしていた。TNF α 、IL-1 β 、IFN γ は脂肪細胞様細胞への分化を抑制し、これは C/EBP 活性化の抑制を介していた。また、IFN γ 刺激は PPAR γ 発現を抑制した。

以上の結果より、RA 滑膜組織では TNF α 、IL-1 β 、IFN γ などの炎症性サイトカインが滑膜線維芽細胞の分化を阻止し、未分化状態を維持し、この未分化状態が滑膜細胞増殖や軟骨・骨破壊促進に関与している。この未分化状態維持を規定している分子機構の解明が、RA の早期診断や臨床経過の予知に有用な手段を与えてくれる。

A. 研究目的

私たちは滑膜線維芽細胞が骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞へ分化できることを確認し、これらの分化能は皮膚の線維芽細胞では認めないため、滑膜細胞に特徴的な機能のひとつであると結論した。この滑膜線維芽細胞は、いくつかの点で間葉系幹細胞に類似した特徴と機能を持った機能である。

今回、滑膜線維芽細胞が脂肪細胞様細胞へ分化させる系において、サイトカインの影響について研究し、この結果が関節リウマチ (RA) の早期診断や臨床経過の予測への関わりについて検討した。

B. 研究方法

1. 滑膜線維芽細胞はインフォームド・コンセント下に採取された滑膜組織を酵素

処理して単離した。5 継代後の細胞を滑膜線維芽細胞として使用した。

2. 滑膜線維芽細胞を PPAR γ アゴニスト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、脂肪細胞様細胞は Oil red O 染色で確認した。

3. 滑膜線維芽細胞及びトログリタゾンで誘導された脂肪細胞様細胞の IL-6、IL-8、MMP-3 産生は ELISA で、NF- κ B 活性は EMSA で検出した。

4. トログリタゾンと同時に、TNF α 、IL-1 β 、IFN γ を加え、脂肪細胞様細胞への分化、C/EBP 核内移行 (EMSA) と PPAR γ 発現 (ウェスタン・ブロット) への影響を検討した。

C. 研究結果

1. 滑膜線維芽細胞はトログリタゾン添加により脂肪細胞様細胞への分化が誘導され、これは RA、変形性関節症及び外傷症例由来 (正常) の滑膜線維芽細胞でも同様に認められた。

2. トログリタゾンで誘導された脂肪細胞様細胞は無刺激培養滑膜線維芽細胞に比較して、培養上清中の IL-6、IL-8、MMP-3 産生は有意に低下し (図 1-1)、NF- κ B 活性化も低下した (図 1-2)。

3. 滑膜線維芽細胞の C/EBP 核内移行はトログリタゾン刺激で誘導された。

4. TNF α 、IL-1 β 、IFN γ 共存下ではトログリタゾン誘導脂肪細胞様細胞への分化 (図 2-1) と C-EBP 核内移行は顕著に抑制された (図 2-2)。

5. IFN γ 処置 6 時間で、PPAR γ 発現が著明に抑制された。しかし、TNF α あるいは

IL-1 β は PPAR γ 発現を抑制しなかった。

D. 考察

滑膜線維芽細胞は PPAR γ アゴニスト刺激で脂肪細胞様細胞へ分化しうること、また、この過程には C/EBP 活性化が重要であることが示唆された。TNF α 、IL-1 β 、IFN γ は脂肪細胞様細胞への分化を抑制したが、これも C/EBP 経路を介すると考えられた。脂肪細胞様細胞の NF- κ B 活性及び IL-6、IL-8、MMP-3 産生は滑膜線維芽細胞に比較して有意に低下した。TNF α 、IL-1 β 、IFN γ は RA 滑膜組織の炎症性病態形成に重要であり、これら液性因子は滑膜線維芽細胞の未分化状態を維持し、この未分化状態が滑膜細胞増殖や軟骨・骨破壊促進に関与していることが示唆された。この未分化状態の維持を規定している分化機構の解明が RA の早期診断や臨床経過の予測に有用であることが示唆される。

E. 結論

TNF α 、IL-1 β 、IFN γ は RA 滑膜組織の炎症性病態形成に重要である。さらに、これらの液性因子は滑膜線維芽細胞の未分化状態を維持し、この未分化状態が滑膜細胞増殖や軟骨・骨破壊促進に関与していることが示唆された。今後は、シグナルクロストークを含め、分子機序を詳細に検討し、滑膜線維芽細胞の分化・未分化状態維持の Key molecule の同定を試みる予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tamada Y, Nakao K, Nagayama Y, Nakata K, Ichikawa T, Kawamata Y, Ishikawa H, Hamasaki K, Eguchi K, Ishii N. Lmp48 Overexpression enhances interferon-mediated expression and activity of double-stranded RNA-dependent protein kinase in human hepatoma cells. *J Hepatol* 37 (4): 493-499, 2002.
- 2) Takino H, Yamasaki H, Abiru N, Sera Y, Abe T, Kawasaki E, Yamaguchi Y, Eguchi K, Kanazawa Y, Nagataki S. Antibodies to GAD in Japanese patients classified as Type 2 diabetes at diagnosis. High titre of GAD Ab is a predictive marker for early insulin treatment-report of west Japan (Kyushu, Yamaguchi, Osaka) study for GAD Ab(+) diabetes. *Diabet Med* 19 (9): 730-734, 2002.
- 3) Miyazoe S, Hamasaki K, Nakata K, Kajiya Y, Kitajima K, Nakao K, Daikoku M, Yatsushashi H, Koga M, Yano M, Eguchi K. Influence of interleukin-10 gene promoter polymorphisms on disease progression in patients chronically infected with hepatitis B virus. *Am J Gastroenterol* 97 (8): 2086-2092, 2002.
- 4) Ohkubo K, Kato Y, Ichikawa T, Kajiya Y, Takeda Y, Higashi S, Hamasaki K, Nakao K, Nakata K, Eguchi K. Viral load is a significant prognostic factor for hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Cancer* 94 (10): 2663-2668, 2002.
- 5) Yamasaki S, Nakashima T, Kawakami A, Miyashita T, Ida H, Migita K, Nakata K, Eguchi K. Functional changes in rheumatoid fibroblast-like synovial cells through activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ -mediated signalling pathway. *Clin Exp Immunol* 129 (2): 379-384, 2002.
- 6) Sun F, Akazawa S, Sugahara K, Kamihira S, Kawasaki E, Eguchi K, Koji T. Apoptosis in normal rat embryo tissues during early organogenesis: the possible involvement of Bax and Bcl-2. *Arch Histol Cytol* 65 (2): 145-157, 2002.
- 7) Degawa-Yamauchi M, Uotani S, Yamaguchi Y, Takahashi R, Abe T, Kuwahara H, Yamasaki H, Eguchi K. Ethanol inhibits leptin-induced STAT3 activation in Huh7 cells. *FEBS Lett* 525 (1-3): 116-120, 2002.
- 8) Kawakami A, Hida A, Yamasaki S, Miyashita T, Nakashima K, Tanaka F, Ida H, Furuyama M, Migita K, Origuchi T, Eguchi K. 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): 26-31, 2002.
- 9) Nakao K, Nakata K, Ohtsubo N, Maeda