

た。一方、FNあるいはTHのいずれかがYAM70%未満となる割合は75歳以上では約80%であり椎体骨折有病率より高率であった。

②RA群とnonRA/CTD群との比較：RA群はnonRA/CTD群に比して骨粗鬆症が多くみられる(RA:53.3%, nonRA:35.9%, $p < 0.001$)。年齢を考慮し両群のBMD Z scoreを比較すると、RA群ではLS: -0.2 ± 1.0 , FN: -0.5 ± 1.3 , TH: -0.6 ± 1.2 、一方nonRA/CTD群ではLS: -0.1 ± 1.1 , FN: 0.0 ± 1.2 , TH: 0.0 ± 1.1 であった。FNおよびTHのZ scoreではRA群はnonRA/CTD群に比べて有意($p < 0.001$)に低値であるが、LSでは有意な差は認められなかった。

③骨密度Z scoreのRA Stage, Class別分散分析：骨密度Z scoreのRA Stage別分散分析では、どの部位の骨密度Z scoreもStageが進むにつれて低下する傾向がみられるが、p値はLS: 0.185 , FN: < 0.001 , TH: < 0.001 であり、大腿骨でStageの進行による有意な低下がみられた。RA Class別分散分析も同様にClassが進むにつれZ scoreは低下する傾向がみられるものの、有意な低下はFN($p < 0.001$)とTH($p < 0.001$)であり、LS($p < 0.121$)では有意差はみられなかった。

④骨密度T scoreを目的変数とした重回帰分析：FNおよびTHのT scoreを目的変数とすると年齢、体重、ステロイド投与の有無以外にRAのStage, ClassやRAの炎症マーカーであるCRPが説明因子として抽出されたが、LSではこれらのRAに関わる因子は抽出されなかった。

D. 考察

RAでは、加齢、グルココルチコイド(GC)の使用、身体活動性の低下、炎症など複数の成因が骨粗鬆症の病態をより複雑化、重症化させている。QOLを低下さ

せる骨折を予防するためにはより早い段階から骨折リスクの高い患者に対しての骨粗鬆症治療が必要である。しかし、腰椎骨密度のみで骨粗鬆症判定をすると、75歳以上では骨粗鬆症と診断されるより多くの患者が既に椎体骨折を有しており骨粗鬆症診断が骨折予防に繋がらない。大腿骨骨密度で診断すればこうしたこと回避し得る。また、RA患者はより多くのGCを投与されているnonRA/CTD患者に比して骨粗鬆症が多くみられるが、これはRA患者のFNやTHの骨密度が有意に低下しているためであり、LS骨密度では有意な差はみられない。また、RAの病期や機能障害度の進行につれて大腿骨骨密度は腰椎に比べて明らかな低下を示す。さらに、RAの病期や機能障害度は大腿骨骨密度低下の説明因子として抽出されるが、腰椎骨密度低下は説明し得ない。以上より、RAの骨粗鬆症は多因子によるが、中でも関節障害による身体活動性低下が大きく寄与しており、これは大腿骨骨密度の低下に如実に現れていると考えられる。

E. 結論

RAに特徴的な骨密度の低下は腰椎よりむしろ大腿骨近位部がより強く反映しており、RA患者の骨粗鬆症判定には大腿骨近位部の骨密度の評価が重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

・中山久徳、當間重人ほか、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；139-147, 2002

・中山久徳 関節リウマチとステロイド性骨粗鬆症：Osteoporosis Japan 12(2) 144-149, 2004.

・中山久徳 関節リウマチ患者の骨粗鬆症の臨床的実態とその治療：Osteoporosis Japan 12(2) 184, 2004.

・Nakayama H, Hagiwara F, Tohma S.

Bone mineral density and frequency of osteoporosis and vertebral fractures in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50 S498,2004

・ Nakayama H, Hagiwara F, Tohma S. The efficacy of alendronate, risedronate and etidronate in treatment of osteoporosis and in reducing the risk of vertebral fractures of rheumatoid arthritis patients(fracture intervention trial). *Arthritis Rheum* 50 S498,2004

2. 学会発表

・ 中山久徳、萩原 太、當間重人、越智隆弘ほか. リウマチ疾患においてグルココルチコイドが骨代謝に及ぼす影響に関する検討. 2004/4/17 第 48 回日本リウマチ学会

・ 中山久徳、萩原 太、當間重人、越智隆弘ほか. 関節リウマチ患者に対する各種骨粗鬆症薬介入の効果 (第 2 報) . 2004/4/17 第 48 回日本リウマチ学会

・ 中山久徳、萩原 太、當間重人、越智隆弘ほか. 関節リウマチ患者にみられる骨粗鬆症の臨床的実態. 2004/8/6 第 22 回日本骨代謝学会

・ 中山久徳、萩原 太、當間重人、越智隆弘ほか. 関節リウマチ患者に対する各種骨粗鬆症薬介入の効果 (2 年間の成績、新規骨折抑制効果と脱落率) . 2004/8/7 第 22 回日本骨代謝学会

・ 中山久徳、萩原 太、當間重人、越智隆弘ほか. 関節リウマチ患者にみられる骨粗鬆症の臨床的実態とその治療. 2004/9/4 第 14 回日本リウマチ学会近畿支部学術集会

・ Nakayama H, Hagiwara F, Tohma S. Bone mineral density and prevalence of osteoporosis and vertebral fractures in Japanese patients with rheumatoid

arthritis. 2004/9/11 APLAR (Jeju, Korea)

・ Nakayama H, Hagiwara F, Tohma S. Bone mineral density and frequency of osteoporosis and vertebral fractures in Japanese patients with rheumatoid arthritis. 2004/10/16 ACR (Sanantonio, USA)

・ Nakayama H, Hagiwara F, Tohma S. The efficacy of alendronate, risedronate and etidronate in treatment of osteoporosis and in reducing the risk of vertebral fractures of rheumatoid arthritis patients (fracture intervention trial). 2004/10/16 ACR (Sanantonio, USA)

・ 中山久徳、萩原 太、當間重人、越智隆弘ほか. 関節リウマチと骨粗鬆症. 2004/11/19 第 6 回日本骨粗鬆症学会

・ 中山久徳、萩原 太、當間重人、越智隆弘ほか. 関節リウマチ患者に対する各種ビスフォスフォネート製剤介入の効果. 2004/11/20 第 6 回日本骨粗鬆症学会

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

II) RA 骨吸収亢進病態解明研究

ヒト破骨細胞形成に関する研究

分担研究者 高橋 直之 松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授

研究要旨：PGE₂は、骨芽細胞の破骨細胞分化因子(RANKL)を誘導することは広く知られているが、破骨細胞前駆細胞に対しても強力に作用する。今回我々は、マウスとヒト破骨細胞形成における PGE₂ の作用を解析し、マウスとヒトの破骨細胞形成に対して、PGE₂ は異なる作用を有することを明らかにした。PGE₂ は、RANKL が誘導するマウス破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を促進した。PGE₂ は、マウス破骨細胞前駆細胞のシグナル伝達因子 TAK1 (TGF-β activated kinase 1) のリン酸化を誘導して、RANKL 誘導性の破骨細胞形成を促進した。一方、ヒト破骨細胞前駆細胞の培養系において、PGE₂ は RANKL が誘導するヒト破骨細胞形成を強力に抑制した。ヒト破骨細胞前駆細胞は、PGE₂ に反応して、破骨細胞形成を抑制する新規のサイトカインを産生することが示された。

A. 研究目的

骨吸収を司る破骨細胞の分化と機能は、骨芽細胞/骨髄間質細胞により調節されている。最近、骨芽細胞/骨髄間質細胞の細胞膜上に発現し破骨細胞の分化と機能を調節する破骨細胞分化因子(RANKL, receptor activator of NF-κB ligand)がクローニングされ、骨芽細胞/骨髄間質細胞による破骨細胞の分化と機能誘導機構が解明された。破骨細胞とその前駆細胞は、RANKL の受容体 RANK (receptor activator of NF-κB) を発現し、細胞間接触を介して RANKL を認識し、破骨細胞に分化する。

我々は、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子(TNF-α)とインターロイキン 1(IL-1)は、RANKL-RANK を介さず、直接破骨細胞の分化と骨吸収活性を誘導することを明らかにした。これらの知見は全て、マウスの細胞をもちいた解析より得られたものである。従来、ヒト骨髄細胞や造血系細胞を用いた培養系で、ヒト破骨細胞の形成機構は研究されてきたが、いくつかの疑問点が残る。とりわけ、プロスタグランジン E₂ (PGE₂)の作用機構に差異がある可能性が指摘される。PGE₂ は骨芽細胞の RANKL 発現を誘導することは広く知られているが、破骨細胞前駆細胞に対しても強力に作用する。マウス

の破骨細胞培養系では、PGE₂ は cAMP 依存性タンパク質リン酸化酵素 PKA の活性化を介し、RANKL が誘導するマウス破骨細胞前駆細胞の破骨細胞への分化を、更に促進する。一方、リウマチ患者に PG 合成酵素 (COX2) 阻害剤を投与しても、骨吸収抑制が認められにくいことも知られる。今回我々は、マウスとヒト破骨細胞形成における PGE₂ の作用を解析した。

B. 研究方法

(1)ヒト破骨細胞の形成実験：ヒト末梢血より、Ficoll-Paque 遠心法で単核細胞を分取した。CD14 抗体ビーズ使い、ヒト末梢血単核細胞より CD14 陽性細胞を分取し、破骨細胞前駆細胞として用いた。CD14 陽性細胞をマクロファージコロニー刺激因子

(M-CSF) や RANKL の存在下あるいは非存在下で、7日間培養した。また、ヒト副甲状腺ホルモン(PTH)受容体を発現させた SaOS4/3 細胞と CD14 陽性細胞の共存培養を行った。ヒト破骨細胞形成に及ぼす PGE₂ の作用を解析した。

(2)マウス破骨細胞の形成実験：8週齢マウスから得た骨髄細胞を M-CSF の存在下で培養して得られた骨髄由来マクロファージ、およびマクロファージ細胞株 RAW264 細胞を、破骨細胞前駆細胞として用いた。骨髄由来マクロファージあるいは RAW264 細胞

を RANKL の存在下あるいは非存在下で 7 日間培養した。PGE₂ の作用機構の解明は、PGE₂ 受容体の解析、シグナル伝達系の解析、各種遺伝子の強制発現等により行った。破骨細胞形成を評価するため、培養後、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色、あるいはビトロネクチン染色を施した。

(倫理面への配慮)

ヒト末梢血採取に当たっては、十分なインフォームドコンセントを得た。また、マウスの飼育や処置などは、松本歯科大学動物管理委員会の管理の下で行った。

C. 研究結果

①マウスの骨髄マクロファージやマクロファージ細胞株 RAW264 細胞を、RANKL で処理すると破骨細胞に分化する。この破骨細胞形成を、PGE₂ は濃度依存的に促進した。骨髄マクロファージと RAW264 細胞は、PGE₂ 受容体 EP2 と EP4 を発現していた。PGE₂ による破骨細胞形成促進効果は、cAMP 依存性タンパク質リン酸化酵素 PKA の活性化により誘導された。②RANK シグナルを伝達する分子を解析し、TGF-β activated kinase 1 (TAK1) が、PKA がリン酸化するモチーフ (RRXS) を有することを見出した。TAK1 は、PGE₂ 刺激でリン酸化され、H89 (PKA 阻害剤) は、そのリン酸化を抑制した。③412 番目の Ser を Ala に置換した S412A-TAK1 を発現させた RAW264 細胞では、破骨細胞形成における PGE₂ の促進作用が消失した。④PGE₂ は、RANKL および M-CSF が誘導するヒト CD14 陽性細胞から破骨細胞への分化を強力に抑制した。H89 は、PGE₂ による抑制作用を解除した。また、CD14 陽性細胞は EP2 と EP4 を発現しており、PGE₂ は CD14 陽性細胞における cAMP 産生を促進した。⑤PTH 受容体を導入したヒト骨芽細胞株 SaOS4/3 細胞と CD14 陽性細胞の共存培養系において、PTH はヒト破骨細胞形成を促進した。この PTH 誘導性破骨細胞形成も PGE₂ は強力に抑制した。⑥CD14 陽性細胞は PGE₂ に反応して、強力な破骨細胞形成抑制因子を産生した。この抑制因子は、ヒト破骨細胞のみならずマウス破骨細胞形成も強力に抑制した。⑦CD14 陽性細胞が産生する破骨細胞形成抑制因子は、破骨細胞形成を抑制することが知られている既知のサイトカイン (GM-CSF, IL-4, INF- γ) ではなく、新規のサ

イトカインである可能性が示された。

D. 考察

末梢血単核細胞より得られた CD14 陽性細胞を用いて、試験管内でヒト破骨細胞が効率的に形成されることが明らかとなった。末梢血 CD14 陽性細胞から破骨細胞への分化誘導には、RANKL とともに M-CSF が必要であった。昨年報告したように、マウスの破骨細胞形成と同様に、ヒト破骨細胞形成も p38 mitogen-activated protein kinase の特異的阻害剤である SB203508 により強力に抑制されるため、ヒト破骨細胞形成もマウスと同様なシグナル系が重要な役割を有していると考えられた。しかし本実験より、マウスとヒトの破骨細胞形成に対して、PGE₂ は逆の作用を有することが示された。マウスの場合、破骨細胞前駆細胞の TAK1 をリン酸化して RANKL 誘導性の破骨細胞形成を促進した。一方、ヒトの破骨細胞前駆細胞は PGE₂ に反応して破骨細胞形成を抑制する新規のサイトカイン (破骨細胞形成抑制因子) を産生する可能性が示された。現在そのサイトカインの同定を行っている。これら知見は、骨吸収を抑制することを目的に、COX2 阻害剤をヒトに投与しても、骨吸収抑制が認められにくいことと一致するかもしれない。

E. 結論

PGE₂ は、マウスとヒト破骨細胞形成に対して、逆の作用を有していた。マウスの場合、破骨細胞前駆細胞の TAK1 をリン酸化して、RANKL 誘導性破骨細胞形成を促進した。一方、ヒトの破骨細胞前駆細胞は、PGE₂ に反応して、破骨細胞形成を抑制する新規サイトカインを産生することが示された。

(健康危険情報)

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 奥村茂樹、宇田川信之、高橋直之：概論破骨細胞の分化・骨吸収調節機構、日本臨床 62(増刊 2): 90-96, 2004.
2. 宇田川信之、中村美どり、高橋直之：破骨細胞分化因子 RANKL、日本臨床 62(増刊 2): 97-101, 2004.
3. 中道裕子、高橋直之：骨のリモデリングと骨粗鬆症、カレントセラピー、22

- (3):214-217, 2004.
4. 高橋直之、小澤英浩：抗 RANKL 抗体 AMG162 による骨粗鬆症の治療、*Clinical Calcium*, 15(1): 43-48, 2005.
 5. 溝口利英、高橋直之：目で見る Bone Biology「破骨細胞の分化と機能調節機構」骨粗鬆症治療, 4(1):2-5, 2005.
 6. Suda K, Udagawa N, Sato N, Takami M, Itoh K, Woo JT, Takahashi N, Nagai K: Suppression of osteoprotegerin expression by PGE₂ is crucially involved in LPS- induced osteoclast formation. *J Immunol* 172:2504-2510, 2004.
 7. Sato N, Suda K, Takahashi N, Nakamura M, Kobayashi Y, Takada H, Shibata K, Takeda K, Akira S, Noguchi T, Udagawa N.: MyD88 is an essential molecule in osteoclastogenesis induced by lipopolysaccharide, diacyl lipopeptide and IL-1 α , and MyD88 knockout mice exhibit a low turnover osteoporotic phenotype. *J Exp Med* 200:601-611, 2004.
 8. Kobayashi Y, Mizoguchi T, Take I, Kurihara S, Udagawa N, Takahashi N: Cyclic AMP/protein kinase A signals enhance osteoclastic differentiation through TAK1 in osteoclast precursors. *J Biol Chem*, in press, 2005
 9. Mizoguchi T, Nagasawa S, Takahashi N, Ygasaki H, Ito M: Dolomite supplementation improves bone metabolism through modulation of calcium-regulating hormone secretion in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab*, in press, 2005.
 10. Namikawa T, Terai H, Suzuki E, Hoshino M, Toyoda H, Nakamura H, Takahashi N, Nimomiya T, Takaoka K: Experimental spinal fusion with recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered by a synthetic polymer and beta-tricalcium phosphate in a rabbit model. *Spine*, in press, 2005.
 11. Takahashi N, Udagawa N, Kobayashi Y, Suda T: Generation of osteoclasts in vitro, and assay of osteoclast activity. In "Arthritis Research: Methods and Protocols" ed by Cop A, Humana Press, Totowa, New Jersey, in press, 2005.
2. 学会発表
 1. 高橋直之：細菌感染と骨吸収（シンポジウム、第 77 回日本細菌学会総会、大阪、2004 年 4 月 3 日）
 2. 高橋直之：カルシトニン受容体のシグナル伝達系、（ランチョンセミナー、第 22 回日本骨代謝学会学術集会、大阪、2004 年 8 月 7 日）
 3. Naoyuki Takahashi：Inflammation and osteoclastogenesis. (16th International Congress of International Anatomy Association, Kyoto, Japan, August 25, 2004)
 4. Naoyuki Takahashi: Role of MyD88-mediated signals in osteoclast differentiation and function (The 11th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress, Jeju, Korea, September 15, 2004)
 5. 高橋直之、佐藤信明、宇田川 信之：炎症性骨吸収における MyD88 シグナルの重要性、(第 41 回日本口腔組織培養学会、東京、2004 年 11 月 20 日)
 6. 高橋直之：破骨細胞形成に及ぼす PGE₂ の作用の解析（越智班、班会議、東京、2004 年 11 月 30 日）
 7. 高橋直之：歯科矯正における骨吸収調節機構：PGE₂ と骨吸収（新潟大学大学院セミナー、新潟、2004 年 12 月 13 日）
 8. Naoyuki Takahashi: Mechanism of bone resorption induced by bacterial components（International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai, 仙台, 2005 年 2 月 3 日）
 9. 高橋直之：炎症性骨吸収の誘導機構（特定領域研究「骨格系の制御プログラムと疾患」班、公開シンポジウム、東京、2005 年 2 月 19 日）
 - G. 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

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

ナース細胞機能に関わる分子の探索：
ナース細胞で発現する新規遺伝子 #4-14 (SRCL) の機能解析に関する研究

分担研究者 鈴木 隆二
所属機関名・職名 (独)国立病院機構相模原病院臨床研究センター・室長

研究要旨 関節リウマチ(RA)患者の骨髄および滑膜にはナース細胞が存在する事を報告してきた。今回、ナース細胞に特異的に発現する遺伝子を探索目的に、2種類の cDNA subtraction 法を行った。その結果、ナース細胞に発現が確認された #4-14/SRCL は #4-14/SRCL はスカベンジャーレセプター(SRA)とアミノ酸レベルで 27%の相同性が認められた。また C 型レクチン領域のみのサーチではマクロファージガラクトースレクチン(ML)と 40%程度の相同性が認められたハイブリットタイプの構造を示していた。今回、この分子の発現細胞の解析と機能解析を行い、本分子が本分子もナース細胞における抗原取り込みや、血管内皮における細胞接着に関与している可能性が得た結果を得た。

A. 研究目的

我々は、関節リウマチ(RA)の骨髄・滑膜組織に存在が確認されたナース様細胞 (RA ナース細胞) が、RA 病態の形成と維持(慢性化)に深く関与する事を報告してきた。RA ナース細胞は、「リンパ球の抱き込み (pseudoemperipolesis)」という特徴的な機能を有し、この細胞間相互作用により、リンパ球系および骨髄球系の免疫担当細胞の維持・活性化を担い、免疫機能の維持、調節に深く関係していると考えられている。このような RA ナース細胞機能を分子レベルで理解するために、ナース細胞の機能に特異的な分子を同定し、RA 関連原因分子の探索をおこなった。

B. 研究方法

ナース細胞と非ナース細胞との間で二種類 cDNA subtraction 法(I-RDA 法および SSH-RDA 法)より得られた約 400 個のクローンにつき解析を行い、ナース細胞で発現している新規スカベンジャーレセプター様遺伝子(#4-14)を同定した。以下今までに得られた #4-14 の機能解析の結果について報告する。なお、本遺伝子は C 型レクチンを持つ新規スカベンジャーレセプターファミリー SRCL(BBRC、2001、280、p1028) として報告されたた

め、ここでは #4-14/SRCL のように併記した。(倫理面への配慮) 本研究に給した臨床サンプルは、全て説明と同意の上入手した。

C. 研究結果

#4-14/SRCL の構造: #4-14/SRCL は 472 アミノ酸残からなり、そのアミノ酸配列の特徴から 5 つのドメイン構造を有する。N 末端より順に細胞質、膜貫通、coiled-coil、コラーゲン、および C タイプレクチン領域からなっていた。細胞質領域にはエンドサイトーシスシグナル (YXXF) が存在し、coiled-coil 領域には疎水性アミノ酸の周期的繰り返しからなるヘプタドリピートが存在し、#4-14/SRCL の 3 量体形成能が示唆された。その疎水性部位の一部に SRA 等でも保存されているヒスチジン残基が 4 個所存在しており、リソソームでのリガンド解離に関わることが報告されている。#4-14/SRCL のコラーゲン領域中には 49 回の GXX の繰り返しが存在し、その中にリジン、アルギニンリッチ領域が 3 箇所存在し、陰性荷電を持つタンパク質等を取り込むことが示唆された。C 末端のレクチン領域はアミノ酸配列の特徴 (QPD モチーフ) から、Ca²⁺ 依存的にガラクトース (Gal) やグルコース (Glc) のような糖鎖を認識することが予想された。#4-14/SRCL のアミノ酸配列のデータベースサーチによると、#

4-14/SRCL はスカベンジャーレセプター (SRA) とアミノ酸レベルで 27% の相同性が認められた。また C 型レクチン領域のみのサーチではマクロファージガラクトースレクチン (ML) と 40% 程度の相同性が認められた。

#4-14/SRCL の発現解析：各種細胞における #4-14/SRCL の発現を調べた。ナース細胞では、胸腺ナース (Hs67)、皮膚ナース (HSN27E、SK-LMS-1) や RA 滑膜ナース細胞 (RA189SM) で発現しており、非ナース細胞では繊維芽細胞様細胞 Hs683 を除き、ほとんどの細胞株 (繊維芽細胞系、上皮細胞系、リンパ球系) で発現していなかった。またヒトプライマリー細胞である胎盤静脈 (HUVEC)、心臓冠動脈 (HCAEC) および大動脈血管内皮細胞 (HAEC) で発現していた。なお、その発現は 100ng/ml の LPS 刺激 8 時間では変化しなかった。ヒト組織では心臓、胎盤、小腸、睾丸、卵巣等で発現していたが、脳、肝臓、末梢血リンパ球では発現していなかった (Fig. 2C)。血管に富む肝臓では発現していないので、#4-14/SRCL はすべての血管内皮細胞では発現しておらず、心臓等の血管内皮細胞等でのみ発現していると考えられる。

#4-14/SRCL による変性 LDL や変性 BSA の取り込み：SRA のリガンドであることが判明している種々の変性タンパク質分子 (DiI 標識アセチル化 LDL、DiI 標識酸化 LDL、DiI 標識糖化 BSA、FITC 標識フォルマリン処理 BSA 等) を作製し、全長 #4-14/SRCL または SRA を大量発現させた 293E 細胞および COS-7、CHO 細胞で、これらのリガンドの取り込みを調べた。SRA ではすべてについて取り込み活性が確認できたが、#4-14/SRCL 大量発現細胞ではまったく取り込み活性が認められなかった。これらのことから #4-14/SRCL は血管内皮細胞において、従来のスカベンジャーレセプターとは異なるリガンドを認識することが示唆された。

#4-14/SRCL のエンドサイトーシス能：#4-14/SRCL は細胞質領域にエンドサイトーシスシグナル (YXXF) を持つことから、#4-14/SRCL のエンドサイトーシス能を調べた (Fig. 4)。方法としては、#4-14/SRCL の C 末端の myc タグを付けたキメラ遺伝子 (#4-14/SRCLmyc) を 293E

細胞に発現させ、抗 myc 抗体の取り込みを、4℃ または 37℃ で調べた。結果は、Fig. 4A に示したように 4℃ では細胞膜が染色され、37℃ では抗体が細胞内に取り込まれ、細胞内が染色された。これを FACS で定量化した結果、陽性細胞が 1% 程度から 37% に上昇した。

次に #4-14/SRCL のレクチン領域はマクロファージガラクトースレクチン (ML) と 40% 程度の相同性があるので、マンノース (Man)、グルコース (Glu) 等のいくつかの糖鎖を結合させたポリアクリルアミド粒子の取り込みを #4-14/SRCL または ML 発現細胞で調べた。糖鎖が N アセチルガラクトサミン (GalNAc) の場合にのみ #4-14/SRCL を大量発現させた 293E 細胞で取り込み活性が確認され、Man、Glu の場合には取り込まなかった。陽性コントロールの ML も同様に GalNAc を取り込んだ。Fig. 4C に GalNAc についての結果を示した。

#4-14/SRCL のレクチン領域の機能解析：#4-14/SRCL のレクチン領域の機能解析のために、レクチン領域の N 末端に IgG のシグナル配列、C 末端にアルカリフォスファターゼ (AP) を融合させたキメラ遺伝子 (LEC-AP) を 293E 細胞に発現させ、その上清の AP 活性を定量し、インビトロ結合実験に使用した。#4-14/SRCL のレクチン領域のリガンド特異性を詳細に検討するため、インビトロで GalNAc ゲルとの結合実験およびその競合阻害実験を行った。1 mM の Ca^{2+} イオン存在下で LEC-AP はインビトロで GalNAc ゲルと結合した。この結合は 5 mM EDTA 存在化でほぼ完全に阻害されることから、 Ca^{2+} 依存性であった。また単糖の GalNAc、D、L 型フコース、D 型ガラクトース、メチル D ガラクトース (各 100 mM) で完全に阻害された (Fig. 6A)。GalNAc、D 型ガラクトース、D 型フコースの 50% 阻害濃度 (IC50) はそれぞれ 6 mM、16 mM、12 mM であった。次に各種二糖での競合阻害実験を行った。その結果、 β -ラクトースで IC50 は 1 mM であった。メリビオース、スクロース等では 1 桁高かった (Fig. 6C)。多糖類ではガラクトタンが IC50 が 1mg/ml であった。これらの結果からある種のガラクトースの多糖体にも結合しうることが示唆された。次に T 抗原 (Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr)、Tn 抗原 (GalNAc- α -Ser/Thr) による競合阻害実験を行った。なお、これらの抗原はあ

る種のガン細胞の表面に発現しており、MLが認識することで、マクロファージによるガン細胞認識において機能していることが示唆されている。そこで、これらの糖鎖によるGalNAc-ゲルとの結合に対する競合阻害実験を行った結果、IC50はT抗原が約1mM、Tn抗原が約0.5mMであった。したがって#4-14/SRCLは、これらの抗原も効率よく認識することが示された。最近の報告によると、コレクチンファミリーのC1qやマンノース結合レクチン(MBL)がアポトーシス細胞の細胞表面の泡構造(Bleb)に特異的に結合することで、これらの細胞のファゴサイトによる認識、除去に積極的に機能していることが報告されている。(J. Immunol., 2001, 166, p3231 & J. Exp. Med., 2001, 194, p781)そこで、#4-14/SRCLのC型レクチン領域がアポトーシス細胞(Jurkat)に結合するか否かを調べた結果、コントロールとして用いたDCIRとよばれるNK細胞が発現しているC型レクチンSEAPキメラ(DCIR-SEAP)あるいはSEAP単独ではほとんど結合しなかったが、LEC-APは未処理のJurkat細胞に特異的に結合した(Fig. 8A None)。この結合は20mM EDTA存在下で完全に阻害されたことからカルシウム依存的であると考えられる。しかし100mMのGalNAcではまったく阻害されず、糖鎖認識部位とは異なる領域で結合していると考えられた。次に0.3mMのH₂O₂で24時間処理し、アポトーシスを誘導したJurkat細胞に結合するか否かを調べた結果、未処理のJurkat細胞と比較して20倍程度結合が上昇した(Fig. 8A H₂O₂)。この結合はdI-dC、ゲノムDNA、プラスミドDNA、ポリI、デキストラン硫酸等の陰性荷電で阻害されたが100mMのGalNAcでは阻害されなかった(Fig. 9)。さらに、#4-14/SRCLのレクチン領域がアポトーシス細胞のどこに結合しているか視覚化するために、LEC-APのAP部分をEGFPと置き換え、LEC-EGFPを作製し、293E細胞で発現させ、その上清を用いて細胞結合実験を行った。その結果、未処理Jurkat細胞にはまったく結合しなかったが、H₂O₂処理Jurkat細胞にはほぼ100%の細胞に結合した。結合場所は不均一で、パッチあるいはモザイク状に結合

していた。今後、この結合している場所がアポトーシス細胞特有の表面Blebなのか否かを調べる予定である。

#4-14/SRCLのコラーゲン領域の機能解析：#4-14/SRCLのコラーゲン領域には3個所の陽性荷電のクラスターがあり、リガンド結合部位と考えられている。最近の報告で#4-14/SRCL発現細胞がグラム陰性細菌(大腸菌)、陽性細菌(黄色ブドウ球菌)、出芽酵母に結合することが報告されている。この結合特性、認識リガンド、認識部位を特定するため、インビトロ結合系の構築を行った。LEC-APと同様に分泌させるため、シグナル配列をN末端につけて、さらに三量体形成能を持たせるためにコイルドコイル領域を含むコラーゲン領域のC末端にAPをつないだキメラを作製し(COL-AP)、これを293E細胞で発現させ、その培養上清をアッセイに使用した。上記COL-APを発現させた培養上清で各種細菌およびヘパリンゲルとの結合実験、および種々の陰性荷電分子による競合阻害実験を行った。SEAPのみではほとんど結合しなかったが、COL-APは大腸菌、黄色ブドウ球菌何れにも結合した。この結合は陰性荷電粒子のフコイダン、ポリグルタミン、デキストラン硫酸、ヘパリンで阻害され、さらにグラム陽性細菌の細胞壁成分であり、この菌のエンドトキシンでもあるペプチドグリカンの結合しているリポテイコ酸(LTA)(1mg/ml)ではほぼ完全に競合阻害された。一方、大腸菌の細胞壁成分のLPSでは阻害されなかった。なお、COL-APはヘパリンゲルとも結合し、この結合はヘパリン(100μg/ml)では阻害されたが、LTA(100μg/ml)ではほとんど阻害されなかったことより、ヘパリンと細菌またはLTAとの結合部位が異なることが示唆された。さらにLTAのIC50を決定した結果、COL-APと黄色ブドウ球菌との結合の競合阻害から求めたLTAのIC50は約10μg/mlであった(Fig. 12)。この濃度はSRAの場合とほぼ同程度であった(4μg/ml:PNAS, 1994, 91, p1863)。これらの結果から#4-14/SRCLが黄色ブドウ球菌を認識するリガンドはLTAであることが示唆された。次に、細胞外マトリックスの主要成分であるグリコサミノグリカンのコンドロイチン硫酸(CS)A、B、Cおよびヘパラン硫酸(HS)によるCOL-APと黄色ブドウ球菌との結合の競合阻害実験を行った。その結果、CS-B(別名デルマタ

ン硫酸)が特異的に結合を阻害した。IC50値は100 μ g/mlでほぼ完全に阻害できた。CS-Bは血管壁等に多く存在し、特に損傷部位血管内皮細胞で発現され、創傷液(wound fluid)中濃度は15-65mg/mlであることが報告(JBC, 1998, 273, p28116)されているので、#4-14/SRCLは生理的にもCS-Bをリガンドとする可能性があり、可溶性CS-B含有プロテオグリカンを血管内皮細胞表面に保持する場合に機能している可能性等が考えられる。さらに、これら細菌およびヘパリンゲルの結合部位を決定するため、コラーゲン領域を順次欠損させた分泌型APキメラ遺伝子を作製し、これらを293E細胞で発現させ、培養上清を細菌等との結合実験に使用した。なお、3個所の陽性荷電領域を図中+で示した。細菌(大腸菌、黄色ブドウ球菌)との結合実験では、両者ともR25で50%程度結合活性が低下し、R24で完全に結合能を失った。しかし、ヘパリンゲルとの結合はR24では上昇しており、R23で完全に消失した。R25、R24間の領域は3番目の陽性チャージの下流領域で、アミノ酸配列はGDPGPPGPPGKEGLPGPQであった。R24、R23間は3番目の陽性チャージ領域と一致し、そのアミノ酸配列は、GERGGKGSKGSQGPKGSRGSPPGKPGPQGPSであった。この結果から細菌とヘパリンゲルとの結合部位は異なることが判明し、さらに1、2番めのチャージはこれらのリガンド認識には関係がないことが判明した。

D. 考察

①二種類cDNA subtraction法によって、ナース細胞に選択的に発現しているスカベンジャーレセプターが単離された。本分子はスカベンジャーレセプター(SRA)とそのアミノ酸レベルで27%相同を有すとともに、C型レクチン領域のみのサーチではマクロファージガラクトースレクチン(ML)と40%程度の相同が認められる、ハイブリッドタイプの非常にユニークな構造を示している。

②発現細胞の解析からナース細胞と血管内皮細胞にその発現が確認され、これらの細胞で、如何なる機能に関与するかであるが、細胞接着や抗原の取り込みをす

ることが知られ、本分子もナース細胞における抗原取り込みや、血管内皮における細胞接着に関与している可能性がある。

E. 結論

ナース細胞に発現する新規遺伝子を単離した。今後は、①. 細胞とLEC-APとの結合において、アポトーシス細胞上の結合部位の決定。②. 固相化#4-14/SRCLとCS-Bまたは細胞との結合等の解析を介してCS-Bとの結合の生理的意味の解明。③. コラーゲン領域の細菌等結合部位の詳細な解明。④. X型PLA₂等による変成LDLの取込み。を行いこれらの解析を介してナース細胞や血管内皮細胞で発現する#4-14/SRCLの生理的役割を理解し、創薬研究の糸口となる研究に発展させていきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yoshida T, Tsuruta Y, Iwasaki M, Yamane S, Ochi T, Suzuki R.

SRCL/CL-P1 recognized GalNAC and a carcinoma-associated antigen, Tn antigen.

J Biochem. 2004 Mar;133(3):271-7

Takano H, Tomita T, Toyosaki-Maeda T, Maeda-Tanimura M, Tsuboi H, Takeuchi E, Kaneko M, Shi K, Takahi K, Myoui A, Yoshikawa H, Takahashi T, Suzuki R, Ochi T.

Comparison of the activities of multinucleated bone-resorbing giant cells derived from CD14-positive cells in the synovial fluids of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients.

Rheumatology(Oxford).2004Apr;43(4):435-41

2. 学会発表

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

ヒトナース細胞特異的遺伝子(特許出願中)

2. 実用新案登録

3. その他

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)
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
分担研究報告書

関節リウマチの破骨細胞活性化亢進 (とくに細胞融合による多核巨細胞化) の
分子機構の解明に関する研究

分担研究者氏名 佐伯行彦 国立病院機構 大阪南医療センター 臨床研究部長

研究要旨: これまでの研究結果から、関節リウマチ (RA) の骨破壊は破骨細胞による骨吸収の亢進が主たる原因と考えられている。また、破骨細胞の活性化過程において、複数の破骨細胞が融合し、多核巨細胞を形成する形態的変化をすることが知られている。この細胞融合による多核巨細胞化は破骨細胞の骨吸収能の獲得 (増幅) と密接な関連があるものと考えられているが、その分子機構はまったく明らかにされていない。一方、最近、膜4回貫通型蛋白質スーパーファミリー (TM4SF) あるいは tetraspanin スーパーファミリーとよばれる分子群 (CD9、CD63、CD81、CD82 など) が種々の細胞融合に関わっていることが報告されている。本年度は、破骨細胞の細胞融合に実際に、tetraspanin の中の CD9 が関与しているかどうかを破骨細胞の前駆細胞であるマウス単球系セルライン、RAW246.7 細胞の実験系を用いて検討した。その結果、RAW246.7 細胞は細胞表面に CD9 を発現し、破骨細胞への分化誘導の主たるシグナルである RANKL の添加によりその発現が up-regulate された。また、RAW246.7 細胞の細胞表面の CD9 は細胞融合後細胞内へ取り込まれた (internalization)。さらに、CD9 に対する中和抗体の添加により、RAW246.7 細胞の細胞融合、破骨細胞への分化・活性化 (骨吸収能) が有意に抑制された。以上のことから、tetraspanin CD9 は、破骨細胞の分化活性化過程において、細胞融合による多核巨細胞化に関与していることが示唆された。また、破骨細胞前駆細胞の細胞融合による多核巨細胞化は、骨吸収能の獲得 (増幅) に重要な形態的変化である可能性が示唆された。

A. 研究目的

これまでの研究結果から、関節リウマチ (RA) の骨破壊は破骨細胞による骨吸収の亢進が主たる原因と考えられている。また、RA 患者由来の関節炎局所の (滑膜組織や関節液から分離した) 細胞を *in vitro* で培養すると多数の骨吸収能を有する活性化した破骨細胞が無刺激下で誘導されることから、RA の関節局所では破骨細胞の活性化が亢進していることが示唆される。また、破骨細胞の活性化過程において、複数の破骨細胞が融合し、多核巨細胞を形成する形態的変化をすることが知られている。この細胞融合による多核巨細胞化は骨吸収能の獲得 (増幅) に密接な関連があるものと考えられているが、その分子機構はまったく明らかにされていない。

一方、最近、膜4回貫通型蛋白質スーパーファミリー (TM4SF) あるいは tetraspanin スーパーファミリーとよばれる分子群 (CD9、CD63、CD81、CD82 など) が精子と卵子、筋芽細胞など種々の細胞融合に関わっていることが報告されている。

本研究では、破骨細胞の細胞融合に関わる分子 (とくに CD9、CD81 などの TM4SF) の同定とその分子の細胞融合過程での動的解析を目的とする。本研究の成果は、破骨細胞の活性化機構の解明だけでなく、その制御法の開発は RA の骨破壊の新たな治療法あるいは治療薬の開発に繋がることを期待できる。本年度は、破骨細胞の細胞融合に実際に、tetraspanin の中の CD9 が関与しているかどうかを破骨細胞の前駆細胞であるマウス単球

系セルライン、RAW246.7細胞の実験系を用いて検討した。

B. 研究方法

破骨細胞の前駆細胞であるマウス単球系セルライン、RAW246.7細胞を用いて以下の実験を行った。

- (1) RAW246.7細胞でのCD9の発現をFACSで確認した。
- (2) RANKL刺激によるCD9の発現の亢進をWestern Blot法で検討した。
- (3) RAW246.7細胞の破骨細胞への分化/活性化実験系で抗CD9中和抗体の破骨細胞分化、細胞融合(多核巨細胞化)への影響(抑制作用の有無)を検討した。

尚、本研究は培養細胞(セルライン)を用いたin vitroの実験であり、人権擁護上の配慮や実験動物に対する動物愛護上の配慮については格別必要ではなく、倫理面での問題は無いものと考えられる。

C. 研究結果

- (1) RAW246.7細胞でのCD9の発現
FACSの結果、RAW246.7細胞表面にはCD9が恒常的に発現していることが確認された。また、Western Blotの結果、RANKL刺激によりCD9の発現が増幅されることが明らかになった。さらに、単細胞の時に細胞表面に発現していたCD9は、細胞融合後、多核巨細胞の表面から細胞内へ取り込まれた(internalization)。
- (2) 抗CD9中和抗体の破骨細胞分化、細胞融合(多核巨細胞化)への影響
抗CD9中和抗体添加により濃度依存的に細胞融合(細胞融合インデックスによる評価)は最大60%抑制され、成熟活性化した破骨細胞(TRAP陽性多核巨細胞)への分化も有意に抑制された。

D. 考察

RAW246.7細胞は細胞表面にCD9を発現し、破骨細胞への分化誘導の主たるシグナルであるRANKLの添加によりその発現がup-regulateされた。また、RAW246.7細胞の細胞表面のCD9は細胞融合後表面から細胞内へ取り込まれた(internalization)。さらに、CD9に対する中和抗体の添加により、RAW246.7細胞の細胞融合、破骨細胞への分化・活性化(骨吸収能)が有意に抑制された。以上のことから、tetraspanin CD9は、破骨細胞の分化活性化過程において、細胞融合による多核巨細胞化に関与していることが示唆された。また、破骨細胞前駆細胞の細胞融合による多核巨細胞化は、骨吸収能の獲得(増幅)に重要な形態的変化である可能性が示唆された。

E. 結論

tetraspanin CD9は、破骨細胞の分化活性化過程において、細胞融合による多核巨細胞化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Ishii T, Ohshima S, Ishida T, Mima T, Tabunoki Y, Kobayashi, Maeda M, Uede T, Liaw L, Kinoshita N, Kawase I, **Saeki Y.**

Osteopontin as a positive regulator in the osteoclastogenesis of arthritis.

Biochem Biophys Res Commun 316(3): 809-15, 2004

(2) Ishii T, Ohshima S, Ishida T, Kawase I, Mima T, Tabunoki Y, Kobayashi, Maeda M, Uede T, Liaw L, Kinoshita N, **Saeki Y.**

Mice with osteopontin deletion remain predisposed to collagen-induced arthritis.

Arthritis Rheum 50(2): 669-73, 2004

(3) 佐伯行彦

骨吸収性疾患におけるオステオポンチン

IRYO 58(6): 335-40, 2004

2. 学会発表

(1) Ishii T, Ohshima S, Ishida T, Mima T,
Tabunoki Y, Kobayashi H, Maeda M, Uede T,
Liaw L, Kinoshita N, Kawase I, Saeki Y.

Osteopontin as a positive regulator in the
osteoclastogenesis of arthritis.

2004 Annual Scientific Meeting of American
College of Rheumatism, San Antonio, USA,
October 16-21, 2004 (Arthritis Rheumatism
50:S367)

(2) 第48回日本リウマチ学会総会・学術集
会 2004年4月15-17日、岡山市

WO37-4 難治性関節リウマチに対する抗
TNF α 療法の有効性について 美馬 享、梅
下光子、片田圭宣、東 直人、木田 博、原
田芳徳、佐伯行彦

WP10-7 著明な好酸球増多およびIgE上昇を
伴った原発性 Sjogren 症候群の一例

東 直人、木村淑美、有本啓恵、原田芳徳、
木田 博、梅下光子、美馬 享、片田圭宣、
佐伯行彦

CR17-5 インフリキシマブが血管炎に対して
有効であった関節リウマチの一例

梅下光子、美馬 享、片田圭宣、
東 直人、木田 博、原田芳徳、
佐伯行彦

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願中

発明の名称：全身性エリテマトーデス (SLE)
患者血液細胞での発現亢進をしている AILE
遺伝子群

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

可溶性 RANKL 産生に関与する分子の網羅的検索に関する研究

分担研究者 田中 栄

所属機関名・職名 東京大学医学部附属病院整形外科 講師

研究要旨 破骨細胞分化促進因子である RANKL は骨芽細胞表面に発現し、破骨細胞前駆細胞表面に発現した RANK に結合することにより破骨細胞の分化およびその機能発現に促進的に働く。RANKL には膜結合型と可溶型があり、膜結合型 RANKL が膜近傍の stalk region で切断されることにより可溶型 RANKL が生じると考えられている。しかしながら可溶型 RANKL 産生の意義やその分子メカニズムは明らかになっていない。われわれは RANKL 可溶活性を持つ分子のスクリーニング系を確立し、Ras-GAP(GTPase-activating protein)として同定された CAPRI (Ca²⁺-promoted Ras inactivator)のスパイスバリエーションを RANKL shedding を誘導する分子として同定した。

A. 研究目的

関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) における骨破壊には破骨細胞による骨吸収が重要な役割を果たしている。破骨細胞は血球系の前駆細胞から分化する多核巨細胞であるが、その分化・活性化には receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) を介するメカニズムと介さないメカニズムの両方が関与することが知られている。RANKL は tumor necrosis factor (TNF) スーパーファミリーに所属する膜結合性サイトカインであり、破骨細胞前駆細胞に発現する受容体 RANK と結合することによって破骨細胞の分化・活性化を促進する。RANKL は膜結合型サイトカインとして発見されたが、その後の検討により、膜結合型 RANKL が膜近傍の stalk region で切断されることにより可溶型 RANKL が生じることが明らかになった。しかしながら可溶型 RANKL 産生の意義やその分子メカニズムはいまだに明らかになっていない。本研究の目的は RANKL の可溶性メカニズムを明らかにし、生理的・病的意義を明らかにするとともにその制御法を開発することである。

B. 研究方法

1) RANKL shedding assay の確立

RANKL は膜近傍の stalk region で切断され、可溶型 RANKL が産生される。本アッセイ系の特色は、細胞内ドメインから stalk region までを含む RANKL と熱安定性

SEAP (secreted alkaline phosphatase) との融合蛋白の発現ベクターを構築し、RANKL の shedding 活性を細胞上清への SEAP の放出という形で捕らえ、その上清中のアルカリフォスファターゼ活性を測定することで shedding 活性を定量するという点である。このアッセイ系を用いることにより、簡便、かつ安価に shedding 活性をもつクローンをスクリーニングすることが可能となる (図1)。

まず生後1日齢のマウス頭蓋骨より骨芽細胞を採取。RNA を抽出し、RT-PCR 法により RANKL をクローニングする。熱安定性 SEAP (secreted alkaline phosphatase) は clontech 社の発現ベクターよりサブクローニングする。pcDNA3.1-V5His vector にこの2つの DNA フラグメントをサブクローニングし、細胞内ドメインから stalk region までを含む RANKL と SEAP との融合蛋白を発現するベクター pcDNA3.1-V5His-RANKL-SEAP (RANKL-SEAP ベクター) を作成する (図1)。次にアッセイ系の有効性を過去の報告から RANKL shedding 活性を有することが知られているマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-14 の発現ベクターを用いて確認する。RANKL-SEAP ベクターと MMP-14 発現ベクターを同時に 293T 細胞にトランスフェクトする。トランスフェクト 72 時間後に培養上清を回収し、pNPP を基質として 65°C、90 分のインキュベーション後 405nm の吸光度を測定する。RANKL-SEAP の切断が stalk region で生じると、上清中のアルカリフォスファターゼ活性が

上昇する。

2) ST2cDNA ライブラリーのスクリーニング

まず大腸菌(DH5 α)に ST2cDNA ライブラリーをトランスフォーメーションした。菌液をアンピシリンプレートに撒き、タイターをチェック、100 コロニーに相当する量の菌液を24well アンピシリンプレートに撒き、サブプール分けを行う。得られたコロニーを培地に溶解し、ミニプレップ法にてプラスミドを抽出する。合計で 1000 個のサブプールを用意し、10 万クローンのスクリーニングを行った。作成した RANKL-SEAP 発現ベクターと ST2cDNA ライブラリーのサブプールを96well プレートに撒いた 293T 細胞に Fugene6(Roche 社)を用いて同時にトランスフェクションし、72 時間後に上清を回収し、pNPP を基質として 65°C、90 分のインキュベーション後 405nm の吸光度を測定した。RANKL の切断が生じたポジティブクローンでは、RANKL-SEAP fusion protein が細胞膜から培養上清中へと遊離し、アルカリフォスファターゼ活性が上昇する(図1参照)。ポジティブプールは初回のサブプール分けと同様の手順で10コロニーずつのサブプールに分けた。同様にしてポジティブプールを選び、最終的にシングルクローンを得た。得られたシングルクローンはライブラリーのプラスミドベクターに設定したプライマーを用いてサイクルシーケンスを行う(Qiagen 社、ABIprism 310 genetic analyzer 使用)。得られた塩基配列はインターネットを利用して(NCBI blast など)類似の配列を検索する。

3) 得られたクローンの機能解析

ポジティブクローンについて、以下のような手順で解析を行った。①得られたクローンが全長 cDNA ではない場合には、その全長をクローニングし、全長 cDNA の RANKL shedding 活性を上記アッセイ系を用いて確認。②得られた遺伝子を全長の RANKL と共発現し、実際に RANKL shedding 活性を有することを、ELISA による培養上清中の可溶性 RANKL 測定によって確認。③得られた遺伝子が RANKL shedding を誘導するメカニズムを、細胞内シグナル伝達という観点から検討した。

(倫理面への配慮)

本研究はヒトサンプルを用いるものではないが、候補遺伝子が得られた場合、そのヒト細胞での作用を確認する必要がある。その

際、個人情報、その外部への持ち出しを厳重に禁止し、遺伝子解析に使用する検体、試料はコード化し匿名とする。また、生命倫理に関してはこの研究の趣旨を充分説明し提供者の自由意思によるインフォームド・コンセントを取得するものとする。

C. 研究結果

先にも述べたように良質な発現ライブラリーを使用することが本研究のカギを握ると考えられる。われわれが ST2cDNA ライブラリー(プラスミドライブラリー)を使用した理由は、①過去の報告から ST2 細胞は大量の可溶性 RANKL を産生することが明らかである、②本研究で供与を受ける ST2 ライブラリーは full length RANKL をクローニングしたものであり、質の保証がある、という 2 点である。スクリーニングに用いる細胞として 293T 細胞を用いるのはトランスフェクションが容易であり、ベースの SEAP 活性が見られないためである。計10万クローンのスクリーニングによって異なる8つのポジティブクローンが得られた。そのひとつは Ras-GAP(GTPase-activating protein)として同定された CAPRI (Ca²⁺-promoted Ras inactivator)のスプライズバリエーションであった。CAPRI は細胞内 Ca²⁺依存性に Ras の活性を抑制する分子であるが、われわれが同定したバリエーション(delta CAPRI)は GAP 活性を欠損しており、ドミナントネガティブ的に作用すると考えられる。Delta CAPRI を発現する細胞では ERK 活性化が認められること、活性型の Ras 遺伝子発現により RANKL shedding が亢進することから、delta CAPRI は Ras の活性化により、RANKL shedding を誘導する可能性が示唆された。

D. 考察

TNF- α は膜結合型サイトカインとして産生され、TACE(TNF- α converting enzyme)などの shedding enzymeによって可溶性となって血中へと放出されることにより全身的な影響をおよぼすと考えられている。破骨細胞分化因子として同定された RANKL 可溶性の意義は未だに不明であるが、TNF- α と同様に可溶性 RANKL が血中に放出されることによって、局所的な骨吸収亢進を全身へと波及させる可能性がある。本研究でわれわれは細胞内シグナル分子である CAPRI の splicing variant が RANKL の shedding を亢進することを明らかにした。今後 RANKL shedding に直接関与する shedding enzyme を同定することによ

って、全身的な骨吸収亢進のメカニズムが明らかになることが期待される。

E. 結論

新しいスクリーニング法を用いて RANKL shedding 活性を持つ遺伝子 delta CAPRI を同定した。Delta CAPRI は細胞内の Ras-ERK 系を活性化することによって作用すると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

英文原著

- 1) Ohazama A, Courtney J-M, Naito A, Tanaka S, Inoue J, Sharpe PT. Traf6 is essential for murine tooth cusp morphogenesis. *Dev Dyn* 2004 229, 131-135.
- 2) Seto H, Kamekura S, Miura T, Yamamoto A, Chikuda H, Ogata T, Hiraoka H, Oda H, Nakamura K, Kurosawa H, Chung U, Kawaguchi H, Tanaka S. Distinct Role of Smad Pathways and p38 Pathways in Cartilage-specific Gene Expression in Synovial Fibroblasts. *J Clin Invest* 2004, 113, 718-726.
- 3) Miyazaki T, Sanjay A, Neff L, Tanaka S, Horne WC, Baron R. Src kinase activity is essential for osteoclast function. *J Biol Chem*, 2004, 279, 17660-6.
- 4) Setoguchi K, Misaki Y, Kawahata K, Shimada K, Juji T, Tanaka S, Oda H, Shukunami C, Nishizaki Y, Hiraki Y, Yamamoto K. Chondromodulin-1, a cartilage-derived angiogenesis inhibitory factor, suppresses T cell response; an implication of a therapeutic potential for the treatment of arthritis. *Arthritis Rheum* 2004, 50, 828-839.
- 5) Song X, Tanaka S, Cox D, Lee SC. Fc receptor signaling in primary human microglia: differential roles of PI3K and Ras/ERK MAP kinase pathways in phagocytosis and chemokine induction. *J Leukoc Biol*. 2004, 75:1147-1155.
- 6) Ogasawara T, Katagiri M, Yamamoto A, Hoshi K, Takato T, Nakamura K, Tanaka S, Okayama H, Kawaguchi H. Osteoclast Differentiation by RANKL

Requires NF-kappaB-Mediated Downregulation of Cyclin-Dependent Kinase 6 (Cdk6). *J Bone Miner Res*. 2004, 19:1128-1136.

- 7) Ogata T, Iijima S, Hoshikawa S, Miura T, Yamamoto S, Oda H, Nakamura K, Tanaka S. Opposing Erk and Akt pathways control Schwann cell myelination. *J Neuroscience* 2004, 24:6724-32.
- 8) Ikeda F, Nishimura R, Matsubara T, Tanaka S, Inoue J, Reddy SV, Hata K, Yamashita K, Hiraga T, Watanabe T, Kukita T, Yoshioka K, Rao A, Yoneda T. Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation. *J Clin Invest* 2004, 114:475-484.
- 9) Kwak HB, Lee SW, Jin HM, Ha H, Lee SH, Takeshita S, Tanaka S, Kim HM, Kim HH, Lee ZH. Monokine induced by interferon-gamma is induced by receptor activator of nuclear factor B ligand and involved in osteoclast adhesion and migration. *Blood*. 2004 Dec 7; [Epub ahead of print]
- 10) Yagishita N, Ohneda K, Amano T, Yamasaki S, Sugiura A, Tsuchimochi K, Shin H, Kawahara K, Ohneda O, Ohta T, Tanaka S, Yamamoto M, Maruyama I, Nishioka K, Fukamizu A, Nakajima T. Essential Role of Synoviolin in Embryogenesis. *J Biol Chem* 2004 Dec 20; [Epub ahead of print]
- 11) Gohda J, Akiyama T, Koga T, Takayanagi H, Tanaka S and Inoue JI. RANK-mediated amplification of TRAF6 signaling leads to NFATc1 induction during osteoclastogenesis. *Embo J* in press.

英文総説

- 1) Tanaka S. Molecular mechanism of life and death of the osteoclast. *Int J Oral Biol* 2004 in press
- 2) Tanaka S. Intracellular signal transduction pathways: good therapeutic targets for joint destruction in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatology* 2005 in press

和文総説

- 1) 田中 栄「RANKL を標的とした骨粗鬆症の分子治療」*医学のあゆみ* 208:343-347, 2004

- 2) 宮崎 剛、田中 栄「TNF-」日本臨床 62 suppl 2:112-115, 2004
- 3) 十字琢夫、田中 栄「RANKL ワクチンによる新しい骨代謝疾患治療」日本臨床 62 suppl 2:799-802, 2004
- 4) 秋山 達、田中 栄「破骨細胞アポトーシスと骨吸収能の制御」 Medical Science Digest 30:42-43, 2004
- 5) 田中 栄「五十肩」 Medical Practice 21:346-347, 2004
- 6) 田中 栄「生物製剤による骨粗鬆症治療」整形・災害外科 47:279-284, 2004
- 7) 田中 栄「RANKL と炎症性骨破壊」医学のあゆみ 208:931-934, 2004
- 8) 田中 栄「RANKL 制御と osteoprotegerin による骨・関節疾患治療」分子リウマチ 1:89-93, 2004
- 9) 田中 栄「遺伝子導入による滑膜細胞制御」臨床免疫 41:534-537, 2004
- 10) 福田 明、田中 栄「OA と破骨細胞～OA 治療薬のあらたなターゲット～」医学のあゆみ 211:285-288, 2004

2. 学会発表

- 1) 茨城県保険医協会・県南地区医師会 学術講演会(2004.5.25)土浦 「運動器疾患の治療戦略」
第 21 回日本 TDM 学会・学術大会ランチョンセミナー(2004.6.6)大阪 「骨破壊をターゲットにした新しい骨代謝疾患治療法の開発」
- 2) 第30回 日本整形外科スポーツ医学会 学術集会(2004.7.3)東京 シンポジウム III 関節軟骨修復術の基礎と臨床 “Molecular mechanism of joint destruction and possible therapeutic approach toward cartilage repair”
- 3) 大阪整形外科症例検討会 特別講演(2004.7.10)大阪 「骨破壊をターゲットにした関節リウマチ治療戦略」
- 4) エピスタ販売記念講演(2004.7.24)盛岡 「骨粗鬆症治療の新世紀～Is the paradigm shifting?～」
- 5) 第 22 回日本骨代謝学会(2004.8.7)大阪 シンポジウム II 関節リウマチと変形性関節症における骨破壊分子メカニズムと治療 「関節炎における骨破壊メカニズムとその制御」
- 6) 第 1 回 横浜骨粗鬆症研究会(2004.9.9)横浜 「骨粗鬆症治療薬の最新

- の話題」
- 7) 第53回日本口腔衛生学会・総会(2004.9.19)盛岡 シンポジウム D 保健生態系で考えるフッ化物応用 「フッ化物と全身の健康」
- 8) 日本医師会生涯教育制度適合学術集会(2004.10.7)大分 「骨粗鬆症治療の新世紀」
- 9) 第 19 回日本整形外科基礎学術集会(2004.10.22)東京 教育研修講演「関節破壊の分子メカニズムとその治療戦略」
- 10) ハイペン発売10周年記念講演会(2004.10.28)神戸 特別講演「関節リウマチの新しい治療戦略」
- 11) Bone and Joint Research Club～骨と関節の代謝調節を考える基礎の会～(2004.11.13-14)かずさ 特別セッション「細胞内シグナル伝達をターゲットにした疾患治療法の開発～新しい時代の創薬をめざして～」 「細胞内シグナル伝達をターゲットにした骨関節疾患治療戦略」
- 12) 千葉市医師会講演会(2004.11.17)千葉 「骨粗鬆症の臨床アップデート～整形外科の立場から～」
- 13) 第2回医療フォーラム 骨と関節疾患制御の新世紀(2004.11.26)東京 「変形性関節症」
- 14) 大阪大学 COE シンポジウム(2004.12.3)大阪 「破骨細胞のアポトーシスと活性化のメカニズム」
- 15) 厚生労働省難治性疾患研究事業 骨・関節系調査研究班 特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会 平成16年度 第2回会議 研究成果報告会(2004.12.4)京都 「新たなマウス骨壊死モデル作成の試み」

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。) なし

骨髄脂肪蓄積細胞および分泌因子からの病態解明に関する研究

分担研究者 下村 伊一郎 大阪大学大学院医学系研究科教授・生命機能研究科教授

研究要旨

- ① 変形性関節症および関節リウマチ患者の大腿骨骨髄から骨髄脂肪細胞を分離する技術を確立し、約 30 種の発現遺伝子を解析した。結果、皮下・内臓脂肪細胞より分泌される数種のタンパク質遺伝子の発現を認めた。また、BMP シグナルと拮抗する分泌タンパク質の発現量が高かった。
- ② ①にて発現を確認した骨髄脂肪蓄積細胞分泌因子に着目し、破骨細胞に対する分化、活性化抑制および骨芽細胞に対する分化、石灰化促進作用を検討し、破骨細胞分化抑制作用を見出した。また、ナース様細胞産生サイトカインに対する作用やナース様細胞との関連を検討中である。

A. 研究目的

ヒト骨髄内には多数の脂肪蓄積細胞が存在し、それら脂肪蓄積細胞数の増加と骨量の低下には相関がみられる。本研究においては、骨髄脂肪蓄積細胞の増加が、関節リウマチや骨粗鬆症の病態形成に関わっているとの仮説に基づき、①骨髄脂肪蓄積細胞が産生する分泌因子を明らかにし、関節リウマチや骨粗鬆症など病態への関与を明らかにする。②骨髄脂肪蓄積細胞の骨代謝への関与、ナース様細胞との関連を明らかにする。

B. 研究方法

①大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学において、変形性関節症あるいは

関節リウマチ患者より摘出された骨片から脂肪蓄積細胞分画と間葉系細胞分画を分離回収した。また、回収した細胞分画より total RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて発現遺伝子を解析比較した。

②続いて、①にて発現が確認された骨髄脂肪蓄積細胞分泌因子の骨代謝への作用、関節リウマチ患者由来のナース様細胞との関連を検討する。特に、in vitro では破骨細胞の分化、活性化や骨芽細胞の分化、石灰化に対する作用を、in vivo ではアデノウイルスを用いて目的タンパク質をマウスに過剰発現させ、骨組織および代謝マーカーを解析する。また、ナース様細胞産生サイトカイン量の変動およびナース様細胞との関連を検討する。

(倫理面への配慮)

上記器官制御外科において人工膝関節置換術を施行する患者に限定して、術前に書面にて研究目的・内容を説明し、同意・承諾を得た上で、術中に取り除かれる骨片を研究材料として用いた。また、実験動物に対し、安楽死を施行するなど、動物愛護に配慮した。ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針および大阪大学医学部附属動物実験施設の定める倫理規定を遵守した。

C. 研究結果

①約 30 種の遺伝子に関して、RT-PCR 法により解析した。結果、BMP シグナルと拮抗する分泌タンパク質の発現量が、脂肪蓄積細胞分画で高かった。また、皮下や内臓脂肪細胞より分泌されるいくつかのタンパク質遺伝子の発現を骨髄脂肪蓄積細胞分画においても認めた。

②続いて、①にて発現を確認した骨髄脂肪蓄積細胞分泌因子に着目し、*in vitro* では、破骨細胞に対する分化、活性化抑制および骨芽細胞に対する分化、石灰化促進作用を検討した。結果、明らかな破骨細胞の分化抑制作用を有することを確認した。更に、*in vivo* では、アデノウイルスを用いた目的タンパク質過剰発現によるマウス骨組織および代謝マーカー解析を行った。結果、コントロール群に比し、有意な骨量増加を認めた。また、ナース様細胞産生サイトカインに対する作用を検討中である。

D. 考察

①RT-PCR 法による解析比較の結果、骨代謝への関与を考えるシグナル分子の発現量に差がみられた。今後、骨髄脂肪蓄積細胞において発現量が多く、特に分泌されるシグナル分子の探索をさらに進める。

②関節リウマチ患者由来のナース様細胞が骨・関節破壊に関与すること、脂肪細胞分泌因子が骨代謝に関与することはこれまでに報告されてきたが、骨髄内細胞のナース様細胞に対する影響はいまだ明らかではない。今回、我々は着目した骨髄脂肪蓄積細胞分泌因子が破骨細胞分化抑制作用を有することを見出した。そこで、この分泌因子の骨代謝に及ぼす詳細な作用機序およびこの分泌因子のナース様細胞に及ぼす影響を明らかにすることが重要であると考えられる。

E. 結論

①ヒト骨髄脂肪蓄積細胞は骨代謝に影響を及ぼすシグナル分子を積極的に産生している可能性がある。

②着目した骨髄脂肪蓄積細胞分泌因子には明らかな破骨細胞分化抑制作用がある。

③骨髄脂肪蓄積細胞が分泌する因子を中心に、ナース様細胞に対する作用を検討するとともに、破骨細胞や骨芽細胞に対する効果を明らかにすることで、骨量減少疾患である骨粗鬆症や関節リウマチの病態解明および治療法への糸口を見つけうる。

(健康危険情報)

該当する事項なし。

F. 研究発表

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

現在、上記 2 項目に該当する事項なし。