

CD14 陽性細胞は EP2 と EP4 を発現しており、PGE<sub>2</sub> 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 PGE<sub>2</sub> は強力に抑制した。⑥CD14 陽性細胞は PGE<sub>2</sub> 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- $\gamma$ ) ではなく、新規のサイトカインである可能性が示唆された。

#### 4 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。また、マウスの破骨細胞形成と同様に、ヒト破骨細胞形成も p38MAPK の特異的阻害剤 SB203508 により強力に抑制された。ヒト破骨細胞にも p38MAPK シグナル系が重要な役割を有していることが示唆された。一方、形成される破骨細胞の数は少ないものの、M-CSF のみを添加した群においても、破骨細胞様細胞が出現した。この破骨細胞様細胞が本来の破骨細胞と同一のものか否か今後の研究から明らかにされるであろう。以前より、破骨細胞やその前駆細胞は RANKL mRNA を発現していることが知られていたが、活性ある RANKL が発現しているかは不明であった。今回の実験結果は、末梢血 CD14 陽性細胞自身が活性を有する RANKL を発現していることを示唆しており、今後の詳しい解析が必要であると考え。マウスの破骨細胞形成とヒト破骨細胞形成に対して PGE<sub>2</sub> は異なる作用を有する可能性が示された。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 PGE<sub>2</sub> 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。

#### 5 評価

##### 1) 達成度について

##### (1)ヒト破骨細胞形成系の確立に関して (達成度: 80%)

再現性のあるヒト破骨細胞の培養系を確立した。この方法はヒト末梢血から得た CD14 陽性細胞を用いるもので、ヒト骨芽細胞陽性細胞 SaOS4/3 細胞と末梢血の共存培養系とともに、今後広く使われるものと考えられた。マウスの細胞を用いた場合、コラーゲン培養により大量の破骨細胞を浮遊した状態で得ることが

できる。一方、ヒト破骨細胞前駆細胞を用いてコラーゲン培養系の確立はできなかった。ヒト破骨細胞を浮遊した状態で得る実験系の確立は今後の課題である。

##### (2)ヒトとマウスの破骨細胞の比較 (達成度: 90%)

ヒト破骨細胞とマウスの破骨細胞の形成に関与するサイトカインとシグナル伝達に関して、基本的には同様である事を明らかにした。各種の実験に関して唯一の違いは、PGE<sub>2</sub> の作用について、マウスの場合は促進に、ヒトの場合は抑制に作用することを明らかにした。

##### (3)PGE<sub>2</sub> 作用機構の解明 (達成度: 50%)

PGE<sub>2</sub> はヒト破骨細胞前駆細胞に「作用して、破骨細胞形成を抑制する液性因子(破骨細胞形成抑制因子)を産生することを明らかにしたが、その因子の同定に至っていない。そのため、ヒトの炎症性骨吸収に関わる PGE<sub>2</sub> の作用をどのように位置づけるか明らかにできなかった。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

簡便なヒトの破骨細胞形成系の確立されたため、各種疾患における破骨細胞前駆細胞の動態を調べる事が可能となった。また、PGE<sub>2</sub> に対する作用を除いて、ヒト破骨細胞とマウスの破骨細胞の形成機構は基本的に同じであること、ヒト破骨細胞とマウス破骨細胞の機能調節も同じであることから、マウスの実験系で得られた知見がヒトに応用できる事が明らかとなった。このことは、骨粗鬆症等の代謝性骨疾患の治療薬の開発や治療指針の確立にマウスのデータを参考にできることを意味するもので、極めて学術的かつ社会的意義が大きいと考えられる。一方、ヒト CD14 陽性細胞が産生する破骨細胞形成抑制因子の同定は国際的にも注目されると考えられる。

##### 3) 今後の展望について

PGE<sub>2</sub> が骨吸収促進因子であることは広く認められているが、ヒトの炎症性骨吸収に関して PGE<sub>2</sub> はどのように関わるか不明である。この事を明らかにしないと、ヒトの場合 COX2 阻害剤を炎症性骨吸収の抑制薬として利用できるか否か定かではない。ヒト CD14 陽性細胞が産生する破骨細胞形成抑制因子の同定を行うことは急務である。この解析を通して、ヒトの炎症性骨吸収に対する PGE<sub>2</sub> の役割が明らかにされるであろう。

##### 4) 研究内容の効率性について

研究期間と達成度を考えると、効率よく研究が遂行されたと考える。本研究を通して、3 論文が国際的学術誌に掲載あるいは掲載予定である。更に現在 1 論文

が投稿中である、加えて、3 論文を執筆中である。また、大阪大学整形外科学教室、国立相模原病院との共同研究も進行しており、研究の共同性に関しても効率的であると考えられる。

## 6 結論

(1)ヒト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実験系を構築した。末梢血 CD14 陽性細胞から破骨細胞への分化誘導に関わるサイトカインは、マウスの破骨細胞形成と同様であった。(2)マウスの破骨細胞形成とヒト破骨細胞形成に対して PGE<sub>2</sub> は異なる作用を有する可能性が示された。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が、ヒトの破骨細胞前駆細胞は PGE<sub>2</sub> 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可能性が示された。

## 7 研究発表

### 1) 国内

口頭発表	14 件
原著論文による発表	0 件
それ以外 (レビュー等) の発表	25 件

そのうち主なもの

#### 論文発表

- 伊藤雅波、高橋直之：「破骨細胞の形成・機能の制御」松本俊夫編「骨・軟骨代謝と注目の骨疾患」、羊土社、東京、pp60-73, 2002.
- 宇田川信之、小竹茂、鎌谷直之、高橋直之、須田立雄：骨吸収における TNF 関連サイトカインの役割—慢性関節リウマチにおける骨吸収機構の解明を目指して—、リウマチ、42:3-12, 2002.
- 宇田川信之、高橋直之：破骨細胞の分化と機能発現における RANKL の役割、日本臨床 60:672-678, 2002.
- 宇田川信之、高橋直之：破骨細胞の分化と骨吸収のメカニズム-歯周病における骨吸収機構の解明を目指して-、炎症と免疫 10(3): 229-238, 2002.
- 宇田川信之、須田幸治、高橋直之：サイトカインによる破骨細胞の分化、Annual Review 免疫 2003 pp93-104, 2002.
- 小林泰浩、宇田川信之、高橋直之：破骨細胞の形成と機能を調節する炎症性サイトカインとリポ多糖 (LPS) の作用機構、実験医学、20(17):2482-2487, 2002.
- 高橋直之：最新用語解説「OPG」骨粗鬆症治療、1(1):56-57, 2002.
- 高橋直之：カラーアトラス「破骨細胞の形成のメカニズム」骨粗鬆症治療、1(1):2-3, 2002.
- 高橋直之：骨代謝、破骨細胞、骨芽細胞、骨粗鬆症、骨誘導因子、破骨細胞活性化因子について、西澤俊樹、今井奨、西原達次、花田信弘(編)「口腔分子生物学小事典」、口腔保険協会、東京、2003.
- 高橋直之：骨吸収. 福永仁夫編「実践・骨代謝マーカー」メディカルレビュー社、東京、pp39-52, 2003.
- 宇田川信之、高橋直之：図説：ビスフォスホネートの作用機序、日本臨床 61 (2):178-179, 2003.
- 小林泰浩、高橋直之：破骨細胞の分化と活性制御. 宮坂信之、野田政樹、西岡久寿樹 (編)「骨・関節疾患」朝倉書店、東京 pp.51-55, 2003.
- 小林泰浩、高橋直之：骨吸収の調節機構 (OPG/RANKL, RANK の相互作用)、日本臨床 61 (2):22-206, 2003.
- 高橋直之：カラーアトラス&レビュー「三次元断面画像にみる骨構造に及ぼすリゼドロネートの作用」、骨粗鬆症治療、2:2-3, 2003.
- 高見正道、高橋直之：B ビスホスホネートの物理科学的・薬物動態・生理作用、痛みと臨床 3(3): 312-318, 2003.
- 中村美どり、宇田川信之、宮沢裕夫、高橋直之：骨のカップリング因子の探索-オステオプロテゲリン(OPG)遺伝子欠損マウスを用いた解析、The Bone 17 (5): 461-467, 2003.
- 高橋直之：破骨細胞の分化と機能を調節するシグナル伝達系、松本歯学 29 (2): 143-151, 2003.
- 小林泰浩、宇田川信之、高橋直之：骨吸収調節機構、最新医学、58:2631-2639, 2003.
- 小林泰浩、宇田川信之、高橋直之：破骨細胞の形成と機能を調節する炎症性サイトカインとリポ多糖(LPS)の作用機構、実験医学、20:2482-2487, 2003.
- 高橋直之、小林泰浩、宇田川信之：骨吸収を促進する炎症性サイトカインと細菌菌体成分の作用機構、エンドトキシン研究 6 : 36-42, 2003.
- 山下照仁、高橋直之：骨吸収・骨形成のメカニズム、Hormone Frontier in Gynecology, 10(4):341-346, 2003.
- 溝口利英、高橋直之：RANKL/RANK 系による骨吸収の制御、治療学、37(12):1242-1246, 2003.
- 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.
- 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.
- 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.

#### 学会発表

- 高直之：骨代謝共役のバランス制御の重要性 (パ

- ネルディスカッション、第24回宇宙ステーション利用計画ワークショップ、東京、2002年7月17日)
2. 高橋直之：骨吸収はどのように調節されているか（特別講演、第40回日本歯科理工学会学術講演会、塩尻、2002年8月31日）
  3. 高橋直之：病原性細菌の菌体成分による骨吸収誘導機構（シンポジウム、第8回日本エンドトキシン研究会、大阪、2002年11月29日）
  4. 高橋直之：破骨細胞を調節するシグナル伝達系と骨・歯周疾患における骨破壊（特定領域研究「骨格系の制御プログラムと疾患」公開シンポジウム、東京、2003年1月31日）
  5. 高橋直之：破骨細胞の分化と機能を調節するRANKL-RANKシグナル（特別講演、第5回岩手軟骨研究会、盛岡、2003年2月27日）
  6. 高橋直之：p38 MAPK-mediated signals are crucially involved in osteoclast differentiation（シンポジウム、第76回日本薬理学会・第80回日本生理学会同一会、福岡、2003年3月25日）
  7. 高橋直之：骨吸収の分子メカニズム（シンポジウム、第26回日本医学会総会、福岡、2003年4月5日）
  8. 高橋直之：骨吸収と骨形成に及ぼす重力の生理作用とその共役機構の解明（シンポジウム、宇宙環境利用に関する地上公募研究成果報告会、東京、2003年8月5日）
  9. 高橋直之：骨吸収機序に関する研究-マウスの破骨細胞とヒトの破骨細胞の比較-（シンポジウム、厚生労働科学研究費補助金事業関節リウマチ・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」研究班会議、東京、2003年12月2日）
  10. 高橋直之：破骨細胞の骨吸収を抑制するカルシトニンの作用機構（オーバービュー、第3回カルシトニン/副甲状腺ホルモン研究会、東京、2003年12月13日）
  11. 高橋直之：破骨細胞を調節するシグナル伝達系と骨・歯周疾患における骨破壊（特定領域研究「骨格系の制御プログラムと疾患」班会議、東京、2004年1月23日）
  12. 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、4月3日）
  13. 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、8月7日）
  14. 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)

## 2) 海外

- |                |     |
|----------------|-----|
| 口頭発表           | 4件  |
| 原著論文による発表      | 15件 |
| それ以外（レビュー等）の発表 | 5件  |
| そのうち主なもの       |     |

## 論文発表

1. Takahashi N, Udagawa N, Takami N, Suda T: Cells of bone: Osteoclast generation. In Principles of bone biology, ed by Raisz LG, Rodan GA, Bilezikian JP, Academic Press, San Diego, pp109-126, 2002.
2. Katagiri T, Takahashi N: Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Diseases* 8(3):147-159, 2002.
3. Li X, Udagawa N, Itoh K, Suda K, Murase Y, Nishihara T, Suda T, Takahashi N: p38 MAP kinase-mediated signals are required for inducing osteoclast differentiation but not for osteoclast function. *Endocrinology* 143(8):3105-3113, 2002.
4. Udagawa N, Kotake S, Kamatani N, Takahashi N, Suda T: The molecular mechanism of bone destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research* 4(5):281-289, 2002.
5. Katagiri T, Imada M, Yanai T, Suda T, Takahashi N, Kamijo R: Identification of a BMP-responsive Element in the Id1 gene. *Genes Cells* 7(9):949-960, 2002.
6. Nakamichi Y, Shukunami C, Yamada T, Aihara K, Kawano H, Sato T, Nishizaki Y, Yamamoto Y, Shindo M, Yoshimura K, Nakamura T, Takahashi N, Kawaguchi H, Hiraki Y, Kato S. Chondromodulin I is a bone remodeling factor. *Mol Cell Biol* 23(2):636-644, 2003.
7. Itoh K, Udagawa N, Kobayashi K, Suda K, Li X, Okahashi N, Nishihara N, Takahashi N: LPS promotes the survival of osteoclasts via Toll-like receptor 4, but cytokine production of osteoclasts in response to LPS is different from that of macrophages. *J Immunol* 170(7):3688-3695, 2003.
8. Takahashi N, Sasaki T, Tsouderos Y, Suda T: Strontium ranelate (S12911-2) inhibits osteoclastic bone resorption. *J Bone Miner Res* 18(6):1082-1087, 2003.
9. Takami M, Suda K, Sahara T, Itoh K, Nagai K, Sasaki T, Udagawa N, Takahashi N: Involvement of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in specific incorporation of risedronate into osteoclasts. *Bone* 32(4):341-349, 2003.
10. Takahashi N, Udagawa N, Tanaka S, Suda T: Generating murine osteoclasts from bone marrow.

- Methods Mol Med 80:129-144, 2003.
11. Nakagawa H, Takami M, Udagawa N, Sawae Y, Suda K, Sasaki T, Takahashi N, Wachi M, Nagai K, Woo JT: Destruins, cyclodepsipeptides, block the formation of actin rings and prominent clear zones and ruffled borders in osteoclasts. *Bone* 33(3):443-455, 2003.
  12. Li X, Udagawa N, Takami M, Sato N, Kobayashi Y, Takahashi N: p38 MAPK is crucially involved in phagocytosis or dendritic cell differentiation of bone marrow macrophages. *Endocrinology* 144(11):4999-5005, 2003.
  13. Nakamura M, Udagawa N, Matsuura S, Mogi M, Nakamura H, Horiuchi H, Saito N, Hiraoka BY, Kobayashi Y, Takaoka K, Ozawa H, Miyazawa H, Takahashi N: Osteoprotegerin regulates bone formation through a coupling mechanism with bone resorption. *Endocrinology* 144(12):5441-5449, 2003.
  14. Suda K, Udagawa N, Sato N, Takami M, Itoh K, Woo JT, Takahashi N, Nagai K: Suppression of osteoprotegerin expression by PGE<sub>2</sub> is crucially involved in LPS-induced osteoclast formation. *J Immunol* 172(4):2504-2510, 2004.
  15. 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 $\alpha$ , and MyD88 knockout mice exhibit a low turnover osteoporotic phenotype. *J Exp Med* 200(5):601-611, 2004.
  16. 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, 2004.
  17. 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, 2004.
  18. 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, 2004.
  19. 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, 2004.
- 学会発表
1. Takahashi N : Osteoclast stem cell- differentiation and function (シンポジウム、The IXth Congress of the International Society of Bone Morphometry, Edinburgh, UK, 2002年4月8日)
  2. Takahashi N: Regulatory mechanism of osteoclast differentiation and function (招待講演、3<sup>rd</sup> Yonsei Dental Symposium, Seoul, Korea, 2003年1月22日)
  3. Takahashi N: Inflammation and osteoclastogenesis. (16th International Congress of International Anatomy Association, Kyoto, Japan, 2004年8月25日)
  4. Takahashi N: Role of MyD88-mediated signals in osteoclast differentiation and function. (The 11th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress, Jeju, Korea, 2004年9月15日)
- 8 知的所有権の出願・取得状況 (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

研究課題：関節リウマチ（RA）ナース細胞によって誘導される破骨細胞に関する研究

分担研究者：所属機関 鈴木隆二：独立行政法人国立病院機構 相模原病院 臨床研究センター・室長  
(研究協力者)：（前田朋子：塩野義製薬株式会社 創薬研究所・主任研究員）

## 1 研究目的

我々は、RA 患者の骨髄および滑膜組織に pseudoemperipoleosis 能を有するナース細胞が特異的に存在し、罹患患部に浸潤する各種血液細胞のそれぞれの機能亢進および長期間の生存などに関与し慢性化に重要な役割を果たす事を報告してきた。しかし、ナース細胞には特異的な抗体の存在が確認されていないことから、その病変部における組織学的検討が成されず、RA 滑膜を構成する細胞群中における本細胞の詳細な同定が成されていない。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の探索を目的とした。本研究では、ナース細胞に特異的に発現する遺伝子を探索する方法として、2種類の cDNA subtraction を行った。また、RA における高度な骨一関節破壊の発症・進行機序にナース細胞がどのように関与するかを検討し、RA 患者関節液および健康人末梢血単球を RA ナース細胞と共培養を行うことにより破骨細胞前駆細胞が選択的に分化・誘導され、その単離と純粋培養系を確立した。最終分化段階である破骨細胞の誘導に作用するサイトカインを検討し、成熟破骨細胞への分化系を解析し、破骨細胞の多様性の存在を確認するとともに、破骨細胞特異的遺伝子の検出と解析を行い、ヒトにおける破骨細胞の多様性の存在と RA における骨一関節破壊における破骨細胞の生物学的意義を検討した。

## 2 研究方法

①ナース細胞関連遺伝子：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)と sulfatase-like 遺伝子(#3-44)を同定した。

②破骨細胞関連：破骨細胞前駆細胞の純培養については、RA 患者由来滑液および健康人末梢血由来単球は CD14 マイクロビーズにより CD14 陽性単核細胞として単離した。これら細胞は RA ナース細胞の単層培養と共培養した。培養後 2～3 週間後、増殖した単核球について TRAP 染色、FACS によるマーカーの検出を行った。成熟破骨細胞の分化に関しては、RA ナース細胞上で増殖した単核球は半浮遊で弱く RA ナース細

胞と接着し、比較的簡単に純粋単離する事が可能である。これら細胞について各種サイトカインを添加することにより成熟破骨細胞へと分化誘導が惹起されるか検討を行った。分化誘導された成熟破骨細胞については、既知のマーカーの検出と破骨能の検討を行った。さらに、破骨細胞特異的遺伝子の解析に関しては関節液由来 CD14 陽性単核細胞、破骨細胞細胞前駆細胞および成熟破骨細胞から mRNA を回収し、differential display により各細胞が特異的に発現する遺伝子の解析を行った。

(倫理面への配慮)

本実験に給した臨床サンプルは、全て説明と同意の上入手した。

## 3 研究結果

### ① ナース細胞関連遺伝子：

1) #4-14/SRCL の構造・発現と機能に関して、#4-14/SRCL は 472 アミノ酸残基からなり、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% 相同であった。各種細胞における発現を検討した結果、RA ナース細胞、胸腺ナース細胞、皮膚ナース細胞で発現し、非ナース細胞では Hs683 を除いて発現していなかった。また、ヒト血管内皮細胞 (HUVEC, HCAEC, HAEC) で発現し、ヒト組織では心臓、胎盤、小腸、睾丸、卵巢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。肝臓での発現が無い事から、全ての血管内皮細胞に発現しているわけではない。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 箇所存在し、リソソームでのリガンド解離に関わる事が予想された。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、Ca<sup>2+</sup>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。実際に擬似リガンドとして、糖鎖付加ポリアクリルアミド粒子の取り込みを調べた結果、糖鎖がN-acetylgalactosamine(GalNac)のみ取り込み活性が確認された。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%程度の相手が認められた。

2) sulfatase-like 遺伝子(#3-44)に関しては、検討したナース細胞の機能を有する全ての細胞に発現が確認され、非ナース細胞(線維芽細胞株、上皮細胞株)にはその発現は観察されなかった。現在、全長鎖をクローニング中であり、本遺伝子のナース細胞機能に係わる検討を行っている。

#### ②破骨細胞関連:

1) RA ナース細胞によるCD14陽性細胞の維持: RA ナース細胞との共培養で増殖する細胞は分離直後のCD14陽性細胞と比較して細胞質に富んだ単核球に変化する。これらの単核球(様細胞)は3ヶ月以上にわたりナース細胞上で増殖し、TRAP陽性で、貪食能を有していたが単核球とは明らかに異なる細胞に分化し、CD14陽性ではあるがRA ナース細胞との共培養下でCD11a,CD35,CD86などが陰性に成る事が確認された。また、CD1a,CD83陰性であり樹状細胞とも異なる細胞であることが示唆されたRA ナース細胞との共培養後約3週間で、98%以上の単核球由来細胞がこのような分化を遂げる事が明らかになった。

2) TRAP陽性単核球の破骨細胞様細胞への分化: TRAP陽性単核球は破骨細胞前駆細胞の可能性が考えられた。本細胞を共培養系から単離し、種々のサイトカインによりこの細胞を刺激する事により単独培養下において多核細胞へと分化するか否かを検討した。TRAP陽性単核球はIL-3,IL-5,IL-7あるいはGM-CSFの存在下に全ての細胞が多核巨細胞へと分化した。これらサイトカインにより分化した多核巨細胞は、象牙切片上において吸収能を有していた。これらの分化は、各サイトカイン特異的中和抗体や、各サイトカイン受容体に対する抗体存在下に阻害された。また、近年、マウスの破骨細胞系で極めて重要とされているRANKL(receptor activator of NF-κB)とM-CSFの共存条件下では、上記サイトカインと比較して約50%程度のfusion indexを認めるにとどまった。また、この破骨細胞はアクチンリングを有し、カルシトニン受容体やMMP-9,carbonic anhydraseIIなど、従来の破骨細胞にあるとされる分子の存在も確認された。以上から、RA ナース細胞との共培養で分化増殖するCD14陽性 TRAP陽性単核細胞はヒト破骨細胞前駆細胞であり、上記サイトカインの存在かで成熟破骨細胞に分化することが明らかになった。

3) 我々の破骨細胞と従来の破骨細胞の相違: 破骨細胞の機能としてMMP産生について検討を行った。我々が記載した破骨細胞はMMP-9とMMP-12を高産生していることが確認された。一方、RANKL+M-CSF誘導破骨細胞はMMP-9は発現しているがMMP-12の発現は確認されなかった。そこで、RA患者の骨破壊部位の連続組織切片を作成し、MMP-9とMMP-12について免疫組織染色を行った。その結果、MMP-12陽性およびMMP-12陰性の破骨細胞の存在を確認した。以上から、RA患者においては異なる破骨細胞の存在が示唆された。

4) 破骨細胞特異的遺伝子の探索: 上記の解析結果から、我々は、ヒト破骨細胞系の全てを純粋培養系として試験内で操作する事が可能となった。従来から破骨細胞の同定に必要な特異的マーカーは存在していない。そこで、これら破骨細胞前駆細胞、成熟破骨細胞に特異的に発現する遺伝子の発現をdifferential display法により行った。その結果、既知・新規遺伝子合わせておよそ20の成熟破骨細胞特異的遺伝子、および15の破骨細胞前駆細胞特異的遺伝子を見出した。このうち、新規であった4回膜貫通型の膜タンパク7-44に関してさらに解析を行ったところ、本遺伝子は成熟破骨細胞にのみ特異的に発現し、末梢単核球や破骨細胞前駆細胞には発現が確認されない事、他の組織にも殆ど全く発現が観察されない事が確認されたため、7-44コードする膜タンパクに対しポリクローナル抗体を作成した。この抗体はヒトおよびマウスの破骨細胞を特異的に認識する事がウエスタンブロッティングおよびヒト骨破壊部位における免疫組織染色で確認された。

#### 4 考察

##### ① ナース細胞関連遺伝子:

1) #4-14/SRCLの構造・発現と機能に関して検討した結果から、本遺伝子は構造上、classCタイプのスカベンジャーの基本構造をとるが、末端にマクロファージレクチン構造を付加したハイブリッドタイプの新規構造を有し、変性LDL等との取り込みは非常に弱いことが実験で確認されている。レクチン部位に関する検討からは、糖鎖を認識することで、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。

2) sulfatase-like 遺伝子(#3-44)に関しては、機能は不明であるが、ナース細胞に対してきわめて特異性が高い事が確認されており、本分子の発現解析検討は、ナース細胞を同定するツールとして期待される。さらに、本分子の機能を確認する予定であるが、ナース機能と相関性が得られれば、ナース機能の抑制によら

の新規治療戦略が可能になると思われる。

②破骨細胞関連：RA において、このような破骨細胞前駆細胞が大量に存在し、これが RA 特有な線維芽細胞である RA ナース細胞によって維持され、RA の炎症時に存在するサイトカインのみで最終分化できるという知見は、今までのマウスを中心とする骨代謝の流れとは異なる。我々は、RA 病態の観察から RA ナース細胞の存在と、その病態形成と慢性化に伴う病態維持にその細胞の重要性を指摘してきた。今回、我々は RA の骨破壊に関わる破骨細胞の誘導機構について検討を行った結果、ヒトにおいては破骨細胞誘導系に多様性があり、従来マウス系でよく理解された RANKL+M-CSF 誘導系以外にも、既知のサイトカインで最終分化誘導ができる事を明らかにした。さらに、本実験系により、従来未解決であった単球-前駆破骨細胞-成熟破骨細胞の各分化段階を詳細に解析し、特異的遺伝子を見出す事が可能となったと同時に、RA 骨関節破壊の病態解明にも新たな知見を加えることができるものがある。今後はより多くの新規破骨細胞特異的遺伝子を見出すための解析が可能である。

## 5 評価

### 1) 達成度について

①ナース細胞関連遺伝子：ナース細胞が RA の罹患幹部に特異的に存在することを報告し、その機能が RA 慢性化に重要に係わることを報告してきた。今回の班研究で、それに特異的に発現する幾つかの遺伝子が探索された事から、RA における本細胞の詳細な解析が可能となる。また、早期 RA 患者の骨髄の変化が関節症状の発症に先駆けて惹起されるという本研究の中核と成す事実について、RA ナース細胞の関与を想定しているが、骨髄中における本分子の発現頻度の検討が可能となった。これらにより、RA の病態発症と病態形成、慢性化と言った複雑な RA の成立に関する新たな研究方向性が開かれると確信している。また、RA の治療に関しても、RA 滑膜に特異的に存在する RA ナース細胞を選択的に狙える分子として位置づけられる可能性がある。

②破骨細胞関連：今回の班研究で見出されたヒト破骨細胞の純粋培養系の確立により、ヒトにおける破骨細胞の機能解析が一段と進展した。また、RA における破骨細胞が従来マウスモデルで確立した誘導系とは異なり、RA 炎症時に産生される炎症性サイトカインで分化・誘導されることや、その際誘導される破骨細胞の性状が MCSF-RANKL で誘導される破骨細胞と異なる点も明らかにした点は評価に値する。さらに、本系の確立により、破骨細胞の分化ステージに特異的に発現する遺伝子の探索が可能となり、7-44 遺伝子の発見に繋がった点も評価される。

### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

RA に特徴的な細胞群に解析から RA ナース細胞を同定し、本細胞の RA 病因・病態における関与を想定した研究から幾つかの新規ストーリーの展開を可能とした。また、今回の班研究の成果からそれを物質として同定するが出来た。本研究においては、RA の分野で米国 NIH の主任研究官である Dr.Lipsky との共同研究も進展中である。また、RA に骨破壊に RA 特異的な破骨細胞の存在と、特異的遺伝子の探索に成功した事は、今後、RA 骨破壊を選択的に抑制する方法の展開が可能となった事を意味し、その成果が広く評価される可能性がある。

### 3) 今後の展望について

RA は現代の発達した医療技術と知識を以ってしても治療に抵抗し進行する関節破壊に対して、我々はその病態解明を通じ、新たな治療・予防法を開発していく事である。RA ナース細胞に関しては、RA 病態形成の中心的役割を演じ、RA の破骨細胞誘導にも重要に係わることが明確になった。また、これら細胞に特異的に発現する遺伝子の解析から幾つかの候補も選択した。今後は、これらの検討を継続し製薬企業レベルの安全性を目指した特異性および機能解析を行い治療・予防法の確立に沿った検討を行う。

### 4) 研究内容の効率性について

本研究班においては、多彩な研究協力者の参画と主任研究者の的確な研究方針決定がなされ、研究目的の早期実現を行ってきた。その結果、本研究内容は主任研究者の策定した研究展開が全て新規であり、得られた生物学的現象が日本から発せられた新規のものである。それを分担研究者および研究協力者が適時・的確な実験手法で展開した成果である。比較対照はないが、RA ナース細胞の概念や新規破骨細胞においては、我々独自の発見であり、それを標的とした検討と探索は効果的にも妥当と考えられる。

## 6 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 PLA<sub>2</sub> 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。RA 病態の形成とその維持に重要に関わる RA ナース細胞は、T 細胞、B 細胞、骨髄球と特徴的な細胞間相互作用を示すことを報告してきた。今回、RA ナース細胞は RA の高度な骨関節破壊に関与する破骨細胞の分化と成熟に深く関

わる事を明らかにした。さらに、ヒト破骨細胞系の全分化段階を試験管内で操作することを可能とした結果、ヒト破骨細胞に特異的に発現する新規4回膜貫通型レセプターの単離に成功した。

## 7 研究発表

### 1) 国内

口頭発表	2件
原著論文による発表	0件
それ以外（レビュー等）の発表	1件
そのうち主なもの	
論文発表	

### 2) 海外

口頭発表	0件
原著論文による発表	21件
それ以外（レビュー等）の発表	1件
そのうち主なもの	
論文発表	
学会発表	

1. Takeuchi E, Tanaka T, Umemoto E, Tomita T, Shi K, Takahi K, Suzuki R, Ochi T, Miyasaka M.

VLA-4-dependent and -independent pathways in cell contact-induced proinflammatory cytokine production by synovial nurse-like cells from rheumatoid arthritis patients.

Arthritis Res. 2002;4(6):R10. Epub 2002 Aug 12.

2. Tsuboi H, Matsui Y, Hayashida K, Yamane S, Maeda-Tanimura M, Nampei A, Hashimoto J, Suzuki R, Yoshikawa H, Ochi T.

Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) positive cells in rheumatoid synovium may induce the destruction of articular cartilage.

Ann Rheum Dis. 2003 Mar;62(3):196-203.

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

SRCL/CL-P1 recognizes GalNAc and a carcinoma-associated antigen, Tn antigen.

J Biochem (Tokyo). 2003 Mar;133(3):271-7.

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

Epub 2004 Feb 03

5. Matsutani T, Shiiba K, Yoshioka T, Tsuruta Y, Suzuki R, Ochi T, Itoh T, Musha H, Mizoi T, Sasaki I.

Evidence for existence of oligoclonal tumor-infiltrating lymphocytes and predominant production of T helper 1/T cytotoxic 1 type cytokines in gastric and colorectal tumors.

Int J Oncol. 2004 Jul;25(1):133-41.

## 8 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

### 1 特許取得

① 新規破骨細胞関連遺伝子（出願中）

② 破骨細胞の純粋培養系の確立（出願中）○○○

### 2 実用新案登録

該当なし

### 3 その他

該当なし



研究課題：関節リウマチにおける破骨細胞活性化亢進に関わる分子に関する研究

分担研究者：所属機関 独立行政法人国立病院機構大阪南医療センター

氏名 佐伯行彦

## 1. 研究目的

関節リウマチ(RA)において临床上最も重大な問題である骨破壊は病理学的検討などから破骨細胞による骨吸収の亢進、つまり破骨細胞の活性化 (osteoclastogenesis) 亢進が主たる原因と考えられている。したがって、RA の破骨細胞活性化亢進に関わる分子を明らかにすることは、RA の骨破壊の診断・治療の開発に不可欠である。本研究では、とくに (1) 骨吸収性疾患の原因分子のひとつとして注目されている、オステオポンチン (OPN) の RA の破骨細胞活性化亢進への関与を明らかにすること、(2) 破骨細胞の多核巨細胞化に関わる分子の同定、動的解析を目的とする。

## 2. 方法

(1) 関節炎局所での OPN の発現の確認: RA の動物モデル関節炎 (マウスコラーゲン誘導関節炎; CIA) において、骨吸収部 (骨びらん部) における OPN の発現を mRNA レベル (in situ hybridization 法)、タンパクレベル (免疫組織染色法) で検討した。また、RA 患者由来の滑膜組織における OPN の発現を免疫組織染色法で検討した。さらに、RA 患者の関節液中の OPN の濃度を酵素免疫法; EIA で測定した。コントロールとして、変形性関節症 (OA) 患者由来の滑膜組織、関節液を用いた。

(2) 関節炎の破骨細胞活性化亢進における

OPN の関与の確認: 鈴木らの報告 (J Rheumatol 25:1154-60,1998) によると、CIA を誘導したマウスの関節炎を惹起している部位より細胞を分離し、in vitro 無刺激下で培養すると多数の骨吸収能を有する成熟活性化した破骨細胞が spontaneously に誘導される。この現象は、active な関節炎局所での osteoclastogenesis の亢進を反映したものと考えられるが、この関節炎局所から分離した細胞の培養上清の OPN の濃度を測定する。この系において、OPN の添加、中和 (中和抗体の添加) による osteoclastogenesis を検討した。

(3) OPN の RA における osteoclastogenesis 亢進の機序、とくに RANK/RANKL/OPG 系との関連: 上記の系では、非関節炎局所から分離した細胞に比べて RANKL の発現が亢進し、OPG の発現は低下し、osteoclastogenesis の亢進に RANK/RANKL/OPG 系の関与が示唆されている。この系において、OPN 添加による RANK/RANKL/OPG 系の発現への影響を real-timePCR 法で検討した。また、ストローマ細胞 (ST2 細胞) における OPN による RANK/RANKL/OPG 系の発現への影響を real-time PCR 法を用いて検討した。

(4) 破骨細胞前駆細胞 (RAW246.7) を用いた RANKL 添加による成熟破骨細胞への分化系において、膜タンパクの統合機能分子の

tetraspanin や lipid raft の細胞融合/多核巨細胞化への関与と作用の動的解析を行う。

RAW246.7 細胞での TM4SF (とくに CD9、CD81) の発現を FACS で確認する。RAW246.7 細胞の破骨細胞への分化系で抗 TM4SF 抗体 (抗 CD9、抗 CD81 抗体) および siRNA による破骨細胞分化、細胞融合 (多核巨細胞化) への影響 (抑制作用の有無) を検討する。RAW246.7 細胞へ TM4SF (CD9 あるいは CD81) GST 融合分子の遺伝子を導入した permanent transfectant を作成し、RANKL 刺激で破骨細胞へ分化させ、その各過程 (とくに細胞融合時) における TM4SF 分子の局在を time-lapse 蛍光顕微鏡下で観察し、動的な変化を捉える。また、Lipid raft を破壊 (methyl- $\beta$ -cyclodextrin、filipin を添加) し、細胞融合や破骨細胞分化への影響を検討する。また、その時の TM4SF 分子の動的変化を検討する。

(倫理面への配慮)

本研究は当施設での倫理審査委員会での承認のもとで行った。また、本研究は患者の遺伝子情報に関するものではなく、患者個人情報扱うものではない。さらに、すべてのヒト由来の検体の採取は文書による説明、同意の上で行った。とくに、患者 (あるいは健康人) 由来の滑膜組織や関節液の採取はこの研究のためだけには行わず、通常の検査/治療の際の余剰のものを用いた。動物 (マウス) の実験は、当施設での動物実験指針を遵守し行った。

### 3. 研究結果

マウス CIA 関節炎局所 (骨びらん部位) で

は、in situ hybridization 法で、活性化した破骨細胞による骨吸収部位に一致して、OPN の mRNA が検出された。また、骨吸収部に存在する活性化した破骨細胞に免疫組織染色法で OPN が検出された。さらに、RA 患者の滑膜組織では、表層滑膜細胞に OPN の局在をみとめた。一方、RA の関節液中では血液中の 10 倍から 100 倍の高濃度 OPN が検出され、また、OA の関節液中の OPN 濃度に比べ有意に高値であった。関節液中の OPN 濃度は炎症の程度 (血中 CRP 値) と相関を認めた。以上から、破骨細胞による active な骨吸収部位では OPN の産生の亢進が認められた。

CIA を誘導したマウスの関節局所由来の細胞を無刺激下で培養すると多数の活性化した破骨細胞 (TRAP 陽性、Pit assay 陽性) が in vitro で誘導された。一方、CIA を誘導しなかったマウスの関節由来の細胞では、活性化された破骨細胞は誘導されなかった。以上のことから、鈴木らの報告のとおり、active な関節炎局所では osteoclastogenesis の亢進があることが示唆された。また、この関節炎を惹起している部位から分離した細胞は、コントロール (非関節炎部位の細胞) に比べて OPN の産生亢進が観られた。さらに、OPN の添加により、破骨細胞の誘導はより亢進し、OPN に対する中和抗体の添加により破骨細胞の誘導は有意に低下したことから、OPN は関節炎局所での osteoclastogenesis の亢進に positive に作用していることが示唆された。また、OPN の添加により、RANKL の発現の亢進、OPG の低下が認められたことから、この OPN の osteoclastogenesis 亢進作用の一部は

RANK/RANKL/OPG 系を介したものであることが示唆された。さらに、ストローマ細胞において、OPN は RANKL の発現の亢進、OPG の低下をもたらしたことから、OPN の osteoclastogenesis 亢進の作用は、直接的な破骨細胞への作用以外にストローマ細胞にも作用していることが示唆された。破骨細胞の前駆細胞において tetraspanin ファミリーの CD9、CD81 の発現が確認された。

#### 4. 考察

以前から OPN は破骨細胞による骨吸収の最終ステップである、骨との接着に必須の分子として知られ、RA の骨吸収への関与が示唆されていたが、ノックアウトマウスなどの実験では一定の結論が得られておらず、議論があった。本研究結果から、OPN は RA の osteoclastogenesis 亢進による骨吸収に positive に作用している分子であることが明らかとなり、また、OPN の作用の一部は osteoclastogenesis の主要なシグナル系である

RANK/RANKL/OPG 系を介したものであることが明らかとなった。以上から、OPN は新たな RA の骨破壊の診断/評価の指標や治療上の標的分子となることが期待できる。さらに、破骨細胞の前駆細胞に tetraspanin ファミリーの CD9、CD81 が発現していたことから、これらの分子が破骨細胞の細胞融合や多核巨細胞化に関わっている可能性が示唆された。

#### 5. 評価

##### 1) 達成度について

RA の osteoclastogenesis 亢進における OPN の関与については、ほぼ計画どおり positive 因子として十分なエビデンスを得ることができた。

しかしながら、RA の骨破壊の診断や予測の指標や治療の標的としての有用性についての検討は不十分で今後更なるエビデンスの蓄積が必要である。破骨細胞の細胞融合/多核巨細胞化における、膜タンパク統合機能分子としての tetraspanin ファミリー分子や lipid raft の関与についての検討は、準備に時間が費やされ、まだ、開始したばかりで、不十分であり、今後の更なる検討が必要である。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究の成果は、日本リウマチ学会だけでなく、リウマチ分野の国際的学会である ACR (American College of Rheumatology) の年次総会でも発表し、また、この分野での権威ある雑誌である、「Arthritis Rheumatism」や「J Rheumatology」などに掲載され、学術的、国際的評価を得た。また、本研究に係る特許等(申請中のものも含む)は4件あり、今後の社会的活用が期待される。

##### 3) 今後の展望について

OPN に関しては、他の研究組織(国立病院機構のネットワーク)で、現在、臨床応用に関する研究(関節リウマチの骨破壊予測因子としての有用性に関する前向き試験)を併行して実施中であり、また、他の研究施設において、ヒト型抗体がすでに作成されている。今後、OPN の関節リウマチにおける臨床的意義が解明されることにより治療などへの臨床応用が期待される。破骨細胞の細胞融合に関する研究はまだ、新しい分野の研究であり、未知の部分が多いが、関節リウマチにおける破骨細胞活性化亢進機序に関する斬新な情報

が得られる可能性がある。

#### 4) 研究内容の効率性について

OPNに関する研究成果については、この研究期間に世界で初めての知見を得ることができ、効率的に実施できた。破骨細胞の細胞融合/多核巨細胞化に関わる分子に関する研究では、これまであまりこの分野での研究が行われていなく、仕込みの実験や細胞や抗体等の材料の準備が必要で時間を費やしているが、準備はほぼ整った。

#### 6. 結論

OPNは、関節リウマチにおける破骨細胞活性化に関わる重要な因子のひとつであり、その作用の一部はRANK/RANKL/OPG系を介したものであることが初めて明らかにされた。OPNは関節リウマチの診断/骨破壊評価の新しい指標や治療法の標的分子として有用と考えられる。

#### 7. 研究発表

##### 1) 国内

口頭発表	8件
原著論文による発表	6件
それ以外(レビュー等)	4件

そのうち主なもの

##### 論文発表

佐伯行彦・骨吸収性疾患におけるオステオポンチン・「医療」・58巻・335-40,

2004年

##### 学会発表

美馬 亨、佐伯行彦 (last) 他 11名・関節リウマチの関節局所でのオステオポンチンの産生の亢進・第46回日本リウマチ学会・2002年4月・東京

美馬 亨、佐伯行彦 (last) 他 13名・ムチランス型関節リウマチの骨髄におけるオステオポンチン産生の亢進・第47回日本リウマチ学会・2003年4月・東京

##### 2) 海外

口頭発表	4件
原著論文による発表	16件
それ以外(レビュー等)	1件

そのうち主なもの

##### 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):669-71, 2004
3. **Saeki Y.** Mima T, Ishii T, Ogata A, Kobayashi H, Ohshima S, Ishida T, Tabunoki Y, Maeda M, Kon S, Kinoshita N, Uede T, Kawase I. Enhanced production of osteopontin in multiple myeloma: clinical and pathogenic implications. **Br J Haematol** 123(2): 263-70, 2003
4. Yamaguchi N, Ohshima S, Umeshita-Sasai M, Nishioka K, Kobayashi H, Mima T, Kishimoto T, **Saeki Y.** Synergistic effect on

- the attenuation of collagen-induced arthritis in tumor necrosis factor receptor I (TNFRI) and interleukin 6 double knockout mice. **J Rheumatol** 30(1):22-7, 2003
5. Ohshima S, Yamaguchi N, Nishioka K, Mima T, Ishii T, Umeshita-Sasai M, Kobayashi H, Shimizu M, Katada Y, Wakitani S, Murata N, Nomura S, Matsuno H, Katayama R, Kon S, Inobe M, Uede T, Kawase I, **Saeki Y**. Enhanced local production of osteopontin in rheumatoid joints. **J Rheumatol** 29(10):2061-7, 2002
6. Atsumi T, Ishihara K, Kamimura D, Ikushima H, Ohtani T, Hirota S, Kobayashi H, Park SJ, **Saeki Y**, Kitamura Y, Hirano T. A point mutation of Tyr-756 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp 130 causes autoimmune arthritis. **J Exp Med** 196(7):979-90, 2002
7. Kobayashi H, Ohshima S, Nishioka K, Yamaguchi N, Umeshita-Sasai M, Ishii T, Mima T, Kishimoto T, Kawase I, **Saeki Y**. Antigen induced arthritis (AIA) can be transferred by bone marrow transplantation: evidence that interleukin 6 is essential for induction of AIA. **J Rheumatol** 29:1176-82, 2002
8. Ohshima S, Kobayashi H, Yamaguchi N, Nishioka K, Umeshita-Sasai M, Mima T, Nomura S, Kon S, Inobe M, Uede T, **Saeki Y**. Expression of osteopontin at sites of bone erosion in a murine experimental arthritis model of collagen-induced arthritis: possible involvement of osteopontin in bone destruction in arthritis. **Arthritis Rheum** 46(4):1094-101, 2002
- 学会発表  
Tabunoki Y, **Saeki Y**, et al.(11, last). Anti-arthritis effects of a novel anti-cytokine low molecular weight compound, K-832. **Arthritis Rheum** 48:S555, Orland, USA, 2003  
Ishii T, **Saeki Y**, et al. (12, last). Osteopontin – deletion predisposed to collagen-induced arthritis. **Arthritis Rheum** 48:S555, Orland USA, 2003  
Ishii T, **Saeki Y**, et al. (12, last). Osteopontin as a positive regulator in the osteoclastogenesis of arthritis. **Arthritis Rheum** 50:S367, San Antonio, USA, 2004
8. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）
- 1) 特許取得
- (1) 抗オステオポンチン抗体  
出願番号 特願 2 0 0 1 - 1 0 7 5 7 8  
特願 2 0 0 1 - 2 9 0 7 0 0
- (2) ミエローマ系腫瘍予防・治療剤及びその診断法  
出願番号 特願 2 0 0 2 - 0 7 6 5 0 1

2) 実用新案登録 無し

3) その他 特記すべき事項なし

研究課題:破骨細胞・滑膜線維芽細胞を標的にした関節リウマチ治療法の開発に関する研究

分担研究者:東京大学医学部整形外科 田中 栄

## 1 研究目的

関節リウマチ(rheumatoid arthritis, RA)は多発性の関節炎を特徴とする慢性炎症性疾患である。疾患が重症化すると、関節周囲のみならず全身の骨粗鬆症を生じると共に多数の関節の著しい破壊をきたし、患者のADL、QOLを著しく損なう。これは患者の幸福を奪うのみならず社会的にも大きな損失であり、RAの有効な治療法を確立することは社会的にも焦眉の急であると考えられる。

炎症関節では異常に増殖した滑膜組織がIL-1、TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカイン、そしてマトリックスメタロプロテアーゼやカテプシンなどのプロテアーゼを産生し、骨軟骨破壊に関与していることが明らかになっている。このような滑膜組織の活性化メカニズムは明らかではないが、未知の自己抗原により活性化されたTリンパ球とマクロファージとの間の直接、あるいは間接的な相互作用が重要な役割を果たすと考えられている。近年RAにおける骨破壊を直接担うのは破骨細胞であることが明らかになってきた。われわれは以前にRA滑膜線維芽細胞(synovial fibroblasts, SFCs)では破骨細胞分化因子であるreceptor activator of NF- $\kappa$ B ligand(RANKL)の発現が著しく亢進していることを明らかにした。RANKLの発現が炎症性サイトカインによって誘導されることを考え合わせると、RA骨関節破壊メカニズムの一端は、細胞-細胞間の反応によって産生された炎症性サイトカインがSFCsにおけるRANKLの発現を促し、その結果破骨細胞が分化・活性化されることが原因であると考えられる。したがってRAの治療戦略としては、滑膜線維芽細胞のカタボリックな活性化および破骨細胞による病的な骨吸収の抑制が考えられる。

本研究班におけるわれわれの目的は、RAにおける骨粗鬆症・骨関節破壊に中心的な役割を果たしている破骨細胞と滑膜線維芽細胞に一貫して注目し、これらの細胞の活性化・生存の分子メカニズムを明らかにすることによって新たなRA治療体系を確立することであった。

## 2 研究方法

破骨細胞はマウス骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系において活性型ビタミンD3とプロスタグランディンの存在下で分化する破骨細胞様多核巨細胞を使用した。また滑膜線維芽細胞はRA患者の人工膝関節全置換術時に患者の書面での同意をとった上で採取した滑膜組織から酵

素消化法によって得られた細胞を用いた。細胞への遺伝子導入にはCLONTECHのキットを用いて作成したアデノウイルスベクターを用いた。破骨細胞のアポトーシスのアッセイは以前の論文の方法を使用した。滑膜線維芽細胞の増殖はBrdUの取り込みを用いて検討し、インターロイキン6の産生はノーザンブロット法、ELISA法によって測定した。軟骨細胞の分化はII型コラーゲン、アグリカンの発現をノーザンブロット法、real time PCR法によって検討した。関節炎モデルとしてはラットアジュバント関節炎を使用した。

## (倫理面への配慮)

研究対象者の人権擁護には十分に配慮し、研究対象者に対する不利益、危険性を排除し、組織の使用に関しては書面によるインフォームドコンセントを得た上で使用した。また実験動物に対しては東京大学の指針に従い、動物愛護上の配慮を十分に行った。

## 3 研究結果

まず骨破壊の中心となる破骨細胞のアポトーシスマカニズムに注目し、Bcl-2ファミリーであるBimが破骨細胞アポトーシスに重要な役割を果たしていることを、ノックアウトマウスを用いた研究、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入によって明らかにした。破骨細胞におけるBimの発現はRas-ERKの活性化によって強力に抑制された。続いて滑膜線維芽細胞の活性化メカニズムとその軟骨細胞分化の可能性を検討した。その結果、ドミナントネガティブ型Ras遺伝子を導入することによってインターロイキン6などの炎症性サイトカインの産生が抑制されることを明らかにした。またアデノウイルスベクターによって炎症関節にドミナントネガティブ型Ras遺伝子を導入することによって関節炎モデルラットの関節破壊が抑制されることをin vivoで明らかにした。一方bone morphogenetic protein2の受容体であるALK3遺伝子の恒常活性型変異体を導入することによってRA滑膜線維芽細胞がII型コラーゲン、アグリカンなど軟骨細胞に特異的なマーカーの発現が上昇すること、このときの細胞内シグナルとしてはSmad経路が重要な役割を果たしていることを示した。

## 4 考察

近年のRA治療体系において、もっとも重要な治療目標

が最終的な骨関節破壊の抑制であるということがコンセンサスとなっている。またこれまでの常識とは異なり、RAの疾患初期に関節破壊の急速な進行していることが示され、いかにして疾患早期の骨関節破壊進展を抑制するかが大きな課題である。生物学的製剤の発展などによってRAの治療体系は大きく変わりつつある。すなわち抗TNF- $\alpha$ 抗体、あるいは可溶性受容体の使用によって骨破壊の抑制のみならず破壊された関節の回復も望めるのではないかと期待が集まっている。しかしながら生物学的な製剤によってかかる高額な医療コストの問題、ノンレスポonderの問題、感染症をはじめとする副作用の問題は解決されておらず、新しい治療法の開発が望まれているのも事実である。このような状況の中で、われわれはRA骨破壊を直接的に担っている破骨細胞、そして破骨細胞分化に重要なサイトカインであるRANKLの供給源である滑膜線維芽細胞にターゲットをしばり、これらの細胞のアポトーシス・活性化を調節する方法の開発をめざしてきた。今回の研究で明らかになったことは、①破骨細胞のアポトーシスにはBH3 only Bcl-2ファミリーであるBimがきわめて重要な役割を果たしており、Bimは破骨細胞の活性化をも調節していること②Bimの発現はRas-ERK系の活性化で抑制されること③滑膜線維芽細胞の増殖・炎症性サイトカイン産生にはRas-ERK系のシグナル伝達機構が重要であり、この経路をブロックすることによって関節炎による骨関節破壊が抑制されること④滑膜線維芽細胞においてALK3経路を活性化することにより軟骨細胞へと分化させることが可能であること、である。

われわれは以前にRas-ERK系のシグナル伝達が破骨細胞のアポトーシスに重要な役割を果たしていることを報告した(Miyazaki et al., J Cell Biol 148:333-342, 2000)。本研究班において滑膜線維芽細胞におけるRas-ERK系の役割を検討したところ、Ras-ERK系は生存・アポトーシスにはほとんど関与しておらず、炎症性サイトカインの分泌、細胞の増殖に関与していることが明らかになった。また関節炎モデルラットにドミナントネガティブ型のRas変異体を導入すると関節炎による骨破壊が抑制されることが明らかになった。これらの結果からRas-ERK系をターゲットにした治療によってRA骨関節破壊を抑制できる可能性があると考えられる。また滑膜線維芽細胞においてALK3のシグナルを恒常的に活性化することにより軟骨細胞へと分化することから、滑膜線維芽細胞を破壊された軟骨再生に対して使用できる可能性を開くことができた。

以上の結果より、RA骨関節破壊の治療体系においてRas-ERK系(そしてBimの発現調節)、ALK3系は重要な標的分子になりうると思われる。

## 5 評価

### 1) 達成度について

本研究班でわれわれが目指した点は、破骨細胞および

滑膜線維芽細胞のアポトーシスメカニズムを明らかにし、その調節を行うことによってRAにおける骨関節破壊を直接的に抑制しようとする点である。そのような点では本研究班において十分に当初の目的は達成したと考えられる。破骨細胞についてはBimというきわめて重要な役割を果たすタンパクの同定に成功し、この結果はEMBO Journalに発表した。また滑膜線維芽細胞におけるRas-ERK経路をブロックすることによって関節炎による骨関節破壊を抑制することを示すことに成功し、Arthritis and Rheumatismに論文発表した。ALK3経路活性化によって滑膜線維芽細胞の軟骨細胞分化を促進することができるという結果はJournal of Clinical Investigationに報告した。今後これらの知見を基盤にして、臨床応用へとつなげる予定である。

### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

上にも述べたように本研究の成果は国際的一流紙に掲載され、学術的のみならず、社会的にも高い評価を得ている。

### 3) 今後の展望について

本研究の成果を元に、Ras-ERK系を抑制するような治療薬を開発することにより、滑膜線維芽細胞の活性化を抑制し、破骨細胞のアポトーシスを誘導することが可能であると考えられる。今後このような薬剤の開発・スクリーニングを行っていく予定である。またBMP-2刺激によってALK3経路を活性化することで滑膜線維芽細胞の軟骨細胞分化を促進できることから、軟骨欠損部にBMP-2ペレットを移植するというような再生医学への応用も期待される。本研究はすべて前臨床段階のものであるが、破骨細胞と滑膜線維芽細胞をターゲットにした治療法のターゲット分子を同定できたという意味できわめて意義深い。今後これらの知見を速やかに臨床応用にもっていくために製薬会社などのタイアップが必要であると考えられる。

### 4) 研究内容の効率性について

上述したように、本研究の成果は国際的な一流紙にいずれも掲載されており、きわめて効率的に行われたと考えられる。

## 6 結論

RAにおける骨関節破壊を抑制するためには、細胞レベルでは破骨細胞、滑膜線維芽細胞をターゲットにする必要がある。本研究によってRas-ERK経路の抑制、ALK3経路の活性化という二つの可能性が提示された。

## 7 研究発表

### 1) 国内

口頭発表	27件
原著論文による発表	0件
それ以外(レビュー等)の発表	15件



そのうち主なもの

#### 論文発表

1. 田中 栄 関節リウマチにおける骨関節破壊メカニズム Rheumatology Clinical Update 9:38-39, 2003
2. 田中 栄 中村耕三 骨粗鬆症の新しい治療 Current Therapy 21:291-294, 2003
3. 田中 栄 破骨細胞アポトーシスの細胞内シグナル 医学のあゆみ 205:182-183, 2003
4. 田中 栄 骨粗鬆症治療の新たな展望 Bone and Osteoporosis 8:10-13, 2003
5. 田中 栄、山本愛一郎「Ras-MAPキナーゼ系の制御による炎症性関節破壊の抑制」リウマチ科 30:369-374, 2003.
6. 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
7. 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
8. 田中 栄「RANKL と炎症性骨破壊」医学のあゆみ 208:931-934, 2004
9. 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
10. 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

#### 学会発表

1. 第9回 九州骨軟骨フォーラム(2003.1.11)長崎 破骨細胞の活性化とアポトーシスの分子メカニズム
2. 第11回 代謝性骨疾患研究会(2003.3.8)大阪 RANKL vaccination による骨代謝疾患治療
3. 第76回日本薬理学会年會・第80回日本生理学会大会(2003.3.24-26)福岡 シンポジウム45 破骨細胞の活性誘導とそれをターゲットとした骨疾患治療薬の開発「細胞内情報伝達機構をターゲットにした破骨細胞機能調節」
4. 東京医科歯科大学難病治療研究所セミナー(2003.4.10)東京「破骨細胞の活性化と生存のメカニズム」
5. 第3回 物理刺激セミナー(2003.4.11)東京「破骨細胞の分化と活性化」
6. 日本医師会生涯教育講座認定 学術講演会 特別講演(2003.4.18)前橋「骨代謝調節の分子メカニズム」
7. 第47回 日本リウマチ学会学術集会(2003.4.24-26)東京 シンポジウム12 RA における胸・腰椎圧迫骨折「関節リウマチにおける骨粗鬆症の分子メカニズム」
8. 第32回松本歯科大学総合歯科医学研究所大学院セミナー(2003.5.23)塩尻「破骨細胞アポトーシス

の分子メカニズム」

9. 第2回リウマチと骨代謝研究会(2003.9.4)東京「破骨細胞をターゲットにした骨代謝疾患治療」
10. 第18回日本整形外科学会基礎学術集会(2003.10.16-17)小倉 シンポジウム1 関節軟骨変性の分子メカニズムから治療へ「遺伝子導入を用いた軟骨再生」
11. 第3回 HAP Working Seminar Consensus Meeting(2003.11.7)東京「骨代謝異常の基本的な捉え方」
12. リウマチフォーラム(2004.1.10)東京「破骨細胞アポトーシスの分子メカニズム」
13. 第3回 Biomatrix Forum(2004.1.17)東京「滑膜線維芽細胞の軟骨細胞分化メカニズムとヒアルロン酸の作用」
14. 第2回運動器再生医学研究会(2004.2.13)札幌「遺伝子導入による脊髄・末梢神経再生の試み」
15. 第2回心血管代謝研究会(2004.2.20)大阪「破骨細胞の活性化とアポトーシスの分子メカニズム」
16. 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」
17. 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」
18. 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”
19. 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」
20. 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?～」
21. 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」
22. 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」
23. 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」
24. 第19回日本整形外科学会基礎学術集会(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」
25. 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」
26. 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」

27. 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～」

2) 海外

口頭発表	5 件
原著論文による発表	11 件
それ以外(レビュー等)の発表	3 件
そのうち主なもの	

論文発表

1. Miyazaki T, Neff L, Tanaka S, Home WC, Baron R. Regulation of cytochrome *c* oxidase activity by c-Src in osteoclasts. *J Cell Biol* 2003, 160: 709-718
2. Kawaida R, Ohtsuka T, Okutsu J, Takahashi T, Kadono Y, Oda H, Hikita A, Nakamura K, Tanaka S, Furukawa H. Jun Dimerization Protein 2 (JDP2), a Member of the AP-1 Family of Transcription Factor, Mediates Osteoclast Differentiation Induced by RANKL. *J Exp Med*, 2003, 197:1029-1035
3. Yamamoto A, Fukuda A, Seto H, Miyazaki T, Kadono Y, Sawada Y, Nakamura I, Katagiri H, Asano T, Tanaka Y, Oda H, Nakamura K, Tanaka S. Suppression of arthritic bone destruction by adenovirus-mediated dominant negative ras gene transfer to synoviocytes and osteoclasts. *Arthritis Rheum* 2003, 48:2682-2692
4. Kim H-H, Chung WJ, Lee SW, Chung P-J, You JW, Kwon HJ, Tanaka S, Lee ZH. Association of Sustained ERK Activity with Integrin  $\beta$ 3 Induction during Receptor Activator of Nuclear Factor KappaB Ligand (RANKL)-directed Osteoclast Differentiation. *Exp Cell Res* 2003, 289:368-377
5. Akiyama T, Bouillet P, Miyazaki T, Kadono Y, Chikuda H, Chung U, Fukuda A, Hikita A, Seto H, Okada T, Inaba T, Sanjay A, Baron R, Kawaguchi H, Oda H, Nakamura K, Strasser A, Tanaka S. Regulation of Osteoclast Apoptosis by Ubiquitination of Proapoptotic BH3-only Bcl-2 Family Member Bim. *Embo J*. 2003, 22, 6653-6664
6. 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.
7. Miyazaki T, Sanjay A, Neff L, Tanaka S, Home WC,

Baron R. Src kinase activity is essential for osteoclast function. *J Biol Chem*, 2004, 279, 17660-6.

8. Setoguchi K, Misaki Y, Kawahata K, Shimada K, Juji T, Tanaka S, Oda H, Shukunami C, Nishizaki Y, Hiraki Y, Yamamoto K. Chondromodulin-I, 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.
9. 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.
10. 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.
11. Takahashi, N., Udagawa, N., Tanaka, S., and Suda, T. Generation of murine osteoclasts from bone marrow. *In* "Methods in Molecular Medicine". Vol. 80: Bone Research Protocols, eds. by M. H. Helfrich and S. H. Ralston, Human Press Inc. pp129-144, 2003.

学会発表

1. Australia-Japan Symposium on Biomedical Sciences (2003.2.25-26) Melbourne: Regulation of synovial cell function by adenovirus vector-mediated gene transduction.
2. Special Seminar in Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research (2003.2.27) Melbourne: Molecular mechanism for regulating skeletal homeostasis.
3. The 12<sup>th</sup> International Rheumatology Symposium (2003.4.24-26) Tokyo: Regulation of synovial cell function by adenovirus vector-mediated gene transduction.
4. The 1<sup>st</sup> Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Society (2003.6.3-7) Osaka: Plenary Lecture 2, Molecular mechanisms regulating life and death of the osteoclast.
5. 3<sup>rd</sup> World Congress of the Global Arthritis Research Network (GARN): International Arthritis Summit (2003.9.14-17) Miyazaki: Topic Symposium (3) Locomotor of Science, Regulation of synovial cell function by adenovirus vector-mediated gene

transduction.

8 知的所有権の出願・取得状況(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

研究課題：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：所属機関 大阪大学大学院医学系研究科・生命機能研究科  
氏名 下村 伊一郎

## 1 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、マース様細胞との関連を明らかにする。

## 2 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マース様細胞との関連を検討する。骨髄脂肪蓄積細胞分泌因子による骨代謝、特に破骨細胞の分化、活性化や骨芽細胞の分化、石灰化能に対する作用およびマース様細胞産生サイトカイン量の変動を検討する。

（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。

## 3 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にて発現が確認され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、石灰化能促進作用を検討した。また、マ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。

## 4 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マース様細胞が骨・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、骨髄内細胞のマース様細胞に対する影響ははまだ明らかではない。そこで、着目した骨髄脂肪蓄積細胞分泌因子のマース様細胞に対する影響と骨代謝に対する作用を明らかにすることが重要であると考えられる。

## 5 評価

### 1) 達成度について

ヒト骨髄脂肪蓄積細胞を分離し、発現遺伝子解析を行った。また、分泌因子および骨代謝への作用検討を行い、病態解明への糸口を発見した。今後、さらなる分泌因子の探索およびマース様細胞への関与検討を行う予定である。

### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

これまでに、脂肪細胞分泌因子が肥満や生活習慣病など代謝異常症候群の病態と密接に関わるものであることが証明された。特に、肝臓や血管、筋組織に対する関与が明らかとなり、世界的な概念として確立されたが、骨組織に対する関与ははまだ知られておらず、本研究が極めて独創的な研究となりうる。また、骨髄脂肪蓄積細胞の分離技術もまだ確立されていない。

### 3) 今後の展望について

骨髄脂肪蓄積細胞分泌因子の探索、骨髄脂肪細胞の骨代謝への関与およびマース様細胞に対する影響を明らかにすることで、さらなる関節リウマチや骨粗鬆症の病態解明および治療法開発へ結びつくことが期待される。

### 4) 研究内容の効率性について

ヒト骨髄脂肪蓄積細胞を分離する技術を確立するにあたり困難を伴った。また、in vivo における詳細な検討のため、3D- $\mu$ CT を用いた新たな骨組織解析を行うにあたり習熟を要した。