

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：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。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。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。マウスの破骨細胞形成と同様に、ヒト破骨細胞形成も p38MAPK の特異的阻害剤である 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。

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- κ B)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 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。また、骨芽細胞/骨髄間質細胞が産生する Osteoprotegerin(OPG) は RANKL のデコイ受容体として RANKL 作用を抑制する。我々は、炎症性サイトカインである TNF α と 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。従来より、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、多くの疑問点が残っている。関節リウマチやこと粗鬆症の発症機序の解明と治療法の確立のためにも、ヒト破骨細胞の形成系の確立は急務である。本研究では、ヒト破骨細胞培養系を確立し、ヒト破骨細胞の分化と機能調節系を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

ヒト末梢血より Ficoll-Paque 遠心法で単核細

胞を分取した。ヒト末梢血単核細胞を CD14 抗体ビーズとインキュベートした後に、MACS Separator を使い、CD14 陽性細胞を分取した。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。培養後、破骨細胞のマーカーと考えられる TRAP 染色及びピトロネクチンレセプター (CD61) 抗体を用いた免疫染色により破骨細胞を検出した。また、CD14 陽性細胞を象牙切片上に撒き、M-CSF や RANKL の存在下で培養した後、象牙切片を Mayer's Hematoxylin 染色に供し、吸収窩を観察した。また、p38MAPK の特異的阻害剤である SB203508 を添加して、ヒト破骨細胞形成における p38MAPK の役割を解析した。なお、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の下で行われた。

C. 結果

(1)CD14 陽性細胞は M-CSF 非添加群では殆んど増殖せず、M-CSF は CD14 細胞の増殖に必要な因子であることが明らかとなった。(2)RANKL 単独添加群においても、CD14 細胞の増殖は認められなかった。(3)CD14 陽性細胞は、M-CSF と RANKL の存在下で TRAP 陽性かつピトロネクチンレセプター陽性単核並びに多核細胞に分化した。(4)M-CSF のみを添加した群において、わずかではあるが、TRAP 陽性でピトロネクチンレセプター陽性の破骨細胞様細胞がコロニーを形成して出現した。(5)CD14 陽性細胞を RANKL と

M-CSF の存在下において象牙切片上で培養すると、象牙切片上に多数の吸収窩が認められた。(6)p38MAPK の特異的阻害剤であるSB203508 は、RANKL と M-CSF が誘導するTRAP 陽性破骨細胞の形成を抑制した。

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。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られる。

E. 結論

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。ヒト破骨細胞形成に p38MAPK シグナル系が重要な役割を有していることが示された。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

和文総説など

- 1) 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

- 2) 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
- 3) 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 10:229-238、2002
- 4) 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
- 5) 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、2002
- 6) 高橋直之:最新用語解説「OPG」骨粗鬆症治療、1:56-57、2002
- 7) 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、1:2-3、2002
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 61:178-179、2003
- 8) 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 61:200-206、2003
- 9) 高橋直之:カラーアトラス&レビュー「三次元断層画像にみる骨構造に及ぼすリゼドドロネートの作用」骨粗鬆症治療、2:2-3、2003

原著論文

- 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, 8:147-159, 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 143:3105-3113, 2002
- 4) Udagawa N, Kotake S, Kamatani N, Takahashi N, Suda T: The molecular mechanism of bone destruction in rheumatoid arthritis. Arthritis Research 4:281-289, 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 7:949-960, 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

- 23:636-644,2003
- 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*, 170:3688-3695, 2003
- 8) Takahashi N, Sasaki T, Tsouderos Y, Suda T: Strontium ranelate inhibits osteoclastic bone resorption. *J Bone Miner Res*, in press.
- 9) Takami M, Suda K, Sahara T, Itoh K, Nagai K, Sasaki T, Udagawa N, Takahashi N: Involvement of vacuolar H⁺-ATPase in specific incorporation of risedronate into osteoclasts. *Bone*, In press.

H. 知的財産の出願・登録状況
特記事項無し。

病的状態で見られる破骨細胞の特性の解析

分担研究者 吉川 秀樹 大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学 (整形外科) 教授

研究要旨

関節リウマチや骨巨細胞腫では、過剰な骨吸収が見られ、その骨破壊機序に、病的な破骨細胞様多核巨細胞の関与が示唆されている。しかし、これらの病的巨細胞の形成機序、骨破壊機序は未だ不明である。本研究では、関節リウマチのみならず骨巨細胞腫にみられる骨吸収異常亢進の病態でも、通常の破骨細胞とは異なる誘導・活性化の制御を受ける病的な破骨細胞様細胞が関与している可能性を明らかにした。

A. 研究目的

関節リウマチ (RA) では関節軟骨下に線維芽細胞様間質細胞の著しい増殖とともに、非常に核数の多い巨大な細胞の形成とこれによる骨吸収が観察され RA の骨破壊の病態に関与すると考えられる。骨吸収の異常亢進が見られる病態では、病的な破骨細胞様細胞の出現が関与している可能性を明らかにする目的で、RA 以外にも病的な破骨細胞様細胞の出現が見られる骨巨細胞腫 (GCT) に関して検討を行った。GCT の TRAP 陽性破骨細胞様多核巨細胞は非常に通常の破骨細胞に比較して核数が多く巨大である点で、RA で見られる TRAP 陽性破骨細胞様多核巨細胞と類似性を有する。従って、GCT を破骨細胞様巨細胞による骨破壊が著明にかつ病的に亢進した状態ととらえ、その巨細胞形成の病的メカニズムを明らかにすることを試みた。

B. 研究方法

RANKL, OCIF、および RANKL のレセプターである RANK (receptor activator of NF- κ B) の mRNA の発現を GCT 14 例の切除組織で RT-PCR 法にて検討した。また、ヒト GCT 細胞の培養を行い、形態学的観察、アルカリフォスファターゼ、TRAP の発現、mRNA による RT-PCR により RANKL, RANK, OCIF の遺伝子発現を検定した。続いて、GOS 細胞が破骨細胞様巨細胞の形成と支持する

かと検討するため、ヒト末梢血より CD14 陽性単核細胞を分離し、GOS 細胞と共培養した。さらに ELISA にて GOS 細胞の培養上清の M-CSF, GM-CSF, VEGF, OCIF と定量した。

C. 研究結果

GCT 14 例中全例で RANKL の mRNA の発現が見られ、OCIF, RANK は GCT 14 例中 12 例ずつに発現と認められた。RANKL に対する in situ hybridization では、RANKL は多核巨細胞、類円型単核細胞に発現が見られた。GCT 培養細胞では 2-3 回の継代で巨細胞が消失し、多角形紡錘形で単核の細胞のみとなった。この培養細胞 (GOS 細胞) はアルカリフォスファターゼ陰性、TRAP 陰性であった。しかし、GOS 細胞より分離した mRNA による RT-PCR では RANKL 陰性、RANK 陰性、OCIF 陽性であった。CD14 陽性単核細胞と GOS 細胞の共培養の結果、多数の TRAP 陽性多核巨細胞が形成された。また、GOS 細胞の培養上清 (GOS-CM) 存在下でヒト末梢血単球と単独培養すると同様に多数の TRAP 陽性多核巨細胞が形成され、dentin 上では吸収窩を形成することが走査電顕にて確認された。RT-PCR でヒト末梢血単球は RANKL 陰性であったが、この多核巨細胞は RANKL を発現していた。GOS 細胞の培養上清には、ELISA にて多量の M-CSF, GM-CSF, VEGF, OCIF が含まれていた。

D. 考察

ヒト骨巨細胞腫で全例に RANKL の mRNA が発現し

ていることより RANKL が GCT における破骨細胞様巨細胞の形成に因与している推測されるが、骨巨細胞腫由来細胞の培養上清が末梢血単球と TRAP 陽性で吸収窩を形成する破骨細胞様多核巨細胞に分化させたことは、このような病的骨破壊の場においては、通常の骨芽細胞・間質細胞の膜結合型 RANKL や OCIF による破骨細胞形成・活性化の制御から逸脱した“病原破骨細胞”の形成機構が存在している可能性を示唆する。

E. 結論

RA だけでなく GCT にみられる骨吸収異常亢進の病態でも、通常の破骨細胞とは異なる誘導・活性化の制御を受ける病的な破骨細胞様細胞の出現が因与している可能性を明らかとなった。

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) 妻木範行、中瀬尚長、宮地高弘、越智隆弘、吉川秀樹：軟骨形成における BMP の役割、骨・関節・靭帯、15:255-260, 2002.

2) 吉川秀樹：BMP の応答制御機構の解析、The Bone、16:85-89, 2002.

3) 富田哲也、高橋康一郎、越智隆弘、吉川秀樹：IL6、病型と関節破壊予測因子、Medical Practice、19: 1149-1151, 2002.

4) 丕井宣行、西川昌孝、名井陽、吉川秀樹：新規人工骨の開発と骨組織の Tissue engineering の試み、関節外科、21:1272-1278, 2002.

5) 吉川秀樹、名井陽、丕井宣行、西川昌孝、海渡貴司：骨軟骨の再生医学、ゲノム医学、2:651-656, 2002.

6) 丕井宣行、名井陽、富田哲也、中瀬尚長、吉川秀樹：連通気孔構造を有する新規多孔体ハイドロキシアパタイトセラミックスーその優れた微細構造と骨伝導能、Orthopaedics Ceramic Implants、21:21-24, 2002.

7) Tamai, N., Myoui, A., Tomita, T., Nakase, T., Tanaka, J., Ochi, T., Yoshikawa, H.: Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo. Journal of Biomedical Material Research, 59:110-117, 2002.

8) Tomita, T., Nakase, T., Kaneko, M., Shi, K., Takahi, K., Ochi, T., Yoshikawa, H.: Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer enhances production of matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. Arthritis and Rheumatism, 46:373-378, 2002.

9) Tsumaki, N., Nakase, T., Miyaji, T., Kakiuchi, M., Kimura, T., Ochi, T., Yoshikawa, H.: Bone morphogenetic protein signals are required for cartilage formation and differently regulate joint development during skeletogenesis. Journal of Bone and Mineral Research, 17:898-906, 2002.

10) Nakase, T., Ariga, K., Meng, W., Iwasaki, M., Tomita, T., Myoui, A., Yonenobu, K., Yoshikawa, H.: Distribution of genes for parathyroid hormone (PTH)-related peptide, Indian hedgehog, PTH receptor and patched in the process of experimental spondylosis in mice. Journal of Neurosurgery, 97:82-87, 2002.

11) Takahi, K., Hashimoto, J., Hayashida, K., Shi, K., Takano, H., Tsuboi, H., Matsui, Y., Nakase, T., Tomita, T., Ochi, T., Yoshikawa, H.: Early closure of growth plate causes poor growth of long bones in collagen-induced arthritis rats. Journal of Musculoskeletal Neuronal Interaction, 2:344-351, 2002.

12) Takahi, K., Tomita, T., Nakase, T., Kaneko, M., Takano, H., Myoui, A., Hashimoto, J., Ochi, T., Yoshikawa, H.: Tumor necrosis factor- α converting enzyme expression in the joints of rheumatoid arthritis patients. Journal of Musculoskeletal Research, 6:63-71, 2002.

13) Higuchi, C., Myoui, A., Hashimoto, N., Kuriyama, K., Yoshioka, K., Yoshikawa, H., Itoh, K.: Continuous inhibition of MAPK signaling promotes the early osteoblastic differentiation and mineralization of the extracellular matrix. Journal of Bone and Mineral Research, 17:1785-1794, 2002.

14) Kuriyama, K., Higuchi, C., Tanaka, K., Yoshikawa, H., Itoh, K.: A novel anti-rheumatic drug, T-614, stimulates osteoblastic differentiation in vitro and bone morphogenetic protein-2 induced bone formation in vivo. Biochemical and Biophysical Research Communications, 299:903-909, 2002.

2. 学会発表

1. 厚生労働省厚生科学研究公開シンポジウム

「リウマチ性疾患制圧に向けて」：骨再生のための新規人工骨の開発、平成14年1月(東京)

2. 日本セラミックス協会2002年年会(戦略フォーラム「臨床から見た生体材料ー骨・軟骨」)：多孔体セラミックスによる骨形成、平成14年3月(吹田)

3. 第20回組織再生材料研究会：運動機能の再建、生体材料による局所治療の重要性、平成14年8月(つくば)

4. 第67回和歌山臨床整形外科医会秋期研修会(特別講演)：外来における骨腫瘍の画像診断、平成14年10月(和歌山)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 「骨欠損治療および骨損傷の治療促進剤」出願番号2002年特願 第181016号

2. 「生体用セラミックス」 出願番号 2002 年特
願 第 268292 号

研究要旨：破骨細胞は骨吸収を担う中心的な細胞であり、骨粗鬆症、あるいは関節リウマチの骨関節破壊において重要な役割を果たすことが知られている。本研究においてわれわれは破骨細胞の生存、細胞死において低分子量Gタンパク質である Rac1 が重要な役割を果たすことを明らかにした。Rac1 をターゲットにした薬剤は骨代謝調節剤として有用であると考えられる。

A. 研究目的

骨組織は成長を終えてからも休みなく新陳代謝を行っており、骨吸収と骨形成がバランスを取ることにより生体におけるホメオスタシスを保っている。この骨代謝の生体内におけるバランスが骨吸収側（負）に傾くと骨強度の減少をきたし、易骨折性をきたす、すなわち骨粗鬆症と呼ばれる状態になる。骨粗鬆症の原因としては閉経後のエストロゲン欠乏、加齢によるものなどの一次的要因や、ステロイド投与などの二次的要因が挙げられる。また関節リウマチにおいてもごく初期から関節近傍を中心として骨粗鬆症が認められ、関節リウマチにおける骨関節破壊に重要な役割を果たしていることが知られている。つまり骨粗鬆症とは「一次的、二次的要因により骨代謝のバランスが骨吸収側に傾き、骨強度が減少し、骨折しやすくなった状態」と定義することができる。1990年代にはいり、骨組織のカルシウム濃度、いわゆる骨密度の正確な測定が可能になったことが骨粗鬆症の診断学、疫学、治療学を大きく変えたといわれている。すなわち骨粗鬆症の診断基準が定められ、それまでの方法に比して比較的容易に骨粗鬆症の診断が可能となったこと、そして骨密度の変化によって治療効果を客観的に定量できる

ようになったことは、近年の evidence-based medicine (EBM) の概念の確立ともあいまって、さまざまな骨粗鬆症治療薬の開発へとつながった。現在骨粗鬆症治療法として、ビスフォスフォネートを中心に据えた治療法がグローバルスタンダードとして確立されようとしている。アレンドロネート、リゼドロネートをはじめとしたビスフォスフォネートは、膨大な基礎研究データの蓄積に加え、大規模かつ広範な臨床研究から骨密度増加のみならず、脊椎骨折、大腿骨頸部骨折の予防効果も確立されたという点で、これまでに類を見ない画期的な治療薬であるといえる。ビスフォスフォネート以外に実際に臨床で用いられているエストロジェン、ラロキシエンも、その作用機序は骨吸収の抑制であると考えられており、現在使用されている骨粗鬆症治療薬のほとんどは骨吸収抑制剤であるといえる。しかしながらこのような治療コンセプトに不安がないわけではない。ビスフォスフォネートは、破骨細胞にアポトーシスを誘導することにより強力に骨吸収を抑制し、骨代謝回転を低下させる。骨組織に蓄積して効果を発揮するというビスフォスフォネートの特徴から、このような低代謝回転は薬物投与中止後もかなり長期間持続すると考えられており、長期におよ

ぶ低代謝回転の持続が本当に骨組織にとって有害ではないのか？という問題は、特に比較的若年の患者を治療する際には重要なポイントになってくると考えられる。このような視点から、骨組織に対してアナボリックな作用を有する治療薬の開発が望まれているのも事実である。

本研究ではビスフォスフォネートの画期的な成功にかんがみ、その欠点を補うような骨粗鬆症治療薬の開発を目指すものである。すなわち破骨細胞へのアポトーシス誘導の分子メカニズムを明らかにし、これをターゲットにした、短期作用型治療薬の開発である。

B 研究方法

破骨細胞としては、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 の存在下で得られた破骨細胞様細胞 (osteoclast-like cell, OCL) を用いた。組換えアデノウイルスベクターは Clontech のキットを用いて作成した。作成したアデノウイルスベクターは、低分子量 G タンパク Rac1 シグナルを負に調節するドミナントネガティブ型 Ras ウイルス (RacDN ウイルス)、および正に調節する恒常活性型ウイルス (RacCA ウイルス) である。まずこれらのウイルスによる OCL への遺伝子導入効率を、特異的な抗体を用いたウエスタンブロットによって調べた。破骨細胞生存率の変化は、マウス共存培養系において、破骨細胞の形成後に骨芽細胞を酵素処理によって取り除き、その後の破骨細胞の生存を TRAP 染色によって調べることによって行った。

C. 研究結果

RacDN, RacCA ウイルスによって OCL に効率

よくこれらの遺伝子の導入が可能であった。RacCA の発現は OCL の生存を有意に促進し、RacDN の発現は生存を抑制した。Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) は強力な破骨細胞のサバイバル因子であるが、OCL の M-CSF 刺激によって急速な Rac1 の活性化が認められた。また M-CSF 刺激は OCL における ERK, Akt の活性化を誘導するが、アデノウイルスによる RacDN の発現によって Akt の活性化はほぼ完全に抑制された。一方 ERK の活性化は変化しなかった。

以上の結果から、Rac1 は破骨細胞において M-CSF シグナルの下流分子として重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

D. 考察および結論

ビスフォスフォネートの画期的な成功をかんがみると破骨細胞の生存・アポトーシスのシグナル伝達機構は骨粗鬆症治療の有効なターゲットになりうると思われる。低分子量 G タンパクは細胞のさまざまな機能に関与するが、アレンドロネート、リセドロネートなどアミノビスフォスフォネートの分子標的である可能性が示唆されている。本研究においてわれわれは Rho ファミリーの低分子量 G タンパクである Rac1 が破骨細胞生存において重要な役割をはたしていることを明らかにした。今後 Rac1 の発現・活性化を調節するような薬剤を開発することにより、破骨細胞の生存調節が可能となり、より安全で有効な骨粗鬆症治療薬の開発につながるものと考えられる。

E. 結論

Rac1 は破骨細胞の生存に重要な役割を果たす。これをターゲットにした創薬は新しい

骨粗鬆症治療薬として有望である。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Mochizuki T, Asai A, Saito N, Tanaka S, Katagiri H, Asano T, Nakane M, Tamura A, Kuchino Y, Kitanaka C, Kirino T: Akt protein kinase inhibits non-apoptotic programmed cell death induced by ceramide. *J Biol Chem* 2002, 277:2790-2797
- 2) Nakamura I, Kadono Y, Takayanagi H, Jimi E, Miyazaki T, Oda H, Nakamura K, Tanaka S, Rodan GA, Duong LT: IL-1 Regulates Cytoskeletal Organization in Osteoclasts Via TNF Receptor-Associated Factor 6/c-Src Complex. *J Immunol* 2002, 168:5103-5109
- 3) Onodera S, Nishihira J, Iwabuchi K, Koyama Y, Yoshida K, Tanaka S, Minami A: Macrophage migration inhibitory factor up-regulates matrix metalloproteinase-9 and -13 in rat osteoblasts. Relevance to intracellular signaling pathways. *J Biol Chem* 2002, 277:7865-7874
- 4) Yamamoto A, Miyazaki T, Kadono Y, Takayanagi H, Miura T, Nishina H, Katada T, Wakabayashi K, Oda H, Nakamura K, Tanaka S: Possible involvement of IkappaB kinase 2 and MKK7 in osteoclastogenesis induced by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand. *J Bone Miner Res* 2002, 17:612-621
- 5) Ioku K, Kawachi G, Fujimori H, Goto S, Fujiwara K, Watanabe M, Oda H, Tanaka S, Matsumoto T: Analysis of apatite in phyma calcified in vivo. *Trans Materials Res Soc Japan* 2002, 27:455-457.
- 6) Nakamura K, Oda H, Tanaka S, Kuga Y, Yamamoto M, Nishikawa T, Juji T, Shimizu M. Usefulness of absorbable screws in the Sauvé-Kapandji procedure for rheumatoid wrist reconstruction. *Mod Rheumatol* 2002, 12:144-147
- 7) Worland RL, Jessup DE, Johnson GVV, Alemparte JA, Tanaka S, Rex FS, Keenan J. The effect of femoral component rotation and asymmetry in total knee replacements. *Orthopedics* 25: (10) 1045-1048, 2002
- 8) Houle EF, Rousseau S, Morrice N, Luc M, Mongrain S, Turner CE, Tanaka S, Moreau P, Huot J. RK mediates phosphorylation of tropomyosin-1 to promote cytoskeleton remodeling in response to oxidative stress. Impact on membrane blebbing. *Mol Biol Cell* In press.
- 9) Miyazaki T, Neff L, Tanaka S, Horne WC, Baron R. Regulation of cytochrome c oxidase activity by c-Src in osteoclasts. *J Cell Biol* In press.
- 10) Tanaka S. Adenovirus vector-mediated gene transduction for the treatment of bone and joint destruction of rheumatoid arthritis. *In* "Tissue Engineering and Biodegradable

- Equivalents.” eds. by Lewandrowski, Trantolo, Gresser, Yaszemski, and Altobelli.. Marcel Dekker, Inc. pp467-482, 2002.
- 11) Juji, T., Hertz, M., Aoki, K., Horie, D., Ohya, K., Gautam, A., Mouritsen, S., Oda, H., Nakamura, K., Tanaka, S. A novel therapeutic vaccine approach, targeting RANKL, prevents bone destruction in bone-related disorders. *J. Bone Miner. Metabolism.* 20:266-268, 2002.
- 12) Takahashi, N., Udagawa, N., Tanaka, S., and Suda, T. 2002. Generation of murine osteoclasts from bone marrow. *In* “Methods in Molecular Medicine”. In press.
- 13) Tanaka S, Nakamura I, Inoue J-I, Oda H, Nakamura K. Signal transduction pathways regulating osteoclast differentiation and function. *J Bone Miner Metabolism.* 2003 In press.
- 14) 田中 栄 破骨細胞およびその前駆細胞への遺伝子導入 *日本骨代謝学会雑誌* 19:76-79, 2002
- 15) 田中 栄 知っておきたい 200 words RANKL-RANK *医学のあゆみ* 200:1052, 2002
- 16) 田中 栄 骨粗しょう症の新しい治療 *最新医学* 57:1515-1523, 2002
- 17) 田中 栄 RANKL ワクチンによる新しい骨代謝疾患治療 *CLINICAL CALCIUM* 2:932-934, 2002
- 18) 田中 栄 破骨細胞性骨吸収の制御 *Medical Science Digest* 28:446-449, 2002
- 19) 緒方 徹、山本真一、田中 栄、中村 耕三 脊髄損傷修復の試み *整形災害外科* 45:1273-1277, 2002
- 20) 門野夕峰、高柳 広、田中 栄 破骨細胞の分化、機能、生存における RANKL/RANK シグナル～IFN シグナルとのクロストークを含めて～ *実験医学* (増刊) 20:2477-2481, 2002
- 21) 田中 栄 特集 あらたな TNF/TNF 受容体ファミリーと疾患 関節疾患治療への応用 *医学のあゆみ* 203:493-494, 2002
- 22) 秋山 達、田中 栄 骨形成・骨吸収のシグナル伝達と創薬 *実験医学* 20:2616-2620, 2002
- 23) 瀬戸宏明、田中 栄、黒澤 尚、中村 耕三 滑膜炎と分化異常 腎と骨代謝 16:21-26, 2003
- 24) 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
- 学会発表
- 1) The 11th International Rheumatology Symposium (2002.4.23) Kobe:
- 2) A therapeutic vaccine approach to inhibit pathological bone destruction. The 3rd International Workshop on Musculoskeletal and Neuronal Interactions (2002. 5.31) Corfu, Greece: Adenovirus vector-mediated ALK gene transduction to synovial cells induces chondrogenic differentiation.
- 3) Osteoporosis Excellence Meeting (2002.11.15-19) New York: A therapeutic vaccine approach to inhibit pathological bone destruction
- 4) セルサイクル研究会 (2002. 6.4) 福岡 破骨細胞の分化と活性化の分子メカニズム
- 5) 第 22 回 日本骨形態計測学会 (2002.6.27-29) 東京 特別講演「骨関節疾

患治療における分子生物学的アプローチ」

- 6) 第 75 回 日本内分泌学会学術総会
(2002.6.28-30) シンポジウム8 骨疾患とシグナル伝達「破骨細胞の分化と活性化の細胞内シグナル」
- 7) 第3回 運動器科学研究会(2002.8.30-31)
淡路島 破骨細胞アポトーシスの細胞内シグナル
- 8) 第8回 人工関節基礎研究会(2002.9.6)東京
破骨細胞をターゲットにした骨関節疾患治療戦略
- 9) 第1回 広島整形外科先端医学セミナー
(2002.9.11)広島 破骨細胞をターゲットにした骨代謝疾患治療
- 10)第17回 日本整形外科基礎学術集会
(2002.10.11-12)青森 シンポジウム15 骨形成と骨吸収 骨吸収の分子メカニズム
- 11)第 7 5 回 日本生化学会大会
(2002.10.14-17)京都 シンポジウム 3S39-2
骨格系細胞の分化制御機構 オーガナイザー
西村理行 田中 栄
- 12)第 5 1 回 東日本整形災害外科学会
(2002.10.24-25)郡山 シンポジウム1 整形外科基礎研究と臨床の接点 関節炎における骨関節破壊
- 13)第 2 回 カルシトニン／副甲状腺ホルモン研究会(2002.12.7)東京 破骨細胞の細胞内シグナルとカルシトニン
- 14)第9回 九州骨軟骨研究会(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

H. 知的所有権の取得状況

特になし

厚生科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
分担研究報告書

関節リウマチ・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

分担研究者 下村 伊一郎 大阪大学大学院生命機能研究科 教授

研究要旨：変形性関節炎、および関節リウマチ患者の大腿骨骨髓
海綿骨片から、骨髓脂肪細胞をコラゲナーゼ消化により純粋に分離
する技術の確立中である。

A. 研究目的

ヒト骨髓に存在する脂肪細胞を単離する技術を確立し、骨髓脂肪細胞の有する基本的性質、ならびに関節リウマチや骨粗鬆症といった病態との関連を明らかにする。

B. 研究方法

大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科において、変形性関節炎あるいは関節リウマチ患者から摘出された海綿骨片、ならびに皮下脂肪組織をコラゲナーゼにより消化し、遠心分離と洗浄を繰り返すことで液上面に浮かぶ脂肪細胞分画と沈殿する間葉系細胞分画を分離回収した。

(倫理面への配慮)

器官制御外科にて人工関節置換術を施す患者に限定して、術前に書面にて研究目的・内容を説明し、同意を得た上で術中に取り除かれる骨片と皮下脂肪組織を研究材料として用いた。

C. 研究結果

ヒト大腿骨骨髓の海綿骨片を、コラゲナーゼで消化する際の諸条件を比較検討

した。また回収された脂肪細胞分画から、十分量の total RNA を抽出する方法に関しても検討を加えた。現在のところ、コラゲナーゼによる消化がまだ十分ではなく、浮遊する脂肪細胞分画に脂肪細胞以外の細胞が混入した。

D. 考察

骨髓脂肪細胞分画への他細胞の混入は、その後の機能解析結果に重大な影響を及ぼすと予想される。コラゲナーゼの種類や濃度、トリプシン消化の追加など、まだ検討を加えていない条件が残されており、今後検討する必要がある。

E. 結論

ヒト骨髓海綿骨片からの骨髓脂肪細胞分離は、技術的な困難を伴うが、諸条件の最適化により達成されうるものと考えられる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

F、G、H に関して、現在のところ該当するものはない。

RA 由来 B 細胞の性状解析

越智 隆弘 国立相模原病院長

研究要旨：われわれは、RA 患者の骨髄および滑膜組織よりナース細胞(RA ナース細胞)が高率に得られる事を報告してきた。RA ナース細胞はリンパ球や顆粒球、単球などを活性化する機能を有し、自らもその特徴的な細胞間相互作用(Pseudoemperipolexis)により活性化し、サイトカイン、ヒアルロン酸などの産生が亢進する。今回、われわれは、RA 患者の滑膜および骨髄から RA ナース細胞に依存性増殖活性を有する B 細胞株の樹立に成功した。これら B 細胞は多量の自己抗体を産生していた。これら自己抗体産生 B 細胞とそれが産生している免疫グロブリンの性状を解析した。

<p>A. 研究目的</p> <p>RA の骨髄・滑膜から RA ナース細胞が高率に得られ、この細胞が B 細胞の活性化と Apoptosis の抑制に関与する事を報告してきた。これらの結果は RA 罹患部における濾胞形成を伴う RA 病態形成を説明可能とした。今回、RA 骨髄・滑膜組織の長期培養中に RA ナース細胞依存性増殖活性を有する B 細胞の樹立を複数患者の組織から成功した。これら樹立された B 細胞の性状解析を行い、罹患部に浸潤している B 細胞の RA 病態における関与を解明する事を目的に以下の検討を行った。</p> <p>B. 研究方法</p> <p><u>B 細胞の樹立</u>：手術時に採取された RA 滑膜については酵素処理後に単一細胞とし、骨髄については Ficoll Paque で分離後、10%FCS 加 DMEM で培養を行った。培養経過中に B 細胞の増殖が認められる検体について以下の解析を行った。</p> <p><u>B 細胞解析</u>：FACS で表層マーカーの解析と免疫グロブリン遺伝子解析を行った。</p> <p><u>B 細胞株の産生する免疫グロブリン解析</u>：免疫グロブリンの定量とアイソタイプ</p>	<p>を検討し、認識する分子の同定を行った。自己抗体産生の有無については、HE p-2 を用いた免疫染色にて決定した。さらに、RA 患者および健常人の末梢血中に本自己抗体が認識する自己抗原の有無については ELISA 系を構築し評価した。</p> <p>C. 研究結果</p> <p>①RA 患者由来組織の長期培養からは、複数の患者から B 細胞の増殖が確認された(6 例)。全培養の 20%程度に B 細胞の樹立が確認された。これら B 細胞の産生する免疫グロブリンのアイソタイプは γ/κ (6 例中 4 例)が殆どであったが、$\mu/\kappa, \alpha/\lambda$ (それぞれ 1 例)のものがあった。樹立された B 細胞は同時に樹立された RA ナースと細胞間相互作用(接着、Pseudoemperipolexis)を示し、その増殖には RA ナースの存在を必要としており、RA ナース細胞依存性増殖を示した。また、樹立された B 細胞は全て EBV 陽性であることが判明した。これら B 細胞株の表層マーカーの解析から CD19, CD20, CD40 陽性で、さらに Germinal center に存在が確認されて CD38, CD39 も陽性であった。ま</p>
--	--

た、接着に関与する CD11a,CD49 も陽性であったが、CXCR4 は陰性であった。

②これら B 細胞の産生する抗体について Hep-2 を用いた自己抗体の検出から、全ての B 細胞が抗細胞質抗体を産生していた。また、RF との異同を検討したが RF ではなかった。

③B 細胞の免疫グロブリン遺伝子解析の結果から、これら B 細胞の使用している免疫グロブリン遺伝子はその殆どが胎児期肝での使用が報告されているものに限定されていた。

④これら B 細胞が認識する自己抗原の一つが EF-1 α であることを明らかにし、RA 患者の末梢血中において EF-1 α の発現が健常人に比較して有意に亢進している事が判明した。

D. 結論

RA 患者由来の罹患部(滑膜・骨髄)の長期培養から RA ナース細胞に依存性増殖能を有する B 細胞の樹立が可能であり、その全てが、自己抗体を産生していた。これら B 細胞の産生する免疫グロブリンは RA ナース細胞との共培養で増加亢進した。また、これら B 細胞は免疫グロブリン遺伝子として、偏ったレパトアを使用しており、その殆どが胎児期肝での使用が確認されているものであった。これら自己抗体を産生 B 細胞が認識する自己抗原の一つは EF-1 α であり、その発現は健常人に比較して RA 患者で病態の進行に随伴し有意に亢進している事が示唆された。

E. 考察

RA 病態における B 細胞の関与と自己抗体の存在は無視できない。今回、われわれは、RA 病態形成に RA ナース細胞の重要性を B 細胞のレベルで検証した。RA 罹患部に存在する B 細胞は RA ナース細胞依存性増殖能を有し、培養上清中に自己抗体を多量に産生する。RA における自己抗体の性状は不明な点が多いが、今回、われわれは、その一つとして EF-1 α を同定し、RA の自己抗原である可能性を示唆した。また、これら B 細胞の殆どが EBV 感染しており、EF-1 α とウイルス潜伏感染との関連性を考慮すると、RA における B 細胞の活性化を考える上で興味深い。さらに、胎児期肝で使用されるレパトアを有しており、本来、胎児期に偏ったレパトアを有する B 細胞の選択を考慮した B 細胞分化成熟の過程が RA のような自己免疫疾患の成立に如何に関与するか、今後、詳細に検討を予定している。

F. 研究発表

1. 論文発表

limited VH gene usage in B cell clones established with nurse-like cells from patients with rheumatoid arthritis.

In preparation

G. 知的所有権の取得状況

検討中

厚生労働科学研究費補助金 (免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業)
分担研究報告書

関節リウマチの骨髄変化に関する研究

分担研究者 広畑俊成 帝京大学 医学部 内科 助教授

研究要旨 関節リウマチ(RA)における滑膜の異常増殖においては血管新生が重要な役割を果たすことが明らかにされている。今回我々は、RA 骨髄幹細胞が血管新生において如何なる役割を果たすかについて検討を行なった。その結果、RA 骨髄においては幹細胞から血管内皮細胞への分化が亢進していることが明らかになった。この機序としては、RA 骨髄細胞において血管内皮の前駆細胞が増加している可能性と、RA 骨髄細胞による VEGF などの血管新生に関わるサイトカインの産生能が亢進している可能性が考えられる。

A. 研究目的

関節リウマチ(RA)においては滑膜の異常増殖により関節破壊が惹起される。この滑膜の異常増殖においては血管新生が重要な役割を果たすことが明らかにされている。一方、RA においては骨髄の異常が病態形成上重要な役割を果たすことをこれまでに我々は明らかにしてきた。近年、血管新生においても骨髄が深く関与することが明らかになっている。今回我々は、RA 骨髄幹細胞が血管新生において如何なる役割を果たすかについて検討を行なった。

B. 研究方法

1. 対象

RA 患者 7 例、OA 患者 3 例につき、関節置換術の際に採取した骨髄液(腸骨骨髄・大腿骨髄)を用いた

2. 骨髄 CD34+細胞の分離と培養

骨髄血より Ficoll 法で単核球分画を得、これより magnetic beads (Dynabeads,

Dynal 社)を用いて CD34+細胞を分離した。得られた細胞を stem cell factor (SCF) (10 ng/ml) + GM-CSF (1 ng/ml) の存在下に 1 週間培養した。

3. Von Willebrand 因子(VWF)の発現の解析

骨髄 CD34+細胞を 1 週間培養後、FITC 標識抗 VWF 抗体(ヤギ)にて染色し、フローサイトメトリーにて解析した。

(倫理面への配慮)

患者には研究内容及び検体採取の方法・危険性等を説明し、インフォームドコンセントを文書で取得した上で検体の提供を受けた。検体については連結匿名化にてプライバシーの保護をはかる。

C. 研究結果

SCF+GM-CSF で 1 週間刺激後の骨髄由来細胞における VWF の発現比率は、RA 群で $14.97 \pm 5.60\%$ 、OA 群で $6.21 \pm 1.88\%$ (mean \pm SD)であり、RA 群で有意に上昇し

ていた (p=0.016)。しかしながら、SCF+GM-CSF で培養4週後にはRA群とOA群でVWF発現細胞の比率には有意差は見られなかった。

D. 考察

以上の結果より、RA骨髄においては幹細胞から血管内皮細胞への分化が亢進していることが明らかになった。この機序としては、RA骨髄細胞において血管内皮の前駆細胞が増加している可能性と、RA骨髄細胞によるVEGFなどの血管新生に関わるサイトカインの産生能が亢進している可能性が考えられる。今後、症例を増やしてこの点について検討を加えてゆく必要がある。

E. 結論

RAにおいては骨髄CD34+細胞からの血管内皮細胞への分化能が亢進しており、これにより滑膜における血管新生を支持することにより滑膜の増殖を促進している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1.論文発表

・Hirohata S, Ohshima N, Yanagida T, Aramaki K. Regulation of human B cell function by sulfasalazine and its metabolites. *Int Immunopharm* 2: 631-640, 2002.

・Hirohata S, Yanagida T, Tomita T, Yoshikawa H, Ochi T. Bone marrow CD34+ progenitor cells stimulated with stem

cell factor and GM-CSF have the capacity to activate IgD⁻ B cells through direct cellular interaction. *J Leukoc Biol* 71: 987-995, 2002.

・Matsuda T, Ohno S, Hirohata S, Miyanaga Y, Ujihara H, Inaba G, Nakamura S, Tanaka S, Kogure M, Mizushima Y. Efficacy of Rebamipide as Adjunctive Therapy in the Treatment of Recurrent Oral Aphthous Ulcers in Patients with Behcet's Disease: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Drugs R D* 4:19-28, 2003.

2.学会発表

・Shibuya H, Nagai T, Yamamoto K, Ishii A, Hirohata S. Differential regulation of Th1 responses and CD154 expression in human CD4⁺ T cells by IFN- α . 66th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, New Orleans, *Arthritis Rheum (Suppl.)*: S248, 2002.

・Nagai T, Shibuya H, Yamamoto K, Hirohata S. Antiribosomal P protein antibody reacts with activated human monocyte-lineage cells and enhances their expression of vascular endothelial growth factor. 66th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, New Orleans, *Arthritis Rheum (Suppl.)*: S280, 2002.

・Kikuchi H, Aramaki K, Isshi K, Hirohata S. Low dose weekly methotrexate therapy for progressive neuro-Behcet's syndrome: a follow up study for 4 years. 66th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, New Orleans, *Arthritis Rheum (Suppl.)*: S325,

2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

該当なし

2.実用新案登録

該当なし

3.その他

該当なし

（分担）研究報告書

関節リウマチの EB ウイルス制御機構の検討

（分担）研究者 武井 正美 日本大学内科学講座内科一部門外来医長、助手

研究要旨：関節リウマチ (RA) 口腔由来野生株の Epstein Barr ウイルス (EBV) の関連蛋白 EBV associated nuclear antigen 3c (EBNA3c) の塩基配列に正常ではほとんど見られない変異が共通してみられ、ペプチドのミスセンス変異を伴っていた。骨髓 CD34 細胞と正常 EBV 未感染 B 細胞との共存培養して得られた EBV 陽性 B 細胞株の EBNA3c の配列がこの変異を持っており、この RA 患者口腔由来野生株の EBNA3c の配列と一つの塩基を除いて一致し、RA 骨髓の CD34 陽性細胞分画に EBV の感染を引き起こす機序が存在することを示唆した。RA 骨髓の GM-CSF, E-CSF コロニー形成能は OA に比し大きな差はなく、その分化した細胞群には EBV 関連 LMP2 領域を 50 コピー検出できる realtimePCR で検出されなかった。

共同研究者: 山上賢治 1、三田村巧 1、大久保陸洋 1,2、澤田滋正 1,2、森俊仁 3、広畑俊成 4
1 日本大学内科学教室内科一部門、2 日大練馬光が丘病院内科、3 国立相模原病院整形外科、4 帝京大学内科

A. 研究目的

これまで Epstein-Barr ウイルス (EBV) と関節リウマチ (RA) の関連を明らかにするため、polymerase chain reaction (PCR)、in situ hybridization 法、組織染色を用いて、RA の滑膜細

胞に EBV が存在する事を証明した (Inter Immunol 9, 739, 1997)。EBV 感染細胞は正常の免疫機能を有していればその再活性化は抑制され潜在感染として維持され疾患の発症は起こらない。上咽頭癌の様にウイルスに変異があり免疫監視機構から逃れている可能性や、RA で EBV 特異的 CTL 活性が低いとの報告もあり、RA 滑膜でこのような細胞の存在を許している可能性もある。我々は EBV 関連疾患としても知られている IgA 腎症の末梢白血球の RNA を用いた fluorescein

differential display 法による解析で偶然にこの遺伝子を発見し全 cDNA の sequence を行った (国際公開番号: WO98-24899、H8, 12, 5)。この遺伝子が 1998 年 12 月に Nature で Sayo らの報告した小児期に EBV の致死的感染症を起こすことで知られている X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP) の原因遺伝子と全く同一のものであった。我々は、この SAP/SH2D1A mRNA の発現が RA 患者 T 細胞で低いことを報告し、SAP/SH2D1A cDNA に XLP のような変異が存在しないことを報告した (Inter Immunol 13, 559, 2001)。また、SAP/SH2D1A の promotor 領域と思われる 5' 上流に存在する CAAT ボックス近傍に単遺伝子変異が存在する可能性を見出し、RA で EBV に対する感染防御機構が異常を起こす原因として、SAP/SH2D1A 分子の機能異常がその原因の一つとして関与する可能性のあることを見出した。この研究では、これまでの発見に基づき RA に特異的な EBV の存在する可能性の検討と RA の骨髄に EBV による滑膜細胞への感染を引き起こす機構の存在の可能性の検討を目的とした。

B. 研究方法

1. RA 由来 EBV の採取

RA、正常者の口腔を綿棒でくまな

く擦過し、2 ml の生理食塩水に懸濁、DNA を抽出するまで -20 度で凍結保存した。EBV 陰性正常者由来 B 細胞と RA 骨髄 CD34 陽性細胞との共培養で樹立した B 細胞株の DNA を抽出し、この細胞株の EBV が RA 骨髄由来であることを解析した。

2. EBNA3c の DNA 配列の検討

EBV 産生株として広く知られている B95-8 で EBNA3c が 39 ヌクレオチドの 3 回の繰り返し構造が存在し、その繰り返し数がウイルス株により異なっていることが報告されている。この部位の DNA 配列を検討するため EBNA3c 領域の DNA 配列を PCR 産物のダイレクトシーケンス法にて ABI 社 DNA シークエンサー 377 (PE Applied Biosystems Inc., CA, USA) を使用し検討した。使用したプライマーは 5'-acgctcctctggatttaagttaca (100621-100645), 5'-catatcctggat-atgaagatgattgg (100796-100821) でシーケンスプライマーも同じものを使用し BigDye, Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (PE Applied Biosystems Inc., CA, USA) を使用し添付文書に従い DNA 配列を両方向で決定した。

3. RA 骨髄のコロニー形成

RA や変形性関節症 (OA) の骨髄を人工関節置換術時に文書にてインフォームドコンセント後採取し、21G の注射針で骨髄細胞の固まりをほぐし、

LSM 細胞分離液にて単核球を分離する。分離後 $1 \times 10^6 / \text{ml}$ に調整した骨髓単核細胞液 0.3ml を 3ml のメチルセルロース培地 (Methocult HF4434 ;Stem-Cell Technologies) に攪拌し 1.1ml を 35mm 培養皿 (3005) で、 37°C 、5%CO₂、湿度 100% で培養し、14 日後 BFU-E、CFU-GM を目視にてカウントしコロニーを分離回収した。

4. EBV 関連 LMP2 の Realtime PCR

前記した骨髓由来細胞コロニーを採取し、DNA を抽出、ABI 社 7700 遺伝子増幅装置 (PE Applied Biosystems Inc., CA, USA) を使用し、定量 PCR を行った。感度は 50 コピー以下で行った。

C. 結果

RA 由来 EBV の EBNA3c

RA の口腔由来 EBNA3c 領域の 39ヌクレオチドの繰り返し数は OA のものと比較し偏りはなかった (RA 7.0 ± 1.3 , Nr 6.7 ± 0.8)。この部位の塩基に RA で変異が認められそのアミノ酸にミスセンス変異によりこれまでの報告されていない異なったアミノ酸の配列が起こることが判明した (図 1)。RA 骨髓由来 CD34 細胞と EBV 陰性末梢血由来 B 細胞と共培養し樹立された EBV 陽性 B 細胞株が HLA の遺伝子型の比較で正常者由来であることが分かった。その EBV の EBNA3c の DNA 配列が

RA 患者口腔由来のものとの塩基変異を除いて他は全て一致し、その繰り返し構造の数も一致した。

RA の骨髓コロニー形成能

RA と OA でのコロニー形成能の違いをみるために GM-CFU, E-BFU の数を比較した。この結果 OA の患者と比較して RA の患者では E-BFU/GM-CFU 形成能に大きな相違はなかった。また、全体のコロニー数に関しても差は認められないと思われた。(図 2)。

RA 骨髓 GM-CFU, E-BFU の EBV の検出—Real time PCR 法

RA 4 例、OA 4 例の骨髓より得られた GM-CFU, E-BFU のコロニーでは LMP-2 のコピーは全て感度以下 (50 コピー) であった。

D. 考察

EBV はヘルペスウイルス群に属し、DNA ウイルスである。DNA ウイルスはレトロウイルスなどの RNA ウイルスと違いその配列に変異をあまり起こさないとされている。EBV ではタイプが 2 つ知られており RA 由来悪性リンパ腫ではその偏りが報告されている。また、EBV 関連蛋白である latent membrane protein(LMP-1)の配列に欠失が存在することが上咽頭癌で報告されたが、その後正常者由来の EBV にもその欠失の存在が報告され病因との関連は不明である。今回発見された