

EBNA3c 領域の RA に偏った DNA の変異はアミノ酸レベルでもミスセンス変異を起こしているが、その生体内における影響はまだ不明である。SLE や RA で以前より EBNA-1 の分子相同性による抗体が病態に結びつく可能性が議論されている。また、EBNA3c 領域は細胞傷害性 T 細胞の認識するエピートープが存在する部位でもあり RA の滑膜中に EBNA3c に対する抗体が高頻度に存在することも知られている。このようなアミノ酸変異が RA での EBV 制御に影響を及ぼす可能性も検討されなければならない。

RA の骨髓由来細胞が EBV の感染に大きな役割を果たす可能性が Hirohata 等 (Rheumatol Int. 2000;19:153) や Shimaoka 等 (J Clin Invest. 1998;102:606) により報告されている。我々は広畑博士との共同研究で骨髓 CD34 陽性細胞分画が RA 由来の EBV 感染に重要な役割を果たしている可能性を見出した。この知見をさらに検討するため骨髓での CFU の形成能を検討した。少数例であるが、骨髓幹細胞の両者への分化能には差を認めなかった。このコロニーに EBV が維持され得るかを調べたがその存在を証明することはできなかった。現在この分化の過程での EBV 感染能力の有無を検討し、RA 骨髓での EBV 感染の場の提供に幹細胞が関わっているか否かの検討を進める予定である。

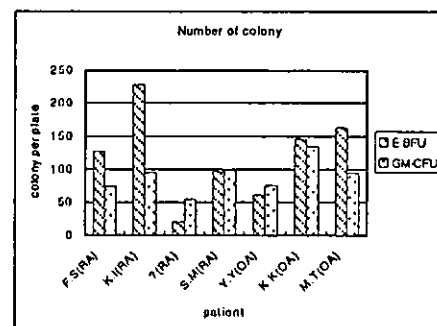
E. 結論

1. RA 由来 EBV 株には正常者と相違するものが存在する可能性があり EBNA3c 領域にアミノ酸変異を伴う塩基配列の相違が見出された。
2. EBV 陰性正常者由来 B 細胞と RA 骨髓 CD34 陽性細胞との共培養で樹立した B 細胞株の解析でこの EBV が RA 骨髓由来の可能性のあることを見出した。
3. 骨髓幹細胞の E-BFU/GM-CFU 形成能は RA と OA では大きな差はなく、そのコロニーに EBV の維持もされていないと考えられた。

図 1。RA 由来 EBV 野生株の EBNA3c のアミノ酸ミスセンス変異

	AA 3Pro置換	AA 2Arg置換	AA 11Gln置換
Nr	1/6	1/6	0/6
RA	5/6	5/6	4/6

図 2。RA と OA の骨髓コロニー形成能



F. 研究発表

1. 論文発表

1) S Sawada, **M. Takei** : Sjogren's syndrome. Yes Autoreactive lymphocytes, Why? virus or gene? Internal Medicine 41(2), 75-76, 2002

2) Azuma T, **Takei M**, Yoshikawa T, Nagasugi Y, Kato M, Otsuka M, Shiraiwa H, Sugano S, Mitamura K, Sawada S, Masuo Y, Seki N.: Identification of candidate genes for Sjogren's syndrome using MRL/lpr mouse model of Sjogren's syndrome and cDNA microarray analysis. Immunol Letter 81(2), 171-6, 2002.

(The first two authors equally contributed)

3) 白岩秀隆、山口美樹、佐藤真記、堀越昶、細川芳文、澤田滋正、逸見明博、佐貫栄一、**武井正美**、三田村巧、大久保陸洋、堀江孝至：壊死性血管炎を伴う溶血性連鎖球菌感染後反応性関節炎の一例

4) 澤田滋正 龍順之助 **武井正美**：慢性関節リウマチ最新治療ー抗 TNF- α 抗体、抗 IL-6 抗体療法 日大医学雑誌 60(10) 439-441, 2002

5) **武井正美**、三田村巧、大久保陸洋、澤田滋正：Epstein-Barr ウイルスと慢性関節リウマチ リウマチ科 27 (3) 255-260, 2002

6) **武井正美**、澤田滋正：シェーグレン症候群の治療戦略のポイント「シェーグレン症候群への strategy」 pp 14-19, 先端医学社、東京、2002

7) **武井正美**、三田村巧、澤田滋正：リウマチ科診療マニュアルーリウマチ性疾患における免疫検査法 サイトカイン リウマチ科 科学評論社 vol 27, pp352-359、2002

8) 三田村巧、**武井正美**、澤田滋正：リウマチ科診療マニュアルーリウマチ性疾患における免疫検査法リンパ球サブセットと可溶性表面マーカー リウマチ科 科学評論社 vol 27 pp347-351、2002

9) 関直彦、東孝典、吉川勉、増保安彦、**武井正美**、澤田滋正：リウマチ科診療マニュアルー検査の意義と検査成績の読み方・考え方 cDNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析 リウマチ科 科学評論社 vol 27 pp360-367、2002

2. 学会発表

1) Shiraiwa H, **Takei M**, Yoshikawa T, Azuma T, kato M, Otsuka M, Mitamura K, Okubo T, Saito I, Hayashi Y, Horie T, Msuh Y, Scki N, Sawada S: Isolation of candidated genes for Sjogren's syndrome using NFS/sld and MRL/lpr mice. animalmodels for primary and ssecondary Sjogren's syndrome by cDNA microarry. The 8th Interantional Symposium on Sjogren's syndrome Kanazawa, Japan, 2002, 5, 16-18

2) 西成田進、青木正紀、清水貴子、北村登、三田村巧、**武井正美**、松川吉博、堀江孝至：ANCA 関連血管炎 18

例の臨床像 日本内科学会 平成14年3月28日 名古屋

3) Y.Nakamoto, MS; I.Fukunishi, MD, PhD, FAPM; M.Takei, MD; M.Ishiburo, BA; M.Miwa, BA; Y. Matsukawa, MD; K. Mitamura, MD; T.Horie, MD; S.Sawada, MD; K.Nakamura, MD; M.Yoshii, MD: Peripheral-type Benzodiazepine Receptors as a Biological Marker for Screening the Degrees of Anxiety: Implications for Consultation-Liaison Psychiatry 49th Academy of Psychosomatic Medicine. Arizona, Tucson USA Nov 21 to 24, 2002

4) 白岩秀隆、武井正美、吉川勉、東孝典、加藤真樹、三田村巧、増保安彦、齋藤一郎、林良夫、大塚基之、大久保隆洋、堀江孝至、関直彦、澤田滋正: DNA チップによるマウス自己免疫性唾液腺炎モデルの遺伝子発現変動の検討 シェーグレン症候群市川セミナー2002 市川 2002年4月27日

5) 神戸栄美子、池田多聞、平沼久人、相川真吾、清水貴子、三田村巧、武井正美、松川吉博、白岩秀隆、大久保隆洋、澤田滋正、堀江孝至: 多発斑状陰影を呈した皮膚筋炎に伴うBOOPの一例 第13回日本リウマチ学会関東支部学術集会 東京 2002年12月14日

6) 小野瀬輝、北村登、山上賢治、岡秀昭、松川吉博、清水貴子、三田村巧、

武井正美、西成田進、澤田滋正、堀江孝至: EB ウイルス持続感染後、難治性血球貪食症候群を起こし末梢性T細胞性リンパ腫が疑われた1例 第46回日本リウマチ学会 2002、4月

7) 竹井和大、大久保隆洋、武井正美、堀江孝至、白岩秀隆、細川芳文、堀越昶、澤田滋正: ループス腸炎を来したSLEの一例 第5回東京リウマチ膠原病研究会、東京、10月5日、2002年(平成14年)

8) Nakamoto Y, Fukunishi I, Takei M, Ishiburo M, Miwa M, matsukawa Y, Mitamura K, Horie T, Sawada S, Nakamura k, Yoshii M: Peripheral-type Benzodiazepine receptors as a biological maker for screening the degrees of anxiety: Implications for consultation-liaison psychiatry. 32 nd. Annual Meeting Society for Neuroscience Orland, Florida USA 2002. Aug.

9) 武井正美、三田村巧、大久保隆洋、白岩秀隆、広畑俊成、堀江孝至、澤田滋正: 慢性関節リウマチとEB ウイルス 第46回日本リウマチ学会、神戸、4月22日、2002

10) 白岩秀隆、武井正美、吉川勉、東孝典、加藤真樹、三田村巧、増保安彦、齋藤一郎、林良夫、大久保隆洋、堀江孝至、関直彦、澤田滋正: 二次性 Sjogren 症候群 (SjS) モデル MRL/lpr と原発性 SjS モデル NFS/sld 唾液腺の遺伝子発現の検討-cDNA マイクロア

レイによる 第46回日本リウマチ学会、名古屋、4、2002

11) 大久保隆洋、武井正美、白岩秀隆、細川芳文、逸見 明博、澤田滋正：

ホジキン病 (HD) を合併した慢性関節リウマチ (RA) の一例 第46回日本リウマチ学会、名古屋、2002、4

12) 大久保隆洋、田平和宣、金子元英、山上賢治、清水貴子、北村登、白岩秀隆、三田村巧、武井正美、松川吉博、澤田滋正、堀江孝至：パルボウイルス感染症を伴った全身性エリテマトーデスの2症例 第43回関東リウマチ研究会、東京、6月22日、2002

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

発現特化型トランスクリプトーム解析による慢性リウマチ原因遺伝子の探索に関する研究
(主任又は分担者) 研究者 野島 博

研究要旨: 本年度は健常人血液細胞発現特化型 cDNA 群 (*PREB*: *predominantly expressed in blood cells*) の包括的単離を行い、単離を目指している、ほぼ全てに相当する 320 種類の *PREB* 遺伝子をクローニングすることに成功した。

分担研究者氏名・所属施設名及び 野島 博・大阪大学微生物病研究所
所属施設における職名 教授

<p>A.研究目的 慢性リウマチ患者の血液細胞発現特化型 cDNA マイクロアレイを作製し、それを用いた選択的トランスクリプトーム解析を行う形での血液診断治療システムを構築する。</p> <p>B.研究方法 健常人の血液細胞から mRNA を精製して作製した cDNA ライブラリーから繊維芽細胞由来の mRNA を差し引いた差分化 cDNA ライブラリーを作製し、段階的サブトラクション法によって健常人血液細胞発現特化型 cDNA 群を全て包括的に単離する。各部局で倫理委員会の承認を受け、健常人および患者の血液採取は全て書面によるインフォームド・コンセントをとることで倫理面に配慮した。</p> <p>C.研究結果 これまでに 3 次差分化まで終了した時点でほとんど同じ cDNA しか採れなくなったので段階的サブトラクションは完了したと判断した。この時点で単離した 320 種類はノーザンプロット解析によって繊維芽細胞には殆どバンドが見られないが血液細胞には強いバンドが見られた遺伝子である。</p> <p>D.考察</p>	<p>単離した <i>PREB</i> 遺伝子のうち約半数は機能解析がまったく行われていない未知遺伝子であった。癌遺伝子である <i>v-yes</i> が大量に発現していたのは意外であった。</p> <p>E.結論 3 次差分までで 320 種類もの <i>PREB</i> 遺伝子が単離できたことにより段階的サブトラクションは有用であると結論できた。</p> <p>F.健康危険情報 なし</p> <p>G.研究発表 1. 論文発表 Fujii, T. et al., <i>EMBO Rep.</i> 3(4):367-372, 2002. 2. 学会発表 日本分子生物学会 (横浜) 2002.12 月</p> <p>H.知的財産権の出願・登録状況 1. 特許取得 抹消血液細胞に示差的に発現されている遺伝子群、およびそれを用いた診断方法とアッセイ方法 (特許出願中) 2. 実用新案登録 なし 3. その他 なし</p>
---	---

(3) 研究成果の刊行に関する一覧表

(平成14年度)

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
伊藤雅波、高橋直之	破骨細胞の形成・機能の制御	松本俊夫	骨・軟骨代謝と注目の骨疾患	羊土社	東京	2002	60-73
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	岸本忠三	Annual Review 免疫 2003	中山書店	東京	2002	93-104
Takahashi N, Udagawa N, Takami N, Suda T	Cells of bone: Osteoclast generation.	Raisz LG, Rodan GA, Bilezikian JP	Principles of bone biology	Academic Press	San Diego	2002	pp109-126
武井正美、澤田滋正	シェーグレン症候群の治療戦略のポイント	住田孝之、竹内勤、山本一彦	シェーグレン症候群への strategy	先端医学社	東京	2002	pp 14-19
広畑俊成	第VI章治療up date 第3節 全身性エリテマトーデスの活動性評価と治療	竹原和彦、桑名正隆、宮地良樹	新・膠原病	診断と治療社	東京	2002	258-259
広畑俊成	第VI章治療up date 第17節 妊娠出産時における膠原病の治療	竹原和彦、桑名正隆、宮地良樹	新・膠原病	診断と治療社	東京	2002	302-303
広畑俊成	Part B 診断基準と診断のポイント 32. Behcet病	住田孝之	ESSENCE 膠原病・リウマチ	診断と治療社	東京	2002	90-91

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takeuchi E, Tanaka T, Umemoto E, Tomita T, Shi K, Takahi K, Suzuki R, Ochi T, Miyasaka M,	VL-4-dependent and -independent pathway in cell contact -induced proinflammatory cytokine production by synovial nurse-like cells from rheumatoid arthritis patients	Arthritis Research	Vol 4		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
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
Takeuchi E, Tanaka T, Umemoto E, Tomita T, Shi K, Takahi K, Suzuki R, Ochi T, Miyasaka M,	VL-4-dependent and -independent pathway in cell contact -induced proinflammatory cytokine production by synovial nurse-like cells from rheumatoid arthritis patients	Arthritis Research	Vol 4		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
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
Katagiri T, Takahashi N	Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation.	Oral Diseases	8(3)	147-159	2002
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
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
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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sawada S., Takei M	Sjogren's syndrome: Yes autoreactive lymphocytes, why? virus or gene?	Internal Medicine	41(2):	75-76	2002
Azuma T, Takei M, Yoshikawa T, Nagasugi Y, Kato M, Otuka M, Shiraiwa H, Sugano S, Mitamura K, Sawada S, Masuho Y, Seki N	Identification of candidate genes for Sjogren's syndrome using MRL/lpr mouse model of Sjogren's syndrome and cDNA microarray analysis.	Immunology Letter	81	171-176	2002
白岩秀隆、山口美樹、佐藤真紀、堀越昶、細川芳文、澤田滋正、逸見明博、佐貫栄一、武井正美、三田村巧、大久保隆洋、堀江孝至	壊死性血管炎を伴う溶連菌感染後反応性関節炎の1例	日大医学雑誌	61(7)	238-241	2002
澤田滋正 龍順之助 武井正美	慢性関節リウマチ最新治療—抗 TNF α 抗体、抗 IL-6 抗体療法	日大医学雑誌	60(10)	439-441	2002
武井正美、三田村巧、大久保隆洋、澤田滋正	Epstein-Barr ウイルスと慢性関節リウマチ	リウマチ科	27(3)	255-260	2002
武井正美、三田村巧、澤田滋正	リウマチ科診療マニュアル—リウマチ性疾患における免疫検査法—サイトカイン	リウマチ科	27	352-359	2002
三田村巧、武井正美、澤田滋正	リウマチ科診療マニュアル—リウマチ性疾患における免疫検査法リンパ球サブセットと可溶性表面マーカー	リウマチ科	27	347-351	2002
関直彦、東孝典、吉川勉、増保安彦、武井正美、澤田滋正	リウマチ科診療マニュアル—検査の意義と検査成績の読み方・考え方 cDNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析	リウマチ科	27	360-367	2002
Yamamoto A Tanaka S etc.	Possible involvement of IkappaB kinase 2 and MKK7 in osteoclastogenesis induced by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand.	J Bone Miner Res	17	612-621	2002
Nakamura I Tanaka S etc	IL-1 Regulates Cytoskeletal Organization in Osteoclasts Via TNF Receptor-Associated Factor 6/c- Src Complex.	J Immunol	168	5103-5109	2002,

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshisue, H. Suzuki, K. Kawabata, A., Ohya, T., Zhao, H., Sakurada, K., Taba, Y., Sasaguri, T., Sakai, N., Yamashita, S., Matsuzawa, Y. and <u>Nojima, H.</u>	Large scale isolation of non-uniform shear stress-responsive genes from cultured human endothelial cells through the preparation of a subtracted cDNA library.	Atherosclerosis	162(2)	323-334	2002
Fuji, T., Tamura, K., Masai, K., Tanaka, H., Nishimune, Y. and <u>Nojima, H.</u>	Use of stepwise subtraction to comprehensively isolate mouse genes whose transcription is upregulated during spermiogenesis.	EMBO Rep.	3(4)	367-372	2002
Yoshioka, N., Fuji, S., Shimakage, M., Kodama, K., Hakura, A., Yutsudo, M., Inoue, H. and <u>Nojima, H.</u>	Suppression of anchorage-independent growth of human cancer cell lines by the TRIF52/periostin/OSF-2 gene	Exp. Cell Res.	279	91-99	2002
Shimada, M., Nabeshima, K., Tbugan, T. and <u>Nojima, H.</u>	The meiotic recombination checkpoint is regulated by checkpoint <i>rad+</i> genes in fission yeast	EMBO J.,	21 (11)	2807-2818	2002
Kimura, S.H. and <u>Nojima, H.</u>	Cyclin G1 mediates the association of MDM2 with ARF and promotes p53 accumulation	Genes Cells,	7(8)	869-880	2002
Watanabe, T., Miyashita, K., Saito, T.T., Nabeshima, K. and <u>Nojima, H.</u>	Abundant poly (A)-bearing RNAs that lack open reading frames in <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	DNA Res.,	9	1-7	2002
Hirohata S, Ohshima N, et al	Regulation of human B cell function by sulfasalazine and its metabolites.	Int Immunopharm	2	631-640	2002
Hirohata S, Yanagida T, et al	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
広畑俊成	リウマチ科診療マニュアル A. 総論-III. リウマチ性疾患の臓器病変の把握と考え方 リウマチ性疾患の精神・神経病変	リウマチ科	27	227-235	2002
広畑俊成	特集 膠原病と合併症 CNSループスおよび神経病変	総合臨床	51	2155-2160	2002
広畑俊成	シンポジウムIII-3 神経免疫性疾患をめぐって 神経ペーチェット病の病態	臨床神経学	41	1147-1149	2002
広畑俊成	全身病としての膠原病 鑑別診断と治療の要点 神経・精神症状の特徴	モダンフィジシャン	22	1373-1380	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
広畑俊成	特集 関節リウマチ治療の進歩—最新の基礎・臨床研究— 薬物療法に関する最近の進歩 Leflunomideの有効性	日本臨床	60	2357-2363	2002
Matsuda T, Ohno S, Hirohata S, et al	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
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
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
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
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
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
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
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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
吉川秀樹	BMP の応答制御機構の解析	The Bone	16	85-89	2002
富田哲也、高樋康一郎、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
玉井直行、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
吉川秀樹、名井陽、玉井直行、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
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
玉井直行、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—その優れた微細構造と骨伝導能	Orthopaedics Ceramic Implants	21	21-24	2002

(4) 研究成果の刊行物

(平成14年度)

□V. サイトカイン

3. サイトカインによる破骨細胞の分化

松本歯科大学学生化学講座 宇田川信之

昭和大学歯学部生化学講座 須田 幸治

松本歯科大学総合歯科医学研究所硬組織疾患制御再建学部門 高橋 直之

key words osteoclast, RANKL, OPG, TNF, IL-1, LPS

動 向

近年, osteoimmunology という言葉が提唱された。これは, 樹状細胞の専門家であるペンシルベニア大学の Choi 博士によって命名されたものである¹⁾。

1998年にそれまで全く不明であった破骨細胞の分化と機能を制御する新しい分子のクローニングが成功した²⁾。この骨芽細胞あるいは骨髄間質細胞の細胞膜上に発現する破骨細胞分化因子 osteoclast differentiation factor (ODF) は, 実は Choi らによって報告された TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine) あるいは Immunex のグループによって報告された RANKL (receptor activation of NF- κ B ligand) と同一分子であった²⁻⁵⁾。ODF/TRANCE/RANKL は TNF ファミリーに属するサイトカインであり, 遺伝子欠損マウスの症状からも, 破骨細胞の分化と骨吸収機能発現に必須の因子であることが明らかとなった。以来, TNF 関連サイトカインのシグナルが破骨細胞の分化と骨吸収機能において重要な役割を果たしていることが各種の遺伝子欠損マウスの解析からも明らかとされてきた。

このように, 免疫学の主役であった TNF 関連サイトカインあるいは T リンパ球が, 直接破骨細胞性の骨吸収に関与する知見が集積されてきた

ことより, osteoimmunology とよばれる分野が開拓されたわけである。

本稿においては, 破骨細胞の分化と骨吸収メカニズムに関する最近の知見について我々の研究成果を中心に概説したい。

A. 破骨細胞形成の分子機構

現在考えられている破骨細胞の分化と活性化(骨吸収機能発現)のメカニズムを図1に示す⁵⁾。活性型ビタミンDや炎症性サイトカインの刺激によって骨芽細胞の細胞膜表面上に発現誘導された RANKL は, その受容体である RANK を発現しているマクロファージ系の細胞あるいは分化した成熟破骨細胞に作用することによって, 破骨細胞の分化と活性化を促進する。OPG は RANK と構造が類似していることからデコイ受容体として働き, RANK よりもはるかに高い親和性をもって RANKL に結合することにより, RANKL の活性を強く抑制することが明らかとなった。

B. 活性化 T リンパ球に発現する RANKL は破骨細胞の分化を直接促進する

RANKL 遺伝子欠損マウスの所見⁶⁾より,

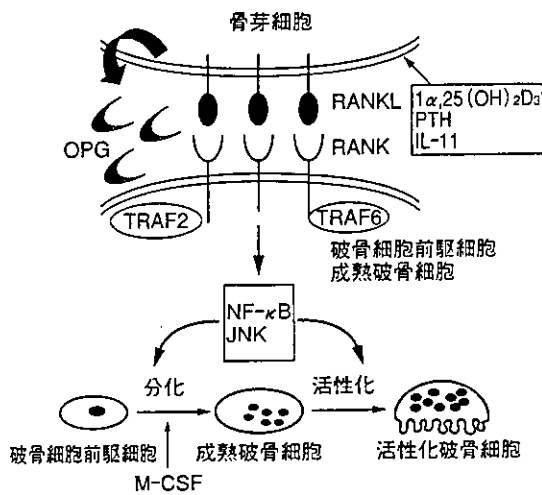


図1 破骨細胞形成の分子機構

活性型ビタミンD ($1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$), 副甲状腺ホルモン (PTH), IL-11等の骨吸収促進因子の刺激により骨芽細胞の細胞膜上に発現誘導されるRANKLを, 破骨細胞前駆細胞または破骨細胞のRANKが認識することによって, TRAFを介したシグナル伝達により破骨細胞の分化と活性化が行われる. TRAFを介したシグナル伝達にはNF- κ BとJNKが関与する. OPGはRANKLのおとり受容体としてRANK以降のシグナル伝達を遮断する.

RANKLは破骨細胞の分化のみならずリンパ節の発生およびリンパ球の分化にも重要な役割を果たしていることが明らかとなり, 免疫系におけるRANKLの重要性が注目されている.

最近, 関節リウマチ (RA) 患者およびリウマチモデル動物の関節滑膜組織におけるRANKLの発現を解析した実験成績が相次いで報告された⁷⁻¹¹⁾. 我々も, *in situ* hybridization法を用いて観察したところ, RA患者の関節滑膜組織において多数増殖が認められる線維芽細胞およびCD3陽性の活性化Tリンパ球にRANKLのmRNAおよび蛋白の発現を認めた¹²⁾. また, RA患者の関節液中の可溶性RANKL濃度をELISA法によって測定した結果, RA患者の関節液中には, 変形性関節症, 外傷, 痛風患者と比較して, 可溶性RANKLが高濃度に含まれていることが明

らかとなった. 一方, RA患者のOPG濃度は低値を示しており, 変形性関節症または痛風患者と比較すると, RA患者の関節液における可溶性RANKLとOPG濃度の比は有意に高値を示した¹²⁾. このようなOPGに対するRANKLの相対比の上昇が, RAにおける骨破壊を惹起している可能性が示された. 実際, 活性化されたTリンパ球がRANKLを発現し, 直接破骨細胞の分化を促進する実験結果も得られている^{6,12,13)}.

以上の*in vitro*の実験結果を支持する*in vivo*の実験結果として, マウスの関節炎モデルにおける骨破壊はRANKL遺伝子欠損マウスでは認められないとする実験成績が報告された¹⁴⁾. また, Amgenのグループ⁶⁾は, Tリンパ球が恒常的に活性化されているctla4遺伝子欠損マウスは骨吸収の亢進が認められ典型的な骨粗鬆症の症状を示すこと, リウマチモデルであるアジュバント誘発関節炎ラットに対するOPGの投与は骨密度の回復作用を示すことを報告した. さらに, 限局性若年性歯周炎の原因菌である*Actinobacillus actinomycetemcomitans*によって発症させた歯周炎モデルマウスにおける歯槽骨の吸収には活性化Tリンパ球(CD4⁺ T cell)が直接関与しており, これらの骨吸収の亢進はOPGの投与によって抑制されるとする興味深い実験結果も報告されている¹⁵⁾.

また, 関節リウマチの滑膜組織に存在するTリンパ球やマクロファージが産生するIL-6, 可溶性IL-6受容体, IL-17, TNF α , IL-1などは骨芽細胞に作用し, RANKLの発現をうながすことにより破骨細胞の形成を促進するとする実験結果¹⁶⁻¹⁸⁾や, TNFやIL-1がRANKLを介さずに直接破骨細胞の分化や機能を制御するとする報告(後述)^{19,20)}もあり, RA病変における骨破壊には複数の機構が関与していると考えられる(図2).

最近, 東京大学医学部整形外科の田中らのグループは, 自己RANKLに対する液性免疫誘導によりマウスの関節炎モデルにおける関節破壊を抑制

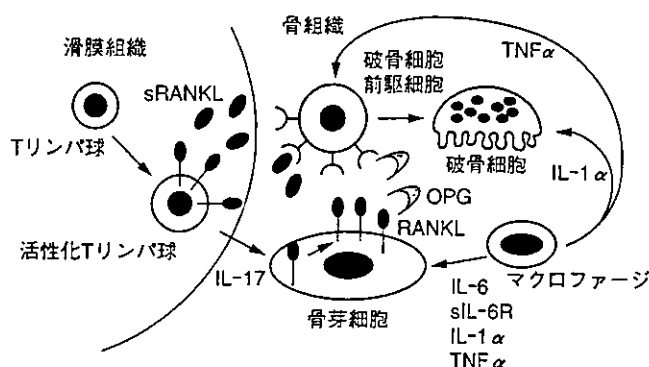


図2 活性化Tリンパ球の破骨細胞分化への関与

RANKLの発現が強く認められる活性化Tリンパ球は破骨細胞前駆細胞に直接作用し、破骨細胞への分化を促進する。活性化Tリンパ球によって産生されるIL-17は骨芽細胞に作用することによりRANKLの発現を誘導し、間接的に破骨細胞の分化を促進する。活性化Tリンパ球によって産生されるRANKLは、骨芽細胞由来のRANKLに較べて膜から離れやすく、可溶性RANKL (sRANKL) になるという。

するという新しい治療法を開発した²¹⁾。このワクチン療法はOPGの頻回投与によって引き起こされる中和抗体産生によるOPGの効果減弱という問題点を克服することができ、RAや骨粗鬆症における病的骨吸収に対する有効な治療法として今後の臨床応用が注目される。

一方、東京大学医学部免疫学の高柳らは、活性化Tリンパ球はIFN- γ の産生を介して破骨細胞の分化を抑制する実験結果を各種の遺伝子欠損マウスを用いて報告している²²⁾。その実験成績によると、IFN- γ はTリンパ球活性化に伴う骨破壊においてTRAF6 (TNF receptor-associated factor 6: RANKL, IL-1, LPSなどのシグナル伝達因子)を標的分子とし、その分解を介してRANKLのシグナル伝達を抑制する機構を有している。したがって、TRAF6の機能や発現を抑制することによって新たな炎症性骨破壊の治療法の確立に道が開けると提唱している。事実、TRAF6遺伝子欠損マウスは重篤な大理石骨病を呈すること^{23,24)}、IFN- γ 受容体遺伝子欠損マウスにおいてはコラーゲン誘発性の関節炎が強く発症

すること²⁵⁾などが報告されている。さらに彼らは、RANKLは破骨細胞前駆細胞におけるc-Fos誘導性のIFN- β 発現を促進し、さらにIFN- β はネガティブフィードバックとしてc-Fosの発現を抑制し、破骨細胞分化を阻害する実験結果を報告した²⁶⁾。IFN- β のノックアウトマウスは破骨細胞数が増加し骨量が減少するという。このような状況の中、NF- κ B, MAPキナーゼおよびc-FosなどのRANKL誘導性の信号伝達が、果たしてどのように破骨細胞の分化と骨吸収機能発現に関与しているかについてはまだまだ謎が多い。

C. LPS (リポ多糖) の破骨細胞分化に対する作用機構

歯周疾患においては歯を支える歯槽骨の吸収が著明に認められることにより、歯の喪失が惹起する。この骨吸収亢進の原因としては、歯周ポケットに存在するグラム陰性菌の菌体成分の刺激によるサイトカインの産生亢進などによる破骨細胞の分化と機能の活性化が考えられる。Lipopoly-

saccharide (LPS) はグラム陰性菌外膜の構成成分で歯周病の原因の1つと考えられている。そこで、LPSの破骨細胞分化に対する作用について詳しく検討した。

まず、骨芽細胞の存在下での共存培養系におけるLPSの作用を検討した²⁷⁾。マウス骨髄細胞と骨芽細胞の6日間の共存培養によって、LPSはビタミンDの添加と同様に多核破骨細胞を誘導した。そこで、LPSによる破骨細胞分化誘導作用にPGE₂が関与しているかについて検討した。その結果、COX2の阻害薬であるNS398は、LPSによる破骨細胞促進作用を完全に阻害した。このとき、ビタミンDによる破骨細胞形成には、NS398は何ら効果を示さなかった。また、培養上清中のPGE₂濃度を測定してみると、共存培養においてLPS刺激を行う条件で、PGE₂産生亢進が認められた。そこで、この破骨細胞形成促進効果がRANKLの信号によって制御されているかについてノーザンブロット法によって検討した。骨芽細胞におけるRANKL mRNAの発現はビタミンD

刺激によって亢進され、骨芽細胞において恒常的に発現しているOPG mRNAは反対に抑制されることが知られているが²⁾、LPSは骨芽細胞におけるRANKL発現を促進し、OPG発現を抑制した。そこで、COX2阻害剤であるNS398のLPS誘導性RANKL発現促進とOPG発現抑制に対する影響を検討した。培養48時間の条件において、NS398はLPS依存性のRANKLの発現促進に対して効果を全く示さない一方、NS398はLPSによるOPG発現の抑制を中和した(図3A)。これらの結果は、LPSによる破骨細胞分化促進作用はPGE₂依存性であり、このPGE₂の作用は骨芽細胞におけるOPGの発現抑制に関与している可能性を示唆している。

そこで、OPG遺伝子欠損マウス由来の骨芽細胞と骨髄細胞を用いた共存培養系におけるLPSによる破骨細胞分化を検討した。OPG欠損マウスの共存培養においては、OPGの産生が欠如していることにより無刺激の状態でも破骨細胞の分化が認められ、LPSの添加により破骨細胞分化のさ

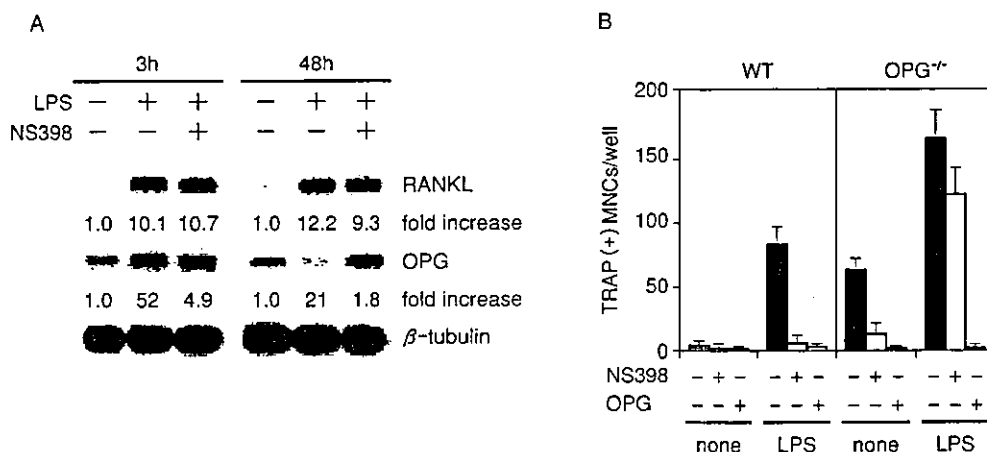


図3 LPSの破骨細胞分化促進作用

- A. 骨芽細胞におけるLPS誘導性のRANKLおよびOPG mRNA発現に対するCOX2阻害剤(NS398)の作用。骨芽細胞をNS398により1時間前処理し、さらにLPSにより3時間または48時間処理した。Total RNAを回収し、ノーザンブロット法により、RANKLおよびOPG mRNAを検出した。
- B. OPG非存在下における破骨細胞分化に対するCOX2阻害剤(NS398)の作用。野生型(WT)またはOPG欠損マウス(OPG^{-/-})由来の骨芽細胞を野生型マウス由来の骨芽細胞とLPSの存在下で共存培養した。培養後TRAP染色を行い、多核TRAP陽性細胞数を破骨細胞として計測した。

らなる促進作用が認められる。正常マウスの共存培養系におけるLPS誘導性の破骨細胞形成促進は、NS398の添加によって完全に阻害されるが、OPG欠損マウスの共存培養においてはNS398の効果は全く認められなかった(図3B)。一方、OPGの添加はLPSによる破骨細胞分化を完全に阻害した(図3B)²⁷⁾。

以上の結果をまとめると、LPSは骨芽細胞に作用することによってCOX2誘導性のPGE₂産生を亢進する。このPGE₂は自らの細胞に作用することによってOPGの発現を抑制すると考えられる。一方、LPSはCOX2非依存性にRANKLの発現亢進を誘導する。このRANKLの発現亢進とOPGの発現抑制によって、LPSは破骨細胞の分化促進に寄与するものと考えられる(図4)。

そこで次に、LPSによるRANKL発現誘導機構を探るため、LPS刺激によるRANKL誘導に対する各種阻害剤の効果を検討した。骨芽細胞に各種

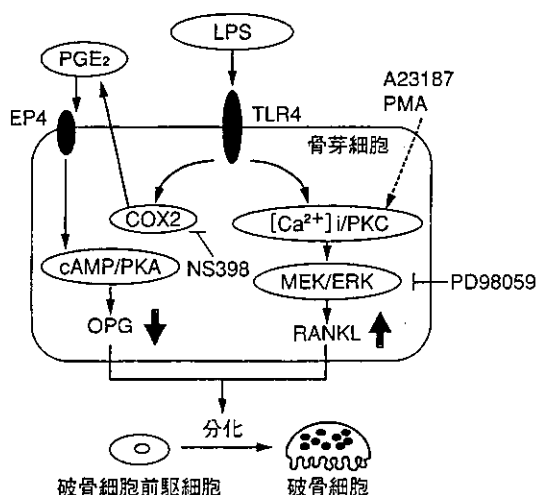


図4 LPSによる破骨細胞の分化誘導機構

LPSは骨芽細胞に直接作用してRANKL発現を誘導するとともに、PGE₂の産生亢進を介してOPGの発現抑制を誘導することにより、破骨細胞の分化を促進する。LPSによるRANKLの発現誘導には、Ca/PKC経路とそれに続くMEK/ERK経路が関与すると考えられる。

阻害剤を1時間前処理した後、LPS刺激を3時間行った。その結果、細胞内カルシウムイオンキレーターであるBAPTA-AM、PKC阻害剤であるRo-32-0432そしてMEK1/2の阻害剤であるPD98059によって、LPS誘導性のRANKL発現は阻害された。PKA阻害剤であるH-89には抑制活性は認められなかった。RANKLの発現誘導において、カルシウム・PKC経路の活性化が示唆されたので、カルシウムイオノフォアであるA23187およびPKC活性化剤であるPMAを骨芽細胞に処理したところ、細胞内カルシウムの上昇やPKCの活性化によりRANKL発現が誘導された。この発現亢進はMEK1/2の阻害剤を前処理することにより抑制された。以上の結果より、LPSはカルシウム・PKC経路とそれに続くMEKの活性化を介してRANKLの発現を誘導することが示唆された(図4)²⁷⁾。

LPSのRANKL発現誘導にMEKの活性化が関与することが示唆されたので、LPSがMEKおよびその下流のERKを活性化するか否かを、それぞれの蛋白質のリン酸化を指標に解析した。骨芽細胞をLPSで処理することにより、MEKのリン酸化が認められ、引き続いてERKのリン酸化が促進された。次に、LPSによるMEK・ERKの活性化が細胞内カルシウム濃度の上昇およびPKCの活性化を介するかを検討した。骨芽細胞を細胞内カルシウムイオンキレーター、PKC阻害剤そしてMEK1/2阻害剤で前処理を行い、LPS刺激を行った結果、これらの阻害剤によってERKのリン酸化が強く抑制された。さらに、細胞内カルシウムの上昇やPKCの活性化を行うと、LPS刺激と同様にERKのリン酸化が誘導された。一方、PKAの信号伝達を介するPGE₂刺激によっては、ERKのリン酸化は誘導されなかった。

最後に、LPSによって誘導される破骨細胞分化に対するMEK阻害剤PD98059の効果を検討した。LPS刺激によって誘導された多核破骨細胞は

PD コンパウンドによって完全に抑制された。PGE₂による破骨細胞形成に対して、PD コンパウンドは何ら効果を示さなかった。

以上の実験結果から、LPSは骨芽細胞に作用してRANKLの発現を促進するとともに、PGE₂の産生誘導を介したOPGの発現抑制を介して破骨細胞の分化の誘導を促進するものと考えられる。このRANKL発現誘導には、カルシウム・PKC経路とそれに続くMEK/ERK経路の活性化が関与することが示された(図4²⁷⁾。

D. LPSの破骨細胞への直接作用

LPSは血清中のLPS結合蛋白と結合した後、血清中のCD14と結合することが確認されてきた。しかしながら、CD14は細胞内ドメインをもたないため、LPSのシグナルを細胞内に伝達することはできない。そのためLPSのシグナルを伝達するLPSの受容体の解明が待たれていた。近年LPSの受容体としてToll-like receptor 4 (TLR4)が同定された。LPSはマクロファージに作用して各種のサイトカイン産生をうながすことが知られている。一方、血球系単核マクロファージから分化してくる破骨細胞へのLPSの効果についてはいまだ不明である。

まず、破骨細胞におけるToll-like receptor (TLR)の発現について検討した。その結果、骨芽細胞と骨髄マクロファージにおいて認められるTLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9およびCD14 mRNAsのうち、破骨細胞においてはTLR2, TLR4およびCD14の発現が確認できた(Suda et al, 投稿中)。分化した破骨細胞は骨芽細胞の非存在下では急速に死に至る。LPSはRANKLあるいはIL-1同様に、破骨細胞に直接作用することにより、成熟破骨細胞の延命を促進した。このLPSによる破骨細胞の延命効果がTLR4を介しているかを検討するた

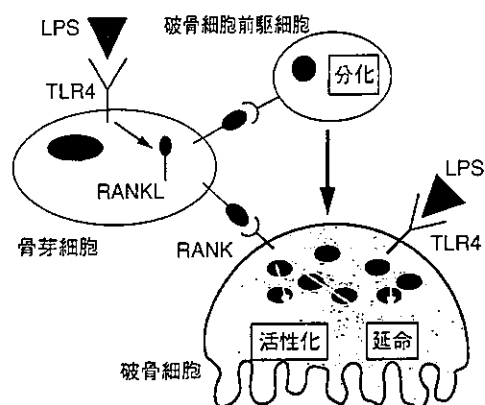


図5 破骨細胞の分化と機能における骨芽細胞の役割とLPSの破骨細胞に対する直接作用

LPSは破骨細胞に発現するTLR4を介して、直接その延命を促進する。

めに、TLR4に点変異を有するLPS低反応性のC3H/HeJマウスを用いて実験を行った。C3H/HeJマウスおよびコントロールマウスとしてC3H/HeNマウス由来の骨髄細胞から誘導したおの破骨細胞におけるIL-1, LPSの延命効果について検討した。その結果、IL-1処理による延命効果はHeJ, HeN両マウスにおいて効果が認められたが、LPSの延命効果はHeJマウスでは全く認められなかった。また、LPSによる破骨細胞の延命効果は、OPGまたはIL-1中和抗体の添加によっても抑制されず、TNF受容体欠損マウスから誘導した破骨細胞を用いた実験でもLPSはRANKL同様延命効果を示さなかった²⁸⁾。

以上まとめると、破骨細胞の分化に対して、LPSはRANKL発現を介する促進作用を示すことが明らかとなった。また、成熟破骨細胞においてもLPS受容体が認められ、LPSが破骨細胞のTLR4を介して直接その延命を促進していることが示された(図5)。

E. RANK-RANKL系を介さないTNF α の破骨細胞形成促進機構

マウス骨髄細胞をM-CSFの存在下で4日間培養して得たマクロファージをRANKLとM-CSFの存在下でさらに3日間培養すると、大部分のマクロファージは破骨細胞に分化する¹⁹⁾。そこでこの培養系を用いて各種サイトカインの作用を調べたところ、マウスTNF α はM-CSFの存在下でマクロファージからの破骨細胞への分化を強力に促進した。一方、ヒトTNF α はわずかな数の単核破骨細胞を誘導するのみであった。このマクロファージの単独培養系において、IL-1には破骨細胞の分化を誘導する活性は認められなかった。また、マウスTNF α による破骨細胞形成はOPGの添加により全く抑制されなかったが、TNF I型受容体ならびにTNF II型受容体に対する中和抗体によって強力に抑制された¹⁹⁾。マウスTNF α はマウスのTNF I型受容体とII型受容体に結合しシグナルを伝達するのに対し、ヒトTNF α はマウスのTNF I型受容体にのみ結合する。以上の知見は、TNF I型受容体及びII型受容体両者からのシグナルが破骨細胞の分化に重要であることを示唆するものである。また、マクロファージの形質を有するマウス株細胞であるRAW264.7細胞の単独培養においてもTNF α 刺激によって破骨細胞の形成が認められた^{29,30)}。TNF α のシグナル伝達にはTRAF2が必須であることが報告されており、TNF α 誘導性の破骨細胞形成におけるTRAF2の重要性が示唆される。しかし、TRAF6遺伝子欠損マウスから得られた破骨細胞前駆細胞にTNF α を処理してもRANKLの場合と同様に破骨細胞はほとんど形成されないことから³¹⁾、TNF α による破骨細胞形成におけるTRAF2とTRAF6の関連は今後に残された課題である。

次に、TNF α によって誘導された破骨細胞に

骨吸収活性が具備されているか否かを解析した。マウスTNF α とM-CSFの存在下で破骨細胞前駆細胞を象牙切片上で培養すると、破骨細胞は誘導されたが吸収窩は形成されなかった。吸収窩は、TNF α とIL-1を同時に添加したときのみ象牙切片上に形成された¹⁹⁾。以上の知見より、マウスTNF α は破骨細胞の分化を促進するが、破骨細胞の活性化を誘導しないこと、一方IL-1は、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を直接促進しないが、形成された破骨細胞の骨吸収活性を誘導することが明らかにされた。このことから、破骨細胞の機能発現にはTRAF6が必須であることがわかる。

Pacificiらは、閉経後のエストロゲン欠乏はTリンパ球によるTNF α の産生亢進を介して骨吸収亢進を惹起するという実験結果を報告した^{32,33)}。すなわち、卵巣摘出術を行ったマウス骨髄においてはTNFを産生するTリンパ球の数が有意に増加すること、Tリンパ球が欠如しているヌードマウスあるいはTNF I型受容体遺伝子欠損マウスにおいては卵巣摘出術による骨量減少が認められないという興味深い結果である。以上の結果は、エストロゲン欠乏による骨破壊にもTリンパ球によるTNF産生が密接に関与している可能性を示している。

むすび

RANKL遺伝子のクローニングにより、破骨細胞の形成を調節する骨芽細胞の役割の詳細が明らかになってきた。さらに、関節リウマチや歯周疾患の発症に関与するさまざまな炎症性サイトカインとRANKLとのシグナル伝達の複雑なクロストークのバールもはがされつつある。また、歯周疾患における骨破壊に関与すると考えられるLPSの破骨細胞の分化と機能に対する役割も注目されてきた。これには、各種の細菌表層成分とそれらを認識するToll-like receptor (TLR) に関する最