

ドに深く関与している可能性が示され²³⁾、抗体や遺伝子治療の検討がされている。Lewisラットの正常関節に注入した実験では血管新生と滑膜増殖、線維化を伴う急性関節炎を起こしたとの報告があり、RAの関節液中のTGFβの高値、滑膜細胞でのmRNAの発現、蛋白合成が報告されている。しかし、変形性関節炎関節液中でも活性型のTGFβがRAより多く存在しており、RAでは非活性型が多いとの報告もある。反面、RAやOAの滑膜細胞、組織から潜在型のもので出されているが、RA関節液はプロテアーゼ、カテプシンなどの酵素に富んでいて活性型になり易いとも指摘されている。RA滑膜細胞の増殖を抗TGFβ抗体が容量依存的に抑制したとの報告や、RA滑膜細胞がオートクラインで増殖する可能性も示された²⁴⁾。

8. IFNα, β

このサイトカインは現在実際にIFNγとともにウイルス性肝炎、腎癌、黒色腫、慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫などの治療として広く使われている。その副作用が自己免疫疾患の誘導がよく知られているもので治療にはその適用が慎重にされているためここでは詳細には解説しない。膠原病での臨床応用としてはCNSループスでの精神症状に髄液のIFNαの値が相関するため保険の適用はないが、測定する機会が多い²⁵⁾。

おわりに

サイトカインと膠原病、リウマチ系疾患の関連については非常に多くの研究がされてきた。その成果として、実際にRAなどで治療に応用され効果を認めているものが出てきたが、その相互の作用の複雑さから臨床検査での単純な相関ははっきりしたものは少なく疾患特異性も少ないことから検査薬として保険適用となっていないものがほとんどないと思われる。実際に測定を希望すれば測定キットはすべて市販されており臨床検査会社での依頼も容易にできる環境となっている。今後サイトカインのmRNAの動きや遺伝子変異をgene chipやreal time PCR法を使って測定し、サイトカイン相互の関連が疾患の活動性や診断に応用できることが可能になるものと考えられる。測定法などの情報は[株]SRLより協力を得た。

文 献

- 1) Segal, R., Bermas, B.L., Dayan, M., et al.: Kinetics of cytokine production in experimental systemic lupus erythematosus : involvement of T helper cell1/ T helper cell 2- type cytokines in disease. *J. Immunol.*, 158 : 3009, 1997.
- 2) Jung, T., Schauer, U., Heusser, C., et al.: Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 159 : 197, 1993.
- 3) Lemmel, E.M., Gaus, W. & Hofschneider, P.H.: Multicenter double-blind trial of interferon-gamma versus placebo in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 34 : 1621, 1991.
- 4) Machold, K.P., Neumann, K. & Smolen, J.S.: Recombinant human interferon gamma in the treatment of rheumatoid arthritis : double blind placebo controlled study. *Ann. Rheum. Dis.*, 51 : 1039, 1992.
- 5) Bigda, J., Mysliwska, J., Dziadziuszko, R., et al.: Interleukin 12 augments natural killer-cell mediated cytotoxicity in hairy cell leukemia. *Leuk. Lymphoma.*, 10 : 121, 1993.
- 6) Majewski, S., Marczak, M., Szmurlo, A., et al.: Interleukin-12 inhibits angiogenesis induced by human tumor cell lines *in vivo*. *J. Investig. Dermatol.*, 106 : 1114, 1996.
- 7) Toi, M., Bicknell, R. & Harris, A.L.: Inhibition of colon and breast carcinoma cell growth by interleukin-4. *Cancer Research*, 52 : 275, 1992.
- 8) Takatsu, K.: Interleukin-5. *Curr. Opin. Immunol.*, 4 : 299, 1992.
- 9) Hirano, T., Matsuda, T., Turner, M., et al.: Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.*, 18 : 1797, 1988.
- 10) Yoshizaki, K., Nishimoto, N., Mihara, M., et al.: Therapy of rheumatoid arthritis by blocking IL-6 signal transduction with a humanized anti-IL-6 receptor antibody. *Springer Semin Immunopathol.*, 20 : 247, 1998.
- 11) Blay, J.Y., Burdin, N., Rousset, F., et al.: Serum interleukin-10 in non-Hodgkin's lymphoma : a prognostic factor. *Blood*, 82 : 2169, 1993.

- 12) Douset, C., Brouty-Boye, D., Pottin-Clemenceau, C., et al.: Interleukin (IL)4 and IL-13 act on human lung fibroblasts. Implication in asthma. *J. Clin. Invest.*, 101 : 2129, 1998.
 - 13) Debinski, W., Obiri, N.I., Powers, S.K., et al.: Human glioma cells overexpress receptors for interleukin 13 and are extremely sensitive to a novel chimeric protein composed of interleukin 13 and pseudomonas exotoxin. *Clinical Cancer Research*, 1 : 1253, 1995.
 - 14) Husain, S.R., Obiri, N.I., Gill, P., et al.: Receptor for interleukin 13 on AIDS associated Kaposi sarcoma cells serves as a new target for a potent Pseudomonas exotoxin based chimeric toxin protein. *Clinical Cancer Research*, 3 : 151, 1997.
 - 15) Campion, G.V., Lebsack, M.E., Lookabaugh, J., et al.: Dose-range and dose-frequency study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis. The IL-1Ra Arthritis Study Group. *Arthritis Rheum.*, 39 : 1092, 1996.
 - 16) Drevlow, B.E., Lovis, R. & Haag, M.A.: Recombinant human interleukin-1 receptor type I in the treatment of patients with active rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 39 : 257, 1996.
 - 17) Brennan, F.M., Zachariae, C.O., Chantry, D., et al.: Detection of interleukin 8 biological activity in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and production of interleukin 8 mRNA by isolated synovial cells. *Eur. J. Immunol.*, 20 : 2141, 1990.
 - 18) McInnes, I.B. & Liew, F.Y.: Interleukin 15 : a proinflammatory role in rheumatoid arthritis synovitis. *Immunol. Today*, 19 : 75, 1998.
 - 19) Gracie, J.A., Forsey, R.J., Chan, W.L., et al.: A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.*, 104 : 393, 1999.
 - 20) Keffer, J., Probert, L., Cazlaris, H., et al.: Transgenic mice expressing human tumor necrosis factor : a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J.*, 10 : 4025, 1991.
 - 21) Elliott, M.J., Maini, R.N., Feldmann, M., et al.: Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet*, 344 : 1105, 1994.
 - 22) Moreland, L.W., Margolies, G., Heck, L.W., Jr., et al.: Recombinant soluble tumor necrosis factor receptor (p80) fusion protein: toxicity and dose finding trial in refractory rheumatoid arthritis. *J. Rheum.*, 23 : 1849, 1996.
 - 23) Symposium on clinical applications of TGF-beta. London, 12-14 June 1990. Proceedings. Ciba Found. Symp., 157 : 1~241, Chichester-Wiley, 1991.
 - 24) Lafyatis, R., Thompson, N.L., Remmers, E.F., et al.: Transforming growth factor-beta production by synovial tissues from rheumatoid patients and streptococcal cell wall arthritic rats. Studies on secretion by synovial fibroblast-like cells and immunohistologic localization. *J. Immunol.*, 143 : 1142, 1989.
 - 25) Shiozawa, S., Kuroki, Y., Kim, M., et al.: Interferon-alpha in lupus psychosis. *Arthritis Rheum.*, 35 : 417, 1992.
- 〔参考web site, 図書〕
- 1) C O P E : Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia. <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi>
 - 2) 宮園浩平, 菅村和男・編: サイトカイン・増殖因子. Bio Science, 用語ライブラリー, 実験医学別冊, 羊土社, 東京, 1998.

A. 総論—IV. 検査の意義と検査成績の読み方・考え方

リウマチ性疾患における 免疫学的検査 リンパ球サブセットと 可溶性表面マーカー*

Key words : Lymphocyte subsets, Soluble cytokine receptors,
Soluble adhesion molecules

三田村 巧**
武井 正美**
澤田 滋正**

リンパ球サブセット

免疫応答細胞のリンパ球はT細胞とB細胞とに大きく分類される。

T細胞は、その機能上、ヘルパーT細胞、サイトトキシック(キラー)T細胞、ヘルパーインデューサーT細胞、サイトトキシックインデューサーT細胞に分類される。また分化過程においては、T細胞は、pro-T細胞、pre-T細胞、胸腺皮質細胞、胸腺髄質細胞、成熟T細胞、活性化T細胞などに分類され、B細胞は、pro-B細胞、pre-B細胞、未熟B細胞、末梢B細胞、形質細胞などに分類される。このような分類は、血液細胞が幹細胞からの分化過程で細胞膜上の特異抗原の発現が変化することをもとにしており、表面の特異抗原は機能と分化過程によって多様に存在する。細胞膜上の抗原に対するモノクローナル抗体によって特異抗原を同定することにより、血液細胞の機能と分化段階の解析が可能となった。

しかし同一抗原を認識する抗体には、名称の異なる種々の抗体が存在するようになり混乱の原因ともなった。そこで白血球分化抗原に対応するモノクローナル抗体が、国際ワークショップによりCD(cluster of differentiation)番号で統

一され表記されるようになった。96年の第6回にはCD1~166までに分類されている¹⁾。T細胞関連抗原、B細胞関連抗原の他には骨髄球関連抗原、血小板関連抗原、NK細胞関連抗原、活性化細胞関連抗原、接着因子関連抗原、サイトカイン関連抗原、内皮細胞関連抗原等に対するモノクローナル抗体が存在する(対応抗原をCD抗原と記す)。これらのモノクローナル抗体は、免疫異常がどの機能・分化過程の細胞による異常なのかという解析を可能とした。

1. リンパ球サブセットの検査方法

モノクローナル抗体を使ったフローサイトメトリー法での解析が一般化されている。蛍光標識モノクローナル抗体と全血を反応させ、細胞洗浄後赤血球を溶血させ測定する。この時、モノクローナル抗体の非特異的反応を検討するために陰性コントロールを置く。また溶血が充分かどうか結果を左右することがあるので注意する²⁾。標識後は、蛍光強度の低下をきたすため速やかに測定する。

2. CD抗原の意義とリンパ球サブセット

1) 細胞表面マーカーとしてのCD抗原(造血器腫瘍の診断)

血液腫瘍細胞における分化段階の判明は、診断と治療の選択だけでなく、治療に対する反

* Lymphocyte subsets and soluble surface marker.

** Koh MITAMURA, M.D., Masami TAKEI, M.D. & Shigemasa SAWADA, M.D.: 日本大学医学部第一内科(〒173-8610 東京都板橋区大谷口上町30-1); First Department of Internal Medicine, Nihon University School of Medicine, Tokyo 173-8610, JAPAN

¹⁾ 現 日本大学医学部附属練馬光が丘病院内科

表1 主なT細胞関連抗原のCD番号

番号	機能	分布
CD2	LFA-2 (Eロゼットレセプター) LFA-3のリガンド	T細胞全般, NK細胞
CD3	TCRを介したシグナル伝達	T細胞全般
CD4	MHCクラスII, HIVのレセプター	ヘルパー/インデューサー T細胞
CD5	CD72のレセプター	T細胞全般, B-CLL
CD7	Fc μ レセプター	T細胞全般, NK, 一部のAMLやALL
CD8	MHCクラスIのレセプター	サブプレッサー/サイトトキシク T細胞

表2 T細胞サブセットとその基準値

CD	サブセット	基準値(平均 \pm SD)%
CD3 ⁺ ・HLA-DR CD4 ⁺ /CD8 ⁺	活性化T細胞	1~10
CD8 ⁺ ・CD11b ⁺	サイトトキシク T細胞	1~2.5 (7 \pm 4)
CD8 ⁺ ・CD28 ⁺	キラー T細胞	(20 \pm 7)
CD4 ⁺ ・CD62L ⁺	サブプレッサーインデューサー T細胞	
CD4 ⁺ ・CD29 ⁺	ヘルパーインデューサー T細胞	(25 \pm 7)
CD4 ⁺ ・CD45RA ⁺	ナイーブ T細胞	(15 \pm 10)
CD4 ⁺ ・CD45RO ⁺	メモリー T細胞	(15 \pm 10)
CD3 ⁻ ・CD16 ⁺	ナチュラルキラー T細胞	

応性や予後までもある程度推察できるようになった。

たとえば白血病の診断においては、急性骨髄性白血病の典型例であるM2(FAB分類)では、CD11b⁺, CD13⁺, CD14⁻, CD33⁺, CD34⁺, HLA-DR⁺という特徴を持つ。t(8, 22)の染色体転座のある例では、CD19陽性例が多いことも報告されている。

しかしCD抗原は、特異的にある細胞系に発現しているだけではなく、表面抗原の解析だけでは骨髄性とリンパ球性の鑑別もできないこともある。また解析の進歩により当初の細胞特異性がない例も判明してきているので注意を要する。よって多種の抗体による検討が必要である。

2) 免疫機能とCD抗原

免疫不全疾患においては、CD4⁺T細胞(ヘルパーT細胞に相当し、MHC class II分子に結合した抗原を認識する)とCD8⁺T細胞(サイトトキシク/キラー T細胞に相当しMHC class I分子と結合した抗原を認識する)の割合とその数、CD4/CD8比の算定などにより、その免疫状態が把握される。CD4⁺T細胞が増加しT細胞系の機能が亢進しCD4/CD8比が高値となる場合が、慢性関節リ

ウマチ、サルコイドーシス、細菌感染症などで認められる。全身性エリテマトーデス、Sjögren症候群、多発性硬化症等では、CD8⁺T細胞が減少しCD4/CD8比が上昇する。ウイルス感染症でCD4⁺T細胞が減少する例の代表にHIV感染症がある。さらにCD4⁺T細胞は、CD4⁺CD45RA⁺(ナイーブT細胞：抗原やサイトカインで活性化されていないT細胞に相当)とCD4⁺CD45RO⁺(メモリーT細胞：免疫によって獲得した免疫記憶を行う、に相当)に機能的に分類できる。加齢とともにCD4⁺CD45RA⁺は、CD4⁺CD45RO⁺に替わっていき成人ではほぼ同率になる。CD4⁺CD29⁺はヘルパーインデューサーT細胞、CD4⁺CD62L⁺はサブプレッサーインデューサーT細胞に相当する。CD8⁺細胞は、CD11b⁺のサブプレッサー機能を持つものとCD28⁺のサイトトキシク機能があるものに分類される(表2)³⁾。

しかしこうした分類による評価は前述したように、使用するモノクローナル抗体の細胞特異性の問題や、病期によるサブセットの変動などにより絶対的なものではないので注意が必要である。

3) CD抗原のその他の機能

CD抗原の分子がウイルスレセプターとして機能するものが存在する。CD4抗原は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜貫通型糖蛋白で、HIVのウイルスレセプターであることが証明されている⁴⁾。またEBウイルス(Epstein-Barr virus: EBV)のレセプターは、補体レセプターCR2であるCD21抗原(免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜貫通型糖蛋白)であり⁵⁾、麻疹ウイルスのレセプターがCD46(補体結合性制御蛋白)という報告も認められる⁶⁾。

また1993年の第5回国際ワークショップでは、14のサイトカインレセプター分子がCD抗原に加えられた(CD115~130)⁷⁾。

可溶性表面マーカー

可溶性サイトカインレセプターは、Rubinなどが活性化末梢T細胞の細胞上清中に可溶性IL-2レセプターα鎖(sIL-2Rα)を発見したのが最初であり⁸⁾その後、サイトカインレセプター遺伝子が次々とクローニングされるようになり、alternatively spliced messageの存在もあきらかとなった⁹⁾。

一般的に可溶性サイトカインレセプターの多くは、サイトカインが細胞膜表面のレセプターに達しシグナル伝達を行うことを、リガンド特異的に抑制するantagonisticな作用を持つ。しかし可溶性サイトカインレセプターがサイトカインと結合することにより、サイトカインの安定性を高めたり、プロテオライシスによる蛋白変性を減少させ半減期を延ばすことにより、生体内でサイトカイン濃度を上昇させるというagonisticな作用も同時に持つ。たとえばマウスでの*in vivo*の実験系においてsIL-4Rや、sTNF-αRの存在下では、IL-4およびTNF-αのプロテオライシスを防御し、血中でのクリアランスを減少させ半減期が延びたことが、報告されている⁹⁾¹⁰⁾。そして中には、sIL-6Rのようにgp-130を介してシグナル伝達が可能なものもある¹¹⁾。

1. 可溶性IL-2受容体(sIL-2R)

sIL-2Rは、膜結合型IL-2RよりプロテオライシスまたはmRNAの選択的スプライジングにより膜貫通領域を欠損して産生されるIL-2Rα鎖(CD25)の可溶性レセプターである。IL-2Rはα鎖(p55)、

β鎖(p75, CD122), γ鎖(p64, CD132)のサブユニットから構成されており、α鎖はリンパ球の活性化に伴い出現しIL-2と低親和性結合能を示す。その可溶性分子であるsIL-2Rは、親和性の違いにより、細胞表面の高親和性IL-2R(α鎖, β鎖, γ鎖から構成)とIL-2との結合を抑制できない。産生細胞は活性化T細胞だけでなくB細胞悪性腫瘍からも作られることが報告され、B細胞の関与も判明している。IL-2R発現細胞の増大に伴いsIL-2Rは高値となる。このことより臨床的にはリンパ球性悪性腫瘍による腫瘍量の増大(非ホジキン病, ホジキン病, 多発性骨髄腫等の血液悪性腫瘍の進行に比例し治療効果とも相関する)や、また固形腫瘍、自己免疫疾患、感染症、臓器移植の拒絶反応時のリンパ球活性化状態においても高値となる。一部の疾患においては、疾患活動性と進行度や予後の指標となることが報告されている¹²⁾¹³⁾。

sIL-2Rが高値の疾患:

悪性腫瘍: 非ホジキンリンパ腫, ホジキン病, 成人T細胞白血病(ATL), 慢性骨髄性白血病, 多発性骨髄腫, 肺癌, 乳癌, 肝癌

自己免疫疾患: 全身性エリテマトーデス(SLE), 慢性関節リウマチ(RA), 全身性強皮症(SSc), 多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM), シェーグレン症候群(SjS), 多発性硬化症(MS)

感染症: AIDS, 伝染性単核球症, 麻疹, 結核, 肝炎

移植後拒絶反応

2. 可溶性IL-6受容体(sIL-6R)

IL-6Rはα鎖(80 kDa, CD126)とシグナル伝達を行うβ鎖(130kDa, gp130, CD130)のサブユニットから構成しており¹⁴⁾, sIL-6RはプロテオライシスとmRNAの選択的スプライジングの両方の機構により産生される。IL-6Rを表現していない細胞においてもβ鎖が単独で発現していれば, sIL-6RとIL-6およびβ鎖の複合体形成によりシグナル伝達が可能であり, 他の可溶性受容体と異なってsIL-6RはIL-6活性を抑制せず増強(agonistic)する¹⁴⁾。sIL-6Rは正常人の血清, 尿中にも存在し, 血中ではIL-6量と比べ多量に存在し, 多くの場合変動しない。疾患の中には血中や局所で増減をみとめるが, しかしその機能や病態はいまだ不明

表3 CD4/CD8比が異常を示す疾患例

<p><CD4/CD8比の上昇></p> <p>全身性エリテマトーデス, 慢性関節リウマチ, Sjögren症候群, サルコイドーシス, 多発性硬化症, 成人性T細胞性白血病(ATL), 慢性活動性肝炎</p>
<p><CD4/CD8比の低下></p> <p>AIDS(後天性免疫不全症候群), EBウイルス感染症, サイトメガロウイルス感染症, 原発性胆汁性肝硬変, 再性不良性貧血, 骨髄移植後, 抗癌剤・免疫抑制剤投与後</p>

な点が多くこれから解明されるべきことである。

sIL-6Rの上昇する疾患:

関節炎: RA, 痛風の関節液中, 炎症性腸疾患, AIDS

sIL-6Rの低下する疾患: 若年性関節リウマチ(JRA)の急性発熱期, 敗血症

3. 可溶性CD4(sCD4), 可溶性CD8(sCD8)
CD4, CD8分子は免疫グロブリンスーパーファミリーに属し, T細胞とB細胞やマクロファージとの接着を強固にする分子であり, CD4はhelper T細胞上に表現されMHCクラスII分子と結合し, CD8はkiller T細胞上に表現されMHCクラスI分子と結合し抗原認識を行う。sCD4は分泌型遺伝子の存在が確認されておりmRNAの選択的スプライジングによりT細胞から分泌されるが, sCD8に関しては分泌型は認められていない。またこれらの可溶性分子であるsCD4, sCD8の機能は不明であるが, sCD4は炎症性疾患において増加しRA, SjS, SLEで高値を示す¹⁵⁾。ウイルス感染症では, ウイルス排除にかかわる免疫担当細胞の活性化に伴いsCD8が増加しウイルス感染症の活動性の指標となりうる(表3)。

sCD4が高値の疾患:

慢性炎症性疾患, RA(急性期の関節液中と血清中で高値: 赤沈値, リウマチ因子と相関), SjS, SLE

sCD8が高値の疾患:

急性ウイルス感染症(麻疹, 伝染性単核球増症), HIV感染症

4. 可溶性Fas (sFas)

Fas(CD95)はTNF(tumor necrosis factor)レセプターファミリーに属する膜蛋白であり, リンパ球, 肝臓, 小腸等の種々の細胞・組織に発現されている。FasはTNFレセプターファミリーの

膜蛋白のFasリガンド(Fas L)との結合によりアポトーシスを引き起こす。その可溶性分子であるsFasは, mRNAの選択的スプライジングによって膜貫通領域を欠損して産生され分泌される¹⁷⁾。膜型Fas/Fas-Lのアポトーシスを抑制しFasを介してのアポトーシスの調節に関与すると考えられている。しかし臨床的意義はまだ確立されていない。

sFasが高値の疾患: SLE(疾患活動性と相関), 急性リンパ球性白血病, 慢性リンパ球性白血病, ATL, AIDS, 大腸癌, 心不全, 乳癌, 卵巣癌, 肝癌, 多発性硬化症(MS), HAM (HTLV-1 associated myelopathy)

5. 可溶性ICAM-1 (sICAM-1)

ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1, CD54)は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子であり, そのリガンドはLFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1)である。血管内皮細胞や単球, 白血球などに存在する。サイトカインで発現が著明に増加し, 炎症部位への白血球動員やローリングのあとの静止, 粘着に関与し, またT細胞活性化の際, 副刺激シグナルを伝える等の炎症反応や免疫反応において重要な役割を担っている。sICAM-1はプロテオライシスによりICAM-1より産生され遊離する¹⁷⁾。ICAM-1の発現量によりsICAM-1の血中濃度は増減すると考えられ, 血管内皮を巻き込んだ炎症で高値となる。

sICAM-1が高値の疾患: 悪性関節リウマチ(MRA), Wegener肉芽腫, 川崎病, 慢性肝炎, 悪性リンパ腫, 多発性骨髄腫, 転移を伴う上皮系悪性腫瘍等

6. 可溶性VCAM-1 (sVCAM-1)

VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1,

CD106)は免疫グロブリンスーパーファミリーに属す接着分子であり、そのリガンドはVLA-4(very late antigen-4)である。サイトカイン刺激により血管内皮細胞に出現し白血球の接着に関与する¹⁸⁾。sVCAM-1はプロテオライシスにより産生され遊離するが、その調節機構は不明でありVCAM-1発現の増減に伴い産生されると考えられている。

sVCAM-1が高値の疾患：

SLE, RA, Wegener 肉芽腫, 川崎病

文 献

- 1) Kishimoto, T., Goyert, S., Kikutani, H., et al.: Update of CD antigens, 1996. *J. Immunol.*, 158 : 3035, 1997.
- 2) 日本臨床検査標準協議会, FCM-WG : フローサイトメトリーによる末梢血リンパ球表面抗原検査に関するガイドライン(JCCLSH1-P・V-1.0), *JCCLS*, 13 : 1, 1998.
- 3) 木村暢宏 : 白血球表面マーカー. *medicina* 増刊号, 36 : 627, 1999.
- 4) Dalgleish, A.G., Beverley, P.C., Clapham, P.R., et al.: The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, 312 : 763, 1984.
- 5) Nemerow, G.R., Houghten, R.A., Moore, M.D., et al.: Identification of an epitope in the major envelope protein of Epstein-Barr virus that mediates viral binding to the B lymphocyte EBV receptor (CR2). *Cell*, 56 : 369, 1989.
- 6) Naniche, D., Varior-Krishnan, G., Cervoni, F., et al.: Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J. Virol.*, 67 : 676025, 1993.
- 7) Schlossman, S.F., Boumsell, L., Gilks, W., et al.: CD antigens 1993. *Immunol. Today*, 15 : 98, 1994.
- 8) Rubin, L.A., Kurman, C.C., Fritz, M.E., et al.: Soluble interleukin 2 receptors are released from activated human lymphoid cells *in vitro*. *J. Immunol.*, 135 : 3172, 1985.
- 9) Fernandez-Botran, R., Chilton, P.M., Ma, Y., et al.: Soluble cytokine receptors: their roles in immunoregulation, disease, and therapy. *Adv. Immunol.*, 63 : 269, 1996.
- 10) Mohler, K.M., Torrance, D.S., Smith, C.A., et al.: Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J. Immunol.*, 151 : 1548, 1993.
- 11) Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., et al.: Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell*, 21, 63 : 1149, 1990.
- 12) Keystone, E.C., Snow, K.M., Bombardier, C., et al.: Elevated soluble interleukin-2 receptor levels in the sera and synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 31 : 844, 1988.
- 13) Tokano, Y., Murashima, A., Takasaki, Y., et al.: Relation between soluble interleukin 2 receptor and clinical findings in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.*, 48 : 803, 1989.
- 14) Novick, D., Shulman, L.M., Chen, L., et al.: Enhancement of interleukin 6 cytostatic effect on human breast carcinoma cells by soluble IL-6 receptor from urine and reversion by monoclonal antibody. *Cytokine*, 4 : 6, 1992.
- 15) Sawada, S., Sugai, S., Iijima, S., et al.: Increased soluble CD4 and decreased soluble CD8 molecules in patients with Sjögren's syndrome. *Am. J. Med.*, 92 : 134, 1992.
- 16) Cascino, I., Fiucci, G., Papoff, G., et al.: Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. *J. Immunol.*, 154 : 2706, 1995.
- 17) Rothlein, R., Mainolfi, E.A., Czajkowski, M., et al.: A form of circulating ICAM-1 in human serum. *J. Immunol.*, 147 : 3788, 1991.
- 18) Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., et al.: Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell*, 59 : 1203, 1989.

A. 総論—IV. 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*

Key words : cDNA microarray, Expression profile, Full-length cDNA library

関 直彦***
東 孝典**
吉 川 勉**
増 保 安彦**
武 井 正美***
澤 田 滋 正****

はじめに

生命の設計図であるゲノム塩基配列情報のすべてが解読された現在、遺伝子研究は大きなターニングポイントを迎えようとしている。遺伝子の発現は生体において時間的かつ空間的に調節されており、これら生命現象の調節機構の網羅的解明が今後の課題である。DNAマイクロアレイ(DNAチップ)は、ヒトゲノム解明により到来するポストゲノムシーケンス時代において、包括的な遺伝子発現モニタリングやゲノムの変異、多型性の検出を可能にする重要なテクノロジーとして注目されている。この先端技術は、基盤上に高密度に整列化したプローブDNAに対して標識した核酸をハイブリダイゼーションし、画像を自動検出器で取り込んでデータを解析処理するものである。DNAマイクロアレイは大きく分けてオリゴDNAをガラス表面上で合成していくタイプと、DNA(主にcDNA)を載せていくタイプの2つがある。それぞれの開発機関の代表は前者はAffymetrix社であり、後者はStanford大学である。ここではわれわれが行っているcDNAマイクロアレイのシステム(Stanfordタイプ)を用いた遺伝子発現解析例について紹介する。

ポストゲノムシーケンス時代における機能ゲノム学

2001年2月12日、国際ヒトゲノムプロジェクトと米国のベンチャー企業セラジェノミックス社が共同記者会見を開催し、ヒトゲノムの解読に成功したことを公表した。おのおの詳細な解析データについては、国際ヒトゲノムプロジェクトがNature誌2月15日号で、セラジェノミックス社はScience誌2月16日号で見ることができる。われわれはついに33億塩基対からなるヒト遺伝暗号のすべてを手にしたわけで、ヒトゲノム解析研究は構造解析から機能解析へと大きなターニングポイントを迎えている^{1)~9)}。全ゲノム配列の決定を受けて、今までのように遺伝子を個々にとらえるのではなく、ゲノム中に埋没しているすべての遺伝子の機能とそのネットワークの網羅的解明に主眼がおかれるようになる。そもそも遺伝子の発現は生体において、時間的かつ空間的に厳密に調節されているにもかかわらず、その実体は不明瞭であり、どのようにして遺伝子ネットワークを探るのが今後の大きな課題である。すなわち多数の遺伝子の発現情報を大規模(massive)で同時平行(parallel)

* Gene expression analysis using the cDNA microarray.

** Naohiko SEKI, Ph.D., Takanori AZUMA, M.D., Tsutomu YOSHIKAWA, Ph.D. & Yasuhiko MASUHO, Ph.D.: ヘルリクス研究所第三研究部門(☎292-0812 木更津市矢野1532-3); Helix Research Institute, Kisarazu 292-0812, JAPAN

*** Masami TAKEI, M.D.: 日本大学医学部第一内科

**** Shigemasa SAWADA, M.D.: 日本大学医学部附属練馬光が丘病院内科

1) 現 千葉大学大学院医学研究科機能ゲノム学講座(☎260-8670 千葉市中央区亥鼻1-8-1)

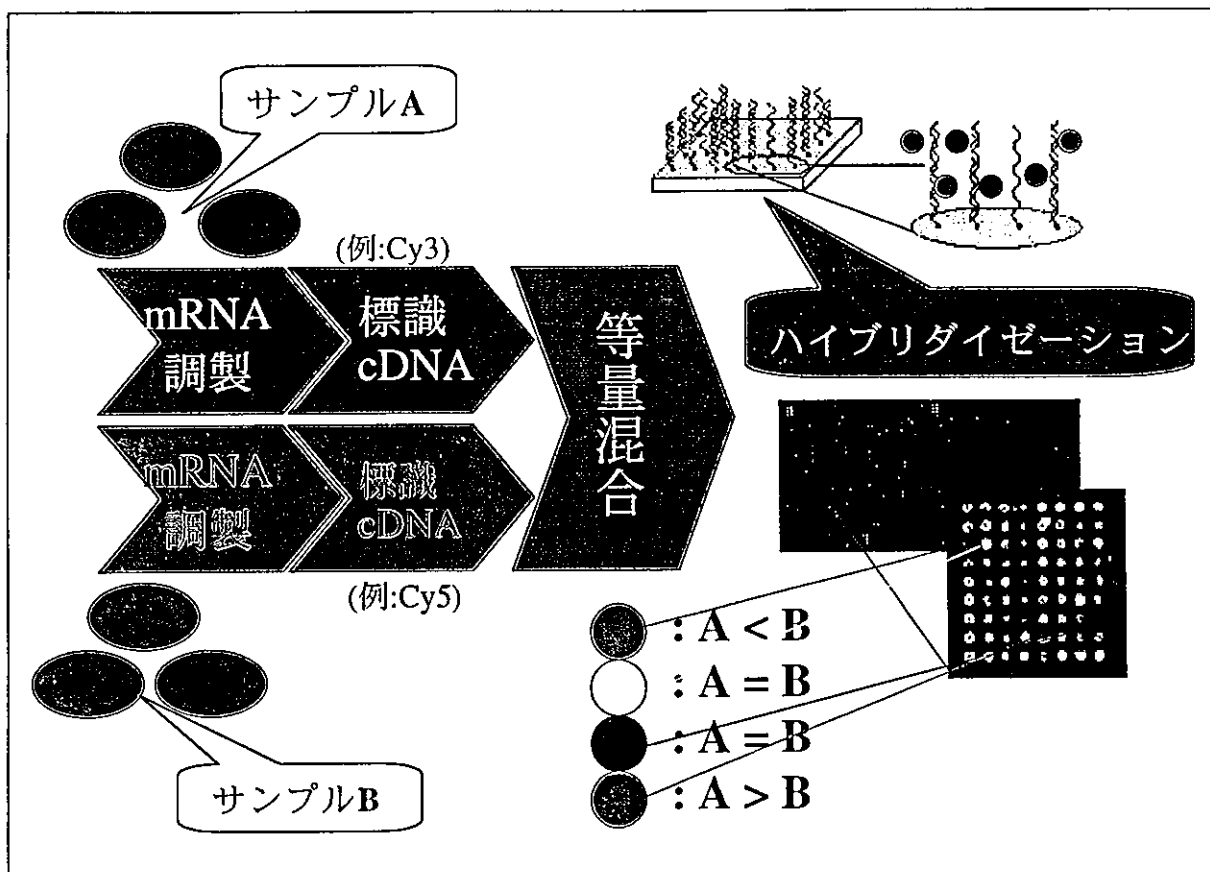


図1 cDNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析の原理

に検出する手段が求められている。

このような背景をもとにDNAマイクロアレイ (DNAチップ) は、ヒトゲノムシーケンス解明により到来するポストゲノムシーケンス時代において、包括的な遺伝子発現モニタリングやゲノムの変異、多型性の検出を可能にする重要なテクノロジーとして注目されている^{10)~12)}。最近、DNAマイクロアレイを用いて病型診断ができることを報告した論文や、抗癌剤の選択方法を予測する論文が発表され、いよいよこの技術が実際の医療に応用できることが示されつつある^{13)~19)}。われわれも遺伝子発現解析の手段としてcDNAマイクロアレイを用いた解析を行っている^{20)~23)}。実際にin-houseでアレイを作製し、発現解析を行ってみるとまだまだこの技術は発展途上のものであり、解決しなくてはならない問題も多いことを実感する。しかしながら、数千から数万個の遺伝子のノーザン解析(expression profile)をスライドガラス1枚でしかも数日で行えるcDNAマイクロアレイ技術は画期的なものであり、今後さらに洗練

されていくものと思われる。

cDNAマイクロアレイとは

cDNAマイクロアレイは、1995年にStanford大学のPatrick Brownらにより開発された技術である¹⁷⁾。この方法は、表面を特殊加工したスライドガラスなどの固相基盤上に多数の異なるプローブcDNAを高密度に固定し、その上でのおの異なる蛍光色素で標識した2種類のmRNA由来のターゲットcDNAを競合的にハイブリダイズさせて、個々のスポットからの蛍光シグナルを自動検出器で取り込み、コンピュータで大量解析するものである。したがって、マイクロアレイ上にスポットされた個々のプローブcDNA上で2種類のターゲットcDNAが競合的にハイブリダイズするため、mRNAの発現量に依存して蛍光強度が変化する(図1)。しかしながら、現時点ではスライドガラス上にスポットするプローブcDNA量を厳密にコントロールすることは困難であるため、別々のcDNAマイクロアレイを用いて解析さ

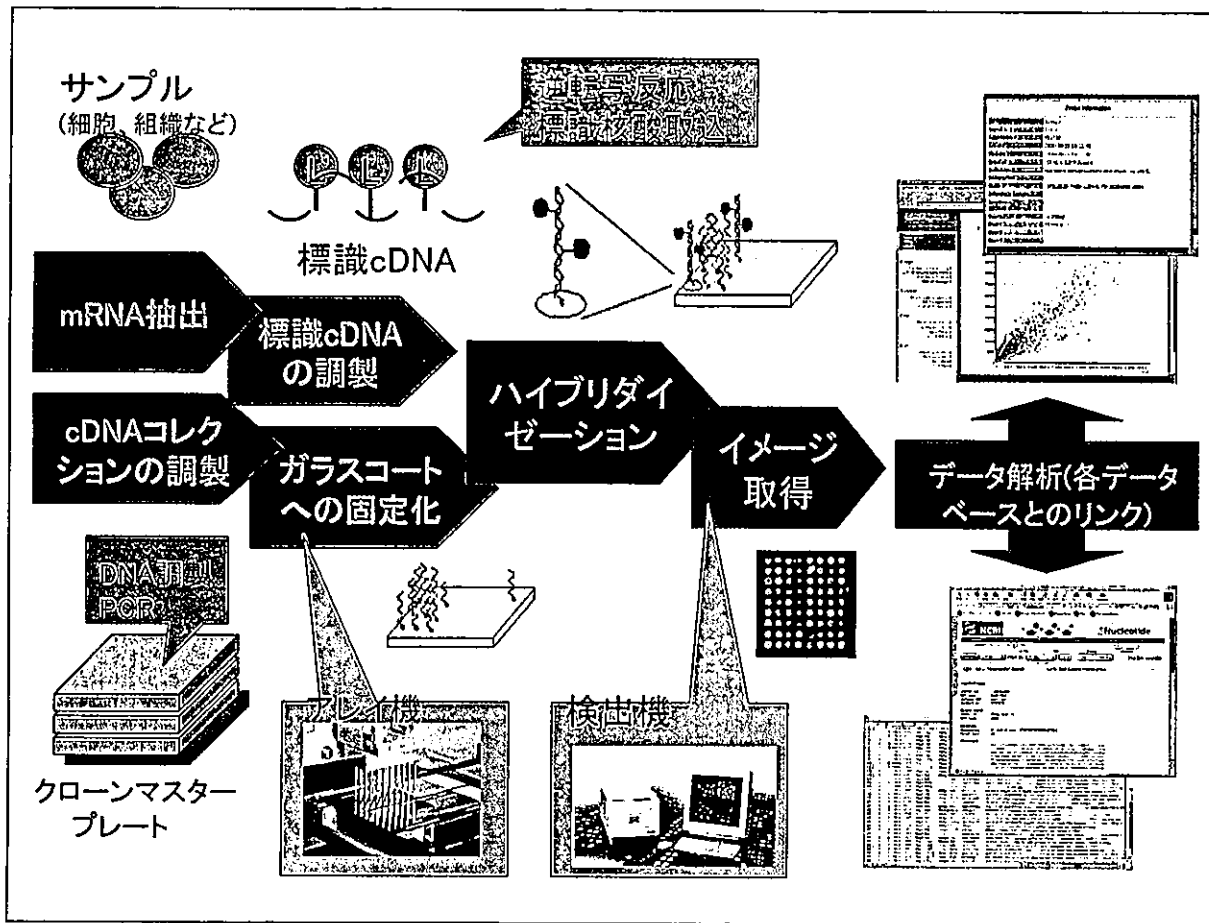


図2 cDNAマイクロアレイの作製および解析の流れ

れた遺伝子の発現量比較や、個々の遺伝子の発現量を絶対値として求めることはできない。あくまでもスポットされた各遺伝子と対照となるmRNAとの相対値を解析するものである。

この方法はDNAアレイ機および検出機があれば、do it yourselfで始めることができる。スポットするDNAを任意に選べる一方で、DNAのコレクションを調製しなければならない複雑さがある。ピン先で物理的にスポットしていくので、Affymetrix社のオリゴチップのような高密度化は望めない。それでもたとえば直径100 μ mのスポットを100 μ m間隔でスポットすると計算上1cm²あたりに2500スポットが可能であり、通常のスライドガラス1枚(有効面積:約4cm²)に最大で1万個ぐらいのプロープcDNAを載せることができる。図2にcDNAマイクロアレイ作製のながれを示した。cDNAマイクロアレイの作製には幾つかのステップ(プロープcDNAの調製、スライドガラスへの固定、標識cDNAの調製、ハイブリダイ

ゼーション、検出、データ解析など)があり、研究室単位でさまざまな工夫がなされている。なお、われわれはアレイスポットターとしてSPBIO2000(日立ソフトウェアエンジニアリング)、検出器としてScanArray 4000(General Scanning社)を使用している。

cDNAマイクロアレイを用いた臨床応用

マイクロアレイを用いて今後の臨床研究の方向性を示す論文が昨年から今年にかけて発表された^{13)~19)}。この中の一つを例にとると、非ホジキンリンパ腫であるDiffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)には化学療法に反応する群と非反応群があることが知られており、従来の病理学の分類法ではこれらの群の判定は困難であった。この論文では、リンパ腫解析のための“Lymphochip”を作製し、DLBCLを含む100例以上の血液腫瘍の解析を行った。この中で著者らは、DLBCLの遺伝子発現プロファイルがgerminal center B-cell関

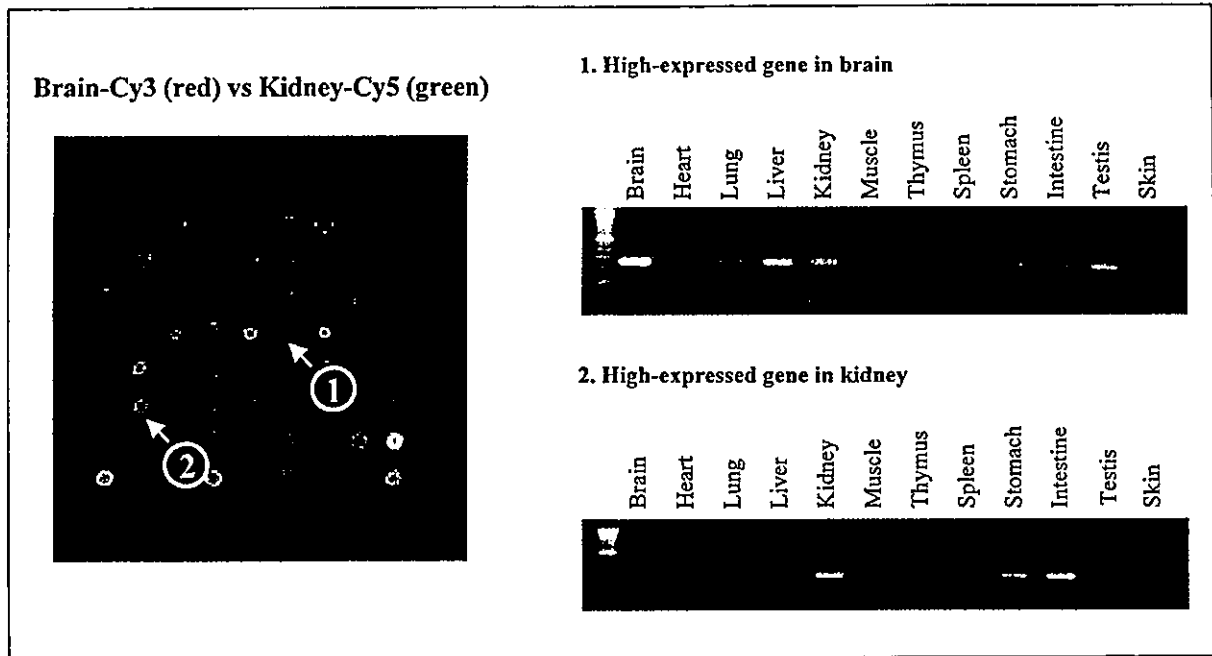


図3 cDNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析例(1)

連遺伝子で不均一であることに注目し、再解析を行った。その結果、DLBCLをgerminal center B-cell関連遺伝子が高発現している群(germinal center B-like DLBCL)と低発現群(activated B-like DLBCL)に分類することができ、さらにactivated B-like DLBCLでは有意に予後の悪いことを見出した。また、従来の分類法でlow risk groupと診断された症例をマイクロアレイを用いてmolecular classificationすると明らかに予後に差が現われ、low risk groupでもactivated B-like DLBCLは早期から骨髄移植を念頭に治療を行うべきであると考察している¹⁴⁾。

このような診断ができるまでには、その研究に合ったマイクロアレイを作製して大量の検体数を解析するシステムが必要である。また、得られる大量のデータをどのように解析し絞り込んでいくかも重要な問題である。さらにこれらの解析には従来の病理学の情報が必須であり、分子生物学者、臨床医、バイオ・インフォマティクスの連携チームが共同して研究を行うことが必要であろう。

In-house cDNAマイクロアレイを用いた解析例

われわれもヒトおよびマウスcDNAマイクロアレイを独自に作製し、他施設と共同研究を進め

ている。ここでは、マウスcDNAマイクロアレイを用いた解析例を2つ報告する。

1) マウス脳で高発現する遺伝子の選び出しについての結果を示す。この実験では、マウス脳由来の完全長cDNAライブラリーから調製した約2,300個のcDNAクローンをスライドガラス上にスポットしたマイクロアレイを用いた。脳由来のmRNAをCy-3蛍光色素(赤)で、一方腎臓、肝臓、および筋組織由来のmRNAをCy-5蛍光色素(緑)でおのこの標識して、マウス脳で高発現する遺伝子の選び出しを行った。その結果、マウス脳で高発現、あるいは脳特異的に発現する9個の遺伝子の選び出しができた²⁰⁾。また、9遺伝子中3遺伝子は新規遺伝子であった。図3左には脳由来mRNAをCy-3蛍光色素(赤)、腎臓由来のmRNAをCy-5蛍光色素(緑)でおのこの標識し、これらの組織間における遺伝子発現のパターンを示した。なお、赤のスポット(1)は脳で、一方緑のスポット(2)は腎臓で高発現している遺伝子である。また、われわれはマイクロアレイを用いて選び出しを行った遺伝子については、RT-PCRあるいはノーザンブロットで確認作業をしている(図3右)。

2) 現在われわれは他施設との共同研究で種々の遺伝子改変マウスあるいは疾患モデルマウス

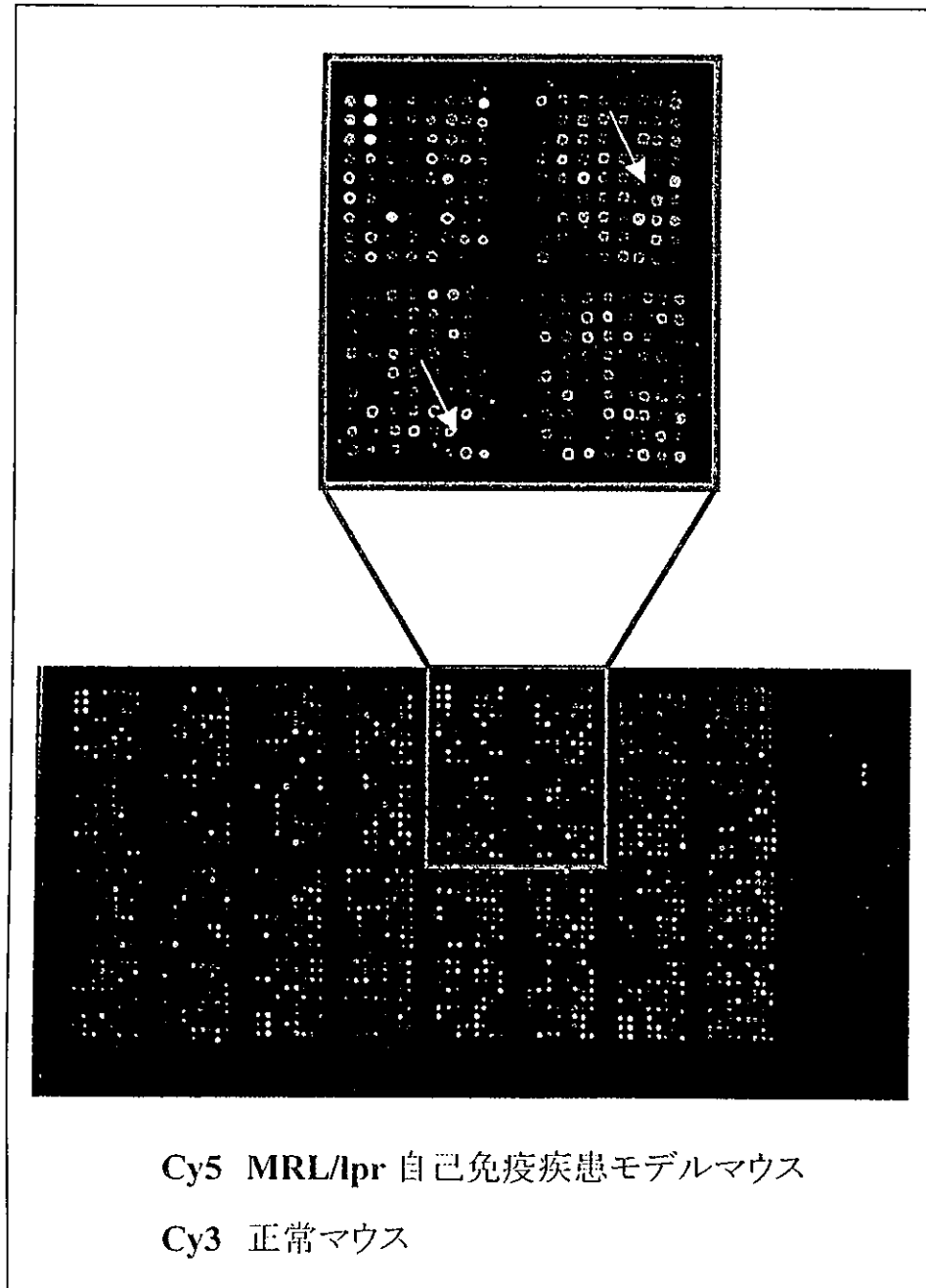


図4 cDNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析例(2)

を用いた解析を行っている。今回示す例は自己免疫疾患モデルマウス(MRL/lpr)の遺伝子発現の解析例である。MRL/lprマウスはヒトのSLEや Sjögren症候群、慢性関節リウマチの疾患モデルとして知られている。このマウスはFas抗原遺伝子のイントロンにトランスポゾンが挿入されたことにより、T細胞やB細胞膜上に機能的Fas抗原が発現されない。このため正常なアポトーシス機構が働かず、本来除去されるべき自己反応性T細胞やB細胞が存在するため自己免疫反応

をひき起こすものと考えられている。しかしながらFas抗原遺伝子のノックアウトではSLE様の病変は現れず、MRL/lprマウスの自己免疫現象にはFas以外の遺伝子群の関与が示唆されている^{24)~28)}。

ここに示したのは16週齢時における唾液腺の遺伝子発現変化である(図4)。明らかに発症マウスにおいて発現が亢進している遺伝子が認められる(矢印、緑のスポット、投稿準備中)。これら遺伝子が発症機序の原因なのか結果なのか

は今後の解析を待たなくてはならないが、マイクロアレイが疾患原因遺伝子単離に向けての1次スクリーニングとして有効であることは間違いないように思われる。

おわりに

これまでの疾患関連遺伝子のスクリーニング法にはdifferential display法, cDNA subtraction法, SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)法がある^{29)~31)}。しかしこれまでの方法で得られる情報はすべて遺伝子の断片であることから、遺伝子の同定には多大な労力が必要であった。これに対して、われわれのcDNAマイクロアレイは、oligo-cap法で作製したcDNAライブラリーを用いているため完全長クローンの割り合いがきわめて高く³²⁾、また、cDNAの配列情報をすべてデータベース化しているため、より迅速な遺伝子同定が可能であり、短期間で網羅的なスクリーニングを行うことができる。

DNAマイクロアレイは多くの生物学研究の分野に急速に浸透しつつある。おそらくDNAマイクロアレイは一過性の流行では終わらず、今後さらに改良が加えられ、重要なツールとして成長していくものと思われる。しかし一般に普及するまでにはまだ乗り越えなければならないいくつかのハードルがある。一枚のDNAマイクロアレイを作製するにも膨大な費用と人的資源を投入する必要があるが、これを一体だれがどういう形でやれば一番効率的なのか。どういうDNAをいくつスポットしていくのか、全遺伝子か一部でよいのか、一部ならばどのように選ぶのか。そしてどの程度のDNAマイクロアレイがいくら位で、いつごろ、どこから入手できるようになるのか。現在はまだまだ高嶺の花であるが、研究者が増えるに従って、コストが下がってアクセスが良くなり、さらに応用も広がっていくという好循環に早くはいることを期待したい。また、マイクロアレイを用いた解析結果から得られた膨大なデータをどの様に解析していくかも今後の大きな課題である。現在、いくつかの解析ソフトが開発されており、マイクロアレイから得られたデータ処理が可能である。この中でクラスタリング解析とよばれる手法がある³³⁾。こ

の手法は類似の発現パターンを示す遺伝子をグループ化することにより、機能未知遺伝子についてその機能を予測しようとするものである。たとえば細胞周期で機能がよく理解されているA遺伝子と類似の発現パターンを示す機能未知遺伝子があるならばその機能もA遺伝子と類似しているのではないかと予測するものである。われわれは、肝臓疾患の臨床サンプルを用いた遺伝子発現データをクラスタリング解析することにより、疾患別にグループ化することに成功している。このことは疾患ごとに特異的に発現している(あるいは発現が抑制されている)遺伝子群があることを示唆しており、これら遺伝子の同定が疾患の発症機序を探る上で糸口となるかも知れない。

現状のcDNAマイクロアレイを用いた解析において一番の問題点はマイクロアレイ上に載っていない遺伝子についてはその発現パターンの解析ができないことである。たとえば、免疫学的実験の解析には当然のことながら脾臓や胸腺由来のcDNAが必要であろうし、脳研究であれば脳由来のcDNAが必要である。われわれもこの観点に立ち、ヒト疾患別cDNAライブラリーおよびマウス臓器別cDNAライブラリーの作製を行い、取得したクローンの末端シーケンスを行うことにより重複度の少ないクローンセット(遺伝子資源)の整備を行っている。現時点で、ヒト疾患別cDNAライブラリーとしては肝臓疾患、胃癌、脾臓癌、口腔癌が準備できており、それぞれのcDNAライブラリーから疾患解析に特化したマイクロアレイの作製を行っている。また、マウスcDNAライブラリーは、脳、胎児、腎臓、肝臓、脾臓、胸腺由来のものがあり、遺伝子数にして約15,000個ほどである。さらに最近、マウスES細胞や神経幹細胞由来のライブラリーが完成し、これらの活用により発生学や再生医学の分野にも重要な情報をもたらすものと期待している。

文 献

- 1) Dunham, L., Shimizu, N., Roe, B.A., et al.: The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature*, 402: 489~495, 2000.
- 2) Bentley, D.R.: Decoding the human genome se-

- quence. *Hum. Mol. Genet.*, 9 : 2353~2358, 2000.
- 3) Hayden, T.: A genome milestone. A first draft is completed as two sides call a truce. *Newsweek*, 136 : 51, 2000.
 - 4) Smaglik, P.: Shares rebound at scent of draft sequence. *Nature*, 405 : 875, 2000.
 - 5) Bentley, D.R.: The Human Genome Project—an overview. *Med. Res. Rev.*, 20 : 189~196, 2000.
 - 6) Ferry, J.: “Working draft” of human genome available by June. *Lancet*, 355 : 1337, 2000.
 - 7) Marshall, E.: Human Genome Project. Sequencers endorse plan for a draft in 1 year. *Science*, 284 : 1439~1441, 1999.
 - 8) Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., et al.: Initial sequencing and analysis of the human genome. International Human Genome Sequencing Consortium. *Nature*, 409 : 860~921, 2001.
 - 9) Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., et al.: The sequence of the human genome. *Science*, 16 : 1304~1351, 2001.
 - 10) Marshall, A. & Hodgson, J.: DNA chips: an array of possibilities. *Nat. Biotechnol.*, 16 : 27~31, 1998.
 - 11) Ramsay, G.: DNA chips: state-of-the art. *Nat. Biotechnol.*, 16 : 40~44, 1998.
 - 12) Editorial: Getting hip to the chip. *Nat. Genet.*, 18 : 195~197, 1998.
 - 13) Golub, T.R., Slonim, D.K., Tamayo, P., et al.: Molecular classification of cancer : class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 286 : 531~537, 1999.
 - 14) Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Davis, R.E., et al.: Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 403 : 503~511, 2000.
 - 15) Scherf, U., Ross, D.T., Waltham, M., et al.: A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat. Genet.*, 24 : 236~244, 2000.
 - 16) Ross, D.T., Scherf, U., Eisen, M.B., et al.: Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat. Genet.*, 24 : 227~235, 2000.
 - 17) Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., et al.: Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406 : 747~752, 2000.
 - 18) Hedenfalk, I., Duggan, D., Chen, Y., et al.: Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 22 : 539~548, 2001.
 - 19) Kihara, C., Tsunoda, T., Tanaka, T., et al.: Prediction of sensitivity of esophageal tumors to adjuvant chemotherapy by cDNA microarray analysis of gene-expression profiles. *Cancer Res.*, 61 : 6474~6479, 2001.
 - 20) Yoshikawa, T., Nagasugi, Y., Azuma, T., et al.: Isolation of novel mouse genes differentially expressed in brain using cDNA microarray. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 275 : 532~537, 2000.
 - 21) Maeda, S., Otsuka, M., Hirata, Y., et al.: cDNA Microarray Analysis of Helicobacter pylori-Mediated Alteration of Gene Expression in Gastric Cancer Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 284 : 443~449, 2001
 - 22) Otsuka, M., Kato, M., Yoshikawa, T., et al.: Differential expression of the L-plastin gene in human colorectal cancer progression and metastasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press.
 - 23) Kato M, Seki N, Sugano S, et al.: Identification of Sonic hedgehog-responsive genes by using cDNA microarray. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press.
 - 24) Andrews, B.S., Eisenberg, R.A., Theofilopoulos, A.N., et al.: Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J. Exp. Med.*, 148 : 1198~1215, 1978.
 - 25) Theofilopoulos, A.N. & Dixon, F.J.: Murine models of systemic lupus erythematosus. *Adv. Immunol.*, 37 : 269~390, 1985.
 - 26) Hayashi, Y., Haneji, N. & Hamano, H.: Pathogenesis of Sjögren’s syndrome-like autoimmune lesions in MRL/lpr mice. *Pathol. Int.*, 44 : 559~568, 1994.
 - 27) Nagata, S.: Human autoimmune lymphoproliferative syndrome, a defect in the apoptosis-inducing Fas receptor: a lesson from the mouse model. *J. Hum. Genet.*, 43 : 2~8, 1998.
 - 28) van Blokland, S.C., van Helden-Meeuwssen, C.G., Wierenga-Wolf, A.F., et al.: Two different types of sialoadenitis in the NOD- and MRL/lpr mouse mod-

- els for Sjögren's syndrome : a differential role for dendritic cells in the initiation of sialoadenitis? *Lab. Invest.*, 80 : 575~585, 2000.
- 29) Liang, P. & Pardee, A.B.: Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257 : 967~971, 1992.
- 30) Vitek, M.P., Kreissman, S.G. & Gross, R.H.: The isolation of ecdysterone inducible genes by hybridization subtraction chromatography. *Nucleic Acids Res.*, 9 : 1191~1202, 1981.
- 31) Velculescu, V.E.: *Essay* : Amersham Pharmacia Biotech & Science prize. Tantalizing transcripts—SAGE and its use in global gene expression analysis. *Science*, 286 : 1491~1492, 1999.
- 32) Suzuki, Y., Yoshitomo-Nakagawa, K., Maruyama, K., Suyama, A. & Sugano, S.: Construction and characterization of a full length-enriched and a 5'-end-enriched cDNA library. *Gene*, 200 : 149~156, 1997.
- 33) Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., Botstein, D.: Free in Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95 : 14863~14868, 1998.

Possible Involvement of I κ B Kinase 2 and MKK7 in Osteoclastogenesis Induced by Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand

AIICHIRO YAMAMOTO,¹ TSUYOSHI MIYAZAKI,¹ YUHO KADONO,¹ HIROSHI TAKAYANAGI,¹ TOSHIKI MIURA,¹ HIROSHI NISHINA,² TOSHIKI KATADA,² KENJI WAKABAYASHI,³ HIROMI ODA,¹ KOZO NAKAMURA,¹ and SAKAE TANAKA¹

ABSTRACT

Recent studies have revealed the essential role of the receptor activator of nuclear factor κ B (NF- κ B) ligand (RANKL) in osteoclast differentiation and activation. Adenovirus vector could efficiently transduce genes into RAW264.7 cells, which differentiate into osteoclast-like multinucleated cells in the presence of RANKL. The role of NF- κ B and *c-jun* N-terminal kinase (JNK) activation in RANKL-induced osteoclast differentiation was investigated using an adenovirus vector carrying the dominant negative I κ B kinase 2 gene (AxIKK2^{DN}) or dominant negative MKK7 gene (AxMKK7^{DN}). IKK2^{DN} and MKK7^{DN} overexpression in RAW cells specifically suppressed the NF- κ B activation and JNK activation in response to RANKL, respectively, without affecting other signaling pathways. Either inhibition of NF- κ B or JNK pathways dose-dependently inhibited osteoclast formation induced by RANKL. These results suggest that both NF- κ B and JNK activation are independently required for osteoclast differentiation. (J Bone Miner Res 2002;17:612–621)

Key words: adenovirus vectors, RAW264.7 cells, nuclear factor κ B, *c-jun* N-terminal kinase, osteoclastogenesis

INTRODUCTION

BONE IS remodeled continuously through the resorption of old bone by osteoclasts and the subsequent formation of new bone by osteoblasts.⁽¹⁾ Osteoclasts are derived from hematopoietic myeloid precursors of monocyte/macrophage lineage under the control of systemic hormonal factors and local factors produced by supporting cells such as osteoblasts and bone marrow stromal cells. Among these factors, two critical extracellular regulators of osteoclast differentiation and activation recently have been identified: osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor κ B (NF- κ B) ligand (RANKL).⁽²⁾ RANKL, also known as osteoclast differentiation factor (ODF), is a tumor necrosis

factor (TNF)-related cytokine that stimulates osteoclast differentiation from hematopoietic precursor cells and activates mature osteoclasts both in vitro and in vivo.^(3–5) Mice lacking in either RANKL or its receptor RANK have defects in osteoclast differentiation that lead to severe osteopetrosis.^(6–8) OPG is a secreted TNF receptor (TNFR)-related protein that binds and blocks the activity of RANKL.^(9,10) Mice lacking OPG develop severe osteoporosis due to the increased number and activity of osteoclasts.^(11,12) These findings indicate that RANKL and OPG interact together as positive and negative regulators of osteoclastogenesis and bone resorption.

RANK is expressed on the surface of osteoclast progenitor cells and induces intracellular signals leading to osteoclastogenesis on ligand binding or agonistic anti-RANK antibody stimulation.^(8,13) Like other TNFR superfamily

The authors have no conflict of interest.

¹Department of Orthopaedic Surgery, Faculty of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan.

²Department of Physiological Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan.

³Lead Discovery Research Laboratories, Sankyo Company, Ltd., Tokyo, Japan.

members, RANK stimulation can induce NF- κ B and *c-jun* N-terminal kinase (JNK) activation, probably via association with several TNFR-associated factors (TRAFs) such as TRAF2, TRAF5, and TRAF6.^(8,14-18) Recently, the role of NF- κ B and activator protein 1 (AP-1) in osteoclast differentiation has been established by findings in a series of knockout mice. Mice deficient in both p50 and p52 subunits of NF- κ B are osteopetrotic because of the failure in osteoclast differentiation, indicating a crucial role of NF- κ B in osteoclastogenesis.^(19,20) The similar phenotype was observed in *c-Fos* knockout mice, which can be rescued by Fra-1 as well as *c-Fos* overexpression.⁽²¹⁻²⁴⁾ These results indicate that both NF- κ B and AP-1 activation are necessary for osteoclast development. However, the detailed molecular events leading to NF- κ B and AP-1 activation remain unclear.

NF- κ B exists in the cytoplasm of resting cells but enters the nucleus in response to various stimuli, including cytokines, pathogens, and stresses. NF- κ B activation requires sequential phosphorylation, ubiquitination, and degradation of inhibitory subunit I κ B as well as consequent exposure of a nuclear localization signal on NF- κ B.⁽²⁵⁻²⁹⁾ I κ B kinase (IKK) is the protein complex that contains the inducible I κ B kinase activity and consists of IKK1 (IKK α), IKK2 (IKK β), and NF- κ B essential modulator (NEMO) (IKK γ). Among these three components of IKK signalosome, both IKK1 and IKK2 appear to play a critical role in I κ B phosphorylation. However, the studies of IKK1 and IKK2 knockout mice indicate that IKK2 is more potent for NF- κ B activation by proinflammatory stimuli than IKK1.⁽³⁰⁻³³⁾ This evidence suggests that IKK2 also may play a critical role in RANKL-induced NF- κ B activation.

JNK is known to activate AP-1 and to be activated by the phosphorylation of Thr and Tyr residues via mitogen-activated protein kinase kinase (MKK) 4 and/or MKK7. MKK7 appears to be more specific in JNK activation than MKK4 because MKK4 is known to activate p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) as well. However, the role and precise mechanism of JNK activation in osteoclastogenesis remains unclear.

In this study, using adenovirus vectors carrying dominant negative IKK2 gene or dominant negative MKK7 gene, we were able to inhibit separately RANKL-induced NF- κ B activation and JNK activation, respectively. We found that the activation of NF- κ B and JNK is regulated independently, and both of these pathways are crucial for osteoclast development.

MATERIALS AND METHODS

Animals and chemicals

Newborn ddY mice and 8-week-old male ddY mice were purchased from Sankyo Laboratories Animal Center (Tokyo, Japan). α -Modified minimum essential medium (α -MEM) and Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) were purchased from Gibco BRL, Life Technologies, Inc. (Rockville, MD, USA), and fetal bovine serum (FBS) was from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Antibodies against I κ B- α , JNKs (p46 and p54), and phosphorylated

JNKs (Thr183/Tyr185) were purchased from New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA, USA). Anti-I κ B kinase 2 (IKK2) and anti-MKK7 (MEK7) antibody were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Human soluble recombinant RANKL (sRANKL) was purchased from Wako (Tokyo, Japan). Other chemicals and reagents used in this study were of analytical grade.

Cells and cell cultures

Mouse bone marrow cells were obtained from tibias of 8-week-old ddY mice as previously reported, and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)-dependent bone marrow macrophages (M-BMM ϕ) were obtained by culturing the bone marrow cells in α -MEM supplemented with 10% FBS and M-CSF (100 ng/ml).⁽³⁴⁾ The RAW264.7 cell line (RIKEN, RCB535) was used for osteoclast progenitor cells and grown in DMEM containing 10% FBS. The culture medium was replaced every 3 days with fresh complete medium containing appropriate reagents. For osteoclast differentiation assay, RAW cells (10⁴ cells in each well) were plated on a 24-well culture plate and grown in DMEM containing 10% FBS and 100 ng/ml of sRANKL at 37°C in 5% CO₂ in air. Treated cells were sequentially subjected to tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining to identify the osteoclast-like cells formed. Forty-eight hours after adding 100 ng/ml of sRANKL in culture medium, TRAP⁺ mononuclear cells appeared and TRAP⁺ multinucleated osteoclast-like cells containing three or more nuclei were formed ~72-96 h after sRANKL stimulation. The proportion of the TRAP⁺ cells in total cells was ~90% in 48 h after sRANKL stimulation. The proportion of TRAP⁺ multinucleated osteoclast-like cells in total cells was ~30% in 96 h after sRANKL stimulation. The efficiency of osteoclast formation seems to be different between various subclones of RAW cells. However, the cells we used were able to differentiate into TRAP⁺ mononuclear cells at the efficiency as high as 90% or higher in response to 48 h of RANKL stimulation as previously described.⁽³⁵⁾

Constructs and gene transduction

The recombinant adenovirus vector carrying dominant negative mutant of IKK2 gene (Ser177 and Ser181 to Ala; AxIKK2^{DN}) was kindly provided by Inder Verma (Salk Institute, La Jolla, CA, USA), and the β -galactosidase gene (AxLacZ) was from Izumu Saito (University of Tokyo, Tokyo, Japan). The recombinant adenovirus vector carrying kinase negative MKK7 (AxMKK7^{DN}, replaced adenosine triphosphate [ATP]-binding lysine with glutamate residue) was constructed following the method previously described.⁽³⁶⁾ AxIKK2^{DN} and AxLacZ contain CAG [cytomegalovirus (CMV) immediate early (IE) enhancer + chicken β -actin promoter + rabbit β -globin poly (A) signal] promoter and dominant negative mutant of MKK7 gene (AxMKK7^{DN}) contains CMV promoter. Titers of the viral stock were determined by modified endpoint cytopathic effect assay with the following modifications. Fifty microliters of DMEM containing 10%FBS was dispensed into each well of a 96-well tissue culture plate, and then eight

rows of 3-fold serial dilutions of the virus starting from 10^{-4} dilutions were prepared. The 3×10^5 293 cells in 50 μ l of DMEM containing 10% FBS was added to each well. The plate was incubated at 37°C in 5% CO₂ in air, and 50 μ l of DMEM containing 10% FBS was added to each well every 3 days. Twelve days later, the endpoint of the cytopathic effect was determined by microscopy, and the 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀) was calculated. One TCID₅₀/ml approximately corresponds to one plaque-forming unit (PFU) per milliliter.⁽³⁷⁾ The efficiency of infection is affected not only by the concentration of viruses and cells, but also by the ratio of viruses to cells, the multiplicity of infection (MOI). In this study, MOI is expressed as a measure of titer of how many PFUs are added to every cell. Infection of adenovirus vectors to osteoclast progenitor cells was carried out as described.⁽³⁸⁾ In short, for RAW cells, cells seeded on culture plates were incubated with a small amount of DMEM containing the recombinant adenoviruses for 1 h at 37°C at the indicated MOI. The cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and further incubated with DMEM containing 10% FBS at 37°C. Experiments were performed 48 h after the infection.

Western blotting

All extraction procedures were performed at 4°C or on ice. Cells were washed with ice-cold PBS and then lysed by adding Tris-HCl, NaCl, and EDTA (TNE) buffer (1% NP-40, 10 mM of Tris-HCl [pH 7.8], 150 mM of NaCl, 1 mM of EDTA, 2 mM of Na₃VO₄, 10 mM of NaF, and 10 μ g/ml of aprotinin). The lysates were clarified by centrifugation at 15,000 rpm for 20 minutes. An equal amount of protein was subjected to 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), transferred electrophoretically onto a nitrocellulose membrane, and probed sequentially with an appropriate primary antibody followed by secondary antibody coupled with horseradish peroxidase (Promega, Madison, WI, USA). Immunoreactive proteins were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL) Western blotting detection reagents (Amersham, Arlington Heights, IL, USA) following the procedure recommended by the supplier. The blots were stripped by incubating for 20 minutes in stripping buffer (2% SDS, 100 mM of 2-mercaptoethanol, and 62.5 mM of Tris-HCl [pH 6.7]) at 50°C and reprobed with other antibodies.

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay

RAW cells were plated on a 96-well culture plate (5 \times 10³ cells in each well) in DMEM supplemented with 10% FBS for 24 h and either noninfected or infected with AxIKK2^{DN}, AxMKK7^{DN}, or AxLacZ at various MOIs. Forty-eight hours after infection, the number of viable cells was quantified by Cell Counting Kit-8 (Wako) according to the conditions recommended by the supplier.

In vitro kinase assay

For the determination of JNK activity, in addition to Western blot analysis, in vitro kinase assay was performed

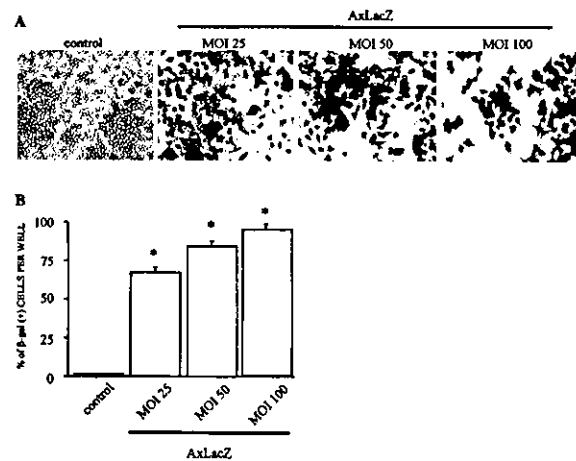


FIG. 1. Efficiency of adenovirus-mediated gene transduction to RAW cells. The 10^6 RAW cells were seeded on a 24-well culture plate and infected with AxLacZ at the various MOI as indicated. Forty-eight hours after infection, cells were subjected to β -gal staining. (A) AxLacZ strongly induced β -gal activity in cells in an MOI-dependent manner. (B) The ratio of β -gal⁺ cells to total cells in each well was counted. Bars represent mean ratio \pm SEM ($n = 6$). * $p < 0.0001$ versus control.

as follows. The 2×10^5 RAW cells were plated on a 6-cm culture dish and infected with AxMKK7^{DN} or AxLacZ at the MOI 100. After 24 h of culture in serum-free DMEM, cells were stimulated with 100 ng/ml of sRANKL for the indicated times. Treated cells were washed twice with ice-cold PBS and then lysed in lysis buffer (20 mM of Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM of NaCl, 1 mM of EDTA, 1 mM of EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM of sodium pyrophosphate, 1 mM of β -glycerophosphate, 1 mM of Na₃VO₄, 1 μ g/ml of leupeptin, and 1 mM of phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF]). The JNK activity of the cell lysates was determined using a stress-activated protein kinase (SAPK)/JNK kinase assay kit (New England Biolabs) according to the supplier's protocol.

Electrophoretic mobility shift assay

The 2×10^5 RAW cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS in a 6-cm dish for 24 h and infected with AxIKK2^{DN}, AxMKK7^{DN}, or AxLacZ at the indicated MOI. Twenty-four hours before stimulation, the culture medium was changed to serum-free DMEM. The cells were treated with 100 ng/ml sRANKL for various periods and then washed with ice-cold PBS and lysed with total lysis buffer (20 mM of HEPES [pH 7.9], 50 mM of NaCl, 10% glycerol, 0.1% NP-40, 10 mM of EDTA, 2 mM of EGTA, 10 mM of Na₂MoO₄ 2H₂O, 10 mM of Na₃VO₄, 100 mM of NaF, 1 mM of dithiothreitol [DTT], 100 μ g/ml of leupeptin, and 0.5 mM of PMSF) to obtain total cell lysate. The total cell lysate (30 μ g of protein) was incubated with an end-labeled, double-stranded, oligonucleotide derived from an NF- κ B binding sequence in interferon β promoter as described (5'-CCGGGAAATCCGCCGGG-AAATCCGCCGGGAAATCCG-3').⁽³⁹⁾ The binding reaction was carried out in 10 mM of Tris [pH 7.5], 1 mM of

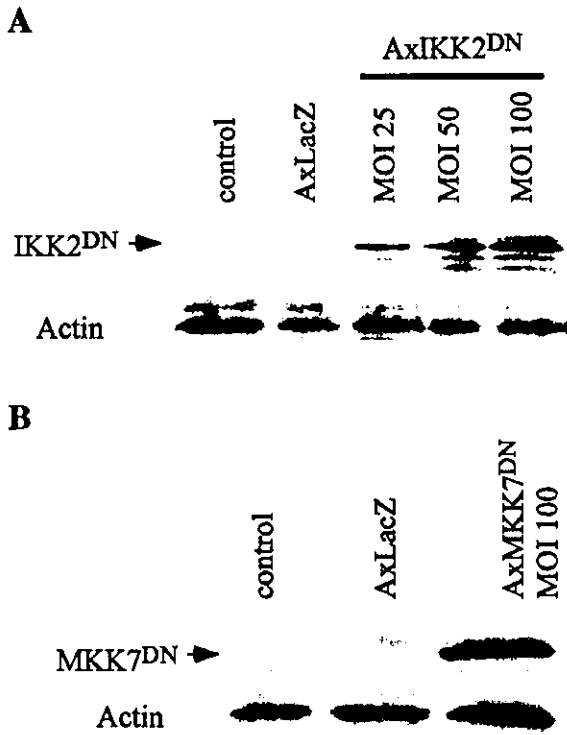


FIG. 2. Adenovirus vector-mediated overexpression of IKK2^{DN} and MKK7^{DN} in RAW cells. Cells were infected with either AxIKK2^{DN} or AxMKK7^{DN} at the MOI indicated and lysed as described. An equal amount of protein was subjected to SDS-PAGE, transferred onto a nitrocellulose membrane, and probed with the antibody specific to (A) IKK2 or (B) MKK7. Both AxIKK2^{DN} and AxMKK7^{DN} clearly induced overexpression of IKK2^{DN} and MKK7^{DN} in an MOI-dependent manner, respectively.

EDTA, 1 mM of DTT, 50 mM of NaCl, 5% glycerol, 2 μg of poly (dI/dC), and 10⁵ cpm of [³²P]-labeled probe in a total volume of 25 μl. The reaction mixture was incubated at room temperature for 30 minutes and then was fractionated by 4% acrylamide gel. The DNA-protein complex was detected by exposure to X-ray film.

Luciferase reporter gene assay

RAW264.7 cells were grown at ~80% confluence on 10-cm tissue culture plates until the day of transfection. Transfection were performed with 11 μg of NF-κB-Luc reporter plasmid and 1 μg of pWL-neo (Stratagene, La Jolla, CA, USA) using FuGENE6 transfection reagent (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) and incubated for 1 day. G418 selection (Geneticin; final effective concentration 1 mg/ml; Gibco BRL) was started the next day after transfection. Six clones that were responsible to sRANKL (RAW-κB-Luc cells) were identified. RAW-κB-Luc cells were infected with AxIKK2^{DN}, AxMKK7^{DN}, or AxLacZ at the indicated MOI. Forty-eight hours after infection, the cells were cultured in a serum-free condition for 24 h and then stimulated with 25 ng/ml of RANKL for the indicated

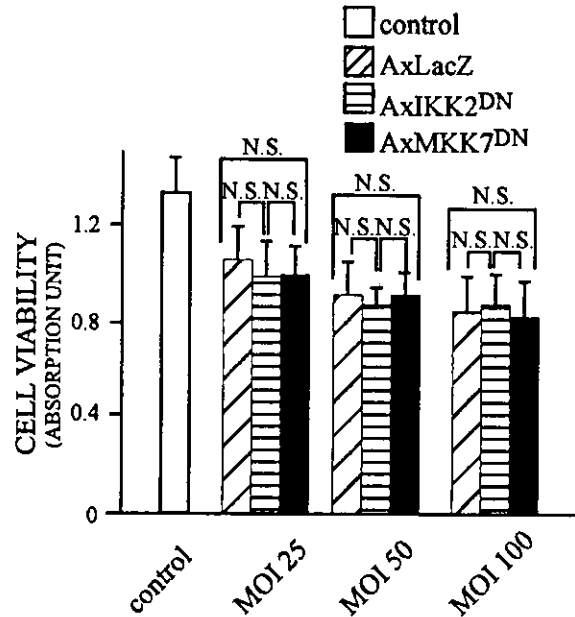


FIG. 3. Effect of adenovirus vector infection in the number of viable RAW cells. The 10⁵ RAW cells were seeded on a 96-well culture plate and infected with either AxLacZ, AxIKK2^{DN}, or AxMKK7^{DN} at the MOI indicated. Forty-eight hours after infection, the number of viable cells was quantified by MTT assay (see Materials and Methods section). Bars represent mean absorption unit ± SEM (n = 8).

times. Luciferase activity was determined with the Luciferase Assay System (Wako) according to the supplier's protocol.

RESULTS

Adenovirus vector efficiently transduces gene to RAW264.7 cells

We previously reported that adenovirus vectors can efficiently transduce foreign genes into mature osteoclasts.^(38,40-42) To determine the efficiency of adenovirus vectors for gene transduction into osteoclast precursors, M-BMMφ and RAW cells were infected with the adenovirus vector carrying β-galactosidase (β-gal) gene (AxLacZ) and stained for β-gal activity using X-gal as a substrate after 48 h of infection. Figure 1A shows that AxLacZ induced strong β-gal activity in RAW cells in an MOI-dependent manner, and almost 100% of the cells were stained positively for β-gal activity at MOI 100 (Fig. 1B). It should be noted that the number of adherent RAW cells was decreased when cells were treated with high titers of virus solution (Fig. 1A), probably because of the inhibitory effect of the adenovirus vectors on cell adhesion or their cytotoxic effects. In contrast, β-gal⁺ cells were scarcely observed in M-BMMφ even at MOI 100 (data not included). This indicates that adenovirus vectors are useful for gene transduction into RAW cells but not for M-BMMφ. Therefore, we used RAW cells and the adenovirus vector system to investigate the intracellular signaling of RANKL in the following experiments.

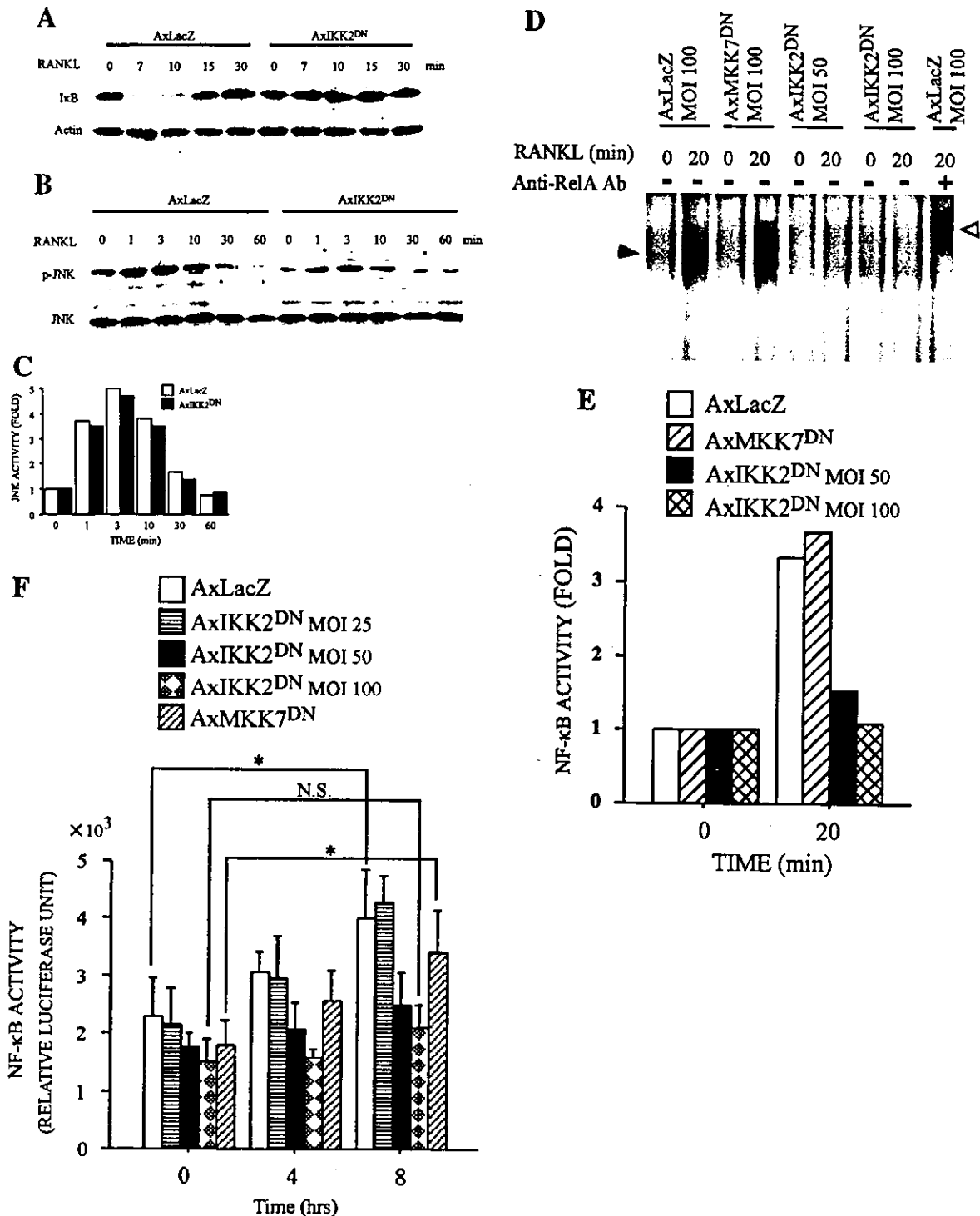


FIG. 4. Specific inhibition of NF- κ B activation in RAW cells by adenovirus vector-mediated IKK2^{DN} expression. The 10^6 RAW cells were plated on a 6-cm culture plate and infected with AxLacZ or AxIKK2^{DN} at MOI 100. Cells were cultured for a further 48 h and then stimulated with 100 ng/ml sRANKL for the indicated times. (A) Degradation of I κ B- α was detected by Western blotting using specific antibody to I κ B- α . Rapid induction of I κ B- α degradation was seen in AxLacZ-infected cells. In contrast, overexpression of IKK2^{DN} clearly inhibited the process. To detect the total amount of protein loaded, the blot was stripped and reprobbed with the antibody specific to actin (lower panel). (B) Activation of JNK was detected by Western blotting using specific antibody to phosphorylated JNK. Rapid induction of JNK activation was seen in both AxLacZ and AxIKK2^{DN}-infected cells. To detect the total amount of protein loaded, the blot was stripped and reprobbed with the antibody specific