

研究要旨: 関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) においては滑膜の異常な増殖が認められ、RA における骨破壊に重要な役割を果たしている。Type B 細胞とも呼ばれている滑膜線維芽細胞 (synovial fibroblastic cells, SFCs) はさまざまな炎症性サイトカインを分泌し、RA 滑膜炎において重要な役割を果たしている。本研究においてわれわれは SFCs にアデノウイルスベクターを用いて遺伝子導入することにより SFCs に軟骨細胞分化を誘導可能であることを明らかにした。

A. 研究目的

RA は多発性の関節炎を特徴とする慢性炎症性疾患である。炎症関節では異常に増殖した滑膜組織が IL-1、TNF- α などの炎症性サイトカイン、そしてマトリックスメタロプロテアーゼやカテプシンなどのプロテアーゼを産生し、骨軟骨破壊に関与していることが明らかになっている (Firestein, 2003 #27)。このような滑膜組織の活性化メカニズムは明らかではないが、未知の自己抗原により活性化された T リンパ球とマクロファージとの間の直接、あるいは間接的な相互作用が重要な役割を果たすと考えられている。近年 RA における骨破壊を直接担うのは破骨細胞であることが明らかになってきたが、われわれは以前に RA SFCs では破骨細胞分化因子である receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) の発現が著しく亢進していることを明らかにした。RANKL の発現が炎症性サイトカインによって誘導されることを考え合わせると、RA 骨関節破壊メカニズムの一端は、細胞-細胞間の反応によって産生された炎症性サイトカインが SFCs における RANKL の発現を促し、その結果破骨細胞が分化・活性化されることが原因であると考えられる。また越智らは SFCs がナース細胞様の活性を有し、B 細胞の生存を促進するこ

とを明らかにしている。つまり RA 関節炎において滑膜はカタボリックな役割を演じ、したがって SFCs の増殖・活性化の制御が重要な RA 治療戦略になる。

このようなカタボリックな作用の一方で、滑膜が軟骨の修復過程にも関与していること、すなわち関節のホメオスタシスに対してアナボリックな役割をも担うことがさまざまな研究から明らかになってきた。Huzinker らは関節軟骨の部分欠損動物モデルを用いて、滑膜細胞が欠損部位に migrate し、未熟ではあるが修復組織を形成することを報告した。西村らは家兎膝関節から採取した滑膜組織が TGF- β の存在下で培養すると軟骨の形質を有するようになることを示した。最近 De Bari らは滑膜組織から多分化能を持つ間葉系細胞を分離することが可能であり、この細胞はさまざまな刺激の下で骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、筋芽細胞などに分化可能であることを明らかにした。また滑膜細胞の良性腫瘍性病変であり、臨床上きわめて興味深い病態として、滑膜性骨軟骨腫をあげることができる。本疾患の原因は不明であるが、滑膜組織に由来すると考えられる遊離体が、関節内に多数出現するのが特徴である。この遊離体を組織学的に検討すると、免疫染色において軟骨後期分化マーカー

であるX型コラーゲンの発現が認められる。すなわち本疾患の病態は、滑膜組織において何らかの影響で軟骨分化過程が進行したものと考えられる。このような事実は、滑膜組織中に未分化間葉系細胞に類似した細胞を含み、これらの細胞は何らかの刺激により軟骨細胞や骨芽細胞などへ分化誘導可能であること、そして滑膜組織・滑膜細胞が関節の修復過程に関わっている可能性を示している。したがって滑膜組織を治療ターゲットと考えた場合、そのカタボリックな作用の抑制と同時に、骨芽細胞・軟骨細胞分化を誘導することは再生医学的な見地からも重要なポイントになると考えられる。本研究においてわれわれは RA SFCs にアデノウイルスベクターによって活性型 ALK(activin receptor-like kinase)3 遺伝子を導入することによって軟骨細胞分化を誘導することが可能であることを明らかにした。

B 研究方法

1) 滑膜線維芽細胞の採取・培養

滑膜線維芽細胞(SFC)は書式によるインフォームドコンセントを得た患者より人工膝関節全置換手術時に得た滑膜組織から酵素消化法にて採取した(Takayanagi, 1999 #4)。得られた細胞は 10% fetal bovine serum (FBS) 入りの alpha-modified minimum essential medium (MEM) 中で培養した。3-5代の継代の後、細胞はほぼ均一な線維芽細胞様の形態を示した。これを SFC として使用した。

2) アデノウイルスベクターの作成

TGF- β /BMP レセプターシグナルを調節する遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターは東京大学医科学研究所の齋藤 泉博士らの方法に準じて作成した(COS-TPC 法)。使用したアデノウイルスは以下の遺伝子を含むものであ

る。

HA-tagged constitutively active ALK3, 5, and 6 (ALK3^{CA}, ALK5^{CA}, ALK6^{CA})

constitutively active MKK6 (MKK6^{CA})

Flag-tagged Smad1 and Smad6

β -galactosidase (LacZ)

3) SFC への遺伝子導入

SFC への遺伝子導入は以下のごとく行った。SFC を少量のウイルス液の存在下で2時間培養後、10倍量のウイルスを含まないメEDIUMで希釈した。遺伝子の発現は特異的な抗体を用いたウエスタンブロットあるいは免疫染色によって確認した。使用した抗体は以下の通りである。

抗 p38 MAPK 抗体、抗 phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) 抗体 (Cell Signaling Inc., Cummings Center, Beverly, MA)

抗 Flag 抗体(SIGMA CHEMICAL Co., St. Louis, MO, USA)

抗 HA 抗体(Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA)

抗 phospho-Smad1/5/8 抗体、抗 phospho-Smad2 抗体 (Cell Signaling Inc., Cummings Center, Beverly, MA)

抗 type II コラーゲン抗体(Oncogen, Boston, MA, USA)

抗 type X コラーゲン抗体(LSL Co., Cosmo Bio, Tokyo, Japan)

4) 遠心管培養法

SFC の遠心管培養は以下のごとく行った。ウイルス感染24時間後、細胞をトリプシン処理により回収し、 5×10^5 個の細胞を15分間 500 x g で遠心し、ペレットにする。これを MEM + 10% FBS 中で培養すると2-3日で浮遊するペレットを得ることができる。2-3日に一度メEDIUM交換を行い培養を続ける。

5) RT-PCR, real time PCR

培養細胞からの RNA 回収は Isogen を用いて行った。PCR に用いたプライマーは表1の通りである。PCR の条件は下記のごとくである(表1)。Initial denaturation 10 分間 94°C 40 cycles (94°C 15 秒、anealing 60°C 1分)

6) 組織学的検討

遠心管培養した細胞を 3.7%ホルマリンで固定後、パラフィンに包埋し、4 mm の切片を作成した。切片は Alizarin red, Alcian blue, Toluidine blue 染色、および II 型コラーゲン、X 型コラーゲン抗体による免疫染色によって検討した。

7) ノードマウスへの移植

3日間遠心管培養を行った細胞をノードマウス皮下に移植することによって in vivo での軟骨分化を検討した。移植細胞は toluidine blue 染色、II 型コラーゲン免疫染色によって検討した。

C. 研究結果

1) 遺伝子の発現

抗 HA 抗体、抗 Flag 抗体を用いたウエスタンブロットによって SFC における恒常活性型 ALK3, 5, 6 および Smad1, 6 の発現が確認された。また MKK6CA による p38 の活性化は抗 phospho-p38 抗体を用いたウエスタンブロットで、ALK3^{CA}, ALK6^{CA} による Smad1/5/8 の活性化、および ALK5^{CA} による Smad2 の活性化はそれぞれのリン酸化抗体によって確認された。

2) SFC の軟骨細胞分化

RT-PCR および real-time PCR による検討から、ALK3^{CA}ウイルスが SFC において著明な Sox9, II 型コラーゲン、アグリカンの発現上昇を誘導する

ことが明らかになった(図 1)。ALK6^{CA}ウイルスにも弱いながら同様の効果が認められたが、LacZ ウイルス、ALK5^{CA}ウイルスは効果を示さなかった。ALK3^{CA} ウイルスによる軟骨細胞分化は Alcian blue staining, II 型コラーゲン免疫染色によっても確認された。ALK3^{CA} ウイルスによる軟骨細胞分化は抑制型 Smad である Smad6 の発現、あるいは p38 の阻害剤である SB203580 によって完全に抑制された。また ALK3^{CA}ウイルスと Smad1 ウイルスとの共感染によって相乗的な効果が認められた。一方 MKK6^{CA}による p38 の強制活性化は Sox9 および II 型コラーゲンの発現を誘導するが、その誘導は一時的であり、速やかな発現減少、そしてそれと同時に X 型コラーゲンの誘導が認められ、軟骨細胞が肥大化している可能性を示唆した。また組織学的検討からも Alizarin red 染色陽性、X 型コラーゲン陽性染色像など肥大化を示唆する所見が得られた。

3) ノードマウスへの移植

ノードマウスに遠心管培養細胞を移植後3週間してからこれを回収し、組織学的に検討したところ ALK3^{CA} 発現細胞において明らかな toluidine blue 染色陽性像、II 型コラーゲン染色陽性像が認められた(図2)。

D. 考察

滑膜線維芽細胞は軟骨細胞や骨芽細胞と同様に未分化間葉系細胞に由来するが、Hunziker らの報告から関節軟骨の修復過程にも関与することが示唆されている(Hunziker, 1996 #7)。本研究においてわれわれは滑膜線維芽細胞 RA SFCs が ALK3^{CA}遺伝子の導入によって軟骨細胞へと分化することを明らかにした。この作用は抑制 Smad あるいは p38 阻害剤によって完全に阻害されること、Smad1 が相乗的な作用を有すること

から Smad pathway, p38 pathway の双方の関与が重要であることが示された。またこのような ALK3^{CA} ウイルスの作用はヌードマウスに移植した細胞でも認められ、in vivo においても軟骨細胞分化能を有することが明らかになった。一方 MKK6^{CA} ウイルスによって p38 pathway のみを強制的に活性化すると、軟骨細胞分化は肥大化まですすんでしまうことが示された。変形性関節症においては軟骨細胞の肥大化が観察されること (von der Mark, 1995 #2)、また軟骨の変性に関与すると考えられているインターロイキン1や tumor necrosis factor- α が p38 pathway を強力に活性化することを鑑みると、p38 の過度の活性化は軟骨の肥大化とそれともなう変性を誘導する可能性を示唆する。今後 p38 pathway, Smad pathway を適切に調節するような薬剤の開発により、あらたな RA 治療薬の開発が期待される。

E. 結論

ALK3 系の活性化によって RA SFCs の軟骨分化誘導が可能であった。今後このようなシグナル伝達系を調節する治療法の開発が期待される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyazaki T, Neff L, Tanaka S, Horne WC, Baron R. Regulation of cytochrome *c* oxidase activity by c-Src in osteoclasts. *J Cell Biol* 2003, 160: 709-718
- 2) Houle EF, Rousseau S, Morrice N, Luc M, Mongrain S, Turner CE, Tanaka S, Moreau P, Huot J. ERK mediates phosphorylation of tropomyosin-1 to promote cytoskeleton remodeling in response to oxidative stress. Impact on membrane blebbing. *Mol Biol Cell* 2003, 14: 1418-1432.
- 3) Kawaida R, Ohtsuka T, Okutsu J, Takahashi T, Kadono Y, Oda H, Hikita A, Nakamura K, Tanaka S, Furukawa H. Jun Dimerization Protein 2 (JDP2), a Member of the AP-1 Family of Transcription Factor, Mediates Osteoclast Differentiation Induced by RANKL. *J Exp Med*, 2003, 197:1029-1035
- 4) Yamamoto A, Fukuda A, Seto H, Miyazaki T, Kadono Y, Sawada Y, Nakamura I, Katagiri H, Asano T, Tanaka Y, Oda H, Nakamura K, Tanaka S. Suppression of arthritic bone destruction by adenovirus-mediated dominant negative ras gene transfer to synoviocytes and osteoclasts. *Arthritis Rheum* 2003, 48:2682-2692
- 5) Kim H-H, Chung WJ, Lee SW, Chung P-J, You JW, Kwon HJ, Tanaka S, Lee ZH. Association of Sustained ERK Activity with Integrin β 3 Induction during Receptor Activator of Nuclear Factor KappaB Ligand (RANKL)-directed Osteoclast Differentiation. *Exp Cell Res* 2003, 289:368-377
- 6) Arany I, Megyesi JK, Kaneto H, Tanaka S, Safirstein RL. Activation of ERK or inhibition of JNK ameliorates hydrogen peroxide-cytotoxicity in mouse kidney proximal tubular cells. *Kidney Int*, In press
- 7) Akiyama T, Bouillet P, Miyazaki T, Kadono Y, Chikuda H, Chung U, Fukuda A, Hikita

- A, Seto H, Okada T, Inaba T, Sanjay A, Baron R, Kawaguchi H, Oda H, Nakamura K, Strasser A, Tanaka S. Regulation of Osteoclast Apoptosis by Ubiquitination of Proapoptotic BH3-only Bcl-2 Family Member Bim. *Embo J.* 2003, 22, 6653-76664
- 8) Ohazama A, Courtney J-M, Naito A, Tanaka S, Inoue J, Sharpe PT. Traf6 is essential for murine tooth cusp morphogenesis. *Dev Dyn* 2004 229, 131-135.
- 9) Seto H, Kamekura S, Miura T, Yamamoto A, Chikuda H, Ogata T, Hiraoka H, Oda H, Nakamura K, Kurosawa H, Chung U, Kawaguchi H, Tanaka S. Distinct Role of Smad Pathways and p38 Pathways in Cartilage-specific Gene Expression in Synovial Fibroblasts. *J Clin Invest* 2004, 113, 718-726.
- 10) Miyazaki T, Sanjay A, Neff L, Tanaka S, Horne WC, Baron R. Src kinase activity is essential for osteoclast function. *J Biol Chem*, 2004 Jan 22 [Epub ahead of print]
2. 学会発表
- 1) 日本医師会生涯教育講座認定 学術講演会 特別講演(2003.4.18)前橋 「骨代謝調節の分子メカニズム」
- 2) 第 47 回 日本リウマチ学会学術集会 (2003.4.24-26)東京 シンポジウム12 RA における胸・腰椎圧迫骨折 「関節リウマチにおける骨粗鬆症の分子メカニズム」
- 3) 第2回リウマチと骨代謝研究会(2003.9.4) 東京 「破骨細胞をターゲットにした骨代謝疾患治療」
- 4) 第 18 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2003.10.16-17) 小倉 シンポジウム1 関節軟骨変性の分子メカニズムから治療へ 「遺伝子導入を用いた軟骨再生」
- 5) 第3回 HAP Working Seminar Consensus Meeting(2003.11.7) 東京 「骨代謝異常の基本的な捉え方」
- 6) リウマチフォーラム(2004.1.10)東京 「破骨細胞アポトーシスの分子メカニズム」
- 7) 第3回 Biomatrix Forum(2004.1.17)東京 「滑膜線維芽細胞の軟骨細胞分化メカニズムとヒアルロン酸の作用」
- 8) The 12th International Rheumatology Symposium (2003.4.24-26) Tokyo: Regulation of synovial cell function by adenovirus vector-mediated gene transduction.
- 9) The 1st Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Society (2003.6.3-7) Osaka: Plenary Lecture 2, Molecular mechanisms regulating life and death of the osteoclast.
- 10) 3rd World Congress of the Global Arthritis Research Network (GARN): International Arthritis Summit (2003.9.14-17) Miyazaki: Topic Symposium (3) Locomotor of Science, Regulation of synovial cell function by adenovirus vector-mediated gene transduction.

H.知的財産権の出願・登録状況
特になし。

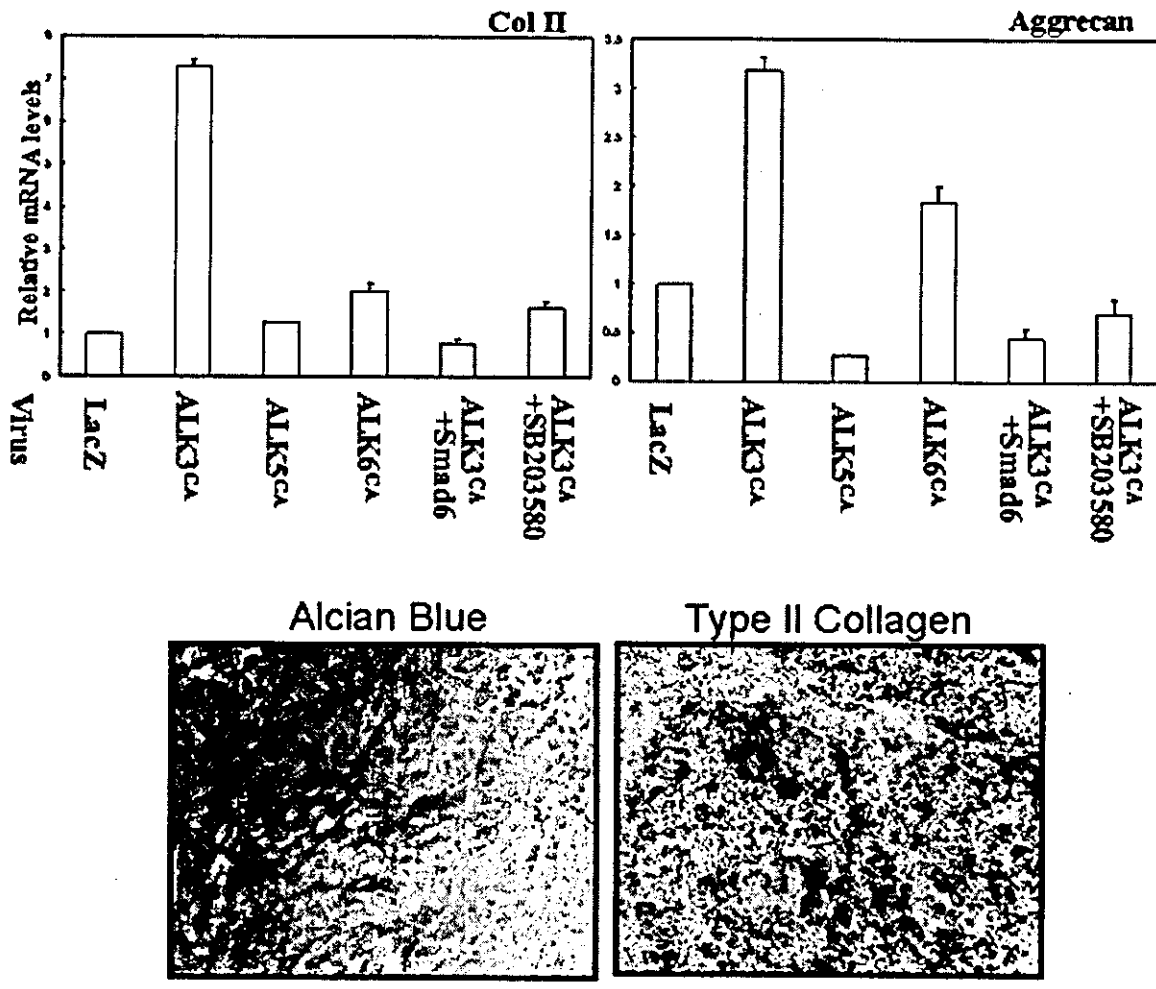


図1: ALK3CAウイルスによる滑膜線維芽細胞の軟骨細胞分化

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
現在、上記 3 項目に該当する事項はない。

III) RA 病因解明研究

関節リウマチ滑膜の血管新生における骨髄の役割に関する研究

分担研究者 広畑俊成 所属機関名 帝京大学医学部・職名 助教授

研究要旨 関節リウマチ (RA) における滑膜増殖においては血管新生が極めて重要な役割を果たすと考えられている。本研究においては、RA 滑膜増殖における骨髄の役割を解明するために、RA 骨髄 CD34+細胞からの血管内皮細胞への分化能及び VEGF や soluble VCAM-1 (sVCAM-1) の産生能について検討した。骨髄 CD34+細胞を SCF+GM-CSF で 2 週間培養した際、vWF+細胞および CD31+/vWF+細胞への分化が RA において対照群に比して有意に亢進していた。CD34+細胞を SCF+GM-CSF にて 4 週間培養した際、RA においては対照群に比して VEGF 及び sVCAM-1 の産生が有意に亢進していた。以上より、RA 関節滑膜における血管新生及び血管内皮細胞の活性化において、骨髄 CD34+細胞の異常が深く関与することが示唆された。

A. 研究目的

関節リウマチ (RA) における滑膜増殖においては血管新生が極めて重要な役割を果たすと考えられている。これまでこうした血管新生は、既存の血管より分枝する angiogenesis と考えられていたが、新たな血管内皮細胞の供給による vasculogenesis の関与が近年指摘されている。我々は、これまで RA において骨髄の異常が病態に深く関与することを示してきた。近年、骨髄 CD34+細胞は SCF+GM-CSF に反応して血管内皮細胞にも分化することが示されている。本研究においては、RA 滑膜増殖における骨髄の役割を解明するために、RA 骨髄 CD34+細胞からの血管内皮細胞への分化能及び VEGF や soluble VCAM-1 (sVCAM-1) の産生能について検討した。

B. 研究方法

インフォームドコンセントの得られた RA 患者及び対照として変形性関節症 (OA) 患者より、人工関節置換術の術中に腸骨骨髓液を採取した。骨髓液より比重遠心法で単核球を分離し、磁気ビーズによる positive selection により CD34+細胞を分離した。CD34+細胞は、SCF (10 ng/ml) と GM-CSF (1 ng/ml) の存在下に 2~4 週間平底 24 穴プレートにて培養した (1×10^5 /well)。2 週間培養後、細胞の表面抗原の発現 (CD14, HLA-DR, CD31, von

Willebrand factor [vWF]) をフローサイトメトリーにて解析した。培養上清中の TNF- α 、VEGF、sVCAM-1 の濃度は ELISA にて測定した。

(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

骨髄 CD34+細胞を SCF+GM-CSF で 2 週間培養した際、vWF+細胞および CD31+/vWF+細胞への分化が RA において対照群に比して有意に亢進していた (図 1)。骨髄 CD34+細胞からの vWF+細胞への分化能は、TNF- α や VEGF の産生能とは相関しなかった (図 2)。CD34+細胞を SCF+GM-CSF にて 4 週間培養した際、RA においては対照群に比して VEGF 及び sVCAM-1 の産生が有意に亢進していた (図 3)。VEGF 産生と sVCAM-1 産生の間には有意の正の相関がみられた。

D. 考察

以上より、RA 患者においては骨髄 CD34+細胞から A 型滑膜細胞の基になる CD14+/HLA-DR+細胞を滑膜内に recruit する上で必要な vasculogenesis の基盤となる血管内皮細胞の分化が亢進していることが示唆された。この血管内皮細胞への分化

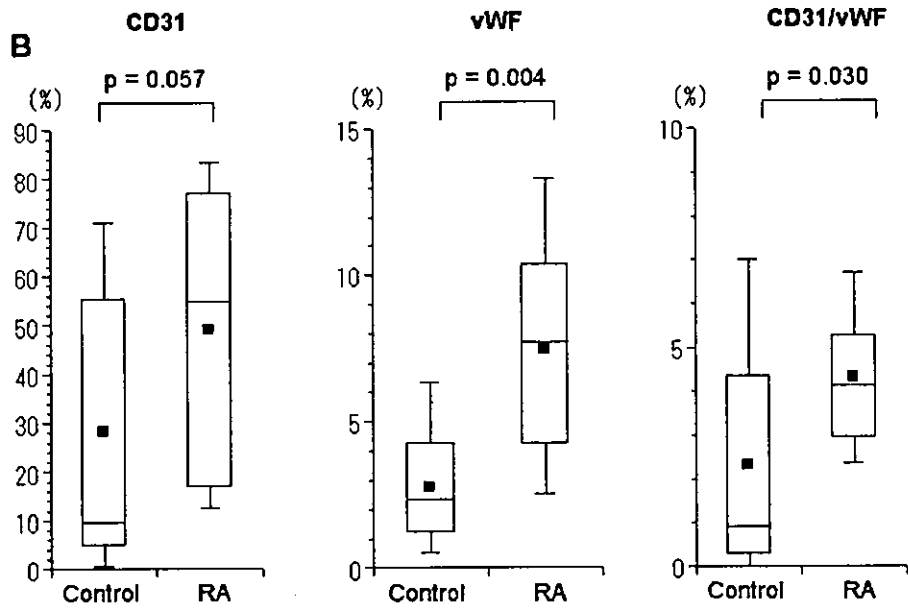


図1 骨髄 CD34+細胞からの血管内皮細胞の分化

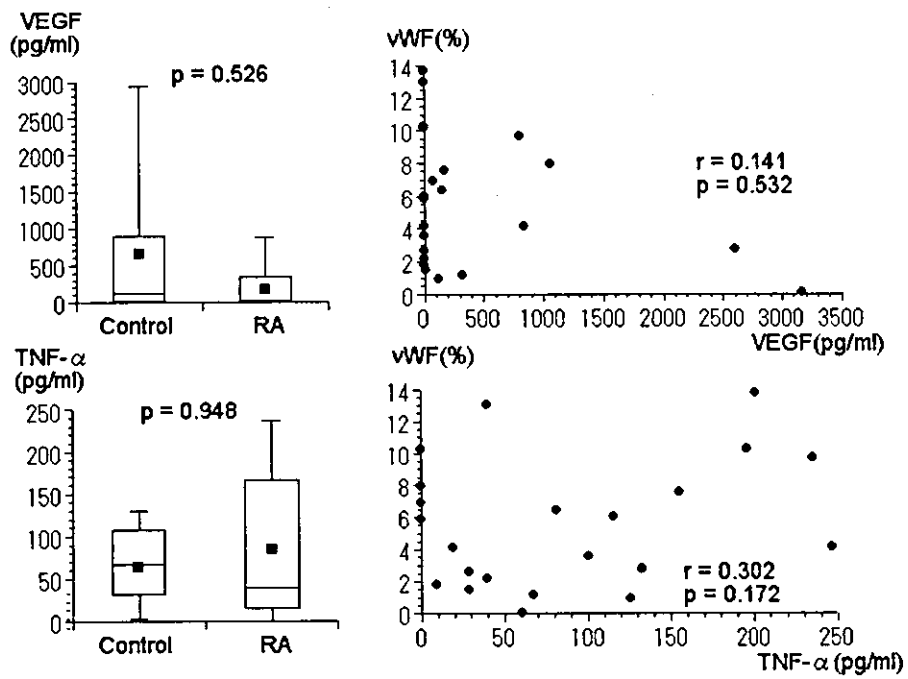


図2 骨髄 CD34+からの vWF+細胞の分化と上清中サイトカインの関係 (培養 2 週間)

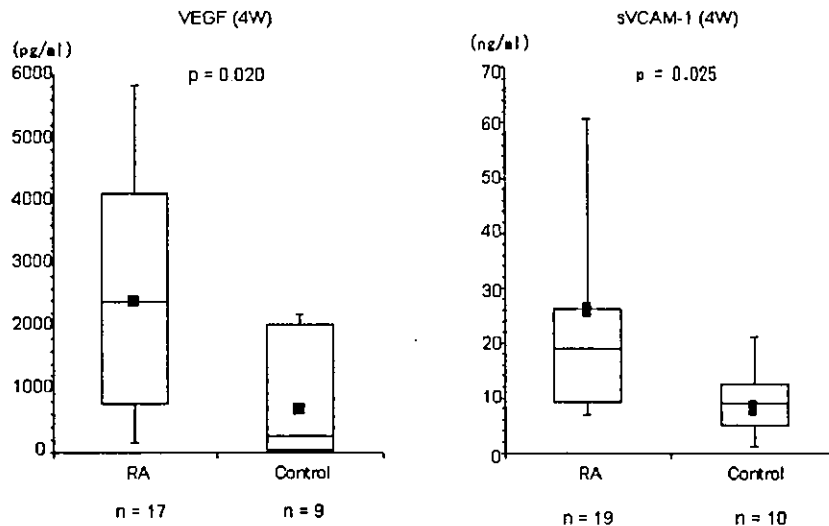


図3 骨髓 CD34+細胞を SCF+ GFCSF で 4 週間培養した際の上清中の VEGF と sVCAM 濃度

の亢進のメカニズムとしては、TNF- α や VEGF などのサイトカインの産生の亢進の可能性は考えにくい。RA 骨髓 CD34+細胞は TNF- α に対する反応性の異常を示すことがこれまでに明らかにされている。従って、そのような CD34+細胞の内因性の異常が血管内皮細胞への分化亢進に関与している可能性が十分考えられる。また、血管内皮細胞の活性化の指標となる sVCAM-1 の骨髓 CD34+細胞による産生も増加していたことから、RA 関節滑膜における血管新生及び血管内皮細胞の活性化において、骨髓 CD34+細胞の異常が深く関与することが示唆された。

E. 結論

以上の結果より、RA 骨髓 CD34+細胞レベルでの異常が RA 関節滑膜の病態の種々の側面において重要な役割を果たしていると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

・Shibuya H, Nagai T, Ishii A, Yamamoto K, Hirohata S. Differential regulation

of Th1 responses and CD154 expression in human CD4+ T cells by IFN- α . Clin Exp Immunol 132: 216-224, 2003

・Takizawa K, Takeuchi F, Nabeta H, Hirohata S, Takeuchi A, Matsumura Y, Yamamoto K. Association of transporter associated with antigen processing genes with Behcet's disease in Japanese. Autoimmunity 36: 161-165, 2003

・Iwai M, Harada Y, Ishii M, Tanaka S, Muramatsu A, Mori T, Nakashima T, Okanoue T, Hirohata S. Autoimmune hepatitis in a patient with systemic lupus erythematosus. Clin Rheumatol 22: 234-236, 2003

・Takayanagi M, Haraoka H, Kikuchi H, Hirohata S. Myocardial infarction caused by rheumatoid vasculitis: histological evidence of the involvement of T lymphocytes. Rheumatol Int 23:315-318, 2003

・広畑俊成 免疫血清検査の最新情報と、輸血過誤防止および輸血の最新情報 第4章自己免疫疾患検査の最新情報 4. 膠原病の検査一特に最近の進歩を中心として 臨床病理レビュー 124: 76-80, 2003

・広畑俊成 解説 ACR より新たに提唱された SLE の精神神経症状の分類リウマチ科

30:171-173, 2003

・広畑俊成 特集：膠原病を疑ったら・・・適切な診断と治療法の選択 推薦処方とその解説 中枢神経症状を伴った全身性エリテマトーデス 今月の治療 11:44-46, 2003

・広畑俊成 臓器病変からリウマチ・膠原病へのアプローチ 5 精神神経病変とリウマチ・膠原病 臨床医 29:2074-2077, 2003

・広畑俊成 特集：肺血管炎の診断と治療 膠原病の肺血管炎(ベーチェット病を含む) 呼吸器科 4:501-504, 2003

・広畑俊成 痴呆症学(2) 一高齢社会と脳科学の進歩一 臨床編 一各論一 IV. 一般身体新刊による痴呆 リウマチ性疾患(膠原病・血管炎症候群) Systemic lupus erythematosus 日本臨床増刊号 62 増刊号1 429-434, 2004

・広畑俊成 第10章膠原病類縁疾患の治療 1. Behçet 病「先端医療シリーズ19・アレルギー・リウマチ・膠原病」アレルギー・リウマチ・膠原病の最新医療 狩野庄吾、中川武正 編集主幹、先端医療技術研究所 pp. 341-346, 2003

・広畑俊成 「今日の臨床検査」河合 忠、水島裕 監修、櫻林郁之介、中川武正、星恵子、板橋明、広畑俊成、伊藤要一 編集、南江堂 2003

・広畑俊成 治療薬ハンドブック 喘息・アレルギー・リウマチ疾患 森田寛、永倉俊和、廣畑俊成 編集、メディカルレビュー社 2003

・広畑俊成 各論 骨・関節疾患 1. 骨粗鬆症 2. 関節リウマチ 3. 変形関節症「薬物療法学」石崎高志、鎌滝哲也、望月真弓 編集、南江堂 205-219, 2003

2. 学会発表

・Hirohata S, Yanagida T, Nampei A, Hashimoto H, Tomita T, Yoshikawa H, Ochi T. Enhanced generation of endothelial cells from CD34+ progenitor cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis. The 6th Korea-Japan combined Meeting of Rheumatology, p. 39, 2003 Seoul Korea

・Hirohata S, Yanagida T, Nampei A, Hashimoto H, Yoshikawa H, Mori T, Ochi T. Enhanced generation of VEGF and soluble VCAM-1 from CD34+ progenitor cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis.

67th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, Orlando, Arthritis Rheum (Suppl.): S341, 2003.

・Aramaki K, Kikuchi H, Hoshino E, Haraoka H, Hirose N, Takeuchi A, Hashimoto T, Hirohata S. Preliminary criteria for the evaluation of the severity of Behçet 's disease. 67th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, Orlando, Arthritis Rheum (Suppl.): S386, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

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

関節リウマチの病因に関する研究

RA と OA の骨髄コロニー形成能の比較検討と
RA 骨髄 CD34 陽性細胞共存で樹立された
EBウイルス感染CD15 (Lewis X) 陽性B細胞株

分担研究者 班員 武井正美

山上賢治¹⁾ 白岩秀隆¹⁾ 三田村巧¹⁾

澤田滋正¹⁾ 広畑俊成²⁾ 森俊仁³⁾

- 1、日本大学医学部内科学講座内科一部門
- 2、帝京大学医学部内科学膠原病リウマチ科
- 3、国立相模原病院整形外科

研究要旨 リウマチを含めた自己免疫疾患の発症機序は、その病因としてEB (Epstein Barr) ウイルスの関与が示唆されているが、病態形成における本ウイルスの役割に関して不明な点が多く本症の病因となりえるのか、または過剰な免疫反応の結果なのか多くの議論が行われている。最近、骨髄とリウマチの関与が注目されるようになり、骨髄でのEBウイルスの関与に関して、その細胞生理学的に研究を行うことはウイルスの病因に関係する機序を解明するうえで重要と考えられる。CD15 (Lewis X) 陽性B細胞は、Hodgkin病、mixed linkage leukemia、慢性甲状腺炎、胎児の発生過程で陽性になると報告されているが、一般に正常人では認められない。我々は活動性が高く間質性肺炎を合併するRAの末梢血に、CD15陽性B細胞が検出されることを報告した。また、RA患者の骨髄のCD34陽性細胞と、正常人のEBウイルス陰性のB細胞との共存培養でRA由来EBウイルス感染CD15陽性B細胞が高率に樹立されることが分かった。また、RAの骨髄では、EBウイルスに対してCTL活性が増加しており、RAの骨髄でEBVの感染制御が活発に行われていることが示唆され、間接的にこのウイルスの再活性化が行われている可能性が示された。

A. 研究目的

RA と OA の骨髄細胞をインフォームドコンセント後に採取し、OA、RA の骨髄コロニー形成能を比較し、治療薬との関連性を検討した。また骨髄細胞の EB ウイルスに対する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の反応性を EBNA 3A ペプチドに対する T-Select MHC-Tetramer アッセイを用いて検討した。フローサイトメトリー法を用いて、4名の RA 患者の骨髄の CD34 陽性細胞と、正常人の EB ウイルス陰性の B 細胞との共存培養によって得られた細胞株の CD15 陽性率を検索し、その病的意義を考察する。

B. 研究方法

術前にインフォームドコンセントを得た後、RA 患者と OA 患者の骨髄細胞を採取し、その骨髄液を Ficoll 液に重層して室温×400g、30 分で遠心分離する。中間層を回収し 2 回洗浄した後、 $1 \times 10^6 / \text{ml}$ に調整した骨髄単核細胞液 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 培養皿で、5%CO₂37℃で 14 日間培養する。培養後に各種コロニー (BFU-E, CFU-GM) 数を算定する。また、骨髄細胞の EB ウイルスに対する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の反応性を検索するため EBNA 3A ペプチドに対する T-Select MHC Tetramer アッセイをおこなった。さらに EB ウイルス LMP-2 を検出する

realtimePCR 法を用いて、骨髓コロニー中の EB ウイルスの存在を検索した

(倫理面への配慮)

院内の倫理委員会にて検討を経て、十分な説明と同意を得た上で患者の骨髓細胞や末梢血の採取を行った。

C. 研究結果

正常者では、B細胞中のCD15陽性B細胞は 2.65 ± 0.08 (mean \pm SE) % (n=11) 存在した。しかし、活動性RA患者の末梢血のCD15陽性B細胞は、有意に上昇する傾向が認められた。また間質性肺炎を合併したRAの一例に関しては、活動性の上昇に伴って末梢血のCD15陽性B細胞が増加する例が認められた。

RA患者の骨髓形成能 (E-CFU、GM-CFU) は OA患者と比較して、ステロイド治療群では低下する傾向を示した。しかし、いずれの症例もDMARDを使用しており、その影響も考えられた。

また骨髓コロニー中のEBウイルスの存在を検索したが、EBウイルスの存在は認められなかった。一般にRA患者では末梢血におけるEBV特異的CTL活性が低いと報告されている。今回、RA患者の骨髓中のCTL活性をMHC-tetramer法を用いて検討した結果、RAでは5例中3例にEBNA3Aに対する特異的CTL細胞が検出されOA患者では3検体中1例のみに認められた。正常人のEBウイルス陰性のB細胞との共存培養によって得られた細胞株のCD15陽性率を検索したところ、4人のRA患者の骨髓CD34陽性細胞と共存培養で樹立したB細胞株のうち2つが高率にCD15陽性であった。

D. 考察、結論

RAの骨髓コロニー形成能が、ステロイド治療により抑制される傾向が認められ、また分化可能な幹細胞にはEBVの存在は認めなかった。しかしRAの骨髓では、EBVに対してCTL活性が増加しており、RAの骨髓でEBVの感染制御が活発に行われていることが示唆され、間接的にこのウイルスの再活性化が行われている可能性が示された。RAの骨髓CD34陽性細胞共存培養で得られたB細胞株に通常では見られないCD15 (Lewis X) が強く発現する可能性が示されたことによりEBVによって活性化されたB細胞が骨髓に対し生理学的に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。さらに、CD15陽性細胞の特性を検索するため、T細胞や nurse

cellとの共存培養を施行し、その反応性を検討していく予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Shiraiwa H, Takei M, Yoshikawa T, Azuma T, Kato M, Mitamura K, Ueki T, Kida A, Horie T, Seki N, Sawada S.

Detection of Grb-2 related adopter protein (Grap) gene and peptide molecule in salivary glands from MRL/lpr model mice and patients with Sjogren's syndrome.

J International Medical Research (in press)

2) Takei M, Shiraiwa H, Omata O, Motooka N, Mitamura K, Horie T, Ookubo T, Sawada S.

A new tactile skin sensor for the measurement of skin hardness in patients with systemic sclerosis and autoimmune Raynaud's phenomenon.

J International Medical Research (in press).

3) 岡島泰彦、岩田光浩、平沼久人、武井正美

強膜炎からSLEが診断された男性例

眼科 45 (2)、241-246、2003

4) Sawada S, Takei M :

Sjogren's syndrome. Yes Autoreactive lymphocytes. Why? virus or gene?

Internal Medicine 41 (2)、75-76、2002

5) Sawada S, Takei M.

Reactivation of immanent herpes group virus.

Internal Medicine 42 (2):140-1、2003

6) 三田村巧、武井正美、澤田滋正

ウイルスとリウマチ疾患

日大医学会雑誌 vol62 (12)、623-638、2003

2. 学会発表

1) 武井正美、尾股定夫、本岡則幸、三田村巧、北村登、松川吉博、堀江孝至、澤田滋正：新たな皮膚硬化度測定法 (尾股法) の強皮症での応用

第47回日本リウマチ学会総会、東京、2003年 4月25日

2) 山上賢治、清水孝子、北村登、三田村巧、武井正美、松川吉博、大久保陸洋、西成田

進、堀江孝至、澤田滋正：肺胞出血、サイトメガロウイルス腸炎を合併した SLE の一例

第 47 回日本リウマチ学会総会、東京、2003 年 4 月 24 日

3) 大久保陸洋、清水孝子、山上賢治、斉木実、白岩秀隆、大木隆史、平沼久人、松川吉博、三田村巧、武井正美、北村登、堀江孝至、澤田滋正：全身性エリテマトーデス (SLE) の血球貪食症候群 (HPS) に対し VP-16 が奏功した一例

第 47 回日本リウマチ学会総会、東京、2003 年 4 月 24 日

4) 清水孝子、北村登、武井正美、三田村巧、松川吉博、澤田滋正、堀江孝至：ループス腎炎におけるアンギオテンシン II 受容体拮抗薬の臨床効果

第 47 回日本リウマチ学会総会、東京、2003 年 4 月 25 日

5) 平沼久人、池田多聞、大久保陸洋、北村登、三田村巧、武井正美、松川吉博、堀江孝至、澤田滋正：全身性エリテマトーデスに伴う両側難治性強膜炎にシクロスポリンが有効であった一例

第 47 回日本リウマチ学会総会、東京、2003 年 4 月 24 日

6) 白岩秀隆、武井正美、吉川勉、東孝典、三田村巧、斉藤一郎、林良夫、大久保陸洋、堀江孝至、関直彦、澤田滋正：二次性シェーグレン症候群 (SjS) モデル MRL/lpr と原発性 SjS モデル NFS/sld 唾液線における遺伝発現解析

第 47 回日本リウマチ学会総会、東京、2003 年 4 月 25 日

7) 山上賢治、本多三男、武井正美、北村登、西成田進、堀江孝至、澤田滋正：骨髓造血機能障害をおこす HIV env gene 組込みサル免疫不全ウイルス C2/1

第 31 回日本臨床免疫学会総会 平成 15 年 10 月 9 日 東京

8) 北村登、清水貴子、松川吉博、武井正美、三田村巧、澤田滋正、堀江孝至：多発性皮膚潰瘍を合併した全身性エリテマトーデス (SLE) の一例

第 31 回日本臨床免疫学会総会 平成 15 年 10 月 9 日 東京

9) 藤田之彦、春山和嘉子、荒川千賀子、原田研介、清水貴子、武井正美、松川吉博、澤田滋正

小児リウマチ学会 平成 15 年 東京

10) 大木隆史、小林朋子、木邨英里、芦野園子、金子尚久、石井信朗、山上賢治、松川吉博、武井正美、橋本修、佐野茂男、西成田進、堀江孝至：

著明な肺胞出血を呈した治療抵抗性の SLE の一例

第 450 回日大医学会例会 平成 15 年 9 月 20 日 日大

11) 上野川久美、大木隆史、竹井和夫、北村登、武井正美、松川吉博、三田村巧、堀江孝至、細川芳文、堀越昶、澤田滋正：腎血管脂肪腫を合併し、その経過中に慢性膵炎を合併した全身性エリテマトーデスの一例

第 450 回日大医学会例会 平成 15 年 9 月 20 日 日大

12) 神戸榮美子、山崎哲男、武井正美、松川吉博、三田村巧、北村登、澤田海彦、澤田滋正、堀江孝至：

MTX 加療中悪性リンパ腫を発症した関節リウマチの 1 例

第 450 回日大医学会例会 平成 15 年 9 月 20 日 日大

13) 小林朋子、武井正美、三田村巧、北村登、松川吉博、福永牧子、橋本修、澤田滋正、堀江孝至：

肺病変を合併したシェーグレン症候群の 3 症例

第 12 回日本シェーグレン症候群研究会 平成 15 年 10 月 11 日 東京

14) 白岩秀隆、武井正美、吉川勉、東孝典、加藤真樹、三田村巧、斉藤一郎、林良夫、大久保陸洋、堀江孝至、関直彦、澤田滋正：シェーグレン症候群疾患関連遺伝子の解析—cDNA マイクロアレイを用いたアプローチ

第 12 回日本シェーグレン症候群研究会 平成 15 年 10 月 12 日 東京

15) 山内渉、河村愛、福田恭子、小峰靖代、落合豊子、武井正美：

凍瘡様皮疹から確定診断に至った Sjogren 症候群

皮膚科学会東京地方会城南 平成 15 年 10 月 18 日 東京

16) 高橋輝行、水谷智彦、武井正美、三田村巧、松川吉博、白岩秀隆、堀越昶、澤田滋正：

MRI 拡散強調画像・ADC 画像で特異な所見を認めステロイドパルス療法で改善した CNS

ループスの一例

第6回東京リウマチ 平成15年10月
18日 東京

17) 白岩秀隆 武井正美 澤田滋正 鷺
尾久予 落合豊子:

爪病変を伴う化膿性関節炎として加療さ
れていた。例

第2回東北臨床免疫研究会 平成12年
8月2日 青森グランドホテル

18) 白岩秀隆、武井正美、尾股定夫、本
岡則幸、三田村巧、北村登、松川吉博、
堀江孝至、澤田滋正:

皮膚硬化度測定法(尾股法)の強皮症で
の応用

第451回日大医学会例会 2003年
11月29日 日大

19) 高橋輝行、水谷智彦、武井正美、三
田村巧、松川吉博、白岩秀隆、掘越昶、
澤田滋正:

MRI 拡散強調画像・ADC 画像で特異な所見
を認めステロイドパルス療法で改善した
CNS ループスノ1例

第6回東京リウマチ膠原病研究会 平成
15年10月18日東京

選択的トランスクリプトーム解析による新しい慢性関節リウマチ
血液診断システムの構築

分担研究者 野島 博、 所属機関名・職名 大阪大学微生物病研究所・教授

研究要旨：健常人の血液細胞特異的に発現している *PREB* 遺伝子群を 263 種類包括的に単離し、DNAチップとして貼り付けてRA特異的に発現亢進（抑制）している遺伝子群を幾つか同定した。一方、RAからOAを差し引くことによってRA特異的に転写誘導されている遺伝子を幾つか単離した。そのうちのひとつはリアルタイムPCRによって全てのRA患者で発現亢進していたが、OA患者では健常人と変化はなかった。これらの新規な遺伝子はRA病因研究に新たな視点を与えると結論した。

A. 研究目的

慢性リウマチ（RA）患者骨髄液に特異的に発現しているが変形性関節症（OA）患者骨髄液では全く発現していない（あるいはその逆）遺伝子群を選択的トランスクリプトーム解析あるいは段階的サブトラクション法により包括的に同定・単離して機能解析することでRAの発症機序を解明する。

B. 研究方法

健常人の血液細胞特異的に発現しているが繊維芽細胞（TIG-1）には発現していない遺伝子群（*PREB*: predominantly expressed in blood cells）を263種類包括的に単離したので、それらを貼り付けたDNAチップを作って選択的トランスクリプトーム解析を行った。RA特異的に発現している遺伝子についてはリアルタイムPCRにより定量的な測定を患者ごとに行った。まず作製した正常血液細胞発現特化型マイクロアレイを評価するため、*PREB* 遺伝子単離の際の段階的サブトラクション法で使用した正常ヒト繊維芽細胞由来のRNAおよび健常人血液RNAをサンプルとしてT7リニア増幅法とアミノアリルUTPラベリング法を用いて繊維芽細胞/血液細胞の発現解析を行った。また、コントロール実験として正常血液細胞/正常血液細胞間の発現差異の存否を確認した。実際には、25x75mmのエポキシ樹脂コートスライドガラス（EasySpot

oligo slide: U-Vision Biotech社製）に対して、合成オリゴヌクレオチド（総計：263）の貼り付けを行った。オリゴヌクレオチドは、横10スポットx縦10スポットを1グリッドとする計32グリッド（100x32=320スポット）に配置させた。また、マイクロアレイ実験の再現性を向上させるために、一遺伝子に対して、それぞれ計8スポットずつ貼り付けを行った。同様にデータ補正用のコントロールスポットとしてGAPDH遺伝子、及びスポットバッファーを貼り付けた。続いて、ラベリングサンプルであるtotal RNAはT7増幅を2回繰り返して、アレイハイブリに用い得る充分量のアンチセンス・アミノアリル標識化RNA（aaaRNA）の合成を行った。その後、アンチセンスRNAに取り込まれたアミノアリルUTPのアミノ基と蛍光色素（Cy3もしくはCy5）を化学結合させることで標識した。

一方、比較対照2種の全RNAをそれぞれ上述の方法で増幅と標識を行い、各々5μgのCy-dye標識アンチセンスRNAを用いてハイブリダイゼーションを行った。次いでアレイを洗浄後、スキャンした画像を数値化し、補正を行った。同様の実験を計2回繰り返し、実験の再現性について評価するため、1回目と2回目の実験の相関値を求めた。このようにしてデータの信憑性を高めた上でRAやOA患者由来のRNAについてのトランスクリプトーム解析を行った。

(倫理面への配慮)

部局で倫理委員会の承認を受けるとともに、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。

C. 研究結果

マイクロアレイに貼り付ける標的遺伝子は、高い特異性が必要である。それによって、非特異的なハイブリダイゼーションを最小限に抑えることができる。*PREB* を全て貼り付けた発現特化型 cDNA 群のマイクロアレイ作製するため、すべてについて 60mer のオリゴヌクレオチドを特殊なプログラムを用いて設計し、我々の研究室に備え付けてあるマイクロアレイスポッターを用いてマイクロアレイを作製した。この DNA 溶液についてスポットングの最適条件の検討を行うとともに、試料 RNA の抽出とハイブリダイゼーションなどについても最適条件を決定する詳細な実験を行った結果、再現性・信頼性の高いデータが得られるようになった。具体的には繊維芽細胞および正常血液細胞由来の全 RNA をそれぞれ増幅して蛍光色素標識を行い、各々 5 μ g の蛍光色素標識アンチセンス RNA を用いてハイブリダイゼーションを行った。実験の再現性について評価するため、同様の実験を計 2 回行い、1 回目と 2 回目の実験の相関値を求めたところ 0.797 であった。また、解析のための基準を満たした遺伝子 (エラースポットを除いた遺伝子) は 202 であった。一般的なマイクロアレイ解析において同一実験を行った場合の相関値は 0.6 以上であることから考えると、今回の血液細胞発現特化型マイクロアレイは繊維芽細胞および正常血液細胞由来試料間では有意な発現解析が行え、且つ再現性が得られたものとなった。

この最適条件下で *PREB* チップを用いて約 80 人の RA 患者および約 70 人の OA 患者より採取した骨髓液におけるトランスクリプトーム解析を開始した。まず、8 人の RA 患者の血液細胞由来 RNA をサンプルとして、8 サンプル各々に対して同様の増幅とラベリング、マイクロアレイハイブリダイゼーションを 2 回試行した。その結果、各実験間での相関係

数は、8 サンプル其々の実験すべてにおいて 0.749~0.923(平均:0.850)となり、解析可能遺伝子群も 200 遺伝子以上、多いものでは 260 遺伝子と非常に佳良な結果が得られた。これらの結果の発現比は 8 人の RA 患者個々によりバラつきが見られるが、ある患者では、健常人と比べて 2 倍以上の発現を有する遺伝子が 116 に及ぶものもあった。また、25 遺伝子については、解析した 8 サンプル全てにおいて健常人よりも 2 倍以上の発現が認められた。このうち 8 人の OA 患者全てと比べても発現亢進している遺伝子(機能未知)はひとつ見つかった。これらの遺伝子群は、何らかの形態で RA 発現特異的遺伝子となりうる可能性が推測される。

逆に健常人発現パターン比較により、発現が顕著に落ちている遺伝子群も幾多含まれていた。それらの多くも未解析な遺伝子であったが、転写抑制されている遺伝子のうちにはミトコンドリア遺伝子やリボソーム遺伝子も見つかった。この結果は RA の白血球細胞におけるこれら遺伝子の低活性化とある種の免疫活性の低下との関連を示唆する。まだ解析サンプル数が少ないため、現時点では統計的な結論を言及できないが、これらの遺伝子群に関してもある種の RA 特有因子としての介在は大いに考えられる。一方、RA から OA を (あるいは OA から RA を) 差し引くことによって RA 特異的に転写誘導 (抑制) されている遺伝子を幾つか単離した。そのうちのひとつについてリアルタイム PCR によって個別の患者に着いての発現程度を調べていったところ、これまでテストした全ての RA 患者 (36 人) で発現亢進していたが、OA 患者 (9 人) では健常人と変化はなかった。興味深いことにこの遺伝子は並行して実験している自己免疫疾患の全身性エリテマトーデス (SLE) 患者血液において 130 人中 126 人で発現亢進していた。SLE は炎症のマーカーのひとつである CRP 値の上昇は通常観察されないため RA における炎症の結果発現亢進しているとは考えにくい。そのほか高安病血管炎患者でも全員で発現亢進しており、自己免疫性血小板減少性紫斑病 (ITP) 患者でも半数で発現亢進していた。この遺伝子の患者血液細胞での発現は T 細胞でも B 細胞でもない他の血液細胞由来であることもリアルタイム PCR により

確認した。この遺伝子の発現亢進が自己免疫疾患としての慢性関節リウマチの発症の原因となっているか否かを検証するため、トランスジェニックマウスの作製を開始した。作製が完成したら、まず関節の病状を調べてみたい。また免疫染色を実行するために抗体の作製も開始した。

D. 考察

各疾患 (RA, OA の 2 種) RNA サンプルを使用した実験については、同一アレイガラス上、同一遺伝子、各々 8 スポット間での解析数値の揺らぎ (8 スポットの平均値) ± (S.D. 値) を算出し、S.D. の揺らぎ値 (S.D. 値) / (8 スポットの平均値) (%) を確認した。その結果、スキャナーより得られる生データで算出した場合、S.D. の揺らぎ値 (S.D. 値) / (8 スポットの平均値) (%) が 50% を超えるものは全体の 15~17%、補正データで算出した場合、4~9% であった。これらの数値は、同一マイクロアレイ上での各同一遺伝子 8 スポット間のデータの信頼性は、非常に高いことを示す。これは今後この系でのアレイデータ解析を高い信頼度を持って進めることができると確信もてる佳良な結果である。

一方、RA 特異的に発現亢進 (抑制) している遺伝子が幾つか同定できた。RA の病状にどのように関連するか、幾つかのアプローチ法により研究を展開することが重要であると考えられる。

E. 結論

PREB チップおよび段階的サブトラクション法による RA 患者特異的遺伝子群の単離は RA 病因研究に新たな視点を与える可能性が高いと結論した。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Ito, A., Jippo, T., Wakayama, T., Morii, E., Koma, Y.I., Onda, H., Nojima, H., Iseki, S., Kitamura, Y.: SgIGSF: a new mast-cell adhesion molecule used for attachment to fibroblasts and transcriptionally regulated by MITF.

Blood, 101(4), 2601-2608, 2003.

(2) Yabuta, N., Kajimura, N., Mayanagi, K., Sato, M., Gotow, T., Uchiyama, Y., Ishimi, Y., and Nojima, H. Mammalian Mcm2/4/6/7 complex forms a toroidal structure. Genes Cells, 8(5), 413-421, 2003.

(3) Okuzaki, D., Satake, W., Hirata, A. and Nojima, H.: Fission Yeast *meu14⁺* is required for proper nuclear division and accurate formation of forespore membrane during meiosis II. J. Cell. Sci., 116(13): 2721-2731, 2003.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

末梢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。(特願 2003-3190)

【出願者】野島博、(株) ジーンデザイン、科学技術振興事業団

【出願日】平成 15 年 9 月 10 日

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

(3) 研究成果の刊行に関する一覧表

(平成15年度)