

Fig. 4. Subcellular localization of Meu14-GFP in fixed cells. (A) Detection of Meu14-GFP protein by western blotting, which is expressed in a meiosis-specific manner. A band corresponding to Meu14-GFP with the expected size (shown by an arrowhead) is detected predominantly 4-8 hours after nitrogen starvation, after which it suddenly disappears and cannot be detected at all at 10 hours and 12 hours (uppermost panels). In contrast, a band for GFP alone is detected primarily at 6-12 hours (middle panels), probably because the Meu14 portion of Meu14-GFP is easily degraded, releasing the GFP portion. Western blot probed by an anti-Cdc2 antibody was used as a loading control. Asterisks indicate nonspecific bands. The extracts of wild-type cells (TP4D-5A/TP4D-1D) transformed with pRGT81-*meu14+* (*meu14+*-GFP) or pRGT81 (GFP vector) are used to identify the expressed Meu14-GFP protein. These extracts are denoted by 14 or G, respectively (rightmost lanes).

(B) Fluorescence from Meu14-GFP observed at various stages of meiosis. Cells were immunostained with the TAT1 antibody to mark the microtubules (red). Cells bearing *meu14+*-*gfp* (YDO120) were induced to enter meiosis and then chemically fixed and analyzed by fluorescence microscopy for DNA (blue), Meu14-GFP (green), and microtubules (red). The three images are merged and shown in the rightmost panels. (C) Correlation of the distance between the two Meu14-GFP rings (c) with either (a) the distance between two nuclei or (b) the length of the microtubules. (D) *meu14+*-*gfp* (YDO120) cells immunostained by the anti-Sad1 antibody to visualize the SPB at various stages of meiosis. It appears that Meu14-GFP is located on the cytoplasmic side of the SPB (white arrow). (E) *meu14+*-*gfp* (YDO120) cells immunostained by the anti-NPC antibody mAB414. Bar, 10 μ m.

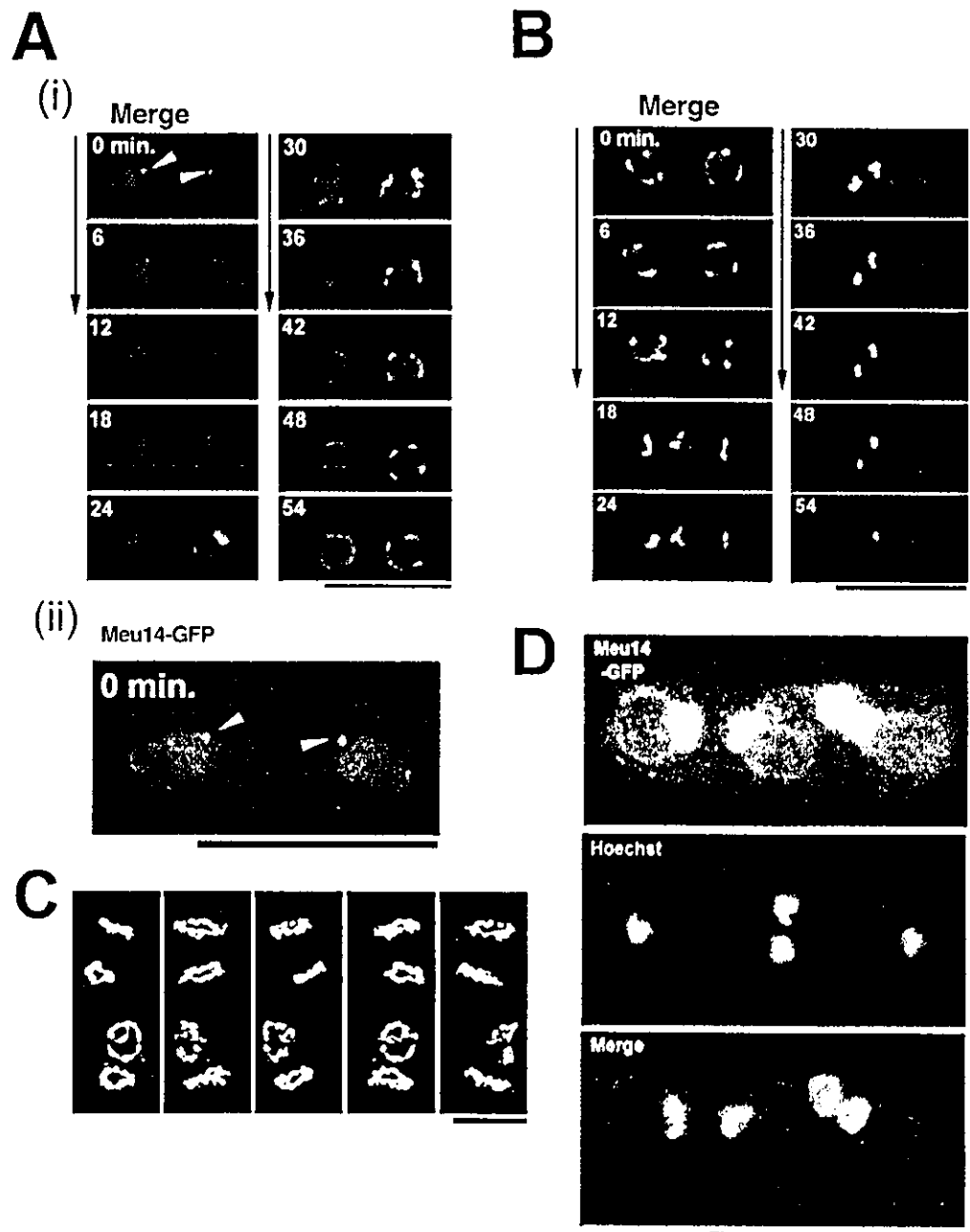


Fig. 5. Dynamic movement of Meu14-GFP in live meiotic cells as revealed by time lapse observations. (A) Cells (YDO120) passing from prometaphase II to metaphase II. (i) Merged images of Meu14-GFP (green) and nuclei stained by Hoechst 33342 (blue) recorded at 2 minute intervals and shown at 6 minute intervals. (ii) An enlarged Meu14-GFP image at 0 minutes is shown to highlight the appearance of the Meu14-GFP dot/ring structure (arrowhead) at the end of the nucleus. (B) Cells passing from metaphase II to anaphase II. (C) Three-dimensional images of the Meu14-GFP structure during anaphase II. (D) Enlarged views of Meu14-GFP localization at the late stage of meiosis II. A thin pouch-like image containing trace amounts of Meu14-GFP is observed, at the end of which a strong band of Meu14-GFP is detected. Bar, 10 μ m. Please refer to Movies 1-4 for the dynamic Meu14-GFP profile and Movie 5 for three-dimensional images of Meu14-GFP rings.

When the *Meu14*-GFP rings are closely examined by an enlarged view rotated on the Y-axis by an angle of seventy-two degrees to obtain three-dimensional images, they are found to form a structure like 'assembled beads' (Fig. 5C, Movie 5). We counted more than ten beads that composed each *Meu14*-GFP ring in these images. Notably, at the end of meiosis II, when the strong *Meu14*-GFP signal is observed as an intense dot at the edge of the nucleus (Fig. 5B), the weak *Meu14*-GFP signal was also observed to have a balloon-like shape (Fig. 5D). This is probably the forespore membrane, indicating that some portion of *Meu14*-GFP is distributed at the forespore membrane.

Meu14 is required for the extension of the forespore membrane from the SPBs

To investigate whether *Meu14* is located on the forespore membrane, we compared the localization of *Meu14*-GFP to that of the *Spo3*-HA molecule, which is a forespore membrane component (Nakamura et al., 2001). *Spo3*-HA fluorescence signals appeared as two semicircular structures that enclose the nucleus at metaphase II, and as four capsular structures enclosing the nucleus at anaphase II (Fig. 6A). The SPBs were situated at the center of each semicircle displayed by *Spo3*-HA. At the edges of these semicircles and capsules, *Meu14*-GFP could be detected. Thus, *Meu14*-GFP occurs at the leading edge of the forespore membrane during meiosis II. The fluorescence of *Meu14*-GFP that localized at the edge of the forespore membrane became reduced as the edge of the forespore membrane encloses itself, while *Spo3*, the component of the forespore membrane, remains until the forespore membrane growth is completed (Fig. 6Ai-v) (Nakamura et al., 2001). The edge of the extended forespore membrane appears to play an important step for the mature spores.

Next, we examined the localization of *Psy1*-GFP in *meu14Δ* cells by fluorescence microscopy. *Psy1*, like *Spo3*, also serves as a marker for the formation of the forespore membrane (Nakamura et al., 2001). The reason for using the *Psy1*-GFP is that fluorescence of *Psy1*-GFP can be detected much more easily during fluorescence microscopy than the fluorescence of *Spo3*-HA (data not shown). *Psy1*-GFP was integrated into the genome of *meu14Δ* cells and wild-type cells. The cells were then induced to enter meiosis II and stained with the anti-Sad1 antibody to mark the SPBs (Fig. 6B). In wild-type cells, the forespore membranes visualized by *Psy1*-GFP assembled normally as a circle and at meiosis II enclosed the haploid nucleus stained by Hoechst 33342 (Fig. 6Bi). In wild-type cells, the forespore membrane extends symmetrically from the SPB and results in this circular structure [data not shown (Nakamura et al., 2001)]. Here, the position of SPBs indicates the orientation of the nuclear division at meiosis II. However, in most of the *meu14Δ* cells, the semicircular forespore membrane is formed in an inappropriate place, thus failing to properly encircle the nucleus (Fig. 6Bii-iv). In *meu14Δ* cells, only few of the forespore membrane leading edges were normally assembled as in wild-type cells (Fig. 6C). The majority were abnormally assembled. These observations indicate that *Meu14* is required for the proper extension of forespore membrane from the SPBs. As shown in Fig. 6C, the *meu14Δ* ascospores were abnormal in number and shape.

In contrast, in wild-type cells, the forespore membrane encapsulated each haploid nucleus (>90%), while the initiation of the forespore membrane in the *meu14Δ* cells is normal, most later fail to develop a normal morphology.

Meu14-GFP can form ring shapes in the absence of *Spo3* or *Spo15*

Previous reports show that *spo15⁺* is required for the alternation of the SPBs in meiosis II and *spo3⁺* is required for the accurate formation of the forespore (Ikemoto et al., 2000; Nakamura et al., 2001). To examine if *Spo3* and *Spo15* are required for the localization of *Meu14*-GFP at the edge of forespore membrane, we constructed the *spo3Δ meu14⁺-gfp* and *spo15Δ meu14⁺-gfp* strains (Fig. 6D). The *h⁹⁰spo3Δ meu14⁺-gfp* or *h⁹⁰spo15Δ meu14⁺-gfp* strains were induced to proceed with zygotic meiosis and sporulation by nitrogen starvation, after which the localization of *Meu14*-GFP was visualized by fluorescence microscopy. As shown in Fig. 6Di, *Meu14*-GFP was detected at the edge of the forespore membrane in zygotic meiosis as also observed in azygotic meiosis (Fig. 4D). The fluorescence of *Meu14*-GFP was found to form ring shapes in both *spo3Δ* and *spo15Δ*. The four ring shapes of *Meu14*-GFP showed a synchronized action in *spo3Δ* but not in *spo15Δ*. In *spo3Δ* cells, we found that *Meu14* is situated at the edge of a spore-like body (Fig. 6Diii,iv). In many *spo15Δ* cells, *Meu14* was undetectable (Fig. 6Dv) while in others, the number, size and position of *Meu14* signals were abnormal (Fig. 6Dvi,vii). Thus, *Meu14*-GFP is able to localize at the edge of the abnormal forespore membrane in the absence of *Spo3* and *Spo15*.

Morphology observed by electron microscopy

To investigate the structure of the forespore membrane and the spore wall of *meu14Δ* cells in more detail, we examined their morphology by thin-section electron microscopy (EM). We treated the cells by high-pressure freezing (Humbel et al., 2001) to minimize the artifacts that can arise during the pre-fixation process. The substituted cells were then fixed and observed by electron microscopy. From the *meu14Δ* cells, we obtained images showing that the forespore membranes and spore wall failed to form accurately and displayed abnormal morphology (Fig. 7Ai) as compared to those of wild-type cells (Fig. 7Aii). Enlarged pictures show some of the various abnormalities of the *meu14Δ* spore wall observed, such as a small spore-like structure without a nucleus (iii), an incompletely encapsulated nucleus (iv), and a nucleus without a spore wall (v). Furthermore, in *meu14Δ* cells, the thickness of the spore wall is not homogeneous compared to that of the wild-type cells (vi).

EM images also show that the interaction of the forespore membrane (black arrows) with the SPB (white arrows) becomes abnormal in *meu14Δ* cells (Fig. 7Bi). That is, the forespore membrane segregates from the SPB, thus extending abnormally to the opposite direction to the nucleus (ii). The relative orientation of the forespore membrane with the SPB (iii) is distinct from that of wild-type cells (iv). This abnormal segregation of the forespore membrane from SPB is consistent with our indirect immunofluorescence data (Fig. 6B). Some *meu14Δ* cells showed abnormally shaped SPBs as indicated by

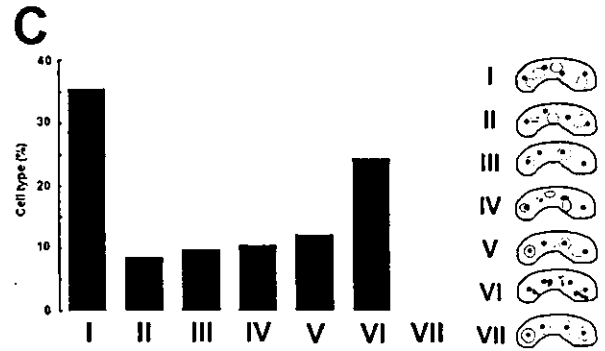
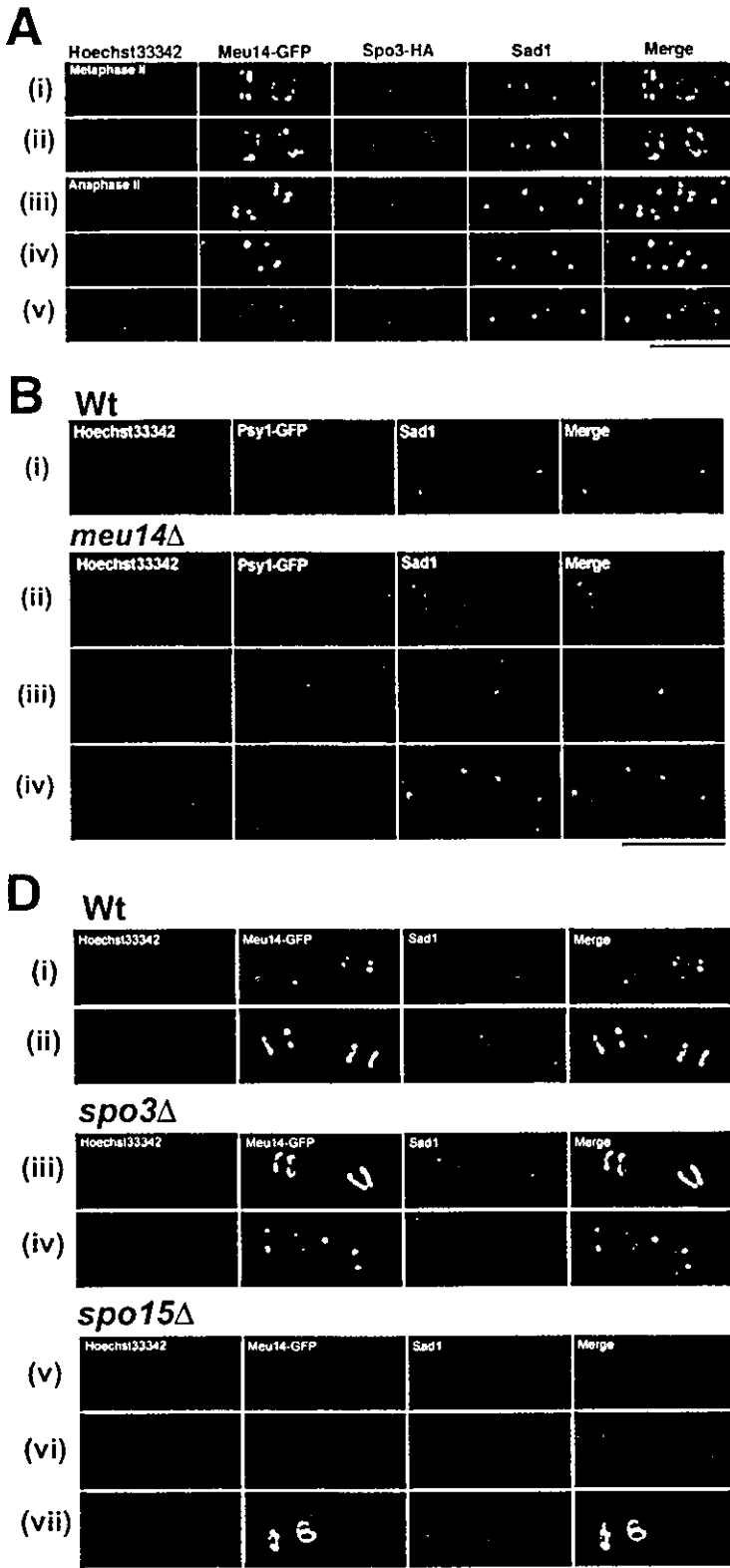
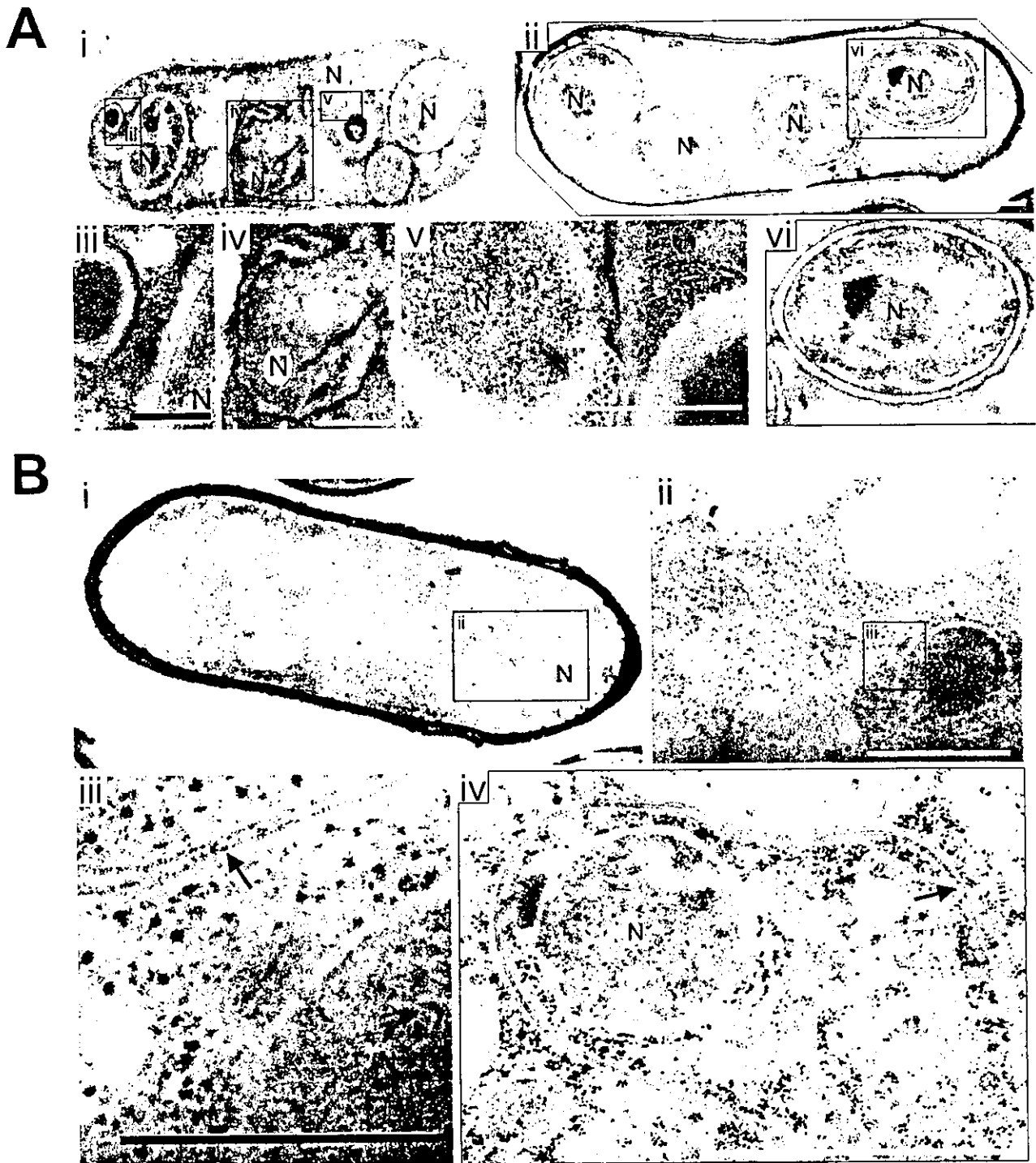


Fig. 6. Meu14 is localized at the leading edge of the forespore membrane and is required for its extension. (A) Localization of Meu14-GFP, Spo3-HA, and Sad1 during meiosis II. *meu14⁺-gfp spo3::HA* diploid cells (YDO121) at metaphase II (panel i and ii) and anaphase II (panels iii-v) were analyzed by immunofluorescence microscopy. Hoechst 33342 staining is blue, Meu14-GFP is green, anti-HA staining is red, and anti-Sad1 staining is yellow. (B) Psy1, a forespore membrane component, localizes abnormally in *h⁹⁰meu14Δpsy1⁺-gfp* cells (YDO150). *h⁹⁰psy1⁺-gfp* cells (YN68) (panel (i)) and *h⁹⁰meu14Δpsy1⁺-gfp* cells (panels ii-iv) harboring the integrated *psy1⁺-gfp* gene were induced to enter meiosis II and were analyzed by immunofluorescence microscopy. Hoechst 33342 staining is blue, anti-Sad1 staining is red, and Psy1-GFP is green. (C) Frequency of the abnormal forespore formation in *h⁹⁰meu14Δ* cells. Stained cells were classified into the following 7 classes: class I, all four forespore membranes were formed next to nuclei; class II, all four membranes were formed next to nuclei but were crushed; class III, one or two forespore membranes alone were formed normally; class IV, membranes were formed but they do not properly enclose the nucleus; class V, one or two membranes were formed but others formed next to the nuclei; class VI, all four membranes were crushed and formed aggregates near the nuclei; class VII, all four membranes were formed normally. At least 250 cells were counted. (D) Localization of Meu14-GFP in the absence of Spo3 or Spo15. *h⁹⁰meu14⁺-gfp* cells (YDO50; panels i and ii), *h⁹⁰meu14⁺-gfp spo3::ura4⁺* cells (YDO130; panels iii and iv), and *h⁹⁰meu14⁺-gfp spo15::ura4⁺* cells (YDO10; panels v-vii) undergoing meiosis II were analyzed by immunofluorescence microscopy. Hoechst 33342 staining is blue, Meu14-GFP is green, and anti-Sad1 staining is red. Bar, 10 μm.

white arrows in Fig. 7C. In such cases, encapsulation of the nucleus by the forespore membrane is mostly unsuccessful (i and iv). Enlarged pictures display the abnormally enclosed forespore membrane without a nucleus (ii) next to the naked

nucleus (iii), both of which carry improperly formed SPBs. Moreover, some of the SPBs do not localize between the nucleus and forespore membrane but rather, are situated outside of these structures (v and vi).



The organization of the spindles are also abnormal in *meul4Δ* cells (Fig. 7D), as some cells have abnormally bundled spindle-like structures (i) that are improperly enclosed by the abnormally formed forespore membranes. Some *meul4Δ* cells showed seemingly normal spindle formation (ii-iv), but enclosure of the bundle is abnormal when no SPB is found (iii). It is also unusual that a spindle-like structure is observed in the spores, indicating that the handling of the spindles is also abnormal in *meul4Δ* cells (Fig. 7Av).

Discussion

Meu14 participates in meiosis II

In the present study, we have shown that *meu14⁺* is a meiosis-specific gene, and the results are consistent with the possibility that *meu14⁺* expression is under the direct control of Mei4. Meu14 was consistently observed to be present only at meiosis II as judged by northern blotting (Fig. 1A,B), western blotting (Fig. 4A) and fluorescence microscopy of chemically fixed (Fig. 4B) and live cells (Fig. 5A,B) expressing the Meu14-GPF

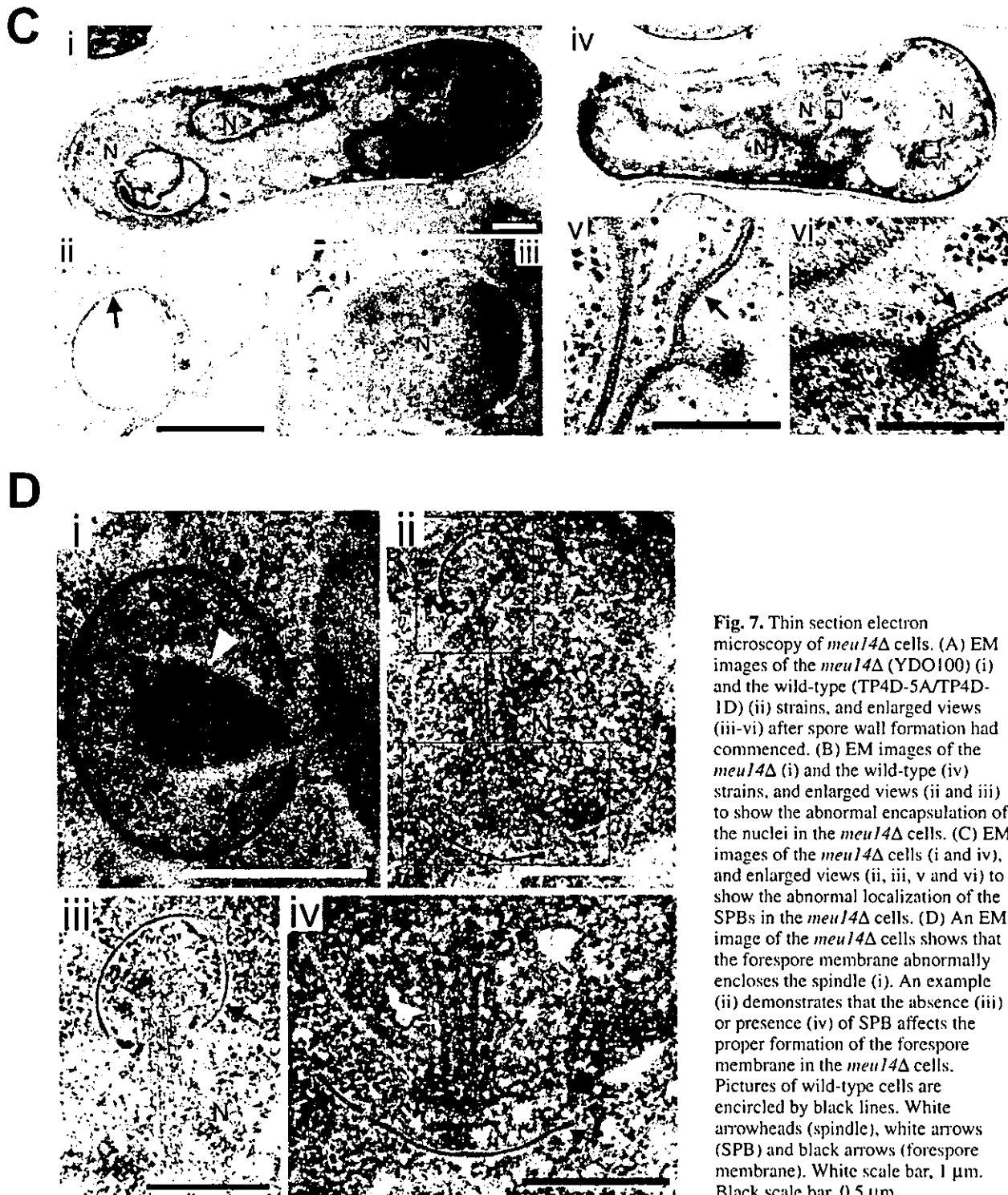


Fig. 7. Thin section electron microscopy of *meu14Δ* cells. (A) EM images of the *meu14Δ* (YDO100) (i) and the wild-type (TP4D-5A/TP4D-1D) (ii) strains, and enlarged views (iii-vi) after spore wall formation had commenced. (B) EM images of the *meu14Δ* (i) and the wild-type (iv) strains, and enlarged views (ii and iii) to show the abnormal encapsulation of the nuclei in the *meu14Δ* cells. (C) EM images of the *meu14Δ* cells (i and iv), and enlarged views (ii, iii, v and vi) to show the abnormal localization of the SPBs in the *meu14Δ* cells. (D) An EM image of the *meu14Δ* cells shows that the forespore membrane abnormally encloses the spindle (i). An example (ii) demonstrates that the absence (iii) or presence (iv) of SPB affects the proper formation of the forespore membrane in the *meu14Δ* cells. Pictures of wild-type cells are encircled by black lines. White arrowheads (spindle), white arrows (SPB) and black arrows (forespore membrane). White scale bar, 1 μ m. Black scale bar, 0.5 μ m.

fusion protein. We found that *meu14Δ* cells were defective in microtubule elongation and organization as well as in the segregation and duplication of SPBs, and that this caused abnormal nuclear division at meiosis II (Fig. 3). Furthermore, Meu14 seems to act not only to stabilize the proper segregation of SPBs during meiosis II but also to accurately encapsulate the haploid nuclei by guiding forespore membrane formation (Fig. 5).

During meiosis II, Meu14-GFP is found first at the cytoplasmic side of the SPB (Fig. 4D) and then at the leading edge of the forespore membrane (Fig. 6A). Time-lapse microscopic analysis using a *meu14⁺-gfp* strain (Fig. 5A,B) allowed us to observe the dynamic behavior of Meu14-GFP in live cells during meiosis II. Meu14-GFP first appears as a dot at the periphery of the nucleus, where it is duplicated and then moves to either end of the nucleus to form a pair of rings. The

rings gradually increase in diameter. At the same time, the forespore membrane, which grows from the SPB, also increases. After the forespore membrane completely encloses the haploid nucleus at the end of meiosis II, the diameter of the rings gradually shrink until they appear as dots, after which they disappear. Thus, Meu14 is required specifically at meiosis II, where it seems important for several processes: (i) it guides the formation of the forespore membrane as it develops during meiosis II and sporulation, and (ii) it assists the equal partitioning of the nucleus and the temporal coordination of this event with chromosome segregation during meiosis II.

Many studies have been conducted to comprehensively identify and characterize the subcellular localization of yeast proteins involved in meiosis and mitosis (Sawin and Nurse, 1996; Ding et al., 2000). Of note is that none of these studies identified Meu14. Thus, the subcellular localization of Meu14-GFP during *S. pombe* meiosis is unique.

Loss of Meu14 may destabilize the SPB

The dynamic movement of Meu14 at meiosis II indicates that Meu14 is a novel type of molecule that regulates the architecture of cellular structures by using the SPB as one of its scaffolds. The SPB is a multilayered proteinaceous structure that is inserted into the nuclear envelope in *S. pombe* (Hirata and Tanaka, 1982; Ding et al., 1997). It is thought that the SPB buried in the nuclear membrane is stable due to astral microtubule interaction with the cell cortex. In the second meiotic nuclear division, the astral microtubules on the cytoplasmic side are exchanged with a multilayered SPB structure from which the forespore membrane, whose analogue in *S. cerevisiae* is the prospore membrane (Neiman, 1998), extends to enclose the spore nucleus. Thus, during meiosis II, astral microtubules are absent. We believe that the lack of Meu14 causes the SPB buried in the nuclear membrane to become unstable, which would explain the fact that *meu14Δ* cells display deformed and multiple SPBs that are not embedded in the nuclear envelope during meiosis II (Fig. 7C). This also explains our observation that the SPBs in *meu14Δ* cells, when observed by Spo15-GFP, a protein that regulates the onset of forespore membrane extension (Ikemoto et al., 2000), are abnormally organized or segregated. It is likely that Meu14 also plays a role in the structure of meiosis I SPB, possibly during anaphase I in preparation for meiosis II. Thus, Meu14 may already associate with the meiosis I SPBs, but it cannot be detected because Meu14-GFP at this stage is too faint to be recognized as GFP signals (Fig. 4B).

Meu14 guides the formation of the forespore membrane

Recently, Spo3 and Psyl of *S. pombe* and Don1, Ady3, and Ssp1 of *S. cerevisiae* (Knop and Strasser, 2000; Moreno-Borchart et al., 2001; Nickas and Neiman, 2002) were identified to be protein components of the forespore membrane. All have been shown to be localized at the cytoplasmic side of SPB. We used a Psyl-GFP integrated cell to trace the assembly and extension of the forespore membrane in *meu14Δ* cells that were also stained with markers for the nucleus and SPBs. We observed that the forespore membrane had an abnormally assembled leading edge that could not

extend out from the SPB and thus could not properly encircle the nucleus in most *meu14Δ* cells (Fig. 6B). We also observed that the loss of *meu14+*, as in the *spo3* mutant, caused sporulating cells to generate spore-like structures lacking nuclei (Fig. 6Bii-iv). This indicates that Spo3 and Meu14 are both required for the accurate enclosure of the spore nucleus by the forespore membrane. However, unlike Spo3, whose localization is distinct from that of Meu14 and stays in the membrane until forespore membrane development is completed, the intensity of the Meu14-GFP signal at the leading edge of the forespore membrane diminishes as the forespore membrane grows, indicating that Meu14 serves a different function to Spo3.

With regard to Don1, its subcellular localization is almost identical to that of Meu14 except that Don1 appears in the cytoplasm during meiosis I (Moreno-Borchart et al., 2001). In contrast, Meu14 appears in the cytoplasm for the first time at meiosis II (Fig. 5A). Furthermore, there is no homology in the amino acid sequences of Don1 and Meu14 and the *DON1* gene is not essential for forespore membrane formation (Moreno-Borchart et al., 2001). Thus, Meu14 is distinct from Don1 in both its structure and function. Taken together, it appears that one function of Meu14 is to guide the formation of the forespore membrane at its front edge, acting to all intents and purposes as a size-adjustable steel ring that is used to make a large soap bubble.

We thank C. Shimoda and M. Yamamoto for *S. pombe* cells and vectors, M. Yanagida for the anti-Sad1 antibody, S. Fujita for the anti-GFP antibody and K. Gull for the anti-tubulin antibody (TAT-1). In particular, we thank C. Shimoda for the gift of the *psyl1+*-gfp strain. We also thank P. Hughes for critically reading the manuscript and T. Nakamura for technical suggestions and critical discussions. This work was supported by a Grant-in-aid for Scientific Research on Priority Areas from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan, and a grant from The Uehara Memorial Foundation to H.N.

References

- Abe, H. and Shimoda, C. (2000). Autoregulated expression of *Schizosaccharomyces pombe* meiosis-specific transcription factor Mei4 and a genome-wide search for its target genes. *Genetics* **154**, 1497-1508.
- Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., McLeod, M. and Warbrick, E. (1993). *Experiments With Fission Yeast: A Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Burkhard, P., Stetefeld, J. and Strelkov, S. V. (2001). Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol.* **11**, 82-88.
- Chikashige, Y., Ding, D. Q., Funabiki, H., Haraguchi, T., Mashiko, S., Yanagida, M. and Hiraoka, M. (1994). Telomere-led premeiotic chromosome movement in fission yeast. *Science* **264**, 270-273.
- Ding, R., West, R. R., Morphew, D. M., Oakley, B. R. and McIntosh, J. R. (1997). The spindle pole body of *Schizosaccharomyces pombe* enters and leaves the nuclear envelope as the cell cycle proceeds. *Mol. Biol. Cell* **8**, 1461-1479.
- Ding, D. Q., Tomita, Y., Yamamoto, A., Chikashige, Y., Haraguchi, T. and Hiraoka, Y. (2000). Large-scale screening of intracellular protein localization in living fission yeast cells by the use of a GFP-fusion genomic DNA library. *Genes Cells* **5**, 169-190.
- Fukushima, K., Tanaka, Y., Nabeshima, K., Yoneki, T., Tougan, T., Tanaka, S. and Nojima, H. (2000). Dmc1 of *Schizosaccharomyces pombe* plays a role in meiotic recombination. *Nucleic Acids Res.* **28**, 2709-2714.
- Hagan, I. and Hyams, S. J. (1988). The use of cell division cycle mutants to investigate the control of microtubule distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* **89**, 343-357.
- Hagan, I. and Yanagida, M. (1995). The product of the spindle formation

- gene *sad1+* associates with the fission yeast spindle pole body and is essential for viability. *J. Cell Biol.* **129**, 1033-1047.
- Hirata, A. and Shimoda, C. (1994). Structural modification of spindle pole bodies during meiosis II is essential for the normal formation of ascospores in *Schizosaccharomyces pombe*: ultrastructural analysis of *spo* mutants. *Yeast* **10**, 173-183.
- Hirata, A. and Tanaka, K. (1982). Nuclear behavior during conjugation and meiosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **28**, 263-274.
- Horie, S., Watanabe, Y., Tanaka, K., Nishiwaki, S., Fujioka, H., Abe, H., Yamamoto, M. and Shimoda, C. (1998). The *Schizosaccharomyces pombe mei4+* gene encodes a meiosis-specific transcription factor containing a forkhead DNA-binding domain. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2118-2129.
- Humbel, B. M., Konomi, M., Takagi, T., Kamasawa, N., Ishijima, S. A. and Osuni, M. (2001). In situ localization of beta-glucans in the cell wall of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **18**, 433-444.
- Ikemoto, S., Nakamura, T., Kubo, M. and Shimoda, C. (2000). *S. pombe* sporulation-specific coiled-coil protein Spo15p is localized to the spindle pole body and essential for its modification. *J. Cell Sci.* **113**, 545-554.
- Knop, M. and Strasser, K. (2000). Role of the spindle pole body of yeast in mediating assembly of the prospore membrane during meiosis. *EMBO J.* **19**, 3657-3667.
- Lupas, A., van Dyke, M. and Stock, J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252**, 1162-1164.
- Maudrell, K. (1993). Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* **123**, 127-130.
- Moreno, S., Klar, A. and Nurse, P. (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* **194**, 795-823.
- Moreno-Borchart, A. C., Strasser, K., Finkbeiner, M. G., Shevchenko, A. and Knop, M. (2001). Prospore membrane formation linked to the leading edge protein (LEP) coat assembly. *EMBO J.* **20**, 6946-6957.
- Nabeshima, K., Kakiyama, Y., Hiraoka, Y. and Nojima, H. (2001). A novel meiosis-specific protein of fission yeast, Meu13p, promotes homologous pairing independently of homologous recombination. *EMBO J.* **20**, 3871-3881.
- Nakamura, T., Nakamura-Kubo, M., Hirata, A. and Shimoda, C. (2001). The *Schizosaccharomyces pombe spo3+* gene is required for assembly of the forespore membrane and genetically interacts with *psy1+*-encoding syntaxin-like protein. *Mol. Biol. Cell* **12**, 3955-3972.
- Nakase, Y., Nakamura, T., Hirata, A., Routt, S. M., Skinner, H. B., Bankaitis, V. A. and Shimoda, C. (2001). The *Schizosaccharomyces pombe spo20(+)* gene encoding a homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Sec14 plays an important role in forespore membrane formation. *Mol. Biol. Cell* **12**, 901-917.
- Neiman, A. M. (1998). Prospore membrane formation defines a developmentally regulated branch of the secretory pathway in yeast. *J. Cell Biol.* **140**, 29-37.
- Neiman, A. M., Katz, L. and Brennwald, P. J. (2000). Identification of domains required for developmentally regulated SNARE function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **155**, 1643-1655.
- Nickas, M. E. and Neiman, A. M. (2002). Ady3p links spindle pole body function to spore wall synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **160**, 1439-1450.
- Pringle, J. R., Broach, J. R. and Jones, E. W. (1997). *The Yeast Saccharomyces: Cell Cycle and Cell Biology*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
- Sawin, K. E. and Nurse, P. (1996). Identification of fission yeast nuclear markers using random polypeptide fusions with green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 15146-15151.
- Shaw, S. L., Yeh, E., Maddox, P., Salmon, E. D. and Bloom, K. (1997). Astral microtubule dynamics in yeast: a microtubule-based searching mechanism for spindle orientation and nuclear migration into the bud. *J. Cell Biol.* **139**, 985-994.
- Shimada, M., Nabeshima, K., Tougan, T. and Nojima, H. (2002). The meiotic recombination checkpoint is regulated by checkpoint *rad+* genes in fission yeast. *EMBO J.* **21**, 2807-2818.
- Sun, G. H., Hirata, A., Ohya, Y. and Anraku, Y. (1992). Mutations in yeast calmodulin cause defects in spindle pole body functions and nuclear integrity. *J. Cell Biol.* **119**, 1625-1639.
- Tanaka, K. and Hirata, A. (1982). Ascospore development in the fission yeasts *Schizosaccharomyces pombe* and *S. japonicus*. *J. Cell Sci.* **56**, 263-279.
- Tougan, T., Chiba, Y., Kakiyama, Y., Hirata, A. and Nojima, H. (2001). Meu10 is required for spore wall maturation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells* **7**, 217-231.
- Watanabe, T., Miyashita, K., Saito, T. T., Yoneki, T., Kakiyama, Y., Nabeshima, K., Kishi, Y. A., Shimoda, C. and Nojima, H. (2001). Comprehensive isolation of meiosis specific genes identifies many unusual non-coding transcripts in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2327-2337.
- Wilkinson, C. R., Ferrell, K., Penney, M., Wallace, M., Dubiel, W. and Gordon, C. (2000). Analysis of a gene encoding Rpn10 of the fission yeast proteasome reveals that the polyubiquitin-binding site of this subunit is essential when Rpn12/Mts3 activity is compromised. *J. Biol. Chem.* **275**, 15182-15192.
- Woods, A., Sherwin, T., Sasse, R., MacRae, T. H., Baines, A. J. and Gull, K. (1989). Definition of individual components within the cytoskeleton of *Trypanosoma brucei* by a library of monoclonal antibodies. *J. Cell Sci.* **93**, 491-500.
- Yamamoto, M., Imai, Y. and Watanabe, Y. (1997). Mating and sporulation in *Schizosaccharomyces pombe* (ed. J. R. Pringle, J. B. Broach and E. W. Jones), pp. 1037-1106. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Yoo, B. Y., Calleja, G. B. and Johnson, B. F. (1973). Ultrastructural changes of the fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) during ascospore formation. *Arch. Mikrobiol.* **91**, 1-10.

厚生労働科学研究費補助金

—厚生労働省免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業—

関節リウマチ・骨粗鬆症患者の疫学、病態解明と
治療法開発に関する研究

平成14年度～平成16年度 総合研究報告書
(3/3冊)

主任研究者 越智隆弘

平成17(2005)年4月

目 次

I. 平成16年度研究報告書

(1)主任研究者 総括研究報告書	5
(2)分担研究報告書	15
I) RA 患者の骨粗鬆症の臨床疫学的研究	
1.関節リウマチにおける骨粗鬆症に関する研究 大阪市立大学大学院医学研究科 教授 西沢良記	
2.関節リウマチ・骨粗鬆症患者の疫学、病態解明と治療法開発に関する研究 大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学(整形外科) 教授 吉川秀樹	
3.関節リウマチ患者の骨粗鬆症評価における大腿骨骨密度測定的重要性に関する研究 国立病院機構相模原病院 リウマチ科 医師 中山久徳	
II) RA 骨吸収亢進病態解明研究	
1.ヒト破骨細胞形成に関する研究 松本歯科大学・総合歯科医学研究所 教授 高橋直之	
2.ナース細胞機能に関わる分子の探索： ナース細胞で発現する新規遺伝子#4-14(SRCL)の機能解析に関する研究 国立病院機構相模原病院臨床研究センター 室長 鈴木隆二	
3.関節リウマチの破骨細胞活性化亢進 (とくに細胞融合による多核巨細胞化)の分子機構の解明に関する研究 国立病院機構大阪南医療センター 臨床研究部長 佐伯行彦	
4.可溶性 RANKL 産生に関与する分子の網羅的検索に関する研究 東京大学医学部附属病院整形外科 講師 田中栄	
5.骨髄脂肪蓄積細胞および分泌因子からの病態解明に関する研究 大阪大学大学院医学系研究科 教授・生命機能研究科 教授 下村伊一郎	
6.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 帝京大学医学部内科 助教授 広畑俊成	
III) RA の病因解明研究	
1.Epstein-Barr ウィルスの関節リウマチ骨髄での病的意義 日本大学医学部内科学講座血液膠原病部門 武井正美	
2.関節リウマチ・骨粗鬆症患者の疫学、病態解明と治療法開発に関する研究 大阪大学微生物病研究所 教授 野島博	
(3)研究成果の刊行に関する一覧表	59
(4)研究成果の刊行物	67

I 平成16年度研究報告書

(1) 主任研究者 総括研究報告書

(関節リウマチ・骨粗鬆症患者の疫学、病態解明と治療法開発に関する研究)
(平成16年度)

主任研究者 越智 隆弘

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

関節リウマチ・骨粗鬆症患者の疫学、病態解明と治療法開発に関する研究

主任研究者 越智 隆弘 独立行政法人国立病院機構相模原病院・病院長

研究要旨：平成 16 年度の研究成果をまとめる。本研究は、RA 患者の臨床疫学、病態解明研究、病因解明研究を骨・関節破壊の角度から進めたものである。臨床疫学研究は骨粗鬆症という視点から、病態解明、病因解明研究は、従来からの厚生科学研究の成果をあげてきた骨髄病態解明の視点に重点をおいた。I) 臨床疫学研究； ①RA 患者には、一般高齢者に比べて、有意に高頻度、高度に骨粗鬆症と骨折が起きる。②RA 患者の骨密度は腰椎のみでなく、股関節や手首など傍関節部の評価が必要である。③RA 早期には手関節部の海綿骨に、炎症指数と相関する骨密度減少が認められ、適切な評価部位である。II) RA 病態解明研究；1) RA 特異的破骨細胞形成の病態研究；異常活性化した単球が、ナース細胞機能を持つ線維芽細胞様細胞で構成される病巣によって維持、活性化され、骨破壊を導く病態を解明した。①ナース細胞特異的遺伝子解明、②CD14(+)細胞から前破骨細胞分化に到る過程解明、③破骨細胞特異的遺伝子解明を進めた。2) 既知の破骨細胞の RA 病態解明研究；①ヒト破骨細胞系樹立と PGE2、PTH などの効果解明。②RANKL shedding メカニズム解明、③破骨細胞 3) 骨髄内脂肪組織の骨破壊への影響、4) 病巣への血管侵入機序解明研究、III) RA 病因解明研究；1) RA 患者骨髄液の選択的トランスクリプトーム解析により得た、RA 骨髄特異的遺伝子と、ヒト以外の（感染病原体の可能性のある）遺伝子を対象にした病因、病態解明研究。2) EBV の角度からの再検討。

分担研究者：

吉川 秀樹	大阪大学大学院医学系研究科 教授
野島 博	大阪大学微生物病研究所難治疾患バイオ分析部門 教授
下村 伊一郎	大阪大学大学院生命機能研究科 教授
高橋 直之	松本歯科大学総合歯科医学研究所 教授
広畑 俊成	帝京大学医学部内科学膠原病リウマチ科 助教授
田中 栄	東京大学医学部附属病院整形外科・脊椎外科 助手
鈴木 隆二	独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センター 診断・治療研究室 室長
武井 正美	日本大学医学部内科学講座内科一部門 助手
西沢 良記	大阪市立大学大学院医学系研究科 教授
佐伯 行彦	独立行政法人国立病院機構大阪南医療センター 臨床研究部 部長

研究協力者：

中山 久徳	独立行政法人国立病院機構相模原病院リウマチ内科医員
前田 朋子	塩野義製薬株式会社創薬研究所 主任研究員
行岡 正雄	行岡病院 病院長
島岡 康則	市立池田病院整形外科 部長
中村 宣雄	協和会病院整形外科 部長
小田 剛紀	独立行政法人国立病院機構大阪南医療センター
桃原 茂樹	東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター 講師
安藤 貴信	独立行政法人国立病院機構盛岡病院整形外科 部長

A. 研究目的

社会の高齢化を迎え、加齢に伴う骨粗鬆症、骨折、続発する機能障害が増し、社会的小および医療経済的問題も大きく、その予防や治療に国家的対応が迫られている。その中でも、従来免疫異常の克服を治療目標にされてきた関節リウマチ(RA)患者には、非RA対照のいわゆる原発性骨粗鬆症に比して更に高頻度、高度な骨粗鬆症と引き続き起きる骨折が、関節機能障害に併せ発症していることが認識され始め、大きな社会問題として注目され始めた。そのような背景からRAの病因・病態解明、そして治療法開発研究は急務となっている。従来、滑膜における免疫異常機序解明を目標に世界中で諸研究が進められながら未解明の現状に対して、新たに、重度な骨粗鬆症という特徴的な臨床症状を引き起こす、骨髄を重要な場とした組織破壊の病因・病態解明という新たな突破口が浮き彫りにされてきた。この問題解明が本研究の重要な主目的である。本研究では、研究目的を以下の3項目の柱に分けて、相互に関連しながら遂行してきた。I) RA患者の骨粗鬆症の臨床疫学的研究、II) RA患者の骨吸収亢進病態解明研究、III) RAの病因解明研究。

B. 方法

臨床研究から分子生物学的研究まで広範な分担研究者および研究協力者連携の下、調査研究に関して必要なインフォームドコンセントを患者あるいは試料提供者から得て、以下の方法で研究を進めた。

I) 関節リウマチ患者に発症する骨粗鬆症の臨床疫学的研究

分担研究者、研究協力者の多施設において、RA患者と対照群との比較研究を行った。①多数患者の疫学的調査は国立相模原病院を中心に行われ、ビスフォスフォネート(BP)未投与の女性RA患者609例(平均 60.6 ± 10.1 歳)を対象に、非RA高齢者、非RA膠原病患者などとの比較研究を行った。これに関しては、両群の年齢を補正してZ scoreを用いて比較した。②RA自然経過の病型別検討は

大阪大学附属病院で長期(平均 $19,1 \pm 6,6$ 年)経過観察された50症例を対象にした。③ステロイド投与の影響については多施設でも検討しているが、大阪市立大学でステロイド長期(平均 $10,2\text{mg/日} \times 7,7$ 年)投与症例と閉経後女性(294名)の腰椎椎体骨折の比較研究が行われた。骨密度(BMD)は腰椎、大腿骨頸部、大腿骨近位部あるいは第2中手骨骨などを対象に、DXA法、CXD法、あるいはpQCT法にて測定した。踵骨音響的骨評価(OSI)はAOS-100で測定した。骨代謝マーカーとしてはBAPと尿NTXなどを、RA活動性の指標としてはCRP、ESRおよびRFを測定した。RAが重症病型か軽症かは関節破壊の広がりによって評価した。

II) RA骨粗鬆症病態解明研究

患者試料; RA患者の手術前に十分なインフォームドコンセントと必要な同意文書を得た患者から、末梢血、あるいは手術目的の麻酔下で骨髄血を採取した。血液から赤血球分画を除いた後、各細胞を採取した。ナース細胞樹立と遺伝子解析; 骨髄血の付着性細胞を採取して単クローン化し、特異なナース細胞機能をもった線維芽細胞様細胞を選別した。鈴木分担研究者がこれにあたり、必要とする分担研究者に供給した。遺伝子解析にあたっては、RA-NLCと非RA-NLC細胞との間でcDNA subtractionを行い約400個のクローンにつき解析を行い、NLCで発現しているスカベンジャーレセプター様遺伝子(#4-14)を同定して解析を進めた。

ヒト末梢血CD14陽性細胞; ヒト末梢血よりFicoll-Paque遠心法で単核細胞を分取した。更に、CD14抗体ビーズとMACS Separatorを使い、CD14陽性細胞を分取した。

ヒト破骨細胞の樹立; ①ナース細胞との共培養を使った系; ヒト末梢血CD14陽性細胞をナース細胞と4週間、共培養するとTRAP陽性単核細胞に分化する。これにconditioned mediumを加えて培養すると多核で骨吸収能をもつ巨細胞(破骨細胞様細胞)が形成される。②ナース細胞との共培養を使わない系; CD14陽性細胞をマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)やRANKLの存在下あるいは非存在下で7日間培養した。また、各種の造血因子による破骨細胞形成を観察した。

破骨細胞の検討； 破骨細胞のマーカーと考えられる TRAP 染色及びビトロネクチンレセプター (CD61) 抗体を用いた免疫染色により破骨細胞を検出した。また、CD14 陽性細胞を象牙切片上に撒き、M-CSF や RANKL の存在下で培養した後、象牙切片上の吸収窩を観察した。また、TGF β 、PGE $_2$ 、p38MAPK の特異的阻害剤である SB203508 を添加して、ヒト破骨細胞形成を解析した。

骨髄脂肪蓄積細胞分泌因子採取； RA および OA 患者の手術時採取試料より、脂肪蓄積細胞分画を採取して total RNA を抽出し、RT-PCR 法にて約 30 種の遺伝子を採取して解析した。これらの遺伝子から発現される骨髄脂肪蓄積細胞分泌因子のうち破骨細胞抑制活性を検討した。

Ⅲ) RA の病因解明研究；

骨髄細胞研究あるいはウイルス学的研究に関しては昨年報告と同様の細胞学的解析方法で行われた。

患者の骨髄血の選択的トランスクリプトームからの解析研究が主体であるが、健康人の血液細胞、正常繊維芽細胞、RA 患者 (約 80 人分) および OA 患者 (約 70 人分) の血液・骨髄液を個別に採取し、全 mRNA を抽出・精製して患者由来の cDNA ライブラリーを作成する。次いで段階的サブトラクション法を用い、健康人の血液細胞 cDNA ライブラリーから正常繊維芽細胞由来の mRNA を差し引くことにより、血液細胞特異的に転写誘導される遺伝子群 (PREB: **P**redominantly **e**xpressed in **b**lood **c**ells) を包括的に単離する。同様にして、RA 患者骨髄液 cDNA ライブラリーから OA 患者骨髄液細胞由来の mRNA を差し引くことにより、RA 患者骨髄液において特異的に転写誘導される遺伝子群

(AURA: **A**ugmented transcription in **R**A patients) を包括的に単離した。この中から RA 特異的な遺伝子解明と、人以外 (ウイルスの) の遺伝子も採取して発病との関連を解析する。

C. 結果

I) 関節リウマチ患者に発症する骨粗鬆症の臨床疫学的研究

RA 患者には非 RA 高齢者に比べ、高頻度、高度な骨粗鬆症が認められ、高齢者

の骨密度減少の特徴部位である腰椎より、むしろ、大腿骨頸部や手首に顕著な骨密度減少が認められるのが特徴であることを明示した。

- ① 非 RA 高齢者骨密度、非 RA 膠原病患者骨密度との Z score の比較研究；西沢分担研究者は RA 患者に発症する骨粗鬆症は pQCT 法により、手首では早期から明らかであり、海綿骨の骨密度変化は RA の炎症指標と相関していることを明らかにした。そして全国津々浦々で測定可能な方法として CXD 法での評価を検討した。CXD 法による第二中手骨での骨密度は、同部の X 線所見変化が現れる前に明瞭な低下があり、有効な指標になることが明示された。中山研究協力者は RA 患者は非 RA 高齢者に比べ、腰椎 (-0.2+1.0/-0.1+1) では有意差なしであったが、大腿骨頸部 (-0.5+1.3/0.0+1.0)、大腿骨近位部全体 (-0.6+1.2/0.0+1.1) であり、RA 患者は非 RA 高齢者に比べ高度の有意差 ($p < 0.001$) で低値を示した。第 2 中手骨の骨密度も有意に低値であった ($p < 0.01$)。RA 患者は非 RA 対照に比べ、骨代謝マーカー (BAP: 29.7/23.1; $p < 0.01$)、尿 NTX (67.2/50.4; $p < 0.01$) とも有意に高値であった。
- ② RA の重症度 (病型) との関連；吉川分担研究者は RA 患者の骨粗鬆症は重症病型に、また腰椎椎体より関節近傍の骨端部に特徴的に認められることが示された。一定期間 (7.7 ヶ月) での骨密度減少は、腰椎、大腿骨では有意差は見られなかったが、手関節部では有意の骨密度減少が認められた。
- ③ 副腎皮質ホルモン剤投与患者；副腎皮質ホルモン剤投与 RA 患者では国立相模原病院、阪大病院の調査で、従来の報告同様の骨密度低値傾向が認められた。しかし、ステロイド投与量の多い膠原病患者より非ステロイド投与 RA 患者のほうが骨密度が低いこと、更に大阪市立大学 (西沢分担研究者) の調査結果では、RA でステロイド長期投与患者では非投与患者に比べて椎体骨折の頻度に優位差はなく、ステロイド投与症例の骨密度低下は、薬物投与の要因より、疾患あるいは RA 重症度に関連する要因である可能性があり、引き続きの検討が必要と考えられた。

II) RA 骨粗鬆症病態解明研究

RA の骨髓には RA 病巣を形成する線維芽細胞様細胞（ナース細胞）と、ナース細胞に支持される異常活性化した血球系細胞とから成る恒常的な病巣が認められること。軽症病型 RA ではリンパ球などの免疫系細胞の活性化が顕著であるが、重症病型 RA では更に破骨細胞や骨髓球系細胞の異常活性化も併せ認められることを報告してきた。そして平成 14 年度までの当研究班報告で、特に顕著な骨粗鬆症を示す重症病型 RA では破骨細胞系の異常亢進が認められ、その破骨細胞は従来知られていたものと異なり、RANKL 非依存性細胞であり、腸骨骨髓と傍関節部骨端部骨髓に分化・増殖が認められることを報告していた。

平成 14 年度に始まった本研究班では、RA 患者に特異的に認められる線維芽細胞様細胞（ナース細胞）、破骨細胞分化誘導の分子生物学的機序解明、破骨細胞の特性解明を進めるとともに、この破骨細胞系とマウスとの異同等の詳細解析に的を絞った。また、田中分担研究者はナース細胞制御を遺伝子導入にて試みている。本研究の生体内の場である骨髓に見られる脂肪組織が骨吸収機序に及ぼす影響も研究の視野に入れてきた。この目的で、さらに DNA マイクロアレイ解析法を導入し、骨代謝に関わる新たな分泌因子の同定を進めている。脂肪細胞で発現の見られる既知の分泌因子、特に骨形成にかかわる分泌因子の探索をおこなってきた。

①ナース細胞の分子生物学的解析；RA 患者病巣（骨髓、滑膜）の主要構成細胞である線維芽細胞様細胞（ナース細胞；RA-NLC）の主要機能である細胞の抱き込み(pseudoemperipolesis)に引き続く諸種の血球系細胞の反応などは既に報告してきた。RA の慢性病巣形成のキーを持つ細胞としての RA-NLC 機能も既に報告してきた。RA 特有のこの細胞を標的に治療法開発を進める一歩として、RA-NLC の特異抗原を探した。RA-NLC と非 RA-NLC 細胞との間での cDNA subtraction による約 400 個のクローンから選んだスカベンジャーレセプター様遺伝子(#4-14)を同定して解析を進めた。#4-14/SRCL は 472 アミノ酸残基から成

り、スカベンジャーレセプター(SRA)とはアミノ酸レベルで 27%相同であった。NLC 以外にはヒト血管内皮細胞で発現していた。発現する生理学的活性の解析を進めている。

②破骨細胞の研究；

(i) RA 患者特異的な破骨細胞分化について；

(A) 前破骨細胞への分化；RA 患者骨髓の未分化細胞から特異的な破骨細胞分化を試みた。RA 患者骨髓単核球のうち約 80%の CD14(+) 細胞が存在し、その半数が CD11a(-)であり、GM-CSF 刺激により TRAP(+)多核巨細胞になる。CD14(-)細胞のうち CD64(+)細胞は RA-NLC との共培養により、約 4 週間で、その 90%近くが CD14(+)CD11a(-)TRAP(+)の多核巨細胞になった。

(B) RA 特異的破骨細胞分化；CD14 陽性単核球様細胞を 4 週間、ナース細胞と共培養して得た TRAP 陽性単核細胞は IL-3、IL-5、IL-7、GM-CSF および RANKL・M-CSF それぞれの刺激により、TRAP、carbonic anhydrase II、カルシトニンレセプター等を発現する多核巨細胞へと分化した。また、この多核巨細胞はウシ骨スライスや象牙切片上に吸収窩を形成したことより、骨吸収能を持つ成熟破骨細胞であり、CD14 陽性単核球様細胞は前駆破骨細胞であることが示唆された。これら前駆破骨細胞及び成熟破骨細胞の性状解析と特異的に発現する遺伝子の解析を differential display 法により行ったところ、既知・新規遺伝子合わせておよそ 20 の成熟破骨細胞特異的遺伝子、およそ 15 の前駆破骨細胞特異的遺伝子を見出した。このうち、新規であった 4 回膜貫通型の膜タンパク 7-44 に関してさらに解析を行ったところ、7-44 は成熟破骨細胞にのみ特異的に発現し、末梢血単球や前駆破骨細胞には発現していないこと、他組織にも全く発現が認められないことが確認されたため、7-44 のコードする膜タンパクに対しポリクローナル抗体を作成した。この抗体はマウスおよびヒトの破骨細胞を特異的に認識することがウェスタンブロットティングおよび免疫組織染色で確認された。これをターゲットに RA による骨吸収抑制治療薬の開発に向かう。

(ii) 非 RA 対照の破骨細胞について；

(A)ヒト破骨細胞形成；CD14 陽性細胞は、M-CSF と RANKL の存在下で TRAP 陽性

かつビトロネクチンレセプター陽性の単核並びに多核細胞に分化した。この細胞誘導を TGF β は促進し、SB203508 は阻害した。

(B) TNF α と M-CSF の添加により、ヒト破骨細胞は誘導された。

(C) PGE $_2$ は RANKL と M-CSF によるマウス破骨細胞形成を促進するが、ヒト破骨細胞の誘導を濃度依存的に抑制した。マウスとヒトの破骨細胞の反応が異なることを示す一つの現象である。

③骨髄脂肪蓄積細胞および分泌因子の骨吸収機序に対する効果；RA 患者の脂肪蓄積細胞分画に発現される骨髄脂肪蓄積細胞分泌因子を採取し検索を進め、その一つが、RA 特有の破骨細胞形成を完全に阻害した。骨髄脂肪組織の病態機序解明を進めるとともに、創薬への検討を進めている。

④病巣への血管新生；広畑分担研究員は、RA 患者骨髄 CD34+ 細胞から、CD14+/HLA-DR 陽性細胞への分化、更に CD31+細胞(血管内皮前駆細胞)、vWF+細胞(血管内皮細胞)への分化も有意に亢進していることから、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、当初からの仮説通りに骨髄 CD34+細胞の異常が深く関与することを示した。

Ⅲ) RA の病因解明研究；

①関節リウマチ特異的遺伝子の解明

(i) RA-1； RA 患者の約 80%の患者が非 RA 対照の約 30 倍の高値の発現量を示した。RA の重症度と関連しているようだ。

(ii) RA-5； RA 患者の約 60%の患者が非 RA 対照の約 20 倍の高値の発現量を示した。RA の重症度と関連しているようだ。

(iii) RA-9； RA 患者の約 60%の患者が非 RA 対照の約 20 倍の高値の発現量を示した。

②膠原病遺伝子の解明

RA-8； RA 以外の膠原病にも発現している遺伝子。

③ヒト以外の遺伝子の発現

Human genome 煮登録されていない遺伝子が十数種類単利されているが、その一つは RA 骨髄液特異的に発現されており、病因微生物の可能性もあり、今後と

も検索を続ける。

④EBV と RA；

武井分担研究者は RA 骨髄中には EBV に対する CTL 活性が増加しており、EBV への感染制御が活発に行われていることを見出した。

D. 考察

I) 関節リウマチ患者に発症する骨粗鬆症の臨床疫学的研究； RA 患者には加齢に伴う原発性骨粗鬆症による骨粗鬆症より明らかに顕著な骨粗鬆症が認められた。RA 特徴的な骨粗鬆症部位は股関節、手関節などの関節近傍であり、一方、腰椎は非 RA 対照との有意差が明瞭でない。従って、RA 患者の骨密度評価は、加齢により骨密度が低下する腰椎骨と、RA 特徴的な骨粗鬆症部位として大腿骨頸部あるいは近位部、そして手首などの骨密度測定が必要となる。RA 患者特有の骨密度低下は手関節海綿骨に先ず有意になり、炎症反応値と相関する。薬物治療の効果は手関節海綿骨で判別しやすいと考えられる。ステロイド投与は骨密度減少に影響を及ぼすことは明瞭と考えられるが、RA 患者疾患特有の骨吸収レベルに対して、ステロイド投与がどの程度の影響を及ぼしているかの判断は困難である。

II) RA 骨粗鬆症病態解明研究； RA 病態は異常活性化した血球系細胞が、やはり異常活性化した線維芽細胞様細胞(チーヌ細胞)による病巣で維持され慢性的な炎症と組織破壊が引き起こされるものであることは前期厚生科学研究プロジェクトで明らかにしてきたが、免疫亢進機序と組織破壊機序を説明できる普遍的な病態と言える様だ。血球細胞の中でも破骨細胞活性化による骨粗鬆症は、その意味で定型的な RA 症状といえるようだ。RA 患者に特徴的に見出された破骨細胞様細胞は従来、マウスなどの系で確立された常識である「RANKL 依存性」ではなかったことから破骨細胞は一様なものでなく、正常代謝と RA、またマウスやラットの実験系とヒトでは異なり得ることが示された。RA の重要病態である骨粗鬆症あるいは骨関節破壊を選択的に抑える治療法へも結び付く研究として、今後、精力的に進める。

III) RA の病因解明研究；骨髄におけるウイルス学的研究も視野に置きながら進めているが、本年度は患者の骨髄血の選択的ト

ランスクリプトームからの解析研究に重点をおいた。RA 骨髄に見出される遺伝子群を包括的に解明することにより、原因遺伝子を捕らえることができると考えている。平成16年以後の病因研究に結び付けてゆく方向で、詳細な研究を続けたい。

E. 結論

1、RA 患者には疾患特異的に骨粗鬆症が広く認められる。骨量の減少は、原発性骨粗鬆症と異なって、腰椎より、むしろ大腿骨近位部に特徴的で診断時に留意が必要である。骨折頻度も高く、今後のRA 対策として重要な事項が明示された。

2、RA 患者の骨脆弱性を引き起こすのは骨髄病態によると考えられる。いわゆるマース細胞と破骨細胞の分子病態機序解明が新たに推進されたが、創薬への更なる研究が急がれる。

3、RA 病態、あるいはRA そのものを引き起こしている可能性のある候補遺伝子が抽出された。原因遺伝子特定が緊急課題となった。

(2) 分担研究者報告書

(平成16年度)

I) RA 患者の骨粗鬆症の臨床疫学的研究

関節リウマチにおける骨粗鬆症に関する研究

分担研究者 西沢良記 所属機関名・職名 大阪市立大学大学院医学研究科・教授

研究要旨

関節リウマチ(RA)による続発性骨粗鬆症は発症部位により全身性と局所性に大別されその中でも傍関節性骨粗鬆症が特徴的とされる。昨年度は早期 RA に特徴的な傍関節性骨粗鬆症について報告したが、今回は、進行期 RA 患者において CXD 法を用いて橈骨遠位端及び中手骨の骨密度を検討した。橈骨遠位端ではレ線ステージの進行が見られない時期から著明に骨密度の低下が見られたが、中手骨ではレ線ステージの進行度と骨密度は負の相関を示し、その低下速度は炎症マーカーと相関を示した。疾患活動性のコントロールが安定した(CRP<1.0 mg/dl) RA 患者においては日常生活動作レベルを反映する HAQ score は大腿骨頸部骨密度と有意な負の相関を示したが、腰椎とは相関は見られなかった。関節破壊の進行度 Larsen damage score と骨密度との相関は見られなかった。早期 RA での手関節近傍の橈骨遠位端の海綿骨量の低下では関節炎に伴う局所での骨吸収性サイトカインの増加がその主たる原因と考えられたが、機械的刺激を受ける中手骨、大腿骨頸部、踵骨の骨密度低下は疾患活動性と関節障害に伴う身体活動性の低下が主因と考えられた。

A. 研究目的

関節リウマチ(RA)は続発性骨粗鬆症の主たる原因疾患の一つである。発症部位により全身性と局所性に大別され後者の中で傍関節性骨粗鬆症が特徴的とされている。これらの発現時期、発症機序は異なると考えられる。従って RA 患者の病期、活動性および測定部位をかえることにより詳細な病態の検討が可能であると考えられる。昨年度は、早期 RA 患者において、すでに橈骨遠位端の海綿骨骨密度が他の部位に先んじて著明に減少しており炎症マーカーと負の相関をしめし、炎症性骨吸収因子の影響をうけていることを明らかにした。今回は、活動期の RA においてレ線像の進行度と骨密度の関係を CXD 法を用いて検討した。さらに、疾患活動性のコントロールが安定した症例において各部位での骨密度と身体活動性の関係を検討した。以上より、各部位での骨粗鬆症発症時期やその主たる発症機序の特徴について検討した。

B. 研究方法

(1) 外来通院中の疾患活動性の認めら

れる女性 RA 患者 62 例において帝人社製ボナライザーII を用い、両手第二中手骨骨密度(m-BMD)および橈骨遠位端骨密度(r-BMD)を測定し、握力、X 線ステージとの相関を検討した。さらに外来通院中の女性 RA 患者、50 例、平均年齢、56.6 ± 13 才(18 - 72)において、m-BMD を測定し、その年間減少率と ESR, CRP, 血清 AL-P 値, 尿中カルシウム・クレアチニン比(U-Ca/U-Cre)などの疾患活動性および骨代謝パラメータおよび ADL(日本リウマチ学会薬効判定委員会の評価表を使用)、握力などの上肢機能の指標との相関を検討した。

(2) 外来通院中の炎症コントロール良好(CRP<1.0mg/dl)な女性リウマチ患者41例(年齢57.2 ± 10.7歳)において腰椎(L-BMD)、橈骨遠位1/3(R1/3-BMD)及び大腿骨頸部(N-BMD)をQDR-4500にて測定し関節障害度の指標であるLarsen's damage scoreと身体活動性の指標であるHAQ scoreとの相関を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は大阪市立大学附属病院の倫理委員会に諮問し承認を受けた。本研究についての目的、意義、方法、予測されうる有用