

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

分担研究者 田中 栄

所属機関名・職名 東京大学医学部附属病院整形外科 講師

研究要旨 破骨細胞分化促進因子である RANKL は骨芽細胞表面に発現し、破骨細胞前駆細胞表面に発現した RANK に結合することにより破骨細胞の分化およびその機能発現に促進的に働く。RANKL には膜結合型と可溶型があり、膜結合型 RANKL が膜近傍の stalk region で切断されることにより可溶型 RANKL が生じると考えられている。しかしながら可溶型 RANKL 産生の意義やその分子メカニズムは明らかになっていない。われわれは RANKL 可溶活性を持つ分子のスクリーニング系を確立し、Ras-GAP(GTPase-activating protein)として同定された CAPRI (Ca²⁺-promoted Ras inactivator)のスプライズバリエントを RANKL shedding を誘導する分子として同定した。

A. 研究目的

関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) における骨破壊には破骨細胞による骨吸収が重要な役割を果たしている。破骨細胞は血球系の前駆細胞から分化する多核巨細胞であるが、その分化・活性化には receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) を介するメカニズムと介さないメカニズムの両方が関与することが知られている。RANKL は tumor necrosis factor (TNF) スーパーファミリーに所属する膜結合性サイトカインであり、破骨細胞前駆細胞に発現する受容体 RANK と結合することによって破骨細胞の分化・活性化を促進する。RANKL は膜結合型サイトカインとして発見されたが、その後の検討により、膜結合型 RANKL が膜近傍の stalk region で切断されることにより可溶型 RANKL が生じることが明らかになった。しかしながら可溶型 RANKL 産生の意義やその分子メカニズムはいまだに明らかになっていない。本研究の目的は RANKL の可溶化メカニズムを明らかにし、生理的・病的意義を明らかにするとともにその制御法を開発することである。

B. 研究方法

1) RANKL shedding assay の確立
RANKL は膜近傍の stalk region で切断され、可溶型 RANKL が産生される。本アッセイ系の特色は、細胞内ドメインから stalk region までを含む RANKL と熱安定性

SEAP (secreted alkaline phosphatase) との融合蛋白の発現ベクターを構築し、RANKL の shedding 活性を細胞上清への SEAP の放出という形で捕らえ、その上清中のアルカリフォスファターゼ活性を測定することで shedding 活性を定量するという点である。このアッセイ系を用いることにより、簡便、かつ安価に shedding 活性をもつクローンをスクリーニングすることが可能となる (図1)。

まず生後1日齢のマウス頭蓋骨より骨芽細胞を採取。RNA を抽出し、RT-PCR 法により RANKL をクローニングする。熱安定性 SEAP (secreted alkaline phosphatase) は clontech 社の発現ベクターよりサブクローニングする。pcDNA3.1-V5His vector にこの2つの DNA フラグメントをサブクローニングし、細胞内ドメインから stalk region までを含む RANKL と SEAP との融合蛋白を発現するベクター pcDNA3.1-V5His-RANKL-SEAP (RANKL-SEAP ベクター) を作成する (図1)。次にアッセイ系の有効性を過去の報告から RANKL shedding 活性を有することが知られているマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-14 の発現ベクターを用いて確認する。RANKL-SEAP ベクターと MMP-14 発現ベクターを同時に 293T 細胞にトランスフェクトする。トランスフェクト 72 時間後に培養上清を回収し、pNPP を基質として 65°C、90 分のインキュベーション後 405nm の吸光度を測定する。RANKL-SEAP の切断が stalk region で生じると、上清中のアルカリフォスファターゼ活性が

上昇する。

2) ST2cDNA ライブラリーのスクリーニング

まず大腸菌(DH5 α)に ST2cDNA ライブラリーをトランスフォーメーションした。菌液をアンピシリンプレートに撒き、タイターをチェック、100 コロニーに相当する量の菌液を24well アンピシリンプレートに撒き、サブプール分けを行う。得られたコロニーを培地に溶解し、ミニプレップ法にてプラスミドを抽出する。合計で 1000 個のサブプールを用意し、10 万クローンのスクリーニングを行った。作成した RANKL-SEAP 発現ベクターと ST2cDNA ライブラリーのサブプールを96well プレートに撒いた 293T 細胞に Fugene6(Roche 社)を用いて同時にトランスフェクションし、72 時間後に上清を回収し、pNPP を基質として 65°C、90 分のインキュベーション後 405nm の吸光度を測定した。RANKL の切断が生じたポジティブクローンでは、RANKL-SEAP fusion protein が細胞膜から培養上清中へと遊離し、アルカリフォスファターゼ活性が上昇する(図1参照)。ポジティブプールは初回のサブプール分けと同様の手順で10コロニーずつのサブプールに分けた。同様にしてポジティブプールを選び、最終的にシングルクローンを得た。得られたシングルクローンはライブラリーのプラスミドベクターに設定したプライマーを用いてサイクルシーケンスを行う(Qiagen 社、ABIprism 310 genetic analyzer 使用)。得られた塩基配列はインターネットを利用して(NCBI blast など)類似の配列を検索する。

3) 得られたクローンの機能解析

ポジティブクローンについて、以下のような手順で解析を行った。①得られたクローンが全長 cDNA ではない場合には、その全長をクローニングし、全長 cDNA の RANKL shedding 活性を上記アッセイ系を用いて確認。②得られた遺伝子を全長の RANKL と共発現し、実際に RANKL shedding 活性を有することを、ELISA による培養上清中の可溶性 RANKL 測定によって確認。③得られた遺伝子が RANKL shedding を誘導するメカニズムを、細胞内シグナル伝達という観点から検討した。

(倫理面への配慮)

本研究はヒトサンプルを用いるものではないが、候補遺伝子が得られた場合、そのヒト細胞での作用を確認する必要がある。その

際、個人情報、その外部への持ち出しを厳重に禁止し、遺伝子解析に使用する検体、試料はコード化し匿名とする。また、生命倫理に関してはこの研究の趣旨を充分説明し提供者の自由意思によるインフォームド・コンセントを取得するものとする。

C. 研究結果

先にも述べたように良質な発現ライブラリーを使用することが本研究のカギを握ると考えられる。われわれが ST2cDNA ライブラリー(プラスミドライブラリー)を使用した理由は、①過去の報告から ST2 細胞は大量の可溶性 RANKL を産生することが明らかである、②本研究で供与を受ける ST2 ライブラリーは full length RANKL をクローニングしたものであり、質の保証がある、という 2 点である。スクリーニングに用いる細胞として 293T 細胞を用いるのはトランスフェクションが容易であり、ベースの SEAP 活性が見られないためである。計10万クローンのスクリーニングによって異なる8つのポジティブクローンが得られた。そのひとつは Ras-GAP(GTPase-activating protein)として同定された CAPRI (Ca²⁺-promoted Ras inactivator)のスプライズバリエーションであった。CAPRI は細胞内 Ca²⁺依存性に Ras の活性を抑制する分子であるが、われわれが同定したバリエーション(delta CAPRI)は GAP 活性を欠損しており、ドミナントネガティブ的に作用すると考えられる。Delta CAPRI を発現する細胞では ERK 活性化が認められること、活性型の Ras 遺伝子発現により RANKL shedding が亢進することから、delta CAPRI は Ras の活性化により、RANKL shedding を誘導する可能性が示唆された。

D. 考察

TNF- α は膜結合型サイトカインとして産生され、TACE(TNF- α converting enzyme)などの shedding enzymeによって可溶性となって血中へと放出されることにより全身的な影響をおよぼすと考えられている。破骨細胞分化因子として同定された RANKL 可溶性の意義は未だに不明であるが、TNF- α と同様に可溶性 RANKL が血中に放出されることによって、局所的な骨吸収亢進を全身へと波及させる可能性がある。本研究でわれわれは細胞内シグナル分子である CAPRI の splicing variant が RANKL の shedding を亢進することを明らかにした。今後 RANKL shedding に直接関与する shedding enzyme を同定することによ

って、全身的な骨吸収亢進のメカニズムが明らかになることが期待される。

E. 結論

新しいスクリーニング法を用いて RANKL shedding 活性を持つ遺伝子 delta CAPRI を同定した。Delta CAPRI は細胞内の Ras-ERK 系を活性化することによって作用すると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

英文原著

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Miyazaki T, Sanjay A, Neff L, Tanaka S, Horne WC, Baron R. Src kinase activity is essential for osteoclast function. *J Biol Chem*, 2004, 279, 17660-6.
- 4) Setoguchi K, Misaki Y, Kawahata K, Shimada K, Juji T, Tanaka S, Oda H, Shukunami C, Nishizaki Y, Hiraki Y, Yamamoto K. Chondromodulin-I, a cartilage-derived angiogenesis inhibitory factor, suppresses T cell response; an implication of a therapeutic potential for the treatment of arthritis. *Arthritis Rheum* 2004, 50, 828-839.
- 5) Song X, Tanaka S, Cox D, Lee SC. Fc receptor signaling in primary human microglia: differential roles of PI3K and Ras/ERK MAP kinase pathways in phagocytosis and chemokine induction. *J Leukoc Biol*. 2004, 75:1147-1155.
- 6) Ogasawara T, Katagiri M, Yamamoto A, Hoshi K, Takato T, Nakamura K, Tanaka S, Okayama H, Kawaguchi H. Osteoclast Differentiation by RANKL Requires NF-kappaB-Mediated Downregulation of Cyclin-Dependent Kinase 6 (Cdk6). *J Bone Miner Res*. 2004, 19:1128-1136.
- 7) Ogata T, Iijima S, Hoshikawa S, Miura T, Yamamoto S, Oda H, Nakamura K, Tanaka S. Opposing Erk and Akt pathways control Schwann cell myelination. *J Neuroscience* 2004, 24:6724-32.
- 8) Ikeda F, Nishimura R, Matsubara T, Tanaka S, Inoue J, Reddy SV, Hata K, Yamashita K, Hiraga T, Watanabe T, Kukita T, Yoshioka K, Rao A, Yoneda T. Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation. *J Clin Invest* 2004, 114:475-484.
- 9) Kwak HB, Lee SW, Jin HM, Ha H, Lee SH, Takeshita S, Tanaka S, Kim HM, Kim HH, Lee ZH. Monokine induced by interferon-gamma is induced by receptor activator of nuclear factor B ligand and involved in osteoclast adhesion and migration. *Blood*. 2004 Dec 7; [Epub ahead of print]
- 10) Yagishita N, Ohneda K, Amano T, Yamasaki S, Sugiura A, Tsuchimochi K, Shin H, Kawahara K, Ohneda O, Ohta T, Tanaka S, Yamamoto M, Maruyama I, Nishioka K, Fukamizu A, Nakajima T. Essential Role of Synoviolin in Embryogenesis. *J Biol Chem* 2004 Dec 20; [Epub ahead of print]
- 11) Gohda J, Akiyama T, Koga T, Takayanagi H, Tanaka S and Inoue JI. RANK-mediated amplification of TRAF6 signaling leads to NFATc1 induction during osteoclastogenesis. *Embo J* in press.

英文総説

- 1) Tanaka S. Molecular mechanism of life and death of the osteoclast. *Int J Oral Biol* 2004 in press
- 2) Tanaka S. Intracellular signal transduction pathways: good therapeutic targets for joint destruction in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatology* 2005 in press

和文総説

- 1) 田中 栄「RANKL を標的とした骨粗鬆症の分子治療」*医学のあゆみ* 208:343-347, 2004

- 2) 宮崎 剛、田中 栄「TNF- α 」日本臨床 62 suppl 2:112-115, 2004
- 3) 十字琢夫、田中 栄「RANKL ワクチンによる新しい骨代謝疾患治療」日本臨床 62 suppl 2:799-802, 2004
- 4) 秋山 達、田中 栄「破骨細胞アポトーシスと骨吸収能の制御」 Medical Science Digest 30:42-43, 2004
- 5) 田中 栄「五十肩」 Medical Practice 21:346-347, 2004
- 6) 田中 栄「生物製剤による骨粗鬆症治療」整形・災害外科 47:279-284, 2004
- 7) 田中 栄「RANKL と炎症性骨破壊」医学のあゆみ 208:931-934, 2004
- 8) 田中 栄「RANKL 制御と osteoprotegerin による骨・関節疾患治療」分子リウマチ 1:89-93, 2004
- 9) 田中 栄「遺伝子導入による滑膜細胞制御」臨床免疫 41:534-537, 2004
- 10) 福田 明、田中 栄「OA と破骨細胞～OA 治療薬のあらたなターゲット～」医学のあゆみ 211:285-288, 2004

2. 学会発表

- 1) 茨城県保険医協会・県南地区医師会 学術講演会 (2004.5.25) 土浦 「運動器疾患の治療戦略」
第 21 回日本 TDM 学会・学術大会ランチョンセミナー (2004.6.6) 大阪 「骨破壊をターゲットにした新しい骨代謝疾患治療法の開発」
- 2) 第 30 回 日本整形外科スポーツ医学会 学術集会 (2004.7.3) 東京 シンポジウム III 関節軟骨修復術の基礎と臨床 “Molecular mechanism of joint destruction and possible therapeutic approach toward cartilage repair”
- 3) 大阪整形外科症例検討会 特別講演 (2004.7.10) 大阪 「骨破壊をターゲットにした関節リウマチ治療戦略」
- 4) エピスタ販売記念講演 (2004.7.24) 盛岡 「骨粗鬆症治療の新世紀～Is the paradigm shifting?～」
- 5) 第 22 回日本骨代謝学会 (2004.8.7) 大阪 シンポジウム II 関節リウマチと変形性関節症における骨破壊分子メカニズムと治療 「関節炎における骨破壊メカニズムとその制御」
- 6) 第 1 回 横浜骨粗鬆症研究会 (2004.9.9) 横浜 「骨粗鬆症治療薬の最新

の話題」

- 7) 第 53 回日本口腔衛生学会・総会 (2004.9.19) 盛岡 シンポジウム D 保健生態系で考えるフッ化物応用 「フッ化物と全身の健康」
- 8) 日本医師会生涯教育制度適合学術集会 (2004.10.7) 大分 「骨粗鬆症治療の新世紀」
- 9) 第 19 回日本整形外科基礎学術集会 (2004.10.22) 東京 教育研修講演「関節破壊の分子メカニズムとその治療戦略」
- 10) ハイペン発売 10 周年記念講演会 (2004.10.28) 神戸 特別講演「関節リウマチの新しい治療戦略」
- 11) Bone and Joint Research Club～骨と関節の代謝調節を考える基礎の会～ (2004.11.13-14) かずさ 特別セッション「細胞内シグナル伝達をターゲットにした疾患治療法の開発～新しい時代の創薬をめざして～」 「細胞内シグナル伝達をターゲットにした骨関節疾患治療戦略」
- 12) 千葉市医師会講演会 (2004.11.17) 千葉 「骨粗鬆症の臨床アップデート～整形外科の立場から～」
- 13) 第 2 回医療フォーラム 骨と関節疾患制御の新世紀 (2004.11.26) 東京 「変形性関節症」
- 14) 大阪大学 COE シンポジウム (2004.12.3) 大阪 「破骨細胞のアポトーシスと活性化のメカニズム」
- 15) 厚生労働省難治性疾患研究事業 骨・関節系調査研究班 特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会 平成 16 年度 第 2 回会議 研究成果報告会 (2004.12.4) 京都 「新たなマウス骨壊死モデル作成の試み」

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。) なし

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

分担研究者 下村 伊一郎 大阪大学大学院医学系研究科教授・生命機能研究科教授

研究要旨

- ① 変形性関節症および関節リウマチ患者の大腿骨骨髄から骨髄脂肪細胞を分離する技術を確立し、約 30 種の発現遺伝子を解析した。結果、皮下・内臓脂肪細胞より分泌される数種のタンパク質遺伝子の発現を認めた。また、BMP シグナルと拮抗する分泌タンパク質の発現量が高かった。
- ② ①にて発現を確認した骨髄脂肪蓄積細胞分泌因子に着目し、破骨細胞に対する分化、活性化抑制および骨芽細胞に対する分化、石灰化促進作用を検討し、破骨細胞分化抑制作用を見出した。また、ナース様細胞産生サイトカインに対する作用やナース様細胞との関連を検討中である。

A. 研究目的

ヒト骨髄内には多数の脂肪蓄積細胞が存在し、それら脂肪蓄積細胞数の増加と骨量の低下には相関がみられる。本研究においては、骨髄脂肪蓄積細胞の増加が、関節リウマチや骨粗鬆症の病態形成に関わっているとの仮説に基づき、①骨髄脂肪蓄積細胞が産生する分泌因子を明らかにし、関節リウマチや骨粗鬆症など病態への関与を明らかにする。②骨髄脂肪蓄積細胞の骨代謝への関与、ナース様細胞との関連を明らかにする。

B. 研究方法

①大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学において、変形性関節症あるい

は関節リウマチ患者より摘出された骨片から脂肪蓄積細胞分画と間葉系細胞分画を分離回収した。また、回収した細胞分画より total RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて発現遺伝子を解析比較した。

②続いて、①にて発現が確認された骨髄脂肪蓄積細胞分泌因子の骨代謝への作用、関節リウマチ患者由来のナース様細胞との関連を検討する。特に、in vitro では破骨細胞の分化、活性化や骨芽細胞の分化、石灰化に対する作用を、in vivo ではアデノウイルスを用いて目的タンパク質をマウスに過剰発現させ、骨組織および代謝マーカーを解析する。また、ナース様細胞産生サイトカイン量の変動およびナース様細胞との関連を検討する。

(倫理面への配慮)

上記器官制御外科において人工膝関節置換術を施行する患者に限定して、術前に書面にて研究目的・内容を説明し、同意・承諾を得た上で、術中に取り除かれる骨片を研究材料として用いた。また、実験動物に対し、安楽死を施行するなど、動物愛護に配慮した。ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針および大阪大学医学部附属動物実験施設の定める倫理規定を遵守した。

C. 研究結果

①約 30 種の遺伝子に関して、RT-PCR 法により解析した。結果、BMP シグナルと拮抗する分泌タンパク質の発現量が、脂肪蓄積細胞分画で高かった。また、皮下や内臓脂肪細胞より分泌されるいくつかのタンパク質遺伝子の発現を骨髄脂肪蓄積細胞分画においても認めた。

②続いて、①にて発現を確認した骨髄脂肪蓄積細胞分泌因子に着目し、*in vitro* では、破骨細胞に対する分化、活性化抑制および骨芽細胞に対する分化、石灰化促進作用を検討した。結果、明らかな破骨細胞の分化抑制作用を有することを確認した。更に、*in vivo* では、アデノウイルスを用いた目的タンパク質過剰発現によるマウス骨組織および代謝マーカー解析を行った。結果、コントロール群に比し、有意な骨量増加を認めた。また、ナース様細胞産生サイトカインに対する作用を検討中である。

D. 考察

①RT-PCR 法による解析比較の結果、骨代謝への関与を考えうるシグナル分子の発現量に差がみられた。今後、骨髄脂肪蓄積細胞において発現量が多く、特に分泌されるシグナル分子の探索をさらに進める。

②関節リウマチ患者由来のナース様細胞が骨・関節破壊に関与すること、脂肪細胞分泌因子が骨代謝に関与することはこれまでに報告されてきたが、骨髄内細胞のナース様細胞に対する影響はいまだ明らかではない。今回、我々は着目した骨髄脂肪蓄積細胞分泌因子が破骨細胞分化抑制作用を有することを見出した。そこで、この分泌因子の骨代謝に及ぼす詳細な作用機序およびこの分泌因子のナース様細胞に及ぼす影響を明らかにすることが重要であると考ええる。

E. 結論

①ヒト骨髄脂肪蓄積細胞は骨代謝に影響を及ぼすシグナル分子を積極的に産生している可能性がある。

②着目した骨髄脂肪蓄積細胞分泌因子には明らかな破骨細胞分化抑制作用がある。

③骨髄脂肪蓄積細胞が分泌する因子を中心に、ナース様細胞に対する作用を検討するとともに、破骨細胞や骨芽細胞に対する効果を明らかにすることで、骨量減少疾患である骨粗鬆症や関節リウマチの病態解明および治療法への糸口を見つけうる。

(健康危険情報)

該当する事項なし。

F. 研究発表

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

現在、上記 2 項目に該当する事項なし。

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 帝京大学医学部内科・助教授

研究要旨 関節リウマチ(RA)の関節滑膜の大きな特徴の1つとして血管新生があげられる。今回我々は、RA 関節滑膜の血管新生における骨髄の関与について明らかにするために、骨髄 CD34+細胞からの血管内皮細胞への分化について検討した。特に、骨髄 CD34+細胞の機能異常と滑膜の血管新生の関係につき検討を行なった。RA 患者骨髄 CD34+細胞からの CD14+細胞、CD14+/HLA-DR+細胞の分化能は対照群と有意差がなかったが、vWF+細胞および CD31+/vWF+細胞への分化能は RA において有意に亢進していた。一方、滑膜の血管密度(MVD)は RA において有意に上昇していた。さらに、骨髄 CD34+細胞からの vWF+細胞への分化能と滑膜の MVD との間には有意の相関を認めた($r=0.569$, $p=0.021$)。また、RA 骨髄 CD34+細胞は OA のそれに比し、KDR mRNA をより多く発現していた。以上より、RA 滑膜の血管新生には骨髄 CD34+細胞の遺伝子発現の異常が関与すると考えられた。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

RA 患者、OA 患者より得られた骨髄血より magnetic beads により CD34+細胞を精製した。CD34+細胞を SCF(10ng/ml) + GM-CSF(1ng/ml)とともに 18 日培養後、各種表面抗原の発現を Flow cytometry にて解析し、上清中の TNF- α 、VEGF 濃度を ELISA にて測定した。一部の患者からは、滑膜も採取し、HE 染色と CD31 免疫染色を行った。さらに、骨髄 CD34+細胞より RNA を抽出し、cDNA を合成し、定量的 PCR により KDR(VEGFR2)の mRNA の発現の評価を行った。

(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った。

C. 研究結果

RA 患者骨髄 CD34+細胞からの CD14+細胞、CD14+/HLA-DR+細胞の分化能は対照群と有意差がなかったが、vWF+細胞および CD31+/vWF+細胞への分化能は RA において有意に亢進していた。骨髄 CD34+細胞からの vWF+細胞への分化能と TNF- α や VEGF の産生能との間には有意の相関は認められなかった。一方、滑膜の血管密度(MVD)は RA において有意に上昇していた。さらに、骨髄 CD34+細胞からの vWF+細胞への分化能と滑膜の MVD との間には有意の相関を認めた($r=0.569$, $p=0.021$) (図 1)。また、RA 骨髄 CD34+細胞は OA のそれに比し、KDR mRNA をより多く発現していた(図 2)。

D. 考察

以上の結果より、RA の関節滑膜の血管新生においては骨髄 CD34+細胞から分化する血管内皮細胞が関与する可能性が示唆された。骨髄 CD34+細胞からの血管内皮細胞への分化能の亢進はサイトカイン産生では説明できず、骨髄 CD34+細胞における KDR mRNA の発現の異常の関与が示唆された。

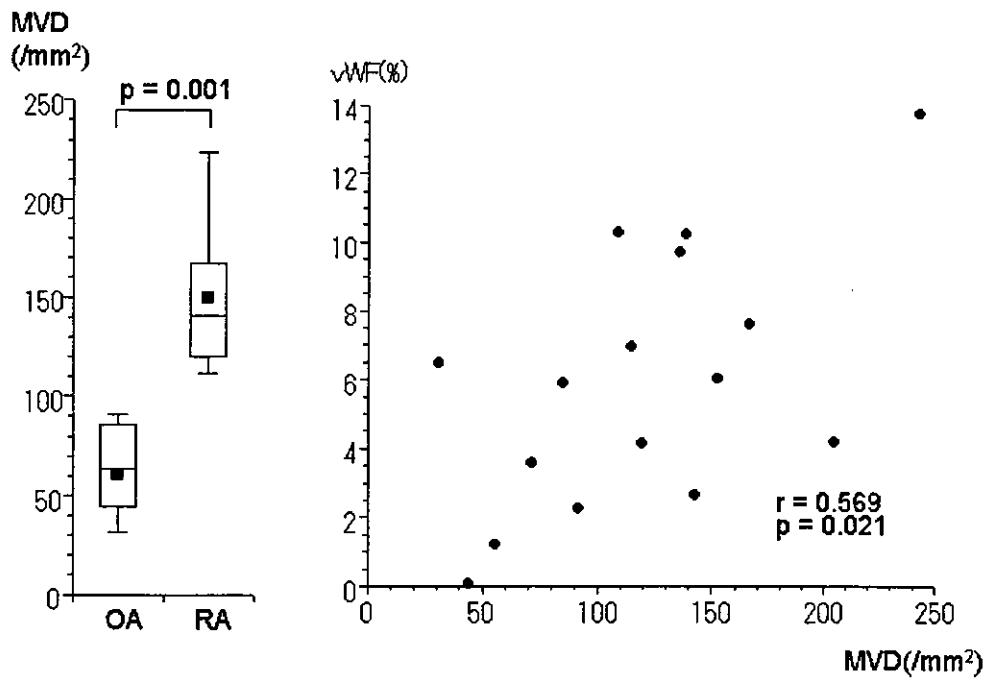


図 1 骨髓 CD34+からの vWF+細胞の分化と滑膜の血管密度

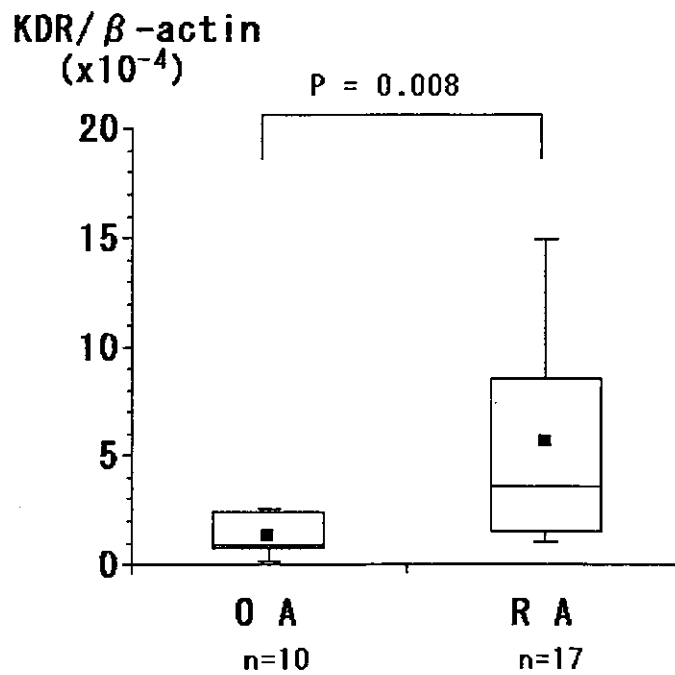


図 2 骨髓 CD34+細胞の VEGFR2/KDR mRNA の発現。
データは VEGFR2/KDR mRNA の β-actin mRNA に対する比で示している。

E. 結論

RA 滑膜の血管新生さらに、RA の病態・病因においては骨髄 CD34+細胞の遺伝子発現の異常が関与すると考えられる。

(健康危険情報[国立相模原病院2])

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

・Kikuchi H, Isshi K, Hirohata S.

Inhibitory effects of bucillamine on the expression of vascular cell adhesion molecule-1 in human umbilical vein endothelial cells. *Int Immunopharm* 4: 119-126, 2004

・Hirohata S, Yanagida T, Nampei A, et al. Enhanced generation of endothelial cells from CD34+ cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis: possible role in synovial neovascularization. *Arthritis Rheum* 50: 3888-3896, 2004.

・広畑俊成、菊地弘敏. <難治性病態の治療戦略> 腸管 Behcet 病 内科 93: 309-311, 2004.

・大島信治、広畑俊成. 成人発症 Still 病と肺病変 呼吸器科 5:242-246, 2004.

・広畑俊成. 抗リボソーム抗体と全身性エリテマトーデス 炎症と免疫 12: 293-299, 2004.

・広畑俊成. 関節リウマチにおける B 細胞の関与 —抗原特異的 B 細胞活性化 医学のあゆみ 209: 796-800, 2004.

・広畑俊成、菊地弘敏. 中枢神経系に血管炎をきたす疾患 リウマチ科 31:447-451, 2004.

・広畑俊成. 膠原病の難治性病態 中枢神経病変 日本臨床免疫学会会誌 27:109-117, 2004.

2. 学会発表

・Hirohata S. Histopathology of central nervous system lesions of Behcet's Disease. XI International Congress on Behcet's Disease, Turkey, p.S131, 2004.

・Aramaki K, Arinuma Y, Kikuchi H, et al. Evaluation of the severity of Behcet's disease. XI International Congress on Behcet's Disease, Turkey, p.S87, 2004.

・Kikuchi H, Hirohata S.

Histopathological analysis of intestinal involvement in Behcet's disease. The 11th APLAR Congress, Jeju, Korea, 2004.

・Aramaki K, Kikuchi H, Hoshino E, et al. Preliminary criteria for the evaluation of the severity of Behcet's disease. The 11th APLAR Congress, Jeju, Korea, 2004.

・Hirohata S, Yangida T, Kunugiza Y, et al. Enhanced generation of endothelial cells from CD34+ cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis: its possible role in synovial neovascularizations. 68th Annual Scientific Meeting, ACR, San Antonio, Arthritis Rheum 50(Suppl.): S1349, 2004.

・柳田たみ子、永井立夫、越智隆弘、他. 関節リウマチ患者骨髄 CD34 陽性細胞の SDF-1 α 産生能 第48回日本リウマチ学会総会・学術集会(岡山)、p.274、2004.

・広畑俊成、柳田たみ子、南平昭豪、他. 関節リウマチ骨髄 CD34+細胞からの血管内皮細胞の分化：関節滑膜増殖との関連 第25回日本炎症・再生医学会(東京)、p.438、2004.

・柳田たみ子、橋本英雄、富田哲也、他. 関節リウマチ患者骨髄 CD34 陽性細胞からの fibroblast 様細胞分化に対する bucillamine と methotrexate の作用 第34回日本免疫学会総会・学術集会(札幌)、p.168、2004.

・有沼良幸、荒巻芸、永井立夫、菊地弘敏、柳田たみ子、広畑俊成. ループス精神病患者血清中にはリボソーム P 蛋白の C 末端 22 アミノ酸以外の抗原決定基に対する抗体が認められる 第34回日本免疫学会総会・学術集会(札幌)、p.283、2004.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

骨髄液の再生方法 (出願中)

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

III) RA の病因解明研究

Epstein-Barr ウイルスの関節リウマチ骨髄での病的意義

RA骨髄CD34陽性細胞共存で樹立された CD15 (Lewis X) 陽性B細胞株とその病的意義

班員 武井正美

山上賢治¹⁾ 猪股 弘武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⁾ 斉藤修⁴⁾ 龍順之助⁴⁾

- 1、日本大学医学部内科学講座血液膠原病部門
- 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
- 4、日本大学医学部整形外科

研究要旨：

関節リウマチ (RA) 口腔由来野生株の Epstein Barr ウイルス (EBV) の関連蛋白 EBV associated nuclear antigen 3c (EBNA3c) の塩基配列に正常ではほとんど見られない変異が共通してみられ、ペプチドのミスセンス変異を伴っていた。骨髄 CD34 細胞と正常 EBV 未感染 B 細胞との共存培養で得られた EBV 陽性 B 細胞株の EBNA3c の配列がこの変異を持っており、この RA 患者口腔由来野生株の EBNA3c の配列と一つの塩基を除いて一致し、RA 骨髄の CD34 細胞分画に EBV の感染を引き起こす機序が存在する可能性が示唆された。CD15 陽性細胞は Hodgkin 病、mixed linkage leukemia、慢性甲状腺炎などに認めるが、一般に正常人のリンパ球には認められない。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、正常人の EBV 陰性の B 細胞と RA 患者の骨髄の CD34 陽性細胞との共培養で RA 由来 EBV 感染 CD15 陽性 B 細胞が高率に樹立されることが分かった。RA 骨髄 CD34 陽性細胞との共培養で出現する CD15 陽性 B 細胞は正常 T 細胞との共培養にて、IFN γ 活性が亢進しており、RA 骨髄由来 EBV が感染した B 細胞は、正常 T 細胞との共培養にて、M-CSF が亢進していて、RA の病態に関与している可能性が示唆された。さらに骨髄 CD34 分画のどの細胞に EBV が感染しているかを検討するため Cell Sorter (FCM) で EBV 核内蛋白や EBV 由来 RNA を単クローン性抗体や EBER PNA プロブ (FITC 標識) を用いて新たな検索法を開発した。その結果、骨髄 CD34 細胞分画に EBV が感染している可能性があり、RA の方が OA よりも高率に EBNA 1 を発現していた。

A. 研究目的

これまで Epstein-Barr ウイルス (EBV) と関節リウマチ (RA) の関連を明らかにするため、PCR、in situ hybridization 法、組織染色を用いて RA の滑膜細胞に EBV が存在することを証明した。EBV 感染細胞は正常の免疫機

能を有していればその再活性化は抑制され潜在感染として維持され疾患の発症は起こらない。上咽頭癌の様にウイルスに変異があり免疫監視機構から逃れている可能性や、RA で EBV 特異的 CTL 活性が低いとの報告もあり、RA 滑膜でこのような細胞の存在を許している可能性もある。我々は EBV

関連疾患としても知られる IgA 腎症の末梢白血球の RNA を用いた fluorescein differential display 法による解析で偶然にこの遺伝子を発見し全 cDNA の sequence を行った (国際公開番号: WO98-24899,H8,12,5)。この遺伝子が 1998 年 12 月に Nature で Sayo らの報告した小児期に EBV の致死感染症を起こすことで知られている X-linked lymphoproliferative syndrome(XLP)の原因遺伝子と全く同一のものであった。我々はこの SAP/SH2D1AmRNA の発現が RA 患者 T 細胞で低いことを報告し、SAP/SH2D1AcDNA に XLP のような変異が存在しないことを報告した (Inter Immunol13,559,2001)。また、SAP/SH2D1A の promoter 領域と思われる 5'上流に存在する CAAT ボックス近傍に単遺伝子変異が存在する可能性を見だし、RA で EBV に対する感染防御機構が異常を起こす原因として、SAP/SH2D1A 分子の機能異常がその原因の一つとして関与する可能性があることを見出した。

RA と OA の骨髓細胞をインフォームドコンセント後に採取し、OA、RA の骨髓コロニー形成能を比較し、治療薬との関連性を検討した。また骨髓細胞の 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。RA 患者の骨髓の CD34 陽性細胞と、正常人の EB ウイルス陰性の B 細胞との共培養で得られた細胞株の CD15 陽性率を検索し、それぞれの細胞株と正常人 T 細胞とを反応させ、各種サイトカインを計測し、その病的意義を考察した。

B. 研究方法:

RA と正常人の口腔粘膜から DNA を抽出した。また EBV 陰性正常者由来 B 細胞と RA 骨髓 CD34 陽性細胞との共培養で樹立した B 細胞株の DNA を抽出し、この細胞株の EBV が RA 骨髓由来であるか解析した。また EBV 産生株として広く知られている B95-8 で EBNA3c が 39 ヌクレオチドの 3 回の繰り返し数がウイルス株により異なっていることが報告されている。この部位の DNA 配列を検討するため EBNA3c 領域の DNA 配列をダイレクトシーケンシング法にて検討した。さらに RA や OA の骨髓中の骨髓単核細

胞液を培養し、14 日後の BFU-E,CFU-GM をカウントしコロニーを分離回収し DNA を抽出、定量 PCR を行った。健常成人の末梢血を採取し T 細胞を分離した。RA 患者の骨髓の CD34 陽性細胞と正常人の EB ウイルス陰性の B 細胞との共培養で得られた各細胞株 (N、I/N、B95-8、K、H/I) のコロニー数をカウントし T 細胞と PHA を加え反応させ、50%NR 取り込み法にて IFN- γ 活性を ELISA 法にて IL-6、M-CSF を計測した。

C. 研究結果:

RA の口腔由来 EBNA3c 領域の 39 ヌクレオチドの繰り返し数は OA のものと比較し偏りはなかった。この部位の塩基配列に RA で変異が認められそのアミノ酸にミスセンス変異によりこれまでの報告されていない異なったアミノ酸の配列が起こることが判明した。RA 骨髓由来 CD34 細胞と EBV 陰性末梢血由来 B 細胞と共培養し樹立された EBV 陽性 B 細胞株が HLA の遺伝子型の比較で正常者由来であることがわかった。その EBV の EBNA3c の DNA 配列が RA 患者口腔由来のものとは 1 つの塩基変異を除いて他はすべて一致し、その繰り返し構造の数も一致した。RA と OA でのコロニー形成能の違いを見るため GM-CFU、E-BFU の数を比較した。この結果、RA と OA 患者では GM-CFU、E-BFU 形成能に大きな相違はなかった。また全体のコロニー数の関しても差は認めなかった。また EB ウイルス LMP-2 を検出する realtime PCR 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。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 6 例中 4 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。正常者より、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 細胞が増加する傾向が認められた。そこで RA の自然発症 EB virus 陰性 B 細胞株 (N)、RA 骨髓 CD34 陽性細胞と、正常 B 細胞との共培養により得られた EBV 陽性 B 細胞株 (I/N、K、H/I) コントロ

ールとして EBV 産生の細胞株 B95-8 由来 EBV で芽球化した B 細胞株(B95-8/H) をそれぞれ用いてその表面マーカーを検索し、T 細胞との共培養によるサイトカイン産生を検索しその生理活性を考察した。各細胞株 (N、I/N、B95-8/H、K、H/I) の CD15/CD19 陽性率はそれぞれ 3.7%、3.7%、27.3%、83.4%、85.8%であった。さらに CD15 陽性 B 細胞は、正常 T 細胞との共培養にて IFN γ 活性が亢進しており、RA 骨髄 CD34 陽性細胞と正常 B 細胞との共培養により得られた EBV 陽性 B 細胞株は M-CSF の産生が亢進している傾向が認められた。このことは EBV 陰性正常者由来 B 細胞と RA 骨髄 CD34 陽性細胞との共培養で樹立した B 細胞株の解析でこの EBV が RA 骨髄由来の可能性があった (下図参照)。また骨髄 CD34 分画のどの細胞に EBV が感染しているかを検討するため Cell Sorter (FCM) で EBV 核内蛋白や EBV 由来 RNA を単クローン性抗体や EBEB PNA プローブ (FITC 標識) を用いて新たな検索法を開発した。その結果、骨髄 CD34 細胞分画に EBV が感染している可能性があり、RA の方が OA よりも高率に EBNA 1 を発現していた。

D. 考察

RA の口腔由来野生株の Epstein Barr ウイルス (EBV) の EBNA3c の塩基配列に正常では、ほとんど見られない変異が共通してみられ、ペプチドのミスセンス変異を伴っていた。骨髄 CD34 細胞と正常 EBV 未感染 B 細胞との共存培養で得られた EBV 陽性 B 細胞株の EBNA3c の配列がこの変異を持っており、この RA 患者口腔由来野生株の EBNA3c の配列と一つの塩基を除いて一致し、RA 骨髄の CD34 細胞分画に EBV の感染を引き起こす機序が存在する可能性が示唆された。RA 骨髄の CFU-GM、BFU-E の数は OA に比し大きな差はなく、コロニー中の EBV の存在は認めなかった。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、正常人の EBV 陰性の B 細胞と RA 患者の骨髄の CD34 陽性細胞との共培養で RA 由来 EBV 感染 CD15 陽性 B 細胞が高率に樹立されることが分かった。DNA ウイルスはその配

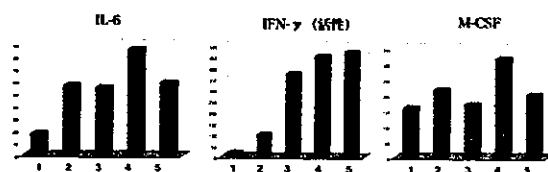
列に変異をあまり起こさないとされているが、EBV ではタイプが 2 つ知られており RA 由来悪性リンパ腫ではその偏りが報告されている。EBNA3c 領域は細胞障害性 T 細胞の認識するエピトープが存在する部位でもあり、RA の滑膜中に EBNA3c に対する抗体が高頻度に存在することも知られている。このようなアミノ酸変異が RA での EBV 制御に影響を及ぼす可能性も検討しなくてはならない。RA の骨髄由来細胞が EBV 感染に大きな役割を果たす可能性も報告されている。T 細胞と CD15 陽性 B 細胞の共培養でサイトカインの活性が亢進することより、疾患の重症化や病態に関連している可能性が示唆された。

E. 結論

RA 由来 EBV 株には正常者と相違するものが存在する可能性があり EBNA3c 領域にアミノ酸変異を伴う塩基配列の相違が見いだされた。また EBV 陰性正常者由来 B 細胞と RA 骨髄 CD34 陽性細胞との共培養で樹立した B 細胞株の解析でこの EBV が RA 骨髄由来の可能性があった。さらに骨髄幹細胞の BFU-E、CFU-GM 形成能は RA と OA で有意な差は認められず、そのコロニーに EBV は維持されていないと考えられた。しかし骨髄単核細胞の EBNA3A に対する CTL 活性は亢進しており、骨髄において活発な感染制御が行われている可能性が認められた。さらに CD15 陽性 B 細胞は、正常 T 細胞との共培養にて IFN γ 活性が亢進しており、RA 骨髄 CD34 陽性細胞と正常 B 細胞との共培養により得られた RA 由来 EBV 陽性 B 細胞株は M-CSF の産生が亢進している傾向が認められ、RA との関連性が示唆される興味深い結果となった。

各Cell lineのサイトカイン産生の特徴

CD15(+)/CD19(+)		N:	
1. N	3.7%	RAの自発発症 EB negative B cell line	
2. I/N	3.7%	I/N,K,H/I: RA骨髄CD34陽性細胞と正常B cellとの共培養により得られたEB positive B cell line	
3. B95-8/H	27.3%	B95-8/H: EB virus 産生のcell line	
4. K	83.4%		
5. H/I	85.8%		



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 32, 284-291, 2004
- 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. JInternational Medical Research 32, 222-231, 2004
- 3) Yamakami K, Honnda M, Takei M, Ami Y, Nishinarita S, Kitamura N, Sawada S, Horie T: Early Bone Marrow Hematopoietic Defect in SHIV C2/1-Infected Macaques and Relevance to Advance of Disease. J Virol. 78(20):10906-10910, 2004
- 4) Sawada S, Takei M. Possible involvement of Epstein-Barr virus and its regulatory gene in rheumatoid synovitis. Autoimmun Rev. 2004 1:69-71. (Sawada and Takei were first authors)
- 5) 山上賢治、武井正美、清水貴子、三田村巧、北村登、松川吉博、澤田滋正、堀江孝至: 全身性エリテマトーデスに合併したヒトパルボウイルス B19 感染症 日大医誌 63、223-228、2004
- 6) Kitamura N, Matsukawa M, Takei M, Mitamura K, Nishinaraita S, Sawada S, Horie T: Wegener's Granulomatosis Complicated with Intestinal Ulceration. Mod Rheumatol, 14 480-484, 2004.
- 7) Sema K, Takei M, Uenogawa K, Horikoshi A, Hosokawa Y, Matsuda M, Henmi A, Sawada S. Felty's syndrome with chronic hepatitis, compatible autoimmune hepatitis - a case presentation.

Internal Medicine. (in press) (First two is equally contributed)

- 8) 白岩秀隆、武井正美、山上賢治、三田村巧、清水貴子、北村登、松川吉博、澤田滋正、杉谷雅彦: サイトメガロウイルス持続感染経過中に肺好酸球症候群 (PIE 症候群) と側頭動脈炎を併発した一例。関東リウマチ 38、87-97、2004
- 9) 澤田滋正、武井正美: 筋肉性疾患の診断と治療「内科学教科書-各論 II リウマチ、アレルギー、膠原病、原発性免疫不全症」(黒川清、松沢佑次編)、pp2271-2273、文光堂、東京、2003
- 10) 武井正美、石渡哲義、三田村巧、山上賢治、澤田滋正: ヘルペスウイルス感染症の制御 Epstein-Barr ウイルス感染と免疫機構を支える遺伝子 (SAP/SH2D1) 日大医誌 63、299-304、2004
- 11) Sawada S, Takei M, (Both authors equally contributed). Epstein-Barr virus etiology in rheumatoid synovitis. autoimmunity Reviews 4, 106-110, 2005

学会報告

- 1) 村上正人、武井正美、松川吉博、澤田滋正、堀江孝至: 心療内科から見た線維性筋痛症の疾患概念と病態 第48回日本リウマチ学会総会 2004年4月17日 岡山
- 2) Sawada S Takei M: Possible involvement of Epstein-Barr virus and its regulatory gene in rheumatoid synovitis. Epstein-Barr infection in rheumatic arthritis. Autoimmune Rheumatic disease days -International symposium-in ATHENES-GREECE June 2004
- 3) 北村登、武井正美、松川吉博、三田村巧、清水貴子、澤田滋正、堀江孝: ステロイド性骨粗鬆症におけるビスホスホネートとビタミン D3、K 併用効果の検討 第101回日本内科学会 2004年4月10日 東京
- 4) 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: 5-HT2 受容体拮抗薬の治療効果判定に有用であったと考えられた新しい皮膚硬度測定法 (尾股法) 第9回関東甲信越セロトニン研究学術集会 2004年2月7日 東京
- 5) 肺高血圧症にエボプステノールを持続

投与した SLE 3 例:伊藝孔明、松川吉博、野崎隆正、大木隆史、青木正紀、清水貴子、北村登、三田村巧、武井正美、澤田滋正、堀江孝至

第 48 回日本リウマチ学会総会 2004 年 4 月 15 日 岡山

6) 関節リウマチ患者の不安と末梢ベンゾジアゼピン受容体:石風呂素子、中本百合江、吉井光信、三田村巧、武井

正美、三輪雅子、北村登、松川吉博、福西勇夫、村上正人、堀江孝至、澤田滋正:第 48 回日本リウマチ学会総会 2004 年 4 月 15 日 岡山 ポスタ WS

7) 多発性脳動脈瘤によるくも膜下出血を合併した抗セントロメア抗体陽性の側頭動脈炎が疑われた症例:土屋貴彦、北村登、清水貴子、松川吉博、三田村巧、武井正美、澤田滋正:第 48 回日本リウマチ学会総会 2004 年 4 月 16 日 岡山

8) 重症な血栓症を認めた抗リン脂質抗体症候群の 2 例:山上賢治、青木正紀、大久保隆洋、清水貴子、武井正美、北村登、三田村巧、松川吉博、西成田進、堀江孝至、澤田滋正:第 48 回日本リウマチ学会総会 2004 年 4 月 16 日 岡山

9) 北村登、武井正美、松川吉博、三田村巧、清水貴子、澤田滋正、堀江孝至:リウマチ、膠原病患者のステロイド性骨粗鬆症におけるビスホスフォネートとビタミン D3, K 併用効果の検討:第 48 回日本リウマチ学会総会 2004 年 4 月 16 日 岡山 WS

10) 山上賢治 武井正美 三田村巧 松川吉博 北村登 清水貴子 青木正紀 澤田滋正 石川弘:眼窩内に腫瘤性病変を認めた一症例 第 3 回東北臨床免疫研究会 仙台 平成 16 年 8 月 7 日

11) Shiraiwa H Takei M Yoshikawa T Azuma T Kato M Mitamura K Saito I Hayashi Y Ueki T Kida A Seki N Sawada S:Detection of Up-regulated genes by in-house cDNA chips and lysosomal-associated protein transmembrane (Laptm5) molecule in salivary glands from model mice and in lip biopsy tissue from patients with Sjogren's syndrome. ACR/ARHP annual scientific meeting in San Antonio 20th Oct. 2004 SanAntonio USA

12) 山上賢治 石川弘 三田村巧 松川

吉博 武井正美 北村登 清水貴子 青木正紀 澤田滋正:眼窩内に腫瘤性病変を認めステロイドとエンドキサンが奏効した Wegener 肉芽腫症の一例

東京リウマチ膠原病研究会 2004 年 10 月 30 日 東京

13) 山上賢治 武井正美 網康至 北村登 三田村巧 本田三男 澤田滋正:病原性 SHIV C2/1 感染カニクイザルにおける早期骨髄幹細胞コロニー形成の障害と病態進行への関連性 第 18 回日本エイズ学会学術集会 2004 年 12 月 10 日 静岡

14) 白岩秀隆、武井正美、野崎高正、猪股広武、吉川勉、東孝典、三田村巧、加藤真樹、山田耕一、斉藤一郎、林良夫、関直彦、澤田滋正:シェーグレン症候群疾患モデルマウスおよび患者唾腺における PSP(parotid secretory protein)分子の発現 第 13 回日本シェーグレン症候群研究会 平成 16 年 9 月 25 日 佐賀

関節リウマチ・骨粗鬆症患者の疫学、病態解明と治療法開発に関する研究

分担研究者 野島 博 大阪大学微生物病研究所・教授

研究要旨：段階的サブトラクション法あるいは DNA チップによって慢性リウマチ（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）患者骨髄液ではほとんど発現していない遺伝子群を多数単離し、*AURA*（*Augmented in RA*）と包括的に命名して解析した。この中には構造から予想される機能を考慮すると RA の発症に重要な役割を果たす可能性のある遺伝子が含まれていた。また感染体由来遺伝子である可能性があるヒトのゲノムに属さない感遺伝子も幾つか含まれていた。

A. 研究目的

慢性リウマチ(RA:Rheumatoid arthritis)患者骨髄液に特異的に発現しているが変形性関節症(OA:Osteoarthritis)患者骨髄液ではほとんど発現していない(あるいはその逆)遺伝子群を段階的サブトラクション法およびDNAチップを用いて網羅的・包括的に単離し、各患者由来のmRNAに対して選択的トランスクリプトーム解析することでRAの発症機序を解明する。

B. 研究方法

本研究では慢性リウマチ(RA)患者特異的に発現している遺伝子群を包括的に単離し、その発現程度と各患者における病態とを関連づけるため、以下の方法を採用した。

(1) 段階的サブトラクション法：

段階的サブトラクション法の原理は、対象となる2つの生物現象において、サブトラクション(差分化)を段階的に繰り返すことで一方にしか存在しないmRNA/cDNA(これを発現特化型cDNAと呼ぶ。分子を全てクローニングすることである。実際にはまずRA患者由来のcDNAライブラリーを作製し、OA患者由来のmRNAをフォトビオチン化してサブトラクションし、1次差分化ライブラリーとして作製する。このうちランダムに約400個のクローンを選んでノーザンプロット解析したのち、これあをひとまとめにしてT7RNAポリメラーゼによりRNA化し、それを用いてもとの1次差分化ライ

ブラリーを差分化する。これを二次差分化と呼ぶ。この二次差分化を行うことで、一次差分にて解析したクローンが除かれ、未解析なクローンを濃縮し、より効率的なクローニングが行われる。このプロセスを数回繰り返す、最終的に得られた高次差分化cDNAライブラリーの中にほぼ同じクローンしか含まれていない状態になった時点で段階的サブトラクション法が終了したと判断する。

(2) 選択的トランスクリプトーム解析：

段階的サブトラクション法により包括的に単離した305種類の正常血液細胞発現特化型cDNA群(PREBs)を貼り付けたマイクロアレイを用いて、RAおよびOAのトランスクリプトーム解析を行うことで、RA特異的な遺伝子発現パターンを見つけ出す。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の貼り付けを行う。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)に配置させる。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う。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を貼り付ける。続いて、ラベリングサンプルであるtotal RNAはT7増幅を2回繰り返す、アレイハイブリに用い得る充分量のアンチセンス・アミノアルル標識化RNA(aaaRNA)の合成を行う。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する。一方、比較対照 2 種 (RA と OA) の全 RNA をそれぞれ増幅と標識を行い、各々 5 μ g 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う。次いでアレイを洗浄後、スキャンした画像を数値化し、補正を行う。同様の実験を計 2 回行い、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る。このようにしてデータの信頼性を高めた上で 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う。

(3) DNA チップ:

段階的サブトラクション法での取りこぼしを防ぐため、補完的にアジラント社性の DNA チップ (44k) を用いて、RA および OA の患者由来の mRNA を比較する形で各疾患において特異的に転写誘導されている遺伝子群を同定する。

(4) リアルタイム PCR:

PCR の増幅過程で検出可能な量に達するまでに必要とする増幅回数の違いを測定することでもとの試料に対する mRNA の量を測定する技術としてリアルタイム PCR を採用する。機器は ABI の PRISM7900HT-2 を使用する。

(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

幾つかの AURA 遺伝子について、RA と OA の各患者由来の mRNA の発現量をリアルタイム PCR により比較したところ、それぞれの遺伝子が患者全般に転写誘導されていることが明らかとなった。現在、病態との関連を解析している。そのなかでも AURA8 と名づけた遺伝子は、他の自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (SLE) における段階的サブトラクションによって SLE 患者で転写誘導されている遺伝子として独立に単離されたことは注目すべきであると考えた。この遺伝子の転写誘導が病因である可能

性を探るため、 β アクチンプロモーターの下流に繋いだ AURA8 を普遍的に過剰発現させているトランスジェニックマウスを作成し、野生の雄マウスと掛け合わせたところ、最初の妊娠では雄と雌のトランスジェニックマウスが 2 匹ずつ生まれた、2 回目の妊娠では妊娠中毒を起して出産前に死んでしまった。また生まれた雌 1 匹はがと野生の雄マウスと掛け合わせたところ、やはり妊娠中毒を起して死んでしまった。もう 1 匹の雌は妊娠しないまま衰弱していたためか、同じ飼育カゴに入れていた雌に食べられて死んでしまった。そしてこれらの理由で雌のトランスジェニックマウスの系統は絶えてしまった。一方、雄のトランスジェニックマウスと野生の雌マウスと掛け合わせたところ、ひとつの系統では生まれてくるのは野生マウスのみで、もうひとつの系統は野生マウスと雄のトランスジェニックマウスのみで雌のトランスジェニックマウスは一匹も生まれてきていない。SLE が女性に高率に発症することを考慮すると、この雌のトランスジェニックマウスが生まれてこないという表現型における性差は深く追求する価値があると考えて、現在より詳細な病理的な解析を進めている。

一方、AURA9 と名づけた遺伝子は、成長因子様の前駆体をコードしていた。ほとんどの RA 患者で AURA9 の転写は OA に比べて骨髄液で数百倍から数千倍以上、末消血で数十から数百倍上昇していた。他方、この受容体と思われるタンパク質は RA の滑膜細胞で過剰発現しているというデータも考えると、AURA9 の過剰発現は RA の発症に深く関わっていると考えて、詳細な解析を進めている。

商品化に成功し、すでに売り出した PREB-DNA チップについて慢性関節リウマチ患者 (13 人分) の末消血液 (骨髄液も含む) について OA 13 人分由来の mRNA との比較診断データを集めクラスター解析を行った。データはきれいに出たので商品としては問題なく、購入者にとって非常に有用であると考えた。改善点として考えられるのは以下の点である。すなわち、検査に使用した血液量は 5 ml であったのにもかかわらず、発現が低いとシグナルが検出できない遺伝子が半分くらい見られた。感度を高める必要がある。解決策として、今年度から新たに共同研究に参加した三菱レイ

ヨン（株）のジェノパールを開発してきた研究者と相談し、ジェノパールに搭載して感度の向上を目指してゆく。

さらに興味深いことに、RA患者骨髄液細胞にヒト由来でない遺伝子が数種類見つかった。現在、ヒトの全ゲノム塩基配列は決定されているので、ヒト由来の遺伝子であればDNAバンクの検索で必ずひっかかるはずである。この遺伝子はタンパク質はコードするが、どのバンクでも相同性のある遺伝子は見つからない。そこでPCRによりRA患者とOA患者の骨髄液についてPCRを行ったところ約半数のRAでバンドが検出されたものの、OA患者および健常人ではこのバンドは検出できなかった。すなわち、この未知なヒト由来でない遺伝子は慢性関節リウマチ患者特異的であった。これが、慢性関節リウマチの原因となる感染体（ウイルス？）由来なのか否かを調べるのが今後の大きな課題である。

D. 考察

これまで単離してきたRA特異的な遺伝子はいずれもこれまでRAとの関連がほとんど研究されていない遺伝子である。そのため、我々の研究はRAの遺伝子レベルでのRA病因解析に新しい視野を与えると考えられる。とくにAURA9の過剰発現系は滑膜細胞の過剰増殖に直接の原因となる可能性があるため、今後の実験結果しだいでは、一気にRAの病因に迫れる可能性がある。

E. 結論

DNAチップを援用した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) Nojima, H.: G1 and S-phase checkpoints, chromosome instability, and cancer. *In* Methods in Molecular Biology, Checkpoint Controls and Cancer. Methods and Protocols.

Humana Press, pp.3-49, 2004.

- (2) Toji, S., Yabuta, N., Kobayashi, T., Tamai, K. and Nojima, H.: The centrosome protein Lats2 is a phosphorylation target of Aurora-A kinase. *Genes Cells*, 9: 383-397, 2004.

- (3) Saito, T.T., Tougan, T. Okuzaki, D., Kasama, T. and Nojima, H.: Mcp6, a meiosis-specific coiled-coil protein of *Schizosaccharomyces pombe*, localizes at the spindle pole body and is required for horsetail movement and recombination *J. Cell Sci.* 118(2):447-459, 2005.

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

なし

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

平成16年8月に、この研究成果の一部であるPREB-DNAチップをタカラバイオ（株）に技術移転することにより商品化に成功し、現在「血液RNA疾病検査チップ」として販売中である。

(3) 研究成果の刊行に関する一覧表

(平成16年度)