

ES細胞による骨・軟骨再生の研究

分担研究者:戸山 芳昭 慶應義塾大学医学部整形外科学教室 教授  
研究協力者:豊田 敬 慶應義塾大学医学部整形外科 助手

研究要旨:ES細胞から関節軟骨組織への分化制御機構の解明を目的として、静水圧が正常関節軟骨組織の細胞外基質代謝に与える影響を検討した。関節軟骨細胞の glycosaminoglycan 合成能, aggrecan mRNA の発現は静水圧負荷により増加したが、培養時期によっては静水圧負荷の影響が一定しない場合もあった。関節軟骨組織の分化制御には静水圧が重要な役割を担っており、軟骨形成能を高めるための負荷刺激には至適条件が存在することが判明した。

A. 研究目的

関節軟骨欠損に対して軟骨細胞移植が行われるようになってきたが、少量の健全軟骨組織から得られる細胞数には限りがあり、これにより修復可能な軟骨欠損の大きさには限界がある。これらの背景から、近年種々の組織に分化可能な未分化幹細胞、特に embryonic stem cells (ES 細胞)を用いた組織再生に期待が高まっている。しかしながら幹細胞から目的の組織への分化制御はいまだ困難とされており、その制御機構の解明が急務である。関節の運動・荷重に常にさらされる軟骨組織においては、機械的負荷が分化制御に極めて重要な役割を担うと考えられ、最近では *in vitro* に機械的負荷を細胞に負荷することにより、移植前に軟骨形成能を高め、より成熟した移植片を作成する mechanical conditioning の概念が提唱されている。本研究ではこの準備段階として、機械的負荷の重要な因子である静水圧が、正常関節軟骨組織の細胞外基質代謝に与える影響を検討した。

B. 研究方法

正常ウシ関節軟骨細胞を agarose gel に包埋し、培養14日目までの glycosaminoglycan 合成能の時間経過を調べた。次に培養 2, 7, 14 日目に自作の装置を用いて 2MPa あるいは 5MPa の圧を持続的あるいは周期的(1 Hz)に 4 時間加え、静水圧負荷による glycosaminoglycan 合成能, proteoglycan の分子サイズおよび凝集能, aggrecan mRNA の発現の変化を調べた。なお、食肉用ウシの屠殺後1時間以内のMTP関節から軟骨細胞を採取したため、倫理上配慮すべき問題点はなかった。

C. 研究結果

静水圧負荷を加えない状態では、関節軟骨細胞の glycosaminoglycan 合成能は培養 2-3 日目が最も高く、5 日目以降は定常状態となった。静水圧負荷の影響をみ

ると、5MPa の圧を持続的に 4 時間負荷することにより glycosaminoglycan 合成能が平均約 11% 増加した。Proteoglycan は分子サイズの大きなものが静水圧負荷により増加していたが、凝集能には変化がなかった。また aggrecan mRNA の発現は約 2.4 倍増加した。培養時期による差を見てみると、5MPa の持続的負荷は培養 2, 7, 14 日目のいずれにおいても glycosaminoglycan 合成能に刺激的に作用したが、glycosaminoglycan 合成能に抑制的に作用した 2MPa の周期的負荷の影響は培養 14 日目のみにおいて見られた。

D. 考察

正常関節軟骨組織の細胞外基質代謝の調節には静水圧負荷が極めて重要な役割を担うことが明らかとなった。また軟骨形成能を高めるための負荷刺激には至適条件が存在することが判明した。しかしながら培養時期によっては静水圧負荷の影響が一定しない場合もあり、関節軟骨細胞の代謝活性自体が静水圧に対する細胞の反応に影響を与える可能性が示唆された。数週間の培養期間における mechanical conditioning の効果を考えた場合、ある一時期に軟骨形成能を高める負荷条件が必ずしも培養期間を通じて同様の効果を得られるとは限らないと予測される。

今後は正常関節軟骨組織におけるこれらの知見を踏まえ、静水圧負荷刺激を ES 細胞の関節軟骨細胞への分化制御に応用し、培養期間を通じて軟骨形成能を高める至適条件を探索する予定である。

E. 結論

関節軟骨組織の分化制御には静水圧が重要な役割を担っている。

F. 健康危険情報

特記すべき事なし

## G. 研究発表

1. Nozaki J, Aizawa M, Uchida H, Itatani K, Suemasu H, Nozue A, Okada I, Matsumoto M, Matsumoto H, Toyama Y : Biocompatibility of hydroxyapatite films formed on Ti metal by a simple urea and urease treatment. *Key Engineering Materials* 240-242:603-606,2003
2. Mamoru Aizawa, Hiroki Shinoda, Hiroshi Uchida, Kiyoshi Itatani, Isao Okada, Morio Matsumoto, Hikaru Morisue, Hideo Matsumoto, Yoshiaki Toyama : Development and biological evaluation of apatite fibre scaffolds with large pore size and high porosity for bone regeneration. *Key Engineering Materials* 240-242:647-650,2003
3. Hiroyuki Enomoto, Isao Inoki, Koichiro Komiya, Takayuki Shiomi, Eiji Ikeda, Kenichiro Obata, Hideo Matusmo, Yoshiaki Toyama, Yasunori Okada : Vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors are expressed in human osteoarthritic cartilage. *American J Pathology* 162:171-181,2003
4. Yasuo Niki, Hideo Matsumoto, Yasunori Suda, Toshiro Otani, Kyosuke Fujikawa, Yoshiaki Toyama, Noriyuki Hisamori, Akira Nozue : Metal ions induce bone-resorbing cytokine production through the redox pathway in synoviocytes and bone marrow macrophage. *Biomaterials* 24(8):1447-1457,2003
5. Tomonori Abe, Harumoto Yamada, Hideto Nakajima, Toshiyuki Kikuchi, Hironari Takaishi, Takushi Tadakuma, Kyosuke Fujikawa, Yoshiaki Toyama : Repair of full-thickness cartilage defects using liposomal transforming growth factor- $\beta$  1. *J Orthop Sci.* 8:92-101,2003
6. Aizawa M, Ito M, Itatani K, Suemasu H, Nozue A, Okada I, Matsumoto M, Ishikawa M, Matsumoto H, Toyama Y : In vivo and in vitro evaluation of the biocompatibility of the hydroxyapatite-PMMA hybrid materials having mechanical property similar to that of cortical bone. *Key Engineering Materials* 218-220:465-468,2002
7. Kiwamu Horiuchi, Shigeki Momohara, Taisuke Tomatsu, Kazuhiko Inoue, Yoshiaki Toyama : Arthroscopic synovectomy of the elbow in rheumatoid arthritis. *J Bone Joint Surg.(Am)* 84-A(3):342-347,2002
8. Toshiyuki Miyasaka, Hideo Matsumoto, Yasunori Suda, Toshiro Otani, Yoshiaki Toyama : Coordination of the anterior and posterior cruciate ligaments in constraining the varus-valgus and internal-external rotatory instability. *J Orthop Sci.* 7:348-353,2002
9. Toshikichi Hayashi, Toshio Kaneda, Yoshiaki Toyama, Masayoshi Kumegawa, Yoshiyuki Hakeda : Regulation of receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand-induced osteoclastogenesis by endogenous interferon- $\beta$  (INF- $\beta$ ) and suppressors of cytokine signaling(SOCS). *J Biological Chemistry* 277(31):27880-27886,2002
10. Kensuke Ochi, Grouping Chen, Takashi Ushida, Satoshi Gojo, Kaoru Segawa, Hitoshi Tai, Kenju Ueno, Hiroyuki Ohkawa, Taisuke Mori, Yoshiaki Toyama, Junichi Hata, Akihiro Umezawa : Use of isolated mature osteoblasts in abundance acts as desired-shaped bone regeneration in combination with a modified Poly-DL-Lactic-Co-Glycolic Acid(PLGA)-Collagen sponge. *J Cellular Physiology* 194:45-53,2002
11. Yasuo Niki, Harumoto Yamada, Shuhji Seki, Toshiyuki Kikuchi, Hironari Takaishi, Yoshiaki Toyama, Kyosuke Fujikawa, Norihiro Toda : Macrophage-and neutrophil-dominant arthritis in human IL-1 $\alpha$  transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 107(9):1127-1135,2001
12. Yasuo Niki, Hideo Matsumoto, Toshiro Otani, Yasunori Suda, Yoshiaki Toyama : Metal ion concentrations in the joint fluid immediately after total knee arthroplasty. *Mod Rheumatol.* 11:192-196,2001
13. Hironori Kaneko, Toshiya Arakawa, Hiroshi Mano, Toshio Kaneda, Aichi Ogasawara, Mari Nakagawa, Yoshiaki Toyama, Yutaka Yabe, Masayoshi Kumegawa, Yoshiyuki Hakeda : Direct stimulation of osteoclastic bone resorption by bone morphogenetic protein(BMP)-2 and expression of BMP receptors in mature osteoclasts. *Bone* 27:479-486,2000

## H. 知的財産権の出願・登録状況 該当なし

免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業 関節リウマチの先端的治療に関する研究  
分担研究報告書

核内 IC を用いたリウマチ滑膜細胞の病的状態の理解とその制御の基盤的研究

中島 利博

聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター ゲノム医科学研究部門 部門長/助教授

研究要旨

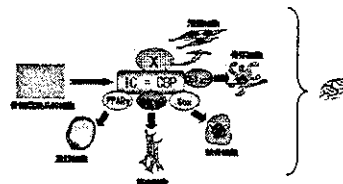
関節リウマチの主病変である滑膜細胞の過増殖と活性化、および軟骨細胞の変性の制御はリウマチ性疾患制圧の標的である。これまで、リウマチ滑膜細胞に転写亢進状態が存在し、その病態に深く関与していることが討議されている。本研究では CREB 結合蛋白質 (CBP) に代表される転写統合装置の機能異常がリウマチ滑膜細胞の転写亢進状態、ひいては同細胞の異常増殖に関与するのではないかと仮定し、本仮説の検証、さらには創薬開発を行うことを目的とする。昨年度、CBP 結合因子としてリウマチ滑膜細胞由来 cDNA ライブラリーより神経系の発生・分化に重要な Notch1 が得られ、リウマチ滑膜細胞では TNF $\alpha$  により Presenilin を介して Notch-1 シグナルが活性化されることが示され、その特異的抑制剤により培養リウマチ滑膜細胞の増殖を制御可能であることを報告した。今年度は、さらに、①本経路の詳細な分子機構を解析した。また、②同様に軟骨細胞のライブラリーより、細胞周期制御因子 p34 が得られ、CBP との複合体形成が CREB 転写系を調節し、同細胞の genesis に影響を与える可能性を報告した (Hirose ら in press)。さらに、CBP 自体の機能亢進現象 (hypernuclear acetylation) がリウマチ滑膜細胞に存在し、その過増殖に関与している可能性を見出した (Nakazawa ら 2002)。今後もこれらの研究を推進しリウマチ制圧法の開発の糸口をしたい。

A. 研究目的

ヒト全ゲノム配列が明らかとなり、より明確な“戦略”を用いて膨大なゲノム資源を選択し、有益な情報を抽出することが 21 世紀の基礎生物学、並びに医学研究の発展に最も求められています。これまで、MyoD、ホメオボックス蛋白質などの組織・細胞・分化特異的転写因子が正常な発生過程のみならず、種々の病巣形成に関与していることが明らかにされました。さらに、これらの因子の機能を理解することが理論的再生医学的アプローチの基盤的知識として必要であることは明白です。すなわち「**相手を知ること**」が、学問体系の確立に必要不可欠であることは自明の理です。関節リウマチの病態を、生体内における多彩な免疫反応と骨破壊を伴った関節滑膜の増殖性疾患という 2 つの側面からとらえた場合、前者の免疫反応に関しては多くの研究がなされ、その分子機序が明らかにされつつあります。しかし後者の関節滑膜細胞の研究に関しては、それが関節リウマチの主座であるのにもかかわらず、その細胞生物学的な特徴すら明らかにされていないのが現状です。

そこで、本研究は“普遍的”転写統合装置を“切り口”として関節リウマチの病巣形成細胞(リウマチ滑膜細胞)の全トランスクリプトームをスクリーニングし、同細胞を規定する核内因子群の同定とその機能解析を行います。すなわち、それぞれの細胞の系譜・生物学的性状、そして病的表現型としての各病変を包括的・根本的に理解し、さらにその分化の人為的制御による治療法の確立を目指すものです。

図. 本研究のわらい



B. 研究方法

方法

滑膜細胞は軟骨細胞などと同様に間葉系細胞由来であるとされています(右図)。しかしながら、その分化・増殖の系譜、さらにそこに関与する分子(群)については明らかにされていません。ある組織・細胞に発現している遺伝子のクローニング法には①ディファレンシャルディスプレイ、サブトラクション法、最近では DNA マイクロアレイを用いた包括的な発現解析法など他の組織・細胞との比較を基盤とする方法がよく行われています。一方で、②affinity カラムなどを用いた生化学的精製法、yeast 2 hybrid 法のようにある因子に結合する因子をその結合力を用いて同定する方法も盛んに行われています。後者のストラテジーの場合、もっとも重要な点のひとつが何をプローブ(指標)として行うかであり、そのことがクローニングの成否を左右しているといっても過言ではありません。申請者は一貫として転写統合装置 CREB binding protein (以下、CBP) の研究を行い、同分子をプローブとして用いた医学研究戦略を展開しています。

(倫理面への配慮)

### I 研究等の対象とする個人の権利擁護

研究結果発表や出版に際しては個人が特定されないよう十分に配慮する。具体的には、研究責任者は、被験者のいかなる個人情報も漏出しないように細心の注意を払い、個人情報管理者を通じて試料等の匿名化を行い、検査実施者(申請者)に対しては登録記号のみで対応する。

### II 研究等の対象となる者に理解を求め同意を得る方法

全ての被験者には別紙の「説明文書」と「同意書」を渡し、内容を十分に説明した上で、その自由意思による同意を得る。DNA、またはcDNAを用いて解析する項目を明確に記載し、被験者の同意が得られた項目に限って検討する。各項目については文書で詳細に説明し、被験者の理解が十分に得られるように努め、インフォームドコンセントを確保する。

### III 研究等によって生ずる個人への不利益並びに危険性への配慮

#### (1) 不利益並びに危険性に対する配慮

検体の採取(採血など)に伴う肉体的苦痛、遺伝子解析への不安などの心理的問題、プライバシーの侵害が考えられる。採血は医師など法的に許可された者が携わり、採血時に不快感を訴えた場合は、ただちに採血を中止し、適切な処置を行う。また、遺伝子を解析することにより、後になって被験者が不安になったり相談したいことができた場合は、まず主治医もしくはインフォームドコンセント担当者などに申し出てもらい相談を受ける。更に必要があれば、研究に直接関与しない第三者として遺伝カウンセリングの担当者に紹介し、カウンセリングを行う。プライバシーの侵害に対しては、前述した方法で個人情報を保護することで対処する。

#### (2) 診断及び検査前後の配慮

遺伝子検査を行うことで、遺伝性疾患を持つ家系に属することが明らかになり、被験者に不安あるいは精神的ストレスを与える可能性があるため、被験者に対する検査前後の配慮を十分に行う。被験者が本研究に協力する際などに、研究説明者(主治医あるいは研究責任者や研究分担者)に聞き難いことや相談しにくいことがあることも予想されるので、専門家によるカウンセリングを行う。

### C. 研究結果

リウマチ滑膜細胞由来cDNAライブラリーよりCBPのC/H3領域をbaitとしたyeast two-hybrid screeningにより117個のポジティブクローンが得られました。シークエンス解析およびデータベース(BLASTP)による検索を行ったところ、29個の陽性クローンがNotch-1でした。

Notchは発生において、主として神経系の側方抑制に関与していることが古典的に知られています。器官幹細胞が分化する際、分化する細胞はそのリガ

ンドを発現し、その周囲の細胞はNotchレセプターが活性化され、分化シグナルが抑制されます。Notch-1は神経系細胞の膜表面でヘテロ二量体として存在し、レセプターとしての機能を有する。リガンドと結合し、Notch-1シグナルが活性化される際、同分子はプロセッシングを受け、核内に移行し転写調節因子としNF- $\kappa$ Bなどのシグナルを活性化すると考えられています。

滑膜細胞でのNotch-1の発現と局在を検討した結果、同分子はリウマチ滑膜細胞で強発現し、かつTNF $\alpha$ のシグナルにより細胞表面から核内への移行を示していました。さらに、リウマチ滑膜細胞ではTNF $\alpha$ によりpresenilinを介してNotch-1シグナルが活性化されることが示され、その特異的抑制剤により培養リウマチ滑膜細胞の増殖を制御可能です。すなわち、今後、まったく新しい視点からのリウマチ性疾患の治療薬の開発が可能です。

さらに残り88クローンのうち一つは新規のクローン(Rheumatoid specific Nuclear Factor1:RSNF1と名付けた)であり、MyoDに類似したモチーフを有していました。現在同分子の細胞レベル、トランスジェニックマウスの作成が終了し、さらにはノックアウトマウスの作成が進んでいます。

### D. 考察

アルツハイマー病と $\gamma$ セクレターゼ/プレセニリンの関連については、多くの優れたレビューがあります。要約すると、プレセニリン1は1995年14番染色体に異常を示す家族性アルツハイマー病の原因遺伝子としてクローニングされました。さらに、プレセニリン2とよばれるホモログがクローニングされました。これも1番染色体に異常を示す家族性アルツハイマー病の原因遺伝子であることが明らかになりました。それぞれ467、448アミノ酸からなる8回貫通型の膜タンパク質で、細胞内では主に小胞体やゴルジ体に局在することが報告されました。これらの遺伝子の一部に突然変異があり、アミノ酸変異が起こると家族性アルツハイマー病を引き起こすことが明らかになりました。その分子機序としてはアルツハイマー病の脳に沈着するアミロイド $\beta$ タンパク質(A $\beta$ )はその前駆体であるアミロイド前駆体タンパク質(APP)から $\gamma$ 、および $\beta$ セクレターゼと呼ばれるプロテアーゼ群により分解を受け生成されます。最近の研究の進展により、プレセニリンが $\gamma$ セクレターゼではないかと考えられています。プレセニリン遺伝子に異常が起こると、 $\gamma$ セクレターゼによるAPPの切断部位が2アミノ酸C末側にシフトし、正常ではあまり産生されない長いA $\beta$ が生み出されるようになります。このA $\beta$ (A $\beta$ 42)は正常のA $\beta$ (A $\beta$ 40)よりも凝集しやすく脳に沈着しやすいことが明らかとなりました。家族性アルツハイマー病で見られる多くのプレセニリン変異はA $\beta$ 42の産生を高めることも知られています。これらのことより、 $\gamma$ セクレターゼはアルツハイマー病の治療の標的として注目を浴びています。

一方、Notch は発生において、主として神経系の側方抑制に関与していることが古典的に知られています。すなわち、器官幹細胞が分化する際、分化する細胞は Notch-1 リガンドを発現し、その周囲の細胞は Notch レセプターが活性化され、分化シグナルが抑制されます。Notch-1 は神経系細胞の膜表面で p180/p120 のヘテロ二量体として存在し、レセプターとして機能します。そのリガンドが結合すると p180 による負の制御が解除され、Notch-1 シグナルが活性化されるものと考えられています。その際、シグナルの活性化により p120 はさらにプロセッシングを受け、核内に移行し、転写調節因子として NF- $\kappa$ B などのシグナルを活性化することが報告されました。最近、この核内移行フラグメント (NICD) のプロセッシングを行うプロテアーゼの一つとして前述したプレセニリンが同定されました。また、PS1、PS2 ダブルノックアウトマウスでは  $\gamma$ セクレターゼ活性、および Notch の切断活性の両者が消失することが示されています。従って、これらの報告と私たちの発見を考え合わせると、 $\gamma$ セクレターゼ/プレセニリンはアルツハイマー病と関節リウマチの両者で共通の活性化分子として存在し、かつ、それぞれの治療の標的となる可能性があります。すなわち、NSAIDs がアルツハイマー病の予防として効果があるということだけではなく、逆に、アルツハイマー病の治療薬が、関節リウマチの治療に有効な可能性も示唆されたのではないかと考えます。

#### E. 結論

思わぬ研究の展開からアルツハイマー病の治療薬として用いられるプレセニリン/ $\gamma$ セクレターゼ阻害剤が関節リウマチの治療にも用いられる可能性を見出しました。

#### F. 健康危惧情報

特にありません。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

H. Fujita, R. Fujii, S. Aratani, T. Amano, A. Fukamizu, T. Nakajima, "Opposite effects of MBD2a on gene regulation" *Molecular and Cellular Biology* in press 2003

S. Aratani, R. Fujii, H. Fujita, A. Fukamizu, T. Nakajima, "Aromatic residues are required for RNA helicase A mediated transactivation." *International Journal of Molecular Medicine* in press 2003

T. Hirose, R. Fujii, H. Nakamura, A. Aratani, H. Fujita, M. Nakazawa, K. Nakamura, K. Nishioka, T. Nakajima, "Regulation of CREB-mediated

transcription by association of CDK4 binding protein p34 SEI-1 with CBP" *International Journal of Molecular Medicine* in press 2003

N. Araya, K. Hirota, Y. Shimamoto, M. Miyagishi, E. Yoshida, J. Ishida, S. Kaneko, M. Kaneko, T. Nakajima, A. Fukamizu. "Cooperative Interaction of EWS with CBP Selectively Activates HNF4-mediated Transcription." *J Biol Chem.* in press 2003

M. Nakazawa, S. Aratani, M. Hatta, N. Araya, H. Daitoku, K. Kawahara, S. Watanabe, H. Nakamura, S. Yoshino, A. Fukamizu, K. Nishioka T. Nakajima, "TNF $\alpha$  induces acetylation of p53 but attenuates its transcriptional activation in rheumatoid synoviocytes" *International Journal of Molecular Medicine* 10: 269-275 2002.

T. Imaizumi, S. Aratani, T. Nakajima, M. Carlson, T. Matsumiya, K. Tanji, K. Ookawa, H. Yoshida, S. Tsuchida, T. M. McIntyre, S. M. Prescott, G. A. Zimmerman, K. Satoh. "Retinoic Acid-Inducible Gene-1 Is Induced in Endothelial Cells by LPS and Regulates Expression of COX-2." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 292: 274-279 2002

Nguyen Ngoc Chau, H. Nakamura, M. Nakazawa, T. Hirose, T. Kobata, K. Nishioka, T. Nakajima, "Expression of HOXD9 in fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients." *International Journal of Molecular Medicine* 10: 41-48 2002

H. Kitagawa, J. Yanagisawa, H. Fuse, S. Ogawa, Y. Yogiashi, A. Okuno, H. Nagasawa, T. Nakajima, T. Matsumoto, S. Kato. "Ligand Selective Potentiation of Rat Mineralocorticoid Receptor Activation Function-1 (AF-1) by ACBP-containing HAT complex." *Mol. Cell. Biol.* 22: 3698-3706 2002.

H. Kawabata, K. Kawahara, T. Kanekura, N. Araya, H. Daitoku, M. Hatta, N. Miura, A. Fukamizu, T. Kanzaki, I. Maruyama, T. Nakajima, "Possible role of transcriptional coactivator P/CAF and nuclear acetylation in calcium induced keratinocyte differentiation." *J Biol Chem.* 277: 8099-8105 2002

H. Ishii, M. Nakazawa, S. Yoshino, H. Nakamura, K. Nishioka, T. Nakajima, "Expression of Notch homologues in the synovium of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients." *Rheumatology International* 21:10-14 2001.

H. Daitoku, J. Ishida, K. Fujiwara, T. Nakajima,

- A. Fukamizu. "Dimerization of small GTPase Rab5" *International Journal of Molecular Medicine* 8 : 397-404 2001.
- S. Aratani, R. Fujii, T. Oishi, H. Fujita, T. Amano, T. Ohshima, M. Hagiwara, A. Fukamizu, and T. Nakajima. "Dual roles of RNA helicase A in CREB-dependent transcription." *Mol. Cell. Biol.* 21 : 4460-4469 2001.
- M. Nakazawa, H. Ishii, H. Aono, M. Takai, T. Honda, S. Aratani, A. Fukamizu, H. Nakamura, S-I, Yoshino, T. Kobata, K. Nishioka, T. Nakajima "Role of Notch-1 intracellular domain in activation of rheumatoid synoviocytes." *Arthritis and Rheumatism* 44 : 1545-1554 2001.
- R. Fujii, M. Okamoto, S. Aratani, T. Oishi, T. Ohshima, K. Taira, M. Baba, A. Fukamizu, T. Nakajima "A role for RNA helicase A in TAR-dependent transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus type 1" *J Biol Chem.* 276 : 5445-5451 2001.
- Nguyen Dinh Khoa, Minako Nakazawa, Tomoko Hasunuma, Toshihiro Nakajima, Hiroshi Nakamura, Tetsuji Kobata, Kusuki Nishioka. "Potential role of HOXD9 in synoviocyte proliferation." *Arthritis and Rheumatism* 44 : 1013-1021 2001
- KP. Sarker, M. Nakata, T. Tokioka, I. Kitajima, T. Nakajima, I. Maruyama. "Inhibition of Caspase-3 Activation by SB203580, p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitor in Nitric Oxide-Induced Apoptosis of PC-12 Cells." *Journal of Molecular Neuroscience* 15 : 243-250 2001.
- Ohshima T, Yoshida Y, Nakajima T, Yagami K, Fukamizu A. "Effects of interaction between parvovirus minute virus of mice NS1 and coactivator CBP on NS1-and p53 -transactivation." *International Journal of Molecular Medicine* 7: 49-54 2001.
- Nakazawa M, Ishii H, Nakamura H, Yoshino S, Fukamizu A, Nishioka K, Nakajima T. "NF $\kappa$ B2 (p52) promoter activation via Notch signaling pathway in rheumatoid synoviocytes." *International Journal of Molecular Medicine* 7: 31-35 2001.
- Miyagishi M, Fujii R, Hatta M, Yoshida E, Araya N, Nagafuchi A, Ishihara S, Nakajima T, Fukamizu A. "Regulation of Lef-mediated transcription and p53-dependent pathway by associating  $\beta$ -catenin with CBP/p300." *J Biol Chem.* 275: 35170-35175 2000.
- Shimohata T, Nakajima T, Yamada M, Uchida C, Onodera O, Naruse S, Kimura T, Koide R, Nozaki K, Sano Y, Ishiguro H, Sakoe K, Ooshima T, Sato A, Ikeuchi T, Oyake M, Sato T, Aoyagi Y, Hozumi I, Nagatsu T, Takiyama Y, Nishizawa M, Goto J, Kanazawa I, Davidson I, Tanese N, Takahashi H. Tsuji S. "Interaction of expanded polyglutamine stretches associated with CAG repeat diseases and hTAFII130 interferes with CREB-dependent transcription." *Nature Genetics* 26: 29-36 2000
- Pitkanen J, Doucas V, Sternsdorf T, Nakajima T, Aratani S, Jensen K, Will H, Vahamurto P, Ollila J, Vihinen M, Scott HS, Antonarakis SE, Kudoh J, Shimizu N, Krohn K, Peterson P. "APECED protein AIRE has transcriptional transactivating properties and interacts with common co-activator CBP." *J. Biol. Chem.* 275: 16802-16809 2000.
- Nakazawa m. Hasunuma T. Ohshima T. Tanaka Y. Nishioka k. Nakajima T. "CBP: a target molecule of HTLV-1 Tax in synoviocyte activation." *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 269: 584-590 2000
- M. Miyagishi, T. Ohshima, J-I. Ishida, R. Fujii, T. Nakajima, A. Fukamizu "Molecular characterization of mesoderm-restricted basic helix-loop-helix protein, POD-1/capsulin." *International Journal of Molecular Medicine* 5: 27-31 2000.
- Miyagishi, M. Nakajima T. Fukamizu A. "Cell type-dependent transactivation or repression of mesoderm-restricted basic helix-loop-helix protein, POD-1/Capsulin." *Molecular and Cellular Biochem.* 205: 141-147 2000.

## 2. 学会発表

- 12<sup>th</sup> Annual Joint Meeting on Immunology Teaching and Research 2002/3/4-6
- Cold Springharbor Laboratory Meeting 2002/5-21-28
- 46<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan College of Rheumatology 2002/4/23

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得  
特にありません。
2. 実用新案登録  
特にありません。
3. その他  
特にありません。

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

関節リウマチの先端的治療に関する研究班  
(分担研究課題:増殖因子による軟骨修復機構)

分担研究者 開 祐司 京都大学再生医科学研究所教授

軟骨は無血管の特殊な結合組織で、胎生期の骨形成予定領域に軟骨性骨原基として広く出現する。しかし、軟骨性骨原基はやがて周囲組織からの血管の侵入をうけ、骨に置換される。このために成熟個体では、関節表面に関節軟骨としてわずかに残るのみとなる。しかし、可動関節表面の軟骨は、荷重を支えると同時に可動性を保証する極めて重要な機能を担っている。それにも関わらず、骨とは対照的に、その表面を覆う関節軟骨は再生能力に極めて乏しい。このため、関節軟骨が一旦損傷や壊死に陥ると進行性に組織破壊が起こる。本研究では、軟骨幹細胞株 ATDC5 細胞による *in vitro* 分化モデルと関節軟骨全層欠損による *in vivo* 軟骨再生モデルを駆使して、軟骨再生誘導の分子基盤とこれを応用した軟骨再生技術を開拓する。

これまでの研究により、関節軟骨全層欠損における軟骨修復においては、軟骨下骨の骨髄から供給される間葉系幹細胞の動員と活発な自己複製能の維持が軟骨再生誘導する決定的な要因であることが明らかとなった。特に、欠損周囲組織から供給される FGF-2 シグナルが骨髄内から動員される前駆軟骨細胞の遊走のみならず、欠損部での旺盛な増殖維持に不可欠の役割を果たしている。そこで本年度は、骨髄より遊走する前駆軟骨細胞の分化初期過程を詳細に解析するために、(種々の分子プローブが利用可能な)ラット大腿骨膝蓋窩に関節軟骨全層欠損モデルの作成を目指した。すなわち、1)自然治癒がはかれる小口径の全層欠損を再現性よく作成する実験手技を工夫する。2)分子プローブを用いて軟骨初期分化過程を追跡することを試みた。

## A. 研究目的

軟骨は無血管の特殊な結合組織で、間葉系細胞の軟骨分化により胎生期の骨形成予定領域に広く出現する。このようにして形成された軟骨性骨原基は、やがて周囲組織からの血管の侵入をうけると共に、骨に置換される。そのため、成熟個体の骨格では関節軟骨として骨端にわずかに残る。一般に高い再生能力を有する骨に比べて、その表面を覆う関節軟骨は再生能力の極めて乏しい組織である。本研究では、軟骨・骨発生におけるシグナルネットワークをモデルに、関節軟骨の再生修復制御の分子基盤を確立する。本年度は、これまでに確立したウサギ関節軟骨全層欠損モデルに代わって、分子生物学的解析手法に適したラットを用いて自然修復しうる定量的全層欠損モデルを確立した。

## B. 研究方法

ウサギよりはるかに小さな組織を持つラットに、幅・長さ・深さを正確に且つ再現性よく保ちながら大腿骨膝蓋溝に関節軟骨全層欠損を作成する2枚刃デバイスの設計と作成した。この独自デバイスを用いて作成された、関節軟骨全層欠損の幅・長さ・深さを計測した。次いで、これを用いて6週齢雄 Wister 系ラット (N=105) の大腿骨膝蓋溝に作成した全層欠損 (幅 0.7mm 長さ 4mm 深さ 0.8mm) を対象に、術後 2、4、7 日目および 2、4、8、12、24 週目で屠殺し、safranin-O 染色による組織学的観察、ならびに免疫組織染色、in situ ハイブリダイゼーション法による II 型コラーゲン mRNA (col II)、N-カドヘリン、および PTH/PTHrP 受容体 (以下 PTHR) の経時的な発現を検討した (倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、京都大学再生医科学研究所及び熊本大学医学部の動物実験委員会に提出・審査を経た実験計画に基づき、「動物実験に関する指針」に従って実施され

た。

## C. 研究結果

2 日目では欠損の辺縁部に未分化細胞の浸潤がみられ、4 日目には欠損全体を未分化細胞が充填し、欠損中心の細胞には N-cadherin の発現がみられた。1 週間にはその発現は消失し、同部には type II collagen mRNA を発現する多角形の細胞が出現し、10 日目には safranin-O 染色陽性の軟骨基質に囲まれる類円形の軟骨細胞が出現した。以後、軟骨形成が進行するが、欠損深部では 4 日目より骨形成を認め、2 週間には新生骨に接して type X collagen mRNA を発現する肥大軟骨細胞がみられた。4 週間には隣接した骨軟骨境界部まで形成された軟骨下骨の表面を軟骨で被覆された本来の組織構築が回復された。12 週目より軟骨基質の染色性の低下がみられたが、24 週までその組織構造は維持されていた。一方、PTHR 受容体は 2 日目の欠損内の未分化細胞には発現していなかったが、4 日目に欠損内を充填した細胞の多くにその発現を認めた。

## D. 考察

今回作成したラット関節軟骨全層欠損モデルでは再現性の高い軟骨修復がみられ、また一定した修復過程が観察された。細胞凝集過程は軟骨初期分化を支配する重要な制御段階であることが知られ、この際 N-cadherin 等の細胞接着分子が重要な働きをしている。本モデルで 4 日目の欠損中心の細胞が N-cadherin を発現し、その後軟骨細胞への分化がみられたことは、これらの細胞が胎生期肢芽形成や軟骨前駆細胞培養系でみられる細胞凝集領域内の細胞に相当することを示唆している。われわれは既に家兎関節軟骨全層欠損モデルにおいて PTH/PTHrP 受容体が高度に軟骨分化に限定された分化段階の細胞 (軟骨前駆細



胞)に発現することを示したが、今回の結果は、骨髄より欠損部に遊走した細胞はこれより未分化な段階にあることを示唆している。

#### E. 結論

大腿骨膝蓋溝に関節軟骨全層欠損を作成するための2枚刃デバイスを独自に設計・作成した。これによって、関節軟骨全層欠損の修復過程を再現性よく追跡することが可能となった。ラットではウサギよりも遥かに充実した分子マーカーを用いた解析ができるので、本ラットモデルは関節軟骨全層欠損の修復制御機構を解明する上で有用なモデルであることが示された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) K. Kusafuka, Y. Hiraki, C. Shukunami, T. Kayano, and T. Takemura (2002) *Acta Histochem.*, 104, 167-175; Cartilage-specific matrix protein, chondromodulin-I (ChM-I), is a strong angio-inhibitor in endochondral ossification of human neonatal vertebral tissues in vivo: relationship with angiogenic factors in the cartilage.
- 2) H. Inoue, Y. Hiraki, T. Nawa, and K. Ishizeki (2002) *Anat. Sci. Int.* 77, 237-246; Phenotypic switching of in vitro mandibular chondylar cartilage during matrix mineralization.

##### 2. 学会発表

- 1) H. Chuma, H. Mizuta, K. Takagi, and Y. Hiraki (2001) Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies of the USA, Canada, Europe and Japan (Greece); The effect of a limited and transient administration of FGF-2 on regeneration

of articular cartilage defects.

- 2) K. Kusafuka, Y. Hiraki, C. Shukunami, A. Yamaguchi, T. Kayano, and T. Takemura (2002) First Congress on Salivary Gland Diseases (Geneva, Switzerland); Chondromodulin-I is associated with hypovascularity of pleomorphic adenomas.
- 3) H. Chuma, H. Mizuta, K. Takagi, and Y. Hiraki (2002) The 48th Annual Meeting of the ORS (Dallas, Texas); Transient administration of FGF-2 promotes regeneration of articular cartilage defects by migration of marrow-derived mesenchymal stem cells.
- 4) 瀬戸口京吾、三崎義堅、川畑仁人、島田浩太、宿南知佐、開祐司、山本一彦(2002) 第46回日本リウマチ学会総会・学術集会(神戸); 骨端軟骨由来因子コンドロモジュリン-I(Chondromodulin-I)のT細胞機能抑制を介した関節炎改善.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生労働科学研究研究費補助金  
免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

関節リウマチの先端的治療に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 西岡 久寿樹

平成16(2004)年4月

関節リウマチの先端的治療に関する研究

主任研究者 西岡 久寿樹 聖マリアンナ医科大学教授 難病治療研究センター長

研究要旨:

人口の高年齢化と共に今後日本でも増加の一途を辿ると考えられる関節リウマチを代表とする骨・関節疾患の病因・病態、特に症状の進展プロセスの解明とその制御（治療）の解明は、疾病の重症度、長期化、QOLに与える著しい損失を考えると緊急の課題である。特にこれらの疾患は、国民医療費が年々著しい増加を辿っている現状で、直接医療費のみならず、ケア等の間接的な医療費に与える影響は極めて深刻である。そこで、①関節リウマチを軸とした運動器疾患の病因・病態に関与するゲノム分子、タンパクを網羅的に解析する方法を確立し、その全容の一部が解明され、これらの成果は直ちに創薬研究へ移行しており、高いQOLの獲得を目的とした治療戦略の確立に一定の「メド」がついてきている。②リウマチ性疾患を制圧し、高いQOLの獲得において、疾病負担を客観的に評価し、開発コスト、保険医療費等のいわゆる「消費される部分」と、自覚症状の開発によって得られるQOLの向上による医療費の「削減」という費用対効果の解析に研究を重ねてきた。国際的に用いられている抗リウマチ剤を対象に行った成果では、著明な医療費抑制効果が認められた。

研究センター 助教授

分担研究者

岩倉洋一郎	東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター 教授
尾崎 承一	聖マリアンナ医科大学リウマチ・膠原病・アレルギー内科 教授
高柳 広	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 特任教授
妻木 範行	大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学 助手
千葉 一裕	慶應義塾大学医学部整形外科学教室 講師
中島 利博	聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター 助教授
開 祐司	京都大学再生医科学研究所 教授
半田 宏	東京工業大学大学院生命理工学研究科 教授
吉田 勝美	聖マリアンナ医科大学予防医学教室 教授

研究協力者

川合 眞一	聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター 教授
加藤 智啓	聖マリアンナ医科大学難病治療

A. 研究目的

昨年の本研究計画書でも述べたように、国民医療費や日常生活機能に直接的重大な影響を及ぼすと考えられる関節リウマチ等骨・関節疾患は、今後増加の一途にあると考えられる。最近の米国における推計では、リウマチ性疾患患者数は2020年までに4000万に上るといわれている（“Time” Dec. 9, 2002）。我々の研究班の調査でも、本邦における同疾患の推定患者数は、現時点で1200万、2020年までには米国並みの推移を辿り、2000万に上ると推定される。我々の研究班では、こういったリウマチ性疾患を克服するために、第一にその病変の主座である関節機能の障害に関連したゲノム医学及びプロテオーム分子レベルでの網羅的解析に基づく病因解明、特に症状進展のプロセスの解明とその制御、及び医療経済的な面からその疾病負担による治療薬の研究開発とその適応によって得られる効果、すなわち費用対効果の2点に重点をおいて研究を重ねてきた。そのために、①運動器を構築する滑膜・骨・軟骨及び筋線維の変性の病態に関わる分子及び遺伝子群の解明、②滑膜、軟骨及び骨破壊の遺伝子分子機構を網羅的に解析するプロテオーム並びにゲノム研究グループによる標的治療分子の解明とナノバイオビーズ等の新技術による創薬開発の可能性の検討、③リウマチ性疾患による骨・関節破壊の障害を生活機能障害の視点より位置づけ、高いQOLの獲得を目指した治療戦略の作成、④リウマ

子性疾患の生活機能障害の実態を把握し、その疾病負担を評価する計量化モデルの作成、以上の4重点課題を提起した。その制圧によって得られる成果を、いわゆる費用対効果の面から詳細な解析を行い、医療福祉・経済面からもこれからの研究開発の妥当性を検証した。

## B. 研究方法

本年度は、新たに発見されたリウマチの関節炎発症の病因タンパク、軟骨細胞の異化に治療的な分子群の機能解析を推進した。

1) 筋骨格系を中心とする運動器障害に伴う生活機能の回復へ向けた研究

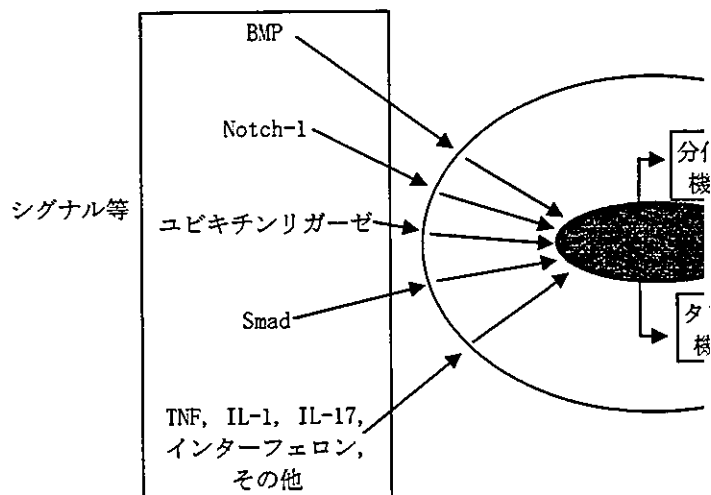
- ① 変形性関節症、骨粗鬆症における骨・軟骨破壊の分子機構の解明。
- ② 成長因子、Notch 遺伝子などによる軟骨分化誘導とその解明に関する基礎的・臨床的研究。
- ③ 運動器科学という新たな学際的領域の確立と生活機能病の概念の普及啓発活動。

2) リウマチ治療関連3班（宮坂班、江口班、竹内班）と合同で、リウマチ治療全般（非ステロイド、骨粗鬆症治療薬、DMARDs、サイトカイン療法、リハビリテーション等）に関する治療の推進、クリニカルパスの作成とPMSの評価

〈倫理面への配慮〉

- ① 生体試料を使用する研究は全て、大学内及び関連施設における倫理委員会の承諾を得るなど十分に倫理面に配慮する。
- ② 遺伝子解析にあたって、被験者の人権を保護する目的から説明文と同意書を文章の形で残し、説明文の中にDNA研究もしくは遺伝子研究という文章を含むものとしている。
- ③ 創薬の開発に関しては、GMP、臨床開発まで進展する場合にはGCPに関する国際基準にのっとり行う。特に、本邦初の画期的創薬の臨床応用を、今後国際的に推進していくためには必須である。

関節炎病態に関する滑膜細胞、破骨細胞、



## C. 研究結果

1) 関節炎発症の分子機構の制御

- ① サイトカイン産生による骨破壊への関与の解明、特にIL-17の骨・軟骨破壊への関与を検討した。
- ② BMPシグナルの遺伝子操作による軟骨の分化誘導を解明し、標的分子の絞込みを行った。
- ③ 関節リウマチにおける関節内のホメオスタシス破綻を解明するための分子戦略を構築した。
- ④ 普遍的核内統合装置機能亢進症、核内アセチル化の亢進を明らかにした。
- ⑤ ユビキチンリガーゼの活性化によるタンパク質の処理機能の障害を解明した。
- ⑥ 軟骨細胞の初期分化誘導にNotch遺伝子が強く関係し、今後の軟骨再生の鍵となる分子であることを明らかにした。
- ⑦ 軟骨細胞由来の抗原ペプチドを網羅的に解析し、その結果TPI (Triphosphate Isomerase)、Fibulin 4などを代表とする計30個の抗体ペプチドを同定し、これらが関節炎の発症、特に軟骨破壊に関与することを明らかにした。

この成果をまとめると以下の図のようになる。

2) 新薬開発と臨床応用に関する費用対効果の検討

本邦で、臨床応用のため開発された新薬の治療効果と、その医療費削減効果を検討した。その結果、新薬の治療効果に対応して医療費の抑制効果が確認された。

#### D. 考察

本年度は、関節リウマチを中心とするリウマチ性疾患制圧に向けて、多くの成果が得られた。リウマチの主病変である滑膜細胞では、世界で初めてユビキチンリガーゼの一つがアポトーシスの制御分子であることが発見され、リウマチの滑膜細胞制御に対する画期的な治療薬開発に大きな進展が見られ、また、軟骨細胞の異化、亢進のシグナル(Smad, BMP, Notch-1 など)やケモカインの働きが解明された。また、軟骨の抗原性ペプチドのプロテーム解析による成果は、免疫応答の制御剤が一定の治療薬候補として考えられることを示した。また、インターフェロンによる破骨細胞の制御の知見は、骨破壊の分子制御と関節病変に関わる主な間葉系細胞の治療に新しい戦略を展開していると考えられる。

新薬の臨床開発コストや医療費、患者の QOL 向上による経済効果を検討した結果、ACR20%、ACR50%、ACR70%のそれぞれに対応し、顕著な医療費の抑制効果が確認されている。

#### E. 結論

- ① 本研究対象の関節リウマチや変形性関節症などの主な関節炎の病変の主座は、それぞれ滑膜間葉系細胞、軟骨細胞である。今回のそれぞれの細胞の増殖、異化アポトーシスの制御に関わる一連のゲノム及び分子群の同定は、今後の画期的創薬の開発に大きな進展をなすことが考えられ、その一部は既に非臨床試験に移行している。
- ② 分子とレセプター間の特異的結合を阻害するため、製剤化の技術として抗体とナノサイズのラテックスビーズを構築して、さらに創薬開発の基盤技術を加えたナノバイオビーズの開発に成功した。
- ③ 本邦で、リウマチ治療新規の2剤が開発され、医療費と臨床効果、開発コストなどを検討した。経口のレフルノミドを対象に、YLD でみると臨床的効果に対応して顕著な医療費の抑制がみられた。これらの事実は、リウマチ性疾患の活動性抑制による臨床効果は、開発コストをはるかに上回り、直接的、間接的医療費の抑制に大きく貢献していることが明らかにされた。

#### F. 健康危険情報

特にありません。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yao Z, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Suzuki-Kurokawa M, Nishioka K, Kato T.: Characterisation of cartilage intermediate layer protein (CILP)-induced arthropathy in mice.

Ann Rheum Dis 63(3): 252-258, 2004.

2. Dai SM, Matsuno H, Nakamura H, Nishioka K, Yudoh K.: Interleukin-18 Enhances Monocyte Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  and Interleukin-1 $\beta$  Production Induced by Direct Contact With T Lymphocytes. Arthritis Rheum 50(2): 432-443, 2004.
3. Yuan G.-H, Tanaka M, Masuko-Hongo K, Shibakawa A, Kato T, Nishioka K, Nakamura H.: Characterization of cells from pannus-like tissue over articular cartilage of advanced osteoarthritis. Osteoarthritis and Cartilage 12: 38-45, 2004.
4. Distler JH, Hagen C, Hirth A, Muller-Ladner U, Lorenz HM, Del Rosso A, Michel BA, Gay RE, Nanagara R, Nishioka K, Matucci-Cerinic M, Kalden JR, Gay S, Distler O.: Bucillamine induces the synthesis of Vascular Endothelial Growth Factor Dose-Dependently in systemic sclerosis fibroblasts via Nuclear Factor- $\kappa$ (kappa)B and Simian Virus 40 Promoter Factor 1 Pathways. Mol Pharmacol 65(2): 389-399, 2004.
5. Sakata M, Masuko-Hongo K, Nakamura H, Onuma H, Tsuruha JI, Aoki H, Nishioka K, Kato T.: Osteoarthritic articular chondrocytes stimulate autologous T cell responses *in vitro*. Clin Exp Rheumatol 21(6): 704-710, 2003.
6. Yuan GH, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K.: Immunological intervention in the Pathogenesis of Osteoarthritis. Arthritis Rheum 48(3): 602-611, 2003.
7. Shibakawa A, Aoki H, Masuko-Hongo K, Kato T, Tanaka M, Nishioka K, Nakamura H.: Presence of pannus-like tissue on osteoarthritic cartilage and its histological character. Osteoarthritis Cartilage 11(2): 133-140, 2003.
8. Inoue K, Masuko-Hongo K, Okamoto M, Nishioka K.: Efficacy of daily compared to intermittent administration of IL-1Ra for protection against bone and cartilage destruction in collagen-challenged mice. Clin Exp Rheumatol 21(1): 33-39, 2003.

##### 2. 学会発表

1. 西岡久寿樹: 研究の総括: 関節リウマチの先端的治療に関する研究 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「公開シンポジウム」. 都市センターホテル (東京) 2/23.24, 2004.
2. 西岡久寿樹: 研究の総括: 関節リウマチの先端的治療に関する研究 平成 15 年度研究報告会 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」. KKR HOTEL TOKYO (東京) 2/16-17, 2004.

3. 唐澤里江、関根太一、大岡正道、三井健一、貫名信行、西村裕之、尾崎承一、西岡久寿樹、加藤智啓: 血管炎における抗内皮細胞抗体の対応抗原に関する検討: ペルオキシシレドキシニン2に対する自己抗体 平成15年度第2回厚生労働科学研究費補助金班会議 難治性疾患克服研究事業「難治性血管炎に関する調査研究」. 都市センターホテル(東京) 2/13, 2004.
4. 西岡久寿樹: 創薬研究開発の拠点形成基本的フレームについて ハイテク・リサーチ・センターフォーラム2004. 聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター 1/20, 2004.
5. 中村 洋、田中道明、加藤智啓、西岡久寿樹: Hyaluronate の軟骨細胞のMMP-1 抑制作用とそのメカニズム 第3回 Biomatrix Forum 研究発表会. パレスホテル(東京) 1/17, 2004.
6. 加藤智啓、大岡正道、関根太一、尾崎承一、西村裕之、三井健一、西岡久寿樹: プロテオミクスを用いた抗内皮細胞抗体の対応抗原の網羅的同定と解析 第33回日本免疫学会総会. 福岡国際会議場 マリンメッセ福岡 12/8-10, 2003.
7. Dai SM, Nishioka K, Yudoh K.: IL-18 enhances monocyte TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production induced by direct contact with T lymphocytes: implication in rheumatoid arthritis. 第33回日本免疫学会総会. 福岡国際会議場 マリンメッセ福岡 12/8-10, 2003.
8. Shan ZZ, Masuko-Hongo K, Nakamura H, Kato T, Nishioka K.: A Potential role of 15-deoxy-delta prostaglandin J2 to induce apoptosis of human articular chondrocytes. 第33回日本免疫学会総会. 福岡国際会議場 マリンメッセ福岡 12/8-10, 2003.
9. Itoh K, Hase H, Kojima H, Nishioka K, Kobata T.: Central role of Mitochondria and p53 in Fas-Mediated Apoptosis of Rheumatoid Synovial Fibroblasts. 第33回日本免疫学会総会. 福岡国際会議場 マリンメッセ福岡 12/8-10, 2003.
10. Kusuki Nishioka: Current and new therapies for Osteoarthritis APLAR Symposium / Annual National Conference of Indian Rheumatology Association (IRACON 2003). India Habitat Centre, New Delhi, India 11/27-30, 2003.
11. 西岡久寿樹: リウマチ医学のプライマリケアから先端医療まで 京都府医師会学術講演会. 京都パークホテル 11/22, 2003.
12. Yudoh K, Matsuno H, Nishioka K.: Telomerized Osteoblasts Prevent Bone Mass Loss in vivo. American College of Rheumatology, 67th Annual Scientific Meeting. Orlando, Florida 10/23-28, 2003.
13. Karasawa R, Sekine T, Ooka S, Nishimura H, Nukina N, Mitsui K, Ozaki S, Nishioka K, Kato T.: Targets of Anti-endothelial Cell Antibodies in Patients with Systemic Vasculitis: Identification by the Proteomic Approach. American College of Rheumatology, 67th Annual Scientific Meeting. Orlando, Florida 10/23-28, 2003.
14. Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Imajoh-Ohmi S, Fukuda H, Nishioka K, Kato T.: Proteomic Surveillance of Autoimmunity in Osteoarthritis: Identification of Triosephosphate Isomerase as an Autoantigen in Patients with Osteoarthritis. American College of Rheumatology, 67th Annual Scientific Meeting. Orlando, Florida 10/23-28, 2003.
15. Dai S-M, Nishioka K, Yudoh K.: IL-18 Stimulates Collagenases and Aggrecanases Production in Human Articular Chondrocytes. American College of Rheumatology, 67th Annual Scientific Meeting. Orlando, Florida 10/23-28, 2003.
16. Sato T, Masuko-Hongo K, Nishioka K.: Chemokines Induce Productions of Matrix Metalloproteinase-3 (stromelysin) and Prostaglandin E2 by Human Articular Chondrocytes. American College of Rheumatology, 67th Annual Scientific Meeting. Orlando, Florida 10/23-28, 2003.
17. Trieu N, Nishioka K, Yudoh K.: Oxidative Stress Induces Cartilage Destruction and Genomic Instability in Cartilages and Chondrocytes from Osteoarthritis (OA) Patients. American College of Rheumatology, 67th Annual Scientific Meeting. Orlando, Florida 10/23-28, 2003.
18. Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Imajoh-Ohmi S, Fukuda H, Nishioka K, Kato T.: Fibulin-4 is a Component of Cartilage and a Target of Autoantibodies in Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis. American College of Rheumatology, 67th Annual Scientific Meeting. Orlando, Florida 10/23-28, 2003.
19. Shibakawa A, Nishioka K, Kato T, Masuko K, Yudo K, Nakamura H.: A Novel Destructive Mechanism of Osteoarthritis Cartilage Mediated by Soft Tissue From Surface and From Bone Marrow. American College of Rheumatology, 67th Annual Scientific Meeting. Orlando, Florida 10/23-28, 2003.
20. Dai S-M, Nishioka K, Yudoh K.: IL-18 Enhances Monocyte TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  Production Induced by Direct Contact with T Lymphocytes: Implication in Rheumatoid Arthritis. American College of Rheumatology, 67th Annual Scientific Meeting. Orlando, Florida 10/23-28, 2003.

21. Dai S-M, Nishioka K, Yudoh K.: IL-18 Modulates Osteoclastogenesis via T Cells in Rheumatoid Arthritis. American College of Rheumatology, 67th Annual Scientific Meeting. Orlando, Florida 10/23-28, 2003.
22. Kato T, Dai S-M, Yao Z, Watanabe A, Ooka S, Kurokawa MS, Nakamura H, Matsui T, Nishioka K.: Inhibition of Osteoclastogenesis by Autoantibodies to RANK in vitro. American College of Rheumatology, 67th Annual Scientific Meeting. Orlando, Florida 10/23-28, 2003.
23. 中村 洋、田中道明、増子佳世、加藤智啓、西岡久寿樹: 変形性関節症における免疫機構—軟骨細胞と T 細胞の相互作用について—第 18 回日本整形外科学会基礎学術集会. 北九州市 (北九州国際会議場) 10/16-17, 2003.
24. Ozaki S, Karasawa R, Ooka S, Sekine T, Nishimura H, Mitsui K, Nukina N, Nishioka K, Kato T.: Novel Autoantigen for Anti-Endothelial Cell Antibodies (AECA) Identified by Proteomic Surveillance. 11th International Vasculitis and ANCA Workshop. Prague, Czech Republic 10/2-5, 2003.
25. 岡 寛、尾崎承一、西岡久寿樹: 関節リウマチにおける生物学的製剤のクリニカルパス～診療の標準化と最適化～ 第 18 回日本臨床リウマチ学会総会. ロイトン札幌 10/2-3, 2003.
26. Nakamura H, Kato T, Masuko-Hongo K, Tanaka M, Shibakawa A, Nishioka K.: T cell-chondrocyte interaction in the pathogenesis of osteoarthritis. 3rd World Congress of the Global Arthritis Research Network (GARN). Miyazaki, Japan (Summit Hall at Sheraton Resorts) 9/14-17, 2003.
27. Yudoh K, Trieu N van, Matsuno H, Nishioka K.: Oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and chondrocyte dysfunctions in osteoarthritis. 3rd World Congress of the Global Arthritis Research Network (GARN). Miyazaki, Japan (Summit Hall at Sheraton Resorts) 9/14-17, 2003.
28. Amano T, Yamasaki S, Yagishita N, Tsuchimochi K, Fukamizu A, Maruyama I, Nishioka K, Nakajima K.: Synoviolin as a novel pathogenic factor for arthropathy. 3rd World Congress of the Global Arthritis Research Network (GARN). Miyazaki, Japan (Summit Hall at Sheraton Resorts) 9/14-17, 2003.
29. Yagishita N, Amano T, Yamasaki S, Tsuchimochi T, Nishioka K, Maruyama I, Fukamizu A, Nakajima T.: The importance of Synoviolin in embryogenesis. 3rd World Congress of the Global Arthritis Research Network (GARN). Miyazaki, Japan (Summit Hall at Sheraton Resorts) 9/14-17, 2003.
30. Tsuchimochi K, Yamasaki S, Yagishita N, Amano T, Komiya S, Maruyama I, Nishioka K, Nakajima T.: Transcriptional regulation of Synoviolin is important for the proliferation of rheumatoid synovial cells. 3rd World Congress of the Global Arthritis Research Network (GARN). Miyazaki, Japan (Summit Hall at Sheraton Resorts) 9/14-17, 2003.
31. Yamasaki S, Yagishita N, Amano T, Tsuchimochi K, Maruyama I, Nishioka K, Nakajima T.: Pathogenic roles of Synoviolin in synovial hyperplasia of rheumatoid arthritis. 3rd World Congress of the Global Arthritis Research Network (GARN). Miyazaki, Japan (Summit Hall at Sheraton Resorts) 9/14-17, 2003.
32. Matsuno H, Yudoh K, Nishioka K.: Antirheumatic effects of humanized anti-Fas monoclonal antibody in human rheumatoid arthritis/SCID mouse chimera. 3rd World Congress of the Global Arthritis Research Network (GARN). Miyazaki, Japan (Summit Hall at Sheraton Resorts) 9/14-17, 2003.
33. Masuko-Hongo K, Shang ZZ, Kato T, Nakamura H, Nishioka K.: 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 induces apoptosis in human articular chondrocytes. 3rd World Congress of the Global Arthritis Research Network (GARN). Miyazaki, Japan (Summit Hall at Sheraton Resorts) 9/14-17, 2003.
34. Kato T, Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Imajoh-Ohmi S, Fukuda H, Nishioka K.: Proteomic surveillance of autoimmunity in osteoarthritis. 3rd World Congress of the Global Arthritis Research Network (GARN). Miyazaki, Japan (Summit Hall at Sheraton Resorts) 9/14-17, 2003.
35. 西岡久寿樹: 関節炎症治療剤創薬のプラットフォーム 第 19 回炎症・再生フォーラム (炎症研究振興会). 静岡 (伊豆/三養荘) 9/12-13, 2003.
36. Yudo K, Dai S, Matsuno H, Nishioka K.: Telomerized osteoblasts prevent bone mass loss in vivo. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR). Lisbon, Portugal 6/18-21, 2003.
37. Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Imajoh-Ohmi S, Fukuda H, Nishioka K, Kato T.: Proteomic surveillance of autoimmunity in osteoarthritis: identification of triosephosphate isomerase as an autoantigen in patients with osteoarthritis. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR). Lisbon, Portugal 6/18-21, 2003.
38. Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K.: Immunoreaction-mediated pathway of cartilage degradation in osteoarthritis. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR). Lisbon,

- Portgal 6/18-21, 2003.
39. 西岡久寿樹: 軟骨破壊の分子機構とその制御 第4回日本リウマチ財団 中国・四国リウマチ外科セミナー. リーガロイヤルホテル広島 6/7, 2003.
  40. 増子佳世、西岡久寿樹: ヒト軟骨細胞におけるプロスタグランジンE合成酵素の発現とIL-1による制御 第47回日本リウマチ学会総会. 東京(京王プラザホテル) 4/24-26, 2003.
  41. 遊道和雄、松野博明、西岡久寿樹: テロメラゼ誘導による骨芽細胞寿命の延長と骨基質合成能の賦活化 第47回日本リウマチ学会総会. 東京(京王プラザホテル) 4/24-26, 2003.
  42. 中村浩士、高田智子、三浦俊郎、加藤智啓、西岡久寿樹、松崎益徳: ウイルス性心筋炎再感染モデルにおける自己抗体の検討 第47回日本リウマチ学会総会. 東京(京王プラザホテル) 4/24-26, 2003.
  43. 中野弘雅、大岡正道、松田隆秀、関根太一、尾崎承一、西岡久寿樹、加藤智啓: ベーチェット病における自己抗体の検索: 抗cofilin抗体の同定 第47回日本リウマチ学会総会. 東京(京王プラザホテル) 4/24-26, 2003.
  44. 大岡正道、松井利浩、西岡久寿樹、加藤智啓: 全身性自己免疫疾患患者におけるCDw150(SLAMF)に対する自己抗体 第47回日本リウマチ学会総会. 東京(京王プラザホテル) 4/24-26, 2003.
  45. 黒川真奈絵、西岡久寿樹、加藤智啓: 骨髄移植後筋炎におけるT細胞クロナリティーの解析 第47回日本リウマチ学会総会. 東京(京王プラザホテル) 4/24-26, 2003.
  46. 田中道明、中村 洋、増子佳世、加藤智啓、西岡久寿樹: 軟骨細胞と自己末梢血T細胞の相互作用に対するヒアルロン酸の作用 第47回日本リウマチ学会総会. 東京(京王プラザホテル) 4/24-26, 2003.
  47. 中村 洋、田中道明、増子佳世、加藤智啓、西岡久寿樹: T/C28a2 ヒト軟骨細胞株 MMP-1発現に対するヒアルロン酸の効果 第47回日本リウマチ学会総会. 東京(京王プラザホテル) 4/24-26, 2003.
  48. 関根太一、中村 洋、西岡久寿樹、加藤智啓: 変性関節症患者軟骨細胞のプロテオーム変化に対するIL-1の影響の解析 第47回日本リウマチ学会総会. 東京(京王プラザホテル) 4/24-26, 2003.
  49. Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Nishioka K, Kato T.: Proteomic surveillance of autoantigen (autoAg)s: Identification of triose phosphate isomerase as an autoAg in osteoarthritis. 第47回日本リウマチ学会総会. 東京(京王プラザホテル) 4/24-26, 2003.
  50. Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Nishioka K, Kato T.: Proteomic surveillance of autoantigen (autoAg)s: Identification of fibulin-4 as an autoAg in osteoarthritis. 第47回日本リウマチ学会総会. 東京(京王プラザホテル) 4/24-26, 2003.
  51. Du H, Kato T, Xiang Y, Masuko K, Nakamura H, Chen SL, Nishioka K.: Detection of Autoantibodies to Cartilage Intermediate Layer Protein in Shanghai Knee Osteoarthritis Patients. 第47回日本リウマチ学会総会. 東京(京王プラザホテル) 4/24-26, 2003.
  52. 佐藤知雄、増子佳世、青木治人、別府諸兄、西岡久寿樹: ヒト軟骨細胞におけるケモカインによるMMP-3およびPGE2発現の検討 第47回日本リウマチ学会総会. 東京(京王プラザホテル) 4/24-26, 2003.
  53. Du H, Chen SL, Nishioka K.: Community-based epidemiological study on knee osteoarthritis in Huang-pu district, Shanghai, China. 第47回日本リウマチ学会総会. 東京(京王プラザホテル) 4/24-26, 2003.
  54. 芝川温之、中村 洋、袁 国華、田中道明、加藤智啓、別府諸兄、青木治人、西岡久寿樹: 変形性関節症の病態形成におけるパンヌス様組織について 第47回日本リウマチ学会総会. 東京(京王プラザホテル) 4/24-26, 2003.
  55. Dai SM, Yudoh K, Nishioka K.: IL-18 enhances TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  rather than IL-10 induction from monocytes by direct contact with T lymphocytes. 第47回日本リウマチ学会総会. 東京(京王プラザホテル) 4/24-26, 2003.
  56. 廣瀬拓司、中村 洋、中村耕三、西岡久寿樹、中島利博: 転写統合装置CBPに結合する軟骨細胞内因子の探索; 細胞周期調節蛋白p34のCREB系転写への影響 第47回日本リウマチ学会総会. 東京(京王プラザホテル) 4/24-26, 2003.
  57. 千葉純司、金子勝一、村田三奈子、野口昌彦、鈴木裕孝、井上靖雄、井上和彦、西岡久寿樹、斎藤知行: OA 膝関節水腫に対するブシラミンの有効性について 第47回日本リウマチ学会総会. 東京(京王プラザホテル) 4/24-26, 2003.
  58. 田中道明、中村 洋、増子佳世、加藤智啓、西岡久寿樹: ヒト軟骨細胞に対するヒアルロン酸の異化抑制効果と分子量について 第47回日本リウマチ学会総会. 東京(京王プラザ



- ホテル) 4/24-26, 2003.
59. 増子佳世、加藤智啓、中村 洋、西岡久寿樹: 免疫学的機序を介する軟骨細胞の変性過程について 第 47 回日本リウマチ学会総会. 東京 (京王プラザホテル) 4/24-26, 2003.
60. 伊藤恵子、長谷英徳、早乙女絃一、西岡久寿樹、小端哲二: 関節リウマチ(RA)滑膜細胞の Fas 依存性アポトーシス誘導における p53 の関与 第 47 回日本リウマチ学会総会. 東京 (京王プラザホテル) 4/24-26, 2003.
61. Odani N, Takai M, Aono H, Sasano M, Shimomura K, Hongo K, Nishioka K.: Effects of bucillamine on apoptosis in cultured chondrocytes. 第 47 回日本リウマチ学会総会. 東京 (京王プラザホテル) 4/24-26, 2003.
62. Masuko-Hongo K, Nishioka K.: Regulation of microsomal prostaglandin E synthase (mPGES) by IL-1 in human chondrocytes. 第 47 回日本リウマチ学会総会. 東京 (京王プラザホテル) 4/24-26, 2003.
63. Kato T, Dai SM, Matsui T, Suzuki-Kurokawa M, Ooka S, Nishioka K.: Autoantibodies (autoAbs) to receptor-activator of NF- $\kappa$ B (RANK). 第 47 回日本リウマチ学会総会. 東京 (京王プラザホテル) 4/24-26, 2003.
64. Yudoh K, Dai SM, Matsuno H, Nishioka K.: Proinflammatory substance IL-18 directly stimulates T-cell mediated osteoclastogenesis through the up-regulation of RANKL and soluble RANKL (sRANKL) in T cells. 第 47 回日本リウマチ学会総会. 東京 (京王プラザホテル) 4/24-26, 2003.
65. Yudoh K, Dai SM, Matsuno H, Nishioka K.: Cell-cell interactions that regulate synovial inflammation in arthritis: Interactions between T cells and synovial cells. 第 47 回日本リウマチ学会総会. 東京 (京王プラザホテル) 4/24-26, 2003.
66. 西岡久寿樹、丹羽雄哉、落合直之、住田孝之 (パネリスト): 今世紀、リウマチ医療はこう変わる 茨城リウマチフォーラム. つくば国際会議場 2/9, 2003.
67. 西岡久寿樹: R A 薬物療法の現状と展望 -DMARDs VS 生物製剤- 第 2 回徳島リウマチフォーラム. ホテルクレメント徳島 1/24, 2003.
68. 西岡久寿樹: ポストゲノムにおける難治性疾患の征圧~プロテオームファクトリーに基づく戦略的研究 ハイテク・リサーチ・センターフォーラム 2003. 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター 1/21, 2003.
69. 西岡久寿樹: 軟骨破壊の分子機構とその制御 第 2 回 Biomatrix Forum 研究発表会. パレスホテル (東京) 1/18, 2003.
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得 (特許出願中)
- 1) 出願日: 平成15年3月18日  
発明の名称: 変形性関節症の検定方法  
発明者: 西岡久寿樹、加藤智啓  
特許出願公開番号: 未定  
公開日: 未定
- 2) 出願日: 平成15年4月21日  
発明の名称: 血管炎抗原ペプチドと血管炎診断方法  
発明者: 西岡久寿樹、尾崎承一、加藤智啓、唐沢里江  
特許出願公開番号: 未定  
公開日: 未定
2. 実用新案登録  
特にありません。
3. その他  
特にありません。

## 発生工学手法によるリウマチ治療薬の開発

岩倉洋一郎

東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター教授

### 研究要旨

われわれは独自に開発した2つの関節リウマチモデルを用いて関節炎の発症には IL-1 が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。最近、IL-1 レセプターアンタゴニスト(IL-1Ra)を欠損させ、過剰の IL-1 シグナルが入るようにしたマウスで、IL-17 の産生が亢進することを見だし、IL-1 の下流で IL-17 が機能していることが示唆された。そこで IL-1Ra 欠損マウスの IL-17 を欠損させたところ、関節炎の発症が完全に阻止されることが分かった。同様の抑制効果はコラーゲン誘導関節炎に於いても認められた。これらの結果は、IL-17 の阻害剤が抗リウマチ薬の有効な候補となることを示すものである。

### A. 研究目的

我々はこれまでに HTLV-I の *tax* 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス(HTLV-I-Tg マウス)、および IL-1Ra 欠損(KO)マウスを作製し、これらのマウスが共に自己免疫性の関節炎を自然発症することを見いだした。これまでの解析から、これらのマウスの関節炎の発症にはT細胞に依存した自己免疫が関与することを明らかにするとともに、HTLV-I-Tg の場合は IL-1 や IL-6 などのサイトカインを欠損させると発症が抑制され、一方、IL-1Ra-KO マウスの場合は TNF $\alpha$  を欠損させることにより、発症を抑制できることを示した。これらの事実は、これらのサイトカインの機能制御が、関節リウマチのコントロールにつながることを示唆すると共に、病因によりサイトカイン依存性が異なることを示した。本年度はこれら2種類の関節リウマチモデルを用い、それらのサイトカイン依存性が異なる理由を明らかにするため、マイクロアレイを用い、関節での発現遺伝子の網羅的解析を行った。また、IL-17 は活性化 CD4 T細胞の産生する炎症性サイトカインの一つで、種々の炎症性サイトカインやケモカインの産生を誘導することが知られているが、我々はこのサイトカインの発現がIL-1Ra-KOマウスで強く亢進していることを見いだした。このサイトカインは関節リウマチ患者の関節でも発現が亢進しており、発症との関

連が疑われているが、これまでその役割は知られていない。そこで、IL-17-KO マウスを作製し、関節炎発症に於ける役割を検討した。

### B. 研究方法

HTLV-I-Tg マウス、IL-1Ra-KO マウスは我々が作製したものをを用いた (Iwakura et al., *Science*, 1991; Horai et al., *J. Exp. Med.*, 2000)。いずれのマウスも BALB/cA マウスに8世代以上戻し交配し、実験に供した。また、IL-17-KO マウスはエクソン 1, 2 を *neo* 遺伝子と置換して作製した (Nakae et al., *Immunity*, 2002)。コラーゲン誘導関節炎は chicken 2 型コラーゲンをフロイントの完全アジュバンドと共に尾の根本に免疫し、21 日後に再び免疫することにより誘導した。遺伝子発現は関節より mRNA を調製し、アフィメトリックス社の GeneChip により解析した。

### C. 研究結果

1. IL-1RaKO マウスと IL-17-KO マウスとを掛け合わせ、IL-17 欠損 IL-1Ra-KO マウスを作製したところ、関節炎の発症が完全に抑制されることがわかった (Nakae et al., *PNAS*, 2003)。このほか、HTLV-I-Tg 関節炎やコラーゲン誘導関節炎も抑制されることを示した (Nakae et al., *J. Imm.*, 2003)。又、この時、

IL-17 はT細胞のプライミングに必要であることを示した。これらの結果から、IL-17 は自己免疫性関節炎の発症にきわめて重要な役割を果たしていることがわかった。これらの結果は、IL-17 が治療のターゲットとして有望であることを示すものである。

2. マイクロアレイ解析の結果、HTLV-I-Tg、あるいは IL-1Ra-KO マウスの何れかで発現変動の認められた遺伝子は 14000 遺伝子中 1200 であった。このうち、共通に発現亢進が見られたものが、200 あり、このうち 30 遺伝子は新規遺伝子であった。共通に発現亢進しているものは主として炎症病態像の形成に関与しているものと考えられる。現在、抗原提示に関与すると考えられる遺伝子についてノックアウトマウスを作製し、機能解析を始めている。病態形成に於ける役割が明らかになれば、当該遺伝子をターゲットとした治療が考えられる。
3. 一方、どちらかのモデルで特異的に発現している遺伝子については、これらのモデルのサイトカイン依存性に関与しているものと考えられ、現在バイオインフォマティクスの手法により、解析を進めている。この結果、原因遺伝子を明らかにすることができれば、予め患者のサイトカイン依存性を予測することができ、抗 TNF 治療や抗 IL-6R 治療に対する有効性を向上させることが期待できる。

#### D. 考察・結論

関節炎発症に IL-17 が関与する可能性は指摘されていたが、これまではっきりとした証拠は示されていなかった。今回、我々は IL-17-KO マウスを作製し、IL-1Ra-KO 関節炎自然発症モデル、および2型コラーゲン誘導関節炎モデルを用いて、IL-17 が自己免疫の発症に深く関与しており、IL-17 を欠損させることによって、発症を阻止できることを示した。この結果は IL-17 が関節リウマチ治療のターゲットとして、きわめて有望であることを示している。

さらに、我々が開発した独自のモデルをマイクロアレイで解析することにより、病態形成に関与する可能性のある遺伝子を多数同定した。現在その生理的、病理的役割を解析しており、関節リウマチの新たな治療ターゲットが見つかる可能性が高い。

#### E. 研究発表

Wu, X., Yoshida, A., Sasano, T., Iwakura, Y., and Endo, Y.

Histamine production via mast cell-independent induction of histidine decarboxylase in response to lipopolysaccharide and interleukin-1. *Int. Immunopharmacology*, in press.

Timoshanko, J. R., Kitching, R. A., Iwakura, Y., Holdsworth, S., R., and Tipping, P. G. Contributions of IL-1 $\beta$  and IL-1 $\alpha$  to crescentic glomerulonephritis in mice. *Am. J. Physiol.*, in press.

Timoshanko, J. R., Kitching, A. R., Iwakura, Y., Holdsworth, S. R., and Tipping, P. G. Leukocyte derived IL-1 $\beta$  interact with renal IL-1 receptor I to promote renal TNF and glomerular injury in murine crescentic glomerulonephritis. *Am. J. Physiol.*, in press.

Kobari, Y., Misaki, Y., Setoguchi, K., Zhao, W., Komagata, Y., Kawahata, K., Iwakura, Y., and Yamamoto, K. T cells accumulating in the inflamed joints of a spontaneous murine model of rheumatoid arthritis become restricted to common clonotypes during disease progression. *Int. Immunol.*, **16**, 131-138 (2004).

Ishida, Y., Kondo, T., Takayasu, T., Iwakura, Y., and Mukaida, N. The essential involvement of cross-talk between IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$  in the skin wound-healing process. *J. Immunol.*, **172**, 1848-1855 (2004).

Ishida, Y., Maegawa, T., Kondo, T., Kimura, A., Iwakura, Y., Nakamura, S., and Mukaida, N. Essential involvement of IFN- $\gamma$  in Clostridium difficile toxin A-induced enteritis. *J. Immunol.*, **172**, 3018-3025 (2004).

Ishihara, K., Sawa, S. I., Ikushima, H., Hirota, S., Atsumi, T., Kamimura, D., Park, S. J., Murakami, M., Kitamura, Y., Iwakura, Y., and Hirano, T. The point mutation of tyrosine 759 of the IL-6 family cytokine receptor gp130 synergizes with HTLV-1 pX in promoting rheumatoid arthritis-like arthritis. *Int. Immunol.*, **16**, 455-465 (2004).

Nakae, S., Komiyama, Y., Narumi, S., Sudo, K., Horai, R., Tagawa, Y., Sekikawa, K., Matsushima, K., Asano, M., and Iwakura, Y. IL-1-induced TNF $\alpha$  elicits inflammatory cell infiltration in the skin by inducing interferon- $\gamma$ -inducible protein-10 in the elicitation phase of contact hypersensitivity response. *Int. Immunol.*, **15**, 251-260 (2003).

Iwakura, Y. Autoimmune chronic inflammatory arthropathy in mice transgenic for the HTLV-I *tax* gene. In "Two decades of adult T-cell leukemia and HTLV-I research", (eds. K. Sugamura, R. Uchiyama, M. Matsuoka,

- and M. Kannagi), *Gann Monograph on Cancer Research*, **50**, Japan Scientific Societies Press and Karger, Tokyo, pp. 197-218 (2003).
- Nakae, S., Horai, R., Komiyama, Y., Nambu, A., Asano, M., Nakane, A., and Iwakura, Y. The role of IL-1 in the immune system. In "Cytokine Knockouts", (ed. G. Fantuzzi), Humana Press, Totowa, NJ, pp. 95-109 (2003).
- Tanaka, J., Ishida, T., Choi, B.-I., Watanabe, T., Yasuda, J., and Iwakura, Y. Latent HIV-1 reactivation in transgenic mice requires cell cycle-dependent demethylation of CREB/ATF sites in the LTR. *AIDS*, **17**, 165-175 (2003).
- Sashinami, H., Nakane, A., Iwakura, Y., and Sasaki, M. Effective induction of acquired resistance to *Listeria monocytogenes* by immunizing mice with *in vivo*-infected dendritic cells. *Infect. Immun.*, **71**, 117-125 (2003).
- Nakae, S., Komiyama, K., Yokoyama, H., Nambu, A., Umeda, M., Iwase, M., Homma, I., Sudo, K., Horai, R., Asano, M. and Iwakura, Y. Interleukin-1 is required for allergen-specific Th2 cell activation and the development of airway hypersensitivity response. *Int. Immunol.*, **15**, 483-490 (2003).
- Voronov, E., Shouval, D. S., Krelin, Y., Cagnano, E., Benharroch, D., Iwakura, Y., Dinarello, C. A., and Apte, R. N. Interleukin 1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 2645-2650 (2003).
- Kirii, H., Niwa, T., Yamada, Y., Wada, H., Saito, K., Iwakura, Y., Asano, M., Moriwaki, H., and Seshima, M. Lack of interleukin-1 $\beta$  decreases the severity of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **23**, 656-660 (2003).
- Nakae, S., Saijo, S., Horai, R., Sudo, K., Mori, S., and Iwakura, Y. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5986-5990 (2003).
- Asano, M., Nakae, S., Kotani, N., Shirafuji, N., Nambu, A., Hashimoto, N., Kawashima, H., Hirose, M., Miyasaka, M., Takasaki, S., and Iwakura, Y. Impaired selectin ligand biosynthesis and reduced inflammatory responses in  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase-I-deficient mice. *Blood*, **102**, 1678-1685 (2003).
- Wheeler, R. D., Brough, D., Le Feuvre, R. A., Takeda, K., Iwakura, Y., Luheshi, G. N., Rothwell, N. J. Interleukin-18 induces expression and release of cytokines from murine glial cells: interactions with interleukin-1 $\beta$ . *J. Neurochem.*, **85**, 1412-1420 (2003).
- Isoda, K., Shiigai, M., Ishigami, N., Matsuki, T., Horai, R., Nishikawa, K., Kusuhara, M., Nishida, Y., Iwakura, Y., Ohsuzu, F. Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist promotes neointimal formation after injury. *Circulation*, **108**, 516-518 (2003).
- Matsuki, T., Horai, R., Sudo, K., and Iwakura, Y. IL-1 plays an important role in lipid metabolism by regulating insulin levels under physiological conditions. *J. Exp. Med.*, **198**, 877-888 (2003).
- Miyake-Nishijima, R., Iwata, S., Saijo, S., Kobayashi, H., Kobayashi, S., Souta-Kuribara, A., Hosono, O., Kawasaki, H., Tanaka, H., Ikeda, E., Okada, Y., Iwakura, Y., and Morimoto, C. Role of Crk-associated substrate lymphocyte type in the pathophysiology of rheumatoid arthritis in *tax* transgenic mice and in humans. *Arthritis Rheum.*, **48**, 1890-1900 (2003).
- Kariyone, A., Tamura, T., Kano, H., Iwakura, Y., Takeda, K., Akira, S., and Takatsu, K. Immunogenicity of peptide-25 of Ag85B in Th1 development: role of IFN- $\gamma$ . *Int. Immunol.*, **15**, 1183-1194 (2003).
- Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K., and Iwakura, Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J. Immunol.*, **171**, 6173-6177 (2003).
- Ohtaki, H., Takaki, A., Yin, L., Dohi, K., Nakamachi, T., Matsunaga, M., Horai, R., Asano, M., Iwakura, Y., Shioda, S. Suppression of oxidative stress after transient focal ischemia in interleukin-1 knock out mice. *Acta Neurochir., Suppl.*, **86**, 191-194 (2003).
- Ono, Y., Ogihara, Y., Saijo, S., Iwakura, Y., and Inoue, M. Evaluation of Kampo medicines used to treat rheumatoid arthritis in collagen-induced arthritis and pX transgenic mice. *Mod. Rheumatol.*, **13**, 50-56 (2003).
- Yokoyama, H., Yasuda, J., Okamoto, H., and Iwakura, Y. Pathological changes of renal epithelial cells in mice transgenic for the TT virus ORF1 gene. *J. Gen. Virol.*, (2002) **83**, 141-150
- Desaki, M., Sugawara, I., Iwakura, Y., Yamamoto, K., and Takizawa, H. Role of interferon-gamma in the development of murine bronchus-associated lymphoid tissues induced by silica *in vivo*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*,