

## 関節リウマチの新規治療薬の当科における市販後調査の成績。現状と分析。

分担研究者 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

岡 寛 聖マリアンナ医科大学 リウマチ・膠原病・アレルギー内科 講師

**研究要旨** 2003 年度に本邦において、関節リウマチ(RA)の新規治療薬としてインフリキシマブ(レミケード)と、レフリノミド(アラバ)の 2 剤が発売され、それぞれ市販後調査(PMS)が義務づけられている。今回の研究では、全国の PMS の結果と、当科の症例の結果を比較検討した。その結果インフリキシマブは、全国の PM では 5950 例(平成 17 年 3 月 18 日現在)が集積されているが、有効性は 85-90%を示している。当科の 45 例の検討でも、ACR50 以上の著効例が 72%を示し高い有効性が再確認された。全国の PMS と同様に、感染症の誘発と Infusion reaction を認めたが、適切な副作用対策によって当科の継続率は 82.2%と良好であった。

レフリノミドは、5250 例(平成 17 年 3 月 2 日現在)の PMS 結果が現在集計中であるが、当科症例の約半数(43%)の症例が投与中止となっており、無効例、アレルギー、肝障害、血球減少などの理由が多かった。本邦の全国 PMS では、間質性肺炎の発症と死亡率の高さが問題となったが、当科では発症例がなかった。

### A. 研究目的

インフリキシマブとレフリノミドの PMS に基づき、全国調査の結果と自験例を比較検討し、両剤の RA 治療の問題点を明らかにし、より適切な治療を模索する。

されたレフリノミド 46 例の効果を関節症状、血清 CRP 値にて評価した。また、副作用の発現率と継続率を求めた。同時に全国のアラバ PMS の結果([www.aventis.co.jp/arava/](http://www.aventis.co.jp/arava/))と比較検討した。

### B. 方法

2003 年 9 月から 2005 年 2 月までの 1 年 5 ヶ月の間に、当科で作成したクリニカルパス(CP)に基づき、活動性 RA にインフリキシマブを 45 例に投与した。同剤の効果は ACR のコアセットを用いた。全国調査の結果は、レミケード田辺製薬株式会社([www.remicade-ra.jp](http://www.remicade-ra.jp))より検索し、両者の結果を比較検討した。2003 年 12 月から 2005 年 2 月までの 1 年 2 ヶ月の間に当科にて RA に投与

### C. 研究結果

当科にてインフリキシマブ 45 例(男性 5 例、女性 40 例、平均年齢 52.9 歳)が RA 症例に投与された。同剤の効果は、投与 4 回目直前の ACR コアセットにて評価し、ACR70 が 16 人(35%)、ACR50 が 17 人(37%)、ACR20 が 6 人(13%)であり、ACR20 以上の有効例を 85%とり、全国 PMS の結果(主治医判断)90.4%と同等であった。副作用は、45 例中 13 例(28.8%)に認め、全国 PMS 結果(33%)と同等であり、感染症の誘発と Infusion

reactionが多かったが、継続率は82.2%と良好であった。レフリノミドは46例に投与されたが、当科で100mg/日のローディングドーズを投与した例は6例のみであった。46例のうち、20例(43%)は無効や副作用で中止となっていたが、継続例の26例中17例(65.3%)では関節症状かつCRPの改善を認めた。同剤のPMS結果でも、脱落例が30%以上あった。間質性肺炎の発症66例中死亡率25例(2005年3月2日現在)が社会問題となったが、当科では間質性肺炎はなかった。これは、投与前のスクリーニング(胸部HRCT)によって、肺合併症例が除外されたためと考えられる。

#### D. 結論

- ① インフリキシマブ 45 例の投与結果は、有効率 85%以上で、ACR50 以上の著効例も 72%であった。
- ② インフリキシマブの副作用として、感染症の誘発 (13.3%)と Infusion reaction (11.1%)が多かったが、継続率は 82.2%と良好であった。
- ③ レフリノミド 46 例の投与結果は、ローディングドーズなしでも、65.3%の症例は投与継続し、関節症状が CRP の改善を認めた。
- ④ レフリノミド投与の 20 例(43%)が 1 年以内に投与中止となっており、無効、湿疹などが多かった。しかし、全国 PMS で問題となった間質性肺炎は当科ではなかった。

#### E. 健康危機情報

2004年2月にレフリノミド発売社のアベンティスファーマより「アラバ錠による間質性肺炎症例の発現について」の緊急安全情報が

医療機関に配布された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kawabata D., Tanaka M., Fujita T., Umehara H., Fujita Y., Yoshifuji H., Mimori T. and Ozaki S.: Ameliorative effects of follistatin - related protein /TSC-36 on joint inflammation in a mouse model of arthritides. *Arthritis Rheum.* 50 (2):660-668,2004.
2. Kumagai S., Kumada F., Kita T., Morinobu A., Ozaki S., Ishida H., Sano H., Matsubara T and Okumura K.: *N-Acetyltransferase 2* genotype-related efficacy of sulfasalazine In patients with rheumatoid arthritis. *Pharmaceutical Research* 21(2):324-329,2004.
3. Ito I., Mitsuoka N., Sobajima J., Uesugi H., Ozaki S., Ohya K. and Yoshida M.: Conformational Difference in HMGB1 Proteins of Human Neutrophils and Lymphocytes Revealed by Epitope Mapping of a Monoclonal Antibody. *J. Biochem.* 136:155-162,2004.
4. Karasawa R., Ozaki S., Nishioka K. and Kato T.: Autoantibodies to peroxiredoxin I and IV in patients with systemic autoimmune diseases. *Microbiol. Immunol.* 49(1):57-65,2005.
5. Watanabe T., Kubota S., Nagaya M., Ozaki S., Nagafuchi H., Akashi K., Taira Y., Tukikawa S., Oowada S. and Nakano S.:

- The role of HMGB-1 on the development of necrosis during hepatic ischemia and hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *J. Surg. Res.* 124(1):59-66,2005.
6. Akaogi J., Akasaka N., Yamada H., Hama N., Satoh M., Nichols C. and Ozaki S.: Intravenous cyclophosphamide therapy in a case with refractory thrombotic microangiopathic hemolytic anemia and SLE. *Clin. Rheumatol.* (in press)
  7. Ito G., Ozaki S., Nakagawa M. and Suzuki Y.: Vascular endothelial growth factor plays a key role in osteoclastic bone destruction by cultured rheumatoid synovium. *臨床リウマチ* 16:11-19,2004.
  8. 岡寛、中野弘雅、木俣敬仁、松田隆秀、尾崎承一:シェーグレン症候群の口腔乾燥症状に対するレバミピドの有用性。 *Progress In Medicine.* 24(10): 2591-2596, 2004.
  9. 岡寛、木俣敬仁、中野弘雅、清水篤、山本直弘、尾崎承一:関節リウマチの膝関節滑膜炎に対する高分子ヒアルロン酸ナトリウム(スベニール®)の効果。 *Journal of Joint Surgery.*23(12)118-124,2004.
2. 学会発表
1. Ozaki S. et al: A novel autoantigen for anti-endothelial cell antibodies (AECA) identified by proteomic surveillance. 11th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress.2004.9., Jeju, Korea.
  2. Azuma K., Yamasaki Y., Yamasaki M., Okubo M., Yamada H. and Ozaki S.: Intravenous cyclophosphamide for the treatment of interstitial lung disease associated with amyopathic dermatomyositis, dermatomyositis and polymyositis: a comparative study with cyclosporine and azathioprine. The 68th National Scientific Meeting of the American College of Rheumatology. 2004.10., San Antonio, Texas, U.S.A.
  3. Karasawa R., Ooka S., Sekine T., Nishimura H., Nukina N., Mitsui K., Ozaki S., Nishioka K. and Kato T.: Targets of anti-endothelial cell antibodies in patients with systemic vasculitis: Identification by the proteomic approach. The 68th National Scientific Meeting of the American College of Rheumatology. 2004.10., San Antonio, Texas, U.S.A.
  4. Akaogi J., Yamada H., Dina Nacionales Kindra Kelly, haoyang Zhuang, Kuroda Y., Westley Reeves, Ozaki S. and Satoh M.: Prostaglandin E2 receptor subtypes EP2/EP4 work synergistically with ICOS toward Th2 skewing through cAMP/PKA and ICOS/PI3K signaling pathways. The 68th National Scientific Meeting of the American College of Rheumatology. 2004.10., San Antonio, Texas, U.S.A.
  5. Tanaka M., Ozaki S. and Mimori T.: Cloning of the molecules Interacting with a novel anti-arthritis factor, follistatin-related protein/FSTL1. The

- 68th National Scientific Meeting of the American College of Rheumatology. 2004.10., San Antonio, Texas, U.S.A.
6. Nozaki T., Yamada H., Akaogi J., Kikukawa T., Mori T., Takahashi K. and Ozaki S.: Prostaglandin E2 receptor subtype EP4 mediated Inhibition of osteoclasts' development and MMP-9 production in rheumatoid synovitis. The 68th National Scientific Meeting of the American College of Rheumatology. 2004.10., San Antonio, Texas, U.S.A.
  7. Imamura Y., Matsuda T., Nikai A., Nakagawa T., Ozaki S. and Tsukikawa S.: MTX therapy In Intestinal Behcet's disease: A case report. The 11th International Conference on Behcet's Disease. 2004.10., Antalya, Turkey.
  8. Kimata T., Oka H., Matsuda T. and Ozaki S.: A case met criteria of HLA-B27 related reactive arthritis and Behcet's disease has erosive arthritis of bilateral knee joints. The 11th International Conference on Behcet's Disease. 2004.10., Antalya, Turkey.
  9. Nakano H., Oka H., Ohya N., Matsuda T. and Ozaki S.: A case of tattoo induced eyes attack and intestinal symptoms in patients with Behcet's disease. The 11th International Conference on Behcet's Disease. 2004.10., Antalya, Turkey.
  10. 尾崎承一: 血管炎の病因 発症の分子メカニズム。「シンポジウム4: 血管炎症候群 遺伝子解析から病因・病態、診断・治療まで」第48回日本リウマチ学会総会・学術集会。2004年4月15-17日 岡山。
  11. 尾崎承一: ANCA 関連血管炎—その病因と治療。「シンポジウム 9: 膠原病の免疫治療の進歩」第54回日本アレルギー学会総会。2004年11月4-5日。横浜。
  12. 伊藤彦、中川美弥子、尾崎承一、鈴木康夫: 血管内皮増殖誘導因子(VEGF)は関節リウマチ滑膜組織培養において破骨細胞による骨破壊に重要な役割を果たす。第48回日本リウマチ学会総会・学術集会。2004年4月15-17日 岡山。
  13. 加藤智啓、中村洋、山田秀裕、尾崎承一、西岡久寿樹: 関節リウマチにおけるプロテオーム診断の可能性。第48回日本リウマチ学会総会・学術集会。2004年4月15-17日 岡山。
  14. 西岡真樹子、秋本美津子、中村洋、尾崎承一、西岡久寿樹: 線維筋痛症の進行度に基づくステージ分類の提唱。第48回日本リウマチ学会総会・学術集会。2004年4月15-17日 岡山。
  15. 大久保道子、山田秀裕、山前正臣、山崎宜興、中野弘雅、尾崎承一: 皮膚筋炎・多発性筋炎に合併する心筋炎の臨床像と予後に与える影響。第48回日本リウマチ学会総会・学術集会。2004年4月15-17日 岡山。
  16. 林彩子、吉田智彦、中野弘雅、柴田朋彦、菅田文彦、山田秀裕、尾崎承一: ステロイド大量投与により微小血管障害(TMA)を発症した強皮症(SSc)の3症例。

- |   |                           |
|---|---------------------------|
| <p>第48回日本リウマチ学会総会・学術集会。<br/>2004年4月15-17日 岡山。</p>   | <p>特になし</p>               |
| <p>17. 野崎俊子、山田秀裕、大久保道子、山崎<br/>宜興、東浩平、<u>尾崎承一</u>：皮膚筋炎・多<br/>発性筋炎136名の長期生命予後の解析。<br/>第48回日本リウマチ学会総会・学術集会。<br/>2004年4月15-17日 岡山。</p>                | <p>2. 実用新案登録<br/>特になし</p> |
| <p>18. 唐澤里江、関根太一、大岡正道、西村裕<br/>之、<u>尾崎承一</u>、西岡久寿樹、加藤智啓：<br/>血管炎における抗内皮細胞抗体の対応<br/>抗原に関する検討。第48回日本リウマチ<br/>学会総会・学術集会。2004年4月15-17<br/>日 岡山。</p>    | <p>3. その他<br/>特になし</p>    |
| <p>19. 田中真生、<u>尾崎承一</u>、三森経世：新規リウ<br/>マチ関節炎抑制因子であるホリスタチン<br/>関連蛋白(FRP/FSTL1)のリガンドのク<br/>ローニング。第48回日本リウマチ学会総<br/>会・学術集会。2004年4月15-17日 岡<br/>山。</p> |                           |
| <p>20. 岡寛、<u>尾崎承一</u>、西岡久寿樹：関節リウマ<br/>チにおけるインフリキシマブ(レミケード)<br/>治療のクリニカルパス。第48回日本リウマ<br/>チ学会総会・学術集会。2004年4月<br/>15-17日 岡山。</p>                     |                           |
| <p>21. 岡寛、<u>尾崎承一</u>、西岡久寿樹：レフルノミド<br/>(アラバ)の市販後の実態調査。「ワークシ<br/>ョップ 1:新規リウマチ治療薬レフルノミド<br/>の功罪」第19回日本臨床リウマチ学会総<br/>会。2004年11月26-27日。東京。</p>        |                           |

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

## サイトカインによるリウマチ破骨細胞の制御に関する研究

分担研究者 高柳 広 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子細胞機能学・特任教授

### 研究要旨

関節リウマチ (RA) 骨破壊においては、破骨細胞による骨吸収の亢進が重要な役割を果たす。TNF ファミリーのサイトカインである RANKL (破骨細胞分化因子) は、破骨細胞分化誘導において必須の因子であるが、その細胞内シグナル伝達機構は不明の点が多く、リウマチ破骨細胞を特異的に抑制する有効な治療法は知られていない。本年度は、RANKL による破骨細胞分化制御機構を詳細に解析し、RANKL には免疫グロブリン様受容体シグナルからの補助シグナルが必要であることを明らかにした。破骨細胞を制御する新たな免疫受容体群の発見は、今後の RA 骨破壊に対する新たな治療戦略に道を開くと考えられる。

### A. 研究目的

関節リウマチ(RA)骨破壊で中心的な役割を果たす破骨細胞の分化誘導には、RANKL (破骨細胞分化因子) が重要である。しかし、その細胞内シグナル伝達機構は不明の点が多く、リウマチ破骨細胞を特異的に抑制する有効な治療法は知られていない。新たな関節リウマチ治療の標的を同定するために、RANKL シグナル伝達系を制御する機構を明らかにすることを目的とした。昨年度までの研究により、破骨細胞の分化を制御するマスター転写因子が NFATc1 であることを同定したが、その活性化は、カルシウムシグナルに依存することが知られている。RANKL のような TNF ファミリーのサイトカインが直接カルシウムを活性化することは考えにくく、破骨細胞の前駆細胞においてカルシウムシグナルを活性化する機構を解明すれば、破骨細胞を制御するための新しい標的となる受容体を発見することができるため、このような受容体を探索した。

### B. 研究方法

免疫細胞に発現する受容体には、immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) と呼ばれるアミノ酸配列が共通して見られ、リン酸化依存性に下流にシグナル伝達を行う。ITAM モチーフは T 細胞受容体、B 細胞受容体、Fc 受容体のコンポーネントに含まれているが、NK 細胞や myeloid 系細胞においては、ITAM をもつアダプター分子が種々の免疫グロブリン受容体と会合してシグナル伝達に寄与していることが知られている。このような ITAM アダプター分子である DNAX activating protein 12 (DAP12) と Fc receptor common  $\gamma$  subunit (FcR $\gamma$ ) のダブルノックアウトマウス(DKO マウス)を作成し、骨組織を病理学的に検討した。また、培養細胞を用いてこれらのアダプター分子と会合する受容体を同定し、破骨細胞分化過

程においてカルシウムシグナルを活性化する経路を検討した。特に、RANKL による転写因子 NFATc1 の誘導に注目して解析した。

### (倫理面への配慮)

動物実験、遺伝子組み換え実験に関する施設内委員会の承認に基づいて実験を遂行した。ヒト試料の使用にあたっては、インフォームドコンセントを徹底したが、DNA などの個人情報を扱う実験は含まれていない。

### C. 研究結果

DKO マウスは、破骨細胞分化が障害され、骨髓腔が形成されない重篤な大理石骨病を呈した。この結果、ITAM モチーフを介したシグナルが破骨細胞の分化に必須であることが明らかになった。DKO 由来の破骨細胞前駆細胞にレトロウイルスで DAP12 を発現させると、WT の DAP12 では効率よくレスキューされるが、ITAM のリン酸化部位に変異をいれた DAP12 においては、レスキューされないことから、破骨細胞分化において ITAM を介したシグナルが重要な意義をもつことが示唆された。さらに、破骨細胞前駆細胞において、DAP12 や FcR $\gamma$  と会合している受容体を検索した結果、FcR $\gamma$  と会合する受容体は paired immunoglobulin-like receptor (PIR)-A、osteoclast-associated receptor (OSCAR) であり、DAP12 と会合する受容体は triggering receptor expressed by myeloid cells (TREM)-2, signal-regulatory protein (SIRP) $\beta$ 1 であることが明らかになった。また、これらの4種類の受容体を抗体を用いてクロスリンクして活性化すると破骨細胞分化を促進できた。このように、ITAM モチーフを持ったアダプター分子と会合する免疫グロブリン様受容体が破骨細胞分化を制御する新たな受容体であること

が解明された。DKO 細胞では、RANKL によるカルシウムシグナル活性化と NFATc1 誘導が障害されており、DAP12 と FcR $\gamma$  を介した ITAM シグナルが破骨細胞分化に必須なカルシウムシグナルを引き起こすのに必須であることが明らかになった。

#### D. 考察

従来、破骨細胞の分化には、RANKL と M-CSF があれば必要十分であると考えられてきたが、この研究によって、この二つの経路以外に、破骨細胞分化に必須のシグナルを伝える第三の受容体群が存在することが明らかになった。これらの受容体は、単独で破骨細胞分化を誘導することはできないが、破骨細胞分化に必須のため、破骨細胞分化における RANKL の共刺激分子(補助シグナル)の役割を担っていると考えられる。新たな制御受容体とシグナル経路の同定により、破骨細胞を標的とした関節疾患および骨疾患の治療に新しい可能性が開けると考えられる。

#### E. 結論

破骨細胞の分化における RANKL の共刺激分子を同定した。この共刺激分子は、RA 骨破壊における有望な治療標的となりえる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Gohda, J., Akiyama, T., Koga, T., Takayanagi, H., Tanaka, S. and Inoue, J. RANK-mediated amplification of TRAF6 signaling leads to NFATc1 induction during osteoclastogenesis. *EMBO* 24(4),790-799(2005)

Takatsuna, H., Asagiri, M., Kubota, T., Oka, K., Osada, T., Sugiyama, C., Saito, H., Aoki, K., Ohya, K., Takayanagi, H. and Umezawa K.

Inhibition of RANKL-induced Osteoclastogenesis by (-)-DHMEQ, a Novel NF- $\kappa$ B Inhibitor, through Downregulation of NFATc1. *J Bone Mineral Res* 20(4):653-662(2005)

Matsumoto, M., Kogawa, M., Wada, S., Takayanagi, H., Tsujimoto, M., Katayama, S., Hisatake, K., Nogi, Y. Essential role of p38 MAP kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1. *J Biol Chem.* 279(44),45969-79 (2004)

Koga, T., Inui, M., Inoue, K., Kim, S., Suematsu, A., Kobayashi, E., Iwata, T., Ohnishi, H., Matozaki, T., Kodama, T., Taniguchi, T., Takayanagi, H.\*, and Takai, T.\* Costimulatory signals mediated by the ITAM motif

cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature* 428,758-763 (2004) \*Corresponding authors

Urushibara, M.\*, Takayanagi, H.\*, Koga, T., Kim, S., Isobe, M., Morishita, Y., Nakagawa, T., Loeffler, M., Kodama, T., Kurosawa, H., and Taniguchi, T. The antirheumatic drug leflunomide inhibits osteoclastogenesis by interfering with receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand-stimulated induction of nuclear factor of activated T cells c1. *Arthritis Rheum* 50(3), 794-804 (2004) \*Equal contributors

Takayanagi, H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *J Periodontal Res* (in press)

Takayanagi, H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol Med* 83(3), 170-179(2005)

Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T. and Taniguchi, T. Stat1-mediated cytoplasmic attenuation in osteoimmunology. *J Cell Biochem* 94, 232-240(2005)

高柳 広 : 関節リウマチにおける骨破壊の分子機構  
内科、95 (2) 338-342、2005

高柳 広 : 免疫系と骨代謝  
日本臨床、63 増刊 1、87-95、2005

高柳 広 : 関節リウマチにおける軟骨破壊の分子機構  
内科、95 (1) 136-139、2005

高柳 広 : 骨免疫学 オステオイムノロジー  
感染炎症免疫、34 (4) 22-32、2004

高柳 広 : RANKL による破骨細胞分化制御と関節リウマチ  
免疫 2005 Molecular Medicine 臨時増刊号、vol. 41、p343-351、2004

高柳 広 : 運動器の形成・維持・老化にかかわる遺伝子制御ネットワークの解明  
ゲノムネットワーク、蛋白質核酸酵素 2004 年 12 月増刊、49 (17) 2943-2949、2004

高柳 広 : オステオイムノロジー  
細胞工学、23 (12) 1424-1430、2004

高柳 広 : Stat1 と Runx ファミリー転写因子 : 自己免疫疾患における役割  
分子リウマチ、1 (3) 168-175、2004

高柳 広 : 骨免疫制御とサイトカイン

分子細胞治療、3 (4) 52-60、2004

高柳 広：ITAM を介した共刺激シグナルと RANKL による骨代謝の維持機構  
実験医学、22 (12) 1726-1729、2004

高柳 広：破骨細胞活性化  
医学のあゆみ、209 (10) 771-778、2004

高柳 広：RA における免疫系と骨代謝の相互作用  
分子リウマチ、6 (2) 74-81、2004

高柳 広：破骨細胞活性化と人為的制御  
臨床免疫、41 (3) 284-290、2004

高柳 広：骨免疫学の世界— 骨疾患と免疫異常  
(編集主幹および「はじめに」)  
医学のあゆみ、208 (11) 899、2004

金宣和、高柳広：IFN-Stat シグナルと骨代謝  
医学のあゆみ、208 (11) 920-925、2004

高柳 広：骨と免疫のクロストーク  
現代医療、36 (3) 697-704、2004

## 2. 学会発表

高柳 広：骨免疫制御における RANKL の補助シグナル  
第 27 回日本分子生物学会、2004.12.8、神戸

高柳 広：炎症性骨破壊と破骨細胞の制御  
日本リウマチ学会関東支部ランチョンセミナー、  
2004.12.4、東京

高柳 広：Regulation of RANKL by NFAT and ITAM  
signal in osteoclast differentiation  
第 34 回日本免疫学会総会・学術集会、2004.12.2、札幌

乾匡範、古賀貴子、井上和也、谷口維紹、高柳広、高井俊行  
アダプター分子 DAP12 および FcγR を介する ITAM シグナルは破骨細胞分化に必須である  
第 34 回日本免疫学会総会・学術集会、札幌、2004.12.2

高綱大士、長田年弘、杉山千枝、朝霧成挙、高柳広、梅沢一夫  
NFκB 阻害剤 DHMEQ による破骨細胞分化と活性化の抑制  
第 34 回日本免疫学会総会・学術集会、札幌、2004.12.2

高柳 広：関節リウマチ骨破壊の制御

日本整形外科学会リウマチ研修会、2004.11.28、東京

高柳 広：骨免疫学における破骨細胞分化の制御機構  
第 52 回国際歯科研究学会日本部会 (JADR) 総会・学術大会、2004.11.27、東京

高柳 広：破骨細胞分化の制御メカニズム  
Bone & Joint Research Club 「骨と関節の代謝調節を考える基礎の会」、2004.11.14、木更津

高柳 広：骨免疫学の新展開  
第 8 回 Omiya Forum on Rheumatoid Arthritis、  
2004.11.12、大宮

高柳 広：RA 骨破壊と破骨細胞の制御  
第 4 回リウマチ性疾患と骨粗鬆症治療研究会、  
2004.11.5、熊本

高柳 広：破骨細胞を制御する新たな免疫シグナル  
バイオサイエンスシンポジウム、2004.10.29、湘南

高柳 広：破骨細胞の起源と分化誘導機構—創薬の観点から—  
第 19 回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー「骨・軟骨研究の最前線— 新たな治療を目指して—」、  
2004.10.26、東京

高柳 広：Regulation of osteoclastogenesis by RANKL and ITAM signals  
Bone Biology Forum、2004.10.22、静岡

高柳 広：骨免疫学への遺伝子チップ応用  
第 32 回日本臨床免疫学会総会、2004.10.8、東京

H. Takayanagi: Integration of RANKL Signaling by NFATc1 in Osteoclastogenesis.  
26th Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, 2004.10.3, Seattle

T. Koga, M. Inui, A. Suematsu, T. Taniguchi, T. Takai, H. Takayanagi: ITAM-mediated costimulatory signals cooperate with RANKL for osteoclastogenesis  
26<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, 2004.10.3, Seattle (Young Investigator's Award)

H. Takayanagi: Novel regulators of RANKL-induced osteoclastogenesis  
The 11th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress, 2004.9.15, Jeju Island, Korea

古賀貴子、乾匡範、末松綾子、谷口維紹、高井俊行、



高柳 広

ITAMを介した共シグナルはRANKLによる破骨細胞分化に必須である

第22回日本骨代謝学会、大阪、2004.8.6

高柳 広：RANKLシグナル制御と骨免疫学

第8回 Molecular Cardiovascular Conference、2004.9.4、北海道

高柳 広：破骨細胞をターゲットとした炎症性骨破壊の制御

第25回日本炎症・再生医学会ランチョンセミナー、2004.7.13、東京

高柳 広：Costimulatory signals in osteoclast differentiation

第1回 ABJS 国際ワークショップ骨と関節の先端的疾患分子医科学、2004,6,22、東京

H. Takayanagi: Leflunomide inhibits bone destruction by interfering with RANKL signaling and osteoclastogenesis  
Annual European Congress of Rheumatology "EULAR 2004", 2004.6.11, Berlin

高柳 広：破骨細胞分化を制御する新たな免疫シグナル

第13回東京免疫フォーラム、2004.5.18、東京

高柳 広：関節破壊の分子機序解明によるRA治療の新時代-新規DMARDレフルノミドの破骨細胞への直接作用と骨破壊抑制-

第48回日本リウマチ学会総会ランチョンセミナー、2004.4.15、岡山

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

特になし

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）  
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

分担研究者 妻木 範行 大阪大学大学院医学系研究科助手  
骨・軟骨破壊に関する遺伝子制御

研究要旨

骨・軟骨における遺伝子発現の統合的制御を担う分子として、骨形成因子(BMP)は重要な役割を果たしていると考えられている。組織特異的 promoter/enhancer 配列を用いて、骨・軟骨形成における BMP シグナルの生体での役割を解析した。抑制型 Smad である Smad6 を軟骨細胞特異的に過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製・解析することで、BMP の細胞内シグナル伝達を担う Smad シグナルは軟骨細胞の肥大化とそのマーカー遺伝子の発現を制御していることが判明した。この知見を本に、肥大化しない関節軟骨細胞の形質維持のメカニズムの解明を進めたい。また変形性膝関節症で見られる骨欠損に対して、仮骨延長と超音波刺激を組み合わせて骨組織の修復を試みる臨床研究を行った。

A. 研究目的

関節リウマチや変形性関節症などにおける骨・軟骨破壊の進行過程では、マトリックス蛋白やシグナル伝達に関する分子の遺伝子発現制御が破綻していると考えられる。骨・軟骨における遺伝子発現の統合的制御を担う分子として、骨形成因子(BMP)は重要な役割を果たしていると考えられている。BMP のシグナルは細胞内では主に Smad 蛋白によって担われている。しかしながら BMP や Smad は種々の組織で活性を持つ multifunctional な因子であり、骨・軟骨形成における BMP シグナルの生体での役割を調べることはとりわけ困難であった。本研究では組織特異的な遺伝子発現をもたらす promoter / enhancer を利用して、BMP による骨・軟骨形成の遺伝子制御機構を生体において解明し、関節リウマチにおける骨・軟骨破壊に関する遺伝子制御の理解につなげることが目的である。また破壊変性の結果生じる骨欠損に対し、仮骨延長と超音波刺激を組み合わせて骨組織の修復を試みる。

B. 研究方法

組織特異的プロモーターを用い、軟骨あるいは骨特異的に BMP シグナルを活性化あるいは不活化させたトランスジェニックマウスを作製した。細胞内 BMP シグナル伝達の遮断を狙い、抑制型 Smad である Smad6 を骨格特異的に強制発現させた。軟骨特異的発現および骨特異的発現を得るために、XI 型コラーゲン遺伝子 promoter/enhancer と I 型コラーゲン遺伝子 promoter 配列をそれぞれ用いた。当動物実験については大阪大学医学部動物実験委員会の承認を受け、そのガイドラインに則って動物の苦痛軽減に努めている。また膝関節骨欠損に対して片側仮骨延長法を用いた高位脛骨骨切手術を行い、超音波照射による延長仮骨骨形成に対する促進効果を判定した。

C. 研究結果

以前に我々は BMP シグナルを細胞外で不活化すると軟骨の形成が認められず、軟骨の発生には BMP が必須であることを発見した。今回作製した Smad6

を内軟骨性骨化の過程に強制発現させたトランスジェニックマウスでは、Smad シグナルの伝達が著しく障害されていた。その結果、軟骨の肥大化が抑制され、マトリックス遺伝子であるX型コラーゲン遺伝子、オステオポンチン遺伝子の発現が低下した。そして骨量が減少し骨粗鬆症様の変化が認められた ( *J Cell Biol.* 2004;165:433-445) 。また膝関節近傍の骨欠損に対し、延長仮骨の成熟に超音波刺激が有効であることが判明した ( *J Bone Joint Surg Am.* 2004;86:2399-2405) 。

#### D. 考察

本研究結果からBMPシグナルを操作することによって、実際に生体においても骨・軟骨の遺伝子発現が変化し、結果として軟骨分化の障害や骨量の減少がおきることが判明した。Smadシグナルの阻害により軟骨細胞の肥大化が抑えられたという所見は、関節軟骨の特性を保つメカニズムの解明に寄与する可能性がある。また関節近傍の骨欠損に対して仮骨延長法によって骨を作り、超音波刺激により成熟を促すことで骨組織の修復の促進が期待できる。このメカニズムを今後、遺伝子発現レベルで解析したい。

#### D. 結論

軟骨細胞でSmadシグナルを阻害すると軟骨の肥大化を抑制できた。このことは、永久軟骨としての関節軟骨が保持されるメカニズムの解明につながる。また仮骨延長と超音波刺激の組み合わせは、骨欠損修復に対して有効である。

E. 健康危険情報 無し

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Horiki, M., Imamura, T., Okamoto, M., Hayashi, M., Murai, J., Myoui, A.,

Ochi, T., Miyazono, K., Yoshikawa, H., and Tsumaki, N.: Smad6/Smurf1 overexpression in cartilage delays chondrocyte hypertrophy and causes dwarfism with osteopenia. *J Cell Biol*, 165(3): 433-445, 2004.

Tsumaki, N., Kakiuchi, M., Sasaki, J., Ochi, T., and Yoshikawa, H.: Low-intensity pulsed ultrasound accelerates maturation of callus in patients treated with opening-wedge high tibial osteotomy by hemicallotaxis. *J Bone Joint Surg Am*, 86-A(11): 2399-2405, 2004.

##### 2. 学会発表

1. 妻木範行, 岡本美奈, 村井純子, 岩井貴男, 吉川秀樹: 骨・軟骨形成におけるBMPシグナルの作用: 第3回 Annual Meeting of Japan Conference on bone and Joint Diseases 12/4, 2004
2. 妻木範行: XI型コラーゲン遺伝子の転写制御と骨格形成におけるBMPの役割. 第4回骨発生・再生研究会 11/12, 2004
3. 妻木範行: 軟骨形成におけるBMPシグナルの役割. 第5回運動器科学研究会. 8/27-28, 2004
4. 妻木範行, 垣内雅明, 佐々木次郎, 越智隆弘, 吉川秀樹: 延長仮骨治療過程における低出力超音波パルス照射の影響. 第17回日本創外固定・骨延長学会学術集会 8/14-15, 2004
5. 妻木範行: Overexpression of BMP4 in osteoblasts causes severe osteopenia in transgenic mice. 骨カルシウム懇話会 3/12-13, 2004
6. J. Murai, M. Horiki, H. Yoshikawa, and N. Tsumaki: Overexpression of BMP4 in Osteoblasts Inhibits Trabecular Bone Formation. 5<sup>th</sup> International Conference on Bone

- Morphogenetic Proteins 9/12-16,  
2004
7. N. Tsumaki, M. Horiki, J. Murai,  
T. Iwai, and H. Yoshikawa: Role  
of BMP signaling in endochondral  
bone formation. 5<sup>th</sup> International  
Conference on Bone Morphogenetic  
Proteins 9/12-16, 2004
  8. M. Horiki, N. Tsumaki, A. Myoui,  
T. Imamura, H. Yoshikawa:  
overexpression of smad6 in  
chondrocytes distinctively  
disturbs terminal  
differentiation of chondrocytes  
and causes osteopenia in  
transgenic mice. 51st Annual  
Meeting of the Orthopaedic  
Research Society 3/7-10, 2004
  9. J. Murai, N. Tsumaki, M. Horiki,  
Y. Hashimoto, K. Kuriyama, H.  
Yoshikawa: Overexpression of  
BMP4 in osteoblasts causes  
osteopenia in transgenic mice.  
Frontiers of Skeletal Biology  
3/20-24, 2004
  10. Horiki, M., Imamura, T., Okamoto,  
M., Hayashi, M., Murai, J., Myoui,  
A., Ochi, T., Miyazono, K.,  
Yoshikawa, H., and Tsumaki, N. :  
Smad6/Smurf1 overexpression in  
cartilage delays chondrocyte  
hypertrophy and causes dwarfism  
with osteopenia. Frontiers of  
Skeletal Biology 3/20-24, 2004

F. 知的財産の出願・登録状況  
該当なし

破骨細胞アポトーシスにおける small G protein の役割に関する研究

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 破骨細胞は生理的な骨吸収のみならず、病的な骨破壊においても中心的な役割を果たす細胞である。その寿命は短く、いったん分化すると生体内では2週間程度でアポトーシスによって細胞死にいたる。本研究においてわれわれは破骨細胞の細胞死において small G protein である Rac1 が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

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。破骨細胞は最終分化した増殖能のない細胞であり、一旦分化すると receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) やマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) などの生存因子が存在しないと速やかに細胞死に至る。破骨細胞の細胞死はアポトーシスによるものであることが報告されている。アポトーシスは「プログラムされた細胞死」とも呼ばれ、細胞への様々な刺激、あるいはストレスなどによって誘導され、DNA の断片化を特徴とする静かな細胞死である。近年破骨細胞の細胞死はアポトーシスによることが明らかになってきたが、このように骨代謝の要ともいえる破骨細胞がなぜアポトーシスに陥りやすいのか、またその分子メカニズムはいかなるものか、などについてはほとんど明らかになっていないのが現状である。ビスフォスフォネートは強力な骨吸収抑制作用を有する骨粗鬆症治療薬であるが、その作用メカニズムとして破骨細胞のアポトーシス誘導が知られている。われわれはこれまでに small G protein のひとつである Ras が破骨細胞の生存に重要であり、Ras の活性を抑制する dominant negative Ras 遺伝子の導入によって破骨細胞は速やかにアポトーシスに陥り、Ras-ERK 経路を活性化する constitutively active MEK1 の導入によってアポトーシスが強力に抑制されることを明らかにした。やはり small G protein である Rho ファミリーに属する Rac1 はラメリポディアの形成などアクチン細胞骨格の制御に

重要な働きをされると考えられているが、ある種の細胞ではアポトーシスシグナルに関与することが明らかになっている。本研究の目的は破骨細胞のアポトーシスにおける small G protein、なかでも Rho, Rac, Cdc42 といった Rho ファミリーの役割を明らかにすることである。

B. 研究方法

ドミナントネガティブ型 Rho, Rac1, Cdc42 を発現するアデノウイルスベクターは Clontech のキットを用いて作成した。破骨細胞はマウス骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養において活性ビタミン D3 とプロスタグランジン E2 の存在下で形成された破骨細胞様細胞を使用した。破骨細胞へのアデノウイルスの感染、破骨細胞の生存アッセイ、破骨細胞による骨吸収アッセイはこれまでに報告したのと同様の方法を用いた (Miyazaki et al., J Cell Biol 2000, 148:333-342)。破骨細胞の motility はビデオマイクロスコープを用いて定量した。

(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

ドミナントネガティブ型 Rho, Rac1 を発現した破骨細胞では骨吸収能の低下が認められ、ドミナントネガティブ Rac1 を発現した場合には破骨細胞のアポトーシスの促進が認められた。一方でドミナントネガティブ型 Cdc42 の発現は破骨細胞の活性、生存に影響を及ぼさなかった。ドミナントネガティブ型 Rac1 は M-CSF による Akt の活性化を抑制するとともに破骨細胞の生存延長効果を失わしめた。ドミナントネガティブ型 Rac1 を発現した細胞では細胞の motility の低下が認められた。

#### D. 考察

Small G protein はさまざまな細胞機能に関与することが明らかになっている。Rac1 はこれまで細胞膜の ruffling を制御し、細胞の走化性、遊走性を制御することが報告されているが、細胞の種類によってはアポトーシスを調節していることが明らかになっている。本研究においてわれわれは、アデノウイルスベクターによる遺伝子導入システムを用いて、Rac1 が M-CSF シグナルの下流分子として機能し、破骨細胞の骨吸収能を調節するのみならず、その生存、細胞の motility に重要な役割を果たしていることを明らかにした。現在最も使用されている骨粗鬆症治療薬であるビスフォスフォネートは破骨細胞のアポトーシスを誘導して作用することが明らかになっているが、その骨への貯留性、骨代謝の長期間抑制が問題となっており、新たな骨粗鬆症治療薬の開発が望まれている。ビスフォスフォネートの破骨細胞アポトーシス誘導作用が small G protein の C 端の prenylation の抑制を介することが報告されており、Rac1 がビスフォスフォネートのターゲット分子の一つである可能性が示唆されている。今後ビスフォスフォネートの作用機序の解明も含め、Rac1 の作用をさらに検討することにより、破骨細胞のアポトーシスメカニズムを詳細に明らかにすることが可能であり、これによって新たな骨吸収治療剤の開発が可能になると考えられる。

#### E. 結論

Small G protein の一つである Rac1 が破骨細胞の細胞機能、細胞死に重要な役割を果たしていることが明らかになった。今後 Rac1 をターゲットにした骨吸収抑制剤の開発が期待される。

#### 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- $\alpha$ 」*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) エビスタ販売記念講演(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」
- 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) 千葉県医師会講演会(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



骨軟骨マトリックス破壊機構に関する研究 -MMP-13 ノックアウトマウスを用いた解析-

分担研究者：千葉 一裕 慶應義塾大学医学部整形外科 助教授

研究協力者：高石 官成 慶應義塾大学医学部整形外科 助手

研究要旨：肥大軟骨細胞、骨芽細胞において特異的に発現するコラゲナーゼである MMP-13 のノックアウト (KO) マウスを作製し、その表現型から骨軟骨形成におけるマトリックス改変機構について解析した。KO マウスは内軟骨性骨化の遅延と破骨細胞の機能不全による遅発性の大理石骨病を呈したことから、本酵素は骨軟骨吸収の足場をつくり、血管内皮細胞と破骨細胞を動員するだけでなく、生理活性物質の遊離を介して間接的に破骨細胞の機能を調節し、骨代謝に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

A. 研究目的

胎生期における内軟骨性骨化過程では、間充織細胞の凝集、軟骨細胞の分化誘導を経て、軟骨膜から侵入する血管に付随して軟骨性骨原基に持ち込まれた破軟骨細胞と骨芽細胞によって、軟骨から骨への置換が開始するとされる。今回、われわれは骨形成に必須な転写因子 Runx-2 の下流分子である MMP-13 の KO マウスを作製し、その表現型から骨モデリング、骨リモデリングにおける本酵素の役割について検討した。

B. 研究方法

16.5dpc マウス胎仔からクローニングした cDNA 断片を用いてマウス MMP-13 遺伝子をスクリーニングし、酵素活性ドメインの 2/3 を d2EGFP と pGKNeo で置換したターゲティングベクターを作製した。電気穿孔法により ES 細胞に導入後、相同組み換えコロニーを C57BL6 プラストシストに注入し、生殖系列に乗った 3 系統から KO マウスを作出し、組織学的解析をおこなった。Runx2 を導入した肋軟骨細胞と HUVEC を用いて共存培養をおこない、肥大軟骨が誘導する血管新生について検討した。またカルバリア由来骨芽細胞と骨髄細胞を用いて共存培養をおこない、骨芽細胞の膜表面に発現するシグナル分子の shedding と破骨細胞形成を検討した。

さらに 12 週齢で OVX または Sham 手術をおこない、硬組織切片を作製し骨形態計測を施行した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いる実験に関しては、慶應義塾大学の実験動物に関する規則に則って計画し、遂行した。

C. 研究結果

KO マウスでは、胎生後期における一次骨化開始が遅延し肥大軟骨細胞層が延長しており、骨髄腔には分解不全のマトリックスに囲まれる軟骨組織が島状に取り残され点在していた。二次骨化中心においても、同様に血管侵入と骨髄腔の形成が遅延していたが、生後 8 週でワイルドタイプに追いついた。TUNEL 染色によるアポトーシスや in situ hybridization による軟骨分化マーカーの局在に差を認めなかったが、胎生期中足骨を PECAM と TRAP の二重染色で経時的に観察すると、KO マウスでは軟骨膜に局在する血管内皮細胞と破軟骨細胞の軟骨性骨原基への侵入が遅れており、最終分化した肥大軟骨細胞に MMP-9 の強い染色性を認めた。長管骨成長板の軟骨移行部においては、一次骨梁の石灰化軟骨コアの吸収不全を補おうとして、TRAP 陽性、MMP-9 陽性の破骨細胞数が代償性が増えていた。また Runx2 を導入した肥大軟骨ペレットをマトリゲル内で HUVEC と共存培養すると、KO

マウスではペレット周囲の血管内皮細胞の引き込みが遅れていた。また KO では遅発性の大理石骨病を呈し、増加した骨量は OVX による高代謝回転誘導に抵抗性であった。骨形態計測では、Sham 群、OVX 群ともに、骨形成率には差を認めなかったが、KO では骨吸収面が有意に減少し、結果として二次海綿骨量が 4 倍に増加していた。さらに KO 由来骨芽細胞では可溶性 RANKL の放出が低下し、共存培養において形成された破骨細胞は小型で大きく広がらない傾向がみられ、吸収窩形成活性が低下していた。

#### D. 考察

近年、基質特異性の異なる種々の分泌型 MMP がインテグリンや膜結合型タンパクと結合することによって細胞膜上に集積し効果的に働く機序が予想されている。本マウスの表現型から、MMP-13 が内軟骨性骨化におけるマトリックス改変と血管侵入に密接に関与していることが明らかになった。ペレット培養の結果から、軟骨性骨原基への血管侵入開始には、肥大軟骨細胞自身が MMP-13 を分泌して石灰化マトリックスを除去するだけでなく、血管新生誘導分子を活性化する機序が考えられた。一方、骨形態計測と破骨細胞形成の結解析結果から、骨リモデリング過程においては、骨芽細胞が産生した MMP-13 がオステオイドを除去し骨吸収の足場を作るだけでなく、生理活性物質の遊離を介して間接的に破骨細胞の機能を調節していることが示唆された。

また、本 KO マウスの表現型は、過去に報告された MMP-9 KO マウスと似ており、遺伝子の重複性が考えられ、産生細胞の局在が異なることから、骨軟骨マトリックスの分解における、複数の MMP 相互による潜在型酵素の活性化機序が予想される。現在、MMP-9 と MMP-13 のダブル KO マウスを作製し、関節炎モデル、変形性関節症モデル、骨折モデルを用いて、病態形成や組織修復における本酵素の役割を詳細に解析している。

#### E. 結論

MMP-13 は、骨リモデリング過程において、肥大軟

骨細胞によって分泌され、軟骨性骨原基を分解し骨吸収の足場を作ることによって、血管内皮細胞と破骨細胞の動員を誘導する。一方、骨リモデリング過程においては、骨芽細胞によって分泌され、オステオイドを除去し骨吸収の足場を作るだけでなく、生理活性物質の遊離放出を介して間接的に破骨細胞の機能を調節し、骨代謝に重要な役割を果たす。

#### F. 健康危険情報

問題なし。

#### G. 研究発表

1. 論文発表：現在、投稿準備中である。
2. 学会発表：Loss of MMP-13 Delays Fetal Bone Formation. Takaishi H, Kimura T, Okada Y, D'Armiento J., 2003 MMP Gordon Research Conference

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

予定していない。

関節リウマチの先端的治療に関する研究

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 教授

研究要旨

我々は、関節を構成する3つの主たるコンポーネント（骨・軟骨・滑膜）の一つである滑膜細胞の細胞生物学的系譜を系統的に探索してきた。その過程で、滑膜細胞の増殖を司る分子シノビオリン（Synoviolin: Syno）を発見した。Synoの関節炎における特徴として、

1. 関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis: RA) 患者の滑膜組織で過剰に発現している (RAにおける over-expression)
2. 同分子の過剰発現マウスは、滑膜の増生、骨、軟骨破壊などリウマチ患者組織に酷似した所見を認める (gain-of-functionによる関節炎の発症)
3. Synoの遺伝子を半分に減らした個体 (Synoヘテロ欠損マウス) に、コラーゲン誘導関節炎を適応したところ、同マウスは関節炎の惹起に対して抵抗性を示した (loss-of-functionによる関節炎への抵抗性)

これらの結果は、Synoの発現量は少なくともマウスでの関節炎/関節症の発症に関与し、その発現量を制御することで、リウマチ滑膜細胞の過増殖を抑制が可能であることを示し、これを標的とした新規治療の強い可能性を示唆している。

そこで、本研究ではSynoの発現制御機構を明らかにするために、遺伝子発現の初期反応である転写レベルからアプローチを試みた。結果として、Synoの転写制御に重要なコアドメインの同定に成功し、さらに、同部位へのデコイ核酸がSynoの発現を抑制することによって、RA滑膜細胞増殖を抑制することを見出した。Synoの生物学的機能を考慮すると、本研究は全く新しいRAに対する新規治療法の開発における有効な知見となる。

A. 研究目的

高齢化社会の進展に伴い、運動器の健康は生命の質に直結する重大な関心事となりつつある。運動器疾患は高齢者の寝たきりを招く主要原因の一つであり、医療経済的にも焦眉の急であると考えられる。特に、WHOが、2000年より「骨関節の10年」を設定し、運動器の研究や治療への社会的関心を広める必要性を強調しているように、運動器疾患制御の分子基盤の解明は世界的な要請ともいえる。

運動器のなかでも、関節はヒトの高度な運動機能を実現する鍵となる器官であり、関節の中で可動性を有する滑膜関節の機能維持は、現代社会の日常生活において、益々その意義を高めている。この関節を冒す重要な疾患として関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis: RA) が挙げられる。関節リウマチは頻度が高く（全人口の0.8%）、難治性かつ慢性の進行性病態であ

り、さらにその多くが若年発症であるため、個人の生活のみならず産業的、経済的にも深刻な社会的負担を課すことになる。従って、関節リウマチの根絶を目指す治療法の確立は、単に医学的見地からの必要性のみならず、社会的要求が極めて大きい。

この状況に対して、これまでにないアプローチでRAの根治を目指した治療法の確立を目指し、新規RA原因遺伝子であるシノビオリン (Synoviolin: Syno) を治療標的と定め、その制御によるRA治療法の研究開発を目的としている。

B. 研究方法

要旨に示すとおり、我々はSynoの発現量は関節炎の発症と密接な関連があることを証明した（論文発表4参照）。この科学的根拠をもとに、転写制御によるSynoの発現量をコントロールする目的で、

- ①「Synoプロモーターの解析」

②「デコイ核酸によるシノビオリン発現抑制と滑膜細胞増殖抑制」という2層性の研究を推し進めている。

① Syno プロモーターの解析

Syno プロモーターの転写調節領域を検索するため、マウスの Syno 遺伝子の上流 4.5k のゲノムを使用したレポータープラスミドを作製し、培養細胞を用いた検討を実施した。レポーター遺伝子としては、Luciferase を使用した。種々の欠質変異体を用いることにより、プロモーターの転写調節領域の探索を実施した。

② デコイ核酸の選定およびその評価

デコイ核酸は、転写調節領域の転写因子結合部位と同じ配列を含む短い核酸であり、転写因子の転写調節領域への結合を阻害することで遺伝子発現を抑制する。Syno の転写調節領域を標的としたデコイ核酸を設計し、RA 滑膜細胞の増殖活性を指標としてデコイ核酸の選定を行なった。

③ 倫理面への配慮、組み換え DNA 実験

ヒト滑膜組織に関しては、当施設倫理委員会の方針に準じ、書面によるインフォームドコンセントを得たもののみを使用した。DNA を用いた実験は、文科省が定めた DNA 実験指針に従い行った。

C. 研究結果

① Syno のコアプロモーターは EBS である。

レポータープラスミドのゲノム部分を少しずつ削っていったところ、S の翻訳開始点から -84 ~ -73bp の部位にその転写活性化能を担う部位が存在することを同定した。この部位は、マウスゲノムとヒトゲノムとの間でよく保存されており、バイオインフォマティクスによる転写因子結合部位の予測から、Ets binding site (EBS) の存在が見出された。さらに、EBS に 1 塩基変異を入れ、レポーター・アッセイを行ったところ、その転写活性化能は約 12% まで低下した。従って、EBS をブロックするデコイ核酸の導入により、強力に Syno の発現が抑制され、それによってもたらされる滑膜細胞の過増殖抑制、ひいては RA の根治へと結びつくと思定された。この結果をもとに、次の実験を行った。

② EBS に対するデコイ核酸は、Syno の発現および滑膜細胞増殖を抑制する。

Syno プロモーターの転写因子結合部位 (EBS) を標的としたデコイ核酸を設計し、この核酸が RA 滑膜細胞の増殖にどのような影響を与えるかを検討した。RA 滑膜細胞にデコイ核酸をトランスフェクション処理により導入後、Syno の蛋白発現量をウェスタンブロッティング法で確認した。デコイ導入による Syno 発現抑制が確認された滑膜細胞の細胞増殖率は Alamar blue assay により測定した。その結果、デコイ核酸による Syno 発現抑制により、RA 滑膜細胞の増殖の有意な減少が確認された。

D. 結論

Syno の発現量を規定するプロモーターの中心的転写調節領域の発見と、それを標的としたデコイ核酸による滑膜細胞の増殖抑制効果を証明した。この発見は滑膜の恒常性維持、および関節リウマチの発症メカニズムの解明のみならず、RA の滑膜細胞の異常増殖をターゲットとした革新的な関節リウマチ治療薬の研究開発につながるものと考えられる。

本研究を含む我々の Syno に関する一連の研究成果は、関節リウマチ滑膜細胞の増殖が Syno を中心とした小胞体蛋白の分解機能と品質管理機能の亢進により制御されるという、全く新しい RA の疾患概念を提唱しうるものである。また、これまでに検討されたことのない機構を標的としているので、RA 根治を目指した新規治療法に関する研究分野の開拓を推し進めるものである。

E. 健康危惧情報

特になし

F. 研究発表

1、論文発表

- 1) Fujita H, Ohshima T, Oishi T, Aratani S, Fujii R, Fukamizu A, Nakajima T. Relevance of nuclear localization and functions of RNA helicase A. *Int J Mol Med.* 15,555-60, 2005.
- 2) Yagishita N, Amano T, and Nakajima T. Essential role of synoviolin in