

深層の細胞に於いて高頻度に、やや好塩基性の胞体を有する細胞がCD68陽性であった。また、滑膜新生血管周囲の紡錘形細胞群の一部にCD68陽性細胞の存在を認めた。対照のOA組織では滑膜表層細胞に限定されていた。

- 2) RA患者の関節近傍の骨吸収部では、TRAP陽性・MMP-12 陽性の多核巨細胞、TRAP陽性・MMP-12 陰性の多核巨細胞、TRAP陰性、MMP-12 陽性の3種の多核巨細胞が存在し、それぞれ骨吸収に関与することを明らかにした。
- 3) 移植後4週で、人工骨中央部まで、良好な骨形成を認め、BMP含有人工骨では、さらに旺盛な骨再生を認めた。骨髄幹細胞含有人工骨では、筋肉内に移植後4週で、マイクロCT評価により、全ての気孔内に豊富な骨形成を観察することができた。
- 4) 人工骨移植を行った5例の関節リウマチ患者では、平均1年、病的骨折を生じず、重症化を予防できた。
- 5) 血中C1q値測定系開発の1次選択として71クローンを選択した。2次選択として12クローンを確立できた。

D. 考察

滑膜内の新生血管周辺にはCD68陽性細胞が存在し、骨髄由来細胞である可能性が示唆された。骨吸収部では、TRAP陰性、MMP-12 陽性の多核巨細胞が存在し、関節リウマチの病態への関与が示唆された。人工骨移植は、関節リウマチ・重症化の予防に有用な骨再生治療となる可能性が示された。血中C1q値測定系の開発により、リウマチ重症化の予後予測に貢献できるものと考えられる。

E. 結論

ヒトRA滑膜組織にはCD68陽性細胞が存在すること、関節リウマチの病態に重要な役割を果たすNurse細胞や、MMP-12陽性が含まれていることが示

された。人工骨を用いた骨再生は、関節リウマチの重症化防止の新規治療法として期待できる。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kaito, T., Myoui, A., Takaoka, K., Saito, N., Nishikawa, M., Tamai, N., Ohgushi, H., Yoshikawa, H.: Potentiation of the activity of bone morphogenetic protein-2 in bone regeneration by a PLA-PEG/hydroxyapatite composite. *Biomaterials*, 26:73-79, 2005.

Kishida, Y., Hirao, M., Tamai, N., Nampei, A., Fujimoto, T., Nakase, T., Shimizu, N., Yoshikawa, H., Myoui, A.: Leptin regulates chondrocyte differentiation and matrix maturation during endochondral ossification. *Bone*, 307:607-621, 2005.

Nakaya, H., Shimizu, T., Isobe, K.I., Tensho, K., Okabe, T., Nakamura, Y., Nawata, M., Yoshikawa, H., Takaoka, K., Wakitani, S.: Microbubble-enhanced ultrasound exposure promotes uptake of methotrexate into synovial cells and enhanced antiinflammatory effects in the knees of rabbits with antigen-induced arthritis. *Arth Rheum*, 52:2559-2566, 2005.

Oshima, K., Nampei, A., Matsuda, M., Iwaki, M., Fukuhara, A., Hashimoto, J., Yoshikawa, H., Shimomura I.: Adiponectin increases bone mass by suppressing osteoclast and activating osteoblast. *Biochem Biophys Res Commun*, 331:520-526, 2005.

Tamai, N., Myoui, A., Hirao, M., Kaito, T., Ochi, T., Tanaka, J., Takaoka, K., Yoshikawa, H.: A new biotechnology for articular cartilage repair: subchondral implantation of a composite of interconnected porous hydroxyapatite, synthetic polymer (PLA-PEG), and bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *Osteoarthr Cartilage*, 13: 405-417, 2005.

Tsuboi, H., Udagawa, N., Hashimoto, J.,

Yoshikawa, H., Takahashi, N., Ochi, T.: Nurse-like cells from patients with rheumatoid arthritis support the survival of osteoclast precursors via macrophage colony-stimulating factor production. *Arth Rheum*, 52:3819-3828, 2005.

Yoshikawa, H., Myoui, A.: Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. *J Art Org*, 8:131-136, 2005.

西川昌孝、名井陽、大串始、池内正子、玉井宣行、吉川秀樹：連通多孔体ハイドロキシアパタイトと骨髄間葉系細胞を用いた骨再生、別冊整形外科、47:7-11, 2005.

富田哲也、橋本英雄、梶座康夫、吉川秀樹：NFκB 阻害による関節破壊制御、分子リウマチ、2: 95-102, 2005.

中村憲正、吉川秀樹：骨・軟骨の再生医療、臨床と研究、82:983-986, 2005.

西川昌孝、名井陽、富田哲也、高樋康一郎、南平昭豪、吉川秀樹：MAPK 阻害薬による関節炎の治療、分子リウマチ、2:182-187, 2005.

吉川秀樹：人工骨・人工関節の開発と問題点、人体にやさしい医療材料、クバプロ、p. 143-152, 2005.

海渡貴司、名井陽、吉川秀樹：骨を生まれ変わらせる—人工骨による骨組織再生、Biophilia、1:28-34, 2005.

吉川秀樹、名井陽：人工骨による骨の組織工学と再生医療、人工臓器・再生医療の最先端、先端医療技術研究所、p.230-234, 2005.

吉川秀樹：運動器の再生医療の現状と展望、理学療法学、32:441-444, 2005.

2. 学会発表

1. 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター開設記念シンポジウム：医工連携による新規人工骨、人工関節の開発、平成 17 年 2 月（大阪）

2. 第 4 回日本再生医療学会総会（市民公開講座）：再生医療への期待、骨、平成 17 年 2 月（大阪）

3. 第 4 回日本再生医療学会総会（ランチョンセミナー）：骨再生、基礎研究から臨床応用へ、平成 17 年 3 月（大阪）

4. 21 世紀 COE 国際シンポジウム『新たな再生医療に向けた革新的な総合拠点形成を目指して』：Bone tissue engineering by interconnected porous hydroxyapatite ceramics、平成 17 年 3 月（大阪）

5. 第 78 回日本整形外科学会学術総会シンポジウム『わが国の再生医療の現状と展望』：運動器の再生医療の現状と展望：骨、平成 17 年 5 月（横浜）

6. 第 40 回日本理学療法学会大会（特別講演）：運動器の再生医療の現状と展望、平成 17 年 5 月（大阪）

7. 第 12 回 NPO 法人再生医療推進センター市民公開講座：骨の病気と老化；夢の治療を目指して、骨はどこまで再生できるか、平成 17 年 6 月（高知）

8. 第 15 回日本リウマチ学会近畿支部学術集会（特別講演）：関節リウマチに対する新しい治療戦略—人工骨による骨軟骨再生、平成 17 年 9 月（大阪）

9. 第 5 回福岡骨代謝研究会：人工骨による骨再生骨粗鬆症の局所治療への応用、平成 17 年 10 月（福岡）

10. 第 50 回日本口腔外科学会総会（教育講演）：人工骨による骨再生—基礎研究から臨床応用へ、平成 17 年 10 月（大阪）

11. 大阪大学 21 世紀 COE プログラム合同シンポジウム：新たな運動器再生技術の開発と臨床応用、平成 17 年 12 月（大阪）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

「徐放用容器」出願者：(株) エムエムテイ、吉川秀樹、越智隆弘、発明者：吉川秀樹、越智隆弘

平成 17 年 4 月 22 日 特許第 3671132 号

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

関節リウマチ・骨粗鬆症の重症化防止治療開発研究

分担研究者 松井 好人 大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学(整形外科)助手

研究要旨：RA病態と破骨細胞に関する研究（骨・軟骨破壊に関わる細胞）を推進している。

A. 研究目的

関節リウマチ(RA)では、免疫反応により活性化された滑膜細胞やその誘導する破骨細胞が関節の骨・軟骨破壊に関与することが明らかになりつつある。われわれはGM-CSFを用いてRA関節由来滑膜ナース細胞と共培養した単球から破骨細胞様多核細胞への分化誘導系を確立し、そのRA病態やコラーゲン代謝への関与を解析してきた。その過程で、GM-CSFにより誘導された破骨細胞様細胞はMMP-12を発現するがRANKLによるものはMMP-12を発現しないことを見出した。今回の研究はRA関節破壊におけるMMP-12の役割を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

GM-CSFによる破骨細胞様細胞分化におけるMMP-12欠失の影響を細胞レベルで、その関節(骨・軟骨)破壊への影響を個体レベルで解析するためにMMP-12の条件的破壊マウスを作成する。すなわち、MMP-12遺伝子のエクソン1を前後7kbにわたってloxp-LacZ-pGK neo-loxpベクター(熊本大学より供与)により相同組み換えしたTT2バックグラウンドのES細胞を得る。この際、複数の変異loxpを用いることで、条

件的破壊と条件的救済が可能となるようにしている。このES細胞からマウスを得て、Creマウスと交配することで条件的破壊、条件的救済を実現する。Creマウスは、TRAP(滑膜線維芽細胞様細胞と共培養した(多核化する前の)単球はTRAPを発現する)、CD98、DC-STAMP(多核化する際に発現する)、カテプシンK、カルシトニンレセプター(多核化した破骨細胞様細胞で発現する)について作成または入手する。以上により、滑膜線維芽細胞様細胞と共培養した単球、多核化する際、多核化後、の各分化段階でMMP-12を欠失した細胞を得ることが可能となる。

(倫理面への配慮)

動物実験実施の際には、動物愛護上の配慮を十分に行って遂行している。

C. 研究結果

MMP-12遺伝子のエクソン1の前後7kbをPCR法により増幅しloxp-LacZ-pGK neo-loxpベクターに組み込んだ。現在、相同組み換えしたTT2バックグラウンドのES細胞をスクリーニングしている。TRAP、カテプシンKのCREマウスは入手の手続きを進めており、カルシトニンレセプター、CD98、DC-STAMPのCREマウス

は現在作成中である。

D. 考察

MMP 1 2 の条件的破壊は、免疫系の異常を通じて関節（骨・軟骨）の破壊に関与するのではないかと予想している。

E. 結論

RA 病態に伴う重症の骨粗鬆症や高度の関節破壊が進展する機序を、破骨細胞の分化異常やコラーゲン代謝異常の側面から動物モデルを用いて明らかにしていく予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sakai T, Matsui Y, Katoh S, Yukata K, Hamada D, Takata Y, Yokoi H, Yasui N. Asynchronous progressive diaphyseal dysplasia. *Mod Rheumatol* 15: 450-453, 2005.
2. 松井好人：骨・軟骨研究の展開 わかりやすい蛋白質解析、分子リウマチ、2:65-68, 2005.
3. 松井好人：先天性骨系統疾患の疫学と病態 低身長をきたす疾患 骨幹端の異常を特徴とする疾患、*THE BONE*、19:279-283, 2005.

2. 学会発表

1. Takata Y, Matsui Y, Hamada D, Goto T, Kubo T, Egawa H, Nakano S, Shinomiya F, Inoue H, Itakura M, Yasui N. The alpha 2 type IX collagen gene tryptophan polymorphism is not associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. Gordon Research Conference on Cartilage Biology and

Pathology (Il Ciocco, Italy, June, 2005)

2. Matsui Y. Collagen IX tryptophan polymorphisms may predispose carriers to the development of symptomatic spinal stenosis associated with spondylolisthesis. Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2005 (Vienna, Austria, June, 2005)
3. Takahashi M, Matsui Y, Goto T, Nishimura G, Ikegawa S, Ohashi H, Yasui N. Intrafamilial phenotypic diversity in multiple epiphyseal dysplasia associated with a COL9A2 mutation (EDM2). Gordon Research Conference on Collagen (New London, NH, Jul-Aug, 2005)
4. 高田洋一郎、松井好人、浜田大輔、井上寛、板倉光夫、中野俊次、四宮文男、安井夏生：IX型コラーゲン alpha2 鎖遺伝子のトリプトファン多型は関節リウマチの発症や重症度に関与しているとはいえない 第49回日本リウマチ学会(平成17年4月 横浜)
5. 高橋光彦、松井好人、池川志郎、西村玄、大橋博文、安井夏生：*COL9A2* 遺伝子変異による多発性骨端異形成症3世代家系の多様な表現型 第37回日本結合組織学会(平成17年5月 富山)
6. 越智隆弘、島岡康則、行岡正雄、坪井秀規、松井好人、小田剛紀：骨髓病巣から見たリウマチ病態と今後の治療法 第78回日本整形外科学会学術総会(平成17年5月 横浜)
7. 松井好人：IX型コラーゲン病における表現型の多様性 第6回運動器科学研究会

(平成17年8月 静岡)

8. 松井好人：IX型コラーゲン異常による運動器疾患 第88回発生研・拠点形成Aセミナー（熊本大学）（平成17年11月 熊本）
9. 松井好人、高橋光彦、後東知宏、西村玄、池川志郎、大橋博文、安井夏生：IX型コラーゲン遺伝子（COL9A2）変異による多発性骨端異形成症の多様な表現型 第17回日本整形外科学会骨系統疾患研究会（平成17年11月 盛岡）

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

MMP12遺伝子改変マウスによる解析研究

分担研究者 山村 研一 熊本大学教授

研究要旨

慢性関節リウマチの発症におけるMmp12の役割を解析することを目的として、その遺伝子破壊マウスを作製することを計画した。ただ、単純な破壊を行うのではなく、第1段階で遺伝子を完全破壊し、その後別の遺伝子で置換し、Mmp12遺伝子内の機能ドメインの解析や、ヒト遺伝子と入れ替えて、詳細に機能を解析することも計画した。このためには相同組み換え用のベクターを作製する必要があるが、どのような遺伝子にも適用できる汎用性のあるベクターを作製することに成功した。

A. 研究目的

関節リウマチや骨粗しょう症に関係することが推定されるMmp12遺伝子等に関して、トランスジェニックマウスや遺伝子破壊マウスを作製する。作製したこれらのモデルマウスを解析することにより、これらの遺伝子が関節リウマチや骨粗しょう症と関連するかどうか、関連するとすれば発症過程のどの時期に関与するのか、そしてその分子機構が何であるのかを明らかにするのが、本研究の目的である。

B. 研究方法

1. データベース等による検索：現在多数の遺伝子トラップ ES 細胞が世界的に樹立されている。場合によっては、候補遺伝子についてすでにそのようなトラップクローンが存在している可能性がある。それを、検索する。
2. 遺伝子の完全破壊あるいは条件的遺伝子破壊等が可能な、ベクターをこれまでに開発した遺伝子トラップベクターpU-17, pU-21等を用いて開発する。
3. リウマチの発症に関与すると考えられているMmp12 遺伝子について、その破壊マウスを作製するための、相同組換えベクターを、これまでに開発済みのベクターを利用して作製する。

(倫理面への配慮)

今年度は、まだ相同組換えベクターの作製段階であり、遺伝子破壊マウスの作製実験には至っていない。来年度に、相同組換えクローンが得られれば、動物実験計画書および遺伝子組換え実験申請を行い、動物実験指針および法律を遵守して、実験を行う予定である。

C. 研究結果

1. 熊本大学の我々のグループ International Gene Trap Consortium に参加しているが、このデータベースを検索したが、Mmp12 のトラップクローンはまだ登録されていなかった。
2. 相同組換え用のベクターとしては、MC1-DT-A-pA-(poly cloning sites) - lox71-PGK-neo-loxP-pA-lox2272 を完成している。これを元に汎用性のベクターを作製中である。このベクターは、第1段階で遺伝子を完全破壊し、その後別の遺伝子で置換できるように設計している。すなわち、lox71 と loxP または lox2272 で挟まれている部分を、別の遺伝子で置換できる。このためには、別途置換用ベクターが必要となる。そこで、置換用ベクターとして2種類作製した。すなわち、lox66-splice acceptor-cloning site-polyA-Frt-PGK

promoter-puro-Frt-loxP と lox66-splice
acceptor-Frt-cloning site-PGK
promoter-Puro-polyA-lox2272-MC1
promoter-DT-A-polyA-loxP である。後者を
用いれば、Frt を認識する FLP を組織特異
的に発現するトランスジェニックマウスと
交配すれば、条件的遺伝子破壊も可能であ
る。

3. 上記のベクターを利用して、Mmp12 遺伝子
の一部を組み込み、相同組換え用のベクター
を作製中である。

D. 考察

遺伝子の機能やヒト疾患の病因・病態解析の解
明には、in vivoの解析系が重要で、トランスジ
ェニックマウスや遺伝子破壊マウスを自在に駆
使する必要がある。しかし、使用するトランスジ
ーンや相同組換えベクターは一つ一つ構築する
必要があるため、それほど容易ではない。したが
って、種々の遺伝子に適用できる汎用性のある組
換えベクターの作製は重要と考えられる。

E. 結論

ヒト疾患の病因・病態解析の解明には、単純な
遺伝子破壊マウスだけではなく、条件的遺伝子破
壊のできるマウス、さらに種々の異なった変異を
導入したマウスが必要である。

F. なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Miyata, K, Oike, Y, Hoshii, T,
Maekawa, H, Ogawa, H, Suda, T,
Araki, K, and Yamamura, K.
Increase of smooth muscle cell
migration and of intimal hyperplasia
in mice lacking the abhydrolase
domain containing2 gene.
Biochem Biophys Res Commun.
329:296-304, 2005.
- (2) Taniwaki, T., Haruna, K., Nakamura,
H., Sekimoto, T., Oike, Y., Imaizumi,

T., Saito, F., Muta, M., Soejima, Y.,
Utoh, A., Nakagata, N., Araki, M.,
Yamamura, K., Araki, K.

Characterization of an exchange-
able gene trap using pU-17 carrying
a stop codon -betageo cassette.
Dev. Growth Differ. 47:163-172,
2005

- (3) Ohmuraya, M., Hirota, M., Araki, M.,
Mizushima, N., Matsui, M.,
Mizumoto, T., Haruna, K., Kume, S.,
Takeya, M., Ogawa, M., Araki, K.
and Yamamura, K. Autophagic cell
death of pancreatic acinar cells in
serine protease inhibitor Kazal
Type 3 deficient mice.
Gastroenterology 129:696-705,
2005.
- (4) Washington Smoaka, I, Byrdb, N.
A., Abu-Issab, R., Goddeerisc, M.
M., Andersonc, R., Morrisb, J.,
Yamamurad, K., Klingensmithc, J.,
Meyers, E. N.. Sonic hedgehog is
required for cardiac outflow tract
and neural crest cell development.
Dev. Biol. 283: 357-372, 2005.
- (5) Yamazaki, H., Sakata, E., Yamane,
T., Yanagisawa, A., Abe, K.,
Yamamura, K., Hayashi, S. and
Kunisada, T. Presence and
distribution of neural crest-derived
cells in the murine developing
thymus and their potential for
differentiation. Int. Immunol. 17:
549-558, 2005.
- (6) Semba, K., Araki, K., Li, Z.,
Matsumoto, K., Suzuki, M.,
Nakagata, N., Takagi, K., Takeya,
M., Yoshinobu, K., Araki, M., Imai,
K., Abe, K. and Yamamura, K. A
novel murine gene, *Sickle tail (Skt)*,
linked to the *Danforth's short tail*
(*Sd*) locus, is required for normal

- development of the intervertebral disc. *Genetics* 172:445-456, 2006.
- (7) Alex S. Nord, A. S., Patricia J. Chang, P. J., Bruce R. Conklin, B. R., Cox, C., Harper, C. A., Hicks, G. G., Huang, C. C. Johns, S. J., Kawamoto, M., Liu, S., Meng, E. C., Morris, J. H., Rossant, J., Ruiz, P., Skarnes, W. C., Soriano, P., Stanford, W. I., Stryke, D., von Melchner, H., Wurst, W., Yamamura, K., Young, S. G., Babbitt, P. C. and Ferrin, T. E. The international gene trap consortium web site: a portal to all publicly available gene trap cell lines and mouse. *Nucleic Acids Res.* 34: D642-D648, 2006.
- (8) Miura, K., Yoshinobu, K., Imaizumi, T., Haruna, K., Miyamoto, Y., Yoneda, Y., Nakagata, N., Araki, M., Miyakawa, T., Yamamura, K. and Araki, K. Impaired expression of Importin/karyopherin β 1 leads to post-implantation lethality. *Biochem Biophys Res Commun.* 341: 132-138, 2006.
- (9) Kishigami, S., Komatsu, Y., Takeda, H., Nomura-Kitabayashi, A., Yamauchi, Y., Abe, K., Yamamura, K. and Mishina, Y. An optimized beta-gal staining method for simultaneous detection of endogenous gene expression in early mouse embryos. *Genesis* in press.
- (10) Ohmuraya, M., Hirota, M., Araki, K., Baba, H. and Yamamura, K. Enhanced trypsin activity in pancreatic acinar cells deficient for serine protease inhibitor Kazal type 3. *Pancreas* in press.
2. 学会発表
- (1) 山村研一, 仙波圭, 松元健一郎, 鈴木操, 中瀨直己, 荒木正健, 今井賢二, 阿部訓也, 荒木喜美: 脊椎形成における新規 Skt 遺伝子の役割, 第52回日本実験動物学会総会, 2005. 5. 18-20, 東京
- (2) 山村研一, 荒木正健, 荒木喜美: 可変型遺伝子トラップ法によるマウスゲノム開拓, 第64回日本癌学会学術総会, 2005. 9. 14-1札幌
- (3) 山村研一, 荒木正健, 荒木喜美: ヒト疾患モデルの大規模作製, 日本人類遺伝学会第50回大会, 2005. 9. 19-22, 岡山
- H. 知的財産権の出願・登録状況
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

可溶性 RANKL 産生における MMP, ADAM 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 破骨細胞分化促進因子である receptor activator of NF- κ B ligand (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 matrix metalloproteinase (MMP) 14 および a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) 10 が RANKL 切断活性を有す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。破骨細胞の分化・活性化には 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。われわれは昨年 Ras-GAP (GTPase-activating protein) として同定された CAPRI (Ca²⁺-promoted Ras inactivator) のスプライスバリエントが RANKL 切断活性を誘導することを明らかにした。本年の研究の目的はさまざまな MMP, ADAM の RANKL 切断における役割を明らかにすることである。

B. 研究方法

RANKL は膜近傍の stalk region で切断され、可溶型 RANKL が産生される。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 活性を定量した。全長 RANKL の切断は切断された可溶型 RANKL を osteoprotegerin-Fc カラムで回収し、抗 RANKL 抗体を用いた Western blotting で検出した。

さまざまな MMP, ADAM を骨髄ストローマ細胞の株細胞 ST2 の cDNA ライブラリーからクローニングし、それらの RANKL shedding に対する役割を、上記アッセイを用いて検討した。また骨髄ストローマ細胞株細胞である TM8B2 細胞および初代培養骨芽細胞における役割を small interfering RNA による gene knockdown 法を用いて検討した。

(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

RANKL-SEAP を用いたスクリーニングにおいていくつかの MMP, ADAM family member が RANKL 切断活性を示した。このうち MMP14, ADAM10 に初代培養骨芽細胞で強い発現が認められた。Osteoprotegerin-Fc カラムを用い

たウエスタンブロット法によって、RANKL は2箇所切断されることが明らかになった。siRNAによるgene knockdownを用いて検討したところ、これらはそれぞれ MMP14, ADAM10 による切断サイトであることが明らかになった(図1)。

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によって可溶型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可溶化の意義は未だに不明であるが、TNF- α と同様に可溶型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MMP14, ADAM10がRANKL shedding活性を有することを明らかにした。今後ノックアウトマウスなどを用いてRANKL sheddingにの生理的、病的役割が明らかになることが期待される。

E. 結論

MMP14, ADAM10 は RANKL shedding 活性を有することが明らかになった。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

英文原著・総説

1. Kwak HB, Lee SW, Jin HM, Ha H, Lee SH, Takeshita S, Tanaka S, Kim HM, Kim HH, Lee ZH. Monokine induced by interferon- γ is induced by receptor activator of nuclear factor κ B ligand and involved in osteoclast adhesion and migration. *Blood*. 2005, 105: 2963-2969.
2. 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* 2005, 280:7909-7916.
3. Gohda J, Akiyama T, Koga T, Takayanagi H, Tanaka S, Inoue JI.

RANK-mediated amplification of TRAF6 signaling leads to NFATc1 induction during osteoclastogenesis. *Embo J* 2005, 24:790-799.

4. Hsia, DA, Lim S-T, Bernard-Trifilo JA, Mitra, SK, Tanaka S, den Hertog, J, Streblov, DN, Ilic Z D, Ginsberg, MH, Schlaepfer DD. Integrin $\alpha 4 \beta 1$ promotes FAK-independent cell motility via $\alpha 4$ cytoplasmic domain-specific activation of Src. *Mol Cell Biol* 2005, 25:9700-9712.
5. Fukuda A, Hikita A, Wakeyama H, Akiyama T, Oda H, Nakamura K, Tanaka S. Regulation of osteoclast apoptosis and motility by small GTPase binding protein Rac1. *J Bone Miner Res* 2005, 20:2245-2253.
6. Hikita A, Kadono Y, Chikuda H, Fukuda A, Wakeyama H, Yasuda H, Nakamura K, Oda H, Miyazaki T, Tanaka S. Identification of an alternatively spliced variant of CAPRI as a possible regulator of RANKL shedding. *J Biol Chem* 2005, 280: 41700-41706.
7. Hu K, Yang J, Tanaka S, Gonias SL, Mars WM, Liu Y. Tissue-type plasminogen activator acts as a cytokine that triggers intracellular signal transduction and induces matrix metalloproteinase-9 gene expression. *J Biol Chem* 2005, 281: 2120-2127.
8. Tanaka S. Intracellular signal transduction pathways: good therapeutic targets for joint destruction in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatology* 2005, 15:19-27.
9. Akiyama T, Miyazaki T, Bouillet P, Nakamura K, Strasser A, Tanaka S. In vitro and in vivo assays for osteoclast apoptosis. *Biol. Proced. Online* 2005, 7: 48-59.
10. Tanaka S, Takahashi N, Nakamura K, Suda, T. Role of RANKL in physiological and pathological bone resorption and therapeutics targeting RANKL-RANK signaling system. *Immunological Review* 2005, 108:30-49.
11. Tanaka S, Suzuki H, Yamauchi H, Nakamura I and Nakamura K. Signal transduction pathways of calcitonin/calcitonin receptor regulating cytoskeletal organization and bone-resorbing activity of osteoclasts.

Cellular and Molecular Biology 2005 in press

12. Ogata T, Yamamoto S, Nakamura K and Tanaka S. Signaling Axis in Proliferation and Differentiation of Schwann Cell. *Mol Neurobiol.* 2006, 33:51-62.
13. Tanaka S, Miyazaki T, Fukuda A, Akiyama T, Kadono Y, Wakeyama H, Kono S, Hoshikawa S, Nakamura M, Ohshima Y, Hikita A, Nakamura K. Molecular mechanism of the life and death of the osteoclast. *Ann N Y Acad Sci* in press.

和文原著・総説

1. 田中 栄「骨代謝-Bone Cell Biology-」*SERM* 1:44-51, 2005.
2. 太田博明、田中 栄、加藤茂明、野崎雅裕「座談会 *SERM*とは」*SERM*1:107-121, 2005.
3. 疋田温彦、田中 栄「関節リウマチの成因と病態生理 概論的事項 破骨細胞と軟骨・骨破壊機構」*日本臨床* Vol 63, Supple 1:84-86, 2005.
4. 泉 亮良、田中 栄「RAの主な整形外科手術と手術を勧めるタイミング-適応と有効性-」*Medical Practice* 22:487-492, 2005.
5. 田中 栄「口が語る性差-口腔所見の性差から全身を診る- 第7回 骨粗鬆症の病態と新しい治療法」性差と医療 2:767-773, 2005
6. 田中 栄「RANKLと骨破壊」炎症と免疫 13:435-440, 2005.
7. 田中 栄「RANKLワクチンによる新骨代謝疾患治療」*Clinical Calcium*15:1160-1164, 2005
8. 山田浩司、田中 栄「人工膝関節術後感染症の治療戦略」*リウマチ科* 33:595-602, 2005
9. 中村正樹、田中 栄「骨侵食の機序」*日本臨床*63:1571-1573, 2005.
10. 十字琢夫、田中 栄「RANKLワクチン」*日本臨床*63:1666-1670, 2005.
11. 田中 栄「骨代謝-Bone Cell Biology-」*SERM* 2:42-47, 2005.
12. 田中 栄「Osteoimmunology 特集にあたって」*The Bone* 19:641-642, 2005.
13. 分山秀敏 田中 栄「関節リウマチの骨破壊と破骨細胞」骨研究がわかる

14. 高柳 広編 羊土社 pp73-79, 2005
15. 田中 栄「破骨細胞アポトーシスの分子機構」*臨床免疫* 44:612-614, 2005.

国際会議招待講演

1. A New York Academy of Sciences Meeting “Skeletal development and remodeling in health, disease & aging” (2005.5.18-21) New York: Session I, BONE CELL FORMATION AND FATE “Regulation of the life and death of the osteoclast”
2. 2nd Asian Osteoporosis Forum (2005.9.3-4) Tokyo. Session 3: Bone & Other Disease States “Rheumatoid Arthritis and Bone”
3. 2nd Meeting of bone biology forum (2005.11.18-19) Fuji, Session VI “Regulation of the life and death of the osteoclast”

国内学会発表・講演(筆頭発表のみ)

1. 第2回大阪 *SERM* 学術セミナー (2005.5.26)大阪 「骨粗鬆症治療の新世紀」
2. 第37回日本結合組織学会学術集会 (2005.5.27)富山 特別講演2「関節リウマチによる骨関節破壊の分子メカニズム」
3. 相楽・綴喜医師会学術講演会 (2005.6.4)京都 「新しい骨粗鬆症治療戦略」
4. 第43回 聖マリアンナ医科大学難治研センター大学院セミナー「骨破壊をターゲットにした骨代謝疾患治療戦略」 (2005.6.2)川崎
5. 竜ヶ崎市・牛久市医師会講演会 (2005.6.7)龍ヶ崎 「骨粗鬆症治療の新世紀」
6. 神奈川県央地区学術講演会 (2005.6.10)相模原 「骨粗鬆症治療の新世紀」
7. *SERM* 学術講演会 (2005.6.24)前橋 「骨粗鬆症治療の新世紀」
8. 田中 栄、大熊千晶 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17年度 第1回会議 研究成果報告会 (2005.7.2)京都 「マウス骨壊死モデルの解析」

9. 第5回臨床骨代謝フォーラム (2005.7.9)東京「関節リウマチにおける骨破壊の分子メカニズム」
10. 第23回 日本骨代謝学会学術集会 (2005.7.21-23)大阪 イブニングセミナー2「新しい骨粗鬆症治療薬とその作用機序」
11. 中弘南黒臨床整形外科医会学術講演会 (2005.10.7)弘前「骨吸収抑制剤を中心とした骨粗鬆症治療体系」
12. Bone & Joint Research Club～第2回骨と関節の代謝調節を考える基礎の会～ (2005.10.8-9)かづさ 特別セッション:【 関節疾患克服に向けての分子生物学的アプローチ 】「骨破壊の分子メカニズムと新しい治療戦略」
13. 第33回 臨床免疫学会総会 ランチオン教育講演 (2005.10.29) 京都「骨破壊をターゲットにした関節リウマチの治療戦略」
14. 第11回 埼玉県骨粗鬆症研究会 (2005.11.5)さいたま市 研修特別講演「骨粗鬆症の新しい治療」
15. 第33回 硬組織セミナー 東京医科歯科大学硬組織薬理学分野 大学院特別講義 (2005.11.8)「関節リウマチの病因と病態のメカニズム」
16. 第33回 日本リウマチ・関節外科学会 (2005.11.11)品川 ワークショップ 2 関節リウマチ治療における骨・関節破壊抑制の最新知見「関節リウマチにおける骨破壊の分子メカニズム」
17. 第48回 山口県臨床整形外科医会 (2005.11.17) 山口 特別講演 I「骨粗鬆症治療の新世紀」
18. 田中 栄、大熊千晶 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17年度 第2回会議 研究成果報告会 (2005.12.3) 京都 「マウス骨壊死モデルの解析 第3報」
19. 第10回 骨代謝セミナー (2005.12.22)東京 「関節リウマチにおける骨破壊のメカニズムと治療戦略」
20. 第6回 熊本骨折セミナー学術講演会 (2006.1.7)熊本 特別講演④「新しい骨粗鬆症治療薬とその作用機序」
21. 第9回 東北リウマチ医の会 (2006.1.22)盛岡 特別講演「関節リウマチにおける骨破壊のメカニズム」
22. 第1回 岡山運動器疾患研究会 (2006.2.1)岡山 特別講演「関節リウマチにおける骨破壊メカニズム」
23. 第10回 臨床応用を目指した三次元臓器造形研究会 (2006.2.4)東京 「関節外科領域における3次元造形応用」
24. Stryker CAOS forum 2006 (2006.2.5) 京都”TKA with navigation support”
25. Evista Web Conference (2006.2.16)東京 「骨粗鬆症治療剤をどのように選択すべきか？」
26. 静岡東部脊椎・骨代謝カンファレンス (2006.2.23)三島 特別講演「骨吸収抑制剤を中心とした新しい骨粗鬆症治療体系」
27. 厚生労働研究 「フッ化物応用による歯科疾患の予防技術評価に関する総合的研究」 合同公開シンポジウム (2006.3.3)「MAP キナーゼ系の石灰化に対する役割」

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。) なし

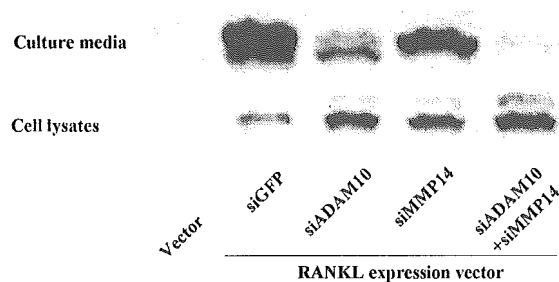


図1 : さまざまな siRNA による RANKL 切断の阻害

RA 骨髄の脂肪組織による骨吸収抑制病態解明と治療薬開発に関する研究

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 脂肪細胞特異的分泌蛋白のアディポネクチンは、関節リウマチ（RA）特異的破骨細胞（ナース様細胞誘導）の増殖・分化を著しく抑制する可能性が高いことが分かった。
- ② アディポネクチンは骨吸収抑制作用、抗炎症作用を有することから、関節リウマチ・骨粗鬆症の局所治療薬として大いに期待でき、動物への投与効果を検討中である。

A. 研究目的

ヒトの骨髄内には多くの脂肪組織が存在し、これら脂肪組織および脂肪細胞は生体をコントロールするために様々な因子を分泌している。我々は、平成 16 年度の研究にて、この分泌因子の一つ、アディポネクチンが骨吸収を抑制することを明らかにした。そこで、この病態解明と関節リウマチ（RA）およびそれに伴う骨粗鬆症や関節破壊の抑制治療薬開発を進めることが本研究の目的である。

B. 研究方法

我々は、平成 16 年度の班研究にて、脂肪細胞分泌因子であるアディポネクチンが骨吸収抑制作用を有することを明らかにした。これをもとに、①RA 患者由来の線維芽細胞様細胞（ナース様細胞）およびこの細胞を用いて誘導される RA 特異的破骨細胞に対するアディポネクチンの作用検討を

行う。また、②RA モデル動物を作製し、リコンビナントアディポネクチン投与やアデノウイルスを用いたアディポネクチン over expression 系において、骨粗鬆症や関節破壊の抑制効果検討を行う。

（倫理面への配慮）

当該研究施設における倫理委員会規定に基づき、術前に書面を用いて研究目的・内容を説明し、同意・承諾を得た上で、血液および手術時に切除した関節病変組織を研究材料として用いた。また、実験動物に対する安楽死施行など、動物愛護に配慮すると共に、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培養細胞実験における予備検討において、生理的濃度のリコンビナントアディポネクチンを添加すると、ナース様細胞を用

いて誘導される RA 特異的破骨細胞の増殖・分化が著しく抑制される結果を得た。

②これまでに、II型コラーゲン抗体を用いた RA モデルマウス、アディポネクチン強発現アデノウイルスを作製した。現在、リコンビナントアディポネクチンの作製、動物モデルに対する投与実験を行っている。

D. 考察

我々は、平成 16 年度の班研究にて、代表的な脂肪細胞分泌因子の一つで、5-30 μ g/ml と血中に高濃度に存在するアディポネクチンが骨吸収抑制作用を有することを明らかにした。これまで、骨髄内に脂肪組織が多く存在することは周知の事実であり、この脂肪組織が RA およびそれに伴う骨粗鬆症や関節破壊に関与していることは想像に難くない。関節破壊および疼痛に対する現存の局所治療として、ヒアルロン酸やステロイドの関節内注入療法があるが、一長一短あり、いずれも決定的な治療法とは言えない。「RA の主病巣は骨髄である」という考えから、アディポネクチンが骨粗鬆症や関節破壊に対して抑制効果を有する局所治療薬として期待できる。これまで、①in vitro にて、アディポネクチン添加により、ナース様細胞を用いて誘導される RA 特異的破骨細胞の著明な増殖・分化抑制効果が見られたので、②in vivo におけるアディポネクチンの投与効果検討を行っている。

E. 結論

①アディポネクチンは、ナース様細胞を用いて誘導される RA 特異的破骨細胞に対して、著しい増殖・分化抑制効果を有する可能性が高い。

②アディポネクチンは骨吸収抑制効果を有することから、有用な局所治療薬になり得る可能性がある。

③アディポネクチンのナース様細胞に対する直接的な作用を追加検討し、RA 治療の病態解明に近づく。

(F. 健康危険情報)

G. 研究発表

1. 論文発表

Adiponectin increases bone mass by suppressing osteoclast and activating osteoblast: K. Oshima, A. Nampei, M. Matsuda, M. Iwaki, A. Fukuhara, J. Hashimoto, H. Yoshikawa, I. Shimomura: BBRC 331 (2005) 520-526

2. 学会発表

①the 2nd Joint Meeting of the European Calcified Tissue Society (ECTS) and the International Bone and Mineral Society (IBMS), Geneva, Switzerland, 25-29 June 2005

②The 10th Adiposcience Symposium (Anniversary International Symposium), Osaka, Japan, 19-20 August 2005

③FRONTIERS OF SKELETAL BIOLOGY (Eleventh and Valedictory Workshop on Cell Biology of Bone and Cartilage in Health and Disease), Davos, Switzerland, 18-21 March 2006

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

現在、上記項目に該当する事項なし。

C) RA の病因遺伝子解明と治療法開発研究

- 1) RA 骨髄細胞特異的遺伝子の gene chip 解析
- 2) 段階的サブトラクション法による解析

「関節リウマチ・骨粗鬆症の重症化防止治療開発研究」
RA 遺伝子の探索に関する研究

主任研究者 越智 隆弘 国立病院機構相模原病院 病院長
分担研究者 鈴木 隆二 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 室長
分担研究者 前田 朋子 塩野義製薬株式会社 創薬研究所 主任研究員

研究要旨：主任研究者の提唱した「関節リウマチ(RA)の主病巣は骨髄」という考え方は厚生科学研究費や医薬品機構研究費などに支援された日本発の独創的研究であり、欧米からも注目され、その解明は急務である。RA および OA(変形性関節症)患者の骨髄液を用いて、夫々に特異的に発現している遺伝子群の GeneChip による網羅的解析を行なった。今回の解析結果から RA では OA と明らかに異なる遺伝子発現プロファイルを示していた。これら遺伝子群の中には、骨髄機能の異常活性化と RA 病巣に特徴的な間葉系細胞の増殖を示唆する分子も存在していた。

以上から、RA 骨髄液を用いた GeneChip による網羅的遺伝子解析から、RA 病態形成に関与する幾つかの候補遺伝子の抽出に成功した。現在、これらの機能解析を用い、新たな細胞生物学的検討により新規診断および治療に可能性を検討中である。

A. 研究目的

「リウマチの主病巣が骨髄」であるという越智の提唱した考え方に従って、RA および OA 患者の骨髄液を用いた網羅的遺伝子解析を行い、RA に特異的に発現し OA では発現の無い遺伝子群を GeneChip を用いて解析し、選択された遺伝子については、RA の主病巣・二次的病巣の病態形成への関与を解明し、最終的には新規診断・治療法の開発研究に資することを目的としている。

B. 研究方法

RA および OA 患者骨髄液：RA 患者の腸骨骨髄液は行岡病院にて、OA 患者の腸骨骨髄液は共和会病院でそれぞれ 10 例ずつ採取された。

GeneChip: Affymetrix 社の GeneChip Genome U133 Plus 2.0 Array(搭載されている Probe set 数: 54,675/array)を使用し、RA および OA 骨髄細胞から抽出した total RNA 3ug を解析に用いた。ノーマライゼーション(正規化)は Signal 値の高い方の 2%と低い方 2%を除いた残りの Probe Set の Signal 平均値が 500 になるように、各 array の Signal

値を補正した。フィルタリングは 20 サンプルのいずれかで、Detection call が Present (P) もしくは Marginal (M) である Probe Set を抽出、すべてのサンプルで Absent (A) は除外した。その結果、抽出された Probe Set 数は 39,338 であり、これらについて、群間比較検定 A を行ない false discovery rate (FDR) の指標である q-value が 0.1%未満であるものを抽出し、RA・OA 群間で変動ある遺伝子として偶然抽出されてしまう遺伝子を排除した。相関距離を元にクラスター分けと発現比によるグループ化を行い、GeneOntology (GO)解析と、Pathway 解析によって目的とする遺伝子の抽出を行なった。

(倫理面への配慮)

本実験に給した臨床サンプルは、全て説明と同意の上入手した。

C. 研究結果

1. RA および OA 患者骨髄液を使用し、GeneChip 解析を行い、RA 患者で発現強度の高い遺伝子の抽出に成功した。

2. 抽出された高発現遺伝子中の細胞外分泌蛋白をコードする遺伝子群には、越智主任研究者が見出した骨髄異常を強く補佐す

る遺伝子が多く存在していた。① IL-8, CEACAM8: Myeloid 系細胞の機能に強く影響をする分子。② PTX3: 炎症時に IL-1 β により誘導される炎症性蛋白で、最近、炎症疾患で FGF-2 (angiogenic fibroblast growth factor 2) と共に検出され、FGF-2 による血管新生機能調節に重要に関与。③ Gelsolin: 破骨細胞の Actin Ring 形成に重要に作用する分子。④ CHI3L1 (Chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39): RA の炎症時および Matrix 破壊時に検出され、MMP-1, -3, -13 および IL-8 産生誘導を抑制。

3. また、RA に関する既報は無いが、その性状から、RA の病態形成に関与すると予想される RA-1-1, RA-1-2, RA-1-3 は、epithelial および hematopoietic cell が産生し、epithelial および mesenchymal cell の増殖を調整する emerging family of growth factors を RA 病態で始めて見出した。これらは、angiogenesis, MMP 産生にも強く関与する事が示唆され、RA の滑膜および骨髄に特徴的に存在する間質細胞の増殖に関わり、RA 病態の慢性化に重要に作用すると考えられる分子の抽出に成功した。この遺伝子群については、リアルタイム PCR によって定量性の確認も行なっている。

D. 考察

RA において、骨髄異常に注目した独自性の高い研究について、今回、GeneChip を用いた網羅的解析を行い、骨髄内での病態特異性を解明した。越智主任研究員等により報告された異常な骨髄活性化を裏付ける遺伝子発現の亢進が確認され、本疾患における骨髄変化の重要性が再確認されたと考えている。また、疾患特異的遺伝子群中には、今迄に RA での報告が無いが、病態形成に関与が示唆される新規の高発現遺伝子も抽出された。これら遺伝子は RA 病態形成に重要に関与するとして我々が報告してきた RA 特有な線維芽細胞である RA ナース細胞の過剰増殖に直接の原因と成る可能性があり、今後の精査により、新規診断および治療開発に迫れる可能性がある。

E. 結論

今回の GeneChip 解析による RA 患者特異的遺伝子群の網羅的解析により抽出された遺伝子群については、RA 病態解明研究に新たな方向性を開く可能性が高いと結論した。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

S. Nakamura-Kikuoka, K. Takahi, H. Tsuboi, T. Toyosaki-Maeda, M. Maeda-Tanimura, C. Wakasa, N. Kikuchi, S. Norioka, M. Iwasaki, T. Matsutani, T. Otoh, S. Yamane, H. Takemoto, Y. Tsuruta, Y. Shimaoka, M. Yukioka, R. Suzuki and T. Ochi:

Limited VH gene usage in B-cell clones established with nurse-like cells from patients with rheumatoid arthritis
Rheumatology(Oxford).

2005Dec20; [Epub ahead of print]

K. Tanaka, T. Toshihiro, T. Juji, S. Suzuki, J. Watanabe, A. Goto, N. Shiobara, S. Yamane, N. Fukui, R. Suzuki and T. Ochi:

Production of interleukin-6 and interleukin-8 by nurse-like cells from rheumatoid arthritis patients after stimulation with monocytes.

Mod Rheumatol (2005) 15:415-422.

T. Tashiro, H. Hirokawa, Y. Ikeda, T. Ohnuki, R. Suzuki, T. Ochi, K. Nakanura and N. Fukui:

Effect of GDF-5 on ligament healing.

J Orthop Res (2006) 24(1):71-79.

鈴木隆二

リウマチの破骨細胞

臨床整形外科(2006) 41(3):260-263.

2. 学会発表

未

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

Patent No.: US6,861,257 B1

Date of Patent: Mar.1 2005.

METHODS FOR ISOLATION OF
OSTEOCLAST PRECURSOR CELLS AND
INDUCING THEIR DIFFERENTIATION
INTO OSTEOCLASTS

Tomoko Maeda, Ryuji Suzuki, Takahiro
Ochi

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

慢性リウマチにおける遺伝子解析に関する研究

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集約型 DNA マイクロアレイ解析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* (**A**ugmented in **RA**) と包括的に命名して解析した。定量リアルタイム PCR によって個別の患者における発現量を検索したところ、多くの RA 患者で高い発現を示す *AURA* 遺伝子が幾つか同定できた。なかでも *AURA9* (=AREG) 遺伝子は多くの RA 患者で OA 患者に比べて数百倍以上の発現亢進を示したので、より詳細に解析した。その結果、AREG が RA 患者の滑膜細胞において EGF 受容体シグナル伝達経路の活性化を誘導することで、滑膜細胞の増殖亢進に寄与している可能性を示唆する結果を得た。

A. 研究目的

慢性リウマチ(RA: Rheumatoid arthritis)患者由来の骨髄液細胞では過剰発現しているが、対照としての変形性関節症(OA: Osteoarthritis)患者骨髄液細胞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集約型 DNA マイクロアレイ解析によって網羅的に単離・同定し、各患者由来の mRNA の発現量を解析する。その結果をもとに RA の発症機序を遺伝子発現の立場から解析することで RA の病因を探る。

B. 研究方法

これまで幾つかの世界各地の研究室において RA の遺伝子解析が行われてきたが、そのほとんどがリウマチ症状が現れる関節の滑膜細胞を対象としてきた。そして滑膜細胞由来の mRNA について DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析が行われ、その結果をクラスター解析することで、多くの RA 患者の滑膜細胞で共通に発現亢進(あるいは抑制)されている遺伝子が単離・同定されてきた。しかしながら、このアプローチではヘテロな病態を示す RA 患者において、病気の結果として発現亢進(抑制)されている遺伝子が単離・同定されやすいこともあって、病因に迫れ

るほどの決定的に重要な遺伝子は捉えられていない。この現状を打破するため、本研究計画では以下の3点において特色あるアプローチ法を採用して研究を進めた。

(1) RA の本質的な病因が潜んでいる可能性のある骨髄液細胞を主たる対象とし、末梢血液細胞を並行して解析した。自己免疫疾患のひとつである RA においては B 細胞の分化成熟過程における中枢性免疫寛容の破綻が指摘されており、それが起こる場所である骨髄に本質的な起こっている可能性が古くから指摘されてきた。にもかかわらず、RA 患者の骨髄液細胞を対象とした網羅的なトランスクリプトーム解析の報告はこれまでになかった。

(2) まず RA (59.8±12.7 歳、男:女=8:42) と OA (62.0±13.7 歳、男:女=3:47) 各 50 人ずつの患者群の間での mRNA 発現量の差が大きな遺伝子を包括的に単離・同定し、次いでそれらをひとつずつ個別の患者で定量リアルタイム PCR (qRT-PCR) を用いて発現量を確認するという方法を採用した。これは従来の解析法とは異なる方向からのアプローチであるが、発現量の検出において DNA マイクロアレイの結果よりも、はるかに正確に検出できる qRT-PCR を採用するため、誤差の少ない結果が得られると期待される。

(3) 遺伝子の単離のために我々が開発した段階的サブトラクション法を採用した。こ

の技術によれば対象となる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 分子を原理的には全て単離できる。DNA マイクロアレイはダイナミックレンジの限界により、とくに発現量の大きな遺伝子において単離不可能な遺伝子が数多く出てくる可能性があるが、この技術はその欠点を補うことが出来ると期待される。

一方、それでも生じるであろう取りこぼしを防ぐためと、2つの技術の能力を比較する目的もあって集約型 DNA マイクロアレイ解析も並行して行った。すなわち本研究計画では50人分の RA と50人分の OA サンプルを別個に集めて、両者で集約的に DNA マイクロアレイによる発現亢進(抑制)されている遺伝子を単離するという変則的な使用方法を採用した。実験にはアジラント社製の DNA マイクロアレイ(44k)を用い、カラースワップによって結果の再現性をとった。

こうしてこの2つの技術で単離された候補遺伝子についての RA/OA 発現優位性の最終的な判定は、患者骨髄液(RA50検体、OA50検体)を RA/OA 別々に混合して RNA を抽出し、それを cDNA 化したサンプルをテンプレートとした RT-PCR によって行った。このうち、発現レベルの再現性チェックに合格したものだけを採用した。ノーザンブロット解析で検出できるほど発現量の多いものについてはその結果も参考にした。

(倫理面への配慮)

部局で倫理委員会の承認を受けるとともに、健常人および患者の血液採取は全て書面によるインフォームド・コンセントをとることで倫理面に配慮した。本研究計画では遺伝子の発現量を検索するだけで塩基配列の違いを比較する訳ではないので、いわゆるゲノム倫理面の問題はないと考えられ、実際にゲノム倫理委員会でもそのような判断がなされたが、念のため規則に準じた扱いをした。

C. 研究結果

(C1) AURA 遺伝子群について

これまでに100種類近くの AURA 遺伝子群を単離・同定した。RT-PCR によ

り、いずれの AURA 遺伝子も RA では大量に発現しているが OA ではほとんど発現していない結果の再現性が確認できた。このうち DNA マイクロアレイでのみ単離・同定されたのはわずかに2割程度であった。この結果により、段階的サブトラクション法のほうが約5倍も多く発現亢進した遺伝子を単離する能力があるパワフルな技術であることが証明できたと考えている。

AURA 遺伝子群のうち10個以上は cDNA として遺伝子バンクに登録されているものの、機能解析はほとんど行われていない新規な遺伝子であった。そのほかは免疫応答、増殖シグナル伝達、細胞骨格、細胞周期、転写、染色体動態、翻訳、タンパク質分解、核酸分解、アポトーシスなどを制御する既知遺伝子であった。ただし遺伝子名だけから RA 発症と直接関連付けられそうなものは少なかった。

qrtPCR により幾つかの AURA 遺伝子について、RA と OA の各患者由来の mRNA の発現量を qrtPCR により比較したところ、患者全般に転写誘導されている RA 発症に関係のありそうな AURA 遺伝子がいくつか見つかった。ただし、そのような遺伝子においてさえ発現レベルの低い RA 患者が2割くらいは見つかった。この結果は、一言に RA といっても病態がヘテロであるため、すべての RA の発症に関わる遺伝子を単離することは困難であることを示唆する。一方、ごく一部の患者でのみ高い発現を示す遺伝子も小数であるが見つかった。これらは RA 発症に関係は薄いと判断した。

このうち AURA9(=AREG) 遺伝子は、OA や健常人に比べて大半の患者で顕著な転写量が上昇していたので、より詳細な解析を進めた。AREG は増殖因子を産生するので、RA 患者の末梢血流に大量に流れていることを期待して ELISA アッセイを行ったが、1割以下の例外を除いて OA や健常人と同様に、検出限界以下の量しか流れていなかった。RA 患者の骨髄液細胞における AREG の過剰発現が滑膜細胞の増殖亢進に影響を与えているかを調べるため、RA と OA の患者滑膜組織を採取し、そこから滑膜細胞を培養して調べたところ、OA に比べて RA の滑膜細胞が AREG に対してやや敏感に応答した。ウェスタン法により調べたところ、RA の滑膜細胞ではその下流の MAP カイネース・シグナル伝達経路