

200500733A

厚生労働科学研究補助金
免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

関節リウマチ及び線維筋痛症の寛解導入を目的とした
新規医薬品の導入・開発及び評価に関する研究

平成17年度 研究報告書

主任研究者 西岡久寿樹

平成18(2006)年4月

目 次

I. 総括研究報告書

西岡 久寿樹

聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1

II. 分担研究報告

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・・・・・・・・・・・・・・ 5

高柳 広

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子情報伝達学・・・・・・・・・・ 8

妻木 範行

大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 11

田中 栄

東京大学大学院医学系研究科感覚・運動機能医学・・・・・・・・・・・・・・ 14

千葉 一裕

慶応義塾大学医学部整形外科学・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 18

中島 利博

聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 20

吉田 勝美

聖マリアンナ医科大学予防医学・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 23

川合 眞一

東邦大学医学部附属大森病院膠原病か・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 31

木村 友厚

富山医科薬科大学整形外科学・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 35

植田 弘師

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科薬学系分子薬理学分野・・・・・・・・・・ 38

浦野 房三

長野県厚生連篠ノ井病院リウマチ膠原病センター・・・・・・・・・・・・・・ 41

福田 国彦

東京慈恵会医科大学放射線医学・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 44

松本 美富士

藤田保健衛生大学七栗サナトリウム内科・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 46

土井 永史

東京大学病院精神神経科・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 49

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 51

関節リウマチ及び線維筋痛症の寛解導入を目的とした新規医薬品の導入・開発及び評価に関する包括的研究

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

関節リウマチ及び線維筋痛症の実態調査及び診断・治療の指針の確立という2つの研究プロジェクトより構成されており、それぞれの分科会を構成して今年度の研究を展開した。

これまで、当研究班で行っている研究成果に基づき「リウマチ重症化・進展及び予防及び線維筋痛症患者の実態調査」を主目的として以下の研究を行った。

- ① 増殖細胞アポトーシス導入剤であるARG098前臨床試験に向けたCROの選定及びプロトコルの作成、海外の臨床試験施設の選定などについて、当研究班では支援体制を確立した。
- ② 関節リウマチの発症及び重症化に関する新規タンパクであるsynoviolinの機構解明と制御。研究プロジェクトは班長の所属する聖マリアンナ医科大学のベンチャーLocomogeneと協同で展開し、synoviolinの創薬化へ向けた研究が進展した。
- ③ 重症化予防のための骨・軟骨破壊に関与する制御分子とその機能の解明が明らかにされた。
- ④ 線維筋痛症の実態及び有病率が疫学研究を通じて明らかにされて来た。

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 |
| 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 |
| 妻木 範行 | 大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学 |
| 田中 栄 | 東京大学大学院医学系研究科 感覚・運動機能医学 |
| 千葉 一裕 | 慶応義塾大学医学部 整形外科 |
| 中島 利博 | 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター |
| 吉田 勝美 | 聖マリアンナ医科大学予防医学 |
| 川合 眞一 | 東邦大学大森病院 膠原病科 |
| 木村 友厚 | 富山医科薬科大学 整形外科 |
| 植田 弘師 | 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科薬学系分子薬理学分野 |
| 浦野 房三 | 長野県厚生連篠ノ井病院リウマチ膠原病センター |
| 福田 国彦 | 東京慈恵会医科大学放射線医学 |
| 松本美富士 | 藤田保健衛生大学七栗サナトリウム内科 |
| 土井 永史 | 東京大学病院 精神神経科 |

研究協力者

| | |
|--------|-------------------------|
| 磯村 達也 | 株式会社クリニカル・スタディ・サポート |
| 大竹 秀彦 | 株式会社MPO |
| 鈴木 利一 | 田辺製薬株式会社 |
| 清野 研一郎 | 理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センター |
| 馬場 久志 | 参天製薬株式会社 |
| 行岡 正雄 | 医療法人行岡医学研究会 行岡病院 |

A. 研究目的

関節リウマチに対する最近の新規治療剤の開発とその臨床応用は、リウマチ重症化予防の最も大きな軸となっている、特に発症後2～3年以内の早期関節リウマチにおいては、完全寛解は実現可能な到達目標となっている。

そこで我々が、これまでの先端医療の研究班で検討を重ねてきた実績に基づき、関節リウマチプロジェクトでは、

- ①滑膜増殖細胞の完全抑制。
- ②軟骨・骨破壊の予防とその制御。
- ③抗リウマチ剤のマクロ経済学的評価。
- ④抗リウマチの再評価も視野に入れた臨床研究の推進。

線維筋痛症のプロジェクトでは、本邦では全くデータがなかった線維筋痛症患者の有病率、疾病負担などの調査を行うことを目的とした。

B. 研究方法

①関節リウマチの病因及び重症化に係わるsynoviolin, N-FAT1、新規分子、骨・関節破壊に関与する分子の機構を遺伝子改変マウス等を用いて検討した。

②骨破壊制御の標的タンパクとして明らかにされたN-FAT1解明を通じて抗リウマチ剤の薬効評価を検討した。

③新規抗リウマチ剤と既存薬剤の使用に関する臨床薬理学的評価、インフリキシマブとメソトレキサートの用量試験を通じて行う、すなわち、新規生物学的製剤の最適パートナーとなるDMARDsの選択プログラムの検討を行った。

④線維筋痛症を対象とした「痛み」の分子レベルでの機序の解明。

⑤線維筋痛症の疫学調査、重症度をもとにしたQ.O.L. 評価。リウマチ、うつ病などの評価基準を用いて行った。

| 関節リウマチ及び線維筋痛症の寛解導入を目的とした新規医薬品の導入・開発及び評価に関する包括的研究のプロジェクトと研究概要と主な研究班員 | | |
|---|----------------|-------------|
| | 関節リウマチ | 線維筋痛症 |
| A. 基礎研究 (病因・病態・疫学) | 妻木・田中・吉田・千葉・西岡 | 松本・福田・清野・西岡 |
| B. 萌芽的研究 (シーズ) | 中島・高柳・木村・岩倉・西岡 | 植田・西岡 |
| C. 臨床研究 | 高柳・川合・中島・西岡 | 土井・西岡 |
| D. 製造販売後調査研究 治療評価・統計 | 川合・吉田・西岡 | 松本・土井・西岡 |

C. 研究結果

本年度は発足初年度にも関わらず数多くの貴重な研究成果が得られた。

①本研究班員がベンチャー企業に研究支援をして推進している、抗Fas抗体(ARG098)の臨床開発に関してオランダやイギリスで臨床開発の用途のGMP創薬の製造が終了し、そのプロトコール作成に多大の助言を行って来た。

②転写因子NFATc1の治療例としてタクロリムス、レフルノミド、メントレキサートの関与が解明された。

③synoviolinの臨床開発の研究にスクリーニング系が構築され、2012年の第1相試験を目指すタイムテーブルが作成された。本研究班は数多くの助言を行った。

④エタネルセプト、インフリキシマブの生物学的製剤に対する抗リウマチ作用を有する低分子化合物の最適パートナー選択プログラムの研究が行われた。

⑤治療評価としてマクロ的視点より医療経済効果が検討された効用比単価をもとに新規薬剤の導入効果が明らかにされた。

⑥線維筋痛症疾患の疫学調査が日本全体で人口の1.66%、推定200万人の患者がいることが明らかにされた。

⑦患者を受け入れる全国的なケアネットワークの構築が財団法人日本リウマチ財団登録医の協力を得て進んでいる。

D. 結論

①これまで萌芽的研究で明らかにされた新規分子が画期的な抗リウマチ剤として非臨床、前臨床等を通じて臨床開発のメドがついてきた。

②インフリキシマブとエタネルセプトの臨床研究が進み、本邦における適正使用と共に対象症例の明確化、他のDMARDsのパートナー選択のプログラムが明らかにされて来た。

③骨・関節疾患のQ.O.L.に及ぼす影響とそれを制御するために、新規導入剤の取り扱いを明らかにした。

④線維筋痛症の疫学研究及び実態調査の研究が進展

した。

⑤実態調査では患者受け入れのための医療機関のネットワーク化が進んでいる。

⑥本症の疼痛誘導物質と考えられる物質が同定された。

E. 健康危惧情報

特になし

F. 研究発表

1. 学会発表

- Kayo MasukoHongo, Minako Murata, Kazuo Yudoh, Hiroshi Nakamura, Tomohiro Kato, Kusuki Nishioka: Articular chondrocytes confront inflammation: a possible role of inflammatory mediators in osteoarthritis: 第49回 日本リウマチ学会総会・学術集会第14回 国際リウマチシンポジウム, パシフィコ横浜, 4/18, 2005
- 木俣敬仁, 岡寛, 森浩一, 中村洋, 西岡久寿樹, 尾崎承一: X線屈折コントラスト法 (Spring8) による人及びラットの変形性関節症の画像的評価: 第49回 日本リウマチ学会総会・学術集会第14回 国際リウマチシンポジウム, パシフィコ横浜, 4/18, 2005
- Yang Chang, Taichi Sekine, Hiroshi Nakamura, Kusuki Nishioka, Tomohiro Kato: Fibulin-4 is expressed in chondrocytes and a target of autoimmunity in patients with osteoarthritis: 第49回 日本リウマチ学会総会・学術集会第14回 国際リウマチシンポジウム, パシフィコ横浜, 4/18, 2005
- 関根太一, 向陽, 増子佳世, 中村洋, 遊道和雄, 西岡久寿樹, 加藤智啓: Beta 2-microglobulin 刺激による軟骨細胞のMMP発現: 第49回 日本リウマチ学会総会・学術集会第14回 国際リウマチシンポジウム, パシフィコ横浜, 4/18, 2005
- 村田三奈子, 増子佳世, 加藤智啓, 中村洋, 遊道和雄, 千葉純司, 井上和彦, 西岡久寿樹: 低酸素刺激による軟骨細胞からの血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 産生の制御順序: 第49回 日本リウマチ学会総会・学術集会第14回 国際リウマチシンポジウム, パシフィコ横浜, 4/18, 2005
- 遊道和雄, 中村洋, 増子本郷佳世, 加藤智啓, 西岡久寿樹: 変形軟骨に発現する低酸素環境適応因子 hypoxia inducible factor (HIF) - α の役割: 軟骨変形過程における二次的防衛因子としての HIF-1 α : 第49回 日本リウマチ学会総会・学術集会第14回 国際リウマチシンポジウム, パシフィコ横浜, 4/18, 2005
- 遊道和雄, 中村洋, 増子本郷佳世, 加藤智啓,

- 西岡久寿樹：軟骨変性に対するスタチンの抑制効果：スタチンは軟骨細胞機能低下・老化を抑制する：第49回 日本リウマチ学会総会・学術集会第14回 国際リウマチシンポジウム，パシフィコ横浜，4/18，2005
8. 松尾光祐，中村 洋，増子佳世，遊道和雄，野寄浩司，斎藤知行，西岡久寿樹，加藤智啓：関節リウマチおよび変形関節症における滑膜細胞のリン酸化プロテオーム解析：第49回 日本リウマチ学会総会・学術集会第14回 国際リウマチシンポジウム，パシフィコ横浜，4/18，2005
 9. 西岡真樹子，荻成行，臼井千恵，中村洋，西岡久寿樹，福田国彦：線維筋痛症の画像診断（脳血流シンチグラフィの有用性について）：第49回 日本リウマチ学会総会・学術集会第14回 国際リウマチシンポジウム，パシフィコ横浜，4/19，2005
 10. 唐澤里江，尾崎承一，西岡久寿樹，加藤智啓：全身自己免疫患者におけるベルオキシレドキシニン I およびIVに対する自己抗体の検討：第49回 日本リウマチ学会総会・学術集会第14回 国際リウマチシンポジウム，パシフィコ横浜，4/20，2005
 11. シャンヤン，関根太一，松尾光祐，中村洋，増子佳世，遊道和雄，西岡久寿樹，加藤智啓：Peptidome of synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis：第49回 日本リウマチ学会総会・学術集会第14回 国際リウマチシンポジウム，パシフィコ横浜，4/20，2005
 12. Phung Anh Duc, Kayo Masuko-Hongo, Kzuo Yudo, Tomohiro Kato, Kusuki Nishioka, Hiroshi Nakamura: Development of pannus-like soft tissue in rat osteoarthritic model: 第49回 日本リウマチ学会総会・学術集会第14回 国際リウマチシンポジウム，パシフィコ横浜，4/20，2005
 13. 村田三奈子，増子佳世，加藤智啓，中村洋，遊道和雄，千葉純司，井上和彦，西岡久寿樹：関節軟骨組織における血管新生制御因子 Angiopoietin-like (ANGPTL)-4 の発見について：第49回 日本リウマチ学会総会・学術集会第14回 国際リウマチシンポジウム，パシフィコ横浜，4/20，2005
 14. 増子佳世，村田三奈子，加藤智啓，中村洋，遊道和雄，西岡久寿樹：スフィンゴ脂質S1Pによる軟骨細胞からのプロスタグランジンE2産生誘導：第49回 日本リウマチ学会総会・学術集会第14回 国際リウマチシンポジウム，パシフィコ横浜，4/20，2005
 15. 西岡久寿樹：線維筋痛症から観た痛みの分子メカニズム：第8回大分疼痛研究会，大分全日空ホテルオアシスワター，6/22，2005
 16. 西岡久寿樹：関節リウマチにおける生物化学性剤における現状と将来願望：大阪RAフォーラム，リッツカールトン大阪，9/1，2005
 17. 西岡久寿樹：“Fibromyalgia” Meeting: Wyeth FM MTG: コンラッド東京，10/12，2005
 18. 西岡久寿樹：関節炎発症の分子機構とその制御：第20回日本整形外科学会基礎学術集会，三重，10/20，2005
 19. 西岡久寿樹：関節リウマチ及び線維筋痛症の寛解導入を目的とした新規医薬品の導入・開発及び評価に関する包括的研究報告：平成17年度厚生労働科学研究費補助金 免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業合同研究発表会，KKR HOTEL TOKYO (東京)，2/1，2006
 20. 西岡久寿樹：線維筋痛症とはどんな病気？：聖マリアンナ医科大学難治研研修会，聖マリアンナ医科大学大講堂，3/14，2006
 21. 西岡久寿樹：新しいミレニアムに入った関節リウマチの治療：第2回山梨RA研究会，アピオ甲府，3/16，2006
 22. 西岡久寿樹：線維筋痛症とはどんな病気？：線維筋痛症コンセンサスカンファレンス，都市センターホテル（東京）3/22，2006
- ## 2. 論文発表
1. Naoko Yagishita, Kinuko Ohneda, Tetsuya Amano, Satoshi Yamasaki, Akiko Sugiura, Kaneyuki Tsuchimochi, Hiroshi Shin, Ko-ichi Kawahara, Osamu Ohneda, Tomohiko Ohta, Sakae Tanaka, Masayuki Yamamoto, Ikuro Maruyama, Kusuki Nishioka, Akiyoshi Fukamizu, Toshihiro Nakajima: Essential Role of Synoviolin in Embryogenesis, J of Bio Chem, 208:9:7909-7916, 2005
 2. 西岡久寿樹、遊道和雄：人体の構造と機能及び疫学の成り立ち 各論 I, 南江堂, 83-85, 2005
 3. 西岡久寿樹：第11回APLAR（アジア太平洋リウマチ会議）～本格的に始動した学術会議としてのAPLAR～, Arthritis, 3(1):56-57, 2005
 4. 西岡久寿樹：線維筋痛症, DOCTOR-SALON, 49: (7) 19-21, 2005
 5. 西岡久寿樹、黒川清：日本の医学界は国際的に何を発信できるか, 日本醫事新報, 4237:1-32, 2005
 6. 西岡久寿樹：「痛風と食事の関係」, ミドルエイジの食生活, 58-64, 2005
 7. 西岡久寿樹：難病対策の動向, 月間臨床と研究別冊, 82:(7), 2005
 8. 西岡久寿樹：アルコール尿酸代謝に及ぼす影響, 治療 (J. Therap) 別冊, 87:(8), 2005
 9. Kaneyuki Tsuchimochi, Naoko Yagishita, Satoshi Yamasaki, Tetsuya Amano, Yukihiro Kato, Ko-ichi Kawahara, Satoko Aratani, Hidetoshi Fujita, Fengyun Ji, Akiko Sugiura, Toshihiko Izumi, Asako Sugamiya, Ikuro Murayama, Akiyosi Fukamizu, Setsuro Komiya,

- Kusuki Nishioka, and Toshihiro Nakajima: Identification of a Crucial Site for Synoviolin Expression, MOLECULAR AND CELL BIOLOGY, 25:(16)7344-7356, 2005
10. Satoshi Yamazaki, Naoko Yagishita, Kaneyuki Tshuchumochi, Kusuki Nishioka, and Toshihiro Nakajima: Rheumatoid arthritis as a hyper-endoplasmic reticulum associated degradation disease, Arthritis Research & Therapy, 7:181-186, 2005
 11. 加藤智啓、西岡久寿樹: 免疫とプロテオミクス, 免疫学ハンドブック, 343-350, 2005
 12. 西岡久寿樹: 名医が語るあなたの健康 「痛風」, ヘルシーメモ, 2005
 13. 西岡久寿樹: 線維筋痛症モデル, カレントセラピー, 24:2006
 14. 西岡久寿樹: 疼痛モデルから痛みをみる2 線維筋痛症モデル, 治療学, 39(8), 2005
 15. Hui Du, Kayo Masuko-Hongo, Hiroshi Nakamura, Yang Xiang, Cun-De Bao, Xiao-Dong Wang Shun-Le Chen, Kusuki Nishioka, Tomohiro Kato: The prevalence of autoantibodies against cartilage intermediate layer protein, YKL-39, osteopontin, and cyclic citrullinated peptide in patients with early-stage knee osteoarthritis: evidence of a variety of autoimmune processes, Rheumatol Int, 26:35-41, 2005
 16. Naoko Yagishita, Satoshi Yamasaki, Kusuki Nishioka & Toshihiro Nakajima: Role of synoviolin in rheumatoid arthritis: possible clinical revance, Research Focus, 1(1):31-36, 2006
 17. 西岡久寿樹、加藤智啓、遊道和雄、中島利博、岡寛: 臨床医学の展望「リウマチアレルギー学」, 日本醫事新報, 4271: 23-30, 2006
 18. Electroconvulsive therapy improves severe pain associated with Fibromyalgia Usui C., Doi N., Nishioka M., Komatsu H., Yamamoto R., Ohkubo T. Ishizuka T., Shibata N., Hatta K., Miyazaki H., Nishioka K., Arai H. : Pain. 2006 Apr;121(3):276-80. Epub 2006 Feb 21

G. 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

遺伝子改変動物による新規抗リウマチ剤導入とその評価

分担研究者 岩倉洋一郎 東京大学医科学研究所

研究要旨

我々は、これまでに発症メカニズムの異なる2種類の関節リウマチモデルマウスを作製することに成功した。このうち、HTLV-I トランスジェニックマウスはIL-6を欠損させると発症が強く抑制されるが、TNF α を欠損させても全く影響を受けない。ところがIL-1レセプターアンタゴニスト(Ra)欠損マウスは全く逆のサイトカイン依存性を示す。現在、TNFを標的とした生物製剤の有効性が注目されているが、この治療に全く反応しない、いわゆる non-responder が存在することが問題となっている。我々は、動物モデルの有用性を活用し、サイトカイン依存性のメカニズムを解析するとともに、non-responder 特異的な遺伝子を探索した。

A. 研究目的

関節リウマチの治療に於いて、抗TNF α 製剤の有効性が注目を浴びている。しかし、その反面 non-responder の存在が指摘され、治療前に有効性を確認することは経済面からも患者のQOLの面からも急務となっている。我々はこれまでに発生工学手法を用い、HTLV-I トランスジェニック(Tg)マウスとIL-1Ra欠損(KO)マウスの2種類の関節炎モデルマウスを独自に開発した。これらのモデルマウスの関節炎発症機構を解析するなかで、2種類のモデルマウスが同様の病態を示すにもかかわらず、

IL-1RaKOマウスはTNF α の欠損により関節炎の発症がほぼ完全に抑えられるのに対し、HTLV-I Tgマウスは関節炎発症率には全く影響を及ぼさないことを見いだした。逆にHTLV-I-TgマウスはIL-6欠損により強く発症が抑制されるのに対し、IL-1RaKOマウスでは全く影響を受けなかった。本研究では両モデルマウスにおけるサイトカイン依存性の分子機構を明らかにすることを第一の目的としている。また、リウマチ患者のなかで、抗TNF α 抗体治療に対する responder と non-responder との間で、モデルマウスで見いだされた遺伝子発現と同様な特

徴があるかどうかを検討し、最終的に抗 TNF α 治療開始前に効果を予測する検査法を開発することを目的とする。また、関節炎発症時に発現変化の見られた遺伝子と関節炎発症との関連を解明することにより、新たな治療薬の標的となる遺伝子を探索する。

B. 研究方法

HTLV-I Tg, IL-1RaKO マウスはそれぞれ8世代以上 BALB/c マウスに戻し交配した。関節部位および PBMC から mRNA を調整し、アフィメトリクス社の Gene Chip を用いて解析した。さらに、発現変動の見られた遺伝子について新たに KO マウスを作製し、関節炎の病態形成に対する影響を検討した。

C. 結果・考察

1. マイクロアレイで発現変化の認められた遺伝子をクラスタリング解析したところ、HTLV-I-Tg マウスと IL-1RaKO マウスで共通に発現上昇する遺伝子や、それぞれのモデルで特徴的に発現変動する遺伝子があることがわかった。各モデルで特徴的に発現する遺伝子の中に両モデルのサイトカイン依存性を支配する遺伝子があると考えており、現在 PBMC での遺伝子発現パターンと対応させている。
2. 両モデルで共通に発現亢進の見ら

れた遺伝子のうち、5種類の遺伝子欠損マウスを作製した。その中で、解析の先行している Dectin-1KO マウス、及びT細胞特異的 CXCR4KO マウスを用いてコラーゲン関節炎の誘導を行ったところ、それぞれ有意に発症率が低下することが明らかとなった。現在その発症抑制のメカニズムについて検討を行っている。

D. 結論

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。そのうちいくつかの遺伝子について欠損マウスを作製し、実際病態形成に関与することを明らかにした。これらの遺伝子は関節リウマチの新たな治療薬の標的となる可能性が高い。

E. 研究発表

Kotani, M., Hirata, K., Ogawa, S., Habiro, K., Ishida, Y., Tanuma, S., Horai, R., Iwakura, Y., Kishimoto, H., Abe, R. CD28-dependent differentiation into the effector/memory phenotype is essential for induction of arthritis in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice. *Arthritis Rheum*, 53:473-481 (2006)

Matsuki, T., Nakae, S., Sudo, K., Horai, R., Iwakura, Y. Abnormal T cell activation caused by the imbalance of

- the IL-1/IL-1R antagonist system is responsible for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int. Immunol.*, 18:399-340 (2006)
- Ishigame, H., Nakajima, A., Saijo, S., Komiyama, Y., Nambu, A., Matsuki, T., Nakae, S., Horai, R., Kakuta, S., Iwakura, Y. The role of TNF α and IL-17 in the development of excess IL-1 signaling-induced inflammatory diseases in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *Ernst Schering Res Found Workshop.* 56:129-53 (2006)
- Zho, F., He, X., Iwakura, Y., Horai, R., Stuart, JM. Arthritis in mice that are deficient in interleukin-1 receptor antagonist is dependent on genetic background. *Arthritis Rheum.* 52:3731-8 (2005)
- Chida, D., Imaki, T., Suda, T., Iwakura, Y. involvement of corticotropin-releasing hormone-and interleukin-6-dependent proopiomelanocortin induction in the anterior pituitary during hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation by IL-1 α . *Endocrinology*, 146: 5496-502 (2005)
- Matsuki, T., Isoda, K., Horai, R., Nakajima, A., Aizawa, Y., Suzuki, K., Ohsuzu, F., Iwakura, Y. Involvement of tumor necrosis factor- α in the development of T cell-dependent aortitis in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice. *Circulation*, 30: 1323-31 (2005)

新規抗リウマチ剤導入による破骨細胞制御メカニズムの分子レベルでの評価

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情報伝達学教授

研究要旨

従来の抗リウマチ薬は、炎症や疼痛の改善において目覚ましい進歩を遂げたが、骨破壊による関節機能障害を効率よく防止することができない。このため、今なお多くの人工関節置換手術が施行されており、骨破壊の制御は関節リウマチの治療における最大の課題となってきた。近年、関節リウマチの病態に関する研究が進展し、骨破壊の機序が次第に明らかになってきた。そして、生物学的製剤や新規抗リウマチ薬などの新しい治療薬が導入され、今後さらに先端的抗リウマチ薬の開発が計画されている。しかし、これらの新規リウマチ薬に関しても、骨破壊への作用を指標にして開発されたものではなく、骨破壊抑制効果やその作用機序は不明である。本研究においては、抗リウマチ薬によって骨破壊を確実に予防するための知見を得るため、骨吸収細胞である破骨細胞と骨形成細胞である骨芽細胞に注目した基礎的な検討を行う。本年度は、特に、関節リウマチへの適応拡大が承認されたタクロリムスの骨代謝制御機構について詳細な解析を行った。

A. 研究目的

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。近年、生物学的製剤や新しい抗リウマチ薬が導入されつつあるが、これらの新規抗リウマチ薬は免疫抑制や滑膜炎に重要な役割を果たすサイトカインを抑制する目的で開発されてきたため、骨破壊への作用を持つ場合であっても、その詳細な作用機序は明らかでない。そこで、骨破壊に直接関与する破骨細胞の分化や活性化に関わる分子機構を解明し、抗リウマチ薬がどのような分子機構で骨破壊を制御するのかを解明することで、効率よい骨破壊制御療法確立への科学的なエビデンスを構築することを目的とする。

B. 研究方法

タクロリムス (商品名プログラフ) は、免疫抑制剤として移植後の拒絶反応抑制に広く使用されているが、近年本邦でも関節リウマチへの適応拡大が認められた新規抗リウマチ剤である。この薬剤の骨代謝へ作用を破骨細胞、骨芽細胞への作用およびマウス個体に投与することで詳細に検討した。また、破骨細胞分化のマスター転写因子である NFATc1 が必須であるかどうかを破骨細胞欠損マウスに NFATc1 を欠損した造血幹細胞を移植することで生体レベルで検証した。さらに、破骨細胞分化の共刺激受容体である osteoclast-associated receptor (OSCAR) や triggering receptor expressed by myeloid cells (TREM)-2 の NFATc1 による転写制御機構について検討した。

C. 研究結果

タクロリムスは転写因子 NFAT の活性を抑制することが知られているため、破骨細胞における NFATc1 活性化を抑制することが期待される。予想通り、タクロリムスは強く破骨細胞分化を抑制し、炎症性骨破壊モデルにおける効果と一致した。しかし、正常な個体に投与した結果は予想に反して骨量減少を引き起こし、骨芽細胞による骨形成に悪影響を与えることが示された。NFATc1 を欠損した造血幹細胞移植では、Fos 欠損マウスの大理石骨病が改善しないことから、NFATc1 が破骨細胞の分化に必須であることが生体レベルで証明された。OSCAR は、カルシウムシグナルを介して NFATc1 誘導を促進するが、この NFATc1 によって OSCAR が誘導されることで、正の feedback がかかることが明らかとなった。

D. 結論

タクロリムスは関節リウマチの骨破壊に効果があることが臨床的に示されているが、効果を高めるためには細胞特異的に作用させる工夫や長期投与を防ぐことが必要である。破骨細胞分化における NFATc1 の重要性が生体レベルで証明されたことで、骨破壊抑制において NFATc1 を標的とすることは非常に合理的な方法であることが示された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 学会発表

M. Asagiri, T. Koga, K. Sato, H. Takatsuna, K. Umezawa, H. Takayanagi. Regulation of bone metabolism by NF- κ B and NFAT
KEYSTONE SYPOISIA Mar. 23-28, 2006, Banff, Canada
田口 祐、合田 仁、秋山 透、古賀 貴子、高柳 広、田中

栄、井上 純一: RANK/TRAF6 シグナルによる破骨細胞分化誘導の分子機構. 第 28 回日本分子生物学会年会、福岡、2005.12.9

高柳広: 関節リウマチ骨破壊と骨免疫学. 第 41 回日本医学放射線学会秋季臨床大会、2005.10.6、広島

高柳広: 炎症性骨破壊の分子機構とその制御. 第 47 回歯科基礎医学会学術大会、2005.9.30、仙台

Hiroshi Takayanagi: Regulation of osteoclasts by the immune system. 5th Global Arthritis Research Network (GARN), 2005.9.16, Vienna, Austria

高柳広: 関節リウマチと RANKL. 第 2 回日本病理学会ガンファランス 2005 道後、2005.7.30、愛媛

古賀貴子、中島和久、高柳広: NFAT ファミリー転写因子による骨形成制御. 第 23 回日本骨代謝学会・学術集会、大阪、2005.7.23

高柳広: 破骨細胞機能低下メカニズムの多様性. 第 23 回日本骨代謝学会学術集会、2005.7.22、大阪

朝霧成挙、佐藤浩二郎、越智小枝、宇佐美貴子、森田育男、高柳広: NFATc1 が破骨細胞分化に必須であることの生体レベルでの証明. 第 23 回日本骨代謝学会・学術集会、大阪、2005.7.22

高柳広: RA による骨・関節破壊メカニズム. 第 23 回日本骨代謝学会学術集会、2005.7.21、大阪

Hiroshi Takayanagi: Regulation of osteoclast differentiation by NFATc1. The 2005 Gordon Conference on Bones and Teeth, 2006.7.11, University of New England, U.S.A.

Hiroshi Takayanagi: The Role of NFAT in osteoclast differentiation. European Calcified Tissue Society and International Bone and Mineral Society (ECTS, IBMS), 2005.6.26, Geneva, Switzerland

Hiroshi Takayanagi: Osteoimmunology—a new regulatory mechanism. Annual European Congress of

Rheumatology "EULAR 2005", 2005.6.8, Vienna

高柳広:炎症性骨破壊と破骨細胞の制御. 第 59 回日本口腔科学会徳島大会、2005.4.21、徳島

高柳広:Regulation of bone metabolism by the immune system. 14th International Rheumatology Symposium、2005.4.19、横浜

2.論文発表

Asagiri, M., Sato, K., Usami, T., Ochi, S., Nishina, H., Yoshida, H., Morita, I., Wagner, E. F., Mak, T. W., Serfling, E., & Takayanagi, H. Autoamplification of *NFATc1* determines its essential role in bone homeostasis. **J Exp Med** 202, 1261-1269 (2005)

Koga, T., Matsui, Y., Asagiri, M., Kodama, T., Crombrughe, B., Nakashima K. & Takayanagi, H. NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. **Nat Med** 11, 880-885 (2005)

Kim, Y., Sato, K., Asagiri, M., Morita, I., Soma, K., and Takayanagi, H. Contribution of NFATc1 to the transcriptional control of immunoreceptor OSCAR but not TREM-2 during osteoclastogenesis. **J Biol Chem** 280, 32905-32913 (2005)

Lee, F.Y., Kim, D.W., Karmin, J.A., Hong, D., Chang, S.S., Fujisawa, M., Takayanagi, H., Bigliani, L.U., Blaine, T.A., and Lee, H.J. μ -calpain regulates RANKL-supported osteoclastogenesis via NF- κ B activation in raw 264.7 cells. **J Biol Chem** 280, 29929-29936 (2005)

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, 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- κ B Inhibitor, through Downregulation of NFATc1. **J Bone Mineral Res** 20, 653-662 (2005)

Takayanagi, H., Sato, K., Takaoka, A., Taniguchi, T. Interplay between interferon and other cytokine systems in bone metabolism. **Immunol Rev** 208, 181-193 (2005)

Takayanagi, H. Osteoimmunological insight into bone damage in rheumatoid arthritis. **Mod Rheumatol** 15, 225-231 (2005)

Takayanagi, H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. **J Periodontal Res** 40, 287-293 (2005)

Takayanagi, H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. **J Mol Med** 83, 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)

G.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

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

抗リウマチ薬剤導入による軟骨細胞分化と再生

分担研究者 妻木 範行 大阪大学大学院医学系研究科助手

研究要旨

関節軟骨は成長軟骨と異なり、肥大化・石灰化することなく軟骨の特性を永久に保持する。骨形成因子 (BMP) は骨・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、重要な役割を果たしていると考えられている。本研究では BMP によって誘導される軟骨増殖、肥大化を担うシグナルの解明を試みた。種々の細胞内シグナルを阻害する薬剤を BMP 存在化での軟骨原基の器官培養に添加し、軟骨の増殖、分化を検討した。軟骨細胞の肥大石灰化には、Smad 蛋白, p38 MAP-kinase, そして Pi3-kinase を介した経路が重要な役割を果たしていることが判明した。これらの経路を抑制することで、軟骨変性疾患において軟骨の増殖能を維持しつつ、変性を抑えうる可能性を考えた。

A. 研究目的

軟骨は関節の構成体として運動機能を担うために、特異的な細胞外マトリックスが産生・構築されてきた高度に分化した組織である。正常の関節軟骨では成長軟骨と異なり、軟骨細胞は肥大化/アポトーシスに陥って変性することはなく、永久に軟骨細胞外マトリックスを代謝・維持する。しかし関節リウマチなどでの変性軟骨ではこの維持機構が破綻している。軟骨破壊の予防、回復を目指すには、軟骨細胞の分化、肥大化、そしてマトリックス遺伝子発現を制御するシグナル伝達機構を解明し、それらをターゲットに軟骨分化、増殖、変性をコントロールしうる薬剤を開発することが必要である。骨形成因子 (BMP) は軟骨増殖・分化の制御に重要な役割を果たしている。我々はその細胞内シグナル伝達を担う Smad 蛋白を軟骨特異的に阻害させた Smad6 トランスジェニックマウスを作製し、そのマウスでは軟骨細胞

の肥大化が抑制され、増殖軟骨細胞の形質が維持されることを見出した。本研究ではこのマウスの器官培養軟骨原基に種々の薬剤を添加し、シグナル伝達の変化と軟骨細胞の肥大化、遺伝子発現変化との関連を検討した。

B. 研究方法

軟骨特異的に Smad6 を発現させたトランスジェニックマウス (Tg) と正常マウス (WT) の 14.5 日目胎仔中足骨軟骨原基の器官培養を rhBMP2 (500ng/ml) 存在下で行った。SB-203580 (p38 MAP-kinase 阻害剤), PD-98059 (MEK1/2 阻害剤 (ERK の活性化を阻害)), LY-294002 (Pi3-kinase 阻害剤) を各々添加し (20 · M), 7 日間培養した。誘導された増殖軟骨層と石灰化肥大軟骨層の形態を定量的に評価し、組織学的にマーカー遺伝子の発現を *in situ* hybridization にて解析した。また WT 軟骨原基に種々の薬剤を添加し、その軟骨増殖促進効果を

BMP と比較した。

C. 研究結果

SB-203580 投与により, Tg 由来の軟骨では WT 由来に比べて軟骨細胞の肥大石灰化が完全に抑えられ, X 型コラーゲン遺伝子 (*Col10a1*), *Mmp13* の発現を認めなかった. 増殖軟骨細胞層には影響を与えなかった. PD-98059 投与は, Tg および WT 由来軟骨において増殖軟骨層と石灰化肥大軟骨層の誘導に影響を与えなかった. LY-294002 投与により, Tg 由来軟骨では石灰化肥大軟骨層の出現が著明に抑えられ, *Col10a1* は発現が限局し, *Mmp13* は発現を認めなかった. また軟骨原基器官培養にある Small compound を投与したところ, BMP 添加の場合とほぼ同程度の増殖軟骨の拡大を認めた. しかし培養軟骨細胞に対しては細胞増殖効果を示さなかった. この 2 つの培養系の違いの一つは軟骨膜の有無であるため, この compound は軟骨膜に働いて 2 次的に軟骨を増殖させていることが考えられた.

D. 考察

p38 MAP-kinase 及び Pi3-kinase を介した経路は, Smad 蛋白による経路と協調して軟骨の肥大石灰化を制御していると考えた. これらの pathway をターゲットとする薬剤を開発し, 関節軟骨に投与することで関節軟骨の変性を抑えられる可能性を考える. また軟骨を増やすためには, 軟骨膜を介した軟骨細胞へのシグナルが重要な役割を果たしていることが示唆された.

D. 結論

軟骨細胞の肥大石灰化には, Smad 蛋白, p38 MAP-kinase, そして Pi3-kinase

を介した経路が重要な役割を果たしていた. 軟骨変性の治療において, これらの pathway がターゲットの一つになりうると考えた.

E. 健康危険情報 無し

F. 研究発表

1. 学会発表

1. T. Iwai, N. Tsumaki, J. Murai, A. Myoui, H. Yoshikawa. : Low-intensity pulsed ultrasound and new bone formation within interconnected porous calcium hydroxyapatite ceramics. 27th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (2005) Sep 23-27, Nashville
2. Junko Murai, Mina Okamoto, Hideki Yoshikawa, and Noriyuki Tsumaki: Overexpression of BMP4 in bone increased osteoclast number and caused osteopenia. 2nd Joint meeting of the European Calcified Tissue Society and the International Bone and Mineral Society. (2005) Jun 25-29, Geneva
3. M. Okamoto, J. Murai, H. Yoshikawa, N. Tsumaki: Role of BMP signals in endochondral ossification and fracture repair: activation of osteoclastic resorption and remodeling of bone. 2nd Joint meeting of the European Calcified Tissue Society and the International Bone and Mineral Society. (2005) Jun 25-29, Geneva
4. Takao Iwai, Mitsuru Horiki, Junko Murai, Hideki Yoshikawa, Noriyuki Tsumaki : Bone morphogenetic protein signaling in chondrocyte proliferation and hypertrophy during endochondral bone formation. 2nd Joint

- meeting of the European Calcified Tissue Society and the International Bone and Mineral Society. (2005) Jun 25-29, Geneva
5. M. Okamoto, J. Murai, H. Yoshikawa, N. Tsumaki: BMP signaling in bone stimulate osteoclastic bone resorption and remodeling during endochondral bone formation and fracture repair. Gordon Conference, Cartilage Biology and Pathology. (2005). Jun 5-9, Il Ciocco, Italy
 6. 岩井貴男, 堀木充, 村井純子, 吉川秀樹, 妻木範行: 軟骨細胞増殖・肥大化における BMP シグナル伝達経路の解明. 第 18 回日本軟骨代謝学会 3/18-19, 2005 千里ライフサイエンスセンター
 7. 妻木範行, 堀木充, 村井純子, 岩井貴男, 岡本美奈, 吉川秀樹: 軟骨・骨形成と BMP シグナル. 第 37 回日本結合組織学会学術大会, 2005 年 5 月 26, 27 日 富山
 8. 岡本美奈, 村井純子, 吉川秀樹, 妻木範行: BMP は内軟骨性骨形成と骨折治癒過程において破骨細胞性骨吸収とリモデリングを促進する: 第 23 回日本骨代謝学会, 2005 年 7 月 21-23 日 大阪国際会議場
 9. 妻木範行, 岡本美奈, 村井純子, 岩井貴男, 吉川秀樹: 内軟骨性骨形成と骨折治癒過程における BMP の機能. BMP 研究会, 2005 年 7 月 24 日 大阪
 10. 岩井貴男 妻木範行 村井純子 名井陽 吉川秀樹: 低出力超音波刺激とハイドロキシアパタイト多孔体における骨新生. 第 6 回運動器科学研究会, 2005 年 8 月 27, 28 日 静岡県大仁ホテル
 11. 村井純子, 吉川秀樹, 妻木範行: *Rxb / Col11a2* ローカスにおける CTCF binding site の同定. 第 6 回運動器科学研究会, 2005 年 8 月 27, 28 日 静岡県大仁ホテル
 12. 岡本美奈, 村井純子, 吉川秀樹, 妻木範行: BMP は内軟骨性骨形成と骨折治癒過程において破骨細胞性骨吸収とリモデリングを促進する. 第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2005 年 10 月 20, 21 日 三重県
 13. 村井純子, 岡本美奈, 吉川秀樹, 妻木範行: 軟骨特異的遺伝子発現にかかわる insulator の解明; *Rxb / Col11a2* locus の解析. 第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2005 年 10 月 20, 21 日 三重県
2. 論文発表
1. Tsumaki, N., and Yoshikawa, H.: The role of bone morphogenetic proteins in endochondral bone formation. *Cytokine Growth Factor Rev.*, (2005)16: 279-285
 2. 村井純子, 吉川秀樹, 妻木範行: 骨・軟骨研究の展開 わかりやすい疾患動物解析①. 分子リウマチ (2005) 2: 231-236
 3. 村井純子, 堀木充, 吉川秀樹, 妻木範行: 骨・軟骨研究の展開 わかりやすい疾患動物解析②. 分子リウマチ (2005) 2: 304-309
 4. 岩井貴男, 妻木範行, 吉川秀樹: BMPs 薬理作用と生理作用 3) 内軟骨性骨化における作用. 臨床分子内分泌学3 日本臨床社, 大阪, (2005) 431-434,
- 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 Bcl-2 family 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 Bcl-2 ファミリー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が、その分子メカニズム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。われわれはこれまでに small G protein である Ras, Rac1 が破骨細胞の生存に重要であり、これらの活性を抑制する dominant negative 型 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ることを明らかにしてきた (Miyazaki et al., J Cell Biol 2000)。また過去の厚生労働省研究班において dominant negative 型 Rac1 変異体の導入によって破骨細胞がアポトーシスに陥ることを明らかにした (Fukuda et al., J Bone Miner Res 2005)。本年の研究班においては破骨細胞アポトーシスにおける Bcl-2 ファミリーの役割に注目して研究をおこなった。

B. 研究方法

Bcl-2 および Bcl-xL のレトロウイルス発現ベクターは pMx-puro (東京大学医科学研究所 北村俊夫教授より供与された) を用いて構築した。破骨細胞前駆細胞への感染は、下記のごとく行った。

①マウス骨髄細胞をマクロファージコロニ

一刺激因子の存在下で培養

②培養 3 日目にレトロウイルスベクターを感染。その後 puromycin の存在下で 2 日間培養

③感染した細胞を RANKL および M-CSF の存在下で培養し、破骨細胞への分化を誘導

このようにして Bcl-2, Bcl-xL を過剰発現した細胞の survival, activity を検討した。

(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

Bcl-2, Bcl-xL を発現した破骨細胞前駆細胞の破骨細胞分化は軽度に促進、あるいはほとんど変化がなかった。一方分化した破骨細胞の生存期間はいずれも著明に延長していた。特に Bcl-xL を発現した細胞は著しい spreading をしめした(図1)。いずれの破骨細胞においても活性化の亢進は認められなかった。

D. 考察

Bcl-2, Bcl-xL などの antiapoptotic Bcl-2 family は血球系の細胞、あるいは神経細胞をはじめとしたさまざまな細胞の survival に関与す

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、レトロウイルスベクターによる遺伝子導入システムを用いて、Bcl-2, Bcl-xLが、破骨細胞の生存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。今後ビスフォスフォネートの代替薬として、Bcl-2 familyをターゲットにした創薬が期待される。

E. 結論

Antiapoptotic Bcl-2 family である Bcl-2, Bcl-xL が破骨細胞の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 Bcl-2 family 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・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-gamma is induced by receptor activator of nuclear factor \cdot 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」SERM1:107-121, 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 Calcium15:1160-1164, 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 「新しい骨粗鬆所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

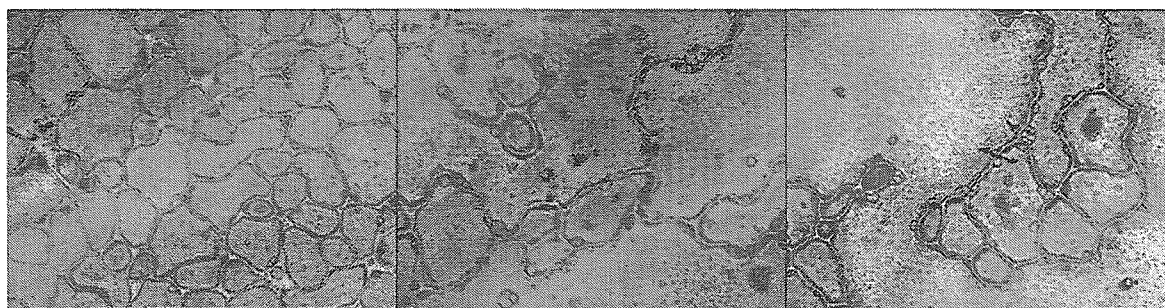


図1 : Bcl-xL 発現による破骨細胞の形態変化。培養後 A:0時間 B:24時間 C:48時間。

分担研究報告書

硬組織形成における MMP・ADAM の役割

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

堀内 圭輔 慶應義塾大学医学部整形外科 助手

研究要旨：硬組織形成における MMP・ADAM の役割についてノックアウトマウス（KO）を用いて解析した。MMP-13KO 由来骨芽細胞は可溶性 RANKL の放出が低下し、共存培養で形成される破骨細胞は大きく広がらず吸収窩形成活性が低下していた。MMP-9 と MMP-13 のダブル KO では成長軟骨板における血管侵入が障害され、四肢短縮型の骨硬化症を呈した。ADAM17、ADAM19KO は心奇形のため生後間もなく死亡したため、硬組織における表現型は不明であった。ADAM8、ADAM9、ADAM12、ADAM15KO、および ADAM9&15 ダブル KO、ADAM9 & 12 & 15 トリプル KO は生理的な条件下において明らかな表現系を認めなかった。MMP は硬組織形成においてマトリックスからの可溶性リガンドの遊離活性化、ADAM は膜型シグナル分子の shedding という作用が示唆されている。軟骨性骨原基の吸収と血管侵入、破骨細胞の分化・成熟・骨吸収能、骨髄微少環境の維持など、各ステップにおける MMP・ADAM ファミリーの作用機序をひとつひとつ解析することで、組織修復や関節炎といった病態下における役割が明らかになると考えられた。

A. 研究目的

慢性関節リウマチの病態が分子レベルで解明され、標的シグナルを抑制する治療法の開発が進み、さまざまな生物学的製剤が臨床応用できるようになっている。マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）は細胞外マトリックス分解酵素として知られているが、単に組織のリモデリングをおこなうだけでなく膜型シグナル分子の shedding、可溶性リガンドの活性化、受容体の機能調節など生体内においてさまざまな作用を持つことが明らかになってきた。そこで、炎症性骨破壊の治療薬開発のターゲットとなる MMP、ADAM ファミリー分子を同定すべく、同遺伝子のノックアウトマウスを作製し、その表現型からまず硬組織形成における役割についてシグナルの調節という新規作用を中心に解析した。

B. 研究方法

MMP-13KO は遺伝子座に d2EGFP と pGKNeo をノッ

クインし作成した。生殖系列に乗った 3 系統を C57BL6 にバッククロスし、MMP-9KO（ジャクソン研究所より分譲）との交配によって、両遺伝子を欠損するダブル KO を作出し、胎生期の骨モデリングおよび出生後の骨リモデリングを組織学的に検討した。活性型ビタミン D3+PGE2 刺激下にてカルバリア由来骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養をおこない、膜型シグナル分子の shedding を検討した。さらに、硬組織において発現がみられる ADAM ファミリーのうち、ADAM8、ADAM9、ADAM12、ADAM15、ADAM17、ADAM19 について KO マウスを相同組み換えにより作成し、それぞれを交配しダブルまたはトリプル KO の表現型を解析した。（倫理面への配慮）慶應義塾大学の組み換え DNA 委員会および実験動物に関する規則にそって計画し遂行した。

C. 研究結果

MMP-13KO 由来骨芽細胞は可溶性 RANKL の放出が低下し、共存培養で形成される破骨細胞は大きく