Matsumoto I, Goto D, Sumida T. Analysis of abnormally expressed genes in synovium from patients with rheumatoid arthritis using a column gel electrophoresis -coupled subtractive hybridization technique. Int J Mol Med15:453-457, 2005

2. Suzuki T, Muraki Y, Yasukochi T, Hua Zhang, Kori Y, Wakamatsu E, Hayashi T, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumichika H, Sumida T., Matsumoto I. Immunoglobulin G from anti-glucose-6-phosphate isomerase antibodies positive patient with rheumatoid arthritis induces synovitis in cynomolgus monkeys Autoimmunity Reviews 4:475-478, 2005

3. Hayashi T, Matsumoto I, Muraki Y, Takahashi R, Chino Y, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. Clinical Characteristics of Anti-Glucose-6 -Phosphate Isomerase Antibodies positive Japanese Patients with Rheumatoid Arthritis Mod Rheumatol 15:253-268, 2005

4. Matsumoto I, Muraki Y, Yasukochi T, Hua Zhang, Kori Y, Hayashi T, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Ikeda K, Sumichika H, Sumida T. The exploration of joint-specific immunoreactions on immunoglobulins G of anti-glucose-6-phosphate isomerase antibody-positive patients with rheumatoid arthritis Int J Mol Med 16:793-800, 2005

5. Matsumoto I, Hua Zhang, Muraki Y, Hayashi T, Yasukochi T, Kori Y, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. A functional variant of Fcγ receptor IIIA is associated with rheumatoid arthritis inanti-glucose-6-phosphate isomerase antibodies-positive individuals. Arthritis Res Ther 7:R1183-R1188, 2005

6. Kori Y, Matsumoto I, Hua Zhang, Yasukochi T, Hayashi T, Iwanami K, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. Characterizationn of Th1/Th2 type, glucose-6-phosphate isomerase reactive T cells in the generation of rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 65:968-969, 2006

7. Ito S, Sugihara M, Suzuki T, Mamura M, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Sumida T. Diagnosis of *Chlamydia*-induced reactive arthritis. Intern Med 45:37, 2006

8. Chino Y, Murata H, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Sakamoto T, Ohtsuka M, Sekisawa K, Ito S, Sumida T. T cell receptor BV gene repertoire of lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluid of Polymyositis/Dermatomyositis patients with interstitial pneumonitis. Int J Mol Med 17:101-109, 2006

9. Naito Y, Matsumoto I, Wakamatsu E, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. Altered peptide ligants regulate muscarinic acetylcholine receptor reactive T cells of patients with Sjogren's Syndrome. Ann. Rheum. Dis. 65:269-271, 2006

10. Yoshioka H, Ito S, Handa S, Tomiha S, Kose K, Haishi T, Tsutsumi A, Sumida T. Low-field compact magnetic resonance imaging system for the hand and wrist in rheumatoid arthritis. JMRI 23:370-376, 2006

11. Suzuki E, Tsutsumi A, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Otsu M, Onodera M, Takahashi S, Sato Y, Sumida T. Gene transduction of tristetraprolin or its active domain reduces TNF-α production in Jurkat T cells. Int. I. Mol. Med 17:801-809, 2006

12. Ito S, Gross WL, Reinhold-Keller E, Gause A, Aries P, Rüther W, Mansoury T, Awad R, Badawy S, Murasawa A, Gejyo F. Rheumatology in Japan, Germany, and Egypt: Comparison of Medical Practices. Acta Med Biol 54:51-58, 2006

13. Tsutsumi A, Hayashi T, Chino Y, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Sumida T. Significnace

of antiprothrombin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus: clinical evaluation of the antiprothrombin assay and the antiphosphatidylserine/prothrombin assay, and comparison with other phospholipids antibody assays. Mod. Rheumatol 16:158-164, 2006

14. Ohnishi Y, Tsutsumi A, Matsumoto I, Goto D, Ito S, Kuwana M, Uemura Y, Nishimura Y, Sumida T. Altered peptide ligands control type II collagen-reactive T cells from RA patients. Mod. Rheumatol. 16:226-228, 2006

15. Suzuki E, Tsutsumi A, Sugihara M, Mamura M, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Ikeda K, Ochiai N, Sato Y, Sumida T. Expression of TNF-α, tristetraprolin, T-cell intracellular antigen-1 and Hu antigen R genes in synobium of patients with rheumatoid arthritis. Int. J. Mol. Med. 18:273-278, 2006

16. Wakamatsu E, Matsumoto I, Yasukochi T, Naito Y, Goto D, Mamura M, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T.:Overexpression of phosphorylated stat1-α in labial salivary glands of patients with Sjogren's Syndrome. Arthritis Rheum 54:3476-3484, 2006

17. Kobayashi T, Ito S, Yasuda K, Kuroda T, Yamamoto K, Sugita N, Tai H, Narita I, Gejyo F, Yoshie H. The Combined Genotypes of Stimulatory and Inhibitory Fcγ Receptor Associated with Systemic Lupus Erythematosus and Periodontitis in Japanese. J Periodontology (in press)

18. Sugihara M, Tsutsumi A, Suzuki E, Wakamatsu E, Suzuki T, Ogishima H, Hayashi T, Chino Y, Ishii W, Mamura M, Goto D, Isao M, Ito S, Sumida T. Effects of infliximab therapy on gene expression levels of TNF-alpha, TTP, TIA-1 and HuR in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum(in press)

2. 学会発表

1. 伊藤　聡、杉原誠人、千野裕介、鈴木　豪、林　太智、後藤大輔、松本　功、堤　明人、住田孝之：　RA 患者における Infliximab 治療反応性の予測　第 49 回日本リウマチ学会（2005 年）

2. 杉原　誠人、千野裕介、鈴木　豪、林　太智、後藤大輔、松本　功、伊藤　聡、堤　明人、住田孝之：当院における関節リウマチに対する Infliximab 投与の臨床的評価　第 49 回日本リウマチ学会（2005 年）

3. 杉原誠人、堤　明人、荻島　博、千野裕介、石井　亘、真村瑞子、後藤大輔、松本　功、伊藤　聡、住田孝之：AU-rich element binding protein 遺伝子発現と関節リウマチ患者での infliximab 効果予測　第 103 回日本内科学会（2006 年）

4. 杉原誠人、堤　明人、岩波慶一、荻島　博、鈴木　豪、林　太智、千野裕介、石井　亘、真村瑞子、後藤大輔、松本　功、伊藤　聡、住田孝之：Infliximab 治療中の関節リウマチ患者における TNFα mRNA の転写後制御因子, TTP, TIA-1 および HuR の遺伝子発現　第 50 回日本リウマチ学会　(2006 年)

5. 伊藤　聡、杉原誠人、荻島　博、千野裕介、石井　亘、真村瑞子、後藤大輔、松本　功、堤　明人、住田孝之：当科における RA 患者での infliximab 治療反応性の予測　第 50 回日本リウマチ学会（2006 年）

6. 半田晋也、拝師智之、巨瀬勝美、吉岡　大、住田孝之、伊藤　聡：関節リウマチ診断用コンパクト MRI の開発　第 50 回日本リウマチ学会　(2006 年)

7. 伊藤　聡：インフリキシマブ使用ＲＡ患者の手足 X 線所見の変化に関する検討　第 34 回日本リウマチ・関節外科学会　(2006 年)

8. Sugihara M, Tsutsumi A, Suzuki E, Suzuki T, Ogishima H, Hayashi T, Chino Y, Ishii W, Mamura M, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Sumida T.: Gene Expressions of TNF-α Tristetraprolin, T cell internal antigen-1 and Hu antigen R in Rheumatoid arthritis

patients treated with infliximab. Annual European Congress of RHEUMATOLOGY EULAR 2006

9. Sugihara M, Tsutsumi A, Suzuki E, Matsui H, Kohno M, Suzuki T, Ishii W, Mamura M, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Sumida T. Gene Expressions of Tumor Necrosis Factor-α Post-Transcriptional Regulators, Tristetraprolin, T Cell Intracellular Antigen-1 and Hu Antigen R in Rheumatoid Arthritis Patients Treated with Infliximab 2006ANNUAL SCIENTIFIC MEETING on the ACR, 2006

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

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）
総合研究報告書

関節リウマチの病態形成に関わるシグナルカスケードに関する研究

分担研究者　川上　純
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科展開医療科学講座
リウマチ免疫病態制御学分野　講師

研究要旨
シグナル伝達の過剰な活性化と不活化は関節リウマチ（RA）の病態と深く関わっている。私たちは本3年間で、滑膜線維芽細胞のアポトーシスと蛋白シトルリン化の制御機構に着目し研究した。滑膜線維芽細胞のアポトーシス抵抗性を惹起するシグナルカスケードの一つに Akt 活性化があるが、私たちはこれら細胞の TRAIL 依存性アポトーシスを指標にし、Akt を活性化する上位 kinase には PI3K と CaMKII が重要であることを明らかとした。後者の CaMKII に関しては滑膜線維芽細胞に優位に発現する CaMKII アイソフォームはγおよびδアイソフォームと考えられ、アポトーシス感受性の観点からは Akt 以外の ERK、JNK、p38 活性化経路と CaMKII とのクロストークは明確には認められなかった。蛋白シトルリン化の制御機構に関しては滑膜線維芽細胞はシトルリン化蛋白の発現が現アッセイ系では検出できず、ヒト株化細胞の HL-60 細胞株を用いた。HL-60 細胞株には異なる分子量のシトルリン化蛋白の発現が検出されたが、最も発現が強い分子はヒストンと考えられた。蛋白シトルリン化は peptidylarginine deiminase（PADI）で誘導されるが HL-60 細胞株には PADI2 と PADI4 の発現が検出された。HL-60 細胞株を TNF-α等の炎症性サイトカインで刺激すると時間依存性に PADI4 発現と蛋白シトルリン化が有意に増強された。PADI2 の発現は刺激前後で変化を認めなかった。これらの結果より CaMKII および蛋白シトルリン化を制御する分子群は RA の新たな治療ターゲットになりうることが示唆された。CaMKII と PADI は Ca influx で伴に活性化される酵素である。アポトーシス抵抗性と蛋白の過剰なシトルリン化は RA 病態の中心と考えられ、今後は CaMKII と PADI のクロストークを含めた解析を行い、抗サイトカイン療法とは異なる次世代の RA 分子標的療法の開発につなげたい。

A.研究目的

滑膜細胞のアポトーシス抵抗性は RA 滑膜増殖に深く関わっている。一方、RA 特異的自己抗体の抗環状シトルリン化ペプチド抗体（抗 CCP 抗体）は蛋白の過剰なシトルリン化で誘導されると考えられており、アポトーシス抵抗性と蛋白シトルリン化亢進は、同一もしくは類似のシグナルカスケードで制御される可能性がある。本3年間では滑膜線維芽細胞のアポトーシスと蛋白シトルリン化の制御機構に関して CaMKII-Akt 活性化経路を中心に解析した。

B.研究方法

1. 今回の実験は健常人末梢血単核球、RA 患者由来培養滑膜線維芽細胞、HL-60 細胞株を用いた。
2. 培養滑膜線維芽細胞のアポトーシスは TRAIL で誘導し、ミトコンドリア膜電位、caspase 活性化、DNA 断片化で評価した。CaMKII を含む kinase 発現はウエスタンブロットで検出し、機能的関与は各 kinase の chemical inhibitor を用いて評価した。CaMKII アイソフォームは real-time RT-PCR で評価した。

3. PADI2/PADI4 発現の検討:mRNA 発現は特異的プライマーを用いた RT-PCR で、また、蛋白発現はポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロットで評価した。
4. 蛋白シトルリン化の検討:蛋白シトルリン化は抗化学修飾シトルリン化蛋白抗体を用いたウエスタンブロットで評価した。ウエスタンブロットの陽性コントロールはシトルリン化リコンビナントヒストンを用いた。

（倫理面への配慮）
ヒト末梢血単核球および RA 患者由来培養滑膜線維芽細胞は、文書で同意が得られた症例より単離し実験に用いた。

C.研究結果

1. CaKMKII による滑膜線維芽細胞 TRAIL 依存性アポトーシスの制御機構の検討:滑膜線維芽細胞には CaMKII の発現がウエスタンブロットで検出され、主なアイソフォームはγおよびδアイソフォームであった(図 1)。これら細胞には TRAIL 依存性アポトーシスが誘導された。Kinase inhibitor を用いた検討では Akt inhibitor と CaMKII inhibitor でこれら細胞の TRAIL 依存性アポトーシスは有意に増強されたが、ERK、JNK、p38 の inhibitor ではアポトーシス感受性に差異はなかった(表 1)。また、ウエスタンブロットでは CaMKII inhibitor により Akt 活性化の抑制が検出された(図 1)。

図1　FLSはCaMKIIを発現し、CaMKII inhibitor, KN93はTRAILで誘導されるAktリン酸化を抑制するが、ERK、p38、JNKのリン酸化は抑制しない

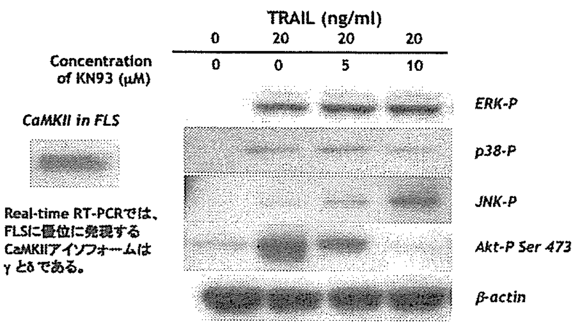
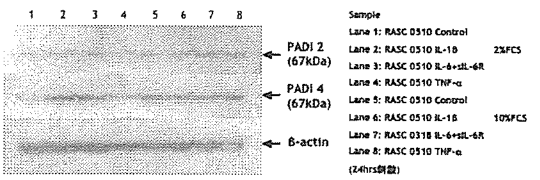


表1　CaMKII阻害によるFLSのTRAIL依存性アポトーシス感受性の増強は、Akt阻害による効果と類似している

Kinase inhibitor (10 μM)	Δψm (% of positive cells)		DNA degradation (% of positive cells)	
	(-)	TRAIL	(-)	TRAIL
-	3.3 ± 0.2	14.7 ± 0.9	3.6 ± 0.2	11.0 ± 0.5
KN93 (CaMKII)	3.7 ± 0.2	*29.9 ± 1.4**	3.7 ± 0.2	*27.7 ± 1.5†*
SH-6 (Akt)	3.7 ± 0.2	*33.6 ± 2.4**	3.8 ± 0.2	*29.9 ± 1.9 †*
PD98059 (ERK)	3.6 ± 0.3	16.5 ± 1.4	3.0 ± 0.2	12.6 ± 0.7
SB203580 (p38)	3.5 ± 0.2	16.0 ± 1.4	3.1 ± 0.2	12.1 ± 1.0
SP600125 (JNK)	3.5 ± 0.2	15.0 ± 1.4	3.1 ± 0.2	11.1 ± 1.0

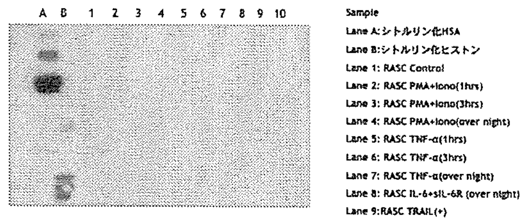
2. 蛋白シトルリン化機序の検討:滑膜線維芽細胞には PADI2/PADI4 発現はあるも現アッセイ系ではシトルリン化蛋白は検出できなかった(図 2)。しかしながら健常人末梢血単核球と HL-60 細胞株には PADI2/PADI4 に加え、シトルリン化蛋白の発現が検出された(図 3:末梢血単核球および図 4:HL-60 細胞株)。

図2. 滑膜線維芽細胞 (Fibroblast like synovial cell:FLS) を用いた実験
Western blot analysis for PADI 2&4 of cultured FLS



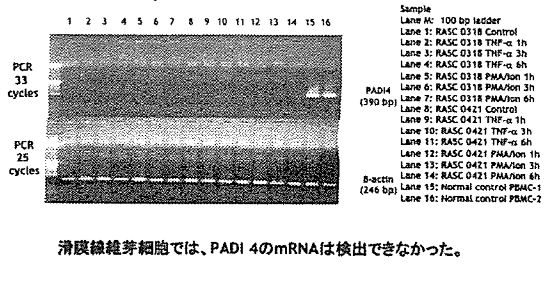
Western blotでは、FLSにはPADI 2とPADI 4が検出された。

図3. 滑膜線維芽細胞 (Fibroblast like synovial cell:FLS) を用いた実験
Western blot analysis for citrullinated proteins of cultured FLS



FLSは、PADI 2/4を発現していたが、
様々な刺激(IL-6,TNF-α,PMA+Ionomycin,TRAIL)を加えても、
シトルリン化された蛋白は検出されなかった。

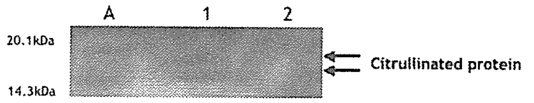
図4. 滑膜線維芽細胞 (Fibroblast like synovial cell:FLS) を用いた実験
RT-PCR analysis for PADI 4 of cultured FLS



滑膜線維芽細胞では、PADI 4のmRNAは検出できなかった。

HL-60 細胞株を用いた検討では、TNF-α、IL-6、IFN-γなど炎症性サイトカインにより PADI2/PADI4 発現およびシトルリン化蛋白の発現が増強された(図 5)。分子量などから推定すると主なシトルリン化蛋白はヒストンと思われるが、HL-60 細胞株ではヒストン以外のシトルリン化蛋白発現がサイトカインにより誘導されると考えられた(図 6)。

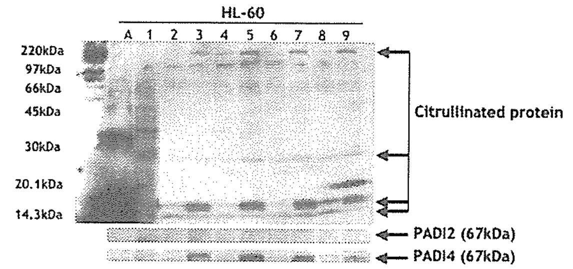
図5.末梢血単核球(PBMC)を用いた実験
Western blot analysis for Citrullinated proteins of PBMC



Lane A: Citrullinated histon
Lane 1: PBMC Iono+$CaCl_2$
Lane 2: PBMC control

PBMCでは、Ca刺激下でシトルリン化蛋白が検出された。

図6. HL-60 をサイトカインで刺激



Lane A:Citrullinated histon
Lane 1: HL-60 control
Lane 2: TNF-α (24h)
Lane 3: TNF-α (48h)
Lane 4: IL-6+sIL-6R (24h)
Lane 5: IL-6+sIL-6R (48h)
Lane 6: IL-18 (24h)
Lane 7: IL-18 (48h)
Lane 8: IFN-γ (24h)
Lane 9: IFN-γ (48h)

D.考察

滑膜線維芽細胞に発現する CaMKII アイソフォームはγおよびδアイソフォームが主体であり、CaMKII-Akt 経路は滑膜線維芽細胞のアポトーシス抵抗性を惹起する kinase cascade と考えられた。これら細胞での蛋白シトルリン化経路の同定はできなかったが、ヒト培養細胞でも PADI2/PADI4 およびシトルリン化蛋白の発現が検出され、これら発現誘導機序が炎症性サイトカインで修飾される可能性が考えられた。

E.結論

CaMKII シグナルと蛋白シトルリン化シグナルの解析が可能となった。CaMKII と PADI;蛋白シトルリン化を誘導する酵素群 は Ca influx で伴に活性化される酵素である。アポトーシス抵抗性と蛋白の過剰なシトルリン化は RA 病態の中心と考えられ、今後は CaMKII と PADI のクロストークを含めた解析を行い、抗サイトカイン療法とは異なる次世代の RA 分子標的療法の開発につなげたい。そのためには PADI(PADI4)-蛋白シトルリン化プロセスや滑膜線維芽細胞でもシトルリン化が検出できるアッセイ系の確立などが必要と考えられる。

F.健康危険情報

なし。

G.研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka F, Migita K, Kawabe Y, Aoyagi T, Ida H, Kawakami A, Eguchi K. Interleukin-18 induces serum amyloid A (SAA) protein production from rheumatoid synovial fibroblasts. Life Sci 74 (13): 1671-1679, 2004.
2. Yamasaki S, Nakashima T, Kawakami A, Miyashita T, Tanaka F, Ida H, Migita K, Origuchi T, Eguchi K. Cytokines regulate fibroblast-like synovial cell differentiation to adipocyte-like cells. Rheumatology (Oxford) 43 (4): 448-452, 2004.
3. Miyashita T, Kawakami A, Nakashima T, Yamasaki S, Tamai M, Tanaka F, Kamachi M, Ida H, Migita K, Origuchi T, Nakao K, Eguchi K. Osteoprotegerin (OPG) acts as an endogenous decoy receptor in tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis of fibroblast-like synovial cells. Clin Exp Immunol 137 (2): 430-436, 2004.
4. Hida A, Kawakami A, Miyashita T, Yamasaki S, Nakashima K, Tanaka F, Izumi Y, Tamai M, Huang M, Ida H, Nakamura H, Origuchi T, Ueki Y, Eguchi K. Nitric oxide acts on the mitochondria and protects human endothelial cells from apoptosis. J Lab Clin Med 144 (3): 148-155, 2004.

5. Kawakami A, Urayama S, Yamasaki S, Hida A, Miyashita T, Kamachi M, Nakashima K, Tanaka F, Ida H, Kawabe Y, Aoyagi T, Furuichi I, Migita K, Origuchi T, Eguchi K. Anti-apoptogenic function of TGFbeta1 for human synovial cells: TGFbeta1 protects cultured synovial cells from mitochondrial perturbation induced by several apoptogenic stimuli. Ann Rheum Dis 63 (1): 95-97, 2004.
6. Ishida Y, Migita K, Izumi Y, Nakao K, Ida H, Kawakami A, Abiru S, Ishibashi H, Eguchi K, Ishii N. The role of IL-18 in the modulation of matrix metalloproteinases and migration of human natural killer (NK) cells. FEBS Lett 569 (1-3): 156-160, 2004.
7. 川上 純、玉井慎美、中村英樹、Hashimi Rashid、上谷雅孝、青柳 潔、江口勝美. 関節リウマチの骨破壊と MMP-3. RA Letter 4, 2004.
8. 川上 純、宮下賜一郎、玉井慎美、田中史子、江口勝美 TRAIL欠損マウスにおける自己免疫疾患の発症. 臨床免疫 41 (1): 73-7, 2004.
9. Huang M, Ida H, Kamachi M, Iwanaga N, Izumi Y, Tanaka F, Aratake K, Arima K, Tamai M, Hida A, Nakamura H, Origuchi T, Kawakami A, Ogawa N, Sugai S, P.J.Utz, Eguchi K. Detection of apoptosis-specific autoantibodies directed against granzyme B-induced cleavage fragments of the SS-B (La) autoantigen in sera from patients with primary Sjögren's syndrome. Clin Exp Immunol 142: 148-152, 2005.
10. Aratake K, Kamachi M, Iwanaga N, Kawasaki E, Izumi Y, Ida H, Tanaka F, Tamai M, Arima K, Nakamura H, Origuchi T, Kawakami A, Eguchi K. A cross-talk between RNA splicing and signaling pathway alters Fas gene expression at post-transcriptional level: alternative splicing of Fas mRNA in the leukemic U937 cells. J Lab Clin Med 146 (3): 184-191, 2005.
11. Nakamura H, Kawakami A, Izumi Y, Nakashima T, Takagi Y, Ida H, Nakamura T, Nakamura T, Eguchi K: Detection of the soluble form of Fas ligand (sFasL) and sFas in the saliva from patients with Sjögren's syndrome. Clin Exp Rheumatol 23(6):915, 2005.
12. Tanaka F, Kawakami A, Tamai M, Nakamura H, Iwanaga N, Izumi Y, Arima K, Aratake K, Huang M, Kamachi M, Ida H, Origuchi T, Eguchi K: IFN-□/JAK/STAT pathway-induced inhibition of DR4 and DR5 expression on endothelial cells is cancelled by cycloheximide-sensitive mechanism: Noble finding of cycloheximide-regulate death receptor expression. Int J Mol Med 15(5):833-839, 2005.
13. Iwanaga N, Kamachi M, Aratake K, Izumi Y, Ida H, Tanaka F, Tamai M, Arima K, Nakamura H, Origuchi T, Kawakami A, Eguchi K: Regulation of alternative splicing of caspase-2 through an intracellular signaling pathway in response to pro-apoptotic stimuli. J Lab Clin Med 145(2):105-110, 2005.
14. Nakamura H, Kawakami A, Izumi Y, Nakashima T, Takagi Y, Ida H, Nakamura T, Nakamura T, Eguchi K: Detection of the soluble form of Fas ligand (sFasL) and sFas in the saliva from patients with Sjögren's syndrome. Clin Exp Rheumatol 23(6):915, 2005.
15. 川上 純、田中史子、玉井慎美、中村英樹、江口勝美：病態形成とアポトーシス. 日本臨床 63(増刊)：100-105、2005.
16. 川上 純、岩永 希、田中史子、玉井慎美、有馬和彦、荒武弘一朗、江口勝美：ヒト型TNF-α抗体アダリムマブ. 炎症と免疫 －Inflammation & Immunology－ 13(3)：55-59、2005.
17. 川上 純：CaMKIIによる滑膜線維芽細胞アポトーシス制御に関する研究 平成16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 平成17年度総括・分担研究報告書 p37-39、2005.
18. Kawakami A, Nakashima K, Tamai M, Nakamura H, Iwanaga N, Fujikawa K, Aramaki T, Arima K, Iwamoto N, Ichinose K,

Kamachi M, Ida H, Origuchi T, Eguchi K. Examination of toll-like receptor expression in salivary glands from patients with Sjögren's syndrome and functional analysis by human salivary gland cell line. J Rheumatol, in press.
19. Soejima K, Nakamura H, Tamai M, Kawakami A, Eguchi K. Activation of MKK4 (SEK1), JNK, and c-Jun in labial salivary infiltrating T cells in patients with Sjögren's syndrome. Rheumatol Int 27 (4): 329-33, 2007.
20. Nakamura H, Kawakami A, Eguchi K. Mechanisms of autoantibody production and the relationship between antuantibodies and the clinical manifestations in Sjögren's syndrome. Translational Res 148 (6): 281-8, 2006.
21. Tamai M, Kawakami A, Tanaka F, Miyashita T, Nakamura H, Iwanaga N, Izumi Y, Arima K, Aratake K, Huang M, Kamachi M, Ida H, Origuchi T, Eguchi K. Significant inhibition of TRAIL-mediated fibroblast-like synovial cell apoptosis by IFN-gamma through JAK/STAT pathway by translational regulation. J Lab Clin Med 147 (4): 182-90, 2006.
22. Izumi Y, Ida H, Huang M, Iwanaga N, Tanaka F, Aratake K, Arima K, Tamai M, Kamachi M, Nakamura H, Origuchi T, Kawakami A, Anderson P, Eguchi K. Characterization of peripheral natural killer cells in primary Sjögren's syndrome: impaired NK cell activity and low NK cell number. J Lab Clin Med 147(5):242-9, 2006.
23. Tamai M, Kawakami A, Iwanaga N, Fujikawa K, Tanaka F, Aramaki T, Izumi Y, Aratake K, Arima K, Kamachi M, Nakamura H, Huang M, Ida H, Origuchi T, Eguchi K. Examination of IgM rheumatoid factor (IgM-RF) and anti-cyclic citrullinated peptide antibody (anti-CCP Ab) in Japanese patients with palindromic rheumatism. Intern Med 45(12):795-7, 2006.
24. Tamai M, Kawakami A, Uetani M, Takao S, Tanaka F, Nakamura H, Iwanaga N, Izumi Y, Arima K, Aratake K, Kamachi M, Huang M, Origuchi T, Ida H, Aoyagi K, Eguchi K. The presence of anti-cyclic citrullinated peptide antibody is associated with magnetic resonance imaging detection of bone marrow oedema in early stage rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 65 (1): 133-134, 2006.
25. Tamai M, Kawakami A, Uetani M, Takao S, Rashid H, Tanaka F, Fujikawa K, Aramaki T, Nakamura H, Iwanaga N, Izumi Y, Arima K, Aratake K, Kamachi M, Huang M, Origuchi T, Ida H, Aoyagi K, Eguchi K. Early prediction of rheumatoid arthritis by serological variables and magnetic resonance imaging of the wrists and finger joints: results from prospective clinical examination. Ann Rheum Dis 65 (1): 134-135, 2006.
26. 川上 純、玉井慎美、江口勝美：早期関節炎の捉え方と病態解析の方向性. 日本臨床免疫学会会誌 30 (1): 37-40, 2007.
27. 川上純, 玉井慎美, 藤川敬太, 岩本直樹, 有馬和彦, 江口勝美, 上谷雅孝, 高尾正一郎, 青柳潔：関節リウマチの早期診断と早期からの骨病変進展予測の試み. 臨床リウマチ 18 (4): 352-357, 2006.
28. 川上 純：CaMKIIによる滑膜線維芽細胞アポトーシス制御に関する研究 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 平成17年度総括・分担研究報告書 p34-37、2006.

2. 学会発表

1. 玉井慎美、川上 純、 江口勝美他. MRIと血清マーカーによる関節リウマチの早期診断. 第101回日本内科学会講演会, 2004年4月8日～10日, 東京.
2. 川上純, 江口勝美他. 滑膜細胞におけるTRAIL を介したアポトーシス誘導の分子機序：サイトカイン成長因子による修飾. 第48回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2004年4月15日～17日, 岡山.
3. 川上純, 江口勝美他. 自己抗体、MRI 画像、疾患遺伝子からみた早期診断と臨床経過の予知. 第48回日本リウマチ学会総会・

学術集会, 2004年4月15日～17日, 岡山.

4. 川上純, 江口勝美他. PDGF による滑膜細胞 TRAIL 依存性アポトーシスの抑制. 第48回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2004年4月15日～17日, 岡山.
5. 和泉泰衛、川上 純、江口勝美他. 原発性シェーグレン症候群患者末梢血中の NK 細胞活性低下のメカニズム:CD160分子発現低下との関連の検討. 第48回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2004月15日～17日, 岡山.
6. 玉井慎美、川上 純、江口勝美他. IFN gamma による滑膜細胞 TRAIL 依存性アポトーシス抑制機序の検討. 第48回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2004年4月15日～17日, 岡山.
7. 田中史子、川上 純、江口勝美他. 血管内皮細胞の TRAIL 依存性アポトーシスへの IFN gamma の作用機序. 第48回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2004年4月15日～17日, 岡山.
8. 宮下賜一郎、川上 純、江口勝美他. Lipid raft 阻害による血管内皮細胞 TRAIL 誘導性アポトーシス感受性の増強. 第48回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2004年4月15日～17日, 岡山.
9. 玉井慎美、川上 純、江口勝美他. IFN-gamma による滑膜細胞 TRAIL 依存性アポトーシス抑制機序の検討. 第32回日本臨床免疫学会総会, 2004年10月8日～9日, 東京.
10. 川上純, 江口勝美他. シェーグレン症候群唾液腺組織における Toll-like receptors (TLRs) 発現の検討. 第32回日本臨床免疫学会総会, 2004年10月8日～9日, 東京.
11. 玉井慎美、川上 純、江口勝美他. 前向き症例対照研究データベースによる関節リウマチ早期診断基準案の作成. 第102回日本内科学会講演会, 2005年4月7日～9日, 大阪.
12. 玉井慎美、川上 純、江口勝美他. 前向き症例対照研究データベースによる関節リウマチ早期診断基準案の作成. 第49回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2005年4月17日～20日, 横浜.
13. 玉井慎美、川上 純、江口勝美他. 早期関節リウマチの手・指関節 MRI 所見と血清マーカー. 第49回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2005年4月17日～20日, 横浜.
14. 川上純, 江口勝美他. CaMKII による血管内皮細胞アポトーシス感受性の制御. 第49回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2005年4月17日～20日, 横浜.
15. 荒武弘一朗、川上 純、江口勝美他. RNA スプライシングと細胞内シグナル伝達経路のクロストークによる Fas 遺伝子発現制御. 第49回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2005年4月17日～20日, 横浜.
16. 岩永希、川上 純、江口勝美他. 細胞内シグナル伝達経路を介した caspase-2の alternative splicing の制御. 第49回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2005年4月17日～20日, 横浜.
17. 田中史子, 川上 純、江口勝美他. CaMKII 阻害による滑膜線維芽細胞アポトーシス感受性の増強. 第49回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2005年4月17日～20日, 横浜.
18. Tamai M, Kawakami A, Eguchi K, et al. Early diagnosis of rheumatoid arthritis by serologic variables and magnetic resonance imaging of the wrists and finger joints: results from prospective clinical examination. American college of rheumatology annual meeting, 2005. 11. 12-17, San Diego.
19. Kawakami A, Eguchi K, et al. Calcium/Calmodulin-Dependent protein kinase II (Camkii) regulates apoptosis of synovial cells through the activation of Akt. American college of rheumatology annual meeting, 2005. 11. 12-17, San Diego.
20. 藤川敬太、川上 純、江口勝美他. CaMKII 阻害による滑膜線維芽細胞アポトーシス感受性の増強. 第50回 (中) 日本リウマチ学会総会・学術集会, 2006年4月23日

～26日，長崎.

21. 岩永　希、川上　純、江口勝美他.　関節リウマチに対する infliximab の治療効果:54週での検討.　第50回 (中) 日本リウマチ学会総会・学術集会, 2006年4月23日～26日，長崎.
22. 中村英樹、川上　純、江口勝美他.　シェーグレン症候群における epidermal growth factor (EGF) による PI3K-Akt 経路の活性化と NF-□B translocation との関係について.　第50回 (中) 日本リウマチ学会総会・学術集会, 2006年4月23日～26日，長崎.
23. 副島和孝、川上　純、江口勝美他.　シェーグレン症候群小唾液腺浸潤 T 細胞における MKK4 (SEK1)、JNK and c-Jun の活性化について.　第50回 (中) 日本リウマチ学会総会・学術集会, 2006年4月23日～26日，長崎.
24. 有馬和彦、川上　純、江口勝美他.　関節リウマチにおける骨髄浮腫と遺伝子多型の検討.　第50回 (中) 日本リウマチ学会総会・学術集会, 2006年4月23日～26日，長崎.
25. 玉井慎美、川上　純、江口勝美他.　関節リウマチの早期診断と予後予測.　第50回 (中) 日本リウマチ学会総会・学術集会, 2006年4月23日～26日，長崎.
26. 玉井慎美、川上　純、江口勝美他.　関節リウマチの早期診断と予後予測の試み.　第103回日本内科学会講演会, 2006年4月14日～16日，横浜.
27. Kawakami A, Eguchi K, et al.　Examination of early joint damage in early-stage rheumatoid arthritis: Results from prospective clinical study.　The 15th International Rheumatology Symposium, 2006. 4. 23-26, Nagasaki.
28. Tamai M, Kawakami A, Eguchi K, et al. Bone marrow oedema and serologic autoantibodies predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferenciated arthritis of Japanese population.　European league against rheumatism annual European congress of rheumatology, 2006. 6. 21-24, Amsterdam.
29. Arima K, Kawakami A, Eguchi K, et al. The increased production of VEGF-A is primary disorder in patients with RS3PE syndrome.　European league against rheumatism annual European congress of rheumatology, 2006. 6. 21-24, Amsterdam.
30. Arima K, Kawakami A, Eguchi K, et al. Functional promoter polimorphism of MMP-9 is related with bone marrow edema of anti-CCP negative patients.　European league against rheumatism annual European congress of rheumatology, 2006. 6. 21-24, Amsterdam.
31. 有馬和彦、川上　純、江口勝美他.　関節リウマチにおける骨髄浮腫と MMP-9高発現機能的遺伝子多型の検討.　第34回日本臨床免疫学会総会, 2006年10月2日～3日，東京.
32. 玉井慎美、川上　純、江口勝美他.　診断未確定関節炎から関節リウマチへの進展予測.　第34回日本臨床免疫学会総会, 2006年10月2日～3日，東京.

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H.知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

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）
総合研究報告書

ヒト末梢血単球サブセットによる破骨細胞への分化能の比較検討

分担研究者　南木敏宏　東京医科歯科大学　膠原病・リウマチ内科学　助手

研究要旨

関節リウマチ(RA)における骨破壊には、破骨細胞が主要な役割を担っている。破骨細胞はマクロファージ／単球系の細胞から分化するが、詳細な起源については未解明である。本研究では、破骨細胞に分化する末梢血単球を同定し、その分化における分子機構の解明を目的とした。末梢血単球はCD16の発現の有無により2つのサブセットに分けられる。RANKL＋M-CSF刺激によりCD16陰性の単球のみが破骨細胞に分化した。CD16陰性細胞からの破骨細胞分化は、CD16陽性細胞を加えることにより抑制されなかった。破骨細胞分化に関連する分子発現を比較したところ、integrin β3のmRNAとαvβ3 heterodimerはCD16陰性単球にのみ発現を認めた。siRNAによるintegrin β3のknockdownはCD16陰性単球からの破骨細胞分化を抑制した。RANKL刺激後の細胞内シグナル伝達経路を解析したところ、CD16陰性単球においてのみ、ERK1/2, p38のリン酸化活性が認められた。一方、CD16陽性単球はCD16陰性単球に比較し、高い炎症性サイトカイン産生を認め、RANKL, M-CSF刺激によりその発現は亢進した。またケモカインに対する遊走能にも2つの単球サブセットにおいて違いがみられた。RA滑膜にはCD16陽性マクロファージとCD16陰性マクロファージの浸潤を認めた。以上より、CD16陰性単球／マクロファージは滑膜組織に浸潤し、破骨細胞へ分化し、RAの骨破壊に寄与していると考えられ、CD16陽性単球／マクロファージは炎症性サイトカイン産生により、滑膜の慢性炎症とともに破骨細胞分化促進にも関与している可能性がある。CD16陰性単球分画のRA滑膜への集積、活性化阻害は骨吸収阻害治療のターゲットとなる可能性が示唆された。

A. 研究目的

関節リウマチ(RA)患者では、病気の進行に伴い骨破壊の進行がみられ、それにより関節機能の低下をきたしてくる。骨破壊は局所の破骨細胞活性化によると考えられるが、その破骨細胞は末梢血単球がケモカインによりリクルートされ破骨細胞に分化していると推測されている。しかし、破骨細胞に分化する末梢血単球についての詳細な解明はされていない。

ヒト末梢血単球はCD16の発現の有無により2つのサブセットに分けられ、サイトカイン産生能やケモカインによる遊走能に差異があることが報告されている。しかし、破骨細胞への分化能の相違については未解明である。そこで、本研究では破骨細胞へ分化する単球サブセットを同定し、その分化に関与する分子機構の解明を目的とする。また、本研究結果により、破骨細胞に分化しうる単球の遊走、活性化を阻害することによりRAの骨破壊を抑制する新たな治療法の開発に結びつくことが期待される。

B. 研究方法

ヒト末梢血より単核球を分離し、マイクロビーズを用いて、CD16陽性単球、CD16陰性単

球を単離する。各単球サブセットを RANKL + M-CSF で7日間刺激培養後、TRAP 染色を施行し、多核で TRAP 染色陽性の細胞を破骨細胞と同定した。また骨吸収能はリン酸カルシウム付着プレートを用いて評価した。

破骨細胞分化に関与する分子の mRNA 発現を半定量 PCR にて解析した。c-fms, RANK の発現を western blot にて、c-fms の細胞表面への発現をフローサイトメーターにて解析した。

CD16 陽性、陰性分画を RANKL にて刺激し、ERK1/2, p38 のリン酸化を、抗リン酸化 ERK1/2, p38 抗体を用いて、フローサイトメーターで解析した。

インテグリン αvβ3 ヘテロダイマー の発現を免疫染色にて解析。インテグリン β3 を siRNA 法を用いてノックダウンし、破骨細胞分化への影響を解析。また、インテグリン阻害剤(RGDfV)を添加し、破骨細胞形成への影響を評価した。

各単球サブセットを RANKL、または M-CSF にて刺激し、培養上清中の TNF-α, IL-6 の産生を ELISA にて解析した。

また、各単球サブセットの各種ケモカインに対する走化性を chemotaxis chamber を用いて解析した。

RA 滑膜組織を CD68 および CD16 にて蛍光二重染色を施行した。

(倫理面への配慮)

RA 滑膜組織は、研究目的などを説明の上、患者より了承を得て使用した。また、本研究は東京医科歯科大学医学部倫理審査委員会にて承認されている。

C. 研究結果

ヒト末梢血 CD16 陽性、CD16 陰性の各単球サブセットを M-CSF + RANKL で1週間刺激し、分化した破骨細胞数を比較した。CD16 陰性のサブセットから TARP 染色陽性・多核の破骨細胞が有意に多く形成され、CD16 陽性のサブセットからはほとんど破骨細胞形成はみられなかった（図1a, b)。リン酸カルシウム付着プレート上で同様に培養し、骨吸収能を解析したが、CD16 陰性サブセットのみ吸収窩が認められた（図1c)。CD16 陽性単球に破骨細胞分化を抑制する働きがあるか否かについて検討するため、CD16 陰性単球に、CD16 陽性単球を加えて、M-CSF + RANKL で刺激し、TRAP 染色陽性、多核の分化した破骨細胞数を計測した。その結果、CD16 陽性単球を加えても、CD16 陰性単球から分化した破骨細胞数に有意な変化は認めなかった（図2)。

破骨細胞分化に関与する分子を半定量 PCR 法にて解析したところ、RANK, TRAF6, TREM2, c-Fos, c-fms, SIRP1-β, DAP12, FcRγ, OSCAR の mRNA 発現は、両サブセット間で明らかな差を認めなかったが、NFATc1, インテグリン αv, β3 は CD16 陰性のサブセットに高い発現を認めた（図3)。M-CSF, RNAKL のレセプターである c-fms, RANK の発現を蛋白レベルで western blot またはフローサイトメーターで解析した。Western blot にて、c-fms および RANK の発現は、CD16 陽性、陰性単球分画において一定の発現量の差は認められなかった（図4a)。また、フローサイトメーターにて c-fms の細胞表面の発現を解析したが、CD16 陽性、陰性に明らかな発現の差異は認められなかった（図4b)。

次に、RANKL 刺激による細胞内シグナルの違いを検討するため、RANKL 刺激後にリン酸化 ERK1/2、p38 の発現を、フローサイトメーターで解析した。ERK1/2, p38 ともに、CD16 陰性単球において、刺激5分後に活性化を認め、10 分後には低下し、20 分後には刺激前と同レベルまで減少した（図5)。

次に、M-CSF + RANKL 刺激によるインテグリン αvβ3 ヘテロダイマー の発現を解析したところ、CD16 陰性サブセットにのみ認められた（図6)。インテグリン β3 をターゲットとする siRNA を投与すると、CD16 陰性サブセットからの破骨細胞形成数が減少した（図7a)。インテグリン阻害剤(RGDfV)を加えることによっても、同様に破骨細胞形成が抑制された（図7b)。

各単球サブセットからのTNF-α, IL-6の産生をELISAにて測定した。CD16陽性単球はCD16陰性単球と比較してTNF-α, IL-6ともにその産生能が高く、RANKLまたはM-CSF刺激によりそれらの産生が亢進した（図８）。

また、各種ケモカインに対する遊走能を解析したところ、CD16陰性単球はMCP-1、MIP-1αに対して高い遊走能を示し、SDF-1、RANTES、FKNに対しても遊走能がみられた（図９）。一方、CD16陽性サブセットはFKNに対してのみ遊走能を認めた。

RA滑膜の免疫組織染色により、広範囲に多数分布するCD16陰性マクロファージと、少数ではあるがlining layerとsublining layer両方に分布するCD16陽性マクロファージを認めた（図１０）。

D. 考察

末梢血単球は、CD16の発現の有無により、2つのサブセットに分けられ、その機能の違いが近年注目されている。本研究結果により、CD16陰性サブセットが破骨細胞に分化しうると考えられた。CD16陰性単球でのみRANKL + M-CSF刺激により、αvβ3の発現が認められ、インテグリンβ3のノックダウンにより、CD16陰性単球からの破骨細胞分化が阻害された。インテグリンβ3は単球・破骨細胞においてはαvとのみ結合し、αvβ3ヘテロダイマー として発現するが、αvβ3はCD16陰性単球が破骨細胞へ分化するために必要な分子であると考えられる。インテグリンの結合阻害剤であるRGDfVにより、破骨細胞分化が抑制されたことより、αvβ3からの細胞内シグナル伝達が破骨細胞分化に重要であると考えられる。

CD16陽性細胞は破骨細胞に分化しないことより、CD16陽性単球に破骨細胞分化を抑制する作用がある可能性が考えられた。しかしながら、CD16陽性単球を加えることにより、CD16陰性単球からの破骨細胞分化は抑制されなかった。このことより、CD16陽性単球に破骨細胞分化抑制作用はなく、破骨細胞への分化能の違いの原因ではないと考えられた。また、RANKL刺激による細胞内シグナル伝達の違いを検討するため、ERK1/2, p38の活性化の違いを解析した。CD16陰性分画においては、ERK1/2, p38のリン酸化が認められたが、CD16陽性細胞においては認められなかった。この違いが、破骨細胞分化の違いに寄与する可能性が示唆された。

一方、CD16陽性細胞は、陰性細胞と比較して、TNF-α, IL-6の産生能が高く、またRANKL, M-CSF刺激において、TNF-α, IL-6の産生の亢進がみられた。また、RA滑膜には、CD16陽性マクロファージとCD16陰性マクロファージが存在し、各々末梢血のCD16陽性およびCD16陰性単球が滑膜にリクルートされた結果と推測される。CD16陰性単球は、RA滑膜で産生されている種々のサイトカイン（M-CSF、RANKL、TNF-α、IL-6）により破骨細胞へ分化し、RAの骨破壊に寄与していると考えられる。一方、CD16陽性単球はTNF-α、IL-6などのサイトカイン産生により、滑膜の慢性炎症とともに破骨細胞分化促進にも関与している可能性がある。

両単球サブセットはケモカインに対する反応性にも違いが認められた。RA滑膜組織で発現が報告されているMCP-1、MIP-1αなどのケモカインは破骨細胞に分化しうるCD16陰性単球の遊走に関与している可能性がある。

これらの結果より、CD16陰性単球の滑膜局所への遊走、および活性化の阻害が、破骨細胞による骨破壊抑制の治療ターゲットとなることが期待される。

E. 結論

ヒト末梢血単球CD16陰性サブセットは破骨細胞に分化すると考えられる。その分化にインテグリンαvβ3は重要である。従って、CD16陰性単球の活性化および滑膜組織への遊走の阻害、インテグリンαvβ3の阻害は、RAの骨破壊抑制に有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G.研究発表

1. 論文発表

* Toshihiro Nanki, Yasuyo Urasaki, Toshio Imai, Miyuki Nishimura, Kenzo Muramoto, Tetsuo Kubota, Nobuyuki Miyasaka. Inhibition of fractalkine ameliorates murine collagen-induced arthritis. J. Immunol. 173(11): 7010-7016, 2004.

* Junko Nishio, Mihoko Suzuki, Toshihiro Nanki, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka. Development of TCRB CDR3 length repertoire of human T lymphocytes. Int. Immunol. 16(3): 423-431, 2004.

* Fumihito Suzuki, Toshihiro Nanki, Toshio Imai, Hirotoshi Kikuchi, Shunsei Hirohata, Hitoshi Kohsaka, Nobuyuki Miyasaka. Inhibition of CX3CL1 (fractalkine) improves experimental autoimmune myositis in SJL/J mice. J. Immunol. 175(10): 6987-6996, 2005.

* Toshihiro Nanki, Takeshi Shimaoka, Kenji Hayashida, Ken Taniguchi, Shin Yonehara, Nobuyuki Miyasaka. Pathogenic role of CXCL16-CXCR6 pathway in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 52(10): 3004-3014, 2005.

* Kyoko Wakamatsu, Toshihiro Nanki, Nobuyuki Miyasaka, Kazuo Umezawa, Tetsuo Kubota. Effect of a small molecule inhibitor of nuclear factor-κB nuclear translocation in a murine model of arthritis and cultured human synovial cells. Arthritis Res. Ther. 7(6): R1348-R1359, 2005.

* 今井俊夫、西村美由希、南木敏宏、梅原久範。フラクタルカインと炎症性疾患。日本臨床免疫学会誌. 28(3): 131-139, 2005.

* Sunit K. Singh, Henner Morbach, Toshihiro Nanki, Hermann. J. Girschick. Differential expression of chemokines in synovial cells exposed to different *Borrelia burgdorferi* isolates. Clin. Exp. Rheumatol. 23(3): 311-322, 2005.

* Ayako Arai, Aishun Jin, Weihua Yan, Daisuke Mizuchi, Koh Yamamoto, Toshihiro Nanki, Osamu Miura. SDF-1 synergistically enhances IL-3-induced activation of the Raf-1/MEK/Erk signaling pathway through activation of Rac and its effector Pak kinases to promote hematopoiesis and chemotaxis. Cell. Signal. 17(4): 497-506, 2005.

* Yukiko Komano, Toshihiro Nanki, Kenji Hayashida, Ken Taniguchi, Nobuyuki Miyasaka. Identification of a human peripheral blood monocyte subset that differentiates into osteoclasts. Arthritis Res. Ther. 8(5): R152, 2006.

* Yoshinori Nonomura, Kenji Nagasaka, Hiroyuki Hagiyama, Chiyoko Sekine, Toshihiro Nanki, Mimi Tamamori-Adachi, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka. Direct modulation of rheumatoid inflammatory mediator expression in retinoblastoma protein- dependent and -independent pathways by cyclin-dependent kinase 4/6. Arthritis Rheum. 54(7): 2074-2083, 2006.

* 越智小枝、南木敏宏、駒野有希子、鈴木文仁、小川純、杉原毅彦、長坂憲治、野々村美紀、萩山裕之、宮坂信之。全身性エリテマトーデスに肥厚性硬膜炎を合併し、低髄圧症候群様の頭痛・難聴を呈した1例。日本臨床免疫学会誌 (in press)。

2. 学会発表

* 駒野有希子、南木敏宏、宮坂信之。ヒト末梢血単球サブセットによる破骨細胞への分化能の比較検討。第34回日本免疫学会総会。2004.

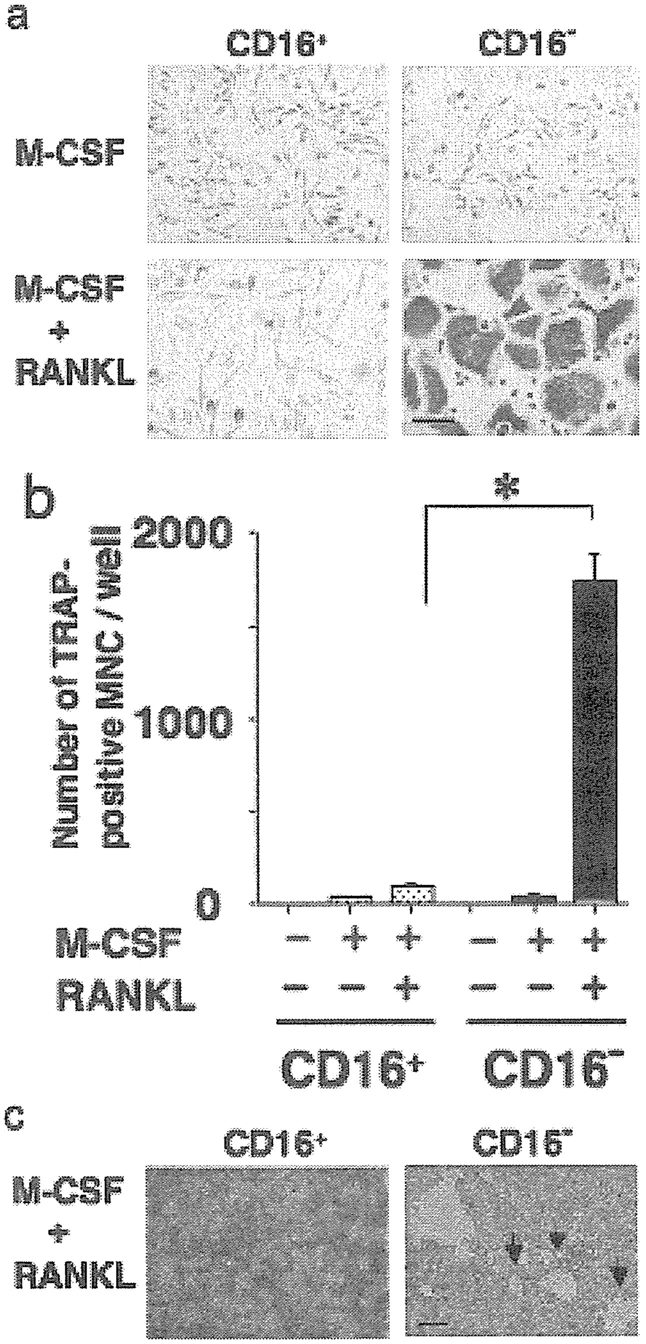
* Tetsuo Kubota, Kyoko Wakamatsu, Toshihiro Nanki, Nobuyuki Miyasaka, Kazuo Umezawa. A Small Molecule NF-κB Inhibitor Suppresses Inflammatory and Destructive Activities of Synovial Cells in

Rheumatoid Arthritis. 第68回アメリカリウマチ学会。2004.
* Kazuki Takada, Toshihiro Nanki, Kenji Hayashida, Ken Taniguchi, Nobuyuki Miyasaka. Chemokine Receptor Expression on the Peripheral Blood and Synovial B Cells in Rheumatoid Arthritis Patients. 第68回アメリカリウマチ学会。2004.
* Hermann Girschick, Toshihiro Nanki, Henner Morbach, Sunit Singh. Differential Expression of Chemokines in Synovial Cells Infected with Different Borrelia Burgdoreri Isolates. ヨーロッパリウマチ学会。2004.
* Hermann Girschick, Toshihiro Nanki, Claudius Faber, Verena Baar, Sunit Singh. Differential Expression of Matrix Metalloproteinases and Cyclooxygenases in Synovial Cells Infected by Borrelia Burgdorferi. ヨーロッパリウマチ学会。2004.
* 若松恭子、窪田哲朗、南木敏宏、宮坂信之、梅澤一夫。NF-κB阻害剤による関節リウマチ滑膜細胞活性化の抑制。第25回日本炎症・再生医学会。2004.
* 南木敏宏、浦崎康代、今井俊夫、村本賢三、窪田哲朗、宮坂信之。抗fractalkine (FKN: CX3CL1)抗体による関節炎抑制効果の検討。第25回日本炎症・再生医学会。2004.
* 鈴木文仁、南木敏宏、上阪等、宮坂信之。筋炎モデルマウスにおける筋炎症部位への細胞浸潤に関与するケモカインの解析。第25回日本炎症・再生医学会。2004.
* 高田和生、南木敏宏、林田賢治、谷口顕、宮坂信之。関節リウマチ滑膜へのB細胞浸潤に関与するケモカインレセプターの解析。第48回日本リウマチ学会総会。2004.
* 鈴木文仁、南木敏宏、上阪等、宮坂信之。筋炎モデルマウスにおける筋炎症部位への細胞浸潤に関与するケモカインの解析。第48回日本リウマチ学会総会。2004.
* 若松恭子、南木敏宏、宮坂信之、窪田哲朗。NF-kB阻害剤の関節リウマチ治療への応用に関する基礎的検討。第48回日本リウマチ学会総会。2004.
* Toshihiro Nanki, Takeshi Shimaoka, Ken Taniguchi, Shin Yonehara, Nobuyuki Miyasaka. Pathogenic role of CXCL16-CXCR6 pathway in rheumatoid arthritis. 第35回日本免疫学会総会. 2005.
* Yukiko Komano, Toshihiro Nanki, Nobuyuki Miyasaka. Identification of human peripheral blood monocyte subset which differentiates into osteoclasts. 第35回日本免疫学会総会. 2005.
* Toshihiro Nanki, Takeshi Shimaoka, Kenji Hayashida, Ken Taniguchi, Shin Yonehara, Nobuyuki Miyasaka. Pathogenic Role of CXCL16-CXCR6 Pathway in Rheumatoid Arthritis. 第69回アメリカリウマチ学会. 2005.
* Yukiko Komano, Toshihiro Nanki, Nobuyuki Miyasaka. Identification of human peripheral blood monocyte subset which differentiates into osteoclasts. 第69回アメリカリウマチ学会. 2005.
* Fumihito Suzuki, Toshihiro Nanki, Toshio Imai, Hirotoshi Kikuchi, Shunsei Hirohata, Hitoshi Kohsaka, Nobuyuki Miyasaka. Inhibition of Fractalkine (CX3CL1) Improves Experimental Autoimmune Myositis in SJL/J Mice. 第69回アメリカリウマチ学会. 2005.
* 田中真生、野島崇樹、平形道人、桑名正隆、津坂憲政、堤明人、寺井千尋、土肥眞、高崎芳成、南木敏宏、市川健司、山田秀裕、吉田俊治、広畑俊成、遠藤平仁、三森経世. 膠原病難治性病態の早期診断、予後推定、治療方針確立における自己抗体の意義に関する多施設共同研究. 第33回日本臨床免疫学会総会. 2005.
* Tetsuo Kubota, Toshihiro Nanki. Treatment of murine arthritis with a NF-kB inhibitor. 第1回East Asian Group of

Rheumatology (EAGOR) meeting. 2005.
＊ 南木敏宏、林田賢治、谷口顕、宮坂信之. 関節リウマチ(RA)滑膜組織における CXCL16/CXCR6 相互作用の解析. 第49回日本リウマチ学会総会. 2005.
＊ 駒野有希子、南木敏宏、宮坂信之. ヒト末梢血単球分画における破骨細胞への分化能の比較検討. 第49回日本リウマチ学会総会. 2005.
＊鈴木文仁、南木敏宏、今井俊夫、菊地弘敏、広畑俊成、上阪等、宮坂信之. 抗 fractalkine (FKN)抗体による実験的多発性筋炎の抑制. 第49回日本リウマチ学会総会. 2005.
＊ Toshihiro Nanki, Yasuyo Urasaki, Toshio Imai, Miyuki Nishimura, Kenzo Muramoto, Tetsuo Kubota, Nobuyuki Miyasaka. Inhibition of Fractalkine Ameliorates Murine Collagen-Induced Arthritis. Keystone symposia, Leukocyte Trafficking: Cellular and Molecular Mechanisms. 2005.
＊野々村美紀、南木敏宏、宮坂信之、上阪等。低酸素による関節リウマチ滑膜細胞の増殖亢進。第34回日本臨床免疫学会総会。2006.
＊ 岸潤、南木敏宏、高村聡人、渡部香織、駒野有希子、宮坂信之。リツキシマブによる薬剤性間質性肺炎を合併した全身性エリテマトーデスの一例。第34回日本臨床免疫学会総会。2006.
＊ Yoshinori Nonomura, Masayasu Toyomoto, Toshihiro Nanki, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka. Hypoxia overcomes contact-dependent proliferative inhibition of rheumatoid synovial fibroblasts by downregulating N-cadherin and subsequent $p27^{Kip1}$ expression. 第70回アメリカリウマチ学会。2006.
＊ 金子英樹、渡部香織、駒野有希子、高田和生、南木敏宏、宮坂信之。SLEの加療中に進行性脳白質病変を来たし、診断に苦慮した一例。関東リウマチ。2006.
＊ 渡部香織，南木敏宏，杉原毅彦，宮坂信之。尿道周囲無菌性膿瘍、尿道皮膚瘻を形成した結節性多発動脈炎の1例。第50回日本リウマチ学会総会。2006.
＊ 田中真生、野島崇樹、平形道人、桑名正隆、津坂憲政、堤明人、寺井千尋、土肥眞、高崎芳成、南木敏宏、市川健司、山田秀裕、吉田俊治、広畑俊成、遠藤平仁、三森経世。膠原病難治性病態の早期診断、予後推定、治療方針確立における自己抗体の意義に関する多施設共同研究。第 50 回日本リウマチ学会総会。2006.
＊ 大柳菜歩、南木敏宏、宮坂信之、窪田哲朗。コラーゲン誘導関節炎における NF-kB 阻害剤による破骨細胞の分化／活性化の抑制。第50回日本リウマチ学会総会。2006.
＊ 野々村美紀、南木敏宏、宮坂信之、上阪等。低酸素による関節リウマチ滑膜細胞の増殖亢進。第50回日本リウマチ学会総会。2006.
＊ Toshihiro Nanki, Takeshi Shimaoka, Kenji Hayashida, Ken Taniguchi, Shin Yonehara, Nobuyuki Miyasaka. Pathogenic Role of CXCL16-CXCR6 Pathway in Rheumatoid Arthritis. Keystone symposia, Chemokines and Chemokine Receptors. 2006.

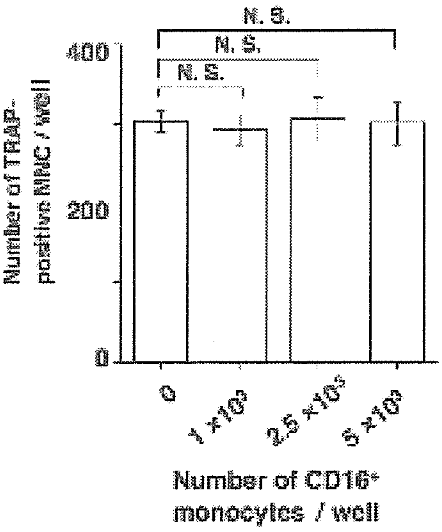
H. 知的財産権の出願・登録状況
特許出願中：炎症性ミオパチーの予防及び／又は治療のための医薬。

図１．末梢血 CD16 陰性細胞からの破骨細胞分化。



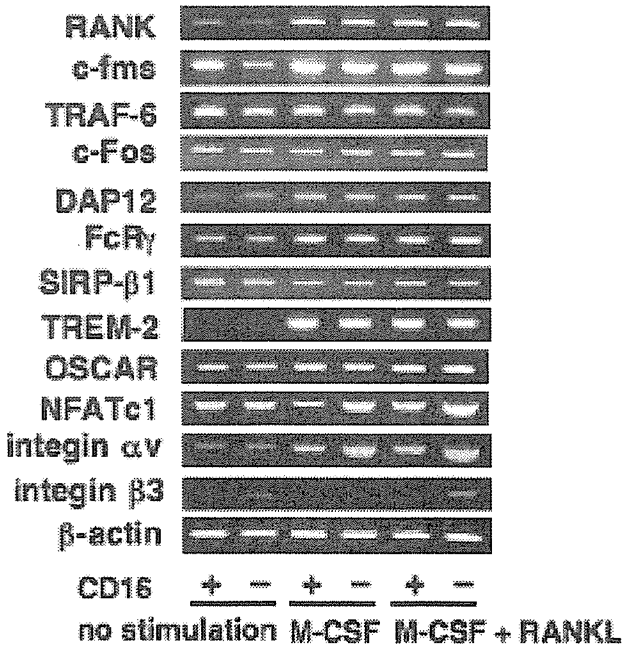
ヒト末梢血 CD16 陽性、陰性単球を RANKL + M-CSF にて 1 週間刺激後に TRAP 染色し(a)、TRAP 陽性・多核の破骨細胞数を計測(b)。リン酸カルシウム付着プレートにて同様に培養し、カルシウム吸収を解析(c)。矢印は吸収窩。

図２．CD16 陽性単球共培養による、CD16 陰性単球からの破骨細胞分化への影響。



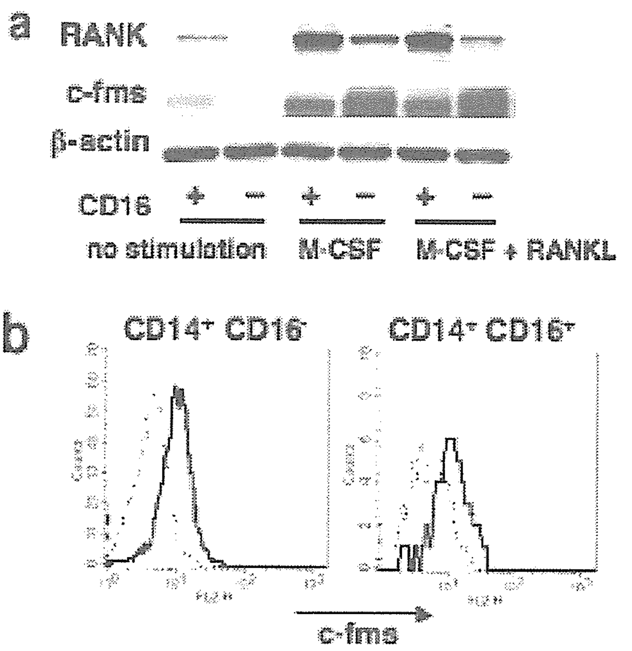
CD16 陰性単球に、CD16 陽性単球を加え、M-CSF + RANKL 刺激後に、TRAP 染色し、TRAP 陽性、多核の破骨細胞数を計測。

図３．破骨細胞分化に関与する分子発現。



破骨細胞分化に関連する分子発現を半定量 RT-PCR にて解析し、CD16 陽性、陰性単球にて比較。

図４．RANK, c-fms の発現。

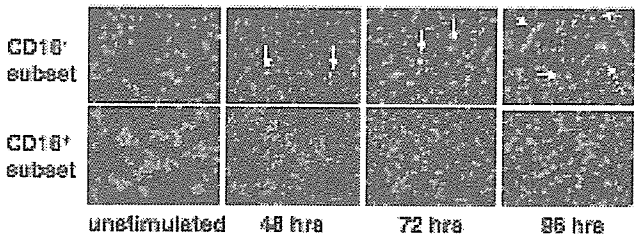


RANK, c-fms の発現を、western blot にて解析(a)、c-fms の細胞表面の発現を FACS にて解析(b)し、CD16 陽性、陰性単球にて比較。

図５．RANKL 刺激後に ERK1/2, p38 活性化の解析。

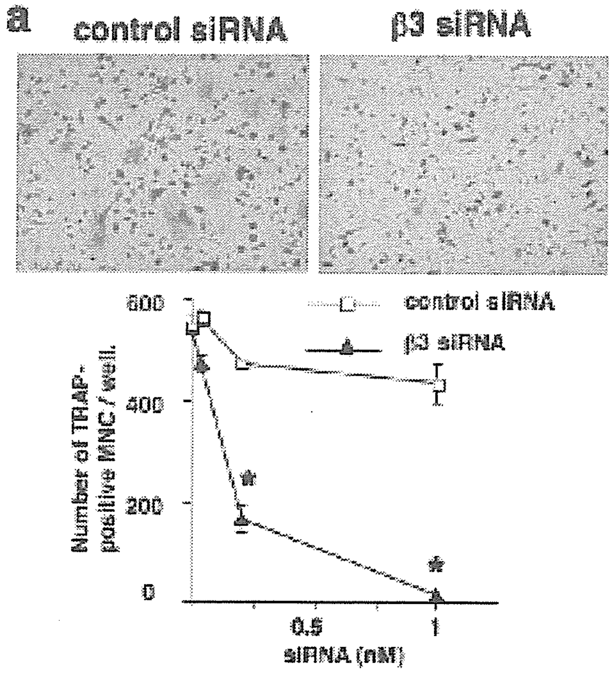
CD16 陽性、陰性単球を RANKL で刺激し、リン酸化 ERK1/2, p38 の発現を、無刺激（緑）、刺激５分（ピンク）、刺激 10 分（青）、刺激 20 分（オレンジ）に、フローサイトメーターで解析。

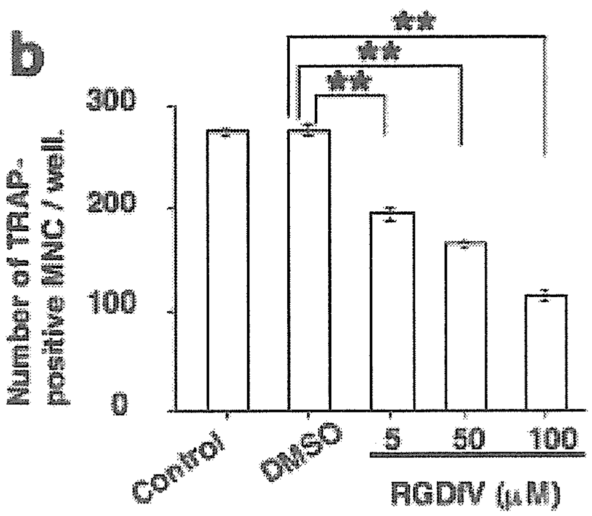
図６．αvβ3 の発現。



CD16 陽性､陰性単球を RANKL + M-CSF 刺激し、αvβ3 の発現を蛍光染色にて解析。実線の矢印は単核のαvβ3 陽性細胞、破線の矢印は多核のαvβ3 陽性細胞。

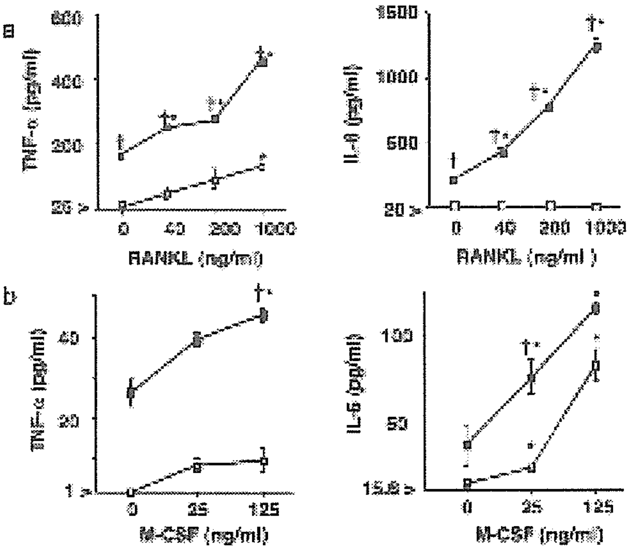
図７．β3 に阻害による、破骨細胞形成抑制。





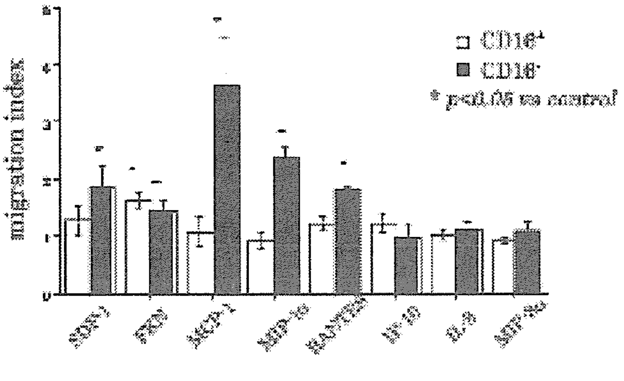
CD16 陰性単球を RANKL + M-CSF で刺激し、インテグリンβ3 に対する siRNA を加え、破骨細胞形成数の変化を解析(a)。インテグリン阻害剤、RGDfV を投与し、破骨細胞形成数の変化を解析(b)。

図８．RANKL, M-CSF 刺激による炎症性サイトカイン産生。



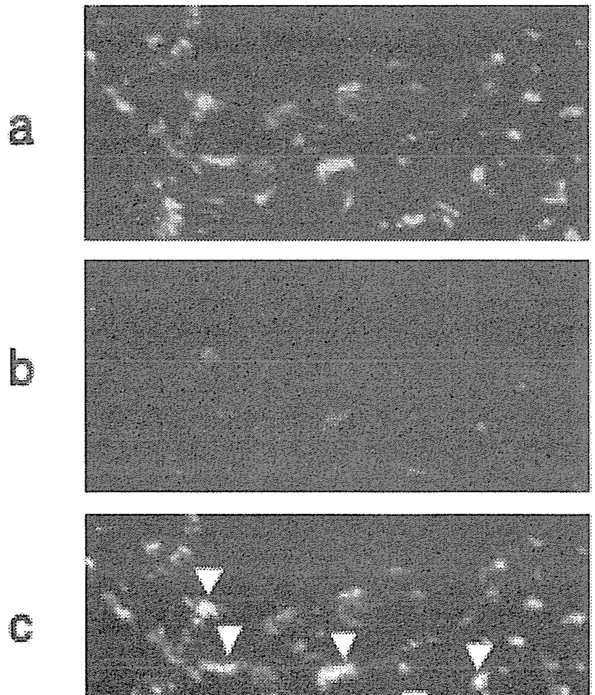
末梢血 CD16 陽性（■）、CD16 陰性（□）単球を、RANKL, M-CSF にて刺激し、培養上清中の TNF-α, IL-6 を ELISA にて測定。

図９．CD16 陽性、陰性細胞の細胞遊走の解析。



末梢血 CD16 陽性、陰性単球を各種ケモカインにて migration assay を施行。

図１０．RA 滑膜組織における CD16 陽性、陰性マクロファージ。



RA 滑膜細胞を抗 CD68 抗体(a)、抗 CD16 抗体(b)で蛍光染色。重ね合わせたものが c。矢印は CD16 陽性マクロファージ。

Ⅳ. 研究成果の刊行に関する一覧表