

G. 研究発表

1. 論文発表

- Karassa FB, Afeltra A, Ambrozeic A, Chang D-M, Keyser FD, Doria A, Galeazzi M, Hirohata S, Hoffman IEA, Inanc M, Massardo L, Mathieu A, Mok CC, Morozzi G, Sanna G, Spindler AJ, Yzioufas AG, Yoshio T, Ioannidis JPA: Accuracy of anti-ribosomal P protein antibody testing for the diagnosis of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. An international meta-analysis. *Arthritis Rheum*, 54: 312-324, 2006.
- Hirohata S: Role of bone marrow in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr Rheum Rev*, 2: 47-54, 2006.
- Hirohata S, Miura Y, Tomita T, Yoshikawa H, Ochi T, Chiorazzi N: Enhanced expression of mRNA for nuclear factor κB1 (p50) in CD34+ cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 8: R54, 2006.
- Hirohata S: Is the long-term use of systemic corticosteroids beneficial in the management of Behcet's syndrome? *Nature Clin Practice Rheum*, 2: 358-359, 2006.
- 広畑俊成: 膠原病・セミナー/膠原病の特異病変における診療のポイント. *中枢神経病変. Medical Practice*, 23:624-638, 2006.
- 広畑俊成: 特集 自己免疫疾患の新しい治療法—生物学的製剤を中心に— エファリズマブ(LFA 抗体)とナタリズマブ(VLA-4 抗体). *最新医学*, 61:993-999, 2006.
- 広畑俊成: 特集 内科疾患最新の治療—専門家からのアドバイス VI. 膠原病・免疫・アレルギー Behcet 病. *内科*, 97:1238-1239, 2006.
- 広畑俊成: 関節リウマチ骨髄 CD34+細胞からの線維芽細胞様細胞の分化. *Rheumatology Clinical Update*, 13:19-21, 2006.
- 広畑俊成: 「関節リウマチ—積極的な治療へのパラダイム転換」 Suggestion: 関節リウマチの病態形成における骨髄異常について. *治療学*, 40: 732-733, 2006.
- 広畑俊成: 特集 リウマチ・膠原病にみられる自己抗体—その対応抗原と臨床的意義 抗リボソームP抗体. *リウマチ科*, 36:58-64, 2006.
- 廣畑俊成: 整形外科医が誤りやすい膠原病. *臨床整形外科*, 41: 962-969, 2006.
- Hirohata S, Kanai Y, Mitsuo A, Tokano Y, Hara M, Kubota T, Hashimoto T: Efficacy of cerebrospinal fluid IL-6 testing for diagnosis of lupus psychosis. *EULAR 2006, Amsterdam, THU0267*, 2006.
- Kikuchi H, Takayama M, Arinuma Y, Aramaki K, Komagata Y, Hirohata S: Low dose weekly methotrexate for progressive neuro-Behcet's syndrome: A follow up study for 8 years seeking possibilities of withdrawal of methotrexate. 12th International Conference on Behcet's disease. Lisbon, S-33, 2006.
- Kikuchi H, Takayama M, Arinuma Y, Aramaki K, Komagata Y, Hirohata S: Infliximab for progressive neuro-Behcet's syndrome refractory to methotrexate. 12th International Conference on Behcet's disease. Lisbon, S-33, 2006.
- Hirohata S, Yanagida T, Miura Y, Tomita T, Yoshikawa H, Ochi T: Enhanced expression of mRNA for Kruppel-Like Factor 5 in CD34+ cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis. 70th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, Washington D.C., *Arthritis Rheum* 53(Suppl.), 2006.
- 広畑俊成: シンポジウム 3: 自己抗体の特異性と多様性: CNS ループスと抗リボソームP抗体. 第50回日本リウマチ学会総会・学術集会(長崎)p.31, 2006.
- 広畑俊成, 金井美紀, 満尾晶子, 戸叶嘉明, 原まさ子, 窪田哲朗, 橋本博史: ワークショップ 8: 全身性エリテマトーデスの臨床(2): ループス精神病の診断における髄液IL-6の有用性の検討. 第50回日本リウマチ学会総会・学術集会(長崎)p.85, 2006.
- 有沼良幸, 柳田たみ子, 広畑俊成: ワークショップ 16: 自己抗体(2): NMDA レセプターサブユニット NR2 に対する抗体はびまん性精神医学的/神経心理学的症状を有する全身性エリテマトーデスと関連がある. 第50回日本リウマチ学会総会・学術集会(長崎)p.99, 2006.
- 荒巻芸, 有沼良幸, 永井立夫, 須田洋子, 菊地弘敏, 竹内明輝, 広畑俊成: ワークショップ 81: ベーチェット病: ベーチェット病重症度判定基準化胃底の試み. 第50回日本リウマチ学会総会・学術集会(長崎)p.212, 2006.
- 菊地弘敏, 有沼良幸, 荒巻芸, 広畑俊成: ワークショップ 82: その他の膠原病(1): 進行性神経ベーチェット病に対するメトトレキサート少量パルス療法—8年間の治療成績—. 第50回日本リウマチ学会総会・学術集会(長崎)p.213, 2006.
- 菊地弘敏, 有沼良幸, 荒巻芸, 広畑俊成: ワークショップ 82: その他の膠原病(1): 進行性神経ベーチェット病に対するインフリキシマブの有効性について. 第50回日本リウマチ学会総会・学術集会(長崎)p.213, 2006.
- 廣畑俊成: シンポジウム S2-2 中枢神経障害. 第34回日本臨床免疫学会総会(東京)p.207, 2006
- 廣畑俊成: シンポジウム S2 「生物学的製剤のさらなる臨床応用」 ベーチェット病における生物学的製剤. 第17回日本リウマチ学会関東支部学術集会(東京), 2006

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

関節リウマチにおける骨粗鬆化の病態解明と重症化防止治療法の開発

分担研究者 吉川 秀樹

所属機関名・職名 大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学（整形外科）・教授

研究要旨

関節リウマチの骨粗鬆化に深く関与する Nurse 細胞の起源や局在を明らかにし、その病態解析を行った。ヒト RA 滑膜中に存在する RA-Nurse 細胞は、RA 病態特異的な液性因子を産生分泌し、関節炎の発症、増悪に関与していることが示された。RA 患者の関節近傍嚢胞性骨病変に対して、人工骨移植術を施行し、臨床的有用性を示した。関節リウマチの重症化を予測し、正確な予後診断を可能とするため、血中 C1q 値の新規定量システムの開発に成功した。

A. 研究目的

関節リウマチ（RA）では、関節滑膜や骨髄中に存在する間質系細胞（Nurse 細胞）が骨破壊病態に強く関与していることが示されている。本研究では、ヒト滑膜組織やヒト骨髄組織における、Nurse 細胞の起源、局在、機能を明らかにし、その病態解明を行う。また、連通多孔体人工骨を用い、RA 患者の脆弱化した骨の再生と骨粗鬆症の重症化防止を試みる。さらに、関節リウマチの重症化を予測し正確な予後診断を可能とするため、血中 C1q 値の新規定量システムの開発を試みる。

B. 方法

1) Nurse 細胞の起源の可能性として、まず組織球を候補と考え、そのマーカーである CD68（KP1 あるいは PGM1）抗体などの関連モノクロー抗体を用いて、ヒト関節滑膜、骨髄に対し免疫組織染色を行った。さらに関節リウマチの重症化予測因子としての C1q と Nurse 細胞の関連を検討するため免疫組織染色を行った。

2) RA-Nurse 細胞、OA 培養細胞、外傷患者培養細胞と B 細胞をそれぞれ 2 日間共培養し、培養上清（3 群；RA-sup、OA-sup、外傷-sup）を RA-Nurse 細胞、OA 培養細胞、外傷培養細胞それぞれに添加した。2 日間の

培養後に各細胞より RNA 抽出 cDNA 合成し、リアルタイム PCR アレイを用いて発現遺伝子の解析を行った。

3) 関節近傍嚢胞性骨病変を有するリウマチ患者 12 例に対し、病巣搔爬と人工骨充填を行った。

4) 血中 C1q 値の高感度測定系の開発のため、新規モノクロー抗体の作製を行った。

C. 結果

1) RA 患者の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。骨髄では、CD68 陽性

細胞が、洞血管内皮近傍に存在することが示された。C1q の発現は、滑膜細胞全体に弱陽性、多くの組織球に陽性であった。

2) RA-Nurse 細胞では、RA-sup 添加によってのみ IL-1、MMPs、CD44、SMAD4 などの遺伝子発現の上昇がみられた。OA 培養細胞、外傷培養細胞では、RA-sup 添加にてもこれらの遺伝子の発現は認められなかった。

3) 12 例中 11 例で、術後 3-6 ヶ月で良好な骨再生を認め人工骨の有用性が示された。

4) モノクローナル抗体を用いて血中 C1q 値を測定した結果、患者血清で測定可能であること、測定値と RA 重症度との相関を認めた。

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。また滑膜組織でのC1q発現細胞を確認した。RA培養上清のみがRA-Nurse細胞で特異的に、CD44、IL-1 β 、MMPs、SMAD4などの炎症関連遺伝子を誘導することから、RA-Nurse細胞とB細胞との共培養によりRA特異的な液性因子が培養上清中に存在することが示唆された。さらに、これらRA特異的な液性因子に対して、RA-Nurse細胞のみが反応しうしくみを持っていることが示されたことから、RA Nurse細胞は、autocrineまたはparacrineにより、これら液性因子を介して、RAの関節破壊に機能的に関与していることが考えられた。RA病変への人工骨移植は、病巣の除去と骨再生の両面の効果があり臨床経過は良好であり、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。

E. 結論

RA滑膜、骨髄に存在するRA-Nurse細胞は、RA病態特異的な液性因子を産生分泌し、関節炎の発症、増悪に関与していることが示された。RA患者の関節近傍嚢胞性骨病変に対する人工骨移植術は臨床的に有用であり、関節リウマチ・骨粗鬆症の重症化防止の新規治療法として期待できる。モノクローナル抗体を用いたC1q値の測定は、RA重症化の予測に有用である。

(倫理面への配慮)

患者本人への組織学的検討の意義と有用性について十分なインフォームドコンセントを得ている。人工骨移植による骨移植は、厚生労働省の認可を受けており、保険診療として行っており、倫理的問題はないと考える。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 妻木範行、村井純子、岩井貴男、岡本美奈、吉川秀樹：BMPシグナルと骨形成・骨吸収、*The Bone*, 20: 343-348, 2006.
2. 名井陽、玉井宣行、荒木信人、藤井

昌一、富田哲也、古野雅彦、吉川秀樹：連通気孔構造を有するハイドロキシアパタイト人工骨の臨床応用、物理学的特性・臨床的特徴・問題点、*日整会誌*, 80:262-269, 2006.

3. 坪井秀規、吉川秀樹：関節リウマチにみられる骨粗鬆症の臨床病態、*Rheumatology*, 13: 22-25, 2006.
4. 向井克容、細野昇、坂浦博伸、藤原桂樹、富士武史、吉川秀樹：関節リウマチ中下位頷椎病変に対する椎弓形成術、*別冊整形外科*, 50:108-112, 2006.
5. Ando, W., Hashimoto, J., Nampei, A., Tsuboi, H., Tateishi, K., Ono, T., Nakamura, N., Ochi, T., Yoshikawa, H.: Imatinib mesylate inhibits osteoclastogenesis and joint destruction in rats with collagen-induced arthritis (CIA). *J Bone Miner Metabol*, 24:274-282, 2006.
6. Hirao, M., Tamai, N., Tsumaki, N., Yoshikawa, H., Myoui, A.: Oxygen tension regulates chondrocyte differentiation and function during endochondral ossification. *J Biol Chem*, 281:31079-31092, 2006.
7. Hirohata, S., Miura, Y., Tomita, T., Yoshikawa, H., Ochi, T., Chiorazzi, N.: Enhanced expression of mRNA for nuclear factor κ B1(p50) in CD34+ cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis. *Arthr Res Ther*, 8:R54, 2006.
8. Kaito, T., Mukai, Y., Nishikawa, M., Ando, W., Yoshikawa, H., Myoui, A.: Dual hydroxyapatite composite with porous and solid parts: Experimental study using canine lumbar interbody fusion model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 78:378-84, 2006.
9. Kawane, K., Ohtani, M., Miwa, K., Kizawa, T., Kanbara, Y., Yoshioka, Y., Yoshikawa, H., Nagata, S.: Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. *Nature*, 443:998-1002, 2006.
10. Kunugiza, Y., Tomita, T., Tomita, N., Morishita, R., Yoshikawa, H.: Inhibitory effect of ribbon-type NF κ B decoy oligodeoxynucleotides on osteoclast induction and activity in vitro and in vivo. *Arthr Res Ther* 8:R103, 2006.

11. Matsubara, T., Myoui, A., Ikeda, F., Yoshikawa, H., Yoneda, T.: Critical role of cortactin in actin ring formation and osteoclastic bone resorption. *J Bone Miner Metabol*, 24:368-372, 2006.
12. Nakase, T., Yoshikawa, H.: Potential roles of bone morphogenetic proteins (BMPs) in skeletal repair and regeneration. *J Bone Miner Metabol*, 24:425-433, 2006.
13. Okamoto, M., Murai, J., Yoshikawa, H., Tsumaki, N.: Bone morphogenetic proteins in bone stimulate osteoclasts and osteoblasts during bone development. *J Bone Miner Res*, 21:1022-33, 2006.
14. Sakaura, H., Hosono, N., Mukai, Y., Fujii, R., Yoshikawa, H.: Paraparesis due to exacerbation of preexisting spinal pseudoarthrosis following infliximab therapy for advanced ankylosing spondylitis. *Spine J*, 6:325-329, 2006.
15. Shi, K., Hayashida, K., Hashimoto, J., Sugamoto, K., Kawai, H., Yoshikawa, H.: Hydroxyapatite augmentation for bone atrophy in total ankle replacement in rheumatoid arthritis. *J Foot Ankle Surg*, 45:316-321, 2006.
16. Tomita, T., Kunugiza, Y., Tomita, N., Takano, H., Morishita, R., Kaneda, Y., Yoshikawa, H.: E2F decoy oligodeoxynucleotide ameliorates cartilage invasion by infiltrating synovium derived from rheumatoid arthritis. *Int J Molecul Med*, 18:257-265, 2006.

2. 学会発表

1. 第16回 Sapporo Orthopaedic Seminar (特別講演): 骨再生のための人工骨の開発と骨疾患治療への応用 (平成18年2月11日、札幌)
2. 第25回中部日本整形外科災害外科学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18年4月7日、大阪)
3. 鹿児島県整形外科教育研修会: 人工骨による骨再生: 基礎研究から臨床応用へ (平成18年4月15日、鹿児島)

島)

4. 三木・飯野メモリアルレクチャー、東北大学整形外科同窓会 (招待講演): 骨再生: 基礎研究から臨床応用へ (平成18年6月10日、仙台)
5. 第58回発生工学・疾患モデル研究会: 骨再生医療の現状と展望 (平成18年8月9日、東京)
6. 鳥取県西部医師会学術講演会: 骨粗鬆症治療への新しいアプローチ - 全身治療と局所治療 (平成18年9月7日、米子)
7. 第28回日本バイオマテリアル学会大会 (シンポジウム): 骨補填・再生材料の現状と展望 (平成18年11月27日、東京)
8. 骨粗鬆症フロンティア学術講演会: 骨粗鬆症治療の新しい治療戦略 - 全身治療と局所治療 (平成18年12月8日、札幌)

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) エムエムティー、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

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

関節リウマチにおけるヒアルロン酸の合成と分解に関する研究

分担研究者 宇月美和 岩手医科大学病理学第一講座 講師

研究要旨 ヒアルロン酸(HA)は分子量によって異なる機能を持つ。関節リウマチ(RA)患者の関節液中のHAは低分子化が進んでおり、関節組織でのHAの減少もみられる。本研究ではRA患者の関節内HAの低分子化の機序についてHA合成酵素とHA分解酵素の検討をおこなった。その結果、RA患者の関節ではHA分解酵素の産生や活性が亢進していることが明らかとなった。低分子量のHAは炎症や血管新生を亢進させるが、RAの関節炎の進行や持続には関節内のHA分解酵素によって分解された低分子HAの関与が示唆された。

A. 研究目的

ヒアルロン酸(HA)は二糖の繰り返しからなる多糖類で、分子量はオリゴ糖から数百万の高分子のものまで生体内には存在している。HAは従来の組織外マトリックスとしての機能のほかに、最近では、細胞の分化、成長、移動や接着をはじめ、CD44のリガンドなど多彩な機能が報告されている。HAは分子量によって細胞に及ぼす作用が異なっているという報告もあり、高分子HAではNF- κ Bなどを抑制し炎症や血管新生を抑制する作用が認められる一方で、低分子HAでは逆にサイトカインの上昇、炎症や血管新生を促進する。関節リウマチ(RA)患者の関節液中のHA濃度や分子量はいずれも健常者に比較して低値を示すが、本研究ではRA患者の滑膜組織におけるHA合成酵素(hyaluronic acid synthase: HAS-1, 2, 3)とHA分解酵素(hyaluronidase: Hyal-1, 2, 3)の分布や陽性細胞数を検討し、さらに関節液中のhyaluronidase酵素活性についてザイモグラフィにより定量化した。また、同一症例で関節液中のHA分子量やhyaluronidase活性、滑膜組織におけるHyalやHASの陽性細胞の発現や分布、および滑膜の炎症の程度との相関について検討した。

B. 研究方法

RA患者(46例)の手術時や関節内穿刺時に得られた関節液を用いて、HA分子量をGPC-MALLS(multi Angle Laser Light Scattering)法にて測定し、hyaluronidase活性についてはHA添加ゲルのnative-PAGEによるzymographyのバンドの吸光度を画像解析装置で測定し、酵素活性として定量化した。さらに滑膜の採取も可能であった症例については滑膜におけるHAS-1, 2, 3およびHyal-1, 2, 3のmRNAおよび蛋白の分布を*in situ* hybridizationと免疫組織化学にて検討し、陽性細胞数を症例間で比較検討した。また、関節液と滑膜での結果を同一症例で比較した。

C. 研究結果

高分子HAを産生するHAS-1, 2は滑膜表層細胞で陽性となり、

低分子HAを産生するHAS-3は滑膜細胞の他に炎症性細胞で陽性になっていた。Hyal-1についてはいずれも滑膜表層細胞で陽性であった。症例間で比較すると、RAで炎症が高度な滑膜では、低分子HAを産生するHAS-3およびHyal-3が増加し、高分子HAを産生するHAS-1, 2は減少していた。炎症の軽度な症例ではその逆の傾向を示していた。HAS-3やHyal-3の陽性細胞数は滑膜の炎症の程度と相関していた。また、RA患者の関節液中にはhyaluronidaseの酵素活性を認め、関節液中のHA分子量はhyaluronidase活性の高い症例で低下している傾向が見られ、負の相関を示した。同一症例での滑膜におけるHyal-3陽性細胞数と関節液中のhyaluronidase活性には正の相関が見られた。また、滑膜中のHAS-3やHyal-3の陽性細胞数と関節液中のHA分子量は負の相関を示していた。

D. 考察

滑膜から産生されるHAの分子量についてHAS-1, 2, 3のそれぞれの陽性細胞との関係に注目すると、RAの炎症性の滑膜組織においてはHAS-3による低分子HAの合成が亢進しているが、HAS-1, 2による高分子HAは低下が起こっている。また、hyaluronidaseについても炎症の高度なRA患者の関節では滑膜細胞からの産生量が亢進し、関節液内での酵素活性も亢進している。これらのことより、RA患者の関節においては低分子HAが優位となることによって関節液の粘弾性が低下し、関節に物理的障害をもたらすとともに、炎症性細胞の遊走や血管新生、サイトカインの活性化などにより関節炎そのものの持続にも影響を与えるものと考えられる。

E. 結論

RAの炎症性滑膜では高分子HAを合成するHAS-1, 2が減少する一方で、低分子HAを合成するHAS-3とHAを分解するHyal-3が増加しており、その結果HAの低分子化がなされていると思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Rosenthal AK, Gohr CM, Uzuki M, Masuda I: Osteopontin promotes pathologic mineralization in articular cartilage. *Matrix Biol.* (2006), in press

Yoshimura F, Kanno H, Uzuki M, Tajima K, Shimamura T and Sawai T: Downregulation of inhibitor of apoptosis proteins in apoptotic human chondrocytes treated with tumor necrosis factor- α and actinomycin D. *Osteoarthritis Cartilage.* 14: 435-441(2006).

Uzuki M, Otsuka K, Akiyama Y, Ohtsu T, Guy CD and Sawai T: A case of vermiform appendix tumor. *J Iwate Med Assoc.* 58: 151-153 (2006).

Watanabe T, Sato A, Sawai T, Uzuki M, Goto H, Yamashita H, Akamatsu D, Sato H, Shimizu T, Miyama N, Nakano Y, Satomi S: The elevated level of circulating matrix metalloproteinase-9 in patients with abdominal aortic aneurysms decreased to levels equal to those of healthy controls after an aortic repair. *Ann Vasc Surg.* 20:317-321 (2006).

Matsushita I, Uzuki M, Matsuno H, Sugiyama E, Kimura T: Rheumatoid nodulosis during methotrexate therapy in a patient with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 16(6): 401-403(2006)

宇月美和、徳永勢二、佐藤克己、澤井高志：関節病変の病理。 *臨床リウマチ* 18: 103-113 (2006)。

宇月美和、徳永勢二、貝山 潤、鎌滝章央、澤井高志：関節リウマチにおける軟骨破壊とヒアルロン酸代謝。 *リウマチ科*. 35: 578-585 (2006)。

貝山 潤、宇月美和：変形性膝関節症における関節液のヒアルロン酸とその性状の変化。 *岩手医誌*. 58(1): 9-21(2006)

2. 学会発表

宇月美和、徳永勢二、鎌滝章央、澤井高志：関節組織におけるヒアルロン酸合成酵素と分解酵素の発現。(第50回日本リウマチ学会総会・学術集会 4月23-26日、長崎)

徳永勢二、宇月美和、鎌滝章央、嶋村 正、澤井高志：関節リウマチ患者の滑膜組織におけるヒアルロン酸分解酵素(Hyal-1, 2, 3)の発現と分布について。(第50回日本リウマチ学会総会・学術集会 4月23-26日、長崎)

吉村文孝、菅野祐幸、宇月美和、大内直久、田島克己、嶋村 正、澤井高志：Tumor necrosis factor alpha (TNF- α)とアクチノマイシンDの併用はヒト軟骨細胞においてinhibitor of apoptosis proteins (IAPs)をdownregulationしてアポトーシスを誘導する。(第50回日本リウマチ学会総会・学術集会 4月23-26日、長崎)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

関節リウマチにおける骨粗鬆化の病態解明と重症化防止治療法の開発

分担研究者 吉川 秀樹

所属機関名・職名 大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学（整形外科）・教授

研究要旨

関節リウマチの骨粗鬆化に深く関与する Nurse 細胞の起源や局在を明らかにし、その病態解析を行った。ヒト RA 滑膜中に存在する RA-Nurse 細胞は、RA 病態特異的な液性因子を産生分泌し、関節炎の発症、増悪に関与していることが示された。RA 患者の関節近傍嚢胞性骨病変に対して、人工骨移植術を施行し、臨床的有用性を示した。関節リウマチの重症化を予測し、正確な予後診断を可能とするため、血中 C1q 値の新規定量システムの開発に成功した。

A. 研究目的

関節リウマチ（RA）では、関節滑膜や骨髄中に存在する間質系細胞（Nurse 細胞）が骨破壊病態に強く関与していることが示されている。本研究では、ヒト滑膜組織やヒト骨髄組織における、Nurse 細胞の起源、局在、機能を明らかにし、その病態解明を行う。また、連通多孔体人工骨を用い、RA 患者の脆弱化した骨の再生と骨粗鬆症の重症化防止を試みる。さらに、関節リウマチの重症化を予測し正確な予後診断を可能とするため、血中 C1q 値の新規定量システムの開発を試みる。

B. 方法

1) Nurse 細胞の起源の可能性として、まず組織球を候補と考え、そのマーカーである CD68（KP1 或いは PGM1）抗体などの関連モノクロー抗体を用いて、ヒト関節滑膜、骨髄に対し免疫組織染色を行った。さらに関節リウマチの重症化予測因子としての C1q と Nurse 細胞の関連を検討するため免疫組織染色を行った。

2) RA-Nurse 細胞、OA 培養細胞、外傷患者培養細胞と B 細胞をそれぞれ 2 日間共培養し、培養上清（3 群；RA-sup、OA-sup、外傷-sup）を RA-Nurse 細胞、OA 培養細胞、外傷培養細胞それぞれに添加した。2 日間の

培養後に各細胞より RNA 抽出 cDNA 合成し、リアルタイム PCR アレイを用いて発現遺伝子の解析を行った。

3) 関節近傍嚢胞性骨病変を有するリウマチ患者 12 例に対し、病巣搔爬と人工骨充填を行った。

4) 血中 C1q 値の高感度測定系の開発のため、新規モノクロー抗体の作製を行った。

C. 結果

1) RA 患者の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。骨髄では、CD68 陽性細胞が、洞血管内皮近傍に存在することが示された。C1q の発現は、滑膜細胞全体に弱陽性、多くの組織球に陽性であった。

2) RA-Nurse 細胞では、RA-sup 添加によってのみ IL-1、MMPs、CD44、SMAD4 などの遺伝子発現の上昇がみられた。OA 培養細胞、外傷培養細胞では、RA-sup 添加にてもこれらの遺伝子の発現は認められなかった。

3) 12 例中 11 例で、術後 3-6 ヶ月で良好な骨再生を認め人工骨の有用性が示された。

4) モノクローナル抗体を用いて血中 C1q 値を測定した結果、患者血清で測定可能であること、測定値と RA 重症度との相関を認めた。

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。また滑膜組織でのC1q発現細胞を確認した。RA培養上清のみがRA-Nurse細胞で特異的に、CD44、IL-1 \cdot 、MMPs、SMAD4などの炎症関連遺伝子を誘導することから、RA-Nurse細胞とB細胞との共培養によりRA特異的な液性因子が培養上清中に存在することが示唆された。さらに、これらRA特異的な液性因子に対して、RA-Nurse細胞のみが反応しうるしくみを持っていることが示されたことから、RA Nurse細胞は、autocrineまたはparacrineにより、これら液性因子を介して、RAの関節破壊に機能的に関与していることが考えられた。RA病変への人工骨移植は、病巣の除去と骨再生の両面の効果があり臨床経過は良好であり、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。

E. 結論

RA滑膜、骨髄に存在するRA-Nurse細胞は、RA病態特異的な液性因子を産生分泌し、関節炎の発症、憎悪に関与していることが示された。RA患者の関節近傍嚢胞性骨病変に対する人工骨移植術は臨床的に有用であり、関節リウマチ・骨粗鬆症の重症化防止の新規治療法として期待できる。モノクローナル抗体を用いたC1q値の測定は、RA重症化の予測に有用である。

(倫理面への配慮)

患者本人への組織学的検討の意義と有用性について十分なインフォームドコンセントを得ている。人工骨移植による骨移植は、厚生労働省の認可を受けており、保険診療として行っており、倫理的問題はないと考える。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 妻木範行、村井純子、岩井貴男、岡本美奈、吉川秀樹：BMPシグナルと骨形成・骨吸収、*The Bone*, 20: 343-348, 2006.
2. 名井陽、玉井宣行、荒木信人、藤井

昌一、富田哲也、古野雅彦、吉川秀樹：連通気孔構造を有するハイドロキシアパタイト人工骨の臨床応用、物理学的特性・臨床的特徴・問題点、*日整会誌*, 80:262-269, 2006.

3. 坪井秀規、吉川秀樹：関節リウマチにみられる骨粗鬆症の臨床病態、*Rheumatology*, 13: 22-25, 2006.

4. 向井克容、細野昇、坂浦博伸、藤原桂樹、富士武史、吉川秀樹：関節リウマチ中下位頰椎病変に対する椎弓形成術、*別冊整形外科*, 50:108-112, 2006.

5. Ando, W., Hashimoto, J., Nampei, A., Tsuboi, H., Tateishi, K., Ono, T., Nakamura, N., Ochi, T., Yoshikawa, H.: Imatinib mesylate inhibits osteoclastogenesis and joint destruction in rats with collagen-induced arthritis (CIA). *J Bone Miner Metabol*, 24:274-282, 2006.

6. Hirao, M., Tamai, N., Tsumaki, N., Yoshikawa, H., Myoui, A.: Oxygen tension regulates chondrocyte differentiation and function during endochondral ossification. *J Biol Chem*, 281:31079-31092, 2006.

7. Hirohata, S., Miura, Y., Tomita, T., Yoshikawa, H., Ochi, T., Chiorazzi, N.: Enhanced expression of mRNA for nuclear factor κ B1(p50) in CD34+ cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis. *Arthr Res Ther*, 8:R54, 2006.

8. Kaito, T., Mukai, Y., Nishikawa, M., Ando, W., Yoshikawa, H., Myoui, A.: Dual hydroxyapatite composite with porous and solid parts: Experimental study using canine lumbar interbody fusion model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 78:378-84, 2006

9. Kawane, K., Ohtani, M., Miwa, K., Kizawa, T., Kanbara, Y., Yoshioka, Y., Yoshikawa, H., Nagata, S.: Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. *Nature*, 443:998-1002, 2006.

10. Kunugiza, Y., Tomita, T., Tomita, N., Morishita, R., Yoshikawa, H.: Inhibitory effect of ribbon-type NF κ B decoy oligodeoxynucleotides on osteoclast induction and activity in vitro and in vivo. *Arthr Res Ther* 8:R103, 2006.

11. Matsubara, T., Myoui, A., Ikeda, F., Yoshikawa, H., Yoneda, T.: Critical role of cortactin in actin ring formation and osteoclastic bone resorption. *J Bone Miner Metabol*, 24:368-372, 2006.
12. Nakase, T., Yoshikawa, H.: Potential roles of bone morphogenetic proteins (BMPs) in skeletal repair and regeneration. *J Bone Miner Metabol*, 24:425-433, 2006.
13. Okamoto, M., Murai, J., Yoshikawa, H., Tsumaki, N.: Bone morphogenetic proteins in bone stimulate osteoclasts and osteoblasts during bone development. *J Bone Miner Res*, 21:1022-33, 2006.
14. Sakaura, H., Hosono, N., Mukai, Y., Fujii, R., Yoshikawa, H.: Paraparesis due to exacerbation of preexisting spinal pseudoarthrosis following infliximab therapy for advanced ankylosing spondylitis. *Spine J*, 6:325-329, 2006.
15. Shi, K., Hayashida, K., Hashimoto, J., Sugamoto, K., Kawai, H., Yoshikawa, H.: Hydroxyapatite augmentation for bone atrophy in total ankle replacement in rheumatoid arthritis. *J Foot Ankle Surg*, 45:316-321, 2006.
16. Tomita, T., Kunugiza, Y., Tomita, N., Takano, H., Morishita, R., Kaneda, Y., Yoshikawa, H.: E2F decoy oligodeoxynucleotide ameliorates cartilage invasion by infiltrating synovium derived from rheumatoid arthritis. *Int J Molecul Med*, 18:257-265, 2006.

2. 学会発表

1. 第16回 Sapporo Orthopaedic Seminar (特別講演): 骨再生のための人工骨の開発と骨疾患治療への応用 (平成18年2月11日、札幌)
2. 第25回中部日本整形外科災害外科学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18年4月7日、大阪)
3. 鹿児島県整形外科教育研修会: 人工骨による骨再生: 基礎研究から臨床応用へ (平成18年4月15日、鹿児島)

島)

4. 三木・飯野メモリアルレクチャー、東北大学整形外科同窓会 (招待講演): 骨再生: 基礎研究から臨床応用へ (平成18年6月10日、仙台)
5. 第58回発生工学・疾患モデル研究会: 骨再生医療の現状と展望 (平成18年8月9日、東京)
6. 鳥取県西部医師会学術講演会: 骨粗鬆症治療への新しいアプローチ - 全身治療と局所治療 (平成18年9月7日、米子)
7. 第28回日本バイオマテリアル学会大会 (シンポジウム): 骨補填・再生材料の現状と展望 (平成18年11月27日、東京)
8. 骨粗鬆症フロンティア学術講演会: 骨粗鬆症治療の新しい治療戦略 - 全身治療と局所治療 (平成18年12月8日、札幌)

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) エムエムティイー、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

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。このために第2エクソンの上流及び下流にlox71とloxPを配置した相同組換え用のベクターをデザインした。これにより、条件的遺伝子破壊や変異遺伝子の挿入が可能となった。

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は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、Mmp12の第1エクソンのATGの上流及び下流の配列を挿入する予定であった。しかし、第1エクソン付近にlox71のような配列が挿入されると、それだけで転写が阻害されることもあるとの情報を得たこと、もう少し汎用性のあるベクターの構築を企図したため、デザインを変更した。その結果、構造としては、「5' arm (第1イントロンの配列) -lox71-第2エクソン-逆向きのPGK-neo-loxP-3' arm (第2イントロンから第5イントロンの一部まで) -逆向きのtk-DT-AJ」となった。これにより、第2エクソンを条件的に欠失させることもでき、また、lox71とloxPの間に変異遺伝子を挿入できる。昨年度考案したベクターでは、2段階目に置換用ベクターを用いて、遺伝子を挿入しなければ条件的破壊ができなかったが、この新しいベクターではそれが不要になった。
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

免疫アレルギー疾患の病因・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ェ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

ヒト疾患を忠実に反映するモデルマウスの作製は重要で、これにより始めて病因・病態解析が可能で、それに立脚した新しい治療法の開発を目指すことが求められる。

F. なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 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.
 - (2) 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 · 1 leads to post-implantation lethality. *Biochem Biophys Res Commun.* 341: 132-138, 2006.
 - (3) 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: J. Genet. Dev.* 44(2):57-65, 2006.
 - (4) 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* 33: 104-106, 2006.
 - (5) Reifenberg, K., Hildt, E., Lecher, B., Wiese, E., Nusser, P., Ott, S., Yamamura, K., Rutter, G. and Loehler, J. IFN · expression inhibits LHBs storage disease and ground glass hepatocyte appearance, but exacerbates inflammation and apoptosis in HBV surface proteinaccumulating transgenic livers. *Liver International* 26: 986-993, 2006.
 - (6) Kanakubo, S., Nomura, T., Yamamura, K., Miyazaki, J., Tamai, M. and Osumi, N. Abnormal migration and distribution of neural crest cells in Pax6 heterozygous mutant eye, a model for human eye diseases. *Genes to Cells.* 11(8):919-33, 2006.
 - (7) Araki, K., Araki, M. and Yamamura, K. Negative Selection with the Diphtheria toxin A fragment Gene Improves Frequency of Cre-Mediated Cassette Exchange in ES Cells. *J. Biochem.* 140, 793-798, 2006.
- ##### 2. 学会発表
- (1) 山村研一：MSM/Ms由来のES細胞の樹立とノックアウトプロジェクト，第20回モノシヌス研究会，2006.6.15-16，熱海
 - (2) 山村研一：ポストゲノムにおける疾患モデルの意義，第3回日本病理学会カンファレンス日本病理学会カンファレンス2006東京，2006.8.3-4，東京
 - (3) 山村研一：大規模ノックアウトマウスプロジェクトとその特許，関西実験動物研究会第91回研究会，2006.9.8，京都
 - (4) 山村研一，広田昌彦，馬場秀夫：Spink3欠損マウスの膵腺房細胞におけるオートファジー細胞死，第65回日本癌学会学術総会，2006.9-28-30，横浜
 - (5) 山村研一：MSM/Msマウスとノックアウトプロジェクト，京都大学再生医科学研究所平成18年学術講演会，2006.10.11，京都
 - (6) 山村研一：優性遺伝病マウスモデルおよび大規模疾患モデル開発，日本人類遺伝学会第51回大会 2006.10.17-20，米子
 - (7) Ken-ichi Yamamura: Gene-environment Interactions in Mammalian Development and Disease, The 22nd International Kumamoto Medical Bioscience Symposium, 2006. 10.23-24, Kumamoto

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

RANKL 依存性破骨細胞分化における下流分子に関する研究

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。ヒト CD14 陽性細胞を RANKL およびマクロファージコロニー刺激因子で刺激することによって破骨細胞様多核細胞が形成されるが、このときに発現が変化する遺伝子として Rab13 を同定した。

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。鈴木・越智らはヒト末梢血 CD14 陽性細胞を RANKL および M-CSF で刺激することによって破骨細胞様多核細胞が形成されることを明らかにしている。本研究ではこのときに発現が変動する遺伝子について、詳細な解析を行った。

B. 研究方法

あらかじめ文書によって同意を得られた RA 患者から末梢血を約 20 ml 採取し、末梢血中の CD14 陽性細胞をマグネットビーズに結合した抗体を用いて精製する。このようにして得られた CD14 陽性細胞を、マース細胞様の活性を持つ RA 骨髄ストローマ細胞と共存培養することによって破骨細胞へと分化させる。また一方で CD14 陽性細胞を可溶性 RANKL (sRANKL) およびマクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) の存在下で培養することによって RANKL 依存性に分化した破骨細胞を得ることが可能である。このように2つの異なった過程で得られた破骨細胞の差違を分子レベルで明らかにするために、破骨細胞分化の様々なステ

ージにおいて mRNA を採取し、発現遺伝子を gene chip を用いて解析する。得られた遺伝子について、実際の破骨細胞分化過程での発現変化を real time PCR によって検討した。また破骨細胞分化に対する作用を in vitro 培養系を用いて詳細に解析した。

(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

ヒト CD14 陽性細胞は RANKL, M-CSF の存在下で破骨細胞様多核細胞へ分化する。このとき発現の変動する遺伝子についてトランスクリプトーム解析を行ったところ、2倍以上に上昇する遺伝子 273、1/2以下に低下する遺伝子 168 が同定された。このうち Sepp1, Legumain, Dpp4, Decysin, Rab13 について、発現の変動を real time PCR によって確認したところ、Rab13 において刺激日数に依存して発現の上昇が認められた。Rab13 をレトロウイルスベクターを用いて破骨細胞前駆細胞に導入したところ、破骨細胞分化の促進が認められた。

D. 考察

破骨細胞はRAの骨破壊において中心的な役割を果たすことが知られている。RAにおける破

骨細胞分化過程にはRANKL依存性の過程と非依存性の過程が存在することが明らかになっているが、その分子メカニズムの差については明らかになっていない。本研究においてわれわれは鈴木らとの共同研究でRANKL依存性に発現変化が見られる遺伝子の解析を行った。ヒト破骨細胞形成系においてDNA microarrayによって発現が変化する遺伝子のうち、Rab13はマウス破骨細胞形成系においてもヒトと同様の挙動を示し、その過剰発現によって破骨細胞分化が促進することから、ヒト・マウス破骨細胞分化に共通して重要な遺伝子である可能性が示唆された。Rabファミリーは細胞内の膜輸送に重要な役割を果たすことが知られており、以上の結果はRANKL依存性の破骨細胞分化において、Rab13を介した細胞内膜輸送が重要な役割を果たす可能性を示唆する。今後 dominant negative Rab13の導入、Rab13 RNAiの導入が破骨細胞分化に及ぼす影響を明らかにすることによって、RANKL依存性破骨細胞分化におけるRab13の役割をさらに詳細に明らかにする予定である。

E. 結論

Rab13 は RANKL 依存性の破骨細胞形成において重要な遺伝子である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

英文原著・総説

1. Fukui N, Ikeda Y, Ohnuki T, Hikita A, Tanaka S, Yamane S, Suzuki R, Sandell JL, Ochi T. Pro-inflammatory cytokine TNF- α induces BMP-2 in chondrocytes via mRNA stabilization and transcriptional up-regulation. *J Biol. Chem* 2006 Jul 11; [Epub ahead of print]
2. Hikita A, Yana I, Wakeyama H, Nakamura M, Kadono Y, Oshima Y, Nakamura K, Seiki M, Tanaka S. Negative Regulation of Osteoclastogenesis by Ectodomain Shedding of Receptor Activator of NF- κ B Ligand. *J Biol. Chem* 2006 Oct 3; [Epub ahead of print]
3. Sato K, Suematsu A, Okamoto K,

Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, Tanaka S, Kodama T, Akira S, Iwakura Y, Cua DJ, Takayanagi H. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 2006, 203:2673-2682.

4. Sawada Y, Tamada M, Dubin-Thaler BJ, Cherniavskaya O, Sakai R, Tanaka S, Sheetz MP. Force Sensing by Mechanical Extension of the Src Family Kinase Substrate p130Cas. *Cell*. 2006, 127:1015-26.
5. 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* 2006, 52: 19-23.
6. Ogata T, Yamamoto S, Nakamura K and Tanaka S. Signaling Axis in Proliferation and Differentiation of Schwann Cell. *Mol Neurobiol*. 2006, 33:51-62.
7. Miyazaki T, Tanaka S, Sanjay A, Baron R. The role of c-Src kinase in the regulation of osteoclast function. *Mod Rheumatol* 2006, 16:68-74.
8. Tanaka S, Miyazaki T, Fukuda A, Akiyama T, Kadono Y, Wakeyama H, Kono S, Hoshikawa S, Nakamura M, Oshima Y, Hikita A, Nakamura K. Molecular mechanism of the life and death of the osteoclast. *Ann N Y Acad Sci* 2006, 1068:180-186..
9. Miyazaki T, Yamamoto S, Tanaka S. Molecular mechanism of bone destruction in rheumatoid arthritis. *Future Rheumatology* 2007, 2:61-72.
10. Yang CS, Lee JS, Song CH, Hur GM, Lee SJ, Tanaka S, Akira S, Paik TH, Jo EK. Protein kinase C zeta plays an essential role for Mycobacterium tuberculosis-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in monocytes/macrophages via Toll-like receptor 2. *Cell Microbiol*. 2007, 9:382-396.
11. Kono SJ, Oshima Y, Hoshi K, Bonewald

LF, Oda H, Nakamura K, Kawaguchi H, Tanaka S. Erk pathways negatively regulate matrix mineralization. Bone. 2007, 40:68-74.

12. Suematsu A, Tajiri Y, Nakashima T, Taka J, Ochi S, Oda H, Nakamura K, Tanaka S, Takayanagi H. Scientific basis for the efficacy of combined use of antirheumatic drugs against bone destruction in rheumatoid arthritis. Mod Rheumatol 2007, 17:17-23.

和文原著・総説

1. 永瀬雄一、田中 栄「代謝性骨疾患 その他 大理石骨病」別冊日本臨床「内分泌症候群(第2版)」pp152-155, 2006.
2. 緒方徹、山本真一、中村耕三、田中 栄「シユワン細胞の分化と細胞内シグナル系」生体の科学 57:219-223, 2006.
3. 宮崎 剛、田中 栄「関節リウマチと破骨細胞」炎症と免疫 14:632-638, 2006
4. 田中 栄「関節炎における免疫学と骨代謝学の接点」ホルモンと臨床 54:779-782, 2006
5. 金子雅子、泉亮良、原慶宏、田中栄、中村耕三「手術治療により発作頻度が著明に減少した多発巨大痛風結節の1例」関東整形災害外科学会誌 37:261-266, 2006
6. 田中 栄「関節炎における免疫学と骨代謝学の接点」ホルモンと臨床 54:779-782, 2006

国際会議招待講演

1. 1st International conference on osteoimmunology: Interactions of the immune and skeletal systems (2006.5.28-6.2) Crete, Greek, Session I. Transcription factors and signals for the osteoimmune system: Part 1 "Regulation of ectodomain shedding of RANKL"
2. 2006 International Symposium of Dental Research Institute, Seoul National University (2006.9.29) Session I: Bone Biology "Regulation of chondrogenic differentiation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis"
3. 3rd IOF ASIA-PACIFIC REGIONAL

CONFERENCE ON OSTEOPOROSIS AND 16th ANNUAL MEETING OF THE ANZ BONE & MINERAL SOCIETY (2006.10.23-26) Workshop B. Inter and intracellular signaling "Signals in Life and Death of the Osteoclast"

4. 第4回抗サイトカイン療法研究会 (2006.4.15) 岐阜「関節リウマチにおける骨破壊メカニズムと治療戦略」
5. 第79回日本整形外科学会学術集会 (2006.5.18-21) 横浜 シンポジウム2 関節リウマチの診断と治療の新展開 「関節リウマチにおける関節破壊の分子メカニズム」
6. 佐賀県臨床整形外科医会(2006.6.8) 佐賀 特別講演「骨吸収抑制剤を用いた骨粗鬆症の治療体系」
7. 日本医師会生涯教育講座(2006.6.15) 骨粗鬆症をめぐる最近の話題「新しい骨粗鬆症治療薬とその作用機序」
8. 第29回 日本骨・関節感染症学会 (2006.6.17) 東京 主題1 人工関節感染の予防と対策 「可動型セメントスペーサーを用いた感染人工膝関節の二期的再置換術」
9. 第24回 日本骨代謝学会学術集会 (2006.7.6-8) 東京 シンポジウム3 免疫と骨代謝の接点:基礎から臨床へ 「Therapeutics modulating osteoclast biology- 抗 RANKL 療法などによる新展開 -」
10. 第32回 リウマチ中央教育研修会 (2006.7.22) 東京「関節リウマチの骨・軟骨破壊」
11. 運動器疾患/骨・関節フォーラム (2006.8.5) 岡山 講演2「骨折予防の観点に基づく最新の骨粗鬆症治療方針」
12. Bone & Joint Research Club~第3回 骨と関節の代謝調節を考える基礎の会~ (2006.9.30-10.1) かづさ 特別セッション:【基礎から臨床応用】「破骨細胞をターゲットにした関節リウマチ治療戦略」
13. 整形外科疾患学術講演会(2006.10.4) 川崎 「関節リウマチにおける骨破壊メカニズム」
14. 第107回 中部日本整形外科災害外科・学術集会(2006.10.7) うずしおセミナー 5 「骨関節破壊を標的にした関節リウマチ治療戦略」

15. 第16回 日本小児リウマチ学会総会・学術集会(2006.10.8) ランチョンセミナー2 「骨関節破壊を標的にした関節リウマチ治療戦略」
 16. 港区医師会外科整形外科医会 学術講演会(2006.10.11) 特別講演 「骨吸収抑制剤による骨粗鬆症治療」
 17. 骨粗鬆症学術講演会 (2006.10.31)町田 「骨吸収抑制剤を用いた骨粗鬆症の治療」
 18. 平成18年度 リウマチ・アレルギー相談員養成研修会(2006.11.9)新宿 「リウマチ外科治療・リハビリ」
 19. 東京大学生命科学研究ネットワークシンポジウム(2006.11.25)東京「破骨細胞アポトーシス制御の分子メカニズム」
 20. 第27回 日本臨床薬理学会年会(2006.12.1)東京 シンポジウム12 炎症制御における分子標的療法「RANKLをターゲットにした骨関節疾患治療戦略」
 21. 第6回 日本整形外科学会リウマチ認定医研修会(2006.12.3)東京「RAの最新研究」
 22. 第17回 日本リウマチ学会関東支部学術集会 (2006.12.7)東京 ヌーンタイムレクチャー2 「関節リウマチにおける骨破壊メカニズム」
 23. 臨床骨代謝フォーラム(2007.1.27)大宮 「骨形成とビスフォスフォネート製剤」
 24. 昭和大学セミナー (2007.2.6) 東京 「Bcl-2 ファミリーの骨組織における役割」
- 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
特になし

厚生労働科学研究費補助金
「関節リウマチ・骨粗鬆症の重症化防止治療開発研究」班
分担研究報告書

RAに対する脂肪細胞分泌因子（アディポネクチン）の抗炎症・骨吸収抑制作用検討と
治療薬開発に関する研究

分担研究者 前田和久 大阪大学内分泌代謝内科学教室 助手

研究要旨

脂肪組織分泌因子であるアディポネクチンは、in vivoでは関節炎モデルマウスに過剰発現させると関節炎の発症が抑制され、in vitroでは破骨細胞の増殖・分化・貪食能が抑制された。アディポネクチンはRAとそれに伴う骨粗鬆症の治療に有用となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

脂肪組織分泌因子であるアディポネクチンはマクロファージや血管内皮に対して抗炎症作用を有することが報告されている。我々はH16年度の研究にてアディポネクチンが破骨細胞に作用して骨吸収を抑制することを報告した。本研究の目的はRAとそれに伴う骨粗鬆症に対して、アディポネクチンによる重症化防止治療薬開発を進めることである。

B. 研究方法

- ①RAモデルマウスに対してアデノウイルスを用いて肝臓でアディポネクチンを過剰発現させ、抗炎症・骨吸収抑制作用を検討した。
- ②RA患者の血清よりCD14陽性単球を分離し、RA患者膝関節滑膜組織より採取した繊維芽細胞（ナース細胞）と共培養を行い、前駆破骨細胞を誘導した。その後、GM-CSFを添加してRA特異的成熟破骨細胞を誘導した。前駆破骨細胞の増殖時、GM-CSF添加後の成熟破骨細胞への分化時および象牙プレート上での成熟破骨細胞培養時にリコンビナントアディポネクチンを投与して、増殖・分化・貪食能に対する効果を検討した。

C. 研究結果

- ①コラーゲン誘導性関節炎モデルマウスにアディポネクチンを過剰発現させると関節炎の発症及び重症化が抑制された。また、関節炎に伴う傍関節の骨吸収も抑制された。
- ②生理的濃度のリコンビナントアディポネクチンは、RA特異的破骨細胞の増殖・分化・貪食能を有意に抑制した。

D. 考察

RAの病態に骨髄の脂肪化などがあり、今回の結果より脂肪細胞分泌因子であるアディポネクチンがRAとそれに伴う骨粗鬆症の病態に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

アディポネクチンはin vivoではマウス関節炎の発症抑制効果を、in vitroではRA特異的破骨細胞の増殖・分化・貪食能の抑制効果を認めた。以上の結果より脂肪細胞分泌因子であるアディポネクチンはRAとそれに伴う骨粗鬆症に対して有効な治療薬となり得る可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ①Adiponectin 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
B. B. R. C. 331 (2005) 520-526
- ②The effects of visceral fat accumulation by diabetes mellitus on bone metabolism
K. Oshima, I. Shimomura, H. Iwahashi
Clin Calcium (2006) volume16, issue8, page72-82

2. 学会発表

- ①ADIPONECTIN INCREASES BONE MASS IN MICE BY SUPPRESSING OSTEOCLASTOGENESIS AND ACTIVATING OSTEOBLASTOGENESIS
K. Oshima, I. Shimomura, H. Yoshikawa, J. Hashimoto, A. Fukuhara, M. Iwaki, M. Matsuda, A. Nampei
The 2nd Joint Meeting of the European Calcified Tissue Society and the International Bone and Mineral Society
(Young Investigator Award)

C) RA骨髓細胞由来病因遺伝子解明と治療法開発研究

「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：RA 病態解析の主任研究者の研究から導き出された「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、RA 病態形成に関わる細胞群の詳細な検討が行なわれてきた。本研究は、RA 特異的病態に関わる病因遺伝子を探索し、その生物学的評価を行うことにある。今回、主たる RA 遺伝子探索は、RA および OA(変形性関節症)患者の骨髄液を用いて行なわれ、夫々に特異的に発現している遺伝子群について GeneChip による網羅的解析を行なった。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。この解析結果から 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。また、RA に特徴的に存在する Nurse-like cell と線維芽細胞を用いた遺伝子発現を subtraction 法にて行い、nurse 機能を有する細胞に選択的に発現している遺伝子の選択を行った。さらに、近年、マクロファージの多核化(破骨細胞)、樹状細胞の機能的成熟、T 細胞の活性化に関与すると報告がある糖蛋白質 Scr homology 2-domain containing protein tyrosine phosphatase substrate 1(SHPS-1)の RA おける関与を併せて検討した

以上から、RA 骨髄液を用いた GeneChip による網羅的遺伝子解析、Nurse 細胞と非 Nurse 細胞を用いた subtraction から、RA 病態形成に関与する候補遺伝子の抽出に成功した。さらに、SHPS-1 の RA における関与一端をマウス CIA モデル系で評価した。

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、今後の治療法を考慮し、細胞膜上に存在するか、もしくは分泌蛋白であることを基準として選択した。また、RA に関連する候補遺伝子は、subtraction 法も併用した。さらに、抗マウス SHPS-1 モノクロー抗体を用いた CIA モデルにおける効果確認から、SHPS-1 分子に注目した。以上のような探索・評価系により、RA 病態形成と維持に関与が示唆される遺伝子の探索を目的とした。

B. 研究方法

1) GeneChip による網羅的解析：

RA および OA 患者骨髄液は 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 例ずつ採取されたサンプルを用いた GeneChip は 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。目的とする解析は、群間比較検定、フィルタリング、クラスタリング解析を行い、抽出遺伝子の特徴解析として、FoldChange 解析、GeneOntology 解析、Pathway 解析を行ない、さらに、GSEA(GeneSet Enrichment Analysis) 解析を行い。最終的には、膜状に存在する、もしくは分泌蛋白であるという基準で遺伝子の探索を行った。

2) Subtraction による探索：

Nurse 細胞株と非 Nurse 細胞(間葉系細胞株、上皮細胞株)間で subtraction を行い最も Nurse 細胞に特徴的に発現が観察された遺伝子の抽出を行った。

最も Nurse 細胞に特徴的に発現が観察された遺伝子の抽出を行った。

3) SHPS-1 の選択 :

抗マウス SHPS-1 モノクロー抗体を入手し、マウス CIA モデルでの効果を検討した。本抗体は、*in vitro* で、マウス破骨細胞形成、サイトカイン産生、*in vivo* で CIA モデルに対する効果を検討した。

(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。本研究に使用したマウスは、動物愛護の精神に基づき適正に使用した

C. 研究結果

1. RA および OA 患者骨髄液を使用した GeneChip 解析結果を観ると、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 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。LIGHT/TNFSF14:破骨細胞形成誘導能を有しており、今回の我々の検討から、RA 滑膜増殖に EGF と同程度の活性を有する事を見出した。以上、RA 患者で発現強度の高い遺伝子が抽出され、本系のデータベースとして信頼度が極めて高い事が分り、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。さらに、RA に関する既報は無いが、炎症時に mesenchymal cell の増殖を調整する granulins が抽出された。Granulins 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 であり、RA 病態で始めて見出した。Granulins 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。

2. Subtraction により、Nurse 細胞に選

択的に発現が確認された遺伝子として、hu-sulf-1 を抽出した。本分子の機能は不明な点が多いが、最近、腫瘍増殖を抑制するという報告があり、RA 滑膜の増殖を調整している可能性はある。

3. CD47 のリガンドで有り、レセプターとして作用する SHPS-1 については、*in vitro* で破骨細胞形成抑制効果、Th1 型サイトカインの選択的産生抑制が確認され、*in vivo* におけるマウス CIA モデルにおいて、関節炎発症・炎症スコアの予防的・治療的効果が確認された。

以上の、研究結果から、RA に関連する分子として、granulins、LIGHT/TNFSF14、hu-sulf-1、SHPS-1 の 4 分子を最終的に候補標的分子とした。

D. 考察

RA において、今回、GeneChip、subtraction、抗体を用いた RA 関連候補標的分子の探索を行い、RA 罹患部における病態特異性を説明可能な分子の探索が出来たと考えている。また、RA 滑膜の特徴と連動した分子として hu-sulf-1 の抽出も行なうと共に、抗マウス SHPS-1 抗体が治療効果を有する事から、この分子についても、候補分子とした。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 granulins が抽出され、病態形成に関与が示唆される遺伝子と考えている。RA 病態形成に重要に関与するとして報告してきた RA 特有な線維芽細胞である Nurse 細胞の過剰増殖に直接の原因と成る可能性がある。

E. 結論

今回の GeneChip 解析を中心とした RA 患者特異的遺伝子群の探索により抽出された。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakamura N, Shimaoka N, Tougan T, Onda H, Okuzaki D, Zhao H, Fujimori A,

Yabuta N, Nagamori I, Tanaigawa A, Sato J, Hayashida K, Suzuki R, Yukioka M, Ochi T. : Isolation and expression profiling of genes upregulated in bone marrow-derived mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients. *DNA Res.* 13(4): 169-183 2006.

Fukunaga A, Nagai H, Yu X, Oniki S, Okazawa H, Motegi S, Suzuki R, Honma N, Matozaki T, Nishigori C, Horikawa T. : Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate 1 regulates the induction of Langerhans cell maturation. *Eur J Immunol.* 36(12): 3216-3226 2006.

Fukui N, Ikeda Y, Ohnuki T, Hikita A, Tanaka S, Yamane S, Suzuki R, Sandell LJ, Ochi T. : Pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor- α induces bone morphogenetic protein-2 in chondrocytes via mRNA stabilization and transcriptional up-regulation. *J Biol Chem.* 281(37): 27229-27241 2006.

鈴木隆二

リウマチの破骨細胞

臨床整形外科(2006) 41(3):260-263.

鈴木隆二、越智隆弘 : 関節リウマチにみられる特異な破骨細胞分化機序
Rheumatology Clinical Update 13 : 15-18 2006

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

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし