

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包括的研究

平成18年度 研究報告書

主任研究者 西岡久寿樹

平成19（2007）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	6
-----------------------------------	---

妻木 範行 大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学	8
-------------------------------	---

千葉 一裕 慶応義塾大学医学部整形外科学	12
-------------------------	----

中島 利博 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター	14
-------------------------------	----

田中 栄 東京大学大学院医学系研究科感覚・運動機能医学	17
--------------------------------	----

吉田 勝美 聖マリアンナ医科大学予防医学	21
-------------------------	----

川合 眞一 東邦大学医学部附属大森病院膠原病科	25
----------------------------	----

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	29
------------------------------------	----

木村 友厚 富山医科薬科大学整形外科学	33
------------------------	----

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	36
-------------------------------------	----

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	40
---------------------------------	----

松本 美富士 藤田保健衛生大学七栗サナトリウム内科	43
------------------------------	----

行岡 正雄 医療法人行岡医学研究会行岡病院整形外科	46
------------------------------	----

長田 賢一 聖マリアンナ医科大学精神神経科	48
横田 俊平 横浜市立大学医学部小児科	50
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表	55

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）

総括研究報告書

「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難病治療研究センター）

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等について、海外で臨床応用への推進。
- 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の機構と制御を解明し、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。また、これまで全く病因が不明であった本症において、動物モデルを通じた研究から中脳、下垂体における下行性疼痛制御経路に異常があるのが判明した。

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
松本美富士	藤田保健衛生大学七栗サナトリウム内科
行岡 正雄	医療法人行岡医学研究会 行岡病院
横田 俊平	横浜市立大学 小児科学
長田 賢一	聖マリアンナ医科大学神経精神科

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。

一方、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、病因の解明、治療ネットワークの作成に主眼点を置いた。

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・浦野・西岡
B. 萌芽的研究 (シーズ)	中島・高柳・木村・岩倉・西岡	植田・横田・西岡
C. 臨床研究	高柳・川合・中島・西岡	長田・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・西岡

C. 研究結果

本年度は発足2年目で 貴重な研究成果が得られた。

①アボトーシス導入剤の臨床開発に関して実用化の目処がついてきた。

②炎症骨破壊の予防・治療の標的細胞としてTh17細胞が明らかにされた。

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と併用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ほぼ完成した。

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、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のために、低用量のメソトレキサートの併用に関する有用性が明らかにされた。

③骨・関節疾患のQ. O. L. に及ぼす影響の疾病負担が解明され、医療経済に与える影響が検討された。

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、下行性疼痛抑制経路の制御に関与していることが明らかにされた。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

1. 学会発表

1. 松本美富士、前田伸治、西岡久寿樹. 本邦線維筋痛症のQOL、ADL、生活実態の検討. 第50回日本リウマチ学会総会・学術集会. 4月, 2006. 長崎
2. 松尾光祐、中村洋、増子佳世、遊道和雄、野寄浩司、斉藤知行、西岡久寿樹、加藤智啓. 関節リウマチおよび変形性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50回日本リウマチ学会総会・学術集会. 4月, 2006. 長崎
3. 村田美奈子、増子佳世、中村洋、遊道和雄、加藤啓智、千葉純司、井上和彦、西岡久寿樹. Angiotensin-like-4 (ANGPTL-4) の関節軟骨細胞における発現と作用機作. 第50回日本リウマチ学会総会・学術集会. 4月, 2006. 長崎
4. 中村洋、増子佳世、遊道和雄、加藤智啓、西岡

- 久寿樹. ラットOAモデルにおけるOAパンスの運命—SCIDマウスを用いた検討—. 第50回日本リウマチ学会総会・学術集会. 4月, 2006. 長崎
5. 増子佳世、遊道和雄、中村洋、西岡久寿樹、加藤智啓. 脂質メディエーターと軟骨: sphingosine-1-phosphateによる関節軟骨細胞代謝制御. 第50回日本リウマチ学会総会・学術集会. 4月, 2006. 長崎
 6. Shi Yeqing, 中村洋、増子本郷佳世、加藤智啓、西岡久寿樹、遊道和雄. Angiogenic growth factors inhibit IL-1 β -induced catabolic activity through downregulation of caveolin-1 in human chondrocytes: Involvement of the p42/44 MAP kinase cascade and PI3K/Akt signaling pathway. 第50回日本リウマチ学会総会・学術集会. 4月, 2006. 長崎
 7. 岡 寛、尾崎承一、西岡久寿樹. 難治性関節リウマチに対するタクロリム治療の試み. 第50回日本リウマチ学会総会・学術集会. 4月, 2006. 長崎
 8. 唐沢里江、大岡正道、増子佳世、遊道和雄、中村洋、尾崎承一、西岡久寿樹、加藤智啓. 全身性血管炎患者における抗内皮細胞抗体の対応抗原の同定: プロテオミクスの手法を用いて. 第50回日本リウマチ学会総会・学術集会. 4月, 2006. 長崎
 9. 向陽、松井利浩、松尾光祐、中村洋、増子佳世、遊道和雄、西岡久寿樹、加藤智啓. Comprehensive analysis of small peptides in sera from patients with systemic sclerosis. 第50回日本リウマチ学会総会・学術集会. 4月, 2006. 長崎
 10. 岡 寛、磯村達也、川合眞一、西岡真樹子、西岡久寿樹. Clinical outcome of low does MTX and Infliximab therapy suggests the in pateints with rheumatiod arthritis. 第27回日本炎症再生学会. 7月, 2006. 東京
 11. 岡 寛、尾崎承一、西岡久寿樹. 難治性関節リウマチに対するタクロリムの治療. 第27回日本炎症再生学会. 7月, 2006. 東京
 12. H. Oka, T. Isomura, M. Nishioka, T. Takayanagi, C. Morimoto, K. Nishioka. Short term efficacy of Etanercept therapy in pateints with rheumatoid arthritis. 第12回 APLAR Congress. 8月, 2006. クアラルンプール
 13. 岡 寛、西岡久寿樹、長田賢一、高柳広. 線維筋痛症に認められるシェーグレン症候群様の症状の検討. 第15回日本シェーグレン症候群研究会. 9月, 2006
 14. Kosuke Matsuo, Hiroshi Nakamura, Kayo Masuko, Kazuo Yudoh, Koji Noyori, Kusuki Nishioka, Tomohiro Kato. The phosphoproteome profile of synoviocytes in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. American College of Rheumatology, 70th Annual Scientific Meeting. 11/10-15, 2006. Washington, DC
 15. Tomoo Sato, Koji Konomi, Ryoji Fujii, Naoko Yagishita, Masahiro Yokouchi, Setsuro Komiya, Moroe Beppu, Haruhito Aoki, Kusuki Nishioka, Toshihiro Nakajima. 11-1-Induced MMP-13 Expression is Regulated by Prostaglandin E2-EP2 Signaling in Human Osteoarthritic Chondrocytes. 70th Annual Scientific Meeting. 11/10-15, 2006. Washington, DC
 16. Rie Karasawa, Seido Ooka, Kayo Masuko, Kazuo Yudo, Hiroshi Nakamura, Syouchi Ozaki, Kusuki Nishioka, Tomohiro Kato. Target of Anti-Endothelial Cell Antibodies in Patients With Systemic Vasculitis: Identification by the Proteomic Approach. 70th Annual Scientific Meeting. 11/10-15, 2006. Washington, DC
 17. Kosuke Matsuo, Yang Xiang, Hiroshi Nakamura, Kayo Masuko, Kazuo Yudoh, Koji Noyori, Kusuki Nishioka, Tomoyuki Saito, Tomohiro Kato. Surveillance of Citrullinated of Synovium in Rheumatoid Arthritis. 70th Annual Scientific Meeting. 11/10-15, 2006. Washington, DC
 18. Kayo Masuko, Minako Murata, Hiroshi Nakamura, Kazuo Yudoh, Kusuki Nishioka, Tomohiro Kato. Sphingosine-1-Phosphate Induces Prostaglandin E2 Production From Human Articular Chondrocytes in vitro: Implications of Sphingolipids in Cartilage Degradation. 70th Annual

- Scientific Meeting. 11/10-15, 2006. Washington, DC
19. Kazuo Yudoh, Sheng-Ming Dai, Yeqing Shi, Hiroshi Nakamura, Kayo Masuko, Tomohiro Kato, Kusuki Nishioka. Catabolic Stress Induces Chondrocyte Aging Through the Acceleration of Caveolin-1 Expression in Osteoarthritis: Angiogenic Growth Factors Inhibit the Caveolin-1 Expression and Chondrocyte Aging. 70th Annual Scientific Meeting. 11/10-15, 2006. Washington, DC
 20. 岡寛, 西岡久寿樹. 関節リウマチにおけるタクロリムスとメントレキサートの併用効果. 第21回日本臨床リウマチ学会. 11/21, 2006. 東京
 21. 松本美富士, 前田伸治, 西岡久寿樹. 本邦線維筋痛症の臨床所見の検討、とくに疲労の慢性疲労症候群との関連について. 第21回日本臨床リウマチ学会. 11/21, 2006. 東京
 22. 松本美富士, 菊地基雄, 西岡久寿樹, 前田伸治, 大澤智代. 本邦線維筋痛症患者の実態、特にADL, QOLについて. 第21回日本臨床リウマチ学会. 11/21, 2006. 東京
 23. 岡寛, 長田賢一, 藤田宗久, 西岡真樹子, 土井永史, 西岡久寿樹. 線維筋痛症に伴うpolyenthesopathyに対するサラゾスルファピリジン (アザルフィジン) の有効性について. 第21回日本臨床リウマチ学会. 11/21, 2006. 東京
 24. 西岡久寿樹. リウマチ治療はここまで進んでいる「薬物治療の立場から」. 医療公開シンポジウム. 2/27, 2006. 東京
 25. 西岡久寿樹. 基調講演 線維筋痛症研究この一年間の進歩. 公開シンポジウム (線維筋痛症研究の進歩). 2/28, 2006. 東京
 26. 西岡久寿樹. 注目されてきている線維筋痛症. 株式会社情報技術協会講演. 3/28, 2006. 東京
2. 論文発表
1. 西岡 久寿樹. リウマチアレルギー学の進歩. 日本醫事新報. 4271: 23-30, 2006
 2. Sheng-Ming Dai, Zheng-Zheng Shan, Hiroshi Nakamura, Kayo Masuko-Hongo, Tomohiro Kato, Kusuki Nishioka, and Kazuo Yudo. Catabolic Stress Induces Features of Chondrocyte Scenscene Through Overexpression of Caveolin1. Arthritis & Rheumatism. 54:3:818-831, 2006
 3. Tomoo Sato, Koji Konomi, Satoshi Yamasaki, Satoko Aratani, Kaneyuki Tsuchimochi, Masahiro Yokouchi, Kayo Masuko-Hongo, Naoko Yagishita, Hiroshi Nakamura, Setsuro Komiya, Moroe Beppu, Haruhito Aoki, Kusuki Nishioka, and Toshihiro Nakajima. Comprehensive Analysis of Gene Expression Profiles in Intact and Damaged Regions of Human Osteoarthritic Cartilage. Arthritis & Rheumatism. 54:3:808-817, 2006
 4. 松本美富士, 前田伸治, 玉腰暁子, 西岡久寿樹. 本邦線維筋痛症の臨床疫学像 (全国疫学調査の結果から). 臨床リウマチ. 18:1: 87-92, 2006
 5. 西岡久寿樹. 線維筋痛症の現状と展望. Pharma Medica. 24:6:9-13, 2006
 6. Satoshi Yamasaki, Naoko Yagishita, Kaneyuki Tsuchimochi, Yukihiro Kato, Takeshi Sasaki, Tetsuya Amano, Moroe Beppu, Haruhito Aoki, Hiroshi Nakamura, Kusuki Nishioka and Toshihiro Nakajima. Resistance to endoplasmic reticulum stress is an acquired cellular characteristic of theumatoid synovial cells. International Journal of Molecular Medicine. 18:113-117, 2006
 7. 八木下尚子, 西岡久寿樹, 中島利博. 滑膜細胞の秘めたポテンシャル. 分子リウマチ. 3:3:47(231)-54(238), 2006
 8. Hiroshi OKA, Kusuki NISHIOKA, Masanori TOGO and Takahiro OCHI. The efficacy of infliximab for patients with rheumatoid arthritis in Japan: results of 5000 cases by post-marketing surveillance data. Asia Pacific League of Associations for Rheumatology. 9:142-145, 2006
 9. 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. リハビリテーション医学別刷. Vol. 43 NO. 10, 2006
 10. Y. Xiang, K. Masuko-Hongo, T. Sekine, H. Nakamura, K. Yudoh, K. Nishioka, T. Kato. Expression of proteinase-activated receptors (PAR)-2 in articular chondrocytes

- is modulated by IL-1 β , TNF- α and TNF- β .
Osteoarthritis and Cartilage.
14:1163-1173, 2006
11. 岡寛、西岡久寿樹. 生物学的製剤または生物学的製剤以外の抗リウマチ薬治療を受けている関節リウマチ患者におけるアバタセプトの安全性について1年間の臨床研究結果. 日本医事新報. 10:48, 2006
 12. 岡寛、西岡久寿樹. 糖尿病発症へのACE阻害薬ラミプリルの効果. 日本医事新報. 11:48, 2006
 13. Satoshi Yamasaki, Naoko Yagishita, Takeshi Sasaki, Minako Nakazawa, Yukihiro Kato, Tadayuki Yamada, Eunkyung Bae, Sayumi Toridera, Rie Ikeda, Lei Zhang, Kazuko Fujitani, Eunkyung Yoo, Kaneyuki Tsuchimochi, Tomohiko Ohta, Natsumi Araya, Hidetoshi Fijita, Satoko Aratani, Katsumi Eguchi, Setsuro Komiya, Ikuro Maruyama, Nobuyo Higashi, Mitsuru Sato, Haruki Senoo, Takahiro Ochi, Shigeyuki Yokoyama, Tetsuya Amano, Jaeseob Kim, Steffen Gay, Akiyoshi Fukamizu, Kusuki Nishioka, Keiji Tanaka, Toshihiro Nakajima. Cytoplasmic destruction of p53 by the endoplasmic reticulum-resident ubiquitin ligase 'Synoviolon'. The EMBO Journal. 26(1):113-122, 2007
 14. Kosuke Matsuo, Yang Xiang, Hiroshi Nakamura, Kayo Masuko, Kazuo Yudoh, Koji Noyori, Kusuki Nishioka, Tomoyuki Saito, Tomohiro Kato. Identification of novel citrullinated autoantigens of synovium in rheumatoid arthritis using a proteomic approach. Arthritis Research & Therapy. 8:R175, 2006

G. 知的財産権の出願・登録状況
本研究班としては特になし。

遺伝子改変動物による新規抗リウマチ剤開発とその評価

分担研究者 岩倉洋一郎（東京大学医科学研究所 教授）

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。さらに両モデルマウスで共通に発現変動をした遺伝子の欠損マウスを作製したところ、関節炎を自然発症するマウスを見いだした。また、別の2種類のマウスではCIAに抵抗性になっていた。これらの遺伝子は関節炎治療薬の標的となる可能性が示された。

A. 研究目的

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マウスでは関節炎発症率に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を調製し、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. 研究結果および考察

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。現在これらの遺伝子の解析を行っている。

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。

3. Dectin-1と同じC型レクチンファミリーに属するDCIRを欠損させたところ、これらのマウスが自己抗体の産生を伴う自己免疫を発症し、関節炎や唾液腺炎を自然発症することを見いだした。この結果は、DCIRが免疫系の抑制因子として重要な役割を果たしていることを示唆する。

E. 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して、非常に有望である。

G. 研究発表

- 論文発表
- Shimizu, M., Shimamura, M., Owaki, T., Asakawa, M., Fujita, K., Kudo, M., Iwakura, Y., Takeda, Y., Mizuguchi, J., and Yoshimoto, T. Antiangiogenic and antitumor activities of IL-27. *J. Immunol.*, 176, 7317-7324 (2006).
- Kotani, M., Hirata, K., Ogawa, S., Habiro, K., Araki, M., Ishi, T., Ishida, Y., Tanuma, S., Tanabe, K., Toma, Horai, R., Iwakura, Y., and Abe, R. Presence of CD28-dependent and independent pathways in autoimmune arthritis developed in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice. *Arth. Rheum.*, 54, 473-481 (2006).
- Matsuki, T., Nakae, S., Sudo, K., Horai, R., and Iwakura, Y. Abnormal T cell activation caused by the imbalance of the IL-1/IL-1 receptor antagonist

- system is responsible for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int. Immunol.*, 18, 399-407 (2006).
4. Ishigame, H., Nakajima, A., Saijo, S., Komiyama, Y., Mastuki, T., Nakae, S., Horai, R., Kakuta, S., and 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, 129-153 (2006).
 5. Vonk, A. G., Netea, M. G., van Krieken, J. H., Iwakura, Y., van der Meer, J. W. M., and Kullberg, J. B. Endogenous interleukin-1 α and interleukin-1 β are crucial for host defense against disseminated candidiasis. *J. Infect. Dis.*, 193, 1419-1426 (2006).
 6. Nambu, A., Nakae, S., and Iwakura, Y. IL-1 β , but not IL-1 α , is required for antigen-specific T cell activation and the induction of local inflammation in the delayed-type hypersensitivity responses. *Int. Immunol.*, 18, 701-712 (2006).
 7. O'Sullivan, B. J., Thomas, H. E., Pai, S., Santamaria, P., Iwakura, Y., Steptoe, R. J., Kay, T. W. H., and Thomas, R. IL-1 β breaks tolerance through expansion of CD25⁺ effector T cells. *J. Immunol.*, 176, 7278-7287 (2006).
 8. Iwakura, Y., and Ishigame, H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J. Clin. Invest.*, 116, 1218-1222 (2006).
 9. Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., and Iwakura, Y. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 177, 566-573 (2006).
 10. Murakami, M., Iwai, S., Hiratsuka, S., Yamauchi, M., Nakamura, K., Iwakura, Y., and Shibuya, M. Signaling of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine kinase promotes rheumatoid arthritis through activation of monocyte/macrophage. *Blood*, 108, 1849-1856 (2006).
 11. Fujikado, N., Saijo, S., and Iwakura, Y. Identification of arthritis-related gene clusters by microarray analysis of two independent mouse models for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 8, R100, 1-13 (2006).
 12. Furuta, T., Kikuchi, T., Iwakura, Y., and Watanabe, N. Protective roles of mast cells and mast cell-derived tumor necrosis factor in murine malaria. *J. Immunol.*, 177, 3294-302 (2006).
 13. Voronov, E., Dayan, M., Zinger, H., Gayvoronsky, L., Lin, J. P., Iwakura, Y., Apte, R. N., and Mozes, E. IL-1 β -deficient mice are resistant to induction of experimental SLE. *Eur. Cytokine Netw.*, 17, 109-116 (2006).
 14. Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Tanaka, S., Kodama, T., Shizuo, A., Iwakura, Y., Cua, D. J., and Takayanagi, H. T_H17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J. Exp. Med.*, 203, 2673-2682 (2006).
 15. Ito, R., Shin-Ya, M., Kishida, T., Urano, A., Takada, R., Sakagami, J., Imanishi, J., Kita, M., Ueda, Y., Iwakura, Y., Kataoka, K., Okanoue, T., and Mazda, O. Interferon-gamma is causatively involved in experimental inflammatory bowel disease in mice. *Clin. Exp. Immunol.*, 146, 330-338 (2006).
 16. Tsurutani, N., Yasuda, J., Yamamoto, N., Choi, B., Kadoki, M., and Iwakura, Y. Nuclear import of the pre-integration complex is blocked upon infection by HIV-1 in mouse cells. *J. Virol.*, 81, 677-688 (2007).
 17. Saijo, S., Fujikado, N., Furuta, T., Chung, S., Kotaki, H., Seki, K., Sudo, K., Akira, S., Adachi, Y., Ohno, N., Kinjo, T., Nakamura, K., Kawakami, K., and Iwakura, Y. Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nature Immunol.*, 8, 39-46 (2007).
 18. Hirota, K., Hashimoto, M., Yoshitomi, H., Tanaka, S., Nomura, T., Yamaguchi, T., Iwakura, Y., Sakaguchi, N., and Sakaguchi, S. T cell self-reactivity forms cytokine milieu for spontaneous development of IL-17⁺ helper T cells that cause autoimmune arthritis. *J. Exp. Med.*, 204, 41-47 (2007).
 19. Nigrovic, P. A., Binstadt, B. A., Monach, P. A., Johnsen, A., Gurish, M., Iwakura, Y., Benoist, C., Mathis, D., and Lee, D. M. Mast cells contribute to initiation of autoantibody-mediated arthritis via IL-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.
 20. Nakamatsu, M., Yamamoto, N., Nakasone, C., Kinjo, T., Miyagi, K., Uezu, K., Nakamura, K., Nakayama, T., Taniguchi, M., Iwakura, Y., Kaku, M., Fujita, J., and Kawakami, K. Role of interferon-gamma in Va14⁺ natural killer T cell-mediated host defense against *Streptococcus pneumoniae* infection in murine lungs. *Microbes Infect.*, in press.
 21. Sugihara, T., Sekine, C., Nakae, T., Kohyama, K., Harigai, M., Iwakura, Y., Matsumoto, Y., Miyasaka, N., and Kohsaka, H. A new murine model defines critical mediators in the pathology and treatment of polymyositis. *Arthritis Rheum.*, in press.
 22. Adachi, K., Soeta-Saneyoshi, C., Sagara, H., and Iwakura, Y. A crucial role of *Bysl* in mammalian preimplantation development as an integral factor for 40S ribosome biogenesis. *Mol. Cell. Biol.*, in press.
 23. Nakae, S., Iwakura, Y., Suto, H., and Galli, S. J. Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell-differentiation by IL-17. *J. Leu. Biol.*, in press.
 24. Ashino, T., Arima, Y., Shioda, S., Iwakura, Y., Numazawa, S., and Yoshida, T. Effect of interleukin-6 on CYP3A11 and metallothionein-1/2 expression in arthritic mouse liver. *Eur. J. Pharm.*, in press.
 25. Onodera, S., Ohshima, S., Tohyama, H., Yasuda, K., Nishihira, J., Iwakura, Y., Matsuda, I., Minami, A., and Koyama, Y. A novel DNA vaccine targeting macrophage migration inhibitory factor protects joints from inflammation and destruction in murine models of arthritis. *Arthritis Rheum.*, 56, 521-530 (2007).

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

関節リウマチ及び線維筋痛症の寛解挿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班

(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 関節リウマチの治療において機能回復を目指すには、骨欠損の回復と骨質の改善が必要である。変性破壊した骨組織を修復するには、内軟骨性骨化の過程を修復過程に再導入する必要があると考え、我々は内軟骨性骨化を誘導する活性を持つ骨形成因子(BMP)に着目した。まず BMP の内軟骨性骨化における作用を解析するために、軟骨、骨において BMP シグナルを活性化あるいは抑制したトランスジェニックマウスを作製し、その骨組織を解析した。BMP には骨芽細胞と破骨細胞を刺激してリモデリングを促進し、強い骨を形成する作用があることが判明した。そして多量のBMPを長期に骨に投与すると、骨吸収が促進されて骨量が低下しうることが判明した。

A. 研究目的

関節リウマチでは活発な炎症により、関節部の骨破壊と骨質の低下を伴う。関節リウマチにおいて寛解導入と機能回復を目指すには、骨欠損の回復と骨質の改善が必要である。さらに関節リウマチでは骨質の低下に伴って、骨折が多く見られしかも治療に難渋することが多い。骨形成因子(BMP)は内軟骨性骨化を誘導する蛋白であり、遷延性偽関節を早期に治癒させる薬剤として米国で使用されている。四肢・脊椎の骨組織は内軟骨性骨化で形成される。関節リウマチにおいて変性破壊した骨組織を修復するには、内軟骨性骨化の過程を修復過程に再導入する必要がある。我々はそのための薬剤として BMP およびその関連物質に注目した。BMP の内軟骨性骨化における作用を解析するために、軟骨、骨において BMP シグナルを活性化あるいは抑制したトランスジェニックマウスを作製し、その骨組織を解析した。さらにマウス骨折モデルにおいて種々の治癒過程に BMP を投与し、骨修復に与える影響を検討した。

B. 研究方法

骨あるいは軟骨特異的に BMP シグナルを活性化あるいは抑制したトランスジェニックマウスを作製し、その骨形成を解析した。BMP シグナルを抑制するために、細胞外で BMPs 2, 4, 7 のアンタゴニストとして働く noggin を用いた。Type XI コラーゲン(Col11a2)プロモーター制御下で軟骨特異的に BMP4 を過剰発現させたトランスジェニックマウス(Col11a2-Bmp4)、そして Type I コラーゲン(Col1a1)プロモーター制御下で、骨特異的に noggin を過剰発現させたトランスジェニックマウス(Col1a1-noggin)と BMP4 を過剰発現させたトランスジェニックマウス(Col1a1-Bmp4)を其々作製し、その骨組織を wild-type マウス(WT)と比較して解析した。またマウス骨折モデルの治癒の過程に BMP を投与し、仮骨を解析した。8週齢マウス脛骨髄内に 30G ワイヤーを通し、3点 bending device にて骨幹部骨折を起こした。3日後および16日後に、recombinant human BMP4 を 5・g あるいは PBS を投与した。骨折後 21 日目

に sacrifice し、脛骨のマイクロ CT 撮影と組織学的解析を行った。

C. 研究結果

軟骨で BMP4 を過剰発現させて BMP シグナルを活性化したトランスジェニックマウス (Coll1a2-Bmp4) では、軟骨が増大し、それを鋳型に形成される骨梁も太くなった。

骨で BMP シグナルを抑制したトランスジェニックマウス (Coll1a1-noggin) では著名な破骨細胞性骨吸収の減少と軽度の骨形成の低下を認めた ($n = 6, p < 0.05$)。そして骨量は増大したものの、woven であり 60% に骨折を認めた。このマウスから培養した骨芽細胞の石灰化能は低下していたが、BMP の投与により回復した。逆に BMP4 を過剰発現させたトランスジェニックマウス (Coll1a1-Bmp4) では骨梁がほとんど消失し、破骨細胞が顕著に増加した。これらの現象は骨折モデルの治癒過程でも再現した。即ち、骨折後早期の BMP 投与で有意に大きな仮骨が形成され、一方後期の投与では仮骨は一時的に吸収され小さくなった ($n = 5, p < 0.05$)。

D. 考察

Coll1a1-noggin トランスジェニックマウスの結果から BMP の骨における生理機能は破骨細胞とリモデリングを刺激して、強い骨を形成することと考えた。Coll1a1-Bmp4 トランスジェニックマウスの結果は、多量の BMP を長期に骨に投与すると、骨吸収が促進され、骨量の低下をきたすことを示唆する。Coll1a2-Bmp4 トランスジェニックマウスの結果から、軟骨形成期に BMP を投与すると結果的に骨組織の回復を得られることが示唆された。これらの知見は骨折治癒過程にも当てはまった。

D. 結論

BMP の骨における生理機能は破骨細胞とリモデリングを刺激して、強い骨を形成することである。多量の BMP を長期に骨に投与すると、骨量の低下をきたす。関節リウマチにおける骨質の改善、骨欠損の修復、骨折の治療に、BMP を用いて治療を考えていく場合、これらの点に留意すべきであることが判明した。

E. 健康危険情報 無し

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Okamoto, M., Murai, J., Yoshikawa, H., and Tsumaki, N.: Bone morphogenetic proteins in bone stimulate osteoclasts and osteoblasts during bone development. *J Bone Miner Res*, 21(7): 1022-1033, 2006.
2. Sugiki, T., Uyama, T., Toyoda, M., Morioka, H., Kume, S., Miyado, K., Matsumoto, K., Saito, H., Tsumaki, N., Takahashi, Y., Toyama, Y., and Umezawa, A.: Hyaline cartilage formation and enchondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts. *J Cell Biochem*, in press, 2006.
3. Hirao, M., Tamai, N., Tsumaki, N., Yoshikawa, H., and Myoui, A.: Oxygen tension regulates chondrocyte differentiation and function during endochondral ossification. *J Biol Chem*, 281(41): 31079-31092, 2006.
4. 妻木範行, 吉川秀樹: 遺伝子改変マウスを用いた BMP シグナルによる骨・軟骨形成機構の解析. *Arthritis*, 4(1), 4-9, 2006.
5. 妻木範行: 最新原著レビュー 低出力超音波パルス照射は片側仮骨延長法を用いた高位脛骨骨切り術における延長仮骨治癒を促進する. *整形外科*, 57, 1531-1535, 2006.
6. 妻木範行: 軟骨・骨形成における骨形成因子 (BMP) シグナルの役割. *Clinical Calcium*,

- 16(4): 138-142, 2006.
7. 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.
 8. 妻木範行, 吉川秀樹: 骨格発生における BMP と関連分子群の生物活性. *Clinical Calcium*, 16(5): 67-72, 2006.
2. 学会発表
1. J. Murai, H. Yoshikawa and N. Tsumaki: Identification of a CTCF-binding site between the *Rxb* and the *Col11a2* genes and its functions., Frontiers of skeletal biology Eleventh and Valedictory Workshop on Cell Biology of Bone and Cartilage in Health and Disease, Davos, Switzerland, March 18 - 21, 2006
 2. J. Murai, H. Yoshikawa, N. Tsumaki: Regulation of the *Col11a2* expression through the histone modification., 28th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Sep 15-19, 2006, Philadelphia, Pennsylvania, USA
 3. T. Iwai, J. Murai, H. Yoshikawa, N. Tsumaki: Role of Smad7 during Endochondral Bone Formation., Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Sep 15-19, 2006, Philadelphia, Pennsylvania, USA
 4. Murai J, Okamoto M, Iwai T, Yoshikawa H, Tsumaki N.: Generation of conditional transgenic mice for BMP4 in bone., 6th International Conference on Bone Morphogenetic Proteins, Oct 11-15, 2006, Cavtat/Dobrovnik
 5. N. Tsumaki, J. Murai, T. Iwai, M. Okamoto, H. Yoshikawa: BMP SIGNALING AND ENDOCHONDRAL BONE FORMATION., 6th International Conference on Bone Morphogenetic Proteins, Oct 11-15, 2006, Cavtat/Dobrovnik
 6. T. Iwai, J. Murai, H. Yoshikawa, N. Tsumaki: Smad7 overexpression inhibits cellular differentiation at multiple steps during endochondral bone formation., 6th International Conference on Bone Morphogenetic Proteins, Oct 11-15, 2006, Cavtat/Dobrovnik
 7. N. Tsumaki, R. Katayama, T. Kimura, H. Yoshikawa: ROLES OF GDF5 IN CARTILAGE FORMATION AND REPAIR, 1st International Conference on the Biology and Therapeutic Potential of GDF5, 2006 10/23-25, Boston
 8. 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9回 超音波骨折治療研究会 2006年1月21日 大阪
 9. 村井純子, 吉川秀樹, 妻木範行: *Rxb* / *Col11a2* locusにおけるCTCF結合領域の同定とその機能解析, 第19回日本軟骨代謝学会, 2006年3月3日-4日 横浜 (はまぎんホールヴィアマール)
 10. 村井純子, 吉川秀樹, 妻木範行: Analysis of histone acetylation around the *Rxb* / *Col11a2* locus, 第38回日本結合組織学会, 2006年5月11日-12日 群馬県前橋(前橋昇降会議所会館)
 11. 妻木範行, 海渡貴司, 岩井貴男, 村瀬剛, 名井陽, 吉川秀樹: 連通気孔を有する3D-CAD人工骨を用いた高位脛骨骨切術の短期成績, 第79回日本整形外科学会, 2006年5月18-21日, 横浜
 12. 妻木範行, 内側型変形性膝関節症治療の現状と将来, 第24回日本骨代謝学会イブニングセミナー, 2006年7月6-8日 東京(東京ファッションタウン)
 13. 岩井貴男, 村井純子, 吉川秀樹, 妻木範行: 軟骨 Smad7 コンディショナルトランスジェニックマウスの作製と解析, 第24回日

本骨代謝学会, 2006年 7 月 6-8 日東京
(東京ファッションタウン)

14. 村井 純子、吉川 秀樹、妻木 範行:
XI 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子発現とヒストン修飾の解析, 第 24 回日本骨代謝学会, 2006 年 7 月 6 日—8 日 東京(東京ファッションタウン)
15. 岡本美奈、村井純子、吉川秀樹、妻木範行: 骨組織において BMP は骨形成と骨吸収を促進する—Noggin 骨組織過剰発現トランスジェニックマウスの解析—, 第 13 回 BMP 研究会, 2006 年 7 月 9 日, 東京
16. 村井純子, 岡本美奈, 吉川秀樹, 妻木範行: *Col11a2/Rxb* locus の遺伝子発現制御,
17. 第 7 回運動器科学研究会, 2006 年 8 月 25-26 日, 大津
18. 岩井貴男、村井純子、吉川秀樹、妻木範行: 軟骨 Smad7 コンディショナルトランスジェニックマウスの作製と解析, 2006 年 8 月 25-26 日, 大津
19. 妻木範行: 骨・軟骨形成における BMP の役割, 第 3 回骨と関節の代謝調節を考える基礎の会, かずさ, 2006 年 9 月 30 日-10 月 1 日
20. 妻木範行, 村井純子, 岩井貴男, 岡本美奈, 吉川秀樹: 内軟骨性骨化における BMP シグナルの役割と XI 型コラーゲン遺伝子プロモーター, 第 21 回日本整形外科学会基礎学術集会 2006 年 10 月 19-20 日, 長崎
21. 岩井貴男、村井純子、吉川秀樹、妻木範行: 軟骨形成における Smad7 の役割の解析, 第 21 回日本整形外科学会基礎学術集会 2006 年 10 月 19-20 日, 長崎
22. 岩井貴男、妻木範行、村井純子、名井陽、吉川秀樹: ハイドロキシアパタイト多孔体内骨新生に対する低出力超音波刺激の影響, 第 26 回 整形外科セラミック・インプラント研究会 2006 年 12 月 2 日 東京

F. 知的財産の出願・登録状況
該当なし

膜型M-CSFシェディングの分子機構に関する研究

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 慶應義塾大学抗加齢医学講座 講師

研究要旨：膜型M-CSFのshedding活性が、ADAM17 (-/-) 由来のMEFで著しく低下しており、MMPインヒビターおよびTIMP3によって阻害されることから、ADAM17が膜型M-CSFの可溶化に関与していることが明らかになった。また、非切断型の膜型M-CSFはClathrin依存性にinternalizationされ、細胞内で分解されることが示された。すなわち、膜型M-CSFはsheddingとendocytosisという異なった機序により修飾を受け、膜表面での蛋白量が調節されることが示唆された。

分担研究者氏名・所属機関名および所属機関における職名

（分担研究者の場合は、省略）

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きた。M-CSF(マクロファージコロニー刺激因子)はRANKL (TRANCE, OPGL, ODF)とともに破骨細胞分化に必須の支持細胞由来の分子であり、その機能の詳細な解明は骨粗鬆症、炎症性骨破壊、癌骨転移などの病態を理解するうえで欠かせない。M-CSFは分泌型蛋白としてだけでなく細胞膜に結合した膜型蛋白としても合成されるが、膜型M-CSFの転写後機能調節に関しては不明な点が多い。本研究の目的はこの膜型M-CSF転写後の機能調節を細胞レベルで明らかにすることである。

B. 研究方法

膜型M-CSFをRT-PCRにてクローニングし、これにAlkaline Phosphatase, GFP, HAなどのタグを付け、COS7、ADAM17 (-/-) 由来MEF、ストローマ細胞であるST2、骨芽細胞様細胞であるMC3T3E-1に発現導入した。導入後、phorbol 12-myristate 13-acid (PMA) 刺激およびGM6001 (Metalloproteinase Inhibitor) またはTIMP1, 2, 3存在下にてshedding assayをおこない、膜型M-CSFの切断機構について解析した。また、HAタグを付けたM-CSFを導入したCOS7細胞に抗体を反応させ、4%PFA固定後に免疫染色をおこない、共焦点顕微鏡で膜型M-CSFの動態を観察した。

（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

Alkaline Phosphataseを付加した膜型M-CSFをCOS7に導入したところ、膜型M-CSFは蛋白分解酵素により細胞膜から切断され可溶性となることが観察された。このshedding活性はMMPインヒビターであるGM6001に感受性が認められ、ST2およびMC3T3E-1においても同様な活性が確認された。また膜型M-CSFのshedding活性は、ADAM17 (-/-) 由来のMEFで著しく低下しており、TIMP1やTIMP2ではなくTIMP3によって阻害されたことから、ADAM17が膜型M-CSFの可溶化に関与していることが示唆された。さらに ST2細胞をPTH(100ng/ml)で刺激することによって膜型M-CSFのshedding活性が亢進したが、 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-8}M) + PGE2 (10^{-6}M) 刺激ではそのshedding活性はわずかであった。細胞染色により膜型M-CSFは膜表面に局在することが確認されたが、一方で小胞体、ゴルジ体と考えられる細胞内器官にも強い染色が認められた。さらに蛋白分解を受けなかった膜型M-CSFは細胞膜上に留まらずendocytosisによって動的に細胞内に取り込まれることが観察された。

D. 考察

膜型M-CSFはPMA刺激によって可溶性に放出され、そのshedding活性はADAM17依存性であり、非切断型の膜型M-CSFはClathrin依存性にinternalizationされ、細胞内で分解されることが明らかになった。すなわち、膜型M-CSFはsheddingとendocytosisという異なった機序により修飾を受け、膜表面での蛋白量が調節されることが示唆された。細胞間相互作用を介したこれらの転写後調節がM-CSF依存性細胞や破骨細胞前駆細胞の分化に与える影響について検討中である。

E. 結論

膜型M-CSFはsheddingによる可溶化およびendocytosisによりその細胞膜上の発現レベルが能動的に調節されている。

F. 健康危険情報

問題なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ogawa Y, Chiba K, Matsumoto M, Nakamura M, Takaishi H, Toyama Y. Postoperative factors affecting neurological recovery after surgery for cervical spondylotic myelopathy. J Neurosurg Spine. 2006 Dec;5(6):483-7.
- 2) Chiba K, Ogawa Y, Ishii K, Takaishi H, Nakamura M, Maruiwa H, Matsumoto M, Toyama Y. Long-term results of expansive open-door laminoplasty for cervical myelopathy--average 14-year follow-up study. Spine. 2006 Dec 15;31(26):2998-3005.
- 3) Ishii K, Chiba K, Maruiwa H, Nakamura M, Matsumoto M, Toyama Y. Pathognomonic radiological signs for predicting prognosis in patients with chronic atlantoaxial rotatory fixation. J Neurosurg Spine. 2006 Nov;5(5):385-91.
- 4) Seki S, Kawaguchi Y, Mori M, Mio F, Chiba K, Mikami Y, Tsunoda T, Kubo T, Toyama Y, Kimura T, Ikegawa S. Association study of COL9A2 with lumbar disc disease in the Japanese population. J Hum Genet. 2006;51(12):1063-7.
- 5) Qi X, Matsumoto M, Ishii K, Nakamura M, Chiba K, Toyama Y. Posterior osteotomy and instrumentation for thoracolumbar kyphosis in patients with achondroplasia. Spine. 2006 Aug 1;31(17):E606-10.
- 6) Matsumoto M, Nojiri K, Chiba K, Toyama Y, Fukui Y, Kamata M. Open-door laminoplasty for cervical myelopathy resulting from adjacent-segment disease in patients with previous anterior cervical decompression and fusion. Spine. 2006 May 20;31(12):1332-7.
- 7) Morisue H, Matsumoto M, Chiba K, Matsumoto H, Toyama Y, Aizawa M, Kanzawa N, Fujimi TJ, Uchida H, Okada I. A novel hydroxyapatite fiber mesh as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances bone union in rat posterolateral fusion model. Spine. 2006 May 15;31(11):1194-200.
- 8) Fukuda K, Okada Y, Yoshida H, Aoyama R, Nakamura M, Chiba K, Toyama Y. Ischemia-induced disturbance of neuronal network function in the rat spinal cord analyzed by voltage-imaging. Neuroscience. 2006 Jul 21;140(4):1453-65.
- 9) Matsumoto M, Chiba K, Ishii K, Watanabe K, Nakamura M, Toyama Y. Microendoscopic partial resection of the sacral ala to relieve extraforaminal entrapment of the L-5 spinal nerve at the lumbosacral tunnel. Technical note. J Neurosurg Spine. 2006 Apr;4(4):342-6.
- 10) Horikoshi T, Maeda K, Kawaguchi Y, Chiba K, Mori K, Koshizuka Y, Hirabayashi S, Sugimori K, Matsumoto M, Kawaguchi H, Takahashi M, Inoue H, Kimura T, Matsusue Y, Inoue I, Baba H, Nakamura K, Ikegawa S. A large-scale genetic association study of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. Hum Genet. 2006 Jul;119(6):611-6.
- 11) Horiuchi K, Le Gall S, Schulte M, Yamaguchi T, Reiss K, Murphy G, Toyama Y, Hartmann D, Saftig P, Blobel CP. Substrate selectivity of epidermal growth factor-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx. Mol Biol Cell. 2007 Jan;18(1):176-88.
- 12) Kosaki N, Takaishi H, Kamekura S, Kimura T, Okada Y, Minqi L, Amizuka N, Chung UI, Nakamura K, Kawaguchi H, Toyama Y, D'Armiento J. Impaired bone fracture healing in matrix metalloproteinase-13 deficient mice. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Mar 23;354(4):846-51.
- 13) Morioka H, Yabe H, Kaneko S, Takaishi H, Ueda T, Watanabe M, Kobayashi K, Toyama Y. Large chondrosarcoma of the rib invading the mediastinum and the spine. J Thorac Cardiovasc Surg. 2006 Oct;132(4):986-7.

2. 学会発表

- 1) 堀内圭輔, 高石官成, 戸山芳昭; 第24回日本骨代謝学会. 抄録集 p161, 2006年
- 2) 高石官成, 戸山芳昭; 第24回日本骨代謝学会. 抄録集 p168, 2006年
- 3) 加藤雅敬, 高石官成, 松本守雄, 千葉一裕, 戸山芳昭; 第24回日本骨代謝学会. 抄録集 p204, 2006年

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

予定していない。

2. 実用新案登録

予定していない。

3. その他

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

中島 利博

聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター ゲノム医科学研究部門 教授

研究要旨

われわれはすでに新規 E3 ユビキチンリガーゼ シノビオリンを同定し、RA の原因遺伝子であることを報告した（参考文献 1-5）。今年度は、その基質を探索することを目的とした。

シノビオリン遺伝子欠損マウス由来の mouse embryonic fibroblasts (MEFs) とその比較対象である同腹の野生型マウス由来の MEFs よりタンパク質を抽出し、二次元電気泳動法によりプロテオミクス解析を行った。とくに本研究ではシノビオリン欠損 MEFs にて蓄積している分子に関して同定した。その結果、驚くべきことにアンチオンコ遺伝子産物 p53 がシノビオリンによりユビキチン化され、かつ同分子の量と質の両面での制御にシノビオリンが細胞質、とりわけ小胞体でかかわっていることが世界で初めて明らかとなった。さらに、ショウジョウバエを用いた遺伝学的解析により、本調節機構は生体内で p53 による細胞の増殖・死に関与することが証明された。

以上の結果から、RA の滑膜細胞 anti-apoptotic 分子であるシノビオリンが ER ストレスとともに p53 のシグナルを介して RA を引き起こすという斬新なモデルを提唱することとなった。また、本モデルは RA に留まらず、がん・動脈硬化などの増殖性疾患に一般に展開可能であることは自明である。

また、蛋白分解の基盤研究の面でもシノビオリンの双方向的シグナル調節機構は今後、多大なる貢献を予想させる発見であろう。

われわれのシノビオリンという独自にクローニングした分子の研究成果は、ついに RA のみならず、がんなどへの大きな展開を見せることとなった。さらに、同分子を標的とすることにより革新的 RA 治療が可能となることの理論構築がなされた。

A. 研究目的

関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis; RA) は、Quality of life を侵す代表的な疾患であり、その罹患率も高いことから、わが国にとって重大な疾患の 1 つであるといえる。RA の病理学的側面としては滑膜細胞の過増殖が知られているが、これがなぜ引き起こされるのかは未だ明らかとなっていない。この原因を解明するために一連の研究を行い、新規 E3 ユビキチンリガーゼ シノビオリンを同定し、RA の原因遺伝子であることを報告した（参考文献 1-5）。今年度は、その基質を探索することを目的とした。

B. 研究方法

(1) トランスクリプトーム シノビオリ

ン遺伝子欠損マウス由来の mouse embryonic fibroblasts (MEFs) とその比較対象である同腹の野生型マウス由来の MEFs よりタンパク質を抽出し、二次元電気泳動法によりスポットを比較し、差があったもの、とくにこの場合はシノビオリン欠損 MEFs にて蓄積している分子に関して同定する。

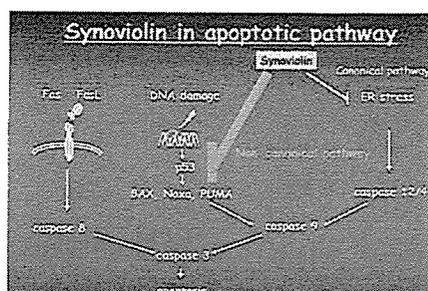
(2) その他 常方に従い、in vitro ならびに in vivo で (1) で得られた候補分子がシノビオリンの基質であるか否かを検証した。さらに、ショウジョウバエの遺伝学的アプローチを用いその生物学的意義を検証した。

C. 結果

驚くべきことにアンチオンコ遺伝子産物

p53 がシノビオリンによりユビキチン化され、かつ同分子の量と質の両面での制御にシノビオリンが細胞質、とりわけ小胞体でかかわって

いることが世界で初めて明らかとなった。さらに、ショウジョウバエを用いた遺伝学的解析により、本調節機構は生体内で p53 による細胞の増殖・死に関与することが証明された。



D. 考察

以上の結果から、シノビオリンが①ER ストレスシグナル、とともに ②p53 依存性シグナル

の双方向的アポトーシスシグナル系を調整して滑膜細胞の過増殖を、ひいては RA を引き起こすという斬新なモデルを提唱することとなった。このモデルにより長らく不明であったリウマチ滑膜細胞の増殖メカニズムにシノビオリンが中心的役割を担っていることが明らかとなった。また、蛋白分解の基盤研究の面でもシノビオリンの双方向的シグナル調節機構は今後、多大なる貢献を予想させる発見であろう。

E. 結論

われわれのシノビオリンという独自にクローニングした分子の研究成果は、ついに RA のみならず、がんなどへの大きな展開を見せることとなった。さらに、同分子を標的とすることにより革新的 RA 治療が可能となることの理論構築がなされた。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Amano T, *et al.* "Synoviolin/Hrd1, an E3 ubiquitin ligase, as a novel pathogenic factor for arthropathy" *Genes Dev* 17: 2436-2449 (2003)
2. Tsuchimochi K, *et al.* "Identification of a Crucial Site for Synoviolin Expression." *Mol Cell Biol.* 25: 7344-56 (2005)
3. Yagishita N, *et al.* "Essential Role of Synoviolin in Embryogenesis" *J Biol Chem* 280:7909-7916 (2005)
4. Yagishita N, *et al.* "Role of synoviolin in rheumatoid arthritis: possible clinical relevance" *Future Rheumatol* 1:31-36 (2006)
5. Yamasaki S, *et al.* "Resistance to endoplasmic reticulum stress is an acquired cellular characteristic of rheumatoid synovial cells" *International Journal of Molecular Medicine* in pres 2006
6. Yamasaki S, *et al.* "Rheumatoid arthritis as a hyper-endoplasmic reticulum-associated degradation disease" *Arthritis Res Ther* 7: 181-186 (2005)
7. Sato T, *et al.* "Comparative Analysis of Gene Expression Profiles in Intact Versus Damaged Regions of Human Osteoarthritic Cartilage" *Arthritis Rheum* 54: 808-817 (2006)
8. Aratani S, *et al.* "The nuclear import of RNA helicase A is mediated by importin- α 3" *Biochem Biophys Res Commun* 340:125-133 (2006)
9. Fujita H, *et al.* "Relevance of nuclear localization and functions of RNA helicase A" *Int J Mol Med* 15:555-560 (2005)

2. 学会発表

1. Nakajima T **ACR2005** "Novel Factor in Synovial Hyperplasia" SanDiego, California 2005/11/12-17
2. Nakajima T **GARN MEETING 2005** "Impact of Synoviolin in Rheumatology and Developmental Biology" Vienna, Austria 2005/9/15-18
3. Nakajima T **EULAR2005** "Lesson from Rheumatoid Synovial cells -What Synoviolin tells us?-" Vienna, Austria 2005/6/8-11
4. Yagishita N *et al.* **JCR2005 (International)** "Lesson from Rheumatoid Synovial cells - What Synoviolin tells us?-" Yokohama, Japan 2005/4/17-21

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
特にありません。
2. 実用新案登録
特にありません。
3. その他
特にありません。

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(第2報)

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特異的 *bcl-x* 遺伝子ノックアウトマウスを作成し、その細胞死、活性化における役割を検討した。

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- κ B ligand (RANKL)やマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)などの生存因子が存在しないと速やかに細胞死に至る。破骨細胞の細胞死はアポトーシスによるものであることが報告されている。アポトーシスは「プログラムされた細胞死」とも呼ばれ、細胞への様々な刺激、あるいはストレスなどによって誘導され、DNAの断片化を特徴とする静かな細胞死である。近年破骨細胞の細胞死はアポトーシスによることが明らかになってきたが、このように骨代謝の要ともいえる破骨細胞がなぜアポトーシスに陥りやすいのか、またその分子メカニズムはいかなるものか、などについてはほとんど明らかになっていないのが現状である。本研究においてわれわれは破骨細胞アポトーシスおよび活性化におけるBcl-xの役割をin vitroのみならずin vivoで検討した。*bcl-x* 遺伝子から産生されるBcl-xLはBcl-2ファミリーに属する代表的なアポトーシス抑制因子であるが、*bcl-x* 遺伝子ノックアウトマウスは神経系および血球系の異常によって胎生13日で致死となる。Bcl-xの破骨細胞における役割を明らかにするためにCre-loxPシステムを用い、その解析を行った。

B. 研究方法

まず*bcl-x*遺伝子にloxPサイトを導入したマウス(*bcl-x* flox/floxマウス)を作成し、これと破骨細胞特異的にCreを発現するcathepsin K gene

locus-knock-inマウスを掛け合わせることで破骨細胞特異的*bcl-x*ノックアウトマウスを作成した。このマウスを用いて、in vitro, in vivoで破骨細胞のアポトーシス、骨吸収能を検討した。破骨細胞はマウス骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養において活性ビタミンD3とプロスタグランジンE2の存在下で形成された破骨細胞様細胞、あるいはマウス骨髄細胞をRANKLおよびM-CSFの存在下で培養して作成した破骨細胞様細胞を使用した。破骨細胞へのレトロウイルス感染は定法に従っておこなった。

C. 研究結果

破骨細胞特異的*bcl-x*ノックアウトマウスは概観上異常を認めないが、骨組織においては破骨細胞数が減少しているとともに骨量の減少が認められた。in vitroにおける解析では、*bcl-x*遺伝子の欠損によって成熟破骨細胞の生存期間は短縮するとともにカスパーゼの活性化を認め、アポトーシスを起こしやすくなっていること、その一方で骨吸収能は亢進していることが明らかになった。このような破骨細胞の以上はレトロウイルスによる*bcl-xL*遺伝子の導入によってrescueされた。

D. 考察

Bcl-xLはantiapoptotic Bcl-2 familyに属し、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。本研究によって、Bcl-xLは破骨細胞の生存のみならず活性化においても重要な役割を果たすことが明らかになった。現在骨粗鬆症治療剤として使用されてい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することによって骨吸収を抑制すること