演)：人工骨による骨再生-基礎研究から臨床応用へ、平成 17 年 10 月 (大阪)

4. 大阪大学 21 世紀 COE プログラム合同シンポジウム：新たな運動器再生技術の開発と臨床応用、平成 17 年 12 月 (大阪)
5. 第 28 回日本ﾊﾞ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)
6. New treatment for juxta-articular intraosseous cystic lesions with interconnected porous calcium hydroxyapatite ceramic. 14th Europe Rheumatoid Arthritis Surgery Society Meeting (Zurich, May, 2006)
7. The new operative technique using IP-CHA implantation in the bone defect following correction of pes-planovalgus deformity in RA foot. 14th Europe Rheumatoid Arthritis Surgery Society Meeting (Zurich, May, 2006)
8. Imatinib mesylate inhibits osteoclastogenesis and joint destruction in rats with collagen-induced arthritis. 28th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (Philadelphia, Sep. 2006)
9. 第 24 回京都運動器疾患フォーラム (特別講演)：人工骨による骨再生：基礎から臨床へ、平成 19 年 2 月 19 日(京都)
10. 骨粗鬆症フォーラム 2007(特別講演)：骨折からみた骨粗鬆症の新しい治療戦略：全身治療と局所治療、平成 19 年 5 月 18 日 (札幌)
11. 第 6 回 ASOS 学術講演会 (特別講演)：骨再生にための人工骨の開発と臨床応用、平成 19 年 6 月 30 日 (大津)
12. 第 29 回日本バイオマテリアル学会(シンポジウム)、再生・医療機器開発―規制と認可のガイドライン：次世代人工骨の開発と課題、平成 19 年 11 月 26 日 (吹田)
13. 第 112 回愛媛整形外科集談会 (特別講演)：人工骨の開発と整形外科疾患への応用、平成 19 年 12 月 15 日 (松山)

G. 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（免疫ｱﾚﾙｷﾞｰ疾患予防・治療研究事業）
総合研究報告書

関節リウマチの重症度(病型)予後診断法としてのC1q値に関する研究

主任研究者　越智　隆弘　大阪大学医学系研究科　招聘教授

関節リウマチの重症度、とくに骨破壊の指標を得ることは重要である。以前より、C1q値と関節破壊の重症度に関連がある（越智ら）ことは指摘されていたが、測定のための抗体がポリクローナル抗体であったり、モノクローナル抗体であっても認識部位、また測定方法の不安定などの理由により、良い結果が再現されなかった。
今回、新たにハイブリドーマを作成し、10種類のモノクローナル抗体と２種のポリクローナル抗体を得た。それぞれの抗体により抗体固相を調整し、C1q検出・定量する新たなサンドイッチ法を開発した。
まず、これら12種類の抗体を、関節リウマチ（以下RAと略す）35検体によりスクリーニングし、安定した値を示し、しかも他の臨床検査地に影響されない４種の抗体を選び出した。さらに、この4種の抗体を使って、RA患者血清135検体を解析した。いずれの抗体についても、RA軽症型病型と、RA重症型病型で有意に異なる値を示すことがわかった。
また、ELISAにより初めてRA患者135検体中6検体にgranulin 蛋白が測定された。

分担研究者　：　島岡　康則
行岡医学研究会　行岡病院 副院長

A．研究目的

関節リウマチの重症度、とくに骨破壊の指標を得るために、新らたに抗C1q抗体を作成し、安定した測定系を開発することを目的とした。
さらにRA重症度判定の有効性を検証し、予後判定、治療への応用を検討した。

B．研究方法

抗C１q抗体を産生するハイブリドーマを新たに作成し、10種類のモノクローナル抗体と２種のポリクローナル抗体を得た。それぞれの抗体により抗体固相を調整し、共通の酵素標識抗体にて検出・定量するサンドイッチ法を開発した。
まず、これら12種類の抗体を、関節リウマチ（以下RAと略す）35検体によりスクリーニングし、安定した値を示し、しかも、他の臨床検査地に影響されない４種の抗体を選び出した。
さらに、新たなRA患者血清１３５検体を、骨高度破壊を示す重症病型（多関節破壊型病型：MES、および、ムチランス型病型：MUD）と骨破壊のほとんど認めない軽症型病型（少関節破壊型病型：LES）とに分類し、この4種の抗体がRA骨破壊の重症度を、判定する指標となるかを検証した。
さらに、分担研究者（鈴木ら）が、RA骨髄液を用いたgenechip解析で発現が高いと報告したgranulinにつき、バキュロ系で発現し、マウスに免疫してモノクロ抗体を取り、この抗体を用いて、サンドイッチELISA系を構築し、初めて末梢血で臨床サンプルを測定した。

（倫理面への配慮）
患者に文書で同意を得るとともに、各検体は無記名にて番号のみで管理し、コンピュウター上でのみ、臨床データと照合できるように配慮した。

C．研究結果

（平成１８年度）
新たな抗体によるC1q値は、RFとの相関係数は0.28－0.30であったが、CRP、MMP-3、赤沈との相関はいずれも0.07以下で、まったく相関を示さないと考えられた。

軽症型病型36検体で、平均年齢55.1歳、検査値平均はRF 58.9±76.4, CRP 0.8±1.4, MMP-3 72.7±54.9,赤沈 34.6±25.5であった。重症型病型は85検体で、平均年齢59.7歳、検査値平均はRF 88.9±100.4, CRP 1.3±1.3, MMP-3 172.4±130.1, 赤沈 55.6±30.8 であった。

今回作成した抗体によるC1q値は、軽症型病型では各抗体とも平均102-105±22であった。重症型病型では平均118-122±24であった。これら抗体がRAの重症度分類の指標になるかを検討するために、統計的学的検定を行うと、抗体No.33 (p=0.0028)、No.40 (p=0.0001)、No.54 (p=0.0006)、No.76 (p=0.0005)と、いずれの抗体についても、軽症型病型と、重症型病型で有意に異なる値を示した。

通常用いられる臨床検査値についても同様の有意差検定を行ったが、RF (p=0.25), CRP (p=0.10), MMP-3 (p=0.04), 赤沈 (p=0.03)であり、いずれも重症度を判定するに有意ではなく、今回開発されたC1q測定法の有用性がより明らかになった。

	C1q				RF	CRP	MMP-3	KL-6	赤沈
	No.33	No.40	No.54	No.76					
LES	104±22 (36-157)	102±21 (39-168)	102±22 (42-185)	105±21 (42-173)	58±76 (0-346)	0.8±1.4 (0.0-6.6)	72±54 (13-173)	250±43 (208-307)	34±25 (8-95)
MES MUD	118±19 (62-258)	120±22 (79-233)	119±27 (60-274)	122±26 (60-252)	88±100 (0-476)	1.3±1.3 (0.1-5.5)	172±130 (36-481)	360±169 (205-707)	55±30 (13-123)
P=	0.00275	0.00009	0.00060	0.00053	0.1049	0.0978	0.0365	0.1477	0.0299

（平成１９年度）

本研究で初めてELISAにより末梢血の血清中にgranulin 蛋白が測定された。RA患者135検体中6検体にgranulin 蛋白が検出された。軽症病型(LES)では 36検体中の1検体で、重症病型(MES, MUD) では85検体中の5検体で granulinが検出された。ただし、このうち1検体 は、喉頭癌、肺癌併発例であった。

血清	性別	年齢	病型	granulin	RF	CRP	C1q	
No.67	F	60	LES	55.6	8	0.0	80	No drug
No.80	F	64	MES	147.4	59	0.6	109	MTX 10mg/w, steroid 3.5mg/d
No.26	M	79	MES	21.6	103	3.1	120	MTX 4mg/w, steroid 5mg/d, 肺癌, 喉頭癌
No.141	F	29	MES	21.0	76	0.1	120	MTX 4mg/w, steroid 10mg/d, 15歳 onset RA
No.105	F	54	MES	22.8	151	0.7	125	MTX 4mg/w, steroid 2mg/d
No.71	F	56	MUD	63.7	59	2.6	130	tacrolimus 1.5mg/d, steroid 10mg/d, 胆石症

D. 考察

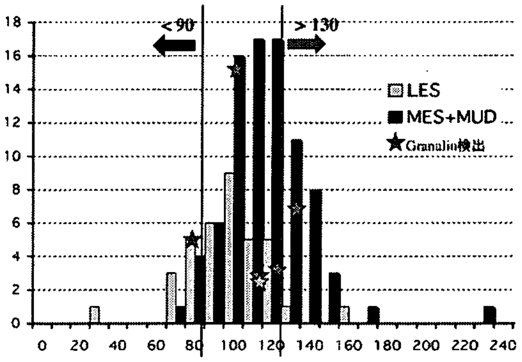
越智らによるRA病型分類は、RAの骨破壊の重症度をもとにした分類であり、本研究でのC1q値が、病型間で有意に異なる値示したことは、本研究で開発されたC1q測定法が、RA骨破壊の重症度の判定や予後予測のうえで、有用で、しかも簡便な指標となることを意味している。

実際、本方法でのC1q値 ９０以下の９０％が軽症病型であり、また、C1q値１３０以上の９５％が重症病型であった。

これまで臨床上使われてきた検査（CRP, MMP-3, RF, 赤沈など）に比較しても、本研究で開発されたC1q測定法は格段にRA重症度判定に有効であった。

投薬内容や、変動する臨床検査値(CRPなど)に左右されない、RA重症度の指標が確立されることは、患者の予後判定をする上で非常に重要な知見であると考える。

現在、RA患者の破壊関節部位や広がり、破壊関節数と、本研究で作成された測定法でのC1q値との関係の検討を進めている。また、認識エピトープの解析を進めており、RA重症化のメカニズムについて解明することができればRA重症化予防にもつながると考える。



E. 結論

今回新たに作成された抗C1q抗体及び測定法は、臨床検査上、最も有意にRA重症度を判定する指標であった。

RA患者、末梢血血清中にgranulin が検出される例がある。ただし、granulin の検出とRAの関係、また重症度との関係は今後の検討を要する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1)
Nakamura N, Shimaoka Y, Tougan T, Onda H, Okuzaki D, Zhao H, Fujimori A, Yabuta N, Nagamori I, Tanigawa A, Sato J, Oda T, Hayashida K, Suzuki R, Yukioka M, Nojima H, Ochi T.
Isolation and expression profiling of genes upregulated in bone marrow-derived mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients.
DNA Res. 2006 Aug 31;13(4):169-83.

2)
Toyosaki-Maeda T, Takano H, Tomita T, Tsuruta Y, Maeda-Tanimura M, Shimaoka Y, Takahashi T, Itoh T, Suzuki R, Ochi T.
Differentiation of monocytes into multinucleated giant bone-resorbing cells: two-step differentiation induced by nurse-like cells and cytokines.
Arthritis Res. 2001;3(5):306-10.

3)
Hayashida K, Shimaoka Y, Ochi T, Lipsky PE.
Rheumatoid arthritis synovial stromal cells inhibit apoptosis and up-regulate Bcl-xL expression by B cells in a CD49/CD29-CD106-dependent mechanism.
J Immunol. 2000 Jan 15;164(2):1110-6.

4)
Shimaoka Y, Attrep JF, Hirano T, Ishihara K, Suzuki R, Toyosaki T, Ochi T, Lipsky PE.
Nurse-like cells from bone marrow and synovium of patients with rheumatoid arthritis promote survival and enhance function of human B cells.
J Clin Invest. 1998 Aug 1;102(3):606-18.

5)
Miyashita T, McIlraith MJ, Grammer AC, Miura Y, Attrep JF, Shimaoka Y, Lipsky PE.
Bidirectional regulation of human B cell responses by CD40-CD40 ligand interactions.
J Immunol. 1997 May 15;158(10):4620-33.

6)
Imanaka T, Shichikawa K, Inoue K, Shimaoka Y, Takenaka Y, Wakitani S.
Increase in age at onset of rheumatoid arthritis in Japan over a 30 year period.
Ann Rheum Dis. 1997 May;56(5):313-6.

7)
Tomita T, Shimaoka Y, Kashiwagi N, Hashimoto H, Kawamura S, Lee SB, Nakagawa S, Shiho O, Hayashida K, Ochi T.
Enhanced expression of CD14 antigen on myeloid lineage cells derived from the bone marrow of patients with severe rheumatoid arthritis.
J Rheumatol. 1997 Mar;24(3):465-9.

8)
Tomita T, Kashiwagi N, Shimaoka Y, Ikawa T, Tanabe M, Nakagawa S, Kawamura S, Denno K, Owaki H, Ochi T.
Phenotypic characteristics of bone marrow cells in patients with rheumatoid arthritis.
J Rheumatol. 1994 Sep;21(9):1608-14.

9)
Tanabe M, Ochi T, Tomita T, Suzuki R, Sakata T, Shimaoka Y, Nakagawa S, Ono K.
Remarkable elevation of interleukin 6 and interleukin 8 levels in the bone marrow serum of patients with rheumatoid arthritis.
J Rheumatol. 1994 May;21(5):830-5.

10)
Ochi T, Tomita T, Kimura T, Azuma F, Owaki H, Wakitani S, Shimaoka Y, Ono H.
A concept to make schedules of therapies based on the natural courses of patients with rheumatoid arthritis
Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi.1994 Jan;68(1):50-61.

11)
Owaki H, Yukawa K, Ochi T, Shimaoka Y, Ono K.
Facs analysis of myeloid differentiation stages in epiphyseal bone marrow, adjacent to joints affected with rheumatoid arthritis.
Scand J Rheumatol. 1991;20(2):91-7.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

主任研究者の指示のもとに検討中である。

2. 実用新案登録

主任研究者の指示のもとに検討中である。

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

関節リウマチにおける線維芽細胞様細胞の由来、特徴に関する研究

主任研究者　越智　隆弘　大阪大学医学系研究科　招聘教授

研究要旨　関節リウマチ(RA)の病変部でより特異的とされる線維芽細胞様細胞(fibriblast like cell: FLC)について電子顕微鏡による検討をはじめ各種マーカーで検索した結果、FLC はマクロファージ系や線維芽細胞系、および両者の中間のような特徴を示していることが明らかとなった。上記の細胞は各種マーカーが陽性となったが、特に CD14 や BST-1 などの骨髄系マーカーが陽性であり、骨髄由来であることが示唆された。また、関節炎モデルマウスによる検討でも、関節炎局所には骨髄由来の細胞が増生していることが確認された。以上より、ヒト RA および関節炎マウスいずれの系でも骨髄由来の細胞が関節炎の発症や進行に関与する可能性が示された。

分担研究者　宇月　美和
岩手医科大学病理学第一講座　講師

A. 研究目的

関節リウマチ(RA)の病理組織像の特徴は 1)滑膜細胞の多層化、2)血管の増生、3)リンパ球浸潤、4)軟骨・骨破壊である。このうち 1)-3)は他の関節炎においてもみられる変化であるが、本研究では RA の病変部でより特異的とされる線維芽細胞様細胞(fibroblast like cell: FLC)について電子顕微鏡による検討をはじめ、各種マーカーや動物モデルを用いて、その由来や特徴を検討する。

B. 研究方法

(1)RA 患者から得られた滑膜および骨破壊部のパンヌスを 4%PFA/PBS で固定し、パラフィン包埋標本のほか、電子顕微鏡用標本を作成し、免疫組織化学による検討や超微形態的観察をおこなった。症例は比較的早期の症例から炎症の高度な症例、炎症が沈静化した症例など様々な炎症の程度の症例を用いた。また、超薄切片を用いた手法にて、酵素電顕を行い、各種マーカー陽性細胞の同定をおこなった。

(2)放射線照射後の C57BL/6 マウスに GFP トランスジェニックマウス由来の骨髄細胞を移植し、生着を確認後に関節炎カクテルを投与し、関節炎を発症させた。その後、滑膜組織やパンヌスを観察し、移植された骨髄由来細胞の分布を検討した。

C. 研究結果

(1) RA の滑膜組織およびパンヌスでみられる FLC の特徴は HLA-DR や CD106 が陽性を示すほかに、CD68 や CD11b などのマクロファージ系や CD14 や BST-1(CD157)の骨髄系など多彩なマーカーが陽性となり、各種のサイトカインや蛋白分解酵素を産生していた。また、電子顕微鏡的には 1)粗面小胞体が発達し、蛋白合成の盛んな線維芽細胞様の細胞、2)ライソゾームや突起を持つマクロファージ系の細胞、3)両者の中間の細胞であった。酵素電顕による検討では HLA-DR や CD14、BST-1, CD106 陽性細胞はおもに上記 1) 2)であった。これらの細胞は RA の発症早期の段階から認められた。

(2) GFP マウス由来の骨髄細胞を移植したマウスの系では、関節炎誘導マウスの滑膜組織およびパンヌス内に緑色蛍光を有する細胞が多数認められ、形態学的には円形や紡錘形など多彩な像を示していた。対照群では末梢血中の細胞と思われる顆粒球のみが陽性であった。

D. 考察

ヒト RA の組織による検討では、FLC は線維芽細胞系あるいはマクロファージ系、またはその中間の特徴を持つものであったが、多様な蛋白を産生しており、多機能な細胞であることが示唆された。また、細胞表面マーカーによる検討では骨髄マーカーも陽性となることから、様々な方向に分化しうるものであると思われる。マウスでの実験系では、関節炎の炎症性滑膜組織内で増生する細胞が骨髄由来のものであることが証明されたが、ヒトの RA の発症にも骨髄由来の細胞が関与している可能性が示唆された。

E. 結論

FLC は、形態学的にも機能的にも由来の同定が難しい細胞であるが、骨髄マーカーが陽性になることやマウスでの実験結果から、様々な方向に分化しうる骨髄由来の細胞であることことが明らかになった。今後は、この細胞に的を絞った検討が重要と思われ、電子顕微鏡や各種マーカーによる検索をすすめる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Miki Y, Suzuki T, Hatori M, Igarashi K, Aisaki KI, Kanno J, Nakamura Y, Uzuki M, Sawai T, Sasano H: Effects of aromatase inhibitors on human osteoblast and osteoblast-like cells: A possible androgenic bone protective effects induced by exemestane. Bone.40:

876-887 (2007)

Rosenthal AK. Gohr CM. Uzuki M. Masuda I. Osteopontin promotes pathologic mineralization in articular cartilage. Matrix Biology. 26(2): 96-105. (2007)

徳永勢二、宇月美和、鎌滝章央、貝山　潤、嶋村　正：関節リウマチ患者の関節内でのヒアルロン酸分解酵素(hyaluronidase)の発現と分布について. 岩手医誌. 59(2): 89-98 (2007)

宇月美和、佐々木喜子、澤井高志：関節リウマチ(RA)における軟骨・骨破壊の病理学的特徴. Clinical Calcium 17 (4): 474-483 (2007)

宇月美和、佐々木喜子、澤井高志：関節疾患の病理学的基礎. 臨床画像. 23(12): 1346-61(2007)

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-alpha and actinomycin D. Osteoarthr Cartil. 14: 435-441(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、佐藤克巳、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)

Miyazaki T, Bub JD, Uzuki M, Iwamoto Y: Adiponectin activates c-Jun NH2-terminal kinase and inhibits signal transducer and activator of transcription 3. [Journal Article] Biochemical & Biophysical Research Communications. 333: 79-87, (2005)

Itoh Y, Uzuki M, Fujii K, Sawai T: Connective tissue growth factor (CTGF) is expressed in early inflammatory stage of synovium of patients with rheumatoid arthritis (RA), and proliferates fibroblast-like synoviocytes. Arthritis Rheum. 52, S48, (2005)

Uzuki M, Sawai T, Ryan LM, Rosenthal A, Masuda I: Characterization of ANK positive cells in joint tissue from patients with calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition disease (CPPD). Arthritis Rheum. 52, S102, (2005)

Uzuki M, Itano N, Kimata K, Kaiyama J, Miyoshi T, Yoshida M, Sawai T: Expression patterns of hyaluronan synthases in the synovial tissue associated with change of molecular weight of hyaluronan in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 64 (suppl): 126(2005)

Uzuki M, Ryan L. M, Sawai T, Kingsley D. M, Masuda I: Expression of ank in joint tissue from patients with calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition disease. Ann Rheum Dis. 64 (suppl): 96 (2005).

Matsuda T, Uzuki M, Uchida T, Nakamura M, Tai M, Yakushiji F, Tomiyama J, Suzuki S, Fujiki K, Taniguchi K. Induction of mononuclear cell infiltration into liver by the Japanese herbal medicine. Drugs Exp Clin Res. 31: 207-214(2005)

宇月美和、大内修二、貝山潤、澤井高志：関節リウマチにおけるヒアルロン酸の動態-高分子ヒアルロン酸による治療の有効性を示す基礎的研究-. Clin Rheumatol. 17: 126-134 (2005)

宇月美和、高橋和広、笹野公伸、澤井高志：末梢CRFとurocortinの役割-免疫系. 内分泌・糖尿病科. 21: 482-489 (2005)

宇月美和、徳永勢二、澤井高志：関節・骨. 膠原病の病理診断マニュアル 病理と臨床 23巻 臨時増刊号（能勢眞人、尾崎承一編). 文光堂. 105-115 (2005)

2. 学会発表

Kumagai J, Uzuki M, Sawai T: Histology of the Traumatic Tom-Cuff Stumps. 10th International Congress of Shoulder and Elbow Surgery. Sep16-20, 2007; Bahia, Brazil.

宇月美和、徳永勢二、鎌滝章央、貝山　潤、吉田昌明、澤井高志：関節リウマチの滑膜組織におけるヒアルロン酸の代謝.（第51回日本リウマチ学会総会・学術集会　2007年4月26-29日、横浜）

徳永勢二、宇月美和、鎌滝章央、貝山　潤、嶋村　正、澤井高志：関節リウマチ患者の関節内でのヒアルロン酸分解酵素（hyaluronidase）の発現について.（第51回日本リウマチ学会総会・学術集会　2007年 4月26-29日、横浜）

宇月美和、徳永勢二、鎌滝章央、貝山　潤、北川広進、三好照三、澤井高志：滑膜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96回日本病理学会総会　2007年3月13-15日、大阪）

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2006年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　2006年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　2006年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95回日本病理学会総会　2006年4月30-5月2日、東京）

宇月美和、澤井高志、益田郁子：CPPD結晶沈着症患者の関節組織におけるANK陽性細胞の性質.（第95回日本病理学会総会　2006年4月30-5月2日、東京）

Sawai T, Uzuki M, Ouchi S, Kanno H: Dynamics of hyaluronic acid associated with cartilage destruction in rheumatoid arthritis. The 14th International Rheumatology Symposium　Apr 17-20, 2005, Yokohama

Itoh Y, Uzuki M, Fujii K, Sawai T: Connective tissue growth factor (CTGF) is expressed in early inflammatory stage of synovium of patients with rheumatoid arthritis (RA), and proliferates fibroblast-like synoviocytes. American College of Rheumatology 69th Annual Scientific Meeting. Nov13-17, 2005,　San Diego

Uzuki M, Sawai T, Lawrence M. Ryan, Ann Rosenthal, Masuda I: Characterization of ANK positive cells in joint tissue from patients with calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition disease (CPPD). American College of Rheumatology 69th Annual Scientific Meeting. Nov13-17, 2005, San Diego

Uzuki M, Itano N, Kimata K, Kaiyama J, Miyoshi T, Yoshida M, Sawai T: Expression patterns of hyaluronan synthases in the synovial tissue associated with change of molecular weight of hyaluronan in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. Annual European Congress of Rheuamtology EULAR 2005, Vienna, Austria, 8-11 June, 2005

Uzuki M, Ryan L. M, Sawai T, Kingsley D. M, Masuda I: Expression of ANK in joint tissue from patients with calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition disease. Annual European Congress of Rheuamtology EULAR 2005, Vienna, Austria, 8-11 June, 2005

高橋幸洋、菅野祐幸、宇月美和、吉田昌明、嶋村 正、澤井高志：関節リウマチ滑膜組織におけるEpstein-Barr virus感染.（第49回日本リウマチ学会総会・学術集会　2005年4月17-20日、横浜）

吉田 渡、吉田昌明、大内直久、田島克己、小山明子、吉田亜希、宇月美和、澤井高志、嶋村 正：ステロイド長期内服中に発生した腱損傷の6例.（第49回日本リウマチ学会総会・学術集会　2005年4月17-20日、横浜）

宇月美和、澤井高志、益田郁子：CPPD結晶沈着症患者の関節組織におけるANKの発現.（第49回日本リウマチ学会総会・学術集会　2005年4月17-20日、横浜）

大内修二、菅野祐幸、宇月美和、吉田昌明、嶋村 正、澤井高志：関節リウマチ関節液による関節軟骨細胞のアポトーシス誘導.（第49回日本リウマチ学会総会·学術集会　2005年4月17-20日、横浜）

宇月美和、澤井高志、益田郁子：CPPD結晶沈着症患者の関節組織におけるANKの発現.（第94回日本病理学会総会　2005年4月14-16日、横浜）

宇月美和、徳永勢二、佐藤克巳、澤井高志：関節病変の病理.（シンポジウム）第20回日本臨床リウマチ学会総会　2005年11月4-5日、神戸

G. 知的財産権の出願・登録状況　　なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫ｱﾚﾙｷﾞｰ疾患予防・治療研究事業）
総合研究報告書

ナース細胞の病態解明

主任研究者　越智　隆弘　大阪大学医学系研究科　招聘教授

研究要旨　　関節リウマチ患者の腸骨から採取した骨髄、もしくは関節から採取した滑膜組織から、８系統のナース細胞の樹立ができ、これらを標準細胞として各研究者に供することが可能となった。これらの細胞の特性を解析することにより、関節破壊におけるナース細胞の役割が解明できるものと考えられた。

分担研究者
大和谷　厚
大阪大学大学院医学系研究科教授

A．研究目的

関節リウマチでは、関節滑膜や骨髄中に存在する間質系細胞(ナース細胞)が骨破壊に強く関与していることが示されている。本研究は、まずナース細胞を樹立することを主たる目的としている。そして、骨髄組織におけるナース細胞を用いて、その関節破壊への関与をサイトカインやケミカルメディエーターの動態から明らかにする。

B．研究方法

1. ナース細胞培養系の樹立

ナース細胞は、関節リウマチ患者の腸骨から採取した骨髄、もしくは関節から採取した滑膜組織から分離した。細胞は10% fetal calf serum[FCS: Hyclone , Logan, UT, USA],100 units/ml of penicillin [Gibco BRL],そして100μg/ml of streptomycin [Gibco BRL]を加えたDMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) [DMEM; Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA]をメディウムとし、37℃7.5%CO_2で培養を行う。継代を重ねた後、B-cell lymphoma lineであるMC/carと共培養し、pseudoemperipolesis能(細胞抱き込み能)を持つことが確認されたものをナース細胞とした。

2. 骨髄ナース細胞の骨吸収能アッセイ

96wellの破骨細胞活性アッセイ用基質プレート(OAAS)に、骨髄ナース細胞を5×10^5cells/mlで播く。3日ごとにメディウムを交換し、14日後、破骨細胞活性アッセイ用基質プレートを目視、もしくは光学顕微鏡下で観察し、骨吸収能を調べる。また、TRAP染色を行う。

C．研究結果

1. ナース細胞の樹立

pseudoemperipolesis能を確認するために、24well細胞培養皿に間葉系細胞を30,000cells/mlの割合で播き、２４時間後B-cell lymphoma lineであるMC/carを1×10^6ずつ加え、６時間後、３つ以上抱き込みをしている細胞が、200以上存在する集団をナース細胞とした結果、滑膜からは5系統、骨髄からは3系統の細胞を樹立することができた。

2. 骨髄ナース細胞の骨吸収能

これらのナース細胞を用い、骨吸収能を調べたところ、ナース細胞単独培養の条件下では骨吸収能が見られなかった。

D．考察

８系統のナース細胞の樹立ができ、これらを標準細胞として各研究者に供することが可能となったが、それぞれの系統についてさらに特性を解析していく必要があると考えられる。また、ナース細胞単独では骨破壊に影響を及ぼさないことが分かったので、今後、骨髄マクロファージなどが関節リウマチ患者の関節破壊に及ぼす影響などを、ナース細胞を用いて調べ、さらに、サイトカインやヒスタミンなどケミカルメディエータの役割を解析していく。特にヒスタミンに関しては、新たに発見されたH4受容体との関連を精査する。

E．結論

８系統のナース細胞の樹立ができた。

F．研究発表

1. 論文発表　　準備中
2. 学会発表　　準備中

G．知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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

RAナース細胞により惹起される自己反応性リンパ球の増殖に関する研究

主任研究者　越智　隆弘　大阪大学医学系研究科　招聘教授

研究要旨
RAナース細胞由来抗原に反応するT細胞がRA患者末梢血中に高頻度に存在する可能性が示唆された。また、RAナース細胞が特定のB細胞を選択的に増殖・活性化する可能性が強まった。

分担研究者　鈴木　隆二
(独)相模原病院　臨床研究センター　病態総合研究部　診断・治療研究室長
分担研究者　前田　朋子
塩野義製薬株式会社　創薬研究所　ターゲット探索部門　主任研究員

A. 研究目的

RAナース細胞が患者における異常な骨破壊と免疫応答を惹起する要因となっていることは、主任研究者をはじめ国内外の研究者により報告されている。今年度はRAナース細胞が異常な免疫環境を構築する機序・機構を解明するために、RA患者末梢血T細胞のナース細胞由来抗原への反応性、ナース細胞の存在下における健常人B細胞の増殖について以下の検討を実施した。

B. 方法

1)RA患者末梢血のRAナース細胞由来抗原に対する反応性の検討
(医)行岡病院よりインフォームドコンセントを経て採取されたRA患者末梢血17例および健常人ボランティア末梢血10例よりficoll法にて末梢血単核球を分離した。抗原として、RA滑膜組織由来T細胞の認識する抗原AのC末端より265残基までのリコンビナント蛋白を精製、抗原とし、抗原存在下における患者および健常人末梢血の増殖活性を10% FBS/RPMI1640、7.5%CO_2存在下、72時間培養後の3H-thymidineの取り込みにより測定した。

2)健常人4例の末梢血よりB細胞を分離し10%FBS/45%RPMI1640/45%DMEM、7.5% CO_2存在下でRAナース細胞との共培養を実施した。約30日間の共培養後、RAナース細胞依存性に増殖した細胞株の培養上清に産生される免疫グロブリンの反応性を検討すると共に、株化細胞をさらにクローニングし、そのVHレパトア解析を実施した。

(倫理面への配慮)
RA患者および健常人からの末梢血、RA患者からの滑膜組織取得に当たっては、各研究実施施設における研究倫理委員会において事前に承認を受け、十分なインフォームドコンセントの下、提供者の自由意思に基づいた検体提供を受けた。

C. 結果

1)10例の健常人末梢血由来単核球はRAナース細胞由来抗原に対し増殖活性を示さなかったのに対し、RA患者末梢血由来単核球は17例中14例が中程度から強い増殖活性(stimulation index:5.38－50.35)を示した。今までに解析した患者および健常人HLA alleleに共通の特徴は存在しなかった。

2)健常人全例の末梢血B細胞はRAナース細胞存在下で増殖した。ナース細胞依存性に増殖するB細胞クローンのVHレパトア(現在解析中)は培養前と比較しオリゴクローナルとなる傾向を見出した。また、株化細胞の培養上清中のイムノグロブリンは、IgG/A/Mであり、一部にRAナース細胞に反応する自己抗体の存在を確認した。

D. 考察

RAナース細胞由来抗原Aは、自己抗原として患者末梢血に認識される頻度が非常に高いことから(82.4%)、これに反応するT細胞の頻度やそのマーカー・サイトカイン産生能等の機能に関する詳細な解析が RA 発症・病態形成機構の解明の一助となると考えられる。
また、健常人B細胞がRAナース細胞により増殖すること自体は島岡ら(J. Clin. Invest.,1998)をはじめとしてすでに報告があるが、今回のレパトア解析を通じ、RA ナース細胞が骨髄・滑膜病変部においてB細胞の再分化と自己反応性の獲得にも関与している可能性が考えられた。これを示すためには、オリゴクローナル化したB細胞の表面抗原の解析や、B細胞レパトアがRAナース細胞によりオリゴクローナル化する機序の解明等が必要である。

E. 結論

RAナース細胞由来抗原に反応するT細胞が末梢血中に高頻度に存在する可能性が示唆された。また、RAナース細胞が特定のB細胞を選択的に増殖・活性化する可能性が強まった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Limited VH gene usage in B-cell clones established with nurse-like cells from patients with rheumatoid arthritis. Nakamura-Kikuoka, S., Suzuki R., Toyosaki-Maeda, T. Shimaoka, Y., Yukioka, M., Ochi, T., et al. Rheumatology (Oxford) 45(5):549-57, 2006.

Adrenocorticotropic hormone and dehydroepiandrosterone sulfate levels of rheumatoid arthritis patients treated with glucocorticoids. Yukioka, M., Komatsubara, Y., Yukioka, K., Toyosaki-Maeda T., Yonenobu, K., Ochi, T. Mod Rheumatol.;16(1):30-5, 2006.

Nurse-like cells reside in the synovial tissue and bone marrow in rheumatoid arthritis. Ochi, T., Yoshikawa, H., Toyosaki-Maeda, T. and Lipsky, P.E. Arthritis Res Ther 9:201, 2007.

Arthritis and pneumonitis produced by the same T cell clones from mice with spontaneous autoimmune arthritis.
Wakasa-Morimoto, C., Toyosaki-Maeda, T., Suzuki R., Sakaguchi S., et al. J. Immunology, in press.

The interaction of monocytes with rheumatoid synovial cells is a key step in LIGHT-mediated inflammatory bone destruction.
Ishida S., , Toyosaki-Maeda, T., Suzuki, R., Ochi T., et al. J. Immunology, In press.

2. 学会発表

SKGマウス関節炎由来T細胞クローン移入による関節炎、間質性肺炎の誘導
森元(若狭)千晶、前田朋子、鈴木隆二、坂口志文ほか
第50回 日本リウマチ学会総会、2006年

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

関節リウマチの骨髄変化に関する研究

主任研究者　越智　隆弘　大阪大学医学研究科　招聘教授

研究要旨

関節リウマチ(RA)骨髄CD34+細胞は(SCF+GM+)TNF-αの存在下において、線維芽細胞様細胞への分化が亢進していること、さらにこのTNF-αに対する異常反応性の1つの機序としてRA骨髄CD34+細胞のNFκB1(p50) mRNAの発現の亢進が関与することを我々は報告してきた。近年、Kruppel-like Factor 5(KLF-5) はNFκB1と協同してPDGF-A遺伝子の発現を上昇させることが注目されている。今回我々は、RA骨髄CD34+細胞のKLF-5 mRNAの発現について検討した。RA患者骨髄CD34+細胞においてはKLF-5 mRNAの発現がOA患者に比して有意に亢進していた。以上の結果より、RA骨髄CD34+細胞では、NFκB1(p50) mRNAとともにKLF-5 mRNAの発現の亢進がそのTNF-αに対する反応性の異常に関与する可能性が示唆された。こうしたKLF-5 mRNAの発現の亢進はPDGF-Aの発現を増強することにより、骨髄CD34+細胞の線維芽細胞様細胞への分化を促進するものと考えられる。一方で、RA骨髄およびOA骨髄由来のpDCはTNF-αあるいはGM- CSF+ TNF-αの存在下で線維芽細胞様細胞へ分化し、両者の分化能には有意差がなく、また両者のVEGF産生能にも有意差はなかった。以上の結果より、RA骨髄CD34+細胞の線維芽細胞様細胞への分化の促進には、CD34+細胞からpDCへの分化の亢進が関与する可能性が示唆された。

分担研究者：　廣畑俊成
北里大学医学部膠原病・感染内科学　教授

A　研究目的

関節リウマチ(RA)は関節滑膜の増殖による骨破壊を主徴とする原因不明の炎症性疾患である。関節滑膜を構成する主要な細胞として、マクロファージ様のA型滑膜細胞と線維芽細胞様のB型滑膜細胞が存在することが知られている。A型滑膜細胞は骨髄に由来することが明らかにされているが、B型滑膜細胞の由来についてはよく知られていなかった。我々は、RA骨髄CD34+細胞は(SCF+GM) +TNF-αの存在下において、OA骨髄CD34+細胞に比し効率的に線維芽細胞様細胞に分化することを明らかにした。この線維芽細胞様細胞はMMP-1を産生することから、B型滑膜細胞と同じ性質を有するものと考えられる。一方、NFκBはTNF-αのシグナル伝達において重要な役割を果たすことが明らかにされている。今回我々は、RA骨髄CD34+細胞のTNF-αに対する異常反応性のメカニズムを解析するため、NFκB関連分子のmRNAの発現について検討した。

B　研究方法

RA患者、OA患者の腸骨骨髄液よりmagnetic beadsを用いてCD34+細胞とCD304+細胞（pDC）を精製した。精製CD34+細胞よりmRNAを抽出し、オリゴdTプライマー法によりcDNAを合成し、Realtime PCRによりNFκB1 (p50)、NFκB2(p52)、RelA(p65)、KLF5のmRNAを定量した。データはβ-actinのmRNAのcopy数に対する比として求めた。また、CD34+細胞とCD304+細胞をGM-CSF・TNF-αの存在・非存在下に3～4週培養し、その形態変化を観察し、線維芽細胞様細胞への分化能と培養上清中のVEGFおよびMMP-1の産生能を検討し

（倫理面への配慮）
患者には研究内容及び検体採取の方法・危険性等を説明し、インフォームドコンセントを文書で取得した上で検体の提供を受けた。検体については連結匿名化にてプライバシーの保護をはかった。

C　研究結果

RA患者骨髄CD34+細胞においてはNFκB1(p50) mRNAの発現がOA患者に比して有意に亢進していたが、NFκB2(p52)およびRelA(p65)のmRNAについては有意な差は認められなかった。メトトレキサート(MTX)あるいはステロイドの投与の有無により、RA患者骨髄CD34+細胞のNFκB1(p50)に対するmRNAの発現に差を認めなかった(図2)。またRA患者骨髄CD34+細胞NFκB1 mRNAの発現と血清CRP値の間に有意な相関はなかった。また、RA患者骨髄CD34+細胞においてはKLF-5 mRNAの発現がOA患者に比して有意に亢進していた。MTXあるいはステロイドの投与の有無により、骨髄CD34+細胞のKLF-5 mRNAの発現に差を認めなかった。また骨髄CD34+細胞のKLF-5 mRNAの発現と血清CRP値の間に有意な相関はなかった。

一方、RA骨髄およびOA骨髄由来のpDCはTNF-αあるいはGM- CSF+ TNF-αの存在下で線維芽細胞様細胞へ分化した。しかし、両者の分化能には有意差がなく、また両者のVEGFとMMP-1の産生能にも有意差はなかった。

D　考察

以上の結果より、RA骨髄CD34+細胞のNFκB1(p50)およびKLF5 mRNAの亢進がそのTNF-αに対する反応性の異常に関与する可能性が示唆された。RelA(p65)やNFκB2(p52)のmRNA発現はRAとOAの間では差がなく、NFκB1(p50) mRNAの選択的発現増強が重要であると考えられる。さらにこうした異常は治療薬や全身の炎症反応による二次的な異常ではなく、RA固有の異常であると考えられる。こうしたNFκB1(p50) mRNAとKLF-5 mRNAの発現の亢進はPDGF-Aの発現を増強することにより、骨髄CD34+

細胞の線維芽細胞様細胞への分化を促進するものと考えられる。

一方で、最終年度の研究結果より、骨髄由来のpDCは線維芽細胞様のB型滑膜細胞の前駆細胞であることが示唆された。さらにこうした骨髄のpDCから線維芽細胞様細胞への分化はRAとOAの間には有意差がなかった。従って、RA骨髄CD34+細胞からのpDCへの分化能の異常亢進が、RA骨髄CD34+細胞の線維芽細胞様細胞への分化の亢進に寄与していると考えられる。

今後、骨髄CD34+細胞のこうしたpDCへの分化能の異常亢進の機序を解明してゆくことがRAの病因の解明の上で重要と思われる。特にNFκB1(p50) mRNAとKLF-5 mRNAの発現の亢進がpDCへの分化能の異常亢進に関与するかについて検討する必要がある。

E. 結論

RA滑膜のB型滑膜細胞増殖さらに、RAの病態・病因においては骨髄CD34+細胞の遺伝子発現の異常が関与すると考えられる。さらにRA骨髄CD34+細胞の線維芽細胞様細胞への分化の促進には、CD34+細胞からpDCへの分化の亢進が関与する可能性が示唆された。

F 研究発表

1. 論文発表

- Nagai T, Arinuma Y, Yanagida T, Yamamoto K, Hirohata S: Anti-ribosomal P protein antibody in human systemic lupus erythematosus up-regulates the expression of proinflammatory cytokines by human peripheral blood monocytes. Arthritis Rheum, 52: 847-855, 2005.
- Yajima N, Kasama T, Isozaki T, Odai T, Matsunawa M, Negishi M, Ide H, Kameoka Y, Hirohata S, Adachi M: Eelevated levels of soluble fractalkine in active systemic lupus erythematosus. Potential involvement in neuropsychiatric manifestations. Arthritis Rheum, 52: 1670-1675, 2005.
- Shibuya H, Hirohata S: Differential effects of IFN-α on the expression of various Th2 cytokines in human CD4+ T cells. J Allergy Clin Immunol, 116: 205-212, 2005.
- 広畑俊成: 第6回Latest Orthopedics研究会の記録. 関節リウマチの病態形成における骨髄異常について. 骨・関節・靭帯, 18: 257-264, 2005.
- Hirohata S, Miura Y, Tomita T, Yoshikawa H, Ochi T, Chiorazzi N: Enhanced expression of mRNA for nuclear factor kB1 (p50) in CD34+ cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther, 8: (Fulltext available online) http://arthritis-research.com/content/8/2/R54, 2006.
- Hirohata S: Is the long-term use of systemic corticosteroids beneficial in the management of Behcet's syndrome? Nat Clin Pract Rheum, 2: 358-359, 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　一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.
- Hirohata S, Arinuma Y, Yanagida T: Specificity of enzyme-linked immunosorbent assay for IgG anti-NR2 glutamate receptor antibodies: Comment on the concise communication by Yoshio et al. Arthritis Rheum, 56: 386-387, 2007.
- Hirohata S, Arimura Y, Takayama M, Yoshio T: Association of cerebrospinal fluid anti-ribosomal P protein antibodies with diffuse psychiatric/neuropsychological syndromes in systemic lupus erythematosus. Arthritis Res Ther, 9: R44, 2007.

2. 学会発表

そのうち主なもの

- Hirohata S: Symposium 4: Basic science of rheumatic dieases- Molecular mechanism and signaling; Abnormalities of bone marrow CD34+ cells in rheumatoid arthritis. The 49th Annual Scientific Meeting (Yokohama) S111, 2005.
- Yoshikawa H, Ochi T: Enhanced expression of mRNA for nuclear factor kB1 (p50) in CD34+ cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis. 69th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, San Diego, Arthritis Rheum 52(Suppl.): S1186, 2005.
- 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.
- Hirohata S:Hypersensitivity of T cells in Behcet's Disease, to a variety of bacterial antigens. Japan and Korea Joint Meeting on Behcet's Disease, Yokohama, p.11, 2007.
- Hirohata S, YanagidaT, Miura Y, Tomita T,
- Hirohata S, Miura Y, Tomita T, Yoshikawa H: Enhanced expression of mRNA for Kruppel-Like Factor 5 in CD34+ cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis. EAGOR 2007, Seoul, p41.

G 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1 特許取得

骨髄液の再生方法（出願中）

2 実用新案登録

該当なし

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

研究課題：**関節リウマチ・骨粗鬆症の重症化防止治療開発研究**

主任研究者　越智　隆弘　大阪大学医学系研究科　招聘教授

山村研一
熊本大学発生医学研究センター･教授

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、elongation factor (EEF1a1), granulin, Sirpa (signal regulatory protein alpha), Sulfatase 1, Tfnsf14 (tumor necrosis factor superfamily, member 14)等に関して、トランスジェニックマウスや遺伝子破壊マウスを作製する。作製したこれらのモデルマウスを解析することにより、これらの遺伝子が関節リウマチや骨粗しょう症と関連するのかどうか、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

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。また、遺伝子破壊の場合は、遺伝子の完全破壊、条件的遺伝子破壊、遺伝子置換が可能なカセットを用いて、相同組換えESクローンの単離、破壊マウスの樹立を行い、そのマウスを解析する。

遺伝子の完全破壊、条件的遺伝子破壊、遺伝子挿入が可能となるように、lox71およびloxPをあらかじめ挿入した相同組換えベクターを用いてtargeted cloneを単離し、キメラマウスを作製する。

トランスジェニックマウス作製においては、まず全身で強く発現させ病気が発症するかどうかを検討するため、すべてCAGGSプロモータを用いることとした。何らかの症状が出現すれば、より特異的なプロモーターを使用する。

（倫理面への配慮）

遺伝子改変マウスの作製と使用に関する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。

C　研究結果

熊本大学の我々のグループは International Gene Trap Consortium に参加している。このコンソーシアムではそれぞれが所属する機関において保有している遺伝子トラップクローンについて、統合データベースを作成した。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。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-A」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。上記のベクターを利用して、Mmp12 遺伝子の一部を組込み、相同組換え用のベクターを作製した。そしてこれを用いて相同組換えクローンを得ることができた。現在キメラマウスを作製中である。

5 つのリウマチ関連遺伝子(EEF1a1, granulin, Sirpa, Sulfatase 1, Tfnsf14)に CAG プロモーターを接続したトランスジーンを構築し、トランスジェニックマウスの作製を開始した。EEF1a1 については、すでに 1 系統樹立した。また、スクリーニング用のサザンブロット解析用のプローブ及び PCR プライマーも準備した。

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、遺伝子破壊マウスやトランスジェニックマウスを自在に駆使する必要がある。現在は、単純に破壊をするだ

けではなく、条件的遺伝子破壊も必須である。さらに、関節リウマチ等の疾患は、ヒトにおいても必ずしも病態が明確ではないので、マウスの内在性遺伝子をヒトの遺伝子で置換する等、ヒト化することが今後ますます重要になると考えられる。

E　結論

ヒト疾患を忠実に反映するモデルマウスの作製のため、マウスの内在性遺伝子をヒト遺伝子で容易に置換できる方法を考案し、それに基づきMmp12遺伝子に相同組換えを行ったESクローンの単離とキメラマウスの作製に成功した。また、5つの遺伝子について、トランスジーンを構築した。年度内には、いずれもマウス系統を樹立できる見込みである。

関節リウマチのモデルはすでにいくつか開発されているが、その病態の多彩さからより多くのモデルが必要とされている。ノックアウトマウス1系統、トランスジェニックマウス5系統の合計6系統が樹立されれば、それらを用いて病態解析を行うことで、大きな成果が期待できる。よいモデルは学術的に価値が高く、国際的にも高い評価をうけることができる。また、ここで試みているヒト化モデルは、創薬ターゲットのvalidationや薬剤の最適化に非常に重要と考えられるに至っており、社会的意義も大きい。

F　研究発表

1．論文発表

(1) Taniwaki, T., Haruna, K., Nakamura, H., Sekimoto, T., Oike, Y., Imaizumi, T., Saito, F., Muta, M., Soejima, Y., Utoh, A., Nakagata, N., Araki, M., Yamamura, K., Araki, K. Characterization of an exchangeable gene trap using pU-17 carrying a stop codon-betageo cassette. Dev. Growth Differ. 47:163-172, 2005.
(2) Alex S. Nord, A. S., Patricia J. Chang, P. J., Bruce R. Conklin, B. R., Cox, C., Harper, C. A., Hicks, G. G., Huang, C. C. Johns, S. J., Kawamoto, M., Liu, S., Meng, E. C., Morris, J. H., Rossant5, J., Ruiz, P., Skarnes, W. C., Soriano, P., Stanford, W. 1., Stryke, D., von Melchner, H., Wurst, W., Yamamura, K., Young, S. G., Babbitt, P. C. and Ferrin, T. E. The international gene trap consortium web site: a portal to all publly available gene trap cell lines and mouse. Nucleic Acids Res. 34: D642-D648, 2006.
(3) 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.
(4) Yamamura, K. and Araki, K. Gene trap mutagenesis in mice: New perspectives and tools in cancer research. Cancer Science 99: 1-6, 2008.

2．学会発表

(1) 山村研一，荒木正健，荒木喜美：ヒト疾患モデルの大規模作製，日本人類遺伝学会第50回大会，2005.9.19-22、岡山
(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：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
(4) Ken-ichi Yamamura: Gene-environment Interactions in Mammalian Development and Disease, The 22nd International Kumamoto Medical Bioscience Symposium, 2006.10.23-24, Kumamoto
(5) 山村研一：ヒト疾患研究における動物モデルの有用性と世界の現状、日本人類遺伝学会第52回大会、2007.9.14、東京
(6) Ken-ichi Yamamura: Exchangeable gene trap as a tool in the mouse knockout project(symposium),The 12th International Symposium for Mouse Genomics The BK21 International Symposium of Veterinary Science, Seoul National University, 2007.5.15, Korea
(7) 山村研一：世界のノックアウトプロジェクト（シンポジウム），第２４回日本疾患モデル学会総会，２００７．８．３１～９．１，つくば
(8) 山村研一：ヒト疾患研究における動物モデルの有用性と世界の現状（教育講演２），第５２回大会日本人類遺伝学会 ゲノム解析から臨床応用へのロードマップ，２００７．９．１２～１５，東京
(9) Kimi Araki, Naoki Takeda, Atsushi Yoshiki, Gen Yamada, Naomi Nakagata,

Toshihiko Shiroishi, Kazuo Moriwaki and Ken-ichi Yamamura: Establishment of embryonic stem cell lines derived from MSM/Ms strain originated from Mus musculus molossinus., 21st International Mammalian Genome Conference IMGC2007, 2007.Oct.28-Nov.1, 京都

G　知的財産権の出願・取得状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫ｱﾚﾙｷﾞｰ疾患予防・治療研究事業）
総合研究報告書

RANKL 依存性破骨細胞形成の分子メカニズムに関する研究

主任研究者　越智　隆弘　大阪大学医学系研究科　招聘教授

研究要旨　本研究において破骨細胞分化因子 RANKL の細胞ガイドメイン切断のメカニズムが明らかになった。また TGF-βシグナルが RANKL 依存性破骨細胞形成において重要な役割を果たすことが明らかになった。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

田中　栄・東京大学医学部附属病院　整形外科　講師

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。破骨細胞は血球系の前駆細胞から分化する多核巨細胞であるが、その分化・活性化には receptor activator of NF-κB ligand(RANKL)を介するメカニズムと介さないメカニズムの両方が関与することが知られている。RANKL は tumor necrosis factor (TNF)スーパーファミリーに所属する膜結合性サイトカインであり、破骨細胞前駆細胞に発現する受容体 RANK と結合することによって破骨細胞の分化・活性化を促進する。RANKL は膜結合型サイトカインとして発見されたが、その後の検討により、膜結合型 RANKL が膜近傍の stalk region で切断されることにより可溶型 RANKL が生じることが明らかになった。

本研究の目的は、①RANKL の可溶化メカニズムを明らかにし、生理的・病的意義を明らかにすること。②RANKL 依存性破骨細胞分化過程の分子メカニズムを明らかにすることであった。

B．研究方法

①RANKL shedding assay の確立

RANKL は膜近傍の stalk region で切断され、可溶型 RANKL が産生される。本アッセイ系の特色は、細胞内ドメインから stalk region までを含む RANKL と熱安定性 SEAP(secreted alkaline phosphatase)との融合蛋白の発現ベクターを構築し、RANKL の shedding 活性を細胞上清への SEAP の放出という形で捕らえ、その上清中のアルカリフォスファターゼ活性を測定することで shedding 活性を定量するという点である。このアッセイ系を用いることにより、簡便、かつ安価に shedding 活性をもつクローンをスクリーニングすることが可能となる。

②ST2cDNA ライブラリーのスクリーニング

まず大腸菌(DH5α)に ST2cDNA ライブラリーをトランスフォーメーションした。菌液をアンピシリンプレートに撒き、タイターをチェック、100 コロニーに相当する量の菌液を 24well アンピシリンプレートに撒き、サブプール分けを行う。得られたコロニーを培地に溶解し、ミニプレップ法にてプラスミドを抽出する。合計で 1000 個のサブプールを用意し、10 万クローンのスクリーニングを行った。ポジティブクローンについて、詳細な解析を行った。中でも matrix metalloproteinase ファミリーについては詳細に解析を行った。

③RANKL 依存性破骨細胞分化シグナルの検討

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、ナ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 陽性細胞を可溶型 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。またマウス破骨細胞形成系においてTGF-βが破骨細胞形成に促進的に働くことが明らかになっているが、このシグナル伝達系についても詳細な解析を行った。

（倫理面への配慮）

動物実験は「動物の保護および管理に関する法律」などに従い、動物愛護の観点に十分配慮して行った。また実験に使用する劇物・毒物の保管、管理は法律に則り、細心の注意を払って行った。個人情報は、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した。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・コンセントを取得した。

C．研究結果

RANKL-SEAPを用いたスクリーニング系を確立し、計10万クローンのスクリーニングを行った。その結果、Ras-GAP(GTPase-activating protein)として同定されたCAPRI (Ca^{2+}-promoted Ras inactivator)のスプライスバリアントがRANKL sheddingを促進することが明らかになった。またMMP, ADAM family memberのスクリーニング、およびノックアウトマウスを用いた研究から、MMP14, ADAM10にが強いRANKL切断活性を有することが明らかになった(図1)。

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を同定した。またマウス破骨細胞形成系を用いて、TGF-βがRANKLによる破骨細胞分化にとって必須な因子であることを阻害剤を用いた研究およびドミナントネガティブ型TGF-βII型受容体を用いた研究から明らかにした。またケモカインであるfractalkine受容体であるCX3CR1の発現を促進し、破骨細胞分化に関与する可能性をRNA interference法を用いて明らかにした(図2)。

D. 考察

TNF-・は膜結合型サイトカインとして産生され、TACE(TNF-・ converting enzyme)などのshedding enzymeによって可溶型となって血中へと放出されることにより全身的な影響をおよぼすと考えられている。破骨細胞分化因子として同定されたRANKL可溶化の意義は未だに不明であるが、TNF-・と同様に可溶型RANKLが血中に放出されることによって、局所的な骨吸収亢進を全身へと波及させる可能性がある。本研究でわれわれは細胞内シグナル分子であるCAPRIのsplicing variant, MMP14, ADAM10がRANKLのsheddingを亢進することを明らかにした。RANKL切断の生理的、病的意義は明確ではないが、関節リウマチ患者において血中RANKL濃度高値は骨破壊について予後不良因子であることが報告されており、今後臨床的意義についての検討が望まれる。また本研究からTGF-・・・型受容体を介したシグナル伝達系がRANKL依存性破骨細胞形成に重要な役割を果たしていることが明らかになった。今後RANKL依存性破骨細胞分化シグナルを標的にした治療薬の開発によって関節リウマチ骨破壊、骨粗鬆症の治療が促進することが期待される。

E．結論

RANKL依存性の破骨細胞分化系は関節リウマチ骨破壊においてきわめて重要な役割を果たしており、この経路を標的にした治療薬は有望な骨破壊予防薬となる可能性がある。

F．研究発表

論文発表

① Kwak HB, Lee SW, Jin HM, Ha H, Lee SH, Takeshita S, Tanaka S, Kim HM, Kim HH, Lee ZH. Monokine induced by interferon-gamma is induced by receptor activator of nuclear factor κB ligand and involved in osteoclast adhesion and migration. Blood. 2005, 105: 2963-2969.

② Yagishita N, Ohneda K, Amano T, Yamasaki S, Sugiura A, Tsuchimochi K, Shin H, Kawahara K, Ohneda O, Ohta T, Tanaka S, Yamamoto M, Maruyama I, Nishioka K, Fukamizu A, Nakajima T. Essential Role of Synoviolin in Embryogenesis. J Biol Chem 2005, 280:7909-7916.

③ Gohda J, Akiyama T, Koga T, Takayanagi H,

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

④ Hsia, DA, Lim S-T, Bernard-Trifilo JA, Mitra, SK, Tanaka S, den Hertog, J, Streblow, DN, IlicZ D, Ginsberg, MH, Schlaepfer DD. Integrin α4β1 promotes FAK-independent cell motility via α4 cytoplasmic domain –specific activation of Src. Mol Cell Biol 2005, 25:9700-9712.

⑤ Fukuda A, Hikita A, Wakeyama H, Akiyama T, Oda H, Nakamura K, Tanaka S. Regulation of osteoclast apoptosis and motility by small GTPase binding protein Rac1. J Bone Miner Res 2005, 20:2245-2253.

⑥ Hikita A, Kadono Y, Chikuda H, Fukuda A, Wakeyama H, Yasuda H, Nakamura K, Oda H, Miyazaki T, Tanaka S. Identification of an alternatively spliced variant of CAPRI as a possible regulator of RANKL shedding. J Biol Chem 2005, 280:41700-41706.

⑦ Hu K, Yang J, Tanaka S, Gonias SL, Mars WM, Liu Y. Tissue-type plasminogen activator acts as a cytokine that triggers intracellular signal transduction and induces matrix metalloproteinase-9 gene expression. J Biol Chem 2006, 281:2120-2127.

⑧ Hikita A, Yana I, Wakeyama H, Nakamura M, Kadono Y, Oshima Y, Nakamura K, Seiki M, Tanak S. Negative Regulation of Osteoclastogenesis by Ectodomain Shedding of Receptor Activator of NF-κB Ligand. J Biol. Chem 2006, 281:36846-36855

⑨ 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.

⑩ 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.

⑪ 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.

⑫ 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.

⑬ 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.

⑭ Hiramatsu K, Asaba Y, Takeshita S, Nimura Y, Tatsumi S, Katagiri N, Niida S, Nakajima T, Tanaka S, Ito M, Karsenty G, Ikeda K. γ-glutamyltransferase as a pathogenic factor of bone and joint disease. Endocrinology 2007, 48:2708-2715.

⑮ Kawamura N, Kugimiya F, Oshima Y, Ohba S, Ikeda T, Saito T, Shinoda Y, Kawasaki Y, Ogata N, Hoshi K, Akiyama T, Chen WS, Hay N, Tobe K, Kadowaki T, Azuma Y, Tanaka S, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H.2007. Akt1 in osteoblasts and osteoclasts controls bone remodeling. PLoS ONE 2:e1058.

⑯ Wakeyama H, Akiyama T, Takahashi K, Amano H, Kadono Y, Nakamura M, Oshima Y, Itabe H, Nakayama KI, Nakayama K, Nakamura K, Tanaka S. 2007. Negative feedback loop in the Bim-caspase-3 axis regulating apoptosis and activity of osteoclasts. J Bone Miner Res 22:1631-1639.

学会発表

① A New York Academy of Sciences Meeting "Skeletal development and remodeling in health, disease & aging" (2005.5.18-21) New York: Session I, BONE CELL FORMATION ANS FATE "Regulation of the life and death of the osteoclast"

② 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"2006

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 A New York Academy of Sciences Meeting "Skeletal development and remodeling in health, disease & aging" (2007.5.18-21) New York: Session I, BONE CELL FORMATION ANS FATE "Regulation of the life and death of the osteoclast"

⑤ 25th Annual Meeting of the Japanese Society for Bone and Mineral Research ANZBMS-JSBMR, Joint Symposium 1-4(2007.7.20) "Role of Bcl-2 Family on Skeletal Integrity" 第22回日本骨代謝学会(2004.8.7)大阪 シンポジウムII 関節リウマチと変形性関節症における骨破壊分子メカニズムと治療 「関節炎における骨破壊メカニズムとその制御」

⑥ 第37回日本結合組織学会学術集会(2005.5.27)富山 特別講演2「関節リウマチによる骨関節破壊の分子メカニズム」

⑦ 第33回 臨床免疫学会総会 ランチョン教育講演 (2005.10.29) 京都 「骨破壊をターゲットにした関節リウマチの治療戦略」

⑧ 第33回 日本リウマチ・関節外科学会(2005.11.11)品川 ワークショップ2 関節リウマチ治療における骨・関節破壊抑制の最新知見「関節リウマチにおける骨破壊の分子メカニズム」

⑨ 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」

⑩ 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 -」

⑪ 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」

⑫ 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 」

⑬ 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」

⑭ 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」

⑮ 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」

⑯ 第80回日本整形外科学会学術集会(2007.5.24) 教育研修講演「骨関節破壊を標的にした関節リウマチ治療戦略」

⑰ 第80回日本整形外科学会学術集会(2007.5.24) パネルディスカッション7:生物学的製剤の功罪と外科療法「生物学的製剤時代の関節破壊と骨破壊制御」

⑱ 第22回 日本整形外科学会基礎学術集会(2007.10.25)浜松 シンポジウム2 骨免疫学「関節リウマチにおける骨破壊の機序」

⑲ 第35回日本リウマチ・関節外科学会(2007.11.9)シンポジウム1 人工膝関節の機種選択と限界「コンピューターナビゲーションシステムの関節リウマチ患者 TKA における有用性とその問題点」

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
   なし
2. 実用新案登録
   なし
3. その他
   なし

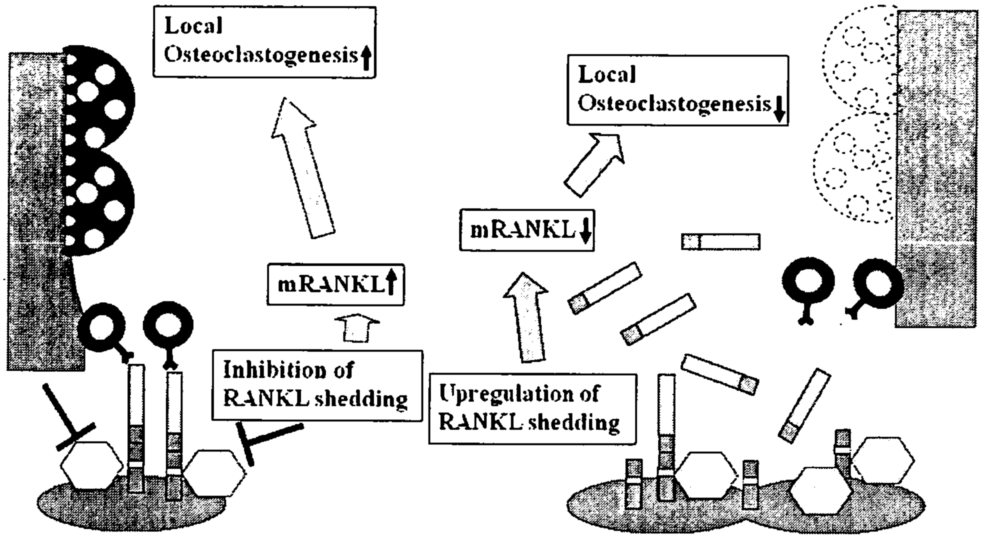


図1：RANKL切断による骨吸収調節

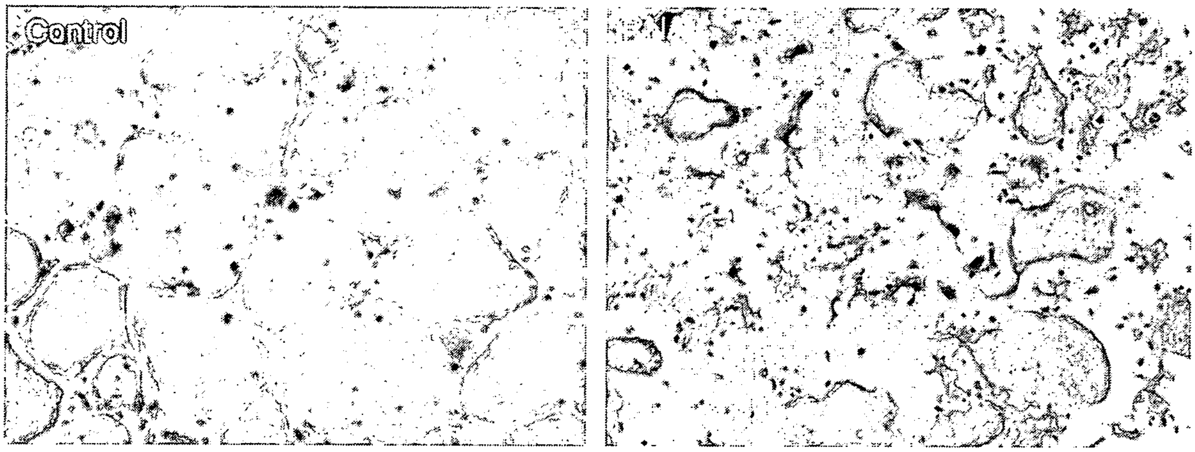


図2：RNA interference法（RNAi）によるCX3CR1の抑制は破骨細胞分化を抑制する