

200729008A

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

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19年度 研究報告書

主任研究者 西岡 久寿樹

平成20(2008)年4月

## 目 次

### I. 総括研究報告書

西岡 久寿樹

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

### II. 分担研究報告

岩倉 洋一郎

東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター・・・・・・・・・・・・・・・・ 5

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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 11

中島 利博

聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 13

田中 栄

東京大学大学院医学系研究科感覚・運動機能医学・・・・・・・・・・・・・・・・ 16

吉田 勝美

聖マリアンナ医科大学予防医学・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 20

川合 眞一

東邦大学医学部附属大森病院膠原病か・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 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・・・・・・・・・・ 28

木村 友厚

富山大学医学部整形外科学・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 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・・・・・・・・・・・・・・ 38

松本 美富士

藤田保健衛生大学七栗サナトリウム内科・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 41

行岡 正雄

医療法人行岡医学研究会行岡病院整形外科・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 43

長田 賢一 聖マリアンナ医科大学精神神経科	45
横田 俊平 横浜市立大学医学部小児科	47
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表	49

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種々の酵素や阻害剤の機序と制御を解明し、カテプシンKなどの酵素阻害剤が臨床治験に入ろうとしている。
- 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	富山大学医学部 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

関節リウマチの最近の治療薬剤の開発とその臨床応用は完全寛解の導入、早期関節リウマチにおいては、実現可能な到達目標となっている。これまでの実績に基づき、関節リウマチをその柱にして、リウマチ性疾患の制圧のためには、①滑膜増殖のメカニズムの解明と制御 ②軟骨・骨破壊の予防とその制御 ③線維筋痛症などの非炎症性慢性疼痛の制御による Q.O.L. の向上 ④マクロ経済学的観点より、医薬品等の適正価格と患者の傷病負担軽減の4つを研究の軸とした。

B. 研究方法

- ① ゲノム、プロテオーム等の新しい技術の導入による滑膜増殖および炎症性骨破壊の分子レベルでの全容の解明。
- ② 病態形成に関わる炎症性分子、骨関節破壊分子、疼痛惹起分子をタンパク解析(プロテオーム)を用いて解析し、重症化予防戦略の確立。
- ③ 線維筋痛症を対象とした慢性疼痛の制御による Q.O.L. の評価。
- ④ ①による疾病抑圧効果による疾病負担の軽減の評価。

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	行岡・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

関節リウマチの完全寛解導入のための臨床的・基礎的研究を柱に置き、その診断、薬物療法の臨床的応用とその評価を行う。関節リウマチの治療薬剤（いわゆる抗リウマチ剤）の有効性に関して、

- ① シノビオリン関連分子が滑膜増殖の発症に関与していることが明らかにされた。
- ② 骨関節破壊の抑制に対して BMP を中心とした標的分子が同定され、また、T細胞と骨破壊の結合メカニズムの全容が解明された。
- ③ 線維筋痛症の病因モデル、病態調査が大きく進歩した。
- ④ 筋骨格系の痛みによる Q.O.L. の損失が計量的に解明された。

### D. 結論

我々は、早期リウマチの疫学的検討、病因・病態解明および治療戦略について、これまで本研究事業の中で中心的な活動を行っている。今年度は、**関節リウマチの基礎病変ともいえる滑膜増殖と炎症性骨破壊の全容を分子レベルでほぼ解明することに成功し、さらに聖マリアンナ医科大学発バイオベンチャーの支援のもと世界で初めてアポトーシス導入による滑膜を標的として治療 (ARG098) の臨床試験が日欧同時に開始され、過去の研究成果の中でも最も大きな成果を挙げる事ができた。**

- ① シノビオリンを始め滑膜増殖因子の抑制シス

テムの基礎的研究の成果がリウマチの滑膜病変の全容をほぼ解明した。

- ② 骨免疫学研究の進歩により、骨破壊のメカニズムの全容が解明されるとともに、新規抗リウマチ剤が発見され、臨床応用の検討が始まった。
- ③ 医療効果およびマクロ経済の双方から検討し、包括的なリウマチ医療体系の整備のための一定の方向性が検討された。
- ④ 線維筋痛症の疫学調査の結果で、200万人近い患者が本邦にも存在し、速やかな対策が必要である。また、動物モデルの解明が一段と進歩し、新規薬剤の開発に一段と弾みがついた。
- ⑤ 線維筋痛症患者 1000 例のデータベースを解析したところ、4つのサブクラスターからなることが判明し、それぞれに対応した治療薬の標的を行っている。
- ⑥ 線維筋痛症のガイドラインの作成の準備が進んでいる。

### E. 健康危機情報 特になし

### F. 研究発表

#### 1. 学会発表

1. 西岡久寿樹. 線維筋痛症の病態と疼痛緩和. 港区ペインコントロールプラティクス研究会 第11回特別講演会 東京 2007年6月
2. 西岡久寿樹. Key role of TNF- $\alpha$  regulation against chronic inflammatory disease. 第22回日本乾癬学会学術大会 三重 2007年9月
3. 西岡久寿樹. 教育講演 線維筋痛症の治療法とケアセンターの構築. 第1回線維筋痛症研究会 東京 2007年9月
4. 岡寛、山野嘉久、西岡久寿樹、富永桂一朗、長田賢一、野原里枝子、中村郁朗. 線維筋痛症のデータベースの試み. 第1回線維筋痛症研究会 東京 2007年9月
5. 藤澤裕樹、金子律子、増子佳世、遊道和雄、西岡久寿樹、加藤智啓. 線維筋痛症の動物モデルとしてのSARTラットの脳プロテオームの解析. 第1回線維筋痛症研究会 東京 2007年9月
6. 松本美富士、菊地基雄、西岡久寿樹. 線維筋痛症における疲労の検討、慢性疲労症候群との関

- 連について. 第1回線維筋痛症研究会 東京 2007年9月
7. 山野嘉久、阿座上和子、中島利博、西岡久寿樹. 線維筋痛症における筋不随意運動. 第1回線維筋痛症研究会 東京 2007年9月
  8. 岡寛、西岡久寿樹、富永桂一朗、長田賢一. 線維筋痛症における痛みの定量化. 第1回線維筋痛症研究会 東京 2007年9月
  9. 西岡久寿樹. 線維筋痛症の現状と求められる新薬像. 第29回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー 東京 2007年10月
  10. Mihoko Muratam Kazuo Yudo, Rie Karasawa, Junji Chiba, Kusuki Nishioka, Kahuhiko Inoue, Tomohiro Kato, Kayo Masuko. Hypoxia up-regulates Expression of Angiopoietin-like (ANGPTL)-4 in human articular chondrocytes: A potential role of ANGPTL-4 in cartilage degradation. American College of Rheumatology, 71th Annual Scientific Meeting. Boston 2007.11
  11. Rie Karasawa, Seido Ooka, Kayo Masuko, Syouchi Ozaki, Kusuki Nishioka, Kazuo Yudo, Tomohiro Kato. Identification of targets of the anti-endothelial cell antibodies in patients with systemic vasculitis: By a proteomic approach. American College of Rheumatology, 71th Annual Scientific Meeting. Boston 2007.11
  12. Rie Karasawa, Kayo Masuko, Shoichi Ozaki, Kusuki Nishioka, Kazuo yudo, Tomohiro Kato. 血管炎患者における抗内皮細胞抗体の対応抗原の同定: プロテオミクスを用いて / Identification of targets of the anti-endothelial cell antibodies in patients with vasculitis. 第37回日本免疫学会総会・学術集会 東京 2007年11月
  13. 岡寛、西岡真樹子、森本幾夫、西岡久寿樹. 関節リウマチにおけるインフリマキシブ治療の長期投与結果. 第22回日本臨床リウマチ学会 鹿児島 2007年11月
  14. 岡寛、西岡久寿樹、富永桂一朗、長田賢一. 線維筋痛症における痛みの定量化. 第22回日本臨床リウマチ学会 鹿児島 2007年11月
  15. 若林弘樹、須藤啓、長谷川正裕、内田淳正、西岡久寿樹. 生物学的製剤における切り替え療法の有効性について. 第37回日本免疫学会総会・学術集会 東京 2007年11月
  16. 西岡久寿樹. 線維筋痛症の診断と治療は困難ではない 新しい医療ニーズに即時対応すべきである. 熊本県臨床整形外科医会 2008年1月
- ## 2. 論文発表
1. Kosuke Matsuo, Yang Xiang, Hiroshi Nakamura, Kayo Masuko, Kazuo Yudo, 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, 2007
  2. 西岡 久寿樹. 【臨床医学の展望】リウマチ・アレルギー学. 日本医事新報 第4323号, 2007
  3. 西岡 久寿樹 編集. 線維筋痛症ハンドブック. 日本医事新報社 (東京) 2007
  4. 友利新、西岡久寿樹. 特集/線維筋痛症の現状 [第5部]実態とマネジメント. 難病と在宅ケア 13:25-27, 2007
  5. 岡寛、西岡久寿樹. 早期関節リウマチにおける治療戦略の比較: 無作為割り付け臨床試験. 日本医事新報 48, 2007
  6. Satoshi Yamasaki, Naoko Yagishita, Kusuki Nishioka, Yoshihiro Nakajima. The role of synoviolin in crosstalk between endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and p53 pathway. *Cell Cycle* 6:1319-1323, 2007
  7. Yoshihiko Nagase, Hiroshi Yotsutanagi, Chiaki Okuse, Kiyomi Yasuga, Tomohiro Kato, Kazuhiko Koike, Michihiro Suzuki, Kusuki Nishioka, Shiro Iino, Fumio Itoh. Effect of treatment with interferon  $\alpha$ -2b and ribavirin in patients infected with genotype 2 hepatitis C virus. *Hepatology Research* 1-7, 2007
  8. Sheng-Ming Dai, Zheng-Zheng Shan, Huji Xu, Kusuki Nishioka. Cellular Targets of interleukin-18 in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 66:1411-1418:2007
  9. 佐藤知雄、八木下尚子、西岡久寿樹、中島利博. 関節リウマチ制御の新規標的分子. 炎症と免

疫 15(6): 681-685, 2007

10. Kazuo Yudoh, Kiyoshi Shishido, Hideki Murayama, Mitsunobu Yano, Kenji Matsubayashi, Horoya Takada, Hiroshi Nakamura, Kayo Masuko, Tomohiro Kato, Kusuki Nishioka. Water-Soluble C60 fullerene prevents degeneration of articular cartilage in osteoarthritis via down-regulation of cartilage degeneration during disease development. *Arthritis & Rheumatism* 56(10): 3307-3318, 2007
11. 西岡久寿樹. 特集: 膠原病: 診断と治療の進歩 <トピックス> II. 最近の話題 1. 線維筋痛症の現状と問題点. *日本内科学会雑誌* 96:2235-2240, 2007
12. M Murata, K Yudoh, K Masuko, K. Nishioka, T. Kato. The potential role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage how the angiogenic factor could be involved in the pathogenesis of osteoarthritis? *Osteoarthritis and Cartilage* in press
13. 西岡久寿樹. リウマチ性多発筋痛症と線維筋痛症. *日本医事新報* 4632:107-108, 2007
14. 岡寛、西岡久寿樹. 多関節型若年性関節リウマチ (JRA) 治療のためのインフリキマブ (INF) とメソトレキサート (MTX) 併用のランダム化プラセボ対照試験. *日本医事新報* 4362, 48, 2007

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に関する研究

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長・教授）

### 研究要旨

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-1 Ra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。これらのマウスは共に自己免疫性の関節炎を発症し、病態は関節リウマチにきわめて類似しているが、両者のサイトカイン依存性は異なっていることがわかっている。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析し、Dectin-1やDcirなどのC型レクチンが発症に関与していることを見だし、これらの分子が新たな治療薬の標的となる可能性が示唆された。

### A. 研究目的

我々はこれまでに発生工学手法を用い、HTLV-I TgマウスとIL-1 Ra 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。このように両モデルの発症メカニズムは必ずしも同じでないが、多くの遺伝子が共通に発現変動していることもわかり、両者に共通のメカニズムも存在するものと考えられる。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違いをもたらす原因を明らかにすると共に、共通に発症に関与している遺伝子を解明することを目指した。今年度はこの内、発症に共通に関与する遺伝子について、新たにC型レクチンの関与を見いだした。

### 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。

### 倫理面への配慮

以上の実験は東京大学医科学研究所組み換えDNA安全委員会及び動物実験委員会の承認を得た上で、規則に従って行った。

### C. 研究結果・考察

1. マイクロアレイで発現変化の認められた遺伝子をクラスタリング解析したところ、HTLV-I-TgマウスとIL-1RaKOマウスで共通に発現上昇する遺伝子や、それぞれのモデルで特徴的に発現変動する遺伝子があることがわかった。先に、我々はこれらの関節炎モデルの発症においてIL-17が中心的役割を果たしていることを明らかにしたが、現在IL-17産生細胞（Th17）分化におけるIL-6の役割を中心として、両モデルのサイトカイン依存性を検討している。
2. 昨年度、両モデルの関節で発現亢進の見られたC型レクチンの一つ、Dectin-1の欠損マウスを作製し、このマウスが真菌感染に易感受性となることを示す(*Nature Immunology*, 2007)と共に、コラーゲン誘導関節炎に対し耐性となることを示した。βグルカンによるDectin-1の活性化がTh17分化を促進することから、この点を中心として、関節炎発症に於けるDectin-1の役割を検討している。
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。Dcirは細胞室内ドメインにITIMを持っており、樹状細胞の分化・増殖を負に制御することにより、免疫系の恒常性の維持に重要な役割



を果たしていることがわかった(*Nature Medicine*, 2008)。

#### D. 結論

我々が開発した独自の関節炎モデルをマイクロアレイで解析することにより、Dectin-1やDc1rなどのC型レクチンが関節炎発症に重要な役割を果たしていることを明らかにした。これらの分子は新たな関節リウマチ治療薬の開発標的として有望である。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Fujikado, N., Saijo, S., Yonezawa, T., Shimamori, K., Ishii, A., Sugai, S., Kotaki, H., Sudo, K., Nose, M., and Iwakura, Y. DCIR deficiency causes development of autoimmune diseases in mice due to excess expansion of dendritic cells. *Nature Med.* **14** 176-80, (2008).
- Okumura, A., Saito, T., Otani, I., Kojima, K., Yamada, Y., Ishida-Okawara, A., Nakazato, K., Asano, M., Kanayama, K., Iwakura, Y., Suzuki, K., and Yamagoe, S. Suppressive role of leukocyte cell-derived chemotaxin 2 in mouse anti-type II collagen antibody-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, **58**, 413-421 (2008).
- Aujla, S. J., Fei, M., Pociask, D. A., Reinhart, T. A., Edeal, J., Gaus, K., Kreindler, J. L., Dubin, P. J., Zheng, M., Pilewski, J. M., Myerburg, M. M., Mason, C. A., Iwakura, Y., and Kolls, J. K. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nature Med.*, **14**, 275-281 (2008).
- Ohsugi, M., Adachi, K., Horai, R., Kakuta, S., Sudo, K., Kotaki, H., Tokai-Nishizumi, N., Sagara, H., Iwakura, Y., and Yamamoto, T. Kid-mediated anaphase chromosome compaction safeguards mouse early embryos against multinuclear formation. *Cell*, **132**, 771-782 (2008).
- Pichavant, M., Goya, S., Meyer, E. H., Johnston, R. A., Kim, H. Y., Matangkasombut, P., Zhu, M., Iwakura, Y., Savage, P. B., DeKruyff, R. H., Shore, S. A., and Umetsu, D. T. Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of Natural Killer T cells and IL-17. *J. Exp. Med.*, **205**, 385-393 (2008).
- Luger, D., Silver, P. B., Tang, J., Cua, D., Chen, Z., Iwakura, Y., Bowman, E. P., Sgambellone, N. M., Chan, C.-C. and Caspi, R. R. Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: context of initial Ag exposure determines dominant effector category. *J. Exp. Med.*, in press.
- 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<sup>+</sup> helper T cells that cause autoimmune arthritis. *J. Exp. Med.*, **204**, 41-47 (2007).
- 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).
- Chida, D., Nakagawa, S., Nagai, S., Sagara, H., Katsumata, H., Imaki, T., Suzuki, H., Mitani, F., Ogishima, T., Shimizu, C., Kotaki, H., Kakuta, S., Sudo, K., Koike, T., Kubo, M., and Iwakura, Y. Melanocortin receptor 2 is required for adrenal gland development, steroidogenesis and neonatal gluconeogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 18205-18210 (2007).
- Kagari, T., Tanaka, D., Doi, H., Iwakura, Y., and Shimozato, T. Anti-type II collagen antibody accelerates arthritis via CXCR2-expressing cells in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *Eur. J. Immunol.*, **37**, 2753-2763 (2007).
- Kohyama, S., Ohno, S., Isoda, A., Moriya, O., Belladonna, M. L., Hayashi, H., Iwakura, Y., Yoshimoto, T., Akatsuka, T., and Matsui, M. IL-23 enhances host defense against vaccinia virus infection via a mechanism partly involving IL-17. *J. Immunol.*, **179**, 3917-3925 (2007).
- Hara, H., Ishihara, C., Takeuchi, A., Imanishi, T., Xue, L., Morris, S. W., Inui, M., Takai, T., Shibuya, A., Saijo, S., Iwakura, Y., Ohno, N., Koseki, H., Yoshida, H., Penninger, J. M., and Saito, T. The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors. *Nature Immunol.*, **8**, 619-629 (2007).
- Sato, N., Kinbara, M., Kuroishi, T., Kimura, K., Iwakura, Y., Ohtsu, H., Sugawara, S., and Endo, Y. Lipopolysaccharide promotes and augments metal allergies in mice, dependent on innate immunity and histidine decarboxylase. *Clin. Exp. Allergy*, **37**, 743-751 (2007).
- Numasaki, M., Tagawa, M., Iwata, F., Suzuki, T.,

- Nakamura, A., Okada, M., Iwakura, Y., Aiba, S., and Yamaya, M. IL-28 elicits antitumor responses against murine fibrosarcoma. *J. Immunol.*, **178**, 5086-5098 (2007).
- Hayashi, T., Ishida, Y., Kimura, A., Iwakura, Y., Mukaida, N., and Kondo, T. IFN-g protects cerulein-induced acute pancreatitis by repressing NF-kB activation. *J. Immunol.*, **178**, 7385-7394 (2007).
- Umemura, M., Yahagi, A., Hamada, S., Begum, M-D., Watanabe, H., Kawakami, K., Suda, T., Sudo, K., Nakae, S., Iwakura, Y., and Matsuzaki, G. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacilli Calmette-Guerin infection. *J. Immunol.*, **178**, 3786-3796 (2007).
- 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).
- 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.*, **81**, 1258-1268 (2007).
- 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.*, **56**, 1304-1314 (2007).
- Kamari, Y., Werman-Venkert, R., Shaish, A., Werman, A., Harari, A., Gonen, A., Voronov, E., Grosskopf, I., Sharabi, Y., Grossman, E., Iwakura, Y., Dinarello, C. A., Apte, R. N., and Harats, D. Differential role and tissue specificity of interleukin-1alpha gene expression in atherogenesis and lipid metabolism. *Atherosclerosis*, **195**, 31-38 (2007).
- 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<sup>+</sup> natural killer T cell-mediated host defense against *Streptococcus pneumoniae* infection in murine lungs. *Microbes Infect.*, **9**, 364-374, (2007).
- 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*, **104**, 2325-2330 (2007).
2. 学会発表
- Yoichiro Iwakura (Invited)  
「The roles of C-type lectins in the development of autoimmunity.」 The second international symposium on “Immune Surveillance-Its Cellular and Molecular Basis, Regulation and Maintenance”. (2007), Tokyo.
- Yoichiro Iwakura (Invited)  
「The role of cytokines in the development of autoimmune arthritis.」 The 2<sup>nd</sup> East Asian Group of Rheumatology Meeting (EAGOR 2007) (2007), Seoul, Korea
- Yoichiro Iwakura (Invited)  
「Rheumatoid arthritis models generated by using transgenic techniques.」 19<sup>th</sup> Federation of Asian and Oceanian Biochemists and Molecular Biologists (FAOBMB), (2007), Seoul, Korea
- Yoichiro Iwakura (Invited)  
「The role of cytokines in the development of autoimmune arthritis.」 The 4<sup>th</sup> International Leukocyte Signal Transduction Workshop: Clinical Implications of Signaling Pathways, (2007), Rhodes, Greece
- 岩倉洋一郎  
「疾患モデルマウスを用いた自己免疫性関節炎発症機構の解析」東北大学21世紀COEプログラム「シグナル伝達病の治療戦略創生拠点」シンポジウム「シグナル伝達病を知る」仙台 (2007)。
- 岩倉洋一郎  
「サイトカインと関節リウマチ動物モデル」高峰カンファレンス「Osteoimmunology」。東京 (2007)。
- 岩倉洋一郎  
「関節炎モデルマウスを用いた病態形成関与遺伝子の探索」日本薬学会第127回年会シンポジウム「ポストゲノムの炎症、リウマチ研究と創薬」、富山 (2007)。
- 岩倉洋一郎  
「疾患モデルを用いた自己免疫発症機構の解析」第34回東京大学医科学研究所創立記念シンポジウム「医科学研究最前線」、東京 (2007)。
- F. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得  
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

(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 准教授

研究要旨 関節リウマチでは活発な炎症により、関節軟骨が破壊される。関節炎下の軟骨では TGF- $\beta$  や骨形成因子 (BMP) シグナルを抑制する Smad7 が上昇し、軟骨修復・再生を妨げていると推測される。軟骨細胞における Smad7 の過剰発現が生体の軟骨形成にどのような影響を与えるかを調べる目的で、軟骨に Smad7 を特異的に過剰発現するコンディショナルトランスジェニックマウスを作製し、その軟骨組織を解析した。軟骨形成初期の Smad7 は軟骨の形成を著しく阻害した。また、軟骨分化後期では Smad7 は軟骨細胞の肥大化を抑制した。また Smad7 は BMP による MAP kinase の活性化を抑制することで、軟骨形成を阻害することが判明した。

A. 研究目的

関節リウマチでは活発な炎症により、関節軟骨が破壊される。関節軟骨進行病変部では、炎症性サイトカインである IL-1 や TNF- $\alpha$  シグナルによる軟骨基質の分解が、TGF- $\beta$  や BMP シグナルによる軟骨基質合成を上回っていると考えられる。近年の研究により、関節炎下の軟骨では TGF- $\beta$  や骨形成因子 (BMP) シグナルを抑制する Smad7 が上昇し、培養関節軟骨細胞に対し IL-1 を投与すると Smad7 の発現が上昇することが分かってきた。この Smad7 の発現上昇が関節リウマチにおける軟骨修復・再生を妨げていると推測されるが、軟骨細胞における Smad7 の過剰発現が生体の軟骨形成にどのような影響を与えるかは分かっていない。本研究では Smad7 を軟骨特異的に過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製し、生体の軟骨細胞における Smad7 の作用機序を解明する。

B. 研究方法

軟骨に Smad7 を特異的に過剰発現するコンディショナルトランスジェニックマウスを作製した。このマウスの発生過程における軟骨形成を解析した。組織、in situ hybridization により各マーカー遺伝子の発現を調べ、軟骨形成異常の分子メカニズムを解析した。また培養間葉系細胞に BMP を添加して軟骨分化を誘導する系において、各種シグナルの阻害剤を添加、またアデノウイルスを用いて Smad7 の遺伝子導入を行い、軟骨形成を調べた。

C. 研究結果

軟骨で Smad7 を過剰発現したマウスでは、軟骨が著しく低形成となった。間葉系細胞の凝集が抑制され、軟骨細胞への分化が阻害されていた。また軟骨細胞の肥大化も遅延しており、Smad7 は軟骨細胞の分化の各段階において抑制的に作用することが示された。またヒストン蛋白を発現する軟骨細胞数が減少しており、細胞増殖が抑制されていた。Sox9 の発

現低下と Aldh1a2 の発現上昇が認められ、BMP シグナルが抑制されていると考えられた。次に、培養間葉系細胞に各種阻害剤を添加したところ、MAP kinase 阻害剤を添加により軟骨への分化が阻害された。また Smad7 の過剰発現でも軟骨への分化が抑制され、ATF2 のリン酸化が抑制された。一方、Smad6 の過剰発現では R-Smad のリン酸化は抑制されるものの、ATF2 のリン酸化は抑制されず、軟骨への分化は影響を受けなかった。

#### D. 考察

Smad7 は BMP により活性化された MAP kinase 経路を抑制することにより、軟骨形成を阻害していると考えた。このメカニズムをターゲットにした治療法を開発することで、関節リウマチにおいて軟骨修復を促進できる可能性がある。

#### E. 結論

Smad7 の過剰発現は BMP により活性化された MAP kinase 経路を抑制することにより、軟骨形成を阻害する。

F. 健康危険情報 無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Iwai, T., Harada, Y., Imura, K., Iwabuchi, S., Murai, J., Hiramatsu, K., Myoui, A., Yoshikawa, H., and Tsumaki, N. *J Bone Miner Metab* 25(6): 392-399, 2007.

##### 2. 学会発表

1. 妻木範行: 内軟骨性骨化と BMP シグナル、松本ボーンフォーラム 特別講演③、2007年5月11-12、松本
2. 妻木範行: 内軟骨性骨化と BMP シグナル、O2 カンファレンス トピックス、2007年

6月2日、大阪

3. 妻木範行: 内軟骨性骨化における BMP シグナルの作用、第14回 BMP 研究会 特別講演、2007年7月22日、大阪
4. 妻木範行、村井純子、岩井貴男、平松久仁彦、岡本美奈、吉川秀樹: BMP は内軟骨性骨形成において破骨細胞性骨吸収とリモデリングを促進する、第22回日本整形外科学会基礎学術集会 シンポジウム「骨免疫学」2007年10月25-26日、浜松
5. 妻木範行: 骨・軟骨形成における BMP の作用の解析
6. 骨粗鬆症学会 イブニングセミナー2、2007年11月13-16日、東京
7. 妻木範行: 内軟骨性骨化における BMP シグナルの役割の解析
8. 日本分子生物学会・日本生化学会合同集会、シンポジウム: 骨・軟骨疾患の分子生物学、2007年12月11-15日、横浜
9. 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20回日本軟骨代謝学会、2007年3月2-3日、岡山
10. T. Iwai, J. Murai, H. Yoshikawa, N. Tsumaki : Role of Smad7 during endochondral bone formation
11. 2007年3月23-24日 第1回 Bone research seminar、東京
12. 岩井貴男、村井純子、吉川秀樹、妻木範行: BMP シグナルと軟骨形成における Smad6 と Smad7 の役割、第25回日本骨代謝学会、2007年7月19-21日、大阪
13. 岩井貴男、村井純子、吉川秀樹、妻木範行: BMP シグナルと軟骨形成における

- Smad6 と Smad7 の役割、第 8 回 運動器  
科学研究会、2007 年 8 月 28-29 日、徳島
14. 岩井貴男、村井純子、吉川秀樹、妻木範  
行：軟骨形成における抑制型 Smad の発  
現と役割
  15. 村井純子、岡本美奈、吉川秀樹、妻木  
範行：Rxb/Coll1a2 locus における  
CTCF 結合領域の機能解析，第 22 回  
日本整形外科学会基礎学術集会 2007  
年 10 月 25-26 日，浜松
  16. 村井純子、岡本美奈、吉川秀樹、妻木範  
行：In vivo での Rxb/Coll1a2 locus に  
おける CTCF 結合領域の機能解析，第  
25 回日本骨代謝学会 2007 年 7 月 19-21  
日，大阪
  17. 村井純子、岡本美奈、吉川秀樹、妻木範  
行：Rxb/Coll1a2 locus における CTCF  
結合領域の機能解析，第 22 回日本整  
形外科学会基礎学術集会 2007 年 10 月  
25-26 日，浜松
  18. 村井純子、岡本美奈、吉川秀樹、妻木範  
行：Coll1a2 / Rxb ローカスにおける軟骨  
特異的転写の制御，第 1 回骨・軟骨フロ  
ンティア 2007 年 12 月 1 日，東京
  19. T. Iwai, J. Murai, H. Yoshikawa, N.  
Tsumaki: Inhibitory Smad6 and Smad7  
Differently Regulate Cartilage Formation,  
29<sup>th</sup> Annual Meeting of the American  
Society for Bone and Mineral Research, Sep  
16-19, 2007, Honolulu, Hawaii, USA
  20. J. Murai, M, Okamoto, H. Yoshikawa, N.  
Tsumaki: Function of the CTCF-bindig  
site between the Rxb and the Coll1a2  
Genes., 29<sup>th</sup> Annual Meeting of the  
American Society for Bone and Mineral  
Research, Sep 15-19, 2007, Honolulu,

Hawaii, USA

H. 知的財産の出願・登録状況  
該当なし

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）  
分担研究報告書

分担研究項目：抗リウマチ剤導入による骨および関節破壊制御に対する臨床的評価  
(IL-1 トランスジェニックマウスにおける COX-2 阻害薬の効果に関する研究)

分担研究者 千葉一裕 慶應義塾大学整形外科准教授

### 研究要旨

我々は IL-1・過剰発現トランスジェニックマウス(Tg マウス)を用いて、IL-1 $\alpha$  誘発性の関節炎・骨破壊に対する COX-2 阻害剤(celecoxib)の効果解析した。

celecoxib は、IL-1 $\alpha$  過剰発現 Tg マウスの関節炎を抑制したが、反対に傍関節性骨粗鬆症を悪化させた。In vitro では、celecoxib は Tg マウスより得られた前骨芽細胞(POB)培養系における ALP, RANKL, MMP-13 の発現を抑制し、骨髄マクロファージからの RANKL による破骨細胞形成も抑制した。本 Tg マウスでは、傍関節性の骨粗鬆症を呈するが、IL-1-induced GM-CSF によって constitutive に破骨細胞形成は抑制され、いわゆる低回転型の骨粗鬆症を示すのが特徴である。したがって骨粗鬆症の悪化は、既に抑制されている破骨細胞形成の抑制よりも骨形成抑制効果の方が相対的に強く出た結果と考えられた。

#### A. 研究目的

関節リウマチにおける骨破壊の進行は著しい機能障害の原因となり、骨破壊を抑制する薬剤の開発が期待される。COX-2 阻害薬は、一般に消炎鎮痛剤として臨床で使用されるが、コラーゲン関節炎やアジュバント関節炎において、関節炎を抑制するだけでなく炎症性サイトカインに伴う傍関節性骨吸収も抑制することが報告されている。また、摩耗粉誘発モデルや OVX マウスにおける骨吸収抑制効果も報告されている。しかし一方では、PGE2 の骨形成促進作用を抑制するため骨癒合を遷延させ、COX-2 KO マウスでは骨吸収が促進するなど、統一的な見解が得られていない。

本研究の目的は、IL-1・過剰発現トランスジェニックマウス(Tg マウス)を用いて、

IL-1 $\alpha$  誘発性の関節炎・骨破壊に対する COX-2 阻害剤の効果を一層明らかにすることである。

#### B. 研究方法

生後 6 週齢の Tg マウスに vehicle, 10, 100 mg/kg の COX-2 阻害剤(celecoxib)を隔日で経口投与した。8 週後、脛骨、大腿骨を採取し、骨密度(BMD)、micro CT 計測を施行した。また対側膝関節を採取し、肉眼的および病理組織学的所見を scoring した。

In vitro の系では Tg マウスおよび littermate の胎仔頭蓋冠から採取した前骨芽細胞(POB)に 0.01, 0.03, 0.1  $\cdot$  M の celecoxib を添加し、ALP, RANKL, MMP-13 の mRNA 発現を RT-PCR にて測定した。また

上記マウスより採取した骨髄細胞を M-CSF, RANKL 存在下で形成される TRAP 陽性細胞数を celecoxib の有無で比較し、破骨細胞形成に対する効果を解析した。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は慶応大学の動物実験に関する倫理委員会の承認を得て施行した。具体的には、ペントバルビタールの投与下に頸椎脱臼を施すことにより安楽死させて上で組織を摘出した。

また Tg マウス作成について遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守し施行した。

#### C. 研究結果

100 mg/kg の celecoxib 投与で PGE2 産生が約 70%抑制された。肉眼的 score, paw swelling は、celecoxib 投与で有意に減少した。反対に、BMD および BV/TV をはじめとする各骨梁構造計測パラメーターの結果では celecoxib 投与で容量依存的に骨粗鬆症は進行していた。

In vitro では、POB による ALP, RANKL, MMP-13 の m-RNA 発現は celecoxib 投与で容量依存的に抑制された。また骨髄細胞の TRAP 陽性細胞形成能も celecoxib 投与で抑制された。

#### D. 考察

IL-1・Tg マウスの phenotype は全身性の関節炎、傍関節性骨粗鬆症を呈するが、celecoxib 投与で前者は抑制されるものの、後者は逆に悪化した。In vitro の結果から、PGE2 の抑制により、POB による骨形成、破骨細胞性骨吸収はともに低下すると考えられたが、Tg マウスでは IL-1 自体の血球分化に対する作用や IL-1-induced GM-CSF に

より破骨細胞前駆細胞が元来減少しており、骨形成抑制効果が相対的に強く出ると考えられた。

#### E. 結論

炎症性関節炎における COX-2 阻害薬の投与は、関節炎症は抑制するが、傍関節性骨粗鬆症や骨破壊に関しては、関節炎の原因や stage によっては悪化させる可能性があると考えられた。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Niki Y, Takaishi H, Takito J, Miyamoto T, Kosaki N, Matsumoto H, Toyama Y, Tada N. :

Administration of cyclooxygenase-2 inhibitor reduces joint inflammation but exacerbates osteopenia in IL-1 alpha transgenic mice due to GM-CSF overproduction, J Immunol, 179(1) :639-46, 2007

##### 2. 学会発表

IL-1 トランスジェニックマウスにおける COX-2 阻害薬の効果

二木 康夫 1)、高石 官成 2)、滝戸 二郎 2)、戸山 芳昭 2)

東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター整形外科 1)、慶應義塾大学整形外科 2)  
第 24 回日本骨代謝学会 2006 年 7 月 6 日 (木) ~8 日 (土)

シノビオリンを標的とした抗リウマチ薬開発の基盤研究

中島 利博

聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター 運動器医科学研究部門 教授

研究要旨

リウマチ滑膜細胞の異常増殖に関わる新規遺伝子シノビオリン（滑膜細胞（Synovial cell）にちなんでシノビオリン（Synoviolin：以下、Syno）と名づけた）の単離に成功した（G&D 2003）。SynoはE3ユビキチンリガーゼであり、小胞体（ER）における不良タンパク質の分解系（ERAD）に関与していることが明らかとなった。同分子はヒト細胞のみならず、系統的発生的解析によりマウス、ショウジョウバエのいずれのモデル生物においても抗アポトーシス作用による非常に強い細胞増殖活性を有することが明らかとなった（MCB 2005、JBC 2005）。この分子基盤を明らかにするためにSynoの基質探索を行った結果、驚くべきことにがん抑制遺伝子産物p53がその一つであることが明らかとなった（EMBO J 2007 Nature Clinical Practice Rheumatology in press）。すなわちERストレスとp53経路のクロストークという新たなシグナル伝達経路がリウマチ滑膜細胞の増殖制御法開発の標的となることを世界に先駆け発見した。

A. 研究目的

一見複雑に見える現象を個々の素過程に分離・純化した後、統合化・数理化し全体像を理解することが自然科学の本流であり醍醐味である。様々なバックグラウンドのもと恒常性の崩れにより生じる“病気”に対しては、素過程を1病態 $\geq$ 1因子 $\approx$ 1遺伝子とみなし単一因子として詳細な解析をすることに加え、個々の素過程（病態）を統合し総合的理解をすることが必要である。特に関節リウマチ（Rheumatoid arthritis; 以下 RA）は『全身性の種々の免疫異常』とともに、『滑膜細胞の増殖異常』、『軟骨変性』、『骨破壊』、『線維化』などの多くの病態が複雑に絡み合いながら多関節で進行していく、時・空間的に複雑性のある疾患であるため、その総合的理解には素過程の詳細な解析とその統合が必須であるといえる。

これまで中島らは、RAの素過程の中で『滑膜細胞の過増殖』のプロセスに着目し研究を続けてきた（*Arthritis Rheum* 1995, 2000, 2001, *J Clin Invest* 1991, 1993）。加えて、米国での真核細胞の転写研究（*Cell* 1996, 1997, *Nature* 1996, *Genes Dev* 1997, *Nature Genet* 1998, 2000 など）により分子細胞生物学的研究法を研鑽した。その際に、“転写統合装置”という概念の提唱とその実証に中心的メンバーとして参画し、素過程の理解とその統合化によ

る総合的検証法の重要性を学んだ。

これらの背景と研究のノウハウを結集させ、RA滑膜細胞より細胞増殖のkey regulatorとして新規分子「シノビオリン」のクローニングに成功した。同分子が抗アポトーシス作用を介してモデル動物における関節症・関節炎の感受性を規定することを証明した（G&D 2003）。さらにTohらは抗TNF $\alpha$ （腫瘍壊死因子）療法に対する約25%のnon-responderを見極めるバイオマーカーの網羅的探索により、シノビオリンが末梢血単核細胞にて有意差をもって上昇する因子の一つであることを報告した（*Tho ML et al. Arthritis Rheum* 2006）これらの背景よりシノビオリンがRAの病態解明とその創薬開発の新機軸であることは疑いようがない。本研究ではシノビオリンの標的分子を明らかにしそれらの基盤とする。

B. 研究方法

シノビオリンはE3ユビキチン化酵素として細胞内の不良タンパク質の品質管理にかかわる。その性質を利用し、シノビオリンの完全欠損マウス胎仔線維芽細胞（MEFs）の網羅的プロテオームを野生型マウスのプロテオームと比較した。

C. 結果



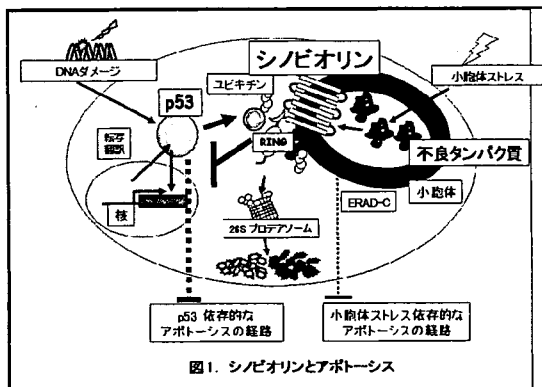
驚くことに、代表的ながん抑制遺伝子産物 p53 がその中に存在していた。生化学的・分子細胞生物学的解析により、p53 がシノビオリンによりユビキチン化・分解されること証明するデータがモデル生物（ハエ）で証明できた。

#### D. 考察

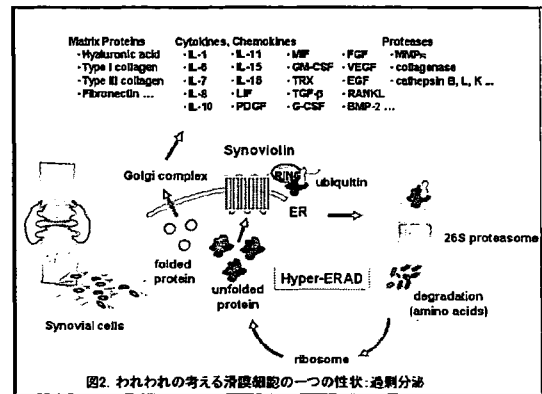
この発見により、世界で初めて小胞体 (ER) ストレスと p53 シグナルのクロストークの示唆があり、これらの発見をもとに①強い増殖能と、②多くのタンパク質を作り出し分泌するという面を併せ持つ稀有な細胞こそが RA 滑膜細胞の本態であると考えた。すなわち、滑膜細胞は、元来、関節の“栄養”“潤滑油”である関節液を作りその内部環境の恒常性を保つ組織である。しかしながら、リウマチ滑膜細胞では、過剰に発現したシノビオリンが小胞体関連分解 (ERAD) で働くことにより関節の栄養・潤滑油を必要以上に作り出し、それにより自らが異常増殖してしまう。つまり、RA は「このシステムの破綻病」であると捉えた。また、この過剰生産というシステムを是正する方法を見出す事ができれば、滑膜細胞の過増殖のみならず、腫瘍壊死因子 (TNF $\alpha$ ) をはじめとした免疫を異常活性化するサイトカイン、関節を破壊する酵素など多くのタンパク質の過剰生産を、まるで蛇口を閉めるかのように抑えることができる可能性がある。

#### E. 結論

シノビオリンシグナルの新たなる分子機構が明らかとなった。



#### F. 健康危惧情報 特になし



#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yagishita N, Yamasaki S, Nishioka K, Nakajima T. Synoviolin, protein folding and the maintenance of joint homeostasis. *Nature Clin Prac Rheum* 2008 ;4(2):91-7

Yamasaki S, Yagishita N, Nishioka K, Nakajima T. The roles of Synoviolin in crosstalk between endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and p53 pathway. *Cell Cycle* 2007;6(11):1-5.

Wu W, Nishikawa H, Hayami R, Sato K, Honda A, Aratani S, Nakajima T, Fukuda M, Ohta T. BRCA1 Ubiquitinates RPB8 in Response to DNA Damage. *Cancer Res* 2007; 67(3): 951-58.

##### 2. 学会発表

7th Meeting of Global Arthritis Research Network(GARN)  
2007/5/10-13 Zurich, Switzerland  
Oncogenic Properties of Rheumatoid Synoviocytes: Crosstalk between ER stress and p53 pathway

第 54 回日本実験動物学会  
2007/5/24 江戸川区総合区民ホール  
リウマチ性疾患の病因・病態・創薬開発における遺伝子改変動物の貢献  
ーリウマチ原因遺伝子シノビオリンの発見とその意義ー

第 28 回日本炎症・再生医学会  
2007/8/3 京王プラザホテル  
ムダなシステムは本当に“ムダ”でしょう

か？

第 5 回日本予防医学会学術集会  
2007/11/23-24 デイポリス指宿  
ムダなシステムは本当に“ムダ”なのだろう  
か？

ICoFF 2007  
2007/11/30 国立京都国際会館  
What Synoviolin tell us? – Luxury feed  
back theory –

第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日  
本生化学会大会 合同大会  
2007/12/13 パシフィコ横浜  
What Synoviolin tell us? – Luxury feed  
back theory –

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。

軟骨細胞アポトーシスにおけるBcl-2 familyの役割に関する研究

分担研究者 田中 栄

所属機関名・職名 東京大学医学部附属病院整形外科 講師

研究要旨 関節リウマチにおいてはアポトーシスによる軟骨細胞死が関節破壊に関与すると考えられている。本研究では、アポトーシスを正/負に調節するBcl-2 family分子群による軟骨細胞アポトーシスの制御機序を、軟骨細胞特異的bcl-x遺伝子ノックアウトマウスを作成し、検討した。

A. 研究目的

軟骨細胞の増殖・分化・細胞死の過程には様々なサイトカインや Sox ファミリーなどの転写因子が関与していることが示されているが、その詳細な分子メカニズム・細胞内シグナルについては不明である。なかでも軟骨細胞アポトーシスの過程はその後の石灰化・骨化・血管侵入の過程とも密接に関わっており、その詳細なメカニズムを明らかにすることは内軟骨性骨化の過程を理解し、それを制御するために極めて重要であると考えられる。

Bcl-2 ファミリーはミトコンドリア経路を介したアポトーシスの制御に深く関与しており、神経細胞、血球系細胞、破骨細胞、心筋細胞などにおいて証明されている。本研究では、アポトーシスを正/負に調節する Bcl-2 family 分子群による軟骨細胞アポトーシスの制御機序を検討した。

B. 研究方法

マウス肋軟骨より軟骨細胞を採取し、無機リン酸(Pi)刺激による細胞死の誘導を検討した。Bcl-2ファミリー分子群(18分子)の過剰発現、およびRNA interferenceによるノックダウンがPiによって誘導されるアポトーシスに及ぼす影響を検討した。軟骨細胞特異的にCre recombinaseを発現するCol2a1-Cre Tgマウスを用いて軟骨組織特異的Bcl-xL欠損マウスを作成し、その表現型を検討した。

C. 研究結果

① インスリン処理で肥大分化させた軟骨細胞株ATDC5を無機リン酸(Pi)で刺激すると、24時間で石灰化およびCaspase活性化を伴うアポトーシスが誘導された。

② Proapoptotic Bcl-2ファミリー15分子の発現量をreal-time RT-PCRで網羅的に検討し、肥大分化に伴って上昇した7分子およびPi刺激後上昇した2分子を同定した。これら分子をRNA interference (RNAi)にて発現抑制したところ、Bnip3のRNAiによりアポトーシスは抑制された

③ Anti-apoptotic Bcl-2ファミリーについても同様に検討したところ、Bcl-xLのノックダウンによりアポトーシスが亢進し、強制発現によって抑制された。

④ Bcl-xL, Bnip3の分子間相互作用を生化学的に検討した。Pi刺激後Bcl-xLの発現量は不変であったが、Bnip3の発現量は上昇し、Bcl-xLと複合体を形成してその抗アポトーシス作用を阻害した。

⑤ マウス成長板における免疫組織学的検討では、Bcl-xLが全ての軟骨層で一様に発現するのに対し、Bnip3は肥大軟骨層に強く発現していた。

⑥ Cre-loxPシステムを用いてBcl-xLの軟骨細胞特異的ノックアウト(cKO)マウスを作成し、解析した。cKOマウスでは、軟骨細胞アポトーシスの亢進(TUNEL染色)により肥大層は著しく短縮し、四肢短縮型dwarfismを呈した(図1)。

D. 考察

軟骨細胞アポトーシスはPiによって制御されており、この過程にBcl-2ファミリーであるBnip3, Bcl-xLが重要な役割をはたしていることが明らかになった。これらの分子を標的にすることにより、関節リウマチや変形性関節症で見られるような軟骨変性を制御できる可能性があると考えられた。今後破骨細胞におけるBc

l-xLの役割をさらに詳細に明らかにすることによって、より効率のよい骨吸収抑制剤の開発へとつながることが期待される。

#### E. 結論

軟骨細胞アポトーシスはBcl-xLとBnip3の相互作用により規定される。肥大軟骨層におけるリン濃度の上昇はBnip3の発現上昇を介してBcl-xLの機能を阻害し、アポトーシスを誘導する。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 英文原著・総説

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Hiramatsu K, Asaba Y, Takeshita S, Nimura Y, Tatsumi S, Katagiri N, Niida S, Nakajima T, Tanaka S, Ito M, Karsenty G, Ikeda K.  $\gamma$ -glutamyltransferase as a pathogenic factor of bone and joint disease. *Endocrinology* 2007, 48:2708-2715.
5. 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.

6. 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

##### 和文原著・総説

- 1) 田中 栄「OSTEO-Illustrated 破骨細胞分化・活性化の分子メカニズムと骨吸収抑制薬の作用機序」*BONE CARE* 3:2-4, 2007.
- 2) 田中 栄「関節破壊抑制療法の標的分子としての RANKL」*Clinical Calcium* 17:586-592, 2007.
- 3) 田中 栄「人工膝関節術後感染」*リウマチ科* 37:559-565, 2007
- 4) 田中 栄「完全ヒト型抗 RANKL 抗体デノスマブ」*骨粗鬆症治療* 6:270-274, 2007.
- 5) 田中 栄「完全ヒト型抗 RANKL 抗体 denosumab」*炎症と免疫* 15:575-579, 2007.
- 6) 田中 栄「炎症性骨破壊と破骨細胞」*生体の科学* 58:205-210, 2007.
- 7) 田中 栄「RANKL をターゲットにした骨関節疾患治療戦略」*臨床薬理* 38:79S-80S, 2007.

##### 国際会議招待講演

1. 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 AND FATE “Regulation of the life and death of the osteoclast”
2. 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”
3. 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」
4. 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