

- Arthritis Rheum 58 : 2105-2112, 2008.
- 10) Giles JT, Ling SM, Ferrucci L, et al : Abnormal body composition phenotypes in older rheumatoid arthritis patients : association with disease characteristics and pharmacotherapies. Arthritis Rheum 59 : 807-815, 2008.
- 11) Dessein PH, Joffe BI : Insulin resistance and impaired beta cell function in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 54 : 2765-2775, 2006.
- 12) Marcora SM, Chester KR, Mittal G, et al : Randomized phase 2 trial of anti-tumor necrosis factor therapy for cachexia in patients with early rheumatoid arthritis. Am J Clin Nutr 84 : 1463-1472, 2006.

■総合臨牀・既刊特集一覧■

詳細はホームページ <http://www.nagaishoten.co.jp>でもご覧頂けます

<b>2006年(平成18年)</b>		8月号	炎症性腸疾患UP TO DATE	定価2,520円/¥148円	8月号	炎症性腸疾患UP TO DATE	定価2,520円/¥148円	
5月号	健康診断をめぐって	定価2,520円/¥148円	9月号	高血圧診療UP TO DATE	定価2,520円/¥148円	9月号	高血圧診療UP TO DATE	定価2,520円/¥148円
6月号	ここまでの分子標的療法	定価2,520円/¥148円	10月号	医科-歯科診療の連携	定価2,520円/¥148円	10月号	医科-歯科診療の連携	定価2,520円/¥148円
7月号	血栓塞栓症のすべて	定価2,520円/¥148円	11月号	生活習慣病と消化器疾患	定価2,520円/¥148円	11月号	生活習慣病と消化器疾患	定価2,520円/¥148円
8月号	臓器移植	定価2,520円/¥148円	12月号	日本の医療制度を考える	定価2,520円/¥148円	12月号	日本の医療制度を考える	定価2,520円/¥148円
9月号	しびれの臨床	定価2,520円/¥148円	<b>2008年(平成20年)</b>					
10月号	COPD 一診療の実態とこれからの治療	定価2,520円/¥148円	1月号	ノーベル賞の医療への貢献	定価2,520円/¥148円	1月号	ノーベル賞の医療への貢献	定価2,520円/¥148円
11月号	浮腫を診る	定価2,520円/¥148円	2月号	虚血性心疾患診療の新時代	定価2,520円/¥148円	2月号	虚血性心疾患診療の新時代	定価2,520円/¥148円
12月号	2006-2007インフルエンザ対策	定価2,520円/¥148円	3月号	見落としがちな内分泌疾患	定価2,520円/¥148円	3月号	見落としがちな内分泌疾患	定価2,520円/¥148円
<b>2007年(平成19年)</b>		4月号	臨床血液学 -新たなエVIDENCEの實踐に向けて	定価2,520円/¥148円	4月号	臨床血液学 -新たなエVIDENCEの實踐に向けて	定価2,520円/¥148円	
1月号	実地医家のためのインスリン療法	定価2,520円/¥148円	5月号	特定健診・特定保健指導の実態	定価2,520円/¥148円	5月号	特定健診・特定保健指導の実態	定価2,520円/¥148円
2月号	高齢者の循環器疾患を予防する -動脈硬化性疾患の克服に向けて-	定価2,520円/¥148円	6月号	肝がん撲滅へ向けて	定価2,520円/¥148円	6月号	肝がん撲滅へ向けて	定価2,520円/¥148円
3月号	膠原病診療のA to Z	定価2,520円/¥148円	7月号	糖尿病診療に必要な検査ABC	定価2,520円/¥148円	7月号	糖尿病診療に必要な検査ABC	定価2,520円/¥148円
4月号	頭痛診療の実際	定価2,520円/¥148円	8月号	禁煙を科学する	定価2,520円/¥148円	8月号	禁煙を科学する	定価2,520円/¥148円
5月号	アレルギー疾患へのアプローチ	定価2,520円/¥148円	9月号	肺がん-がん津波への備え	定価2,520円/¥148円	9月号	肺がん-がん津波への備え	定価2,520円/¥148円
6月号	全身性疾患と腎臓病	定価2,520円/¥148円	10月号	後期高齢者をどう診ていくか	定価2,520円/¥148円	10月号	後期高齢者をどう診ていくか	定価2,520円/¥148円
7月号	適切な高脂血症診療の實踐のために	定価2,520円/¥148円	11月号	変化する感染症-人間の備えは十分か?	定価2,520円/¥148円	11月号	変化する感染症-人間の備えは十分か?	定価2,520円/¥148円

2003年増刊	理解して実践する 感染症診療-投薬ガイド	定価8,400円/¥450円
2004年増刊	救急マニュアル2004	定価8,400円/¥450円
2005年増刊	臨床医のための 超音波診断アトラス	定価8,400円/¥450円

2006年増刊	日本のプライマリ・ケア よくある健康問題100	定価8,400円/¥450円
2007年増刊	DATAで読み解く内科疾患	定価8,400円/¥450円
2008年増刊	新版処方計画法	定価8,925円/¥450円

定価は税込の価格です

境界領域/知っておきたい

## 骨代謝におけるアディポネクチンの役割

蛭名 耕介 福原 淳範 下村伊一郎

臨床整形外科

第43巻 第11号 別刷

2008年11月25日 発行

医学書院

## 骨代謝におけるアディポネクチンの役割

### ■ はじめに

近年の食生活の欧米化などにより、本邦でも肥満脂肪細胞により惹起されるメタボリックシンドロームなどの生活習慣病が大きな社会問題となっている。様々な研究の結果、脂肪細胞は単なるエネルギー貯蔵のための臓器ではなく、アディポネクチンやレプチンなどの“アディポサイトカイン”と呼ばれる生理活性物質を分泌する内分泌臓器であることが明らかとなった。また、肥満は骨量と密接な関係があることは以前から知られており、アディポサイトカインの骨代謝における役割がクローズアップされている。今回はこの中の主要な因子の一つであるアディポネクチンの骨代謝における役割を中心に最新の知見を踏まえて報告する。

### ■ アディポネクチンの糖脂質代謝における役割

現在までに、アディポネクチンは抗糖尿病・抗動脈硬化・抗炎症作用を有することが明らかとなっている。ヒトにおいては肥満や糖尿病、狭心症などの動脈硬化性疾患の患者でその血中濃度が低下しており、アディポネクチンノックアウトマウスでは糖尿病や動脈硬化などが悪化することが報告されている<sup>9,10</sup>。その主な作用機序は、脂肪酸酸化や糖取り込み促進によるインスリン感受性増強や、血管内皮への単球の接着・平滑筋の増殖・マクロファージの泡沫化の抑制であることが報告されている<sup>12,18</sup>。以上から血中アディポネクチン濃度の低下が様々な生活習慣病の原因となっている可能性が示唆されている。

### ■ アディポネクチンの構造と受容体

アディポネクチンは脂肪細胞から最も豊富に分泌される因子の一つで、血中に約5~30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と高濃度に存在する。その構造は約30kDaのポリペプチドで、C末端のglobular domainとN末端のcollagen-like domainより構成されるTNF- $\alpha$ スーパーファミリーの一つである。アディポネクチンは、そのisoformにより①globular domain、②3量体であるlow molecular weight(LMW)、③6量体であるmiddle molecular weight(MMW)、④12-18量体であるhigh molecular weight(HMW)に分類される。近年、種々の細胞や臓器におけるアディポネクチンの作用はそのisoformにより異なることが報告されている。また、アディポネクチン受容体はAdipoR1とAdipoR2とT-cadherinの3種類が同定され、骨芽細胞などの細胞に発現していることが明らかとなり、アディポネクチンの骨代謝における様々な役割が報告されている。

### ■ アディポネクチンの骨芽細胞に対する作用 (図1~3)

アディポネクチン受容体AdipoR1とAdipoR2はヒトおよびマウス骨芽細胞においてその発現が確認された<sup>8</sup>。ヒト骨芽細胞やマウス前駆骨芽細胞MC3T3-E1においてアディポネクチンは容量依存的に増殖を促進し、また骨芽細胞の分化マーカーであるALP活性や、オステオカルシン・I型コラーゲンの産生を上昇させることが報告されている<sup>4,8,11</sup>。また、この増殖促進作用にはAdipoR1を介したc-Jun N-terminal kinase(JNK)の活性化が重要であり、分化誘導作用にはAdipoR1を介したp38MAPKの活性化が重要であることが明らか

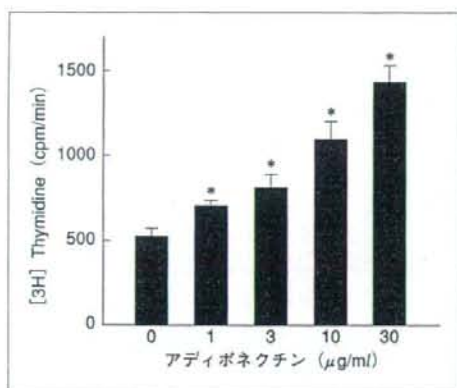


図 1 ヒト骨芽細胞の増殖に対するアディポネクチンの効果

アディポネクチンを添加して 48 時間後に細胞増殖を評価(文献 8 より引用改変)

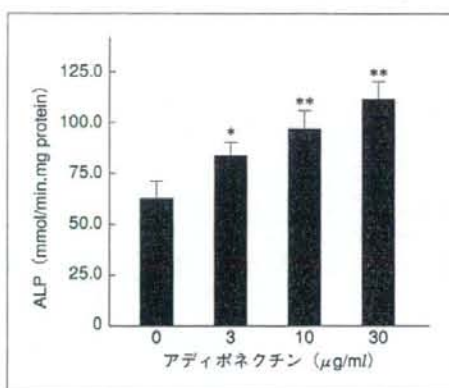


図 2 ヒト骨芽細胞の分化に対するアディポネクチンの効果

アディポネクチンを添加して 48 時間後に ALP 活性を評価(文献 8 より引用改変)

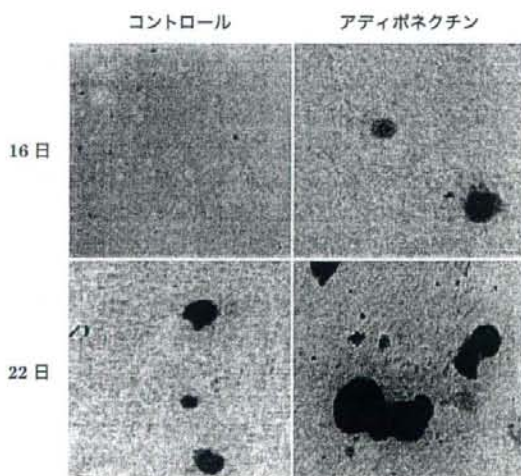


図 3 ヒト骨芽細胞の分化に対するアディポネクチンの効果

アディポネクチン(30 μg/ml)を添加して培養後 16 日と 22 日(Alizarin Red S 染色)(文献 8 より引用改変).

となった<sup>6)</sup>。他方、アディポネクチンが骨芽細胞において破骨細胞誘導因子である receptor activator of NF-κ B ligand(以下、RANKL)の発現上昇と、破骨細胞形成抑制因子であるオステオプロテグリンの発現低下を惹起するという報告もなされてい

る<sup>7)</sup>。

■ アディポネクチンの破骨細胞に対する作用 (図 4)

マウス骨髄細胞, ヒト末梢血 CD14 陽性細胞,

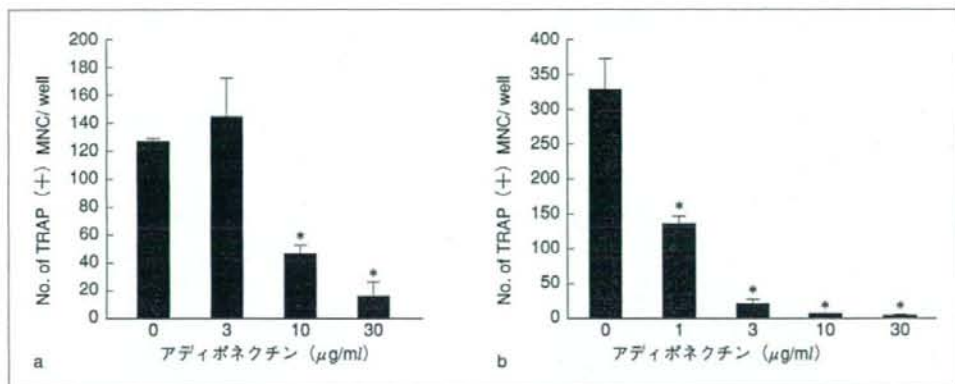


図4 マウス骨髄細胞(a)およびヒト CD14 陽性単球(b)からの破骨細胞分化におけるアディポネクチンの効果  
a, b: 上記細胞に M-CSF と RANKL を添加して破骨細胞を誘導した際の TRAP 染色陽性細胞数(文献 11 より引用  
改変)

RAW264 細胞は, macrophage colony-stimulating factor(以下 M-CSF)もしくは lipopolysaccharide(以下 LPS)の存在下に RANKL を加えると, 破骨細胞へと分化誘導される。分化した破骨細胞は NO を産生し, 象牙吸収能を示す。しかしアディポネクチンにより破骨細胞の分化は抑制され, NO 産生能や象牙吸収能も抑制される<sup>11,17)</sup>。破骨細胞の分化誘導において転写因子 NF- $\kappa$ B は必須な因子である。アディポネクチンはマクロファージ・クッパー細胞において NF- $\kappa$ B を抑制することが報告されており, 破骨細胞においてもアディポネクチンは NF- $\kappa$ B を抑制することで破骨細胞の分化・活性を抑制すると考えられる<sup>17)</sup>。

#### ■ アディポネクチンの骨髄細胞に対する

##### 作用

アディポネクチンは骨髄の前駆脂肪細胞からの成熟脂肪細胞への分化を抑制することより, 骨髄局所で間葉系幹細胞の脂肪分化を抑制している可能性が示されている<sup>19)</sup>。

上記のようにアディポネクチンは骨芽細胞の増殖・分化を促進し, 骨髄の単球系細胞からの破骨細胞への分化や前駆脂肪細胞の脂肪への分化を抑

制する。しかし, 同時に骨芽細胞において破骨細胞誘導因子である RANKL の発現上昇と, 破骨細胞形成抑制因子であるオステオプロテグリンの発現低下を惹起することから, 生体全体の骨代謝におけるアディポネクチンの作用は複雑な表現系を示す。Shinoda ら<sup>13)</sup>はアディポネクチンのノックアウトマウスやトランスジェニックマウスで骨形態や骨量に異常がないことを報告している。一方, Oshima ら<sup>11)</sup>はアデノウイルスによる一過性過剰発現により骨量が増加することを報告しており, 動物実験においてアディポネクチンと骨量との関係についての報告は一定の見解を得ていない。また, ヒトにおいてはアディポネクチンの血中濃度は体重と逆相関している。すなわち肥満者においてはアディポネクチンの血中濃度は低下しているが, 体重増加に伴う力学的負荷の増大による影響を受けるため, ヒトにおいて骨へのアディポネクチンの直接的な作用を評価することは困難と考えられる。また, 過去の報告においてもヒトの血中アディポネクチン濃度と骨量との関係についての報告は一定の見解を得ておらず<sup>3,5,6,16)</sup>, 今後のさらなる報告が待たれる。

## ■ 内臓脂肪型肥満と骨代謝

近年、内臓脂肪の蓄積が、動脈硬化や耐糖能異常などのメタボリックシンドロームの病態と密接に関わっていることが明らかとなってきた。内臓脂肪の蓄積が、血中アディポネクチン濃度低下とともに血中レプチン濃度上昇や、インスリン抵抗性とそれに伴う高インスリン血症を惹起することは広く知られている。またエストロゲンは閉経後においては主に脂肪組織で副腎由来アンドロゲンから変換産生されるため、閉経後女性で血中エストロン(エストロゲン的一种)濃度は脂肪量と有意に相関することが報告されている。またエストロゲンはマウスと培養脂肪細胞からのアディポネクチンの分泌を低下させるとの報告があり<sup>1)</sup>、これが内臓脂肪増加による血中アディポネクチン濃度低下に関与している可能性も考えられる。レプチン・インスリン・エストロゲンはいずれも糖脂質代謝のみならず骨代謝においても重要な役割を果たすことが知られており、内臓脂肪蓄積に伴うこれらの因子の変動が骨代謝に大きな影響を及ぼすと考えられる。

食欲調節因子であるレプチンは脂肪細胞から分泌され、その血中濃度が皮下脂肪量・内臓脂肪量・総体脂肪量と有意に相関することが報告されている。レプチン受容体は骨芽細胞に発現しており、*in vitro* ではレプチンは骨芽細胞の増殖と分化を促進させる<sup>2)</sup>。また、破骨細胞分化因子であるRANKLの産生を抑制することで骨髄細胞の破骨細胞への分化を抑制する<sup>3)</sup>。このように末梢においてレプチンは骨量維持に促進的に作用する。一方、Takedaら<sup>4)</sup>は、レプチンは視床下部にあるレプチン受容体を介し交感神経系を刺激することで骨芽細胞におけるRANKLの発現を亢進し、破骨細胞を活性化することで骨吸収促進作用を発揮することを報告した。このようにレプチンの骨代謝における作用は末梢と中枢で相反するものであり、また臨床的にもレプチンの血中濃度と骨量の関係はいまだ一定の見解を得ていない。

インスリンは *in vitro* では強力な骨芽細胞の増

殖・分化、およびコラーゲン合成の促進作用を有し、また *in vivo* ではストレプトゾトシンによるインスリン分泌不全ラットで急速な骨量減少が報告されている。エストロゲンは骨髄細胞に直接作用して破骨細胞のアポトーシスを誘導し、骨芽細胞への分化および骨基質蛋白の産生を促進する。つまり、肥満(内臓脂肪の増加)により惹起される高インスリン血症および血中エストロゲン濃度の上昇が、骨量維持・増加に重大な役割を果たしている可能性が考えられる。同時に肥満に伴う血中アディポネクチン濃度の低下や血中レプチン濃度の上昇による骨量への影響は、血中インスリン・エストロゲン濃度上昇の作用の影響をより強く受ける可能性があり、今後さらなる検討が必要と考えられる。

## ■ おわりに

骨代謝におけるアディポサイトカインの役割を、アディポネクチンを中心に概説した。骨代謝においては力学的因子の関与に加え、複数のアディポサイトカインや肥満関連液性因子が互いに影響を及ぼし合うと考えられるため、臨床的には複雑な表現系を示す。内臓脂肪の蓄積に伴い惹起されるアディポサイトカインの変動は、いわゆるメタボリックシンドロームだけでなく骨代謝においても重要な役割を果たすことが想定され、今後この分野のさらなる発展が期待される。

## 文 献

- 1) Combs TP, Berg AH, Rajala MW, et al: Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes* 52: 268-276, 2003
- 2) Holloway WR, Collier FM, Aitken CJ, et al: Leptin inhibits osteoclast generation. *J Bone Miner Res* 17: 200-209, 2002
- 3) Jurimae J, Jurimae T: Adiponectin is a predictor of bone mineral density in middle-aged premenopausal women. *Osteoporos Int* 18: 1253-1259, 2007
- 4) Kanazawa I, Yamaguchi T, Yano S, et al: Adiponectin and AMP kinase activator stimulate prolifera-

- tion, differentiation, and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *BMC Cell Biol* **8** : 51, 2007
- 5) Kontogianni MD, Dafni UG, Routsias JG, et al : Blood leptin and adiponectin as possible mediators of the relation between fat mass and BMD in perimenopausal women. *J Bone Miner Res* **19** : 546-551, 2004
  - 6) Lenchik L, Register TC, Hsu FC, et al : Adiponectin as a novel determinant of bone mineral density and visceral fat. *Bone* **33** : 646-651, 2003
  - 7) Luo XH, Guo LJ, Xie H, et al : Adiponectin stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway. *J Bone Miner Res* **21** : 1648-1656, 2006
  - 8) Luo XH, Guo LJ, Yuan LQ, et al : Adiponectin stimulates human osteoblasts proliferation and differentiation via the MAPK signaling pathway. *Exp Cell Res* **309** : 99-109, 2005
  - 9) Maeda N, Shimomura I, Kishida K, et al : Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* **8** : 731-737, 2002
  - 10) Matsuda M, Shimomura I, Sata M, et al : Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis. *J Biol Chem* **277** : 37487-37491, 2002
  - 11) Oshima K, Nampei A, Matsuda M, et al : Adiponectin increases bone mass by suppressing osteoclast and activating osteoblast. *Biochem Biophys Res Commun* **331** : 520-526, 2005
  - 12) Ouchi N, Kihara S, Arita Y, et al : Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* **103** : 1057-1063, 2001
  - 13) Shinoda Y, Yamaguchi M, Ogata N, et al : Regulation of bone formation by adiponectin through autocrine/paracrine and endocrine pathways. *J Cell Biochem* **99** : 196-208, 2006
  - 14) Steppan CM, Crawford DT, Chidsey-Frink KL, et al : Leptin is a potent stimulator of bone growth in ob/ob mice. *Regul Pept* **92** : 73-78, 2000
  - 15) Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, et al : Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* **111** : 305-317, 2002
  - 16) Tamura T, Yoneda M, Yamane K, et al : Serum leptin and adiponectin are positively associated with bone mineral density at the distal radius in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* **56** : 623-628, 2007
  - 17) Yamaguchi N, Kukita T, Li Y J, et al : Adiponectin inhibits osteoclast formation stimulated by lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **49** : 28-34, 2007
  - 18) Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, et al : Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* **8** : 1288-1295, 2002
  - 19) Yokota T, Meka CS, Medina KL, et al : Paracrine regulation of fat cell formation in bone marrow cultures via adiponectin and prostaglandins. *J Clin Invest* **109** : 1303-1310, 2002

蛸名耕介\*1,2), 福原淳範\*2)  
下村伊一郎\*2)

\*1) 大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学  
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2

\*2) 大阪大学大学院医学系研究科  
内分泌代謝内科学

## 骨代謝における アディポサイトカインの役割

蛭名 耕介\* 福原 淳範\*\*<sup>1)</sup> 下村 伊一郎\*\*<sup>2)</sup>

肥満と骨量に相関があることは臨床的によく知られているが、これには体重増加による力学的負荷の増大に加え生化学的因子の関与が示唆されてきた。近年、脂肪細胞は、単なるエネルギー貯蔵の為の臓器ではなく、レプチン、アディポネクチンなどのさまざまな“アディポサイトカイン”と呼ばれる生理活性物質を分泌する内分泌臓器であることが明らかとなった。また、これらのアディポサイトカインの骨代謝におけるさまざまな効果も報告されるに至った。今回は、アディポサイトカインの骨代謝における役割および内臓脂肪の蓄積に伴うこれらの因子の変動が、骨代謝に及ぼす影響の可能性について考察する。

The metabolic syndrome and bone health.

### *The role of adipocytokine in bone metabolism.*

*Osaka University, Graduate School of Medicine, Department of Orthopaedics/*

*Department of Internal Medicine and Molecular Science*

*Kosuke Ebina*

*Osaka University, Graduate School of Medicine, Department of Internal Medicine and Molecular Science*

*Atsunori Fukuhara, Iichiro Shimomura*

Growing evidence suggests that positive association between fat mass and bone mineral density (BMD) is mediated not only biomechanical but also biochemical factors. Recent studies on adipocyte function have revealed that adipose tissue is not merely an energy-storing organ but it secretes a variety of biological active molecules, conceptualized as "adipocytokines", including leptin and adiponectin. Adipocyte also exist in bone marrow, and experimental finding indicate the dynamic involvement of adipocytokines in bone metabolism. This report aims to review some of the effects of adipocytokines in bone metabolism, in relation to visceral fat accumulation.

\*大阪大学大学院医学系研究科器管制御外科学 / 内分泌代謝内科学 (えびな・こうすけ)

\*\*大阪大学大学院医学系研究科内分泌代謝内科学 <sup>1)</sup> (ふくはら・あつり) <sup>2)</sup> 教授 (しもむら・いichろう)



## はじめに

骨格の主たる機能は、軟部組織の支持・保護および運動のための強固な枠組みを供給することにある。ゆえに骨格の強度は、支持・保護する軟部組織の量(=体重)と相関することが推測される。筋肉以外の軟部組織で、体重を左右する主要因子として脂肪組織があげられる。脂肪組織の増加は骨格に対する負荷を増大させる為、肥満では骨折率は上昇することも想定されるが、臨床的に肥満は有意に骨折率を低下させることが報告されている。

そこで体重以外の脂肪組織と骨量を結びつける因子が想定されてきた。近年脂肪組織が内分泌組織であるという概念が提唱されて以降、脂肪細胞分泌因子(アディポサイトカイン)の骨代謝における役割がクローズアップされている。

## 肥満関連液性因子と骨代謝の関係について

肥満における骨代謝に関与すると考えられる因子は、大きく物理的因子と液性因子の2つに分けられる。物理的因子とは、肥満により増大する体重などの骨への力学的負荷である。液性因子としては、肥満の病態に伴ってその分泌量や活性が変化する因子があげられる。

つまり閉経後、脂肪組織で変換産生されるエストロゲンや $\beta$ 細胞由来生理活性物質であるインスリンや脂肪組織分泌因子(アディポサイトカイン)などである。ここでは肥満関連液性因子と骨代謝の関係を中心に述べる。

## エストロゲン

エストロゲンは、閉経後においては主に脂肪組織で副腎由来アンドロゲンから変換され産生される。エストロゲンは、骨髄細胞に直接作用して破骨細胞のアポトーシスを誘導し、骨芽細胞への分

化および骨基質タンパクの産生を促進する。閉経後は、脂肪組織が多いほど副腎由来アンドロゲンから変換されるエストロゲンが増加するので骨量維持に優位に作用すると考えられている。

## インスリン

肥満は、インスリン抵抗性を惹起する最大の因子である。インスリン抵抗性が生じると、インスリンによる末梢組織(骨格筋、脂肪組織)への糖取り込み作用や肝臓の糖放出抑制作用が障害され、インスリンによる血糖降下作用が障害される。その為、インスリンの分泌予備能が維持されていれば代償性にインスリン分泌が亢進して高インスリン血症となる。インスリンは重要な骨代謝調節因子であり、*in vitro*では骨芽細胞の増殖・分化およびコラーゲン合成の促進作用が報告され、*in vivo*ではストレプトゾトシンによるインスリン分泌不全ラットで急速な骨量減少が報告されている。

## アディポサイトカイン

### 1. レプチン

食欲調節因子であるレプチンは、その血中濃度が皮下脂肪量・内臓脂肪量・総体脂肪量と有意に相関することが報告されている。レプチン受容体は、骨芽細胞に発現しており、*in vitro*ではレプチンは骨芽細胞の増殖と分化を促進させる<sup>1)</sup>。また、破骨細胞分化因子である receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (以下 RANKL) の産生を抑制することで骨髄細胞の破骨細胞への分化を抑制する<sup>2)</sup>。このように末梢においてレプチンは骨量維持に促進的に作用する。

一方、Takedaらはレプチンが視床下部にあるレプチン受容体を介し、交感神経系を刺激することで骨芽細胞における RANKL の発現を亢進し、破骨細胞を活性化することで骨吸収促進作用を発

RANKL : receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand

揮することを報告した<sup>3)</sup>。このようにレプチンの骨代謝における作用は、末梢と中枢で相反するものであり、また臨床的にもレプチンの血中濃度と骨量の関係はいまだ一定の見解を得ていない。

## 2. レジスチン

レジスチンは、抗糖尿病薬であるチアゾリジン誘導体の使用時に、脂肪細胞での発現が低下する因子として同定された。レジスチンは、骨芽細胞の分化と増殖を促進すると同時に、破骨細胞の分化を促進することが報告されている<sup>4)</sup>。これらの骨形成に対する相反する作用が、骨量の変化にどのように作用するかはいまだ明らかとなっていない。

## 3. ビスファチン

ビスファチンは、内臓脂肪で高発現しているアディポサイトカインで、Xieらはヒト骨芽細胞においてビスファチンがその増殖とI型コラーゲン産生を促進すると報告しているが<sup>5)</sup>、臨床的にビスファチンと骨量の具体的な関連を示す報告はない。

## 4. アディポネクチン

アディポネクチンは、脂肪細胞より最も豊富に分泌される因子の一つで、血中に約5~30 µg/mLと高濃度に存在する。その構造は約30 kDaのポリペプチドで、C末端のglobular domainとN末端のcollagen-like domainより構成されるTNF-α (tumor necrosis factor-α)スーパーファミリーの一つである。アディポネクチンは、そのisoformによりglobular・3量体であるlow molecular weight (LMW)・6量体であるmiddle molecular weight (MMW)・12-18量体である

high molecular weight (HMW)に分類される。

近年、種々の細胞や臓器におけるアディポネクチンの作用は、そのisoformにより異なることが報告されている<sup>6)</sup>。また、アディポネクチン受容体はAdipoR1とAdipoR2とT-cadherinの3種類が同定され、アディポネクチンがAMPkinase, p38MAPK, PPAR-α (peroxisome proliferator-activated receptor-α) ligand activitiesを上昇させることが報告されている。その結果、脂肪酸の酸化や糖取り込みを促進し、インスリン感受性を増強することで抗糖尿病作用を発揮すると考えられる。また血管壁に作用して単球の接着・平滑筋の増殖・マクロファージの泡沫化を抑制して抗動脈硬化作用を発揮する。また、血中アディポネクチン濃度は肥満や糖尿病、狭心症などの動脈硬化性疾患の患者で低下していることも報告されている。

以上のように、アディポネクチンはその抗糖尿病・抗動脈硬化作用を中心に検討されてきたが、近年その受容体の発現がユビキタスであることより、骨代謝における役割も検討されている。本稿では我々のデータも含めて紹介する。

### (I) アディポネクチンの骨芽細胞に対する作用 (図1, 図2, 図3)

アディポネクチン受容体AdipoR1とAdipoR2は、ヒトおよびマウス骨芽細胞においてその発現が確認された。ヒト骨芽細胞やマウス前駆骨芽細胞MC3T3-E1においてアディポネクチンは、容量依存的に増殖を促進し、また骨芽細胞の分化マーカーであるALP (アルカリホスファターゼ)活性や、オステオカルシン・I型コラーゲンの産生を上昇させる<sup>7)~9)</sup>。また、この増殖促進作用にはAdipoR1を介したJNKの活性化が重要であり、分化誘導作用にはAdipoR1を介したp38

ALP:アルカリホスファターゼ, HMW:high molecular weight, LMW:low molecular weight, MMW:middle molecular weight, PPAR-α: peroxisome proliferator-activated receptor-α, TNF-α: tumor necrosis factor-α

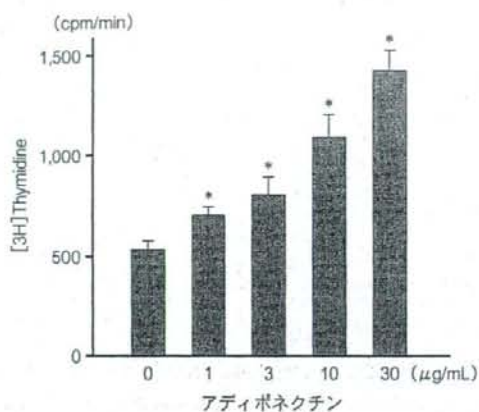


図1 ヒト骨芽細胞の増殖に対するアディポネクチンの効果

アディポネクチンを添加して48時間後に細胞増殖を評価。

\*p < 0.05 vs. control

(文献7より引用改変)

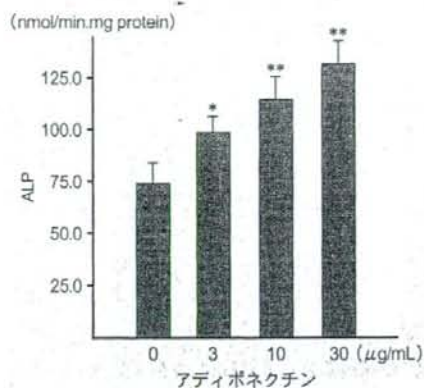


図2 ヒト骨芽細胞の分化に対するアディポネクチンの効果

アディポネクチンを添加して48時間後にALP活性を評価。

ALP：アルカリホスファターゼ

\*p < 0.05

\*\*p < 0.001 vs. control

(文献7より引用改変)

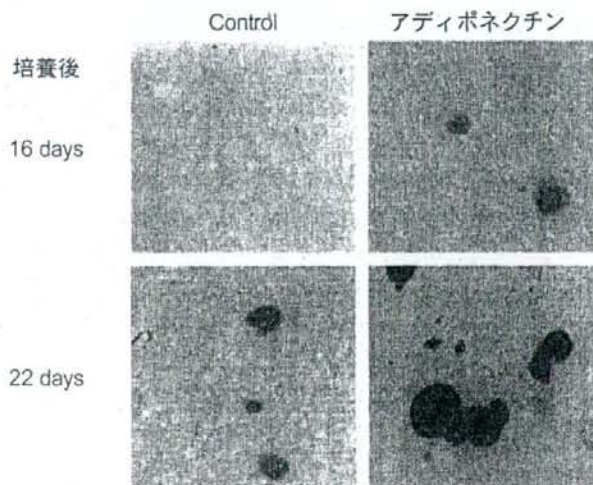


図3 ヒト骨芽細胞の分化に対するアディポネクチンの効果

アディポネクチン(30 μg/mL)を添加して培養後16日と22日。(Alizarin Red S染色)

(文献7より引用改変)

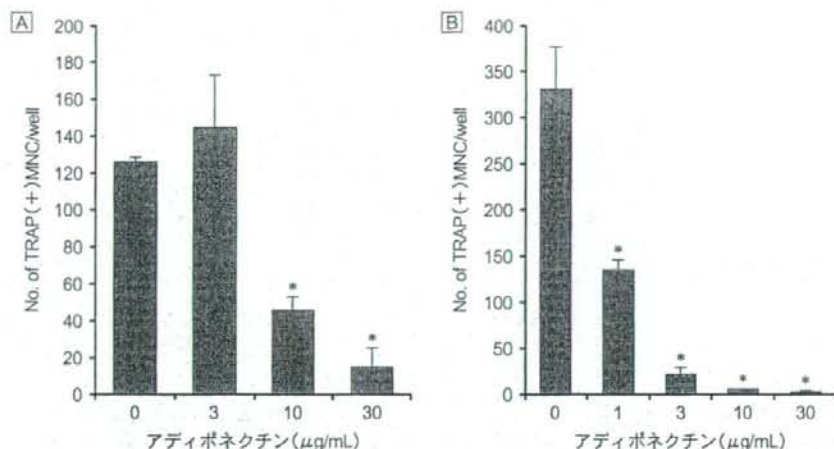


図4 マウス骨髄細胞 (A) およびヒトCD 14 陽性単球 (B) からの破骨細胞分化におけるアディポネクチンの効果

A, B 上記細胞に M-CSF と RANKL を添加して破骨細胞を誘導した際の TRAP 染色陽性細胞数。  
RANKL : receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand

\* $p < 0.05$  vs. control

(文献8より引用改変)

MAPK の活性化が重要である<sup>7)</sup>。他方、アディポネクチンが骨芽細胞において AdipoR1/p38 MAPK を介して破骨細胞誘導因子である RANKL の発現上昇と、破骨細胞形成抑制因子であるオステオプロテグリンの発現低下を惹起するという報告もなされている<sup>10)</sup>。

#### (2) アディポネクチンの破骨細胞に対する作用 (図4, 図5, 図6)

マウス骨髄細胞, ヒト末梢血 CD14 陽性細胞, RAW264 細胞は, macrophage colony-stimulating factor (以下 M-CSF) もしくは lipopolysaccharide (以下 LPS) に加え, RANKL の刺激により破骨細胞へと分化誘導される。分化した破骨細胞は NO を産生し, 象牙吸収能を示す。しかし, この過程でアディポネクチンを添加すると破骨細胞の分化は抑制され, NO 産生能や象牙吸収

能も抑制される<sup>11)</sup>。転写因子 NF- $\kappa$ B は破骨細胞の分化誘導に重要な因子である。アディポネクチンは, マクロファージ・血管内皮細胞において NF- $\kappa$ B を抑制することが報告されており, 破骨細胞においてもアディポネクチンは, NF- $\kappa$ B を抑制することで破骨細胞の分化・活性を抑制すると考えられる<sup>11)</sup>。

#### (3) アディポネクチンの骨髄細胞に対する作用

アディポネクチンは, 骨髄の前駆脂肪細胞からの成熟脂肪細胞への分化を抑制することより, 骨髄局所で間葉系幹細胞の脂肪分化を抑制している可能性が示唆される<sup>12)</sup>。

前述のようにアディポネクチンは, 骨芽細胞の増殖・分化を促進し, 骨髄の前駆脂肪細胞の脂肪分化や破骨細胞の分化を抑制する。しかし, 同時に骨芽細胞において破骨細胞誘導因子である

LPS : lipopolysaccharide, M-CSF : macrophage colony-stimulating factor

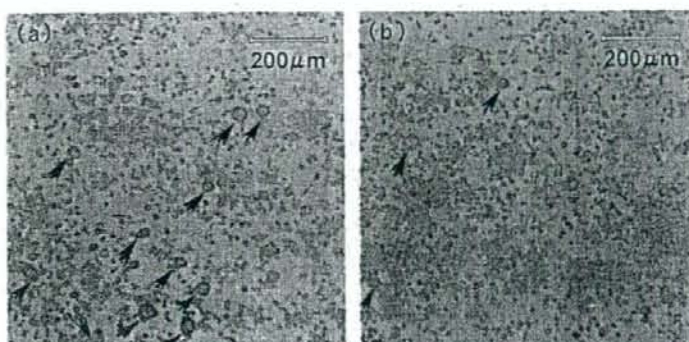


図5 マウス RAW-264 細胞からの破骨細胞分化におけるアディポネクチンの効果

(a) コントロール (b) アディポネクチン 20 μg/mL 添加時。

(文献 11 より引用改変)

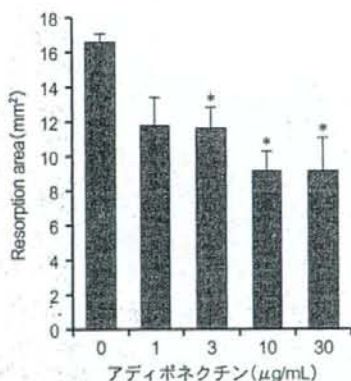


図6 ヒト CD14 陽性単球より誘導した破骨細胞の象牙吸収能に対するアディポネクチンの効果

破骨細胞分化誘導後、3～14日までアディポネクチンを添加して培養。

\* p < 0.05 vs. control

(文献 8 より引用改変)

RANKL の発現上昇と、破骨細胞形成抑制因子であるオステオプロテグリンの発現低下を惹起することより、生体全体の骨代謝におけるアディポネクチンの作用は、複雑な表現系を示す。Shinoda らは、アディポネクチンのノックアウトマウスやトランスジェニックマウスで骨形態や骨量に異常

がないことを報告している<sup>13)</sup>。

一方、Oshima らは、アデノウイルスによる一過性過剰発現により骨量が増加することを報告しており<sup>8)</sup>、動物実験においてアディポネクチンと骨量との関係についての報告は、一定の見解を得ていない。また、ヒトにおいては、アディポネクチンの血中濃度は体重と逆相関している。すなわち、肥満者においてはアディポネクチンの血中濃度は低下しており、体重増加に伴う力学的負荷の増大による骨量への影響を完全に除外して、アディポネクチンの骨への直接的な作用を評価することは困難と考えられる。実際に、ヒトにおいてもアディポネクチンと骨量との関係についての報告は、一定の見解を得ておらず<sup>14)～16)</sup>、今後のさらなる報告がまたれる。

#### ■ 内臓脂肪と骨代謝

近年、内臓脂肪の蓄積が、動脈硬化や耐糖能異常などのメタボリックシンドロームの病態と密接に関わっていることが明らかとなってきた。内臓脂肪の蓄積が、インスリン抵抗性とそれに伴う高インスリン血症、血中レプチン濃度上昇および血中アディポネクチン濃度低下を惹起することは広

く知られている。また、閉経後女性で血中エストロン(エストロゲン的一种)は、脂肪量と有意に相関することが報告されている。これは、肥満では副腎由来アンドロゲンをエストロゲンに変換する脂肪の絶対量が増大していることと、内臓脂肪での17 $\beta$ -hydroxysteroid-dehydrogenase/aromatase比が上昇して副腎由来アンドロゲンからエストロゲンを変換する効率が上昇していることなどが理由と考えられる。また、肥満では脂肪と肝臓でのsex hormone-binding globulin合成は抑制され、free estradiolの割合が増加し、全体としてエストロゲンの活性を上昇させる<sup>19)</sup>。エストロゲンは、マウスと培養脂肪細胞からのアディポネクチンの分泌を低下させるとの報告があり<sup>20)</sup>、これが内臓脂肪増加による血中アディポネクチン濃度低下に関与している可能性も考えられる。

以上より、肥満(内臓脂肪の増加)により惹起される高インスリン血症および血中エストロゲンの上昇が肥満における骨量増加に大きく関与している可能性が考えられる。同時に肥満に伴う血中アディポネクチン濃度の低下や血中レプチン濃度の上昇による骨量への影響は、これらの因子の影響をより強く受ける可能性もあり、今後さらなる検討が必要と考えられる。

## おわりに

骨代謝におけるアディポサイトカインの役割をアディポネクチンを中心に概説した。骨代謝においては力学的因子に加え、インスリンやアディポサイトカインが互いに影響を及ぼし合うと考えられるため、臨床的には複雑な表現系を示す。また内臓脂肪の蓄積に伴い惹起されるアディポサイトカインの変動は骨代謝においても重要な役割を果たすことが想定されるため、今後その影響を明らかにしていくことが望まれる。

## 文 献

- 1) Stepan CM, Crawford DT, Chidsey-Frink KL, et al: Leptin is a potent stimulator of bone growth in ob/ob mice. *Regul Pept* **92**: 73, 2000.
- 2) Holloway WR, Collier FM, Aitken CJ, et al: Leptin inhibits osteoclast generation. *J Bone Miner Res* **17**: 200, 2002.
- 3) Takeda S, Eleftheriou F, Karsenty G, et al: Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* **111**: 305-317, 2002.
- 4) Thommesen L, Stunes AK, Syversen U, et al: Expression and regulation of resistin in osteoblasts and osteoclasts indicate a role in bone metabolism. *J Cell Biochem* **99**: 824-834, 2006.
- 5) Xie H, Tang SY, Liao EY, et al: Insulin-like effects of visfatin on human osteoblasts. *Calcif Tissue Int* **80**: 201-210, 2007.
- 6) Neumeier M, Weigert J, Scholmerich J, et al: Different effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells. *J Leukoc Biol* **79**: 803-808, 2006.
- 7) Luo XH, Guo LJ, Liao EY, et al: Adiponectin stimulates human osteoblasts proliferation and differentiation via the MAPK signaling pathway. *Exp Cell Res* **309**: 99-109, 2005.
- 8) Oshima K, Nampei A, Shimomura I, et al: Adiponectin increases bone mass by suppressing osteoclast and activating osteoblast. *Biochem Biophys Res Commun* **331**: 520-526, 2005.
- 9) Kanazawa I, Yamaguchi T, Sugimoto T, et al: Adiponectin and AMP kinase activator stimulate proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *BMC Cell Biol* **8**: 51, 2007.
- 10) Luo XH, Guo LJ, Liao EY, et al: Adiponectin stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway. *J Bone Miner Res* **21**: 1648-1656, 2006.
- 11) Yamaguchi N, Kukita T, Yamashita Y, et al:

- Adiponectin inhibits osteoclast formation stimulated by lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *FEMS Immunol. Med Microbiol* **49** : 28-34, 2007.
- 12) Yokota T, Meka CS, Kincade PW, et al : Paracrine regulation of fat cell formation in bone marrow cultures via adiponectin and prostaglandins. *J Clin Invest* **109**:1303-1310, 2002.
- 13) Shinoda Y, Yamaguchi M, Kawaguchi H, et al : Regulation of bone formation by adiponectin through autocrine/paracrine and endocrine pathways. *J Cell Biochem* **99**:196-208, 2006.
- 14) Lenchik L, Register TC, Bowden DW, et al : Adiponectin as a novel determinant of bone mineral density and visceral fat. *Bone* **33** : 646-651, 2003.
- 15) Kontogianni MD, Dafni UG, Skopouli FN, et al : Blood leptin and adiponectin as possible mediators of the relation between fat mass and BMD in perimenopausal women. *J Bone Miner Res* **19** : 546-551, 2004.
- 16) Järnå J, Järnå T : Adiponectin is a predictor of bone mineral density in middle-aged premenopausal women. *Osteoporos Int* **18** : 1253-1259, 2007.
- 17) Tamura T, Yoneda M, Kohno N, et al : Serum leptin and adiponectin are positively associated with bone mineral density at the distal radius in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* **56** : 623-628, 2007.
- 18) Richards JB, Valdes AM, Spector TD, et al : Serum adiponectin and bone mineral density in women. *J Clin Endocrinol Metab* **92** : 1517-1523, 2007.
- 19) Tanko LB, Christiansen C : Can confounding with fat-derived endogenous free estradiol explain the inverse correlation of bone mineral density with adiponectin? *Bone* **34**:916-917, 2004.
- 20) Combs TP, Berg AH, Jimenez-Chillaron JC, et al : Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes* **52** : 268-276, 2003.



## 腰部脊柱管狭窄 診断サポートツールマニュアル

福島県立医科大学整形外科助教授 紺野 慎一  
 福島県立医科大学副理事長(医療担当)兼附属病院長 菊地 臣一  
 京都大学大学院医学研究科医療疫学 林野 泰明  
 京都大学大学院医学研究科医療疫学教授 福原 俊一

A4変型判 36頁 定価1,995円(本体1,900円+税5%)送料実費  
 ISBN4-7532-2217-9 C3047

- ◎日本脊椎脊髄病学会評議員会で合意された診断サポートツール・最終版!
- ◎高齢者で訴えの多い間欠跛行は、腰部脊柱管狭窄からくるものなのか?  
簡潔な質問10項目から導き出された初期鑑別法!
- ◎市中医から専門医へ、的確な患者紹介をサポート。

株式会社 医薬ジャーナル社 〒541-0047 大阪市中央区淡路町3丁目1番5号・淡路町ビル21 電話 06(6202)7280(代) FAX 06(6202)5295 ( 振替番号 )  
 〒101-0061 東京都千代田区三崎町3丁目3番1号・TKIビル 電話 03(3265)7861(代) FAX 03(3265)8369 00910-13353

(Ⅲ) 新鮮な RA 骨髄細胞から選択された  
新規遺伝子からの病因物質解明研究



## Isolation and Expression Profiling of Genes Upregulated in Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells of Rheumatoid Arthritis Patients

Nobuo NAKAMURA,<sup>1,†</sup> Yasunori SHIMAOKA,<sup>2,†</sup> Takahiro TOUGAN,<sup>3</sup> Hiroaki ONDA,<sup>3,4</sup> Daisuke OKUZAKI,<sup>3</sup> Hanjun ZHAO,<sup>3</sup> Azumi FUJIMORI,<sup>3</sup> Norikazu YABUTA,<sup>3</sup> Ipei NAGAMORI,<sup>3</sup> Akie TANIGAWA,<sup>4</sup> Jun SATO,<sup>3</sup> Takenori ODA,<sup>5</sup> Kenji HAYASHIDA,<sup>6</sup> Ryuji SUZUKI,<sup>7</sup> Masao YUKIOKA,<sup>2</sup> Hiroshi NOJIMA,<sup>3,4,\*</sup> and Takahiro OCHI<sup>7</sup>

Center of Arthroplasty, Kyowakai Hospital, Suita, Japan<sup>1</sup>, Yukioka Hospital, Osaka, Japan<sup>2</sup>, Department of Molecular Genetics, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 562-0031, Japan<sup>3</sup>, Innovation Plaza Osaka, Izumi, Japan<sup>4</sup>, Department of Rheumatology, NHO Osaka-Minami Medical Center, Kawachinagano, Japan<sup>5</sup>, Hoshigaoka Kosei-Nenkin Hospital, Hirakata, Japan<sup>6</sup> and Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology, National Sagami Hospital, 18-1 Sakura-dai, Sagami, Kanagawa 228-8522, Japan<sup>7</sup>

(Received 25 July 2006; revised 21 August 2006)

### Abstract

We have comprehensively identified the genes whose expressions are augmented in bone marrow-derived mononuclear cells (BMMC) from patients with Rheumatoid Arthritis (RA) as compared with BMMCs from Osteoarthritis (OA) patients, and named them *AURA* after *augmented in RA*. Both stepwise subtractive hybridization and microarray analyses were used to identify *AURA* genes, which were confirmed by northern blot analysis and/or reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). We also assessed their expression levels in individual patients by quantitative real-time RT-PCR. Of 103 *AURA* genes we have identified, the mRNA levels of the following 10 genes, which are somehow related to immune responses, were increased in many of the RA patients: *AREG* (= *AURA9*), FK506-binding protein 5 (FKBP5 = *AURA45*), C-type lectin superfamily member 9 (*CLECSF9* = *AURA24*), tyrosylprotein sulfotransferase 1 (*TPST1* = *AURA52*), lymphocyte G0/G1 switch gene (*G0S2* = *AURA8*), chemokine receptor 4 (*CXCR4* = *AURA86*), nuclear factor-kappa B (*NF-κB* = *AURA25*) and two genes of unknown function (*FLJ11106* = *AURA1*, *BC022398* = *AURA2* and *XM.058513* = *AURA17*). Since *AREG* was most significantly increased in many of the RA patients, we subjected it to further analysis and found that *AREG*-epidermal growth factor receptor signaling is highly activated in synovial cells isolated from RA patients, but not in OA synoviocytes. We propose that the expression profiling of these *AURA* genes may improve our understanding of the pathogenesis of RA.

**Key words:** stepwise subtraction; microarray; RA; OA; amphiregulin; synoviolin

### 1. Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease characterized by arthritis that predominantly

results in chronic inflammation of systemic joints associated with the overgrowth of synovial cells. This induces progressive cartilage and bone destruction in the joint and subsequent disability. Since RA pathogenesis is likely to involve genetic elements, a number of groups have subjected samples from healthy and affected individuals to DNA microarray analyses for a broad-scale comparison. These studies have provided

Communicated by Mitsuo Oshimura

\* To whom correspondence should be addressed. Tel. +81-6-6875-3980, Fax. +81-6-6875-5192, E-mail: snj-0212@biken.osaka-u.ac.jp

† These authors contributed equally to this work.

significant insights into RA pathogenesis.<sup>1,2</sup> The first samples tested were synovial specimens,<sup>3-8</sup> and peripheral blood mononuclear cells (PBMC),<sup>9</sup> from RA and osteoarthritis (OA) patients, and cluster analysis of the resulting microarray gene-expression data revealed some candidate genes that may play a specific role in RA pathogenesis.

In other studies searching for key factors in RA pathogenesis, immunoscreening by using an antirheumatoid synovial cell antibody identified synoviin/Hrd1 to be a highly expressed enzyme (E3 ubiquitin ligase) in the rheumatoid synovium.<sup>10</sup> Synoviin appears to be a pathogenic factor for RA because mice overexpressing this enzyme developed spontaneous arthropathy, while heterozygous knockdown results in increased synovial cell apoptosis and resistance to collagen-induced arthritis.<sup>11</sup> It was proposed that the excess elimination of unfolded proteins due to synoviin overexpression triggers synovial cell overgrowth.<sup>12</sup> Thus, synoviin may play a pivotal role in the pathogenesis of arthropathy due to its functions in the quality control of proteins through the endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation (ERAD) system; its elevated expression may therefore have an anti-apoptotic effect that causes synovial hyperplasia.

Bone marrow-derived mononuclear cells (BMMC) are another target for analyses aiming to identify the key genes that participate in RA pathogenesis because accumulating evidence suggests that BMMC cell abnormalities may contribute to the pathogenesis of RA and experimental arthritis models.<sup>13-17</sup> Moreover, RA patients suffer from defective central and peripheral B-cell tolerance checkpoints,<sup>18</sup> the first of which occurs in the bone marrow between the early immature and immature B-cell stages (the second counter selection step of autoantibody-expressing B cells takes place in the periphery, when the new emigrant becomes a mature naive B cell).<sup>18,19</sup> In addition, inflammatory changes similar to those found in RA synovium seem to occur in the subchondral bone marrow of the involved RA joint,<sup>20</sup> and synovial inflammatory tissue can reach the adjacent bone marrow by fully breaking the cortical barrier.<sup>21</sup> Thus, BMMC cells are an interesting subject for studies seeking to identify specific genes involved in RA pathogenesis.

To identify the genes whose expressions are dramatically induced or reduced in the pooled BMMC mRNAs of 50 RA patients as compared with 50 OA patients, we here subjected these pooled mRNAs to stepwise subtraction, which is a unique technique that we have developed previously.<sup>22</sup> This method permitted the comprehensive identification of those genes that are specifically up- or down-regulated during RA pathogenesis. In addition, we also used microarray analysis, since DNA microarray analyses on the BMMC of RA patients have not been described previously. As a control, we also subjected the BMMC RNA from OA patients to stepwise subtraction

and microarray analysis to identify the genes that are specifically involved in OA pathogenesis. These analyses together resulted in the isolation of 103 RA-upregulated genes, of which amphiregulin (AREG) was revealed by quantitative real-time RT-PCR (QRT-PCR) to be the most conspicuously induced gene in RA patients. Interestingly, we also show here that AREG operates upstream of synoviin in isolated synovial cells through an epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway. We discuss how AREG upregulation could contribute to RA pathogenesis.

## 2. Patients, Materials and Methods

### 2.1. Human subjects and ethical considerations

All RA patients satisfied the 1987 revised diagnostic criteria of the American College of Rheumatology (ACR; formerly the American Rheumatism Association).<sup>23</sup> All OA patients fulfilled the ACR criteria for hip or knee OA.<sup>24</sup> The RA and OA patient groups were largely matched in terms of their average age and sex (Supplementary Figure S1A and B). This study was reviewed and approved by the Internal Review Board of the Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University. Accordingly, a written informed consent was obtained from each participant before obtaining human tissues.

### 2.2. Cell proliferation assay

The synovial cells from each patient were seeded onto uncoated 35 mm tissue culture plates at  $1 \times 10^5$  cells/well and cultured in 5% FBS/DMEM. After 12 h, the cells were incubated in fresh 5% FBS/DMEM with (100 ng/ml) or without AREG (Sigma-Aldrich, A 7080). Four photos were taken from fixed areas in four quadrants near the central area of each plate at the 0, 1, 3 and 4 day time points. The cells at each time point were counted from these four photos and expressed as mean  $\pm$  standard error (SE).

### 2.3. Statistical analysis

Significant differences were determined using the Spearman's rank correlation (Supplementary Figure S4) or the Mann-Whitney *U*-test (Figs 2, 4 and Supplementary Figure S3). The data are expressed as means  $\pm$  SE.  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$  was considered to be statistically significant.

## 3. RESULTS

### 3.1. Identification of RA- or OA-specific genes by stepwise subtraction and DNA microarray analysis

To isolate the putative RA-specific genes that are upregulated in BMMC of RA patients relative to those

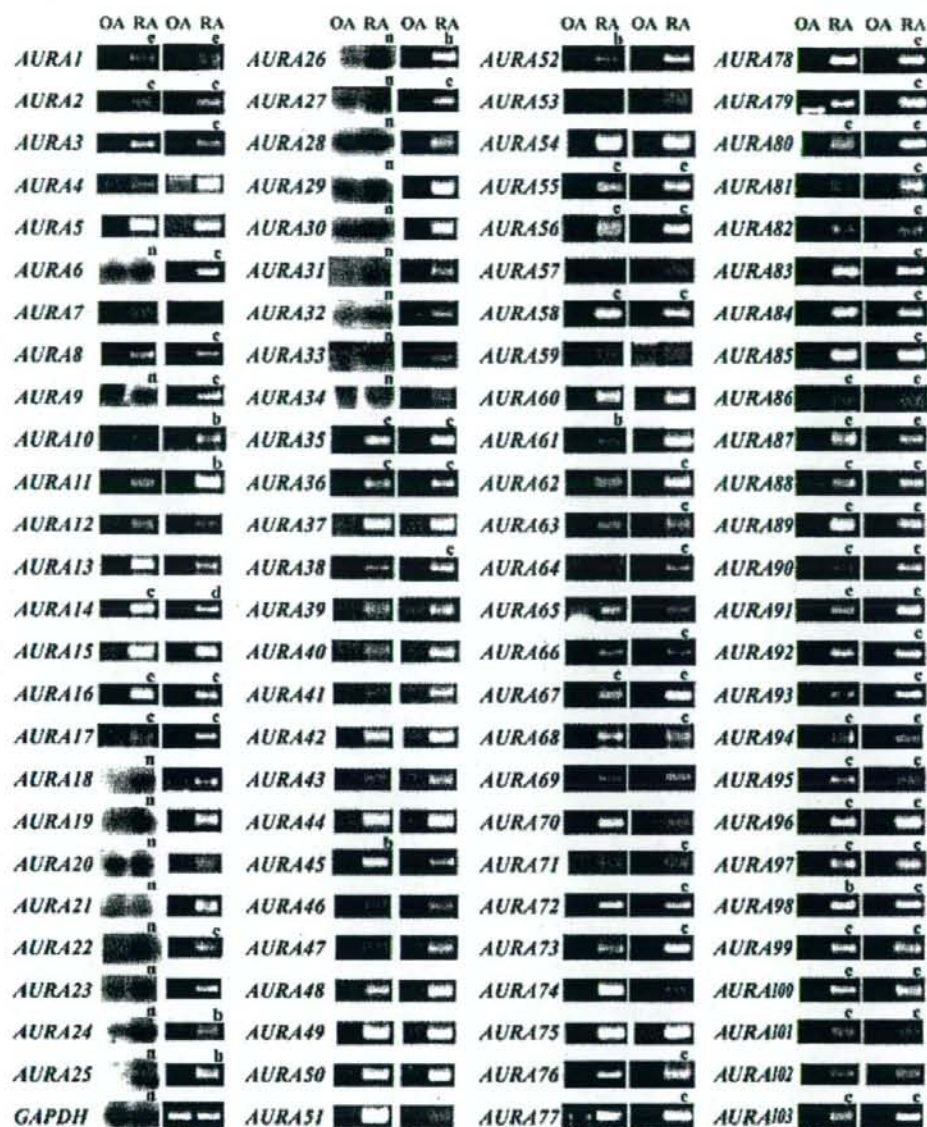


Figure 1. Northern blot or RT-PCR analysis of individual *AURA* cDNA clones to compare the expression levels of the genes in the BMMC of 50 RA patients and 50 OA patients (see Table 1 for their gene names). A northern blot or RT-PCR for *GAPDH* is also shown as a loading control. Left row: expression level as detected by RT-PCR or northern blot analysis (denoted as n above each picture). Right row: confirmation of the expression level of each gene as determined by RT-PCR. The annealing temperature and amplification cycles for RT-PCR were always 50°C and 40 cycles, respectively, with the exception of the reactions denoted by a (50°C and 35 cycles, respectively), b (50°C and 30 cycles, respectively), c (55°C and 35 cycles, respectively), d (55°C and 40 cycles, respectively), and e (60°C and 40 cycles, respectively).

that are upregulated in OA patients, we first used our stepwise subtractive hybridization method. Briefly, we prepared a cDNA library from the pooled mRNA from the BMMC of 50 RA patients (Supplementary Figure S1A) by the linker-primer method using a pAP3neo vector.<sup>25</sup> Stepwise subtractive hybridization was then performed with the biotinylated pooled mRNA from the

BMMC of 50 OA patients (Supplementary Figure S1A) to select candidate genes that may show upregulation in RA BMMC only as described previously.<sup>22</sup> To examine if the candidate genes are actually upregulated in RA but not OA BMMC, we performed northern blot analysis and/or RT-PCR using the pooled mRNA from the BMMC of 50 RA and 50 OA patients (Fig. 1). To reduce

the possibility of missing important RA-specific pathogenic genes by this method, we also performed a genome-wide complementary DNA microarray analysis using the Agilent Hu44K array with the same pooled RNA samples obtained from the BMMC of RA and OA patients that were described above. When we tested top 70 genes from the microarray list of RA-upregulated genes by northern blot analysis and/or RT-PCR as described above, we found that only 20 genes really displayed RA-upregulated expressions. Thus, we identified 103 RA-upregulated genes (Fig. 1) and named them *AURA* (augmented in RA). As shown in Table 1, 15 *AURA* genes (*AURA1*~*AURA7* and *AURA10*~*AURA17*) are uncharacterized novel genes.

We also performed similar experiments to obtain candidate OA-upregulated genes by generating a cDNA library from the pooled mRNA from the BMMC of 50 OA patients (Supplementary Figure S1A) and then using biotinylated pooled mRNA from the BMMC of 50 RA patients for subtraction (Supplementary Figure S1A). DNA microarray analysis also yielded a number of candidate OA-specific genes, as described above. However, when we checked whether these candidate genes are truly specifically up-regulated in OA BMMCs by northern blot analysis and/or RT-PCR, we could confirm this for only two genes (Supplementary Figure S2). These two OA-upregulated genes encode nuclear receptor coactivator 1 and a hypothetical protein (FLJ20581). This result suggests that the gain of function due to the enhanced expression of the RA-upregulated candidate genes is important in the pathogenesis of RA. Thus, we subsequently concentrated our study on the RA-upregulated genes.

### 3.2. Expression profiles of RA-upregulated genes in individual RA or OA patients

To determine whether the upregulation of the 103 RA-specific candidate genes is widespread in many RA patients or occurs in only a few patients, we performed QRT-PCR using individually prepared RNA samples from the BMMC or PBMC of RA patients. Of the 103 candidate genes, 5 genes whose functions are unknown and 12 genes that may be related to growth regulation or immune response were analyzed by QRT-PCR. OA patients were also examined as negative controls. In every QRT-PCR, a standard RNA from the PBMC of a healthy volunteer (male, age 52) was used (denoted as normal with a relative intensity of 1.0). This allowed us to compare the expression profiles of the genes tested in this study. In addition, since we used this control, we could also compare the expression profiles of the genes in this study with those of other genes tested in our previous reports on other autoimmune diseases.<sup>26</sup>

Of the 17 tested *AURA* genes (denoted x in Table 1), AREG (*AURA9*) was the most conspicuously upregulated

in the BMMC of many of the RA patients, while in contrast OA BMMCs invariably expressed this gene at very low levels (Fig. 2A). Similarly, the PBMC of many RA patients strongly expressed AREG, while only very low expression was detected in the PBMC of the OA patients (Fig. 2A). AREG is one of the EGF-like growth factors that stimulate cell growth by activating the EGF receptor (EGFR) signaling of the target cells in an autocrine/juxtacrine fashion.<sup>27</sup>

*AURA1* was the next most conspicuously upregulated gene in the BMMC of many RA patients, while the BMMC of all OA patients showed only very low expression of this gene (Fig. 2B). However, unlike AREG, the PBMC of RA patients showed negligible enhancement in the expression of *AURA1*. *AURA1* encodes an uncharacterized protein containing a thioesterase domain (Fig. 2B inset) that may cleave thioester bonds of an unknown target.

The gene encoding FK506 (tacrolimus)-binding protein 5 (FKBP5 = *AURA45*) also showed enhanced expression in nearly half of the RA patient BMMC samples, while no such increase was observed in the OA patient BMMC samples or in the PBMC of the RA patients (Fig. 2C). FKBP5 is a cellular receptor for FK506 and has an immunosuppressive effect on activated T cells because it inhibits the protein phosphatase calcineurin.<sup>28</sup>

Nearly half of the RA patient BMMC samples showed 5- to 50-fold greater expression of *CLECSF9* (= *AURA24*), *TPST1* (= *AURA52*) and *AURA2* than the normal control PBMC sample (Fig. 2D-F). No such increase was observed in the BMMC of OA patients or in the PBMC of the RA patients. *CLECSF9* encodes a macrophage-inducible C-type lectin (Mincle) that harbors a calcium-dependent carbohydrate-recognition domain. *TPST1* is one of the two Golgi tyrosylprotein sulfotransferases (*TPST1* and *TPST2*) that mediate the post-translational modification tyrosine O-sulfation.

*G0S2* (= *AURA8*), chemokine receptor 4 (CXCR4 = *AURA86*), nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B = *AURA25*) and *AURA17* showed augmented expression in both the BMMC and PBMC of some of the RA patients when compared to the expression in the BMMC and PBMC of the OA patients, although the differences between the RA and OA samples are not as significant as for the previously discussed genes (Supplementary Figure S3A-D). *G0S2* is one of the G0/G1 switch (*G0S*) genes that are differentially expressed in lymphocytes during their lectin-induced switch from the G0 to the G1 phases of the cell cycle.<sup>29</sup> CXCR4, the receptor for a chemokine called stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/CXCL12), is important in the migration, homing and survival of hematopoietic stem cells. SDF-1, which is secreted by ischemic myocardium, is involved in the homeostatic and inflammatory traffic of leukocytes, and is highly expressed in the synovial tissues of RA patients.<sup>30</sup> NF- $\kappa$ B