

IFN β や TNF α 遺伝子が活性化されるが、今回その過程は細胞膜上の TLR 受容体を介したシグナル系ではなく、細胞内でのシグナル系が関与していることが明らかとなった。DNase II 遺伝子欠損マウスでは DNA はマクロファージのリソソームに蓄積されており、この DNA がどのように細胞内でのシグナル伝達へ導くのか興味深い。最近細胞内で DNA ウイルスの DNA を認識する分子として DAI, HMGB1, AIM2 などが報告されている。これらの分子が DNase II 遺伝子欠損マウスにおいて DNA 認識受容体として認識するか検討する必要がある。未分解 DNA による TNF 産生のシグナル伝達経路の解明は関節炎に対する薬剤開発へと導くであろう。

ところで、ヒト関節リウマチの亜種、全身型若年性特発性関節炎では高濃度の血清 IL-18 が認められ、IL-6, TNF α , IL-1 の中和療法が有効である。一方、この関節炎ではリンパ球は関与していないとも考えられている。これらの特徴は DNase II 欠損マウスにおける関節炎とよく似ている。最近、リンパ球の作用を抑える薬剤をヒト関節リウマチの患者に用いる試みがなされている。DNase II 欠損マウスの関節炎は Rag2 遺伝子欠損により悪化した。このことは、関節炎がリンパ球依存性かどうかにより、抗リンパ球薬剤が全く異なる効果を示す可能性を示しており、抗リンパ球薬剤の投与は注意深く進める必要がある。

E. 結論

未分解の DNA に応答した IFN β 遺伝子の活性化に関与する EYA を同定するとともに、関節炎がリンパ球に依存せず、マクロファージからのサイトカインのみで発症しうることを示す。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki J, Umeda M, Sims PJ & Nagata S (2010) Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature*, 468:834-838
2. Kawane K, Tanaka H, Kitahara Y, Shimaoka S & Nagata S (2010) Cytokine-dependent but acquired immunity-independent arthritis caused by DNA escaped from degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:19432-19437
3. Nagata S, Hanayama R & Kawane K (2010) Autoimmunity and the Clearance of Dead Cells. *Cell* 140:619-630
4. Yamaguchi H, et al. (2010) Aberrant splicing of milk fat globule EGF factor 8 gene in human systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol* 40:1778-1785
5. Östberg T, et al. (2010) Protective targeting of HMGB1 in a spontaneous arthritis model. *Arthritis & Rheumatism* 62:2963-2972
6. Nagata, S. (2010) Apoptosis and Autoimmune Diseases. *Ann NY Acad Sci*. 1209:10-16
7. Kitahara Y, Kawane K & Nagata S (2010) Interferon-induced TRAIL-independent cell death

in DNase II^{-/-} embryos. *Eur J Immunol* 40:2590-2598

8. Fujii T, Ueda T, Nagata S & Fukunaga R (2010) Essential Role of p400/mDomino Chromatin-remodeling ATPase in Bone Marrow Hematopoiesis and Cell-cycle Progression. *J Biol Chem* 285:30214-30223
9. Nagasaka A, Kawane K, Yoshida H & Nagata S (2010) Apaf-1-independent programmed cell death in mouse development. *Cell Death Differ* 17:931-941
10. Okabe Y, Sano T & Nagata S (2009) Regulation of the innate immune response by threonine-phosphatase of Eyes absent. *Nature* 460: 520-524
11. Dasgupta SK, Abdel-Monem H, Niravath P, Le A, Bellera RV, Langlois K, Nagata S, Rumbaut RE & Thiagarajan P (2009) Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. *Blood* 113: 1332-1339
12. Strasser A, Jost, PJ & Nagata S (2009) The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 30: 180-192
13. Galluzzi L, Nagata S, Kroemer G et al. (2009): Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ* 16: 1093-1107

和文総説

1. 川根公樹、長田重一「DNA の分解異常による関節炎」「炎症と免疫」Vol. 19, No. 2, 24-29 頁, 先端医学社, 2011年2月20日
2. 鈴木淳、長田重一「TMEM16F による細胞膜におけるリン脂質のスクランブル」「ライフサイエンス 新着論文レビュー」Web Journal, 2011年1月7日 <http://first.lifescience.db.jp/archives/1809>
3. 岡部泰賢、長田重一「スレオニン脱リン酸化酵素 Eya による自然免疫の制御」「実験医学」Vol. 28, No.12(増刊), 48-54 頁, 羊土社, 2010年8月1日
4. 山口裕嗣、長田重一「MFG-E8 および Tim4 を介したアポトーシス細胞の認識・食食機構とその破綻」「実験医学」Vol. 28, No. 7(増刊), 72-78 頁, 羊土社, 2010年5月1日
5. 川根公樹「DNA 分解の分子機構及び生理作用」「生化学」Vol. 81, No. 9, 765-779 頁, 日本生化学会, 2009年9月25日

2. 学会発表

1) 国内 25 件

そのうち主なもの

学会発表

1. 長田重一 (平成 21 年 5 月 23 日) アポトーシスと死細胞の食食 第 7 回北東北血液研究会 特別講演 秋田温泉さとみコンベンションホール 秋田
2. 佐野晃之, 岡部泰賢, 長田重一 (平成 21 年 10 月 21 日) Eyes absent のスレオニン脱リン酸化酵素活性による自然免疫活性化の調節機構 シンポジウム 神戸国際会議場 神戸
3. 長田重一 (平成 22 年 4 月 23 日) 死細胞の分解異常による炎症 第 54 回日本リウマチ学

会総会・学術集会 招聘講演 神戸ポート
ピアホテル 神戸

4. 長田重一(平成22年5月17日)細胞の死と死細胞の貪食 金沢大学がん研究所竣工記念講演会 特別講演 金沢大学 金沢
5. 長田重一(平成23年1月29日)アポトーシスと慢性炎症 第10回リウマチ性疾患研究会 特別講演 経団連会館 東京
6. 長田重一(平成23年3月28日)Apoptosis and Autoimmunity 第88回日本生理学会大会 第116回日本解剖学会総会合同大会) 特別講演 パシフィコ横浜 横浜

2) 海外

28件

そのうち主なもの

学会発表

1. Nagata, S. (Aug 30, 2009) Programmed cell death and autoimmune diseases, **Workshops**, The EMBO meeting, Amsterdam, NETHERLANDS
2. Okabe, Y., Sano, T., Kawane, K. and Nagata, S. (February 15, 2010) Activation of innate immune reaction by mammalian DNA that escaped from degradation, **Symposium**, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Fairmont Banff Springs, Banff, CANADA
3. Nagata, S. (May 9, 2010) Engulfment and degradation of dead cells, **Organizer, Keynote Address**, The conference of "clearance of dying cells in a healthy and diseased immune system", Jerusalem, ISRAEL
4. Nagata, S. (May 24, 2010) Engulfment and degradation of apoptotic cells, **Symposium**, The Nobel Symposium 2010 on the cell cycle and apoptosis in disease, Karolinska Institute, Stockholm, SWEDEN
5. Nagata, S. (September 4, 2010) Clearance of dead cells, **Symposium**, The 18th Euroconference on Apoptosis, Ghent University, Ghent, BELGIUM
6. Nagata, S. (December 27, 2010) Apoptosis, engulfment, and degradation of dead cells, 2010 **Charles Janeway Lecture** at the Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy, Moscow, RUSSIA
7. Nagata, S. (March 13, 2011) Removal of dead corpses required to prevent autoimmunity, **Key Note Lecture**, The "Death in the Alps" conference, Innsbruck University Conference Center, Obergurgl, AUSTRIA

G. 知的所有権の出願・取得状況

1 特許取得

1. 国名：米国 出願日：2010年9月1日
発明の名称：Method of screening a blood coagulation modulator
出願人：京都大学

2 実用新案登録

なし

3 その他

新聞、テレビ等での報道

1. 平成21年6月29日

日本経済新聞、朝日新聞 他

「ウイルスから細胞を守る物質 増やす酵素を発見

2. 平成22年2月4日

日本経済新聞

ひと脈々「先端医療の梁山泊(1)」

3. 平成22年10月26日

日本経済新聞、読売新聞、京都新聞 他

「関節リウマチ 子供発症 仕組み解明」

4. 平成22年11月25日

毎日新聞、読売新聞、京都新聞 他

「止血の「引き金」たんぱく質特定」

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

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

分担研究者 下村伊一郎 大阪大学内分泌代謝内科学教室 教授

研究要旨

脂肪組織分泌因子であるアディポネクチンは、in vivoでは関節炎モデルマウスに過剰発現させると関節炎の発症が抑制され、in vitroでは破骨細胞の増殖・分化・食食能が抑制される。アディポネクチンは補体活性に対する作用は認めないが、C1qと結合する作用をもっており、C1qとの結合によって炎症抑制作用を発揮する可能性が示された。

A. 研究目的

私共は、脂肪組織由来の分泌因子であるアディポネクチンがマクロファージや血管内皮に対して抗炎症作用を有することを報告してきた。さらに、アディポネクチンがRAモデルマウスにおいて関節炎の重症化を抑制すること、破骨細胞に作用して骨吸収を抑制することを報告した。本研究の目的はアディポネクチンの関節炎重症化抑制機構を解明し、治療薬の開発を目指すことである。

B. 研究方法

コラーゲン誘導性関節炎モデルマウスに対して、アデノウイルスにて肝臓でアディポネクチンを過剰発現させ、組織所見、炎症性因子の発現変化を解析した。補体に対する作用を解析するために組換えアディポネクチン蛋白を用いて補体C1qに対する作用を解析した。

C. 研究結果

アディポネクチンはN末端にコラーゲンドメイン、C末端にグロブラドメインを有し、補体C1qとドメイン構造が類似する。アディポネクチン蛋白を固層化したプレートに対するC1q蛋白との結合を測定したところ、アディポネクチンとC1qは濃度依存性の結合がみられた。

固相化した免疫複合体に対して血清を添加することで補体が活性化し、結合したC1q, C3を測定する系を作成した。この系に対してアディポネクチンを添加したが、C1q, C3の結合は阻害されなかった。

ヒト血清を対照として、マウス血清を用いた補体活性の測定を行った。Reactive lysis法として羊赤血球に対してザイモサン存在下に血清を添加し、5時間後の溶血を測定した。マウス血清では低い溶血であったが、コントロールマウスは平均27%±6%の溶血に対してアディポネクチンKOマウスでは23%±7%の溶血であり、有意な差を認めなかった。

また、C1qと抗原抗体複合体の結合に対するアディポネクチンの抑制作用を検討したが、結合したC1q, C3に対する阻害効果は認めなかった。

D. 考察

アディポネクチンを過剰発現することで関節軟骨表面での補体結合、活性化が抑制されたことから、アディポネクチンと補体の相互作用を解析した。アディポネクチンは補体C1qと結合したが、アディポネクチンを欠損した血清において補体活性の変化は示されなかった。C1qは多機能な分子であり、食食促進作用も有しており、このような補体活性化以外の作用に対して、アディポネクチンの及ぼす作用を解析する必要がある。

E. 結論

アディポネクチンは補体C1qと類似したドメイン構造を有し、C1qと直接的に結合した。これまでの研究で、アディポネクチンは関節炎を抑制する作用を報告したが、この炎症抑制作用はC1qが標的因子である可能性が示唆された。アディポネクチンのC1qに対する作用の解析を進めることで、RAの治療法につながる可能性が示唆された。

F. 研究発表

G. 論文発表

Ebina, K., Oshima, K., Matsuda, M., Fukuhara, A., Maeda, K., Kihara, S., Hashimoto, J., Ochi, T., Banda, N. K., Yoshikawa, H., and Shimomura, I. Adenovirus-mediated gene transfer of adiponec tin reduces the severity of collagen-induced art hritis in mice *Biochem Biophys Res Commun* (2009) 378 (2), 186-191

Ebina, K., Fukuhara, A., Ando, W., Hirao, M., K oga, T., Oshima, K., Matsuda, M., Maeda, K., Nak amura, T., Ochi, T., Shimomura, I., Yoshikawa, H., and Hashimoto, J. Serum adiponec tin concentr ations correlate with severity of rheumatoid art hritis evaluated by extent of joint destruction *Clin Rheumatol* (2009) 28 (4), 445-451

2. 学会発表

記載事項なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

記載事項なし

関節リウマチの疾患誘導因子の解明

研究分担者 吉川秀樹 大阪大学大学院医学系研究科教授

研究要旨 関節リウマチの疾患誘導因子の解明のため、RA 特異的オステオポンチンの発現・機能解析、酸素分圧による骨吸収機序の解析、補体 C1q を抑制する新規ペプチドの合成とコラーゲン関節炎制御について検討を行った。関節リウマチ患者滑膜細胞において疾患特異的翻訳後修飾をうけたと考えられる 75kDa オステオポンチンの発現がみられ、この疾患特異的オステオポンチンは、関節リウマチ患者滑膜細胞膜上に存在しリンパ球との細胞接着を介して IL-6 産生を誘導することを明らかにした。また、高酸素環境により、破骨細胞支持細胞からの MCSF 分泌増加により、血液から供給される破骨細胞前駆細胞の長期維持が起こり、骨吸収が持続的に亢進することを明らかにした。さらに、C1q に対するモノクローナル抗体の作成過程で得られたエピトープ解析から新規低分子ペプチドを合成した。本ペプチドは IgG の Fc 部分に非特異的に結合することにより IgG と C1q の結合を阻害し、コラーゲン関節炎の関節破壊の抑制効果を認めた。

A. 研究目的

1. オステオポンチン (OPN) は RA 関節液中での上昇や関節炎との関わりが指摘されている。本研究では RA 滑膜細胞由来のオステオポンチン (OPN) 発現, B 細胞との接着、IL-6 産生につき検討し、RA 病態における OPN の意義につき検討した。
2. 酸素濃度は様々な細胞の増殖・分化・機能発現に関わっている。関節リウマチでは、血管新生を伴う高酸素環境下で重篤な骨破壊が起きることに注目し、酸素分圧の上昇が、破骨細胞による骨吸収に影響を与えるか否かを検討した。
3. 関節リウマチの重症化に補体 C1q が深く関わっていることが報告されている。C1q に対するモノクローナル抗体の

作成過程で得られたエピトープ解析から新規低分子ペプチドを合成し、コラーゲン関節炎 (CIA) ラットの関節炎抑制効果について検討した。

B. 研究方法

1. RA11 名および非 RA 患者 10 名滑膜より分離した初代培養滑膜細胞 (FLS) (4~10 継代) と、B 細胞株 MC/Car を用い、OPN 発現をウェスタンブロットにて評価した。FLS の B 細胞との共培養を行ない、培養上清の IL-6 濃度を ELISA にて測定した。FLS に OPN 遺伝子導入により過剰発現、または、siRNA 導入による OPN 発現抑制下で、B 細胞との共培養、培養上清の IL-6 濃度を測定した。FLS に OPN 中

和抗体を投与し、B 細胞との共培養を行ない、抱きこまれた B 細胞の細胞数を計測した。RA 患者滑膜組織での B 細胞・OPN 陽性細胞・IL-6 陽性細胞の局在を免疫組織化学法にて検討した。

(倫理面への配慮)

患者データなどの個人情報および解析結果は、各施設で厳重に管理保管し秘密を厳守した。ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針(平成 13 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号)疫学研究に関する倫理指針(平成 14 年文部科学省・厚生労働省告示第 2 号)臨床研究に関する倫理指針(平成 15 年厚生労働省告示 255 号)および、申請者、研究分担者が所属する研究機関が定めた倫理規定を遵守して行った。研究参加は参加を許諾した場合でも拒否した場合でも全く同質の治療が行われることを説明した上で、患者の任意によりインフォームドコンセントを得て行われた。

2. 関節リウマチ患者の骨破壊病変組織の免疫染色にて、血管増生と酸素濃度及び破骨細胞の出現との関連を検討した。通常酸素濃度下と高酸素濃度下で破骨細胞を単培養・共培養にて長期培養し、TRAP 染色を用いて比較した。また、破骨細胞の増殖・分化などに関わる因子の遺伝子発現を比較検討した。

3. 新規ペプチドを CIA ラットに対し、感作 12 日目から連日腹腔内投与し、関節炎評価、X 線学的、組織学的評価にて新規ペプチドの関節炎に対する効果を検討した。またラット大腿骨骨髓細胞を採取し、破骨細胞形成能について検討した。対照群として MTX を腹腔内投与した群を

作成し治療効果を比較した。

C. 研究結果

1. オステオポンチンに対するウェスタンブロット法では、全ての FLS で 54kD に double band が検出されたほか、全ての RA 患者由来の FLS と、3 例の非 RA 患者由来の FLS で、75kD の band が検出された。B 細胞と FLS の接触を伴う共培養では、75kdOPN+ FLS において培養上清中の IL-6 濃度は有意に上昇した($p < 0.001$)。75kdOPN+ FLS では OPN 過剰発現により有意に培養上清中 IL-6 濃度が上昇した($p < 0.001$)。OPN ノックダウンにより培養上清中 IL-6 の有意な低下を認めた($p < 0.001$)。免疫組織化学では、OPN は過去の報告と同様に滑膜絨毛の表層およびその下層の細胞に強く検出された。B 細胞は滑膜の内層に集積して認められ、OPN 陽性細胞と B 細胞が共存している部位で、IL-6 も検出された。

2. ヒト関節リウマチの滑膜・骨組織の免疫組織染色では、血管増生を伴う骨破壊病変では、高酸素により誘導される ROS (Reactive oxygen species)、破骨細胞の出現、MCSF の局在がほぼ一致することが明らかとなった。共培養系では破骨細胞前駆細胞が、高酸素濃度下では通常酸素濃度下の 3 倍以上の長期間にわたり観察された。またこの現象は、高酸素濃度下での支持細胞からの MCSF の発現・産生亢進を伴い、さらに MCSF の中和抗体により完全に破骨細胞の形成が阻害された。

3. 新規ペプチドを投与した群において、関節炎スコア、足関節 X 線学的スコア、

組織学的スコアは、CIA 群と較べて有意に低値であり、MTX 群と較べても低くなる傾向を示した。新規ペプチド投与によりラット大腿骨骨髓細胞からの破骨細胞形成能は有意に抑制されていた。

D. 考察

OPN ノックアウトマウスでコラーゲン誘導関節炎が発症しないことや RA 患者関節液中で高濃度であることなど関節炎との関わりが示されている。RA 滑膜細胞において RA 特異的翻訳後修飾をうけたと考えられる RA 特異的 OPN は、RA 滑膜細胞膜上に存在し B 細胞との細胞接着を介して IL-6 産生を誘導していることが新たに示された。本研究結果は、RA の病態を解明する上で意義深いのみならず、RA 特異的 OPN の発現を抑える事で IL-6 発現が抑制されることから、RA 疾患治療の可能性が考えられる。一方、血管増生を伴う骨破壊病変では、酸素分圧の上昇に伴う破骨細胞の持続的過剰供給という病態の存在が示され、RA における骨吸収機序は酸素分圧により制御を受けることが明らかとなった。さらに、本研究で合成した新規低分子ペプチドは IgG の Fc 部分に非特異的に結合することにより IgG と C1q の結合を阻害し、関節炎、関節破壊の抑制効果を認めたことから、関節リウマチの新規治療薬として開発が期待された。

E. 結論

RA 患者の滑膜細胞では、RA 特異的な翻訳後修飾を受ける 75kDa OPN が発現し、細胞表面に存在することにより B 細胞の

抱きこみ現象の key molecule として、IL-6 分泌を誘導していることが初めて明らかになった。高酸素環境により、破骨細胞支持細胞からの MCSF 分泌増加により、血液から供給される破骨細胞前駆細胞の長期維持が起こり、骨吸収が持続的に亢進することが明らかとなった。C1q に対するモノクローナル抗体の作成過程で得られたエピトープ解析から合成した新規低分子ペプチドは、コラーゲン関節炎の関節破壊の抑制効果を認めた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Arimitsu, S., Sugamoto, K., Hashimoto, J., Murase, T., Yoshikawa, H., Moritomo, H.: Analysis of radiocarpal and midcarpal motion in stable and unstable rheumatoid wrists using 3-dimensional computed tomography. *Journal of Hand Surgery*, 33A:189-97, 2008.
- 2) Hattori, T., Hashimoto, J., Tomita, T., Kitamura, T., Yoshikawa, H., Sugamoto, K.: Radiological study of joint destruction patterns in rheumatoid flatfoot. *Clin Rheumatology*, 27:733-737, 2008.
- 3) Iwai, T., Murai, J., Yoshikawa, H., Tsumaki, N.: SMAD7 inhibits chondrocyte differentiation at multiple steps during endochondral bone formation and down-regulates p38 mapk pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 283: 27154-27164, 2008.
- 4) Nampei, A., Hashimoto, J., Koyanagi, J., Ono, T., Hashimoto, H., Tsumaki, N., Tomita, T., Sugamoto, K., Nishimoto, N., Ochi, T., Yoshikawa, H.: Characteristics of fracture and related factors in patients with rheumatoid arthritis. *Modern Rheumatology*, 18:170-176, 2008.
- 5) Nomura, K., Kuroda, S., Yoshikawa, H., Tomita, T.: Inflammatory osteoclastogenesis can be induced by GM-CSF and activated under TNF immunity. *Biochem Biophys Res Commun*, 367:881-887, 2008.
- 6) Otsuru, S., Tamai, K., Yamazaki, T., Yoshikawa, H., Kaneda, Y.: Circulating bone marrow-derived osteoblast progenitor cells are recruited to the

- bone-forming site by CXCR4/SDF-1 pathway. *Stem Cells*, 26:223-234, 2008.
- 7) Shimizu, H., Nakagami, H., Osako, MK, Hanayama, R., Kunugiza, Y., Kizawa, T., Tomita, T., Yoshikawa, H., Ogihara, T., Morishita, R.: Angiotensin II accelerates osteoporosis by activating osteoclasts. *FASEB Journal*, 22:2465-2475, 2008.
- 8) 吉川秀樹、玉井直行、名井陽：人工骨による骨・関節疾患の治療、*日本医事新報*, 4403:53-56, 2008.
- 9) Ebina, K., Oshima, K., Matsuda, M., Fukuhara, A., Maeda, K., Kihara, S., Hashimoto, J., Ochi, T., Banda, N.K., Yoshikawa, H., Shimomura, I.: Adenovirus-mediated gene transfer of adiponectin reduces the severity of collagen-induced arthritis in mice. *BBRC*, 378:186-191, 2009.
- 10) Ebina, K., Fukuhara, A., Ando, W., Hirao, M., Koga, T., Oshima, K., Matsuda, M., Maeda, K., Nakamura, T., Ochi, T., Shimomura I, Yoshikawa, H., Hashimoto J.: Serum adiponectin concentrations correlate with severity of rheumatoid arthritis evaluated by extent of joint destruction. *Clinical Rheumatology*, 28:445-451, 2009.
- 11) Goto A, Murase T, Hashimoto J, Oka K, Yoshikawa, H., Sugamoto K.: Morphologic analysis of the medullary canal in rheumatoid elbows. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, 18:33-37, 2009
- 12) Hashimoto, J., Garnero, P., van der Heijde, D., Miyasaka, N., Yamamoto, K., Kawai, S., Takeuchi, T., Yoshikawa, H., Nishimoto, N.: A combination of biochemical markers of cartilage and bone turnover, radiographic damage and body mass index to predict the progression of joint destruction in patients with rheumatoid arthritis treated with disease-modifying anti-rheumatic drugs. *Modern Rheumatology*, 19:273-282, 2009.
- 13) Hirao, M., Hashimoto, J., Tsuboi, H., Nampei, A., Nakahara, H., Yoshio, N., Mima, T., Yoshikawa, H., Nishimoto, N.: Laboratory and febrile features after joint surgery in rheumatoid arthritis patients treated with tocilizumab. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 68:654-657, 2009.
- 14) Hirohata, S., Yanagida, T., Tomita, T., Yoshikawa, H.: Differential influences of bucillamine and methotrexate on the generation of fibroblast-like cells from bone marrow CD34+ cells of rheumatoid arthritis patients, *International Immunopharmacology*, 9:86-90, 2009.
- 15) Kuriyama K, Hashimoto J, Murase T, Fujii M, Nampei A, Hirao M, Tsuboi H, Myoui A, Yoshikawa, H.: Treatment of juxta-articular intraosseous cystic lesions in rheumatoid arthritis patients with interconnected porous calcium hydroxyapatite ceramic. *Modern Rheumatology*, 19:180-186, 2009.
- 16) Morimoto D, Kuroda S, Kizawa T, Nomura K, Higuchi C, Yoshikawa, H., Tomita T.: Equivalent osteoblastic differentiation function of human mesenchymal stem cells from rheumatoid arthritis in comparison with osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 48:643-649, 2009.
- 17) Take, Y., Nakata, K., Hashimoto, J., Tsuboi, H., Nishimoto, N., Ochi, T., Yoshikawa, H.: Specifically modified osteopontin in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes supports interaction with B cells and enhances production of interleukin-6. *Arthritis Rheumatism*, 60:3591-3601, 2009.
- 18) Yamasaki, N., Hirao, M., Nampei, A., Tsuboi, H., Yoshikawa, H., Hashimoto, J.: High oxygen tension prolongs the survival of osteoclast precursors via macrophage colony-stimulating factor. *Bone*, 44:71-79, 2009.
- 19) Hattori, T, Fei, W., Kizawa, T., Nishida, S., Yoshikawa, H., Kishida, Y.: The fixed herbal drug composition "Saikokaryukotsu-boreito" prevents bone loss with an association of serum IL-6 reductions in ovariectomized mice model. *Phytomedicine*, 17:170-177, 2010.
- 20) Igarashi, H., Hashimoto, J., Tomita, T., Yoshikawa, H., Ishihara, K.: TP53 mutations coincide with the ectopic expression of activation-induced cytidine deaminase in the fibroblast-like synoviocytes derived from a fraction of patients with rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Immunology*, 161:71-80, 2010.
- 21) Hashimoto, J., Garnero, P., van der Heijde, D., Miyasaka, N., Yamamoto, K., Kawai, S., Takeuchi, T., Yoshikawa, H., Nishimoto, N.: Humanized anti-interleukin-6-receptor antibody (tocilizumab) monotherapy is more effective in slowing radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis at high baseline risk for structural damage evaluated with levels of biomarkers, radiography, and BMI: data from the

SAMURAI study. Modern Rheumatology, 21:10-15, 2011.

22) Nakura, A., Higuchi, C., Yoshida, K., Yoshikawa, H.: PKC α suppresses osteoblastic differentiation. Bone, 48:476-484, 2011.

2. 学会発表

1) RA 滑膜細胞発現のオステオポンチン：B細胞の抱きこみ現象と IL-6 産生刺激 第40回日本結合組織学会 2008 5月 東京

2) RA 滑膜細胞表面のオステオポンチンはB細胞の抱きこみ現象と IL-6 の産生を刺激する 武 靖浩、中田研、吉川秀樹、越智隆弘 第23回日本整形外科基礎学術集会、2008.10月 京都

3) Cell Surface Osteopontin Expressed by Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synoviocyte Induces IL-6 Production by Supporting Cell-Cell Interaction with B-lymphocyte. Take Y., Nakata K., Ochi T., Yoshikawa, H 55th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, 2009 Feb. Las Vegas, Nevada, USA

4) 武 靖浩、中田研、吉川秀樹. RA 滑膜細胞発現のオステオポンチン：B細胞の抱きこみ現象と IL-6 産生刺激 厚生労働省班会議報告会 2009 1月 大阪

5) Take Y., Nakata K., Ochi T., Yoshikawa, H Cell Surface Osteopontin Expressed by Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synoviocyte Induces IL-6 Production by Supporting Cell-Cell Interaction with B-lymphocyte. 55th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, 2009 Feb. Las Vegas, Nevada, USA

6) Kanamoto T, Nakata K, Akamine K. Yoshikawa H. Alteration in distribution of cytoskeletal proteins in 3-dimensional cultured tissue of human synovium-derived stem cell and human meniscus cell with collagen scaffold. 日本軟骨代謝学会名古屋 2009 3月

7) Akamine K, Nakata K, Kanamoto T, Yoshikawa H. Over-stress of cyclic compressive load on human synovium-derived cells in three-dimensional collagen-based cultured tissue induces prolonged MMP-3 gene expression in an intensity dependent manner 日本結合組織学会 2009 6月 湘南

8) Kanamoto T, Nakata K, Akamine K, Shimonura K, Yoshikawa H, Alteration in distribution of cytoskeletal proteins in 3-dimensional cultured tissue of human synovium-derived stem cell and

human meniscus cell with collagen scaffold. International Cartilage Repair Society 2009 9 Miami USA

9) 武 靖浩、中田研、下村和範、神田秀之、赤峯勇哲、金本隆司、吉川秀樹長時間の動的圧縮刺激はコラーゲン内三次元培養半月細胞によるマトリックスの再構成を促進する 日本整形外科基礎学術集会 2009 10月 横浜

10) 南平昭豪、平尾眞、西本憲弘、吉川秀樹、橋本淳：トシリズマブ投与後の関節リウマチ患者の血清 DKK1 濃度の変化、第 54 回日本リウマチ学会総会 2010 4月 神戸

11) 五十嵐英哉、橋本淳、富田哲也、吉川秀樹、石原克彦：線維芽細胞様滑膜細胞株亜型に発現する RA 関連遺伝子の探索、第 54 回日本リウマチ学会総会 2010 4月 神戸

12) 本城由衣、平尾眞、川戸良能、小瀬弘樹、史賢林、名井陽、吉川秀樹、橋本淳：軟骨初期分化において IL-6 は促進的にはたらく、第 28 回日本骨代謝学会学術集会 2010 7月 東京

13) 吉田清志、樋口周久、名倉温雄、吉川秀樹：Spleen tyrosine kinase (Syk)の骨芽細胞分化に対する影響、第 28 回日本骨代謝学会学術集会 2010 7月 東京

14) 川戸良能、平尾眞、本城由衣、小瀬弘樹、史賢林、名井陽、吉川秀樹、橋本淳：低酸素が AKT-FoxO3a を介して筋芽細胞の分化、融合を促進する、第 28 回日本骨代謝学会学術集会 2010 7月 東京

15) 小瀬弘樹、平尾眞、川戸良能、本城由衣、史賢林、吉川秀樹、橋本淳：骨芽細胞培養下での細胞周囲酸素濃度について、第 25 回日本整形外科基礎学術集会 2010 10月 京都

16) 川戸良能、平尾眞、本城由衣、小瀬弘樹、史賢林、吉川秀樹、橋本淳：低酸素が筋芽細胞の分化、融合を促進する、第 25 回日本整形外科基礎学術集会 2010 10月 京都

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

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。
これまでの研究で、ハイブリドーマにより新たに抗C1q抗体を作成し、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。さらに、ここから有用な4種の抗体を選択し、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。さらに、これらの抗体の認識エピトープが、RA重症度と関連すると考えられたため、合成ペプチドを作成し、認識エピトープの解析を行った。
優れた抗C1q抗体を用いた測定値は、RAのprognostic assessment parameter となり得ると考えられ、近年リウマチ重症度との関連が検討されている抗CCP抗体、MMP-3、IL-6とあわせて検討した。

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ことは重要である。これまでの研究で他の臨床検査値に影響されず安定した値を示す4種の抗体によりC1q検出・定量する新たなサンドイッチ法を開発した。RA患者血清135検体を解析した結果、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。これらの抗体の認識エピトープが、RA重症度と関連すると考えられたため、合成ペプチドを作成し、認識エピトープの解析を行った。

近年、prognostic assessment parameter として、抗CCP抗体、MMP-3、IL-6などが重用視されており、これらの臨床検査値とあわせて、本研究でのC1q値を検討した。

B. 研究方法

新たに抗C1q抗体を産生する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。さらに、ここから有用な4種の抗体を選択し、RA患者血清135検体を解析した。また、これらの抗体の認識エピトープが、RA重症度と関連する重要部位だと考えられたため、合成ペプチドを作成し、認識エピトープの解析を行った。

C1qエピトープの同定は、ヒトC1qのサブユニットA鎖、B鎖、C鎖の各サブユニットのアミノ酸配列を15アミノ酸(残基)ずつ3アミノ酸の間隔でずらした配列を合成ペプチドとしてガラスアレイ上に合成した。それぞれのペプチドの合成はアレイ上の特定の位置で行い、C1qのサブユニットの全アミノ酸配列を網羅する合成ペプチド含むペプチドアレイを作製した。ここに本研究で得られた抗C1qモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから産生された抗C1q抗体#8、#33、#40、#54、および#76を精製し、ペプチドアレイ上に塗布し蛍光スキャナーで、スキャンし、強い蛍光強度を示すスポットを検出し、有用なペプチドを決定した。合成ペプチドR1 (P G L Y Y F)、R2 (C K V P G L Y)を決定、作成した。さらに、この合成ペプチドに対す

る抗体(抗R2-KLHモノクローナル抗体)を4種を作成した。

(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、コンピュータ上でのみ、臨床データと照合できるように配慮した。

C. 研究結果

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地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かった。

今回作成された抗R2-KLHモノクローナル抗体は4種類であった。抗体サブクラスはIgM抗体が3種類(抗体No. 3, No4, No5)、未定が1種類(抗体No. 1)であった。固相化したR2-OVAとの反応では、いずれの抗体もR2-OVAを認識していることが確認された。この系にフリーの合成ペプチド(R2)を加えることで、少ないながらも抗体No. 3, No5で阻止反応が観察された。阻止反応が認められたことから、患者血清中のR2エピトープ相当部位を測定できると考えた。135検体のRA患者血清につき阻止反応を測定したが患者血

清による阻止反応(抑制率)は、いずれも、0.922-1.078であり、患者血清での有為な測定はできなかった。

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値もRA骨破壊の重症度の指標となると考える。

今回、新たに開発された抗C1q抗体、測定法は、これまで臨床に使われてきた検査(CRP, MMP-3, RF, 赤沈など)に比較して、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。これらの抗体の認識エピトープが、RA重症度と関連する重要部位だと考えられる。今回の研究では、有効なエピトープの決定、これの合成ペプチド(R1, R2)の作製までは完了したが、患者血清での測定には至らなかった。今後、測定系の感度を上げるなどの改良が必要と考える。

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り、すぐにでも臨床に利用できる点で意義は大きい。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書に記載とする。)

G. 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.

H. 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。

関節リウマチにおけるヒスタミンの病態生理学的役割と H4-受容体の関与に関する研究

分担研究者 大和谷 厚 大阪大学医学系研究科教授

研究要旨

滑膜組織や関節液中にはマスト細胞（MC）が存在し、脱顆粒によりヒスタミンが遊離する。また、関節滑膜組織にはヒスタミン受容体が存在することが知られている。しかし、関節リウマチ(RA)の病態において MC やヒスタミンがどのような働きをしているかは不明である。本研究では、ヒスタミンが RA 患者における関節破壊にどのように関与しているのかを、関節軟骨破壊、骨破壊の両面から調べ、さらに、H4 受容体を介してのヒスタミンの関節リウマチの病態における役割を検討した。

その結果、ヒスタミンは RA 関節滑膜の MMP3 遺伝子発現を減少させ、滑膜による軟骨破壊、および、健康人末梢血由来 CD14+細胞の破骨細胞様多核細胞形成に抑制的に働くことが示された。さらに、ヒスタミンはマクロファージの H4 受容体を介して TNF- α の発現を抑制し、抗炎症的に働いていることが示唆された。以上より、H4 受容体に特異的なリガンドは新たな抗関節リウマチ治療薬の創薬に結びつくことが期待される。

A. 研究目的

ヒスタミンはヒスチジン脱炭酸酵素（HDC）により L-ヒスチジンから合成される生体アミンであり、肥満細胞および好塩基球中に貯蔵され、即時型アレルギー等に関与していることは古くより知られている。また、ヒスタミンは胃粘膜では ECL 細胞で合成され胃酸分泌に、脳内ではヒスタミン神経系が存在し覚醒維持などの機能をもつこともあきらかにされている。さらに、これらとは別に、IL1 β 等により好中球やマクロファージ内に誘導される HDC が存在し、合成されたヒスタミンが免疫調節にかかわっていることが推定されている。

一方、関節リウマチ(RA)では、関節滑膜の慢性的な炎症、関節軟骨や骨の破壊が引き起こされ、滑膜組織や関節液中にはマスト細胞（MC）が存在し、脱顆粒によりヒスタミンをはじめとする炎症メディエータが遊離する。滑膜細胞において H1、H2、および H4 各受容体の発現が認められており、また、関節リウマチ患者の関節液中のヒスタミン濃度が増加していることがほくくされている。さらに、滑膜での H4 受容体の発現が RA 患者の病態の進行度によって変化し、進行例で発現量が減

少すると報告されている（Ikawa *et al.* 2005, Ohki *et al.* 2007）。

ヒスタミンは、従来 H1 受容体を介して炎症を促進する方向に働くと考えられていたが、むしろ、H4 受容体を介して抗炎症的に作用する可能性がある。そこで、本研究では、ヒスタミンが RA 患者における関節破壊にどのように関与しているのかを、関節軟骨破壊、骨破壊の両面から調べ、さらに、H4 受容体を介してのヒスタミンの関節リウマチの病態における役割を検討した。

B. 研究方法

1. 滑膜ナース細胞の pseudoemperipolesis 能に対するヒスタミンの影響

RA 患者の関節滑膜組織から分離したナース細胞と B-cell lymphoma cell line である MC/Car を共培養し、ヒスタミンを投与した場合の pseudoemperipolesis 能の変化を顕微鏡下で観察した。

2. rhTNF- α 刺激による RA 滑膜細胞の MMP3 遺伝子発現上昇に対するヒスタミンの影響

RA 患者の関節滑膜由来滑膜細胞を培養し、rhTNF- α で刺激した際の MMP3 遺伝子発現に

対するヒスタミンの影響を Real-time PCR 法により定量した。

3. マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) によって、ヒト CD14+細胞から誘導される破骨細胞様多核細胞形成に対するヒスタミンの影響

健康人の末梢血から精製した CD14+細胞の mRNA を抽出し、ヒスタミン受容体の遺伝子発現を RT-PCR 法にて確認し、M-CSF (100ng/ml) と RANKL (160ng/ml) で刺激し、ヒスタミンの TRAP 陽性細胞形成に対する影響を調べた。

4. マウス活性化マクロファージ様細胞株 (RAW264.7) における、ヒスタミンの TNF- α mRNA 発現に及ぼす作用

RAW264.7細胞を 1×10^6 cells/well の密度プレートに播種し、24時間インキュベートした。その後、ヒスタミン (1×10^{-8} - 1×10^{-6} M) を添加し、3時間経過してから、細胞内の全 RNA を QIAGEN 社の RNeasy Mini Kit を用いて TNF- α mRNA 抽出し定量した。また、ヒスタミン (1×10^{-8} M) の添加 15分前に、H1R、H2R、および H4R のアンタゴニストであるメピラミン、ファモチジンおよび JNJ7777120 をそれぞれ 10^{-6} M 添加した時の TNF- α mRNA 発現量への影響、および H4R アゴニストのディマプリット (10^{-8} - 10^{-6} M) を単独添加した時の TNF- α mRNA 発現量についても RT-PCR 法により調べた。

C. 結果

1. ヒスタミン投与群は、コントロール群と比較して、ナース細胞の pseudoemperipolesis 能に有意な差は見られなかった。

2. rhTNF- α を RA 滑膜細胞に投与した時の MMP3 遺伝子発現の上昇が、ヒスタミン 10^{-8} M、 10^{-6} M 共存下で有意に抑えられた。

3. CD14+細胞には、4種類のヒスタミン受容体すべての遺伝子が発現しており、CD14+細胞から M-CSF と RANKL で分化誘導させる際にヒスタミンを投与すると、有意に破骨細胞様多核細胞の数が減少した。

4. RAW264.7細胞における TNF- α mRNA 発現レベルはヒスタミン 10^{-8} M から 10^{-6} M まで濃度依存的に有意に抑制されヒスタミン 10^{-6} M では対照群の約 60%の発現量であった。ヒスタミン 10^{-8} M による TNF- α mRNA 発現抑制は、H4R アンタゴニストの JNJ7777120 10^{-6} M により特異的に遮断され、H4R アゴニストのディマプリットが、ヒスタミンと同様の抑制作用を示した。

D. 考察・結論

ヒスタミンは RA 関節滑膜の MMP3 遺伝子発現を減少させ、滑膜による軟骨破壊、および、健康人末梢血由来 CD14+細胞の破骨細胞様多核細胞形成に抑制的に働くことが示された。

また、恐らく肥満細胞で産生されたヒスタミンがマクロファージの H4 受容体を介して TNF- α の発現を抑制していることが想定され、ヒスタミンは H4 受容体を介して抗炎症的に働いていることが示唆された。

以上より、ヒスタミンが RA における関節破壊に対して H4 受容体を介して、抑制的かつ抗炎症的に働く可能性が示された。また、H4 受容体に特異的なリガンドを開発することにより、新たな抗関節リウマチ治療薬の創薬に結びつくことが期待される。

E. 研究発表

学会発表

大豊裕一、山本浩一、室谷知孝、中村侑亮、

浅野景子、大和谷厚

シスプラチンによる RAW264.7 細胞内

TNF- α 発現へのヒスタミンの関与

第 83 回 日本薬理学会年会

平成 22 年 3 月 16 日 (大阪)

総合研究報告書

RA 患者骨髄液の網羅的解析から選択された LIGHT/TNFSF14 の病態形成への関与

主任研究者 越智 隆弘 大阪警察病院 病院長

分担研究者 鈴木 隆二 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 室長

研究要旨 RA の病因を骨髄に求める研究方針に従い、RA および OA 患者の骨髄液について網羅的遺伝子解析を行った。RA に特徴的に発現し、OA では発現が無い、もしくは少なく、さらに、細胞膜上または分泌蛋白をコードする遺伝子として LIGHT/TNFSF14 を選択した。RA 骨髄液および RA の骨破壊に特徴的に観察される破骨細胞を用いた GeneChip 解析により選択された LIGHT/TNFSF14 は、RA 滑膜および RA 骨髄中に存在が確認されている RA ナース細胞の増殖に重要に関与していた。さらに RA ナース細胞存在下で維持・分化・増殖する MMP-12 陽性の RA に特徴的な破骨細胞の誘導に M-CSF+RANKL の関与なしに作用することを明らかにした。

分担研究者 所属期間 鈴木 隆二
(独) 国立病院機構相模原病院
臨床研究センター 室長

A. 研究目的

「リウマチの主病巣が骨髄」であるという主任研究者の提唱した考え方に従って、RA および OA 患者の骨髄液を用いた網羅的遺伝子解析を行い、RA に特異的に発現し OA では発現の無い遺伝子群を GeneChip を用いて解析し、細胞膜上および分泌蛋白をコードする遺伝子について選択された LIGHT/TNFSF14 の RA 病態に於ける生物学的意義の解明を行った。

B. 研究方法

1) GeneChip による網羅的発現解析：
RA および OA 患者骨髄液：RA 患者の腸骨骨髄液は行岡病院、OA 患者の腸骨骨髄液は共和会病院でそれぞれ 10 例採取したサンプルを用いた。GeneChip は Affymetrix 社の GeneChip Genome U133 Plus 2.0 Array(搭載されている Probe set 数：54,675/array)を使用し、RA および OA 骨髄細胞から抽出した total RNA 3ug を解析に用いた。目的とする解析は、群間比較検定、フィルタリング、クラスター解析を行い、抽出遺伝子の特徴解析として、FoldChange 解析、GeneOntology 解析、Pathway 解

析、GSEA(GeneSet Enrichment Analysis) 解析を行った。最終的には、細胞膜上もしくは分泌蛋白であるという基準で遺伝子の選定を行った。

2) RA 特異的破骨細胞を用いた網羅的発現解析：RA 特異的破骨細胞に選択的に発現している遺伝子についても、同様の GeneChip を用いた解析を行い遺伝子の選択を行った。

3) LIGHT/TNFSF14 による RA 滑膜ナース細胞の増殖に対する効果の検討を行った。

4) LIGHT/TNFSF14 による破骨細胞誘導能の検討を行った。

(倫理面への配慮)

本実験に給した臨床サンプルは、全て説明と同意の上入手した。本研究に使用したマウスは、動物愛護の精神に基づき適正に使用した。

C. 研究結果

1). GeneChip 解析より：

(1). RA および OA 患者骨髄液を使用し、GeneChip 解析を行い、RA 患者で発現強度の高い遺伝子の抽出に成功した。

(2). LIGHT/TNFSF14 の選択と RA 病態への関与：RA 滑液および滑膜組織は OA のそれと比較して有意に LIGHT の発現が高いことが確認された。LIGHT 存在下に細胞増殖が確認され、その活性は EGF および PDGF と同程度であった。RA 滑膜上には LIGHT の受容体である HVEM と LTβ

R が共に発現していたが、LIGHT 依存性増殖および IL-8 と MCP-1 の産生誘導、ICAM-1 の発現誘導は共に siLTβR で抑制された。LIGHT による RA 滑膜細胞増殖と機能は NF-κB 阻害剤の PDCT で阻害された。LIGHT 存在下に NF-κB の核移行と IκBα の degradation が確認された。以上から、RA では LIGHT が高く存在し、RA 滑膜細胞は LIGHT により増殖する。LIGHT により炎症性サイトカイン、ケモカイン、接着因子の発現が亢進され、これらは RA 滑膜上に存在する LTβR—NF-κB の経路であることが明らかとなった。さらに、LIGHT は RA に特徴的に存在する破骨細胞の分化・成熟に関与している。LIGHT は、末梢血単球 (PBMC) を RA 滑膜 Nurse 細胞と共培養することで得られた OC 前駆細胞 (pOC) に対しては OC 分化誘導作用を示し、その作用は RANKL により亢進したが、PBMC に対しては OC 誘導作用が認められなかった。LIGHT 誘導性 OC は、骨吸収能、TRAP、CTSK、MMP-9 などの破骨細胞マーカー遺伝子の発現、アクチンリングの形成などの OC 特徴的なプロファイルを示し、さらに、PBM 由来の OC には発現が認められない MMP-12 を発現していた。RA 罹患部関節の免疫染色により、MMP-12 陽性の TRAP 陽性 OC が認められたが、OA 関節では認められなかった。

D. 考察

1). LIGHT に関しては、RA 滑膜の増殖と炎症性の液性因子および接着因子の発現亢進に LIGHT が関連することが示唆された。LIGHT のレセプターの中でこれらに関与するのは LTβR であることを明らかにした。また、既に LIGHT による破骨細胞の誘導には HVEM が関与することを見出している。RA における滑膜増殖とそれに伴う炎症性破骨細胞誘導は今回の検討から共に LIGHT が関係し、それぞれ、異なる 2 種類のレセプターを使用している。炎症と関節破壊の両方に関与する LIGHT の誘導機構は未だ不明のままであるが、RA 滑膜浸潤細胞が産生している可能性が高い。

RA 病態形成に重要に関与するとして我々が報告してきた RA 特有な線維芽細

胞である RA ナース細胞の過剰増殖に直接の原因と成る可能性がある。また、RA に特徴的な破骨細胞の誘導に関与する分子、免疫バランスを調整する分子も含まれ、今後の精査により、新規診断および治療開発に迫れる可能性がある。

E. 結論

今回の解析による RA 患者特異的遺伝子群の網羅的解析により抽出された LIGHT/TNFSF14 は、RA 病態解明研究に新たな方向性を開く可能性が高いと結論した。

F. 研究発表

1). 論文発表

(1). 海外 2 件

The interaction of monocytes with rheumatoid synovial cells is a key step in LIGHT-mediated inflammatory bone destruction.

Ishida S, Yamane S, Nakano S, Yanagimoto T, Hanamoto Y, Maeda-Tanimura M, Toyosaki-Maeda T, Ishizaki J, Matsuo Y, Fukui N, Itoh T, Ochi T, Suzuki R. Immunology. 2009 Sep;128(1 Suppl):e315-24. Epub 2008 Nov 19

LIGHT induces cell proliferation and inflammatory responses of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via lymphotoxin beta receptor.

Ishida S, Yamane S, Ochi T, Nakano S, Mori T, Juji T, Fukui N, Itoh T, Suzuki R. J Rheumatol. 2008 Jun;35(6):960-8. Epub 2008 Apr 15

(2). 国内

未

2). 学会発表

未

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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・骨粗鬆症の重症化防止治療開発研究

課題番号：

主任研究者：越智隆弘

分担研究者：所属機関 熊本大学生命資源研究・支援センター 教授
氏 名 山村 研一

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遺伝子に関して、トランスジェニックマウスや遺伝子破壊マウスを作製し、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かどうか、関連するとすれば発症過程のいつ関与するのか、そしてその分子機構がなにであるのかを明らかにするのが、本研究の目的である。

B 研究方法

- (1) リウマチと関連する 7 つの遺伝子を *actin promoter* を用い強制発現させ、リウマチ用症状が出現するかどうかを解析する。遺伝子としては、*EEF1a1*, *Tnfsf14*, *Granulin*, *Sirpa*, *Sulf1*, *Cxcl5*, *Olr1* を選択する。後者 2 つについては、遺伝子上流に *lox71* を、下流に *loxP* を加え、組織特異的に遺伝子発現を除去できるようにデザインする。
- (2) リウマチと関連する 4 つの遺伝子については、相同組換え法により、条件的に破壊できる遺伝子座を作製し、条件的に破壊できるようにする。遺伝子としては、*Mmp12*, *Col9a2*, *S100a4*, *CCAR1* を選択する。

C 研究結果

- (1) *EEF1a1*, *Tnfsf14*, *Granulin*, *Sirpa*, *Sulf1*, *Cxcl5*, *Olr1* のうち、*EEF1a1*, *Sulf1*, *Cxcl5*, *Olr1* については、トランスジェニックマウスを、それぞれ 1, 2, 4, 3 系統作製できた。
- (2) しかし、3 つの遺伝子 *Tnfsf14*, *Granulin*, *Sirpa* について、トランスジェニックマウスを作製したが、ファウンダーが得られないか、もしくは精巣が委縮し次世代が得られなかった。そこで、*Tnfsf14* について、遺伝子発現誘導系での発現を目指すことにした。

- (3) そこで、2 つのコンストラクトを準備し、それぞれトランスジェニックマウスを作製することとした。両者のトランスジェニックマウスを交配し、遺伝子発現誘導物質を投与した時に初めて目的の遺伝子が発現するようにするためである。

1) CLIP-Cre-ERT2-polyA

マイクロインジェクションによるトランスジェニックマウス作製では、挿入場所により受ける位置効果が異なるため、発現の見られないラインや、発現場所が異なるラインが得られる可能性がある。また、多くのトランスジェニックマウスを作製し、最適の系統をスクリーニングしなければならず、非常に手間がかかる。そこで、*Et14/Ski* 遺伝子座にトラップベクターが挿入されている ES クローン (Ayu 21-T288) を利用し、そこに、Cre/変異 *lox* による組み換えで CILP-promoter-Cre-mERT2-PA を挿入することとした。

そのため、上記の遺伝子を含む置換ベクターを 2 種類作製することを計画した。第 1 は、*cartilage intermediate layer protein (CILP) promoter* を直接 Cre-mERT2 に接続したコンストラクト (3.5 CILP-Cre-mERT2) で、プロモーター領域を 3.5 kb 含むものである。CILP 遺伝子については Smad に対する反応に転写開始点上流 3k までが必要であることが示されているので、上流 3.5 kb のプロモーター配列で十分と考えたからである。しかし一方で、このトランスジーンにはイントロンがないので、場合によっては発現が低いことが予想される。また、CILP 遺伝子の第 1 イントロンには保存されている配列があることが明らかにされている。そこで、CILP promoter から第 1 エクソン、第 1 イントロン、そして第 2 エクソンまでを含む 5.3 kb の DNA 断片を用いて第 2 のコンストラクト (5.3 CILP-Cre-mERT2) を作製するこ

とにした。CILP遺伝子は、理化学研究所・ゲノム医科学研究センター骨関節疾患研究チーム池川志郎博士より入手した。一方、マウスのエストロゲンレセプター遺伝子に、1997年にChambornの報告したT2変異を加え、さらに、メチル化を受けやすいCpG配列を減らした遺伝子を合成、Cre遺伝子の3'側にフレームを合わせて接続しmERT2を作製した。両者をつなぎ、3.5CLIP-Cre-ERT2および5.3CILP-Cre-mERT2を作製した。さらに、挿入に必要な変異lox配列や、薬剤耐性遺伝子を組み込んだ、LoxKR3-3.5CILP (or 5.3CILP)-Cre-mERT2-pA-FRT-PGK-Puro-FRT-loxPという置換ベクターを構築した。

これらの置換ベクターを、ES細胞に導入し、それぞれ5または4つの挿入クローンを確認した。これらのクローンをを用いてキメラ作製を行い、それぞれ2系統を樹立した。これらのオスキメラの精子とレポーターマウス (R26R) からの卵子とで体外受精を行い、CreとlacZを持つマウスを得た。3.5CILP-Cre-mERT2に3日間タモキシフェンを投与し、大腿骨を採取し、lacZ発現を解析した。骨端軟骨板で発現が認められた。5.3CILP-Cre-mERT2についても、レポーターマウス (R26R) からの卵子と体外受精を行い、CreとlacZを持つマウスを得た。

2) CAG-lox-CAT-lox-Tnfsf14-polyA

このマウスでは、最初はCATが発現し、Tnfsf14は発現しない。CAG-lox-CAT-loxとTnfsf14-polyAを受精卵に注入し、2匹のファウンダーマウスを得て、マウス系統を樹立した。

3) 上記の2種類のトランスジェニックマウスを交配し、2つの遺伝子を持つマウスを作製する。この状況下で、tamoxifenを投与すると、これが細胞質にあるCre-ERT2のERT2部分と結合し、Cre-ERT2が、核内に移行する。そうするとCreによって、loxP配列間で組換えが起こり、CATが除去され、Tnfsf14が発現するようになる。この方法で、任意の時期にTnfsf14を発現させることができる。

(4) ノックアウトマウス

Mmp12, Sl100a4, CCAR1については相同組換えESクローンが得られ、生殖キメラマウスの作製にも成功した。しかし、Col9a2に

ついては、ヒト患者でみられるアミノ酸変異を導入する計画で相同組み換えベクターを作製した。相同組換えESクローンは得られ、80-90%のキメラ率のキメラマウスが得られたものの、精巣が委縮し、製紙は採油できず、結局生殖系列には伝達せず、マウス系統としては樹立できなかった。ヘテロ状態ですでに致死となるものと想定された。

(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、実験を行った。

D. 考察

EEF1a1、Sulfatase、CLR1については、順調にトランスジェニックマウスの作成が可能であった。しかし、3つの遺伝子Tnfsf14、Granulin、Sirpaについては、それが強く発現すると胚発生もしくは精子形成に障害がおこることが明らかとなった。Tnfsf14については、そのままでは発現せず、tamoxifen投与時にのみ発現するようにしたところ、ファウンダーマウスは順調に得られたところから、その遺伝子発現が生体にとっては毒性があること、このような場合には、Tamoxifen投与時に、発現を誘導する方法が有効と考えられた。

E. 結論

ヒト疾患の病因・病態解析の解明には、単純な遺伝子破壊マウスやトランスジェニックマウスだけではなく、条件的遺伝子破壊や条件的遺伝子発現のできるマウス、さらに種々の異なった変異を導入したマウスが必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Araki, K., Takeda, T., Yoshiki, A., Obata, Y., Nakagata, N., Shiroishi, T., Moriwaki, K. and Yamamura, K. Establishment of germline-competent embryonic stem cell lines from the MSM/Ms strain. *Mammal. Genome* 20: 14-20, 2009.
- ② Araki, M., Araki, K. and Yamamura, K. International gene trap project: towards gene-driven saturation mutagenesis in mice. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 10: 221-229, 2009.

- ③ Nakagata, N and Yamamura, K. Current activities of CARD as an international core center for mouse resources. *Exp. Animals* 58: 343-350, 2009.
- ④ Araki, K., Okada, Y., Araki, M. and Yamamura, K. Comparative analysis of right-element mutant *lox* sites on recombination efficiency in ES cells. *BMC Biotech.* 10: 29, 2010.
- ⑤ Wang, J., Ohmuraya, M., Suyama, K., Hirota, M., Ozaki, N., Baba, H., Nakagata, N., Araki, K. and Yamamura, K. Relationship of strain dependent susceptibility to experimentally induced acute pancreatitis with regulation of *Prss1* and *Spink3* expression. *Lab. Invest.* 90: 654-664, 2010.
- ⑥ Li, Z., Zhao, G., Shen, J., Araki, K., Haruna, K., Inoue, S., Wang, J. and Yamamura, K. Enhanced expression of human cDNA by phosphoglycerate kinase promoter-puromycin cassette in the mouse transthyretin locus. *Transgenic Res.* 20: 191-200, 2011.
- ⑥ Yamamura, K. :MSM/Ms mouse as a tool for humanized mouse project in Japan. (Plenary Lecture)., 2010 KALAS International Symposium, August 19-21, 2010, Pusan Korea.
- ⑦ Yamamura, K. :Humanized Mice for Functional Genomics and Human Disease Model, The4th AFLAS Congress Meeting 5th AMMRA Meeting & 11th CSLAS Annual Meeting, 2010. 11. 9-11, Taipei Taiwan.
- ⑧ Li, Z., Araki, K., Yamamura, K. :Production of Optimum Humanized Mouse Model for Familial Amyloidotic Polyneuropathy, 2010. 11. 9-11, Taipei Taiwan.

H. 知的財産権の出願・取得状況
なし

2. 学会発表

- ① 山村研一：ノックアウトマウスプロジェクトはなぜ必要か（シンポジウム），第56回日本実験動物学会総会，2009. 5. 14-16, 埼玉
- ② 荒木喜美, 平山知実, 作村由美, 荒木正健, 山村研一：可変型遺伝子トラップクローンを利用したトランスジェニックマウス作製システムの構築，第56回日本実験動物学会総会，2009. 5. 14-16, 埼玉
- ③ 吉信公美子, 来海葉子, 廣田貴子, 古閑成美, 江上稔子, 作村由美, 荒木喜美, 山村研一, 荒木正健：Gene Expression Profiles of Exchangeable Gene Trap Mice，第32回日本分子生物学会年会，December 9-12, 2009, 横浜
- ④ 山村研一：膵炎におけるオートファジーの役割（シンポジウム3オートファジーと病態），第99回日本病理学会総会，2010. 4. 27-29, 東京
- ⑤ 山村研一：典型的な優性遺伝病の発症における環境要因（シンポジウム1実験動物学を考えるー遺伝と環境を統御した優れた動物実験ー），第57回日本実験動物学会総会，2010. 5-12-14, 京都（京都テルサ）