

### Ⅲ. 分 担 研 究 報 告 書

関節リウマチ患者骨髄細胞における遺伝子発現異常と  
バイオインフォマティクス解析

研究分担者 西本憲弘 和歌山県立医科大学免疫制御学講座 教授  
堀内行雄 川崎市立川崎病院 病院長  
島岡 康則 行岡医学研究会行岡病院 副院長  
研究協力者 越智 健介 川崎市立川崎病院 医長  
橋本 淳 国立病院機構大阪南医療センター 部長

研究要旨

関節リウマチ(RA)の原因病巣は骨髄である可能性が示されている。そこでRA患者の骨髄細胞における異常発現遺伝子をマイクロアレイとバイオインフォマティクスにより解析した。その結果、骨髄での免疫機能の異常亢進が示唆された。また、骨格形成、筋肉形成に関わる機能分子の発現低下が見られ、RA病態において骨髄細胞が骨格形成、筋肉形成に関与している可能性が示唆された。一方、RA患者や白血病患者の骨髄で存在が報告されているCD14+CD15+細胞を、RA患者の腸骨骨髄の単球系細胞の中に確認した。

A. 研究目的

関節リウマチ(RA)の原因病巣は骨髄である可能性が示されている。そこでRA患者の骨髄細胞における異常発現遺伝子を網羅的に解析し、バイオインフォマティクス・ツールを応用して骨髄細胞機能の異常と、異常発現遺伝子の分子間相互作用を明らかにすることを第1の目的とした。第2に、RA患者や白血病患者の骨髄には、健常者では見られないCD14+CD15+細胞が存在し、この細胞は癌特異的抗原を発現していることが報告されている。また、我々は、これまでにRA患者の骨髄で、癌や胎生期に発現するHLA-E、F、G抗原の発現が増強することを報告した。そこで、RA患者の腸骨骨髄細胞を用い、CD14+CD15+細胞ならびにHLA-E、-G抗原陽性細胞の同定を試みた。

B. 研究方法

① 18例のRA患者腸骨から採取した骨髄全血を用いTotal RNAを抽出し、DNAマイクロアレイ

イ(Agilent Whole Human Genome4x44K<sup>®</sup>)により網羅的な遺伝子発現解析を行った。本研究の主旨を理解し、検体提供に御同意下さったRA患者を対象とし、全身麻酔がかかったのち、無痛下で骨髄血採取ならびに末梢血採取を行った。採取した検体は共同研究機関の指定した方法に準じて処理したのち、各研究機関に供給した。対照には8例の健常人骨髄(BioChain<sup>®</sup>, 米国より購入)を用いた。発現異常を示した遺伝子のgene ontologyに基づき、Expression Analysis Systemic Explorer<sup>®</sup>(EASE)バージョン2.0を用いて、骨髄細胞の機能異常を検討した。さらに免疫応答に関連する遺伝子の分子間相互作用をIngenuity Pathways Analysis (IPA)<sup>®</sup>バージョン7.5.を用いて解析した。

② RA患者の腸骨骨髄液から単核球分画を比重遠心により分離し、CD14+細胞におけるCD15+細胞の割合をフローサイトメトリーで測定した。また、各種マーカーとの2重染色によりHLA-E、G抗原陽性細胞を同定した。

(倫理面への配慮)

患者検体の採取はヘルシンキ宣言を遵守し、各施設の倫理委員会の承認のもとに行った。患者情報に関しては、治療施設・氏名・生年月日・住所などの情報を削除し、匿名化した。

患者の遺伝子情報の取り扱いに際しては、“ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針”、“疫学研究に関する倫理指針”“臨床研究に関する倫理指針”に沿って、人権の保護について、十分配慮しながら実験を行った。

### C. 研究結果

① RA 患者の骨髄全血細胞と健常骨髄(米国より購入)の比較で、1168 遺伝子の発現が増強し、1002 遺伝子の発現が減少していた。これらの遺伝子の機能をバイオインフォマティクスで検討したところ、免疫応答の亢進が非常に強く描出された(有意性を示す EASE score  $5.5 \times 10^{-23}$ )。免疫応答関連分子は 153 同定され、インターフェロン(IFN)  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  を中心とするネットワークに加えて、Tumor necrosis factor (TNF), Transforming growth factor (TGF)  $\beta$ , IL-1, IL-12, IL-18 が分子間ネットワークの中心に位置し発現を制御していると考えられた。またその制御シグナルは NF $\kappa$ B, P38MAPK, ERK, JNK 等の転写因子を介していた。MHC class II に加えて、class I 分子の発現も増強し、骨髄単核球分画で見出された HLA-E の発現増強が、骨髄全血でも確認された。それ以外に、ストレス反応、創傷治癒、アポトーシスに関連した分子の遺伝子発現が亢進し、逆に、骨格形成、筋肉形成、DNA のパッケージング、細胞接着、細胞増殖、細胞移動に関する分子の遺伝子発現が低下しており、これらの機能の異常が示唆された。

② RA 患者骨髄細胞数と lymphoid 分画、myeloid 分画、さらに CD14+CD15+細胞の割合は、患者間で大きく異なっていた。そこで単核球分画と思われる細胞群にゲートをかけ、さらに CD14+細胞中における CD15+細胞の割合を検討したが、CD14+単核球系細胞中における CD15+細胞の割合は 18-51%と、患者間で大きく

異なった。HLA-G 陽性細胞は T、B 細胞、単球のいずれにも見られたが、CD14+CD15+細胞は殆どすべてが HLA-G を発現していた。HLA-E に対する抗体は HLA-A, B, C と交叉性を示したため検出できなかった。

### D. 考察

骨髄単核球分画のみならず全血の遺伝子発現解析においても、type I ならびに type II IFN によって誘導される分子の発現が更新するとともに、抗原提示に関与する分子の発現が亢進しており、骨髄での免疫機能の異常な亢進が確認された。この遺伝子発現プロフィールは関節炎を自然発症する DNaseII ノックアウトマウスの骨髄における遺伝子発現パターンと酷似している。また、正常な MHC class I, II 分子に加え、癌や胎生期に発現するとされる HLA-G 分子が T、B 細胞、単球に発現していることは、骨髄が強い活性化状態にあることを強く示唆する。

免疫関連分子以外では、骨格形成、筋肉形成に関与する分子の発現が低下しており、本研究班の他の研究者との共同研究でその意義を明らかにしたい。

一方、越智らにより報告された CD14+CD15+単核球系細胞が、今回の検討でも RA 患者骨髄に確認され、しかも殆どの細胞が HLA-G 陽性であったことも、これらの細胞が活性化状態にあることを示唆すると考える。

これらの異常が、生物学的製剤治療でどのように変化するかは非常に興味深い。もし、生物学的製剤により患者が臨床的寛解状態になっても、このような骨髄における異常所見が残存すれば、生物学的製剤の中止により再発する可能性が高いと考えられる。来年度以降の研究で、これらの検討を行いたい。

### E. 結論

RA 患者の骨髄における免疫機能の亢進、CD14+CD15 細胞の存在が確認された。骨髄異常がどの分化段階で生じているかを明らかにし、根治療法の研究へと結び付けたい。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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. *Mod Rheumatol* 21:10-15, 2011.
2. Lee HM, Sugino H, Aoki C, Nishimoto N. Underexpression of mitochondrial-DNA encoded ATP synthesis-related genes and DNA repair genes in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 15;13(2):R63, 2011. [Epub ahead of print]
3. Hirao M, Nampei A, Shi K, Yoshikawa H, Nishimoto N, Hashimoto J. Diagnostic features of mild cellulitis phlegmon in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab: a report of two cases. *Mod Rheumatol* 2011 May 1. [Epub ahead of print]
4. Murakami M, Nishimoto N. The value of blocking IL-6 outside of rheumatoid arthritis: current perspective. *Curr Opin Rheumatol*. 2011 May;23(3):273-7.
5. Imagawa T, Yokota S, Mori M, Miyamae T, Takei S, Imanaka H, Nerome Y, Iwata N, Murata T, Miyoshi M, Nishimoto N, Kishimoto T. Safety and efficacy of tocilizumab, an anti-IL-6-receptor monoclonal antibody, in patients with polyarticular-course juvenile idiopathic arthritis. *Mod Rheumatol* 2011 Jun 12. [Epub ahead of print]
6. Lee HM, Sugino H, Aoki C, Shimaoka Y, Suzuki R, Ochi K, Ochi T, Nishimoto N. Abnormal networks of immune

response-related molecules in bone marrow cells from patients with rheumatoid arthritis as revealed by DNA microarray analysis. *Arthritis Res Ther*. 2011 Jun 16;13(3):R89.

7. Hoshi D, Nakajima A, Inoue E, Shidara K, Sato E, Kitahama M, Seto Y, Tanaka E, Urano W, Ichikawa N, Koseki Y, Momohara S, Taniguchi A, Nishimoto N, Yamanaka H. Incidence of serious respiratory infections in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab. *Mod Rheumatol* 2011 Jul 8. [Epub ahead of print]
8. Hirao M, Yamasaki N, Oze H, Ebina K, Nampei A, Kawato Y, Shi K, Yoshikawa H, Nishimoto N, Hashimoto J. Serum level of oxidative stress marker is dramatically low in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab. *Rheumatol Int* 2011 Sep 11. [Epub ahead of print]
9. Mori S, Tokuda H, Sakai F, Johkoh T, Mimori A, Nishimoto N, Tasaka S, Hatta K, Matsushima H, Kaise S, Kaneko A, Makino S, Minota S, Yamada T, Akagawa S, Kurashima A; and the NTM-BIORA (NTM infection in Biologic-treated RA patients) Study Investigators. Radiological features and therapeutic responses of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease in rheumatoid arthritis patients receiving biological agents: a retrospective multicenter study in Japan. *Mod Rheumatol* 2011 Dec 30. [Epub ahead of print]

### 2. 学会発表

1. 川合眞一、西本憲弘. シンポジウム. 日本初の創薬をめざして. わが国の成功例: 抗IL-6受容体抗体、トシリズマブの基礎と臨床開発. 第28回日本医学会総会 2011. 2011.4.8-10
2. 西本憲弘. シンポジウム. 免疫システムの臨床応用: 課題と今後の展望. 抗IL-6受容体抗体による炎症性免疫疾患の治療. 第28回日本医学会総会 2011. 2011.4.8-10
3. 西本憲弘. 炎症性免疫疾患に対するIL-6阻害治療-from bench to bedside-. 第54回日本腎臓学会学術総会. パシフィコ横浜. 神

- 奈川. 2011.6.16
4. 西本憲弘.免疫内科における免疫抑制剤の使い方.スリーサム2011京都 第45回日本眼炎症学会. 2011.7.8
  5. 西本憲弘. シンポジウム. 生物学的製剤の効果から見た成人の RA の炎症病態. 第55回日本リウマチ学会総会・学術集会. 神戸ポートピアホテル.兵庫.2011.7.18-20
  6. 西本憲弘. ランチョンセミナー.実臨床におけるエタネルセプトの有効な使用法-ケーススタディ: 迷った末の選択-.第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会.神戸ポートピアホテル.兵庫.2011.7.18-20
  7. 和田雅史、李 慧敏、青木千恵子、杉野英彦、村上美帆、松谷隆治、越智隆弘、西本憲弘. ワークショップ. RA 患者と関節炎を呈するDNaseII KOマウスの骨髄における免疫機能異常の類似性.第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会.神戸ポートピアホテル.兵庫.2011.7. 18-20
  8. 杉野英彦、李 慧敏、青木千恵子、和田雅史、村上美帆、松谷隆治、越智隆弘、西本憲弘. ワークショップ. 破骨細胞形成における s100A4 の機能解析. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 神戸ポートピアホテル.兵庫.2011.7.18-20
  9. 李 慧敏、杉野英彦、青木千恵子、島岡康則、越智健介、越智隆弘、西本憲弘. ワークショップ. 関節リウマチ (RA) の骨髄細胞における免疫関連遺伝子の発現異常. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 神戸ポートピアホテル.兵庫.2011.7.18-20
  10. 中野直子、森谷夕造、竹本幸司、中野威史、石井榮一、伊藤卓夫、西本憲弘. 家族性高コレステロール血症及び若年性特発性関節炎の治療中に高安動脈炎を発症したシトステロール血症の一例. 第21回日本小児リウマチ学会総会・学術集会. 神戸国際会議場.兵庫. 2011.10.14-16
  11. 松谷隆治、村上美帆、李 慧敏、杉野英彦、西本憲弘. 毒性水準下レベルの水銀が誘導する自己抗体産生機構の解明. 第40回日本免疫学会総会・学術集会ワークショップ. 幕張メッセ. 千葉. 2011.11.27-29
  12. 北浦一孝、松谷隆治、藤井克樹、白井顕治、鈴木さつき、高崎智彦、小笠原康悦、西本憲弘、倉根一郎、鈴木隆二. 新世界ザルにおける T 細胞受容体  $\beta$  鎖遺伝子の CDR3 領域における正の選択. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会. 幕張メッセ. 千葉. 2011.11.27-29.
  13. 西本憲弘. シンポジウム臨床薬理と最新治療: リウマチ膠原病. 関節リウマチに対する分子標的治療. 第32回日本臨床薬理学会年会. 2011.12.1
  14. 松谷隆治、李穎、村上美帆、松井聖、關口昌弘、藤井隆夫、大村浩一郎、前田恵治、黒岩孝則、入交重雄、井村嘉孝、川人豊、三森経世、佐野統、西本憲弘、ABROAD 研究グループ. 生物学的製剤未使用の活動性 RA 患者における T 細胞サブセット解析. 第26回日本臨床リウマチ学会. パシフィコ横浜、神奈川 2011.12.3-4
  15. Lee HM, Sugino H, Aoki C, Nishimoto N. Underexpressions of mitochondrial-DNA encoded ATP synthesis-related genes and of DNA repair genes in systemic lupus erythematosus. The Asia pacific league of Association of Rheumatology (APLAR) Symposium 2011, Taipei. 2011.4.15-17
  16. Sugino H, Lee HM, Ochi T, Nishimoto N. Suppression of intracellular S100A4 utilizing siRNA inhibits osteoclastogenesis. EULAR2011. London. 2011.5.25-28.
  17. Lee HM, Sugino H, Aoki C, Shimaoka Y, Ochi T, Nishimoto N. Comparisons of MHC class I molecule expressions in bone marrow (BM) cells and peripheral blood cells (PBCS) of rheumatoid arthritis (RA). EULAR2011. London. 2011.5.25-28.
  18. Matsutani T, Murakami M, Lee HM, Sugino H, Nishimoto N. Subtoxic dose of mercury reduces splenic marginal zone B cells, resulting in the increase in autoantibodies in murine mercury-induced autoimmunity ACR/ARHP 2011. Chicago. USA. 2011.11.5-9.
  19. Lee HM, Sugino H, Aoki C, Murakami M, Matsutani T, Ochi T, Nishimoto N.

- Correlations between S100 gene expression levels and the local and systemic inflammatory markers (matrix metalloproteinase-3, MMP3; erythrocyte sedimentation rate, ESR) in rheumatoid arthritis patients. ACR/ARHP 2011. Chicago. USA. 2011.11.5-9.
20. Nishimoto N, Murakami M, Matsutani T, Hashimoto J, Takagi N. Interleukin-6 as a therapeutic target in locomotor disorders. Bio-Rheumatology International Congress. Tokyo. Japan. 2011.11.14-16.
  21. Lee HM, Aoki C, Shimaoka Y, Ochi K, Ochi T, Nishimoto N. Abnormal expressions of immune response-related genes in RA bone marrow cells. Bio-Rheumatology International Congress. Tokyo. Japan. 2011.11.14-16.
  22. Lee HM, Sugino H, Aoki C, Umegaki N, Katayama I, Furukawa F, Nishimoto N. Association between SLE patients with or without photosensitivity and the expression of mitochondrial encoded ATP synthesis-related and DNA repair genes. The 5th Autoimmunity Congress Asia (ACA 2011), Singapore, 2011.11.17-19.
  23. Murakami M, Matsutani T, Aoki C, Lee HM, Li Y, Nishimoto N. Blocking interleukin-6 signal ameliorates inflammatory manifestations and laboratories of cachexia in a patient with malignant mesothelioma: A case study. The 6th Cachexia Conference. Milan, Italy. 2011,12.8-10.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

##### 1. 特許取得

特記すべきことなし。

##### 2. 実用新案登録

特記すべきことなし。

##### 3. その他

特記すべきことなし。

## 関節リウマチの骨髓と末梢血 CD14<sup>+</sup>単球のフェノタイプ解析に関する研究

研究分担者	桑名正隆	慶應義塾大学医学部リウマチ内科	准教授
	堀内行雄	川崎市立川崎病院	病院長
	島岡康則	浜脇整形外科病院	副院長
研究協力者	瀬田範行	慶應義塾大学医学部リウマチ内科	助教
	越智健介	川崎市立川崎病院整形外科	医長

### 研究要旨

関節リウマチ (RA) の病態に関わる CD14<sup>+</sup>単球の新たな細胞集団を探究するために RA 患者 7 例の腸骨骨髓と末梢血、健常人 6 例の末梢血を用いて CD14<sup>+</sup>単球における CD15、CD29、CD31、CD34、CD144、CCR1、CCR2、CCR4、CCR5、CCR6、CXCR3、CXCR4、VEGFR 1 の発現をフローサイトメトリーで解析した。RA 腸骨骨髓中には CD15<sup>+</sup>単球が多数存在し、CD15<sup>+</sup>単球と比べて CD34 と CCR5 を高発現していた ( $p = 0.0002$ )。また、健常人と RA 患者のいずれの末梢血中にも CD15<sup>+</sup>単球が存在したが、RA 末梢血 CD15<sup>+</sup>単球は健常人末梢血 CD15<sup>+</sup>単球より CD34 と CCR5 の発現が高い傾向にあった。一方、これまでの検討で末梢血 CXCR4<sup>high</sup> 単球中に骨芽細胞や軟骨芽細胞への分化能を有する単球由来多能性細胞の前駆細胞が存在することが判明している。また、末梢血単球の CXCR4 の発現は健常人より RA 患者で低く、活動性が高い RA 患者ほど低いことより、RA 患者では活動性の上昇に伴い骨や軟骨の修復能が低下している可能性が示唆されている。今回の検討では末梢血単球において CD15 と CXCR4 は互いに相反する発現パターンを示し、CD15<sup>+</sup>単球と単球由来多能性細胞の前駆細胞は異なる細胞集団と考えられた。以上より、RA 患者腸骨に存在する CD15<sup>+</sup>(CD34<sup>+</sup>) 単球は関節破壊に関わる単球で、骨芽細胞や軟骨芽細胞への分化能を有する単球由来多能性細胞の前駆細胞を含む CD14<sup>+</sup>CXCR4<sup>high</sup> 細胞は関節修復に関わる単球である可能性が示された。活動期 RA では、これら 2 つの単球サブセットが CD15<sup>+</sup>(CD34<sup>+</sup>) 単球に偏奇することで病態に関わる可能性が考えられた。

### A. 研究目的

RA の罹患関節の組織学的特徴であるパンヌスは主に増殖した滑膜細胞、浸潤したマクロファージやリンパ球や形質細胞、破骨細胞で形成されており、滑膜細胞や滑膜に浸潤した炎症性細胞から様々な炎症性サイトカインが産生される。滑膜マクロファージからは TNF $\alpha$  や IL-1 などのサイトカインが大量に産生され、治療の標的にもなっている。また、RA に特徴的な骨浸食には、炎症性サイトカインの影響で分化を促された破骨細胞が積極的に関与している。このように、滑膜細胞、浸潤した炎症性細胞、破骨細胞が RA 病態の中心的役割を担っていると考えられている。以前よ

り滑膜マクロファージは末梢血単球由来と考えられてきたが、破骨細胞も M-CSF と RANKL の存在下で末梢血 CD14<sup>+</sup>単球から *in vitro* で分化誘導されることから前駆細胞が末梢血 CD14<sup>+</sup>単球中にも存在すると考えられる。そこで、本研究では RA の CD14<sup>+</sup>単球のフェノタイプを解析して、RA 病態に関与する単球の新たな細胞集団を探究することを目的とした。

### B. 研究方法 対象

RA 患者 86 名（平均年齢 60.7 歳、男性 15 名）と健常人 32 名（平均年齢 27.2 歳、男性 21 名）から末梢血を提供して頂き解析に用いた。RA

患者 86 名中 9 名からは骨髄も提供して頂いた。診療情報の得られた RA 患者 86 名中 77 名は検体採取時の疾患活動性から低疾患活動性 (DAS28 < 3.2) と高疾患活動性 (DAS ≥ 3.2) に分類した。

### フローサイトメトリー

腸骨骨髄と末梢血から比重遠心法で単核球を分離して CD14 (RM052)、CD15 (80H5)、CD29 (MAR4)、CD31 (P2B1)、CD34 (AC136)、CD144 (55-7H1)、CCR1 (53504)、CCR2 (48607)、CCR4 (205410)、CCR5 (2D7/CCR5)、CCR6 (53103)、CXCR3 (49801)、CXCR4 (12G5)、CXCR5 (RF8B2)、VEGFR1 (49560) の発現をフローサイトメトリーで解析し、蛍光平均強度 (Mean fluorescence intensity: MFI) を用いて CD14<sup>+</sup>単球における各分子の発現強度を比較した。更に一部の検体の末梢血 CD14<sup>+</sup>単球における CXCR4 の発現も測定して MFI を用いて比較した。

### 単球由来多能性細胞の作製

フローサイトメーター (FACS Calibur) の細胞分離システムを用いて健康人末梢血から CD14<sup>+</sup>CXCR4<sup>high</sup>細胞と CD14<sup>+</sup>CXCR4<sup>low</sup>細胞を単離し、それぞれフィブロネクチンをコートした培養プレートで CD14<sup>+</sup>細胞由来液性因子と共に培養した[1]。培養 7 日目に付着した紡錘型細胞を単球由来多能性細胞と定義し、紡錘型細胞数を比較した。

### (倫理面への配慮)

検体を提供してもらう際には、ヘルシンキ宣言に従い対象となる個人の擁護を優先し、プライバシーの保護、研究協力の任意性、提供を受けた検体の取り扱い方、得られる研究成果の医学的貢献度などについて研究協力者に十分説明した上で、文章により同意を得た。なお、本研究は各共同研究施設の臨床研究審査委員会の承認を受けて実施した。

## C. 研究結果

### 1) RA 骨髄の解析

検討に用いた RA 全例 (n=9) で骨髄 CD14<sup>+</sup>単球

の 28-60%に CD15 の発現が見られ、以前に報告された骨髄 CD15<sup>+</sup>単球の存在が再確認された[2] (図 1)。

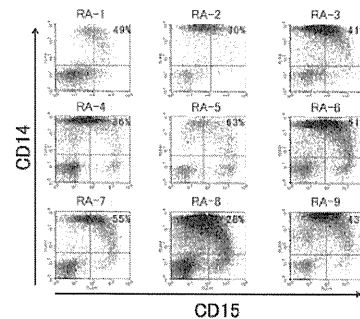
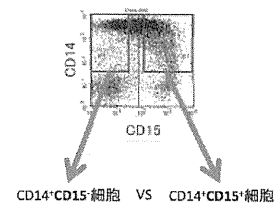


図 1 RA 骨髄 CD14<sup>+</sup>単球中の CD15<sup>+</sup>発現の検討

次に RA 骨髄単核細胞を CD14 と CD15 で展開したドットプロット上の CD15<sup>+</sup>単球と CD15<sup>-</sup>単球にゲートかけて、CD15<sup>+</sup>単球と CD15<sup>-</sup>単球の CD29、CD31、CD34、CD144、CCR1、CCR2、CCR4、CCR5、CCR6、CXCR3、CXCR4、CXCR5、VEGFR1 の発現を比較したところ、多くの検体で CD15<sup>+</sup>単球で CD15<sup>-</sup>単球と比べて CD34 と CCR5 の発現が高い傾向が見られた (図 2)。



以下の方分子の発現を比較検討

CD29 (MAR4)、CD31 (P2B1)、CD34 (AC136)、CD144 (55-7H1)、CCR1 (53504)、CCR2 (48607)、CCR4 (205410)、CCR5 (2D7/CCR5)、CCR6 (53103)、CXCR3 (49801)、CXCR4 (12G5)、CXCR5 (RF8B2)、VEGFR1 (49560)

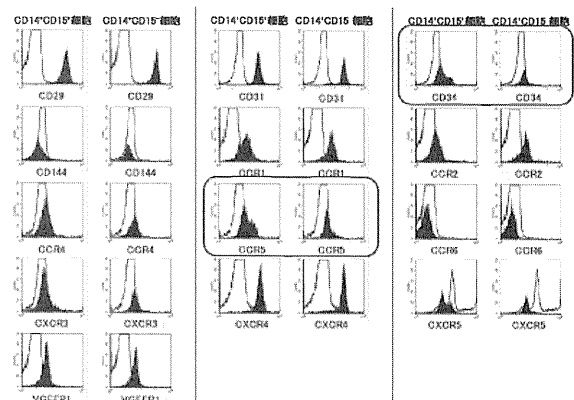




図2 RA 骨髄 CD15<sup>+</sup>単球と CD15<sup>-</sup>単球の各種分子発現の比較 (代表例を提示) 黒と白抜きのヒストグラムはそれぞれの表面分子に対する抗体とアイソタイプコントロール抗体を表す

更に CD34 と CCR5 の発現を MFI を用いて比較したところ、有意差をもって CD15<sup>+</sup>単球で発現が高かった (図3)。また、CD15<sup>+</sup>単球の CD34 の発現の高い症例は、同時に CD15<sup>+</sup>単球の CCR5 の発現も高い傾向にあった。

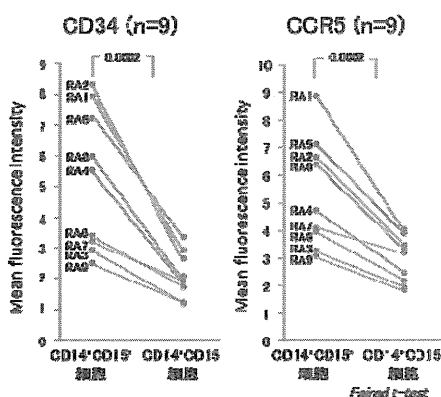


図3 RA 骨髄 CD15<sup>+</sup>単球と CD15<sup>-</sup>単球における CD34 と CCR5 発現レベルの比較

### 2) 末梢血における CD15<sup>+</sup>単球の解析

健康人6例と RA 9例の全例で末梢血単核中に CD14<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>細胞が検出され、末梢血にも CD15<sup>+</sup>単球が存在することが判明した (図4)。

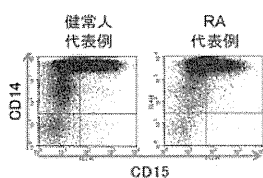


図4 健康人と RA の末梢血中の CD15<sup>+</sup>細胞の存在 (代表例を各1例ずつ提示)

次に RA 骨髄 CD15<sup>+</sup>単球で高発現していた CD34 と CCR5 の発現を健康人末梢血 CD15<sup>+</sup>単球と RA

末梢血 CD15<sup>+</sup>単球で比較したところ、有意差を認めなかったが、RA 末梢血 CD15<sup>+</sup>単球で発現が高い傾向にあった (図5)。

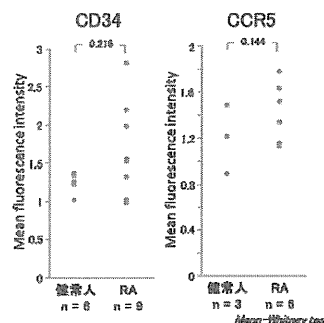
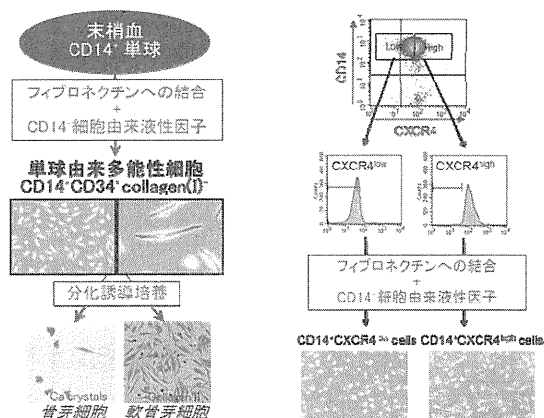


図5 健康人と RA の末梢血 CD15<sup>+</sup>単球の CD34 と CCR5 発現レベルの比較

### 3) 単球由来多能性細胞の前駆細胞の解析

以前に我々は、末梢血 CD14<sup>+</sup>単球をフィブロネクチン上で CD14<sup>-</sup>細胞由来液性因子と共に培養すると、骨芽細胞や軟骨芽細胞への分化能を有する紡錘形の単球由来多能性細胞が作成できることを報告した [1、3、4] (図6左)。更に、末梢血中の CXCR4 を高発現している単球と低発現の単球を分離して単球由来多能性細胞への分化効率を比較したところ、CXCR4 を高発現している単球の方が低発現の単球より分化効率が高かった。したがって、単球由来多能性細胞の前駆細胞は CD14<sup>+</sup>CXCR4<sup>high</sup>細胞中に存在すると考えられ、末梢血 CXCR4<sup>high</sup>単球は単球由来多能性細胞を介して骨芽細胞や軟骨芽細胞へ分化することで関節の修復に関わる善玉単球である可能性が想定された (図6右)。



る細胞集団と思われた。

図6 単球由来多能性細胞とその前駆細胞の同定

また、末梢血単球の CXCR4 の発現は健常人より RA 患者で低く、活動性が高い RA 患者ほど低いことより単球由来多能性細胞の前駆細胞数は RA の活動性に反比例する。そのため、RA の活動性が高いほど関節修復能が低下する可能性も想定された (図7)。

### CXCR4

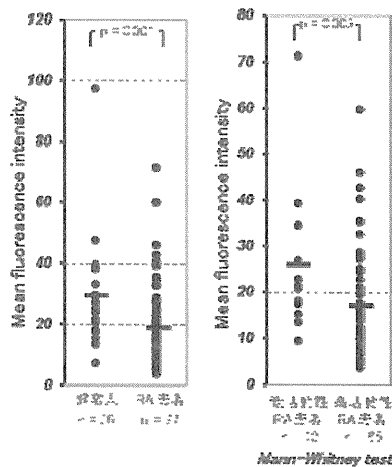


図7 健常人と RA、低活動性 RA と高活動性 RA の末梢血 CD14<sup>+</sup>単球における CXCR4 の発現レベルの比較

そこで、今回我々は RA 患者腸骨に存在して関節破壊に関与している可能性のある CD15<sup>+</sup>単球と単球由来多能性細胞の前駆細胞の RA 病態における役割を明らかにするために末梢血 CD14<sup>+</sup>単球の CD15 と CXCR4 の発現パターンを解析したところ、CXCR4 を低発現する単球は CXCR4 を高発現する単球より有意に CD15 の発現が高く、CD15<sup>-</sup>単球は CD15<sup>+</sup>単球より有意に CXCR4 の発現が高いことが判明した (図8)。すなわち、末梢血単球における CD15 と CXCR4 は互いに相反する発現パターンを示し、CD15<sup>+</sup>単球と単球由来多能性細胞の前駆細胞は異なる

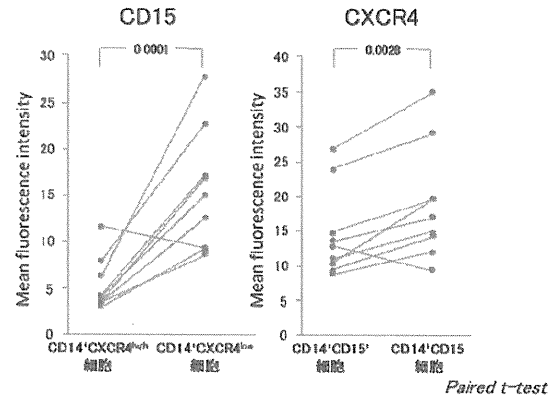


図8 末梢血単球における CXCR4 の発現レベルによる CD15 の発現レベルの比較と末梢血単球における CD15 の有無による CXCR4 の発現レベルの比較

### D. 考察

RA の腸骨骨髄には癌特異的抗原を発現する CD15<sup>+</sup>単球が豊富に存在し、関節破壊との関連が示唆されている [2、5]。本検討では、RA 全例 (n=9) で骨髄 CD14<sup>+</sup>単球に CD15 の発現が見られ、骨髄 CD15<sup>+</sup>単球は CD15<sup>-</sup>単球と比べて CD34 と CCR5 の発現が有意に高かった。また、健常人と RA 共に末梢血中に CD14<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>細胞が存在していたが、健常人と比較して RA の CD14<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>細胞の方が CD34 と CCR5 の発現が高い傾向にあり、健常人と RA の CD14<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>細胞には質的違いがある可能性が示唆された。更に、末梢血単球における CD15 と CXCR4 の発現パターンの解析から、RA の末梢血中には関節破壊に関わる CD15<sup>+</sup>単球と関節修復に関わる CXCR4<sup>high</sup> 単球という異なる細胞群が存在する可能性が想定された。そして、RA の骨髄 CD15<sup>+</sup>単球は MIP-1 $\alpha$  や RANTES の受容体である CCR5 を高発現しており、関節の修復に関わる可能性のある単球は SDF-1 の受容体である CXCR4 を高発現していることより、これら2つの細胞はそれぞれ異なるケモカインによってコントロールされている可能性も考えられた (図9)。一方、本検討では健常人の末梢血中

にも関節破壊に関わる可能性のある CD15<sup>+</sup>単球が存在することが判明した。しかし、健常人はRAに比べて末梢血中の CXCR4<sup>high</sup>単球が多く存在することが示されていることから、この2つの細胞群のバランスは健常人とRAの間で異なる可能性が示唆された (図10)。

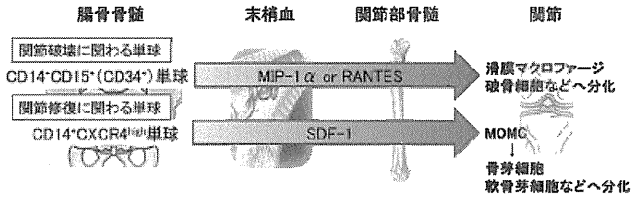


図9 関節破壊に関わる単球と関節修復に関わる単球

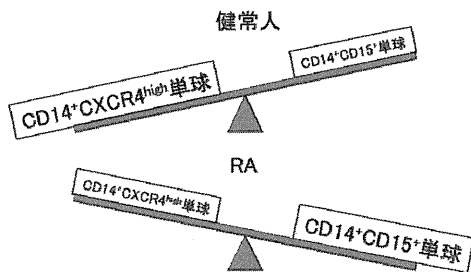


図10 健常人とRAにおける CXCR4<sup>high</sup>単球と CD15<sup>+</sup>単球のバランス (仮説)

## E. 結論

本研究では、RAの病態において関節破壊に関与する CD15<sup>+</sup>(CD34<sup>+</sup>)単球と、関節修復に関与する CXCR4<sup>high</sup>単球のバランスが重要であると考えられた。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kaneko Y, Kuwana M, Kameda H, and Takeuchi T. Sensitivity and specificity of 2010 rheumatoid arthritis classification criteria. *Rheumatology*. 2011; 50(7): 1268-1274.
- 2) Seta N, and Kuwana M. Potential

involvement of human circulating CD14<sup>+</sup> monocytes in tissue repair and regeneration. *Inflam. Regen*. 2012; 32(1): 1-7.

- 3) Hattori H, Suzuki S, Okazaki Y, Suzuki N, and Kuwana M. Intracranial transplantation of monocyte-derived multipotential cells enhances recovery after ischemic stroke in rats. *J. Neurosci. Res*. 2012; 90(2): 479-488.

## 2. 学会発表

なし

## H. 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

## I. 参考文献

- 1) Kuwana M, Okazaki Y, Kodama H, et al. Human circulating CD14<sup>+</sup> monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation. *J Leukoc Biol*. 2003; 74(5): 833-845.
- 2) Tomita T, Kashiwagi N, Shimaoka Y, et al. Phenotypic characteristics of bone marrow cells in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1994; 21(9):1608-1614.
- 3) Seta N and Kuwana M. Derivation of multipotent progenitors from human circulating CD14<sup>+</sup> monocytes. *Exp. Hematol*. 2010; 38(7): 556-583.
- 4) Seta N and Kuwana M. Potential Involvement of Human Circulating CD14<sup>+</sup> Monocytes in Tissue Repair and Regeneration. *Inflammation and Regeneration*. 2012; 37(1): 1-7.
- 5) Ochi T, Hakomori S, Adachi M, et al. The presence of a myeloid cell

population showing strong reactivity with monoclonal antibody directed to difucosyl type 2 chain in epiphyseal bone marrow adjacent to joints affected with rheumatoid arthritis (RA) and its absence in the corresponding normal and non-RA bone marrow. *J Rheumatol.* 1988; 15(11): 1609-1615.

iPS 細胞を用いたリウマチ性疾患の原因・病態解析に関する研究

研究分担者 中畑龍俊 京都大学 iPS 細胞研究所臨床応用研究部門 副所長

研究要旨

リウマチ性疾患の患者特異的 iPS 細胞を用いた研究を推進するため、iPS 細胞からの安定的・機能的な単球・樹状細胞の分化系を構築した。

A. 研究目的

人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells: iPS 細胞)は、京都大学の山中らによって開発された細胞で、ヒト体細胞から誘導され、ES 細胞と同様の多分化能を有する。

リウマチ性疾患では、自然免疫担当細胞が疾患形成に果たす役割は大きいですが、患者由来の血球細胞を用いた検討は、病気の活動性や治療薬による影響を受けやすいことから、問題が多い。

患者由来 iPS 細胞を使用して、一定の条件下で分化させた免疫細胞同士を比較することにより、より精密な病態解析が行えることが期待できる。

そのため、iPS 細胞から単球系細胞を樹立する系を構築することとした。

B. 研究方法

我々が開発したヒト iPS 細胞からの血球分化系(Niwa et al., PLOS one, 2011)を応用して、この系から単球を樹立することを試みた。

(倫理面での配慮)

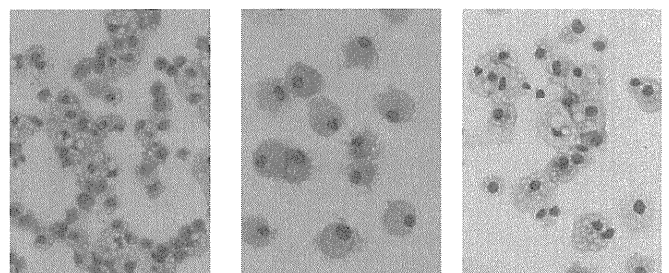
本研究では個人情報情報の付帯したヒト由来試料の取り扱いはない。組み替え遺伝子指針、ヒト ES 指針に則って実験計画を提出

し、それを遵守して研究を行っている。

C. 研究結果

サイトカインの種類とタイミングを調節することにより、複数の iPS 細胞株から安定して単球を誘導する系を確立することに成功した。この系は Feeder 細胞と血清に依存せず安定した収量の単球を得ることができることから、多数の患者由来の単球を扱う疾患解析に好適であると考えられた。

ヒトiPS細胞から誘導した  
単球系細胞



単球

樹状細胞

マクロファージ

分化した単球は、CD14 陽性で炎症性サイトカインを産生し、ケモアトラクタントに対する遊走能を示した。OVA 抗原取り込み能も保持していた。

また、この単球を樹状細胞・マクロファージへ分化させることができた。分化させ

た樹状細胞は、成熟に伴って Naïve T 細胞への抗原提示能が亢進したため、機能的にも成熟しているものと考えられた。

#### D. 考察と今後の展望

以上のように患者特異的 iPS 細胞の解析に有用な単球系細胞の分化系の構築に成功した。

次年度は、慢性関節リウマチ患者さんから iPS 細胞を樹立し、この系を用いて解析を進めていきたい。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. Morishima T., Watanabe K., Niwa A., Fujino H., Matsubara H., Adachi S., Suemori H., Nakahata T., Heike T.: Neutrophil differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *J. Cell. Physiol.* 226(5):1283-1291,2011.
2. Heike T., Saito M., Nishikomori R., Yasumi T., Nakahata T.: Autoinflammatory diseases-a new entity of inflammation. *Inflammation and Regeneration* 31:125-136, 2011.
3. Kamio T., Ito E., Ohara A., Kosaka Y., Tsuchida M., Yagasaki H., Mugishima H., Yabe H., Morimoto A., Ohga S., Muramatsu H., Hama A., Kaneko T., Nagasawa M., Kikuta A., Osugi Y., Bessho F., Nakahata T., Tsukimoto I., Kojima S.: Relapse of aplastic anemia in children after immunosuppressive therapy: a report from the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. *Haematologica* 96: 814-819, 2011.
4. Yoshida N., Yagasaki H., Hama A., Takahashi Y., Kosaka Y., Kobayashi R., Yabe H., Kaneko T., Tsuchida M.,

Ohara A., Nakahata T., Kojima S.: Predicting response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica* 96: 771-774, 2011.

5. Kawagoe S., Higuchi T., Xing-Li M., Shimada Y., Dhimizu H., Fukuda T., Chang H., Nakahata T., Fukada S., Ida H., Ohashi T., Eto Y.: Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells derived from a murine model of Pompe disease and differentiation of Pompe-iPS cells into skeletal muscle cells. *Mol. Genet. Metab.* 104: 123-128, 2011.
6. Niwa A., Heike T., Umeda K., Oshima K., Kato I., Sakai H., Suemori H., Nakahata T., Saito M.: A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. *PloS ONE* 2011;6(7):e22261.
7. Murata Y., Yasumi T., Shirakawa R., Izawa K., Sakai H., Abe J., Tanaka N., Kawai T., Oshima K., Saito M., Nishikomori R., Ohara O., Ishii E., Nakahata T., Horiuchi H., Heike T.: Rapid diagnosis of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3 (FHL3) by flow cytometric detection of intraplatelet Munc 13-4 protein. *Blood* 118: 1225-1230, 2011.
8. Tanaka N., Nishikomori R., Saito M., Izawa K., Sakuma M., Morimoto T., Kambe N., Watanabe S., Oshima K., Ohara O., Goldbach-Mansky R., Aksentijevich I., Arostegui J.I., Yague Jm Joost F., van Gijn M.E., Saint-Basile G., Pontillo A., Kawai T., Yasumi T., Nakahata T., Horiuchi H., Heike T.: High

incidence of NLRP3 somatic mosaicism in chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome patients; the results of an international multicenter collaborative study. *Arthritis Rheum.* 63:3625-3632,2011.

9. 中畑龍俊:小児医療をめぐる最先端医学 iPS 細胞を用いた今後の医療. (特集 小児医療の最先端—これからの新たな展望— 東京小児科医会報 29(3): 26-33, 2011.
10. 中畑龍俊:V 分子生物学的方法論と新領域、24 再生医療.『第3版 分子生物学』田沼靖一編著、丸善出版 2010.
11. 中畑龍俊: iPS 細胞の臨床応用の展望. *BIO Clinica* 26(9):16-17, 2011.
12. 中畑龍俊:疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子治療・個別化医療. *小児科* 52 (12) 1743-1749, 2011.

F. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

発明の名称: 多能性幹細胞から樹状細胞への分化誘導法

出願日: 2011/2/23

出願番号: 61/445,856

出願国: 米国

発明者: 中畑龍俊/斎藤潤/丹羽明/柳町昌克

備考: 樹状細胞の分化誘導方法

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

## 関節リウマチにおける軟骨・滑膜の病態と細胞間相互作用の解析

研究分担者 吉川秀樹 大阪大学大学院医学系研究科 教授  
研究協力者 中田 研 大阪大学大学院医学系研究科 講師

### 研究要旨

関節リウマチの罹患組織である関節を構成する骨・軟骨・滑膜の力学負荷に対する生体応答を解明することは、RA における病態，治療ターゲットを考える上で重要と考える。本研究では、RA 患者関節組織由来の細胞より確立した三次元培養組織に力学刺激環境下における細胞応答を、正常関節組織と比較検討することを目的に研究を行った。三次元力学刺激培養システムにて、ヒト滑膜細胞より作成した三次元組織に、繰返し力学刺激（0.5Hz, 40kPa, 1時間）を与え、6時間後に遺伝子発現，蛋白発現を解析すると、IL-6, IL-8, PGE2, MMP-1, MMP-2, MMP-3, ADAMTS-4 のマトリックス分解酵素の遺伝子，蛋白の発現亢進を認めた。以上より，関節に加わる力学負荷が，関節炎の発症や関節破壊を引き起こすことが示された。今後，メカノシグナルトランスダクションの解明。および，リウマチ患者の滑膜組織，または，リウマチ患者由来の iPS 細胞などを用いて，三次元力学負荷による疾患での関節炎症，関節破壊のしくみについて明らかにする。

### A. 研究目的

関節リウマチの罹患組織である関節を構成する骨・軟骨・滑膜の力学負荷に対する生体応答を解明することは、RA における病態，治療ターゲットを考える上で重要と考える。本研究では、RA 患者関節組織由来の細胞より確立した三次元培養組織に力学刺激環境下における細胞応答を、正常関節組織と比較検討することを目的とした。

### B. 研究方法

1. 三次元培養組織を作製するための力学的強度のある細胞担体をアテロコラーゲンを凍結乾燥し、架橋構造を導入した連通孔をもつ三次元コラーゲン細胞担体を作製した。
2. 三次元力学刺激培養システム (3D dynamic culture system) を構築した。

3. ヒト滑膜細胞をアテロコラーゲンゲルと混和、コラーゲンスキャフォールドへ播種し三次元培養組織を作製した。三次元培養組織の力学刺激応答をマトリックス分解酵素，炎症性サイトカイン (PGE2, IL-6, IL-8) の発現につき，解析した。

さらに、三次元培養組織へ COX-2 選択的阻害剤存在または非存在下に繰返し力学刺激負荷 (40kPa, 0.5Hz, 1時間) を加え、負荷 6 時間後の培養上清中 PGE2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  濃度，組織内の p38 のリン酸化、COX-2 タンパク発現を測定した。次に IL-1 レセプターアンタゴニスト (IL-1Ra) 存在下に繰返し力学刺激負荷あるいは IL-1 $\beta$  (10ng/ml) 投与をおこない、刺激 6 時間後の PGE2 濃度を測定した。

(倫理面への配慮)



ヒト組織の採取にあたっては、院内倫理委員会の承認のもと、患者より事前に説明し、文書による同意を得て、研究を遂行した。

### C. 研究結果

24well, 96well での三次元培養組織に繰返し周期、荷重量をコントロールして鉛直荷重または専断応力を繰返し負荷できる培養システムである 3D dynamic culture system を構築した。本システムを用いて、0.1Hz-2Hz, 0-40kPa, ひずみ率 0-25% の繰返し力学刺激培養を 28 日間可能となった。

ヒト滑膜細胞, 半月板細胞, 骨芽細胞株 (MC3T3), 軟骨細胞株 (ATDC5) からなる三次元培養組織繰返し力学負荷により IL-6, IL-8, PGE2 の発現上昇を認めた。力学負荷により p38 リン酸化が亢進し, COX-2 タンパクの発現を認めた。また, 力学負荷により MMP-1, MMP-2, MMP-3, ADAMTS-4 のマトリックス分解酵素の遺伝子発現の亢進を認めた。COX-2 阻害剤 (100nM 以上) 存在下では力学負荷による PGE2 濃度上昇は抑制された。IL-1Ra 存在下 (1mM) では、力学負荷および IL-1 $\beta$  刺激による PGE2 濃度上昇は抑制された。

繰返し力学負荷により PGE2 の有意な濃度上昇を認めたが IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  は濃度上昇を認めなかった。培養組織では力学負荷により p38 のリン酸化を亢進、COX-2 タンパクの発現がみられた。COX-2 阻害剤 (100nM 以上) 存在下では力学負荷による PGE2 濃度上昇は抑制された。IL-1Ra 存在下 (1mM) では、力学負荷および IL-1 $\beta$  刺激による PGE2 濃度上昇は抑制された。

### D. 考察

関節組織を厚生する骨・軟骨・滑膜などの細胞より三次元培養組織を作製し、力学刺激培養をおこなうことで、生体内の力学負荷環

境を近似した培養を行うことが可能となった。ヒト滑膜細胞由来三次元培養組織では、繰返し力学負荷によりマトリックス分解、炎症性サイトカイン発現など生体内細胞応答を解析する培養システムが構築され、力学負荷による発現遺伝子解析、メカノシグナルトランスダクションの解明が可能となった。三次元培養組織への力学負荷は COX-2 を介した PGE2 産生を誘導したが、従来重要とされた IL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  の上昇を認めなかった。さらに IL-1Ra 存在下に PGE2 の産生が抑制された事は、力学負荷によるシグナル伝達が、リガンド非存在下に IL-1R シグナルを介する可能性を示唆している。これらの結果は力学負荷による関節破壊のメカニズムの解明につながると考えられる。

### E. 結論

三次元力学負荷は IL-6, IL-8 の発現, COX-2 を介した PGE2 産生を誘導し, さらにマトリックス分解酵素 (MMP-1, MMP-2, MMP-3, ADAMTS-4 など) の発現を誘導した。この三次元力学刺激培養システムを用いた, 力学応答の分子レベルでの解析は, 関節疾患における運動負荷下の関節炎, 関節破壊のメカニズムの解明, および, 治療法の開発の新たなツールとなり, 従来の研究方法では明らかにできない, 分子メカニズム, 治療法の解明につながると考えられる。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Tao, H., Okamoto, M., Nishikawa, M., Yoshikawa, H., Myoui, A.: P38

- |  |                                   |
|--|-----------------------------------|
| mitogen-activated protein kinase inhibitor, FR167653, inhibits parathyroid hormone related protein-induced osteoclastogenesis and bone resorption. PLoS One, 6:e23199, 2011.   | 1. 特許取得<br>強度のある細胞担体 2011.12 特許取得 |
| 2. Akamine Y, Muroi Y, Nakata K, Kakudo K. Cyclic mechanical loading to human synovial cells in three-dimensional cultured tissue up-regulates inflammatory cytokines and matrix metalloproteinases Int J of Oral Maxillofac Surg PMID:22264498 2012 | 2. 実用新案登録<br>なし                   |
|  | 3. その他<br>なし                      |

## 2. 学会発表

1. 下村和範 1、北圭介 1、金本隆司 2、中村憲正 3,4、前達雄 1、松尾知彦 1、赤峯勇哲 5、太田啓介 1,5、金銅真世 1,5、宮本諭 1、吉川秀樹 1、中田研 1 ヒト滑膜細胞は、力学負荷により IL-1 レセプターシグナル、COX-2 を介するメカノトランスダクションによりプロスタグランジンE2を産生する 第26回日本整形外科学会基礎学術集会 2011
2. 北圭介, 下村和範, 松尾知彦, 前達雄, 太田圭介, 金銅真世, 宮本諭, 吉川秀樹, 中田研 三次元モデルによる軟骨修復 第39回日本関節病学会 2011
3. Shimomura, K; 1Kita, K; 1Kanamoto, T; 2Nakamura, N; 1Mae, T; 1Yoshikawa, H; 1Nakata, K Prostaglandin E2 up-regulation by cyclic compressive loading on 3-D tissue of human synovial fibroblasts via COX-2 and IL-1 receptor signal pathway Orthopaedic Research Society 2012 Annual Meeting San Francisco 2012

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

## 肺線維化モデル動物を用いた間葉系細胞活性化に関する研究

研究分担者 松尾 光一 慶應義塾大学医学部医学研究科 教授

### 研究要旨

関節リウマチにおいては、骨における炎症と骨・軟骨の恒常性維持の破綻が問題となる。本研究では、骨における炎症応答と骨リモデリング異常を示す Fra-1 トランスジェニックマウスを材料に、全身の間葉系細胞の活性化を解析し、骨髄内の細胞相互作用を含めて骨モデリング・リモデリング破綻のメカニズムを明らかにすることを目指す。まず、骨芽細胞と肺の間質における線維芽細胞に着目し、骨芽細胞増殖による過剰骨形成と、肺線維芽細胞増殖による肺線維症との共通の分子機構があるのではないかという仮説を立て、Fra-1 トランスジェニックマウスの肺線維化を解析した。その結果、抗がん剤や Toll 様受容体リガンドの存在下で、野生型マウスでも Fra-1 の転写を介して肺線維化が進むことが明らかとなり、転写因子 Fra-1 が骨芽細胞だけでなく、肺線維芽細胞の間葉系細胞活性化因子として働くことが示された。

### A. 研究目的

関節リウマチは、炎症性の疾患であり、骨形成は通常抑制されている。Fra-1 は AP-1 ファミリーの転写因子であり、骨芽細胞の増生を特徴とする Fra-1 トランスジェニックマウス（以下、Fra-1 マウス）では、炎症応答が抑制されている (Yamaguchi et al 2009, J. Bone Miner. Res; Takada et al, 2010, J Immunol)。つまり、炎症と骨形成とは逆相関の関係にあると考えられた。Fra-1 マウスでは、骨髄腔が埋まるほどの骨形成亢進をきたすことが知られており、骨髄における破骨細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞などの細胞間相互作用の異常が疑われるものの、骨リモデリング異常に関しては、その分子機構が不明である。われわれは、Fra-1 マウスでは、骨芽細胞増殖だけでなく、肺における線維芽細胞の増殖が亢進していることを見出した。そこで、「骨芽細胞増殖による骨形成促進と、肺線維芽細胞増殖による肺線維症との共通の分子機構があるのではないか」という仮説を立てた。野生型マウスに非小細胞肺癌の治療に用いられる上皮成長因子受容体 (EGFR) の阻害剤ゲフィチニブを前投与した上で Toll 様受容体リガンドを投与すると、転写因子 Fra-1 の発現上昇を介して

間質性肺炎が誘導された (Takada et al, 2011, Oncogene)。さらに、この転写因子 Fra-1 がどのように肺や骨において間葉系細胞の活性化を引き起こしているのかを解明するために、非小細胞肺癌の治療に用いられる複数の EGFR 阻害剤について、Fra-1 とその標的遺伝子群であるサイトカインとケモカインの発現変動を比較し、肺の線維化を亢進させるかどうかを検討した。

### B. 研究方法

Fra-1 マウスに Toll 様受容体リガンドとしてリポ多糖体 (LPS) を腹腔内投与し、骨、肺を含む全身の臓器を組織学的に解析した。同様に、野生型マウスにも LPS などを腹腔内に投与し肺の組織学的解析を行った。ゲフィチニブを経口で前投与した上で、LPS その他の Toll 様受容体リガンド、特に内因性リガンドを投与した。また、担癌マウスを作製し、抗がん剤を投与した上で LPS を投与した。機能喪失実験には、Fra-1 コンディショナルノックアウトマウスを用いた。肺組織における、種々のサイトカインとケモカインの発現を定量 RT-PCR で測定した。また、肺がん患者の肺胞洗浄液中のサイトカインやケモカインを

ELISA 法により定量した。マウスの骨髄細胞より調製したマクロファージ・コロニー刺激因子依存的なマクロファージを、ゲフィチニブ、エルロチニブ、AG1517 のいずれかと共に Toll 様受容体リガンドで刺激し、*Tnfa* (TNF- $\alpha$ ), *Ccl2* (MCP-1), *Fos11* (Fra-1) の遺伝子発現を定量 PCR により比較した。同様に、マウスにおけるブレオマイシン投与による肺損傷のモデルにおいて、ゲフィチニブ、エルロチニブを投与し、肺における上記 3 遺伝子の発現を定量した。なお、動物実験と臨床検体を用いた実験に関しては、学内の委員会承認、を得ておこなった。

### C. 研究結果

Fra-1 を過剰に発現する Fra-1 マウスでは、全身で TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインの産生が低下していた。それにもかかわらず、LPS 刺激後に、間質性肺炎を起こし、マクロファージの集積が認められ、また肺線維芽細胞の増殖も観察された。MCP-1 (CCL2) など、いくつかのケモカインの発現が高かった。野生型マウスにおいても、LPS に加えて、ゲフィチニブの前投与により、間質性肺炎が引き起こされ、それは Fra-1 を介していることが、Fra-1 ノックアウトマウスでは間質性肺炎が起こらないことから示された。つまり、ゲフィチニブは、Toll 様受容体リガンドの存在下で、Fra-1 を活性化することにより、間質性肺炎を起こすことが分かった。

LPS は細菌の菌体成分であり、肺がん患者で細菌性の肺炎が起こることは例外的であることから、LPS ではなく、内因性の Toll 様受容体リガンドが働くことがよそくされる。実際、腫瘍細胞をマウスに移植し、抗がん剤

(gemcitabine) を投与したところ、ゲフィチニブとの組み合わせで間質性肺炎を増悪することが分かった。

また、肺がん患者の肺胞洗浄液に MCP-1 の量がゲフィチニブ投与後に増加していた。

マウス由来の細胞を用いた培養系において

調べた 3 つの EGFR 阻害剤のうち、Fra-1 の発現を活性化したのはゲフィチニブだけであった。TNF- $\alpha$  の発現抑制と MCP-1 の発現亢進もゲフィチニブだけで認められた。ブレオマイシンを投与したマウスを用いた実験では、ゲフィチニブとエルロチニブの両方が MCP-1 の発現を誘導したが、Fra-1 の発現を誘導したのはゲフィチニブだけであった。

### D. 考察

以上の結果は、当初の予想を超えて、転写因子 Fra-1 による活性化機構が、骨芽細胞に限らず肺線維芽細胞においても働くことを示している。

Fra-1 マウスは骨折後や腸炎誘導後にも炎症が起こりにくいことを以前に報告したが (Yamaguchi et al 2009, J. Bone Miner. Res; Takada et al, 2010, J Immunol)、LPS 投与による肺損傷においてもやはり、炎症性サイトカインの産生が低かったことで、Fra-1 による炎症抑制が臓器や細胞種を超えて本質的なものであることが明らかになってきた。

本研究ではじめて、Fra-1 は MCP-1 など、一部のケモカインの活性化を起こすことが明らかになった。これは、間質性肺炎の発症機序に一部を説明するものである。一方、本研究の結果は、これまで間質性肺炎や肺線維症を起こす機序が不明であったゲフィチニブの標的分子が、EGFR 以外のものであることを示唆している。ゲフィチニブ特異的な標的遺伝子がどのように Fra-1 を活性化するかは不明である。最近、cyclin-G-associated kinase や heat shock protein 70 などがゲフィチニブの標的分子として報告されたが、これらの分子にゲフィチニブ以外の EGFR 阻害剤が結合するかどうかは不明である。

骨における骨芽細胞増生の分子機構と肺における線維芽細胞増殖の分子機構にどのような本質的な共通点があるかについては今後の課題であるが、肺における間葉系細胞を中心とする細胞間相互作用と、骨や骨髄における骨芽細胞を中心とする細胞間相互作用とを比