

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許取得

- ・ 2011-138935 ・ 荷重感知遺伝子

2. 実用新案登録

3. その他

肺線維化モデル動物を用いた骨形成活性化・骨吸収抑制の制御法の開発

研究分担者 慶應義塾大学医学部 松尾光一 (教授)

研究要旨

関節リウマチにおいては、全身性の炎症と骨・軟骨の破壊を制御する必要がある。本研究では、骨における炎症応答低下、骨形成亢進を示す Fra-1 トランスジェニックマウス (Fra-1 マウス) を材料に、間葉系細胞の活性化と破骨細胞の機能抑制を追究した。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 マウスの骨芽細胞と肺線維化を解析した。予期せぬことに、複数の EGFR 阻害剤のうち gefitinib については、Toll 様受容体リガンドと併用してマウスに投与すると、Fra-1 の転写を介して肺線維化が急激に進むことが明らかとなった。つまり、骨芽細胞活性化因子として知られる転写因子 Fra-1 が、ケモカイン (MCP-1) を介して、単球・マクロファージを活性化することを見出した。一方、Fra-1 マウスでは、破骨細胞抑制因子である osteoprotegerin (OPG) の血中濃度が、Toll 様受容体リガンドの存在下で有意に増加したことから、「内在性 OPG の産生誘導により骨吸収を抑制する」方法を開発する基盤として、産生誘導因子の解析と、産生する臓器・組織を探索した。

A. 研究目的

関節リウマチは、炎症性の疾患であり、骨芽細胞による骨形成は通常抑制され、破骨細胞による骨・軟骨の破壊が亢進している。Fra-1 は Fos ファミリーの転写因子であり、Jun ファミリーの転写因子と 2 量体を形成し、転写因子 AP-1 として、標的遺伝子の転写調節領域に結合する。

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る。

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、骨の増生に関しては、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。その分子機構を明らかにすることを最初の目的とした。

炎症性サイトカインの作用を抑制する生物製剤が関節リウマチの治療に用いられている一方、破骨細胞による骨吸収が起こらないマウスモデルでは、炎症存在下でも関節の骨破壊が起こらないことが分かっている。つまり RANKL を標的とする治療法は有効であると示唆される。関節リウマチでは、破骨細胞

分化を抑制する osteoprotegerin (OPG) の発現が低下し、TNF- α などの破骨細胞分化を促進する炎症性サイトカインの産生が上昇すると考えられている。我々は以前に、リポ多糖体 (LPS) などの Toll 様受容体のリガンドをマウスの腹腔内に投与すると、炎症時に伴い OPG 分泌を高めるメカニズムが働き出すことを報告した (Maruyama et al, 2006, J. Immunol.)。そこで、OPG 産生誘導のメカニズムを理解し、骨破壊の抑制につなげることを二番目の目標にした。

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) などを腹腔内投与し、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。gefitinib 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。マウスの骨髓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、gefitinib、erlotinib、AG1517 のいずれかと共に Toll 様受容体リガンドで刺激し、*Tnfa* (TNF- α), *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 bleomycin 投与による肺損傷のモデルにおいて、gefitinib、erlotinib を投与し、肺における上記 3 遺伝子の発現を定量した。

LPS (1 μ g/g 体重) を、野生型マウス (C57BL/6J) の腹腔内に投与した。LPS 投与後の OPG の産生臓器・細胞を特定するために、LPS 曝露の有無で、OPG の血中濃度と様々な臓器中のタンパク質濃度を ELISA キット

(R&D)によって、遺伝子発現量は定量 RT-PCR によって測定した。さらに、パラフィン切片を用いて抗 OPG 抗体による免疫染色を行い、OPG 産生細胞を検索した。

(倫理面への配慮)

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。マウスを用いた動物実験に関しては、慶應義塾動物実験委員会の承認を得た動物実験計画に従って行った (承認番号: 09208、09221)。

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- α 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 gefitinib 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。つまり、野生型マウスにおいても、LPS に加えて、gefitinib 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 (Takada et al, 2011, Oncogene)。ヒトにおいても、gefitinib が同じような Fra-1 を介した分子機構で間質性肺炎を起こすかどうかは、明らかでない。

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。

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予測される。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、gefitinib 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 gefitinib 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ものは gefitinib だけであった。TNF- α の発現抑制と MCP-1 の発現亢進も gefitinib だけで認められた。bleomycin を投与したマウスを用いた実験では、gefitinib と erlotinib 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 gefitinib だけであった。

病原微生物 (グラム陰性菌のサルモネラ、グラム陽性菌のブドウ球菌、結核菌、インフルエンザウイルス) を感染させたマウスで血中の OPG 濃度が上昇すること、サルモネラワクチン株を感染させたマウスでは、OPG 濃度上昇に伴い骨量が増加することを見出し、さらに樹状細胞、好中球、リンパ節の内皮細胞、脂肪細胞なども LPS に応答して OPG を産生する細胞であることが示唆された。

次に、自然免疫系の惹起によって OPG を内分泌する臓器は不明のままであったので、マウスに LPS を投与する実験系で、OPG 産生誘導のメカニズムについて詳細に解析した。

LPS 投与後に、血中 OPG 濃度が上昇することを確認した上で、以下の実験を行った。刺激前の PBS 投与の対照マウスでは、胸腺の OPG (質量/組織総タンパク質量) が最も高かった。LPS 投与・非投与の OPG 比が ELISA 法で最も安定的に高かったのは肝臓で、臓器のサイズからも主要な OPG 分泌臓器であると考えられた。パラフィン切片の組織染色により、LPS 投与後に、肝臓の中心静脈周囲が濃染し、小葉間の「三つ組み」(動脈、肝門脈、胆管) 周囲は染色されなかった。OPG 欠損マウスの対照では染色されず、PBS 投与でもきわめて

染色は薄かった。OPG 質量/組織総タンパク質量が比較的高い、肺や甲状腺では、LPS による明確で再現性のある発現上昇は観察されていない。

D. 考察

以上の結果は、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。

ところが、本研究で初めて、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の一部を説明するものである。しかも、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 gefitinib の標的分子が、EGFR 以外のものであることを示唆している。gefitinib 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 gefitinib の標的分子として報告されたが、これらの分子に gefitinib 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較していくことにより、これまで知られていなかった骨・軟骨における間葉系幹細胞の活性化機構が解明されていくものと期待される。

本研究で、自然免疫を活性化すると肝細胞

での OPG 発現が上昇し、中心静脈へ分泌されることが示唆された。LPS により OPG が増加しない臓器でも、増加分がすべて血中に放出されている可能性は否定できない。また、肝細胞における TLR の直接刺激により OPG が産生されるのか、TNF- α などの炎症性サイトカインによる間接的な刺激が肝細胞に入るのかは不明である。

肝実質細胞やクッパー細胞は、自然免疫賦活化により、血中 OPG 濃度を上昇させる主要な細胞であることが示唆された。OPG の内分泌を促進する分子機構の理解と制御により、骨粗鬆症における骨量減少や、関節リウマチなどの全身性の炎症疾患において骨破壊を阻止できる可能性がある。

E. 結論

転写因子 Fra-1 は、骨芽細胞だけでなく、肺線維芽細胞のような、間葉系細胞の活性化にも寄与していた。Fra-1 は、TNF- α などの炎症性サイトカインの産生を抑制するが、少なくとも肺においては、MCP-1 などの一部のケモカインの発現を誘導してマクロファージの遊走を促していた。Gefitinib は Fra-1 の転写を活性化する場合がある。また、破骨細胞阻害因子 OPG は、病原体関連分子パターンにより発現誘導がかかり、血中濃度が上昇する。このメカニズムを利用して、OPG の誘導法を開発できれば治療に結びつく可能性がある。

F. 健康危険情報

gefitinib や erlotinib などの EGFR 阻害剤のうち gefitinib は、EGFR 以外の標的に対する「特異的なオフターゲット効果」によって Fra-1 を活性化し、間質性肺炎や肺線維症を引き起こしている可能性がある (Takada et al, 2011; Takada and Matsuo, 2012)。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yasunari Takada, Lionel Gresh, Aline Bozec, Eiji Ikeda, Kazunori Kamiya, Masazumi

Watanabe, Koichi Kobayashi, Koichiro Asano, Yoshiaki Toyama, Erwin F. Wagner, Koichi Matsuo. (2011) Interstitial lung disease induced by gefitinib and Toll-like receptor ligands is mediated by Fra-1. *Oncogene* 30, 3821-3832.

2. Takada Y, Matsuo, K. Gefitinib, but not erlotinib, is a possible inducer of Fra-1-mediated interstitial lung disease. *Keio J. Med.* 61, 120-127

3. 松尾光一. 骨の破壊と再生. 臨床検査. 医学書院 (東京) 2011, 55, 1497-1502.

4. 松尾光一. 骨免疫から見た老化制御 *Clin Calcium*. 医薬ジャーナル(大阪)2013, 23, 59-64.

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

破骨細胞における Stat5 の機能に関する研究

研究分担者 田中 栄 東京大学医学部整形外科 (教授)
研究協力者 廣瀬 旬 東京大学医学部整形外科 (大学院生)

研究要旨

破骨細胞分化・生存・機能における Stat5 の機能を in vivo、in vitro の両面から解析した。破骨細胞特異的 Stat5 ノックアウトマウスは骨の粗鬆化を呈し、骨吸収の亢進を認めた。in vitro の破骨細胞培養においては Stat5 のノックアウトにより破骨細胞の分化および生存に変化はみられなかったが、骨吸収活性の亢進がみられた。破骨細胞内の主要シグナルでは MAPK、中でも特に Erk の活性が亢進していた。DNA microarray を行い、MAPK の活性を調節している Stat5 の下流分子として Dusp1 および Dusp2 を同定した。さらに、破骨細胞において Stat5 の活性化を誘導する因子として IL-3 を同定した。IL-3 刺激により Stat5 が活性化されて Dusp1 および Dusp2 の発現が上昇し、これらによる MAPK、特に Erk 活性の抑制が破骨細胞の骨吸収活性を負に制御している可能性が示唆された。さらに、破骨細胞を RANKL にて刺激することによって破骨細胞内における IL-3 の発現の誘導がみられ、IL-3 が RANKL による骨吸収活性亢進に negative feedback をかけている可能性も考えられた。

A. 研究目的

近年、日本では社会高齢化が急速に進行しており、平均寿命は世界でもトップクラスとなっている。しかしそれに伴い、寝たきりなどの要介護者の増加、およびそれに伴う医療コストの増大が社会問題となっており、いかに健康で自立した状態を保てるか、いわゆる健康寿命を延ばすことが課題となっている。骨折はこの寝たきりになる原因として上位に挙げられるが、高齢者の骨折の多くが骨粗鬆症を背景として軽微な外傷で生じるものである。それゆえ、骨粗鬆症の治療および骨折予防は高齢化社会の一つの大きな課題と考えられる。

骨は主に破骨細胞が担う骨吸収と骨芽細胞が担う骨形成を繰り返すこと、いわゆるリモデリングにより維持されている。この骨吸収と骨形成のアンバランスが骨粗鬆症や大理石骨病の原因となる。破骨細胞は生体内で

唯一の吸収能を有する多核巨細胞であり、単球・マクローファージ系の前駆細胞にマクローファージコロニー刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor、M-CSF) および RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) が作用することにより分化することが知られている。近年、破骨細胞に関連する遺伝子やサイトカインを標的とした研究や治療が推し進められており、実際にこのような因子が少しずつ同定されている。それらの中には疾患治療の標的として臨床試験が行われているものもあり、注目を集めている。しかしながら、いまだ破骨細胞の分化メカニズムにも不明な部分は多く、活性化メカニズムに至ってはほとんど解明されていないと言っても過言ではない。

Stat (Signal transducers and activators of transcription) は様々なサイトカインや成長因子の刺激を細胞内に伝達し、下流分子の転

写を促進あるいは抑制する転写因子である。このStatの中でもStat5は体中の多くの組織で発現し、非常に多彩なサイトカインや成長因子によって活性化することが知られている。特に血球系の細胞においてStat5は様々な機能を果たしていることが明らかになっている。例えばStat5のノックアウトマウスにおいては、T細胞、B細胞、NK細胞の分化に障害が起こることが報告されている。また、古くはキメラ遺伝子であるBCR-ABLにより発症するCML（慢性骨髄性白血病）においてStat5が活性化していることが知られていたが、最近ではAML（急性骨髄性白血病）やALL（急性リンパ性白血病）患者の芽球においても活性化したStat5が見られたとの報告がある。しかし、血球系の細胞である破骨細胞における機能についてはこれまでに報告がない。

本研究においては血球系由来の破骨細胞においてStat5がその分化・生存・機能に関わっているのではないかと考え、破骨細胞におけるStat5の機能についての解析を行うこととした。

B. 研究方法

*Stat5a*および*Stat5b*の遺伝子をloxP配列で挟み込んだ*Stat5^{fl/fl}*マウスとCathepsin Kのプロモーター領域にCreリコンビナーゼ遺伝子をノックインさせたCathepsin K-Creノックインマウスを交配させることにより、破骨細胞特異的Stat5ノックアウトマウス(*Stat5* cKOマウス)を作成し、その表現型を解析した。具体的には画像的にはX線写真や骨密度測定、マイクロCTの撮影などを行い骨量の評価を行った。また、8週齢の*Stat5^{fl/fl}*マウスと*Stat5* cKOマウスより採取した脛骨の非脱灰標本を作成して骨形態計測を行った。静的パラメーターとして、BV/TV; Bone volume per tissue volume、Tb.N; Trabecular number、Tb.Th; Trabecular thickness、Tb.Sp; Trabecular separation、ES/BS; Erosive surface per bone surface、OC.S/BS; Osteoclast surface per bone surface、N.Oc/B.Pm; Number of osteoclasts per 100 mm of bone perimeter、Ob.S/BS; Osteoblast surface per bone surfaceを計測した。また、骨形成の

動的パラメーターであるBFR/BS; Bone formation rate per bone surface、MAR; Mineral apposition rateを計測した。マウスより採血を行い、骨吸収マーカーであるCTx-Iおよび骨形成マーカーであるOsteocalcinを測定した。

in vitroにおいてはまずStat5のノックアウトが破骨細胞の分化に与える影響を調べるため、Stat5ノックアウトマウスおよびコントロールマウスの長管骨から骨髓細胞を採取し、M-CSF 100 ng/mlで2日間培養後、M-CSF 10 ng/mlおよびRANKL 100 ng/mlの存在下に2-4日培養を行い成熟破骨細胞へと分化させた。破骨細胞の生存および骨吸収能を調べるためには、共存培養を行った。マウスの長管骨より採取した骨髓細胞を、コラーゲンゲルコートした培養ディッシュ上でマウス初代骨芽細胞とともに培養することで破骨細胞へと分化を促し、破骨細胞が成熟したのちにコラーゲンゲル基質を溶解させることで破骨細胞を遊離して各々の実験に用いる培養ディッシュに分注した。骨芽細胞を除去した後に時間経過を追って生存率を調べることにより、破骨細胞の生存能に対する影響を調べた。また、象牙質切片上で24時間破骨細胞を培養の後、骨吸収窩を染色することによって骨吸収の程度を評価し、破骨細胞の骨吸収活性に与える影響を調べた。

Stat5が破骨細胞の骨吸収活性を調節するメカニズムを調べるため、Stat5ノックアウト破骨細胞およびコントロール細胞より採取したタンパクを用いてウエスタンブロッティングを行い、破骨細胞内の主要シグナルについて、活性化の状態を調べた。さらに、DNA microarrayを用い、Stat5のノックアウトにより発現に増減のある遺伝子を網羅的に調べた。また、破骨細胞においてStat5を活性化させる因子を同定するため、他の細胞でStat5を活性化させることが知られている各種のサイトカインによる破骨細胞刺激後のStat5リン酸化を調べた。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は「動物の保護及び管理に関

する法律」、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準（総理府告示）」、「東京大学医学部動物実験指針」に従って行った。

C. 研究結果

1 年齢マウスの下肢および脊椎のレントゲン写真を比較すると、*Stat5* cKO マウスでは下肢の骨幹端部、脊椎において骨陰影の低下がみられた。また、*Stat5* cKO マウスでは *Stat5^{fl/fl}* マウスと比較して脛骨近位、腰椎において有意に骨密度が低下していた。1 年齢マウスの大腿骨遠位マイクロ CTにおいて、*Stat5* cKO マウスでは著明に骨量が減少していた。マイクロ CT 画像を定量的に解析したところ、*Stat5* cKO マウスにおいて単位骨量 (BV/TV) および骨梁数 (Tb.N) が *Stat5^{fl/fl}* マウスと比較して有意に減少、骨梁間距離 (Tb.Sp) は有意に増加していた。骨梁幅 (Tb.Th) に有意差はみられなかった。これらは *Stat5* cKO マウスにおける骨量の減少を裏付ける結果であった。8 週齢マウスの脛骨近位部組織の骨形態計測を行ったところ、*Stat5* cKO マウスにおいて単位骨量 (BV/TV) の減少、骨吸収の指標となる eroded surface / bone surface ratio (ES/BS) の有意な増加がみられたが、破骨細胞数 (Oc.N/B.Pm) および破骨細胞面 (Oc.S/BS) に有意な差はみられなかった。骨形成パラメーター (MAR, BFR/BS) についても有意な差はみられなかった。CTx-I および骨形成マーカーである osteocalcin の血清中濃度を測定したところ、CTx-I は *Stat5* cKO マウスにおいて *Stat5^{fl/fl}* マウスと比較して有意に濃度が上昇していたが、osteocalcin 濃度には有意差がみられなかった。これらの結果により、*Stat5* cKO マウスが破骨細胞の骨吸収活性亢進によって骨量減少を示すことが明らかとなった。

in vitro にて破骨細胞分化における *Stat5* の作用を明らかとするため、*Stat5* cKO マウスおよびコントロールマウスより採取した細胞に RANKL を添加して破骨細胞分化を誘導し、TRAP 染色での破骨細胞のカウント

および破骨細胞分化マーカーの real-time PCR にて破骨細胞分化を評価したところ、両者に差は見られなかった。また、*Stat5* cKO マウスおよびコントロールマウスより採取した骨髄細胞を用いて骨芽細胞との共存培養を行い、破骨細胞に分化させた。これら破骨細胞につき、骨芽細胞をはがした後に時間経過を追って生存率を計測したところ、両者に有意な差はみられなかった。以上より、*Stat5* は破骨細胞分化および生存能に対して重要ではないと考えられた。*Stat5^{fl/fl}* マウスおよび *Stat5* cKO マウスから採取した骨髄細胞から共存培養により分化させた破骨細胞の骨吸収活性を pit formation assay により評価したところ、*Stat5* ノックアウト破骨細胞では骨吸収活性が有意に亢進していた。*Stat5* ノックアウト破骨細胞にアデノウイルスベクターを用いて *Stat5a* および *Stat5b* を強制発現させたところ、*Stat5* のノックアウトにより亢進した骨吸収活性は *Stat5a* および *Stat5b* の導入により回復した。以上の結果から in vitro において *Stat5* が破骨細胞の骨吸収活性を負に制御していることが明らかとなった。

Stat5 ノックアウト破骨細胞における骨吸収活性亢進のメカニズムを調べるため、破骨細胞内のシグナルの中でも活性化に関与すると考えられるシグナルである MAPK 経路、NFκB 経路、Akt 経路、Src 経路につき、その活性化をウェスタンブロッティング法によるリン酸化の検出により調べたところ、*Stat5* ノックアウト破骨細胞において MAPK、特に Erk の活性が亢進していた。この結果より、破骨細胞において *Stat5* は MAPK、特に Erk の活性化を抑制する働きをしていることが示唆された。*Stat5* は転写因子であることから、このような MAPK 活性の変化は *Stat5* が MAPK の活性に影響を与える因子の転写を調節していることによるのではないかと考えた。そこで、*Stat5* により転写調節を受けている下流分子を同定するため、*Stat5* ノックアウト破骨細胞とコントロール破骨細胞より採取した RNA

から cDNA を作成して DNA マイクロアレイに提出し、発現 profile の違いを解析した。Stat5 ノックアウト破骨細胞において発現量がコントロール破骨細胞の 1/2 未満に低下していた遺伝子群の中で MAPK のリン酸化に関与する遺伝子を抽出したところ、*Dusp* (*Dual specificity phosphatase*) 2 が同定された。*Dusp* とはチロシンおよびセリン/スレオニンを脱リン酸化できる二重特異性ホスファターゼであり、その約半数が MKP (MAPK phosphatase) としての機能を持つ。さらに詳細に Stat5 ノックアウト破骨細胞における *Dusp* family の発現変化を調べるため、Stat5 ノックアウト破骨細胞およびコントロール破骨細胞において real-time PCR を行い *Dusp* family 遺伝子の中でも MKP 活性を持つものの発現を調べたところ、*Dusp1* および *Dusp2* の発現が Stat5 ノックアウト破骨細胞において有意に低下していた。Stat5 ノックアウト破骨細胞で亢進した骨吸収活性は、*Dusp1* および *Dusp2* の導入により低下した。ここまでの結果から、Stat5 は破骨細胞において *Dusp1* および *Dusp2* の転写制御を介して MAPK の活性を抑制していると考えられた。

さらに、破骨細胞において Stat5 を活性化させる因子を同定するため、Stat5 を活性化することが知られている既知の因子である IL-2、IL-3、IL-5、GH、PRL、EGF にて破骨細胞を刺激したのちにタンパクを回収した。このタンパクを用いて Western ブロットティングを行い、リン酸化 Stat5 の発現を調べた。IL-3 刺激後 5 分より Stat5 のリン酸化がみられ、この効果は 1 時間後まで持続していた。その他の因子による刺激ではリン酸化 Stat5 は検出されなかった。コントロール破骨細胞においては IL-3 刺激後 20 分で *Dusp1*、*Dusp2* の発現が上昇したのに対し、Stat5 ノックアウト破骨細胞ではこのような発現の上昇がみられなかった。以上の結果より、IL-3 の刺激により早期に *Dusp1*、*Dusp2* の発現が誘導され、この経路には Stat5 が関わっていることが示唆された。成熟破骨細胞を

RANKL によって刺激し、時間経過を追って RNA を採取した。*IL-3* の発現量の変化を real-time PCR にて評価したところ、RANKL 刺激後、1 時間、2 時間で *IL-3* の発現が上昇することが確認された。

D. 考察

Stat5 cKO マウスは破骨細胞の骨吸収活性上昇に基づく骨量減少を示したが、これは、Stat5 が破骨細胞の骨吸収に対して抑制的に働くことを示している。これまで報告された Stat family の破骨細胞における機能としては、Stat1 が β -interferon の刺激を受けて RANKL による破骨細胞分化を抑制するとの報告や、Stat6 が IL-4 のシグナルを受けて破骨細胞の分化および骨吸収活性を負に調節しているとの報告がある。本研究においても Stat5 が破骨細胞に対して抑制的に作用するという点ではこれらの報告と同様であった。しかし今回の結果では、Stat1 や Stat6 とは違い、Stat5 は破骨細胞分化に対して重要ではないという結果であった。同じ Stat family でも member によってその機能は大きく異なること、時によっては他の member が代償的に働きことが知られる。したがって、本研究結果のように Stat5 が破骨細胞分化にとっては重要ではないが、成熟破骨細胞の活性化に対しては抑制的な機能を有するという可能性は十分に考えられた。Stat5 ノックアウト破骨細胞においては MAPK 経路、中でも特に Erk の活性が亢進していることが明らかとなった。Erk の破骨細胞における機能については古くから多くの報告がある。この中には Erk は破骨細胞の生存に関与するが骨吸収活性には関与しないとする報告や破骨細胞の骨吸収に必須である波状縁の形成に必要であるとする報告などがある。このように、Erk の破骨細胞における機能については報告により異なるが、その原因として Erk が活性化持続時間や細胞内での分布などによりその機能が変化するということが一因と考えられる。例えば、活性化の持続時間により Erk が全く正反対の機能を示すとした報告もある。近年、

Erk1 および Erk2 のノックアウトマウスを用いた研究において、Erk1 が破骨細胞の分化および骨吸収活性に対して重要であることが明らかとなった。また、Erk ほどではないものの、Stat5 ノックアウト破骨細胞においては JNK の活性化も軽度亢進していた。JNK も RANKL により活性化される MAPK であり、やはり破骨細胞の骨吸収活性に関与すると考えられている。これらのことから、Stat5 ノックアウト破骨細胞において骨吸収能が亢進している原因は Erk を中心とする MAPK の活性化にあると推察された。分化に差が出なかった原因として、破骨細胞前駆細胞においては Stat5 のノックアウトによって Erk の活性化は変化せず、Stat5 は成熟破骨細胞においてのみ Erk の活性化を調節するものと考えられた。さらに、転写因子である Stat5 のノックアウトにより MAPK の活性が亢進しているメカニズムとして、Stat5 が MAPK のリン酸化に影響するような何らかの分子の発現を制御しているとの仮説を立て DNA microarray および real-time PCR を行ったところ、Stat5 ノックアウト破骨細胞において MAPK の脱リン酸化酵素である *Dusp1* および *Dusp2* の発現が有意に低下していることが明らかとなった。これまでに *Dusp* family の破骨細胞における機能については、*Dusp1* のノックアウトマウスが破骨細胞の骨吸収亢進によると考えられる骨密度低下を示したとする報告がある。*Dusp2* の破骨細胞における機能についての報告はいまだないが、*Dusp2* を破骨細胞において強制発現させると特に Erk の活性化が抑制されることから、*Dusp2* も *Dusp1* と同様、破骨細胞の機能に対して抑制的に作用すると考えられる。さらに、破骨細胞において IL-3 が Stat5 のリン酸化・核移行および *Dusp1*, *Dusp2* の発現を誘導することが明らかになったが、これは IL-3 が破骨細胞による骨吸収の亢進が原因となる疾患、例えば骨粗鬆症や関節リウマチにおける関節破壊の治療に応用できる可能性を示唆している。

E. 結論

破骨細胞特異的 Stat5 ノックアウトマウスの解析、および Stat5 ノックアウト破骨細胞の解析により、転写因子 Stat5 が破骨細胞において *Dusp1* および *Dusp2* の発現制御を介して破骨細胞の骨吸収活性に対して抑制的に作用することが示された。また、IL-3 は破骨細胞において Stat5 による骨吸収活性の抑制を誘導する因子の一つと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hirose J, Masuda H, Tokuyama N, Omata Y, Matsumoto T, Yasui T, Kadono Y, Hennighausen L, Tanaka S. Bone resorption is regulated by cell-autonomous negative feedback loop of Stat5-Dusp axis in the osteoclast. *J Exp Med.* 211(1):153-63, 2014
2. Matsumoto T, Nagase Y, Hirose J, Tokuyama N, Yasui T, Kadono Y, Ueki K, Kadowaki T, Nakamura K, Tanaka S. Regulation of bone-resorption and sealing zone formation in osteoclasts occurs through Akt-mediated microtubule stabilization. *J Bone Miner Res.* 28(5):1191-202, 2013
3. Tanaka S Regulation of bone destruction in rheumatoid arthritis through RANKL-RANK pathways. *World J Orthop.* 18;4(1):1-6, 2013
4. Miyazaki T, Iwasawa M, Nakashima T, Mori S, Shigemoto K, Nakamura H, Katagiri H, Takayanagi H, Tanaka S. Intracellular and extracellular ATP coordinately regulate the inverse correlation between osteoclast survival and bone resorption *J Biol Chem.* 287(45):37808-23, 2012
5. Shinohara M, Nakamura M, Masuda H, Hirose J, Kadono Y, Iwasawa M, Nagase

- Y, Ueki K, Kadowaki T, Sasaki T, Kato S, Nakamura H, Tanaka S, Takayanagi H. Class IA phosphatidylinositol 3-kinase regulates osteoclastic bone resorption through Akt-mediated vesicle transport. *J Bone Miner Res.* 27(12):2464-75, 2012
6. Mochizuki A, Takami M, Miyamoto Y, Nakamaki T, Tomoyasu S, Kadono Y, Tanaka S, Inoue T, Kamijo R. Cell Adhesion Signaling Regulates RANK Expression in Osteoclast Precursors. *PLoS One.* 7(11):e48795, 2012

2. 学会発表

1. 第30回日本骨代謝学会 2012年7月21日
2. ASBMR annual meeting 2012 2012年10月1日

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

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 教授

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、関節リウマチの罹患関節の構成体（骨・軟骨・滑膜）に対する力学負荷応答を解明し、RA の病態、治療ターゲットを検討する目的で、関節組織由来細胞の三次元培養組織の力学負荷細胞応答と、関節治療薬剤効果（ステロイド、NSAIDs、ヒアルロン酸）を検討し、さらに、IL-6 抗体による IL-6 の意義につき、検討した。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、力学負荷による関節炎発症や関節破壊の病態が示された。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、ステロイド、NSAIDs により PGE2 産生抑制がみられ、また、これら薬剤とヒアルロン酸は MMP-3, ADAMTS4 の力学負荷による発現誘導を抑制する効果を示し、関節リウマチにおける関節破壊抑制の可能性を示した。

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 罹患関節である膝関節滑膜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検討することを目的とした。さらに、関節治療薬剤であるステロイド、NSAIDs、ヒアルロン酸の力学負荷応答に対する効果を検討し、また、IL-6 抗体による力学負荷のマトリックス分解酵素の遺伝子発現亢進に対する効果につき検討した。

B. 研究方法

1. 三次元力学刺激培養システムの構築

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、三次元力学刺激培養システム（3D dynamic culture system）を構築した。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。

三次元培養組織を、繰返し力学刺激培養装置（CLS-4J）を用いて、繰返し圧縮刺激による力学刺激培養を行った。

2. 三次元力学刺激培養システムにおけるマトリックス分解酵素、サイトカインの遺伝子、蛋白発現

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(MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, ADAM-TS-4, ADAM-TS-5), 炎症性サイトカイン(PGE2, IL-6, IL-8)の発現につき, 解析した。

3. 三次元力学刺激における消炎鎮痛薬剤の効果

三次元培養組織へステロイド, NSAIDs, (COX-2 選択的阻害剤, および COX-2 非選択的阻害剤) 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 β , TNF- α 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。

4. 三次元力学刺激におけるヒアルロン酸製剤の効果

三次元培養組織へ分子量の異なるヒアルロン酸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 β , TNF- α 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。

5. 三次元力学刺激における抗 IL-6 抗体または IL-1 レセプターアンタゴニスト (IL-1Ra) の効果

抗 IL-6 抗体または 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 β (10ng/ml) 投与をおこない、刺激6時間後の PGE2 濃度, MMP-3 遺伝子発現を測定した。

(倫理面への配慮)

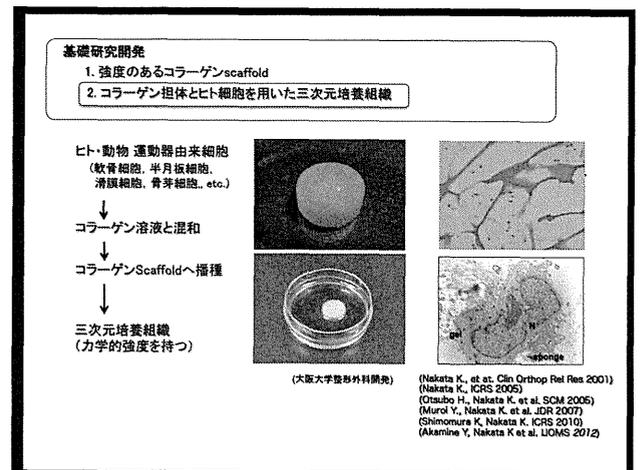
ヒト組織の採取にあたっては、院内倫理委員会の承認のもと、患者より事前に説明し、文書による同意を得て、研究を遂行した。

C. 研究結果

1. 三次元力学刺激培養システムにおけるマトリックス分解酵素, サイトカインの遺伝子, 蛋白発現

三次元 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。



基礎研究開発

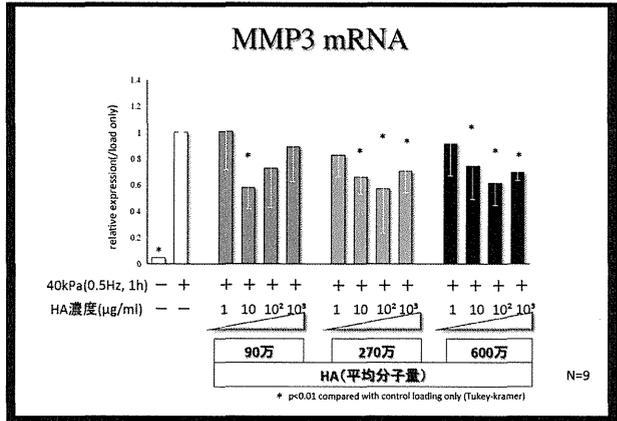
1. 新開発の強度のあるコラーゲンscaffold
2. コラーゲン担体とヒト細胞を用いた三次元培養
3. 三次元力学負荷培養装置の開発

ピストンによる鉛直荷重
↓
三次元培養体の変形
↓
培養皿を水平方向に移動
↓
関節運動に近似した力学刺激
(鉛直荷重, 専断応力)

(Patent # P4116057) (PCT/JP2008/052099)
CLS-4J, テクノビュー社

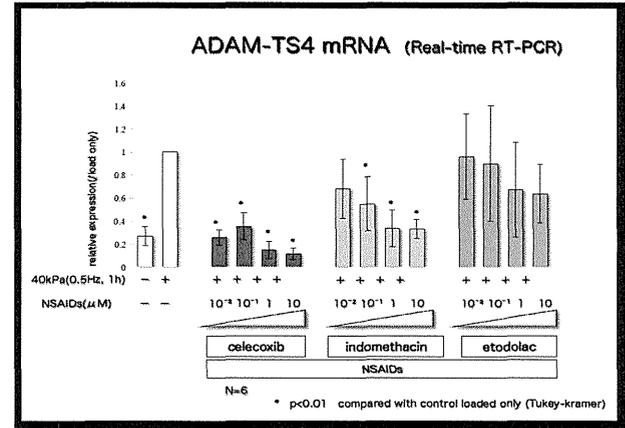
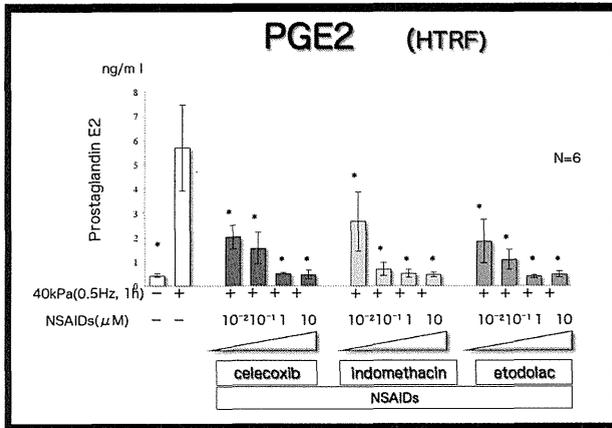
✓ 様々な力学的負荷量 (0-50kPa)
✓ 多サンプル同時並列処理
(異なる力学負荷量で)

(Muroi Y, Nakata K, et al. J D R 2007)
(Nakata K, Akamine Y, et al IBCF 2009)
(Shimomura K, Nakata K, et al ICRS 2010)
(Akamine Y, Nakata K et al IJOMS in press)



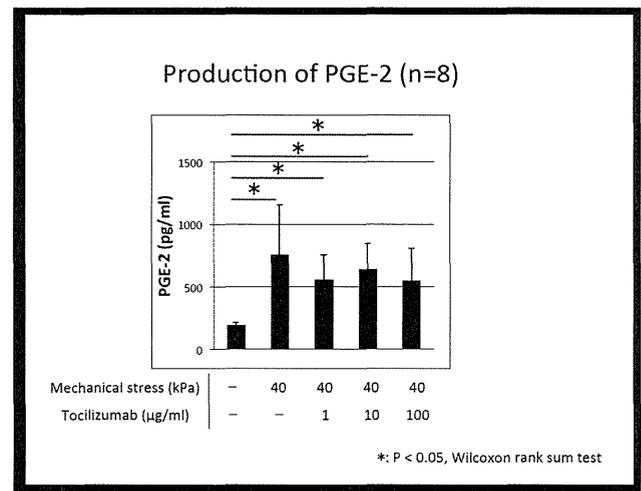
2. 三次元力学刺激における消炎鎮痛薬剤の効果

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。



4. 三次元力学刺激における抗 IL-6 抗体または IL-1 レセプターアンタゴニスト (IL-1Ra) の効果

IL-6 抗体, IL-1Ra 存在下(1mM)では力学負荷誘導 PGE2 産生, MMP-3, ADAMTS4 遺伝子発現を部分的に抑制した。



繰り返し力学負荷により PGE2 の有意な濃度上昇を認めたが IL-1β, TNF-α 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。

3. 三次元力学刺激におけるヒアルロン酸製剤の効果

ヒアルロン酸添加 (270 万 Da 以上) は PGE2 発現不変, MMP-3, ADAMTS4 遺伝子発現抑制効果を認めた。

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 β や TNF- α 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。

ステロイド、NSAIDs により PGE2 産生抑制がみられ、また、これら薬剤とヒアルロン酸は MMP-3, ADAMTS4 の力学負荷による発現誘導を抑制する効果を持つものもあり、関節リウマチにおける関節破壊抑制の効果の可能性を示唆する。

また、抗 IL-6 抗体が、三次元滑膜由来培養組織に対する繰返し力学刺激による PGE2 産生を部分的に抑制したことは、リウマチにおける運動時関節痛に対し、抗 IL-6 抗体が鎮痛効果を持ちうる可能性を示唆するものとして意義が高い。

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。また、関節疾患治療薬 (ステロイド, NSAIDs, ヒア

ルロン酸, IL-6 抗体, IL-1・ブロック) は、力学負荷による MMP-3, ADAMTS4 発現を抑制するものがあつた。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、関節リウマチ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、治療法の評価、開発の新たなツールとして新たな分子メカニズム、治療法の解明となる。

F. 健康危険情報

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
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
3. Matsuo T, Mae T, Kita K, Tachibana Y, Yoshikawa H, Nakata K. Bone Substitutes and Implantation Depths for Subchondral Bone Repair in Osteochondral Defects of Porcine Knee Joints Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2014 In press)
4. 中田 研, 前 達雄, 米谷泰一, 松尾 知彦, 橘 優太, 金本 隆司, 北圭介, 吉川秀樹 半月板バイオマテリアルの開発 Clinical Calcium 23;12 39-47, 2013

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
4. 宮本 諭, 吉川秀樹, 中田研 器官培養モデルにおける力学刺激が骨・軟骨の成長に与える影響 日本結合組織学会 第 44 回日本結合組織学会 2012 年 6 月 東京
5. 中田研 関節の繰り返し力学負荷による生物学的応答と薬物効果：関節炎，関節破壊と薬効メカニズム 第 32 回日本歯科薬物療法学会 特別講演 2012 年 6 月 大
6. 金銅 真世, 北圭介, 室井悠里, 太田啓, 赤峯勇哲, 中田研, 吉川秀樹, 覚道健治 繰り返し圧縮負荷によるヒト滑膜由来三次元培養組織滑膜炎モデルにおける各種 NSAIDs のマトリックス破壊抑制および抗炎症効果 第 32 回日本歯科薬物療法学会 特別講演 2012 年 6 月 大阪
7. 太田啓介, 北圭介, 下村和範, 松尾知彦, 宮本諭, 金銅真世, 室井悠里, 前達雄, 覚道健治, 吉川秀樹, 中田研 至適な繰り返し圧縮負荷は、三次元培養組織における骨芽細胞分化を促進する 第 30 回日本骨代謝学会 2012 年 7 月 東京
8. 中田研, 金銅真世, 北圭介, 松尾知彦, 橘優太, 米谷泰一, 前達雄, 吉川秀樹 ヒアルロン酸がヒト滑膜細胞三次元培養メカニカルストレス下に軟骨に対する catabolic & anabolic 効果 第 3 回ヒアルロン酸研究会 2012 年 10 月 名古屋
9. 金銅真世, 室井悠里, 北圭介, 太田啓介, 赤峯勇哲, 中田研, 吉川秀樹, 覚道健治 ヒト滑膜三次元培養組織の繰り返し圧迫力学刺激におけるヒアルロン酸のマトリックス破壊抑制および疼痛緩和機序の解析 第 25 回日本顎関節学会 2012 年 7 月 札幌
10. 金銅真世, 室井悠里, 太田啓介, 赤峯勇哲, 中田研, 吉川秀樹, 覚道健治 第 57 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会 2012 年 10 月 横浜
11. Mayo Kondo¹, Keisuke Kita², Yuri Muroi³, Keisuke Ota¹, Yutetsu Akamine³, Ken Nakata², Kenji Kakudo³ Chondro-protective effects of NSAIDs on mechanical stress-induced arthritis by cyclic compressive loading on 3-D cultured human synovial cells Asia Oral Maxiofacial Surgery Society 2012 年 10 月 バリ島 インドネシア
12. 金本 隆司, 前 達雄, 米谷 泰一, 松尾 知彦, 橘 優太, 宮本 諭, 金銅 真世, 矢谷 真也, 吉川 秀樹, 中田 研 ヒト半月板細胞の力学負荷応答の解析：荷重負荷量と細胞骨格・遺伝子・蛋白発現の変化 第 26 回日本軟骨代謝学会 2013 年 3 月大阪
13. 中田 研 骨・軟骨・半月板細胞のメカニカルストレスに対する応答メカニズム 第 26 回 骨を語る会 2013 年 4 月 弘前
14. S. Miyamoto, Y. Yonetani, T Mae, H.

Yoshikawa, K. Nakata Effects of
Mechanical load on Bone/cartilage
Development in Murine Long Bone Organ
Culture Model IBMS 2013年5月 神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

- 1) 特許出願 「生体埋植用の強度のあるコラーゲン」特願 2013-27905
- 2) 特許取得 「生体形状を含んだ三次元組織の培養方法」特許第 4919296 号 2012. 2. 10
- 3) 特許取得 「細胞培養用担体」特許第 4915693 号 2012. 2. 3

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

関節リウマチの病態に対するアディポネクチンの作用

研究分担者 下村伊一郎 大阪大学内分泌代謝内科学 (教授)

研究要旨

アディポネクチンは関節リウマチ患者では血中濃度が上昇することが報告されている。組換え蛋白を用いた結合実験をおこなったところ、C1qとアディポネクチンは濃度依存性に結合した。また、ヒト血清の解析によって、血中にアディポネクチンと C1q の複合体が存在することを見出した。さらに、両者の抗体を用いた ELISA 測定系を構築することに成功した。本複合体は関節リウマチ患者の血清において健常者と比較して有意に高値であり、関節リウマチ重症例では軽症例よりも高値であった。以上のことからアディポネクチンと C1q は、実際に血中で結合しており、関節リウマチの病態に関与する可能性が示された。

A. 研究目的

脂肪細胞由来分泌因子であるアディポネクチンは C1q と構造的に相同性有しており、関節リウマチ患者では血中濃度が上昇する。そこで、アディポネクチンと補体 C1q の結合を解析し、両者の複合体の意義を明らかにする

B. 研究方法

アディポネクチン組換え蛋白と血清を用いて、C1q とアディポネクチンの結合を解析した。ヒト血液に対して、抗アディポネクチン抗体、抗 C1q 抗体を用いた免疫沈降を行った。沈降産物に対してそれぞれの抗体を用いたウェスタンブロットを行った。抗アディポネクチン抗体をプレートに固層化し、抗 C1q 抗体と標識 2 次抗体を用いた ELISA システムを構築した。本 ELISA を用いて健常者、リウマチ患者における血中アディポネクチン-補体 C1q 複合体を測定した。

C. 研究結果

組換えアディポネクチン蛋白は、血清中の補体 C1q と濃度依存性に結合した。しかし、コントロールマウスとアディポネクチン KO マウスでは

補体活性に有意な差を示さなかった。

生体内での両者の結合を明らかにするために、ヒト血清を用いて免疫沈降を行ったところ、抗 C1q 抗体による免疫沈降によってアディポネクチンが共沈された。反対に抗アディポネクチン抗体を用いた免疫沈降によって C1q が共沈された。すなわち血中において両者は複合体を形成していた。

次に、抗アディポネクチン抗体をプレートに固層化し、抗 C1q 抗体と標識 2 次抗体を用いた ELISA システムを構築した。血液をゲル濾過し、各フラクションにおける複合体濃度を測定した。アディポネクチンは高分子、中分子、低分子の 3 種の多量体を形成しており、血中では高分子が最も多いことが知られている。一方で本複合体は中分子に多量に存在していた。

本 ELISA を用いて健常者、リウマチ患者における血中アディポネクチン-補体 C1q 複合体を測定した。リウマチ患者では血中 C1q 濃度は健常者と比較して差はなかったが、複合体濃度はリウマチ患者で有意に増加していた。

軽症リウマチ症例と重症症例で比較を行うと、重症度に応じて血中複合体濃度が増加した。

D. 考察

アディポネクチンが補体活性に及ぼす作用は認められなかったが、アディポネクチンと C1q が結合することが示された。アディポネクチン-補体C1q複合体の血中濃度測定は、リウマチ患者の重症度予測因子として有用である可能性が示された。本複合体自体の作用は不明であるが、関節での炎症を惹起し、リウマチの病態形成に関与する可能性がある。

E. 結論

ヒト血中において、アディポネクチンはC1qと結合しており、本複合体濃度は関節リウマチの重症度と関連する。

F. 健康危険情報

記載事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. A. Hirata, K. Kishida, H. Kobayashi, H. Nakatsuji, T. Funahashi, **I. Shimomura**, Correlation between serum C1q-adiponectin/total adiponectin ratio and polyvascular lesions detected by vascular ultrasonography in Japanese type 2 diabetics, *Metabolism* 62 (2013) 376-385.
2. A. Hirata, K. Kishida, H. Nakatsuji, H. Kobayashi, T. Funahashi, **I. Shimomura**, High serum C1q-adiponectin/total adiponectin ratio correlates with coronary artery disease in Japanese type 2 diabetics, *Metabolism* 62 (2013) 578-585.
3. K. Kishida, N. Kishida, M. Arima, H. Nakatsuji, H. Kobayashi, T. Funahashi, **I. Shimomura**, Serum C1q-binding adiponectin in maintenance hemodialysis patients, *BMC Nephrol* 14 (2013) 50.
4. H. Nakatsuji, K. Kishida, H. Kobayashi, T. Funahashi, **I. Shimomura**, I.I.G. Senri Study, Three-month treatment with pioglitazone reduces circulating C1q-binding adiponectin complex to total-adiponectin ratio, without changes in body mass index, in people with type 2 diabetes, *Diabetes Res Clin Pract* 99 (2013) e14-17.
5. H. Nakatsuji, K. Kishida, H. Kobayashi, T.

Nakagawa, T. Funahashi, **I. Shimomura**, Correlation of circulating C1q and C1q-binding adiponectin concentrations with aging in males: a preliminary report, *Diabetol Metab Syndr* 5 (2013) 17.

6. H. Nakatsuji, H. Kobayashi, K. Kishida, T. Nakagawa, S. Takahashi, H. Tanaka, S. Akamatsu, T. Funahashi, **I. Shimomura**, Binding of adiponectin and C1q in human serum, and clinical significance of the measurement of C1q-adiponectin / total adiponectin ratio, *Metabolism* 62 (2013) 109-120.

2. 学会発表

記載事項なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

記載事項なし

2. 実用新案登録

記載事項なし

3. その他

記載事項なし

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表