

関節リウマチ(RA)患者の骨髄細胞異常と RA 特異的 iPS 細胞の樹立

研究分担者： 西本 憲弘 東京医科大学医学総合研究所難病分子制御部門 兼任教授
中畑 龍俊 京都大学 iPS 細胞研究所 副所長
研究協力者： 齋藤 潤 京都大学 iPS 細胞研究所 准教授
越智 健介 東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター 助教
橋本 淳 国立病院機構大阪南医療センター 部長
島岡 康則 浜脇整形外科病院 副院長
行岡 正雄 行岡病院 院長

研究要旨

関節リウマチ(RA)患者の骨髄細胞の機能異常を明らかにするために、網羅的遺伝子発現解析を行った。バイオインフォマティクスの応用により、骨髄での免疫機能の異常亢進、骨格・筋肉形成の機能低下が明らかになった。すなわち、骨髄細胞が骨格形成、筋肉形成に参与している可能性がある。また、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。

骨髄での初期分化異常の有無を明らかにするために、RA 患者由来のヒト人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells : iPS 細胞)の樹立を行うとともに、単球系細胞への分化過程における異常の有無を検討した。複数の家族歴を有する RA 患者と未発症同胞より iPS 細胞を作製し、単球への分化誘導を行ったところ、分化の初期に一過性に CD14+CD15+細胞が検出された。未発症同胞由来 iPS 細胞との比較で CD14+CD15+細胞の出現の割合は RA 患者で高かった。また、RA 特異的 iPS 細胞から破骨細胞への分化誘導を行ったところ、iPS 細胞から分化した CD14+のうち一部の細胞が RANKL 刺激により破骨細胞へ分化した。

以上の病因・病態研究の成果は、新たな診断法・治療法につながる可能性がある。

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遺伝子発現を網羅的に解析し、バイオインフォマティクスを応用して、骨髄細胞機能の異常の有無を明らかにすることを第1の目的とした。また、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。さらに、我々は、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、第2の目的は RA 患者の腸骨骨髄細胞を用い、CD14+CD15+細胞ならびに HLA-E、F、G 抗原陽性細胞を同定することとした。

さらに、第3目的として骨髄での初期分化異常の有無を明らかにするために、RA 患者特異的 iPS 細胞の樹立を行うとともに、単球系細胞への分化過程における異常の有無を検討した。

B. 研究方法

28 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 (Agilent Whole Human Genome4x44K®) により網羅的な遺伝子発現解析を行った。対照には 11 例の健常人骨髄 (BioChain®, 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® (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)®バージョン 7.5. を用いて解析した。

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。

インフォームドコンセントを得た、親子あるいは同胞内発症の RA 患者と未発症同胞の血液単核球ならびに皮膚線維芽細胞を用いて、iPS 細胞の樹立を行った。

ヒト iPS 細胞からの血球分化系 (Niwa et al. PLOS one, 2011) を応用して、RA 特異的 iPS 細胞から単球へ分化させた。FACS 解析により、各分化段階での細胞表面マーカーを健常人 (RA 特異的 iPS 細胞を樹立した患者の家族内未発症者) 由来の iPS 細胞と比較した。

RA 特異的 iPS 細胞から単球に分化させた後、RANKL を添加し、破骨細胞への分化誘導を検討した。

(倫理面での配慮) 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。iPS 研究に関しては“臨床研究に関する倫理指針”、“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た。

C. 研究結果

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、機能が分かっている 744 遺伝子の発現が増強し、838 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分類したところ、免疫応答関連分子は 166 あり、免疫機能の亢進が強く描出された (有意性を示す EASE score 5.5×10^{-55})。それ以外に、ストレス反応 (5.4×10^{-15})、創傷治癒 (4.2×10^{-15})、アポトーシス (5.4×10^{-6})、細胞貪食機能の亢進が見られた。一方、遺伝子発現の低下は骨格形成、筋肉形成、DNA のパッケージング、細胞接着、細胞増殖、細胞移動に係る遺伝子群で見られ、これらの機能低下が示唆された。

免疫応答関連分子のネットワーク解析では、インターフェロン (IFN) に加えて、Tumor necrosis factor (TNF)、Transforming growth factor (TGF)、IL-1、IL-12、IL-18 が分子間ネットワークの中心に位置し制御分子であると考えられた。またその制御シグナルは NFkB, 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。

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。そこで単球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ところ、CD14+単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。

トシリズマブ使用中の 2 例、MTX 使用中の 1 例ならびに健常人コントロールから iPS 細胞を作製した。末梢血単核球では、トシリズマブ使用例からはクローン樹立は困難であったが、皮膚線維芽細胞を用いることにより全員から樹立できた。

RA 患者由来 iPS 細胞を用い、*in vitro* で単球系への分化誘導を試みた。Day 20 では、CD45+CD14+細胞は 61% に達し、しかもそのほとんどが CD11b (MAC-1、インテグリン M、CR3) も発現していた。

RA 患者由来 iPS 細胞から単球への分化誘導 15 日目で、CD14+CD15+細胞が検出された。また RA 患者由来 iPS 細胞と未発症同胞ならびに他の健常人由来 iPS 細胞で CD14+CD15+細胞の割合を比較したところ RA が最も多かった。

iPS 細胞から分化した浮遊 CD14 陽性細胞を M-CSF の存在下に RANKL のパルス刺激を行ったところ RANKL 濃度依存的な破骨細胞の形成が確認された。その際、破骨細胞に分化したのは、接着能を有する細胞のみであり、前述の CD14+CD15+細胞の分化能は低かった。

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亢進するとともに、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。また、細胞のアポトーシスの亢進が示され、死細胞を貪食するマクロファージの活性化とそれに続くインターフェロンの産生増強につながる可能性がある。

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いた。

この遺伝子発現プロファイ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した。越智らにより報告された CD14+CD15+単球系細胞が、今回の RA 患者骨髄でも確認され、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。

また RA 患者特異的 iPS の樹立に成功した。RA 患者由来 iPS 細胞から単球系細胞へ *in vitro* で分化誘導する過程で、CD14+CD15+細胞の出現を確認した。この細胞分画は健常人由来 iPS 細胞からも誘導することが可能であり、分化初期に一過性に出現した。さらに RA 患者由来 iPS 細胞では健常人由来 iPS 細胞に比べ、この細胞分画の出現頻度は高かったことから、RA の発症に関連している可能性が示唆される。現在、別家系の 3 例の RA 患者から iPS 細胞を作製しており、その結果と比較したい。また、この細胞群は、骨髄環境すなわちストローマ細胞やそこから産生されるサイトカインの影響を受ける可能性が考えられる。今後、ストローマ細胞との共培養や種々のサイトカイン存在下での検討を行う予定である。

また、単球に分化させた後、さらに破骨細胞への分化に成功した。CD14+細胞の中でも破骨細胞へ分化誘導可能なものは一部分であり、今後どのようなフェノタイプを持つ細胞が破骨細胞に分化するかを検討したい。

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。また、RA 患者由来 iPS 細胞を樹立し、単球系細胞へ分化誘導できた。その初期分化の過程で、CD14+CD15+細胞の出現を確認した。この細胞群は RA 患者に特徴的である可能性がある。ま

た、iPS 細胞から破骨細胞へ分化させることができた。

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. Nishimoto N, Amano K, Hirabayashi Y, Horiuchi T, Ishii T, Iwahashi M, Iwamoto M, Kohsaka H, Kondo M, Matsubara T, Mimura T, Miyahara H, Ohta S, Saeki Y, Saito K, Sano H, Takasugi K, Takeuchi T, Tohma S, Tsuru T, Ueki Y, Yamana J, Hashimoto J, Matsutani T, Murakami M, Takagi N. Drug free REmission/low disease activity after cessation of tocilizumab (Actemra) Monotherapy (DREAM) study. *Mod Rheumatol.* 24(1):17-25. 2014.
2. Nishimoto N, Amano K, Hirabayashi Y, Horiuchi T, Ishii T, Iwahashi M, Iwamoto M, Kohsaka H, Kondo M, Matsubara T, Mimura T, Miyahara H, Ohta S, Saeki Y, Saito K, Sano H, Takasugi K, Takeuchi T, Tohma S, Tsuru T, Ueki Y, Yamana J, Hashimoto J, Matsutani T, Murakami M, Takagi N. Retreatment efficacy and safety of tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis in recurrence (RESTORE) study. *Mod Rheumatol.* 24(1):26-32 2014.
3. Fujita R, Kawano F, Ohira T, Nakai N, Shibaguchi T, Nishimoto N, Ohira Y. Anti-interleukin-6 receptor antibody (MR16-1) promotes muscle regeneration via modulation of gene expressions in infiltrated macrophages. *Biochim Biophys Acta.* 15. pii: S0304-4165(14)00016-6. 2014.
4. Schoels MM, van der Heijde D, Breedveld FC, Burmester GR, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Gabay C, Gibofsky A, Gomez-Reino JJ, Jones G, Kvien TK, Murakami M, Nishimoto N, Smolen JS. Blocking the effects of interleukin-6 in rheumatoid arthritis and other inflammatory rheumatic diseases: systematic literature review and meta-analysis informing a consensus statement. *Ann Rheum Dis.* 72(4):583-9. 2013.
5. Smolen JS, Schoels MM, Nishimoto N, Breedveld FC, Burmester GR, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Gabay C, Gibofsky A, Gomez-Reino JJ, Jones G, Kvien TK, Murakami M, Betteridge N, Bingham C 3rd, Bykerk V, Choy EH, Combe B, Cutolo M, Graninger W, Lanus A, Martin-Mola E, Montecucco C, Ostergaard M, Pavelka K, Rubbert-Roth A, Sattar N, Scholte-Voshaar M, Tanaka Y, Trauner M, Valentini G, Winthrop KL, de Wit M, van der Heijde D. Consensus statement on blocking the effects of interleukin-6 and in particular by interleukin-6 receptor inhibition in rheumatoid arthritis and other inflammatory conditions. *Ann Rheum Dis.* 72(4):482-92. 2013.
6. Yokota S, Imagawa T, Mori M, Miyamae T, Takei S, Iwata N, Umebayashi H, Murata T, Miyoshi M, Tomiita M, Nishimoto N, Kishimoto T. Long-term treatment of systemic juvenile idiopathic arthritis with tocilizumab: results of an open-label extension study in Japan. *Ann Rheum Dis.* 72(4):627-8. 2013.
7. Fiala M, Mizwicki MT, Weitzman R, Magpantay L, Nishimoto N. Tocilizumab infusion therapy normalizes inflammation in sporadic ALS patients. *Am J Neurodegener* 2(2):129-39. 2013.
8. Shimane K, Kochi Y, Suzuki A, Okada Y, Ishii T, Horita T, Saito K, Okamoto A, Nishimoto N, Myouzen K, Kubo M, Hirakata M, Sumida T, Takasaki Y, Yamada R, Nakamura Y, Kamatani N, Yamamoto K. An association analysis of HLA-DRB1 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in a Japanese population: effects of *09:01 allele on disease phenotypes. *Rheumatology (Oxford).* 52(7):1172-82. 2013.
9. Chang Q, Bournazou E, Sansone P, Berishaj M, Gao SP, Daly L, Wels J, Theilen T, Granitto S, Zhang X, Cotari J, Alpaugh ML, de Stanchina E, Manova K, Li M, Bonafe M, Ceccarelli C, Taffurelli M, Santini D, Altan-Bonnet G, Kaplan R, Norton L, Nishimoto N, Huszar D, Lyden D, Bromberg

- J. The IL-6/JAK/Stat3 Feed-Forward Loop Drives Tumorigenesis and Metastasis. *Neoplasia*. 15(7):848-62 2013.
10. Hirao M, Hashimoto J, Nishimoto N. Anti-cytokine agents to combat oxidative stress. In: Alcaraz MJ, Gualillo D, Sánchez-Pernaute O. *Oxidative Stress in Advanced Basic Research and Clinical Practice. Studies on Arthritis and Joint Diseases*. Springer. pp 297-309.2013.
 11. 西本憲弘, 村上美帆. 炎症性自己免疫疾患における治療標的としての IL-6 . 日本臨床増刊号「血管炎」 . 日本臨床社 . 2013 : 71 (増刊号 1) : 623-629
 12. 西本憲弘. IL-6 標的薬 . 特集/関節リウマチ治療における分子標的薬の進歩 . 臨床薬理 . 三原医学社 . 2013 : 44 (1) : 9-14
 13. 松谷隆治, 村上美帆, 西本憲弘 . 水銀による自己抗体産生誘導 . 臨床免疫・アレルギー科 . 科学評論社 . 2013 : 59 (5) : 611-613
 14. 西本憲弘, 村上美帆 . 成人病発症 Still 病 . 内科 . 南江堂 . 2013 : 112 (1) : 73-76
 15. 西本憲弘 . 技術革新で既存の治療法の枠組みを変える可能性 . Medical ASAHI . 朝日新聞社 . 2013 : 42 (10) : 16-18
 16. 西本憲弘 . キャスルマン病と IL-6 . 血液内科 . 2013 : 67 (4) : 467-471
 17. 西本憲弘 . リウマチ性疾患 10.1 総論 1) 免疫・炎症に關与する細胞分子 . 内科学第十版 . (矢崎義雄編) 朝倉書店 : 東京 2013 : 1227-1231 .
 18. 西本憲弘, 村上美帆 . BMS945429 (P274) ・ Brodalumab (P277) ・ Ixekizumab (P314) ・ Sarilumab (P346) ・ Secukinumab (P348) ・ Siltuximab (P351) ・ Sirukumab (P352) ・ Tocilizumab (P358) . 免疫・アレルギー疾患の分子標的と治療薬事典 生物学的製剤、低分子化合物のターゲット分子と作用機序、薬効のすべて . (田中良哉編) 羊土社 : 東京 2013 .
 19. 西本憲弘, 村上美帆 . 生物学的製剤使用時の WBC 減少 . リウマチ病セミナー XXIV . (監修 七川歡次) 永井書店 . 2013 : 217
 20. 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* 22(1):122-7, 2012.
 21. Ozaki S, Atsumi T, Hayashi T, Ishizu A, Kobayashi S, Kumagai S, Kurihara Y, Kurokawa MS, Makino H, Nagafuchi H, Nakabayashi K, Nishimoto N, Suka M, Tomino Y, Yamada H, Yamagata K, Yoshida M, Yumura W. Severity-based treatment for Japanese patients with MPO-ANCA-associated vasculitis: the JMAAV study. *Mod Rheumatol* 22(3):394-404, 2012.
 22. Yamamoto M, Tabeya T, Naishiro Y, Yajima H, Ishigami K, Shimizu Y, Obara M, Suzuki C, Yamashita K, Yamamoto H, Hayashi T, Sasaki S, Sugaya T, Ishida T, Takano KI, Himi T, Suzuki Y, Nishimoto N, Honda S, Takahashi H, Imai K, Shinomura Y. Value of serum IgG4 in the diagnosis of IgG4-related disease and in differentiation from rheumatic diseases and other diseases. *Mod Rheumatol* 22(3):419-25, 2012.
 23. 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* 22(5):727-37, 2012.
 24. Okada Y, Shimane K, Kochi Y, Tahira T, Suzuki A, Higasa K, Takahashi A, Horita T, Atsumi T, Ishii T, Okamoto A, Fujio K, Hirakata M, Amano H, Kondo Y, Ito S,

- Takada K, Mimori A, Saito K, Kamachi M, Kawaguchi Y, Ikari K, Mohammed OW, Matsuda K, Terao C, Ohmura K, Myouzen K, Hosono N, Tsunoda T, Nishimoto N, Mimori T, Matsuda F, Tanaka Y, Sumida T, Yamanaka H, Takasaki Y, Koike T, Horiuchi T, Hayashi K, Kubo M, Kamatani N, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K. A Genome-Wide Association Study Identified AFF1 as a Susceptibility Locus for Systemic Lupus Erythematosus in Japanese. *PLoS Genet.* 8(1):e1002455. 2012.
25. Terada M, Kawano F, Ohira T, Nakai N, Nishimoto N, Ohira Y. Effects of Mechanical Over-loading on the Properties of Soleus Muscle Fibers, with or without Damage, in Wild Type and Mdx Mice. *PLoS ONE* 7(4):e34557. 2012.
 26. Nishimoto N, Murakami M, Matsutani T. IL-6 blocker. In: Maurizio Cutolo eds. Addressing Unmet Medical Needs in RA. the Future Science Group E-Books.
 27. Murakami M, Tomiita M, Nishimoto N. Tocilizumab in the treatment of systemic juvenile idiopathic arthritis. *Open Access Rheumatology: Research and Reviews.* 2012:4
 28. Ogata T, Yamazaki H, Teshima T, Tsuchiya T, Nishimoto N, Matsuura N. Anti-IL-6 receptor antibody does not ameliorate radiation pneumonia in mice. *Exp Ther Med.* 4(2):273-276. 2012.
 29. 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.* 22(1):109-15 2012.
 30. 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* 22(1):122-7 2012.
 31. 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* 32(12):4041-5. 2012.
 32. 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* 22(5):727-37. 2012.
 33. 村上美帆, 西本憲弘. IL-6 阻害薬 . 医薬ジャーナル . 医薬ジャーナル社 . 2012;48(6):75-80
 34. 村上美帆, 西本憲弘 . IL-6 を標的とした RA 関節破壊の制御 . 医学のあゆみ . 医歯薬出版 . 2012 : 242 (9) : 764-769
 35. 西本憲弘, 村上美帆. 抗体を用いた医療-血清療法から抗体医薬まで-「抗 IL-6 抗体」 . 臨床と微生物 . 2012 : 39(5):445-450
 36. 村上美帆, 西本憲弘 . 炎症性サイトカインと関節リウマチ . CLINICAL CALCIUM . 医薬ジャーナル社 . 2012 : 22(11) : 107-116
 38. Hashimoto J, Garner 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.

39. 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.
40. 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*. Dec;21(6):673-7. 2011.
41. Murakami M, Nishimoto N. The value of blocking IL-6 outside of rheumatoid arthritis: current perspective. *Curr Opin Rheumatol*. 23(3):273-7. 2011.
42. 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*. 13(3):R89. 2011.
4. Nishimoto N. Abatacept treatment suppresses T CELL activation in anti-cyclic citrullinated peptide antibody (ACPA) positive RA patients but not in acpa negative RA patients. *EULAR 2013*. Madrid. Spain. 2013.6.12-15.
4. M. Murakami, T. Matsutani, M. Sekiguchi, K. Matsui, M. Kitano, M. Namiki, K. Ohmura, Y. Imura, T. Fujii, T. Kuroiwa, H. Nakahara, S. Higa, K. Maeda, Y. Nozaki, M. Funauchi, K. Murakami, T. Ikawa, S. Irimajiri, A. Nampei, T. Azuma, T. Sasaki, A. Yokota, S. Morita, Y. Kawahito, T. Mimori, H. Sano, N. Nishimoto. Changes in cytokine profiles in rheumatoid arthritis patients during abatacept treatment. *EULAR 2013*. Madrid. Spain. 2013.6.12-15.
5. S. De Vita, L. Quartuccio, M. Isola, L. Corazza, M. Ramos-Casals, S. Retamozo, R.M. Gaafar, M.N. Zoheir, E.-M.M. Abdel-Moneim, M. Salem. D. Sansonno, V. Conteduca, G. Ferraccioli, E. Gremese, A. Tzioufas, M. Voulgarelis, D. Vassilopoulos, C. Koutsianas, A. L. Zignego, T. Urraro, N. Pipitone, C. Salvarani, A. Ghinoi, L. Guillevin, B. Terrier, P. Cacoub, D. Filippini, F. Saccardo, A. Gabrielli, P. Fraticelli, M. Tomsic, C. Ferri, M. Sebastiani, A. Tavoni, E. Catarsi, C. Mazzaro, P. Pioltelli, N. Nishimoto, P. Scaini, G. Monti. M. Pietrogrande, M. Galli, S. Bombardieri. Preliminary results of the classification criteria for cryoglobulinemic vasculitis validation study. *EULAR 2013*. Madrid. Spain. 2013.6.12-15.
6. N. Nishimoto. Tocilizumab treatment in autoimmune diseases. 12th International Symposium on Sjogren's Syndrome. Luncheon Seminar 2. Kyoto Hotel Okura. Kyoto. 2013.10.9-12
7. 西本憲弘 . リウマチ性疾患におけるサイトカインの役割 . 小児リウマチ研修会in OKINAWA イブニングセミナー . 沖縄市町村自治会館 2 階 . 沖縄 . 2013.3.15
8. 村上美帆、松谷隆治、李穎、關口昌弘、松井聖、北野将康、大村浩一郎、井村嘉孝、藤井隆夫、黒岩孝則、中原英子、前田恵治、村上孝作、森田智視、川人豊、

2. 学会発表

1. N. Nishimoto . A role of interleukin-6 pathogenesis and treatment in auto-immunology disorders . Shanghai-Tokyo Workshop on Rheumatology 2013 .Shanghai 2013.3.30-31
2. Y. Terasaki, S. Ikushima, Y. Ichimura, M. Ujita, Y. Matsuzawa, M. Arita, K. Tomii, Y. Komase, I. Ohwan, T. Kawamura, S. Izumi, M. Murakami, H. Ishimoto, H. Kimura, M. Bando, N. Hada, N. Nishimoto, S. Matsui, T. Ogura. Comparison Of Pathological Features Of The Lung Lesions Of Systemic IgG4-Related Disease And Multicentric Castleman's Disease. *American Thoracic Society 2013*. Philadelphia. 2013.5.17-22
3. T. Matsutani, M. Murakami, M. Sekiguchi, K. Matsui, M. Kitano, M. Namiki, K. Ohmura, Y. Imura, T. Fujii , T.Kuroiwa, H. Nakahara, S. Hika, K. Maeda, Y. Nozaki, M. Funauchi, K. Murakami, T. Ikawa, S. Irimajiri, A. Nampei, T. Azuma, T. Sasaki, A. Yokota, S. Morita, Y. Kawahito, T. Mimori, H. Sano, N. Nishimoto . Abatacept treatment suppresses T CELL activation in anti-cyclic citrullinated peptide antibody (ACPA) positive RA patients but not in acpa negative RA patients. *EULAR 2013*. Madrid. Spain. 2013.6.12-15.
4. M. Murakami, T. Matsutani, M. Sekiguchi, K. Matsui, M. Kitano, M. Namiki, K. Ohmura, Y. Imura, T. Fujii, T. Kuroiwa, H. Nakahara, S. Higa, K. Maeda, Y. Nozaki, M. Funauchi, K. Murakami, T. Ikawa, S. Irimajiri, A. Nampei, T. Azuma, T. Sasaki, A. Yokota, S. Morita, Y. Kawahito, T. Mimori, H. Sano, N. Nishimoto. Changes in cytokine profiles in rheumatoid arthritis patients during abatacept treatment. *EULAR 2013*. Madrid. Spain. 2013.6.12-15.
5. S. De Vita, L. Quartuccio, M. Isola, L. Corazza, M. Ramos-Casals, S. Retamozo, R.M. Gaafar, M.N. Zoheir, E.-M.M. Abdel-Moneim, M. Salem. D. Sansonno, V. Conteduca, G. Ferraccioli, E. Gremese, A. Tzioufas, M. Voulgarelis, D. Vassilopoulos, C. Koutsianas, A. L. Zignego, T. Urraro, N. Pipitone, C. Salvarani, A. Ghinoi, L. Guillevin, B. Terrier, P. Cacoub, D. Filippini, F. Saccardo, A. Gabrielli, P. Fraticelli, M. Tomsic, C. Ferri, M. Sebastiani, A. Tavoni, E. Catarsi, C. Mazzaro, P. Pioltelli, N. Nishimoto, P. Scaini, G. Monti. M. Pietrogrande, M. Galli, S. Bombardieri. Preliminary results of the classification criteria for cryoglobulinemic vasculitis validation study. *EULAR 2013*. Madrid. Spain. 2013.6.12-15.
6. N. Nishimoto. Tocilizumab treatment in autoimmune diseases. 12th International Symposium on Sjogren's Syndrome. Luncheon Seminar 2. Kyoto Hotel Okura. Kyoto. 2013.10.9-12
7. 西本憲弘 . リウマチ性疾患におけるサイトカインの役割 . 小児リウマチ研修会in OKINAWA イブニングセミナー . 沖縄市町村自治会館 2 階 . 沖縄 . 2013.3.15
8. 村上美帆、松谷隆治、李穎、關口昌弘、松井聖、北野将康、大村浩一郎、井村嘉孝、藤井隆夫、黒岩孝則、中原英子、前田恵治、村上孝作、森田智視、川人豊、

- 三森経世、佐野統、西本憲弘. 抗環状シトルリン化ペプチド抗体陽性RA患者におけるT細胞の活性化. 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会. ポスター. 国立京都国際会館. 京都. 2013.4.18-20.
9. 松谷隆治、李穎、村上美帆、關口昌弘、松井聖、北野将康、大村浩一郎、井村嘉孝、藤井隆夫、黒岩孝則、中原英子、前田恵治、村上孝作、川人豊、三森経世、佐野統、西本憲弘. 関節リウマチの治療 生物学的製剤(TNF阻害薬以外) アバタセプト治療は抗環状シトルリン化ペプチド抗体陽性RA患者の活性化T細胞を抑制する. 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会. 口頭発表. 国立京都国際会館. 京都. 2013.4.18-20.
 10. 藤井隆夫、關口昌弘、大村浩一郎、井村嘉孝、橋本求、前田恵治、中原英子、比嘉慎二、黒岩孝則、井川宣、三木健司、吉井一郎、波内俊三、村上孝作、尾本篤志、川人豊、西本憲弘、三森経世、佐野統、ABROAD研究グループ. 関節リウマチの治療 生物学的製剤(TNF阻害薬以外) アバタセプトによる生物学的製剤未治療関節リウマチ患者の寛解導入率とそれに影響を与える因子の検討(ABROAD試験). 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会. 国立京都国際会館. 京都. 2013.4.18-20.
 11. 吉川卓宏、松井聖、關口昌弘、北野将康、横田章、船内正憲、八田和大、東光久、新名直樹、樋上謙士、尾崎吉郎、日高利彦、竹内孝男、藤本隆、川人豊、藤井隆夫、西本憲弘、三森経世、佐野統、ABROAD研究グループ. 関節リウマチの治療 生物学的製剤(TNF阻害薬以外) 生物学的製剤未治療RA患者に対するBody Mass Index(BMI)とアバタセプト(ABT)の臨床的効果との関連(ABROAD試験の中間解析). 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会. 国立京都国際会館. 京都. 2013.4.18-20.
 12. 西本憲弘. IL-6阻害による関節リウマチの治療. 平成25年度日本内科学会生涯教育講演会. 大阪国際会議場. 大阪. 2013.5.19
 13. 西本憲弘. IL-6と炎症. 第34回日本炎症・再生医学会. 教育講演. 国立京都国際会館. 京都. 2013.7.2
 14. 西本憲弘. IL-6 阻害による関節リウマチの治療. 平成25年度日本内科学会生涯教育講演会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2013.9.29
 15. Nishimoto N. Interleukin-6 as a therapeutic target in inflammatory autoimmune diseases. - From rheumatoid arthritis to vasculitis syndromes-. The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop2012. Tokyo, conference center. Tokyo, Japan. 2012.3.29
 16. Nishimoto N, Lee HM, Murakami M, Aoki C, Li Y, Matsutani T. Expressions of immune response related genes were normalised after Tocilizumab treatment in rheumatoid arthritis (RA) patients. EULAR 2012. Messe Berlin. Berlin. Germany. 2012.6.6-9.
 17. 松谷隆治、李穎、村上美帆、李慧敏、青木千恵子、西本憲弘. リンパ球サブセットの解析. 関西関節リウマチセミナー. ヒルトン大阪. 大阪. 2012.1.20
 18. Lee HM, Aoki C, Murakami M, Matsutani T, Nishimoto N. Overexpressions of S100A4/A6/A9/A11/A12 in the patients with RA, SLE, and JIA and correlations of their expression levels with the local and systemic inflammatory biomarkers in RA patients. 第56回日本リウマチ学会総会・学術集会. 第21回国際リウマチシンポジウム. ポスター発表 1. グランドプリンスホテル新高輪. 東京. 2012.4.26-28
 19. Nishimoto N. Advanced therapeutic strategy using anti-IL6 receptor antibody, tocilizumab, in RA. 第56回日本リウマチ学会総会・学術集会. 第21回国際リウマチシンポジウム. 第21回国際リウマチシンポジウム 3. グランドプリンスホテル新高輪. 東京. 2012.4.26-28

20. 西本憲弘．免疫系におけるサイトカインの働きとリウマチ性疾患．第22回日本小児リウマチ学会総会・学術集会 教育講演．ウィルあいち．愛知．2012.10.5-7
21. Nishimoto N. Discovery of IL-6 and its clinical application - The journey from IL-6 to tocilizumab-第41回日本免疫学会学術集会 International Symposium 12 Translational Research in Immunology 第41回日本免疫学会学術集会 シンポジウム．神戸国際会議場．2012.12.5-7
22. 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
23. 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
24. 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
25. 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
26. 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
27. 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
28. 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DNase1 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
29. 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
30. 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
31. 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
32. 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
33. 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β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
34. 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
35. 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
36. 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
37. Sugino H, Lee HM, Ochi T, Nishimoto N. Suppression of intracellular S100A4 utilizing siRNA inhibits osteoclastogenesis. EULAR2011. London. 2011.5.25-28.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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。

関節リウマチの病態を制御する末梢血単球亜分画に関する研究

研究分担者 桑名 正隆 慶應義塾大学リウマチ内科 准教授
研究協力者 金子 祐子 慶應義塾大学リウマチ内科 助教
研究協力者 瀬田 範行 慶應義塾大学リウマチ内科 助教
研究協力者 堀内 行雄 川崎市立川崎病院 病院長
研究協力者 島岡 康則 浜脇整形外科病院 副院長
研究協力者 越智 健介 東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター 助教

研究要旨

関節リウマチ (RA) 病態の中心的役割を担う滑膜細胞、破骨細胞は末梢血単球由来と考えられてきた。末梢血単球には多彩な亜分画が存在し、それぞれが炎症惹起、免疫抑制、組織再生など異なる機能を有する。そこで、RA 患者末梢血、骨髓を用いて CD14+単球亜分画の RA 病態における役割を検討した。末梢血単核球をソーティングして特定の単球分画のフェノタイプ、機能を検討したところ、CD14+CD15+CXCR4^{low} 細胞は TNF や IL-6 を高発現することで関節内の炎症を惹起するが、CD14+CD15-CXCR4^{high} 細胞は骨芽細胞や軟骨芽細胞への分化能を有して関節の再生を促して保護的に働くことが明らかとなった。また、未治療 RA 患者の前向きコホート (SAKURA) データベースを用いて、診断時の末梢血単球亜分画と疾患活動性やその後の関節破壊進展との関連を追究した。未治療 RA では健常人に比べて CD14+CD16+、CD14+CCR2+単球が増加し、CD14+単球における CXCR4 発現は低下、CCR2 発現は上昇していた。CD14+CCR2+は CRP と正の相関を示し、CD14+CD16+は MRI における骨びらん・骨髓浮腫と関連し、1 年後の関節破壊進行例 (mRSS > 0.5/年) および急速関節破壊進行例 (mRSS 5/年) と関連した。二項ロジスティック回帰分析では診断時 CD14+CD16+単球比率のみが関節破壊進行、特に関節裂隙狭小化の進行を予測する独立因子として抽出された。以上より、末梢血単球亜分画はそれぞれが異なる RA 病態と関連していた。これら末梢血単球亜分画のバランスが個々の症例における関節炎の程度や関節破壊の進行度の多様性を制御している可能性がある。末梢血中単球亜分画が予後不良を予測するバイオマーカーとして有用であるとともに、RA の新たな治療標的として注目された。

A. 研究目的

関節リウマチ (RA) は関節滑膜の増殖と炎症により関節破壊をきたす全身性炎症性疾患である。その病態には T 細胞、B 細胞、破骨細胞、滑膜細胞などの多彩な細胞、ケモカイン、サイトカインなどの液性因子の関連が知られている。RA 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、TNF や IL-1 など様々な炎症性サイトカインを産生する。また、骨浸食には破骨細胞が積極的に関与する。このように RA 病態の中心的役割を担う滑膜細胞、破骨細胞は末梢血単球由来と考えられてきた。腸骨から末梢血に動員される CD14+CD15+単球が重症のムチランス型と関連することが示されているが、末梢血単球の RA 病態への関わりについての報告は少ない。

末梢血単球は抗原提示細胞、炎症細胞の前駆細胞であることが知られているが、多彩な亜分画が存在し、それぞれが炎症惹起、免疫抑制、組織再生など異なる機能を有する。そこで、RA患者末梢血、骨髓を用いてCD14+単球亜分画のRA病態における役割を検討した。また、未治療RA患者の前向きコホート(SAKURA)データベースを用いて、診断時の末梢血単球亜分画と疾患活動性やその後の関節破壊進展との関連を追究した。

B. 研究方法 対象

外来通院中のRA患者86名と健常人32名を対象とした。うち9名のRAより同時に骨髓血の提供を受けた。

SAKURAは新規RA患者を対象とした前向きコホートで、平成19年8月より未治療RA患者を連続して登録してきた。登録例のうち、1年以上経過観察し、その間の関節破壊に関するデータが前向きに収集できた75例を対象とした。RA診断時に関節所見、免疫・血清反応を含めた血液検査、関節X線、手関節MRI、骨密度、頸動脈エコー、足関節上腕血圧比を実施し、末梢血を採取した。また、経時的に臨床情報を蓄積している。

フローサイトメトリー

末梢血または骨髓血から比重遠心法で単核球を分離してCD3、CD14、CD15、CD16、CD19、CD29、CD31、CD34、CD144、CCR1、CCR2、CCR4、CCR5、CCR6、CXCR3、CXCR4、CXCR5、VGEFR1の発現を多重染色後のフローサイトメトリーで解析し、陽性分画の比率または蛍光平均強度(Mean fluorescence intensity: MFI)を求めた。

CXCR4発現レベルによる単球のフェノタイプ・機能解析

フローサイトメーター(FACS CaliburまたはMoFlo™)の細胞分離システムを用いて末梢血からCD14+CD15-CXCR4high細胞とCD14+CD15+CXCR4low細胞を単離した。これら細胞群におけるIL-1α、IL-6、IL-8、TNF、MCP-1、CCR1、CCR2、CCR5、CX3CR1の発

現を定量的PCRで解析した。遺伝子発現レベルはGDPAHの発現量で補正した。さらに、単球由来多能性細胞の誘導のためにフィブロネクチンをコートした培養プレートでCD14-細胞由来液性因子と共に培養した。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た。

(倫理面への配慮)

本研究は学内倫理委員会で承認済みで、患者本人に対して研究内容を説明し、文書による同意を取った。

C. 研究結果

RA骨髓ではCD14+単球の28-60%にCD15の発現が見られた。CD15発現の有無で層別化するとCD15+単球でCD15-単球と比べてCD34とCCR5の発現が高かった($P < 0.05$)。同様の傾向は末梢血でもみられたが、統計学的な有意差はなかった。一方、再生能の高い単球由来多能性細胞への分化効率はCXCR4high単球の方がCXCR4low単球に比べて高かった。したがって、単球由来多能性細胞の前駆細胞はCD14+CXCR4high細胞中に濃縮され、末梢血CXCR4high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可能性が想定された。RA患者では末梢血単球のCXCR4の発現は健常人より低く、疾患活動性が高いほど低下した。そこで、末梢血CD14+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-単球はCD15+単球より有意にCXCR4の発現が高かった。すなわち、末梢血単球におけるCD15とCXCR4の発現は互いに相反した。そこで、MoFlo™を用いて末梢血単核球からCD14+CD15+CXCR4lowとCD14+CD15-CXCR4highを高率に含む分画を分離し、それらの遺伝子発現プロフィールを比較した。その結果、CD14+CD15+CXCR4lowでTNFαとIL-6、CD14+CD15-CXCR4highでCX3CR1の発現レベルが高かった。

最後にSAKURAコホートに登録された75例

を対象として診断時の末梢血単球分画と疾患活動性やその後の関節破壊進展との関連を追究した。罹病期間 0.6 ± 0.4 年、ステージ I が 91%であったが、シャープ変法 (mTSS) による骨破壊は 9.6 ± 20 で早期にもかかわらず関節破壊進行が早い予後不良例を多く含んでいた。

登録時の単球分画を RA75 例と健常人 20 例で比較した。単球分画では、健常人に比べて RA では CD14+CD16+単球の増加 ($P = 0.04$)、CD14+CCR2+単球の増加 ($P < 0.001$) を認めた。また、CD14+単球における CXCR4 発現は低下し ($P = 0.003$)、CCR2 発現は上昇していた ($P < 0.001$)。登録時の活動性指標と末梢血単球分画の関連を調べたところ、CD14+CCR2+は CRP と相関したが ($r = 0.33$, $P = 0.001$)、CD14+CD16+単球比率、CD14+単球における CXCR4 の発現レベルは活動性指標と相関しなかった。

登録時の MRI による関節破壊 (骨びらんまたは骨髄浮腫) の有無と単球分画の関連を調べた。診断時に関節破壊を認めた例では認めなかった例と比較して CD14+CD16+単球比率が高かった ($P = 0.003$) が、他の単球指標との関連はなかった。1 年間に関節破壊の進行 ($mRSS > 0.5$ /年) を認めた 38 例では、それ以外に比べて有意に CD14+CD16+単球比率が高かった ($P = 0.04$)。特に急速に関節破壊が進行した ($mRSS \geq 5$ /年) 20 例は、CD14+CD16+単球比率が高かった ($P = 0.01$)。mTSS を関節裂隙狭小化と骨びらんに分けて解析した。関節裂隙狭小化進行例は非進行例に比べて CD14+CD16+比率が高かったが ($P = 0.04$)、骨びらん進行例と非進行例の間で統計学的な有意差はなかった。

最後に関節破壊進行を予測する独立因子を検討した。単変量解析で関節破壊進行を予測する因子を調べると 12 ヶ月後の DAS28 と診断時 CD14+CD16+単球比率が得られた ($P = 0.02$, 0.04)。これら 2 項目に診断までの期間、抗 CCP 抗体、12 ヶ月までの生物学的製剤使用を加えて二項ロジスティック回帰分析を行ったところ、診断時 CD14+CD16+単球比率

のみが関節破壊進行を予測する独立因子として抽出された ($P = 0.02$ 、オッズ比 1.8、95%CI 1.1-2.8)。同様の解析を関節裂隙狭小化、骨びらんの進行で行うと、関節裂隙狭小化の進行を予測する独立因子として診断時 CD14+CD16+単球比率 ($P = 0.03$ 、オッズ比 1.03、95%CI 1.004-1.062)、骨びらん進行を予測する独立因子として 12 ヶ月後の DAS28 が抽出された ($P = 0.01$ 、オッズ比 1.95、95%CI 1.2-3.2)。

D. 考察

RA 病態における単球亜分画と病態への関わりを検討した。その結果、末梢血単球には多様な分画が存在し、それぞれが異なる役割を果たしていることが明らかとなった。CD14+CD15+CXCR4^{low} 細胞は TNF や IL-6 を高発現することで関節内の炎症を惹起するが、CD14+CD15-CXCR4^{high} 細胞は骨芽細胞や軟骨芽細胞への分化能を有して関節再生に働くことが明らかとなった。また、末梢血 CD14+CD16+単球比率は関節破壊進行の早い予後不良例で増加し、かつ治療導入にもかかわらず関節破壊、特に関節裂隙狭小化の進行と関連する。これら末梢血単球亜分画のバランスが個々の症例における関節炎の程度や関節破壊進行度の多様性を制御している可能性がある。末梢血 CD14+CD15+CXCR4^{low} 細胞比率が炎症、CD14+CD16+単球比率が関節予後不良を予測するバイオマーカーとして有用な可能性が示された。今後、単球分画が関節破壊を誘導する機序のさらなる解明が必要であるが、新たな治療標的としてもきわめて魅力的である。

E. 結論

RA 患者末梢血中単球亜分画のバランスが疾患活動性、関節予後不良と関連した。末梢血単球が RA の新たな治療標的として有望な可能性が示された。

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*. 50(7): 1268-1274. 2011.
2. Seta N and Kuwana M. Potential involvement of human circulating CD14⁺ monocytes in tissue repair and regeneration. *Inflam. Regen*. 32(1): 1-7. 2012.
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*. 90(2): 479-488. 2012.
4. Mitsunaga S, Suzuki Y, Kuwana M, Sato S, Kaneko Y, Homma Y, Narita A, Kashiwase K, Okudaira Y, Inoue T, Kulski JK, and Inoko H. Associations between six classical HLA loci and rheumatoid arthritis: a comprehensive analysis. *Tissue Antigens*. 80(1): 16-25. 2012.
5. Seta N, Okazaki Y, Izumi K, Miyazaki H, Kato T, and Kuwana M. Fibronectin binding is required for human circulating monocytes to acquire the mesenchymal/endothelial differentiation potential. *Clin. Dev. Immunol*. 2012: 820827. 2012.
6. Yamaguchi Y and Kuwana M. Proangiogenic hematopoietic cells of monocytic origin: roles in vascular regeneration and pathogenic processes of systemic sclerosis. *Histol. Histopathol*. 28(2): 175-183. 2013.
7. Mitsunaga S, Hosomichi K, Okudaira Y, Nakaoka H, Kunii N, Suzuki Y, Kuwana M, Sato S, Kaneko Y, Homma Y, Kashiwase K, Azuma F, Kulski JK, Inoue T, and Inoko H. Exome-sequencing identifies novel rheumatoid arthritis-susceptible variants in the BTNL2. *J. Hum. Genet*. 58(4): 210-215. 2013.
8. Seta N, Okazaki Y, Miyazaki H, Kato T, and Kuwana M. Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 is required for the transformation of circulating monocytes into

multipotential cells. *PLoS One*. 8(9): e74246. 2013.

2. 学会発表

1. 西本哲也、瀬田範行、金子祐子、桑名正隆、竹内勤: 未治療の日本人関節リウマチ患者における一塩基多型の解析. 第55回日本リウマチ学会総会 (神戸). 2011. 7. (ワークショップ: 関節リウマチの病因・病態 5)
2. Nishimoto T, Seta N, Anan R, Yamamoto T, Kaneko Y, Kuwana M, Takeuchi T: Gene Polymorphisms of STAT4 and TRAF1 Predict Clinical Response to DMARDs in Japanese Patients with RA. The 4th East Asian Group of Rheumatology (Tokyo). 2011. 10.
3. 仁科直、亀田秀人、金子祐子、桑名正隆、竹内勤: 初発関節リウマチに患者に対する non-biological DMARDs 治療と血清サイトカインの変化. 第56回日本リウマチ学会総会 (東京). 2012. 4. (ワークショップ 77: 関節リウマチの治療: DMARDs-NSAIDs1)
4. 瀬田範行、岡崎有佳、越智健介、島岡康則、堀内行雄、竹内勤、桑名正隆: 関節リウマチの骨髄と末梢血 CD14⁺単球のフェノタイプ解析. 第56回日本リウマチ学会総会 (東京). 2012. 4.
5. Nishimoto T, Seta N, Anan R, Yamamoto T, Kaneko Y, Kuwana M, Takeuchi T: A single nucleotide polymorphism of tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 predicts clinical response to anti-tumor necrosis factor treatments in Japanese patients with rheumatoid arthritis. The 76th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (Washington, DC). 2012. 11.
6. Nishina N, Kameda H, Kaneko Y, Kuwana M, Takeuchi T: Interleukin-6 as a biomarker for the clinical and radiological effectiveness of methotrexate in rheumatoid arthritis. The 76th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (Washington, DC). 2012. 11.

7. 仁科直、金子祐子、亀田秀人、桑名正隆、竹内勤: 初発関節リウマチ患者に対するメソトレキセート治療で血漿 IL-6 は低下し、治療後 IL-6 は関節破壊のバイオマーカーとなりうる. 第 57 回日本リウマチ学会総会 (京都). 2013. 4. (ワークショップ 39: 関節リウマチの治療: DMARDs-NSAIDs 3)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

1. 桑名正隆、加藤尚志、瀬田範行、宮崎洋: 単球由来多能性細胞 (MOMC) の効率的な作製法、特許第5416895号、2013年11月22日.
2. 桑名正隆、加藤尚志、瀬田範行、宮崎洋: 単球由来多能性細胞 (MOMC) の効率的な作製法 (Method for efficient production of Monocyte-derived multipotent cell (MOMC)) \ US Patent 8,216,838、2012年7月10日.

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

RA における骨髄造血幹細胞分化異常の解析に関する研究

研究分担者 中畑龍俊 京都大学 iPS 細胞研究所 教授

研究要旨

慢性関節リウマチ(RA)の発症には自然免疫担当細胞が関与していることが知られているため、iPS 細胞を用いた RA 研究には機能的な血球を効率的に分化させることができる分化系が必要である。我々が開発した血球分化系を拡張して、機能的な単球、マクロファージ、樹状細胞を作製する分化系を確立した。また、新たなスキャフォールドを用いた 3 次元培養法を確立した。PET 線維で補強したコラーゲンスポンジを基材として用いることにより、従来の血球系と異なり、細胞クラスターでなく単一細胞を播種して血球分化を開始することが可能となった。また、この系には、長期間の培養が可能になり、電子顕微鏡による解析では、ニッシェ細胞と血球細胞が 3 次元スキャフォールド上でニッシェを構築していることが明らかになった。また、慢性関節リウマチ患者 5 名からの iPS 細胞樹立を行った。

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。これらの目的のためには、iPS 細胞より多くの血球系細胞を安定して確保することが必要であるが、従来の方法では限界があった。

そこで、我々は、分担研究として、iPS 細胞から単球系細胞を樹立する系を構築すること、及び慢性関節リウマチ(RA)患者由来 iPS 細胞を樹立することを目的とした。

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。確立した分化系を用いて、マクロファージ・樹状細胞の機能評価を行った。

また、新規培養系として、コラーゲンスポンジ(CS)を用いた 3 次元培養系の構築も試みた。ヒト ES/iPS 細胞コロニーをコラーゲンナーゼで解離し、非接着培養用に処理した培養皿で浮遊培養を行う。基礎培地としては主に臍帯血の ex vivo 増幅に用いられる無血清培地を用いる。サイトカインは主に ES/iPS 細胞の中胚葉分化に VEGF、造血分化に SCF, TPO, FL, IL3, EPO を用い、それらの濃度と投与期間を変えて検討した。3 次元スキャフォールドとして、PET 繊維補強コラーゲンスポンジ(PETcol-24W)を MedGEL CO., LTD から購入して使用した。

iPS 細胞の樹立については、血液または皮膚線維芽細胞より、エピソーマルベクターを用

いて行った。

(倫理面での配慮)

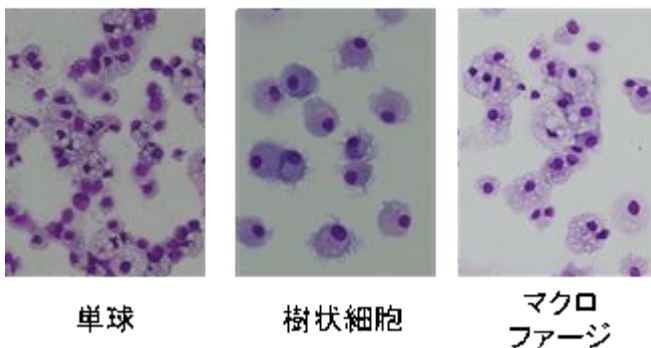
尚、iPS細胞に関する本研究における患児の遺伝子情報の取り扱いに際しては、“ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針”及び文部科学省研究振興局長通知に定める細則に沿って、京都大学医の倫理委員会の審査承認を受けている(実施責任者:中畑龍俊、当初承認日:平成20年6月4日、変更・追加承認日:平成24年7月19日)が、人権及び利益の保護について、十分配慮しながら実験を行った。患者からの疾患関連iPS細胞作製にあたり、「ヒト疾患特異的iPS細胞の作製とそれをを用いた疾患解析に関する研究」について、京都大学医の倫理委員会の承認を頂いている(実施責任者:中畑龍俊、当初承認日:平成20年6月4日、変更・追加承認日:平成24年7月19日)。

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。

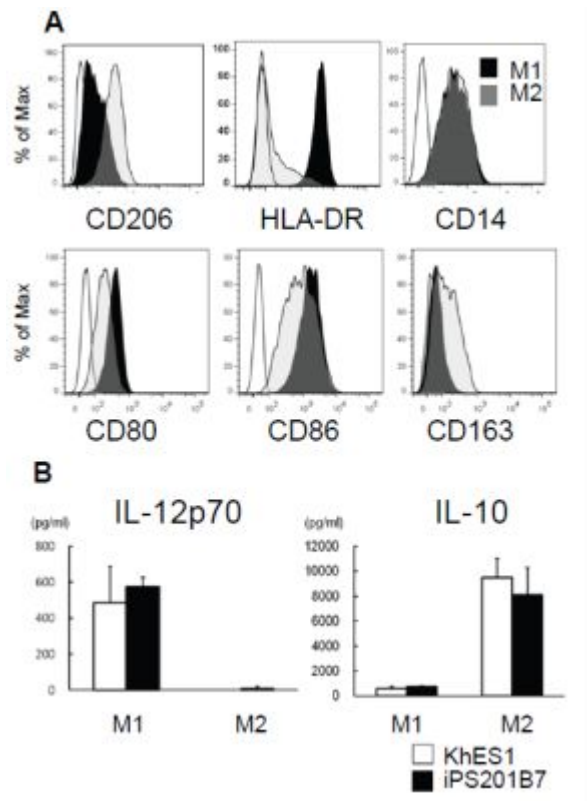
分化した単球は、CD14陽性で炎症性サイトカインを産生し、ケモアトラクタントに対する遊走能を示した。OVA抗原取り込み能も保持していた。

ヒトiPS細胞から誘導した 単球系細胞



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。

さらに単球系細胞分化系の評価として、クローン数を増やして検討したが、5クローンのヒトiPS/ES細胞株から安定して誘導可能であった。また、単球系の純度は一貫して60-90%程度であり、細胞純化を行わずに機能評価が可能であった。分化した単球をマクロファージに分化させ、さらにM1/M2マクロファージへと分極させることが可能か検討したところ、マクロファージは刺激に対してM1/M2それぞれに一致するサイトカイン分泌能を示した。したがって、ヒト多能性幹細胞から誘導したマクロファージは適切な刺激により分極が可能であることが判明した。

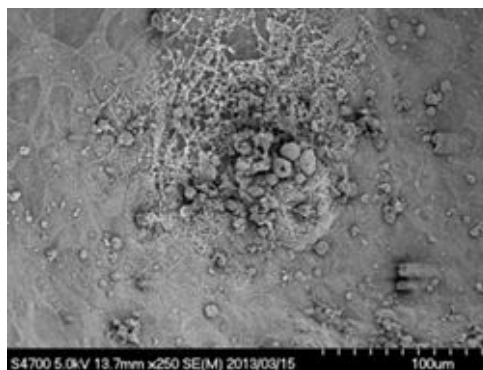


また、三次元培養系については、最初に、我々が以前に開発した二次元・マトリゲル上の血球分化系(以下2D-MG系)を応用して、CS上の血球分化を行えるかを検討した。すると、

従来の方法と同様に、Day 6 の flow cytometry では、KDR+CD34+の中胚葉系の血球前駆細胞と考えられる分画が生じていた。その割合は、クローン毎に様々であったが、2D-MG 法と同程度であった。

次に、上述の造血前駆細胞分画から各種血球細胞を得るために幾つかのサイトカインの組み合わせを用いて血球分化を行った。概ね day 20 頃からスポンジから浮遊細胞の出現が顕著になり、well の底に溜まっていく。これらの細胞は、スポンジを取り出して残りの培養上清を遠心することにより簡単かつ繰り返し回収することができる。得られた血球細胞の細胞表面マーカと形態を観察すると、サイトカインカクテルの組み合わせにより、好中球系細胞、単球系細胞あるいは赤芽球系細胞を作り分けることが可能であった。中胚葉・血球分化系は共培養や胚様体形成が必要で、Single-cell に分離した状態からフィーダーフリーで血球分化させるのは困難である。しかし、分化能の定量化や手技の簡略化のためには、Single cell にしたPSCから分化が行えることが望ましい。そこで、接着している iPS 細胞を単一細胞に解離してCS に撒いて分化が可能かを検討した。この場合も、Day 6 の flow cytometry では、KDR low ~ + CD34+ の分画が出現していた。さらに、Day 20 頃からCS から浮遊細胞が遊離しており、これらは CD43+CD45+ の血球系細胞であることが確認された。CS の内部構造を確認するため、走査電顕でCSを観察したところ、一部で、円柱あるいは扁平上皮が細胞集簇して平面を形成し、その一部から球形の細胞が敷石状に萌出している部分を認めた。また、PET 繊維に円形の細胞が集団を形成している部分を認めた。

疾患特異的 iPS 細胞樹立については、5名の患者より皮膚線維芽細胞あるいは血液を採取し、iPS 細胞樹立を行った。



ニッシュ細胞上の 血球様細胞

D. 考察

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。本法で作製した単球系細胞は形態学的やサイトカイン産生能について、プライマリ血球細胞に類似していた。一方、樹状細胞のHLA-DR 発現はプライマリ単球より誘導した樹状細胞より低く、アロ T 細胞の刺激能も低かった。概ね良好な分化系を樹立したと考えているが、さらなる検討が必要である。

さらに、3次元スキャフォールドを用いた多能性幹細胞からの血球分化系を開発した。この系では、ニッシュを構成する基質と細胞が一塊となって形成され、血球分化を支持しているように見える。この分化系は、従来の2D-MG系などに比べて長期間維持が可能であることや、ニッシュと血球系前駆細胞を一塊として可搬性のある基材上で誘導できることから、複数のCSを浮遊培養に持ち込むことにより大量の血球細胞を継続的に得ることが可能になるかもしれない。また、ニッシュと血球系前駆細胞を一塊として免疫不全マウスに移植するという応用も考えられる。もちろん現時点ではニッシュの機能は不十分ではあるものの、今後改善を重ねて、系を改良することにより、より有用な系が開発できるものと期待される。

E. 結論

慢性関節リウマチの解析や移植実験に有用な、新たな多能性幹細胞からの分化誘導系を開発することができた。iPS細胞研究の骨子になるのは安定した分化系の構築であり、この成果を生かし研究を進めてゆきたい。樹立した疾患特異的 iPS 細胞をこれらの系を用いて自然免疫担当細胞へ誘導し、機能解析を行うことにより、新たな治療法開発へつながることが期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

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. Yamanaka Y, Kitano A, Takao K, Prasansuklab A, Mushiroda T, Yamazaki K, Kumada T, Shibata M, Takaoka Y, Awaya T, Kato T, Nakahata T, Heike T. Inactivation of fibroblast growth factor binding protein 3 causes anxiety-related behaviors. *Mol. Cell. Neurosci.* 46: 200-212. 2011.
4. 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.
5. 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.
6. Kawagoe S, Higuchi T, Xing-Li M, Shimada Y, Dhimizu H, Fukuda T, Chang H, Nakahata T, Fukuda 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. doi: 10. 1016/ j.ymgme. 2011.05.020.
7. 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* 6(7): e22261. 2011.
8. 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.
9. Tanaka N, Nishikomori R, Saito M, Izawa K, Sakuma M, Morimoto T, Kambe N, Watanabe S, Oshima K, Ohara O, Goldbach-Mansky R, Aksentjevich I, Arostegui J. I, Yague Jm Joost F, van Gijn M.E, SaintBasile 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.
10. Sakai H, Okafuji I, Nishikomori R, Abe J, Izawa K, Kambe N, Yasumi T, Nakahata T, Heike T. The CD40-CD40L axis and INF-g play critical roles in Langerhans giant cell formation. *Int. Immunol.* 24(1): 5-15. 2012.
11. Izawa K, Hijikata A, Tanaka N, Kawai T, Saito M. K, Goldbach-Mansky R, Aksentjevich I, Yasumi T, Nakahata T, Heike T, Nishikomori R, Ohara O. Detection of base substitution-type somatic mosaicism of the NLRP3 gene with >99.9% statistical confidence by massively parallel sequencing. *DNA Res.* 19(2):143-152. 2012.
12. Kawai T, Nishikomori R, Izawa K, Murata Y, Tanaka N, Sakai H, Saito M, Yasumi T,

- Takaoka Y, Nakahata T, Mizukami T, Nunoi H, Kiyohara Y, Yoden A, Mutara T, Sasaki S, Ito E, Akutagawa H, Kawai T, Imai C, Okada S, Kobayashi M, Heike T. Frequent somatic mosaicism of NEMO in T cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia and immunodeficiency. *Blood* 119 (23): 5458-66. 2012.
13. Tsumura M, Okada S, Sakai H, Yasunaga S, Ohtsubo M, Murata T, Obata H, Yasumi T, Kong X, Abhyankar A, Heike T, Nakahata T, Nishikomori R, Al-Muhsen S, Boisson-Dupuis S, Casanova J, AlZahrani M, Shehri MA, ElGhazali G, Takihara Y, Kobayashi M. Dominant-negative STAT1 SH2 domain mutations in unrelated patients with Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. *Human Mutation* 33(9):1377-87. 2012.
 14. Tanaka T, Takahashi K, Yamane M, Tomida S, Nakamura S, Oshima K, Niwa A, Nishikomori R, Kambe N, Hara H, Mitsuyama M, Morone N, Heuse J.E, Yamamoto T, Watanabe A, Sato-Otsubo A, Ozawa S, Asaka I, Heike T, Yamanaka S, Nakahata T, Saito M.K. Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. *Blood* 120(6):1299-308.2012.
 15. Kawai T, Saito M, Nishikomori R, Yasumi T, Izawa K, Murakami T, Okamoto N, Mori Y, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Wada T, Yatie A, Oomori K, Nakahata T, Heike T. Multiple reversions of an IL2RG mutation restore combined immunodeficiency patient. *J. Clin. Immunol.* 32(4):690-7. 2012.
 16. Nakazawa Y, Saito S, Yanagisawa R, Suzuki T, Ito T, Ishida F, Muramatsu H, Matsumoto K, Kato K, Ishida H, Umeda K, Adachi S, Nakahata T, Koike K. Recipient seropositivity for adenovirus type 11 is a highly predictive factor for the development of AdV11-induced hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 48:737-739. 2013.
 17. Yanagimachi MD, Niwa A, Tanaka T, Ozaki F, Nishimoto S, Murata Y, Yasumi T, Ito J, Tomida S, Oshima K, Asaka I, Goto H, Heike T, Nakahata T, Saito MK. Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell- free conditions. *PLoS ONE.* 8(4):e59243. doi: 10.1371/journal.pone.0059243 2013.
 18. Kodera Y, Yamamoto K, Harada M, Morishima Y, Dohy H, Asano S, Ikeda Y, Nakahata T, Imamura M, Kawa K, Kato S, Tanimoto M, Kanda Y, Tanosaki R, Shiobara S, Kim SW, Nagafuji K, Hino M, Miyamura K, Suzuki R, Hamajima N, Fukushima M, Tamakoshi A; for the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation, Halter J, Schmitz N, Niederwieser D, Gratwohl A.: PBSC collection from family donors in Japan: a prospective survey. *Bone Marrow Transplant.* Sep 30. doi: 10.1038/ bmt. 2013.147. in press.
 19. Morishima T, Watanabe KI, Niwa A, Hirai H, Saida S, Tanaka T, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Saito MK, Matsubara K, Adachi S, Kobayashi M, Nakahata T, Heike T.: Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis. *Haematologica.* 99(1):19-27. 2014.

2.学会発表

1. 中畑龍俊：公開講演、iPS 細胞を用いた今後の医療。第 60 回日本医学検査学会(市民公開講座) 2011 年 6 月 6 日 東京国際フォーラム
2. 中畑龍俊：教育講演、疾患特異的 iPS 細胞を用いた今後の医療。第 28 回日本医学学会総会 2011 年 9 月 18 日,東京国際展示場,東京。
3. Nakahata T.: Various clinical applications of human induced pluripotent stem cells. (Keynote Lecture) 2011 International Symposium on Recent Advances in Pluripotent Stem Cells & 7th Annual Meeting of Taiwan Society for Stem Cell Research, Oct. 1, 2011, Taipei Medical University, Taiwan.
4. Yanagimachi M., Niwa A., Tanaka T., Oshima K., Saito M., Nakahata T.:

- Differentiation of monocytic lineage cells from human iPS cells by using a serum and feeder free culture method. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.
5. Niwa A., Saito M., Oshima K., Yanagimachi M., Tanaka T., Kato I., Nakahata T.: Human ESC/iPSC-derived mesenchymal stroma can support hematopoietic progenitors. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.
 6. Morishima T., Watanabe K., Niwa A., Tanaka T., Saida S., Kato I., Umeda K., Hiramatsu H., Matsubara K., Adachi S., Nakahata T., Heike T.: Induced pluripotent stem cell model of severe congenital neutropenia with HAX1 gene deficiency. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.
 7. Yokoyama K., Ikeya M., Nasu A., Tanaka T., Saito M., Umeda K., Nishikomori R., Nakahata T., Heike T., Toguchida J.: Understanding the pathology of the arthropathy in chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome by using iPS cells technology. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.
 8. Tanaka T., Saito M., Takahashi K., Yamanaka S., Nakahata T.: Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.
 9. 田中孝之、斎藤潤、西小森隆太、平家俊男、中畑龍俊：患者特異的 iPS 細胞を用いた CINCA 症候群体細胞モザイクでの病態の再現と解析．第 114 回日本小児科学会学術集会 2011 年 8 月 14 日 グランドプリンスホテル新高輪,東京.
 10. 田中尚子、井澤和司、斎藤潤、作間未織、大嶋宏一、小原収、西小森隆太、森本剛、中畑龍俊、平家俊男：NLRP3 体細胞モザイクは CINCA 症候群の 25%以上に認められる．第 114 回日本小児科学会学術集会 2011 年 8 月 13 日,グランドプリンスホテル新高輪,東京.
 11. 中畑龍俊：iPS 細胞研究の今、その可能性と将来展望．第 115 回日本小児科学会学術集会 2012 年 4 月 20 日, 福岡国際会議場 福岡市.
 12. 中畑龍俊：特別講演、iPS 細胞研究の進展．第 59 回日本臨床検査医学会学術集会 2012 年 11 月 30 日 国立京都国際会館,京都.
 13. 中畑龍俊：教育講演、小児患者における iPS 細胞の応用．第 49 回日本小児アレルギー学会 2012 年 9 月 16 日 大阪国際会議場,大阪.
 14. Suzuki N., Hira A., Niwa A., Saito M., Matsuo K., Nakahata T., Takata M., Yabe M.: Mesodermal development from reprogrammed Fanconi anemia cells is affected by ALDH2 enzymatic activity. 54th Annual Meeting of the AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY, December 8-11, 2012, Atlanta.
 15. 井澤和司、土方敦司、西小森隆太、小原収、田中尚子、河合朋樹、八角高裕、斎藤潤、中畑龍俊、平家俊男：次世代シーケンサーによる NLRP3 体制モザイクの診断．第 115 回日本小児科学会学術集会 2012 年 4 月 20-22 日(21 日)福岡国際会議場 福岡市.
 16. 井澤和司、西小森隆太、吉岡耕平、斎藤潤、中畑龍俊、平家俊男：CINCA 症候群における NLRP3 体細胞モザイク変異．第 33 回日本炎症・再生医学会 2012 年 7 月 5-6 日(5 日) ホテル日航福岡,福岡.
 17. 中畑龍俊：iPS 細胞研究が切り開く未来の医療．日本学術会議公開学術講演会「未来社会を築く生命科学と医療のフロンティア」2013 年 8 月 3 日 京都大学薬学部記念講堂,京都.

18. 中畑龍俊：iPS 細胞の臨床応用：患者さんから樹立する iPS 細胞を用いた難病の病態解析と創薬． 東京医科大学医学総合研究所シンポジウムイノベーションシリーズ Vol.3『免疫難病に対する挑戦 - バイオ医薬品から iPS 細胞の応用へ』 2013 年 9 月 11 日 東京医科大学病院 6 階臨床講堂,東京.
19. 中畑龍俊：特別講演、iPS 細胞の小児医療への応用．第 38 回東日本小児科学会 2013 年 11 月 23 日 大宮ソニックシティ, 大宮
20. 中畑龍俊：教育講演、iPS 細胞の臨床応用．第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会．2013 年 11 月 29 日 30 日, ヒルトン福岡シーホーク,福岡.
21. 中畑龍俊：iPS 細胞を活用した医療の可能性と倫理．第 10 回 STS フォーラム「科学技術が拓く人間の未来」公開シンポジウム 2013 年 10 月 5 日 京都商工会議所ビル講堂,京都.
22. 横山宏司、西小森隆太、池谷真、那須輝、田中孝之、齋藤潤、梅田雄嗣、中畑龍俊、戸口田淳也、平家俊男：罹患者由来 iPS 細胞を用いた CINCA 症候群における関節病態の分子機構の解明．第 34 回日本炎症・再生医学会 2013 年 7 月 2-3 日 国立京都国際会館,京都.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

骨細胞ネットワークによる骨量調節機構に関する研究

研究分担者 小守壽文 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 教授
研究協力者 森石武史 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 助教

研究要旨

BCL2 を骨芽細胞特異的に発現させたトランスジェニックマウスでは、骨細胞突起の数が減少し、骨細管が著減、4ヶ月齢では75%の骨細胞が死滅し、骨細胞ネットワークが破綻することを見いだした。骨形成は促進、骨吸収は低下しており、骨細胞ネットワークは、生理的条件下では、骨芽細胞機能を低下させ骨形成を抑制、破骨細胞分化・活性を促進させ骨吸収を促進させることが明らかとなった。さらに、非荷重時には、骨細胞ネットワークは、骨細胞によるスクレロスチン発現誘導により骨形成を抑制するとともに、骨芽細胞での Rank1 発現誘導により破骨細胞分化・活性を促進させ、骨吸収を増加、骨量を減少させることが明らかとなった。これにより骨細胞ネットワークは、メカニカルストレスの感知・応答システムであることが証明された。尾部懸垂により後肢を非荷重状態にした野生型マウスと BCL2 トランスジェニックマウスをマイクロアレイ解析で比較、非荷重を感知した骨細胞ネットワークが、骨芽細胞および骨細胞に Pdk4、Fkbp5 を発現誘導することを見いだした。Pdk4 ノックアウトマウスでは、非荷重時の骨吸収の亢進による骨量減少が起こらなかった。Pdk4 は骨芽細胞で RANKL 発現を誘導、破骨細胞形成、さらに骨吸収に導いていた。また、骨髄細胞も非荷重時に Pdk4 発現を上昇させ、破骨細胞形成に関与していた。Fkbp5 のノックアウトマウスでは、非荷重時に野生型マウスより強い骨量減少を認めた。また、Fkbp5 のノックアウトマウスは、グルココルチコイドに高い感受性を示し、強い骨量減少を認めた。Fkbp5 はグルココルチコイドの作用を調節するだけでなく、非荷重時の骨量減少にも関与することが示唆された。

A. 研究目的

骨形成と骨吸収はカップリングし、バランスが保たれているが、様々な非荷重状態では、骨形成は抑制され、骨吸収が亢進し、骨量が減少する。骨細胞は骨の中でお互いの突起および突起が通る骨細管で連絡している。さらに骨細胞はその突起と骨細管を介して骨表面の骨芽細胞と連絡し、骨全体にネットワークを形成している。骨細胞ネットワークは、その構造からメカニカルストレスを感知、骨芽細胞・破骨細胞にシグ

ナルを伝達し、骨量を調節していると推定されている。しかし、骨細胞機能を解明するためのモデルマウスが存在せず、これまで、その機能は証明されていない。今回、骨細胞ネットワークが骨量調節を行っていることを証明するとともに、その分子メカニズムを明らかにすることを本研究目的とした。

B. 研究方法

2.3 kb Col1a1 プロモーターを用いて BCL2 を骨芽細胞特異的に発現させたトランスジェニックマウスを作製した。マイクロ CT で骨量を野生型マウスと比較、骨組織形態計測で、骨形成、骨吸収パラメーターを測定した。銀染色で骨細管を観察するとともに、透過型電子顕微鏡および走査型電子顕微鏡で骨細胞の形態および突起構造を観察した。骨芽細胞の増殖を BrdU ラベルで、骨細胞死の頻度を TUNEL 染色で計測した。アポトーシス関連遺伝子の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法で、蛋白レベルを Western blot 法で検討した。4 ヶ月齢の BCL2 トランスジェニックマウスと野生型マウスで、1 週間の尾部懸垂により後肢に非荷重状態を作り、骨量を比較するとともに、非荷重時に骨芽細胞分画あるいは骨細胞分画に誘導される遺伝子をマイクロアレイで比較した。野生型マウスで誘導され、骨細胞ネットワークが破綻したマウスでは誘導されない遺伝子を探索した。リアルタイム RT-PCR 法により確認し、骨細胞ネットワークにより調節される遺伝子を同定した。さらに、同定した Pdk4 および Fkbp5 のノックアウトマウスを作製した。マイクロ CT、骨組織形態計測、リアルタイム RT-PCR にてコントロール群と非荷重群を野生型マウスとノックアウトマウスで比較した。グルココルチコイド投与実験は、1.25mg/kg/day あるいは 3.2mg/kg/day 用量のプレドニゾロンペレットを 4 週間皮下に植え込む方法、あるいはデキサメタゾン(2mg/kg/day、5mg/kg/day、10mg/kg/day) を 1 日 1 回 4 週間注射投与にて行った。in vitro の破骨細胞形成実験は、骨髄細胞を M-CSF と RANKL 存在下で培養する方法と、骨芽細胞と骨髄細胞の共培養の 2 つの方法で行った。レポーターアッセイで RANKL promoter 活性を検討した。Glucocorticoid receptor (GR)、Androgen receptor (AR)、Prolactin receptor (PR)、estrogen receptor α (ER α)、estrogen

receptor β (ER β) のレポーターベクターを用い、野生型および Fkbp5 のノックアウトマウスの初期培養骨芽細胞でレポーターアッセイを行った。初期培養骨芽細胞の骨芽細胞分化をアルカリホスファターゼ染色で比較するとともに real time RT-PCR で骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現を検討した。

C. 研究結果

10 週齢の BCL2 トランスジェニックマウスの骨量は野生型と差を認めなかった。BCL2 トランスジェニックマウスと野生型マウスの頭蓋冠由来細胞を用いて骨芽細胞分化を比較したが、BCL2 トランスジェニックマウス由来骨芽細胞で分化が遅れていた。逆に Bcl2 ノックアウトマウスでは、in vivo、in vitro とともに骨芽細胞分化が進んでいた。また、BCL2 トランスジェニックマウスと野生型マウスの頭蓋冠由来細胞と骨髄細胞を共培養し、破骨細胞分化を比較したが、差を認めなかった。したがって、BCL2 トランスジェニックマウスの骨芽細胞は、その分化能においては軽度低下、破骨細胞支持能においては野生型と同レベルであると考えられた。トランスジーン発現レベルは 2 週齢で最も高く、以後漸減、4 ヶ月齢以降は低いレベルで推移した。成長過程で BCL2 トランスジェニックマウスの骨細胞は、アポトーシスで徐々に死滅していった。TUNEL 陽性細胞の頻度は、5-6 週齢で 20%、10 週齢で 50%、4 ヶ月齢で 75% と最大に達し、8 ヶ月齢では、リモデリングにより 50% に低下した。骨細管染色、透過型電子顕微鏡および走査型電子顕微鏡観察で、骨細胞突起が著減していた。骨細胞死は、この骨細胞突起の減少に起因すると考えられた。4 ヶ月齢では、完全に骨細胞ネットワークは破綻していた。マイクロ CT 解析で、BCL2 トランスジェニックマウスの骨幹部皮質骨の厚さは、10 週齢から 4 ヶ月齢にかけて有意に上昇、4 ヶ月齢で骨形成率および血中オステオカル

シンの上昇を見た。破骨細胞数は 2 週齢で増加、6 週齢移行は低下しており、血中 TRAP5b も 4 ヶ月齢で低下していた。すなわち、4 ヶ月齢の骨細胞ネットワークが破綻した BCL2 トランスジェニックマウスでは、骨形成が増加、骨吸収が減少していた。すなわち、骨細胞ネットワークは、これまで言われてきたように骨形成を促進し、骨吸収を抑制するのではなく、骨形成を抑制、骨吸収を促進させる機能を持っていた。

さらに、骨細胞ネットワークが破綻したマウスでは、野生型マウスで見られる非荷重時の骨量減少が起こらなかった。野生型マウスでは、非荷重時に主に破骨細胞形成の促進により、一部骨芽細胞の機能低下により骨量が減少していたが、骨細胞ネットワークが破綻したマウスでは、破骨細胞形成の促進も骨芽細胞の機能低下も認められなかった。非荷重時には、野生型マウスでは、限局した部位で、骨細胞でのスクレロスタチンの発現が増加していたが、骨細胞ネットワークが破綻したマウスでは、認められなかった。野生型マウスでは、非荷重時に骨芽細胞に RANKL が発現誘導されていたが、骨細胞ネットワークが破綻したマウスでは、その発現誘導が見られなかった。

野生型マウスで誘導され、骨細胞ネットワークが破綻したマウスでは誘導されない遺伝子をマイクロアレイで探索、pyruvate dehydrogenase kinase 4 (Pdk4) および Fkbp5 を同定した。Pdk は Pdk1, 2, 3, 4 からなるが、Pdk4 のみが、非荷重時に骨芽細胞、骨細胞、骨髄細胞に発現誘導された。Pdk4 ノックアウトマウスは、生理的条件下では異常を認めなかった。しかし、野生型に見られる非荷重時の骨量減少が Pdk4 ノックアウトマウスでは見られなかった。さらに、野生型マウスに見られる非荷重時の破骨細胞形成促進が、Pdk4 ノックアウトマウス

スでは見られなかった。in vitro の破骨細胞形成実験では、Pdk4^{-/-}骨髄細胞の破骨細胞への分化が阻害されていた。また、Pdk4^{-/-}骨芽細胞と野生型骨髄細胞との共培養での破骨細胞形成も阻害されていた。さらに、Pdk4^{-/-}骨芽細胞では RANKL 発現、RANKL promoter 活性ともに低下していた。Pdk4 の過剰発現は、Rank1 発現、RANKL promoter 活性、破骨細胞形成をともに促進させた。

Fkbp5 ノックアウトマウスの骨量をマイクロ CT で比較したところ、雌での骨量低下傾向を認めたが、有意な低下ではなかった。尾部懸垂すると、Fkbp5 ノックアウトマウスでより強い骨量減少を認めた。特に雌での骨量減少が強かった。Fkbp5 は、グルココルチコイドレセプターと結合し、グルココルチコイドレセプターの核移行を抑制することが報告されている。高用量のプレドニゾロンペレット (3.2mg/kg/day) では、全例の Fkbp5 ノックアウトマウスが死亡した。低用量のプレドニゾロンペレット (1.25mg/kg/day) では、Fkbp5 ノックアウトマウスで、より強い骨量減少を認めた。特に雌での骨量減少が強かった。デキサメタゾンの連日注射でも、高用量で、雌の Fkbp5 ノックアウトマウスに多数の死亡例が観察された。やはり、Fkbp5 ノックアウトマウスで、より強い骨量減少を認め、特に雌での骨量減少が強かった。また、野生型マウスでは、グルココルチコイド投与早期に、Fkbp5 mRNA の上昇を認めた。レポーターアッセイでは、GR のレポーター活性が Fkbp5 ノックアウトマウス由来骨芽細胞で活性が上昇していた。Fkbp5 ノックアウトマウス由来の骨芽細胞は、野生型マウス由来の骨芽細胞と比較し、より低濃度のグルココルチコイドで骨芽細胞分化が阻害された。

D. 考察

BCL2 トランスジェニックマウスでは骨細胞死を起こしても骨吸収の増加が認められず、逆に低下していた。これは、骨細胞死が必ず骨吸収を惹起するというこれまでの観察に反していた。BCL2 トランスジェニックマウスでは、骨細胞突起が減少し、骨細胞突起が通る骨細管も当然減少していた。骨細胞は骨基質内に存在するため、アポトーシスを起こしてもマクロファージによって貪食されない。したがって、結局細胞膜は破綻し二次性ネクローシスを起こす。ネクローシスを起こすと、骨細管を通過して、HMGB1, S100, HSP, ATP, 尿酸等の炎症惹起分子は骨髄腔に排出されマクロファージを活性化、TNF- α , IL-6, IL1 等の破骨細胞分化活性化因子が放出され、破骨細胞による骨吸収が始まると考えられる。しかし、BCL2 トランスジェニックマウスでは、骨細管が著明に減少していたため、二次性ネクローシスを起こしても炎症惹起分子は骨髄腔に排出されず、破骨細胞分化の亢進及び骨吸収が起こらなかったと考えられた。したがって、これまで、骨細胞死によって骨吸収が起きていた現象を、骨細胞が破骨細胞および骨吸収を抑制しているためと考えられてきたが、これは誤りで、骨吸収は骨細胞のネクローシスによって引き起こされていたと考えられる。骨細胞の機能としては、これまでの考えと逆に、破骨細胞分化・活性を刺激していると考えられる。骨形成に関しても、これまでの考えと異なり、骨細胞は骨芽細胞の活性を抑制、骨形成を抑制していると考えられる。非荷重状態にすると、破骨細胞数が増加、骨形成が低下するが、骨細胞は、骨芽細胞での RANKL 発現を誘導し破骨細胞分化・活性を増強、骨吸収を促進させ、骨細胞におけるスクレロスタチンの発現を誘導、Wnt シグナルを阻害し骨芽

細胞の機能を低下させると考えられる。

Pdk4 は、PDC(pyruvate dehydrogenase complex)をリン酸化、PDC の機能を抑制し、糖代謝でのエネルギー産生を抑制する酵素である。飢餓状態で主に筋肉に発現誘導されることが報告されてきた。我々は、非荷重状態を骨細胞ネットワークが感知し、骨細胞および骨芽細胞で Pdk4 を発現誘導することを明らかにした。また、Pdk4 は RANKL を骨芽細胞に発現誘導し、破骨細胞分化を誘導することを明らかにした。しかし、Pdk4 による PDC リン酸化を阻害する DCA(dichloroacetate)の添加や PDC を脱リン酸化する Pdp1(pyruvate dehydrogenase phosphatase)の過剰発現は、破骨細胞形成や Rank1 発現に影響しなかった。したがって、Pdk4 は、PDC のリン酸化を介さずに、破骨細胞形成や Rank1 発現を誘導すると考えられた。骨細胞ネットワークが Pdk4 発現を誘導する機序および Pdk4 が RANKL 発現を誘導する機序は不明であり、今後明らかにしていかなければならない。

非荷重による骨量減少は、Fkbp5 ノックアウトマウスでより強く認められた。非荷重ストレスは、血中コルチゾールを増加させ、骨量減少を引き起こす可能性がある。しかし、血中コルチゾールは、野生型マウスでは非荷重時に増加したが、ノックアウトマウスでは増加しなかった。したがって、Fkbp5 ノックアウトマウスでは、非荷重時の骨量減少の増強に、グルココルチコイドレセプターシグナル以外の経路が関与したと考えられる。Fkbp5 ノックアウトマウスは、グルココルチコイドに対する感受性が高く、強い骨量減少を認めたが、特に雌で顕著であり、性差があることが示唆された。Fkbp5 ノックアウトマウスは、ステロイド性骨粗鬆症の病態解明のモデルマウスとなると考えられた。

E. 結論

これまで、骨細胞死によって骨吸収が惹起されるのは、骨細胞が破骨細胞を抑制するためと考えられてきたが、これは、骨細胞の二次性ネクロシスによって起こることであり、骨細胞は本来、破骨細胞を活性化、骨芽細胞機能を抑制していることが明らかになった。また、骨細胞ネットワークはメカニカルストレスを感受、応答するシステムであることが証明された。さらに、骨細胞ネットワークの機能は非荷重状態ではさらに増強され、骨芽細胞における RANKL 誘導を介した破骨細胞分化・活性化の促進、骨細胞におけるスクレロスタチン誘導による骨芽細胞機能の抑制により、骨量減少を引き起こすことが明らかとなった。さらに、非荷重を感知した骨細胞ネットワークは、骨芽細胞に Pdk4 を誘導、Pdk4 は RANKL 発現を誘導し、破骨細胞形成、さらに骨吸収に導いていた。また、骨髄細胞も非荷重時に Pdk4 発現を上昇させ、破骨細胞形成に関与していた。また、Fkbp5 はグルココルチコイドの作用を調節するだけでなく、非荷重時の骨量減少にも関与することが示唆された。

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. Cao L, Moriishi T, Miyazaki T, Iimura T, Hamagaki M, Nakane A, Tamamura Y, Komori T, Yamaguchi A. Comparative morphology of the osteocyte lacunocanalicular system in various vertebrates. *J Bone Miner Metab.* 29(6): 662-70. 2011.
2. Moriishi T, Maruyama Z, Fukuyama R, Ito M, Miyazaki T, Kitaura H, Ohnishi H, Furuichi T, Kawai Y, Masuyama R, Komori H, Takada K, Kawaguchi H, Komori T. Overexpression of bcl2 in osteoblasts inhibits osteoblast differentiation and

- induces osteocyte apoptosis. *PLoS One.* 6(11) : e27487. 2011.
3. Wang Y, Liu W, Masuyama R, Fukuyama R, Ito M, Zhang Q, Komori H, Murakami T, Moriishi T, Miyazaki T, Kitazawa R, Yoshida CA, Kawai Y, Izumi S, Komori T. Pyruvate dehydrogenase kinase 4 induces bone loss at unloading by promoting osteoclastogenesis. *Bone.* 50(1): 409-19. 2012.
 4. Moriishi T, Fukuyama R, Ito M, Miyazaki T, Maeno T, Kawai Y, Komori H, Komori T. Osteocyte network; a negative regulatory system for bone mass augmented by the induction of Rankl in osteoblasts and Sost in osteocytes at unloading. *PLoS One.* 7(6) : e40143. 2012.
 5. Komori T. Functions of the osteocyte network in the regulation of bone mass. *Cell Tissue Res.* 352(2) : 191-8. 2013
 6. Moriishi T, Kawai Y, Komori H, Rokutanda S, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Asahina I, Komori T. Bcl2 Deficiency Activates FoxO through Akt Inactivation and Accelerates Osteoblast Differentiation. *PLoS One.* 9(1) : e86629. 2014.

2. 学会発表

1. Regulation of bone mass at unloaded condition by osteocyte network. Komori T. Bio-Rheumatology International Congress in Tokyo 2011
2. Osteocyte network and mechanical stress. Komori T. 第 22 回国際リウマチシンポジウム 2013
3. Osteocytes, Coordinator of the Bone. Komori T. 2013 Seoul International Congress of Endocrinology and Metabolism 2013
4. 骨細胞ネットワークによるメカニカルストレス応答 小守壽文. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2013

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、担癌マウスを複製し、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、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、肺がん患者の肺泡洗浄液に 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に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. Takada Y, Gresh L, Bozec A, Ikeda E, Kamiya K, Watanabe M, Kobayashi K, Asano K,

Toyama Y, Wagner EF, Matsuo K. Interstitial lung disease induced by gefitinib and Toll-like receptor ligands is mediated by Fra-1. *Oncogene* 30: 3821-3832. 2011.

2. Takada Y and Matsuo K. Gefitinib, but not erlotinib, is a possible inducer of Fra-1-mediated interstitial lung disease. *Keio J. Med.* 61: 120-127. 2012.

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

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)* 23: 59-64. 2013.

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・マクロファージ系の前駆細胞にマクロ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を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髄細胞を採取し、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髄細胞を、コラーゲン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ェ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 においても、*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 のリン酸化に關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 ブロッキングを行い、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關与するが骨吸収活性には關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

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業
(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 免疫アレルギー研究分野)
平成 23 年度～平成 25 年度 **総合研究報告書**

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グルと混和、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, 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, 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 (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)

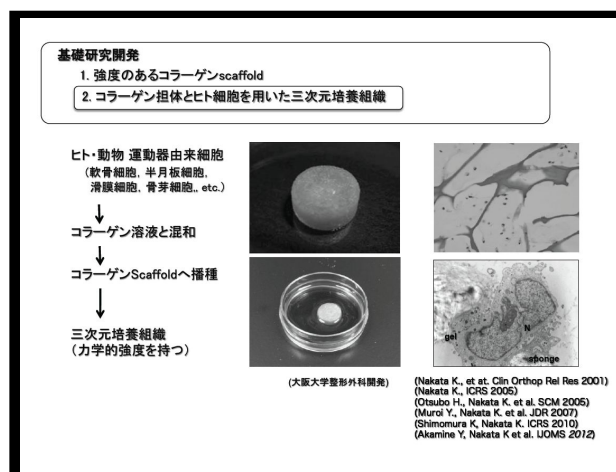
ヒト組織の採取にあたっては、院内倫理委員会の承認のもと、患者より事前に説明し、文書による同意を得て、研究を遂行した。

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。



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 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 α 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, 橋 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, 北圭介, 金本隆司, 中村憲正, 前 達雄, 松尾知彦, 赤峯勇哲, 太田啓介,

- 金銅真世, 宮本諭, 吉川秀樹, 中田研. 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, Kita K, Kanamoto T, Nakamura N, Mae T Yoshikawa H, Nakata 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 大阪
 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. Kondo M, Kita K, Muroi Y, Ota K, Akamine Y, Nakata K, Kakudo K. 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. Miyamoto S, Yonetani Y, Mae T, Yoshikawa H, Nakata K. 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. Hirata A, Kishida K, Kobayashi H, Nakatsuji H, Funahashi T, Shimomura I. Correlation between serum C1q-adiponectin/total adiponectin ratio and polyvascular lesions detected by vascular ultrasonography in Japanese type 2 diabetics. *Metabolism* 62: 376-385. 2013.
2. Hirata A, Kishida K, Nakatsuji H, Kobayashi H, Funahashi T, Shimomura I. High serum C1q-adiponectin/total adiponectin ratio correlates with coronary artery disease in Japanese type 2 diabetics. *Metabolism* 62: 578-585. 2013.
3. Kishida K, Kishida N, Arima M, Nakatsuji H, Kobayashi H, Funahashi T, Shimomura I. Serum C1q-binding adiponectin in maintenance hemodialysis patients. *BMC Nephrol* 14: 50. 2013.
4. Nakatsuji H, Kishida K, Kobayashi H, Funahashi T, Shimomura I. 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: e14-17. 2013.

5. Nakatsuji H, Kishida K, Kobayashi H, Nakagawa T, Funahashi T, Shimomura I. Correlation of circulating C1q and C1q-binding adiponectin concentrations with aging in males: a preliminary report. *Diabetol Metab Syndr*. 5: 17. 2013.
6. Nakatsuji H, Kobayashi H, Kishida K, Nakagawa T, Takahashi S, Tanaka H, Akamatsu S, Funahashi T, Shimomura I. Binding of adiponectin and C1q in human serum, and clinical significance of the measurement of C1q-adiponectin / total adiponectin ratio. *Metabolism* 62: 109-120. 2013.

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