

機関番号：35307

研究種目：基盤研究 B

研究期間：平成 19 年度～平成 21 年度

課題番号：19390026

研究課題名(和文)炎症関連因子クラスター分化抗原 8 1 を用いた根絶的リウマチ治療薬の開発

研究課題名(英文) Isolation and identification of CD81 as a novel target for treatment of rheumatoid arthritis.

研究代表者 中西 徹 (就実大学・薬学部・教授)

研究者番号：30243463

## 研究成果の概要(和文):

(1) CD81を細胞表面に発現するヒト滑膜肉腫細胞SW982を用いて、様々な条件下で抗CD81抗体添加による刺激実験を行い、抗体刺激によってシノビオリンの発現が直接的に誘導されることを、定量PCRおよびシノビオリンプロモーターを有するレポーター遺伝子発現系によって明らかにした。また、細胞表面のCD81からシノビオリンの発現誘導に至るおけるシグナル伝達経路を解析し、MAPキナーゼERKの関与を示唆する結果を得た。

(2) 関節炎モデルラットの関節組織にCD81のsiRNAを注入してCD81の発現を抑制することで病態の改善を試みる治療実験を行い、CD81分子の発現抑制に、炎症性サイトカインの抑制を上回る治療効果があることを確認した。さらにCD81の抑制によってシノビオリンの分布も抑制されることが免疫組織化学的に確認できた。(Biochem.Biophys.Res.Commun. 388, 467-472, 2009)。

(3) 国立成育センター宮戸室長より分与を受けたCD81ノックアウトマウスのヘテロ体を交配してホモ体を作製し解析を行った。その結果、ノックアウトマウスでは破骨細胞の形成や機能が亢進していることが明らかとなった。

(4) CD81を測定する早期リウマチ診断薬を開発するためCD81タンパクの細胞外領域を大腸菌で大量発現する試みを行った。その結果、GSTおよびHisタグを有する融合タンパク質としてCD81細胞外領域の大量発現に成功した。このタンパク質には若干の分解産物が混合しているため、さらに精製を進めている。またこのタンパク質を放射標識して、血中や関節液中のCD81を測定することでRAの早期診断が可能なキットの開発を進めている。

## 研究成果の概要(英文):

Quantitative PCR and reporter gene system showed that the stimulation of CD81 on cell surface of SW982 cells directly induced the expression of synoviolin. When siRNA of CD81 introduced into the joints of RA-model rats, this siRNA targeting CD81 ameliorated RA in these rats.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
20年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
21年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：CD81、リウマチ、シノビオリン、滑膜細胞、DNAチップ

## 1. 研究開始当初の背景

クラスター分化抗原 CD81 は TAPA-1 と呼ばれ、22-26kDa の III 型膜貫通蛋白 (膜四回貫通型蛋白) であり、広く造血系、神経外胚葉系、間葉系に発現している。

ヒト型高密度 DNA チップを用いた変形性関節症 (OA) 滑膜細胞と関節リウマチ (RA) 滑膜細胞の遺伝子発現比較において、RA で発現亢進する遺伝子の中にこの CD81 が見い出された。ヒト滑膜由来滑膜肉腫細胞株である SW982 を用いて、CD81 の刺激に対するこの細胞の応答を DNA チップを用いて解析したところ、RA における滑膜細胞の異常増殖を引き起こす原因遺伝子として、最近単離され、注目されているシノビオリン遺伝子の発現が上昇していた。

## 2. 研究の目的

シノビオリンは現在のところ RA において滑膜細胞の異常増殖を引き起こし、リウマチ性疾患発症の原因となる因子の一つとして最も有力なものであり、多くの研究者がこのシノビオリンの発現を増大させるメカニズムの発見に取り組んでいるが、その詳細は明らかでない。

このような状況下、我々は上述のように滑膜様細胞においてシノビオリンの発現を直接促進する可能性のある因子として今回初めて CD81 を同定した。従って、この炎症の発症と強く関連する CD81 を標的とする創薬が、シノビオリン発現の抑制と炎症性応答の抑制という二重の作用で、現在、対照療法に終始しているリウマチ性疾患の究極の治療薬になる可能性があるのではないかという大きな期待を持った。また、この CD81 が、血中における新たなリウマチ性疾患の診断マーカーなる可能性がある。

## 3. 研究の方法

(1) シノビオリンプロモーターにルシフェラーゼを接続したレポーター遺伝子を SW982 細胞に導入し、この細胞に CD81 刺激抗体を作用させてレポーターの発現上昇を調べた。またシノビオリンプロモーターについては、NIH-3T3 における基本的発現領域 (-2005/+845) の他、種々のその欠失変異体 (-1175/+845, -1062/+845, -320/+845, -199/+845, +410/+845, +800/+845) を用意して、誘導に必要な領域を同定した。さらにシグナル伝達経路を阻害剤で遮断して、シノビオリンの発現をみた。

(2) RA モデル動物を用いた治療実験: コラーゲン誘導 RA モデルラットを用い、関節内に CD81siRNA を導入して CD81 の発現を抑制して、RA 治療効果を判定した。

(3) リウマチ病態の発症と CD81 の関係を

さらに深く理解するため、遺伝子変異動物の作製とその解析を実施した。CD81 ノックアウトマウスは協力研究者の国立成育センター宮戸博士により作製、樹立された。このマウスの解析を進めた。またトランスジェニックマウスについては、骨特異的コラーゲン (型) 遺伝子あるいは軟骨特異的コラーゲン (型) 遺伝子のプロモーターを装備した発現ベクターを用いて作製を行う。

(4) CD81 の細胞外ループの長い方のループで機能上重要な ECL2 領域を大量発現させ、GST や His タグを利用して精製することを試みた。この組換えタンパク質を、リウマチ早期診断薬開発やリウマチ治療実験のためのモノクローナル抗体作製や CD81 結合タンパク質の探索に用いる。

## 4. 研究結果。

(1) CD81 を細胞表面に発現するヒト滑膜肉腫細胞 SW982 を用いて、様々な条件下で抗 CD81 抗体添加による刺激実験を行い、抗体刺激によってシノビオリンの発現が直接的に誘導されることを、定量 PCR およびシノビオリンプロモーターを有するレポーター遺伝子発現解析によって確認した。またプロモーター部分を様々な程度に部分欠失させた変異体を作製し、抗 CD81 抗体の刺激によるシノビオリンの発現誘導におけるシノビオリンプロモーター上の必須 cis エLEMENT の同定を行った。さらに、この定量 PCR およびシノビオリンプロモーターを有するレポーター遺伝子発現系によって、細胞表面の CD81 からシノビオリンの発現誘導に至るおけるシグナル伝達経路を解析し、MAP キナーゼ ERK の関与を示唆する結果を得た。

(2) 関節炎ラットの関節組織に CD81 の siRNA を注入して病態の改善を試みる治療モデル実験を繰り返し、炎症性サイトカインの抑制を上回る治療効果があることを確認した。さらに CD81 の抑制によってシノビオリンの分布も抑制されることが免疫組織化学的に確認できた。(産経新聞、山陽新聞に掲載) (Biochem. Biophys. Res. Commun. 388, 467-472, 2009)。

(3) 国立成育センター宮戸室長より分与を受けた CD81 ノックアウトマウスのヘテロ体を交配してホモ体を作製し解析を行った。その結果、ノックアウトマウスでは破骨細胞の形成や機能が亢進していることが明らかとなった。

(4) CD81 を測定する早期リウマチ診断薬を開発するため CD81 タンパクの細胞外領域を大腸菌で大量発現する試みを行った。その結果、GST および His タグを有する融合タンパク質として CD81 細胞外領域の大量発現に成功した。このタンパク質には若干の分解産物

が混合しているため、さらに精製を進めた。  
このタンパク質を放射標識して、血中や関節  
液中の CD81 を測定することで RA の診断が可  
能なキットの開発を進めていく。

(5) CD81 の様々な組織や細胞における作用  
を調べるための CD81 を発現するアデノウイ  
ルスの作製を行った

#### 5 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に  
は下線)

1. Mori H, Itano Y, Kobayashi N, Kosaka Y,  
Tanaka N, Nakanishi T. Characterization  
and gene expression profiling of human  
mesenchymal stem cells. J Hard Tissue  
Biol 16, 36-41, 2007
2. Mori H, Nishida K, Ozaki T, Inoue H,  
Nakanishi T. Isolation of a mRNA  
preferentially expressed in synoviocytes  
from rheumatoid arthritis that is  
identical with lumican, which encodes a  
collagen binding, extracellular matrix  
protein. J Hard Tissue Biol 17, 125-130,  
2008
3. Nakagawa S, Arai Y, Mori H, Matsushita  
Y, Kubo T, Nakanishi T. Small interfering  
RNA targeting CD81 ameliorated arthritis  
in rats. Biochem Biophys Res Commun 388,  
467-472, 2009
4. 中西 徹 ポストゲノムの炎症・リウマチ  
研究と創薬 薬学雑誌 128, 245, 2008
5. 森 宏樹、中西 徹 炎症性関節リウマチ  
滑膜細胞のシグナル伝達 薬学雑誌 128,  
263-268, 2008
6. 中西 徹 ポストゲノムと神経薬理研究  
日本神経精神薬理学雑誌 29, 181-188,  
2009

[雑誌論文](計6件)

[学会発表](計6件)うち2件は国内招待  
講演(日本生化学会シンポジウム、日本分子  
生物学会ワークショップ)うち1件は海外  
招待講演(国際分子診断学会議、北京)

[その他]

ホームページ等

新聞発表; 関節リウマチの一因同定 山陽新  
聞(2009.1.6)、産経新聞(2009.1.15)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

中西 徹 (就実大学・薬学部・教授)  
研究者番号: 30243463

##### (2)研究分担者

森 宏樹 (就実大学・薬学部・助教)  
研究者番号: 40388989

中島利博 (医療法人さわらび会福祉村  
病院長寿医学研究所・研究員)  
研究者番号: 90260752

浅沼幹人 (岡山大学・大学院医歯薬  
学総合研究科・准教授)  
研究者番号: 00273970

新井佑志 (京都府立医科大学・医学部  
・助教)  
研究者番号: 50347449