

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目： 基盤研究（C）

研究期間： 2007～2008

課題番号： 19591174

研究課題名（和文）

PGE2 サイトカイン誘導性ムチンをターゲットとした関節リウマチ治療法の研究

研究課題名（英文） Study of the therapy of rheumatoid arthritis against mucin inducing PGE2 and cytokine

研究代表者

川人 豊 (KAWAHITO YUTAKA)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号： 50336731

研究成果の概要：

関節リウマチでは、罹患関節に存在するムチンが糖鎖異常におちいり、関節リウマチの病因に関与することが予測される。本研究では、可溶性スカベンジャーリセプターが、ムチン結合能を有し実験的関節炎を抑制することから、これらムチン阻害剤が関節リウマチの有力な治療法になることが示された。また、IL-6 誘導能のあるムチンが MUC-1 であることが判明し、MUC-1 が関節リウマチの特異的な治療ターゲットとして有力であることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：膠原病・リウマチ・感染症内科学

キーワード：リウマチ学

## 1. 研究開始当初の背景

ムチンは消化管粘膜や関節液などに存在し、O-グリコシド結合を介してポリペプチドに結合した無数の糖鎖を持ち、自然免疫をふくめた粘膜防御や多様な免疫反応などに重要な役割を果している。申請者らは、上皮性癌細胞の産生するムチンが単球/マクロファージのスカベンジャーリセプター(SCR)に結合し、COX-2 の誘導に続いて PGE2 の産生亢進をもたらすことを報告した (Proc Natl

Acad Sci U S A. 2003)。関節リウマチでは、罹患関節に存在するムチンが糖鎖異常におちいり、COX-2 の誘導に続く PGE2 の産生亢進による様々な関節破壊につながる免疫現象を起こす可能性がある。これらの事象を背景に、関節リウマチ患者の関節組織にもムチンが発現し、滑膜の増殖・炎症を起こし、関節破壊に関与していると考え研究を行ってきた。その結果、関節リウマチ患者関節組織の滑膜細胞やマクロファージで MUC-1、Tn、sialyl、Tn の発現を免疫組織学的に証明し、

関節液からプロスタグランジンやサイトカイン誘導性ムチンの抽出・精製してきた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、抽出したプロスタグランジンやサイトカイン誘導性ムチンの生化学的活性をさらに検討し、最終的には関節リウマチの関節特異的な治療薬のターゲットとして、この分子の阻害薬を開発して、関節リウマチの治療薬に応用することにある。

具体的には、抽出したプロスタグランジンやサイトカイン誘導性ムチンの精製物の構造解析は、多種のムチンの含有があり、その特定には至らなかったため、IL-6 誘導のあるムチンの同定を行った。また、これらムチと結合能のあるスカベンジャーリセプター (SCR) の関節炎治療応用可能性について検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) IL-6 誘導のある関節リウマチにおけるムチンの同定

プロスタグランジンやサイトカイン誘導性ムチンの中で、関節リウマチの病因に関わる、IL-6 に注目し、IL-6 産生誘導能のあるものは、どのようなムチンが主体であるかを検討した。

① 関節リウマチ患者の関節液をヒアルロニダーゼ処理し、Sepharose 6B カラムを用いゲルろ過後、健常者ヒト末梢単核球 (PBMCs) に IL-6 を産生誘導する分画に存在するムチンを dot blot 法で検索した。

② さらに IL-6 を PBMC に産生誘導する分画を高分子量分を CsCl を用いた密度勾配遠心法にてさらに精製をおこない、Western blot 法でムチンを同定し、このムチンが関節リウマチの滑膜組織や滑膜培養細胞などで存在するか免疫染色法を含めて検討した。

(2) マウス関節炎モデルを用いたムチン阻害療法としての可溶性スカベンジャーリセプター (SCR) の応用

SCR を腹腔内投与し、マウスコラーゲン誘導性関節炎の発症、重症度にあたる影響を検討した。

### ①可溶性 SCR の作成

SCR (グループ A、タイプ II) のエクストド

メインに相当する cDNA を CHO 細胞に導入し、安定発現株を調整し、その培養上清より可溶性 SCR を抽出し透析後使用した。

### ②可溶性 SCR によるコラーゲン誘発関節炎マウスの発症抑制効果

DBA1/J male mice の尾根部に Complete Freund's Adjuvant (CFA) と牛コラーゲンのエマルジョンを皮下注射したさらに 21 日後に Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) と牛コラーゲンのエマルジョンを皮下注射し、コラーゲン誘導性関節炎を発症させた。

可溶性 SCR は、関節炎の発症していない 2 回目の牛コラーゲン免疫後より、28 日間 (5  $\mu$ g, ip) 2 日に一度投与した。コントロールは可溶性 SCR を最終調整時に行った等量の透析外液を投与した。

### ③可溶性 SCR によるコラーゲン誘発関節炎マウスの関節炎改善効果

(b) と同様の方法でコラーゲン誘導性関節炎を発症させ、牛コラーゲン免疫後 56 日後で全ての固体に関節炎が発症した時点で、関節炎スコアの平均値が同じになるように 2 群に分け、14 日間可溶性 SCR を (10  $\mu$ g, ip) 連日投与した。

## 4. 研究成果

### (1) IL-6 誘導のある関節リウマチにおけるムチンの同定

関節リウマチ関節液を Sepharose 6B カラムを用いてゲルろ過した高分子画分で PBMC に IL-6 産生誘導能のある分画 (No20 から 29) で、dot blot 法で MUC-1 が存在することが判明したが (図 1)

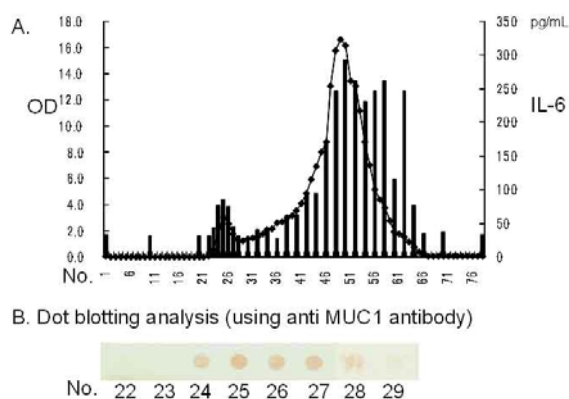


図 1 A: 蛋白量と IL-6 産生 B MUC-1 発現  
横軸はゲルろ過分画 No

さらに、これら分画 CsCl を用いた密度勾配遠心法で精製したところ、PAS 染色陽性、銀染色陰性で、PBMCs に IL-6 を誘導する分画に (No4 から 9) で (図 2)、dot blot 法により MUC-1 の存在が確認されたが、MUC-2、MUC-3、MUC-5AC は検出されなかった (data not shown)。さらに、Western blot 法でも、この分画の他、滑膜組織や滑膜培養細胞に MUC-1 が発現していることを示した (図 3)。

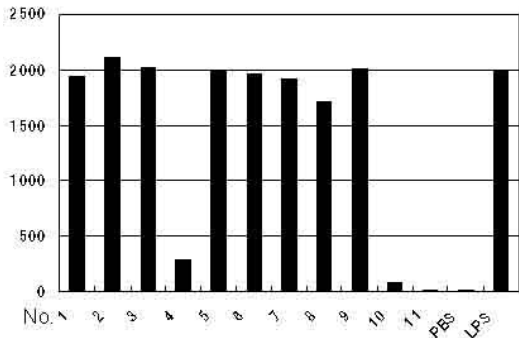


図 2 精製分画の IL-6 誘導能

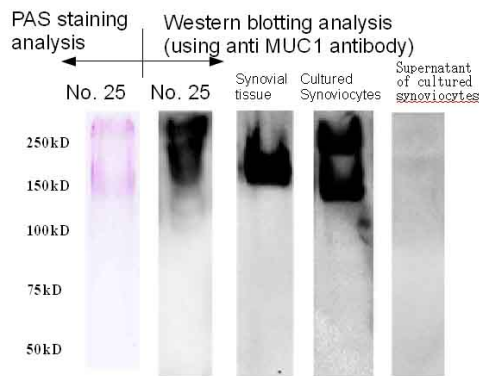


図 3 PAS 染色と Western blotting (No25 は精製した分画)

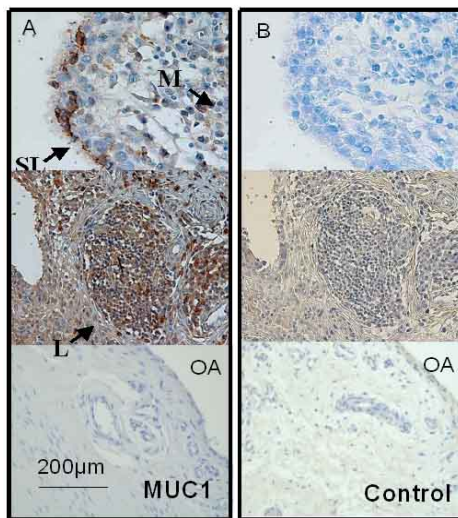


図 4 免疫染色 茶褐色が陽性所見 RA: 関節リウマチ OA: 変形性関節症

免疫染色では、変形性関節症に比較し関節炎リウマチの滑膜組織の滑膜細胞や浸潤単核球に有意に発現していた (図 4)。

これらの結果より、関節リウマチの罹病関節では、IL-6 誘導能のある MUC-1 が存在し、その病態にかかわることが予測され、治療ターゲットとして有力であることが示された。現在さらなる生物活性を検討中である。

## (2) 可溶性スカベンジャーレセプター (SCR) によるコラーゲン誘発関節炎マウスの発症抑制効果

可溶性 SCR によるコラーゲン誘発関節炎マウスの発症抑制効果

図 5 に示すように SCR 投与群でもすべてのマウスに関節炎が発症したが、すべてのマウスが関節炎を発症したのは、コントロール群に比較し、6 日遅延した。また、関節炎スコアは全経過を通じて SCR 投与群で低く、関節炎による体重減少 (炎症性やせ) も軽減された。また、関節組織では、滑膜肥厚の減少が認められた。

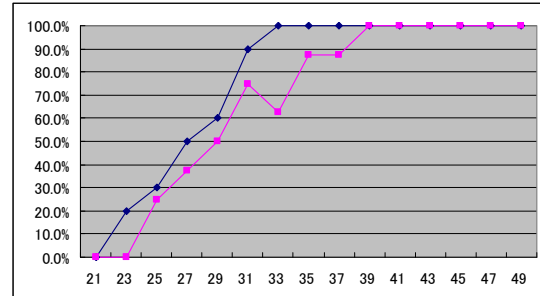


図 5 可溶性 SCR の関節炎発症に対する影響 横軸は、コラーゲン免疫後の日数 青線: コントロール 赤線: SCR 群

可溶性 SCR によるコラーゲン誘発関節炎マウスの関節炎改善効果

図 6 に示すように SCR を関節炎発症後に投与した場合でも、コントロール群に比較し、関節炎を有意に抑制し、体重減少の軽減もみられた。また組織学的にも可溶性 SCR 群で滑膜炎の増殖抑制効果が認められた。

このように、ムチン阻害薬は、実験的関節炎を抑制し、関節リウマチの有力な治療法になる可能性があり、特許出願した。

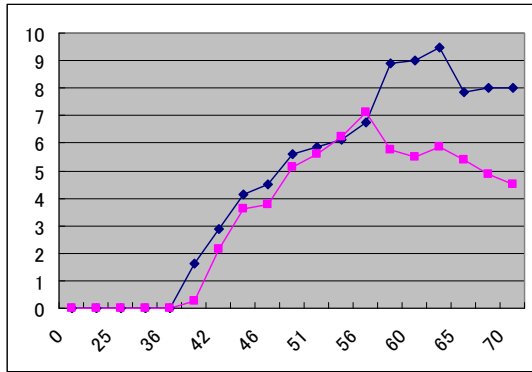


図6 可溶性SCRの関節炎重症度に対する影響  
横軸は、コラーゲン免疫後の日数  
縦軸は関節炎スコア  
青線：コントロール 赤線：SCR群

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 5 件)

- 石野秀岳、川人 豊、濱口真英、竹内紀子、徳永大作、北條達也、河野正孝、坪内康則、和田 誠、山本相浩、角谷昌俊、新美美貴子、吉川敏一、中田 博  
関節リウマチの病因に関与する関節液由来糖鎖分子の検討  
第51回日本リウマチ学会総会・学術集会  
2007年4月26-29日 横浜
- 石野秀岳、川人 豊、濱口真英、河野正孝、坪内康則、和田 誠、山本相浩、角谷昌俊、新美美貴子、吉川敏一  
関節リウマチ患者関節液中に存在する糖鎖分子の精製と、その生化学的活性の検討  
第28回日本炎症・再生医学会  
2007年8月2-3日 東京
- 関節リウマチの関節液由来糖鎖分子の検討  
石野秀岳、川人 豊、濱口真英、河野正孝、坪内康則、山本相浩、角谷昌俊、妹尾高宏、吉川敏一  
第35回日本臨床免疫学会総会、10月19-20日、大阪。
- Ishino H, Kawahito Y, Hamaguchi M, Takeuchi N, Tokunaga D, Hojo T, Kohno M, Tubouchi Y, Yamamoto A, Kadoya M, Niimi M, Senoo T, Yoshikawa T, Nakada H.  
An Important Role for Aberrantly Glycosylated Mucin in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis  
The 71st annual meeting of the American College of Rheumatology

2007年11月6-11日 Boston, USA

- 石野秀岳  
関節リウマチ患者の関節液に由来する糖鎖分子の検討。  
第18回日本リウマチ学会近畿支部学術集会2008年9月6日 大阪

[産業財産権]

- 出願状況 (計 1 件)

産業財産権の名称：関節リウマチ治療剤  
発明者：

学校法人京都産業大学 中田 博  
京都府立医科大学 川人 豊

権利者：学校法人京都産業大学  
産業財産権の種類、番号

特許出願番号 2008-32226

国内出願年月日 平成20年2月13日

国際出願年月日 平成21年1月27日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川人 豊 (KAWAHITO YUTAKA)  
京都府立医科大学・医学研究科・講師  
研究者番号：50336731

### (2) 研究分担者

吉川 敏一 (YOSHIKAWA TOSHIKAZU)  
京都府立医科大学・医学研究科・教授  
研究者番号：90158410

徳永 大作 (TOKUNAGA DAISAKU)  
京都府立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：90343409

中田 博 (NAKADA HIROSHI)  
京都産業大学・工学部・教授  
研究者番号：90113141

佐野 統 (SANO HAJIME)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：00196304

河野 正孝 (KOUNO MASATAKA)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：60405256

坪内 康則 (TSUBOUCHI YASUNORI)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：80381945

(3) 連携研究者

石野 秀岳 (ISHINO HIDETAKA)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：60464583