

機関番号：32607

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20790695

研究課題名（和文） 関節リウマチの骨髄における発現遺伝子の解析

研究課題名（英文） Gene expression analysis of bone marrow CD34 positive cells in patients with rheumatoid arthritis

研究代表者 橋本 篤 (HASHIMOTO ATSUSHI)  
北里大学・医学部・助教  
研究者番号：50327376

研究成果の概要（和文）：関節リウマチ(RA)例および変形性関節症(OA)例の CD34 陽性骨髄細胞の mRNA 発現量を比較すると FKBP5 (FK506-binding protein 5) 遺伝子および転写因子 NFκB の mRNA が RA 例でより強く発現していた。FKBP5 遺伝子を導入した細胞株 RAW264.7 を炎症性サイトカイン TNF $\alpha$  で刺激すると NFκB の発現亢進および線維芽細胞様細胞への形態変化が確認された。これより FKBP5 による NFκB の活性化が骨髄細胞の線維芽細胞様細胞への変化を通じ RA の病態を形成している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The expression of mRNA for FKBP5 was significantly higher in rheumatoid arthritis (RA) BM CD34+ cells than those in osteoarthritis (OA). FKBP5 stable transfectant of RAW 264.7 (Mouse leukemic monocyte macrophage cell line) was made and stimulated with TNF- $\alpha$ , resulted in up-regulation of NFκB and transformation to fibroblast-like cells. This is a possible pathway linking bone marrow and arthritis in RA patients. Identification of the gene associated with pathogenesis of RA such as FKBP5 can lead to new fundamental gene therapy of RA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、膠原病・アレルギー内科学

キーワード：関節リウマチ、変形性関節症、骨髄、FKBP5

## 1. 研究開始当初の背景

## 関節リウマチとは

関節リウマチ(RA)は全身の関節滑膜における慢性炎症を主徴とする疾患で、自己免疫病態の関与に多くの知見があるが、いまだ原因は不明である。関節滑膜はパンススと呼ばれ、過剰な増殖により周囲の関節軟骨や軟骨下骨、さらには関節構造を破壊し、患者の日常生活を著しく損ねる。日本における RA の

患者数は70万人であり、年間1万5000人が新たに発症すると言われている。RAは早期発見し適切な治療を行えば予後が大きく改善することが知られており、それは患者一人一人の日常生活を改善するにとどまらず、日本経済における医療費削減にも貢献する。このように、RAの病因解明および新たな治療法の開拓は我々リウマチ科医にとって急務である。

## 関節リウマチの炎症細胞と骨髄

RA における慢性炎症の場である関節滑膜の表層細胞は主にマクロファージ様の A 型滑膜細胞と線維芽細胞様の B 型滑膜細胞である。このうち A 型滑膜細胞については、近年、その由来が骨髄である可能性が示唆されており (Burmester GR, et al. Arthritis Rheum 40:5-18, 1997.)、さらには炎症性滑膜における血管新生にも骨髄由来の細胞の関与が示されている (Hirohata S, et al. Arthritis Rheum 50:3888-3896, 2004)。

A 型滑膜細胞は単球系細胞であり、これは骨髄で産生され体循環を介して関節滑膜に定住したものであると考えられており、実際に動物を用いた実験関節炎モデルでは骨髄から細胞が関節腔に侵入する経路も示されている (Nakagawa S, et al. J Rheumatol 23:2098-2103, 1996.) が、ヒトではいまだ証明されていない。RA 骨髄血では、単核球成分における CD14 陽性細胞の分化が変形性関節症 (OA) に比べ亢進している事が示されているため、この CD14 陽性細胞が RA 病態に何らかの関与をしている事が考えられる。事実、CD14 陽性細胞は末梢血 B リンパ球のリウマトイド因子 (IgM-RF) 産生能を増加させる事が示されている (Hirohata S, et al. J Immunol 145:1681-1686, 1990) が、この CD14 陽性細胞の A 型滑膜細胞への分化能も含め、その働きはまだよく知られていない。

一方、B 型滑膜細胞と骨髄の関係については、これまでの研究から、RA 由来の骨髄 CD34 陽性細胞は stem cell factor、granulocyte-macrophage colony stimulating factor、tumor-necrosis factor (TNF)- $\alpha$  存在下にて OA 由来の同細胞に比し線維芽細胞様細胞への分化が有意に亢進している事が示されている (Hirohata et al. J Leukoc Biol 70:413-421, 2001.)。このことより、RA 関節滑膜に存在する B 型滑膜細胞も骨髄由来の細胞である可能性がある。

さらに、RA の骨髄 CD34 陽性細胞は関節滑膜の血管新生との関係も示唆されている。von Willebrand Factor (vWF) は血管内皮細胞のマーカーとして知られているが、RA 骨髄 CD34 陽性細胞は OA 由来の同細胞に比し vWF 陽性細胞への分化が亢進している事がわかった。また、RA 骨髄 CD34 陽性細胞は OA 由来の同細胞に比し vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) mRNA 発現が亢進している事も明らかになっており (Hirohata S, et al. Arthritis Rheum 50:3888-3896, 2004.)、以上から RA の骨髄由来 CD34 陽性細胞は血管内皮細胞への分化を介して RA 病態に関与している事が示唆される。

上記より、RA の骨髄 CD34 陽性細胞の遺伝子異常が RA の病因に強く関係している可能

性が考えられるが現在までのところはいくつかの遺伝子についてしか解析されていない。中村らは、RA と OA の全骨髄細胞における遺伝子発現をマイクロアレイで比較した (Nakamura N, et al. DNA Research 13:169-183, 2006.)。これにより、RA で OA よりも発現が亢進している遺伝子が発見されたが、これには炎症に伴う二次的な変化も含まれていると考えられ、さらなる解析が必要と考えられる。

## 2. 研究の目的

**骨髄の遺伝子異常を解析し、RA 病態への関与を証明する。さらには、その遺伝子/蛋白を標的とした、RA の新しい治療法を開発する。**

骨髄全血については RA で OA よりも発現が亢進している遺伝子がいくつか指摘されているが、骨髄 CD34 陽性細胞の遺伝子異常の全体像は明らかになっていないため、特に RA 病態に関係していると思われるいくつかの遺伝子を明らかにする。具体的には、研究協力者の廣畑俊成教授が大阪大学から譲渡された RA および OA 骨髄 CD34 陽性細胞の cDNA ライブラリにおいて、前述の中村らの報告を参考に、RA 病態に強く関係すると考えられるいくつかの遺伝子の mRNA 発現を解析し、RA 骨髄で発現の亢進している遺伝子を確認する。標的遺伝子の RA/OA の関節滑膜における発現、分布について解析する。RA および OA 関節滑膜組織を用いた免疫染色、もしくは in situ hybridization で滑膜における標的蛋白、mRNA 発現細胞、発現量を確認する。標的遺伝子をマウス・マクロファージ様細胞 RAW264.7 などに in vitro transfection により遺伝子発現させ、線維芽細胞様滑膜細胞 (B 型滑膜細胞) への変化など細胞の変化を形態的、機能的に確認する。

## 3. 研究の方法

文書によるインフォームドコンセントを得て採取された、RA 52 例および OA 35 例の骨髄液 CD34 陽性細胞より分離した RNA より合成された cDNA を検体とした。これは研究協力者である廣畑俊成教授が大阪大学医学部より譲渡されたものであり、同教授の前研究機関である帝京大学医学部の倫理委員会により承認されている。採取された骨髄液はただちに無菌的状态でフィコール法による単核球の分離を行い、さらにマグネティックビーズを用い CD34 陽性細胞への分離が行われた。それらから total RNA が抽出され、さらに oligo-dT 法にて cDNA が合成され、これは -70°C で保存されていたものが譲渡された。

中村らの研究 (Nakamura N, et al. DNA Research 13:169-183, 2006.) にて RA 骨髄における発現亢進が指摘されている遺伝子を中心に、それら複数遺伝子に対する PCR プラ

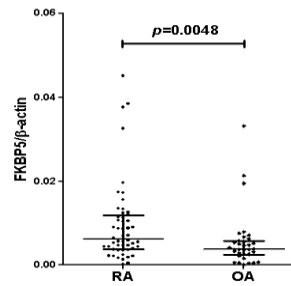
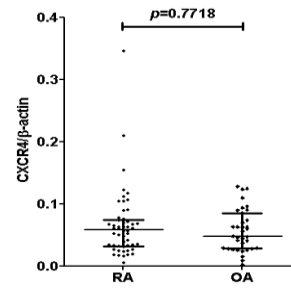
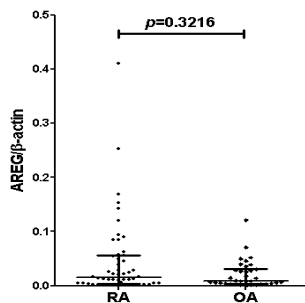
イマーを作製し、その発現をリアルタイム PCR 法にて解析した。測定された遺伝子は、同報告において RA で過剰発現の指摘された Amphiregulin (AREG)、Chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4)、FK506 (tacrolimus)-binding protein 5 (FKBP5)、その他である。

リアルタイム PCR 法を用いた遺伝子発現量の測定には ABI PRISM 7300 Real-Time PCR System を用いた。専用試薬は SYBR® Premix Ex Taq キット (タカラバイオ株式会社) を用いた。定量精度を上げるためプライマー毎にコピー数が既知のプラスミドを作製し、mRNA 発現量の絶対的定量を行う。internal standard としては  $\beta$ -actin を用い、この internal standard との発現量の比を絶対的発現量とした。これにより、OA に比し RA 骨髄で発現亢進している遺伝子を確認した。また、炎症に関与する転写因子 NF $\kappa$ B の mRNA 発現量についても同様に測定した。

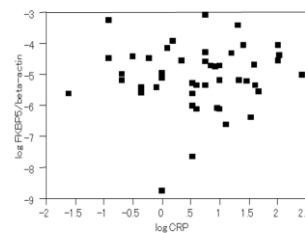
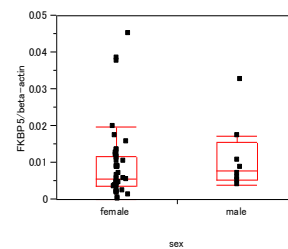
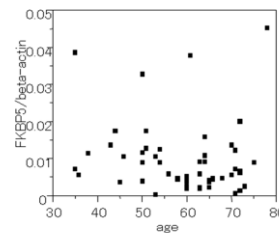
さらに、標的遺伝子を RAW264.7 (マウスマクロファージ様細胞株) にアミンを用いたトランスフェクションキット (siPORT™ Amine Transfection Agent (Ambion)) で *in vitro* transfection し、標的遺伝子を高発現した細胞株 permanent transfectant を作製した。FKBP5 の発現は蛋白レベルで確認した (Western blotting)。このクローンを TNF- $\alpha$  で刺激し、FKBP5 および NF $\kappa$ B 発現量を測定した。後者の測定にはルシフェラーゼアッセイ法を用いた。遺伝子導入後の細胞株の形態変化についても観察した。

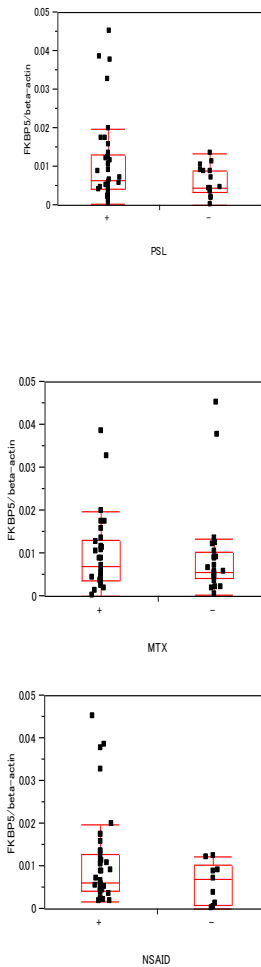
#### 4. 研究成果

上記のように Amphiregulin、CXCR4、FKBP5 につき、mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法にて定量的に解析した。その結果、3 種の遺伝子のうち FKBP5 mRNA は OA に比べ RA で有意に強く発現していた。

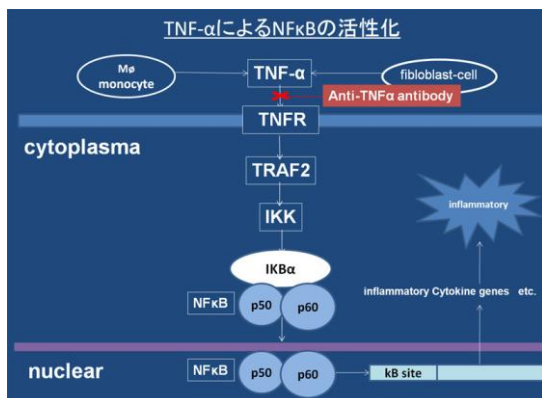


患者背景との相関を検討したが、FKBP5 mRNA 発現量は年齢、性別、血清 C-reactive protein 濃度、治療薬 (非ステロイド性消炎鎮痛薬、メトトレキサート、ステロイド剤) との有意な相関はみとめられなかった。





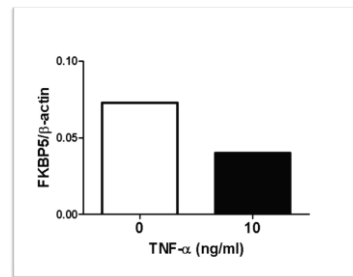
以上より、AREG, CXCR4 とは異なり、FKBP5 は RA の病因に直接関与していると推測した。次に、RA の病態には、TNF- $\alpha$  が深く関与すると考えられており、Infliximab, etanercept, adalimumab などの TNF を阻害する生物製薬は、RA 治療において極めて有効な成績を上げている。これは炎症性の転写因子 NF $\kappa$ B に至る経路を阻害するためである。



最近の研究にて、RA 患者の骨髄 CD34+細胞は TNF- $\alpha$  に異常反応をする傾向があり、MMP-1 を産生する線維芽細胞様細胞へと分化

する能力があることが明らかになった (Hirohata S, et al. induction of fibroblast-like cells from CD34+ progenitor cells of bone marrow in rheumatoid arthritis. J Leukoc Biol 2001; 70)。

一方、健常人の骨髄 CD34+細胞に対して TNF- $\alpha$  (10ng/ml) で刺激後 24 時間の FKBP5 の mRNA 発現量を比較したところ、これによる FKBP5 の発現亢進はみられなかった。

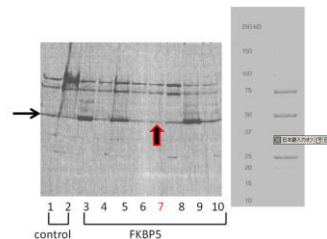


これより、FKBP5 と NF $\kappa$ B の mRNA 発現量の活性化の機序は異なり、FKBP5 mRNA の高発現は、TNF- $\alpha$  によるものとは説明できず、RA 固有の主要な異常と考えられた。

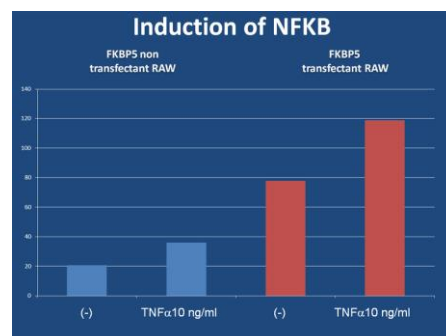
さらに、FKBP5 遺伝子を RAW264.7 細胞株にトランスフェクションし、FKBP5 過剰発現細胞株を作成した。FKBP5 蛋白の発現は Western Blotting にて確認した。

### Western Blotting

一次抗体: (F-13) Santa-Cruz  $\alpha$ FKBP5 goat, 50kDa, 1/200  
二次抗体: (SC-2020) Santa-Cruz donkey anti goat, 1/200

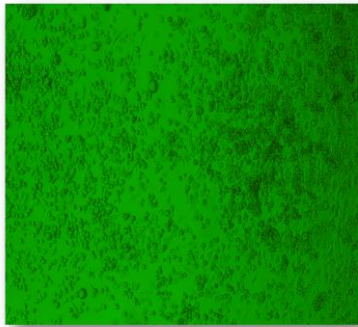


FKBP5 を過剰発現させた細胞を TNF- $\alpha$  で刺激後に NF $\kappa$ B の発現量をルシフェラーゼアッセイにて測定したところ、FKBP5 過剰発現細胞にて TNF- $\alpha$  添加による NF $\kappa$ B の発現亢進が確認された。

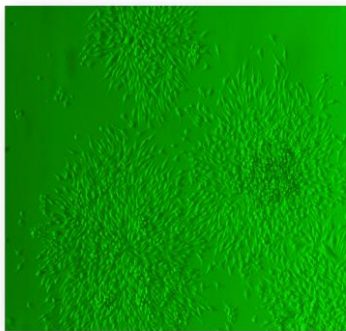


また、この FKBP5 導入細胞を 2 週間程度培養したところ、線維芽細胞様細胞への形態変化が確認された。

コントロール



FKBP5 導入細胞



以上より、骨髄 CD34 陽性細胞における FKBP5 発現過剰を基礎として、それにより TNF- $\alpha$  に対する過剰反応を介した炎症性転写因子 NF $\kappa$ B 発現亢進、骨髄細胞の線維芽細胞への変化、関節への移行などが関節リウマチの病態として想定された。今後、FKBP5 を始めこの病態に関与する遺伝子を発見し、阻害することにより新たな関節リウマチの治療法につながると考えられた。

#### 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)

[雑誌論文] (計 1 件)

Matsushita R, Hashimoto A, Tomita T, Yoshitawa H, Tanaka S, Endo H, Hirohata S. Enhanced expression of mRNA for FK506-binding protein 5 in bone marrow CD34 positive cells in patients with rheumatoid arthritis. Clinical and

Experimental Rheumatology, 査読有, Vol. 28, No.1, 2010, pp. 87-90.

[学会発表] (計 3 件)

- ① R. Matsushita, A. Hashimoto, S. Tanaka, H. Endo, S. Hirohata, T. Tomita, H. Yoshikawa. GENE EXPRESSION ANALYSIS OF BONE MARROW CD34 POSITIVE CELLS IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS. European League against Rheumatic Diseases 2010, 2010.6.16, Rome (Abstract)
- ② 松下礼子、橋本篤、飯塚進子、遠藤平仁、富田哲也、吉川秀樹、廣畑俊成、関節リウマチ骨髄における FKBP5 の NF $\kappa$ B 活性化への関与に関する解析、第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2009 年 4 月 25 日、東京
- ③ 松下礼子、橋本篤、飯塚進子、木村美保、遠藤平仁、廣畑俊成、富田哲也、吉川秀樹、関節リウマチ骨髄における発現遺伝子の解析、第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2008 年 4 月 21 日、札幌

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

橋本 篤 (HASHIMOTO ATSUSHI)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：50327376