

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月29日現在

機関番号：13501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890076

研究課題名（和文） 関節リウマチの滑膜増殖におけるHER2の役割と抗HER2抗体による治療の可能性

研究課題名（英文） The role of HER2 in Rheumatoid Arthritis therapy

研究代表者

安藤 隆 (ANDO TAKASHI)

山梨大学・医学工学総合研究部・助教

研究者番号：10377492

研究成果の概要（和文）：

当科における関節リウマチ患者の人工関節手術の切除検体の一部をヒト（患者）滑膜検体としての採取を行った（山梨大学医学部倫理委員会・第657号）。関節リウマチ滑膜検体にHER2が多く発現する傾向をみるが、対照群に対する有意差を得るに至っていない。抗HER2抗体（トラストズマブ）による滑膜増殖抑制効果をWST確認し、アポトーシス細胞の出現をFACSで確認した。

研究成果の概要（英文）：

Approved by the Ethics Committee in the University of Yamanashi, human synovial membrane was collected as a sample of Rheumatoid Arthritis patient on Total Knee Arthroplasty. Although there is a tendency of high expression of HER2 in rheumatoid arthritis synovial membrane samples, have yet to get a significant difference from control group. After anti-HER2 antibody (trastuzumab) treatment, the effect of suppressing synovial cell proliferation was confirmed by WST assay and the appearance of apoptotic cells were detected by FACS analysis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2011年度	1,130,000	339,000	1,469,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：関節リウマチ、滑膜、HER2、関節炎モデルマウス、抗HER2抗体

1. 研究開始当初の背景

（1）関節リウマチは世界中に広く分布する疾患であり、すべての民族、どの年齢層にも発症しうる。日本における有病率は0.33%と報告されている。（居村茂明 1998 疫学と患者実態、厚生省 pp107）本邦における全国患

者数は60万人と推定される。

その病態は、関節滑膜を病変の主座とした多発性関節炎を呈する原因不明の炎症性疾患であり、増殖している滑膜組織からは種々の炎症性サイトカイン、中性プロテアーゼ、活性酸素などの炎症性メディエーターが生産

され、破骨細胞の活性化を介して骨破壊が起こる。(宮坂信之 2002 関節リウマチ, 最新医学社 pp9-15)

(2) 受容体型チロシンキナーゼの一つである human EGFR-related 2 (HER2) は 1985 年に 185kDa の糖タンパクとして同定され、正常細胞では細胞の増殖・分化に関与している一方、多くの癌(乳癌、胃癌、卵巣癌、前立腺癌、など)で HER2 遺伝子に増幅や変異が確認されている。(Baselga J et al. Nat Rev Cancer 2009; 9: 463-75) HER2 タンパクを過剰発現した癌は予後不良であることも報告されている。そして、多くの HER2 強発現腫瘍に対して抗 HER2 抗体(Trastuzumab)による治療の有用性が示されている。(Choudhury A, Kiessling R. Breast Dis 2004; 20:25-31)

2. 研究の目的

近年、関節リウマチにおいても HER2 が過剰発現しているとの報告がある(Yamane S. J Inflamm (Lond) 2008;5:5.) (Satoh K et al. Arthritis Rheum 2001; 44(2): 260-265.)。しかしながら、関節リウマチにおける HER2 の発現と臨床症状との関連性、および抗 HER2 抗体による治療の可能性については明らかになってはいない。我々の研究グループでは以前、PDGF 受容体を Imatinib でブロックすることによって関節リウマチ様変化を有意に抑えることをマウスモデルで証明している。この経験を生かして、当科での手術において摘出される検体を用いて個々の症例における HER2 のタンパク発現量を定量し、さらに抗 HER2 抗体(Trastuzumab)による滑膜増殖抑制の検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト(患者)検体より培養した滑膜細胞における HER2 発現の検討。手術検体を DMEM(10%FCS)の培地で培養し、滑膜細胞の比率(90%以上)が上がるまで継代する。滑膜細胞をトリプシンで回収し、いくつかのペレットする。1つのペレットを PCR 法で解析し、mRNA レベルでの HER2 の発現を定量する。1つのペレットを WB 法で解析し、タンパクレベルでの HER2 の発現を定量する。

(2) 関節リウマチの滑膜細胞における HER2 の局在を調べる。抗 HER2-PE 抗体を用いた

FACS 解析によって関節リウマチの滑膜細胞における HER2 の細胞表面上の発現を確認、定量する。チャンバースライドで滑膜細胞を培養し、抗 HER2 抗体を用いた免疫染色法によって HER2 の細胞内、細胞表面の局在比率を確認する。

(3) 臨床におけるリウマチの進行評価と滑膜細胞における HER2 の発現量の相関について各手術症例の臨床症状(VAS スケール等)、血液検査(炎症反応等)、レントゲン(関節変形スコア)を定量化し、数値化する。(1)、(2)で得られた滑膜細胞における HER2 の発現量を上記の臨床における各スコアとの相関を統計学的手法により解析する。

(4) 滑膜細胞における HER2 の細胞内シグナリングと機能の解析。各検体の滑膜細胞における、HER2 の自己リン酸化率を HER2 のリン酸化抗体を用いて WB 法によって定量する。同じく WB 法により、抗リン酸化 AKT 抗体を用いて PI3K-AKT シグナルを、抗リン酸化 MAPK 抗体を用いて MAPKK-MAPK シグナルを解析していく。

(5) 培養滑膜細胞に抗 HER2 抗体(Trastuzumab)を使用したときの治療効果(増殖抑制、アポトーシス)を in vitro で確認する。抗 HER2 抗体(Trastuzumab)を各濃度で培養液に投与し、増殖抑制を WST assay で確認する。同様の条件下で、アポトーシス率を AnnexinV を用いた FACS 法で定量する。

4. 研究成果

関節リウマチにおける HER2 の作用を探る過程において、臨床に即した形(臨床検体を使用し、臨床データを集め、臨床に応用する)で進行するという事に意義を見だし、実行した。山梨大学医学部倫理委員会(第657号)をへて、当科における関節リウマチ患者の人工関節手術の切除検体の一部をヒト(患者)滑膜検体としての採取を行った。

(1) まず、手術時に摘出された滑膜の検体を培養し、増殖した滑膜細胞の RNA とタンパクを回収し、HER2 の全体発現量を PCR、WB にて定量した。



図1: WB法によるHER2タンパク定量。

具体的には、リウマチ患者、変形性関節症患者（対照群）よりの検体を適正培養条件のもと、滑膜細胞比率を90%以上にし、mRNAおよびタンパクの回収を行っている。遺伝子レベル、タンパクレベルでのHER2発現を確認している。（図1）また、すべての各手術症例の臨床症状（VASスケール等）、血液検査（炎症反応等）、レントゲン（関節変形スコア）を定量化し、数値化する作業を行った。

結果としては、関節リウマチ滑膜検体にHER2が多く発現する傾向をみるが、対照群に対する有意差を得るに至っていない。今後は検体数を増やすこと、病理組織における免疫染色を追加することによって、新たなデータとの有意差も確認していく。

（2）次に、FACSによる細胞表面のHER2の発現量を各検体で確認した。

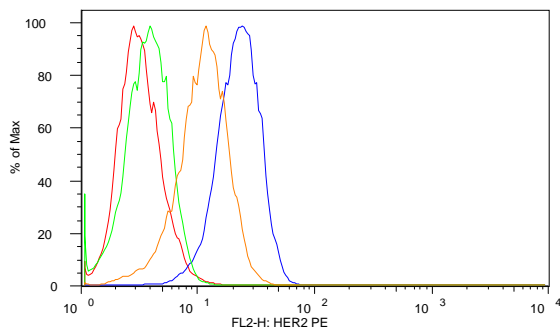


図2: 抗HER2-PE抗体を使用し、FACSにてHER2の滑膜細胞表面の発現を確認。

WB法の結果同様、検体によって発現しているもの、していないものがあった。（図2）また、検体による発現量の違いが大きく、この結果が炎症状態を反映していると仮定すると近年導入された生物学的製剤の影響が強いのではないかと考察される。今後は生物学的製剤の導入様式と臨床症状、HER2の発現について統計を追加する予定である。

（3）最後に、培養滑膜細胞に抗HER2抗体（Trastuzumab）を使用したときの治療効果（増殖抑制、アポトーシス）をin vitroで確認した。

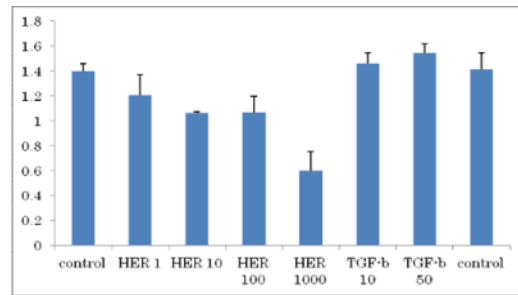


図3: WST assay, ハーセプチン(Trastuzumab)によって滑膜の増殖抑制がみられた。

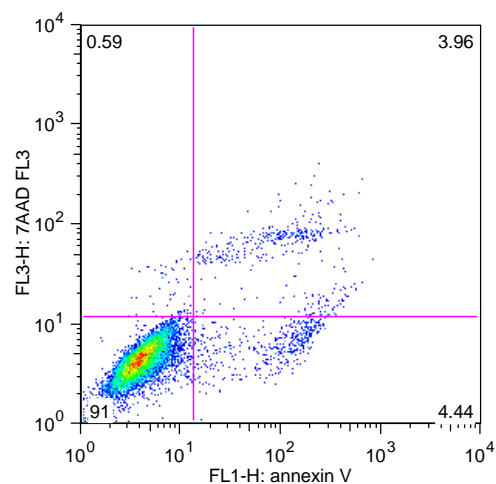
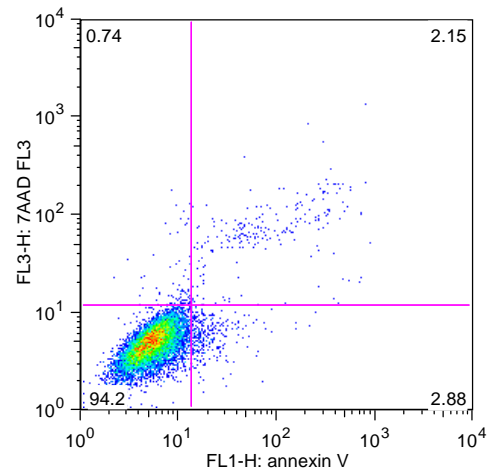


図4: Annexin Vと7AADを使用し、FACSで細胞死を確認

WST assay法により、抗HER2抗体（トラズズマブ）を培養滑膜細胞に投与することによって、滑膜増殖抑制効果があることを確認した。（図3）、また、同様の処置によって滑膜細胞の一部がアポトーシスすることもFACSによって確認することができた。（図4）また、副次的ではあるが、本研究において各種サイトカインを使用し、同じプロトコールで関節

リウマチ滑膜細胞を刺激した。その結果、TGF-beta において用量依存的に細胞増殖に働く傾向がみられた。これを preliminary なデータとして、新たな実験にのぞんでいきたい。

初期の実験結果(検体)では、HER2の陽性率が高く、また、抗HER2抗体での増殖抑制も強くみられる傾向にあり、後半の検体では逆の結果であった。1つの考察として数多くの生物学的製剤、免疫抑制剤の関節リウマチ患者への投与が考えられる。現状、当院で得られる患者検体のほとんどは、MTXを高容量かつ、生物学的製剤の併用となっている。検体数を集め、統計学的検討をすることによってこのことも証明していきたい。

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3件)

① Okita R, Mougiakakos D, Ando T, Mao Y, Sarhan D, Wennerberg E, Seliger B, Lundqvist A, Mimura K, Kiessling R. HER2/HER3 Signaling Regulates NK Cell-Mediated Cytotoxicity via MHC Class I Chain-Related Molecule A and B Expression in Human Breast Cancer Cell Lines. Journal of immunology 2012;188:2136-45. 査読有

② Fujita K, Ando T, Ohba T, Wako M, Sato N, Nakamura Y, Ohnuma Y, Hara Y, Kato R, Nakao A, Haro H. Age-related expression of MCP-1 and MMP-3 in mouse intervertebral disc in relation to TWEAK and TNF-alpha stimulation. Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society 2012;30:599-605. 査読有

③ Mimura K, Ando T, Poschke I, Mougiakakos D, Johansson CC, Ichikawa J, Okita R, Nishimura MI, Handke D, Krug N, Choudhury A, Seliger B, et al. T cell recognition of HLA-A2 restricted tumor antigens is impaired by the oncogene HER2. Int J Cancer 2011;128:390-401. 査読有

[学会発表] (計1件)

① 安藤隆: "HER2-HER3 シグナルは乳癌細胞株において MICA/B の発現を制御する" 第19回日本乳癌学会学術総会(2011.09.03)、仙台

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/orthop/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安藤 隆 (ANDO TAKASHI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部

・助教

研究者番号: 10377492

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし