

機関番号 : 32202

研究種目 : 研究活動スタート支援

研究期間 : 2009 年度～2010 年度

課題番号 : 21890242

研究課題名 (和文)

: 関節リウマチ新規治療ターゲットとしての BCMA 分子の関節炎への病的関与の解明

研究課題名 (英文)

: BCMA expression in rheumatoid arthritis fibroblast-like synovial cells

研究代表者 : 永谷勝也 (NAGATANI KATSUYA)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 50508752

研究成果の概要 (和文) :

我々は、A proliferation-inducing ligand (APRIL) とその受容体である B cell maturation antigen (BCMA) が関節リウマチ (Rheumatoid arthritis; RA) 患者の関節線維芽細胞様滑膜細胞 (Fibroblast-like synoviocytes; FLS) に発現しており、RA 患者では血清 APRIL 濃度が有意に高いことを見出した。さらに FLS に *in vitro* で APRIL を添加すると、FLS の有意な増殖と、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、および破骨細胞分化因子である Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL) mRNA 発現が有意に増加することを示した。

次に我々は、これまで B 細胞の生存因子の一つと考えられていた APRIL とその受容体である BCMA が、RA 患者 FLS に病的に発現しているメカニズムについて検討した。PU.1 および OBF.1 は BCMA の発現調節に関わる転写因子およびコアクチベーターとして報告されている。エピジェネティックな PU.1 および OBF.1 発現調節の破綻が、病的な BCMA 発現の一因である可能性があると予測し、RA と疾患コントロールの変形性関節症 (osteoarthritis; OA) 患者 FLS において、PU.1 および OBF.1 遺伝子の発現について比較検討した。その結果、RA 患者では、疾患コントロールの OA 患者 FLS と比して、PU.1 および OBF.1 遺伝子の発現が有意に亢進していることが示された。さらに、PU.1 および OBF.1 遺伝子の発現は、RA 患者 FLS において、BCMA の遺伝子発現と有意に正の相関を認めることを示した。

以上の検討から、エピジェネティックな PU.1 および OBF.1 発現亢進が、BCMA の病的発現亢進に関与し、RA 患者 FLS においては APRIL-BCMA のオートクラインループが形成され、炎症性サイトカインや破骨細胞分化因子の発現を亢進させることにより RA の病態に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文) :

Fibroblast-like synoviocytes (FLS) are among the principal effector cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA). We recently reported the variety of stimulating effects of a proliferation-inducing ligand (APRIL), and its specific effect on the FLS in the affected RA synovium (RA-FLS). A significantly higher level of soluble APRIL was detected in RA serum than in normal serum. Among the three receptors of APRIL tested, RA-FLS expressed only B cell maturation antigen (BCMA), whereas the FLS in the affected

osteoarthritis synovium(OA-FLS) expressed none of the receptors. APRIL stimulated RA-FLS but not OA-FLS to produce interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and APRIL itself. APRIL also enhanced the receptor activator of nuclear factor kappaB ligand(RANKL) expression in RA-FLS.

The regulatory mechanisms of BCMA expression have not been fully described. OBF.1 is a transcriptional co-activator, and has been shown to regulate the expression of PU.1. In this study, we demonstrated that RA-FLS expressed transcription factor PU.1 and transcriptional co-activator OBF.1, and the expression levels of PU.1 and OBF-1 were correlated with those of BCMA in RA-FLS.

These results provide evidence that APRIL is one of the main regulators in the pathogenesis of RA. Epigenetic regulation of BCMA transcription might contribute to the underlying mechanisms of this condition. Thus, both BCMA and APRIL could be considered as potential therapeutic targets in ameliorating damage to the affected joints of patients with RA.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	400,000	120,000	520,000
22年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,000,000	300,000	1,300,000

研究分野：生物系/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：リウマチ学

#### 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ（以下 RA）は世界中全ての人種、民族に存在し、その有病率は約 0.7%とされている。我が国の疫学調査では、その有病率は約 0.5%で、全国の RA 患者は約 60 万人と推定されている。RA は免疫異常に起因する関節滑膜の病的増殖と、それに伴う骨・関節破壊を特徴とする原因不明の難治性慢性炎症性疾患である。国際的なゲノム解析の進展にもかかわらず、その病因については未だ明らかになっていない。一方、病態については、1) 免疫担当細胞の活性化 2) 関節滑膜細胞の病的増殖 3) 関節軟骨および骨・関節破壊

の進行、の 3 段階を特徴とし、それぞれについて解明が進んでいる。

RA の治療の現状および開発の方向は、作用点が不明瞭な従来の疾患修飾性抗リウマチ薬から、リンパ球などの免疫担当細胞、関節滑膜細胞、破骨細胞、介在する炎症性サイトカインの抑制という、ターゲットが明確な治療に向けて進んでいる。現在、すでに臨床応用され、一定の効果を上げているものは、TNF- $\alpha$ 、IL-6 などをターゲットとした抗サイトカイン療法である。一方、これらの単独投与では効果が不十分で、全ての症例において病勢の寛解を誘導し得ないのが現状である。

加えて、これらの薬剤にもレスポンダーとノンレスポンダーが認められ、またレスポンダーにおいても、投与継続中に、いわゆるエスケープ現象と呼ばれる効果の減弱が生じ、四肢の機能障害を来す骨・関節破壊を、長期にわたり確実に防止できる治療法は未だ確立されていない。

RAの病態の特徴の一つは、慢性的な炎症反応が持続することである。何らかのトリガーで炎症反応が生じ、免疫担当細胞、関節滑膜細胞、破骨細胞の間で炎症の連鎖環が生じていると考えられる。その連鎖環の複数箇所をピンポイントに断ち切ることができれば、これまで以上にRAの病勢の寛解率を向上させることが可能になると考えられる。

RAの病態において、特に関節炎の持続におけるキープレーヤーは関節滑膜細胞である。関節リウマチ患者の関節炎局所から得られた線維芽細胞様滑膜細胞（以下FLS）は、*in vitro*でも自律的に増殖を続け、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6などの炎症性サイトカインや、破骨細胞分化因子であるRANKLを産生する。これら炎症性サイトカインが免疫担当細胞を活性化させて関節炎が持続し、RANKLが血中の単核細胞から破骨細胞への分化を促進して、骨・関節破壊を引き起こすと考えられる。

最近我々は、これまでB細胞の生存因子の一つと考えられていたAPRILと、その受容体であるBCMAが、RA患者の関節炎局所から得られたFLSに発現しており、RA患者では、疾患コントロールの変形性関節症（以下OA）患者に比して、血清APRIL濃度が有意に高いことを見出した。さらに、FLSに*in vitro*でAPRILを添加すると、培養FLSの有意な細胞増殖と、炎症性サイトカインであるTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 mRNA発現の有意な増加を認めた。さらに興味深いことに、*in vitro*でのAPRIL刺激により破骨細胞分化因子であるRANKL mRNA発現の有意な増加を認めた。

過去の報告では、BCMAは主にB細胞に発現が認められ、BCMAのリガンドであるAPRILはリンパ球などの血球系細胞以外に種々の癌細胞における発現が報告されている。さらに、

APRIL欠損マウスおよびBCMAディプリーションマウスの検討では、リンパ濾胞のB細胞や末梢血B細胞に著しい形態的、機能的異常は認められなかったとの報告がある。これらの報告は、APRILおよびBCMAの生理的な役割は不明で、むしろ病的な環境における何らかの関与が示唆される。

これらの研究成果より、RAの病態において、関節滑膜細胞が関節炎の持続におけるキープレーヤーであり、BCMAが、関節炎局所に特異的に発現していることから考えて、BCMAおよび、そのリガンドであるAPRIL分子をターゲットとした治療は、生理的な作用に影響を及ぼしにくい有望な治療と考えられる。また我々の検討から、APRILはRA患者の末梢血液中に高い濃度で存在していることから、むしろRA関節滑膜局所に選択的に発現しているBCMA分子を治療ターゲットとした方が、より効率的であると考えられた。

将来、RA患者に治療応用することを見据え、本研究において、BCMA分子が、RAの有効かつ安全性の高い新規治療ターゲットとなり得ることが分かれば、既存の関節リウマチに対するターゲット療法と組み合わせ、これまで以上に関節リウマチの病勢の寛解率を向上させることが可能になると期待される。

## 2. 研究の目的

エピジェネティクスは、ゲノムDNAの後天的な修飾、制御によってゲノム情報を活用する高次の生体システムである。関節リウマチのように、遺伝因子や環境因子のような異なる複数の病因が複雑に関与する疾患では、エピジェネティクスが、その両者の橋渡しをする要素として注目されている。

PU.1はBCMA発現に重要な転写因子として報告されている。また、OBF.1はPU.1の発現調節因子として報告されている。エピジェネティックなOBF.1およびPU.1発現調節の破

綻が、病的な BCMA 発現の一因となっている可能性がある。

本研究では、RA 患者 FLS において、BCMA の発現調節に関わる転写因子およびコアクチベーター分子の遺伝子発現を調べ、RA 患者 FLS における病的な BCMA 遺伝子発現亢進のメカニズムについて検討することを目的とする。

### 3. 研究の方法

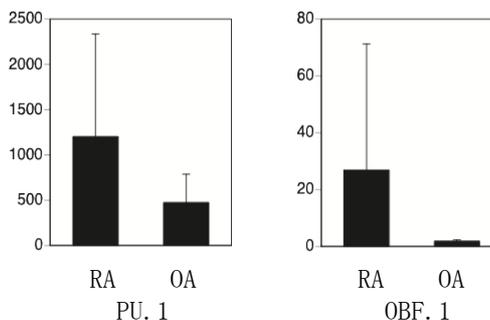
RA 患者および疾患コントロールの OA 患者の FLS を用いた。RA または OA 患者の FLS は、RA または OA により膝関節の人工関節置換手術が必要となり、膝関節の人工関節置換手術施行のため当院整形外科に入院した患者から同意を得た上、膝関節の人工関節置換手術施行の際、通常破棄されている滑膜組織を採取した。採取した滑膜組織は培養して FLS に純化させる。純化させた FLS は、使用するまで液体窒素内で保存する。RA または OA 患者滑膜組織由来の FLS は *in vitro* で APRIL 刺激を行う。刺激 24 時間後に FLS を回収し、回収した FLS から mRNA を抽出する。抽出された RA および OA 患者 FLS の mRNA における PU.1 および OBF.1 遺伝子の発現について比較検討した。遺伝子発現は定量的 PCR 法を用い、コントロールのハウスキーピング遺伝子との発現量の差で示した。

### 4. 研究成果

RA 患者 FLS では、疾患コントロールの OA 患者 FLS と比して、B 細胞の生存因子の一つと考えられている APRIL の受容体である BCMA の発現調節に関わる PU.1 と OBF.1 の遺伝子発現が有意に亢進していた (図 1)。さらに、PU.1 および OBF.1 遺伝子の発現は、RA 患者 FLS において、BCMA の遺伝子発現と有意に正の相関を認めることを示した (図 2 A, B, C)。

RA 患者 FLS では、BCMA の発現調節に関わる転写因子およびコアクチベーターである PU.1、OBF.1 遺伝子の発現が亢進していることから、BCMA 遺伝子発現亢進への関与が示唆され、エピジェネティックな OBF.1 および PU.1 発現調節の破綻が、関節リウマチ患者滑膜細胞における病的な BCMA 発現の一因となり、さらに APRIL-BCMA のオートクラインループを形成して、炎症性サイトカイン、破骨細胞分化因子の発現を亢進させ、破骨細胞増殖を誘導し、関節リウマチの病態形成に関与している可能性が示唆された。

【図 1】

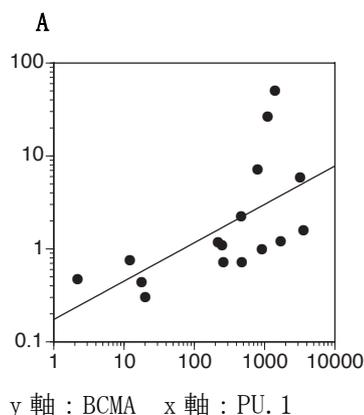


RA : 関節リウマチ患者滑膜細胞

OA : 変形性関節症患者滑膜細胞

$p < 0.05$  (RA vs. OA)

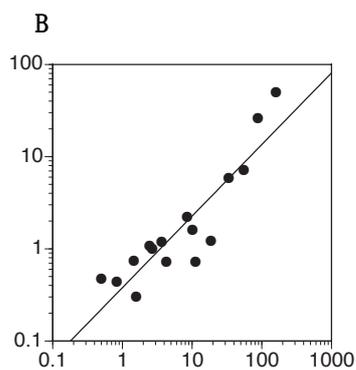
【図 2】



y 軸 : BCMA x 軸 : PU.1

$r_s = 0.724$

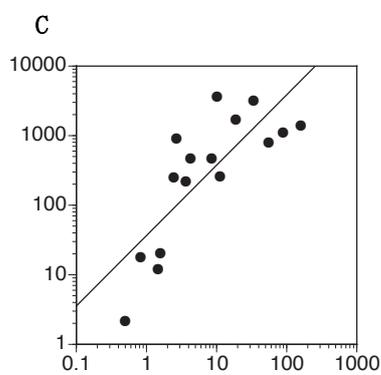
$p < 0.01$



y 軸 : BCMA x 軸 : OBF. 1

$r_s=0.846$

$p<0.01$



y 軸 : PU.1 x 軸 : OBF. 1

$r_s=0.812$

$p<0.01$

##### 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)

① 永谷勝也, 簗田清次. 関節リウマチ新規治療ターゲットとしてのBCMA分子の関節炎への病的関与の解明. 自治医科大学紀要 33: 191, 2010.

[学会等発表] (計1件)

① 永谷勝也, 簗田清次. 関節リウマチ新規治療ターゲットとしてのBCMA分子の関節炎への病的関与の解明. 第9回自治医科大学シンポジウム. 栃木, 2010年9月.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

##### 6. 研究組織

研究代表者

永谷 勝也 (NAGATANI KATSUYA)

自治医科大学・内科学講座アレルギー膠原病

学部門・講師

研究者番号 : 50508752