

平成 21 年 6 月 23 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791052

研究課題名（和文）腫瘍壊死因子切断機構および関節リウマチにおけるその病的意義の解明

研究課題名（英文）Investigation for the mechanism of shedding for tumor necrosis factor- α and its pathological significance in rheumatoid arthritis.

研究代表者

疋田 温彦 (HIKITA ATUHIKO)

独立行政法人国立病院機構（相模原病院臨床研究センター）

病態総合研究部・特別研究員

研究番号：60443397

研究成果の概要：腫瘍壊死因子（tumor necrosis factor- α 、TNF- α ）の切断に関与するタンパク分解酵素のスクリーニングを行い、従来報告されている ADAM17 以外に ADAM9、ADAM10、ADAM19 がこの因子の切断能を持つことを明らかにした。さらに種々の株化細胞、一次培養細胞における検討から、これらの酵素のうち ADAM10 と ADAM17 が実際に TNF- α の切断に関与しうること、この2つの酵素の TNF- α 切断における寄与の程度は酵素の発現量と酵素の活性を阻害する TIMP の発現レベルによって決定されることを明らかにした。またヒトの血管炎に罹患した血管内皮細胞と変形性関節症に罹患した軟骨組織における軟骨細胞において TNF- α と ADAM10 が同時に発現していることから、これらの病態では TNF- α の切断に ADAM10 が実際に関与している可能性があると考えられた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	0	1,300,000
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	570,000	3,770,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：腫瘍壊死因子、切断酵素、関節リウマチ、変形性関節症

1. 研究開始当初の背景

腫瘍壊死因子（tumor necrosis factor- α 、TNF- α ）は広範な生理活性を持つ因子であるが、当初膜結合型分子として産生され、細胞外領域が切断され可溶性分子となって生理活性をしめすようになる。したがってその活性発現には分子の切断（ectodomain shedding）が重要な意義を持つ。従来 TNF- α の切断には metalloproteinase の一つ ADAM17 が重要とされてきたが、これ以外

の酵素が TNF- α 分子の切断に関与するかどうかについては報告がなかった。このため本研究では TNF- α の切断に関与するタンパク分解酵素をスクリーニングによって同定し、さらに種々の細胞においてそれらが実際に TNF- α の切断に関与するかを検証した。また実際の病理組織において、新たに同定された TNF- α 切断酵素がその病態の伸展にどのように関与しているかを検討することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は第一に TNF- α の切断に関与する酵素を同定することであり、第二に種々の細胞において TNF- α の切断が実際にどのような酵素によって行われるかを明らかにすることである。また本研究ではさらに実際のヒトの組織において TNF- α の切断がどのような酵素によって行われているかについても検討を行った。

3. 研究の方法

TNF- α の切断酵素のスクリーニングははじめにこの因子の切断部位 (stalk region) とアルカリフォスファターゼの融合タンパクを用いた実験で酵素の候補を選択し、選ばれた酵素についてさらに全長 TNF- α を用いた切断実験を行って実際の活性を確認した。

次に 293A、NIH3T3、UV α 2 の各株化細胞とマウスの spleen macrophage およびヒトの一次培養関節軟骨細胞において選択された酵素の発現を qPCR により検討し、さらに shRNA の強制発現あるいは recombinant TIMP 1、3 の添加によりその酵素の発現あるいは酵素活性を抑制することでそれぞれの細胞で実際に TNF- α の切断がどの酵素によって行われているかを検討した。

4. 研究成果

二段階のスクリーニングによって従来報告のある ADAM17 以外に ADAM10 も TNF- α の切断活性を持つことが明らかになった。

293A細胞を用いた実験では shRNA の導入による発現抑制実験の結果から ADAM10 と ADAM17 がほぼ等しい比率で TNF- α の切断に関与していると考えられた。

一方マウス spleen macrophage では従来の報告どおり ADAM17 が主要な TNF- α 切断酵素と考えられたが、ADAM10 もその切断にある程度関与していると考えられた。

一方、NIH3T3 細胞では ADAM10 が主要な TNF- α 切断酵素であることを示す結果が得られ、血管内皮細胞由来の UV α 2 では 293A 細胞同様 ADAM10 と ADAM17 の双方が TNF- α の切断に関与していると考えられた。ヒトの血管炎においても血管内皮細胞において TNF- α とともに ADAM10 の発現が観察され、この酵素が実際に病態に関与している可能性が示唆された。

ヒトの一次培養軟骨細胞を用いた実験では ADAM10 は軟骨細胞においても TNF- α の切断に関与していると考えられた。また変形性関節症 (OA) 罹患軟骨の組織学的検討から、OA では軟骨細胞において TNF- α と ADAM10 がともに発現していることが確認された。

以上の結果から TNF- α の切断には従来こ

の因子の主要な切断酵素であると考えられてきた ADAM17 のほかに ADAM10 も関与している可能性があることが示された。

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 6 件)

1. Hikita A, Tanaka N, Yamane S, Ikeda Y, Furukawa H, Tohma S, Suzuki R, Tanaka S, Mitomi H, Fukui N. Involvement of a disintegrin and metalloproteinase 10 and 17 in shedding of tumor necrosis factor- α . *Biochem Cell Biol* (in press).
2. Hikita A, Tanaka S. Ectodomain shedding of receptor activator of NF- κ B ligand. *Adv Exp Med Biol* 2007;602:15-21.
3. Fukui N, Ikeda Y, Ohnuki T, Tanaka S, Yamane S, Suzuki R, Sandell LJ, Ochi T. TNF- α induces the expression of BMP-2 through transcriptional and post-transcriptional regulatory mechanisms. *J Biol Chem* 281:27229-41, 2006.
4. Fukui N, Ikeda Y, Ohnuki T, Tanaka N, Hikita A, Mitomi H, Mori T, Juji T, Katsuragawa Y, Yamamoto S, Sawabe M, Yamane S, Suzuki R, Sandell LJ, Ochi T. Regional differences in chondrocyte metabolism in osteoarthritis. A detailed analysis by laser capture microdissection. *Arthritis Rheum* 58:154-163, 2008.
5. Fukui N, Miyamoto M, Nakajim M, Ikeda Y, Hikita A, Furukawa H, Mitomi H, Tanaka N, Katsuragawa Y, Yamamoto S, Sawabe M, Juji T, Mori T, Suzuki R, Ikegawa S. Zonal gene expression of chondrocytes in osteoarthritis cartilage. *Arthritis Rheum* 58:3834-53, 2008.
6. Nakajima K, Kakihana W, Nakagawa T, Mitomi H, Hikita A, Suzuki R, Akai M, Iwaya T, Nakamura K, Fukui N. Addition of an arch support improves the biomechanical effect of a laterally wedged insole. *Gait Posture* 29: 208-13, 2009.

[学会発表] (計 9 件)

1. Hikita A, Suzuki R, Tohma S, Tanaka S, Fukui N. Identification of TNF- α Shedding Enzyme in Macrophages. ASBMR 29th Annual Meeting. Sep16-19 2007, Honolulu, Hawaii, USA
2. Fukui N, Ikeda Y, Ohnuki T, Tanaka N,

- Hikita A, Yamane S, Suzuki R, Ochi T, Katsuragawa Y, Yamamoto S. Integrin $\alpha\beta 5$ may be responsible for the suppression of cartilage matrix genes and formation of cytoskeletons during dedifferentiation in the monolayer cultured adult human articular chondrocytes. 2006 World Congress on Osteoarthritis. Prague, Czech Republic. December, 2006.
3. Fukui N, Ikeda Y, Ohnuki T, Tanaka N, Ishida S, Yamane S, Mitomi H, Hikita A, Yamamoto S, Katsuragawa Y, Suzuki R. Identification of possible regulatory molecules for chondrocyte anabolism in osteoarthritic cartilage. 2007 World Congress on Osteoarthritis. Ft. Lauderdale, FL, USA. December 2007.
 4. 疋田温彦、福井尚志. **TNF- α 切断酵素の検索**. 第25回骨代謝学会 2007年7月、大阪.
 5. 疋田温彦、鈴木隆二、當間重人、福井尚志、田中 栄. TNF- α 切断酵素の検索. 第22回日本整形外科学会基礎学術集会. 2007年10月、浜松市.
 6. 福井尚志、池田泰子、鈴木隆二、疋田温彦、桂川陽三、山本精三. 単層培養された関節軟骨細胞の表現型の変化には少なくとも2種のインテグリンヘテロダイマーが関与する. 第22回日本整形外科学会基礎学術集会 2007年10月、浜松市.
 7. 福井尚志、池田泰子、大貫俊幸、田中信帆、石田 暁、山根昌治、疋田温彦、桂川陽三、山本精三、宮本恵成、鈴木隆二. ヒト変性性関節症罹患軟骨における anabolic factor の探索. 第21回日本軟骨代謝学会. 2008年3月、京都.
 8. 福井尚志、池田泰子、疋田温彦、三富弘之、十字琢夫、森俊仁、桂川陽三、宮本恵成、山本精三、鈴木隆二. インテグリンの活性抑制は変形性関節症罹患軟骨における病的コラーゲンの発現を軽減し、培養軟骨細胞の脱分化を抑制する. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会. 2008年10月、京都.
 9. 福井尚志、宮本恵成、中島正弘、池田泰子、疋田温彦、三富弘之、森俊仁、鈴木隆二、桂川陽三、山本精三、池川志郎. 変形性関節症罹患軟骨における軟骨細胞の代謝活性の検討 —マイクロアレイによる軟骨各層の遺伝子発現の解析結果から—. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会. 2008年10月、京都.

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

疋田 温彦 (HIKITA ATUHIKO)
独立行政法人国立病院機構 (相模原病院
臨床研究センター)・病態総合研究部・
特別研究員
研究者番号: 60443397

(2) 研究分担者

(なし)

(3) 連携研究者

福井 尚志 (FUKUI NAOSHI)
独立行政法人国立病院機構 (相模原病院
臨床研究センター)・病態総合研究部・
研究部長
研究者番号: 10251258

田中 信帆 (TANAKA NOBUHO)
独立行政法人国立病院機構 (相模原病院
臨床研究センター)・病態総合研究部・
研究員
研究者番号: 60530920

山根 昌治 (YAMANE SHOJI)
独立行政法人国立病院機構 (相模原病院
臨床研究センター)・病態総合研究部
特別研究員
研究者番号: 40419148

池田 泰子 (IKEDA YASUKO)
独立行政法人国立病院機構 (相模原病院
臨床研究センター)・病態総合研究部・
研究員
研究者番号: 未取得

古川 宏 (FURUKAWA HIROSHI)
独立行政法人国立病院機構 (相模原病院
臨床研究センター)・リウマチ性疾患研究
部・研究員
研究者番号: 372293

當間 重人 (TOUMA SHIGETO)
独立行政法人国立病院機構 (相模原病院
臨床研究センター)・リウマチ性疾患研究
部・研究部長
研究者番号：50207528

鈴木 隆二 (SUZUKI RYUJI)
独立行政法人国立病院機構 (相模原病院
臨床研究センター)・診断・治療研究室・
室長
研究者番号：70373470

三富 弘之 (MITOMI HIROYUKI)
独立行政法人国立病院機構 (相模原病院臨
床研究センター)・検査科 (病理)・科長
研究者番号：90181940