

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(c)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591176

研究課題名(和文) 包括的遺伝子発現解析および変動蛋白解析による関節リウマチ骨破壊機序の解明

研究課題名(英文) Study on the molecular mechanisms of bone destruction by rheumatoid synovium by using comprehensive gene expression analysis and multiplex cytokine profiling .

研究代表者 鈴木 康夫 (SUZUKI YASUO)

東海大学 医学部 教授

研究者番号：90129495

研究成果の概要(和文)：

関節リウマチ(RA)滑膜炎による関節破壊の分子メカニズムを明らかにする目的で、RA 及び変形性関節症(OA)患者より手術時に採取した滑膜組織を培養し、破骨細胞形成過程に変動するバイオマーカーを包括的遺伝子発現解析および多項目同時解析手法を用いた変動蛋白解析により検討した。RA 滑膜組織培養では培養2日目より ACP5 遺伝子の発現が上昇し、OA に比べて多数の破骨細胞が形成された。Gene chip 解析では、炎症性サイトカイン(IL-1, TNF α , IL-6) 遺伝子の発現は培養初期に高く、漸減し、RANKL 遺伝子は培養全期をとして発現がみられ、RA と OA で差はなかった。Pathway 解析では NF κ -B, p38 Mark signaling 等炎症、免疫系のシグナル伝達経路に変動遺伝子の集積がみられた。培養上清中のバイオマーカーの多項目同時解析では、RA 滑膜組織培養において TNF β 、IL-17F の増加がみられ、その他の炎症性サイトカイン、破骨細胞分化誘導因子などの変化は RA, OA で差はなかった。RA 滑膜組織由来破骨細胞による骨破壊には炎症性サイトカインや T 細胞サイトカインが関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

To clarify the molecular mechanism(s) of bone destruction by rheumatoid synovium, we analyzed the expression profile of gene and molecular markers including cytokines, growth factors, adhesion molecules, protein kinase, and transcription factors by comprehensive gene expression analysis and multiple analyte profiling in the culture of the synovial tissues derived from patients with rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA). The higher number of osteoclasts was formed in the culture of rheumatoid synovium compared to the culture of OA synovium. In the culture of rheumatoid synovium, the increased gene expression of proinflammatory cytokines and IL-17F was observed and the pathway analysis showed the activation of NF κ -B and p38 Mark signaling. The increased production of TNF β and IL-17F by the cultured rheumatoid synovium was confirmed using multiplex cytokine profiling. The results indicate that the proinflammatory and T cell cytokine profiles differ in the culture of synovial tissues between RA and OA and this may contribute the excessive formation of osteoclasts in RA joints.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2009年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2010年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：関節リウマチ、関節破壊、破骨細胞、包括的遺伝子発現解析、包括的変動蛋白解析

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)では慢性増殖性滑膜炎により骨・軟骨破壊が起こり、高度の関節変形をきたす。関節の機能障害はRA患者のADLに重大な支障を来し、生命予後まで不良にする。従って、骨破壊の抑制は患者のADLや生命予後の改善に大いに貢献できる。近年、RA滑膜炎による骨破壊に破骨細胞の関与が明らかになっている。申請者はRA滑膜細胞より誘導因子、支持細胞非存在下で破骨細胞様細胞を誘導し、6ヶ月以上の長期に渡り培養維持できるin vitro骨破壊モデルを確立した(Rheumatology, 2000;40:673)。本培養モデルでは、滑膜マクロファージ、線維芽細胞、リンパ球の増殖がみられRA滑膜炎組織をin vitroで再現できると同時に、滑膜マクロファージが破骨細胞へ分化し、形成された破骨細胞により骨破壊が起こる。

正常骨組織における破骨細胞の分化過程はかなり詳細に明らかになってきている(図)。破骨細胞の前駆細胞であるマクロファージ系細胞が増殖し、前破骨細胞にcommitするには骨芽細胞に発現するreceptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)とマクロファージ系細胞のRANKの結合と骨芽細胞が産生するM-CSFが必須である。また、転写因子としては前駆細胞の初期の分化に関わるPU.1やRANKLの細胞内シグナル伝達に関わるTRAF6の重要性が指摘されている。さらにTRAF6の下流で活性化される分子としてNF- κ B TAK1, JNK, p38MAPK, ERK, PI3K/Aktなどが知られているがノックアウトマウスの実験で必須であるのはNF- κ Bだけである(EMBO J 20:1271, 2001)。一方RANKLは転写因子複合体であるAP-1の構成分子であるc-fosを誘導しAP-1を活性化することが証明され、これも破骨細胞の分化には必須である。最近、NFATc1が破骨細胞の分化におけるマスター転写因子として注目されている。これらのRANKLを介したシグナルに加え、カルシウムシグナリングの重要性が明らかになりCAMK-IIの阻害は破骨細胞形成を抑制する事も明らかになった(Zhang L, Crit Rev Eukaryot Gene Expr 15:1-13, 2005)。通常骨組織における破骨細胞の分化シグナルに加え、炎症性骨破壊ではTNF α , IL-1の様なRANKL非依存的シグナルも関与している可能性が指摘されている。TNF

α はRANKL非依存的に単独で破骨細胞を分化誘導するかは疑問視されているが、RANKLの発現が極少量あればTNF α が破骨細胞を分化誘導する事が報告されている(J Clin Invest 106: 1481, 2000)

In vitro 滑膜炎・骨破壊モデルでは滑膜マクロファージ、滑膜線維芽細胞、リンパ球、樹状細胞など複数の細胞がパンヌス様組織を形成し、破骨細胞の分化・活性化に関わるIL-1, TNF α , IL-6+sIL-6R等の炎症性サイトカイン、commitment factorであるM-CSF, VEGFの産生、T細胞や線維芽細胞のRANKL発現が確認されている。さらに、RANKL, TNF, VEGFの阻害は破骨細胞の形成を低下させることが明らかとなった(Itoh G et al Clin Rheumatol, 16:11:2004)。しかし、RANKL-RNAi系の阻害では破骨細胞の形成は十分抑制されないことから、炎症性骨破壊にはRANKL-RANK系以外の複数の因子が複雑に関与している可能性がある。以上より、RANKLの発現は、許容作用として破骨細胞の分化誘導には必要であるが、炎症性骨破壊部位では、正常骨組織には存在しない多因子の役割を明らかにしなければならない。

2. 研究の目的

滑膜マクロファージの増殖、破骨細胞への分化誘導に促進的あるいは抑制的に関わるサイトカイン、成長因子などの液性因子、cell-to-cell contactに関わる接着分子その後の破骨細胞形成に関わる細胞内シグナルを転写因子やリン酸化酵素を蛋白質レベルと遺伝子レベルの両者で包括的に解析し、関節リウマチ滑膜組織由来の破骨細胞が骨破壊を来す分子メカニズムを明らかにして、新規治療法を開発する。

3. 研究の方法

(1)ヒト滑膜細胞培養と破骨細胞様細胞の形成：

RA患者の滑膜組織を手術時に採取し、顕微鏡下で表層細胞を含む小組織片に細切する。滑膜の研究利用に関しては、術前に文書で同意が得られた場合に限る。既に発表した方法により小組織片をcoatingしたチャンバースライドと象牙片あるいはhydroxyapatite-coated well上で培養培養する(Rheumatology, 2000;40:673)。同様に細切し

た組織片を 6-well 培養ウェル内で培養し、組織片より出てきた細胞を回収し、チャンバースライド内で培養する

(2) 破骨細胞の同定と骨吸収活性の評価

破骨細胞細胞数は TRAP (酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ) 活性陽性の 3 核以上の多核細胞を顕微鏡下で算定する。骨吸収能は培養細胞の cell lysate の TRAP 活性, ハドロキシアパタイトあるいは象牙片上の骨吸収窩面積, 数で評価する。骨吸収窩面積は MacScope ver II を用いて画像解析で測定する

(3) In vitro 骨破壊モデルにおける破骨細胞形成に関わる蛋白、リン酸化酵素、転写因子の包括的探索

① 包括的変動蛋白解析: 多項目同時解析手法 (Multiple Analyte Profiling: MAP) による解析

滑膜細胞培養開始時から 1, 3, 6, 10, 13 日目の培養細胞及び培養上清を回収する。回収時には同時に TRAP 染色を行い、各培養時期の破骨細胞の形成状態を確認する。培養上清の生理活性物質および細胞内リン酸化蛋白は multiple bead array assay にて行う。50 μ l の培養上清あるいは cell lysate を用いて以下の項目を測定する。測定は Capture antibody を結合させた beads とサンプルを array 内で反応させ、サンドイッチ法イムノアッセイで多種類の蛋白を同時に定量する

- 1) サイトカイン, 成長因子群: IL-1 ~ 17, IL-1ra, TNF, TNFR, VEGF, MCP-1, bFGF, MMP, TIMP, RANTES, RNAKL, OPG, ICAM-1
- 2) リン酸化酵素: Akt, p38, JNK1/2 etc
- 3) Transcription factors: Ap-2, CREB, EGR, HIF, NF- κ B, NFAT, NF-kB, PPAR, SRE etc

② 包括的遺伝子発現解析 (ジーンチップ解析)

- 1) Affymetrix 社製 GeneChip Expression Analysis により行う。回収した細胞より RNeasy Mini kit (QUIAGEN[®]) を用いて, RNase-free DNase 存在下 total RNA を抽出する。約 100 ng の total RNA を用いて実験を行う
- 2) cDNA 合成とラベリング: Two-cycle Target Labelling and control reagents (Affymetrix), MEGAscriptT7 kit (Ambion) を用いて, cDNA 合成、増幅、ラベリングを行う。
- 3) ハイブリダイゼーション、スキャン: ラベルされた cDNA をマイクロアレイにのせて、GeneChip hybridization Oven 640 を用いてハイブリダイゼーションを行う。使用するマイクロアレイは Human Genome U133 Plus 2.0 Array で 1 枚のアレイに約 47,000 の転写産物/54,000 のプローブセットが搭載されている。サイトカイン・サイトカイン受容体関連遺伝子群, 成長因子関連遺伝

子群, アポトーシス関連遺伝子群, 骨芽細胞/破骨細胞関連遺伝子群, 細胞外マトリックス関連遺伝子群, 転写調節因子関連遺伝子群, 細胞周期関連遺伝子群, 細胞表面蛋白関連遺伝子群, カルシウムシグナリング-Kinase 関連遺伝子はマイクロアレイに全て網羅されている。ハイブリダイゼーション後、Fluidics station 450 および GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix) を用いて、アレイの染色、スキャンをおこなう

- 4) データ解析: GeneChip operating software (GCOS) を用いて遺伝子の発現を解析する。全プローブより相同性の低いもの、発現 (-), 低値のものを除き主成分分析 (PCA) を行う。培養後有意かつ 2 倍以上の変動を示した遺伝子群の同定を行う。

4. 研究成果

(1) 滑膜組織培養における破骨細胞の形成:

RA 患者由来滑膜組織培養では培養 10~14 日目で、TRAP 陽性多核細胞 275~418/well が形成されたが、OA 患者由来滑膜組織培養では、43~76/well と少なかった。

(2) 包括的遺伝子発現解析

RA 患者 2 例の滑膜組織培養において、破骨細胞形成過程における変動遺伝子を解析した

① 破骨細胞関連遺伝子: 培養 2 日目より破骨細胞特異的マーカーである ACP5 (TRAP5B) 遺伝子の発現が上昇し、12 日目まで続いた。また、M-CSF 受容体の遺伝子 Cathepsin K 遺伝子 MMP9 遺伝子も検出された

② サイトカイン遺伝子: IL-1 β , TNF α , IL-6 は培養初期に発現が高かったが、4 日目以降減少した。1 例で IL-17F の遺伝子発現増加がみられた。RANKL 遺伝子の発現は培養 4-6 日目がピークであった。

③ 血管新生関連遺伝子: VEGF-A, VEGF-C 遺伝子の発現は培養後期に増加した。VEGF-B 遺伝子は培養 2 日目から高い発現がみられた

④ リンパ球関連遺伝子: T 細胞表面マーカーたる CD3, CD4, CD5 の各遺伝子が検出された

⑤ Pathway 解析: Acute phase response signaling, NF κ -B signaling, Toll-like receptor signaling, p38 Mark signaling, Chemokine signaling, など炎症、免疫系の多くのシグナル伝達経路に変動遺伝子の集積がみられた。

(3) 多項目同時解析手法 (Multiple Analyte Profiling: MAP) を用いた変動蛋白解析:

RA 患者 6 例, OA 患者 5 例由来の滑膜組織培養上清の炎症性サイトカイン, T cell サイトカイン, モノカインおよび破骨細胞誘導因子の計 16 項目の蛋白の変動を同時測定した。

炎症性サイトカインでは、やや RA 滑膜で産生が多い傾向であったが、RA 滑膜及び OA 滑膜ともに培養全期にわたって多量の IL-6

を産生しており有意差はなかった。また、RA、OA 滑膜とも培養全期に渡り 20-30pg/ml 程度の持続的な TNF α の産生がみられた。IL-1 β は培養初期の数日間で産生が多くその後、漸減した (RA 滑膜培養上清中 30-60pg/ml vs OA 滑膜 18-38pg/ml)。TNF β はOA 滑膜培養ではほとんど産生がなかったが、RA 滑膜では培養開始 2~6 日目まで、100 pg/ml 以上の TNF β が産生された。

T細胞サイトカインでは、IL-4, IL-10, IFN γ の産生は RA, OA 滑膜培養で差はなかった。IL-17は RA, OA 滑膜とも培養全期にわたって、培養上清中に 20pg/ml 前後の IL-17A が測定され、両者の間には差はなかったが、RA 滑膜培養では培養後の 1 週間にわたり、OA 滑膜培養に比べて薬 20 倍量の IL-17F の産生がみられた。

ケモカイン (MIP-1 α , β , MCP-1) の産生は RA, OA 滑膜で差はなかった。

破骨細胞の分化調節因子である RANKL, M-CSF, VEGF は培養全期にわたって産生がみられたが、RA, OA 滑膜で差はなかった

今回の検討で、主要な炎症性サイトカインや T細胞サイトカイン、破骨細胞分化誘導因子の産生に大きな差はみられなかったが、OA 滑膜に比べて RA 滑膜では有意に高用量の TNF β 、IL-17F の産生がみられ、滑膜組織からの破骨細胞の分化、活性化に関わる役割が注目される。

今回は、リン酸化酵素や transcription factor の解析は十分出来なかったが、これらの変動を解析することにより、今後、滑膜細胞から破骨細胞への分化シグナルを明らかにしてゆきたい

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 21 件)

1. Mitsunaga S, Okudaira Y, Kunii N, Cui T, Hosomichi K, Oka A, Suzuki Y, et al. Exact break point of a 50 kb deletion 8 kb centromeric of the HLA-A locus with HLA-A*24:02: the same deletion observed in other A*24 alleles and A*23:01 allele. Immunogenetics in press
2. 鈴木康夫、山田千穂、若林孝幸 アンカードラッグとしてのメトトレキサート (MTX) の使いかた Medical Practice 査読無 Vol. 27 2010 2097~2103
3. 鈴木康夫 変形性関節症 日本内科学会誌 査読無 第99巻 2010 109~114 Vol. 30 2010 1023~1027
4. 鈴木康夫、齋藤榮子、本田桐、佐々木則子 抗リウマチ薬 (メトトレキサートを含む) 治療学 査読無 Vol. 44 2010 1112~1117
5. 鈴木康夫、本田桐、佐々木則子、佐藤慎二 メトトレキサートのガイドライン~欧米と日本の使用法の違い~ Modern Physician 特集 関節リウマチの治療 査読無
6. 鈴木康夫 治癒をめざした MTX の使い方 医学のあゆみ 特集 関節リウマチ 査読無 Vol. 234 2010 72~77
7. 鈴木康夫 RA に対するメトトレキサートの使用に関する最新情報-EULAR 勧告 リウマチ科 査読無 Vol. 43 2010 664~670
8. Ichikawa Y, Saito T, Yamanaka H, Suzuki Y, et al. Clinical activities after 12 weeks of treatment with non-biologics in early rheumatoid arthritis may predict the articular destruction 2 years later. J Rheumatol Vol. 37 2010 P723-729 (査読あり)
9. 鈴木康夫 COX-2 選択薬の現状 総合臨床 2009. 58:820-1821
10. 鈴木康夫 特集 膠原病・リウマチ性疾患診療のより深い理解を目指して III 適正な治療のために 2. 抗リウマチ薬 (MTX を含む) の使い方 日本内科学会雑誌 98巻 2009年 P 2493-2499
11. 鈴木康夫、若林孝幸、齋藤榮子 特集 「関節リウマチと痛風-新しい治療戦略」 関節リウマチの注意すべき全身症状 臨床と研究 86巻 2009年 P705-710
12. 鈴木康夫 特集: 関節リウマチ-治療を目指す治療の新時代へ- 早期症例に対する最新治療 最新医学 64巻 2009年 P1011-1019
13. 鈴木康夫 高用量 MTX の有効性と生物学的製剤使用時の MTX の適正投与方法 Arthritis 7巻 2009年 P22-32
14. 鈴木康夫 タクロリムスによる関節リウマチ治療の現状と問題点 リウマチ科 2009. 41:401-409
15. 鈴木康夫 特集 内科医が診る関節リウマチ-State of Art 日常診療における治療薬の選択と使い方 内科 103巻 2009年 P733-745
16. Suwa A, Hirakata M, Kaneko Y, Sato S, Suzuki Y, Kuwana M Successful treatment of refractory polymyositis with the immunosuppressant

- mizoribine: case report Clin Rheumatol 2009. 28: 227-229
17. 鈴木康夫、齋藤榮子、若林孝幸ほか 関節リウマチ治療におけるステロイド薬の位置づけとステロイド性骨粗鬆症の管理・治療 Clinical Calcium 2009. 19:112-123
 18. 鈴木康夫 抗リウマチ薬 新薬展望 2009. 45:206-215
 19. 鈴木康夫、齋藤榮子、若林孝幸ほか 関節リウマチ患者に対するメトトレキサートの経口vs.皮下投与の比較検討 リウマチ科 40巻 2008年 P415-421
 20. 鈴木康夫、齋藤榮子、若林孝幸ほか 骨免疫学的視点からみたステロイド薬の関節リウマチに対する有用性—抗炎症による骨破壊阻止効果か、ステロイド骨粗鬆症か？リウマチ科 2008. 40:155-161
 21. 鈴木康夫 続発性骨粗鬆症:関節リウマチ The Bone 2008. 22:61-75

[学会発表] (計12件)

1. 鈴木康夫 RAタイトコントロールにおけるメトトレキサートの役割と使い方—JCR診療ガイドラインをふまえて— 第41回九州リウマチ学会(特別講演) 2011年3月19日宮崎市民プラザ(宮崎)
2. 鈴木康夫 リウマチ治療の歴史の変遷とアンカードラッグであるMTXを正しく安全に使用するために 第43回日本薬剤師会学術大会 2010年10月10日 ホクト文化会館(長野)
3. 鈴木康夫 関節リウマチ治療におけるメトトレキサート診療ガイドライン—JCR 2010 Recommendationから 第9回北海道リウマチ医の会 2010年10月09日 ホテルニューオータニ札幌(北海道)
4. 鈴木康夫 メトトレキサート(MTX)をanchor drugとしてRA寛解を目指す 第83回日本整形外科学会学術集会 2010年5月30日 東京国際フォーラム/よみうりホール(東京)
5. 鈴木康夫 関節リウマチに対してMTXをAnchor Drugとして最適に使う 第54回日本リウマチ学会総会 2010年4月25日 神戸ポートピアホテル(神戸)
6. 鈴木康夫 リウマチ性疾患における生物学的製剤治療の現状と今後 第24回日本乾癬学会 2009年 9月5日 東海大学校友会館(東京)
7. 鈴木康夫 関節リウマチ治療におけ

- るアンカードラッグとしてのメトトレキサート 第22回熊本リウマチセミナー 2009年 8月22日 熊本全日空ホテル(熊本)
8. 鈴木康夫 標準薬としてのメトトレキサート 第53回日本リウマチ学会総会・学術集会 市民公開講座 2009年 4月26日 グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール(東京)
9. 鈴木康夫 MTXをanchor drugとした生物学的製剤のBest Useに向けて—エタネルセプトを中心に— 第53回日本リウマチ学会総会・学術集会 2009年 4月26日グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール(東京)
10. 鈴木康夫 関節リウマチ(RA)に対する薬物療法—MTXの積極的投与と生物製剤で寛解をめざす— 第18回日本小児リウマチ学会総会・学術集会 2008年10月4日 札幌
11. 鈴木康夫 関節リウマチ(RA)に対するメトトレキサートの適正使用 第81回日本整形外科学会学術集会 2008年5月25日 札幌
12. 鈴木康夫 関節リウマチ治療におけるアンカードラッグとしてのメトトレキサート 第52回日本リウマチ学会総会 2008年4月20日 札幌

[図書] 計(7)件

1. 鈴木康夫 南江堂 間質性肺疾患診療マニュアル(編集 久保恵嗣 藤田次郎) IV-C薬剤性間質性肺疾患 6生物学的製剤 2010 274~276
2. 鈴木康夫 診断と治療社 リウマチ病学テキスト(編集 一般社団法人日本リウマチ学会生涯教育委員会財団法人日本リウマチ財団教育研修委員会) 全身性疾患に伴う関節炎 1サルコイドーシス 2010 362~367 2009 216-220
3. 鈴木康夫 日本医学館 生物学的製剤によるリウマチ治療マニュアル(監修 日本リウマチ実地医会)関節リウマチの一般的治療指針 2010 3~17
4. 鈴木康夫 中山書店 内科学書(改訂第7版) 総編集:小川聡 血清反応陰性脊椎関節症
5. 鈴木康夫 永井書店 よくわかる関節リウマチのすべて 宮坂信之編 抗リウマチ薬の適応と副作用 2008年 P194-204
6. 鈴木康夫 医薬ジャーナル社 続発性骨粗鬆症—ステロイド性骨粗鬆症と関節リウマチに伴う骨粗鬆症— 鈴木康夫編 2008年

P10-13,P96-101,P102-104

7. 鈴木 康夫 最新医学社 新しい診
断と治療のABC 関節リウマチ、宮坂
信之編 治療薬剤(3)ステロイド剤
2008年 P194-204

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木康夫 (SUZUKI YASUO)

研究者番号：90129495

東海大学・医学部・教授

(2) 研究分担者 無

(3) 連携研究者

諏訪 昭 (SUWA AKIRA)

研究者番号：30187819

東海大学・医学部・准教授

谷原 正夫 (TANIHARA MASAO)

研究者番号：50294286

奈良先端技術大学院大学・物質創成科学
研究科・教授

