

平成 23 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009 年度～2010 年度
 課題番号：21790946
 研究課題名（和文） 抗リウマチ薬投与下のヒト成熟破骨細胞における関節リウマチ特異自己抗原の機能解析
 研究課題名（英文） Function analysis of autoantigens in human mature osteoclast from rheumatoid arthritis patient under anti-rheumatic drugs.
 研究代表者 野島 崇樹 (NOJIMA TAKAKI)
 京都大学・医学研究科・助教
 研究者番号：30327514

研究成果の概要（和文）：ヒト末梢血単核細胞を用いた成熟破骨細胞形成系で day3-6 に calpastatin が分解され、calpain 活性が上昇した。われわれのヒト成熟破骨細胞形成系では、calpain1 と calpain2 に蛋白発現の変化はみられなかった。cell permeable calpastatin はヒト破骨細胞の形成と骨吸収能を抑制した。TNF α (100ng/ml) 刺激 15 分後にヒト破骨細胞内 calpain 活性は上昇した。

研究成果の概要（英文）：In osteoclastogenesis system using human peripheral-blood mononuclear cells, we found that calpastatin was cut off and calpain revitalization was elevated from 3 day to 6 day. The protein level changes of calpain 1 and calpain 2 were not detected in our osteoclastogenesis system. Cell permeable calpastatin down-regulated the osteoclastogenesis and the bone absorptivity of human osteoclast. After 15 minutes TNF α (100ng/ml) stimulation, calpain revitalization elevated in human osteoclast.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	2,100,000 円	630,000 円	2,730,000 円
平成 22 年度	1,200,000 円	360,000 円	1,560,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000 円	990,000 円	4,290,000 円

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：破骨細胞、自己抗原、関節リウマチ

1. 研究開始当初の背景

RA はリウマトイド因子 (RF) や抗 CCP 抗体の存在から自己免疫疾患のひとつと考えられているが、RF は疾患特異性が低く、抗 CCP 抗体も病因・病態との関連がいまだ不明である。

申請者は RA 患者血清中に RA 特異的と思われる数種類の新しい自己抗体の存在を明ら

かにし (リウマチ 1994、Jpn J Rheumatol 1996)、それらの対応自己抗原をコードする cDNA のクローニングにより、カルシウム依存性中性プロテアーゼ (カルパイン (CP)) の特異的内在性阻害蛋白であるカルパスタチン (CPS) が自己抗原であることを突き止め、CPS への自己抗体の結合が CPS の CP 阻害活性を抑制し、CP のプロテアーゼ活性を亢

進させることによって RA の発症に関与する可能性を示した(Proc Natl Acad Sci USA 1995、Modern Rheumatology 2000)。

さらに、申請者らは RA 特異的自己抗体の対応抗原をコードする cDNA のクローニングを行い、癌遺伝子 c-myc の調節因子である far up-stream element binding protein (FBP) を獲得し、RA 患者の約 20% に抗 FBP 抗体が検出されることを示した(慶応医学 2004)。

2. 研究の目的

ヒト末梢血単核細胞の lineage を統一させ、破骨細胞を単離形成する実験系を確立し、RA 自己抗原と破骨細胞機能との関連を解明することを目的とした。

申請者の、抗 CPS 抗体、抗 FBP 抗体は世界ではじめての報告であり RA に特異性が高いことより、RA における破骨細胞の病態解明、さらに抗リウマチ薬・生物学的製剤の破骨細胞への薬理作用を考えるうえで、有用な成果があがると考えた。

3. 研究の方法

ヒト破骨細胞におけるカルパイン・カルパスタチン系(CP・CPS系)及びc-Mycの分析

1) Ficoll-Paque を用いて健常人協力者より PBMC を回収し、MACS (Magnetic Cell Sorting and Separating of Biomolecules, Miltenvi Biotec 社) と抗ヒト CD14 モノクローナル抗体を用いて CD14(+)細胞を分離、10%FBS・M-CSF (25ng/ml) 入り α MEM に浮遊させ、200 万-1000 万個ずつ、21.3cm² dish で培養を行う。

2) 3 日後、PBS で dish を 2 回洗浄、rypsin-EDTA 処理の後、dish 付着細胞を回収し、再度 10%FBS・M-CSF (25ng/ml) 入り α MEM に浮遊させ、100 万個/well ずつ 9.6cm² dish (6 well dish) で培養を行う。この際、ODF の濃度を変えて添加し (5-100ng/ml の範囲)、破骨細胞への分化を確認する。

3) 上記のヒト破骨細胞形成系を用いて、破骨細胞への分化段階での、CP・CPS 系および c-Myc、FBP の発現を、RT-PCR ならびに免疫組織学的手法 (取得しうる抗体を用いた免疫染色、ならびに、ssDNA を合成して in situ hybridization を行う) にて確認する。

4) 培養液中に CP、CPS、カルパイン阻害物質 (Calpeptin、E-64-d、E-64-c など) を添加し、c-Myc・FBP については遺伝子を破骨細胞に強制発現させることで、ヒト破骨細胞形成に対する RA 特異自己抗原の影響を RAP (Tartrate-resistant Acid Phosphatase) 染色、RANK (receptor activator of NFkappaB)、osteoprotegerin、Cathepsin K の発現について定量 RT-PCR で確認する。また、破骨細胞の骨形成において重要とされ

る細胞内シグナルの、STAT6、JNK、NF κ B などについても RT-PCR や免疫プロットで発現量を検討する。

5) さらに上記ヒト破骨細胞形成系で得られる多核の成熟破骨細胞を用いて、破骨細胞の骨吸収活性に対する CP・CPS 系および c-Myc、FBP の関与を、破骨細胞活性アッセイ用基質プレート (コスモ・バイオ) を使用し検討する。培養液中に CP、CPS、カルパイン阻害物質を添加し、c-Myc・FBP については遺伝子を強制発現させることで、骨吸収活性に対する影響を検討する。

また、骨吸収において重要な Cathepsin K の発現を免疫プロットや ELISA にて確認する。

4. 研究成果

ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) を用いた破骨細胞形成系の確立および成熟破骨細胞形成系におけるカルパイン・カルパスタチン系の役割の解明

1) 健常人協力者より PBMC を回収し、マグネットビーズと抗ヒト CD14 モノクローナル抗体を用いて CD14(+)細胞を分離し、10%FBS・M-CSF (25ng/ml)・ODF (20ng/ml) 入り α MEM で培養し、12 日目、15 日目に多核巨細胞を回収した。

2) 回収した多核巨細胞について TRAP (Tartrate-resistant Acid Phosphatase) 染色陽性であることを確認。また、成熟破骨細胞の機能を有するか否かを確認するため、dentin slice を用いて pit formation を確認した。TRAP 染色、RANK (receptor activator of NFkappaB)、osteoprotegerin、Cathepsin K の発現について定量 RT-PCR で確認した。

3) 上記、ヒト PBMC からの成熟破骨細胞形成系において、カルパイン・カルパスタチン系の蛋白発現を詳細に調べたところ、calpain1 と calpain2 に蛋白発現の変化はみられなかったが、calpastatin は day3-6 にかけて全長蛋白が分解されることが確認された。また、成熟破骨細胞における calpain 活性は RANKL 濃度依存性に増加することが確認された。しかし、カルパインの mRNA 量は破骨細胞成熟過程で変化が確認されなかった。

4) cell permeable calpastatin を用いた実験で、破骨細胞の形成ならびに吸収能が抑制されることが確認された。

5) 破骨細胞分化過程において TNF α (100ng/ml) 刺激を行うことで、15 分後に細胞内 calpain 活性が上昇することが示された。

5. 主な発表論文等
(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

1. Anti-citrullinated peptide antibody-negative RA is a genetically distinct subset: a definitive study using only bone-erosive ACPA-negative rheumatoid arthritis.

Ohmura K, Terao C, Maruya E, Katayama M, Matoba K, Shimada K, Murasawa A, Honjo S, Takasugi K, Tohma S, Matsuo K, Tajima K, Yukawa N, Kawabata D, Nojima T, Fujii T, Yamada R, Saji H, Matsuda F, Mimori T. *Rheumatology (Oxford)*, 査読有, 49(12):2010, 2298-2304.

2. Anti-U1 RNP antibodies in cerebrospinal fluid are associated with central neuropsychiatric manifestations in systemic lupus erythematosus and mixed connective tissue disease.

Sato T, Fujii T, Yokoyama T, Fujita Y, Imura Y, Yukawa N, Kawabata D, Nojima T, Ohmura K, Usui T, Mimori T. *Arthritis Rheum.*, 査読有, 62(12):2010, 3730-40.

3. Two cases of late-onset drug-induced lupus erythematosus caused by ticlopidine in elderly men.

Yokoyama T, Usui T, Kiyama K, Nakashima R, Yukawa N, Kawabata D, Nojima T, Ohmura K, Fujii T, Mimori T. *Mod Rheumatol.*, 査読有, 20(4):2010, 405-9.

4. Periodic fever and erythema nodosum associated with MDS with trisomy 8: report of two cases and review of the literature.

Fujimura T, Yukawa N, Nakashima R, Imura Y, Kawabata D, Nojima T, Ohmura K, Fujii T, Usui T, Mimori T. *Mod Rheumatol.*, 査読有, 20(4):2010, 413-9.

5. Discontinuation of infliximab after attaining low disease activity in patients with rheumatoid arthritis: RRR (remission induction by Remicade in RA) study.

Tanaka Y, Takeuchi T, Mimori T, Saito K, Nawata M, Kameda H, Nojima T, Miyasaka N, Koike T; RRR study investigators. *Ann Rheum Dis.*, 査読有, 69(7):2010, 1286-91.

6. Etanercept-induced anti-Jo-1-antibody-positive polymyositis in a patient with rheumatoid arthritis: a case report and review of the literature.

Ishikawa Y, Yukawa N, Ohmura K, Hosono Y, Imura Y, Kawabata D, Nojima T, Fujii T, Usui T, Mimori T. *Clin Rheumatol.*, 査読有, 29(5):2010, 563-6.

7. The RIG-I-like receptor IFIH1/MDA5 is a dermatomyositis-specific autoantigen identified by the anti-CADM-140 antibody.

Nakashima R, Imura Y, Kobayashi S, Yukawa N, Yoshifuji H, Nojima T, Kawabata D, Ohmura K, Usui T, Fujii T, Okawa K, Mimori T. *Rheumatology (Oxford)*, 査読有, 49(3):2010, 433-40.

8. Gamma/delta T cells are the predominant source of interleukin-17 in affected joints in collagen-induced arthritis, but not in rheumatoid arthritis.

Ito Y, Usui T, Kobayashi S, Iguchi-Hashimoto M, Ito H, Yoshitomi H, Nakamura T, Shimizu M, Kawabata D, Yukawa N, Hashimoto M, Sakaguchi N, Sakaguchi S, Yoshifuji H, Nojima T, Ohmura K, Fujii T, Mimori T. *Arthritis Rheum.*, 査読有, 60(8):2009, 2294-303.

9. タクロリムス (ループス腎炎以外の SLE、多発性筋炎/皮膚筋炎、血管炎症候群、成人ステイル病など)

野島崇樹 リウマチ科, 査読無, 第 45 巻第 1 号, 2011, 25-28.

10. 関節炎における interleukin-1 receptor-associated kinase-4 の役割(解説) 石川優樹, 野島崇樹 リウマチ科, 査読無, 44 巻 1 号, 2010, 69-74.

11. 【関節リウマチ(第 2 版) 寛解を目指す治療の新時代】 関節リウマチの検査・診断 免疫・血清学的検査 細胞性免疫検査(解説/特集)

野島崇樹 日本臨床, 査読無, 68 巻増刊号 5 関節リウマチ, 2010, 258-261.

12. ミニレクチャー: 関節リウマチでのメトトレキサートの使い方

野島崇樹 臨床研修プラクティス, 査読無, 7 巻 3 号, 2010, 73-74.

13. マクロファージにおける AMP-activated protein kinase の抗炎症作用

野島崇樹 リウマチ科, 査読無, 第 42 巻第 4 号, 2009, 424-428.

14. 早期診断と鑑別診断の留意点

野島崇樹 リウマチ科, 査読無, 第 41 巻第 6 号, 2009, 553-557.

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 野島崇樹 内科的治療の変遷—生物学的製剤を中心に—

第 36 回 日本股関節学会学術集会

2009 年 10 月 30 日

国立京都国際会館 (京都府).

〔図書〕(計 2 件)

1. 【研修医のための膠原病診療ガイド】 関節リウマチでのメトトレキサートの使い方 (解説/特集)

野島崇樹 臨床研修プラクティス

7 巻 3 号 Page73-74(2010. 02).

2. リウマトイド因子と抗核抗体

リウマチ・膠原病内科クリニカルスタンダード 必携ベッドサイドで必ず役立つリウマチ・膠原病学のエッセンス

石川優樹, 野島崇樹

2010 年 8 月 26 日 (文光堂) .

6. 研究組織

(1) 研究代表者 野島 崇樹 京都大学・

医学研究科・助教

研究者番号 : 30327514