

## 遺伝子情報を利用した慢性関節リウマチの病態解析と分子診断法の開発

●武川 陸寛<sup>1)</sup> ◆有村 佳明<sup>2)</sup>

1) 東京大学医科学研究所

2) 札幌医科大学内科学第一講座

### 〈研究の目的と進め方〉

関節リウマチ (RA) は最も頻度の高い自己免疫疾患であり、我が国における患者数は約70万から100万人であると推計されているが、その病因は明らかにされていない。RA臨床上の重要な問題点として、1) 特異性に乏しいリウマチ因子以外に診断に有用な血清マーカーが存在しないこと、2) 疾患活動性をモニターする客観的かつ特異的な指標が無いこと、3) 予後の推定や薬剤投与の基準となる適切なマーカーが判明していないこと、があげられる。本研究においては関節リウマチの病態解明、および治療法選択や予後の指標等に成り得る臨床上有用な遺伝子マーカーの同定を目指し、RA患者から採取した滑膜細胞を用いてマイクロアレイ法による遺伝子発現解析を行い、RA特異的に発現量が変化する遺伝子の同定を行った。

また、関節リウマチに特徴的な関節滑膜細胞の異常増殖のメカニズムとして、p53の遺伝子異常や機能異常が関与することがこれまでに数多く報告されている。そこで、滑膜細胞の増殖能獲得機構を解明し、その制御方法の開発へ発展させることを最終的な目的として、p53の活性制御機構に関わる新規分子の同定を試みた。

さらに、RA患者の関節内では抗原提示を担う樹状細胞の分化異常が報告されており、RAの病因と深く関与することが示唆されている。樹状細胞の分化成熟過程に関与する遺伝子の同定は、自己免疫疾患の病因および病態を理解する上で極めて重要であると思われるが、その詳細は明らかにされていない。本研究では樹状細胞の分化を制御する遺伝子を同定し、RA患者において、その発現異常が存在するか明らかにすることを目的としてdifferential display法による遺伝子スクリーニングを行った。

### 〈研究開始時の研究計画〉

・ RA臨床材料の収集とcDNAアレイによるスクリーニング

関節リウマチ及び対照として変形性関節症 (OA) 患者から関節滑膜組織を収集する。これらの臨床材料からRNAを抽出してcDNAプローブを製し、cDNAマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイリングを行う。各遺伝子の発現量を11種類のハウスキーピング遺伝子に対する相対値に換算して標準化し、RAおよびOA滑膜における遺伝子発現パターンを比較することで、RA特異的に発現量が変化する遺伝子の同定を試みる。

・ p53の活性制御機構に関与する新規分子の同定

RA滑膜細胞内では、癌抑制遺伝子p53の機能異常、及びストレス応答MAPKであるp38の異常活性化が起きていることが知られており、このようなシグナル伝達分子の制御異常がRAの病態に深く関与することが明らかにされている。p53の活性化にはp53蛋白質のセリン・スレオニン残基のリン酸化が必要であることが知られているが、興味深いことに、近年p38MAPKがp53をリン酸化して活性化することが明らかにされた。我々はPP2C型のセリン・スレオニン脱リン酸化酵素であるWip1がp53によって発

現誘導される標的遺伝子の一つであることを見出した。そこでp38MAPK-p53シグナルにおけるWip1の生理機能の解析を行う。

・ 樹状細胞の分化に関与する遺伝子の同定

ヒト末梢血より樹状細胞を精製し、in vivoにおいてLPS、TNF $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 等で処理して分化誘導する。分化途中の細胞から経時的にRNAを採取してdifferential display法による遺伝子発現解析を行い、分化に伴い発現量の変化する遺伝子を単離、同定する。

### 〈研究期間の成果〉

・ RA滑膜における遺伝子発現解析

滑膜組織を用いたcDNAアレイ解析の結果、OAに対してRAで2倍以上発現量が増加する遺伝子として、既にRAで遺伝子発現が亢進することが知られているBcl-2、iNOS、vEGF、TNF-R1型受容体やインテグリンの他、今回新たにBag1 (70%の症例)、methallothionein (62%)、MDM2 (55%)、E-cadherin (55%)、nm23 (46%)、ICAD (40%)、BAD (31%)、BID (31%) など、アポトーシスや細胞接着制御に関わる数十種類の遺伝子を同定し得た。一方、OAに対してRAで2分の1以下に発現量が低下する遺伝子としてThymidylate synthetase、Egr-1、Egr-2、FGFR-1、RanBP-1他、数十種類の遺伝子を同定した。さらに幾つかの遺伝子に関して滑膜組織の免疫染色を行い、実際に蛋白質レベルでの発現量の変化を確認した。

・ p53の活性制御機構に関与する新規分子の同定 3, 4)

RA滑膜細胞において、p38MAPKの異常な活性亢進が起きていることが知られている。p38シグナル伝達経路はTNF $\alpha$ 等の炎症性サイトカイン産生に必須であることから、p38の恒常的活性化がRAの病態形成に極めて重要であると考えられている。一方、RAで観察される滑膜細胞の異常増殖にp53の遺伝子変異や機能異常が関与することが示されている。p38やp53の活性化には、これらの蛋白質のリン酸化が必要であるが、興味深いことに近年、p38がp53を直接リン酸化して活性化することが報告された。従ってRA滑膜細胞内ではp38が恒常的に活性化されているものの、p53の機能異常により増殖抑制に作用せず、滑膜の異常増殖が起こる一因となっている可能性が示唆される。

Wip1はDNA損傷後にp53依存的に発現誘導されるセリン・スレオニン脱リン酸化酵素として同定されたが、その機能は明らかにされていない。我々はp38-p53経路の活性制御機構にWip1が関与する可能性を想定し研究を行った。

まずWip1の発現をノザンプロットにより解析したところ、さまざまなストレス刺激に応答してWip1遺伝子の強い発現誘導が起こることを見出した。さらにWip1の発現誘導にはp38およびp53両方の活性化が必要であることを確認した。またWip1が核内でp38と特異的に結合し、p38のスレオニン残基を直接脱リン酸化することでp38のキナーゼ活性を阻害することを見出した。

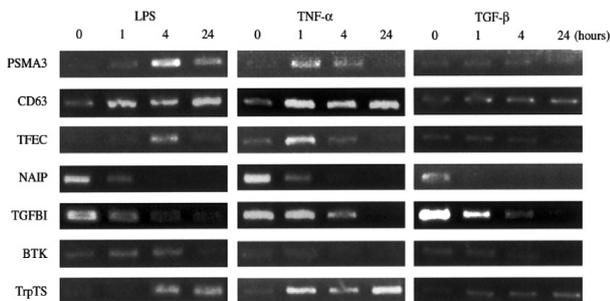
次にWip1がp53の活性化に影響を与えるか検討したと

ころ、Wip1の強制発現によりp38の不活化を介してp53のリン酸化が間接的に抑制され、p53の転写活性およびアポトーシス誘導能が阻害されることを見出した。これらの結果から、p38MAPKを介してp53が活性化されるとWip1が発現誘導され、その結果、p38が脱リン酸化されて不活性化するというネガティブ・フィードバック機構の存在が明らかになった。RA滑膜細胞においてはp38が活性化されても、p53の機能異常が存在するためWip1の発現誘導が起らず、p38恒常的活性化の一因となることが示唆された。

・ 樹状細胞の分化に関わる遺伝子の同定 1), 2)

正常ヒト末梢血単球をGM-CSFおよびIL-4を添加した培地で8日間培養した後、浮遊細胞を採取し、さらにメトリザマイドを用いて混入したリンパ球を取り除き、樹状細胞のみを単離した。この樹状細胞をLPSで刺激することによって分化誘導した。刺激後0、1、4、24時間の各時点でRNAを採取し、differential display法を用いてRNA発現量の経時変化を解析した。60通りのprimer setを用いてdifferential displayを施行した結果、発現量が変化する約100種類の遺伝子を捕らえることが出来た。これらの候補遺伝子の中、2nd PCRを施行し、明らかに発現量に差を認めた14種類をクローニングし、塩基配列を決定した。その結果、経時的に発現の増加する遺伝子としてCD63、tryptophanyl-tRNA synthetase、一過性に発現が増強する遺伝子としてPSMA3、TFEC、BTK2f10-rpiを同定した。一方、分化に伴い発現が減弱する遺伝子としてTGFBIやIAP familyの一つであるNAIPを同定した。

次に樹状細胞をTNF $\alpha$ 、TGF- $\beta$ で刺激して分化誘導した場合に、これらの遺伝子の発現量がどう変化するか検討した。PSMA3はTNF $\alpha$ 刺激でLPS刺激に比べ早期に誘導されたが、TGF- $\beta$ では発現量の変化を認めなかった。またCD63およびtryptophanyl-tRNA synthetaseの発現はいずれの刺激でも増強した。BTKはLPSでのみ発現が増強し、TNF $\alpha$ やTGF- $\beta$ 刺激では変化が認められなかった(下図)。



NAIPはIAPファミリー分子の一員であり、アポトーシス抑制作用を有することが知られている。NAIPはいずれの刺激においても樹状細胞の分化に伴い発現量が顕著に低下した。そこで、他のアポトーシス制御分子(IAPファミリーおよびBcl-2ファミリー分子)に関しても発現変化を検討したところ、IAP1/2、XIAPや多くのBcl-2ファミリー分子は分化誘導4時間後にむしろ発現が増強した。今回調べたアポトーシス関連分子の中、NAIPのみが経時的に発現量が減弱する遺伝子であり、他の抗アポトーシス分子とは異なる発現パターンを示すことが明らかになった。

#### 〈国内外での成果の位置づけ〉

滑膜組織を用いたcDNAアレイ解析により、RA特異的に発現量の変化する遺伝子として、アポトーシスや細胞接着制御に関わる数十種類の遺伝子を同定することが出

来た。RAの病状の進展に関わる要因として、滑膜細胞におけるp53の変異が報告されているが、本研究においてRA滑膜でp53の失活に作用するMDM2遺伝子の発現が亢進していることを見出した。この結果はRA関節滑膜細胞の異常増殖にp53の機能異常が関与することをサポートする知見として興味深い。

また、本研究によりp53の新たな活性制御機構としてPP2C型脱リン酸化酵素Wip1を介したネガティブ・フィード機構の存在を明らかにすることが出来た。Wip1はp53の活性化によって発現誘導されるp53標的遺伝子の一つであり、p38MAPKの活性化を阻害することによってp38MAPK-p53シグナルを負に制御する。周知のように、p53はヒト癌の約50%に遺伝子変異が見出される癌抑制遺伝子であるが、我々の発見の後、Wip1(PPM1D)が乳癌、卵巣癌、神経芽腫等、さまざまな癌で遺伝子増幅していることを見出された(Nature Genetics 2002)。Wip1の過剰発現はp53の機能阻害に作用することから、Wip1が新たな癌遺伝子であることが明らかにされ、Wip1の機能を初めて明らかにした我々の報告が世界的に注目を集めた。

また、本研究では樹状細胞の分化に伴い発現量が変化する数種類の新たな遺伝子を同定した。これらの遺伝子は、樹状細胞成熟度のマーカーに成り得ると考えられる。特に当初、神経細胞のアポトーシス抑制に作用する分子として同定されたNAIPが未熟樹状細胞においても発現しており、さらに分化に伴いその発現量が著しく低下するという知見を得た。このようなアポトーシス調節分子の発現変化が樹状細胞の寿命や免疫応答制御に関与する可能性が示唆される。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

RA滑膜のcDNAアレイ解析に関しては、臨床検体を用いている関係上、試料収集が比較的困難で、得られる量も少量であり、質に関しても不安定であった。

#### 〈今後の課題〉

これまでのcDNAマイクロアレイを用いた発現解析により得られた結果を基に、RAの診断、予後推定や薬剤投与の決定に有用と考えられる数十個程度の遺伝子を選択し、実際に臨床の現場で利用可能な規模の独自のcDNAアレイシステムの作成を目指したい。このような検査システムが、RA患者の診断、病態解析に有用であるか検証を行い、RAの新しい遺伝子診断法、血清診断法の確立を図ることが最終的な課題である。

また、今回新たに樹状細胞の分化に伴って発現量が変化する数種類の遺伝子を同定した。これらの遺伝子が樹状細胞の分化、成熟過程に果たす役割を解明すると共に、関節リウマチの滑膜内でこれらの遺伝子の発現異常、機能異常が存在するか解明したい。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 0602101123  
Takekawa, M., Tatebayashi, K., Itoh, F., Adachi, M., Imai, K. and Saito, H.: Smad-dependent GADD45b expression mediates delayed activation of p38 MAP kinase by TGF- $\beta$ . EMBO J. 21, 6473-6482 (2002).
- 0602101133  
Matsunaga, T., Ishida, T., Takekawa, M., Nishimura, S., Adachi, M. and Imai, K.: Analysis of gene expression during maturation of immature dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. Scand. J. Immunol. 56, 593-

601, (2002).

3. 0602101240

Takekawa, M., Adachi, M., Nakahata, A., Nakayama, I., Itoh, F., Tsukuda, H., Taya, Y. and Imai, K.: p53-inducible Wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. *EMBO J.*, 19, 6517-6526, (2000).

4. 0602101250

Koyama, Y., Adachi, M., Sekiya, M., Takekawa, M. and Imai, K.: Histone deacetylase inhibitors suppress IL-2-mediated gene expression prior to induction of apoptosis. *Blood* 96, 1490-1495, (2000).