

---

転写因子 NF- $\kappa$ B 制御による関節リウマチ滑膜炎の新規治療法確立に  
関する研究

---

課題番号 17591544

平成17年度～平成18年度科学研究費補助金（基盤研究(C)）

研究成果報告書

平成19年3月

研究代表者 平野史倫

(旭川医科大学医学部講師)

## 【はしがき】

関節リウマチ (RA) は関節滑膜を病変の主座とする原因不明の慢性炎症性疾患であり、持続的な滑膜炎によって関節破壊から関節変形をきたす疾患である。滑膜炎は滑膜細胞増殖と炎症性細胞浸潤・血管新生などを特徴とし、tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ など炎症性サイトカインによって惹起されていることが報告されている。さらに、これら病態形成に重要な転写因子として NF- $\kappa$ B の関与が言われている。従って、NF- $\kappa$ B の活性化の制御は RA 治療に直結していると考えられる。NF- $\kappa$ B はその抑制分子である I $\kappa$ B ファミリーによって不活化され細胞質に止まっている。様々な外来刺激によって I $\kappa$ B が分解され、遊離した NF- $\kappa$ B は核内へ移行することによって標的遺伝子のプロモーターに結合することで作用を発揮している。I $\kappa$ B の中でも研究者らが発見した I $\kappa$ B $\beta$  2 蛋白は I $\kappa$ B $\beta$  のアイソフォームの一つであり、他の I $\kappa$ B に比較して非常に非分解性蛋白であり、様々な刺激によって細胞内の I $\kappa$ B $\beta$  2 量が増加しないことから、内在性の I $\kappa$ B $\beta$  2 量によって NF- $\kappa$ B の活性化度が異なることを報告してきた。

そこで、本研究は、

- 1) 各疾患における I $\kappa$ B ファミリーの機能解析
- 2) I $\kappa$ B $\beta$  2 の細胞内特性と安定性および RNA 結合蛋白同定
- 3) RNA 結合蛋白の機能解析と in vivo 実験による臨床応用の検討

の3プロジェクトを推進することによって、RA 患者滑膜炎における NF- $\kappa$ B 活性化機序を I $\kappa$ B $\beta$  2 の発現機構の観点から明らかにすることによって、RA 滑膜炎の病態を解明するとともに、新規治療法を確立することを目的とした。

## 【研究経過・成果】

### 1) NF- $\kappa$ B と I $\kappa$ B ファミリーの活性化と発現の検討。

健常者や変形性関節炎 (OA) 患者に比較して RA 患者の滑膜細胞は内因性に発現した I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白と I $\kappa$ B $\beta$ 1 蛋白で発現に差がなかったが、I $\kappa$ B $\beta$ 2 蛋白で明らかに減少していた。すなわち、この結果は、I $\kappa$ B $\beta$ 2 の少ない RA 滑膜では、容易に NF- $\kappa$ B が活性化されることを想定させる。さらに、ゲルシフト法を用いた検討から、各々の滑膜細胞での NF- $\kappa$ B の活性化は健常者あるいは OA に比較して RA では NF- $\kappa$ B の DNA 結合活性は上昇していた。また、定量的 RT-PCR 法を用いた検討から、RA 滑膜細胞では明らかに I $\kappa$ B $\beta$ 2 mRNA の発現が低下していた。そこで、その低下の機序として、まず Run-on assay にて転写レベルでの作用を検討したところ I $\kappa$ B $\beta$ 1 と I $\kappa$ B $\beta$ 2 では全く差がなかった。従って、I $\kappa$ B $\beta$ 2 mRNA 発現の低下は、転写レベルでの作用ではないことが明らかになった。従って、RA 滑膜炎における重要なサイトカインである TNF- $\alpha$  は NF- $\kappa$ B によって誘導されることが知られていることから、NF- $\kappa$ B の活性化は内在性の I $\kappa$ B $\beta$ 2 発現量低下との関連が示唆された。

### 2) NF- $\kappa$ B 活性化における I $\kappa$ B $\beta$ 2 の役割の検討。

滑膜細胞における NF- $\kappa$ B 活性化に及ぼす I $\kappa$ B $\beta$ 2 発現の作用を検討するため、I $\kappa$ B $\beta$ 2 発現プラスミドを細胞に導入後、非刺激下および TNF- $\alpha$  存在下での NF- $\kappa$ B ゲルシフト法を施行した。その結果、I $\kappa$ B $\beta$ 2 を強制的に発現させた滑膜細胞では、非刺激下あるいは TNF- $\alpha$  存在下でいずれも NF- $\kappa$ B の DNA 結合活性を低下させた。その作用は、発現量に依存していた。同時に測定した TNF- $\alpha$  産生量は上清中の蛋白および細胞内 mRNA 発現量いずれも I $\kappa$ B $\beta$ 2 発現量に依存して低下した。従って、I $\kappa$ B $\beta$ 2 は非刺激下はもとより TNF- $\alpha$  存在下においても安定して NF- $\kappa$ B の活性化を抑制することが明らかとなった。

### 3) 各疾患における I $\kappa$ B ファミリーの細胞内安定性の検討。

健康者・OA および RA 滑膜細胞における I $\kappa$ B ファミリーの蛋白安定性を検討するため、<sup>35</sup>S-methionine を用いて細胞内蛋白をラベル後、経時的に細胞抽出液を採取し抗 I $\kappa$ B $\alpha$ 抗体/抗 I $\kappa$ B $\beta$ 1 抗体/抗 I $\kappa$ B $\beta$ 2 抗体による免疫沈降法で解析した。その結果、I $\kappa$ B ファミリーは非刺激下ではその半減期に差を認めなかった。さらに、I $\kappa$ B $\beta$ 2 mRNA の安定性に与える 3'-非翻訳領域の影響を解析するため、内因性に発現していない luciferase 遺伝子に 3'-非翻訳領域を結合させた発現プラスミドを作成し細胞内に導入発現後、TNF- $\alpha$ ・アクチノマイシン存在下で mRNA の安定性を経時的に RT-PCR 法で検討した。その結果、RA 滑膜細胞において mRNA の半減期は低下していた。また、健康者あるいは OA 滑膜細胞では差を認めなかった。従って、RA 滑膜細胞における I $\kappa$ B $\beta$ 2 蛋白発現の低下は、I $\kappa$ B $\beta$ 2 mRNA の発現量に依存し、その作用は転写後の mRNA の安定性に起因していることが明らかになった。

### 4) I $\kappa$ B $\beta$ 2 mRNA における RNA 結合蛋白の同定と機能解析。

I $\kappa$ B $\beta$ 2 mRNA の 3'-非翻訳領域に結合する蛋白を解析するため、3'-非翻訳領域を in vitro transcription にて [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP でラベルし RNA-ゲルシフト法で検討した。その結果、I $\kappa$ B $\beta$ 2 mRNA の 3'-非翻訳領域に特異的に結合する蛋白がいくつか同定され、現在解析中である。

## 【研究組織】

研究代表者 平野史倫 (旭川医科大学医学部講師)  
研究分担者 府川悦士 (旭川医科大学医学部助手)  
海外共同研究者 C. Scheidereit (Max-Delbrück Center, Germany)

## 【交付決定額（配分費）】

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成17年度	2,500	0	2,500
平成18年度	1,100	0	1,100
総計	3,600	0	3,600

## 【研究発表】

### (1) 学会誌など

#### 1. 英文

Hirano F, Maruyama N, Komura K, Okamoto K, Nomura Y, Fukawa E, Haneda M.  
Effect of thrombin on RANKL expression in T cells: Correlation between thrombin receptor (ThrR) expression and prognostic factor of joint destruction in rheumatoid arthritis (RA) patients.

*Mod Rheumatol* 16(suppl): 203, 2006.

Hirano F, Haneda M, Makino I.

Chenodeoxycholic acid and taurochenodexychoic acid induce anti-apoptotic cIAP-1 expression in human hepatocytes

*J Gastroenterol Hepatol* 21(12):1807-1813, 2006.

Scheidereit C.

I $\kappa$ B kinase complexes: gateways to NF- $\kappa$ B activation and transcription.

*Oncogene* 25(51):6685-705, 2006.

Schmidt-Ullrich R, Tobin DJ, Lenhard D, Schneider P, Paus R, Scheidereit C.

NF- $\kappa$ B transmits Eda A1/EdaR signalling to activate Shh and cyclin D1 expression, and controls post-initiation hair placode down growth.

*Development* 133(6):1045-57, 2006.

Kobayashi A, Hirano F, Makino I.

The inhibitory effect of bisphosphonates on glucocorticoid-induced RANKL expression in human cells.

*Scand J Rheumatol* 34(6):480-484, 2005.

Hirano F, Maruyama N, Komura K, Nomura Y, Fukawa E, Haneda M.

Relation between thrombin receptor (ThrR) expression and prognostic factor of joint destruction in RA patients- 3 years follow-up study.

**Mod Rheumatol** 15(suppl): S283, 2005.

Mathas S, Johrens K, Joos S, Lietz A, Hummel F, Janz M, Jundt F, Anagnostopoulos I, Bommert K, Lichter P, Stein H, Scheidereit C, Dorken B.

Elevated NF- $\kappa$ B p50 complex formation and Bcl-3 expression in classical Hodgkin, anaplastic large-cell, and other peripheral T-cell lymphomas.

**Blood** 106(13):4287-93,2005.

Freund C, Schmidt-Ullrich R, Baurand A, Dunger S, Schneider W, Loser P, El-Jamali A, Dietz R, Scheidereit C, Bergmann MW.

Requirement of nuclear factor- $\kappa$ B in angiotensin II- and isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in vivo.

**Circulation** 111(18):2319-25, 2005.

Mehrhof FB, Schmidt-Ullrich R, Dietz R, Scheidereit C.

Regulation of vascular smooth muscle cell proliferation: role of NF- $\kappa$ B revisited.

**Circ Res** 96(9):958-64, 2005.

Krappmann D, Scheidereit C.

A pervasive role of ubiquitin conjugation in activation and termination of I $\kappa$ B kinase pathways.

**EMBO Rep** 6(4):321-6, 2005.

Salanova B, Choi M, Rolle S, Wellner M, Scheidereit C, Luft FC, Kettritz R.

The effect of fever-like temperatures on neutrophil signaling.

**FASEB J** 19(7):816-8, 2005.

## 2、邦文

平野史倫

酸化ストレスの基礎 グルココルチコイド受容体のレドックス制御

医学のあゆみ

別冊酸化ストレス Ver.2ーフリーラジカル医学生物学の最前線 79-82, 2006

## (2) 口頭発表 (主なもの)

2007年

### 第19回北海道骨粗鬆症研究会

1月20日、札幌、北海道大学医学部大講堂

低容量ステロイドによる osteoprotegerin 発現抑制作用の検討

○ 平野史倫、丸山直紀、小村景司、岡本健作、牧野雄一、府川悦士、羽田勝計

### 第32回北海道リウマチ研究会

3月3日、札幌、ロイトン札幌

血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) 様病態を呈した皮膚筋炎の1例

○ 丸山直紀、小村景司、岡本健作、牧野雄一、府川悦士、平野史倫、羽田勝計

### 第6回旭川関節疾患カンファランス

3月10日、旭川、旭川トーヨーホテル

乳癌切除後に症状が改善し、炎症反応の陰性化が認められたリウマチ性多発筋痛症 (PMR) の1例

○ 小村景司、丸山直紀、岡本健作、牧野雄一、府川悦士、平野史倫、羽田勝計

2006年

### 第5回旭川関節疾患カンファランス

3月11日、旭川、旭川グランドホテル

関節破壊を呈した痛風の1例

○ 丸山直紀、小村景司、岡本健作、野村嘉伸、府川悦士、平野史倫、羽田勝計

### 第5回旭川関節疾患カンファランス

3月11日、旭川、旭川グランドホテル

クリオグロブリン血症を合併したシェーグレン症候群の1例

- 岩本英孝、丸山直紀、小村景司、岡本健作、野村嘉伸、府川悦士、平野史倫、羽田勝計

### 第50回日本リウマチ学会総会・学術集会

4月23日～26日、長崎、長崎ブリックホール

ワークショップ「関節リウマチの関節破壊機序(1)」

RA患者末梢血単核球(PBMC)におけるトロンビン受容体(ThrR)とRANKL発現の検討

- 平野史倫、丸山直紀、小村景司、岡本健作、野村嘉伸、府川悦士、羽田勝計

### 第50回日本リウマチ学会総会・学術集会

4月23日～26日、長崎、長崎ブリックホール

甲状腺機能低下、乾燥症状、膀胱・消化管出血など多彩な病態を呈した2次性アミロイドーシス合併関節リウマチの一部検例

- 岡本健作、小村景司、府川悦士、丸山直紀、野村嘉伸、平野史倫、羽田勝計

### 第50回日本リウマチ学会総会・学術集会

4月23日～26日、長崎、長崎ブリックホール

IgA腎症を疑わせる腎障害を合併した抗リン脂質抗体症候群(APS)の一例

- 小村景司、野村嘉伸、丸山直紀、岡本健作、府川悦士、平野史倫、羽田勝計

第355回日本皮膚科学会北海道地方会

9月6日、札幌、北海道大学医学部大講堂

下腿に皮膚潰瘍を生じたシェーグレン症候群にともなうクリオグロブリン血症の1例

○ 伊部昌樹, 小松成綱, 飯塚一, 岡本健作, 野村嘉伸, 平野史倫

第240回日本内科学会北海道地方会

9月9日、札幌、タケダ札幌ビル

バセドウ病治療によりステロイド抵抗性の病態が改善した血球貪食症候群合併成人発症スチル病 (AOSD) の1例

○ 小村景司, 丸山直紀, 岡本健作, 牧野雄一, 府川悦士, 平野史倫, 羽田勝計

第92回日本循環器学会北海道地方会

9月18日、札幌、かでる2・7

Churg&Strauss 症候群に endmyocardial fibrosis を伴う心筋病変を合併した一例

○ 坂本央, 松木孝樹, 三浦恵理子, 山内敦司, 小倉幸恵, 八巻多, 太田久宣, 田邊康子, 藤野貴行, 竹原有史, 竹内利治, 佐藤伸之, 川村祐一郎, 長谷部直幸, 菊池健次郎, 名取俊介, 小村景司, 平野史倫, 羽田勝計, 玉地智宏, 齋藤康

第35回北海道膠原病談話会

10月28日、札幌、中外製薬札幌支店

関節・骨破壊と破骨細胞誘導因子 RANKL~ステロイド治療の是非

○ 平野史倫

## 第6回日本内分泌学会北海道地方会

10月28日、札幌、北海道大学医学部大講堂

### 転移性多発骨腫瘍によるクッシング症候群の1例

○ 府川悦士、小村景司、丹代晋、丸山直紀、岡本健作、牧野雄一、平野史倫、羽田勝計

2005年

## 第19回北海道骨粗鬆症研究会

1月22日、札幌、北海道大学医学部大講堂

### ステロイド性骨粗鬆症における RANKL と osteoprotegerin (OPG) の検討

○ 平野史倫、丸山直紀、小村景司、野村嘉伸、府川悦士、羽田勝計

## 第4回旭川関節疾患カンファランス

2月5日、旭川、旭川パレスホテル

### 肺腺癌切除後、症状の改善を認めた肺性肥大性骨関節症の1例

○ 丸山直紀、小村景司、野村嘉伸、府川悦士、平野史倫、羽田勝計、佐藤一博、笹嶋唯博、徳差良彦、三代川斎之

## 第30回北海道リウマチ研究会

3月12日、札幌、ロイトン札幌

### 肺腺癌切除後、症状の改善を認めた肺性肥大性骨関節症の1例

○ 丸山直紀、小村景司、野村嘉伸、府川悦士、平野史倫、羽田勝計、佐藤一博、笹嶋唯博、徳差良彦、三代川斎之

第49回日本リウマチ学会総会・学術集会

4月17日～20日、横浜、パシフィコ横浜

RAにおけるトロンビン受容体(ThrR)の発現と関節予後不良因子との関連—3年間のX線変化の検討

○ 平野史倫、丸山直紀、小村景司、野村嘉伸、府川悦士、羽田勝計

第5回北海道整形外科オステオポロシスセミナー

7月2日、札幌、札幌プリンスホテル

ステロイド性骨粗鬆症におけるBisphosphonateによる骨密度と骨代謝マーカーの経時変化の検討

○ 平野史倫

第15回日本リウマチ学会北海道・東北支部学術集会

9月30日～10月1日、仙台、仙台市情報産業プラザ

膠原病患者における低容量ステロイド内服中の血中sRANKLとosteoprotegerinの検討

○ 平野史倫、丸山直紀、小村景司、岡本健作、野村嘉伸、府川悦士、羽田勝計

第15回日本リウマチ学会北海道・東北支部学術集会

9月30日～10月1日、仙台、仙台市情報産業プラザ

クリオグロブリン血症を合併したシェーグレン症候群の1例

○ 丸山直紀、小村景司、岡本健作、野村嘉伸、府川悦士、平野史倫、羽田勝計

第7回日本骨粗鬆症学会総会・学術集会

10月13日～15日、大阪、大阪国際会議場

低容量ステロイドによる骨代謝マーカーへの作用の検討

○ 平野史倫、丸山直紀、小村景司、岡本健作、野村嘉伸、府川悦士、羽田勝計

### (3) 出版物

なし