

慢性関節リウマチに対する tristetraprolin を用いた  
遺伝子治療の検討

(12670440)

平成 12 年度～平成 14 年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）研究成果報告書

平成 15 年 9 月

研究代表者 針谷 正祥  
(東京女子医科大学医学部講師)



# は し が き

## 研究組織

研究代表者：針 谷 正 祥 (東京女子医科大学医学部講師)  
研究分担者：原 ま さ 子 (東京女子医科大学医学部教授)  
研究分担者：川 口 鎮 司 (東京女子医科大学医学部助手)  
研究分担者：田 中 み ち (東京女子医科大学医学部助手)

交付決定額 (配分額) (金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 12 年度	1,000	0	1,000
平成 13 年度	1,200	0	1,200
平成 14 年度	900	0	900
総 計	3,100	0	3,100

## 研究発表

### (1) 学会誌等

1. Tanaka M, Harigai M, Kawaguchi Y, Ohta S, Sugiura T, Takagi K, Ohsako-Higami S, Fukasawa C, Hara M, Kamatani N. Mature form of interleukin 18 is expressed in rheumatoid arthritis synovial tissue and contributes to interferon-gamma production by synovial T cells. J Rheumatol. 2001;28(8):1779-87.
2. Ohta S, Harigai M, Tanaka M, Kawaguchi Y, Sugiura T, Takagi K, Fukasawa C, Hara M, Kamatani N. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) converting enzyme contributes to production of TNF-alpha in synovial tissues from patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 2001;28(8):1756-63.

### (2) 口頭発表

1. 田中みち、他. Tristetraprolin(TTP)の慢性関節リウマチ(RA)滑膜組織における発現とサイトカイン産生抑制作用の検討. リウマチ 2001;41:428

### (3) 出版物

なし

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

なし

## 研究成果

### 1. はじめに

関節リウマチ（研究課題名では、「慢性関節リウマチ」となっているが、課題の採択後に、「関節リウマチ」に病名を変更することが日本リウマチ学会で決定された。本報告書では、「関節リウマチ」を用いる）(rheumatoid arthritis, RA)の罹患関節では、滑膜組織が増殖しパンプスを形成する。パンプスを形成した滑膜組織では、多量の tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )が産生され、炎症の進展、増悪に寄与している。RA 罹患関節内における TNF- $\alpha$ の役割として表 1 に示すような、滑膜細胞あるいは軟骨細胞からの interleukin (IL)-1、IL-6、granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)などの炎症性サイトカインの誘導、IL-8、monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 などのケモカインの誘導、白血球のリクルートメントに重要な接着分子の発現亢進、軟骨破壊に重要な matrix metalloproteinase の誘導、滑膜細胞のアポトーシス抑制などが報告されている<sup>1-7)</sup>。また、近年、臨床応用された抗 TNF- $\alpha$ 抗体あるいは可溶性 TNF 受容体の優れた抗リウマチ作用からも、関節内における TNF- $\alpha$ の重要性が強く示唆されている<sup>8)</sup>。

表 1 RA における TNF- $\alpha$ の役割

IL-1, IL-6, GM-CSF などの他の炎症性サイトカインの発現誘導
IL-8, MCP-1 などのケモカインの発現誘導
白血球遊走に必要な接着分子の発現誘導
関節破壊に重要な matrix metalloproteinase の誘導
滑膜細胞のアポトーシスの制御

私たちは平成 11 年度までに、RA の滑膜組織において過剰の炎症性サイトカイン産生が誘導され、病態形成に寄与していることを明らかにしてきた。具体的には、滑膜組織中の CD4 陽性 T 細胞が CD40 ligand (CD154) を発現し、CD40/CD40 ligand 系を介してマクロファージ系の滑膜細胞を刺激し TNF- $\alpha$  の産生を亢進させること、放出された TNF- $\alpha$  はサイトカインカスケードの頂点にあり、他の炎症性サイトカイン産生を誘導することを示してきた (図 1, 2)<sup>9, 10)</sup>。この研究を発展させ、他の慢性炎症性疾患である特発性筋疾患においても CD40/CD40 ligand 系により炎症性サイトカインの産生が刺激されることを示した (平成 10 年度厚生科学研究費補助金)<sup>11)</sup>。さらに最近では、CD40 ligand と同じ TNF family に属する LIGHT ((1) lymphotoxin にホモロジーを有し、(2) 刺激により発現が誘導され(inducible)、(3) HSV glycoprotein D と競合的に Herpes virus entry mediator と結合し、(4) T 細胞に発現する特徴を有することから、LIGHT と命名

された) が RA 滑膜組織に過剰発現すること、LIGHT の受容体である HVEM も滑膜組織に発現すること、マクロファージ系滑膜細胞を LIGHT で刺激すると TNF- $\alpha$  産生が誘導されることを報告した (図 3, 4) <sup>12)</sup>。このように、私たちは、RA の滑膜組織に浸潤した T 細胞は細胞表面分子を介して TNF- $\alpha$  産生を制御していることを明らかにしてきた。

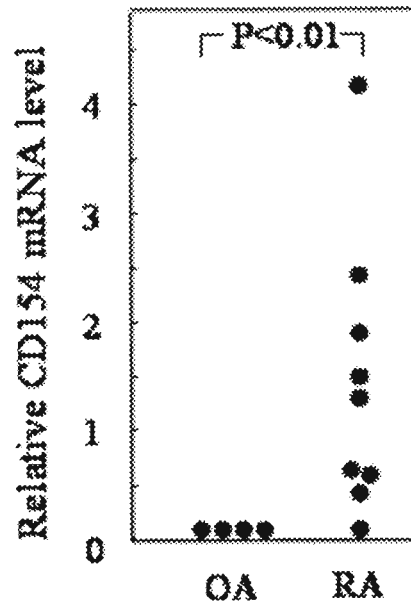


図1 滑膜組織のCD154 mRNA発現  
RA: 関節リウマチ  
OA: 変形性関節症

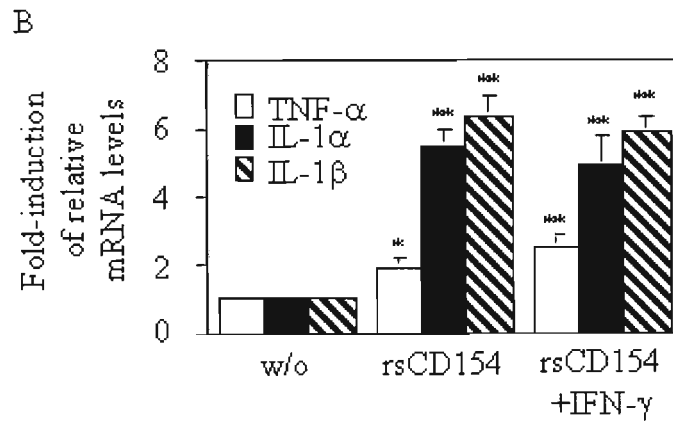
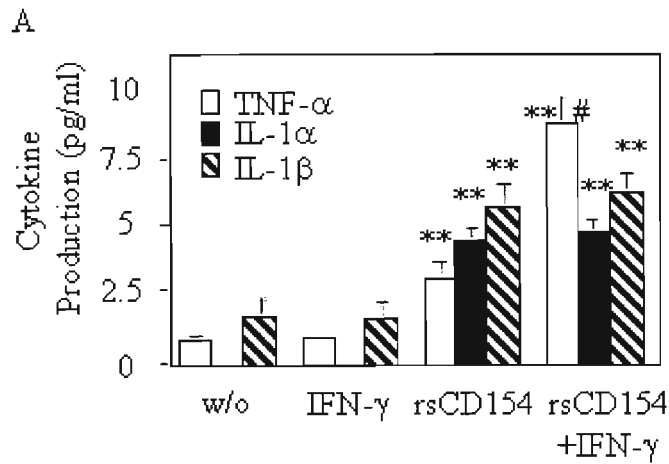


図2 滑膜組織のrecombinant CD154刺激によるIL-1 $\alpha$ 、IL- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 発現誘導

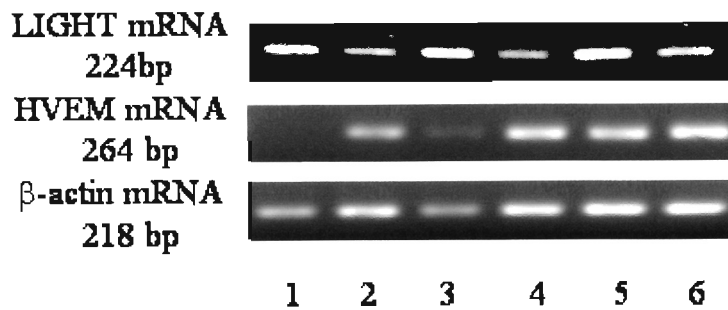
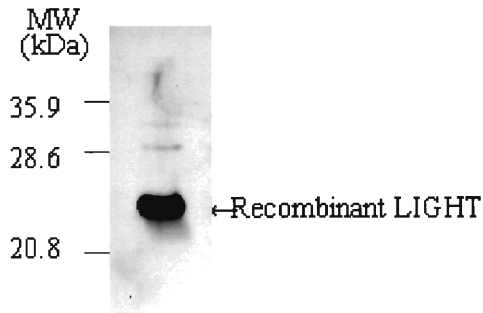


図3 滑膜組織のLIGHT mRNAおよびHVEM mRNA発現

A



B

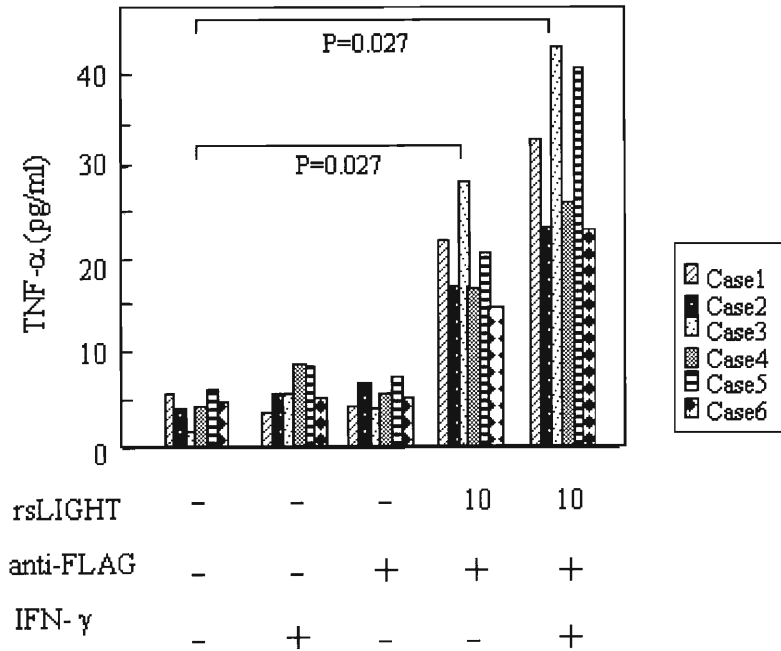


図4-A 精製recombinant LIGHTのSDS-PAGE解析画像

図4-B RAマクロファージ系滑膜細胞のrecombinant LIGHT刺激によるTNF- $\alpha$ 産生誘導

図1 滑膜組織の CD154 mRNA 発現

RAおよび変形性関節症 (osteoarthritis, OA) 患者由来滑膜組織より total RNA を調整し、定量的 reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法により CD154 mRNA 発現を解析した。OA では、全例 40 サイクルの増幅にても CD154 mRNA は検出感度以下であったが、RA では 8 例中 7 例で CD154 mRNA が検

出された。

図2 滑膜細胞の recombinant CD154 刺激による IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  発現誘導

- A) RA 滑膜組織を酵素処理し、滑膜細胞を得た。抗 CD14 抗体結合磁気ビーズによりマクロファージ系滑膜細胞を濃縮した。これらのマクロファージ系滑膜細胞を recombinant CD154 単独で 48 時間刺激し、その培養上清中のサイトカインを enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) にて測定した。recombinant CD154 単独刺激により、培養上清中の IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  産生は有意に増加した。recombinant CD154 + interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) でマクロファージ系滑膜細胞を刺激したところ、TNF- $\alpha$  産生は recombinant CD154 単独刺激に比較し、有意に増加した。
- B) 図2-A と同様にマクロファージ系滑膜細胞を刺激し、刺激 6 時間後の細胞から total RNA を抽出し、定量的 PCR 法にてサイトカイン mRNA 発現を測定した。recombinant CD154 単独刺激により、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  mRNA 発現は有意に増強した。interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) の同時添加によっても、これらのサイトカイン mRNA 発現のさらなる増強は認められなかった。

図3 RA 滑膜組織 LIGHT mRNA および HVEM mRNA 発現

RA 患者滑膜組織から total RNA を抽出し、RT-PCR 法にて LIGHT mRNA および HVEM mRNA 発現を検討した。RA 患者滑膜組織は、全例が LIGHT mRNA を発現し、6 例中 5 例が HVEM mRNA を発現していた。

図4 recombinant LIGHT による RA マクロファージ系滑膜細胞からの TNF- $\alpha$  産生誘導

- A) human LIGHT 分子の細胞外ドメインの N 末端を flag-tag で標識し、抗 flag 抗体結合ゲルにて精製し、recombinant LIGHT を得た。recombinant LIGHT を SDS-PAGE にて解析した結果を示す。
- B) 図2 と同様な方法で、RA 滑膜組織からマクロファージ系滑膜細胞を得、recombinant LIGHT 単独および recombinant LIGHT + IFN- $\gamma$  にて刺激し、培養上清中の TNF- $\alpha$  を ELISA にて測定した。recombinant LIGHT 単独刺激にてマクロファージ系滑膜細胞の TNF- $\alpha$  産生は有意に増加し、IFN- $\gamma$  との共刺激によりその産生はさらに増加した。

TNF- $\alpha$  は主として滑膜組織中のマクロファージ系滑膜細胞により産生される。図5 に TNF- $\alpha$  の細胞内での産生機序を示す。まず核内で TNF- $\alpha$  遺伝子から primary RNA transcript が作られ、splicing などの RNA processing control

を受けて、messenger RNA (mRNA)になる。mRNA は細胞質に移行し、リボゾームにより蛋白に翻訳され、膜型 TNF- $\alpha$ が産生される。膜型 TNF- $\alpha$ は細胞膜に輸送され、膜上に発現する。一方、膜型 TNF- $\alpha$ は膜型 TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE) による protein processing を受けて、可溶性 TNF- $\alpha$ として細胞外へ分泌される。これまでの報告から、マクロファージによる TNF- $\alpha$ 産生においては、(1)の transcriptional control に比較し、(3)の translational control がより重要であることが示されている。

## Regulation of TNF- $\alpha$ biosynthesis

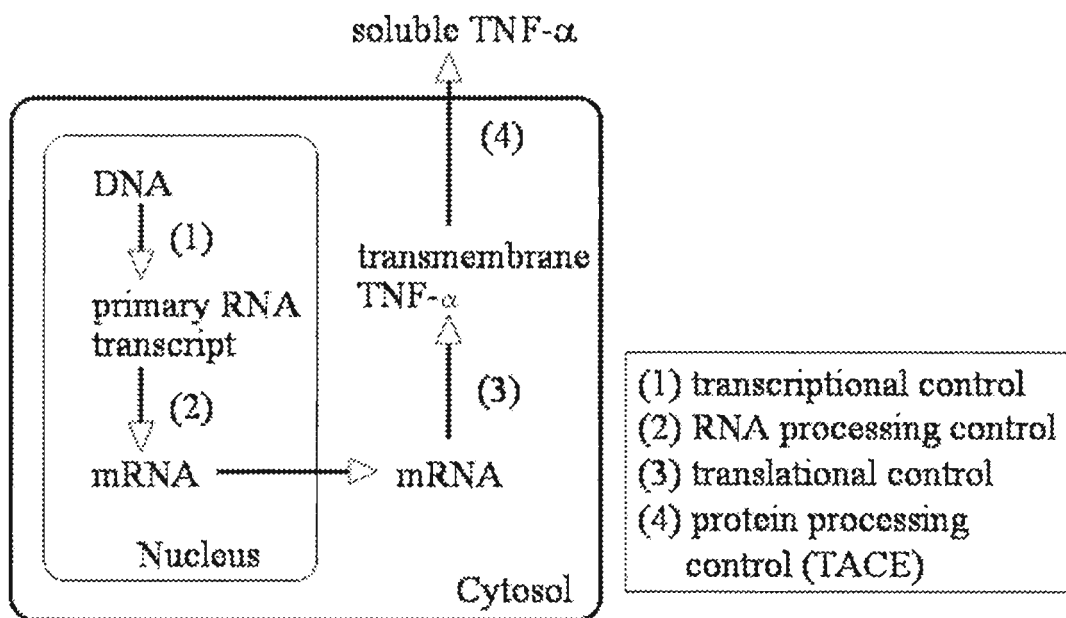


図5 TNF- $\alpha$ の産生制御 (詳細は本文を参照)

TNF- $\alpha$  mRNA の 3' 非翻訳領域には AUUA rich element (AURE)が存在する (図6)。AURE 類似の配列は多くのサイトカインの mRNA にも認められ、mRNA の不安定性を誘導する配列と考えられている。Tristetraprolin (TTP)は、転写後レベルで TNF- $\alpha$  mRNA の安定性を調節する分子として近年同定された<sup>13)</sup>。TTP は TNF- $\alpha$  mRNA の AURE に結合して、mRNA の崩壊を促進する。TTP の過剰発現により蛋白レベルでの TNF- $\alpha$ 産生量が減少することが知られている。TTP は分子量 34 kD で、プロリン含有量に富む Zinc-finger 蛋白である。TTP 遺伝子欠損マウスは、悪液質、びらん性関節炎、皮膚炎、骨髄過形成、抗核抗体などの TNF- $\alpha$  transgenic マウス類似の異常形質を示す<sup>13)</sup>。



以上示した我々の研究結果とこれまでの報告に基づき、平成 12 年度から 14 年度の間、本研究を実施した。本研究では、RA 滑膜病変への TTP の関与を明らかにするとともに、人為的な TTP 過剰発現による RA 治療の可能性を検討することを目的とした。

### Structure of TNF- $\alpha$ mRNA

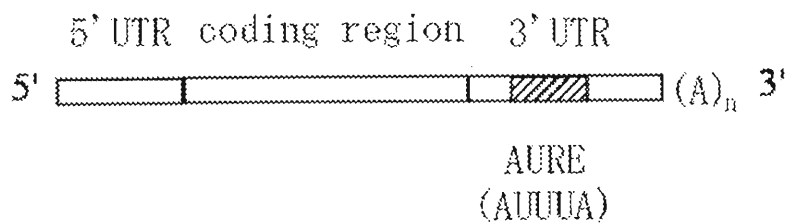


図 6 TNF- $\alpha$  mRNA の構造

TNF- $\alpha$  mRNA の 3' 非翻訳領域には AUUA rich element (AURE) が存在し、mRNA の不安定性に寄与している。TTP はこの領域に結合して、TNF- $\alpha$  mRNA の崩壊を誘導する。

## 2. 交付申請書に記載した〔研究目的〕

### 〔研究目的〕

本研究では次の4点を明らかにすることを目的とする。(1) マウスマクロファージ系細胞株を用いてTTP過剰発現株を樹立する。(2) TTP過剰発現株と親株をそれぞれLPSで刺激し、炎症性サイトカインのmRNAおよび蛋白レベルでの発現を定量し、TTPがどのサイトカイン産生に関与しているかを明らかにする。(3) 上記(2)と同様な系で刺激後のサイトカインmRNAの安定性を測定する。(4) アデノウイルス発現ベクターにマウスTTP cDNAを組み込んだTTPアデノウイルスを作製する。マウスコラーゲン関節炎モデルにTTPアデノウイルスを感染させ、関節炎に対する治療効果を検討する。

本研究の特色、特徴は以下のとおりである。慢性関節リウマチ(RA)の病態には炎症性サイトカインが深く関与しており、サイトカインの中和または産生抑制は近年のRAに対する薬物開発の中心的な路線になっている。従来サイトカイン産生調節の研究は主に転写調節レベルの調節に関して行われてきた。私たちはmRNAの不安定性という従来あまり注目されなかった炎症性サイトカインに共通する特徴に着眼し、本研究を開始した。近年、転写後レベルでTNF- $\alpha$  mRNAの安定性を調節する分子としてTristetraproline(TTP)が同定された。TTPはサイトカインmRNAの3'側のAT rich regionに結合して、mRNAの崩壊を促進する。TTPの過剰発現により蛋白レベルでのTNF- $\alpha$ 産生量が減少することが知られている。多くの炎症性サイトカイン(IL-2、IL-6、IL-8など)のmRNAはAT rich regionを有し、TNF- $\alpha$  mRNAと同様に非常に不安定である。従って、TTPが他のサイトカインmRNAの不安定性にも関与し、それらの産生調節を行っている可能性が高いと考えられる。このように、炎症性サイトカインの不安定性を利用した抗炎症戦略はこれまでに報告がなく、本研究の学術的な特色といえる。本研究で予想される結果としては、(1)TTPの過剰発現がマウスマクロファージ系細胞株におけるTNF- $\alpha$ を含む複数のサイトカイン産生を低下させる、(2)TTPの過剰発現がサイトカインmRNAの不安定性の増強を誘導する、(3)TTPアデノウイルスはコラーゲン関節炎に対する治療効果を示すことが挙げられる。これらの結果はTTPの新たな生物学的役割の証明とRAを含む関節炎疾患へのTTPの関与の可能性を示す意義を有する。また、TTP過剰発現が関節炎モデルで治療効果を示せば、TTPを標的分子とした新たな創薬研究の出発点となる可能性がある。

本研究に関連する研究としては、各種の薬物あるいはアンチセンス、リボザイムなどを用いたサイトカイン産生調節の研究がある。しかし、前述の如くTTPのようなmRNAの崩壊促進能を持つ分子に焦点を当てた研究はこれまでに行われていない。したがって本研究は全く新規の方向から炎症の治療にアプローチする研究として期待できる。遺伝子治療という観点から見ても、本研究は新規のメカニズムによる遺伝子治療の可能性を探るという特徴を有する。

以上をまとめると、RAの新たな治療戦略を立てるために、TTPの炎症性サイトカイン産生調節能を検討し、遺伝子治療によりそのin vivoでの治療効果を明らかにするとが本研究の研究目的となる。

### 3. 交付申請書に記載した〔研究計画・方法〕

〔平成 12 年度〕

#### 1. TTP 発現 plasmid の構築

すでに合成した完全長 cDNA を発現 plasmid に挿入する。発現システムとしては恒常的に発現させるものと、誘導できるものの二種類を構築する。TTP の優良な抗体が市販されていないので、発現システムには epitope tag 付きの plasmid を用いる。

#### 2. TTP 過剰発現株の作成とその解析

発現 plasmid を electroporation により Raw264.7 に transfect する。抗生物質により発現細胞を選択し、その発現を western blot 法により確認する。解析は LPS 刺激による各種サイトカイン産生、mRNA 発現をまず検討する。サイトカイン産生は当研究室で開発した酵素免疫抗体法で、mRNA 定量は ABI PRISM 7700 により行う。さらに、TTP 過剰発現株において産生が抑制されたサイトカインについては、常法により mRNA stability を測定する。この測定にも感度と再現性の優れた ABI PRISM 7700 を用いる。

#### 3. マウス TTP 発現アデノウイルスの作成

COS-TCP 法によりマウス TTP を組み込んだ組み換えアデノウイルスを作成する (TTP アデノウイルス)。TTP アデノウイルスを in vitro でヒト由来滑膜細胞に感染させて、その発現を RT-PCR で確認する。

〔平成 13 年度〕

#### 1. TTP アデノウイルスの治療効果の検討

コラーゲン関節炎マウスを作成する。TTP アデノウイルスを第二回免疫時および 3 週後に一方の関節に注入し、他方の関節には生理食塩水を注入する。4 ないし 6 週後の関節標本を作成し、病理組織学的検討および免疫組織学的検討を行う。同時に、関節炎発症の頻度、重症度についても経時的に観察する。

#### 2. ヒト RA 由来滑膜細胞に対する効果

RA 由来滑膜初代培養細胞および滑膜由来線維芽細胞にヒト TTP アデノウイルスを感染させ、産生されるサイトカインを酵素免疫抗体法で測定する。

#### 4. 研究経過と結果

##### ① RA 滑膜組織における TTP mRNA・TTP 蛋白発現の検討

RA 滑膜病変への TTP の関与を検討するため、RA 滑膜組織における TTP mRNA 発現を RT-PCR 法にて、TTP 蛋白発現を Western blotting 法にて検討した。滑膜組織は、東京女子医科大学附属青山病院にて実施した人工膝関節置換術症例より得た。滑膜組織の採取にあたっては、手術前に患者に十分な説明を行い、書面にて同意を得た。6 例の RA 滑膜組織から total RNA を抽出し、human TTP cDNA 特異的 primer により RT-PCR を行い、得られた RT-PCR 産物をアガロースゲル電気泳動にて解析した。6 例中 5 例で TTP mRNA 発現が認められた (図 7)。

次に、蛋白レベルでの発現を検討するため、4 例の RA 滑膜組織から蛋白を抽出し、SDS-PAGE にて電気泳動後、nitrocellulose 膜に転写し、抗 TTP 抗体にて検出した。検討した 4 例全例で、滑膜組織の TTP 発現が確認された (図 8)。

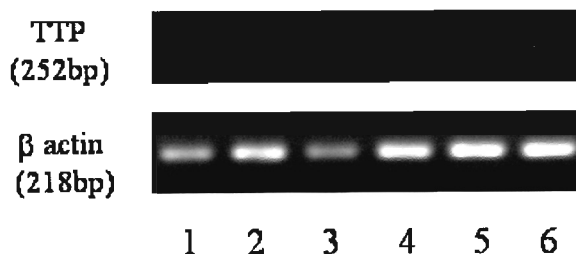


図7 RA滑膜組織におけるTTP mRNAの発現

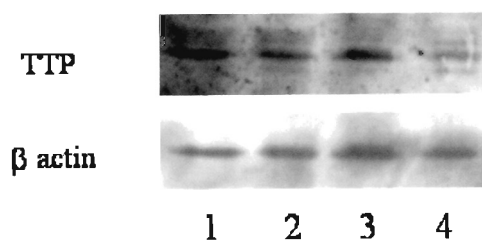


図8 RA滑膜組織におけるTTP蛋白の発現

##### 図 7 RA 滑膜組織における TTP mRNA の発現

RA 6 症例の滑膜組織から total RNA を抽出し、TTP 特異的プライマーにて RT-PCR を行った (上段)。6 例中 5 例に、TTP mRNA の発現が確認された。同じ検体を b-actin 特異的プライマーにて増幅した (下段)。

### 図8 RA 滑膜組織における TTP 蛋白の発現

RA 4 症例の滑膜組織から蛋白抽出液を作成し、SDS-PAGE にて電気泳動後、nitrocellulose 膜に転写した。TTP の検出は、ヤギ抗 humanTTP 抗体と、アルカリホスファターゼ標識抗ヤギ IgG 抗体にて行った (上段)。4 例中全例に、TTP 蛋白の発現が確認された。下段は、同じ nitrocellulose 膜を用い、抗 $\beta$ -actin 抗体と反応させた図である。どのレーンにもほぼ同量の蛋白が泳動されていることを示している (下段)。

### ② RA 滑膜組織における TTP の局在の検討

次に、RA 滑膜組織において、どの細胞が TTP を主に発現しているかを免疫組織化学染色により検討した。RA 滑膜組織より凍結切片を作成し、冷アセトンにて固定後、ABC(avidin-biotin complex)法にて染色した。1 次抗体には、ヤギ抗 humanTTP 抗体または正常ヤギ IgG を用いた。TTP は、RA 滑膜表層細胞、血管周囲に主として発現し、血管内皮細胞の一部にも発現を認めた (図 9-A、B、C)。滑膜リンパ濾胞には TTP の発現はほとんど認めなかった (図 9-D)。一方 OA 滑膜組織では、滑膜表層細胞・表層下細胞のいずれにも、明らかな TTP の発現は認められなかった (図 9-E、F、G)。

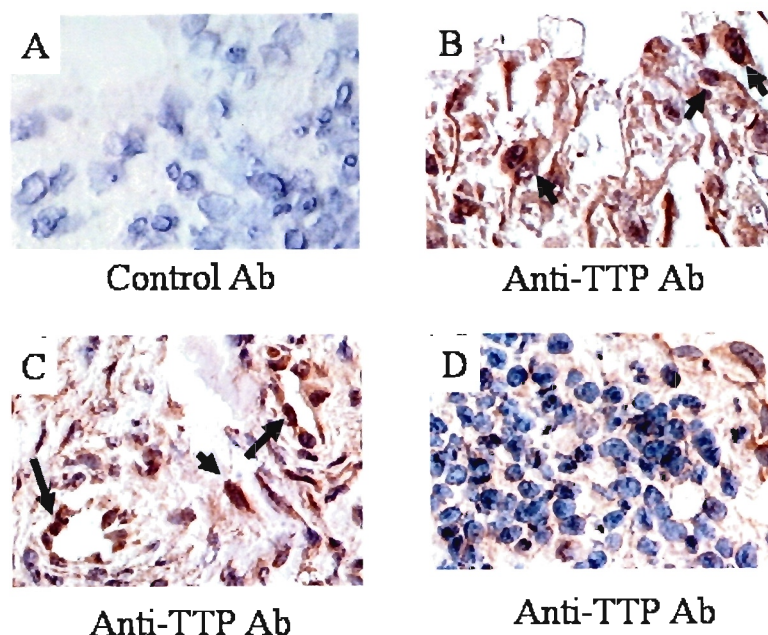


図 9 (A-D) 滑膜組織における TTP の局在

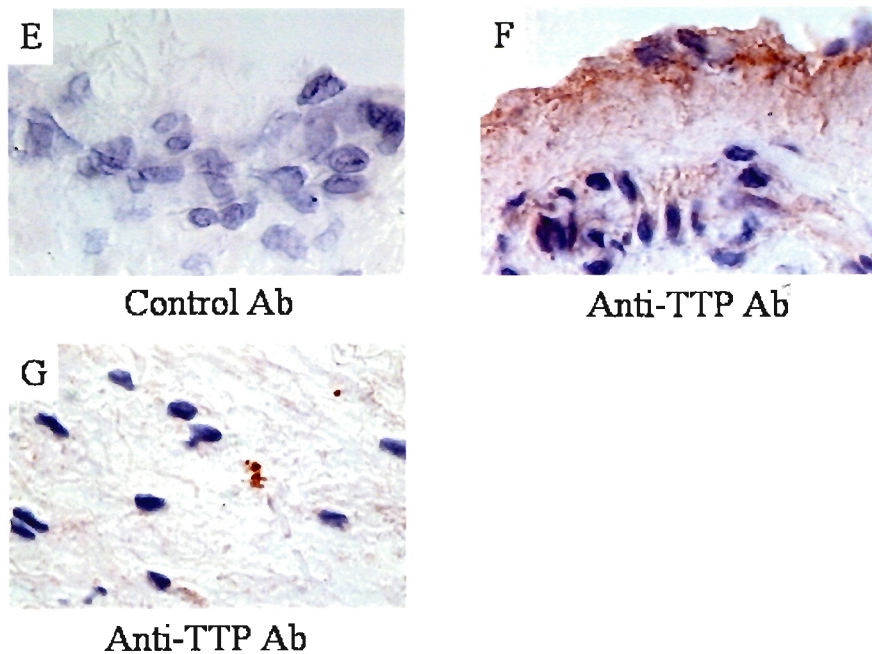


図9 (E-G) 滑膜組織における TTP の局在

RA (A-D)および OA (E-G)の滑膜組織より凍結切片を作製し、免疫組織化学染色により TTP の局在を検討した。A)RA 滑膜組織のコントロール IgG による染色像、B)RA 滑膜表層細胞に強い TTP の発現が認められる (矢印)、C)RA 滑膜組織内血管内皮細胞 (長い矢印) および血管周囲の滑膜細胞 (短い矢印) に TTP の発現を認める、D)RA 滑膜組織リンパ濾胞には TTP は殆ど発現していない、E)OA 滑膜組織のコントロール IgG による染色像、F、G)OA 滑膜組織では、表層細胞・表層下細胞のいずれにも明らかな TTP の発現は認められない。

### ③ TTP 発現 plasmid の構築

完全長 mouse および human TTP cDNA を含む plasmid を Human Genome Science より購入し、その配列 (図 10、図 11) を DNA sequence 法により確認した。特異的プライマーを合成し、human TTP cDNA、mouse TTP cDNA をそれぞれ増幅後、flag epitope tag を有する発現 plasmid に挿入した。これらの発現 plasmid (2x flag-hTTP、2x flag-mTTP) を Cos7 細胞に遺伝子導入後、細胞溶解液を作成した。これらの細胞溶解液 SDS-PAGE で泳動し、nitrocellulose 膜に転写後、抗 flag モノクローナル抗体で検出し、良好な発現を確認した (図 12)。

1 cgttacacca tggatctgac tgccatctac gagagcctcc tgctgctgag cctgacgtg  
61 cccgtgccat cggacatgg agggactgag tccagcccag gctggggctc ctggggaccc  
121 tggagcctga gcccctccga ctccagcccg tctggggctca cctcccgcct gctggccgc  
181 tccaccagcc tagtggaggg ccgcagctgt ggctgggtgc ccccacccc tggcttcgca  
241 ccgtggctc cccgcctggg cctgagctg tcacctcac cacttcgcc cactgcaacc  
301 tccaccacc cctcgcgcta caagactgag ctatgtcgga cctctcaga gactggggcg  
361 tgccgctacg gggccaagtg ccagttgcc catggcctgg gcgagctgcg ccaggccaat  
421 cgccaccca aatacaagac ggaactctgt cacaagtct acctccaggg ccgctgcccc  
481 tacggctctc gctgccactt catccacaac ctagcgaag acctggcggc cccggggcc  
541 cctctgtgc ttcgccagag catcagctt cccggcctgc ccttggccg ccggacctca  
601 ccaccaccac caggcctggc cggcccttc ctgtctcca gctccttc gccctccagc  
661 tcccaccac cacctgggga cttccactg tcacctctg cttctctgc tgcccctggc  
721 acccccctgg ctggaagaga cccacccca gtctgttgc cctctgccg aagggccact  
781 cctatcagc tctgggggcc cttgggtggc ctggttcgga cccctctgt acagtccctg  
841 ggatccgacc ctgatgaata tgcagcagc ggcagcagc tggggggctc tgactctccc  
901 gtcttcgagg cgggagttt tgcaccacc cagcccgtgg cagcccccg ggcactcccc  
961 atcttcaate gcactctgt ttctgagtga caaagtact gcccggtcag atcagctgga  
1021 tctcagcggg gagccacgtc tcttgcactg tggctctgc atggaccca gggctgtggg  
1081 gacttggggg acagtaata agtaatcccc tttccagaa tgcattaacc cactccccctg  
1141 acctcacgct ggggcaggtc cccaagtgtg caagctcagt atctatgatg gtgggggatg  
1201 gactgtcttc cgaggttctt gggggaaaaa aaattgtagc atatttaagg gaggcaatga  
1261 acctctccc ccactcttc cctgcccata tctgtctctt agaatttat gtgcttgaa  
1321 taataggcct tcaactcccc tccagtttt atagacctga ggttccagt tctctggta  
1381 actggaacct ctctgaggg ggaatctctg tctcaaatt acctccaaa agcaagtac  
1441 caaagccgtt gccaaacccc accataaat caatgggcc tttattatg acgacttat  
1501 ttattctaat atgatttat agtattata tatattgggt cgtctgctc ccttgtatt  
1561 ttctctctt tttgtaata ttgaaaacga cgtatataatt attataagta gactataata  
1621 tatttagtaa tatatattat taccttaaaa gtctatttt gtgtttggg catttttaa  
1681 taaa

図 10 human TTP cDNA 配列

第 10 nucleotide から第 990 nucleotide が human TTP 蛋白をコードしている。

1 cggtctcttc accaaggcca ttcgcccac catggatctc tctgcatct acgagagcct  
 61 ccagtcgatg agccatgacc tgcaccca ccacggagga accgaatccc tcggaggact  
 121 ttggaacata aactcggact ccaccccgc tggggtcacc tctgcctga ctggccgctc  
 181 cactagcctg gtggagggcc gaagctgtgg ctgggtacc ccaccccctg gttttgcacc  
 241 tttggctccc cgcccaggcc ctgagctgtc accctcacct acttcgccta ctgcaactcc  
 301 caccacctcc tctcgataca agaccgagct ctgtcggacc tactcagaaa gcgggcgttg  
 361 tcgctacggg gccaaagtgc agtttgctca cggcctgggt gaacttcgcc aagccaatcg  
 421 ccacccaag taaaaacgg aactctgcca caagtctac ctccagggcc gctgccccta  
 481 tggctctcga tgccacttca tccacaacce caccgaggac ctgctctcc ctggccagcc  
 541 ccatgtctg cgacaaagca tcagcttctc cggcttgccc tcaggccgca gaagctcgcc  
 601 gccacctca ggctttctg gcccttccct gtctctgtg tcttttgc cttccagctc  
 661 cccaccgcc cctggggatc ttccacttc ccttctgcc ttctctgtg ccctgggac  
 721 cctgtgact cgaagagacc ctaaccaggc ctgttgcctc tctgcccga ggtctactac  
 781 cccagcacc atctgggggc cctgggtgg cctggctcgg agcccatctg cccactctc  
 841 gggatccgat cctgatgact acgccagcag cggcagcagc ctgggggggt cagactcacc  
 901 tgtctttgag gcaggggtg ttggcctcc ccagaccct gcaccccaa ggcgtctccc  
 961 catctcaat cgtatctg tctctgagtg acaagtgcct acctaccag tatggatcag  
 1021 ctgatctca aagagagggc agggactcgt cattgctgtg gggacctggg gcactcctc  
 1081 aagtaataa gtccatctt ctggacattc caagatgcaa taaccattt ccctgggtgct  
 1141 gggctggggc aggtccctag tttgcaaat cagtgtttgg gtggatccgt tctagggta  
 1201 cctaagatg ttgaggaga cagttgacag ttggtctcc aggcccaag tcttctgtg  
 1261 ttttgagat aggagcttat tatggtacc caggctggct ttgaactca tataatcctg  
 1321 ccttagcctt ttccaagtc tggggttaca ggtatgcacc agcccctctg caactctgt  
 1381 ctctggaat ctaagtctg tgaagagccg gctcccaca tactatccta attttacta  
 1441 gaccctgaag ttcagtgtc ggtggctgaa gcctctctg agaatcctgg tgctcaaatt  
 1501 tccctctaa agcaaatagc caaagccatt gccaatccc ttctcccca accagtgggc  
 1561 cctttatta tgacacttt atttattgta ttaagattt atagtatta tataatgg  
 1621 gtcgtctact ccgttttct ttttgaatg ttaaaactga tactgtatta agtataatgct  
 1681 ataatatatt aatatattg tacctacaa gtctatttt tgggggggt tggaatttt  
 1741 aaataaaatc ttgagtgtga actg

図 11 mouse TTP cDNA 配列

第 32 nucleotide から第 991 nucleotide が mouse TTP 蛋白をコードしている。



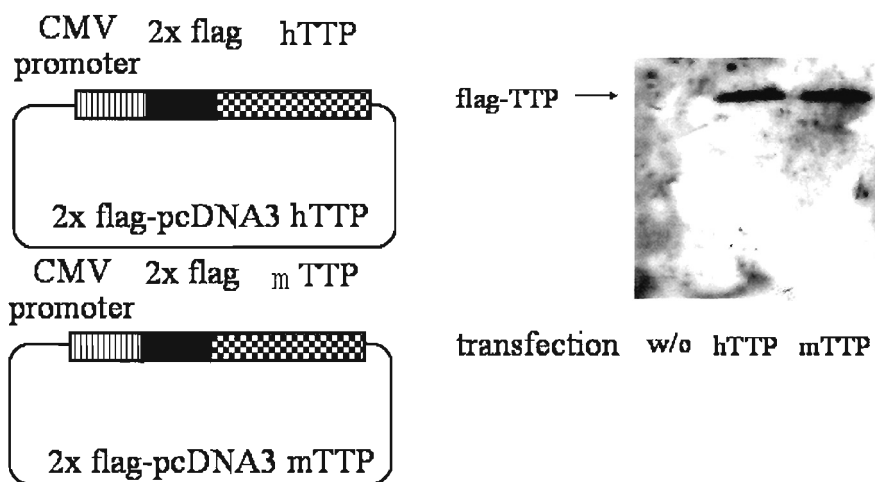


図 12 TTP 発現 plasmid による human TTP、mouse TTP 遺伝子の強制発現  
 hTTP、mTTP cDNA を 2x flag-tag を有する発現 plasmid に組み込み、Cos7 にトランスフェクションし、Western blot により発現を確認した。いずれの遺伝子の発現 plasmid にても、良好な発現が確認できた。

#### ④ TTP 発現アデノウイルスの作成

研究計画では COS-TCP 法を用いる予定であったが、in vitro ligation 法によるアデノウイルス作製が可能になったため、より簡便なこの方法に変更した。human TTP cDNA 組み換えアデノウイルス (hTTP アデノウイルス) およびコントロールとして用いる LacZ 発現ウイルスを作製した。LacZ 発現ウイルスは比較的高力価のウイルス ( $10^9$  pfu/ml 以上) が作製でき、in vitro ligation 法の有用性が確認できた。hTTP アデノウイルスについては、vector の構築までは問題なく進んだが、高力価のウイルスは産生されなかった。詳細な原因は不明であるが、hTTP の発現が HEK293 細胞に細胞毒性をもたらした可能性が考えられた。そこで、hTTP の発現誘導調節が可能な Tet-Off システムを用いてアデノウイルスを再度作製した。Tet-Off システムでは、Adeno-X Tet-Off ウイルスと TRE-hTTP アデノウイルス、Adeno-X Tet-Off ウイルスと TRE-betaGal アデノウイルスの組み合わせで共感染させることにより、前者では hTTP が、後者では  $\beta$ -galactosidase が誘導される。この際、hTTP の検出を容易にするため、図 12 のプラスミドと同様に TTP cDNA に flag-tag を付加した。この hTTP アデノウイルスを COS7 細胞に感染させたところ、hTTP 蛋白の良好な発現誘導が確認できた (図 13)。ウイルス力価を上昇させるため、増幅・濃縮を行い  $2 \times 10^8$  pfu/ml の力価を得た。動物実験のためには一般に  $10^{10}$  pfu/ml 以上の力価が必要で

あり、本研究期間内の動物実験は行えなかった。

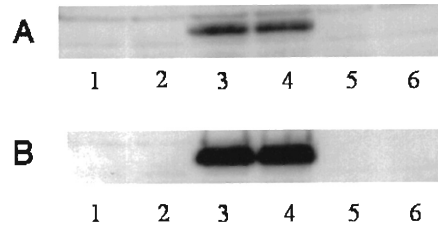


図 13 hTTP アデノウイルスによる hTTP の発現誘導

A) COS7 細胞に以下のウイルスを感染させ、72 時間後に細胞溶解液を作製した。感染なし(lane 1, 2)、TRE-hTTP アデノウイルス(lane 3, 4)、TRE-betaGal アデノウイルス(lane 5, 6)。B) COS7 細胞に上記 A) のウイルスに加え、Adeno-X Tet-Off ウイルスを共感染させ、72 時間後に細胞溶解液を作製した。各細胞溶解液を SDS-PAGE で泳動し、ニトロセルロース膜に転写後、抗 flag モノクローナル抗体にて検出した。A) では、TRE-hTTP アデノウイルスによる、僅かな hTTP の誘導が認められる。B) では、TRE-hTTP アデノウイルスと Adeno-X Tet-Off ウイルスの共感染による強い hTTP の誘導が認められた。A)、B) 共に lane 1、2、5、6 では hTTP の誘導は認められない。

⑤ In vitro における hTTP 発現アデノウイルスの効果を検討する基礎実験として、マクロファージ系細胞株 Raw264.7 を用い、LPS 刺激による TNF- $\alpha$  mRNA 発現誘導の経時的変化を検討した。mRNA の定量には ABI Prism 7900 を用いた。TNF- $\alpha$  mRNA 発現は LPS 刺激後 3 時間でピークに到達し、その後漸減することが明かとなった (データ省略)。

## 5. 今後の進展

本研究により、RA における TTP の関与が明らかとなり、TTP 発現アデノウイルスを作製できた。研究期間内には残念ながら施行できなかった hTTP アデノウイルスによる関節炎治療実験を今後実施し、hTTP アデノウイルスによる遺伝子治療効果を明らかにする。

6. 文献

1. Fox, D. A. 1997. The role of T cells in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis: new perspectives. *Arthritis Rheum.* 40:598.
2. Panayi, G. S., V. M. Corrigall, and C. Pitzalis. 2001. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. The role of T cells and other beasts. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 27:317.
3. Arend, W. P. 1997. The pathophysiology and treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 40:595.
4. VanderBorgh, A., P. Geusens, J. Raus, and P. Stinissen. 2001. The autoimmune pathogenesis of rheumatoid arthritis: role of autoreactive T cells and new immunotherapies. *Semin. Arthritis Rheum.* 31:160.
5. Aarvak, T., and J. B. Natvig. 2001. Cell-cell interactions in synovitis: antigen presenting cells and T cell interaction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 3:13.
6. Weyand, C. M. 2000. New insights into the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 39 Suppl 1:3.
7. Harigai, M., M. Hara, T. Yoshimura, E. J. Leonard, K. Inoue and S. Kashiwazaki. 1993. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in inflammatory joint diseases and its involvement in the cytokine network of rheumatoid synovium. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 69:83.
8. Feldmann, M., and R. N. Maini. 2001. Anti-TNF  $\alpha$  therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Ann. Rev. of Immunol.* 19:163.
9. Harigai, M., M. Hara, S. Nakazawa, C. Fukasawa, S. Ohta, T. Sugiura, K. Inoue, and S. Kashiwazaki. 1999. Ligation of CD40 induced tumor necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: a novel mechanism of activation of synoviocytes. *J. Rheumatol.* 26:1035.
10. Harigai, M., Hara, M., Kawamoto, M., Kawaguchi, Y., Sugiura, T., Tanaka, M.,

- Nakagawa, M., Ichida, H., Takagi, K., Higami-Ohsako, S., Shimada, K., Kamatani, N. The Ligation of CD40 on CD14<sup>+</sup> Synovial Cells from Rheumatoid Arthritis Patients Amplifies the Synovial Inflammatory Response through Phosphorylation of Mitogen-Activated Protein Kinases and Secretion of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , Interleukin-1 $\alpha$  and Interleukin-1 $\beta$ . submitted.
11. Sugiura, T., Y. Kawaguchi, M. Harigai, K. Takagi, S. Ohta, C. Fukasawa, M. Hara, and N. Kamatani. 2000. Increased CD40 expression on muscle cells of polymyositis and dermatomyositis: role of CD40-CD40 ligand interaction in IL-6, IL-8, IL-15, and monocyte chemoattractant protein-1 production. *J. Immunol.* 164:6593.
  12. Nakagawa M, Harigai M, Kawaguchi Y, Sugiura T, Tanaka M, Ichida H, Hara M, Kamatani N. 2002. LIGHT, a co-stimulatory molecule for T cells, and its receptors are expressed in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis patients and contribute to TNF-alpha and interleukin-12 production. *Arthritis Rheum.* 46(9): S558.
  13. Carballo, E., Lai, W. S., Blackshear, P. J. 1998. Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin. *Science* 281: 1001.