

氏 名 (本籍)

とも お たかし  
友 尾 孝 (大 阪 府)

学 位 の 種 類

博 士 (医 学)

学 位 記 番 号

博 甲 第 3782 号

学位授与年月日

平成 17 年 3 月 25 日

学位授与の要件

学位規則第 4 条第 1 項該当

審 査 研 究 科

人間総合科学研究科

学 位 論 文 題 目

Analysis of abnormally expressed genes in synovium from patients with rheumatoid arthritis using a column gel electrophoresis-coupled subtractive hybridization technique

(column gel electrophoresis-coupled subtractive hybridization technique を用いた関節リウマチ患者関節滑膜における発現異常遺伝子の解析)

主 査

筑波大学教授

医学博士

小 山 哲 夫

副 査

筑波大学講師

博士 (医学)

島 野 仁

副 査

筑波大学講師

博士 (医学)

成 田 奈緒子

副 査

筑波大学講師

博士 (医学)

野 口 恵美子

【235】

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

関節リウマチ (RA) は、持続する滑膜の増殖と炎症により関節破壊を来す疾患であるが、その病因・病態の理解は未だ不十分である。臨床すでに TNF $\alpha$  阻害剤 (Infliximab) が導入され有効性を示しているが、更なる進歩には本疾患の病態に関するより深い分子生物学的解析が必要である。RA 患者の滑膜組織において特異的に発現している遺伝子を同定することは、RA の病態を形成する分子的生物学的機序を理解し、更に RA に特異的な治療の標的を探索することに有用と考えられる。

組織特異的に発現している遺伝子の解析のために種々の手法が開発されてきているが、本研究では新しく開発された gel electrophoresis-coupled subtraction hybridization (CGESH) 法を用いた。本法では比較したい 2 検体の DNA をそれぞれ制限酵素で切断した後混合し、ゲル電気泳動により size に依存した分画を行い、その状態で変性・再会合を行う。この gel 内での過程が他の subtraction 法にはない特徴的な過程である。分画を行うことで変性・再会合の効率を上げることができ、配列は関連するが size の異なる断片は物理的に離れて互いに干渉しない。筆者らはこの新規の手法を用いて RA 患者滑膜組織中に特異的に発現している遺伝子の同定を目的として以下の実験を行った。

### (対象と方法)

- 1) CGESH 法: RA 患者滑膜及び変形性関節症 (OA) 患者滑膜からそれぞれ poly(A)+RNA を精製し、cDNA を合成した。制限酵素で切断した RA 患者由来 cDNA を tester, OA 患者由来 cDNA を driver として CGESH 法による subtraction を行った。
- 2) dot blot 解析: 得られた CGESH library (RA-OA) を cloning し、2 枚の nylon membrane に等しく blot した。OA-RA の library も同様に作製した。RA-OA, OA-RA の library から作製した probe をそれぞれの

membrane に hybridize させ、結合の度合いを化学発光法と densitometer で検出した。RA-OA library の結合が OA-RA のそのの 2 倍以上である clone を選択した。

3) homology 解析：これらの塩基配列を決定し、BLAST program を用いて homology search を行った。

#### (結果)

1) RA-OA の subtraction library を cloning し、273 clone を得た。2) これらのうち dot blot hybridization により RA-OA で 2 倍以上の結合を示した 13 の clone を選択した。3) これらの clone について塩基配列を決定し、BLAST program による homology search の結果、6 個の遺伝子 (HLA-DRB1, sequestosome 1, elongation factor 1 alpha 1, clusterin, glutathione S-transferase pi, FLJ00133) を同定した。13 clone のうち、6 clone が clusterin、2 clone が sequestosome 1、2 clone が elongation factor 1 alpha 1 で、その他の遺伝子は各 1 clone であった。

#### (考察)

HLA-DRB1 は、class II の MHC で抗原提示に重要な分子で、RA の病態形成に深く関与していると考えられている。Sequestosome 1 は、IL-1 及び TNF- $\alpha$  から NF- $\kappa$ B の活性化への signal 伝達の足場として重要な役割を担っていること、さらに、破骨細胞形成に関与している遺伝子であることが報告されており、RA 患者における関節破壊の過程に機能している可能性が考えられる。Elongation factor 1 alpha 1 は RA 滑膜において OA 滑膜と比べて mRNA 他の発現が亢進していること、また、この蛋白に対する自己抗体が Felty 症候群患者で認められることが報告されている。Clusterin 及び glutathione S-transferase pi は、NF- $\kappa$ B の signal 伝達に関与していること報告されている。FLJ00133 はその機能は未だ不明である。このように同定された遺伝子は機能不明の一遺伝子を除き、いずれも RA の病態に関与しうる遺伝子であると思われた。

本試験では CGESH 法により得られた clone の screening に dot blot hybridization 法を用いた。しかし、dot blot hybridization 法では splice variant のような size の異なる遺伝子を同定することはできない。CGESH 法では size 分画を行うという過程が含まれていることから、variant の検出が理論的には可能であるが、dot blot hybridization 法による screening の過程でそのような variant を検出できていない可能性も考えられる。CGESH 法は、今後より効率的な screening 法と組み合わせることで、2つの組織中で発現に差がある遺伝子を同定する強力な解析手段となりうると考えられた。

#### (結論)

CGESH 法を用いて RA の病態形成に関与している可能性のある遺伝子を同定した。本法が疾患に関連し発現異常を呈した遺伝子の同定に有用であることが示唆された。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

関節リウマチは持続する滑膜の増殖と炎症により関節破壊を来す疾患であるが、現在のところの病因・病態の解明は未だ不十分である。本研究では新しく開発された gel electrophoresis-coupled subtraction hybridization 法を用い、変形性関節症を対照として、患者の滑膜組織より関節リウマチに高発現している遺伝子を 6 種類同定した。これらの遺伝子の産物が関節リウマチの病因・病態に関与するものと推測された。今後さらに症例を増やし、これらの遺伝子の産物が関節リウマチの成因・病態においてどの様に関連するかの研究が期待される。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。