関節リウマチに対するレーザー照射療法の 機能ゲノム科学的考察

安 孫 子 宜 光

日本大学松戸歯学部生化学・分子生物学講座

(受付：2010年10月15日，受理：2010年11月26日)

Functional Genomic Study on Laser Therapy for Rheumatoid Arthritis

Yoshimitsu ABIKO

Department of Biochemistry and Molecular Biology,
Nihon University School of Dentistry at Matsudo

(Received: October 15, 2010, Accepted for Publication: November 26, 2010)

Abstract: Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disorder that involves inflammation and pain of joints and has been treated by steroid hormones. However, long-term use of steroid often causes side effects. Low-level laser irradiation (LLLI) is being evaluated for treating RA, and no side effects have been reported. LLLI reduced inflammation in collagen-induced RA rats. Linearly polarized infrared light irradiation (IPIL) and steroid reduced the expression of IL-8 in human RA synovocyte MH-7A cells. GeneChip analysis coupled with a signal pathway database showed that steroid randomly altered the expression of many genes including unwanted genes, whereas IPIL reduced genes which are useful for anti-inflammation.

(J. Jpn. Soc. Laser Dent. 21 : 179 ~ 184, 2010 Reprint requests to Dr. ABIKO)

Key words = Rheumatoid arthritis, Laser irradiation, Gene chip, Functional genomic

キーワード=関節リウマチ，レーザー照射，遺伝子チップ，機能ゲノム科学

緒 言

関節リウマチ (RA) は高度な慢性炎症・疼痛を伴う自己免疫疾患である。多くの患者が慢性疼痛と関節の変形に苦しみ、低いレベルの Quality of Life を余儀なく強いられている。RA は自己免疫疾患であるが故に根治療法が困難で現在でも炎症、疼痛に対する対症療法としてステロイドホルモンのコルチゾン投与が汎用されている。そして、ステロイドホルモンの長期的な投与によって副作用が強く現れるのが問題視されている¹⁾。最近では、TNF- α が関節リウマチの重要な病態促進因子であることに注目して、抗ヒト TNF- α 抗体であるインフリキシマブ (Infliximab) が分子標的治療薬として用いられ、有効であるとされているが、コストが高いという欠点がある。

これに対して、レーザー照射が創傷や難治性潰瘍に対し

て治療効果があると報告されて以来、炎症抑制、疼痛減少、など広範な臨床効果が報告され、関節リウマチに対しても有用であるとの報告が多く^{2,3)}、興味深いことに副作用の報告はほとんど聞かない。しかしながら、レーザー照射の関節リウマチに対する生物学的効果の作用機序？なぜ副作用が少ないのか？は不明である。光照射療法の関節リウマチへの積極的な臨床応用を推進するためにも生物学的効果のメカニズムを機能ゲノム科学的研究を応用して実証科学的に解明する必要があると思われる⁴⁾。

ゲノム情報に対して、mRNA レベル情報を総括してトランスクリプトーム、遺伝子産物すなわちタンパク質の情報を総括してプロテオームとよぶ。これらオームのデータベース情報、解析技術を利用して統括する学問体系はバイオインフォマティクス (生物情報科学) と言う新しい学問体系を産み出し、疾病関連遺伝子の探索、遺伝子産物タ

図1 機能ゲノム科学の概観

ゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム・メタボロームの概観

各オームの階層のデータベースを包括的に応用するバイオインフォーマティクス（生物情報科学）研究はあらゆる生命科学研究に有用である。

図2 情報伝達系コアーデータベース Ingenuity Pathway 解析システム (IPA)

Gene Chip は遺伝子のエキソン部分の特異配列部分のオリゴヌクレオチドプローブを高密度合成したマイクロアレイで、蛍光標識した mRNA サンプルをハイブリダイズさせることで膨大な数の遺伝子発現をモニターできる。膨大な Gene Chip 解析データを人の手で網羅的検索を行なうことはもはや不可能で、解析結果を論文情報データベースへ入力することで、情報伝達系をコアとする遺伝子間、タンパク質間の相互関係、高次生物学的プロセス関係を基盤とした各分子間ネットワークが提示され、かつ標的遺伝子の詳細な情報を入手できる。

ンパク質情報を基盤としたゲノム創薬へと発展している。ヒトゲノム計画が終了し、大量のゲノムデータベースの蓄積とともにゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム・メタボロームを統合した機能ゲノム科学研究が飛躍的に進展している（図1）。

バイオインフォーマティクスの発展によって遺伝子相互関係、タンパク質間相互作用、高次生物学的ネットワークおよびそれらの基盤情報に関する膨大なデータベースが構築されている。そして、網羅的に得られたトランスクリプトーム解析結果を情報伝達系コアーとする Ingenuity Pathway 解析 (IPA) システムを応用して、これまで人の能力では解析が不可能な情報の発見、提示が可能となっている（図2）。

レーザー照射の抗炎症作用の解明の一助として、ラット関節リウマチ (RA) モデル実験系を用いて低レベルダイオードレーザー (Ga-AL-As 830nm, 松下電気) を用いて炎症抑制効果の有用性を調べた。ついで、ヒト膝関節リウ

マチ滑膜細胞 MH-7A に炎症因子 IL-1 β で刺激する病態モデルで、直線偏光近赤外線 (SuperLizer; 東京医研) を照射し、発痛因子、炎症性サイトカインの産生に与える影響を調べた。そして、Affymetrix Gene Chip を用いて遺伝子発現の変動を解析し、さらに IPA データベースを応用することで分子機序の解析を試みた。

1. ラット動物モデル実験

ウシ II 型コラーゲンの免疫によってラットの関節リウマチモデル (CIA) を作成し、Ga-AL-As 830nm を照射した。II 型 CIA ラットの後肢足趾の腫脹は著明に増大し、レーザー照射によって明らかに減少していた（図3）。

炎症抑制効果は、後肢足趾の体温の減少でも明らかであった。関節リウマチラットは、後肢を正常な位置で踏ん張ることができず、前肢だけを使って後肢を引きずるようにしか歩行できなかったが、レーザー照射後は、正常に近く後肢を使って歩行できるように改善された（図3）。これらの結果からレーザー照射は関節リウマチラットに対し

関節リウマチラット

SL照射後の関節リウマチラット

図 3 ラット関節リウマチモデルに対する直線偏光近赤外線照射の歩行運動の改善

図 4 ラット関節リウマチ IL-1 β 発現に対するレーザー照射の影響
IL-1 β 遺伝子発現: A; RT-PCR, B; Real-time PCR, C; IL-1b 発現の免疫組織化学

図5 IL-1β刺激 MH-7A 細胞の IL-8 発現

A: IL-8 産生に対する SL の影響 (ELISA 法), B: IL-8 遺伝子発現に対する SL の影響 (real-time PCR)

て炎症を抑制できることが示唆された。ついで CIA ラットの関節滑膜組織から mRNA を回収して GeneChip 解析を行った結果、リウマチ病態の主要因子である IL-1β の遺伝子発現が CIA 群で増大し、レーザー照射群で減少していた。次いで mRNA レベルを RT-PCR, real-time PCR 法で、タンパク質レベルでも免疫組織化学分析で証明された⁵⁾ (図4)。

2. 関節リウマチ滑膜細胞 MH-7A 実験

ヒト膝関節リウマチ滑膜細胞 MH-7A に IL-1β で刺激で、培養液中のケモカイン IL-8 の産生量が著明に上昇し、SL 照射およびステロイドホルモン (Dexamethasone; DEX) 投与によりタンパク質, mRNA レベルが低下した^{6,7)} (図5)。

従って、この細胞培養実験系は有用であると判断し、

MH-7A 細胞から mRNA を回収し、Affymetrix GeneChip を用いて遺伝子発現プロファイル解析した。さらに IPA システムを応用して機序解析を試みた。その結果、図6に示すように IL-1β 刺激は多数の遺伝子発現を誘導し、DEX の投与はさらに多数の遺伝子の発現を変動させた。これに対して SL 照射は比較的少数の遺伝子の発現を変動させ、炎症抑制に有用な遺伝子のみしか発現を変動させなかった。

ついで IL-1β 刺激系の Gene Chip 解析結果から IPA データベースを用いて情報伝達系のネットワーク解析を行った。その結果、図7に示すように、IL-1β 刺激は MH-7A 細胞に対して、キモカイン、炎症サイトカイン、炎症に関与する転写因子 NF-κB、アポトーシスに関与する情報伝達系の遺伝子発現を上昇させていることが明らかとなった。また、FGF13 遺伝子発現を上昇させて細胞増殖に関与することが示唆された。そして、IL-1β 刺激下の MH-7A 細胞への SL 照射、DEX 投与の Gene Chip 解析の結果を IPA システムで解析した結果の例を図7に示す。図7の左テーブルに示すように種々の情報伝達系が関与することが判明した。例えば、グルココルチコイドパスウェイでは 38 遺伝子の関与が存在した。

SL 照射、DEX 投与の遺伝子発現の結果を比較検討してみると、興味深いことに、炎症の促進に関与する IL-8、滑膜増殖に関与する FGF-13 遺伝子の発現は、SL 照射、DEX 共に遺伝子発現を抑制していた。しかし、炎症の促進に働くキモカイン Gro-α、炎症促進因子 PTX3 につい

図 7 IPA データベースの情報伝達系ネットワーク解析の結果

では、SL 照射は遺伝子発現を抑制するが、DEX は抑制できないことが明らかになった。

考 察

機能ゲノム科学研究は関節リウマチのレーザー治療に有用な分子を発見できるだけでなく、新規治療薬、治療法の開発に貢献できると期待される。また、IPA 解析の結果から、なぜ DEX の長期投与は副作用を起こし、レーザー照射には副作用がみられない謎を解く糸口になると考えられる。すなわちステロイドホルモンは多数の遺伝子の発現を、いわばでたらめに変動させ、一時的には抗炎症作用、疼痛軽減が期待できるものの、長時間経過後では副作用の原因となることが示唆された。これに対して、光照射群は抗炎症作用に合目的な遺伝子の発現のみを変動させることから、副作用が少ないことの裏付けになると考えられる。

文 献

- 1) Bijlsma JW, Van Everdingen AA, Huisman M, et al: Glucocorticoids in rheumatoid arthritis: effects on erosions and bone. *Ann N Y Acad Sci*, 966 : 82-90, 2002.
- 2) Marks R, de Palma F: Clinical efficacy of low power laser therapy in osteoarthritis. *Physiother Res Int*, 4 : 141-157, 1999.
- 3) Brosseau L, Welch V, Wells G, et al: Low level laser therapy for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a metaanalysis. *J Rheumatol*, 27 : 1961-1969, 2000.
- 4) 安孫子宜光: レーザー照射の生物学的効果の解明と機能ゲノム科学. *日本レーザー医学会誌*, 25 : 313-322, 2005.
- 5) Koitabashi T, Zhao J, Zhang' L, et al: Reduction of Interleukin-1 β Expression in Rheumatoid Arthritis Rat by Ga-Al-As (830 nm) Low Level Laser Irradiation. *Medicine and Biology*, 156(10), in press.
- 6) Shibata Y, Araki H, Oshitani T, et al: Effects of linear polarized infrared light irradiation on the transcriptional regulation of IL-8 expression in IL-1 β -stimulated human rheumatoid synoviocytes involves phosphorylation of the NF-kappaB RelA subunit. *J Photochem Photobiol B*, 94 : 164-170, 2009.
- 7) Shibata Y, Ogura N, Yamashiro K, et al: Anti-inflammatory effect of linear polarized infrared irradiation on interleukin-1 β -induced chemokine production in MH7A rheumatoid synovial cells. *Lasers Med Sci*, 20 : 109-113, 2005.