

200/0800

厚生科学研究費補助金
感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業

慢性関節リウマチの発症及び重篤な
合併症の早期診断に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

平成14年3月

主任研究者 江 口 勝 美

目次

| | |
|---|-------|
| 1. 構成員名簿 | 5 |
| 2. 総括研究報告書 | |
| 慢性関節リウマチの発症及び重篤な合併症の早期診断に関する研究 | |
| 江口勝美 | 9~17 |
| 3. 分担研究報告書 | |
| (1) 慢性関節リウマチのMRIによる早期診断、活動性および予後判定に関する研究 | |
| 上谷雅孝 | 21~24 |
| (2) 慢性関節リウマチの自己抗体による早期診断に関する研究 | |
| 三森経世 | 25~29 |
| (3) NKT細胞による慢性関節リウマチの早期診断・制御に関する研究 | |
| 住田孝之 | 30~33 |
| (4) 滑膜線維芽細胞の間葉系幹細胞への分化と脂肪分化に注目した病態への関与と 治療への応用に関する研究 | |
| 江口勝美 | 34~38 |
| (5) 慢性関節リウマチ (RA) 患者由来関節滑膜細胞の遺伝子発現プロファイルに関する研究 | |
| 岡本 尚 | 39~40 |
| (6) RA 遺伝子発現情報を基礎とした慢性関節リウマチ滑膜の病態の解析 | |
| 土屋尚之 | 41~48 |
| (7) 慢性関節リウマチの多因子遺伝に関わる疾患感受性遺伝子の同定 | |
| 塩澤俊一 | 49~52 |
| (8) RA の腎機能評価における血清 Cystatin C (CyC) の有用性の検討 | |
| 中野正明 | 53~56 |
| 4. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 59~66 |

1. 構成員名簿

平成 13 年度慢性関節リウマチの発症及び
重篤な合併症の早期診断に関する研究

班 員 名 簿

| 区 分 | 氏 名 | 所 属 施 設 名 | 職 名 |
|-------|------|-----------------------------------|-----|
| 主任研究者 | 江口勝美 | 長崎大学医学部分子統御医学講座 免疫内分泌代謝病態制御学分野 | 教 授 |
| 分担協力者 | 三森経世 | 京都大学大学院医学研究科 臨床免疫学講座 | 教 授 |
| | 住田孝之 | 筑波大学臨床医学系内科 | 教 授 |
| | 岡本 尚 | 名古屋市立大学医学部分子医学研究所 分子遺伝部門 | 教 授 |
| | 土屋尚之 | 東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学教室 | 助教授 |
| | 塩澤俊一 | 神戸大学医学部保健学科 膠原病学講座 | 教 授 |
| | 中野正明 | 新潟大学医学部保健学科 臨床生体情報学講座 | 教 授 |
| | 上谷雅孝 | 長崎大学医学部内臓機能医学講座 放射線診断治療学領域 | 助教授 |

2. 平成13年度総括研究報告書

(感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業)

主任研究者 江 口 勝 美

厚生科学研究費補助金
感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業
総括研究報告書

慢性関節リウマチの発症及び重篤な合併症の早期診断に関する研究

主任研究者 江口勝美

長崎大学医学部分子統御医学講座免疫内分泌代謝病態制御学分野 教授

研究要旨

慢性関節リウマチ (RA) 対策の21世紀の夢は、その病因を解明し、新たに RA が発症することを阻止することである。しかしながら、現時点では RA の発症を阻止することは不可能であり、いかにして早期に診断し、早期に治療することによって疾患の予後を改善するかが最重要課題である。また、RA は腎臓、肺など関節以外にも重篤な合併症を来す。これらの合併症を早期に予知・診断し、治療することによって進行を阻止することも予後や QOL の改善に大切である。このような観点から、RA の発症及び重篤な合併症の早期診断や対策の指針を作成することを目的として本研究を行った。画像的には両手の dynamic MRI を撮像し、dynamic curve を数値化した基準や functional image による視覚的に評価できる方法を確立した。今後、prospective study により RA の早期診断、炎症の活動性指標、関節の軟骨・骨破壊の予測についての有用性を検討する予定である。血清学的には RA 患者血清中に高い陽性率を示す自己抗体が検出されている。最近、注目されている抗フィラグリン抗体などを含めて RA に特異性の高い自己抗体を発見し、測定系を確立することが急がれる。自己免疫応答において、NKT 細胞もネガティブに制御する調節性 T 細胞として機能している。RA 患者末梢血では NKT 細胞が減少しており、NKT 細胞の機能異常のメカニズムが明らかになった。今後、RA の発症と NKT 細胞の減少との関わりが注目される。RA 関節局所において、滑膜細胞の著しい増殖が認められる。関節に存在する滑膜線維芽細胞は骨髄由来間葉系幹細胞と同様の培養条件で骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞へと分化誘導することが判明した。さらに、滑膜線維芽細胞を脂肪分化誘導によって、滑膜線維芽細胞から産生されるサイトカインやプロテアーゼが減少した。つまり、RA における滑膜増殖の一因として脂肪分化誘導が阻止され、増殖に向かわせていることが示唆され、これを調節している分子の解明が待たれる。RA の滑膜細胞では健常滑膜細胞に比べて PDGFR α 、PAI-1、SDF の遺伝子発現が増加し、実際に RA 滑膜細胞は PDGF による増殖促進効果の感受性が有意に増加して

いた。この結果は RA 滑膜細胞の異常増殖を表している。さらに RA 滑膜において、Id1、Id3の発現増強が確認され、免疫組織染色により血管内皮細胞に局在が観察された。また、fos ファミリーである FOSB 遺伝子は RA 滑膜で発現が増強していたことに加え、その splicing isoform である Δ FOSB の mRNA 相対的発現量が減少していた。これらの遺伝子が RA 滑膜における血管新生や増殖に関与する可能性が示唆された。RA の疾患感受性遺伝子座を第1染色体 DIS214/253、第8染色体 D8S556、X染色体 DXS1232/984の3箇所に同定した。第1染色体に位置する疾患遺伝子候補として細胞死に関わる DR3遺伝子の変異を、そしてX染色体に位置する疾患遺伝子として低分子量 G 蛋白に対する GEF 活性を有する Dbl プロトオンコジンの3'端欠損遺伝子を見出した。すなわち、細胞増殖あるいは細胞死に関わる分子が自己免疫疾患の遺伝素因を形作っていることが見出された。最後に、RA の腎機能評価における血清 Cystatin C (CyC) の有用性を検討した。CyC は Cr に比べて RA の腎機能低下を有意に感度よく検出し、有用な腎機能指標であることを明らかにした。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ (RA) は遺伝的要因に環境要因が複雑に絡み合って発症する疾患である。しかも両要因にはさまざまな因子が関与しており、未だその要因も解明されていない。21世紀の夢は、RA の病因を解明し、新たに RA が発症することを阻止することである。しかしながら、現時点では RA の発症を阻止することは不可能であり、いかに早期に診断し、早期に治療することによって疾患の予後を改善するかが最重要課題である。また、RA は腎臓、肺など関節以外にも重篤な合併症を来す。これらの合併症を早期に予知、あるいは診断・治療し、進行を阻止することも RA 患者の予後や QOL を改善するのに大変重要である。

RA の発症及び重篤な合併症の早期診断の指針を作成することを目的として、以下の項目について研究を行った。

I. RA の MRI による早期診断、活動

性及び予後判定に関する研究

II. RA の自己抗体による早期診断に関する研究

III. NKT 細胞による RA の早期診断・制御に関する研究

IV. 滑膜線維芽細胞の間葉系幹細胞への分化と脂肪分化に注目した病態への関与と治療への応用

V-1. RA 患者由来関節滑膜細胞の遺伝子発現プロフィールに関する研究

—cDNA array を用いての検討—

V-2. RA 遺伝子発現情報を基礎とした慢性関節リウマチ滑膜の病態の解析

VI. RA の多因子遺伝に関わる疾患感受性遺伝子の同定

VII. RA の腎機能評価における血清 Cystatin C (CyC) の有用性の検討、である。

B. 研究方法

I. RA の MRI による早期診断・活動性及び予後判定に関する研究。

dynamic MRI の造影剤増強効果を経

時的变化で示す dynamic curve の解析方法を確立し、早期診断及び炎症の活動性指標における有用性を検討した。MRI は四肢用のコイルを使用し、手関節に平行な2cm 厚の1スライスを設定し、造影剤投与直後から3秒おきの撮像 (fast-SPGR 法) を行った。滑膜のエンハンス効果がみられる部位に関心領域を設定し、その部位の dynamic curve について立ち上がりから60秒後の時点まで直線を引き、この直線と dynamic curve との間の面積 (positive enhancement integral-60; PEI-60) を計測した。さらに、この指標をもとにした functional image を作製した。

Ⅱ. RA の自己抗体による早期診断に関する研究。

HeLa 細胞由来 λ gt11-cDNA ライブラリーにより RA 患者血清が認識する自己抗原 cDNA クローンを分離し、このクローンより cDNA インサートをプラスミド DNA に組み換えて、塩基配列をシーケンシングし、塩基配列及び推定アミノ酸配列を遺伝子データベースとのホモロジーサーチによりコードされる蛋白分子を決定した。

Ⅲ. NKT 細胞による RA の早期診断・制御に関する研究。

RA 患者の末梢血リンパ球 (PBL) を対象として、5カラーを用いたフローサイトメトリーにより TCRAV24AJ18*BV11*DN の NKT 細胞を算定した。PBL を in vitro で α -galactosylceramide (α -GalCer) とともに培養し、NKT 細胞の増殖能を測定した。コラーゲンタイプⅡ誘導マウス (CIA) に α -GalCer を投与し、関

節炎に対する影響を検討した。

Ⅳ. 滑膜線維芽細胞の間葉系幹細胞への分化と脂肪分化に注目した病態への関与と治療への応用。

RA 滑膜線維芽培養細胞をトログリタゾン $10 \mu\text{M}$ 、 β -glycerophosphate 10mM 、TGF- β 3を含んだ培養液で3週間培養した。脂肪分化は oil red O 染色、骨芽細胞分化は von Kossa 染色、軟骨分化は Alcian blue 染色にて確認した。脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞へそれぞれ分化させ、培養上清中のサイトカイン (IL-6、IL-8)、メタロプロテアーゼ (MMP-3) を ELISA 法にて測定した。

V-1. RA 患者由来関節滑膜細胞の遺伝子発現プロファイルに関する研究。

—cDNA array を用いての検討—

関節滑膜細胞より mRNA を抽出し、 ^{32}P 標識 cDNA プローブを合成し、cDNA array にハイブリダイゼーションし、遺伝子発現プロファイルを解析した。発現量の増加していた遺伝子については real-time RT-PCR を用いて mRNA 量の定量を実施した。さらに、これらの結果を培養細胞系に戻してその生物学的意義を調べた。

V-2. RA 遺伝子発現情報を基礎とした RA 滑膜の病態の解析。

RA 及び変形性関節症 (OA) 滑膜から採取した RNA をテンプレートした differential display RT-PCR 法により、両者において発現レベルが有意に異なる遺伝子断片を同定し、塩基配列を決定し、遺伝子を同定した。また、BCMA (TNFRSF17) を候補遺伝子と考え、ゲノム DNA を用いて、PCR-

single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) 及び direct sequencing 法を用いて多型スクリーニングを行った。

V. RA の多因子遺伝に関わる疾患感受性遺伝子の同定。

マイクロサテライトマーカーを用いた家系解析を用いて疾患感受性遺伝子座を第1染色体 DIS214/253、第8染色体 D8S556、X染色体 DXS1232/984の3箇所に同定した。この結果を踏まえて、当該部位に位置する疾患感受性遺伝子として、第一染色体に位置する疾患遺伝子候補として細胞死に関わる Fas のファミリーである DR3 遺伝子の変異を、X染色体に位置する疾患遺伝子として低分子量 G 蛋白に対する GEF 活性を有する Dbl プロトオンコジーン の3'端欠損遺伝子を見出した。今回、①RA 患者におけるアポトーシス不全の頻度を求める、②変異 DR3 分子によるアポトーシス抑制機構を生化学的に確定する、③第8染色体に位置する疾患遺伝子を発見する、④X染色体に位置する疾患遺伝子 Dbl を確定する。

VI. RA の腎機能評価における血清 Cystatin C (CyC) の有用性の検討。

RA 患者血清の CyC をネフェロメトリー法で測定し、血清クレアチン (Cr) 値、24時間クレアチンクリアランス (Ccr) と対比した。

(倫理面への配慮)

MRI 撮像を行う被験者にはあらかじめ研究の目的を十分に説明し、インフォームド・コンセントを得た。滑膜や末梢血単核球の遺伝子発現プロファイル、疾患感受性遺伝子研究それぞれに

ついて、所属施設の倫理審査委員会の承認を受けて行われた。検体は匿名化され、個人情報と完全に切り離された形で研究に用いられた。

C. 研究結果

I. RA の MRI による早期診断、活動性及び予後判定に関する研究。

滑膜炎の部位における dynamic curve は急峻な立ち上がりを示し、12秒前後でプラトーに達した。PEI-60は、dynamic curve の立ち上がりとピークの高さに依存し、この値に基づく functional image を作成することで dynamic curve の傾向を視覚的に評価することが可能であった。

II. RA の自己抗体による早期診断。

RA 患者血清が認識する自己抗原としてカルパスタチン (CS) の他に、ubiquitin-conjugating enzyme (UBC-5)、cytokeratin (CK)-18、myc far upstream sequence element binding protein {myc FUSE-bp/DNAhelicase V (DH-V)}, γ -synergin がクローニングされた。RA における陽性率は、不明の蛋白 (17%)、抗 CS 抗体 (57%)、抗 CK-18抗体 (15%)、抗 myc FUSE-bp/DH-V 抗体 (13%)、抗 γ -synergin 抗体 (36%) であった。

III. NKT 細胞による RA の早期診断・制御に関する研究。

RA 末梢血 PBL において NKT 細胞は減少していた。 α -GalCer 刺激で応答群と不応答群の2群が存在した。不応答群では、NKT 細胞の機能異常が示唆された。さらに、不応答群では抗原提示能を抑制する C1d variants が存

在した。CIA では α -GalCer 投与により関節炎は増悪し、マウスの NKT 細胞 (TCRAV14AJ28I⁺細胞) は肝臓で有意に減少していた。

IV. 滑膜線維芽細胞の間葉系幹細胞への分化と脂肪分化に注目した病態への関与と治療への応用。

滑膜線維芽培養細胞は間葉系幹細胞と同様な方法で、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞などの間葉系細胞へ分化誘導することができた。骨芽細胞や脂肪細胞へと分化誘導した培養上清中において IL-6 産生は減少し、脂肪細胞へ分化誘導した培養上清中において IL-8 と MMP-3 の産生も減少した。

V-1. RA 患者由来関節滑膜細胞の遺伝子発現プロファイルに関する研究。

RA 滑膜細胞では IGFBP-5、PDGF receptor α (PDGFR α)、decorin、PAI-1、SDF1 の mRNA が増加していた。real-time detection RT-PCR 法を用いて mRNA の定量した結果、実際に増加が確認できたものは PDGFR α 、PAI-1、SDF1 のみであった。PDGFR α の発現は蛋白レベルでも亢進し、in vitro で PDGF に対する増殖応答が亢進していた。

V-2. RA 遺伝子発現情報を基礎とした RA 滑膜の病態の解析。

differential display (DD) の結果、RA において発現亢進が認められた遺伝子が 20 種検出された。データベース検索から、既知の遺伝子と一致したものの中で、Id ファミリー分子があり、RA において mRNA レベルで ID1 と ID3 が有意に増加していた。RA 滑膜組織に Id1、Id3 とともに血管内皮細胞に強

い染色が検出された。また、RA において FOSB 発現の上昇が見出され、FOSB に対する Δ FOSB の相対的発現量の低下が示唆された。BCMA の翻訳領域に 2 箇所、プロモータ領域に 2 箇所、3'UTR に 1 箇所の多型部位と、全体で 4 箇所の頻度の低い変異を検出した。多型部位の組み合わせにより、4 種の主要ハプロタイプを形成して存在することが見出された。しかし、RA 感受性との有意な関連は見出されなかった。

VI. RA の多因子遺伝に関わる疾患感受性遺伝子の同定。

RA の遺伝素因について、第 1 染色体 DIS214/253、第 8 染色体 D8S556、X 染色体 DXS1232 に疾患感受性遺伝子座 RA1、RA2、RA3 を同定した。第 1 染色体に位置する疾患遺伝子 (RA1) 候補として細胞死に関わる Fas ファミリーである DR3 遺伝子で、DR3 エキソンマップ上で nt564 (A-G); Asp159Gly、nt630+622 (del14)、nt631-538 (C→T)、nt631-391 (A→T)、nt631-243 (A-G) の SNP 4 箇所及び核酸欠損 1 箇所の連鎖不平衡を示す変異がみられた。この結果、転写が早期に終結し、細胞内 death domain を欠いた変異体を生成し、この DR3 変異体は正常 DR3 分子と三量体を形成し、ドミナントネガティブに DR3 機能を低下させた。DR3 変異体存在下に DR3 分子は TRADD 分子に結合せず、下流のシグナルが阻害された。変異は多発家系の RA で 6/60 (10%)、孤発 RA で 7/297 (2.36%)、健常対照者で 1/266 (0.38%) に存在し、変異遺伝子

は遺伝的に RA 家系に有意に保存、伝承されたものと考えられた。RA3 遺伝子は、Dbl3' 端近くの 223bp の第 23、24 エキソンスキッピングで、変異は家系 RA でヘテロ型 25%、ホモ型 25%、非家系 RA 例でヘテロ型 19.2%、ホモ型 21.2%、健常対照者でヘテロ型 15.2%、ホモ型 4.0% であった。さらに、DNA 上に nt2522+394 (C→T)、nt2632+106 (T→G)、nt2632+211 (A→C)、nt2745+576 (G→A) の SNP が RA に有意に集積して見出された。変異体は支配下に G 蛋白 cdc42 に対する GEF 活性に欠損があり、Rac をはじめ低分子量 G 蛋白の支配下にある NADPH オキシダーゼの活性化にも欠損が見出され、欠損型の個人は十分量の活性酸素を生成できなかった。

VII. RA の腎機能評価における血清 Cystatin C (CyC) の有用性の検討。

CyC、Ccr、Cr の異常はそれぞれ RA 患者 126 例中 87 例、81 例、41 例に認められた。Cr と CyC の相関性は高く、Ccr との相関は Cr より CyC が高かった。

D. 考察

慢性関節リウマチの発症及び重篤な合併症の早期診断の指針を作成することを目的として研究を行った。

I. RA の MRI による早期診断、活動性及び予後判定に関する研究。

dynamic MRI は炎症性滑膜の血流を反映すると考えられる。四肢用局所コイルを利用することで十分な広い撮像視野で手根部から指先端まで良好な画像を得ることができた。両手を同時に撮像することが可能であることがわか

ったので、今後は両手撮像による検討を行う予定である。これを踏まえて、PEI-60 の結果と関節炎の鑑別、関節の軟骨・骨破壊の進行予測判定、薬剤効果判定への有用性について検討予定である。

II. RA の自己抗体による早期診断に関する研究。

CS 以外にも RA 患者血清が認識する自己抗原が多数見出された。これらの自己抗原と最近注目されている Filaggrin に対する抗体の定量的検出法を確立し、早期 RA における感度、特異度、有用度を明らかにする計画である。

III. NKT 細胞による RA の早期診断・制御に関する研究。

RA において NKT 細胞が減少していることから、RA の早期診断として NKT 細胞の測定が有用であると考えられる。疾患活動性と NKT 細胞量との関係や疾患特異性などが今後の課題である。NKT 細胞が RA で減少しているメカニズムとして、1) in vivo での抗原量の不足、2) NKT 細胞自身の機能異常、3) 抗原提示能力の低下、が明らかになった。これらの原因を改善する戦略により、RA の制御が可能となることが期待される。

IV. 滑膜線維芽細胞の間葉系幹細胞への分化と脂肪分化に注目した病態への関与と治療への応用。

滑膜線維芽細胞の中には骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞などの間葉系細胞に分化する能力を有する未分化な細胞が含まれると考えられた。一方、滑膜線維芽細胞を脂肪細胞へ分化誘導させる

ことで、炎症性サイトカインやプロテアーゼの産生を抑制できることを示した。早期 RA において滑膜線維芽細胞を脂肪細胞へと分化誘導することで、炎症関節での滑膜線維芽細胞による高サイトカイン、高プロテアーゼの環境を未然に防ぎ、RA の進行を防ぐことができるのではないかと考えられた。

V-1. RA 患者由来関節滑膜細胞の遺伝子発現プロファイルに関する研究。

RA 滑膜細胞で PDGF に対する増殖応答が亢進していることがわかった。ケモカインである SDF1 の産生が亢進していることとあわせて、正常の滑膜細胞とは明らかに異なる性質を獲得していることが明白になった。今後は、さらに多数の遺伝子を対象とした DNA array 解析を進めていくことにより、RA の病態形成課程が明らかになり、早期診断に結びつくことが期待される。

V-2. RA 遺伝子発現情報を基礎とした慢性関節リウマチの病態の解析。

RA 滑膜における Id ファミリー分子の発現を見出したのは初めてである。血管内皮細胞に強い発現が検出されたことから、本分子が RA における血管新生に何らかの役割を果たすこと、本分子の発現あるいは活性の制御により RA の血管新生を制御しうる可能性が示唆された。また、FOSB 遺伝子は RA 滑膜組織で発現が増強していることに加えて、その splicing isoform である Δ FOSB mRNA の相対的発現量が減少していた。この結果から、FOSB 遺伝子が RA 滑膜増殖の制御に関与している可能性が示唆された。さ

らに、 Δ FOSB の強制発現が将来的に治療となりうる可能性が示唆された。

VI. RA の多因子遺伝に関わる疾患感受性遺伝子の同定。

本研究はマイクロサテライトマーカーによる遺伝子座の位置決めを踏まえて、実際に疾患遺伝子座を同定したのは世界的に初めてである。疾患遺伝子である DR3 異常はマウスで明らかにされた Fas 遺伝子異常に匹敵するものである。アポトーシス異常が RA の発症病因に重要な役割を果たしていることを示唆している。他の第8及びX染色体の疾患遺伝子もその作用は従来炎症で云々された既知のものと違ふと予想されるが、今後、新たな病態生理機構が解明されてくるものと期待される。

VII. RA の腎機能評価における血清 Cystatin C (CyC) の有用性の検討。

血清 Cr が RA 患者の腎機能評価に適さないことが改めて確認された。一方、CyC の腎機能低下に対する感度は95%と極めて高く、CyC が RA の腎機能低下を感度よく検出することが確認された。免疫抑制薬であるメトトレキサートなどの使用に際して、腎機能に応じた用量調節が必要である。そのような場合、Cr では腎機能の詳細な評価ができず、投与量の過剰による重篤な副作用の危険性があるが、今後 CyC による的確な評価が可能となれば、このような問題も少なくなるものと期待される。

E. 結論

RA の発症及び重篤な合併症の早期

診断に関する知見として以下の点が明らかになった。

RA の手関節における造影剤投与後の dynamic study の方法と評価法を検討した。dynamic curve は数値化した基準や functional image による視覚的評価が可能で、滑膜炎の活動性評価における有用性が期待できた。今後は臨床症例を増やし、早期診断、活動性判定及び予後判定における有用性を検討する。RA 患者で高い陽性率を示す5つの自己抗体が検出されたが、他の自己免疫疾患でも検出された。今後、これらの自己抗体の早期 RA における意義が注目された。

自己免疫応答を制御する NKT 細胞は、RA の末梢血において著明に減少しており、RA の早期診断に有用であろう。NKT 細胞を増加させる RA の治療戦略が今後期待される。滑膜線維芽細胞を脂肪細胞へ分化誘導により、滑膜線維芽細胞からのサイトカインやプロテアーゼの産生を抑制できることを明らかにした。早期 RA において滑膜線維芽細胞の増殖開始時期をとらえ、滑膜線維芽細胞を脂肪細胞へと分化誘導することで、炎症関節での滑膜線維芽細胞による高サイトカインや高プロテアーゼの環境を未然に防ぎ、RA の進行を防ぐことができると期待された。

RA 滑膜細胞では PDGFR α の発現亢進がみられ、実際に PDGF に対する免疫応答が亢進していた。ケモカインである SDF1 の産生亢進が選択的に亢進していることと合わせて、RA 滑膜細胞は正常細胞とは異なる性質を獲

得していることが明らかになった。RA 滑膜血管内皮細胞における Id ファミリー分子の発現亢進を初めて検出した。また、RA 滑膜組織における FOSB 遺伝子の発現亢進と、その splicing isoform である Δ FOSB の相対的な発現低下を検出した。BCMA 遺伝子に多数のゲノム DNA 多型を検出したが、RA 感受性との関連は見出されなかった。

RA の疾患遺伝子として第1染色体上の DR3 遺伝子の変異を、X 染色体上の Dbl プロトオンコジーンの変異をそれぞれ発見した。すなわち、細胞増殖あるいは細胞死に関わる分子が自己免疫疾患の遺伝的素因を形作っていることが見出された。

最後に、Cr、CyC の Ccr 低下に対する感度は各々51%、95%であり、同じく特異度は各々100%、76%であった。すなわち、CyC は Cr に比べて RA の腎機能障害を有意に感度よく検出し、有用な腎機能の指標と思われた。

F. 健康危険情報

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

- 1) 出願番号：特願平09-125899号 発明の名称：慢性関節リウマチの疾患遺伝子と慢性関節リウマチの診断方法
- 2) 出願番号：特願平10-031840号 発明の名称：慢性関節リウマチの疾患遺伝子、慢性関節リウマチの診断方法および慢性関節リウマチの原因因子

の決定方法

- 3) 出願番号：PCT/JP98/01665(NT-2)
発明の名称：慢性関節リウマチの疾患遺伝子、慢性関節リウマチの診断方法および慢性関節リウマチの原因因子の決定方法
 - 4) 出願番号：特願平11-116933号 発明
の名称：慢性関節リウマチの疾患遺伝子と慢性関節リウマチの診断方法
 - 5) 出願番号：PCT/JP00/01697(NT-3)
発明の名称：慢性関節リウマチの疾患遺伝子と慢性関節リウマチの診断方法
 - 6) 出願番号：特願平11-310805号 発明
の名称：慢性関節リウマチの診断方法
 - 7) 出願番号：特願平11-323323号 発明
の名称：慢性関節リウマチの診断方法および慢性関節リウマチの治療法
 - 8) 出願番号：特願2000-324296号 発明
の名称：慢性関節リウマチに關与するゲノム、その診断方法、その発症可能性の判定法およびそれらの検出用の診断キット
 - 9) 出願番号：PCT/JP00/07690(NT-4)
発明の名称：慢性関節リウマチの診断方法
 - 10) 出願番号：CT/JP00/07827(TOK-10)
発明の名称：慢性関節リウマチの診断方法および慢性関節リウマチの治療法
2. 実用新案登録
該当なし
 3. その他
該当なし

3. 平成13年度分担研究報告書

(感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業)

慢性関節リウマチのMRIによる早期診断、活動性および 予後判定に関する研究

分担研究者 上 谷 雅 孝

長崎大学医学部内臓機能医学講座放射線診断治療学領域 助教授

研究要旨

本研究の目的は dynamic MRI による造影剤増強効果の経時的変化を示す dynamic curve の解析の方法を確立し、RA の早期診断、炎症の活動指標、予後判定における有用性を検討することである。Dynamic curve は数値化した基準や functional image による視覚的評価が可能で、滑膜炎の活動性評価における有用性が期待できる。RA でもっとも侵されやすい手関節病変における滑膜炎を評価するひとつの基準になりうると考えられた。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ (RA) およびその関連疾患において、滑膜炎に伴う滑膜増殖は骨・関節破壊をきたす重要な因子である。最近の研究では造影 MRI により滑膜増殖が明瞭に描出されることがわかり、早期診断における MRI の有用性が注目されている。また造影効果の程度あるいは範囲が病変の活動性の指標となることがわかってきた。我々は、RA の手関節における脂肪抑制併用造影 MRI を行い、滑膜の造影剤増強効果のスコア化によって病変の活動性評価に有用であることを明らかにしてきたが、スコア化は客観性に欠けるといふ欠点がある。他の方法として滑膜の造影効果の容積を算出する試みがあるが、造影された範囲を抽出する方法が煩雑で、実用的ではない。最近の研究では、滑膜の造影効果の経時的変化をみる dynamic study が滑膜の血流を反映しており、炎症の活動性をより敏感に反映すると報告されている。本研究の目的は dynamic MRI による造影剤増強効果の経時的変化を示す dynamic curve の解析の方法

を確立し、RA の早期診断、炎症の活動指標、さらに予後判定における有用性を検討することである。

B. 研究方法

RA の診断が確定し、手関節の少なくとも1関節に症状のあるものを対象にした。MRI は、四肢用のコイルを使用し、手関節に平行な2cm 厚の1スライスを設定し、造影剤投与直後から3秒おきの撮像 (fast-SPGR 法) を行った。滑膜のエンハンス効果がみられる部位に関心領域を設定し、その部位の dynamic curve について立ち上がりから60秒後の時点まで直線を引き、この直線と dynamic study curve との間の面積 (positive enhancement integral) を計測した (これを PEI-60とする) (図1)。さらにこの指標をもとにした functional image を作製した (図2)。

(倫理面の配慮)

被検者には、あらかじめこの研究の目的を十分に説明し、インフォームドコンセントを得た。検査にかかる費用は研究費で負担した。

C. 研究結果

滑膜炎の部位における Dynamic curve は急峻な立ち上がりを示し、12秒前後でプラトー形成を示した。PEI-60は、dynamic curve の立ち上がりとピークの高さに依存し、この値に基づく functional image を作成することで、dynamic curve の傾向を視覚的に評価することが可能であった(図2)。

D. 考察

今回の研究では炎症性滑膜の容積や範囲ではなく、炎症性滑膜の血流を反映すると考えられる dynamic MRI を試みた。手関節の dynamic MRI による RA の活動性評価に関しては、我々の検索した限りでは報告されていない。従来報告では膝関節における dynamic study が行われているが、撮像間隔が30秒以上と長く、我々が得たような急峻な立ち上がりとプラトー形成をもつ dynamic curve は得られていない。滑膜血流をより正確に反映した dynamic curve を得るためには、少なくとも6秒間隔で撮像を行う必要があると考えられた。

手関節は RA において初期から滑膜炎が出現する部位で、手関節の滑膜炎の活動性の評価は特に初期 RA の活動性や薬剤効果判定に有用と考えられる。ただし、手関節という小さくて末梢に位置している関節は良好な MR 画像を得ることが難しい部位であり、dynamic MRI を行う前にこの技術的問題を解決する必要があった。我々は四肢用の局所コイルを利用することで、十分な広い撮像視野で手根部から指先端まで良好な画像を得ることができた。RA の患者は両側の手関節に症状を有することが多く、理想的には両側の手関節を撮像できることが望ましい。今回は症状の強い片側だけに限定して MRI を行

ったが、最近両手を同時に撮像することが可能であることがわかったので、今後は両手撮像による検討を行う予定である。

E. 結論

RA の手関節における造影剤投与後の dynamic study の方法と評価法を検討した。Dynamic curve は数値化した基準や functional image による視覚的評価が可能で、滑膜炎の活動性評価における有用性が期待できる。多発性関節炎である RA を手関節だけで判定する点に問題が残るが、RA でもっとも侵されやすい手関節病変における滑膜炎を評価するひとつの基準になりうると考えられた。今後は臨床症例を増やし、早期診断、活動性判定および予後判定における有用性を具体的に検討する。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawahara Y, Uetani M, Fuchi K, Eguchi H, Hashmi R, Hayashi K. MR assessment of meniscal movement during knee flexion: correlation with the severity of cartilage abnormality in the femorotibial joint. J Comput Assist Tomogr 25: 683-690, 2001.
- 2) Uetani M. MR imaging of cartilage lesions of the knee: what is the clinical indication? (radiologist's view). Semin Musculoskelet Radiol 5: 147-149, 2001.
- 3) Ito M, Nishida A, Uetani M, Hayashi K. Osteoporosis in the Japanese population. Semin Musculoskelet Radiol 5: 121-126, 2001.

- 4) 上谷雅孝, 川原康弘, 林 邦昭. 特集 : 関節炎の画像診断, その他の関節炎. 画像診断 18: 304-312, 2002.
- 5) 上谷雅孝, 川原康弘, 林 邦昭. 特集 : 骨軟部腫瘍の画像診断」血腫, ヘモグロビン沈着や液面形成を伴う病変. 画像診断 22: 277-283, 2002.
- 6) 川原康弘, 上谷雅孝, 林 邦昭. 特集 : 骨軟部腫瘍の画像診断」嚢胞性病変. 画像診断 22: 293-300, 2002.
- 7) 上谷雅孝. 足, 足関節. 骨軟部 CT・MRI 診断のキーワード137 (江原茂編). メディカルビュー社 244-261, 2001.
- 8) 麻生 暢哉, 上谷 雅孝, 林 邦昭. CT・MRI アトラス, 正常解剖と読影のポイント, 肩関節. Medicina 38: 354-359, 2001.
- 9) 上谷雅孝, 川原康弘, 林 邦昭. 特集 : 骨軟部組織の外傷, 診断の進め方」手関節, 手の外傷. 画像診断 21: 281-290, 2001.

2. 学会発表

- 1) 上谷雅孝 : リウマチ性疾患の画像診断. 熊本関節リウマチ研究会. 熊本. 2001.10.20.
- 2) 上谷雅孝 : 早期関節リウマチにおける画像診断. 自己免疫疾患研究会. 佐世保. 2001.10.6.
- 3) 上谷雅孝 : 筋疾患のMRI. 骨軟部放射線診断セミナー. 高崎. 2001.8.17.
- 4) 上谷雅孝 : 骨軟部腫瘍の画像診断. 専門医会主催ミッドサマーセミナー. 東京. 2001.7.28.
- 5) 川原康弘, 上谷雅孝, 林 邦昭 他 : 肩関節唇損傷の診断における MR arthrographyの有用性. 第60回日本医学放射線学会. 神戸. 2001.4.4.
- 6) 山口哲治, 川原康弘, 上谷雅孝, 林 邦昭 : 股関節周囲の石灰沈着性腱炎/滑液包炎の画像所見. 第13回 骨軟部

放射線研究会. 広島. 2002.1.25.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

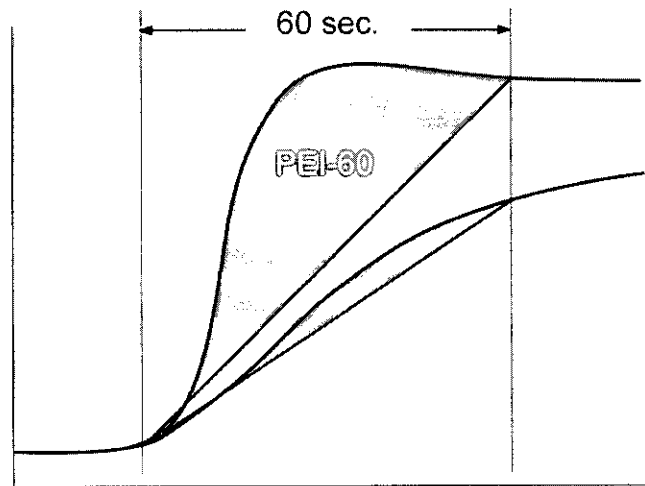


図1 : Dynamic curve における positive enhancement integral-60 (PEI-60) の設定

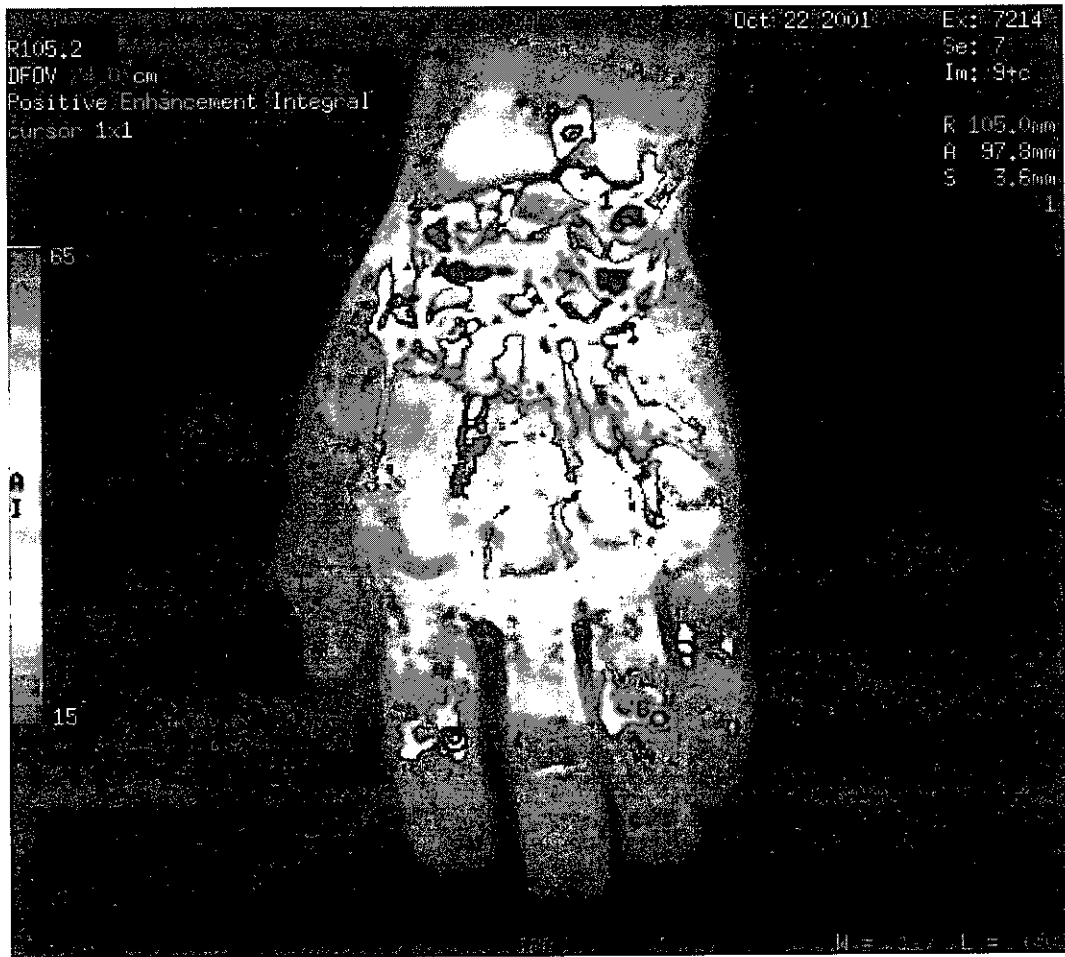


図2 : PEI-60に基づく functional image の作成 (実際はカラー表示になる)

慢性関節リウマチの自己抗体による早期診断に関する研究

分担研究者 三 森 経 世
京都大学大学院医学研究科臨床免疫学講座 教授

研究要旨

慢性関節リウマチ (RA) 患者血清が認識する自己抗原遺伝子をクローニングし、RA および他のリウマチ疾患における自己抗体陽性率を検討した。RA 患者血清が認識する自己抗原としてカルパスタチン (CS)、ubiquitin-conjugating enzyme (UBC-5)、cytokeratin (CK)-18、myc far upstream sequence element binding protein (myc FUSE-BP、または DNA helicase V (DH-V))、 γ -synergin がクローニングされた。これら自己抗原の大腸菌発現産物に対する患者血清の反応性を免疫ブロット法で検索したところ、RA における各自己抗体陽性率は、未同定蛋白 (RA-2) に対する抗体17%、抗 CS 抗体57%、抗 CK-18抗体15%、抗 myc FUSE-BP/DH-V 抗体13%、抗 γ -synergin 抗体36%であり、これらはいずれも RA 以外でも検出されたが、RA-2を除き RA での陽性率が最も高かった。また、かかる自己抗体の定量的検出法の開発のため、リコンビナントヒト CS の発現と精製を試み、構造と生理活性が保たれた全長 CS の精製に成功した。

A. 研究目的

我々はこれまでにカルパイン (カルシウム依存性システインプロテアーゼ) の特異的阻害蛋白であるカルパスタチン (calpastatin: CS) に対する自己抗体が慢性関節リウマチ (RA) をはじめとするリウマチ疾患に検出されることを報告してきた。カルパインは軟骨破壊や炎症の惹起に関与する中性プロテアーゼの一種と考えられるため、その阻害蛋白である CS に対する自己抗体の存在は RA の病態に関与する可能性が示唆されている。事実、RA 患者の滑膜や関節液中にはカルパインが増加しているとの報告もある。我々は、これまでに RA 患者血清とともに関節液中に CS に対する自己抗体が検出されること、かかる抗 CS 抗体が *in vitro* で CS 活性を抑制してカルパインの蛋白分解活性を亢進させること、RA の実験モデルであるコラーゲン感作ラット関節炎がカルパイン阻

害剤であるカルペプチンによって抑制されること、カルパインが破骨細胞の活性に重要な役割を果たすことを報告してきた。また、CS のクローニングの過程で RA 患者抗体が認識する多くの自己抗原が同定された。そこで本研究では、かかる新たな RA 自己抗体の検出法を確立し、RA の早期診断における有用性を追求することを目的とした。

B. 研究方法

1. 自己抗原cDNAのクローニング

HeLa 細胞抽出物を抗原とする免疫ブロット法で 75kDa、60kDa および 45kDa の蛋白成分は RA 患者血清により特異的に反応すると考えられた。そこでかかる蛋白成分と強く反応した RA 患者血清5例の混合血清をクローニングのプロープに用いた。HeLa 細胞由来 λ gt11-cDNA ライブラリー (Clontech 社) より RA 患者血清が