

ようにデザインされたプラスミドを HEK293 細胞に遺伝子導入し、抗 flag 抗体カラムで精製し作製した。RA および変形性関節症(OA) 患者の膝関節置換術または関節鏡視下手術時に滑膜組織を採取した。滑膜組織の採取にあたっては、手術患者に切除した滑膜組織を本研究に使用することを説明し同意を得た。滑膜組織での mRNA 発現は RT-PCR にて、蛋白の局在は免疫染色法にて、蛋白発現の確認はウエスタンブロット法にて行なった。培養上清中のサイトカインは ELISA 法にて測定した。滑膜組織中の CD14 陽性細胞は、滑膜組織を酵素処理して得られた滑膜細胞を 3-5 日間無刺激培養後、抗 CD14 抗体標識磁気ビーズにて分離・濃縮した。これらの細胞をマクロファージ様滑膜細胞として使用した。

### C.研究結果

(1)RA 滑膜組織における LIGHT、HVEM および LT $\beta$ R mRNA の発現。RA 滑膜組織では 6 例中 6 例が LIGHT mRNA を、5 例が HVEM mRNA を、3 例が LT $\beta$ R mRNA を発現していた。(2)RA および OA 滑膜組織における LIGHT および受容体の局在。LIGHT は RA 滑膜組織内血管周囲浸潤 T 細胞に強く発現していたが、OA 滑膜組織では LIGHT の発現は認められなかった。HVEM は RA 滑膜表層細胞に強く発現していたが、表層下層には有意な発現はなかった。また、OA 滑膜組織では HVEM の発現を認めなかった。LT $\beta$ R は RA、OA ともに発現を認められなかった。(3) RA および OA 滑膜組織における LIGHT および HVEM の蛋白レベルでの発現 (図 1)。RA 滑膜組織ではウエスタンブロットにより LIGHT および HVEM の強い発現を認めたが、OA 滑膜組織ではいずれの蛋白質の発現も RA に比較して弱かった。LT $\beta$ R の発現は RA、OA 共に認められなかった。(4)rsLIGHT のマクロファージ様滑膜細胞に対する作用 (図 2)。磁気ビーズにて分離・濃縮した CD14 陽性滑膜細胞 (マクロファージ様滑膜細胞) を rsLIGHT  $\pm$  interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )にて 48 時間

刺激し、上清中の TNF- $\alpha$ および IL-12 を測定した。細胞表面に結合した rsLIGHT を架橋するため、rsLIGHT と共に抗 flag 抗体を使用した。rsLIGHT は単独で TNF- $\alpha$ の産生を誘導し、IFN- $\gamma$ との共刺激によりさらに強い TNF- $\alpha$ 産生誘導を認めた。IL-12 は rsLIGHT + IFN- $\gamma$ 刺激時にのみ誘導された。

### D.考察

RA 滑膜組織に T 細胞の著明な浸潤が認められることは古くから知られているが、その機能は明らかにされていない。今回の研究および我々の以前の CD154 に関する報告から、RA 滑膜浸潤 T 細胞が、細胞表面分子あるいはその可溶性分子を介してマクロファージ様滑膜細胞を刺激し炎症性サイトカインを誘導し、RA の病態形成に寄与することが示唆された。LIGHT は樹状細胞などの抗原提示細胞発現され、T 細胞の増殖および活性化に関与することが報告されているが、T 細胞上に発現した LIGHT の機能についてはいまだ報告が少ない。CD154 の研究結果と併せて、抗原特異的 T 細胞は抗原提示細胞から情報を受け取るのみならず、T 抗原提示細胞を活性化する複数の手段を有することが明かとなった。細胞は活性化に伴いさまざまな表面分子を発現するので、RA 滑膜組織内では CD154 や LIGHT 以外の分子でこれらの分子と類似の働きをし、相加相乗的に作用している未知の分子の関与も予想される。かかる分子病態の解明が RA における新たな治療標的の同定につながると考えられる。In vivo における LIGHT の関節炎への関与に関しては、関節炎モデルに可溶性 HVEM-Fc を投与し、治療効果を検討する予定である。

### E..結論

RA 滑膜組織では LIGHT および HVEM が過剰発現し、滑膜浸潤 T 細胞/マクロファージ様滑膜細胞間相互作用によるサイトカインの過剰産生を介して病態形成に寄与している。

## **F.健康危険情報**

特記事項なし。

## **G.研究発表**

### **1.論文発表**

・針谷正祥、中川美紀：新規 TNF ファミリー分子 LIGHT と慢性関節リウマチ. 最新医学. 印刷中

### **2.学会発表**

・ T 細胞副刺激分子 LIGHT およびその受容体の慢性関節リウマチ(RA)滑膜組織における発現と役割. 日本免疫学会総会・学術集会記録. 31:55. 2001

・ Expression and function of LIGHT, a co-stimulatory molecule for T cell, and its receptors in synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. The 7th international workshop on autoantibodies and autoimmunity. program/abstract :12, 2001

## **H.知的財産権の出願登録**

なし。

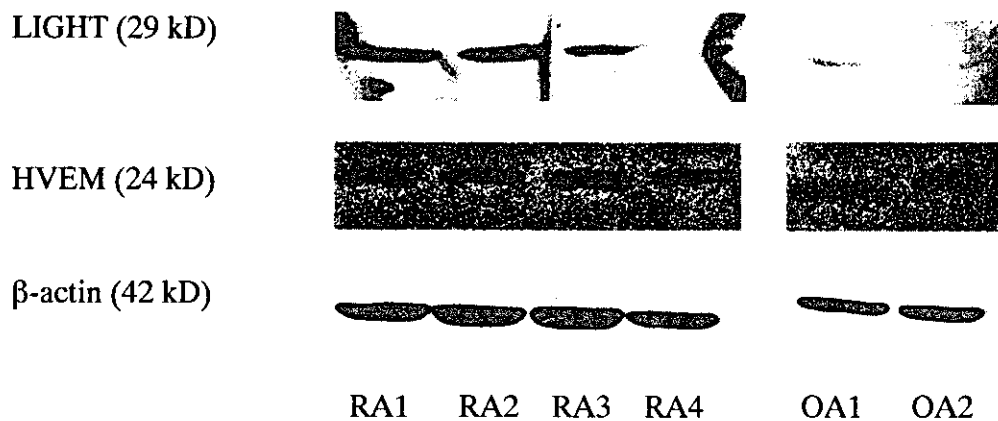


図1 RA および OA 滑膜組織における LIGHT および HVEM の発現 (Western blotting)  
 RA および OA 滑膜組織由来蛋白抽出液を SDS-PAGE にて分離後、ニトロセルロース膜に転写し、それぞれの分子の特異抗体で染色した。RA では LIGHT および HVEM の発現が OA に比較して亢進していた。 $\beta$ -actin はコントロールとして使用した。

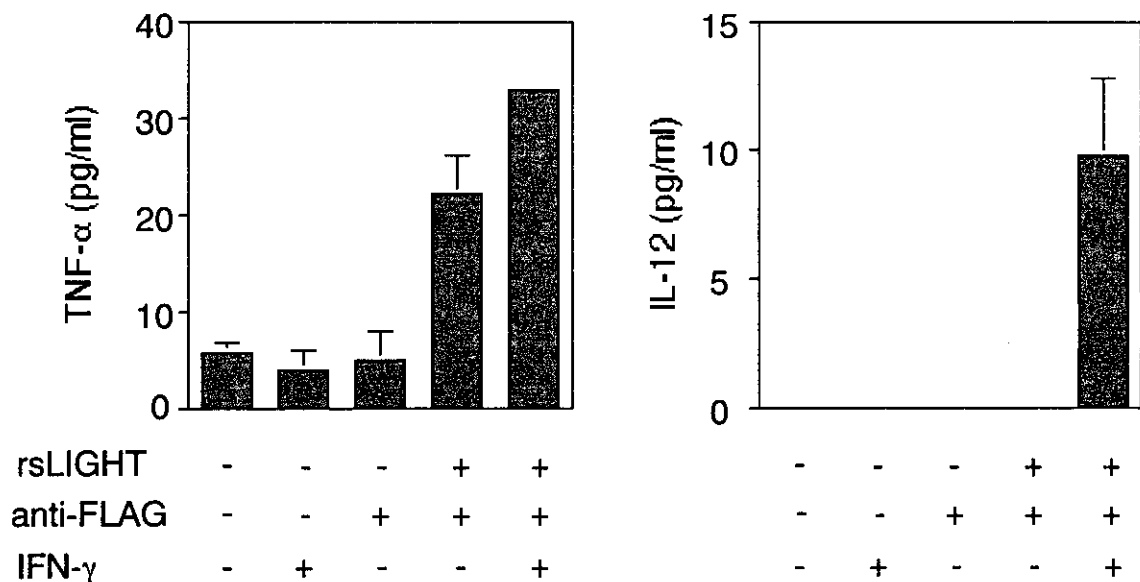


図2 RA 患者由来マクロファージ様滑膜細胞に対するリコンビナント可溶性 LIGHT (rsLIGHT) の効果

RA 患者由来マクロファージ様滑膜細胞を rsLIGHT+抗 flag 抗体で刺激すると TNF- $\alpha$  産生が誘導された。IFN- $\gamma$  の共刺激により、TNF- $\alpha$  産生はさらに増加し、IL-12 産生も誘導された。

慢性関節リウマチの滑膜組織における NF- $\kappa$ B の役割  
—治療の標的として転写因子 NF- $\kappa$ B を考える—

分担研究者 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 教授

研究要旨

慢性関節リウマチ (RA) 滑膜細胞の核に転写因子 NF- $\kappa$ B が強く発現しており、活性化していることが示唆された。NF- $\kappa$ B 活性化阻害剤により滑膜細胞のカスパーゼを介したアポトーシスが著明に増強し、TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  刺激のみでは滑膜細胞のアポトーシスが NF- $\kappa$ B 阻害剤により高率に誘導できた。グルココルチコイド (GC) は GC がグルココルチコイド受容体 (GR) と結合し、核内移行し、NF- $\kappa$ B と結合し、NF- $\kappa$ B が遺伝子プロモーターに結合するのを阻止することや、GR を介して I $\kappa$ B を産生し、これが NF- $\kappa$ B の活性化を阻害した。タクロリムス (FK506) は、GR の核内移行を阻止したり、炎症刺激による NF- $\kappa$ B の核内移行を GC と相加的に阻止することが明らかになった。

A. 研究目的

RA 滑膜組織では浸潤した単核球と滑膜細胞は互いに活性化し、炎症性サイトカイン、増殖因子、ケモカイン、ケミカルメディエーターを多量に産生し、炎症を増巾している。NF- $\kappa$ B はこれらや接着分子を制御する転写因子であり、最近では細胞の生と死 (アポトーシス) とのシグナルのクロストークに重要な役割を果たしていることが明らかにされている。今回、①RA 滑膜組織における NF- $\kappa$ B と培養滑膜細胞アポトーシスに対する NF- $\kappa$ B の作用、②免疫抑制剤 [グルココルチコイド (GC) とタクロリムス (FK506)] の NF- $\kappa$ B を介しての炎症抑制機構について検討した。

B. 研究方法

1. RA 滑膜組織の NF- $\kappa$ B 発現と NF- $\kappa$ B 活性化阻害による滑膜細胞のアポトーシスについての検討  
NF- $\kappa$ B 活性化はプロテアゾーム阻害剤 (LLL-CHO) で抑制し、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及び抗 Fas IgM 抗体添加によるアポトーシス感受性を評価した。

2. FK506 による RA 滑膜細胞における GC の抗炎症作用の増強作用についての検討  
IL-1 $\beta$  刺激滑膜細胞の COX-2mRNA と蛋白の発現は RT-PCR とウェスタンブロットで、NF- $\kappa$ B の活性化は electrophoretic mobility shift assay で検出した。

C. 研究結果

1. RA 滑膜組織における NF- $\kappa$ B 発現と NF- $\kappa$ B 活性化抑制による培養滑膜細胞のアポトーシス亢進
  - ①RA 患者の滑膜組織では、PCNA 陽性滑膜細胞を多数、TUNEL 陽性細胞も少数検出、滑膜細胞の核に NF- $\kappa$ B が発現していた (図 1)。
  - ②TNF- $\alpha$  と IL-1 $\beta$  は、培養滑膜細胞の NF- $\kappa$ B の核内移行を増強し、NF- $\kappa$ B 阻害剤はこれを抑制し (図 2)、カスパーゼ 3 活性化とアポトーシスを誘導した (図 3)。
  - ③NF- $\kappa$ B 阻害剤は、IL-1 $\beta$  と抗 Fas IgM 処理滑膜細胞では IAP の発現

を低下させた。

2. FK506 は RA 滑膜細胞における GC の抗炎症作用を増強する
  - ①IL-1 $\beta$  は滑膜細胞を刺激して、COX-2 mRNA と蛋白発現を増強した。
  - ②DEX は IL-1 $\beta$  刺激 COX-2 蛋白発現を抑制した。FK506 はこの抑制をさらに増強した。
  - ③FK506 は低濃度 DEX による GR の核内移行を促進した (図 4)。
  - ④DEX は IL-1 $\beta$  刺激滑膜細胞の NF- $\kappa$ B 核内移行を抑制し、FK506 はこの抑制をさらに増強した (図 5)。

#### D. 考察

RA 滑膜細胞には NF- $\kappa$ B の活性化がみられた。NF- $\kappa$ B 活性化阻害剤により滑膜細胞のカスパーゼを介したアポトーシスが著明に増強し、TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  刺激のみでは誘導されない滑膜細胞のアポトーシスが NF- $\kappa$ B 阻害剤により高率に誘導できた。IL-1 $\beta$  や Fas 依存性アポトーシスにおいては、あらかじめ NF- $\kappa$ B 活性化を阻害することで IAP が低下し、カスパーゼの活性化を惹起し、アポトーシスが亢進すると考えられた。

滑膜細胞における IL-1 $\beta$  刺激 COX-2 の発現は NF- $\kappa$ B を介している。GC は GR が核内移行し、NF- $\kappa$ B と結合し、NF- $\kappa$ B が遺伝子プロモーターに結合するのを阻止することや、GR を介して I $\kappa$ B を産生し、これが NF- $\kappa$ B の活性化を阻害する。FK506 は GR の核内移行を阻止したり、炎症刺激による NF- $\kappa$ B の核内移行を GC と相加的に阻止すると考えられる。

#### E. 結論

NF- $\kappa$ B は RA 滑膜細胞に強く発現しているが、この活性化を阻止することで、滑膜細胞を効率よくアポトーシスへ誘導できる。NF- $\kappa$ B 活性化抑制は GC でみられるが、タクロリムスは GC による NF- $\kappa$ B 活性化抑制をさらに増強することができる。

#### F. 健康危険情報

該当なし

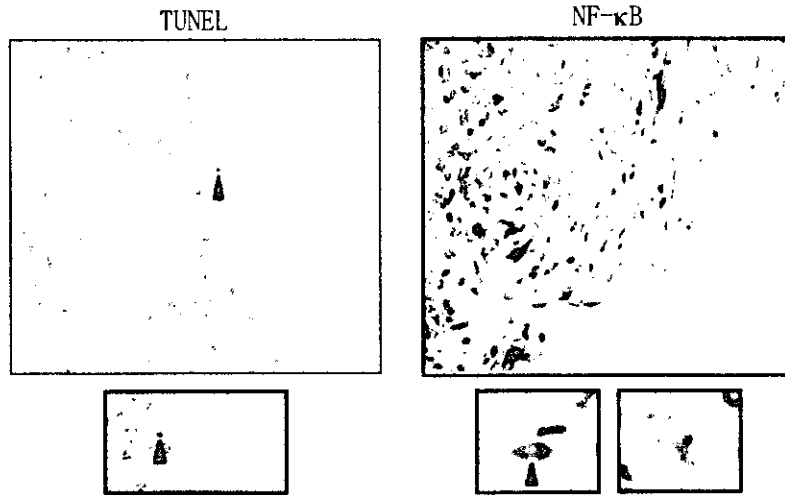
#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yamasaki S, Kawakami A, Nakashima T, Nakamura H, Kamachi M, Honda S, Hirai Y, Hida A, Ida H, Migita K, Kawabe Y, Koji T, Furuichi I, Aoyagi T, Eguchi K. Importance of NF- $\kappa$ B in rheumatoid synovial tissues: in situ NF- $\kappa$ B expression and in vitro study using cultured synovial cells. *Ann Rheum Dis* 60 (7): 678-684, 2001.
- 2) Migita K, Yamasaki S, Kita M, Ida H, Shibatomi K, Kawakami A, Aoyagi T, Eguchi K. Nitric oxide protects cultured rheumatoid synovial cells from Fas-induced apoptosis by inhibiting caspase-3. *Immunology* 103: 362-367, 2001.
- 3) Honda S, Migita K, Hirai Y, Origuchi T, Yamasaki S, Kamachi M, Shibatomi K, Fukuda T, Kita M, Hida A, Ida H, Aoyagi T, Kawakami A, Kawabe Y, Oizumi K, Eguchi K. Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in rheumatoid synovial cells. *Clin Exp Immunol* 126: 131-136, 2001.
- 4) Migita K, Tanaka F, Yamasaki S, Shibatomi K, Ida H, Kawakami A, Aoyagi T, Kawabe Y, Eguchi K. Regulation of rheumatoid synoviocyte proliferation by endogenous p53 induction. *Clin Exp Immunol* 126: 334-338, 2001.
- 5) Migita K, Eguchi K. FK506-mediated T-cell apoptosis induction. *Transplant P* 33: 2292-2293, 2001.
- 6) Hashimoto Y, Matsuoka N, Kawakami A, Tsuboi M, Nakashima T, Eguchi K, Tomioka T, Kanematsu T. Novel immunosuppressive effect of FK506 by augmentation of T cell apoptosis. *Clin Exp*

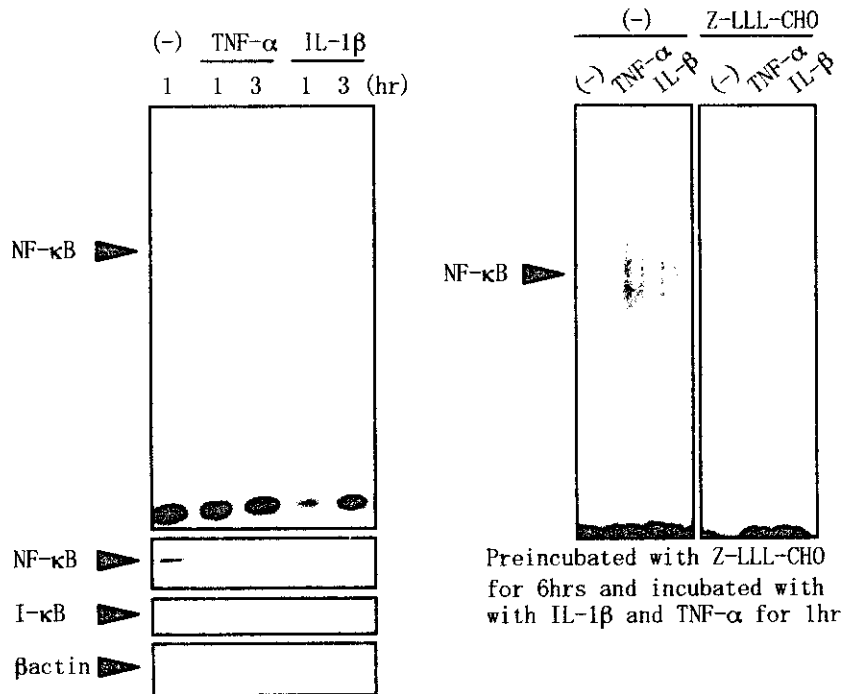
- Immunol 125: 19-24, 2001.
- 7) Hirai Y, Migita K, Honda S, Ueki Y, Yamasaki S, Urayama S, Kamachi M, Kawakami A, Ida H, Kita M, Fukuda T, Shibatomi K, Kawabe Y, Aoyagi T, Eguchi K. Effects of nitric oxide on matrix metalloproteinase-2 production by rheumatoid synovial cells. *Life Sci* 68: 913-920, 2001.
- 8) Migita K, Yamasaki S, Shibatomi K, Ida H, Kita M, Kawakami A, Eguchi K. Impaired degradation of serum amyloid A (SAA) protein by cytokine-stimulated monocytes. *Clin Exp Immunol* 123: 408-411, 2001.
- 9) Shibatomi K, Ida H, Yamasaki S, Nakashima T, Origuchi T, Kawakami A, Migita K, Kawabe Y, Tsujihata M, Anderson P, Eguchi K. A novel role for interleukin-18 in human natural killer cell death. *Arthritis Rheum* 44 (4): 884-892, 2001.
- 10) Migita K, Eguchi K. Induction of apoptosis: How do tacrolimus and ciclosporin compare? Mechanistic differences of cornerstone immunosuppressants 14-19, 2001.
- 11) Kawakami A, Eguchi K. Role of HTLV-I infection in the pathogenetic of Sjögren's syndrome and rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 11: 87-90, 2001.
- 12) Nagayama Y, Kita-Furuyama M, Nakao K, Ando T, Eguchi K, Niwa M. A novel murine mode of Graves' hyperthyroidism with intramuscular injection of adenovirus expressing thyrotropin receptor. *J Immunol*, in press, 2002.
- 13) Apoptosis in autoimmune disease. *Internal Med* 40 (4): 275-284, 2001.
- 14) Yamasaki S, Nakashima T, Kawakami A, Migita K, Eguchi K. Functional change of rheumatoid fibroblast-like synovial cell through activation of PPAR $\gamma$ -mediated signaling pathway. *Clin Exp Immunol*, in press, 2002.
- 15) 川上純, 山崎聡士, 宮下賜一郎, 飛田あゆみ, 江口勝美. NF- $\kappa$ B と炎症. 炎症と免疫 9 (6): 77-84, 2001.
- 16) 川上純, 江口勝美. T 細胞特異的 NF- $\kappa$ B 阻害薬によるコラーゲン誘発関節炎発症阻止. 臨床免疫 36 (3): 444-448, 2001.
- 17) 川上純, 江口勝美. A20 欠損マウスにおける TNF 誘導 NF- $\kappa$ B 発現およびアポトーシス異常. 臨床免疫 36 (5): 802-805, 2001.
- 18) 江口勝美. 炎症における HTLV-I 感染の役割. 血液・免疫・腫瘍 6 (2): 61-71, 2001.
- 19) 江口勝美. 自己免疫疾患におけるアポトーシス. *MINOPHAGEN MEDICAL REVIEW* 46: 309-330, 2001.
- 20) 川上純, 江口勝美. 血管内皮細胞. 臨床免疫 35 (1): 69-74, 2001.
- 21) 川上純, 江口勝美. HTLV-I 感染によるシェーグレン症候群・慢性関節リウマチの発症機序. 臨床リウマチ 13 (1): 11-17, 2001.
- 22) 右田清志, 江口勝美. RA 治療における新しい免疫抑制薬 (レフルノミド、シクロスポリン、タクロリムス). *Pharma Medica* 19 (7): 67-72, 2001.
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得  
該当なし
  2. 実用新案登録  
該当なし
  3. その他  
該当なし

図1. RA 滑膜組織でのアポトーシスと NF- $\kappa$ B の検出



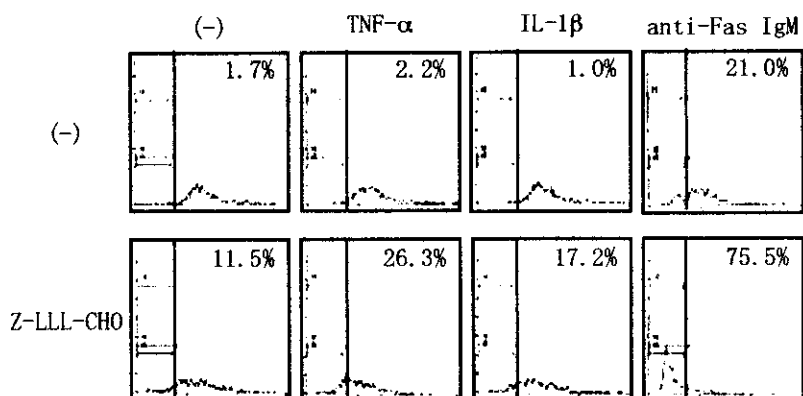
左図は RA 滑膜組織には TUNEL 陽性細胞が少数みられた。右図は NF- $\kappa$ B が染色され、特に NF- $\kappa$ B は核内に局在していた。

図2. RA 滑膜組織の NF- $\kappa$ B のゲルシフトアッセイ



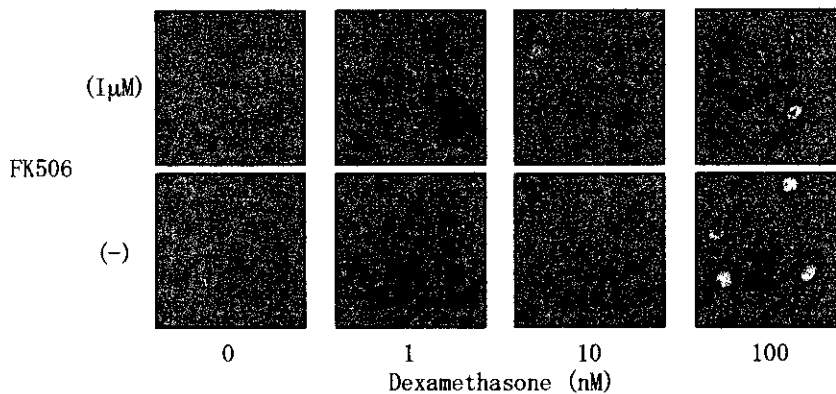
図左は TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  刺激1時間後、3時間後に NF- $\kappa$ B の核内移行が認められた。図右は Z-LLL-CHO で6時間前培養すると、TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  刺激による NF- $\kappa$ B の核内移行が阻害された。

図3. NF- $\kappa$ B 阻害剤は滑膜細胞のアポトーシスを誘導・増強する



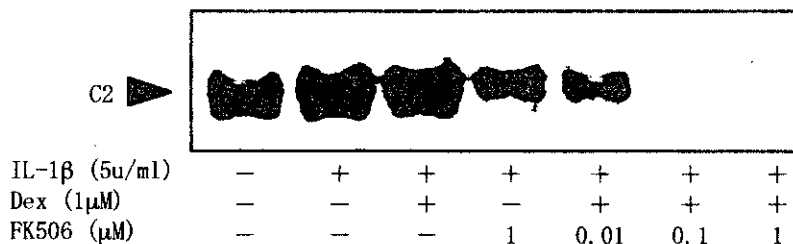
NF- $\kappa$ B 阻害剤 (LLL-CHO) で6時間培養して、TNF- $\alpha$  (200IU/ml)、IL-1 $\beta$  (20IU/ml)、抗 Fas IgM 抗体 (1 $\mu$ g/ml) を添加した。アポトーシスは hypodiploid DNA で検出した。

図4. FK506は低濃度デキサメサゾンによるグルココルチコイド受容体の核内移行を促進した。



RA 滑膜細胞をデキサメサゾンと FK506で培養した。グルココルチコイド受容体 (GR) の核内移行を共焦点レーザー顕微鏡で検出した。デキサメサゾン1nM と10nM では FK506添加で GR が核内で強く染まっている。

図5. デキサメサゾンは IL-1 $\beta$  刺激滑膜細胞の NF- $\kappa$ B 核内移行を抑制し、FK506はこの抑制を更に増強した



滑膜細胞を IL-1 $\beta$  (5U/ml)、デキサメサゾン (DEX, 1 $\mu$ M)、FK506を投与してゲルシフトアッセイをした。



厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

慢性関節リウマチ患者末梢血単核球に発現される mRNA の遺伝子チップを用いたクラスター解析—キメラ型抗 TNF $\alpha$ モノクローナル抗体投与前後の変動に関する研究

竹内 勤（埼玉医科大学総合医療センター第2内科・教授）

研究要旨

TNF 阻害療法は、慢性関節リウマチの薬物治療にこれまでにない臨床的効果と関節破壊抑制効果をもたらし、画期的薬剤として評価が高まっている。一方、その機序に関しては不明な部分が多く、その詳細が明らかになれば新たな治療標的を探索する上で大きな情報となる。そこで、キメラ型抗 TNF $\alpha$ モノクローナル抗体 infliximab 投与前後の患者末梢血単核球における mRNA 発現を、マイクロアレイを用いてクラスター解析し、臨床的有効例と非有効例での発現パターンの相違から興味ある知見が得られた。

A. 研究目的

TNF 阻害療法は、慢性関節リウマチの薬物治療にこれまでにない臨床的効果と関節破壊抑制効果をもたらし、画期的薬剤として評価が高まっている。一方、その機序に関しては、末梢血単核球の関節局所への浸潤を血管内皮細胞の接着分子発現抑制を介して阻止することなどが報告されているが、その詳細については不明な部分が多い。その作用機序が明らかになれば、新たな治療標的を探索する上で大きな情報となる。そこで、遺伝子チップを用いて薬剤投与前後の遺伝子発現の変動を解析し、臨床効果との対応からそれと密接に関連する分子を同定し、新たな治療標的となりうるか否かを検討することを目的とした。

B. 研究方法

日本において実施されたキメラ型抗 TNF $\alpha$ モノクローナル抗体 infliximab の後期第2相試験において、文書同意が得られた4症例を対象として、治療前後の末梢血単核球における mRNA 発現を、Affimetrix マイクロアレイ Hu6800 を用いて解析し、そのデータを Cluster (Stanford Univ) によって処理した。

C. 研究結果

Infliximab 投与前、および第一回投与後2週間の2点で患者末梢血単核球を採取し、遺伝子チップを用いて約6000個の mRNA 発現パターンを Cluster ソフトによって、クラスター分析により解析した。4症例は、3例が実薬、1例がプラセボ投与群 (MTX 単独) で、実薬投与3例のうち、2例が ACR 50% 基準を満足する有効群、1例が ACR 20% も満足しない効果不十分例であった。これら症例での mRNA 発現パターンを解析したところ、実薬群では、TNF を含む Node6258 が、実薬投与有効群では、IL-1 $\beta$  を含む Node5756 のクラスターが明らかとなった。この実薬投与有効群で発現低下したサイトカイン・ケモカイン群を表に示す。有効群では TNF 阻害によってこれら mRNA が発現抑制され、サイトカインカスケードで TNF の下流に位置すると思われた。有効群と無効群でこれら mRNA の抑制態度が何故異なるのかを追求し、その分子機序を明らかにできれば、TNF 阻害薬無効例における新たな治療法開発の標的となる。

D. 考察および結論

慢性関節リウマチの治療に画期的効果をもたらした TNF 阻害療法前後で変動する多くの遺伝子群を、末梢血単核球を用いて遺伝子チップで一括して解析可能である事が判明した。有効群では

TNF 阻害によって IL-1/IL-1R, IL-6 などの一連のサイトカイン mRNA が発現抑制され、サイトカインカスケードで TNF の下流に位置すると思われた。一方、無効群ではその抑制が見られなかったことから、有効群と無効群でこれら mRNA の抑制態度が何故異なるのかを追求し、その分子機序を明らかにできれば、TNF 阻害薬無効例における新たな治療法開発の標的となりうる。同時に、有効群で、発現抑制された分子の中で、さらなるカスケードの階層性が明らかになれば、各分子の治療標的としての位置付けが明確となる。今後、各クラスター群に存在する遺伝子の機能、発現、分布などから、慢性関節リウマチの病態に関与するものを抽出し、治療標的としての妥当性を各個の分子を対象として検討する必要がある。

表  
infliximab 有効群で発現低下したサイトカイン・ケモカイン分子群

サイトカイン	サイトカインレセプター
TNF $\alpha$	TNFR
IL-1 $\beta$	IL-1R (type1)
IL-2	IL-5R $\alpha$
IL-6	
IL-8	IL-9R
IL-12	IL-13R $\alpha$ 1, $\alpha$ 2 IL-15R
IFN	
TGF $\beta$	ケモカインレセプター
	CCR1
	CCR6
	CCR8

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Pang M, Setoyama Y, Tsuzaka K, Yoshimoto K, Amano K, Abe T, and Takeuchi T. Defective expression and tyrosine phosphorylation of the T cell receptor zeta chain in peripheral blood T cells from systemic lupus erythematosus patients. *Clin Exp Immunol* in press.
- 2) Tsuzaka T, Onoda N, Yoshimoto K, Zhang L, Pang M, Abe T, and Takeuchi T. Alternatively spliced 3' untranslated region of TCR  $\zeta$  mRNA in the peripheral blood T cells of systemic lupus erythematosus patients. *Modern Rheum* in press.
- 3) Abe T and Takeuchi T. Rheumatoid Arthritis and tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Autoimmunity* 34:291-303,2002.
- 4) Kameda H, Rinsinger JI, Han B-B, Baek SJ, Barrett JC, Abe T, Takeuchi T, Glasgow WC, and Elling TE. Expression of Gab1 lacking the Pleckstrin Homology domain is associated with neoplastic progression. *Mol Cell Biol* 21:6895-6905, 2001.
- 5) Amano K, and Takeuchi T. Amebiasis in acquired immunodeficiency syndrome. *Int Med* 40: 563-4,2001.
- 6) Ahmed S, Ihara K, Kanemitsu S, Nakashima H, Otsuka T, Tsuzaka K, Takeuchi T, and Hara T. Association of CTLA-4 but no CD28 gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in the Japanese population. *Rheumatology* 40: 662-7,2001.
- 7) Kawashima M, Yamamura M, Tani M, Yamauchi, H, Tanimoto T, Kurimoto M, Miyawaki S, Amano T, Takeuchi T, and Makino H. Extremely increased levels of IL-18 and IL-18 binding protein in blood circulation of patients with adult still's disease. *Arthritis & Rheum*44: 550-60,2001.
- 8) Ishihara O, Saitoh M, Hayashi N, Kinoshita K, and Takeuchi T. Failure of embryo implantation successfully treated with prednisolone in patients with Sjogren's syndrome. *Fertility & Sterility*75: 640-1,2001.

- 9) Tsubota K, Fujita H, Tsuzaka K, and Takeuchi T. Lacrimal gland function, lymphocyte infiltration and apoptosis of aciner cells in Mikulicz's disease and Sjögren's syndrome. *Invest Ophthal Vis Sci*42: 101-110,2001.
- 10) Abe T, and Takeuchi T. The other side of TNF-targeted therapy of patients with rheumatoid arthritis. *Curr Rheum Report* 3: 1-2,2001.

## 2.学会発表

- 1) Tsuzaka K, Onoda N, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, Takeuchi T. Alternatively spliced 3' untranslated region of TCR $\zeta$  messenger RNA could lead to the downregulation of TCR $\zeta$  monomer and homodimer in the peripheral blood T cells of systemic lupus erythematosus patients. American College of Rheumatology, 65th Annual Meeting, San Francisco, U.S.A., November, 2001
- 2) Shiraishi K, Tsuzaka K, Tsubota K, Abe T, Takeuchi T. Increased expression of caspases, PARP, and DFF45 in the lacrimal gland of patients with Sjogren's syndrome. American College of Rheumatology, 65th Annual Meeting, San Francisco, U.S.A., November, 2001
- 3) Suzuki K, Tsuzaka K, Onoda N, Abe T, Takeuchi T. Molecular mechanism of BAFF expression in peripheral blood lymphocytes in systemic lupus erythematosus patients. American College of Rheumatology, 65th Annual Meeting, San Francisco, U.S.A., November, 2001
- 6) Tsuzaka K, Onoda N, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, Takeuchi T. Molecular mechanism of the decreased expression of TCR $\zeta$  in systemic lupus erythematosus patients.第 45 回日本リウマチ学会総会, 2001 年 5 月 (国際シンポジウム)

分担研究報告書

慢性関節リウマチに対する細胞周期制御療法の分子基盤の研究

分担研究者 上阪 等 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 助教授  
研究協力者 宮坂 信之 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 教授  
野々村美紀 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 大学院生  
長坂 憲治 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 大学院生

研究要旨 サイクリン依存性キナーゼインヒビター(CDKI) p16<sup>INK4a</sup> もしくは p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子導入による滑膜への細胞周期制御療法は、慢性関節リウマチ(RA)動物モデルの関節炎に著効し、滑膜組織での炎症性サイトカイン産生を抑制した。そこで、p21<sup>Cip1</sup> による細胞周期制御療法の分子的基盤を明らかにするため、RA 由来滑膜線維芽細胞(RSF)に p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子を導入した時の種々の遺伝子発現の変化を解析した。そのために、まず、RSFを培養し、p21<sup>Cip1</sup> アデノウイルスもしくは挿入遺伝子のないアデノウイルスを感染させ、IL-1 $\beta$ と TNF- $\alpha$ 刺激下ないし無刺激下において、DNA アレイにて遺伝子の発現変化を解析した。発現が変化した遺伝子の中から、RAの病態に関与すると考えられる遺伝子を選び、ノ-ザンプロット、ウェスタンプロット、ELISA 法などで確認した。その結果、RSFに p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子を導入すると、type I IL-1 receptor (IL-1R1), macrophage chemotactic protein (MCP)-1, cathepsin B, cathepsin K などの分子の発現が減少していた。また、p21<sup>Cip1</sup> を強制発現させた RSF においては、IL-1 $\beta$ と TNF- $\alpha$ との刺激による IL-6, IL-8, macrophage inflammatory protein (MIP)-3 $\alpha$ , matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3 の産生が抑制されていた。これらの分子の発現抑制には、activator protein (AP)-1 の転写活性抑制や IL-1R1 の発現低下が関与していると考えられた。従って、p21<sup>Cip1</sup> 細胞周期制御療法は、CDK 活性抑制による滑膜増生の制御以外に、炎症や骨軟骨破壊に関与する分子の発現を減少させる作用を介して、関節炎治療効果を発揮すると考えられる。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ(RA)の病理は、炎症、滑膜増殖、関節破壊の三つの段階があり、RA の治療はこれらの各段階を制御して最終的に関節破壊を阻止することを目的とする

現在のRA治療は、主に炎症の抑制を目的としている。しかし、炎症においては多くの因子が存在し、単独の因子の抑制のみでは他の経路が活性化される可能性がある。新しい治療薬も、炎症の是正のみを目的とする限り、このような限界に至る可能性がある。

一方、RAの病態には、炎症の面だけではなく、滑膜線維芽細胞の増殖とそれによる関節破壊という

面がある。滑膜線維芽細胞の増殖や軟骨、骨破壊性といった形質を変換することができれば、直接パナヌスの形成を阻止して関節の破壊を防ぐことができると考えられる。

そこで、細胞周期を制御する分子によって、滑膜線維芽細胞の増殖を直接抑え、関節破壊を阻止することを試みた。細胞周期制御分子であるサイクリン依存性キナーゼインヒビター(CDKI)遺伝子p16<sup>INK4a</sup>もしくはp21<sup>Cip1</sup>による細胞周期制御療法は、RA動物モデルに著効し、滑膜組織でのTNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6などの炎症性サイトカイン産生を抑制した。しかしながら、マクロファージ系の細胞株であるRAW247.9にCDKIを強制発現させてもこれらの炎症性サイトカインの産生は抑制さ

れなかった。そこで、p21<sup>Cip1</sup>細胞周期制御療法の分子基盤を明らかにするため、p21<sup>Cip1</sup>の強制発現によるRA由来滑膜線維芽細胞 (rheumatoid synovial fibroblasts: RSF) における遺伝子の発現変化を解析した。

## B. 研究方法

RA患者の罹患関節手術検体の滑膜組織から、RSFを培養し、p21<sup>Cip1</sup>アデノウイルスもしくは挿入遺伝子のないアデノウイルスを感染させた。3日後、RNAを抽出し、DNAアレイ(Atlas 1.2 Human Expression Array, Clontech, Palo Alto, CA)にて遺伝子の発現変化を解析した。また、一部のRSFは、アデノウイルス感染3日後にTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ で刺激して24時間後にRNAを抽出し、別のDNAアレイ(Human Immunology Array, Toyobo, Osaka, Japan)にて遺伝子の発現変化を解析した。発現が変化した遺伝子のうち、RAの病態に関与すると考えられる遺伝子を選び、ノーザンブロット、ウェスタンブロット、ELISA法などの従来の方法で確認した。また、転写因子のactivator protein (AP)-1の転写活性へのp21<sup>Cip1</sup>の影響を、AP-1/c-Jun Transcription Factor Assay Kit (Active Motif, Carlsbad, CA)で検討した。

## (倫理面への配慮)

本研究においては、患者組織由来の培養細胞を使用するが、各患者より書面にてインフォームドコンセントを得た。また、本実験の概要は東京医科歯科大学倫理審査委員会で審議され、承認されたものである。

## C. 研究結果

RSF に p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子を強制発現させると、type I interleukin-1 receptor (IL-1R1), macrophage chemotactic protein (MCP)-1, cathepsin B, K などの遺伝子の発現の減少を DNA アレイの解析から認めた。これらの発現減少は、ノーザンブロット、ウェスタンブロット、ELISA などの従来の方法で確認された (図 1)。また、p21<sup>Cip1</sup> の強制発現により、IL-1R1, MCP-1, cathepsin K などの発現を調節している転写因子の一つである AP-1 の転写活性が抑制されていた。

さらに、DNA アレイの解析より、IL-1 $\beta$ と TNF- $\alpha$ で刺激した RSF においては、p21<sup>Cip1</sup> を強制発現させると、IL-6, -8, macrophage inflammatory protein (MIP)-3 $\alpha$ , matrix metalloproteinase (MMP)-1, -3 の産生の抑制を認めた。RSF に p21<sup>Cip1</sup> アデノウイルスもしくはコントロールウイルスを感染させて3日後、血清、IL-1 $\beta$ もしくは TNF- $\alpha$ で 24 時間刺激した後の培地上清の IL-6 濃度を ELISA で解析すると、IL-6 の産生は IL-1 $\beta$ で刺激した時は抑制されたが、TNF- $\alpha$ で刺激した時は抑制されなかった (図 2)。この結果は、IL-8, MCP-1, MIP-3 $\alpha$ , MMP-1, -3 などについても同様であった。つまり、p21<sup>Cip1</sup> は IL-1R1 の発現低下を介して IL-1 刺激によるサイトカイン、ケモカイン、プロテアーゼの産生を抑制していると考えられた。

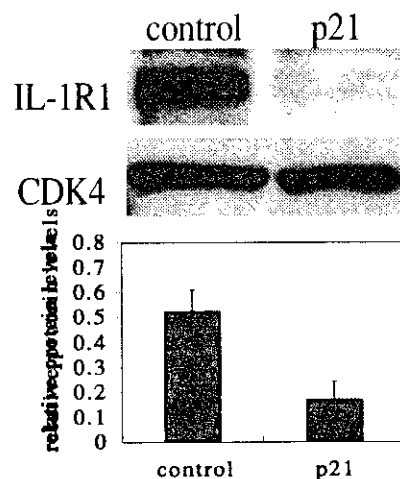


図 1. p21<sup>Cip1</sup>をRSFに強制発現させると、IL-1R1の発現が低下する。上のパネルはウェスタンブロットを、下のグラフは、IL-1R1ウエスタンブロットのシグナル強度をCDK4で補正して定量化した結果である。棒グラフは補正したシグナル強度の平均±標準偏差を示す (n=3, P<0.05)。

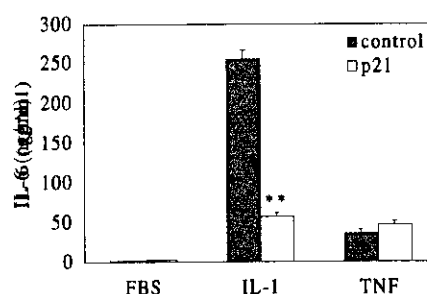


図 2. p21<sup>Cip1</sup>をRSFに強制発現させ、IL-1 $\beta$ で刺激すると、刺激によるIL-6産生が抑制された。その差

は、統計学的に有意であった(n=3, \*\*P<0.0005)。血清、もしくはTNF- $\alpha$ のみで刺激すると、抑制を認めなかった。

#### E. 結論

RSFにおけるp21<sup>Cip1</sup>強制発現は、炎症(MCP-1, IL-6, IL-8, MIP-3 $\alpha$ )、滑膜組織における血管新生(IL-8)や骨軟骨破壊(cathepsin B, K, MMP-1, -3)に関与すると考えられる分子の発現を減少させた。これらの分子の発現制御には、AP-1の転写活性抑制やIL-1R1の発現低下が関与していると考えられた。p21<sup>Cip1</sup>細胞周期制御薬は、CDK活性抑制による滑膜増生の制御以外に、これらの作用を介して、関節炎治療効果を発揮すると考えられる。

F. 健康危険情報  
なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nonomura Y, Kohsaka H\*, Nasu K, Terada Y, Ikeda M, Miyasaka N. Suppression of arthritis by forced expression of cyclin-dependent kinase Inhibitor p21<sup>Cip1</sup> gene into the joints. *Int Immunol* 13(6): 723-731, 2001.

#### 2. 学会発表

1. サイクリン依存性キナーゼインヒビター-p21<sup>Cip1</sup>遺伝子による滑膜線維芽細胞の遺伝子発現の変化 第45回 日本リウマチ学会総会 学術集会 東京 5/14/2001

2. Yoshinori Nonomura, Hitoshi Kohsaka, Kenji Nagasaka and Nobuyuki Miyasaka. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21<sup>Cip1</sup> gene induction into rheumatoid synovial fibroblasts regulates expression of genes related to cell cycle inflammation and joint destruction. 7th International Workshop of Autoantibodies and Autoimmunity. Awajishima, Hyogo, Japan. 9/28/2001.

3. 野々村美紀、上阪 等、長坂憲治、宮坂信之。サイクリン依存性キナーゼインヒビター-p21<sup>Cip1</sup>遺伝子導入による慢性関節由来滑膜線維芽細胞の炎症、関節破壊関連遺伝子発現の変化 第31回 日本免疫学会総会 学術集会 大阪 12/11/2001

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。

慢性関節リウマチにおける経済評価研究の世界的現状に関する研究

分担研究者 津谷喜一郎 東京大学大学院薬学系研究科・医薬経済学 客員教授

研究要旨 NHS-EED (The National Health Service - Economic Evaluation Database) を用いて慢性関節リウマチにおける臨床経済評価研究の世界的動向を調査した。介入は薬物治療が主体で、ヘルスアウトカムとして QOL と有害事象が単一の study ないし複数の study から用いられ、経済評価の方法は CEA が主体であることが明らかとなった。これらに基づき今後の日本での研究テーマがリストされ、その選択についての基本的

A. 研究目的

世界における慢性関節リウマチ(RA)の臨床経済評価研究の現状調査。

B. 研究方法

世界的に定評のある臨床経済評価文献データベースである The National Health Service - Economic Evaluation Database (NHS-EED) を用いた。NHS-EED は Centre for Reviews and Dissemination (CRD), University of York, UK が 1994 年より作成・管理しているものである。検索 strategy として “rheumat” (前方一致) and “arthritis” を、検索フィールドには all field を用いた。得られた文献につき独立した 3 人が、介入、主要なアウトカム評価項目、研究タイプ、経済評価の方法、研究の行われた国などを分析し、合致しない場合は討論によって解決した。

(倫理面への配慮)

既存研究の文献調査であり配慮する必要はない。

C. 研究結果

(1) NHS-EED には全部で約 6,000 の研究が収録され、そのうち、①コストとヘルスアウトカムの両方を考慮している、②比較対照がある、の 2 つの条件を満たすものを「完全な経済評価」(full economic evaluation)と呼び、約 2,000 (30%) 存在する。

(2) RA の研究は全部で 78 存在し、そのうち「完全な経済評価」は 15 であった。

(3) 介入については、治療 8、(そのうち薬物治療 6)、二次予防 4、診断 2、リハビリ 1、であった。

(4) 主要なアウトカム評価項目については、疾病特異的 QOL 尺度 5、疾病非特異的 QOL 尺度 3、胃腸の有害作用 3、有害作用 2、QALY (Quality Adjusted Life Years) 2、LYG (Life Years Gained) 2、痛み 1、関節機能 1 であった。1 つの研究で複数のアウトカムが用いられることがあるため合計は 15 にならない。

(5) ヘルスアウトカムのソースについては、single (ヘルスアウトカムのデータを 1 つの研究から得たもの) 6、review (ヘルスアウトカムのデータを複数の研究から得たもの) 4、single/review 1、抄録作成途中 4、であった。

(6) 経済評価の方法は、費用効果分析 (cost effectiveness analysis: CEA) 9、費用効果分析と費用効用分析 (cost utility analysis: CUA) の両方行ったもの 2、抄録作成途中および不明 4、であった。

(7) 研究のおこなわれた国は、UK 5、USA 3、Netherlands 2、Canada 2、Finland 1、Norway 1、Denmark 1、であった。

D. 考察

RA の臨床評価研究において、介入は薬物治療

が主体であるが、予防や診断、リハビリなど幅広い。アウトカム評価項目については、QOL 尺度としては、疾病特異的尺度が5つ、非特異的尺度が3つと、双方とも用いられている。薬物による副作用が多い現状を反映して特に、胃腸の有害作用などを用いたものも多い。長期の臨床試験に基づくLYGやQALYを用いたものも少なからず存在する。

QALYを用いたsulphasalazine, methotrexate, prednisoloneの3剤併用療法と、sulphasalazeni単剤とを比較したCUAでは、コストは患者一人、56週間で、併用療法が\$5519、単剤療法が\$6511、QALYは患者一人あたり併用療法が単剤療法より0.06長くなり、コスト、アウトカムともに併用療法がdominantであった。

ヘルスアウトカムのソースとしてはsingle studyとreview文献がほぼ同数であった。

経済評価の方法について、CUAが2つ、CEAが9つとなっているのは、QOLが費用対効果の算出に用いられなかった場合や、QOLが同等で費用最小化分析(cost minimization analysis: CMA)が用いられた場合、このデータベースではCEAとして扱われるためである。国別では、米国、欧州が主であった。慢性関節リウマチは経過が長期間におよび、治療法なども多岐にわたる難治性疾患であるため、リサーチクエスチョンは多様になるものと思われる。

日本での今後の研究テーマとしては、(1) 欧米の臨床経済評価研究の結果の日本への外挿化可能性の検討、(2) リサーチクエスチョンのしぼり込み、(3) QOLや有害事象などのアウトカム評価項目の検討、(4) コスト評価の方法論の確立、(5) 日本で計画中ないしはon goingの薬剤の臨床試験の現状把握と、そこにおける臨床経済研究のfeasibility調査、(6) より広い医療経済研究として、適応外使用されている医薬品がどれほどの経済的規模なのかの経済分析 - があげられる。日本としては、経済評価へのニーズと研究資源の双方を考慮し、研究テーマを設定すべきであろう。

## E. 結論

NHS - EEDによれば、RAの完全な経済評価論文は世界で15存在した。介入は薬物治療が主流であるが、予防や診断、リハビリなど幅広く、アウトカム評価項目はQOLと有害事象が主体であり、生存年が一部用いられ、ヘルスアウトカムのソースはsingle studyとreview文献がほぼ同数であり、経済評価の方法はCEAが主体であるが、一部CUAも用いられており、国別では米国、欧州が主であることが明らかになった。

日本の今後の研究テーマの見通しが得られた。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) 津谷喜一郎、福田敬、北畑勝彦. NHS-EEDの現状 (in preparation)

(2) 北畑勝彦、福田敬、津谷喜一郎. 慢性関節リウマチの経済評価の現状 (in preparation)

### 2. 学会発表

(1) Tsutani K, Fukuda T, Kitahata K. Review of Analysis of clinical trials using pharmacogenetics diagnosis in NHS-EED. 1st meeting of CIOMS working group on pharmacogenetics and pharmacoconomics, London, 14 February 2002.

## H. 知的財産権の出願・登録

なし。



### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

分担研究者氏名： 宮坂 信之

雑誌

	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
1	J. Nishio, H. Kohsaka, T. Shimamura, J. Hamuro, N. Miyasaka	Abundant expression of common cytokine receptor $\gamma$ chain(CD132) in the rheumatoid joints.	J. Rheumatol.	28	240-244	2001
2	野々村美紀, 小池竜司, 西尾純子, 鐺田利恵子, 上阪等, 窪田哲朗, 宮坂信之	シクロスポリン併用により改善を見た縦隔気腫併発皮膚筋炎の一例	リウマチ	41	653-658	2001
3	Y. Nonomura, R. Koike, J. Nishio, R. Tsubata, H. Kohsaka, T. Kubota, N. Miyasaka	Overlap syndrome with cerebral hemorrhage caused by prostaglandin E1 infusion.	Int. Med.	40	265-266	2001
4	Y. Nonomura, H. Kohsaka, K. Nasu, Y. Terada, M. Ikeda, N. Miyasaka	Suppression of arthritis by forced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21CIP1 gene into the joints.	International Immunol.	13	723-731	2001
5	T. Kubota, N. Watanabe, T. Kaneko, F. Satake, K. Miura, Y. Kurosawa, N. Miyasaka, Y. Kanai	Activation of autoreactive T cells that help nucleobindin-injected mice produce anti-DNA antibodies.	Immunol. Lett.	75	111-115	2001
6	J. Nishio, M. Suzuki, N. Miyasaka, H. Kohsaka	Clonal biases of peripheral CD8 T cell repertoire directly reflect local inflammation in polymyositis.	J. Immunol.	167	4051-4058	2001
7	T. Nanki, K. Nagasaka, K. Hayashida, N. Miyasaka	Chemokines regulate IL-6 and IL-8 production by fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis.	J. Immunol.	167	5381-5385	2001
8	A. Arai, Y. Noksaka, E. Kanda, K. Yamamoto, N. Miyasaka, O. Miura	Rap1 is activated by erythropoietin or interleukin-3 and is involved in regulation of $\beta$ 1 integrin-mediated hematopoietic cell adhesion.	J. Biol. Chem.	276	10453-10462	2001
9	岩井秀之, 小池竜司, 萩山裕之, 長坂憲治, 古賀道子, 野々村美紀, 西尾純子, 上阪等, 窪田哲朗, 宮坂信之	鼻咽腔腫瘍と神経病変を主徴としたサルコイドーシスの1症例	日本臨床免疫学会誌	24	21-28	2001
10	R. Koike, T. Iizuka, T. Watanabe, N. Miyasaka	The GOR gene product cannot cross-react with hepatitis C virus in humans.	Clin. Exp. Immunol.	124	429-434	2001
11	Y. Nosaka, A. Arai, E. Kanda, T. Akasaki, H. Sumimoto, N. Miyasaka, O. Miura	Rac is activated by tumor necrosis factor $\alpha$ and is involved in activation of Erk.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	285	375-379	2001
12						
13						
14						
15						
16						

## 研究成果の刊行に関する一覧表

分担研究者氏名： 橋本博史

雑誌

	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
1	Tajima M, Haruta K, Kobayashi S, Tamura N, Hashimoto H	Pentoxifylline induces the shedding of L-selectin on polymorphonuclear cells by stimulation via adenosine receptor as well as by the inhibition of phosphodiesterase.	Mod Rheumatol	11	65-71	2001
2	Haruta K, Kobayashi S, Tajima M, Sakai A, Tamura N, Bando H, Hara M, Kawashima, Takasaki Y, Hashimoto H	Effect of immune complexes in serum from patients with rheumatoid vasculitis on the expression of cell adhesion molecules on polymorphonuclear cells.	Clin Exp Rheumatol	19	59-68	2001
3	Kawasaki A, Tsuchiya N, Fukazawa T, Hashimoto H, Tokunaga K	Presence of four major haplotypes in human BCMA gene: lack of association with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis.	Genes Immun	2	276-279	2001
4	宮方 了, 竹内 健, 山路 健, 金井美紀, 津田裕士, 高崎芳成, 橋本博史	抗SS-A/Ro抗体・抗SS-B/La抗体陽性患者に対する妊娠経過中の血漿交換療法.	リウマチ	41	726-735	2001
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						

## 研究成果の刊行に関する一覧表

分担研究者氏名： 渥美達也

雑誌

	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
1	Caliz T, Atsumi T, Kondeatis E, Amengual O, Khamashta MA, Vaughan RW, Lanchbury JS, Hughes GRV.	HLA class II gene polymorphisms in antiphospholipid syndrome: haplotype analysis in 83 caucasoid patients.	Rheumatology	40	31-36	2001
2	Bertolaccini ML, Atsumi T, Lanchbury JS, Caliz AT, Katsumata K, Vaughan RW, Kondeatis E, Khamashta MA.	Plasma tumor necrosis factor alpha levels and the -238*A promoter polymorphism in patients with antiphospholipid syndrome.	Thromb Haemost	85	198-203	2001
3	Kobayashi K, Matsuura E, Liu Q, Furukawa Ji, Kaihara K, Inagaki J, Atsumi T, Sakairi N, Yasuda T, Voelker DR, Koike T.	A specific ligand for beta(2)-glycoprotein I mediates autoantibody-dependent uptake of oxidized low density lipoprotein by macrophages.	J Lipid Res	42	697-709	2001
4	Tsutsumi A, Sasaki K, Wakamiya N, Ichikawa K, Atsumi T, Ohtani K, Suzuki Y, Koike T, Sumida T.	Mannose-binding lectin gene: polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and Sjogren's	Genes Immun99-104, 2001	2	99-104	2001
5	Atsumi T, Bertolaccini ML, Koike T.	Genetics of antiphospholipid syndrome.	Rheum Dis Clin N Am	27	565-572	2001
6	Tsutsumi A, Atsumi T, Yamada H, Hirayama-Kato E, Ichikawa K, Fujimoto S, Koike T.	Anti-phosphatidylserine/prothrombin antibodies are not frequently found in patients with unexplained recurrent miscarriages.	Am J Reprod Immunol	46	242-244	2001
7	Bertolaccini ML, Atsumi T, Escudero-Contreras A, Khamashta MA, Hughes GRV.	The value of IgA antiphospholipid testing for diagnosis of antiphospholipid (Hughes) syndrome in systemic lupus erythematosus.	J Rheumatol	28	2637-2643	2001
8	Mukai M, Ieko M, Atsumi T, Notoya A, Kohno M.	Multiple thromboses in major arteries in a patient with antiphospholipid syndrome associated with excess of a large multimer of von Willebrand factor.	Lupus	10	895-896	2001
9	Atsumi T, Koike T	Clinical relevance of antiprothrombin antibodies.	Autoimmunity Reviews	1	49-53	2002
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						