

200/0809

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 EBM (evidence based medicine)  
に基づく早期治療法の確立に関する研究』

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 市川 陽一

平成14年3月

## 【目次】

I. 総括研究報告書	
慢性関節リウマチの EBM (evidence based medicine) に基づく早期治療法の確立に関する研究.....	1
聖マリアンナ医科大学リウマチ・膠原病・アレルギー内科 主任研究者 市川 陽一	
II. 分担研究報告書	
1. 慢性関節リウマチにおけるメトトレキサートの作用機序に関する研究.....	5
北里大学医学部臨床検査診断学 分担研究者 赤星 透	
2. 慢性関節リウマチの自己抗体による層別化の試みと治療反応性に関する研究.....	10
聖マリアンナ医科大学リウマチ・膠原病・アレルギー内科 分担研究者 尾崎 承一	
3. DNA ワクチンによるアジュバント関節炎の抑制に関する研究.....	16
福島県立医科大学内科学第2講座 分担研究者 佐藤由紀夫	
4. IL-6 シグナル伝達阻害による慢性関節リウマチの治療法の確立.....	19
大阪大学健康体育部健康医学第一部門 分担研究者 西本 憲弘	
5. 抗コラーゲン抗体カクテル誘発関節炎マウスにおけるカルパイン阻害物質の効果の検討.....	23
京都大学大学院医学研究科臨床免疫学 分担研究者 三森 経世	
6. COX-2 阻 害 薬 の 滑 膜 炎 増 幅 作 用 に 関 す る 研 究.....	26
聖マリアンナ医科大学リウマチ・膠原病・アレルギー内科 分担研究者 山田 秀裕	
7. 血清マトリックスメタロプロテアーゼ-3 (MMP-3) からみた抗リウマチ薬の効果判定.....	29
東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 分担研究者 山中 寿	
8. 疾病負担の将来予測からみた慢性関節リウマチの研究戦略.....	31
聖マリアンナ医科大学予防医学 分担研究者 吉田 勝美	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	34

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EBM（evidence based medicine）に基づく早期治療法の確立に関する研究

主任研究者 市川陽一  
聖マリアンナ医科大学内科学（リウマチ・膠原病・アレルギー内科）客員教授

研究要旨

慢性関節リウマチ早期治療指針確立のための臨床研究として、メトトレキサート (MTX) 単独、ブシラミン (BUC) 単独、両者併用の3群間の二重盲検比較試験は、平成14年3月に2年間の観察を終わり、成績の分析に移る。キーオープン例の分析では、効果不十分例11例のうち10例がMTXあるいはBUC単独群であり、併用例は1例のみで、併用療法の有用性を強く示唆した。次世代の早期治療薬開発については、抗IL-6R抗体の著明な臨床効果と血管新生の抑制が示され、カルパイン阻害薬、DNAワクチンはいずれもRAモデル動物での有効性が示された。さらに、プロスタノイドの有効性ととも非ステロイド性抗炎症剤使用の問題点が判明した。また、新たにRAで見いだされた複数の自己抗体はRAの治療反応性における多様性に結びつく可能性を示唆した。

分担研究者氏名

赤星 透	北里大臨床診断学助教授
尾崎承一	聖マ大内科教授
佐藤由紀夫	福島県立医大第二内科教授
西本憲弘	大阪大健康体育部助教授
三森経世	京都大臨床免疫学教授
山田秀裕	聖マ大内科助教授
山中 寿	東京女子医大膠原病リウマチ痛風センター助教授
吉田勝美	聖マ大予防医学教授

**A. 研究目的：**現在、我が国に約70万人のRA患者が存在し、全身関節の疼痛、変形のために苦しみ、また、多くの治療費を要している。早期治療方針が確立されれば、これらの治療費が減少するのみならず、患者のQOLを改善させ、社会での活動が可能となる。しかし、抗リウマチ薬は時に重篤な副作用を伴うため、関節破壊の速やかな症例を特定して、より強力な治療を行う必要がある。また、現在用い得る抗リウマチ薬では関節破壊を完全に防止することは出来ないため、併用療法に関する基礎的検討、およびRAの病態に基づいた新薬につながる

る研究を行う必要がある。そこで、1) 早期治療を必要とする症例を選択する、2) 関節破壊を防ぐ早期治療法を明らかにする、3) 将来的により強力に関節破壊を防ぐ新薬、併用療法を見出すことを研究目的とした。

**B. 方法**

1) 早期治療法の確立のための臨床試験：早期治療法の確立のための臨床試験としては、発症2年以内の早期RA患者を対象とし、メトトレキサート(MTX)単独、ブシラミン(BUC)単独、あるいはこれら2者の併用の効果、副作用を、二重盲検比較対照試験で検討している。副作用防止のため、何れの薬剤も漸増し、ブシラミンは2ヶ月以降200mg/日、メトトレキサートは4ヶ月以降8mg/週とした。調査項目としては患者の関節痛評価、患者による全般評価、身体機能評価(mHAQ)、握力、疼痛関節数、腫脹関節数、医師の全般評価、赤沈値、CRP、RF、HLA-DRB1、両手、両足正面のX線写真、末梢血、肝機能、クレアチニン、尿所見などである。観察期間は2年間とした。

2) 次世代の早期治療薬と治療法開発のための研究：ヒト型化抗IL-6レセプター(IL-

6R) 抗体を使用し、難治性 RA 患者を対象にオープン試験を行い、臨床効果および副作用を検討した。さらに、IL-6、抗 IL-6R 抗体の血管新生に対する影響を検討するため、これらによる血管内皮細胞増殖、滑膜線維芽細胞による VEGF 産生の変化、および RA 患者における抗 IL-6R 抗体療法前後の血清 VEGF 濃度を検討した。

65kDa-heat shock protein (hsp65) を発現するプラスミドを DNA ワクチンとして用い、ラットアジュバント関節炎に対する DNA ワクチン接種の影響を検討した。

Balb/c マウスにモノクローナル抗 II 型コラーゲン抗体カクテルと LPS を投与することで、抗コラーゲン抗体カクテル誘発関節炎を誘発した。種々のカルパインインヒビターを腹腔内投与し、関節炎に対する影響を検討した。

RA 患者滑膜組織由来の初代滑膜細胞を培養し、産生されるサイトカイン、in vitro でのパンヌス形成に対する COX-2 選択的阻害薬 (NS-398)、非選択的 COX 阻害薬 (インドメタシン)、PGE<sub>2</sub>、EP4 アゴニスト、PGD<sub>2</sub>、15d-PGJ<sub>2</sub> の作用を検討した。

MTX の RA 治療における作用機序を明らかにするため、単球・マクロファージの分化に対する MTX の影響を検討した。単球・マクロファージの分化マーカーである CD36 の発現はフローサイトメトリーで、cyclin-dependent kinase の阻害分子である p21 の発現は RT-PCR で検討した。さらに、MTX のマクロファージ貪食能への影響を検討した。

RA 患者滑膜細胞より得た cDNA 発現ライブラリーと RA 患者関節液中の IgG を用いた発現クローニング法で、新たな自己抗体および対応抗原を検索した。

抗リウマチ薬の血清中 matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) 濃度に対する影響を検討するため、早期 RA 患者で各種抗リウマチ薬の治療前後での血清中の MMP 濃度を ELISA で測定した。

RA 患者負担の将来の動向を予測するために、2020 年までの推計患者数を算出した。

### C. 結果

#### 1) 早期治療法の確立のための臨床試験

平成 10 年 6 月に第 1 回班会議で臨床試験計画の検討を開始して以来、製薬会社からの実薬およびプラセボの供給、各施設倫理委員会の手続き、コントローラーによる薬剤割付け、医師賠償責任保険の手続きを終了し、平成 11 年 2 月より臨床試験を開始した。さらに 10 月には 6 国立病院および 1 私立病院から研究協力者が新たに参加し、平成 12 年 3 月末までに 76 例のエントリーを終了、現在、2 年間の観察を継続している。平成 14 年 2 月現在で、治療効果がなく ACR 20%改善に到達しないためキーオープンした症例は 11 例であったが、4 例は BUC 単独、6 例は MTX 単独で、併用例は 1 例のみであった。また、副作用のためキーオープンした 2 例も BUC 単独群であった。この結果は、併用例の有効性が単独治療群に比して高く、かつ重篤な副作用が少ない傾向を示し、併用療法の有用性を示唆した。

#### 2) 次世代の早期治療薬と治療法開発のための研究

(1) 抗 IL-6R 抗体による RA 治療では、ACR20%改善が 88%、ACR50%改善が 50% に達した。IL-6 は IL-6R の存在下で滑膜線維芽細胞による VEGF の産生を増強し、抗 IL-6R 抗体は、この作用を抑制した。RA 患者における抗 IL-6R 抗体療法で血清 VEGF 濃度は低下した。

(2) Hsp65 を発現する pACB-hsp65 を用いた DNA ワクチンは、アジュバント関節炎の発症を抑制し、予防的効果が明らかとなった。さらに、発症早期に DNA ワクチンを接種した場合、関節炎の程度の減弱が認められ、早期使用での治療効果も認められた。

(3) 抗コラーゲン抗体/LPS 投与マウスは 3-5 日目より関節炎を発症し、12 日目には関節炎がピークを示した。各種カルパイン阻害薬 (3 mg/kg のカルペプチン、ロイペプチン、E-64-d) は同程度に関節炎を抑制した。E-64-d を 9 mg/kg に増量して投与したところ、関節炎の発現はほぼ完全に抑制された。また、ヒトカルバスタチンでも関節炎抑制効果が確認された。

(4) 初代滑膜細胞による in vitro でのパンヌス形成と TNF- $\alpha$ 、MMP-9 の産生は、COX-2 選択的阻害薬 (NS-398: 1~10  $\mu$

M)、および非選択的 COX 阻害薬 (インドメタシン: 0.1~10  $\mu$ M) により用量依存的に増強された。これに対して、PGE<sub>2</sub>(3~100nM)、PGE<sub>2</sub> 受容体 EP4 アゴニスト(1~30nM)、PGD<sub>2</sub>(1~100  $\mu$ M)、15d-PGJ<sub>2</sub>(1~100  $\mu$ M)は、いずれも用量依存的にパンヌス形成と TNF- $\alpha$ 、MMP-9 産生を抑制した。

(5) MTX は THP-1 細胞 (ヒト単球性白血病細胞株) と末梢血マクロファージの CD36 発現を用量依存性に増強した。また、CD36 は mRNA レベルでも発現が誘導されていることを RT-PCR で確認できた。さらに、THP-1 細胞での PCR での検討で、MTX は p21 の発現を誘導した。MTX はマクロファージの貪食能を有意に亢進させ、アポトーシス細胞を貪食したマクロファージは LPS 刺激による TNF $\alpha$ 産生能が低下していた。

(6) High Mobility Group (HMG) 蛋白である HMG1/HMG2 に対する抗 HMG1/HMG2 抗体が RA 患者の 48%に検出された。さらに、発現クローニング法で新たな自己抗原である gp130-RAPS とホリスタチン関連蛋白 (FRP) を同定した。RA 患者での頻度は、抗 gp130-RAPS 抗体は 73%、抗 FRP 抗体は 30%であった。各抗体の力価は RA の疾患活動性と相関していた。

(7) 早期 RA 患者の検討で、NSAID 治療群、注射金剤治療群、Bucillamine および D-penicillamine 治療群 (SH 群) での、治療前後での血清 MMP-3 濃度の変化はなかった。一方、MTX 治療群では血清 MMP-3 濃度の減少がみられた。

(8) 平成 11 年度の患者調査のデータを基に、各将来年次での推計患者数を算出すると、2005 年には約 81120 人、2010 年には 84029 人、2015 年には 87158 人、2020 年には 87748 人と増加傾向が明らかとなった。

**D. 考察:** RA 早期治療指針確立のために必要なものとして、1) 早期治療を必要とする症例を選択する、2) 関節破壊を防ぐ早期治療法を明らかにする、3) 長期間にわたり、副作用なく疾患活動性を抑制する早期治療法を見いだす、4) 将来的により強力に関節破壊を防ぐ新薬、併用療法を見出す、をあげることが出来る。これらの問題

を解明するため、臨床研究と次世代の早期治療薬の開発のための基礎的研究に分けて研究を進めることとした。臨床的研究に関しては、evidence based medicine (EBM) が重視されなくてはならない。しかし、EBM に最も有用とされる多施設協同二重盲検比較試験は、新薬承認のための製薬会社が主体となって行う治験を別にすれば、わが国にはほとんどない。今回、我が国で開発された比較的強力な抗リウマチ薬である BUC およびこれからの RA 治療の中心となる MTX を取り上げ、2者併用の継続性、関節炎に対する有効性、関節破壊の抑制効果および副作用を多施設協同二重盲検比較試験によって各単剤と比較した。キーオープン例の検討結果は、併用療法の有効性が単独治療より高く、かつ重篤な副作用のないことを示唆していた。平成 14 年 3 月にはすべての症例の試験期間が終了するため、全症例をキーオープンし、データを解析することで RA 早期治療指針を確立する。

ヒト型化抗 IL-6R 抗体は、臨床試験において新たな RA の治療法としての臨床試験において有用性が確立された。さらに、滑膜細胞からの VEGF 産生を抑制することで血管新生に抑制的に働く可能性が明らかとなり、作用機序が一層明確になった。アジュバント関節炎における DNA ワクチンの予防的効果および治療効果は、DNA ワクチンの将来的な臨床応用への可能性を示唆した。短期間で効率よく関節炎を誘導できるとされる抗コラーゲン抗体カクテルと LPS によるマウス関節炎に対し、すべてのカルパイン阻害物質は一定の抑制効果を示し、カルパイン阻害が新たな RA の治療戦略となる可能性を示唆した。関節炎局所で産生される PGE がパンヌス形成と関節破壊を制御する生体防御因子であり、その作用が EP4 受容体/cAMP シグナル伝達系を介することを明らかにした。さらに、COX-2 によって産生されるプロスタノイドのうち PGD<sub>2</sub> およびその代謝産物 PGJ<sub>2</sub> が、PGE<sub>2</sub> と同様に滑膜炎制御作用をもつこと、また、COX-2 選択的阻害薬がパンヌス形成と TNF- $\alpha$ 、MMP-9 産生を増幅することを明らかにした。MTX の新たな作用機序として p21 の発現を

誘導することで、単球・マクロファージの分化を誘導する可能性が示唆された。また、CD36 を介したアポトーシス細胞の貪食を亢進させ、これによる抗炎症作用を誘導している新たな可能性も示唆された。遺伝子工学的手法を用いた検討で RA における新たな自己抗原/自己抗体系を明らかにした。gp130-RAPS は炎症性サイトカインのシグナリングに対し抑制性に働き、FRP は MMP の産生抑制作用があることを明らかにした。今後、かかる自己抗体の臨床的意義を明確にしていく必要がある。血清 MMP-3 濃度は関節破壊予知の有用なマーカーであることが明らかとなり、今後は MMP-3 も抗リウマチ薬の評価に用いていく必要があると考えられた。RA 患者数が将来的に増加する可能性が示されたことより、RA の早期治療指針作製の必要性が再確認された。

**E. 結論：**慢性関節リウマチ早期治療指針確立のための臨床研究として、メトトレキサート単独、ブシラミン単独、両者併用の3群間の二重盲検比較試験は、平成14年3月に2年間の観察を終わり、成績の分析に移る。キーオープン例の分析は併用療法の有用性を強く示唆した。次世代の早期治療薬開発については、抗 IL-6R 抗体の著明な臨床効果と血管新生の抑制が示され、カルパイン阻害薬、DNA ワクチンはいずれも RA モデル動物での有効性が示された。さらに、プロスタノイドの有効性ととも非ステロイド性抗炎症剤使用の問題点が判明した。また、新たに RA で見いだされた複数の自己抗体は RA の治療反応性における多様性に結びつく可能性を示唆した。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 市川陽一：感染症に対する副腎皮質ステロイドの使用意義について。「感染症における副腎皮質ステロイド薬適正使用指針」

市川陽一編、医薬ジャーナル社、大阪、東京、2001.4.25 発行、p12-20.

2) 市川陽一：ステロイド薬の副作用と対策。今日の治療指針、多賀須幸男、尾形悦郎監修、医学書院、東京、p.534-535、2002.1.1

3) 市川陽一：膠原病の病因と病態。医学と薬学 46(1):46:5-10,2001.7.

4) 市川陽一：シェーグレン症候群と口腔乾燥症の治療。Physician's Therapy Manual vol.11,13(9), Oct 2001

5) 加瀬千容、大久保道子、山前正臣、山田秀裕、鈴木康夫、浜信昭、市川陽一、笹下薫、中島康夫：ミノサイクリンにより関節炎と閉塞性細気管支炎がともに改善した慢性関節リウマチの1例。リウマチ 41(4):745-750,2001.

6) Suzuki Y, Tsutsumi Y, Nakagawa M, Suzuki H, Matsushita K, Beppu M, Aoki H, Ichikawa Y, Mizushima Y: Osteoclast-like cells in an *in vitro* model of bone destruction by rheumatoid synovium. Rheumatology 40:673-682,2001

7) 市川陽一：DMARD 併用療法—オーバービュー。リウマチ科 27(1):1-5,2002.1.

8) 鈴木康夫、井出美香子、野口淳、尾崎承一、市川陽一：MTX 追加併用療法。リウマチ科 27(1):25-32,2002.1.

## H. 知的財産権の出願・登録情報 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

慢性関節リウマチにおけるメソトレキサートの作用機序に関する研究

分担研究者 赤星 透 北里大学医学部臨床検査診断学 助教授

研究要旨

MTX の抗炎症・抗リウマチ作用を解析するために、M $\phi$  の分化に及ぼす MTX の作用を検討した。MTX は RA 患者に投与される臨床有効血中濃度の範囲内において、健常人末梢血単球や単球性白血病細胞株 THP-1 の p21 発現をすみやかに誘導し、続いて単球・M $\phi$  の分化抗原である CD36 の発現を誘導した。MTX により発現が誘導された CD36 は機能的分子であり、MTX を添加し培養した M $\phi$  のアポトーシス細胞貪食能は対照に比較し有意に亢進した。さらに、スカベンジャー受容体を介したアポトーシス細胞の貪食は M $\phi$  の TNF $\alpha$  産生を有意に抑制した。本研究の結果により、MTX による M $\phi$  の分化誘導作用が MTX の抗リウマチ作用の一部を担っている可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、RA 患者に対して、葉酸代謝拮抗薬であるメソトレキサート (MTX) の少量パルス療法が行なわれ、その有効性が確立している。MTX には、アデノシン産生の誘導、炎症性サイトカイン産生の抑制、アポトーシスの誘導、細胞の分化促進などの作用が報告されているが、MTX の抗炎症、抗リウマチ作用の詳細は未だ不明である。特に、RA 患者における有効血中濃度の範囲内で MTX がどのような作用を惹起しているかについては不明の点が多い。RA 患者の関節滑膜組織には多数のマクロファージ (M $\phi$ ) が浸潤し、関節炎の進展に主要な役割を担っている。したがって、RA 患者に投与される MTX も M $\phi$  に作用し、臨床効果を発現している可能性が示唆される。

そこで、本研究では、M $\phi$  の分化抗原で

ある CD36 を取り上げ、MTX の CD36 発現への影響を検討した。CD36 はスカベンジャー受容体であり、単球 (Mo)・M $\phi$  系細胞に発現がみられ、Mo から M $\phi$  への細胞の分化に伴い発現が亢進することが知られている。CD36 は N 末端と C 末端が細胞質側に突き出した膜 2 回貫通型構造を持つ糖蛋白である。CD36 には、Ox-LDL を含む陰イオン化リン脂質、長鎖脂肪酸、アポトーシス細胞、マラリア感染赤血球、また血小板上においては thrombospondin(TSP)、コラーゲンなどの多くのリガンドが作用することが確認されている。CD36 は長鎖脂肪酸の転写蛋白質としての脂肪の蓄積への関与、Ox-LDL やアポトーシスに陥った細胞の貪食、核内受容体である peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) や、転写因子である nuclear factor-kappa

B (NF- $\kappa$ B) などへのシグナル伝達、インスリン抵抗性関連分子、細胞接着分子などの多彩な機能を有していることが報告されてきている。特にアテローム動脈硬化症において、CD36 は Ox-LDL を取り込むことで、粥状硬化巣における M $\phi$  の泡沫化の機転に強く関与していると推測されている。

細胞の分化は Cyclin-Dependent Kinase (CDK) と Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor (CKI) の発現・相互作用により調整されている。CKI の CIP/KIP ファミリーに属する p21<sup>Cip1/WAF1</sup> は、Cip1 (CDK2-interacting protein)、CAP20、PIC1、mda-6 (melanoma differentiation-associated gene)、SDI1 (senescent-derived inhibitor-1)、WAF1 (wild-type p53-activated fragment 1) などの名称でそれぞれクローニングされた分子である。p21 は種々の cyclin-CDK complex に結合し、CDK 活性を阻害することにより細胞周期を G1 期で停止させたり、apoptosis を誘導することなどが知られている。さらに、近年、CKI を導入したトランスジェニックマウスが作製され、CKI の発現が関節炎の発現と進展に対して抑制的に作用することが報告されている。そこで本研究では、MTX の M $\phi$  分化誘導作用機序を解析するために、p21 の発現誘導作用についても検討した。

## B. 研究方法

① 細胞培養：急性単球性白血病由来ヒトマクロファージ様細胞株 THP-1 と健常人末梢血単核球 (PBMC) 及び末梢血単球を用いた。② Viability 測定：MTX を添加培養した細胞の viability は MTT assay と trypan blue dye exclusion test により測定した。③ 遺伝子発現：CD36 と p21 の mRNA 発現は

RT-PCT southern hybridization 法を用いて解析した。④ CD36 発現：単球・M $\phi$  における CD36 発現は FITC-conjugated anti-human CD36 抗体を用いて FACS 解析を行った。⑤ p21 発現：p21 発現は M $\phi$  の細胞溶解産物を用いて Western Blot 法により解析した。⑥ 単球による好中球貪食とサイトカイン産生：単球を MTX ( $6 \times 10^{-8}$ M) 存在下で3日間培養し、アポトーシスに陥らせた好中球を Mo：アポトーシス細胞=1：10 の割合で添加培養し、単球に好中球を貪食させた。好中球を貪食した M $\phi$  は MPO 染色により算定した。⑦ M $\phi$  の TNF $\alpha$  産生：アポトーシスに陥った好中球を貪食した M $\phi$  を LPS で刺激し、TNF $\alpha$  産生を ELISA 法により測定した。

## C. 研究結果

1. THP-1 細胞の viability に及ぼす MTX の影響

RA における有効血中濃度の範囲内の MTX ( $10^{-8}$ M $\sim$  $10^{-7}$ M) を THP-1 細胞に添加培養し viability を測定したところ、MTT assay では MTX 添加 2 $\sim$ 3 日目で有意に低下したが、Trypan blue dye exclusion test では軽度の低下を示したのみであった。

2. MTX による p21 発現誘導

THP-1 細胞を無刺激、または  $6 \times 10^{-8}$ M の MTX 存在下で各時間培養し、p21 mRNA 発現を RT-PCR 法で解析したところ、MTX は添加 6 $\sim$ 12 時間後において p21 遺伝子の発現を明らかに誘導した。また、Western blotting においても、MTX は p21 の発現を誘導した。

3. MTX による CD36 発現

MTX ( $\sim 10^{-7}$ M) を THP-1 細胞または健常人末梢血単球に添加培養し、CD36 発現



を FACS 解析したところ、MTX は時間・用量依存的に CD36 の発現を誘導した。CD36 発現誘導作用は培養 2 日目以降に有意となった。また、MTX は添加 12~24 時間後において、CD36 mRNA の発現を明らかに誘導した。細胞表面への CD36 の発現が MTX 添加後 2~3 日目で増加するのに先行して CD36 遺伝子の発現が亢進することが判明した。

#### 4. MTX 添加 M $\phi$ におけるアポトーシス細胞貪食能と TNF $\alpha$ 産生能

健常人末梢血単球を MTX  $6 \times 10^{-8}M$  存在下で 3 日間培養し、アポトーシスに陥らせた好中球と 1 時間培養した後に、好中球を 2 個以上貪食した M $\phi$ の割合を MPO 染色により測定した。MTX を添加した M $\phi$ のアポトーシス細胞貪食能は有意に亢進していた。したがって MTX により誘導された CD36 は機能分子であることが証明された。さらに、MTX を添加培養した M $\phi$ の TNF $\alpha$ 産生能は対照に比較し有意に低下していた。したがって、MTX により誘導された CD36 がアポトーシス細胞の貪食を介して TNF $\alpha$ の産生を抑制することが示された。

#### D. 考察

本研究において、MTX が RA 患者における有効血中濃度の範囲内において、健常人末梢血単球や M $\phi$ 細胞株 THP-1 の p21 や CD36 発現を誘導することを明らかにした。発現が誘導された CD36 は機能的分子であり、MTX により CD36 発現が誘導された単球・M $\phi$ のアポトーシス細胞貪食能は有意に亢進していた。しかも、アポトーシス細胞を貪食した単球・M $\phi$ の TNF $\alpha$ 産生能は対照に比べ有意に抑制された。

MTX は RA に対して最も有効性の高い抗

リウマチ薬と位置付けられ、MTX の少量間欠投与法は RA の治療に汎用されている。しかし、MTX の投与と有効性は臨床経験に基づいて確立されたものであり、MTX の抗リウマチ作用の詳細は未だ不明である。葉酸拮抗薬である MTX の薬理作用としては、dihydrofolate reductase 阻害による DNA 合成障害が良く知られている。悪性腫瘍などに用いられている MTX 療法の薬理作用は主としてこの DNA 合成障害によるものである。しかし、RA における MTX 投与は少量間欠投与であり、RA 患者における MTX の血中濃度も最高で  $\sim 1 \cdot 10^{-7}M$  程度である。したがって、RA における MTX の薬理作用は悪性腫瘍に対する高用量投与とは異なった作用機序が推定される。今日まで、RA における MTX の薬理作用としては、アデノシン産生誘導による抗炎症作用や活性化 T 細胞のアポトーシス誘導作用、さらには M $\phi$ のサイトカイン産生抑制作用などが報告されている。しかし、アポトーシス誘導作用やサイトカイン産生抑制作用は高濃度の MTX により誘導されるものであるため、これらの作用が RA における MTX の薬理作用の主体とは言いがたい。アデノシン誘導作用は MTX の抗炎症作用を構成する機序の 1 つと考えられているが、MTX にはこの作用以外にも新たな抗リウマチ作用があるものと推測される。

MTX をはじめとして、多くの抗癌剤には腫瘍細胞の増殖抑制作用とともに分化誘導作用があることが報告されている。一方、RA の関節炎局所には M $\phi$ が多く浸潤し、RA の病態形成に主要な役割を果たしている。M $\phi$ は骨髓由来の細胞であり、末梢血単球より M $\phi$ へと分化して行く。そこで本研究では、RA の病態形成に重要である単

球・M $\phi$ の分化に及ぼす MTX の作用を解析した。RA 患者で認められる血中濃度の範囲内において、MTX は THP-1 細胞の増殖抑制と共に、単球・THP-1 細胞の p21 発現や CD36 発現を誘導することを初めて証明した。CDKI ファミリーに属する p21 は細胞増殖の抑制や分化誘導作用に重要な役割を担っている。また、CD36 は M $\phi$ の分化抗原の一つであり、スカベンジャー受容体として動脈硬化の進展や炎症の収束機序などに関与することが注目されている。MTX が 10<sup>-8</sup> M レベルの低濃度において単球の p21 や CD36 発現を誘導することから、MTX が RA 患者においても単球・M $\phi$ の分化を誘導しているものと推察される。

RA における CDKI ファミリーの発現とその臨床的意義は未だ不明の点が多い。上阪らは、CDKI ファミリーに属する p16 のトランスジェニックマウスに慢性関節炎を惹起させ、p16 の強制発現が関節破壊の進展を有意に抑制すると報告している。したがって、増殖性の滑膜炎である RA において CDKI ファミリーの発現亢進は関節炎に対して抑制的に作用していることが推測される。MTX による抗リウマチ作用に p21 発現誘導が関与している可能性が示唆された。

CD36 は M $\phi$ の分化抗原であり、スカベンジャー受容体として酸化 LDL やアポトーシス細胞の貪食に関与している。本研究で明らかにされた MTX による単球の CD36 発現誘導は、MTX を服用している RA 患者の単球・M $\phi$ が CD36 を高発現し、酸化 LDL やアポトーシス細胞の貪食を高率に行っている可能性を示唆している。しかも、CD36 を介したアポトーシス細胞の貪食が LPS 刺激による M $\phi$ のサイトカイン産生を抑制

することから、この分化誘導作用が MTX の抗炎症作用の一部を担っていることが推測された。また、CD36 が酸化 LDL のスカベンジャー受容体であることは、MTX による CD36 発現が RA における泡沫細胞の形成にも関与していることも示唆している。M $\phi$ の分化が RA の病態にどのような影響を与えるのかについて更に解析することは、RA の病態の解明のみならず、抗リウマチ薬の作用機序を解析するためにも重要な課題であると考えられた。

## E. 結語

MTX は RA 患者における有効血中濃度の範囲内において、単球・M $\phi$ の p21 発現と分化を誘導した。MTX により発現が誘導された CD36 は、アポトーシス細胞の貪食を介してサイトカイン産生を抑制するものと考えられた。これらの作用は MTX の抗炎症作用や抗リウマチ作用の一部を担っている可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Matsui, T., Akahoshi, T., Namai, R., Hashimoto, A., Kurihara, Y., Rana, M., Nishimura, A., Kitasato, H., Endo, H., Kondo, H.: Selective recruitment of CCR6 expressing cells by increased production of MIP-3  $\alpha$  in rheumatoid arthritis. Clin. Exp. Immunol. 125:155-161, 2001

2. Kitasato, H., Noda, M., Akahoshi, T., Okamoto R., Koshino, T., Murakami, Y., Inoue, M., Kawai, S. : Activated Ras modifies the proliferative response of rheumatoid synovial cells to TNF- $\alpha$  and TGF- $\alpha$ . *Inflamm. Res.*, 50:592-597, 2001
3. Uchida, T., Gao, J-P., Wang, C., Satoh, T., Ito, I., Muramoto, M., Hyodo, T., Irie, A., Akahoshi, T., Jiang, S-X, Kameya, T., Baba, S. : Antitumor effect of *bcl-2* antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides on human renal-cell carcinoma cells *in vitro* and in mice. *Molecular Urology*, 5:71-78, 2001.
4. Shimoyama Y., Sakamoto R., Akahoshi T., Tanaka M., Ohtsuki K. : Characterization of secretory type II phospholipase A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>-IIA) as a glycyrrhizin (GL)-binding protein and the GL-induced inhibition of the CK-II-mediated stimulation of sPLA<sub>2</sub>-IIA activity *in vitro*. *Biol. Pharm. Bull.*, 24:1004-1008, 2001.
5. Kurihara, Y., Endo, H., Akahoshi, T., Kondo, H. : Up-regulation of prostaglandin E receptor EP2 and EP4 subtypes in rat synovial tissues with adjuvant arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 123:323-330, 2001.
2. 学会発表
1. Watanabe, M., Namai, R., Matsui, T., Kondo, H., Akahoshi, T. : Methotrexate-induced expression of p21 and CD36 in monocytes. American College of Rheumatology 65th National Scientific Meeting, 2001.11.10-11.15, San Francisco, California.
2. 渡邊 恵、松井俊通、近藤啓文、赤星 透 : マクロファージの p21 発現と分化誘導に 及ぼすメントレキサートの作用、第 29 回日本臨床免疫学会、2001. 12.10-11、大阪

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）  
分担研究報告書

慢性関節リウマチの自己抗体による層別化の試みと治療反応性に関する研究

分担研究者氏名 尾崎承一

聖マリアンナ医科大学 リウマチ・膠原病・アレルギー内科 教授

研究要旨 我々は HMG1/HMG2、gp130-RAPS、および、FRP を新規に自己抗原として同定し、これらに対する自己抗体を RA および種々の自己免疫疾患で測定した。その結果、RA においては抗 HMG1/HMG2 抗体は 48%、抗 gp130-RAPS 抗体は 73%、抗 FRP 抗体は 30%に検出され、いずれも RA の疾患活動性と有意に相関して検出された。以上の経緯から、現在使用可能な種々の自己抗体系に加えて、我々が新規に開発した自己抗体系を用いて RA 症例を層別化し、その subtype における RA の病型・治療反応性・重症度・予後を解析することが、RA の治療戦略を考える上で有用であると思われる。

#### A. 研究目的

慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) は破壊性・増殖性滑膜炎を特徴とする自己免疫疾患である。進行すると滑膜細胞の半自律性増殖が主体となるが、発病初期には種々の抗原系の T 細胞応答が関与する。従って RA はいくつかの subtype よりなる極めて heterogeneous な集団と考えられ、このことが RA の治療戦略や予後を考える上での障害となっている。RA の機能的 subtype の分類を T 細胞の感作抗原に基づき行うことは理論的であるが実用的でない。むしろ、病態と密接に関連する自己抗体による分類が臨床的、現実的である。しかし、これまでにこのような分類と解析の試みは無く、これは有用な自己抗体がなかったことにも起因する。以上の経緯から、本研究は現在使用可能な種々の自己抗体系に加えて、我々が新規に開発した自己抗体系を用いて RA 症例を層別化し、その subtype における RA の病型・治療反応性・重症度・予後を解析して、かかる層別化の臨床診断的意義を確立することを目的とする。

#### B. 方法

本年度は新規自己抗体の開発と測定系の樹立を行った。新規自己抗体の開発は、(1)対応抗原の生化学的精製とアミノ酸配列の同定、および、(2)発現クローニングという分子生物学的手法によった。新規自己抗体の測定系の樹立は、精製抗原または合成ペプチドを用いた酵素抗体法 (ELISA) によった。

#### C. 結果

##### (1) 生化学的手法による新規自己抗原の同定： HMG1/HMG2

我々は潰瘍性大腸炎患者血清の一部が認識する 28kD/29kD 抗原に着目し、その同定を行なった。6 M guanidine/HCl で処理した HL-60 ( $3 \times 10^9$ ) をソニケーションしたのち超遠沈し、上清を PBS で透析後、逆相 HPLC で精製分画した。そのうち二つの分画が immunoblotting で潰瘍性大腸炎患者血清と反応し、それぞれ 28kD および 29kD のバンドを形成した。この二つの分画を SDS-PAGE で精製したのち Edman 法でアミノ酸解析を行い、N 末端から 32 個のアミノ酸を決定した。ホモロジー検索の結果、28kD および 29kD の蛋白はそれぞれ High Mobility Group (HMG) 蛋白質の HMG2 および HMG1 と一致した。

HMG1/HMG2 は種族間でよく保存された構造をとるため、我々は自己抗体の測定法としてブタ HMG1/HMG2 を抗原とした ELISA を樹立し、RA をふくむ種々の自己免疫疾患についてこの自己抗体を測定した。その結果、抗 HMG1/HMG2 抗体は全身性リウマチ疾患、炎症性腸疾患、自己免疫性肝疾患の一部で高頻度に検出された。全身性リウマチ疾患のうちでは、RA の 48%、全身性エリテマトーデス (SLE) の 45%、シェグレン症候群の 44%、強皮症の 41% において抗 HMG1/HMG2 抗体が検出された。抗 HMG1 抗体の陽性率は抗 HMG2 抗体のそれよりも高い傾向にあった。各疾患における P-ANCA の出現と各対応

抗原 (myeloperoxidase, cathepsin G, lactoferrin, HMG1/HMG2) に対する抗体の出現との相関を検索したところ、RA においてのみ P-ANCA と抗 HMG1/HMG2 抗体との間に有意の相関がみられた。また、いずれの疾患においても抗 HMG1/HMG2 抗体と抗核抗体の出現の間には相関は認められなかった。RA と SLE においては、抗 HMG1/HMG2 抗体と疾患活動性との間に相関が見られた。RA では抗 HMG1/HMG2 抗体の陽性群では陰性群に比し、血沈亢進、CRP 高値、RF 高力価、関節スコア高値および握力低下が有意に認められた。

## (2) 分子生物学的手法新規自己抗原の同定 : gp130-RAPS および FRP

我々は、関節で構成的に発現している抗原が B 細胞や T 細胞を活性化し続け炎症を持続させるのに大きな役割を演じていると考え、その抗原を同定するため RA 患者由来の培養滑膜細胞より入ファージ cDNA 発現ライブラリーを作製し、RA 患者由来関節滑液 IgG をプローブとした発現クローニングを行った。その結果、これまでに 2 つのリウマチ滑膜自己抗原 gp130-RAPS および FRP のクローニングと解析に成功した。

### (a) 可溶性 gp130 (gp130-RAPS)

クローニングされた自己抗原の一つは、IL-6 シグナル伝達子 gp130 の新規な可溶性分子であった。我々はこの新規可溶性 gp130 が RA 患者由来自己抗体の抗原エピトープを有することから gp130-RAPS (gp130 of the rheumatoid arthritis antigenic peptide-bearing soluble form) と命名した。gp130-RAPS は gp130 の mRNA スプライスバリエーションであった。その cDNA は gp130 mRNA の細胞外ドメイン半ばをコードする 83bp の塩基配列を欠失し、そのためフレームシフトが起こり、gp130 に無い 5 アミノ酸 (Asn-Ile-Ala-Ser-Phe: NIASF) とそれに続く終止コドンにコードしていた。従って、その翻訳物の N 末端側は gp130 の細胞外ドメインの約半分の、ちょうどフィブロネクチン型モジュール 3 つから構成され、C 末端はその名の由来のとおり RA における抗原エピトープを形成していた。

gp130-RAPS 蛋白質および既報の長鎖型可溶性 gp130 は RA 患者、健康人にかかわらず血清中および関節滑液中で検出された。gp130-RAPS mRNA は末梢血単核球ではコンカナバリン A により、関節滑膜

細胞および肝細胞癌株 HepG2 細胞では IL-6, OSM, LIF によりその発現の増強を認めた。関節滑液中の可溶性 gp130 の濃度を RA 患者と対照疾患の変形性関節症 (OA) 患者で調べると、長鎖型可溶性 gp130 の濃度にはほとんど違いを認めないが、gp130-RAPS の濃度は RA の方が高い傾向を認め、gp130-RAPS は局所での炎症反応を反映している印象を得た。

gp130-RAPS の抗原エピトープは gp130 に無い特徴的な C 末端アミノ酸配列 NIASF を含む 10 アミノ酸残基内に同定された。gp130-RAPS の C 末端に対する抗体の陽性率は RA で 73%、その他のリウマチ性疾患群 4% (血管炎: 14%、SLE: 6%、シェグレン症候群: 6%、強皮症: 5%、筋炎: 0%、ベーチェット病: 0%)、健康人 0% であり、RA で有意に高頻度であった ( $p < 0.0001$ ) (感度 73%、特異度 96%)。RA における本抗体の力価は、RA の疾患活動指標である CRP、赤沈、血小板数および血清 IL-6 濃度と有意な相関を示した ( $p < 0.005$ )。

### (b) ホリスタチン関連蛋白 (Follistatin-related protein : FRP)

クローニングされたもう 1 つの自己抗原はホリスタチン関連蛋白 FRP であった。FRP は既に TGF- $\beta$ 1 によりマウス骨芽細胞株 NIH3T3 細胞で誘導される分泌蛋白としてクローニングされていた。その名はアクチビンの阻害蛋白ホリスタチンとのアミノ酸配列の相同性に由来するが、その機能は全く不明であった。FRP はホリスタチンモジュールよりなる FS ドメインと EF hand を有する EC ドメインを分子内にもつが、これら共通のドメイン構造を持つ蛋白として osteonectin/SPARC、QR1、hevin、testican などがファミリーを形成している。SPARC は RA などの関節軟骨での発現亢進が報告されているが、FRP の関節炎での動態は全く不明である。我々の解析によると、FRP は分子量 42~50 kDa の分泌蛋白として関節滑液中に検出され、ノーザンブロットではその mRNA は RA 滑膜で OA 滑膜より有意に高発現していた。滑液中の FRP 濃度は RA と OA で差が無かったことから、RA 滑膜における FRP のターンオーバーの亢進が推定された。

大腸菌発現 FRP を用いたイムノブロットによる血清抗 FRP 抗体陽性率は RA 30%、その他の膠原病群 10% (強皮症: 17%、SLE: 10%、シェグレン症候群: 10%、筋炎: 0%)、健康人 0% であり、血清抗 FRP 抗

体の RA 感受性は 30%、特異性は 90%であった。一方、滑液抗 FRP 抗体陽性率は RA 44%、OA 0%であった。RA 患者において血清抗 FRP 抗体陽性群と陰性群では男女比、年齢及び罹病期間に有意差はなかった。しかし、臨床データでは CRP と ESR が陽性群で陰性群に比し有意に高値であり [CRP:  $4.4 \pm 3.3$  v.s.  $2.3 \pm 2.8$  (mg/dl);  $p < 0.05$ 、および、ESR:  $65 \pm 35$  v.s.  $43 \pm 25$  (mm/hr);  $p < 0.01$ ]、抗 FRP 抗体は RA で炎症反応の強い例に多く検出されることが明かとなった。さらに、血清抗 FRP 抗体測定後 1 年間の治療経過では、陽性群は陰性群に比して投薬の強化例が多く、逆に緩和例が少ない傾向を認めた。これらの結果から、RA の予後判定に寄与する抗体である可能性が示唆された。

#### D. 考察

RA における自己抗体として約 80%に出現する rheumatoid factor (RF)や約半数に見られる抗核抗体があるが、これらは疾患活動性とは関連が無い。我々は RA 疾患活動性と相関する新規自己抗体を種々の方法で探索した。生化学的手法により同定された HMG1/HMG2 は転写調節に重要な役割をしている非ヒストン核蛋白の主要成分であるが、近年可溶型 HMG1 の機能も注目されている。抗 HMG1/HMG2 抗体は RA の 48%に疾患活動性と相関して検出され、RA の P-ANCA の主要成分であった。一方、分子生物学的手法により新規可溶型 gp130-RAPS と Follistatin-related protein (FRP) とをクローニングした。前者は gp130 のスプライスバリエーションであり、その抗体は RA 患者の 73%に、RA 特異的にかつ疾患活動性と有意に相関して検出された。FRP は TGF- $\beta$ 1 で誘導される機能未知の分泌蛋白であり、血清抗 FRP 抗体は RA 患者で最も高頻度(30%)にかつ疾患活動性と有意に相関して出現した。

これらの自己抗体が出現する患者の病態に特徴的な傾向があるか否かが今後の焦点である。可溶型 HMG1 の機能としてエンドトキシンショックや急性肺損傷のメディエーターとしての役割や腫瘍の進展・転移における関与が注目されている。RA における可溶型 HMG1 の関与が検討される必要がある。

可溶型 gp130 は膜結合部位および細胞内ドメインを欠失した gp130 である。よって可溶型 gp130 はシグナルを伝達出来ない三量体を IL-6 と形成しその活性を阻害する。さらに、可溶型 gp130 は IL-6 のみならず

gp130 関連サイトカインの活性も阻害し広い抑制的生理活性をもつと予想される。実際、gp130-RAPS は *in vitro* の実験系で IL-6 および OSM の活性を抑制した。一方、患者由来の自己抗体は *in vitro* の実験系で gp130-RAPS 分子と反応してその機能を抑え、gp130-RAPS によって抑制されていた IL-6 や OSM の活性を回復させた。よって gp130-RAPS の C 末端に対する抗体は gp130-RAPS の中和抗体であるといえる。IL-6 は前述のように、RA において関節の炎症と破壊を促す主要なサイトカインの一つであり、OSM も滑膜の増殖を促進する。従って、gp130-RAPS に対する自己抗体は IL-6 や OSM と協調し、RA 患者の関節炎、滑膜増殖、そして関節破壊を促進する作用を有すると考えられ、このことは C 末端に対する抗体価と RA の活動性との相関からも支持される。

FRP の主なエピトープは、段階的に C 末端を欠失された GST 融合 FRP のイムノプロットにより、Ca<sup>2+</sup> の結合する EF ハンドに隣接する EC ドメイン上に推定された。さらに、合成ペプチドを用いた ELISA により、エピトープはこの領域のアミノ酸残基 156-176 に決定された。このエピトープの機能は不明であるが、FRP はホリスタチンとのアミノ酸配列の類似性により何らかの活性阻害物質であると想定されている。そのような活性阻害物質に対する抗体は阻害の解除という点で RA の病態形成に関与することが推定された。実際、我々は FRP がマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-1, -3 やプロスタグランジン(PG)E<sub>2</sub> の産生を抑制することを見出している(田中真生ほか、投稿準備中)。MMP-1, -3 や PGE<sub>2</sub> は骨・軟骨基質を破壊する直接作用分子であり、FRP は TNF- $\alpha$  や IL-1 を軸とするサイトカインカスケードとは異なった経路で RA 関節炎を阻止し得る分子と考えている。

以上の観点から、抗 HMG1/HMG2 抗体、抗 gp130-RAPS 抗体、および、抗 FRP 抗体の出現するような、ある一定の病態が想定される。今後、簡便な各抗体の測定法を用いて RA 患者血清を検索し、陽性抗体により患者を層別化して、各 subtype における RA の病態・治療反応性・重症度・予後を解析する方針である。かかる層別化の臨床診断的意義を確立することが、RA の EBM に基づく早期治療法の確立に寄与すると思われる。

#### E. 結論

我々は HMG1/HMG2、gp130-RAPS、および、FRP

を新規に自己抗原として同定し、これらに対する自己抗体を RA および種々の自己免疫疾患で測定した。その結果、RA においては抗 HMG1/ HMG2 抗体は 48%、抗 gp130-RAPS 抗体は 73%、抗 FRP 抗体は 30%に検出され、いずれも RA の疾患活動性と有意に相関して検出された。

#### F. 参考文献

1. Sobajima J., Ozaki S., Osakada F., Uesugi H., Shirakawa H., Yoshida M. and Nakao K.: Novel autoantigens of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (P-ANCA) in ulcerative colitis: non-histone chromosomal proteins, HMG1 and HMG2. *Clin. Exp. Immunol.* 107(1): 135-140, 1997.
2. Sobajima J., Ozaki S., Uesugi H., Osakada F., Shirakawa H., Yoshida M. and Nakao K. : Prevalence and characterization of P-ANCA directed against HMG1 and HMG2 in ulcerative colitis. *Clin. Exp. Immunol.* 111(2): 402-407, 1998.
3. Uesugi H., Ozaki S., Sobajima J., Osakada F., Shirakawa H., Yoshida M. and Nakao K. : Prevalence and characterization of novel P-ANCA, antibodies to the high mobility group non-histone chromosomal proteins HMG1 and HMG2, in systemic rheumatic diseases. *J. Rheumatol.* 25: 703-709, 1998.
4. Tanaka M., Ozaki S., Osakada F., Mori K. and Nakao K.: Cloning of follistatin-related protein (FRP) as a novel autoantigen in systemic rheumatic diseases. *Int. Immunol.* 10(9): 1305-1314, 1998.
5. Sobajima J., Ozaki S., Uesugi H., Osakada F., Inoue M., Fukuda Y., Shirakawa H., Yoshida M., Rokuhara A., Imai H., Kiyosawa

K. and Nakao K.: High mobility group non-histone chromosomal proteins HMG1 and HMG2 are significant target antigens of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune hepatitis. *Gut* 44(6) : 867-873, 1999.

6. Tanaka M., Kishimura M., Ozaki S., Osakada F., Hashimoto H., Okubo M., Murakami M. and Nakao K.: Cloning of novel soluble gp130 and detection of its neutralizing autoantibodies in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 106(1): 137-144, 2000.

#### G. 健康危険情報 特になし。

#### H. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ozaki S.: ANCA in inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol.* 35: 721-723, 2000.
2. Ma W., Ozaki S., Sobajima J., Uesugi H., Murakami M., Tanaka M., Kozuki M., Hashimoto H., Fujita Y., Kawabata D., Osakada F., Shirakawa H., Yoshida M., Hayami M. and Nakao K.: Detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in MRL/lpr/lpr mice and analysis of their target antigens. *Autoimmunity* 32: 282-291, 2000.
3. Okazaki T., Ozaki S., Nagaoka T., Kozuki M., Sumita S., Tanaka M., Osakada F., Kishimura M., Kakutani T. and Nakao K.: Antigen-specific Th1 cell as direct effectors of Propionibacterium acnes-primed lipopolysaccharide-induced hepatic injury. *Int. Immunol.*

2. 学会発表

1. Akaogi J., Yamada H., Azuma K., Hama N., Kikukawa T., Mori T. and Ozaki S.: Suppression of pannus formation by 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 is mediated through induction of apoptosis of synovial vascular endothelial cells and fibroblast-like synoviocytes. The 65th National Scientific Meeting of the American College of Rheumatology. 2001, San Francisco, California, U.S.A.
2. Akaogi J., Yamada H., Hama N., Kikukawa T., Mori T., Kawai S. and Ozaki S. : Prostaglandin E2 receptor Subtype EP4 Mediated suppression of pannus formation in rheumatoid arthritis. The 65th National Scientific Meeting of the American College of Rheumatology. 2001, San Francisco, California, U.S.A.
3. Yamasaki Y., Azuma K., Yamasaki M., Hama N., Yamada H. and Ozaki S.: Pulmonary fibrosis dose not progress during long-term follow-up in most of the patients with systemic sclerosis without cyclophosphamide treatment. The 65th National Scientific Meeting of the American College of Rheumatology. 2001, San Francisco, California, U.S.A.
4. Yamasaki Y., Azuma K., Yamasaki M., Hama N., Yamada H. and Ozaki S.: Small airway disease as an important complication of systemic sclerosis. The 65th National Scientific Meeting of the American College of Rheumatology. 2001, San Francisco, California, U.S.A.
5. Yamasaki Y., Azuma K., Yamasaki M., Hama N., Yamada H. and Ozaki S.: Lipidmicrosphere-incorporated prostaglandin E1 for the treatment of pulmonary fibrosis in patients with systemic sclerosis. The 65th National Scientific Meeting of the American College of Rheumatology. 2001, San Francisco, California, U.S.A.
6. 三森経世、田中真生、村上雅朗、尾崎承一：慢性関節リウマチの病原的自己抗体と対応抗原。「シンポジウム 13：新しい自己抗体と臨床的意義」第 45 回日本リウマチ学会総会・学術集会。2001 年 5 月 14-16 日。東京。
7. 藤田義正、村上雅朗、尾崎承一、中尾一和：肥満物質（レプチン）の免疫系における抗アポトーシス作用。「ワークショップ：リウマチ性疾患とアポトーシス」第 45 回日本リウマチ学会総会・学術集会。2001 年 5 月 14 日-16 日。東京。
8. 加勢千容、山田秀裕、浜信昭、笹下薫、中島康雄、尾崎承一：慢性関節リウマチに合併する細気管支炎の臨床的意義とその治療。「ワークショップ：慢性関節リウマチ」第 29 回日本臨床免疫学会総会。2001 年 12 月 10 日-11 日。大阪。
9. 田中真生、尾崎承一、川端大介、村上雅朗、三森経世：慢性関節リウマチにおける抗ホリスタチン関連蛋白抗体のエピトープ反応性および HLA-DQ 抗原との相関。「ワークショップ：慢性関節リウマチ」第 31 回日本免疫学会総会・学術集会。2001 年 12 月 11 日-13 日。大阪。
10. 藤井琢磨、松井友吾、蓬田雅人、桐栄純一、黒沢大、小寺洋、松島瑞子、稲田祐二、尾崎承一、広瀬幸子、白井俊一、西村裕之：SLE モデルマウスにおける内在性レトロウィルスに対する自己免疫応答の遺伝支配。「ワークショップ：全身性自己免疫疾患」第 31 回日本免疫学会総会・学術集会。2001 年 12 月 11 日-13



日。大阪。

11. 田中真生、川端大介、岸村昌明、小坂田史雄、村上雅朗、尾崎承一、三森経世：慢性関節リウマチにおける抗ホリスタチン関連蛋白(FRP)抗体のエピトープおよび HLA タイプによる抗体出現性の解析。第 45 回日本リウマチ学会総会・学術集会。2001 年 5 月 14 日-16 日。東京。
12. 川端大介、藤田義正、田中真生、村上雅朗、尾崎承一、三森経世：経過中に重症筋無力症を合併したオーバーラップ症候群の一例。第 45 回日本リウマチ学会総会・学術集会。2001 年 5 月 14 日-16 日。東京。

I. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

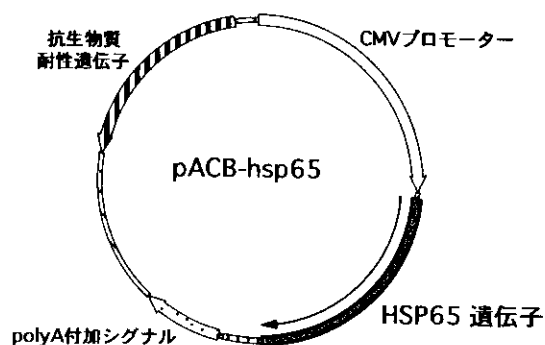
研究要旨：Complete Freund adjuvant (CFA)投与により惹起されるアジュバント関節炎(AA)では、65-kDa heat shock protein (HSP65)反応性 T細胞が関節炎の発症に関与する。しかし、HSP65 蛋白の免疫は、CFA による AA を抑制する。今回、HSP65 をコードするプラスミドを用いた DNA ワクチンにて AA を抑制できるかを検討した。その結果、AA の発症早期に DNA ワクチンを施行することにより、関節炎を抑制できることが示された。

### A. 研究目的

Rheumatoid arthritis (RA)の動物モデルとしてアジュバント関節炎があり、結核菌の菌体成分を含む Complete Freund adjuvant (CFA) を Lewis rat に免疫することにより関節炎が発症する。これらの rat では CFA に含まれる 65-kDa heat shock protein (HSP65) に反応する T 細胞が誘導され、この HSP65 反応性 T 細胞を別の rat に投与することにより関節炎を移入できることが示されている。一方、HSP65 蛋白を免疫した場合には関節炎はおこらず、これらの rat では CFA 投与によって誘導される関節炎に対して抵抗性となることが報告されている。DNA ワクチンでは、抗原蛋白 cDNA を組み込んだ plasmid DNA を生体に直接注射することにより抗原蛋白を局所の細胞で発現させて免疫を誘導する。今回、DNA ワクチンにて誘導された HSP64 に対する免疫反応がアジュバント関節炎に及ぼす影響を検討した。

### B. 研究方法

サイトメガロウイルス由来のプロモーターをもつ pACB ベクターに、マイコバクテリア由来 HSP65 の cDNA を組み込んだ pACB-hsp65 (図 1) を作製し、DNA ワクチンに使用した。



Lewis ラット尾根部の皮内に生理食塩水に溶解した 50 µg の pACB-hsp65 を 1 週間おきに 3 回注射することにより免疫を行った。アジュバント関節炎は 100 µl の CFA をラットの尾根部の皮内に注射することにより誘導した。HSP65 に対する血清 IgG 抗体の測定および脾細胞を用いたリンパ球増殖試験を行った。

(倫理面への配慮)

実験動物は、当大学の実験動物取り扱い倫理指針を遵守して実験に使用する。

### C. 研究結果

pACB-hsp65 の免疫により、CFA 投与と同様に HSP65 に対する血中 IgG 抗体が誘導された。また、脾細胞を用いたリンパ球増殖試験にて、pACB-hsp65 免疫ラット由来の脾細胞は、HSP65 に反応することが示された (図 2)。

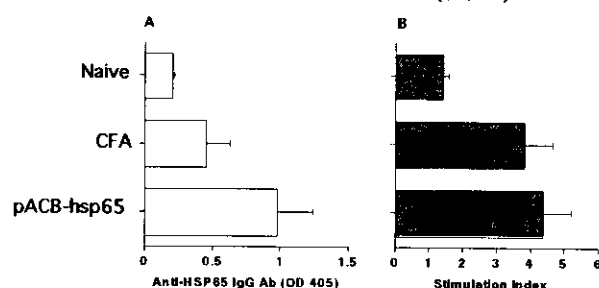


図 2

しかし、CFA 投与によって誘導されるような関節炎は発症しなかったことより、アジュバント関節炎に対する DNA ワクチンの予防的効果について検討を行った。pACB-hsp65 初回免疫後 45 日に CFA を注射しアジュバント関節炎を誘導したところ、pACB-hsp65 を前投与したラットではアジュバント関節炎の発症は抑制された (図 3)。

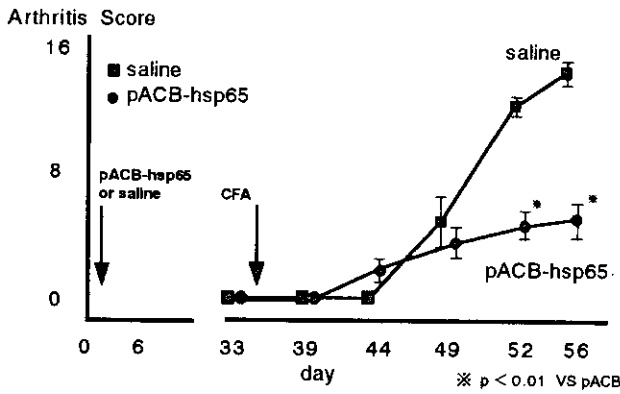


図 3

次にアジュバント関節炎に対する DNA ワクチンの治療的効果について検討を行った。CFA を注射してアジュバント関節炎を発症させた後 (CFA 投与後 14 日目) に pACB-hsp65 を免疫した rat では、陽性コントロール群 (CFA のみの投与群) に比べ関節炎の減弱は認めなかった (図 4)。

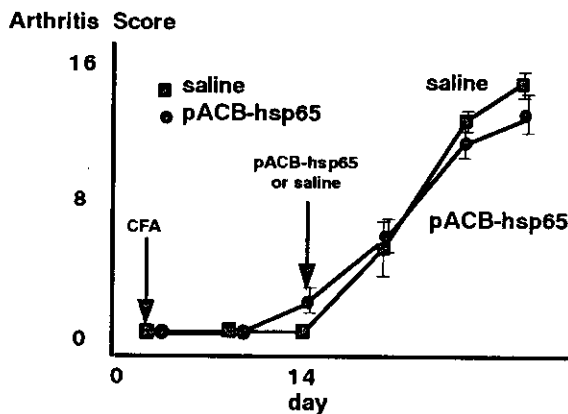
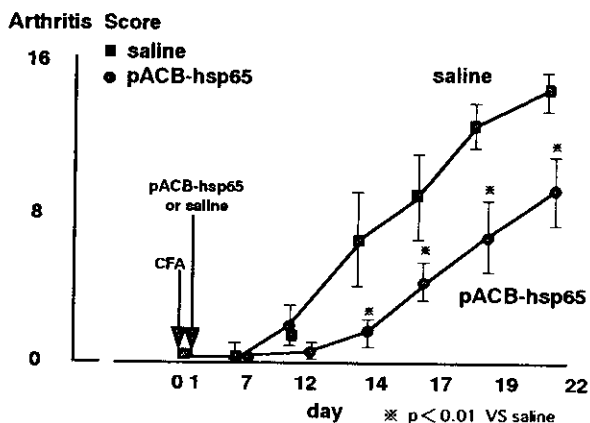


図 4

一方、CFA 投与後、翌日より pACB-hsp65 を免疫したグループでは陽性コントロール群に比して関節炎が有意に減弱した (図 5)。

図 5



## D. 考察

pACB-hsp65 を用いた DNA ワクチンにはアジュバント関節炎に対する予防的効果のみならず、CFA 投与後、早期に施行した場合には治療的効果も認められることが示された。HSP65 は哺乳類の HSP60 とアミノ酸レベルで 48% の相同性があり、HSP65 の N 末端から 256-270 の 5 つのアミノ酸配列は rat の HSP60 にも存在する。

HSP65 蛋白を免疫した rat 由来のアジュバント関節炎抑制性 T 細胞エピトープを検討した従来の報告では、関節炎抑制性の MHC クラス II 拘束性 T 細胞 (主に CD4+ T 細胞) のみがこの共通配列をエピトープとして認識し、マイコバクテリアの HSP65 のみならず rat の HSP60 にも反応することが明らかにされている。すなわち、自己の HSP に交差反応する T 細胞が関節炎の抑制に関与する可能性が示されている。

研究分担者の検討では、DNA ワクチンを施行した rat の T 細胞は HSP60 にも交差反応するが示され、ラット HSP60 と共通のエピトープを認識している可能性が示唆された。よって、DNA ワクチンによるアジュバント関節炎の抑制にも、自己の HSP60 と反応する T 細胞が関与することが推定される。

## E. 結論

アジュバント関節炎の発症早期に DNA ワクチンを施行することにより、関節炎を抑制できる可能性が示された。

## F. 健康危険情報

DNA ワクチンに用いるプラスミドは、遺伝子工学の分野で最も頻用されるベクターのひとつであり、その安全性は保証されている。さらに、ヒトにおける DNA ワクチンの安全性は、欧米で施行されている DNA ワクチンの臨床試験にて証明されている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

佐藤由紀夫, Immunostimulatory DNA sequence. 呼吸, 464-469, 2001.

佐藤由紀夫, 減感作から DNA ワクチンへ. 治療, 35, 35, 564-567, 2001.

佐藤由紀夫, DNA ワクチン. 臨床病理, 47, 669-672, 2001.

Yukio Sato, Masayuki Ito, Hiroko Kobayashi, Inhibition of pulmonary eosinophilia by DNA vaccine. Pediatric Allergy and Clinical Immunology, in press

### 2. 学会発表

佐藤由紀夫, 小林浩子, DNA ワクチン. (第 13 回日本アレルギー学会春期臨床大会・ワークショップ) アレルギー, 50, 222, 2001

## G. 知的財産権の出版・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