

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

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

分担研究者 西本 憲弘 大阪大学健康体育部健康医学第一部門、  
同・大学院医学系研究科分子病態医学専攻生理病態学 助教授

慢性関節リウマチ(RA)の関節組織の病理学的特徴は血管新生を伴う増殖性滑膜炎であり、増殖した滑膜がパンヌスを形成し関節を破壊する。血管新生はパンヌス形成に不可欠と考えられ、その病態に Vascular endothelial growth factor (VEGF)の関与が示唆されている。RA 滑膜細胞から VEGF が産生され、Interleukin-6 (IL-6) および Interleukin-1 (IL-1) 刺激によりその産生は増強された。Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) 単独では産生増強は認められなかった。IL-6 は IL-1 あるいは TNF  $\alpha$  と相乗的に VEGF 産生を増強し、抗 IL-6 受容体(IL-6R)抗体はこれらの相乗効果を阻害した。さらに RA 患者の血清中の VEGF は高値を示し、ヒト型化抗 IL-6R 抗体治療により正常値に低下した。IL-6 は関節滑膜での VEGF 産生を介して血管新生を促進する可能性がある。また IL-6 阻害治療が効果を発揮する機序の1つに VEGF の抑制があると考えられた。

#### A. 研究目的

慢性関節リウマチ(RA)は関節滑膜を主座とする慢性炎症性疾患である。その初期の病理学的特徴は炎症細胞の浸潤と血管新生を伴う増殖性滑膜炎で、増殖した滑膜がパンヌスを形成し、関節を破壊する。全身性に関節破壊が進行すると身体機能を障害し、QOL の低下が見られる。致命的な症状を引き起こす場合もある。現在用いられている抗リウマチ薬や免疫抑制剤に対して抵抗性を示す患者も多く新たな治療法の開発が必要である。血管新生はパンヌス形成に重要と考えられ、血管新生の抑制によりパンヌス形成ひいては関節破壊を阻止できる可能性がある。

RA 患者の滑膜組織ではマクロファージや繊維芽細胞に著明な VEGF の発現がみられるという報告をはじめ RA の血管新生に VEGF の関与が示唆されている。また VEGF は炎症反応にかかわることも報告されている。これまでの研究で我々は IL-6 の阻害治療が RA 患者の症状や検査異常を改善させることを明らかにした。また同時に行った Castleman 病の治療において、IL-6 阻害が血管新生を抑制する可能性も示した。一方、ミエロマ細胞では IL-6 刺激により VEGF 産生が亢進することが証明されている。そこで RA において IL-6 阻害による血管新生抑制の可能性を知るため、IL-6 の血管内皮細胞増殖に対する作用および IL-6 による滑膜細胞からの VEGF 産生に対する作用を検

討した。さらに大阪大学で、先進医療として難治性 RA 患者に対するヒト型化抗 IL-6R 抗体治療を行い、IL-6 阻害による血清中の VEGF に対する効果を検討した。

#### B. 研究方法

##### 1) 血管内皮細胞の増殖に対する IL-6 の作用

ヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC, 三光純薬) ならびにヒト皮膚微小血管内皮細胞 (HMVEC, 三光純薬)の増殖に対する IL-6 の作用を検討した。血管内皮細胞は 96 well flat plate に  $3 \times 10^3$  cells / well の濃度でまき 37°C、7.5%CO<sub>2</sub> の条件下で 72 時間培養した。HUVEC は培養終了の 6 時間前に、また HMVEC は 18 時間前に 18.5 KBq/well の <sup>3</sup>H-TdR を添加し DNA に取り込まれた <sup>3</sup>H-TdR で増殖活性を評価した。実験はすべて triplicate で行った。

##### 2) 滑膜細胞からの VEGF 産生に対するサイトカインの作用

インフォームドコンセントを得た RA 患者の手術時に採取した関節滑膜組織より滑膜繊維芽細胞を分離し滑膜細胞として用いた。この細胞を 48 well flat plate に  $2 \times 10^4$  cells / well の濃度でまき 37°C、7.5%CO<sub>2</sub> の条件下にて培養した。無刺激あるいは IL-6(100ng/ml)+可溶性 IL-6R(sIL-6R)(100ng/ml)、IL-1(5ng/ml)、TNF  $\alpha$ (10ng/ml)、IL-6(100ng/ml) + sIL-6R(100ng/ml)+IL-

1(5ng/ml)、IL-6(100ng/ml) + sIL-6R(100ng/ml)+ TNF $\alpha$ (10ng/ml)で刺激を行い、それぞれ24時間、48時間、72時間培養後の上清中の VEGF 量を酵素抗体法で測定した。IL-6 阻害による VEGF 産生抑制を調べるためヒト型化抗 IL-6R 抗体 (25 $\mu$ g/ml) を IL-6 による刺激 30 分前に加え 48 時間培養した後 VEGF を定量した。コントロールとしてヒト IgG (25 $\mu$ g/ml) を用いた。実験はすべて triplicate で行った。ELISA は R&D 社のキットを用い測定は duplicate で行った。

### 3) IL-6 阻害治療の臨床研究

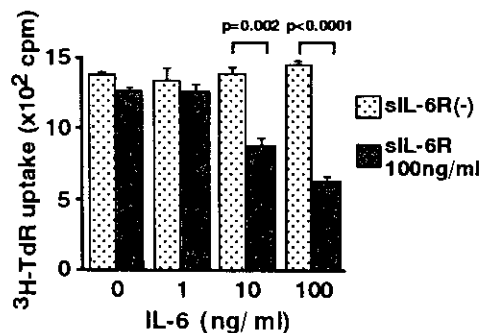
大阪大学先進医療審査会の許可のもと、インフォームドコンセントを得た難治性 RA 患者 9 人に対し、ヒト型化抗 IL-6R 抗体, MRA, 治療を行った。治療は 50mg/body 週 2 回または 100mg/body 週 1 回点滴静注にて行った。治療前ならびに治療開始後 2 ヶ月後、6 ヶ月後の血清中の VEGF を測定し、IL-6 阻害による血中 VEGF への影響を調べた。

## C. 研究結果

### 1) 血管内皮細胞の増殖に対する IL-6 の作用

IL-6 単独では HUVEC の増殖になら影響を及ぼさなかったが、sIL-6R (100ng/ml) の存在下では、IL-6 は 10ng/ml から 100ng/ml の範囲内で HUVEC の増殖を濃度依存性に抑制した (図 1)。同様の現象は HMVEC を用いた場合にも認められた。

図1 血管内皮細胞の増殖に対するIL-6の作用



また 10ng/ml の VEGF は、IL-6 と sIL-6R によるこれらの細胞の増殖抑制効果を打ち消し逆に増殖を促進させた。

### 2) 滑膜細胞からの VEGF 産生に対するサイトカインの作用

RA 滑膜細胞は無刺激でも培養上清中に VEGF を産生していた (図 2)。IL-6 は sIL-6R の存在下で、また IL-1 も単独で滑膜細胞からの VEGF の産生を増強した。一方 TNF $\alpha$  単独では VEGF の産生を増強しなかった。さらに IL-6 は IL-1 あるいは TNF $\alpha$  と相乗的に VEGF 産生を増強し、抗 IL-6R 抗体はこの相乗効果を阻害した (図 3)。

図2 RA滑膜細胞からのVEGF産生に対するIL-6とTNF $\alpha$ , IL-1の相乗効果

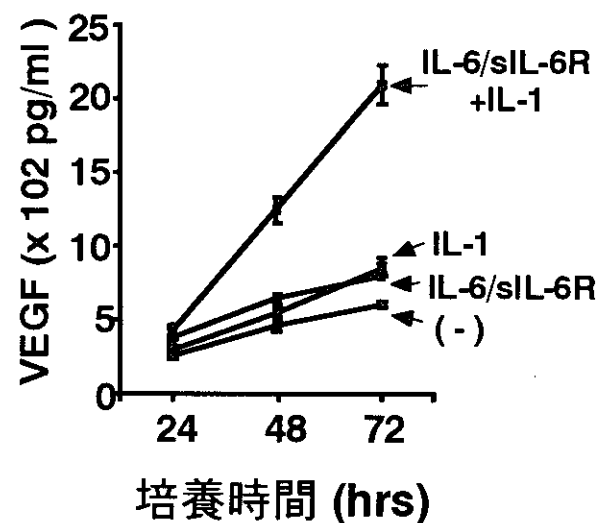
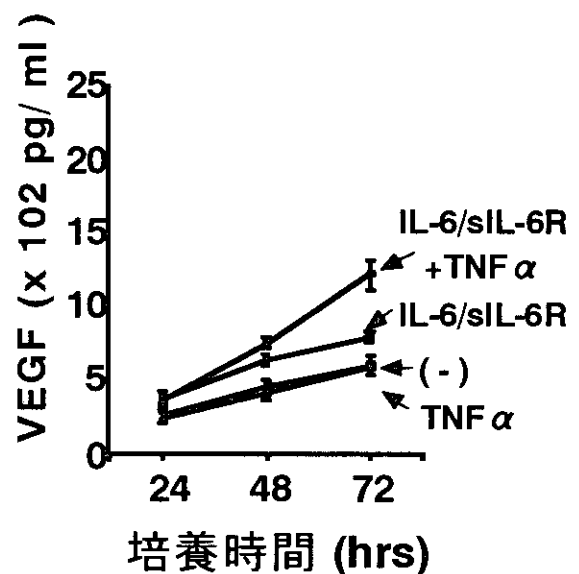
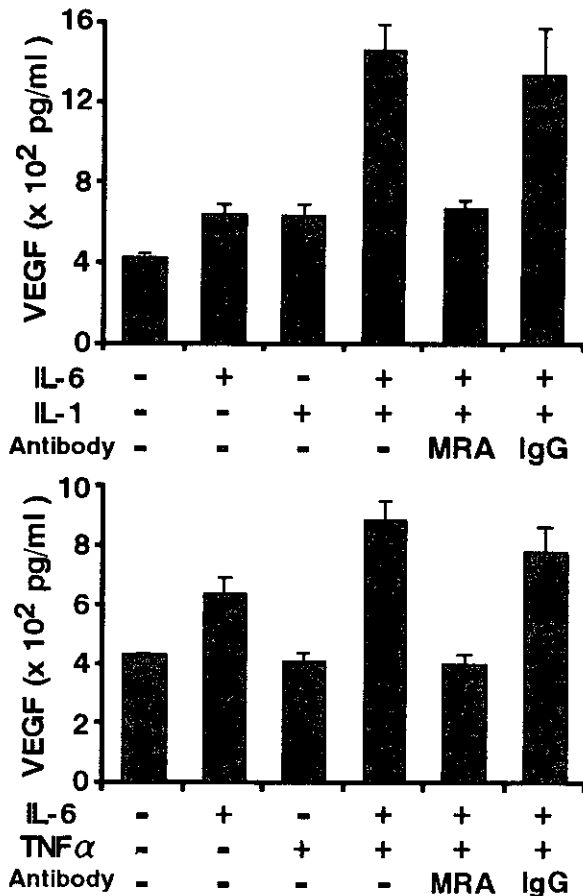


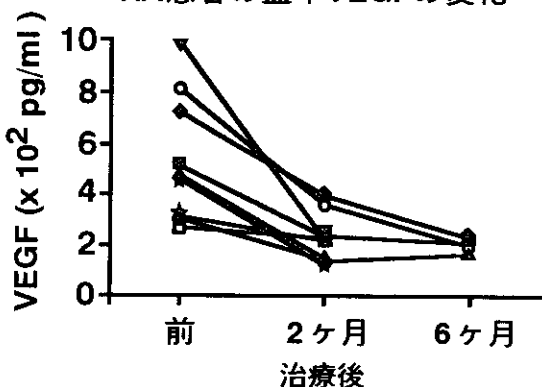
図3 RA滑膜細胞からのVEGF 産生に対するMRAの阻害効果



### 3) IL-6 阻害治療による血中 VEGF の変化

血中 VEGF は治療開始前には 9 人中 6 人で高値を示していた (RA: 535 ± 246 pg/ml, n=9、健常人: 189 ± 130 pg/ml, n=32)。ヒト型化抗 IL-6R 抗体投与により RA の臨床症状や検査所見の改善に加えて、血中 VEGF は全例で改善した (2 ヶ月後: 228 ± 96 pg/ml, n=9、6 ヶ月後: 199 ± 24 pg/ml, n=5) (図 4)。

図4 ヒト型化抗IL-6R抗体療法によるRA患者の血中VEGFの変化



## D. 考察

Castleman 病における抗 IL-6R 抗体治療によりリンパ節組織での新生血管が消失したことから、IL-6 は血管内皮細胞増殖を刺激するのではないかと当初予想された。しかし、予想に反し IL-6 は直接的には血管内皮細胞に対し増殖抑制作用を示した。一方、IL-6 は sIL-6R の存在下で、滑膜細胞から VEGF 産生を促進し、しかもその VEGF は 10ng/ml 以上の濃度では IL-6/sIL-6R による増殖抑制作用を打ち消し逆に血管内皮細胞の増殖を促進させた。従って、患者の関節内で IL-6 は滑膜細胞から VEGF 産生を誘導し、間接的に血管新生を促進している可能性がある。IL-1 や TNFα は IL-6 による VEGF 産生誘導を増強したが、そのような相乗効果も抗 IL-6R 抗体で抑制されたことから、IL-6 の阻害は VEGF 産生抑制を介し血管新生を阻害すると考えられる。実際に、RA 患者でも MRA 治療により血中 VEGF レベルが正常化することから、IL-6 が VEGF 産生調節に中心的な役割を担っていることが確認された。

すでにヒト型化抗 IL-6R 抗体による RA 患者に対する治療の有効性が臨床試験でも明らかになりつつあるが、その効果発現のメカニズムの 1 つに VEGF 抑制があると考えられた。

## E. 結論

IL-6 の阻害は RA の血管新生を抑制する可能性がある。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Mihara M, Kotoh M, Nishimoto N, Oda Y, Kumagai E, Takagi N, Tsunemi K, Ohsugi Y, Kishimoto T, Yoshizaki K, Takeda Y. Humanized antibody to human interleukin-6 receptor inhibits the development of collagen arthritis in monkeys. *Clin. Immunol.* 98:319-326, 2001.

### 2. 学会発表

1) Nishimoto N, Maeda K, Deguchi H, Imai N, Kuritani T, Kakehi T, Sato B, Suemura M,

Kishimoto T, Yoshizaki K: Safety and efficacy of repetitive treatment with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody (MRA) in rheumatoid arthritis (RA). 65th National Scientific Meeting of American College of Rheumatology. San Francisco, USA. Nov. 11-15, 2001.

- 2) 中原英子, 吉崎和幸, 西本憲弘: 抗 IL-6 レセプター抗体治療による慢性関節リウマチ患者の血中 VEGF の抑制. 第46回日本リウマチ学会. 神戸, 日本. 2001年4月22-24日, 2002(予定).

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得  
IL-6 アンタゴニストを有効成分として含有する血中 VEGF 濃度低下剤 (申請中)
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 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

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・教授

研究協力者 吉藤 元

京都大学大学院医学研究科臨床免疫学

### 研究要旨

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）の特異阻害蛋白であるカルパスタチン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カルパスタチン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る。そこでカルパイン活性の抑制が RA における新たな早期治療となる可能性を想定し、RA モデル動物である抗コラーゲン抗体カクテル誘発関節炎マウスのカルパイン阻害薬による治療を試みた。種々のカルパイン阻害物質（カルパスタチン、ロイペプチン、カルペプチン、E-64-d）を関節炎誘発マウスに投与し、関節炎発症に与える影響を検討したところ、すべてのカルパイン阻害薬に関節炎発症の抑制効果が認められ、特に高用量の E-64-d はデキサメサゾンに匹敵する関節炎抑制効果を示した。

### A. 研究目的

我々はカルパイン（カルシウム依存性システインプロテアーゼ）の特異阻害蛋白であるカルパスタチン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カルパスタチン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カルパスタチンに対する自己抗体が検出されること、かかる抗カルパスタチン抗体が *in vitro* でカルパスタチン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。しかし、予備的実験では、カルパイン阻害はラットでは関節炎の抑制効果が認められたものの、マウスでは明らかな効果が確認できなかった。そこで本年度

は新たな関節炎モデルとして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の関与を検討し、カルパイン阻害による関節炎の抑制効果を検討することを目的とした。

### B. 研究方法

1. 材料：カルパインインヒビターとして、ヒトリコンビナントトカルパスタチン（ドメイン I, 8mg/kg, 宝酒造）、ロイペプチン（3mg/kg, ペプチド研）、カルペプチン（3mg/kg, Tocris Cookson Inc.）、E-64-d（3mg/kg または 9mg/kg, ペプチド研）を用いた。また、対照薬剤としてデキサメサゾン（0.1mg/kg）を用いた。これらの薬剤は 15%DMSO 溶液として一匹あたりの投与量が 0.5ml となるよう調整して用いた。

2. 関節炎誘導モノクローナル抗体によるマウス関節炎の作成とカルパイン阻害物質の効果：Balb/c マウス（7 週齢雌，1 群 5 匹）にモノクローナル抗 II 型コラーゲン抗体カクテル（関節炎用カクテル，IBL 社）2mg を尾静脈内注射し，2 日目に LPS 50 $\mu$ g を腹腔内注射して関節炎を誘発した。経時的に後肢の関節炎スコアと footpad および ankle 厚を測定し，関節炎の指標とした。種

々のカルパインインヒビターは0日目より19日目まで上記の用量で1日1回腹腔内投与した。

(倫理面への配慮)

実験に用いた動物については、動物の保護および管理に関する法律(昭和58年12月12日法律第80号)および実験動物の飼育および保管等に関する基準(昭和55年3月27日総理府告示第6号)に留意し、いかなる場合においても実験動物に苦痛・恐怖を与えることのないように配慮した。

### C. 研究結果

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。3mg/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が、E-64-dと対照マウスの間にのみ有意差が確認された(図1)。そこで、E-64-dを9mg/kgに増量して投与したところ、関節炎の発現はデキサメサゾンと同様にほぼ完全に抑制された。また、ヒトカルパスタチン(8mg/kg)でもある程度の関節炎抑制効果が確認された(図2)。

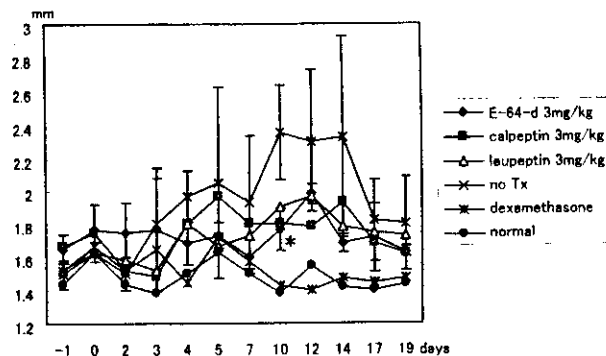


図1. マウス関節炎に対する種々のカルパイン阻害薬の抑制効果(踵厚)

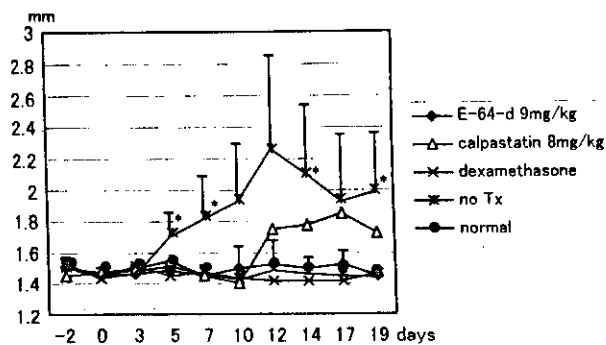


図2. マウス関節炎に対するE-64-dおよびカルパスタチンの抑制効果(踵厚)

また、組織像においてもE-64-d(3mg/kg)投与ラットでは炎症細胞浸潤や骨軟骨破壊の程度が、デキサメサゾンの効果には及ばないものの、対照ラットに比して軽度であった(図3)。

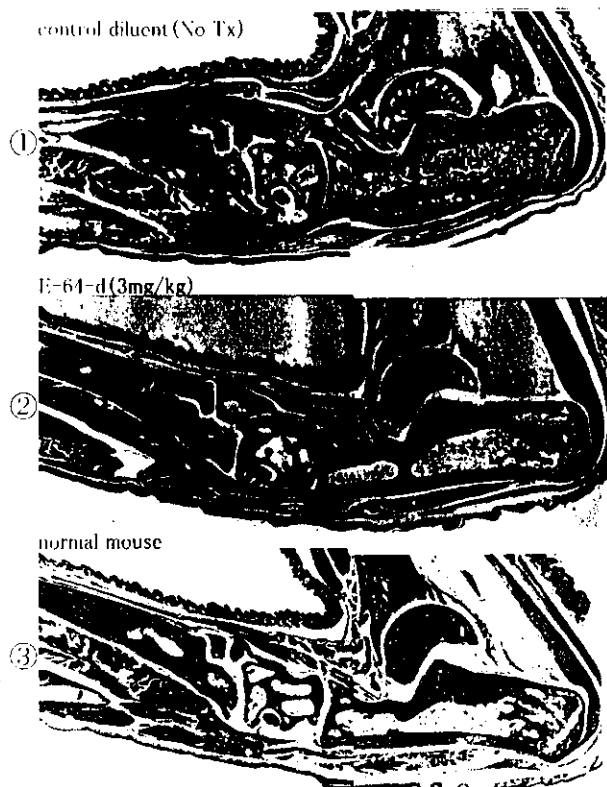


図3. マウス関節炎における足趾の病理組織像

### D. 考察

我々はRAに出現する新たな自己抗体を見だし、その対応抗原遺伝子のクローニングにより、カルシウム依存性中性プロテアーゼ(カルパイン)に特異的な内在性阻害蛋白であるカルパスタチンであることを報告してきた。カルパスタチンはI、II、III、IVの5つのドメインから構成され、ドメインI~IVに共通の領域(TIPPXYR)がカルパイン結合部位と考えられており、それぞれがカルパイン阻害活性を持つ。

カルパインはRA患者の滑膜や関節液中に増加し、RAの関節破壊に関与するという証拠がある。カルパインは、IL-1 $\alpha$ の活性化と分泌、白血球遊走活性の誘導、プロテインキナーゼC活性化などを通じて炎症の惹起に関与する可能性があり、また軟骨基質プロテオグリカンを分解すると報告されている。したがって、RA患者血清中の抗カルパスタチン抗体がカルパスタチン活性を抑制するならば、カルパインを相対的に上昇させ、RA

の発症や進展に関与する可能性がある。我々は、抗カルパスタチン抗体陽性 RA 患者 IgG がカルパスタチン活性を抑制してカルpain活性を上昇させることを見だし、カルパスタチンに対する自己抗体の産生が RA の病態と深く関与する可能性を示唆した。

このような背景から、我々はカルpain活性の抑制が RA における新たな早期治療となる可能性を想定し、RA モデル動物関節炎のカルpain阻害薬による治療を試みてきた。これまでに RA の動物モデルとされる II 型コラーゲン誘発関節炎におけるカルpain阻害の効果を検討してきたが、予備的実験ではラットには抑制効果が認められるものの、マウスには明らかな効果が確認できなかった。そこで本年度は、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する種々のカルpain抑制物質の効果を検討した。用いたカルpain阻害物質はカクテル関節炎に対してすべて一定の抑制効果が認められ、特に E-64-d は高用量を用いるとデキサメサゾンと同程度の抑制効果を示した。

以前の研究ではコラーゲン誘発関節炎ラットでカルペプチンにのみ関節炎抑制効果が認められ、カルペプチンはカルシウム依存性システインプロテアーゼに共通するインヒビターであるため、カルpain以外のカテプシンなどのシステインプロテアーゼを同時に阻害することによって、関節炎の発症が抑えられた可能性も否定できなかった。しかし、今回のカクテル関節炎マウスにおいてはカルパスタチン自身にも一定の抑制効果が認められた。この事実は、少なくともこの関節炎モデルにおいては、他のシステインプロテアーゼではな

くカルpain自身が関節炎の発症に重要な役割を果たしていることを示唆する。

関節炎におけるカルpainの関与とその制御による関節炎抑制の研究には、実験動物の種と系統、関節炎誘発方法の違いが大きいものと考えられる。今後、このカクテル関節炎を用いて、さらに投与スケジュール、至適投与量、副作用について検討を進める。

## E. 結 論

抗コラーゲン抗体カクテル/LPS によって誘発されるマウス関節炎に対して種々のカルpain阻害物質が関節炎抑制効果を持つことを確認し、カルpain阻害が新たな RA の治療戦略となる可能性を示唆した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 三森経世：プロテアーゼインヒビターに対する自己抗体と病態形成への意義。臨床免疫 36(5) : 806-811, 2001.
- 2) 三森経世, 田中真生：慢性関節リウマチの新しい自己抗体。炎症と免疫 10(1):78-83, 2002.

### 2. 学会発表

- 1) 三森経世：膠原病と自己抗体。第 100 回日本皮膚科学会教育講演，東京，2001 年 4 月
- 2) 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「新しい自己抗体と臨床的意義」，第 45 回日本リウマチ学会，東京，2001 年 5 月
- 3) 三森経世：自己抗体研究の進歩。第回日本臨床免疫学会教育講演，大阪，2001 年 12 月

# 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

### COX-2 阻害薬の滑膜炎増幅作用に関する研究

分担研究者：山田秀裕

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）助教授

#### 研究要旨

滑膜炎組織に発現する COX-2 はアラキドン酸から PGE2 などのプロスタノイドを産生する。昨年度までの研究で PGE2 や PGE1 が RA 患者由来初代滑膜細胞による TNF- $\alpha$ , MMP-9 の産生を抑制し、*in vitro* でのパンヌス組織形成を用量依存的に抑制すること、さらに、PGE2 が EP4 受容体サブタイプを介して抗リウマチ作用を発揮することを明らかにした。本年度は、NSAID のみならず COX-2 選択的阻害薬が逆に TNF- $\alpha$ , MMP-9 の産生や *in vitro* でのパンヌス組織形成を増強することを明らかにした。慢性関節リウマチ(RA)の早期治療の主目的は関節破壊を未然に防ぐことである。したがって、RA の早期治療においては、COX 阻害薬の使用を可能な限り避けるべきであると考えられた。

**A. 研究目的：**慢性関節リウマチ(RA)の早期治療の主目的は、関節破壊を未然に防ぐ事によって関節機能障害を予防する事にある。その一手段として抗リウマチ薬が RA の診断早期から治療に用いられるようになった。一方、以前から非ステロイド抗炎症薬(NSAID)が関節炎の発症初期から対症療法として投与されている。さらに最近、消化性潰瘍などの副作用を回避できる NSAID (COX-2 選択的阻害薬)が開発され、欧米では爆発的に普及し、我が国においても RA などの関節痛に対する対症療法に導入されようとしている。COX-2 阻害薬の主作用は、炎症部位でのプロスタノイド産生抑制である。しかし、PGE2、PGD2、あるいはその代謝産物である 15d-PGJ2 などのプロスタノイドは、マクロファージの活性化や TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインを抑制することが知られている。また、我々は

PGE2 がその受容体サブタイプ EP4 を介して抗炎症/抗免疫作用を発揮することを明らかにしてきた。したがって、COX-2 選択的阻害薬は、滑膜炎を増悪させる可能性が考えられる。今年度の研究は、この点について RA 患者由来滑膜細胞を用いて検証する事を目的とした。

**B. 方法：**滑膜組織は、本学倫理委員会の承認のもと、人工関節置換術を施行する RA 患者からあらかじめ文書による同意を取得した上で採取し、実験に用いた。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)、PGE2、EP4 アゴニスト、PGD2、15d-PGJ2 の作用を検討した。

**C. 結果：**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



依存的にパンヌス形成と TNF- $\alpha$ 、MMP-9 産生を抑制した。

**D. 考察：**4年間にわたる本研究は、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して発現することを明らかにし、その作用の増幅が RA の新しい治療戦略になるという仮説を立証してきた。

本年度は、RA 滑膜組織に発現する COX-2 は、種々のプロスタノイドを産生するが、このうち、PGD2 およびその代謝産物 15d-PGJ2 が、PGE2 と同様に滑膜炎抑制作用をもつ事を明らかにした。さらに、これらプロスタノイドの産生を抑制する COX-2 選択的阻害薬は、逆にパンヌス形成と TNF- $\alpha$ 、MMP-9 産生を増幅することを明らかにした。

近年のプロスタノイド受容体サブタイプの解析研究から、それぞれの機能が明らかにされた。疼痛（関節痛）や血管透過性亢進（朝のこわばり）は PGI<sub>2</sub>/IP 受容体、および PGE<sub>2</sub>/EP<sub>3</sub> 受容体を、発熱や血管新生は PGE<sub>2</sub>/EP<sub>3</sub> を介して発現することが明らかにされた。一方、PGE<sub>2</sub>/EP<sub>4</sub> は、1~100nM で骨形成を促進し、10~100 $\mu$ M の超高濃度で破骨細胞の分化と骨吸収を促進することも明らかにされた。われわれは、PGE<sub>2</sub>/EP<sub>4</sub> が、1~100nM でマクロファージを不活性化し、滑膜細胞の増殖/炎症性サイトカイン産生/パンヌス形成を抑制する事を明らかにしてきた。さらに、PGD<sub>2</sub> 代謝産物である 15d-PGJ<sub>2</sub> が、滑膜炎抑制作用をもつ事が明らかにされた。以上のプロスタノイドは、いずれも炎症部位に発現する COX-2 によって産生される。したがって、COX-2 選択的阻害薬は疼痛/こわばり/発熱を抑制する一方で、滑膜増殖/炎症性サイトカイン産生/パンヌス形成を増幅する事になり、その長期投与は RA 滑膜炎を遷延させて関節破壊を

促進させる可能性が考えられる。これの対して少量のステロイド療法は RA の関節破壊を抑制することが、二重盲検比較対照試験で証明されている。したがって、RA の早期治療においては、COX-2 阻害薬などの NSAID の使用は避け、関節痛の抑制が必要な場合は少量のステロイドを考慮すべきであると考えられる。

**E. 結論：**COX-2 選択的阻害薬は疼痛/こわばり/発熱を抑制する一方で、滑膜増殖/炎症性サイトカイン産生/パンヌス形成を増幅する。RA の早期治療においては、COX-2 選択的阻害薬を含む NSAID の使用は避けるべきであると考えられる。

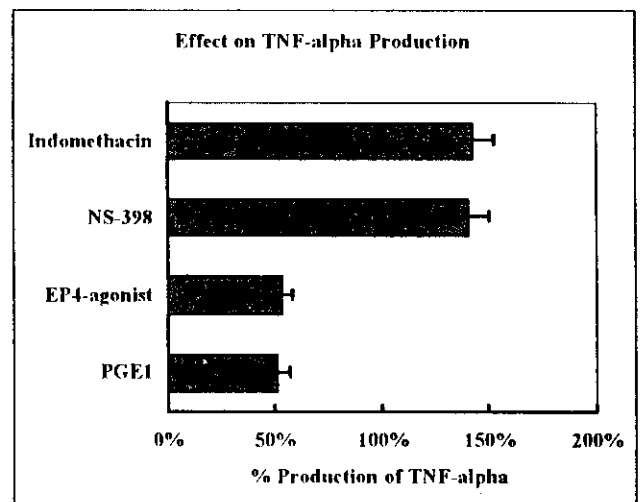


表1 RA 患者初代滑膜細胞からの TNF- $\alpha$  産生に対する NSAID、COX-2 選択的阻害薬、EP4 アゴニスト、PGE1 の作用

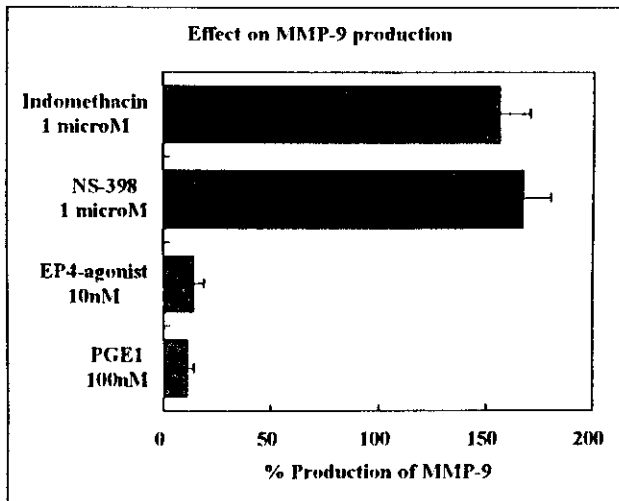


表 2 RA 患者初代滑膜細胞からの MMP-9 産生に対する NSAID, COX-2 選択的阻害薬、EP4 アゴニスト、PGE1 の作用

Table 1. Number of synoviocyte samples examined

	Pannus growth score				difference vs medium
	1	2	3	4	
Medium	0	3	11	2	
PGE1 (100 nM)	8	2	0	0	p<0.001
EP4-agonist (10 nM)	9	1	0	0	p<0.001
NS-398 (1 microM)	0	0	0	6	p<0.001
Indomethacin *	0	0	3	9	p<0.001

\* 1 microM

## 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

分担研究者 山中 寿 東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター・助教授  
協力者 浦野和子・田中栄一・中島亜矢子・谷口敦夫・鎌谷直之

### 研究要旨

血清 MMP-3 は RA 患者の予後因子として重要であることが示されているが、MTX 投与により経時的に低下する傾向が認められ、治療手段の選択に有用な指標となることが示唆された。

### A. 研究目的

Matrix metalloproteinase-3 (MMP-3, stromelysin-1) は、増殖する滑膜組織と軟骨細胞に主として発現する蛋白分解酵素であり、関節リウマチ (RA) の病態にも深く関与していると考えられている。血清 MMP-3 濃度は早期の RA では滑膜増殖の程度を反映する指標と考えられるが、RA 患者で高値を示すことが多く、早期の症例でも高値を呈することが知られており、さらに RA の骨破壊を予測する指標としても有用であることが示されている。我々は、抗リウマチ薬治療の手段と血清 MMP-3 の変動の検討を試みた。

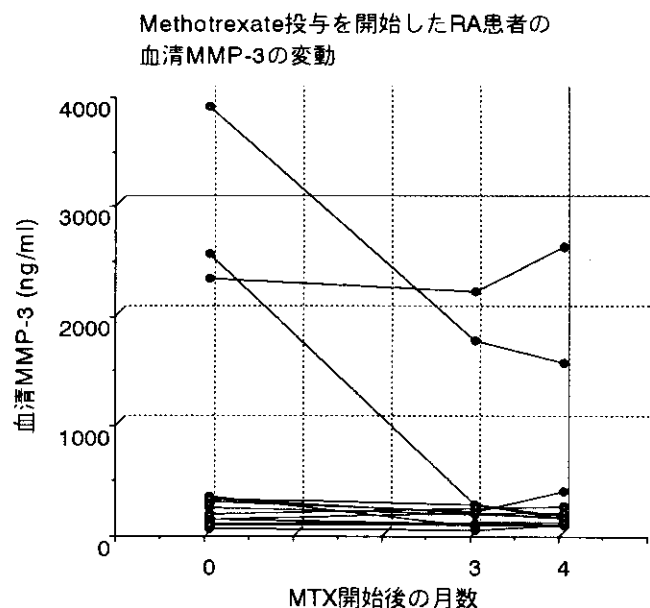
### B. 研究方法

東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センターに通院中の RA 患者で、メトトレキサート (MTX)、ブシラミン (BUC)、スルファサラジン (SASP)、注射金剤 (GST)、オーラノフィン (AUR)、プレドニゾロン (PSL) の投与を開始した患者の治療開始前後の血清 MMP-3 濃度を測定し、他の臨床指標との相関を検討した。

### C. 研究結果

発病後 1 年以内に当科を受診し、治療を

開始した早期 RA 例で、治療手段別に臨床効果と血清 MMP-3 の関連を検討した。1991 年から開始したプロスペクティブな検討で、当初 6 か月間の治療が NSAID のみであった NSAID 群 6 例、当初 6 か月間の治療が注射金剤であった GST 群 10 例、当初 6 か月間の治療が Bucillamine または D-penicillamine であった SH 群 9 例の比較検討では、血清



MMP-3 (ng/ml) は、NSAID 群  $137.5 \pm 28.1 \rightarrow 197.0 \pm 19.3$ 、GST 群  $222.9 \pm 74.4 \rightarrow 203.6 \pm 53.5$ 、SH 群  $366.1 \pm 122.9 \rightarrow 433.8 \pm 138.0$  といずれも有意の変動を起こさなか

った。

しかし、この間にX線変化をLarsen gradeの変動で見るとNSAID群  $2.6 \pm 1.0 \rightarrow 13.6 \pm 4.3$ 、GST群  $5.1 \pm 1.1 \rightarrow 17.3 \pm 4.4$ 、SH群  $3.3 \pm 0.85 \rightarrow 14.6 \pm 3.5$  といずれも有意に増加していた。一方、Preliminaryな検討において、MTX製剤の投与を開始した14例の血清MMP-3は、投与前  $511.2 \pm 848.7$  ng/mlから投与3か月後において  $294.1 \pm 571.7$  ng/mlへと減少傾向を認めた。

さらに、2001年4月以降に新たにDMARDを開始した患者の投与前後の血清MMP-3濃度を検討したところ、同様の結果が得られた。

#### 抗リウマチ薬投与前後の血清MMP-3の推移

	n	投与前	投与後 (4~6か月)
GST	3	$226.1 \pm 238.7$	$251.9 \pm 288.6$
BUC	6	$102.9 \pm 51.1$	$176.9 \pm 94.8$
SASP	6	$241.0 \pm 139.7$	$231.8 \pm 115.4$
ACT	3	$279.2 \pm 95.9$	$417.0 \pm 152.0$
MTX	22	$535.9 \pm 881.3$	$377.4 \pm 508.7$
PSL	7	$185.5 \pm 240.5$	$233.8 \pm 248.1$

#### D. 考察

血清MMP-3は持続的滑膜炎の指標であり、X線的に見たRAの予後を予測する優れた指標であるとの一連の報告がある。つまり、血清MMP-3を指標とするとRAの関節予後の予測がある程度可能になることが考えられ、早期RAで血清MMP-3が高値の例があれば、有効なDMARDを用いて炎症をできる限り制御する必要があることを報告してきた。しかしながら、現在まで抗リウマチ薬をはじめとするRAの治療手段が血清MMP-3濃度に

及ぼす影響については十分な検討がなかった。

一方、RAにおける骨関節破壊はCRP高値が持続する例で進行性であるが、CRPを有効に低下させる治療手段であるステロイド薬やDMARDを用いても骨関節破壊は進行することが知られている。これはCRPがRAにおける非特異的炎症の指標であり、骨軟骨破壊を直接的に反映する指標でないためと考えられる。つまり、MMP-3のような骨関節破壊に直接関与する指標を用いれば、より臨床的に有用な情報となる可能性がある。

今回の検討で、一般のDMARDは血清MMP-3を十分に低下させないこと、MTXは低下させる傾向があることが明らかになった。

最近、経口ステロイド薬の投与は血清MMP-3を低下させず、むしろ上昇させることが報告されている。また、抗TNF- $\alpha$ 抗体や抗IL-6抗体などの抗サイトカイン療法は、血清MMP-3を有効に低下させることも報告された。血清MMP-3濃度は滑膜組織におけるMMP-3産生を反映していると考えられるため、血清MMP-3を低下させる治療はRAにおける骨関節破壊を抑制しうる可能性が高い。

以上のことから、RAに対する治療手段が血清MMP-3を低下させるかどうかについての情報は、骨関節破壊の進行を抑制する観点から非常に重要であり、抗リウマチ薬の臨床評価の上でも重要な指標になると考えられた。

#### E. 結論

血清MMP-3はRAの治療手段の選択上重要な指標であると考えられた。

### 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

分担研究者 吉田 勝美 聖マリアンナ医科大学予防医学教室 教授  
須賀 万智 聖マリアンナ医科大学予防医学教室 助手  
清田 礼乃 聖マリアンナ医科大学大学院 大学院生

研究要旨：厚生科学研究の対象疾患を根拠に基づき選択するとともに、その研究成果による患者負担の軽減程度を定量的客観的に把握する必要がある。今回、患者負担として医療経済の将来的負担として表現するモデルを構築し、その結果から研究戦略に反映する手法を検討した。今回は、既存資料として社会診療医療行為別調査報告、患者調査、将来人口推計をもとに、慢性関節リウマチや変形性関節症について、平成 15 年、20 年、25 年における推計医療費を算出し、研究戦略としての経済的疾患負担の評価方法、予測値の精度向上について検討を行った。

#### A. 研究目的

慢性関節リウマチは有病率からみて筋骨格系疾患の中でも大きな位置づけを占めている。本研究では、この慢性関節リウマチの疾病負担を経済的視点と患者負担の二つの視点から検討することを目的としている。しかしながら、経済的負担については十分な検討がおこなわれていない。今回は、将来にわたる経済負担の状況を明らかにするために、既存資料から将来推計を行った。ことに、慢性関節リウマチと変形性関節症の経済負担を比較することで、研究戦略上の位置づけを検討した。

#### B. 研究方法

経済的負担の将来推計を行うために、次の構造により解析を行った。

医療費の推計値は、患者当たりの推計単価と推計将来患者数をもとに算出した。

推計単価の算出は、社会診療医療行為別調査報告をもとに、慢性関節リウマチと変形性関節症の医療費を患者数で除して求めた。患者数は、患者調査から聖マリアンナ医科大学病院調査をもとに推計値を算出した。

将来患者数の推計値は、人口動態統計と

患者調査から有病率を算出して、将来推計人口から推計患者数を求めた。この際、慢性関節リウマチが年齢に依存している疾患であることから、将来の年齢構成に分けて推計を行った。

今回は、社会診療医療行為別調査報告から疾病分類による集計がなされていないために、今後の分析で調整することとした。

推計年度は、平成 15 年、20 年、25 年と 3 点を推計した。推計には、

図 1 に推計医療費算出のモデルを示した。

#### C. 研究結果

##### 社会診療医療行為別調査

筋骨格系に該当する疾患の中で、年齢階級を 3 段階分けて、医療費を求める。

医療費(Ct)			
		慢性関節リウマチ	変形性関節症
年齢階級	Age1	CiRA1	CiOA1
	Age2	CiRA2	CiOA2
	Age3	CiRA3	CiOA3
	Total	CiRA	CiOA

##### 患者調査

患者調査から、治療対象者数を年齢階級別に求める。

患者数(Pt)			
		慢性関節 リウマチ	変形性関 節症
年齢階級	Age1	PtRA1	PtOA1
	Age2	PtRA2	PtOA2
	Age3	PtRA3	PtOA3
	Total	PtRA	PtOA

### 人口静態統計

患者調査と同年調査の人口静態統計を用いて population at risk を求める。

対象人口(Po)			
		慢性関節 リウマチ	変形性関 節症
年齢階級	Age1	PoRA1	PoOA1
	Age2	PoRA2	PoOA2
	Age3	PoRA3	PoOA3
	Total	PoRA	PoOA

### 有病率の算出

有病率は患者数を対象人口で除して求める。

有病率(Pr)			
		慢性関節 リウマチ	変形性関 節症
年齢階級	Age1	PtRA1/PoRA1	PtOA1/PoOA1
	Age2	PtRA2/PoRA2	PtOA2/PoOA2
	Age3	PtRA3/PoRA3	PtOA3/PoOA3
	Total	PtRA/PoRA	PtOA/PoOA

### 人口推計値

人口の推計値を年齢階級別に平成15、20、25年と求める。

人口推計値(EP)				
		平成15年	平成20年	平成25年
年齢階級	Age1	EP15-1	EP20-1	EP25-1
	Age2	EP15-2	EP20-2	EP25-2
	Age3	EP15-3	EP20-3	EP25-3
	Total	EP15	EP20	EP25

b

### 推計患者数

人口推計値と有病率から、推計患者数を算

出する。

### 推計医療費

推計患者数と治療担架より、推計医療費を算出する。

推計患者数(ExPt)				
		平成15年	平成20年	平成25年
年齢階級	Age1	EP15-1*PrRA1	EP20-1*PrRA1	EP25-1*PrRA1
	Age2	EP15-2*PrRA2	EP20-2*PrRA2	EP25-2*PrRA2
	Age3	EP15-3*PrRA3	EP20-3*PrRA3	EP25-3*PrRA3
	Total	EP15*PrRA	EP20*PrRA	EP25*PrRA

推計医療費(ExCt)				
		平成15年	平成20年	平成25年
年齢階級	Age1	EP15-1*PrRA1*Ct1	EP20-1*PrRA1*Ct1	EP25-1*PrRA1*Ct1
	Age2	EP15-2*PrRA2*Ct2	EP20-2*PrRA2*Ct2	EP25-2*PrRA2*Ct2
	Age3	EP15-3*PrRA3*Ct3	EP20-3*PrRA3*Ct3	EP25-3*PrRA3*Ct3
	Total	EP15*PrRA*Ct	EP20*PrRA*Ct	EP25*PrRA*Ct

表1 患者数の予測

推計外患者数					
	2000	2005	2010	2015	2020
RA	42,247.7	52,181.0	54,780.1	57,666.3	58,458.7
OA	175,895.9	191,392.2	208,180.7	223,566.6	229,604.4
筋骨格系	878,269.7	958,474.6	998,944.7	1,026,631.4	1,037,208.6
推計内患者数					
	2000	2005	2010	2015	2020
RA	13,814.3	14,639.1	15,364.8	16,182.8	16,405.3
OA	13,895.0	15,140.0	16,311.5	17,899.7	19,156.2
筋骨格系	82,417.9	86,861.2	89,812.6	92,123.8	92,748.0
患者総数					
	2000	2005	2010	2015	2020
RA	63,852.0	66,820.2	70,144.9	73,849.1	74,864.0
OA	189,490.9	206,472.1	222,462.2	241,254.1	247,770.6
筋骨格系	1,060,687.6	1,044,535.8	1,078,957.3	1,117,808.2	1,124,460.8

表2 患者数の増加率

2000年を1として					
	2000	2005	2010	2015	2020
RA	1.00	1.06	1.11	1.17	1.19
OA	1.00	1.09	1.17	1.27	1.31
筋骨格系	1.00	1.04	1.08	1.12	1.12

表3 医療費推計値

合計診療費					
	2000	2005	2010	2015	2020
RA	¥488,017	¥542,257	¥594,819	¥653,517	¥689,967
OA	¥1,025,558	¥1,253,384	¥1,490,829	¥1,782,037	¥1,993,241
筋骨格系	¥3,971,861	¥4,119,638	¥4,283,475	¥4,515,781	¥4,789,088

D. 考察

1 推計値の比較

推計医療費について、慢性関節リウマチと変形性関節症を比較することにより、将来的な医療経済の負担を明らかにした。医療経済的負担を軽減することは、厚生科学研究の対象疾患を選択評価する際の指標となりうる。今回、筋骨格系疾患の中で、慢性関節リウマチが持つ医療経済負担が変形性関節症よりも大きく、十分な対象疾患としての根拠になることが示された。

2 医療モデルの精度向上

今回の解析では、根拠となる指標を直近の発表資料のみを使用した。将来予測を行うためには、経年的な変動を考慮していく必要がある。また、治療法の進歩により同じ有病率でも質的な変化が起こり、経済的負担にも影響が起こる。以上の2点を考慮して、時間的変動を時系列回帰分析を導入

するとともに、治療による患者の負担程度を考慮した評価モデルを考慮することが望まれる。現在、日本リウマチ財団の協力を得て、患者負担を通院、入院、積極的治療の3段階に分け患者分布と将来予測を行っており、これらの結果からより将来の予測モデルを補正していくことが可能になると期待される。

E. 結論

研究対象疾患の重要性を客観的に評価する指標として、患者負担が挙げられており、今回は慢性関節リウマチの医療経済的負担について変形性関節症を対比疾患として検討を行うモデルを検討した。

F. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

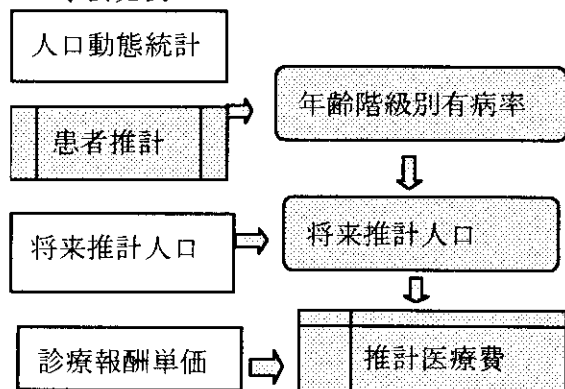


図1 推計医療算出のモデル

G. 知的所有権の取得など

1. 特許許可
2. 実用新案登録
3. その他

研究成果の刊行に関する一覧表（平成13年度）

雑誌-1

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻：頁,出版年
市川 陽一	膠原病の病因と病態	医学と薬学	46(1):5-10,2001
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), 2001
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
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
市川 陽一	DMARD併用療法ーオーバービュー	リウマチ科	27(1):1-5, 2002
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
Fujii T, Nojima T, Yasuoka H, Satoh S, Nakamura K, Kuwana M, Suwa A, Hirakata M, Mimori T	Cytokine and immunogenetic profiles in Japanese patients with adult Still's disease. Association with chronic articular disease.	Rheumatology (Oxford)	40(12):1398-404, 2001
Umebara H, Inoue H, Huang J, Kono T, Minami Y, Tanaka Y, Okazaki T, Mimori T, Bloom ET, Domae N	Role for adapter proteins in costimulatory signals of CD2 and IL-2 on NK cell activation.	Mol Immunol	38(8):587-96, 2002
三森経世	自己抗体と自己抗原の分子生物学.	組織培養工学	27(5): 172-174, 2001
三森経世	膠原病・リウマチの現状と治療.	毎日ライフ	2001年6月号: 12-14, 2001
三森経世	更年期医療とリウマチ疾患.	産婦人科の実際	50(7): 845-850, 2001



研究成果の刊行に関する一覧表（平成13年度）

雑誌-2

三森経世	自己免疫疾患—慢性関節リウマチを中心に。	学術月報	54(7): 67-71, 2001
三森経世	プロテアーゼインヒビターに対する自己抗体と病態形成への意義。	臨床免疫	36(5): 806-811, 2001
三森経世	多発性筋炎／皮膚筋炎の診断と自己抗体。	リウマチ科	26(5): 403-408, 2001
田中真生, 三森経世	慢性関節リウマチの難治性病態と治療。	Mebio	18(12): 97-101, 2001
三森経世	慢性関節リウマチの新しい自己抗体。	炎症と免疫	10(1):78-83, 2002
三森経世	全身性エリテマトーデスの治療。	内科	89(2): 257-260, 2002
三森経世	膠原病と自己抗体。	日本皮膚科学会雑誌	111(12): 1690-1692, 2001
Mihara M, Kotob M, Nisimoto N, Oda Y, Kumagai E, Takagi N, Tsunemi K, Ohsugi Y, Kishimoto T, Yoshizaki K, Takeda Y	Humanized antibody to human interleukin-6 receptor inhibits the development of collagen arthritis in cynomolgus monkeys.	Clin Immunol	98: 319-326, 2001
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
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
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 <i>in vitro</i> and in mice.	Molecular Urology	5:71-78, 2001
Shimoyama Y, Sakamoto R, Akahoshi T, Tanaka M, Ohtsuki K	Characterization of secretory type II phospholipase A2 (sPLA2-IIA) as a glycyrrhizin (GL)-binding protein and the GL-induced inhibition of the CK-II-mediated stimulation of sPLA2-IIA activity <i>in vitro</i> .	Biol Pharm Bull	24:1004-1008, 2001
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

研究成果の刊行に関する一覧表（平成13年度）

雑誌-3

Okazaki T, Ozaki S, Nagaoka T, Kozuki M, Sumita S, Tanaka M, Osakada F, Kishimura M, Kakatani T, Nakao K	Antigen-specific Th1 cell as direct effectors of Propionibacterium acnes-primed lipopolysaccharide-induced hepatic injury.	Int Immunol	13:607-613, 2001
佐藤由紀夫	Immunostimulatory DNA sequence	呼吸	44-469, 2001
佐藤由紀夫	減感作からDNAワクチンへ	治療	35:564-567, 2001
佐藤由紀夫	DNAワクチン	臨床病理	47:669-672, 2001
Sato Y, Ito M, Kobayashi H	Inhibition of pulmonary eosinophilia by DNA vaccine.	Pediatric Allergy and Clinical Immunology	in press

研究成果の刊行に関する一覧表（平成13年度）

書籍-1

著者氏名	論文タイトル	書籍名	編集者名	出版社名 (出版地)	頁,出版年
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	医薬ジャーナル社(大阪)	12-20, 2001
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	医学書院(東京)	534-535, 2002
三森経世	血管炎症候群.	今日の治療指針 2001年版	多賀須幸男, 尾形悦郎, 山口徹, 北原光夫	医学書院 (東京)	624-625, 2001
三森経世	疾患標識抗体.	リウマチナビゲーター	中村耕三, 山本一彦, 原まさ子	メディカルレビュー社 (東京)	68-69, 2001
三森経世	抗核抗体.	リウマチナビゲーター	中村耕三, 山本一彦, 原まさ子	メディカルレビュー社 (東京)	70-71, 2001
三森経世	血管炎症候群.	リウマチナビゲーター	中村耕三, 山本一彦, 原まさ子	メディカルレビュー社 (東京)	202-205, 2001
三森経世	抗Sm抗体, 抗U1RNP抗体.	臨床検査診断マニュアル	古澤新平, 金山正明, 橋本博史	永井書店 (東京)	338-340, 2001
三森経世	多発性筋炎・皮膚筋炎.	リウマチ・膠原病の治療と看護	川合真一, 森脇美登里	南江堂 (東京)	144-150, 2001
三森経世	アレルギー・リウマチ内科の問診のポイント.	研修医ノート-医の基本	永井良三	診断と治療社 (東京)	324-326, 2001
三森経世	抗核抗体.	看護のための最新医学講座第11巻免疫・アレルギー疾患	山本和彦	中山書店 (東京)	70-77, 2001
三森経世	リウマトイド因子.	看護のための最新医学講座第11巻免疫・アレルギー疾患	山本和彦	中山書店 (東京)	78-83, 2001
三森経世	混合性結合組織病.	Expert膠原病・リウマチ	住田孝之	診断と治療社 (東京)	300-308, 2001

研究成果の刊行に関する一覧表（平成13年度）

書籍-2

三森経世	成人発症スチル病.	今日の治療指針 2002年版	多賀須幸男, 尾形悦郎, 山口徹, 北原光夫	医学書院 (東京)	520-521, 2002
------	-----------	-------------------	---------------------------	--------------	------------------