

厚生労働科学研究費補助金
免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

関節リウマチの難治性病態に対する 新規治療法の開発研究に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

平成16年3月

主任研究者 宮 坂 信 之

目次

I	総括研究報告	
	関節リウマチの難治性病態に対する新規治療法の開発研究	1
	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 教授 宮坂信之	
II	分担研究報告	
1	メトトレキサート治療が困難な関節リウマチ患者に対する白血球除去療法の治療効果	5
	順天堂大学医学部膠原病内科 教授 橋本博史	
2	難治性関節リウマチに対する造血幹細胞移植に関する研究	10
	北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学講座免疫病態分野 講師 渥美達也	
3	多剤耐性遺伝子を標的とする難治性関節リウマチに新規治療に関する研究	14
	産業医科大学医学部第一内科学講座 教授 田中良哉	
4	関節炎病変集積 T 細胞の抗原特異性の再構築による抗原解析・治療応用の検討	18
	東京大学大学院医学系研究科内科学専攻アレルギーリウマチ学 教授 山本一彦	
5	タクロリムスの抗リウマチ作用に関する研究	20
	国立病院長崎医療センター 臨床センター 免疫研究部長 右田清志	
6	関節リウマチにおけるマクロファージ系滑膜細胞-T細胞間相互作用とその新規治療への応用に関する研究	23
	東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 教授 原まさ子	
7	関節リウマチの滑膜細胞におけるアプター蛋白の発現とチロシンキナーゼ阻害薬による増殖制御に関する研究	26
	埼玉医科大学総合医療センター第2内科 講師 亀田秀人	
8	関節リウマチに遺伝子治療にむけたアデノウイルスベクター改変に関する研究	29
	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 教授 宮坂信之	
9	サイクリン依存性キナーゼインヒビター-p21 ^{Cip1} 強制発現による p16 ^{INK4a} 発現誘導機構の研究	32
	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 助教授 上阪 等	
10	RA治療に用いられる生物製剤の医薬経済学的評価に関する研究	36
	東京大学大学院薬学系研究科医薬経済学 客員教授 津谷喜一郎	
III	研究成果の刊行に関する一覧表	39

I . 総括研究報告

関節リウマチの難治性病態に対する新規治療法の開発研究

主任研究者 宮坂信之 東京医科歯科大学大学院生体応答調節学教授

研究要旨 本研究は、難治性関節リウマチ(RA)に対して、有効性が高くても有害事象が少なく、かつ関節破壊を阻止できる治療法を開発することを目的としている。本年度は、白血球除去療法、末梢血幹細胞移植療法の臨床応用、T細胞レセプター標的療法、多剤耐性遺伝子標的療法、細胞内シグナル伝達阻害療法、アポトーシス誘導療法、細胞周期調節療法、抗サイトカイン療法などに関する基礎的検討を行った。

(分担研究者氏名 所属機関 職名)

渥美 達也	北海道大学大学院分子病態制御学講師
亀田 秀人	埼玉医科大学総合医療センター第二内科助手
上阪 等	東京医科歯科大学大学院生体応答調節学助教授
田中 良哉	産業医科大学医学部第一内科講座教授
津谷喜一郎	東京大学大学院薬学研究科医薬経済学教授
橋本 博史	順天堂大学医学部膠原病内科教授
原 まさ子	東女医大膠原病リウマチ痛風センター教授
右田 清志	長崎医療センター免疫研究部長
宮坂 信之	東京医科歯科大学大学院生体応答調節学教授
山本 一彦	東京大学大学院アレルギーリウマチ学教授

A 研究目的

関節リウマチ(RA)の病態形成の分子機構は少しずつ解明されつつあり、治療学の進歩に伴い本症の治療法は改良され、その長期予後は改善しつつある。しかし一方で、患者の生存率の延長に伴って新たに出現した難治性病態や治療薬剤による有害事象によって誘発される難治性病態などは、日常临床上、大いなる問題となっている。さらに、現在の治療法に全く反応せずに日常労作の著しい障害を来す進行性の症例も少なからず存在している。このような現状から、従来の治療法とは異なる新たな理念に基づいたRAの新規治療法を早急に開発することが求められている。本研究においては、難治性RA患者に対し有害事象が少なくかつ関節破壊を防止し、しかも

患者のQOLを高める治療法の開発と実用化を試み、RAに対する新たな治療方針の確立に努めることを目標としている。

B 研究方法

本年度は、白血球除去療法、T細胞レセプター標的療法、多剤耐性遺伝子標的療法、細胞シグナル伝達阻害療法、末梢血幹細胞移植療法、細胞周期調節療法、抗サイトカイン療法、遺伝子治療法などについて、その作用機序、有用性、臨床応用の可能性などを解析するとともに、現在、治験で行われている抗サイトカイン療法としてのEtanerceptの自己注射のcost-effectiveness analysis(CEA)についても検討を行った。このため、一部の実験はin vitroを用いて行うとともに、動物モデルを用いたin vivoの実験と比較対照した。なお、患者からの検体採取および新たな治療法の臨床応用に際しては、研究分担者が所属する各施設の倫理審査委員会の承認を受けるとともに患者より文書同意を取得して行うことを前提とし、すべての臨床実験はヘルシンキ宣言を遵守し、各施設における治験審査委員会(IRB)の承認を得たのちに初めて行うこととした。また、実験動物に対する動物愛護の配慮を行った。

(倫理面への配慮)

患者からの検体採取および新たな治療法の臨床応用

に際しては、研究分担者が所属する各施設の倫理審査委員会の承認を受けるとともに患者より文書同意を取得して行うことを前提とし、すべての臨床実験はヘルシンキ宣言を遵守し、各施設における治験審査委員会(IRB)の承認を得たのちに初めて行うこととした。また、実験動物に対する動物愛護の配慮を行った。

C 研究結果

橋本は白血球除去療法について検討を行った。アメリカリウマチ学会診断基準を満たし、しかもメトトレキサート抵抗性の RA 患者 9 名に対して白血球除去療法を週 1 回の間隔で 5 回行い、治療前後に疼痛関節数、腫脹関節数、患者による疼痛評価と全般活動性評価(VAS スケール)、患者による運動機能評価(mHAQ)を経時的に測定することにより、ACR コアセット 20%以上の改善を認めたものを効果ありと判定した。その結果、3 人の患者が治療後 4 週目より症状の悪化等で、治療後 12 週目以降に 1 人が骨折のため離脱したが、研究期間中全体の ACR コアセット 20%の改善は 77.8% (9 例中 7 例で改善)、50%の改善は 44.4% (9 例中 4 例で改善)であった。ACR コアセット 20%の改善は早い症例で治療 3 週目より認め、2 症例は治療終了後 1 年でも効果の持続を認めた。しかし、赤沈、1 年後の骨破壊に関しては有意の変化はみられなかった。今後、さらに治療プロトコルの検討、responder の臨床的特徴、本治療法の作用機序、cost performance の面からの検討も行われる必要がある。

渥美は自家末梢血幹細胞移植療法(APBST)について強皮症患者 4 例での治験経験を報告し、CD34 陽性細胞を選択的に移入することによって速やかな造血能の回復とともに皮膚硬化の改善がみられ、それとともにサイトカイン関連遺伝子のダイナミックな変化が起こることを cDNA アレイを用いて明らかにした。今後、抗 TNF α 抗体に対して抵抗性を示したり、あるいはアナフィラキシーが起こる RA に対して APBST 治療を行うことを検討しているが、cost performance の問題に加えて移植後の強い免疫抑制の問題に対してどのように対処するかが課題として

残されている。

右田は RA に合併する二次性アミロイドーシスに対する新規治療法を開発する目的で、血清アミロイド(SAA)産生の制御機構を解析し、これを阻害する薬剤を検討した。その結果、IL-1 β が肝細胞からの SAA 産生を誘導し、その過程には MAP キナーゼ及び NF κ B の活性化が関与しており、SAA の産生は JNK 阻害剤により強く抑制された。以上より、JNK 阻害剤は RA に合併する二次性アミロイドーシス発症予防に有用である可能性が示唆された。

田中は治療抵抗性となる一つのメカニズムとして多剤耐性遺伝子が関与している可能性を推測した。まず、30 例の RA 患者について多剤耐性遺伝子 MDR-1 がコードする細胞膜上 P 糖蛋白質の発現、及び MDR-1 の特異的転写因子である YB-1 の細胞内発現を検討したところ、両分子の発現がともに亢進しており、しかもリンパ球の P-糖蛋白質発現率は、リンパ球採取時の CRP 値、ESR 値、疼痛関節数、腫脹関節数などと相関、または、相関傾向を示した。実際、P-糖蛋白質の過剰発現を呈する活動期 RA 症例では、既存の DMARD 治療では制御不十分で、インフリキシマブの追加併用による強化療法を要し、疾患活動性の改善に伴い P-糖蛋白質の発現は健常人レベルにまで低下し、治療反応性が回復した。これまで RA における薬剤抵抗性の分子機構は不明であったが、本研究によって多剤耐性遺伝子 MDR-1 及びその遺伝子産物の糖蛋白質が関与していること、そして P 糖蛋白質阻害薬は治療抵抗性を回復させる可能性があることが初めて明らかとなった。

山本は以前より抗原特異的免疫療法の可能性について提唱しているが、これは、生体内の情報を利用した T 細胞レセプター(TCR)遺伝子のクローニングから、遺伝子導入による抗原特異性の再構築、さらに機能遺伝子の導入を含めた抗原特異的 T 細胞の試験管内再構築とその疾患への応用からなっている。本年度はコラーゲン関節炎モデルにおいて滑膜浸潤 T 細胞の TCR α 、 β 鎖を同定し、これを CD4 T 細胞に遺伝子導入することで抗原特異性の再構築ができること、そして抑制性分子 IL-10 遺伝子を組み

込むことで関節炎の治療が可能であることを示した。

原は、RA 滑膜におけるT細胞とマクロファージの相互作用において CD40L(CD154)-CD40 及び LIGHT-HVEM が重要であり、CD40 及び HVEM 刺激によりマクロファージからの炎症性サイトカイン産生が誘導されること、CD40-cartilage oligomeric matrix protein (COMP)融合蛋白はコラーゲン関節炎の発症を予防することができることを明らかにし、これら分子の相互作用を阻害することが難治性 RA の新規治療法となりうる可能性を示した。

上阪は、細胞周期調節分子群として知られるサイクリン依存性キナーゼインヒビター(CDKI)p16^{INK4}、p21^{Cip1} の遺伝子導入によって CIA などの動物モデルにおける関節炎発症を抑制できることをすでに明らかにしているが、今回は p21^{Cip1} 発現によって p16^{INK4} が誘導されるメカニズムについて検討を行った。その結果、による発現誘導の際に特異的発現変化をする一連の新規遺伝子が存在することが明らかとなり、現在、その同定を行っている。これらの遺伝子は RA 治療の新たな標的遺伝子となる可能性があり、今後その探索かさらに行われる予定である。

宮坂は、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子療法の際に問題となっているベクターの炎症惹起作用を軽減する目的で、ベクターの改変を試みた。その結果、ファイバー改変アデノウイルスベクターを用いたり、発現カセットを改変することにより、滑膜線維芽細胞への感染効率率は飛躍的に増加することが明らかとなり、RA 遺伝子治療に最適なアデノウイルスベクターを作成することが可能であると推測された。

亀田は、RA における滑膜増殖において滑膜細胞内のアダプター蛋白の関与を推測し、新たな分子標的療法の可能性を追究している。今回の研究では滑膜線維芽細胞を PDGF で刺激することによって Gab1, Gab2, Nck, Shc のアダプター蛋白発現が誘導されること、慢性骨髄性白血病(CML)の治療薬として知られる STI571 (imatinib)によってこれらのアダプター蛋白発現の抑制とともに滑膜細胞増殖が著しく抑制されることが明らかとなった。以上の結果は、CML

治療薬である STI571 が新たな RA 治療薬となる可能性を示唆するものであり、今後のさらなる検討が期待される。

津谷は、RA において高い有効性が認められている生物製剤の cost-effective analysis(CEA)を行うことを計画し、現在我が国で治験として長期投与試験が行われている etanercept を対象として、etanercept の自己注射 通院治療の CEA を行った。その結果、自己注射が通院治療に比較して明らかに医療費を削減できることが明らかとなった。D 考察及び結論 今回の検討により、RA の難治性病態に対して有効性が期待される新規治療法の開発が可能であることを示唆する結果が得られつつある。これらの中にはすぐに臨床応用が可能なものと、今後の検討が必要なものとに大別されるが、来年度もこれらの検討をさらに継続することによって、各種の新規治療法の分子機序を解明するとともに、有害事象が少なくかつ臨床的に有効な新規治療法の開発を目指したい。

D 考察および結論

本年度の検討により、RA の難治性病態に対して有効性が期待される新規治療法の開発が可能であることをさらに示唆する結果が得られた。特に分子細胞学的あるいは細胞生物学的解析によって、病態形成に重要な役割を果たしているエフェクター細胞 (Tリンパ球、好中球、マクロファージ、滑膜線維芽細胞) や分子 (MAP キナーゼ、NF κ B、P糖蛋白質、CD40、HVEM、Gab1 などのアダプター蛋白、サイクリン依存性キナーゼインヒビター) などが次々と同定されたより、それらを標的とした新たな治療法 (分子標的療法) が開発できる可能性がさらに高まった。今後、さらなる基礎的検討を積み重ねることによって、bench で創出された研究成果を clinic において臨床応用を行い、難治性病態を克服しうる新たな RA 治療薬が開発されることを目指したい。

E 健康危険情報

特になし。

F 研究発表

1 論文発表

- 1 Y Nonomura, H Kohsaka, K. Nagasaka, N Miyasaka
Gene transfer of a cell cycle modulator exerts anti-inflammatory effects in treatment of arthritis
Proc Natl Acad Sci (USA), in press
- 2 N Nishimoto, K Yoshizaki, N Miyasaka, K Yamamoto, S Kawai, T Takeuchi, J Hashimoto, J Azuma, T Kishimoto
Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin 6 receptor antibody
Arthritis Rheum, in press
- 3 K. Tsuchiya, Y Kawano, T Kojima, K. Nagata, T Takao, M Okada, H Shinohra, K. Maki, N Toyama-Sorimachi, N Miyasaka, M Watanabe, H Karasuyama
Molecular cloning and characterization of TPP36 and its isoform TPP32, novel substrates of Abl tyrosine kinase
FEBS Letters 537 203-209, 2003
- 4 Das H, Atsumi T, Fukushima Y, Shibuya H, Ito K, Amasaki Y, Ichikawa K, Yamada Y, Koike T
Specificity of anti-agalactosyl IgG antibodies for diagnosing rheumatoid arthritis
Clin Rheumatol (in press)
- 5 Nakayamada S, Saito K, Fujii K, Yasuda M, Tamura M, Tanaka Y
 β 1 integrin-mediated signaling induces ICAM-1 and Fas and Fas-mediated apoptosis of rheumatoid synovial cells
Arthritis Rheum (2003) 48, 1239-1248
- 6 Nakayamada S, Okada Y, Saito K, Tamura M, Tanaka Y
 β 1 integrin/focal adhesion kinase-mediated signaling induces intercellular adhesion molecule 1 and receptor activator of nuclear factor κ B ligand on osteoblast and osteoclast maturation
J Biol Chem (2003) 278 45368-45374
- 7 Miyashita T, Kawakami A, Tamai M, Izumi Y, Mungguo H, Tanaka F, Abiru S, Nakashima K, Iwanaga N, Aratake K, Kamachi M, Arima K, Ida H, Migita K, Origuchi T, Tagashira S, Nishikaku F, Eguchi K.
Akt is an endogenous inhibitor toward tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-mediated apoptosis in

rheumatoid s1 2003 35 341-348

- 8 Tahara H, Fujio K, Araki Y, Setoguchi K, Misaki Y, Kitamura T and Yamamoto K.
Reconstitution of CD8⁺ T cells by retroviral transfer of the TCR ab-chain genes isolated from a clonally expanded P815-infiltrating lymphocyte¹
J Immunol 2003 171 2154-2160
- 9 Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhuro S, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Nakayama-Hamada M, Kawaida R, Ono M, Ohtsuki M, Furukawa H, Yoshino S, Yukioka M, Tohma S, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Nishioka Y, Sekine A, Iida A, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y and Yamamoto K
Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis
Nature Genet 2003 34 395-402

学会発表

- 1 Kameda H, Ishigami H, Abe T, Takeuchi T
Expression of adapter proteins in rheumatoid synovial fibroblast-like cells and their involvements in the signaling from growth factor receptors
第 67 回米国リウマチ学会, 2003 年 10 月, オーランド
- 2 Tanaka Y, Okada Y, Nakayamada S, Nakano K, Fujii K, Saito K.
Cell biology of synovial inflammation and secondary osteoporosis in rheumatoid arthritis
The 3rd World Congress of the Global Arthritis Research Network International Arthritis Summit, Miyazaki, 平成 15 年 9 月
- 3 Igarashi A, Fukuda T, Tsutani K
Cost-effectiveness analysis of self-injection vs ambulatory care of anti-rheumatoid biologics (etanercept)
ISPOR first Asia-Pacific conference 1 Sep 2003, Kobe, Japan

H 知的財産権の出願 登録

4 なし

II. 分担研究報告

メトトレキサート治療が困難な関節リウマチ患者に対する白血球除去療法の治療効果

分担研究者 橋本博史 順天堂大学 医学部 膠原病 リウマチ内科 教授

研究要旨 関節リウマチの治療の一つに血漿交換療法があり、その治療法の一つである白血球除去療法は疾患の炎症反応に関与する白血球を除去する治療法である。この治療法をメトトレキサートによる治療が副作用や合併症等で困難、あるいは効果を得にくい関節リウマチ患者に対し施行し治療効果をACR コアセットにて検討。治療後4週目のACR コアセット 20%改善を認めたのは66.7%、ACR コアセット 50%改善を認めたのは22.2%の患者であり、関節リウマチ患者に対する白血球除去療法の有効性

A 研究目的

関節リウマチの治療の一つに血漿交換療法が位置し、その中の従来からの治療法である二重膜濾過法や吸着療法は液性免疫能を対象とする方法である。一方で細胞性免疫能の中の白血球は、関節リウマチにおいて重要な役割を占めることが知られている。今回我々が注目した白血球除去療法は、この白血球を血液から除去する方法である。この治療法は潰瘍性大腸炎に対して保険適応があり、安全性も確立されている治療法であるが、関節リウマチ患者に対しても有効であることが報告されてきた。今回、この白血球除去療法をメトトレキサートによる治療が副作用や合併症等で困難、あるいは効果を得にくい関節リウマチ患者に対し施行し、ACR コアセット 20%、50%の改善の有無、治療効果の発現時期と持続性の観察、治療1年後の関節破壊の有無に関して評価をした。

B 研究方法

アメリカリウマチ学会の診断基準を満たし、表1の選択基準を満たす患者を研究対象とした。対象となったリウマチ患者は9人(男性2例、女性8例、年齢31-64才、平均51.9才)を選択。研究対象となった患者のプロフィールは表2を参照。治療の方法として白血球除去療法を週1回の間隔で白血球除

去療法を計5回施行(治療期間5週間)。白血球除去フィルターはセルソーハ(旭メディカル社製)を使用。治療中の抗凝固剤はメシル酸ナファモスタトを40ml/時にて使用。1回の血液処理量は全血3000Lを約1時間で処理。治療効果の判定はACR コアセット 20% 50%改善を用い評価。判定は各5回の治療前の他に、治療後1、2、4週に評価。治療前から治療終了後4週間の間でACR コアセット 20%改善を満たすものを効果のある有効群とする。その後、治療後8、12、24、48週の時点でも評価し、治療効果の持続性を検討。合計の観察期間は治療期間5週間と観察期間48週間を合わせ、約1年間の53週間。各評価時に、CRP、赤沈(ESR)、リウマチ因子(RF)、IL-6、MMP-3を検査。治療開始前と治療後48週に手関節X線を撮影し、Sharp法(van der Heijdeの変法)を用いて骨破壊の有無に関して評価。また、本研究開始1ヶ月前からこの研究期間中の内服治療等の変更は原則として行わないこととした。

(倫理面への配慮)

当大学の倫理委員会で臨床研究の承諾を受けた後、患者に対し治療前に具体的な治療方法、除去膜の作用機序、起こりうる副作用に関して説明を行い、承諾を得た上で治療を行う。また、治療中に患者本人

の意思で治療の継続を望まない場合には、患者の希望に従うこととする。治療中や観察期間中に症状の変化のため、他の治療が必要となった場合には、研究からの離脱を許可することとした。

C 研究結果

治療開始後、治療3回前から、ACR コアセット20%の改善を認める症例が確認され、治療後4週目の時点ではACR コアセット20%改善を認めた症例は9人中6人で66.7%、ACR コアセット50%改善は9人中2人で22.2%であった。この時点でACR コアセット20%改善を認めた6人は有効群としてその後の観察を継続。効果を認めなかった3例に関しては、効果無効群とした。この3例は治療後4週直後に関節症状の悪化が2人、骨折を1人認め、内服等の治療内容の変更を必要としたため研究より離脱。有効群・無効群の疼痛関節と腫脹関節の平均値の変化をグラフ2-3に示す。治療効果有効群の6人に関しては、治療後8、12、24、48週の時点で評価したところ、ACR コアセット20%は治療後8週と12週の時点で効果は6人中6人(100%)に効果を認めたが、24週目、1人(16.7%)48週目、2人(33.3%)と低下。ACR コアセット50%は治療後8週で4人(66.7%)に効果を認めたが、治療後12週は2人(33.3%)、その後は効果の持続性は認められず。

全観察期間中の疼痛関節数と腫脹関節数の平均値の変化をグラフ4、5に示す。CRPに関しては、有効群で治療前と治療後8週で有意に変化し($p < 0.05$)、無効群では変化を認めず(グラフ6)。IL-6も同様に有効群で治療前と治療後8週で有意に変化し($p < 0.05$)、無効群では変化を認めず(グラフ7)。血沈に関しては観察期間中、有意な変化は認めず。RFは治療前と治療後8-48週で有意に変化($p < 0.05$) (グラフ8)。MMP-3は治療前と治療5週、治療後48週で有意に変化($p < 0.05$)を認めた(グラフ9)。

有効群の6例に対する手関節X線のSharp法(van

der Heydeの変法)による評価は、治療開始前のSharp score132.6 \pm 41.5、約1年後は133.8 \pm 42.2で有意な変化を認めず、骨破壊の進行が無いことが示唆された。また、治療期間を含む全観察期間では、副作用は一切認められなかった。

D 考察

治療の対象となった患者はメトトレキサートによる治療が肝障害、脱毛等の副作用や間質性肺炎による合併症等で使用や増量が困難、あるいは効果を得にくい関節リウマチ患者であった。これら9人の患者に対する5回の白血球除去療法の治療効果は、治療後4週目の時点でACR コアセット20%の改善は66.7%、ACR コアセット50%の改善は22.2%と効果があることが示唆された。20%の改善を認める効果有効群の6人の治療効果の持続性は治療後12週までは効果は100%続いたが、その後は低下。治療効果はある程度持続することが観察された。有効群では疼痛関節や腫脹関節の改善の他、CRP、IL-6、MMP-3、RF、も改善することが認められた。

E 結論

関節リウマチの治療において薬物治療は重要であるが、副作用や合併症のため薬の試用が困難な場合がある。今回、この様にメトトレキサートによる治療が困難、あるいは効果を得にくい関節リウマチに対して白血球除去療法を行い、治療後4週目のACR コアセット20%の改善66.7%、ACR コアセット50%の改善22.2%と効果を認め、治療効果の持続性と治療の安全性も認められた。この様に、薬物による治療が困難な症例に対し、白血球除去療法が治療の1つとして施行ことが期待される。今後は、治療の回数や血液処理量等の検討を含め、研究が必要と思われる。

F 健康危険情報

一般的に、白血球除去療法での副作用としては、体外循環に基づく一過性の低血圧、発熱、気分不快、

体外循環回路内の凝固を防ぐ抗凝固剤（メシル酸ナファモスタット）によるアレルギー症状などがあるが、今回の研究においては、治療中と治療後に副作用は認められなかった。

G 研究発表

1 論文発表

Yamaji K, Yang K, Tsuda H, Hashimoto H
Fluctuations in the peripheral blood leukocyte and platelet counts in leukocytapheresis in healthy volunteers
Therapeutic Apheresis, 6 402-12

Kempe K, Tsuda H, Yang K, Yamaji K, Hashimoto H
Filtration leukocytapheresis therapy in the treatment of rheumatoid arthritis patients resistant to or failed with methotrexate
Therapeutic Aphereresis and Dialysis 2004
(in press)

2 学会発表

第47回 日本リウマチ学会総会・学術集会（東京）2003年4月25日

関節リウマチに対する白血球除去療法の治療効果の検討

第19回 日本医工学治療学会（札幌）2003年5月17日

関節リウマチに対する白血球除去療法の治療効果の検討

第23回 日本アフェレシス学会学術大会（東京）2003年4月4日

関節リウマチに対する白血球除去療法の治療効果の検討

H 知的財産権の出願・登録

なし

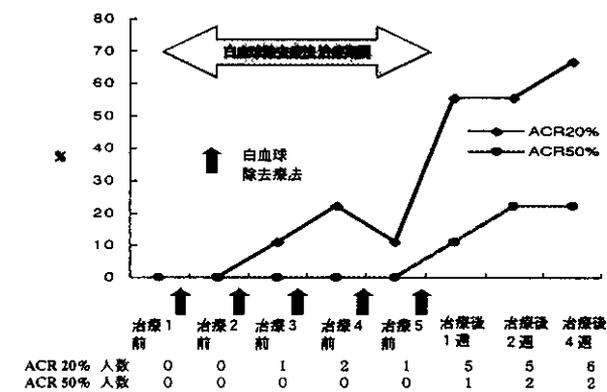
表1 選択基準 1から4をみたす患者を研究対象とする

1 発症後6ヶ月以上を経過した患者
2 年齢20才以上 75才以下の患者
3 メトトレキサートによる治療が困難 これまでに メトトレキサートを含む2剤以上の抗リウマチ薬を3ヶ月以上投与にもかかわらず合併症や副作用のために メトトレキサートの増量が困難 あるいは効果を得にくい症例で (下記の1)及び2)の他に3)または4)のいずれかを満たす患者 1) 疼痛の認められる関節点数6関節以上 2) 腫脹の認められる関節点数3関節以上 3) CRP \geq 10mg/dl 4) ESR \geq 30mm/h
4 プレトニノロンの投与量が15mg/日以下の患者

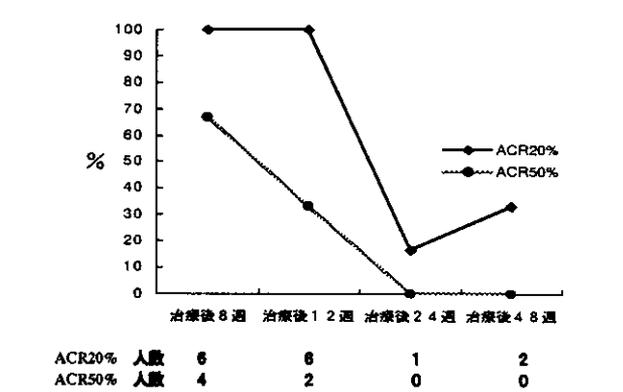
表2 患者プロフィール

患者	年齢	性別	Stage	Class	メトトレキサート	プレトニノロン	その他の併用薬品	過去に無効の薬	メトトレキサート使用が困難な理由
1	64	男	IV	3	6mg/週	5mg/日	NSAID オーラノフィン		肝障害 間質性肺炎のため増量困難
2	56	女	III	3	6mg/週		NSAID	ブンラミン オーラノフィン サラ/スルファピリノン	間質性肺炎のため増量困難
3	53	女	IV	3	8mg/週	10mg/日	NSAID サラ/スルファピリノン		8mgで効果不足 間質性肺炎のため増量困難
4	57	女	IV	3	6mg/週	6mg/日	NSAID ヘニンラミン アザチオプリン		増量で肝障害
5	55	女	III	3	4mg/週	8mg/日	NSAID ブンラミン		間質性肺炎のため増量困難
6	62	女	IV	4	6mg/週	15mg/日	NSAID ノクロスギリン	ブンラミン オーラノフィン サラ/スルファピリノン	6mgで効果不足 増量で肝障害
7	54	男	III	3	6mg/週	10mg/日	NSAID	ブンラミン ノオノール アクタリット	増量で脱毛と皮疹
8	37	女	IV	3	6mg/週		NSAID ブンラミン	サラ/スルファピリノン	6mgで効果不足 増量で肝障害
9	31	女	IV	3	7.5mg/週	6mg/日	NSAID ブンラミン アクタリット		7.5mgで効果不足 増量で肝障害

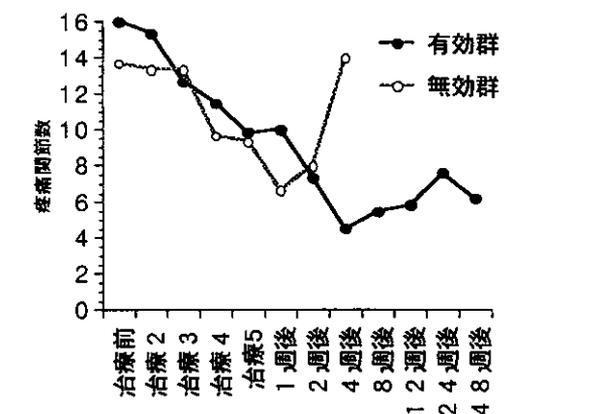
グラフ1 治療開始前～治療後4週間のACRコアセット



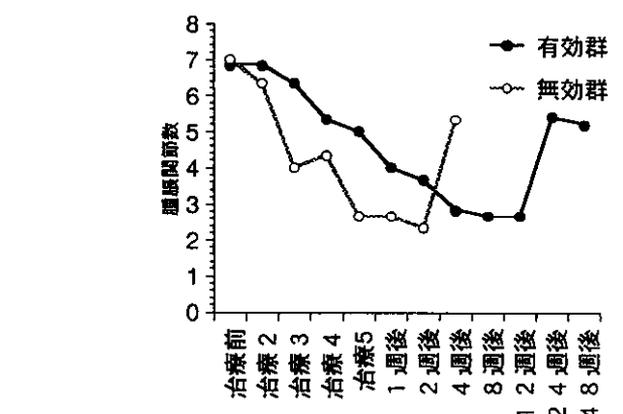
グラフ2 治療有効群6人の治療後8～48周 ACRコアセット



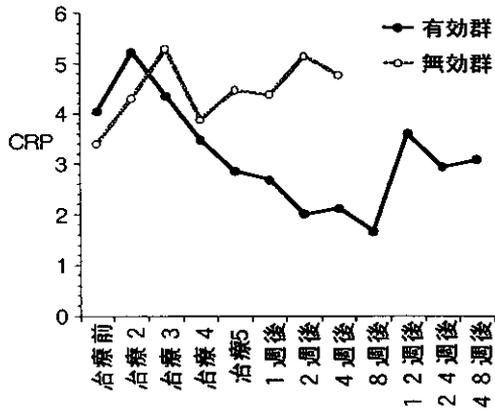
グラフ4 疼痛関節数 (平均値)



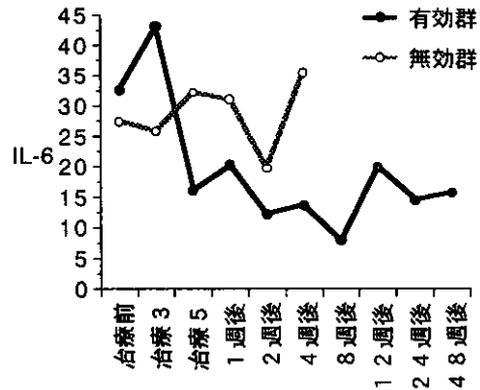
グラフ5 腫脹関節数 (平均値)



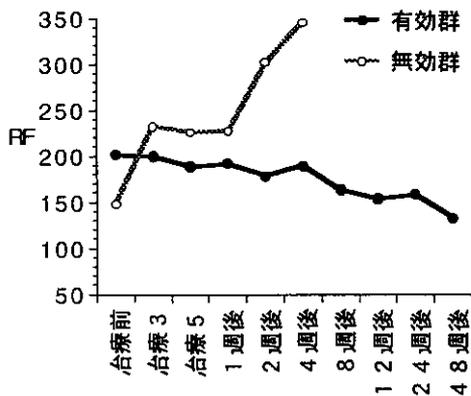
グラフ6 CRP (mg/dl) 平均値



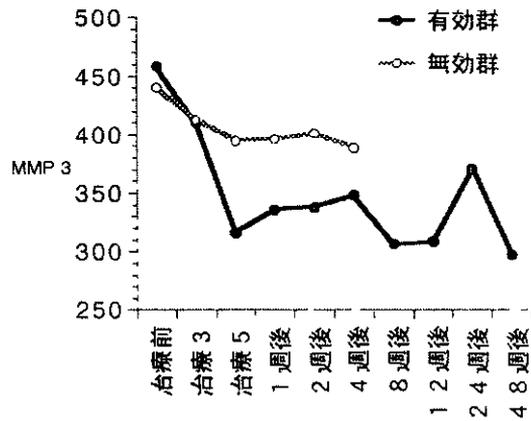
グラフ7 IL-6 (pg/ml) 平均値



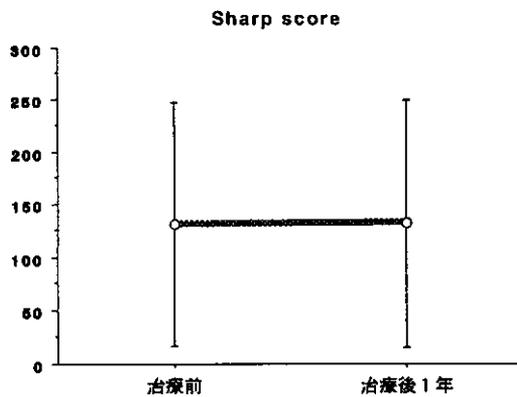
グラフ8 RF (IU/ml) 平均値



グラフ9 MMP-3 (ng/ml) 平均値



グラフ10 1年後の手関節 Sharp スコアの変化



治療開始前 Sharp score 132.6±41.5 1年後 133.8±42.2 有意な変化を認めず

厚生科学研究費補助金（免疫・アレルギー疾患予防・治療研究事業）
分担研究報告書

難治性関節リウマチに対する造血幹細胞移植に関する研究

分担研究者 渥美達也 北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学講座免疫病態分野 講師

研究要旨

多くの症例において DMARDs の使用により関節リウマチの病勢を調節することか可能であるか、劇的な効果のある抗 TNF α 抗体などの生物製剤を使用しても十分な効果か得られない症例、あるいは副作用のため生物製剤か使用できない症例かなお存在する。本研究は、従来の治療法に抵抗性を示す難治性関節リウマチに対して、自家末梢血幹細胞移植併用超大量免疫抑制療法を行うことで病態修飾を行い、原疾患の進行抑制および治癒を導くことを目的とする。当科において施行した強皮症 4 症例から難治性関節リウマチへの適応拡大の可能性について考察する。症例は強皮症 5 例、末梢血幹細胞動員を顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)および cyclophosphamide (CPA) 4g/m²+G-SCF で行い、CD34 陽性細胞を純化、凍結保存した。移植前処置は CPA 200 mg/kg で行った。移植前後における臨床症状、血清学的変化を観察するとともに、末梢血単核球について分画および炎症、免疫関連遺伝子発現レベルを FACS、cDNA アレイ法を用いて検討した。症例 1-3 の臨床経過は昨年の研究班会議で発表したか、現在まで最長 36 ヶ月観察して再発はない。症例 4 および 5 については、観察期間か短いものの安全性に問題なく、症例 1~3 と同様、mRodnan (modified Rodnan total thickness skin score)、mHAQ (modified health assessment questionnaire)において改善を認めている。末梢血単核球において、CD4⁺/CD8⁺比は移植後長期にわたり低値を示したか、CD56⁺、CD19⁺分画の回復は比較的速やかであった。T 細胞分画については、CD4⁺CD45RO⁺分画の回復に続いて CD4⁺CD45R0⁻分画の回復か観察された。cDNA アレイ法を用いた末梢血単核球における炎症、免疫関連遺伝子発現レベルの検討では、TGF β 遺伝子の発現には移植前後で差かなかったか、IL-1 β 、TNF α を含めた向炎症因子において変化か認められた。これらの向炎症サイトカインか病態の基本である関節リウマチにおいても自家末梢血幹細胞移植併用超大量免疫抑制療法か有効である可能性か示された。また 4 例の移植治療のコストは平均約 420 万円（おもに CD34 選択と輸血、抗ウイルス剤など）で、インフリキシマブを 2 年間使用するのとはほぼ同額であった。

A 研究目的

メソトレキセートは強力な抗リウマチ作用をもつか、それを含む種々の疾患修飾性抗リウマチ剤に抵抗性を示す症例か経験される。この様な症例に対して、平成 15 年秋より我が国でも抗 TNF α 製剤か使用可能となり、劇的な効果をあげている。しかし同治療法の有効率は約 70%であり、すなわち残

りの 30%の患者には現時点では有効な治療法か存在しないことになる。このような難治性関節リウマチにおいて、治療法の 1 つとして超大量免疫抑制療法か挙げられ有効性か認められつつある。この際、超大量免疫抑制療法による骨髄不全回避のため造血幹細胞移植による支持療法か不可欠である。そこで、難治性関節リウマチに対する自家

末梢血幹細胞移植併用超大量免疫抑制療法の治療法確立のため、その有効性、安全性を検討することを本研究の目的とした。

当科では自己免疫疾患に対する自己末梢血純化 CD34 陽性細胞移植を検討中であるが、強皮症 5 例に対してこの治療をおこない、臨床的な有用性を確認したが、重篤なウイルス感染症を合併した症例もあった。関節リウマチに本治療法を応用するにあたり、強皮症の経験例において詳細な炎症・免疫学的検討をおこなった。その結果をふまえて関節リウマチに対する本治療の施行プロトコールを作成した。

B 研究方法

当科では、強皮症 5 症例に対する自家末梢血 CD34 陽性細胞移植併用超大量免疫抑制療法を施行した。

1) 対象症例(強皮症)

現時点での当科の自己末梢血純化 CD34 陽性細胞移植の対象は、発症 3 年以内の全身性強皮症である。60 歳以上、高度の心不全、コントロール不能な不整脈、高度の腎障害等を有する症例は除外例とした。

2) 治療法

Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) 単独もしくは、Cyclophosphamide (CPA) $2 \text{ g/m}^2 \times 2$ 日間投与後 G-CSF 併用で末梢血中へ血液幹細胞を動員 (mobilization)、採取を行う。採取した末梢血幹細胞を磁気細胞分離システムを用いて CD34 positive selection を行い純化し凍結保存する。同時に CD34 純化を行わない末梢血幹細胞を back up 用として凍結保存する。CPA 200 mg/kg を 4 日間に分けて投与し移植前処置を行う。前処置後、純化凍結保存しておいた自己末梢血 CD34 陽性細胞を輸注し、その後、G-CSF 投与を行い造血能の回復を促す。

3) 炎症・免疫学的検討

治療前後において、フローサイトメトリーによる末梢血リンパ球サブセットおよび

末梢血単核球から mRNA を抽出し、免疫・炎症物質の発現の治療前後における状態を DNA アレイを用いてスクリーニングした。

(倫理面への配慮)

患者および家族へは本治療にともなう利益と不利益を十分に説明した。適応の有無は当施設の倫理委員会の決定事項にしたかって、判定委員会一例ずつ検討され承認された。

C 研究結果

1) 臨床症状

いずれの症例も造血能の回復は速やかであった。症例 1-4 とともに modified Rodnan total thickness skin score (mRodnan TSS) で 25%以上の改善を認め、modified Health Assessment Questionnaire (mHAQ) についても症例 3 を除いて著明な改善を認めた。症例 5 は移植後約 6 週を経過したか、また皮膚スコアには変化はない。症例 3 については、移植後、ウイルス性膀胱炎などの感染症か遷延し、mHAQ の悪化を認めた。

抗核抗体および抗 Scl-70 抗体については、消失はせず症例間に一定の傾向は認められなかった。皮膚所見と血清学的所見は平行しなかった。

2) 安全性に関する検討

前述のプロトコールで mobilization を施行し、5 症例ともに十分量の CD34 陽性細胞が採取され、移植後の造血能回復は速やかであった。移植後、症例 1-3 でサイトメガロウイルス抗原血症を認め、ガンシクロビルによる加療を行ったか、症例 4, 5 ではその所見は認めなかった。症例 2 については、移植後に血球貪食症候群の合併を認め、移植後 7 ヶ月後には自己免疫機序によると考えられる血小板減少を来した。症例 3 については、移植後、貧血を伴う出血性膀胱炎、心膜炎、心嚢液貯留による心機能低下、骨髄抑制を認め、最終的に back up として保存してあった CD34 未選択幹細胞を投与した。

何れの症例も、現在、外来通院中であり、

2-36ヶ月経過して再発を認めていない。

3) 免疫学的検討

造血器疾患に対して自己末梢血純化 CD34 陽性細胞移植を施行した際は、一般にリンパ球の回復が遷延することが知られており、当科症例も同様の経過を示した。特に CD4 陽性細胞の回復は遷延し、1年を経過しても正常化しなかった。上述の如く血清学的変化は、症例によりさまざまであったが自己抗体は消失しなかった。

末梢血単核球における炎症、免疫関連遺伝子の発現状況について1年を超える3例について cDNA アレイ法を用いて観察したところ、移植前後において、TGF- β の遺伝子発現の変化は明らかでなかったか、IL-1 β 、TNF α 等、種々のサイトカインの mRNA レベルでの発現量低下を認めた(図)。

D 考察

強皮症に対する自己幹細胞移植症例は1997年の Tyndall A, et al による報告が最初であり、2000年の EBMT/EULAR (European League Against Rheumatism and European Group for Blood and Marrow Transplantation) の報告によれば、約70%の症例で skin score で25%以上の改善が認められている。関節リウマチにおいても海外では本治療法がおこなわれ、約70%で ACR コアセット20%以上の改善が認められ、移植関連死亡率も約2%と低値であることが報告されている一方、移植後の再燃率が約50-70%あるとされる点が問題として挙げられる。しかし、これら再燃例の多くで、移植前に無効であった DMARDs への反応性の獲得が報告されている。この中には、抗 TNF α 製剤無効例も含まれている。ただし、海外では CD34 細胞選択移植と非選択移植で効果に差はなかったと報告された。

強皮症においては国際的に CD34 細胞選択のうえ移植することか一般的となっている。皮膚所見に対しては我々の経験は満足いくものであったと考える。しかし5例中1例

では遷延する感染症によりかえって QoL をさげてしまう結果となった。

また、幹細胞動員、移植とその間の必要なコストはひとりあたり約420万円であった。このなかには研究のための検査費用を含むので、この治療がルーチンになったときには10-20%軽減されると考える。しかし CD34 選択自身に伴う費用、感染症対策に必要な費用は大きく、この点では common disease である関節リウマチに導入するにあたって大きな問題である。

以上より、難治性関節リウマチにおいては、超大量免疫抑制療法後の移植片を純化 CD34 細胞ではなく、抗 CD34 抗体による純化を行わない自家末梢血幹細胞を用いることを基本とした。適応除外基準、移植前処置も含めて更なる検討が必要である。

E 結論

関節リウマチへの自己末梢血幹細胞移植治療の応用が十分に考えられ、従来の DMARDs に加えて抗 TNF α 製剤無効例への適応が考えられる。

F 健康危険情報

難治性関節リウマチへの同療法の施行例はないものの、当科において経験した強皮症症例において、治療期間中、感染性と思われる発熱、ウイルス感染によると思われる出血性膀胱炎、血球貪食症候群、心膜炎、骨髄抑制等を認めた。抗生剤、抗ウイルス剤等の使用により加療可能であったか、1症例で自己末梢血幹細胞非選択移植を必要とした。いずれの症状も造血能回復とともに軽快傾向を示した。

G 研究発表

1 論文発表

1 Oku K, Atsumi T, Furukawa S, Horita T, Sakai Y, Jodo S, Amasaki Y, Ichikawa K, Amengual O, Koike T Cerebral imaging by magnetic resonance imaging and single photon emission computed tomography in systemic

lupus erythematosus with central nervous system involvement *Rheumatol* 42 773-7, 2003

2 Amengual O, Atsumi T, Koike T Specificities, properties and clinical significance of antiprothrombin antibodies *Arthritis Rheum* 48 886-95, 2003

3 Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA Tissue factor in antiphospholipid syndrome Shifting the focus from coagulation to endothelium *Rheumatol* 42 1029-31, 2003

4 Kobayashi K, Kishi M, Atsumi T, Bertolaccini M, Makino H, Sakurai N, Yamamoto I, Yasuda T, Khamashta MA, Hughes GR, Koike T, Voelker DR, Matsuura E Circulating oxidized LDL forms complexes with beta 2-glycoprotein I implication as an atherogenic autoantigen *J Lipid Res* 44 716-26, 2003

5 Sakai Y, Atsumi T, Itoh T, Koike T Uveitis, pancarditis, haemophagocytosis, and abdominal masses *Lancet* 361 834, 2003

6 Yamada H, Atsumi T, Kato EH, Shimada S, Morikawa M, Minakami H Prevalence of diverse antiphospholipid antibodies in women with recurrent spontaneous abortion *Fertil Steril* 80 1276-8, 2003

7 Li N, Nakamura K, Jiang Y, Tsurui H, Matsuoka S, Abe M, Ohtsuji M, Nishimura H, Kato K, Kawai T, Atsumi T, Koike T, Shirai T, Ueno H, Hirose S Gain-of-function polymorphism in mouse and human Ltk implications for the pathogenesis of systemic lupus erythematosus *Hum Mol Genet* 13, 171-9, 2004

8 Das H, Atsumi T, Fukushima Y, Shibuya H, Ito K, Amasaki Y, Ichikawa K, Yamada Y, Koike T Specificity of anti-agalactosyl IgG antibodies for diagnosing rheumatoid arthritis *Clin Rheumatol* (in press)

9 Yasuda S, Atsumi T, Ieko M, Matsuura E, Kobayashi K, Inagaki J, Kato H, Tanaka H, Yamakado M, Akino M, Saitou H, Amasaki Y, Jodo S, Amengual O, Koike T Nicked beta2-glycoprotein I A marker of cerebral infarct and a novel role in the negative feedback pathway of extrinsic fibrinolysis *Blood* (in press)

2 学会発表

1 Atsumi T, Ieko M, Jodo S, Amasaki Y, Koike T Sensitivity of semiquantitative lupus anticoagulant test for the diagnosis of antiphospholipid syndrome 19th Congress of The International Society on Thrombosis and Haemostasis, Birmingham, UK, 12-18 July 2003

H 知的財産権の出願・登録

該当無し

謝辞

本研究は、北海道大学大学院医学研究科・分子病態制御学の大学院生、坊垣暁之先生、天崎吉晴助手の御協力および小池隆夫教授の御指導でおこなわれた。各先生に深謝する。

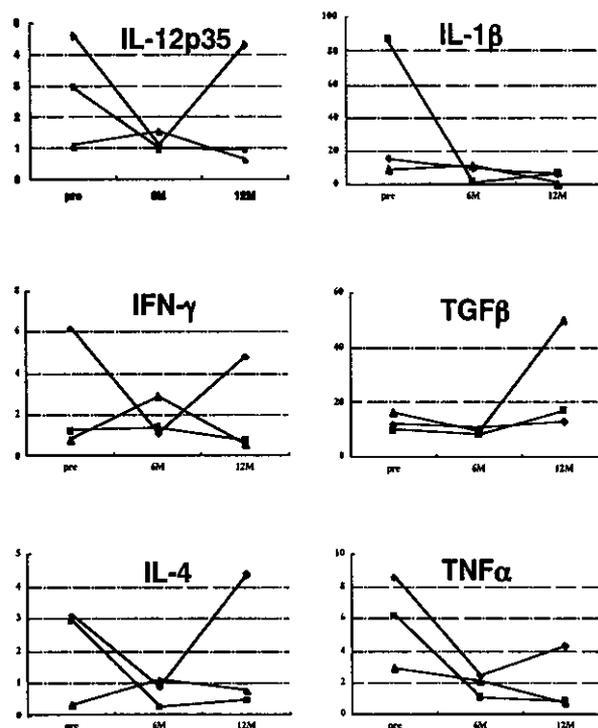


図 自己末梢血幹細胞移前後における末梢血単核球 mRNA 発現の DNA アレイによるスクリーニング

多剤耐性遺伝子を標的とする難治性関節リウマチの新規治療に関する研究

分担研究者 田中良哉 産業医科大学医学部第一内科学講座 教授

研究要旨

関節リウマチ（RA）では、抗リウマチ薬や抗炎症薬の長期連用を治療法の主体とするが、臨床上重要な問題である治療抵抗性獲得の機序に関して、多剤耐性遺伝子 MDR-1 がコートする細胞膜 P-糖蛋白質に着目して研究してきた。今年度は、疾患活動性が高く、薬剤不応性を示す RA 症例のリンパ球で P-糖蛋白質が発現し、P-糖蛋白質発現率は、CRP 値、ESR 値、疼痛関節数、腫脹関節数などの疾患活動性指数と相関する事を認めた。その機序として、IL-2 や IL-4 等によって、MDR-1 の転写、P-糖蛋白質発現が誘導される事が解明された。実際、既存の DMARD 治療では制御不十分な RA 症例に対して、抗 TNF- α 抗体インフリキシマブを併用すると、疾患活動性の改善に伴い、P-糖蛋白質の発現は健常人レベルにまで低下した。即ち、RA 患者リンパ球の P-糖蛋白質の発現の検索により、難治性（薬剤不応性）症例の識別が可能で、抗 TNF- α 抗体などの新規治療法の適応評価、即ち、新規治療法を用いたテーラーメード医療の実践を可能とするものである。

A 研究目的

関節リウマチ（RA）では、抗リウマチ薬や抗炎症薬の長期連用を治療法の主体とするが、治療抵抗性獲得は臨床上重要な問題点である。多剤耐性遺伝子 MDR-1 がコートする細胞膜 P-糖蛋白質は、薬物投与等により発現し、細胞内薬物を細胞外に能動排出して治療抵抗性を齎すか、RA における MDR-1 の関与は不詳であり、治療抵抗性克服に関しては全く対策がなされていない。治療抵抗性は、疾患活動性が高いために治療に反応しない薬剤不応性と、長期間の薬剤投与による薬剤耐性（二次無効）に大別される。昨年度は、RA 患者リンパ球における P-糖蛋白質の発現が、薬剤耐性の獲得の指標となる事を報告した。今年度は、疾患活動性が高いために治療不応性を示す難治性の RA 症例における P-糖蛋白質の関与、その機序、抗 TNF- α 抗体療法などの新規治療法の適応評価を目的として研究を行った。

B 方法

健常人 20 例、RA 患者 30 例の末梢血リンパ球を用いた。RA 症例は、平均腫脹関節数 10.2、同赤沈値 46.7 mm、同 CRP 値 2.2mg/dl と疾患活動性の高い症例を stage I から IV まで選んだ。リンパ球の P-糖蛋白質発現は、抗 P-糖蛋白質抗体 MRK16 を用いてフローサイトメーターで解析した。活性化リンパ球の MDR-1 特異的転写因子 YB-1 の核内移行を共焦点レーザー顕微鏡や EMSA で、MDR-1 の転写を PCR 法で解析した。

（倫理面への配慮）

臨床検体を使用する場合には、所属機関の倫理委員会、或は、IRB で承認を得た研究に限定し、患者からインフォームトコンセントを得た上で、倫理委員会の規約を遵守し、所属機関の現有設備を用いて行う。患者の個人情報が入所機関外に漏洩せぬよう、試料や解

析データは万全の安全システムをもって厳重に管理し、人権擁護に努めると共に、患者は、経済的負担を始め如何なる不利益や危険性も被らない事を明確にする。

C 結果

健常人 20 例、RA 患者 30 例の末梢血リンパ球の P-糖蛋白質の細胞膜上での発現を解析した。リンパ球の P-糖蛋白質は、健常人の CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺細胞では発現しないが RA 症例では高頻度に高発現した。リンパ球の P-糖蛋白質発現率は、リンパ球採取時の CRP 値、ESR 値、疼痛関節数、腫脹関節数などと相関、または、相関傾向を示した。また、リンパ球上の P-糖蛋白質の発現強度は、ACR の RA 臨床的寛解基準に基づき寛解例では軽度に留まり、非寛解例で増強した。さらに、P-糖蛋白質が発現増強している RA 患者リンパ球では、細胞内ステロイド濃度が減少した。なお、滑膜細胞では、P-糖蛋白質の発現を認めず、MDR-1 を介する機構を有さない事が示唆された。一方、リンパ球を IL-2 や IL-4 などで活性化すると、MDR-1 特異的転写因子 YB-1 の核内移行、MDR-1 遺伝子の転写活性部位 Y ホノクスへの結合、MDR-1 の転写、P-糖蛋白質の発現が誘導された。即ち、P-糖蛋白質を介する薬剤抵抗性は、リンパ球活性化によっても齎された。さらに、活性化リンパ球を P-糖蛋白質拮抗薬（ノクロスポリン、PSC833、タクロリムス、MS-209）で前処理すると、細胞内ステロイド濃度の低下は回復した。実際、P-糖蛋白質の過剰発現を呈する活動期 RA 症例では、既存の DMARD 治療では制御不十分で、インフリキシマブの追加併用による強化療法を要し、疾患活動性の改善に伴い P-糖蛋白質の発現は健常人レベルにまで低下し、治療反応性が回復した。

D 考察

薬剤抵抗性は、疾患活動性が高いために治療に反応しない薬剤不応性と、長期間の薬剤投与による薬剤耐

性（二次無効）に大別される。昨年度まで、RA の治療耐性獲得には、長期薬剤連用によるリンパ球の P-糖蛋白質の発現誘導が関与する事を報告した。今年度は、P-糖蛋白質の発現による薬剤耐性がノクロスポリンやタクロリムスにより拮抗的に克服し得ることを認めた。一方、今年度は、疾患活動性が高いために薬剤不応性を示す難治性の RA 症例に於いても、リンパ球の P-糖蛋白質の発現誘導を認め、P-糖蛋白質発現率は、CRP 値、ESR 値、疼痛関節数、腫脹関節数などの疾患活動性指数と相関した。その機序として、活性化リンパ球から産生される IL-2 や IL-4 等によって、MDR-1 の転写、さらに、P-糖蛋白質の発現が誘導される事が解明された。実際、既存の DMARD 治療では制御不十分な RA 症例に対して、抗 TNF- α 抗体インフリキシマブを併用する事により、疾患活動性の改善に伴い、P-糖蛋白質の発現は健常人レベルにまで低下した。即ち、RA 患者リンパ球の P-糖蛋白質の発現の検索により、難治性（薬剤不応性）症例の識別が可能であり、抗 TNF- α 抗体などの新規治療法の適応評価に於いて極めて有用であることが示された。

E 結論

RA のリンパ球上の P-糖蛋白質発現の評価は、薬剤耐性(二次無効)の臨床的指標として有用な臨床検査で、タクロリムスなどの P-糖蛋白質拮抗薬による不応性解除の適応を明確にするものである。同時に、P-糖蛋白質の検索は、難治性（薬剤不応性）症例の識別を可能とし、抗 TNF- α 抗体などの新規治療法の適応判定に於いて極めて有用である。即ち、新様な指標を使用することにより難治性 RA に於ける新規治療法を用いたテーラーメード医療の実践を可能とし、新たな治療的戦略の構築を期待させるものである。

F健康危険情報

特になし。

G 研究発表

1 論文発表

- 1 Saito K, Nawata M, Nakayamada S, Tokunaga M, Tsukada J, Tanaka Y Successful treatment with anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) of life-threatening refractory systemic lupus erythematosus with renal and central nervous system involvement *Lupus* (2003) **12**, 798-800
- 2 Fujii Y, Fujii K, Nakano K, Tanaka Y Crosslinking of CD44 on human osteoblastic cells upregulates ICAM-1 and VCAM-1 *FEBS Letters* (2003) **539**, 45-50
- 3 Nakayamada S, Saito K, Fujii K, Yasuda M, Tamura M, Tanaka Y β 1 integrin-mediated signaling induces ICAM-1 and Fas and Fas-mediated apoptosis of rheumatoid synovial cells *Arthritis Rheum* (2003) **48**, 1239-1248
- 4 Yamamoto A, Fukuda A, Seto H, Miyazaki T, Kadono Y, Sawada Y, Nakamura I, Katagiri H, Asano T, Tanaka Y, Oda H, Nakamura K, Tanaka S Suppression of arthritic bone destruction by adenovirus-mediated dominant-negative Ras gene transfer to synoviocytes and osteoclasts *Arthritis Rheum* (2003) **48** 2682-2692
- 5 Nakayamada S, Okada Y, Saito K, Tamura M, Tanaka Y β 1 integrin/focal adhesion kinase-mediated signaling induces intercellular adhesion molecule 1 and receptor activator of nuclear factor κ B ligand on osteoblast and osteoclast maturation *J Biol Chem* (2003) **278** 45368-45374
- 6 Nakayamada S, Saito K, Nakatsuka K, Nakano K, Tokunaga M, Sawamukai N, Tsujimura S, Nawata M, Tanaka Y Efficacy of mizoribine treatment in patients with Sjogren's syndrome an open pilot trial *Mod Rheumatol* (2003) **13**, 339-345
- 7 Nakatsuka K, Saito K, Kohshi K, Konda I, Tanaka Y Severe skin ulceration associated with Wegener's granulomatosis Successful treatment with hyperbaric oxygen and prostaglandin E_1 *Mod Rheumatol* (2003) **13**, 346-349
- 8 Nakayamada S, Okada S, Saito K, Tanaka Y Etidronate prevents high-dose glucocorticoid-induced bone loss in premenopausal individuals with systemic autoimmune diseases *J Rheumatol* (2004) **31**, 163-6
- 9 Saito K, Nakayamada S, Nakano K, Tokunaga M, Tsujimura S, Nakatsuka K, Adachi T, Tanaka Y Detection of *Pneumocystis carinii* by DNA amplification in patients with connective tissue diseases Reevaluation of clinical features of *P carinii* pneumonia in rheumatic diseases *Rheumatology* (in press)
- 10 Nakano K, Okada Y, Saito K, Tanaka Y Fibroblast growth factor-2 induces receptor activator of nuclear factor kappa B ligand expression and osteoclast maturation by binding to heparan sulfate proteoglycan on rheumatoid synovial fibroblasts *Arthritis Rheum* (in press)
- 11 田中良哉 SLE一病態に応じた急性期治療と維持治療の実際 *Medical Practice* (2003) **20**, 568-576
- 12 田中良哉 リウマトイト血管炎 診断と治療 (2003) **91**, 839-844
- 13 田中良哉 サイトカイン サイトカインレセプター 日本内科学会雑誌 (2003) **92**, 1969-1976
- 14 田中良哉 全身性エリテマトーデス 今月の治療 (2003) **11**, 1238-1245
- 15 田中良哉 生物製剤の使い方 *Mebio* (2003) **20**, 46-52
- 16 田中良哉 リウマチ・膠原病 内科 (2003) **92**, 1143-1148
- 17 田中良哉、齋藤和義、名和田雅夫、徳永美貴子、塚田順一 抗 CD20 抗体 臨床免疫 (2003) **40**, 536-543
- 18 田中良哉 抗 CD20 抗体 *Current Therapy* (2004) **22**, 53-58