

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）
分担研究報告書

抗リウマチ薬投与に関するテーラーメイド医療

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（教授）

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

研究要旨

我々は、抗リウマチ薬（DMARD）の至適投与にケノム情報を用いるテーラーメイド医療試みとして sulfasalazine 投与時の N-acetyltransferase2 遺伝子、methotrexate 投与時の methylene tetrahydrofolate reductase 遺伝子のハプロタイプか副作用発現を予測しうることを報告してきた。今回我々は、thymidylate synthetase (TS)と reduced folate carrier (RFC)遺伝子のハプロタイプか methotrexate 投与時の効果と副作用に及ぼす影響を検討した。その結果、TS および RFC 遺伝子型による副作用発症の統計学的な有意差は認められなかったが、有効性との関連では、TS 遺伝子における 3R3R 遺伝子型を有する群で CRP 値の有意な改善を認めた (p<0.005)。TS 遺伝子型の検討は RA 症例における pharmacogenomics に基づくテーラーメイド医療の有益な指標となる可能性が示された。

A 研究目的

我々は、関節リウマチ(RA)をテーラーメイド医療のプロトタイプと想定し、特に抗リウマチ薬（DMARD）の至適投与にケノム情報を用いる試みを行ってきた。既に salazosulfapyridine 投与時の N-acetyltransferase-2 遺伝子、methotrexate 投与時の methylene tetrahydrofolate reductase 遺伝子のハプロタイプか副作用発現を予測しうることを報告してきた。本年度我々は、1) thymidylate synthetase (TS) と reduced folate carrier (RFC) 遺伝子のハプロタイプか methotrexate 投与時の効果と副作用に及ぼす影響を検討した。

検討した。TS については PCR 法、RFC については PCR-RFLP 法を用いた。対象患者において MTX は 2.5-7.5mg/週で開始され臨床効果に応じて増量された。MTX の有効性は MTX5mg/週で開始された症例における投与前後3ヵ月間の圧痛/腫脹関節数、CRP 値、赤沈値の比較で検討した。これらの有効性の指標および調査期間に生じた副作用と TS および RFC 遺伝子型の関係を検討した。

（倫理面への配慮）

本計画は、東京女子医科大学遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会により承認されている。

B 研究方法

当センターと受診した RA 症例から MTX 服用歴のある 106 例を無作為に抽出し、インフォームドコンセントを得た後末梢血からケノム DNA を抽出し TS および RFC 遺伝子型を

C 研究結果

1 TS 遺伝子型は表 1 のように分布した。

【表 1】TS 遺伝子多型の分布

genotype	2R2R	2R3R	3R3R
number	5	32	57

(5 3%) (34 0%) (60 6%)
 2R allele frequency=0 22
 3R allele frequency=0 78

GG 10 5% 統計学的有意差なし。
 other 16 0%
 AA 50 0% 統計学的有意差なし。

2 TS 遺伝子型と副作用発現について
 検討した 94 例中、副作用発現は 18 例であ
 ったか、TS 遺伝子型と関連は認めなかつた。

【表 2】TS 遺伝子多型と副作用発現の関連

	副作用発現	
with 2R	18 9%	
without 2R	19 3%	統計学的有意差なし。
with 3R	20 2%	
without 3R	0%	統計学的有意差なし。

3 RFC 遺伝子型と MTX 投与の有効性

【表 3】RFC 遺伝子型と有効性
 MTX 5mg/week 投与症例 81 人における、
 3ヶ月前後での改善率

	other	GG	significance
ESR	+26 6%	+20 2%	ns
CRP	+33 7%	+51 0%	ns
TJ	+38 0%	-7 2%	ns
SJ	+15 0%	+24 2%	ns

3 TS 遺伝子型と MTX 投与の有効性

【表 3】有効性 MTX 5mg/week 3ヶ月投
 与前後での改善率

	with 3R	without 3R	significance
ESR	+25 0%	+15 2%	ns
CRP	+50 8%	-2 8%	p<0 005
TJ	+33 4%	+21 1%	ns
SJ	-4 37%	+20 9%	ns

TS 遺伝子の 3R3R 遺伝子型を有する群で
 CRP 値の有意な改善を認めた (p<0 005)。
 赤沈値、疼痛/腫脹関節数の検討では統計学
 的有意差は認められなかつた。

4 RFC 遺伝子型は表 4 のように分布した。

【表 4】RFC 遺伝子多型の分布

genotype	AA	AG	GG
number	30	56	19
	(28 6%)	(53 4%)	(18 1%)

A allele frequency=0 55
 G allele frequency=0 45

2 RFC 遺伝子型と副作用発現について
 検討した 105 例中副作用発現は 22 例であ
 ったか、RFC 遺伝子型との関連は認めな
 かつた。

【表 2】RFC 遺伝子多型と副作用発現

genotype	副作用発現
other	23 3%

以上の結果より、RFC 遺伝子型は作用・副
 作用のいずれにも関連しなかつたか、TS 遺
 伝子は有効性と関連する可能性が示唆された。

D 考察

RA 治療における MTX の作用機序につい
 ては葉酸代謝拮抗による細胞増殖抑制作用か最
 も大きく関わりとされている。TS は
 dTMP プールを維持するための酵素であり、
 TS 酵素活性は血漿葉酸濃度やホモシスチン
 濃度に影響する可能性が示唆される。TS 遺
 伝子 5'UTR における SNP, 3R3R 遺伝子型
 を有する群で血漿葉酸濃度の低下、高ホモシ
 スチン血症との関連 (MTHF 多型による葉
 酸やホモシスチンとの関与から独立してい
 る)が報告されている (Hum Genet 111, 299,
 2002)。一方、RFC は哺乳類細胞における
 MTX の主要なトランスポーターであるか、
 G80A (His27Arg) 多型が報告されている。
 2002 年 Caroline らは、小児急性リンパ
 性白血病の MTX 治療例における検討で、GG
 遺伝子型を有する群は他群と比べて血漿
 MTX 濃度が有意な高値で、予後が良好であ
 ったと報告している (Blood 100, 3832,
 2002)。以上より RA 治療における MTX の
 有効性や副作用発現と TS・RFC 遺伝子多型
 の関連を検討し、これらの遺伝子多型の臨床
 的有用性について検討した。

その結果、TS および RFC 遺伝子型による副作用発症の統計学的な有意差は認められなかった。有効性との関連では、TS 遺伝子における 3R3R 遺伝子型を有する群で CRP 値の有意な改善を認めた ($p < 0.005$)。赤沈値、疼痛／腫脹関節数の検討では統計学的有意差は認められなかった。RFC 遺伝子型による有効性との関連は認められなかった。TS 遺伝子型の検討は RA 症例における Pharmacogenomics に基づくオーダーメイド医療に有用な可能性があることか示唆された。ただし、今回の検討で示されたことく、RA における薬剤の治療反応性を正確に把握することはプロスペクティブな研究以外の方法論では困難を伴う場合が多い。今後はこの点にも焦点を当てて研究を進めていく予定である。

E 結論

Thymidylate synthetase 遺伝子のハプロタイプは治療の有効性と関連する可能性か示唆

され、RA 患者に対する MTX 投与をより有効に行うための Pharmacogenomics に基づくオーダーメイド医療に用いる指標としての有用性が示された。

F 健康危険情報
特になし

G 研究発表

- 1 論文発表
未発表
- 2 学会発表
未発表

H 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

- 1 特許取得
未申請
- 2 実用新案登録
未申請

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）
分担研究報告書

関節リウマチ患者骨髄幹細胞における遺伝子発現の異常に関する研究

分担研究者	小林茂人	(順天堂大学医学部膠原病内科 助教授)
研究協力者	他田 真	(順天堂大学医学部膠原病内科 助手)
	田村直人	(順天堂大学医学部膠原病内科 助手)
	橋本博史	(順天堂大学医学部膠原病内科 教授)
	野沢雅彦	(順天堂大学医学部整形外科 助教授)
	前沢克彦	(順天堂大学医学部整形外科 助手)
	松田圭二	(順天堂大学医学部整形外科 助手)
	黒澤 尚	(順天堂大学医学部整形外科 教授)
	安田勝彦	(静岡県厚生連中伊豆温泉病院 内科医長)
	勝部定信	(静岡県厚生連中伊豆温泉病院 院長)

研究要旨

関節リウマチの炎症の主座は関節であるか、骨髄細胞の異常かその病因・病態に関与していることか推定されている。我々はCD34+骨髄幹細胞に注目し、その機能解析として、cDNAアレーを用い、遺伝子発現の差異をRAとOAの患者から得られたRNAを比較することで検討した。さらに得られた結果を元に、定量的 real-timePCR 法を用いて差異のあった遺伝子について mRNA 発現を、RA、OA、大腿骨頭壊死症患者で比較した。RA患者はOA患者、大腿骨頭壊死症患者に比べて有意にS100A8、S100A9の発現が高かった。

A.研究目的

関節リウマチ(RA)の炎症の主座は、関節滑膜であるか、その免疫学的異常か骨髄細胞にあることか従来推定されている。その骨髄細胞の遺伝子の異常を検討することは、末梢血、関節滑膜などの免疫異常と深く関わると考え、検討を開始した。

RA患者6例、OA患者8例、大腿骨頭壊死症患者4例について、RT-PCR、定量的PCR法によりS100 protein family であるS100A8、S100A9、S100A12の発現を検討した。

B.研究方法

関節手術時骨髄液を採取、マグネットヒース法にてCD34陽性細胞を分離した後、RNAを抽出し、定量的 real-time PCR 法にて骨髄細胞における遺伝子の発現状況を解析した。

C.研究結果

RA患者は、OA患者、大腿骨頭壊死患者に比べて有意にS100A8、S100A9の発現が高かった。また、RA患者について、MTX治療を行なっている患者とステロイド治療のみの患者の発現も調べたが、これには有意な差は認められなかった。

D. 考察

カルシウム結合蛋白である S100 protein は炎症性メディエーターとして知られている。関節リウマチにおいても関節液および血清中濃度の上昇、さらには滑膜での発現の増強が報告されている。S100A8、S100A9 は R A のマクロファージに発現しているという報告があり、骨髄内での不顕性炎症の存在を示唆する可能性がある。これらの結果は骨髄細胞が炎症関節に侵潤するメカニズムを示すうえで、重要な手かかりとなる可能性が考えられる。今後症例数を増やし、さらに検討していく方針である。

E. 結論

S100 protein が R A の骨髄異常の主体である可能性が考えられる。今後、さらに個々の症例の治療経過など、臨床データと併せて健闘を進める方針である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 論文発表

- 1 Kobayashi S, Ishizuka S, Tamura N, Takaya M, Kaneda K, Hashimoto H Churg-Strauss syndrome (CSS) in a patient receiving pranlukast Clin Rheumatol 2003,22 491-2
- 2 Bando H, Kobayashi S, Matsumoto T, Tamura N, Yamanaka K, Yamaji C, Takasaki C, Takasaki Y, Hashimoto H Acute acalculous cholecystitis induced by mesenteric inflammatory veno-occlusive disease (MIVOD) in systemic lupus erythematosus Clin Rheumatol 2003,22 447-9
- 3 Kobayashi S, Yano T, Inaba Y, Hashimoto H, Matsumoto Y, Tamakoshi A, Kawamura T, Ohno Y Ocular involvement of Japanese patients with giant cell arteritis from the first nation-wide survey Arthritis Rheum 2003,49 867-868 (Letter)
- 4 Kobayashi S, Yano T, Matsumoto Y, Numano F, Nakajima N, Yasuda K, Yutani C, Nakayama T, Tamakoshi A, Kawamura T, Ohno Y, Inaba Y, Hashimoto H Clinical and epidemiologic analysis of giant cell (temporal) arteritis from a nationwide survey in 1998 in Japan the first government-supported nationwide survey Arthritis Rheum 2003 .49 594-8
- 5 Kobayashi S, Tamura N, Ikeda M, Sakuraba K, Matsumoto T, Hashimoto H Uveitis in Adult patients with poststreptococcal reactive arthritis the first two cases reported associated with uveitis Clin Rheumatol 2002,6 533-5
- 6 Tsuchiya N, Kobayashi S, Kawasaki A, Kyogoku C, Arimura Y, Yoshida M, Tokunaga K, Hashimoto H, Genetic background of Japanese patients with antineutrophil Cytoplasmic antibody-associated vasculitis association of HLA-DRB1*0901 with microscopic polyangiitis J Rheumatol 2003,30 1534-40
- 7 Takaya M, Tamura N, Kobayashi S, Haruta K, Tajima M, Hara M, Yang K-S, Tsuda H, Hashimoto H CD154 expression and mRNA stability of activated CD4-positive T cells in patients with systemic lupus erythematosus Mod Rheumatol 2003,13 220-236

8 Bando H, Tamura N, Kobayashi S, Hara MO, Ichimura Y, Tajima M, Haruta K, Hashimoto H, Endothelial cell-binding antibodies in patients with systemic lupus erythematosu Mod Rheumatol 2003, 13 44-49

1. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

- 1 Akimoto T, Kobayashi S, Zhong B, Matsumoto T, Hashimoto H what is the better treatment for relapsing polychondritis? Analysis of 99 Japanese cases The ACR/ARHP Annual Scientific Meeting Orlando, FL, Oct 27,
- 2 Kobayashi S, Tamura N, Akimoto T, Takaya M, Ikeda M, Hashimoto H Clinical manifestations of Churg-Strauss syndrome (CSS) following treatment with cysteinyl leukotriene type I receptor antagonist 11th International Vasculitis and ANCA Workshop Prague, Czech Republic, Oct 2-5, 2003
- 3 小林茂人、田村直人、石塚修悟、高谷磨紀代、池田 真、金田和彦、戸叶嘉明、橋本博史 Churg-Strauss 症候群 (CSS) 当院27症例と喘息治療薬 (cysteinyl leukotriene type I receptor antagonist) 誘発症例との臨床的比較 日本リウマチ学会総会 平成15年4月24日、東京、2003
- 4 Kobayashi S, Tamura N, Ikeda M, Haruta K, Zhong B, Akimoto T, et al Poststreptococcal reactive arthritis and tonsillitis induced reactive

arthritis International congress series 1257 2003,151-154

- 5 Kobayashi S, Tamura N, Ikeda M, Haruta K, Tanaka M, Kawana T et al Anterior uveitis and poststreptococcal reactive arthritis International congress series 1257 2003,231-234

H.知的財産権の出願・登録状況
なし

1.特許取得
なし

2.実用新案登録
なし

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）
分担研究報告書

滑膜細胞の TRAIL 誘導性アポトーシスの検討に関する研究

分担研究者 川上 純 長崎大学医学部 第一内科（講師）

研究要旨

昨年度までの検討で滑膜細胞には tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)誘導性アポトーシスが惹起され、Akt は翻訳後修飾の機序で滑膜細胞 TRAIL 誘導性アポトーシスを抑制することかわかった。本年度は翻訳調節機序での制御機構を検討した。Interferon gamma (IFN- γ)で滑膜細胞を刺激すると STAT がリン酸化され、滑膜細胞の TRAIL 感受性は顕著に抑制された。この過程では滑膜細胞の TRAIL 受容体発現には変化はなく、しかしながら、STAT 阻害剤および蛋白合成阻害剤の添加で IFN- γ の抑制作用は解除された。Western blotting での評価では、滑膜細胞の pro-caspase-3/-8/-9、Bcl-2、Bcl-xL、Bax、FLIP、SOCS-1/-3 の発現は IFN- γ 刺激の有無で差異はなかった。今回の検討では STAT が制御する蛋白の同定はできなかったか、STAT は、翻訳調節機序で滑膜細胞の TRAIL 誘導性アポトーシスを制御する重要な転写因子であることが示唆された。

A.研究目的

滑膜細胞の TRAIL 誘導性アポトーシスの制御と関節リウマチ (RA) 病態との関連性が近年注目されている。PDGF は滑膜細胞の強力な増殖因子だが、私たちの検討ではその作用には TRAIL 誘導性アポトーシス抑制があり、その過程では Akt を介する翻訳後修飾機序の重要性が考えられた。TRAIL 誘導性アポトーシスの制御には翻訳後修飾に加えて翻訳調節も重要であり、本年度は後者の検討を行った。

B.研究方法

実験に使用したサンプルはすべてインフォームトコンセント下に採取した。培養滑膜細胞（滑膜線維芽細胞）は整形外科的手術時に得られた滑膜組織を細切して得た。滑膜細胞を IFN- γ の有無で培養後 rTRAIL を添加して、アポトーシス感受性を caspase 活性化とミトコンドリア膜電位の低下 ($\Delta\Psi_m$) で評価した。滑膜細胞の膜型 TRAIL 受容体、STAT、

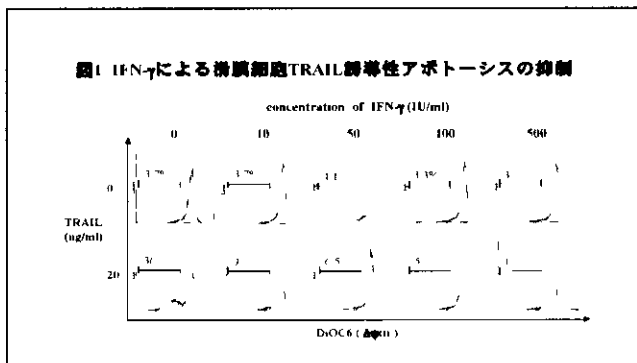
ERK、Akt、pro-caspase-3/-8/-9、Bcl-2、Bcl-xL、Bax、FLIP、SOCS-1/-3 の発現は western blotting で評価した。STAT 阻害剤としては ATA を、また、蛋白合成阻害剤としては cyclohexamide (CHX) を用いて培養し、IFN- γ の作用が解除されるか否かを検討した。

（倫理面への配慮）

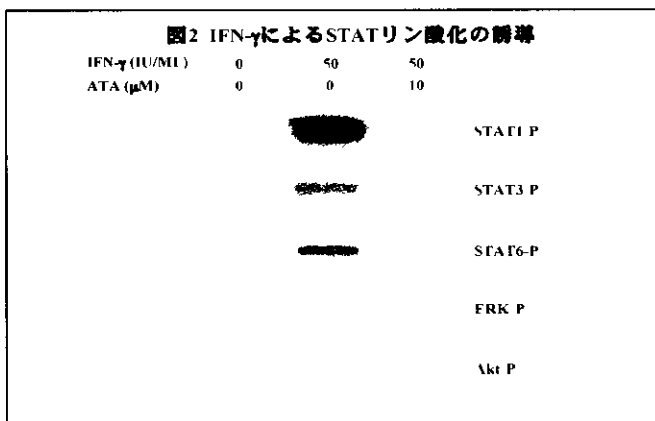
実験に使用したサンプル（滑膜細胞）はすべて文書でインフォームトコンセントが得られた患者より用いた。

C 研究結果

1. 滑膜細胞を IFN- γ で刺激すると滑膜細胞の TRAIL 誘導性アポトーシスは顕著に抑制された。アポトーシス抑制効果は caspase 活性化と $\Delta\Psi_m$ ともに認められたか、IFN- γ の短時間刺激（～1 時間）では検出されず、24 時間刺激で顕著に認められた。この過程で滑膜細胞の TRAIL 受容体発現には変化がなかった。



2. IFN- γ 刺激で滑膜細胞の STAT1/3/6 (特に STAT1) は強くリン酸化が誘導されたか、同細胞の ERK と Akt のリン酸化は軽微であった。



3. ATA (STAT 阻害剤) もしくは CHX (蛋白合成阻害剤) の前処理をすると、IFN- γ の滑膜細胞に対する抑制効果は解除された。

4. 滑膜細胞の pro-caspase-3/-8/-9、Bcl-2、Bcl-xL、Bax、FLIP、SOCS-1/-3 の発現は IFN- γ 刺激の有無で変化しなかった。

D. 考察

IFN- γ は STAT を介する翻訳調節の機序で、滑膜細胞の TRAIL 誘導性アポトーシスを抑制した。滑膜細胞の TRAIL 受容体や pro-caspase の発現は IFN- γ 刺激で差異はなく、STAT を制御する分子は DISC の下流に作用するアポトーシス関連蛋白であることが示唆された。

E. 結論

IFN- γ は特異的免疫反応の発動に加え滑膜細胞の副刺激分子発現誘導作用もあり、RA の病態形成に重要と考えられてきた。今回の検討では滑膜細胞の TRAIL 誘導性アポトーシス抑制作用があることもわかり、IFN- γ は RA 滑膜組織局所で炎症反応および滑膜細胞増殖を促進することが示唆された。転写因子としては STAT が重要なか今後は STAT を制御する遺伝子産物を同定し、RA の新たな治療ターゲットを探索したい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Tanaka F, Kawakami A (6 番目、他 5 名) Interleukin-18 induces serum amyloid A (SAA) protein production from rheumatoid synovial fibroblasts *Life Sci* 74(13) 1671-1679, 2004
- 2 Yamasaki S, Kawakami A (3 番目、他 7 名) Cytokines regulate fibroblast-like synovial cell differentiation to adipocyte-like cells *Rheumatology* in press, 2004
- 3 Migita K, Kawakami A (6 番目、他 4 名) The role of mitochondria in nitric oxide-mediated thymocyte apoptosis *Immunol Lett* 90 87-91, 2004
- 4 Kawakami A (筆頭著者、他 14 名) Anti-apoptogenic function of TGF β 1 for human synovial cells TGF β 1 protects cultured synovial cells from mitochondrial perturbation induced by several apoptogenic stimuli *Ann Rheum Dis* 63(1) 95-97, 2004
- 5 Tanaka F, Kawakami A (9 番目、他 9 名) Clinical outcome and survival of secondary (AA) amyloidosis *Clin Exp Rheum* 21 343-346, 2003
- 6 Nakashima K, Kawakami A (2 番目、他 15 名) Protection of mitochondrial perturbation by human T-lymphotropic virus type 1 tax through induction of Bcl-xL expression *J Lab Clin Med* 42(5) 341-347, 2003

7 Ida H, Kawakami A (9 番目、他 11 名)
Granzyme B leakage-induced cell death a new
type of activation-induced natural killer cell death
Eur J Immunol 33 3284-3292, 2003

8 Miyashita T, Kawakami A (2 番目、他 16 名)
Akt is an endogenous inhibitor toward tumor
necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-
mediated apoptosis in rheumatoid synovial cells
BBRC 312(2) 397-404, 2003

9 Shigeno M, Kawakami A (5 番目、他 11 名)
Interferon-alpha sensitizes human hepatoma cells
to TRAIL-induced apoptosis through DR5
upregulation and NF- kappa B inactivation
Oncogene 22(11) 1653-1662, 2003

10 川上 純、江口勝美 (筆頭著者)
adalimumab カレントセラピー 22(1) 44-47,
2003

2. 学会発表

1 Kawakami A(筆頭演者、他 9 名) Examination
of anti-apoptogenic property of salivary
infiltrating T cell Possible association with
HTLV-I infection Arthritis Rheum 46 (Supple)

2 Izumi Y, Kawakami A(7 番目、他 8 名)
Granzyme B Leakage-induced Cell Death A
New Type of Activation-induced Natural Killer
Cell Death Arthritis Rheum 48(9) (Supple)

3 Kawakami A(筆頭演者、他 10 名) PDGF-
mediated Inhibition of TRAIL-induced apoptosis
in Fibroblast-like Synovial Cells Through
Activation of Akt Arthritis Rheum 48(9) (Supple)

4 和泉泰衛、川上 純 (9 番目、他 9 名) サ
イトカインによる NK 細胞死のメカニズム。
第 47 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄
録集 43 (2) p274、2003

5 宮下賜一郎、川上 純 (2 番目、他 9 名)
Lipid raft 阻害による血管内皮細胞 TRAIL 誘
導性アポトーシス感受性の増強。第 47 回日
本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 43 (2)
p275、2003

6 川上 純 (筆頭演者、他 10 名) 滑膜細胞
TRAIL 誘導性アポトーシスへの PDGF の抑制
効果。第 47 回日本リウマチ学会総会・学術
集会抄録集 43 (2) p377、2003

7 宮下賜一郎、川上 純 (2 番目、他 9 名)
滑膜細胞 TRAIL 誘導性アポトーシスへの
PDGF の抑制効果。第 47 回日本リウマチ学
会総会・学術集会抄録集 43 (2) p404、2003

8 右田清志、川上 純 (10 番目、他 9 名) RA
滑膜細胞 MMP-13 産生に対する FK506 の作
用。第 47 回日本リウマチ学会総会・学術集
会抄録集 43 (2) p407、2003

9 田中史子、川上 純 (2 番目、他 8 名)
IFN-gamma による血管内皮細胞 TRAIL 誘導
性アポトーシスの抑制。第 24 回日本日本炎
症・再生医学会総会・学術集会抄録集 p345、
2003

10 宮下賜一郎、川上 純 (2 番目、他 3 名)
Raft 凝集阻害剤による血管内皮細胞 TRAIL
感受性の増強。第 33 回日本日本免疫学会総
会・学術集会抄録集 p104、2003

**H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も
含む)**

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3 その他

なし

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）
分担研究報告書

In vitro でのヒト末梢血 B 細胞の
抗シトルリン化ペプチド抗体産生に関する検討

分担研究者 沢田哲治 東京大学医学部アレルギー・リウマチ科（助手）

研究要旨

（緒言）従来 RA に特異的な自己抗体として anti-keratin antibody や anti-perinuclear factor が知られていたか、その対応抗原は peptidylarginine deiminase により翻訳後修飾（シトルリン化）されたフィラグリンであることが報告された。その後、シトルリン化フィラグリンを用いた ELISA (anti-citrullinated filaggrin antibody, AFA) や、シトルリンを含む環状合成ペプチドを用いた ELISA (anti-cyclic citrullinated peptide antibody, anti-CCP) が開発された。生物製剤を含む抗リウマチ薬の進歩に伴い、RA の早期診断や予後予測因子の開発が重要と考えられる。anti-CCP は、RA 診断においてリウマトイド因子より感度・特異度に優れているのみならず、早期診断や予後予測に有用であることが報告されており、有用なマーカーのひとつと考えられるか、その産生機転の詳細は不明である。本研究では末梢血 B 細胞の in vitro での AFA や anti-CCP 産生能を健常人および RA 患者を対象に検討した。

（方法）11例の RA 患者および5例の健常人より末梢血リンパ球を採取し、ヒツン赤血球を用いたロゼット法により T 細胞および B 細胞を単離した。B 細胞の活性化は、固相化した抗 CD3 抗体 (64 1) で刺激した T 細胞と B 細胞とを共培養することにより行った。

（結果）培養上清中の IgM-AFA、IgG-AFA、IgG-anti-CCP は ELISA により測定した。健常人由来 B 細胞はすべて IgM-AFA を産生したが、IgG-AFA や IgG anti-CCP は産生しなかった。多くの RA 患者 B 細胞でも IgM-AFA の産生が認められた。一方、11例中2例の RA 患者では、B 細胞から IgG-AFA および IgG anti-CCP の産生が検出されたか。この B 細胞の IgM-AFA 産生は軽微であった。

（考察）AFA や anti-CCP などシトルリン化ペプチドに対する IgM 抗体はリウマトイド因子と同様、健常人 B 細胞からも産生された。しかし、末梢血 B 細胞からの IgG 抗体産生は一部の RA 患者のみに認められ、IgM から IgG へのシフトが RA に特徴的な現象であると考えられる。

A 研究目的

従来 RA に特異的な自己抗体として anti-keratin antibody や anti-perinuclear factor が知られていたか、その対応抗原は peptidylarginine deiminase により翻訳後修飾（シトルリン化）されたフィラグリンであることが報告された。その後、シトルリン化

フィラグリンを用いた ELISA (anti-citrullinated filaggrin antibody, AFA) や、シトルリンを含む環状合成ペプチドを用いた ELISA (anti-cyclic citrullinated peptide antibody, anti-CCP) が開発された。

TNF- α や IL-6、IL-1 を標的にした生物製剤は優れた抗リウマチ作用が認められる一方で、

副作用や高額であることか問題であり、これらの生物製剤の適応を考える上で、RAの早期診断や予後予測因子の開発が重要と考えられている。

ant1-CCPは、RA診断においてリウマトイド因子より感度・特異度に優れているのみならず、早期診断や予後予測に有用であることが報告されており、有用なマーカーのひとつと考えられるか、その産生機転の詳細は不明である。

本研究では末梢血B細胞のin vitroでのAFAやant1-CCP産生能を健常人およびRA患者を対象に検討した。

B 研究方法

11例のRA患者および5例の健常人の末梢血から比重遠心法によりリンパ球を採取し、ヒツシ赤血球を用いたロゼット法によりT細胞およびB細胞を単離した。

B細胞の活性化は、固相化した抗CD3抗体(641)刺激により活性化され、マイトマイシン処理によりサプレッサー活性を抑制されたT細胞とB細胞とを共培養することにより行った。

培養上清中のIgM-AFA、IgG-AFA、IgG-ant1-CCPはELISAにより測定した。

(倫理面への配慮)

本研究はケノム研究ではなく、リンパ球の機能解析実験である。また、末梢静脈血で15mlの採血であり、身体に与える影響は軽微である。

C 研究結果

in vitroで活性化T細胞によるpolyclonal B cell activationにより産生される免疫グロブリンは、IgG、IgMともに、健常人B細胞からの産生に比して、RA患者B細胞では低い傾向にあった。これはステロイド剤やDMARD投与による影響と考えられる(図1)。

健常人由来B細胞はすべてIgM-AFAを産生したか、IgG-AFAやIgG ant1-CCPは産生しな

かった(図2)。また、多くのRA患者B細胞でもIgM-AFAの産生が認められた。

一方、11例中2例のRA患者では、B細胞からIgG-AFAおよびIgG ant1-CCPの産生が検出されたか(図3)、この2例のRA患者B細胞のIgM-AFA産生は軽微であった。

図1 Production of immunoglobulin (IgM and IgG) from normal B cells (n=6) and RA B cells (n=11)

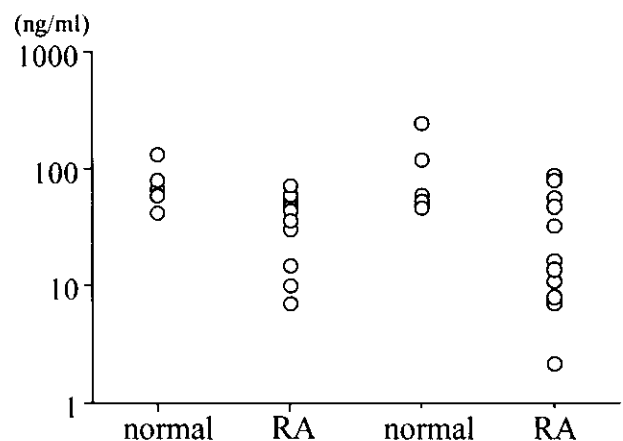


図2 Production of anti-citrullinated filaggrin antibody (AFA) from normal B cells (n=6)

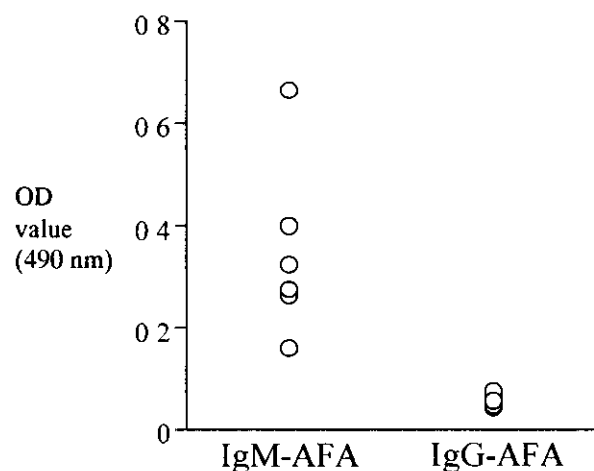
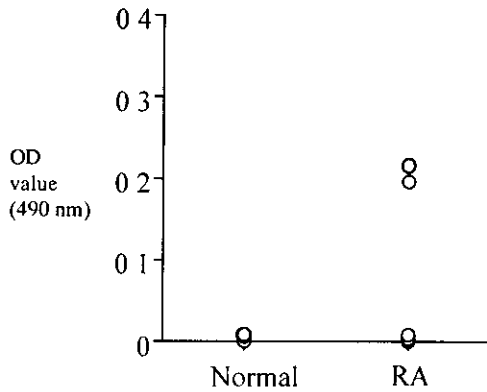


図3 Production of IgG ant1-CCP antibody from normal (n=6) and RA (n=11) B cells



D 考察

健常人 B 細胞からリウマトイド因子 (IgM) が産生されることか報告されている。AFA や anti-CCP などシトルリン化ペプチドに対する IgM 抗体はリウマトイド因子と同様、健常 B 細胞からも産生され、何らかの生理的な役割を担っている可能性もある。しかし、末梢血 B 細胞からの IgG 型の自己抗体産生は一部の RA 患者のみに認められ、IgM から IgG へのシフトが RA に特徴的な現象であると考えられる。今回、末梢血 B 細胞からの自己抗体産生は一部 RA 患者で検出されたか、これは抗シトルリン抗体の主な産生部位が滑膜であるという従来の報告と合致するものと考えられる。

E 結論

RA の早期診断や予後予測での有用性が期待されている AFA や anti-CCP などシトルリン化ペプチドに対する自己抗体産生に関して、IgM クラスは健常 B 細胞からも産生されるか、IgG クラス産生は RA に特徴的な事象である。

F 健康危険情報

特記事項なし

G 研究発表

1 論文発表

(1) K Suzuki, T Sawada, A Murakami, T Matsu, S Tohma, K Nakazono, M Takemura, Y Takasaki, T Mimori, K Yamamoto High diagnostic performance of ELISA detection of antibodies to citrullinated antigens in

rheumatoid arthritis Scand J Rheumatol 32(4) 197-204, 2003

(2) Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhiro S, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Nakayama-Hamada M, Kawaida R, Ono M, Ohtsuki M, Furukawa H, Yoshino S, Yukioaka M, Tohma S, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Nishioka Y, Sekine A, Iida A, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis Nature Genetics 34(4), 395-402, 2003

2 学会発表

Sawada T, Suzuki K, Matsui T, Tohma S, Nakazono K, Takemura M, Takasaki Y, Mimori T, Yamamoto K ELISA detection of antibodies to citrullinated antigens indicates superior discriminative ability for the diagnosis of rheumatoid arthritis (Poster 17) The 5th Korea-Japan Combined Meeting of Rheumatology (KJCMR) Association (May 22, 2003, Seoul, Korea)

H 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

- 1 特許取得
なし
- 2 実用新案登録
なし
- 3 その他
なし

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）
分担研究報告書

抗 fractalkine 抗体による関節炎抑制機序の検討

分担研究者 南木敏宏 東京医科歯科大学 生体応答調節学（助手）

研究要旨

コラーゲン関節炎マウスに抗 fractalkine (FKN)抗体を投与することにより、その関節炎が抑制された。抗 FKN 抗体投与は抗コラーゲン抗体産生には影響せず、また脾臓 T 細胞のコラーゲン刺激による IFN- γ 産生にも影響しなかったが、脾臓 Mac-1 陽性細胞の関節滑膜組織への遊走は抗 FKN 抗体投与で抑制された。このことより、抗 FKN 抗体により炎症細胞浸潤が抑制され、関節炎が抑制されたと考えられた。FKN/CX3CR1 相互作用阻害が RA の新たな治療薬となる可能性が示唆された。

A 研究目的

関節リウマチ(RA)患者の罹患関節滑膜組織には、T細胞、マクロファージなどの炎症細胞浸潤がみられ、浸潤した細胞は炎症性サイトカイン産生などにより RA の病態形成に深く関与している。その炎症細胞浸潤には滑膜組織で発現しているケモカインが関与していると考えられており、ケモカインは RA に対する新規治療ターゲットとして考えられている。

これまでの本研究事業において、RA 滑膜組織への T 細胞浸潤に fractalkine (FKN)/CX3CR1 相互作用が重要であることを報告し、また、関節炎モデル動物を用いて、抗 FKN 抗体投与がその関節炎を抑制することを報告してきた。本年度は、FKN 阻害による関節炎抑制機序に関して詳細に解析し、RA に対する新規治療薬としての可能性を検討した。

B 研究方法

関節炎モデル動物として、コラーゲン誘導関節炎マウスを用いた。DBA/1J マウス（雄、8 週令）に、bovine type II collagen と complete Freund's adjuvant (CFA) のエマルジョンを皮内投与し、その 3 週間後に再度同様に bovine

type II collagen + CFA を投与した。2 回目の免疫時を day 0 とし、抗マウス FKN 抗体、またはコントロール抗体を 500 μ g ずつ週 3 回腹腔内に投与した。

Day7 に、関節炎マウスの脾臓 Th1 2 陽性 T 細胞をマクネティックヒースを用いて単離。また正常マウスの脾細胞より Th1 2 および B220 陽性細胞 (T, B 細胞) を除去した抗原提示細胞を、関節炎マウスの脾臓 T 細胞と共培養し、bovine type II collagen で刺激 72 時間後に培養上清中の IFN- γ 濃度を ELISA にて測定した。

Day15 に、血清中の抗コラーゲン抗体価を ELISA を用いて測定した。

Day7 に関節炎マウス（抗体治療無し）の脾臓より Mac-1 陽性細胞を単離し、CMTMR (5-(and-6)-(((4-chloromethyl) benzoyl) amino) tetramethylrhodamine)で蛍光標識した。1 \times 10⁷ 標識 Mac-1 陽性細胞を関節炎マウスにトランスファーした。レシピエントの関節炎マウスには、トランスファー24時間前と2時間前に、抗 FKN 抗体またはコントロール抗体を腹腔内に投与した。トランスファー24時間後に足関節を切除し、クリコールメタクリレート樹脂包埋し、足関節の切片を蛍光顕微鏡で観察

し、CMTMR 陽性細胞をカウントした。

関節炎マウスの足関節より線維芽細胞様滑膜細胞を樹立し、TNF- α , IL-1 β , IFN- γ で48時間刺激し、培養上清中の FKN 濃度を ELISA で解析した。

動物実験においては、動物愛護などに配慮して行った。

C. 研究結果

Day7 に、脾臓 T 細胞を抗原提示細胞とともに培養し、コラーゲン刺激して培養上清中の IFN- γ 産生を解析した。無刺激では抗 FKN 抗体投与群とコントロール抗体投与群で、IFN- γ 産生に有意差はなかった。またコラーゲン刺激によりともに IFN- γ の発現は亢進したか、刺激後も抗 FKN 抗体投与群とコントロール抗体投与群にその産生量に有意差はみられなかった (図1)。

血中抗コラーゲン抗体の産生は、抗 FKN 抗体投与群とコントロール抗体投与群において有意差は認めなかった (図2)。

蛍光標識した脾臓 Mac-1 陽性細胞をトランスファーし、関節炎マウスの滑膜組織への遊走について解析したところ、レシピエントへの抗 FKN 抗体投与群では、コントロール抗体投与群と比較して、標識細胞の関節滑膜への遊走は有意に抑制された (図3)。

線維芽細胞様滑膜細胞からの FKN 産生を解析したところ、TNF- α 刺激で FKN 産生は亢進したか、IL-1 β , IFN- γ 刺激ではむしろ FKN 産生は抑制された。しかし、TNF- α , IL-1 β の共刺激においては TNF- α 単独刺激よりも明らかに FKN 発現の亢進がみられた (図4)。

D 考察

末梢血 CX3CR1 陽性 T 細胞は、IFN- γ , TNF- α などの type 1 型のサイトカイン、および granzyme A, perforin などの細胞障害性分子を発現する特異な細胞であり、FKN により RA 滑膜組織に浸潤している。FKN/CX3CR1 相互作用は滑膜組織への T 細胞浸潤に寄与することにより RA の病態形成に関与していると

考えられる。実際に、関節炎モデルマウスにおいて、抗 FKN 抗体が関節炎を抑制することを見出した。本研究においては、FKN 阻害による関節炎抑制の機序について検討した。抗 FKN 抗体の投与は、脾臓 T 細胞のコラーゲン刺激に対する反応性には変化がなく、また血中の抗コラーゲン抗体産生にも影響しなかった。このことは、コラーゲン免疫に対する反応には抗 FKN 抗体は影響がないと考えられる。しかし、抗 FKN 抗体の投与により、滑膜組織への Mac-1 陽性細胞の浸潤が抑制されたことにより、抗 FKN 抗体の投与により炎症細胞浸潤が抑制されて関節炎が軽減したと考えられた。

RA 滑膜組織では、マクロファージ様滑膜細胞、樹状細胞様滑膜細胞からも CX3CR1 が発現していることが報告されている。抗 FKN 抗体はそれらの細胞浸潤も抑制した可能性がある。また、RA 線維芽細胞様滑膜細胞は FKN 刺激により matrix metalloproteinase-2 の発現が増強されることも報告されている。

これらのことより、FKN 阻害剤は、炎症細胞浸潤の抑制のみならず、滑膜細胞の活性化抑制などの作用も加わり、関節炎抑制効果があるものと考えられ、RA に対する新規治療薬としての可能性があると考えられる。

E. 結論

FKN/CX3CR1 相互作用阻害剤は、RA に対する新規治療薬として有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

* Junko Nishio, Mihoko Suzuki, Toshihiro Nanki, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka
Development of TCRB CDR3 length repertoire of human T lymphocytes Int Immunol (inpress)

2.学会発表

* 南木敏宏、浦崎康代、今井俊夫、村本賢三、窪田哲朗、宮坂信之。抗 fractalkine (FKN CX3CL1)抗体による関節炎抑制効果の検討。第 33 回日本免疫学会総会。2003

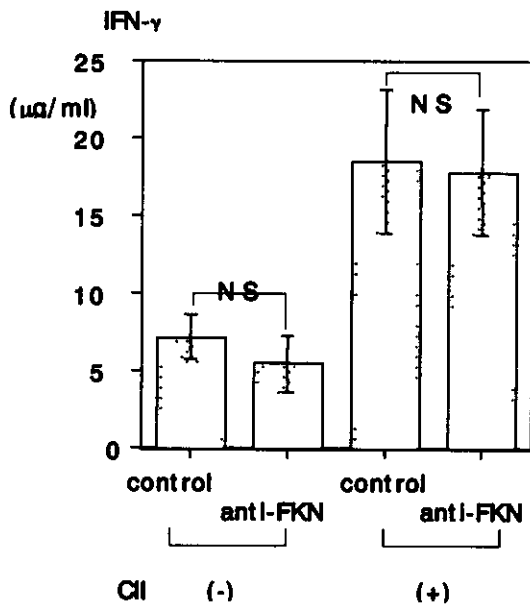
* Toshihiro Nanki, Yasuyo Urasaki, Toshio Imai, Kenzo Muramoto, Tetsuo Kubota, Nobuyuki Miyasaka Inhibition of Fractalkine Ameliorates Mouse Collagen-Induced Arthritis 第 67 回アメリカリウマチ学会。2003

* 浦崎康代、南木敏宏、今井俊夫、村本賢三、窪田哲朗、宮坂信之。抗 fractalkine (CX3CL1)抗体による関節炎抑制効果の検討。第 47 回リウマチ学会総会。2003

H.知的財産権の出願・登録状況

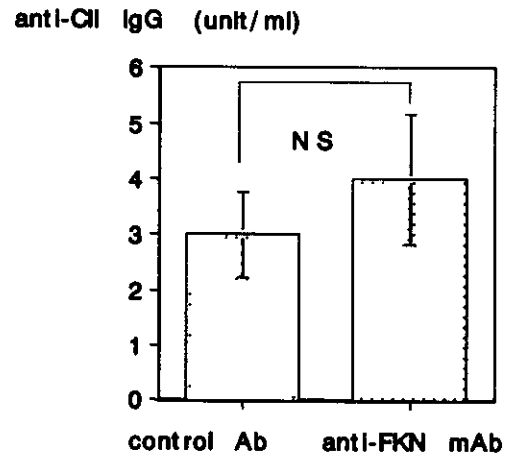
特になし。

図 1 抗 FKN 抗体投与による脾臓 T 細胞からの IFN- γ 産生への影響



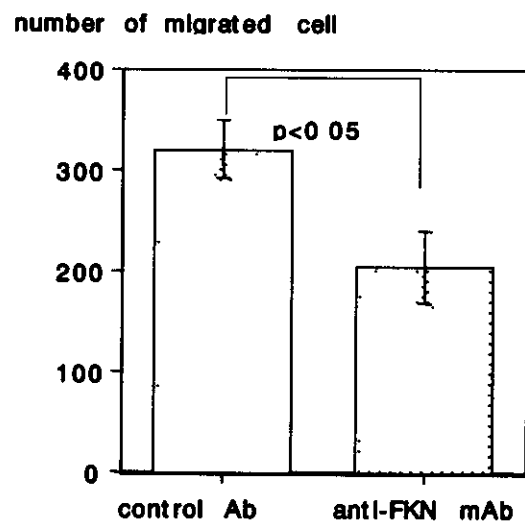
脾臓 T 細胞を抗原提示細胞と共培養し、IFN- γ 産生を ELISA で解析。コントロール抗体投与マウスと抗 FKN 抗体投与マウスで比較した。またコラーゲン刺激 72 時間後の IFN- γ 産生も解析。

図 2 血清中の抗コラーゲン抗体産生に対する抗 FKN 抗体の影響



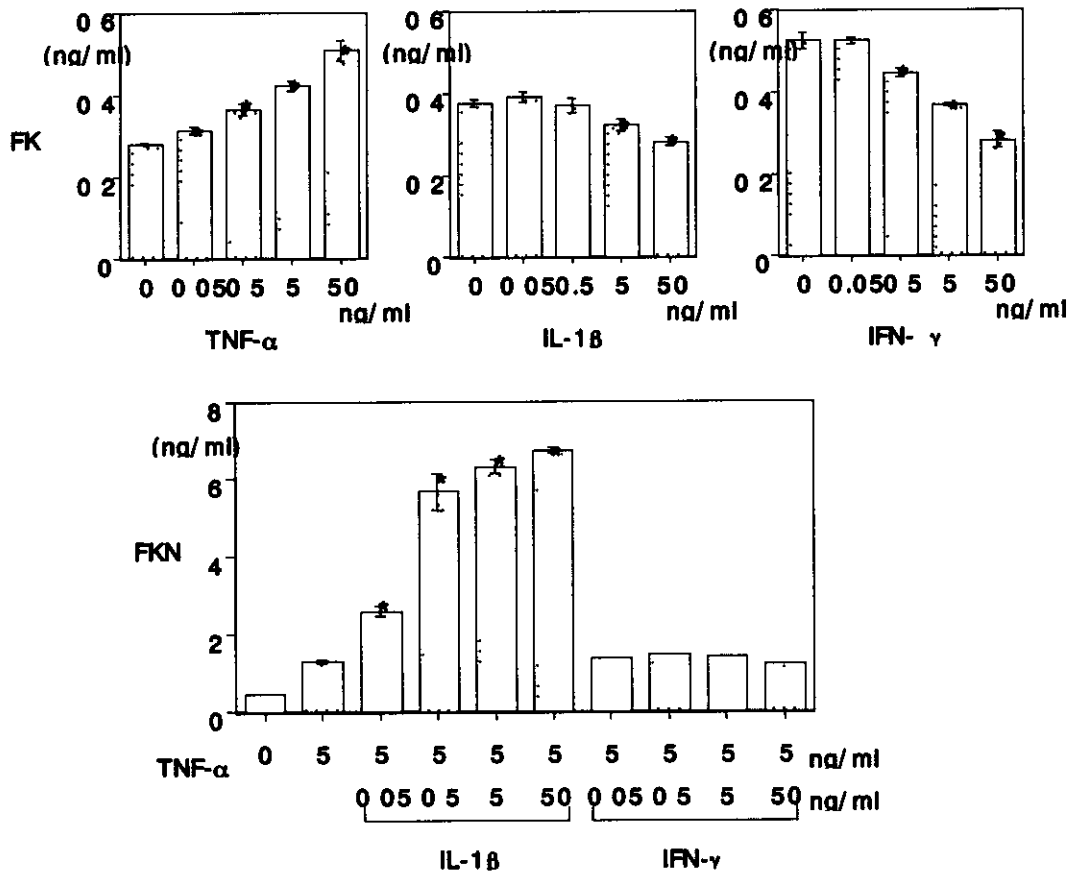
コラーゲン関節炎マウスに、抗 FKN 抗体、またはコントロール抗体を投与し、day 15 に血清中の抗コラーゲン抗体価を ELISA にて測定。

図 3 抗 FKN 抗体投与による脾臓 Mac-1 陽性細胞の滑膜への浸潤抑制



脾臓 Mac-1 陽性細胞を CMTMR で蛍光標識し関節炎マウスにトランスファーした。レシピエントマウスにはトランスファー 24 時間前と 2 時間前に、抗 FKN 抗体またはコントロール抗体を投与した。24 時間後に足関節の切片を蛍光顕微鏡を用いて CMTMR 陽性細胞をカウントした

図4 線維芽細胞様滑膜細胞からのFKN産生



TNF- α , IL-1 β , IFN- γ 刺激による、線維芽細胞様滑膜細胞からのFKN産生をELISAで解析。

IV. 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（平成15年度）

主任研究者氏名 竹内 勤

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の		書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
		編集者名						
亀田秀人 竹内 勤	膠原病肺病変に対するシクロステロイド	工藤翔二 十屋了 介 金沢史 大田健		Annual Review 呼吸器	中外医学社	東京	2004	234-239
竹内 勤	全身性エリテマトーデスの免疫異常	狩野正吾 中川武 正 竹内 勤 他		アレルギー リウマチ膠原病の最新医療	先端医療技術研究所	東京	2004	248-253
竹内 勤	生物学的製剤による治療	平澤泰介 井上一 岳岳邦夫 他		先端医療シリーズ22 整形外科の最新医療	先端医療技術研究所	東京	2004	130-136
竹内 勤	リウマチ専門医試験 例題と解説	日本リウマチ学会		リウマチ専門医試験	メジカルビュー社	東京	2003	
竹内 勤	リウマチ入門	日本リウマチ学会		リウマチ入門	日本リウマチ学会	東京	2003	
竹内 勤	全身性エリテマトーデス	泉 孝英 他		ガイドライン 外来診療2004	日経メディカル開発	東京	2004	381-383
亀田秀人 竹内 勤	全身性エリテマトーデス 多発性筋炎/皮膚筋炎	名和田 新		ステロイド骨粗しょう症の治療マニュアル	ライフサイエンス出版	東京	2004	52-58

分担研究者氏名 小林茂人

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の		書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
		編集者名						
小林茂人	リウマチ専門医試験	日本リウマチ学会		リウマチ専門医試験	メジカルビュー社	東京	2003	
小林茂人	骨粗鬆症と代謝性骨疾患	日本リウマチ学会		リウマチ入門	日本リウマチ学会	東京	2003	520-7
小林茂人	強直性脊椎炎	ト条文武 齋藤 康		ダイナミック ステイション	西村書店	新潟市	2003	19-126-127
小林茂人	乾癬性関節炎	ト条文武 齋藤 康		ダイナミック ステイション	西村書店	新潟市	2003	19-128
小林茂人	Reiter 症候群(反応性関節炎)	ト条文武 齋藤 康		ダイナミック ステイション	西村書店	新潟市	2003	19-129-130
秋元智博 小林茂人 橋本博史	再発性多発軟骨炎	北村論 福地義之助 石井芳樹		伊子のあゆみ	医歯薬出版	東京	2003	693-696
小林茂人 浅川順一 田中 尤彦	強直性脊椎炎 反応性関節炎および分類不能脊椎関節症	福井 欠久 黒川 清		ハリノ内科学 15版	メジカルサイエンスインターナショナル	東京	2003	1995-2001
小林茂人	好酸球性筋膜炎	山口 徹 北原 尤夫		今日の治療指針	医学書院	東京	2003	553
川野昭長 小林茂人	乾癬性関節炎 結晶誘発性関節炎	黒川 清 松澤佑次		内科学	文九堂	東京	2003	2216

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の		書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
		編集者名						
Kobayashi S, Tamura N, Ikeda M, Haruta K, Zhong BB, Akimoto T, Hashimoto H et al	Poststreptococcal reactive arthritis and tonsillitis induced reactive arthritis	Yamanaka N, Kuki K, Fujihara K, Tamura S, Hotomi M		International congress series 1257 Current topics on tonsillitis and mucosal barriers of upper airways Proceedings of the 5th International Symposium on Tonsillitis and Mucosal Barriers of Upper Airways held in Wakayama between 9-11 April 2003	Elsevier	London	2003	151-154
Kobayashi S, Tamura N, Ikeda M, Haruta K, Tanaka M, Kawano T, Hashimoto H et al	Anterior uveitis and poststreptococcal reactive arthritis	Yamanaka N, Kuki K, Fujihara K, Tamura S, Hotomi M		International congress series 1257 Current topics on tonsillitis and mucosal barriers of upper airways Proceedings of the 5th International Symposium on Tonsillitis and Mucosal Barriers of Upper Airways held in Wakayama between 9-11 April 2003	Elsevier	London	2003	231-234

研究成果の刊行に関する一覧表（平成15年度）

主任研究者氏名 竹内 勤

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
Tsuzaka K Fukuhara I Setoyama Y, Yoshimoto K Suzuki K, Abe I, and Takeuchi I	TCR α mRNA with an alternatively spliced 3' untranslated region detected in systemic lupus erythematosus patients leads to the down-regulation of TCR α and TCR-CD3 complex	J Immunol	171	2496-2503,	2003
Takeuchi T, Tsuzaka K, and Abe I	Altered expression of the T cell receptor-CD3 complex in systemic lupus erythematosus	Int Rev Immunol	in press		
亀田秀人 竹内 勤	関節リウマチに伴う骨粗鬆症	日本臨床	61	292-298	2003 2
天野宏一、竹内 勤	関節リウマチの薬物治療	レビューノート	5	81-86	2003 5
竹内 勤	関節リウマチ治療薬の使い方—改良された標準治療と今後の展望—	Medical Practice	20	667-671	2003 4
竹内 勤	ここが知りたい治りにくい病気—関節リウマチ	暮しと健康	5	66-69	2003 5
竹内 勤 James F Fries 川野 淳、山中 寿	問題の核心のさらに核心にあるもの Evolution of COX isozymes and their inhibitors (Round table discussion in Phuket)	Excerpta Medica (エクトピア)		6-10	2003 3
天野宏一、竹内 勤	リウマチの新しい治療戦略 キメラ抗TNF- α 抗体, Infliximab	Meibio	20	16-22	2003 3
竹内 勤	関節リウマチ治療 DMARDs治療の今後の展望	参天製薬株式会社 7月発行15周年記念		7-8	2003 3
竹内 勤	RAにおける薬物療法② DMARDs処方現状	Arothro-care	3	6-8	2003
竹内 勤	厚生労働省構成科学研究公開シンポジウム「リウマチ性疾患新規治療の確立に向けて」	Medical Tribune	36	16-17	2003 2
竹内 勤	関節リウマチ 慢性疾患—かかりつけ医のための診断とフォローアップ	日医雑誌	129	18-19	2003 4
竹内 勤	TNF阻害剤による治療	関節外科	22	60-66	2003
竹内 勤	抗TNF製剤による治療	Pharma Medica	21	49-54	2003
亀田秀人 天野宏一 竹内 勤	関節リウマチに対する抗TNF- α 療法	整形 災害外科	46	985-990	2003