

20030685

厚生労働科学研究研究費補助金

免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

関節リウマチの発症及び重篤な合併症の
早期診断に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 江口勝美

平成16(2004)年3月

— 目 次 —

I. 総括研究報告書

関節リウマチの発症及び重篤な合併症の早期診断に関する研究 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科病態解析・制御学講座 (第一内科) 教授 江口勝美	1
--	---

II. 分担研究報告書

1. 関節リウマチの自己抗体による早期診断に関する研究 — 診断未確定関節炎における抗 CCP 抗体の意義 — 京都大学大学院医学研究科臨床免疫学 教授 三森経世	1 3
2. 関節リウマチの MRI による早期診断, 活動性および予後判定に関する研究 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線生命科学講座 助教授 上谷雅孝	1 7
3. RA の早期診断と臨床経過, 特に関節破壊の進行予測 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科病態解析・制御学講座 (第一内科) 教授 江口勝美	2 1
4. NKT 細胞による関節リウマチの早期診断・制御に関する研究 筑波大学臨床医学系内科 教授 住田孝之	3 1
5. RA 患者滑膜細胞の遺伝子発現プロファイル解析 : Notch の活性化とその意義に関する研究 名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学 教授 岡本 尚	3 7
6. ゲノム解析に基づく, 関節リウマチ病因・病態解析 東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野 助教授 土屋尚之	4 1
7. 疾患遺伝子 <i>DR3</i> からみた早期診断と臨床経過の予知 神戸大学医学部保健学科膠原病学講座・大学院医学系研究科病態解析学・ 附属病院免疫内科 教授 塩澤俊一	4 7
8. RA に続発するアミロイドーシスの遺伝要因の解析 新潟大学医学部保健学科 教授 中野正明	5 1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	5 5

I. 総括研究報告

主任研究者：江口勝美

関節リウマチの発症及び重篤な合併症の早期診断に関する研究

主任研究者：江口勝美

(長崎大学大学院医歯薬学総合研究科病態解析・制御学講座 (第一内科) 教授)

研究要旨

RA の発症及び重篤な合併症の早期診断や臨床経過の予測について、その管理指針を作成することを目標にして研究を進めている。

RA の新たな自己抗体として抗 CCP 抗体が注目されているが、初診時に抗 CCP 抗体が陽性であれば、初診時に RA 分類基準を満たさない関節炎症例を追跡調査することにより、後に RA と診断される可能性が高く、従来の RF より RA の診断予測に優れていることが明らかになった。

両手同時に撮像した MRI 所見について、後に RA と確定診断された症例 (早期 RA) と RA 以外の疾患と診断された症例 (非 RA) を比較した。骨髄浮腫と骨浸蝕は早期 RA において感度は 50~60% であり、特異度は 90% であった。

初診時の検査所見と MRI 所見から、種々の項目を拾い、SAS システム解析を実施し、早期 RA の寄与因子について検討した。早期 RA として Odds 比が高い項目は、①MRI 所見における対称性滑膜炎の存在 (Odds 比 5.2)、②MRI 所見における骨髄浮腫 and/or 骨浸蝕像の存在 (Odds 比 9.6)、③抗 CCP 抗体陽性 and/or RF 陽性 (Odds 比 7.7) であった。これら 3 項目中 2 項目以上陽性である場合を早期 RA とする診断基準案を作成した。この診断基準案は感度 86.8%、特異度 87.5% と優れており、RA の早期診断に有用であることを明らかにした。

骨髄浮腫はすべて滑膜炎のある関節にみられ、骨髄浮腫のない関節と比較して滑膜炎の活動性が高かった。骨髄浮腫は CRP、MMP-3、RF、抗 CCP 抗体、抗フィラグリン抗体、血清 IL-6 と HLA-DRB1*0405 保有者と相関があった。骨髄浮腫とこれらの検査所見は臨床経過、特に関節破壊の進行予測に有用であることが示唆された。

末梢血 NKT 細胞は RA をはじめとする自己免疫疾患をネガティブに制御する調節性 T 細胞として知られているが、早期 RA 症例においても有意に低下していたが、疾患特異的ではなかった。一方、NKT 細胞の減少に関連のある可溶性 CD1d 分子は mRNA 及び蛋白レベルで RA 特異的に減少していた。以上より、NKT 細胞、可溶性 CD1d 分子は RA の早期診断に関して補助的マーカーになりうると考えられ

た。

RA 患者の滑膜細胞の遺伝子発現プロファイル解析を実施した結果、RA 滑膜細胞は、発生期における運命決定因子である Notch1、Notch4 とそのリガンド分子 Jagged2 を TNF の刺激により特異的に発現した。この結果は、RA 滑膜細胞が発生期の増殖性に富んだ形質を改め再獲得していることを示し、RA に特徴的な関節破壊を伴う滑膜組織の増殖と自己永続性の炎症応答を支持するものであった。

RA 滑膜組織内の血管内皮細胞は転写制御因子 Id1、Id3 を強発現していた。また、Id1、Id3 を強制発現させることにより、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の血管新生を誘導した。この血管新生は Id1、Id3 の RNAi によってほぼ完全に抑制された。この理由から、Id が VEGF 誘導性血管内皮細胞の活性化、血管新生に必須の因子であることが示された。

RA 疾患感受性遺伝子について SNP 解析を施行した。LILRB1 多型が HLA-DRB1* shared epitope 陰性 RA と関連がみられた。LILRB1 に隣接する LILRB4 プロモーター領域の SNP に RA との関連を見出した。また BLYS とその抑制型受容体である TACI 多型との組み合わせが RA に関連することを見出した。

第 1 染色体に位置する RA の疾患遺伝子としてアポトーシスシグナル受容体 DR3 の遺伝子変異を DNA レベルで確定した。変異 DR3 分子は正常型 DR3 によるアポトーシス誘導をドミナントネガティブに抑制した。変異は多発 RA 家系の 10%に見い出され、RA 家系に遺伝的に集積していた。DR3 遺伝子変異陽性症例は対照症例と比較して、関節置換術を受けた頻度が高いことから、DR3 遺伝子変異が RA の疾患の発症でなく進行に関わる疾患遺伝子であることを証明した。さらに、DR3 遺伝子が近傍に重複して存在し、遺伝子重複の頻度が RA 患者で健常者よりも高頻度であることを見出した。

RA の重篤な合併症である反応性 AA アミロイドーシスの発症において、遺伝要因として ApoE4 が重要と考えられた。ApoE4 はより短期間でのアミロイドーシス合併に関係し、合併後の腎障害の重症化にも関連する傾向が示唆された。つまり、ApoE4 陽性例は陰性例に比べて、RA 発症以後の生命予後が有意に不良であった。

分担研究者氏名・所属機関・職名

- ・三森経世 (京都大学大学院医学研究科臨床免疫学 教授)
- ・上谷雅孝 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線生命科学講座 助教授)
- ・住田孝之 (筑波大学臨床医学系内科 教授)
- ・岡本 尚 (名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学 教授)
- ・土屋尚之 (東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野 助教授)
- ・塩澤俊一 (神戸大学医学部保健学科膠原病学講座・大学院医学系研究科病態解析学・附属病院免疫内科 教授)
- ・中野正明 (新潟大学医学部保健学科 教授)

A. 研究目的

アメリカリウマチ学会 (ACR) は「RA 治療のガイドライン」を 2002 年に改訂した。これでは RA 管理の第一歩は早期に診断を確定し、疾患の活動性と機能障害を把握し、臨床経過を予測することであるとしている。関節炎で発症した RA は 2 年以内に約 70%が関節破

壊に移行するが、残り約 30%は移行しない。早期 RA において、抗リウマチ薬や抗サイトカイン療法の有用性は明らかにされているが、これらの薬剤の問題点はしばしば重篤な有害事象を来したり、薬価が高いことである。RA の早期診断と臨床経過、特に関節の軟骨・骨破壊の予測は薬剤の cost vs benefit、risk vs benefit、テーラーメイド治療を考える上で重要な課題である。

RA は腎臓、肺臓などの臓器障害や二次性アミロイドーシスを合併し、これらの合併症は RA の生命予後を大きく左右する。これらの合併症を早期に予測あるいは診断・治療し、進行を阻止することも RA 患者の QOL と予後を改善するのに重要である。

私たちは、RA の発症及び重篤な合併症の早期診断や臨床経過の予測について指針を作成することを目的として、以下の項目について研究を行った。

I) 臨床検査、MRI 画像、遺伝子解析、調節性 T 細胞からみた RA の早期診断と臨床経過の予測

I-A) RA の自己抗体による早期診断に関する研究—診断未確定関節炎における抗 CCP 抗体の意義—

I-B) RA の MRI による早期診断、活動性及び予後判定に関する研究

I-C) RA の早期診断と臨床経過、特に関節破壊の進行予測

I-D) NKT 細胞による RA の早期診断・制御に関する研究

II) RA 滑膜組織の性質・特性からみた早期診断と臨床経過の予測

II-A) RA 患者滑膜細胞の遺伝子発現プロフィール解析：Notch の活性化とその意義に関する研究

II-B) RA 滑膜組織内の遺伝子発現解析

III) RA 疾患感受性遺伝子解析

III-A) ゲノム解析に基づく RA 病因・病態解析

III-B) RA の疾患遺伝子 DR3 からみた早期診断と臨床経過の予知

IV) RA の重篤な合併症の早期診断と臨床経過の予測

IV-A) RA に続発するアミロイドーシスの遺伝要因の解析

B. 研究方法

I) 臨床検査、MRI 画像、遺伝子解析、調節性 T 細胞からみた RA の早期診断と臨床経過の予測

I-A) RA の自己抗体による早期診断に関する研究—診断未確定関節炎における抗 CCP 抗体の意義—

対象は初診時診断未確定関節炎症例 100 名で、初診時の抗 CCP 抗体と RF を測定し、その後の転帰を追跡した。

I-B) RA の MRI による早期診断、活動性及び予後判定に関する研究

対象は初診時診断未確定関節炎症例 88 名 (男 19 名、女 69 名) である、このうち最終診断が確定できなかった 11 名と薬剤アレルギーの既往のため造影剤を使用できなかった 1 名を除外して検討した。MRI は両手を同時に撮影し、両手指関節の 30 部位について、滑膜炎と骨変化 (骨髄浮腫と骨浸蝕像) の有無、dynamic study における最大増強速度 (E-rate) を評価した。症例は 6 ヶ月間隔で 2 年間 MRI を撮影し、経過を追跡した。

I-C) RA の早期診断と臨床経過、特に関節破壊の進行予測

1) 対象は診断確定した RA 64 名、RA 以外のリウマチ・膠原病疾患患者 149 名。

2) 対象は I-B) と同じである。初診時に MRI の撮影と同時に、臨床所見、臨床検査、HLA-DRB1* genotyping を検索した。遺伝子検査以外の検査は 6 ヶ月間隔で 2 年間追跡した。

I-D) NKT 細胞による RA の早期診断・制御に関する研究

1) 早期 RA 25 名、進行 RA 28 名、健康人 24 名を対象に末梢血 NKT 細胞、double negative (DN) 及び CD4⁺TCRAV24⁺BV11⁺NKT 細胞数を 5 カラーのフローサイトメトリーを用い

て定量した。

2) 可溶性 CD1d 蛋白 (sCD1d) をサンドウィッチ ELISA 法にて測定した。

3) マウスのコラーゲンタイプ II (CII) 誘導関節炎を誘導する系に、免疫時に α -GalCer を投与し、関節炎への影響を検討した。

II) RA 滑膜組織の性質・特性からみた早期診断と臨床経過の予測

II-A) RA 患者滑膜細胞の遺伝子発現プロフィール解析：Notch の活性化とその意義に関する研究

RA (RSF) 及び正常培養滑膜細胞 (NSF) に TNF 刺激を加え、mRNA を採取した。cDNA array を用いた遺伝子発現プロフィール解析を実施し、real-time RT-PCR 法を用いて確認した。遺伝子発現に差が見られたものについては、ウェスタンブロット、細胞増殖試験と免疫染色を行い、確認した。

II-B) RA 滑膜組織内の遺伝子発現解析

培養ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) に転写制御因子 Id 遺伝子を過剰発現させた際の血管新生活性を検討した。また、Id1 及び Id3 に対する shRNA を HUVEC に導入して、血管新生活性を検討した。

III) RA 疾患感受性遺伝子解析

III-A) ゲノム解析に基づく RA 病因・病態解析

各遺伝子の多型スクリーニングを行い、見いだされた多型部位につき、RA、対照群の関連研究を行った。LILRB1、B4 については連鎖不平衡の検討により、RA との関連の一義性を検討した。

III-B) RA の疾患遺伝子 DR3 からみた早期診断と臨床経過の予知

DR3 遺伝子をプラスミドに組み換えて発現させて、抗体による免疫沈降法、ウェスタンブロットを用いて細胞内相互作用を検討した。

IV) RA の重篤な合併症の早期診断と臨床経過の予測

IV-A) RA に続発するアミロイドーシス

の遺伝要因の解析

対象はアミロイドーシス合併 RA 例 68 名、非合併 RA 例 144 名である。患者血清を等電点電気泳動法にて分画後、アルカリホスファターゼ標識した抗 ApoE を用いてイムノブロッティングし、ApoE 表現型を検出した。

(倫理面への配慮)

すべての研究は、各施設の遺伝子倫理委員会の審査を受け、承認された研究計画に則って行われた。検体は匿名化され、個人情報と切り離された形で研究に用いられた。

C. 研究結果

I) 臨床検査、MRI 画像、遺伝子解析、調節性 T 細胞からみた RA の早期診断と臨床経過の予測

I-A) RA の自己抗体による早期診断に関する研究—診断未確定関節炎における抗 CCP 抗体の意義—

1) 初診時の抗 CCP 抗体陽性 35 例中 26 例 (74%) が後に RA と診断されたが、同抗体陰性 65 例の中から後に RA と診断されたのは 11 例 (17%) にすぎなかった。一方、RF 陽性 48 例中後に RA と診断されたのは 24 例 (50%) にすぎず、RF 陰性 52 例中 13 例 (25%) が後に RA と診断されていた。

2) 初診時抗 CCP 抗体と RF 両方陽性であった症例は後に 80% が RA と診断されたが、RF 陰性でも抗 CCP 抗体陽性ならば 67% が RA であった。

3) 最終的に RA と診断された 33 症例における抗 CCP 抗体は RF と弱い相関がみられたが、MMP-3、CRP、赤沈値とは相関しなかった。

4) 最終転帰において、抗 CCP 抗体は、RA における感度 70%、特異度 86%、診断確度 80% と、RF 及び MMP-3 に比して優れていた。

I-B) RA の MRI による早期診断、活動性及び予後判定に関する研究

滑膜炎は早期 RA 群で 94.7%、非 RA

群で 52.6%、骨髄浮腫は早期 RA 群で 59.6%、非 RA 群 10.5%、骨浸蝕像は早期 RA 群で 50.1%、非 RA 群 10.5%に見られた。骨髄浮腫は滑膜炎のある関節にのみ認められ、滑膜炎のない関節では認められなかった。また、骨髄浮腫のある滑膜炎において有意に E-rate が上昇していた。

I-C) RA の早期診断と臨床経過、特に関節破壊の進行予測

1) 診断が確定した RA において抗 CCP 抗体は 89.1%に検出された。RA 以外のリウマチ・膠原病疾患では 8.1%にしか検出されなかった。すなわち、抗 CCP 抗体は RA において、感度及び特異度で IgM-RF や IgG-RF に比較して優れていた。

2) 初診時診断未確定の関節炎症例に基づいて RA の早期診断案作成

早期 RA と非 RA 群を鑑別する項目を SAS (Speeding Attitude Scale) システムを用いて抽出した。MRI 画像所見の個々のパラメーターの重要性和 ACR 1987 年改訂分類基準より、①MRI 所見の対称性手指滑膜炎、②MRI 所見の骨髄浮腫 and/or 骨浸蝕像、③抗 CCP 抗体陽性 and/or IgM-RF 陽性を SAS システムで解析すると、①、②、③の項目すべてにおいて RA と非 RA 群間で有意差が見られた。Odds 比は①が 5.2、②が 9.6、③が 7.7 であった。この理由から①、②、③の 3 項目中 2 項目以上を RA と診断すると、感度 86.8%、特異度 87.5%であった。この RA 早期診断基準案は感度及び特異度に優れ、今後汎用されることが期待される。

3) 臨床経過、特に関節の軟骨・骨破壊の予測

早期 RA 症例の初診時検査では、骨髄浮腫は RF、抗 CCP 抗体、抗フィラグリン抗体、血清 IL-6 値、HLA-DRB1*0405 保有者と相関があった。

I-D) NKT 細胞による RA の早期診断・制御に関する研究

1) NKT 細胞、DN NKT 細胞、CD4+NKT 細胞のいずれも早期 RA 及び進行 RA において健常人と比較して有意に減少していた。

2) RA において sCD1d mRNA 及び sCD1d 蛋白量は健常人に比して有意に低下していた。

3) α GalCer をタイプ II コラーゲン (C II) と同時に投与した場合、関節炎の発症は抑制された。NKT 及び CD1 ノックアウトマウスにおいて、C II コラーゲン誘導関節炎 (CIA) は抑制されていた。

II) RA 滑膜組織の性質・特性からみた早期診断と臨床経過の予測

II-A) RA 患者滑膜細胞の遺伝子発現プロファイル解析：Notch の活性化とその意義に関する研究

1) TNF 刺激 6 時間後の時点で、RA では Notch1、Notch4 とともに、そのリガンドである Jagged2 の発現が亢進していた。関節破壊に関与すると考えられる MMP-11 や MMP-17 が TNF 刺激 6 時間後に RA 滑膜細胞でのみ亢進し、細胞周期因子である Cyclin B1、Cdk1 及び Wee1 の発現も 24 時間後に亢進していた。

2) RA 滑膜細胞では TNF 刺激後に Notch1 の細胞質領域 (NICD) が核内に移行していた。RA 患者滑膜組織でも Notch1、Notch4、Jagged2 の蛋白レベルでの発現が増加していた。

3) 胎生 15 日 (E15) マウスの関節の滑膜組織と軟骨形成予定領域の両者に Notch1、Notch4、Jagged2 の発現がみられた。関節が完成している生後 1 日目の関節ではこれらの蛋白の発現は滑膜組織に局限して認められ、その量も減少していた。

II-B) RA 滑膜組織内の遺伝子発現解析

遺伝子導入により Id3 を過剰に発現させた HUVEC では、走化性、MMP2 や MMP9 産生、管腔形成のいずれもが亢進していた。一方、Id1 及び Id3 に対する shRNA 導入により上記のいずれ

もが、ほぼ完全に抑制された。

Ⅲ) RA 疾患感受性遺伝子解析

Ⅲ-A) ゲノム解析に基づく RA 病因・病態解析

LILRB4 に 15 個所の多型・変異を検出し、うちプロモーター領域の SNP に、RA との有意な関連を見いだした。TNFRSF13B に 6 個所の多型・変異を見い出した。TNFRSF13B のプロモーター領域と TNFRSF13B の 3'非翻訳領域の SNP の組み合わせに、RA との有意な負の関連を検出した。

Ⅲ-B) RA の疾患遺伝子 DR3 からみた早期診断と臨床経過の予知

DR3 遺伝子上に SNP4 個所及び核酸欠損 1 個所の変異を見出した。この変異型 DR3 分子が正常 DR3 分子とヘテロ三量体を形成し、変異 DR3 分子は正常型 DR3 によるアポトーシス誘導をドミナントネガティブに抑制した。変異は RA 多発家系の 10%に見出され、RA 家系に遺伝的に集積していた。DR3 遺伝子変異陽性 RA 症例は、関節置換術を受けた頻度及び 2 回以上関節置換術を受けた頻度が高かった。さらに、FISH 及び fiber FISH 法を用いて、DR3 遺伝子が近傍に重複して存在し、遺伝子重複の頻度が RA 患者で健常者よりもより高頻度であることを見出した。

Ⅳ) RA の重篤な合併症の早期診断と臨床経過の予測

Ⅳ-A) RA に続発するアミロイドーシスの遺伝要因の解析

- 1) ApoE4 陽性例の割合はアミロイドーシス合併群 (26.5%) で、非合併群 (14.6%) に比較して有意に高頻度であった。
- 2) ApoE4 陽性群は陰性群に比較して早期発症から短期間でアミロイドーシスを合併する傾向を認めた。
- 3) 透析導入例の割合は ApoE4 陽性群が陰性群と比較して多い傾向であった。
- 4) RA 発症後の累積生存率は ApoE4 陽性群が陰性群と比較して、予後不良の

結果が得られた。

D. 考 察

I) 臨床検査、MRI 画像、遺伝子解析、調節性 T 細胞からみた RA の早期診断と臨床経過の予測

I-A) RA の自己抗体による早期診断に関する研究—診断未確定関節炎における抗 CCP 抗体の意義—

抗 CCP 抗体は RA における診断確度が 87% (感度 82%、特異度 85%) と極めて高い診断的意義を持つことを確認した。その一方で、RF 陰性 RA においても抗 CCP 抗体が 67%に検出された。

初診時に RA 分類基準を満たさない関節炎/関節痛症例の追跡調査により、初診時に抗 CCP 抗体が陽性であれば、後に RA と診断される可能性が高い。この事実は抗 CCP 抗体が RA の早期診断に極めて有用であり、RA の診断基準を満たしていなくても抗リウマチ薬による早期治療を開始する指針となりうる可能性を示唆するものである。

I-B) RA の MRI による早期診断、活動性及び予後判定に関する研究

私たちは両手関節の MRI を施行し、滑膜炎と骨変化の関係を検討した。滑膜炎は非 RA の約半数に見られる所見で、特異性が低い。これに対して、骨髄浮腫及び骨浸蝕は RA の約半数に認められるが、非 RA における頻度は約 10%であり、特異性が高い点が注目される。また、骨髄浮腫は滑膜炎のある関節にのみ認められ、dynamic study で評価した滑膜炎の活動性との相関が高いことがわかった。骨髄浮腫は骨浸蝕にいたる前段階であることが報告されており、関節破壊の予測においても有用性が高いと考えられた。

I-C) RA の早期診断と臨床経過、特に関節破壊の進行予測

抗 CCP 抗体は RA において、感度は 89.1%で、特異度は 91.9%であり、IgG-RF や IgM-RF の感度と特異度と比

較して極めて高い診断的意義を持っていた。初診時診断未確定の関節炎症例を追跡調査し、早期 RA 症例と非 RA 症例で、初診時の臨床検査値と MRI 画像所見を解析した。早期 RA においても抗 CCP 抗体は感度 68%、特異度 94% であり、初診時に抗 CCP 抗体が陽性であれば後に RA と診断される可能性が高いことが明らかになった。両手 MRI 撮像所見では、骨髄浮腫と骨浸蝕像は早期 RA でそれぞれ感度は 57.9%、52.6% であり、特異度は両方とも 89.5% と高かった。

初診時検査所見について SAS システムを用いて解析を行うと、早期 RA の Odds 比は①対称性滑膜炎、②骨髄浮腫 and/or 骨浸蝕像、③抗 CCP 抗体 and/or RF 陽性、が高かった。これら 3 項目中 2 項目以上が存在すると早期 RA とする診断基準案は、感度 86.8%、特異度 87.5% とともに高く、RA を早期に診断するのに有用であることが明らかになった。

MRI 画像所見の骨髄浮腫は血清学的検査 (MMP-3、CRP 値)、自己抗体 (RF、抗 CCP 抗体、抗フィラグリン抗体)、HLA-DRB1*0405 保有者と相関関係がみられた。これらの検査所見は関節の軟骨・骨破壊の予測因子となることが示唆された。

I -D) NKT 細胞による RA の早期診断・制御に関する研究

NKT 細胞は自己免疫病をネガティブに調節する T 細胞で、RA において減少していることを明らかにしてきた。今回、T 細胞 NKT 細胞は進行 RA ばかりでなく、早期 RA の補助的な診断マーカーとなりうる可能性が判明した。可溶性 CD1d 分子は RA で特異的に蛋白レベルでも減少していることから、診断に有用であることが示された。CIA モデルマウスにおいては、NKT 細胞は関節炎を制御する regulatory NKT 細胞ばかりでなく、関節炎を誘導する

effector NKT 細胞としても機能していることが明らかになった。

II) RA 滑膜組織の性質・特性からみた早期診断と臨床経過の予測

II -A) RA 患者滑膜細胞の遺伝子発現プロファイル解析：Notch の活性化とその意義に関する研究

RA の滑膜細胞では、Notch シグナルが惹起されるため、TNF/IL-1 シグナルに加えて、より広い範囲の NF-κB トランスクリプトームを活性化している可能性がある。さらに、RA ではすでに分化していたはずの滑膜細胞が分化の逆行現象を無秩序に起こし、そのために細胞増殖と関節破壊があたかも発生の状況を再現するかのよう積極的に起こっているように見える。

II -B) RA 滑膜組織内の遺伝子発現解析

Id は HUVEC における VEGF 誘導性血管新生において必須の因子であり、RA 滑膜組織の血管新生に深く関わっていることが示唆された。

III) RA 疾患感受性遺伝子解析

III -A) ゲノム解析に基づく RA 病因・病態解析

LILR 遺伝子ファミリーは、極めて多型に富み、免疫疾患の感受性に深い関連を有する可能性が示唆された。また、BLyS と TACI はリガンド・受容体の関係にあり、両方の制御領域多型の組み合わせが、遺伝子間相互作用を介して RA 感受性に関連するものと考えられた。

III -B) RA の疾患遺伝子 DR3 からみた早期診断と臨床経過の予知

FISH 及び fiber FISH 法を用いて、DR3 遺伝子が元の遺伝子の近傍に重複して存在し、遺伝子重複の頻度が RA 患者で健常者より高頻度であることを見出した。この知見は、DR3 遺伝子変異の疾患の発症と進行に及ぼす影響を知る上で重要であると考えられた。

IV) RA の重篤な合併症の早期診断と臨床経過の予測

IV-A) RA に続発するアミロイドーシスの遺伝要因の解析

ApoE4 の存在はアミロイドーシスを合併しやすく、特に RA 発症後早期にアミロイドーシスを合併しやすく、腎障害が重症化しやすく、RA 発症以後の累積生存率を低下させた。

E. 結論

RA の発症及び重篤な合併症の早期診断や臨床経過の予測について、指針を作成することを目標に研究を進めた。

初診時に RA 分類基準を満たさない関節炎でも抗 CCP 抗体が陽性であれば、後に RA と診断される可能性は高く、その診断率は RF よりも優れていた。

初診時診断未確定関節炎症例に両手同時に MRI を撮像すると、早期 RA において骨髄浮腫と骨浸蝕は感度は 50～60%であるが、特異度は 90%と高かった。初診時検査項目について SAS システム解析を行うと、RA の Odds 比が高い項目は①MRI 所見における対称性滑膜炎の存在、②MRI 所見における骨髄浮腫 and/or 骨浸蝕の存在、③抗 CCP 抗体 and/or RF 陽性、であった。この 3 項目中 2 項目以上が陽性である場合、早期 RA とする診断基準案を作成した。この診断基準案は感度 86.8%、特異度 87.5%と優れており、RA の早期診断に有用であることが明らかになった。

NKT 細胞数の測定は早期 RA、進行 RA において診断に有用であり、sCD1d は RA 特異的な診断マーカーとなりうる可能性が考えられた。

RA 滑膜細胞の遺伝子発現プロファイル解析を実施した結果、発症期における細胞運命決定因子である Notch1、Notch4 とそのリガンド分子 Jagged2 の発現が TNF 刺激によって特異的に起こった。この結果は、RA 滑膜細胞が発症期の増殖性に富んだ形質を改めて再獲得していることを示し、RA に特徴的な関節破壊を伴う滑膜組織の増殖と自己永続性の炎症応答を説明した。

RA 滑膜組織の血管内皮細胞には、Id が過剰に発現し、VEGF 誘導性血管新生に重要な役割を果たしている。Id 分子の制御が新たな RA 治療に結び付く可能性がある。

RA の疾患感受性遺伝子について検討した。LILRB1、LILRB4 多型がそれぞれ独立に、TNFSF13B、TNFRSF13B 制御領域 SNP は組み合わせで、それぞれ RA 感受性と関連があった。

DR3 分子が関節炎に関わることの証拠として、①マウスのコラーゲン誘導関節炎に対して抗 DR3 抗体治療が有効であることを示した。また、②ヒトにおける DR3 遺伝子変異例の臨床所見を対照と比較すると、発症年齢は差がなかったものの、DR3 変異例には関節置換術が高頻度に見い出されたことから、DR3 遺伝子変異が疾患の発症ではなく、進行に関わる疾患遺伝子であると結論された。

RA におけるアミロイドーシス合併の遺伝的要因として、ApoE4 が重要と考えられた。ApoE4 はより短期間でのアミロイドーシス合併に関係し、合併後の腎障害の重症化にも関連する傾向が示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanaka F, Migita K, Kawabe Y, Aoyagi T, Ida H, Kawakami A, Eguchi K. Interleukin-18 induces serum amyloid A (SAA) protein production from rheumatoid synovial fibroblasts. *Life Sci* 74 (13): 1671-1679, 2004.
- 2) Saeki A, Nakao K, Nagayama Y, Yanagi K, Matsumoto K, Hayashi T, Ishikawa H, Hamasaki K, Ishii N, Eguchi K. Diverse efficacy of vaccination therapy using the alpha-fetoprotein gene against mouse hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Med* 13 (1): 111-116, 2004.

- 3) Ide A, Kawasaki E, Abiru N, Sun F, Kobayashi M, Fukushima T, Takahashi R, Kuwahara H, Kita A, Oshima K, Uotani S, Yamasaki H, Yamaguchi Y, Eguchi K. Association between IL-18 gene promoter polymorphisms and CTLA-4 gene 49A/G polymorphism in Japanese patients with type 1 diabetes. *J Autoimmun* 22 (1): 73-78, 2004.
- 4) Origuchi T, Kawasaki E, Ide A, Kamachi M, Tanaka F, Ida H, Kawakami A, Migita K, Eguchi K. Correlation between interleukin 10 gene promoter region polymorphisms and clinical manifestations in Japanese patients with Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 62 (11): 1117-1118, 2003.
- 5) Nakashima K, Kawakami A, Hida A, Yamasaki S, Nakamura H, Kamachi M, Miyashita T, Tanaka F, Izumi Y, Tamai M, Ida H, Furuyama M, Koji T, Nakamura T, Migita K, Origuchi T, Eguchi K. Protection of mitochondrial perturbation by human T-lymphotropic virus type 1 tax through induction of Bcl-xL expression. *J Lab Clin Med* 142 (5): 341-347, 2003.
- 6) Ida H, Huang M, Hida A, Origuchi T, Kawakami A, Migita K, Tsujihata M, Mimori T, Eguchi K. Characterization of anticytoplasmic antibodies in patients with systemic autoimmune disease. *Mod Rheumatol* 13 (4): 333-338, 2003.
- 7) Ida H, Nakashima T, Kedersha NL, Yamasaki S, Huang M, Izumi Y, Miyashita T, Origuchi T, Kawakami A, Migita K, Bird PI, Anderson P, Eguchi K. Granzyme B leakage-induced cell death: a new type of activation-induced natural killer cell death. *Eur J Immunol* 33 (12): 3284-3292, 2003.
- 8) Miyashita T, Kawakami A, Tamai M, Izumi Y, Mingguo 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 synovial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 312 (2): 397-404, 2003.
- 9) Kita-Furuyama M, Nagayama Y, Pichurin P, McLachlan SM, Rapoport B, Eguchi K. Dendritic cells infected with adenovirus expressing the thyrotrophin receptor induce Graves' hyperthyroidism in BALB/c mice. *Clin Exp Immunol* 131 (2): 234-240, 2003.
- 10) Tanaka F, Migita K, Honda S, Fukuda T, Mine M, Nakamura T, Yamasaki S, Ida H, Kawakami A, Origuchi T, Eguchi K. Clinical outcome and survival of secondary (AA) amyloidosis. *Clin Exp Rheumatol* 21 (3): 343-346, 2003.
- 11) Kusumoto K, Origuchi T, Migita K, Tanaka F, Miyashita T, Hida A, Ida H, Kawakami A, Kawabe Y, Ashizawa K, Eguchi K. A case of amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis complicated with Graves' ophthalmopathy. *Mod Rheumatol* 13: 261-264, 2003.
- 12) Migita K, Eguchi K. FK506: Anti-Inflammatory properties. *Curr Med Chem-Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents* 2 (3): 260-264, 2003.
- 13) Yanagi K, Nagayama Y, Nakao K, Saeki A, Matsumoto K, Ichikawa T, Ishikawa H, Hamasaki K, Ishii N, Eguchi K. Immuno-gene therapy with adenoviruses expressing fms-like tyrosine kinase 3 ligand and CD40 ligand for mouse hepatoma cells in vivo. *Int J Oncol* 22 (2): 345-351, 2003.
- 14) Ishikawa H, Nakao K, Matsumoto K, Ichikawa T, Hamasaki K, Nakata K, Eguchi K. Antiangiogenic gene therapy for hepatocellular carcinoma using angiostatin gene. *Hepatology* 37 (3): 696-704, 2003.
- 15) Shigeno M, Nakao K, Ichikawa T, Suzuki K, Kawakami A, Abiru S, Miyazoe S, Nakagawa Y, Ishikawa H, Hamasaki K, Nakata K, Ishii N, Eguchi K. Interferon- α sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation and NF- κ B inactivation. *Oncogene* 22 (11): 1653-1662, 2003.

- 16) Hamasaki K, Nakao K, Matsumoto K, Ichikawa T, Ishikawa H, Eguchi K. Short interfering RNA-directed inhibition of hepatitis B virus replication. *FEBS Lett* 543 (1-3): 51-54, 2003.
- 17) Ohata K, Hamasaki K, Toriyama K, Matsumoto K, Saeki A, Yanagi K, Abiru S, Nakagawa Y, Shigeno M, Miyazoe S, Ichikawa T, Ishikawa H, Nakao K, Eguchi K. Hepatic steatosis is a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Cancer* 97 (12): 3036-3043, 2003.
- 18) Matsumoto K, Tanigawa K, Nakao H, Okudaira S, Yamada M, Kishikawa H, Eguchi K. A case of pancreatic ascites and pleural effusion: Confirmation of a pancreatic duct contrast leakage using computed tomography after endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Acta Med Nagasaki* 48: 73-76, 2003.
- 19) Nakao K, Hamasaki K, Wakihama N, Maeda M, Ohtsubo N, Sagiike T, Ichikawa T, Ishikawa H, Eguchi K, Ishii N. Analysis of anti-HBs levels in healthcare workers over 10 years following booster vaccination for hepatitis B virus. *Vaccine* 21 (25-26): 3789-3794, 2003.
- 20) Fukuda T, Motomura M, Nakao Y, Shiraishi H, Yoshimura T, Iwanaga K, Tsujihata M, Eguchi K. Reduction of P/Q-type calcium channels in the postmortem cerebellum of paraneoplastic cerebellar degeneration with Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Ann Neurol* 53 (1): 21-28, 2003.
- 21) Motomura M, Nakao Y, Fukudome T, Fukuda T, Shiraishi H, Yoshimura T, Tsujihata M, Eguchi K. What's in the serum of seronegative MG and LEMS? *Neurology* 2 (2): 277-278, 2003.
- 22) Motomura M, Fukuda T, Nakao Y, Shiraishi H, Yoshimura T, Iwanaga K, Tsujihata M, Desaka-Akita H, Eguchi K. Reply. *Ann Neurol* 54 (2): 277-278, 2003.
- 23) Ashizawa K, Eguchi K. Serum anti-myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibodies (MPO-ANCA) in patients with Graves' disease receiving anti-thyroid medication. *Intern Med* 42 (6): 463-464, 2003.
- 24) Ide A, Kawasaki E, Abiru N, Sun F, Fukushima T, Takahashi R, Kuwahara H, Fujita N, Kita A, Oshima K, Uotani S, Yamasaki H, Yamaguchi Y, Kawabata Y, Fujisawa T, Ikegami H, Eguchi K. Stromal-cell derived factor-1 chemokine gene variant is associated with type 1 diabetes age at onset in Japanese population. *Hum Immunol.* 64 (10): 973-978, 2003.
- 25) Fujita N, Sakamaki H, Uotani S, Takahashi R, Kuwahara H, Kita A, Oshima K, Yamasaki H, Yamaguchi Y, Eguchi K. Acute effects of ethanol on feeding behavior and leptin-induced STAT3 phosphorylation in rat hypothalamus. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 (1): 55-59, 2003.
- 26) Kita A, Uotani S, Kuwahara H, Takahashi R, Oshima K, Yamasaki H, Mizuguchi H, Hayakawa T, Nagayama Y, Yamaguchi Y, Eguchi K. Vanadate enhances leptin-induced activation of JAK/STAT pathway in CHO cells. *Biochem Biophys Res Commun* 302 (4): 805-809, 2003.
- 27) Ozaki M, Yamasaki H, Kondo H, Yamasaki S, Fujita N, Yamauchi MD, Abe T, Yamakawa K, Sera Y, Uotani S, Kawasaki E, Takino H, Kijima H, Kondo T, Yamaguchi Y, Eguchi K. Enhanced insulin gene expression by reduced intracellular glutathione level in insulin secreting cells MIN6. *Diabetes Nutr Metab* 16 (2): 81-87, 2003.
- 28) Kuwahara H, Uotani S, Abe T, Degawa-Yamauchi M, Takahashi R, Kita A, Fujita N, Oshima K, Sakamaki H, Yamasaki H, Yamaguchi Y, Eguchi K. Insulin attenuates leptin-induced STAT3 tyrosine-phosphorylation in a hepatoma cell line. *Mol Cell Endocrinol* 205 (1-2): 115-120, 2003.
- 29) Ohata K, Ichikawa T, Nakao K, Shigeno M, Nishimura D, Ishikawa H, Hamasaki

- K, Eguchi K. Interferon alpha inhibits the nuclear factor kappa B activation triggered by X gene product of hepatitis B virus in human hepatoma cells. *FEBS Lett* 553 (3): 304-308, 2003.
- 30) Ichikawa T, Hamasaki K, Ishikawa H, Ejima E, Eguchi K, Nakao K. Non-alcoholic steatohepatitis and hepatic steatosis in patients with adult onset growth hormone deficiency. *Gut* 52 (6): 914, 2003.
- 31) Akahoshi M, Amasaki Y, Soda M, Hida A, Imaizumi M, Nakashima E, Maeda R, Seto S, Yano K. Effects of radiation on fatty liver and metabolic coronary risk factors among atomic bomb survivors in Nagasaki. *Hypertens Res* 26 (12): 965-970, 2003.
- 32) Shimizu I, Makino H, Osawa H, Kounoue E, Imagawa A, Hanafusa T, Kawasaki E, Fujii Y. Association of fulminant type 1 diabetes with pregnancy. *Diabetes Res Clin Pract* 62 (1): 33-38, 2003.
- 33) Fujita N, Sakamaki H, Uotani S, Takahashi R, Kuwahara H, Kita A, Oshima K, Yamasaki H, Yamaguchi Y, Eguchi K. Intracerebroventricular administration of insulin and glucose inhibits the anorectic action of leptin in rats. *Exp Biol Med* 228 (10): 1156-1161, 2003.
- 34) Fukuda T, Motomura M, Nakao Y, Shiraishi H, Yoshimura T, Iwanaga K, Tsujihata M, Eguchi K. Reduction of P/G-type calcium channels in the postmortem cerebellum of paraneoplastic cerebellar degeneration with Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Ann Neurol* 53: 21-28, 2003.
- 35) Yanagi K, Nagayama Y, Nakao K, Saeki A, Matsumoto K, Ichikawa T, Ishikawa H, Hamasaki K, Ishii N, Eguchi K. Immuno-gene therapy with adenoviruses expressing fms-like tyrosine kinase 3 ligand and CD40 ligand for mouse hepatoma cells in vivo. *Int J Oncol* 22: 345-351, 2003.
- 36) 江口勝美. ヒト抗 TNF α 抗体アダリムマブを用いた関節リウマチの治療. *炎症免疫* 12 (1): 70-77, 2004.
- 37) 江口勝美. 関節リウマチの合併症の治療. *臨床と研究* 81 (2): 27-33, 2004.
- 38) 江口勝美. RA の病態と最新の薬物療法. *骨・関節・靭帯* 17 (2): 149-159, 2004.
- 39) 川上純, 江口勝美. Adalimumab. *Current Therapy* 22 (1) 44-47, 2004.
- 40) 折口智樹, 井田弘明, 江口勝美. 関節リウマチの最新薬物療法. *ナーシング* 24 (2): 6-17, 2004.
- 41) 川上純, 玉井慎美, Hashmi Rashid, 上谷雅孝, 青柳潔, 江口勝美. MRI の進歩. *内科* 93 (2): 229-231, 2004.
- 42) 川上純, 宮下賜一郎, 玉井慎美, 田中史子, 江口勝美. TRAIL 欠損マウスにおける自己免疫疾患の発症. *臨床免疫* 41 (1): 73-77, 2004.
- 43) 折口智樹, 江口勝美. シェーグレン症候群. *診断と治療* 92 (2): 265-270, 2004.
- 44) 濱崎圭輔, 江口勝美. RNAi による B 型肝炎の治療を目指して. *Molecular Medicine* 41 (1): 30-34, 2004.
- 45) 江口勝美. ACR ガイドラインはどう変わったのか. *Arthro-Care* 3 (4): 2-5, 2003.
- 46) 江口勝美, 中島宗敏. 抗リン脂質抗体症候群. *今月の治療* 10 (臨時増刊号): S281-S284, 2003.
- 47) 江口勝美, 折口智樹. RA のテーラーメイド治療は可能か. *診断と治療* 91 (5): 866-872, 2003.
- 48) 江口勝美. 関節リウマチの重篤な合併症の早期診断とその対策. *日本医事新報* 4131: 1-8, 2003.
- 49) 江口勝美. COX-2 選択的阻害薬の現況とさらなる可能性. *医薬ジャーナル* 39 (7): 83-92, 2003.
- 50) 江口勝美. 高齢者にみられる多発関節炎. *CLINICIAN* 522 (50): 25-30, 2003.
- 51) 江口勝美, 田中良哉. リウマチ膠原

- | | |
|---|--|
| <p>病の重症肺病変. 九州リウマチ 23 (1): S1, 2003.</p> <p>52) 江口勝美. 変化するリウマチ治療と期待される”生物学的製剤”. INFO RDIC 3: 1-9, 2003.</p> <p>53) 江口勝美. 早期関節リウマチの考え方. Pharma Medica 21 (12): 27-31, 2003.</p> <p>54) 川崎英二, 江口勝美. 1型糖尿病の分子マーカー. 医学のあゆみ 207 (9): 719-723, 2003.</p> <p>55) 川上純, 江口勝美. シェーグレン症候群. 看護アセスメントに役立つ検査の読み方, 医学芸術社 p433-438, 2003.</p> <p>56) 山崎聡士, 江口勝美. 関節リウマチにおける滑膜恒常性の再生. リウマチ科 30 (2): 163-170, 2003.</p> <p>57) 山崎聡士, 江口勝美. 滑膜線維芽細胞の分化能と治療応用への可能性. 臨床免疫 40 (2): 172-179, 2003.</p> <p>58) 井田弘明, 江口勝美. NK 細胞における活性化誘導細胞死の機序. 臨床免疫 40 (2): 232-236, 2003.</p> <p>59) 右田清志, 江口勝美. 二次性アミロイドーシス—原因と対策—. 九州リウマチ 23 (1): 11-16, 2003.</p> <p>60) 山崎聡士, 江口勝美. 関節リウマチにおける滑膜恒常性の再生. リウマチ科 30 (2): 163-170, 2003.</p> | <p>2. 実用新案登録
なし</p> <p>3. その他
なし</p> |
|---|--|

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

・出願番号 2003-331089 : ヒト血管内皮細胞の VEGF 誘導性活性化及び血管新生における Id の役割 (平成15年9月24日)

・出願番号 PCT/JP01/09313 (TLOP1-2/PCT) : 慢性関節リウマチに関与するゲノムの診断方法、その発症可能性の判定方法、それらの検出用診断キットおよび、慢性関節リウマチの治療方法ならびに治療薬剤

・特許番号 2004-3727、2004-3728 : NF-κB 活性化抑制剤

II. 分担研究報告

関節リウマチの自己抗体による早期診断に関する研究
－診断未確定関節炎における抗 CCP 抗体の意義－

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)

研究要旨

これまで RA では他の膠原病のような疾患特異的自己抗体の報告は少なく、RA において臨床的に利用される唯一の血清マーカーであるリウマトイド因子は感度・特異度とも満足すべきものではなかった。近年、シトルリン化 Filaggrin およびその環状化ペプチドである CCP に対する自己抗体が RA の新たな自己抗体として注目されている。昨年度は、抗 Filaggrin/CCP 抗体は日本人の RA においても感度と特異度に優れることを明らかにしたが、本年度は、初診時に RA 分類基準を満たさない関節炎症例の追跡調査により、初診時に抗 CCP 抗体が陽性であれば後に RA と診断される可能性が高く、RF よりも RA の診断予測に優れていることが示された。この事実は抗 CCP 抗体が RA の早期診断に極めて有用であり、RA の診断基準を満たしていても DMARDs による早期治療を開始する指針となりうる可能性を示唆するものである。

A. 研究目的

関節リウマチ (RA) は全身性自己免疫疾患に分類されるにもかかわらず、これまで他の膠原病のような疾患特異的自己抗体の報告は少なく、たとえあってもほとんど追試がなされていなかった。リウマトイド因子はこれまで RA において臨床的に利用される唯一の血清マーカーであるが、その RA における感度は 60-80% であり、他疾患にも検出されるため特異度は低い。我々はこれまでにカルパイン (カルシウム依存性中性プロテアーゼ) の特異的阻害蛋白であるカルパスタチンに対する自己抗体が 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。しか

し、これらの自己抗体は RA の病因病態論上は興味深いものであったが、RA 以外の疾患にも検出されることから RA の早期診断には有用な血清マーカーとはならなかった。

一方近年、RA の新たな自己抗体としてシトルリン蛋白である Filaggrin およびその環状化ペプチドである CCP (cyclic citrullinated peptide) に対する自己抗体が注目されている。昨年度は診断確定症例において抗 CCP 抗体が RA における感度・特異度ともに優れた血清マーカーであることを示したが、本年度は RA の診断確定前における抗 CCP 抗体の有用性をリウマトイド因子 (RF) と比較して検討した。

B. 研究方法

1)対象： 初診時に診断が確定しなかった関節痛または関節炎を主訴とする患者 100 例を対象とし，インフォームドコンセントを得て血清を採取・保存した。

2)対象患者の追跡： 初診時に採取保存した血清について抗 CCP 抗体と RF を測定し，その後の転帰を追跡した（最長 3 年間）。

3)抗体測定法： 抗 CCP 抗体の測定には Axis-Shield 社製 ELISA キット（カットオフ値 5.0 U/ml）を用い，RF の検出にはラテックス免疫比濁法（カットオフ値 11.7 IU/ml）を用いた。

(倫理面への配慮)

京都大学医の倫理委員会の承認のもとに，患者血清はすべてインフォームドコンセントを得て採取した。

C. 研究結果

1)初診時未診断関節炎患者における抗 CCP 抗体と RF の陽性率と最終転帰： 初診時未診断関節炎患者 100 例中，抗 CCP 抗体は 35 例 (35%)，RF は 48 例 (48%) に陽性であった。最終的に 37 例が RA，38 例が RA 以外のリウマチ性疾患（非 RA）と診断され（各々疑い例を含む），25 例が診断未確定のままであった。

2)初診時血清マーカーによる層別化： 抗 CCP 抗体陽性 35 例中 26 例 (74%) が後に RA と診断されたが（うち 7 例は DMARDs を開始した疑診例），同抗体陰性 65 例の中から後に RA と診断されたのは 11 例 (17%)（疑診 3 例）にすぎなかった。一方，RF 陽性 48 例中，後に RA と診断されたのは 24 例 (50%)（疑診 7 例）にすぎず，RF 陰性 52 例中 13 例 (25%)（疑診 3 例）が後に RA と診断されていた（図 1）。診断が確定した症例の多くは 1 年以内に確定したが，診断未確定例の多くは 1 年以内に脱落していた。

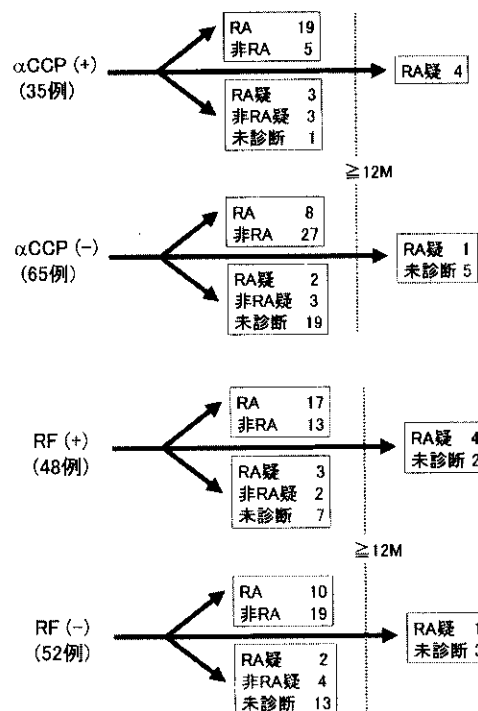


図 1. 初診時診断未確定関節炎 100 例の転帰

抗 CCP 抗体陽性例から後に非 RA と診断されたのは回帰性リウマチ (3 例) とシェーグレン症候群 (2 例) が多かったのに対し，抗 CCP 抗体陰性例では OA が最も多く，SLE，反応性関節炎など多彩な疾患が含まれていた（表 1）。

表 1. RA 以外と診断された症例の内訳（疑診含む）

転 帰	初診時抗 CCP 抗体	
	陽性(8)	陰性(30)
回帰性リウマチ	3	0
シェーグレン症候群	2	2
PM+IP(抗 ARS 症候群)	1	0
強皮症	1	0
RS ₃ PE 症候群	1	1
OA	0	10
SLE	0	4
PMR	0	2
パルボウイルス感染症	0	2
反応性関節炎	0	2
乾癬性関節炎	0	1
脊椎関節症	0	1
腸関節症	0	1
レイノー病	0	1
痛風	0	1
軟骨石灰化症	0	1
結節性紅斑	0	1

3)抗 CCP 抗体と RF の組み合わせによる RA の診断率 (表 2)

抗 CCP 抗体と RF 両方陽性であった症例は後に 80%が RA と診断されたが (疑診含む), RF 陰性でも抗 CCP 抗体陽性ならば 67%が RA であった. これに対し, 抗 CCP 抗体が陰性の場合 RF の有無に関わらず RA の診断率は低値であった.

4)RA における抗 CCP 抗体と他のマーカーの相関 (表 3)

最終的に RA とされた症例 33 例における抗 CCP 抗体と他の血清マーカーの相関を検討した. 抗 CCP 抗体は RF とは弱い相関があったが, MMP-3, CRP, 赤沈値とは相関しなかった.

表 2. 抗 CCP 抗体とリウマトイド因子の組み合わせによる RA の診断率

マーカー		全例数	RA 例数*	診断率*
抗 CCP	RF			
+	+	25	20(14)	80%(56%)
+	-	9	6(5)	67%(56%)
-	+	23	4(3)	17%(13%)
-	-	43	7(5)	16%(12%)

*疑診例を含む, ()内は診断確定例

表 3. RA における抗 CCP 抗体と他のマーカーの相関

マーカー	抗 CCP 抗体		P 値
	陽性 (26)	陰性 (11)	
RF	77%	36%	P=0.047
MMP-3	52%	63%	P=0.624
CRP(mg/dl)	2.5±4.4	2.1±3.8	P=0.707
赤沈値(mm/h)	47±30	44±25	P=0.692

5)最終転帰における各血清マーカーの有用性 (表 4): 最終転帰において, 抗 CCP 抗体は RA における感度 70%, 特異度 86%, 診断確度 80%と, RF および MMP-3 に比して優れていた. 抗 CCP 抗体と RF を組み合わせると感度は 81%に上昇したが, 特異度は 59%に減少し, 診断確度も 67%と減少した.

表 4. 初診時診断未確定例の最終転帰と各種血清マーカーの有用性

マーカー	RA* (37)	非 RA† (63)	診断確度
抗 CCP	70%	14%	80%
RF	65%	38%	63%
MMP-3	45%	30%	61%
抗 CCP+RF	81%	41%	67%

*疑診例を含む, †終診時診断未確定例を含む

D. 考 察

RA は全身性自己免疫疾患に分類されるにもかかわらず, これまで他の膠原病のような疾患特異的自己抗体の報告は少なく, たとえあってもほとんど追試がなされていなかった. RF はこれまで RA において臨床的に利用される唯一の血清マーカーであるが, その RA における感度は 60-80%であり, 他疾患にも検出されるため特異度は低い. また, RA 発症初期には陽性率はさらに低くなるため, 早期診断のマーカーとしては満足すべきものではなかった.

Filaggrin はかつて RA に検出されると報告されたいわゆる「抗ケラチン抗体」および核周囲因子 (perinuclear factor) の対応抗原として同定された蛋白で, 皮膚などの角質化上皮組織に分布し, サイトケラチンの凝集に関与すると考えられている. 近年, アルギニン残基がシトルリンに変換されたシトルリン化 Filaggrin およびその人工的な環状化ペプチドである CCP に対する自己抗体が RA の新たな自己抗体として注目されている. 昨年度の検討では, 抗 Filaggrin/CCP 抗体は日本人 RA においても感度と特異度に優れていることが明らかとなり, 特に抗 CCP 抗体は RA における診断確度が 87% (感度 82%, 特異度 95%), 早期 RA においても診断確度 82% (感度 78%, 特異度 85%) と, 極めて高い診断的意義を持つことを確認した. その一方で RF 陰性 RA にも抗 CCP 抗体が 67%に検出された.

本年度は, 初診時に RA 分類基準を満

たさない関節炎／関節痛症例の追跡調査により、初診時に抗 CCP 抗体が陽性であれば後に RA と診断される可能性が高く、RF よりも RA の診断予測に優れていることが示された。この事実は抗 CCP 抗体が RA の早期診断に極めて有用であり、RA の診断基準を満たしていても DMARDs による早期治療を開始する指針となりうる可能性を示唆するものである。

しかし、その一方で、抗 CCP 抗体の有無は CRP 値および赤沈値とは関連せず、活動性の指標としては有用でない可能性も示唆された。また、RA の重症度、関節破壊の進行、関節外症状などと抗 CCP 抗体の関連については今後の検討を要する。

E. 結 論

初診時に RA 分類基準を満たさない関節炎症例でも抗 CCP 抗体が陽性であれば後に RA と診断される可能性が高く、その診断率は RF よりも優れていた。抗 CCP 抗体は RA の早期診断に有用であり、RA 早期治療の指針となりうる可能性がある。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanaka M, Ozaki S, Kawabata D, Kishimura M, Osakada F, Okubo M, Murakami M, Nakao K, Mimori T. Potential preventive effects of follistatin-related protein/TSC-36 on joint destruction and antagonistic modulation of its autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Intl Immunol* 15 (1): 71-77, 2003.
- 2) Ida H, Huang M, Hida A, Origuchi T, Kawakami A, Migita K, Tsujihata M, Mimori T, Eguchi K. Characterization of anticytoplasmic antibodies in patients with systemic autoimmune diseases. *Mod Rheumatol* 13: 333-338, 2003.

- 3) Suzuki K, Sawada T, Murakami A, Matsui T, Tohma S, Nakazono K, Takemura M, Takasaki Y, Mimori T, Yamamoto K: High diagnostic performance of ELISA detection of antibodies to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 32:197-204, 2003.
- 4) Kawabata D, Tanaka M, Fujii T, Umehara H, Fujita Y, Yoshifuji H, Mimori T, Ozaki S: Ameliorative effects of follistatin-related protein/TSC-36/FSTL1 on joint inflammation in a mouse model of arthritis. *Arthritis Rheum* 50(2):660-668, 2004.
- 5) 三森経世. 自己抗体. *Medico* 34 (4): 128-13, 2003.
- 6) 田中真生, 三森経世. 関節リウマチと関連する新たな自己抗体. *リウマチ科* 29 (4): 412-416, 2003.
- 7) 三森経世. 関節リウマチの新しい自己抗体. *炎症と免疫* 11 (3): 358-362, 2003.
- 8) 三森経世. 関節リウマチの早期診断における抗フィラグリン/CCP 抗体の意義. *臨床免疫* 40 (2): 185-189, 2003.
- 9) 三森経世. 関節リウマチの新しい血清マーカー—シトルリン化蛋白に対する自己抗体—. *Pharma Medica* 21 (12): 33-37, 2003.
- 10) 三森経世. 関節リウマチの新たな自己抗体—抗シトルリン化タンパク抗体. *内科* 93 (2): 233-236, 2004.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし