

K, Juji T, Tanaka S, Oda H, Shukunami C, Nishizaki Y, Hiraki Y, Yamamoto K. Suppression of T cell responses by chondromodulin I, a cartilage-derived angiogenesis inhibitory factor. *Arthritis Rheum.* 50:828-839, 2004.

9. Kobari Y, Misaki Y, Setoguchi K, Zhao W, Komagata Y, Kawahata K, Iwakura Y, Yamamoto K. T cells accumulating in the inflamed joints of a spontaneous murine model of rheumatoid arthritis become restricted to common clonotypes during disease progression. *Int Immunol.* 16:131-138, 2004.

H.知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

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

Methotrexate の薬理遺伝学的研究

分担研究者 谷口敦夫 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

研究要旨

抗リウマチ薬の効果や副作用の発現には個体差が大きい。これらの原因のひとつとして薬物代謝 (関連) 酵素の遺伝子多型が考えられる。我々は以前、MTX の副作用発現に *MTHFR* 遺伝子の C677T 多型が関与することを報告した。今回、別の対象症例群について検討を行ったところ、同様の結果が示された。したがって、*MTHFR* 遺伝子の C677T 多型が MTX の副作用発現の予測に有用であることが改めて示された。この結果は RA 患者の MTX 治療にテーラーメイド医療を導入する際の重要な情報であると考えられる。今後、MTX の影響を受ける代謝経路の種々の酵素について副作用や効果との関連を検討する必要がある。

A. 研究目的

ヒトゲノム塩基配列が明らかになるとともに、遺伝子配列がどのような形質と結びついているかについての研究がさかんに行われるようになった。この形質のなかには、薬効の程度、副作用の有無なども含まれる。このような研究の進展により、個人の遺伝子の違い、すなわち遺伝子多型に基づいたテーラーメイド医療の実現が現実味を帯びてきた。

一方、薬理遺伝学 (薬理ゲノミクス) はヒトゲノム情報から得られた遺伝子多型 (特に single nucleotide polymorphism, SNP) をもとに薬効の個体差を予測しようとする研究分野である。そして、これらのゲノム情報を遺伝統計学的に処理することにより薬効の個体差を考慮した治療方針を立てることが可能になる。副作用の原因として頻繁に報告されている薬物の約60%が、一つ以上のSNPをもつ薬物代謝酵素で代謝され、これに対し無作為に抽出した薬物では22%である ($p=0.006$)¹⁾ ことが示されており、このことは、薬理遺伝学に基づく個人に最適化された治療、すなわちテーラーメイド医療により薬物による副

作用の頻度を減少させることができる可能性を示唆している。

テーラーメイド医療はリウマチ学の分野では未だ応用には至っていない。しかし、抗リウマチ薬の特徴として効果に個体差が大きいこと (responder・nonresponder の存在、有効性を示す薬物投与量に個体差があること)、副作用の発現頻度は25~30%と比較的高く、稀に重篤な副作用も認められるが、全く副作用を発現しない症例もあること、などがあげられる。薬物代謝酵素の遺伝子多型はこのような個体差が生じる原因のひとつであると考えられる。したがって、遺伝子多型に基づくテーラーメイド医療を導入することにより、関節リウマチ (Rheumatoid arthritis, RA) の治療はより効率的になるであろう。

我々は以前からこの点に着目して、最もよく用いられている抗リウマチ薬であるメトトレキサート (methotrexate, MTX) の副作用や効果について、薬理遺伝学的検討を行っている。MTX が発揮する抗リウマチ作用には葉酸代謝拮抗作用が重要であると考えられているので、我々は葉酸代謝経路における主要な

酵素である methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) に注目した。MTHFR 遺伝子には C677T 多型があり、変異により酵素活性が低下する。2002年に教室の Urano らは106例の MTX 服用歴のある RA 患者を対象に検討を行い、C677T 多型の T アレルを持つ症例で副作用の頻度が有意に高いことを報告した²⁾。今回、我々は以下の2点について研究を行った。

- 1) 異なる患者集団で Urano らの報告²⁾を検証する。
- 2) MTX が関連する代謝経路の他の酵素について、副作用との関連を検討する。

B. 研究方法

1. 対象

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し、MTXの服用歴のあるRA患者192例を対象とした。

2. 方法

対象患者の末梢血からゲノムDNAを抽出した。MTHFR 遺伝子の C677T 多型、methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/methylenetetrahydrofolate cyclohydrolase/formyltetrahydrofolate synthetase (MTHFD1) 遺伝子の R134K 多型、gamma-glutamylhydrolase (GGH) 遺伝子の R6C 多型について、TaqMan 法 (Applied Biosystems, Foster City, CA) により遺伝子型を決定した。

3. 副作用の評価

対象患者の臨床記録からMTXによる副作用を抽出した。今回の研究では特にMTXによる肝機能異常に注目し、ALT 45 IU/lを超える場合を肝機能異常ありとした。

なお、本研究は東京女子医科大学の遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会で承認されている。

C. 研究結果

対象患者の年齢は58.8±12.6歳、罹病期間

は11.8±9.5年、女性が83.7%、リウマトイド因子陽性例は86.1%であった。このなかで、自己免疫性肝炎、慢性肝炎など既存の肝疾患を有する10症例と、Urano らが2002年に行った検討に含まれている20症例を除外した162例について検討を行った。対象症例162例について、MTXの総投与量が300mgに至るまでにALTが45 IU/lを超えた症例数を各遺伝子の遺伝子型別に検討した。

MTHFR 遺伝子 C677T 多型において、CC の場合は ALT 45 IU/l を超えた症例は 14.5% であるのに対し、CT あるいは TT では 34.0% と、T アレルを持つ症例の方が有意に肝機能異常の頻度が高かった (P<0.05, RR 2.3, 95%CI 1.2-4.4)。アレル頻度を検討すると、C アレルを有する症例では 19.8% であったのに対し、T アレルを有する症例では 35.5% であり、有意に T アレルを有する症例の方が有意に肝機能異常の頻度が高かった (P<0.05, RR 1.7, 95%CI 1.2-2.4)。

MTHFD1 遺伝子の R134K 多型については GG である症例の 57.8%、GA あるいは AA である症例の 63.7% に肝機能異常が認められたが、有意差はなかった。

GGH 遺伝子の R6C 多型では AA である症例で 59.9%、AG あるいは GG である症例で 61.2% に肝機能異常が認められたが、有意差はなかった。

D. 考察

MTHFR 遺伝子の C677T 多型と RA 患者における MTX の副作用発現との関連についてはすでに報告が散見される。Van Ede らは 236 例の RA 患者を前向きに 6 ヶ月間検討し、C677T 多型の T アレルを持つ症例で MTX による副作用中止が有意に高頻度であった (RR 2.01, 95%CI 1.09-3.70) と報告している。特に、肝機能検査異常による中止例のみで検討しても有意差が得られたことより (RR 2.38, 95%CI 1.06-5.34)、C677T 多型は MTX による肝機能異常の遺伝的危険因子であるとしている³⁾。しかし、Kumagai らは 115 例の後ろ向き研究

を行い、C677TのTアレル頻度はMTXの副作用と無関係であったと報告している4)。また、最近、Berkunらは横断的研究を行い、MTXの副作用発現にはC677Tアレルは無関係であるが、A1298C多型のCアレルを持つ症例で副作用の頻度が有意に高いことを報告した5)。このようにRA患者におけるMTXの副作用発現とMTHFR遺伝子多型との関連についての報告は一致していない。そこで、今回、我々はUranoらによって行われた検討の結果2)を検証するために、Uranoらの検討に含まれなかった症例を対象とし、MTXによる肝機能異常とMTHFR遺伝子C677T多型との関連を検討した。その結果、MTX投与総量300mg以内に起こる肝機能異常の頻度はTアレルを有する症例で有意に高かった。このように、今回の研究で、MTXの副作用とMTHFR遺伝子C677T多型との関連が再確認された。テーラーメイド医療を実践する場合、臨床的な形質と遺伝子型との関連についての基礎データは、異なる対象症例を用いて再現されていることが望ましい。今回の検討により、MTHFR遺伝子のC677T多型がMTXの副作用発現の予測に有用であることが2つの異なる患者群で示されたことになる。このことは、RA患者のMTX治療にテーラーメイド医療を導入する際の重要な情報であると考えられる。

一方、MTXの影響を受ける代謝経路にはMTHFR以外にも種々の酵素が関与している。MTHFD1はNADP依存性の酵素で一連の3つの反応を触媒する。この酵素によりtetrahydrofolate (THF)は順に10-formyl、5,10-methenyl、5,10-methylene THFに変換され、5,10-methylene THFはMTHFRの基質となる。したがって、MTHFD1は5,10-methylene THFの供給に重要である。また、MTXは細胞内に入った後にポリグルタメイト化される。ポリグルタメイト化されたMTXが薬理学的効果の発揮に重要であることが、RAにおいても示されている。GGHはライソゾーム酵素であり、ポリグルタメイト化されたMTXに高い親和性を持つ。MTXの添加されたグルタミン酸

はGGHにより除かれる。したがって、GGHの作用が弱いとMTXはよりポリグルタメイト化されやすいと考えられる。今回の検討ではMTHFD1遺伝子、GGH遺伝子のアミノ酸変異を伴う遺伝子多型と副作用との関連を検討したが、これらの多型は副作用には関連しないと考えられた。しかし、MTXの影響を受ける代謝経路は比較的複雑であり、他の酵素の遺伝子多型がMTXの効果や副作用に関連する可能性もあると考えられる。今後、他の酵素遺伝子についてさらに検討を進めたい。

E. 結論

RA患者におけるMTXの副作用発現(MTXによるAJT>45の頻度)はMTHFR遺伝子C677T多型のTアレルを有する症例において有意に高い。MTHFD1遺伝子のR134K多型、GGH遺伝子のR6C多型についてはMTXの副作用との関連は認められない。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

H. 学会発表

第49回日本リウマチ学会総会で発表予定
(発表誌名巻号・頁・発行年等：現在未定)

参考文献

1. Phillips KA, Veenstra DL, Oren E, et al: Potential role of pharmacogenomics in reducing adverse drug reactions. A systematic review. JAMA 2001; 286:2270-9.
2. Urano W, Taniguchi A, Yamanaka H, et al: Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses. Pharmacogenetics 2002; 12:183-

90.

3. van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, et al: The C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: a genetic risk factor for methotrexate-related elevation of liver enzymes in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 2001 ;44:2525-30.

4. Kumagai K, Hiyama K, Oyama T, et al: Polymorphisms in the thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to the low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Mol Med* 2003 ;11:593-600.

5. Berkun Y, Levartovsky D, Rubinow A, et al: Methotrexate related adverse effects in patients with rheumatoid arthritis are associated with the A1298C polymorphism of the MTHFR gene.

Ann Rheum Dis 2004 ;63:1227-31.

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

早期リウマチ診断に有用な遺伝子に関する研究

分担研究者	小林茂人	順天堂大学医学部膠原病内科・順天堂越谷病院内科	助教授
共同研究者	三宅幸子	国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部	室長
	阿部香織	順天堂大学医学部膠原病内科	講師
	田村直人	順天堂大学医学部膠原病内科	講師
	池田 真	順天堂大学医学部膠原病内科	助手
	海江田信二郎	久留米大学医学部第一内科・順天堂大学医学部膠原病内科・ 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部	研究生

研究要旨

生物製剤の使用によるリウマチの早期治療の重要性が高まるとともに、リウマチの早期診断の必要性が高まっている。そこで、リウマチ専門医以外でも容易にリウマチ専門医へのコンサルトに必要な疾患マーカーの検索を DNA マイクロアレイを用いて網羅的におこなった。早期 RA では、急性期反応性蛋白や赤血球系遺伝子、シグナル抑制因子などの遺伝子の発現が 2 倍以上に上昇していた。2 倍以上に減少していた遺伝子は、シグナル伝達に関与する分子、細胞接着に関与する分子、細胞内の vesicle transport に関する遺伝子、細胞周期に関する遺伝子等が多かった。これらはいずれも、他の臓器特異的自己免疫疾患でみられたものとは、著しく異なる遺伝子プロファイルであったが、今後変形性関節炎等の関節疾患との比較が重要であると思われる。

A. 研究目的

関節リウマチ(RA)は、近年続々と新規治療薬が開発・発売され、治療方針も従来踏襲されてきた非ステロイド系抗炎症剤から治療を開始するピラミッド型治療ではなく、むしろ早期から積極的に抗リウマチ薬を使用することによって軟骨・骨破壊が予防するという治療法が推称される様になった。このような治

療方針の転換と、軟骨・骨破壊は発症後 2 年以内の比較的早期から始まるということを考慮すると、RA の早期診断の重要性はこれまで以上に高まっている。現在、早期 RA の診断に関しては、熟練したリウマチ専門医の臨床診断が最も信頼性が高く、リウマチ因子や炎症反応等の比較的的特異的な検査を補助的に用いているのが現状である。しかし、RA

は 100 万人の病気といわれるほど患者数の多い疾患であり、必ずしもリウマチ専門医を受診するわけではない。そこで、リウマチを専門としない医師が専門医に紹介するかどうかの判断材料として使用するのに適当な診断試薬が発達すると、より効率的に早期診断が可能になると考えられる。以上のことから、早期 RA の診断に有用な DNA 診断チップを作製することを目的とする。

B. 研究方法

初診時に RA が強く疑われ、初診時から 6 ヶ月後に RA の診断が確定した患者さんの初診時の末梢血リンパ球の遺伝子プロファイルを、関節痛を主訴として来院したが、RA の可能性が低いと判断され、その後も RA と診断されなかった症例、変形性関節症と診断された症例、健常人と比較し、発現に優位に差がある遺伝子を DNA マイクロアレイを用いて網羅的に抽出する。検体は、全血から total RNA を調整し、マイクロアレイは、Affimetrix 社の Human Genome U133Plus2 を用いる。さらに、real-time PCR を用いてマイクロアレイの結果を確認する。これらの解析で、発現に優位に差がある遺伝子のみを測定できるチップを作製し、実際に早期 RA の診断に役立つかどうかの検討を開始する。また、初診時から 6 ヶ月後に RA と診断されている人については末梢血リンパ球の遺伝子プロファイルを検討し、初診時からの変化を検討する。また、臨床経過は 2 年間観察し、軟骨・骨病変の進行が早い群については、軟骨・骨病変が進行しない群と比較し、軟骨・骨病変進行を予測できる遺伝子があるかどうかを検

討する。各施設の倫理委員会の承認のもとに研究を行った。

C. 研究結果

現在まだ、RA9 例、健常人 7 名の比較であるが、RA 末梢血で健常人と比較して 2 倍以上に上昇していた遺伝子は、急性期反応性蛋白や赤血球系遺伝子、またシグナル抑制因子などの遺伝子であった。

RA 末梢血で健常人と比較して 2 倍以上に減少していた遺伝子は、370 遺伝子以上あった。其の内訳では、シグナル伝達に関与する分子、細胞接着に関与する分子、細胞内の vesicle transport に関する遺伝子、細胞周期に関する遺伝子等が多かった。これらはいずれも、他の臓器特異的自己免疫疾患（多発性硬化症など）でみられたものとは、著しく異なる遺伝子プロファイルを示した。

D. 考察

今回早期 RA でみられた遺伝子プロファイルは他の臓器特異的自己免疫疾患とは異なったものの、変形性関節症などの他の関節疾患と区別しうる特異的なものを検討することが今後重要と考えられる。診断用にマイクロアレイを用いることは、コスト面でまだ実用には問題がある。今後更に廉価で解析できるシステムの開発が重要である。また、特異的な遺伝子数が限られたものであれば、蛋白質発現を簡易に測定できるチップの開発がコスト的には実現性が高いと思われた。

E. 結論

早期 RA では、他の臓器特異的自己免疫疾

患とは異なる遺伝子の発現の上昇や減少がみられ、疾患特異的マーカーとなる可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Akimoto T, Kobayashi S, Tamura N, Ohsawa T, Kawano T, Tanaka M, Hashimoto H. Risk factors for recurrent thrombosis: prospective study of a cohort of Japanese systemic lupus erythematosus (SLE). *Angiology* (in press).
2. Zhong B, Kobayashi S, Ikeda M, Akimoto T, Haruta K, Tamura N, Asakawa J, Tsuda H, Tanaka M, Kawano T, Hashimoto H. Clinical manifestations of patients with rheumatoid arthritis associated with vasculitis and/or extra-articular lesions in malignant rheumatoid arthritis in Japan. (in preparation).
3. Zhong B, Kobayashi S, Ikeda M, Akimoto T, Haruta K, Tamura N, Asakawa J, Tsuda H, Tanaka M, Kawano T, Hashimoto H. Inhibitory effect of Mizoribine on matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-3 production by production by synovial fibroblasts and THP-1 (Mod Rheumatol (in press)).
4. Kobayashi S, Kida I. Reactive arthritis. Recent advance and clinical manifestations. *Internal Med* (in Press).

和文総説

1. 小林茂人、木田一成、薬剤性腎障害 リウマチ科 31 272-277, 2004
2. 小林茂人、木田一成、大動脈炎をきたす疾患 リウマチ科、31 452-457、2004
3. 小林茂人 リウマチ医の役割と家庭医・かかりつけ医との連携、*クリニカル プラクティス*、23, 828-831, 2004
4. 石塚修悟、小林茂人、炎症マーカー：関節リウマチ、*日本臨床*、63:306-309、2005
5. 石塚修悟、小林茂人、IgM-RF. 関節リウマチ、*日本臨床*、63:318-321、2005

2. 学会発表

1. 田村直人、小林茂人、橋本博史、関節リウマチの治療、医療機器などレギュラトリーサイエンス総合研究事業、血管炎のための人工ぽポリクローナルグロブリン製剤の開発と安全性向上に関する研究、班会議 2005年1月8日、国立感染症研究所
2. 小林茂人、血管炎の診断と治療、第48回日本リウマチ学会総会・学術集会、4月15日、2004。岡山
3. Kobayashi S, Ihara T, Muso E, Suzuki K, et al. Prevalence of microscopic polyangiitis/Wegener's granulomatosis and P-, MPO-/C-, PR3-ANCA and genetic background in Japan. The 4th International Peroxidase Meeting. Oct.27-30, 2004.

4. Kobayashi S, Tamura N, Ikeda M, et al.
Clinical problems in coping with
ANCA-associated vasculitides.
International Symposium on
therapeutic Strategy to the best
advantage of collaboration between
basic science and clinical research.
Feb. 8th. 2005

H. 知的財産権の出願・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

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

関節リウマチ患者における臨床像、末梢血単核球中 TNF α および
tristetraprolin mRNA 量、血中抗 glucose-6-phosphate isomerase 抗体の
有無による Infliximab 治療反応性の予測に関する研究

分担研究者 伊藤 聡 筑波大学大学院人間総合科学研究科
先端応用医学専攻臨床免疫学 講師

研究要旨

関節リウマチ患者 20 例に Infliximab を使用した。30 週での ACR コアセットは、無効:6 例、20:3 例、50:1 例、70:3 例であった。有効例 3 例、無効 3 例で 0、2 週の臨床所見、TNF α と tristetraprolin (TTP) の mRNA 量を比較した。また全例で抗ヒト glucose-6-phosphate isomerase (GPI) 抗体を測定した。有効群は、腫脹関節数、関節点数 (腫脹関節にグレーディングをし、加算したもの)、医師評価が高く、赤沈、IgG が低かった。2 週後、有効群では IgG が無効群よりも低値であり、有効群で腫脹関節数、関節点数、CRP、無効群で赤沈が改善していた。TTP、TNF α の mRNA 量に差はなかった。無効群 2 例で抗 GPI 抗体が陽性であった。関節腫脹が激しく CRP が低下しやすい抗 GPI 抗体陰性例で、Infliximab の反応性がよいと思われた。

A. 研究目的

生物学的製剤の導入により、関節リウマチ (RA) の治療は飛躍的に進歩している。我が国においても 2003 年から Infliximab の使用が可能となり、高い有効性が報告されつつあるが、一部には治療抵抗性の症例も存在する。Infliximab は高価であり、また海外では Infliximab 無効例における他の生物学的製剤 (我が国でも承認予定) の有効性も報告されていることから、その治療反応性を予測することは、経済的な観点、関節破壊を防ぐという観点から非常に重要である。私達は臨床像、末梢血単核球中 TNF α および TNF α の制御分子である tristetraprolin (TTP) の mRNA 量、血中抗 glucose-6-phosphate isomerase (GPI) 抗体の有無などにより、Infliximab の治療反応性が予測可能か検討した。

B. 研究方法

2003 年 10 月に Infliximab 特殊外来を開

設し、2004 年 9 月までに 20 例の RA 患者に Infliximab を使用した。患者の平均年齢は 52.5 歳 (26-67 歳)、平均罹病期間は 9.1 年 (1.7-18 年)、Steinbrocker の stage、class はそれぞれ平均 3.0、2.0 であった。30 週までを終了した 13 例では、ACR コアセットで、無効:6 例、ACR20:3 例、ACR50:1 例、ACR70:3 例であった。この中から、ACR コアセット、ならびに減量が可能であった薬剤の量などを考慮した主治医判断により、有効群 3 例 (全員 ACR70 を達成)、無効群 3 例 (全員 ACR 達成率なし)、それぞれ男性 1 例、女性 2 例を抽出し、Infliximab 使用前と使用 2 週後の身体所見 (疼痛関節数、腫脹関節数、関節点数 (腫脹関節にグレーディングをし、加算したもの))、検査所見 (CRP、赤沈、RF、MMP-3、IgG)、VAS スコア、HAQ、TaqMan PCR 法で測定した TNF α と TTP の mRNA 量を比較した。また、全例で Recombinant ヒト GPI 抗原に対する抗 GPI 抗体を ELISA 法で測定した。陽性例では、使

用 6 週後の抗 GPI 抗体も測定した。

(倫理面への配慮)

研究計画は筑波大学倫理委員会の承認を得た。患者には研究計画を口頭と文書で説明し、文書による同意を得た。

C. 研究結果

1) 有効群、無効群で年齢、罹病期間、stage、class、プレドニゾロンやメトトレキサートの使用量に差は認められなかった (表 1)。関節点数、CRP の動きを図 1, 2 に示す。2) 使用前では、有効群は、腫脹関節数、関節点数 (図 3) が有意に高く (12.7 ± 3.06 vs 4.67 ± 4.04 , 22.7 ± 8.62 vs 6.33 ± 5.51)、赤沈、IgG (図 4) が有意に低く (28.3 ± 15.0 vs 66.7 ± 14.6 , 830.7 ± 91.5 vs 1384.0 ± 298.5)、医師評価点数が高かった (48.3 ± 6.67 vs 33.7 ± 3.51)。3) 使用 2 週間後では、有効群で IgG が有意に低い (774.7 ± 117.9 vs 1245.7 ± 266.6 、図 4) 他は、両群に差は認められなかった。4) 有効群では、2 週後に、関節点数 (22.7 ± 8.62 から 8.67 ± 4.51 、図 3)、CRP (2.51 ± 0.70 から 0.15 ± 0.156) が有意に改善していた。一方、無効群では、赤沈 (66.7 ± 14.6 から 47.7 ± 5.67) が有意に改善していた。5) 両群で、TNF α 、TTP、TTP/TNF α 比に差はなかった。6) Infliximab 使用による TNF α 、TTP、TTP/TNF α 比の有意な変動は認められなかった。7) 20 例中 3 例で抗 GPI 抗体が陽性であったが、2 例とも無効群であった (図 5)。また、残りの陽性例 1 例は、2 週後の判定で ACR 改善度の判定は無効であった (図 5)。Infliximab 使用により抗体価の減少は認められなかった。

D. 考察

両群で年齢、罹病期間、stage、class、VAS スケールによる疼痛の度合いや各種炎症所見に差が認められないにも関わらず、有効群では有意に関節腫脹が高度で、医師評価点数が高かった。このことから、関節腫脹が激しく、また初回の治療で反応性の良好な RA 患者が、

Infliximab のよい適応症例である可能性が考えられた。抗 GPI 抗体の存在は、Infliximab 抵抗性と関連がある可能性が示唆された。

E. 結論

関節腫脹が激しく、赤沈の値がさほど上昇しておらず、Infliximab 使用 2 週後に関節腫脹、CRP 値の改善が認められる患者で、使用 30 週後に有効性が認められた。抗 GPI 抗体の存在は、Infliximab 抵抗性と関連がある可能性が示唆され、症例数を増やしさらに検討を続ける予定である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし。

2. 学会発表

伊藤 聡、杉原誠人、千野裕介、鈴木 豪、林 太智、後藤大輔、松本 功、堤 明人、住田孝之： RA 患者における Infliximab 治療反応性の予測。第 49 回日本リウマチ学会 (2005 年) で発表の予定。

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。

表1. 有効群、無効群のInfliximab 投与前背景

	有効群 3例 (M 1, F 2)	無効群 3例 (M 1, F 2)	
年齢 (歳)	55.0 ± 13.5	43.7 ± 16.3	ns
罹病期間 (年)	13.7 ± 3.8	9.7 ± 9.0	ns
Stage	3.0 ± 1.0	3.0 ± 1.0	ns
Class	2.0 ± 1.0	2.0 ± 1.7	ns
PSL量 (mg/day)	7.5 ± 7.5	8.3 ± 2.9	ns
MTX量 (mg/week)	7.3 ± 2.3	8.7 ± 3.1	ns

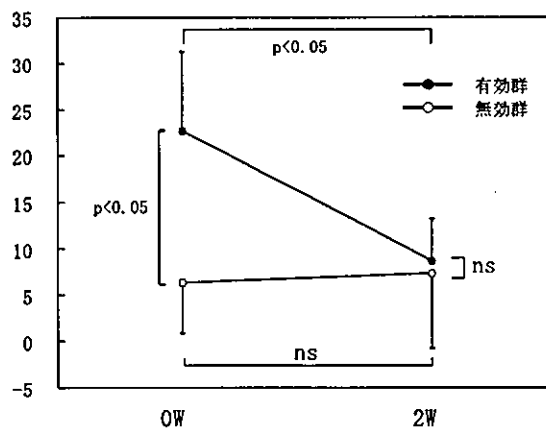


図3 0週、2週における有効群、無効群での関節点数の比較

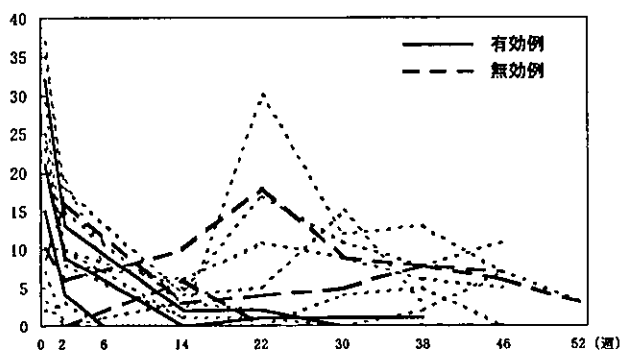


図1 関節点数の推移

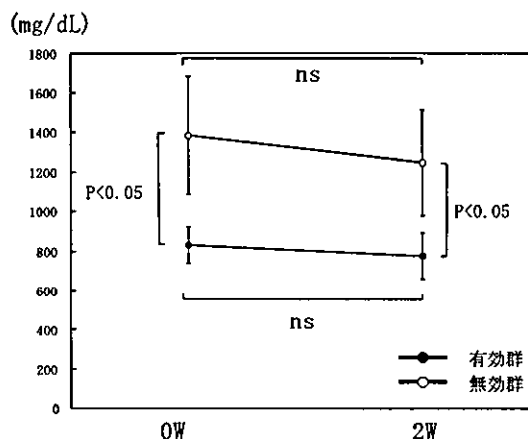


図4 0週、2週における有効群、無効群でのIgGの比較

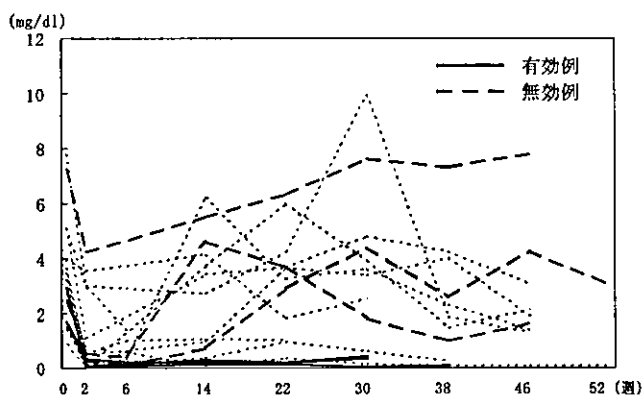
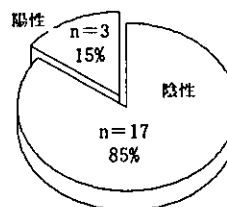


図2 CRPの推移

3例中2例が無効例
1例は2週後の判定でACR無効



※陽性例2例は6週後も陽性

図5. 抗GPI抗体の陽性率

CaMKII による滑膜線維芽細胞アポトーシスの制御に関する研究

分担研究者 川上 純 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) 講師

研究要旨

種々の kinase 活性化および不活化は、関節リウマチ (RA) の病態に重要である。私たちは滑膜線維芽細胞のアポトーシス制御には、Akt をはじめとする kinase 活性化の重要性を報告してきた。今回、その上流 kinase として、CaMKII の関与を検討した。コラーゲン誘発関節炎 (CIA) マウスでは、関節局所にリン酸化 Akt に加え CaMKII が発現し、その局在は merge していた。培養滑膜線維芽細胞でも Akt と CaMKII の発現が検出された。滑膜線維芽細胞には Fas 依存性アポトーシスと TRAIL 依存性アポトーシスが誘導されるが、CaMKII の chemical inhibitor 添加により、滑膜線維芽細胞のこれらアポトーシス感受性は顕著に増大した。今後は滑膜線維芽細胞における CaMKII と Akt のシグナル伝達を研究し、CIA マウスのデータを含めて、滑膜増殖への CaMKII の関与を検討する予定である。また、この研究は、RA の新たな治療ターゲット検索にも重要と考えられる。

A. 研究目的

種々の kinase cascade は、RA の病態形成に必須である。私たちは滑膜線維芽細胞のアポトーシス感受性が kinase 活性化・不活化により制御されることを報告してきており、特に Akt はこれら細胞のアポトーシスの制御に重要であることがわかった。Calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) は Akt の上位 kinase の可能性があり、今回、CaMKII と滑膜線維芽細胞のアポトーシスについて検討した。

B. 研究方法

CIA マウスでの検討

CIA マウスの関節局所の Akt と CaMKII 発現は免疫組織学的に検討した。Akt は Ser473 のリン酸化抗体を、CaMKII はリン酸化の有無に関わらずに認識する抗体を使用した。

ヒト培養滑膜線維芽細胞での検討

滑膜線維芽細胞の Akt と CaMKII はウエスタンブロットで評価した。滑膜線維芽細胞の Fas 依存性アポトーシスは抗 Fas 抗体で、また、TRAIL 依存性アポトーシスは rTRAIL で誘導し、ミトコンドリア膜電位の低下で定量した。CaMKII の chemical inhibitor として KN93 を用い、CaMKII の滑膜線維芽細胞アポトーシスへの関与を評価した。

(倫理面への配慮)

培養滑膜線維芽細胞は文書で同意が取得されている手術症例から単離培養し、個人情報 は匿名化により保護されている。

C. 研究結果

CIA マウスでの検討

1. CIA マウス関節局所では PCNA 陽性細胞数

は多いが TUNEL 陽性細胞数は少なく、ヒト RA 類似の病態が検出された。

2. CIA マウス関節局所では、多くの細胞がリン酸化 Akt と CaMKII が陽性で、共焦点で merge 像が認められた。

ヒト培養滑膜線維芽細胞での検討

1. 培養滑膜線維芽細胞には、Akt と CaMKII の発現がみとめられた。

2. 滑膜線維芽細胞には Fas 依存性アポトーシスおよび TRAIL 依存性アポトーシスが誘導されたが、これらアポトーシスは CaMKII chemical inhibitor の KN93 により顕著に増大した (図 1 と図 2)。

図 1 CaMKII阻害剤 KN93による滑膜線維芽細胞の Fas依存性アポトーシスの増強

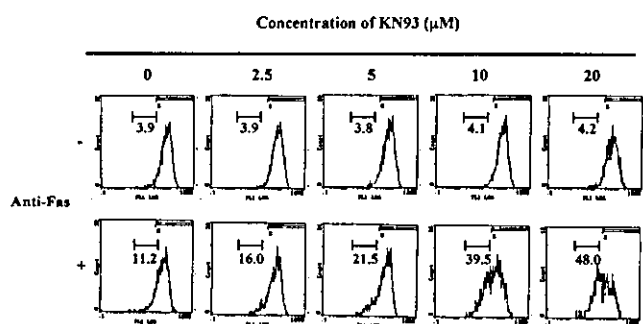
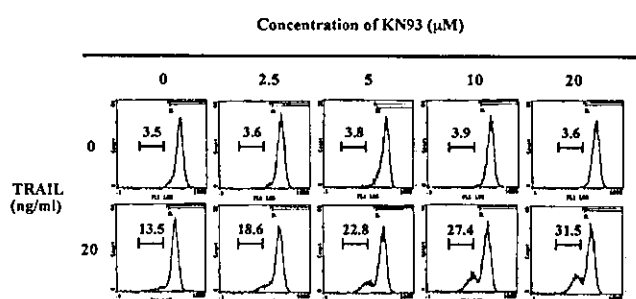


図 2 CaMKII阻害剤 KN93による滑膜線維芽細胞の TRAIL依存性アポトーシスの増強



D. 考察

CIA および培養滑膜線維芽細胞を用いたデータより、滑膜増殖における CaMKII の関与が示唆された。私たちは Akt 活性化阻害により滑膜線維芽細胞アポトーシス感受性が亢進す

ることを見いだしており、今回のデータは CaMKII と Akt の関与を示唆するものと考え

E. 結論

CIA と培養滑膜線維芽細胞を用いた検討から、CaMKII は Akt 活性化を制御し、滑膜増殖をコントロールしていることが考えられた。CaMKII は RA 治療の新たなターゲット分子の可能性があり、今後は RNAi や dominant negative transformants などを用いて、より詳細な機序の検討を考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tamai M, Kawakami A (2番目、他12名) Significant inhibition of TRAIL-mediated fibroblast-like synovial cell apoptosis by IFN- γ through JAK/STAT pathway by translational regulation. 論文投稿中

2. Tanaka F, Kawakami A (2番目、他11名) IFN- γ /JAK/STAT pathway-induced inhibition of DR4 and DR5 expression on endothelial cells is cancelled by cycloheximide-sensitive mechanism: Noble finding of cycloheximide to regulate death receptor expression. Int J Mol Med, in press.

3. Miyashita T, Kawakami A (2番目、他10名) Osteoprotegerin (OPG) acts as an endogenous decoy receptor in tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis of fibroblast-like synovial cells. Clin Exp Immunol 137: 430-436, 2004.

4. Migita K, Kawakami A (8番目、他10名) Suppressive effect of leflunomide metabolite (A77 1726) on metalloproteinase production in IL-1 β stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. Clin Exp Immunol. 137: 612-616, 2004.

5. Hida A, Kawakami A (2番目、他12名) Nitric

oxide acts on the mitochondria and protects human endothelial cells from apoptosis. *J Lab Clin Med* 144: 148-155, 2004.

6. Ida H, Kawakami A (10番目、他10名) A novel mutation (T61I) in the gene encoding tumour necrosis factor receptor superfamily 1A (TNFRSF1A) in a Japanese patient with tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome (TRAPS) associated with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 43: 1292-1299, 2004 Oct;43: 1292-9.

7. Ishida Y, Kawakami A (6番目、他4名) The role of IL-18 in the modulation of matrix metalloproteinases and migration of human natural killer (NK) cells. *FEBS Lett* 569: 156-160, 2004.

8. 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: 1671-1679, 2004.

9. Yamasaki S, Kawakami A (3番目、他7名) Cytokines regulate fibroblast-like synovial cell differentiation to adipocyte-like cells. *Rheumatology* 43: 448-452, 2004.

10. Kawakami A (筆頭著者、他14名) Anti-apoptogenic function of TGFbeta1 for human synovial cells: TGFbeta1 protects cultured synovial cells from mitochondrial perturbation induced by several apoptogenic stimuli. *Ann Rheum Dis* 63: 95-97, 2004.

11. 川上 純 (筆頭著者、他4名) TRAIL 欠損マウスにおける自己免疫疾患の発症 臨床免疫 41: 73-77, 2004.

12. 川上 純 (筆頭著者、他4名) 関節リウマチの成因と病態生理 概論的事項 病態形成とアポトーシス 日本臨床 63: 100-105, 2005.

2. 学会発表

1. 川上 純 (筆頭演者、他4名) 滑膜細胞における TRAIL を介したアポトーシス誘導の分子機序: サイトカイン成長因子による修飾 第48回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p93, 2004.

2. 川上 純 (筆頭演者、他14名) PDGF による滑膜細胞 TRAIL 依存症アポトーシスの

制御 第48回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p159, 2004.

3. 田中史子、川上 純 (2番目、他13名) 血管内皮細胞の TRAIL 依存症アポトーシスへの IFN gamma の作用機序 第48回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p174, 2004.

4. 川上 純 (筆頭演者、他14名) シェーグレン症候群唾液腺組織における Toll-like receptors (TLRs) 発現の検討 第48回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p199, 2004.

5. 玉井慎美、川上 純 (2番目、他13名) IFN gamma による滑膜細胞 TRAIL 依存症アポトーシス制御機序の検討 第48回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p279, 2004.

6. 宮下賜一郎、川上 純 (2番目、他10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48回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p280, 2004.

7. 玉井慎美、川上 純 (2番目、他10名) IFN gamma による滑膜細胞 TRAIL 依存症アポトーシス制御機序の検討 日本臨床免疫学会会誌 27: p256, 2004.

8. 川上 純 (筆頭演者、他13名) シェーグレン症候群唾液腺組織における Toll-like receptors (TLRs) 発現の検討 日本臨床免疫学会会誌 27: p248, 2004.

9. 田中史子、川上 純 (2番目、他11名) IFN γ による滑膜細胞 TRAIL 依存症アポトーシス制御機序の検討 日本免疫学会総会・学術集会記録 p247, 2004.

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

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

ヒト末梢血単球サブセットによる破骨細胞への分化能の比較検討

分担研究者 南木敏宏 東京医科歯科大学 膠原病・リウマチ内科学 助手

研究要旨

関節リウマチ(RA)でみられる骨破壊に關与する破骨細胞は、末梢血単球が局所に遊走し破骨細胞に分化していることが推測されている。本研究では、破骨細胞に分化する末梢血単球を同定し、そのケモカインに対する遊走能を解明することを目的とした。末梢血単球は CD16 の発現の有無により 2 つのサブセットに分けられる。RANKL または TNF- α +M-CSF 刺激において CD16 陰性の単球が破骨細胞に分化した。またケモカインに対する遊走能にも 2 つのサブセットにおいて違いがみられた。CD16 陰性単球の遊走に關与するケモカインを阻害することにより RA 骨破壊が抑制しうると考えられた。

A.研究目的

関節リウマチ(RA)患者では、病気の進行に伴い骨破壊の進行がみられ、それにより関節機能の低下をきたしてくる。骨破壊は局所の破骨細胞活性化によると考えられるが、その破骨細胞は末梢血単球がケモカインによりリクルートされ破骨細胞に分化していると推測されている。しかし、破骨細胞に分化する末梢血単球についての詳細な解明はされていない。そこで、本研究では破骨細胞へ分化する単球サブセットを同定し、そのケモカインに対する遊走能を解明することを目的とする。また、本研究結果により、破骨細胞に分化しうる単球の遊走を阻害することにより骨破壊を抑制する新たな治療法の開発に結びつくことが期待される。

B.研究方法

ヒト末梢血より単核球を分離し、マイクロビーズを用いて、CD16 陽性単球、CD16 陰性単球を単離する。単離した各単球サブセットを RANKL+M-CSF, TNF- α +M-CSF で刺激培養し、破骨細胞を誘導する。7 日間培養後に、TRAP 染色を施行し、多核で TRAP 染色陽性の細胞を破骨細胞と同定した。また

骨吸収能はリン酸カルシウム付着プレートを用いて評価した。破骨細胞分化に關与する分子の mRNA 発現を半定量 PCR にて解析した。

各単球サブセットを RANKL+M-CSF にて刺激し、培養上清中の TNF- α , IL-6 の産生を ELISA にて解析した。また、各単球サブセットの各種ケモカインに対する走化性を chemotaxis chamber を用いて解析した。

RA 滑膜組織を CD68 および CD16 にて蛍光二重染色を施行した。

(倫理面への配慮)

RA 滑膜組織は、研究目的などを説明の上、患者より了承を得て使用した。また、本研究は東京医科歯科大学医学部倫理審査委員会にて承認されている。

C.研究結果

CD16 陽性、CD16 陰性の各単球サブセットを M-CSF+RANKL または TNF- α で刺激し、分化した破骨細胞数を比較した。いずれの条件下でも CD16 陰性のサブセットから破骨細胞が有意に多く形成された (図 1)。リン酸カルシウム付着プレート上で培養し、骨吸収能を解析したが、同様に CD16 陰性サブ

セットのみ骨吸収が認められた。破骨細胞分化への関連が報告されているRANK, TRAF6, TREM2, c-fos, c-fms, NFATc, SIRP1- β , DAP12, FcR γ の mRNA 発現を半定量 PCR 法にて比較したが、両サブセット間で明らかな差は認めなかった。

各単球サブセットを RANKL+M-CSF で刺激し、TNF- α , IL-6 の産生を ELISA にて測定した。CD16 陽性単球は CD16 陰性単球と比較して TNF- α , IL-6 とともにその産生能が高く、RANKL 刺激によりそれらの産生が亢進した (図 2)。

また、各種ケモカインに対する遊走能を解析したところ、CD16 陰性単球は MCP-1、MIP-1 α に対して高い遊走能を示し、SDF-1、RANTES、FKN に対しても遊走能がみられた (図 3)。一方、CD16 陽性サブセットは FKN に対してのみ遊走能を認めた。

RA 滑膜組織を CD68 および CD16 で二重染色したところ、一部の CD68 陽性マクロファージにおいて CD16 の発現がみられた。

D. 考察

末梢血単球は、CD16 の発現の有無により、2 つのサブセットに分けられ、その機能の違いに近年注目されている。本研究結果により、CD16 陰性サブセットが破骨細胞に分化しうると考えられた。しかしながら、破骨細胞分化に関連が報告されている分子の発現に有意な違いは見いだせず、破骨細胞への分化能の違いについての分子学的機序の解明はできなかった。

一方、破骨細胞への分化誘導と同様の RANKL+M-CSF 刺激において、CD16 陽性細胞からは TNF- α , IL-6 の産生の亢進がみられた。これらのことより、RA 滑膜組織へ浸潤した単球のうち、CD16 陰性サブセットは破骨細胞に分化しうると考えられ、CD16 陽性細胞は炎症性サイトカイン産生により RA の病態形成に関与していることが推測される。実際に、RA 滑膜組織には CD16 陽性、CD16 陰性両方のマクロファージの存在が認

められた。

また、両単球サブセットはケモカインに対する反応性にも違いが認められた。RA 滑膜組織で発現が報告されている MCP-1、MIP-1 α などのケモカインは破骨細胞に分化しうる CD16 陰性単球の遊走に関与している可能性があり、破骨細胞による骨破壊抑制の治療ターゲットとなることが期待される。

E. 結論

ヒト末梢血単球 CD16 陰性サブセットはケモカインに反応して滑膜組織に遊走し、破骨細胞に分化すると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

* Ayako Arai, Aishun Jin, Weihua Yan, Daisuke Mizuchi, Koh Yamamoto, Toshihiro Nanki, Osamu Miura. SDF-1 synergistically enhances IL-3-induced activation of the Raf-1/MEK/Erk signaling pathway through activation of Rac and its effector Pak kinases to promote hematopoiesis and chemotaxis. *Cell. Signal.* 17(4): 497-506, 2005.

* Toshihiro Nanki, Yasuyo Urasaki, Toshio Imai, Miyuki Nishimura, Kenzo Muramoto, Tetsuo Kubota, Nobuyuki Miyasaka. Inhibition of fractalkine ameliorates murine collagen-induced arthritis. *J. Immunol.* 173(11): 7010-7016, 2004.

* Junko Nishio, Mihoko Suzuki, Toshihiro Nanki, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka. Development of TCRB CDR3 length repertoire of human T lymphocytes. *Int. Immunol.* 16(3): 423-431, 2004.

2. 学会発表

* 駒野有希子、南木敏宏、宮坂信之。ヒト末梢血単球サブセットによる破骨細胞への分化能の比較検討。第 34 回日本免疫学会総会。2004.

* Tetsuo Kubota, Kyoko Wakamatsu, Toshihiro Nanki, Nobuyuki Miyasaka, Kazuo Umezawa. A Small Molecule NF- κ B Inhibitor Suppresses Inflammatory and Destructive Activities of Synovial Cells in Rheumatoid Arthritis. 第 68 回アメリカリウマチ学会。2004.

* Kazuki Takada, Toshihiro Nanki, Kenji Hayashida, Ken Taniguchi, Nobuyuki Miyasaka. Chemokine Receptor Expression on the Peripheral Blood and Synovial B Cells in Rheumatoid Arthritis Patients. 第 68 回アメリカリウマチ学会。2004.

* Hermann Girschick, Toshihiro Nanki, Henner Morbach, Sunit Singh. Differential Expression of Chemokines in Synovial Cells Infected with Different *Borrelia burgdorferi* Isolates. ヨーロッパリウマチ学会。2004.

* Hermann Girschick, Toshihiro Nanki, Claudius Faber, Verena Baar, Sunit Singh. Differential Expression of Matrix Metalloproteinases and Cyclooxygenases in Synovial Cells Infected by *Borrelia burgdorferi*. ヨーロッパリウマチ学会。2004.

* 若松恭子、窪田哲朗、南木敏宏、宮坂信之、梅澤一夫。NF- κ B 阻害剤による関節リウマチ滑膜細胞活性化の抑制。第 25 回日本炎症・再生医学会。2004.

* 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 25 回日本炎症・再生医学会。2004.

* 鈴木文仁、南木敏宏、上阪等、宮坂信之。筋炎モデルマウスにおける筋炎症部位への細

胞浸潤に関与するケモカインの解析。第 25 回日本炎症・再生医学会。2004.

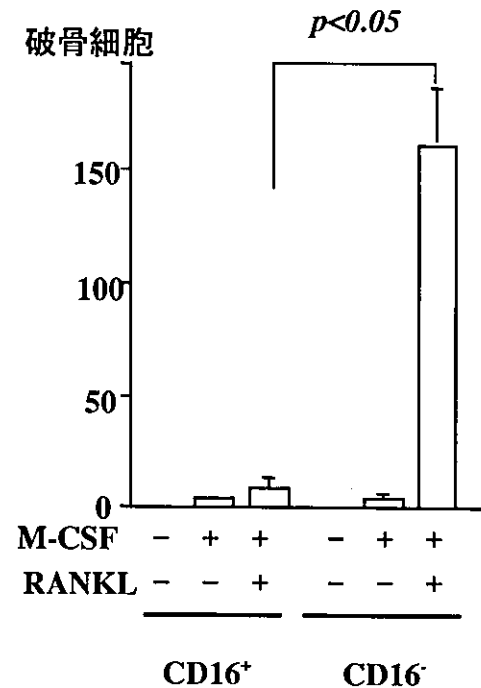
* 高田和生、南木敏宏、林田賢治、谷口顕、宮坂信之。関節リウマチ滑膜への B 細胞浸潤に関与するケモカインレセプターの解析。第 48 回日本リウマチ学会総会。2004.

* 鈴木文仁、南木敏宏、上阪等、宮坂信之。筋炎モデルマウスにおける筋炎症部位への細胞浸潤に関与するケモカインの解析。第 48 回日本リウマチ学会総会。2004.

* 若松恭子、南木敏宏、宮坂信之、窪田哲朗。NF- κ B 阻害剤の関節リウマチ治療への応用に関する基礎的検討。第 48 回日本リウマチ学会総会。2004.

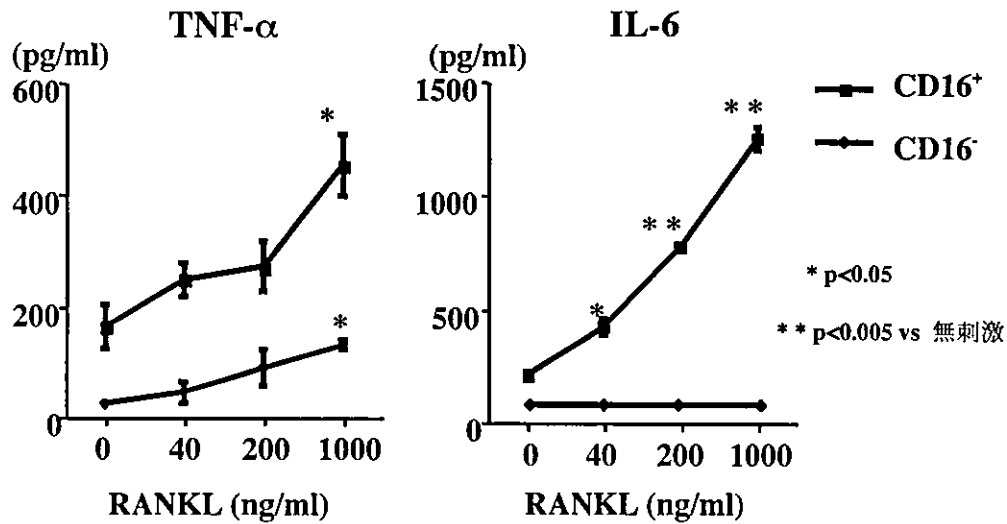
H.知的財産権の出願・登録状況
特になし。

図 1 末梢血単球サブセットによる破骨細胞分化の比較



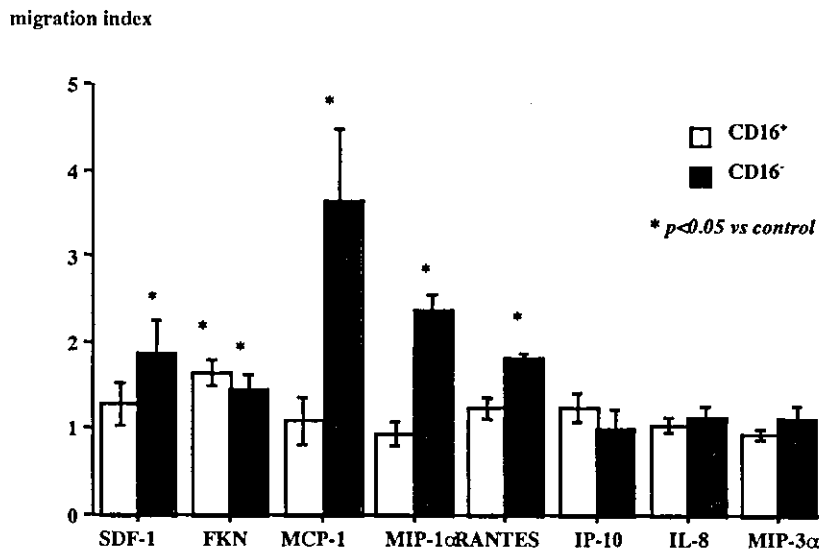
末梢血単球を CD16 陽性、陰性に単離後、RANKL+M-CSF 刺激し、形成した破骨細胞数を比較。

図2 末梢血単球サブセットによるサイトカイン産生の比較



末梢血 CD16 陽性、陰性単球を RANKL+M-CSF で刺激し、TNF- α 、IL-6 の産生を ELISA にて解析。

図3 末梢血単球サブセットによる各種ケモカインに対する遊走能の比較



末梢血 CD16 陽性、陰性単球を各種ケモカインにて migration assay を施行。

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表