

antibody is a target of autoimmunity  
in rheumatoid arthritis. Biochem  
Biophys Res Commun. 333:418-426,  
2005.

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

## 抗リウマチ薬の薬理遺伝学に関する研究

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

抗リウマチ薬は関節リウマチ薬物治療において中心的な役割を担っている。しかし、その効果や副作用の発現には個体差が大きい。この原因のひとつとして個人の薬物代謝酵素遺伝子の違いが考えられる。我々は以前、methotrexate (MTX) の投与量あるいは副作用の発現に methylenetetrahydrofolate reductase 遺伝子多型が、sulfasalazine (SSZ) の副作用発現に N-acetyltransferase-2 遺伝子多型が関与することを報告した。今回、異なる対象症例においてこれらの結果の再現性を検討したところ、同様の結果が得られた。したがって、これらの結果は RA 患者の MTX あるいは SSZ を用いた治療に応用可能であると考えられた。

### A. 研究目的

抗リウマチ薬は関節リウマチ (RA) 薬物治療において中心的な役割を担っている。しかし、その効果や副作用の発現に個体差が大きいことが治療上の問題点であるとされている。抗リウマチ薬のなかには、その作用点や薬物代謝経路が明らかな薬物がある。このような薬物においては効果や副作用発現の予測に薬理遺伝学的アプローチが可能である。今日、最もよく使われる抗リウマチ薬である methotrexate (MTX) は dihydrofolate reductase の競合阻害薬であるが、RA における作用機序はいまだに明らかではない。しかし、臨床的に葉酸あるいは folinic acid の投与により MTX の効果あるいは副作用が減少することが知られている。したがって、RA における MTX の作用機序の少なくとも一部には葉酸代謝が関与していると考えられる。

Methylenetetrahydrofolate reductase

(MTHFR) は葉酸代謝経路の主要な酵素であり、アミノ酸置換を伴う single nucleotide polymorphism (SNP) として、C677T、A1298C 多型が知られている。677C>T、1298A>C により

酵素活性が低下することがすでに報告されている。我々はこの点に着目し、MTHFR 遺伝子多型と MTX の効果・副作用との関連を検討してきた。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 アレルを有する症例で副作用の頻度が有意に高いこと、A1298C 多型の C アレルを有する症例では MTX5mg/週で開始後一定期間内に増量される症例数が有意に少ないことを報告した (Urano W, et al: Pharmacogenetics 2002;12:183)。Sulfasalazine (SSZ) は MTX と同様に使用頻度の高い抗リウマチ薬であり、N-acetyltransferase-2 (NAT2) でアセチル化され、代謝される。NAT2 には rapid acetylator と slow acetylator という 2 つの表現型があり、これは NAT2 遺伝子の複数の多型に起因している。すなわち、複数の多型から構成されるハプロタイプには野生型 (NAT2\*4) と多数の種類の変異型ハプロタイプがあるが、一般に NAT2\*4 を含むディプロタイプ形は rapid acetylator、NAT2\*4 を含まないディプロタイプ形は slow acetylator と考えられる。教室の Tanaka らは NAT2 遺伝子のディプロタイプ

形が SSZ の副作用発現に関係していることを報告している (Tanaka E, et al: J Rheumatol 2002;29:12)。

これらの結果は MTX や SSZ の投与に薬理遺伝学的アプローチが有効である可能性を示唆する。しかし、実際にこれらの結果を臨床応用にあたっては、結果の再現性を確認する必要がある。そこで、今回我々は以下の2点について各々の以前の報告とは異なる症例において再現性を確認する研究を行った。

1. MTX の効果 (投与量) ・副作用発現と MTHFR 遺伝子多型の関連
2. NAT2 ディプロタイプ形と SSZ 副作用発現の関連

## 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中の RA 患者 384 例を対象とした。

### 2. 方法

対象患者のなかで MTX 投与歴のある 209 例において、MTX 週 6mg 以下で開始された症例における 12 ヶ月後の増量の有無および MTX 総投与量 300mg 以内に生じた副作用と、MTHFR 遺伝子 C677T・A1298C 多型との関連を検討した。また、SSZ 投与歴のある 186 例で SSZ の副作用と NAT2 ディプロタイプ形との関連を検討した。副作用については臨床記録から MTX あるいは SSZ による副作用を抽出した。MTX による肝機能異常については、ALT 45 IU/l を超える場合を肝機能異常ありとした。

対象患者の末梢血からゲノム DNA を抽出した。MTHFR 遺伝子 C677T、A1298C 多型のタイピングには TaqMan 法 (Applied Biosystems) を用いた。また、NAT2 遺伝子の多型のなかから 4 種を選択し、TaqMan 法でタイピングを行った。得られた結果と表現型を PENHAPLO (Ito T, et al: Genetics. 2004;168:2339) を用いて解析し、ディプロタイプ形と表現型の関連について検討した。

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

1) MTX 週 6mg 以下で開始され、12 か月以上経過した症例は 159 例であった。このなかで、12 ヶ月後の MTX 投与量が週 6mg を超えていた症例は 95 例 (high dose group)、6mg 以下であった症例は 64 例 (low dose group) であった。MTHFR 遺伝子 A1298C 多型において、AA あるいは AC を持つ症例は有意に high dose group に多く ( $P=0.008$ ,  $RR=1.84$ , 95%CI 1.12-3.01)、gene dose effect が認められた。C677T 多型では関連性は認められなかった。

2) MTX 総投与量 300mg を超えた症例は 170 例であった。既存の肝疾患を有する症例 (慢性ウイルス性肝炎など) を除いた 156 例を用いて副作用と遺伝子型との関連を検討した。MTX 総投与量 300mg 以内に副作用が生じた症例は 43 例であった。C677T 多型の CT あるいは TT を有する症例群は CC を有する症例群に比し副作用が生じた症例が有意に多かった ( $P=0.006$ ,  $RR=2.2$ , 95% CI = 1.20-4.02)。また、副作用の中で肝機能異常 ( $GPT>45IU/l$ ) を認めた症例も CT あるいは TT 群で有意に多く、gene dose effect も認められた。A1298C 多型との関連は認められなかった。

3) SSZ 投与症例において SSZ による副作用は 33 例に認められた。ハプロタイプ解析では野生型ハプロタイプ (W) である NAT2\*4、変異型ハプロタイプ (M) である NAT2\*5B、NAT2\*5E、NAT2\*6A、NAT2\*7B、NAT2\*13 が認められた。Slow acetylator と関連する MM ディプロタイプ形を有する症例群は、rapid acetylator と関連する WW あるいは WM ディプロタイプ形を有する症例群に比し、有意に副作用発現が高かった ( $P=0.001$ ,  $RR=3.31$ , 95% CI=1.76-6.22)。また、副作用の中でも特に重症と考えられる 3 症例のうち 2 症例が MM ディプロタイプ形であり、重症副作用も有意に MM ディプロタイプ形を有する症例に多いことが

示された (P=0.015, RR=24.6, 95%CI 2.37-254.53)。

#### D. 考察

今回の検討により MTX の投与量増加と *MTHFR* 遺伝子 A1298C 多型、MTX の副作用発現と C677T 多型、*NAT2* 遺伝子ディプロタイプ形と SSZ 副作用発現の関連が validate された。このように、今回の研究では異なる対象群において、前回の結果が確認された。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に重要であると考えられる。また、*MTHFR* 遺伝子と MTX の反応性との関連については gene dose effect が認められているが、これは薬理遺伝学的データの臨床応用を容易にする要因になりうると思われる。さらに、*NAT2* 遺伝子ディプロタイプ形については SSZ の重症副作用とも関連しており、臨床的にも有用であると考えられた。

#### E. 結論

*MTHFR* 遺伝子 C677T 多型・A1298C 多型と MTX の副作用発現・投与量、*NAT2* 遺伝子ディプロタイプ形と SSZ 副作用発現の関連が validate された。これらの結果は、MTX あるいは SSZ による治療において、遺伝情報に基づき表現型を予測するアルゴリズムを構築することにより、テーラーメイド医療に応用することが可能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

・谷口敦夫、鎌谷直之 テーラーメイド医療とゲノム創薬 日本臨牀 63 (増刊号1)、686-690, 2005

##### 2. 学会発表

・Taniguchi A, Urano W, Yamanaka M, Tanaka E, Yamanaka H, Kamatani N: Validation of the association between the C677T polymorphism of the *MTHFR* gene and methotrexate related adverse effects in patients with rheumatoid arthritis. *Modern Rheumatology* 15(suppl):S138, 2005 (第49回日本リウマチ学会、2005年4月18日)

・谷口敦夫、浦野和子、降籟志おり、山中麻里子、田中栄一、山中寿、鎌谷直之: RA へのオーダーメイド医療の導入をめざして 第50回日本人類遺伝学会、2005年9月21日

・Taniguchi A, Furihata S, Urano W, Yamanaka M, Tanaka E, Yanamaka H, Kamatani N: Validation of pharmacogenetic data necessary to put personalized medicine into practice in rheumatoid arthritis. 55th Annual meeting of American Society of Human Genetics 2005. 10. 27

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 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

関節リウマチ（RA）患者におけるメトトレキサート（MTX）の CD4 陽性 T 細胞上の Signaling Lymphocytic Activation Molecule (SLAM) 発現とサイトカイン産生に対する影響に関する研究に関する研究

分担研究者 深沢 徹  
順天堂大学医学部膠原病内科 講師

研究要旨

本研究は、CD4 陽性 T 細胞において Th1 型サイトカインである IFN- $\gamma$  産生調節に関与している SLAM に着目し、MTX の影響について検討し、その作用機序の一斑を明らかにしている。結果として、MTX は SLAM 陽性 CD4 陽性 T 細胞の Th1 型サイトカインである IFN- $\gamma$  と Th2 型サイトカインである IL-4 発現を均衡なバランスで抑制した。今までに、MTX が作用する CD4 陽性 T 細胞のフェノタイプを解析した報告はなく、サイトカイン産生抑制機序も不明であった。RA 患者において活性化 CD4 陽性 T 細胞上の SLAM を経て末梢血中 IFN- $\gamma$  及び IL-4 の産生を抑制している可能性が始めて明らかになった。

A. 研究目的

RA では Th1/Th2 サイトカインバランスがその病態に関与していると考えられている。SLAM は Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$  の産生の調節に関与していることが知られている。本研究では、RA 患者の CD4 陽性 T 細胞上の SLAM 発現およびサイトカイン産生における MTX の影響について検討した。

B. 研究方法

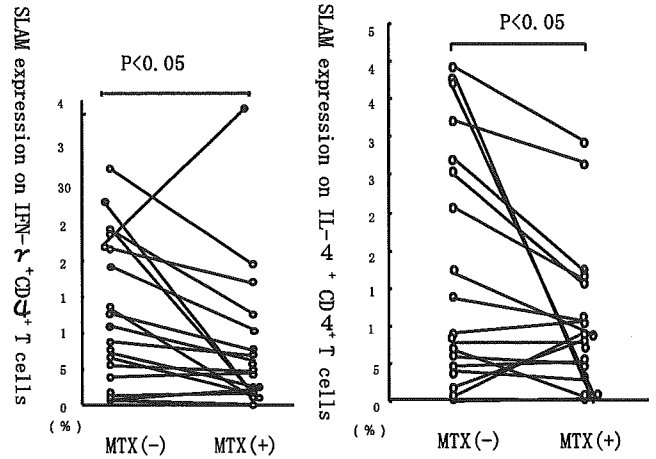
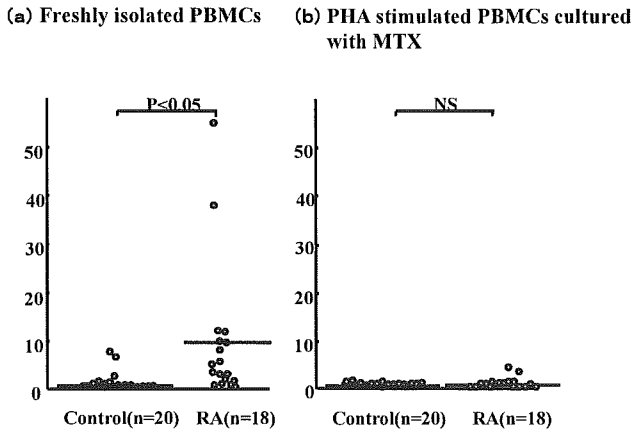
対象は RA 患者 18 例（女性 14 例、男性 4 例、38-70 歳：平均 57.9 歳）で、全例 MTX の治療歴はなく、プレドニゾロン 5mg/日以下、他の抗リウマチ剤の併用可の症例とした。方法は、RA 患者 18 例、健常人 20 例の末梢血単核球を PHA で刺激後、MTX 存在下 (0.01  $\mu$ M) または非存在下で 48 時間培養し、培養前後の細胞内及び、細胞表面上の SLAM 発現を、フローサイトメトリーを用いて解析した。細胞内 IFN- $\gamma$ 、IL-4 の発現量の解析の場合には培養 40 時間後に Brefeldin A (1  $\mu$ g/ml) を添加した。

| Characteristics                                       | n=18            |
|---|-----------------|
| Demographics  |                 |
| Age, mean $\pm$ SD years                              | 57.9 $\pm$ 11.8 |
| Sex, male. n/ female. n                               | 4/ 14           |
| Clinical  |                 |
| Disease duration, mean $\pm$ SD years                 | 7.7 $\pm$ 6.4   |
| Morning stiffness, mean $\pm$ SD minutes              | 34.7 $\pm$ 45.8 |
| Number of swelling joints, mean $\pm$ SD              | 9.6 $\pm$ 12.5  |
| Number of tender joint counts, mean $\pm$ SD          | 32.3 $\pm$ 26.9 |
| Laboratory  |                 |
| Erythrocyte sedimentation rate, mean $\pm$ SD mm/hour | 31.1 $\pm$ 15.4 |
| C-reactive protein, mean $\pm$ SD mg/dl               | 1.43 $\pm$ 1.8  |
| Rheumatoid factor positivity, n                       | 10              |
| Concurrent therapy                                    |                 |
| DMARDs*   |                 |
| Auranofin, n  | 1               |
| Bucilamine, n   | 3               |
| Sulfasalazine, n                                      | 10              |
| Actarit, n  | 2               |
| Gold, n   | 1               |
| Dose of predonisone, mg/day **                        | 0~5             |
| Nonsteroidal anti inflammatory drugs, n               | 8               |

C. 研究結果

①培養前の細胞内 IFN- $\gamma$ 、IL-4 の発現および IFN- $\gamma$ /IL-4 比は健常人と比較して RA 患者において有意に高かった。

IFN- $\gamma$ /IL-4 ratio(%)

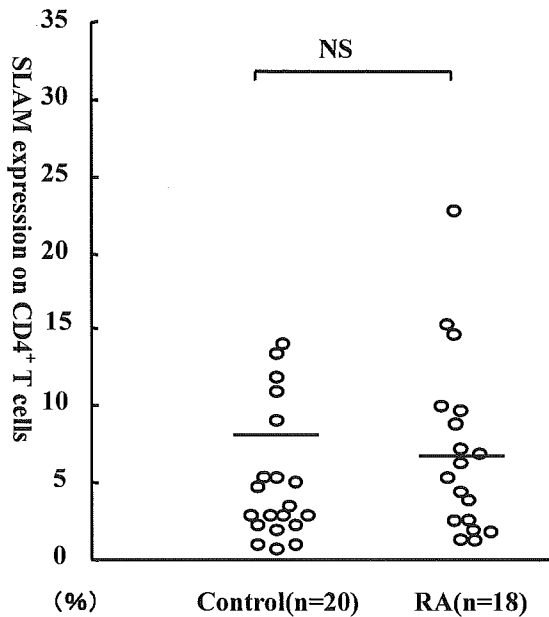


②RA 患者において MTX 存在下で細胞内 IFN- $\gamma$ , IL-4 の発現は低下した。また IFN- $\gamma$ , IL-4 の発現低下は葉酸誘導体 (folinic acid) の添加によって回復した。③培養前の CD4 陽性 T 細胞上の SLAM 発現量は健常人と RA 患者で有意差を認めなかった。

⑤IFN- $\gamma$  /IL-4 比を培養前後で比較した結果は病期や病態に関連を認めなかった。

D. 考察

MTX は RA 患者の治療に頻用されているが、その作用点は解明されていない。近年、MTX が Th1/Th2 バランスを是正することにより、その作用を発現するという報告がある。本研究の結果から MTX は SLAM を介し、サイトカイン産生経路に作用している可能性がある。ただし、SLAM は細胞の活性化に伴い発現が増強されることから、本研究で認められた SLAM 発現における MTX の効果が T 細胞の活性化抑制によるものか、SLAM 特異的なものかを今後説明する必要がある。



E. 結論

RA 患者において MTX は活性化 CD4 陽性 T 細胞上の SLAM を経て末梢血中 IFN- $\gamma$  及び IL-4 の産生を抑制している可能性が示唆された。

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

Morita Y, Fukazawa T, Hirashima M, Kaga K, Kusaoi M, Morita T, Touyama S, Morita K, Takasaki Y, Hashimoto H : The effect of

④RA 患者において SLAM 陽性 CD4 陽性 T 細胞質内 IFN- $\gamma$  及び、SLAM 陽性 CD4 陽性 T 細胞質内 IL-4 の発現量は有意に MTX 存在下で低下した。

methotrexate(MTX) on expression of signaling lymphocytic activation molecule(SLAM) in patients with rheumatoid arthritis(RA) and its role in regulation of cytokine production. (Scan J Immunol in press)

2. 学会発表

特記すべき事なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

特記すべき事なし

2. 実用新案登録

特記すべき事なし

その他

特記すべき事なし

## 当科における RA 患者での 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

Infliximab を使用し、30 週を経過した 19 例の RA 患者を評価した。30 週での ACR コアセットは、無効:9 例、20:4 例、50:3 例、70:3 例であった。有効例 6 例 (ACR50 以上を達成) を有効群とし、無効 9 例のうち主治医による改善度評価の低い方からの 6 例を無効群とした。この有効群、無効群で、1) 0 週、2 週の臨床所見を比較した。2) 末梢血単核球中 TNF  $\alpha$ 、TTP、TIA-1、HuR の遺伝子発現を定量 PCR 法にて測定した。3) ELISA を用いて血中抗 GPI 抗体を測定した。有効群は、0 週で、赤沈、血清 IgG が低く、初回投与の反応性がよかった。有効群は、0 週での HuR が低く、TIA-1/HuR が高かった。抗 GPI 抗体は、無効群 1 例でのみ陽性であった。0 週で、赤沈、IgG が低く、初回投与の反応性のよい患者で、30 週後の有効性が高いことが明らかとなった。

### 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 が使用され、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の有効性も報告されていることから、治療反応性の予測は、経済的な観点、関節破壊を防ぐという観点から重要である。我々は治療前の臨床像、初回投与の反応性などで有効性が予測可能か検討した。

### B. 研究方法

Infliximab を使用し、30 週を経過した 19 例 (男性 8 例、女性 11 例、 $51.4 \pm 12.3$  歳) の RA 患者を評価した。30 週での ACR コアセットは、無効:9 例、20:4 例、50:3 例、70:3 例であった。有効例 6 例 (男性 4 例、女性 2 例、ACR50 以上を達成) を有効群とし、無効 9

例のうち主治医による改善度評価の低い方からの 6 例 (男性 2 例、女性 4 例) を無効群とした。この有効群、無効群で、1) 0 週、2 週の臨床所見を比較した。2) 末梢血単核球中 TNF  $\alpha$ 、および TNF- $\alpha$  mRNA の AU-rich element に結合し、それぞれ mRNA の分解促進、翻訳の抑制、安定化に働く tristetraprolin (TTP)、T-cell intracellular antigen-1 (TIA-1)、Hu antigen R (HuR) の遺伝子発現を定量 PCR 法にて測定した。3) ELISA を用いて血中抗 glucose-6-phosphate isomerase (GPI) 抗体を測定した。抗 GPI 抗体は、ヒト GPI 抗原、ラビット GPI 抗原を用いた系の両方で陽性のものを、真の陽性と判断した。

(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) 有効群と無効群の間で、年齢、罹病期間、SteinbrockerのStage、Class、プレドニゾン、メトトレキサートの内服量に差はなかった。

表1 有効群、無効群のInfliximab 投与前背景

|                | 有効群<br>6例 (M 4, F 2) | 無効群<br>6例 (M 3, F 3) |    |
|----------------|----------------------|----------------------|----|
| 年齢 (歳)         | 54.3 ± 9.5           | 49.2 ± 12.2          | ns |
| 罹病期間 (年)       | 14.6 ± 5.6           | 8.5 ± 7.8            | ns |
| Stage          | 2.8 ± 1.0            | 2.9 ± 1.0            | ns |
| Class          | 1.8 ± 0.8            | 2.0 ± 1.3            | ns |
| PSL量 (mg/day)  | 7.1 ± 5.1            | 9.4 ± 5.1            | ns |
| MTX量 (mg/week) | 7.7 ± 1.5            | 8.7 ± 2.1            | ns |

関節加算点数、CRPの動きを図1, 2に示す。

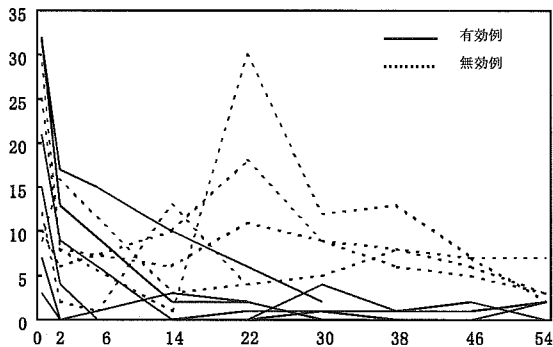


図1 関節点数の推移

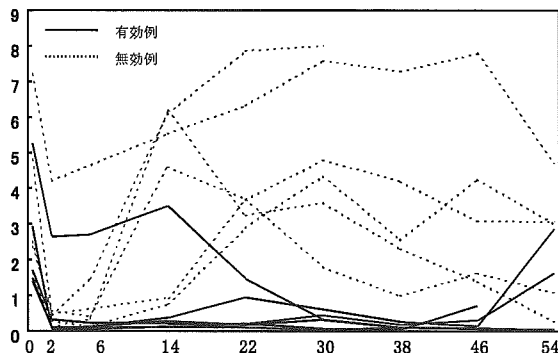


図2 CRPの推移

2) 0週で、有効群は、無効群に比べ、赤沈、血清IgG(図3)が有意に低かった(33.0±20.0

vs 66.0±23.1、919.7±272.3 vs 1463.0±210.5)。

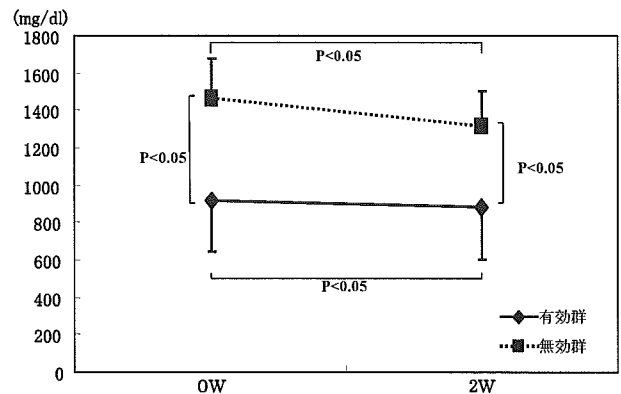


図3 0週、2週における有効群、無効群でのIgGの比較

3) 無効群は、血清IgGが高かったが、1例でのみ、抗SS-A抗体が陽性で、シェーグレン症候群の合併が疑われた。3) 2週後、両群とも医師評価(有効群 46.3±9.5 から 25.3±11.1、無効群 38.8±10.8 から 20.0±7.9)とCRP(有効群 2.61±1.47 から 0.55±1.03、無効群 3.36±2.22 から 1.01±1.58)が改善していた。しかし、腫脹関節数(11.7±7.3 から 7.2±7.0)、圧痛関節痛(16.5±7.5 から 6.3±2.7)、関節加算点数(18.3±12.3 から 7.2±7.0、図4)、MMP-3(404.7±233.7 から 168.3±91.7)、HAQ(1.21±0.68 から 0.69±0.79)、患者全般評価(52.2±14.0 から 25.1±15.6)は有効群でのみ改善していた。

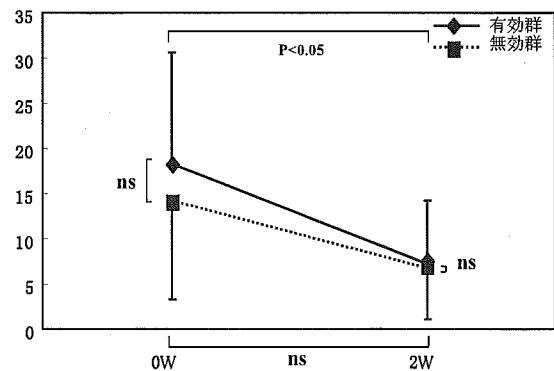


図4 0週、2週における有効群、無効群での関節点数の比較

4) 有効群は、0週でのHuRが低く(1.22±0.35 vs 1.93±0.58、図5)、TIA-1/HuRが高かった

(2.09 ± 0.55 vs 1.26 ± 0.44、  
図 6)。

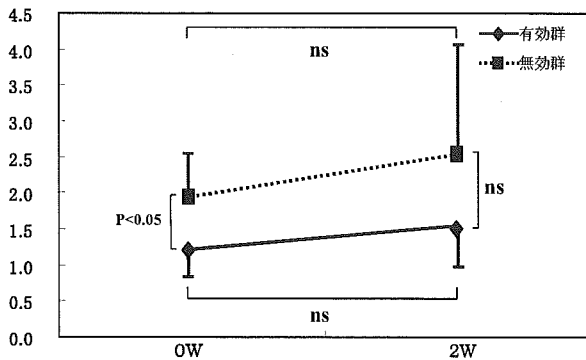


図5 0週、2週における有効群、無効群でのHuRの比較

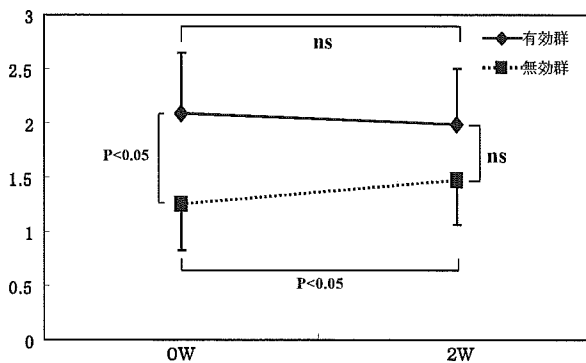


図6 0週、2週における有効群、無効群でのTIA-1/HuRの比較

5) 抗 GPI 抗体は、無効群 1 例でのみ陽性であった。

#### D. 考察

0週で、赤沈、IgGが低く、初回投与の反応性のよい患者で、30週後に有効性が高いことが明らかとなった。しかし、30週で無効群に入っていたが、54週を過ぎてから改善している症例が数例あり、今後54週あるいはさらに長期観察時での有効性を投与前の所見と初回投与の反応性で予測できるかという検討が必要と思われた。抗 GPI 抗体の有無が治療反応性に関係しているのかについては、さらに症例を増やしての検討が必要である。

#### E. 結論

Infliximab の投与前の所見と初回投与の反応性で、30週後の効果の予測がある程度可能と思われた。

F. 健康危険情報  
なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Tomoo T, Tsutsumi A, Yasukochi T, Ikeda T, Ochiai N, Ozawa K, Shibana Y, Ito S, Matsumoto I, Goto D, Sumida T. Analysis of abnormally expressed genes in synovium from patients with rheumatoid arthritis using a column gel electrophoresis-coupled subtractive hybridization technique. *Int J Mol Med*15:453-457, 2005
- Suzuki T, Muraki Y, Yasukochi T, Hua Zhang, Kori Y, Wakamatsu E, Hayashi T, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumichika H, Sumida T., Matsumoto I. Immunoglobulin G from anti-glucose-6-phosphate isomerase antibodies positive patient with rheumatoid arthritis induces synovitis in cynomolgus monkeys *Autoimmunity Reviews* 4:475-478, 2005
- Hayashi T, Matsumoto I, Muraki Y, Takahashi R, Chino Y, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. Clinical Characteristics of Anti-Glucose-6-Phosphate Isomerase Antibodies positive Japanese Patients with Rheumatoid Arthritis *Mod Rheumatol* 15:253-268, 2005
- Matsumoto I, Muraki Y, Yasukochi T, Hua Zhang, Kori Y, Hayashi T, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Ikeda K, Sumichika H, Sumida T. The exploration of joint-specific immunoreactions on immunoglobulins G of anti-glucose-6-phosphate isomerase antibody-positive patients with rheumatoid arthritis *Int J Mol Med*

- 16:793-800, 2005
5. Matsumoto I, Hua Zhang, Muraki Y, Hayashi T, Yasukochi T, Kori Y, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. A functional variant of Fc $\gamma$  receptor IIIA is associated with rheumatoid arthritis in anti-glucose-6-phosphate isomerase antibodies-positive individuals. *Arthritis Res Ther* 7:R1183-R1188, 2005
  6. Kori Y, Matsumoto I, Hua Zhang, Yasukochi T, Hayashi T, Iwanami K, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. Characterization of Th1/Th2 type, glucose-6-phosphate isomerase reactive T cells in the generation of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* (in press)
  7. Kitagawa M, Goto D, Mamura M, Matsumoto I, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. Identification of three novel peptides that inhibit CD40-CD154 interaction. *Mod Rheumatol* 15:423-426, 2005
  8. Ohnishi Y, Tsutsumi A, Goto D, Ito S, Matsumoto I, Taniguchi M, Sumida T. TCRVa14+NKT cells function as effector T cells in collagen-induced arthritis mice. *Clin. Exp. Immunol.* 141:47-53, 2005
  9. Yoshioka H, Ito S, Handa S, Tomiha S, Kose K, Haishi T, Tsutsumi A, Sumida T. Low-field compact magnetic resonance imaging system for the hand and wrist in rheumatoid arthritis. *JMRI* (in press).
  10. Suzuki E, Tsutsumi A, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Otsu M, Onodera M, Takahashi S, Sato Y, Sumida T. Gene transduction of tristetraprolin or its active domain reduces TNF- $\alpha$  production in Jurkat T cells. *Int. J. Mol. Med* (in press).
  11. 住田孝之、伊藤 聡、杉原誠人、鈴木 豪、千野裕介、林 太智、岩波慶一、荻島 博、石井 亘、真村瑞子、後藤大輔、松本 功、堤 明人、吉岡 大、巨瀬勝美：コンパクト MRI による関節破壊評価 リウマチ科 34:288-294、2005
2. 学会発表
1. 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)
  2. 杉原 誠人、千野裕介、鈴木 豪、林 太智、後藤大輔、松本 功、伊藤 聡、堤 明人、住田孝之：当院における関節リウマチに対する Infliximab 投与の臨床的評価 第 49 回日本リウマチ学会 (2005 年)
- 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。

## 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）病態の理解および治療法の開発に重要である。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 活性化カスケードが重要性であることを報告してきた。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）マウスおよびアジュバント関節炎ラットでは、関節炎局所にリン酸化 Akt に加え CaMKII が発現し、merge 像では共発現が示唆された。培養滑膜線維芽細胞でも Akt と CaMKII の発現が検出され、CaMKII のアイソフォームは  $\gamma$  と  $\delta$  が優位に発現していた。滑膜線維芽細胞には TRAIL 依存性アポトーシスが誘導されるが、TRAIL はアポトーシスのみではなく、Akt をはじめとする種々の kinase リン酸化を惹起した。滑膜線維芽細胞の TRAIL 依存性アポトーシスは CaMKII の chemical inhibitor 添加および Akt の chemical inhibitor 添加により増強され、かつ、これら細胞の TRAIL 依存性 Akt リン酸化は CaMKII の chemical inhibitor 添加で顕著に抑制された。しかしながら、Akt 以外の ERK、JNK および p38 活性化と TRAIL 依存性アポトーシス・CaMKII 活性化との関連性は認められなかった。これらの結果は CaMKII は RA の新たな治療ターゲットになりうること、およびその下流には Akt カスケードがあることを示唆し、今後は CaMKII 遺伝子改変マウスのデータを含めて、滑膜増殖への CaMKII の関与を詳細に検討する予定である。

### A. 研究目的

関節リウマチ（RA）の滑膜組織局所には種々の kinase 活性化が検出され、滑膜線維芽細胞 kinase cascade の研究は、RA の病態形成の理解に必須である。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いるが、私たちの研究を含め、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てきた。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 マウスとアジュバント関節炎ラットでの検討

CIA マウスおよびアジュバント関節炎ラットの関節炎局所における 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用い、実験に供した。

#### ヒト培養滑膜線維芽細胞での検討

インフォームド・コンセントが得られた手術症例より滑膜線維芽細胞を得、これら細胞の Akt 発現と CaMKII 発現をウエスタンブロットで評価した。滑膜線維芽細胞のアポトーシスと CaMKII との関わりは、TRAIL 依存性アポトーシスを用いた。すなわち滑膜線維芽細胞に rTRAIL を添加し、アポトーシスをミトコンド

リア膜電位の低下、カスパーゼ活性化、DNA断片化で評価した。同時に Akt を含む種々の kinase リン酸化をウエスタンブロットで確認した。これら kinase 活性化と TRAIL 依存性アポトーシスとの関連は、各 kinase の chemical inhibitor を用いて評価した。

(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 マウスとアジュバント関節炎ラットでの検討

1. CIA マウス関節炎局所では 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。アジュバント関節炎ラットでは PCNA と TUNEL は検討していないが、顕著な細胞浸潤が認められた。
2. これら動物関節炎局所では、多くの細胞にリン酸化 Akt と CaMKII が発現しており、共焦点では merge 像が認められ、これら kinase の共発現が示唆された。

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、ウエスタンブロットで Akt と CaMKII の発現が認められ、real-time RT-PCR では CaMKII の  $\gamma$  と  $\delta$  アイソフォームが優位に発現していた。Akt と CaMKII に加え、ERK、p38、JNK の発現も検出された (図 1)。
2. 滑膜線維芽細胞には 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 (表 1)。種々の kinase inhibitor を用いると、Akt inhibitor は CaMKII inhibitor と同様の効果が検出されたが、他の ERK、p38、JNK の chemical inhibitor では TRAIL 依存性アポトーシスの増強はなかった (表 2)。ウエスタンブロットで評価すると、TRAIL は滑膜線維芽細胞にアポトーシスを誘導するとともに Akt、ERK、p38、JNK リン酸化を誘導した

が、CaMKII 阻害剤は Akt リン酸化のみを顕著に抑制した (図 1)。

図1. CaMKII inhibitor, KN93はTRAILで誘導される Aktリン酸化を抑制するが、 ERK、p38、JNKのリン酸化は抑制しない

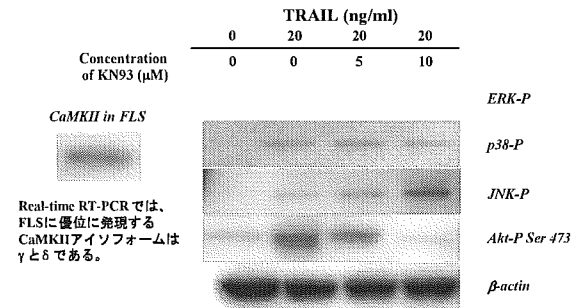


表1. CaMKII inhibitor, KN93による FLSのTRAIL依存性アポトーシスの増強: IETDase活性と hypodiploid DNA陽性細胞による評価

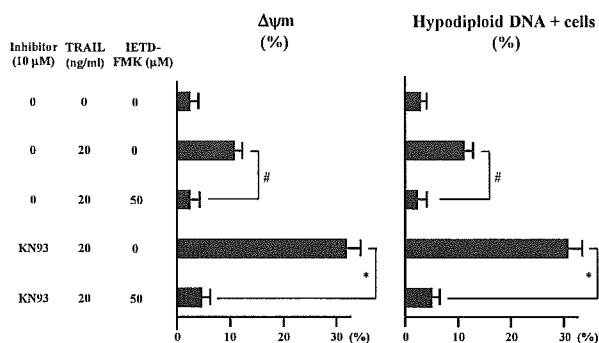
| Stimuli         | Concentration of KN93 ( $\mu$ M) | IETDase (% of positive cells) |                  | Hypodiploid DNA + cells (% of positive cells) |                |
|-----------------|----------------------------------|-------------------------------|------------------|---|----------------|
|                 |                                  | (-)                           | TRAIL            | (-)   | TRAIL          |
| KN93 ( $\mu$ M) | 0                                | 3.4 $\pm$ 0.2                 | 12.5 $\pm$ 0.9   | 3.6 $\pm$ 0.2                                 | 11.9 $\pm$ 0.5 |
|                 | 2.5                              | 3.7 $\pm$ 0.2                 | 20.9 $\pm$ 1.9*  | 3.7 $\pm$ 0.2                                 | 18.7 $\pm$ 1.0 |
|                 | 5                                | 3.4 $\pm$ 0.2                 | 25.9 $\pm$ 1.9** | 3.8 $\pm$ 0.2                                 | 24.8 $\pm$ 1.7 |
|                 | 10                               | 3.5 $\pm$ 0.2                 | 34.8 $\pm$ 2.6** | 3.0 $\pm$ 0.2                                 | 32.9 $\pm$ 2.6 |

表2. CaMKII阻害による FLSのTRAIL依存性アポトーシス感受性の増強は、Akt阻害による効果と類似している

| Kinase inhibitor (10 $\mu$ M) | $\Delta$ sym (% of positive cells) |                 | Hypodiploid DNA + cells (% of positive cells) |                |
|-------------------------------|------------------------------------|-----------------|---|----------------|
|                               | (-)                                | TRAIL           | (-)   | TRAIL          |
| -                             | 3.3 $\pm$ 0.2                      | 14.7 $\pm$ 0.9  | 3.6 $\pm$ 0.2                                 | 11.0 $\pm$ 0.5 |
| KN93 (CaMKII)                 | 3.7 $\pm$ 0.2                      | 29.9 $\pm$ 1.4* | 3.7 $\pm$ 0.2                                 | 27.7 $\pm$ 1.5 |
| SH-6 (Akt)                    | 3.7 $\pm$ 0.2                      | 33.6 $\pm$ 2.4* | 3.8 $\pm$ 0.2                                 | 29.9 $\pm$ 1.9 |
| PD98059 (ERK)                 | 3.6 $\pm$ 0.3                      | 16.5 $\pm$ 1.4  | 3.0 $\pm$ 0.2                                 | 12.6 $\pm$ 0.7 |
| SB203580 (p38)                | 3.5 $\pm$ 0.2                      | 16.0 $\pm$ 1.4  | 3.1 $\pm$ 0.2                                 | 12.1 $\pm$ 1.0 |
| SP600125 (JNK)                | 3.5 $\pm$ 0.2                      | 15.0 $\pm$ 1.4  | 3.1 $\pm$ 0.2                                 | 11.1 $\pm$ 1.0 |

3. TRAIL で活性化される caspase-8 を抑制すると、滑膜線維芽細胞の TRAIL 依存性アポトーシスは、kinase inhibitor 添加の有無に関わらずに解除された (図 2)。

図2. FLSのTRAIL依存性アポトーシス感受性は CaMKII inhibitor, KN93で増強するが、Caspase-8活性化を抑制することで解除される



#### D. 考察

CIA マウス、アジュバント関節炎ラット、培養滑膜線維芽細胞を用いたデータより、CaMKII 活性化は Akt 活性化を誘導し、滑膜線維芽細胞の増殖・アポトーシス抑制に関与すると考えられた。また、その作用点は DISC での caspase-8 活性化に関わると考えられた。

#### E. 結論

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と考えられる。CaMKII は RA 治療の新たなターゲット分子の可能性があり、今後は培養滑膜線維芽細胞では優位に機能するアイソフォームを同定し、かつ、CaMKII 遺伝子改変マウスのデータも取り入れ、滑膜増殖への CaMKII の関与を詳細に検討する予定である。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Mami Tamai, Atsushi Kawakami (他9名、2番目) Significant inhibition of TRAIL-mediated fibroblast-like synovial cell apoptosis by IFN- $\gamma$  through JAK/STAT pathway by translational regulation. J Lab Clin Med, in press, 2006.
2. Hideki Nakamura, Atsushi Kawakami (他7

名、2番目) Detection of the soluble form of Fas ligand (sFasL) and sFas in the saliva from patients with Sjögren's syndrome. Clin Exp Rheumatol 23: 915, 2005.

3. Fumiko Tanaka, Atsushi Kawakami (他11名、2番目) IFN-gamma/JAK/STAT pathway-induced inhibition of DR4 and DR5 expression on endothelial cells is cancelled by cycloheximide-sensitive mechanism: novel finding of cycloheximide-regulating death receptor expression. Int J Mol Med 15 : 833-839, 2005.

4. Nozomi Iwanaga, Atsushi Kawakami (他11名、11番目) Regulation of alternative splicing of caspase-2 through an intracellular signaling pathway in response to pro-apoptotic stimuli. J Lab Clin Med 145 : 105-110, 2005.

5. Mingguo Huang, Atsushi Kawakami (他16名、13番目) Detection of apoptosis-specific autoantibodies directed against granzyme B-induced cleavage fragments of the SS-B (La) autoantigen in sera from patients with primary Sjögren's syndrome. Clin Exp Immunol 142: 148-152, 2005.

6. Kouichiro Aratake, Atsushi Kawakami (他11名、11番目), A cross-talk between RNA splicing and signaling pathway alters Fas gene expression at post-transcriptional level: alternative splicing of Fas mRNA in the leukemic U937 cells. J Lab Clin Med 146 : 184-191, 2005.

7. 川上 純 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 平成16年度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 平成16年度 総括・分担研究報告書 p37-39, 2005.

8. 川上 純 (筆頭著者、他4名) 関節リウマチ -成因研究から治療の新時代- 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. 黄 明国、川上 純 (12 番目、他 13 名) 原発性シェーグレン症候群 (SS) 患者血清中にみられたアポトーシス特異的自己抗体の検討 第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p115, 2005.
2. 川上 純 (筆頭演者、他 12 名) CaMKII による血管内皮細胞アポトーシス感受性の制御 第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p235, 2005.
3. 荒武弘一朗、川上 純 (11 番目、他 10 名) RNA スプライシングと細胞内シグナル伝達経路のクロストークによる Fas 遺伝子発現制御 第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p248, 2005.
4. 岩永 希、川上 純 (11 番目、他 10 名) 細胞内シグナル伝達を介した caspase-2 の alternative splicing の制御 第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p252, 2005.
5. 田中史子、川上 純 (2 番目、他 11 名) CaMKII 阻害による滑膜線維芽細胞アポトーシス感受性の増強 第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p275, 2005.

6. Kamachi Makoto、Kawakami Atsushi (3 番目、他 3 名) RNA splicing of caspase-8 alters through intracellular signaling pathway: its pathophysiological role in SLE 日本免疫学会総会・学術集会記録 p195, 2005.
7. 川上 純 (筆頭演者、他 6 名) CaMKII 阻害による滑膜線維芽細胞アポトーシス感受性の増強 日本免疫学会総会・学術集会記録 p252, 2005.
8. . Atsushi Kawakami (筆頭演者、他 14 名) Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II (Camkii) Regulates Apoptosis of Synovial Cells through the Activation of Akt. Arthritis Rheum 52 (Supplement) S575-S576, 2005.

## 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)における骨破壊には、破骨細胞が主要な役割を担っている。破骨細胞はマクロファージ/単球系の細胞から分化するが、詳細な起源については未解明である。本研究では、ヒト末梢血単球分画(CD16<sup>+</sup>、CD16<sup>-</sup>)間において、破骨細胞分化能を比較検討し、CD16<sup>-</sup>単球が破骨細胞に分化することを示した。Integrin  $\beta 3$  の mRNA と  $\alpha v\beta 3$  heterodimer は CD16<sup>-</sup>単球にのみ発現を認めた。siRNA による integrin  $\beta 3$  の knockdown は CD16<sup>-</sup>単球からの破骨細胞分化を抑制した。一方、CD16<sup>+</sup>単球は CD16<sup>-</sup>単球に比較し、高い炎症性サイトカイン産生を認めた。また、RA 滑膜には CD16<sup>+</sup>マクロファージと CD16<sup>-</sup>マクロファージの浸潤を認めた。以上より、CD16 陰性単球は破骨細胞へ分化し、RA の骨破壊に寄与していると考えられ、CD16 陽性単球は炎症性サイトカイン産生により、滑膜の慢性炎症とともに破骨細胞分化促進にも関与している可能性がある。CD16<sup>-</sup>単球分画の RA 滑膜への集積、活性化阻害は骨吸収阻害治療のターゲットとなる可能性が示唆された。

### A. 研究目的

関節リウマチ(RA)における骨破壊には、破骨細胞が主要な役割を果たしている。破骨細胞は単球/マクロファージ系に由来しているが、詳細な起源については未解明である。ヒト末梢血単球は CD16 の発現の有無により 2 つのサブセットに分けられ、サイトカイン産生能やケモカインによる遊走能に差異があることが報告されている。しかし、破骨細胞への分化能の相違については不明である。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、活性化を阻害することにより RA の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

ヒト末梢血より単離した単球サブセット

(CD16 陽性、CD16 陰性分画)からの破骨細胞形成を、形態・TRAP 染色などにより評価した。炎症性サイトカイン産生能を ELISA 法で測定。破骨細胞分化に関与する分子の mRNA 発現を半定量 PCR にて解析した。インテグリン  $\alpha v\beta 3$  ヘテロダイマーの発現を免疫染色にて解析。インテグリン  $\beta 3$  を siRNA 法を用いてノックダウンし、破骨細胞分化への影響を解析。また、c-src 阻害剤(Herbimycin A)を添加し、破骨細胞形成への影響を評価した。RA 滑膜組織を CD16, CD68 にて 2 重蛍光染色し CD16 陽性および陰性マクロファージの分布を解析。

(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

単球各サブセットを M-CSF+RANKL または M-CSF+TNF- $\alpha$  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、CD16 陽性のサブセットからはほとんど形成されなかった (図 1)。一方、CD16 陽性単球は、無刺激下で、CD16 陰性単球よりも高い TNF- $\alpha$ 、IL-6 産生を示し、RANKL 刺激によりその産生が亢進した (図 2)。破骨細胞分化に関与する分子を半定量 PCR 法にて解析したところ、RANK, TRAF6, TREM2, c-Fos, c-fms, SIRP1- $\beta$ , DAP12, FcR $\gamma$ , OSCAR の mRNA 発現は、両サブセット間で明らかな差を認めなかったが、NFATc1, インテグリン $\alpha$ v,  $\beta$ 3 は CD16 陰性のサブセットに高い発現を認めた。また、M-CSF+RANKL 刺激によるインテグリン $\alpha$ v $\beta$ 3 ヘテロダイマーの発現を解析したところ、CD16 陰性サブセットにのみ認められた。インテグリン $\beta$ 3 をターゲットとする siRNA により、CD16 陰性サブセットからの破骨細胞形成数が減少した (図 3)。また、Herbimycin A の添加により、濃度依存性に、CD16 陰性サブセットからの破骨細胞形成数が減少した。RA 滑膜の免疫組織染色により、広範囲に多数分布する CD16 陰性マクロファージと、少数ではあるが lining layer と sublining layer 両方に分布する CD16 陽性マクロファージを認めた。

## D. 考察

CD16 陰性単球は、M-CSF+RANKL および M-CSF+TNF- $\alpha$  刺激により破骨細胞への分化を示し、一方、CD16 陽性単球は CD16 陰性単球と比較し、高い炎症性サイトカイン産生能を有していた。インテグリン $\beta$ 3 のノックダウンにより、CD16 陰性単球からの破骨細胞分化が阻害された。インテグリン $\beta$ 3 は単球・破骨細胞においては $\alpha$ v とのみ結合し、 $\alpha$ v $\beta$ 3 ヘテロダイマーとして発現することより、 $\alpha$ v $\beta$ 3 は CD16 陰性単球が破骨細胞へ分化するために必要な分子と考えられる。Herbimycin A により阻害される c-src はインテグリン $\beta$ 3 と結合

し細胞内シグナル伝達に関与している。そのため、 $\alpha$ v $\beta$ 3 からの細胞内シグナル伝達が破骨細胞分化に重要であると考えられる。また、RA 滑膜には、CD16 陽性マクロファージと CD16 陰性マクロファージが存在し、各々末梢血の CD16 陽性および CD16 陰性単球が滑膜にリクルートされた結果と推測される。CD16 陰性単球は、RA 滑膜で産生されている種々のサイトカイン (M-CSF、RANKL、TNF- $\alpha$ 、IL-6) により破骨細胞へ分化し、RA の骨破壊に寄与していると考えられる。一方、CD16 陽性単球は TNF- $\alpha$ 、IL-6 などのサイトカイン産生により、滑膜の慢性炎症とともに破骨細胞分化促進にも関与している可能性がある。

## E. 結論

破骨細胞は CD16 陰性単球より分化すると考えられ、インテグリン $\alpha$ v $\beta$ 3 はその破骨細胞分化に重要である。従って、CD16 陰性単球の活性化および滑膜組織への遊走の阻害、インテグリン $\alpha$ v $\beta$ 3 の阻害は、RA の骨破壊抑制に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

1 Fumihito Suzuki, Toshihiro Nanki, Toshio Imai, Hirotohi Kikuchi, Shunsei Hirohata, Hitoshi Kohsaka, Nobuyuki Miyasaka. Inhibition of CX3CL1 (fractalkine) improves experimental autoimmune myositis in SJL/J mice. *J. Immunol.* 175(10): 6987-6996, 2005.

2 Toshihiro Nanki, Takeshi Shimaoka, Kenji Hayashida, Ken Taniguchi, Shin Yonehara, Nobuyuki Miyasaka. Pathogenic role of CXCL16-CXCR6 pathway in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 52(10): 3004-3014, 2005.

3 Kyoko Wakamatsu, Toshihiro Nanki,

Nobuyuki Miyasaka, Kazuo Umezawa, Tetsuo Kubota. Effect of a small molecule inhibitor of nuclear factor- $\kappa$ B nuclear translocation in a murine model of arthritis and cultured human synovial cells. *Arthritis Res. Ther.* 7(6): R1348-R1359, 2005.

4 今井俊夫、西村美由希、南木敏宏、梅原久範。フラクタルカインと炎症性疾患。日本臨床免疫学会誌。28(3): 131-139, 2005.

\* Sunit K. Singh, Henner Morbach, Toshihiro Nanki, Hermann. J. Girschick. Differential expression of chemokines in synovial cells exposed to different *Borrelia burgdorferi* isolates. *Clin. Exp. Rheumatol.* 23(3): 311-322, 2005.

5 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.

## 2. 学会発表

1 Toshihiro Nanki, Takeshi Shimaoka, Ken Taniguchi, Shin Yonehara, Nobuyuki Miyasaka. Pathogenic role of CXCL16-CXCR6 pathway in rheumatoid arthritis. 第35回日本免疫学会総会。2005.

2 Yukiko Komano, Toshihiro Nanki, Nobuyuki Miyasaka. Identification of human peripheral blood monocyte subset which differentiates into osteoclasts. 第35回日本免疫学会総会。2005.

3 Toshihiro Nanki, Takeshi Shimaoka, Kenji Hayashida, Ken Taniguchi, Shin Yonehara, Nobuyuki Miyasaka. Pathogenic Role of CXCL16-CXCR6 Pathway in Rheumatoid Arthritis. 第69回アメリカリウマチ学会。2005.

4 Yukiko Komano, Toshihiro Nanki, Nobuyuki Miyasaka. Identification of human peripheral blood monocyte subset which differentiates into osteoclasts. 第69回アメリカリウマチ学会。2005.

5 Fumihito Suzuki, Toshihiro Nanki, Toshio Imai, Hiroto Kikuchi, Shunsei Hirohata, Hitoshi Kohsaka, Nobuyuki Miyasaka. Inhibition of Fractalkine (CX3CL1) Improves Experimental Autoimmune Myositis in SJL/J Mice. 第69回アメリカリウマチ学会。2005.

6 田中真生、野島崇樹、平形道人、桑名正隆、津坂憲政、堤明人、寺井千尋、土肥眞、高崎芳成、南木敏宏、市川健司、山田秀裕、吉田俊治、広畑俊成、遠藤平仁、三森経世。膠原病難治性病態の早期診断、予後推定、治療方針確立における自己抗体の意義に関する多施設共同研究。第33回日本臨床免疫学会総会。2005.

7 Tetsuo Kubota, Toshihiro Nanki. Treatment of murine arthritis with a NF- $\kappa$ B inhibitor. 第1回 East Asian Group of Rheumatology (EAGOR) meeting. 2005.

8 南木敏宏、林田賢治、谷口顕、宮坂信之。関節リウマチ(RA)滑膜組織におけるCXCL16/CXCR6相互作用の解析。第49回日本リウマチ学会総会。2005.

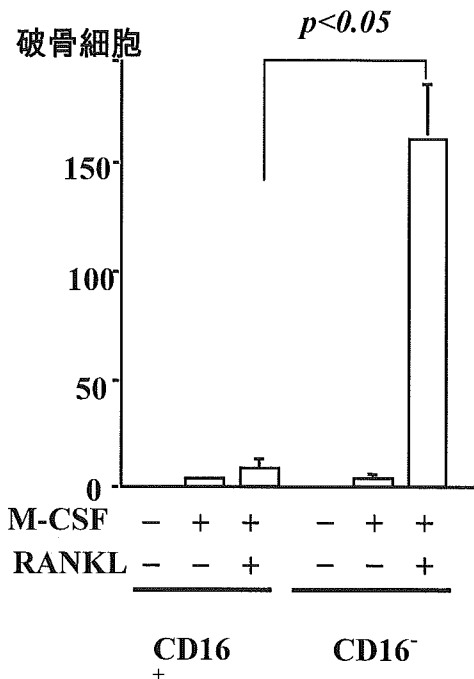
9 駒野有希子、南木敏宏、宮坂信之。ヒト末梢血単球分画における破骨細胞への分化能の比較検討。第49回日本リウマチ学会総会。2005.

10 鈴木文仁、南木敏宏、今井俊夫、菊地弘敏、広畑俊成、上阪等、宮坂信之。抗fractalkine(FKN)抗体による実験的多発性筋炎の抑制。第49回日本リウマチ学会総会。2005.

11 Toshihiro Nanki, Yasuyo Urasaki, Toshio Imai, Miyuki Nishimura, Kenzo Muramoto, Tetsuo Kubota, Nobuyuki Miyasaka. Inhibition of Fractalkine Ameliorates Murine Collagen-Induced Arthritis. Keystone symposia, Leukocyte Trafficking:

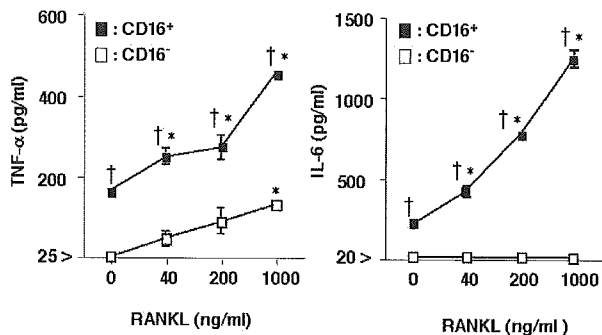
H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。

図1 末梢血単球サブセットによる破骨細胞分化の比較



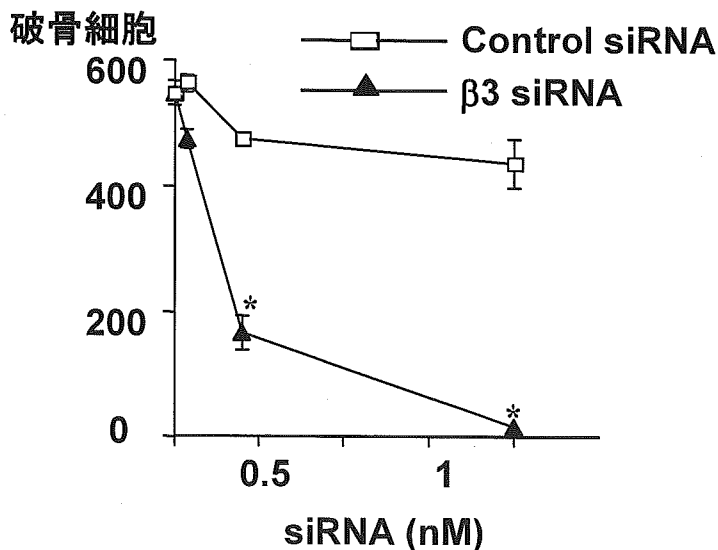
末梢血単球を CD16 陽性、陰性に単離後、RANKL+M-CSF 刺激し、形成した破骨細胞数を比較。

図2 RANKL 刺激による炎症性サイトカイン産生



末梢血単球 CD16 陽性、および陰性分画を RANKL で刺激し、TNF- $\alpha$ 、IL-6 の発現を ELISA にて解析。

図3  $\beta 3$  に対する siRNA による、破骨細胞形成阻害



CD16 陰性分画を RANKL+M-CSF で刺激し、インテグリン $\beta 3$  に対する siRNA による破骨細胞形成数の変化を解析。

#### IV. 研究成果の刊行に関する一覧表