

関節リウマチに対する生物学的製剤による悪性腫瘍発生リスクの検討：ナチュラル・キラー（NK）細胞への影響に関する研究

分担研究者 井田弘明 長崎大学 医学部・歯学部附属病院 第一内科 助手

研究要旨 関節リウマチ(RA)に対する生物学的製剤の副作用に、悪性リンパ腫を代表とする悪性腫瘍の出現がある。NK 細胞の活性低下と悪性腫瘍発生率との間に相関関係があることは、すでに証明されている。今回、各生物学的製剤が、ヒトNK 細胞へ及ぼす影響を *in vitro* 実験、および、実際に生物学的製剤を使用している RA 患者の末梢血中のNK 細胞の変化(NK 細胞活性、表面分子発現)を観察することによって、悪性腫瘍発生リスクを検討した。

生物学的製剤による直接的なNK 細胞のアポトーシスは、*in vitro* 実験で証明できなかった。RA 患者では、他の自己免疫疾患患者と同様、健常者に比べて、NK 細胞数減少によるNK 活性低下がみられた。生物学的製剤使用 RA 患者の経時的検討では、投与42日後にNK 細胞数低下を伴わないNK 活性の低下、つまり、NK 細胞1個あたりの活性低下が存在することが判明した。NK 細胞表面分子の経時的変化では、Fas 分子とCD2 分子の発現低下がみられた。

今後、NK 細胞中の細胞傷害物質(グランザイム B、パーフォリン、など)、細胞内シグナル伝達関連分子(ZAP70、 $\zeta$ 鎖、など)、細胞表面活性化分子(CD2、NKG2D、など)の経時的変化を検討し、生物学的製剤使用 RA 患者のNK 活性の低下の原因を探る必要があると思われる。

#### A. 研究目的

関節リウマチ(RA)に対する生物学的製剤が世界中で使用され、様々な副作用が報告されている。その中で、感染症以外に注目されているものに、悪性リンパ腫を代表とする悪性腫瘍の出現がある。NK 細胞の活性低下と悪性腫瘍発生率との間に相関関係があることは、すでに証明されている。私たちはこれまで、NK 細胞自身がアポトーシスを生じる結果、末梢血中のNK 細胞数の低下、ひいてはNK 細胞活性の低下が生じていることを証明してきた。

本研究では、各生物学的製剤が、ヒトNK 細胞へ及ぼす影響を *in vitro* 実験、および、実際に生物学的製剤を使用している RA 患

者の末梢血中のNK 細胞の変化(NK 細胞活性、表面分子発現)を観察することによって、悪性腫瘍発生リスクを検討することを目的とする。

#### B. 研究方法

1) 健常者末梢血からNK 細胞を *negative selection* で分離、培養液中に Infiximab (1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$ )、Etanercept (0.675, 1.25, 2.5  $\mu\text{g/ml}$ )、ネガティブコントロールとしてヒトガンマグロブリン (1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$ )、ポジティブコントロールとしてサイトカイン(IL-2 150 IU/ml + IL-12 2ng/ml)を添加し、24h、48h、72h 後にNK 細胞がアポトーシスを生じているか、Annexin V、DiOC6(3)を使用してフ

ローサイトメータで解析した。

2) 当大学病院、および、ながさき内科リウマチ科病院受診中の生物学的製剤開始 RA 患者 6 例(Infliximab 3 例、Etanercept 3 例)、MTX 開始 RA 患者 3 例を対象として、各薬剤投与直前、14 日後、42 日後に、末梢血中の NK 細胞の変化(NK 細胞数、NK 細胞活性、表面分子発現 ; CD2, CD16, CD161, CD244, Fas, NKG2D, NKp46, NKp30, CD94, CD158, ILT2)を観察した。

NK 活性は、<sup>51</sup>Cr release assay (ET 比 50:1、20:1、10:1)で評価した。

Lytic Unit (LU)は、20%の標的細胞を殺傷するのに必要な NK 細胞数の逆数をあらわすもので、値が高いほど NK 活性が強いことを示す。LU/NK cell 値は、NK 細胞 1 個あたりの LU 値で、NK 細胞 1 個あたりの殺傷力をあらわす。

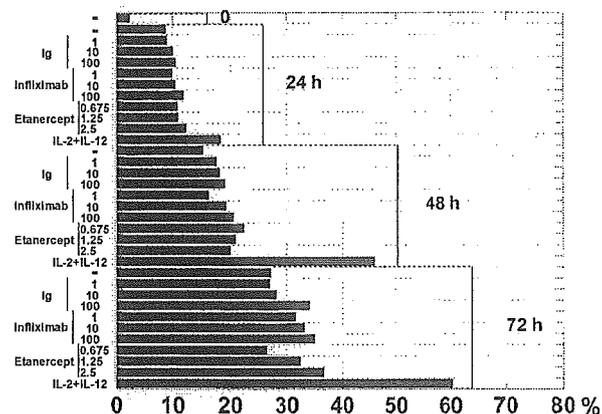
(倫理面への配慮)

NK 細胞は文書で同意が取得されている患者から分離し、個人情報情報は匿名化により保護されている。

### C. 研究結果

1) in vitro 実験で、NK 細胞のアポトーシスは、各生物学的製剤(Infliximab、Etanercept) 添加、24h、48h、72h 後と増加したが、ネガティブコントロール(ヒトガンマグロブリン)と差はなかった。Annexin V のデータを右上図に示す。

NK細胞のアポトーシス (Annexin V)



2) RA 患者 の NK 細胞の検討で、NK 活性の低下がみられたが、NK 細胞数低下が主な原因であり、LU/NK cell 値は、正常者と差がなかった。

3) Infliximab 群、Etanercept 群、MTX 群ともに、開始 14 日後、42 日後で、NK 細胞数の変化はなかったが、LU/NK cell 値は、低下傾向がみられた。

4) NK 細胞表面分子の検討で Etanercept 群、MTX 群に Fas 分子の、Infliximab 群で CD2 分子の経時的発現低下がみられた。

5) Infliximab 使用 RA 患者 1 例はニューモシスチス肺炎を併発したが、その時点での NK 活性は著明に低下、NK 細胞数も著減していた。

ニューモシスチス肺炎発症例

73 F

臨床経過: 2003年3月発症のRA。MTX無効のため2005年7月12日からInfliximab開始。7月26日(14日目)に2回目投与。8月16日から悪寒、翌17日から発熱、呼吸困難出現。CT上左上肺野に強い非区域性GGOあり。同日のニューモシスチスPCR陽性。βDグルカン 289.5 pg/ml。ニューモシスチス肺炎と診断。

NK活性とNK細胞数の推移

日時	NK活性			NK細胞数 (/ $\mu$ l)	リンパ球数 (/ $\mu$ l)
	50:1	20:1	10:1		
2005/ 7/ 12 (0)	32.8	15.6	9.1	102	799
2005/ 7/ 15 (3 days)	13.1	4.2	2.3	49	1761
2005/ 7/ 26 (14 days)	23.2	13.1	8.1	55	1280
2005/ 8/ 23 (42 days)	6.9	2.2	1.0	3	761

#### D. 考察

生物学的製剤が多くの RA 患者に使用され、副作用の報告も増えてきている。その中で悪性腫瘍の発生は、以前から危惧されていたものの、大変由々しき問題である。生物学的製剤の副作用として、結核などの感染症は、治療にて治癒する確率が高いが、悪性腫瘍は、死に至る可能性がある。そういう意味でも、悪性腫瘍発生リスクに関する基礎的検討、生物学的製剤使用中の患者の検討は必要である。各生物学的製剤が、NK 細胞へ及ぼす影響の基礎的検討、生物学的製剤を投与されている RA 患者の末梢血中の NK 細胞の変化を検討することは、まだ投与期間が定まっていない生物学的製剤の投与期間に一定の基準を定められる可能性も期待できる。

RA 患者の悪性リンパ腫罹患率はもともと高いが、生物学的製剤との因果関係に関しては、関係ありとの報告が最近出てきている(Ann Rheum Dis. 64:699-703, 657-658, 2005)。

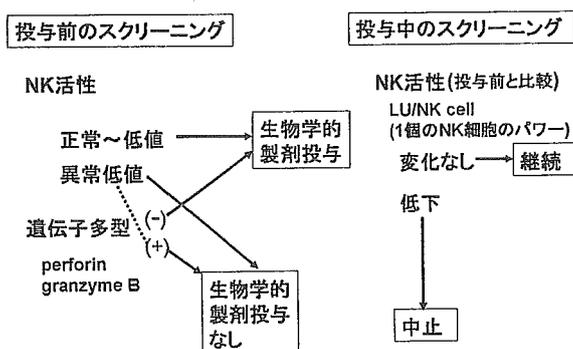
中地らは、一般住民約 3500 人を 11 年間追跡調査したコホート研究で、NK 活性が低いグループは、それ以外のグループと比較して、男性で 1.7 倍、女性で 2 倍、癌に罹患しやすいという結果を報告している(Lancet 356:1795-1799, 2000)。この結果は、NK 細胞活性低下と発癌との間にはっきりとした関連を認めたもので、生物学的製剤投与後、生じる可能性のある癌発生に関して、NK 細胞活性の変化がひとつの指標となると思われる。

今回の検討では、生物学的製剤使用 RA 患者で、投与 42 日後に NK 細胞数低下を伴わない NK 活性の低下、つまり、NK 細胞 1 個あたりの活性低下が存在することが判明した。今後、生物学的製剤使用 RA 患者を

長期にフォローアップするとともに、NK 細胞中の細胞傷害物質(グランザイム B、パーフォリン、など)、細胞内シグナル伝達関連分子(ZAP70、 $\zeta$ 鎖、など)、細胞表面活性化分子(CD2、NKG2D、など)の経時的変化を検討し、生物学的製剤使用 RA 患者の NK 活性低下の原因を探る必要があると思われた。

下図に NK 活性に基づいた新規生物学的製剤投与・継続の方針(案)を示す。生物学的製剤投与前に NK 活性を検討し、異常低値の場合は、投与を見合わせる。さらに、グランザイム B、パーフォリンの遺伝子多型検索も必要であろう。特に、NK 活性が低いグランザイム B、パーフォリンの遺伝子多型の場合は、投与を禁止する必要があるだろう。また、生物学的製剤投与中に NK 活性を測定し、低下傾向が著しい場合は、投与を中止する。これらの方策を講じることによって、生物学的製剤を長期使用する場合、悪性腫瘍発生リスクを軽減させることになると考えられる。

NK 活性に基づいた新規生物学的製剤投与・継続の方針(案)



#### E. 結論

生物学的製剤による直接的な NK 細胞のアポトーシスは、in vitro 実験で証明できなかった。生物学的製剤使用 RA 患者では、NK 細胞数低下を伴わない NK 活性の低下が存在することが判明した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

・Ida H, Utz PJ, Anderson P, Eguchi K. Granzyme B and NK cell death. **Modern Rheum.** 15(5): 315-322, 2005.

・Huang M, Ida H, Eguchi K. (2 番目、他 14 名 ) 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(10): 148-154, 2005.

・Izumi Y, Ida H, Eguchi K. (2 番目、他 11 名) Characterization of peripheral natural killer cells in primary Sjögren's syndrome: impaired NK cell activity and low NK cell number. **J Lab Clin Med.** In press.

・井田弘明、和泉泰衛、黄明国、有馬和彦、江口勝美 アポトーシスによる新たな組織障害機構: グランザイム B の役割 リウマチ科 34 巻 4 号 p416-425 2005 年

2. 学会発表

・Izumi Y, Ida H, Eguchi K. (2 番目、他 10 名) Mechanisms of impaired natural killer cell activity in primary Sjögren's syndrome: Involvement of low NK cell number and low expression of NK cell activating receptors. European League Against Rheumatism, Annual European Congress of Rheumatology. 2005. 6. 8-11, Vienna.

・和泉泰衛、井田弘明、江口勝美 (2 番目、他 10 名) 原発性シェーグレン症候群(SS)患者末梢血中のNK細胞活性低下のメカニズム: NK細胞数の低下と活性化分子発現低下の検討 第49回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p203, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

(共同研究者; 荒牧俊幸、和泉泰衛、黄明国、松岡直樹、江口勝美)

## RA 治療に用いられる生物製剤の医薬経済学的評価に関する研究

分担研究者 津谷喜一郎 東京大学大学院薬学系研究科医薬経済学客員教授  
研究協力者 福田 敬 東京大学大学院薬学系研究科医薬経済学客員助教授  
研究協力者 五十嵐 中 東京大学大学院薬学系研究科医薬経済学博士課程  
研究協力者 成 倫慶 東京大学大学院薬学系研究科医薬経済学研究生

**研究要旨** 日韓での生物製剤を主とした抗リウマチ薬の承認・保険収載状況と適応外使用の現状と問題点を調査した。日韓では承認、保険収載、それぞれに **time lag** が存在する。また韓国でモデルを用いて抗リウマチ薬の薬剤経済評価を行い、それを援用して日本での経済評価モデルを構築した。日韓共通の承認審査制度、共通プロトコールによる臨床試験、さらによりよいモデルを用いた経済分析、患者会の日韓交流への側面からのサポートなどが今後の課題である。

### A. 研究目的

- (1) 日韓での生物製剤の抗リウマチ薬、すなわちエタネルセプト (etanercept: ETA) とインフリキシマブ (infliximab: IFX) などの承認・保険収載状況と適応外使用の現状と問題点を調査する。
- (2) 韓国でモデルを用いて抗リウマチ薬の薬剤経済評価を行うとともに、日本での経済評価モデルを構築する。

### B. 研究方法

#### (1) 日韓抗リウマチ薬の保険収載・使用状況

専門家へのインタビューと文献調査による現状の把握と問題点の抽出。

#### (2) 韓国での抗リウマチ薬の薬剤経済評価と日本でのモデル構築

決定樹 (decision tree) モデルを作成の上、米国での臨床試験データと韓国のコストデータとを用いて解析を行った。その上で、日本のデータを援用してモデルを改訂した。

(倫理面への配慮)

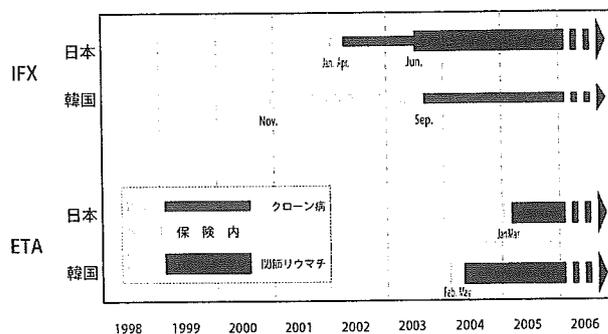
現段階では個人情報が含まれるデータソースは用いないため、配慮する必要はない。

### C. 研究結果

#### (1) 日韓の承認・保険収載・使用状況

図 1 に、承認・保険償還状況を示す。承認・保険収載ともに **time lag** が存在している。

図 1 日韓の抗リウマチ生物学的製剤の承認・保険償還状況



#### 1) 日本

原則的には承認後 3 か月以内に保険償還の対象になり、承認後、生物学的製剤を適応外で使用することは少ない。ただしメトトレキサート (methotrexate: MTX, リュー

マトレックス) の上限用量が 8mg と諸外国に比べて低いため、MTX を海外での標準用量 10-15mg まで増量した場合は全て適応外使用となる。

## 2) 韓国

RA で承認・保険償還されているのは ETA のみで、承認から保険償還開始までも時間がかかる。医療制度上、混合診療が可能である。適応外医薬品のみを自己負担とすることも制度上問題ない。IFX が RA では未承認のままであるが、適応外の自己負担で使用していることが多い。

## 3) 日韓共通

日韓ともに未承認薬を輸入して使うケースがある。

## (2) 韓国での抗リウマチ薬の薬剤経済評価と日本でのモデル構築

1) MTX 単剤療法の継続, 2) MTX+レフルノミド, 3) レフルノミド 20mg, 4) シクロスポリン + MTX, 5) ETA 単剤, 6) MTX+ETA。観察期間は 6 か月とした。主要なアウトカムとして ACR20 をとり、ICER を算出した。

最も費用対効果が良いのは 2) の MTX+レフルノミド、次点は 6) の MTX+ETA であった。

この結果を踏まえて、日本での経済評価モデルの構築を行った。暫定的にインフリキシマブを対象とし、わが国の臨床試験データを援用した。具体的には、有効性については第 1 相の長期投与試験のデータを、安全性については長期投与試験に加えて市販後特別調査のデータを組み込んだ。

## D. 考察

抗リウマチ薬の適応外使用には、医薬品の承認制度や保険償還制度など様々な問題が関与する。今回の研究で、両国での承認と保険収載それぞれの time lag が明らかになった。今回は制度的分析と医療従事者からのインタビューを主

として情報収集したものである。

高額ではあるが有効性の高い抗リウマチ薬をより迅速・合理的に使用していくためには、以下が今後必要である。

## 1) 承認制度

日韓の国民は genetically また ethnically に共通性が多い。医薬品承認において日韓共通の審査システムの導入が望まれる。それにより、日韓共通のプロトコールによる臨床試験が普及し、患者リクルートが容易になり、治験期間が短縮され、より早い承認が可能となろう。

## 2) 経済分析による効率性分析

日韓で共通な clinical evidence が得られれば、よりよい分析モデルが開発され、両国でのコストを用いることにより、より質のよい経済分析が可能になる。

## 3) 情報源としての患者団体

上記経済分析にあたってコストを算定する際には患者の実際の自己負担額データを得る必要がある。代替医療に対する支払額などのデータなどは、患者団体によるアンケート調査などから得ることができる。韓国には「ペンギン会」(<http://www.kpenguin.org/>) なるリウマチ患者会が存在する。現在のところ日韓の患者会の協力関係はないが、これを開始し、日本で行われている患者実態調査のシステムの韓国での展開などが期待される。患者中心の医療が叫ばれている現在、日韓の患者同士の交流には多方面にわたる大きな潜在的可能性がある。

## E. 結論

日韓での生物製剤を主とした抗リウマチ薬の適応外使用の現状が明らかになった。承認・保険償還それぞれに time lag が存在する。日韓共通の承認審査制度、共通プロトコールによる臨床試験、さらによりよいモデルを用いた経済分析、患者会の日韓交流への側面からのサポート

などが今後の課題である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) 津谷喜一郎, 五十嵐中. リウマチ治療薬の経  
済評価. *medicina* 2005; 42(5): 750-4.

2. 学会発表

(1) 成倫慶, 五十嵐中, 辻香織, 津谷喜一郎. 日  
韓の抗リウマチ薬適応外使用の現状. 第 26  
回日本臨床薬理学会年会, 別府, 2005.12.2.  
*臨床薬理* 2005; 36 (Suppl): S203.

H. 知的財産権の出願・登録

なし。

関節リウマチ患者の医療経済学的検討 -疾患活動性制御と医療費-

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

研究要旨 東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センターで実施中の RA 患者を対象とした前向きコホート研究において、医療費の解析を行った。5,666 名の 8489.5 患者・年のデータを解析したところ、直接医療費のみの年間医療費は、417,134 ± 32,040 円であった。RA 患者の年間医療費は年々増加しているが、RA の病状悪化とともに年間医療費が増大する傾向が明らかであった。疾患活動性の変化量 ( $\Delta$ DAS28) には薬剤使用の寄与度が最も大きく、ステロイド薬、インフリキシマブ、メトトレキサートの順に寄与度が高かった。年間医療費の変化量 ( $\Delta$ cost)には疾患活動性の変化( $\Delta$ DAS28)の寄与が最も大きく、RA が改善すれば、外来医療費が安くなる傾向が認められた。以上より、積極的な治療が医療費軽減につながる可能性が示された。今後、RA 患者の生涯医療費をアウトカムとした医療経済学的検討が必須になると考える。

#### A. 研究目的

関節リウマチ(RA)の治療は、生物学的製剤の導入により大きな転換期を迎えているが、高価な薬剤費という新たな問題が生じている。RA 患者は、薬剤費や手術費などの直接医療費のみでなく、身体機能低下に伴う社会的損失も含めて大きな負担を強いられ、RA 医療費は重要な社会的問題でもある。したがって、RA の医療経済学的検討が必須であるが、その基礎となるべき日本におけるコホートを用いた経年的なリウマチ医療費に関わる解析はほとんどないと言ってよい。我々は、当施設で 2000 年から実施している RA 患者における大規模前向き観察研究 J-ARAMIS を用い、リウマチ外来における医療費につき検討を加えた。

#### B. 研究方法

東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センターで 2000 年 10 月から実施中のコホート研究 J-ARAMIS 調査に一度でも参加したことがある RA 患者 7,151 名、24681.5 人年 (女性率 81.7%、年齢 55.7 ± 13.5 歳、平均 RA 罹病期間 9.1 ± 8.8 年)を対象とした。

1. RA 患者の 2000 年 4 月から 4.5 年間のリウマチ

外来における医療費の推移を検討。尚、リウマチ外来医療費は当センターの診療報酬記録を用いた。

2. J-ARAMIS データを基に、外来医療費に影響を与える因子につき、治療内容・RA 活動性・機能障害との関わりも含め分散分析を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は東京女子医科大学ゲノム倫理審査委員会の承認を得て実施中であり、患者調査時には毎回文書同意を得ている。データの処理は匿名化の上で行っている。

#### C. 研究結果

1. 当科外来における直接医療費は、2000 年時の 267,259 円/人年から 2004 年時の 289,375 円/人年に 4.5 年間で 8%増加した。この内訳では投薬料が約 50%と最も大きく、年々増加し、逆に検査料は年々減少傾向 (-16%/4.5 年)であった。注射料はインフリキシマブ導入に伴い増加した(+223%/4.5 年)。

2. 直接医療費は、高齢者ほど、罹病期間が長いほど、機能障害がある (HAQ が高い) ほど、疾患活動性がある (DAS28 が高い) ほど高額であった。

3. 積極的な治療が疾患活動性を制御するかどうかを検討するために、DAS28 の変化量( $\Delta$ DAS28=治療後 DAS28- 治療前 DAS28)を目的変数、年齢、性、RA 発症年齢、RA 罹病期間、年時変化、各 DMARD 治療有無、ステロイド治療有無を説明変数とする線形モデルを作成した後、分散分析を施行し、各説明変数が $\Delta$ DAS28 に及ぼす寄与の大きさを検定した。その結果、 $\Delta$ DAS28 には薬剤使用の寄与度が最も大きく、ステロイド薬、インフリキシマブ、メトトレキサートを使用すると有意に $\Delta$ DAS28 が低下し、RA の活動性が改善することが明らかになった。

4. さらに、積極的な治療が直接医療費の減少につながるかどうかを検討するために、外来医療費の変化量( $\Delta$ Cost=治療後医療費- 治療前医療費)を目的変数、 $\Delta$ DAS28、年齢、性、RA 発症年齢、年時変化、RA 罹病期間、 $\Delta$ DAS28 と年時変化の交互作用を説明変数とする線形モデルを作成した後、分散分析を施行して、各説明変数が $\Delta$ Cost に及ぼす寄与の大きさを検定した。その結果、 $\Delta$ Cost に最も大きく寄与しているのは $\Delta$ DAS28 であることが示され、疾患活動性を制御すれば医療費が減少することが示された。

#### D. 考察

今回の検討により、RA に対する積極的な治療が疾患活動性を制御し、疾患活動性を制御することが医療費を減少させることが明らかになった。今回は、外来診療に係わる直接医療費のみの解析であるが、実際には入院費や関節医療費も考慮する必要がある。

また、今回の検討に用いたデータベースでは、高価な生物学的製剤の使用例がまだ多くなかったことも考慮する必要があり、あくまで限定的なモデルであることを考慮する必要がある。

RA に対する薬物治療が進歩し、より早期からより強力な治療法が選択されるようになった。その中には高価な治療法も含まれており、外来医療費は年々増加傾向にある。他方で、RA の進行により疾患活動性が高くなり、機能障害が進行すれば医療費は増加する。機能障害が悪化すれば人工関節のような外科的手段が必要になったり、介護などに係わる経費が増加する。このように RA 患者の医療費には多く

の要素が複雑に関与しているが、今後は、RA 患者の生涯医療費という視点から、医療の質を保持したままで医療費総計をいかにして減額できるかに対する検討が必要である。わが国では RA における薬剤経済学的検討はほとんどないに等しいが、今後は必須になるものと思われる。

#### E. 結論

RA 患者における外来医療費は年々増加傾向にあるが、積極的な RA 治療が長期的には医療費削減につながる可能が示された。RA における医療経済学的検討は今後必須になると思われる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

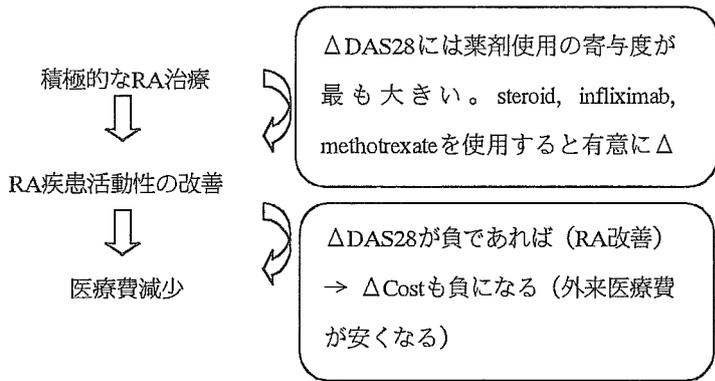
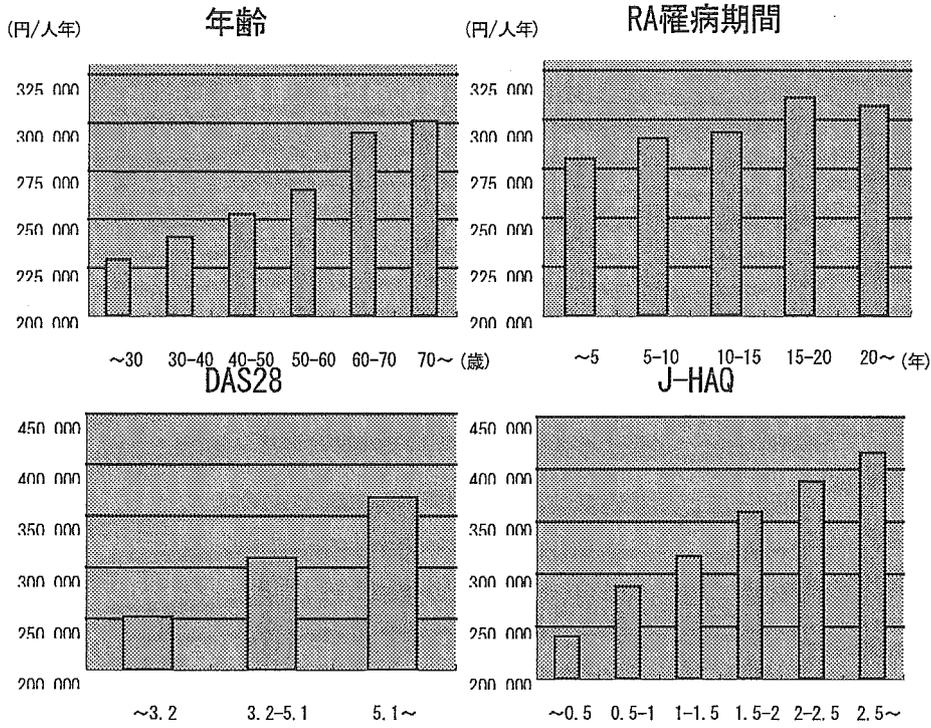
##### 2. 学会発表

田中栄一、上辻茂男、井上永介、田野原紀代子、山田徹、中島亜矢子、谷口敦夫、原まさ子、戸松泰介、山中 寿、鎌谷直之：大規模コホート J-ARAMIS における RA 患者 7,151 名 4.5 年間のリウマチ医療費に関する検討 第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会

#### H. 知的財産権の出願・登録

特になし

RA 患者の医療費に及ぼす要因



インフリキシマブの関節破壊阻止効果と臨床的活動性評価による関節破壊の予測に関する研究

分担研究者 亀田秀人 埼玉医科大学総合医療センター リウマチ・膠原病内科 講師

研究要旨 本邦におけるインフリキシマブの関節破壊阻止効果を検討し、同時に簡便な新しい包括的活動性指標の有用性を検証した。46例のRA患者において、現在最も普及しているDAS28による活動性評価でインフリキシマブ投与前の5.9から1年後には3.0へと改善、新たに提唱した指標であるHRAS38でも132.2から46.4へと改善し、後者は簡便ながら前者に劣らぬ指標であった。インフリキシマブ開始前のmodified Sharpスコア年度平均進行は平均32.3(9.1~185.0)と高度であったが、インフリキシマブ開始後1年間では平均4.3と著明に抑制されていた。しかし、DAS28やHRAS38の1年間の平均値において、非進行(0以下)12例、10未満の軽度進行12例、10以上の中等度以上進行13例の3群間で有意差を認めなかった。

A. 研究目的

インフリキシマブは欧米で優れた関節破壊阻止効果が示されている。一方、ACRコアセットやDAS28を用いた従来の臨床的な活動性や治療反応性の評価法では、日常臨床で用いるには煩雑な面があるのみならず、有効例と無効例の間に関節破壊阻止効果に大きな差異が認められないことが指摘されている。またDAS28で足の関節が評価されないことが、一部の患者の関節炎の過小評価につながることで、標準的X線評価法となっているmodified Sharpスコアで手と足の関節がほぼ同等の位置づけとなっていることとの不一致など問題点も多い。昨年の班会議で我々は、新たに考案した40関節(DAS28の評価関節に足関節とMTP関節を加えた)における腫脹の程度を0-3で段階評価した腫脹関節スコアに、患者全般評価(mmVAS)、血清CRP値(mg/l)の単純総和で表したHandy rheumatoid activity score with 40 joints(HRAS40)を提唱し、インフリキシマブによる半年間の治療成績においてDAS28と高い相関を示した。そこで、本研究ではインフリキシマブの本邦のRA患者における関節破

壊阻止効果を検証するとともに、それをDAS28や新たな臨床評価法で予測しうるかを検討する。

B. 研究方法

当科でインフリキシマブを5回以上投与され、1年間経過観察されたRA患者46例を対象とした。臨床的活動性評価はDAS28、およびHRAS40から関節腫脹の評価困難な肩関節を除いて38関節と改訂したHRAS38を用いて行った。関節破壊はmodified Sharpスコアを用いて3名のリウマチ専門医が評価した。

(倫理面への配慮)

保健診療内で行なわれており、特に倫理的問題はない。

C. 研究結果

インフリキシマブ投与により0週時、2週後、54週後の腫脹関節数は平均13.3から6.5、2.4と低下、腫脹関節スコアは平均32.6から12.4、4.8と低下、血清CRP値は平均4.1mg/dlから0.9、0.4と低

下、DAS28は平均5.9から3.8、3.0と改善、HRAS38も平均132.2から53.1、46.4と改善した。従ってインフリキシマブは全般的には速やかに活動性を改善させ、その効果は1年間持続した。関節所見の評価としては腫脹関節スコアが最も高感度な指標であり、これを中心としたHRAS38は1年間の臨床評価においてもDAS28と高い相関を示す有用かつ簡便な包括的活動性評価法であった。次に、インフリキシマブ開始直前と1年後の関節X線評価を完了した37例の関節破壊を検討した。インフリキシマブ開始前のmodified Sharpスコアを罹病年数で除した全罹病期間の年度平均進行は平均32.3(9.1~185.0)と高度であったが、インフリキシマブ投与後の進行がそれ以前の進行を上回ったのは4例に過ぎず、インフリキシマブ開始後1年間では平均4.3と著明に抑制されていた。その内訳は非進行(0以下)が12例(-22~0)、10未満の軽度進行が12例(2.3~8.3)、10以上の中等度以上進行が13例(10.5~24)であった。腫脹関節スコア、血清CRP値、さらに包括的評価法であるDAS28やHRAS38の1年間の平均値を3群間で比較すると、非進行群で各々9.7、1.7 mg/dl、3.5、67.3、軽度進行群で各々9.0、1.3 mg/dl、3.8、57.0、中等度以上進行群で各々11.1、1.6 mg/dl、3.4、57.4といずれの評価項目においても有意差を認めず、軽度進行群を非進行群あるいは中等度以上進行群と併せた2群で検討しても、同様の結果であった。

#### D. 考察

インフリキシマブの投与はMTX効果不十分のRA患者において、臨床的活動性評価では約7割の例に有用であり、修復を含む優れた関節破壊抑制効果が確認された。しかしながら、軽度も含めた関節破壊の進行は過半数の症例に認められ、今後現行の3 mg/kgから6 mg/kgあるいは10 mg/kgへの増量や投与間隔の調節などを含め、さらに治療を向上させる余地が見られた。また本研究により日常診療における簡便な臨床評価法HRAS38の有用性が示された。しかし、これもDAS28と同様、関節破壊

進行との関連が不十分であり、かかるTNF阻害薬による治療においては、関節破壊とより密接に関連する別の指標の同定が必要と考えられた。さらに本年より新たに本邦で承認された生物学的製剤エタネルセプトにおいても本研究と同様の結果となるのか、あるいは何らかの差異が認められるのかが来年以降の課題である。

#### E. 結論

インフリキシマブは本邦のRA患者においても優れた関節破壊抑制効果を示した。腫脹関節スコアはインフリキシマブ投与RA患者の活動性や治療効果の判定に有用で、これを中心とした新しい簡便な包括的活動性評価法であるHRAS38はDAS28の代替評価法となりうることを示唆された。しかし、いずれの臨床評価法を用いてもインフリキシマブの関節破壊阻止効果の予測は困難であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

特に無し。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kameda H, Ishigami H, Suzuki M, Abe T, Takeuchi T. Imatinib mesylate inhibits proliferation of rheumatoid synovial fibroblast-like cells and phosphorylation of Gab adapter proteins activated by platelet-derived growth factor. Clin Exp Immunol (in press).

亀田秀人, 竹内勤: 生物学的製剤、免疫抑制薬. Monthly Book Orthopaedics 18(10):107-116, 2005.

亀田秀人: 関節リウマチ治療における生物学的製剤の役割. 日本内科学会雑誌 94(10):2084-2091, 2005.

亀田秀人, 竹内勤: 生物学的製剤による関節リウマチの関節破壊抑制. The Bone 19(6):67-72, 2005.

Takeuchi T, Amano K, Kameda H, Abe T. Anti-

TNF biological agents in rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases. *Allergology International* 54(2):191-202, 2005.

Sekiguchi N, Kameda H, Amano K, Takeuchi T. Efficacy and safety of bucillamine, a d-penicillamine analogue, in patients with active rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* (in press).

## 2. 学会発表

・小川祥江、亀田秀人、関口直哉、武井博文、長澤逸人、鈴木勝也、津坂憲政、天野宏一、竹内勤. インフリキシマブ投与前後の関節リウマチ患者血清における GRO $\alpha$  の発現検討. 第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2005 年 4 月、横浜

関口直哉、亀田秀人、小川祥江、長澤逸人、武井博文、津坂憲政、天野宏一、竹内勤. 関節リウマチにおけるインフリキシマブの臨床的効果と効果予測因子の検討. 第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2005 年 4 月、横浜

長澤逸人、亀田秀人、関口直哉、武井博文、小川祥江、鈴木勝也、津坂憲政、天野宏一、竹内勤. 関節リウマチ (RA) 患者の HAQ に及ぼす疾患活動性の影響. 第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2005 年 4 月、横浜

Kameda H, Ishigami H, Suzuki M, Abe T, Takeuchi T. Involvement of Gab adaptor proteins in the proliferative signaling through platelet-derived growth factor receptor in rheumatoid synovial fibroblast-like cells and their regulation by imatinib mesylate. Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2005, 2005 年 6 月、ウィーン

H. 知的財産権の出願・登録  
無し

**Handy Rheumatoid Activity Score with 38 joints (HRAS38)**

患者全般評価 (0-100 mmのVAS)  
 腫脹関節スコア (0-114)  
 血清CRP値 (mg/L)  
 以上3つの総和

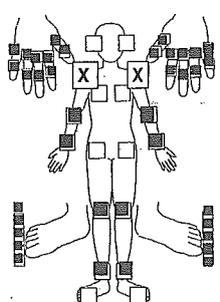


図1. HRAS38 の評価法

**Infliximab開始後の包括的活動性スコアの経時変化**

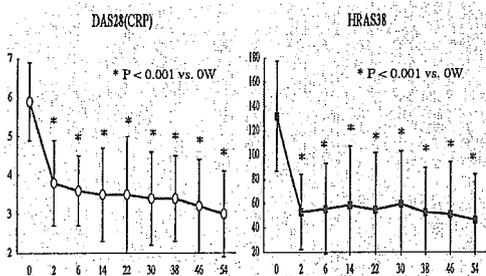


図2. インフリキシマブ投与後の DAS28(crp)および HRAS38 の改善の比較

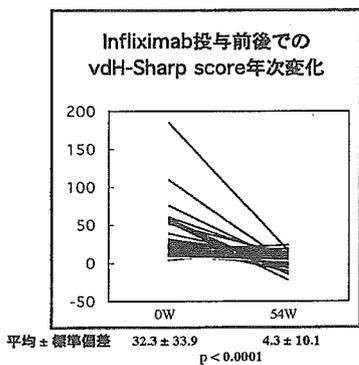


図3. インフリキシマブ投与前後の vdH-Sharp スコア年次変化

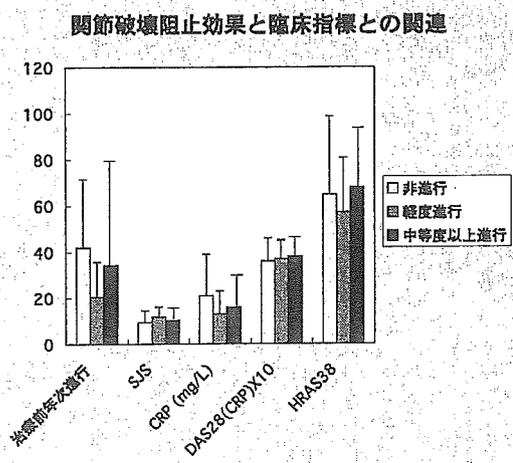


図4. インフリキシマブ投与後の関節破壊と活動性

関節リウマチに対する生物製剤の治療効果判定—パワードップラー超音波検査、造影 MR 画像による評価に関する研究

分担研究者 小池隆夫 北海道大学大学院医学研究科 病態内科学講座・第二内科 教授

研究要旨 関節リウマチ (RA) に対する生物製剤の治療評価判定において、全身MR I が全身の多関節の関節炎の治療効果判定に耐える画質を提供することができるかどうかを検討した。生物製剤投与前の患者を対象に全身MR I を施行し、一度のMR検査でRA関節炎の好発部位である全身関節の関節炎や骨髄浮腫の有無につき、臨床所見、超音波検査の画像を比較検討した。

#### A. 研究目的

生物製剤の使用継続の適応の判断には、ある製剤のそれぞれの患者における効果をいかに評価するかが重要である。通常ACRコアセットが汎用されるが、より客観的なマーカーとして関節リウマチ(RA)の病態そのものである滑膜炎の病勢をあらわす方法の開発が必要である。我々はインフリキシマブの使用前後においてパワードップラー超音波検査およびMR画像を用いた関節炎の評価を試みた。

#### B. 研究方法

一度のMR検査でRA関節炎の好発部位である環軸関節、手関節、手指関節、肩関節、股関節、膝関節、足関節、足指関節の関節炎や骨髄浮腫の有無につき検討するために、全身を5つの領域に分けて順次撮像を繰り返した。患者の協力が得られる時間の上限を30分と考え検査を構築した。結果を腫脹、疼痛関節と比較、一致率を検討した。また、同時期に手指のパワードップラー超音波検査(PDUS)を施行して、関節炎の診断に関する一致率を検討した。対象はエタネルセプト導入前にMRI検査が施行された8例で、RAが7例、成人Still病が1例であった。性別は男性2例、女性6例、年齢は39から82歳であった。MRIの撮像法は脂肪抑制画像の一種であるSTIR法で全身の冠状断画像を撮像し、手のMP、PIP関節、手関節、肩関節、股関節、膝関節、足関節、足のMP関節の各関節につき炎症及び

骨髄浮腫の有無を判定した。PDUSとの比較においては、PDUSで評価した両側第II、III MP関節、第II PIP関節、遠位橈尺関節につき、独立して評価し一致率を検討した。

#### (倫理面への配慮)

検査目的とMRI検査の危険性につき事前に患者に文書で説明、同意書にサインを得た上で検査を施行した。

#### C. 研究結果

1例では膝関節の進展障害があり下半身に全身コイルを装着できずに、上半身のみの撮像となった。各関節における関節炎の状況は8例中、手のMP関節4例、手関節は8例、膝関節と足関節は5例、肩関節と股関節は1例であった。骨髄浮腫は3例(距骨2例、手の中手骨1例)に認められた。腫脹関節との一致率は83.2%、疼痛関節との一致率は74.2%であった。PDUSとの比較ではPDUSでの関節炎の所見は63関節中、28関節に認められ、MRIでは63関節中29関節に認められた。一致率は80%(51/63)であった。

#### D. 考察

PDUSでは関節内に増加した血流を直接評価するのに対して、MRIのSTIR法は関節液や炎症性滑膜増殖などの雑多な病理をまとめてとらえていると考えられる。

したがって観察している対象は完全に一致するわけではない。それでも罹患関節の一致率は十分高い値であった事を考慮すると、全身MRIのSTIR法で検出された関節病変をRAによる関節炎と考えて経過を観察することは可能と考えられた。この方法により全身のRA病変の状況をモニターしながら治療を継続することが可能になると思われた。また、骨髄浮腫性変化などPDUSでは指摘不能な病変も検出可能であり、病勢の判定は全身に拡大するのみならず、関節外病変の観察も可能となる可能性がある。今後は治療効果判定が真に可能かどうかをACRコアセットなどとの比較により検討する必要がある。

#### E. 結論

全身 MRI によりこれまでは治療効果判定に用いられてこなかった部位のRA関節炎や関節外病変の描出が可能であり、治療効果のモニターとして用いる事ができる可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Yasuda,S.,Atsumi,T.,Matsuura,E.,Kaihara,K.,Yamamoto,D.,Ichikawa,K.,Koike,T. Significance of valine/leucine<sup>247</sup> polymorphism of  $\beta$ 2-glycoprotein I in antiphospholipid syndrome: increased reactivity of anti- $\beta$ 2-glycoprotein I autoantibodies to the valine<sup>247</sup> $\beta$ 2-glycoprotein I variant. *Arthritis Rheum* 52(1) 212-218.2005
2. Kataoka,H.,Takahashi,S.,Takase,K.,Yamasaki,S.,Yokosuka,T.,Koike,T.,Saito,T. CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells exert in vitro suppressive activity independent of CTLA-4. *Int Immunol* 17(4) 421-427.2005
3. Jodo,S.,Pidiyar,VJ.,Xiao,S.,Furusaki,A.,Sharma,R.,Koike,T.,Ju,ST. Cutting Edge: Fas Ligand (CD178) Cytoplasmic Tail Is a Positive Regulator of Fas Ligand-Mediated Cytotoxicity. *J Immunol* 174(8)

- 4470-4474.2005
4. Nishio,S.,Hatano,M.,Nagata,M.,Horie,S.,Koike,T.,Tokuhisa,T.,Mochizuki,T. Pkd1 regulates immortalized proliferation of renal tubular epithelial cells through p53 induction and JNK activation. *J Clin Invest* 115(4) 910-918.2005
5. Kochi,Y.,Yamada,R.,Suzuki,A.,Harley,JB.,Shirasawa,S.,Sawada,T.,Bae,SC.,Tokuhiro,S.,Chang,X.,Sekine,A.,Takahashi,A.,Tsunoda,T.,Ohnishi,Y.,Kaufman,KM.,Kang,CP.,Kang,C.,Otsubo,S.,Yumura,W.,Mimori,A.,Koike,T.,Nakamura,Y.,Sasazuki,T.,Yamamoto,K. A functional variant in FCRL3, encoding Fc receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities. *Nat Genet* 37(5) 478-485.2005
6. Imai,Y.,Chou,T.,Tobinai,K.,Tanosaki,R.,Morishima,Y.,Ogura,M.,Shimazaki,C.,Taniwaki,M.,Hiraoka,A.,Tanimoto,M.,Koike,T.,Kogawa,K.,Hirai,H.,Yoshida,T.,Tamura,K.,Kishi,K.,Hotta,T; CliniMACS Study Group. Isolation and transplantation of highly purified autologous peripheral CD34<sup>+</sup> progenitor cells: purging efficacy, hematopoietic reconstitution in non-Hodgkin's lymphoma (NHL): results of Japanese phase II study. *Bone Marrow Transpl* 35(5) 479-487.2005
7. Bando,H.,Atsumi,T.,Nishio,T.,Niwa,H.,Mishima,S.,Shimizu,C.,Yoshioka,N.,Bucala,R.,Koike,T. Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of glycolytic regulators in human cancer. *Clin Cancer Res* 11 5784-5792.2005
8. Atsumi,T.,Furukawa,S.,Amengual,O.,Koike,T. Antiphospholipid antibody associated thrombocytopenia and the paradoxical risk of thrombosis. *Lupus* 14 499-504.2005
9. Bohgaki,T.,Amasaki,Y.,Nishimura,N.,Bohgaki,M.,Yamashita,Y.,Nishio,M.,Sawada,KI.,Jodo,S.,Atsumi,T.,Koike,T. Up regulated expression of tumour necrosis factor  $\alpha$  converting enzyme in peripheral monocytes of patients with early systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 64 1165-1173.2005

10. Atsumi, T., Amengual, O., Yasuda, S., Matsuura, E., Koike, T. Research around  $\beta_2$ -glycoprotein I: A major target for antiphospholipid antibodies. *Autoimmunity* 38(5) 377-381.2005
  11. Fukae, J., Amasaki, Y., Yamashita, Y., Bohgaki, T., Yasuda, S., Jodo, S., Atsumi, T., Koike, T. Butyrate suppresses tumor necrosis factor  $\alpha$  production by regulating specific messenger RNA degradation mediated through a cis-acting AU-rich element. *Arthritis Rheum.* 52(9) 2697-2707.2005
  12. Koike, T., Atsumi, T. Antiphospholipid antibodies and cell activation: crucial role of p38 MAPK pathway. *Lupus* 14(10) 799-801.2005
  13. Atsumi, T., Nishio, T., Niwa, H., Takeuchi, J., Bando, H., Shimizu, C., Yoshioka, N., Bucala, R., Koike, T. Expression of inducible 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Bisphosphatase/PFKFB3 isoforms in adipocytes and their potential role in glycolytic regulation. *Diabetes* 54(12) 3349-3357.2005
  14. Kasahara, H., Matsuura, E., Kaihara, K., Yamamoto, D., Kobayashi, K., Inagaki, J., Ichikawa, K., Tsutsumi, A., Yasuda, S., Atsumi, T., Yasuda, T., Koike, T. Antigenic structures recognized by anti-B2-glycoprotein I auto-antibodies. *Int immunol* 17(12) 1533-1542.2005
  15. Yasuda, S., Bohgaki, M., Atsumi, T., Koike, T. Pathogenesis of antiphospholipid antibodies: impairment of fibrinolysis and monocyte activation via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Immunobiology* 210 775-780.2005
  16. Nakabayashi, T., Mizukami, K., Naitoh, S., Takeda, M., Shikamoto, Y., Nakagawa, T., Kaneko, H., Tarumi, T., Mizoguchi, I., Mizuno, H., Ieko, M., Koike, T. Protein C Sapporo (protein C Glu 25  $\rightarrow$  Lys): A heterozygous missense mutation in the Gla domain provides new insight into the interaction between protein C and endothelial protein C receptor. *Thromb Haemost* 94 942-950.2005
  17. Goto, H., Nishio, M., Endo, T., Sato, N., Koizumi, K., Fujimoto, K., Sakai, T., Kumano, K., Obara, M., Koike, T. Effective in vivo purging with rituximab and autologous peripheral blood stem cell transplantation in a woman with CD5 positive primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Haematol.* 74(6) 526-528.2005
  18. Nakamura, A., Simizu, C., Nagai, S., Taniguchi, S., Umetsu, M., Atsumi, T., Yoshioka, N., Ono, Y., Tajima, T., Kubo, M., Koike, T. A rare case of Gitelman's syndrome presenting with hypocalcemia and osteopenia. *J Endocrinol Invest* 28 464-468.2005
  19. Nishio, M., Endo, T., Fujimoto, K., Sato, N., Sakai, T., Obara, M., Kumano, K., Minauchi, K., Koike, T. Persistent panhypogammaglobulinemia with selected loss of memory B cells and impaired isotype expression after rituximab therapy for post-transplant EBV-associated autoimmune hemolytic anemia. *Eur J Haematol.* 75(6) 527-529.2005
  20. Matsumoto, R., Shimizu, C., Nagai, S., Taniguchi, S., Umetsu, M., Kimura, Y., Atsumi, T., Yoshioka, N., Kubo, M., Koike, T. Cat-eye syndrome with isolated idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Internal Med* 44(10) 1069-1073.2005
  21. Ieko, M., Tarumi, T., Nakabayashi, T., Yoshida, M., Naito, S., Koike, T. Factor Xa inhibitors: new anti-thrombotic agents and their characteristics. *Frontiers in Bioscience* 11 232-248.2006
- 著書
1. Yasuda S, Atsumi T, and Koike T.  $\beta_2$ -glycoprotein I and Anti- $\beta_2$ -glycoprotein I antibodies In: Khamashta MA, editor. *Hughes Syndrome.* London: Springer
- I. 学会発表  
APLAR meeting, 2006 予定
- H. 知的財産権の出願・登録  
なし

新規抗シトルリン化ペプチド抗体アッセイ系の開発と  
生物製剤反応予測因子としての展開に関する研究

分担研究者 沢田哲治 東京大学医学部 アレルギー・リウマチ内科 助手

研究要旨

（研究目的）抗 CCP (Cyclic citrullinated peptide) 抗体をはじめ、シトルリン残基を含むペプチドに対する抗体は関節リウマチ (RA) に特異性の高い血清マーカーであり、RA の診断や予後予測因子としての有用性が期待されている。本研究の目的は新規の抗シトルリン化ペプチド抗体アッセイ系を作成し、一連のシトルリン化抗原に対する反応パターンと疾患活動性・PADI 遺伝子多型・抗リウマチ薬（生物学的製剤を含む）に対する反応性について検討することである。今年度は *in vitro* でシトルリン化した defensins、p53 およびシトルリンを含むフィブリノゲン合成ペプチドについて RA 患者血清との反応性を検討した。（方法）自己抗体は ELISA、western blot を用いて測定した。シトルリン化抗原としては、*in vitro* で human PADI2 または PADI4 によりシトルリン化したリコンビナント p53 (His-tag)、 $\alpha$  defensin-1 (HNP1)、 $\alpha$  defensin-5 (HD5)、 $\beta$  defensin-1 (BD1)、 $\beta$  defensin-2 (BD2)、 $\beta$  defensin-3 (BD3) を使用した（コントロールはカルシウムの代わりに EDTA を添加）。シトルリン化の有無は anti-modified citrulline (Senshu) 抗体を用いて western blot で確認した。また、フィブリノゲンのアルギニンシトルリンに置換した 2 種類の合成ペプチド（コントロールはアルギニンのままのペプチド）も抗原として用いた。（結果）PADI2 は 5 種類の defensins すべてを、PADI4 は HD5 と BD3 を *in vitro* でシトルリン化した。RA 血清との反応性がシトルリン化により増幅されることはなかった。シトルリン化 p53 に対する抗体はおよそ 1/3 の RA 血清で検出された。シトルリンを含むフィブリノゲンペプチドとの反応パターンは多様であった。（考察）defensin はアルギニンを含む環状ペプチドであり、環状という点で CCP との類似性が考えられたが、シトルリン化しても RA 血清との反応は認められなかった。シトルリン化 p53 や個々のシトルリンを含むフィブリノゲンペプチドに対する抗体の陽性率は低い。しかし、組み合わせることで RA 患者をいくつかのグループに分けることが可能と考えられる。（結論）今後これらのシトルリン化ペプチド抗体の反応パターンと臨床的特徴（疾患活動性や生物学的製剤を含む薬剤反応性）との関連について検討する予定である。

A. 研究目的

○ 抗 cyclic citrullinated peptide (CCP) 抗体は関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) の診断マーカー、予後予測因子として有用な新規の自己抗体検査法である。すなわち、早期 RA を含めた RA 診断において、抗 CCP 抗体はリウマトイド因子より感度と特異度に優れており、リウマトイド因子に替わる新規の RA 診断マーカーとして期待されてい

る。さらに抗 CCP 抗体は、初診時に RA の診断基準を満たさない、診断未確定関節炎において、将来びらん性関節炎や RA を発症するか否かを予測する血清マーカーとしても有用であり、早期治療のマーカーとなる可能性も考えられる。一方、さらに抗 CCP 抗体が認識する自己抗原の本態に関しては不明であり、フィラグリン、フィブリノゲンやビメンチンの他にも、 $\alpha$  enolase、I 型および II 型コラーゲン、

eIF4GI などが知られているが、その病因的意義は確立されていない。本研究の目的はシトルリン化抗原を検索して、新規の抗シトルリン化ペプチド抗体アッセイ系を作成し、一連のシトルリン化抗原に対する反応パターンと疾患活動性・PADI 遺伝子多型・抗リウマチ薬（生物学的製剤を含む）に対する反応性について検討することである。今年度は *in vitro* でシトルリン化した defensins、p53 およびシトルリンを含むフィブリノゲン合成ペプチドについて RA 患者血清との反応性を検討した。

## B. 研究方法

自己抗体は定法にならない、ELISA、western blot を用いて測定した。シトルリン化抗原としては、*in vitro* で human PADI2 または PADI4 によりシトルリン化したリコンビナント p53 (His-tag)、 $\alpha$  defensin-1 (HNP1)、 $\alpha$  defensin-5 (HD5)、 $\beta$  defensin-1 (BD1)、 $\beta$  defensin-2 (BD2)、 $\beta$  defensin-3 (BD3) を使用した（コントロールはカルシウムの代わりに EDTA を添加して作成）。シトルリン化の有無は anti-modified citrulline (Senshu) 抗体を用いて western blot で確認した。

フィブリノゲンのアルギニンシトルリンに置換した 2 種類の合成ペプチド（コントロールはアルギニンのままのペプチド）も抗原として用いて抗シトルリン化フィブリノゲンペプチド抗体も ELISA にて測定した（シトルリンペプチドに対する抗体の OD 値と非シトルリンペプチドに対する抗体の OD 値との差分として表示）。

BSA-conjugated fibrinogen peptides  
 アルギニン・ペプチド A : EGGVVRGPRVV  
 シトルリン・ペプチド A : EGGVVCGRVV  
 アルギニン・ペプチド B : GNEITRGGSTS  
 シトルリン・ペプチド B : GNEITCGSTS

（倫理面への配慮）

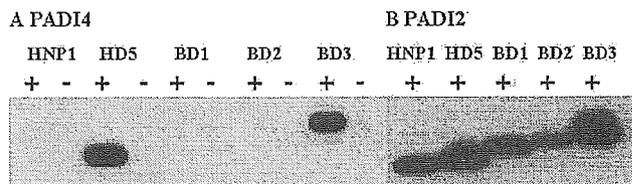
本研究は機能解析研究であり、遺伝子研究は含まない。また研究に用いる血清量はわずかであり、身体に与える影響は軽微である（倫理委員会承認済み）。

## C. 研究結果

用いたデフェンシンのアミノ酸配列は以下の通りである。

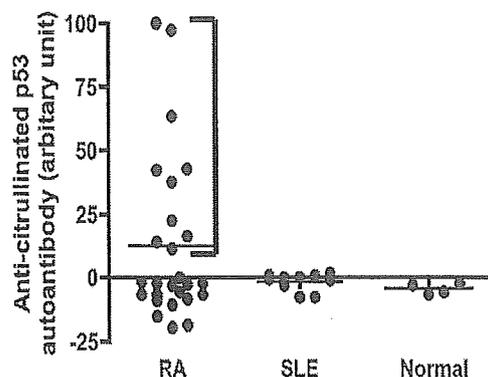
$\alpha$  defensin-1  
 ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRWLWAFCC  
 $\alpha$  defensin-5  
 ATCYCRTGRCATRESLSGVCEISGRLYRLCCR  
 $\beta$  defensin-1  
 DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQTGTCYRGKAKCKK  
 $\beta$  defensin-2  
 GIGDPVTCLKSGAICHVPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCKCKP  
 $\beta$  defensin-3  
 GIINTLQKYYCRVRGGRAVLSCPLKKEEQIGKCTRGRKCCR  
 RKK

下図のように、PADI2 は 5 種類の defensins すべてを、PADI4 は HD5 と BD3 を *in vitro* でシトルリン化した（Senshu 抗体による検出）。

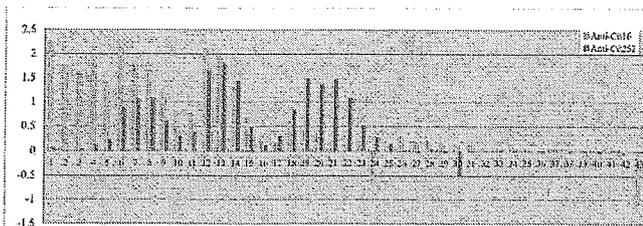


しかし、RA 血清との反応性がシトルリン化により増幅されることはなかった。

シトルリン化 p53 に対する抗体はおおよそ 1/3 の RA 血清で検出された。シトルリンを含むフィブリノゲンペプチドとの反応パターンは多様であった。



シトルリンを含むフィブリノゲンペプチドとの反応パターンは多様であった。



#### D. 考察

defensin はアルギニンを含む環状ペプチドであり、環状という点で CCP との類似性が考えられたが、シトルリン化しても RA 血清との反応は認められなかった。シトルリン化 p53 や個々のシトルリンを含むフィブリノゲンペプチドに対する抗体の陽性率は低いが検出は可能であった。

#### E. 結論

今回報告した新規シトルリンペプチド抗体の感度は抗 CCP 抗体（第2世代）よりも明らかに低い結果であった。しかし、組み合わせることで RA 患者を分類することが可能と考えられる。今後これらのシトルリン化ペプチド抗体の反応パターンと臨床的特徴（疾患活動性や生物学的製剤を含む薬剤反応性）との関連について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

・Kawaida R, Yamada R, Kobayashi K, Tokuhiko S, Suzuki A, Kochi Y, Chang X, Sekine A, Tsunoda T, Sawada T et al. CUL1, a component of E3 ubiquitin ligase, alters lymphocyte signal transduction with possible effect on rheumatoid arthritis. *Genes Immun.* 6(3):194-202, 2005.

・Kochi Y, Yamada R, Suzuki A, Harley JB, Shirasawa S, Sawada T, et al. A functional variant in FCRL3, encoding Fc receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities.

*Nat Genet.* 37(5):478-85, 2005.

・Suzuki A, Yamada R, Ohtake-Yamanaka M, Okazaki Y, Sawada T, Yamamoto K. Anti-citrullinated collagen type I antibody is a target of autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun.* 333(2):418-26, 2005.

・Y Takizawa, T Sawada et al. Peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) identified as a conformation-dependent autoantigen in rheumatoid arthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 34(3), 212-5, 2005

・Okazaki Y, Sawada T et al. Effect of Nuclear Factor- $\kappa$ B Inhibition on Rheumatoid Fibroblast-like Synoviocytes and Collagen Induced Arthritis. *J Rheumatol.* 32(8):1440-7, 2005.

・Chang X, Yamada R, Suzuki A, Kochi Y, Sawada T, Yamamoto K. Citrullination of fibronectin in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Rheumatology* 44(11):1374-82, 2005.

・Okazaki Y, Suzuki A, Sawada T et al. Identification of citrullinated eukaryotic translation initiation factor 4G1 as novel autoantigen in rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun* 341(1):94-100, 2006.

・Takizawa Y, Suzuki A, Sawada T, Ohsaka M, Inoue T, Yamada R, Yamamoto K. Citrullinated fibrinogen detected as a soluble citrullinated autoantigen in rheumatoid arthritis synovial fluids. *Ann Rheum Dis.* 2006 Jan 31; [Epub ahead of print]

##### 2. 学会発表

・山本一彦、沢田哲治、岡崎優子、瀧澤泰伸、山田亮. 自己免疫疾患発症の分子機構と制御 PADI4遺伝子は関節炎症の必要因子か 日本リウマチ学会総会・学術集会 (2005.04)

#### H. 知的財産権の出願・登録

なし