

関節リウマチ疾患関連遺伝子の民族差

分担研究者 山本 一彦 東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 教授
研究協力者 森美賀子（東京大学、理化学研究所）
小林香子、山田亮、鈴木亜香里、高地雄太（理化学研究所）

研究要旨

RA の個別医療を推進するためには疾患関連遺伝子の検索が重要である。近年、RA についても HLA 以外の疾患関連遺伝子の報告が出つつあるが、これらが民族に特有のものである可能性が示唆されている。そこで、白人集団で RA 関連遺伝子多型として報告のあったものを我が国の RA と非 RA サンプルで検討した。その結果、多型自体が存在しない場合、多型が存在しても頻度が異なる場合があり、いずれも RA との関連が見いだされることが判明した。今後、民族差を含めて疾患関連遺伝子多型をどのように考えていくかの問題が提起された。

A.研究目的

関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) は発症や病態の進展に複数の遺伝要因および環境要因が関連する、いわゆる多因子疾患の 1 つであると考えられている。RA の将来的な個別医療を推進する為には、これらの要因の同定と臨床症例との詳細な解析が重要である。従来から遺伝要因としては HLA-DR の共通アミノ酸配列 (シェアードエピトープ) が注目されてきており、これはほとんどの民族で概ね追認されていた。最近、HLA 以外に疾患関連遺伝子が報告され始め、我々も日本人 RA の疾患関連遺伝子として、peptidylarginine deiminase type 4 (PADI4) や Fc receptor-like 3 (FCRL3) などを報告している。しかし、これらは日本人やアジア人では追認されるものの、白人 (コーカサス人) では追認されないとの報告が多く、疾患関連遺伝子に民族差があることが大きな問題となりつつある。そこで、今回、主に白人において RA 関連遺伝子多型として報告されている、Cytotoxic T lymphocyte-associated 4 (CTLA4), MHC class II transactivator

(MHC2TA), Programmed cell death 1 (PDCD-1), Protein tyrosine phosphatase, nonreceptor-type 22 (PTPN22), Tumor necrosis factor α (TNF), Tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) などの遺伝子多型を日本人サンプルについて検討した。

B.研究方法

白人で報告されている RA 関連遺伝子多型頻度について日本人の患者 (1010 名) と非 RA 罹患者 (752 名) を用いて TaqMan アッセイ法にてジェノタイピングした。さらに性別、HLA-DR による層別化検定も行った。

C.研究結果

PTPN22 および PDCD-1 については、当該疾患関連 SNP が日本人には存在しなかった。また、CTLA4, MHC2TA, TNF, TNFR2 については関連が認められなかった。さらに、性別、HLA DR による層別分類によってもアレル頻度は変化がなかった。

D. 考察

それぞれの疾患関連遺伝子多型が民族により異なる場合、その遺伝子が民族特有の要因である可能性と当該遺伝子は疾患の成立に関与しているが、遺伝子多型に有意差が検出されない場合があり得る。例えば、アフリカ系米国人では HLA-DR の shared epitope 仮説が追認されないが、これはこの民族の RA には HLA-DR 遺伝子が関与していないことを示すものではない。すなわち、民族特有の関連遺伝子として検出されている遺伝子多型の中には、RA の共通要因として重要な遺伝子ないしカスケードに関するものが多く含まれている可能性が多い。しかし、多型自体の存在しない場合や、他の背景や環境の影響などで、ある民族ではそれらの多型が疾患関連遺伝子として有意に検出されない可能性がある。遺伝学的解析と病態生理学的解析を融合して判断する必要がある。

E. 結論

RA のように浸透率が低く複数の遺伝子座が発症に関与する可能性が考えられている疾患においては、さらなる疾患関連遺伝子同定のために日本人検体の確保、SNP データベースの充実などが急務と考える。また民族間の比較を平行して行う必要があると考える。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamamoto K, Okamoto A, Fujio K. Antigen-

specific immunotherapy for autoimmune diseases. *Expert Opin Biol Ther.* 7:359-367, 2007.

2. Okazaki Y, Suzuki A, Sawada T, Ohtake-Yamanaka M, Inoue T, Hasebe T, Yamada R, Yamamoto K. Identification of citrullinated eukaryotic translation initiation factor 4G1 as novel autoantigen in rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun.* 341:94-100, 2006.
3. Nakagome K, Dohi M, Okunishi K, To Y, Sato A, Komagata Y, Nagatani K, Tanaka R, Yamamoto K. Antigen-sensitized CD4⁺ CD62L^{low} memory/ effector T helper 2 cells can induce airway hyperresponsiveness in an antigen free setting. *Respir Res.* 28:6-46, 2006.
4. Nagatani K, Dohi M, To Y, Tanaka R, Okunichi K, Nakagome K, Sagawa K, Tanno Y, Komagata Y, Yamamoto K. Splenic dendritic cells induced by oral antigen administration are important for the transfer of oral tolerance in an experimental model of asthma. *J Immunol.* 176:148-1489, 2006.
5. Fujio K, Okamoto A, Araki Y, Shoda H, Tahara, Tsuno NH, Takahashi K, Kitamura T, Yamamoto K. Gene therapy of arthritis with TCR isolated from the inflamed paw. *J Immunol.* 177: 8140- 8147, 2006.

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

Methotrexate の薬理ゲノム学的研究—MTHFR 以外の遺伝子を中心に

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

Methotrexate (MTX) は最も重要な関節リウマチ (RA) の治療薬のひとつである。しかしその効果や副作用発現には個人差が大きいことが知られている。したがって、投与前に MTX に対する反応性が予測できれば臨床的に有用性が高いと考えられる。我々は以前、葉酸代謝の中心的酵素である methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) の遺伝子多型が MTX の投与量、副作用の予測に有用であることを報告したが、MTX が関係する代謝経路には他の酵素も関与する。そこで MTHFR 以外の代謝酵素の遺伝子多型と MTX の効果・副作用との関連について検討した結果、副作用の発現については 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase (FTD) 遺伝子、thymidylate synthase (TYMS) 遺伝子の多型、reduced folate carrier (RFC) 遺伝子、投与量との関係については serine hydroxymethyltransferase (SHMT) 遺伝子で有意な関連を認めた。これらの関連について今後さらに検証していく必要がある。

A. 研究目的

Methotrexate (MTX) は最も重要な関節リウマチ (RA) の治療薬のひとつである。しかしその効果や副作用発現には個人差が大きいことが知られている。したがって、投与前に MTX に対する反応性が予測できれば臨床的に有用性が高いと考えられる。我々は以前、葉酸代謝の中心的酵素である methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) の遺伝子多型が MTX の投与量、副作用の予測に有用であることを報告したが、MTX が関係する代謝経路には他の酵素遺伝子なども関与する。そこで、今回は主に MTHFR 以外の代謝酵素の遺伝子多型と MTX の効果・副作用との関連について検討した。

B. 研究方法

当センターに通院中の RA 患者のなかで東京女子医科大学遺伝子研究に関する倫理委員会で承認された研究計画に基づき同意が得られた患者 384 例からゲノム DNA を抽出した。MTX

の代謝経路の関係する酵素遺伝子の中から既知の多型を選択し、TaqMan 法 (Applied Biosystems) あるいは PCR-RFLP 法で遺伝子型を決定した。多型については、機能 (酵素活性など) に与える影響が報告されているものを含めて選択したが、一部では intron の SNP も解析対象とした。診療記録から MTX の投与量、副作用などを収集し、これらと遺伝子型との関について統計学的に解析した。

(倫理面への配慮)

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た計画に基づいて行われた。

C. 研究結果

228 例に MTX の投与歴を認めた。副作用については MTX 投与総量 300mg までに生じた副作用の頻度を各遺伝子型別に検討した。この検討においては投与前から肝機能異常のある症例や

既存の肝疾患症例を除いた 156 例を対象とした。また、投与量については MTX6mg/週以下で開始された 159 例のうち、投与開始 1 年後の増量の有無を各遺伝子型別に検討した。全副作用の発現については 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase (FTD) 遺伝子、thymidylate synthase (TYMS) 遺伝子の多型において有意な関連が認められた。副作用を肝機能異常のみに限ると reduced folate carrier (RFC) 遺伝子にも弱い関連が認められた。投与量については、serine hydroxymethyltransferase (SHMT) 遺伝子で有意な関連が認められた。しかし、5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase、5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide transformylase, folylpolyglutamyl synthase、dihydrofolate reductase, gamma-glutamyl hydrolase、MTHFD1, GART については検討した多型において有意な関連を認めなかった。

D. 考察

多くの疾患で薬理ゲノム学的検討が行われており、抗リウマチ薬についても薬理ゲノム学的データが集積しつつある。しかし、遺伝子多型の頻度には人種差があり、検討方法の違いなども結果に影響する可能性がある。したがって、我々は、薬物に対する反応性とゲノム情報との関連を臨床応用するにあたっては、「1. 仮説検定 (遺伝情報により表現型が異なる)、2. 再確認 (検定で確認された結果を独立のサンプルで再確認し、本質的に同じ結果が得られる)、3. ゲノム情報を治療に応用するアルゴリズムが構成でき、医療介入の結果が患者に有利であると予測される」、という 3 つのステップが必要であることを提唱している (Taniguchi A, et al.: Pharmacogenet Genomics in press)。これに基づき、すでに報告した MTHFR 遺伝子の多型と MTX の効果・副作用との関連については、治療アルゴリズムの有用性の検討を開始している。今回の検討で得られた関連については多型が酵素活性に与える影響が明らかでないものも含まれている。したがって、その関連性については今

後別の症例群で再確認し、そのうえでオーダーメイド医療における有用性を検討すべきであると考えられる。

E. 結論

MTX の関連する代謝経路の代謝酵素 (MTHFR を除く) の遺伝子を中心に、MTX の効果・副作用との関連性について検討した。TYMS、SHMT、FTD、RFC 遺伝子の多型において有意な関連が認められたが、これらの結果についてはさらに別の症例群で再確認する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 谷口敦夫: 関節リウマチのテーラーメイド医療 日医雑誌 135(5):1052,2006
2. Atsuo Taniguchi, Hisashi Yamanaka, Naoyuki Kamatani: Pharmacogenomics in the treatment of rheumatoid arthritis: clinical implication and perspective. Personalized Medicine 3(2):151-163, 2006
3. Atsuo Taniguchi, Wako Urano, Eiichi Tanaka, Shiori Furihata, Shigeo Kamitsuji, Eisuke Inoue, Mariko Yamanaka, Hisashi Yamanaka, Naoyuki Kamatani: Validation of the associations between single nucleotide polymorphisms or haplotypes and responses to diseasemodifying antirheumatic drugs in patients with rheumatoid arthritis: a proposal for prospective pharmacogenomic study in clinical practice Pharmacogenet Genomics in press
4. 谷口敦夫、鎌谷直之: 抗リウマチ薬の薬理ゲノム学とオーダーメイド医療への展開 日本臨床 65(2): 371-379, 2007

2. 学会発表

1. 谷口敦夫、浦野和子、田中栄一、降籬志おり、上辻茂男、山中麻里子、山中寿、鎌谷直之: 抗リウマチ薬の薬理遺伝学—オーダーメイド医療への応用をめざして. 日本内科学会雑誌

- 95(臨時増刊号),166: 2006
2. Atsuo Taniguchi, Wako Urano, Shiori Furihata, Shigeo Kamitsuji, Eisuke Inoue, Mariko Yamanaka, Hisashi Yanamaka, Naoyuki Kamatani: Validation of pharmacogenomic evidence necessary to put personalized medicine into practice for rheumatoid arthritis: (1)MTHFR polymorphisms and responses to MTX. Mod Rheumatol 16(suppl):125,2006
 3. Atsuo Taniguchi, Eiichi Tanaka, Shiori Furihata, Mariko Yamanaka, Wako Urano, Hisashi Yanamaka, Naoyuki Kamatani: Validation of pharmacogenomic data necessary to put personalized medicine into practice for rheumatoid arthritis: (2)NAT2 polymorphisms and adverse effect of sulfasalazine. Mod Rheumatol 16(suppl): 85、2006
 4. 谷口敦夫、浦野和子、降旗志おり、山中麻里子、田中栄一、山中寿、鎌谷直之:抗リウマチ薬の薬理遺伝学的検討の validation: RA へのオーダーメイド医療の導入をめざして. 第 13

- 回遺伝子診療学会 2006年7月28-29日、東京
5. 谷口敦夫、浦野和子、山中麻里子、川本学、山中寿、浦野真理、斎藤加代子、鎌谷直之: 関節リウマチにおけるオーダーメイド医療の試み 東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター、東京女子医科大学附属遺伝子医療センター 日本人類遺伝学会第51回大会 2006年10月17-20日、米子

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

ホスファチジルイノシトール3キナーゼ阻害による関節炎制御に関する研究

分担研究者 田村直人 順天堂大学膠原病内科 講師

研究要旨

新しいホスファチジルイノシトール3 (PI3)キナーゼ選択的阻害薬であるZSTK474を用いて、PI3キナーゼ阻害による抗リウマチ効果を検討した。コラーゲン誘発性関節炎モデルマウスにZSTK474を投与したところ、投与群で明らかな関節炎抑制が認められた。体重減少や臓器障害などの重篤な副作用は認められなかった。またPI3キナーゼ阻害によりリンパ球の活性化、増殖抑制、さらに滑膜細胞増殖や破骨細胞形成の抑制が認められ、これらの作用が抗リウマチ効果に関与していると考えられた。以上より、PI3キナーゼ阻害薬ZSTK474が、関節炎モデルマウスにおいて明らかな副作用なく関節炎を抑制すること、関節リウマチ治療に有用である可能性があること等が明らかになった。

A.研究目的

関節リウマチは関節滑膜を主座とする慢性の全身性炎症性疾患である。抗TNF- α 製剤をはじめとする生物学的製剤は、従来の抗リウマチ薬と比べ高い有効性を示すが、無効例があること、経口投与ができないこと、医療コストが高いこと、などの問題があり、さらなる治療法の開発が望まれる。

PI3キナーゼは、様々な細胞において種々の刺激により活性化し、細胞内シグナル伝達を行う重要なシグナル分子で、細胞の活性化や増殖、抗アポトーシス、炎症に強く関与する。PI3キナーゼは、関節リウマチの滑膜組織でも活性化していることが報告されている。以前より、抗炎症治療のターゲットとして注目されていたが、既存の阻害薬は動物実験で副作用が強く、使用が困難であった。

本研究では、PI3キナーゼ阻害薬の抗リウマチ作用を検討するため、コラーゲン誘発性関節炎モデルマウスに新しいPI3キナーゼ阻害薬であるZSTK474を投与し、関節炎抑制効果を検討した。また、PI3キナーゼ阻害薬の作用について *in vitro*での解析を行った。

B.研究方法

コラーゲン誘発性関節炎モデルマウスに新たに合成されたトリアジン系化合物であるPI3キナーゼ阻害薬(ZSTK474)を投与し、その効果を検討した。オスDBA/1マウスにday 1とday 22でII型コラーゲンを皮下注射にて投与し、約半数のマウスが関節炎を発症したday 28に、ランダムに4群に分け、各群それぞれ、溶媒のみ、ZSTK474 25, 50, 100 mg/kgを連日経口投与した。関節炎スコアおよび関節の病理所見を評価し、関節炎抑制効果を検討した。day 50に抗コラーゲン抗体をELISA法にて測定した。また、flow cytometry法を用いて、脾細胞の解析を行った。さらに、*in vitro*にて同阻害薬の脾リンパ球の増殖・活性化に対する影響をそれぞれ検討した。ヒト関節リウマチ患者由来の滑膜細胞をplatelet-derived growth factor (PDGF)で刺激しZSTK474添加の影響を検討した。また、破骨細胞誘導への影響を検討するため、ZSTK474存在下・非存在下に骨髄細胞をvitamin D存在下で骨芽細胞と共培養し、TRAP染色陽性細胞数を測定した。

(倫理面への配慮)

関節リマチ患者滑膜細胞の採取は、順天堂大学倫理委員会での承認の後に、手術時に従来は破棄するものを、患者から文書によるインフォームド・コンセントを得て行った。

C. 研究結果

コラーゲン誘発性関節炎モデルマウスにおいて、溶媒のみ投与群に比べ、ZSTK474 100mg/kg 投与群では、明らかに関節炎の抑制が認められた(図1)。また、病理学的にも炎症細胞浸潤、滑膜増殖および軟骨・骨破壊の抑制が認められた。投与群では、脾臓のT細胞数の軽度減少が認められたが、非投与群と比べて抗コラーゲン抗体価の有意な低下は認められなかった。投与群で体重減少や重篤な臓器障害は認められなかった。脾細胞を、*in vitro* でコンカナバリンAにより刺激した時の細胞増殖はZSTK474 添加により濃度依存性に抑制された。またZSTK474は、T細胞を抗CD3抗体および抗CD28抗体で刺激した時の、活性化マーカーであるCD69およびCD40 ligandの発現を抑制し、lipopolysaccharide 刺激時のB細胞増殖を抑制した。また、滑膜細胞をPDGFで刺激時にZSTK474を添加したところ、細胞数の減少が認められた(図2)。さらに、ZSTK474によるPI3キナーゼ阻害により、破骨細胞誘導の抑制が認められた。

D. 考察

PI3キナーゼは、種々の刺激により活性化し細胞増殖や炎症に関与する重要なシグナル分子である。本研究では、関節炎モデルマウスにおける関節炎抑制効果を、新たに合成されたPI3キナーゼ阻害薬であるZSTK474を用いて検討した。PI3キナーゼ阻害により関節炎は抑制がみられたことから、PI3キナーゼの関節炎の病態形成への関与が考えられた。抗コラーゲン抗体価は投与群・非投与群で差がなかったことから、そ

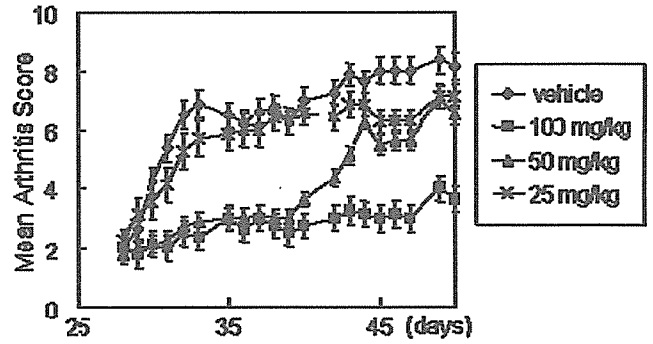


図1. 関節炎モデルにおけるZSTK474の効果

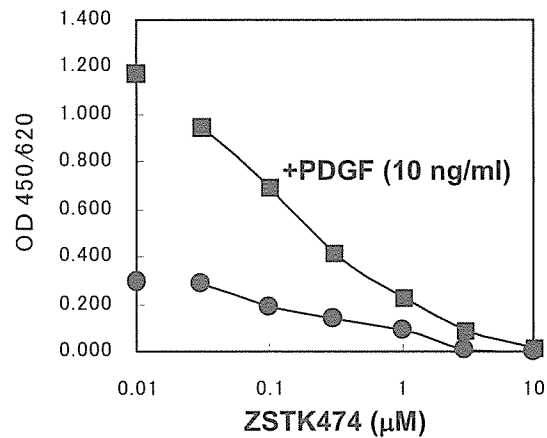


図2. PI3キナーゼ阻害による滑膜細胞増殖抑制

の抑制機序についてはT細胞あるいは関節滑膜への作用などが推察された。また投与群において、体重減少や明らかな臓器障害などの副作用は認められなかった。

PI3キナーゼには α 、 β 、 γ 、 δ のサブタイプがあり、 α 、 β はコヒキタスに広く分布し、 γ 、 δ は主に血液系細胞に発現している。最近、PI3キナーゼ γ 特異的阻害薬のコラーゲン誘発性関節炎に対する抑制効果が示され(Camps M, et al, Nature Medicine 11, 2005)、PI3キナーゼ阻害が関節リマチ治療のターゲットになる可能性が示唆された。サブタイプ特異的な阻害薬を用いることにより副作用の軽減がはかれる可能性があるが、その発現がない滑膜細胞や破骨細胞に対する直接的な効果は期待できない。本研究で用いられたZSTK474はサブタイプ非特異的な阻害薬であるが、重篤な副作用もマウスでは認められなかった。

今後は、病態に応じてサブタイプ特異的あるいは非特異的な阻害を試みることにより、その時点での病態に効果があり、より副作用が少ない治療を選択できる可能性が考えられる。

E. 結論

PI3 キナーゼ阻害薬 ZSTK474 は、コラーゲン誘発性関節炎を抑制した。PI3 キナーゼ阻害による関節リウマチ治療の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

田村直人, 春田和彦, 小林茂人, 橋本博史:
ホスファチジルイノシトール3キナーゼ阻害剤の
関節炎モデルに対する抑制作用. 第50回日本リ

ウマチ学会総会・学術集会, 2006, 長崎.

Tamura, N., Haruta, K., Kobayashi, S., Hirose, S., Bando, H., Fujii, T., Takasaki, Y., Shirai, R., Hashimoto, H.: Effect of monoclonal anti-cardiolipin antibodies from NZB/W F1 mouse on the expression of thrombomodulin on the human umbilical vein endothelial cells. American College of Rheumatology 61st National Scientific Meeting, 1997, Washington DC, USA. (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

インフリキシマブ使用関節リウマチ患者における手足 X 線所見の変化に関する研究

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

インフリキシマブを使用し、54 週（1 年後）を経過した 25 例（男性 10 例、女性 15 例）の RA 患者の、手、足の X 線を評価し、骨破壊の進行について検討した。1 年後に骨びらんの進行を認めた 6 例（関節破壊進行群）と、進行を認めなかった 19 例（関節破壊非進行群）で、インフリキシマブ使用前、使用後 2 週目（2W）での臨床症状、検査成績等を比較した。進行群、非進行群ともに、2W で ESR、MMP-3、腫脹関節数、関節点数、医師 VAS、患者疼痛評価、患者全般評価が改善していた。しかし、進行群では、RF、圧痛関節数、HAQ の改善は認められなかった。非進行群では、2W で TTP/HuR が有意に低下し、TIA-1/TNF α が有意に上昇していた。また、1 例ではインフリキシマブ使用前後でコンパクト MRI による評価を行なったところ、骨びらんが明らかに改善していた。インフリキシマブはある程度骨破壊を防いでいる可能性があること、投与初期の反応性で 1 年後の骨破壊の進行を予測できる可能性があることが明らかになった。

A. 研究目的

インフリキシマブの関節破壊抑制効果を明らかにし、また、関節破壊進行例と非進行例が予測可能であるかを検討する。

B. 研究方法

1) インフリキシマブを使用し、54 週（1 年後）を経過した 25 例（男性 10 例、女性 15 例）の RA 患者の、手、足の X 線を評価し、骨破壊の進行について放射線科医の診断を基に検討した。放射線科医は、インフリキシマブ使用患者であることは知らされているが、臨床症状や検査データは知らされずに診断を行った。その後も半年おきに評価し、最長 2 年半まで追跡した。平均年齢は 52.2 ± 12.1 才、平均罹病期間は 9.6 ± 6.3 年、Steinbrocker の Stage, Class の平均は、それぞれ 2.8 ± 1.0 、 1.9 ± 0.9 であった。1 年後の ACR 改善率は、0: 9 例（36.0%）、20: 5 例（20.0%）、50: 4 例（16.0%）、70: 7 例（28.0%）であった。1 年後に X 線上骨び

らんの進行を認めた 6 例（関節破壊進行群）と、進行を認めなかった 19 例（関節破壊非進行群）で、インフリキシマブ使用前（0W）、使用後 2 週目（2W）での臨床症状、検査成績を比較し、使用初期の状態で 1 年後の骨破壊を予測できるかを検討した。また、末梢血単核球中 TNF α 、および TNF α 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 0W、2W で定量 PCR 法にて測定し、同様に、関節破壊進行群と、非進行群で比較した。2) 1 例については、筑波大学附属病院の外来に設置したコンパクト MRI を用いて、インフリキシマブ使用前、6 回使用後（30 週後）に両手を撮像した。

（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. 手足 X 線の変化

右手では、半年後、1 年後、1 年半後、2 年後、2 年半後にそれぞれ 21/25 例 (84.0%)、21/25 例 (84.0%)、8/11 例 (72.7%)、4/8 例 (50.0%)、2/6 例 (33.3%) で進行を認めなかった (図 1a)。

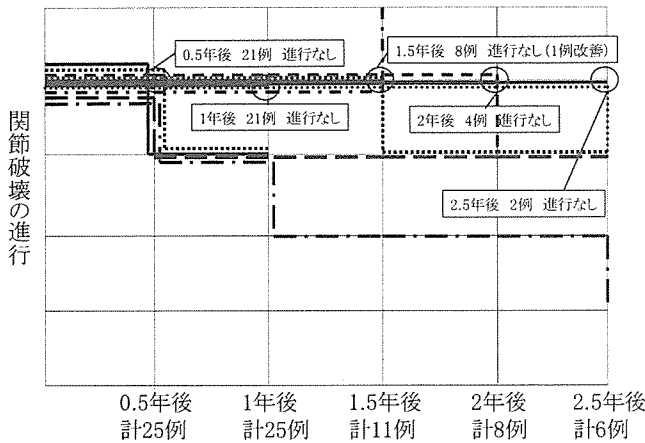


図1a 右手X線での骨破壊の進行

左手の進行も全く同じ%であった。1 年半後では、進行のない 8 例のうち、1 例は改善と判断されていた。右足では、半年後、1 年後、1 年半後、2 年後、2 年半後にそれぞれ 23/25 例 (92.0%)、23/25 例 (92.0%)、10/11 例 (90.9%)、7/8 例 (87.5%)、5/6 例 (83.3%) で進行を認めなかった (図 1b)。

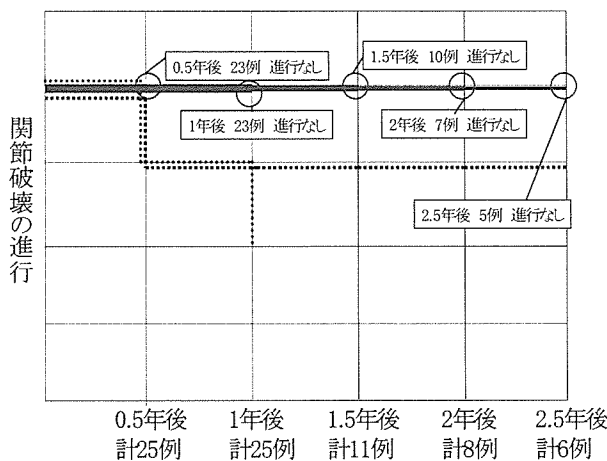


図1b 右足X線での骨破壊の進行

左足では、半年後、1 年後、1 年半後、2 年後、

2 年半後にそれぞれ 22/25 例 (88.0%)、22/25 例 (88.0%)、8/11 例 (72.7%)、6/8 例 (75.0%)、4/6 例 (66.7%) で進行を認めなかった。両手足でまったく進行のない症例は、半年後、1 年後、1 年半後、2 年後、2 年半後にそれぞれ 19/25 例 (76.0%)、19/25 例 (76.0%)、10/11 例 (90.9%)、2/8 例 (25.0%)、0/6 例 (0%) であった。1 年後に X 線上骨びらんの進行を認めた 6 例の ACR 改善率は、ACR 0: 1 例、ACR 20: 1 例、ACR 50: 3 例、ACR 70: 1 例であった。研究期間中 1 例が右股関節の関節置換術を施行されていたが、インフリキシマブ使用前にすでに関節は破壊されていた。関節破壊進行群と、非進行群では、年齢、罹病期間、Stage、Class、プレドニゾンや MTX の使用量に差はなかった。進行群、非進行群ともに、2W で ESR、MMP-3、腫脹関節数、関節点数、医師 VAS、患者疼痛評価、患者全般評価が改善していた。しかし、進行群では、RF、圧痛関節数、HAQ の改善は認められなかった。非進行群では、2W で TTP/HuR が有意に低下し、TIA-1/TNF α が有意に上昇していた。

2. コンパクト MRI での骨病変の評価

52歳女性、罹病期間2年、Stage 2、Class 1。初診時の DAS28 は 4.18 で、その後プレドニゾン 10mg/日、SASP 1g/日、MTX 10mg/週、でも活動性が高く、腫脹関節数4、疼痛関節数1、DAS3.73の時点でインフリキシマブの導入となった (図2a)。

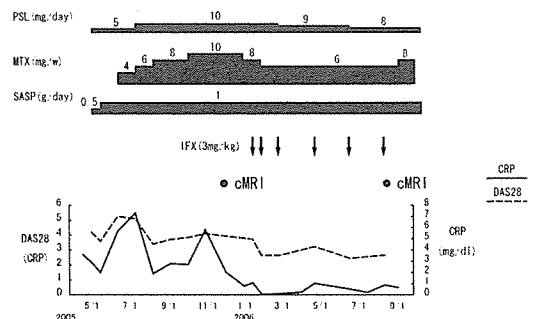


図2a コンパクトMRIで評価した症例の臨床経過

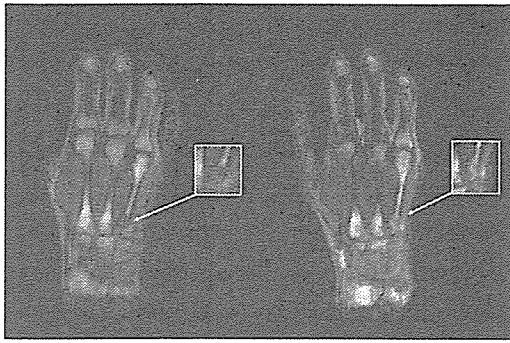


図2b コンパクトMRIでの右手の変化
T1強調画像。インフリキシマブ開始前は右第1,4中手骨に骨びらんを認めているが、インフリキシマブ投与後は骨修復が認められている。

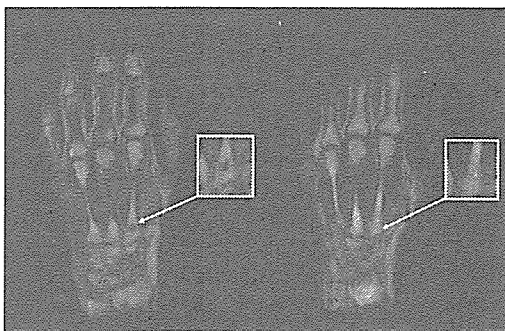


図2c コンパクトMRIでの左手の変化
T1強調画像。インフリキシマブ開始前は左第1,2中手骨に骨びらんを認めているが、インフリキシマブ投与後は骨修復が認められている。

これまでにインフリキシマブを6回投与しており、CRPは1mg/dl前後で推移し、DAS28は2の後半から3前後で経過している。DAS28の変化は1.5程度で、moderate responderである。半年後の手足単純X線評価では、骨病変の進行は認めなかった。この症例はインフリキシマブ使用から1年を経ておらず、前述の手足単純X線評価の研究には含まれていない。投与前に右第1・4CM関節、左第1・2CM関節に骨びらんを認めたが、投与後改善を認めた(図2b, c)。

D. 考察

今回の研究では、インフリキシマブ導入のため他院から紹介された患者が多く、また当院通院中に導入した患者も導入前の定期的なX線を撮影しておらず、導入前後の骨破壊の速度の比較は不可能であった。しかし、手足に限っては、インフリキシマブはある程度骨破壊を防いでいる可能性が示唆された。1年後

のACR改善率と骨破壊の進行には明確な関係は認められない可能性があるが、投与初期の反応性で1年後の骨破壊の進行を予測できる可能性があると思われた。今回の研究は手足のみに注目したが、今後大関節(荷重関節)も評価した研究が必要であると思われる。また、インフリキシマブ導入症例全例を今後コンパクトMRIを用いて撮像し、骨破壊の抑制、改善を評価する予定である。

E. 結論

手足に限っては、インフリキシマブはある程度骨破壊を防いでいる可能性がある。また、投与初期の反応性で1年後の骨破壊の進行を予測できる可能性があると思われた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.* 65:968-969, 2006
2. 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* 23:370-376, 2006
3. 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- α production in Jurkat T cells. *Int. J. Mol. Med* 17:801-809, 2006
4. Ohnishi Y, Tsutsumi A, Matsumoto I, Goto D, Ito S, Kuwana M, Uemura Y, Nishimura Y,

Sumida T. Altered peptide ligands control type II collagen-reactive T cells from RA patients. *Mod. Rheumatol.* 16:226-228, 2006

5. Suzuki E, Tsutsumi A, Sugihara M, Mamura M, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Ikeda K, Ochiai N, Sato Y, Sumida T. Expression of TNF- α , tristetraprolin, T-cell intracellular antigen-1 and Hu antigen R genes in synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Med.* 18:273-278, 2006

6. Kobayashi T, Ito S, Yasuda K, Kuroda T, Yamamoto K, Sugita N, Tai H, Narita I, Gejyo F, Yoshie H. The Combined Genotypes of Stimulatory and Inhibitory Fc γ Receptor Associated with Systemic Lupus Erythematosus and Periodontitis in Japanese. *J Periodontology* (in press)

7. Sugihara M, Tsutsumi A, Suzuki E, Wakamatsu E, Suzuki T, Ogishima H, Hayashi T, Chino Y, Ishii W, Mamura M, Goto D, Isao M, Ito S, Sumida T. Effects of infliximab therapy on gene expression levels of TNF- α , TTP, TIA-1 and HuR in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*(in press)

2. 学会発表

1. 杉原誠人、堤 明人、荻島 博、千野裕介、石井 亘、真村瑞子、後藤大輔、松本 功、伊藤 聡、住田孝之: AU-rich element binding protein 遺伝子発現と関節リウマチ患者での infliximab 効果予測 第103回日本内科学会 (2006年)

2. 杉原誠人、堤 明人、岩波慶一、荻島 博、鈴木 豪、林 太智、千野裕介、石井 亘、真村瑞子、後藤大輔、松本 功、伊藤 聡、住田孝之: Infliximab 治療中の関節リウマチ患者における TNF α ; mRNA の転写後制御因子, TTP, TIA-1 および HuR の遺伝子発現

第50回日本リウマチ学会 (2006年)

3. 伊藤 聡、杉原誠人、荻島 博、千野裕介、石井 亘、真村瑞子、後藤大輔、松本 功、堤 明人、住田孝之: 当科における RA 患者での infliximab 治療反応性の予測 第50回日本リウマチ学会 (2006年)

4. 半田晋也、拝師智之、巨瀬勝美、吉岡 大、住田孝之、伊藤 聡: 関節リウマチ診断用コンパクトMRIの開発 第50回日本リウマチ学会 (2006年)

5. 伊藤 聡: インフリキシマブ使用RA患者の手足 X 線所見の変化に関する検討 第34回日本リウマチ・関節外科学会 (2006年)

6. Sugihara M, Tsutsumi A, Suzuki E, Suzuki T, Ogishima H, Hayashi T, Chino Y, Ishii W, Mamura M, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Sumida T.: Gene Expressions of TNF- α , Tristetraprolin, T cell internal antigen-1 and Hu antigen R in Rheumatoid arthritis patients treated with infliximab. Annual European Congress of RHEUMATOLOGY EULAR 2006

7. Sugihara M, Tsutsumi A, Suzuki E, Matsui H, Kohno M, Suzuki T, Ishii W, Mamura M, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Sumida T. Gene Expressions of Tumor Necrosis Factor- α Post-Transcriptional Regulators, Tristetraprolin, T Cell Intracellular Antigen-1 and Hu Antigen R in Rheumatoid Arthritis Patients Treated with Infliximab 2006 ANNUAL SCIENTIFIC MEETING on the ACR, 2006

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。

蛋白シトルリン化機序の解析に関する研究

分担研究者 川上 純
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科展開医療科学講座
リウマチ免疫病態制御学分野 講師

研究要旨

抗環状シトルリン化ペプチド抗体(抗 CCP 抗体)は関節リウマチ(RA)に特異的に検出され、かつ、RA 滑膜組織では peptidylarginine deiminase 4(PADI4)とシトルリン化蛋白の発現が強いことが確認されている。今回、蛋白シトルリン化機序を、培養滑膜線維芽細胞、末梢血単核球、HL-60 細胞株を用いて解析した。培養滑膜線維芽細胞は PADI2 蛋白と PADI4 蛋白の発現はあるも PADI4 mRNA 発現とシトルリン化蛋白は検出し得なかった。末梢血単核球と HL-60 細胞株ではシトルリン化蛋白の発現が認められ、以下の解析は HL-60 細胞株を用いた。HL-60 細胞株には異なる分子量のシトルリン化蛋白の発現が検出されたが、最も発現が強い分子はヒストンと考えられた。HL-60 細胞株を TNF- α 等の炎症性サイトカインで刺激すると時間依存性に PADI4 発現と蛋白シトルリン化が有意に増強された。PADI2 の発現は刺激前後で変化を認めなかった。今後はサイトカインで誘導される PADI(PADI4)-蛋白シトルリン化のシグナルカスケードを明らかにし、抗サイトカイン療法とは異なる次世代の分子標的療法の開発につなげたい。

A.研究目的

シトルリン化蛋白の発現は RA 滑膜組織では強い。シトルリン化蛋白は HLA-DRB1 shared epitope (SE)に提示されやすく、この過程が抗 CCP 抗体産生誘導につながると考えられ、蛋白シトルリン化機序の研究は RA の新たな分子標的療法の開発に重要な課題と思われる。今回はヒト培養細胞を用い、蛋白シトルリン化および PADI2/PADI4 発現誘導機序に関して研究した。

B.研究方法

1. 今回の実験は健常人末梢血単核球、RA 患者由来培養滑膜線維芽細胞、HL-60 細胞株を用いた。
2. PADI2/PADI4 発現の検討:mRNA 発現は特異的プライマーを用いた RT-PCR で、また、蛋白

発現はポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロットで評価した。

3. 蛋白シトルリン化の検討:蛋白シトルリン化は抗化学修飾シトルリン化蛋白抗体を用いたウエスタンブロットで評価した。ウエスタンブロットの陽性コントロールはシトルリン化リコンビナントヒストンを用いた。

(倫理面への配慮)

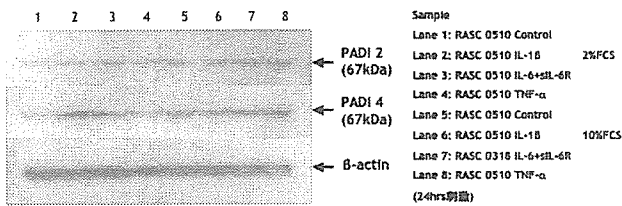
ヒト末梢血単核球および RA 患者由来培養滑膜線維芽細胞は、文書で同意が得られた症例より単離し実験に用いた。

C.研究結果

1. 培養滑膜線維芽細胞での検討:ウエスタンブロットでは PADI2/PADI4 発現は検出されるも(図

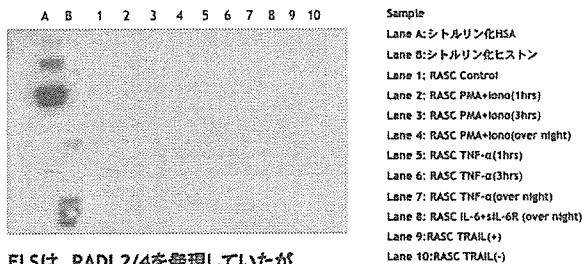
1)、滑膜線維芽細胞では炎症性サイトカインを含む種々の刺激下でもシトルリン化蛋白(図2)ならびに PADI4 mRNA 発現は検出し得なかった(図3)。

図1. 滑膜線維芽細胞 (Fibroblast like synovial cell: FLS) を用いた実験
Western blot analysis for PADI 2&4 of cultured FLS



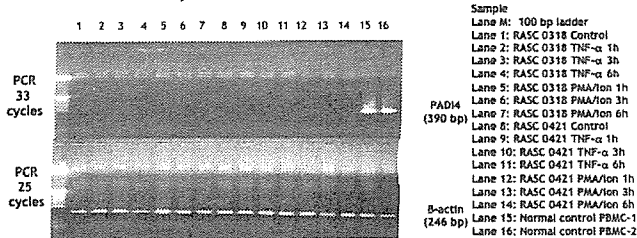
Western blotでは、FLSにはPADI 2とPADI 4が検出された。

図2. 滑膜線維芽細胞 (Fibroblast like synovial cell: FLS) を用いた実験
Western blot analysis for citrullinated proteins of cultured FLS



FLSは、PADI 2/4を発現していたが、様々な刺激(IL-6, TNF-α, PMA+ionomycin, TRAIL)を加えても、シトルリン化された蛋白は検出されなかった。

図3. 滑膜線維芽細胞 (Fibroblast like synovial cell: FLS) を用いた実験
RT-PCR analysis for PADI 4 of cultured FLS



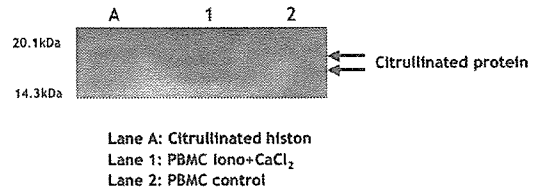
滑膜線維芽細胞では、PADI 4のmRNAは検出できなかった。

2. 末梢血単核球とHL-60細胞株での検討: 末梢血単核球はPADI4 mRNA(図3)を発現し、シトルリン化蛋白もCa influx刺激下で検出し得た(図4; イオノマイシン+CaCl₂刺激)。HL-60細胞株ではCa influx刺激がなくてもPADI4およびシトルリン化蛋白を検出し得た(図5)。HL-60細胞株を用いた検討では、TNF-α、IL-6、IFN-γなど炎症性サイトカインによりPADI2/PADI4発現およびシトルリン化蛋白の発現が増強された(図6)。分子量などから推定すると主なシトルリン化蛋白は

ヒストンと思われるが、HL-60細胞株ではヒストン以外のシトルリン化蛋白発現がサイトカインにより誘導されると考えられた(図6)。

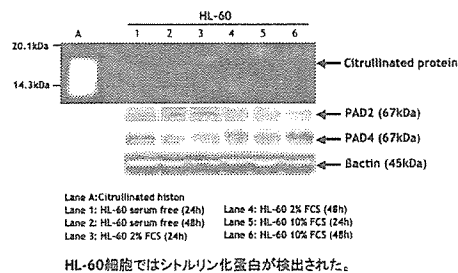
図4. 末梢血単核球(PBMC)を用いた実験

Western blot analysis for Citrullinated proteins of PBMC



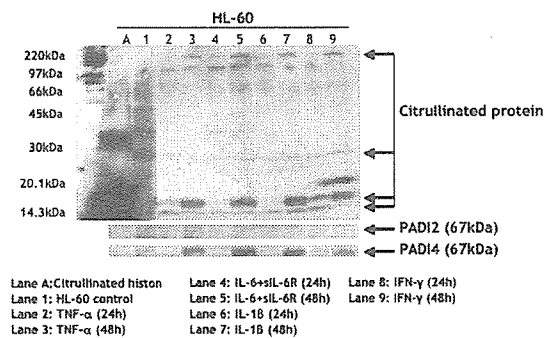
PBMCでは、Ca刺激下でシトルリン化蛋白が検出された。

図5. HL-60を用いた実験



HL-60細胞ではシトルリン化蛋白が検出された。

図6. HL-60をサイトカインで刺激



D. 考察

ヒト培養細胞でもPADI2/PADI4およびシトルリン化蛋白の発現が検出され、これら発現誘導機序が炎症性サイトカインで修飾される可能性が考えられた。

E. 結論

蛋白シトルリン化が炎症性サイトカインにより、シトルリン化誘導酵素(PADI)発現誘導機序を介して制御されることが示唆された。今後は詳細なシグナル伝達機構の解析、シトルリン化される分子

の同定および滑膜線維芽細胞でも検出可能なアッセイ系の確立などが課題と考えられる。

F.健康危険情報

なし。

G.研究発表

1.論文発表

- 1.Kawakami A, Nakashima K, Tamai M, Nakamura H, Iwanaga N, Fujikawa K, Aramaki T, Arima K, Iwamoto N, Ichinose K, Kamachi M, Ida H, Origuchi T, Eguchi K. Examination of toll-like receptor expression in salivary glands from patients with Sjögren's syndrome and functional analysis by human salivary gland cell line. *J Rheumatol*, in press.
- 2.Soejima K, Nakamura H, Tamai M, Kawakami A, Eguchi K. Activation of MKK4 (SEK1), JNK, and c-Jun in labial salivary infiltrating T cells in patients with Sjögren's syndrome. *Rheumatol Int* 27 (4): 329-33, 2007.
- 3.Mechanisms of autoantibody production and the relationship between antiantibodies and the clinical manifestations in Sjögren's syndrome. *Translational Res* 148 (6): 281-8, 2006.
- 4.Tamai M, Kawakami A, Tanaka F, Miyashita T, Nakamura H, Iwanaga N, Izumi Y, Arima K, Aratake K, Huang M, Kamachi M, Ida H, Origuchi T, Eguchi K. Significant inhibition of TRAIL-mediated fibroblast-like synovial cell apoptosis by IFN-gamma through JAK/STAT pathway by translational regulation. *J Lab Clin Med* 147 (4): 182-90, 2006.
- 5.Izumi Y, Ida H, Huang M, Iwanaga N, Tanaka F, Aratake K, Arima K, Tamai M, Kamachi M, Nakamura H, Origuchi T, Kawakami A, Anderson P, Eguchi K. Characterization of peripheral natural killer cells in primary Sjögren's syndrome: impaired NK cell activity and low NK cell number. *J Lab Clin Med* 147(5):242-9, 2006.
- 6.Tamai M, Kawakami A, Iwanaga N, Fujikawa K, Tanaka F, Aramaki T, Izumi Y, Aratake K, Arima K, Kamachi M, Nakamura H, Huang M, Ida H, Origuchi T, Eguchi K. Examination of IgM rheumatoid factor (IgM-RF) and anti-cyclic citrullinated peptide antibody (anti-CCP Ab) in

Japanese patients with palindromic rheumatism. *Intern Med* 45(12):795-7, 2006.

7. Tamai M, Kawakami A, Uetani M, Takao S, Tanaka F, Nakamura H, Iwanaga N, Izumi Y, Arima K, Aratake K, Kamachi M, Huang M, Origuchi T, Ida H, Aoyagi K, Eguchi K. The presence of anti-cyclic citrullinated peptide antibody is associated with magnetic resonance imaging detection of bone marrow oedema in early stage rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 65 (1): 133-134, 2006.
8. Tamai M, Kawakami A, Uetani M, Takao S, Rashid H, Tanaka F, Fujikawa K, Aramaki T, Nakamura H, Iwanaga N, Izumi Y, Arima K, Aratake K, Kamachi M, Huang M, Origuchi T, Ida H, Aoyagi K, Eguchi K. Early prediction of rheumatoid arthritis by serological variables and magnetic resonance imaging of the wrists and finger joints: results from prospective clinical examination. *Ann Rheum Dis* 65 (1): 134-135, 2006.
- 9.川上 純、玉井慎美、江口勝美:早期関節炎の捉え方と病態解析の方向性. *日本臨床免疫学会会誌* 30 (1): 37-40, 2007.
10. 川上純, 玉井慎美, 藤川敬太, 岩本直樹, 有馬和彦, 江口勝美, 上谷雅孝, 高尾正一郎, 青柳潔:関節リウマチの早期診断と早期からの骨病変進展予測の試み. *臨床リウマチ* 18 (4): 352-357, 2006.
11. 川上 純: CaMKII による滑膜線維芽細胞アポトーシス制御に関する研究 平成 17 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 17 年度 総括・分担研究報告書 p34-37, 2006.

2.学会発表

- 1.藤川敬太、川上 純、江口勝美他. 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 50 回 (中) 日本リウマチ学会総会・学術集会, 2006 年 4 月 23 日~26 日, 長崎.
- 2.岩永 希、川上 純、江口勝美他. 関節リウマチに対する infliximab の治療効果: 54 週での検討. 第 50 回 (中) 日本リウマチ学

会総会・学術集会, 2006年4月23日～26日, 長崎.

3.中村英樹、川上 純、江口勝美他. シェーグレン症候群における epidermal growth factor (EGF) による PI3K-Akt 経路の活性化と NF-κB translocation との関係について. 第50回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会, 2006年4月23日～26日, 長崎.

4.副島和孝、川上 純、江口勝美他. シェーグレン症候群小唾液腺浸潤 T 細胞における MKK4 (SEK1)、JNK and c-Jun の活性化について. 第50回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会, 2006年4月23日～26日, 長崎.

5.有馬和彦、川上 純、江口勝美他. 関節リウマチにおける骨髄浮腫と遺伝子多型の検討. 第50回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会, 2006年4月23日～26日, 長崎.

6.玉井慎美、川上 純、江口勝美他. 関節リウマチの早期診断と予後予測. 第50回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会, 2006年4月23日～26日, 長崎.

7.玉井慎美、川上 純、江口勝美他. 関節リウマチの早期診断と予後予測の試み. 第103回日本内科学会講演会, 2006年4月14日～16日, 横浜.

8.Kawakami A, Eguchi K, et al. Examination of early joint damage in early-stage rheumatoid arthritis: Results from prospective clinical study. The 15th International Rheumatology Symposium, 2006. 4. 23-26, Nagasaki.

9.Tamai M, Kawakami A, Eguchi K, et al. Bone marrow oedema and serologic autoantibodies predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis of

Japanese population. European league against rheumatism annual European congress of rheumatology, 2006. 6. 21-24, Amsterdam.

10.Arima K, Kawakami A, Eguchi K, et al. The increased production of VEGF-A is primary disorder in patients with RS3PE syndrome. European league against rheumatism annual European congress of rheumatology, 2006. 6. 21-24, Amsterdam.

11.Arima K, Kawakami A, Eguchi K, et al. Functional promoter polymorphism of MMP-9 is related with bone marrow edema of anti-CCP negative patients. European league against rheumatism annual European congress of rheumatology, 2006. 6. 21-24, Amsterdam.

12.有馬和彦、川上 純、江口勝美他. 関節リウマチにおける骨髄浮腫と MMP-9 高発現機能的遺伝子多型の検討. 第34回日本臨床免疫学会総会, 2006年10月2日～3日, 東京.

13.玉井慎美、川上 純、江口勝美他. 診断未確定関節炎から関節リウマチへの進展予測. 第34回日本臨床免疫学会総会, 2006年10月2日～3日, 東京.

(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)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。昨年までの本研究により、ヒト末梢血単球分画（CD16 陽性、CD16 陰性）間において、破骨細胞分化能を比較検討し、CD16 陰性単球が破骨細胞に分化することを示した。本年度は、両単球間での破骨細胞分化能の違いについてより詳細に検討した。CD16 陰性細胞からの破骨細胞分化は、CD16 陽性細胞を加えることにより抑制されなかった。また、RANKL 刺激後の細胞内シグナル伝達経路を解析したところ、CD16 陰性単球においてのみ、ERK1/2, p38 のリン酸化活性が認められた。これらの結果より、CD16 陽性単球に破骨細胞抑制機能はないこと、また RANKL 刺激による ERK1/2, p38 活性化の違いが破骨細胞分化の差異に寄与す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。昨年までの本研究により、ヒト末梢血単球分画のうち、CD16 陰性単球が破骨細胞に分化することを見出した。本年は CD16 陽性、陰性分画の破骨細胞分化の違いについてより詳細に検討した。

B. 研究方法

ヒト末梢血より CD16 陽性、陰性単球を単離し、M-CSF + RANKL で刺激し、破骨細胞形成を、形態・TRAP 染色により評価した。

CD16 陽性、陰性の単球分画からの c-fms, RANK の発現を western blot にて解析した。また、c-fms の細胞表面への発現をフローサイトメーターにて解析した。

CD16 陽性、陰性分画を RANKL にて刺激し、ERK1/2, p38 のリン酸化を、抗リン酸化 ERK1/2, p38 抗体を用いて、フローサイトメーターで解

析した。

（倫理面への配慮）

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 陽性単球に破骨細胞分化を抑制する働きがあるか否かについて検討するため、CD16 陰性単球に、CD16 陽性単球を加えて、M-CSF + RANKL で刺激し、TRAP 染色陽性、多核の分化した破骨細胞数を計測した。CD16 陽性単球を加えても、CD16 陰性単球から分化した破骨細胞数に有意な変化は認めなかった（図 1）。

M-CSF, RANKL のレセプターである c-fms, RANK の発現を蛋白レベルで western blot またはフローサイトメーターで解析した。Western blot にて、c-fms および RANK の発現は、CD16 陽性、陰性単球分画において一定の発現量の差は認められなかった（図 2）。また、フローサイトメーターにて c-fms の細胞表面の発現を解析したが、CD16 陽性、陰性に明らかな発現の差異は認められなかった（図 2）。

次に、RANKL 刺激による細胞内シグナルの違いを検討するため、RANKL 刺激によりリン酸化 ERK1/2、p38 の発現を、フローサイトメーターで解析した。ERK1/2、p38 とともに、CD16 陰性単球において、刺激 5 分後に活性化を認め、10 分後には低下し、20 分後には刺激前と同レベルまで減少した (図 3)。

D. 考察

CD16 陰性単球は、M-CSF + RANKL 刺激により破骨細胞への分化を示し、一方、CD16 陽性単球は破骨細胞に分化しない。そのため、CD16 陽性単球に破骨細胞分化を抑制する機能がある可能性が考えられた。しかしながら、CD16 陽性単球を加えることにより、CD16 陰性単球からの破骨細胞分化は抑制されなかった。このことより、CD16 陽性単球に破骨細胞分化抑制作用はなく、破骨細胞への分化能の違いの原因ではないと考えられた。

RANKL、M-CSF のレセプターである、RANK、c-fms の発現に関して本年は蛋白レベルで解析したが、CD16 陽性、陰性単球間で明らかな違いは認められなかった。

また、RANKL 刺激による細胞内シグナル伝達の違いを検討した。ERK1/2、p38 の活性化の違いを解析したが、CD16 陰性分画においては、ERK1/2、p38 のリン酸化が認められたが、CD16 陽性細胞においては認められなかった。この違いが、破骨細胞分化の違いに寄与する可能性が示唆された。

E. 結論

CD16 陽性単球に破骨細胞分化抑制機能はなく、CD16 陽性、陰性で RANKL からの細胞内シグナルに違いがあり、それが、破骨細胞分化能の差異に関与していると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

* 越智小枝、南木敏宏、駒野有希子、鈴木文仁、小川純、杉原毅彦、長坂憲治、野々村美紀、萩山裕之、宮坂信之。全身性エリテマトーデスに肥厚性硬膜炎を合併し、低髄圧症候群様の頭痛・難聴を呈した 1 例。日本臨床免疫学会誌 (in press)。

* Yukiko Komano, Toshihiro Nanki, Kenji Hayashida, Ken Taniguchi, Nobuyuki Miyasaka. Identification of a human peripheral blood monocyte subset that differentiates into osteoclasts. *Arthritis Res. Ther.* 8(5): R152, 2006.
* Yoshinori Nonomura, Kenji Nagasaka, Hiroyuki Hagiyama, Chiyoko Sekine, Toshihiro Nanki, Mimi Tamamori-Adachi, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka. Direct modulation of rheumatoid inflammatory mediator expression in retinoblastoma protein-dependent and -independent pathways by cyclin-dependent kinase 4/6. *Arthritis Rheum.* 54(7): 2074-2083, 2006.
2. 学会発表

* 野々村美紀、南木敏宏、宮坂信之、上阪等。低酸素による関節リウマチ滑膜細胞の増殖亢進。第 34 回日本臨床免疫学会総会。2006。

* 岸潤、南木敏宏、高村聡人、渡部香織、駒野有希子、宮坂信之。リツキシマブによる薬剤性間質性肺炎を合併した全身性エリテマトーデスの一例。第 34 回日本臨床免疫学会総会。2006。

* Yoshinori Nonomura, Masayasu Toyomoto, Toshihiro Nanki, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka. Hypoxia overcomes contact-dependent proliferative inhibition of rheumatoid synovial fibroblasts by downregulating N-cadherin and subsequent p27^{Kip1} expression. 第 70 回アメリカリウマチ学会。2006。

* 金子英樹、渡部香織、駒野有希子、高田和生、南木敏宏、宮坂信之。SLE の加療中に進行性脳白質病変を来し、診断に苦慮した一

例。関東リウマチ。2006.

* 渡部香織, 南木敏宏, 杉原毅彦, 宮坂信之。尿道周囲無菌性膿瘍、尿道皮膚瘻を形成した結節性多発動脈炎の1例。第50回日本リウマチ学会総会。2006.

* 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50回日本リウマチ学会総会。2006.

* 大柳菜歩, 南木敏宏, 宮坂信之, 窪田哲朗。コラーゲン誘導関節炎におけるNF-κB阻害剤による破骨細胞の分化/活性化の抑制。第50回日本リウマチ学会総会。2006.

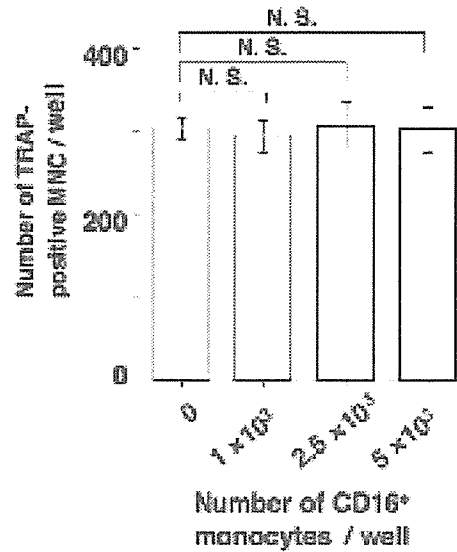
* 野々村美紀, 南木敏宏, 宮坂信之, 上阪等。低酸素による関節リウマチ滑膜細胞の増殖亢進。第50回日本リウマチ学会総会。2006.

* Toshihiro Nanki, Takeshi Shimaoka, Kenji Hayashida, Ken Taniguchi, Shin Yonehara, Nobuyuki Miyasaka. Pathogenic Role of CXCL16-CXCR6 Pathway in Rheumatoid Arthritis. Keystone symposia, Chemokines and Chemokine Receptors. 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

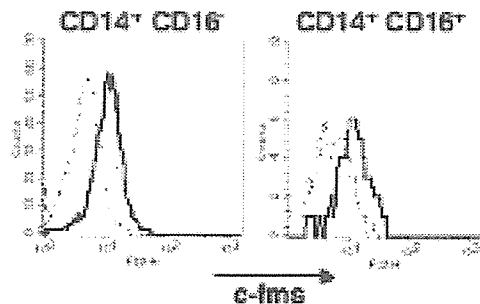
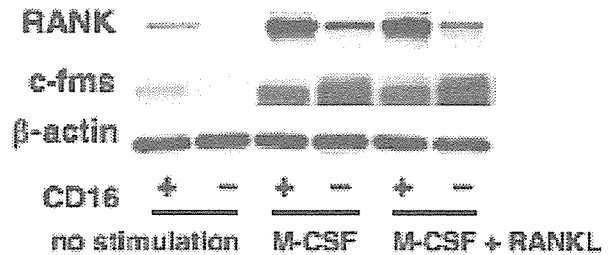
特許出願中：炎症性ミオパチーの予防及び/又は治療のための医薬。

図1. CD16陽性単球による、CD16陰性単球からの破骨細胞分化への影響。



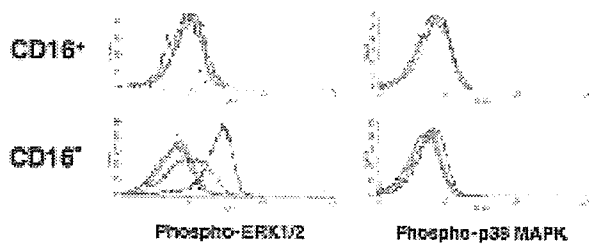
CD16陰性単球に、CD16陽性単球を加え、M-CSF + RANKL刺激後に、TRAP染色し、TRAP陽性、多核の破骨細胞数を計測。

図2. RANK, c-fmsの発現。



RANK, c-fmsの発現をwestern blotにて解析(上段)。c-fmsの発現をフローサイトメーターで解析(下段)。CD16陽性、陰性単球にて比較。

図3. RANKL 刺激後に ERK1/2, p38 活性化の解析。



CD16 陽性、陰性単球を RANKL で刺激し、リン酸化 ERK1/2, p38 の発現を、無刺激 (緑)、刺激 5 分 (ピンク)、刺激 10 分 (青)、刺激 20 分 (オレンジ) に、フローサイトメーターで解析。