

に肥厚した滑膜をとらえていると考えられる。したがって、様々な原因で生じる関節腫脹や疼痛と比較してより直接的に関節炎を捉えていると考える事が出来る。今回得られた520関節の検討では手と足のMP関節の罹患が同様に多い事が判明した。そして、この方法の感度が腫脹・疼痛関節評価と比較して優れていることが示された。この方法により全身のRA滑膜炎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。今後は治療効果判定が真に可能かどうかをDAS28などとの比較により検討する必要がある。

#### E. 結論

1. 超音波とMRIは半定量的にリウマチ罹患関節の血流を評価でき、生物製剤の投与でそれが変化することが確認できた。これらの検査は新しいリウマチ性滑膜炎の活動性評価法として有用である可能性があり、生物製剤の効果判定のひとつの判断基準となりうる。

2. 全身非造影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。

3. 全身造影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関節炎のさらに高感度な描出が可能であり、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

•Li,N., Nakamura,K.,Jiang,Y.,Tsurui,H., Matsuoka,S.,Abe,M.,Ohtsuji,M.,Nishimura,H.,Kato,K.,Kawai,T.,Atsumi,T., Koike,T.,Shirai,T.,Ueno,H., Hirose,S. Gain-of-function polymorphism in mouse and human Ltk:implications for the pathogenesis of lupus

erythematosus. Hum Mol Genet 13:(2) 171-179.2004

•Endo,T.,Nakao,S.,Koizumi,K.,Nishio,M., Fujimoto,K., Sakai,T., Kuwano,K., Obara,M., Koike,T. Successful treatment with rituximab for autoimmune hemolytic anemia concomitant with proliferation of Epstein-Barr virus and monoclonalgammopathy in a post-non myeloblastic stem cell transplant patient. Ann Hematol.83. 114-116.2004

•Koizumi,K., Fujimoto,K., Haseyama,Y., Endo,T., Nishio,M., Yokota,K., Itoh,K., Sawada,K., Koike,T.: Effective high-dose chemotherapy combined with CD34+-selected peripheral blood stem cell transplantation in a patient with cutaneous involvement of nasal NK/T-cell lymphoma. Eur J Haematol. 72.140-144. 2004

•Yamamoto,S., Tsuji,T., Matsuzaki,J., Zhange,Y., Chamoto,K., Kosaka,A., Togashi,Y., Sekikawa,K., Sawada,K., Takeshima,T. Koike,T., Nishimura,T.: Unexpected role of TNF- $\alpha$  in graft versus host reaction (GVHR): donor-derived TNF- $\alpha$  suppresses GVHR via inhibition of IFN- $\gamma$ -dependent donor type-1 immunity. Int Immunol. 16: 811-817. 2004

•Endo,T., Mogi,Y., Koizumi,K., Nishio,M., Fujimoto,K., Sakai,T., Kumano,K., Obara,M., Ikeda,H., Koike,T.: Peripheral blood stem cell mobilization following plus rituximab therapy combined with G-CSF in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. Bone Marrow Transplant. 33.703-707. 2004

•Yasuda,S.,Atsumi,T.,Ieko,M.,Matsuura,E.,Kobayashi,K., Inagaki,J.,Kato,H.,Tanaka,H.,Yamakado,M.,Akino,M.,Saitou,H.,Amasaki,Y.,Jodo,S,Amengual,O.,Koike,T: Nicked  $\beta$ 2-glycoprotein I: a marker of cerebral infarct and a novel role in the negative feedback pathway of extrinsic fibrinolysis.Blood. 103:10. 3766- 3772.2004

- Yasuda,S.,Ogura,N.,Horita,T.,Yasuda,I.,Hioka,T.,Kondo,N., Fujisaku,A. Abacterial prostatitis and primary biliary cirrhosis with Sjogren's syndrome. Mod Rheumatol 14:70-72.2004
- Das,H.,Atsumi,T.,Fukushima,Y.,Shibuya,H.,Ito,K., Yamada,Y., Amasaki,Y.,Ichikawa,K.,Amengual,O.,Koike,T: Diagnostic value of antiagalactosyl IgG antibodies in rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol 23:218-222.2004
- Ieko,M.,Tarumi,T.,Takeda,M.,Nito,S.,Nakabayashi,T., Koike,T.: Synthetic selective inhibitors of coagulation factor Xa strongly inhibit thrombin generation without affecting initial thrombin forming time necessary for platelet activation in hemostasis. J Thromb Haemost 2: 612-622.2004
- Amengual,O.,Atsumi.T.,Koike,T: Antiprothombin antibodies and the diagnosis of antiphospholipid syndrome. Clin Immunol 112: 144-149.2004
- Endo,T.,Koizumi,K.,Nishio,M.,Fujimoto,K.,Sakai,T., Kumano,K., Obara,M.,Minauchi,K.,Koike,T.:Localized relapse in bone marrow of extremities after allogenic stem cell transplantation for acute lymphoblastic leukemia. Am J Hematol 76: 279-282.2004
- Yang,L.,Hakoda.M.,Iwabuchi.K.,Takeda.T.,Koike.T., Kamatani.N.,Takada.K.: Rheumatoid Factors Induce Signaling from B cells, leading to Epstein-Barr virus and B-cell activation. J Virol 78:18. 9918- 9923.2004
- Kataoka,H.,Koike,T. :Lupus mortality in Japan. Autoimmunity Reviews 3: 421- 422.2004
- Endo,T.,Sato,N.,Koizumi,K.,Nishio,M.,Fujimoto,K., Yamamoto,S.,Sakai,T.,Bohgaki,T.,Sawada,K.,Koike,T.: A preliminary analysis of the balance between Th1 and Th2 cells after CD34+ cell-selected autologous PBSC transplantation. Cytotherapy 6:4.337- 343.2004
- Xiao,S.,Deshmukh,S.U.,Jodo,S.,Koike,T.,Sharma,R., Furusaki,A.,Sung,J.S.,Ju,Shyr-Tu.: Novel negative regulator of expression in Fas Ligand(CD178)Cytoplasmic tail:Evidence for Translational Regulation and against Fas Ligand Retention in secretory lysosomes. J Immunol 173: 5095- 5102.2004
- Yasuda,S.,Atsumi,T.,Ieko,M.,Koike,T:  $\beta$ 2-glycoprotein I,anti- $\beta$ 2-glycoprotein I, and fibrinolysis. Thromb Res 114: 461- 465.2004
- Astumi,T.,Amengual,O.,Yasuda,S.,Koike,T.: Antiprothrombin antibodies-are they worth assaying? Thromb Res 114: 533-538.2004
- Bohgaki,M.,Atsumi,T.,Yamashita,Y.,Yasuda,S.,Sakai,Y., Furusaki,A.,Bohgaki,T.,Amengual,O.,Amasaki,Y.,Koike, T.: The p38 mitogen-activated protein kinase(MAPK)pathway mediates induction of the tissue factor gene in monocytes stimulated with human monoclonal anti- $\beta$ 2Glycoprotein I antibodies. Int Immunol 16:11. 1633- 1641.2004
- Sugiura-ogasawara.M.,Atsumi,T.,Ozaki,Y.,Koike,T., Suzumori,K.:Phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibodies are not useful markers for high-risk woman with recurrent miscarriages.Fertil Steril 82:51440-1442.2004
- 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

- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- Atsumi,T.,Furukawa,S.,Amengual,O.,Koike,T. Antiphospholipid antibody associated thrombocytopenia and the paradoxical risk of thrombosis. *Lupus* 14 499-504.2005
- 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
- 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
- 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
- Koike,T.,Atsumi,T. Antiphospholipid antibodies and cell activation: crucial role of p38 MAPK pathway. *Lupus* 14(10) 799-801.2005
- 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
- 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
- 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
- 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
- Nishio,M.,Endo,T.,Fujimoto,K.,Sato,N.,Sakai,T.,Obara,M.,Kumano,K.,Minauchi,K.,Koike,T. Persistent pancytopenia 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

• 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

• Koike T, Atsumi T.  
“Resurrection of Thrombin” in the pathophysiology of the antiphospholipid syndrome.

*Arthritis Rheum.* (in press)

• Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RHW, de Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA.

International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome.

*J Thromb Haemost.* 4:295-306,2006

• Mizumoto H, Maihara T, Hiejima E, Shiota M, Hata A, Seto S, Atsumi T, Koike T, Hata D.

Transient antiphospholipid antibodies associated with acute infections in children: a report of three cases and a review of the literature.

*Eur J Pediatr.* 165:484-488,2006

• Minauchi K, Nishio M, Itoh T, Yamamoto S, Fujimoto K, Sato N, Koike T.

Hepatosplenic alpha/beta T cell lymphoma presenting with cold agglutinin disease.

*Ann Hematol.* 86(2):155-157,2007

• Amengual O, Atsumi T, Koike T.

Pathophysiology of the antiphospholipid syndrome: roles of anticardiolipin antibodies in thrombosis and fibrinolysis.

*APLAR J Rheumatol.* 9:377-386,2006

• Mizukami K, Nakabayashi T, Naitoh S, Takeda M, Tarumi T, Mizoguchi I, Ieko M, Koike T.

One novel and one recurrent mutation in the PROS1 gene

cause type I protein S deficiency in patients with pulmonary embolism associated with deep vein thrombosis.

*Am J Hematol.* 81:787-797,2006

• 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

• Furusaki A, Judo S, Yamashita Y, Amasaki Y, Atsumi T, Koike T.

TRAIL-mediated cytotoxicity: Impacts of sTRAIL and vTRAIL microvesicles.

*J Biol Sci.* 6(1):150-159,2006

• Furukawa S, Yasuda S, Amengual O, Horita T, Atsumi T, Koike T.

Protective effect of pravastatin on vascular endothelium in patients with System Sclerosis: a pilot study.

*Ann Rheum Dis.* 65(8):1118-1120,2006

#### 著書

Atsumi, T., Matsuura, E., Koike, T.: Immunology of anti-phospholipid antibodies and cofactors. Systemic Lupus Erythematosus 3rd edition. Lahita RG ed. Harcourt Brace & Company. 1081-1105.2004

#### 1. 学会発表

予定なし

#### H. 知的財産権の出願・登録

なし

#### I. 謝辞

本研究は、北海道大学大学院医学研究科病態情報学講座 放射線医学分野の神島保先生、および病態内科学講座の渥美達也先生、川瀬義明先生のご協力でおこなわれた。各先生に深謝する

infliximab および etanercept の効果検定と効果予測因子の検索に関する研究

分担研究者 住田 孝之 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 教授

（研究要旨） 関節リウマチに対する etanercept（エンブレル）の効果検定と効果予測因子を明らかにすることを目的とした。検査項目として、DAS28-CRP、検査所見、末梢血単球中サイトカイン、TNF- $\alpha$ 転写分子などの投与前後（0週、2週）での変化を解析した。その結果、DAS28-CRP、CRP、ESR、MMP-3が有意に減少していた。TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TTP、TIA-1、HuRは投与前後で有意な差は認められなかったが、TNF- $\alpha$ とTTP、TNF- $\alpha$ とIL-1 $\beta$ 、TIA-1とHuRが有意に相関していた。4例のGood responder（GR）と7例のModerate responder（MR）との比較では、0週のGRではTNF- $\alpha$ 、TTP、IL-1 $\beta$ が低い傾向があり、MMP-3が有意に高値であった。以上の結果から、etanerceptの効果予測因子として、投与前の末梢血単核球中のTNF- $\alpha$ 、TTP、IL-1 $\beta$ 値および血中MMP-3値が重要であることが判明した。

A. 研究目的

新規生物学的製剤である infliximab（レミケード）および etanercept（エンブレル）による関節リウマチに対する効果を評価することは重要である。本研究では、臨床的な指標、およびサイトカインや制御分子の発現について解析し、infliximab、etanercept の効果を検定すること、有効例を予測する因子を見いだすことを目的とした。

B. 研究方法

(A) infliximab: 当科外来および関連病院で infliximab 投与を施行した 33 症例を対象として、以下の項目について検討した。方法は、infliximab 使用前後（投与前、投与後 2 週、54 週）の CRP、DAS28-CRP などの臨床マーカーと末梢血単核球中 TNF- $\alpha$ 、tristetraprolin（TTP）、T cell intracellular antigen 1（TIA-1）、Hu antigen R（HuR）などのサイトカインおよび制御分子の mRNA 発現量について TaqMan® realtime PCR 法にて定量し比較した。54 週を終了した症例のうち、infliximab 有効群（ACR50、ACR70）7 例と ACR 0 の無効群 9 例について、投与前のサイトカイン、サイトカイン制御分子の mRNA 発現量についても検討した。

(B) etanercept: 当科外来および関連病院で

etanercept 投与を施行した 11 症例を対象として、以下の項目について検討した。方法は、etanercept 使用前後（投与前、投与後 2 週）の CRP、DAS28-CRP などの臨床マーカーと TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、tristetraprolin（TTP）、TIA-1、HuR などのサイトカインおよび TNF- $\alpha$ 制御分子の mRNA 発現量について TaqMan PCR 法にて定量し比較した。さらに、4 例の Good responder（GR）と 11 例の moderate responder（MR）のデータを比較し、GR 予測因子を推定した。

（倫理面への配慮）

ヒトの検体を使用する際には、大学の倫理委員会の承認を得た上で、患者さんにインフォームド・コンセントを施行し、十分に研究内容を理解していただき、ご本人の同意を得た上で研究を実行した。

C. 研究結果

(A) infliximab:

1) 臨床的マーカー (1)CRP(mg/dl): 0 週 3.33+1.94 (mean+SD)、2 週 1.071+1.46 ( $p < 0.001$ )、54 週 2.21+2.04 (ns)、(2)ESR(mm/h): 0 週 60.5 +22.6、2 週 36.0+17.8 ( $p < 0.001$ )、54 週 44.1+30.3 (ns)、

(3)MMP-3 (ng/ml) : 0 週 337+234、2 週 197+132、  
( $p<0.01$ )、54 週 250+229 ( $p<0.05$ )、(4)RF (IU/ml) :  
0 週 246+373、2 週 231+364 ( $p<0.05$ )、54 週 110+169  
( $p<0.001$ )、(5)DAS28-CRP : 0 週 6.30+1.17、2 週  
4.79+1.24 ( $p<0.001$ )、54 週 4.20+1.42 ( $p<0.005$ )。

2) サイトカイン等発現 : (1) TNF- $\alpha$  : 0 週 3.26 +  
2.86、2 週 3.30 + 2.67 (ns)、(2) TTP: 0 週 1.21  
+ 0.82、2 週 1.01 + 0.79 (ns)、(3) TIA-1: 0 週 3.31  
+ 1.52、2 週 3.87 + 1.51 (ns)、(4) HuR: 0 週  
2.15+1.04 2 週 2.51+1.17 (ns)

3) (1) TNF- $\alpha$ : 有効群 2.02  $\pm$  1.63, 無効群 2.20  $\pm$   
1.28 (ns)、(2) TTP: 有効群 1.40  $\pm$  1.41, 無効  
群 1.01  $\pm$  0.41 (ns)、(3)TIA-1: 有効群 2.53  $\pm$   
0.82, 無効群 2.87  $\pm$  1.10 (ns)、4)HuR : 有効群  
1.24+0.33 無効群 2.03+0.73 ( $p<0.05$ )。

(B) etanercept:

1) 臨床的マーカー : (1)CRP (mg/dl) : 前値 1.80 +  
0.93 (mean+SD)、2 週間値 0.51+0.65、 $p<0.001$ 、  
(2)ESR (mm/h) : 前値 54.5+30.9、2 週間値 33.5+32.1、  
有意差なし、(3)MMP-3 (ng/ml) : 221.7+77.6、  
162.5+37.2、 $p<0.05$ 、(4)RF (IU/ml) : 226.3+297.8、  
261.5+291.7、有意差なし、(5)DAS28-CRP : 前値 5.65  
+0.95、2 週間値 3.20+1.02、 $p<0.0005$ 。

2) サイトカイン、TNF- $\alpha$  制御因子の発現 : (1) TNF- $\alpha$   
前値 3.016+2.342、2 週間値 4.401+3.913、有意差  
なし。(2)IL-1 $\beta$  前値 6.433+7.145、2 週間値  
4.118+2.271、有意差なし。(3)IL-6 前値 4.736+4.581、  
2 週間値 4.666+4.203、有意差なし。(4)TTP 前値  
0.915+0.378、2 週間値 0.870+0.291、有意差なし。  
(5)TIA-1 前値 1.778+0.636、2 週間値 1.679+0.802、  
有意差なし。(6)HuR 前値 1.297+0.271、2 週間値  
1.344+0.389、有意差なし。(7)0 週および 2 週にお  
いて、TNF- $\alpha$ と TTP ( $p<0.0035$ 、 $p<0.0239$ )、TNF- $\alpha$   
と IL-1 $\beta$  ( $p<0.0011$ 、 $p<0.0025$ )、TIA-1 と HuR  
( $p<0.0078$ 、 $p<0.0001$ )が有意に相関していた。

3) Good responder と moderate responder の違い :  
投与前値において、GR の TNF- $\alpha$ (1.586+1.001)、  
TTP(0.641+0.129)、IL-1 $\beta$ (3.450+2.504) は MR  
(TNF- $\alpha$ :3.834+2.549、TTP: 1.071+0.389、IL-1 $\beta$ :  
8.136+8.523) より低い傾向があった。GR (294+26.3)  
では血中 MMP-3 値が MR (185+41.0) より有意に高値  
( $p<0.0381$ )であった。

#### D. 考察

(A) infliximab 投与症例における検討結果から、1)  
臨床的マーカーにおいては、54 週で CRP、MMP-3、RF、

DAS28 の有意な改善が認められた。2) 投与 2 週では、  
有意なサイトカイン制御分子の増減は認められな  
かった。3) 54 週有効群では、HuR 発現が有意に減少し  
ていた。(B) etanercept 投与症例における検討結果  
から、1) 臨床的マーカーにおいては、投与 2 週に  
おいて DAS28、CRP、MMP-3 の改善が認められた。2)  
投与 2 週では、末梢血単核球中のサイトカインや  
TNF- $\alpha$ 制御因子発現に有意な差は認められなかった。  
3) etanercept に対する good responder では、末梢  
血単核球中の TNF- $\alpha$ 、TTP、IL-1 $\beta$ 値が低く、血中  
MMP-3 が高値であった。

#### E. 結論

infliximab 投与 54 週後に有効な症例では、投与前  
の末梢血単核球中の TNF- $\alpha$ 安定化分子である HuR の  
発現が低下していることが判明した。一方、  
etanercept 投与 2 週後に有効な症例では、投与前  
の末梢血単核球中の TNF- $\alpha$ 、TTP、IL-1 $\beta$ 値が低い傾  
向にあり、血中 MMP-3 が高値であることが判明した。  
今後、症例数を増加することにより、これら TNF プ  
ロセッサーの有効、無効の判断となるバイオマーカー  
の解析を進めていきたい。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Wakamatsu, E., Nakamura, Y., Matsumoto, I.,  
Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T.  
DNA microarray analysis of labial salivary glands  
from patients with Sjogren's syndrome. *Ann.  
Rheum. Dis. (in press)*

2. Yoshioka, H., Ito, S., Handa, S., Tomiha, S.,  
Kose, K., Haishi, T., Tsutsumi, A., and Sumida,  
T. Low-field compact magnetic resonance  
imaging system for the hand and wrist in  
rheumatoid arthritis. *J. Magn. Res. Im.*  
23:370-376, 2006.

3. Wakamatsu, E., Matsumoto, I., Naito, Y., Goto,  
D., Mamura, M., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida,  
T. Overexpression of phosphorylated STAT-1 $\alpha$  in  
the labial salivary glands from patients with  
Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 54:3476-

3484, 2006.

4. Kori, Y., Matsumoto, I., Zhang, H., Yasukochi, T., Hayashi, T., Iwanami, K., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A. and 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.

5. Naito, Y., Matsumoto, I., Wakamatsu, E., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T. Altered peptide ligands regulate muscarinic acetylcholine receptor reactive T cells from patients with Sjogren's syndrome. Ann. Rheum. Dis. 65:269-271, 2006.

6. Matsumoto, I., Hua, Z., Muraki, Y., Hayashi, T., Yasukochi, T., Kori, Y., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T. A functional variant of Fcγ receptor IIIA is associated with rheumatoid arthritis in anti-glucose-6-phosphate isomerase antibodies positive individuals. Arthritis Res. Ther. 7: 1183-1188, 2005.

7. Ohnishi, Y., Tsutsumi, A., Goto, D., Itoh, S., Matsumoto, I., Taniguchi, M., and Sumida, T. TCRVα14+ NKT cells function as effector T cells in collagen-induced arthritis mice. Clin. Exp. Immunol. 141:47-53, 2005.

8. Naito, Y., Matsumoto, I., Wakamatsu, E., Goto, D., Tsutsumi, A., and Sumida, T. Muscarinic acetylcholine receptor autoantibodies in patients with Sjogren's syndrome. Ann. Rheu. Dis. 64:510-511, 2005.

9. Takahashi, R., Tsutsumi, A., Ohtani, K., Muraki, Y., Goto, D., Matsumoto, I., Wakamiya, N., and Sumida, T. Association of mannose-binding lectin (MBL) gene polymorphism and serum MBL concentration with characteristics and progression of systemic lupus erythematosus. Ann. Rheu. Dis. 64:311-314, 2005.

10. Muraki, Y., Matsumoto, I., Chino, Y., Hayashi, T., Suzuki, E., Goto, D., Ito, S., Murata, H., Tsutsumi, A., and Sumida, T. GPI variants play a key role in the generation of anti-GPI Abs: possible mechanism of autoantibody production. Biochem. Bioph. Res. Co. 60:1316-1324, 2004.

图 1

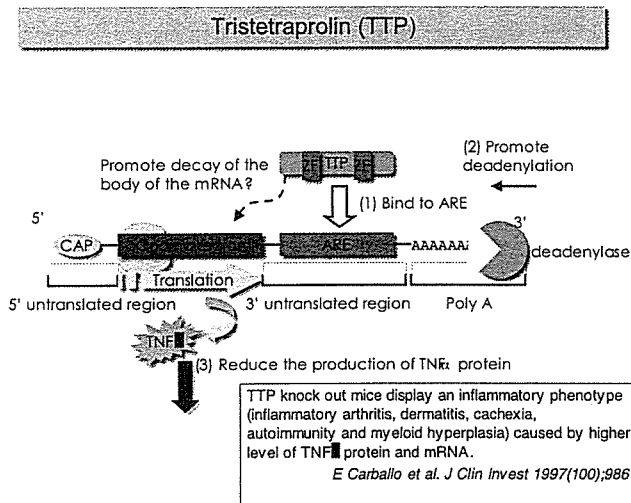


图 4

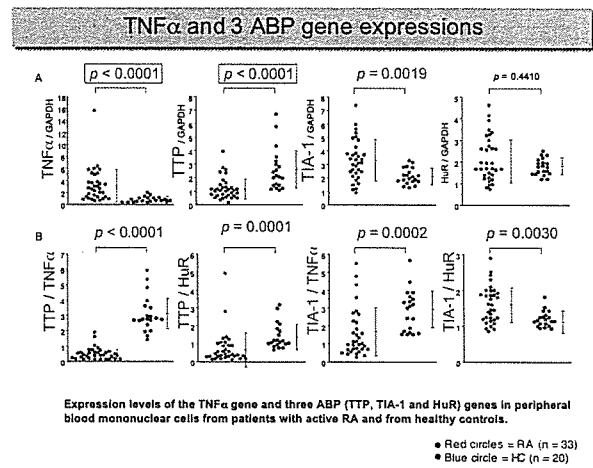


图 2

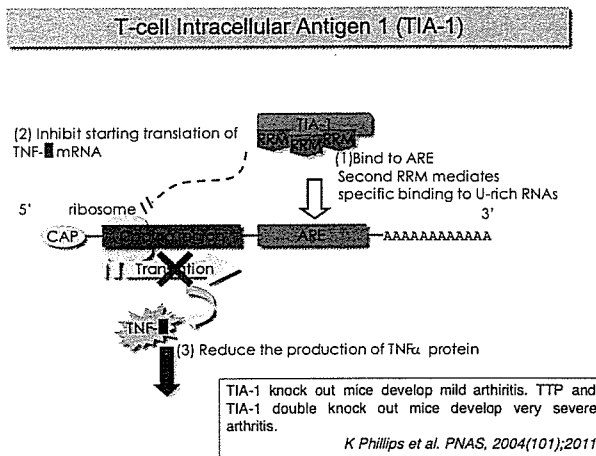


图 5

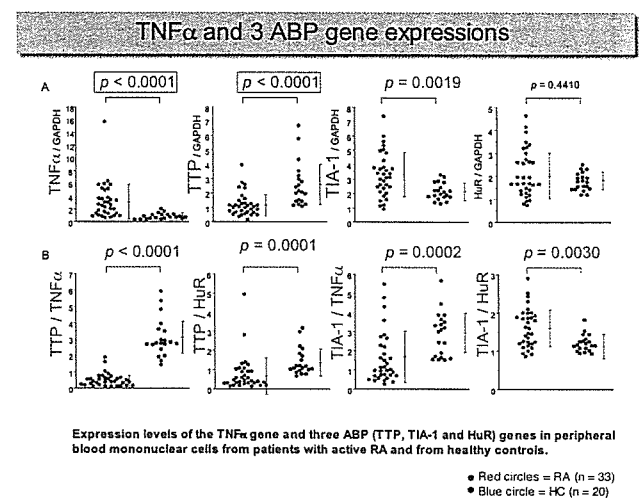


图 3

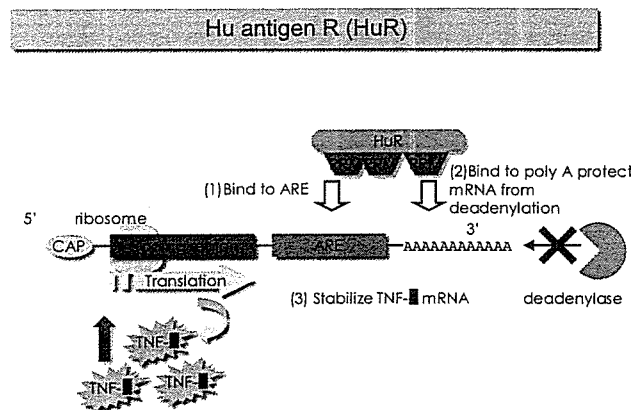


图 6

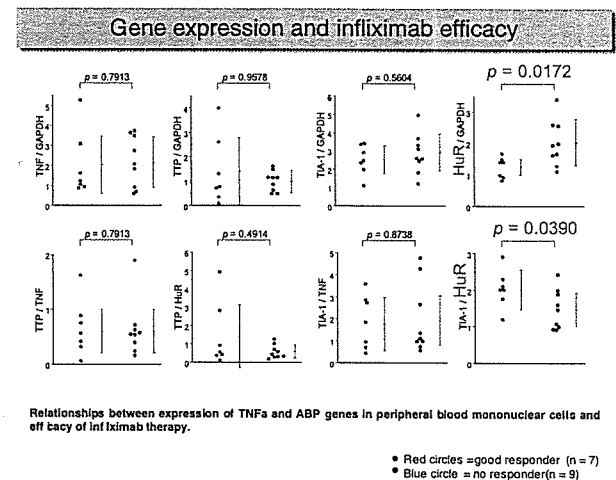




図 7

### Etanercept投与前後での遺伝子発現の変化

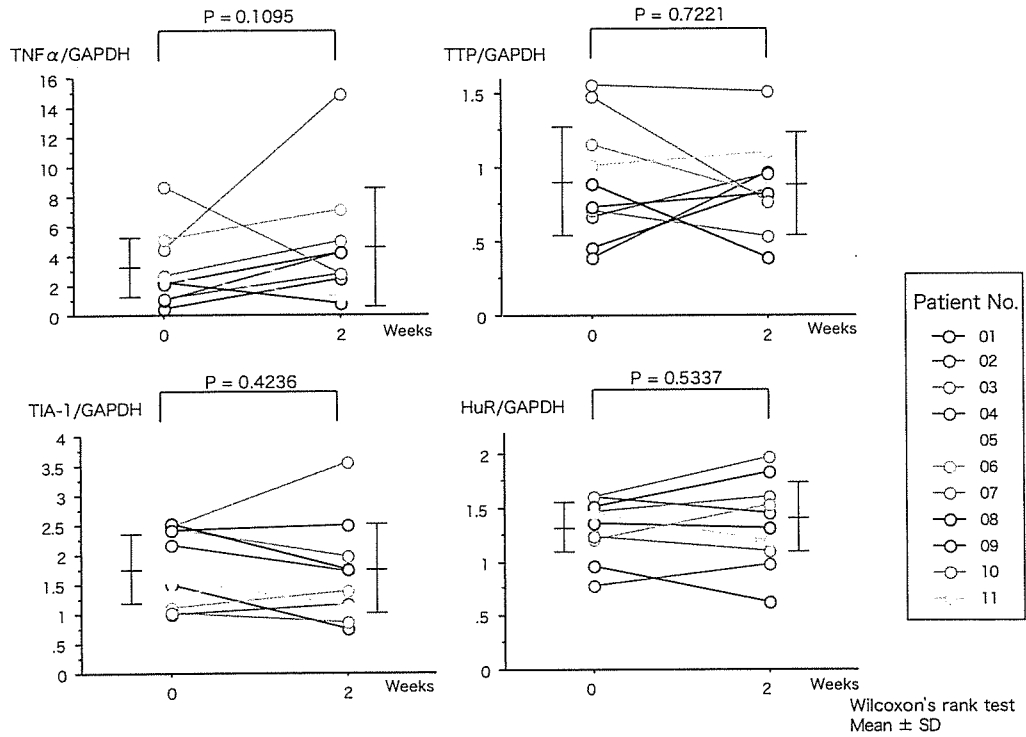
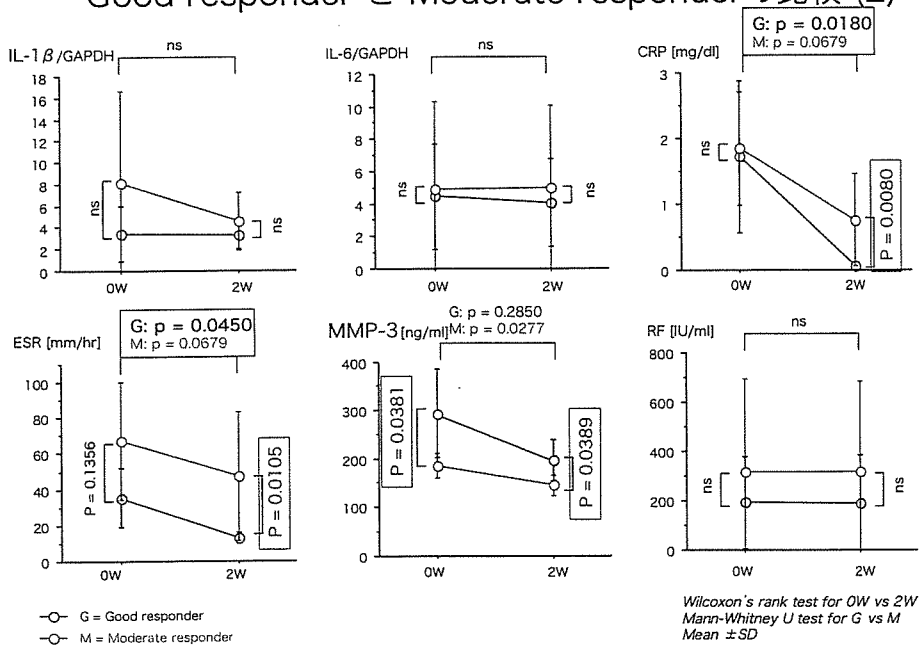


図 8

### Good responder と Moderate responder の比較 (2)



日本人関節リウマチ患者におけるインフリキシマブの関節破壊抑制効果と感染症併発予防に関する研究

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 関節リウマチ (RA) に対するインフリキシマブ治療は、日本人 RA 患者においても臨床的に高い有効性を示し、その臨床評価は患者全般評価、腫脹関節スコア、血清 C 反応性蛋白の 3 項目の総和 **handy rheumatoid activity score with 38 joints (HRAS38)** で包括的に評価可能であること、さらに インフリキシマブ開始前に比較して関節破壊の進行(**van der Heijde-modified Sharp** 法で解析)を 85%も抑制することを報告した。さらに、インフリキシマブ投与 RA 患者において血中  $\beta$ -D グルカン測定は、主として **Pneumocystis jirovecii** 肺炎 (PCP) のモニターに有用であり、ハイリスク患者以外はこの測定値により ST 合剤を予防投与することが有用である可能性を見いだした。

A. 研究目的

関節リウマチ (RA) 患者に生物学的製剤を用いる最大の理由は関節破壊を阻止するためである。そこで、生物学的製剤の投与の適応や投与後の効果などを適切に判定するためには、関節破壊の進行と密接に関連した疾患活動性の評価を行うことが必須である。しかも、生物学的製剤が臨床治験としてごく限られた患者に用いられていたこれまでとは大きく異なり、今後は数人に一人の RA 患者が生物学的製剤による治療を受けることになると考えられる。

従来の生物学的製剤の臨床評価は ACR コアセットを用いた ACR 反応率や ACR-N、またはそのうちの 4 項目を用いた DAS28 (disease activity score with 28 joints) で評価されてきた。しかしながら、ACR コアセットは項目数が多く、DAS は平方根や対数の計算を要するため、全国のあらゆる施設で、生物学的製剤を投与される全ての RA 患者の活動性評価法としては不適切である。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。

そこで本研究では、包括的な活動性評価法でありながら、迅速かつ簡便に行え、しかも関節破壊の進行を従来の活動性評価法より高い精度で予測しうるものを導入する。次に、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。さらに RA の関節破壊を新たな臨床評価法で予測しうるかを検討する。

一方、生物学的製剤の有効性の検証のみならず安全性の検証、およびそれを向上させるための工夫が必要である。本邦の市販後調査で **Pneumocystis jirovecii** 肺炎 (PCP) が 0.4%に認められると報告され、これは欧米に比較して頻度が高いと考えられる。そこで、この PCP や他の真菌症のリスク評価として、本研究班を含む 3 研究班および日本リウマチ学会で策定されたガイドラインにも取り入れられた血中  $\beta$ -D グルカン測定の、インフリキシマブ導入時およびその後の感染症モニタリングにおける有用性を検討する。

## B. 研究方法

まず、従来の活動性評価項目相互の関連性を検討し、重複なく独立性の高い評価項目を抽出した。次に国内外の文献において関節破壊の進行と関連が高いとされる評価項目を特に重視し、関節腫脹を単純な有無のみで評価した腫脹関節数ではなく、腫脹の程度を次の3段階に区別して評価した。Grade 1：視診で明らかでないが触診で確認出来る、Grade 2：視診で明らかで、緊満なし、Grade 3：緊満した腫脹。これに基づいて38関節（両側の肘、手、MCP、IP/PIP、膝、足、MTP）の腫脹の程度を評価した腫脹関節スコア（SJS）を医師の側の活動性評価項目（0-114）とした。患者評価項目としては全般的身体（活動性）評価（PGA; 0-100 mmのVAS）を選択、検査項目としては赤沈値よりも関節破壊との関連が強いとされる血清CRP値（mg/L）を採用した。

この3項目のスコアの単純な総和Handy rheumatoid activity score with 38 joints（HRAS38）の妥当性、インフリキシマブの関節破壊抑制効果、および血中 $\beta$ -Dグルカン測定の有用性を検討するため、当科でインフリキシマブ開始後30週以上経過観察されたRA患者117例（男性14例、女性105例）を対象とした。年齢は24-71歳（平均 $53.5 \pm 11.9$ ）、罹病期間3-624ヶ月（平均 $100.3 \pm 100.0$ ）、RF陽性が97例（17-2980 IU/ml）で、MTX投与量は6 mg/週以下が23例、8 mg/週が55例、10-20 mg/週が39例で平均8.8 mg/週、PSLが90例（1-15 mg/日、平均 $6.3 \pm 2.6$  mg/日）に投与されていた。全例がスクリーニング時、およびインフリキシマブ投与毎の血中 $\beta$ -Dグルカン測定の対象となり、このうち2004年12月までに関節評価を終了した46例がHRAS38による臨床評価およびvan der Heijde-modified Sharpスコアを用いたインフリキシマブ投与前後の関節破壊進行評価の対象とし、2名のリウマチ専門医が独立に読影した。血中 $\beta$ -Dグルカンの測定はSRLで行った（基準値：20 pg/mL以下）。

（倫理面への配慮）

通常の臨床における観察のため、特別な問題はない。

## 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4.1 mg/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（ $r=0.846$ ）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46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448点に対する百分率で平均53%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0.8%と著明に抑制されていた（図1上段）。その内訳は非進行が12例、smallest detectable changeとして算出された10未満の進行疑いが19例、それ以上確実な進行が15例であった。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群間で比較してもいずれの評価項目においても有意差を認めず（図1下段）、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。

感染症モニタリングの研究においては、インフリキシマブ導入前のスクリーニング時点で $\beta$ -Dグルカン陽性は2名（22.7 pg/mL、27.4 pg/mL）で（表1）、全例そのまま導入となった。6週時の陽性者は見られなかったが、14週時にはPCP発症1例（6週時の $\beta$ -Dグルカン値5.6 pg/mL、9週の発症時103.5 pg/mL、14週時25.1 pg/mL）を含め25.3 pg/mL、57.7 pg/mL（スクリーニング時も陽性）、96.9 pg/mL、133 pg/mLと計5例の陽性者を認めた。PCP非発症4

例中スクリーニング時陽性者はそのまま投与継続され 22 週時には陰性化、他の 3 例は ST 合剤 2-4 錠の週 2 回投与で 8-32 週後に陰性化した。その他、22 週で 2 例、30 週で 1 例、54 週で 2 例が陽性となったがいずれも 30 pg/mL 以下で、一過性であった。インフリキシマブ 13 回投与後の PCP 発症も 1 例あり、この例では発症直前のインフリキシマブ投与時の  $\beta$ -D グルカンが未検 (12 回投与時は陰性) であった。入院加療を要するアスペルギルスやカンジダなどの真菌感染症は 1 例も認めなかった。

#### D. 考察

本研究ではまず、生物学的製剤の適応や治療効果の判定に有用で、関節破壊と密接に関連し、かつ簡便で迅速に全ての RA 患者に適用可能な包括的活動性評価を考案した。評価項目を出来るだけ独立性の高いもののみとするために、患者評価、医師評価、検査所見に分けた。患者評価としては全般的活動性評価が全般的疼痛評価と QOL の両者を勘案した評価になると考え採用した。医師評価では圧痛関節数は患者評価の側面が半分あることから除外、医師の全般的評価は関節所見と検査所見の総合的勘案であることから除外した。腫脹関節数では関節腫脹の程度の改善が評価されず、高度な腫脹と軽度の腫脹が同程度に関節破壊に影響を及ぼすかどうかの検討もできないことから、腫脹関節スコアを考案した。視診と触診で grade をつけることで、関節の大きさによらない評価を可能とした。検査成績としては骨破壊との関連が高いとされることから、赤沈値ではなく血清 CRP 値を採用した。

これらの 3 評価項目がほぼ同等に寄与するよう考慮して、新しい包括的活動性評価法 HRAS38 を試案するにあたり、評価関節の選択を次に行った。ACR コアセットの 68 関節は日常診療には多過ぎるが、DAS28 の 28 関節では関節破壊の標準的 X 線評価法である vdH-modified Sharp score における評価部位との整合性が不十分であることから、まず MTP 関節を加え、臨床的見地から第 1 趾 IP 関節ではなく足関節を加えて、腫脹の診察が困難な肩関節を除外し

た。

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。さらに遅れて承認された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が今後の課題であり、多施設共同臨床試験で検討されている。

$\beta$ -D グルカンは一般的にインフリキシマブ投与後の感染症の発症ピークとされる時期に一致して、投与開始 14 週後に陽性化しやすい傾向を示し、ST 合剤の予防投与により低下したことから *P. jirovecii* 感染を主に反映すると考えられた。従って、本研究からは血中の  $\beta$ -D グルカン陽性のみで、無症状の場合には、ST 合剤投与を他の抗真菌薬投与に優先すべきであり、この投与下でインフリキシマブ治療は継続可能と考えられた。しかし PCP の発症は急性であり、インフリキシマブ投与毎の  $\beta$ -D グルカン測定では全例において PCP 発症を回避することは困難と考えられた。そのため、今後 PCP 発症のハイリスク患者を抽出し、その症例には血中  $\beta$ -D glucan 陰性時からの ST 合剤予防投与も必要と考えられた。

#### E. 結論

生物学的製剤の適正使用に不可欠な、関節破壊を高精度で予測可能で、簡便な包括的活動性指標 HRAS38 を試案した。従来の活動性評価法と高い相関を示し、インフリキシマブ治療による改善も鋭敏

に捉える有用な評価法であった。

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が示唆された。インフリキシマブ投与 RA 患者における血中  $\beta$ -D グルカン測定は主として PCP のモニターに非常に有用であり、この測定値による ST 合剤予防投与の有用性も示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ・ 長澤逸人, 亀田秀人, 天野宏一, 竹内勤: 関節リウマチ患者における血清マトリックスメタロプロテイナーゼ-3 (MMP-3) の臨床的意義. 炎症・再生. 25(1):60-64, 2005.
- ・ Kameda H, Amano K, Sekiguchi N, Takei H, Ogawa H, Nagasawa H, Takeuchi T: Factors predicting the response to low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis: a better response in male patients. Mod Rheumatol 14:442-446, 2004.
- ・ 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.
- ・ 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 2006;144:335-341.
- ・ 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 2006;16:85-91.
- ・ Takeuchi T, Amano K, Kameda H. Impact of TNF inhibitors on rheumatoid arthritis. Inflammation and Regeneration 2006;26:148-159.
- ・ Kameda H, Sekiguchi N, Nagasawa H, Amano K, Takei H, Suzuki K, Nishi E, Ogawa H, Takeuchi T. Development and validation of handy rheumatoid activity score with 38 joints (HRAS38) in rheumatoid arthritis patients receiving infliximab. Mod Rheumatol 2006; 16: 381-388.
- ・ Kameda H, Okuyama A, Tamaru J-I, Itoyama S, Iizuka A, Takeuchi T. Lymphomatoid granulomatosis and diffuse alveolar damage associated with methotrexate therapy in a patient with rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol (in press).
- ・ Yamanaka H, Tanaka Y, Sekiguchi N, Inoue E, Saito K, Kameda H, Iikuni N, Nawata M, Amano K, Shinozaki M, Takeuchi T. Retrospective study on the notable efficacy and related factors of infliximab therapy in a rheumatoid arthritis management group in Japan (RECONFIRM). Mod Rheumatol 2007;17(1):28-32.
- ・ 亀田秀人, 竹内勤: 関節リウマチ. 山本一彦 編. 臨床免疫学 —基礎研究の進歩と最新の臨床— 日本臨床社, 大阪, 261-266, 2005.
- ・ 亀田秀人, 竹内勤: TNF を標的とした慢性炎症性疾患の治療—抗 TNF 生物製剤による関節リウマチの寛解導入. 医学のあゆみ 208(5):336-342, 2004.
- ・ 亀田秀人, 竹内勤: レフルノミド. 日本病院薬剤師会雑誌 40(3):293-296, 2004.
- ・ 亀田秀人: メシル酸イマチニブの滑膜増殖抑制作用. 臨床免疫 42(5):523-527, 2004.
- ・ 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.
- ・ 竹内 勤, 亀田秀人, 天野宏一: 抗リウマチ薬の薬剤性肺障害. 日本医師会雑誌 134(11):2148-2153, 2006.

- ・ 亀田秀人, 竹内勤: 抗リウマチ薬による間質性肺炎、結核. *Ortho Community* 18:7-8, 2006.
- ・ 亀田秀人, 奥山あゆみ, 関口直哉. 乾癬性関節炎に対する TNF 阻害薬の効果. *リウマチ科*. 2006;35:397-401.
- ・ 長澤逸人, 亀田秀人, 竹内勤. 生物学的製剤による抗サイトカイン療法. *Medicina* 2006;43:972-975.
- ・ 亀田秀人, 竹内勤. 関節評価の実際と課題. *リウマチ科* 2006;36:260-265.
- ・ 亀田秀人, 竹内勤. エタネルセプト: 使い方と市販後調査. *Mebio* 2006;23:52-58.
- ・ 亀田秀人. エタネルセプトの使い方と注意すべき副作用. *治療* 2007;89(2): 308-312.

## 2. 学会発表

- ・ Kameda H, Ishigami H, Abe T, Takeuchi T: Expression of adapter proteins in rheumatoid synovial fibroblast-like cells and their involvements in signaling from growth factor receptors. 第 5 回欧州リウマチ会議, 2004 年 6 月.
- ・ Kameda H, Ishigami H, Abe T, Takeuchi T. Blockade of signaling from growth factor receptors by STI571 inhibits both anchorage-dependent and -independent growth of rheumatoid synovial fibroblast-like cells. 第 68 回米国リウマチ学会, 2004 年 10 月.
- ・ 亀田秀人, 石上浩庸, 安倍達, 竹内勤: 関節リウマチの滑膜細胞におけるアダプター蛋白の発現とチロシンキナーゼ阻害薬による増殖制御. 第 48 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2004 年 4 月.
- ・ 長澤逸人, 亀田秀人, 関口直哉, 武井博文, 小川祥江, 津坂憲政, 天野宏一, 竹内勤: 関節リウマチ (RA) 患者の QOL と血清学的活動性指標との関連. 第 48 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2004 年 4 月.
- ・ 関口直哉, 亀田秀人, 根本朋恵, 武井博文, 飯塚篤, 小川祥江, 長澤逸人, 津坂憲政, 天野宏一, 竹内勤: 関節リウマチ患者におけるブシラミンの有用性の検討. 第 48 回日本リウマチ学会総会・学術集

会, 2004 年 4 月.

- ・ 関口直哉, 根本朋恵, 武井博文, 小川祥江, 鈴木勝也, 長澤逸人, 亀田秀人, 津坂憲政, 天野宏一, 竹内勤. 関節リウマチにおける infliximab の臨床効果～教室自験例 40 例の検討～. 第 32 回日本臨床免疫学会総会, 2004 年 10 月.
- ・ 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
- ・ 亀田秀人, 関口直哉, 長澤逸人, 武井博文, 西英子, 鈴木勝也, 天野宏一, 竹内勤. 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予測. 第 103 回日本内科学会講演会. 2006 年 4 月, 横浜
- ・ 亀田秀人. エタネルセプト. 第 50 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2006 年 4 月, 長崎
- ・ 関口直哉, 西英子, 武井博文, 小川祥江, 鈴木勝也, 長澤逸人, 亀田秀人, 津坂憲政, 天野宏一, 竹内勤. 末梢血 TNF- $\alpha$  産生能/CRP を指標としたインフリキシマブ有効性予測に関する検討. 第 50 回日本リ

ウマチ学会総会・学術集会. 2006年4月, 長崎

・長澤逸人, 亀田秀人, 西英子, 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. 疾患活動性指標による関節リウマチ (RA) 患者の関節破壊進行の予測. 第50回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2006年4月, 長崎

・Nagasawa N, Kameda H, Sekiguchi N, Nishi E, Takei H, Suzuki K, Amano K, Takeuchi T. Association of the joint destruction in patients with rheumatoid arthritis (RA) by the indicators of clinical disease activity and the patient's quality of life (QOL). The 12<sup>th</sup> APLAR Congress, August 2006, Kuala Lumpur, Malaysia

・Okuyama A, Kameda H, Sekiguchi N, Nagasawa H, Nishi E, Takei H, Suzuki K, Amano K, Takeuchi T. Successful control of methotrexate-refractory psoriatic arthritis with infliximab. The 12<sup>th</sup> APLAR Congress, August 2006, Kuala Lumpur, Malaysia

・関口直哉, 西英子, 武井博文, 小川祥江, 鈴木勝也, 長澤逸人, 津坂憲政, 亀田秀人, 天野宏一, 竹内勤. 末梢血 TNF- $\alpha$  産生能を指標としたインフリキシマブ有効性予測に関する検討. 第34回日本臨床免疫学会総会. 2006年10月, 東京.

・奥山あゆみ, 亀田秀人, 関口直哉, 天野宏一, 竹内勤. 乾癬性関節炎に対するインフリキシマブ療法の有用性. 第34回日本臨床免疫学会総会. 2006年10月, 東京.

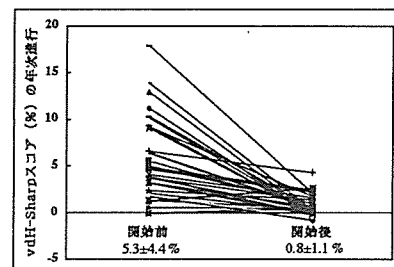
・Kameda H, Suzuki M, Ishigami H, Sakai H, Abe T, Takeuchi T. Proliferation of synovial fibroblast-like cells is synergistically enhanced by the infiltration of T lymphocytes and the stimulation with platelet-derived growth factor. 70<sup>th</sup> Annual Scientific meeting of ACR, November 2006, Washington DC, USA.

・Suzuki K, Takei H, Kameda H, Nagasawa H, Sekiguchi N, Nishi E, Ogawa H, Tsuzaka K, Amano K, Takeuchi T. Efficacy and safety of tacrolimus in patients with rheumatoid arthritis in clinical practice: Significant role of blood concentration measurement for preventing severe adverse events. 70<sup>th</sup> Annual Scientific meeting of ACR, November 2006, Washington DC, USA.

・奥山あゆみ, 西英子, 亀田秀人, 関口直哉, 長澤逸人, 鈴木勝也, 武井博文, 天野宏一, 竹内勤. 2度の MTX 投与に関連して異なる病像の呼吸器障害を呈した関節リウマチ (RA) の1例. 第17回日本リウマチ学会関東支部学術集会. 2006年12月, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録なし。

図1. インフリキシマブの関節破壊阻止効果と臨床指標による予測



	非進行 (<=0%/年) n=12, 0.2 ± 0.2	軽度進行 (0-1%/年) n=19, 0.5 ± 0.1	中等度以上進行 (>1%/年) n=15, 2.1 ± 0.6	
関節破壊進行率 (%)	6.1 ± 4.5	4.5 ± 4.3	5.6 ± 4.7	N.S.
腫脹RF (IU/mL)	135.5 ± 138.2	285.2 ± 318.7	244.6 ± 287.5	N.S.
CRP (mg/dL, mean 0-54W)	1.3 ± 1.6	1.8 ± 1.5	1.8 ± 1.7	N.S.
DAS28 (CRP), mean 0-54W	3.4 ± 0.9	3.8 ± 0.6	3.7 ± 1.0	N.S.
HRAS38, mean 0-54W	57.0 ± 34.1	64.7 ± 23.7	65.1 ± 29.3	N.S.
ACR50 反応率 (%), 54W	58.3	47.4	53.3	N.S.
ACR70 反応率 (%), 54W	33.3	26.3	33.3	N.S.
EULAR good response	66.7	42.1	46.7	N.S.

表1. インフリキシマブ投与 117 例中, PCP 非発症の血中  $\beta$ -D glucan 陽性者 10 例の経時変化

	0 W	6 W	14 W	22 W	30 W	38 W	46 W	54 W
44, F	27.4		57.7					
46, F	22.7							
70, F			133 (ST開始)	27.8	26.5	36.9	35.8	
64, F			96.9 (ST開始)					
67, F			25.3 (ST開始)					
49, F				22	26.9		22.3	31.5
24, F				26.3				
56, F					29			
65, F								29.3
49, F								29.5

新規シトルリン化ペプチドおよび抗シトルリン化ペプチド抗体アッセイ系の開発に関する研究

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 抗 CCP (cyclic citrullinated peptide) 抗体をはじめ、シトルリンを含むペプチドに対する自己抗体は関節リウマチ (RA) に特異的な血清マーカーであり、早期診断や予後予測因子としての有用性が期待されている。しかし、抗 CCP 抗体がリウマトイド関節炎の結果として産生される単なる疾患標識マーカーであるのか、あるいは Peptidylarginine deiminases (PADI)sによるペプチドのシトルリン化修飾や抗 CCP 抗体の出現が RA の病態形成に関与するのかは明らかではない。これまでに抗シトルリン化ペプチド抗体の対応抗原としては、シトルリン化フィラグリン、シトルリン化フィブリノーゲン ( $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖)、シトルリン化ビメンチンが報告されている。しかし、RA 特異的シトルリン化抗原についての詳細は不明な点が多い。

本研究では、*in vitro* でシトルリン化した滑膜細胞ライセートやリコンビナント p53 抗原あるいはフィブリノーゲン由来ペプチド (アルギニンをシトルリンに置換) を用いて、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た。これらの新規抗シトルリン化ペプチド抗体は感度の点では既存の抗 CCP 抗体に及ばなかったが、その反応パターンにより RA 患者を分類することが可能であった。また、RA 関節液からプロタミン結合分画ペプチドとしてシトルリン化抗原を粗精製することが可能であった。さらに、抗シトルリン化フィブリノーゲンに対するモノクローナル抗体を用いて RA 関節液中のシトルリン化フィブリノーゲンを同定・定量化した。

RA においては関節局所でシトルリン化ペプチドに対する自己免疫反応が起こっていると想定されている。しかし、自己抗原となる PADIs の基質を含め、抗 CCP 抗体産生機転の詳細には不明な点が多い。今後、これらシトルリン化抗原や抗シトルリン化ペプチド抗体の研究をさらに進めることにより、関節リウマチの病態解明 (生物学的製剤への効果予測含む) に役立つものと期待される。

#### A. 研究目的

抗 CCP (cyclic citrullinated peptide) 抗体をはじめ、シトルリンを含むペプチドに対する自己抗体は関節リウマチ (RA) に特異的な血清マーカーであり、RA 診断、早期診断、予後予測における有用性が確立されている。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。

抗 CCP 抗体の抗原認識にはペプチド抗原のシトルリン残基の存在が必須であるが、ペプチド中のシトルリン残基は PADI (peptidylarginine deiminases) による翻訳後修飾の結果作られる。PADIs には PADI-1、2、3、4、6 のサブタイプがあるが (酵素活性を有するのは 1-4)、最近 PADI4 の遺伝子多型が RA 発症、並びに抗シトルリン化フィラグリン抗体産生機転と関連することが報告された。しかし、抗 CCP 抗体がリウマトイド関節炎の結果として産生される単なる疾患標識マーカーであるのか、ある



いは PADI<sub>s</sub> によるペプチドのシトルリン化修飾や抗 CCP 抗体の出現が RA の病態形成に関与するのかが明らかではない。

RA 患者血清との反応性に抗原の種類は重要であり、例えば、シトルリン化ミエリン塩基性蛋白 (myelin basic protein) でもある程度の陽性率が得られるが、シトルリン化ウシ・アルブミンでは RA 患者血清との反応性は認められない。抗シトルリン化ペプチド抗体の対応抗原としては、シトルリン化フィラグリン、シトルリン化フィブリノーゲン ( $\alpha$  鎖、 $\beta$  鎖) がよく知られているが、その他にも  $\alpha$  enolase、I 型および II 型コラーゲン、eIF4GI などが知られている。しかし、その病因的意義は確立されていない。

本研究の目的は、RA の病因・病態 (生物学的製剤への反応性を含む) 解明のために、PADI<sub>s</sub> 新規シトルリン化抗原同定および新規抗シトルリン化ペプチド抗体アッセイ系の作成を行うことである。

## B. 研究方法

### ①シトルリン化した抗原を用いた抗シトルリン化ペプチド抗体測定

(1) 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滑膜細胞ライセート (RA 患者の手術時に得られた滑膜組織から fibroblast 型の培養滑膜細胞を継代培養にて作成した。この RA 滑膜線維芽細胞を CHAPS バッファーで可溶化)、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。

(2) フィブリノー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) を抗原として用いた抗シトルリン化フィブリノーゲンペプチド抗体を 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)。用いたフィブリノーゲンペプチドの配列は以下の通りである。

### BSA-conjugated fibrinogen peptides

アルギニン・ペプチド A : EGGGVRGPRVV

シトルリン・ペプチド A : EGGGVCGRVV

アルギニン・ペプチド B : GNEITRGGSTS

シトルリン・ペプチド B : GNEITCGGSTS

②関節液中にシトルリン化ペプチドの解析  
ヘパリンまたは EDTA 試験管を用いて、RA 患者または変形性関節症 (OA) 患者から関節液を採取し、遠心により細胞成分を除いて実験に用いた。

(1) 希釈した関節液をプロタミン-アガロースやヘパリン-アクリルビーズ、コラーゲン-アガロース (Sigma) と一定時間インキュベーションしたのちに洗浄し、SDS-PAGE 用バッファーで処理した。そして一次元または二次元で展開した後に Western blot を行い、抗シトルリン抗体 (Upstate 社) やメンブレンを化学修飾したのちに Senshu 抗体を用いてシトルリン化抗原の検出を行った。

(2) フィブリノーゲンの 16 番アルギニン、252 番アルギニンをシトルリンに置換した合成ペプチドをマウスに免役して得られたモノクローナル抗体 (理化学研究所鈴木博士より供与) と Senshu (anti-modified citrulline) 抗体を用いて sandwich ELISA を行い、関節液中のシトルリン化フィブリノーゲンを測定した。

### (倫理面への配慮)

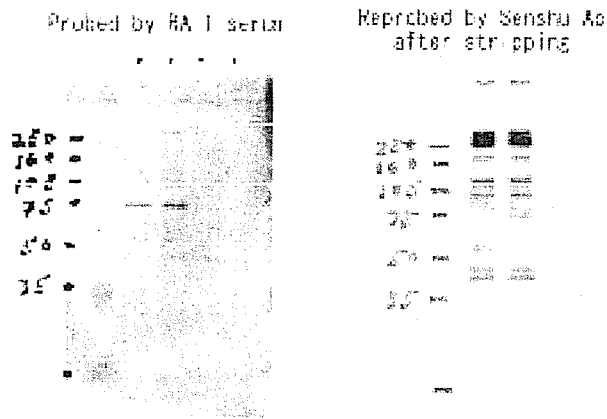
本研究は機能解析研究であり、遺伝子研究は含まない。また研究に用いる血清量はわずかであり、身体に与える影響は軽微である。関節液・滑膜組織は関節穿刺または関節手術が必要な症例において、文書により同意を得て実験に用いた (倫理委員会承認済み)。

## C. 研究結果

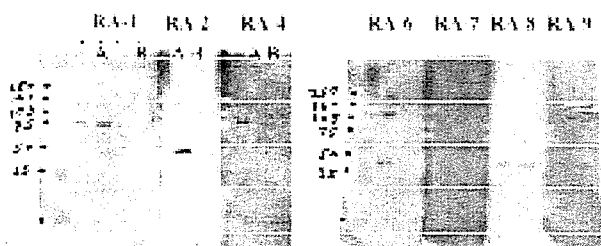
### ①シトルリン化滑膜細胞抗原を用いた抗シトルリ

シトルリン化ペプチド抗体

Senshu 抗体 (anti-modified citrulline Ab) を用いた Western blot (右側) では、PADI 処理した滑膜細胞蛋白中に多数のシトルリン化蛋白のバンドが検出された。



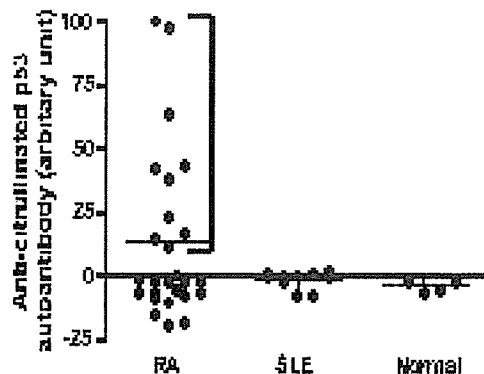
しかし、RA 患者血清が認識したのはそのうちの一部のバンドのみであり、それらは患者により異なる傾向があった。PADI は滑膜細胞に含まれるタンパク質の多くを基質としシトルリン化を行うことができる。しかし、そのうち自己抗原となるのは一部である。また、抗CCP抗体は関節リウマチの9割前後で陽性となるが、関節リウマチにおけるシトルリン抗原に対する自己免疫応答は多様であり、患者ごとに重要な自己抗原の種類が異なっている可能性が考えられる。



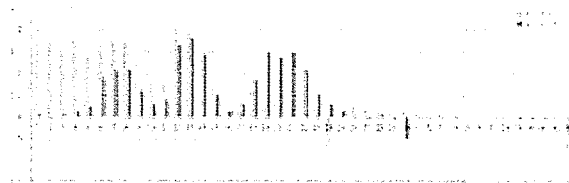
Lane A: Ca<sup>2+</sup> lysate, detected *in vitro* by exam 92619  
Lane B: Control. DETA was added instead of Ca<sup>2+</sup>

②抗シトルリン化 p53 抗体

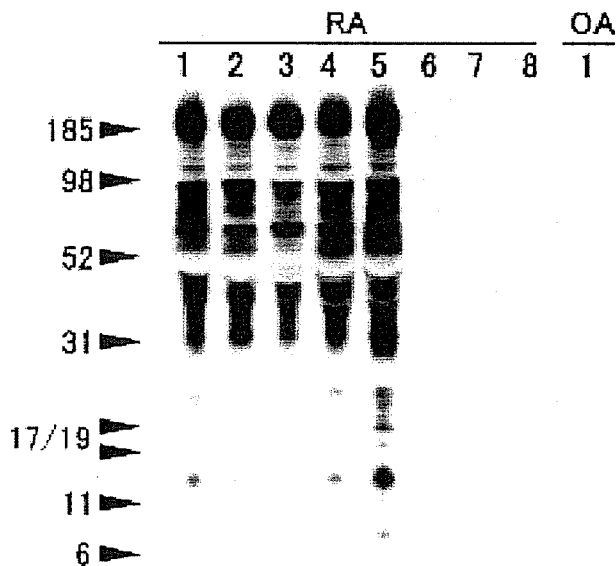
*in vitro* でシトルリン化したりコンビナント p53 に対する抗体は ELISA による検討では約 1/3 の RA 患者で検出することが可能であった。シトルリンを含むフィブリノゲンペプチドとの反応パターンは多様であった。また、抗シトルリン化 p53 抗体の存在はウエスタンブロット法によっても確認することが可能であった。



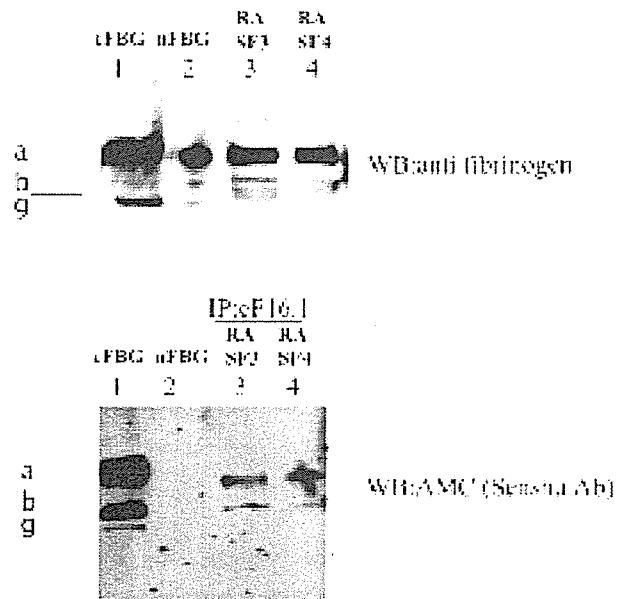
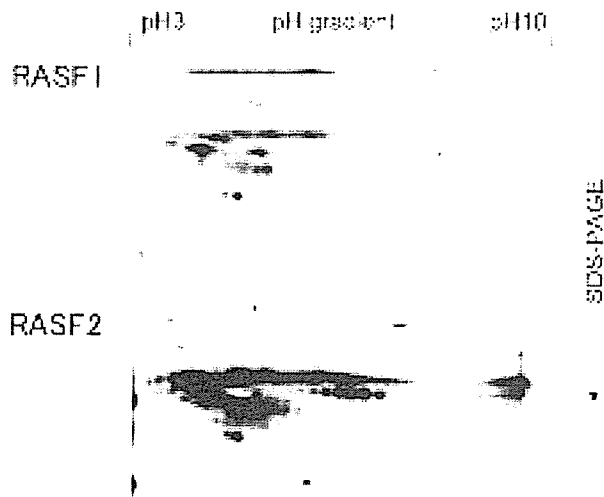
③抗シトルリン化フィブリノゲンペプチド抗体  
フィブリノゲンの 16 番アルギニン、252 番アルギニンをシトルリンに置換した合成ペプチドを用いて、抗シトルリン化フィブリノゲンペプチド抗体を ELISA により測定したところ、RA におけるシトルリンを含むフィブリノゲンペプチドとの反応パターンは多様であることが明らかとなった。



③プロタミン結合分画として、RA 関節液でシトルリン化抗原が検出された。OA や細胞数の少ない RA 関節液 (レーン 6-8) ではシトルリン化抗原はほとんど検出されなかった。

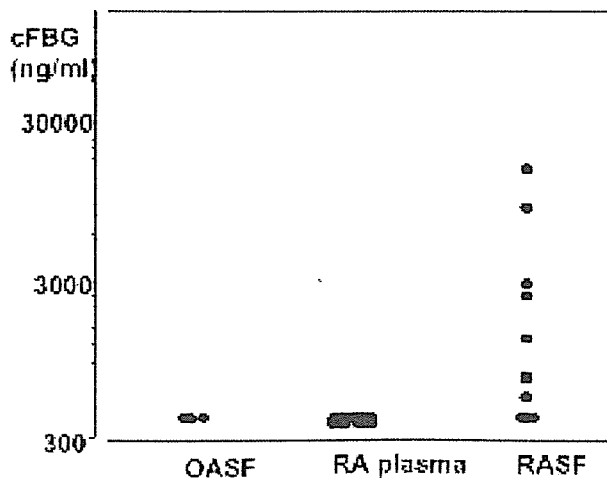


また、二次元電気泳動においてもプロタミン結合分画には数多くのシトルリン化ペプチドが含まれることが示された。



④フィブリノーゲンの 16 番または 252 番のアルギニンをシトルリンに置換したペプチドに対するモノクローナル抗体と Senshu 抗体を用いて、ELISA 法により RA 患者の関節液中でシトルリン化フィブリノーゲンが検出された。また、Immunoprecipitation (IP)-Western blotting によっても、RA 関節液中にシトルリン化フィブリノーゲンが同定した。

結果③で既に示したように、少なからぬ割合の RA 患者血清はフィブリノーゲンの 16 番または 252 番のアルギニンをシトルリンに置換したペプチドと反応する。これは RA 患者の関節液中にシトルリン化フィブリノーゲンが存在することを示唆するデータであると考えられる。



#### D. 考察

抗 CCP 抗体は RA 診断上有用な検査であるが、その対応抗原はシトルリンを含む合成ペプチドライブラリーから選別された混合ペプチドであり、生体内情報に基づくものではなく、関節リウマチの病態解明の点では必ずしも優れているとはいえない可能性がある。また、感度がよい反面、混合ペプチドが用いられていてその詳細が開示されていないため、抗 CCP 抗体の有無で RA を分類することが困難である。

抗 CCP 抗体は関節リウマチの 8-9 割で陽性となるが、今回の研究により関節リウマチにおけるシトルリン抗原に対する自己免疫応答は多様であり、患者ごとに重要な自己抗原の種類が異なっている可能性が考えられる。今回報告した新規シトルリン化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。

今回の検討により、RA 患者の関節液中にはシトルリン化フィブリノーゲンあるいはプロタミン結合分画ペプチドをはじめ、数多くのシトルリン化抗原が存在することが明らかとなった。シトルリン化反応の場や関与するシトルリン化酵素は不明であるが、プロタミン結合分画のシトルリン化ペプチドは関節

液細胞（主に好中球）の多い関節液で検出されていたことから、好中球 PADI4 が関与している可能性はあると思われる。また、シトルリン化フィブリノーゲンに関しては、16 番のアルギニンがシトルリンに置換されたフィブリノーゲンはトロンビンによる切断を受けず、フィブリンへの重合反応が起きない可能性がある。このような異常シトルリン化フィブリノーゲンの集積が関節リウマチの病態形成に関与している可能性も考えられる。

## 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ことは、RA の病因・病態解明に有用である可能性がある。また、RA の関節液中にはシトルリン化フィブリノーゲンを含め多くのシトルリン化抗原が存在することを明らかにした。今後これらシトルリン化抗原の詳細を検討し、関節リウマチの病態解明（生物学的製剤の有用性予測を含め）のバイオマーカーとしての有用性の可能性を検討したい。

## F. 健康危険情報

特記事項なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

・Chang X, Yamada R, Sawada T, Suzuki A, Kochi Y, Yamamoto K. The inhibition of antithrombin by peptidylarginine deiminase 4 may contribute to pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 44(3):293-8,2005.

・Chang X, Yamada R, Suzuki A, Sawada T, Yoshino S, Tokuhiko S, Yamamoto K. Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial

tissue of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 44(1):40-50,2005.

・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-kB 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* 65(8):1013-20,2006

### 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遺伝子は関節炎の必要因子か 日本リウマチ学会総会・学術集会 (2005.04)