

関節リウマチ骨髄血液の疾患誘導因子解明と根治療法開発研究
抗ヒト SHPS-1 モノクロー抗体の作成

研究分担者

鈴木 隆二 国立相模原病院 臨床研究センター 研究室長

前田 朋子 塩野義製薬株式会社 医薬開発研究本部 創薬研究所 主任研究員

研究要旨 糖タンパク質 Src homology 2-domain containing protein tyrosine phosphatase substrate 1(SHPS-1/SIRP-A)はマクロファージの多核化(破骨細胞形成誘導)、樹状細胞の機能成熟、T細胞の活性化に関与する。抗マウス SHPS-1 モノクロー抗体は、In vitro においては、破骨細胞形成阻止、炎症性サイトカイン産生誘導抑制効果を示した。また、In vivo でマウス CIA モデルに対して予防的および治療的効果を示した。マウスモデル系において本分子の RA 治療における可能性が示唆されたことから、次に、ヒト SHPS-1/SIRP-A に対するモノクロー抗体の作成を行い、ヒト単球を認識し、ヒト破骨細胞誘導を抑制する機能的抗体の選択を行い、目的とする抗体の確立に成功した。

A. 研究目的

SHPS-1/SIRP-A は単球・樹状細胞に高発現する膜タンパクであり、フォスファターゼ SHP-1/2 と結合することが知られている。我々は、抗マウス SHPS-1 抗体の in vitro おける破骨細胞形成誘導阻害効果と炎症性サイトカイン産生誘導抑制効果を確認した。さらに、CIA 誘発性関節炎モデル (CIA マウス) に対して治療効果を有することも見出した。SHPS-1/SIRP-A が RA 治療に対してターゲットと成り得る可能性を示唆した。これらの結果から、さらに、ヒト SHPS-1/SIRP-A に対するモノクロー抗体を作成し、in vitro での効果を検討したので報告する。

B. 研究方法

1) 抗マウス SHPS-1 モノクロー抗体の効果：
□本抗体存在下に RANKL 誘導破骨細胞形成に対する効果を検討した。□本抗体存在下にマウス脾細胞を ConA で刺激し、誘導されるサイトカインを ELISA で定量した。□CIA マウスに本抗体を投与し、四肢の関節の腫脹を観察した。また、病理組織学的検討を行った。抗体の投与は、関節腫脹以前と関節腫脹後に行い、それぞれを予防的および治療的投与とした。
2) ヒト SHPS-1/SIRP-A に対するモノクロー抗体の作成と評価：□ヒト SHPS-1 は 3 つの Ig 様ループ構造をもつ糖タンパク質であり、リガンドである CD47 との結合には N 末のループが重要と推測されている。この SHPS-1

活性化に影響する抗体の作成を目的とした。免疫原としての組換えタンパクの調整は、バキュロ発現系にて、40 番目の D から 145 番目の R まで(GST-N 末領域 His タグ：SIRP-A)、40 番目の D から 371 番目の N まで(細胞外領域全体 His タグ：SIRP-B)を発現・精製して Balb/c マウスに免疫しハイブリドーマの樹立を行った。目的とする抗体の選択は、1 次スクリーニングとして、免疫原タンパクに対する ELISA で、2 次スクリーニングとして FACS による THP-1 細胞表面上の SHPS-1 の検出を行った。□選択された抗体については、ヒト破骨細胞形成誘導系に添加して、その効果を検討した。

(倫理面への配慮)

本実験に給した臨床サンプルは、全て説明と同意の上入手した。本研究に使用したマウスは、動物愛護の精神に基づき適正に使用した。

C. 研究結果

1) 抗マウス SHPS-1 モノクロー抗体の効果：
□本抗体存在下に破骨細胞誘導能を濃度依存的に抑制した。□ConA 刺激脾細胞から誘導されるサイトカインのうち IL-18, IL-2, IL-12, IFN- γ , TNF- α は抗体の濃度依存的に抑制された。IL-4, IL-10 について抑制効果が確認されなかった。□CIA マウスにおける本抗体の効果は、予防的投与のみならず治療的投与においても投与量に依存して観察された。病理組織学的解析からも炎症の程度の減弱化が確認された。
2) ヒト SHPS-1/SIRP-A に対するモノクロー抗体の作成と評価：□1 次スクリーニングにおい

て、免疫原 SIRP-A に対して 185 個、免疫原 SIRP-B に対して 179 個の陽性クローンを選択した。□2 次スクリーニングの結果、最終的に免疫原 SIRP-A に対して 18 個、免疫原 SIRP-B に対して 2 個の陽性クローンを選択した。これら最終選択したクローンについては、ウエスタンブロッティングにて認識する分子量を検討した。これらクローンは腹水化、Ig アイソタイプを決定した。□腹水化後に精製したモノクロー抗体については、ヒト破骨細胞誘導系に添加実験を行い、その効果を検討した結果、クローン#101H9, 102H2, 111A7, 125D3 において用量依存性抑制効果が確認された。

D. 考察

上記の研究展開から、RA の治療に関わる分子として SHPS-1/SIRP-A を選択した。マウス SHPS-1 の CIA モデルの結果から、ヒト SHPS-1/SIRP-A に注目した今回の検討から、ヒト SHPS-1/SIRP-A に対するモノクロー抗体を作成した。生細胞上の本分子を認識する抗体の選択に成功し、ヒト破骨細胞誘導抑制という機能的抗体であることも確認した。マウス系で得られた本分子の作用の一つとして破骨細胞形成抑制能を有していることから、本抗体を用いた治療の可能性が示唆される。今後は、各種サイトカイン誘導能に対する効果を検討する予定である。して、合計 9 遺伝子を選択した。

E. 結論

マウスで先行した SHPS-1/SIRP-A 分子を抑制することによる関節炎モデルマウスの治療効果とその作用機序の検討から、ヒト SHPS-1/SIRP-A に対するモノクロー抗体を作成した。現在迄に、その抗体は、ヒト破骨細胞誘導を濃度依存性に抑制することが明らかとなった。

G. 研究発表

1). 論文発表

(1). 海外 5 件

1. Ishida S, Yamane S, Nakano S, Yanagimoto T, Hanamoto Y, Maeda-Tanimura M, Toyosaki-Maeda T, Ishizaki J, Matsuo Y, Fukui N, Itoh T, Ochi T, Suzuki R.
The interaction of monocytes with rheumatoid synovial cells is a key step in

LIGHT-mediated inflammatory bone destruction.

Immunology. 2008 Nov 14. [Epub ahead of print]

2. Tanaka K, Horikawa T, Suzuki S, Kitaura K, Watanabe J, Gotoh A, Shiobara N, Itoh T, Yamane S, Suzuki R, Fukui N, Ochi T.
Inhibition of Src Homology 2 Domain-Containing Protein Tyrosine Phosphatase Substrate-1 Reduces the Severity of Collagen-Induced Arthritis.

J Rheumatol. 35(12):2316-2324. 2008.

3. Wakasa-Morimoto C, Toyosaki-Maeda T, Matsutani T, Yoshida R, Nakamura-Kikuoka S, Maeda-Tanimura M, Yoshitomi H, Hirota K, Hashimoto M, Masaki H, Fujii Y, Sakata T, Tsuruta Y, Suzuki R, Sakaguchi N, Sakaguchi S.

Arthritis and pneumonitis produced by the same T cell clones from mice with spontaneous autoimmune arthritis.

Int Immunol. 20(10):1331-42. 2008.

4. Yamane S, Ishida S, Hanamoto Y, Kumagai K, Masuda R, Tanaka K, Shiobara N, Yamane N, Mori T, Juji T, Fukui N, Itoh T, Ochi T, Suzuki R.

Proinflammatory role of amphiregulin, an epidermal growth factor family member whose expression is augmented in rheumatoid arthritis patients.

J Inflamm (Lond). 27;5:5. 2008.

5. Ishida S, Yamane S, Ochi T, Nakano S, Mori T, Juji T, Fukui N, Itoh T, Suzuki R
LIGHT induces cell proliferation and inflammatory responses of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via lymphotoxin beta receptor.

J Rheumatol. 35(6):960-8. 2008.

2). 学会発表

未

3). 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし

4). 実用新案登録

なし

5). その他

なし

関節リウマチ骨髄血液の疾患誘導因子解明と根治療法開発研究
RA 骨髄細胞から関節リウマチ関連疾患候補遺伝子の選択とその解析研究

研究代表者 越智 隆弘 大阪警察病院 院長

研究分担者

鈴木 隆二 国立相模原病院 臨床研究センター 研究室長

吉川 秀樹 国立大学法人大阪大学医学系研究科 整形外科学 教授

宇月 美和 岩手医科大学医学部 病理学第一講座 講師

前田 朋子 塩野義製薬株式会社 医薬開発研究本部 創薬研究所 主任研究員

研究要旨 RAの病因を骨髄に求める研究方針に従い、RAおよびOA患者の骨髄液について網羅的遺伝子解析を行った結果、RA骨髄に高発現が確認された遺伝子としてLIGHT/TNFSF14、Granulin、CCAR1、CXCL5、OLR1を選択した。また、RAに特徴的に存在するNurse細胞に選択的に発現する遺伝子としてHu-Sulf-1、EF-1 α を、RAの骨破壊に特異的に誘導され病変部のその存在が確認された破骨細胞に発現しているSHPS-1/SIRP-A、MMP-12も選択した。これら遺伝子についてはモノクロー抗体作成・ELISA測定系確立によるRA患者における測定を行いRA病態との関連性を検討し、さらに、遺伝子改変動物の作成により病因との関連性を詳細に検討中である。

A. 研究目的

本班研究は今までの厚生労働科学研究として続けてきたRA病態研究成果を基に、「RA主病巣は骨髄」という仮説をたてて、本疾患の重症化の原因となる骨吸収亢進と骨破壊拡大機序解明の研究を進めてきた。本報告では、これら病態に関連する病因遺伝子の選択を行い、さらに、それら候補遺伝子の疾患への関連性を明らかにすることにある。

B. 研究方法

1) GeneChipによる網羅的発現解析：
RAおよびOA患者骨髄液：RA患者の腸骨骨髄液は行岡病院、OA患者の腸骨骨髄液は共和会病院でそれぞれ10例採取したサンプルを用いた。GeneChipはAffymetrix社のGeneChip Genome U133 Plus 2.0 Array(搭載されているProbe set数：54,675/array)を使用し、RAおよびOA骨髄細胞から抽出したtotal RNA 3 μ gを解析に用いた。目的とする解析は、群間比較検定、フィルタリング、クラスタリング解析を行い、抽出遺伝子の特徴解析として、FoldChange解析、GeneOntology解析、Pathway解

析、GSEA(GeneSet Enrichment Analysis)解析を行った。最終的には、細胞膜上もしくは分泌蛋白であるという基準で遺伝子の選定を行った。

2) RA特異的破骨細胞を用いた網羅的発現解析：RA特異的破骨細胞に選択的に発現している遺伝子についても、同様のGeneChipを用いた解析を行い遺伝子の選択を行った。

3) Subtractionによる探索：Nurse細胞株と非Nurse細胞株間でSubtractionを行い、Nurse細胞において特徴的に発現が観察された遺伝子を選択した。

4) SHPS-1/SIRP-Aの選択：抗マウスSHPS-1/SIRP-Aモノクロー抗体がマウスCIAモデルに対し予防的及び治療的効果を示したことから、パキユロ発現ヒトSHPS-1/SIRP-Aを作成しモノクロー抗体を作成した。

5) 遺伝子改変動物の作成：RA病態形成に関連性のあると予想された遺伝子については、遺伝子改変マウス(トランスジェニックマウス：TGマウス)の作出を行った。(倫理面への配慮)

本実験に給した臨床サンプルは、全て説明と同意の上入手した。本研究に使用したマウスは、動物愛護の精神に基づき適正に

使用した。

C. 研究結果

1) GeneChip による網羅的解析より：

RA および OA 患者骨髄液を使用し、GeneChip 解析を行い、RA 患者で発現強度の高い遺伝子の抽出に成功した。①RA 骨髄に OA 骨髄と比較して強度に発現する遺伝子として、LIGHT/TNFSF14、Granulin を選択した。LIGHT/TNFSF14 は RA 関節滑膜の増殖を促進させ、さらに破骨細胞分化誘導能を有することも明らかとなった。②Granulin は炎症時に epithelial および hematopoietic cell が産生し、epithelial および mesenchymal cell の増殖を調整する emerging family of growth factors である。RA における報告は無い。RA における Granulin の病態への関与を行うために、抗ヒト Granulin モノクロー抗体を作成し、RA 患者における発現量を蛋白レベルで検討するために ELISA 系を作成した。また、モノクロー抗体を用いた病巣部の免疫染色により RA 滑膜組織の線維芽細胞様細胞、マクロファージ系細胞その他に発現していることが判明した。LIGHT/TNFSF14 により誘導される破骨細胞は、RANKL により誘導される破骨細胞と異なり③MMP-12 を特徴的に保有しており、MMP-12 は RA 罹患関節部の破骨細胞は発現が確認されるが、OA の関節部に存在する破骨細胞は発現していないことを免疫組織染色で確認した。

2) Subtraction 解析より：

Nurse 細胞に選択的に発現が確認された①hu-sulf-1 については、腫瘍細胞増殖抑制効果を有すると言う報告から RA 滑膜増殖に negative に関与している可能性があると共に、抗体作成が順調に行っていないため機能解析が進んでいない。また、Nurse 細胞と共培養することにより樹立される B 細胞の認識する自己抗原として②EF-1 α については、RA 滑膜組織中に多量に存在することを明らかにした。

3) SHPS-1/SIRP-A に関して：

Anti-SHPS-1mAb の投与は、CIA マウスで観察される関節部の炎症、骨と軟骨の破壊を有意に減少させた。この効果は、CIA マウスの関節炎発症後からの anti-SHPS-1mAb 投与によっても観察

された。anti-SHPS-1mAb 投与によっても CIA マウスにおける anti-CII Ab 濃度には何ら影響は無かった。in vitro 実験系で、Anti-SHPS-1mAb はマウス骨髄細胞の破骨細胞形成を有意に抑制し、マウス脾細胞を ConA 刺激で誘導される IL-1 β , IL-2, IL-12, IFN- γ , TNF- α を有意に抑制したが、IL-4, IL-10 は抑制しなかった。マウスモデルで本抗体による予防的・治療的效果が観察されたため、抗ヒト SHPS-1 モノクロー抗体の作成を行った。

4) NIH との共同研究から：

NIH の Dr. P Lipsky のラボとの共同研究から CCAR1, CXCL5, OLR1 の三種類の遺伝子を選択した。

5) 遺伝子改変動物の作成と評価：

RA 骨髄に選択的に高発現した遺伝子として LIGHT/TNFSF14, Granulin, CCAR1, CXCL5, OLR1, hu-sulf-1 を、RA 破骨細胞に関連して MMP-12 を、RA 自己抗原として EF-1 α を、さらに、RA の治療に関わる SHPS-1/SIRP-A を選択し、これら遺伝子の RA 病態形成および病因解析を目的に TG マウスの作成を行った。現在迄に、

① LIGHT/TNFSF14 の TG マウスは致死的であり作成が出来ていない。② Granulin の TG マウスの作成が出来ていない。これらについては胚性致死の可能性はあるが、ベクター構築を再検討中である。③ SHPS-1/SIRP-A についてはファウンダーから F1 作成中であるが、生殖能力に異常が確認されている。④ hu-sulf-1 との TG マウスは F1 が誕生している。⑤ EF-1 α の TG マウスは作成が完了し、現在、詳細な検討を準備中である。また、hu-sulf-1 と EF-1 α のダブル TG マウスの作成を予定している。⑥ RA 破骨細胞が選択に保有する MMP-12 については、その機能を検討するためにノックアウトマウス (KO マウス) の作成を行った。KO マウスの作成は完了した。⑦ 上記の 6 遺伝子以外の CCAR1, CXCL5, OLR1 についても TG マウスを作成中である。

D. 考察

上記の研究展開から、RA に関連すると考えられる分子として、合計 9 遺伝子を選択した。

1) LIGHT/TNFSF14 に関しては、RA 滑膜の増生と炎症性の液性因子および接着因子

の発現亢進に関与を示唆した。また、既に LIGHT/TNFSF14 による破骨細胞の誘導することを見出している。RA における滑膜増生とそれに伴う炎症性破骨細胞誘導は今回の検討から共に LIGHT/TNFSF14 が関係していた。炎症と関節破壊の両方に関与する誘導機構は未だ不明のままであるが、RA 滑膜浸潤細胞が産生している可能性が高い。

2) SHPS-1/SIRP-A に関しては、Anti-SHPS-1mAb の投与により、CIA マウスの関節炎に対して治療の効果を有することが示された。Anti-SHPS-1mAb の投与は、炎症性サイトカインの産生抑制と破骨細胞形成阻害の両作用によることが示唆された。今回、抗ヒト SHPS-1 モノクロー抗体の作成に成功した。今後はヒトの系に本抗体の評価を行い、治療の可能性を検討する。

3) Granulin に関しては機能を解明する目的とで、ヒト Granulin に対するモノクロー抗体作成に成功し、ELISA 系を確立した。今後、RA 病態との関連性を検討が可能となった。

4) MMP-12 に関しては、RA 特異的な破骨細胞のマーカーとして

5) hu-sulf-1 に関しては、Nurse 細胞に対する特異性は高いが、機能的には不明な点が多い。また、論文上の報告では、細胞増殖抑制作用が示唆されている。現在までに、抗体作成も順調ではない。

6) EF-1 α に関しては、RA における自己抗原の可能性があり、パンヌス中の B 細胞の関与が示唆される。

7) 上記 6 遺伝子に、CCAR1、CXCL5、OLR1 の 3 遺伝子については、最終的な機能を確認するためにも、遺伝子改変動物の作成を進めており、幾つかの遺伝子については順調に進んでいる。

E. 結論

今回の解析による RA 患者特異的遺伝子群の網羅的解析などにより抽出された遺伝子群については、RA 病態解明研究に新たな方向性を開く可能性が高いと結論した。治療法開発研究は平成 21 年度以後の研究になる。

G. 研究発表

1). 論文発表

(1). 海外 4 件

1. Ishida S, Yamane S, Nakano S, Yanagimoto T, Hanamoto Y, Maeda-Tanimura M, Toyosaki-Maeda T, Ishizaki J, Matsuo Y, Fukui N, Itoh T, Ochi T, Suzuki R.

The interaction of monocytes with rheumatoid synovial cells is a key step in LIGHT-mediated inflammatory bone destruction.

Immunology. 2008 Nov 14. [Epub ahead of print]

2. Tanaka K, Horikawa T, Suzuki S, Kitaura K, Watanabe J, Gotoh A, Shiobara N, Itoh T, Yamane S, Suzuki R, Fukui N, Ochi T.

Inhibition of Src Homology 2 Domain-Containing Protein Tyrosine Phosphatase Substrate-1 Reduces the Severity of Collagen-Induced Arthritis.

J Rheumatol. 35(12):2316-2324. 2008.

3. Yamane S, Ishida S, Hanamoto Y, Kumagai K, Masuda R, Tanaka K, Shiobara N, Yamane N, Mori T, Juji T, Fukui N, Itoh T, Ochi T, Suzuki R.

Proinflammatory role of amphiregulin, an epidermal growth factor family member whose expression is augmented in rheumatoid arthritis patients.

J Inflamm (Lond). 27;5:5. 2008.

4. Ishida S, Yamane S, Ochi T, Nakano S, Mori T, Juji T, Fukui N, Itoh T, Suzuki R

LIGHT induces cell proliferation and inflammatory responses of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via lymphotoxin beta receptor.

J Rheumatol. 35(6):960-8. 2008.

2). 学会発表

未

3). 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

4). 実用新案登録

なし

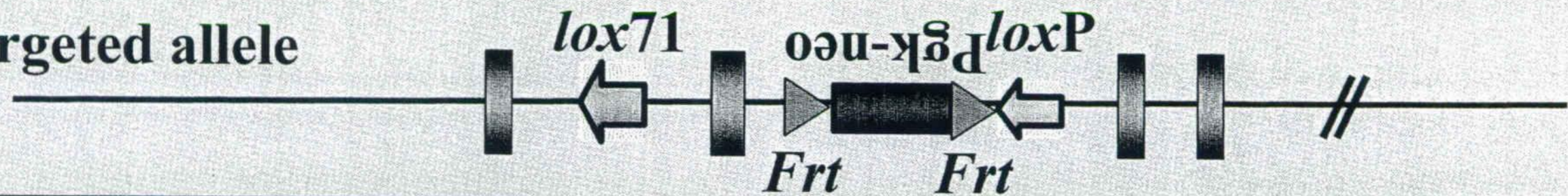
5). その他

なし

Knockout mouse, Transgenic mouse 作製進捗 H20.11

遺伝子名	Vector	Target領域	ES clone樹立	Flp組換え	キメラマウス作成	GT確認	ホモ作製
Mmp12	Condition al KO	Exon2	1 clone樹立 (363 cloneから スクリーニング)	7 clone樹 立	70%以上 5匹樹立	F1マウス 樹立	CREマウス との交配を 計画中
CCAR1	Condition al KO	Exon3	3 clone樹立 (180 cloneから スクリーニング)	進行中			

Targeted allele



遺伝子名	移植胚数	産子数	産子率 (産子数/移植胚数)	解析結果
EEF1a1	146	51	13.9%	1
Tnfsf14	280	35	12.5%	0
Granulin	433	49	11.3%	0
Sirpa	189	32	16.9%	2
Sulfatase1	189	30	15.9%	2
CXCL5	274	69	25.2%	4
OLR1	237	55	23.2%	
EEF1a1×Sulfatase1	ダブルトランスジェニックマウスを作製中。			

DNA マイクロアレイとバイオインフォマティクスを用いた RA 関連遺伝子の解析
- S100 ファミリー分子の発現と関節破壊との関連 -

研究分担者 西本憲弘 和歌山県立医科大学免疫制御学講座 教授

研究要旨

関節リウマチ(RA)患者と健常人の末梢血細胞における3万個の遺伝子発現を、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析し、RAで異常発現する分子群を同定した。また、関節破壊にかかわる機能分子を同定する目的で、RAと類似の病態を有する多関節型若年性特発性関節炎(polyJIA)、炎症性自己免疫疾患でありながら関節破壊がまれである全身性エリテマトーデス(SLE)と全身型若年性特発性関節炎(sJIA)との比較を行った。RA患者の末梢血細胞では、カルシウム結合性タンパク質S100ファミリーに属するS100A4, S100A6, S100A8, S100A9, S100A11, S100A12の6分子の発現が増加していた。これらの中で、S100A4だけが骨破壊の強いRAとpolyJIAでは著増し、sJIAならび関節破壊を見ないSLE患者では発現増加は見られず、骨破壊に関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

関節リウマチ(RA)は関節破壊を特徴とする原因不明の炎症性自己免疫疾患である。RAの病態形成にはTNFやIL-6などの炎症性サイトカインをはじめとする多数の機能分子がネットワークを形成しながら関わっていると考えられる。このため、特定の分子を追跡する演繹的なアプローチでは真の発症機構に迫るには限界がある。そこで、我々は、RA患者末梢血細胞における3万個の分子の遺伝子発現を、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析し、そのプロフィールから帰納法的に病態解析を試みた。特に関節破壊にかかわる分子を同定する目的で、RAに加えて類似の病態を有する小児疾患と考えられる多関節型若年性特発性関節炎(polyJIA)患者で異常発現する分子群の検索を行った。一方、同じく炎症性自己免疫疾患でありながら関節破壊がまれである全身性エリテマトーデス(SLE)、と全身型若年性特発性関節炎(sJIA)についても異常発現する分子群を同様にDNA マイクロアレイを用いて

検索し、それらとの比較により関節破壊を特徴とするRAならびにpolyJIAにのみ選択的に発現する分子の特定を試みた。

B. 研究方法

RA患者(114例)、polyJIA患者(6例)、SLE患者(12例)、sJIA患者(51例)の末梢血細胞中のmRNAの発現量を、ヒトの3万個の遺伝子からデザインしたオリゴDNA搭載マイクロアレイDNAチップ(AceGene®)を用いて網羅的に測定し、健常人(45例)と比較して発現が変動している遺伝子を特定した。それらの分子の中から、さらにRAならびにpolyJIAでのみ選択的に発現する分子の同定を試みた。

患者の末梢血全血よりtotal RNAを抽出した。RNAを増幅後、アミノアリルRNAを蛍光色素Cy3, Cy5で標識し、ヒトの3万個の遺伝子からデザインしたオリゴDNA搭載マイクロアレイDNAチップ(AceGene®)にハイブリし、末梢血細胞中の29640種のRNA発現量を測定

した。Reference には健常人 45 人の末梢血から抽出した RNA をプールして用いた。

(倫理面への配慮)

患者のインフォームドコンセントを得た上で検査を行った。患者情報に関しては、治療施設・氏名・生年月日・住所などの情報を一切削除し、匿名化の下に行った。

C. 研究結果

RA、患者の末梢血細胞では、カルシウム結合性タンパク質 S100 ファミリーに属する、S100A4, S100A6, S100A8, S100A9, S100A11, S100A12 の 6 種類の発現が増加しており、常に有意差検定において異常発現する分子群の上位に位置した。これらの分子の発現は IL-6 阻害治療により改善した。SLE、sJIA、polyJIA 患者での発現プロフィールと比較したところこれらの中で、S100A4 だけが骨破壊の強い RA と polyJIA では著増していたが、全身の炎症症状が主体で骨破壊の比較的少ない sJIA ならびに関節破壊を見ない SLE 患者では発現増加は見られなかった。

D. 考察

近年、上記の 6 種類の S100 ファミリーのうち S100A4, S100A8, S100A9, S100A12 の 4 種類が RA 患者の滑膜細胞で発現が増加していることが個別に報告されているが、今回の我々の DNA チップによる網羅的な解析でも確認された。一方、S100A6, S100A11 は今回初めて見出されたものである。これら 6 種類の中でも S100A4 だけが骨破壊の強い RA と polyJIA で著増していた。S100 ファミリーの中で S100A8, S100A9, S100A12 は貪食細胞、顆粒球に局限するのに対し、S100A4 は免疫担当細胞、繊維芽細胞、血管内皮細胞など炎症滑膜組織を構成する細胞で発現する。S100A4 は、p53 と結合し p53 の標的分子の発現を増加させる。また S100A4 は p53 のリン酸化を抑制しその機能を抑制することより S100A4/p53 複合体が RA 病態の形成に関わっている可能性が報告されている。また、培養

滑膜細胞では、細胞外の S100A4 が MMP-1 と MMP-3 の発現を促進するとの報告があり、これらのマトリックス分解酵素の発現誘導を介して関節破壊にかかわっている可能性がある。さらに破骨細胞分化に必須の転写因子 NFATc1 の活性化において、S100 タンパクは、カルシニューリンやカルモデュリンと同様に調整因子として機能する可能性が考えられる。

今後 S100A4 分子欠損マウスならびに遺伝子のノックインマウスを用いて関節炎モデルを作成し、関節破壊に対する影響を検討する予定である。これにより、S100A4 の関節破壊における役割が明らかになる可能性がある。

E. 結論

RA 患者では 6 種類の S100A4, S100A6, S100A8, S100A9, S100A11, S100A12 のカルシウム結合タンパク質の発現増加が認められた。これらの中で S100A4 は骨破壊に関与する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishimoto N, Mima T. Tocilizumab In: Hochberg M, Weinblatt M, Weisman M, Smolen J and Silman A eds Rheumatoid Arthritis: Elsevier 2008
2. Nishimoto N, Kishimoto T. Humanized Antihuman IL-6 Receptor Antibody, Tocilizumab. In: Chernajovsky Y, Nissim A, eds. Therapeutic Antibodies. Handbook of Experimental Pharmacology: Springer-verlag Berlin Heidelberg 181:151-60, 2008
3. Mima T, Nishimoto N. Tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis. Expert Rev Clin Immunol. 4:165-172, 2008.
4. Yokota S, Imagawa T, Mori M, Miyamae T, Aihara Y, Takei S, Iwata N, Umebayashi

- H, Murata T, Miyoshi M, Tomiita M, Nishimoto N, Kishimoto T. Efficacy and safety of tocilizumab in patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, withdrawal phase III trial. *Lancet* 371: 998-1006, 2008.
5. Ishikawa S, Mima T, Aoki C, Yoshio-Hoshino N, Adachi Y, Imagawa T, Mori M, Tomiita M, Iwata N, Murata T, Miyoshi M, Takei S, Aihara Y, Yokota S, Matsubara K, Nishimoto N. Abnormal expression of the genes involved in cytokine networks and mitochondrial function in systemic juvenile idiopathic arthritis identified by DNA microarray analysis. *Ann Rheum Dis*. 68:264-72, 2009 Epub 2008 Apr 3
 6. Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Azuma J, Kishimoto T. Study of active controlled tocilizumab monotherapy for rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to methotrexate (SATORI): significant reduction in disease activity and serum vascular endothelial growth factor by IL-6 receptor inhibition therapy. *Mod Rheumatol*. 2008 Sep 2. [Epub ahead of print]
 7. Nishimoto N, Terao K, Mima T, Nakahara H, Takagi N, Kakehi T. Mechanisms and pathological significances in serum interleukin-6(IL-6) and soluble IL-6 receptor after administration of an anti-IL-6 receptor antibody, tocilizumab, in patients with rheumatoid arthritis and Castleman's disease. *Blood*. 2008 Sep 10. [Epub ahead of print]
 8. Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Azuma J. Long-term safety and efficacy of tocilizumab, an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody, in monotherapy, in patients with rheumatoid arthritis (the STREAM study): evidence of safety and efficacy in a 5-year extension study. *Ann Rheum Dis*. 2008 Nov 20. [Epub ahead of print]
 9. Mima T, Ishikawa S, Aoki C, Yoshio-Hoshino N, Adachi Y, Imagawa T, Mori M, Tomiita M, Iwata N, Murata T, Miyoshi M, Takei S, Aihara Y, Yokota S, Matsubara K, Nishimoto N. Interleukin-11 and paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha expression correlates with the number of joints with active arthritis in systemic juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2009 Feb;68(2):286-7
1. 学会発表
 1. Nishimoto N. The role of IL-6 in RA. advances in Targeted Therapies. Rapallo, Liguria, Italy. 2008. 4. 2-6
 2. Nishimoto N, Suwabe T, Kakehi T, Kawata Y, Mima T, Takeuchi T, Kawai S, Yamamoto K, Miyasaka N. Relationship between serum IL-6 levels after Tocilizumab treatment and clinical remission in active rheumatoid arthritis(RA) patients. EULAR2008. Paris. France. 2008. 6. 11-14
 3. Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Ito k, Kakehi T. Safety profile of Tocilizumab in Japanese patients with Rheumatoid arthritis-incidences of infections in Japanese long-term clinical studies. EULAR2008. Paris. France. 2008. 6. 11-14
 4. Nishimoto N, Miyasaka N, Van der Heijde D, murata N, Takeuchi T, Kawai S, Hashimoto J, Yamamoto K. Three-year extension of the SAMURAI STUDY confirms Tocilizumab to prevent joint destruction in patients with rheumatoid arthritis. EULAR2008. Paris. France. 2008. 6. 11-14
 5. Nishimoto N. The pathological roles of interleukin-6 in rheumatic diseases. MEDICAL-EXPO2008 in APLAR's World. Yokohama, Japan. 2008. 9. 24-2
 6. 西本憲弘. トシリズマブ. 第52回日本リウマチ学会総会・学術集会 第17回国際リウマチシンポジウム シンポジウム7 S07. ロイトン札幌. 2008. 4. 20-23
 7. 西本憲弘, 山本一彦, 川合眞一, 竹内 勤, 宮坂信之. 関節リウマチ患者に対する

トシリズマブの長期投与における安全性・有効性(STREAM試験). 第52回日本リウマチ学会総会・学術集会 第17回国際リウマチシンポジウム ワークショップ W33-5. 札幌. 2008. 4. 20-23

8. 杉野英彦, 美馬 亨, 石川 悟, 安達康雄, 今川智之, 横田俊平, 西本憲弘. 関節リウマチ・若年性特発性患者でのS100タンパク質ファミリーの発現. 第52回日本リウマチ学会総会・学術集会 第17回国際リウマチシンポジウム ポスターセッション P2-185. 札幌. 2008. 4. 20-23
9. 西本憲弘, 寺尾公男, 美馬 亨, 中原英子, 高木信宏, 笥 高裕. トシリズマブ治療中の血中IL-6の推移と臨床的意義. 第36回臨床免疫学会総会. 京王プラザホテル. 2008. 10. 17
10. 西本憲弘, 寺尾公男, 美馬 亨, 中原英子, 高木信宏, 笥 高裕. トシリズマブ治療中に見られる血中IL-6濃度上昇の病的意義. 第23回日本臨床リウマチ学会. パシフィコ横浜. 2008. 11. 29

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

特記すべきことなし。

2. 実用新案登録

特記すべきことなし。

3. その他

特記すべきことなし。

国際学会発表

1. Nishimoto N. The role of IL-6 in RA. advances in Targeted Therapies. Rapallo,Liguria, Italy.2008.4.2-6
2. Nishimoto N, Suwabe T, Kakehi T, Kawata Y, Mima T, Takeuchi T, Kawai S, Yamamoto K, Miyasaka N. Relationship between serum IL-6 levels after Tocilizumab treatment and clinical remission in active rheumatoid arthritis(RA) patients. EULAR2008. Paris. France.2008. 6.11-14
3. Nishimoto N, Kawai S, Yamamoto K, Miyasaka N, Ito k, Kakehi T, Takeuchi T. Safety profile of Tocilizumab in Japanese patients with Rheumatoid arthritis-incidences of infections in Japanese long-term clinical studies. EULAR2008. Paris. France.2008. 6.11-14
4. Nishimoto N, Miyasaka N, Van der Heijge D, murata N, Takeuchi T, Kawai S, Hashimoto J, Yamamoto K. Three-year extension of the SAMURAI STUDY confirms Tocilizumab to prevent joint destruction in patients with rheumatoid arthritis. EULAR2008. Paris. France.2008. 6.11-14
5. Nishimoto N. The pathological roles of interleukin-6 in rheumatic diseases.MEDICAL-EXPO2008 in APLAR's World.Yokohama, Japan. 2008.9.24-25

国内学会発表

1. 西本憲弘. トシリズマブ. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会 第 17 回国際リウマチシンポジウム シンポジウム 7 S07. ロイトン札幌. 2008. 4. 20-23
2. 西本憲弘, 山本一彦, 川合眞一, 竹内 勤, 宮坂信之. 関節リウマチ患者に対するトシリズマブの長期投与における安全性, 有効性 (STREAM 試験). 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会 第 17 回国際リウマチシンポジウム ワークショップ W33-5. 札幌. 2008. 4. 20-23
3. 杉野英彦, 美馬 亨, 石川 悟, 安達康雄, 今川智之, 横田俊平, 西本憲弘. 関節リウマチ・若年性特発性患者での S100 タンパク質ファミリーの発現. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会 第 17 回国際リウマチシンポジウム ポスターセッション P2-185. 札幌. 2008. 4. 20-23
4. 西本憲弘, 寺尾公男, 美馬 亨, 中原英子, 高木信宏, 笥 高裕. トシリズマブ治療中の血中 IL-6 の推移と臨床的意義. 第 36 回臨床免疫学会総会. 京王プラザホテル. 2008. 10. 17
5. 西本憲弘, 寺尾公男, 美馬 亨, 中原英子, 高木信宏, 笥 高裕. トシリズマブ治療中に見られる血中 IL-6 濃度上昇の病的意義. 第 23 回日本臨床リウマチ学会. パシフィコ横浜. 2008. 11. 29

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
澤井高志、 宇月美和、 佐々木喜子、 金仁順	病理・病態生理、病理-滑膜の炎症から骨破壊まで。	宮坂 信之	最新医学別冊 新しい診断と治療の ABC8. 関節リウマチ	最新医学社	東京	2008	26-41
宇月美和、 澤井高志	免疫染色・ <i>in situ</i> hybridization	伊藤 浩行	エラスチン-構造・機能・病理-	日本エラスチン研究会	大阪	2008	9-22

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
宇月美和、佐々木喜子、澤井高志	RA における骨・軟骨破壊の病理学的特徴	Rheumatology Clinical Update	15	7-10	2008
澤井高志、三浦康宏 宇月美和	学会発表講座 リウマチ性疾患における病理組織画像のプレゼンテーション	Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology	2(3)	168-173	2008
澤井高志、宇月美和	関節リウマチにおける関節炎の破壊に関する最近の病理学的話題。	Clinical Calcium	19(3)	325-338	2009

研究成果の刊行に関する一覧表

【H20. 4. 1～H21. 3. 31】

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Arimitsu, S., Sugamoto, K., Hashimoto, J., Murase, T., Yoshikawa, H., Moritomo, H.	Analysis of radiocarpal and midcarpal motion in stable and unstable rheumatoid wrists using 3-dimensional computed tomography	Journal of Hand Surgery	33A	189-197	2008
Hattori, T., Hashimoto, J., Tomita, T., Kitamura, T., Yoshikawa, H., Sugamoto, K.	Radiological study of joint destruction patterns in rheumatoid flatfoot	Clin Rheumatology	27	733-737	2008
Iwai, T., Murai, J., Yoshikawa, H., Tsumaki, N.	SMAD7 inhibits chondrocyte differentiation at multiple steps during endochondral bone formation and down-regulates p38 mapk pathways	Journal of Biological Chemistry	283	27154-27164	2008
Nampei, A., Hashimoto, J., Koyanagi, J., Ono, T., Hashimoto, H., Tsumaki, N., Tomita, T., Sugamoto, K., Nishimoto, N., Ochi, T., Yoshikawa, H.	Characteristics of fracture and related factors in patients with rheumatoid arthritis	Modern Rheumatology	18	170-176	2008
Nomura, K., Kuroda, S., Yoshikawa, H., Tomita, T.	Inflammatory osteoclastogenesis can be induced by GM-CSF and activated undesired TNF immunity	Biochem Biophys Res Commun	367	881-887	2008
Otsuru, S., Tamai, K., Yamazaki, T., Yoshikawa, H., Kaneda, Y.	Circulating bone marrow-derived osteoblast progenitor cells are recruited to the bone-forming site by CXCR4/SDF-1 pathway	Stem Cells	26	223-234	2008
Shimizu, H., Nakagami, H., Osako, MK, Hanayama, R., Kunugiza, Y., Kizawa, T., Tomita, T., Yoshikawa, H., Ogihara, T., Morishita, R.	Angiotensin II accelerates osteoporosis by activating osteoclasts	FASEB Journal	22	2465-2475	2008
吉川秀樹、玉井宣行、名井陽	人工骨による骨・関節疾患の治療	日本医事新報	4403	53-56	2008

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kosuke Ebina, Kazuya Oshima, Morihiro Matsuda, Atsunori Fukuhara, Kazuhisa Maeda, Shinji Kihara, Jun Hashimoto, Takahiro Ochi, Nirmal K. Banda, , Hideki Yoshikawa, Iichiro Shimomura	Adenovirus-mediated gene transfer of adiponectin reduces the severity of collagen-induced arthritis in mice	Biochemical and Biophysical Research Communications	378(2)	186-91	2009
Kosuke Ebina, Atsunori Fukuhara, Wataru Ando, Makoto Hirao, Tadashi Koga, Kazuya Oshima, Morihiro Matsuda, Kazuhisa Maeda, Tadashi Nakamura, Takahiro Ochi, , Hideki Yoshikawa, Jun Hashimoto	Serum adiponectin concentrations correlate with severity of rheumatoid arthritis evaluated by extent of joint destruction	Clinical Rheumatology	28(4)	445-51	2009
Kosuke Ebina, Atsunori Fukuhara, Iichiro Shimomura	Role of adipocytokine in bone metabolism	Clinical Calcium	18(5)	623-30	2008
蛭名耕介, 福原淳 範, 下村伊一郎, 橋本淳	肥満とリウマチの奇妙な関係	総合臨床	Vol.5 7 No.12	2830-33	2008
蛭名耕介, 福原淳 範, 下村伊一郎	骨代謝におけるアディポネクチンの役割	臨床整形外科	Vol.4 3No.1 1	1102-06	2008

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ishida S, Yamane S, Nakano S, Yanagimoto T, Hanamoto Y, Maeda-Tanimura M, Toyosaki-Maeda T, Ishizaki J, Matsuo Y, Fukui N, Itoh T, Ochi T, Suzuki R.	The interaction of monocytes with rheumatoid synovial cells is a key step in LIGHT-mediated inflammatory bone destruction.	<i>Immunology</i>	Nov 14. [Epub ahead of print]		2008
Tanaka K, Horikawa T, Suzuki S, Kitaura K, Watanabe J, Gotoh A, Shiobara N, Itoh T, Yamane S, Suzuki R, Fukui N, Ochi T.	Inhibition of Src Homology 2 Domain-Containing Protein Tyrosine Phosphatase Substrate-1 Reduces the Severity of Collagen-Induced Arthritis.	<i>J Rheumatol</i>	35(12)	2316-2324	2008
Wakasa-Morimoto C, Toyosaki-Maeda T, Matsutani T, Yoshida R, Nakamura-Kikuoka S, Maeda-Tanimura M, Yoshitomi H, Hirota K, Hashimoto M, Masaki H, Fujii Y, Sakata T, Tsuruta Y, Suzuki R, Sakaguchi N, Sakaguchi S.	Arthritis and pneumonitis produced by the same T cell clones from mice with spontaneous autoimmune arthritis.	<i>Int Immunol</i>	20(10)	1331-42	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamane S, Ishida S, Hanamoto Y, Kumagai K, Masuda R, Tanaka K, Shiobara N, Yamane N, Mori T, Juji T, Fukui N, Itoh T, Ochi T, Suzuki R.	Proinflammatory role of amphiregulin, an epidermal growth factor family member whose expression is augmented in rheumatoid arthritis patients.	<i>J Inflamm (Lond)</i>	27;5	5:5	2008
Ishida S, Yamane S, Ochi T, Nakano S, Mori T, Juji T, Fukui N, Itoh T, Suzuki R	LIGHT induces cell proliferation and inflammatory responses of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via lymphotoxin beta receptor.	<i>J Rheumatol</i>	35 (6)	960-8	2008

研究成果の刊行に関する一覧表・平成20年度

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻	頁	出版年
Yokota S, Imagawa T, Mori M, Miyamae T, Aihara Y, Takei S, Iwata N, Umebayashi H, Murata T, Miyoshi M, Tomiita M, Nishimoto N, Kishimoto T.	Efficacy and safety of tocilizumab in patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, withdrawal phase III trial.	Lancet	371	998-1006	2008
Mima T, Nishimoto N.	Tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis.	Expert Rev Clin Immunol	4	165-172	2008
Ishikawa S, Mima T, Aoki C, Yoshio-Hoshino N, Adachi Y, Imagawa T, Mori M, Tomiita M, Iwata N, Murata T, Miyoshi M, Takei S, Aihara Y, Yokota S, Matsubara K, Nishimoto N.	Abnormal expression of the genes involved in cytokine networks and mitochondrial function in systemic juvenile idiopathic arthritis identified by DNA microarray analysis.	Ann Rheum Dis.	69	264-73	2010
Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Azuma J, Kishimoto T.	Study of active controlled tocilizumab monotherapy for rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to methotrexate (SATORI): significant reduction in disease activity and serum vascular endothelial growth factor by IL-6 receptor inhibition therapy.	Mod Rheumatol.		[Epub ahead of print]	2008 Sep 2.
Nishimoto N, Terao K, Mima T, Nakahara H, Takagi N, Kakehi T.	Mechanisms and pathological significances in serum interleukin-6(IL-6) and soluble IL-6 receptor after administration of an anti-IL-6 receptor antibody, tocilizumab, in patients with rheumatoid arthritis and Castleman's disease.	Blood		[Epub ahead of print]	2008 Sep 10.
Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Azuma J.	Long-term safety and efficacy of tocilizumab, an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody, in monotherapy, in patients with rheumatoid arthritis (the STREAM study): evidence of safety and efficacy in a 5-year extension study.	Ann Rheum Dis.		[Epub ahead of print]	2008 Nov 20.
Mima T, Ishikawa S, Aoki C, Yoshio-Hoshino N, Adachi Y, Imagawa T, Mori M, Tomiita M, Iwata N, Murata T, Miyoshi M, Takei S, Aihara Y, Yokota S, Matsubara K, Nishimoto N.	Interleukin-11 and paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha expression correlates with the number of joints with active arthritis in systemic juvenile idiopathic arthritis. Ann Rheum Dis. 2009 Feb;68(2):286-7	Ann Rheum Dis.	68	286-7	2009

研究成果の刊行に関する一覧表・平成20年度

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名・出版地	頁	出版年
Nishimoto N, Mima T.	Tocilizumab	Hochberg M, Weinblatt M, Weisman M, Smolen J and Silman A eds	Rheumatoid Arthritis	Elsevier		2008

<作成例>

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名・出版地	頁	出版年
〇〇 〇〇	〇〇〇〇〇	〇〇〇〇 編集	〇〇〇〇〇	〇〇書店・ 東京	88-93	2006

IV. 研究成果の刊行物・別刷