

- の UA に対する DMARDs 治療の評価. 第 53 回 日本リウマチ学会総会・学術集会, 2009.4.23-26, 東京.
- 209) 玉井慎美, 川上 純, 上谷雅孝, 有馬和彦, 岩本直樹, 藤川敬太, 山崎聡士, 川尻真也, 荒牧俊幸, 一瀬邦弘, 蒲池 誠, 中村英樹, 井田弘明, 折口智樹, 青柳 潔, 江口勝美. 診断未確定関節炎(UA)における非造影手関節 MRI の有用性の検討. 第 53 回 日本リウマチ学会総会・学術集会, 2009.4.23-26, 東京.
- 210) 玉井慎美, 川上 純, 上谷雅孝, 有馬和彦, 岩本直樹, 藤川敬太, 川尻真也, 荒牧俊幸, 一瀬邦弘, 蒲池 誠, 山崎聡士, 中村英樹, 井田弘明, 折口智樹, 青柳 潔, 江口勝美. 診断未確定関節炎の評価. 第 53 回 日本リウマチ学会総会・学術集会, 2009.4.23-26, 東京.
- 211) 玉井慎美, 川上 純, 上谷雅孝, 岩本直樹, 藤川敬太, 有馬和彦, 高尾正一郎, 折口智樹, 青柳 潔, 江口勝美. Leiden score と Nagasaki score を用いた診断未確定関節炎の評価. 第 106 回 日本内科学会講演会, 2009.4.10-12, 東京.
- 212) 玉井慎美, 川上 純, 上谷雅孝, 有馬和彦, 喜多潤子, 岡田覚丈, 川尻真也, 古賀智裕, 岩本直樹, 山崎聡士, 中村英樹, 井田弘明, 折口智樹, 青柳 潔, 江口勝美. 早期関節リウマチにおける抗 CCP 抗体価と骨破壊予測. 第 24 回 日本臨床リウマチ学会, 2009.11.20-21, 岩手.
- 213) 橋本 求. 補体による Th17 依存性自己免疫性関節炎の制御. 第 39 回日本免疫学会, 2009. 12. 2, 大阪.
- 214) 前田伸治. 正常 ZAP70 の発現量操作による自己免疫性関節炎の誘導. 第 39 回日本免疫学会, 2009. 12. 2, 大阪.
- 215) 秋月修治. TCR シグナル不全による制御性 T 細胞分化障害と自己免疫病の発症. 第 39 回日本免疫学会, 2009. 12. 2, 大阪.
- 216) 橋本 求. SKG マウスの関節炎発症における Decti-1 依存的、非依存的経路の解析. 第 38 回日本免疫学会, 2008. 12. 1, 京都.
- 217) 前田伸治. TCR シグナル伝達の補正による SKG マウスの自己免疫性関節炎の発症抑制. 第 38 回日本免疫学会, 2008. 12. 1, 京都.
- 218) 野村尚史. TCR シグナル不全による制御性 T 細胞分化障害と自己免疫病の発症. 第 38 回日本免疫学, 2008. 12. 1, 京都.
- 219) Shoda H, **Fujio K**, Yamaguchi Y, amamoto K. Mycobacterium HSP70 immunization induces anti-citrullinated peptide antibody and exacerbates mouse models of inflammatory arthritis. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 2008.12.2、京都.
- 220) 庄田宏文, 藤尾圭志, 山本一彦. 関節リウマチ患者における抗酸菌 HSP70 への免疫応答. 第 53 回日本リウマチ学会総会, 2009.4.23-26, 東京.
- 221) 庄田宏文, 藤尾圭志, 沢田哲治, 山本一彦. 関節リウマチ患者における抗酸菌 HSP70 への免疫応答. 第 37 回日本臨床免疫学会総会, 2009.11.13-15, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

土屋尚之

●出願番号：2008-074288

発明者：松下正毅, 土屋尚之,
住田孝之.

発明の名称：インフリキシマブの
有効性判定方法

出願人：国立大学法人筑波大学、

湧永製薬株式会社

出願日：2008. 3. 21.

津坂憲政

●出願番号：2008-258235

発明の名称：関節リウマチに対する抗TNF α 抗体薬の薬効予測方法及び薬効予測措置

出願日：2008年10月3日

坂口志文

●出願番号：12/339, 129

発明者：坂口志文.

発明の名称：4型葉酸受容体の発現を指標とした制御性T細胞の検出方法、及び免疫賦活剤

出願人：国立大学法人 東京大学

出願日：2008. 12. 19.

藤尾圭志

●出願番号：国際特許番号

PCT/JP2008/057460

発明者：藤尾圭志, 岡村僚久, 山本一彦.

発明の名称：新規T細胞

出願人：国立大学法人 東京大学

出願日：2008. 4. 10.

●出願番号：(未定)

発明者：藤尾圭志, 庄田宏文, 山本一彦.

発明の名称：関節炎モデル治療効果を持つ関節リウマチ関連エピトープ

出願人：国立大学法人 東京大学

出願日：2009年出願予定

住田孝之

●出願番号：2008-074288

発明者：松下正毅, 土屋尚之, 住田孝之.

発明の名称：インフリキシマブの有効性判定方法

出願人：国立大学法人筑波大学、湧永製薬株式会社

出願日：2008. 3. 21.

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅲ. 総合研究報告書

関節リウマチ患者性差の検討による重症化因子の解析
-抗 CCP 抗体と妊娠・出産の影響-

研究分担者：寺井千尋

自治医科大学附属さいたま医療センター総合医学 I 教授

研究要旨

関節リウマチ (RA) は女性で疾患活動性が高く、予後が不良である。2000-04 年の全国剖検症例中 RA1225 例の死亡年齢は女性が 69 才、男性 70 才で、女性 RA 例はアミロイドーシスによる死亡が多く、疾患活動性がより高いことが示唆された。大規模 RA コホート IORRA の検討では女性は全年齢層で男性より DAS28 が高く、その差は 30 代で最大であった。性別は DAS28 の最大の寄与因子であったが、妊娠・出産歴は DAS28 に影響を与えなかった。

2001年に抗CCP抗体を測定し2006年にも調査対象となった781例で、抗CCP抗体と5年間のHAQ増加に関与する因子につき検討した。喫煙歴は男性80%強、女性で約20%であったが、抗CCP抗体陽性率には男女差はなく、男性でのみ喫煙歴と正の相関、女性でアルコールと負の相関が示唆された。抗CCP抗体陽性例では、男女とも疾患活動性が高く、5年間のHAQの低下が大きい傾向がみられた。女性RAの80%に妊娠・出産歴があったが、妊娠・出産歴は抗CCP抗体とは関連を示さなかった。妊娠・出産歴は疾患活動性には関連しなかったが、5年間の Δ HAQと関連する傾向があった。

A. 研究目的

関節リウマチ (RA) の遺伝的・先天的要因の中で、性別は最も顕著な要因のひとつといえる。女性患者では RA の罹患率が男性より高く、RA の活動性がより強く、重症化しやすいと報告されている。女性と男性の RA 症状や活動性の差、治療に対する反応性の差、経過・予後の差を検討することにより、RA をより重症化させる因子を抽出することを目的とした。

一方、抗 CCP 抗体は RA 発症前から高率に陽性化し、RA 機能予後低下のリスクであることが知られている。また喫煙も RA 発症リスクで喫煙による抗 CCP 抗体誘導の可能性が報告されている。RA における疾患活動性への性差の影響を妊娠・出産、抗 CCP 抗体、

喫煙などの面から検討を試みた。

初年度は妊娠と出産の影響について検討した。

次年度は抗 CCP 抗体と喫煙と性差の関連につき検討した。

最終年度には女性で抗 CCP 抗体を誘導する因子を検討し、さらに 5 年間の HAQ 低下に関与する因子の抽出を試みた。

B. 研究方法

1. RA 患者の男女別の死因を大規模に調査した。2000 年から 2004 年の 5 年間の日本病理剖検輯報より臨床診断あるいは病理診断名に関節リウマチの記載のある剖検例を抽出し、個々の例で死因と死亡年齢を調査し、RA 患者の死亡

における性差を検討した。

2. 東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センターで実施中の RA 患者前向きコホート IORRA データベースを用いて男女差、抗 CCP 抗体、喫煙、妊娠・分娩の相互の影響、これら要因が RA 疾患活動性、機能予後に与える影響を検討した。

最初に 2006 年 10 月の第 13 回 IORRA 調査に参加した 5,073 名の RA 患者を対象とし性別、年齢による RA 活動性の違いにつき解析した。さらに女性患者を妊娠・出産歴の有無で区別し RA 活動性に与える影響を検討した。DAS28 を目的変数、説明変数に年齢、性別、発症年齢、罹病期間、身長、体重、BMI、飲酒歴、喫煙歴、妊娠・出産歴、薬剤 (NSAID, DMARD, steroid, MTX, BUC, SASP, DPC, GST, AF, ACT, MZR, LEF, TAC, IFX, ETN, MTX dose, PSL dose) を用い重回帰分析を行った。

さらに 2001 年 10 月の第 3 回 IORAA 調査に参加し抗 CCP 抗体を測定した 1269 例のうち、5 年後の 2006 年 10 月実施の第 13 回 IORRA 調査に参加した 781 例 (男性 112 例、女性 669 例) を対象として、抗 CCP 抗体値、HAQ、喫煙歴、RA 家族歴、アルコール歴、性別、発症年齢、罹病期間、BMI、RF、炎症マーカー、DAS28 につき解析した。HAQ の 2001 年から 2006 年の 5 年間の変動を Δ HAQ とした。解析は SAS の JMP8.0 を用い、単変量解析、多変量解析を行った。抗 CCP 抗体を目的変数として、説明変数には遺伝要因として RA 家族歴、環境要因として喫煙、アルコール歴、妊娠・出産歴、身長、体重、BMI など関節炎自体以外の因子につき検討した。 Δ HAQ を目的変数とした場合は、さらに 2001 年時の関節炎関連因子も加えて影響を検討した。

抗 CCP 抗体は 4.5U/ml 未満が陰性で、測定上限が 100U/ml であった。そのため、抗 CCP 抗体の検討では上限 100 の実測値以外に、4.5U/ml 未満、4.5-13.5、13.5-

100、100 以上の 4 群に分けて順序尺度としても解析を行った。

(倫理面への配慮)

IORRA 調査においては参加者全員の文書による informed consent を取得している。

C. 研究結果

1. 2000-2005 年の 5 年間の全国の剖検例 126,437 例中に RA 剖検例 1,225 例、男性 408 例 (男性剖検例の 0.5%) と女性 817 例 (女性剖検例の 1.84%) が見出された。男性 RA の平均死亡年齢は 70.1 才、女性 RA の平均死亡年齢は 69.1 才で、同時期の日本人死亡年齢より男性で 8.0 年、女性で 15.8 年短縮していた。死亡原因が男性 RA では感染症、呼吸器疾患、心血管障害、悪性疾患の順であったが、女性 RA では感染症、続発性アミロイドーシス、呼吸器疾患の順で男女で大きく異なった。続発性アミロイドーシスは、女性 RA 死因の 14.7% を占めるのに対し、男性 RA では 4.7% で、病理学的なアミロイド沈着は男性 RA 例の 15.0%、女性 RA 例の 31.9% に認められた。

2. IORRA 調査 2006 年 10 月参加者 5,073 名中、平均年齢 61.3 才 (発症年齢 50.0 才、平均罹病期間 11.3 年) の男性 RA 806 例の DAS28 は 2.96 ± 1.23 に対し、平均年齢 58.2 才 (発症 45.9 才、罹病期間 12.3 年) の女性 RA 4267 例の DAS28 は 3.49 ± 1.16 と有意に高く、HAQ、J-HAQ、腫脹関節数、疼痛関節数、患者疼痛 VAS、患者 general VAS、医師による general VAS、赤沈値すべてで女性が有意に高値を示した。一方 CRP は男性が女性より高値であった。次に男女を 10 才ごとに分け比較すると、DAS28 は男女とも年齢が高くなるほど高値となったが、DAS28 の男女差は 31-40 才で最大 (0.78) で、年齢が高くなるにつれその差は縮小

した (71-80 才で 0.39)。DAS28 に関連する因子を重回帰分析により解析すると、女性であると Odds 1.74 ($p=5.9 \times 10^{-32}$) で DAS28 は上昇した。

妊娠出産歴有り群 3201 例と無し群 912 例の比較では、全体では両群で年齢差が大きいため、10 才毎に分け比較したが、各年齢群において妊娠出産歴の有無で DAS28 の差は無かった。妊娠出産歴有り群を RA 発症後の妊娠出産歴有りとしに分けた場合にも DAS28 には差はなかった。

妊娠・出産に関連する説明変数として、妊娠出産歴有無、総出産回数、総妊娠回数、RA 発症前出産回数、RA 発症後出産歴有無、RA 発症後出産回数、RA 発症後妊娠回数を順に先の説明変数のひとつとして採用して重回帰分析を行った。いずれの妊娠・出産に関連する説明変数を用いても、有意な差はみられなかった。

3. 抗 CCP 抗体の測定された RA 患者 781 例では、男性 112 例 (2001 年 10 月時点で 60.0 才、発症 50.9 才、平均罹病期間 9.1 年)、女性 669 例 (平均 56.6 才、発症 45.1 才、罹病期間 11.5 年) のうち、抗 CCP 抗体陽性は男性 91 人 (81.3%)、女性 562 人 (84.0%) であった。関節炎の指標では腫脹関節数、圧痛関節数、赤沈、DAS28、患者 general VAS、医師による general VAS が女性で有意に高く、HAQ、JAHQ も女性で有意に高値であった。

2001 年 10 月での喫煙歴有は男性 94 人 (84.7%)、女性 135 人 (21.1%) で、喫煙歴有の男性の抗 CCP 抗体陽性率は 81.9%、無が 76.5% で喫煙歴による抗 CCP 抗体陽性の Odds は 1.4 倍、現喫煙者に限ると Odds は 2.1 倍であったがともに有意差はなかった。喫煙歴有の女性患者の抗 CCP 抗体陽性率は 83.7%、無が 84.0% で喫煙歴による抗 CCP 抗体陽性の Odds は 0.98 倍であった。喫煙歴有男性の抗 CCP 抗体値は 60.6U/ml、無し男性では 39.1 ($p=0.06$) であったが、女性では喫煙歴有 52.5、無 57.2 とむしろ喫煙歴有で低値であった。

男性抗 CCP 抗体陽性群の DAS28 は抗 CCP 抗体陰性群より有意に高値を示した。女性では抗 CCP 抗体有無による有意差はなかった。一方、喫煙歴の有無による比較では男性喫煙群で高値、女性では非喫煙群で DAS28 が高い傾向がみられた。

2001 年の HAQ は男性抗 CCP 抗体陽性群 0.41、陰性群 0.29 と抗 CCP 抗体陽性群で高値を示し、 Δ HAQ は陽性群 0.09、陰性群 0.02 で 5 年間に HAQ の差はさらに拡大した。2001 年の女性抗 CCP 抗体陽性群の HAQ は 0.77、陰性群では 0.68、2006 年は陽性群 0.93、陰性群 0.78 で、 Δ HAQ は陽性群で 0.15 の増加に対し、陰性群では 0.10 であった。喫煙の有無による Δ HAQ は男性喫煙歴有で 0.09、無で 0.01、女性喫煙歴有で 0.12、無で 0.14 と差は認められなかった。

4. 抗 CCP 抗体の測定がなされた RA 患者 781 例を対象にさらに妊娠・出産の関与を調べた。女性 RA の 525 人 (79.8%) が妊娠・出産歴を有した。

単変量解析では、喫煙歴有りの患者を除外すると、女性での飲酒は抗 CCP 抗体と有意に負に相関した。女性全体を対象としても、喫煙歴無し女性のみを対象としても、妊娠・出産歴は抗 CCP 抗体とは関連しなかった。先の検討で妊娠出産歴はその時点での疾患活動性 (DAS28) には関連しなかったが、RA 発症前の妊娠回数は 5 年間の Δ HAQ 悪化に関連した。女性全体でも喫煙歴無し女性を対象としても、妊娠・出産歴の有無は抗 CCP 抗体とは関連しなかった。

多変量解析では、抗 CCP 抗体にもっとも関連を示したのは男性では罹病期間であり、喫煙の関与はそれに次ぐがともに有意ではなかった。女性患者では喫煙歴、妊娠・出産歴、発症年齢、罹病期間も含め抗 CCP 抗体と有意な関連を示す因子はなかった。

5 年間の Δ HAQ は、男性では腫脹関節数に関連、女性患者では罹病期間が有意に関連し、妊娠・分娩歴が関連する傾向を示した。

D. 考 察

2000-2004 年の剖検 RA1225 例の検討

では、女性の方が男性より寿命が短く、男性RA死因の第6位であるアミロイドーシスが女性では死因の第2位(14.7%)で、アミロイド沈着も男性RAの倍以上にみられた。続発性アミロイドーシスは急性炎症蛋白である血清アミロイドAの高値持続が主要な要因であり、長期間にわたり関節炎炎症がコントロールされなかった症例に発症しやすい。続発性アミロイドーシス合併が女性患者に圧倒的に多い要因としては、女性でRA罹病期間がより長期であるか、関節炎活動性が女性でより高い可能性が考えられる。

IORRA調査における検討で、10才ごとに区切ったすべての年代で女性のDAS28は男性より有意に高値でその差は31-40才で最大であった。またさまざまな要因の中でDAS28に最も大きな影響をあたえる因子は性別であったが、妊娠・出産自体はDAS28に有意な影響をあたえなかった。したがって20-50才でもっとも顕著である女性のDAS28の上昇は妊娠・出産によっては説明されず、女性ホルモン自体が関与する可能性が高いと考えられた。

喫煙と抗CCP抗体の検討では、男性で喫煙と抗CCP抗体陽性に関連が示されたが、女性ではむしろ喫煙歴のある女性で抗CCP抗体陽性率が低く、抗体価も低値であった。

喫煙による抗CCP抗体誘導はHLAにshared epitope(SE)を有する患者に見られると報告される。しかし、SEの陽性率や女性RA患者の喫煙歴陽性率(21%)からは、80%を超える抗CCP抗体陽性率は説明できず、多くの要因が関与すると考えられる。女性においては、喫煙以外の因子によっても抗CCP抗体が誘導されると考えられ、アルコールは負の相関、コーヒーや経口避妊薬使用、分裂病の家族歴などが正に相関することが報告されている。本検討でも女性におけるアルコールの負の相関が示唆されたが、一方、妊

娠・出産歴は、抗CCP抗体とは関連を示さなかった。

また、抗CCP抗体陽性例では、男女ともDAS28にみる疾患活動性が高く、5年間のHAQの低下も陽性群でより大きかった。妊娠・出産歴はその時点での疾患活動性には関連しなかったが、5年間の Δ HAQで見ると単変量解析では有意に、多変量解析では関連する傾向があり、育児による関節への負荷の増加が推定される。

E. 結 論

RA患者での抗CCP抗体誘導において関連する要因は性差で大きく異なり、男性では喫煙が、女性ではアルコールの負の関与がみられたが、これらの要因の関与は全体としては大きいものではなかった。妊娠・出産は抗CCP抗体とは関連を示さなかった。

女性RA患者における妊娠・出産歴は疾患活動性には関連しないが、HAQの悪化には関連する傾向を示した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Moriguchi M, Kaneko H, Terai C, Koseki Y, Kajiyama H, Inada S, Kitamura Y, Kamatani N. Relative transcriptional activities of SAA1 promoters polymorphic at position -13(T/C): potential association between increased transcription and amyloidosis. **Amyloid** 12: 26-32, 2005.
- 2) Koseki Y, Inada S, Kitahama M, Sakurai T, Kamatani N, Terai C. Methotrexate Improved Outcome of Japanese AA-amyloidosis Patients Secondary to Rheumatoid Arthritis. **Amyloid** 13: 38, 2006.
- 3) Kitahama M, Sakurai T, Itoh M, Koseki

- Y, Kamatani N, **Terai C**. Prevalence of AA-amyloidosis in autopsied patients in Japan. **Amyloid** 13 : 37-38, 2006.
- 4) **Terai C**, Kaneko H, Koseki Y, Sakurai T, Kitahama M, Kamatani N. Study of MEFV Gene Mutations in Japanese Patients with AA-amyloidosis Secondary to Rheumatoid Arthritis. **Amyloid** 13 : 62-63, 2006.
 - 5) Koseki Y, Inada S, Kitahama M, Sakurai T, Kamatani N, **Terai C**. Methotrexate Improved Outcome of Japanese AA-amyloidosis Patients Secondary to Rheumatoid Arthritis. **Arthritis Rheum** 54 : S373-S374, 2006.
 - 6) Kitahama M, Sakurai T, Itoh M, Koseki Y, Kamatani N, **Terai C**. Causes of death and prevalence of AA-amyloidosis among Japanese patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum** 54 : S186, 2006.
 - 7) Yamanaka H, Inoue E, Tanaka E, Nakajima A, Taniguchi A, **Terai C**, Hara M, Tomatsu T, Kamatani N. Influence of methotrexate dose on its efficacy and safety in rheumatoid arthritis patients: evidence based on the variety of prescribing approaches among practicing Japanese rheumatologists in a single institute-based large observational cohort (IORRA). **Mod Rheumatol** 17 : 98-105, 2007.
 - 8) Yamanaka H, Inoue E, Tanaka E, Nakajima A, Taniguchi A, **Terai C**, Hara M, Tomatsu T, Kamatani N. Influence of methotrexate dose on its efficacy and safety in rheumatoid arthritis patients: evidence based on the variety of prescribing approaches among practicing Japanese rheumatologists in a single institute-based large observational cohort (IORRA). **Mod Rheumatol** 17 : 98-105, 2007.
 - 9) Kobayashi S, Ikari K, Kaneko H, Kochi Y, Yamamoto K, Shimane K, Nakamura Y, Toyama Y, Mochizuki T, Tsukahara S, Kawaguchi Y, **Terai C**, Hara M, Tomatsu T, Yamanaka H, Horiuchi T, Tao K, Yasumoto K, Hamada D, Yasui N, Inoue H, Itakura M, Okamoto H, Kamatani N, Momohara S. Association of STAT4 with susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in Japanese. **Arthritis Rheum** 58 : 1940-1946, 2008.
 - 10) 佐藤美樹, 森口正人, 高鳥志乃, 樋口敬和, 寺井千尋. 大量免疫グロブリン療法が奏効した抗リン脂質抗体関連血球貪食症候群の1例. **日本内科学会雑誌** 97 : 125-127, 2008.
 - 11) Hoshi D, Okamoto H, Kaneko H, Ichikawa N, **Terai C**, Yamanaka H, Kamatani N. Association of polymorphism in the monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 gene and lupus nephritis in systemic lupus erythematosus patients. **Clin Exp Rheum** 26 (5): 972-973, 2008.
 - 12) 和田英則, 寺迫桐子, 佐藤 謙, 佐藤美樹, 木村俊一, 仲宗根秀樹, 奥田慎也, 賀古真一, 山崎絵里, 大島久美, 樋口敬和, 西田淳二, 神谷百合香, 森口正人, 寺井千尋, 神田善伸. 治療抵抗性全身性エリテマトーデス (SLE) に対する自家末梢血幹細胞移植. **臨床血液** 50 (8): 674, 2009.
- ## 2. 学会発表
- 1) 小関由美, 北浜真理子, 櫻井 正, 鎌谷直之, 寺井千尋. 大量ステロイド投与での SAA と CRP の動態に関する検

- 討. 第 51 回日本リウマチ学会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウムプログラム・抄録集 51 回・16 回 Page416、2007.
- 2) 岡本 完, 桃原茂樹, 寺井千尋, 谷口敦夫, 山中 寿, 鎌谷直之. 血清アミロイド A 蛋白の関節リウマチ病態における意義. 第 51 回日本リウマチ学会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウムプログラム・抄録集 51 回・16 回 Page275, 2007.
 - 3) 北浜真理子, 小関由美, 櫻井 正, 伊藤美紀, 鎌谷直之, 寺井千尋. AA-アミロイドーシス臨床像の年代別変化. 第 51 回日本リウマチ学会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウムプログラム・抄録集 51 回・16 回 Page282, 2007.
 - 4) 森口正人, 高鳥志乃, 渡辺恭孝, 金子裕隆, 寺井千尋. 日本人地中海熱の 2 例報告. 第 51 回日本リウマチ学会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウムプログラム・抄録集 51 回・16 回 Page339, 2007.
 - 5) Kitahama M, Koseki Y, Sakurai T, Kamatani N, Terai C. Female is a risk factor for developing AA-amyloidosis in patients with Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 56 : S410-411, 2007.
 - 6) 小関由美. SAA1 遺伝子多型と関節リウマチ (RA) に合併した反応性 AA-アミロイドーシス (ア症) の臨床的特徴と予後との関連. 日本人類遺伝学会 第 52 回大会, 2007.9.14, 東京.
 - 7) 小関由美, 北浜真理子, 櫻井 正, 鎌谷直之, 寺井千尋. ステロイド投与での SAA と CRP の動態に関する検討. 第 35 回日本臨床免疫学会, 2007. 10. 16, 大阪.
 - 8) 寺井千尋, 北浜真理子, 井上永介, 飯国紀子, 岡本 完, 山中 寿, 原まさ子, 戸松泰介, 鎌谷直之. 関節リウマチ患者性差の検討による重症化因子の解析. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会プログラム・抄録集, p 298, 2008.
 - 9) 小関由美, 北浜真理子, 櫻井 正, 井上永介, 原まさ子, 戸松泰介, 山中寿, 鎌谷直之, 寺井千尋. RA 患者の予後に関連する炎症値の比較 -IORRA コホートにおける検討-. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会プログラム・抄録集, p 446, 2008.
 - 10) 小林 秀, 猪狩勝則, 金子裕隆, 岡本完, 川口鎮司, 戸松泰介, 戸山芳昭, 寺井千尋, 原まさ子, 山中 寿, 鎌谷直之, 桃原茂樹. 日本人における SATT4 遺伝子の関節リウマチ、全身性エリテマトーデスとの関連. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会プログラム・抄録集, p 352, 2008.
 - 11) 櫻井 正, 北浜真理子, 小関由美, 鎌谷直之, 寺井千尋. HBV 関連結節性多発動脈炎の一例. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会プログラム・抄録集, p 379, 2008.
 - 12) 岡本 完, 金子裕隆, 猪狩勝則, 市川奈緒美, 桃原茂樹, 寺井千尋, 谷口敦夫, 山中 寿, 鎌谷直之. クラス II 組織適合抗原 (MHCIIA) 遺伝子多型と関節リウマチ、全身性エリテマトーデスの疾患感受性の相関. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会プログラム・抄録集, p 307, 2008.
 - 13) 北浜真理子, 櫻井 正, 小関由美, 鎌谷直之, 寺井千尋. 関節リウマチと悪性腫瘍 -剖検輯報 2000-04 年度収載 1225 例から-. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会プログラム・抄録集, p 304, 2008.
 - 14) 北浜真理子, 井上永介, 金子裕隆, 櫻井 正, 小関由美, 山中 寿, 原まさ子, 戸松泰介, 鎌谷直之, 寺井千尋. 関節リウマチ患者の腎機能低下に関連す

- る因子 -IORRA コホートの検討-. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会プログラム・抄録集, p 303, 2008.
- 15) 神谷百合香, 森口正人, 宇賀田祐介, 谷口祐子, 寺井千尋. サラゾスルファピリジンが奏効したた SAPHO 症候群の一例. 第 19 回日本リウマチ学会関東支部学術集会プログラム予稿集. p 56, 2008.
- 16) Moriguchi M, Kamiya Y, Sakurai T, Terai C. A brachial-ankle pulse wave velocity is affected by the level of serum amyloid A in patients with systemic lupus erythematosus. ACR 2009 Annual Scientific Meeting, 2009.10.20, Philadelphia, USA. Arthritis Rheum 58,1584,2009,
- 17) 寺井千尋, 森口正人, 桃原茂樹, 谷口敦夫, 原まさ子, 山中 寿. 喫煙が抗 CCP 抗体におよぼす影響の男女差. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会プログラム・抄録集, p 269, 2009.
- 18) 森口正人, 神谷百合香, 寺井千尋. ANCA 関連血管炎分類のための新アルゴリズムの有用性-ACR 基準にて分類できなかった限局型 Wegener 肉芽腫が疑われた 6 名への適応. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会プログラム・抄録集, p 208, 2009.
- 19) 森口正人, 神谷百合香, 寺井千尋. 全身性エリテマトーデス患者における脈波を用いた動脈硬化の解析. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会プログラム・抄録集, p 226, 2009.
- 20) 神谷百合香, 森口正人, 寺井千尋. 画像にて診断し得た分類不能大動脈炎の 7 例. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会プログラム・抄録集, p 209, 2009.
- 21) 渡辺恭孝, 森口正人, 津田篤太郎, 神谷百合香, 寺井千尋. Hypomyopathic dermatomyositis 合併間質性肺炎の臨床的特徴-生存例 2 例と死亡例 2 例の検討. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会プログラム・抄録集, p 378, 2009.
- 22) 小関由美, 森口正人, 寺井千尋, 北浜真理子, 桜井 正, 井上永介, 桃原茂樹, 谷口敦夫, 原まさ子, 山中 寿. eGFR による RA 患者の腎機能評価 -IORRA コホートによる検討-. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会プログラム・抄録集, p 451, 2009.
- 23) 神谷百合香, 森口正人, 小田彩, 桜井正, 寺井千尋. 多発性筋炎に合併したインスリン受容体異常症 B 型の一例. 第 20 回日本リウマチ学会関東支部学術集会プログラム予稿集, p 13, 2008.
- 24) 小田 彩, 森口正人, 神谷百合香, 桜井 正, 寺井千尋. 関節リウマチに対するトシリズマブ投与中に化膿性椎間板炎を合併した一例. 第 20 回日本リウマチ学会関東支部学術集会プログラム予稿集, p 17, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

RAの重症化に関わる遺伝的要因の解析に関する研究

研究分担者： 三森 経世

京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学 教授

研究協力者： 大村 浩一郎

京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学 院内講師

研究要旨

関節リウマチ(RA)の重症化に関わる遺伝子多型を検索するため、3000例以上のRA患者のDNA検体を収集した。その中で最重症RA vs 軽症RAを用いた全ゲノムSNPタイピング・関連解析を行い、重症化に関連する遺伝子多型(SNP)を探索したが、検体数が十分でなく有意な遺伝子は見つからなかった。そこで、RA患者 vs 健常人の大規模全ゲノム関連解析→候補遺伝子解析により新規感受性遺伝子を検索することとした。最終的に染色体18番に新規RA関連遺伝子を発見し($p=2.9 \times 10^{-8}$, OR=1.23)、しかもその蛋白に対する自己抗体がRAに特異的に認められることを見出した。さらに注目すべきことに抗CCP抗体陰性RA患者にも約半数で抗体が陽性となることから、今後早期診断や重症化予測に有用である可能性がある。

A. 研究目的

関節リウマチ(RA)の重症化に関わる遺伝子多型を検索するため、最重症型RA患者および軽症型RA患者、また健常人よりDNA検体を収集する。全ゲノムSNPタイピング、関連解析により関節炎の重症化(関節破壊)に関係する遺伝子多型(SNP)を見つけ出すことを第1の目的とするが、RA患者と健常人ゲノムを比較することで新規RA関連遺伝子を検索することを第2の目的とする。最終的には将来のテーラーメイド医療、新規治療開発の基礎を作ることを目的とする。

B. 研究方法

各研究協力施設(京都大学医学部疾患ゲノムセンター、国立病院機構相模原病院、道後温泉病院、東京大学アレルギーリウマチ内科、東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター、愛知がんセンター、京都大学医学部眼科)での倫理委員

会承認のもと、文書による同意書をとった上でRA患者、健常人からDNA、血清(または血漿)を多施設において収集した。

まず最重症型と考えられる全身型ムチランスRA患者78例、10年以上経ても軽症のまま寛解状態を維持している軽症型RA患者64例による全ゲノムSNPタイピングをIllumina社のDNAチップ(30-55万SNP)を用いて行い、関連解析を行った。

また、計990例のRAと1241例の健常人による全ゲノム関連解析を行い、候補遺伝子を絞ったのち2138例のRAと1803例の健常人を用いたvalidationを行った。具体的にはコホート1(658RA vs 934ctr)、コホート2(332RA vs 307ctr)を277,420SNPsによる全ゲノムにわたるタイピング(Illumina Human Hap300, Human CNV370-Duo, Human 610-Quad, Human Hap550)をおこない、それぞれの

コホートで関連解析を行い、ともに $p < 0.01$ でかつメタ解析で $p < 0.0001$ となる SNP のうち既報の HLA と PADI4 をのぞいた 5 遺伝子領域 10 SNP を候補遺伝子とし、次の確認関連解析を行った。コホート 3 (874 RA vs 855 ctr) では TaqMan による allele discrimination 法で候補遺伝子領域の 5 Tag-SNPs をタイピングしたところ $p < 0.05$ となる SNP は 18 番染色体の 1 SNP のみであった。コホート 4 (1264 RA vs 948 ctr) でさらに validation を行った。

新規関連遺伝子産物に対する自己抗体の測定は ELISA を用いた。遺伝子産物である commercial の native 蛋白 (X) を ELISA plate に固層化し、BSA でブロッキングしたのち血清 (血漿) を加え、洗浄後 ALP 標識 2 次抗体を加え、NBT で発色させ plate reader にて吸光度を測定する。

統計学的検定に関して、関連解析は Cochran-Armitage trend test およびメタ解析を Cochran-Mantel-Haenszel test にて行った。自己抗体価検定のための Wilcoxon rank-sum test および感度・特異度解析を行うための Receiver operating characteristic (ROC) curve 解析は R-statistical system を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は遺伝子情報を扱う臨床研究であることから「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」「臨床研究に関する倫理指針」およびヘルシンキ宣言 (2004 年改訂) を遵守する。本研究は京都大学医学部医の倫理委員会の承認を受けて進めており、各研究協力施設においても倫理委員会で協議、承認されている。

C. 研究結果

最重症型 RA、軽症型 RA を用いた全ゲノム関連解析では統計学的に有意な重症化に関わる遺伝子多型は見つからなかった。また重症化に関連するともしないと

も報告されている HLA-DRB1 の shared epitope (SE) が最重症型と軽症型で usage に差があるかどうかを検討した結果、表 1 に示すように差がなく、HLA-DRB1 SE は発症と関連するが重症化とは関連しなかった。また抗 CCP 抗体の有無で階層化してみると抗 CCP 抗体陽性 RA では最重症型も軽症型もともに SE をもつ患者が多く、また抗 CCP 抗体陰性 RA では SE をもたない患者が多い傾向にあったことから、これまでの SE は抗 CCP 抗体産生に関連するという報告を裏付けた。

表 1. HLA-DRB1 SE の重症度との関連

	Ctr	CCP(+)-RA		CCP(-)-RA	
		重症	軽症	重症	軽症
SE (+)	190	23	21	1	0
SE (-)	380	9	9	1	4

Shared epitope (SE): *HLA-DRB1* *0101, *0102, *0401, *0404, *0405, *0408, *0410, *1001, *1402

次に RA と健常人を比較する新規 RA 関連遺伝子検索では、研究方法に示したように全ゲノム関連解析 (図 1) と候補遺伝子解析を組み合わせた結果、最終的にこれまで報告のある HLA と PADI4 以外に、18 番染色体の新規遺伝子 (X) が感受性遺伝子として同定された ($p = 2.9 \times 10^{-8}$, OR=1.23)。

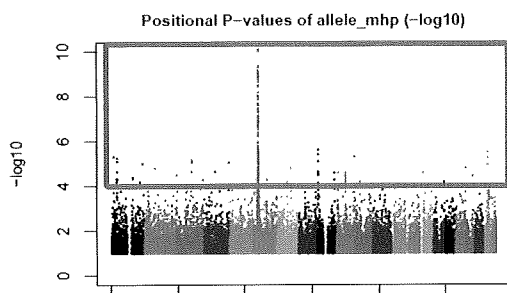
遺伝子 X と病態との関わりを検索するために、遺伝子発現産物 (X) に対する自己抗体 (抗 X 抗体) の有無を検索した。ELISA の測定系を作成し血中抗体価を RA と健常人で測定した結果、図 2 に示すごとく有意に RA 患者血中に抗 X 抗体が高かった ($p = 4.6 \times 10^{-47}$)。Cut-off 値を変化させたときの感度と特異度を求め Receiver Operating Character (ROC) curve を描いたものを図 3 に示した。Area under curve (AUC) は 0.924 と高く、cut-off 値を

2.16Uとした場合の特異度は91.0%、感度は82.7%となった。他の膠原病や関節炎を対照とした場合のROC curveのAUCは0.784でcut off値を2.74Uとすると感度64.4%、特異度82.7%となった。大変興味深いことに、RAを抗CCP抗体(ACPA)とリウマチ因子(RF)で階層化して抗X抗体陽性率を調べたところ、ACPA陰性RA、RF陰性RAでもそれぞれ51.6%、49.1%と高率に陽性となっており、ACPA(-)RF(-)の患者でも39.4%に陽性であった(表2)。このことは今後抗X抗体が早期診断に有用である可能性があることを示している。

表2
RAサブセットでの抗X抗体陽性率

グループ	n	抗体陽性率
RA	323	64.4%
ACPA(+)	261	68.2%
ACPA(-)	62	51.6%
RF(+)	266	68.8%
RF(-)	57	49.1%
ACPA(-)RF(-)	33	39.4%
健常人	133	5.2%
RA以外膠原病	162	17.3%

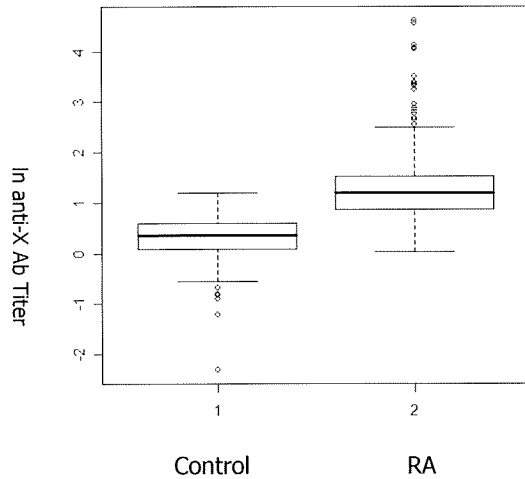
図1
990RA vs 1241 Ctrの全ゲノム関連解析



990人のRA患者と1241人の健常人(1次、2次スクリーニングを集計)での全ゲノム関連解析をMantel-Haenszel検定を

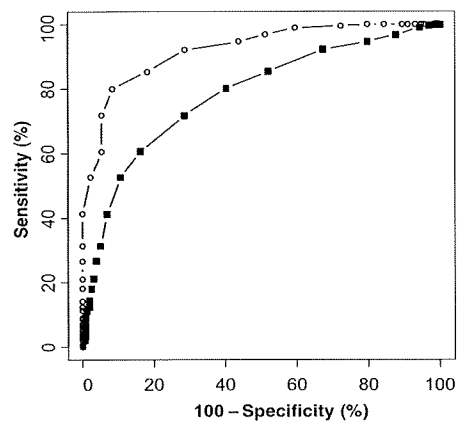
用いて行った際のp値から $-\log P$ を縦軸にとり、すべてのマーカー(SNP)を染色体ごとにplotした。 $P < 0.0001$ となるSNPを四角で囲って示している。

図2
RA患者と健常人血漿中の抗X抗体価



323人のRA患者血漿と133人の健常人血漿中の抗X抗体価を箱ひげ図でplotした。縦軸は抗体価をln scaleで示している。

図3
抗X抗体価におけるROC曲線



健常人対照(○)、RA以外の膠原病患者対照(■)としたときの、抗X抗体価cut off値によるRA診断能を示すROC曲線。

D. 考 察

本研究を遂行するために収集した3000例を超えるRA患者DNA検体と血清(血漿)および臨床情報は大きな財産であり、今後の研究の礎となるであろう。

本研究第一の目的であるRAの重症化に関連する遺伝的要因の解析という点では新規の遺伝子発見は達成できなかったが、HLA-DR shared epitopeが軽症型RAでも重症型RAと同等に認められたことから発症には関与するが重症化に直接は影響しない可能性が示唆された。より多くの症例で検証が必要である。

本研究第二の目的である新規RA関連遺伝子検索は大きな成果を挙げた。本研究で行った990例のRA vs 1241例の健常人の全ゲノム関連解析は世界的にみても最大級の解析であり、そこから得られた候補遺伝子領域をさらに2138例のRAと1803例の健常人を用いて validation を行い、新規関連遺伝子Xを同定した。今後遺伝子XおよびXの遺伝子多型がどのように病態と関連するのかは今後の課題である。なお、遺伝子Xまたは蛋白XはこれまでRAとの関連が指摘されたことはなく、全くの新規発見である。

さらに、抗X抗体がRAに比較的特異的に認められることは驚きであった。特に抗CCP抗体陰性RAでも約半数に抗体が陽性となるため、今後RAの早期診断にも有用である可能性がある。重症化予測に応用可能かどうかの検討も今後の課題である。

E. 結 論

多施設から多数のRA患者DNAを収集し、大規模ケースコントロール全ゲノム関連解析を行った。絞り込んだ候補遺伝子による関連解析を組み合わせ、新規RA関連遺伝子を18番染色体に発見した。未発表であるため遺伝子名は公表できないが、これまでRAとの関連を指摘された

ことのない分子である。遺伝子産物に対する自己抗体がRA患者血清に比較的特異的に認められ、しかも抗CCP抗体陰性RA患者にも高率に自己抗体が存在することから、RAの早期診断への応用が期待される。

F. 健康危機情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kyogoku C, Morinobu A, Nishimura K, Sugiyama D, Hashimoto H, Tokano Y, **Mimori T**, Terao C, Matsuda F, Kuno T, Kumagai S. Lack of association between tyrosine kinase 2 (TYK2) gene polymorphisms and susceptibility to SLE in a Japanese population. **Mod Rheumatol** 19: 401-406, 2009.
- 2) Ito Y, Usui T, Kobayashi S, Iguchi-Hashimoto M, Ito H, Yoshitomi H, Nakamura T, Shimizu M, Kawabata D, Yukawa N, Hashimoto M, Sakaguchi N, Sakaguchi S, Yoshifuji H, Nojima T, Ohmura K, Fujii T, **Mimori T**. Gamma/delta T cells are the predominant source of interleukin-17 in affected joints in collagen-induced arthritis, but not in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum** 60 (8):2294-303, 2009.
- 3) Nakashima R, Imura Y, Kobayashi S, Yukawa N, Yoshifuji H, Nojima T, Kawabata D, Ohmura K, Usui T, Fujii T, Okawa K, **Mimori T**. The RIG-I-like receptor IFIH1/MDA5 is a dermatomyositis-specific autoantigen identified by the anti-CADM-140 antibody. **Rheumatology** 2009 Dec 16 [Epub ahead of print]
- 4) **Mimori T**, Imura Y, Nakashima R, Yoshifuji H. Autoantibodies in

idiopathic inflammatory myopathy: an update on clinical and pathophysiological significance. **Curr Opin Rheumatol** 19 (6): 523-9, 2007.

- 5) Fujita Y, Fujii T, Takeda N, Tanaka M, **Mimori T**. Successful treatment of primary Sjögren's syndrome with chronic natural killer lymphocytosis by high-dose prednisolone and indomethacin farnesil. **Intern Med** 46 (5): 251-4, 2007.
- 6) Ito Y, Kawabata D, Yukawa N, Yoshifuji H, Usui T, Tanaka M, Fujii T, **Mimori T**. Severe subcutaneous generalized edema in a patient with dermatomyositis. **Mod Rheumatol** 17 (2): 171-3, 2007.
- 7) Murakami K, Fujii T, Yukawa N, Yoshifuji H, Kawabata D, Tanaka M, Usui T, **Mimori T**. Successful treatment of a patient with refractory adult Still's disease by tacrolimus. **Mod Rheumatol** 17 (2): 167-70, 2007.

2. 学会発表

- 1) Terao C, Ohmura K, Yamada R, Shimada K, Takasugi K, Kamatani N, Nakagome K, Lathrop M, **Mimori T**, Matsuda F. Identification of a novel genetic determinant of rheumatoid arthritis at chromosome 18q by a genome-wide association study (GWAS) approach using large-scale Japanese cohorts. EULAR2009, 2009.6.11, Copenhagen. (OP-0123)
- 2) Takano K, Ohmura K, Imura Y, Ono Y, Kawaguchi N, Shima A, Yukawa N, Kawabata D, Nojima T, Fujii T, Ohashi N, Umehara H, Saito M, Nishikomori R, **Mimori T**. Two cases of adult TRAPS (tumor necrosis factor-associated periodic syndrome) treated with etanercept. International Conference on Inflammation, 2009.7.8, Tokyo. (GA07.46)
- 3) 片山昌紀, 大村浩一郎, 三森経世ほ

か. SLE 病態における TNFRSF1A 遺伝子変異 (T61I) の関与. 第 37 回日本臨床免疫学会, 2009.11.13-14, 東京.

- 4) 寺尾知可史, 大村浩一郎, 山田 亮, 島田浩太, 高杉 潔, 吉藤 元, 野島崇樹, 臼井 崇, 藤井隆夫, 松田文彦, 三森経世. 日本人 RA 患者を用いた TRAF1/C5 遺伝子の多型と疾患感受性の検討. 第 52 回日本リウマチ学会総会, 2008.4.20-23, 札幌.
- 5) 寺尾知可史, 山田 亮, Roubila Meziani, 高橋めい子, 大村浩一郎, 小久保美紀, 吉住明子, 水谷美香, Mark Lathrop, Inga Melchers, 松田文彦. 日本人、白人のリウマチ検体を用いたゲノムワイド相関解析. 「テーラーメイド医療を目指したゲノム情報活用基盤技術」第 4 回公開シンポジウム, 2008.8.1, 東京.
- 6) 三森経世. RA の臨床経過予測マーカーとしての抗 CCP 抗体. (シンポジウム). 第 51 回日本リウマチ学会総会, 2007.4.26-29, 横浜.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

「関節リウマチにおける新たな自己抗原の同定と診断マーカーの発見」として特許出願準備中 (学内申請済み)。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

Differential subtraction chain 法を用いた RA 発症関連遺伝子の同定に関する研究
と投与前血中 ADAMTS ファミリー分子発現による RA に対する
抗 TNF α 生物学的製剤有効性予測

研究分担者：津坂 憲政

東京歯科大学市川総合病院内科 准教授

研究要旨

平成 19 年度には、RA 患者遺伝子発現パターンと健常人あるいは他の膠原病患者遺伝子発現パターンとの差を、Differential subtraction chain 法と Differential screening 法を用いて検討した。その結果、RA 患者に優位に発現される 190bp の subtracted tester DNA を検出し、RA 発症関連遺伝子の可能性が示唆された。平成 20、21 年度には、インフリキシマブ(INF)ならびにアダリムマブ(ADA)投与前の血中 ADAMTS ファミリー分子発現量によって INF あるいは ADA の RA に対する有効性予測が可能かどうかを前向き試験により検討した。その結果、INF 投与前の血中 ADAMTS5 が低値の場合には投与 14 週後の INF 有効性が、ADA 投与前の血中 ADAMTS4 および ADAMTS5 が高値の場合には ADA 投与 12 週後の ADA 有効性を予測することがわかり、投与前血中 ADAMTS4 と ADAMTS5 発現量で 2 つの抗 TNF α 生物学的製剤の選別が可能となることが示唆された。

A. 研究目的

関節リウマチ (RA) は、関節滑膜をその炎症の主座とし、関節破壊の進行する難治性の全身性自己免疫疾患であるが、その発症機序に関してはいまだ不明な点が多い。そこで本年度われわれは、RA 患者遺伝子発現パターンと健常人あるいは他の膠原病患者遺伝子発現パターンとの差を、differential subtraction chain 法等を用いて検出し、RA 発症関連遺伝子の同定を試みることを平成 19 年度の目的とした。

近年、関節リウマチ(RA)寛解目的に TNF α を標的にした生物学的製剤が使用されるようになり、その有効性が認められるようになってきた。インフリキシマブ(INF)あるいはアダリムマブ(ADA)は抗 TNF α モノクローナル抗体から成る TNF α をターゲットとする生物学的製剤で、

RA の活動性を抑えることが既に知られている。また、RA の活動性を抑えるのみならず、RA に伴う骨破壊も抑制することが報告されている。しかし、このように顕著な有効性を持ち合わせているにもかかわらず、INF や ADA 無効の RA 症例も存在する。さらにこれら抗 TNF α 生物学的製剤にはニューモシスティス肺炎や肺結核等の感染症を惹起しやすい副作用もあるため、投与前にその有効性を予測することで、より確実に効く症例に INF や ADA を投与することで無駄な副作用を回避することもできる。抗 TNF α 生物学的製剤有効性予測因子を同定する試みはこれまでのところいくつか報告が認められるが、有効例と無効例間で比較した後向き試験で、有効例と関連する遺伝子発現をアルゴリズムで解析したものが多く、前向き試験等で確認し得た確実な

INF 有効性予測因子はまだ同定されていない。ADAMTS(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs)⁴やADAMTS5はADAMTSファミリーに属する軟骨破壊に関与するアグリカナゼであることが知られている。とくに、変形性関節症モデルマウスにおいて、ADAMTS5の欠失が軟骨破壊を抑制することが報告されている。さらに、ADAMTS5発現はTNF α やIL-1で誘導されずエタネルセプト投与でも阻害されないことが報告されている。そこでわれわれはこのADAMTSファミリー分子に着目し、INFあるいはADA投与前の血中ADAMTSファミリー分子発現量によってINFあるいはADA有効性予測が可能かどうかを前向き試験により検討することを平成20、21年度の目的とした。

B. 研究方法

1. Differential subtraction chain 法を用いた RA 発症関連遺伝子の同定

RA患者末梢血リンパ球(PBT)と、健常人PBTからそれぞれ全ゲノムDNAを抽出し、Bgl II処理を行った。つぎにアダプターDNAをそれぞれの制限酵素処理ゲノムDNAとライゲートさせ、Tester DNAを作製した。また、Tester DNAをBgl II処理したものをDriver DNAとした。Tester DNA, Driver DNAをハイブリダイゼーションした後にmung bean nucleaseで処理した。同様な過程をさらに3回繰り返して得られた産物をPCR法で増幅したものをsubtracted tester DNAとした。RA患者DNAをTester DNAとした場合のsubtracted tester DNA(RA)と健常人DNAをTester DNAとした場合のsubtracted tester DNA(normal)をそれぞれ³²P-dUTPでラベルしたプローブを作製し、subtracted tester DNA(RA)プローブと反応するがsubtracted tester DNA(normal)プローブとは反応しないsubtracted tester

DNA(RA)のみをDifferential screening法で抽出した。

2. 投与前血中ADAMTS5発現量をもとにしたRAに対するINF有効性予測法

平成19年10月から平成21年10月までに埼玉医科大学総合医療センター・リウマチ膠原病内科外来を受診し、INFを投与されたRA患者100例(女性86例、平均年齢:54.1 \pm 13.3歳、INF投与前平均DAS28スコア:5.65 \pm 1.35、INF投与前平均HAQ値:1.43 \pm 0.84)を対象とした。INF投与前の末梢血を採取しPAXgene tubeに刺入後、Blood RNA Kit[®]を用いてTotal RNAを抽出し、Reverse transcriptaseでcDNAに変換したものをtemplate DNAとしてTaqMan[®] Gene Expression Assayを用いてADAMTS5 mRNAをreal-time PCR法で測定し、 β -actin mRNAとの相対量で定量化を行った。RA患者のRA活動性はINF投与前ならびに投与14週後のDAS28[DAS28(0w), DAS28(14w)]で評価し、INF有効性はDAS28(14w)を用いたEULAR改善基準によって、good responder, moderate responder, no responderとした。

3. 投与前血中ADAMTSファミリー分子発現によるRAに対するADA有効性予測

平成20年9月から平成21年9月までに埼玉医科大学総合医療センター・リウマチ膠原病内科外来を受診し、ADAを投与されたRA患者33例(女性27例、平均年齢:54.1 \pm 13.3歳、ADA投与前平均DAS28スコア:5.32 \pm 1.27、ADA投与前平均HAQ値:1.15 \pm 0.77)を対象とした。ADA投与前の末梢血を採取しPAXgene tubeに刺入後、Blood RNA Kit[®]を用いてTotal RNAを抽出し、Reverse transcriptaseでcDNAに変換したものをtemplate DNAとしてTaqMan[®] Gene Expression Assayを用いてADAMTS4, ADAMTS5 mRNAをそれぞれreal-time PCR法で測定し、 β -actin mRNAとの相

対量で定量化を行った。RA 患者の RA 活動性は ADA 投与前ならびに投与 12 週後の DAS28[DAS28(0w), DAS28(12w)]で評価し、ADA 有効性は DAS28(12w)を用いた EULAR 改善基準によって、good responder, moderate responder, no responder とした。

(倫理面への配慮)

末梢血採取ならびに mRNA・ゲノム DNA 抽出にあたって、研究対象者には不利益・危険性の排除と十分な説明（インフォームドコンセント）を行う。また本研究での遺伝子解析にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針（平成 13 年 3 月 29 日付 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）を遵守した。

C. 研究結果

1. Differential subtraction chain 法を用いた RA 発症関連遺伝子の同定

subtracted tester DNA(RA)プローブと反応するが subtracted tester DNA(normal)プローブとは反応しない subtracted tester DNA(RA)が 1 クローン得られた。PCR で増幅した結果、190bp の大きさであった。

2. 投与前血中 ADAMTS5 発現量をもとにした RA に対する INF 有効性予測

投与 14 週後における EULAR 改善基準に基づく INF の有効性は、good responder (GR)が 42 例、moderate responder が 35 例、non responder が 23 例であった。また、寛解例(DAS28<2.6)は 32 例であった。投与 14 週後の GR 群と NGR 群 (moderate + none responder) とで比較すると、INF 投与前の投与時年齢、罹病期間、リウマトイド因子、MMP-3、MTX 投与量、ステロイド投与量、DAS28、HAQ に差はなかったが、投与前血中 ADAMTS5 mRNA 値は、NGR と比較して GR 群では有意に低値であった。次に、ROC カーブより投与

14 週後の GR[GR(14w)]と寛解[寛解(14w)]を予測するための ADA 投与前血中 ADAMTS5 発現量 cut off 値は 1.12×10^{-4} であった。ADAMTS5 mRNA 発現量が 1.12×10^{-4} より小さい場合を低値群、 1.12×10^{-4} 以上の場合を高値群とした場合に、ADAMTS5 高値群と比較して低値群では有意に INF 投与 12 週後の DAS28[DAS28(12w)]が低かった (図 1)。さらに、ADAMTS5 低値であった場合の GR(14w)を予測する正診率、陽性的中率 (PPV)、陰性的中率 (NPV) はそれぞれ 70.1%、70.4%、68.5% と高く、さらに ADAMTS5 低値であった場合の寛解(14w)を予測する正診率、PPV、NPV もそれぞれ 74.2%、61.5%、78.4% と高かった (表 1)。

3. 投与前血中 ADAMTS ファミリー分子発現による RA に対する ADA 有効性予測

投与 12 週後における EULAR 改善基準に基づく ADA の有効性は、good response (GR)が 15 例、moderate response が 11 例、no response が 7 例であった。また、寛解例(DAS28<2.6)は 7 例であった。投与 12 週後の GR 群と NGR 群 (moderate + none responder) とで比較すると、ADA 投与前の投与時年齢、罹病期間、リウマトイド因子、MMP-3、MTX 投与量、ステロイド投与量、DAS28、HAQ に差はなかったが、投与前血中 ADAMTS4 ならびに ADAMTS5 mRNA 値は、NGR と比較して GR 群では有意に高値であった。次に、ROC カーブより投与 12 週後の GR[GR(12w)]と寛解[寛解(12w)]を予測するための ADA 投与前血中 ADAMTS4 ならびに ADAMTS5 発現量 cut off 値はそれぞれ 0.30×10^{-4} ならびに 4.90×10^{-4} であった。ADAMTS4 mRNA 発現量が 0.30×10^{-4} より小さい場合を低値群、 0.30×10^{-4} 以上の場合を高値群とした場合に、ADAMTS4 低値群と比較して高値群では有意に ADA 投与 12 週後の DAS28[DAS28(12w)]が低かった (図 2)。

また、ADAMTS5 mRNA 発現量が 4.90×10^{-4} より小さい場合を低値群、 4.90×10^{-4} 以上の場合を高値群とした場合に、ADAMTS5 低値群と比較して高値群では有意に DAS28(12w)が低かった (図 2)。さらに、ADAMTS4 高値であった場合の GR(12w)を予測する正診率、陽性的中率 (PPV)、陰性的中率 (NPV) はそれぞれ 69.7%, 85.7%, 65.4%と高く、ADAMTS5 高値であった場合の GR(12w)を予測する正診率、PPV、NPV もそれぞれ 72.7%, 100.0%, 66.7%と極めて高かった (表 1)。さらに、ADAMTS4 高値であった場合の寛解(12w)を予測する正診率、PPV、NPV はそれぞれ 81.8%, 57.1%, 88.5%と高く、ADAMTS5 高値であった場合の寛解(12w)を予測する正診率、PPV、NPV はそれぞれ 90.9%, 83.3%, 92.6%と極めて高かった (表 2)。一方、ADA 投与前 ADAMTS4 ならびに ADAMTS5 発現量と DAS28(12w)との相関を検討してみたところ、両者の間に有意の負の相関(それぞれ $r=-0.370$ ならびに $r=-0.476$)が認められた (図 3)。このことはすなわち、ADA 投与前の血中 ADAMTS4 あるいは ADAMTS5 mRNA 量によって、ADA 投与 12 週後における ADA 有効性が定量化して推測できることを示唆するものである。

D. 考 察・結 論

本研究では、ゲノム DNA あるいは RNA を用いて、遺伝子発現パターンを RA と健常人あるいは RA と他の膠原病疾患で比較することで、両者の差を見いだすことができ、そのような差こそが、RA 発症関連遺伝子と結びつく可能性が高いと考えられた。今回、Differential subtraction chain 法と Differential screening 法を用いて得られた 190bp の subtracted tester DNA は、RA 患者に優位に発現される遺伝子の可能性があり、RA 発症関連遺

伝子につながる可能性が示唆された。

INF の有効性予測因子に関してはすでに既報が存在するが、いずれの報告も、用いた有効性予測試験は後ろ向き試験であり、本法の成績が前向き試験に基づくものであり、優れていると言える。また、INF 投与による寛解予測も可能とした方法は本法を除いては現在のところ他になく、本法は INF 投与前のワンポイントにおける ADAMTS5 という単一遺伝子によって INF 投与による寛解を含めた有効性が予測できる点で他の方法よりも優れていると考えられる。一方、Badot らは、ADA を 12 週間投与され、有効であった RA 患者と無効であった RA 患者の滑膜における遺伝子発現の相違を DNA microarray とアルゴリズムを用いて解析し、439 遺伝子の組み合わせが ADA 無効と関与することを報告している。しかし、この方法はあくまでも後ろ向き試験で、ADA 有効性を定量化して表していない。その点において、本法は ADA 投与前のワンポイントにおける ADAMTS4 あるいは ADAMTS5 という単一遺伝子を用いた前向き試験によって、ADA 投与による寛解を含めた有効性が予測できる点で他の方法よりも優れていると考えられる。

以上のことから、 $ADAMTS5 < 1.12 \times 10^{-4}$ のときは INF が有効、 $ADAMTS4 > 0.30 \times 10^{-4}$ あるいは $ADAMTS5 > 4.90 \times 10^{-4}$ のときは ADA が有効であることが明らかとなり、このように、投与前血中 ADAMTS4 と ADAMTS5 発現量で 2 つの抗 TNF α 生物学的製剤の選別が可能となることが示唆された。

E. 健康危機情報

特記すべきことなし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Ogawa H, Kameda H, Nagasawa H,

- Sekiguchi N, Takei H, **Tsuzaka K**, Amano K, Takeuchi T. Prospective study of low-dose cyclosporine A in patients with refractory lupus nephritis. **Mod Rheumatol** 17: 92-97, 2007.
- 2) **Tsuzaka K**, Matsumoto Y, Sasaki Y, Abe T, Tsubota K, Takeuchi T. Down-regulation of Fas-ligand mRNA in Sjögren's syndrome patients with enlarged exocrine glands. **Autoimmunity** 40: 497-502, 2007.
- 3) Suzuki K, Kobayashi S, Yamazaki K, Gondo M, Tomizawa K, Arimura Y, Nakabayashi K, Ozaki S, Yoshida M, Yoshida T, **Tsuzaka K**, Muso E, Okazaki T, Hashimoto H. Analysis of risk epitopes of anti-neutrophil antibody MPO-ANCA in vasculitis in Japanese population. **Microbiol Immunol** 51: 1215-1220, 2007.
- 4) **Tsuzaka K**, Itami Y, Kumazawa C, Suzuki M, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, Takeuchi T. Conservative sequences in 3'UTR of TCR ζ mRNA regulate TCR ζ in SLE T cells. **Biochem Biophys Res Commun** 367: 311-317, 2008.
- 5) Ohashi Y, **Tsuzaka K**, Takeuchi T, Sasaki Y, Tsubota K. Reduced expression of aquaporin 5 and its C-terminal binding protein in the lacrimal glands of a mouse model for Sjögren's syndrome. **Current Eye Res** 33: 621-629, 2008.
- 6) Suzuki K, Setoyama Y, Yoshimoto K, **Tsuzaka K**, Abe T, Takeuchi T. Effect of interleukin 2 on synthesis of B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family (BAFF) in human peripheral blood mononuclear cells. **Cytokine** 44: 44-48, 2008.
- 7) Suzuki K, Kameda H, Amano K, Nagasawa H, Takei H, Sekiguchi N, Nishi E, Ogawa H, **Tsuzaka K**, Takeuchi T. Single center prospective study of tacrolimus efficacy and safety in treatment of rheumatoid arthritis. **Rheumatol Int** 29: 431-436, 2009.
- 8) **Tsuzaka K**, Itami Y, Amano K, et al. **Arthritis Rheum** 60: S345, 2009.
2. 学会発表
- 1) **Tsuzaka K**, Itami Y, Kumazawa C, et al. 71st Annual Meeting, 2007.11.6-11, Boston, U.S.A.
- 2) Yoshimoto K, Setoyama Y, **Tsuzaka K**, et al. 71st Annual Meeting, 2007.11.6-11, Boston, U.S.A.
- 3) **Tsuzaka K**, Itami Y, Kumazawa C, et al. 71st Annual Meeting, 2007.11.6-11, Boston, U.S.A.
- 4) **Tsuzaka K**, Itami Y, Kumazawa C, et al. ACR 72nd Annual Meeting, 2008.10.24-29, San Francisco, U.S.A.
- 5) **Tsuzaka K**, Itami Y, Kumazawa C, et al. 2008.10, Oklahoma City, U.S.A.
- G. 知的財産権の出願・登録状況**
1. 特許出願
- (1) 発明の名称：関節リウマチに対する抗TNF α 抗体薬の薬効予測方法、及び薬効予測装置
出願番号：特願2008-258235
出願日：平成20年10月3日
- (2) 発明の名称：関節リウマチに対する抗TNF α 抗体薬の薬効予測方法、及び薬効予測装置
出願番号：PCT/JP2009/067187
出願日：平成21年10月1日
- (3) 発明の名称：関節リウマチに対するヒト型抗TNF α 抗体薬の薬効予測方法、及び薬効予測装置
出願番号：特願2009-266539
出願日：平成21年11月24日