

【Ⅲ】 研究分担報告

関節リウマチに対する関節エコー検査の有用性に関する研究

研究分担者 小池 隆夫 (北海道大学大学院医学研究科内科学講座・第二内科 教授)

研究協力者 深江 淳 (時計台記念病院リウマチ膠原病センター)

研究要旨

手指単関節に焦点を絞って、パワードプラ法による定量的関節超音波法を確立した。この方法を用いて活動期の RA 患者を対象に、DMARDs 治療開始前と 8 週間後の MCP 関節、PIP 関節の関節血流値を測定し、治療前から 20 週間後の関節破壊進行度を単純 X 線写真とともに評価した。その結果、手指単関節においては①治療前の関節血流値が高値であるほど骨破壊が進行する。②DMARDs 治療開始 8 週間で、血流が改善するほど骨破壊が抑制される。以上の 2 点が明らかになった。

A. 研究目的

生物学的製剤の登場により関節リウマチ (RA) の治療は格段に進歩した。多くのエビデンスが構築されるのに伴い、RA をより早期に診断し、適切な指標を用いて、生物学的製剤を含め、治療内容をステップアップすることで RA の予後を改善し、ひいては完全寛解にいたらせる可能性があることが明らかになってきた。しかし現時点では、RA の早期診断や、治療指標には確立されたものが存在せず、治療の進展に比して遅れが指摘されている。

関節超音波はリアルタイムに関節内の詳細な情報を得ることが可能であり、欧米を中心に RA の診療のツールとして有用性が確立されつつある。本研究では、手指関節を対象として、パワードプラ法を利用した関節腔内の炎症に起因する異常血流を数値評価可能な定量関節超音波法を作成した。関節血流は炎症を反映するとされている。これまでは定量的な評価法が存在しなかったが、本評価法を用いて、関節血流値と骨破壊の関係を検討した。

B. 研究方法

患者: ACR の 1987 年分類基準で確定診断され、DAS28-ESR (>2.7) で活動期と診断された RA 患者 19 症例

を対象とした。RA19 例のうち、13 症例は DMARDs の単剤 (MTX 9 例、SSZ 2 例、BUC 2 例) による治療を受けた。6 症例は DMARDs 併用 (MTX+BUC 2 例、MTX+SSZ 1 例、SSZ+FK506 1 例) による治療を受けた。また 13 症例は、経口プレドニゾン(3-10mg/day) の投与を受けた。

本研究プロトコールは病院倫理委員会で承認され、全症例が同意を取得後、本研究に参加した。

画像検査: 関節超音波検査は同法に熟練した 3 名の検査技師が施行した。使用機器は 13MHz リニア型探触子 (HITACHI EUP-L34P, HITACHI)、超音波断層装置 (HITACHI EUB-6500, HITACHI) を使用した。本体に装備する Vascularity mode を使い、寸法を固定した方形 ROI 内の血流ピクセルを測定し、関節血流値とした。DMARDs 治療開始前と、8 週後に手指関節 (MCP, PIP 関節) の関節超音波を施行し、関節血流値を測定した。同様に治療開始前、20 週後に両手の単純 X 線を撮像し、Genant-modified Sharp score により骨破壊進行度を評価した。診療情報を秘匿とした検査技師と、リウマチ専門医師が検査と画像の読影を行った。

統計解析: 統計解析には、EXCEL プログラム (Microsoft)、MedCalc プログラム (MedCalc Software) を使用した。二群

間の有意差は、Student's *t*-test、Wilcoxon's signed rank test, Mann-Whitney U test で検定した。また二群間の相関は、Pearson's correlation test、Spearman's rank correlation test で検定した。

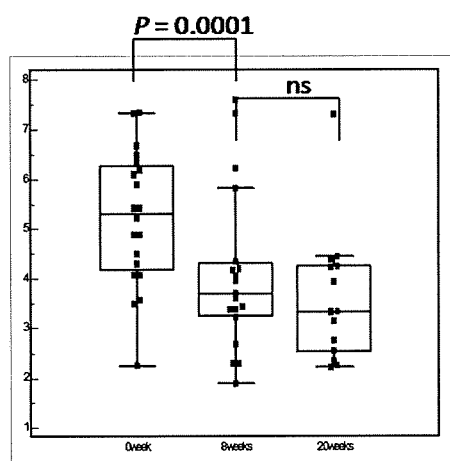
(倫理面への配慮)

患者には、検査、治療内容ならびに、研究成果の発表についてインフォームドコンセントを得た。また本邦における保険診療に従った検査と治療を行った。

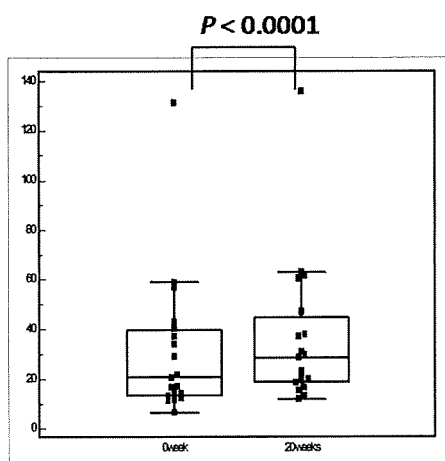
C.研究結果

1) 治療開始前の DAS28-ESR は 5.21 ± 1.39 であったが、8 週後には 4.08 ± 1.60 と、有意に低下した ($P=0.0001$)。8 週後と 20 週後の間には有意差を認めなかった(図1上)。

図1 DAS28-ESR

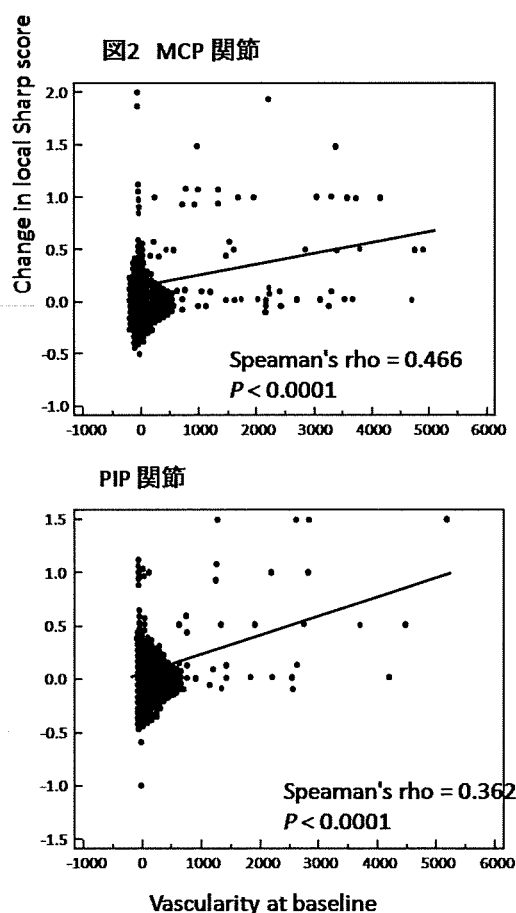


Total Genant-modified Sharp score



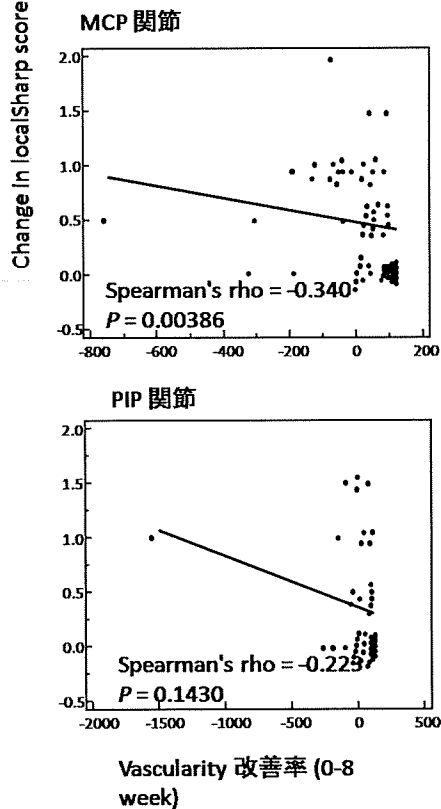
治療開始前の、手指関節の骨破壊を、Genant-modified Sharp score で評価した結果、MCP 関節と PIP 関節の各々の中央値は、0 (IQR 0-1), 0.5 (IQR 0-1.5)であった。20 週間後の中央値は、0.5 (0-1.5), 0.75 (IQR 0-1.5)であった(図1下)。

2) MCP 190 関節、PIP 190 関節の治療前血流値と、それぞれの Genant-modified Sharp score 進行度との関連を検討した結果、両者は有意差をもって正の相関関係を示した (Spearman's rho = 0.466, $P < 0.0001$, 0.362, $P < 0.0001$) (図2)。



3) MCP 190 関節の治療前-8 週間の血流変化率と、それぞれの Genant-modified Sharp score 進行度の関連を検討した結果、両者は有意差をもって負の相関関係を示した(図3上)。しかし PIP 関節については有意差を認めなかった(図3下)

図3 変化率 = (滑膜血流値 0-8 週) / 血流値 0 週 (%)



D. 考察

RA の手指関節においては治療前の関節異常血流値が高値であるほど骨破壊が進行することが明らかになった。すなわち治療前に関節血流値が高値であることは予後不良のサインであり、個々の関節血流値は炎症のレベルを直接反映しており、定量関節超音波法はこれを評価するのに適切な方法であると結論出来た。

RA 患者に DMARDs 治療を行ったところ、関節血流値は治療により変化した。治療前から 8 週間の変化率を算出し、骨破壊進行度の関係を検討したところ、血流が改善するほど、骨破壊進行が抑制されることが明らかになった。この結果から、関節血流の変化率は薬剤の治療反応を評価する指標となり得ると考えられた。

RA を早期に診断し、適切な指標により治療をステップアップし、速やかに炎症を抑制することで、より良い長期予後が得られることが明らかになってきている。我々は、以前の研究で手指関節の異常関節血流の総和から、RA のス

クリーニングが可能であることを報告してきた。今回の研究結果と併せて、関節血流値を測定することにより、RA の早期診断、薬剤評価さらには治療効果の判定にも関節エコー検査を用いることが出来る事を示せた。

E. 結論

- ① 手指単関節の関節血流値により骨破壊進行の予後予測が出来る。
- ② 関節血流値の変化率から治療反応性を評価することが出来る。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukae J, Kon Y, Henmi M, Sakamoto F, Narita A, Shimizu M, Tanimura K, Matsushashi M, Kamishima T, Atsumi T, Koike T. Change of synovial vascularity in single finger joint assessed by power Doppler sonography correlated with radiographic change in rheumatoid arthritis: Comparative study of novel quantitative score with semi-quantitative score. Arthritis Care Res (Hoboken). 2010 Jan 29. [Epub ahead of print]
2. Bohgaki M, Matsumoto M, Atsumi T, Kondo T, Yasuda S, Horita T, Nakayama KI, Okumura F, Hatakeyama S, Koike T. Plasma gelsolin facilitates interaction between beta(2) glycoprotein I and alpha5beta1 integrin. J Cell Mol Med. in press
3. Yamada H, Atsumi T, Kobashi G, Ota C, Kato EH, Tsuruga N, Ohta K, Yasuda S, Koike T, Minakami H. Antiphospholipid antibodies increase the risk of pregnancy-induced hypertension and adverse pregnancy outcomes. J Reprod Immunol 79: 188-195, 2009
4. Oku K, Atsumi T, Bohgaki M, Amengual O, Kataoka

- H, Horita T, Yasuda S, Koike T. Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis.* 68(6):1030-1035, 2009
5. Horita T, Atsumi T, Yoshida N, Nakagawa H, Kataoka H, Yasuda S, Koike T, STAT4 single nucleotide polymorphism, rs7574865 G/T, as a risk for antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis.* 68(8):1366-1367, 2009
6. Nakagawa H, Yasuda S, Matsuura E, Kobayashi K, Ieko M, Kataoka H, Horita T, Atsumi T, Koike T. Nicked β 2-glycoprotein I binds angiostatin 4.5 (plasminogen kringle 1-5) and attenuates its antiangiogenic property. *Blood.* 114(12):2553-2559, 2009
7. Sakai Y, Atsumi T, Ieko M, Amengual O, Furukawa S, Furusaki A, Bohgaki M, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Koike T. The effects of phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody on thrombin generation. *Arthritis Rheum.* 60(8):2457-2467, 2009
8. Bohgaki T, Atsumi T, Bohgaki M, Furusaki A, Kondo M, Sato-Matsumura KC, Abe R, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Amasaki Y, Nishio M, Sawada K, Shimizu H, Koike T. Immunological reconstitution after autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with systemic sclerosis: relationship between clinical benefits and intensity of immunosuppression. *J Rheumatol.* 2009; 36: 1240-8

2. 学会発表

1. 深江淳、谷村一秀、小池隆夫、第 53 回日本リウマチ学会総会シンポジウム、S9-4: パワードップラー関節エコー検査とリウマチ診療、2009 年 4 月 23~26 日

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

TNF- α 制御分子、tristetraprolin(TTP)を介した関節リウマチの治療戦略に関する研究

研究分担者 住田 孝之 (筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻臨床免疫学 教授)

研究協力者 神宮 崇、鈴木 豪、杉原 誠人、

(筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻臨床免疫学)

研究要旨

関節リウマチ(RA)の発症において TNF- α が重要な働きを果たしている。本研究では、TNF- α の制御分子のひとつである Tristetraprolin(TTP)に焦点をあて、TTP-ZF トランスジェニックマウスを作成し、TTP-ZF の高発現による TNF- α 産生およびコラーゲン誘導関節炎(CIA)への影響を検討した。その結果、TTP-ZF トランスジェニックマウスにおいて、1)CIA が有意に抑制された。2)関節組織の炎症細胞浸潤、滑膜細胞増殖が有意に抑制されていた。3)関節局所における TNF- α mRNA 発現が減少していた。4)LPS 刺激による TNF- α 産生が低下していた。5)TNF- α mRNA の安定性が低下していた。以上の研究成果より、TTP-ZF の過剰発現は、TNF- α mRNA の安定性を損い TNF- α 発現を減少させるために CIA 発症が抑制される事が判明した。今後、TTP を分子標的とした RA の新規治療戦略の開発を進める。

A.研究目的

関節リウマチ(RA)の発症に TNF- α が重要な働きを果たしており、TNF ブロッカーによる治療は RA の根治的な治療として脚光を浴びている。しかし、その TNF ブロッカーが有効である RA 患者は約 50%であり、無効症例においては他のサイトカインブロッカー(IL-6 や IL-1 β)、T 細胞をターゲットした治療薬(CTLA4-Ig など)や B 細胞に対する治療薬(抗 CD20 抗体など)に変更することになる。患者の QOL を改善し、医療効率を高めるためには、治療前あるいは治療開始後早期に、治療薬の有効性を知り得るバイオマーカーが必要である。その一つの候補分子として TNF- α の制御分子である tristetraprolin(TTP)分子に焦点を当て、末梢血リンパ球における mRNA 発現、SNP 解析等を進めてきた。本研究では、TTP-ZF トランスジェニックマウスを作成して関節炎発症に対する TTP-ZF 分子の制御機構を明らかにする事を目的とした。

B.研究方法

1) マウス TTP-ZF 遺伝子を DBA/1 マウスの受精卵に遺伝子導入しトランスジェニックマウスを作成し、in vivo での CIA の関節炎スコア、および発症頻度などについて検討した。

2)TTP-ZF トランスジェニックマウスの関節炎について H-E 染色による組織学的解析を行った。

3)TTP-ZF トランスジェニックマウスにおいて、関節での TNF- α 発現を RT-PCR 法で解析した。

4)LPS 刺激による脾細胞での TNF- α mRNA 発現を real-time PCR 法にて検討した。

5)脾細胞を LPS で刺激後、Actinomycin D の有無で培養し、産生された TNF- α mRNA を real-time PCR 法で測定することにより TNF- α mRNA の安定性について検討した。

(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

- 1) TTP-ZF トランスジェニックマウスにおいて、関節炎スコアの有意な低下および発症頻度の抑制が認められた。
- 2) 組織学的解析により関節炎の有意な抑制が認められた。
- 3) 関節において TNF- α mRNA 発現が低下していた。
- 4) LPS 刺激による TNF- α 産生は有意に減少していた。
- 5) TTP-ZF トランスジェニックマウスにおける TNF- α mRNA の安定性が低下していることが判明した。

D. 考察と結論

トランスジェニックマウスを用いた解析から、TTP-ZF 分子は、TNF- α の安定性を低下させ関節局所での TNF- α mRNA 発現を抑制することにより CIA 発症を制御していることが判明した。今後、TTP-ZF 分子を標的とした治療戦略の開発を進めていく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Iwanami, K., Matsumoto, I., Tanaka, Y., Inoue, A., Minami, R., Hayashi, T., Goto, D., Ito, S., Nishimura, Y., and Sumida, T. Altered peptide ligands inhibit glucose-6-phosphate isomerase (GPI) peptide-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.* (*in press*)
2. Ito, I., Kawasaki, A., Ito, S., Kondo, S., Sugihara, M., Horikoshi, M., Hayashi, T., Goto, D., Matsumoto, I., Tsutsumi, A., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Matsuta, K., Sumida, T., and Tsuchiya, N., Replication of association between FAM167A(C8orf13)-BLK region and rheumatoid arthritis in a Japanese population. *Ann. Rheum. Dis.* (*in press*)
3. Segawa, S., Goto, D., Yoshiga, Y., Sugihara, M., Hayashi, T., Chino, Y., Matsumoto, I., Ito, S., Ito, S.,

- and Sumida, T. Inhibition of TGF- β signaling attenuates IL-18 plus IL-2-induced interstitial lung disease. *Clin. Exp. Immunol.* (*in press*)
4. Wang, Y., Ito, S., Chino, Y., Goto, D., Matsumoto, I., Murata, H., Tsutsumi, A., Uchida, K., Usui, J., Yamagata, K., and Sumida, T. Analysis of cytokine balance in lupus nephritis by laser-microdissection. *Clin. Exp. Immunol.* (*in press*)
 5. Inoue, A., Matsumoto, I., Tanaka, Y., Iwanami, K., Goto, D., Ito, S., and Sumida, T. Role of tumor necrosis factor- α -induced adipose-related protein in autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum. Ther.* (*in press*)
 6. Tanaka-Watanabe, Y., Matsumoto, I., Iwamami, K., Inoue, A., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T. B cells have crucial role as autoantibody producers in arthritis mediated by glucose-6-phosphate isomerase. *Clin. Exp. Immunol.* **155**: 285-294, 2009.
 7. Ito, I., Kawasaki, A., Ito, S., Hayashi, T., Goto, D., Matsumoto, I., Tsutsumi, A., Hom, G., Graham, R.R., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Ohashi, J., Behrens, T.W., Sumida, T., and Tsuchiya, N. Replication of the association between C8orf13-BLK region and systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Arthritis Rheum.* **60**: 553-558, 2009.
 8. Kaaguchi, Y., Wakamatsu, E., Matsumoto, I., Nishimagi, E., Kamatani, N., Satoh, T., Kuwana, M., Sumida, T., and Hara, M. Muscarinic-3 acetylcholine receptor autoantibody in patients with systemic sclerosis: contribution to severe gastrointestinal tract dysmotility. *Ann. Rheum. Dis.* **68**: 710-714, 2009.
 9. Suzuki, T., Ito, S., Handa, S., Kose, K., Okamoto, Y., Minami, M., Hayashi, T., Goto, D., Matsumoto, I., and Sumida, T. A new low-field extremity magnetic resonance imaging and proposed compact MRI score: evaluation of anti-tumor necrosis factor biologics on rheumatoid arthritis. *Mod. Rheumatol.* **19**: 358-365, 2009.

10. Wakamatsu, E., Matsumoto, I., Yoshiga, Y., Iwanami, K., Tsuboi, H., Hayashi, T., Goto, D., Ito, S., and Sumida, T. Altered peptide ligands regulate type II collagen-induced arthritis in mice. *Mod. Rheumatol.* 19:366-371, 2009.
11. Segawa, S., Goto, D., Yoshiga, Y., Hayashi, T., Matsumoto, I., Ito, S., and Sumida, T. The decrement of soluble CD1d proteins affects the function of NKT cells in patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Med.* 24:481-486,2009.
12. Horikoshi, M., Ito, S., Ishikawa, M., Umeda, N., Kondo, Y., Tsuboi, H., Hayashi, T., Goto, D., Matsumoto, I., and Sumida, T. Efficacy of mizoribine pulse therapy in rheumatoid arthritis patients with reduced or insufficient response to infliximab. *Mod. Rheumatol.* 19: 229-234, 2009.

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

申請準備中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

インフリキシマブ投与量と関節破壊抑制効果に関する研究

研究分担者 竹内 勤 (慶應義塾大学医学部リウマチ内科 教授)

研究要旨

インフリキシマブ投与量別の臨床的有効性と観察破壊抑制効果を検証した RISING 試験の成績を基に、関節破壊抑制効果と、血清インフリキシマブトラフ濃度、臨床的有効性の関係について検討を加えた。その結果、体重あたり3mg/kg、8週間隔の最小用量によっても、RECONFIRM-2J など以前からの成績が示す様に、臨床効果以上に強力な関節破壊抑制効果が明らかとなった。一方、関節破壊進行度の速い早期 RA においては、54週後の血清インフリキシマブトラフ濃度が検出限界以下の症例において、20%に関節破壊進行が認められた。これら症例に対しては、インフリキシマブ増量あるいは期間短縮によって血清トラフ濃度を増加させることによって関節破壊の進行を阻止できるかどうか検証する必要がある。

A.研究目的

我国におけるインフリキシマブの投与量は、体重あたり3mg で、0,2,6 週の導入後8週間隔で維持する方法であった。しかし、世界的に見るとこの用法 用量は最低量である事、この投与量では、2 時無効例が少なからず観察される事から、投与量の増量に対するエビデンスが求められていた。そこで、体重あたり3mgを0,2,6wで導入した後、10wで3mg/kg、6mg/kg、10mg/kgに割り付け、ブラインド下に14週以降54週まで各用量のインフリキシマブを投与して観察するRISING試験が行われた。臨床的効果、安全性の評価と同時に、インフリキシマブ投与前後の関節画像検査が施行され、投与量別の関節破壊抑制効果が解析された。関節破壊抑制効果と関連する要因を明らかにし、インフリキシマブ投与にも関わらず関節破壊が進行する症例の特徴を明らかにする。

B.研究方法

334例がオープンでインフリキシマブ3mg/kgを0, 2w, 6wに投与され、14週以降ブラインドで、3mg/kg群(n=99例)、6mg/kg群(104例)、10mg/kg群(104例)の3群で54週まで投与が行われた。各来院日の臨床評価とともに、インフ

リキシマブ血清濃度を測定した。0週と54週の手足 X-Pが撮影された症例の関節破壊がシャープ変法によって解析された。

C.研究結果

1) インフリキシマブ投与前の関節破壊進行度:インフリキシマブ投与前の年間関節破壊進行度の中央値は、3mg/kg群5.5、6mg/kg群7.6、10mg/kg群6.5で、投与54週後は、それぞれ0.0、0.5、0.0といずれの群でも進行はほぼ抑えられていた。これを関節破壊進行、不変、改善の割合で示すと、3mg/kgは7.0%/88.4%/4.7%、6mg/kg群は13.0%/81.5%/5.4%、10mg/kg群では5.3%/87.4%/7.4%で、6mg/kg群の進行例の割合が多少高値で有った以外は、ほぼ、同様の割合を示した。6mg/kgで進行例が多い事に関しては、投与前の年間進行度が7.6と3群の中で最も高い事が関連していると考えられた。

2) 関節破壊進行度の累積図:年間進行度の累積プロット図解析で3群間を比較すると、修復を示す $-10^{\sim}-20$ から、進行を示す $10^{\sim}20$ までに3群間ともほぼ同様のプロットを示していた。

3) インフリキシマブ投与54週後の血清濃度別の関節破壊

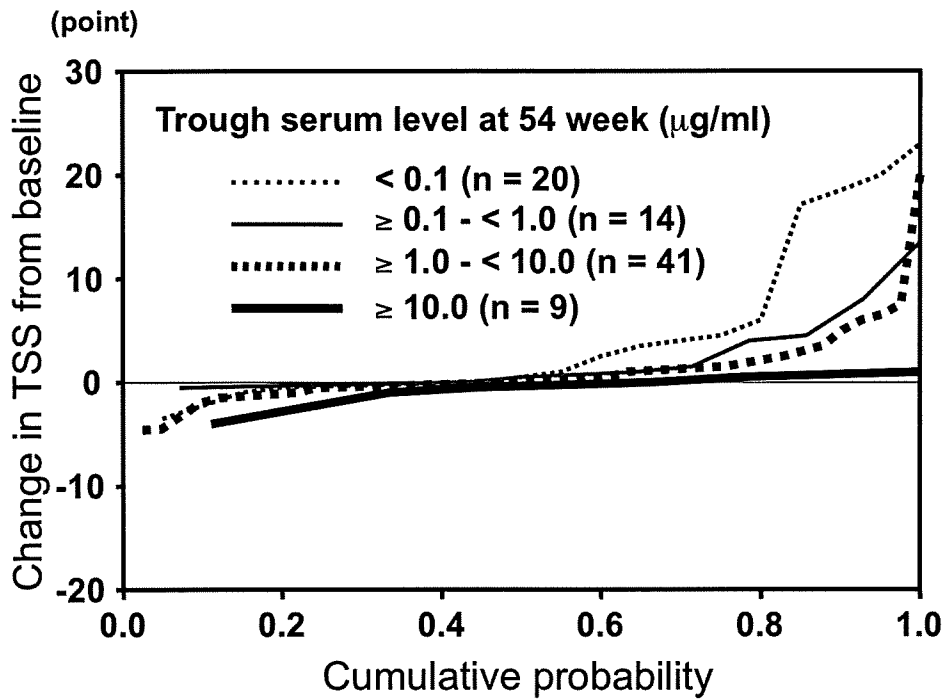


図1 罹病期間3年未満の早期 RA(n=84)における関節破壊進行度

進行度:各用量群の54週の血清インフリキシマブ濃度は、3mg/kg 群で 0.4ug/ml、6mg/kg 2.3ug/ml、10mg/kg 5.5ug/ml で、臨床的有効性と血清濃度に良い相関が見られることから、関節破壊進行度と54週インフリキシマブ血清濃度との関連が解析された。その結果、54週の血清インフリキシマブが検出限界以下の群では、10%ほどの症例が5-20の進行を示すのに対し、10ug/mlとインフリキシマブ濃度が高値の症例では、これが0-5とほぼゼロ進行にとどまった。興味深いのは、罹病期間3年未満の早期 RA 84例のみを対象として、54週血清インフリキシマブトラフ濃度別の累積プロット解析を行うと、この差がより顕著になった。特に、インフリキシマブが検出限界以下の症例では、年間関節進行度5を超える進行例が20%に認められた。一方、インフリキシマブ濃度が上昇すると共に進行例は減少し、10ug/ml以上の高値例では関節破壊進行を認めなかった。

D. 考察と結論

関節破壊の年間進行度が早い日本人 RA において、インフリキシマブ各用量群の強力な関節破壊阻止効果が確認された。3mg/kg、6mg/kg、10mg/kg で、年間関節破壊進行度の中央値に大きな差はなく、ほぼ関節破壊ゼロに抑えられていたが、興味深い事に54週の血清インフリキシマブトラフ濃度別の累積プロット解析を行ったところ、関節破壊進行度のより速い早期 RA では、インフリキシマブの血清濃度が検出されない症例で、20%もが進行する事が明らかとなった。血清インフリキシマブトラフ濃度が検出限界以下の症例は、臨床的反応が見られない症例である事が RISING 試験の結果から示されており、早期症例で、54週目に臨床的反応が得られないものでは、関節破壊が進行する可能性がある。従って、インフリキシマブ投与後の臨床的反応性を注意深く観察し、効果が得られない症例では血清トラフ値が上昇しない事を考え増量、あるいは期間短縮を行って関節破壊進行を抑える工夫が必要である。

今後、この戦略によって、真に関節破壊抑制の進展を完全に良くし出来るかどうか、検証する必要がある。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

1. Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Azuma J, and Kishimoto T. Study of Active controlled Tocilizumab monotherapy for Rheumatoid Arthritis Patients with an Inadequate Response to Methotrexate (SATORI): significantly reduction in disease activity and serum vascular endothelial growth factor by IL-6 receptor inhibition therapy. *Mod Rheum* 19:12-19, 2009.
2. Suzuki K, Kameda H, Amano K, Nagasawa H, Sekiguchi H, Nishi E, Ogawa H, Tsuzaka K, and Takeuchi T. Single Center Prospective Study for Efficacy and Safety of Tacrolimus in Rheumatoid Arthritis. *Rheumatology Int* 29:431-6, 2009.
3. Nagasawa H, Kameda H, Sekiguchi N, Amano K, and Takeuchi T. Improvement of the HAQ score by infliximab treatment in patients with RA: its association with disease activity and joint destruction. *Mod Rheum* 19: 166-172, 2009.
4. Komano Y, Harigai M, Koike R, Sugiyama H, Ogawa J, Saito K, Sekiguchi N, Inoo M, Onishi I, Ohashi H, Amamoto F, Miyata M, Kageyama G, Imaizumi K, Tokuda H, Okochi Y, Tanaka Y, Takeuchi T, and Miyasaka N. Pneumocystis pneumonia in patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab: a retrospective review and case-control study of 21 patients. *Arthritis & Rheum* 61:305-12, 2009.
5. Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, and Azuma J. Long-term safety and efficacy of tocilizumab, an anti-interleukin(IL)-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* 68: 1580-84, 2009.
6. Takeuchi T, Miyasaka N, Inoue K, Abe T, and Koike T. Impact of through serum level on Radiographic and Clinical Response to Infliximab plus Methotrexate in Patients with Rheumatoid Arthritis: results from the RISING Study. *Mod Rheumatology* 19:478-87, 2009.
7. Hashimoto J, Garnero P, van der Heijde, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Yoshikawa H, and Nishimoto N. A combination of biochemical markers of cartilages and markers of cartilage and bone turnover, radiographic image and body mass index to predict progression of joint destruction in patients with rheumatoid Arthritis treated with Disease modifying Anti-Rheumatic Drugs. *Mod Rheum*19: 273-282, 2009.
8. Tanino M, Matoba R, Nakamura S, Kameda H, Amano K, Okayama T, Nagasawa H, Suzuki K, Matsubara K, and Takeuchi T. Prediction of efficacy of anti-TNF biologic agent, infliximab, for rheumatoid arthritis patients using a comprehensive transcriptome analysis of white blood cells. *Biochem Biophys Research Comm* 387: 261-265, 2009.
9. Koike T, Harigai M, Inokuma S, Inoue K, Ishiguro N, Ryu J, Takeuchi T, Tanaka Y, Yamanaka H, Fujii K, Freundlich B, and Suzukawa M. Post-marketing surveillance of the safety and efficacy of etanercept in Japan. *J Rheum* 36:898-906, 2009.
10. Nagasawa H, Kameda H, Sekiguchi N, Amano K, and Takeuchi T. Normalization of physical function by infliximab in RA patients: Factors associated with normal physical function. *Clin Exp Rheum* in press.
11. Nagasawa H, Kameda H, Sekiguchi N, Amano K, and Takeuchi T. Differences between the Health Assessment Questionnaire Disability Index (HAQ-DI) and the modified HAQ (mHAQ) score before and

- after infliximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheum*, in press.
12. Tanaka Y, Takeuchi T, Mimori T, Saito K, Nawata M, Kameda H, Nojima T, Miyasaka N, Koike T. Discontinuation of infliximab after attaining low disease activity in patients with rheumatoid arthritis, RRR (remission induction by remicade in RA) study. *Ann Rheum Dis*. In press
 13. 竹内 勤: RECONFIRM-2J 研究と RRR 研究から関節破壊抑制をみる 分子リウマチ治療 2(4): 161-164, 2009
 14. 谷野元彦、天野宏一、竹内 勤 インフリキシマブ投与前の全血 RNA の遺伝子発現パターンからの投与後の効果予測 分子リウマチ治療 2(4):194-197, 2009
 15. 竹内 勤: 関節リウマチ—治療を目指す治療の新時代へのアプローチ (治療パラダイムシフト)— 医学のあゆみ 230(9):727-731, 2009
 16. 竹内 勤: 関節リウマチの治療 —Next Stage— 臨床のあゆみ 81:7-8, 2009
 17. 亀田秀人、竹内 勤 エタネルセプト—わが国のエビデンス (市販後調査、JESMR 試験). リウマチ科 2009; 42(3):257-261.
- ## 2. 学会発表
1. Kameda H, Kanbe K, Sato E, Ueki Y, Saito K, Nagaika S, Hidaka T, Atsumi T, Tsukano M, Kasama T, Shiozawa S, Tanaka Y, Yamanaka H, Takeuchi T. Etanercept (ETN) plus methotrexate (MTX) combination therapy resulted in a better outcome in joint damage and physical function than ETN monotherapy even in patients with active rheumatoid arthritis despite MTX treatment: 52-week results from the JESMR study. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR 2008). 2009年6月、コペンハーゲン.
 2. Tsutomu Takeuchi : Industry Sponsored Symposium 3. HUMIRA: for a long term and comprehensive RA Disease management—clinical Data, Radiographic Data, Functionally Data, Work Productivity Data— The 9th World Congress on Inflammation. 2009年7月、東京.
 3. Nishimura K, Kameda H, Kurasawa T, Kondo T, Okuyama A, Nishi E, Takei H, Suzuki K, Nagasawa H, Abe H, Tsuzaka K, Amano K, Takeuchi T. Influence of tocilizumab to interstitial pneumonia (IP) complicating rheumatoid arthritis patients. The 9th World Congress on Inflammation. 2009年7月、東京.
 4. Tsutomu Takeuchi : New biologics for rheumatoid arthritis in Japan: A multi-center, randomized, double-blind, controlled, dose-response study of Abatacept (BMS-188667) in Japanese active rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to Methotrexate. The 53rd Annual General Assembly and Scientific meeting of Japan College of Rheumatology, The 18th International Rheumatology symposium. Tokyo. April. 2009.
 5. 竹内 勤: 関節リウマチ治療に抗 TNF α がもたらしたものの第137回日本医学会シンポジウム 2009年12月 東京
 6. 竹内 勤: 抗リウマチ薬の現状と課題 第30回日本臨床薬理学会 シンポジウム 2009年12月 横浜
 7. 西村幸治、亀田秀人、倉沢隆彦、近藤恒夫、奥山あゆみ、西英子、武井博文、長澤逸人、天野宏一、竹内 勤. 皮膚筋炎に合併した急速進行性間質性肺炎に対して多剤併用療法が奏効した一例. 第20回日本リウマチ学会 関東支部学術集会. 2009年12月、横浜.
 8. 竹内 勤: RA 完全寛解に向けた治療戦略 ランチョンセミナー 第37回日本臨床免疫学会総会. 2009年11月、東京.
 9. 竹内 勤: 分子標的治療—Annual Review 1— 第37回日本臨床免疫学会総会. 2009年11月、東京.
 10. 竹内 勤: 免疫難病における新しいターゲット分子と制御 シンポジウム 第37回日本臨床免疫学会総会. 2009年11月、東京.
 11. 奥山あゆみ、亀田秀人、瀬戸山由美子、鈴木美由紀、西村幸治、倉沢隆彦、近藤恒夫、西英子、武井博文、鈴木勝也、長澤逸人、竹内 勤、天野宏一. 関節リウマチ

- 患者における infliximab の注射時反応と Fc γ receptor III 遺伝子多型との関連. 第 37 回日本臨床免疫学会総会. 2009 年 11 月、東京.
12. 近藤恒夫, 鈴木勝也, 亀田秀人, 西村幸治, 倉沢隆彦, 奥山あゆみ, 西英子, 武井博文, 長澤逸人, 津坂憲政, 天野宏一, 竹内 勤. インフリキシマブ投与関節リウマチ症例における抗 CCP 抗体価の推移と臨床的意義. 第 37 回日本臨床免疫学会総会. 2009 年 11 月、東京.
13. 竹内 勤: より良い治療成績をめざす～ RISING STUDY の示唆するもの～ シンポジウム 第 24 回日本臨床リウマチ学会 2009 年 11 月 岩手
14. 竹内 勤: 関節リウマチの最新薬物療法 ランチョンセミナー 第 82 回日本整形外科学会 2009.5 福岡
15. 竹内 勤: リウマチ治療の最前線 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会. ランチョンセミナー 2009 年 4 月、東京.
16. 竹内 勤: リウマチに使うくすり～最新情報～ 市民公開講座 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2009 年 4 月、東京.
17. 亀田秀人, 神戸克明, 佐藤恵理, 植木幸孝, 斎藤和義, 長岡章平, 日高利彦, 渥美達也, 東野通志, 笠間毅, 塩沢俊一, 田中良哉, 山中寿, 竹内 勤. メトトレキサートは効果不十分例においてもエタネルセプトを中止せず継続した方が良好な関節破壊の阻止と身体機能の改善が得られる (JESMR 試験 52 週の結果から). 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会 (シンポジウム). 2009 年 4 月、東京.
18. 倉沢隆彦, 亀田秀人, 西村幸治, 近藤恒夫, 奥山あゆみ, 西英子, 武井博文, 鈴木勝也, 長澤逸人, 阿部治男, 津坂憲政, 天野宏一, 竹内 勤. Infliximab 中止後の活動性コントロール維持における bucillamine の有用性: BuSHIDO (Bucillamine study of holding remission after infliximab drop-off) 試験. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2009 年 4 月、東京.
19. 奥山あゆみ, 亀田秀人, 瀬戸山由美子, 鈴木美由紀, 西村幸治, 倉沢隆彦, 近藤恒夫, 西英子, 武井博文, 鈴木勝也, 長澤逸人, 阿部治男, 津坂憲政, 天野宏一, 竹内 勤. 関節リウマチ (RA) 患者における infliximab の注射時反応と Fc γ receptor (Fc γ R) IIIA 遺伝子多型との関連. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2009 年 4 月、東京.
20. 津坂憲政, 鈴木勝也, 長澤逸人, 武井博文, 西英子, 阿部治男, 奥山あゆみ, 近藤恒夫, 倉沢隆彦, 西村幸治, 亀田秀人, 天野宏一, 永田雅良, 竹内 勤. ステロイド剤治療とトシリズマブの有効性. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2009 年 4 月、東京.
21. 西村幸治, 亀田秀人, 倉沢隆彦, 近藤恒夫, 奥山あゆみ, 西英子, 武井博文, 鈴木勝也, 長澤逸人, 阿部治男, 津坂憲政, 天野宏一, 竹内 勤. 関節リウマチ合併間質性肺炎患者に対するトシリズマブ投与の影響. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2009 年 4 月、東京.
22. 天野宏一, 長澤逸人, 鈴木勝也, 亀田秀人, 津坂憲政, 竹内 勤. 関節リウマチに対する tocilizumab の短期的有用性. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2009 年 4 月、東京.
23. 近藤恒夫, 鈴木勝也, 亀田秀人, 西村幸治, 倉沢隆彦, 奥山あゆみ, 西英子, 武井博文, 長澤逸人, 阿部治男, 津坂憲政, 天野宏一, 竹内 勤. インフリキシマブ投与 RA 症例における抗 CCP 抗体価の推移と臨床的意義. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2009 年 4 月、東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

骨芽細胞をターゲットとする関節リウマチの治療に関する研究

研究分担者 三森 経世 京都大学大学院医学研究科臨床免疫学 教授
研究協力者 野島 崇樹 京都大学大学院医学研究科臨床免疫学 助教

研究要旨

RA に対する骨免疫学的な集学的治療を目的として、関節滑膜、リンパ球、破骨細胞を対象とした既存治療に加え、骨形成に必須である骨芽細胞をターゲットにした治療の有用性に関して検討を進めた。DKK-1 は骨芽細胞において Wnt シグナルを抑制することで、骨形成を抑制する細胞外調節因子である。本研究では骨芽細胞を介した RA 関節破壊病態の改善を検討するために、本年度は、炎症性サイトカイン存在下におけるヒト骨芽細胞培養上清中の DKK-1 濃度の解析、生物学的製剤を使用した RA 患者の治療前後における血清 DKK-1 濃度の測定および臨床経過との比較を行なった。hFOB1.19 培養上清中の DKK-1 濃度は、増殖条件(34℃培養)では低く、分化条件(39℃培養)では増加したが、TNF α 存在下での hFOB1.19 培養上清中の DKK-1 濃度は一定の傾向を示さなかった。RA 患者(TNF 阻害療法前)の血清中 DKK-1 濃度(71.4 \pm 36.7 pmol/l)は、健常人(52.6 \pm 20 pmol/l)に比し、有意に高値であった(P=0.013)。DKK-1 濃度(TNF 阻害療法前)と DAS28 には相関がみられ、RA 患者における血清中の DKK-1 が骨芽細胞を介して、RA における骨破壊病態に寄与していることが示唆された。

A.研究目的

生物学的製剤の導入により、関節リウマチ(RA)の治療目標が関節炎のコントロールから骨破壊抑制へと推移しつつあるが、関節滑膜、リンパ球、破骨細胞を対象とした既存の RA 治療において、炎症・疼痛や免疫異常を抑えてもなお、骨破壊が進んでしまう症例が多数経験される。

骨は骨リモデリング(骨吸収と骨形成の繰り返し)により維持されているが、骨芽細胞を対象とした RA 治療の研究は少ない。本研究では、骨免疫学的な集学的治療を目的として、既存の RA 治療に加え骨芽細胞標的療法を追加併用することで、RA の骨破壊抑制ならびに骨再生を目指した治療の可能性を探る。

DKK-1 は骨芽細胞において Wnt シグナルを抑制することで、骨形成を抑制する細胞外調節因子である。本研究では骨芽細胞を介した RA 関節破壊病態の改善を検討するために、炎症性サイトカイン存在下での骨芽細胞機能の解

析、骨芽細胞機能に対する DKK-1 の役割および抗 DKK-1 抗体の作用の検討を行う。

B.研究方法

①生物学的製剤を使用した RA 患者の治療前後における血清 DKK-1 濃度の測定および臨床経過との比較
Human DKK-1 ELISA KIT (BIOMEDICA 社) を用いて、生物学的製剤を使用した RA 患者 43 例の治療前の血清を用いて DKK-1 濃度を測定した。さらに、37 例は治療後の DKK-1 濃度も測定し、TNF 阻害療法治療前後の DKK-1 濃度、RA 疾患活動性や治療反応性などの臨床経過との比較検討を行った。

②ヒト骨芽細胞上清中における DKK-1 蛋白量の測定
温度感受性ヒト骨芽細胞株(hFOB1.19)の培養上清中における DKK-1 蛋白量を ELISA 法で検討した。

③炎症性サイトカイン存在下でのヒト骨芽細胞上清中の

DKK-1 濃度、および骨芽細胞関連マーカー mRNA 発現の解析

TNF α 存在下での hFOB1.19 培養上清中の DKK-1 濃度、および hFOB1.19 細胞における DKK-1 と、ALP、OC、OPG などの骨芽細胞分化マーカーの mRNA 発現を RT-PCR で評価した。

(倫理面への配慮)

特に該当せず。

C. 研究結果

①生物学的製剤を使用した RA 患者の治療前後における血清 DKK-1 濃度の測定および臨床経過との比較

血清中の DKK-1 濃度は、健常人 52.6 ± 20 pmol/l に対し、RA 患者(TNF 阻害療法前) 71.4 ± 36.7 pmol/l であり、RA 患者で有意 ($P=0.013$) に高値であった(図1)。治療前 DKK-1 濃度と DAS28 との弱い相関がみられた(図2)。TNF 阻害療法前後で DKK-1 濃度の有意な低下は認められず、EULAR 反応性と DKK-1 濃度との相関は確認できなかった。

②ヒト骨芽細胞上清中における DKK-1 蛋白量の測定
hFOB1.19 培養上清中の DKK-1 濃度は、増殖条件(34°C 培養)では低く、分化条件(39°C 培養)では増加することが示された(図3)。

③炎症性サイトカイン存在下でのヒト骨芽細胞上清中の DKK-1 濃度、および骨芽細胞関連マーカー mRNA 発現の解析

TNF α 存在下での hFOB1.19 培養上清中の DKK-1 濃度は一定の傾向を示さなかった。TNF α 存在下での hFOB1.19 で種々の骨芽細胞関連マーカーの mRNA 発現は一定の傾向を示さなかった(図4)。

D. 考察

RA の手指関節においては治療前の関節異常血流値が高 DKK-1 は骨芽細胞において Wnt シグナルを抑制することで、骨形成を抑制する細胞外調節因子であり、多発性骨髄腫患者の血清・骨髄において DKK-1 濃度が上昇し

ていること、骨髄腫の骨破壊病変と関連していることが示されている。

RA では DKK-1 が関節腔内で濃度上昇していること、RA 滑膜組織での DKK-1 発現、また、TNF- α によって RA 滑膜繊維芽細胞から DKK-1 が産生することが示されており、RA 骨破壊病態への関与が注目されている。

今回の検討で、TNF 阻害療法前の RA 患者血清中の DKK-1 濃度が高値であることが確認され、DAS28 との弱い相関がみられた。TNF 阻害療法前後で DKK-1 濃度の有意な低下は認められず、EULAR 反応性と DKK-1 濃度との相関は確認できなかったが、TNF 阻害療法後として採取した血清サンプルの中に、二次無効例のものも含まれていたことより、より詳細な検討が必要と考えられた。

hFOB1.19 培養上清中の DKK-1 濃度は、増殖条件(34°C 培養)では低く、分化条件(39°C 培養)では増加することが確認され、さらに炎症性サイトカイン存在下での骨芽細胞機能(分化および骨形成能)の解析をすすめたが、上清中の DKK-1 濃度や骨芽細胞関連マーカーの mRNA 発現は一定の傾向を示さなかった。

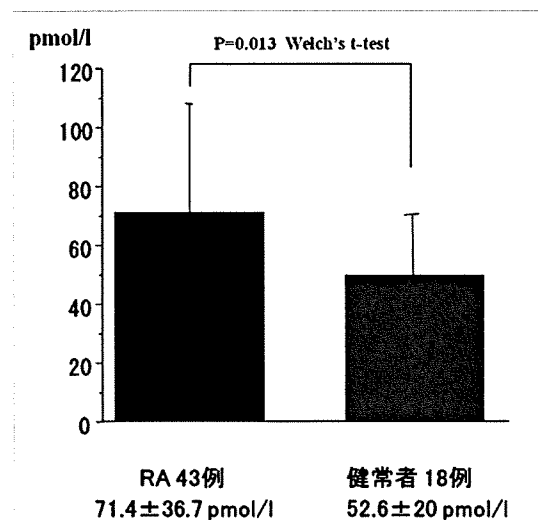


図1. RA(TNF阻害療法前)と健常者の血清DKK-1濃度

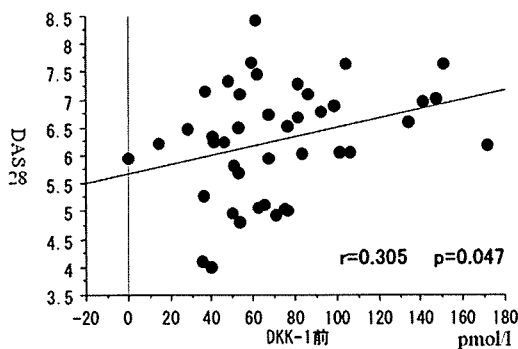


図2. 血清DKK-1濃度(TNF阻害療法前)とDAS28の相関

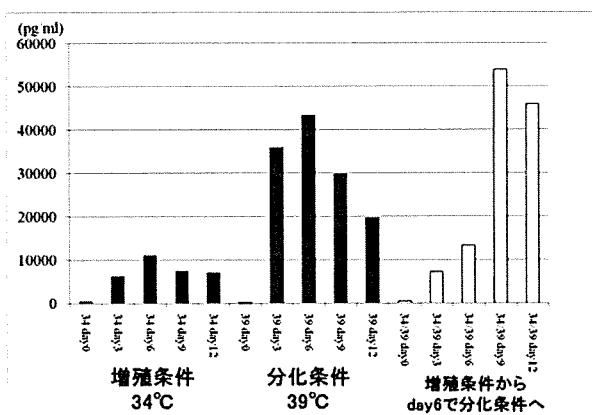


図3. hFOB培養上清中のDKK-1 ELISA

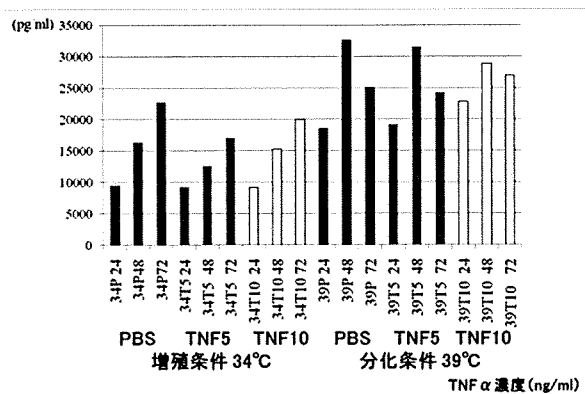


図4. TNF α 存在下でのhFOB培養上清中のDKK-1濃度

E. 結論

TNF 阻害療法開始前の RA 患者血清中の DKK-1 濃度が高値であることが確認され、DAS28 との弱い相関がみられたことより、RA 治療の新しい標的として骨芽細胞が候補となる可能性が示された。

炎症性サイトカイン存在下での DKK-1 や骨芽細胞関連マーカーの解析からは一定の傾向が確認されなかったことより、RA モデルマウスを用いた抗 DKK-1 抗体による加療実験のまえに、炎症性サイトカイン存在下における骨芽細胞機能の更なる解析が大切と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ichikawa Y, Saito T, Yamanaka H, Akizuki M, Kondo H, Kobayashi S, Oshima H, Kawai S, Hama N, Yamada H, Mimori T, Amano K, Tanaka Y, Matsuoka Y, Yamamoto S, Matsubara T, Murata N, Asai T, Suzuki Y. Clinical Activity After 12 Weeks of Treatment with Nonbiologics in Early Rheumatoid Arthritis May Predict Articular Destruction 2 Years Later. J Rheumatol. 2010 Mar 1. [Epub ahead of print]
- 2) Ishikawa Y, Yukawa N, Ohmura K, Hosono Y, Imura Y, Kawabata D, Nojima T, Fujii T, Usui T, Mimori T. Etanercept-induced anti-Jo-1-antibody-positive polymyositis in a patient with rheumatoid arthritis: a case report and review of the literature. Clin Rheumatol. 2010 Feb 9. [Epub ahead of print]
- 3) Higashi T, Nakayama T, Fukuhara S, Yamanaka H, Mimori T, Ryu J, Yonenobu K, Murata N, Matsuno H, Ishikawa H, Ochi T. Opinions of Japanese rheumatology physicians regarding clinical practice guidelines. Int J Qual Health Care. 2010 Jan 15. [Epub ahead of print]
- 4) 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 recognized by anti-CADM-140 antibody. *Rheumatology (Oxford)* 49(3):433-40, 2010.

5) Satoh T, Ishikawa O, Ihn H, Endo H, Kawaguchi Y, Sasaki T, Goto D, Takahashi K, Takahashi H, Misaki Y, Mimori T, Muro Y, Yazawa N, Sato S, Takehara K, Kuwana M: Clinical usefulness of anti-RNA polymerase III antibody measurement by enzyme-linked immunosorbent assay. *Rheumatology (Oxford)* 48(12):1570-4, 2009.

6) Kobayashi K, Okamoto Y, Inoue H, Usui T, Ihara M, Kawamata J, Miki Y, Mimori T, Tomimoto H, Takahashi R: Leukoencephalopathy with cognitive impairment following tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis (RA). *Intern Med.* 48(15):1307-9, 2009.

7) Fujii T, Okada M, Fujita Y, Sato T, Tanaka M, Usui T, Umehara H, Mimori T: Vaccination with autoreactive CD4(+)Th1 clones in lupus-prone MRL/Mp-Fas(lpr/lpr) mice. *J Autoimmun.* 33(2):125-34, 2009.

8) 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.

9) Kitaori T, Ito H, Yoshitomi H, Aoyama T, Fujii T, Mimori T, Nakamura T: Severe erosive arthropathy requiring surgical treatments in systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol.* 19(4):431-6, 2009.

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

なし

関節リウマチに対するサイクリン依存性キナーゼ阻害因子誘導療法に関する研究

研究分担者 宮坂 信之 (東京医科歯科大学膠原病・リウマチ内科 教授)

研究協力者 上阪 等、村上洋介 (東京医科歯科大学膠原病・リウマチ内科)

研究要旨

我々は Cyclin-dependent kinase (CDK) 4/6 の阻害因子である p16^{INK4a} 遺伝子を関節炎モデルに強制発現させると、滑膜細胞の増殖抑制することにより、関節炎を改善することを示した。しかし、p16^{INK4a} は滑膜細胞からの炎症性メディエーターの産生も抑制するが、主要な炎症性サイトカイン産生細胞であるマクロファージにおける作用は不明であった。このため、マクロファージに p16^{INK4a} を強制発現させたところ、LPS 刺激による IL-6 発現が著明に抑制された。ところが、CDK4/6 阻害剤や siRNA による CDK4 のノックダウンでは IL-6 抑制作用は観察されなかった。p16^{INK4a} の強制発現では、IRAK1 の分解が亢進しており、その下流の p38MAPK/JNK のリン酸化阻害および AP-1 の活性化が抑制された。IRAK1 のノックダウンでも同様に AP-1 の活性化は阻害された。プロテアソーム阻害剤の投与は、IRAK1 の分解促進を阻害し、下流の p38MAPK/JNK のリン酸化を回復した。また p16^{INK4a} を発現させた THP-1 マクロファージに IRAK1 を共発現させると、IL-6 産生抑制が解除された。さらに内因性 p16^{INK4a} を発現した老化マクロファージの p16^{INK4a} をノックダウンすると LPS 刺激による IL-6 産生が増強した。以上のことから、マクロファージにおいて、p16^{INK4a} は CDK4/6 非依存的に IRAK1 のプロテアソーム依存的な分解作用を促進することで AP-1 カスケードを阻害し、IL-6 産生を抑制していることをわかり、p16^{INK4a} 誘導療法の特性の一端が明らかになった。

A. 研究目的

生物学的製剤に代表される免疫抑制的な抗リウマチ薬に加え、作用機序の異なる治療薬を開発し、併用することが、安全かつ究極的な骨破壊抑制に寄与すると考えられる。我々はアデノウイルスによる炎症関節へのサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 (CDKI) p16^{INK4a} 遺伝子導入が、滑膜細胞の増殖を抑制し、関節リウマチ(RA)動物モデルに著効することを見いだした。その効果の一部は、低分子CDK4/6 阻害薬で代替可能であったが、p16^{INK4a} には固有の作用もあり、滑膜細胞選択的に p16^{INK4a} を発現させる治療法もまた開発を考慮する余地がある。これ迄の研究で、p16^{INK4a} は RA 滑膜細胞 (RSF) からの MCP-1 や MMP-3 の産生は抑制することを見いだしたが、本研究では、マクロファージの炎症性サイトカイン産生に対する p16^{INK4a} 強制発現の効

果を検討した。

B. 研究方法

DBA/1J マウスの骨髄細胞を M-CSF 存在下で培養して、骨髄由来マクロファージ (BMM) を得た。RSF は RA 患者滑膜組織から分離した。p16^{INK4a} ないし IRAK1 遺伝子のレトロウイルス発現ベクター、CDK4 および IRAK1 に対する short hairpin RNA (shCDK4, shIRAK1) のレトロウイルス発現ベクターを構築し、マクロファージに導入した。RSF への p16^{INK4a} の遺伝子導入にはアデノウイルスベクターを用いた。IL-6 発現は ELISA 法、定量的 PCR 法、シグナル伝達分子発現とリン酸化は Western blot 法で検討した。AP-1、NF- κ B の結合活性は、ゲルシフトアッセイで測定した。

(倫理面への配慮)

患者よりの検体採取、研究への使用に関しては、倫理審査委員会承認に基づき、文書同意を取得して研究を行った。

C. 研究結果

p16^{INK4a} 発現により、LPS 刺激下の BMM からの TNF mRNA 発現は変動せず、IL-6 mRNA およびタンパクの発現が著減した。この抑制は、選択的 CDK4/6 阻害薬や、shCDK4 による CDK4 をノックダウンによって細胞増殖を抑制しても影響を受けず、CDK4/6 活性低下に依存しなかった。また、RSF では p16^{INK4a} を強制発現させても IL-6 産生に影響がなかった。LPS 受容体である TLR4 下流分子では、p16^{INK4a} 発現 BMM で IRAK1 分解亢進が認められ、p16^{INK4a} 発現 RSF では認められなかった。刺激した BMM における IRAK1 下流シグナルを検討したところ、p38MAPK および JNK のリン酸化、AP-1 結合活性の低下があり、AP-1 経路が抑制されていた。さらに、プロテアソーム阻害薬を投与したところ、p16^{INK4a} による IRAK1 の分解亢進は解除され、それに伴い AP-1 経路抑制が回復した。一方で、p16^{INK4a} 発現は IKK リン酸化、I B 分解、NF- B の結合活性のいずれにも影響を与えず、NF- B 経路は保持されていた。次に、IRAK1 分解亢進を模倣するために、shIRAK1 で IRAK1 をノックダウンしたところ、やはり AP-1 結合活性低下が認められ、一方、I B 分解は保持されていた。また、p16^{INK4a} 発現した THP-1 (ヒトマクロファージ) 細胞では、BMM と同様に LPS 誘導 IL-6 産生が抑制され、この IL-6 産生低下は、IRAK1 追加強制発現によって解除された。以上の結果は、p16^{INK4a} 発現はマクロファージにおいて、IRAK1 分解を亢進させ、AP-1 経路を抑制して IL-6 産生を低下させることを示す。なお、細胞老化を誘導するため、増殖停止まで培養して内因性 p16^{INK4a} 誘導負荷をかけた BMM を LPS 刺激して IL-6 を産生させる際に、p16^{INK4a} に対する siRNA で p16^{INK4a} をノックダウンしたところ、IL-6 産生が増強した。従って、p16^{INK4a} 発現による IL-6 阻害は、生理的意義をもつものと考えられる。

D. 考察

p16^{INK4a} 遺伝子は、CDK4/6 非依存的に IL-6 産生を抑制する。CDK4/6 を除いた p16^{INK4a} の標的分子としては、HeLa 細胞において NF- B の構成分子である p65 に結合することが示されており、NF- B の活性化を阻害することが報告されている。また MEF に UV 照射し p16^{INK4a} を発現させた研究では、p16^{INK4a} は JNK に結合し、JNK のリン酸化を阻害することなく、JNK が c-Jun との結合を阻害して AP-1 活性化を抑制することが報告されている。これら線維芽細胞系を用いて示された p16^{INK4a} の作用機序とは異なり、p16^{INK4a} 発現マクロファージでは IRAK1 分解亢進により、p38MAPK および JNK のリン酸化を抑制し、AP-1 活性を阻害した結果 IL-6 産生が抑制されたと考えられる。一方、NF- B 経路が阻害されなかったのは分解亢進により IRAK1 が減少しても NF- B 経路を活性化できることが考えられる。IRAK1 の分解機序は、MEF を用いた研究でユビキチン化依存でないことが報告されているが、我々の知見と同様に単球/マクロファージでは、プロテアソーム阻害剤により、IRAK1 の分解が抑制されることが示されている。このことから、p16^{INK4a} は細胞特異的にプロテアソーム依存・非依存的に IRAK1 分解を制御していることが考えられる。

E. 結論

p16^{INK4a} が RA 炎症に重要なマクロファージからの IL-6 産生を CDK 活性非依存的に抑制していることが明らかになった。p16^{INK4a} を滑膜細胞選択的に発現させることができれば CDK4/6 阻害薬にはない治療効果も期待される。低分子 CDK4/6 阻害薬と合わせて開発を進めたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishimoto N, Miyaska 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) : significantly reduction in disease activity and serum vascular endothelial growth factor by IL-6 receptor inhibition therapy. *Mod. Rheumatol.* 19:12-19, 2009
2. Takeuchi T, Miyasaka N, Inoue K, Abe T, Koike T. Impact of trough serum level on radiographic and clinical response to infliximab plus methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: results from the RISING study. *Mod. Rheumatol.* 19(5):478-487, 2009
 3. Hashimoto J, Garner P, D. van der Heijde, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Yoshikawa H, Nishimoto N. A combination of biochemical markers of cartilage and bone turnover, radiographic damage and body mass index to predict progression of joint destruction in patients with rheumatoid arthritis treated with disease modifying anti-rheumatic drugs. *Mod. Rheumatol.* 19:273-282, 2009
 4. Komano Y, Harigai M, Koike R, Sugiyama H, Ogawa J, Saito K, Sekiguchi N, Inoo M, Onishi I, Ohashi H, Amamoto F, Miyata M, Ohtsubo H, Hiramatsu K, Iwamoto M, Minota S, Matsuoka N, Kageyama G, Imaizumi K, Tokuda H, Okochi Y, Kudo K, Tanaka Y, Takeuchi T, Miyasaka N. Pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab : a retrospective review and case-control study of 21 patients. *Arthritis & Rheum.* 61(3):305-312, 2009
 5. Nii T, Kubota T, Nanki T, Komano Y, Harigai M, Kohsaka H, Hirose W, Nagasaka K, Sakurai T, Miyasaka N. Reevaluation of antibody titers 1 year after influenza vaccination in patients with rheumatoid arthritis receiving TNF blockers. *Mod. Rheumatol.* 19:216-218, 2009
 6. Nonomura Y, Mizoguchi F, Suzuki A, Nanki T, Kato H, Miyasaka N, Kohsaka H. Hypoxia-induced abrogation of contact-dependent inhibition of rheumatoid arthritis synovial fibroblast proliferation. *J. Rheumatol.* 36(4):698-705, 2009
 7. Koike R, Harigai M, Atsumi T, Amano K, Kawai S, Saito K, Saito T, Yamamura M, Matsubara T, Miyasaka N. Japan College of Rheumatology 2009 guidelines for the use of tocilizumab, a humanized anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody, in rheumatoid arthritis. *Mod. Rheumatol.* 19:351-357, 2009
 8. Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Azuma J. Long-term safety and efficacy of tocilizumab, an anti-IL-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.* 68:1580-1584, 2009
 9. Sato A, Watanabe K, Kaneko K, Murakami Y, Ishido M, Miyasaka N, T Nanki. The effect of synthetic retinoid, Am80, on T helper cell development and antibody production in murine collagen-induced arthritis. 2009 Dec.29 [Epub ahead of print]
 10. Mizoguchi F, Izu Y, Hayata T, Hemmi H, Nakashima K, Nakamura T, Kato S, Miyasaka N, Ezura Y, Noda M. Osteoclast-specific Dicer gene deficiency suppresses osteoclastic bone resorption. 2009 Dec.28 [Epub ahead of print]
 11. Murakami Y, Akahoshi T, Aoki N, Toyomoto M, Miyasaka N, Kohsaka H. Intervention of an inflammation amplifier, triggering receptor expressed on myeloid cells 1, for treatment of autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum.* 60(6):1615-1623, 2009

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし