

図1 RA 滑膜での Bv8 の発現の *in situ* hybridization による検出

sublining layer に陽性細胞がみられた (A). センスプローブでは陽性反応は認められなかった (B). (A, B) に対応する HE 染色像 (C). 好中球やマクロファージ様の細胞や紡錘形の細胞が陽性であった(D, E).

Scale bar: 100 $\mu$ m (A, B, C), 25 $\mu$ m (D, E)

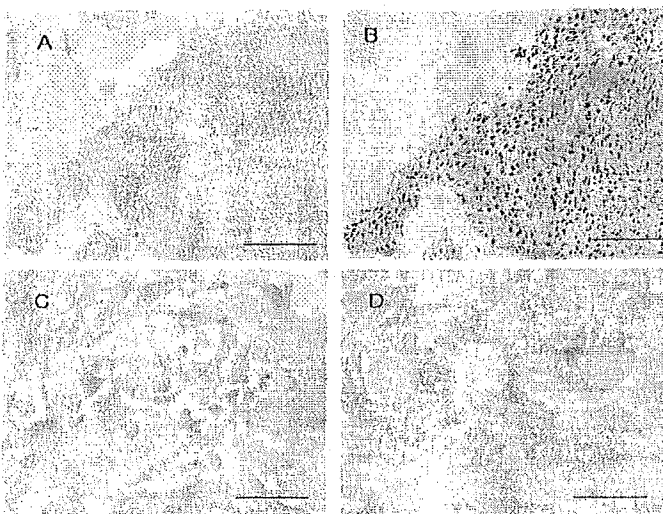


図2 RA 滑膜での Bv8 の発現の免疫組織化学染色による検出

sublining layer に Bv8 の発現がみられた(A). (A)に対応する HE 染色像(B). 好中球やマクロファージ様の細胞や紡錘形の細胞で発色を認めた(C, D).

Scale bar: 100 $\mu$ m (A, B), 25 $\mu$ m (C, D)

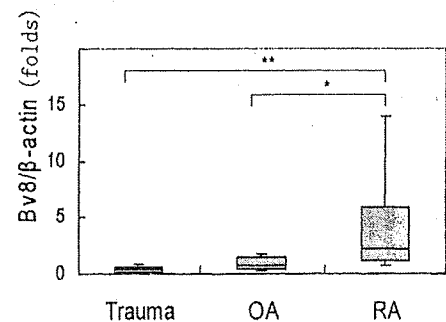


図3 RA, OA, 外傷後滑膜での Bv8 mRNA の発現量の比較

RA 滑膜では、OA 滑膜や外傷後滑膜に比べ、有意に高い Bv8 の発現が認められた。外傷後滑膜では全体的に発現が低かった。

(\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ )

厚生労働科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)  
分担研究報告書

関節リウマチ患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞に対する IL-6 刺激による  
蛋白分解酵素 ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の発現に関する研究

分担研究者 澤井高志 岩手医科大学医学部 病理学講座 教授  
研究協力者 鎌滝章央 岩手医科大学医学部 病理学講座 助教  
研究協力者 三又義訓 岩手医科大学医学部 整形外科講座 大学院生

研究要旨

アグリカン分解酵素 ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の発現に対する IL-6 による影響を調べた。免疫組織化学で関節リウマチ患者の滑膜表層に ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の発現を認めた。線維芽細胞様滑膜細胞を IL-6 で刺激し ADAMTS-4 と ADAMTS-5 mRNA の発現量を real-time PCR 法で解析した。ADAMTS-4 の発現量は IL-6 添加により増加し、抗 IL-6 受容体抗体の添加により減少した。ヒト RA 滑膜組織においては IL-6 の刺激により ADAMTS-4 の発現が亢進し、軟骨破壊に関与している可能性が示された。

A. 研究目的

軟骨の細胞外基質であるアグリカンの分解酵素 a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS)-4 と ADAMTS-5 は関節リウマチ(rheumatoid arthritis, RA)患者の軟骨組織だけではなく滑膜組織でも発現しており、アグリカンの分解に大きな役割を果たしている。これまでにヒト滑膜組織を用いて、ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の発現に対する TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  等のサイトカインによる影響を調べた研究はいくつか報告されているが、IL-6 による影響を調べた研究は未だ報告されていない。RA における軟骨破壊の発生機序を解明するために RA 患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS) に対する IL-6 刺激による蛋白分解酵素 ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の発現への影響を解析した。

B. 研究方法

1) 免疫組織化学

人工関節置換術を施行した RA 患者の組織を用いて免疫染色を行った。採取した滑膜、骨組織を 4%パラホルムアルデヒドで固定してパラフィン切片を作製した。一次抗体(ポリクローナルウサギ抗 ADAMTS-4 抗体、抗 ADAMTS-5 抗体)と二次抗体(ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体)を用い、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンで検出感度を増幅し、DAB 発色で検出した。

2) real-time PCR

RA 患者の滑膜組織から FLS を調製した。IL-6 と可溶性 IL-6 受容体(soluble IL-6 receptor; sIL-6R)を添加して培養後、細胞から total RNA を抽出し cDNA を合成した。それを鋳型に用い ADAMTS-4 と

ADAMTS-5 の mRNA 発現量を real-time PCR 法で解析した。さらに抗 IL-6 受容体抗体を添加した条件下での ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の mRNA 発現量を解析した。

3) 統計処理

有意差検定には Dunnett's test を用い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

倫理面への配慮

本研究は十分なインフォームドコンセントを行い、書面による患者の同意を得て採取した検体を使用した。

C. 研究結果

1) 炎症により増殖・多層化した表層滑膜と骨に浸潤しているパンススで ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の発現が認められた。ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の発現は最表層である superficial lining layer よりもやや深層の sublining layer でより顕著であった。

2) IL-6 と sIL-6R をそれぞれ 100 ng/ml の濃度で FLS に添加して 0~48 時間培養した結果、ADAMTS-4 は経時的に発現が増加し 12 時間でピークとなった。一方、ADAMTS-5 では経時的に若干減少し 12 時間で最低値を示した。

3) IL-6 と sIL-6R をそれぞれ 0~200 ng/ml の濃度で添加して培養した結果、ADAMTS-4 mRNA の発現量は濃度依存的に増加し(図 1)、ADAMTS-5 mRNA の発現量は濃度依存的に減少する傾向が認められた。

4) 抗 IL-6 受容体抗体を添加した群では、ADAMTS-4 mRNA の発現量は IL-6/sIL-6R のみを添加した群と比べて抗体濃度に依存して減少した(図 2)。ADAMTS-5 mRNA の発現量は抗 IL-6 受容体抗体の濃度に依存し

## 別紙①

て増加した。

### D. 考察

免疫組織化学的手法により ADAMTS-4 と ADAMTS-5 が RA 患者の滑膜表層部およびパンヌスで発現していることを確認した。また、RA 患者由来の FLS において IL-6 刺激により ADAMTS-4 の発現が亢進することを明らかにし、さらに抗 IL-6 受容体抗体を同時に添加することによりその発現が抑制されることを明らかにした。IL-6 は活動性の高い RA 患者の血清および関節液中に豊富に存在するため、これらの結果よりヒト RA 滑膜組織においては IL-6 刺激により ADAMTS-4 の発現が亢進し、RA の軟骨破壊に深く関与している可能性が示された。

### E. 結論

ヒト RA 滑膜組織においては IL-6 の刺激により ADAMTS-4 の発現は亢進した。ADAMTS-4 が RA の軟骨破壊に関与している可能性がある。

### F. 健康危険情報

特になし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

三又義訓, 鎌滝章央, 及川伸也, 村上賢也, 澤井高志. 関節リウマチ患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞に対する IL-6 刺激による蛋白分解酵素 ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の発現の変化の解析. 岩手医学雑誌 62(2): (in press)

Mimata Y, Kamataki A, Oikawa S, Shimamura T, Sawai T: Expression of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 by IL-6 stimulation in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 68(Suppl3): 730. 2009

#### 2. 学会発表

三又義訓, 鎌滝章央, 及川伸也, 西田 淳, 嶋村 正, 澤井高志: 関節リウマチ患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞に対する IL-6 刺激による蛋白分解酵素 ADAMTS-4, ADAMTS-5 の発現動態. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 東京, 4 月

### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

#### 1. 特許取得

特になし

#### 2. 実用新案登録

特になし

#### 3. その他

特になし

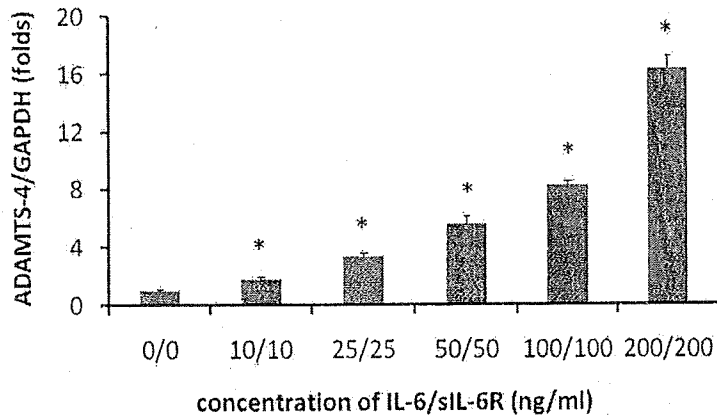


図1. IL-6/sIL-6 の濃度による FLS における ADAMTS-4 の発現の変化  
 FLS での ADAMTS-4 mRNA の発現量は、無添加群と比べて IL-6/sIL-6R 添加群では濃度に依存して有意に増加した。(\*:  $p < 0.01$ )

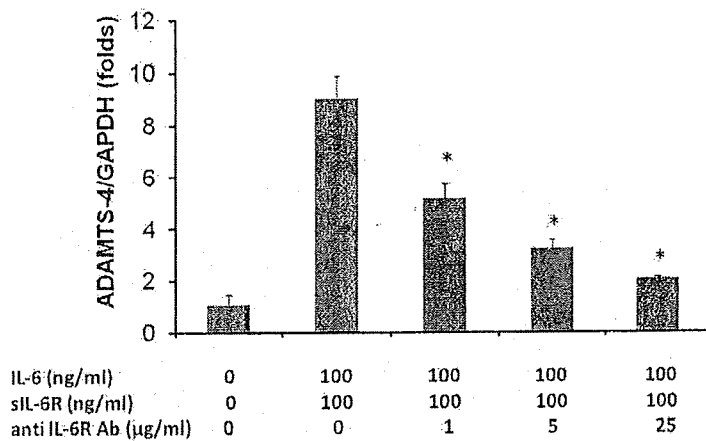


図2. 抗 IL-6 受容体抗体の添加による FLS における ADAMTS-4 の発現の変化  
 ADAMTS-4 mRNA の発現量は IL-6/sIL-6R のみを添加した群と比べて抗 IL-6 受容体抗体も添加した群では抗体濃度に依存して有意に減少し、IL-6/sIL-6R 無添加の発現レベルに近づいた。(\*:  $p < 0.01$ )

厚生労働科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)  
分担研究報告書

遺伝子組換えマウスを用いた関節リウマチ発症に関わる遺伝子の検討

分担研究者	澤井高志	岩手医科大学医学部	病理学講座	教授
研究協力者	鎌滝章央	岩手医科大学医学部	病理学講座	助教
研究協力者	村上賢也	岩手医科大学医学部	整形外科講座	大学院生

### 研究要旨

関節リウマチと変形性関節症の骨髄や滑膜組織で発現の異なる遺伝子のうち、関節リウマチの病態と関係があると推測される遺伝子を過剰発現するマウスとノックアウトマウスを用意し、関節炎誘導や加齢での関節の変化を検討した。EEF1A1, SULF1, OLR1, CXCL5 および EEF1A1 と SULF1 の両方を過剰発現するトランスジェニックマウスが得られた。また MMP12 floxed と C57BL/6-Tg(CAG-Cre) を交配しヘテロマウスが得られている。関節炎誘導した EEF1A1 や SULF1 のトランスジェニックマウスと野生型マウスでは、著しい違いは認められなかった。すべてのトランスジェニックマウスについて現在は加齢変化をみるための長期飼育をしている。

### A. 研究目的

関節リウマチと変形性関節症の骨髄および滑膜組織では、発現する遺伝子が異なることが明らかにされている。それらの遺伝子のうち、関節リウマチ発症に関連する遺伝子を明らかにすることを目的とし、遺伝子組換えマウスの作製および関節炎発症の検討を行った。

### B. 研究方法

トランスジェニックマウスについては株式会社トランスジェニック社に作製を依頼した。EEF1A1, SULF1, OLR1, CXCL5 のそれぞれの遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウスと EEF1A1 と SULF1 の二つの遺伝子を過剰発現するマウスを用意した。また、MMP12 のコンディショナルノックアウトマウスを作製するための MMP12 floxed マウスの作製もトランスジェニック社に依頼した。MMP12 floxed と交配する Cre を発現するマウスとして、C57BL/6-Tg(CAG-Cre) を熊本大学生命資源・支援センターを介して作製者の宮崎先生、目加田先生より供与して頂いた。

抗コラーゲンカクテル抗体を用いた関節炎惹起に伴う変化と加齢に伴う関節の変化から関節リウマチの病態への関与を検討した

### C. 研究結果

7週齢の EEF1A1 トランスジェニックマウス雄3匹雌3匹と野生型の同腹仔を検討した結果、雄1匹のみに滑膜の多層化(2~3層)と関節脂肪組織の血管周囲の炎症性細胞を認めた(図1)。7週齢の EEF1A1 トランスジェニックマウス雄3匹雌3匹と野生型の同腹仔に関節炎を誘導した結果、トランスジェニックマウスの雄1匹に特に著しい変化が認めら

れたものの、野生型の雄1匹にも顕著な関節炎・滑膜炎が認められた(図2)。14カ月齢の EEF1A1 トランスジェニックマウスの関節を検討した結果、滑膜細胞の軽度の多層化と表層の軽度の線維化の傾向がみられた。しかし、解析できたマウスが3匹のみだったこと、同齢の野生型マウスを用意できなかったことから、現在、トランスジェニックマウスと同腹仔の野生型マウスを加齢変化解析用に飼育中である。

SULF1 トランスジェニックマウスについて、7週齢の雄3匹と雌3匹を野生型の同腹仔と比較したところ全てのマウスに病変は認められなかった(図3)。SULF1 トランスジェニックマウスに関節炎誘導すると雄3匹雌3匹のうち雄1匹に著しい関節炎が認められたものの、野生型の雄1匹ではより強い関節炎と顆粒球の浸潤が認められた(図4)。

### D. 考察

関節炎誘導したマウスでは全体的に炎症が強く、野生型とトランスジェニックマウスの違いは明確にはできなかった。より弱い条件を選択する必要があると考え、加齢により違いがあらわれるか解析するために長期飼育している。12カ月齢をめどに解析に供する予定である。

### E. 結論

関節炎誘導では EEF1A1 トランスジェニックマウスおよび SULF1 トランスジェニックマウスと野生型マウスとの間で著しい違いは認められなかった。

EEF1A1, SULF1, OLR1 および CXCL5 トランスジェニックマウスを加齢による変化をみるために飼育している。

MMP12 ノックアウトマウスを作製するために C57BL/6-Tg(CAG-Cre) と MMP12 floxed マウスを交配している。交配した最初の世代からヘテロマウスが得られており、現在はこのヘテロマウスを交配している。

別紙①

F.健康危険情報

特になし。

G.研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

なし

H.知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1.特許取得

特になし

2.実用新案登録

特になし

3.その他

特になし

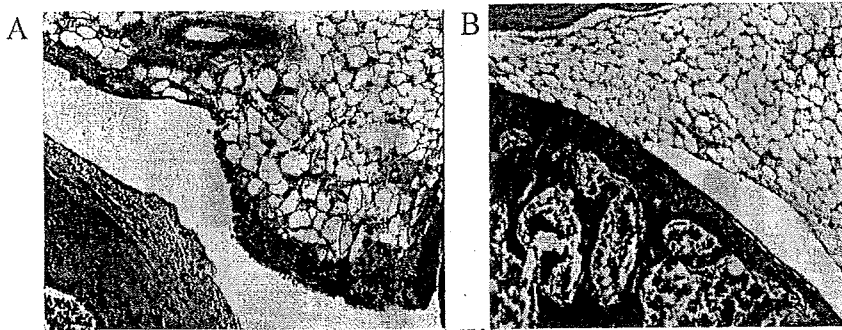


図1. EEF1A1 トランスジェニックマウスの膝関節  
EEF1A1 トランスジェニックマウス 1 例においてのみ滑膜の増生が認められた (A)。  
それ以外のマウスでは変化が認められなかった (B)。

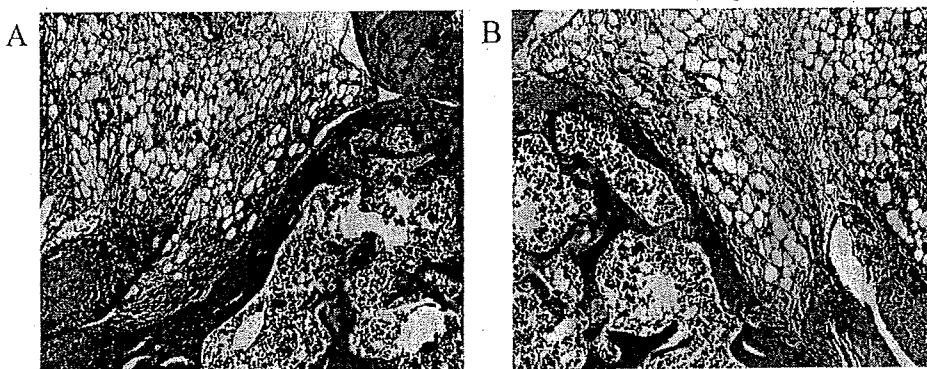


図2. 関節炎を誘導した野生型マウスと EEF1A1 トランスジェニックマウスの膝関節  
EEF1A1 トランスジェニックマウスの雄 1 匹に特に著しい変化が認められた (A)。  
野生型の雄 1 匹にも顕著な関節炎・滑膜炎が認められた (B)。

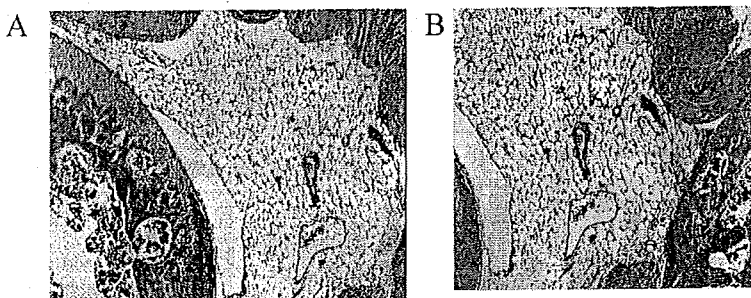


図3. SULF1 トランスジェニックマウスの膝関節  
SULF1 トランスジェニックにおいて、関節の変化は認められなかった (A, B)。

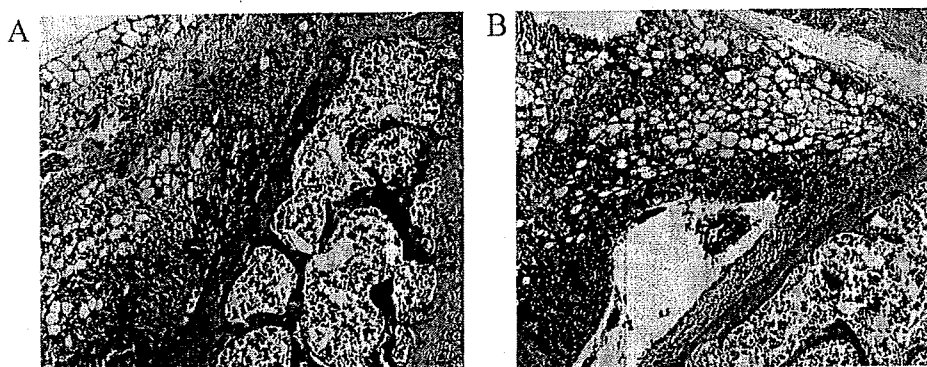


図4. 関節炎を誘導した野生型マウスと SULF1 トランスジェニックマウスの膝関節  
SULF1 トランスジェニックマウス 1 匹に著しい関節炎が認められた (A)。  
野生型の雄 1 匹ではより強い関節炎と顆粒球の浸潤が認められた (B)。

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）  
研究分担報告書

アポトーシスと関節炎に関する研究

研究分担者 長田 重一 京都大学大学院医学研究科

研究要旨 死細胞はマクロファージによって貪食され、その DNA はリソソームの DNase II によって分解される。この DNA 分解が効率よく進行しないとマクロファージから TNF が産生され、マウスはヒトのリュウマチに似た関節炎を発症する。今回、未分解 DNA によるサイトカイン遺伝子の活性化に関与している EYA (Eyes absent) と呼ばれる分子を同定した。

A. 研究目的

アポトーシスは細胞の凝縮と断片化、染色体 DNA の分解を伴う過程であり、カスペースと呼ばれるタンパク質分解酵素によって進行する。アポトーシス細胞はその最終段階で、マクロファージや樹上細胞によって速やかに貪食され、分解される。マクロファージで死細胞の DNA を分解する酵素はリソソームに存在する DNase II と呼ばれる酵素である。赤血球の分化過程で核が排出されるがこの核もマクロファージによって貪食され、DNase II によって分解される。DNase II 遺伝子を欠損したマクロファージはアポトーシス細胞や赤血球からの核を貪食するがその DNA を分解できないことから、大量の未分解 DNA を蓄積する。そのためマクロファージは IFN $\beta$  を産生、この因子の作用により、マウスは発症途上、死滅する。平成 18 年、私達は DNase II 遺伝子と IFN タイプ I 受容体遺伝子をとともに欠損するマウスを樹立し、このマウスは一見、正常に誕生するが年とともに慢性関節炎を発症することを見出した。同じような関節炎は DNase II 遺伝子をマウスの生後、誘導的に欠損させても観察された。以上の結果はアポトーシス細胞や赤血球の核がマクロファージによって貪食された後、その DNA が効率よく分解されなければ関節炎へと導くことを示している。本年度はこの関節炎発症の分子機構、特にマクロファージに蓄積した DNA による IFN $\beta$  遺伝子活性化機構を解析し、この過程に関与している phosphatase を同定した。

B. 研究方法

DNase II 欠損マウス MEF にアポトーシスを起こした胸腺細胞を貪食させるとこの細胞のリソソームには未分解の DNA が蓄積し、その培養上清中には IFN $\beta$  が分泌される。この過程に関与している分子を同定するため、400 個のグループに分けたマウス cDNA library (20000 のクローン) を MEF に導入、アポトーシス細胞を貪食させた後、上清中の IFN $\beta$  を測定、IFN $\beta$  の分泌を顕著に上昇さ

せる遺伝子を同定探索した。

C. 研究結果

MEF から調製した cDNA ライブラリーから死細胞由来の DNA に応答して IFN $\beta$  遺伝子を活性化させる分子として EYA (Eyes absent) を単離した。この分子は本来、転写因子として同定されたが、数年前、tyrosine-phosphatase の活性を持つことが報告された。EYA の組み替え体を動物細胞で作成し、その生化学的解析から、EYA には tyrosine-phosphatase ばかりでなく、threonine-phosphatase 活性が存在すること、その活性が IFN $\beta$  遺伝子の活性化に必要なことが示された。この因子は死細胞 DNA ばかりでなく、ウイルスの RNA による IFN $\beta$  遺伝子の活性化も促進した。

D. 考察

IFN $\beta$  遺伝子は TLR や RIG-I からのシグナルで活性化される。このシグナル伝達の過程には種々の kinase の関与が知られているが、phosphatase に関しては報告がない。今回のわれわれの結果はこの過程が kinase と phosphatase により、巧妙に制御されていることを示している。今後はこの phosphatase の基質を同定するとともに、その活性機構の解析が必要であろう。EYA が関与したシグナル伝達経路は未分解 DNA による TNF 産生、関節炎に関与している。EYA の作用機構の解明は TNF の産生抑制、関節炎の薬剤開発へと導くであろう。

E. 結論

未分解の DNA に応答した IFN $\beta$  遺伝子の活性化に関与する phosphatase EYA の同定。

F. 研究発表

1. 論文発表
  1. Nagata, S., Hanayama, R. & Kawane, K.: Autoimmunity and the Clearance of Dead Cells. *Cell*, in press
  2. Nagasaka, A., Kawane, K., Yoshida, H. & Nagata,



S. Apaf-1-independent programmed cell death in mouse development. *Cell Death Differ*, in press

3. Okabe, Y., Sano, T. & Nagata, S. Regulation of the innate immune response by threonine-phosphatase of Eyes absent. *Nature* 460, 520-524 (2009)
4. Strasser, A., Jost, P. J. & Nagata, S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 30, 180-192 (2009)
5. Nakaya, M., Kitano, M., Matsuda, M. & Nagata, S. Spatiotemporal activation of Rac1 for engulfment of apoptotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 9198-9203 (2008)
6. Kitano, M., Nakaya, M., Nakamura, T., Nagata, S. & Matsuda, M. Imaging of Rab5 activity identifies essential regulators for phagosome maturation. *Nature* 453, 241-245 (2008)

## 2. 学会発表

1) 国内 14 件

そのうち主なもの

学会発表

1. 長田重一 (平成 21 年 5 月 23 日) アポトーシスと死細胞の貪食 第 7 回北東北血液研究会 特別講演 秋田温泉さとみコンベンションホール 秋田
2. 佐野晃之, 岡部泰賢, 長田重一 (平成 21 年 10 月 21 日) Eyes absent のスレオニン脱リン酸化酵素活性による自然免疫活性化の調節機構 シンポジウム 神戸国際会議場

神戸

2) 海外 13 件

そのうち主なもの

学会発表

1. Nagata, S. (Aug 30, 2009) Programmed Cell Death and Autoimmune Diseases, The EMBO meeting, Amsterdam RAI, Amsterdam, NETHERLANDS.
2. Okabe, Y., Sano, T., Kawane, K. and Nagata, S. (February 15, 2010) Activation of innate immune reaction by mammalian DNA that escaped from degradation, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Fairmont Banff Springs, Banff, CANADA

G. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

1 特許取得

なし

2 実用新案登録

なし

3 その他

新聞、テレビ等での報道

1. 平成 21 年 6 月 29 日  
日本経済新聞、朝日新聞 他 「ウイルスから細胞を守る物質 増やす酵素を発見」

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）  
分担研究報告書

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  
- 関節リウマチ患者由来骨髄細胞移入マウスの病理学的検討 -

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

研究要旨 関節リウマチ (RA) の病因を骨髄に求める研究方針に従い、RA 患者由来の骨髄細胞を SCID マウスに移入し、移入動物に如何なる変化が起きるかを観察した。移入後経時的に観察した結果、移入マウスの膝関節部に RA 様病態を呈した例が確認された。移入細胞数、RA 患者のプロファイルに関しては、今回は少数例ではあるが、 $2 \times 10^7$  個の移入細胞で初めて確認された。また、生物製剤をしていない患者由来の骨髄細胞の移入により病態が惹起された。このことから、RA 骨髄中には RA 病態を引き起こす病因が存在する事が確認された。

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、関節リウマチ患者由来の骨髄細胞を SCID マウスに移入し、移入マウスに如何なる変化が起こるかを観察する事を目的とした。

マウスの後脚については足根部および膝部について HE 染色を行った。

患者プロファイル

実験番号	移植細胞数	患者情報
Exp-1	$7.0 \times 10^6$ cells/0.5ml/one Scid mouse	
Exp-2	$1.0 \times 10^6$ cells/0.5ml/one Scid mouse	
Exp-3	$2.0 \times 10^6$ cells/0.5ml/one Scid mouse	70代女性、ムチラン型、MTX(+)
Exp-4	$2.0 \times 10^6$ cells/0.5ml/one Scid mouse	
Exp-5	$2.0 \times 10^6$ cells/0.5ml/one Scid mouse	
Exp-7	$2.0 \times 10^6$ cells/0.5ml/one Scid mouse	
Exp-8	$2.0 \times 10^6$ cells/0.5ml/one Scid mouse	生物製剤(-)

B. 研究方法

- 1) マウス：C.B-17/Icr-scid/scidJcl (日本クレア乾式会社) 6 週令♀を使用した。飼育環境はヘパフィルター飼育器内、通常の給餌および給水を自由に与えた。
- 2) RA 患者骨髄液：市立川崎病院整形外科の越智健介先生より提供をされた。大腿骨から手術時にヘパリンにて抗凝固処理され 20ml 採取され、採取後直ちに実験に使用した。
- 3) 骨髄細胞移入：骨髄液は洗浄後、比重遠心法にて単核細胞群を回収し、さらに、赤血球層上のバフィーコートも回収し、混在する赤血球を除去後、PBS に再浮遊して  $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$  個を SCID マウスの腹腔に投与した。移入 1 ヶ月後に後脚を切断し、10%ホルマリン緩衝液で固定・保存した。
- 4) 病理学的検討：骨髄細胞移入 SCID

(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

今回の検討から、移入細胞数が  $2 \times 10^7$  個の実験群において移入動物 4 匹中 2 匹の膝関節部に病理学的所見から大腿骨と脛骨の菲薄化と軟骨の変性、および滑膜の肥厚が観察された。移入細胞数の少ない実験群では変化が明確ではなかった。本症状を惹起させた骨髄の由来は、70 歳代女性で病型はムチラン型で MTX の

み内服であった。

#### D. 考察

RA 患者由来骨髓細胞の SCID マウス移入実験によりマウス膝関節に RA 様病態が惹起された。今回の検討では、 $2 \times 10^7$  個の移入細胞で初めて確認された。また、生物製剤をしていない患者由来の骨髓細胞の使用が本結果を導いたのかもしれない。実験群 4 匹中 2 匹に観察された病的変化（発症率 50%）については、積極的に誘導をかける CIA モデルの発症率（80~90%）を考慮しても、単に患者骨髓細胞を移入して起きる変化は決して低いとは考えられず、骨髓に病因が有るとする主任研究者の仮説を証明する糸口となると考えられる。

めて解析を行う。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1). 論文発表

未

##### 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

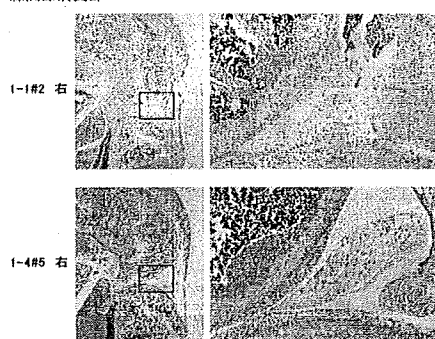
##### 5). その他

なし

表5. 顕微鏡所見

群	0-1H		1-1H		1-2H		1-2M		1-4H		0-2H		1-2H		1-2H	
	シ	ノ	シ	ノ	シ	ノ	シ	ノ	シ	ノ	シ	ノ	シ	ノ	シ	ノ
顕微鏡所見																
大腸炎	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
腎臓病変の発生	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
膵炎	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
腎臓病変の発生	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
膵臓病変の発生	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
膵臓病変の発生	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
膵臓病変の発生	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
膵臓病変の発生	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

膝関節病変部



#### E. 結論

RA 患者由来骨髓細胞は SCID マウスに移入後、移入マウスの膝関節部に RA 様病態を惹起した。今回の検討結果から、症例数の増加と移入細胞数および移入ルートを検討を行う。また、病理変化の詳細については免疫染色を含

## (ii) ナース様細胞抑制など

1. RA に対する脂肪細胞分泌因子（アディポネクチン）の抗炎症・骨吸収抑制作用検討と治療薬開発に関する研究
2. 関節リウマチ疾患特異的分子オステオポンチンによる病態の機能解析
3. 関節リウマチの重症度（病型）予後診断法としての C1q 値に関する研究
4. 関節リウマチにおけるヒスタミンの病理生理学的役割と H4-受容体の関与に関する研究

厚生労働科学研究費補助金  
「関節リウマチ・骨粗鬆症の重症化防止治療開発研究」班  
分担研究報告書

RAに対する脂肪細胞分泌因子（アディポネクチン）の抗炎症・骨吸収抑制作用検討と  
治療薬開発に関する研究

分担研究者 下村伊一郎 大阪大学内分泌代謝内科学教室 教授

研究要旨

脂肪組織分泌因子であるアディポネクチンは、in vivoでは関節炎モデルマウスに過剰発現させると関節炎の発症が抑制され、in vitroでは破骨細胞の増殖・分化・貪食能が抑制される。RA発症時には関節軟骨骨表面に補体が沈着するが、アディポネクチンはC1qと結合し、補体機能に  
関与する可能性が示された。

A. 研究目的

脂肪組織分泌因子であるアディポネクチンはマクロファージや血管内皮に対して抗炎症作用を有することが報告されている。我々はH20年度の研究でアデノウイルスによるアディポネクチンの過剰発現によって、コラーゲン誘導性の関節炎モデルマウスにおいて関節炎の重症化が抑制されることを見出した。さらに、このモデルマウスでは軟骨表面への補体の沈着が抑制されていた。本研究の目的はアディポネクチンの補体に対する直接的な作用を明らかにすることで、アディポネクチンの関節炎重症化抑制機構を解明し、治療薬の開発を目指すことである。

B. 研究方法

RAモデルアディポネクチンと補体C1qの直接的な結合、血液中の補体活性化に対する作用を解析した。

C. 研究結果

アディポネクチンはN末端にコラーゲンドメイン、C末端にグロブドメインを有し、補体C1qとドメイン構造が類似していた。プレートに抗原抗体複合体を固相化し、C1qおよびアディポネクチンの結合を定量するELISA系を作成した。C1qは抗原抗体複合体に対する用量依存的な結合が見られたが、アディポネクチンは結合しなかった。次に、アディポネクチン蛋白をプレートに固層化し、C1q蛋白との結合を測定するELISA系を作成した。アディポネクチンとC1qは濃度依存性の結合がみられた。そこで、C1qと抗原抗体複合体の結合に対するアディポネクチンの抑制作用を検討した。C1qと抗体の結合を阻害しなかった。固相化した免疫複合体に対して血清を添加することで補体が活性化し、結合したC1q、C3を測定する系を作成した。この系に対してアディポネクチンを添加したが、C1q、C3の結合は阻害されなかった。

D. 考察

アディポネクチンを過剰発現することで関節軟骨表面での補体結合、活性化が抑制されたことから、アディポネクチンと補体の相互作用を解析した。今回の研究では、アディポネクチンは補体活性化を抑制する作用

は有していなかった。しかし、アディポネクチンが補体C1qと類似したドメイン構造を有し、C1qと直接的に結合することを見出した。C1qは補体活性化以外の作用が報告されており、アポトーシスした細胞の除去に関与することも知られている。補体活性化以外のC1qの作用に対してアディポネクチンの及ぼす作用の解析が必要である。

E. 結論

アディポネクチンは補体C1qと類似したドメイン構造を有し、C1qと直接的に結合した。これまでの研究で、アディポネクチンは関節炎を抑制する作用を報告したが、この炎症抑制作用はC1qが標的因子である可能性が示唆された。アディポネクチンのC1qに対する作用の解析を進めることで、RAの治療法につながる可能性が示唆された

G. 研究発表

1. 論文発表

Ebina, K., Oshima, K., Matsuda, M., Fukuhara, A., Maeda, K., Kihara, S., Hashimoto, J., Ochi, T., Banda, N. K., Yoshikawa, H., and Shimomura, I. Adenovirus-mediated gene transfer of a diponectin reduces the severity of collagen-induced arthritis in mice *Biochem Biophys Res Commun* (2009) 378 (2), 186-191

Ebina, K., Fukuhara, A., Ando, W., Hirao, M., Koga, T., Oshima, K., Matsuda, M., Maeda, K., Nakamura, T., Ochi, T., Shimomura, I., Yoshikawa, H., and Hashimoto, J. Serum adiponectin concentrations correlate with severity of rheumatoid arthritis evaluated by extent of joint destruction *Clin Rheumatol* (2009) 28 (4), 445-451

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況  
記載事項なし

関節リウマチ疾患特異的分子オステオポンチンによる病態の機能解析

研究分担者 吉川秀樹 大阪大学大学院医学系研究科教授

研究要旨 関節炎の発症、増悪には多くの因子が関わる。オステオポンチン（OPN）は多様な翻訳後修飾をうける多機能分子であるが、OPNの機能抑制により関節炎が抑えられることが知られている。OPNは、関節リウマチ（RA）においても病態、病勢に関わる分子であり、RA患者の関節液、血中にOPNが高濃度にみられる。RAでは、関節滑膜細胞とB細胞との相互作用が病態に重要な役割を持つ事が知られてきたが、RAにおけるOPNの分子メカニズムは不明である。本研究ではRAにおけるOPNの機能をRA由来滑膜細胞とB細胞との細胞間相互作用に着目して解析した。関節リウマチ患者滑膜細胞において疾患特異的翻訳後修飾をうけた75kDaオステオポンチンの発現がみられ、この疾患特異的オステオポンチンは、関節リウマチ患者滑膜細胞膜上に存在しリンパ球との細胞接着を介してIL-6産生を誘導していること、さらに、RA患者滑膜組織において、OPN陽性細胞とB細胞が共在している部位で、IL-6が検出され、OPNが病態に関わっていることが強く示唆される結果を得た。

A. 研究目的

関節炎の発症、増悪には多くの因子が関わる。オステオポンチン（OPN）は多様な翻訳後修飾をうける多機能分子であるが、OPNの機能抑制により関節炎が抑えられることが知られている。OPNは、関節リウマチ（RA）においても病態、病勢に関わる分子であり、RA患者の関節液、血中にOPNが高濃度にみられる。一方、関節リウマチ（RA）では滑膜細胞がリンパ球抱き込み現象によるサイトカインの産生が知られている。本研究ではRA滑膜細胞由来のオステオポンチン（OPN）発現、リンパ球抱き込み現象としてB細胞との接着、B細胞接触によるIL-6産生、RA患者におけるOPN発現とサイトカイン発現につき解析し、RA病態におけるOPN

の意義につき検討した。本研究によりOPNを疾患治療ターゲットとなりうるか否かを検証する。

B. 研究方法

RA11名および非RA患者10名滑膜より分離した初代培養滑膜細胞（FLS）（4～10継代）と、B細胞株MC/Carを用い、OPN発現をウェスタンブロットにて評価した。また、FLSの細胞表面でのOPN発現をウェスタンブロットにて評価した。さらに、FLSのB細胞との共培養を、Transwellあり・なし、FLS単独培養を行ない、培養上清のIL-6濃度をELISAにて測定した。FLSにOPN遺伝子導入により過剰発現、または、siRNA導入によるOPN発現抑制下で、B細胞との共培養、培養上清のIL-6濃度を測定した。FLSに

OPN 中和抗体を投与し、B 細胞との共培養を行ない、抱きこまれた B 細胞の細胞数を計測した。RA 患者滑膜組織での B 細胞・OPN 陽性細胞・IL-6 陽性細胞の局在を免疫組織化学法にて検討した。

(倫理面への配慮)

患者データなどの個人情報および解析結果は、各施設で厳重に管理保管し秘密を厳守した。ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成 13 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号)疫学研究に関する倫理指針(平成 14 年文部科学省・厚生労働省告示第 2 号)臨床研究に関する倫理指針(平成 15 年厚生労働省告示 255 号)および、申請者、研究分担者が所属する研究機関が定めた倫理規定を遵守して行った。研究参加は参加を承諾した場合でも拒否した場合でも全く同質の治療が行われることを説明した上で、患者の任意によりインフォームドコンセントを得て行われた。

### C. 研究結果

OPN に対するウェスタンブロット法では、全ての FLS で 54kD に double band が検出されたほか、全ての RA 患者由来の FLS と、3 例の非 RA 患者由来の FLS で、75kD の band が検出された。FLS 単独培養または Transwell を用いて接触を阻んだ B 細胞との共培養では、培養上清中の IL-6 濃度は低値であったが、B 細胞と FLS の接触を伴う共培養では、75kD OPN+ FLS において培養上清中の IL-6 濃度は有意に上昇した ( $p < 0.001$ )。75kD OPN+ FLS では、細胞表面に 200kD 超のトロンピン切断された OPN を発現しており、免疫蛍光法では OPN は細胞の形状に沿って検出された。

200kD 超の OPN は、ファイブロネクチン (FN) 抗体による免疫沈降タンパクでも検出され、また OPN 抗体による免疫沈降タンパクに対する FN へのウェスタンブロットでも 200kD 超のバンドが検出されることから、200kD 超の OPN は FN と共有結合した分子であると示唆された。このような共有結合を施す分子としてトランスグルタミナーゼが過去に報告されており、その阻害薬である cystamine sulfate を FLS に投与すると、200kD 超の OPN の発現は抑制された。次に OPN、特に 75kD OPN が共培養における IL-6 の産生への関わりについて OPN の過剰発現とノックダウンにより検討した。レンチウイルスを用いた OPN 過剰発現により、75kD OPN+ FLS では 200kD 超、75kD、54kD 全てのバンドが増強したが、75kD OPN- FLS では 54kD のバンドのみ増強した。OPN 発現ベクターの導入後に B 細胞と共培養したところ、75kD OPN+ FLS では OPN 過剰発現により有意に培養上清中 IL-6 濃度が上昇した ( $p < 0.001$ ) が、75kD OPN- FLS では有意な差を認めなかった。さらに 75kD OPN+ FLS に OPN siRNA またはコントロール siRNA を導入し同様に培養上清中 IL-6 を測定したところ、OPN ノックダウンにより有意な低下を認めた ( $p < 0.001$ )。OPN は接着分子として知られているため、OPN 中和抗体を用いて FLS 表面上の OPN をマスクしたのち B 細胞と共培養し、FLS 上に接着しなかった B 細胞を洗浄にて取り除き、その細胞数を計測した。中和抗体により接着した B 細胞数は有意に減少した ( $p < 0.001$ )。最後に RA 患者滑膜組織での B 細胞・OPN 陽性細胞・IL-6 陽性細胞の

局在を免疫組織化学法にて検討した。

OPNは過去の報告と同様に滑膜絨毛の表層およびその下層の細胞に強く検出された。B細胞は滑膜の内層に集積して認められ、OPN陽性細胞とB細胞が共在している部位で、IL-6も検出された。

#### D. 結論

本研究より、RA滑膜細胞は特異的に修飾された75kDのOPNを発現しており、それはトランスグルタミナーゼによりFNと結合し滑膜細胞表面上に局在し、滑膜細胞表面上のOPNを介しB細胞が接着し、滑膜細胞とB細胞の細胞接着を伴う細胞間相互作用によりIL-6の産生が刺激されていることが明らかとなった。このRA滑膜におけるRA特異的OPNによる滑膜細胞-B細胞相互作用が、IL-6を介してRAにおける慢性炎症など病態に関わっている可能性が考えられた。

OPNが疾患治療ターゲットとして key molecule のひとつであることが示された。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ebina, K., Oshima, K., Matsuda, M., Fukuhara, A., Maeda, K., Kihara, S., Hashimoto, J., Ochi, T., Banda, N.K., Yoshikawa, H., Shimomura, I.: Adenovirus-mediated gene transfer of adiponectin reduces the severity of collagen-induced arthritis in mice. *BBRC*, 378:186-191, 2009.

2. Ebina, K., Fukuhara, A., Ando, W., Hirao, M., Koga, T., Oshima, K., Matsuda, M., Maeda, K., Nakamura, T., Ochi, T., Shimomura I, Yoshikawa, H., Hashimoto J.: Serum adiponectin concentrations correlate with severity of rheumatoid arthritis evaluated by extent of joint

destruction. *Clinical Rheumatology*, 28:445-451, 2009.

3. Goto A, Murase T, Hashimoto J, Oka K, Yoshikawa, H., Sugamoto K.: Morphologic analysis of the medullary canal in rheumatoid elbows. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, 18:33-37, 2009

4. Hashimoto, J., Garnero, P., van der Heijde, D., 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 the progression of joint destruction in patients with rheumatoid arthritis treated with disease-modifying anti-rheumatic drugs. *Modern Rheumatology*, 19:273-282, 2009.

5. Hirao, M., Hashimoto, J., Tsuboi, H., Nampei, A., Nakahara, H., Yoshio, N., Mima, T., Yoshikawa, H., Nishimoto, N.: Laboratory and febrile features after joint surgery in rheumatoid arthritis patients treated with tocilizumab. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 68:654-657, 2009.

6. Hirohata, S., Yanagida, T., Tomita, T., Yoshikawa, H.: Differential influences of bucillamine and methotrexate on the generation of fibroblast-like cells from bone marrow CD34+ cells of rheumatoid arthritis patients, *International Immunopharmacology*, 9:86-90, 2009.

7. Kuriyama K, Hashimoto J, Murase T, Fujii M, Nampei A, Hirao M, Tsuboi H, Myoui A, Yoshikawa, H.: Treatment of juxta-articular intraosseous cystic lesions in rheumatoid arthritis patients with interconnected porous calcium hydroxyapatite ceramic. *Modern Rheumatology*, 19:180-186, 2009.

8. Morimoto D, Kuroda S, Kizawa T, Nomura K, Higuchi C, Yoshikawa, H., Tomita T.: Equivalent osteoblastic differentiation function of human



mesenchymal stem cells from rheumatoid arthritis in comparison with osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 48:643-649, 2009.

9. Take, Y., Nakata, K., Hashimoto, J., Tsuboi, H., Nishimoto, N., Ochi, T., Yoshikawa, H.: Specifically modified osteopontin in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes supports interaction with B cells and enhances production of interleukin-6.

*Arthritis Rheumatism*, 60:3591-3601, 2009.

10. Yamasaki, N., Hirao, M., Nampei, A., Tsuboi, H., Yoshikawa, H., Hashimoto, J.: High oxygen tension prolongs the survival of osteoclast precursors via macrophage colony-stimulating factor. *Bone*, 44:71-79, 2009.

## 2. 学会発表

1) 武 靖浩、中田研、吉川秀樹. RA 滑膜細胞発現のオステオポンチン: B 細胞の抱きこみ現象と IL-6 産生刺激 厚生労働省班会議報告会 2009 1 月 大阪

2) Take Y., Nakata K., Ochi T., Yoshikawa, H. Cell Surface Osteopontin Expressed by Rheumatoid Arthritis

Fibroblast-like Synoviocyte Induces IL-6 Production by Supporting

Cell-Cell Interaction with

B-lymphocyte. 55<sup>th</sup> Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, 2009

Feb. Las Vegas, Nevada, USA

3) Kanamoto T, Nakata K, Akamine K, Yoshikawa H. Alteration in

distribution of cytoskeletal proteins

in 3-dimensional cultured tissue of

human synovium-derived stem cell

and human meniscus cell with

collagen scaffold. 日本軟骨代謝学会

名古屋 2009 3 月

4) Akamine K, Nakata K, Kanamoto T, Yoshikawa H. Over-stress of cyclic compressive load on human synovium-derived cells in

three-dimensional collagen-based

cultured tissue induces prolonged

MMP-3 gene expression in an

intensity dependent manner 日本結合

組織学会 2009 6 月 湘南

5) Kanamoto T, Nakata K, Akamine K, Shimonura K, Yoshikawa H,

Alteration in distribution of

cytoskeletal proteins in

3-dimensional cultured tissue of

human synovium-derived stem cell

and human meniscus cell with

collagen scaffold. International

Cartilage Repair Society 2009 9

Miami USA

6) 武 靖浩、中田研、下村和範、神田秀之、赤峯勇哲、金本隆司、吉川秀樹

長時間の動的圧縮刺激はコラーゲンゲル内三次元培養半月細胞によるマトリ

ックスの再構成を促進する 日本整形

外科基礎学術集会 2009 10 月横浜

## F. 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

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）  
総合研究報告書

関節リウマチの重症度(病型) 予後診断法としてのC1q値に関する研究

分担研究者 島岡 康則 行岡医学研究会 行岡病院 副院長

関節リウマチの重症度、とくに骨破壊の指標を得ることは重要である。

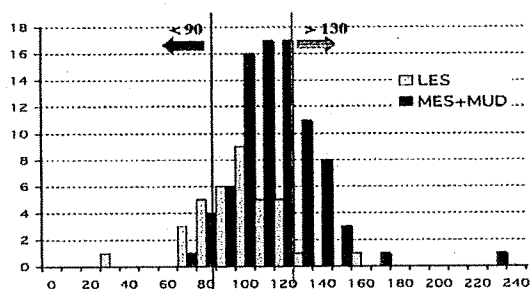
平成19年度までの研究で、ハイブリドーマにより新たに抗C1q抗体を作成し、10種類のモノクローナル抗体と2種のポリクローナル抗体を得た。それぞれの抗体により抗体固相を調整し、C1q検出・定量する新たなサンドイッチ法を開発した。さらに、ここから有用な4種の抗体を選択し、RA患者血清135検体を解析した。いずれの抗体についても、RA軽症型病型と、RA重症型病型で有意に異なる値を示すことがわかった。

優れた抗C1q抗体を用いた測定値は、RAのprognostic assessment parameter となり得ると考えられ、近年リウマチ重症度との関連が検討されている抗CCP抗体、MMP-3、IL-6とあわせて検討した。

A. 研究目的

関節リウマチの重症度、とくに骨破壊の指標を得ることは重要である。昨年までの研究で、他の臨床検査値に影響されず安定した値を示す4種の抗体によりC1q検出・定量する新たなサンドイッチ法を開発した。RA患者血清135検体を解析した結果、RA軽症型病型と、RA重症型病型で有意に異なる値を示すことがわかった。

<病型別C1q値の度数分布>



近年、prognostic assessment parameterとして、抗CCP抗体、MMP-3、IL-6などが重用視されており、これらの臨床検査値とあわせて、本研究でのC1q値を検討した。

B. 研究方法

RA患者血清76検体を、骨高度破壊を示す重症病型（多関節破壊型病型：MES、およびムチランス型病型：MUD）52検体と骨破壊のほとんど認めない軽症型病型（少関節破壊型病型：LES）24検体とに分類し、H19年度に開発した、新たな抗C1q抗体のうち結果が安定し、優れていると考えられた4種の抗体によりC1qを測定した。あわせて抗CCP抗体、MMP-3、IL-6についても測定し、RA骨破壊の重症度の assessment Parameterとしての有用性を検討した。

(倫理面への配慮)

患者に文書で同意を得るとともに、各検体は無記名にて番号のみで管理し、コンピュータ上でのみ、臨床データと照合できるように配慮した。

C. 研究結果

<臨床検査値のRA重症度判定における有用性>

	CRP	赤沈	RF	抗CCP#	IL-6	MMP-3
LES	0.3±0.4 (0.0 - 1.0)	35.6±15.0 (14 - 73)	126.5±213.8 (0 - 780)	56.8±45.6 (0 - 100)	7.0±7.6 (0 - 26)	130.6±15.0 (39 - 330)
MES	1.3±1.3	53.2±22.0	112.9±146.2	59.5±39.6	15.9±14.7	200.4±127.1
MUD	(0.0 - 5.0)	(21 - 113)	(0 - 605)	(0 - 100)	(2 - 53)	(51 - 486)
P =	0.004	0.009	0.804	0.842	0.022	0.064

臨床検査値のRA重症度判定に対する有用性の検討では、CRPは軽症病型(LES)で $0.3 \pm 0.4$ 、重症病型(MES,MUD)で $1.2 \pm 1.3$ と有為な差( $p=0.04$ )を認めた。赤沈(1時間値)も軽症病型で $35.6 \pm 15.0$ 、重症病型で $53.2 \pm 22.0$ と有為な差( $p=0.09$ )を認めた。これに対し、リウマチ因子(RF)、抗CCP抗体では、それぞれ $P=0.804$ 、 $P=0.842$ と、全く差異を認めなかった。IL-6は、軽症病型で $7.0 \pm 7.6$ 、重症病型で $15.9 \pm 14.7$ 、またMMP-3は、軽症病型で $130.6 \pm 15.0$ 、重症病型で $200.4 \pm 127.1$ と差異は認めしたが、有為ではなかった( $P=0.022$ 、 $P=0.064$ )。

<C1q値のRA重症度判定における有用性>

	No.33	No.40	No.54	No.76
LES	108.2 ± 22.3 (66 - 158)	102.7 ± 21.5 (79 - 168)	101.4 ± 25.6 (68 - 185)	106.0 ± 21.1 (71 - 173)
MES	118.6 ± 16.1	118.9 ± 17.2	117.3 ± 21.9	125.4 ± 21.3
MUD	(86 - 147)	(79 - 147)	(84 - 153)	(80 - 158)
P =	0.078	0.007	0.031	0.004

今回、我々が作成した方法によるC1q値は、抗体No.40で軽症病型で $102.7 \pm 21.5$ 、重症病型で $118.9 \pm 17.2$  ( $p=0.007$ )、抗体No.76で軽症病型で $106.0 \pm 21.1$ 、重症病型で $125.4 \pm 21.3$  ( $p=0.004$ )と有為の差を示した。

<臨床検査値の相関>

	CPK	LDH	CRP	RF	MMP-3	赤沈	抗CCP抗体	IL-6
CPK	1.00000	0.06774	-0.27736	-0.06042	0.03129	-0.26150	0.13905	-0.14986
LDH	0.06774	1.00000	0.22742	0.39940	0.12294	0.29242	0.40532	0.04455
CRP	-0.27736	0.22742	1.00000	0.39483	0.21999	0.73158	0.19713	0.58574
RF	-0.06042	0.39940	0.39483	1.00000	0.02114	0.47857	0.46230	0.08617
MMP-3	0.03129	0.12294	0.21999	0.02114	1.00000	0.34912	0.47092	0.24477
赤沈	-0.26150	0.29242	0.73158	0.47857	0.34912	1.00000	0.39141	0.42131
抗CCP抗体	0.13905	0.40532	0.19713	0.46230	0.47092	0.39141	1.00000	0.21136
IL-6	-0.14986	0.04455	0.58574	0.08617	0.24477	0.42131	0.21136	1.00000

各臨床検査値の相関では、CRPと赤沈は強い相関(0.732)を示した。MMP-3は抗CCP抗体と弱い相関(0.471)し、抗CCP抗体はRF、MMP-3と弱い相関(0.462, 0.471)を示した。IL-6はCRP、赤沈と弱い相関(0.586, 0.421)を示した。

<C1q値と臨床検査値の相関>

	CPK	LDH	CRP	RF	MMP-3	赤沈	抗CCP抗体	IL-6
No.33	0.20374	0.16387	0.29873	0.04474	0.17335	0.41165	0.17363	0.15738
No.40	-0.02434	0.22601	0.21779	-0.00089	0.09151	0.24556	-0.01761	-0.01976
No.54	-0.00224	0.17008	0.19450	0.02633	0.25348	0.28109	0.09553	0.12006
No.76	-0.03799	0.23782	0.23170	0.04681	0.26641	0.40532	0.18667	0.07913

新たに作成された抗C1q抗体によるC1q値は、抗体No.40、抗体No.54で、他の臨床検査値と全く相関を示さなかった。

D. 考察

越智らによるRA病型分類は、RAの骨破壊

の重症度をもとにした分類であり、本研究でのC1q値もRA骨破壊の重症度の指標となると考える。

今回、新たに開発された抗C1q抗体、および、その測定法は、臨床上有用と考えられているCRP、赤沈、血中IL-6に比較して、格段にRA重症度判定に有効であった。なかでも抗体No.40はRA重症度と関連し、他の臨床検査値とは独立した値をとることがわかった。

投薬内容や、変動する臨床検査値(CRPなど)に左右されない、RA重症度の指標が確立されることは、患者の予後判定、とくに骨破壊の予測をする上で非常に重要な知見であると考ええる。

E. 結論

優れた抗C1q抗体によるC1q値はRA重症度と関連し、他の臨床検査値とは独立した値をとることから、RAのprognostic assessment parameter となり得る。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書に記載とする。)

G. 研究発表

1. 論文発表

1)

Nakamura N, Shimaoka Y, Tougan T, Onda H, Okuzaki D, Zhao H, Fujimori A, Yabuta N, Nagamori I, Tanigawa A, Sato J, Oda T, Hayashida K, Suzuki R, Yukioka M, Nojima H, Ochi T.

Isolation and expression profiling of genes upregulated in bone marrow-derived mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients.

DNA Res. 2006 Aug 31;13(4):169-83.

2)

Toyosaki-Maeda T, Takano H, Tomita T, Tsuruta Y, Maeda-Tanimura M, Shimaoka Y, Takahashi T, Itoh T, Suzuki R, Ochi T.

Differentiation of monocytes into multinucleated giant bone-resorbing cells: two-step differentiation induced by nurse-like cells and cytokines.

Arthritis Res. 2001;3(5):306-10.

- 3) Hayashida K, Shimaoka Y, Ochi T, Lipsky PE. Rheumatoid arthritis synovial stromal cells inhibit apoptosis and up-regulate Bcl-xL expression by B cells in a CD49/CD29-CD106-dependent mechanism. J Immunol. 2000 Jan 15;164(2):1110-6.
- 4) Shimaoka Y, Attrep JF, Hirano T, Ishihara K, Suzuki R, Toyosaki T, Ochi T, Lipsky PE. Nurse-like cells from bone marrow and synovium of patients with rheumatoid arthritis promote survival and enhance function of human B cells. J Clin Invest. 1998 Aug 1;102(3):606-18.
- 5) Miyashita T, McIlraith MJ, Grammer AC, Miura Y, Attrep JF, Shimaoka Y, Lipsky PE. Bidirectional regulation of human B cell responses by CD40-CD40 ligand interactions. J Immunol. 1997 May 15;158(10):4620-33.
- 6) Imanaka T, Shichikawa K, Inoue K, Shimaoka Y, Takenaka Y, Wakitani S. Increase in age at onset of rheumatoid arthritis in Japan over a 30 year period. Ann Rheum Dis. 1997 May;56(5):313-6.
- 7) Tomita T, Shimaoka Y, Kashiwagi N, Hashimoto H, Kawamura S, Lee SB, Nakagawa S, Shiho O, Hayashida K, Ochi T. Enhanced expression of CD14 antigen on myeloid lineage cells derived from the bone marrow of patients with severe rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 1997 Mar;24(3):465-9.
- 8) Tomita T, Kashiwagi N, Shimaoka Y, Ikawa T, Tanabe M, Nakagawa S, Kawamura S, Denno K, Owaki H, Ochi T. Phenotypic characteristics of bone marrow cells in patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 1994 Sep;21(9):1608-14.
- 9) Tanabe M, Ochi T, Tomita T, Suzuki R, Sakata T, Shimaoka Y, Nakagawa S, Ono K. Remarkable elevation of interleukin 6 and interleukin 8 levels in the bone marrow serum of patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 1994 May;21(5):830-5.
- 10) Ochi T, Tomita T, Kimura T, Azuma F, Owaki H, Wakitani S, Shimaoka Y, Ono H. A concept to make schedules of therapies based on the natural courses of patients with rheumatoid arthritis. Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi. 1994 Jan;68(1):50-61.
- 11) Owaki H, Yukawa K, Ochi T, Shimaoka Y, Ono K. Facs analysis of myeloid differentiation stages in epiphyseal bone marrow, adjacent to joints affected with rheumatoid arthritis. Scand J Rheumatol. 1991;20(2):91-7.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
1. 特許取得  
主任研究者の指示のもとに検討中である。  
2. 実用新案登録  
主任研究者の指示のもとに検討中である。