

関節リウマチにおけるヒスタミンの病態生理学的役割と H4-受容体の関与に関する研究

分担研究者 大和谷 厚 大阪大学医学系研究科教授

研究要旨

免疫系の細胞にはヒスタミン H4 受容体が発現しており、炎症性サイトカインの刺激により、その発現が増加することが知られている。また、炎症性サイトカインはマクロファージにヒスタミン合成酵素を誘導し、*de novo* にヒスタミンを合成し、分泌することも知られている。そこで、本年度はマクロファージにおける TNF- $\alpha$  産生にヒスタミンがどのような役割を担っているかについて、マウス活性化マクロファージ様細胞株 (RAW264.7) を用い、ヒスタミンが TNF- $\alpha$  mRNA 発現に及ぼす作用を解析した。加えて、ヒスタミン受容体の各種アンタゴニストを用い、いずれのサブタイプが TNF- $\alpha$  mRNA 発現に関与しているか検討した。その結果、RAW264.7 細胞内の TNF- $\alpha$  mRNA 発現レベルはヒスタミンによって有意に抑制された。このヒスタミンによる抑制作用は、H4 アンタゴニストの JNJ7777120 をあらかじめ添加することによって用量依存的に阻害され、H4 アゴニストのディマプリットが、ヒスタミンと同様の TNF- $\alpha$  抑制作用を示した。

以上より、マクロファージにおいて、炎症性サイトカインにより *de novo* に合成されたヒスタミンが、H4 受容体を介して、オートクリン的に働き、マクロファージにおける TNF- $\alpha$  発現を抑制し、抗炎症的に働く可能性が示唆された。

A. 研究目的

生体内に侵入した細菌やウイルスによって活性化を受けたマクロファージは貪食作用や抗原の提示、サイトカインの産生などを行い、免疫に重要な役割を担っている。特に、活性化マクロファージが放出するサイトカインの中でも腫瘍壊死因子(TNF)- $\alpha$  はサイトカインカスケードの最上流に位置し、インターロイキン(IL)-1 $\beta$ 、IL-6 などをはじめとする他の炎症性サイトカインの産生を促している。炎症性サイトカインは、近傍の細胞の増殖、分化、活性化に関与するだけでなく、様々な炎症症状を惹起している。このため、関節リウマチなどの炎症疾患の治療において抗 TNF- $\alpha$  抗体が用いられ、一定の治療成績を収めている。ところで、血管拡張、血管透過性亢進などに関わる生体アミンのヒスタミンが持つ 4 つの受容体サブタイプ(H1R、H2R、H3R、H4R)

のうち、H1R、H2R、および H4R が炎症に関与するとの報告がある。また、関節リウマチの関節液中にヒスタミンが存在し、関節滑膜にはヒスタミン受容体が存在することが知られている。さらに、昨年度の研究によりヒスタミンが関節リウマチ滑膜細胞の MMP3 遺伝子発現を、および CD14+ 細胞の破骨細胞様多核細胞形成を抑制することを見いだした。そこで、本年度はマクロファージにおける TNF- $\alpha$  産生にヒスタミンがどのような役割を担っているかについて、マウス活性化マクロファージ様細胞株(RAW264.7)を用い、ヒスタミンが TNF- $\alpha$  mRNA 発現に及ぼす作用を解析した。加えて、ヒスタミン受容体の各種アンタゴニストを用い、いずれのサブタイプが TNF- $\alpha$  mRNA 発現に関与しているか検討した。

B. 研究方法

12well プレートに RAW264.7 (1 $\times$ 10<sup>6</sup>)

cells/well)を播種し、24時間インキュベートした。ヒスタミン( $1 \times 10^{-8}$ – $1 \times 10^{-6}$ M)添加3時間後に細胞内の全RNAをQIAGEN社のRNeasy Mini Kitを用いて抽出した。また、ヒスタミン( $1 \times 10^{-6}$ M)の添加15分前に、H1R、H2R、およびH4Rのアンタゴニストであるメピラミン、ファモチジンおよびJNJ7777120をそれぞれ $1 \times 10^{-6}$ M添加したもの、あるいはH4Rアゴニストのディマプリット( $1 \times 10^{-8}$ – $1 \times 10^{-6}$ M)を単独添加したものにおいても同様にRNAを抽出した。抽出したRNAから各条件におけるTNF- $\alpha$  mRNA発現量の変化をRT-PCR法により調べた。

### C. 結果

RAW264.7細胞内のTNF- $\alpha$  mRNA発現レベルはヒスタミンによって有意に抑制された。このヒスタミンによる抑制作用は、H4RアンタゴニストのJNJ7777120をあらかじめ添加することによって用量依存的に阻害されたが、H1Rアンタゴニストのメピラミン、H2Rアンタゴニストのファモチジンでは阻害されなかった。また、H4Rアゴニストのディマプリットが、ヒスタミンと同様のTNF- $\alpha$ 抑制作用を示した。

### D. 考察および結論

RAW264.7細胞におけるヒスタミンのTNF- $\alpha$ 抑制作用は、各受容体サブタイプの中でもH4Rを介して惹き起こされると考えられた。

一方、炎症性サイトカインによりマクロファージにヒスタミンの合成酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素が誘導され、de novoに合成されたヒスタミンが分泌されることも知られている。今回の結果と併せて考えると、マクロファージにおいて、炎症性サイトカインによりde novoに合成されたヒスタミンが、これもまた炎症性サイトカインにより発現したH4Rを介して、オーソクリン的に働き、マクロファージにおけるTNF- $\alpha$ 発現を抑制し、抗炎症的に働く可能性が示唆された。このことより、H4作動薬のリウマチなど炎症性疾患の治療薬となり得る可能性が考えられた。

### E. 研究発表

#### 学会発表

大豊裕一、山本浩一、室谷知孝、中村侑亮、浅野景子、大和谷厚  
シスプラチンによるRAW264.7細胞内TNF- $\alpha$ 発現へのヒスタミンの関与  
第83回日本薬理学会年会  
平成22年3月16日(大阪)

### (iii) 病因物質の遺伝子探求

1. RA ナース細胞により惹起される自己反応性リンパ球の増殖に関する研究
2. 関節リウマチ・骨粗鬆症の重症化防止治療開発研究

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

RA ナース細胞により惹起される自己反応性リンパ球の増殖に関する研究

分担研究者 鈴木 隆二

(独)相模原病院 臨床研究センター 病態総合研究部 診断・治療研究室長

分担研究者 前田 朋子

塩野義製薬株式会社 創薬研究所 疾患ターゲット探索部門 主任研究員

研究要旨

RA ナース細胞由来抗原に反応する T 細胞が RA 患者末梢血中に高頻度に存在する可能性が示唆された。また、RA ナース細胞が特定の B 細胞を選択的に増殖・活性化する可能性が高まった。

A. 研究目的

RA ナース細胞が患者における異常な骨破壊と免疫応答を惹起する要因となっていることは、主任研究者をはじめ国内外の研究者により報告されている。今年度は RA ナース細胞が異常な免疫環境を構築する機序・機構を解明するために、RA 患者末梢血 T 細胞のナース細胞由来抗原への反応性、ナース細胞の存在下における健常人 B 細胞の増殖について以下の検討を実施した。

B. 方法

1) RA 患者末梢血の RA ナース細胞由来抗原に対する反応性の検討

(医)行岡病院よりインフォームドコンセントを経て採取された RA 患者末梢血 17 例および健常人ボランティア末梢血 10 例より ficoll 法にて末梢血単核球を分離した。抗原として、RA 滑膜組織由来 T 細胞の認識する抗原 A の C 末端より 265 残基までのリコンビナント蛋白を精製、抗原とし、抗原存在下における患者および健常人末梢血の増殖活性を 10% FBS/RPMI1640、7.5% CO<sub>2</sub> 存在下、72 時間培養後の 3H-thymidine の取り込みにより測定した。

2) 健常人 4 例の末梢血より B 細胞を分離し 10% FBS/45% RPMI1640/45% DMEM、7.5% CO<sub>2</sub> 存在下で RA ナース細胞との共培養を実施した。約 30 日間の共培養後、RA ナース細胞依存性に増殖した細胞株の培養上清に産生される免疫グロブリンの反応性を検討すると共に、株化細胞をさらにクローニングし、その VH レパトア解析を実施

した。

(倫理面への配慮)

RA 患者および健常人からの末梢血、RA 患者からの滑膜組織取得に当たっては、各研究実施施設における研究倫理委員会において事前に承認を受け、十分なインフォームドコンセントの下、提供者の自由意思に基づいた検体提供を受けた。

C. 結果

1) 10 例の健常人末梢血由来単核球は RA ナース細胞由来抗原に対し増殖活性を示さなかったのに対し、RA 患者末梢血由来単核球は 17 例中 14 例が中程度から強い増殖活性 (stimulation index: 5.38 - 50.35) を示した。今までに解析した患者および健常人 HLA allele に共通の特徴は存在しなかった。

2) 健常人全例の末梢血 B 細胞は RA ナース細胞存在下で増殖した。ナース細胞依存性に増殖する B 細胞クローンの VH レパトア(現在解析中)は培養前と比較しオリゴクローナルとなる傾向を見出した。また、株化細胞の培養上清中のイムノグロブリンは、IgG/A/M であり、一部に RA ナース細胞に反応する自己抗体の存在を確認した。

D. 考察

RA ナース細胞由来抗原 A は、自己抗原として患者末梢血に認識される頻度が非常に高いことから (82.4%)、これに反応する T 細胞の頻度やそのマーカー・サイトカイン産生能等の機能に関する

る詳細な解析が RA 発症・病態形成機構の解明の一助となると考えられる。

また、健常人 B 細胞が RA ナース細胞により増殖すること自体は島岡ら(J. Clin. Invest.,1998)をはじめとしてすでに報告があるが、今回のレパトア解析を通じ、RA ナース細胞が骨髄・滑膜病変部において B 細胞の再分化と自己反応性の獲得にも関与している可能性が考えられた。これを示すためには、オリゴクローナル化した B 細胞の表面抗原の解析や、B 細胞レパトアが RA ナース細胞によりオリゴクローナル化する機序の解明等が必要である。

#### E. 結論

RA ナース細胞由来抗原に反応する T 細胞が末梢血中に高頻度に存在する可能性が示唆された。また、RA ナース細胞が特定の B 細胞を選択的に増殖・活性化する可能性が強まった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nurse-like cells reside in the synovial tissue and bone marrow in rheumatoid arthritis. Takahiro Ochi, Hideki Yoshikawa, Tomoko Toyosaki-Maeda and Peter E Lipsky. Arthritis Res Ther 9:201, 2007.

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

Chiaki Wakasa-Morimoto, Tomoko Toyosaki-Maeda, Ryuji Suzuki et al. Intl.Immunol. 20:1331, 2008.

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・骨粗鬆症の重症化防止治療開発研究

課題番号：

主任研究者：越智隆弘

分担研究者：所属機関 熊本大学生命資源研究・支援センター 教授  
氏名 山村 研一

A 研究目的

関節リウマチや骨粗しょう症に関係することが推定される遺伝子に関して、トランスジェニックマウスや遺伝子破壊マウスを作製し、これらのモデルマウスを解析することにより、これらの遺伝子が関節リウマチや骨粗しょう症と関連するかどうか、関連するとすれば発症過程のいつ関与するのか、そしてその分子機構がなにであるのかを明らかにするのが、本研究の目的である。

B 研究方法

- (1) 3つの遺伝子 *Tnfsf14*, *Granulin*, *Sirpa* について、トランスジェニックマウスを作製したが、ファウンダーが得られないか、もしくは精巣が委縮し次世代が得られなかった。
- (2) そこで、*Tnfsf14* について、遺伝子発現誘導系での発現を目指すことにした。
- (3) 2つのコンストラクトを準備し、それぞれトランスジェニックマウスを作製する。
  - 1) CLIP-Cre-ERT2-polyA  
このマウスでは、Cre と ERT2 の融合タンパクができ、軟骨で発現するが、細胞質にとどまったままとなる。したがって、Cre は作用できない。
  - 2) CAG-lox-CAT-lox-*Tnfsf14*-polyA  
このマウスでは、最初は CAT が発現し、*Tnfsf14* は発現しない。
- (4) 上記の2種類のトランスジェニックマウスを交配し、2つの遺伝子を持つマウスを作製する。この状況下で、tamoxifen を投与すると、これが細胞質にある Cre-ERT2 の ERT2 部分と結合し、Cre-ERT2 が、核内に移行する。そうすると Cre によって、loxP 配列間で組換えが起こり、CAT が除去され、*Tnfsf14* が発現するようになる。この方法で、任意の時期に *Tnfsf14* を発現させることができる。

(倫理面への配慮)

遺伝子改変マウスの作製と使用に関する動物実験計画書および遺伝子組換え実験申請を行い、動物実験指針および法律を遵守して、実験を行う予定である。

C 研究結果

(1) CILP-Cre-ERT2-polyA

cartilage intermediate layer protein (CILP) 遺伝子については Smad に対する反応に転写開始点上流 3k までが必要であることが示されているので、上流 3.5 kb のプロモーター配列を含むプラスミドを理化学研究所・ゲノム医科学研究センター骨関節疾患研究チーム池川志郎博士より入手した。一方、マウスのエストロゲンレセプター遺伝子に、1997年に Chamborn の報告した T2 変異を加え、さらに、メチル化を受けやすい CpG 配列を減らした遺伝子を作成、Cre 遺伝子の 3' 側にフレームを合わせて接続した。両者をつなぎ、CLIP-Cre-ERT2-polyA を作製した。マイクロインジェクションによるトランスジェニックマウス作製では、挿入場所により受ける位置効果が異なるため、発現の見られないラインや、発現場所が異なるラインが得られる可能性がある。そこで、*Et14/Skt* 遺伝子にトラップベクターが挿入されている ES クローン (Ayu21-T288) を利用し、そこに、Cre/ 変異 lox による組み換えで CILP-promoter-Cre-mERT2-PA を挿入することとした。このため、挿入に必要な変異 lox 配列や、薬剤耐性遺伝子を組み込んだ、LoxKR3-CILPpromoter-Cre-mERT<sup>2</sup>-pA-FRT-PGK-Puro-FRT-loxP という挿入プラスミドを構築し、ES 細胞に導入し、挿入クローンを確認した。今後キメラ作製を行う。

(2) CAG-lox-CAT-lox-*Tnfsf14*-polyA

CAG-lox-CAT-lox-と *Tnfsf14*-polyA を接続し、受精卵に注入し、マウスが生まれて

いるので、現在トランスジェニックマウスをスクリーニング中である。

分子生物学会年会, December 9-12, 2009, 横浜

#### D. 考察

EEF1a1, Sulfatase, CLR1 については、順調にトランスジェニックマウスの作成が可能であった。しかし、3つの遺伝子 Tnfsf14, Granulin, Sirpa については、それが強く発現すると胚発生もしくは精子形成に障害がおこることが明らかとなった。このような場合には、Tamoxifen 投与時に、発現を誘導する方法が有効と考えられた。

#### E. 結論

ヒト疾患の病因・病態解析の解明には、単純な遺伝子破壊マウスやトランスジェニックマウスだけではなく、条件的遺伝子破壊や条件的遺伝子発現のできるマウス、さらに種々の異なった変異を導入したマウスが必要である。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ①Araki, K., Takeda, T., Yoshiki, A., Obata, Y., Nakagata, N., Shiroishi, T., Moriwaki, K. and Yamamura K. Establishment of germline-competent embryonic stem cell lines from the MSM/Ms strain. *Mammal. Genome* 20: 14-20, 2009.
- ②Araki, M., Araki, K. and Yamamura, K. International gene trap project: towards gene-driven saturation mutagenesis in mice. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 10: 221-229, 2009.
- ③Nakagata, N and Yamamura, K. Current activities of CARD as an international core center for mouse resources. *Exp. Animals* 58: 343-350, 2009.

##### 2. 学会発表

- ①山村研一：ノックアウトマウスプロジェクトはなぜ必要か（シンポジウム），第56回日本実験動物学会総会，2009.5.14-16，埼玉
- ②荒木喜美，平山知実，作村由美，荒木正健，山村研一：可変型遺伝子トラップクローンを利用したトランスジェニックマウス作製システムの構築，第56回日本実験動物学会総会，2009.5.14-16，埼玉
- ③吉信公美子，来海葉子，廣田貴子，古閑成美，江上稔子，作村由美，荒木喜美，山村研一，荒木正健：Gene Expression Profiles of Exchangeable Gene Trap Mice，第32回日本

#### H. 知的財産権の出願・取得状況

なし

## (iv) RA患者骨髄細胞遺伝子

1. DNA マイクロアレイとバイオインフォマティクスを用いた RA 関連遺伝子の解析  
-RA 患者骨髄細胞における免疫機能関連分子の遺伝子発現異常とネットワーク解析-



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

DNA マイクロアレイとバイオインフォマティクスを用いた RA 関連遺伝子の解析  
- RA 患者骨髄細胞における免疫機能関連分子の遺伝子発現異常とネットワーク解析-

研究分担者 西本憲弘 和歌山県立医科大学免疫制御学講座 教授

研究要旨

関節リウマチ(RA)の病態形成には骨髄の異常が関わっていると考えられる。そこで骨髄細胞で発現する遺伝子を、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析し、変形性関節症(OA)のそれと比較することで、RAに特徴的な遺伝子発現プロファイルの解析を行った。さらに、骨髄単核球で異常発現する分子群の機能に基づくオントロジー解析ならびに分子間ネットワーク解析を行い、骨髄における機能異常ならびにそれに関わる分子間の相互作用を検討した。その結果、RA患者の骨髄では、「免疫」、「細胞内シグナルカスケード」、「タンパクのリン酸化」、「RNAのスプライシング」、「細胞の構造」にかかわる分子の発現が有意に増加しており、「細胞分裂」、「cell cycleの制御」、「DNAの複製」、そして「細胞の構造」に関わる分子発現が低下していた。免疫機能分子のネットワーク解析では、インターフェロン刺激により誘導される分子群の発現増加をはじめ免疫能の亢進が示唆された。

A. 研究目的

関節リウマチ(RA)は関節破壊を特徴とする原因不明の全身性炎症性自己免疫疾患であるが、その病態形成には骨髄の異常が関わっていると考えられる。そこで骨髄細胞で発現する遺伝子を、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析し、変形性関節症(OA)のそれと比較することで、RAに特徴的な遺伝子発現プロファイルを明らかにする。さらに、骨髄細胞で異常発現する分子群の機能に基づくオントロジー解析ならびに分子間ネットワーク解析を行い、骨髄における機能異常ならびにそれに関わる分子間の相互作用を明らかにする。

B. 研究方法

9例のRA患者の骨髄単核球からTotal RNAを抽出し、54679遺伝子オリゴDNA搭載マイクロアレイ(Affymetrix社Genechip®)を用いて網羅的に測定し、10例のOA患者のそれと比較して発現が変動している遺伝子を特定

した。それらの分子の機能分類(gene ontology)に基づきExpression Analysis Systemic Explorer(EASE)®バージョン2.0を用いて、骨髄における機能異常を検討した。さらに「免疫」に関与する分子群の分子間相互作用をIngenuity Pathways Analysis(IPA)®バージョン7.5.を用いて解析した。  
(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

RA患者の骨髄では、OA患者に比べ764分子の発現が増加し、1910分子の発現が低下していた。これらの分子機能に基づくEASE解析の結果、発現が増加している分子は、「免疫」、「細胞内シグナルカスケード」、「タンパクのリン酸化」、「RNAのスプライシング」、「細胞

の構造」にかかわる分子が有意に含まれており、これらの機能に異常が存在する可能性が示唆された。一方、発現が低下していた分子からは、「細胞分裂」、「cell cycleの制御」、「DNAの複製」、そして「細胞の構造」に関わる分子が含まれており、細胞増殖の抑制が示唆された。次に、「免疫」機能に分類される分子群のネットワーク解析を行ったところ、インターフェロン(IFN) $\alpha$ 、IFN $\beta$ 、IFN $\gamma$ 、Interleukin(IL)-12、MYD88、NF $\kappa$ B、MHC class I complex等がひとつのネットワークとして描出され、また、その周辺部にはIFNで誘導される分子群 IFN-inducible molecules (IFITM1, IFITM2, IFITM3, IFI16, and IFI35)が見られた。IFN $\alpha$ とIFN $\beta$ の発現そのものは骨髄では増加していなかったが、IFNで誘導される分子群の発現が増加していたことから、RA骨髄ではIFNの刺激を受けていることが示唆された。他にIL-8、IL-2 receptor (IL-2R)、IL-4R、IL-7Rなどサイトカインあるいはレセプターの発現増加も見られた。MHC class Iに分類されるHLA-E、HLA-F、HLA-G、抗原提示に関与するtapasin (TAP)とTAP binding protein (TAPBP)の発現も増加し、骨髄においても抗原提示機能の亢進が示唆された。

第2のネットワークは、主に転写因子が中心で、AP1、Rac、ERK、MAP kinase (MAPK) 14、TNFSF8、Kruppel-like factor (KLF) 6、またCD46とCD24、FCGRなどが含まれた。

第3のネットワークはIFN $\gamma$ とP38MAPKを中心としたネットワークである。Proteasomes、2種類のC type lectin family molecules (CLEC5A and CLEC4E)とCXCR4も含まれていた。最後の第4ネットワークは、hepatocyte nuclear factor (HNF)1A、HNF4A、and transforming growth factor (TGF)  $\beta$  1を含んでいた。

#### D. 考察

骨髄由来単核球で免疫機能の亢進が存在したことは、従来報告されてきたRAにおける骨髄異常の存在を支持する。と同時に、免疫担

当細胞の源である骨髄において、すでに抗原提示に基づく特異的免疫応答が行われている可能性がある。一方、細胞分裂が本来盛んな骨髄において、細胞増殖抑制が示唆された。当初MTXの使用と関連すると考えたが、その後の検討でMTX未使用の患者でも低下が見られ、RAではOAに比べて骨髄単核球の分裂能の低下が示唆される。骨髄全血での検討では逆に細胞増殖が亢進していたことから、単核球の分離による影響が考えられた。単核球分画は有意に赤芽球が濃縮されていることから、赤芽球の分裂抑制の可能性が示唆された。これは、慢性炎症により、造血抑制がかかっている可能性を示唆する。この現象についてはさらなる検討が必要である。

#### E. 結論

RAの骨髄細胞における免疫反応の亢進が示唆された。同時に、骨髄細胞の増殖抑制も示唆された。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Azuma J, Kishimoto T. Study of active controlled tocilizumab monotherapy for rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to methotrexate (SATORI): significant reduction in disease activity and serum vascular endothelial growth factor by IL-6 receptor inhibition therapy. *Mod Rheumatol*.19:12-19, 2009
2. Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Azuma J. Long-term safety and efficacy of tocilizumab, an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody, in monotherapy, in patients with rheumatoid arthritis (the STREAM study): evidence of safety and efficacy in a 5-year extension study. *Ann Rheum Dis*.

- 68:1580-1584, 2009.
3. Mima T, Nishimoto N. Clinical value of blocking IL-6 receptor. *Curr Opin Rheumatol* 21:224-30, 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 Progression of Joint Destruction in Patients with Rheumatoid Arthritis treated with Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs. *Mod Rheumatol* 19:273-82, 2009.
  5. 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 IL-6 production. *Arthritis Rheum* 60:3591-3601, 2009
  6. Nishimoto N, Ito K, Takagi N. Safety and efficacy profiles of tocilizumab monotherapy in Japanese patients with rheumatoid arthritis – meta-analysis of 6 initial trials and 5 long-term extensions -. *Mod Rheumatol* (in press).
  7. Nishimoto N. Interleukin-6 as a therapeutic target in candidate inflammatory diseases. *Clin Pharmacol Ther* (in press).
  8. Sugino H, Hooi-Ming L, Nishimoto N. DNA microarray analysis of rheumatoid arthritis susceptibility genes identified by genome-wide association studies (GWAS). *Arthritis Res Ther* (in press)
1. 学会発表
1. 西本憲弘. RA の関節破壊における IL-6 の重要性. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会シンポジウムサテライトシンポジウム サイトカインネットワークと関節破壊 - 何を狙うべきか - 東京. 2009.4.23-26
  2. 西本憲弘. 関節リウマチに対する IL-6 阻害治療の効果発現メカニズムと効果予測. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会サテライトシンポジウム. 東京. 2009.4.24-26
  3. 美馬 亨, 西本憲弘. トシリズマブの TNF 阻害剤抵抗性関節リウマチに対する第Ⅲ相試験-有効性と安全性ならびに IL-6 阻害による IL-17 の変化. 第 53 回日本リウマチ学会. 東京. 2009.4.23-26
  4. 西本憲弘, 美馬亨, 川田祐一. RA 患者に対するトシリズマブの治療効果は DNA チップを用いて予測可能である. 第 53 回日本リウマチ学会ワークショップトシリズマブ. 東京. 2009.4.25
  5. 橋本 淳, 平尾 眞, 坪井秀規, 南平昭豪, 中原英子, 吉雄直子, 美馬 亨, 吉川秀樹, 西本憲弘. 抗 IL-6 使用下での周術期の問題点と対策. 第 53 回日本リウマチ学会学術集会サテライトシンポジウム. 東京. 2009.4.23-26
  6. 平尾 眞, 南平昭豪, 小瀬弘樹, 坪井秀規, 吉川秀樹, 西本憲弘, 橋本 淳. 関節リウマチにおけるトシリズマブ治療の酸化ストレスへの影響. 第 53 回日本リウマチ学会ワークショップトシリズマブ. 東京. 2009.4.24
  7. 都留智巳, 美馬 亨, 洲崎みどり, 中島 衡, 寺尾公男, 笥 高裕, 西本憲弘. トシリズマブによる IL-6 阻害治療中の関節リウマチ患者におけるインフルエンザワクチンに対する免疫反応の検討-TNF 阻害薬、DMARDs 治療中関節リウマチ患者との比較-. 第 53 回日本リウマチ学会ワークショップトシリズマブ 3. 東京. 2009.4.24
  8. 西本憲弘. 関節リウマチ(RA) 治療の最前線=テーラーメイド診療実際-. 第 37 回日本免疫学会・学術集会. 大阪. 2009.12.4
  9. Nishimoto N, Sugino H, Aoki C, Lee H, Matsubara K, Mima T. Gene expression profiling of S100 protein families in the peripheral blood from patients with RA, SLE, polyJIA and sJIA-correlation between S100A4 expression and joint destruction-. *EULAR2009*. Copenhagen. Denmark. 2009. 6.12
  10. Tsuru T, Terao K, Suzuki M, Nakashima H, Akiyama A, Nishimoto N. Normalisation in serum IL-6 levels is a good biomarker for the patients who can cease the corticosteroid

without flare during IL-6 receptor inhibition therapy with tocilizumab. EULAR2009. Copenhagen. Denmark. 2009.6.10-13

11. Nishimoto N, Kawata Y, Aoki C, Mima T. Gene expression profile in peripheral blood cells at baseline predicts tocilizumab responsiveness of patients with rheumatoid arthritis. EULAR2009. Copenhagen. Denmark. 2009.6.12
12. Nishimoto N, Kawata Y, Lee HM, Aoki C, Adachi Y, Sugino H, Imagawa T, Mori M, Tomiita M, Iwata N, Murata T, Miyoshi M, Takei S, Aihara Y, Ochi T, Yokota S. The peripheral blood genes that account for predictability of clinical response to tocilizumab (TCZ) treatment, corticosteroid dose reduction, and serum IL-6 normalization at week 48 on systemic onset juvenile idiopathic arthritis (sJIA) patients. ACR/ARHP2009.Philadelphia.USA. 2009.10.16-23
13. Sugino H, Aoki C, Lee H, Adachi Y, Matsubara K, Ochi T, Nishimoto N. About half of S100 cluster genes on chromosome 1q21.1 are up-regulated in patients with rheumatoid arthritis (RA), systemic lupus erythematosus (SLE), polyarticular type juvenile idiopathic. ACR/ARHP2009. Philadelphia. USA. 2009.10.16-23
14. Lee H, Sugino H, Adachi Y, Aoki C, Ochi T, Nishimoto N. DNA Microarray Analysis Revealed Abnormal Networks of Immune Response Molecules in Bone Marrow Cells From Patients with Rheumatoid Arthritis. ACR/ARHP2009.Philadelphia.USA.2009.10.16-23
15. Nishimoto N. Tocilizumab, a new therapeutic antibody inhibiting IL-6 action, for immune inflammatory diseases including rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis. - Mechanisms of action and prediction for the clinical efficacy using DNA microarray -. 2nd International Conference on Drug Discovery & Therapy. Dubai. UAE. 2010.2.4

1. 特許取得  
特記すべきことなし。
2. 実用新案登録  
特記すべきことなし。
3. その他  
特記すべきことなし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

### Ⅲ.研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

## 書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の<br>編集者名 | 書 籍 名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------|---------|---------------|-------|------|-----|-----|-----|
|      |         |               |       |      |     |     |     |
|      |         |               |       |      |     |     |     |
|      |         |               |       |      |     |     |     |

## 雑誌

| 発表者氏名                  | 論文タイトル名   | 発表誌名               | 巻号            | ページ           | 出版年  |
|------------------------|---|--------------------|---------------|---------------|------|
| Nagata, S. et al.      | Autoimmunity and the Clearance of Dead Cells.   | Cell               | in press      |               | 2010 |
| Nagasaka, A. et al.    | Apaf-1-independent programmed cell death in mouse development.                                      | Cell Death Differ. | in press      |               | 2009 |
| Okabe, Y. et al.       | Regulation of the innate immune response by threonine-phosphatase of Eyes absent.                   | Nature.            | 460<br>(7254) | 520<br>-524   | 2009 |
| Dasgupta, S. K. et al. | Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles.  | Blood              | 113<br>(6)    | 1332<br>-1339 | 2009 |
| Strasser, A. et al.    | The Many Roles of FAS Receptor Signaling in the Immune System.                                      | Immunity           | 30<br>(2)     | 180<br>-192   | 2009 |
| Galluzzi, L. et al.    | Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. | Cell Death Differ  | 16<br>(8)     | 1093<br>-1107 | 2009 |

## 研究成果の刊行に関する一覧表

|  |       | 課題番号  | H20-免疫一般-002   |
|--|-------|-------|--|
|  |       | 氏名    | 吉川 秀樹  |
| 刊行書籍又は雑誌名<br>(雑誌のときは雑誌名、<br>巻号数、論文名)   | 刊行年月日 | 刊行書店名 | 執筆者氏名  |
| 1. Adenovirus-mediated gene transfer of adiponectin reduces the severity of collagen-induced arthritis in mice. BBRC, 378:186-191  | 2009  |       | Ebina, K., Oshima, K., Matsuda, M., Fukuhara, A., Maeda, K., Kihara, S., Hashimoto, J., Ochi, T., Banda, N.K., <u>Yoshikawa, H.</u> , Shimomura, I.                  |
| 2. Serum adiponectin concentrations correlate with severity of rheumatoid arthritis evaluated by extent of joint destruction. Clinical Rheumatology, 28:445-451  | 2009  |       | Ebina, K., Fukuhara, A., Ando, W., Hirao, M., Koga, T., Oshima, K., Matsuda, M., Maeda, K., Nakamura, T., Ochi, T., Shimomura I, <u>Yoshikawa, H.</u> , Hashimoto J. |
| 3. Morphologic analysis of the medullary canal in rheumatoid elbows. Journal of Shoulder and Elbow Surgery, 18:33-37   | 2009  |       | Goto A, Murase T, Hashimoto J, Oka K, <u>Yoshikawa, H.</u> , Sugamoto K.   |
| 4. 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  |       | Hashimoto, J., Garnero, P., van der Heijde, D., Miyasaka, N., Yamamoto, K., Kawai, S., Takeuchi, T., <u>Yoshikawa, H.</u> , Nishimoto, N.                            |
| 5. Laboratory and febrile features after joint surgery in rheumatoid arthritis patients treated with tocilizumab. Annals of the Rheumatic Diseases, 68:654-657   | 2009  |       | Hirao, M., Hashimoto, J., Tsuboi, H., Nampei, A., Nakahara, H., Yoshio, N., Mima, T., <u>Yoshikawa, H.</u> , Nishimoto, N.   |
| 6. 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  |       | Hirohata, S., Yanagida, T., Tomita, T., <u>Yoshikawa, H.</u>   |
| 7. Treatment of juxta-articular intraosseous cystic lesions in rheumatoid arthritis patients with interconnected porous calcium hydroxyapatite ceramic. Modern Rheumatology, 19:180-186  | 2009  |       | Kuriyama K, Hashimoto J, Murase T, Fujii M, Nampei A, Hirao M, Tsuboi H, Myoui A, <u>Yoshikawa, H.</u>   |
| 8. Equivalent osteoblastic differentiation function of human mesenchymal stem cells from rheumatoid arthritis in comparison with osteoarthritis. Rheumatology (Oxford), 48:643-649   | 2009  |       | Morimoto D, Kuroda S, Kizawa T, Nomura K, Higuchi C, <u>Yoshikawa, H.</u> , Tomita T.  |
| 9. 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  |       | Take, Y., Nakata, K., Hashimoto, J., Tsuboi, H., Nishimoto, N., Ochi, T., <u>Yoshikawa, H.</u>   |
| 10. High oxygen tension prolongs the survival of osteoclast precursors via macrophage colony-stimulating factor. Bone, 44:71-79  | 2009  |       | Yamasaki, N., Hirao, M., Nampei, A., Tsuboi, H., <u>Yoshikawa, H.</u> , Hashimoto, J.  |

## 作成上の留意事項

- 1 この表に記入した書籍又は雑誌は、その刊行物又は別刷り一部を添付すること。
- 2 日本工業規格A列4番の用紙を用いること。各項目の記入量に応じて、適宜、欄を引き伸ばして差し支えない。
- 3 当該事業に関する研究成果を記載することとし、該当がない場合も、「該当なし」と記入して提出すること。
- 4 主任研究者及び分担研究者全員は、それぞれ自分の分を作成すること。

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名   | 論文タイトル名  | 発表誌名           | 巻号        | ページ    | 出版年  |
|---|--|----------------|-----------|--------|------|
| Nakamura N,<br><u>Shimaoka Y.</u><br>Tougan T,<br>Onda H,<br>Okuzaki D,<br>Zhao H,<br>Fujimori A,<br>Yabuta N,<br>Nagamori I,<br>Tanigawa A,<br>Sato J,<br>Oda T,<br>Hayashida K,<br>Suzuki R, Yukioka<br>M, Nojima H,<br>Ochi T. | Isolation and expression<br>profiling of genes<br>upregulated in bone<br>marrow-derived<br>mononuclear cells of<br>rheumatoid arthritis<br>patients.                   | DNA Res.       | 31;13(4)  | 169-83 | 2006 |
| Toyosaki-Maeda T,<br>Takano H,<br>Tomita T,<br>Tsuruta Y, Maeda-<br>Tanimura M,<br><u>Shimaoka Y.</u><br>Takahashi T,<br>Itoh T,<br>Suzuki R,<br>Ochi T.  | Differentiation of<br>monocytes into<br>multinucleated giant<br>bone-resorbing cells:<br>two-step differentiation<br>induced by nurse-like<br>cells and cytokines.     | Arthritis Res. | 3(5)      | 306-10 | 2001 |
| Hayashida K,<br><u>Shimaoka Y.</u><br>Ochi T,<br>Lipsky PE.   | Rheumatoid arthritis<br>synovial stromal cells<br>inhibit apoptosis and<br>up-regulate Bcl-xL<br>expression by B cells in<br>a CD49/CD29-CD106<br>dependent mechanism. | J Immunol.     | 15;164(2) | 1110-6 | 2000 |
| <u>Shimaoka Y.</u><br>Attrep JF,<br>Hirano T,<br>Ishihara K,<br>Suzuki R,<br>Toyosaki T,<br>Ochi T,<br>Lipsky PE.   | Nurse-like cells from<br>bone marrow and<br>synovium of patients<br>with rheumatoid arthritis<br>promote survival and<br>enhance function of<br>human B cells.         | J Clin Invest. | 1;102(3)  | 606-18 | 1998 |



|  |   |   |            |         |      |
|--|---|---|------------|---------|------|
| Miyashita T,<br>McIlraith MJ,<br>Grammer AC,<br>Miura Y,<br>Attrep JF,<br><u>Shimaoka Y</u> ,<br>Lipsky PE.                                      | Bidirectional regulation<br>of human B cell<br>responses by<br>CD40-CD40 ligand<br>interactions.  | J Immunol.                                | 15;158(10) | 4620-33 | 1997 |
| Imanaka T,<br>Shichikawa K,<br>Inoue K, <u>Shimaoka</u><br><u>Y</u> , Takenaka Y,<br>Wakitani S.   | Increase in age at onset<br>of rheumatoid arthritis in<br>Japan over a 30 year<br>period.   | Ann Rheum<br>Dis.                         | 56(5)      | 313-6   | 1997 |
| Tomita T,<br><u>Shimaoka Y</u> ,<br>Kashiwagi N,<br>Hashimoto H,<br>Kawamura S,<br>Lee SB,<br>Nakagawa S,<br>Shiho O,<br>Hayashida K,<br>Ochi T. | Enhanced expression of<br>CD14 antigen on<br>myeloid lineage cells<br>derived from the bone<br>marrow of patients with<br>severe rheumatoid<br>arthritis. | J<br>Rheumatol.                           | 24(3)      | 465-9   | 1997 |
| Tomita T,<br>Kashiwagi N,<br><u>Shimaoka Y</u> ,<br>Ikawa T,<br>Tanabe M,<br>Nakagawa S,<br>Kawamura S,<br>Denno K,<br>Owaki H,<br>Ochi T.       | Phenotypic<br>characteristics of bone<br>marrow cells in patients<br>with rheumatoid arthritis.   | J Rheumatol.                              | 21(9)      | 1608-14 | 1994 |
| Tanabe M,<br>Ochi T,<br>Tomita T,<br>Suzuki R,<br>Sakata T,<br><u>Shimaoka Y</u> ,<br>Nakagawa S,<br>Ono K.                                      | Remarkable elevation of<br>interleukin 6 and<br>interleukin 8 levels in the<br>bone marrow serum of<br>patients with rheumatoid<br>arthritis.             | J Rheumatol.                              | 21(5)      | 830-5   | 1994 |
| Ochi T,<br>Tomita T,<br>Kimura T,<br>Azuma F,<br>Owaki H,<br>Wakitani S,<br><u>Shimaoka Y</u> ,<br>Ono H.  | A concept to make<br>schedules of therapies<br>based on the natural<br>courses of patients with<br>rheumatoid arthritis.                                  | Nippon<br>Seikeigeka<br>Gakkai<br>Zasshi. | 68(1)      | 50-61   | 1994 |

|   |  |                       |        |      |      |
|---|--|-----------------------|--------|------|------|
| Owaki H,<br>Yukawa K,<br>Ochi T,<br><u>Shimaoka Y</u> ,<br>Ono K. | Facs analysis of myeloid<br>differentiation stages in<br>epiphyseal bone marrow,<br>adjacent to joints<br>affected with rheumatoid<br>arthritis. | Scand J<br>Rheumatol. | 20 (2) | 91-7 | 1991 |
|---|--|-----------------------|--------|------|------|

#### IV.研究成果の刊行物・別刷

# Examination of *in vivo* gelatinolytic activity in rheumatoid arthritis synovial tissue using newly developed *in situ* zymography and image analyzer

W. Yoshida<sup>1</sup>, M. Uzuki<sup>2</sup>, J. Nishida<sup>3</sup>, T. Shimamura<sup>3</sup>, T. Sawai<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthopedic Surgery, Iwate Prefectural Kamaishi Hospital, Kamaishi, Japan;

<sup>2</sup>Department of Pathology, Iwate Medical University, School of Medicine, Morioka, Japan;

<sup>3</sup>Department of Orthopedic Surgery and Rheumatology, Iwate Medical University, School of Medicine, Morioka, Japan.

---

## Abstract

### Objective

The aim of this study was to examine *in vivo* gelatinolytic activity of rheumatoid arthritis (RA) synovium using a newly developed *in situ* zymography (ISZ) method and pathological image analyzer, and to evaluate the relationship between this activity and several features on RA.

---

### Methods

A total of 8 samples of synovium were obtained from RA patients during surgery, and 8 samples from osteoarthritis (OA) patients were examined as controls. Furthermore, total 14 samples of synovium were obtained for comparison among radiographical classifications as Larsen grade (4 cases of grade III, 5 cases of grade IV and 5 cases of grade V). These specimens were frozen with OCT compound immediately after surgery. Frozen sections were applied to a newly developed gelatin-coated FIZ film (Fuji Film Co. Tokyo, Japan) designed for use ISZ, and incubated at 37° C for 6 hours. Using an image analyzer (image processor for analytical pathology; IPAP), two variables were measured as indicators of *in vivo* gelatinolytic activity: optical density of gelatinolyzed area (ODG), and ratio of gelatinolyzed area (RGA). Also, we investigated the relationship between these indicators and the following variables: radiographic changes (Larsen grades), clinical data (C-reactive protein concentration), histological score of synovial tissue (modified Rooney's score), and expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 (assessed by immunohistochemistry).

---

### Results

RA synovium had significantly higher RGA and lower ODG than OA, indicating higher gelatinolytic activity in RA. Synovium from cases with Larsen grade IV or V had significantly lower ODG than cases with grade III, but there was no significant difference in RGA between grades. There was no significant correlation between gelatinolytic activity (ODG or RGA) and either CRP or modified Rooney's Histological Score. The results of ISZ indicate that the gelatinolyzed areas were mainly localized in the lining area, with a small amount scattered throughout the stroma. The results of immunohistochemistry indicate that MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 were expressed in areas of gelatinolysis.

---

### Conclusions

The present results indicate that *in vivo* gelatinolytic activity of synovium is stronger in RA than in OA. They also indicate that gelatinolytic activity of RA synovial cells is stronger in cases with Larsen grade IV or V than in cases with grade III, although the gelatinolyzed area is similar. Gelatinolytic activity, as indicated by optical density and the gelatinolyzed area, differed between regions, even within the same specimen, suggesting an imbalance between production of proteinases and their inhibitors. We believe that the present zymography method can contribute to the elucidation of biological enzymatic activity of RA synovium.

---

### Key words

Rheumatoid arthritis, *in situ* zymography, gelatinolytic activity.