

関節リウマチに対する関節エコー(超音波)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(北海道内科リウマチ科病院 医長)

研究要旨

関節リウマチ(RA)は関節滑膜に自己免疫性の炎症を起こす疾患である。炎症を起こした関節では異常な血流が関節腔内に生じる。この血流を評価することで炎症そのものを評価することが可能である。我々は手指単関節(MCP,PIP)の炎症を評価する目的に、パワードプラ法を用いた定量関節超音波法を確立した。この方法を用いて以下の検討を行った。活動期の関節リウマチ患者を対象に、DMARDs治療開始前と8週間後のMCP関節の関節血流値を測定した。また治療前から20週間後の関節破壊進行度を単純X線写真で評価した。この結果、手指単関節において、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ことが明らかとなった。更にDMARDs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。また20週間後に関節破壊進行群と非進行群を分類するための治療開始8週間における血流変化率の理想的カットオフ値は72.2%改善であることが明らかとなった。

A.研究目的

生物学的製剤の登場により関節リウマチ(RA)の治療面は格段に進歩した。治療面のエビデンスが構築されるにつれて、RAをより早期診断し、適切な指標を用いることで生物学的製剤を含めた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いわれてきた。しかしながら現時点では、RAの早期診断、治療指標としては確立されたものが存在せず、進歩した治療面と比較して診断評価の分野の遅れが指摘されてきた。これに対して各方面で多種の研究が進行している。そのなかで、近年、画像診断の利用に注目が集まってきている。関節超音波法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診療ツールとして有用性がいわれている。

我々は、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に生じた炎症性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。関節血流は炎症そのものを反映するとされているが、これまでは詳細な評価法が存在しなかった。我々は、これを用いて、関節血流値と骨破壊の関係を検討した。

B.研究方法

ACR1987分類基準にて確定診断され、DAS28-ESR(>2.7)で活動期と診断された関節リウマチ患者19症例を対象とした。本研究プロトコルは病院倫理委員会で承認され、全症例が同意を取得後、本研究に参加している。

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、8 週後の各々に手指関節 (MCP,PIP 関節) に対して関節超音波法を施行し、関節血流値を測定した。更に治療開始前、20 週後に両手の単純 X 線写真を施行し、Genant-modified Sharp score により骨破壊進行度を評価した。各々は診療情報を秘匿とした検査技師、リウマチ専門医師が検査、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。

1. 手指個々の治療前-8 週間のそれぞれの血流値変化率を計算した ((治療前血流値 - 8 週間後血流値) / 治療前血流値 × 100 (%))。
2. 手指個々の治療前-20 週間の Genant modified Sharp Score の進行度を計算した。
3. MCP 関節において、血流値変化率と骨破壊進行度の関係を検討した (receiver operating characteristic (ROC) 解析)。

(倫理面への配慮)

患者には、検査、治療内容、研究成果の学会発表についてインフォームドコンセントを得ている。また本邦における保険診療に従った検査、治療を行っている。

C. 研究結果

関節リウマチ 19 例(平均年齢 54, 女:男=17:2)の治療経過は以下の通りである。13 症例は DMARDs 単剤 (MTX 9 例、SSZ 2 例、BUC 2 例)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)治療を受けた。また 13 症例は、経口プレドニゾロン (3-10mg/day) 投与を受けた。治療開始前 DAS28-ESR (5.21±1.39)は、8 週後 (4.08±1.60)と、有意差をもって低下した ($P=0.0001$)。8 週後と 20 週後の間には有意差を認めなかった。治療開始前、手指関節の骨破壊を、Genant-modified Sharp score で評価した結果、MCP 関節の中央値は 0.5 (IQR 0-1.5)であった。20 週間後の中央値は、0.75 (IQR 0-1.5)であった。MCP 関節で治療前に血流陽性関節に注目した。これらの治療開始 8 週間の血流値

変化率と 20 週間後の骨破壊進行度は有意差をもって負の相関を示した (Spearman's rho=-0.340, $P=0.00386$)。また 20 週後に骨破壊進行を抑制できた関節とそうでない関節を分類する関節血流変化率のカットオフ値は 72.2%改善であった (ROC-AUC 0.697 ± 0.07 vs 0.5, $P=0.0053$, 特異度 82.86%, 感度 61.54%)。

D. 考察

本研究結果から、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。このことから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ことに適切な方法であると考えられた。また治療前に関節血流値が高値であることは予後不良であると考えられた。

今回の症例に対して、DMARDs 治療を開始したところ、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 診療の骨子は、RA を早期診断し、適切な指標により、治療をステップアップし、速やかに炎症を改善することでより良い長期予後を得ることが可能であると考えられてきている。先の我々の報告では、手指関節の異常関節血流の総和により、RA をスクリーニングすることが可能であることを報告した。今回の研究結果も併せた上で、関節血流値により、RA の早期診断を行い、確定後は速やかに、この評価を治療前値として、治療反応を追っていくアルゴリズムを確立することが可能と考えられた。今回の研究は治療反応として関節血流をどのように動かすかを検討した。すなわち、治療前後の二点間の血流値変化率と、骨破壊進行度が相関することを前回報告したが、この結果は、血流値変化率により、治療効果を評価できる可能性を示唆する。また、治療開始後、一定の期間内に一定の改善率(変化率)に達成することが出来なければ、結果として骨破壊が進行する可能性がある。今回の結果は、この改善率として手指単関節におい

てはDMARDs治療開始8週間で70%改善が達成されなければ20週間後には骨破壊が進行することを示唆している。血流値変化率は、臨床的反応より客観性があり、またより早期に治療効果を評価できる可能性がある。

現在のRA治療プロトコールでは、ファーストライン治療はDMARDsである。これらは遅効性であるため、臨床的な問題として治療反応を患者、医師ともに実感、確認するには相当な時間が必要である。現在の臨床的指標では早期に治療反応を予測することが不可能である。関節血流の変化は症状変化に先行して変化する可能性があり、治療評価を早い段階で判断できる可能性がある。具体的には、関節血流を指標としたRA治療アルゴリズムとして、全般的評価(グローバル)、単関節に注目した局所評価(ローカル)とそれぞれの改善率の基準を設定し、RAをシステムティックに治療することが考えられる。これにより薬効評価の難しいDMARDs治療、また現時点では適応が限定されている生物学的製剤の早期導入の指標となる可能性がある。

E. 結論

手指単関節において関節血流値により骨破壊進行の予後予測の可能である。また関節血流値の変化率により治療反応を評価し、骨破壊を予測することが可能と考えられた。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamada H, Atsumi T, Amengual O, Koike T, Furuta I, Ohta K, Kobashi G. Anti-beta2 glycoprotein-I antibody increases the risk of pregnancy-induced hypertension: a case-controlled study. *J Reprod Immunol.* 84(1):95-99,2010
2. Nakamura A, Shimizu C, Nagai S, Yoshida M, Aoki K, Kondo T, Miyoshi H, Wada N, Tajima T, Terauchi Y, Yoshioka N, Koike T. Problems in diagnosing atypical

Gitelman's syndrome presenting with normomagnesaemia. *Clin Endocrinol.* 72:272-276,2010

3. Miyoshi H, Souza SC, Endo M, Sawada T, Perfield JW 2nd, Shimizu C, Stancheva Z, Nagai S, Strissel KJ, Yoshioka N, Obin MS, Koike T, Greenberg AS. Perilipin overexpression in mice protects against diet-induced obesity. *J Lipid Res.* 51(5):975-982,2010
4. Shimane K, Kochi Y, Horita T, Ikari K, Amano H, Hirakata M, Okamoto A, Yamada R, Myouzen K, Suzuki A, Kubo M, Atsumi T, Koike T, Takasaki Y, Momohara S, Yamanaka H, Nakamura Y, Yamamoto K. The association of a nonsynonymous single-nucleotide polymorphism in TNFAIP3 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Arthritis Rheum.* 62(2):574-579,2010
5. Kondo T, Yasumoto A, Arita K, Sugita J, Shigematsu A, Okada K, Takahata M, Onozawa M, Kahata K, Takeda Y, Obara M, Yamamoto S, Endo T, Nishio M, Sato N, Tanaka J, Hashino S, Koike T, Asaka M, Imamura M. Successful treatment of acute myelogenous leukemia with favorable cytogenetics by reduced-intensity stem cell transplantation. *Int J Hematol.* 91(2):310-321,2010
6. Shimane K, Kochi Y, Horita T, Ikari K, Amano H, Hirakata M, Okamoto A, Yamada R, Myouzen K, Suzuki A, Kubo M, Atsumi T, Koike T, Takasaki Y, Momohara S, Yamanaka H, Nakamura Y, Yamamoto K. The association of a nonsynonymous single-nucleotide polymorphism in TNFAIP3 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Arthritis Rheum.* 62:574-879,2010
7. Suzuki E, Amengual O, Atsumi T, Oku K, Hashimoto T, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Ieko M, Fukushima

- K, Koike T. Increased expression of phospholipid scramblase 1 in monocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 37:1639-1645,2010
8. Ieko M, Yoshida M, Naito S, Nakabayashi T, Kanazawa K, Mizukami K, Mukai M, Atsumi T, Koike T. Increase in plasma thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor may not contribute to thrombotic tendency in antiphospholipid syndrome because of inhibitory potential of antiphospholipid antibodies toward TAFI activation. *Int J Hematol*91:776-783,2010
9. Nanjo K, Nagai S, Shimizu C, Tajima T, Kondo T, Miyoshi H, Yoshioka N, Koike T. Identification and functional analysis of novel calcium-sensing receptor gene mutation in familial hypocalciurichypercalcemia. *Endocrine J.* 57(9):787-792,2010
10. Takahata M, Hashino S, Okada K, Onozawa M, Kahata K, Sugita J, Shigematsu A, Kondo T, Yamamoto S, Endo T, Nishio M, Ito Y, Tanaka J, Koike T, Asaka M, Imamura M. Reduced intensity conditioning regimen with fludarabine, busulfan, and low-dose TBI(Flu-BU2-TBI): Clinical efficacy in high-risk patients. *Am J Hematol.*84:243-248,2010
11. 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 a single finger joint assessed by power Doppler sonography correlated with radiographic change in rheumatoid arthritis: Comparative study of a novel quantitative score with a semiquantitative score. *Arthritis Care Res.*62(5):657-663,2010
12. Kamishima T, Fujieda Y, Atsumi T, Mimura R, Koike T, Terae S, Shirato H. Contrast-Enhanced Whole Body Joint MR Imaging in Patients with Unclassified Arthritis Developing Early Rheumatoid Arthritis in 2 Years: Feasibility Study and Correlation with MR Imaging Findings of the Hands. *Am J Roentgenol.*195: 287-92,2010
13. Fujieda Y, Kataoka H, Odani T, Otomo K, Kato M, Fukaya S, Oku K, Horita T, Yasuda S, Atsumi T, Koike T. Clinical features of reversible posterior leukoencephalopathy syndrome in patients with systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol* (in press)
14. Atsumi T, Amengual O, Koike T. Antiphospholipid syndrome: pathogenesis. In: Lahita RG, editor. *Systemic Lupus Erythematosus* 5th edition. San Diego: Academic Press; p.945-66. 2010
- 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、tristetlaprolin(TTP)を介した関節リウマチ制御機構に関する研究

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 (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)
	鈴木 豪 (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)
	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 Tristetlaprolin(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 および IL-6mRNA 発現が減少していた。4)LPS 刺激による TNF- α および IL-6 産生が低下していた。5)TNF- α および IL-6mRNA 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 および IL-6mRNA の安定性を損い TNF- α /IL-6 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 法にて検討した。
- 4)CII 免疫後のソケイリン関節由来 T 細胞を in vitro で CII と共培養して種々のサイトカイン産生について ELISA 法で解析した。
- 5)脾細胞を in vitro で LPS と共培養しサイトカイン

ン産生をELISA法で測定した。6)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 、IL-6、およびCXCL2のmRNAをreal-time PCR法で測定することにより、それぞれの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。マウスの実験においては疼痛を与えないために麻酔科で対処した。

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) IFN- γ 、TNF- α 、IL-6、IL-17、GM-CSF産生も有意に低下していた。5) TNF- α およびIL-6産生が有意に低下していた。6) TTP-ZFトランスジェニックマウスにおけるTNF- α mRNA、IL-6 mRNAの安定性が低下していることが判明した。一方で、CXCL2 mRNAの安定性は低下していなかった。

D.考察

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 およびIL-6 mRNAの安定性を低下させ関節局所でのTNF- α とIL-6 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。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 およびIL-6 mRNAの安定性を低下させ関節局所でのTNF- α とIL-6 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。

E.結論

TTP-ZFの過剰発現は、TNF- α およびIL-6 mRNAの安定性を損いTNF- α /IL-6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。

F.健康危険情報

特記事項なし

G.研究発表

1. 論文発表

1. Segawa, S., Goto, D., Yoshiga, Y., Horikoshi, M., Sugihara, M., Hayashi, T., Chino, Y., Matsumoto, I., Ito, S., and Sumida, T. NK1.1+ gdT cells attenuates IL-18 plus IL-2-induced murine interstitial lung disease. *Am. J. Res. Cell. Mol. Biol.* (in press)
2. Hikami, K., Kawasaki, A., Koga, M., Ito, S., Hayashi, T., Matsumoto, I., Tsutsumi, A., Kusaoi, M., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Arinami, T., Sumida, T., and Tsuchiya, N. Association of a functional polymorphism in the 3' untranslated region of SP11 with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* (in press)
3. Kawasaki, A., Ito, S., Furukawa, H., Hayashi, T., Goto, D., Matsumoto, I., Ohashi, J., Graham, R.R., Matsuta, K., Behrens, T.W., Tohma, S., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Sumida, T., and Tsuchiya, N. Association of TNFAIP3 interacting protein 1, TNIP1 with systemic lupus erythematosus in a Japanese population: a case-control association study. *Arthritis Reas. Ther.* 2010 Sep 17;12(5):R174. [Epub ahead of print]
4. Iizuka, M., Wakamatsu, E., Matsumoto, I., Tsuboi, H., Nakamura, Y., Hayashi, T., Goto, D., Ito, S., and Sumida, T. M3 muscarinic acetylcholine receptor reactive immune response induces Sjogren's syndrome-like sialoadenitis. *J. Autoimmunity* 35: 383-389, 2010.

5. Shen, N., Fu, Q., Deng, Y., Qian, X., Zhao, J., Kaufman, K.M., Tang, Y., Chen, J-Y, Yang, W., Wong, M., Kawasaki, A., Tsuchiya, N., Sumida, T., Kawaguchi, Y., Yum C-Y, Takasaki, Y., Hashimoto, H., Harley, J.B., Guthridge, J.M., Grossman, J.M., Cantor, R.M., Song, Y.W., Bae, S, Cehn, S, Hahn, B.H., Lau, Y.L., and Tsao, B.P. Gender specific association of X-linked TLR7 with male systemic lypus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 10715838-43, 2010.
6. Tsuboi, H., Matumoto, I., Wakamatsu, E., Iizuka, M., Nakamura, Y., Hayashi, T., Goto, D., Ito, S., and Sumida, T. The new epitopes of anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies in patients with Sjogren's syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* 162:53-61,2010.
7. Sumida, T., Tsuboi, H., Iizuka, M., Nakamura, Y., and Matsumoto, I. Functionla role of M3 muscarinic acetylcholine receptor (m3R) reactive T cells and anti-M3R autoantibodies in patients with Sjogren's syndrome. *Autoimmunity Reviews* 9:615-617,2010.
8. Tashiro, T., Nakagawa, R., Inoue, S., Omori-Miyake, M., Chiba, T., FUjii, S-I, Shimizu, K., Mori, K., Yoshiga, Y., Sumida, T., Watarai, H., and Taniguchi, M. Induction of Th1-biased cytokine production by a-carba-GalCer, a neoglycolipid ligand for natural killer T cells. *Int. Immunol.* 22:319-28. Epub 2010 Feb 24.
9. Segawa, S., Goto, D., Yoshiga, Y., Sugihara, M., Hayashi, T., Chino, Y., Matsumoto, I., Ito, S., Ito, S., and Sumida ,T. Inhibition of TGF-b signaling attenuates IL-18 plus IL-2-induced interstitial lung disease. *Clin. Exp. Immunol.* 160: 394-402. Epub 2010 Jan 19.
10. Chen, Q., Lamphier, M., Muramoto, K., Ding, Y., Ynag, H., Mackey, M., Li, W., Liu, D., Inoue, Y., Massaki, N., Patel, T., Groom, A., Reynolds, D., Perron, S., Shirota, H., Matsumoto, I., Sumida, T., Spyvee, M., Schiller, S., ZGusovsky, F., and Marc, K. Preostaglandin E2 stimulation of EP4 promotes Th1 differentiation and Th17 expansion and is critical for autoimmune disease. *Br. J. Pharmacol.* 160: 292-310, 2010.

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

図1 TTPトランスジェニックマウスとTTP-ZFトランスジェニックマウスにおけるCII誘導関節炎の発症頻度

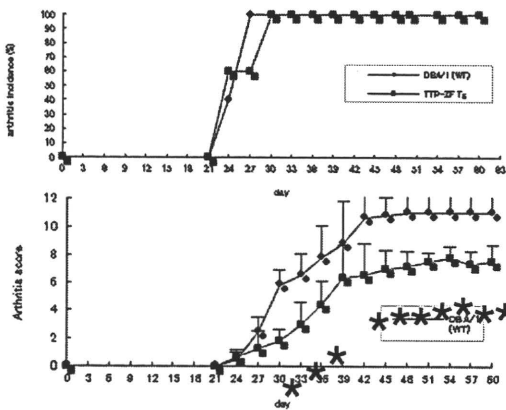


図4 TTP-ZFトランスジェニックマウスにおけるCII反応性T細胞からのサイトカイン産生

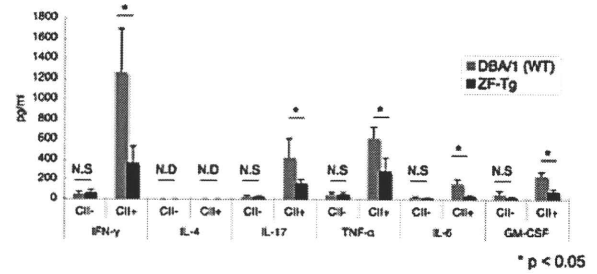


図2 TTP-ZFトランスジェニックマウスの関節組織像 (H-E染色)

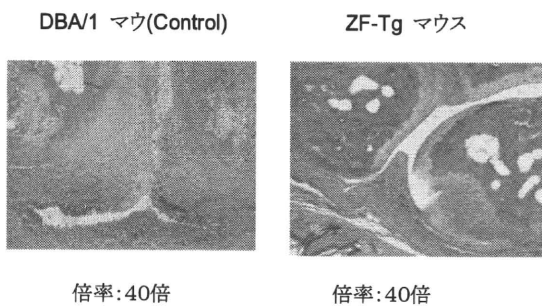


図5 TTP-ZFトランスジェニックマウスにおけるTNF-αとIL-6mRNAの安定性

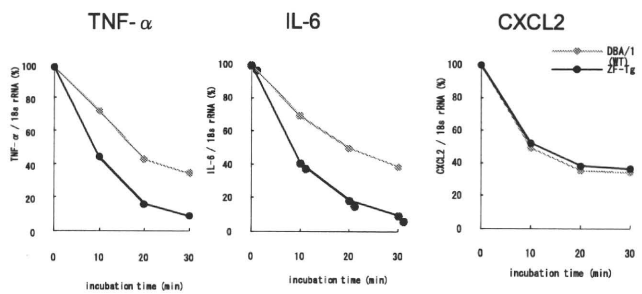


図3 TTP-ZFトランスジェニックマウス関節におけるTNF-αおよびIL-6mRNA発現

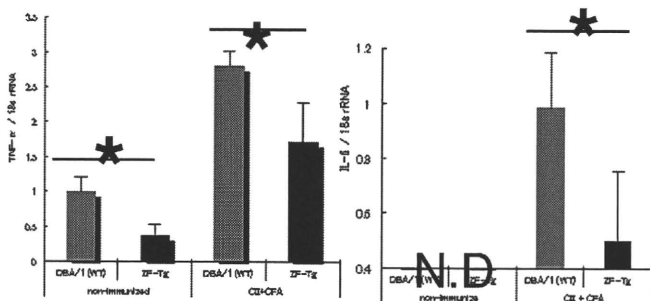
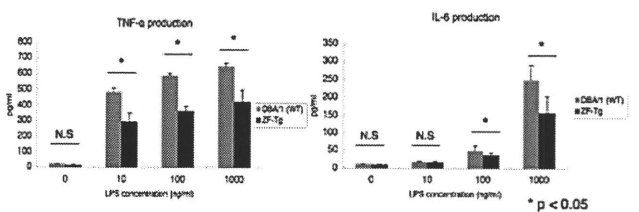


図6 TTP-ZFトランスジェニックマウスにおけるLPS刺激によるTNF-αおよびIL-6産生



TNF 阻害薬インフリキシマブの骨びらん、関節裂隙狭小化に対する効果と機能障害に及ぼす影響に関する研究

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

TNF 阻害薬インフリキシマブの用量反応性を検証する RISING 試験で示された関節破壊抑制効果に着目し、骨びらん、関節裂隙それぞれに対する効果を検討した。軟骨障害を反映すると考えられる関節裂隙狭小化は、骨破壊を反映する骨びらんよりも、スコア一点数あたりより機能障害に関わる可能性が明らかとなった。

A.研究目的

TNF 阻害薬インフリキシマブの用量反応性を検証する RISING 試験においては、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、臨床効果と関節破壊抑制効果を検証した。関節破壊は、van der heijde-sharp 変法によって中央評価された。その際のデータは貴重で、臨床的評価のみならず、インフリキシマブトラフ値や、関節評価の際の総スコア、ならびに、骨びらんスコア、関節裂隙狭小化スコアが利用可能である。そこで、このデータセットを用いて、骨びらん、関節裂隙狭小化の観点から、個別に解析した。

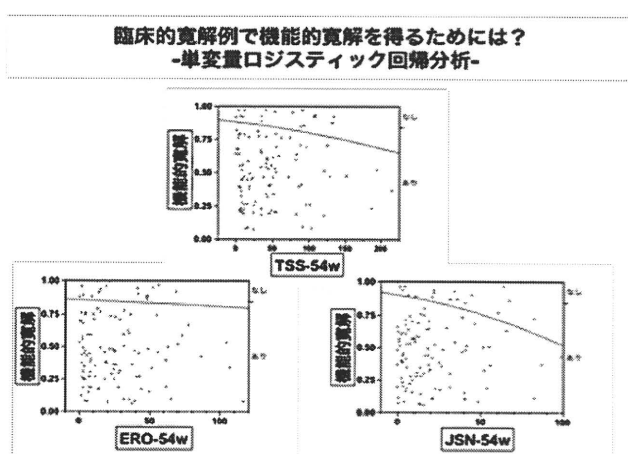
B.研究方法

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。0週と54週の手足X-Pが撮影された症例の関節破壊がvan der heijde-sharp変法によって解析され、総スコア、骨びらんスコア、関節裂隙狭小化スコアが算出された。

C.研究結果

- 1) RISING 試験の患者背景:3mg/kg群(n=99)は、平均年齢49.7歳、罹病期間8.3年で、DAS28-CRP=6.2, HAQ=1.18であった。これに対し、6mg/kg, 10mg/kgでは、それぞれ、48.8歳、50.4歳と、いずれの群もこれまでに行われた既存生物学的製剤と同様で、罹病期間も7.2年、8.4年、DAS28-ESRは6.2, 6.2, HAQは1.18, 1.21であった。
- 2) 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。
- 3) 総スコア、骨びらんスコア、関節裂隙狭小化に及ぼす影響:インフリキシマブ投与前後の総スコア、骨びらんスコア、関節裂隙狭小化スコアは、総スコアが8.8+/-9.1から0.5+/-3.9へ有意に減少(p<0.0001)、骨破壊を反映する骨びらんも4.7+/-4.8から-0.1+/-へと低下した(P<0,0001)。一方、軟骨破壊を関連する裂隙狭小化も他と同様に、4.0+/-5.6から-0.2+/-2.0へと同様に有意に低下を見せた。
- 4) 臨床的寛解例の関節破壊障害度と投与1年目のHAQ

の関係：54週目に臨床的寛解に至った症例のみを抽出し、van der heijde-sharp 変法による各スコアと54週の機能的寛解(HAQ0.5 以下)との関係をロジスティック回帰分析した。その結果、骨びらんとは $r=0.1175(p=0.2049)$ と有意差を認めなかったが、関節裂隙狭小化では、 $r=0.2840(p=0.0018^*)$ と有意差をもって関連する事が明らかとなった。しかもロジスティック回帰直線の傾きは、骨びらんに比べ関節裂隙がより急峻で、HAQ に及ぼす影響はより高いと考えられた(図)。



D. 考察

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。一方、従来の臨床研究に比較して罹病期間がより短く、また機能障害度の低い今回のコホートを用いると、軟骨障害を反映すると考えられる関節裂隙狭小化は、骨破壊を反映する骨びらんよりも、スコア一点数あたりより機能障害に関わる可能性が明らかとなった。しかも、その関与は、ほぼ直線的であるのに対し、骨びらんにある閾値を境に急速に機能障害に影響を及ぼす可能性が指摘され、早期 RA を対象とする関節破壊抑制の治療を考える上で、軟骨破壊抑制を念頭においた戦略を構築する必要がある。

E. 結論

TNF 阻害薬インフリキシマブの用量反応性を検証する

RISING 試験で、軟骨障害を反映すると考えられる関節裂隙狭小化は、骨破壊を反映する骨びらんよりも、スコア一点数あたりより機能障害に関わる可能性が明らかとなった。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takeuchi T and Kameda H. The Japanese experiences with biologic therapies for Rheumatoid Arthritis. *Nat Rev Rheum*, 6:544-562, 2010.
2. Okuyama A, Nagasawa H, Suzuki K, Kameda H, Kondo H, Amano K, and Takeuchi T. Fc gamma receptor IIIb polymorphism and usage of glucocorticoids at baseline are associated with infusion reactions to infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 70:299-304, 2011.
3. Yamanaka H, Tanaka Y, Hoshi D, Inoue E, Saito K, Amano K, Kameda H, and Takeuchi T. Efficacy of tocilizumab for rheumatoid arthritis patients in daily practice in Japan -message from REACTION study, *Mod Rheum*, in press
4. Tanaka Y, Takeuchi T, Mimori T, Saito K, Nawata M, Kameda H, Nojima T, Miyasaka N, and 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* 69:1286-91, 2010.
5. 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. *ClinExp Rheum* 28:365-72, 2010.
6. 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*, 20:337-42, 2010.
7. Kameda H, Ueki Y, Saito K, Nagaoka S, Hidaka T, Atsumi T, Tsukano M, Kasama T, Shiozawa S, Tanaka Y, Takeuchi T, and Japan Biological Agent Integrated Consortium (J-BASIC). The comparison of efficacy and safety between continuation and discontinuation of methotrexate (MTX) at the commencement of etanercept in patients with active rheumatoid arthritis despite MTX therapy: 24-week results from the JESMR study. *Mod Rheum*, 20:531-8, 2010.
8. Tsuzaka K, Itami Y, Takeuchi T, Shinozaki N, and Morishita T. ADAMTS5 is a biomarker for prediction of the response to Infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheum* 37:1454-60 2010.
2. 学会発表
1. H. Yamanaka, Y. Tanaka, E. Inoue¹, D. Hoshi, S. Momohara, K. Hanami, N. Yunoue, K. Saito, K. Amano, H. Kameda, T. Takeuchi. EFFICACY OF TOCILIZUMAB IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS IN DAILY CLINICAL PRACTICE IN JAPAN: RESULTS FROM A RETROSPECTIVE STUDY (REACTION STUDY). Annual European Congress of Rheumatology (EULAR 2010). June, 2010, Rome, Italy
2. BoulosHaraoui, Josef S Smolen, Daniel Aletaha, Ferdinand C Breedveld, Maarten de Wit, MaximeDougados, Paul Emery, Allan Gibofsky, Desiree M Van Der Heijde, Gerd R Burmester, Mario Cardiel-Rios, CatalinCodreanu, Patrick Durez, Joao Eurico Fonseca, Winfried B Graninger, VerdatHamuryudan, Maria Jose Jannaut-Pena, JochenKalden, Tore K Kvien, IedaLaurindo, CarlomaurizioMontecucco, Jose A Pereira Da Silva, Guyla Poor, Pedro Ivan Santos Moreno, EwaStanislawska-Biernat, Tsutomu Takeuchi, and the Treat to Target Taskforce. Treating Rheumatoid Arthritis to Target: Multinational Recommendations Assessment Questionnaire. 75th Annual Scientific meeting of ACR, October 2010, Atlanta, USA.
3. 竹内 勤: 関節リウマチにおける生物学的製剤の最新情報 第20回日本リウマチ学会北海道・東北支部学術集会 アフタヌーンティセミナー 2010年9月札幌
4. 竹内 勤: 関節リウマチの最新情報 第38回日本関節病学会 特別講演 2010年11月 京都
- 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

抗 CCP 抗体陰性、リウマトイド因子陰性関節リウマチの自己抗体検索に関する研究

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 大村浩一郎 (京都大学大学院医学研究科 臨床免疫学 助教)

研究要旨

抗 CCP 抗体陰性、リウマトイド因子(RF)陰性の関節リウマチ(RA)の診断はしばしば困難である。この抗 CCP 抗体陰性 RF 陰性 RA の血清中に RA 特異的な自己抗体が見つければ診断に有用である。我々は最近開発された簡便な自己抗体のスクリーニング法(AlphaScreen 法)を用いて 8 人の抗 CCP 抗体陰性 RF 陰性 RA 患者血清の自己抗体を検索した。その結果、抗 CCP 抗体陰性 RF 陰性 RA 血清中にも多くの自己抗体が存在することを見出した。

A.研究目的

RA による関節破壊をおこさせないためには、早期診断、早期治療が不可欠であるが、リウマトイド因子(RF)や抗 CCP 抗体などの血清マーカーが陰性の場合しばしば診断が困難である。我々は抗 CCP 抗体陰性 RF 陰性の RA に RA 血清中の特異的な自己抗体を網羅的に検索し、早期診断につながる新たなバイオマーカーの確立をめざした。

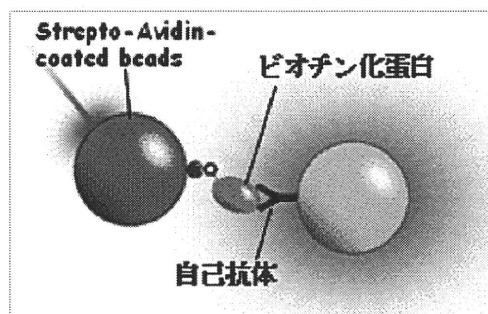
B.研究方法

愛媛大学無細胞生命科学工学研究センターにて開発された無細胞合成蛋白質アレイによる自己抗体検索スクリーニング法(AlphaScreen 法)を用いた。以下の図に示すように、ビオチン化した蛋白質アレイに RA 患者血清 IgG をコートしたビーズとstreptavidinをコートした別のビーズを反応させる(図1)。自己抗体をもつ場合にのみ 2 つのビーズが近接し、レーザー照射により発光させる仕組みである。無細胞合成蛋白質アレイを用いた AlphaScreen 法は、自己抗体を検出したあとで抗原同定の必要がなく、同時に多くの自己抗体をスクリーニングすることができる点で画期

的である。

この方法により、抗 CCP 抗体陰性 RF 陰性 RA 患者のうち X 線像で RA に典型的な骨びらんを認めた 8 例の血清を用いスクリーニングを行った。自己抗体アレイに用いる蛋白質は、RA 滑膜細胞のマイクロアレイデータから RA 滑膜に特異的に発現される蛋白および自己免疫疾患感受性遺伝子座の候補遺伝子約 3000 の中で、予備実験において RA 血清に反応することがわかっている 243 蛋白を用いた。

図1. AlphaScreen 法の原理



(倫理面への配慮)

患者血清の採取は京都大学医の倫理委員会の承認を得て、患者よりインフォームドコンセントを取得して行った。また、個人情報がわからないようにするため、匿名符号を用いて実験および解析をした。

C. 研究結果

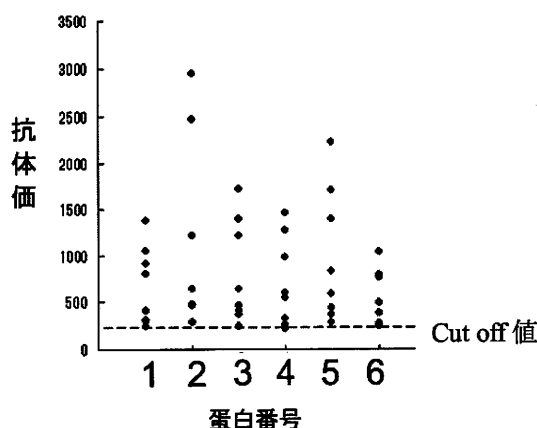
健常人血清の陰性コントロールにおける OD 値+3SD を cut off 値とした。抗 CCP 抗体陰性 RF 陰性 RA 患者 8 例の血清を用いて 243 個の蛋白スクリーニングをおこなった。243 蛋白のうち、70 蛋白に対する自己抗体が見つかった。表1に示すように全 8 症例中、8 例陽性 11 個、7 例陽性 7 個、6 例陽性 10 個、5 例陽性 15 個、4 例陽性 12 個、3 例陽性 6 個、2 例陽性 2 個、1 例陽性 7 個、陽性例なし 173 個、という結果が得られた。

表1. RF(-)抗 CCP 抗体(-)RA 血清(8 検体)に反応した 70 蛋白の内訳(何検体に反応したかでソートしてある)

8 検体中自己抗体陽性検体数	左記陽性検体数を示した蛋白の数
8	11
7	7
6	10
5	15
4	12
3	6
2	2
1	7
0	173

8 例すべてに共通して見られた自己抗原のうち、関節炎や自己免疫との関連の報告の見られた6つの蛋白を選択し、ELISA の系を構築した。ただし、これら6つの蛋白に対する自己抗体の報告はこれまで見られていない。抗体価を ELISA にて測定した結果を図2に示す。

図2. RF(-)抗 CCP 抗体(-)RA 血清8検体中の6つの自己抗体の抗体価。



D. 考察

RA の治療は近年劇的に進歩し、患者の QOL の大幅な改善が見られるものの、十分な治療にも関わらず骨破壊が進行していく RA 患者も少なくない。早期診断、早期積極的治療が RA の機能予後を改善することは間違いないが、RF 陰性、抗 CCP 抗体陰性の場合の診断はしばしば困難である。このような患者における新たなバイオマーカーの確立が求められている。

そのような中で新たな自己抗体のスクリーニング法として AlphaScreening 法が開発され、その有効性が今回示された。特に、抗 CCP 抗体陰性 RF 陰性 RA においても多くの自己抗体が検出されたことは特記すべきであり、expression cloning 法、蛋白免疫沈降法、ファージディスプレイ法などと異なり、本方法の特徴として自己抗体が検出された時点ですでに自己抗原の蛋白が明らかとなっているため、各自己抗体の感度、特異度といった検討を速やかに行うことができる。

今後、スクリーニングで検出された自己抗体を Western Blot で確認し、他のリウマチ性疾患での陽性率と比較し RA 特異的な自己抗体を同定していく予定である。また、RF 陰性、抗 CCP 抗体陰性 RA だけでなく、骨破壊が急速に進行する重症型 RA や治療抵抗性の RA などに特徴的な自己抗体の検索にも応用でき、関節破壊0を目指す本研究班のテーマにも合致している。

E. 結論

無細胞合成蛋白質アレイを用いた AlphaScreening 法により抗 CCP 抗体陰性 RF 陰性 RA 血清中にも多くの自己抗体を検出した。今後、感度、特異度のよい自己抗体を検索していく基礎データが得られた。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. Yamaguchi H, Fujimoto T, Nakamura S, Ohmura K, Mimori T, Matsuda F, Nagata S. Aberrant splicing of milk fat globule EGF factor 8 gene in human systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol.* 40(6): 1778-1785, 2010.
3. Kochi Y, Okada Y, Suzuki A, Ikari K, Terao C, Takahashi A, Yamazaki K, Hosono N, Myouzen K, Tsunoda T, Kamatani N, Furuichi T, Ikegawa S, Ohmura K, Mimori T, Matsuda F, Iwamoto T, Momohara S, Yamanaka H, Yamada R, Kubo M, Nakamura Y, Yamamoto K: A regulatory variant in CCR6 is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Nat Genet* 42(6):515-9, 2010.
4. Hashimoto M, Hirota K, Yoshitomi H, Maeda S, Teradaira S, Akizuki S, Prieto-Martin P, Nomura T, Sakaguchi N, Khl J, Heyman B, Takahashi M, Fujita T, Mimori T, Sakaguchi S. Complement drives Th17 cell differentiation and triggers autoimmune arthritis. *J Exp Med* 207(6):1135-43, 2010.
5. Hoshino K, Muro Y, Sugiura K, Tomita Y, Nakashima R, Mimori T: Anti-MDA5 and anti-TIF1 α antibodies have clinical significance for patients with dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)* 49(9):1726-33, 2010.
6. Tanaka M, Murakami K, Ozaki S, Imura Y, Tong XP, Watanabe T, Sawaki T, Kawanami T, Kawabata D, Fujii T, Usui T, Masaki Y, Fukushima T, Jin ZX, Umehara H, Mimori T: DIP2 disco-interacting protein 2 homolog A (*Drosophilla*) is a candidate receptor for follistatin-related protein/follistatin-like 1. Analysis of their binding with TGF- β superfamily proteins. *FEBS J.* 277(20): 4278-89, 2010.
7. Ohmura K, Terao C, Maruya E, Katayama M, Matoba K, Shimada K, Murasawa A, Honjo S, Takasugi K, Tohma S, Matsuo K, Tajima K, Yukawa N, Kawabata D, Nojima T, Fujii T, Yamada R, Saji H, Matsuda F, Mimori T. Anti-citrullinated peptide antibody-negative RA is a genetically distinct subset: a definitive study using only bone-erosive ACPA-negative rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 49(12): 2298-2304, 2010.
8. Kang EH, Nakashima R, Mimori T, Kim J, Lee YJ, Lee EB, Song YW: Myositis autoantibodies in Korean patients with inflammatory myositis: Anti-140-kDa polypeptide antibody is primarily associated with rapidly progressive interstitial lung disease independent of clinically amyopathic dermatomyositis. *BMC MusculoskeletDisord.* 11(1):223, 2010.
9. Sato T, Fujii T, Yokoyama T, Fujita Y, Imura Y, Yukawa N, Kawabata D, Nojima N, Ohmura K, Usui T, Mimori T: Anti-U1 RNP antibodies in cerebrospinal fluid are associated with central neuropsychiatric manifestations in systemic lupus erythematosus and mixed connective tissue disease. *Arthritis Rheum.* 62(12): 3730-40, 2010.

2. 学会発表

1. K. Ohmura, C. Terao, E. Maruya, M. Katayama, N. Yukawa, D. Kawabata, T. Nojima, T. Usui, T. Fujii, H. Saji, R. Yamada, F. Matsuda, T. Mimori: HLA-DR8 is associated with ACPA-negative RA in Japanese (Oral presentation). 第 14 回国際免疫会議、神戸、2010 年 8 月

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

新規関節炎治療薬開発のための CDK4/6 阻害薬スクリーニングに関する研究

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)

研究要旨

関節リウマチ細胞周期制御(CDK4/6 阻害)療法は、関節リウマチ病態の滑膜増殖相を標的とした独創的アイデアに基づく。これを臨床応用するために、細胞増殖抑制及び組織破壊酵素産生を効率的に抑制する独自の低分子 CDK4/6 阻害剤をスクリーニングで得る。このクラスの薬剤は免疫抑制が弱いことが期待でき、しかも医療経済的に優れた治療に繋がると考えられる。

A.研究目的

CDK4/6 阻害の関節局所や経口投与によりモデル動物関節炎が改善する。これは関節炎での滑膜細胞増殖と組織破壊酵素産生を抑制するためである。我々は臨床応用可能な、抗関節炎効果が強く、優れた薬物動態をもつ CDK4/6 阻害薬を化合物ライブラリーからスクリーニングする。

B.研究方法

CDK4/6 阻害薬による細胞増殖と MMP-3 発現の抑制は、前者が pRB 依存的で後者が非依存적である。したがって、両抑制のバランスにより有効性・安全性が決定されると想定される。

非細胞系一次スクリーニング法としてリン酸化による基質の電荷の変化を用いた電気泳動法である Mobility Shift Assay(MSA)法を用いてスクリーニングを行う。化合物ライブラリーは東京医科歯科大学ケミカルスクリーニングセンターのものを使用する。その後、二次スクリーニングとして化合物の作用が細胞毒性に基づくものではなく、Rb 依存性阻害によることを、Rb(+)細胞(MCF-7)及び Rb(-)細胞(MDA-MD-468)での増殖抑制で確認する。さらに、ヒト関

節リウマチ患者滑膜線維芽細胞における MMP-3 産生抑制を確認し炎症抑制能を評価する。また、マウスコラーゲン誘導関節炎で in vivo 治療効果、機序を検討する。候補化合物のマウス体内動態や毒性も検討し、構造改変による至適化や投与方法至適化を行う。

(倫理面への配慮)

動物実験は東京医科歯科大学動物実験ガイドラインに従い、必要最低限の数で動物福祉に十分配慮する。本動物実験計画書を東京医科歯科大学動物実験委員会に提出し認可を得ている。

C.研究結果

MSA 法を用いた 1 次スクリーニングにて約 2 万個の化合物ライブラリーから 70%以上の CDK4/6 阻害効果を持つ化合物を 40 個抽出した。さらに Rb(+)及び Rb(-)細胞を用いた系で Rb 依存性増殖抑制能を持つ候補化合物を 2 個に絞り込むことができた。これらの化合物の中から、ヒト関節リウマチ患者滑膜線維芽細胞における MMP-3 産生抑制をきたす化合物を 1 個選別することができた。

D. 考察

化合物ライブラリーの中から MSA 法による酵素系、Rb 依存性阻害をみる細胞系で関節リウマチの滑膜増殖相に作用する化合物を抽出した。さらに炎症相に作用する化合物を MMP-3 産生を指標に選別した。今後、in vivo での効果をマウスコラーゲン誘導関節で解析を進めていく必要がある。また、投与方法、投与量の改善、化合物の分子構造、半減期変換による薬物動態改良を行うとともに、スクリーニングをさらに増量し、最適な化合物を開発していく。

E. 結論

滑膜細胞増殖と組織破壊酵素産生両者を抑制する化合物をスクリーニングできた。今後、in vivo での効果をマウスコラーゲン誘導関節で解析を進めていく必要がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sato A, Watanabe K, Kaneko K, Murakami Y, Ishido M, Miyasaka N, Nanki T. The effect of synthetic retinoid, Am80, on T helper cell development and antibody production in murine collagen-induced arthritis. *Mod. Rheumatol.* 20(3):244-251, 2010
2. 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. *J. Cell Biochem.* 109(5):866-875, 2010
3. Tanaka Y, Takeuchi T, Mimori T, et al. Discontinuation of infliximab after attaining low disease activity in patients with rheumatoid arthritis: RRR(remission induction by Remicade in RA) study. *Ann. Rheum. Dis.* 69(7):1286-1291, 2010
4. Watanabe K, Penfold M.E, Matsuda A, Ohyanagi N,

Kaneko K, Miyabe Y, Matsumoto K, Schall T.J, Miyasaka N, Nanki T. Pathogenic role of CXCR7 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 62: 3211-3220, 2010

5. Kaneko K, Nanki T, Hosoya T, Mizoguchi F, Miyasaka N. Etanercept-induced necrotizing crescentic glomerulonephritis in two patients with rheumatoid arthritis. *Mod. Rheumatol.* 20(6):632-636, 2010
6. Hashimoto J, Garnero P, van der Heijde D, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Yoshikawa H, Nishimoto N. Humanized anti-Interleukin-6 receptor antibody (TOCILIZUMAB) is effective in slowing radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis, regardless of baseline levels of the predictors : data from the SAMURAI study. *Mod. Rheumatol.* 2010 Jun 24 [Epub ahead of print]
7. Nakashioya H, Nakano K, Watanabe N, Miyasaka N, Matsushita S, Kohsaka H. Therapeutic effect of D1-like dopamine receptor antagonist on collagen-induced arthritis of mice. *Mod. Rheumatol.* 2010 Dec 28. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

1. 上阪等, 村上洋介, 宮坂信之. 新規分子治療標的薬 サイクリン依存性キナーゼ阻害薬 *Inflammation and Regeneration* 2010.07.

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

関節リウマチにおける関節破壊危険因子の同定に関する研究

研究分担者 山中 寿 (東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 教授)

研究協力者 猪狩勝則 (東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 講師)

研究要旨

関節リウマチにおける関節破壊危険因子の同定は、関節リウマチ治療における関節破壊ゼロを目指す治療指針の確立において重要な意義を持つ。我々は開始10年目を迎えたIORRAコホート内でDNAを収集しえた約2000名のうち、発症5年時の両手X線をSharp/van der Heijdeスコア(SHS)によりスコアリングした628名のサブコホートを得ている。これを用いて既知の疾患感受性遺伝子マーカーについて関節破壊との関連を検討した。

A. 研究目的

関節リウマチ(RA)の発症進展には多くの遺伝要因が関与していると考えられており、これまでにいくつかの疾患感受性遺伝子が報告されてきた。特に近年のDNAチップ技術の革新により、ゲノムワイド関連解析(GWAS)が比較的容易に行えるようになったことで、この数年疾患感受性遺伝子の報告が相次いでいる。しかしこれらの疾患感受性遺伝子の探究は病因に関する知見をもたらし、早期診断に利用できる可能性を示唆したものの、骨関節破壊との関連は十分には明らかにできていない。本研究の目的は、既知の疾患感受性遺伝子情報などを用いて、RAにおける骨関節破壊関連要因を同定することである。

B. 研究方法

発症5年時の両手X線を用いてSharp van der Heijde score(SHS, hands)により骨関節破壊の評価を行った。罹病期間を揃えたことで、関節破壊に強い影響を与える罹病期間の影響を排除するとともに、単回の読影で5年間の関節破壊の変化量(delta-5yrs)の近似値を得ることが可能となる。読影は熟練した整形外科医が行った。本学で行われ

ている前向き観察研究IORRAに登録され、DNAを収集しえた患者のうち628名の発症5年時のSHSを得た。解析対象遺伝子はこれまでに日本人変形性関節症(OA)患者を用いた研究でOAの疾患感受性との関連を認めた以下の遺伝子(多型)である: *ASPN* (D-repeat)、*DVWA* (rs7639618)、*GDF5* (rs143383)、*CALMI* (rs12885713)。マイクロサテライトである*ASPN* (D-repeat)の遺伝子型同定には蛍光プライマーを使用し、GeneMapper(アプライドバイオシステムズ社)で解析した。その他の多型の同定にはTaqMan 試薬(同)を用いている。昨年までの成果として骨関節破壊に関連していることが明らかとなっているHLA-DRB1 shared epitope(SE)、性、自己抗体、発症年齢もIORRA データベースから抽出し解析に使用した。統計解析には解析ソフトRを使用し、SHSを従属変数とし、各遺伝子のリスクアレルの数、性別、発症年齢、自己抗体(抗CCP抗体)陽性の有無を説明変数とする重回帰分析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究で想定されている研究内容に関しては、「ヒトゲノ

ム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」など関連する指針などに基づいて妥当性を適切に判断している。また、東京女子医科大学遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会において承認を得た上で、インフォームドコンセントのもとに書面による同意を得て実施している。

C. 研究結果

DVWA (rs7639618)が既知の骨関節破壊関連因子である発症年齢、性、抗 CCP 抗体、SE と独立した骨関節破壊関連因子であることが明らかとなった ($P=0.023$) (表 1)。

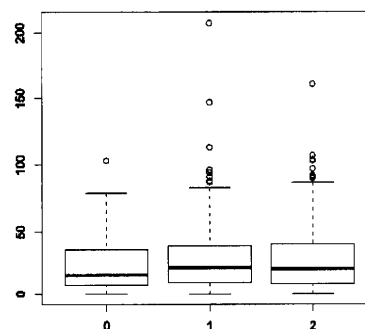
表 1 発症 5 年時の関節破壊関連危険因子

		standardized regression coefficient	P
Age of onset		-0.17	6.2×10^{-5}
Gender	(female)	0.17	2.1×10^{-5}
Anti-CCP antibody	(positive)	0.08	0.053
HLA-DRB1	shared epitope	0.09	0.024
DVWA	rs7639618	0.09	0.022
ASPN	D-repeat	-0.07	0.09
GDF5	rs143383	-0.01	0.76
CALM1	rs12885713	0.04	0.35

Multiple regression analysis

有意差を認めたDVWAについて、個別に解析を行ったところ、DVWA のリスクアレル保持数に従って、発症 5 年時の SHS が増加していた (図 1)。

図 1 DVWA のリスクアレル保持数と発症 5 年時の SHS



D. 考察

軟骨破壊・骨破壊を伴う点で共通する面もあることから、OA 関連遺伝子は RA における骨関節破壊関連遺伝子の候補に充分なり得ると考えられた。今回の検討で骨関節破壊という点において部分的とはいえ両者が共通する遺伝背景を有することを明らかに出来たことは興味深い。

E. 結論

DVWA (rs7639618) は既知の骨関節破壊関連因子である発症年齢、性、SE と独立した骨関節破壊関連因子であり、予後予測に役立つ可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Kochi Y, Okada Y, Suzuki A, Ikari K, Terao C, Takahashi A, Yamazaki K, Hosono N, Myouzen K, Tsunoda T, Kamatani N, Furuichi T, Ikegawa S, Ohmura K, Mimori T, Matsuda F, Iwamoto T, Momohara S, Yamanaka H, Yamada R, Kubo M, Nakamura Y, Yamamoto K. A regulatory variant in CCR6 is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Nat Genet.* 42(6):515-9, 2010
- Shimane K, Kochi Y, Horita T, Ikari K, Amano H,

- Hirakata M, Okamoto A, Yamada R, Myouzen K, Suzuki A, Kubo M, Atsumi T, Koike T, Takasaki Y, Momohara S, Yamanaka H, Nakamura Y, Yamamoto K. The association of a nonsynonymous single-nucleotide polymorphism in TNFAIP3 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Arthritis Rheum.* 62(2):574-579, 2010
3. Momohara S, Inoue E, Ikari K, Kawamura K, Tsukahara S, Iwamoto T, Hara M, Taniguchi A, Yamanaka H. Decrease in orthopaedic operations, including total joint replacements, in patients with rheumatoid arthritis between 2001 and 2007: data from Japanese outpatients in a single institute-based large observational cohort (IORRA). *Ann Rheum Dis.* 69(1):312-3, 2010.
4. Nakajima A, Inoue E, Tanaka E, Singh G, Sato E, Hoshi D, Shidara K, Hara M, Momohara S, Taniguchi A, Kamatani N, Yamanaka H. Mortality and cause of death in Japanese patients with rheumatoid arthritis based on a large observational cohort, IORRA. *Scand J Rheumatol.* 39(5):360-7, 2010
5. Yano K, Ikari K, Inoue E, Tokita A, Sakuma Y, Hiroshima R, Iwamoto T, Kawakami K, Taniguchi A, Yamanaka H, Momohara S. Effect of total knee arthroplasty on disease activity in patients with established rheumatoid arthritis: 3-year follow-up results of combined medical therapy and surgical intervention. *Mod Rheumatol.* 20(5):452-7, 2010
6. Ota Y, Kawaguchi Y, Takagi K, Tochimoto A, Kawamoto M, Katsumata Y, Gono T, Masuda I, Ikari K, Momohara S, Yamanaka H. Single nucleotide polymorphisms of CD244 gene predispose to renal and neuropsychiatric manifestations with systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol.* 20(5):427-31, 2010
7. Kitahama M, Okamoto H, Koseki Y, Inoue E, Kaneko H, Taniguchi A, Momohara S, Yamanaka H. Efficacy and safety of tacrolimus in 101 consecutive patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 20(5):478-85, 2010.
8. Shidara K, Hoshi D, Inoue E, Yamada T, Nakajima A, Taniguchi A, Hara M, Momohara S, Kamatani N, Yamanaka H. Incidence of and risk factors for interstitial pneumonia in patients with rheumatoid arthritis in a large Japanese observational cohort, IORRA. *Mod Rheumatol.* 20(3):280-6, 2010.
9. Iwamoto T, Toki H, Ikari K, Yamanaka H, Momohara S. Multiple extensor tendon ruptures caused by tophaceous gout. *Mod Rheumatol.* 20(2):210-2, 2010.
10. Tanaka E, Inoue E, Mannalithara A, Bennett M, Kamitsuji S, Taniguchi A, Momohara S, Hara M, Singh G, Yamanaka H. Medical care costs of patients with rheumatoid arthritis during the prebiologics period in Japan: a large prospective observational cohort study. *Mod Rheumatol.* 20(1):46-53, 2010
- 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