

- study): evidence of safety and efficacy in a 5-year extension study. *Ann Rheum Dis* 68: 1580–84, 2009.
9. Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Azuma J, and Kishimoto T. Study of Active controlled Tocilizumab monotherapy for Rheumatoid Arthritis Patients with an Inadequate Response to Methotrexate (SATORI): significantly reduction in disease activity and serum vascular endothelial growth factor by IL-6 receptor inhibition therapy. *Mod Rheum* 19:12–19, 2009
 10. Suzuki K, Kameda H, Amano K, Nagasawa H, Sekiguchi H, Nishi E, Ogawa H, Tsuzaka K, and Takeuchi T. Single Center Prospective Study for Efficacy and Safety of Tacrolimus in Rheumatoid Arthritis. *Rheumatology Int* 29:431–6, 2009.
 11. Nagasawa H, Kameda H, Sekiguchi N, Amano K, and Takeuchi T. Improvement of the HAQ score by infliximab treatment in patients with RA: its association with disease activity and joint destruction. *Mod Rheum* 19: 166–172, 2009.
 12. Takeuchi T, Miyasaka N, Inoue K, Abe T, and Koike T. Impact of through serum level on Radiographic and Clinical Response to Infliximab plus Methotrexate in Patients with Rheumatoid Arthritis: results from the RISING Study. *Mod Rheumatology* 19:478–87, 2009.
 13. Hashimoto J, Garner P, van der Heijde, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Yoshikawa H, and Nishimoto N. A combination of biochemical markers of cartilages and markers of cartilage and bone turnover, radiographic image and body mass index to predict progression of joint destruction in patients with rheumatoid Arthritis treated with Disease modifying Anti-Rheumatic Drugs. *Mod Rheum* 19: 273–282, 2009.
 14. Tanino M, Matoba R, Nakamura S, Kameda H, Amano K, Okayama T, Nagasawa H, Suzuki K, Matsubara K, and Takeuchi T. Prediction of efficacy of anti-TNF biologic agent, infliximab, for rheumatoid arthritis patients using a comprehensive transcriptome analysis of white blood cells. *BiochemBiophys Research Comm* 387: 261–265, 2009.
 15. Koike T, Harigai M, Inokuma S, Inoue K, Ishiguro N, Ryu J, Takeuchi T, Tanaka Y, Yamanaka H, Fujii K, Freundlich B, and Suzukawa M. Post-marketing surveillance of the safety and efficacy of etanercept in Japan. *J Rheum* 36:898–906, 2009.
 16. Sawada T, Inokuma S, Sato T, Ohtsuka T, Saeki Y, Takeuchi T, Matsuda T, Takemura T, and Sagawa A. Leflunomide-induced interstitial lung disease: Prevalence and risk factors in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 48:1069–72, 2009
 17. Sato T, Inokuma S, Sagawa A, Matsuda T, Takemura T, Ohtsuka T, Saeki Y, Takeuchi T, and Sawada T. Factors associated with fatal outcome of leflunomide-induced lung injury in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 48:1265–8, 2009
 18. Kameda H, Amano K, Nagasawa H, Ogawa H, Sekiguchi N, Takei H, Suzuki K, and Takeuchi T. Notable difference between the development of vertebral fracture and osteonecrosis of femoral head in patients treated with high-dose glucocorticoids for systemic rheumatic diseases. *Internal Med* 48:1931–8, 2009
 19. 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.
 20. 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.

21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Takeuchi T and Kameda H. The Japanese experiences with biologic therapies for Rheumatoid Arthritis. *Nat Rev Rheum*, 6:544-562, 2010.
25. 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.
26. 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.

2. 学会発表

1. T Takeuchi. Japanese PMS for Etanercept. 8th Asia Pacific League Against Rheumatism, 2008.
2. Nishimoto, N. Miyasaka, K. Yamamoto, S. Kawai, T. Takeuchi, T. Mima, T. Suwabe, Y. Kawata, T. Kakehi. Relationship between serum IL-6 levels after to cilizumab treatment and clinical remission in active rheumatoid arthritis(RA) patients. 9th annual meeting for European League Against Rheumatism, 2008.
3. T. Koike, M. Harigai, S. Inokuma, K. Inoue, N. Ishiguro, J. Ryu, T. Takeuchi, Y. Tanaka, H. Yamanaka, B. Freundlich, K. Fujii, M. Suzukawa. Safety and effectiveness of etanercept in patients with moderate and high rheumatoid arthritis disease activity: results from a large Japanese post-marketing surveillance study. 9th annual meeting for European League Against Rheumatism, 2008.
4. H.Kameda, Y. Ueki, K. Saito, S. Nagaoka, T. Hidaka, T. Atsumi, M. Tsukano, T. Kasama, S. Shiozawa, Y. Tanaka, T. Takeuchi. The comparison of efficacy and safety between etanercept(ETN) plus methotrexate(MTX) combination therapy and ETN monotherapy and ETN monotherapy in MTX-refractory Japanese patients with rheumatoid arthritis: 24-week results from the JESMR study. 9th annual meeting for European League Against Rheumatism, 2008.
5. T. Koike, M. Harigai, S. Inokuma, K. Inoue, N. Ishiguro, J. Ryu, T. Takeuchi, Y. Tanaka, H. Yamanaka, B. Freundlich, K. Fujii, M. Suzukawa. Safty and effectiveness of switching from infliximab to etanercept in patients with rheumatoid arthritis: results from a large Japanese post marketing

- surveillance 9th annual meeting for European League Against Rheumatism, 2008.
6. Hideto Kameda, Yukitaka Ueki, Kazuyoshi Saito, Shouhei Nagaoka, Toshihiko Hidaka, Tatsuya Atsumi, Michishi Tsukano, Tsuyoshi Kasama, Shunichi Shinozawa, Yoshiya Tanaka, Tsutomu Takeuchi. The comparison of efficacy and safety between Etanercept (ETN) plus Methotrexate (MTX) combination therapy and ETN monotherapy in MTX-refractory Japanese patients with rheumatoid arthritis: 52-week clinical results from the JESMR study. 72th Annual Meeting of American College of Rheumatology, 2008.
 7. Suzuki K, Amano K, Kameda H, Sekiguchi N, Abe H, Nagasawa H, Takei H, Nishi E, Okuyama A, Tsuzaka K, Takeuchi T.: Risk factors and therapeutic outcome of aspergillosis in patients with collagen vascular diseases. The EULAR annual congress of rheumatology. June. 2008, Paris, France, Abstract presentation.
 8. Kameda H, Kanbe K, Sato E, Ueki Y, Saito K, Nagaoka S, Hidaka T, Atsumi T, Tsukano M, Kasama T, Shiozawa S, Tanaka Y, Yamanaka H, Takeuchi T. Etanercept (ETN) plus methotrexate (MTX) combination therapy resulted in a better outcome in joint damage and physical function than ETN monotherapy even in patients with active rheumatoid arthritis despite MTX treatment: 52-week results from the JESMR study. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR 2008). 2009年6月、コペンハーゲン.
 9. Tsutomu Takeuchi : Industry Sponsored Symposium 3. HUMIRA: for a long term and comprehensive RA Disease management—clinical Data, Radiographic Data, Functionally Data, Work Productivity Data— The 9th World Congress on Inflammation. 2009年7月、東京.
 10. Nishimura K, Kameda H, Kurasawa T, Kondo T, Okuyama A, Nishi E, Takei H, Suzuki K, Nagasawa H, Abe H, Tsuzaka K, Amano K, Takeuchi T. Influence of tocilizumab to interstitial pneumonia (IP) complicating rheumatoid arthritis patients. The 9th World Congress on Inflammation. 2009年7月、東京.
 11. Tsutomu Takeuchi : New biologics for rheumatoid arthritis in Japan: A multi-center, randomized, double-blind, controlled, dose-response study of Abatacept (BMS-188667) in Japanese active rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to Methotrexate. The 53rd Annual General Assembly and Scientific meeting of Japan College of Rheumatology, The 18th International Rheumatology symposium. Tokyo. April. 2009.
 12. H. Yamanaka, Y. Tanaka, E. Inoue, 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
 13. Boulos Haraoui, Josef S Smolen, Daniel Aletaha, Ferdinand C Breedveld, Maarten de Wit, Maxime Dougados, Paul Emery, Allan Gibofsky, Desiree M Van Der Heijde, Gerd R Burmester, Mario Cardiel-Rios, Catalin Codreanu, Patrick Durez, Joao Eurico Fonseca, Winfried B Graninger, Verdat Hamuryudan, Maria Jose Jannaut-Pena, Jochen Kalden, Tore K Kvien, Ieda Laurindo, Carlomaurizio Montecucco, Jose A Pereira Da Silva, Guyla Poor, Pedro Ivan Santos Moreno, Ewa Stanislawska-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.

14. T Takeuchi: Evidences of infliximab treatment for A in JAPAN-RECONFIRM and RISING study- The 4th Asian congress on Autoimmunigy. 12th September,2009 Singapore

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

骨芽細胞をターゲットとする関節リウマチの治療に関する研究

研究分担者 三森経世(京都大学大学院医学研究科 臨床免疫学 教授)
研究協力者 野島崇樹(京都大学大学院医学研究科 臨床免疫学 非常勤講師)
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

関節リウマチ(RA)に対する骨免疫学的な集学的治療を目的として、関節滑膜、リンパ球、破骨細胞を対象とした既存治療に加え、骨形成に必須である骨芽細胞をターゲットにした治療の有用性に関して検討を進めた。DKK-1 は骨芽細胞において Wnt シグナルを抑制することで、骨形成を抑制する細胞外調節因子である。本研究では、骨芽細胞を介した RA 関節破壊病態の改善を検討するために DKK-1 のヒト組織 mRNA 発現量比較、ヒト骨芽細胞培養上清中の DKK-1 濃度の解析、生物学的製剤を使用した RA 患者の治療前後における血清 DKK-1 濃度の測定および臨床経過との比較を行なった。各種臓器から作製した cDNA パネルの検討では、胎盤、前立腺、脾臓、精巣で DKK-1 mRNA の発現が確認された。TNF α 存在下での hFOB1.19 培養上清中の DKK-1 濃度は一定の傾向を示さなかった。RA 患者(TNF 阻害療法前)の血清中 DKK-1 濃度(71.4 ± 36.7 pmol/l)は、健常人(52.6 ± 20 pmol/l)に比し、有意に高値であった($P=0.013$)。DKK-1 濃度(TNF 阻害療法前)と DAS28 には相関がみられ、RA 患者における血清中の DKK-1 が骨芽細胞を介して、RA における骨破壊病態に寄与していることが示唆された。

A. 研究目的

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

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

DKK-1 は骨芽細胞において Wnt シグナルを抑制する

ことで、骨形成を抑制する細胞外調節因子である。本研究では骨芽細胞を介した RA 関節破壊病態の改善を検討するために、炎症性サイトカイン存在下での骨芽細胞機能の解析、骨芽細胞機能に対する DKK-1 の役割および抗 DKK-1 抗体の作用の検討を行う。

B. 研究方法

①ヒト各種臓器における DKK-1 mRNA 発現量の比較

Human multiple tissue cDNA panels I & II (Clontech Laboratories)を template とし、Standard cDNA として hsfcl を用いた。Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System で、SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio Co.)を用いて、real-time PCR を行った。内因性コントロールとして GAPDH

を用いた。

②生物学的製剤を使用した RA 患者の治療前後における血清 DKK-1 濃度の測定および臨床経過との比較

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

③炎症性サイトカイン存在下でのヒト骨芽細胞上清中の DKK-1 濃度の測定

TNF α 存在下での温度感受性ヒト骨芽細胞株 (hFOB1.19) の培養上清中における DKK-1 蛋白量を ELISA 法で検討した。

(倫理面への配慮)
特に該当せず。

C. 研究結果

①ヒト各種臓器における DKK-1 mRNA 発現量の比較

各種ヒト臓器における DKK-1 mRNA の発現分布を定量 PCR にて比較したところ、胎盤の発現量が多く、次いで前立腺、脾臓、精巣、脳、小腸、肺において、DKK-1 mRNA 量が多いことが示された。(図1)

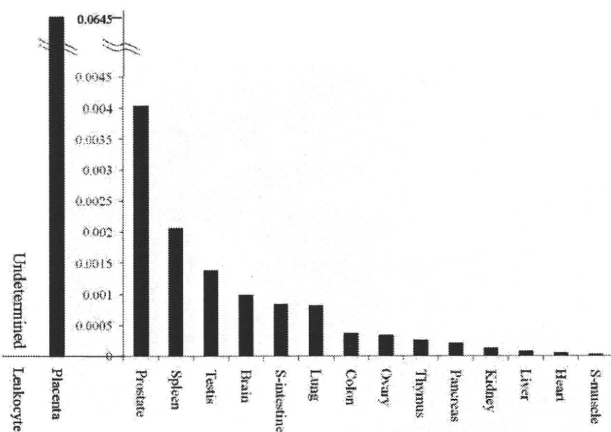


図1. 各種ヒト臓器における DKK-1 発現(定量 PCR にて)

②生物学的製剤を使用した RA 患者の治療前後における血清 DKK-1 濃度の測定および臨床経過との比較

血清中の DKK-1 濃度は、健常人 52.6 ± 20 pmol/l に対し、RA 患者(TNF 阻害療法前) 71.4 ± 36.7 pmol/l であり、RA 患者で有意 ($P=0.013$) に高値であった(図 2)。治療前 DKK-1 濃度と DAS28 との弱い相関がみられた(図 3)。TNF 阻害療法前後で DKK-1 濃度の有意な低下は認められず、EULAR 反応性と DKK-1 濃度との相関は確認できなかった。

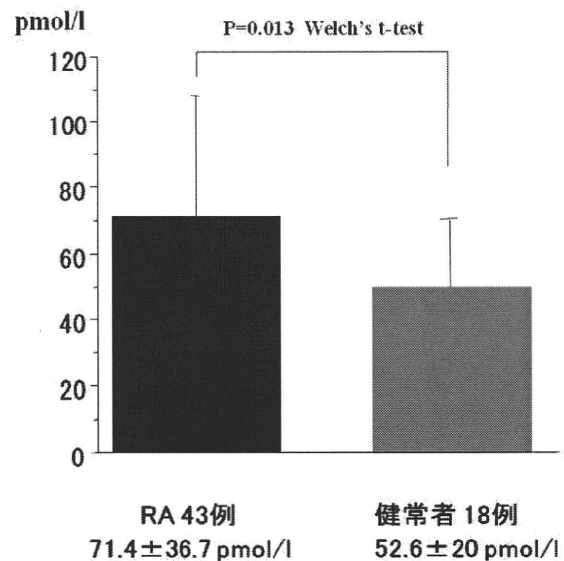


図2. RA (TNF 阻害療法前) と健常人の血清 DKK-1 濃度

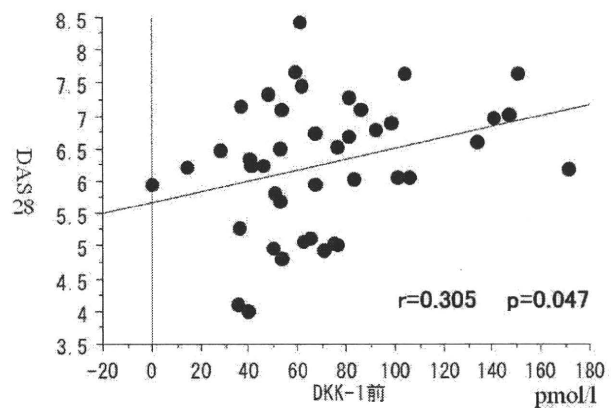


図3. 血清 DKK-1 濃度 (TNF 阻害療法前) と DAS28 の相関

③炎症性サイトカイン存在下でのヒト骨芽細胞上清中の DKK-1 濃度

TNF α 存在下での hFOB1.19 培養上清中の DKK-1 濃度は一定の傾向を示さなかった。(図 4)

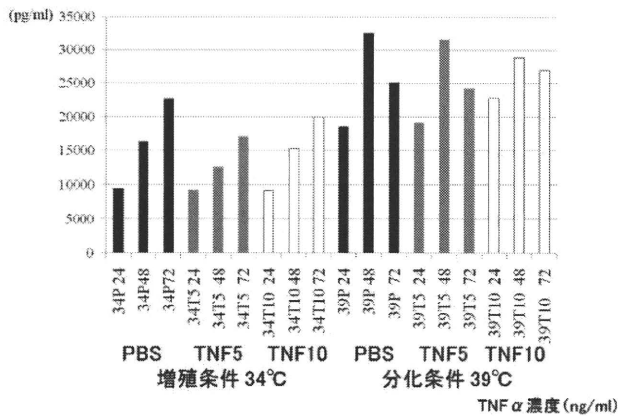


図 4. TNF α 存在下での hFOB 培養上清中の DKK-1 濃度

D. 考察

DKK-1 は骨芽細胞において Wnt シグナルを抑制することで、骨形成を抑制する細胞外調節因子であり、多発性骨髄腫患者の血清・骨髄において DKK-1 濃度が上昇していること、骨髄腫の骨破壊病変と関連していることが示されている。

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

今回の検討で、RA 患者血清中の DKK-1 濃度が高値であることが確認された。DKK-1 は骨芽細胞機能を抑制することから、RA 治療において骨芽細胞を標的とした抗 DKK-1 抗体使用の有用性が期待できる結果であった。

しかし、他の臓器細胞(胎盤、前立腺、脾臓、睾丸など)においても、DKK-1 の発現が確認されたことより、RA モデルマウスの治療として抗 DKK-1 抗体を使用する際には、これらの臓器に対する抗 DKK-1 抗体の影響について、注意深く評価する必要があると考えられた。

E. 結論

TNF 阻害療法開始前の RA 患者血清中の DKK-1 濃度が高値であることが確認され、DAS28 との弱い相関がみられたことより、RA 治療の新しい標的として骨芽細胞が候補となる可能性が示された。RA 患者における血清中の DKK-1 が骨芽細胞を介して、RA における骨破壊病態に寄与していることが示唆され、炎症性サイトカイン存在下での、骨芽細胞の骨形成における DKK-1 の役割について更なる検討をすすめ、RA モデルマウスにおける抗 DKK-1 抗体治療遂行の一助としたい。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Jin ZX, Mimori T, et al: Impaired TCR signaling through dysfunction of lipid rafts in sphingomyelin synthase 1 (SMS1)-knockdown T cells. *Int Immunol* 20(11): 1427-37, 2008.
- Satoh T, Ishikawa O, Ihn H, Endo H, Kawaguchi Y, Sasaki T, Goto D, Takahashi K, Takahashi H, Misaki Y, Mimori T, Muro Y, Yazawa N, Sato S, Takehara K, Kuwana M: Clinical usefulness of anti-RNA polymerase III antibody measurement by enzyme-linked immunosorbent assay. *Rheumatology (Oxford)* 48(12):1570-4, 2009.
- Kobayashi K, Okamoto Y, Inoue H, Usui T, Ihara M, Kawamata J, Miki Y, Mimori T, Tomimoto H, Takahashi R: Leukoencephalopathy with cognitive impairment following tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis (RA). *Intern Med.* 48(15):1307-9, 2009.
- Fujii T, Okada M, Fujita Y, Sato T, Tanaka M, Usui T, Umehara H, Mimori T: Vaccination with autoreactive CD4(+)-Th1 clones in lupus-prone

- MRL/Mp-Fas(lpr/lpr) mice. *J Autoimmun.* 33(2):125-34, 2009.
5. Ito Y, Usui T, Kobayashi S, Iguchi-Hashimoto M, Ito H, Yoshitomi H, Nakamura T, Shimizu M, Kawabata D, Yukawa N, Hashimoto M, Sakaguchi N, Sakaguchi S, Yoshifuji H, Nojima T, Ohmura K, Fujii T, Mimori T: Gamma/delta T cells are the predominant source of interleukin-17 in affected joints in collagen-induced arthritis, but not in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 60(8):2294-303, 2009.
 6. Kitaori T, Ito H, Yoshitomi H, Aoyama T, Fujii T, Mimori T, Nakamura T: Severe erosive arthropathy requiring surgical treatments in systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol.* 19(4):431-6, 2009.
 7. 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.
 8. Ichikawa Y, Saito T, Yamanaka H, Akizuki M, Kondo H, Kobayashi S, Oshima H, Kawai S, Hama N, Yamada H, Mimori T, Amano K, Tanaka Y, Matsuoka Y, Yamamoto S, Matsubara T, Murata N, Asai T, Suzuki Y. Clinical Activity After 12 Weeks of Treatment with Nonbiologics in Early Rheumatoid Arthritis May Predict Articular Destruction 2 Years Later. *J Rheumatol.* 37(4):723-9, 2010.
 9. Ishikawa Y, Yukawa N, Ohmura K, Hosono Y, Imura Y, Kawabata D, Nojima T, Fujii T, Usui T, Mimori T. Etanercept-induced anti-Jo-1-antibody-positive polymyositis in a patient with rheumatoid arthritis: a case report and review of the literature. *ClinRheumatol.* 29(5):563-6, 2010.
 10. Higashi T, Nakayama T, Fukuhara S, Yamanaka H, Mimori T, Ryu J, Yonenobu K, Murata N, Matsuno H, Ishikawa H, Ochi T. Opinions of Japanese rheumatology physicians regarding clinical practice guidelines. *Int J Qual Health Care.* 22(2):78-85, 2010.
 11. 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.
 12. 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.
 13. Hashimoto M, Hirota K, Yoshitomi H, Maeda S, Teradaira S, Akizuki S, Prieto-Martin P, Nomura T, Sakaguchi N, Köhl 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.
 14. Hoshino K, Muro Y, Sugiura K, Tomita Y, Nakashima R, Mimori T: Anti-MDA5 and anti-TIF1 \cdot antibodies have clinical significance for patients with dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)* 49(9):1726-33, 2010.
 15. 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.

16. 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.
17. 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 Musculoskelet Disord*. 11(1):223, 2010.
18. 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.
- predominant IL-17-producing cells in affected joints of collagen-induced arthritis. 第38回日本免疫学会, 京都, 2008年12月
5. Murakami K, Mimori T, et al: Follistatin-Related Protein (FRP/FSTL1) is one of the regulators of IL-6 production in fibroblast-derived cell lines. 第38回日本免疫学会, 京都, 2008年12月
6. Ohmura K, Mimori T, et al: 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

2. 学会発表

1. 村上孝作, 三森経世ほか: 早期関節リウマチにおける抗CCP抗体価と疾患活動性との相関. 第52回日本リウマチ学会, 札幌, 2008年4月
2. 伊藤能永, 三森経世ほか: II型コラーゲン誘発性関節炎(CIA)局所におけるIL-17分泌細胞の解析. 第52回日本リウマチ学会, 札幌, 2008年4月
3. Murakami K, Mimori T, et al: Correlation between anti-CCP antibody and disease activity in patients with early rheumatoid arthritis. 72nd American College of Rheumatology, San Francisco, Oct 2009.
4. Ito Y, Mimori T, et al: Gamma delta T cells are the

[1] TNF 阻害療法施行時の有害事象に関する研究、及び

[2] 関節リウマチに対するサイクリン依存性キナーゼ阻害因子誘導療法に関する研究

研究分担者 宮坂信之(東京医科歯科大学膠原病・リウマチ内科 教授)

研究要旨

[1] 関節リウマチ(RA)に対する TNF 阻害療法は、関節破壊を阻止する点においてはきわめて高い有効性を発揮するが、一方で重篤な副作用を起こしうる。我々は RA に対する etanercept (ETN) 投与中に発症した壊死性半月体形成性糸球体腎炎を 2 例経験した。自験例の臨床経過、病理組織像などを明らかにするとともに、文献的考察を加えることにより、その病態を明確にし、その診断法、治療法などについて検討を行った。

[2] 我々は Cyclin-dependent kinase (CDK) 4/6 の阻害因子である p16INK4a 遺伝子を関節炎モデルに強制発現させると、滑膜細胞の増殖抑制することにより、関節炎を改善することを示した。しかし、p16INK4a は滑膜細胞からの炎症性メディエーターの産生も抑制するが、主要な炎症性サイトカイン産生細胞であるマクロファージにおける作用は不明であった。本研究で、マクロファージにおいて、p16INK4a は CDK4/6 非依存的に IRAK1 のプロテアソーム依存的な分解作用を促進することで AP-1 カスケードを阻害し、IL-6 産生を抑制していることが判明し、p16INK4a 誘導療法の特性の一端を明らかにした。さらに、関節リウマチ細胞周期制御 (CDK4/6 阻害) 療法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 阻害剤をライブラリースクリーニングにより選別した。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

[1] 我々は、関節リウマチ(RA)に対する etanercept (ETN) 投与中に発症した壊死性半月体形成性糸球体腎炎 (NCGN) を 2 例経験した。この病態を明確にし、その診断法、治療法などについて検討を行う。

[2] 生物学的製剤に代表される免疫抑制的な抗リウマチ薬に加え、作用機序の異なる治療薬を開発し、併用することが、安全かつ究極的な骨破壊抑制に寄与すると考えられる。我々はアデノウイルスによる炎症関節へのサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 (CDKI) p16INK4a 遺伝子導入が、滑膜細胞の増殖を抑制し、関節リウマチ(RA)動物モデルに著効することを見いだした。これまで、p16INK4a は

RA 滑膜細胞 (RSF) からの MCP-1 や MMP-3 の産生は抑制することを確認したが、本研究では、マクロファージの炎症性サイトカイン産生に対する p16INK4a 強制発現の効果を検討する。さらに、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サイクリン依存性キナーゼ阻害薬 (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

[1] 当科にて経験した 2 症例の臨床経過について詳細に記述するとともに、これまで報告されている ETN 投与中に発症した NCGN の症例について文献的考察を行った。

[2] DBA/1J マウスの骨髓細胞を M-CSF 存在下で培養して、骨髓由来マクロファージ(BMM)を得た。RSF は RA 患者滑膜組織から分離した。p16INK4a ないし IRAK1 遺伝子のレトロウイルス発現ベクター、CDK4 および IRAK1 に対する short hairpin RNA (shCDK4, shIRAK1) のレトロウイルス発現ベクターを構築し、マクロファージに導入した。RSF への p16INK4a の遺伝子導入にはアデノウイルスベクターを用いた。IL-6 発現は ELISA 法、定量的 PCR 法、シグナル伝達分子発現とリン酸化は Western blot 法で検討した。AP-1、NF- κ B 結合活性はゲルシフトアッセイで測定した。

CDK4/6 阻害薬の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った。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した。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した。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した。

(倫理面への配慮)

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

[1] 症例 1: 36 歳、女性。25 歳時 RA と診断。methotrexate (MTX) 8 mg/週を投与していたがコントロール不良であり、3 年前より MTX に加え ETN 25 mg \times 2/週を開始された。以降関節炎コントロールは良好であったが、ETN 開始 1 年 8 ヶ月後より軽度の蛋白尿と顕微鏡的血尿が出現、その 4 ヶ月後には尿蛋白 3.6 g/日まで増加し、血

清 Alb 値の低下も認めた。さらに左下肺野に器質化肺炎様均等影の出現と MPO-ANCA の上昇(36 IU/l)を認め、腎生検にて巣状分節性硬化を伴う NCGN、免疫染色にて係蹄壁に軽度の免疫複合体の沈着を認めた。ETN による ANCA 関連腎炎および肺病変を疑い、ETN を中止したところ速やかに肺病変は消失。ANCA も 20 IU/l まで低下した。しかし尿所見改善は不十分であり、6 週間後より prednisolone (PSL) 1mg/kg/day を開始し血尿の消失と蛋白尿改善を認めた。その後、tocilizumab 投与にて加療を継続し経過良好である。

症例 2: 64 歳、女性。44 歳時 RA と診断。金製剤、bucillamine, salazosulfapyridine を投与されたがいずれも副作用で中止されている。また 3 年前より軽度の腎機能障害(Cr 1.0-1.3mg/dl)と蛋白尿(定性 1-2+)があった。2 年前より ETN 25mg \times 2/週を開始され関節炎のコントロールは良好であったが、ETN 開始 1 年半後より急激に尿量の減少(約 500ml/日)と血圧上昇、両側下腿浮腫が出現。その後約 1 ヶ月間で急速な腎機能の増悪(Cr 3.7mg/dl)と蛋白尿の増加(9.8g/日)、顕微鏡的血尿の出現を認めた。ANCA やその他の自己抗体は認められなかった。ETN による急速進行性糸球体腎炎を疑い ETN を中止し、ステロイドパルス療法および PSL 0.5mg/kg/day の後療法を施行したところ、腎機能は Cr 2.4mg/dl まで改善。また発症時、溶血性貧血および血小板減少も認めていたが、腎機能の回復と共に速やかに改善したため、糸球体病変に合併した溶血性尿毒症性症候群と考えた。腎生検では、膜性腎症を背景にメサングウムおよび管内増殖を伴う活動性の NCGN を認め、免疫染色にて係蹄壁に顆粒状および結節状の強い免疫複合体沈着を認めた。その後、PSL 投与を継続し経過良好である。

[2] p16INK4a 発現により、LPS 刺激下の Bone Marrow Macrophage (BMM)からの TNF mRNA 発現は変動せず、IL-6 mRNA およびタンパクの発現が著減した。この抑制は、選択的 CDK4/6 阻害薬や、shCDK4 による CDK4 をノックダウンによって細胞増殖を抑制しても影響を受けず、CDK4/6 活性低下に依存しなかった。また、RSF では

p16INK4aを強制発現させてもIL-6産生に影響がなかった。LPS受容体であるTLR4下流分子では、p16INK4a発現BMMでIRAK1分解亢進が認められ、p16INK4a発現RSFでは認められなかった。刺激したBMMにおけるIRAK1下流シグナルを検討したところ、p38MAPKおよびJNKのリン酸化、AP-1結合活性の低下があり、AP-1経路が抑制されていた。さらに、プロテアソーム阻害薬を投与したところ、p16INK4aによるIRAK1の分解亢進は解除され、それに伴いAP-1経路抑制が回復した。一方で、p16INK4a発現はIKKリン酸化、I κ B分解、NF- κ Bの結合活性のいずれにも影響を与えず、NF- κ B経路は保持されていた。次に、IRAK1分解亢進を模倣するために、shIRAK1でIRAK1をノックダウンしたところ、やはりAP-1結合活性低下が認められ、一方、I κ B分解は保持されていた。また、p16INK4a発現したTHP-1(ヒトマクロファージ)細胞では、BMMと同様にLPS誘導IL-6産生が抑制され、このIL-6産生低下は、IRAK1追加強制発現によって解除された。以上の結果は、p16INK4a発現はマクロファージにおいて、IRAK1分解を亢進させ、AP-1経路を抑制してIL-6産生を低下させることを示す。なお、細胞老化を誘導するため、増殖停止まで培養して内因性p16INK4a誘導負荷をかけたBMMをLPS刺激してIL-6を産生させる際に、p16INK4aに対するsiRNAでp16INK4aをノックダウンしたところ、IL-6産生が増強した。従って、p16INK4a発現によるIL-6阻害は、生理的意義をもつものと考えられる。

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

[1] 当科にて経験した2症例は、ETN投与前には血管炎合併を疑わせる所見を認めなかったが、開始後に

NCGNを発症した。ETN投与開始から腎炎発症までに1年以上経過しているが、薬剤の中止とステロイド療法追加にて軽快したことから腎炎発症にETNが関与していた可能性は高いと考えられる。同様の症例は、近年海外から複数報告されてきており、3症例について文献的に詳細な報告が認められている。当科症例2例と合わせ、それらの臨床的特徴についての考察を行った(表1)。

(表1)

	1 (Doulton et al., 2004)	2 (Stokes et al., 2005)	3 (Kemp et al., 2001)	4 (当科 症例1)	5 (当科 症例2)
年齢 性別	32歳 女性	55歳 男性	65歳 女性	35歳 女性	64歳 女性
投与 期間	8ヶ月	4ヶ月	11ヶ月	1年 8ヶ月	1年 6ヶ月
自己 抗体	MPO- ANCA, ANA 陽性	MPO- ANCA, ANA 陽性	陰性	MPO- ANCA, ANA 陽性	陰性
随伴 症状	なし	肺出血 単神経炎	なし	器質化 肺炎様 病変	溶血性 尿毒症性 症候群
発症後 ENT	中止	中止	継続	中止	中止
治療	CS, oral CY	IVCY	詳細 不明	CS	CS
転帰	軽快	死亡	軽快	軽快	軽快

それによると、ETN開始から腎炎発症までの期間は、これまでの報告例では3例とも1年以内の早期であったが、当科症例ではいずれも1年半以上経過した後の発症であった。また血清学的には当科症例1を含む5例中3例で抗核抗体およびMPO-ANCAが認められた。腎炎発症後の経過については、5例中4例で速やかにETNが中止され、ステロイドおよび免疫抑制療法にて軽快していたが、1例は診断後もETNが継続投与され、全身血管炎増悪による肺出血を起こして死亡している。このため、ETN使用中は尿検査および腎機能検査を含む全身状態のモニタリングを継続して行い、腎炎出現時には速やかに投与中止を行う必要がある。またinfliximabやadalimumabなど他のTNF阻害薬投与下でもNCGNを発症しうることが報告され

ており、ETNのみならず広くTNF阻害療法がNCGNの発症に関与する可能性が示唆される。これまでもTNF阻害療法による抗核抗体や抗dsDNA抗体、SLE様症状、皮膚白血球破砕性血管炎の出現が報告されており、TNF阻害が新たな自己免疫疾患発症の誘因となることが推測されてきた。今後、ETNをはじめとするTNF阻害薬とNCGN発症との因果関係を明らかにするため、更なる症例の蓄積が必要と考えられる。

[2] p16INK4a遺伝子は、CDK4/6非依存的にIL-6産生を抑制する。CDK4/6を除いたp16INK4aの標的分子としては、HeLa細胞においてNF- κ Bの構成分子であるp65に結合することが示されており、NF- κ Bの活性化を阻害することが報告されている。またMEFにUV照射しp16INK4aを発現させた研究では、p16INK4aはJNKに結合し、JNKのリン酸化を阻害することなく、JNKがc-Junとの結合を阻害してAP-1活性化を抑制することが報告されている。これら線維芽細胞系を用いて示されたp16INK4aの作用機序とは異なり、p16INK4a発現マクロファージではIRAK1分解亢進により、p38MAPKおよびJNKのリン酸化を抑制し、AP-1活性を阻害した結果IL-6産生が抑制されたと考えられる。

一方、NF- κ B経路が阻害されなかったのは分解亢進によりIRAK1が減少してもNF- κ B経路を活性化できることが考えられる。IRAK1の分解機序は、MEFを用いた研究でユビキチン化依存でないことが報告されているが、我々の知見と同様に単球/マクロファージでは、プロテアソーム阻害剤により、IRAK1の分解が抑制されることが示されている。このことから、p16INK4aは細胞特異的にプロテアソーム依存・非依存的にIRAK1分解を制御していることが考えられる。

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

[1] RAへのETN投与中にNCGNを発症した2例を経験した。今後も症例の蓄積を行い、TNF阻害薬などの生物学的製剤の安全性を注意深くモニタリングすることが重要と思われる。

[2] p16INK4aがRA炎症に重要なマクロファージからのIL-6産生をCDK活性非依存的に抑制していることが明らかになった。p16INK4aを滑膜細胞選択的に発現させることができればCDK4/6阻害薬にはない治療効果も期待される。一方、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. 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
2. 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
3. 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
4. Miyasaka N. Adalimumab for the treatment of

- rheumatoid arthritis. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 5(1):19–26, 2009
5. Komano Y, Harigai M, Koike R, Sugiyama H, Ogawa J, Saito K, Sekiguchi N, Inoo M, Onishi I, Ohashi H, Amamoto F, Miyata M, Ohtsubo H, Hiramatsu K, Iwamoto M, Minota S, Matsuoka N, Kageyama G, Imaizumi K, Tokuda H, Okochi Y, Kudo K, Tanaka Y, Takeuchi T, Miyasaka N. Pneumocystis jiroveci pneumonia in patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab : a retrospective review and case-control study of 21 patients. *Arthritis & Rheum.* 61(3):305–312, 2009
 6. Nonomura Y, Mizoguchi F, Suzuki A, Nanki T, Kato H, Miyasaka N, Kohsaka H. Hypoxia-induced abrogation of contact-dependent inhibition of rheumatoid arthritis synovial fibroblast proliferation. *J. Rheumatol.* 36(4):698–705, 2009
 7. Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Azuma J. Long-term safety and efficacy of tocilizumab, an anti-IL-6 receptor monoclonal antibody, in monotherapy, in patients with rheumatoid arthritis (the STREAM study) : evidence of safety and efficacy in a 5-year extension study. *Ann. Rheum. Dis.* 68:1580–1584, 2009
 8. Murakami Y, Akahoshi T, Aoki N, Toyomoto M, Miyasaka N, Kohsaka H. Intervention of an inflammation amplifier, triggering receptor expressed on myeloid cells 1, for treatment of autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum.* 60(6):1615–1623, 2009
 9. Sekine C, Sugihara T, Miyake S, Hirai H, Yoshida M, Miyasaka N, Kohsaka H. Successful treatment of animal models of rheumatoid arthritis with small-molecule cyclin-dependent kinase inhibitors. *J. Immunol.* 180:1954–1961, 2008
 10. Mizoguchi F, Mizuno A, Hayata T, Nakashima K, Heller S, Ushida T, Sokabe M, Miyasaka N, Suzuki M, Ezura Y, Noda M. Transient receptor potential vanilloid 4 deficiency suppresses unloading-induced bone loss. *J. Cellular Phys.* 216:47–53, 2008
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.
 2. 上阪等, 村上洋介, 野々村美紀, 宮坂信之. 疾患の病態と分子医学 関節リウマチ治療の新たな標的分子 日本臨床分子医学会学術総会 2008.07
 3. 上阪等, 村上洋介, 野々村美紀, 宮坂信之. 疾患の病態と分子医学 関節リウマチ治療の新たな標的分子 日本臨床分子医学会学術総会 2008.07
- 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(RA)における関節破壊危険因子の同定は、RA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IORRAコホート内でDNAを収集しえた約2000名のうち、発症年数を揃えた両手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。また近年生物学的製剤の導入 RA患者のエタネルセプト(ETN)治療による疾患活動性や身体機能障害に与える影響についても検討した。

A. 研究目的

遺伝解析技術の進歩によってRAの疾患感受性遺伝子の報告が相次いでいるが骨関節破壊との関連は十分に明らかになっていない。本研究の目的は既知の疾患感受性遺伝子情報を用いてRAにおける関節破壊危険因子を同定することである。また近年RAを劇的に変化させた治療生物学的製剤の有効性や安全性に関しては多くの報告があるが、身体機能障害への影響に関する報告は少ない。今回、我々は、当センターにおけるRA患者のETN治療により疾患活動性や身体機能障害に与える影響を検討した。

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。本学で施行中の前向き観察研究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。解析対象遺伝子は既知の疾患関連遺伝子:HLA-DRB1(shared epitope), PADI4(rs2240340), STAT4(rs7574865),

CTLA4(rs231775), MHC2TA(rs3087456), FCRL3(rs7528684), TRAF1-C5(rs10818488), CD40(rs4810485), さらに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)。同定された多型情報に加え、IORRAコホートデータベースから、性、発症年齢、喫煙歴、自己抗体など臨床情報を引き出し、重回帰解析によって関節破壊危険因子の検出を行った。続いて有意差を認めた因子とOA感受性遺伝子を説明変数とする説明変数とする重回帰分析を行った。

さらに当センターにてETN治療を08年3月までに新規開始したRA患者144名のETN開始後、6・12・24か月後の有効性を、EULAR改善基準や寛解率(DAS28スコア使用)・機能障害度(J-HAQスコア使用)を用いて検討した。

(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

若年発症 (P=0.003), 女性 (P=0.001), HLA-DRB1 (P=0.002), PADI4 (P=0.01), DVWA (P=0.023) が骨関節破壊関連因子であることが明らかとなった (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	6.2x10 ⁻⁵
Gender (female)	0.17	2.1x10 ⁻⁵
Anti-CCP antibody (positive)	0.08	0.053
HLA-DRB1 shared epitope	0.09	0.024
DVWA rs7639618	0.09	0.022
ASPIN D-repeat	-0.07	0.09
GDF5 rs143383	-0.01	0.76
CALM1 rs12885713	0.04	0.35

Multiple regression analysis

ETN 投与 6 か月後 (N=120)・12 か月後 (N=88)・24 か月後 (N=40) の平均 DAS28/J-HAQ は, それぞれ 3.31/1.04, 3.31/0.97, 2.97/0.96 と有意な改善を認め, DAS28<2.6 の寛解症例数はそれぞれ 33 (27.5%), 27 (30.7%), 12 (30.0%), EULAR 改善基準の Good/Moderate 反応症例数はそれぞれ 43(35.8%)/57(47.5%), 41(46.6%)/34(38.6%), 28(70.0%)/11(27.5%)であった。多変量解析で, ETN 投与前 J-HAQ 低値が EULAR 改善基準の Good response を予測する因子であり, MTX 併用使用有無はこれらに影響を与

えなかった (表 1)。また, ステロイド剤併用が ETN 長期使用者の身体機能を有意に悪化させた (表 2)。

(表 2) EULAR 改善基準 Good response をアウトカムとしたロジスティックモデル

	6 か月			12 か月			24 か月		
n	127			110			60		
variables	esti	OR	p	esti	OR	p	esti	OR	p
	mate			mate			mate		
(Intercept)	2.43	11.3	0.18	1.81	6.13	0.33	-1.5	0.22	0.5
							3		5
MTX 使用* (mg/week)	-0.06	0.94	0.18	0.04	1.04	0.45	-0.0	0.97	0.6
							3		6
PSL 使用* (mg/day)	-0.02	0.98	0.77	-0.02	0.98	0.80	0.01	1.01	0.9
									1
IFXからの移行	0.27	1.31	0.61	-0.14	0.87	0.80	0.32	1.38	0.6
									4
Age* (y.o.)	-0.03	0.97	0.14	-0.02	0.99	0.46	0.03	1.03	0.3
									5
RA duration* (years)	-0.01	0.99	0.65	0.02	1.02	0.61	0.03	1.03	0.4
									1
gender	-0.42	0.66	0.53	-0.14	0.87	0.83	0.83	2.30	0.3
									4
DAS28 *	0.03	1.04	0.86	-0.19	0.83	0.36	-0.2	0.77	0.3
							6		7
J-HAQ *	-0.77	0.46	0.02	-0.74	0.48	0.03	-0.5	0.57	0.1
							6		9

*: ETN 導入時点におけるデータ

(表 3) 最終観察時点における J-HAQ スコアをアウトカムとした多変量モデル

	6 か月	12 か月	24 か月			
n	127	110	60			
variables	estimate	p	estimate	p	estimate	p
(Intercept)	0.316	0.21	-0.101	0.74	-0.485	0.31
MTX 使用 * (mg/week)	0.001	0.82	0.009	0.27	0.009	0.42
PSL 使用 * (mg/day)	0.007	0.37	0.016	0.10	0.040	0.01
レミケードからの移行	0.021	0.78	0.016	0.86	-0.018	0.90
Age* (y.o.)	-0.002	0.43	-0.002	0.61	0.001	0.91
RA duration* (years)	0.003	0.44	0.004	0.38	0.003	0.72
gender	-0.112	0.25	0.048	0.69	0.092	0.57
DAS28 score*	-0.029	0.28	-0.032	0.34	-0.026	0.63

* : ETN 導入時点におけるデータ

D. 考察

罹病期間を揃えたコホートを用いたことで、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、若年発症のリスクを同定することが可能となったと考えられる。実地の臨床で HLA shared epitope, PADI4 リスクアレルを調べる体制を整えることで、関節破壊リスクの高い患者を同定し、それに対処することが容易になると考えられる。

また OA 関連遺伝子は軟骨・骨破壊を伴う点で共通する面もあることから、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。

今回の我々の検討から、ETN 使用により長期に渡り疾患活動性や身体機能障害を有意に改善させること、さらに多変量解析の結果から、ETN 投与前の身体機能障害が軽度である方が、より長期の疾患活動性や身体機能障害の進行を予防できうる可能性が示唆された。

E. 結論

若年発症、女性、HLA-DRB1 SE 陽性、PADI4, DVWA リスクアレル陽性は、RA における関節破壊危険因子である。また ETN は長期に渡り RA 患者の疾患活動性・身体機能障害を改善させた。RA 患者の長期予後改善のためには、生物学的製剤導入時の身体機能障害度がより軽度であることが望ましい。従って、高度のみならず中等度の活動性を有する例にも生物学的製剤を考慮すること、さらに生物学的製剤導入以前に十分な治療を行っていることなどが重要であると考えられる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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
2. 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. Nishimoto K, Kochi Y, Ikari K, Yamanaka H. Association study of TRAF1-C5 polymorphisms with susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in Japanese. *Ann Rheum Dis.* 69(2):368-373, 2009.
 11. Urano W, Furuya T, Yamanaka H. Associations between methotrexate treatment and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms with incident fractures in Japanese female rheumatoid arthritis patients. *J Bone Miner Metab.* 27(5):574-583, 2009.
 12. Furuya T, Urano T, Ikari K, Yamanaka H. A1330V polymorphism of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene and self-reported incident fractures in Japanese female patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 19(2):140-146, 2009.
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

蛋白のシトルリン化酵素である PADI4 を標的とする治療法の開発

研究分担者 山本一彦 (東京大学大学院医学系研究科内科学専攻アレルギーリウマチ学 教授)
研究協力者 鈴木亜香里 (理化学研究所ゲノム医科学研究センター)

研究要旨

関節リウマチ(RA)の根本的な治療法には、病因に一義的に関与する因子を標的にすることが重要である。抗シトルリン化蛋白抗体はRAに極めて特異性が高く、また蛋白をシトルリン化する酵素の一つであるPADI4は疾患感受性遺伝子として同定されている。したがって、蛋白のシトルリン化がRAの病態に一義的に重要な役割を果たしている可能性が高い。そこで、PADI4 ノックアウトマウスの作成を通じて、これらの病態との関係を明かにし、さらにこの酵素を抑制することで関節炎の治療が可能であることを明らかにすることを目指し研究を進めた。

A. 研究目的

現在、関節リウマチ(RA)の発症に関して、次のような仮説が提唱されている。すなわち、喫煙や歯肉炎により、肺や口腔内にシトルリン化蛋白が形成され、これに対する免疫応答が惹起される。そして、このような個人に偶発的な関節炎が起こり、関節内の蛋白がシトルリン化されることで、免疫応答の標的が関節内に向けられる、というものである。また、このシトルリン化された自己蛋白に対する自己抗体は、発症後の関節破壊の進展にも影響する。そこで、この仮説において重要な役割を果たす蛋白のシトルリン化酵素の病因論的役割を検証し、根本的治療法を開発することを目的として研究を推進した。すなわち、我々が報告したRA関連遺伝子である蛋白のシトルリン化酵素PADI4に注目し、その役割を明らかにした上で、PADI4を標的とする治療法の開発へと進めることを目的とした。

B. 研究方法

PADI4 ノックアウトマウスを作成した。このマウスを関節炎

を惹起可能なバックグラウンドにするため、バッククロス法を繰り返した。そしてII型コラーゲンの免疫により惹起される関節炎の動物モデルにおけるPADI4の役割を検証した。またノックアウトマウスの特徴を利用した特異性の高い抗PADI4モノクローナル抗体を作成することで、抗PADI4モノクローナル抗体による関節炎抑制実験を可能にする手段の可能性を検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては、倫理委員会により承認された実験計画書に基づいて実験を行った。

C. 研究結果

PADI4のノックアウトマウスを作製した。サザンブロットにてPADI4遺伝子が改変されていること、ノザンブロットで、PADI4遺伝子の発現がないことを確認した。次に、関節炎惹起可能なC57BL/6とDBA/1の系統にバッククロスを進めた。現在までにB6バックグラウンドのマウスにII型コラーゲ

ン誘導性関節炎を惹起させたところ、コントロールマウスと比較して、関節炎が軽減されることが判明している。また、マウスの血清中の抗 II 型コラーゲン抗体は、ワイルドタイプと比較して低下していることを見出した。

一方、PADI4 ノックアウトマウスにリコンビナントマウス PADI4 を免疫することで、PADI4 特異的なモノクローナル抗体を樹立する作業を繰り返した。現在までに、PADI4 の酵素活性を確実に阻害出来る抗体は得られていない。

D. 考察

RA において最も特異性の高い自己抗体が抗シトルリン化蛋白抗体である。これは、蛋白質中のアルギニンがシトルリンに変換されたものを認識する自己抗体である。蛋白をシトルリン化する酵素は、現在までに知られているのは PADI(または PAD) だけであり、PADI1-6 のアイソタイプが存在する。この中で関節や血球中で発現可能なものは PADI2 と PADI4 とされていることから、このどちらかが RA におけるシトルリン化蛋白の産生に重要な役割を果たしているものと考えられている。

我々は RA の疾患関連遺伝子として蛋白のシトルリン化酵素である PADI4 を同定し、報告した。PADI4 の遺伝子多型と RA との関連はアジア人を用いた解析では複数回追認され、確実視されている。さらに、欧米人でも、我々の報告した遺伝子多型と、抗 PADI4 抗体の陽性率、関節破壊が相関することが報告され、PADI4 は人種を越えて RA の発症に関与している可能性が高いと考えられる。そこで、PADI4 の役割と関節炎の成立との因果関係をより明確にして、治療の標的としての PADI4 の位置づけを確立できれば、より明確に関節破壊の進まない RA の治療戦略を構築することが可能となると考えられる。

この目的の為、PADI4 のノックアウトマウスの作成とそのマウスにおける関節炎の観察を本研究の主な目的とした。現在のところ、PADI4 ノックアウトマウスは関節炎が軽減されることが観察されている。これは PADI4 の発現が関節炎の誘発または増悪に一義的に重要な役割を持つことを示唆している。ヒトにおいて示された疾患関連遺伝子の病態への

関わりを検証するシステムが出来たことになる。今後、これが抗シトルリン化蛋白抗体や抗 PADI4 抗体を介して病態に関与しているのか、蛋白のシトルリン化自体が関節炎に関与しているのか、などを明らかにする必要がある。

また、蛋白のシトルリン化には高濃度の Ca が必要であり、これらの環境は細胞外で達成されることが多い。従って蛋白のシトルリン化は、破壊された細胞から放出された PADI4 が、細胞外で自己の蛋白に対して働いている可能性が指摘されている。これらを考慮すると、PADI4 の酵素活性を阻害できるモノクローナル抗体を用いることで、細胞外での蛋白のシトルリン化を抑制することが、直接関節炎に対する治療の可能性を検証することが可能と考える。ノックアウトマウスは PADI4 に対する免疫学的トレランスを持たないことから、リコンビナントの PADI4 をノックアウトマウスに免疫することで、PADI4 に対するモノクローナル抗体を樹立可能と考えた。現在までに、確実に酵素活性を阻害する抗体は得られていないが、この手法を用いて、有用な抗体を獲得したい。

E. 結論

PADI4 と関節炎の関係を、ノックアウトマウスとモノクローナル抗体作成を中心として研究を進めた。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kochi Y, Thabet MM, Suzuki A, Okada Y, Daha NA, Toes REM, Huizinga TWJ, Myouzen K, Kubo M, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K. PADI4 polymorphism predisposes male smokers to rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis, 2010 in press.
2. Okada Y, Suzuki A, Yamada R, Kochi Y, Shimane K, Myouzen K, Kubo M, Nakamura Y, Yamamoto K. HLA-DRB1*0901 lowers anti-cyclic citrullinated