

関節リウマチの疾患誘導因子の解明

研究分担者 吉川秀樹 大阪大学大学院医学系研究科教授

研究要旨 関節リウマチでは、血管新生を伴う高酸素環境下で重篤な骨破壊が起きることに注目し、酸素分圧が破骨細胞形成に影響を与えるか否かを検討した。高酸素による破骨細胞支持細胞からの MCSF 分泌増加により、血液から供給される破骨細胞前駆細胞の長期維持が起こり、破骨細胞の持続的過剰形成を認めた。関節リウマチの重症化に補体 C1q が深く関わっていることに注目し、C1q に対するモノクローナル抗体の作成過程で得られたエピトープ解析から新規低分子ペプチドを合成した。新規低分子ペプチドを用いて、コラーゲン関節炎（CIA）ラットの関節炎抑制効果について検討した結果、本ペプチドは IgG の Fc 部分に非特異的に結合することにより IgG と C1q の結合を阻害し、関節炎、関節破壊の抑制効果を認めた。

A. 研究目的

1. 酸素濃度は様々な細胞の増殖・分化・機能発現に関わっている。関節リウマチでは、血管新生を伴う高酸素環境下で重篤な骨破壊が起きることに注目し、酸素分圧の上昇が、破骨細胞による骨吸収に影響を与えるか否かを検討した。
2. 関節リウマチの重症化に補体 C1q が深く関わっていることが報告されている。C1q に対するモノクローナル抗体の作成過程で得られたエピトープ解析から新規低分子ペプチドを合成し、コラーゲン関節炎（CIA）ラットの関節炎抑制効果について検討した。

B. 研究方法

1. 通常酸素濃度下と高酸素濃度下で破骨細胞を単培養・共培養にて長期培養し、TRAP 染色を用いて比較した。また、破骨細胞の増殖・分化などに関わる因子の遺伝子発現を比較検討した。関節リウマチ患者の骨破壊病変組織の免疫染色にて、血管増生

と酸素濃度及び破骨細胞の出現との関連を検討した。

2. CIA ラットを作成し、感作 12 日目から新規ペプチドを連日腹腔内投与し、関節炎評価、X 線学的、組織学的評価にて新規ペプチドの関節炎に対する効果を検討した。またラット大腿骨骨髓細胞を採取し、破骨細胞形成能について検討した。対照群として MTX を腹腔内投与した群を作成し治療効果を比較した。

C. 研究結果

1. 共培養系では破骨細胞前駆細胞が、高酸素濃度下では通常酸素濃度下の 3 倍以上の長期間にわたり観察された。またこの現象は、高酸素濃度下での支持細胞からの MCSF の発現・産生亢進を伴い、さらに MCSF の中和抗体により完全に破骨細胞の形成が阻害された。また、ヒト関節リウマチの滑膜・骨組織の免疫組織染色では、血管増生を伴う骨破壊病変では、高酸素により誘導される ROS (Reactive oxygen species)、

破骨細胞の出現、MCSF の局在がほぼ一致することが明らかとなった。

2. 新規ペプチドを投与した群において、関節炎スコア、足関節 X 線学的スコア、組織学的スコアは、CIA 群と較べて有意に低値であり、MTX 群と較べても低くなる傾向を示した。新規ペプチド投与によりラット大腿骨骨髓細胞からの破骨細胞形成能は有意に抑制されていた。

D. 結論

1. 血管増生を伴う骨破壊病変では、酸素分圧の上昇に伴う破骨細胞の持続的過剰供給という病態の存在が示された。つまり高酸素による破骨細胞支持細胞からの MCSF 分泌増加により、血液から供給される破骨細胞前駆細胞の長期維持が起こり、破骨細胞の持続的過剰形成を認めた。

2. 新規低分子ペプチドは IgG の Fc 部分に非特異的に結合することにより IgG と C1q の結合を阻害し、関節炎、関節破壊の抑制効果を認めた。関節リウマチの新規治療薬として開発が期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Hattori, T., Fei, W., Kizawa, T., Nishida, S., Yoshikawa, H., Kishida, Y.: The fixed herbal drug composition "Saikokaryukotsu-boreito" prevents bone loss with an association of serum IL-6 reductions in ovariectomized mice model. *Phytomedicine*, 17:170-177, 2010.

2. Igarashi, H., Hashimoto, J., Tomita, T., Yoshikawa, H., Ishihara, K.: TP53 mutations coincide with the ectopic expression of activation-induced cytidine deaminase in the fibroblast-like synoviocytes derived from a fraction of patients with rheumatoid arthritis.

Clinical and Experimental Immunology, 161:71-80, 2010.

3. Hashimoto, J., Garner, P., van der Heijde, D., Miyasaka, N., Yamamoto, K., Kawai, S., Takeuchi, T., Yoshikawa, H., Nishimoto, N.: Humanized anti-interleukin-6-receptor antibody (tocilizumab) monotherapy is more effective in slowing radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis at high baseline risk for structural damage evaluated with levels of biomarkers, radiography, and BMI: data from the SAMURAI study. *Modern Rheumatology*, 21:10-15, 2011.

4. Nakura, A., Higuchi, C., Yoshida, K., Yoshikawa, H.: PKC α suppresses osteoblastic differentiation. *Bone*, 48:476-484, 2011.

2. 学会発表

1) 南平昭豪、平尾眞、西本憲弘、吉川秀樹、橋本淳：トシリズマブ投与後の関節リウマチ患者の血清 DKK1 濃度の変化、第 54 回日本リウマチ学会総会 2010 4 月 神戸

2) 五十嵐英哉、橋本淳、富田哲也、吉川秀樹、石原克彦：線維芽細胞様滑膜細胞株亜型に発現する RA 関連遺伝子の探索、第 54 回日本リウマチ学会総会 2010 4 月 神戸

3) 本城由衣、平尾眞、川戸良能、小瀬弘樹、史賢林、名井陽、吉川秀樹、橋本淳：軟骨初期分化において IL-6 は促進的にはたらく、第 28 回日本骨代謝学会学術集会 2010 7 月 東京

4) 吉田清志、樋口周久、名倉温雄、吉川秀樹：Spleen tyrosine kinase (Syk) の骨芽細胞分化に対する影響、第 28 回日本骨代謝学会学術集会 2010 7 月 東京

5) 川戸良能、平尾眞、本城由衣、小瀬弘樹、史賢林、名井陽、吉川秀樹、橋本淳：低酸素が AKT-FoxO3a を介して筋芽細胞の

分化、融合を促進する、第 28 回日本骨代謝学会学術集会 2010 7月 東京

6) 小瀬弘樹、平尾眞、川戸良能、本城由衣、史賢林、吉川秀樹、橋本淳：骨芽細胞培養下での細胞周囲酸素濃度について、第 25 回日本整形外科基礎学術集会 2010 10月 京都

7) 川戸良能、平尾眞、本城由衣、小瀬弘樹、史賢林、吉川秀樹、橋本淳：低酸素が筋芽細胞の分化、融合を促進する、第 25 回日本整形外科基礎学術集会 2010 10月 京都

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

関節リウマチの重症度(病型) 予後診断法としてのC1q値に関する研究

分担研究者 島岡 康則 行岡医学研究会 行岡病院 副院長

関節リウマチの重症度、とくに骨破壊の指標を得ることは重要である。

これまでの研究で、ハイブリドーマにより新たに抗C1q抗体を作成し、10種類のモノクローナル抗体と2種のポリクローナル抗体を得た。それぞれの抗体により抗体固相を調整し、C1q検出・定量する新たなサンドイッチ法を開発した。さらに、ここから有用な4種の抗体を選択し、RA患者血清135検体を解析した。いずれの抗体についても、RA軽症型病型と、RA重症型病型で有意に異なる値を示すことがわかった。さらに、これらの抗体の認識エピトープが、RA重症度と関連すると考えられたため、合成ペプチドを作成し、認識エピトープの解析を行った。

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

A. 研究目的

関節リウマチの重症度、とくに骨破壊の指標を得ることは重要である。これまでの研究で他の臨床検査値に影響されず安定した値を示す4種の抗体によりC1q検出・定量する新たなサンドイッチ法を開発した。RA患者血清135検体を解析した結果、RA軽症型病型と、RA重症型病型で有意に異なる値を示すことがわかった。これらの抗体の認識エピトープが、RA重症度と関連すると考えられたため、合成ペプチドを作成し、認識エピトープの解析を行った。

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

B. 研究方法

新たに抗C1q抗体を産生するハイブリドーマを作成し、10種類のモノクローナル

抗体と2種のポリクローナル抗体を得た。それぞれの抗体により抗体固相を調整し、C1q検出・定量する新たなサンドイッチ法を開発した。さらに、ここから有用な4種の抗体を選択し、RA患者血清135検体を解析した。また、これらの抗体の認識エピトープが、RA重症度と関連する重要部位だと考えられたため、合成ペプチドを作成し、認識エピトープの解析を行った。

C1qエピトープの同定は、ヒトC1qのサブユニットA鎖、B鎖、C鎖の各サブユニットのアミノ酸配列を15アミノ酸(残基)ずつ3アミノ酸の間隔でずらした配列を合成ペプチドとしてガラスアレイ上に合成した。それぞれのペプチドの合成はアレイ上の特定の位置で行い、C1qのサブユニットの全アミノ酸配列を網羅する合成ペプチド含むペプチドアレイを作製した。ここに本研究で得られた抗C1qモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから産生された抗C1q抗体#8、#33、#40、#54、および#76を精製し、ペプチドアレイ上に塗布し蛍光スキャナーで、スキャンし、強い蛍光強度を示すスポットを検出し、有用なペプチドを決定した。合成ペプチドR1 (P G L Y Y F)、R2

(C K V P G L Y) を決定、作成した。さらに、この合成ペプチドに対する抗体(抗R2-KLHモノクローナル抗体)を4種を作成した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

新たな抗体によるC1q値は、RFとの相関係数は0.28-0.30であったが、CRP、MMP-3、赤沈との相関はいずれも0.07以下で、まったく相関を示さないと考えられた。

軽症型病型36検体で、平均年齢55.1歳、検査値平均はRF 58.9±76.4, CRP 0.8±1.4, MMP-3 72.7±54.9, 赤沈 34.6±25.5 であった。重症型病型は85検体で、平均年齢59.7歳、検査値平均はRF 88.9±100.4, CRP 1.3±1.3, MMP-3 172.4±130.1, 赤沈55.6±30.8 であった。

今回作成した抗体によるC1q値は、軽症型病型では各抗体とも平均102-105±22であった。重症型病型では平均118-122±24であった。これら抗体がRAの重症度分類の指標になるかを検討するために、統計学的検定を行うと、抗体No. 33 (p=0.0028)、No. 40 (p=0.0001)、No. 54 (p=0.0006)、No. 76 (p=0.0005)と、いずれの抗体についても、軽症型病型と、重症型病型で有意に異なる値を示した。

通常用いられる臨床検査地についても同様の有意差検定を行ったが、RF (p=0.25), CRP (p=0.10), MMP-3 (p=0.04), 赤沈 (p=0.03)であり、いずれも重症度を判定するに有意ではなかった。

今回作成された抗R2-KLHモノクローナル抗体は4種類であった。抗体サブクラスはIgM抗体が3種類(抗体No. 3, No4, No5)、未定が1種類(抗体No. 1)であった。固相化したR2-OVAとの反応では、いずれの抗体もR2-OVAを認識していることが確認された。この系にフリーの合成ペプチド(R2)を加えることで、少ないながらも抗体No. 3, No5で阻止反応が観察された。阻止反応が認められたことから、患者血清中のR2エピトープ相当部位を測定できると考えた。135検体のRA患者

血清につき阻止反応を測定したが患者血清による阻止反応(抑制率)は、いずれも、0.922-1.078であり、患者血清での有為な測定はできなかった。

D. 考察

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

今回、新たに開発された抗C1q抗体、測定法は、これまで臨床上使われてきた検査(CRP, MMP-3, RF, 赤沈など)に比較して、格段にRA重症度判定に有効であった。

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

る。これらの抗体の認識エピトープが、RA重症度と関連する重要部位だと考えられる。今回の研究では、有効なエピトープの決定、この合成ペプチド(R1, R2)の作製までは完了したが、患者血清での測定には至らなかった。今後、測定系の感度を上げるなどの改良が必要と考える。

E. 結論

今回新たに作成された抗C1q抗体及び測定法は、臨床検査上、最も有意にRA重症度を判定する指標であり、すぐにでも臨床に利用できる点で意義は大きい。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書に記載とする。)

G. 研究発表
1. 論文発表

1)

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

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

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

2)

Toyosaki-Maeda T, Takano H, Tomita T, Tsuruta Y, Maeda-Tanimura M, Shimaoka Y, Takahashi T, Itoh T, Suzuki R, Ochi T. Differentiation of monocytes into multinucleated giant bone-resorbing cells: two-step differentiation induced by nurse-like cells and cytokines.

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

3)

Hayashida K, Shimaoka Y, Ochi T, Lipsky PE. Rheumatoid arthritis synovial stromal cells inhibit apoptosis and up-regulate Bcl-xL expression by B cells in a CD49/CD29-CD106-dependent mechanism.

J Immunol. 2000 Jan 15;164(2):1110-6.

4)

Shimaoka Y, Attrep JF, Hirano T, Ishihara K, Suzuki R, Toyosaki T, Ochi T, Lipsky PE. Nurse-like cells from bone marrow and synovium of patients with rheumatoid arthritis promote survival and enhance function of human B cells.

J Clin Invest. 1998 Aug 1;102(3):606-18.

5)

Miyashita T, McIlraith MJ, Grammer AC, Miura Y, Attrep JF, Shimaoka Y, Lipsky PE. Bidirectional regulation of human B cell responses by CD40-CD40 ligand interactions. J Immunol. 1997 May 15;158(10):4620-33.

6)

Imanaka T, Shichikawa K, Inoue K, Shimaoka Y, Takenaka Y, Wakitani S. Increase in age at onset of rheumatoid arthritis in Japan over a 30 year period.

Ann Rheum Dis. 1997 May;56(5):313-6.

7)

Tomita T, Shimaoka Y, Kashiwagi N, Hashimoto H, Kawamura S, Lee SB, Nakagawa S, Shiho O, Hayashida K, Ochi T. Enhanced expression of CD14 antigen on myeloid lineage cells derived from the bone marrow of patients with severe rheumatoid arthritis.

J Rheumatol. 1997 Mar;24(3):465-9.

8)

Tomita T, Kashiwagi N, Shimaoka Y, Ikawa T, Tanabe M, Nakagawa S, Kawamura S, Denno K, Owaki H, Ochi T. Phenotypic characteristics of bone marrow cells in patients with rheumatoid arthritis.

J Rheumatol. 1994 Sep;21(9):1608-14.

9)

Tanabe M, Ochi T, Tomita T, Suzuki R, Sakata T, Shimaoka Y, Nakagawa S, Ono K. Remarkable elevation of interleukin 6 and interleukin 8 levels in the bone marrow serum of patients with rheumatoid arthritis.

J Rheumatol. 1994 May;21(5):830-5.

10)

Ochi T, Tomita T, Kimura T, Azuma F,
Owaki H, Wakitani S, Shimaoka Y, Ono H.
A concept to make schedules of therapies based
on the natural courses of patients with
rheumatoid arthritis
Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi. 1994
Jan;68(1):50-61.

11)

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

主任研究者の指示のもとに検討中である。

2. 実用新案登録

主任研究者の指示のもとに検討中である。

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

マクロファージでの H4 受容体とサイトカイン、特に腫瘍壊死因子 (TNF) $\cdot\cdot$ がリウマチの病態発症における骨破壊や滑膜細胞の活動性に関係しているか否かを検討するため、昨年度に引き続き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 $\cdot\cdot$ mRNA 発現に及ぼす作用を解析した。

その結果、RAW264.7 細胞における TNF $\cdot\cdot$ mRNA 発現レベルはヒスタミン 10^{-8}M から 10^{-6}M まで濃度依存的に有意に抑制された。ヒスタミン 10^{-6}M では対照群の約 60%の発現量であった。ヒスタミン 10^{-8}M による TNF $\cdot\cdot$ mRNA 発現抑制は、H4R アンタゴニストの JNJ77771201 10^{-6}M により特異的に遮断され、H4 受容体アゴニストのディマプリットが、ヒスタミンと同様の抑制作用を示した。以上の結果より、恐らく肥満細胞で産生されたヒスタミンがマクロファージの H4 受容体を介して TNF $\cdot\cdot$ の発現を抑制していることが想定され、ヒスタミンは H4 受容体を介して抗炎症的に働いていることが示唆された。

A. 研究目的

ヒスタミンはヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) により L-ヒスチジンから合成される生体アミンであり、肥満細胞および好塩基球中に貯蔵され、即時型アレルギー等に関与していることは古くより知られている。また、ヒスタミンは胃粘膜では ECL 細胞で合成され胃酸分泌に、脳内ではヒスタミン神経系が存在し覚醒維持などの機能をもつこともあきらかにされている。さらに、これらとは別に、IL1B 等により好中球やマクロファージ内に誘導される HDC が存在し、これにより合成されるヒスタミンが免疫調節機能をもつことが推定されている。

一方、リウマチ患者の滑膜細胞において、細胞内ヒスタミン濃度の増加と H1、H2、および H4 各受容体の発現が認められている。

中でも、最近になって発見された H4 受容体については、その発現が患者の病態の進行度によって変化し、進行例で発現量が減少すると報告されている (Ikawa *et al.* 2005, Ohki *et al.* 2007)。ここで、H4 受容体を発現している細胞はマクロファージであると同定されており、ヒスタミンが H4 受容体を介してサイトカイン発現を調節することも知られている。

さらに、本分担研究により昨年度までにヒスタミンが関節リウマチ滑膜細胞の MMP3 遺伝子発現および 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ている。そこで、マクロファージでの H4 受容体とサイトカイン、特に腫瘍壊死因子(TNF)- α がリウマチの病態発症における骨破壊や滑膜細胞の活動性に関係しているか否かを検討するため、昨年度に引き

続き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- α mRNA 発現に及ぼす作用を解析した。

B. 研究方法

RAW264.7 細胞を 1×10^6 cells/well の密度プレートに播種し、24 時間インキュベートした。その後、ヒスタミン (1×10^{-8} - 1×10^{-6} M) を添加し、3 時間経過してから、細胞内の全 RNA を QIAGEN 社の RNeasy Mini Kit を用いて TNF- α mRNA 抽出し定量した。また、ヒスタミン (1×10^{-8} 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 10^{-6} M 添加した時の TNF- α mRNA 発現量への影響、および H₄R アゴニストのディマプリット (10^{-8} - 10^{-6} M) を単独添加した時の TNF- α mRNA 発現量についても RT-PCR 法により調べた。

C. 結果・考察および結論

RAW264.7 細胞における TNF- α mRNA 発現レベルはヒスタミン 10^{-8} M から 10^{-6} M まで濃度依存的に有意に抑制されヒスタミン 10^{-6} M では対照群の約 60% の発現量であった。ヒスタミン 10^{-8} M による TNF- α mRNA 発現抑制は、H₄R アンタゴニストの JNJ7777120 10^{-6} M により特異的に遮断され、H₄R アゴニストのディマプリットが、ヒスタミンと同様の抑制作用を示した。以上の結果より、恐らく肥満細胞で産生され

たヒスタミンがマクロファージの H₄ 受容体を介して TNF- α の発現を抑制していることが想定され、ヒスタミンは H₄ 受容体を介して抗炎症的に働いていることが示唆された。

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- α 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)

分担研究報告書

抗ヒト SHPS-1 モノクロー抗体の機能解析

分担研究者 鈴木 隆二 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 室長

研究要旨：RA 病態解析の主任研究者の研究から導き出された「関節リウマチ(RA)の主要病巣は骨髄」という考え方は厚生科学研究費や医薬品機構研究費などに支援された日本発の独創的研究であり、RA 病態形成に関わる細胞群の詳細な検討が行なわれてきた。本研究は、RA 特異的病態に関わる病因遺伝子を探索の結果、見出された糖タンパク質 Src homology 2-domain containing protein tyrosine phosphatase substrate 1(SHPS-1/SIRP-A)はマウス系に於いてマクロファージの多核化（破骨細胞形成誘導）、樹状細胞の機能成熟、T 細胞の活性化に関与する事を明らかにし、さらに、抗マウス SHPS-1 モノクロー抗体は、In vitro においては、破骨細胞形成阻止、炎症性サイトカイン産生誘導抑制効果を示した。また、In vivo でマウス CIA モデルに対して予防的および治療的効果を示した。マウスモデル系において本分子の RA 治療における可能性が示唆されたことから、本年度は、ヒト SHPS-1/SIRP-A に対するモノクロー抗体の作成を行った。選択されたモノクロー抗体はヒト単球を認識し、ヒト破骨細胞誘導を抑制し、更に ConA 刺激ヒト末梢血に産生誘導される IL-2 を濃度依存性に抑制した。

A. 研究目的

SHPS-1/SIRP-A は単球・樹状細胞に高発現する膜タンパクであり、フォスファターゼ SHP-1/2 と結合することが知られている。我々は、抗マウス SHPS-1 抗体の in vitro おける破骨細胞形成誘導阻害効果と炎症性サイトカイン産生誘導抑制効果を示し、さらに、*in vivo* で CII 誘発性関節炎モデル（CIA マウス）に対して治療効果を有することを報告してきた。これらの結果から、SHPS-1/SIRP-A が RA 治療に対してターゲットと成り得る可能性を示唆した。これらの結果から、さらに、ヒト SHPS-1/SIRP-A に対するモノクロー抗体を作成し、*in vitro* ヒト単球由来破骨細胞誘導系および ConA 刺激サイトカイン誘導系における本抗体の効果を検討したので報告する。

B. 研究方法

ヒト SHPS-1/SIRP-A に対するモノクロー抗体の作成と評価：①ヒト SHPS-1 は 3 つの Ig 様ループ構造をもつ糖タンパク質であり、リガンドである CD47 との結

合には N 末のループが重要と推測されている。この SHPS-1 活性化に影響する抗体の作成を目的とした。免疫原としての組換えタンパクの調整は、バキュロ発現系にて、40 番目の D から 145 番目の R まで(GST-N 末領域 His タグ：SIRP-A)、40 番の D から 371 番目の N まで(細胞外領域全体 His タグ：SIRP-B)を発現・精製して Balb/c マウスに免疫しハイブリドーマの樹立を行った。目的とする抗体の選択は、1 次スクリーニングとして、免疫原タンパクに対する ELISA で、2 次スクリーニングとして FACS による THP-1 細胞表面上の SHPS-1 の検出を行った。②選択された抗体については、ヒト破骨細胞形成誘導系に添加し、その効果を検討した。また、ConA 刺激ヒト末梢血単核細胞に抗体を添加し誘導されるサイトカイン量を測定した。

(倫理面への配慮)

本実験に給した臨床サンプルは、全て説明と同意の上入手した。本研究に使用したマウスは、動物愛護の精神に基づき適正に使用した。

C. 研究結果

ヒト SHPS-1/SIRP-A に対するモノクロ抗体の作成と評価：①1次スクリーニングにおいて、免疫原 SIRP-A に対して 185 個、免疫原 SIRP-B に対して 179 個の陽性クローンを選択した。②2次スクリーニングの結果、最終的に免疫原 SIRP-A に対して 18 個、免疫原 SIRP-B に対して 2 個の陽性クローンを選択した。これら最終選択したクローンについては、ウエスタンブロッティングにて認識する分子量を検討した。これらクローンは腹水化、Ig アイソタイプを決定した。③腹水化後に精製したモノクロ抗体については、ヒト破骨細胞誘導系に添加実験を行い、その効果を検討した結果、クローン #102B2, 101H9 において用量依存性抑制効果、#111A7, 125D3 においては形成増加効果が確認された。また、ConA 刺激ヒト末梢血単核球サイトカイン産生は 102B2, 101H9 で IL-2, IFN γ に抑制効果が確認された。

D. 考察

ヒト SHPS-1/SIRP-A に注目した今回の検討から、ヒト SHPS-1/SIRP-A に対するモノクロ抗体を作成した。生細胞上の本分子を認識する抗体の選択に成功し、ヒト破骨細胞誘導抑制および増強効果を示す機能的抗体が得られた。抑制効果を示した抗体が認識する SHPS-1 の部位は抑制抗体では 40 番目の D から 145 番目の R までを認識していた。

E. 結論

マウスで先行した SHPS-1/SIRP-A 分子を抑制することによる関節炎モデルマウスの治療効果とその作用機序の検討から、ヒト SHPS-1/SIRP-A に対するモノクロ抗体を作成した。現在迄に、その抗体は、ヒト破骨細胞誘導を濃度依存性に抑制することが明らかとなった。また、SHPS-1 分子上の部位によって機能的抑制と増強効果のシグナルを伝え方が異なる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
未
2. 学会発表
未

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
未
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特になし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
（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か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、もしくは精巣が萎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

上記の遺伝子を含む置換ベクターを2種類作製する。第1は、CILP promoterを直接Cre-mERT2に接続したコンストラクト (3.5CILP-Cre-mERT2) で、プロモーター領域を3.5kb含むものである。しかし、このトランスジーンにはイントロンがないので、場合によっては発現が低いことが予想される。また、CILP遺伝子の第1イントロンには保存されている配列がある。そこで、CILP promoterから第2エクソンまでの5.3kbのDNA断片を用いて第2のコンストラクト (5.3CILP-Cre-mERT2) を作製する。このベクターとCre発現ベクターを電気穿孔法で既存のトラップクローンに導入する。そして、マウス系統を樹立する。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、このままでは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、3.5CILP-Cre-ERT2および5.3CILP-Cre-mERT2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、LoxKR3-3.5CILP (or 5.3CILP)-Cre-mERT²-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、それぞれ 5 または 4 つの挿入クローンを確認した。これらのクローンを用いてキメラ作製を行い、それぞれ 2 系統を樹立した。これらのオスキメラの精子とレポーターマウス (R26R) からの卵子とで体外受精を行い、Cre と lacZ を持つマウスを得た。3.5CILP-Cre-mERT2 に 3 日間タモキシフェンを投与し、大腿骨を採取し、lacZ 発現を解析した。骨端軟骨板で発現が認められた。5.3CILP-Cre-mERT2 についても、レポーターマウス (R26R) からの卵子と体外受精を行い、Cre と lacZ を持つマウスを得た。

(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、2 匹のファウンダーマウスを得、マウス系統を樹立した。

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。Tnfsf14 については、そのままでは発現せず、tamoxifen 投与時にのみ発現するようにしたところ、ファウンダーマウスは順調に得られたところから、その遺伝子発現が生体にとっては毒性があること、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

- ① Araki, K., Okada, Y., Araki, M. and Yamamura, K. Comparative analysis of right-element mutant lox sites on recombination efficiency in ES cells. BMC Biotech. 10: 29, 2010.
 - ② Wang, J., Ohmuraya, M., Suyama, K., Hirota, M., Ozaki, N., Baba, H., Nakagata, N., Araki, K. and Yamamura, K. Relationship of strain dependent susceptibility to experimentally induced acute pancreatitis with regulation of Prss1 and Spink3 expression. Lab. Invest. 90: 654-664, 2010.
 - ③ Li, Z., Zhao, G., Shen, J., Araki, K., Haruna, K., Inoue, S., Wang, J. and Yamamura, K. Enhanced expression of human cDNA by phosphoglycerate kinase promoter-puromycin cassette in the mouse transthyretin locus. Transgenic Res. 20: 191-200, 2011.
2. 学会発表
- ① 山村研一：膵炎におけるオートファジーの役割 (シンポジウム 3 オートファジーと病態), 第 9 9 回
 - ② 山村研一：膵炎におけるオートファジーの役割 (シンポジウム 3 オートファジーと病態), 第 9 9 回日本病理学会総会, 2010.4.27-29, 東京
 - ③ 山村研一：典型的な優性遺伝病の発症における環境要因 (シンポジウム 1 実験動物学を考える—遺伝と環境を統御した優れた動物実験—), 第 5 7 回日本実験動物学会総会, 2010.5-12-14, 京都 (京都テルサ)
 - ④ Yamamura, K.: MSM/Ms mouse as a tool for humanized mouse project in Japan. (Plenary Lecture)., 2010 KALAS International Symposium, August 19-21, 2010, Pusan Korea (Busan BEXCO Exhibition & Convention Center).
 - ⑤ Yamamura, K.: Humanized Mice for Functional Genomics and Human Disease Model, The 4th AFLAS Congress Meeting 5th AMMRA Meeting & 11th CSLAS Annual Meeting, 2010.11.9-11, Taipei Taiwan (Taipei International Convention Center)
 - ⑥ Li, Z., Araki, K., Yamamura, K.: Production of Optimum Humanized Mouse Model for

Familial Amyloidotic Polyneuropathy,
2010.11.9-11, Taipei Taiwan (Taipei
International Convention Center)

H. 知的財産権の出願・取得状況
なし

マイクロアレイを用いた関節リウマチ患者骨髄細胞における免疫機能異常の解析

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
共同研究者 李慧敏、杉野英彦 大阪大学大学院生命機能研究科
和田雅史、松谷隆治 和歌山県立医科大学免疫制御学講座
島岡康則 行岡病院
越智健介 川崎市立病院
鈴木隆二 国立相模原病院臨床研究センター
川根公樹、長田重一 京都大学大学院医学研究科
越智隆弘 大阪警察病院

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、バイオインフォマティクスの応用により、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患者骨髄では、インターフェロ(IFN)で誘導される分子群の発現増加(いわゆるIFN signature)が見られた。またMHC class Iに分類されるHLA-E、HLA-F、HLA-G、抗原提示に関与する分子の発現が増加し、抗原提示機能の亢進が示唆された。次に関節炎モデルであるDNaseII KOマウスで、RA患者類似の骨髄の機能異常が見られるか否かを検討したところ、ヒトRA患者のそれと類似していた。HLA class Iに分類されるHLA-E、HLA-F、HLA-Gの発現は、健常成人では通常は見られず、癌細胞や活性化リンパ球に発現する。骨髄細胞で見られる免疫機能の亢進を含めたこれらの異常は、骨髄がRAの原因病巣であることを支持する。

A. 研究目的

関節リウマチ(RA)は関節滑膜の増殖と関節破壊を特徴とする炎症性疾患であるが、病態形成には骨髄細胞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、バイオインフォマティクスを用いてRAの骨髄における機能異常とそれに関わる分子間の相互作用を明らかにする。

一方、RA様関節炎を発症するDNaseII KOマウスでは、未分解DNAの蓄積によるマクロファージの活性化と赤芽球の増殖抑制が骨髄で認められる。そこで、RA患者骨髄とDNaseII

KOマウスの骨髄での遺伝子発現プロファイルを比較し、骨髄における機能異常の類似性を検討する。

B. 研究方法

9例のRA患者と10例の変形性関節症(OA)患者の骨髄単核球からTotal RNAを抽出し、遺伝子発現プロファイルを、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析し、骨髄における機能異常をバイオインフォマティクス・ツールで比較検討した。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。同様に7例のRA患者と6例の健常人骨髄血全血を用いて骨髄における機能異常を検討した。DNA マイクロアレイは、54679 遺伝子オリゴ DNA 搭載マイクロアレイ Affymetrix 社 Genechip®ならびに Agilent Whole Human Genome4x44K®を用いた。

次に DNaseII KO マウス骨髄血の遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析し RA 患者の骨髄血の遺伝子発現プロフィールと比較した。DNA マイクロアレイは、Agilent Whole Mouse Genome4x44K®を用いた。(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「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」にかかわる分子群の発現が有意に増加しており、これらの機能異常が示唆された。免疫関連分子では、インターフェロン(IFN) α 、IFN β 、IFN γ 、IL-12、MYD88、NF κ 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の発現増加(いわゆる IFN signature) が見られた。

MHC class I に分類される HLA-E、HLA-F、HLA-G、抗原提示に関与する分子の発現が増加し、抗原提示機能の亢進が示唆された。

骨髄血全血を用いた検討でも基本的には同様の結果であった。

一方、DNase II KO マウスの骨髄でも、IFN で誘導される分子群と MHC クラス I 分子群の発現が増加しており、ヒト RA 患者のそれと類似していた。しかしながら、両者に共通して

発現が増強あるいは減少していた分子は免疫機能関連分子に集中しており、それ以外の機能に両者に共通して異常な発現パターンを示す遺伝子はなかった。

D. 考察

HLA class I に分類される HLA-E、HLA-F、HLA-G の発現は、健常成人では通常は見られず、癌細胞や活性化リンパ球に発現することが、2010 年に他の研究室から報告された。骨髄細胞で見られる免疫機能の亢進を含めたこれらの異常は、骨髄が RA の原因病巣であることを支持する。

一方、RA の関節炎モデルマウスである DNase II KO マウスの骨髄でもヒト RA 患者の骨髄で見られる遺伝子と類似の免疫機能関連分子が異常発現しており、かつそれ以外の機能には類似点は見られなかったことも、関節炎の発症に骨髄機能異常の関与を示唆する。

E. 結論

RA 患者骨髄における免疫反応の亢進が関節炎に関与することが示唆された。

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. Interleukin-6 as a therapeutic target in candidate inflammatory diseases. Clin Pharmacol Ther 87:483-487, 2010.
2. 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 20: 222-232, 2010.
3. Sugino H, Lee HM, Nishimoto N. DNA microarray analysis of rheumatoid arthritis susceptibility genes identified by genome-wide association studies (GWAS). Arthritis Res Ther 12:401, 2010.

4. Nishimoto N, Takagi N. Assessment of the validity of the 28-joint disease activity score using erythrocyte sedimentation rate (DAS28-ESR) as a disease activity index of rheumatoid arthritis in the efficacy evaluation of 24-week treatment with tocilizumab: subanalysis of the SATORI study. *Mod Rheumatol* 20:539-47, 2010
 5. 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) monotherapy is more effective in slowing radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis at high baseline risk for structural damage evaluated with levels of biomarkers, radiography, and BMI: data from the SAMURAI study. *Mod Rheumatol* 2011 21:10-152.
 2. 学会発表
 1. 西本憲弘. トシリズマブによる RA の治療 (完結編) — ドラッグフリーへの挑戦 — 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会シンポジウム 神戸. 2010.4.23-26
 2. 杉野英彦、李慧敏、安達康雄、青木千恵子、西本憲弘. GWAS から得られた関節リウマチ感受性遺伝子の DNA マイクロアレイによる発現検討 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会シンポジウム神戸. 2010.4.23-26
 3. 西本憲弘. 関節リウマチに対するトシリズマブ休薬後の効果持続期間の検討 (DREAM 試験) 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会 神戸. 2010.4.23-26
 4. 西本憲弘. RA 患者における TCZ 休薬後の再燃に対する再投与の安全性と有効性 (RESTORE 試験) 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会 神戸. 2010.4.23-26
 5. 西本憲弘、橋本 淳. 関節リウマチに対する IL-6 阻害治療から学んだ骨代謝における IL-6 の役割 第 25 回日本骨代謝学会シンポジウム 東京. 2010.7.21
 6. 西本憲弘. 関節リウマチに対する IL-6 阻害治療と DNA チップによる効果予測. 第 31 回日本臨床薬理学会シンポジウム 2010.12.1
 7. 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
 8. Nishimoto N, Drug free REmission after cessation of Actemra Monotherapy (DREAM study) EULAR2010. Roma. 2010.6.17.
 9. Nishimoto N, Retreatment Efficacy and Safety of TOcilizumab in patients with rheumatoid arthritis at REcurrence (RESTORE study) EULAR2010. Roma. 2010.6.17.
 10. Nishimoto N. Drug free REmission after cessation of tocilizumab (Actemra) Monotherapy (DREAM study) ACR/ARHP 2009. Atlanta. USA. 2010.10.16-23
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)
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。

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(平成22年度)

研究分担者氏名: 澤井 高志

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
1	Takamiya M, Fujita S, Niitsu H, Aoki Y, Kanno H, Sawai T	A Case of Takayasu arteritis complicated by right atrium perforation and injuries of the right common iliac artery and vein caused by cannulation for percutaneous cardiopulmonary support	Am J Forensic Med Pathol	31(1)	72-76	2010
2	Yamauchi K, Sasaki N, Niisato M, Kamataki A, Shikanai T, Nakamura Y, Kobayashi H, Suwabe A, Kanno H, Sawai T and Inoue H	Analysis of pulmonary allergic vasculitis with eosinophil infiltration in asthma model of mice	Exp Lung Res	36	227-236	2010
3	Kurose R, Ichinohe S, Tajima G, Horiuchi S, Kurose A, Sawai T, Shimamura T	Characterization of human synovial fluid cells of 26 patients with osteoarthritis knee for cartilage repair therapy	Int J Rheum Dis	13(1)	68-74	2010
4	Mimata Y, Kamataki A, Oikawa S, Murakami K, Shimamura T, Sawai T	Tocilizumab suppresses ADAMTS-4 gene expression in fibroblast-like synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis	Ann Rheum Dis	69(Suppl3)	663	2010
5	及川伸也、鎌滝章央、三又義訓、村上賢也、澤井高志	関節リウマチ滑膜におけるBv8の発現	岩手医学雑誌	62(1)	37-45	2010
6	三又義訓、鎌滝章央、及川伸也、村上賢也、澤井高志	節リウマチ患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞に対するIL-6刺激による蛋白分解酵素ADAMTS-4とADAMTS-5の発現の変化の解析	岩手医学雑誌	62(2)	85-94	2010
7	石黒直樹、岩館克治、澤井高志	実験的変形性膝関節症に対する高分子量ヒアルロン酸(平均分子量270万HA)スベニールと架橋型ヒアルロン酸(Hylan G-F20)SYNVISCOの作用比較	関節外科	29(12)	112-124	2010
8	佐々木信人、鎌滝章央、澤井高志	全身性強皮症および類似疾患、肺病理	日本胸部臨床	69(3)	224-233	2010
9	村上賢也、鎌滝章央、佐々木信人、澤井高志	関節破壊の病理組織学的特徴	日本臨床	68(増刊号5)	65-70	2010
10	菅野祐幸	臨床リウマチ医のための基礎講座 免疫担当細胞のクロナリディ	臨床リウマチ	22	257-259	2010
11	字月美和、鎌滝章央、佐々木喜子、徳永勢二、澤井高志	関節リウマチにおけるヒアルロン酸の合成と分解について	臨床リウマチ	22	337-343	2010
12	佐々木信人、山内広平、長島広相、古和田浩子、中館俊英、中村 豊、内海 裕、鈴木奈緒美、秋山貞親、小林仁、井上洋西、澤井高志	アレルギー性血管炎における血管リモデリングに対するイマチニブの効果	日本呼吸器学会雑誌	48	158	2010

13	澤井高志、鎌滝章央、佐々木 信人、畠山 明	混合性結合組織病(MCTD)にとも なう肺高血圧(PH)に関連する抗内 皮細胞抗体(AECA)に関する研究	厚生労働科学研究費補助 金難治性疾患克服研究事 業「混合性結合組織病の病 態解明と治療法の確立に関 する研究」平成21年度総括・ 分担研究報告書		22-24	2010
14	澤井高志	関節リウマチにおける軟骨・骨破壊 の病理学的解析	東日本整災会誌	22(3)	269	2010