

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

ヒト関節リウマチ特異的 CD4 陽性細胞および  
血漿・関節液 miRNA の同定と治療・診断への応用

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉富 啓之

平成24（2012）年 5月

## 目 次

I.	総括研究報告	
	ヒト関節リウマチ特異的 CD4 陽性細胞および血漿・関節液 miRNA の同定と治療・診断への応用	1
	研究代表者 吉富 啓之	
II.	分担研究報告	
	1. ヒト関節リウマチ特異的 CD4 陽性細胞および血漿マイクロ RNA の同定	7
	研究代表者 吉富 啓之	
	2. ヒト関節リウマチにおける IL-27 に関する研究	13
	研究分担者 中村 孝志	
	3. 関節リウマチにおける血漿中マイクロ RNA の臨床的解析	17
	研究分担者 伊藤 宣	
III.	研究成果の刊行に関する一覧・別刷	19

# I. 総括研究報告

## ヒト関節リウマチ特異的 CD4 陽性細胞および血漿・関節液 miRNA の 同定と治療・診断への応用

研究代表者 吉富 啓之 京都大学大学院医学研究科 整形外科 助教  
研究分担者 中村 孝志 京都大学大学院医学研究科 整形外科 名誉教授  
研究分担者 伊藤 宣 京都大学大学院医学研究科 リウマチ性疾患制御学 准教授

### 研究要旨:

関節リウマチの病態は十分に解明されているとはいえ、それが治療無効例につながっていると考えられる。最近我々は、関節液および血漿中のマイクロ RNA の存在と関節リウマチに対するバイオマーカーとしての可能性を示した。また、ヒトとマウスの CD4 陽性細胞等の免疫反応の違いが近年指摘されており、本研究ではヒト検体を用いて関節に浸潤する CD4 陽性細胞の解析と、関節液・血漿中マイクロ RNA の解析にて臨床使用可能な新たな検査の確立と、新たな病態機序の解明による新規治療を目指す。

### A. 研究目的

近年、動物モデルとヒト自己免疫疾患の違いが指摘されている。動物では IL-17 産生性 CD4 陽性 T 細胞(Th17)が重要な役割を果たし、末梢および炎症部位にて Th17 細胞の増加を認めるが(J Exp Med, 204:2803-12)、ヒト関節リウマチ(関節リウマチ)で Th17 は細胞は末梢で増加せず、関節局所では減少している。原因としては動物種による CD4 陽性リンパ球の性質の差があると考えられる。例えば、マウス Th17 の分化には IL-6 と TGF- $\beta$  が重要だが(Nature,441: 235-238)、ヒトでは IL-1 が重要である事(J Exp Med, 205:1903-16)、ヒト CD4 陽性細胞には Th17 に分化可能な CD161 陽性群と不可能な CD161 陰性群が存在する事(J Exp Med, 205:1903-16)等が指摘されている。これらの事より、動物モデルだけでなくヒト関節リウマチの検体を用いた病態解析が必要となってきた。

新たな側面として、最近我々は関節液中にマイクロ RNA が安定して存在し、関節リウマチと変形性関節症で発現が著明に異なる事を示した。血漿マイクロ RNA は癌の特異的なマーカーとして重要で(Natl Acad Sci

USA, 105:10513-18.) 関節リウマチでも血漿・関節液マイクロ RNA が重要なマーカーとして期待される。マイクロ RNA は抗原提示や信号伝達に関与する 50nm-100nm の小囊胞である exosome に含まれて分泌されると考えられており、特異的マイクロ RNA の解明は新たな病態の発見につながりえる。

本研究ではヒト関節リウマチにおける CD4 陽性 T 細胞の役割の解明と疾患特異的マイクロ RNA の同定を目的としている。動物種間の反応性違いにより、ヒト関節リウマチ検体で病態を解析することが求められている。動物ではなくヒト検体を用いる事、細胞内マイクロ RNA だけでなく、血漿・関節液内マイクロ RNA の解析を行う事が特色で、新たな関節リウマチの病態機序を明らかにすることが期待される。

具体的には関節リウマチの病態を明らかにするために、以下の 3 つの課題に関して研究を行った。

#### ① ヒト関節リウマチにおける IL-27 の役割

IL-27 は EBI-3 と IL27-p28 のヘテロダイマーからなるサイトカインで、Th1 細胞への

分化を促すだけでなく、Th17 細胞への分化を抑制するなどの免疫抑制作用を持つことが知られている。平成 22 年度には関節リウマチ患者における IL-27 の発現および線維芽細胞様滑膜細胞に対する炎症性サイトカインの抑制能を示した。

平成 23 年度は関節リウマチにおける IL-27 の CD4 陽性細胞に対する制御を解析した。

## ② 関節リウマチ特異的な血漿・関節液中マイクロ RNA の解析

これまで、血漿中にはマイクロ RNA が存在し、腫瘍のマーカーとして有用であることが示されてきたが、平成 24 年に我々は関節液にもマイクロ RNA が存在すること、血漿中マイクロ RNA が関節リウマチの診断および病勢マーカーとなり得ることを示した (Arthritis Res Ther. 2010 55(2)巻 R86 項)

平成 23 年度は関節リウマチに対する診断および病勢判定を目的とした血漿中マイクロ RNA による臨床検査応用を目指し、まずはじめに血漿中マイクロ RNA の網羅的な解析を行った。さらに、候補血漿中マイクロ RNA に対して臨床的な状況にてどの程度の感度特異度、および病勢マーカーとの相関を認めるのかを、50 人の健常人と関節リウマチ患者の血漿を用いて検証した。

さらに候補マイクロ RNA のうちで関節モデルにて同様の変化をする血漿中マイクロ RNA について in vivo の解析を行い、新たな関節リウマチの機序解明を試みた。

## ③ ヒト関節リウマチ関節に遊走するリンパ球の解析

病理学的所見や遺伝子変異との関連、さらには T 細胞共刺激遮断薬が関節リウマチに有効であることから、CD4 陽性細胞が関節リウマチ滑膜での炎症に関与していることは明らかだが、どの様な機序で働いているのかはいまだに不明な点が多い。また最近になりヒトとマウスの CD4 陽性 T 細胞を始

めとする免疫系に違いがあることが明らかになっており、動物モデルで得られた知見がヒトの疾患では応用できないことが少なくない。

本研究では関節リウマチ患者の炎症滑膜に存在する CD4 陽性細胞の組織内での分布や、表面抗原および産生するサイトカインの解析を行うことで、関節リウマチの未知の病態を明らかにし新たな治療へとつなげることが出来ると考える。

## B. 研究方法

### ① ヒト関節リウマチ病態における IL-27 の役割

平成 22 年度は、それぞれ 15 名の関節リウマチ患者および変形性関節症患者から関節液および血漿、健常人より血漿を採取し、IL-27 の濃度を ELISA にて測定した。

次に、IL-27 の由来を調べるために、関節リウマチ患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞 (FLS) や単核球による IL-27 の産生を測定した。また、関節リウマチおよび変形性関節症の滑膜組織の免疫染色にて IL-27 産生細胞の分布を解析した。

In vitro では TNF $\alpha$  および IL-17 刺激にて誘導される FLS からの IL-6 および CCL20 産生における IL-27 の影響および IL-27 の受容体である WSX-1 の関与を解析した。

平成 23 年度は関節リウマチ関節における IL-27 の機能を解析するために、関節リウマチ関節液での IL-27 と IFN- $\gamma$  または IL-17 の濃度を ELISA にて測定し、それらの相関を解析した。

### ② 関節リウマチ特異的な血漿・関節液中マイクロ RNA の解析

平成 22 年度は関節液中マイクロ RNA の存在と、その凍結融解等における安定性を解析した。次にそれぞれ 30 名の関節リウマチ患者および変形性関節症患者より血漿と関節液を、健常人より血漿を採取し、細胞

内のマイクロ RNA として関節リウマチとの関連が報告されている miR-16, miR-132, miR-146a, miR-155 および miR-223 の濃度をリアルタイム PCR を用いて測定した。また、滑膜組織、線維芽細胞様滑膜細胞、単核球が、培養上清中に分泌する上記マイクロ RNA の濃度を同様に測定し、関節液および血漿中マイクロ RNA の発現パターンと比較した。最後に、健常人、関節リウマチおよび変形性関節症によるマイクロ RNA の発現の違いや、関節リウマチの疾患活動性とマイクロ RNA の相関を解析した。

平成 23 年度は関節リウマチ患者と健常人の 768 種類の血漿中マイクロ RNA を、リアルタイム PCR 法を用いたアレイにて網羅的に 3 検体ずつ解析し比較した。P 値が 0.1 以下または発現差が 4 倍以上あるもの等を候補とした。これらのマイクロ RNA に対して 6 検体ずつで  $\Delta Ct$  法にて発現比較を行い、P 値が 0.05 以下で有意差のあるものを RACmiR とした。さらに、関節リウマチ患者および健常人での RACmiR の発現をそれぞれ 50 名程度の検体で解析し、感度・特異度やリウマチ因子 (RF)、抗 CCP 抗体、MMP3 等のマーカーや疾患活動性との相関を解析した。また治療による発現の変化も解析した。

さらに候補マイクロ RNA のうちで関節モデルにて同様の变化をする血漿中マイクロ RNA について in vivo の解析を行い、新たな関節リウマチの機序解明を試みた。

### ③ ヒト関節リウマチ関節に遊走するリンパ球の解析

整形外科手術時に摘出された関節リウマチ滑膜組織中に浸潤する免疫細胞を抗 CD3 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体等にて蛍光多重免疫染色を行い、それらが滑膜組織中での分布を解析した。次に Th1 細胞が産生する IFN- $\gamma$  や Th17 細胞が産生する IL-17A と異なった CD4 陽性細胞が産生する因子があるのかを検索するために、滑

膜組織内で発現する IL-17 等のサイトカインや CCR5, CCR6, CD161 等の表面分子を蛍光多重免疫染色やフローサイトメトリー、RT-PCR にて解析した。

## C. 研究結果

### ① ヒト関節リウマチ病態における IL-27 の役割

血漿においては、関節リウマチ、変形性関節症、健常人共に 400pg/ml 程度の IL-27 を認め、有意差はなかった。一方で関節液においては、関節リウマチでは 100pg/ml 程度の IL-27 が存在したのに対し、変形性関節症ではほとんど検出されず、有意に差を認めた。

IL-27 の産生は CD14 陽性細胞のみに認められ、FLS、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、B 細胞からは認められなかった。

関節リウマチおよび変形性関節症の滑膜組織の免疫染色では、関節リウマチには多数の IL-27 産生性 CD14 細胞の浸潤が認められたが、変形性関節症にはほとんど認めなかった。

TNF  $\alpha$  および IL-17 により誘導される FLS からの IL-6 および CCL20 の産生は IL-27 により抑制された。さらに IL-27 の受容体である WSX-1 のデコイを加えたところ抑制が解除されたことより、この抑制は WSX-1 受容体を介していると考えられた。

関節リウマチ罹患関節液において、IL-27 と IFN- $\gamma$  濃度は有意な正の相関を示したのに対し、IL-27 と IL-17 は弱い負の相関を示した。このことから、関節リウマチ罹患関節において IL-27 は実際に Th1 の産生を促し、Th17 の分化や遊走を抑制していることが示唆された。

### ② 関節リウマチ特異的な血漿・関節液中マイクロ RNA の解析

平成 22 年度には関節液中にもマイクロ RNA は存在し、-20 度での保存および 8 回までの融解凍結でも血漿中マイクロ RNA と

同様に安定していることを示した。5種類のマイクロ RNA の発現量でレーダーチャートを作成し、発現パターンを検討したところ、血漿と関節液で発現パターンは異なっていた。このため、血漿中マイクロ RNA と関節液中マイクロ RNA はその産生機序が異なると考えられた。次に FLS、滑膜組織、単核球ともに培養上清中を解析したところ、それぞれにマイクロ RNA が放出されていることが明らかとなった。関節液マイクロ RNA の発現パターンは滑膜組織が放出するマイクロ RNA のパターンに酷似していた。これらのことから、関節液中マイクロ RNA は血漿中マイクロ RNA と比較して、関節の状態をより反映していると考えられた。

血漿中のマイクロ RNA は 5 種のなかで miR-132 が健常人で有意に高く( $p < 0.01$ )、ROC カーブにて診断能力を解析したところ、83.8%の感度と 80.7%の特異度で健常人と関節リウマチ患者を区別し AUC は 0.90 と高値であったが、関節リウマチ患者と OA 患者の区別は困難であった。血漿 miR-16、miR-146a、miR-155、miR-223 と圧痛関節数、血漿 miR-16 と DAS28 が相関した ( $p < 0.05$ )。上記の成果は Arthritis Research & Therapy 誌 12(3)巻 R86 項(2010 年)に掲載された。この論文は Nature Review Rheumatology 誌 6(8)巻 436 巻 (2010 年)で取り上げられ、現在国際特許申請中である。

平成 23 年度にはマイクロ RNA アレイを行った。網羅的に解析されたマイクロ RNA 768 個のうち健常人、関節リウマチそれぞれ 3 検体の解析で候補となった一次候補血漿中マイクロ RNA は 49 種であった。これらのマイクロ RNA のうち 6 検体で差が認められたものは 17 種類でこれらを RA Associated Circulating micro RNA (RACmiR)とした。これらの RACmiR はこれまでヒト疾患との関連が報告されていないものがほとんどであった。これらの RACmiR について、48 名の健常人と関節リウマチ患者を区別する ROC 解

析にて、優れた検査の指標である AUC 0.9 以上となる RACmiR は 3 種類認められ、それぞれ感度 91.7%で特異度 81.3%、感度 81.3%で特異度 95.8%、感度 85.4%で特異度 83.3%であった。AUC が 0.88 以上のものも含めるとさらに 3 種類認めた。また 17 種類の RACmiR と各関節リウマチ疾患活動性との相関を解析したところ、RACmiR-5, 9 と赤沈、VAS (全身状態)と RACmiR-3, 9, 17、が有意に相関した。また、RACmiR-15 は生物製剤の治療前後で変化し、治療判定マーカーとしても使用できる可能性があった。一方で、抗 CCP 抗体と相関のあるものはなく、17 種類の RACmiR は抗 CCP 抗体が陽性陰性にかかわらず関節リウマチ患者で同様の発現を示した。なお、本研究における対象症例で抗 CCP 抗体の陽性率は関節リウマチ患者で 75%、健常人で 2%であった。

その内、RACmiR-15 は関節炎動物モデルでも同様の変化を来し、脾臓細胞にて特に発現が強いことから免疫系で重要な役割を果たすことが示唆された。さらに、RACmiR-15 が標的とし発現を抑制する遺伝子を複数個同定している。

### ③ ヒト関節リウマチ関節に遊走するリンパ球の解析

関節リウマチ滑膜組織の sublining layer 中には多数の CD3 陽性細胞がびまん性または濾胞様に浸潤しており、その多数は CD4 陽性細胞であった。多重染色にて、滑膜組織中は CCR5、CCR6、CD161 陽性の CD3 陽性 T 細胞の頻度が高かった。滑膜組織の免疫染色では、IFN- $\gamma$ や IL-17 陽性の T 細胞は数%程度の割合であった。IL-17 は CD4 陽性 T 細胞だけではなく、多核細胞等からも産生されていた。

さらに、関節リウマチにて CD4 陽性細胞が産生する 2 因子を同定した。因子 A は健常人末梢血と比較して、関節リウマチ患者の末梢血や関節に存在する CD4 陽性細胞が Th 分画によらず幅広く非特異的に産生

していた。因子 B は関節中 CD4 陽性細胞中に、Th1 細胞と同程度の高頻度で発現を認め、興味深い事に Th1 や Th17 とは独立した分画が産生するパターンを示した。末梢血では関節リウマチ患者でも因子 B の発現をみとめず、関節炎特異的な現象に関与していると考えられた

#### D. 考察

①生理的な濃度の IL-27 は炎症性サイトカインにより誘導される CCL20 や IL-6 の産生を抑制し、Th17 細胞の分化や遊走の抑制に働いていると考えられた。関節リウマチの滑膜中には IL-27 産生性 CD14 細胞が浸潤しており、この機能を強化することにより関節リウマチの新たな治療へとつながる可能性が考えられた。

②健常人および関節リウマチ患者の網羅的な血漿中マイクロ RNA の解析から、血漿中マイクロ RNA はこれまで用いられてきたマーカーより高い感度特異度を持つ可能性があり、発現は抗 CCP 抗体の陽性陰性によらないことから、抗 CCP 抗体陰性関節リウマチの早期診断に有用である可能性が示唆された。また、これまで主観的な評価であった VAS を RACmiR の検査で客観的に裏付けられる可能性が考えられた。今後は実臨床使用を目指して、さらに大規模な検体数での RACmiR の診断性に対する検討、他疾患での発現解析による疾患特異性の検討、未診断関節炎の前向き観察研究等による関節リウマチに対する発症予測性や予後予測性の解析等を行い、RACmiR が早期診断や予後診断に有用かを確認してゆく。

例えば慢性 C 型肝炎に対するマイクロ RNA 標的薬が第二相臨床治験されている。動物モデルの解析からは関節リウマチの新たな機序が明らかになるだけでなく、肝炎と同様に関節リウマチに対してもマイクロ RNA 標的薬による新たな治療が期待される。

③滑膜組織の蛍光多重染色にて、T 細胞等の免疫細胞の滑膜組織での分布が明らかとなった。関節リウマチ滑膜の sublining layer には多数の T 細胞、B 細胞、点在する樹状細胞を認め、滑膜組織内でリンパ組織様の構造をとっていることが明らかとなった。また、炎症関節に浸潤する T 細胞はヒト Th17 と関連が強いことが報告されている CD161 を有意に発現していた。その他にも複数の候補分子を発現することを確認した。

この解析から得られた知見を、ヒト細胞の培養系や、可能なものは関節炎モデルにて解析することで、CD4 陽性細胞が滑膜におよぼす機序を解明し新規治療の応用が期待される。

#### E. 結論

ヒト関節リウマチ検体を用いた研究により、Th17 細胞の分化遊走を抑制する IL-27 産生細胞がリウマチ滑膜組織内に存在することが明らかとなった。この機能を強化することによる関節リウマチの新たな治療が期待される。

関節液に存在する CD4 陽性細胞のケモカイン受容体の発現プロファイルは末梢血と異なり、CD161 を始めとする分子を発現することが明らかとなった。

血漿および関節液中マイクロ RNA は関節リウマチの有用なマーカーで、網羅的な解析をすることにより、多数の関節リウマチ特異的なマイクロ RNA を同定した。さらに多数検体にて解析することで、臨床的に使用可能でより優れた感度、特異度、発症予測性、予後予測性を有する検査の確立が期待できる。

#### F. 健康危険情報

特に無し

#### G. 研究発表



## 1. 論文発表

吉富啓之. 臨床医学の展望 2011 関節リウマチ. 日本医事新報. No4529 p50-51.

Tanida S, Yoshitomi H, Ishikawa M, Kasahara T, Murata K, Shibuya H, Ito H, Nakamura T. IL-27-producing CD14(+) cells infiltrate inflamed joints of rheumatoid arthritis and regulate inflammation and chemotactic migration. Cytokine. 2011 Aug;55(2):237-44.

## 2. 学会発表

吉富啓之、伊藤宣、中村孝志. 関節リウマチ滑膜には IL-27 産生性 CD14 陽性細胞が浸潤し炎症や遊走を制御する. 第 40 回日本免疫学会学術集会. 千葉.

吉富啓之、村田浩一、他. 関節疾患と分泌 microRNA. 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会. 前橋.

村田浩一、吉富啓之、他. 血漿・関節液マイクロ RNA は関節リウマチの疾患バイオマーカーとなりうるか?. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 神戸.

### H. 知的財産研の出願・登録状況

関節液・血漿中 microRNA に関する国際特許申請中

## II. 分担研究報告

## ヒト関節リウマチ特異的 CD4 陽性細胞および血漿マイクロ RNA の同定

研究代表者 吉富 啓之 京都大学大学院医学研究科 整形外科 助教

研究協力者 村田 浩一 京都大学大学院医学研究科 整形外科 大学院生

### 研究要旨:

関節リウマチの病態は十分に解明されているとはいえ、それが治療無効例につながっていると考えられる。最近我々は、関節液および血漿中にマイクロ RNA が存在すること、血漿中および関節液中マイクロ RNA の RA マーカーとしての可能性を示した。また、ヒトとマウスの CD4 陽性細胞等の免疫反応の違いが近年指摘されており、本研究ではヒト検体を用いて関節に浸潤する CD4 陽性細胞の解析と、血漿中マイクロ RNA の解析にて臨床使用可能な新たな検査の確立と、新たな病態機序の解明による新規治療を目指す。

### A. 研究目的

近年、動物モデルとヒト自己免疫疾患の違いが指摘されている。動物では IL-17 産生性 CD4 陽性 T 細胞(Th17)が重要な役割を果たし、末梢および炎症部位にて Th17 細胞の増加を認めるが (J Exp Med, 204:2803-12)、ヒト関節リウマチ(RA)で Th17 細胞は末梢で増加せず、関節局所では減少していることが報告されている。この差異の原因としては動物種による CD4 陽性リンパ球の性質の差があるためと考えられている。例えば、マウス Th17 細胞の分化には IL-6 と TGF- $\beta$  が重要だが (Nature, 441:235-238)、ヒトでは IL-1 が重要である事 (J Exp Med, 205:1903-16)、ヒト CD4 陽性細胞には Th17 細胞に分化可能な CD161 陽性群と Th17 細胞に分化が不可能な CD161 陰性群が存在する (J Exp Med, 205:1903-16) がマウスでは同様の現象が認められない等が指摘されている。これらの事より、動物モデルだけでなくヒト RA の検体から新たな研究標的のシードを検索することが必要である。

別の側面として、最近我々は関節液中に

マイクロ RNA が安定して存在し、関節リウマチと変形性関節症で発現が著明に異なる事を示した。血漿マイクロ RNA は癌の特異的なマーカーとして重要で (Nat Acad Sci USA, 105:10513-18.) 関節リウマチでも血漿・関節液マイクロ RNA が重要なマーカーとして期待される。マイクロ RNA は抗原提示や信号伝達に関与する 50nm-100nm の小囊胞である exosome に含まれて分泌されると考えられており、特異的マイクロ RNA の解明は新たな病態の発見につながりえる。

本研究ではヒト関節リウマチにおける CD4 陽性 T 細胞の役割の解明と関節リウマチ特異的マイクロ RNA の同定を目的としている。モデル動物での知見がヒトには応用出来ない事が多々あることから、患者への応用を目指して患者検体で病態を解析することが求められている。動物ではなくヒト検体を用いる事、細胞内マイクロ RNA だけでなく、血漿・関節液内マイクロ RNA の解析を行う事が特色で、新たな関節リウマチの病態機序を明らかにすることが期待される。

平成 23 年度には以下の 2 つの課題について研究を行った。

## ① 関節リウマチ特異的な血漿・関節液中マイクロ RNA の解析

これまで、血漿中にはマイクロ RNA が存在し、腫瘍のマーカーとして有用であることが示されてきたが、関節リウマチに対するマーカーとして使用可能かは不明であった。また、関節液中にもマイクロ RNA が存在するのかどうかは知られていなかった。

平成 22 年度には、関節液中にも安定してマイクロ RNA が存在する事、さらに細胞内で関節リウマチと関連することが知られている5種類のマイクロ RNA を用いて、血漿中および関節系中マイクロ RNA が関節リウマチの診断および病勢マーカーとして使用できる可能性を示した (Arthritis Res Ther. 2010 55(2)巻 R86 項)。

臨床応用、さらに新たな関節リウマチの病態解明を目指して、高い特異度と感度を有する血漿中マイクロ RNA を同定するために、網羅的な血漿中マイクロ RNA の解析を行った。

## ② ヒト関節リウマチ炎症関節に遊走するリンパ球の解析

関節リウマチは滑膜組織の増殖と肥厚から始まり、引き続き滑膜組織が産生するマトリックスメタプロテアーゼ等による軟骨及び靭帯組織の損傷、および滑膜組織に誘導される破骨細胞による骨破壊により関節の変形が生じ、患者の著しい日常生活能力の低下へと至る。一方で、CD4 陽性細胞が滑膜局所で引き起こす免疫反応についてはいまだに不明な点が多い。さらに最近ではモデル動物とヒト関節リウマチとの免疫反応の違いが明らかになってきており、モデルマウスから同定した治療標的がヒトでは無効である場合が少なくない。従って、ヒト関節リウマチの関節局所に遊走する CD4 陽性細胞が発現する遺伝子や、滑膜組織での分布を解析することで、関節リウマチの病態を明らかにし新たな治療へとつなげることが出来ると考えられる。

平成 22 年度は、関節リウマチ滑膜組織の CD4 陽性リンパ球等の免疫細胞の多重蛍光免疫染色を行い、滑膜組織に遊走している CD4 陽性細胞の滑膜組織内での分布や、表面抗原および産生するサイトカインの解析を行った。さらに、関節液および末梢血中の CD4 陽性 T 細胞のフローサイトメトリーを用いた解析を行い、炎症関節に遊走する CD4 陽性リンパ球の性質を解析した。平成 23 年度は Th1 細胞が産生する IFN- $\gamma$  や Th17 細胞が産生する IL-17A と異なった CD4 陽性細胞が産生する因子があるのかを検索した。

## B. 研究方法

### ① 関節リウマチ特異的な新規血漿マイクロ RNA の解析

平成 22 年度には細胞内マイクロ RNA として関節リウマチとの関連が報告されている miR-16, miR-132, miR-146a, miR-155 および miR-223 の濃度をリアルタイム PCR を用いて測定し、関節液中マイクロ RNA の存在と、凍結融解等における安定性、および血漿中または関節液中マイクロ RNA の関節リウマチに対する診断または病勢判定に関する可能性を示した (Arthritis Res Ther. 2010 55(2)巻 R86 項)。

平成 23 年度は、関節リウマチ患者と健康人の血漿中マイクロ RNA を、リアルタイム PCR 法を用いたアレイにて網羅的に3検体ずつ解析し比較した。P 値が 0.1 以下または発現差が 4 倍以上あるもの等を候補とした。これらのマイクロ RNA に対して6検体ずつで  $\Delta$ Ct 法にて発現比較を行い、有意差のあるものを RA-associated circulating micro RNA (RACmiR)とした。さらに、関節リウマチ患者および健康人での RACmiR の発現をそれぞれ 50 名程度の検体で解析し、感度・特異度やリウマチ因子(RF)、抗 CCP 抗体、MMP3 等のマーカーや疾患活動性との相関を解析した。

さらに上記 RACmiR のうちで関節炎モデルの血漿中で患者検体と同様の変化を示すものがあるのかを解析し、同様の変化を示すものに関しては、そのマイクロ RNA がどの様に関節炎の病態に関与しているのかを、関節炎モデルを用いて解析した。

## ② ヒト関節リウマチ関節に遊走するリンパ球の解析

整形外科手術時に摘出された関節リウマチ滑膜組織中に浸潤する免疫細胞を抗 CD3 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体等にて蛍光多重免疫染色を行い、それらが滑膜組織中での分布を解析した。

次に、Th1 細胞が産生する IFN- $\gamma$  や Th17 細胞が産生する IL-17A と異なった CD4 陽性細胞が産生する因子があるのかを明らかにするために、末梢や炎症関節にて T 細胞が発現する IFN- $\gamma$  や IL-17 等のサイトカインや CCR5、CCR6、CD161 等の表面分子を蛍光多重免疫染色やフローサイトメトリー、RT-PCR 等にて解析した。

## C. 研究結果

### ① 関節リウマチ特異的な血漿・関節液中マイクロ RNA の解析

平成 22 年度には関節液中にもマイクロ RNA は存在し、-20 度での保存および 8 回までの融解凍結で血漿中マイクロ RNA と同様に安定していることを示した。5 種類のマイクロ RNA の発現量をレーダーチャートを作成し、発現パターンを検討したところ、血漿と関節液で発現パターンは異なっていた。このため、血漿中マイクロ RNA と関節液中マイクロ RNA はその産生機序が異なると考えられた。次に FLS、滑膜組織、単核球ともに培養上清中を解析したところ、それぞれにマイクロ RNA が放出されていることが明らかとなった。関節液マイクロ RNA の発現パターンは滑膜組織が放出するマイクロ RNA

のパターンに酷似していた。これらのことから、関節液中マイクロ RNA は血漿中マイクロ RNA と比較して、関節の状態をより反映していると考えられた。

血漿中のマイクロ RNA は 5 種のなかで miR-132 が健常人で有意に高く ( $p < 0.01$ )、ROC カーブにて診断能力を解析したところ、83.8%の感度と 80.7%の特異度で健常人と関節リウマチ患者を区別し AUC は 0.90 と高値であったが、関節リウマチ患者と OA 患者の区別は困難であった。血漿 miR-16、miR-146a、miR-155、miR-223 と圧痛関節数、血漿 miR-16 と DAS28 が関連した ( $p < 0.05$ )。上記の成果は Arthritis Research & Therapy 誌 12(3)巻 R86 項(2010 年)に掲載された。この論文は Nature Review Rheumatology 誌 6(8)巻 436 巻 (2010 年)で取り上げられ、現在国際特許申請中である。

平成 23 年度にはマイクロ RNA アレイを行った。網羅的に解析されたマイクロ RNA 768 個のうち健常人、関節リウマチそれぞれ 3 検体の解析で候補となった一次候補血漿中マイクロ RNA は 49 種であった。これらのマイクロ RNA のうち 6 検体で差が認められたものは 17 種類でこれらを RA Associated Circulating micro RNA (RACmiR)とした。これらの RACmiR はこれまでヒト疾患との関連が報告されていないものがほとんどであった。これらの RACmiR について、48 名の健常人と関節リウマチ患者を区別する ROC 解析にて、優れた検査の指標である AUC が 0.9 以上となる RACmiR は 3 種類認められ、それぞれ感度 91.7%で特異度 81.3%、感度 81.3%で特異度 95.8%、感度 85.4%で特異度 83.3%であった。AUC が 0.88 以上のものも含めるとさらに 3 種類認めた。また 17 種類の RACmiR と各関節リウマチ疾患活動性との相関を解析したところ、RACmiR-5, 9 と赤沈、VAS (全身状態)と RACmiR-3, 9, 17、が有意に関連した。また、RACmiR-15 は生物製剤の治療前後で変化し、治療判定マー

カーとしても使用できる可能性があった。一方で、抗 CCP 抗体と相関のあるものはなく、17 種類の RACmiR は抗 CCP 抗体が陽性陰性にかかわらず関節リウマチ患者で同様の発現を示した。なお、本研究における対象症例で抗 CCP 抗体の陽性率は関節リウマチ患者で 75%、健常人で 2%であった。

その内、RACmiR-15 は関節炎動物モデルでも同様の変化を来し、脾臓細胞にて特に発現が強いことから免疫系で重要な役割をはたすことが示唆された。さらに、RACmiR-15 が標的とし発現を抑制する遺伝子を複数個同定している。

## ② ヒト関節リウマチ関節に遊走するリンパ球の解析

平成 22 年度には、関節リウマチ滑膜組織の免疫染色を行い、sublining layer 中には多数の CD3 陽性細胞がびまん性または濾胞様に浸潤していることや、滑膜組織の免疫染色では、IFN- $\gamma$  や IL-17 陽性の T 細胞は数%程度の割合であること、IL-17 は CD4 陽性 T 細胞だけではなく、多核細胞等からも産生されていることを示した。また、フローサイトメリーにて、関節リウマチの関節中 CD4 陽性細胞中の CD161 陽性細胞は統計学的に有意に増加していた。

平成 23 年度には関節リウマチにて CD4 陽性細胞が産生する 2 因子を同定した。因子 A は健常人末梢血と比較して、関節リウマチ患者の末梢血や関節に存在する CD4 陽性細胞が Th 分画によらず幅広く非特異的に産生していた。因子 B は関節中 CD4 陽性細胞中に、Th1 細胞と同程度の高頻度で発現を認め、興味深い事に Th1 や Th17 とは独立した分画が産生するパターンを示した。末梢血では関節リウマチ患者でも因子 B の発現をみとめず、関節特異的な現象に関与していると考えられた。

## D. 考察

①健常人および関節リウマチ患者の網羅的な血漿中マイクロ RNA の解析から、血漿中マイクロ RNA はこれまで用いられてきたマーカーより高い感度特異度を持つ可能性があり、発現は抗 CCP 抗体の陽性陰性によらないことから、抗 CCP 抗体陰性関節リウマチの早期診断に有用である可能性が示唆された。また、これまで主観的な評価であった VAS を RACmiR の検査で客観的に裏付けられる可能性が考えられた。今後は実臨床使用を目指して、さらに大規模な検体数での RACmiR の診断性に対する検討、他疾患での発現解析による疾患特異性の検討、未診断関節炎の前向き観察研究等による関節リウマチに対する発症予測性や予後予測性の解析等を行い、RACmiR が早期診断や予後診断に有用かを確認していく。

例えば慢性 C 型肝炎に対するマイクロ RNA 標的薬が第二相臨床治験中である。動物モデルの解析からは関節リウマチの新たな機序が明らかになるだけでなく、肝炎と同様に関節リウマチに対してもマイクロ RNA 標的薬による新たな治療が期待される。

②因子 A,B ともに CD4 陽性細胞での役割は関節リウマチに限らずこれまでほとんど解析されておらず、研究を進めることで関節リウマチならび免疫学に新たな知見をもたらすことが期待できる。この解析から得られた知見を、ヒト細胞の培養系や、関節炎モデルにて解析することで、CD4 陽性細胞が滑膜におよぼす役割を解明し新規治療の応用が期待される。

## E. 結論

ヒト関節リウマチ検体を用いた研究により、これまでヒト疾患と関連することが報告されていない多数の血漿中マイクロ RNA を同定した。また、これらの血漿中マイクロ RNA は CCP 抗体陽性患者と陰性患者の間で発現に明らかな差を認めないことから、

ACR/EULAR 2010 新分類基準で問題となっているリウマチ因子や抗CCP抗体陰性の者の早期診断に使用できる可能性がある。

また血漿中マイクロRNAは診断マーカーとしてだけでなく、関節炎の新たな機序の解明や治療薬としての核酸製剤へと応用できる可能性がある。

さらにヒト関節リウマチの炎症関節にはIFN- $\gamma$ を産生するTh1細胞やIL-17Aを産生するTh17細胞とは異なるCD4陽性T細胞分画が多数存在した。これらの知見に対する研究を進展させることで、関節リウマチの早期診断や既存薬で効果不十分な症例に対して新たな治療を提供できると考える。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

吉富啓之. 臨床医学の展望 2011 関節リウマチ. 日本医事新報. No4529 p50-51.

Tanida S, Yoshitomi H, Ishikawa M, Kasahara T, Murata K, Shibuya H, Ito H, Nakamura T. IL-27-producing CD14(+) cells infiltrate inflamed joints of rheumatoid arthritis and regulate inflammation and chemotactic migration. Cytokine. 2011 Aug;55(2):237-44.

### 2. 学会発表

吉富啓之、伊藤宣、他. 関節リウマチ滑膜にはIL-27産生性CD14陽性細胞が浸潤し炎症や遊走を制御する. 第40回日本免疫学会学術集会. 千葉.

吉富啓之、村田浩一、他. 関節疾患と分泌microRNA. 第26回日本整形外科学会基礎学術集会. 前橋.

村田浩一、吉富啓之、他. 血漿・関節液マ

イクロRNAは関節リウマチの疾患バイオマーカーとなりうるか?. 第55回日本リウマチ学会総会・学術集会. 神戸.

## H. 知的財産研の出願・登録状況

関節液・血漿中microRNAに関する国際特許申請中

## ヒト関節リウマチにおける IL-27 に関する研究

研究分担者 中村 孝志 京都大学大学院医学研究科 整形外科 名誉教授

研究協力者 谷田 司明 兵庫県立尼崎病院 整形外科 医長

### 研究要旨:

IL-27 は CD4 陽性細胞の Th1 への分化を誘導する一方で、Th17 への分化や炎症性シグナルを抑制するとされている。本研究では関節リウマチにおける IL-27 の役割を解析し、炎症抑制としての IL-27 の可能性を検討した。生理的な濃度の IL-27 は炎症性サイトカインにより誘導される CCL20 や IL-6 の産生を抑制し、Th17 細胞の分化や遊走の抑制に働いていた。関節リウマチの滑膜中には IL-27 産生性 CD14 細胞が浸潤していた。関節リウマチの炎症関節では IL-27 と IFN- $\gamma$  が有意な正の相関を示し、IL-27 と IL-17 が弱い負の相関を示したことから、IL-27 は関節リウマチ関節において実際に Th1 への分化を促進し、Th17 の分化や遊走を抑制していることが示唆された。この機能を強化することにより関節リウマチの新たな治療へとつながる可能性が考えられる。

### A. 研究目的

TNF や IL-6 中和療法が出現してより関節リウマチの治療は劇的に改善したが、3割に効果不十分例が存在する。これは関節リウマチの病態に TNF や IL-6 のみが関与するのではなく、様々なサイトカインが関与しており、またその病態に不明な点が多いためと考えられる。また、リンパ球とこれらのサイトカインの関係も十分に理解されているとは言えない。

IL-27 は IL-6 ファミリーに属するサイトカインで、炎症性シグナルを抑制するだけでなく、Th1 への分化を誘導するが Th17 分化は抑制するとされている。一方で、高濃度の IL-27 は IL-6 同様に炎症性サイトカインとして働くという報告もあり、ヒト関節リウマチにてどの様に働いているのかはこれまで不明であった。

本研究では関節リウマチにおける IL-27 の役割を解析し、炎症抑制としての IL-27 の可能性を検討した。

### B. 研究方法

平成 22 年度はそれぞれ 15 名の関節リウマチ患者および変形性関節症患者から関節液および血漿、健常人より血漿を採取し、ELISA にて IL-27 の濃度を測定した。

次に、関節リウマチ関節液中 IL-27 の由来を調べるために、関節リウマチ患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞 (FLS) や単核球による IL-27 の産生を測定した。さらに、フローサイトメトリーにて IL-27 産生細胞の同定を試みた。関節リウマチおよび変形性関節症の滑膜組織に免疫染色を行い、共焦点蛍光顕微鏡を用いて IL-27 産生細胞の分布を解析した。

In vitro では、炎症性サイトカインにて誘導される FLS からの IL-6 および CCL20 産生における IL-27 の影響および IL-27 の受容体である WSX-1 の関与を解析した。

平成 23 年度は関節リウマチ関節における IL-27 の CD4 陽性 T 細胞に対する機能を解析するために、関節リウマチ関節液での IL-27 と IFN- $\gamma$  または IL-17 の濃度を ELISA にて測定し、それらの相関を解析し



た。

### C. 研究結果

血漿においては、関節リウマチ、変形性関節症、健常人共に平均で 400pg/ml、最大で 1.2ng/ml 程度の IL-27 を認め、有意差はなかった。一方で関節液においては、関節リウマチでは平均で 100pg/ml 程度の IL-27 が存在したのに対し、変形性関節症ではほとんど検出されず、有意に差を認めた ( $p < 0.001$ )。

FLS の炎症性サイトカイン刺激、および単核球のフローサイトメトリー解析により、IL-27 の産生は CD14 陽性細胞のみに認められ、FLS、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、B 細胞からは認められなかった。

関節リウマチおよび変形性関節症の滑膜組織の免疫染色では、関節リウマチ滑膜には多数の IL-27 産生性 CD14 細胞の浸潤が認められたが、変形性関節症滑膜にはほとんど認めなかった。

血漿の測定結果より、生理的な濃度は 10ng/ml 以下であると判断し、その濃度での *in vitro* の解析をおこなった。TNF  $\alpha$  および IL-17 により誘導される FLS からの IL-6 および CCL20 の産生は IL-27 により抑制された。さらに IL-27 の受容体である WSX-1 の可溶化受容体を加えたところ抑制が解除されたことより、この抑制は WSX-1 受容体を介していると考えられた。

平成 23 年度の解析からは、関節リウマチ関節液において、IL-27 と IFN- $\gamma$  濃度は有意な正の相関を示したのに対し、IL-27 と IL-17 は弱い負の相関を示した。このことから、関節リウマチ関節において IL-27 は実際に Th1 の産生を促し、Th17 の分化や遊走を抑制していることが示唆された。

上記の結果は平成 23 年度に Cytokine 誌へ掲載された。

### D. 考察

生理的な濃度の IL-27 は、炎症性サイトカインにより誘導される CCL20 や IL-6 の産生を抑制し、Th17 細胞の分化や遊走の抑制に働いていると考えられた。関節リウマチの滑膜中には IL-27 産生性 CD14 細胞が浸潤していた。関節リウマチ関節では IL-27 と IFN- $\gamma$  が有意な正の相関を示し、IL-27 と IL-17 が弱い負の相関を示すことから、IL-27 は関節リウマチ関節において実際に Th1 への分化を促進し、Th17 の分化や遊走を抑制していることが示唆された。

### E. 結論

IL-27 は CD14 陽性細胞から産生され、変形性関節症に比較して関節滑膜に有意に浸潤していた。この関節リウマチ関節での IL-27 濃度は IFN- $\gamma$  と相関し、IL-17 と負の相関を示したことから、*in vitro* と同様に実際の関節で Th17 に抑制的に働いていると考えられた。

炎症性サイトカインや Th17 を抑制する IL-27 は血漿中に恒常的に存在するが、関節液にはわずかにしか存在しない。関節リウマチでは IL-27 の濃度が上昇してくるが、末梢血でのレベルまでは到達しない。

このことから、関節リウマチ関節では IL-27 の働きが不十分である可能性があり、これを強化することで、関節リウマチの新たな治療へとつながる可能性があると考えられた。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

Tanida S, Yoshitomi H, Nakamura T. et al. IL-27-producing CD14+ cells infiltrate inflamed joints of rheumatoid arthritis and regulate inflammation and chemotactic migration. Cytokine 2011 Aug;55(2):237-44.

#### 2. 学会発表

吉富啓之、伊藤宣、中村孝志. 関

節リウマチ滑膜には IL-27 産生性 CD14 陽性細胞が浸潤し炎症や遊走を制御する。  
第 40 回日本免疫学会学術集会. 千葉.

**G. 知的財産研の出願・登録状況**

なし

## 関節リウマチにおける血漿中マイクロ RNA の臨床的解析

研究分担者 伊藤 宣 京都大学大学院医学研究科 リウマチ性疾患制御学 准教授

研究協力者 村田 浩一 京都大学大学院医学研究科 整形外科 大学院生

### 研究要旨:

血漿中にはマイクロ RNA が存在し、悪性腫瘍のマーカーとなり得ることが 2008 年に報告された。研究協力者の村田らは血漿・関節液中マイクロ RNA が関節リウマチのマーカーとなり得ることを 5 種類のマイクロ RNA を解析し世界に先駆けて示した。本研究では血漿・関節液中マイクロ RNA が関節リウマチ治療の臨床現場に応用可能かを明らかにするため、網羅的に解析し得られた関節リウマチ関連血漿中マイクロ RNA (RACmiR) の感度・特異度、および疾患活動性や抗 CCP 抗体などのバイオマーカーとの相関等を多数検体を用いて検討する。

### A. 研究目的

血漿中にはマイクロ RNA が存在し、悪性腫瘍のマーカーとなり得ることが 2008 年に報告された。研究協力者の村田らは血漿・関節液中マイクロ RNA が関節リウマチのマーカーとなり得ることを 5 種類のマイクロ RNA を解析し世界に先駆けて示した (Arthritis Res Ther. 2010 55(2)巻 R86 項)。

本研究では血漿中マイクロ RNA が関節リウマチ治療の臨床現場に応用可能かを明らかにするため、網羅的に解析し得られた関節リウマチ関連血漿マイクロ RNA (RACmiR) の感度・特異度、疾患活動性や抗 CCP 抗体などのバイオマーカーとの相関等を多数検体を用いて検討する。

### B. 研究方法

まずはじめに、関節リウマチ患者と健常人 3 名ずつの 768 種類の血漿中マイクロ RNA を、リアルタイム PCR 法を用いたアレイにて網羅的に解析し比較した。P 値が 0.1 以下または発現差が 4 倍以上あるもの等を候補とした。これらのマイクロ RNA に対して 6 検体ずつで  $\Delta Ct$  法にて発現比較を行い、

P 値が 0.05 以下で有意差のあるものを RACmiR とした。さらに、関節リウマチ患者および健常人での RACmiR の発現をそれぞれ 50 名程度の検体で解析し、感度・特異度やリウマチ因子 (RF)、抗 CCP 抗体、MMP3 等のバイオマーカーや疾患活動性との相関を解析した。また治療による発現の変化も解析した。

### C. 研究結果

マイクロ RNA アレイにて網羅的に解析された血漿中マイクロ RNA 768 種類のうち健常人および関節リウマチ患者血漿の各 3 検体の解析で候補となった血漿中マイクロ RNA は 49 種であった。これらのマイクロ RNA のうち各 6 検体で差が認められたものは 17 種類でこれらを RA-associated circulating micro RNA (RACmiR) とした。これらの RACmiR について、50 名程の健常人と関節リウマチ患者を区別する ROC 解析にて、優れた検査の指標である AUC が 0.9 以上となる RACmiR は 3 種類認められ、それぞれ感度 91.7% で特異度 81.3%、感度 81.3% で特異度 95.8%、感度 85.4% で特異度 83.3% であった。AUC が 0.88 以上のものも含める

とさらに 3 種類認めた。また 17 種類の RACmiR と各関節リウマチ疾患活動性との相関を解析したところ、RACmiR-5, 9 と赤沈、VAS (全身状態) と RACmiR-3, 9, 17、が有意に相関した。また、RACmiR-15 は生物製剤の治療前後で変化し、治療判定マーカーとしても使用できる可能性があった。一方で、抗 CCP 抗体と相関のあるものはなく、17 種類の RACmiR は抗 CCP 抗体が陽性陰性にかかわらず関節リウマチ患者で同様の発現を示した。なお、本研究における対象症例で抗 CCP 抗体の陽性率は関節リウマチ患者で 75%、健常人で 2%であった。

#### D. 考察

これらの結果から、血漿中マイクロ RNA はこれまで用いられてきたマーカーより高い感度特異度を持つ可能性があり、さらに発現が抗 CCP 抗体の陽性陰性によらないことから、抗 CCP 抗体陰性関節リウマチの早期診断に有用である可能性が示唆された。また、これまで主観的な評価であった VAS を RACmiR の検査で客観的に裏付けられる可能性があった。今後は実臨床使用を目指して、さらに大規模な検体数での RACmiR の診断性に対する検討、他疾患での発現解析による疾患特異性の検討、未診断関節炎の前向き観察研究等による関節リウマチに対する発症予測性や予後予測性の解析等を行い、RACmiR が早期診断や予後診断に有用かを確認して行く。

#### E. 結論

血漿中マイクロ RNA の関節リウマチに対する感度・特異度は十分に高く新たな診断マーカーとして実臨床で使用が期待される。特に抗 CCP 抗体陰性症例の関節リウマチ診断に有用である可能性がある。今後、関節リウマチに対する新たな検査として

RACmiR の臨床応用が期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

吉富啓之. 臨床医学の展望 2011 関節リウマチ. 日本医事新報. No4529 p50-51.

Tanida S, Yoshitomi H, Ishikawa M, Kasahara T, Murata K, Shibuya H, Ito H, Nakamura T. IL-27-producing CD14(+) cells infiltrate inflamed joints of rheumatoid arthritis and regulate inflammation and chemotactic migration. Cytokine. 2011 Aug;55(2):237-44.

##### 2. 学会発表

吉富啓之、伊藤宣、他. 関節リウマチ滑膜には IL-27 産生性 CD14 陽性細胞が浸潤し炎症や遊走を制御する. 第 40 回日本免疫学会学術集会. 千葉.

吉富啓之、村田浩一、伊藤宣、他. 関節疾患と分泌 microRNA. 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会. 前橋.

村田浩一、吉富啓之、伊藤宣、他. 血漿・関節液マイクロ RNA は関節リウマチの疾患バイオマーカーとなりうるか?. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 神戸.

#### G. 知的財産研の出願・登録状況

なし