

は、検査、治療内容、研究成果の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

活動性RA患者の右手に対して施行された。III-V PIP 関節、II-III MCP 関節に集積した異常血流スポット像を認めた。関節超音波検査は、近赤外線カメラ検査とは独立して施行された。両検査に共通した部位に滑膜異常血流を認めた。

### D.考察

インドシアニングリーンはアルブミン蛋白と結合し、800nm 波長の励起光により845nm 波長の近赤外線蛍光を発する。同蛍光は深部2cmの軟部組織を貫通しデジタルビデオカメラで画質化することが可能である。励起光、蛍光ともに暴露に際しての組織障害はない。インドシアニンググリーンは、従来、肝臓機能評価や、眼底網膜造影に投与される。投与量においては、肝臓機能評価(0.5mg/kg, 25mg/50kg body)に比較して、本検討は0.25mg/bodyと低用量で画像が得られた。近赤外線カメラの構成ハードウェアとして、デジタルビデオカメラ、励起光発光LED、画像解析用パソコンであるが、既存技術の集合であり、開発は比較的 low cost である。欧州から同様原理のRA専用機器が最近実用化された。同機器を使った報告では、画像評価には半定量4段階評価が使用され、MRI、超音波検査に遜色ない関節炎の診断能が示されている。また同報告で、半定量評価法はICGによる造影 phase により評価者の判断にばらつきがあることが指摘されている。評価者判断ばらつきの少ない定量評価法の開発が期待される。

### E.結論

近赤外線カメラは、低浸襲、低コストであり、両手の手指関節滑膜異常血流を一機的に評価することが可能であり、有用性が期待される。評価法についての検討が今後必要

であり、実臨床での多施設検討も必要と考えられる。

### F.健康危険情報

なし

### G.研究発表

#### 1. 論文発表

Koike T. The new era of autoimmune disease research. Arthritis Research & Therapy. 13:113, 2011

Kato M, Atsumi T, Kurita T, Odani T, Fujieda Y, Otomo K, Horita T, Yasuda S, Koike T. Hapatitis B virus reactivation by immunosuppressive therapy in patients with autoimmune diseases: Risk analysis in hepatitis B surface antigen-negative cases. J Rheumatol. 38:10, 2209-14, 2011

Koike T. IFN  $\gamma$  independent suppression of Th-17 differentiation by T-bet expression in autoimmune arthritis mice. Arthritis Rheum. 2012 Jan 64(1):40-41

#### 2. 学会発表

### 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

T-bet トランスジェニックマウスにおける関節炎制御機構に関する研究

研究分担者 住田 孝之 (筑波大学医学医療系内科(膠原病・リウマチ・アレルギー) 教授)

研究協力者 近藤 裕也 (筑波大学医学医療系内科(膠原病・リウマチ・アレルギー) 講師)

研究要旨

関節リウマチ(rheumatoid arthritis; RA)の病態形成におけるCD4<sup>+</sup> T細胞の分化制御機構を明らかにすることを目的として、Th-1分化を決定する転写因子T-betをT細胞でのみ過剰発現したT-betトランスジェニックマウス(T-bet Tg)に対してコラーゲン誘導関節炎(collagen induced arthritis; CIA)を誘導したところ、T-bet Tgでは野生型(WT)と比較して関節炎の発症率、重症度の有意な減少が認められた。抗原であるタイプIIコラーゲン(CII)反応性T細胞のサイトカイン産生、転写因子発現については、T-bet TgにおいてIL-17産生の有意な抑制が認められ、T-betの発現亢進とTh-17分化に重要な転写因子であるROR $\gamma$ tの発現抑制が認められた。Th-17分化に対するT-betの影響を解析するために実施したin vitroのTh-17分化誘導実験では、T-bet TgおよびT-bet TgとIFN $\gamma$ 欠損(IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>)マウスの交配により作成したT-bet Tg/IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウス由来のCD4<sup>+</sup> T細胞を用いた場合にTh-17分化抑制が認められた。以上からT-betは、IFN $\gamma$ 非依存的にROR $\gamma$ t発現を抑制することによりIL-17産生が抑制したと考えられた。

以上からT-betが病原性Th-17分化抑制によって関節炎発症を抑制したこと、さらにT-betによるTh-17分化抑制はIFN $\gamma$ 非依存的であること等が明らかになった。

A.研究目的

関節リウマチ(rheumatoid arthritis; RA)の病態形成におけるCD4<sup>+</sup> T細胞の分化および機能との関連について検討するために、RAの疾患モデルであるコラーゲン誘導関節炎(collagen induced arthritis; CIA)を用いて転写因子T-betが関節炎発症やCD4<sup>+</sup> T細胞の分化に与える影響を解析することによって、RAの病態形成におけるCD4<sup>+</sup> T細胞の分化制御機構を明らかにすることを目的とした。

B.研究方法

本研究では、T-betをT細胞においてのみ過剰発現させたT-betトランスジェニックマウス(T-bet Tg)を用いて、以下の検討を行った。

- 1) 野生型(WT)およびT-bet Tgに対してCIAを誘導し、臨床像を比較検討した。
- 2) 抗原反応性T細胞のサイトカイン産生、転写因子発現を評価するためにCII投与後のマウスからリンパ節を採取し、in vitroで抗原であるCIIとともに培養し、ELISAによる培養上清中のサイトカイン量の測定、培養後の細胞を回収してFACSや定量PCRによるサイトカイン、転写因子発現の評価を行った。
- 3) 各マウスから分離したCD4<sup>+</sup> T細胞、CD11c<sup>+</sup> 樹状細胞のcriss-cross co-cultureによって抗原反応性T細胞のサイトカイン産生、転写因子発現を評価した。
- 4) T細胞分化に対するT-bet過剰発現の影響を解析するために、WT、T-bet Tg およびT-bet TgとIFN $\gamma$ 欠

損マウス( $IFN\ \gamma^{-/-}$ )を交配させることにより作成した T-bet Tg/ $IFN\ \gamma^{-/-}$ マウスの脾臓 na ve  $CD4^{+}$  T 細胞を MACS を用いて分離し、in vitro で T 細胞分化を誘導して、サイトカイン産生パターン、転写因子発現について FACS により解析した。

- 5) WT、T-bet Tg マウスの脾臓 na ve  $CD4^{+}$  T 細胞について、IL-6 レセプター発現、IL-6 刺激に対する STAT3 のリン酸化についてそれぞれ FACS により解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は、当施設の遺伝子組み換え実験安全委員会、動物実験委員会に実験計画書を提出して承認を得ており、研究の実施に当たっては筑波大学遺伝子組換え実験安全管理規定および筑波大学動物実験取扱規定に留意しながら行っている。

### C. 研究結果

- 1) T-bet Tg では WT と比較して CIA の発症率、重症度について有意な減少が認められ(図1A、B)、関節の病理学的評価においても炎症、関節破壊は T-bet Tg で有意に抑制されていた(図1C)。
- 2) CII 反応性 T 細胞のサイトカイン産生は、T-bet Tg において IL-17 産生の有意な抑制が認められたが、 $IFN\ \gamma$  は WT と T-bet Tg の間で特に差は認められなかった。抗原反応性の転写因子発現については、T-bet Tg において T-bet の発現亢進と Th-17 分化に重要な転写因子である  $ROR\ \gamma\ t$  の発現抑制が認められた(図2)。
- 3) criss-cross co-culture では、T-bet Tg 由来の  $CD4^{+}$  T 細胞は WT、T-bet Tg のいずれの  $CD11c^{+}$  樹状細胞を使用した場合であっても、WT 由来の  $CD4^{+}$  T 細胞を用いた場合と比較して IL-17 産生および  $ROR\ \gamma\ t$  発現の有意な抑制が認められた(図3A、B)。
- 4) 脾臓  $CD4^{+}$  T 細胞を用いた in vitro での Th-17 分化誘導実験においては、T-bet Tg 由来の  $CD4^{+}$  T 細胞では WT と比較して IL-17<sup>+</sup> 細胞の減少と  $IFN\ \gamma^{+}$  細胞の

増加が認められた。また T-bet Tg 由来の  $CD4^{+}$  T 細胞では Th-17 分化誘導条件においても T-bet<sup>+</sup> 細胞の増加と  $ROR\ \gamma\ t^{+}$  細胞の減少が認められ、 $ROR\ \gamma\ t^{+}$  細胞からの IL-17 産生の低下が認められた。T-bet Tg/ $IFN\ \gamma^{-/-}$ マウス由来の  $CD4^{+}$  T 細胞を用いた Th-17 分化誘導実験では  $IFN\ \gamma$  の産生細胞が認められなかったが、IL-17 産生細胞の減少が認められた(図4)。

- 5) T-bet Tg マウスの脾臓 na ve  $CD4^{+}$  T 細胞の IL-6 レセプター発現は WT と比較して低下しており、IL-6 刺激に対する STAT3 のリン酸化についても抑制されていた。

### D. 考察

T-bet Tg に対して CIA を誘導した場合に WT と比較して関節炎の有意な抑制が認められた。in vitro での抗原反応性のサイトカイン産生、転写因子発現の評価では、T-bet Tg において IL-17 産生の低下および  $ROR\ \gamma\ t$  発現の抑制が認められ、抗原特異的な Th-17 分化が抑制されていることが示された。T-bet Tg では抗原反応性の T-bet 発現亢進が認められたが、 $IFN\ \gamma$  の産生亢進は認められなかった。T-bet による関節炎原生の Th-17 分化の抑制が関節炎の発症抑制に結び付いていると考えられたが、Th-17 分化抑制には従来の報告とは異なり  $IFN\ \gamma$  の関与が乏しい可能性が示唆された。

Th-17 細胞の分化誘導実験においては、T-bet Tg 由来の  $CD4^{+}$  T 細胞は、WT と比較して T-bet<sup>+</sup> 細胞が増加しており IL-17<sup>+</sup> 細胞および  $ROR\ \gamma\ t^{+}$  細胞の減少が確認されたことから、T-bet の発現によって  $ROR\ \gamma\ t$  によって誘導される Th-17 分化が抑制されていることが示された。さらに T-bet Tg/ $IFN\ \gamma^{-/-}$ マウス由来の  $CD4^{+}$  T 細胞を用いた検討では、 $IFN\ \gamma$  の欠損にも関わらず Th-17 分化は誘導されず、T-bet が  $IFN\ \gamma$  を介さずに Th-17 分化を抑制していることが示唆された。また T-bet Tg の  $CD4^{+}$  T 細胞では、IL-6 レセプターの発現減少、IL-6 刺激に対する STAT3 リン酸化の抑制が確認され、T-bet が IL-6 シグナル伝達に対して抑制的に働いている可能性が示唆された。

## E. 結論

T細胞におけるT-betの過剰発現は、IFN $\gamma$ を介さずに抗原反応性のTh-17分化を抑制することによって自己免疫性関節炎発症を抑制していると考えられる。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Hasebe, N., Kawasaki, A., Ito, I., Kawamoto, M., Hasegawa, M., Fujimoto, M., Furukawa, H., Tohma, S., Sumida, T., Takehara, K., Sato, S., Kawaguchi, Y., and Tsuchiya, N. Association of UBE2L3 polymorphism with diffuse cutaneous systemic sclerosis in a Japanese population. *Ann. Rheum. Dis.* (in press)
2. Tanaka, Y., Matsumoto, I., Iwanami, K., Inoue, A., Minami, R., Umeda, N., Kanamori, A., Ochiai, N., Miyazawa, K., Sugihara, M., Hayashi, T., Goto, D., Ito, S., and Sumida, T. Six-transmembrane epithelial antigen of prostate 4 (STEAP4) is expressed on monocytes/neutrophils, and is regulated by TNF antagonist in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* (in press).
3. Tanaka, Y., Matsumoto, I., Iwanami, K., Inoue, A., Umeda, N., Sugihara, M., Hayashi, T., Ito, S., and Sumida, T. Six-transmembrane epithelial antigen of prostate4 (STEAP4) is a tumor necrosis factor alpha-induced protein that regulates IL-6, IL-8, and cell proliferation in synovium from patients with rheumatoid arthritis. *Mod. Rheumatol.* (in press).
4. Kondo, Y., Matsumoto, I., Iizuka, M., Wakamatsu, E., Zhaojin, Y., Tsuboi, H., Sugihara, M., Hayashi, T., Goto, D., Ito, S., Takahashi, S., and Sumida, T. Overexpression of T-bet gene regulates murine autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum.* 64:162-172,

2012.

5. Yoshiga, Y., Goto, D., Segawa, S., Hayashi, T., Matsumoto, I., Ito, S., Taniguchi, M., and Sumida, T. Activation of natural killer T cells by  $\alpha$ -carba-GalCer (RCAI-56), a novel synthetic glycoipid ligand, suppresses murine collagen-induced arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 164(2):236-247,2011.
6. Segawa, S., Goto, D., Yoshiga, Y., Horikoshi, M., Sugihara, M., Hayashi, T., Chino, Y., Matsumoto, I., Ito, S., and Sumida, T. Involvement of NK 1.1-positive  $\gamma$   $\delta$  T cells in interleukin-18 plus interleukin-2-induced interstitial lung disease. *Am. J. Res. Cell. Mol. Biol.* 45(3):659-666,2011.
7. 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 SPI1 with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 63:755-763, 2011.

## 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  
特記事項なし

図1: コラーゲン誘導関節炎

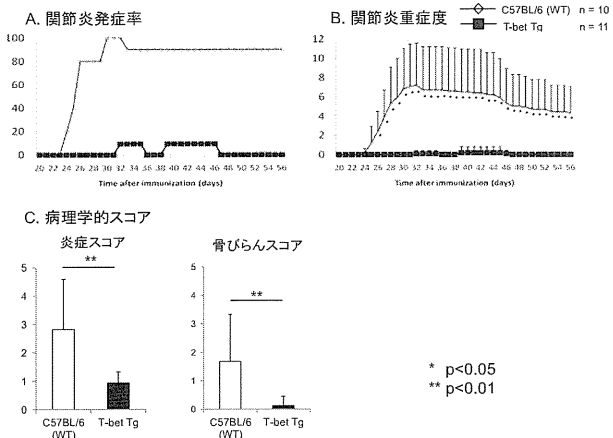


図4. Th-17分化誘導

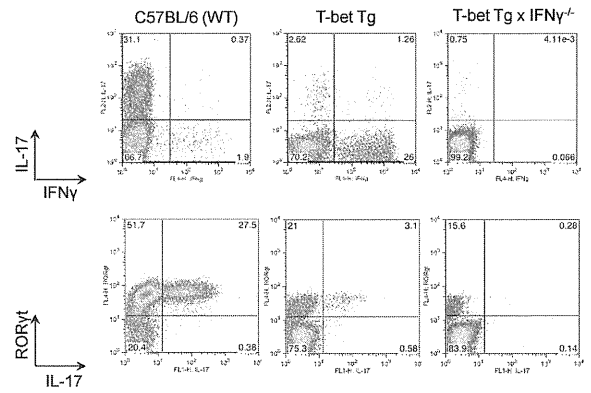


図2. サイトカイン産生、転写因子発現

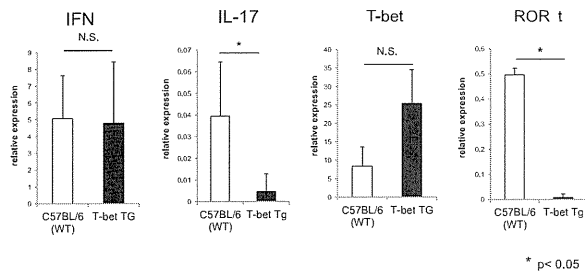
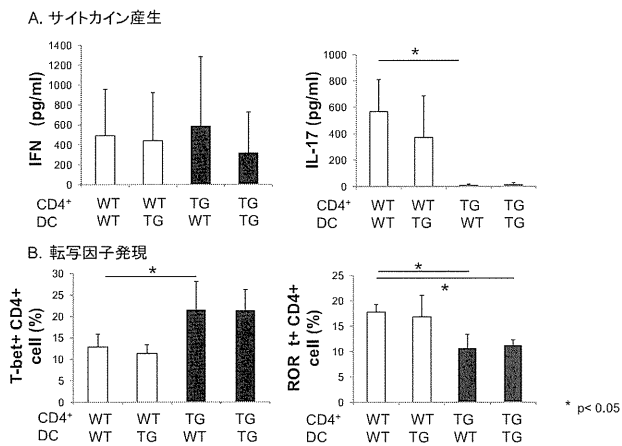


図3. criss-cross co-culture



## 生物学的製剤の関節破壊抑制効果と機能障害改善効果に関する検討

研究分担者氏名: 竹内 勤 慶應義塾大学医学部 リウマチ内科 教授  
天野 宏一 埼玉医科大学総合医療センター リウマチ 膠原病内科  
山中 寿 東京女子医科大学リウマチ膠原病痛風センター  
田中 良哉 産業医科大学第一内科

### (研究要旨)

我が国における日常診療下での生物学的製剤治療の関節破壊抑制効果と機能障害の改善効果を比較検討した。4大学で行われている観察研究を中心として解析したところ、生物学的製剤の強力な関節破壊抑制効果が明らかになり、多くの治験データを支持する成績が得られた。一方、臨床的寛解率は、罹病期間10年前後の長期罹患患者でも30%を超えており、長期罹患患者でも達成可能な目標である可能性が示唆された。課題として、臨床的寛解を達成し、関節破壊が強力に抑制されたとしても、機能的寛解を達成する事は、罹病期間とともに低下する可能性がある事が明らかとなった。

### A.研究目的

日常診療下における生物学的製剤治療の関節破壊抑制効果と機能障害の改善効果を比較検討し、どのような条件で生物学的製剤を使用すれば、関節破壊抑制効果や身体機能障害改善が最大化されるか検討した。

### B.研究方法

埼玉医科大学総合医療センターリウマチ 膠原病内科、東京女子医科大学リウマチ膠原病痛風センター、産業医科大学第一内科、慶應義塾大学医学部リウマチ内科などで行われたインフリキシマブを対象とした RECONFIRM-2 研究(n=410)、エタネルセプトを対象とした ENRICH 研究(n=208)、アダリムマブを対象とした HARMONY 研究(n=167)、トシリズマブを対象とした REACTION-52w 研究(n=232)について、その結果を比較検討した。加えて、一部の解析には、埼玉医科大学総合医療センターで行われたインフリキシマブ観察研究である NAGASAWA 研究(n=125)、ならびに竹内が研究代表者として施行した多施設

共同医師主導型臨床試験 JESMR 研究を用いた。この JESMR 研究では、MTX 効果不十分例 151 例を、エタネルセプトへのスイッチ群(n=74)と MTX とエタネルセプト併用群(n=77)に割り付けて比較しており、52 週時点での有効性対象となったスイッチ群 69 例と、併用群 73 例の結果も検討対象の一部とした。

(倫理面への配慮)

平成 22 年 1 月 11 日付で、慶應義塾大学医学部倫理委員会にて同研究内容は、多施設共同研究として承認されている(No.2011-231)。

### C.研究結果

1)患者背景:表1に RECONFIRM-2 研究、ENRICH 研究、JESMR 研究、HARMONY 研究、REACTION-52w 研究の患者背景を示した。RECONFIRM-2 研究は、410 例を対象とし、そのうち関節評価が可能であった例は 67 例で、母集団と関節評価集団の間には、疾患活動性など一部数値の低い項目が関節評価集団で認められたが、統計学的

表1 4大学臨床研究 -関節破壊データ-

研究名	背景因子 (ベースライン)								1年後の関節破壊抑制効果 (52-54w)		
	症例数 (Xp評価例)	年齢	罹病期間	MTX 併用率	DAS28-ESR (DAS28-CRP)	HAQ-DI	TSS	estimated yearly progression (YP)	YP	%YP抑制	構造的 寛解
RECONFIRM-2/ RECONFIRM-2J (Infliximab)	410 (67)	53.1 +/- 12.7	9.4 +/- 8.8	100%	(5.6 ± 1.0)	n.d.	104 ± 87	21.3 ± 20.9	0.0 ± 2.4	100	84.2
ENRICH (etanercept)	208 (120)	54.6 +/- 13.4	9.6 +/- 8.2	65.0%	5.7 ± 1.2 (5.0 ± 1.2)	1.4 ± 0.8	101 ± 92	15.4 ± 16.1	1.8 ± 7.7	88.3	48.4
JESMR (etanercept)	71:76 (63:73)	58.1 +/- 12.6 vs 56.6 +/- 11.1	10.6 +/- 10.6 vs 8.0 ± 7.6	n.a.	6.1 ± 0.9 vs 6.0 ± 1.0	1.3 vs 1.2	115 ± 86 vs 113 ± 86	17.7 ± 13.2 vs 20.8 ± 18.2	3.6 vs 0.8	77.8 vs 95.2	39.6 vs 57.4
HARMONY (adalimumab)	178 (97)	58.4 +/- 13.0	9.0 +/- 9.5	85.6%	5.3 ± 1.3 (4.4 ± 1.3)	1.2 ± 0.8	97 ± 88	25.4 ± 43.9	0.8 ± 4.2	97.7	58.8
REACTION-52w (tocilizumab)	232 (149)	59.1 +/- 13.3	12.4 +/- 11.1	55.6%	5.6 ± 1.3 (5.0 ± 1.2)	1.6 ± 0.8	140 ± 101	20.8 ± 1.3	1.1 ± 1.3	94.7	62.8

な有意差はなかった。他の研究も同様に、日常診療下での観察研究であるために、臨床的評価よりも関節評価例が少なかったが、各臨床パラメーターに統計学的有意差は認めなかった。一方、JESMR 研究では、全例が関節評価を施行したが、脱落症例などで関節評価が行われなかった症例がエタネルセプトスイッチ群で8例、併用群で3例認められた。これら研究間では、RECONFIRM-2 研究が最も年齢が低く 53.1 +/- 12.7 歳で、ENRICH 研究はこれ

より若干高い 54.6 +/- 13.4 歳であった。一方、JESMR 研究と HARMONY 研究は、56~58 歳と、これら研究より年齢が高く、REACTION-52w 研究では、最も高い 59.1 +/- 13.3 際であった。罹病期間も同様で、特に REACTION-52w 研究では、他の研究が平均罹病期間 9-10 年前後であったのに比し、12.4 +/- 11.1 と最も罹病期間が長かった。そのことは、ベースラインでの関節破壊進行度と関連しており、他の試験のベースライン TSS が

表2 4大学臨床研究 -HAQ-DIデータ-

	罹病期間	年齢	臨床的寛解 DAS28-ESR	0w HAQ	52w HAQ	機能的寛解
Nagasawa (IFX)	7.9 ± 6.9	52.8 ± 13.3	45.5% (DAS-CRP)	1.44 ± 0.71	0.95 ± 0.78	37.4%
				← 0.49 →		
HARMONY (ADA)	9.0 ± 9.5	58.4 ± 13.0	35.0%*	1.24 ± 0.78	0.92 ± 0.77	43.0%*
				← 0.32 →		
ENRICH (ETN)	9.6 ± 8.2	54.6 ± 13.4	32.7%	1.37 ± 0.82	0.94 ± 0.80	38.5%
				← 0.43 →		
REACTION-52w (TCZ)	12.4 ± 11.1	59.1 ± 13.3	43.7%	1.56 ± 0.80	1.29 ± 0.87	26.4%
				← 0.27 →		

\* Non-responder imputation (NRI)

Nagasawa	Nagasawa H, et al. Clin Exp Rheum 28:365-72, 2010
HARMONY	Takeuchi T, et al. Mod Rheum on line Sep 9, 2011
ENRICH	Tanaka Y, et al. Mod Rheum on line Aug 1, 2011
REACTION	Takeuchi T, et al. Rheumatology 50:1908-15, 2011

100~110 前後であったのに対して、REACTION-52w 研究では生物学的製剤投与前に 140 と破壊が進んでいた。

2) 投与 1 年後の関節破壊抑制効果:年間関節破壊進行度 (YP)は、生物学的製剤投与によって 0~4 と、投与前の 15~25 と比較して明らかに低下していた。これを投与前後の抑制率(%YP 抑制)で表すと 77.8%~100%で、強力な関節破壊抑制効果が確認された。しかし、これらの数字には幅があり、各研究の患者背景との関連を比較すると MTX 併用率の最も低い ENRICH 研究で、この抑制率が 88.3%と低い傾向にあり、MTX が 100%の RECONFIRM-2J で 100%抑制を記録した。この事は、エタネルセプトスイッチ群と、エタネルセプト併用群を比較した JESMR 研究で明確で、エタネルセプト単独群では 77.8%であったのに対して、エタネルセプト+MTX 併用様群では、これが 95.2%と高い数字を示した。一方、トシリズマブは、MTX 併用率が 56%と低かったにも拘らず、%YP は 94.7%と高い値を示した。TNF 阻害製剤が、MTX 併用で高い関節破壊抑制効果を示したのに対して、トシリズマブによる IL-6 阻害が、MTX 併用/非併用に拘らず高い関節破壊抑制効果を示すか否かは、JESMR のような研究デザインによるスイッチ群と MTX 併用群を比較する SURPRISE 研究の結果を待つ必要がある。

3) 投与1年後身体機能障害改善効果:インプリキシマブを用いた RECONFIRM-2/RECONFIRM-2J 研究では、HAQ 評価が行われなかったため、一施設の観察研究ではあるが、同時期に論文化された NAGASAWA 研究を検討対象とした。表2に示す様に、HAQ0.5 以下を機能的寛解と定義すると、26%-43%にそれが達成されていた。NAGASAWA 研究では、機能的寛解の必要条件の一つとして1年後の臨床的寛解が示されているため、これを各研究で比較すると ENRICH 研究 32.7%、HARMONY 試験 35.0%であった。NAGASAWA 研究ではこれが 45.5%と高かったが、この研究では DAS28-CRP による疾患活動性評価であったため、DAS28-ESR による ENRICH や HARMONY よりも評価が甘く、また、一施設での検討であった可能性がある。一方、トシリズマブの REACTION-52w 研究では、DAS28-ESR 寛解で 43.7%と最も高いレベルであったのに対して、機能的寛

解は 26.4%と他の研究の 37.4%-43.0%に比べて低かった。その理由として、REACTION-52w では、年齢が高く、罹病期間が長く、そのため投与開始時の TSS が 140 と最も進行していることが要因の一つと考えられた。この事からも、HAQ を規定する要因として、臨床的活動性に加えて、関節破壊が関係しており、特に関節破壊の進行を強力に抑えても、すでに進行してしまった関節破壊による不可逆的な身体機能障害は改善しない事を示すと考えられる。

#### D. 考察および結論

生物学的製剤の強力な関節破壊抑制効果が日常診療下における観察研究でも明らかになり、多くの治験データを支持する成績が得られた。一方、臨床的寛解率は、罹病期間10年前後の長期罹患患者でも 30%を超えており、長期罹患患者でも達成可能な目標である可能性が示唆された。課題として、臨床的寛解を達成し、関節破壊が強力に抑制されたとしても、機能的寛解を達成する事は、罹病期間とともに低下する可能性がある事が明らかとなった。身体機能障害には、不可逆的な関節破壊が関与し、生物学的製剤が開始される時点で、関節破壊が進行していると、機能的寛解は望めない。Smolen らは治験データによるメタ解析の結果、TSS10 の進行は HAQ0.1 の悪化に相当すると試算している。これを機能的寛解の上限である 0.5 を想定すると、TSS は50である。機能的寛解を最終的に目指すのであれば、この TSS を念頭に生物学的製剤の開始時期を遅れないような配慮が求められる。関節破壊と関連する機能障害 damage-associated HAQ が、果たして日常診療下でも、また、日本における解析でも示されるかどうか、の検討も必要である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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, and Takeuchi T. Continuation of Methotrexate resulted in better clinical and radiographic outcomes than discontinuation upon starting etanercept in patients with Rheumatoid Arthritis: 52-Week results from the JESMR Study. *J Rheum*, 38:1581-92, 2011.
2. Tanaka Y, Yamanaka H, Saito K, Iwata S, Miyagawa I, Seto Y, Momohara S, Nagasawa H, Kameda H, Kaneko Y, Izumi K, Amano K, and Takeuchi T. Structural damages disturb functional improvement in patients with rheumatoid arthritis treated with etanercept. *Mod Rheum*, in press.
  3. Takeuchi T, Tanaka Y, Kaneko Y, Tanaka E, Hirata S, Kurasawa T, Kubo S, Shidara K, Kimura N, Nagasawa H, Kameda H, Amano K, and Yamanaka H. Effectiveness and safety of adalimumab in Japanese patients with rheumatoid arthritis: Retrospective analyses of data collected during the first year of adalimumab treatment in routine clinical practice (HARMONY study). *Mod Rheum*, Online 6,Sep.2011
  4. Kaneko Y, Kuwana M, Kameda H, and Takeuchi T. Sensitivity and Specificity of 2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria. *Rheumatology*, 50:1268-74, 2011.
  5. Takeuchi T, Tanaka Y, Amano K, Hoshi D, Nawata M, Nagasawa H, Satoh E, Saitao K, Kaneko Y, Fukuyo S, Kurasawa T, Hanami K, Kameda H, and Yamanaka H. Clinical, radiographic, and functional effectiveness of tocilizumab for rheumatoid arthritis patients - REACTION-52 weeks study. *Rheumatology*, on line July 13, 2011.
  6. Takeuchi T, Miyasaka N, Tatsuki Y, Yano T, Yoshinari T, Abe T, and Koike T. Baseline tumor necrosis factor alpha levels predict the necessity for dose escalation of infliximab therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 70:1208-15, 2011.

## 2. 学会発表

特になし

(発表誌名 巻号・頁・発行年等も記入)

## H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

### 1. 特許取得

### 2. 実用新案登録

### 3. その他

特になし

## 抗シトルリン化ペプチド抗体陰性関節リウマチ患者における新規自己抗体に関する研究

分担研究者： 三森 経世（京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学 教授）

協力研究者： 大村 浩一郎（京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学 講師）

### 研究要旨

抗 CCP 抗体陰性の関節リウマチ (RA) は診断がしばしば困難であり、その結果、治療が遅れ関節破壊につながる。事実、全身性ムチランス患者 38 例において、3 例(7.9%)は抗 CCP 抗体陰性、2 例(5.3%)は 10U/ml 以下の弱陽性であり、抗 CCP 抗体陰性であるからといって、必ずしも関節破壊が軽いとはいえない。そこで、抗 CCP 抗体陰性 RA 血清中の自己抗体のスクリーニングを AlphaScreen 法を用いて行った。8 例の抗 CCP 抗体陰性 RA 患者に共通する自己抗体(抗原)を 6 蛋白同定し、そのうちの 2 蛋白に関して Western Blot (WB) 法で特異性を確認したのち、ELISA による測定系の確立を試みた。WB では自己抗体の確認ができ、ELISA での検出率は十分ではなく条件検討の後、RA に対する特異度を検討する。

### 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

まず、RA の最重症型といえる全身性ムチランス型 RA 患者における、抗 CCP 抗体陰性患者の頻度について調べた。全身性ムチランス型の定義は大関節 1 関節以上を含む 3 関節以上に Larsen 分類 Grade V の関節変形を認めることとした。

抗 CCP 抗体陰性かつ RF 陰性で X 線上典型的な骨破壊を認める RA 患者血清 8 検体を用いて自己抗体のスクリーニングを AlphaScreen 法で行った。AlphaScreen 法は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であり、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ストレプトアビジンをコートした別のビーズを反応させる。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。自己抗体アレイに用いる蛋白は、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。これまでに 8 検体すべてに反応がみられた(すなわち自己抗体を有している)6 蛋白のうち、2 蛋白を無細胞合成系でタンパク合成し、Western Blot (WB)にて自己抗体の存在を確認した。ELISA は大腸菌に発現させた市販の recombinant 蛋白を ELISA plate に固相化し 100 倍希釈血清を用いて assay を行った。

(倫理面への配慮)

患者血清を用いる場合、個人情報が出ないようにする

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

表1. 全身性ムチランス型 RA 38 例の抗 CCP 抗体価

抗 CCP 抗体価	患者数(%)
陰性(4.5 U/ml 未満)	3 例 (7.9%)
弱陽性(4.5-10 U/ml)	2 例 (5.3%)
陽性(10 U/ml 以上)	33 例 (86.8%)

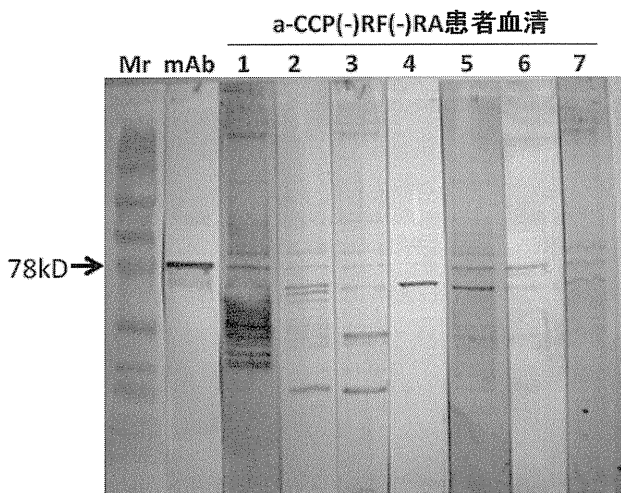


図1. 蛋白①の WB 像

抗 CCP 抗体(-)RF(-) erosive RA 患者血清 8 例のうち AlphaScreen 法でシグナルの弱かった1例を除いた 7 検体にて蛋白①の WB を行った。すべての血清で 78kD のバンドを認めた(図1)。

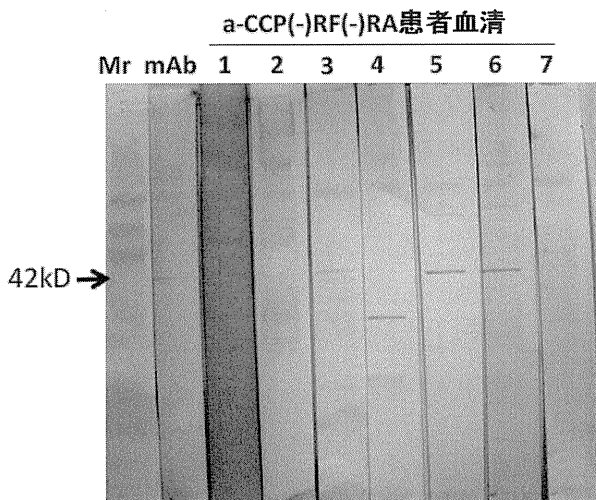


図2. 蛋白②の WB 像

図1同様に蛋白②に対するWBを行った。薄いがすべての血清で 42kD のバンドを認めた。

表2. 蛋白①、蛋白②に対する ELISA の検討

	CCP(-)RF(-) RA	CCP(+)RF(+) RA	SLE
蛋白①	3/7	3/7	1/7
蛋白②	1/7	1/7	2/7

健常人(n=5)の OD 値+2SD を cut-off 値とした時の陽性率

### D. 考察

全身性ムチランス型 RA のような重症型 RA においても 8% は抗 CCP 抗体陰性であり、抗 CCP 抗体陰性 RA であっても、早期診断、早期治療の重症性は抗 CCP 抗体陽性 RA と同様であることが示された。関節破壊ゼロを目指すためには抗 CCP 抗体陰性 RA の診断能向上につながるよいバイオマーカーの確立が望まれる。

我々は AlphaScreen 法にて抗 CCP 抗体(-)RF(-)RA でも多数の自己抗体が存在することを示しており、今回その端緒として AlphaScreen 法で検出した 2 種の自己抗原蛋白に関して、WB 法および ELISA 法による自己抗体検出の確認を行った。無細胞蛋白合成系で生成した蛋白を用いた WB ではきちんと自己抗体検出ができていますが、大腸菌発現系で生成した蛋白を用いた ELISA では検出率が悪く、立体構造など蛋白の質の問題の可能性もあり、無細胞蛋白合成系蛋白を精製し純度を上げて ELISA 法を行うなど、改良を試みる。

今後、様々な条件検討を行い、WB、ELISA の系確立に加えて、他の自己抗原の確認も行っていきたい。

### E. 結論

8 例の抗 CCP 抗体(-)RF(-) erosive RA 血清を用いて AlphaScreen 法にて自己抗体のスクリーニングを行い、共

通にみられた自己抗体の対応抗原 2 種について WB および ELISA にて自己抗体の検出を試みた。WB では自己抗体を検出できたが、ELISA の検出率が悪く、今後条件検討を行ったのち、本自己抗体の臨床的有用性を検討していきたい。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Terao C, Yamada R, Ohmura K, Takahashi M, Kawaguchi T, Kochi Y, Human Disease Genomics Working Group, RA Clinical and Genetic Study Consortium, Okada Y, Nakamura Y, Yamamoto K, Melchers I, Lathrop M, Mimori T, Matsuda F: The human AIRE gene at chromosome 21q22 is a genetic determinant for the predisposition to rheumatoid arthritis in Japanese population. *Hum Mol Genet.* 20(13):2680-2685, 2011.

2) Terao C, Ohmura K, Katayama M, Takahashi M, Kokubo M, Diop G, Toda Y, Yamamoto N; Human Disease Genomics Working Group; Rheumatoid Arthritis (RA) Clinical and Genetic Study Consortium, Shinkura R, Shimizu M, Gut I, Heath S, Melchers I, Manabe T, Lathrop M, Mimori T, Yamada R, Matsuda F. Myelin basic protein as a novel genetic risk factor in rheumatoid arthritis—a genome-wide study combined with immunological analyses. *PLoS One.* 6: e20457, 2011.

3) Terao C, Ohmura K, Kochi Y, Ikari K, Maruya E, Katayama M, Shimada K, Murasawa A, Honjo S, Takasugi K, Matsuo K, Tajima K, Suzuki A, Yamamoto K, Momohara S, Yamanaka H, Yamada R, Saji H, Matsuda F, Mimori T. A large-scale association study identified multiple HLA-DRB1 alleles associated with ACPA-negative rheumatoid arthritis in Japanese subjects. *Ann Rheum Dis.* 70: 2134-2139, 2011.

4) Iguchi-Hashimoto M, Usui T, Yoshifuji H, Shimizu M, Kobayashi S, Ito Y, Murakami K, Shiomi A, Yukawa N, Kawabata D, Nojima T, Ohmura K, Fujii T, Mimori T: Overexpression of minimal domain of calpastatin suppresses IL-6 production and Th17 development via reduced NF- $\kappa$ B and increased STAT5 signals. *PLoS ONE* 6(10):e27020, 2011.

5) Yukawa N, Fujii T, Kondo-Ishikawa S, Yoshifuji H, Kawabata D, Nojima T, Ohmura K, Usui T, Mimori T. Correlation of antinuclear antibody and anti-double-stranded DNA antibody with clinical response to infliximab in patients with rheumatoid arthritis: a retrospective clinical study. *Arthritis Res Ther.* 13(6):R213, 2011.

6) Murakami K, Tanaka M, Usui T, Kawabata D, Shiomi A, Iguchi-Hashimoto M, Shimizu M, Yukawa N, Yoshifuji H, Ohmura K, Fujii T, Mimori T: Follistatin-related protein/follistatin-like 1 evokes an innate immune response via CD14 and toll-like receptor 4. *FEBS Lett.* 586(4):319-324, 2012.

7) Terao C, Ikari K, Ohmura K, Suzuki T, Iwamoto T, Takasugi K, Saji H, Taniguchi A, Momohara S, Yamanaka H, Matsuda F, Mimori T: Quantitative effect of HLA-DRB1 alleles to ACPA levels in Japanese rheumatoid arthritis: no strong genetic impact of shared epitope to ACPA levels after stratification of HLA-DRB1\*09:01. *Ann Rheum Dis.* 2012 Jan 10. [Epub ahead of print]

### 2. 学会発表

1) Terao C, Ohmura K, Yamada R, Kochi Y, Okada Y, Nakamura Y, Yamamoto K, Melchers I, Lathrop M, Mimori T, Matsuda F: A haplotype of the human AIRE gene is associated with the risk for Rheumatoid Arthritis in Japanese population. European League Against Rheumatism 2011, London, June 2011.

2) Terao C, Ohmura K, Mimori T, et al: A large-scale

association study identified multiple HLA-DRB1 alleles associated with anti-citrullinated peptide antibody negative rheumatoid arthritis in Japanese. American College of Rheumatology 2011, Chicago, Nov. 2011.

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

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)  
研究分担報告書

新規関節炎治療法開発を目指した TREM-1 及び TREM-1 リガンド相互作用解析

研究分担者氏名 宮坂 信之

(所属施設名及び職名)東京医科歯科大学 膠原病・リウマチ内科 教授

研究協力者氏名 岩井秀之、上阪 等

(所属施設名及び職名)東京医科歯科大学 膠原病・リウマチ内科 特任講師、准教授

研究要旨

TREM-1 阻害療法は既存の生物学的製剤とは異なり、結核や重症感染症といった副作用を増加させない関節炎治療法となることが期待される。我々はこれまでに、マウス関節炎モデルに TREM-1-Ig 投与し関節炎の改善を認めた。また、マウス TREM-1 リガンドの同定に成功し、同リガンドに対する抗体投与でも関節炎は改善した。本研究では、TREM-1 と TREM-1 リガンドとの相互作用、機能の解析を行うとともに、ヒト TREM-1 リガンドを同定し、TREM-1 阻害療法を感染のリスクの少ない新規関節炎治療法として開発していく。

A.研究目的

Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-1 は、マクロファージや好中球に発現し、その刺激は Toll 様受容体刺激による炎症性サイトカインの分泌を増幅させる。一方、マウス敗血症モデルの TREM-1 細胞外ドメイン Ig 融合蛋白(mTREM-1-Ig)による TREM-1 阻害療法は生存率を改善させた。これは TREM-1 阻害では感染防御に必要な炎症性サイトカインを温存しつつ炎症を抑制することを示唆する。我々はこれまでに、TREM-1 の関節リウマチ患者滑膜細胞での発現、及び TREM-1 阻害のコラーゲン誘導関節炎(CIA)マウスでの治療効果を報告した。さらに、B 細胞に発現するマウス TREM-1 リガンド (mTREM-1-L-B)を同定し、抗 mTREM-1-L-B 抗体投与による、CIA での治療効果を検討してきた。本研究では、TREM-1 及び mTREM-1-L-B 発現細胞の相互作用を解析する。また、ヒト TREM-1-リガンド(hTREM-1-L)同定も行う。

mTREM-1-L-B-Ig 刺激、あるいは mTREM-1-L-B 発現細胞である B 細胞との共培養による、TNF- $\alpha$  産生や増殖能に与える影響を検討する。

ヒト TREM-1 細胞外ドメイン 6 x Histidine 融合蛋白 (hTREM-1-His)を用いて、hTREM-1-L が発現する細胞を確認する。同細胞の cDNA ライブラリーを用いた発現クローニングにより hTREM-1-L を同定する。同分子の発現様式を明らかにする。

(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。ヒト検体を扱う研究はインフォームドコンセントを得て検体を採取し、個人情報の取り扱いに注意して行う。倫理審査実施計画書を東京医科歯科大学倫理審査委員会に提出し認可済みである。

B.研究方法

TREM-1 発現細胞であるマクロファージに対する、

C.研究結果

mTREM-1-L-B-Ig を用いた、TREM-1 を介したマクロフ

フェージ刺激では TNF- $\alpha$  の産生が確認された。この作用には LPS 刺激による TNF- $\alpha$  産生への増幅効果も認められた。一方、mTREM-1-His 同時投与によりこの TNF- $\alpha$  産生は抑制され、mTREM-1-L-B-Ig による刺激は TREM-1 特異的であることがわかった。

マクロファージと mTREM-1-L-B を発現していると考えられる B 細胞との共培養では抗 IgM 抗体存在下で、TNF- $\alpha$  産生は増加した。この増加は抗 mTREM-1-L-B 抗体投与で抑制され、primary 細胞でも TREM-1 特異的な相互作用が確認された。

hTREM-1-His による各種ヒト細胞の染色を行ったところ、既報告とは異なり、マクロファージやマクロファージ腫瘍株に結合することが判明した。マクロファージ腫瘍株の cDNA を用いた発現クローニングにより、マクロファージ上の hTREM-1-L(hTREM-1-L-M)を同定した。

#### D. 考察

マクロファージ及び B 細胞の相互作用に関与する分子として、BAFF (B cell-activating factor belonging to the TNF family)及び BAFF レセプターが知られている。今回、他に TREM-1 及び TREM-1-L を介する経路が存在することが示唆された。また、新規に同定された hTREM-1-L-M は mTREM-1-L-B とは発現様式も全く異なるものであり、この機能解析も行い、関節炎における役割の解明を行っていく必要がある。

#### E. 結論

mTREM-1-L-B の同定により、マクロファージと B 細胞の新たな相互作用経路の可能性が示唆された。

hTREM-1-L-M も同定され、更なる機能解析により、TREM-1 阻害が新規関節炎治療法として開発されることが期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

TREM-1 リガンドの同定とモノクローナル抗体による新規関節炎治療法の開発

岩井秀之, 細矢匡, 村上洋介, 宮坂信之, 上阪等  
第 39 回日本臨床免疫学会 2011.10.

免疫疾患の病態解明と診断の進歩 リウマチ治療の新戦略を求めて

上阪等, 細矢匡, 岩井秀之, 村上洋介, 宮坂信之  
第 39 回日本臨床免疫学会 2011.10.

Identification of the TREM-1 ligand as a therapeutic target of arthritis Hideyuki Iwai, Tadashi Hosoya, Yousuke Murakami, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka  
第 4 回 EAGOR 2011.10

Identification of the TREM-1 ligand on B lymphocytes as a therapeutic target of arthritis  
Hideyuki Iwai, Tadashi Hosoya, Yousuke Murakami, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka  
第 40 回日本免疫学会 2011.11

Identification of the TREM-1 ligand as a therapeutic target of arthritis Hideyuki Iwai, Tadashi Hosoya, Yousuke Murakami, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka  
第 7 回骨免疫ワークショップ 2011.11

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

##### 1. 特許取得

ヒト TREM-1 リガンドの同定(予定)

##### 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 准教授

### 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予後不良因子と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)の関節破壊の進行には多くの要因が関与していると考えられており、これまでに様々な予後不良因子が報告されてきた。ACR/EULAR recommendationにおいても予後不良因子の有無によって治療法を選択することを推奨しており、治療前に予後不良因子を同定することはRAの治療において非常に有益である。しかしこれらの探究の中でも未だに見解の一致を得られていない因子も散見される。本研究の目的は、既知の予後不良因子やRA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危険因子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。解析対象はこれまでに骨関節破壊に関連していることが

報告されているDAS28(Disease Activity Score28)、発症年齢、性、自己抗体、喫煙歴をIORRAデータベースから抽出し解析に使用した。また、これまでに日本人RA患者を用いた研究で疾患感受性との関連を認めた以下の遺伝子(多型)を対象とした:*HLA-DRB1*(shared epitope)、*PADI4*(rs2240340)、*STAT4*(rs7574865)、*CTLA4*(rs231775)、*MH2CTA*(rs3087456)、*FCRL3*(rs7528684)、*TRAF1-C5*(rs10818488)、*CCR6*(rs3093024)。遺伝子型の同定にはすでに本学で施行したタイピングデータを用いている。統計解析には解析ソフトRを使用し、SHSを従属変数とし、平均DAS28、発症年齢、性、自己抗体(RF)陽性の有無、各遺伝子のリスクアレルの数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

平均 DAS28、年齢（若年発症）、性別（女性）、HLA-DRB1、*PADI4* (rs7639618)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
Mean DAS28		0.22	2.6x10 <sup>-7</sup>
Age at onset		-0.15	0.0002
Sex	female	0.10	0.026
RF	positive	-0.007	0.87
History of smoking	ever	-0.01	0.79
HLA-DRB1	SE	0.10	0.013
<i>PADI4</i>	rs2240340	0.10	0.017
<i>STAT4</i>	rs7574865	0.01	0.72
<i>CTLA4</i>	rs231775	0.03	0.45
<i>MHC2TA</i>	rs3087456	0.04	0.36
<i>FCRL3</i>	rs7528684	0.03	0.40
<i>TRAF1-C5</i>	rs10818488	-0.007	0.86
<i>CCR6</i>	rs3093024	-0.04	0.31

#### Multiple regression analysis

最も有意差を認めた平均 DAS28 について、個別に解析を行ったところ活動性の上昇に従って 発症 5 年時の SHS が増加していた(図 1)。

図 1 RA 疾患活動性と発症 5 年時の SHS

### D. 考察

本研究で同定された骨関節破壊予後不良因子のうち、性、発症年齢、遺伝子多型はコントロール不能であるが DAS28 だけは唯一コントロール可能な因子である。つまり RA を低活動性に tight control することが骨破壊の防止につながると考えられた。また骨関節破壊予後不良因子を

同定し得たことで RA 患者に対して治療法を選択する上で非常に有益であると考えられた。

### E. 結論

平均 DAS28、年齢（若年発症）、性別（女性）、HLA-DRB1、*PADI4* (rs2240340)が RA 骨関節破壊関連因子であることが同定された。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Iwamoto T, Seto Y, Ikari K, Yamanaka H, Momohara S. Solitary extranodal malignant lymphoma of the forearm in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 63(1):304.2011
2. Nishimoto K, Ikari K, Kaneko H, Tsukahara S, Kochi Y, Yamamoto K, Nakamura Y, Toyama Y, Taniguchi A, Yamanaka H, Momohara S. Association of EMCN with susceptibility to rheumatoid arthritis in a Japanese population. *J Rheumatol.* 38(2):221-8, 2011
3. Furuya T, Hosoi T, Saito S, Inoue E, Taniguchi A, Momohara S, Yamanaka H. Fracture risk assessment and osteoporosis treatment disparities in 3,970 Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 30(8):1105-11,2011
4. Momohara S, Tanaka E, Iwamoto T, Ikari K, Yamanaka H. Reparative radiological changes of a large joint after adalimumab for rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 30(4):591-2,2011
5. Sugiura T, Kawaguchi Y, Ikari K, Ichida H, Kawamoto M, Momohara S, Hara M, Yamanaka H. Interleukin-18 promoter polymorphisms in Japanese patients with rheumatoid arthritis:

- protective effect of the T allele and T/T genotype at rs360722. *Mod Rheumatol.* 21(4):359-64,2011
6. Yamanaka H, Tanaka Y, Inoue E, Hoshi D, Momohara S, Hanami K, Yunoue N, Saito K, Amano K, Kameda H, Takeuchi T. Efficacy and tolerability of tocilizumab in rheumatoid arthritis patients seen in daily clinical practice in Japan: results from a retrospective study (REACTION study). *Mod Rheumatol.* 21(2):122-33,2011
7. Yamagiwa K, Iijima S, Furuya T, Ikai T, Inoue E, Taniguchi A, Momohara S, Yamanaka H. Incidence of falls and fear of falling in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 21(1):51-6,2011
8. Momohara S, Ikari K, Kawakami K, Iwamoto T, Inoue E, Yano K, Sakuma Y, Hiroshima R, Tokita A, Taniguchi A, Yamanaka H. The increasing disease duration of patients at the time of orthopaedic surgery for rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* [in press]
9. Momohara S, Inoue E, Ikari K, Yano K, Tokita A, Suzuki T, Sakuma Y, Hiroshima R, Kawakami K, Masuda I, Iwamoto T, Taniguchi A, Yamanaka H. Efficacy of total joint arthroplasty in patients with established rheumatoid arthritis: improved longitudinal effects on disease activity but not on health-related quality of life. *Mod Rheumatol.* 21(5):476-81, 2011
10. Terao C, Ohmura K, Katayama M, Takahashi M, Kokubo M, Diop G, Toda Y, Yamamoto N; Human Disease Genomics Working Group; Rheumatoid Arthritis (RA) Clinical and Genetic Study Consortium, Shinkura R, Shimizu M, Gut I, Heath S, Melchers I, Manabe T, Lathrop M, Mimori T, Yamada R, Matsuda F. Myelin basic protein as a genome-wide study combined with immunological analyses. *PLoS One.* 6(6):e20457, 2011
11. Terao C, Yamada R, Ohmura K, Takahashi M, Kawaguchi T, Kochi Y; Human Disease Genomics Working Group; RA Clinical and Genetic Study Consortium, Okada Y, Nakamura Y, Yamamoto K, Melchers I, Lathrop M, Mimori T, Matsuda F. The human AIRE gene at chromosome 21q22 is a genetic determinant for the predisposition to rheumatoid arthritis in Japanese population. *Hum Mol Genet.* 20(13):2680-5, 2011
- 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

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)  
研究分担報告書

蛋白のシトルリン化酵素である PADI4 の病態への関与と新規治療法の研究

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 庄田 宏文、瀬理 祐、藤尾 圭志(東京大学アレルギーリウマチ学)  
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)の疾患感受性遺伝子として報告した蛋白のシトルリン化酵素 PADI4 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。PADI4 ノックアウトマウスを作成し、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。これらを用いて関節炎を惹起した結果、PADI4 は免疫系において想定以上に多くの遺伝子の制御と細胞分化、サイトカイン産生に関与していることが判明した。

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。一方、我々は蛋白のシトルリン化酵素(PADI、蛋白は PAD とも呼ばれる)の中の PADI4 を RA の疾患感受性遺伝子として報告している。最近のメタ解析では、アジア人だけでなく欧米人でも関連が認められることが追認され、民族を超えた普遍的な病因との関係が注目されている。そこで、この仮説において重要な役割を果たす PADI4 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。

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、DBA/1J 系へのバッククロスを完成させた。既に完成している C57BL/6 系へのバッククロスマウスと共に、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。

DBA/1J, C57BL/6 系の 6-8 週齢メスマウスに、II 型コラーゲンを免疫し、コラーゲン誘発関節炎(collagen-induced arthritis (CIA))の発症率・重症度を検討した。関節炎マウス血清中の抗 II 型コラーゲン抗体(IgM, IgG)、抗環状シトルリン化ペプチド(cyclic citrullinated peptide: CCP)抗体を ELISA 法にて測定した。また炎症関節組織におけるシトルリン化蛋白の発現を免疫染色法で調べた。一部のマウスは初回免疫後 7 日目でリンパ節、脾臓における濾胞性ヘルパー T 細胞(Tfh)、Germinal center (GC) B 細胞の分化を FACS で検討した。

また、DBA/1J 系の 6-8 週齢メスマウスに、抗 II 型コラーゲン抗体カクテルを移入し、LPS 刺激後に発症するコラーゲン抗体誘導関節炎(collagen-antibody induced arthritis : CAIA)の重症度を検討した。

マクロファージ、樹状細胞の LPS に対する反応を検討するため、骨髄由来マクロファージ(bone marrow-derived macrophage: BMM)、骨髄由来樹状細胞(bone

marrow-derived dendritic cell: BMDC)を作成し、試験管内で LPS(100ng/mL)で 24 時間刺激後の遺伝子発現を定量的 PCR で測定した。

### C. 研究結果

PADI4 ノックアウトマウスでは末梢における CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、B 細胞、樹状細胞、マクロファージ、好中球の割合は野生型と有意な差は見られなかった。

PADI4 ノックアウトにより C57BL/6, DBA/1J 系ともに CIA の発症・関節炎スコアが有意に抑制された。さらに、PADI4 ノックアウトマウスでは、CIA 血清で抗 CCP 抗体価の低下がみられたのみならず、抗 II 型コラーゲン抗体価も初回免疫後 3 週で IgM, IgG 型抗体ともに有意に低値を示した。PADI4 ノックアウトの CIA 関節炎組織ではシトルリン化フィブリノーゲンの発現消失がみられた。初回免疫後 7 日目の検討では、PADI4 ノックアウトマウスにおいて、所属リンパ節・脾臓の両方で Tfh, GC B 細胞の割合が有意に減少していた。

次に炎症の effector phase への効果を検討するため CAIA を検討した。PADI4 ノックアウトマウスにおいて、DBA/1J 系での関節炎スコアが有意に抑制された。PADI4 ノックアウトマウスと野生型マウスの間では、BMM, BMDC の分化、CD80, MHC class II の表面発現には差がみられなかったが、LPS 刺激後の BMM, BMDC においては、TNF-alpha, IFN-gamma, IL-12p35 の遺伝子発現が低下していた。

### D. 考察

PADI4 はマウス関節炎モデルに関して、その priming phase、effector phase の両方で作用している可能性がある。priming phase としては、抗原のシトルリン化による抗原性の変化の可能性に加えて、PADI4 が Tfh, GC B 細胞の分化そのものに影響を与え、抗 CCP 抗体、抗 II 型コラーゲン抗体の産生を制御している可能性が示された。effector phase としては、マクロファージ、樹状細胞のサイトカイン産生能などへの影響が考えられ、PADI4 はシトルリン化抗原の産生のみならず、各種の免疫細胞において多面的な遺伝子発現を制御している可能性が推測された。

### E. 結論

PADI4 は免疫系において想定以上に多くの遺伝子の制御と細胞分化、サイトカイン産生に参与していることが判明した。今回の研究を通して、PADI4 の関節炎との多面的な関わりがより明確になりつつあると考えられる。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Okada Y, Shimane K, Kochi Y, Tahira T, Suzuki A, Higasa K, Takahashi A, Horita T, Atsumi T, Ishii T, Okamoto A, Fujio K, Hirakata M, Amano H, Kondo Y, Ito S, Takada K, Mimori A, Saito K, Kamachi M, Kawaguchi Y, Ikari K, Mohammed O W, Matsuda K, Terao C, Ohmura K, Myouzen K, Hosono N, Tsunoda T, Nishimoto N, Mimori T, Matsuda F, Tanaka Y, Sumida T, Yamanaka H, Takasaki Y, Koike T, Horiuchi T, Hayashi K, Kubo M, Kamatani N, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K. A genome-wide association study identified AFF1 as a susceptibility locus for systemic lupus erythematosus in Japanese PLoS Genet. in press

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, 70:512-5, 2011.

### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

#### 1. 特許取得

特になし

#### 2. 実用新案登録

特になし

#### 3. その他

特になし