

201229012B

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業

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

総合研究報告書（平成22年度－24年度）

研究代表者 吉富 啓之

平成25（2013）年 5月

目 次

I.	総合研究報告	
	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	
	資料 患者さんおよび健常人への研究協力説明書および同意書	
II.	研究成果の刊行に関する一覧・別刷	19

I. 総合研究報告

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
次世代免疫制御を目指す創薬医学融合拠点 特定准教授
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。不十分な病態解明の原因の1つには動物モデルとヒト関節リウマチの病態や免疫反応の違いがあると考えられ、実際にマウスモデルで得られた知見がヒトの疾患に応用できないことはしばしば経験される。そこで我々は関節リウマチ患者由来の検体から研究シードを探索し解析するという方針で研究を行ってきた。その成果の1つとして関節液および血漿中のマイクロ RNA の存在とそれらの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世界に先駆けて示した。血漿中マイクロRNAの網羅的な解析をさらに行い、関節リウマチ特異的な血漿中マイクロRNAとして miR-24、miR-26a、miR-125a-5p およびそれらの複合値 ePRAM を同定し 100 名程度の関節リウマチ患者にて確認した。これらは関節リウマチに対して 60%程の感度と 90%程の特異度を示した。また興味深いことに、血漿中マイクロRNAは抗CCP抗体が陰性の群でも同様の感度特異度を示し、抗CCP抗体陰性症例の早期診断に寄与する可能性が示唆された。また血漿中で変化しているマイクロRNAの機能を動物モデルを用いて解析を行い、miR-451 が p38 経路を介して好中球の遊走を制御していることを明らかにした。他にも、関節リウマチ関節において IL-27 が Th17 細胞と炎症性サイトカインを抑制していること、さらに関節リウマチ滑膜炎局所に、Th1 や Th17 細胞と別個の CD4 陽性 T 細胞集団が存在することを明らかにしている。この様に本研究では、関節リウマチ患者由来の検体から関節リウマチの新たな診断や治療につながる知見を得ており、国民の健康とともに行政にも貢献できる成果を得たと考える。

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 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- β 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、血漿中にはマイクロ RNA が安定して存在し、癌の特異的なマーカーとして重要であることが示された(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 の小嚢胞である 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。患者にてどのような免疫現象が生じているのかを明らかにするため、ヒト関節リウマチ検体から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4つの課題に関して研究を行った。

① ヒト関節リウマチ病態における 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。動物モデルで IL-27 は関節炎抑制的に働くという報告がある一方で (Ann Rheum Dis. 2008;67:1474-9.)、IL-27 が炎症性に働くという報告もある (Arthritis Res Ther. 2010;12:R129.)。また、ヒト関節リウマチにおける IL-27 の役割はこれまで明らかでなかった。本研究で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、さらに 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、関節液にもマイクロ RNA が存在するのか、また血漿中マイクロ 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のかはこれまで知られていなかった。

本研究ではまずはじめに、関節液中にもマイクロ RNA が存在するのか、また血漿・関節液中マイクロ RNA が関節リウマチのバイオマーカーと成り得るのかを5種類のマイクロ RNA を測定し解析した。

さらに、血漿中マイクロ RNA による関節リウマチ診断および病勢判定の臨床応用を目指し、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、および臨床マーカーとの相関を認めるのかを、100 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。単純にマーカーとしての有用性だけではなく、現在臨床上で問題となっている抗 CCP 抗体陰性症例に対しても使用できるのかも検討した。

③ マイクロ RNA による関節炎制御の解析

血漿中マイクロ RNA はマーカーとしての役割だけでなく、自己免疫性関節炎の病態に関与している可能性がある。本解析では、詳細に機序を解明するために関節炎モデルを用いて解析した。関節炎にて変化するマイクロ RNA がどのように関節炎の病態に関与するのかを、マイクロ RNA が標的とする遺伝子や信号伝達系、さらに細胞群を明らかにすることを試みた。

④ ヒト関節リウマチ関節に遊走するリンパ球の解析

病理組織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、どの様な機序で関与し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解析を行った。

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

まず初めに、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より関節液および血漿、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 α 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。

さらに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- γ または IL-17 の濃度を ELISA にて測定し、それらの関連を解析した。

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

まず初めに、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患者におけるマイクロ 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 の関連を解析した。

次に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 0.05 以下または発現差が 4 倍以上あるものを第一次候補とした。これらのマイクロ RNA に対して 8 検体ずつで発現比較を行い、P 値が 0.05 以下で有意差のあるものを第二次候補とした。さらに、関節リウマチ患者および健常人での第二次候補マイクロ RNA の発現をそれぞれ 100 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。また変形性関節症患者や SLE 患者の血漿でのこれらのマイクロ RNA の発現を解析し、関節リウマチに対する特異性を確認した。

③ マイクロ RNA による関節炎制御の解析

関節炎動物モデルの血漿中で RA 患者と同様に変化しているマイクロ RNA の同定を試みた。次にこれらのマイクロ RNA が関節炎の病態機序へ果たす役割を明らかにするために、in vitro の系や動物モデルを用いて、同定したマイクロ RNA が関与する細胞群やそれが標的とする遺伝子、および信号経路を解析した。さらには関節炎モデルにてマイクロ RNA の制御を行い、関節炎に対する効果を解析する事で、マイクロが関節炎の治療標的となるのかを検討した。

④ ヒト関節リウマチ関節に遊走するリンパ球の解析

関節リウマチの炎症局所には病態に関与する特徴的 CD4 陽性 T 細胞が集積していると考え、関節リウマチ患者の滑膜炎由来の検体を中心に多重免疫染色やフローサイトメリーにて解析を行った。動物モデルからは CD4 陽性 T 細胞のなかでも Th1 細胞や Th17 細胞が重要であると考えられているが、これまでの様々の臨床研究の結果から IFN- γ や IL-17 と独立した因子が関節リウマチの病態に関与すると考え、これらと独立した発現パターンを示す因子を中心に解析を行った。またこれらの因子が、関節リウマチの病態に重要な役割を果たすことが分かっている TNF や IL-6 などの炎症性サイトカインとどのような関係を示すのかを解析した。

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(図 1)。

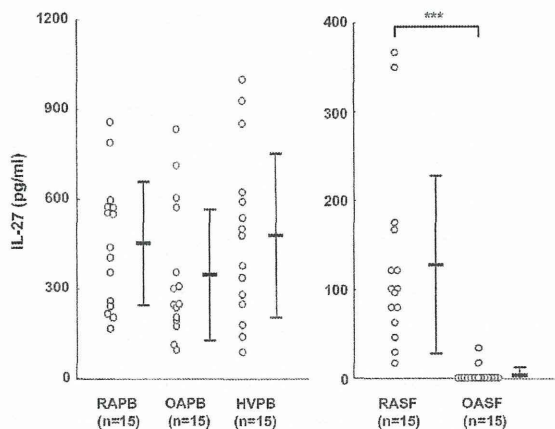


図 1 末梢血および関節液中の IL-27 濃度

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。

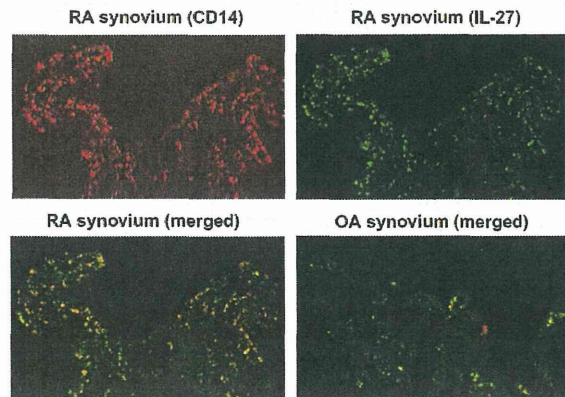


図 2 RAおよびOA滑膜組織の免疫染色(赤:CD14、緑:IL-27)

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(図 2)。

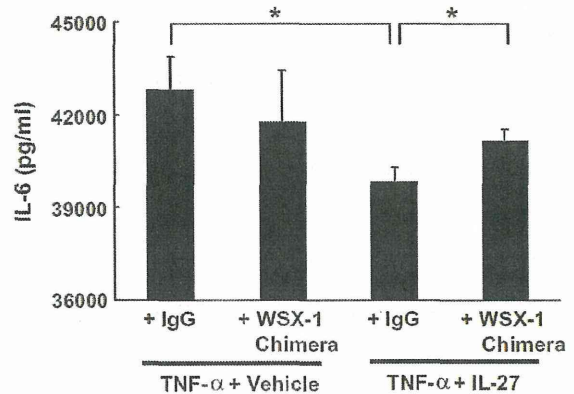


図 3 IL-27 による IL-6 産生抑制

TNF α 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(図 3)。

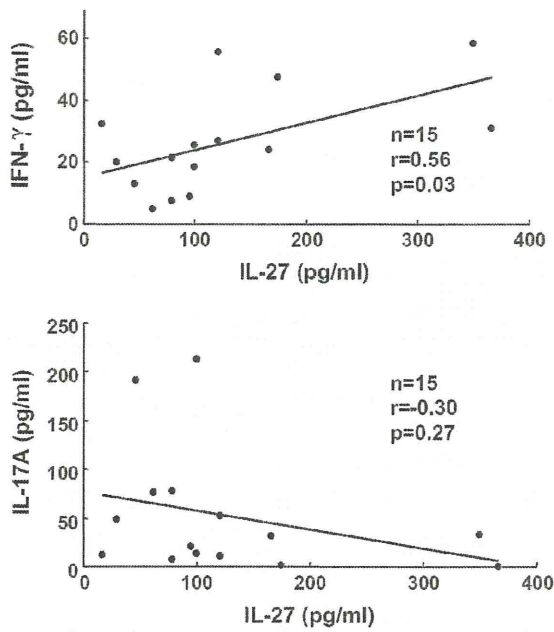


図4 関節液中IL-27とIFN- γ 、IL-17濃度の関連

関節リウマチの関節液において、IL-27とIFN- γ 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。これらのことから、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。

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(図5)。miR-16, miR-132, miR-146a, miR-155 およびmiR-223の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

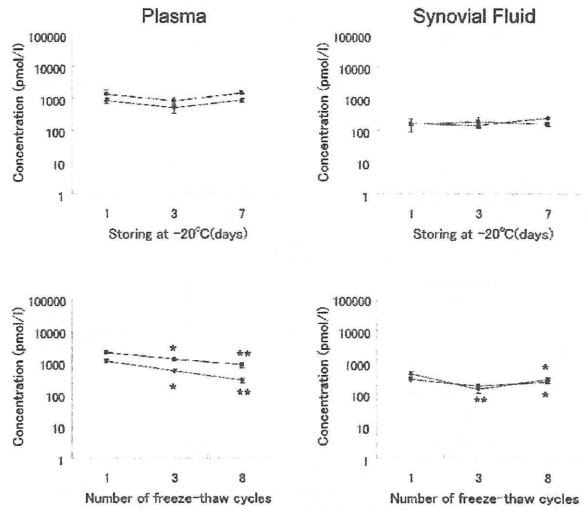


図5 血漿および関節液中のマイクロRNAの保存や凍結融解に対する安定性。

■ miR-16、◆ miR-223

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(図6)。

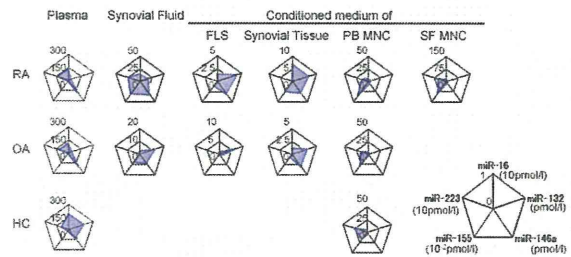


図6 FLS、滑膜組織、末梢血単核球、関節液単核球からのマイクロRNA分泌パターン

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り、さらに特異的な血漿中マイクロRNAの探索が必要と考えられた(図7)。

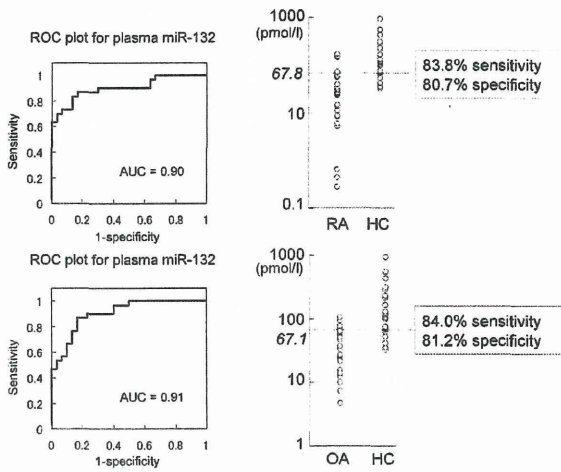


図7 血漿中 miR-132 による健常人と RA および OA の鑑別

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 年度からはマイクロ 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 26 種であった。これらのマイクロ RNA のうち関節リウマチ患者、健常人それぞれ 8 検体で差が認められた血漿中マイクロ RNA は miR-24、miR-26a、miR-28-5p、miR-28-3p、miR-30a-5p、miR-30c、miR-30e-3p、miR-125a-5p、miR-126-3p の 8 種類であった。これらの血漿中マイクロ RNA 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。これらのマイクロ RNA について、それぞれ 100 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 0.8 以上となるマイクロ RNA は miR-24、miR-26a、miR-125a-5p の 3 種類認められ、それぞれ感度 63.7%で特異度 89.5%、感度 53.9%で特異度 94.3%、感度

64.7%で特異度 89.5%であった(図8)。

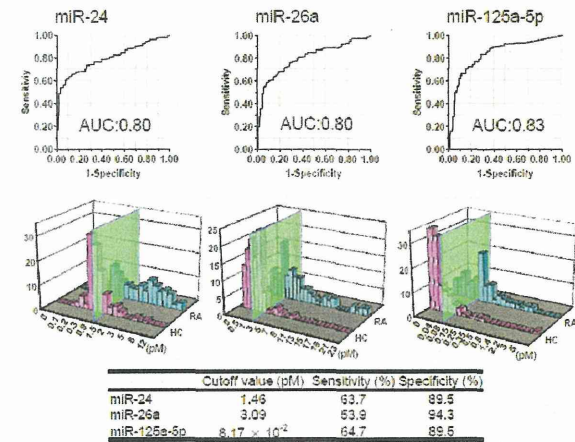


図8 血漿中 miR-24、miR-26a、miR-125a-5p の RA に対する感度特異度

また、血漿中マイクロ RNA の内、内部標準的な変化を示すものとして miR-30a-5p を同定した。これと miR-24、miR-125a-5p を組み合わせた複合値 (Estimated Probability of RA by plasma MiRNA (ePRAM))を作成することにより、78.4%の感度と 92.3%の特異度が得られた(図9)。

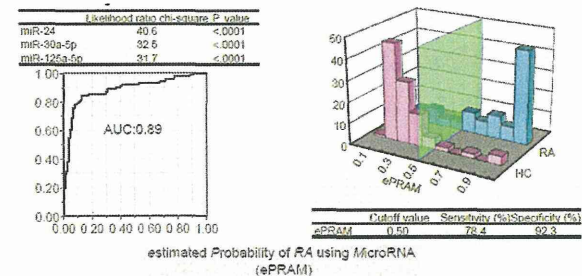


図9 複合値(ePRAM)による感度特異度

また 8 種類の候補血漿中マイクロ RNA 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、抗CCP抗体と相関を認めたものは miR-26a と miR-30e-3p、CRP とは miR-26a、miR-28-3p、miR-30c、miR-30e-3p、miR-126-3p、全身状態の患者 VAS と miR-24、miR-26a、miR-30c、miR-126-3p、DAS28(ESR)と miR-24、miR-26a、miR-30c、miR-126-3p、DAS28(CPR) と miR-24、miR-26a、miR-30c に相関を認めた。

また、抗CCP抗体陰性症例(15名)と陽性症例(87名)とでそれぞれの診断率を見たところ、miR-24で47%と64%、miR-26aで40%と55%、miR-125a-5pで67%と64%、ePRAMで73%と78%と有意な差を認めなかったことから、血漿中マイクロRNAを用いて抗CCP抗体陰性症例の診断の臨床応用が期待された。

③ マイクロRNAによる関節炎制御

網羅的な血漿中マイクロRNAの解析で関節リウマチ患者の血漿にて低下する傾向を認め、自己免疫性関節炎モデルでも関節炎を有するマウスの血漿で低下しているマイクロRNA、miR-451を同定した。マウス各臓器でmiR-451は血球系において高発現で、なかでも好中球が最もmiR-451を放出した。マウスに対してmiR-451の導入を行うと好中球の遊走が阻害され、それはmiR-451の直接の標的と新規に同定した2遺伝子を介したp38 MAPKのリン酸化の抑制によるものであった(図10)。

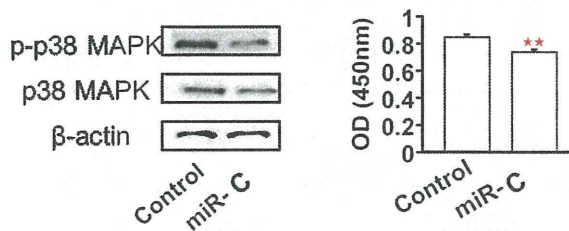


図10 miR-451による好中球でのp-p38の抑制

またmiR-451の全身投与により自己免疫性関節炎モデルでの関節炎重症度が低下した。

④ 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(図11)。多重染色にて、滑膜組織中はCD161陽性のCD3陽

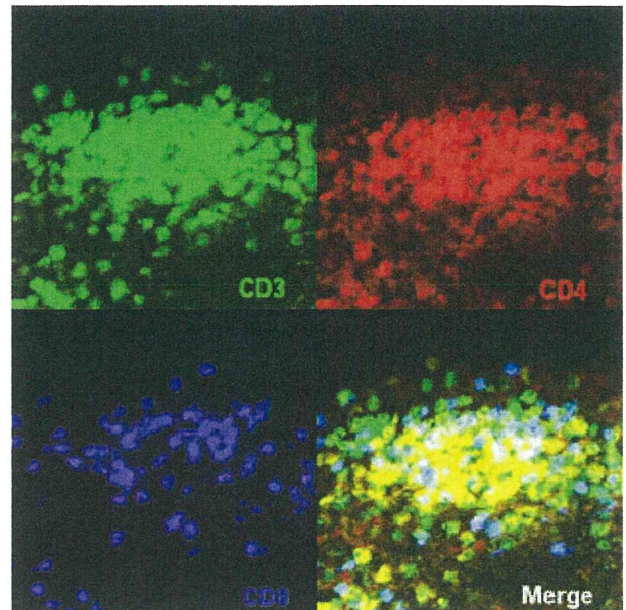


図11 RA滑膜組織に浸潤するTリンパ球。CD3(緑)、CD4(赤)、CD8(青)にて多重蛍光免疫染色を行った。

性T細胞の頻度が高かった。滑膜組織の免疫染色では、IFN- γ 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Th1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とは独立した産生パターンを示した。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、関節炎特局所での現象に関与していると考えられた。また、炎症性サイトカインはこの分画を増強させることが明らかとなった。

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 血漿中マイクロRNAと関節液中マイクロRNAの発現パターンは異なり、関節液中のマイクロRNAは関節局所の状況を反映していると考えられた。血漿中マイクロRNAはリウマチ因子や抗CCP抗体などの自己抗体とは産生機序の異なる新機軸のバイオマーカーである。血漿中の miR-24, miR-26a, miR-125a-5p, ePRAM はこれまでのバイオマーカーに劣らない感度および特異度を示すだけでなく、抗CCP抗体陰性患者においても同様の診断性を示し、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 を血漿中マイクロRNAにて客観的に裏付けられる可能性が考えられた。本研究により、established RA において血漿中マイクロRNAは抗CCP抗体と独立した性質をもつ有用なバイオマーカーであることが示された。今後は、血漿中マイクロRNAを用いて早期RAの診断や機能的予後予測が可能かを検討していく必要がある。

③ 本研究では miR-451 が p38 経路を介して好中球の遊走を抑制することが明らかとなった。また、miR-451 の全身投与により自己免疫性関節炎モデルでの関節炎重症度が抑制された。miR-451 投与による関節炎抑制の機序には好中球の遊走抑制だけでなく、他の細胞群の関与も考えられ、それらに関しては今後も解析を要すると思われた。臨床的には、例えば慢性 C 型肝炎に対するマイクロRNA 標的薬 Miravirsen が第二相臨床治験において安全性と有効性が示された。(N Engl J Med. 2013)。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。

④ 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。また、動物モデルから自己免疫疾患に関与するとされていた Th1 や Th17 と独立した発現パターンを有する CD4 陽性細胞を同定した。この分画が関節リウマチの滑膜炎に関与する機序を明らかにすることで、治療抵抗性の関節リウマチ患者に対する新たな治療やより安全な治療への応用が期待された。

E. 結論

ヒト関節リウマチ検体を解析することで動物モデルからは得られない新たな研究シードを探索し、関節リウマチの新たな病態を明らかにする事を目的として本課題の研究を行った。その結果として、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、血漿中 miR-24、miR-26a、miR-125a-5p および ePRAM は関節リウマチの有用なマーカーで新機軸のバイオマーカーとして抗CCP抗体陰症例の診断などで期待できること、マイクロRNAが好中球を介して関節炎に作用する新たな機序、さらにリウマチ滑膜炎局所に浸潤するCD4陽性細胞の新たな特徴を明らかにすることができた。

これらの知見は、抗CCP抗体陰性患者の早期診断や、既存薬に抵抗性の関節リウマチ患者に対する新たな治療へとつなげることができると考えている。この様に本研究は、関節リウマチの早期診断や新規治療を通じて、関節リウマチ患者の ADL 低下を防

止すること等で国民の健康の向上に貢献するだけでなく、医療経済的にも行政へと貢献することが出来る成果を得たと考える。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

1. 論文発表

平成 22 年度

1. Murata K, Yoshitomi H, Tanida S, Ishikawa M, Nishitani K, Ito H, Nakamura T. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(3):R86.
2. 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*. 2010;207(6):1135-43.
3. Tanaka S, Maeda S, Hashimoto M, Fujimori C, Ito Y, Teradaira S, Hirota K, Yoshitomi H, Katakai T, Shimizu A, Nomura T, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Graded attenuation of TCR signaling elicits distinct autoimmune diseases by altering thymic T cell selection and regulatory T cell function. *J Immunol*. 2010;185(4):2295-305.
4. Yoshitomi H, Neo M, Ito H, Takemoto M, Masaki Y, Nakamura T. Doppler Ultrasonography and CT Angiography Demonstrate Positional Occlusion of Vertebral Artery Associated with One-sided Destruction of the Atlantoaxial Lateral Mass Caused by Rheumatoid Arthritis: A Case Report. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2011;36(22):E1493-6
5. 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.

平成 23 年度

6. 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 55(2):237-44.
7. 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*. 2011;6(6):e20457.

平成24年度

8. Ishikawa M, Ito H, Akiyoshi M, Kume N, Yoshitomi H, Mitsuoka H, Tanida S, Murata K, Shibuya H, Kasahara T, Kakino A, Fujita Y, Sawamura T, Yasuda T, Nakamura T. Lectin-like oxidized LDL receptor-1 signal is a potent biomarker and therapeutic target for human rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2012;64(4):1024-34.
9. Murata K, Kitaori T, Oishi S, Watanabe N, Yoshitomi H, Tanida S, Ishikawa M, Kasahara T, Shibuya H, Fujii N, Nagasawa T, Nakamura T, Ito H. Stromal cell-derived factor 1 regulates the actin organization of chondrocytes and chondrocyte hypertrophy. *PLoS One*. 2012;7(5):e37163.
10. Yamada M, Aoyama T, Mori S, Nishiguchi S, Okamoto K, Ito T, Muto S,

Ishihara T, Yoshitomi H, Ito H. Objective assessment of abnormal gait in patients with rheumatoid arthritis using a smartphone. *Rheumatol Int.* 2012;32(12):3869-74.

11. Nishiguchi S, Yamada M, Nagai K, Mori S, Kajiwara Y, Sonoda T, Yoshimura K, Yoshitomi H, Ito H, Okamoto K, Ito T, Muto S, Ishihara T, Aoyama T. Reliability and validity of gait analysis by android-based smartphone. *Telemed J E Health.* 2012 ;18(4):292-6.

12. Terao C, Hashimoto M, Yamamoto K, Murakami K, Ohmura K, Nakashima R, Yamakawa N, Yoshifuji H, Yukawa N, Kawabata D, Usui T, Yoshitomi H, Furu M, Yamada R, Matsuda F, Ito H, Fujii T, Mimori T. Three Groups in the 28 Joints for Rheumatoid Arthritis Synovitis - Analysis Using More than 17,000 Assessments in the KURAMA Database. *PLoS One* 2013;8(3):e59341.

2. 学会発表

平成 22 年度

1. Murata K, Yoshitomi H, Ishikawa M, Kasahara T, Shibuya H, Nakamura T, Ito H. Plasma miR-132 and synovial fluid miR-223 as potential diagnostic biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. 第 57 回 ORS.2011.1.13. Long Beach.

2. Murata K, Yoshitomi H, Ito H, Nakamura T. Synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. 7th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies. 2011.10.17. 京都

3. 吉富啓之 伊藤宣 谷田司明 秋山泰高 吉岡豊一 中村孝志. 維持透析中の関節リウマチ患者に対する低用量ミゾリビン間欠投与の経験. 第54回日本リウマチ学会. 2011.4.23. 神戸.

4. 吉富啓之. 関節リウマチの病態はどこまでわかったか? -リンパ球を中心に-. 第2回神戸京整会症例検討会. 2010.5.22. 神戸.

5. 村田浩一、伊藤宣、北折俊之、吉富啓之、谷田司明、石川正洋、中村孝志. SDF-1 はアクチン重合を制御して軟骨の肥大化を促進する. 第24回軟骨代謝学会. 2011.3.5. 福岡.

平成 23 年度

6. 吉富啓之 伊藤宣 中村孝志. 強直性脊椎炎に対するレミケードの使用経. 京整会 RA 懇話会. 2011.7.3. 京都.

7. 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. 2011. 11. 28. 千葉.

8. 中村孝志. 整形外科バイオマテリアル過去・現在・未来. 第 31 回整形外科バイオマテリアル研究会. 2011. 11. 21. 京都

9. 吉富啓之、村田浩一、伊藤宣、中村孝志. 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. 2011. 10. 20. 前橋.

10. 伊藤宣、吉富啓之、中村伸一郎、中村孝志. 施行した人工関節の種類によってその後の死亡率に差があるのか-人工関節置換術後生存率調査- 第 55 回日本リウマチ学会学術集会 2011. 7. 18. 神戸.

11. 村田浩一、吉富啓之、伊藤宣、中村孝志. 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. 2011.7.18. 神戸. JCR2011 ワークショップ 賞受賞

12. 伊藤宣. 生物製剤使用中患者の手術.-生物学的製剤の選択と実践- 第 21 回日本リウマチ学会近畿支部学術集会 2011.9.3. 大阪

13. Ishikawa M, Ito H, Akiyoshi M,

Yoshitomi H, Murata K, Tanida S, Shibuya H, Kume N, Sawamura T, Nakamura T. A crucial role for lectin-like oxidized LDL receptor-1 signal on cartilage destruction in inflammatory arthritis. 58th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2012.2.6, San Francisco, USA

平成 24 年度

14. Murata K, Yoshitomi H, Ishikawa M, Shibuya H, Ito H, Matsuda S. Comprehensive microRNA analysis identifies miR-24, miR-26a, and miR-125a-5p as plasma biomarkers for rheumatoid arthritis. 2012 ACR/ARHP Annual Meeting. 2012.11.11. Washington DC. USA.

15. 村田浩一、北折俊之、中村孝志、伊藤宣. Stromal cell-derived factor 1 regulates the actin organization of chondrocytes and chondrocyte hypertrophy. 第 30 回骨代謝学会. 2012.7.20. 東京.

16. Murata K, Kitaori T, Ito H, Yoshitomi H, Furu M, Ishikawa M, Shibuya H, Matsuda S. Stromal cell-derived factor 1 regulates the actin organization of chondrocytes and chondrocyte hypertrophy. GCOE リトリート 2012. 2012.10.5. 淡路.

17. 村田浩一、伊藤宣、北折俊之、吉富啓之、石川正洋、渋谷秀幸、布留守敏、中村孝志、松田秀一. SDF-1 は軟骨細胞のアクチン細胞骨格を制御し、肥大化を促進する. 第27回日本整形外科学会基礎学術集会. 2012.10.27. 名古屋.

18. 吉富啓之、小林志緒. Analysis of synovial tissue with inflammation of rheumatoid arthritis as a tertiary lymphoid organ. 2012.12.5. 第 41 回日本免疫学会. 神戸.

19. 中村孝志. 関節外科の未来. 第 85 回日本整形外科学会学術集会. 2012.5. 京都.

20. Ishikawa M, Ito H, Akiyoshi M, Murata

K, Tanida S, Shibuya H, Kasahara Y, Yoshitomi H, Nakamura T. A crucial role for lectin-like oxidized LDL receptor-1 signal on synovial inflammation in RA. The Annual European Congress of Rheumatology EULAR2012, June 6~9, 2012.6.6, Berlin, Germany.

21. Ishikawa M, Ito H, Yoshitomi H, Akiyoshi M, Murata K, Furu M, Matsuda S. A crucial role for lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 signal in rheumatoid arthritis. 15th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (APLAR) 2012.9.11, JORDAN

22. 伊藤宣. 生物製剤使用中患者の手術-生物学的製剤の適正な使用と諸問題- 第 22 回日本リウマチ学会近畿支部学術集会 2012.9.1. 大阪.

23. Murata K, Kitaori T, Ito H, Yoshitomi H, Furu M, Ishikawa M, Shibuya H, Matsuda S. Stromal cell-derived factor 1 regulates the actin organization of chondrocytes and chondrocyte hypertrophy. 59th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2013.1.26. San Antonio, USA. NIRA finalist.

H. 知的財産研の出願・登録状況

関節液・血漿中 microRNA に関する特許申請中 二件

資料 患者さんおよび健常人への研究協力説明書および同意書

血液または関節液をご提供いただく方への説明書（患者さん用）

分泌マイクロ RNA の関節疾患および自己免疫疾患に対する診断性に関する研究

研究の目的

・私たちは、関節リウマチや変形性関節症がなぜ生じてどの様に悪くなるのかを研究することで、早く病気を発見したり、これまでの治療で効果がない患者さんに新しい治療を提供することを目標として研究に取り組んでいます。それぞれの病気で何が違うのかを調べるためには、様々な病気の方の血液や関節液を調べる必要があります。今回の研究では、特定の病気の方だけで変化のあると思われる何種類かのマイクロ RNA と呼ばれるものを見つけています。提供頂いた血液または関節液を用いて多くの患者さんで確認し、本当に検査として使えるのかを確認したいと思っています。

プライバシーの保護について

・研究のデータの処理に氏名は含めずに、年齢、性別、治療内容、病気の状態等の情報のみを統計的に処理しますので、学会発表などでプライバシーが侵害される可能性はありません。今回の新しい検査の結果に関しては、病気の診断に対する意義がまだ確立していませんので、お知らせしない予定です。また、今回の研究は遺伝するような遺伝子の異常をしらべるものではありません。

提供いただく検体について

・採血では 5~10ml の血液を採取し研究目的に使用します。また治療による変化をみるために、差し支えなければ 1 年ほど後に血液の提供をお願いする予定です。関節液は、治療で穿刺したときのみ提供をお願いしています。研究への協力をご希望されない場合にも、治療内容への影響はありません。また同意した後に協力を撤回することも可能です。この説明書をお読みにになり、提供に同意される方は別紙の同意書に署名をお願いします。

この研究に関して何か分からないことや心配なことがありましたら、主治医までお問い合わせ下さい。

連絡先

〒606-8507

京都市左京区聖護院川原町 54

京大病院整形外科 吉富啓之

同 意 書

京都大学医学部附属病院院長殿

研究課題名

分泌マイクロRNAの関節疾患および自己免疫疾患に対する診断性に関する研究

私は、上記研究に関する説明を担当医師から受け、下記の点を確認した上、参加することに同意します。

1. 研究の目的及び方法
2. 研究の結果は、将来学会等で発表されることがあるが、プライバシーは厳密に保護されること。
3. 試料の提供が無償であること
4. 研究への参加を同意した場合でも、いつでも撤回できること
5. 研究への参加を同意しない場合であっても、原疾患に対する治療等で一切不利益を被ることはないこと
6. 提供した検体は
 - () 本研究以外には使用しない。
 - () 長期間保存され、京都大学大学院医学研究科医の倫理委員会で認可された研究に将来使用してもよい。

同意日 平成 年 月 日

本人署名 _____

本研究に関する説明を行い、自由意思による同意が得られたことを確認します。

施設名・診療科 _____

説明医師氏名 _____

本同意書は、本人と担当医師が一部ずつ保管する。

採血にご協力いただく方への説明書

分泌マイクロ RNA の関節疾患および自己免疫疾患に対する診断性に関する研究

採血の目的

・私たちは、関節リウマチや変形性関節症がなぜ生じてどの様に悪くなるのかを研究することで、早く病気を発見したり、これまでの治療で効果がない患者さんに新しい治療を提供することを目標として研究に取り組んでいます。健康な方と病気の方で何が違うのかを調べるためには、病気の方の血液だけでなく、健康な方の血液も同様に調べる必要があります。今回の研究では、病気の方だけで変化のあると思われる何種類かのマイクロ RNA と呼ばれるものを見つけています。たくさんの患者さんと健康な方の両方で確認し、本当に検査として使えるのかを確認したいと思っています。

プライバシーの保護について

・今回頂いたお名前はご本人から問い合わせがあった場合にのみ使用します。データの処理には氏名は含めずに、年齢、性別、身長、体重、いままでかかった病気等の情報のみを統計的に処理しますので、学会発表などでプライバシーが侵害される可能性はありません。今回の新しい検査の結果に関しては、病気の診断に対する意義がまだ確立していませんので、お知らせしない予定です。また、今回の研究は遺伝するような遺伝子の異常をしらべるものではありません。

採血について

今回の採血では 5~10ml の血液を採取し研究目的にて使用します。この説明書をお読みにになり、採血への協力を希望される方は別紙の同意書に署名をお願いいたします。

この研究に関して何か分からないことや心配なことがありましたら、
研究責任者 吉富までお問い合わせ下さい。

(右記の問い合わせ番号もお伝え下さい 問い合わせ ID をここに記載)

連絡先

〒606-8507

京都市左京区聖護院川原町 54

京都大学大学院医学研究科

吉富啓之

説明者： _____

現在かかっておられる病気に○を付けてください。

お薬で治療されている場合は二重丸 をお願いします

心臓の病気（高血圧 心不全 狭心症 不整脈） 肺の病気
胃炎・胃潰瘍 肝炎・肝硬変 胆嚢の病気
糖尿病 高脂血症 脳梗塞 脳出血 腎不全
免疫の病気 内分泌の病気（ ）
（アレルギー 関節リウマチ SLE その他 ）
変形性関節症（ ） 骨粗鬆症 脊柱管狭窄症 骨折
腫瘍（ ） その他（ ）

年齢 _____ 才 性別 男・女

身長 _____ cm 体重 _____ Kg 問い合わせIDをここに記載

血液採取同意書 京都大学医学部附属病院長殿

別紙の説明を熟読し、①採血の研究使用目的、②プライバシーの保護、
③採血が自由意志に基づいて無償でおこなわれること に対して同意いたし
ましたので、署名の上で採血に協力します。

平成 _____ 年 _____ 月 _____ 日

氏名 _____

提供した検体は

- () 本研究以外には使用しない。
() 長期間保存され、京都大学大学院医学研究科医の倫理委員会で認
可された研究に将来使用してもよい。

問い合わせIDをここに記載

採血にご協力いただく方を募集しています

厚生労働科学研究 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

分泌マイクロRNAの関節疾患および自己免疫疾患に対する診断性に関する研究

採血の目的

・私たちは、関節リウマチや変形性関節症がなぜ生じてどの様に悪くなるのかを研究することで、早く病気を発見したり、これまでの治療で効果がない患者さんに新しい治療を提供することを目標として研究に取り組んでいます。健康な方と病気の方で何が違うのかを調べるためには、病気の方の血液だけでなく、健康な方の血液も同様に調べる必要があります。今回の研究では、病気の方だけで変化のあると思われる何種類かのマイクロRNAと呼ばれるものを見つけています。たくさんの患者さんと健康な方の両方で確認し、本当に検査として使えるのかを確認したいと思っています。

プライバシーの保護について

・今回頂いたお名前はご本人から問い合わせがあった場合にのみ使用します。データの処理には氏名は含めずに、年齢、性別、身長、体重、いままでかかった病気等の情報のみを統計的に処理しますので、学会発表などでプライバシーが侵害される可能性はありません。今回の新しい検査の結果に関しては、病気の診断に対する意義がまだ確立していませんので、お知らせしない予定です。また、今回の研究は遺伝するような遺伝子の異常をしらべるものではありません。

この掲示について

・この募集は 事業所名 の許可を得て掲示させていただいています。今回の採血では5~10mlの血液を採取し研究目的にて使用します。この募集をお読みになり、個人の自由意志として採血へご協力いただける方は下記の連絡先にご連絡いただけますよう、お願いいたします。

厚生労働科学研究 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業
研究責任者 京都大学大学院医学研究科 吉富啓之

連絡先

事業所名または京大

事業所または京大の担当者

電話番号

II. 研究成果の刊行に関する一覧・別刷