

【Ⅲ】 研究分担報告

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)
研究分担報告書

関節リウマチの関節破壊の進展に寄与する因子の解析研究

研究分担者 川上 純 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科リウマチ免疫病態制御学分野 教授
研究協力者 玉井慎美 長崎大学保健・医療推進センター
中島好一 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科リウマチ免疫病態制御学分野
岡田覚丈 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科リウマチ免疫病態制御学分野
川尻真也 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科リウマチ免疫病態制御学分野
岩本直樹 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科リウマチ免疫病態制御学分野
青柳 潔 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科社会医療科学講座公衆衛生学分野
上谷雅孝 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科展開医療科学講座放射線診断治療学

研究要旨 関節リウマチ(RA)の中で、Rapid radiographic progression (RRP)もしくは Clinical relevance of rapid radiographic progression (CRRP)を来す症例の特徴を見出すことは重要である。今年度は、実地診療下における CRRP、また、早期関節リウマチコホートにおける RRP に主に着目して解析した。実地臨床下においては合成 DMARDs 投与 1 年間の 261 例を対象としたが、多変量解析により、発症早期、積分 DAS28-ESR 高値、ベースライン mTSS 高値が CRRP の危険因子と抽出され、MTX 非使用にもその傾向を認めた。早期関節炎コホートにおいては、2 年間フォローした 111 名を対象に、 Δ Genant-modified Sharp score >3 を RRP として解析した。RRP は 20 例(18%)に認め、多変量解析において手指関節 MRI 骨炎は RRP の独立した予測因子と抽出され、それ以外ではベースライン Genant-modified Sharp score と 2 年間における生物学的製剤治療歴が抽出された。早期関節炎コホートでの preliminary な追加解析では、近年の T2T 治療戦略は、手指関節 MRI 骨炎を改善するとともに、Xp 骨変化および SDAI 寛解導入にもよい影響を与えていた。今回の解析により、早期からの MTX を用いての積極的な治療は RA の予後改善には有効で、MRI 骨炎はその補助診断に有益であることが明らかとなった。

A.研究目的

関節リウマチ(RA)の治療目標は関節破壊の抑制であり、それには早期からの積極的な治療介入とフォローアップが肝要である。関節破壊については Rapid radiographic progression (RRP)もしくは Clinical relevance of rapid radiographic progression (CRRP)が関節予後不良の指標として注目されている。今年度は、実地診療下における CRRP、また、早期関節リウマチコホートにおける RRP に主

に着目し、これらに関連する因子の抽出を試みた。

B.研究方法

実地臨床下における CRRP の評価では、合成 DMARDs で 1 年間治療された 261 例(エントリー時に DAS28-ESR 中等度疾患活動性以上もしくは Xp 骨びらんあり)を対象に、CRRP (Δ mTSS >3.0)を来す特徴を抽出した。早期関節炎コホートにおける RRP の評価では、長崎大学早期関

節炎コホートで 2 年間フォローした 111 例を対象に、 Δ Genant-modified Sharp score >3 を RRP として、RRP を来す特徴を解析した。また、このコホートにおいては preliminary ではあるが、抗リウマチ治療の変化の効果も解析した。

(倫理面への配慮)

上記の研究は長崎大学病院臨床研究倫理委員会の承認および文書での研究への同意を得ている。

C. 研究結果

1. 実地臨床下における CRRP

図 1 に解析対象の症例構成を示す。これは現在進行形の臨床研究であるが(総エントリー996 例)、今回は、研究方法に示した 261 例を解析した。CRRP は 31 例(11.9%)に認めた。性別、年齢、罹病期間、DAS28-ESR、DAS28-ESR 積分値(1 年間で 3 ヶ月おきの 5 ポイント)、CRP、自己抗体、MTX 使用、PSL 使用、HAQ、mTSS の変数の中で、多変量解析において、発症早期(短い罹病期間)、積分 DAS28-ESR 高値、ベースライン mTSS 高値が RRP を予測する独立因子と抽出され、MTX 非使用(non-MTX DMARDs による加療)にもその傾向を認めた(表 1)。

2. 早期関節炎コホートにおける RRP

図 2 に解析の対象と方法を示すが、今回は、データセットが揃った 111 例を対象に、 Δ Genant-modified Sharp score >3 を RRP として、RRP を来す特徴を解析した。RRP は 20 症例(18%)に認めた。多変量解析においてベースライン手指関節 MRI 骨炎は RRP の独立した予測因子と抽出され、それ以外ではベースライン Genant-modified Sharp score と 2 年間における生物学的製剤治療歴が抽出された(表 2)。

また、preliminary ではあるが、抗リウマチ治療の変化の効果も解析した。2008 年以降の T2T 治療ストラテジーの浸透により、長崎大学早期関節炎コホートにおいては、治療経過による手指関節 MRI 骨炎が改善するとともに、Xp 骨変化進展の抑制および SDAI 寛解率上昇が確認された。

D. 考察

リウマチ実地臨床において関節破壊の進展を防止するに

は、早期から MTX を用いた、目標達成に向けた積極的な治療を行うことの重要性が確認された。特に骨線では所見が乏しい早期 RA では、MRI 骨炎が予後不良因子になると考えられ、MRI 骨炎が認められた場合は、より積極的な治療介入が必要かもしれない。Preliminary ではあるが、T2T 治療ストラテジーは、MRI 骨炎への改善効果を認めた。

E. 結論

合成 DMARDs 治療下のリウマチ実地臨床下における検討で、RA の関節破壊の進展(CRRP への進展)に寄与する因子を明らかとした。早期 RA においては、MRI 骨炎が RRP 進展に寄与することも明らかとした。実地臨床下における検討では生物学的製剤の効果の解析を試みる予定である。また、関節破壊が最も早い活動性早期 RA における目標達成に向けた治療評価も継続し、これら症例群の予後を規定する因子を、MRI 画像解析を含めて、詳細に検討する予定である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohyama K, Kawakami A, Tamai M, Baba M, Kishikawa N, Kuroda N. Serum immunocomplex containing thrombospondin-1: a novel biomarker for early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 71 (11): 1916-1917, 2012.
- 2) Kita J, Tamai M, Arima K, Kawashiri SY, Horai Y, Iwamoto N, Okada A, Koga T, Nakashima Y, Suzuki T, Yamasaki S, Nakamura H, Origuchi T, Ida H, Aoyagi K, Uetani M, Eguchi K, Kawakami A. Significant improvement in MRI-proven bone edema is associated with protection from structural damage in very early RA patients managed using the tight control approach. *Mod Rheumatol.* 2012 Jun 6.

- 3) Kawashiri SY, Suzuki T, Okada A, Yamasaki S, Tamai M, Nakamura H, Origuchi T, Mizokami A, Uetani M, Aoyagi K, Eguchi K, Kawakami A. Musculoskeletal ultrasonography assists the diagnostic performance of the 2010 classification criteria for rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 23 (1) 36-43, 2013.
- 4) Kita J, Tamai M, Arima K, Nakashima Y, Suzuki T, Kawashiri SY, Okada A, Koga T, Yamasaki S, Nakamura H, Origuchi T, Aramaki T, Nakashima M, Fujikawa K, Tsukada T, Ida H, Aoyagi K, Uetani M, Eguchi K, Kawakami A. Delayed treatment with tumor necrosis factor inhibitors in incomplete responders to synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs shows an excellent effect in patients with very early rheumatoid arthritis with poor prognosis factors. *Mod Rheumatol.* 22(2): 195-201, 2012.
- 5) Tamai M, Kawakami A, Uetani M, Fukushima A, Arima K, Fujikawa K, Iwamoto N, Aramaki T, Kamachi M, Nakamura H, Ida H, Origuchi T, Aoyagi K, Eguchi K. Magnetic resonance imaging (MRI) detection of synovitis and bone lesions of the wrists and finger joints in early-stage rheumatoid arthritis: comparison of the accuracy of plain MRI-based findings and gadolinium-diethylenetriamine pentaacetic acid-enhanced MRI-based findings. *Mod Rheumatol.* 22 (5): 654-658, 2012.
- Practice:A Large-Scale Prospective Longitudinal Cohort Study(the 1st report of Apple Survey). *American College of Rheumatology(ACR/ARHP 2012)* . 2012/11/10-11/14
- 2) Tamai M, Nakasima Y, Suzuki T, Horai Y, Okada A, Kita J, Kawashiri S, Iwamoto N, Ichinose K, Arima K, Nakamura H, Origuchi T, Uetani M, Aoyagi K, Eguchi K, and Kawakami A. Magnetic Resonance Imaging-Proven Osteitis At Baseline Predicts the Early Rheumatoid Arthritis Patients Who Will Develop Rapid Radiographic Progression : MRI Is Beneficial to Find the Window of Opportunity in Early RA. *American College of Rheumatology(ACR/ARHP 2012)* . 2012/11/10-11/14
- 3) 川上 純, 鈴木貴久, 玉井慎美, 中村英樹, 植木幸孝, 江口勝美. LC-MS/MSによる関節リウマチ患者血清のイムコンプレキソーム解析. 第56回日本リウマチ学会総会・学術総会. 2012/4/26-4/28
- 4) 川尻真也, 西野文子, 鈴木貴久, 中島好一, 寶來吉朗, 岡田覚丈, 一瀬邦弘, 玉井慎美, 山崎聡士, 中村英樹, 折口智樹, 青柳 潔, 上谷雅孝, 江口勝美, 川上 純. 関節エコーは2010年分類基準の早期リウマチにおける診断能を向上させる. 第56回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2012/4/26-4/28
- 5) 川上 純. 関節リウマチの早期診断:2010 RA分類基準と画像診断. 第56回日本リウマチ学会総会・学術総会. 2012/4/26-4/28

2.学会発表

- 1) Okada A, Kawakami A, Fukuda T, Hidaka T, Ishii T, Ueki Y, Koderu T, Nakashima M, Takahashi Y, Honda S, Horai Y, Koga T, Watanabe R, Okuno H, Eguchi K. Characteristic of the Japanese Patients with Rheumatoid Arthritis(RA) of Rapid Radiographic Progression(RRP) Treated with Synthetic Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs(DMARDs)in Daily

H.知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

図1. 解析対象 症例構成

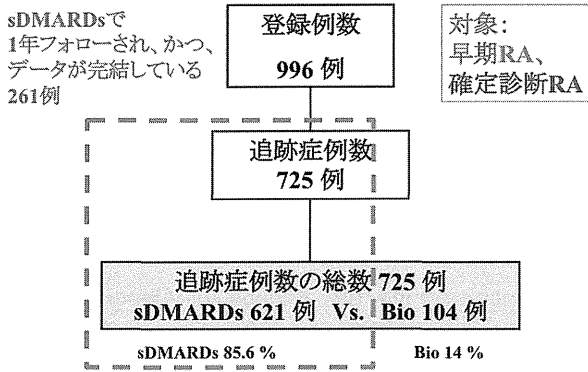


表2. 2年後のRRPをアウトカムとした多変量解析

	オッズ比	95%信頼区間	p値
初診時MRI骨炎 (あり/なし)	3.88	1.05 - 14.42	0.043
フォロー2年間の生物学的製剤使用(あり/なし)	7.95	2.29 - 27.56	0.0011
初診時Genant modified Sharp score	1.24	1.03 - 1.50	0.027

AIC= 91.50

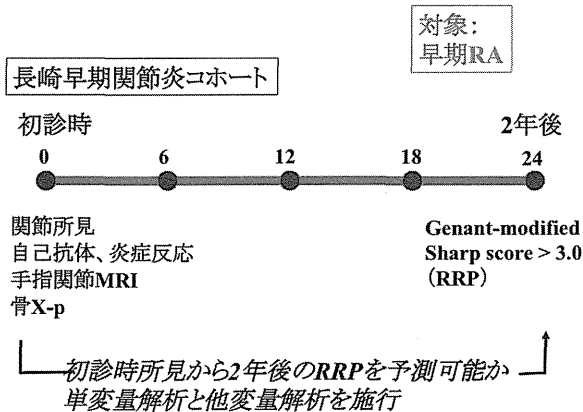
表1. CRRPをアウトカムとした多変量解析

Baseline variables	comparison	odds ratio	95% C.I.	p value
Disease duration	2 y decrease	1.334	1.062 - 1.676	0.013
MTX use	- / +	2.124	0.938 - 4.811	0.071
Time-integrated DAS28-ESR	10 increase	1.459	1.044 - 2.038	0.027
mTSS	5 increase	1.071	1.017 - 1.128	0.010

Starting with a full model including all variables, the most appropriate model was selected on the basis of Akaike's information criteria (AIC).

We have found that the early disease, high time-integrated DAS28-ESR and high mTSS at baseline are the independent predictors toward development of CRRP. High DAS28-ESR at baseline was not selected during the process. MTX use tended to inhibit the development of CRRP.

図2. 早期RAでの解析: 対象と方法



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)
研究分担報告書

インドシアニングリーン蛍光血管描出法による手指関節滑膜血流の評価

研究分担者 小池 隆夫 (NTT 東日本札幌病院 院長、北海道大学 名誉教授)

研究協力者 深江 淳 (北海道内科リウマチ科病院 医長)

研究要旨

インドシアニンググリーンは肝機能検査に用いられてきた緑色色素である。同薬は人体投与後、血中アルブミンと結合し近赤外線領域の800nmの励起光を吸収し、845nmの蛍光を発する。800-845nm近赤外線は人体深部約2cmを貫通するが組織障害はない。蛍光はデジタルビデオカメラで描出することが可能である。近年、この原理を利用して外科手術後の再開血流の評価や、リンパ管造影も行われている。我々は手指関節において、滑膜炎に伴う異常血流出現を同法を利用して描出可能か否かを検討した。前回の報告で、活動性関節リウマチ(RA)患者の、腫脹を認めた右手に対して、近赤外線カメラと関節超音波検査を施行し比較した。その結果、関節超音波検査にて滑膜異常血流陽性と判別された部位に、近赤外線カメラにて異常蛍光スポットを描出した。今回、我々は両手用撮像機器を開発した。同機器を使用して両手の同時撮影を行い良好な結果をえた。近赤外線カメラは低コスト、低浸襲であり、機器に特別な施設を必要としない。関節超音波検査と同様に滑膜異常血流を描出することが可能であり、特に習熟したテクニックは必要としない。近赤外線カメラはRAにおいて有用な検査となる可能性が考えられた。

A.研究目的

関節リウマチ(RA)は治療法の進展により、早期診断方法、関節炎の正確な評価法が必要となっている。病理学的検討、画像検査(MRI、超音波検査)による検討から関節滑膜内には炎症と相関し異常血流が生じることが明らかとなっている。この異常血流を簡便に捉えることが可能な検査は関節炎の評価に有用と考えられる。インドシアニンググリーン蛍光血管描出法は、インドシアニンググリーンを静脈内投与することで血流を赤外線領域に蛍光発光させ、デジタルカメラで画像として捉える検査である。既に臨床応用されており、低浸襲、低コスト、簡便な検査である。同法を用いて手指関節炎の描出を試みた。

B.研究方法

1. 近赤外線カメラ(浜松ホトニクス)を用いて、両手撮像用

機器を作成した。活動性RA患者の両手に対して、撮像を施行した。カメラ本体は手より20cmに固定し、対側の肘静脈よりインドシアニンググリーン(0.25mg/body)を静脈内投与した。

2. 各濃度のインドシアニンググリーンをエタノールと混合し7穴ウエルにそれぞれ封入した。これを蛍光ファントムとして用いた。

3. 撮影動画より、方形のROIを設定することで、time intensity curveを得ることが出来るソフトウェアを開発した。

(倫理面への配慮)

本検討は病院倫理委員会を経て討議された後、了承された。患者には紙面同意を得た上で施行された。

患者には、検査、治療内容、研究成果の発表について

ンフォームドコンセントを得ている。

C.研究結果

活動性 RA 患者四名の両手に対して撮像を施行した。左右の II MCP 関節の撮像画像を比較したところ、肉眼で蛍光差異が認められた。同部位に ROI を設定し、左右でそれぞれ得られた time intensity curve には最大蛍光強度に差が認められた。

作成した蛍光ファントムの各穴の蛍光はそれぞれの蛍光強度で発光が認められたが、線形比例の関係にはなかった。

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は、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。今回の結果から、蛍光 time intensity curve から炎症パラメータになり得る候補がいくつか考えられた。今後はこれらを検討し、有用な評価法として確立していく必要がある。蛍光ファントムは、機器の改造や、解析ソフトウェアのアップデートに際しても、以前のデータと、今回のデータとを比較する際に重要である。インドシアニンググリーンとエタノールの配合には工夫が必要と考えられた。

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。

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と実臨床での多施設検討が必要と考えられる。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

1. Takeuchi T, Miyasaka N, Tatsuki Y, Yano T, Yoshinari T, Abe T, Koike T. Inhibition of plasma IL-6 in addition to maintenance of an efficacious trough level of infliximab associated with clinical remission in patients with rheumatoid arthritis: analysis of the RISING Study. *Ann Rheum Dis.* 71(9):1583-5.2012
2. Sakai R, Tanaka M, Nanki T, Watanabe K, Yamazaki H, Koike R, Nagasawa H, Amano K, Saito K, Tanaka Y, Ito S, Sumida T, Ihata A, Ishigatsubo Y, Atsumi T, Koike T, Nakajima A, Tamura N, Fujii T, Dobashi H, Tohma S, Sugihara T, Ueki Y, Hashiramoto A, Kawakami A, Hagino N, Miyasaka N, Harigai M; REAL Study Group. Drug retention rates and relevant risk factors for drug discontinuation due to adverse events in rheumatoid arthritis patients receiving anticytokine therapy with different target molecules. *Ann Rheum Dis;* 71(11):1820-6.2012
3. Sakai R, Komano Y, Tanaka M, Nanki T, Koike R, Nagasawa H, Amano K, Nakajima A, Atsumi T, Koike T, Ihata A, Ishigatsubo Y, Saito K, Tanaka Y, Ito S, Sumida T, Tohma S, Tamura N, Fujii T, Sugihara T, Kawakami A, Hagino N, Ueki Y, Hashiramoto A, Nagasawa K, Miyasaka N, Harigai M; REAL Study Group. Time-dependent increased risk for serious infection from continuous use of tumor necrosis factor antagonists over three years in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res;*64(8):1125-34.2012
4. Koike T, Harigai M, Inokuma S, Ishiguro N, Ryu J, Takeuchi T, Tanaka Y, Yamanaka H, Fujii K,

- Yoshinaga T, Freundlich B, Suzukawa M. Safety and effectiveness of switching from infliximab to etanercept in patients with rheumatoid arthritis: results from a large Japanese postmarketing surveillance study. *Rheumatol Int.* 32(6):1617-24.2012
5. Koike T, Harigai M, Inokuma S, Ishiguro N, Ryu J, Takeuchi T, Tanaka Y, Yamanaka H, Fujii K, Yoshinaga T, Freundlich B, Suzukawa M. Safety and effectiveness responses to etanercept for rheumatoid arthritis in Japan: a sub-analysis of a post-marketing surveillance study focusing on the duration of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 32(6):1511-9.2012
6. Tanaka Y, Harigai M, Takeuchi T, Yamanaka H, Ishiguro N, Yamamoto K, Miyasaka N, Koike T, Kanazawa M, Oba T, Yoshinari T, Baker D; the GO-FORTH Study Group. Golimumab in combination with methotrexate in Japanese patients with active rheumatoid arthritis: results of the GO-FORTH study. *Ann Rheum Dis.* 71(6):817-24,2012
7. Koike T, Harigai M, Ishiguro N, Inokuma S, Takei S, Takeuchi T, Yamanaka H, Tanaka Y. Safety and effectiveness of adalimumab in Japanese rheumatoid arthritis patients: postmarketing surveillance report of the first 3,000 patients. *Mod Rheumatol.* 22(4):498-508,2012
8. Kamishima T, Kato M, Atsumi T, Koike T, Onodera Y, Terae S. Contrast-enhanced whole body joint MR Imaging in rheumatoid patients on tumour necrosis factor-alpha agents: a pilot study to evaluate novel scoring system for MR synovitis *Clin Exp Rheumatol.* 31(1):154,2013
9. Fukae J, Isobe M, Kitano A, Henmi M, Sakamoto F, Narita A, Ito T, Mitsuzaki A, Shimizu M, Tanimura K, Matsushashi M, Kamishima T, Atsumi T, Koike T. Positive synovial vascularity in patients with low disease activity indicates smouldering inflammation leading to joint damage in rheumatoid arthritis: time-integrated joint inflammation estimated by synovial vascularity in each finger joint *Rheumatology(Oxford)*, 2012(in press)
10. Takamura A, Hirata S, Nagasawa H, Kameda H, Seto Y, Atsumi T, Dohi M, Koike T, Miyasaka N, Harugau M. A retrospective study of serum KL-6 levels during treatment with biological disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis patients: a report from the Ad Hoc Committee for Safety of Biological DMARDs of the Japan College of Rheumatology. *Mod Rheumatol.*2012(in press)
11. Harigai M, Takamura A, Atsumi T, Dohi M, Hirata S, Kameda H, Nagasawa H, Seto Y, Koike T, Miyasaka N. Elevation of KL-6 serum levels in clinical trials of tumor necrosis factor inhibitors in patients with rheumatoid arthritis: a report from the Japan College of Rheumatology Ad Hoc Committee for Safety of Biological DMARDs. *Mod Rheumatol.* 2012(in press)
2. 学会発表
1. Koike,T. ”Catastrophic Antiphospholipid Syndrome;CAPS”, Manila,Filipin, Asian Lupus Summit 2012,November 29, 2012
2. Koike,T. ”New Concepts in Antiphospholipid syndrome”, Manila,Filipin, Asian Lupus Summit 2012,November 30, 2012
- 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
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)
研究分担報告書

ROR γ t 過剰発現による自己免疫性関節炎の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
田原 昌浩 筑波大学医学医療系内科(膠原病・リウマチ・アレルギー)

研究要旨

関節リウマチ(rheumatoid arthritis; RA)の病態形成における CD4⁺ 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、T helper 17 細胞(Th-17)分化を決定する転写因子 ROR γ t を T 細胞でのみ過剰発現した ROR γ t トランスジェニックマウス(ROR γ t 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、ROR γ t Tg マウスでは野生型(wild type; 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、また病理組織学的に関節局所の炎症像および骨破壊像が減弱していた。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、ROR γ t Tg マウスにおいて IL-17 産生の有意な亢進および ROR γ t の発現の亢進が認められた。ROR γ t Tg マウスにおける ROR γ t 発現亢進は、Foxp3⁺CD4⁺T 細胞(Foxp3⁺制御性 T 細胞)においても認められ、同時に関節炎局所への遊走に重要なケモカインレセプター CCR6 の発現亢進を認めた。WT に対して ROR γ t Tg マウス由来のリンパ節細胞の経静脈的に移入し、CIA を誘導した場合の影響を解析したところ、ROR γ t Tg マウス由来のリンパ節細胞を移入したことによる関節炎の減弱傾向が認められ、ROR γ t Tg マウス内に関節炎に対する抑制性細胞分画が存在している可能性が示唆された。以上、ROR γ t 発現により Th-17 分化が優位となった場合であっても関節炎発症が減弱すること、さらに ROR γ t Tg マウス内に関節炎発症に対して抑制的に働く細胞成分が存在する可能性があることが明らかになった。

A. 研究目的

関節リウマチ(rheumatoid arthritis; RA)の疾患モデルであるコラーゲン誘導関節炎(CIA)を用いて自己免疫疾患への関与が注目されている Th-17 の分化に必須な転写因子 ROR γ t が関節炎発症に与える影響を解析することによって、関節炎の病態形成における CD4⁺ 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

- 1) ROR γ t を T 細胞においてのみ過剰発現させた ROR γ t トランスジェニックマウス(ROR γ t Tg)に対して CIA を誘導し、野生型 C57BL/6(WT)と臨床像を比較検討した
- 2) CII 投与 42 日後に後肢を摘出し、関節局所の炎症所

見、骨破壊所見について病理組織学的に評価した。

- 3) CII 投与後の所属リンパ節細胞を 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および FACS によるサイトカイン産生、転写因子 ROR γ t 発現の評価を行った。
- 4) CII 投与後に所属リンパ節細胞を採取して FACS により転写因子 Foxp3 発現およびケモカインレセプター発現との関連を解析した。
- 5) CII 投与後の WT もしくは ROR γ t Tg マウス由来の所属リンパ節細胞を CII 投与後の WT マウスに経静脈的に移入し、関節炎発症に与える影響を評価した。

(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) ROR γ t Tg マウスでは 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た (図 1)。
- 2) 関節局所の病理学的評価では、ROR γ t Tg マウスにおいて炎症像、関節破壊像は有意に抑制されていた (図 2)。
- 3) in vitro で培養後の上清中 IL-17 濃度は、WT と比較して ROR γ t Tg マウス由来のリンパ節細胞を培養した場合に有意な増加が認められた。同条件下での CD4⁺ 細胞における ROR γ t の発現は、WT と比較して ROR γ t Tg マウスにおいて有意に亢進していた。
- 4) 所属リンパ節中 CD4⁺ T 細胞における Foxp3 発現は、WT、ROR γ t Tg マウス間で有意な差は認めなかったが、ROR γ t Tg 由来の Foxp3⁺ CD4⁺ 細胞においては WT と比較して ROR γ t および CCR6 の発現が有意に亢進していた。
- 5) ROR γ t Tg マウス由来の所属リンパ節細胞を WT マウスに移入した後に CIA を誘導した場合に、WT 由来の所属リンパ節細胞を移入した場合と比較して、関節炎の発症率、重症度が低下する傾向が認められた。

D. 考察

ROR γ t Tg マウス由来の所属リンパ節細胞の in vitro における解析では、抗原反応性の IL-17 産生、CD4⁺ T 細胞の ROR γ t Tg 発現が有意に亢進しており、所属リンパ節において Th-17 が増加していることが示唆されたが、関節炎の発症は抑制された。ROR γ t Tg マウスでは、Foxp3⁺制御性 T 細胞において ROR γ t、CCR6 発現の有意な亢進が認められ、炎症局所における関節炎発症制御に関与している可能性が考えられる。

E. 結論

T 細胞における ROR γ t の過剰発現は自己免疫性関節炎の発症を抑制することが明らかとなり、細胞移入実験などの結果から関節炎発症を抑制する細胞の存在が示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Furukawa H, Kawasaki A, Oka S, Shimada K, Masui T, Ikenaka T, Hashimoto A, Okazaki Y, Takaoka H, Futami H, Komiya A, Kondo Y, Ito S, Hayashi T, Matsumoto I, Kusaoi M, Takasaki Y, Nagai T, Hirohata S, Setoguchi K, Suda A, Nagaoka S, Kono H, Okamoto A, Chiba N, Suematsu E, Fukui N, Hashimoto H, Sumida T, Ono M, Tsuchiya N, Tohma S: Association of a Single Nucleotide Polymorphism in the SH2D1A Intronic Region with Systemic Lupus Erythematosus. Lupus (in press)
2. Ito S, Ogishima H, Kondo Y, Sugihara M, Hayashi T, Chino Y, Goto D, Matsumoto I, Sumida T: Early diagnosis and treatment of steroid-induced diabetes mellitus in patients with rheumatoid arthritis and other connective tissue diseases. Mod Rheumatol (in press).
3. Shimane K, Kochi Y, Suzuki A, Okada Y, Tomonori I, Horita T, Saito K, Okamoto A, Nishimoto N, Myouzen K, Hirakata M, Sumida T, Takasaki Y, Yamada R, Kamatani N, Nakamura Y, Kubo M, Yamamoto K: An association analysis of HLA-DRB1 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in a Japanese population: effects of *09:01 allele on disease phenotypes. Rheumatology (in press).
4. Umeda N, Matsumoto I, Ito I, Kawasaki A, Tanaka Y, Inoue A, Tanaka Y, Tsuboi H, Suzuki T, Hayashi T, Ito S, Tsuchiya N, Sumida T: Anti-citrullinated glucose-6-phosphate isomerase peptide antibodies in patients with rheumatoid arthritis are associated with HLA-DRB1 shared epitope alleles and disease activity. Clin Exp Immunol (in press).
5. Anami A, Fukushima K, Takasaki Y, Sumida T, Waguri M, Murashima A, Wake N: The predictive value of SS-A antibody titration in pregnant women with fetal congenital heart block. Mod Rheumatol (in press).
6. Ishiguro N, Yamamoto K, Katayama K, Kondo M, Sumida T, Mimori T, Soen S, Nagai K, Yamaguchi T, Hara M, Igaratimod-Clinical Study Group: Concomitant

- iguratimod therapy in patients with active rheumatoid arthritis despite stable doses of methotrexate: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. Mod Rheumatol (in press).
7. Suzuki T, Horikoshi M, Sugihara M, Hirota T, Ogishima H, Umeda N, Kondo Y, Tsuboi H, Hayashi T, Chino Y, Matsumoto I, Sumida T: Therapeutic efficacy of tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor inhibitors: One year follow-up by low-field extremity MRI. Mod Rheumatol (in press).
8. Iizuka M, Tsuboi H, Matsuo N, Kondo Y, Asashima H, Matsui M, Matsumoto I, Sumida T: The crucial roles of IFN- γ in the development of M3 muscarinic acetylcholine receptor induced Sjogren's syndrome-like sialadenitis. Mod Rheumatol (in press).
9. Sumida T, Tsuboi H, Iizuka M, Asashima H, Matsumoto I: Anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies in patients with Sjogren's syndrome. Mod Rheumatol (in press).
10. Tsuboi H, Hagiwara S, Asashima H, Umehara H, Kawakami A, Nakamura H, Sano H, Tsubota K, Ogawa Y, Takamura E, Saito I, Inoue H, Nakamura S, Moriyama M, Takeuchi T, Tanaka Y, Hirata S, Mimori T, Matsumoto I, Sumida T: Validation of different sets of criteria for the diagnosis of Sjogren's syndrome in Japanese patients. Mod Rheumatol (in press).
11. Yamaguchi T, Ito S, Takano Y, Umeda N, Goto M, Horikoshi M, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Sumida T: A case of a disseminated sporotrichosis patient treated with prednisolone, immunosuppressants, and tocilizumab under the diagnosis of rheumatoid arthritis. Intern Med;51(15):2035-9,2012.
12. Tsuboi H, Nakamura Y, Iizuka M, Matsuo N, Matsumoto I, Sumida T: Generation and functional analysis of monoclonal antibodies against the second extracellular loop of human M3 muscarinic acetylcholine receptor. Mod Rheumatol; 22(2): 264-271, 2012.
13. Tanaka Y, Matsumoto I, Iwanami K, Inoue A, Umeda N, Tanaka Y, Sugihara M, Hayashi T, Ito S, Sumida T: Six-transmembrane epithelial antigen of prostate4 (STEAP4) is expressed on monocytes/neutrophils, and is regulated by TNF antagonist in patients with rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol;30(1):99-102,2012.
14. Kondo Y, Iizuka M, Wakamatsu E, Yao Z, Tahara M, Tsuboi H, Sugihara M, Hayashi T, Yoh K, Takahashi S, Matsumoto I, Sumida T: Overexpression of T-bet gene regulates murine autoimmune arthritis. Arthritis Rheum; 64: 162-172, 2012.
15. Hasebe N, Kawasaki A, Ito I, Kawamoto M, Hasegawa M, Fujimoto M, Furukawa H, Tohma S, Sumida T, Takehara K, Sato S, Kawaguchi Y, Tsuchiya N: Association of UBE2L3 polymorphisms with diffuse cutaneous systemic sclerosis in a Japanese population. Ann Rheum Dis; 71(7): 1259-60, 2012.
16. Kawasaki A, Furukawa H, Kondo Y, Ito S, Hayashi T, Kusaoi M, Matsumoto I, Tohma S, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T, Tsuchiya N: Association of PHRF1-IRF7 region polymorphism with clinical manifestations of systemic lupus erythematosus in a Japanese population. Lupus; 21(8): 890-5, 2012.
17. 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 W O, 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;8(1): e1002455,2012.
18. Umehara H, Okazaki K, Masaki Y, Kawano M, Yamamoto M, Saeki T, Matsui S, Sumida T, Mimori T, Tanaka Y, Tsubota Y, Toshino T, Kawa S, Suzuki R, Takegami T, Tomosugi N, Kurose N, Ishigaki Y, Azumi A, Kojima M, Nakamura S, Inoue D: A novel clinical entity, IgG4-related disease (IgG4RD): general concept and details. Mod Rheumatol; 22(1): 1-14,2012.
19. Umehara H, Okazaki K, Masaki Y, Kawano M,

Yamamoto M, Saeki T, Matsui S, Yoshino T, Nakamura S, Kawa S, Hamano H, Kamisawa T, Shimosegawa T, Shimatsu A, Nakamura S, Ito T, Notohara K, Sumida T, Tanaka Y, Mimori T, Chiba T, Mishima M, Hibi T, Tsubouchi H, Inui K, Ohara H: Comprehensive Diagnostic Criteria (CDC criteria) for IgG4-related disease (IgG4-RD),2011.

Mod Rheumatol;22:21-30,2012.

20.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, Sumida T: Six-transmembrane epithelial antigen of prostate4(STEAP4) is TNFalpha-induced protein that regulates IL-6, IL-8, and cell proliferation in synovium from patients with rheumatoid arthritis. Mod Rheumatol; 22:128-136,2012.

21.Sakai R, Komano Y, Tanaka M, Nanki T, Koike R, Nagasawa H, Amano K, Nakajima A, Atsumi T, Koike T, Ihata A, Ishigatubo Y, Saito K, Tanaka Y, Ito S, Sumida T, Tohma S, Tamura N, Fujii T, Sugihara T, Kawakami A, Hagino N, Ueki Y, Hashiramoto A, Nagasaka K, Miyasaka N, Harigai M, for the REAL Study Group: Time-dependent increased risk for serious infection from continuous use of TNF antagonists during three years in rheumatoid arthritis patients. Arthritis Care Res;64(8):1125-1134,2012.

22.Sakai R, Tanaka M, Nanki T, Watanabe K, Yamazaki H, Koike R, Nagasawa H, Amano K, Saito K, Tanaka Y, Ito S, Sumida T, Ihata A, Ishigatsubo Y, Atsumi T, Koike T, Nakajima A, Tamura N, Fujii T, Dobashi H, Tohma S, Sugihara T, Ueki Y, Hashiramoto A, Kawakami A, Hagino N, Miyasaka N, Harigai M, for the REAL Study Group: Drug retention rates and relevant risk factors for drug discontinuation due to adverse events in rheumatoid arthritis patients receiving anti-cytokine therapy with different target molecules.

Ann Rheum Dis ; 71(11): 1820-1826, 2012.

23.Hashizume M, Yoshida H, Tanaka K, Suzuki M, Matsumoto I, Sumida T, Mihira M: Interleukine-6 regulates anti-arthritis effect of methotrexate via the reduction of SLC19A1 expression in mouse arthritis model. Arthritis Res. Ther;14(2):R96,2012.

24.Tsuboi H, Matsuo N, Iizuka M, Tsuzuki S, Kondo Y, Tanaka A, Moriyama M, Matsumoto I, Nakamura S, Sumida T: Analysis of IgG4 class switch-related molecules in IgG4-related disease. Arthritis Res Ther;14(4):R171,2012.

25.Inoue A, Matsumoto I, Tanaka Y, Umeda N, Tanaka Y, Mihara M, Takahashi S, Sumida T : TIARP (TNFAIP9) deficiency leads to arthritis via IL-6 overproduction with enhanced NF-kB, STAT3 signaling and dysregulated apoptosis of macrophages.

Arthritis Rheum;64(12):3877-85,2012.

26.Sumida T, Iizuka M, Asashima H, Tsuboi H, Matsumoto I: Pathogenic role of anti-M3muscarinic acetylcholine receptor immune response in Sjogren's syndrome.

Presse Med;41(9 Pt 2):e461-6,2012.

27.Horikoshi M, Goto D, Seiji Segawa, Yohei Yoshiga, Keiichi Iwanami, Asuka Inoue, Yuki Tanaka, Matsumoto I, Sumida T: Activation of invariant NKT cells with glycolipid ligand α -galactosylceramide ameliorates glucose-6-phosphate isomerase peptide-induced arthritis. PLoS One;7(12):e51215,2012.

2. 学会発表

- ・ 近藤裕也 住田孝之他: 転写因子 ROR γ t による関節炎制御機構 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2012 年
- ・ Kondo Y, Sumida T et al. CCR6⁺Foxp3⁺ regulatory T cells regulate the development of collagen induced arthritis in T cell specific ROR γ t transgenic mice. 2012 ANNUAL SCIENTIFIC MEETING on the American College of Rheumatology, 2012

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

図1 コラーゲン誘導関節炎 (CA)

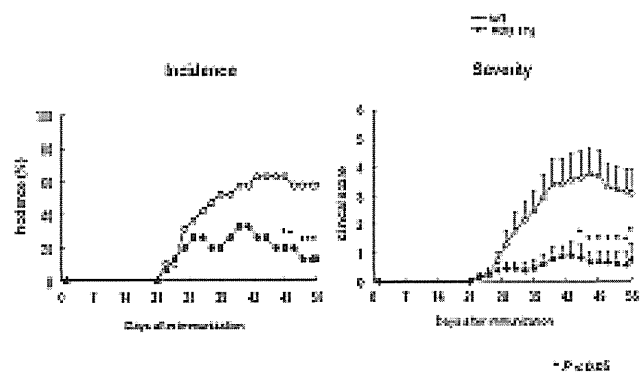
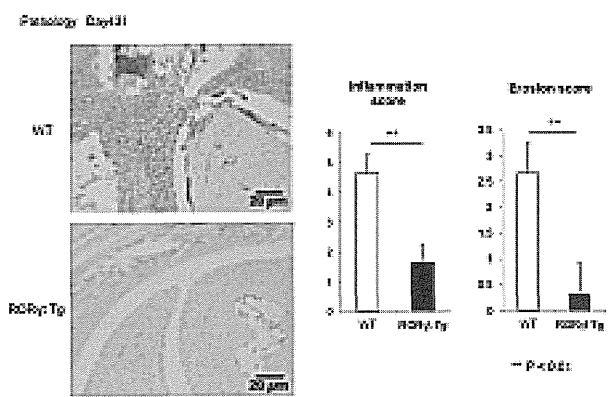


図2 関節の組織学的評価



早期 RA に対する MTX の関節破壊抑制効果-SAKURA コホートの解析から

研究分担者 竹内 勤 慶應義塾大学医学部リウマチ内科 教授

研究要旨

日常診療下の早期 RA に対するメトトレキサートの関節破壊抑制効果に着目し、それと関連する臨床的要因、サイトカイン変動を、慶應義塾大学リウマチ内科の早期 RA コホートから解析した。関節リウマチ治療薬のアンカードラッグであるメトトレキサートを日常臨床で経験する中疾患活動性の症例に投与した場合、76%が最低限の治療目標である低疾患活動性を1年後に満足するが、その時の構造的寛解は65%に留まり、一方、32%が臨床的に問題となる関節破壊進行(CRRP)を示し、18%が急速に関節破壊進行を来す事が SAKURA コホートの解析から明らかとなった。関節破壊進行と関連する血漿サイトカインとして IL-6 が有用なバイオマーカーである事が示された。

A.研究目的

日常診療下の早期 RA に対するメトトレキサートの関節破壊抑制効果に着目し、それと関連する臨床的要因、サイトカイン変動を、慶應義塾大学リウマチ内科の早期 RA コホートから解析する。

B.研究方法

1. 対象患者: 慶應義塾大学リウマチ内科で、2008年8月から前向きに登録された新規診断 RA コホート SAKURA の中から、第一 DMARD として MTX が投与された 62 例を対象とした。2. 臨床データ: 62例の MTX 投与前、MTX 投与

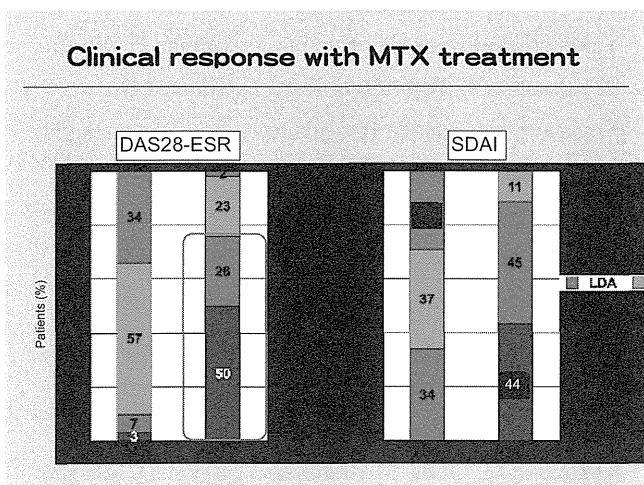
1年後の DAS28-ESR, SDAI, CDAI, CRP, MMP-3 などの臨床パラメーターを収集した。1年以内に MTX 単独治療が終了した症例では、その最終単独等予備の臨床データを LOCF して解析した。3. 血漿サイトカイン: R&D 社の蛍光 EKISA キットを用いて、MTX 投与前と投与1年後の患者血漿を測定した。4. 手足 X-P のスコアリング: van der heijde modified sharp 法によって、62例の MTX 投与前後の写真を2名の読影者(K.Y., N.N.)がスコア化(mTSS)した。4. 統計解析: JMP9.0 ソフトウェアを用いて統計解析した。

(倫理面への配慮)

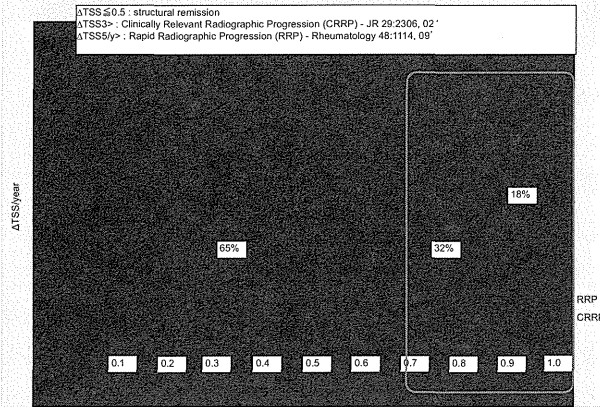
2011年12月26日付で、慶應義塾大学医学部倫理委員会にて同研究内容は、多施設共同研究として承認されている(No.2011-231)。

C.研究結果

1) 患者背景: 女性 79%、年齢 56+/-14.5 才、罹病期間 6.3+/-8.0 ヶ月、RF+ 74.2%、抗 CCP 74.2%、MTX 用量 8.7+/-2.3mg/週。
2) 臨床効果: MTX 投与前の DAS28-ESR 高疾患活動性 33.9%、中疾患活動性 56.5%、低疾患活動性 6.5%、寛解 3.2%、MTX 投与1年後の DAS28-ESR 高疾患活動性 1.6%、中疾患活動性 22.6%、低疾患活動性 25.8%、寛解 50.0%、と、半数が臨床的寛解を達成、3/4が低疾患活動



MTX治療後の関節破壊の進行：累積プロット解析



性以上を達成した。3) 関節破壊の進行: MTX 投与前の mTSS 8.7+/-20.3、MTX 投与1年後の mTSS 11.1+/-21.1。

4) 構造的寛解とCRRP/RRP: 構造的寛解は65%、Clinically relevant radiographic progression (CRRP) 32%、Rapid radiographic progression (RRP) 18%。

5) 血漿IL-6濃度はMTX投与前4.72pg/mlから1.04pg/mlへと78%低下したのに対し、TNFαは0.87pg/mlから-0.83pg/mlと有意な低下を認めなかった。

6) 年間関節破壊進行度と関連するMTX投与1年後の要因: クラスター解析によって estimated yearly progression との相関を解析した所、これとクラスターを形成する要因として、MTX投与1年後の IL-6 値、MMP-3 の二つが明らかとなった。最も相関が強かった MTX投与後 IL-6 値と臨床的に問題となる関節破壊進行 CRRP の関連をロジスティック回帰分析した所、この両者は p<0.0001 で有意に関連し、CRRP を来す IL-6 値を ROC 解析によって求めた所、4pg/ml のカットオフが AUC=0.938、感度 91%、特異度 89% の優れた数値を示す事が明らかとなった。

D. 考察/E. 結論

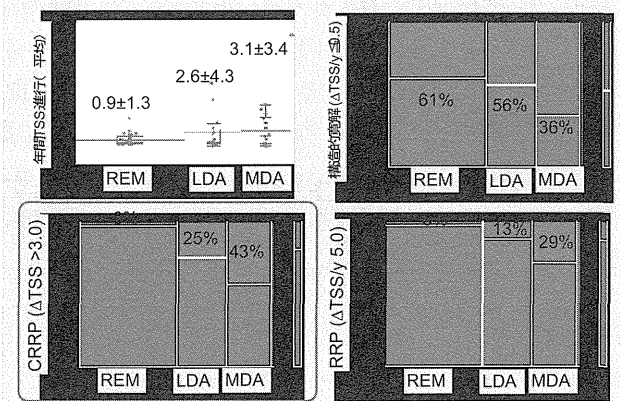
関節リウマチ治療薬のアンカードラッグであるメトトレキサートを日常臨床で経験する中疾患活動性の症例に投与した場合、76%が最低限の治療目標である低疾患活動性を1年後に満足するが、その時の構造的寛解は65%に留まり、一方、32%が臨床的に問題となる関節破壊進行

(CRRP)を示し、18%が急速に関節破壊進行を来す事が SAKURA コホートの解析から明らかとなった。関節破壊進行と関連する血漿サイトカインとして IL-6 が有用なバイオマーカーである事が示された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

MTX治療後の関節破壊の進行：疾患活動性による解析



G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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*, 22:186-94, 2012.
2. 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*, 22:327-338, 2012.
3. Tanaka Y, Harigaya M, Takeuchi T, Yamanaka H, Ishiguro N, Yamamoto K, Miyasaka N, Koike T, Kanazawa M, Ohba T, Yoshinari T, Baker D, and the

- GO-FORTH study group. Golimumab, a human anti-TNF- α monoclonal antibody, injected subcutaneously every 4 weeks in Japanese patients with active rheumatoid arthritis in combination with methotrexate: results of the Phase 2/3, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled GO-FORTH study through 24 weeks. *Ann Rheum Dis*, 71:817-24, 2012.
4. Koike T, Harigaya M, Ishiguro N, Inokuma S, Takei S, Takeuchi T, Yamanaka H, and Tanaka Y. Safety and effectiveness of adalimumab in Japanese rheumatoid arthritis patients: post marketing surveillance report of the first 3,000 patients. *Mod Rheum* 22:498-508, 2012.
 5. Takeuchi T, Miyasaka N, Tatsuki Y, Yano T, Yoshinari T, Abe T, and Koike T. Inhibition of plasma IL-6 in addition to maintain efficacious trough level of infliximab was associated with clinical remission in patients with rheumatoid arthritis: analysis of the RISING Study. *Ann Rheum Dis*, 71:1583-85, 2012.
 6. Takeuchi T and Kameda H. What is the future of CCR5 antagonists? *Arthritis Research and Therapy* 14: R11, 2012.
 7. Harigai M, Takeuchi T, Tanaka Y, Matsubara T, Yamanaka H, and Miyasaka N. Discontinuation of adalimumab treatment in rheumatoid arthritis patients after achieving low disease activity. *Mod Rheum* 22: 814-22, 2012.
 8. Niki Y, Takeuchi T, Masanori Nakayama, Hayato Nagasawa, Takahiko Kurasawa, Harumoto Yamada, Toyama Y, and Takeshi Miyamoto. Clinical Significance of Cartilage Biomarkers for Monitoring Structural Joint Damage in Rheumatoid Arthritis Patients Treated with Anti-TNF Therapy. *PLoS ONE* 7:e37447, 2012.
 9. Sugano K, Kinoshita Y, Miwa H, Takeuchi T, and the esomeprazole NSDAID preventive study group. Randomised clinical trial: esomeprazole for the prevention of nonsteroidal anti-inflammatory drug-related peptic ulcers in Japanese patients. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* in press.
 10. Takeuchi T, Matsubara T, Nitobe T, Suematsu E, Ohta S, Honjyo S, Abe T, Yamamoto A, Miyasaka N, and The Japan Abatacept Study Group. Phase II dose-response study of abatacept in Japanese patients with active rheumatoid arthritis with inadequate response to methotrexate. *Mod Rheum* on line June 12, 2012.
 11. Takeuchi T, Harigaya M, Tanaka Y, Yamanaka H, Ishiguro N, Yamamoto K, Miyasaka N, Koike T, Kanazawa M, Ohba T, Yoshinari T, Baker D, and the GO-MONO study group. Golimumab monotherapy in Japanese patients with active rheumatoid arthritis despite prior treatment with disease-modifying anti-rheumatic drugs: results of the Phase 2/3, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled GO-MONO study through 24 weeks. *Ann Rheum Dis online September 14, 2012*.
 12. Takeuchi T, Miyasaka N, Zang C, Alvarez D, Fletcher T, Wajdula J, Yuasa H, and Vlahos B. A phase 3 randomized, double-blind, multicenter comparative study evaluating the effect of etanercept versus methotrexate on radiographic outcomes, disease activity and safety in Japanese subjects with rheumatoid arthritis. *Mod Rheum* online September 26, 2012.
 13. 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. A merged presentation of clinical and radiographic data using probability plots in a clinical trial, the JESMR study. *Ann Rheum Dis* 72:310-2, 2012.
 14. Takeuchi T, Yamanaka H, Ishiguro N, Miyasaka N, Mukai M, Matsubara T, Uchida S, Akama H, Hartmut K, Vipin A, and Tanaka Y. Adalimumab, a Human anti-TNF monoclonal antibody, outcome study for the prevention of joint damage in Japanese patients with early RA; the HOPEFUL 1 study. *Ann Rheum Dis* online January 11, 2013.
 15. Nakajima A, Saitoh K, Kojima T, Amano K, Yoshio T,

Fukuda W, Inoue E, Taniguchi A, Momohara S, Minota S, Takeuchi T, Ishiguro N, Tanaka Y, and Yamanaka H. No increased mortality in patients with rheumatoid arthritis treated with biologics: results from the biologics register of six rheumatology institutes in Japan. *Mod Rheum* in press.

2.学会発表

1. Tsutomu Takeuchi. Japanese PMS: Safety and efficacy from large population. 8th International congress on Autoimmunity. Granada, Spain. 2012.5.11
2. Tsutomu Takeuchi, Masayoshi Harigai, Yoshiya Tanaka, Hisashi Yamanaka, Naoki Ishiguro, Kazuhiko Yamamoto, Minoru Kanazawa, Yoshinori Murakami, Toru Yoshinari, Daniel Baker, Nobuyuki Miyasaka, Takao Koike. Golimumab, a human anti-TNF monoclonal antibody, administered subcutaneously every four weeks as monotherapy in patients with active rheumatoid arthritis despite DMARD therapy: 52-week results of clinical, radiographic and pharmacokinetic assessments. EULAR 2012: 2012.6.6-9, Berlin, Germany.
3. Tsuneo Kondo, Keiko Yoshimoto, Katsuya Suzuki, Hideto Kameda, Koichi Amano, Tsutomu Takeuchi: Decreased peripheral CD3 zeta chain expression in patients with active rheumatoid arthritis can be restored by various biologic DMARDs and methotrexate. EULAR 2012: 2012.6.6-9, Berlin, Germany.
4. Hideto Kameda, Katsuaki Kanbe, Eri Sato, Yukitaka Ueki, Kazuyoshi Saito, Shouhei Nagaoka, Toshihiko Hidaka, Tatsuya Atsumi, Michishi Tsukano, Tsuyoshi Kasama, Shunichi Shiozawa, Yoshiya Tanaka, Hisashi Yamanaka, Tsutomu Takeuchi: Continuation / discontinuation of methotrexate and clinical response to etanercept determine the radiographic progression/repair in patients with rheumatoid arthritis: a subanalysis of 52-week results from the JESMR study. EULAR 2012: 2012.6.6-9, Berlin, Germany.
5. Tsukasa Matsubara, Hiroshi Inoue, Mitsuhiro Iwahashi, Akira Yamazaki, Tsutomu Takeuchi: A multi-center, double-dummy, double-blind study of subcutaneous (SC) abatacept (ABA) compared with intravenous (IV) ABA in Japanese rheumatoid arthritis patients with inadequate response to methotrexate. EULAR 2012: 2012.6.6-9, Berlin, Germany.
6. Takahiko Kurasawa, Hayato Nagasawa, Koichi Amano, Tsutomu Takeuchi, Hideto Kameda: The addition of another disease-modifying anti-rheumatic drug to methotrexate in place of infliximab improves the rate of infliximab-free sustained remission. EULAR 2012: 2012.6.6-9, Berlin, Germany.
7. Keisuke Izumi, Yuko Kaneko, Hidekata Yasuoka, Noriyuki Seta, Hideto Kameda, Masataka Kuwana and Tsutomu Takeuchi. Lack of Additive Benefits of Concomitant Methotrexate Use to Tocilizumab Monotherapy for Rheumatoid Arthritis in Daily Clinical Practice. ACR2012: 2012.11.9-14, Washington D.C., USA.
8. Hideto Kameda, Takahiko Kurasawa, Hayato Nagasawa, Koichi Amano and Tsutomu Takeuchi. The Addition of Another Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drug to Methotrexate in Place of Infliximab Reduces the Flare Rate During 2 Years After Infliximab Discontinuation in Patients with Rheumatoid Arthritis. ACR2012: 2012.11.9-14, Washington D.C., USA.
9. Tsutomu Takeuchi, Tsukasa Matsubara, Shuji Ohta, Masaya Mukai, Koichi Amano, Shigeto Tohma, Yoshiya Tanaka, Hisashi Yamanaka and Nobuyuki Miyasaka. Abatacept Biologic-Free Remission Study in Established Rheumatoid Arthritis Patients. Orion Study. ACR2012: 2012.11.9-14, Washington D.C., USA.
10. Tsutomu Takeuchi, Kazuhiko Yamamoto, Hisashi Yamanaka, Naoki Ishiguro, Yoshiya Tanaka, Katsumi Eguchi, Akira Watanabe, Hideki Origasa, Toshiharu Shoji, Nobuyuki Miyasaka and Takao Koike. Clinical Response At 12 Weeks Predicts Long-Term Remission and the Extent of Radiographic Progression in Japanese Patients with Rheumatoid Arthritis

Treated with Certolizumab Pegol with and without Methotrexate Coadministration. ACR2012: 2012.11.9-14, Washington D.C., USA. 3. その他
なし

11. Tsutomu Takeuchi, Masayoshi Harigai, Yoshiya Tanaka, Hisashi Yamanaka, Naoki Ishiguro, Kazuhiko Yamamoto, Minoru Kanazawa, Yoshinori Murakami, Toru Yoshinari, Daniel Baker, Nobuyuki Miyasaka and Takao Koike. Golimumab, A Human Anti-TNF Monoclonal Antibody, Administered Subcutaneously Every Four Weeks As Monotherapy in Patients with Active Rheumatoid Arthritis Despite Disease Modifying Antirheumatic Drug Therapy: Week 104 Results of Clinical, Radiographic and Safety Assessments. ACR2012: 2012.11.9-14, Washington D.C., USA.
12. Yoshiya Tanaka, Masayoshi Harigai, Tsutomu Takeuchi, Hisashi Yamanaka, Naoki Ishiguro, Kazuhiko Yamamoto, Yutaka Ishii, Daniel Baker, Nobuyuki Miyasaka and Takao Koike. Prevention of Joint Destruction in Patients with High Disease Activity or High C-Reactive Protein. ACR2012: 2012.11.9-14, Washington D.C., USA.
13. Naoshi Nishina, Hideto Kameda, Yuko Kaneko, Masataka Kuwana and Tsutomu Takeuchi. Interleukin-6 As a Biomarker for the Clinical and Radiological Effectiveness of Methotrexate in Rheumatoid Arthritis. ACR2012: 2012.11.9-14, Washington D.C., USA.
14. Masako Tsukamoto, Yosuke Hashimoto, Tatsuhiro Ohshige, Keiko Yoshimoto, Yuko Kaneko, Hideto Kameda and Tsutomu Takeuchi. Fc γ Receptor IIIb Polymorphism Is Associated with Injection Reaction to Adalimumab in Patients with Rheumatoid Arthritis. ACR2012: 2012.11.9-14, Washington D.C., USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

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)
研究分担報告書

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

研究分担者: 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
研究協力者: 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 抗体は関節リウマチ (RA) の特異的自己抗体であるが、早期 RA の約半数は抗 CCP 抗体陰性であり、診断がしばしば困難である。診断の遅れが関節破壊につながるため、抗 CCP 抗体陰性 RA の特異的な診断マーカーが求められている。今回我々は AlphaScreen 法と呼ばれる自己抗体の網羅的スクリーニング法を用いて抗 CCP 抗体陰性 RA の自己抗体のスクリーニングを行った。前年度報告した候補蛋白 6 種類は確かに自己抗体であることが Western Blot 法で確認されたが、ELISA 法では健常人血清にも反応していることが確認されたため、新たに健常人血清 1 例、RA 血清 3 例を用いて 2457 蛋白に対する AlphaScreen を行い解析した。その結果、新たな自己抗体候補として 29 蛋白が上がった。

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

AlphaScreen 法は2つのビーズが近接したときのみレーザーを当てると化学発光するシステムで、本研究では Strepto-Avidin をコートした donor beads と protein A をコートした acceptor beads を用いる。患者血清をあらかじめ Protein A コートした acceptor beads と反応させておき、準備しておいたビオチン化蛋白と donor beads を加え、その蛋白と反応する自己抗体が血清に含まれていればビーズが近接し発光するという方法である。2457 種類のビオチン化蛋白ライブラリーをもちいて、自己抗体をスクリーニングした。

昨年度の報告で、8 例の抗 CCP 抗体陰性 RF 陰性 RA 患者血清を用いて、6 つの蛋白が候補蛋白に上がったことを報告した。今回、各蛋白に対する Western Blot を行い、その後 ELISA を用いて抗 CCP 抗体陽性 RA、陰性 RA、全身性エリテマトーデス (SLE)、健常人 (HC) 各 10 人ずつで陽性率を比較した。また、新たな 4 例 (抗 CCP 抗体陽性 RA 2 例、抗 CCP 抗体陰性 RA 1 例、健常人 1 例) の血清を用いて AlphaScreen 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

昨年度報告した候補自己抗原 6 蛋白 (FKBP4、SRP19、GABARAPL2、ABCF1、RPL29、JSRP1) をウェスタンブロットにより陽性対照患者血清と反応させ、少なくとも 4 蛋白 (FKBP4、SRP19、ABCF1、RPL29) に対する反応が確認できた (図 1)。しかし、ELISA を用いた検討ではこれらの蛋白

は RA に特異的ではなく、いずれも健常人でも反応が見られることが判明した(図 2)。そこで新たな 4 例の RA および健常人血清を用いて 2457 蛋白に対して AlphaScreen を行った。健常人が 1 例だけであり、カットオフ値を現時点で決められないが、健常人の蛍光強度の 2 倍をカットオフとすると新たに 29 蛋白が候補蛋白として同定された。

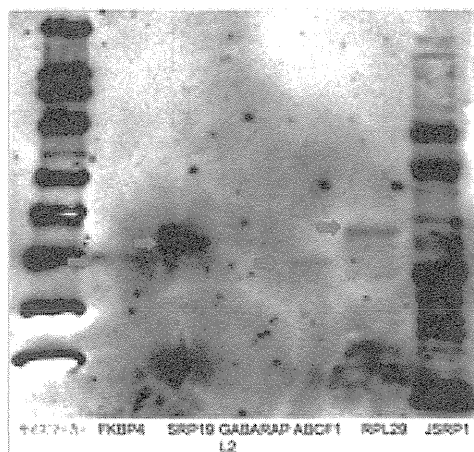


図1. ポジティブコントロール血清を用いた 6 候補蛋白に対する反応。抗 CCP 抗体(-)RF(-)RA 患者血清 8 例のうち抗体価の高い血清を用いて市販の recombinant 蛋白 (FKBP4、SRP19、GABARAPL2、ABCF1、RPL29、JSRP1) に対する反応性を Western Blot 法にて確認した。

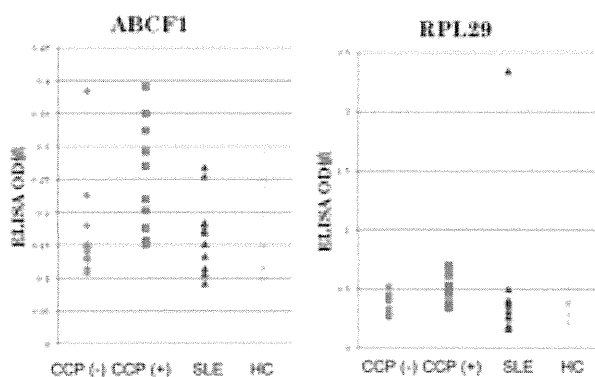


図 2. RA, SLE, 健常人における ABCF1, RPL29 に対する抗体価。抗 CCP 抗体陰性 RA (CCP(-))、抗 CCP 抗体陽性 RA (CCP(+))、SLE、健常人(HC)各 10 名の血清中の抗 ABCF1 抗体、抗 RPL29 抗体価を ELISA 法にて測定した。

D. 考察

AlphaScreen 法は自己抗体を網羅的に探索する有効な方法である。昨年度報告した抗 CCP 抗体陰性 RA 血清中に認められた候補自己抗体 6 種類を検出する ELISA 法を確立し、RA、SLE、健常人血清を用いて抗体価を測定したところ、いずれも健常人血清中にも存在する自己抗体であることが今回確認された。このことは、逆に AlphaScreen 法が非常に感度の高い鋭敏な検査法であることを示しており、AlphaScreen 法が有望な自己抗体スクリーニング法であることが証明された。

今回健常人コントロール 1 検体を含めたスクリーニングを行い、新たに 29 の自己抗原を発見したが、疾患特異抗体と呼ぶにはもう少し多くの健常人コントロールが必要であるため、次のスクリーニング実験を計画している。また、抗 CCP 抗体陰性 RA 中の自己抗体スクリーニングとともに、最重症型 RA である全身性ムチランス型 RA 血清を用いて、重症 RA に多く認められる自己抗体のスクリーニングも併せて行う予定である。

次のスクリーニングで候補自己抗体を絞り込み、抗 CCP 抗体陽性および陰性 RA、他の膠原病、健常人血清を用いて感度、特異度を求め、診断や重症化予測に有用な自己抗体を同定する予定である。これらの自己抗体が同定されれば、関節破壊「ゼロ」を目指す治療法確立に大きく貢献できると考えます。

E. 結論

昨年度報告した抗 CCP 抗体陰性 RA に認められた自己抗体 6 種類は、いずれも健常人血清中にも認められる自己抗体であることが判明した。今年度行った、少人数の患者と健常人血清を用いた AlphaScreen (2457 蛋白) では新たに 29 の自己抗体を発見したが、さらに多くの検体を用いたスクリーニングを予定しており、それらの結果をすべて合わせて診断に有用な自己抗体の候補を絞り込む。

F. 健康危険情報

特になし。