

## 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

分担研究者:川上 純<sup>1</sup> 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科展開医療科学講座  
リウマチ免疫病態制御学分野(第一内科) 教授

研究協力者:玉井慎美<sup>1</sup>、中島好一<sup>1</sup>、川 真也<sup>1,2</sup>、岩本直樹<sup>1</sup>、青柳 潔<sup>2</sup>、上谷雅孝<sup>3</sup>

<sup>2</sup>長崎大学大学院公衆衛生学分野、<sup>3</sup>長崎大学大学院放射線診断治療学

### 研究要旨

関節リウマチ(RA)の関節破壊の進展に寄与する因子を、2つの患者コホートから解析した。一つは両側手指関節MRIを撮像する長崎早期関節炎コホートで、rapid radiographic progression (RRP)は $\Delta$  Genant-modified Sharp score $>3$ と定義した。エントリーから1年間の観察研究で76症例を解析した。RRPは12症例(15.8%)に認め、多変量解析において、エントリー時のMRI骨炎の程度、および、観察期間内における生物学的製剤の導入の2項目が、RRP進展に寄与する因子と抽出された。次に、関節エコーを用いたMTX治療経過の観察研究のコホートでは、6ヶ月間の臨床的治療反応(DAS28)、エコー所見、バイオマーカーの関連を評価した。33症例がエントリーされ、DAS28寛解群13症例と治療抵抗群12症例を比較検討した。その結果、DAS28寛解群は治療抵抗群と比較して、明らかにグレースケールスコア(GSスコア)とパワーDプラスコア(PDスコア)が改善した。バイオマーカーでは血清IL-6、TNF- $\alpha$ 、VEGFを評価したが、その中ではIL-6が、臨床的治療反応およびエコー所見を反映した。今年度の解析で、MRI骨炎とエコー滑膜炎の情報は、RAの関節破壊の予測に重要であることが明らかとなった。今後はMRI骨炎、エコー滑膜炎、バイオマーカーを組み合わせた、より精度が高いRAの関節破壊予測のアルゴリズムの構築を目指したい。

### 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、その達成には、関節破壊の予後予測が肝要である。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、画像所見ではMRI骨炎やエコー関節滑膜炎と予後予測との関連が指摘されている。今年度はRA患者コホートを用いて、これらに関連する因子の抽出を試みた。

### B.研究方法

1. 長崎早期関節炎コホートを用いて解析した。コホート

においてDMARDsを導入された76症例を対象とした。DMARDs導入下での1年間の観察研究である。このコホートは両側手指関節MRIを撮像しているので、関節破壊は両側手指関節Xpを用い、 $\Delta$  Genant-modified Sharp score $>3$ をRRPと定義した。RRP進展に寄与する因子を、多変量解析で抽出した。

2. MTX治療エコーコホートを用いて解析した。MTXが導入され、エコーとバイオマーカーを経時的に評価した、6ヶ月間の観察研究である。33症例がエントリーされ、両側手指22関節のグレースケールスコア(GSスコア)とパワーDプラスコア(PDスコア)、血清IL-6、

TNF- $\alpha$ 、VEGF を評価した。臨床的治療反応は DAS28-ESR を用いた。

(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. 長崎早期関節炎コホートをを用いた解析

エントリーまでの罹病期間中央値 3 ヶ月、RAMRIS 骨炎スコア中央値 1 の 76 症例の検討である。RRP は 12 症例 (15.8%) に認め、17 症例 (22.4%) は観察期間内に生物学的製剤が導入された。多変量解析において、エントリー時の MRI 骨炎の程度、および、生物学的製剤の導入の 2 項目が、RRP 進展に寄与する因子と抽出された (表 1)。

#### 2. MTX 治療エコーコホートをを用いた解析

33 症例の検討である。6 ヶ月後の DAS 寛解は 13 症例に認めた。6 ヶ月後の DAS が moderate or high、もしくは生物学的製剤が導入された症例を治療抵抗群と考え、これを 12 症例に認めた。図 1 と図 2 に示すが、DAS 寛解群でのみ、GS スコア、PD スコア、IL-6、VEGF の低下を認めた。バイオマーカーでは、IL-6 でその傾向が顕著であった。

### D.考察

関節破壊の進展を防止するには、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た。同時に抽出された生物学的製剤の導入は、合成 DMARDs への治療抵抗性を反映していると思われた。それに加え、エコー所見も RA 疾患活動性を反映し、バイオマーカーとしての IL-6 の有用性も示唆された。

### E.結論

リウマチ実地臨床下における 2 つの観察研究の結果から、RA の関節破壊の進展に寄与する因子の抽出を試みた。

早期 RA においては、MRI 骨炎が RRP 進展に寄与すること、および、MTX 治療経過をエコー所見とバイオマーカーが反映することを明らかとした。今後は MRI 骨炎、エコー滑膜炎、バイオマーカーを組み合わせ、より精度が高い RA の関節破壊予測のアルゴリズムの構築を目指したい。

### F.健康危険情報

なし。

### G.研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Kawashiri SY, Arima K, Suzuki T, Nakashima Y, Horai Y, Okada A, Tamai M, Nakamura H, Kawakami A. Presence of ultrasound subclinical synovitis and increment of serum vascular endothelial growth factor in a patient with rheumatoid arthritis achieved in sustained clinical remission by treatment with adalimumab and methotrexate. Mod Rheumatol. 2013 Jan 12.
- 2) Kawashiri SY, Fujikawa K, Nishino A, Suzuki T, Okada A, Nakamura H, Kawakami A. Usefulness of ultrasonography-proven tenosynovitis to monitor disease activity of a patient with very early rheumatoid arthritis treated by abatacept. Mod Rheumatol. 23 (3): 582-586, 2013.
- 3) 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. 23 (2): 254-259, 2013.
- 4) Satomura K, Torigoshi T, Koga T, Maeda Y, Izumi Y, Jiuchi Y, Miyashita T, Yamasaki S, Kawakami A, Aiba

Y, Nakamura M, Komori A, Sato J, Ishibashi H, Motokawa S, Migita K. Serum amyloid A (SAA) induces pentraxin 3 (PTX3) production in rheumatoid synoviocytes. Mod Rheumatol. 23 (1): 28-35, 2013.

5) 玉井慎美, 川上 純. MRI 画像の特徴と早期診断・治療評価. Mebio. 30 (2): 16-20, 2013.

## 2. 学会発表

1) 川上 純, 玉井慎美, 川尻真也, 中村英樹, 折口智樹, 上谷雅孝, 青柳 潔, 江口勝美. MRIからみた寛解基準の意義. 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術総会. 第 22 回国際リウマチシンポジウム. 2013/4/18-4/20.

2) 岡田覚丈, 川上 純, 福田孝昭, 日高利彦, 石井智徳, 植木幸孝, 小寺隆雄, 中島宗敏, 高橋裕一, 本多靖洋, 寶來吉朗, 古賀智裕, 渡部 龍, 奥野洋史, 江口勝美. 前向き多施設コホート研究によるRA関節破壊の評価. 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 第 22 回国際リウマチシンポジウム. 2013/4/18-4/20.

3) Tamai M, Takatani A, Nakashima Y, Suzuki T, Kita J, Horai Y, Okada A, Kawashiri S, Iwamoto N, Ichinose K, Arima K, Nakamura H, Origuchi T, Uetani M, Aoyagi K, Eguchi K, Kawakami A. Stringent Therapies Improve Clinical, Radiographic and Magnetic Resonance Imaging Outcome In Early-Stage From Nagasaki Early Arthritis Cohort. 2013 ACR/ARHP Annual Meeting 13. 2013/10/25-10/30.

4) 西野文子, 川尻真也, 高谷亜由子, 鈴木貴久, 中島好一, 寶來吉朗, 岩本直樹, 一瀬邦弘, 玉井慎美, 有馬和彦, 中村英樹, 折口智樹, 川上 純. 関節リウマチ患者においてアダリムマブ治療反応性を予測する関節エコー所見の検討. 第 28 回日本臨床リウマチ学会. 2013/11/30-12/1.

5) 鈴木貴久, 川尻真也, 西野文子, 高谷亜由子, 中島好一, 寶來吉朗, 岡田覚丈, 岩本直樹, 一瀬邦

弘, 玉井慎美, 有馬和彦, 中村英樹, 折口智樹, 江口勝美, 川上 純. 関節リウマチ(RA)患者におけるメトトレキサート(MTX)投与による関節超音波画像の検討. 第 28 回日本臨床リウマチ学会. 2013/11/30-12/1.

## 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。

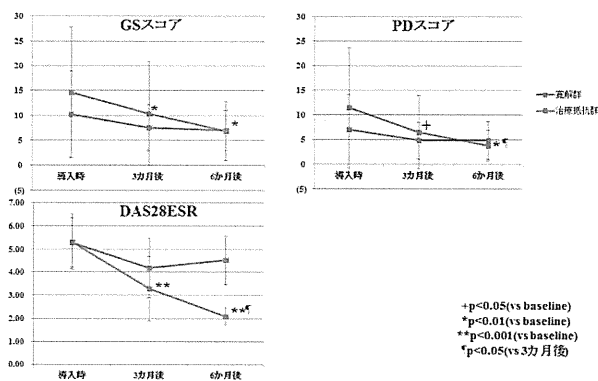
### 3. その他

なし。

表1. RRP進展を予測する多変量解析

	Odds ratio	95% C.I.	p-value
エントリー一時のRAMRIS骨炎スコア	1.10	1.04 - 1.16	0.0009
生物学的製剤の導入	5.46	1.05 - 28.57	0.044

図1. 寛解群と治療抵抗群の比較: DASとエコー



## 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

関節リウマチ (RA) は、Treat to target の治療概念の啓蒙に伴って、従来より早期における RA 診断法、また、関節炎の正確な評価法の重要性に注目が集まっている。このなかで RA では全身的な治療反応後においても局所には炎症が残存し予後不良であることが判明してきている。このような関節炎は臨床症状に乏しく、従来の方法では評価することが困難である。最近になり、このような sub-clinical synovitis の発見と評価には画像検査が有用であると報告されている。関節 MRI 検査は、骨髄浮腫などの特徴的所見を捉えることが可能である。しかしながら、高い医療コスト、一度に施行可能部位の制限、医療施設の限定などの問題から、頻回施行には向かない。関節超音波検査は自由度が高い検査であり、滑膜炎の状態を鋭敏に評価することが可能である。しかしながら画像描出は煩雑であり習熟が必要である。更には自由度の高さから評価法は決定されたものではなく検証段階にある。低コスト、簡便に滑膜炎を評価できる画像検査は、診断と評価の面で有用と考えられる。

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。これを利用して眼科領域では蛍光眼底造影検査が施行されている。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(インドシアニンググリーン蛍光血管描出法)を利用して描出可能かを検討した。初年の報告で、活動性 RA 患者の、臨床的に腫脹を認めた右手に対して、インドシアニンググリーン蛍光血管描出法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、インドシアニンググリーン蛍光血管描出法にて異常蛍光スポットを描出した。更に我々は両手用撮像機器を開発した。今回、同機器を使用して両手の同時撮影を行い、炎症部位の定量法を検討した。

インドシアニンググリーン蛍光血管描出法は低コスト、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。インドシアニンググリーン蛍光血管描出法は 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)の関節画像評価法を確立し、診断、治療評価基準を確立する。RA は、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、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、評価可能な検査は関節炎評価に有用と考えられる。インドシアニンググリーン (ICG) は静脈内投与後に蛍光発光する。デジタルビデオカメラによって簡便に微小血管を画像化できる。関節滑膜異常血流は関節部位に

集積する蛍光として捉えることができる。異常集積の定量法について検討した。

## B.研究方法

医療機器である近赤外線描出カメラ(浜松ホトニクス)を使用した両手用撮像装置を作成した。

活動性 RA 患者4症例の両手に対して、関節超音波検査と近赤外線カメラ検査を施行した(ICG: 0.25mg/body)。定量パワードップラ関節超音波検査にて滑膜血流値を得た後、両者結果を比較した。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。Intensity curve を MCP2-3, PIP2-3 関節から得た。このグラフより Fluorescent intensity max (Imax) を算出した。

(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

MCP, PIP 関節に対して、Imax は、異常滑膜血流陽性関節では、陰性関節と比較して有意に高値であった。更に MCP 関節において、定量異常滑膜血流値と、Imax は有意に相関した。PIP 関節においては、有意差は認めなかった。

## D.考察

本研究の結果から

ICG 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。ICG 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として、デジタルビデオカメラ、励起光 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。

得られた動画から、関節部位に region of interest (ROI) を置くことで同部位の蛍光 intensity curve が得られた。観察者が異常部位を判断し評価することに加えて、intensity curve から、正常・異常の判別、また異常を定量する方法を確立することで、RA 診断、治療評価へ有用な可能性がある。今回の結果から、Imax は、炎症指標として有用な可能性が示された。PIP 関節において、異常滑膜血流陽性関節 vs 陰性関節の間には有意差が認められた。両者には有意な相関は認めなかったが、傾向が示された。これについては更に多数の症例検討が必要である。Intensity curve より、Imax 以外のパラメータも算出可能であり、今後検討が必要である。

## E.結論

近赤外線カメラを使ったインドシアニングリーン蛍光血管描出法は、低侵襲、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。ICG 蛍光による滑膜血流は定量評価可能である。今後、同検査にて正常部位、異常部位の判定方法についても考えていく。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

1. Ikeda K, Seto Y, Narita A, kawakami A, Kawahito Y,

Ito H, Matsushita I, Ohno S, Nishida K, Suzuki T, Kaneko A, Ogasawara M, Fukae J, Henmi M, Sumida T, Kamishima T, Koike T. Ultrasound assessment of synovial pathologic features in rheumatoid arthritis using comprehensive multi-plane images of the 2<sup>nd</sup> metacarpophalangeal joint – Identification of the components which are reliable and influential on the global assessment of the whole joint.

Arthritis Rheum, Nov 18, 2013, in press.

2. Takamura A, Hirata S, Nagasawa H, Kameda H, Seto Y, Atsumi T, Dohi M, Koike T, Miyasaka N, Harigai 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.* 23(2): 297-303, 2013.

3. 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.* 23(2): 284-96, 2013.

4. Koike T.

IgG4-related disease: why high IgG4 and fibrosis. *Arthritis Res Ther.* 15(1):103, 2013.

5. Fukae J, Isobe M, Kitano A, Henmi M, Sakamoto F, Narita A, Ito T, Mitsuzaki A, Shimizu M, Tanimura K, Matsushita 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* 52, 523-528, 2013.

6. Fukae J, Tanimura K, Atsumi T, Koike T.

Sonographic synovial vascularity of synovitis in

rheumatoid arthritis. *Rheumatology* Sep 18, 2013

(epub ahead of print)

## 2. 学会発表

1. Koike T: "Antiphospholipid syndrome: 30 years", 6<sup>th</sup> Autoimmunity Congress Asia. 2013/11/19-23. Hong Kong.

2. Koike T: "My contribution, my dream: 1983-2013", 14<sup>th</sup> International Congress on Antiphospholipid Antibodies & 4<sup>th</sup> Latin American Congress on Autoimmunity. 2013/9/17-23. Rio de Janeiro. Brazil.

3. 深江 淳、成田明宏、邊見美穂子、坂本文彦、北野明美、青木悠子、高松尚徳、磯部将人、清水昌人、松橋めぐみ、伊藤武哉、光崎明生、谷村一秀: 関節リウマチにおける滑膜肥厚の定量測定

インドシアニングリーン蛍光血流画像は手指異常滑膜血流をとらえ評価することが可能である低疾患活動性を得た関節リウマチ患者の手指関節炎の変化。

第 57 回日本リウマチ学会総会 2013/4/18-20、京都

## 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

## 関節リウマチ治療における細胞周期制御・抗炎症併用療法の有効性の検討

研究分担者 上阪 等 東京医科歯科大学 膠原病・リウマチ内科 教授  
研究協力者 細矢 匡 東京医科歯科大学 膠原病・リウマチ内科 大学院生

### 研究要旨

CDK4/6 阻害による滑膜細胞の細胞周期制御療法が関節炎の動物モデルに著効することを示してきた。臨床的に安全性が証明された CDK4/6 阻害薬 palbociclib でも関節炎治療効果があることを証明するとともに、RA を特徴づける 2 つの病態に対しての治療である、抗サイトカイン療法と細胞周期制御療法を併用することで、関節炎の治療効果を高め、副作用を軽減できるかを検討した。高用量の CDKI は血球減少をきたしたが、減量により副作用なく、関節炎抑制効果を得ることができると考えられた。また、低用量の細胞周期制御療法と抗炎症療法との併用は協調的に関節炎の抑制効果を得ることができ、かつ獲得免疫能のさらなる抑制はきたさない安全な治療法になると考えられた。

### A. 研究目的

関節リウマチ(RA)における滑膜炎には、免疫細胞の浸潤とサイトカイン産生を主体とする炎症相と、滑膜細胞の増殖によるパンヌス形成に代表される増殖相の 2 つの病態がある。近年出現した炎症性サイトカインやリンパ球を標的とした分子標的療法は、炎症相に注目した治療戦略であり、実臨床でも高い有効性を示した。その一方で、それぞれ異なる治療標的をもつにもかかわらず、その有効性には大きな差がなく、MTX 効果不十分患者に対しての ACR70 response rate はいずれも 5 割に満たない。またこれらの分子標的療法を併用した報告では、有効性を増強することなく重症感染症を増加させる結果となったため、炎症相の過度の抑制は有効性と安全性のバランスを欠く可能性がある。われわれは非免疫抑制的な治療戦略を目指して滑膜細胞に注目した。RA 患者の滑膜細胞はパンヌス形成を通じて骨破壊に直接関与し、炎症性サイトカインやケモカインの分泌を介して罹患関節局所の炎症を増強させる。この過度の増殖をきたした滑膜細胞では p16INK4a といった内因性の細胞周期制御分子の発現が抑制されていることを見出

した。さらに、CDK4/6 阻害による滑膜細胞の細胞周期制御療法が関節炎の動物モデルに著効することを示してきた。CDK 阻害薬は抗癌剤として開発されてきた歴史があるが、きわめて特異的が高い CDK4/6 阻害薬 palbociclib (CDKI) とアロマターゼ阻害薬である letrozole の併用療法が、進行性の乳癌に対して高い有効性を示したことから臨床応用が進んでいる。臨床試験において治療継続性が高く、重篤な副作用も少なかったことから、CDK4/6 阻害による細胞周期制御療法はヒトの臨床においても副作用の少ない治療であることが示された。

本研究では、臨床的に安全性が証明された CDKI でも関節炎治療効果があることを証明するとともに、RA を特徴づける 2 つの病態に対しての治療である、抗サイトカイン療法と細胞周期制御療法を併用することで、関節炎の治療効果を高め、副作用を軽減できるかを検討することを目的とした。

### B. 研究方法

DBA1/J マウスをウシ II 型コラーゲン(C II)と complete

Freund's adjuvant で 2 回免疫し、コラーゲン誘導関節炎 (CIA) を発症させ、関節炎スコアと骨破壊像で評価した。CDKI の関節炎への作用を評価し、末梢血球数への影響を計測した。また、抗サイトカイン療法として etanercept (ETN) と抗マウス IL-6 受容体抗体 (抗 IL-6R Ab) を用い、それぞれの単独療法と CDKI との併用療法の関節炎への作用を評価した。獲得免疫系への影響を評価するために血清中の抗 C II 抗体価とリンパ節由来細胞の C II 特異的 T 細胞応答を測定した。

(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。

### C. 研究結果

CDKI は用量依存性の関節炎抑制効果を示したが、100mg/kg の連日投与では末梢血の赤血球数の減少を認めた。20mg/kg の CDKI は血球減少や消化管障害などの副作用なく、関節炎抑制効果を示した。

ETN 単独療法の関節炎抑制効果は 20mg/kg の CDKI 単独療法と同程度の効果を示したが、10mg/kg と 3mg/kg で用量反応性は認めなかった。しかし、3mg/kg の ETN と 20mg/kg の CDKI の併用療法は、速やかかつ強力な関節炎抑制効果を示した。骨破壊の抑制は ETN 単独療法でも観察されたが、併用療法ではより強力な骨破壊抑制傾向を示した。それぞれの単独療法、併用療法ともに抗 C II 抗体価と C II 特異的 T 細胞応答の抑制はきたさなかった。抗 IL-6 R Ab 単独療法の関節炎抑制効果も 20mg/kg の CDKI 単独療法と同程度だったが、抗 IL-6R=Ab と CDKI の併用療法も、それぞれの単独療法より高い有効性を示した。骨破壊抑制効果は各々の単独療法では観察されず、

併用療法でのみ観察された。抗 IL-6R Ab 単独療法と併用療法は抗 C II 抗体価の低下をきたしたが、CDKI の併用による更なる抗体価の低下は見られなかった。また各群とも C II 特異的 T 細胞応答の抑制はきたさなかった。

### D. 考察

臨床的に安全性が証明された CDKI でも関節炎治療効果を示すことができた。高用量の CDKI は血球減少をきたしたが、減量により副作用なく、関節炎抑制効果を得ることができると考えられた。また、低用量の細胞周期制御療法と抗炎症療法との併用は協調的に関節炎の抑制効果を得ることができ、かつ獲得免疫能のさらなる抑制はきたさない安全な治療法になると考えられた。

### E. 結論

本成果は二つの異なる分子標的治療の協調的効果を初めて示すものであり、細胞周期制御・抗炎症併用療法は副作用を抑えた、高い治療効果を協調的に示す新たな RA 治療法としての開発が期待される。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

1. 関節リウマチ治療における細胞周期制御・抗炎症併用療法の可能性(口演、第 57 回日本リウマチ学会、2013 年)
2. 関節リウマチ治療における細胞周期制御・抗炎症併用療法の有効性の検討(ポスター発表、第 30 回炎症再生学会、2013 年)
3. Cell cycle regulation therapy combined with cytokine blockade enhances anti-arthritis effects without increase of immune suppression.(口演、ACR\_ARHP Annual Meeting、2013 年)
4. Cell cycle regulation therapy combined with cytokine



blockade enhances anti-arthritic effects without increase of immune suppression.(口演、日本免疫学会、2013年)

#### 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

特になし

## SAKURA 早期関節炎コホートにおける高感度サイトカインアッセイ系による検討

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投与例における、血中サイトカイン変動を、Electro-chemiluminescence (ECL)による超感度アッセイ系により解析した。

平均罹病期間 0.6 年の早期 RA コホート62例において IL-1 $\beta$  と IL-6 の有意な低下を明らかにした。その中で、関節破壊進行と関連する治療後サイトカインを検討した所、治療後 TNF $\alpha$  は抽出されず、従来型 ELISA 法と同様 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投与例における、血中サイトカイン変動を、Electro-chemiluminescence (ECL)による超感度アッセイ系により解析する。

(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)。

### B.研究方法

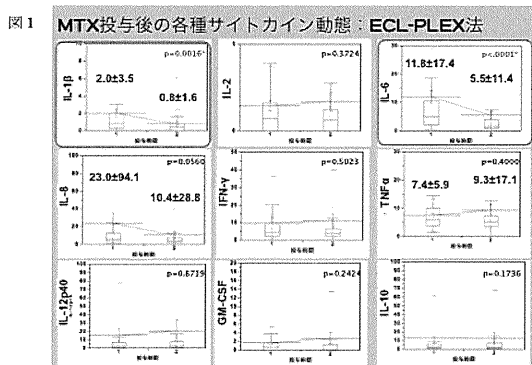
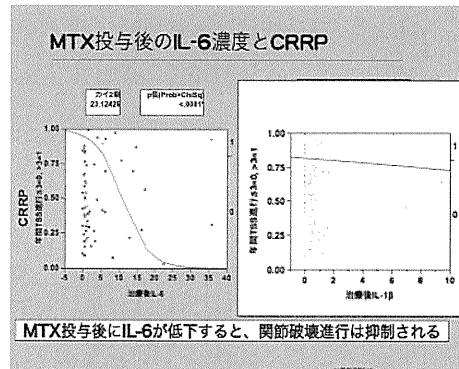
1.対象患者:慶應義塾大学リウマチ内科で、2008年8月から前向きに登録された新規診断 RA コホート SAKURA の中から、第一 DMARD として MTX が投与された 62 例を対象とした。2.臨床データ:62例の MTX 投与前、MTX 投与1年後の DAS28-ESR, SDAI, CDAI, CRP, MMP-3 などの臨床パラメーターを収集した。3.血漿サイトカイン:MSD 社のルテニウム標識抗体による ultra-sensitive ELISA 9-plex キット(ECL 法)を用いて、MTX 投与前と投与1年後の患者血漿サイトカイン(IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , GM-CSF, 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。5.統計解析:JMP9.0 ソフトウェアを用いて統計解析した。

### C.研究結果

1)患者背景と臨床効果:昨年報告した通り、女性 79%、年齢 56 $\pm$ 14.5 才、罹病期間 6.3 $\pm$ 8.0 ヶ月、RF+ 74.2%、抗 CCP 74.2%、MTX 用量 8.7 $\pm$ 2.3mg/週。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が低疾患活動性以上を達成した。  
2)IL-6 と TNF $\alpha$  の従来型 ELISA 法と超高感度 ECL 法の比較:MTX 投与前後の IL-6 と、TNF $\alpha$  に関して、両アッセイ系によって比較した。IL-6 の両アッセイの相関は、 $r=0.864$ ,  $p<0.0001$  と良好で、TNF $\alpha$  は、 $r=0.659$ ,  $p<0.001$  と IL-6 に比較し相関が低かった。IL-6 は、従来型 ELISA 法で 20.9 $\pm$ 47.3pg/ml で検出限界に近い 1pg/ml 以下を9例(14.5%)に、検出不能例を2例に認めた。一方、超高感

度 ECL 法による IL-6 は  $11.8 \pm 17.4$  pg/ml で、1pg/ml 以下は4例(6.5%)であったが、検出不能例は認めなかった。TNF  $\alpha$  は、従来型 ELISA 法で  $1.0 \pm 1.3$ pg/ml で検出限界に近い 1pg/ml 以下を33例(53.2%)に、検出不能例を26例(41.9%)に認めた。一方、超高感度 ECL 法による TNF  $\alpha$  は  $7.0 \pm 4.6$  pg/ml で、1pg/ml 以下は0例、検出不能例を認めなかった。いずれのサイトカインにおいても ultra-sensitive ECL アッセイ系の優越性が明らかとなった。特に、TNF  $\alpha$  測定においては、超高感度 ECL アッセイ法は、検出不能例がなく、優れた検出系と考えられた。

感度ECL法によっても、治療後TNF  $\alpha$  の単位オッズ比は1.08、95%信頼区間は0.50-1.91であった。



3) 治療後サイトカインの変動(図1): 治療前後で有意に変化したサイトカインは、IL-1βとIL-6であった。IL-1βは治療前 $2.0 \pm 3.5$  pg/mlから、治療後 $0.8 \pm 1.6$  pg/mlへと低下した( $p=0.0016$ )。IL-6は、治療前 $11.8 \pm 17.4$  pg/mlから治療後 $5.5 \pm 11.4$  pg/mlへと68%低下した( $p<0.0001$ )。一方、TNF  $\alpha$  は、超高感度ECL法によっても、治療前 $7.0 \pm 4.6$  pg/mlから治療後 $9.3 \pm 17.1$  pg/ml( $p=0.400$ )と変化無く、IL-2, IL-8, IL-10, IFN  $\gamma$ , GM-CSFも有意な変化を示さなかった。

4) CRRPと関連するMTX投与1年後の要因:  $\Delta$  TSS>3以上のclinically relevant radiographic progression (CRRP)と関連する治療後サイトカインを解析した所、ロジスティック回帰分析によって、唯一治療後IL-6がCCRPPと関連する要因として抽出された(単位オッズ比=1.92、95%信頼区間=1.30-3.63)。CRRPを来すIL-6値をROC解析によって求めた所、2.4pg/mlのカットオフが得られた(図2)。一方、高

#### D. E. 考察/結論

平均罹病期間 0.6 年の早期 RA コホート62例で MTX の関節破壊抑制効果と血中サイトカイン9種類の変動を超高感度 ECL 法で解析し、IL-1βとIL-6の有義な低下を明らかにした。その中で、関節破壊進行と関連する治療後サイトカインを検討した所、治療後 TNF  $\alpha$  は抽出されず、従来型 ELISA 法と同様 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。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Takeuchi T, Kawai S, Yamamoto K, Harigai M, Ishida K, and Miyasaka M. Post-marketing surveillance of the safety and effectiveness of tacrolimus in 3267 Japanese patients with rheumatoid arthritis. Mod Rheum24:8-16, 2014.
2. Nishimoto N, Koichi Amano, Yasuhiko Hirabayashi, Takahiko Horiuchi, Tomonori Ishii, Mitsuhiro Iwahashi, Masahiro Iwamoto, Hitoshi Kohsaka, Masakazu Kondo, Tsukasa Matsubara, Toshihide Mimura, Hisaaki Miyahara, Shuji Ohta, Yukihiko Saeki, Kazuyoshi Saito,

- Hajime Sano, Kiyoshi Takasugi, Tsutomu Takeuchi, Shigeto Tohma, Tomomi Tsuru, Yukitaka Ueki, Jiro Yamana, Jun Hashimoto, Takaji Matsutani, Miho Murakami, Nobuhiro Takagi. Retreatment efficacy and safety of tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis in recurrence (RESTORE) study. *Mod Rheum* 24:26–32, 2014.
3. Sugano K, Kinoshita Y, Miwa H, Takeuchi T, and the esomeprazole NSAID 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.
  4. 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.
  5. Koike T, Harigai M, Inokuma S, Ishiguro N, Ryu J, Takeuchi T, Tanaka Y, Yamanaka H, Hirose T, Yoshinaga T, and Suzukawa M. Safety and effectiveness of 6 months etanercept monotherapy and combination therapy in Japanese patients with Rheumatoid Arthritis: Effect of concomitant disease-modifying anti-rheumatic drugs. *J Rheumatology* in press.
  6. Kaneko Y, Kuwana M, and Takeuchi T. Osteolytic change in distal interphalangeal joint and sacroiliac joints in subluxing arthropathy in anti-jo-1 antibody. *Joint Bone & Spine*, in press.
  7. Koike T, Harigai M, Inokuma S, Ishiguro N, Ryu J, Takeuchi T, Takei S, Tanaka Y, Sano Y, Yamaguchi H, and Yamanaka H. Characteristics related to good effectiveness and safety with tocilizumab: Post-marketing surveillance of 7901 rheumatoid arthritis patients in Japan. *J Rheum* in press.
  8. Sugano K, Kinoshita Y, Miwa H, Takeuchi T, and Esomeprazole NSAID Prevention study group. Safety and efficacy of long-term esomeprazole 20mg in Japanese patients with a history of peptic ulcer receiving daily non-steroidal anti-inflammatory drugs. *BMC Gastroenterology* in press.
  9. Yamamoto K, Takeuchi T, Yamanaka H, Ishiguro N, Tanaka Y, Eguchi K, Watanabe A, Origasa H, Shoji T, Sakamaki Y, van der Heijde D, Miyasaka N, and Koike T. Efficacy and safety of certolizumab pegol plus methotrexate in Japanese rheumatoid arthritis patients with inadequate response to methotrexate: the J-RAPID randomized, placebo-controlled trial. *Mod Rheum* in press.
  10. Yamamoto K, Takeuchi T, Yamanaka H, Ishiguro N, Tanaka Y, Eguchi K, Watanabe A, Origasa H, Iwai K, Sakamaki Y, van der Heijde D, Miyasaka N, and Koike T. Efficacy and safety of certolizumab pegol without methotrexate co-administration in Japanese patients with active rheumatoid arthritis: the HIKARI randomized, placebo-controlled trial. *Mod Rheum* in press.
  11. Tanaka Y, Yamamoto K, Takeuchi T, Yamanaka H, Ishiguro N, Eguchi K, Watanabe A, Origasa H, Shoji T, Miyasaka N, and Koike T. Long-term efficacy and safety of certolizumab pegol in Japanese rheumatoid arthritis patients who could not receive methotrexate: 52-week results from an open-label extension of the HIKARI study. *Mod Rheum* in press.
  12. Tanaka Y, Kubo S, Yamanaka H, Amano K, Hirata S, Tanaka E, Nagasawa H, Yasuoka H, and Takeuchi T. Efficacy and safety of abatacept in routine care of patients with rheumatoid arthritis: Oencia as Biological Intensive Treatment for RA (ORBIT) study.

- Mod Rheum in press.
13. Kaneko Y, Kondo H and Takeuchi T. ACR/EULAR remission criteria maintains strict performance when evaluated in 44 joints. *J Rheumatology* 40:1254–8, 2013
  14. 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, and Sumida T. Validation of different sets of criteria for the diagnosis of Sjogren's syndrome in Japanese patients. *Mod Rheum* 23:219–225, 2013.
  15. Takeuchi T and Suzuki K. CD247 variants single nucleotide polymorphisms observed in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology online* March 23, 2013.
  16. Nishina N, Kaneko Y, Kameda H, Kuwana M, and Takeuchi T. Reduction of plasma IL-6, but not TNF- $\alpha$  by methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis: a potential biomarker for radiographic progression. *Clinical Rheumatology* 32:1661–6, 2013.
  17. 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* 23:226–235, 2013.
  18. Sakai R, Nagasawa H, Nishi E, Okuyama A, Takei H, Kurasawa T, Kondo T, Nishimura K, Shirai Y, Ito T, Kameda H, Takeuchi T, and Amano K. Successful treatment of adult-onset Still's disease with tocilizumab monotherapy: two case reports with literature review. *Clin Rheum* 31:569–74, 2012.
  19. 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* 72:1488–95, 2013.
  20. 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* 23:623–33, 2013.
  21. 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.
  22. Tokuhira M, Watanabe R, Nemoto T, Sagawa M, Tomikawa T, Tamaru J, Itoyama S, Nagasawa H, Amano K, Kameda H, Takeuchi T, Mori S, and Kizaki M. Clinicopathological analysis in patients with iatrogenic immunodeficiency-associated lymphoproliferative diseases and rheumatoid arthritis. *Leukemia & Lymphoma* 53:616–23, 2012.
  23. 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.

24. Nishina N, Kikuchi J, Hashizume M, Yoshimoto K, Kameda H, and Takeuchi T. Baseline levels of soluble interleukin-6 receptor predict clinical remission in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab: implications for molecular targeted therapy. *Ann rheum Dis*, online December 13, 2013.

#### 学会発表

1. T. Takeuchi , Y. Kaneko , T. Atsumi , Y. Tanaka , M. Inoh , H. Kobayashi , K. Amano , M. Miyata , Y. Murakawa , T. Fujii , A. Kawakami , H. Yamanaka , K. Yamamoto , N. Miyasaka , T. Mimori: ADDING TOCILIZUMAB OR SWITCHING TO TOCILIZUMAB MONOTHERAPY IN RA PATIENTS WITH INADEQUATE RESPONSE TO METHOTREXATE: 24- WEEK RESULTS FROM A RANDOMIZED CONTROLLED STUDY (SURPRISE STUDY). Madrid, Spain. 2013.6.13
2. H. Yamanaka , K. Yamamoto , T. Takeuchi , N. Ishiguro , Y. Tanaka , K. Eguchi , A. Watanabe , H. Origasa , T. Shoji , S. Onodera , N. Miyasaka , T. Koike: WEEK 12 CLINICAL RESPONSE TO CERTOLIZUMAB PEGOL PREDICTS LONG-TERM OUTCOMES REGARDLESS OF CONCOMITANT MEDICATIONS AND BASELINE DISEASE CHARACTERISTICS IN JAPANESE PATIENTS WITH ACTIVE RHEUMATOID ARTHRITIS. Madrid, Spain. 2013.6.13
3. T. Takeuchi , N. Wakasugi , H. Makino . Keio University, Astellas Pharma Inc., Tokyo, Okayama University, Okayama, Japan: LONG-TERM SAFETY AND EFFICACY OF TACROLIMUS FOR LUPUS NEPHRITIS PATIENTS -INTERIM ANALYSIS OF POST MARKETING SURVEILLANCE IN 1375 PATIENTS IN JAPAN (TRUST STUDY). Madrid, Spain. 2013.6.13
4. N. Nishina, J. Kikuchi, M. Hashizume, K. Yoshimoto, H. Kameda, T. Takeuchi: BASELINE SOLUBLE INTERLEUKIN-6 RECEPTOR LEVELS PREDICT THE CLINICAL EFFECTIVENESS OF TOCILIZUMAB IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS. Madrid, Spain. 2013.6.14
5. J. Kikuchi, H. Kameda, K. Yoshimoto, T. Takeuchi: LOW SERUM INTERLEUKIN-6 LEVEL AT BASELINE, RATHER THAN AT FOLLOW-UP, IS ASSOCIATED WITH FAVORABLE RADIOGRAPHIC OUTCOME IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS TREATED WITH ABATACEPT. Madrid, Spain. 2013.6.14
6. T. Takeuchi, M. Harigai, Y. Tanaka, H. Yamanaka, N. Ishiguro, K. Yamamoto, Y. Murakami, T. Yoshinari, D. Baker, N. Miyasaka, T. Koike: GOLIMUMAB MONOTHERAPY IN PATIENTS WITH ACTIVE RHEUMATOID ARTHRITIS DESPITE DMARD THERAPY: WEEK 104 RESULTS OF CLINICAL, RADIOGRAPHIC AND SAFETY ASSESSMENTS INCLUDING EVALUATION OF REMISSION USING THE NEW ACR/EULAR CRITERIA. Madrid, Spain. 2013.6.14
7. T. Takeuchi, T. Yano, T. Inui, T. Yoshinari, N. Miyasaka, T. Abe, T. Koike: ACHIEVEMENT OF LOW DISEASE ACTIVITY (LDA) AT 3 MONTHS PREDICTS CLINICAL REMISSION (REM) AT 1 YEAR OF INFLIXIMAB (IFX) THERAPY IN RA: POST- HOC ANALYSIS OF A RANDOMIZED DOUBLE-BLIND CLINICAL STUDY (RISING STUDY). Madrid, Spain. 2013.6.14
8. T. Takeuchi, K. Yamamoto, H. Yamanaka, N. Ishiguro, Y. Tanaka, K. Eguchi, A. Watanabe, H. Origasa, Y. Wada, T. Shoji, N. Miyasaka, T. Koike: IMMUNOGENICITY OF CERTOLIZUMAB PEGOL

- WITHOUT CONCOMITANT METHOTREXATE AND CLINICAL RESPONSE IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS: POST-HOC ANALYSIS OF THE HIKARI STUDY. Madrid, Spain. 2013.6.14
9. Y. Tanaka, M. Harigai, T. Takeuchi, H. Yamanaka, N. Ishiguro, K. Yamamoto, Y. Murakami, T. Yoshinari, D. Baker, N. Miyasaka, T. Koike: GOLIMUMAB ADMINISTERED SUBCUTANEOUSLY EVERY FOUR WEEKS IN PATIENTS WITH ACTIVE RHEUMATOID ARTHRITIS DESPITE METHOTREXATE THERAPY: LONG-TERM CLINICAL, RADIOGRAPHIC AND SAFETY RESULTS, INCLUDING EVALUATION OF REMISSION USING THE NEW ACR/EULAR CRITERIA. Madrid, Spain. 2013.6.14
  10. Y. Tanaka, T. Takeuchi, T. Mimori, N. Miyasaka, T. Koike and RRR Study Investigators: THE POSSIBILITY AND PREDICTIVE FACTORS OF MAINTAINING LOW DISEASE ACTIVITY AND JOINT STRUCTURE AFTER DISCONTINUATION OF INFLIXIMAB IN RA PATIENTS: RESULTS FROM 3-YEAR EXPERIENCE OF RRR STUDY. Madrid, Spain. 2013.6.14
  11. G. Burmester, T. Takeuchi, O. Barbarash, G. Ranganna, D. Close, A. Godwood, D. Saurigny and EARTH Study Group.: CONSISTENT EFFICACY AND SAFETY OUTCOMES BETWEEN EUROPEAN AND JAPANESE SUBJECTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS FOLLOWING TREATMENT WITH MAVRILIMUMAB IN THE PHASE 2 EARTH STUDY. Madrid, Spain. 2013.6.14
  12. K. Amano, T. Matsubara, H. Inoue, M. Iwahashi, A. Yamazaki, C. S. Karyekar, T. Takeuchi and Department of RheuJapan Abatacept Study Group: LONG-TERM SAFETY AND EFFICACY OF TREATMENT WITH SUBCUTANEOUS ABATACEPT IN JAPANESE PATIENTS WITH RA WHO WERE MTX INADEQUATE RESPONDERS – 76-WEEK RESULTS. Madrid, Spain. 2013.6.14
  13. T. Takeuchi on behalf of ORION study group, T. Matsubara, S. Ohta, M. Mukai, K. Amano, S. Tohma, Y. Tanaka, H. Yamanaka, N. Miyasaka and ORION study group: ABATACEPT BIOLOGIC-FREE REMISSION STUDY IN ESTABLISHED RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS ORION STUDY. Madrid, Spain. 2013.6.15
  14. M. Harigai, S. Inokuma, N. Ishiguro, J. Ryu, T. Takeuchi, S. Takei, Y. Tanaka, H. Yamanaka, Y. Sano, H. Yagurumaki, T. Koike: CHARACTERISTICS ASSOCIATED WITH BETTER EFFECTIVENESS AND SAFETY IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS TREATED WITH INTRAVENOUS TOCILIZUMAB: RESULTS FROM FULL ANALYSIS OF ALL-PATIENT POSTMARKETING SURVEILLANCE IN JAPAN. Madrid, Spain. 2013.6.15
  15. T. Takeuchi, Y. Tanaka, K. Amano, J. Kikuchi, E. Tanaka, S. Hirata, H. Nagasawa, H. Yasuoka, H. Yamanaka: EFFECTIVENESS OF ABATACEPT AGAINST RHEUMATOID ARTHRITIS IN DAILY CLINICAL PRACTICE – ORBIT STUDY. Madrid, Spain. 2013.6.15
  16. Yoshiya Tanaka, Kazuhiko Yamamoto, Tsutomu Takeuchi, Nobuyuki Miyasaka, Takayuki Sumida, Tsuneyo Mimori, Takao Koike and Kazuhiro Endo: Efficacy Of Rituximab In Patients With Refractory Lupus Nephritis, a Post-Hoc Analysis From Phase II Trial In Japan. San Diego, USA. 2013.10.27
  17. Hidekata Yasuoka, Yuichiro Shirai, Yuichi Tamura, Toru Satoh, Tsutomu Takeuchi and Masataka Kuwana: Baseline Characteristics That Predict a

- Short-Term Response To Immunosuppressive Treatment In Patients With Pulmonary Arterial Hypertension Associated With Connective Tissue Disease. San Diego, USA. 2013.10.27
18. Hidekata Yasuoka, Ken Stern, Yuka Okazaki, Tetsuya Nishimoto, Tsutomu Takeuchi and Masataka Kuwana: Up-Regulated Expression Of CXCL5 In Circulating Platelets From Patients With Systemic Sclerosis: A Role In Fibrosis. San Diego, USA. 2013.10.27
  19. Misato Hashizume, Keiko Esaki, Keiko Yoshimoto, Hideto Kameda, Tsutomu Takeuchi and Yoshihiro Matsumoto: Novel Function Of Soluble Interleukin-6 Receptor As An Antagonist Of Interleukin-27-Mediated Anti-Inflammatory Responses. San Diego, USA. 2013.10.28
  20. Yoshiya Tanaka, Tsutomu Takeuchi, Naoki Ishiguro, Hisashi Yamanaka, Toshiyuki Yoneda, Harry K. Genant and Désirée van der Heijde: Estimation Of The Effect Of Denosumab On Bone Loss From The Results Of The 12-Month Phase II Study In Patients With Rheumatoid Arthritis (RA) On Background Methotrexate (MTX). San Diego, USA. 2013.10.28
  21. Takao Koike, Masayoshi Harigai, Naoki Ishiguro, Shigeo Inokuma, Junnosuke Ryu, Syuji Takei, Tsutomu Takeuchi, Y. Tanaka, Masahiko Watanabe and Hisashi Yamanaka: Safety and Effectiveness Of Abatacept In 3985 Japanese Patients With Rheumatoid Arthritis; Japan All-Cases Post-Marketing Surveillance. San Diego, USA. 2013.10.28
  22. Gerd-Rüdiger Burmester, Tsutomu Takeuchi, Olga Barbarash, Duncan Porter, Didier Saurigny, David Close, Alex Godwood, Yoojung Yang and Ancilla W. Fernandes: Early and Sustained Improvement In Pain and Physical Function As Measured By Visual Analog Scale and Short Form-36 Physical Component Summary Score In Rheumatoid Arthritis Patients Treated With Mavrilimumab, An Investigational Anti-GM-CSFR-Alpha Monoclonal Antibody, In a Phase 2a Study. San Diego, USA. 2013.10.28
  23. M Weinblatt, P Mease, E Mysler, T Takeuchi, E Drescher, A Berman, M Zilberstein, J Xing and P Emery: A Phase IIb Study Of The Efficacy and Safety Of Subcutaneous Clazakizumab (anti-IL-6 monoclonal antibody) With Or Without Methotrexate In Adults With Moderate-To-Severe Active Rheumatoid Arthritis and An Inadequate Response To Methotrexate. San Diego, USA. 2013.10.28
  24. Keiko Yoshimoto, Maiko Tanaka, Masako Kojima, Hideko Ogata, Eriko Ishioka, Ayumi Nishikawa, Katsuya Suzuki, Hideto Kameda, Tohru Abe and Tsutomu Takeuchi: Increased Expression of BAFF Receptor On Monocytes Is a Contributory Factor of Hypergammaglobulinemia in Patients With Primary Sjögren's Syndrome. San Diego, USA. 2013.10.29
  25. Keiko Yoshimoto, Maiko Tanaka, Masako Kojima, Hideko Ogata, Eriko Ishioka, Ayumi Nishikawa, Katsuya Suzuki, Hideto Kameda, Tohru Abe and Tsutomu Takeuchi: BAFF Induces Production of Matrix Metalloproteinase-9 By Peripheral Monocytes in Patients With Primary Sjögren's Syndrome Through a Signaling Pathway That Involves NF- $\kappa$ B and PI3 Kinase. San Diego, USA. 2013.10.29
  26. Yuko Kaneko, Hironari Hanaoka, Michito Hirakata, Tsutomu Takeuchi and Masataka Kuwana: Distinct Arthropathies In Patients With Anti-Aminoacyl tRNA Synthetase Antibodies: Utility Of Autoantibody Profiles In Discrimination. San Diego, USA.



- 2013.10.29
27. Tsutomu Takeuchi, Kazuhiko Yamamoto, Hisashi Yamanaka, Naoki Ishiguro, Yoshiya Tanaka, Katsumi Eguchi, Akira Watanabe, Hideki Origasa, Mariko Kobayashi, Toshiharu Shoji, Nobuyuki Miyasaka and Takao Koike: Post-Hoc Analysis Showing Better Clinical Response With The Loading Dose Of Certolizumab Pegol In Japanese Patients With Active Rheumatoid Arthritis. San Diego, USA. 2013.10.29
28. Yoshiya Tanaka, Kazuhiko Yamamoto, Tsutomu Takeuchi, Hisashi Yamanaka, Naoki Ishiguro, Katsumi Eguchi, Akira Watanabe, Hideki Origasa, Tadao Okamoto, Yumiko Wada, Toshiharu Shoji, Nobuyuki Miyasaka and Takao Koike: Comprehensive Disease Remission Achieved By Certolizumab Pegol Treatment, and Factors Associated With Certolizumab Pegol Comprehensive Disease Remission, In Rheumatoid Arthritis Patients With Predominantly High Disease Activity. San Diego, USA. 2013.10.29
29. Yoshiya Tanaka, Yasuhiko Shinmura, Ryo Nakajima, Takahiro Muramatsu, Shuichi Komatsu, Tadamichi Kubo, Aki Kuroki, Ataru Igarashi, Toshiro Tango and Tsutomu Takeuchi: Economic Impact Of Adalimumab Treatment In Japanese Patients With Rheumatoid Arthritis: Analysis Of 24 Weeks Data From The Anouveau Study. San Diego, USA. 2013.10.29
30. Masako Tsukamoto, Katsuya Suzuki, Keiko Yoshimoto, Hideto Kameda and Tsutomu Takeuchi: Pleiotropic Roles Of Fc $\gamma$  Receptors Upregulated On Circulating Monocytes In Rheumatoid Arthritis Patients. San Diego, USA. 2013.10.29
31. Masataka Kuwana, Yuichiro Shirai, Hidekata Yasuoka, Tsutomu Takeuchi and Kenichi Masui: Utility Of Autoantibody Testing For Predicting Risk Of Pulmonary Arterial Hypertension: A Retrospective Analysis In Routine Autoantibody Laboratory. San Diego, USA. 2013.10.29
32. Yoshiya Tanaka, Hisashi Yamanaka, Naoki Ishiguro, Nobuyuki Miyasaka, Katsuyoshi Kawana, Tadamichi Kubo, Aki Kuroki and Tsutomu Takeuchi: Clinical Remission After 52 Weeks Of Treatment Is a Predictor Of Adalimumab-Free Disease Control In Patients With Early Rheumatoid Arthritis: HOPEFUL 2 Study. San Diego, USA. 2013.10.29
33. Tsutomu Takeuchi, Yoshiya Tanaka, Naoki Ishiguro, Hisashi Yamanaka, Toshiyuki Yoneda, Harry K. Genant and Désirée van der Heijde: Dose-Response Effects Of Denosumab, a Novel Subcutaneous RANKL Inhibitor, On The Progression Of Bone Erosion In Japanese Patients With Rheumatoid Arthritis Treated With Methotrexate: Results Of Phase II DRIVE Study—A Twelve Month Placebo Controlled, Randomized, Double Blind Study. San Diego, USA. 2013.10.30

#### 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

## ROR $\gamma$ 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))

研究協力者 近藤 裕也、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<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、T helper 17 細胞(Th-17)分化を決定する転写因子 ROR $\gamma$ t を T 細胞でのみ過剰発現した ROR $\gamma$ t トランスジェニックマウス(ROR $\gamma$ 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 $\gamma$ 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 $\gamma$ t Tg マウスにおいて IL-17 産生の有意な亢進および ROR $\gamma$ t の発現の亢進が認められた。ROR $\gamma$ t Tg マウスにおける ROR $\gamma$ t 発現亢進は、Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞(Foxp3<sup>+</sup>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。また Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞の細胞増殖抑制能は、WT と ROR $\gamma$ t Tg マウス間に有意な差は認められなかった。WT に対して ROR $\gamma$ 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 $\gamma$ t Tg マウス由来のリンパ節細胞の移入による関節炎の減弱が確認され、ROR $\gamma$ 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。

以上から ROR $\gamma$ 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 $\gamma$ 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し、ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞が関与する可能性が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 $\gamma$ 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<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

1) ROR $\gamma$ t を T 細胞においてのみ過剰発現させた ROR

$\gamma$ t トランスジェニックマウス(ROR $\gamma$ 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 $\gamma$ 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) WT Foxp3<sup>GFP</sup> reporter マウスおよび ROR $\gamma$ t Tg Foxp3<sup>GFP</sup> reporter マウスから CD4<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>(=Foxp3<sup>+</sup>)細胞を sorting し、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>GFP<sup>-</sup>細胞を effector T 細胞に対する細胞増殖抑制能を in vitro で評価した。
- 6) CII 投与後の WT もしくは ROR $\gamma$ 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 $\gamma$ 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 $\gamma$ 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 $\gamma$ 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<sup>+</sup>細胞における ROR $\gamma$ t の発現は、WT と比較して ROR $\gamma$ 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<sup>+</sup>T 細胞における Foxp3 発現は、WT、ROR $\gamma$ t Tg マウス間で有意な差は認めなかったが、ROR $\gamma$ t Tg 由来の Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>細胞においては WT と比較して ROR $\gamma$ t および CCR6 の発現が有意に亢進していた。
- 5) WT Foxp3<sup>GFP</sup> reporter マウス、ROR $\gamma$ t Tg Foxp3<sup>GFP</sup> reporter マウスから分離した CD4<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>(=Foxp3<sup>+</sup>)細胞の effector T 細胞に対する細胞増殖抑制能は、WT、

ROR $\gamma$ t Tg マウス間で有意な差は認められなかった。

- 6) ROR $\gamma$ 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、関節炎の重症度が有意に低下した。

## D. 考察

ROR $\gamma$ t Tg マウス由来の所属リンパ節細胞の in vitro における解析から 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、また ROR $\gamma$ t Tg マウスのリンパ節細胞の移入によって WT の関節炎が抑制されたことから、ROR $\gamma$ t Tg には関節炎に対する抑制性の細胞成分が存在すると考えられた。ROR $\gamma$ t Tg マウスでは、Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞において ROR $\gamma$ t の有意な亢進が認められたが、細胞増殖能は保たれていることが明らかになった。また ROR $\gamma$ t Tg マウスの Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞において CCR6 の発現亢進が認められたことから、これらが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た。

## E. 結論

T 細胞における ROR $\gamma$ 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. Gazal S, Sacre K, Allanore Y, Teruel M, Goodall AH, Tohma S, Alfredsson L, Okada Y, Xie G, Constantin A, Balsa A, Kawasaki A, Nicaise P, Amos C, Rodriguez-Rodriguez L, Chiocchia G, Boileau C, Zhang J, Vittecoq O, Barnetche T, Gonzalez-Gay MA,

- Furukawa H, Cantagrel A, Le Loet X, Sumida T, Hurtado-Nedelec M, Richez C, Chollet-Martin S, Schaefferbeke T, Combe B, Khoryati L, Coustet B, El-Benna J, Siminovitch K, Plenge R, Padyukov L, Martin J, Tsuchiya N, Dieud P.: Validation of EULAR primary Sjogren's Syndrome disease activity and patient indexes. Ann Rheum Dis (in press)
2. Yoon J, Sudo K, Han J, Chae M, Park S, Weinstein M, Nakae S, Yamashita T, Lee , Sumida T, Kuroda M, Mamura M.: Smad2 is the TGF- $\beta$  receptor-regulated Smad to suppress the immunogenicity of mouse and human dendritic cells. Eur J Immunol (in press)
3. Yoon JH, Jung SM, Park SH, Kato M, Yamashita T, Lee IK, Sudo K, Nakae S, Han JS, Kim OH, Oh BC, Sumida T, Kuroda M, Ju JH, Jung KC, Park SH, Kim DK, Mamura M. :Activin receptor-like kinase5 inhibition suppresses mouse melanoma by ubiquitin degradation of Smad4, thereby derepressing eomesodermin in cytotoxic T lymphocytes. EMBO Mol Med 5(11):1720-39,2013
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 172(1):44-53,2013
5. 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 23(4):782-7,2013

## 2. 学会発表

1. 近藤裕也、住田孝之他:転写因子 ROR $\gamma$ t 高発現による自己免疫性関節炎制御機構の解析 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2013 年
2. Kondo Y, Sumida T, et al. Overexpression of ROR $\gamma$ t in T cells suppresses collagen induced arthritis The 5<sup>th</sup> East Asian Group of Rheumatology, 2013

## 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 (CIA)

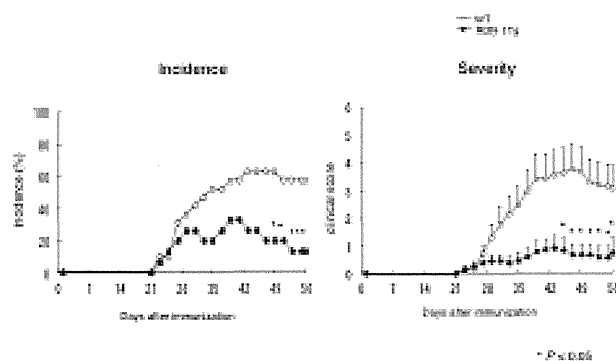


図2 関節の組織学的評価

