

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- α 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.
 25. Yamanaka H, Ishiguro N, Takeuchi T, Miyasaka N, Mukai M, Matsubara T, Uchida S, Akama H, Kupper H, Arora V, and Tanaka Y. Recovery of clinical but not radiographic outcomes by the delayed addition of adalimumab to methotrexate-treated Japanese patients with early rheumatoid arthritis: 52-week results of the HOPEFUL-1 trial. *Rheumatology* in press.
 26. 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 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.
 27. 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.
 28. 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.
29. 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.
 30. 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.
 31. Takeuchi T and Kameda H. What is the future of CCR5 antagonists? *Arthritis Research and Therapy* 14: R11, 2012.
 32. Takeuchi T, Suzuki K, Kondo T, Yoshimoto K, and Tsuzaka K. CD3 z defects in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 71:i78–i81, 2012.
 33. Koike T, Harigai M, Inokuma S, Ishiguro N, Ryu J, Takeuchi T, Takei S, Tanaka Y, Ito K, and Yamanaka H. Postmarketing surveillance of tocilizumab for Rheumatoid Arthritis in Japan—Interim analysis of 3881 patients. *Ann Rheum Dis*, 70:2148–51, 2011.
 34. Haraoui B, Smolen JS, Aletaha D, Breedveld FC, Burmester G, Codreanu C, Da Silva JP, de Wit M, Dougados M, Durez P, Emery P, Fonseca JE, Gibfsky A, Gomez-Reino J, Graninger W, Hamuryudan V, Jannaut Peya MJ, Kalden J, Kvien TK, Laurindo I, Martin-Mola E, Montecucco C, Moreno PS, Pavelka K, Poor G, Cardiel MH, Stanislawski-Biernat E, Takeuchi T, van der Heijde D, and the Treat to Target Taskforce. Treating Rheumatoid Arthritis to Target: multinational recommendatios assessment questionnaire. *Ann Rheum Dis*, 70:1999–2002, 2011.
 35. 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.
 36. Nishi E, Kameda H, Ogawa H, Nagasawa H, Takei H, Okuyama A, Kurasawa T, Kondo T, Nishimura K, Shirai Y, Sakai R, Ito T, Takeuchi T, and Amano K. Efficacy of weekly mizoribine pulse therapy in refractory lupus nephritis. *Mod Rheum* in press.
 37. 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.
 38. Suzuki K, Kameda H, Amano K, Nagasawa H, Takeii H, Nishi E, Okuyama A, Tsuzaka K, and Takeuchi T. Single center prospective study of tacrolimus efficacy and safety in the treatment of various manifestations in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology Int*, 31:757–63, 2011.
 39. Yamanaka H, Tanaka Y, Inoue E, Hoshi D, Momohara S, Hanami K, Yunoue N, Saito K, Amano K, Kameda H, and Takeuchi T. Efficacy of tocilizumab for rheumatoid arthritis patients in daily practice in Japan –message from REACTION study. *Modern Rheum*, 21:122–33, 2011.
 40. Okuyama A, Nagasawa H, Suzuki K, Kameda H, Kondo H, Amano K, and Takeuchi T. Fc gamma receptor IIIb polymorphism and usage of glucocorticoids at baseline are associated with infusion reactions to infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 70:299–304, 2011.
 41. Takeuchi T, Miyasaka N, Tatsuki Y, Yano T, Yoshinari T, Abe T, and Koike T. Baseline tumor necrosis factor

- alpha levels predict the necessity for dose escalation of infliximab therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 70:1208–15, 2011.
42. Kameda H, Kanbe K, Sato E, Ueki Y, Saito K, Nagaoka S, Hidaka T, Atsumi T, Tsukano M, Kasama T, Shiozawa S, Tanaka Y, Yamanaka H, and Takeuchi T. Continuation of Methotrexate resulted in better clinical and radiographic outcomes than discontinuation upon starting etanercept in patients with Rheumatoid Arthritis: 52-Week results from the JESMR Study. *J Rheum*, 38:1581–92, 2011.
 43. Kaneko Y, Kuwana M, Kameda H, and Takeuchi T. Sensitivity and Specificity of 2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria. *Rheumatology*, 50:1268–74, 2011.
 44. Komano Y, Tanaka M, Nanki T, Koike R, Sakai R, Kameda H, Nakajima A, Saito K, Takeno M, Atsumi T, Tohma S, Ito S, Tamura N, Fujii T, Sawada T, Ida H, Hashiramoto A, Koike T, Ishigatsubo Y, Eguchi K, Tanaka Y, Takeuchi T, Miyasana N, and Harigai M. Incidence and risk factors for serious infection in rheumatoid arthritis patients treated with tumor necrosis factor (TNF) inhibitors: a report from the registry of Japanese Rheumatoid Arthritis Patients for Long-Term Safety. *J Rheum*, 38:1258–64, 2011.
 45. Suzuki K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Tsuzaka K, Abe T, and Takeuchi T. Decreased mRNA expression of two Foxp3 isoforms in peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Int J Immunopathol and Pharmacology*, 24:7–14, 2011.
 46. Hashimoto J, Garnero P, van der Heijde, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, and Yoshikawa H, and Nishimoto N. Humanized anti-interleukin 6 receptor antibody (tocilizumab) monotherapy is more effective in slowing radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis at high baseline risk for structural damage evaluated with levels of biomarkers, radiography, and BMI: data from the SAMURAI study. *Modern Rheum* 21:10–15, 2011.
 47. Takeuchi T, Tanaka Y, Amano K, Hoshi D, Nawata M, Nagasawa H, Satoh E, Saitao K, Kaneko Y, Fukuyo S, Kurasawa T, Hanami K, Kameda H, and Yamanaka H. Clinical, radiographic, and functional effectiveness of tocilizumab for rheumatoid arthritis patients – REACTION-52 weeks study. *Rheumatology*, 50:1908–15, 2011.
 48. Takeuchi T. Revolutionary change in rheumatoid arthritis management with biological therapy. *Keio J Med*, 60:75–81, 2011.
 49. Koike T, Harigai M, Inokuma S, Ishiguro N, Ryu J, Takeuchi T, Tanaka Y, Yamanaka H, Fujii K, Fruendlich B, and Suzukawa M. Postmarketing surveillance of safety and effectiveness of etanercept in Japanese patients with Rheumatoid Arthritis. *Mod Rheum* 21:343–351, 2011.
 50. Yoshimoto K, Tanaka M, Kojima M, Setoyama Y, Kameda H, Suzuki K, Tsuzaka K, Ogawa Y, Tsubota K, Abe T, and Takeuchi T. Regulatory mechanism of BAFF and IL-6 are impaired in monocytes of patients of primary Sjogren’s syndrome. *Arthritis Research and Therapy* 13:R170, 2011.
 51. Kawai S, Takeuchi T, Yamamoto K, Tanaka Y, and Miyasaka N. Efficacy and safety of additional use of tacrolimus in patients with early rheumatoid arthritis patients with inadequate response to DMARDs – a multi-center, double blind, parallel-group trial. *Mod Rheum* 21:458–468, 2011.
 52. Kameda H, Tokuda H, Sakai F, Johkoh T, Mori S, Yoshida Y, Takayanagi N, Takai H, Hasegawa Y, Hatta K, Yamanaka H, Dohi M, Hashimoto S, Yamada H, Kawai S, Takeuchi T, Tateda K, and Goto H. Clinical and radiological features of acute-onset diffuse interstitial lung diseases in patients with

rheumatoid arthritis receiving treatment with biological agents: Importance of pneumocystis pneumonia in Japan revealed by a multicenter study. Intern Med 50:305–313, 2011.

2.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. Yaguramaki, 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, Shigeko 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- κ B and PI3 Kinase. San Diego, USA. 2013.10.29
 26. Yuko Kaneko, Hironari Hanaoka, Michito Hirakata, Tsutomu Takeuchi and Masa-taka 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 γ 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
34. Tsutomu Takeuchi . Japanese PMS: Safety and efficacy from large population. 8th International congress on Autoimmunity. Granada, Spain. 2012.5.11
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. 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

3. その他

なし

CD4⁺T 細胞分化のマスター転写因子の自己免疫性関節炎発症に与える影響に関する研究

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⁺ T 細胞の分化制御機構を明らかにすることを目的として、Th-1 分化を決定する転写因子 T-bet および T 細胞でのみ過剰発現した T-bet トランスジェニックマウス(T-bet Tg)に対してコラーゲン誘導関節炎(collagen induced arthritis; CIA)を誘導したところ、T-bet Tg では野生型(WT)と比較して関節炎の発症率、重症度の有意な減少が認められ、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、T-bet Tg において IL-17 産生の有意な抑制が認められ、T-bet の発現亢進と Th-17 分化に重要な転写因子である ROR γ t の発現抑制が認められた。以上から T-bet は、ROR γ t 発現を抑制することにより IL-17 産生が抑制したと考えられた。次に 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。ROR γ t Tg マウスにおいて Foxp3⁺CD4⁺T 細胞(Foxp3⁺制御性 T 細胞)における ROR γ t の発現亢進を認め、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⁺制御性 T 細胞の細胞増殖抑制能は、WT と ROR γ 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 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の移入による関節炎の減弱が確認され、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。

以上から、CD4⁺ T 細胞の分化を決定する各マスター転写因子の発現は、自己免疫性関節炎の発症とこれに伴う関節破壊に多大な影響を及ぼすこと等が明らかになった。

A.研究目的

RA の疾患モデルである CIA を用いて CD4⁺ T 細胞の分化を決定するマスター転写因子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

T-bet Tg の検討

- 1) 野生型(WT)および T-bet Tg に対して CIA を誘導し、臨床像を比較検討した。
- 2) 抗原反応性 T 細胞のサイトカイン産生、転写因子発現を評価するために CII 投与後のマウスからリンパ節を採取し、in vitro で抗原である CII とともに培養し、ELISA による培養上清中のサイトカイン量の測定、培養後の細胞を回収して FACS によるサイトカイン、転写因子発

現の評価を行った。

- 3) 各マウスから分離した CD4⁺ T 細胞、CD11c⁺ 樹状細胞の criss-cross co-culture によって抗原反応性 T 細胞のサイトカイン産生、転写因子発現を評価した。
- 4) T 細胞分化に対する T-bet 過剰発現の影響を解析するために、WT、T-bet Tg の脾臓 naïve CD4⁺ T 細胞を MACS を用いて分離し、in vitro で T 細胞分化を誘導して、サイトカイン産生パターン、転写因子発現について FACS により解析した。

ROR γ t Tg の検討

- 1) WT および ROR γ t Tg に対して CIA を誘導し、臨床像を比較検討した。
- 2) 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。
- 3) 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。
- 4) WT Foxp3^{GFP} reporter マウスおよび ROR γ t Tg Foxp3^{GFP} reporter マウスから CD4⁺GFP⁺(=Foxp3⁺)細胞を sorting し、CD4⁺CD25⁻GFP⁻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。
- 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

T-bet Tg の検討

- 1) T-bet Tg では WT と比較して CIA の発症率、重症度について有意な減少が認められ(図1)、関節の病理学的評価においても炎症、関節破壊は T-bet Tg で有意に抑制されていた。
- 2) CII 反応性 T 細胞のサイトカイン産生は、T-bet Tg において IL-17 産生の有意な抑制が認められたが、IFN γ は WT と T-bet Tg の間で特に差は認められなかった。抗原反応性の転写因子発現については、T-bet Tg において T-bet の発現亢進と Th-17 分化に重要な転写因子である ROR γ t の発現抑制が認められた。

- 3) criss-cross co-culture では、T-bet Tg 由来の CD4⁺ T 細胞は WT、T-bet Tg のいずれの CD11c⁺樹状細胞を使用した場合であっても、WT 由来の CD4⁺ T 細胞を用いた場合と比較して IL-17 産生および ROR γ t 発現の有意な抑制が認められた(図2)。
- 4) 脾臓 CD4⁺ T 細胞を用いた in vitro での Th-17 分化誘導実験においては、T-bet Tg 由来の CD4⁺ T 細胞では WT と比較して IL-17⁺ 細胞の減少と IFN γ ⁺ 細胞の増加が認められた。また T-bet Tg 由来の CD4⁺ T 細胞では Th-17 分化誘導条件においても T-bet⁺ 細胞の増加と ROR γ t⁺ 細胞の減少が認められ、ROR γ t⁺ 細胞からの IL-17 産生の低下が認められた。

ROR γ t Tg の検討

- 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3)。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4)。
- 2) 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。
- 3) 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。

- 4) WT Foxp3^{GFP} reporter マウス、ROR γ t Tg Foxp3^{GFP} reporter マウスから分離した CD4⁺GFP⁺(=Foxp3⁺)細胞の effector T 細胞に対する細胞増殖抑制能は、WT、ROR γ t Tg マウス間で有意な差は認められなかった。
- 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、関節炎の重症度が有意に低下した。

D. 考察

T-bet Tg に対して CIA を誘導した場合に WT と比較して関節炎の有意な抑制が認められた。in vitro での抗原反応性のサイトカイン産生、転写因子発現の評価および Th-17 細胞の分化誘導実験では、T-bet Tg において IL-17 産生の低下および ROR γ t 発現の抑制が認められ、抗原特異的な Th-17 分化が抑制されていることが示された。T-bet による関節炎原生の Th-17 分化の抑制が関節炎の発症抑制に結び付いていると考えられた。

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 γ 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 γ 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 γ t Tg マウスでは、Foxp3⁺制御性 T 細胞において ROR γ 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 γ t Tg マウスの Foxp3⁺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

CD4⁺ T 細胞の分化を決定する各マスター転写因子の発現は、自己免疫性関節炎の発症とこれに伴う関節破壊に

多大な影響を及ぼすこと等が明らかになった。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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
2. Horikoshi M, Goto D, Segawa S, Yoshiga Y, Iwanami K, Inoue A, Tanaka Y, 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
3. Inoue A, Matsumoto I, Tanaka Y, Umeda N, Tanaka Y, Mihara M, Takahashi S, Sumida T.: Murine tumor necrosis factor α -induced adipose-related protein (tumor necrosis factor α -induced protein 9) deficiency leads to arthritis via interleukin-6 overproduction with enhanced NF- κ B, STAT-3 signaling, and dysregulated apoptosis of macrophages. Arthritis Rheum 64(12):3877-85,2012
4. 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(1):162-72,2012
5. Yoshiga Y, Goto D, Segawa S, Horikoshi M, Hayashi T, Matsumoto I, Ito S, Taniguchi S, Sumida T.: Activation

of natural killer T cells by α -carba-GalCer (RCAI-56), a novel synthetic glycolipid ligand, suppresses murine collagen-induced arthritis. Clin Exp Immunol 164(2):236-47,2011

2. 学会発表

1. Kondo Y, Sumida T, et al. Overexpression of T-Bet Gene Regulates Collagen Induced Arthritis Via IFN γ Independent Suppression of IL-6 Signal Transduction. 2011 ANNUAL SCIENTIFIC MEETING on the American College of Rheumatology, 2011
2. 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
3. Kondo Y, Sumida T, et al. Overexpression of ROR γ t in T cells suppresses collagen induced arthritis The 5th 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2. criss-cross co-culture

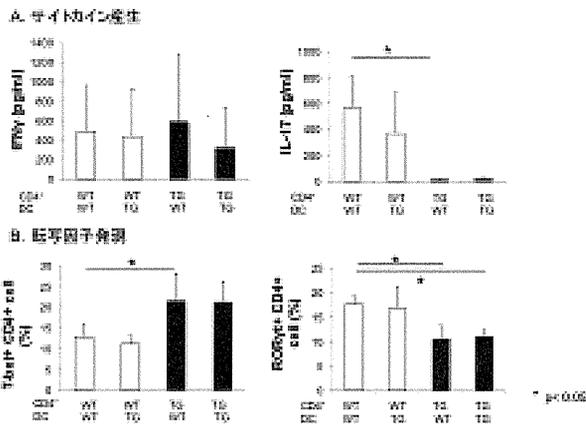


図3 ROR γ t TgにおけるCIA

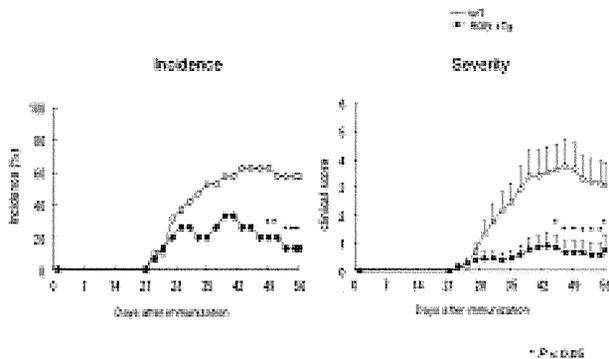


図4 関節の組織学的評価

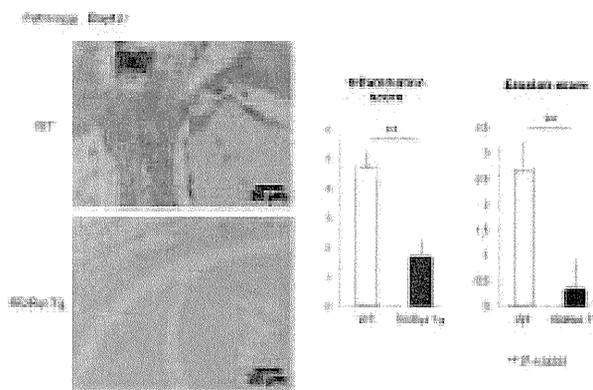
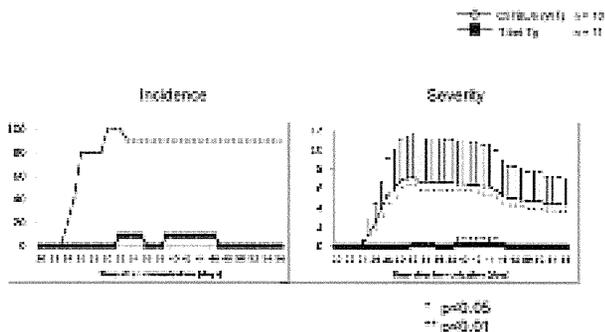


図1 T-bet TgにおけるCIA



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

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

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

研究要旨

抗環状シトルリン化ペプチド抗体(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。native 蛋白に対する抗体と未知のシトルリン化蛋白に対する抗体の両方をスクリーニングした。多くの native 蛋白に対する抗体は健常人でも認められることが判明。健常人コントロールにおいて再検索し、14 個の未知のシトルリン化蛋白が候補対応抗原としてあがり、そのうち 2 個が頻度は少ないながら新規自己抗体として明らかになった。

A.研究目的

抗環状シトルリン化ペプチド抗体(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 での陽性率は 50%程度にすぎず、診断・治療の遅れから関節破壊の進行をまねく。本研究では抗 CCP 抗体陰性 RA の診断に有用な新規自己抗体を検索する。

B.研究方法

まず、一般に抗 CCP 抗体陰性 RA は骨破壊が少ないと考えられがちであることから、最重症型 RA である全身性ムチランス型 RA 患者における抗 CCP 抗体の陽性率を調査した。

自己抗体のスクリーニングには AlphaScreen 法を用いた。AlphaScreen 法は愛媛大学無細胞生命科学工学研究センターにて開発された無細胞合成蛋白質アレイによる自己抗体検索スクリーニング法であり、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。

最初は抗 CCP 抗体陰性かつ RF 陰性で X 線上典型的な骨破壊像を認める RA 患者血清 8 検体を用いて小規模の native 蛋白(243 蛋白)に対する自己抗体のスクリーニングを行った。次に 2181 種類のビオチン化蛋白ライブラリーにて、3 例の抗 CCP 陰性 RA、4 例の抗 CCP 抗体陽性 RA、3 例の健常人の血清を用いて、native 蛋白、シトルリン化蛋白に対する自己抗体をスクリーニングした。

(倫理面への配慮)

患者血清を用いる場合、個人情報かわからないようにするため、匿名符号を用いて実験および解析をした。

C.研究結果

表1. 全身性ムチランス型 RA 38 例の抗 CCP 抗体価

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

まず、全身性ムチランス型 RA 患者の抗 CCP 抗体価を測定したところ、38 例中 3 例 (7.9%) は陰性、2 例は弱陽性 (5.3%) であった。抗 CCP 抗体陰性 RA でも severe な骨破壊をきたすことを示している。

次に、243 種の native 蛋白 (予備実験において RA 血清に反応することがわかっている) を用いて AlphaScreen にて 8 人の抗 CCP 抗体陰性 RA 血清中の自己抗体を検索し 6 蛋白が候補として上がった。しかしながら、ELISA の系を組み、健常人、SLE 患者、抗 CCP 抗体陽性 RA で反応性を確認すると、いずれも健常人にも反応する抗体であることが判明した。ABCF1、RPL29 の結果を図 1 に示す。

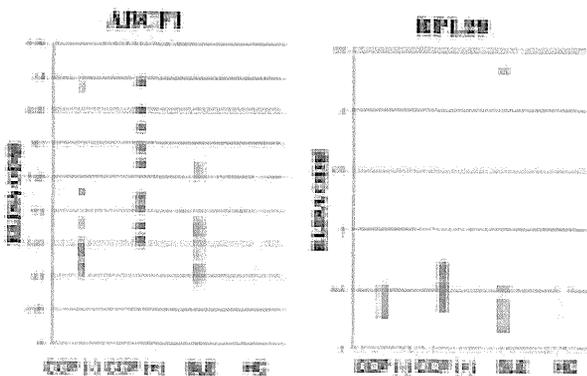


図1. RA, SLE, 健常人における ABCF1, RPL29 に対する抗体価。抗 CCP 抗体陰性 RA (CCP(-))、抗 CCP 抗体陽性 RA (CCP(+))、SLE、健常人(HC)各 10 名の血清中の抗 ABCF1 抗体、抗 RPL29 抗体価を ELISA 法にて測定した。

このことは、逆に健常人の自己抗体を detect できるほど AlphaScreen 法の感度が非常に高いことを示すと同時に、コントロールとして健常人血清をおくことの重要性を表している。

そこで、次の実験では比較的関節破壊の強い 3 例の抗 CCP 抗体陰性 RA 患者血清と、対照として 4 例の抗 CCP 抗体陽性 RA および 3 例の健常人血清を用いて、2181 種類のビオチン化蛋白ライブラリーにて AlphaScreen を行った。この際、native 蛋白に対する反応をみるのと同時に、未知のシトルリン化蛋白に対する自己抗体のスクリーニングを行った。シトルリン化蛋白のライブラリーは 2181 種類のビオチン化蛋白ライブラリーを一斉に PAD もちいて、シトルリン化することで得られた。ここでは未知のシトルリン化蛋白に対する抗体の結果を示す。

実験ごとに AlphaScreen の OD 値のベースが多少異なるため、実験毎で各血清に対応する mock (20 well 以上) の OD 値を基に mean + 3SD を cut-off 値として設定した。抗 CCP 抗体陽性 RA 血清では明らかにシトルリン化蛋白に対する反応が強く、抗 CCP 抗体陽性 RA 血清 (4 検体) で陽性となったシトルリン化蛋白の数は 2181 蛋白中 186 個、それに対して、抗 CCP 抗体陰性 RA 血清 (3 検体) では陽性となったシトルリン化蛋白の数は 2181 蛋白中 14 個のみであり、健常人血清 (3 検体) では陽性となったシトルリン化蛋白の数は 2181 蛋白中 9 個であった (表 2)。

表 2 2181 個のシトルリン化蛋白中、自己抗体が検出された蛋白数

検体(血清)	陽性蛋白数
抗 CCP 抗体(+)RA	186
抗 CCP 抗体(-)RA	14
健常人	9

抗 CCP 抗体陰性 RA 血清で比較的高い OD 値を示し、健常人血清では陰性であった候補タンパクを 3 つ選び validation study を行った。まずは Western blot によりシトルリン化候補タンパクに対する自己抗体であることを確認した。蛋白③に対する反応を図 2 に示す。

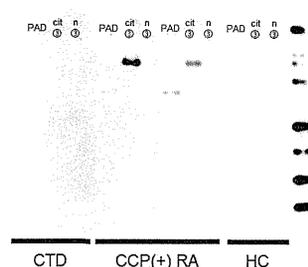


図2 シトルリン化候補タンパク③に対する自己抗体

候補タンパク③とそのシトルリン化したタンパク、またシトルリン化した際に用いた酵素の PAD を電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写したのち、抗 CCP 抗体陽性患者血清 2 検体、膠原病患者血清 1 検体(CTD)、健常人血清 1 検体(HC)と反応させ、Western Blot を行った。native 蛋白のバンドはないが、シトルリン化蛋白に対するバンドが強く認められる。抗 CCP 抗体(+)RA 患者血清は PAD に対する抗体も弱く認められている。

さらに、抗 CCP 抗体(-)RA 血清のうち 1 検体でも高い OD 値を示し、健常人では陰性であった蛋白を 3 個選び、ELISA 法にて抗 CCP 抗体(+)RA 患者 30 例、抗 CCP 抗体(-)RA 患者 30 例、他の膠原病患者 22 例、健常人 20 例を用いて、非シトルリン化蛋白およびシトルリン化蛋白に対する陽性率を検討した。蛋白①に対する結果を図 3 と図 4 に示す。

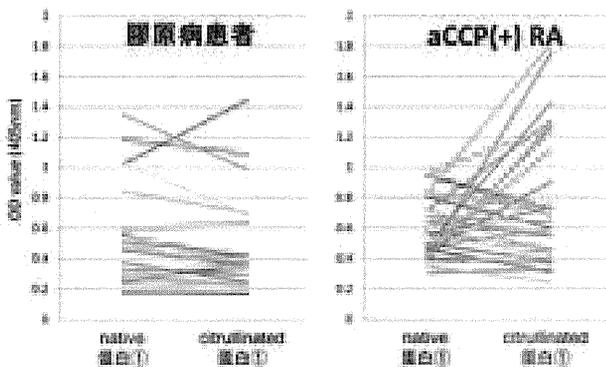


図3 native およびシトルリン化蛋白①に対する抗体価
膠原病患者 22 例、抗 CCP 抗体(+)RA 患者 30 例の native 蛋白①とそのシトルリン化した蛋白①に対する抗体価を OD 値で示し、同じ患者血清を直線で結んだ。

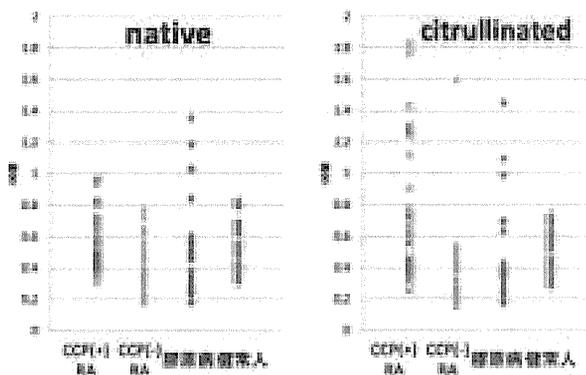


図4 各疾患、健常人での抗蛋白①抗体価

抗 CCP 抗体(+)RA 患者 30 例、抗 CCP 抗体(-)RA 患者 30 例、他の膠原病患者 22 例、健常人 20 例の native 蛋白①とそのシトルリン化した蛋白①に対する抗体価を OD 値で示す。

図 3 より膠原病患者の陽性例は主に native 蛋白に対する抗体で、RA 患者陽性例はシトルリン化蛋白に対する抗体であることがわかる。図 4 で抗 CCP 抗体(-)RA 患者 30 例中 1 例に抗シトルリン化蛋白①抗体が認められたため、スクリーニングに用いた血清 3 例を加えると 33 例中 2 例で陽性ということになる。

同様に蛋白②、蛋白③とそのシトルリン化した蛋白に対する自己抗体価を ELISA で確認した。シトルリン化蛋白②に対する自己抗体は抗 CCP 抗体陰性 RA 30 例中 1 例に認められたが、これは native 蛋白に対する抗体であった。シトルリン化蛋白③に対する抗体は 30 例の抗 CCP 抗体(-)RA 患者血清中には認められなかった。

D. 考察

AlphaScreen 法にて抗 CCP 抗体陰性 RA にみられる自己抗体を検索した。健常人にみられた陽性シグナルが Western Blot (data not shown) や ELISA (図 1) にても確認できたことは AlphaScreen 法が高い感度を有していることを表している。AlphaScreen 法の利点を列記すると

1. 同時に多数の自己抗体をスクリーニングできる
2. 他のスクリーニング方法と異なり、陽性シグナルを示す蛋白が既知であるため、蛋白同定の手間が必要ない
3. 同時に蛋白の翻訳後修飾を行うことができる

となるが、特に 3 の特徴を生かして一斉に蛋白シトルリン化をすることで、未知のシトルリン化蛋白抗体をスクリーニングすることができた。この方法の有効性が表 2 に示す通り、抗 CCP 抗体陽性 RA 患者血清で多くのシトルリン化蛋白抗体を検出したことから理解できる。抗 CCP 抗体陰性 RA 患者血清に反応するシトルリン化蛋白は少ないが存在し(図 4)、

蛋白①のように33例中2例であっても、同様の蛋白を複数見つけ組み合わせることで、抗CCP抗体陰性RA中の抗シトルリン化蛋白抗体をみつけ、診断能の向上が期待できる。今回はスクリーニング後の validation として3蛋白しか検討できていないため、今後さらに確認作業を行うことで、診断に有用な自己抗体を見つけることができると考えらる。

E. 結論

AlphaScreen 法を用いて関節破壊の強い抗CCP抗体陰性RA患者の自己抗体をスクリーニングし、これまでに2つ未知のシトルリン化蛋白抗体を発見した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Terao C, Yamada R, Ohmura K, Takahashi M, Kawaguchi T, Kochi Y, Human Disease Genomics Working Group, RA Clinical and Genetic Study Consortium, Okada Y, Nakamura Y, Yamamoto K, Melchers I, Lathrop M, Mimori T, Matsuda F: The human AIRE gene at chromosome 21q22 is a genetic determinant for the predisposition to rheumatoid arthritis in Japanese population. *Hum Mol Genet.* 20(13):2680–2685, 2011.
- 2) Terao C, Ohmura K, Katayama M, Takahashi M, Kokubo M, Diop G, Toda Y, Yamamoto N; Human Disease Genomics Working Group; Rheumatoid Arthritis (RA) Clinical and Genetic Study Consortium, Shinkura R, Shimizu M, Gut I, Heath S, Melchers I, Manabe T, Lathrop M, Mimori T, Yamada R, Matsuda F. Myelin basic protein as a novel genetic risk factor in rheumatoid arthritis—a genome-wide study combined with immunological analyses. *PLoS One.* 6: e20457, 2011.
- 3) Terao C, Ohmura K, Kochi Y, Ikari K, Maruya E, Katayama M, Shimada K, Murasawa A, Honjo S, Takasugi K, Matsuo K, Tajima K, Suzuki A, Yamamoto K, Momohara S, Yamanaka H, Yamada R, Saji H, Matsuda F, Mimori T. A large-scale association study identified multiple HLA-DRB1 alleles associated with ACPA-negative rheumatoid arthritis in Japanese subjects. *Ann Rheum Dis.* 70: 2134–2139, 2011.
- 4) Iguchi-Hashimoto M, Usui T, Yoshifuji H, Shimizu M, Kobayashi S, Ito Y, Murakami K, Shiomi A, Yukawa N, Kawabata D, Nojima T, Ohmura K, Fujii T, Mimori T: Overexpression of minimal domain of calpastatin suppresses IL-6 production and Th17 development via reduced NF- κ B and increased STAT5 signals. *PLoS ONE* 6(10):e27020, 2011.
- 5) Yukawa N, Fujii T, Kondo-Ishikawa S, Yoshifuji H, Kawabata D, Nojima T, Ohmura K, Usui T, Mimori T. Correlation of antinuclear antibody and anti-double-stranded DNA antibody with clinical response to infliximab in patients with rheumatoid arthritis: a retrospective clinical study. *Arthritis Res Ther.* 13(6):R213, 2011.
- 6) Murakami K, Tanaka M, Usui T, Kawabata D, Shiomi A, Iguchi-Hashimoto M, Shimizu M, Yukawa N, Yoshifuji H, Ohmura K, Fujii T, Mimori T: Follistatin-related protein/ follistatin-like 1 evokes an innate immune response via CD14 and toll-like receptor 4. *FEBS Lett.* 586(4):319–324, 2012.
- 7) Terao C, Ikari K, Ohmura K, Suzuki T, Iwamoto T, Takasugi K, Saji H, Taniguchi A, Momohara S, Yamanaka H, Matsuda F, Mimori T: Quantitative effect of HLA-DRB1 alleles to ACPA levels in Japanese rheumatoid arthritis: no strong genetic impact of shared epitope to ACPA levels after stratification of HLA-DRB1*09:01. *Ann Rheum Dis.* 2012 Jan 10. [Epub ahead of print]
- 8) Okada Y, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K,

- Suzuki A, Kawaguchi T, Stahl EA, Kurreeman FA, Nishida N, Ohmiya H, Myouzen K, Takahashi M, Sawada T, Nishioka Y, Yukioka M, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Tohma S, Takasugi K, Shimada K, Murasawa A, Honjo S, Matsuo K, Tanaka H, Tajima K, Suzuki T, Iwamoto T, Kawamura Y, Tanii H, Okazaki Y, Sasaki T, Gregersen PK, Padyukov L, Worthington J, Siminovitch KA, Lathrop M, Taniguchi A, Takahashi A, Tokunaga K, Kubo M, Nakamura Y, Kamatani N, Mimori T, Plenge RM, Yamanaka H, Momohara S, Yamada R, Matsuda F, Yamamoto K. Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Nat Genet.* 2012, 44(5): 511–6
- 9) Terao C, Ohmura K, Ikari K, Kochi Y, Maruya E, Katayama M, Yurugi K, Shimada K, Murasawa A, Honjo S, Takasugi K, Matsuo K, Tajima K, Suzuki A, Yamamoto K, Momohara S, Yamanaka H, Yamada R, Saji H, Matsuda F, Mimori T. ACPA-negative RA consists of two genetically distinct subsets based on RF positivity in Japanese. *PLoS One.* 2012;7(7): e40067
- 10) Nakano M, Fujii T, Hashimoto M, Yukawa N, Yoshifuji H, Ohmura K, Nakaizumi A, Mimori T. Type I interferon induces CX3CL1 (fractalkine) and CCL5 (RANTES) production in human pulmonary vascular endothelial cells. *Clin Exp Immunol.* 2012 Oct;170(1):94–100.
- 11) Ohmura K, Terao C, Mimori T. Recent advances on the genetics of rheumatoid arthritis: current topics and the future. *Inflamm Regen* 2012, 32 (3): 90– 98.
- 12) Myouzen K, Kochi Y, Okada Y, Terao C, Suzuki A, Ikari K, Tsunoda T, Takahashi A, Kubo M, Taniguchi A, Matsuda F, Ohmura K, Momohara S, Mimori T, Yamanaka H, Kamatani N, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K. Functional Variants in NFKBIE and RTKN2 Involved in Activation of the NF- κ B Pathway Are Associated with Rheumatoid Arthritis in Japanese. *PLoS Genet.* 2012 Sep;8(9):e1002949
- 13) Katayama M, Ohmura K, Yukawa N, Terao C, Hashimoto M, Yoshifuji H, Kawabata D, Fujii T, Iwakura Y, Mimori T. Neutrophils are essential as a source of IL-17 in the effector phase of arthritis. *PLoS One.* 2013, 8: e62231
- 14) Cui J, Stahl EA, Saevarsdottir S, Miceli C, Diogo D, Trynka G, Raj T, Mirkov MU, Canhao H, Ikari K, Terao C, Okada Y, Wedrén S, Askling J, Yamanaka H, Momohara S, Taniguchi A, Ohmura K, Matsuda F, Mimori T, Gupta N, Kuchroo M, Morgan AW, Isaacs JD, Wilson AG, Hyrich KL, Herenius M, Doorenspleet ME, Tak PP, Crusius JB, van der Horst-Bruinsma IE, Wolbink GJ, van Riel PL, van de Laar M, Guchelaar HJ, Shadick NA, Allaart CF, Huizinga TW, Toes RE, Kimberly RP, Bridges SL Jr, Criswell LA, Moreland LW, Fonseca JE, de Vries N, Stranger BE, De Jager PL, Raychaudhuri S, Weinblatt ME, Gregersen PK, Mariette X, Barton A, Padyukov L, Coenen MJ, Karlson EW, Plenge RM. Genome-Wide Association Study and Gene Expression Analysis Identifies CD84 as a Predictor of Response to Etanercept Therapy in Rheumatoid Arthritis. *PLoS Genet.* 2013, 9: e1003394
- 15) 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: e59341
- 16) Terao C, Ohmura K, Kawaguchi Y, Nishimoto T, Kawasaki A, Takehara K, Furukawa H, Kochi Y, Ota Y, Ikari K, Sato S, Tohma S, Yamada R, Yamamoto K, Kubo M, Yamanaka H, Kuwana M, Tsuchiya N,

Matsuda F, Mimori T. PLD4 as a novel susceptibility gene for systemic sclerosis in a Japanese population. *Arthritis Rheum*. 2013, 65: 472-80

- 17) Terao C, Hashimoto M, Furu M, Nakabo S, Ohmura K, Nakashima R, Imura Y, Yukawa N, Yoshifuji H, Matsuda F, Ito H, Fujii T, Mimori T. Inverse association between air pressure and rheumatoid arthritis synovitis: an observational study. *PLoS One* 2014, 9: e85376

2. 学会発表

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

2) Terao C, Ohmura K, Mimori T, et al: A large-scale association study identified multiple HLA-DRB1 alleles associated with anti-citrullinated peptide antibody negative rheumatoid arthritis in Japanese. American College of Rheumatology 2011, Chicago, Nov. 2011.

3) 大村浩一郎: 抗 CCP 抗体陰性関節リウマチに関連する遺伝因子。第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2012 年 東京(品川) シンポジウム(oral presentation)

4) Terao C, Ohmura K, Mimori T, et al: ACPA-NEGATIVE RHEUMATOID ARTHRITIS CONSISTS OF TWO GENETICALLY DISTINCT SUBSETS BASED ON RF POSITIVITY. European League Against Rheumatism 2012, Berlin, June. 2012. (poster presentation)

5) Hiwa R, Ohmura K, Mimori T, et al: Only rheumatoid factor-positive subset of anti-citrullinated peptide/protein antibody-negative rheumatoid arthritis seroconverts to anti-citrullinated peptide/protein antibody positive. American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting 2013, San Diego, Oct 29, 2013

(poster presentation).

6) Hiwa R, Ohmura K, Mimori T, et al: Clinical characteristics of rheumatoid factor-positive or -negative subsets of anti-citrullinated peptide/protein antibody-negative rheumatoid arthritis. American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting 2013, San Diego, Oct 29, 2013 (poster presentation).

7) Hiwa R, Ohmura K, Mimori T, et al: Does anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) antibody-negative rheumatoid arthritis (RA) become anti-CCP positive RA? 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2013 年 (京都) 国際ワークショップ(oral presentation)

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