

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患等克服研究事業

(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 免疫アレルギー研究分野))

**関節リウマチの関節破壊機序の解明と
関節破壊「ゼロ」を目指す治療法確立に関する研究**

平成23～25年度 総合研究報告書

平成26(2014)年3月

研究代表者 田中 良哉

【 目 次 】

. 構成員名簿

. 総括研究報告書

関節リウマチの関節破壊機序の解明と関節破壊「ゼロ」を目指す治療法確立に関する研究
田中 良哉(産業医科大学医学部 第1内科学講座 教授)

. 分担研究報告書

1. 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
川上 純(長崎大学大学院医歯薬学総合研究科展開医療科学講座 教授)
2. 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
小池 隆夫(NTT 東日本札幌病院 院長、北海道大学 名誉教授)
3. [1] 新規関節炎治療法開発を目指した TREM-1 及び TREM-1 リガンド相互作用解析
[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
上阪 等(東京医科歯科大学 膠原病・リウマチ内科 教授)
4. 早期 RA に対する MTX の関節破壊抑制効果に関する解析
竹内 勤(慶應義塾大学医学部 リウマチ内科 教授)
5. 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
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))
6. 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
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)
7. 関節リウマチ患者における関節破壊と身体機能障害進行の危険因子の同定に関する研究
山中 寿(東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 教授)
8. 関節リウマチの PADI4 を標的とする治療法の開発
山本 一彦(東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 教授)

. 研究成果の刊行に関する一覧表

. 研究成果の刊行物・別刷り

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業
 (免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 免疫アレルギー研究分野))

**「関節リウマチの関節破壊機序の解明と
 関節破壊「ゼロ」を目指す治療法確立に関する研究班」構成員名簿**

区 分	氏 名	所 属	職 名
研究代表者	田中 良哉	産業医科大学 医学部 第一内科学講座	教 授
研究分担者	川上 純	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科展開医療科学講座 (第一内科学)	教 授
	小池 隆夫	N T T 東日本札幌病院	院 長
	上阪 等	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 膠原病・リウマチ内科	教 授
	住田 孝之	筑波大学医学医療系内科（膠原病・リウマチ・アレルギー）	教 授
	竹内 勤	慶應義塾大学医学部 リウマチ内科	教 授
	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
	山中 寿	東京女子医科大学附属 膠原病リウマチ痛風センター	教 授
	山本 一彦	東京大学大学院医学系研究科 アレルギー・リウマチ学	教 授

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等克服研究事業

総合研究報告書

関節リウマチの関節破壊機序の解明と関節破壊「ゼロ」を目指す治療法確立に関する研究

研究代表者	田中良哉（産業医科大学医学部第一内科学講座 教授）
研究分担者	川上 純（長崎大学大学院医歯学研究科リウマチ免疫制御学）
	小池隆夫（北海道大学大学院医学研究科 内科学講座・第二内科 教授）
	上阪 等（東京医科歯科大学膠原病・リウマチ内科 教授）
	住田孝之（筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻臨床免疫学 教授）
	竹内 勤（慶應義塾大学医学部リウマチ内科 教授）
	三森経世（京都大学大学院医学研究科 臨床免疫学 教授）
	山中 寿（東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 教授）
	山本一彦（東京大学大学院医学系研究科内科学専攻アレルギーリウマチ学 教授）

研究要旨

約 100 万人を数える関節リウマチ(RA)患者に必発する進行性関節破壊は、日常生活機能障害に伴う社会的損失や関節置換術などによる医療費負担を生じてきた。日本人 RA は、難治性、関節破壊進行が急速・高度とされ、一旦、関節が破壊・変形すると不可逆的で、身体機能の低下は必至である。しかし、TNF を標的とした生物学的製剤は関節破壊制御を可能とし、欧米では治療指針が大幅に改定された。一方、現状ではTNF 阻害薬投与前にすでに関節破壊が進行し、それによる不可逆性の機能障害を有する症例が大部分であり、治療指針の設定による医療の標準化が最重要課題である。また、破壊された関節は機能的寛解でも身体機能の改善は得られず、「修復」を目指した治療の開発が必須である。そこで、(1)関節破壊ゼロを目指す関節リウマチの治療指針の確立、および、(2) 関節リウマチの根治療法、関節破壊修復療法の開発を主目的として研究を行った。(1)については、RA 患者のプライマリケア医から専門医まで保険診療内で実施できる関節破壊「ゼロ」を目標とした治療ガイドラインを作成した。平成 25 年 8 月までに 162 例が登録された。MTX 治療開始時点での疾患活動性は DAS28: 4.7、SDAI: 18.8 であった。MTX 開始 3 か月後に TNF (T)群 35 例、MTX (M)群 29 例、high responder (HR)群に振り分けられた。MTX 開始 3 か月後の DAS28(T 群、M 群、HR 群は各 5.7、4.1、2.7)、SDAI(27.9、12.6、4.8)、3 ヶ月間の mTSS 0 は各 44%、43%、78%であり、MTX 開始 12 か月後には(中間報告 69 例)、DAS28(T 群、M 群、HR 群は各 2.5、3.0、2.4)、SDAI(3.6、6.1、3.2)、3-15 カ月目までの1年間の mTSS は各 1.2、0.3、0.2 であった。予備的成績として、HR 群では 15 ヶ月間疾患活動性と関節破壊が抑制されたが、T 群、M 群では最初の 3 ヶ月の間に関節破壊が既に進行したが、その後の1年では制御され、「関節破壊をゼロに」できる可能性が示唆された。(2)については、RA の関節破壊関連因子として PADI4、CDK4/6、ROR γ t、TTP、HLA SE、OA 関連 *DVWA* (rs743777)、DKK-1 を同定し、モデル動物を用いて関節破壊における PADI4、TTP、CDK4/6 の役割を解明した。例えば、PADI4 ノックアウトマウスにおけるコラーゲン誘導性関節炎が軽減され、IL-6-Th17 系が減弱し、関節破壊が軽減傾向であった。また、ROR γ t 過剰発現 T 細胞により関節炎の発症と関節破壊が抑制され、Foxp3⁺制御性 T 細胞に CCR6 の発現亢進が認められた。また、

p16^{INK4a}をアデノウイルスで動物モデル関節に遺伝子導入すると関節炎が改善する事を明らかにし、TTP-ZF (TTP の zing finger 部位)トランスジェニックマウスを用いた in vitro および in vivo における解析から、TNF- α 、IL-6、IL-17 の発現抑制を介して関節炎の発症、重篤化、関節破壊を制御した。さらに、ヒト間葉系幹細胞から骨芽細胞への誘導培養系を確立した。即ち、骨芽細胞分化培地に IL-1 を添加すると、迅速で効率的な骨芽細胞分化が確認された。また、Wnt5a/Ror2 がそのシグナル伝達を担うことを発見した。さらに、さらに、in vitro、及び、CIA ラットモデルでの解析により、ナノファイバー (PLGA) に播種したヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) は、骨芽細胞や軟骨細胞への分化誘導、破骨細胞の分化制御、全身性免疫応答の抑制作用を併せ持ち、RA の疾患制御、関節機能の再生・修復を目指す上で有効なツールである事が明らかになり、関節破壊の根治・修復療法の基礎を築いた。

A. 研究目的

関節リウマチ (RA) 患者は約 70 万人を数え、特に日本人は関節破壊進行が急速・高度とされ、変形すると不可逆的で、身体機能の低下は必至である。機能不良に伴う社会的損失や関節置換術などによる多大なる医療費負担を生じている。生物学的製剤による治療が進歩した現在、関節破壊を生じない治療の標準化が急務である。また、一旦破壊された関節の再生、修復を目指した治療の開発も最重要課題である。そこで、本研究では RA の関節破壊「ゼロ」を目指して、2 つのメインテーマに対して、基礎的・臨床的の重層的研究をオールジャパンで実施することを主目的とした。

1) RA の関節破壊「ゼロ」を目指す治療法確立研究:

TNF 阻害薬を用いた強化療法により、関節破壊の阻止が可能となったが、現状では強化治療前に既に関節破壊が進行し、不可逆性の機能障害が生じた症例が大部分であり、医療の標準化が最重要課題である。平成 23 年度は、発症早期から保険診療内の強化療法により関節破壊を「ゼロ」にすることを旨とした治療ガイドラインを策定した。平成 24,25 年度はエビデンスの蓄積と検証を目的として症例登録を実施し [“ZERO-J” 試験 (UMIN000001281)]、関節破壊をゼロにする治療指針の確立を目指した。

2) 難治性 RA の関節破壊の機序の解明、修復研究: 平成 23 年度は、関節破壊機序に関与する遺伝子多型の解析などにより新規標的分子として PADI4、CDK4/6、ROR γ t 等を同定した。平成 24,25 年度は、これらの RA

疾患・関節破壊関連分子に着目し、関節破壊の分子機序の解明と抗体や阻害薬などの治療開発を目指した。また、申請者らが確立したヒト間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化誘導、ナノファイバーを用いた 3 次元骨再生系を確立し、実験動物レベルでの評価系の確立を目指した。

B. 研究方法

1) RA の関節破壊「ゼロ」を目指す治療法確立研究

1. 関節破壊を「ゼロ」にする治療ガイドラインの検証:

研究分担者施設を中心とした多施設共同研究で、各施設の倫理委員会承認後、ACR/EULAR2010年RA分類基準に基づき診断され、抗CCP抗体陽性、罹病歴2年以内、関節X線で骨びらんが3個以内、MTX未使用症例を登録する。MTX6-16mg/週を3ヶ月投与後、「RAに対するTNF阻害療法施行ガイドライン」の基準を満たし、同意が得られればTNF阻害薬を1年間投与 (T群)、非同意症例はMTXで1年間治療を継続 (M群)、基準を満たさない症例はhigh responder (HR) 群として1年間経過観察する。主要評価項目は、初診時 (MTX開始時)、TNF阻害薬開始時 (またはTNF阻害薬に非同意時)、開始1年後に於ける総Sharpスコアを評価した。

2. RAにおける機能障害進行危険因子に関する研究:

IORRAコホート研究に登録され、ベースラインと登録5年後のmTSS値が得られた865名のRA患者を対象とし、関節破壊進行危険因子に関して重回帰分析を用いて解析した。

3. 早期RAに対するMTXの関節破壊抑制効果に関する

検討: 慶應大学リウマチ内科で前向きに登録されたRAコホートSAKURAの中から、MTXで治療開始した62例について、関節破壊、臨床データを収集して統計解析した。

4. RAの関節破壊の進展に寄与する因子に関する検討:

長崎大学早期関節炎コホート、長崎超音波コホートで、関節破壊進展に寄与する因子を抽出し、有効な治療法を検討した。

5. 高精度画像検査による関節破壊の評価: 近赤外線カメラ両手用撮像装置を開発し、活動性 RA 患者の患手に対してインドシアニングリーンを静脈内投与し、関節超音波検査と近赤外線カメラを同時期に施行した。

2) 難治性RAの関節破壊機序の解明、修復研究

1. PADI4を標的とする関節破壊の治療戦略: PADI4 KOマウスを作成し、DBA/1Jにバッククロスした上で、rhGPIを免疫して関節炎を誘導し、関節炎スコア、病理、T細胞を評価した。

2. ROR γ 過剰発現による関節炎の制御: ROR γ をT細胞においてのみ過剰発現させたROR γ トランスジェニックマウスにCIAを誘導し、野生型と臨床像、転写因子発現、関節炎発症・破壊、病理所見に関して比較検討した。

3. CDK4/6阻害を介する関節破壊治療: CDK4/6阻害薬のCIA治療における作用機序を検討した。

4. 重症型RAの網羅的自己抗体検出研究: 抗CCP抗体陰性でX線上典型的な骨破壊像を認めるRA患者血清を用いて2181蛋白に対する自己抗体のスクリーニングをAlphaScreen法で行った。

5. 間葉系幹細胞を用いた関節破壊の機序の解明、再生・修復に関する研究: ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)を播種したナノファイバーシートをCIA発症前の関節近傍に移植し、関節炎スコア、病理組織標本、軟部X線、micro CTを評価した。MSCをナノファイバーに播種し、サイトカイン産生および骨芽細胞、軟骨細胞分化能を評価した。

(倫理面への配慮)

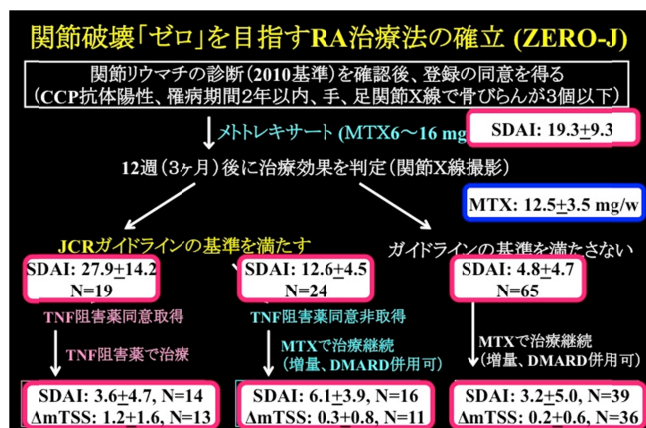
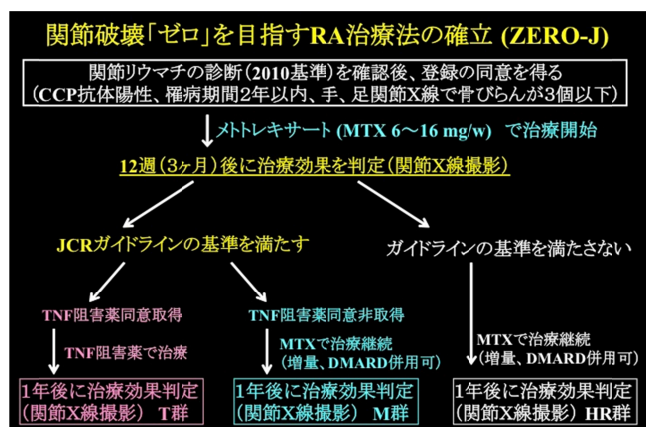
臨床検体を使用する場合には、ヘルシンキ宣言を遵守し、各施設の倫理委員会、或は、IRBで承認を得た研究に限定し、患者及び家族からインフォームドコンセントを得た上で、倫理委員会の規約を遵守し、現有設備を用いて行う。患者の個人情報が入属機関外に漏洩せぬよう、試料や解析データは万全の安全システムをもって厳重に管理し、患者は、経済的負担を始め如何なる不利益も被らない事を明確にする。また、動物実験は、動物実験施設指針等に則り、材料、モデルともに、動物愛護上の十分な配慮を持って行う。なお、関節リウマチの関節破壊ゼロを目指す治療指針の確立に関する研究は、申請者の施設の倫理委員会で承認済みで、また、“ZERO-J試験”としてすでにUMINに登録済(UMIN000001281)である。

C. 研究結果

1) RAの関節破壊「ゼロ」を目指す治療法確立研究:

1. 関節破壊を「ゼロ」にする治療ガイドラインの検証と公布: 13施設で倫理申請が承認され、平成25年8月までに162例が登録された。女性121名、男性41名、罹病期間 7.5 ± 4.7 月(1-24月)、MTX治療開始時点での疾患活動性はDAS28: 4.7 ± 1.0 、SDAI: 18.8 ± 9.0 、HAQ: 0.7 ± 0.6 であった。MTX開始3か月後のガイドライン基準判定時点へ到達した症例は151例で、87例はTNF阻害療法施行ガイドライン基準を満たさずHR群、その他はT群35例、M群29例に振り分けられた。各群の登録時背景は、DAS28、SDAI、HAQともにT群はHR群より有意に高く、MTXは 12.5 ± 2.5 mg/週まで増量されていた。MTX開始3か月後のT群24例、M群65例、HR群19例の評価としては、DAS28(T群、M群、HR群は各 5.7 ± 1.2 、 4.1 ± 0.6 、 2.7 ± 0.8)、SDAI(27.9 ± 14.2 、 12.6 ± 4.5 、 4.8 ± 4.7)であった。即ち、登録後3か月での各群への振り分け時には、DAS28、SDAIともにT>M>HR群の順で有意に高く、HR群では3ヶ月で疾患活動性が制御されていたが、T群では、

MTX治療にも関わらず、疾患活動性がさらに増悪されていた。また、3ヶ月間に関節破壊が進行しなかった率は (mTSS 0)、T群、M群、HR群は各44%、43%、78%であり、HR群では関節破壊が抑制された一方、T群、M群では3ヶ月の間に関節破壊が既に進行していた。MTX開始12か月後の最終判定時点へ到達した症例69例(T群14名、M群16、HR群39名)では、DAS28(T群、M群、HR群は各 2.5 ± 1.0 、 3.0 ± 1.0 、 2.4 ± 0.9)、SDAI(3.6 ± 4.7 、 6.1 ± 3.9 、 3.2 ± 5.0)と群間に有意差がなかった。また、3-15カ月目までの1年間の mTSSは、T群、M群、HR群は各 1.2 ± 1.6 、 0.3 ± 0.8 、 0.2 ± 0.6)であった。



2. RAにおける機能障害進行危険因子に関する研究:

IORRAコホート研究の856名のRA患者において、若年発症・女性・抗CCP抗体陽性・HLA-DRB1・PADI4遺伝子が関節破壊進行の危険因子であり、高齢・女性・長い罹病期間が身体機能障害進行の危険因子であることが明らかになった。一方、欧米で報告された6カ所の遺伝子

座(*IL-15*, *GZMB*, *IL2RA*, *Dkk-1*, *Sost*, *MMP-9*)より11個の一塩基多型(SNP)を選択し、ゲノタイピングを施行したが、関節破壊と有意な関連性のあるSNPは認められなかった。

3. 早期RAに対するMTXの関節破壊抑制効果に関する検討:

SAKURAコホートで早期RA患者62例にMTXを投与し(平均罹病期間0.6年)、76%が最低限の治療目標である低疾患活動性を1年後に満足するが、その時の構造的寛解は65%に留まり、一方、32%が臨床的に問題となる関節破壊進行(CRRP)を示し、18%が急速に関節破壊進行を来す事が明らかとなった。また、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-1 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 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。

4. RAの関節破壊の進展に寄与する因子に関する検討:

長崎コホートでは、多変量解析で2008年以降のエントリーは関節破壊の急速進行(RRP)進展には負の(オッズ比0.03)、また、エントリー時のRAMRIS骨炎スコアは正の因子(1スコア当たりオッズ比1.10)と抽出された。さらに、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。

5. 高精度画像検査による関節破壊の評価:

近赤外線カメラを使ったインドシアニンググリーン(ICG)蛍光血管描出法は、低浸襲、低コストであり、両手の手指関節滑膜異常血流を一機的に評価することが可能であり、有用性が期待される。ICG蛍光による滑膜血流は定量評価可能で、定量異常滑膜血流値とImaxは関節超音波滑膜血流値と有意に相関した。

2) 難治性RAの関節破壊の機序の解明、修復研究

1. PADI4 を標的とする関節破壊の治療戦略:

Padi4 KOマウスにおいてhrGPI 関節炎は有意に軽減され、骨破壊は軽度であった。*Padi4* KOではday 7, 14において脾臓、

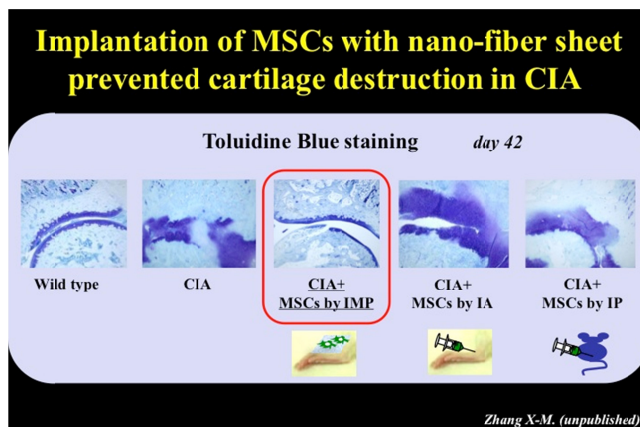
リンパ節 CD4 陽性 Th17 細胞に有意な減少を認めた。定量的 PCR で検討したところ、PADI4 KO マウスにおいて Bcl-2, Bim, Bax, Bid などのアポトーシス関連遺伝子の発現が亢進していた。また骨髄好中球の in vitro におけるアポトーシスの検討では、いずれの条件においても PADI4 KO 好中球のアポトーシスが WT と比較して有意に亢進していた。

2. ROR t 過剰発現による関節炎の制御: ROR t Tg マウスにおいては、CD4⁺ T細胞のROR t Tg発現が有意に亢進し、CII反応性Th17細胞からのIL-17産生が亢進しているのに係らず、CIAの発症、及び、関節破壊が有意に抑制されていた。その原因として、ROR t過剰発現CD4⁺抑制性T細胞の存在が示唆された。

3. CDK4/6阻害を介する関節破壊治療: CDKIは用量依存性の関節炎抑制効果を示し、ETNとの併用療法で強力な関節破壊抑制効果を示した。また、抗IL-6R抗体とCDKIの併用療法も、関節破壊抑制効果を示した。なお、獲得免疫系には影響がなかった。

4. 重症型RAの網羅的自己抗体検出研究: 抗CCP抗体陰性で骨破壊を認めるRA患者血清を用いて2181蛋白に対する自己抗体のスクリーニングを行い、新たに4蛋白が候補として同定された。

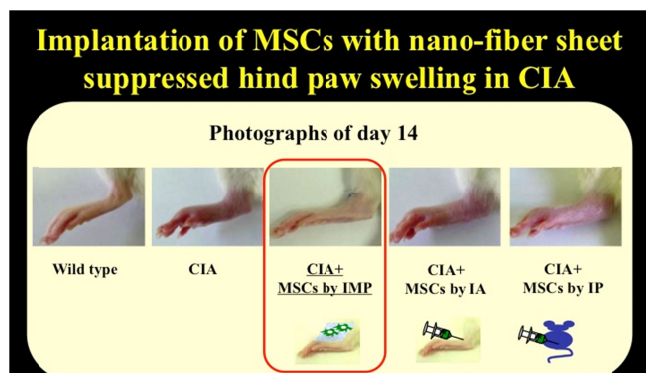
5. 間葉系幹細胞を用いた関節破壊の機序の解明、再生・修復に関する研究: ナノファイバーシートに播種したヒトMSCをラット関節近傍に移植すると、関節炎、骨破壊が臨床的、構造的、病理学的に抑制された。一方、MSC単独で関節内や腹腔内に投与しても殆ど抑制効果を示さなかった。ナノファイバー播種MSC治療群では関節局所のIL-1、IL-6発現や所属リンパ節腫大、加えて脾腫および血清抗II型コラーゲン抗体産生が抑制され、また、リンパ節のT細胞の増殖、IL-2, IL-17, IFN- γ の産生が阻害され、局所の治療効果のみならず全身性免疫応答の抑制作用を持つことが示唆された。



D. 考察

1) RAの関節破壊「ゼロ」を目指す治療法確立研究:

平成22年にACR/EULARよりRA分類基準、23年には寛解基準、治療指針Treat-to-targetが発表された。いずれも発症早期から十分量のMTXで治療を開始し、疾患活動性とともに関節破壊を制御する事を目標としている。本邦でもMTXの増量と共に、7剤の生物学的製剤が承認され、実臨床に沿ったエビデンスを構築するための好機である。この絶好のタイミングで、本研究により関節破壊ゼロを導く治療戦略が検証され、報告されることが期待される。疾患活動性の高い症例がT群に振り分けられた傾向にあるが、斯様な点も踏まえて現在、HR群、T群、M群の1年3ヶ月後の関節破壊の進行を調査中である。162例が登録され、MTX治療開始時点での疾患活動性はDAS28: 4.7、SDAI: 18.8であった。一方、MTX開始3か月後のDAS28 (T群、M群、HR群は各5.7、4.1、2.7)、SDAI (27.9、12.6、4.8)、3ヶ月間の mTSS 0は各44%、43%、78%であり、MTX開始12か月後には(中間報告69例)、DAS28 (T群、M群、HR群は各2.5、3.0、2.4)、SDAI (3.6、6.1、3.2)、3-15カ月目までの1年間の



mTSSIは各1.2、0.3、0.2であった。以上より予備的成績ではあるが、HR群では15ヶ月間疾患活動性と関節破壊が抑制されたが、T群、M群では最初の3ヶ月の間に関節破壊が既に進行したが、その後の1年では制御され、『関節破壊をゼロに』できる可能性が示唆されるが、最終的な結論を得るためにはあと数ヶ月を要する。今後、検証が終了すれば、ガイドラインの公布を通じて医療の標準化・効率化を齎すことにより、関節破壊制御・長期機能予後改善を可能とし、社会的損失や医療費高騰を抑制できるはずである。

また、IORRA コホートでは、白人で同定された遺伝子を候補とした解析を日本人で行ったが、いずれの遺伝子においても有意な関連を認めなかった。本研究の限界として発症5年目の両手正面X線写真におけるスコアを5年間の累積スコアとして代用しており、サンプル数も欧米で行われた研究と比較すると少ないため、検出力には限界があると考えられる。しかしながら遺伝子によっては作用方向も異なり、白人と日本人との間における遺伝的異質性の存在が示唆される。SAKURA コホートでは、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-1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。長崎コホートでは、2008年以降のエントリーはrapid radiographic progressor (RRP)進展には負と抽出されたが、これはtreat to targetの効果と考えられ、RAMRIS骨炎スコアが正の因子と抽出された点は、エントリー時の画像的疾患活動性の関与と考えられた。MTXの有効性は超音波コホートから関節エコーでも検証され、その所見をもとにする関連解析が必要である。近赤外線カメラは、関節超音波検査と同様に手指関節滑膜異常血流を一機的に評価し、滑膜血流の定量評価可能となった。

2) 難治性RAの関節破壊の機序の解明、修復研究:

研究者らが同定してきたRA疾患・関節破壊関連分子であるPADI4、CDK4/6、ROR γ tについて治療応用の可能性が示唆された。Padi4 KOマウスではIL-6-Th17系が減弱し、関節破壊が軽減傾向であった。PADI4 KOマウスにおける関節炎モデル研究により、PADI4が顆粒球系細胞・単球系細胞の生存、Th17細胞の分化、抗体産生といった自然免疫・獲得免疫の幅広いシステムを制御していることが判明した。これらのPADI4 KOマウスでの知見より、PADI4阻害薬はRA治療薬となりうると考えられる。実際、腫瘍研究においてPADI4阻害作用のある小分子化合物の報告がなされつつあり、ヒトにおける副作用を見極めたうえでRA治療への応用も期待される。

ROR γ t過剰発現T細胞により関節炎の発症と関節破壊が抑制されることが判明した。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Th17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。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症・破壊制御に関与し、今後の治療応用の標的となり得ると考えられた

CIAマウスでは低用量の細胞周期制御療法と抗炎症療法の併用は関節炎や関節破壊を抑制した。また、骨破壊関連蛋白として新たに4蛋白が候補として同定された

CIAラットにおいては、ナノファイバー(PLGA)播種MSCの関節近傍への移植により、関節炎と関節破壊の抑制が示された。関節内投与ではこれらの効果は認められず、ナノファイバーを足場として関節近傍にMSCをとどめる事により局所効果が発揮されたと考えられた。また、ナノファイバー播種MSCはTGF β 産生誘導等を介して、骨芽細胞、軟骨細胞の分化誘導能のみならず、顕著な免疫抑制効果を有する事が示された。以上、ナノファイバー播種MSCは、RAの疾患制御、関節機能の再生・修

復を目指す上で有効であり、治療ツールとしての実践的展開を検討していく予定である。

RAの関節破壊関連遺伝子としてPADI4やROR γ t等を同定し、関節破壊におけるこれらの分子の役割を解明した。今後、動物モデル、前臨床における疾患制御を目的とした継続研究を要する。また、間葉系幹細胞から骨芽細胞の誘導、ナノファイバーによる3次元骨形成系を確立し、今後は前臨床試験による継続研究が必要である。

3年間の研究期間で、これまでの最重要課題であった関節破壊を抑止するガイドラインを設定し、検証しえた点は、効率性という点でも高く評価できると思われる。PADI4、ROR γ t阻害剤、及び、間葉系幹細胞から骨再生系の確立に関する研究は、いずれもモデル動物、解析システムが樹立され、今後の研究の効率良い発展が期待される。

E. 結論

関節破壊ゼロを導く治療戦略の検証研究を実施した。HR 群、T 群、M 群のいずれも1年3ヶ月後の疾患活動性が制御された。関節破壊の進行抑制については調査中であるが、中間調査では十分に抑制され、関節破壊「ゼロ」に留める可能性が示唆される。本研究により関節破壊抑止のガイドラインが公表されれば、機能予後改善により社会的損失をなくし、医療費削減を含む経済的問題の克服を齎すものと期待できる。

一方、研究者らが同定してきたRA疾患・関節破壊関連分子であるPADI4、CDK4/6、ROR γ tについて治療応用の可能性が示唆された。*Padi4* KO マウスではIL-6-Th17系が減弱し、関節破壊が軽減傾向であった。ROR γ t過剰発現T細胞により関節炎の発症と関節破壊が抑制されることが判明した。また、*in vitro*、及び、CIAラットモデルでの解析により、ナノファイバー(PLGA)に播種したヒト骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)は、骨芽細胞や軟骨細胞への分化誘導、破骨細胞の分化制御、全身性免疫応答の抑制作用を併せ持ち、RAの疾患制御、関節機能の再生・修復を目指す上で有効なツールである

事が明らかになった

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(研究代表者)

田中良哉

1. Kubo S, Yamaoka K, Kondo M, Yamagata K, Zhao J, Iwata S, Tanaka Y. The JAK inhibitor tofacitinib reduces the T cell stimulatory capacity of human monocyte-derived dendritic cells. *Ann Rheum Dis* (in press)
2. Tanaka Y, Hirata S, Kubo S, Fukuyo S, Hanami K, Sawamukai N, Nakano K, Nakayamada S, Yamaoka K, Sawamura F, Saito K. Discontinuation of adalimumab after achieving remission in patients with established rheumatoid arthritis: 1-year outcome of the HONOR study. *Ann Rheum Dis* (in press)
3. Tanaka Y. Next stage of RA treatment: TNF-inhibitor-free remission will be a possible treatment goal ? *Ann Rheum Dis* (2013) 72, ii124-ii127
4. Tanaka Y, Maeshima Y, Yamaoka K. In vitro and in vivo analysis of a Jak inhibitor in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* (2012) 71, i70-i74
5. Iwata S, Yamaoka K, Niino H, Nakano K, Wang S-P, Akashi K, Tanaka Y. Amplification of toll-like receptor-mediated signaling through Syk in human B cell activation. *J Allergy Clin Immunol* (2012) 129, 1594-1601
6. 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 pathologies in rheumatoid arthritis using comprehensive multi-plane images of the 2nd 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.
7. Koike T. IgG4-related disease: why high IgG4 and fibrosis. *Arthritis Res Ther*. Jan 25; 15(1):103, 2013.
 8. 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.
 9. 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* 8(5):e62231, 2013
 10. 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*. 8(3):e59341, 2013
 11. Sumitomo S, Fujio K, Okamura T, Morita K, Ishigaki K, Suzukawa K, Kanaya K, Kondo K, Yamasoba T, Furukawa A, Kitahara N, Shoda H, Shibuya M, Okamoto A, Yamamoto K. Transcription factor early growth response 3 is associated with the TGF- β 1 expression and the regulatory activity of CD4-positive T cells in vivo. *J Immunol*. 2013;191(5):2351-9.
 12. Iwasaki Y, Fujio K, Okamura T, Yanai A, Sumitomo S, Shoda H, Tamura T, Yoshida H, Charnay P, Yamamoto K. Egr-2 transcription factor is required for Blimp-1-mediated IL-10 production in IL-27-stimulated CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol*. 2013;43(4):1063-73
 13. Sawamukai N, Satake A, Schmidt AM, Lamborn IT, Tanaka Y, Kambayashi T. Cell autonomous role of TGF β and IL-2 receptor in CD4⁺ and CD8⁺ inducible regulatory T cell generation during graft-versus-host disease. *Blood* (2012) 119: 5575-83
 14. Iwata S, Yamaoka K, Niuro H, Nakano K, Wang S-P, Akashi K, Tanaka Y. Amplification of toll-like receptor-mediated signaling through Syk in human B cell activation. *J Allergy Clin Immunol* (2012) 129, 1594-1601
 15. Iwata S, Saito K, Tokunaga M, Tanaka Y. B-cell or T-cell-dominant recurrence after rituximab therapy in patients with SLE. *Ann Rheum Dis* (2012) 71, 1749-1750
 16. Tanaka Y, Maeshima Y, Yamaoka K. In vitro and in vivo analysis of a Jak inhibitor in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* (2012) 71, i70-i74
 17. Iwata S, Saito K, Hirata S, Tanaka Y. Phenotypic changes of lymphocyte in a patients with IgG4-related disease after corticosteroid therapy. *Ann Rheum Dis* (2012) 71, 2058-2059
 18. Tak PP, Mease PJ, Genovese MC, Kremer J, Haraoui B, Tanaka Y, Bingham III CO, Ashrafzadeh A, Travers H, Safa-Leathers S, Kumar S, Dummer W. Efficacy and safety of ocrelizumab in patients with active rheumatoid arthritis with an inadequate response to at least one TNF inhibitor: results from

the phase III SCRIPT trial. *Arthritis Rheum* (2012) 64, 360-370

19. Sonomoto K, Yamaoka K, Oshita K, Fukuyo S, Zhang X, Nakano K, Okada Y, Tanaka Y. IL-1 induces differentiation of human mesenchymal stem cells into osteoblasts via the Wnt5a/Ror2 pathway. *Arthritis Rheum* (2012) 64, 3355-3363
20. Maeshima K, Yamaoka K, Kubo S, Nakano K, Iwata S, Saito K, Ohishi M, Miyahara H, Tanaka S, Ishi K, Yoshimatsu H, Tanaka Y. A JAK inhibitor tofacitinib regulates synovitis through inhibition of IFN- γ and IL-17 production by human CD4+ T cells. *Arthritis Rheum* (2012) 64, 1790-1798

(分担代表者)

川上純

- 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) Ohyama K, Kawakami A, Tamai M, Baba M, Kishikawa N, Kuroda N. Serum immunocomplex containing thrombospondin-1: a novel biomarker for early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 71: 1916-7, 2012
- 6) Tamai M, Kawakami A, Uetani M, Fukushima A, Arima K, Fujikawa K, Iwamoto N, Aramaki T, Kamachi M, Nakamura H, Ida H, Origuchi T, Aoyagi K, Eguchi K. Magnetic resonance imaging (MRI) detection of synovitis and bone lesions of the wrists and finger joints in early-stage rheumatoid arthritis: comparison of the accuracy of plain MRI-based findings and gadolinium-diethylenetriamine pentaacetic acid-enhanced MRI-based findings. *Mod Rheumatol* 22:654-8, 2012
- 7) Kita J, Tamai M, Arima K, Nakashima Y, Suzuki T, Kawashiri SY, Iwamoto N, Okada A, Koga T, Yamasaki S, Nakamura H, Origuchi T, Ida H, Aoyagi K, Uetani M, Eguchi K, Kawakami A. Treatment discontinuation in patients with very early rheumatoid arthritis in sustained simplified disease activity index remission after synthetic disease-modifying anti-rheumatic drug administration. *Mod Rheumatol* 22:346-52, 2012.

小池隆夫

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 2nd 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. Koike T. IgG4-related disease: why high IgG4 and fibrosis. *Arthritis Res Ther*. 15(1):103, 2013.
3. Fukae J, Isobe M, Kitano A, Henmi M, Sakamoto F, Narita A, Ito T, Mitsuzaki A, Shimizu M, Tanimura K, Matsubashi M, Kamishima T, Atsumi T, Koike T. Positive synovial vascularity in patients with low disease activity indicates smoldering 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.
4. Fukae J, Tanimura K, Atsumi T, Koike T. Sonographic synovial vascularity of synovitis in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* Sep 18, 2013 (epub ahead of print)
5. Koike T. IFN independent suppression of Th-17 differentiation by T-bet expression in autoimmune arthritis mice. *Arthritis Rheum*. 2012 64(1):40-4
6. Koike T, Harigai M, Inokuma S, Ishiguro N, Ryu J, Takeuchi T, Tanaka Y, Yamanaka H, Fujii K, Yoshinaga T, Freundlich B, Suzukawa M. Safety and effectiveness of switching from infliximab to etanercept in patients with rheumatoid arthritis: results from a large Japanese postmarketing surveillance study. *Rheumatol Int*. 32(6):1617-24.2012
7. Koike T, Harigai M, Inokuma S, Ishiguro N, Ryu J, Takeuchi T, Tanaka Y, Yamanaka H, Fujii K, Yoshinaga T, Freundlich B, Suzukawa M. Safety and effectiveness responses to etanercept for rheumatoid arthritis in Japan: a sub-analysis of a post-marketing surveillance study focusing on the duration of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 32(6):1511-9.2012
8. Takeuchi T, Miyasaka N, Tatsuki Y, Yano T, Yoshinari T, Abe T, Koike T. Inhibition of plasma IL-6 in addition to maintenance of an efficacious trough level of infliximab associated with clinical remission in patients with rheumatoid arthritis: analysis of the RISING Study. *Ann Rheum Dis*. 71(9):1583-5.2012
9. Tanaka Y, Harigai M, Takeuchi T, Yamanaka H, Ishiguro N, Yamamoto K, Miyasaka N, Koike T, Kanazawa M, Oba T, Yoshinari T, Baker D; the GO-FORTH Study Group. Golimumab in combination with methotrexate in Japanese patients with active rheumatoid arthritis: results of the GO-FORTH study. *Ann Rheum Dis*. 71(6):817-24,2012
10. Koike T, Harigai M, Ishiguro N, Inokuma S, Takei S, Takeuchi T, Yamanaka H, Tanaka Y. Safety and effectiveness of adalimumab in Japanese rheumatoid arthritis patients: postmarketing surveillance report of the first 3,000 patients. *Mod Rheumatol*. 22(4) :498-508,2012

住田孝之

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-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):1720-39,201
 4. Inoue A, Matsumoto I, Tanaka Y, Umeda N, Tanaka Y, Mihara M, Takahashi S, Sumida T. :TIARP (TNFAIP9) deficiency leads to arthritis via IL-6 overproduction with enhanced NF-kB, STAT3 signaling and dysregulated apoptosis of macrophages *Arthritis Rheum* 64(12):3877-85,201
 5. Tsuboi H, Matsuo N, Iizuka M, Tsuzuki S, Kondo Y, Tanaka A, Moriyama M, Matsumoto I, Nakamura S, Sumida T.: Analysis of IgG4 class switch-related molecules in IgG4-related disease. *Arthritis Res Ther.* 14(4):R171,201
 6. Kondo Y, Iizuka M, Wakamatsu E, Yao Z, Tahara M, Tsuboi H, Sugihara M, Hayashi T, Yoh K, Takahashi S, Matsumoto I, Sumida T.: Overexpression of T-bet gene regulates murine autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum.* 64:162-172,2012
 7. Hasebe N, Kawasaki A, Ito I, Kawamoto M, Hasegawa M, Fujimoto M, Furukawa H, Tohma S, Sumida T, Takehara K, Sato S, Kawaguchi Y, Tsuchiya N: Association of UBE2L3 polymorphisms with diffuse cutaneous systemic sclerosis in a Japanese population. *Ann Rheum Dis*; 71(7): 1259-60, 201
 8. Okada Y, Shimane K, Kochi Y, Tahira T, Suzuki A, Higasa K, Takahashi A, Horita T, Atsumi T, Ishii T, Okamoto A, Fujio K, Hirakata M, Amano H, Kondo Y, Ito S, Takada K, Mimori A, Saito K, Kamachi M, Kawaguchi Y, Ikari K, Mohammed W O, Matsuda K, Terao C, Ohmura K, Myouzen K, Hosono N, Tsunoda T, Nishimoto N, Mimori T, Matsuda F, Tanaka Y, Sumida T, Yamanaka H, Takasaki Y, Koike T, Horiuchi T, Hayashi K, Kubo M, Kamatani N, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K: A genome-wide association study identified AFF1 as a susceptibility locus for systemic lupus erythematosus in Japanese. *PLoS Genet*;8(1): e1002455,201
 9. Sakai R, Tanaka M, Nanki T, Watanabe K, Yamazaki H, Koike R, Nagasawa H, Amano K, Saito K, Tanaka Y, Ito S, Sumida T, Ihata A, Ishigatsubo Y, Atsumi T, Koike T, Nakajima A, Tamura N, Fujii T, Dobashi H, Tohma S, Sugihara T, Ueki Y, Hashiramoto A, Kawakami A, Hagino N, Miyasaka N, Harigai M, for the REAL Study Group: Drug retention rates and relevant risk factors for drug discontinuation due to adverse events in rheumatoid arthritis patients receiving anti-cytokine therapy with different target molecules. *Ann Rheum Dis* ; 71(11): 1820-1826, 2012
 10. Tsuboi H, Matsuo N, Iizuka M, Tsuzuki S, Kondo Y, Tanaka A, Moriyama M, Matsumoto I, Nakamura S, Sumida T : Analysis of IgG4 class switch-related molecules in IgG4-related disease. *Arthritis Res Ther*;14(4):R171,2012.

竹内勤

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 Rheum*24:8-16, 2014
2. 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
3. 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
4. Takeuchi T and Suzuki K. CD247 variants single nucleotide polymorphisms observed in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology online* March 23, 2013.
5. Nishina N, Kaneko Y, Kameda H, Kuwana M, and Takeuchi T. Reduction of plasma IL-6, but not TNF- by methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis: a potential biomarker for radiographic progression. *Clinical Rheumatology* 32:1661-6, 2013.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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

12. 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.
3. 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
4. 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*. [Epub ahead of print]

三森経世

1. 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*. 7(7):e40067, 2012
2. 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*. 44(5):511-6, 2012

山中寿

1. 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.
2. 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
3. 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 Mar 25;44(5):511-6
4. 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 Jun;71(6):1095-
 5. Seto Y, Inoue E, Shidara K, Hoshi D, Sugimoto N, Sato E, Tanaka E, Nakajima A, Taniguchi A, Momohara S, Yamanaka H. Functional disability can deteriorate despite suppression of disease activity in patients with rheumatoid arthritis: a large observational cohort study. *Mod Rheumatol.* [Epub ahead of print]
 6. Yamanaka H, Seto Y, Tanaka E, Furuya T, Nakajima A, Ikari K, Taniguchi A, Momohara S. Management of rheumatoid arthritis: the 2012 perspective. *Mod Rheumatol.* 23(1):1-7, 2013.
 7. Yoshida S, Ikari K, Yano K, Toyama Y, Taniguchi A, Yamanaka H, Momohara S. Lack of association between IL-15 genetic variants and progression of joint destruction in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2013 Nov 22.
 8. Suzuki T, Ikari K, Yano K, Inoue E, Toyama Y, Taniguchi A, Yamanaka H, Momohara S. PADI4 and HLA-DRB1 are genetic risks for radiographic progression in RA patients, independent of ACPA status: results from the IORRA cohort study. *PLoS One.* 2013;8(4):e61045.
- 山本一彦
1. 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.* 44(5):511-6, 2012
 2. Okada Y, Shimane K, Kochi Y, Tahira T, Suzuki A, Higasa K, Takahashi A, Horita T, Atsumi T, Ishii T, Okamoto A, Fujio K, Hirakata M, Amano H, Kondo Y, Ito S, Takada K, Mimori A, Saito K, Kamachi M, Kawaguchi Y, Ikari K, Mohammed O W, Matsuda K, Terao C, Ohmura K, Myouzen K, Hosono N, Tsunoda T, Nishimoto N, Mimori T, Matsuda F, Tanaka Y, Sumida T, Yamanaka H, Takasaki Y, Koike T, Horiuchi T, Hayashi K, Kubo M, Kamatani N, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K. A genome-wide association study identified AFF1 as a susceptibility locus for systemic lupus erythematosus

in Japanese PLoS Genet. 2012 ;8(1):e1002455

3. Okamoto A, Fujio K, Tsuno NH, Takahashi K, Yamamoto K. Kidney-infiltrating CD4+ T-cell clones promote nephritis in lupus-prone mice. Kidney Int. 2012;82(9):969-79.

2. 学会発表

(研究代表者)

田中良哉

1. Tanaka Y, Hirata S. Novel multi-biomarkers for estimating disease activity in rheumatoid arthritis. The 22nd International Rheumatology Symposium . Tokyo, Japan 平成 25 年 4 月
2. Tanaka Y. The Development of Anti-TNF Agents in Rheumatoid Arthritis. EAGOR2013, The 5th East Asian Group of Rheumatology (symposium). Seoul, Korea. 平成 25 年 5 月
3. Tanaka Y. A potential of human mesenchymal stem cells for the treatment of Rheumatoid Arthritis. The First ARISE WITH APLAR. Seoul, Korea. 平成 25 年 9 月
4. Tanaka Y. Certolizumab pegol and biologics for the treatment of rheumatic diseases. 12th International symposium on Sjögren's syndrome. Kyoto, Japan 平成 25 年 10 月
5. Tanaka Y, Emoto K, Tsujimoto M, Schlichting DE, Macias W. 12-week results of a phase 2b dose-ranging study of baricitinib, an oral JAK1/JAK2 inhibitor in Japanese patients with rheumatoid arthritis on background methotrexate therapy. ACR 2013. San Diego, USA. 平成 25 年 10 月
6. Tanaka Y, Yamanaka Y, Ishiguro N, Miyasaka N, Kawana K, Kubo T, Kuroki A, Takeuchi T. Clinical remission after 52 weeks of treatment is a predictor of adalimumab-free disease control in patients with early rheumatoid arthritis: Hopeful 2 Study. ACR

2013. San Diego, USA. 平成25年10月

7. T Fujii, M Sekiguchi, K Matsui, M Kitano, M Hashimoto, K Ohmura, A Yamamoto, H Nakahara, K Maeda, A Yokota, K Miki, N Shimmyo, T Kuroiwa, K Murakami, Y Ozaki, K Higami, I Yoshii, Y Nozaki, T Ikawa, S.Morita, Y Kawahito, N Nishimoto, T Mimori, H Sano: Higher Titer of Anti-Citrullinated Protein Antibodies in Biologic-Naïve Rheumatoid Arthritis Patients are Candidate Biomarkers to Predict Sensitivity Leading to Clinical Remission with Abatacept (Poster #465). American College of Rheumatology, San Diego, Oct. 26-30, 2013
8. Y Tanaka. The Maximization of Efficacy of Tocilizumab for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. The 8th International Congress on Autoimmunity, Granada, Spain. May/2012
9. Y. Tanaka. Treatment of SLE with biologics. The 15th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology, APLAR 2012, Dead Sea, Jordan, Sep/2012
10. Y Tanaka, S Hirata, S Fukuyo, M Nawata, S Kubo, K Yamaoka, K Saito. Discontinuation of Adalimumab without Functional and Radiographic Damage Progression After Achieving Sustained Remission in Patients with Rheumatoid Arthritis (the HONOR study): 1-Year Results. The 78th Annual Congress of American College of Rheumatology, 2012, Washington DC, USA, Nov/2012

(分担代表者)

川上純

1. 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.
2. Okada A, Kawakami A, Fukuda T, Hidaka T, Ishii T, Ueki Y, Kodera T, Nakashima M, Takahashi Y, Honda S, Horai Y, Koga T, Watanabe R, Okuno H, Eguchi K. Characteristic of the Japanese Patients with Rheumatoid Arthritis(RA) of Rapid Radiographic Progression(RRP) Treated with Synthetic Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs(DMARDs)in Daily Practice:A Large-Scale Prospective Longitudinal Cohort Study(the 1st report of Apple Survey). American College of Rheumatology(ACR/ARHP 2012) . 2012/11/10-11/14
 3. Tamai M, Nakasima Y, Suzuki T, Horai Y, Okada A, Kita J, Kawashiri S, Iwamoto N, Ichinose K, Arima K, Nakamura H, Origuchi T, Uetani M, Aoyagi K, Eguchi K, and Kawakami A. Magnetic Resonance Imaging-Proven Osteitis At Baseline Predicts the Early Rheumatoid Arthritis Patients Who Will Develop Rapid Radiographic Progression : MRI Is Beneficial to Find the Window of Opportunity in Early RA. American College of Rheumatology(ACR/ARHP 2012) . 2012/11/10-11/14

小池隆夫

1. Koike T: "Antiphospholipid syndrome: 30 years", 6th Autoimmunity Congress Asia. 2013/11/19-23. Hong Kong.
2. Koike T: "My contribution, my dream: 1983-2013", 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies & 4th Latin American Congress on Autoimmunity. 2013/9/17-23. Rio de Janeiro. Brazil.
3. Koike T. "Catastrophic Antiphospholipid Syndrome;

- CAPS", Manila,Filipin, Asian Lupus Summit 2012, November 29, 2012
4. Koike T. "New Concepts in Antiphospholipid syndrome", Manila,Filipin, Asian Lupus Summit 2012, November 30, 2012

上阪等

1. Hideyuki Iwai, Tadashi Hosoya, Yousuke Murakami, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka Identification of the TREM-1 ligand as a therapeutic target of arthritis. Keystone symposium 2012.1
2. Hideyuki Iwai, Tadashi Hosoya, Kenchi Takenaka, Yousuke Murakami, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka. Functional analysis of mouse TREM-1 ligand and identification of human TREM-1 ligand 第 41 回日本免疫学会 2012.12,
3. Tadashi Hosoya, Yousuke Murakami¹, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka Identification of the TREM-1 ligand as a therapeutic target of arthritis Hideyuki Iwai 第 4 回 EAGOR 2011.10
4. Hideyuki Iwai, Tadashi Hosoya, Yousuke Murakami¹, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka. Identification of the TREM-1 ligand on B lymphocytes as a therapeutic target of arthritis 第 40 回日本免疫学会 2011.11

住田孝之

1. 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
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

竹内勤

1. 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
2. T Takeuhi . Japanese PMS: Safety and efficacy from large population. 8th International congress on Autoimmunity. Granada, Spain. 2012.5.11
3. T 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.
4. T 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.
5. T 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.

6. T 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.

三森経世

1. 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

山中寿

1. Yoshida S, Ikari K, Toyama Y, Taniguchi A, Yamanaka H, Momohara S. Lack of association between IL-15 genetic variants and progression of joint destruction in Japanese rheumatoid arthritis patients. The 14th Annual European Congress of Rheumatology, The European League Against Rheumatism 2013.
2. Yoshida S, Ikari K, Yano K, Toyama Y, Taniguchi A, Yamanaka H, Momohara S. Genetic association on

disease severity in rheumatoid arthritis: a validation study in Japanese patients. The 77th American College of Rheumatology/Associations of Rheumatology Health Professionals Annual Meeting 2013.

3. Yoshida S, Ikari K, Shidara K, Ochi K, Toyama Y, Taniguchi A, Yamanaka H, Momohara S. Analysis of factors associated with the Health Assessment Questionnaire score change in five years. American College of Rheumatology, Annual Meeting 2012

山本一彦

1. Seri Y, Yamamoto K, et al. Peptidyl arginine deiminase type 4 deficiency suppresses the development of rhGPI induced arthritis. 第42回日本免疫学会総会(平成25年12月12日、千葉幕張)

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 ¹	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 ¹ 、中島好一 ¹ 、岡田覚丈 ² 、川尻真也 ^{1,3} 、岩本直樹 ¹ 、青柳 潔 ³ 、上谷雅孝 ⁴	² 長崎原爆病院、 ³ 長崎大学大学院公衆衛生学分野、 ⁴ 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患者コホートから解析した。1.合成 DMARDs 投与 1 年間の 392 症例を対象とした観察研究では、 $mTSS > 3.0$ を Rapid radiographic progression (RRP)と定義した。RRP は 42 症例(10.7%)に認め、多変量解析により、1 年間の DAS 積分値、ベースラインの炎症反応高値、女性が、RRP 進展に寄与する因子と抽出された。2.両側手指関節 MRI を撮像する長崎早期関節炎コホートで、RRP を 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 症例を解析したが、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。3.関節エコーを用いた MTX 治療経過の 33 症例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。DAS28 寛解群 13 症例と治療抵抗群 12 症例を比較検討し、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)とパワードプラスコア(PD スコア)が改善した。バイオマーカーでは IL-6 が、臨床的治療反応およびエコー所見をよく反映した。今回の解析で、RRP への進展を予防ための T2T 治療戦略の重要性が確認され、かつ、疾患活動性の評価における MRI 骨炎とエコー滑膜炎の重要性が明らかとなった。バイオマーカーとしての IL-6 の有用性も示唆され、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、適切な治療介入と関節破壊の予後予測が肝要である。前者に関しては T2T が、また、後者に関しては 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、MRI 骨炎やエコー関節滑膜炎と予後予測との関連も指摘されている。今回は 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

- 合成 DMARDs 治療経過における観察研究
これらで 1 年間治療された 392 症例(エントリー時に DAS28-ESR 中等度疾患活動性以上もしくは Xp 骨びらんあり)を対象に、(C)RRP($mTSS > 3.0$)を来す因子を多変量解析で抽出した。
- 長崎早期関節炎コホートにおける観察研究
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、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。

3. MTX 治療エコーコホートにおける観察研究
- 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) とパワードプラススコア (PD スコア)、血清 IL-6、TNF- α 、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

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。

D. 考察

実地臨床において関節破壊の進展を防止するには、目標達成に向けた積極的な治療 (T2T) を行うことの重要性が確認された。骨レ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、今回の解析で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。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観察研究から、RA の関節破壊の進展に寄与する因子の抽出を試みた。今回の解析で、RRP への進展を予防ための T2T 治療戦略の重要性が確認され、かつ、疾患活動性の評価における MRI 骨炎とエ

コー滑膜炎の重要性が明らかとなった。バイオマーカーとしての IL-6 の有用性も示唆され、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。

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) Kita J, Tamai M, Arima K, Nakashima Y, Suzuki T, Kawashiri SY, Iwamoto N, Okada A, Koga T, Yamasaki S, Nakamura H, Origuchi T, Ida H, Aoyagi

K, Uetani M, Eguchi K, Kawakami A. Treatment discontinuation in patients with very early rheumatoid arthritis in sustained simplified disease activity index remission after synthetic disease-modifying anti-rheumatic drug administration. Mod Rheumatol. 22 (3): 346-352, 2012.

- 5) Tamai M, Kawakami A, Uetani M, Fukushima A, Arima K, Fujikawa K, Iwamoto N, Aramaki T, Kamachi M, Nakamura H, Ida H, Origuchi T, Aoyagi K, Eguchi K. Magnetic resonance imaging (MRI) detection of synovitis and bone lesions of the wrists and finger joints in early-stage rheumatoid arthritis: comparison of the accuracy of plain MRI-based findings and gadolinium-diethylenetriamine pentaacetic acid-enhanced MRI-based findings. Mod Rheumatol. 22 (5): 654-658, 2012.

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, 竇來吉朗, 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) 鈴木貴久, 川尻真也, 西野文子, 高谷亜由子, 中島好一, 竇來吉朗, 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.
- 5) Tamai M, Nakashima Y, Suzuki T, Okada A, Kita J, Horai Y, Kawasiri S.-Y, Iawmoto N, Ichinose K, Arima K, Yamasaki S, Nakamura H, Origuchi T, Uetani M, Aoyagi K, Eguchi K, Kawakami A. The presence of Magnetic Resonance Imaging-proven osteitis at entry predicts the development of rapid radiographic progression in patients with early rheumatoid arthritis. Annual European Congress of Rheumatology. 2012/6/6-6/9.

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群とnon-RRP群の比較

Baseline variables	RRP (+) N = 42	RRP (-) N = 250	p value
Gender (female %)	92.9%	66.8 %	0.0066
Age (y.o., median [Q1-Q3])	40 [39 - 48]	62 [54 - 69]	0.30
Disease duration (year, median [Q1-Q3])	3.4 [1.4 - 7.7]	4.1 [1.5 - 8.3]	0.55
DAS28-CRP at baseline	3.58 [2.75 - 4.32]	3.085 [2.19 - 3.69]	0.0042
Time integrated DAS28-CRP	26.635 [28.63 - 47.63]	28.215 [23.13 - 37.00]	0.0005
DAS28-ESR at baseline	4.49 [3.59 - 4.98]	3.605 [2.87 - 4.38]	0.0051
Time integrated DAS28-ESR	41.835 [36.48 - 53.39]	36.57 [29.66 - 45.12]	0.0005
CRP at baseline (mg/dL)	0.72 [0.28 - 2.40]	0.299 [0.10 - 0.79]	0.0001
ESR at baseline (mm/hr)	30 [18 - 50]	20 [13 - 36]	0.0013
Autoantibody (RF or ACPA positive %)	88.1 %	69.4 %	0.14
Methotrexate use (positive %)	66.3 %	64.3 %	0.28
Probiolone use (positive %)	45.2 %	33.4 %	0.40
HAQ	0.375 [0.125 - 0.875]	0.125 [0.0 - 0.625]	0.001
mTSS	36.0 [10.5 - 61.5]	11.50 [4.00 - 33.00]	0.0004

Fisher's exact probability test and Wilcoxon signed-rank test were used to assess statistical difference. Variables except age and probiolone use were tested toward logistic regression analysis.

表2. RRP進展を予測する多変量解析: 392症例の解析

Baseline variables	Unit	Odds ratio	95% C.I.	p value
Gender	Male	0.24	0.07 - 0.82	0.023
CRP (mg/dL)	1.65 mg/dL increase	1.32	1.00 - 1.73	0.049
Time-integrated DAS28-ESR	11.85 increase	1.54	1.11 - 2.13	0.0094

AIC=251.1

Baseline variables	Unit	Odds ratio	95% C.I.	p value
Gender	Male	0.24	0.07 - 0.82	0.022
ESR (mm/hr)	22 mm/hr increase	1.44	1.07 - 1.94	0.017
Time-integrated DAS28-CRP	10.91 increase	1.53	1.11 - 2.12	0.0099

AIC=247.5

Starting with a full model including all variables, the most appropriate model was selected on the basis of Akaike's information criteria (AIC). We have found that the early disease, high time-integrated DAS28-ESR/CRP and high CRP/ESR at baseline are the independent predictors toward development of RRP. High DAS28-ESR/CRP at baseline was not selected during the process. Male tended to inhibit the development of RRP.

図2. 寛解群と治療抵抗群の比較: バイオマーカー

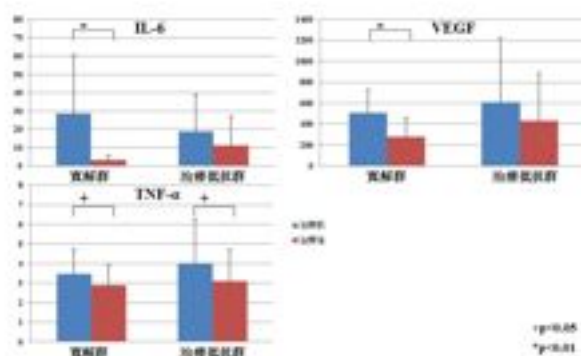
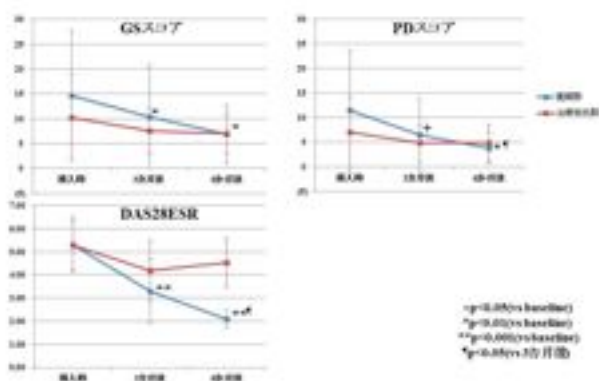


表3. RRP進展を予測する多変量解析: 早期関節炎コホート

	Odds ratio	95% C.I.	p-value
エントリー時の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

インドシアニンググリーン (ICG)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(ICG 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、ICG 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、ICG 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。

ICG 蛍光血管描出法は低コスト、低侵襲であり、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。ICG 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関連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

1. 近赤外線カメラ(浜松ホトニクス)を用いて、両手撮像用機器を作成した。活動性 RA 患者の両手に対して、撮像を施行した。カメラ本体は手より 20cm に固定し、対側の肘静脈より ICG (0.25mg/body) を静脈内投与した。
2. 各濃度のインドシアニンググリーンをエタノールと混合し7穴ウエルにそれぞれ封入した。これを蛍光ファントムとして用いた。
3. 撮影動画より、方形の ROI を設定することで、time intensity curve を得ることが出来るソフトウェアを開発した。
4. 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。

C. 研究結果

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

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

3. 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

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。

欧州から同様原理の RA 専用機器が最近実用化された。同機器を使った報告では、画像評価には半定量 4 段階評価が使用され、MRI、超音波検査に遜色ない関節炎の診断能が示されている。

E. 結論

近赤外線カメラを使った ICG 蛍光血管描出法は、低浸襲、低コストであり、両手の手指関節滑膜異常血流を一機能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. [Koike T.](#) The new era of autoimmune disease research. *Arthritis Research&Therapy*. 13:113, 2011.
2. Kato M, Atsumi T, Kurita T, Odani T, Fujieda Y, Otomo K, Horita T, Yasuda S, Koike T. Hapatitis B virus reactivation by immunosuppressive therapy in patients with autoimmune diseases: Risk analysis in

- hepatitis B surface antigen-negative cases. *J Rheumatol.*38:10, 2209-14, 2011.
3. Fukae J, Isobe M, Kitano A, Henmi M, Sakamoto F, Narita A, Ito T, Mitsuzaki A, Shimizu M, Tanimura K, Matsuhashi M, Kamishima T, Atsumi T, Koike T. Radiographic prognosis of finger joint damage predicted by early alteration in synovial vascularity in patients with rheumatoid arthritis: Potential utility of power doppler sonography in clinical practice. *Arthritis Care Res.*63(9):1247-53,2011.
 4. Koike T. IFN independent suppression of Th-17 differentiation by T-bet expression in autoimmune arthritis mice. *Arthritis Rheum.* 64(1):40-41,2012.
 5. Takeuchi T, Miyasaka N, Tatsuki Y, Yano T, Yoshinari T, Abe T, Koike T. Inhibition of plasma IL-6 in addition to maintenance of an efficacious trough level of infliximab associated with clinical remission in patients with rheumatoid arthritis: analysis of the RISING Study. *Ann Rheum Dis.* 71(9):1583-5,2012.
 6. Sakai R, Tanaka M, Nanki T, Watanabe K, Yamazaki H, Koike R, Nagasawa H, Amano K, Saito K, Tanaka Y, Ito S, Sumida T, Ihata A, Ishigatsubo Y, Atsumi T, Koike T, Nakajima A, Tamura N, Fujii T, Dobashi H, Tohma S, Sugihara T, Ueki Y, Hashiramoto A, Kawakami A, Hagino N, Miyasaka N, Harigai M; REAL Study Group. Drug retention rates and relevant risk factors for drug discontinuation due to adverse events in rheumatoid arthritis patients receiving anticytokine therapy with different target molecules. *Ann Rheum Dis;* 71(11):1820-6, 2012.
 7. Sakai R, Komano Y, Tanaka M, Nanki T, Koike R, Nagasawa H, Amano K, Nakajima A, Atsumi T, Koike T, Ihata A, Ishigatsubo Y, Saito K, Tanaka Y, Ito S, Sumida T, Tohma S, Tamura N, Fujii T, Sugihara T, Kawakami A, Hagino N, Ueki Y, Hashiramoto A, Nagasawa K, Miyasaka N, Harigai M; REAL Study Group. Time-dependent increased risk for serious infection from continuous use of tumor necrosis factor antagonists over three years in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res;*64(8): 1125-34, 2012.
 8. Koike T, Harigai M, Inokuma S, Ishiguro N, Ryu J, Takeuchi T, Tanaka Y, Yamanaka H, Fujii K, Yoshinaga T, Freundlich B, Suzukawa M. Safety and effectiveness of switching from infliximab to etanercept in patients with rheumatoid arthritis: results from a large Japanese postmarketing surveillance study. *Rheumatol Int.* 32(6):1617-24, 2012.
 9. Koike T, Harigai M, Inokuma S, Ishiguro N, Ryu J, Takeuchi T, Tanaka Y, Yamanaka H, Fujii K, Yoshinaga T, Freundlich B, Suzukawa M. Safety and effectiveness responses to etanercept for rheumatoid arthritis in Japan: a sub-analysis of a post-marketing surveillance study focusing on the duration of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 32(6):1511-9,2012.
 10. Tanaka Y, Harigai M, Takeuchi T, Yamanaka H, Ishiguro N, Yamamoto K, Miyasaka N, Koike T, Kanazawa M, Oba T, Yoshinari T, Baker D; the GO-FORTH Study Group. Golimumab in combination with methotrexate in Japanese patients with active rheumatoid arthritis: results of the GO-FORTH study. *Ann Rheum Dis.* 71(6):817-24, 2012.
 11. Koike T, Harigai M, Ishiguro N, Inokuma S, Takei S, Takeuchi T, Yamanaka H, Tanaka Y. Safety and effectiveness of adalimumab in Japanese rheumatoid arthritis patients: postmarketing surveillance report of the first 3,000 patients. *Mod Rheumatol.*22(4) :498-508,2012.

12. Otomo K, Atsumi T, Amengual O, Fujieda Y, Kato M, Oku K, Horita T, Yasuda S, Koike T. The efficacy of antiphospholipid score for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and its predictive value for thrombotic events. *Arthritis Rheum*. 64(2):504-12, 2012.
 13. Kamishima T, Kato M, Atsumi T, Koike T, Onodera Y, Terae S. Contrast-enhanced whole body joint MR Imaging in rheumatoid patients on tumour necrosis factor-alpha agents: a pilot study to evaluate novel scoring system for MR synovitis. *Clin Exp Rheumatol*. 31(1):154,2013.
 14. Fukae J, Isobe M, Kitano A, Henmi M, Sakamoto F, Narita A, Ito T, Mitsuzaki A, Shimizu M, Tanimura K, Matsuhashi 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(3):523-8, 2013.
 15. 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.
 16. 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.
 17. 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 2nd 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.
 18. Koike T. IgG4-related disease: why high IgG4 and fibrosis. *Arthritis Res Ther*. 15(1):103, 2013.
 19. Fukae J, Tanimura K, Atsumi T, Koike T. Sonographic synovial vascularity of synovitis in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* Sep 13, 2013 (epub ahead of print)
- 2. 学会発表**
1. Koike T: "Antiphospholipid syndrome:pathogenesis", Anti-Phospholipid Antibodies in Medicine, Pilsen(Czech Republic), 2011/6/24.
 2. Koike T: "Antiphospholipid Syndrome,2011", 5th Breton Workshop on Autoimmunity, Brest(France), 2011/10/14.
 3. Koike,T: "Catastrophic Antiphospholipid Syndrome;CAPS", Asian Lupus Summit 2012, Manila,Filipin, 2012/11/29.
 4. Koike T: "New concepts in antiphospholipid syndrome", Asian Lupus Summit 2012, Manila,Filipin, 2012/11/30.
 5. Koike T: "My contribution, my dream: 1983-2013", 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies & 4th Latin American Congress on Autoimmunity, Rio de Janeiro, Brazil, 2013/9/17-23.

6. Koike T: "Antiphospholipid syndrome: 30 years", 6th Autoimmunity Congress Asia, Hong Kong
2013/11/19-23.
7. 深江 淳、成田明宏、遠見美穂子、坂本文彦、北野明美、青木悠子、磯部将人、清水昌人、松橋めぐみ、伊藤武哉、光崎明生、神島 保、谷村一秀:生物学的製剤による手指関節腔内異常血流の反応近赤外線カメラによる関節腔内異常血流の描出、第55回日本リウマチ学会総会 2011/7/17-20、神戸
8. 深江 淳、成田明宏、遠見美穂子、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:関節滑膜血流累積値と関節破壊の関係近赤外線カメラによる関節滑膜血流測定、第56回日本リウマチ学会総会 2012/4/26-29、東京
9. 深江 淳、成田明宏、遠見美穂子、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

厚生労働科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)

総合研究報告書

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

[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

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 岩井秀之 東京医科歯科大学 膠原病・リウマチ内科 特任講師

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

[1] TREM-1 阻害療法は既存の生物学的製剤とは異なり、結核や重症感染症といった副作用の少ない関節炎治療法となることが期待されている。我々はこれまでに、マウス関節炎モデルに TREM-1-Ig を投与し関節炎の改善を認めた。また、マウス TREM-1 リガンドの同定に成功し、同リガンドに対する抗体投与でも関節炎改善及び骨破壊、関節破壊抑制を確認した。本研究では、抗 TREM-1 リガンド抗体の作用機序解析を行うとともに、B 細胞上のヒト TREM-1 リガンドを同定した。TREM-1 阻害療法を感染のリスクが少なく関節破壊ゼロを目指した新規関節炎治療法として開発していく

[2] 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 つの病態に対する治療である、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

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

効果を検討してきた。しかし、同抗体が刺激性あるいは拮抗性か作用機序は不明であった。また、B 細胞に発現するヒト TREM-1-L は未知であり、TREM-1 阻害療法を臨床応用するために、その同定が必要とされていた。本研究では抗マウス TREM-1-L 抗体の CIA での作用機序解明及び、B 細胞上のヒト TREM-1-L の同定を目的とした。

[2] 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 p16^{INK4a} 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。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

[1] 抗 TREM-1-L-B 抗体の CIA 治療における作用機序を解明するために、TREM-1-Ig を TREM-1-L-B 強制発現細胞に架橋した。TREM-1-L は細胞質内に ITIM モチーフを含むが、TREM-1-L-Ig 架橋による Tyrosine のリン酸化の有無を免疫沈降により確認した。また、マクロファージと B 細胞の共培養系では TNF- α が産生されるが、抗 TREM-1-L 抗体添加による TNF- α 産生への影響を確認した。B 細胞上のヒト TREM-1-L を同定するために、ヒト

TREM-1 細胞外ドメイン 6 x Histidine 融合蛋白 (TREM-1-His) を用いて、ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) の cDNA ライブラリーを用いた発現クローニングを行った。同分子の発現様式を明らかにした。

[2] DBA1/J マウスをウシ 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

[1] TREM-1-L-Ig 架橋により TREM-1-L 強制発現細胞での tyrosine のリン酸化はほとんど認められなかった。一方、マクロファージと TREM-1-L-B を発現している B 細胞の共培養系での抗 TREM-1-L 抗体の添加では、抗 IgM 抗体存在下で、TNF- α 産生は減少した。この増加は抗 mTREM-1-L-B 抗体投与で抑制され、primary 細胞でも TREM-1 特異的な相互作用が確認された。これらより抗 TREM-1-L 抗体による CIA 治療効果は TREM-1 に対する拮抗作用によるものと考えられた。

ヒト PBMC cDNA ライブラリー及びヒト TREM-1-His を用い

た発現クローニングにより、B 細胞に発現するヒト TREM-1-L を同定した。

[2] 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、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 抗体価と C 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 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 特異的 T 細胞応答の抑制はきたさなかった。

D. 考察

[1] マウス CIA における抗 TREM-1-L 抗体の作用機序が明らかとなった。また、B 細胞上のヒト TREM-1-L も明らかとなり、マウス抗 TREM-1-L 抗体により確認された関節炎改善効果を関節リウマチ治療に応用できる可能性がでてきた。この治療法は骨破壊抑制も確認されており、関節破壊ゼロを目指した臨床応用に向けてヒト TREM-1-L の機能解析を行っていく。

[2] 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

[1] B 細胞上のヒト TREM-1 リガンドが同定され、抗 TREM-1-L 抗体による TREM-1 阻害が、マウス TREM-1 阻害同様、感染リスクが少なく、かつ関節破壊を抑制する新規関節炎治療法として開発されることが期待される。

[2] 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. 学会発表

- Hideyuki Iwai, Tadashi Hosoya, Yousuke Murakami, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka. Identification of the TREM-1 ligand as a therapeutic target of arthritis. Keystone symposium 2012.1
- Hideyuki Iwai, Tadashi Hosoya, Kenchi Takenaka, Yousuke Murakami, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka. Functional analysis of mouse TREM-1 ligand and identification of human TREM-1 ligand 第 41 回日本免疫学会 2012.12,
- Tadashi Hosoya, Yousuke Murakami1, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka. Identification of the TREM-1 ligand as a therapeutic target of arthritis Hideyuki Iwai 第 4 回 EAGOR 2011.10
- Hideyuki Iwai, Tadashi Hosoya, Yousuke Murakami1, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka. Identification of the TREM-1 ligand on B lymphocytes as a

therapeutic target of arthritis 第40回日本免疫学会 2011.11

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

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^γt Tg の検討

- 1) WT および ROR^γt 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^γt 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^γt 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^γt 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^γt 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^γt 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^γt⁺ 細胞の減少が認められ、ROR^γt⁺ 細胞からの IL-17 産生の低下が認められた。

ROR^γt Tg の検討

- 1) ROR^γt 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^γt 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^γt 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^γt の発現は、WT と比較して ROR^γt 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^γt Tg マウス間で有意な差は認めなかったが、ROR^γt 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 -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 -induced adipose-related protein (tumor necrosis factor -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 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

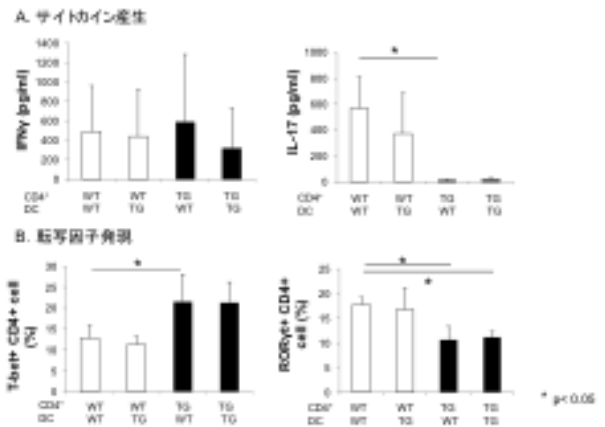


図3 ROR γ t TgにおけるCIA

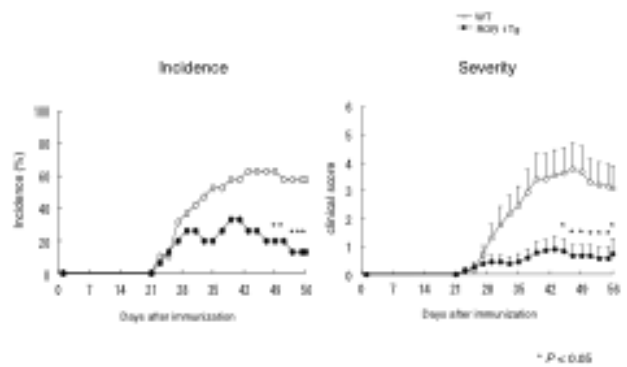


図4 関節の組織学的評価

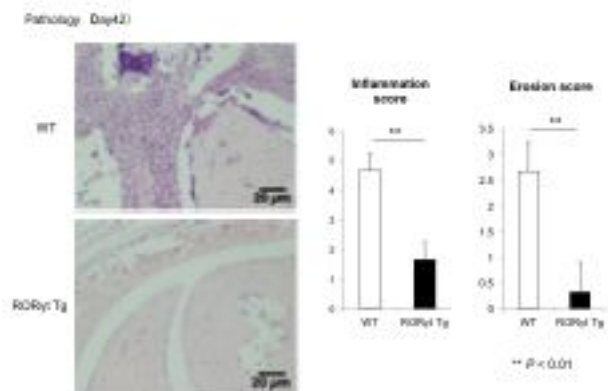
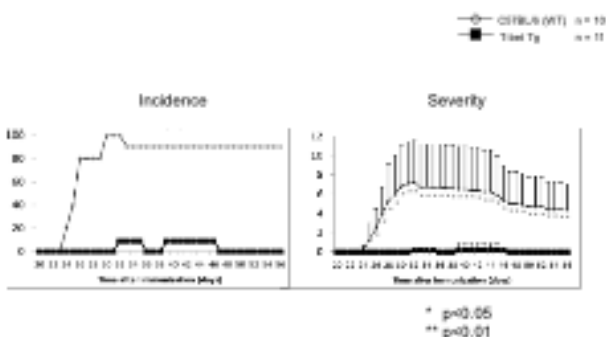


図1 β -bet TgにおけるCIA



早期 RA に対する MTX の関節破壊抑制効果に関する解析

研究分担者 竹内 勤 慶應義塾大学医学部リウマチ内科 教授

研究要旨

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

2. 臨床データ: 62例の MTX 投与前、MTX 投与1年後の DAS28-ESR, SDAI, CDAI, CRP, MMP-3 などの

臨床パラメーターを収集した。1年以内に MTX 単独治療が終了した症例では、その最終単独等予備の臨床データを LOCF して解析した。

3. 血漿サイトカイン: 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 ,

IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TNF , IFN , 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。

(倫理面への配慮)

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

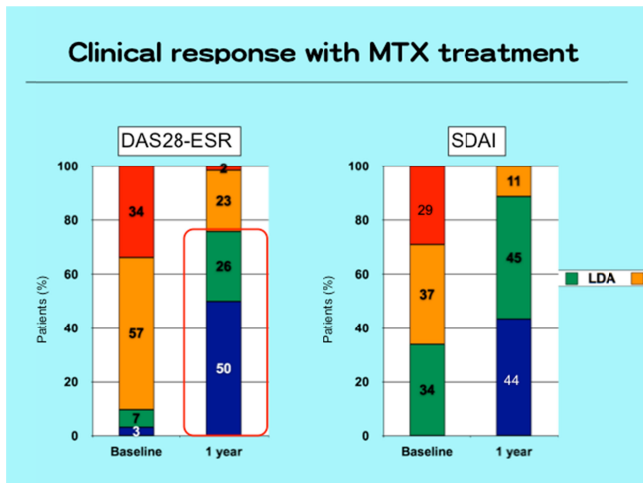
C. 研究結果

1) 患者背景: 女性 79%、年齢 56+/-14.5 才、罹病期間 6.3+/-8.0 ヶ月、RF+ 74.2%、抗 CCP 74.2%、MTX 用量 8.7+/-2.3mg/週。

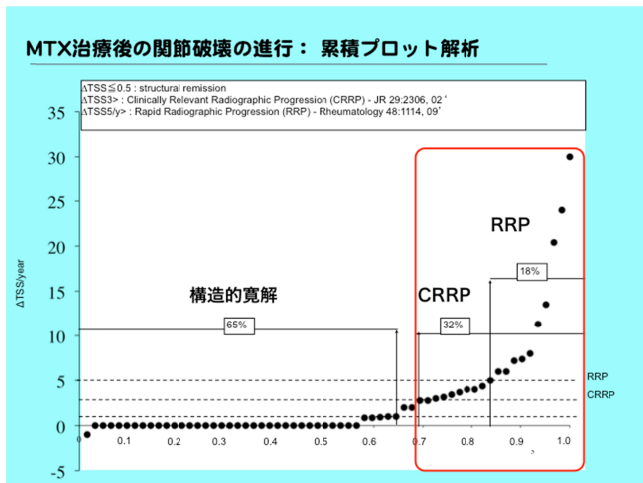
2) 臨床効果 (図1): MTX 投与前の DAS28-ESR 高疾患活動性 33.9%、中疾患活動性 56.5%、低疾患活動性 6.5%、寛解 3.2%、MTX 投与1年後の DAS28-ESR 高疾患活動性 1.6%、中疾患活動性 22.6%、

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。3) 関

節破壊の進行: MTX 投与前の mTSS 8.7+/-20.3, MTX 投与1年後の mTSS 11.1+/-21.1.



4) 構造的寛解とCRRP/RRP(図2): 構造的寛解は65%、Clinically relevant radiographic progression (CRRP) 32%、Rapid radiographic progression (RRP) 18%.

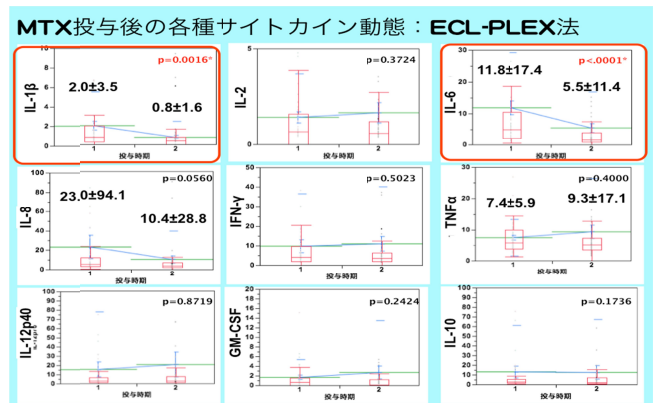


5) 血漿IL-6濃度はMTX投与前4.72pg/mlから1.04pg/mlへと78%低下したのに対し、TNFαは0.87pg/mlから-0.83pg/mlと有意な低下を認めなかった。

6) IL-6とTNF α 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 α 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 α 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 ± 47.3pg/mlで検出限界に近い1pg/ml以下を9例(14.5%)に、

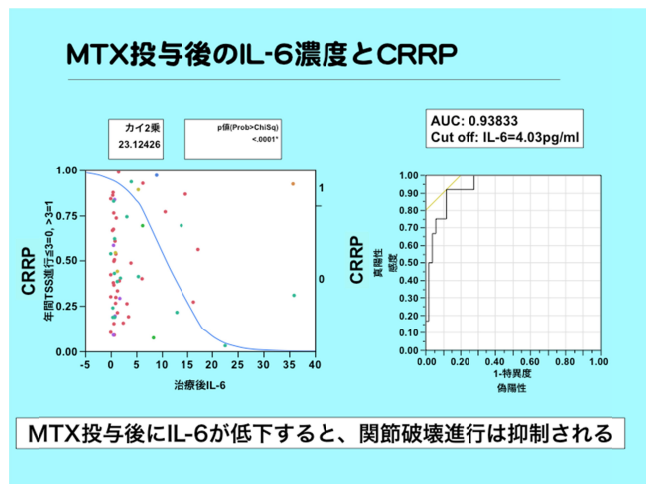
検出不能例を2例に認めた。一方、超高感度ECL法によるIL-6は11.8 ± 17.4 pg/mlで、1pg/ml以下は4例(6.5%)であったが、検出不能例は認めなかった。TNF α は、従来型ELISA法で1.0 ± 1.3pg/mlで検出限界に近い1pg/ml以下を33例(53.2%)に、検出不能例を26例(41.9%)に認めた。一方、超高感度ECL法によるTNF α は7.0 ± 4.6 pg/mlで、1pg/ml以下は0例、検出不能例を認めなかった。いずれのサイトカインにおいてもultra-sensitive ECLアッセイ系の優越性が明らかとなった。特に、TNF α 測定においては、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。

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



8) 年間関節破壊進行度と関連する MTX 投与1年後の要因: クラスター解析によって estimated yearly progression との相関を解析した所、これとクラスターを形成する要因として、MTX 投与1年後の IL-6 値、MMP-3 の二つが明らかとなった。最も相関が強かった MTX 投与後 IL-6 値と臨床的に問題となる関節破壊進行 CRRP の関連をロジスティック回帰分析した所、この両者は p<0.0001 で有意に関連し、

CRRP を来す IL-6 値を ROC 解析によって求めた所、4pg/ml のカットオフが AUC=0.938、感度 91%、特異度 89% の優れた数値を示す事が明らかとなった。(図4)



D. 考察/E. 結論

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

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 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 Rheum 24:8-16, 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- 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 α 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, Stanislawska-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, Garner 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, Freundlich 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 Hashi-zume, 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-Kb 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 Yamana, 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 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 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

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。

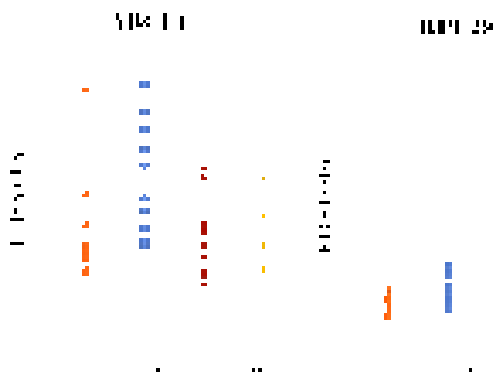


図1. RA, SLE, 健常人における ABCF1, RPL29 に対する抗体価。抗 CCP 抗体陰性 RA (CCP(-)), 抗 CCP 抗体陽性 RA (CCP(+)), SLE, 健常人(HC) 各 10 名の血清中の抗 ABCF1 抗体、抗 RPL29 抗体価を ELISA 法にて測定した。

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 に対する反応を図 2 に示す。

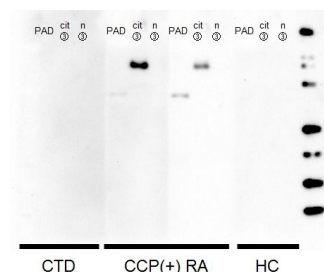


図2 シトルリン化候補タンパク に対する自己抗体

候補タンパク 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 に対する結果を図 3 と図 4 に示す。

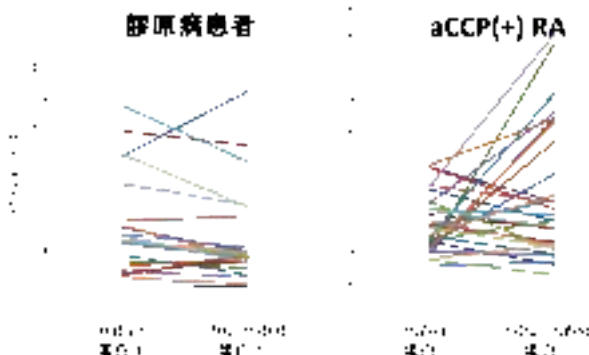


図3 native およびシトルリン化蛋白 に対する抗体価
 膠原病患者 22 例、抗 CCP 抗体(+)RA 患者 30 例の native 蛋白 とそのシトルリン化した蛋白 に対する抗体価を OD 値で示し、同じ患者血清を直線で結んだ。

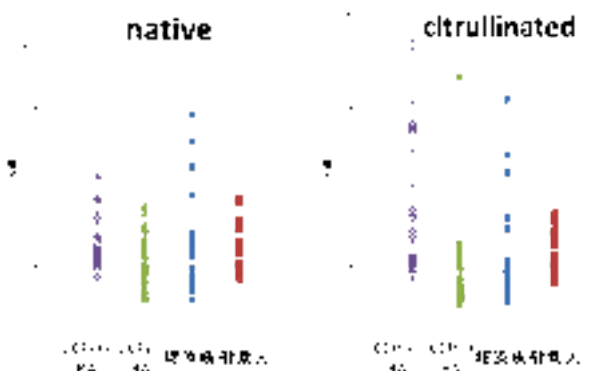


図4 各疾患、健常人での抗蛋白 抗体価

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 とそのシトルリン化した蛋白 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 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 、蛋白 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 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 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- 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

関節リウマチ患者における関節破壊と身体機能障害進行の危険因子の同定に関する研究

研究分担者	山中 寿	東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 教授
研究協力者	猪狩 勝則	東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 准教授
	吉田 進二	東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 助教

研究要旨

関節リウマチにおける関節破壊は結果として身体機能障害をもたらし、日常生活動作を障害することで生活の質を低下させる。関節破壊と身体機能障害進行に関連する危険因子の同定は、関節リウマチ治療における関節破壊ゼロを目指す治療指針の確立において重要な意義を持つ。IORRA コホートには 5000 名超の関節リウマチ患者が登録されており、DNA を収集し得た約 2000 名の内、発症 5 年時の両手正面 X 線写真を Sharp/van der Heijde スコア(SHS)によりスコアリングした 865 名のサブコホートも有する。これらのデータを用いて既知の予後不良因子や既報の疾患感受性遺伝子と関節破壊関連遺伝子との関連を検討したところ、若年発症・女性・抗 CCP 抗体陽性・HLA-DRB1・PADI4 遺伝子が関節破壊進行の危険因子であり、高齢・女性・長い罹病期間が身体機能障害進行の危険因子であることが明らかになった。

A. 研究目的

関節リウマチの治療薬および治療戦略の著しい進歩により、進行性の関節破壊の阻止が可能となっはきていますが、現状では治療強化前に関節破壊が進行し、不可逆的な変形による高度な身体機能障害を呈する患者も存在する。本研究の目的は関節破壊と身体機能障害に関連する危険因子を同定することである。

B. 研究方法

本研究は東京女子医科大学で実施中の IORRA コホート研究の一貫として実施した。

関節破壊

関節破壊の評価には SHS (Sharp/van der Heijde score)を用い、発症 5 年目の両手正面 X 線写真が得られた 865 名の関節リウマチ患者を対象とした。疾患感受性遺伝子 13 種類 (HLA-DRB1、PADI4、TNFAIP3、CCR6、B3GNT2、ANXA3、CSF2、CD83、NFKBIE、ARID5B、

PDE2A-ARAP1、PLD4、PTPN2)と欧米で関節破壊との関連が報告された 6 か所の遺伝子座 (IL-15、GZMB、IL2RA、Dkk-1、Sost、MMP-9)より 11 個の一塩基多型 (SNP) を選択し、ゲノタイピングを施行した。統計学的解析では発症 5 年目の両手 SHS を従属変数とした。まず非遺伝因子として既知の予後不良因子を独立変数とした重回帰分析を行った。次に各 SNP におけるリスクアレルの個数を独立変数とし、既知の予後不良因子の内、関連が認められたものを調節因子として加えて重回帰分析を行った。

身体機能障害

身体機能障害評価には J-HAQ (Japanese version of Health Assessment Questionnaire)を用い、2000 年から 2004 年に IORRA に登録され、ベースラインと登録 5 年後の J-HAQ が得られた 4408 名の関節リウマチ患者を対象とした。IORRA データベースより以下のデータ入手し、独立変数として使用した:登録フェーズ、性別、年齢、罹病期

間、BMI、リウマトイド因子(定性)、DAS28(Disease Activity Score with 28-joint counts)。従属変数として登録5年後から登録時のJ-HAQを引いた J-HAQを使用し、調整因子として登録時のJ-HAQを加えて重回帰分析を行った。さらに得られたリスク因子に5年間の平均DAS28を加えた解析もサブ解析として行った。

(倫理面への配慮)

本研究で想定されている研究内容に関しては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」など関連する指針などに基づいて妥当性を適切に判断している。また、東京女子医科大学遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会において承認を得た上で、インフォームドコンセントのもとに書面による同意を得て実施している。

C. 研究結果

関節破壊

非遺伝要因として年齢(若年発症)、性別(女性)、抗CCP抗体陽性が有意に関連していた。遺伝要因では疾患感受性遺伝子の内、HLA-DRB1とPADI4遺伝子が危険因子であることが明らかとなった。欧米で関節破壊との関連が報告された遺伝子座ではいずれのSNPにおいても有意な関連を認めなかった(表1、2)。

(表1) 関節破壊進行と関連する因子

	95%信頼区間	P
抗CCP抗体(陽性)	0.12 0.05-0.17	0.00056
性別(女性)	0.09 0.03-0.16	0.0059
発症年齢	-0.07 -0.14- -0.01	0.024
HLA-DRB1 SE	0.11 0.04-0.17	0.0021
PADI4 rs2240340	0.07 0.004-0.14	0.037

(表2) 各SNPの重回帰分析による解析結果

Gene	SNP	MAF (CEU)	P	
IL-15	rs6821171	0.30 (0.21)	-0.02	0.49
	rs1521761	0.15 (0.33)	-0.04	0.24

GZMB	rs8192916	0.45 (0.36)	-0.01	0.79
IL2RA	rs2104286	0.10 (0.25)	0.03	0.35
Dkk-1	rs1896368	0.42 (0.51)	0.04	0.26
	rs1896367	0.30 (0.37)	-0.06	0.07
	rs1528873	0.22 (0.42)	-0.04	0.22
Dkk-1 & Sost	rs1528873	0.22 (0.42)	-0.01	0.85
	rs6503475	0.45 (0.43)		
	rs10762715	0.22 (0.37)	-0.02	0.55
	rs4792909	0.40 (0.39)		
	rs10762715	0.22 (0.37)	0.02	0.48
MMP-9	rs6503475	0.45 (0.43)		
	rs11908352	0.18 (0.26)	-0.00	0.91

身体機能障害

最も強く関連していたのは長い罹病期間であり、次いで早いコホート登録時期、女性、高齢が危険因子であることが明らかとなった。(表3)。サブ解析の結果、5年間の平均DAS28に最も強い関連を認めた($P < 2 \times 10^{-16}$)。

(表3) 5年間のJ-HAQ進行と関連する因子

		P
IORRA登録フェーズ	-0.150	$< 2 \times 10^{-16}$
性別(女性)	0.091	1.3×10^{-8}
年齢	0.082	5.8×10^{-7}
罹病期間	0.176	$< 2 \times 10^{-16}$
BMI	0.005	0.74
リウマトイド因子(陽性)	0.026	0.11
登録時DAS28	-0.019	0.30

D. 考察

本研究で関節破壊の危険因子として若年発症、女性、抗CCP抗体陽性、HLA-DRB1、PADI4遺伝子が同定された。これらを同定し得たことは関節リウマチ患者に対して治療法を選択する上で将来的な治療薬の選択などにおいて非常に有益な結果につながる可能性がある。しかしながら白人で報告された関連遺伝子においてはいずれも有意な

関連を認めなかった。遺伝子によっては作用方向も異なり、白人と日本人との間における遺伝的異質性の存在が示唆された。

身体機能障害については最近コホートに登録した患者で、罹病期間が短い若年男性患者は障害が進行しにくいことが明らかとなり、近年の治療薬および治療戦略の著しい進歩が機能障害進行抑制に関与している可能性が示唆された。また疾患活動性を低く抑えることで中期的な機能障害抑制が可能となることが示された。

E. 結論

若年発症・女性・抗 CCP 抗体陽性・HLA-DRB1・PADI4 遺伝子が関節破壊進行の危険因子であり、高齢・女性・長い罹病期間が身体機能障害進行の危険因子である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, Yoshida S, Graham RR, Manoharan A, Ortmann W, Bhangale T, Denny JC, Carroll RJ, Eyler AE, Greenberg JD, Kremer JM, Pappas DA, Jiang L, Yin J, Ye L, Su DF, Yang J, Xie G, Keystone E, Westra HJ, Esko T, Metspalu A, Zhou X, Gupta N, Mirel D, Stahl EA, Diogo D, Cui J, Liao K, Guo MH, Myouzen K, Kawaguchi T, Coenen MJ, van Riel PL, van de Laar MA, Guchelaar HJ, Huizinga TW, Dieudé P, Mariette X, Louis Bridges Jr S, Zhernakova A, Toes RE, Tak PP, Miceli-Richard C, Bang SY, Lee HS, Martin J, Gonzalez-Gay MA, Rodriguez-Rodriguez L, Rantapää-Dahlqvist S, Arlestig L, Choi HK, Kamatani Y, Galan P, Lathrop

M, Eyre S, Bowes J, Barton A, de Vries N, Moreland LW, Criswell LA, Karlson EW, Taniguchi A, Yamada R, Kubo M, Liu JS, Bae SC, Worthington J, Padyukov L, Klareskog L, Gregersen PK, Raychaudhuri S, Stranger BE, De Jager PL, Franke L, Visscher PM, Brown MA, Yamanaka H, Mimori T, Takahashi A, Xu H, Behrens TW, Siminovitch KA, Momohara S, Matsuda F, Yamamoto K, Plenge RM. Nature. 2013 Dec 25.

- 2) Lack of association between IL-15 genetic variants and progression of joint destruction in Japanese patients with rheumatoid arthritis. Yoshida S, Ikari K, Yano K, Toyama Y, Taniguchi A, Yamanaka H, Momohara S. Ann Rheum Dis. 2013 Nov 22.
- 3) PADI4 and HLA-DRB1 are genetic risks for radiographic progression in RA patients, independent of ACPA status: results from the IORRA cohort study. Suzuki T, Ikari K, Yano K, Inoue E, Toyama Y, Taniguchi A, Yamanaka H, Momohara S. PLoS One. 2013;8(4):e61045.
- 4) Functional disability can deteriorate despite suppression of disease activity in patients with rheumatoid arthritis: a large observational cohort study. Seto Y, Inoue E, Shidara K, Hoshi D, Sugimoto N, Sato E, Tanaka E, Nakajima A, Taniguchi A, Momohara S, Yamanaka H. Mod Rheumatol. 2013 Nov;23(6):1179-85.
- 5) Functional variants in NFKBIE and RTKN2 involved in activation of the NF- κ B pathway are associated with rheumatoid arthritis in Japanese. 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. PLoS Genet. 2012 Sep;8(9):e1002949.

- 6) ACPA-negative RA consists of two genetically distinct subsets based on RF positivity in Japanese. 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. PLoS One. 2012;7(7):e40067.
- 7) Management of rheumatoid arthritis: the 2012 perspective. Yamanaka H, Seto Y, Tanaka E, Furuya T, Nakajima A, Ikari K, Taniguchi A, Momohara S. Mod Rheumatol. 2013 Jan;23(1):1-7.
- 8) Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. 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. Nat Genet. 2012 Mar 25;44(5):511-6.
- 9) Solitary extranodal malignant lymphoma of the forearm in rheumatoid arthritis. Iwamoto T, Seto Y, Ikari K, Yamanaka H, Momohara S. Arthritis Rheum. 2011 Jan;63(1):304.
- 10) Association of EMCN with susceptibility to rheumatoid arthritis in a Japanese population. Nishimoto K, Ikari K, Kaneko H, Tsukahara S, Kochi Y, Yamamoto K, Nakamura Y, Toyama Y, Taniguchi A, Yamanaka H, Momohara S. J Rheumatol. 2011 Feb;38(2):221-8.
- 11) Fracture risk assessment and osteoporosis treatment disparities in 3,970 Japanese patients with rheumatoid arthritis. Furuya T, Hosoi T, Saito S, Inoue E, Taniguchi A, Momohara S, Yamanaka H. Clin Rheumatol. 2011 Aug;30(8):1105-11.
- 12) Reparative radiological changes of a large joint after adalimumab for rheumatoid arthritis. Momohara S, Tanaka E, Iwamoto T, Ikari K, Yamanaka H. Clin Rheumatol. 2011 Apr;30(4):591-2.
- 13) Interleukin-18 promoter polymorphisms in Japanese patients with rheumatoid arthritis: protective effect of the T allele and T/T genotype at rs360722. Sugiura T, Kawaguchi Y, Ikari K, Ichida H, Kawamoto M, Momohara S, Hara M, Yamanaka H. Mod Rheumatol. 2011 Aug;21(4):359-64.
- 14) Efficacy and tolerability of tocilizumab in rheumatoid arthritis patients seen in daily clinical practice in Japan: results from a retrospective study (REACTION study). Yamanaka H, Tanaka Y, Inoue E, Hoshi D, Momohara S, Hanami K, Yunoue N, Saito K, Amano K, Kameda H, Takeuchi T. Mod Rheumatol. 2011 Apr;21(2):122-33.
- 15) Incidence of falls and fear of falling in Japanese patients with rheumatoid arthritis. Yamagiwa K, Iijima S, Furuya T, Ikai T, Inoue E, Taniguchi A, Momohara S, Yamanaka H. Mod Rheumatol. 2011 Feb;21(1):51-6.

2. 学会発表

- 1) Lack of association between IL-15 genetic variants

and progression of joint destruction in Japanese rheumatoid arthritis patients. Yoshida S, Ikari K, Toyama Y, Taniguchi A, Yamanaka H, Momohara S. The 14th Annual European Congress of Rheumatology, The European League Against Rheumatism 2013.

2) Genetic association on disease severity in rheumatoid arthritis: a validation study in Japanese patients. Yoshida S, Ikari K, Yano K, Toyama Y, Taniguchi A, Yamanaka H, Momohara S. The 77th American College of Rheumatology/Associations of Rheumatology Health Professionals Annual Meeting 2013.

3) Analysis of factors associated with the Health Assessment Questionnaire score change in five years. Yoshida S, Ikari K, Shidara K, Ochi K, Toyama Y, Taniguchi A, Yamanaka H, Momohara S. The 76th American College of Rheumatology/Associations of Rheumatology Health Professionals Annual Meeting 2012.

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

厚生労働科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)

総合研究報告書

関節リウマチの PADI4 を標的とする治療法の開発

研究分担者 東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 教授 山本 一彦

研究協力者 庄田 宏文 同 助教

瀬理 裕 同 大学院生

藤尾 圭志 同 講師

鈴木 亜香里 理化学研究所 ゲノム医科学研究センター

自己免疫疾患研究チーム 上級研究員

研究要旨

関節リウマチ(Rheumatoid arthritis:RA)は多因子疾患であり、その疾患感受性遺伝子として Peptidylarginine deiminase 4 (PADI4)が同定されているが、関節炎病態における意義は明らかとなっていない。今回 PADI4 の関節炎病態・骨破壊における役割を明らかとするため、PADI4 knockout (KO)マウスを作成した。コラーゲン誘導性関節炎(CIA)モデルでは、関節炎の著明な軽減、抗コラーゲン抗体価の低下、血清炎症性サイトカインの低下を認めた。Glucose-6-phosphate isomerase (GPI)免疫による関節炎モデルでは、PADI4 KO マウスにおいて関節炎の重症度の低下がみられた。更に、顆粒球系細胞、単球系細胞の減少、抗 GPI 抗体価の低下、Th17 細胞の減少を認めた。PADI4 は関節炎の病態に関与することが想定されたが、その作用機序としては免疫系細胞に対して多様な影響を有していることが判明した。以上の検討より PADI4 は、自然免疫・獲得免疫系に影響を与え、RA の病態に重要な役割を果たすことが明らかとなった、新たな創薬標的となりうると考えられた。

A.研究目的

関節リウマチ(RA)は全身の関節に持続的な炎症をきたす疾患であり、炎症の持続により骨破壊、機能障害に至ることが知られている。RA は多因子疾患として知られているが、現在、RA の病因に関して、次のような仮説が提唱されている。すなわち、喫煙や歯肉炎により、肺や口腔内にシトルリン化蛋白が形成され、これに対する免疫応答が惹起される。そして、このような個人に偶発的な関節炎が起こり、関節内の蛋白がシトルリン化されることで、免疫応答の標的が関節内に向けられる、というものである。また、このシトルリン化された自己蛋白に対する自己抗体は、発症後の関節破壊の進展にも影響する。一方、我々は蛋白のシトルリン化酵素 Peptidylarginine deiminase 4 (PADI4)を RA の

疾患感受性遺伝子として同定し、疾患感受性アレルでは mRNA 分解の低下が起こることにより PADI4 の発現亢進が起きることが分かっている。メタ解析の結果では、アジア人だけでなく欧米人でも関連が認められることが追認され、民族を超えた普遍的な病因との関係が注目されている。一方で、PADI4 の生理学的機能研究では PADI4 はヒストンのシトルリン化などを介した転写調節により、細胞生存に関与しているとの報告もある。PADI4 は免疫系においては好中球、単球やマクロファージに発現することが知られている。しかし、PADI4 の免疫系における機能については未知の部分が多く、PADI4 を標的とした RA 治療法開発の為に PADI4 の免疫系における機能解析が必要である。そこで、この仮説において重要な役割を果たす PADI4 の病因論的

役割を検証し、根本的治療法を開発することを目的として研究を推進した。

B. 研究方法

(1) PADI4 KO マウス作成

PADI4 ノックアウトマウス(PADI4 gene exon 1 の欠損による)を C57BL/6 系で作成した。関節炎を惹起可能なバックグラウンドにするため、DBA/1J 系へのバッククロスを完成させた。

(2) コラーゲン誘発関節炎

DBA/1J, C57BL/6 系の 6-8 週齢メスマウスに、II 型コラーゲンを免疫し、コラーゲン誘発関節炎(collagen-induced arthritis (CIA))の発症率・重症度を検討した。経時的に採血した血清を用いて関節炎マウス血清中の抗 II 型コラーゲン抗体(IgM, IgG)、抗環状シトルリン化ペプチド(cyclic citrullinated peptide: CCP)抗体を ELISA 法にて測定した。また炎症関節組織におけるシトルリン化蛋白の発現を免疫染色法で調べた。一部のマウスは初回免疫後 7 日目でリンパ節、脾臓における濾胞性ヘルパー T 細胞(Tfh)、Germinal center (GC) B 細胞の分化を FACS で検討した。また脾臓 CD4 陽性 T 細胞を MACS にて単離し、II 型コラーゲン刺激に対する増殖反応を ³H-thymidine 取り込み法により測定した。

(3) OVA 免疫系

B6 PADI4 KO マウスを NP-OVA+alam で免疫し、血清抗 NP 抗体を測定するとともに、FACS で T 細胞分画、B 細胞分画を解析した。

(4) Glucose-6-phosphate isomerase (GPI) 誘発関節炎

GPI を CFA と免疫することで炎症性関節炎を誘導し、関節炎スコア、病理スコアを経時的に測定した。免疫前、day7、day14 における骨髓、脾臓、関節における免疫系細胞の数、表現型を FACS Vantage を用いて解析した。一部の細胞は cell sorting により回収し、RNeasy Micro kit(Qiagen) を用いて mRNA を合成したうえで、逆転写酵素(super script III (Invitrogen))により cDNA 合成を行い、SYBR Green(Qiagen)を用いて定量的 PCR を行った。免疫後経

時的に回収した血清を用いて、ELISA 法により抗 GPI 抗体価、IL-6 濃度を測定した。また、脾臓 CD4 陽性 T 細胞を MACS により単離したうえで、GPI で再刺激し、Th1, Th17 細胞への分化を FACS で測定した。

(5) in vitro Th17 分化実験

免疫前のマウス脾臓より CD4 陽性 T 細胞を単離し、抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体、各種サイトカインによる Th1, Th17 condition で培養を行い、Th1, Th17 細胞への分化を FACS で測定した。

(6) 骨髓好中球生存実験

マウス骨髓細胞より Percoll を用いて単離した好中球を、TNF-a, LPS, GM-CSF, G-CSF をそれぞれ添加して培養し、24 時間後の細胞死(Annexin V+PI)を FACS で解析した。

(7) サイトカイン産生測定

マクロファージ、樹状細胞の LPS に対する反応を検討するため、骨髓由来マクロファージ(bone marrow-derived macrophage: BMM)、骨髓由来樹状細胞(bone marrow-derived dendritic cell: BMDC)を作成し、試験管内で LPS(100ng/mL)で 24 時間刺激後の遺伝子発現を定量的 PCR で測定した。

(8) 倫理的配慮

マウス実験を行うに当たり、所属機関の承認を受けた動物実験計画書に従い、実験動物に対する倫理的配慮を最大限に行ったうえで、実験を施行した。

C. 研究結果

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

PADI4 KO により C57BL/6, DBA/1J 系ともに CIA の発症・関節炎スコアが有意に抑制された。さらに、PADI4 KO マウスでは、血清抗 II 型コラーゲン抗体価は、IgG, IgM ともに KO マウス群で免疫後 2 週間から WT 群と比較して有意な減少がみられた。一方、ACPA については抗 CCP 抗

体、抗シトルリン化フィブリノーゲンペプチド抗体とともに KO 群で低下していたが、シトルリン化されていないフィブリノーゲンペプチドに対する抗体も同程度に陽性となったため、その意義は不明であった。また病理スコアでは関節の骨破壊の抑制がみられた。関節炎局所では WT において滑膜、血管周囲にシトルリン化フィブリノーゲンの存在がみられたが、KO マウスでは存在は消失していた。初回免疫後 7 日目の検討では、FACS 解析では PADI4 KO マウス脾臓・局所リンパ節において、CD4+CXCR5+PD-1+濾胞性 T 細胞の減少、B220+GL-7+CD95+GC B 細胞の減少がみられた。PADI4 KO マウス由来の脾臓 CD4 陽性細胞の II 型コラーゲンに対する増殖反応には低下がみられた。

NP-OVA+alum 免疫後の PADI4 KO マウスでは抗 NP-IgG, IgM 抗体価の低下がみられた。一方で、NP(8), NP(25)に対する IgG1 抗体価はどちらも PADI4 KO で減少しており、抗体の affinity maturation との関連はみいだせなかった。免疫後 7 日目の脾臓において、CD4+CXCR5+PD-1+濾胞性 T 細胞の減少、B220+GL-7+CD95+GC B 細胞、CD138 陽性形質細胞の減少がみられた。

PADI4 KO マウスにおいて GPI 関節炎は有意に軽減された(平均スコア 10 vs 4: $p < 0.05$)。関節炎の発症については PADI4 KO マウスでやや遅れる傾向があったが最終的に有意差はみられなかった。病理学的検討では炎症細胞浸潤、骨破壊は PADI4 KO マウスで有意に軽度であった。PADI4 KO マウスにおいては、day14 における血清抗 GPI 抗体価(IgG, IgM)の減少、GC B 細胞の減少、day7 以降の血清 IL-6 濃度の低下が観察された。また、GPI 関節炎では IL-6-IL-17 pathway の重要性が報告されているが(Iwanami K, et al. Arthritis Rheum, 2008)、PADI4 KO マウスでは day7 における脾臓 CD4 陽性 T 細胞の Th17 分化が抑制されていた。一方で、免疫前の細胞を in vitro で Th17 へ分化させた場合、WT, PADI4 KO CD4 陽性 T 細胞で Th17 分化の程度は不変であったため、PADI4 KO GPI 関節炎における Th17 細胞減少に関しては、T 細胞へ

の extrinsic な影響が示唆された。

脾臓、所属リンパ節の総細胞数は GPI 免疫後に増加するが、PADI4 KO マウスでは有意に増加が低下していた。細胞別の解析では、CD3+T 細胞数、B 細胞数に差を認めなかったが、CD11b+Ly6G+の顆粒球系細胞、Ly6C+の単球系細胞の PADI4 KO マウスにおける有意な減少が認められた。骨髄における検討では、GPI 免疫前、免疫後でも WT, PADI4 KO で顆粒球系細胞、単球系細胞の細胞数に差を認めなかった。Day14 の炎症関節では、顆粒球系細胞の有意な減少を認めた。これらの細胞群のアポトーシス関連遺伝子の発現を定量的 PCR で検討したところ、PADI4 KO マウスにおいて Bcl-2, Bim, Bax, Bid などのアポトーシス関連遺伝子の発現が亢進していた。また骨髄好中球の in vitro におけるアポトーシスの検討では、いずれの条件においても PADI4 KO 好中球のアポトーシスが WT と比較して有意に亢進していた。

PADI4 KO マウス由来 BMM, BMDC においては、LPS 刺激後の TNF-alpha, IFN-gamma, IL-12p35 の遺伝子発現が低下していた。

D. 考察

PADI4 KO マウスモデルを用いた複数の関節炎モデルにおける検討により、PADI4 には関節炎を悪化させる作用があることが判明した。また、PADI4 は好中球、単球、マクロファージなどの自然免疫系細胞で主に発現しているが、PADI4 KO マウスにおいては自然免疫系のみならず、抗体産生の変化など獲得免疫系への影響も観察され、PADI4 が免疫系を広く制御している可能性が示唆された。

PADI4 のヒトにおける RA への病態との関わりについては、自己抗原のシトルリン化と、ACPA の産生に参与している可能性が考えられてきた。マウスにおける ACPA の意義は明らかではないが、CIA マウスにおいて ACPA が出現することは報告されている。一方で、我々の CIA モデルを用いた検討では、PADI4 KO マウスにおいては、確かに関節局所におけるシトルリン化抗原の発現はほぼ認められず、PADI4 欠損によるシトルリン化蛋白の減少作用は確認

された。また ACPA の抗体価は PADI4 KO マウスで減少していたものの、抗体の標的については、確実にシトルリン化されたエピートプを認識しているかどうかは明らかとはならなかった。マウス関節炎モデルにおける ACPA については、ヒト RA と異なり、必ずしもシトルリン化抗原を認識する抗体であることが示せないとの報告もあり(Vossenaar ER, et al. Arthritis Rheum, 2003)、別のシトルリン化抗原に対する抗体を検討するなど更なる検討が必要である。CIA の発症については、抗II型コラーゲン抗体が重要であることが知られている。我々の検討では、CIA マウスの系において、抗 II 型コラーゲン抗体価は IgG, IgM 共に低下していた。また NP-OVA-alum を免疫する別の系でも、抗 NP 抗体価の減少を確認している。これらの結果から、PADI4 KO マウスにおける CIA 改善効果は、獲得免疫系の低下による抗体産生低下による可能性があると考えられる。

また、PADI4 KO マウスにおける GPI 誘発関節炎モデル研究により、PADI4 が顆粒球系細胞・単球系細胞の生存、Th17 細胞の分化、抗体産生といった自然免疫・獲得免疫の幅広いシステムを制御していることが判明した。今回使用した GPI 関節炎モデルは IL-6-IL-17 pathway の重要性が証明されているモデルであり、PADI4 KO マウスの GPI 誘発関節炎軽症化の機序としては in vivo における Th17 細胞分化の減少が関与している可能性がある。また GPI 誘発関節炎における IL-6 の産生細胞としては CD11b 陽性細胞と報告されており、我々が細胞数の減少を証明した顆粒球系細胞・単球系細胞が IL-6 産生を担っている可能性を考慮している。

以上のような PADI4 KO マウスでの複数の関節炎モデルによる知見より、PADI4 阻害薬は RA 治療薬となりうると思われる。実際、腫瘍研究において PADI4 阻害作用のある小分子化合物の報告がなされつつあり、ヒトにおける副作用を見極めたうえでの RA 治療への応用も期待される。

E. 結論

マウスモデルによる検討により、PADI4 は関節炎の病態に

関与することが示された。また、PADI4 には、従来知られていなかった獲得免疫系に対する作用があることが推測された。PADI4 阻害療法は RA 治療の新たな戦略となることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1.Kochi Y, Thabet MM, Suzuki A, Okada Y, Daha NA, Toes REM, Huizinga TWJ, Myouzen K, Kubo M, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K. PADI4 polymorphism predisposes male smokers to rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis, 70:512-5, 2011.

2.Okada Y, Shimane K, Kochi Y, Tahira T, Suzuki A, Higasa K, Takahashi A, Horita T, Atsumi T, Ishii T, Okamoto A, Fujio K, Hirakata M, Amano H, Kondo Y, Ito S, Takada K, Mimori A, Saito K, Kamachi M, Kawaguchi Y, Ikari K, Mohammed O W, Matsuda K, Terao C, Ohmura K, Myouzen K, Hosono N, Tsunoda T, Nishimoto N, Mimori T, Matsuda F, Tanaka Y, Sumida T, Yamanaka H, Takasaki Y, Koike T, Horiuchi T, Hayashi K, Kubo M, Kamatani N, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K. A genome-wide association study identified AFF1 as a susceptibility locus for systemic lupuseyrthematosus in Japanese PLoS Genet. 2012;8(1):e100245

3.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.

4.Okamoto A, Fujio K, Tsuno NH, Takahashi K, Yamamoto K. Kidney-infiltrating CD4+ T-cell clones promote nephritis in lupus-prone mice. Kidney Int. 2012;82(9):969-79.

5.Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, Yoshida S, Graham RR, Manoharan A, Ortmann W, Bhangale T, Denny JC, Carroll RJ, Eyler AE, Greenberg JD, Kremer JM, Pappas DA, Jiang L, Yin J, Ye L, Su DF, Yang J, Xie G, Keystone E, Westra HJ, Esko T, Metspalu A, Zhou X, Gupta N, Mirel D, Stahl EA, Diogo D, Cui J, Liao K, Guo MH, Myouzen K, Kawaguchi T, Coenen MJ, van Riel PL, van de Laar MA, Guchelaar HJ, Huizinga TW, Dieudé P, Mariette X, Louis Bridges Jr S, Zhernakova A, Toes RE, Tak PP, Miceli-Richard C, Bang SY, Lee HS, Martin J, Gonzalez-Gay MA, Rodriguez-Rodriguez L, Rantapää-Dahlqvist S, Arlestig L, Choi HK, Kamatani Y, Galan P, Lathrop M; the RACI consortium; the GARNET consortium, Eyre S, Bowes J, Barton A, de Vries N, Moreland LW, Criswell LA, Karlson EW, Taniguchi A, Yamada R, Kubo M, Liu JS, Bae SC, Worthington J, Padyukov L, Klareskog L, Gregersen PK, Raychaudhuri S, Stranger BE, De Jager PL, Franke L, Visscher PM, Brown MA, Yamanaka H, Mimori T, Takahashi A, Xu H, Behrens TW, Siminovitch KA, Momohara S, Matsuda F, Yamamoto K, Plenge RM. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. Nature. 2013. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

1.瀬理 祐、山本 一彦ら. 関節リウマチの疾患感受性遺伝子である PADI4 の関節炎モデルマウスを用いた機能解析. 第 41 回日本臨床免疫学会総会(平成 25 年 11 月 27 日、下関)

2.Seri Y, Yamamoto K, et al. Peptidyl arginine deiminase type 4 deficiency suppresses the development of rhGPI induced arthritis. 第 42 回日本免疫学会総会(平成 25 年 12 月 12 日、千葉幕張)

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

研究成果の刊行に関する一覧表(平成 23 ~ 25 年度)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kubo S, Yamaoka K, Kondo M, Yamagata K, Zhao J, Iwata S, <u>Tanaka Y.</u>	The JAK inhibitor tofacitinib reduces the T cell stimulatory capacity of human monocyte-derived dendritic cells.	Ann Rheum Dis		in press	
<u>Tanaka Y</u> , Hirata S, Kubo S, Fukuyo S, Hanami K, Sawamukai N, Nakano K, Nakayamada S, Yamaoka K, Sawamura F, Saito K.	Discontinuation of adalimumab after achieving remission in patients with established rheumatoid arthritis: 1-year outcome of the HONOR study.	Ann Rheum Dis		in press	
<u>Tanaka Y.</u>	Next stage of RA treatment: TNF-inhibitor-free remission will be a possible treatment goal ?	Ann Rheum Dis	72	ii124-ii127	2013
<u>Tanaka Y</u> , Maeshima Y, Yamaoka K.	In vitro and in vivo analysis of a Jak inhibitor in rheumatoid arthritis.	Ann Rheum Dis	71	i70-i74	2012
Iwata S, Yamaoka K, Niino H, Nakano K, Wang S-P, Akashi K, <u>Tanaka Y.</u>	Amplification of toll-like receptor-mediated signaling through Syk in human B cell activation.	J Allergy Clin Immunol	129	1594-1601	2012

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 pathologies in rheumatoid arthritis using comprehensive multi-plane images of the 2nd metacarpophalangeal joint-Identification of the components which are reliable and influential on the global assessment of the whole joint.	Arthritis Rheum	in press		
Koike T.	IgG4-related disease: why high IgG4 and fibrosis. Arthritis Res Ther.	Arthritis Res Ther	15(1)	103	2013
Takeuchi T, Yamanaka H, Ishiguro N, Miyasaka N, Mukai M, Matsubara T, Uchida S, Akama H, Hartmut K, Vipin A, and <u>Tanaka Y.</u>	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	in press		
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	8(5)	e62231	2013
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	8(3)	e59341	2013

Sumitomo S, Fujio K, Okamura T, Morita K, Ishigaki K, Suzukawa K, Kanaya K, Kondo K, Yamasoba T, Furukawa A, Kitahara N, Shoda H, Shibuya M, Okamoto A, Yamamoto K.	Transcription factor early growth response 3 is associated with the TGF- 1 expression and the regulatory activity of CD4-positive T cells in vivo.	J Immunol	191(5)	2351-9	2013
Iwasaki Y, Fujio K, Okamura T, Yanai A, Sumitomo S, Shoda H, Tamura T, Yoshida H, Charnay P, Yamamoto K.	Egr-2 transcription factor is required for Blimp-1-mediated IL-10 production in IL-27-stimulated CD4+ T cells.	Eur J Immunol	43(4)	1063-73	2013
Sawamukai N, Satake A, Schmidt AM, Lamborn IT, <u>Tanaka Y</u> , Kambayashi T.	Cell autonomous role of TGF and IL-2 receptor in CD4+ and CD8+ inducible regulatory T cell generation during graft-versus-host disease.	Blood	119	5575-83	2012
Iwata S, Yamaoka K, Niuro H, Nakano K, Wang S-P, Akashi K, <u>Tanaka Y</u> .	Amplification of toll-like receptor-mediated signaling through Syk in human B cell activation.	J Allergy Clin Immunol	129	1594-1601	2012
Iwata S, Saito K, Tokunaga M, <u>Tanaka Y</u> .	Phenotypic changes of lymphocyte in a patients with IgG4-related disease after corticosteroid therapy.	Ann Rheum Dis	71	2058-2059	2012
Tak PP, Mease PJ, Genovese MC, Kremer J, Haraoui B, Tanaka Y, Bingham III CO, Ashrafzadeh A, Travers H, Safa-Leathers S, Kumar S, Dummer W.	Efficacy and safety of ocrelizumab in patients with active rheumatoid arthritis with an inadequate response to at least one TNF inhibitor: results from the phase III SCRIPT trial.	Arthritis Rheum	64	360-370	2012

Sonomoto K, Yamaoka K, Oshita K, Fukuyo S, Zhang X, Nakano K, Okada Y, <u>Tanaka Y.</u>	IL-1 induces differentiation of human mesenchymal stem cells into osteoblasts via the Wnt5a/Ror2 pathway.	Arthritis Rheum	64	3355-3363	2012
Maeshima K, Yamaoka K, Kubo S, Nakano K, Iwata S, Saito K, Ohishi M, Miyahara H, Tanaka S, Ishi K, Yoshimatsu H, <u>Tanaka Y.</u>	A JAK inhibitor tofacitinib regulates synovitis through inhibition of IFN-g and IL-17 production by human CD4+ T cells.	Arthritis Rheum	64	1790-1798	2012
Kawashiri SY, Arima K, Suzuki T, Nakashima Y, Horai Y, Okada A, Tamai M, Nakamura H, <u>Kawakami A.</u>	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	In Press		
Kawashiri SY, Fujikawa K, Nishino A, Suzuki T, Okada A, Nakamura H, <u>Kawakami A.</u>	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
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, <u>Kawakami A.</u>	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
Kita J, Tamai M, Arima K, Nakashima Y, Suzuki T, Kawashiri SY, Iwamoto N, Okada A, Koga T, Yamasaki S, Nakamura H, Origuchi T, Ida H, Aoyagi K, Uetani M, Eguchi K, <u>Kawakami A.</u>	Treatment discontinuation in patients with very early rheumatoid arthritis in sustained simplified disease activity index remission after synthetic disease-modifying anti-rheumatic drug administration.	Mod Rheumatol	22 (3)	346-352	2012

<p>Tamai M, <u>Kawakami A</u>, Uetani M, Fukushima A, Arima K, Fujikawa K, Iwamoto N, Aramaki T, Kamachi M, Nakamura H, Ida H, Origuchi T, Aoyagi K, Eguchi K.</p>	<p>Magnetic resonance imaging (MRI) detection of synovitis and bone lesions of the wrists and finger joints in early-stage rheumatoid arthritis: comparison of the accuracy of plain MRI-based findings and gadolinium-diethylenetriamine pentaacetic acid-enhanced MRI-based findings.</p>	<p>Mod Rheumatol</p>	<p>22 (5)</p>	<p>654-658</p>	<p>2012</p>
<p>Fukae J, Isobe M, Kitano A, Henmi M, Sakamoto F, Narita A, Ito T, Mitsuzaki A, Shimizu M, Tanimura K, Matsuhashi M, Kamishima T, Atsumi T, <u>Koike T.</u></p>	<p>Radiographic prognosis of finger joint damage predicted by early alteration in synovial vascularity in patients with rheumatoid arthritis: Potential utility of power doppler sonography in clinical practice.</p>	<p>Arthritis Care Res</p>	<p>63(9)</p>	<p>1247-53</p>	<p>2011</p>
<p>Otomo K, Atsumi T, Amengual O, Fujieda Y, Kato M, Oku K, Horita T, Yasuda S, <u>Koike T.</u></p>	<p>The efficacy of antiphospholipid score for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and its predictive value for thrombotic events.</p>	<p>Arthritis Rheum</p>	<p>64(2)</p>	<p>504-12</p>	<p>2012</p>
<p>Fukae J, Isobe M, Kitano A, Henmi M, Sakamoto F, Narita A, Ito T, Mitsuzaki A, Shimizu M, Tanimura K, Matsuhashi M, Kamishima T, Atsumi T, <u>Koike T.</u></p>	<p>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.</p>	<p>Rheumatology</p>	<p>52(3)</p>	<p>523-8</p>	<p>2013</p>
<p>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, <u>Koike T.</u></p>	<p>Ultrasound assessment of synovial pathologic features in rheumatoid arthritis using comprehensive multi-plane images of the 2nd metacarpophalangeal joint - Identification of the components which are reliable and influential on the global assessment of the whole joint.</p>	<p>Arthritis Rheum</p>	<p>in press</p>		

Fukae J, Tanimura K, Atsumi T, <u>Koike T.</u>	Sonographic synovial vascularity of synovitis in rheumatoid arthritis.	Rheumatology	epub ahead of print		
Murakami Y, Mizoguchi F, Saito T, Miyasaka N, <u>Kohsaka H.</u>	p16(INK4a) exerts an anti-inflammatory effect through accelerated IRAK1 degradation in macrophages.	J Immunol.	189	5066-72	2012
細矢 匡, <u>上阪 等</u>	【低分子抗炎症薬の進歩】CDK 阻害薬の発見から臨床応用の可能性まで	炎症と免疫	20	278-283	2012
岩井 秀之, <u>上阪 等</u>	新規関節炎治療標的としての Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 阻害	日本臨床免疫学会会誌	35	81-86	2012
溝口 史高, <u>上阪 等</u>	関節リウマチにおける microRNA の役割	日本臨床免疫学会会誌	35	69-74	2012
<u>上阪 等</u>	【関節リウマチの最新情報-寛解を目指した診断と治療の新展開-】新たな関節リウマチ治療のターゲット 滑膜線維芽細胞を標的とした治療法の開発	最新医学	67	281-286	2012
Umeda N, Matsumoto I, Ito I, Kawasaki A, Tanaka Y, Inoue A, Tanaka Y, Tsuboi H, Suzuki T, Hayashi T, Ito S, Tsuchiya N, <u>Sumida T.</u>	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	44-53	2013
Horikoshi M, Goto D, Segawa S, Yoshiga Y, Iwanami K, Inoue A, Tanaka Y, Matsumoto I, <u>Sumida T.</u>	Activation of invariant NKT cells with glycolipid ligand -galactosylceramide ameliorates glucose-6-phosphate isomerase peptide-induced arthritis.	PLoS One	7	e51215	2012

Inoue A, Matsumoto I, Tanaka Y, Umeda N, Tanaka Y, Mihara M, Takahashi S, <u>Sumida T.</u>	Murine tumor necrosis factor -induced adipose-related protein (tumor necrosis factor -induced protein 9) deficiency leads to arthritis via interleukin-6 overproduction with enhanced NF- B, STAT-3 signaling, and dysregulated apoptosis of macrophages.	Arthritis Rheum	64	3877-85	2012
Kondo Y, Iizuka M, Wakamatsu E, Yao Z, Tahara M, Tsuboi H, Sugihara M, Hayashi T, Yoh K, Takahashi S, Matsumoto I, <u>Sumida T.</u>	Overexpression of T-bet gene regulates murine autoimmune arthritis.	Arthritis Rheum	64	162-72	2012
Yoshiga Y, Goto D, Segawa S, Horikoshi M, Hayashi T, Matsumoto I, Ito S, Taniguchi S, <u>Sumida T.</u>	Activation of natural killer T cells by -carba-GalCer (RCAI-56), a novel synthetic glycolipid ligand, suppresses murine collagen-induced arthritis.	Clin Exp Immunol	164	236-47	2011
Nishimoto N, Koichi Amano, <u>Tsutomu Takeuchi,</u> Nobuhiro Takagi, et al.	Retreatment efficacy and safety of tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis in recurrence (RESTORE) study.	Mod Rheumatol	24	26-32	2014
Kaneko Y, Kondo H and <u>Takeuchi T.</u>	ACR/EULAR remission criteria maintains strict performance when evaluated in 44 joints.	J Rheumatology	40	1254-8	2013
Nishina N, Kaneko Y, Kameda H, Kuwana M, and <u>Takeuchi T.</u>	Reduction of plasma IL-6, but not TNF- by methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis: a potential biomarker for radiographic progression.	Clinical Rheumatol	32	1661-7	2013
Nishina N, Kikuchi J, Hashizume M, Yoshimoto K, Kameda H, and <u>Takeuchi T.</u>	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,		In press	

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
Nakashima R, Imura Y, Hosono Y, Seto M, Murakami A, Watanabe K, Handa T, Mishima M, Hirakata M, Takeuchi T, Fujio K, Yamamoto K, Kohsaka H, Takasaki Y, Enomoto N, Suda T, Chida K, Hisata S, Nukiwa T, <u>Mimori T</u> .	The Multicenter Study of a New Assay for Simultaneous Detection of Multiple Anti-Aminoacyl-tRNA Synthetases in Myositis and Interstitial Pneumonia	PLoS One	9	e85062	2014
Tanizawa K, Handa T, Nakashima R, Kubo T, Hosono Y, Aihara K, Ikezoe K, Watanabe K, Taguchi Y, Hatta K, Oga T, Chin K, Nagai S, <u>Mimori T</u> , Mishima M	The prognostic value of HRCT in myositis-associated interstitial lung disease.	Respir Med.	107	745-752	2013
<u>Mimori T</u> , Nakashima R, Hosono Y	Interstitial lung disease in myositis: Clinical subsets, biomarkers, and treatment.	Curr Rheumatol Rep	14	264-274	2012
Watanabe K, Handa T, Tanizawa K, Hosono Y, Taguchi Y, Noma S, Kobashi Y, Kubo T, Aihara K, Chin K, Nagai S, <u>Mimori T</u> , Mishima M	Detection of antisynthetase syndrome in patients with idiopathic interstitial pneumonias.	Respir Med.	105	1238-1247	2011
Tanizawa K, Handa T, Nakashima R, Kubo T, Hosono Y, Watanabe K, Aihara K, Oga T, Chin K, Nagai S, <u>Mimori T</u> , Mishima M	HRCT features of interstitial lung disease in dermatomyositis with anti-CADM-140 antibody.	Resp Med	105	1380-1387	2011
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, <u>Mimori T</u> , <u>Yamanaka H</u> , Kamatani N, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K.	Functional variants in NFKBIE and RTKN2 involved in activation of the NF- B pathway are associated with rheumatoid arthritis in Japanese.	Plos Genet	8(9)	e1002949	2012

<p>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, <u>Yamanaka H</u>, Yamada R, Saji H, Matsuda F, Mimori T.</p>	<p>ACPA-negative RA consists of two genetically distinct subsets based on RF positivity in Japanese.</p>	<p>Plos One</p>	<p>7(7)</p>	<p>e40067</p>	<p>2012</p>
<p>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, Tani 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, <u>Yamanaka H</u>, Momohara S, Yamada R, Matsuda F, Yamamoto K</p>	<p>Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population.</p>	<p>Nat Genet</p>	<p>25</p>	<p>511-6</p>	<p>2012</p>
<p>Yamanaka H, Tanaka Y, Inoue E, Hoshi D, Momohara S, Hanami K, Yunoue N, Saito K, Amano K, Kameda H, Takeuchi T.</p>	<p>Efficacy and tolerability of tocilizumab in rheumatoid arthritis patients seen in daily clinical practice in Japan: results from a retrospective study (REACTION study).</p>	<p>Mod Rheumatol</p>	<p>21</p>	<p>122-33</p>	<p>2011</p>

<p>Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, Yoshida S, Graham RR, Manoharan A, Ortmann W, Bhangale T, Denny JC, Carroll RJ, Eyster AE, Greenberg JD, Kremer JM, Pappas DA, Jiang L, Yin J, Ye L, Su DF, Yang J, Xie G, Keystone E, Westra HJ, Esko T, Metspalu A, Zhou X, Gupta N, Mirel D, Stahl EA, Diogo D, Cui J, Liao K, Guo MH, Myouzen K, Kawaguchi T, Coenen MJ, van Riel PL, van de Laar MA, Guchelaar HJ, Huizinga TW, Dieudé P, Mariette X, Louis Bridges Jr S, Zhernakova A, Toes RE, Tak PP, Miceli-Richard C, Bang SY, Lee HS, Martin J, Gonzalez-Gay MA, Rodriguez-Rodriguez L, Rantapää-Dahlqvist S, Arlestig L, Choi HK, Kamatani Y, Galan P, Lathrop M; the RACI consortium; the GARNET consortium, Eyre S, Bowes J, Barton A, de Vries N, Moreland LW, Criswell LA, Karlson EW, Taniguchi A, Yamada R, Kubo M, Liu JS, Bae SC, Worthington J, Padyukov L, Klareskog L, Gregersen PK, Raychaudhuri S, Stranger BE, De Jager PL, Franke L, Visscher PM, Brown MA, <u>Yamanaka H</u>, Mimori T, Takahashi A, Xu H, Behrens TW, Siminovitch KA, Momohara S, Matsuda F, <u>Yamamoto K</u>, Plenge RM.</p>	<p>Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery.</p>	<p>Nature</p>	<p>506</p>	<p>376-381</p>	<p>2013</p>
<p>Okamoto A, Fujio K, Tsuno NH, Takahashi K, <u>Yamamoto K</u>.</p>	<p>Kidney-infiltrating CD4+ T-cell clones promote nephritis in lupus-prone mice.</p>	<p>Kidney Int</p>	<p>82</p>	<p>969-79</p>	<p>2012</p>

<p>Okada Y, Shimane K, Kochi Y, Tahira T, Suzuki A, Higasa K, Takahashi A, Horita T, Atsumi T, Ishii T, Okamoto A, Fujio K, Hirakata M, Amano H, Kondo Y, Ito S, Takada K, Mimori A, Saito K, Kamachi M, Kawaguchi Y, Ikari K, Mohammed O W, Matsuda K, Terao C, Ohmura K, Myouzen K, Hosono N, Tsunoda T, Nishimoto N, Mimori T, Matsuda F, Tanaka Y, Sumida T, Yamanaka H, Takasaki Y, Koike T, Horiuchi T, Hayashi K, Kubo M, Kamatani N. Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K.</p>	<p>Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population</p>	<p>Nat Genet.z</p>	<p>44</p>	<p>511-6</p>	<p>2012</p>
<p>Kochi Y, Thabet MM, Suzuki A, Okada Y, Daha NA, Toes REM, Huizinga TWJ, Myouzen K, Kubo M, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K.</p>	<p>PADI4 polymorphism predisposes male smokers to rheumatoid arthritis.</p>	<p>Ann Rheum Dis.</p>	<p>70</p>	<p>515-5</p>	<p>2011</p>