

いま話題の関節リウマチの病因論

山田久方 九州大学生体防御医学研究所
(2010年、第11回博多リウマチセミナー)

【話題】

- 1) RA の感受性遺伝子 キーワード : GWAS
- 2) RA の 2 つのサブセット キーワード : ACPA
- 3) RA の病因細胞 キーワード : Th17

1) RA の感受性遺伝子

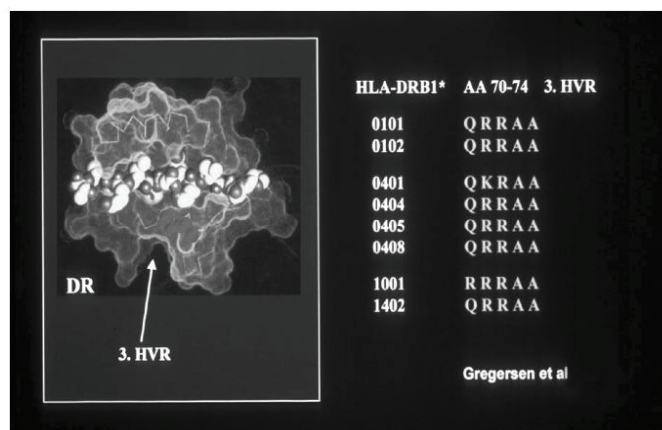
RA 発症への遺伝的要因の関与を示唆する知見

- RA の家族集積性 : 一卵性双生児で 12-15%、二卵性双生児や兄弟間では 2-4%。
全体の 60%が遺伝要因との推定も(1)。

RA との関連がよく知られている遺伝子、およびその遺伝子産物

HLA (human leukocyte antigen)

- ・全遺伝要因の 30%を説明できると統計学的に推測されている。
- ・HLA-DR タンパクはマクロファージ、樹状細胞、B 細胞等が発現し、CD4T 細胞に抗原を提示する。
- ・特に HLA-DR 分子β鎖をコードする遺伝子の DRB1*0101、*0401、*0404、*0405 などが RA と関連する。これらの遺伝子から作られる DRβ鎖の 70-74 番目のアミノ酸配列はほぼ共通(QK/RRAA)し、**shared epitope (SE)**と呼ばれる(2)。

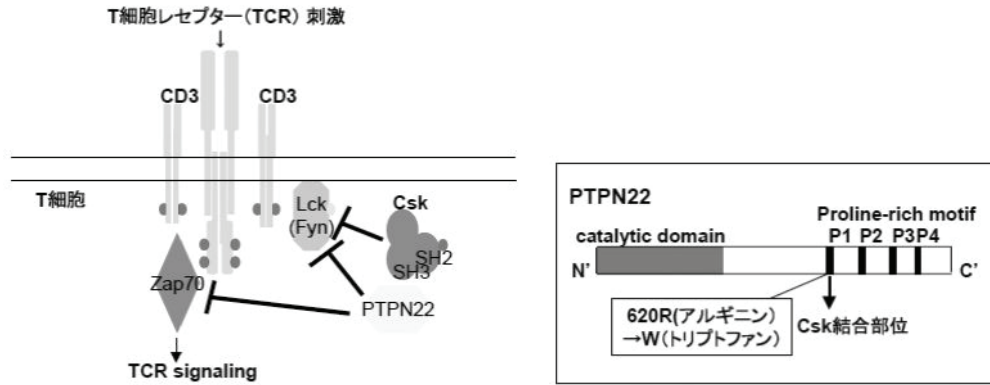


de Vries et al. (2005) (3)より引用

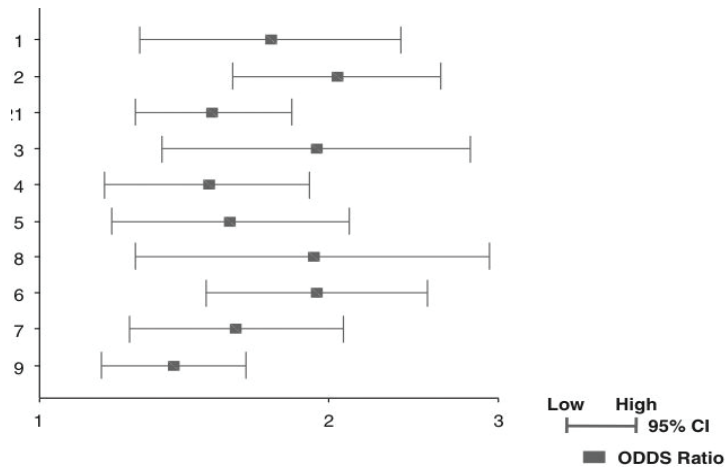
- ・しかし、日本人では SE を持たない DRB1*0901 とも RA が関連。アフリカ系、ヒスパニック系も SE は関係ない様子。

PTPN22 (protein tyrosine phosphatase N22)

- ・チロシン脱リン酸化酵素で、T細胞の抗原レセプターからのシグナルを抑制。
- ・PTPN22 遺伝子の 1858 番目のシトシン(C)がチミン(T)になった C1858T 多型 (アミノ酸では 620 番目のアルギニンがトリプトファンに置換) は RA 感受性 (4)。



- ・多くの追試で RA の危険性が 1.4~2 倍に増加することが示されている(5)。



- ・RA 以外にも SLE や 1 型糖尿病などとも関連する。
- ・しかし、日本人にはこの多型自体がほとんど存在しない！

ゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study: **GWAS**)

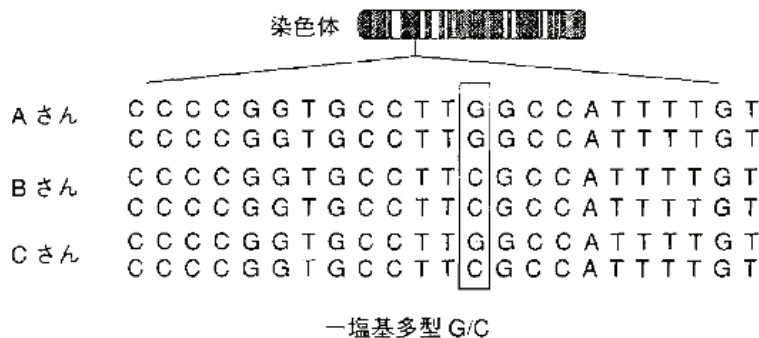
従来の疾患関連遺伝子の研究法：特定の候補遺伝子を疾患群と対照群で比較

→ あらかじめ疾患との関連が予想されないような遺伝子は検討されない。

GWAS：特定の候補遺伝子を決めず、ランダムに全ゲノム（染色体全体）をスクリーニングする。特に一塩基多型(single nucleotide polymorphism: **SNP***)を利用した、疾患群と対照群の関連解析法が用いられる。

※SNPとは？

ヒトゲノムは約 30 億個の塩基対からなり、個人間には約 0.5%の違いがある。塩基配列の違いのうち、一般人口中で 1%以上存在するものを多型と呼び、SNP は多型を認める一塩基(例: C1858T)。2005 年 HapMap プロジェクトで全ゲノムの SNP のリストが完成し、解析が大きく進歩した (6)。SNP は約 1000 万個あるが、その中の約 50 万個を調べることでほぼ全体がカバーできることが明らかに。

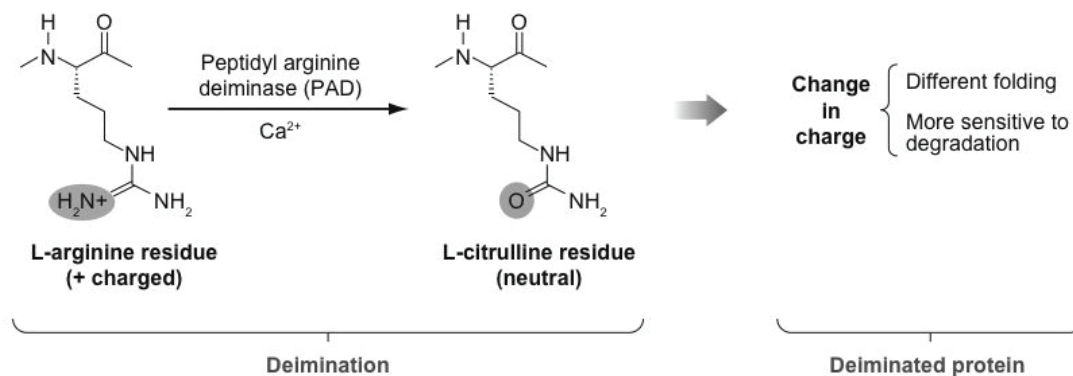


- ・実際、50 万個の遺伝子多型を約 2000 人の RA 患者と 3000 人の対照群と比較することで、*HLA-DRB1* や *PTPN22* との関連も再確認されている (7)。

GWAS から明らかになってきた RA 感受性遺伝子 (代表例)

***PADI4* (peptidylarginine deiminase 4) (8)**

- ・タンパクのアルギニン残基をシトルリンに変換する酵素の一つ。



Klareskog *et al.* (2008) (9)より引用

- ・感受性多型では *PADI4* mRNA の安定性が高く、*PADI4* タンパク発現が増加。
- ・最初に日本人の GWAS から発見され、韓国人の解析でも関連を認めた。
- ・しかし欧米白人では関連が見られない (10)。

TNFAIP3 (tumor necrosis factor alpha-induced protein 3) (11, 12)

- ・ TNF- α シグナル抑制に働く、A20 と呼ばれるタンパクをコードする遺伝子。
- ・ 疾患感受性多型では TNF- α のシグナル抑制が弱いことが示されている (13)。
- ・ RA のみならず SLE でも関連が認められている。

TRAF1/C5 (TNF receptor-associated factor 1/C5) (14, 15)

- ・ TNF レセプター等のシグナル伝達分子の TRAF1 と補体第 5 成分(C5)の遺伝子の中間に位置する塩基の多型。
- ・ CCP 抗体陽性 RA 患者を対象にした GWAS で検出された。

CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) (16)

- ・ 活性化した T 細胞が発現し、抑制シグナルを入れる分子。
- ・ 自己免疫性甲状腺炎、1 型糖尿病、SLE、重症筋無力症との関連も報告。

STAT4 (signal transducer and activator of transcription 4) (17)

- ・ インターロイキン(IL)-12 や IL-23 などのサイトカインシグナルに関わる転写因子。

CD244 (18)

- ・ NK 細胞などの表面に発現し、機能調節に働く分子。日本人のみで RA と関連。

FCRL3 (Fc receptor-like 3) (19)

- ・ これも日本人で見つかった RA 関連遺伝子。機能は不明。

GWAS から見えてきた問題点

- ・ 人種間での遺伝学的異質性 (**genetic heterogeneity**) がかなり大きい。
- ・ *HLADRB1* と *PTPN22* 以外は、全てオッズ比 1.1~1.5 程度の弱い関連のみ。

Gene	dbSNP ID	Effect on gene function	Allele frequency ^a		Effect size in meta-analysis (odds ratio) ^b	
			European	Asian	European	Asian
PTPN22	rs2476601	Amino-acid change	0.14	<0.01	1.68 (1.53-1.84)	n.a.
TRAF/C5	rs3761847	Unknown	0.48	0.53	1.10 (1.04-1.16)	n.a.
TNFAIP3 (6q23)	rs6920220	Unknown	0.18	<0.01	1.24 (1.16-1.32)	n.a.
PADI4	rs2240340	Stability of mRNA	0.43	0.42	1.13 (0.99-1.29)	1.31 (1.15-1.48)
FCRL3	rs7528684	Transcription-factor binding	0.44	0.43	1.03 (0.98-1.09)	1.20 (1.12-1.29)
CD244	rs6682654	Transcription-factor binding	0.36	0.57	n.a.	n.a.

Kochi *et al.* (2009) (20)より引用

- ・ では、遺伝子解析は役に立たない? ⇔ 治療標的として証明された例もある
 CTLA-4 遺伝子と RA (Abatacept : 可溶性 CTLA4-Ig)
 IL-23R 遺伝子と Crohn 病 (Ustekinumab : 抗 IL-12/23p40 抗体)

2) RA には 2 つのサブセット？

ACPA (anti-citrullinated protein/peptide antibody) 陽性 RA と ACPA 陰性 RA

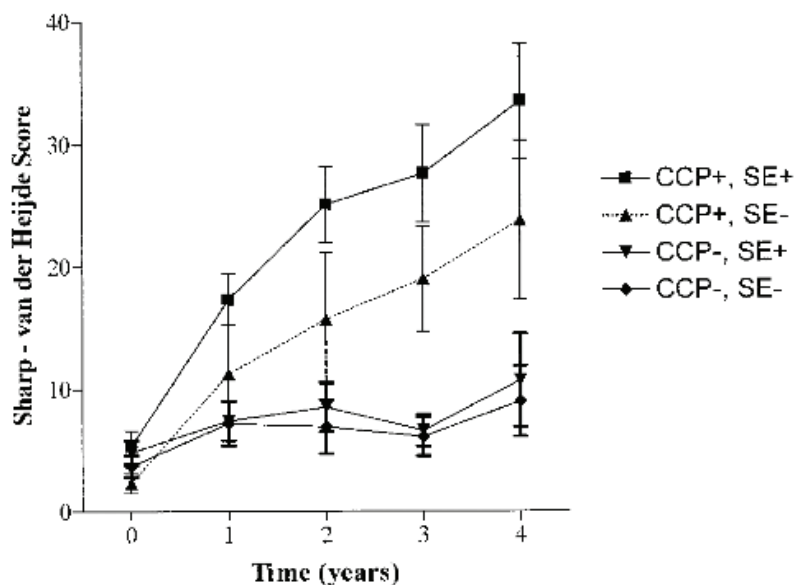
- SE と関連するのは、ACPA 陽性 RA のみであることが明らかになった (21)。

SE	Dutch EAC RA patients				
	Dutch controls (n = 423), no. (%)	Anti-CCP positive (n = 195)		Anti-CCP negative (n = 213)	
		No. (%)	OR (95% CI)	No. (%)	OR (95% CI)
+/+	26 (6)	49 (25)	11.79 (6.58–21.13)	16 (8)	1.38 (0.71–2.67)
+/-	153 (36)	107 (55)	4.37 (2.88–6.65)	88 (41)	1.29 (0.91–1.82)
-/-	244 (58)	39 (20)	1.0	109 (51)	1.0

* The following alleles were classified as shared epitope (SE) positive: DRB1*0101, *0102, *0104, *0401, *0404, *0405, *0408, *0413, *0416, *1001, and *1402 (4). EAC = Early Arthritis Clinic; RA = rheumatoid arthritis; CCP = cyclic citrullinated peptide; OR = odds ratio; 95% CI = 95% confidence interval.

Huizinga *et al.* (2005) (21)より引用

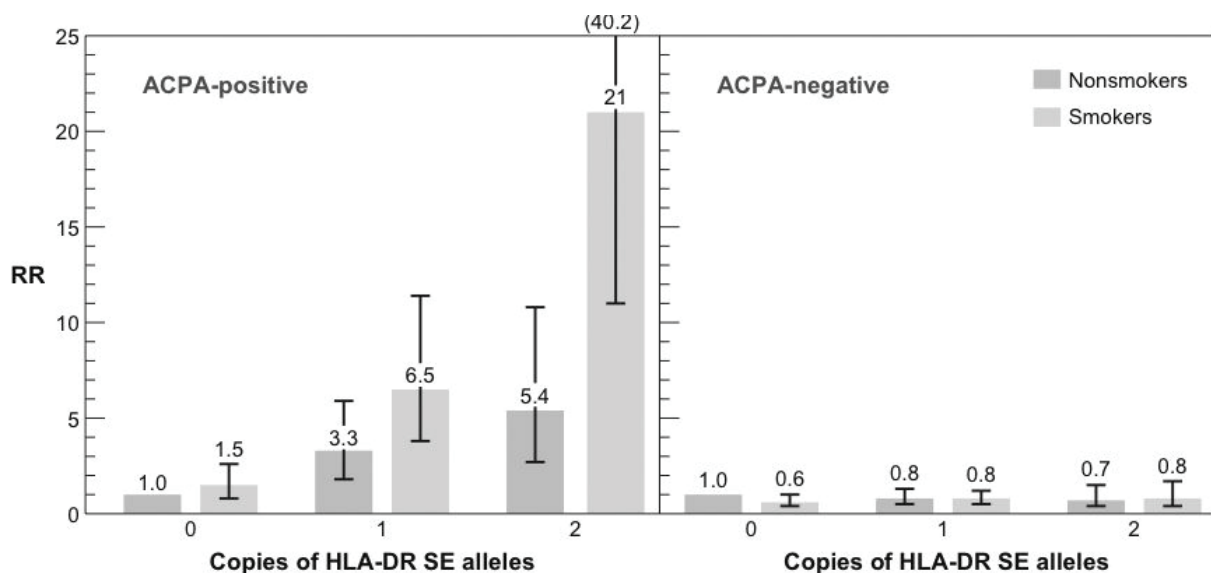
- SE は骨破壊と相関すると言われていたが、これも ACPA 陽性患者に限られる。
(一方、ACPA 陽性 RA と陰性 RA の間には骨破壊に大きな差がある)



- *PTPN22*, *CTLA4*, *TRAF1/C5* 等の多型も ACPA 陽性 RA とのみ関連 (15, 16)。
- 一方、*PADI4* はタンパクのシトルリン化に関わる分子であるにもかかわらず、その遺伝子多型と ACPA 価とは関連がないとする報告が多い。
- *STAT4* も ACPA とはあまり関連なさそう。

喫煙も？！

- ・喫煙と関連するのも ACPA 陽性 RA。SE 陽性でさらに危険が増加 (22)。



Klareskog *et al.* (2008) (9)より引用

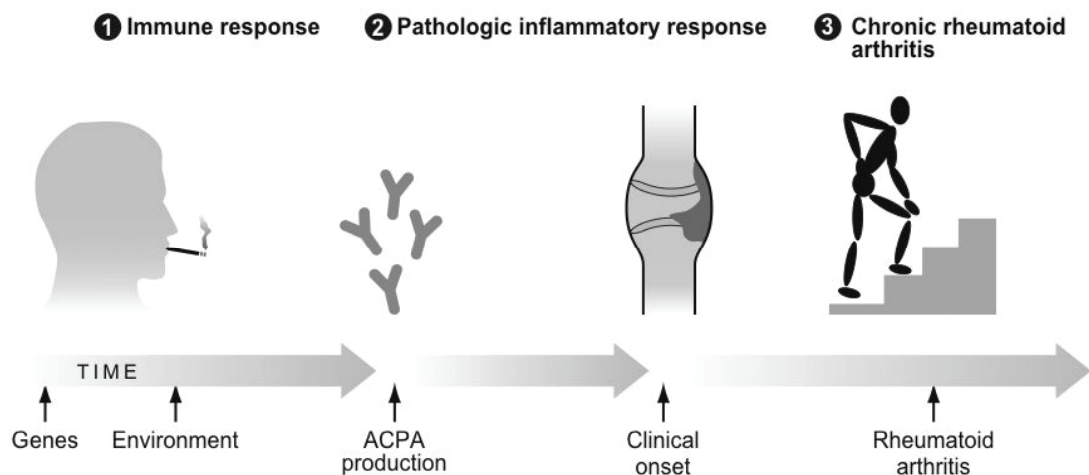
RR = relative risk

→ SE 陽性の方がタバコを吸うと ACPA 陽性 RA になりやすいのか？

この仮説を支持するデータ

- ・喫煙者の肺胞洗浄液中細胞ではシトルリン化タンパクが検出 (22)。
- ・一部のペプチドはシトルリン化を受けると、HLA-DR4 への結合能が増加 (23)。
- ・シトルリン化フィブリノーゲンの免疫で、HLA-DR4 遺伝子導入マウスは関節炎発症 (24)

推測される RA 発症機序



Klareskog *et al.* (2008) (9)より引用

- ❶ 喫煙などによる肺の組織損傷はタンパクのシトルリン化を引き起こす。ここで、*HLADRBI*、*PTPN22* などの感受性遺伝子多型を持っているとシトルリン化タンパクに対する自己免疫応答が誘導される(これは関節炎発症の数年前から、ACPA が検出される事実と一致する)。
- ❷ 外傷、感染等により関節内で非特異的炎症が起きると、局所で PADI が活性化され、シトルリン化自己タンパクができる。
- ❸ 関節内のシトルリン化自己タンパクに対する免疫反応は慢性炎症 (RA) を引き起こす。
→ しかし、これで RA の病態 (多発性など) が説明できるのか？

注) タンパクのシトルリン化は、アポトーシスや炎症が起きている部位では RA に限らず認められる。表皮角質、中枢神経星状細胞などでは生理的状态でもシトルリン化が起きている。すなわち、シトルリン化タンパク自体ではなく、それに対する抗体ができるのが RA の特徴であることに注意。

その他の知見

- ・ ACPA 陽性と陰性では滑膜病理組織像も異なるという報告もある (25)。
- ・ しかし喫煙はあまり関係ないという報告も (26)。

3) RA の病因細胞

RA の自己免疫病態の中心は、自己反応性 CD4T 細胞と考えられている。

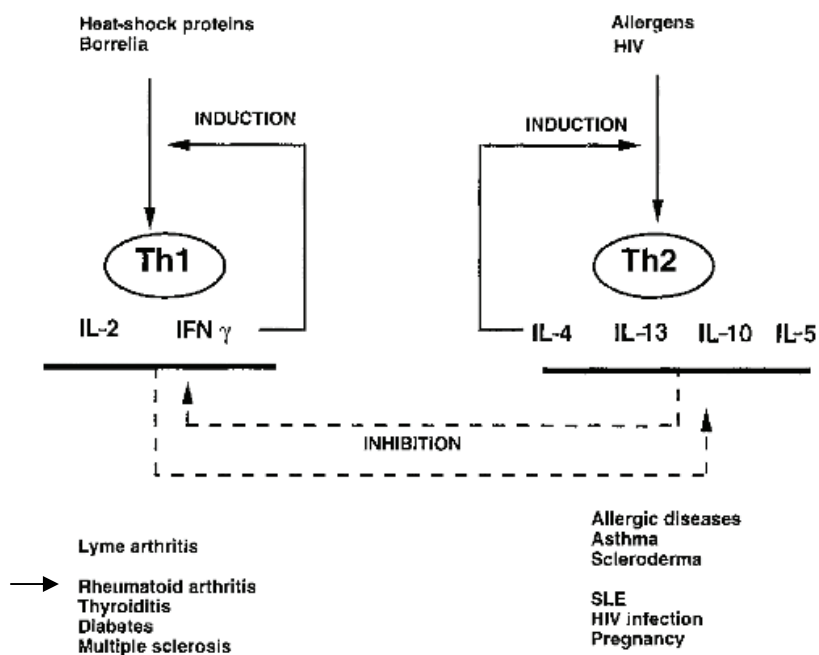
【理由】

- ・ 炎症滑膜組織への活性化 CD4T 細胞の浸潤。
- ・ MHC クラス II 遺伝子 (*HLADR*) との関連。
- ・ 実験的に誘導される自己免疫性関節炎の発症に CD4T 細胞が必要。
など

では、どのような CD4T 細胞なのか？

→ 従来は CD4T 細胞の中でもインターフェロン (IFN)- γ などを産生し、マクロファージを活性化する Th1 型ヘルパーT 細胞と考えられていた。

Th1/Th2 バランス説



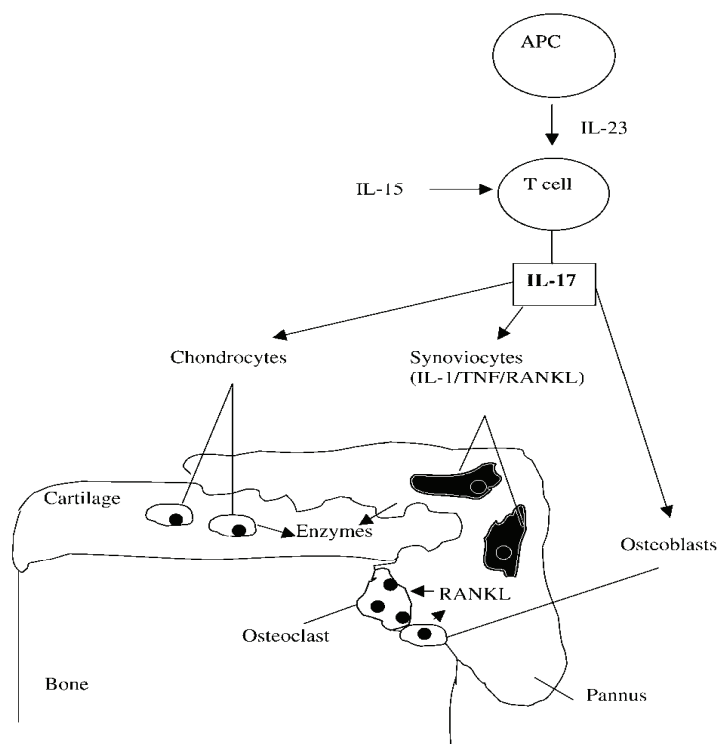
Miossec and van den Berg (1997) (27)より引用

しかし、ここ数年の自己免疫動物モデルの解析から、Th1 細胞ではなく、IL-17 とそれを産生する新たなヘルパーCD4T 細胞サブセット (**Th17 細胞**) が、疾患発症に重要なことが明らかになった。

Th17 病因説を支持する知見

- IL-17 欠損マウスや抗 IL-17 抗体を投与されたマウスは、各種関節炎モデルの誘導に抵抗性 (28)。
- IL-17 にはマクロファージや線維芽細胞の活性化に加え、軟骨細胞の各種サイトカインや MMP の産生誘導およびプロテオグリカン産生抑制、骨芽細胞の RANKL 発現誘導による破骨細胞誘導作用などもある。

→ RA の関節破壊病態をよく説明できるよう。



Lubberts *et al.* (2005)(28) より

多くの総説で「RA 関節では IL-17 が大量に産生」と記述されている。実際のデータは？

関節液中の IL-17 濃度 (ELISA 法)

著者	RA	OA
Kotake (1999)	2.5	<0.5
Ziolkowska (2000)	≒ 700 (12/15)	<15 (0/8)
Raza (2005)	早期: 30 (6/8) 慢性期: 0 (0/9)	0 (0/4)
Hirota (2007)	≒ 40 (10/21)	<4 (1/21)
Singhら (2007)	<7.8 (14/31) 反応性関節炎: 46 (21/33)	<7.8 (3/10)
Shahrara (2008)	238 ± 64	38 ± 18
Hussein (2008)	6.4 ± 23	0.5 ± 0.2
Moran (2009)	(28/49 反応性関節炎を含む)	(1/5)

数値は平均値 (pg/ml)、表中の括弧内は検出頻度。Yamada (2009) (29) より改変引用
確かに OA に比べて平均値が高いことが多いが、半数近くの症例で測定限界以下。発症初期

RA、反応性関節炎や若年性特発性関節炎などで IL-17 が有意に高値を示しても、RA と OA の間には差を認めない場合もある。

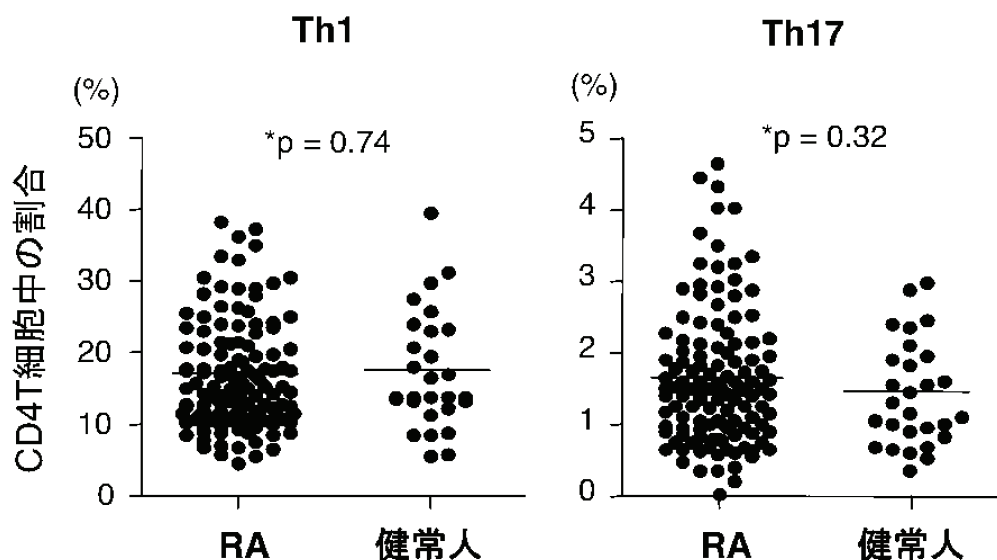
関節滑膜組織の IL-17mRNA 発現頻度 (RT-PCR 法)

著者	RA	OA
Chabaud (1999) (30)	4/5	0/3
Kirkham (2006) (31)	15/54	データなし
Kohno (2008) (32)	0.245 (IL-17/GAPDH)	0.327
Stamp (2009) (33)	13/25	データなし
Hillyer (2009) (34)	13/18	データなし

全ての RA 滑膜で IL-17mRNA が検出されている訳ではない。報告によっては OA 滑膜と発現量に差を認めない。

→ RA 関節でも IL-17 が大量に産生されているとはいいがたく、検出されない症例もかなりの割合で存在するのが実際？では、Th17 細胞の数は？

RA 患者と健常人の末梢血中 Th1/Th17 細胞

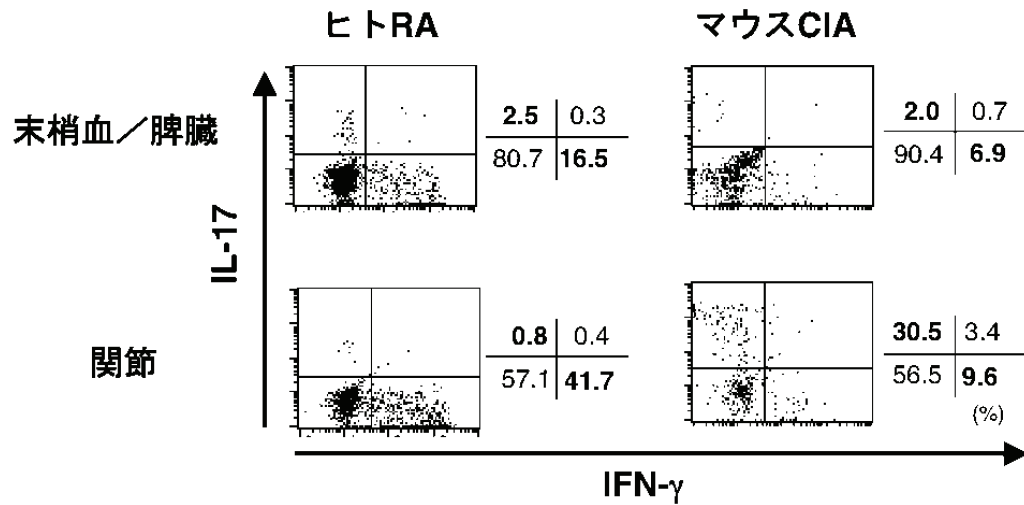


Yamada *et al.* (2008) (35)より改変引用

Th1 細胞のみならず Th17 細胞にも RA と OA で有意な差は認めず。IL-17 産生細胞数と年齢、性などの背景因子や疾患活動性との相関も認めていない (非提示データ)。

しかし、関節では Th17 細胞が増えている？

関節内 CD4T 細胞の細胞内染色フローサイトメーター解析



(CIA: collagen-induced arthritis)

ヒト RA 関節内では、Th1 細胞は末梢血に比べ著増しているが、Th17 細胞はごく少数。一方、マウスの関節では確かに Th17 細胞が多い。

他の報告

- ・組織の免疫染色でも IL-17 陽性は T 細胞の 1% 以下 (30)。
- ・滑膜細胞培養に IL-17 中和抗体を加えると、TNF- α と IL-1 産生を約 30% 抑制し、IL-6 産生は抑制しなかった (34)。
- ⇔ 同様の実験系で抗 TNF- α 抗体は IL-1 産生をほぼ完全に抑制し、IL-6、IL-8、GM-CSF の産生も抑制している (36)。

- 本当にヒト RA も Th17 細胞が引き起こしている自己免疫疾患なのか？
- 果たして抗 IL-17 抗体治療は RA の治癒をもたらすか？

参考文献

- 1) MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, Silman AJ. 2000. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* 43:30-7.
- 2) Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. 1987. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 30:1205-13.
- 3) de Vries RR, Huizinga TW, Toes RE. 2005. Redefining the HLA and RA association: to be or not to be anti-CCP positive. *J Autoimmun* 25 Suppl: 21-5.
- 4) Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC et al. 2004. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 75:330-7.
- 5) Hinks A, Worthington J, Thomson W. 2006. The association of PTPN22 with rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 45:365-8.
- 6) International HapMap Consortium. 2005. A haplotype map of the human genome. *Nature* 437: 1299-320.
- 7) Wellcome Trust Case Control Consortium. 2007. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447: 661-78.
- 8) Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokunishi S, Sawada T, Suzuki M et al. 2003. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 34: 395-402.
- 9) Klareskog L, Rönnelid J, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. 2008. Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol.* 26: 651-75.
- 10) Burr ML, Naseem H, Hinks A, Eyre S, Gibbons L, Bowes J, et al. 2009. PADI4 genotype is not associated with rheumatoid arthritis in a large UK Caucasian Population. *Ann Rheum Dis* [Epub ahead of print].
- 11) Plenge RM, Cotsapas C, Davies L, Price AL, de Bakker PI, Maller J, et al. 2007. Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 40: 1477-82.
- 12) Thomson W, Barton A, Ke X, Eyre S, Hinks A, Bowes J et al. 2007. Rheumatoid arthritis association at 6q23. *Nat Genet* 39: 1431-3.
- 13) Musone SL, Taylor KE, Lu TT, Nititham J, Ferreira RC, Ortmann W et al. 2008. Multiple polymorphisms in the TNFAIP3 region are independently associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 40: 1062-4.
- 14) Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L, Lee AT, Remmers EF, Ding B, et al. 2007. TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis--a genomewide study. *N Engl J Med* 357: 1199-1209.

- 15) Kurreeman FA, Padyukov L, Marques RB, Schrodi SJ, Seddighzadeh M, Stoeken-Rijsbergen G, et al. 2007. A candidate gene approach identifies the TRAF1/C5 region as a risk factor for rheumatoid arthritis. *PLoS Med* 4: e278.
- 16) Plenge RM, Padyukov L, Remmers EF, Purcell S, Lee AT, Karlson EW, et al. 2005. Replication of putative candidate-gene associations with rheumatoid arthritis in >4,000 samples from North America and Sweden: association of susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. *Am J Hum Genet* 77: 1044–60.
- 17) Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, et al. 2007. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 357: 977-86.
- 18) Suzuki A, Yamada R, Kochi Y, Sawada T, Okada Y, Matsuda K, et al.: 2008. Functional SNPs in CD244 increase the risk of rheumatoid arthritis in a Japanese population. *Nat Genet* 40: 1224-9.
- 19) Kochi Y, Yamada R, Suzuki A, Harley JB, Shirasawa S, Sawada T, et al. 2005. A functional variant in FCRL3, encoding Fc receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities. *Nat Genet* 37: 478-85.
- 20) Kochi Y, Suzuki A, Yamada R, Yamamoto K. 2009. Genetics of rheumatoid arthritis: underlying evidence of ethnic differences. *J Autoimmun* 32: 158-62.
- 21) Huizinga TW, Amos CI, van der Helm-van Mil AH, Chen W, van Gaalen FA, Jawaheer D, et al. 2005. Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum* 52:3433-8.
- 22) Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Källberg H, Bengtsson C, Grunewald J, et al. 2006. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum* 54: 38-46.
- 23) Hill JA, Southwood S, Sette A, Jevnikar AM, Bell DA, Cairns E. 2003. Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule. *J Immunol* 171: 538-41.
- 24) Hill JA, Bell DA, Brintnell W, Yue D, Wehrli B, Jevnikar AM, et al. 2008. Arthritis induced by posttranslationally modified (citrullinated) fibrinogen in DR4-IE transgenic mice. *J Exp Med* 205: 967-79.
- 25) van Oosterhout M, Bajema I, Levarht EW, Toes RE, Huizinga TW, van Laar JM. 2008. Differences in synovial tissue infiltrates between anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis and anti-cyclic citrullinated peptide-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 58: 53-60.
- 26) Lee HS, Irigoyen P, Kern M, Lee A, Battiwalla F, Khalili H, et al. 2007. Interaction between smoking, the shared epitope, and anti-cyclic citrullinated peptide: a mixed picture in three large North American rheumatoid arthritis cohorts. *Arthritis Rheum* 56:1745-53.
- 27) Miossec P and van den Berg W. 1997. Th1/Th2 cytokine balance in arthritis. *Arthritis Rheum* 40:

2105-15.

- 28) Lubberts E, Koenders MI, van den Berg WB. 2005. The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther* 7: 29-37.
 - 29) Yamada H. 2009. Th17 cells in human rheumatoid arthritis. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 32: 249-55.
 - 30) Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, Miossec P. 1999. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 42: 963-70.
 - 31) Kirkham BW, Lassere MN, Edmonds JP, Juhasz KM, Bird PA, Lee CS, et al. 2006. Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study (the DAMAGE study cohort). *Arthritis Rheum* 54: 1122-31.
 - 32) Kohno M, Tsutsumi A, Matsui H, Sugihara M, Suzuki T, Mamura M, et al. 2008. Interleukin-17 gene expression in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 18: 15-22.
 - 33) Stamp LK, Eason A, Pettersson L, Highton J, Hessian PA. 2009. Monocyte derived interleukin (IL)-23 is an important determinant of synovial IL-17A expression in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 36: 2403-8.
 - 34) Hillyer P, Larché MJ, Bowman EP, McClanahan TK, de Waal Malefyt R, Schewitz LP, et al. 2009. Investigating the role of the interleukin-23/17A axis in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 48: 1581-9.
 - 35) Yamada H, Nakashima Y, Okazaki K, Mawatari T, Fukushi JI, Kaibara N, et al. 2008. Th1 but not Th17 cells predominate in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 67:1299-1304.
 - 36) Brennan FM, Chantry D, Jackson A, Maini R, Feldmann M. 1989. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet* 2:244-7.
- MacGregor AJ et al.: *Arthritis Rheum* 43:30-7, 2000