



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	線維芽細胞様滑膜細胞における Ras guanine nucleotide-releasing protein 4 の増殖促進作用に関する研究 [全文の要約]
Author(s)	河野, 通仁
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号 : 2115 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11488号
Issue Date	2014-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56749
Type	doctoral thesis
File Information	Michihito_Kono_summary.pdf



学 位 論 文（ 要 約 ）

線維芽細胞様滑膜細胞における
Ras guanine nucleotide-releasing protein 4 の
増殖促進作用に関する研究
(The synovial proliferative effect of
Ras guanine nucleotide-releasing protein 4
in fibroblast-like synoviocytes)

2014 年 6 月
北 海 道 大 学
河 野 通 仁

1. 緒言

1.1 関節リウマチ

関節リウマチ (rheumatoid arthritis : RA) は関節滑膜の炎症に始まり、滑膜の肥厚・絨毛組織の増殖により骨・軟骨を破壊する慢性多発性関節炎を特徴とする自己免疫性疾患である¹。RAの発症は、何らかの滑膜炎に関連したペプチドが樹状細胞などの抗原提示細胞に提示されることで免疫反応が開始されると考えられている²。T細胞^{3,4}、マクロファージ^{5,6}、B細胞⁷、マスト細胞の活性化⁸⁻¹¹により tumor necrosis factor alpha (TNF α)、interleukin-6 (IL-6)などの炎症性サイトカインが産生され、IL-17産生ヘルパーT細胞の分化が促進される^{12,13}。さらに炎症性サイトカインにより線維芽細胞様滑膜細胞(fibroblast-like synoviocytes: FLS)が増殖し、matrix metalloproteinase (MMP)などを産生することで軟骨破壊を促進し^{4,14}、receptor activator of nuclear factor κ -B ligand (RANKL)の発現を介して破骨細胞の分化を促進し、骨破壊をきたすと考えられているが^{15,16}、未だその病態には不明な点も多い。近年、メトトレキサートなどの disease-modifying anti-rheumatic drugs¹⁷⁻¹⁹やTNF α 阻害薬²⁰⁻²²、IL-6阻害薬^{23,24}などの生物学的製剤が開発され、RAの治療は劇的に進歩したが、約3割の患者は治療によっても骨破壊、関節破壊による関節の変形を完全には食い止めることが出来ず activities of daily living (ADL)が低下する患者もみられる^{1,25-30}。また、易感染性などの薬剤の副作用³¹⁻³⁴やコストの高さ^{35,36}など、未だ問題点も多い。RAの病因により近い治療ターゲットとその薬剤開発が求められている。

1.2 線維芽細胞様滑膜細胞

滑膜細胞はマクロファージ様滑膜細胞とFLSに分類される³⁷。FLSは滑膜表層に存在し、RA患者の関節の炎症や骨破壊において中心的役割を果たしている³⁷⁻³⁹。関節組織を侵食する腫瘍様のパンヌスと呼ばれる組織がRAのひとつの特

徴であり、そのパンヌスを形成する主要な細胞は FLS と考えられている^{40,41}。Cadherin-11⁴²⁻⁴⁴、heat shock protein-47 が滑膜において FLS に特異的に存在し、滑膜表層の FLS の面積が関節リウマチの活動性と相関すると報告されている⁴⁵。また、FLS は MMP^{46,47} や RANKL^{48,49}、IL-6⁵⁰、vascular endothelial growth factor A (VEGF)⁵¹ など種々のサイトカインやケモカインを産生する²⁵。TNF α などのサイトカイン刺激により FLS は RANKL、MMP などの産生を増やし、骨・軟骨破壊に関わっている⁵²。TNF α 阻害薬は FLS やその他の細胞における MMP や RANKL などの産生を抑えることで RA の病態を改善していると考えられている。

1.3 Ras guanine nucleotide-releasing protein 4

Ras guanine nucleotide-releasing protein (RasGRP) family は RasGRP1 から 4 が発見されており、ジアシルグリセロール/ホルボールエステルとカルシウムイオンの結合部位を持つ、ユニークな guanine nucleotide exchange factor の一種であり、Ras を活性化する⁵³。RasGRP4 は当初マスト細胞から同定されたが⁵³⁻⁵⁵、その後我々は末梢血 CD14 陽性細胞にも発現していることを示し⁵⁶、さらに Suire らは好中球にも発現していることを示した⁵⁷。

正常の線維芽細胞は RasGRP family を発現しておらず、線維芽細胞に RasGRP1^{58,59}、RasGRP2⁶⁰、RasGRP3⁶¹、RasGRP4^{53,55,62} を強制発現させ、少量の Phorbol 12-Myristate 13-acetate (PMA) で刺激すると、contact inhibition が減少し、増殖能が増加する。また、RasGRP1、RasGRP2、RasGRP4 に近い染色体 7A3-B1 にマウス白血病ウイルスを挿入すると、そのマウスは骨髄性白血病、B 細胞性リンパ腫、T 細胞性リンパ腫を引き起こす^{63,64}。また、RasGRP4 の cDNA が急性骨髄性白血病患者の白血球から分離され⁶²、急性骨髄性白血病に対するファルネシルトランスフェラーゼ阻害薬による治療の予後不良因子として、RasGRP1 の高発現による同阻害薬への抵抗性が報告されている⁶⁵。これらのことから RasGRP は腫瘍化や増殖と密接な関連があると考えられている。

我々は健常者と比較し、関節リウマチ患者の末梢血 CD14 陽性単球において、RasGRP4 のスプライシング変異が有意に多いことを報告した⁵⁶。また、Adachi らは RasGRP4 をノックアウトした B6 マウスを作製した。K/BxN マウスの血清を用いて関節炎を誘導したところ⁶⁶⁻⁶⁸、RasGRP4 ノックアウトマウスで関節炎スコア、骨びらんは著明に減少していた。マスト細胞の数やマスト細胞の組織学的評価では異常を認めなかったが、PMA 刺激を行った骨髄由来マスト細胞

の TNF- α 、IL-18 の遺伝子発現量は **wild type** の骨髄由来マスト細胞と比較し、低下しており、関節炎を抑えた原因と考えられた⁶⁹。このことから、**RasGRP4** は関節リウマチと関連があることが示唆された。

マスト細胞は関節リウマチの病態の一部を担っていると考えられているが、関節炎モデルにおいて、マスト細胞の重要性に関する見解は一定していない。一部のマスト細胞欠損マウスでは関節炎の抑制はおきるが^{70,71}、他のマスト細胞欠損マウスでは関節炎の抑制は起きない^{72,73}。

RasGRP4 ノックアウトマウスの関節炎の抑制のすべてをマスト細胞のみで説明することは困難と考え、関節リウマチにおける **RasGRP4** の関与について研究することとした。第一部では **RA** 患者と変形性関節症(**osteoarthritis : OA**) 患者の滑膜の免疫組織染色について、第二部では患者滑膜から分離した **FLS** を用いた **RasGRP4** の遺伝子発現量と増殖能について、第三部では関節炎ラットに対する **RasGRP4** 特異的 **siRNA** の治療効果について述べる。

2. 第一部

RA 患者、OA 患者の滑膜組織の組織学的検討

2.1 背景

RA は関節滑膜の炎症に始まり、滑膜の肥厚・絨毛組織の増殖により骨・軟骨を破壊する慢性多発性関節炎を特徴とする自己免疫性疾患である。RasGRP4 ノックアウトマウスでは関節炎の誘導が抑制されるが⁶⁹、その詳細な機序は解明されていない。滑膜組織には滑膜細胞、T 細胞、B 細胞、樹状細胞、マスト細胞など種々の細胞が存在している。また、滑膜細胞はマクロファージ様滑膜細胞と FLS に分けられる³⁷。マクロファージ様滑膜細胞は CD14 もしくは CD68 が陽性であり、FLS には Cadherin-11⁴²⁻⁴⁴、heat shock protein-47⁴⁵ が特異的に存在している。我々は RasGRP4 ノックアウトマウスで関節炎が抑制された原因を解明するため、ヒト滑膜組織において、RasGRP4 を発現している細胞を同定することを研究の第一の目的とすることとした。

2.2 研究の目的

本研究の目的は、ヒト滑膜組織における RasGRP4 陽性細胞を明らかにし、RA 患者と OA 患者の違いについて検討することである。

2.3 患者と方法

2012 年 4 月から 2013 年 12 月までに北海道大学病院整形外科で人工関節置換術を施行された患者のうち、文書による説明と同意を得られた RA 患者 9 例、変形性関節症 5 例の滑膜に対し、ミラー切片を用いて滑膜組織において FLS に特異的に発現していると報告されている Cadherin-11 を認識する抗体および抗 RasGRP4 抗体で免疫組織化学染色を行った。また、滑膜表層の Cadherin-11 陽性かつ RasGRP4 陽性の面積を測定した。また、滑膜組織の RasGRP4 の遺伝子発現を検討するため、in situ hybridization を行った。

2.4 結果

滑膜の免疫組織化学染色では、FLS に特異的な cadherin-11 を発現している細胞の多くにミラー切片で RasGRP4 が発現しており、RasGRP4 は特に滑膜表層の重層化している部分に高発現していた。滑膜表層の Cadherin-11 陽性かつ RasGRP4 陽性細胞の面積は OA 患者と比較し、RA 患者で増加していた。*in situ* hybridization においても滑膜表層の FLS に RasGRP4 の遺伝子発現が認められた。

2.5 考察

RasGRP4 はマスト細胞、末梢血 CD14 陽性細胞、好中球に発現していることがわかっていたが、滑膜組織に RasGRP4 が発現しているかどうか検討した研究はこれまでなかった。我々は滑膜組織における RasGRP4 の発現を検討したところ、蛋白レベルでも RNA レベルでも滑膜表層に RasGRP4 の発現を認め、多くの RasGRP4 陽性細胞は滑膜表層の FLS であることがわかった。また、OA 患者と比較し、RA 患者の滑膜表層の FLS で RasGRP4 の蛋白発現が亢進していた。RasGRP4 陽性細胞は FLS の中でも特に滑膜表層の重層化している部分に多く存在しており、RA の病態に RasGRP4 が関わっている可能性が考えられた。滑膜表層の重層化している部分に高発現していることから、RasGRP4 が FLS の増殖に関与している可能性が示唆された。そこで、われわれは患者から得られた滑膜から FLS を分離し、*in vitro* で FLS における RasGRP4 と増殖能の関連について検討することとした。

2.6 結語

OA 患者と比較し、RA 患者の FLS に RasGRP4 が高発現していた。RasGRP4 は特に、RA 患者の滑膜表層の重層化している FLS に高発現していた。

3. 第二部

FLS における RasGRP4 の発現量と増殖能 に関する検討

3.1 背景

RA において FLS は関節破壊や関節炎において中心的な役割を担っている⁷⁴。我々は OA 患者と比較し、RA 患者の FLS に RasGRP4 が高発現していること、RasGRP4 は特に、RA 患者の滑膜表層の重層化している部分に高発現していることを第一章で報告した。RasGRP4 は Ras を活性化する guanine nucleotide exchange factor であり⁵³、滑膜表層の重層化している部分に高発現していることから、RasGRP4 が FLS の増殖に関与している可能性が示唆された。そこで、われわれは患者から得られた滑膜から FLS を分離し、FLS における RasGRP4 の機能について検討することとした。

3.2 研究の目的

本研究の目的は、FLS における RasGRP4 の機能を明らかにすることである。

3.3 患者と方法

北海道大学病院整形外科で人工関節置換術または滑膜切除術を施行された患者のうち、文書による説明と同意を得られた RA 患者 10 例、変形性関節症患者 10 例の滑膜から FLS を分離し、RasGRP4 の遺伝子発現量を real-time quantitative PCR で検討した。FLS に TNF α を添加し、FLS における RasGRP4 の遺伝子発現量と増殖能を検討した。また RasGRP4 に特異的な small interfering RNAs (siRNA) を FLS に添加し、FLS の増殖能と FLS における RANKL、IL-6、VEGF、MMP-1、MMP3、microsomal prostaglandin E synthase-1 (miPGES-1) の遺伝子発現量を検討した。増殖能は tetrazolium/formazan assay を用いて検討した。

3.4 結果

患者から分離した FLS における RasGRP4 の遺伝子発現量は OA 患者と比較し、一部の RA 患者で増加していた。生物学的製剤を使用していた RA 患者 6 例中 5 例、特に TNF α 阻害薬を使用していた RA 患者 4 例中 4 例で、FLS における RasGRP4 の遺伝子発現量は低下していた。FLS における RasGRP4 の遺伝子発現量は FLS の増殖能と正の相関を示した。TNF α の添加により FLS における RasGRP4 の遺伝子発現量は濃度依存性に増加し、同時に FLS の増殖能も増加した。siRNA を用いた RasGRP4 の knock down により、FLS の増殖能は低下した。RasGRP4 の knock down により、FLS における RANKL、IL-6、VEGF、MMP-3 の遺伝子発現量は変化しなかったが、MMP-1、miPGES-1 の遺伝子発現量は低下した。

3.5 考察

第一章で我々は滑膜組織において、OA 患者と比較し、RA 患者の FLS で RasGRP4 の発現が亢進していること、RA 患者の滑膜表層の FLS が重層化している部分に RasGRP4 が多く発現していることを示した。第二章では我々は滑膜組織から FLS を分離し RasGRP4 の遺伝子発現量の検討を行った。一部の RA 患者の FLS において RasGRP4 は高発現していた。また、生物学的製剤、とくに TNF α 阻害薬を使用されていた RA 患者の FLS で RasGRP4 の発現が低下していた。FLS に TNF α を添加すると容量依存性に RasGRP4 の発現が亢進した。FLS における RasGRP4 の遺伝子発現量と FLS の増殖能は強い相関を認めることから、TNF α 阻害薬を使用されていた RA 患者で FLS の RasGRP4 の発現が落ちていることは治療による影響が考えられた。FLS における RasGRP4 の遺伝子発現量と disease activity score 28 (DAS28)^{75,76} や CRP、MMP-3 などの RA の疾患活動性との相関は認められなかった。FLS は、人工関節置換術もしくは滑膜切除術を施行されたそれぞれの患者の 1 つの関節から得ており、それが DAS28 や CRP、MMP-3 などの RA の全身の疾患活動性を示す指標と相関が認められなかった原因と考えられた。

RasGRP4 の knockdown により、FLS の増殖能が低下した。また、FLS における RANKL、IL-6、VEGF、MMP-3 の細胞レベルにおける遺伝子発現量に変

化がなかったが、細胞数自体は RasGRP4 の knockdown により減少しており、FLS が産生する総量としての RNAKL、IL-6、VEGF、MMP-3 は低下していることが考えられた。一方 MMP-1、miPGES-1 の遺伝子発現量は RasGRP4 の knockdown により低下した。

RA において、mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路はサイトカインや Toll 様受容体などにより刺激され、その下流は extracellular signal-regulated kinase (ERK) 経路、p38 MAPK 経路、c-Jun N-terminal kinase (JNK) 経路に分けられる⁷⁷。RNAKL、IL-6、VEGF は FLS においては p38 MAPK を介しており、MMP-3 は p38 MAPK、JNK を介していると考えられている。一方、prostaglandin E₂ (PGE₂)⁷⁸、MMP-1⁷⁹ は ERK を介していると考えられている。

RasGRP4 は guanine nucleotide exchange factor の一種であり、Ras を活性化し、Raf、MAPK/ERK kinase (MEK)、ERK1/2 のリン酸化を介して細胞増殖に関与している。RasGRP4 の knockdown により、PGE₂ の合成酵素である miPGES-1 と MMP-1 の発現が低下したことは理に適っていると考えられる。

MMP-1 は細胞外マトリックスのリモデリングに関わり、FLS から産生される。関節リウマチでは軟骨破壊に重要な役割を果たしている⁷⁹。

miPGES-1 は、COX-2 の下流で作用し、PGE₂ 生合成の最終段階を触媒する酵素である。関節リウマチの滑膜では、滑膜細胞、軟骨細胞、マクロファージや単球などは、炎症性サイトカインで活性化され、PGE₂ を産生し、炎症、発熱、疼痛の原因となっている⁸⁰。COX-2 は、選択的 COX-2 阻害剤を含む非ステロイド性抗炎症薬の標的である。また、PGE₂ は破骨細胞に直接作用し、骨破壊の原因のひとつとなっている。

RasGRP4 の遺伝子発現量は FLS の増殖と関わっており、RasGRP4 は関節リウマチの新たな治療ターゲットとなる可能性が考えられた。そこで次の実験として、RA の動物モデルを用いて、*in vivo* における、RasGRP4 の knockdown による関節炎の抑制効果を検討することとした。

3.6 結語

FLS における RasGRP4 遺伝子発現量は FLS の増殖能と相関しており、RasGRP4 は RA の新たな治療ターゲットとなる可能性がある。

4. 第三部

ラット関節炎モデルに対する RasGRP4 特異的
siRNA の治療効果に関する検討

4.1 背景

RA は滑膜の肥厚・絨毛組織の増殖により骨・軟骨を破壊する慢性多発性関節炎を特徴とする自己免疫性疾患である¹。近年、メトトレキサートなどの **disease-modifying anti-rheumatic drugs** や TNF α 阻害薬、IL-6 阻害薬などの生物学的製剤が開発され、RA の治療は劇的に進歩したが、約 3 割の患者は治療によっても骨破壊、関節破壊による関節の変形を完全には食い止めることが出来ず ADL が低下する患者もみられる^{1,25-27}。また、易感染性などの薬剤の副作用やコストの高さなど、未だ問題点も多い。RA の病因により近い治療ターゲットとその薬剤開発が求められている。

RA において FLS は関節破壊や関節炎において中心的な役割を担っている³⁷⁻³⁹。我々は OA 患者と比較し、RA 患者の滑膜表層の FLS に RasGRP4 が高発現していること、RasGRP4 は特に、RA 患者の滑膜表層の重層化している FLS に高発現していることを第一章で報告した。また、第二章では、FLS における RasGRP4 の遺伝子発現量は FLS の増殖能と相関しており、RasGRP4 の knockdown により FLS の増殖能が低下し、MMP-1、miPGES-1 の遺伝子発現量が低下することを報告した。これらのことから、RasGRP4 は RA の新たな治療ターゲットとなる可能性がある。本章では、RasGRP4 が RA の治療ターゲットとなるかどうか、ラット関節炎モデルを用いて検討することとした。

4.2 研究の目的

本研究の目的は RA 動物モデルにおいて RasGRP4 が治療ターゲットとなるかどうか明らかにすることである。

4.3 動物と方法

合計15匹の7週齢のLewisラットにⅡ型コラーゲンを免疫し関節炎を誘導した。各グループ5匹ずつ3群に分け、siRNA Control または2種類のRasGRP4特異的 siRNA と atelocollagen との混合液を両足関節に関節注射した。関節炎スコア、足関節の直径、micro CT を用いた画像的評価、組織学的評価を行った。

4.4 結果

RasGRP4 特異的 siRNA の関節注射により、足関節の直径、滑膜炎スコアは改善した。micro CT を用いた画像的評価では骨びらんスコアの改善が認められ、組織学的評価においても、滑膜組織への炎症細胞浸潤、骨・軟骨破壊はいずれも軽減した。

4.5 考察

本章ではRasGRP4がRAの治療ターゲットとなるかどうか、関節炎モデルを用いて検討した。RasGRP4はCD14陽性細胞やマスト細胞にも発現しており、RasGRP4のknockdownによる関節局所における影響をより詳細に検討するため、足関節にsiRNAの関節注射を行った。動物種は足関節への関節注射が可能なラットを用いた。

AdachiらはRasGRP4ノックアウトマウスで関節炎の誘導が抑制されることを示した。RasGRP4はマスト細胞の分化に関わっているが⁵³、予想に反して、RasGRP4のノックアウトマウスではマスト細胞の数や顆粒の数などに変化は認められなかった。マウスの関節炎において、マスト細胞はTNF α やIL-1 β などのサイトカインの産生に関わっていると報告されている⁸¹。RasGRP4ノックアウトマウスの骨髄から分離したマスト細胞にPMA刺激をしたところ、ワイルドタイプと比較し、TNF α やIL-1 β の産生が低下しており、AdachiらはこのことがRasGRP4ノックアウトマウスの関節炎の誘導の抑制の原因の一つであると考察している⁶⁹。しかし、関節炎モデルにおいて、マスト細胞の重要性は一

定していない。一部のマスト細胞欠損マウスでは関節炎の抑制はおきるが^{70,71}、他のマスト細胞欠損マウスでは関節炎の抑制は起きない^{72,73}。

我々はヒトと同様、ラットにおいても滑膜表層の FLS に RasGRP4 が発現していることを示した。また、RasGRP4 特異的 siRNA の関節注射により、コラーゲン誘導関節炎ラットの RasGRP4 陽性 FLS の面積が著明に減少し、滑膜炎、骨・軟骨破壊は著明に改善した。関節炎モデルにおいて、RasGRP4 の knockdown により、FLS の増殖が抑えられ、炎症性サイトカイン、MMP、RANKL などの産生が低下することで、関節炎、骨・軟骨破壊が抑制されたと考えられた。

4.6 結語

RasGRP4 に特異的な siRNA の関節注射により、ラットの滑膜炎、骨・軟骨破壊は軽減した。RasGRP4 は RA の新たな治療ターゲットとなる可能性がある。

5. 総合考察

関節リウマチの FLS における RasGRP4 の役割に関して検討した。第一章で OA 患者と比較し、RA 患者の滑膜表層の FLS に RasGRP4 が高発現していること、RasGRP4 は特に、RA 患者の滑膜表層の重層化している FLS に高発現していることを初めて報告した。また、第二章では、FLS における RasGRP4 の遺伝子発現量は FLS の増殖能と相関しており、RasGRP4 の knockdown により FLS の増殖能が低下し、MMP-1、miPGES-1 の遺伝子発現量が低下することを報告した。第三章では RasGRP4 に特異的な siRNA の関節注射により、コラーゲン誘導関節炎ラットの滑膜炎、骨びらん、軟骨破壊が抑制されたことを示した。

FLS の腫瘍様の増殖は RA の特徴のひとつと考えられている。本研究で我々は FLS に RasGRP4 が発現しており、RasGRP4 の遺伝子発現量は FLS の増殖能に相関していることを明らかにした。FLS は MMP や RANKLなどを産生することで軟骨破壊や骨破壊をきたすと考えられている。RasGRP4 を抑制することで、FLS の増殖が抑えられ、FLS が産生する総量としての MMP や RANKL、PGE₂ などが低下し、軟骨破壊や骨破壊が抑制されることが考えられた。

RasGRP4 に特異的な siRNA の関節注射により、コラーゲン誘導関節炎ラットの滑膜炎、骨・軟骨破壊が抑制されたことが RasGRP4 の FLS への影響だけでも起こりうるのかどうか、siRNA の全身投与を行うことで全身の関節炎が抑制されるのかどうか、副作用を認めるのかどうかなど、さらなる検討が必要と考えられる。

関節リウマチは MTX や生物学的製剤など治療が発展しているが、寛解に至らず、骨破壊が進行し、ADL が低下してしまう症例も認める。また、生物学的製剤は感染症などの合併症やそのコストなど未だ問題点も認めている。RasGRP4 は RA の新たな治療ターゲットとなる可能性があり、今後の研究の成果を期待する。

6. 引用文献

- 1 McInnes, I. B., Schett, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 365, 2205-2219, (2011).
- 2 Lebre, M. C. *et al.* Rheumatoid arthritis synovium contains two subsets of CD83-DC-LAMP-dendritic cells with distinct cytokine profiles. *Am J Pathol.* 172, 940-950, (2008).
- 3 Cantaert, T. *et al.* Alterations of the synovial T cell repertoire in anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 60, 1944-1956, (2009).
- 4 Bradfield, P. F. *et al.* Rheumatoid fibroblast-like synoviocytes overexpress the chemokine stromal cell-derived factor 1 (CXCL12), which supports distinct patterns and rates of CD4+ and CD8+ T cell migration within synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 48, 2472-2482, (2003).
- 5 Haringman, J. J. *et al.* Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 64, 834-838, (2005).
- 6 Liew, F. Y., McInnes, I. B. The role of innate mediators in inflammatory response. *Mol Immunol.* 38, 887-890, (2002).
- 7 Schroder, A. E., Greiner, A., Seyfert, C., Berek, C. Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93, 221-225, (1996).
- 8 Gotis-Graham, I., McNeil, H. P. Mast cell responses in rheumatoid synovium: association of the MCTC subset with matrix turnover and clinical progression. *Arthritis Rheum.* 40, 479-489, (1997).
- 9 Gotis-Graham, I., Smith, M. D., Parker, A., McNeil, H. P. Synovial mast cell responses during clinical improvement in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 57, 664-671, (1998).
- 10 Tetlow, L. C., Woolley, D. E. Mast cells, cytokines, and metalloproteinases at the rheumatoid lesion: dual immunolocalisation studies. *Ann Rheum Dis.* 54, 896-903, (1995).
- 11 Nigrovic, P. A., Lee, D. M. Synovial mast cells: role in acute and

- chronic arthritis. *Immunol Rev.* 217, 19-37, (2007).
- 12 Chabaud, M., Fossiez, F., Taupin, J. L., Miossec, P. Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. *J Immunol.* 161, 409-414, (1998).
 - 13 Miossec, P., Korn, T., Kuchroo, V. K. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med.* 361, 888-898, (2009).
 - 14 Sabeh, F., Fox, D., Weiss, S. J. Membrane-type I matrix metalloproteinase-dependent regulation of rheumatoid arthritis synoviocyte function. *J Immunol.* 184, 6396-6406, (2010).
 - 15 Gravallese, E. M. *et al.* Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Am J Pathol.* 152, 943-951, (1998).
 - 16 Schett, G., Teitelbaum, S. L. Osteoclasts and Arthritis. *J Bone Miner Res.* 24, 1142-1146, (2009).
 - 17 Donahue, K. E. *et al.* Systematic review: comparative effectiveness and harms of disease-modifying medications for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med.* 148, 124-134, (2008).
 - 18 Suarez-Almazor, M. E. *et al.* Methotrexate for rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev*, CD000957, (2000).
 - 19 Suarez-Almazor, M. E. *et al.* Sulfasalazine for rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev*, CD000958, (2000).
 - 20 Feldmann, M., Brennan, F. M., Maini, R. N. Rheumatoid arthritis. *Cell.* 85, 307-310, (1996).
 - 21 Kristensen, L. E. *et al.* The number needed to treat for adalimumab, etanercept, and infliximab based on ACR50 response in three randomized controlled trials on established rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Scand J Rheumatol.* 36, 411-417, (2007).
 - 22 Alonso-Ruiz, A. *et al.* Tumor necrosis factor α drugs in rheumatoid arthritis: systematic review and metaanalysis of efficacy and safety. *BMC Musculoskelet Disord.* 9, 52, (2008).
 - 23 Choy, E. H. *et al.* Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Arthritis Rheum.* 46, 3143-3150, (2002).
 - 24 An, M. M. *et al.* The addition of tocilizumab to DMARD therapy for

- rheumatoid arthritis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Clin Pharmacol*. 66, 49-59, (2010).
- 25 Klareskog, L., Catrina, A. I., Paget, S. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 373, 659-672, (2009).
 - 26 Yazici, Y. Treatment of rheumatoid arthritis: we are getting there. *Lancet*. 374, 178-180, (2009).
 - 27 Scott, D. L., Wolfe, F., Huizinga, T. W. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 376, 1094-1108, (2010).
 - 28 Singh, J. A. *et al*. A network meta-analysis of randomized controlled trials of biologics for rheumatoid arthritis: a Cochrane overview. *CMAJ*. 181, 787-796, (2009).
 - 29 Singh, J. A. *et al*. Biologics for rheumatoid arthritis: an overview of Cochrane reviews. *Cochrane Database Syst Rev*, CD007848, (2009).
 - 30 Maxwell, L. J., Singh, J. A. Abatacept for rheumatoid arthritis: a Cochrane systematic review. *J Rheumatol*. 37, 234-245, (2010).
 - 31 Dixon, W. G. *et al*. Drug-specific risk of tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register (BSRBR). *Ann Rheum Dis*. 69, 522-528, (2010).
 - 32 Leombruno, J. P., Einarson, T. R., Keystone, E. C. The safety of anti-tumour necrosis factor treatments in rheumatoid arthritis: meta and exposure-adjusted pooled analyses of serious adverse events. *Ann Rheum Dis*. 68, 1136-1145, (2009).
 - 33 Hyrich, K. L., Watson, K. D., Isenberg, D. A., Symmons, D. P. The British Society for Rheumatology Biologics Register: 6 years on. *Rheumatology*. 47, 1441-1443, (2008).
 - 34 Strangfeld, A. *et al*. Risk of herpes zoster in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF- α agents. *JAMA*. 301, 737-744, (2009).
 - 35 Nixon, R. M. *et al*. The Rheumatoid Arthritis Drug Development Model: a case study in Bayesian clinical trial simulation. *Pharm Stat*. 8, 371-389, (2009).
 - 36 Finckh, A. *et al*. Treatment of very early rheumatoid arthritis with symptomatic therapy, disease-modifying antirheumatic drugs, or biologic agents: a cost-effectiveness analysis. *Ann Intern Med*. 151, 612-621, (2009).
 - 37 Bartok, B., Firestein, G. S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector

- cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* 233, 233-255, (2010).
- 38 Huber, L. C. *et al.* Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 45, 669-675, (2006).
- 39 Tolboom, T. C. *et al.* Invasive properties of fibroblast-like synoviocytes: correlation with growth characteristics and expression of MMP-1, MMP-3, and MMP-10. *Ann Rheum Dis.* 61, 975-980, (2002).
- 40 Muller-Ladner, U. *et al.* Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol.* 149, 1607-1615, (1996).
- 41 Tolboom, T. C. *et al.* Invasiveness of fibroblast-like synoviocytes is an individual patient characteristic associated with the rate of joint destruction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 52, 1999-2002, (2005).
- 42 Lee, D. M. *et al.* Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. *Science.* 315, 1006-1010, (2007).
- 43 Chang, S. K., Gu, Z., Brenner, M. B. Fibroblast-like synoviocytes in inflammatory arthritis pathology: the emerging role of cadherin-11. *Immunol Rev.* 233, 256-266, (2010).
- 44 Xiao, C. Y. *et al.* Expression of beta-catenin in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Scand J Rheumatol.* 40, 26-33, (2011).
- 45 Izquierdo, E. *et al.* Synovial fibroblast hyperplasia in rheumatoid arthritis: clinicopathologic correlations and partial reversal by anti-tumor necrosis factor therapy. *Arthritis Rheum.* 63, 2575-2583, (2011).
- 46 Kumkumian, G. K. *et al.* Platelet-derived growth factor and IL-1 interactions in rheumatoid arthritis. Regulation of synovocyte proliferation, prostaglandin production, and collagenase transcription. *J Immunol.* 143, 833-837, (1989).
- 47 Lotz, M., Guerne, P. A. Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases-1/erythroid potentiating activity (TIMP-1/EPA). *J Biol Chem.* 266, 2017-2020, (1991).
- 48 Shigeyama, Y. *et al.* Expression of osteoclast differentiation factor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43, 2523-2530, (2000).
- 49 Hashizume, M., Hayakawa, N., Mihara, M. IL-6 trans-signalling directly induces RANKL on fibroblast-like synovial cells and is involved in RANKL induction by TNF- α and IL-17. *Rheumatology.* 47,

- 1635-1640, (2008).
- 50 Guerne, P. A. *et al.* Synovium as a source of interleukin 6 *in vitro*. Contribution to local and systemic manifestations of arthritis. *J Clin Invest.* 83, 585-592, (1989).
 - 51 Hashizume, M., Hayakawa, N., Suzuki, M., Mihara, M. IL-6/sIL-6R trans-signalling, but not TNF- α induced angiogenesis in a HUVEC and synovial cell co-culture system. *Rheumatol Int.* 29, 1449-1454, (2009).
 - 52 Lee, A. *et al.* Tumor necrosis factor α induces sustained signaling and a prolonged and unremitting inflammatory response in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 65, 928-938, (2013).
 - 53 Yang, Y. *et al.* RasGRP4, a new mast cell-restricted Ras guanine nucleotide-releasing protein with calcium⁻ and diacylglycerol-binding motifs. Identification of defective variants of this signaling protein in asthma, mastocytosis, and mast cell leukemia patients and demonstration of the importance of RasGRP4 in mast cell development and function. *J Biol Chem.* 277, 25756-25774, (2002).
 - 54 Li, L., Yang, Y., Stevens, R. L. Cloning of rat Ras guanine nucleotide releasing protein 4, and evaluation of its expression in rat mast cells and their bone marrow progenitors. *Mol Immunol.* 38, 1283-1288, (2002).
 - 55 Li, L., Yang, Y., Wong, G. W., Stevens, R. L. Mast cells in airway hyporesponsive C3H/HeJ mice express a unique isoform of the signaling protein Ras guanine nucleotide releasing protein 4 that is unresponsive to diacylglycerol and phorbol esters. *J Immunol.* 171, 390-397, (2003).
 - 56 Hashimoto, T. *et al.* Aberrant splicing of the hRasGRP4 transcript and decreased levels of this signaling protein in the peripheral blood mononuclear cells in a subset of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 13, R154, (2011).
 - 57 Suire, S. *et al.* GPCR activation of Ras and PI3K α in neutrophils depends on PLC β 2/ β 3 and the RasGEF RasGRP4. *Embo J.* 31, 3118-3129, (2012).
 - 58 Ebinu, J. O. *et al.* RasGRP, a Ras guanyl nucleotide⁻ releasing protein with calcium⁻ and diacylglycerol-binding motifs. *Science.* 280, 1082-1086, (1998).

- 59 Tognon, C. E. *et al.* Regulation of RasGRP via a phorbol ester-responsive C1 domain. *Mol Cell Biol.* 18, 6995-7008, (1998).
- 60 Clyde-Smith, J. *et al.* Characterization of RasGRP2, a plasma membrane-targeted, dual specificity Ras/Rap exchange factor. *J Biol Chem.* 275, 32260-32267, (2000).
- 61 Yamashita, S. *et al.* CalDAG-GEFIII activation of Ras, R-ras, and Rap1. *J Biol Chem.* 275, 25488-25493, (2000).
- 62 Reuther, G. W. *et al.* RasGRP4 is a novel Ras activator isolated from acute myeloid leukemia. *J Biol Chem.* 277, 30508-30514, (2002).
- 63 Li, J. *et al.* Leukaemia disease genes: large-scale cloning and pathway predictions. *Nat Genet.* 23, 348-353, (1999).
- 64 Suzuki, T. *et al.* New genes involved in cancer identified by retroviral tagging. *Nat Genet.* 32, 166-174, (2002).
- 65 Raponi, M. *et al.* A 2-gene classifier for predicting response to the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in acute myeloid leukemia. *Blood.* 111, 2589-2596, (2008).
- 66 Kouskoff, V. *et al.* Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell.* 87, 811-822, (1996).
- 67 Matsumoto, I., Staub, A., Benoist, C., Mathis, D. Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science.* 286, 1732-1735, (1999).
- 68 Korganow, A. S. *et al.* From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity.* 10, 451-461, (1999).
- 69 Adachi, R. *et al.* Ras guanine nucleotide-releasing protein-4 (RasGRP4) involvement in experimental arthritis and colitis. *J Biol Chem.* 287, 20047-20055, (2012).
- 70 Lee, D. M. *et al.* Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science.* 297, 1689-1692, (2002).
- 71 van den Broek, M. F., van den Berg, W. B., van de Putte, L. B. The role of mast cells in antigen induced arthritis in mice. *J Rheumatol.* 15, 544-551, (1988).
- 72 Zhou, J. S. *et al.* gp49B1 deficiency is associated with increases in cytokine and chemokine production and severity of proliferative synovitis induced by anti-type II collagen mAb. *Eur J Immunol.* 35, 1530-1538, (2005).

- 73 Feyerabend, T. B. *et al.* Cre-mediated cell ablation contests mast cell contribution in models of antibody- and T cell-mediated autoimmunity. *Immunity*. 35, 832-844, (2011).
- 74 Bottini, N., Firestein, G. S. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol*. 9, 24-33, (2013).
- 75 Dougados, M., Aletaha, D., van Riel, P. Disease activity measures for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 25, S22-29, (2007).
- 76 Aletaha, D., Smolen, J. S. The Simplified Disease Activity Index and Clinical Disease Activity Index to monitor patients in standard clinical care. *Rheum Dis Clin North Am*. 35, 759-772, viii, (2009).
- 77 Paunovic, V., Harnett, M. M. Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets for rheumatoid arthritis. *Drugs*. 73, 101-115, (2013).
- 78 Nah, S. S. *et al.* Epidermal growth factor increases prostaglandin E2 production via ERK1/2 MAPK and NF- κ B pathway in fibroblast like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 30, 443-449, (2010).
- 79 Barchowsky, A., Frleta, D., Vincenti, M. P. Integration of the NF- κ B and mitogen-activated protein kinase/AP-1 pathways at the collagenase-1 promoter: divergence of IL-1 and TNF-dependent signal transduction in rabbit primary synovial fibroblasts. *Cytokine*. 12, 1469-1479, (2000).
- 80 Kojima, F. *et al.* Potential roles of microsomal prostaglandin E synthase-1 in rheumatoid arthritis. *Inflamm Regen*. 31, 157-166, (2011).
- 81 Nigrovic, P. A. *et al.* Mast cells contribute to initiation of autoantibody-mediated arthritis via IL-1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104, 2325-2330, (2007).