



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
Author(s)	河野, 通仁
Description	配架番号 : 2115
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11488号
Issue Date	2014-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11488
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59716
Type	doctoral thesis
File Information	Michihito_Kono.pdf



学 位 論 文

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

目次

発表論文目録および学会発表目録.....	1
1. 緒言	2
1.1 関節リウマチ	2
1.2 線維芽細胞様滑膜細胞	4
1.3 Ras guanine nucleotide-releasing protein 4	6
2. 略語表	8
3. 第一部	10
RA 患者、OA 患者の滑膜組織の組織学的検討	10
3.1 背景	11
3.2 研究の目的	11
3.3 患者と方法	12
3.3.1 対象患者	12
3.3.2 方法	13
3.3.2.1 HEK-293 細胞を用いた RasGRP4 のトランスフェクション	13
3.3.2.2 RasGRP4 をトランスフェクションされた HEK-293 細胞の免疫組 織化学染色	13
3.3.2.3 滑膜組織の免疫組織化学染色	14
3.3.2.4 RA 患者と OA 患者の滑膜表層 RasGRP4 陽性面積の比較	15
3.3.2.5 ヒト滑膜組織の in situ hybridization	15
3.4 結果	17
3.4.1 HEK-293 細胞を用いた RasGRP4 のトランスフェクションと RasGRP4 の免疫組織化学染色	17
3.4.2 滑膜組織の抗 RasGRP4 抗体、抗 CD14 抗体、抗 CD68 抗体による免 疫組織化学染色	19
3.4.3 ヒト滑膜組織の抗 RasGRP4 抗体、抗 Cadherin-11 抗体による免疫組 織化学染色	22
3.4.4 ヒト滑膜組織の抗 RasGRP4 抗体、抗 HSP-47 抗体による免疫組織化 学染色	26
3.4.5 RA 患者と OA 患者の滑膜表層 RasGRP4 陽性面積の比較	28
3.4.6 ヒト滑膜組織の in situ hybridization	29
3.5 考察	31

3.6 結語	32
4. 第二部	33
FLS における RasGRP4 発現量と増殖能に関する検討	33
4.1 背景	34
4.2 研究の目的	35
4.3 患者と方法	35
4.3.1 対象患者	35
4.3.2 方法	36
4.3.2.1 FLS の分離方法	36
4.3.2.2 分離した FLS の純度についての検討	36
4.3.2.3 RNA の抽出と Real-time PCR	37
4.3.2.4 FLS の RasGRP4 発現量における TNF α の影響	37
4.3.2.5 RA-FLS における RasGRP4 の knockdown の影響	38
4.4 結果	39
4.4.1 分離した FLS の純度についての検討	39
4.4.2 RA 患者と OA 患者の FLS における RasGRP4 遺伝子発現量の比較	43
4.4.3 FLS における RasGRP4 の遺伝子発現量と FLS の増殖能についての検討	47
4.4.4 FLS の RasGRP4 遺伝子発現量における TNF α の影響	48
4.4.5 RA-FLS における RasGRP4 の knockdown の影響	49
4.5 考察	52
4.6 結語	55
5. 第三部	56
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	56
5.1 背景	57
5.2 研究の目的	58
5.3 動物と方法	58
5.3.1 コラーゲン誘導滑膜炎ラットと治療	58
5.3.2 関節炎の評価方法	59
5.3.3 関節炎の組織学的検討	59
5.3.3.1 ラット滑膜組織のヒト RasGRP4 抗体による染色	59
5.3.3.2 ラット滑膜組織の組織学的評価	60

5.4	結果	61
5.4.1	RasGRP4 に特異的な siRNA の関節注射による滑膜炎の変化	61
5.4.2	micro CT による骨破壊の評価	62
5.4.3	組織学的評価	63
5.4.3.1	ラット滑膜組織のヒト RasGRP4 抗体による染色	63
5.4.3.2	RasGRP4 の knockdown の証明	65
5.4.3.3	各グループの組織学的評価	68
5.5	考察	70
5.6	結語	71
6.	総合考察	72
7.	謝辞	75
8.	引用文献	76

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は下記の論文に投稿した。

1. Michihito Kono, Shinsuke Yasuda, Richard L Stevens, Hideyuki Koide, Takashi Kurita, Yuka Shimizu, Yusaku Kanetsuka, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, Olga Amengual, Tetsuya Horita, Tomohiro Shimizu, Tokifumi Majima, Takao Koike, and Tatsuya Atsumi, RasGRP4-dependent arthritis and proliferation of fibroblast-like synoviocytes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, submitted

本研究の一部は下記の学会で発表した。

1. Michihito Kono, Shinsuke Yasuda, Richard L Stevens, Hideyuki Koide, Takashi Kurita, Tetsuya Horita, Tsutomu Endo, Tokifumi Majima, Takao Koike, Tatsuya Atsumi, Ras guanine nucleotide-releasing protein 4 (RasGRP4) is aberrantly expressed in the fibroblast-like synoviocytes of arthritis patients, and this signaling protein helps control their proliferation. Federation of Clinical Immunology Societies, 28-30 June, 2013, Boston
2. 河野通仁、保田晋助、栗田崇史、奥健志、坊垣暁之、堀田哲也、渥美達也、Ras guanine nucleotide-releasing protein 4 (RasGRP4) is aberrantly expressed in the fibroblast-like synoviocytes of arthritis patients, and this signaling protein is a possible target for proliferative synovitis. 第 42 回日本免疫学会学術集会、2013 年 12 月 11-13 日、千葉
3. 河野通仁、保田晋助、栗田崇史、奥健志、坊垣暁之、Olga Amengual、堀田哲也、渥美達也、The synovial proliferative effect of RasGRP4 (Ras guanine nucleotide-releasing protein 4) in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014 年 4 月 24-26 日、東京

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 の罹患頻度は 0.5~2%、男女比は 1 : 3 程度で 40 歳代に最も多い²⁻⁴。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则认为られている⁵。T 細胞^{6,7}、マクロファージ^{8,9}、B 細胞¹⁰、マスト細胞の活性化¹¹⁻¹⁴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^{15,16}。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^{7,17}、receptor activator of nuclear factor kappa-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^{18,19}、未だその病態には不明な点も多い(Figure 1)。近年、メトトレキサートなどの disease-modifying anti-rheumatic drugs²⁰⁻²²や TNF α 阻害薬²³⁻²⁵、IL-6 阻害薬^{26,27}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^{1,3,28-32}。また、易感染性などの薬剤の副作用³³⁻³⁶やコストの高さ^{37,38}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。

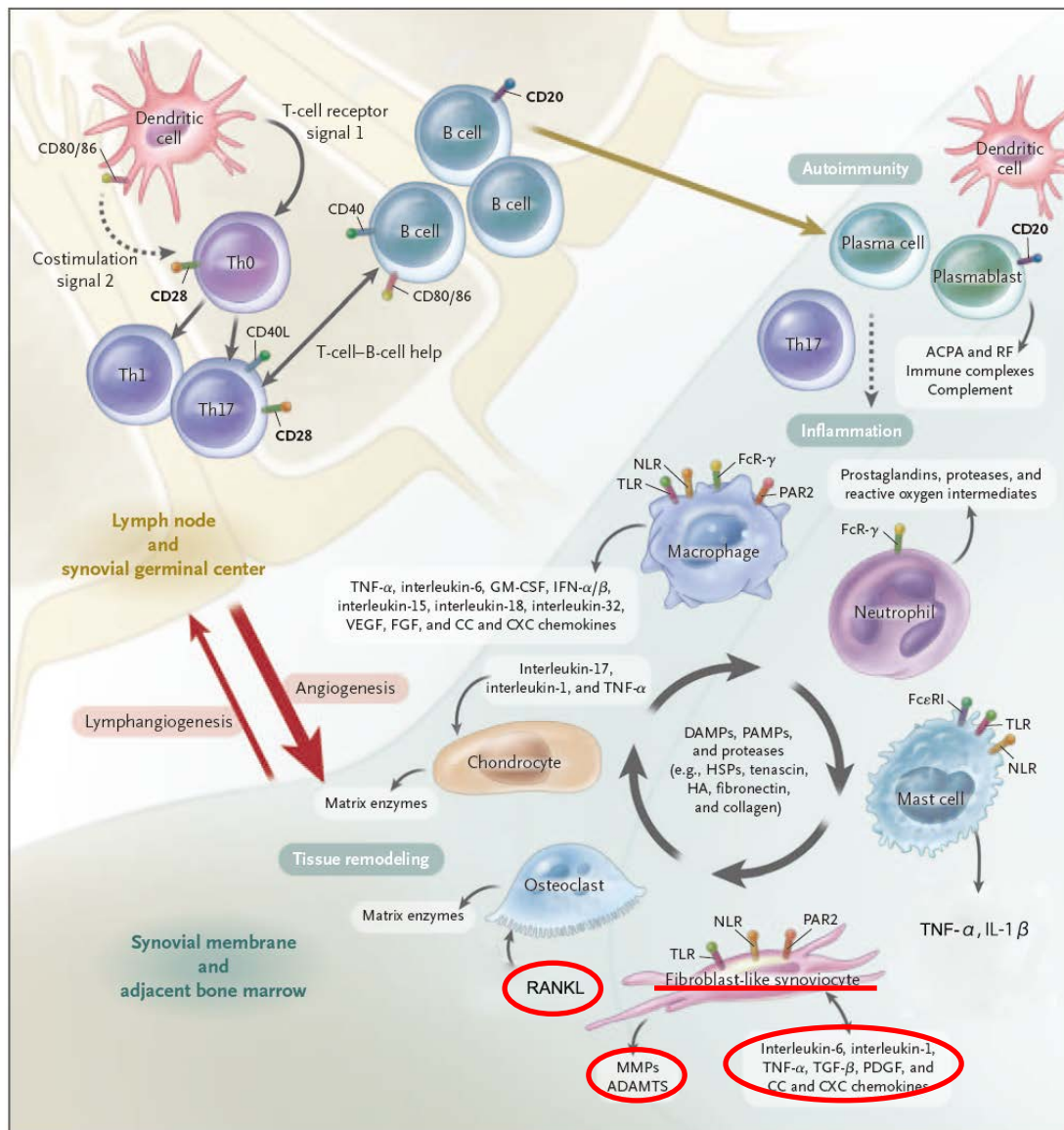


Figure 1. 関節リウマチの病態(文献 1 より引用改変)

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³⁹。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³⁹⁻⁴¹。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^{42,43}。Cadherin-11⁴⁴⁻⁴⁶、heat shock protein-47 (HSP-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⁴⁷。Cadherin-11 は滑膜組織の形成に必須であり、Cadherin-11 ノックアウトマウスでは滑膜表層が低形成で、炎症に対する滑膜の反応が低下し、滑膜炎に抵抗性であった。さらにマウス滑膜炎モデルにおいて、Cadherin-11 抗体により滑膜炎は軽減された⁴⁴。また、RA の軟骨とパンヌスの接合部位には Cadherin-11 の発現が亢進しており、さらに Cadherin-11 を強制発現させると FLS の侵食能は増大したことから、Cadherin-11 は FLS の侵食に関与していると考えられた⁴⁸。また、FLS は MMP^{49,50} や RANKL^{51,52}、IL-6⁵³、vascular endothelial growth factor A (VEGF)⁵⁴ など種々のサイトカインやケモカインを産生する²⁸ (Figure 2)。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⁵⁵。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。

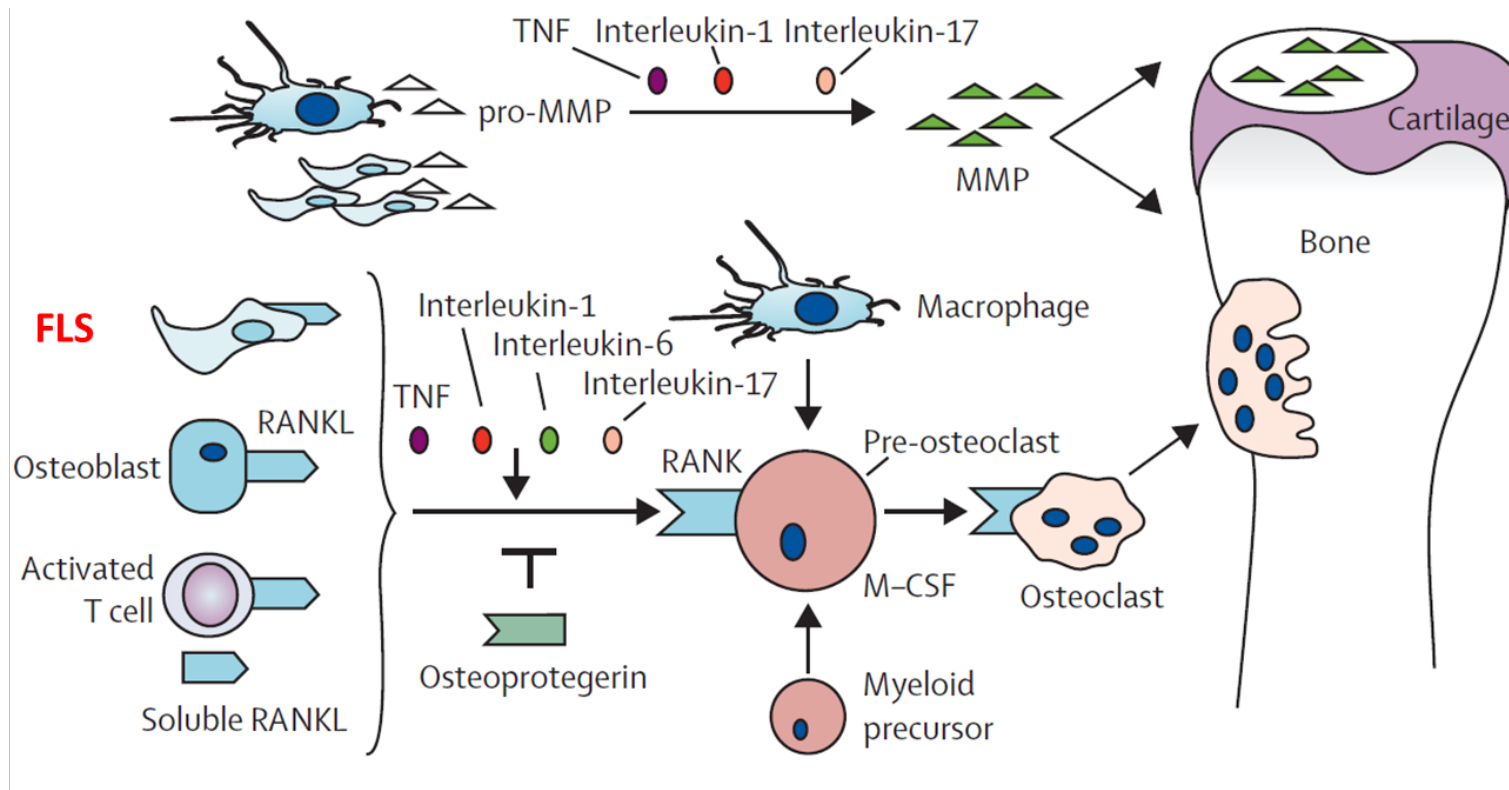


Figure 2. FLS による骨・軟骨破壊の機序(Klareskog et al. Lancet 2009 を改変)

FLS: Fibroblast-like synoviocytes, MMP: Matrix Metalloproteinase

RANKL: receptor activator of nuclear factor- κ B ligand

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⁵⁶ (Figure 3)。RasGRP4 は当初マスト細胞から同定されたが⁵⁶⁻⁵⁸、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⁵⁹、さらに Suire らは好中球にも発現していることを示した⁶⁰。

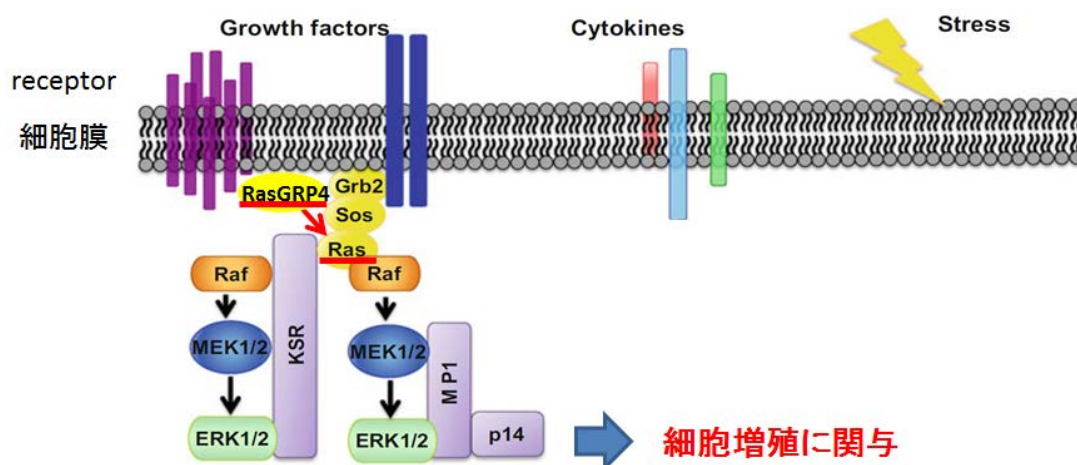


Figure 3. RasGRP4 とその下流のシグナル伝達(Paunovic et al. Drugs. 2013 を改変)

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^{61,62}、RasGRP2⁶³、RasGRP3⁶⁴、RasGRP4^{56,58,65} 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 細胞リンパ腫を引き起こす^{66,67}。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⁶⁵、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⁶⁸。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⁵⁹。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⁶⁹⁻⁷¹、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⁷²。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^{73,74}、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^{75,76}。

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 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.略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ACPA	anti-citrullinated peptide antibody
CRP	C reactive protein
DAS28	disease activity score 28
ETN	etanercept
ERK	extracellular signal-regulated kinase
ESR	erythrocyte sedimentation rate
FBS	fetal bovine serum
FLS	fibroblast-like synoviocyte
GLM	golimumab
HAQ-DI	health assessment questionnaire disability index
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HE	hematoxylin-eosin
HSP-47	heat shock protein 47
IFX	infliximab
IL-6	interleukin-6
IMDM	Iscoe's modified Dulbecco's medium
JNK	c-Jun N-terminal kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
miPGES-1	microsomal prostaglandin E synthase-1
MMP	matrix metalloproteinase
MTX	methotrexate
NA	not available
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
OA	osteoarthritis
PBS	phosphate buffered saline
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
R	correlation coefficient
RA	rheumatoid arthritis
RANKL	receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RasGRP	Ras guanine nucleotide-releasing protein
RF	rheumatoid factor

RQ	relative quantification
TCZ	tocilizumab
TNF α	tumor necrosis factor alpha
VEGF	vascular endothelial growth factor A

3. 第一部

RA 患者、OA 患者の滑膜組織の組織学的検討

3.1 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⁷²、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³⁹。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-11⁴⁴⁻⁴⁶、HSP-47⁴⁷ 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。

3.2 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。

3.3 患者と方法

3.3.1 対象患者

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9名のRA患者と5名のOA患者を対象とした。すべてのRA患者は1987年⁷⁷または2010年⁷⁸のアメリカリウマチ学会の関節リウマチ分類基準に基づき診断された。本研究は北海道大学病院の倫理委員会の承認のもとに行った(研究番号 008-0103)。

3.3.2 方法

3.3.2.1 HEK-293 細胞を用いた RasGRP4 のトランスフェクション

ラビット抗ヒト RasGRP4 (ヒト RasGRP4) ポリクローナル抗体 (Abcam, ab96294)が免疫組織化学染色で適切に使用できるかどうか判断するため、RasGRP4 を発現していない HEK-293 (line CRL-1573; American Type Culture Collection)を用いて RasGRP4 のトランスフェクションを行った。pcDNA3.1-RasGRP4 vector は FuGENE HD (Promega)を用いたリポフェクション法によって、HEK-293 細胞にトランスフェクションされた。

3.3.2.2 RasGRP4 をトランスフェクションされた HEK-293 細胞の

免疫組織化学染色

HEK-293 細胞、空ベクターをトランスフェクションした HEK-293 細胞、RasGRP4 をトランスフェクションした HEK-293 細胞を iPGell (Genostaff)を用いて浮遊した状態のまま固定し、さらに 4%パラホルムアルデヒドで 24 時間固定した。固定後パラフィン包埋したのち、6 μm の厚さの組織切片を作成した。キシレンで脱パラフィンを行い、エタノールで洗浄し、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline: PBS)に置換した。内因性ペルオキシダーゼ活性を不活化するため、0.3%過酸化水素を混ぜた PBS に常温で 30 分間浸した。洗浄後、G-Block (Genostaff, GB-01)で 10 分間ブロッキングを行った後、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ラビット抗ヒト RasGRP4 (ヒト RasGRP4) ポリクローナル抗体で染色した。コントロールとして同濃度の正常ラビット IgG (Dako, X0936)を用いた。

3.3.2.3 滑膜組織の免疫組織化学染色

滑膜組織は 4%パラホルムアルデヒドで 24 時間固定した。パラフィン包埋の後、6 μ m の厚さの組織切片を作成した。キシレンで脱パラフィンを行い、エタノールで洗浄し、PBS に置換した。内因性ペルオキシダーゼ活性を不活化するため、0.3%過酸化水素を混ぜた PBS に常温で 30 分間浸した。洗浄後、G-Block (Genostaff, GB-01)で 10 分間ブロッキングを行い、免疫組織化学染色を行った。ミラー切片は、連続切片の共通割面を上方に向けてスライドガラスに貼り付けて作成した。分割された細胞の同一面を二つの異なる抗体により染色することにより共発現を検討した。

10 μ g/ml の抗ヒト RasGRP4 抗体を加え、一晚インキュベートを行った。同濃度の正常ラビット IgG をコントロールとした。洗浄後、二次抗体(anti-rabbit Biotin, Dako, E0432)を加え 30 分常温で放置した。Cadherin-11 染色には 10 μ g/ml のヤギ抗ヒト Cadherin-11 ポリクローナル抗体を用いた。コントロールとして同濃度の正常ヤギ IgG (Santacruz, sc-2028)を用い、二次抗体(anti-goat Biotin, Dako, E0466)を加え 30 分常温で放置した。CD14 染色には 10 μ g/ml のマウス抗ヒト CD14 モノクローナル抗体(Abcam, ab49755)を用いた。コントロールとして同濃度の正常マウス IgG2a (R&D Systems, MAB0031)を用い、二次抗体(anti-mouse Biotin, Dako, E0464)を加え 30 分常温で放置した。CD68 染色には 0.1 μ g/ml のマウス抗ヒト CD68 モノクローナル抗体(Dako, M0876)を用いた。コントロールとして同濃度の正常マウス IgG (Santacruz, sc-2025)を用い、二次抗体(anti-mouse Biotin, Dako, E0464)を加え 30 分常温で放置した。HSP47 染色には 20 μ g/ml のマウス抗ヒト HSP47 モノクローナル抗体(Enzo Life Sciences, ADI-SPA-470)を用いた。コントロールとして同濃度の正常マウス IgG2a (R&D Systems, MAB0061)を用い、二次抗体(anti-mouse Biotin, Dako, E0464)を加え 30 分常温で放置した。ペルオキシダーゼ活性を検出するためにペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(Nichirei, 426062)を使用した。また、hematoxylin-eosin (HE)染色とトルイジンブルー染色も行った。

3.3.2.4 RA 患者と OA 患者の滑膜表層 RasGRP4 陽性面積の比較

RA 患者 9 例、OA 患者 5 例について、滑膜表層の Cadherin-11 陽性かつ RasGRP4 陽性面積を Image J を用いて測定した。FLS の増生は滑膜表層に並行して起きるため、RasGRP4 陽性領域は表層の長さで補正を行った。

3.3.2.5 ヒト滑膜組織の in situ hybridization

ヒト RasGRP4 の cDNA (GenBank accession no. NM170604.2) の 2039 番から 2513 番のまでの 475 塩基の DNA 断片を pGEM-T Easy vector (Promega) にサブクローニングを行い、センス、アンチセンス RNA プローブを作製した。また、ネガティブコントロールとして、570 塩基の植物由来のヌクレオチド配列から RNA プローブを作製した⁷⁹。ジゴキシゲニンによる RNA プローブの標識は DIG RNA labeling Mix (Roche Diagnostics) を使用した。

滑膜組織における RasGRP4 の RNA の存在を確認するため、RA 患者 1 例、OA 患者 1 例の滑膜組織の in situ hybridization を行った。滑膜組織は in situ hybridization 用の組織固定液(Genostaff)で固定した後、パラフィン包埋を行い、4 μ m の厚さの組織切片を作成した。キシレンとエタノール系列で脱パラフィンを行い、切片を 4%パラホルムアルデヒドで 15 分固定し、PBS で洗浄した。次に 6 μ g/ml の ProteinaseK を溶解液に 37°C で 30 分間浸し、PBS で洗浄後、4%パラホルムアルデヒドで再固定し、再度 PBS で洗浄し、0.2N HCl に 10 分間浸した。PBS で洗浄後、切片を tri-ethanolamine-HCl (pH 8.0, 0.25% acetic anhydride) に浸し、10 分間インキュベーションを行いアセチル化した。PBS で洗浄後、エタノールで脱水を行った後、300 ng/ml の濃度でプローブを加え、16 時間 60°C でハイブリダイゼーションを行った。次に 5x HybriWash (Genostaff) で 60°C、20 分間洗浄し、50%formamide 入り 2x HybriWash で 60°C、20 分間処理した。50 μ g/mL RNaseA (Sigma) 溶液で 37°C にて 30 分間処理し、2x HybriWash で 60°C にて 20 分間処理した。0.2x HybriWas で 60°C にて 20 分間処理したのち、Tris buffered saline tween で洗浄した。切片は、1x G-Block (Genostaff) で室温にて 15 分間処理した。x50 G-Block (Genostaff) を含む Tris Buffered SalineTween で 2000 倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体 (Roch) で室温にて 1 時間処理した。Tris buffered saline tween で 2

回すすいだのち、発色用バッファー(100 mM NaCl、50 mM MgCl₂、0.1% Tween 20, 100 mM Tris-HCl, pH 9.5)ですすいだ。NBT/BCIP 溶液(Sigma)を切片にアプライし、十分な発色が得られるまで冷暗所にてインキュベートした。PBS ですすいだのち、ケルンエヒトロート溶液(武藤化学)で対比染色した。水溶性封入剤の CC/Mount (Diagnostic Biosystem)でスライドを封入し、顕微鏡で観察した。

3.4 結果

3.4.1 HEK-293 細胞を用いた RasGRP4 のトランスフェクション と RasGRP4 の免疫組織化学染色

トランスフェクション試薬のみ、あるいは空ベクターをトランスフェクションした HEK293 細胞はヒト RasGRP4 抗体で染色されなかったが、RasGRP4 をトランスフェクションした HEK293 はヒト RasGRP4 抗体で染色され (Figure 4)、ヒト RasGRP4 抗体がヒト RasGRP4 に特異的に働き、免疫組織化学染色に使用できることを確認した。

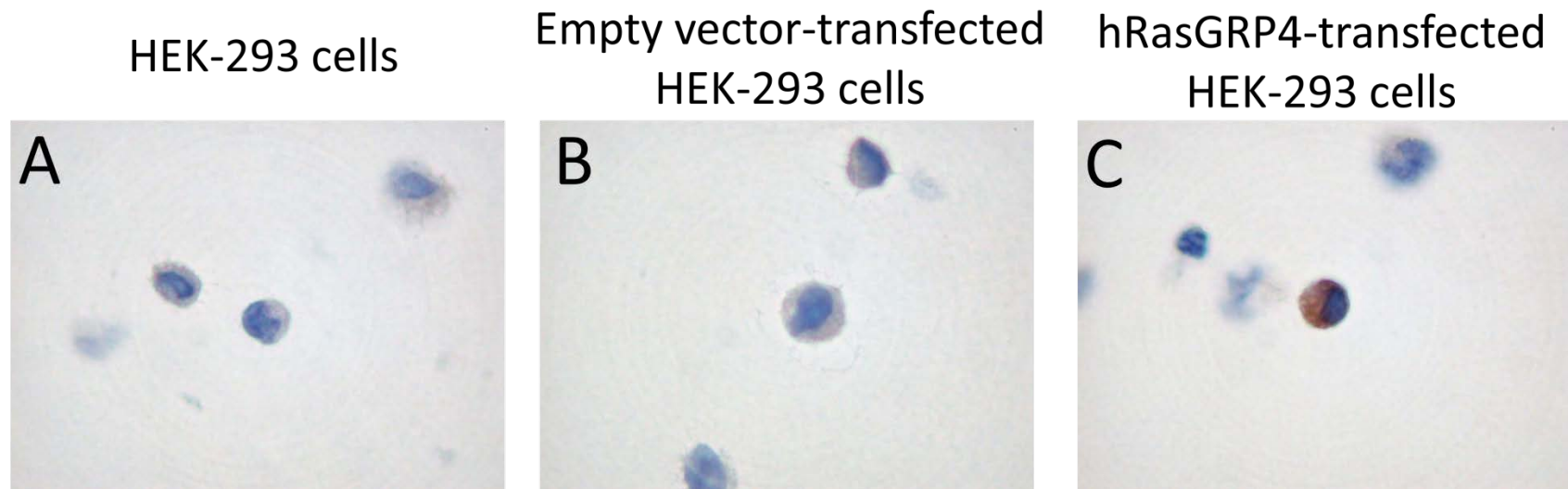


Figure 4. HEK-293 細胞を用いた RasGRP4 のトランスフェクション

A : HEK-293 細胞、B : 空ベクターをトランスフェクションした HEK-293 細胞、C : ヒト RasGRP4 をトランスフェクションした HEK-293 細胞、ヒト RasGRP4 抗体 (2 μ g/ml)。倍率 : $\times 1000$ 。

3.4.2. 滑膜組織の抗 RasGRP4 抗体、抗 CD14 抗体、抗 CD68 抗体 による免疫組織化学染色

滑膜組織の免疫組織化学染色においても、ヒト RasGRP4 抗体がヒト RasGRP4 に特異的に働き、免疫組織化学染色に使用できることを確認するため、positive control として、マスト細胞を用いた。トルイジンブルー染色で異染性を示すマスト細胞はミラー切片において、ヒト RasGRP4 抗体でも染色された。(Figure 5)。また、滑膜表層に RasGRP4 陽性細胞を認め(Figure 5、6)、多くの RasGRP4 陽性細胞は CD14 陰性、CD68 陰性細胞であった(Figure 6)。

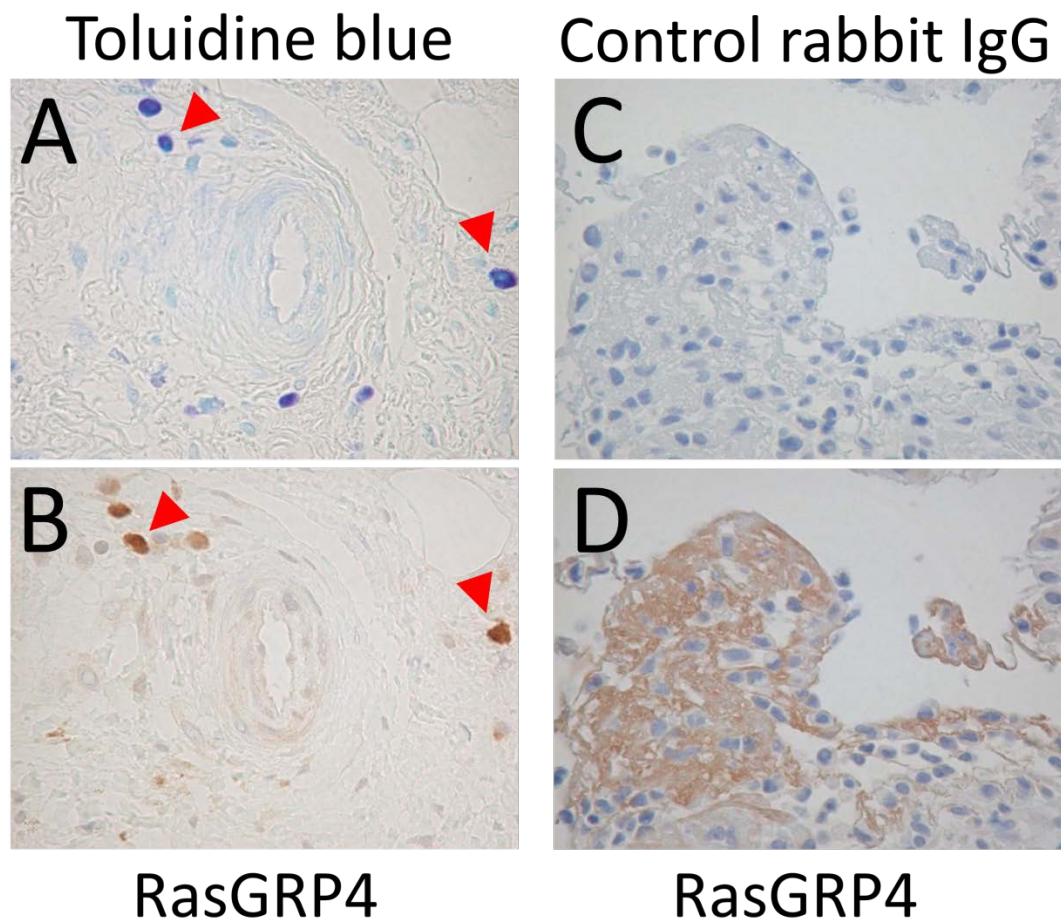


Figure 5. 滑膜組織の RasGRP4 染色、トルイジンブルー染色

A: トルイジンブルー染色、B: 抗 RasGRP4 抗体 (10 $\mu\text{g/ml}$)、赤矢印: マスト細胞、抗 RasGRP4 抗体はトルイジンブルー染色で異染色性に染色されるマスト細胞を正確に認識した。C: 正常ラビット IgG 抗体(10 $\mu\text{g/ml}$)。D: 抗 RasGRP4 抗体 (10 $\mu\text{g/ml}$)、滑膜表層に RasGRP4 陽性細胞を認める。倍率は 400 倍で撮像した。A と B、C と D はそれぞれミラー切片。

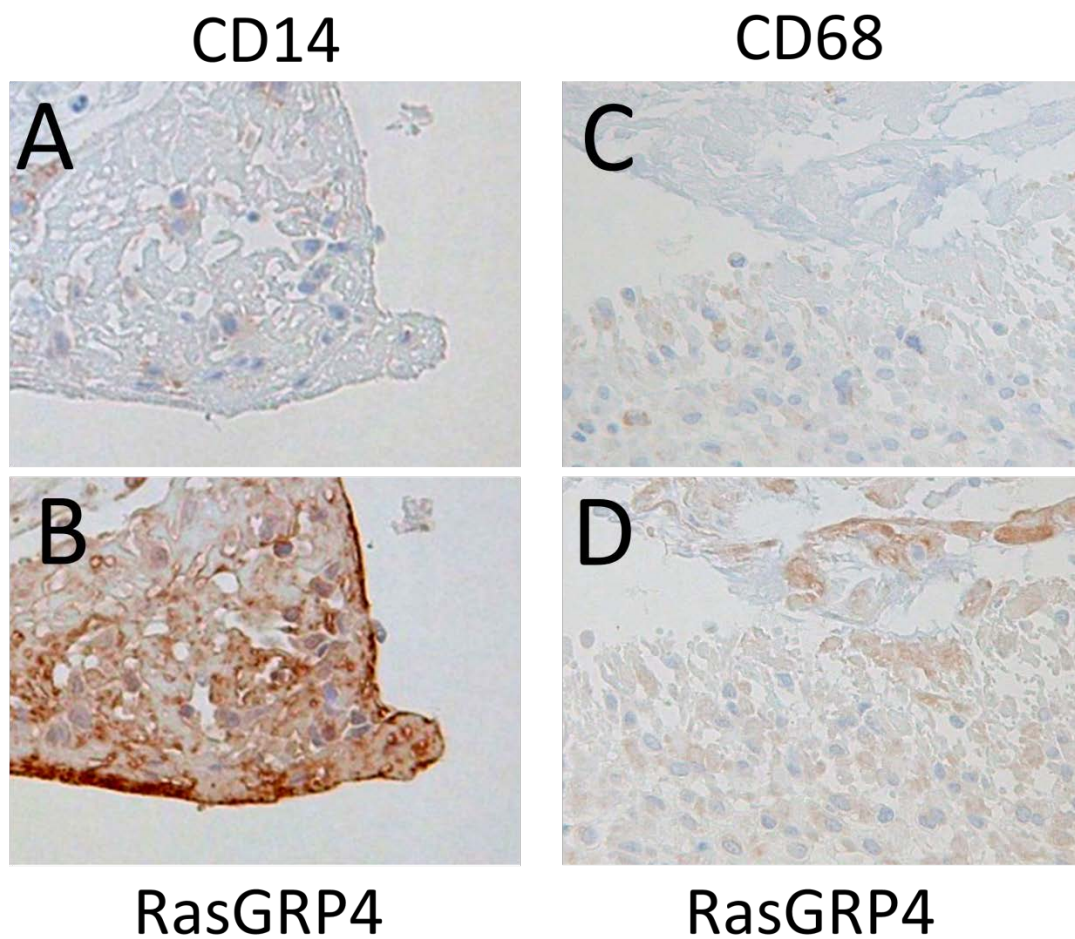


Figure 6. 滑膜組織の CD14、CD68、RasGRP4 染色

A: 抗 CD14 抗体 (10 $\mu\text{g/ml}$)、B: ヒト抗 RasGRP4 抗体、C: 抗 CD68 抗体 (0.1 $\mu\text{g/ml}$)、D: 抗ヒト RasGRP4 抗体、倍率は 400 倍で撮像した。多くの RasGRP4 陽性細胞は CD14 陰性、CD68 陰性細胞であった。A と B、C と D はそれぞれミラー切片。

3.4.3. ヒト滑膜組織の抗 RasGRP4 抗体、抗 Cadherin-11 抗体による免疫組織化学染色

免疫化学組織染色に使用した患者の患者背景については Table 1 に示す。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、特に RasGRP4 は 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た(Figure 7、8)。

Table 1. 免疫化学組織染色に使用した患者の患者背景

	Histological examination	
	RA	OA
Gender, female/male	7/2	5/0
Age at the operation, years	70 (58-78)	73 (63-80)
Duration of disease, years	11 (5-48)	NA
Serum CRP level, mg/dl	0.16 (0.02-5.69)	0.05 (0.02-0.32)
MMP-3, mg/dl	95.7 (44.8-449.9)	NA
RF, U/ml	12 (1.1-82.8)	NA
ACPA, U/ml	115 (4.5-300)	NA
Swollen joint count	3 (1-6)	NA
Tender joint count	2 (0-16)	NA
DAS28-ESR	4.4 (2.4-5.0)	NA
HAQ-DI	1 (0-1.75)	NA
Methotrexate use, n (%)	5 (55)	0 (0)
Biologics agent use, n (%)	4 (44, TCZ 22, IFX 22)	0 (0)

RA: rheumatoid arthritis, OA: osteoarthritis, NA: not available,
 CRP: C reactive protein, MMP-3: matrix metalloproteinase-3,
 RF: rheumatoid factor, ACPA: anti-citrullinated peptide antibody,
 DAS28: disease activity score 28, ESR: erythrocyte sedimentation rate,
 HAQ-DI: health assessment questionnaire disability index,
 TCZ: tocilizumab, IFX: infliximab

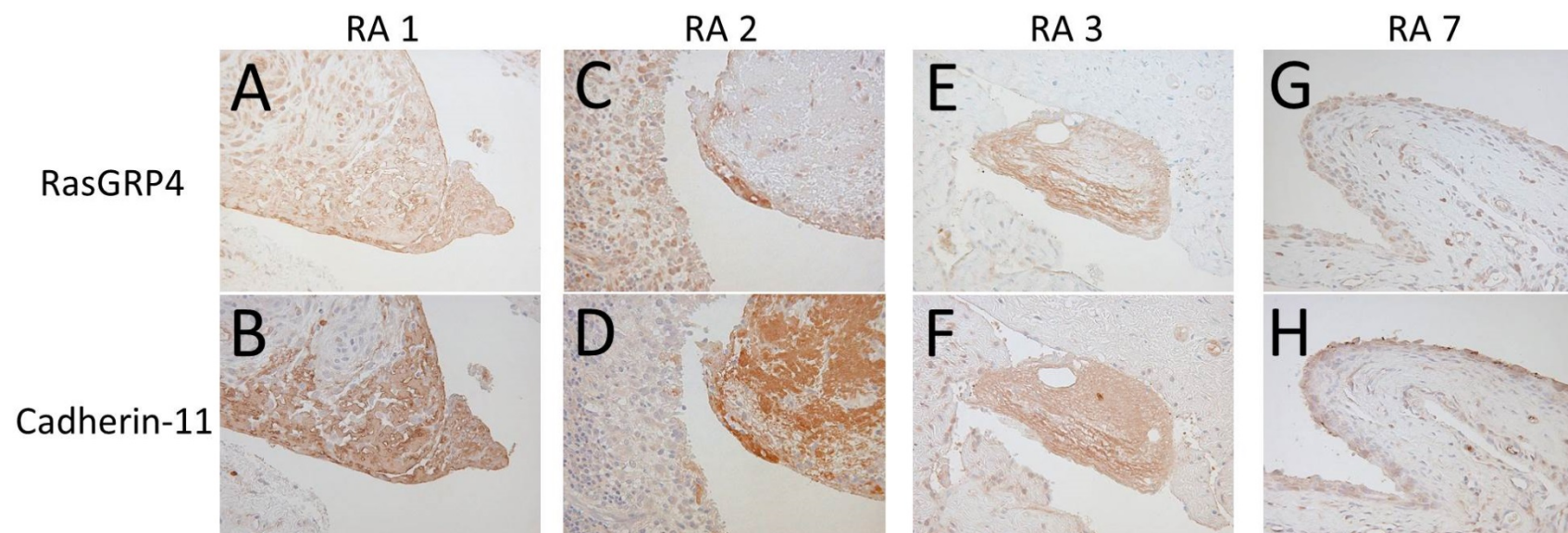


Figure 7. RA 患者の滑膜組織における抗 RasGRP4 抗体、抗 Cadherin-11 抗体による免疫組織化学染色

上段は抗 RasGRP4 抗体、下段は Cadherin-11 による染色を行った。A と B、C と D、E と F、G と H はそれぞれミラー切片。倍率は 200 倍で撮像した。RA: rheumatoid arthritis.

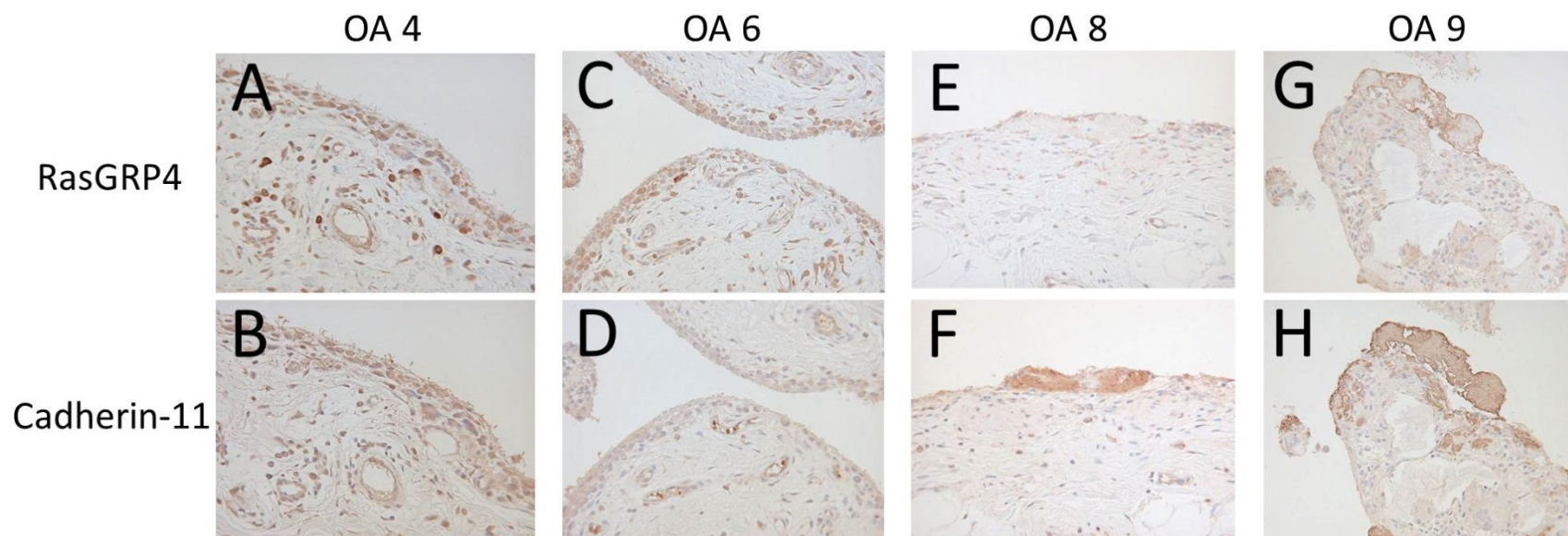


Figure 8. OA 患者の滑膜組織における抗 RasGRP4 抗体、抗 cadherin-11 抗体による免疫組織化学染色

上段は抗 RasGRP4 抗体、下段は Cadherin-11 による染色を行った。A と B、C と D、E と F、G と H はそれぞれミラー切片。倍率は 200 倍で撮像した。OA: osteoarthritis.

3.4.4. ヒト滑膜組織の抗 RasGRP4 抗体、抗 HSP-47 抗体による免疫組織化学染色

Cadherin-11 と同様、FLS に特異的な HSP-47 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、特に RasGRP4 は滑膜表層の重層化している部分に高発現していた(Figure 9)。

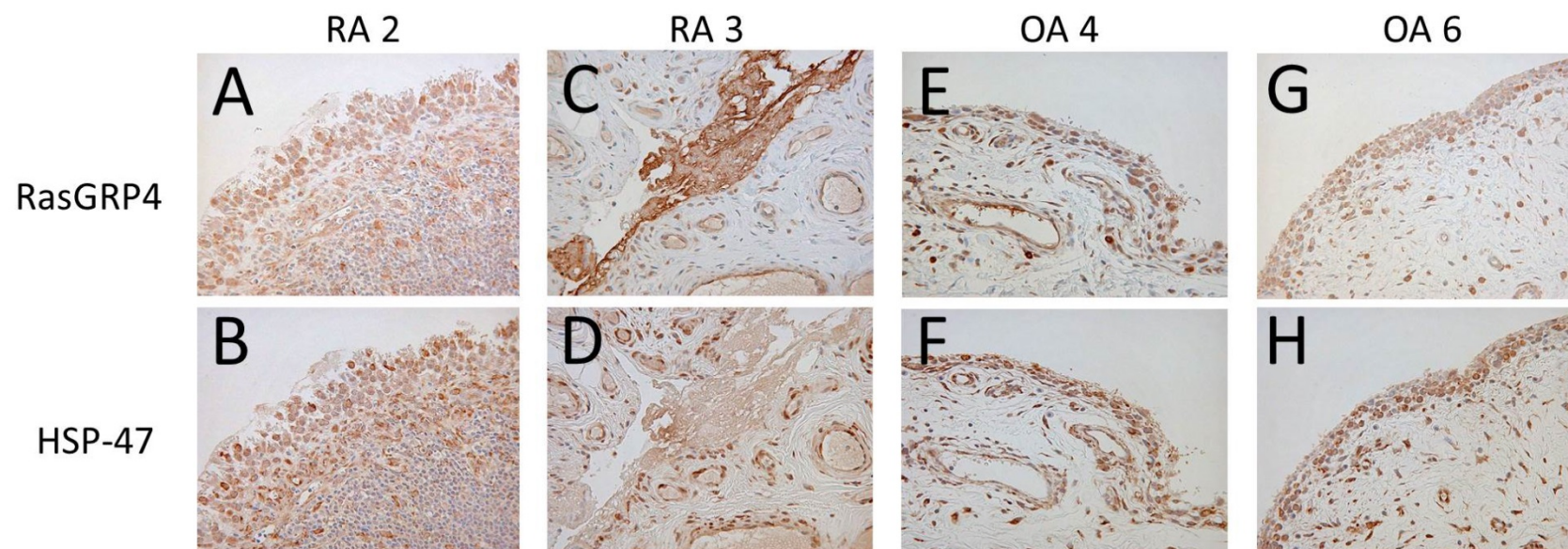


Figure 9. RA、OA 患者の滑膜組織における抗 RasGRP4 抗体、抗 HSP-47 抗体による免疫組織化学染色

上段は抗 RasGRP4 抗体、下段は HSP-47 による染色を行った。A と B、C と D、E と F、G と H はそれぞれミラー切片。
倍率は 200 倍で撮像した。RA: rheumatoid arthritis、OA: osteoarthritis

3.4.5. RA 患者と OA 患者の滑膜表層 RasGRP4 陽性面積の比較

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(Figure 10. $p < 0.01$, Welch's t-test)。

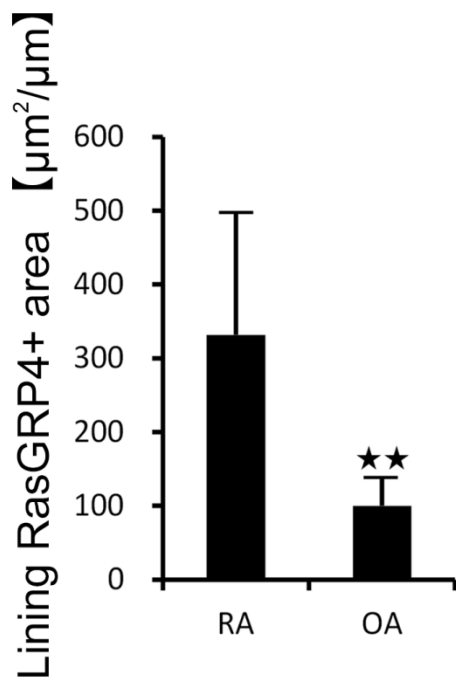


Figure10. 滑膜表層 RasGRP4 陽性面積の比較

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($p < 0.01$, Welch's t-test)。データは平均±標準偏差で示した。

3.4.6. ヒト滑膜組織の in situ hybridization

滑膜におけるどの細胞に RasGRP4 の遺伝子が発現しているかを解明するため、ヒト滑膜組織の in situ hybridization を行った。RasGRP4 のアンチセンスプローブで RA 患者の滑膜表層に染色が認められ(Figure 11. A-C)、OA 患者の滑膜表層にも弱い染色が認められた(Figure 11. D-F)。また、トルイジンブルー染色で異染性に染色されるマスト細胞にもアンチセンスプローブで染色が認められた(Figure 11. G, H)。また、アンチセンスプローブで染色される RasGRP4 の遺伝子発現が RasGRP4 抗体の免疫組織化学染色で染色される部位と一致し(Figure 11. I, J)、さらに Cadherin11 抗体の免疫組織化学染色で染色される部位とも一致していること(Figure 11. K, L)を確認した。

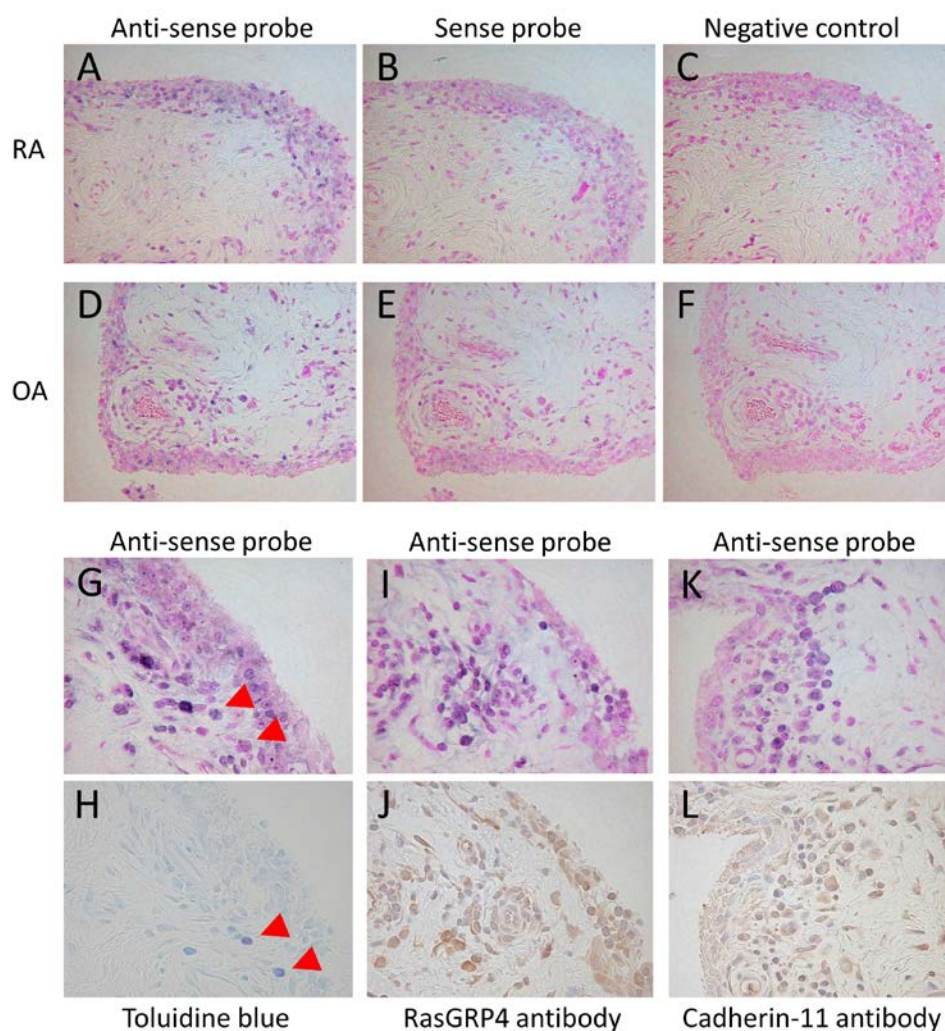


Figure 11. RasGRP4 の mRNA は RA 患者、OA 患者の滑膜表層に存在する A/B/C、D/E/F、G/H、I/J、K/L は連続切片。A-C、G-L は RA 患者の滑膜組織。D-F は OA 患者の滑膜組織。A、D、G、I、K はアンチセンスプローブでの染色、B、E はセンスプローブでの染色。C、F は植物由来のヌクレオチドから作成した 570 塩基の negative control で染色した。H はトルイジンブルー染色、J は抗ヒト RasGRP4 抗体、L は抗ヒト Cadherin-11 抗体で免疫組織化学染色を行った。トルイジンブルーで異染色性に染色されるマスト細胞は RasGRP4 のアンチセンスプローブで染色された(赤矢印)。倍率は A-F は 200 倍、G-L は 400 倍。

3.5 考察

FLS は RA 患者の滑膜に存在する主要な細胞のひとつである。FLS は炎症性サイトカインや RANKL、MMP などを産生し、骨・軟骨破壊や滑膜炎に大きな役割を果たしている⁸⁰。Cadherin-11 は滑膜において FLS に特異的な接着蛋白であり、Cadherin-11 ノックアウトマウスは関節炎の誘導が抑制される⁴⁴。また、Izquierdo らは、滑膜において HSP-47 も FLS に特異的に発現しており、滑膜表層における HSP-47 陽性細胞の面積は関節リウマチの活動性や治療反応性と相関すると報告している⁴⁷。

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。また、RasGRP4 は Ras を活性化する guanine nucleotide exchange factor であり⁵⁶、下流の ERK のリン酸化を介して、細胞の分化や増殖に関わっている。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。

3.6 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。

4. 第二部

FLS における RasGRP4 の発現量と増殖能 に関する検討

4.1 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⁸⁰。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⁵⁶、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。

4.2 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。

4.3 患者と方法

4.3.1 対象患者

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10名のRA患者と10名のOA患者を対象とした。すべてのRA患者は1987年⁷⁷または2010年⁷⁸のアメリカリウマチ学会の関節リウマチ分類基準に基づき診断された。本研究は北海道大学病院の倫理委員会の承認のもとに行った(研究番号008-0103)。

4.3.2 方法

4.3.2.1 FLS の分離方法

滑膜切除術あるいは人工関節置換術を行われた患者の滑膜を使用した。滑膜から結合組織や脂肪を除去し、細かく切り刻み、分離し、5 mg/ml の type I コラゲナーゼ (Sigma)を含んだ Hanks' balanced salt solution (HBSS)に入れ、37 度で 2 時間インキュベートを行った。その後メッシュを通し、遠心分離を行った後、10%非働化ウシ胎児血清(fetal bovine serum: FBS)、ペニシリン、ストレプトマイシン含有 Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM, Sigma)で培養した。すべての FLS は 3 から 6 継代のものを使用した。

4.3.2.2 分離した FLS の純度についての検討

分離した FLS の純度を検討するため、抗 HSP-47 抗体、抗 CD14 抗体、トルイジンブルー染色を行った。FLS を iPGell (Genostaff)を用いて浮遊した状態のまま固定し、さらに 4%パラホルムアルデヒドで 24 時間固定した。固定後パラフィン包埋したのち、6 μ m の厚さの組織切片を作成した。キシレンで脱パラフィンを行い、エタノールで洗浄し、PBS に置換した。内因性ペルオキシダーゼ活性を不活化するため、0.3%過酸化水素を混ぜた PBS に常温で 30 分間浸した。洗浄後、G-Block (Genostaff, GB-01)で 10 分間ブロッキングを行った。HSP47 染色には 2 μ g/ml のマウス抗ヒト HSP47 モノクローナル抗体(Enzo Life Sciences, ADI-SPA-470)を用いた。コントロールとして同濃度の正常マウス IgG2a (R&D Systems, MAB0061)を用い、二次抗体(anti-mouse Biotin, Dako, E0464)を加え 30 分常温で放置した。CD14 染色には 10 μ g/ml のマウス抗ヒト CD14 モノクローナル抗体(Abcam, ab49755)を用いた。コントロールとして同濃度の正常マウス IgG2a (R&D Systems, MAB0031)を用い、二次抗体(anti-mouse Biotin, Dako, E0464)を加え 30 分常温で放置した。ペルオキシダーゼ活性を検出するためにペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(Nichirei, 426062)を使用した。また、マスト細胞の混入の有無を検討するためトルイジンブルー染色も行った。

4.3.2.3 RNA の抽出と Real-time PCR

本研究では TRIzol RNA Reagent (Life Technologies)を用いて mRNA を抽出した。抽出した mRNA は濃度を調整後に SuperScript VILO (Invitrogen)を用いて cDNA とし、Taq-Man Gene Expression Assay (Applied Biosystems) による Real-time-PCR 法でヒト RasGRP4 mRNA およびヒト GAPDH mRNA の発現を定量した (使用した probe の Assay ID はそれぞれ Hs01073180m1 および Hs99999905m1)。測定には 7500 Fast Realtime PCR system (Applied Biosystems)を用いた。RasGRP4 の probe はエクソン 2 と 3 の間に位置する sequence を認識するものを用いた。RasGRP4 発現量は $\Delta\Delta CT$ 法によって各細胞の RasGRP4 と GAPDH の平均の差を計算し、RasGRP4 mRNA 量を算出した。

4.3.2.4 FLS の RasGRP4 発現量における TNF α の影響

4名の RA 患者と 3名の OA 患者から分離した 7.5×10^5 個の FLS を PBS で洗浄したのち、T-75 フラスコに散布し、10%非働化 FBS、ペニシリン、ストレプトマイシン含有 IMDM 15 ml で培養を行った。一晚インキュベーションした後、0、10、100 ng/ml の濃度でヒト TNF α を培養液に加え、48 時間後に細胞を回収し、洗浄後、前述のように RNA を抽出し、Real-time PCR 法で遺伝子発現量を検討した。

また、tetrazolium/formazan assay を用い、細胞増殖能を検討した。 3×10^3 個の FLS を PBS で洗浄したのち、96 well プレートに散布し、10%非働化 FBS、ペニシリン、ストレプトマイシン含有 IMDM 100 μ l で培養を行った。一晚インキュベーションした後、0、10、100 ng/ml の濃度でヒト TNF α を培養液に加え、5 日間インキュベーションを行った。15 μ l の Dye Solution を各 well に加え、4 時間インキュベーション後、100 μ l の Stop Solution を加え、570 nm の吸光度で測定した。tetrazolium/formazan assay は常に confluent にならない条件で行った。

4.3.2.5 RA-FLS における RasGRP4 の knockdown の影響

7.5×10^5 個の FLS を PBS で洗浄したのち、T-75 フラスコに散布し、10% 非働化 FBS 含有 IMDM 15 ml で培養を行った。一晚インキュベーションした後、メディウムを 15ml の Opti-MEM I (Life Technologies)に変更し、siRNA negative Control (Applied Biosystems, Silencer select negative control No. 1 siRNA, 10 nM)-Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies, 3 nM)複合体または RasGRP4-specific siRNAs (Applied Biosystems, Silencer Select Pre-designed siRNA, s41861 または s41862, 10 nM)-Lipofectamine RNAiMAX (3 nM)複合体を加えた。6 時間インキュベーション後、メディウムを 10%非働化 FBS 含有 IMDM15ml に変更した。さらに 48 時間インキュベーション後、細胞を回収し、RNA を抽出し、抽出した mRNA は濃度を調整後に SuperScript VILO (Invitrogen)を用いて cDNA とし、Taq-Man Gene Expression Assay による Real-time PCR 法を用いて RasGRP4、RANKL、interleukin-6 (IL-6)、VEGF、matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)、MMP-3、microsomal PGE synthase-1 (miPGES-1)の遺伝子発現量を測定した。RANKL、IL-6、VEGF、MMP-1、MMP-3、miPGES-1 の probe はそれぞれ Hs00243522m1、Hs00985639m1、Hs00900055m1、Hs00899658m1、Hs00968305m1、Hs01115610m1 を用いた。発現量は $\Delta\Delta CT$ 法によって各細胞の RasGRP4、RANKL、IL-6、VEGF、MMP-1、MMP-3、miPGES-1 と GAPDH の平均の差を計算し、それぞれの遺伝子の mRNA 量を算出した。

また、tetrazolium/formazan assay を用い、細胞増殖能を検討した。 1×10^5 個の FLS を PBS で洗浄したのち、96 well プレートに散布し、10%非働化 FBS 含有 IMDM 100 μ l で培養を行った。一晚インキュベーションした後、メディウムを 100 μ l の Opti-MEM I に変更し、siRNA negative Control-Lipofectamine RNAiMAX 複合体(3 nM)または RasGRP4-specific siRNAs (s41861 または s41862, 10 nM)-Lipofectamine RNAiMAX (3 nM)複合体を加えた。6 時間インキュベーション後、メディウムを 10%非働化 FBS 含有 IMDM 15 ml に変更した。さらに 48 時間インキュベーション後、15 μ l の Dye Solution を各 well に加え、4 時間インキュベーション後、100 μ l の Stop Solution を加え、570 nm の吸光度で測定した。tetrazolium/formazan assay は常に confluent にならない条件で行った。

4.4 結果

4.4.1 分離した FLS の純度についての検討

分離した FLS の HSP-47 染色を行ったところいずれの患者においても 97%以上陽性であり、CD14 染色、トリイジンブルー染色で異染性を示す細胞 1%以下であった(Figure 12-14)。

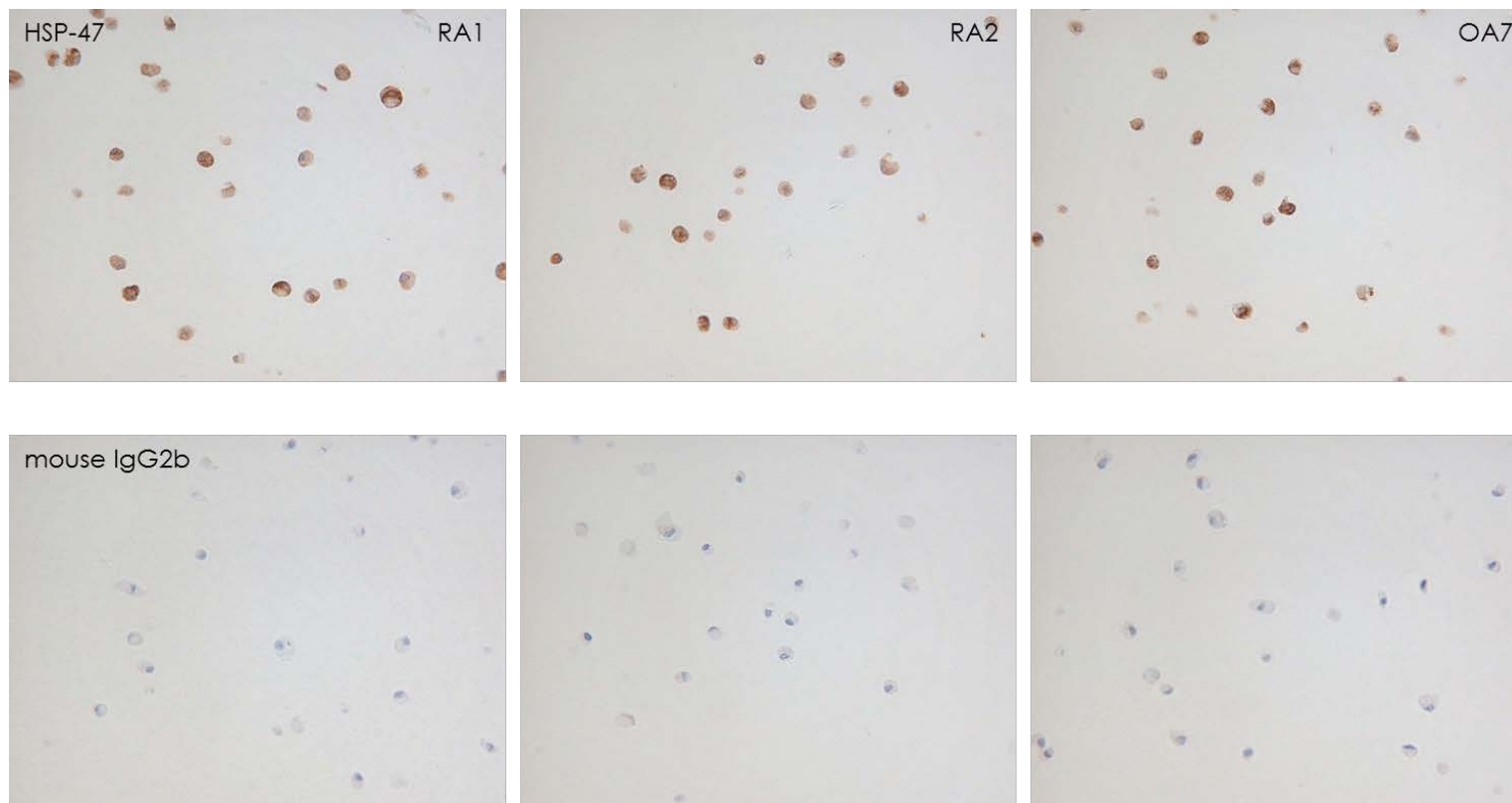


Figure 12. FLS の HSP-47 染色とマウス IgG2b 染色
 FLS の 97%以上が HSP-47 陽性細胞であった。

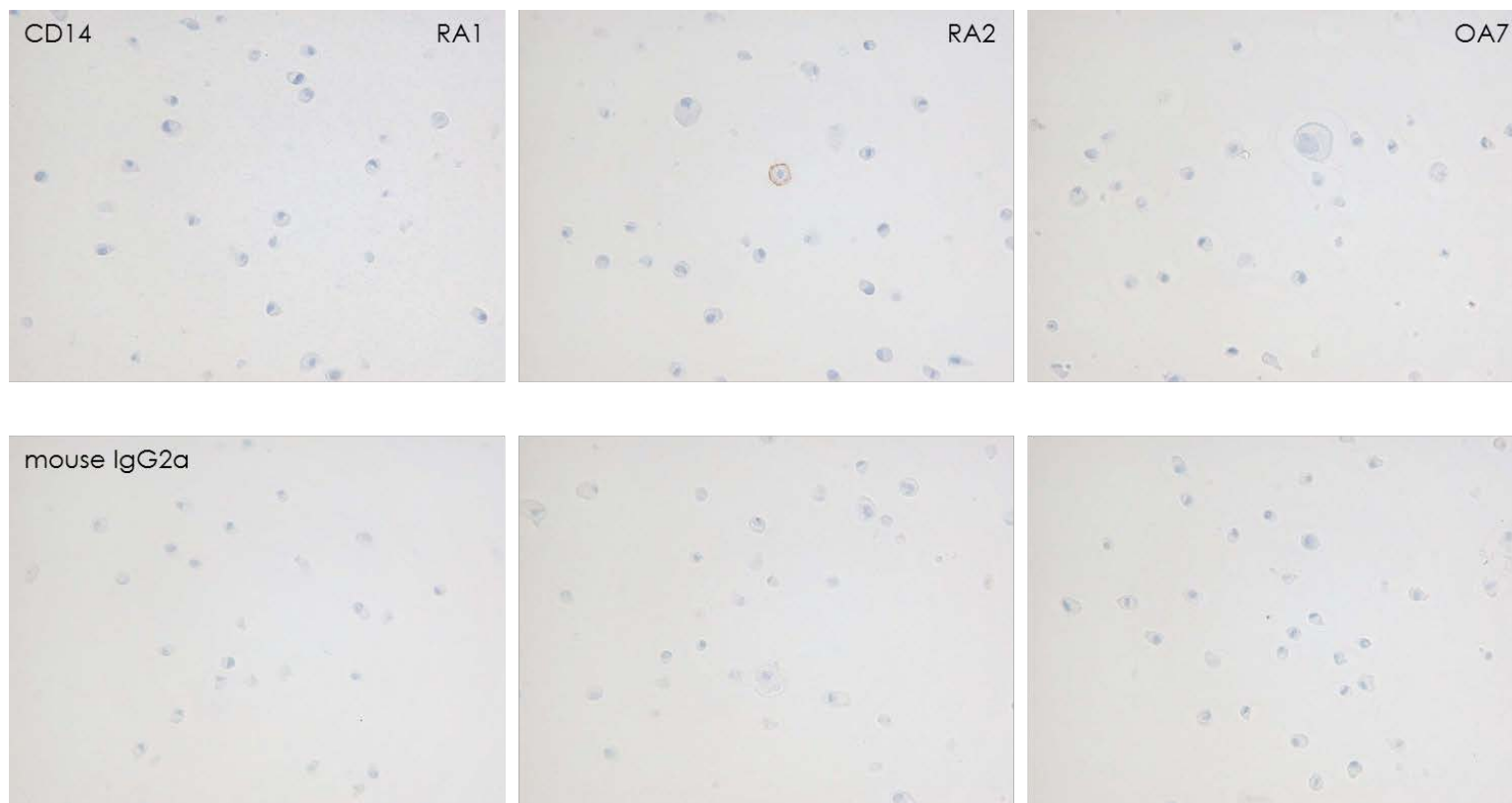


Figure 13. FLS の CD14 染色とマウス IgG2a 染色
 CD14 陽性細胞は全細胞の 1%以下であった。

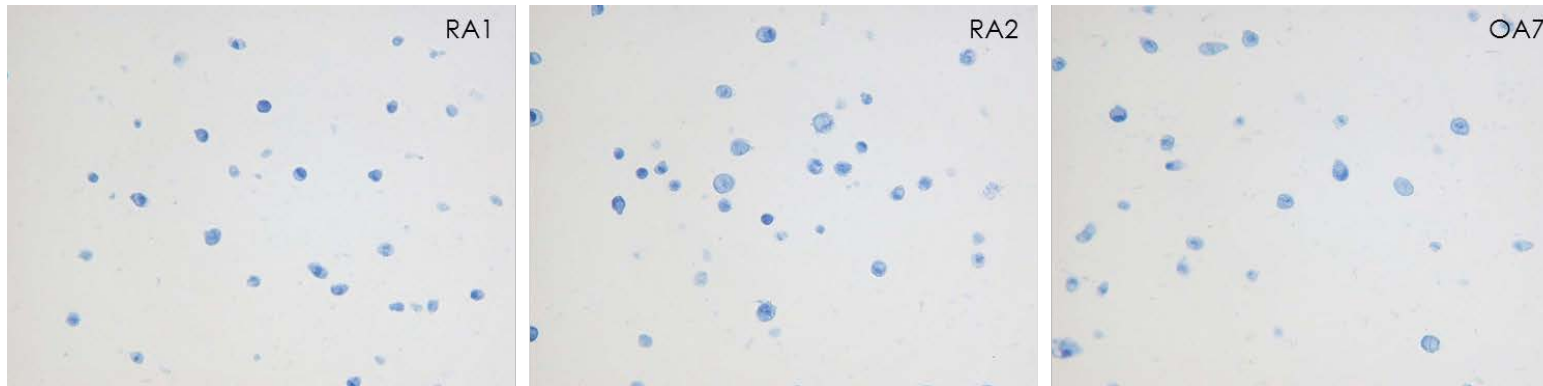


Figure 14. FLS のトルイジンブルー染色
トルイジンブルー染色で異染性を示す細胞は全細胞の 1% 以下であった。

4.4.2 RA 患者と OA 患者の FLS における RasGRP4 遺伝子発現量の比較

FLS を分離した RA 患者と OA 患者の患者背景を Table 2 に示す。また、RA 患者の患者背景の詳細については Table 3 に示す。RA 患者と OA 患者の FLS において RasGRP4 の遺伝子発現量に統計学的有意差は認めなかったが、一部の RA 患者の FLS において RasGRP4 の遺伝子は高発現していた。また、生物学的製剤を使用していた 6 人のうち 5 人(TNF α 阻害薬を使用されていた RA 患者 4 人中 4 人)の FLS で RasGRP4 の遺伝子発現量が低下していた(Figure 15)。

Table 2. FLS を分離した患者の患者背景

	Examination of cultured FLS	
	RA	OA
Gender, female/male	8/2	10/0
Age at the operation, years	66 (33-78)	72 (58-80)
Duration of disease, years	10.5 (2-48)	NA
Serum CRP level, mg/dl	0.12 (0.02-5.69)	0.1 (0.02-0.61)
MMP-3, mg/dl	90.5 (31.3-449.9)	NA
RF, U/ml	16.4 (1.1-82.8)	NA
ACPA, U/ml	115 (4.5-300)	NA
Swollen joint count	3 (1-6)	NA
Tender joint count	3 (0-16)	NA
DAS28-ESR	4.3 (2.4-5.0)	NA
HAQ-DI	1 (0-1.75)	NA
Methotrexate use, n (%)	5 (50)	0 (0)
Biologics agent use, n (%)	6 (60, TCZ 20, IFX 20, ETN 10, GLM 10)	0 (0)

FLS: fibroblast-like synoviocyte, RA: rheumatoid arthritis,
 OA: osteoarthritis, NA: not available, CRP: C reactive protein,
 MMP-3: matrix metalloproteinase-3, RF: rheumatoid factor,
 ACPA: anti-citrullinated peptide antibody,
 DAS28: disease activity score 28, ESR: erythrocyte sedimentation rate,
 HAQ-DI: health assessment questionnaire disability index,
 TCZ: tocilizumab, IFX: infliximab, ETN: etanercept, GLM: golimumab.

Table 3. FLS を分離した RA 患者の患者背景

Patient No.	Age (years old)	Sex	Duration of disease (years)	Treatment	RF, (U/ml)	ACPA, (U/ml)	DAS28-ESR	HAQ-DI
RA 1	78	M	48	BUC (100mg/d)	82.8	196.5	4.44	0.5
RA 2	78	F	5	PSL (5 mg/d)	51.7	> 300	4.35	1.25
RA 3	58	F	10	TCZ + MTX (4 mg/w) + PSL (5 mg/d)	7.3	285.2	2.39	1.25
RA 4	72	F	11	TCZ + PSL (2.5 mg/d)	6.2	136.6	4.1	1.5
RA 5	63	M	16	IFX + MTX (10 mg/w) + PSL(10 mg/d)	40.4	66.6	4.53	0
RA 6	56	F	2	GLM + PSL (2.5 mg/d)	21.1	240.1	2.99	2.25
RA 7	63	F	9	IFX + MTX (4 mg/w) + PSL (1 mg/d)	11.7	115	4.34	0.875
RA 8	33	F	9	ETN + PSL (5 mg/d)	7.6	28.3	4.12	1.375
RA 9	69	F	12	MTX (6 mg/w)	1.1	< 4.5	4.99	1
RA 10	77	F	31	MTX (2 mg/w) + PSL (4 mg/d)	36.2	< 4.5	4.95	1.75

RA: rheumatoid arthritis, FLS: fibroblast-like synoviocyte,

No: number, M: male, F: female, BUC: bucillamine, PSL: prednisone,

TCZ: tocilizumab, MTX: methotrexate, IFX: infliximab, GLM: golimumab, ETN: etanercept, CRP: C-reactive protein,

MMP-3: matrix metalloproteinase-3, RF: rheumatoid factor, ACPA: anti- cyclic citrullinated peptide antibody,

DAS 28-ESR: disease activity score 28 erythrocyte sedimentation rate, HAQ-DI: health assessment questionnaire disability index.

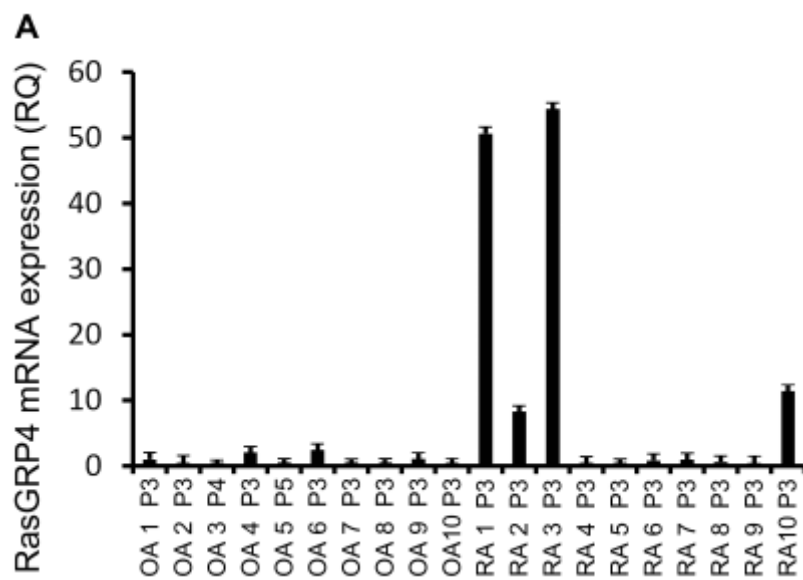


Figure 15.

RA 患者と OA 患者の RasGRP4 の遺伝子発現量

データは平均±標準誤差で示した。

RA: rheumatoid arthritis, OA: osteoarthritis,

RA③、④ : tocilizumab で加療中、RA⑤、⑦ : infliximab で加療中、

RA⑥ : golimumab で加療中、RA⑧ : etanercept で加療中。

4.4.3 FLSにおけるRasGRP4の遺伝子発現量とFLSの増殖能についての検討

FLSにおけるRasGRP4の遺伝子発現量とcell proliferation assayを用いたFLSの増殖能は強い正の相関($R^2 = 0.67$ 、 $p < 0.01$ 、Pearson's test)を認めた(Figure 16)。

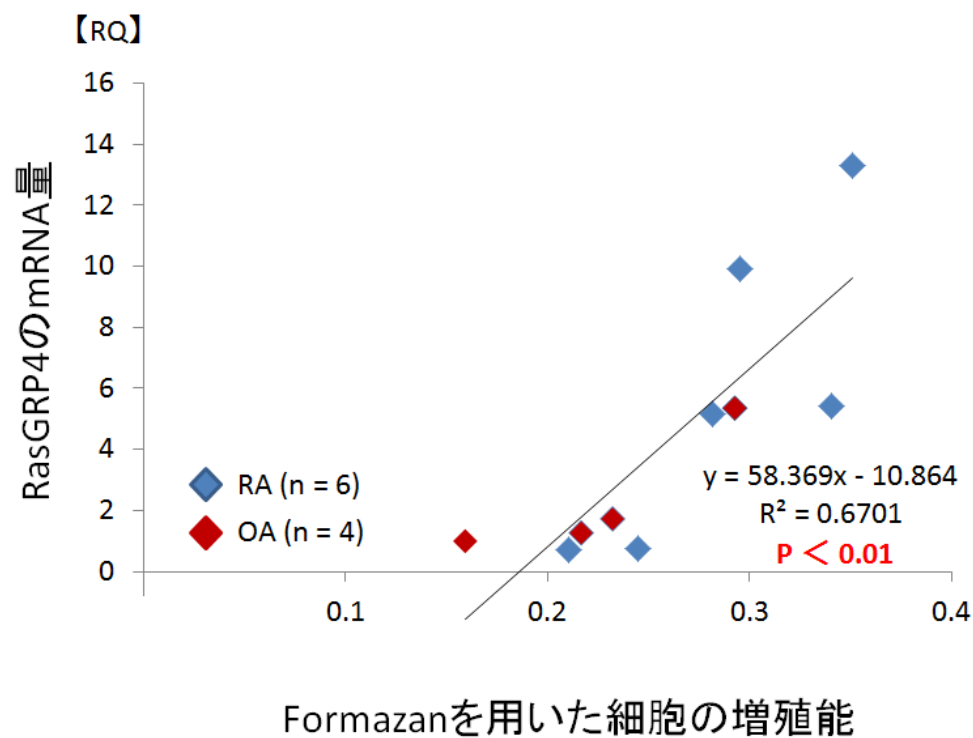


Figure 16. FLS における RasGRP4 の遺伝子発現量と FLS の増殖能

RA: rheumatoid arthritis, OA: osteoarthritis.

FLS: fibroblast-like synoviocyte, P: passage, RQ: relative quantification, R: correlation coefficient.

4.4.4 FLS の RasGRP4 遺伝子発現量における TNF α の影響

FLS に TNF α を添加したところ、濃度依存性に RasGRP4 の遺伝子発現量は増加し、cell proliferation assay を用いて検討した増殖能も増加した(Figure 17)。

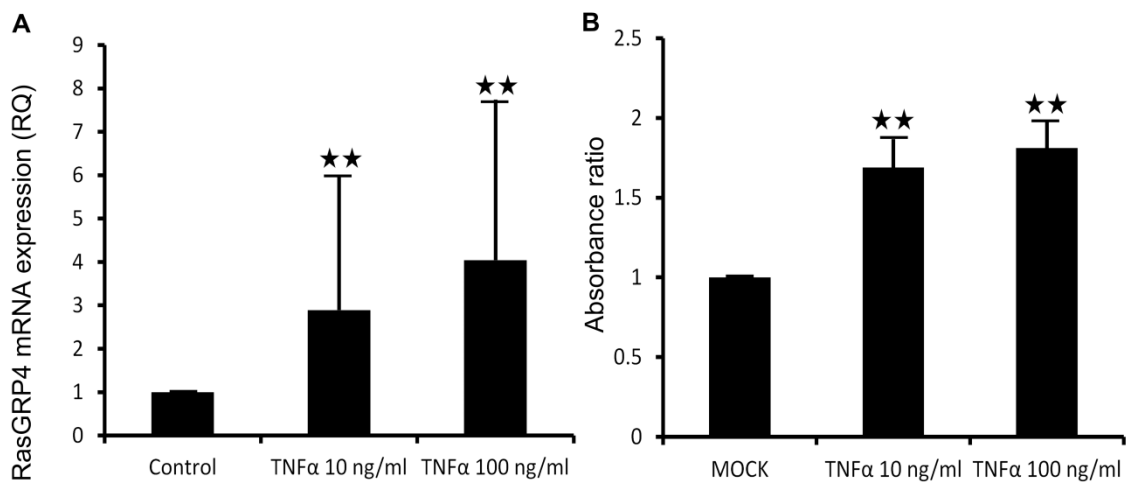


Figure 17. FLS の RasGRP4 発現量における TNF α の影響

A : TNF α で刺激した FLS の RasGRP4 発現量。B: TNF α で刺激した FLS の増殖能

RQ: relative quantification, FLS: fibroblast-like synoviocyte,
TNF α : tumor necrosis factor α , mean $\pm$ standard deviation,
Welch's t-test, ★★: $p < 0.01$.

4.4.5 RA-FLS における RasGRP4 の knockdown の影響

まず最初に RasGRP4 の遺伝子発現量が RasGRP4 に特異的な siRNA で knockdown できていること ($p < 0.05$, Welch's t-test)を確認した(Figure 18. A)。また、RasGRP4 の knockdown により FLS の増殖能は低下($p < 0.01$, Welch's t-test)していた(Figure 18. B)。

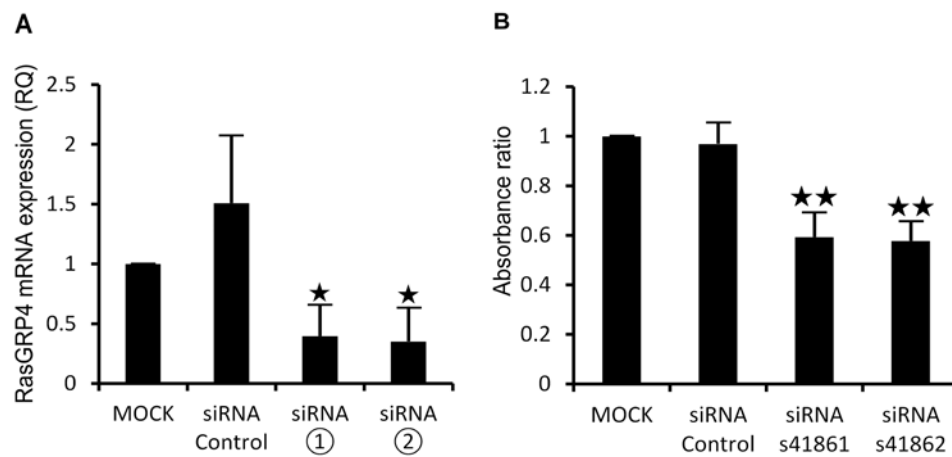


Figure 18. RA-FLS における RasGRP4 の knockdown の影響

A: RA-FLS における RasGRP4 の knockdown による遺伝子発現量の変化

B: RA-FLS における RasGRP4 の knockdown による FLS の増殖能の変化
データは平均±標準偏差で示した。

RA: rheumatoid arthritis, FLS: fibroblast-like synoviocyte,

RQ: relative quantification, siRNA: small interfering RNA,

The concentration of siRNA is 10 nM.

Welch's t-test, ★: $p < 0.05$, ★★: $p < 0.01$.

次に RasGRP4 の knockdown による FLS の RANKL、IL-6、VEGF、MMP-1、MMP-3、miPGES-1 の産生の変化について検討した。RasGRP4 の knockdown により、FLS における RANKL、IL-6、VEGF、MMP-3 の遺伝子発現量には変化が見られなかったが(Figure 19. A-D)、MMP-1 と miPGES-1 の遺伝子発現量は低下した(Figure 19. E-F、 $p < 0.05$ 、Welch's t-test)。

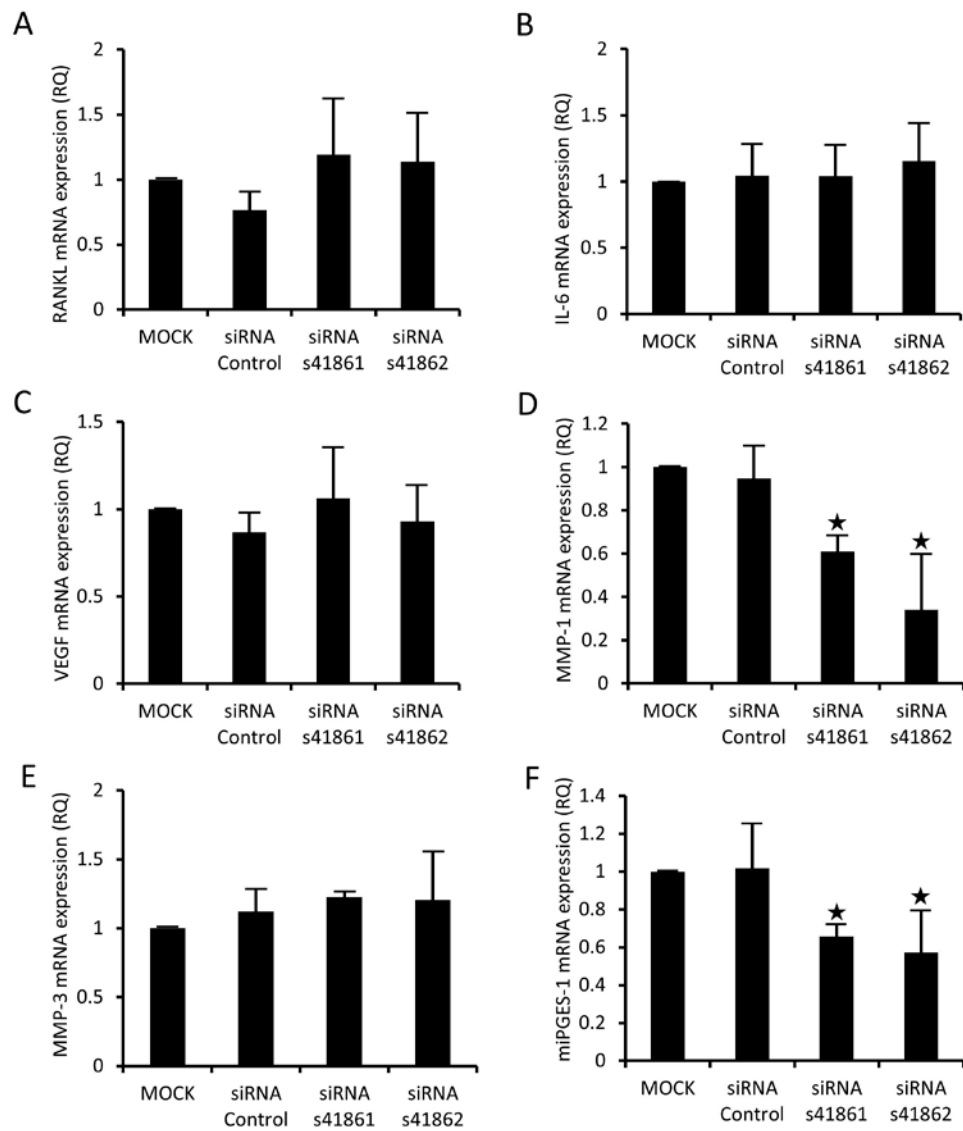


Figure 19. RasGRP4 の knockdown による FLS の RANKL (A)、IL-6 (B)、VEGF (C)、MMP-1 (D)、MMP-3 (E)、miPGES1 (F) 産生の変化

データは平均±標準偏差で示した。

Welch's t-test, ★: $p < 0.05$, ★★: $p < 0.01$.

FLS: fibroblast-like synoviocyte, RQ: relative quantification,

siRNA: small interfering RNA,

RANKL: receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand,

IL-6: interleukin-6, VEGF: vascular endothelial growth factor,

MMP: matrix metalloproteinase,

miPGES-1: microsomal prostaglandin E synthase-1

The concentration of siRNA is 10 nM.

4.5 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)^{81,82} 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 RNAKL、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⁸³。RANKL、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)⁸⁴、MMP-1⁸⁵はERKを介していると考えられている(Figure 20)。

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(Figure 3)。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。

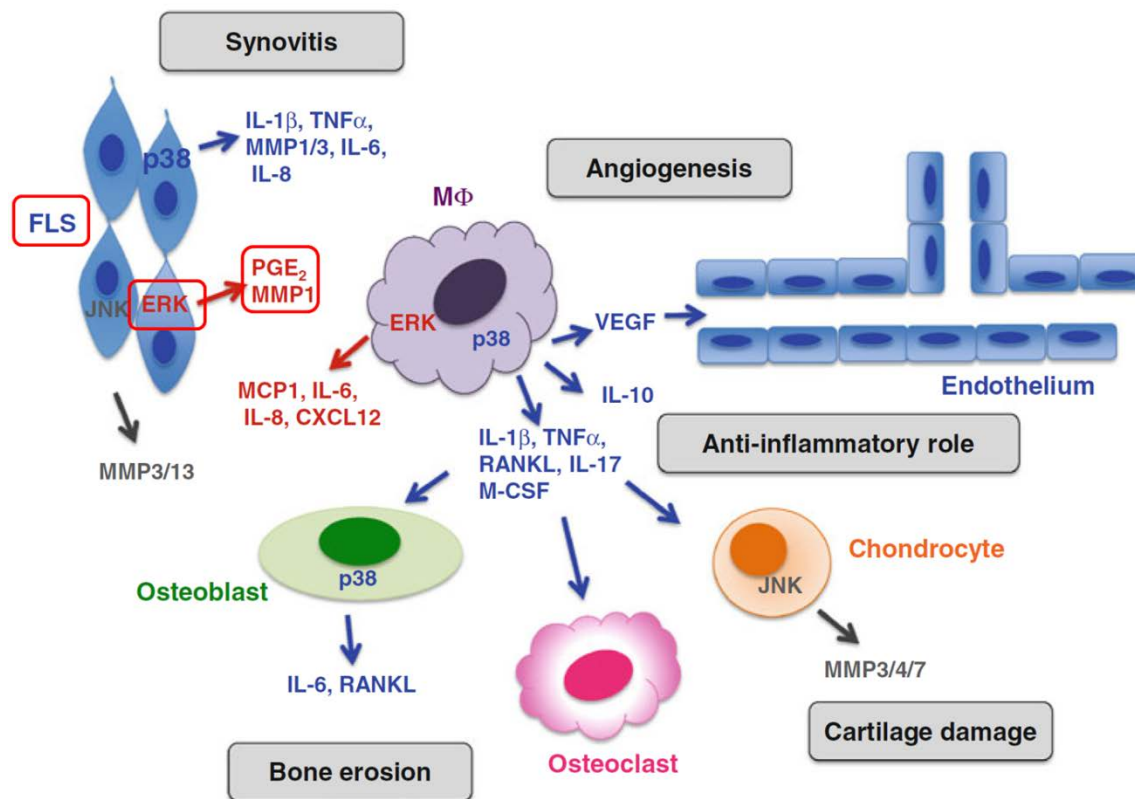


Figure 20. 関節リウマチと mitogen-activated protein kinase
Paunovic et al. Drugs 2013 を改変

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⁸⁵。

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⁸⁶。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 の増殖に関わっており、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。

4.6 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。

5. 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

5.1 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^{1,3,28,29}。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³⁹⁻⁴¹。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。

5.2 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。

5.3 動物と方法

5.3.1 コラーゲン誘導滑膜炎ラットと治療

合計 15 匹の 7 週令の Lewis ラットを用いた。Day0 に 200 μ l の incomplete Freund's adjuvant (Chondrex) に溶解した 200 μ g ブタ II 型コラーゲン (Chondrex)を用いてラットに免疫を行った。Day7 に 100 μ l の incomplete Freund's adjuvant に溶解した 100 μ g ブタ II 型コラーゲン(Chondrex)を用いて再免疫を行った⁸⁷。Day14 に各グループ 5 匹ずつ、10 μ M の siRNA Control、RasGRP に特異的な siRNA (s139320 または s139321)と atelocollagen (Koken) の混合液を両足関節に関節注射を行った。動物実験は北海道大学の動物実験倫理委員会の承認のもと(承認番号 12-0113)、北海道大学動物実験に関する規定に従い行った。

5.3.2 関節炎の評価方法

Day0、7、14、17、21、24、28、31、35 に足関節の直径、関節炎スコアを測定した。関節炎スコアは 0 から 4 点にスコア化された(0 点：関節に発赤、腫脹を認めない。1 点：足根骨または足関節に軽度の発赤と腫脹を認める。2 点：足関節から足根骨にかけて軽度の発赤と腫脹を認める。3 点：足関節から中足骨関節にかけて中等度の発赤と腫脹を認める。4 点：足関節、足部、足趾にまで広がる重度の発赤と腫脹を認める、または足肢の関節強直を認める)⁸⁸。Day35 に屠殺した後、骨破壊について検討するため、足関節の micro CT を撮像した。骨破壊は 0 点から 3 点にスコア化された(0 点：正常、1 点：軟部組織の腫脹のみ、2 点：軟部組織の腫脹と軽度の骨びらん、3 点：重度の骨びらん)⁸⁹。

5.3.3 関節炎の組織学的検討

ラットは day35 に屠殺された後、滑膜組織は 4%パラホルムアルデヒドで 24 時間固定し、その後脱灰を行った。パラフィン包埋の後、6 μm の厚さの組織切片を作成した。脱パラフィンを行い、エタノールで洗浄し、PBS に置換した。内因性ペルオキシダーゼ活性を不活化するため、0.3%過酸化水素を混ぜた PBS に常温で 30 分間浸した。洗浄後、G-Block (Genostaff, GB-01)で 10 分間ブロッキングを行い、免疫組織化学染色、HE 染色、トリジンブルー染色を行った。

5.3.3.1 ラット滑膜組織のヒト RasGRP4 抗体による染色

ヒト RasGRP4 抗体がラットの組織の免疫組織化学染色にも適切に使用できるか検討するため、ラットの滑膜組織のミラー切片を用いて、トリジンブルー染色と抗ヒト RasGRP4 抗体による染色を行った。ミラー切片は、連続切片の共通断面を上方に向けてスライドガラスに貼り付けて作成した。分割された細胞の同一面を二つの異なる抗体により染色することにより共発現を検討した。

5.3.3.2 ラット滑膜組織の組織学的評価

滑膜組織の組織学的評価は滑膜腔への炎症細胞浸潤、滑膜組織への炎症細胞浸潤、軟骨破壊、骨破壊に関して検討した。滑膜腔への炎症細胞浸潤、滑膜組織への炎症細胞浸潤については0点(炎症なし)から3点(重度の炎症)でスコア化した。軟骨破壊については0点(軟骨損傷なし)から3点(関節滑膜の完全欠損)でスコア化を行い、骨破壊は0点(骨破壊なし)から5点(完全な骨構造の欠損)でスコア化を行った⁹⁰⁾。

5.4 結果

5.4.1 RasGRP4 に特異的な siRNA の関節注射による滑膜炎の変化

RasGRP4 に特異的な siRNA の関節注射により、関節炎スコア(Figure 21. A)、足関節の直径(Figure 21. B)は改善した。

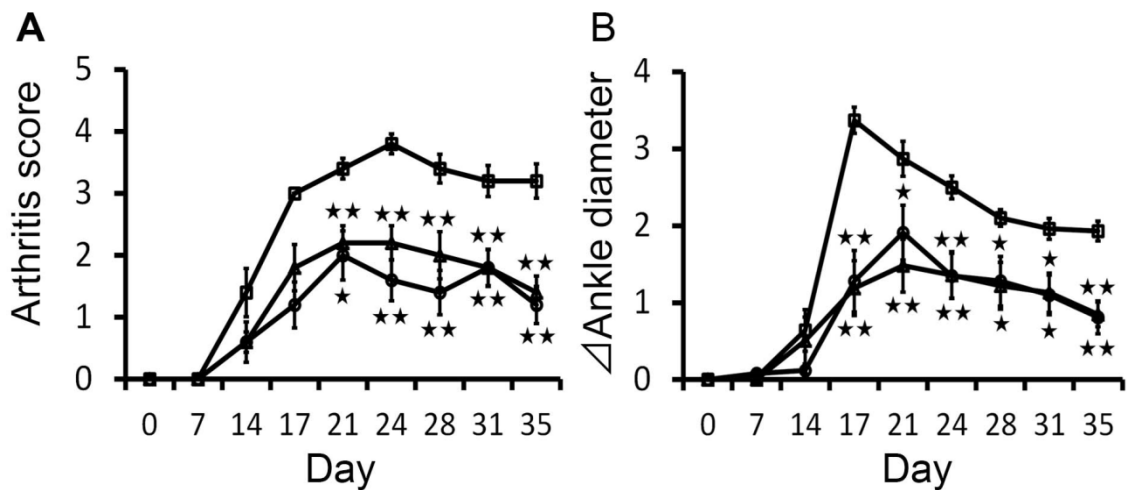


Figure 21. RasGRP4 に特異的な siRNA の関節注射による滑膜炎の変化

A : 関節炎スコア、B : 足関節の直径の変化

□ : siRNA control、△ : siRNA ① (s139320)、○ : siRNA ② (s139321)

データは平均±標準誤差で示した。Kruskal-Wallis test with post-hoc test.

★: p < 0.05, ★★: p < 0.01.

5.4.2 micro CT による骨破壊の評価

micro CT で骨破壊の評価を行ったところ、RasGRP4 に特異的な siRNA の関節注射により、骨破壊は改善した(Figure 22、23)。

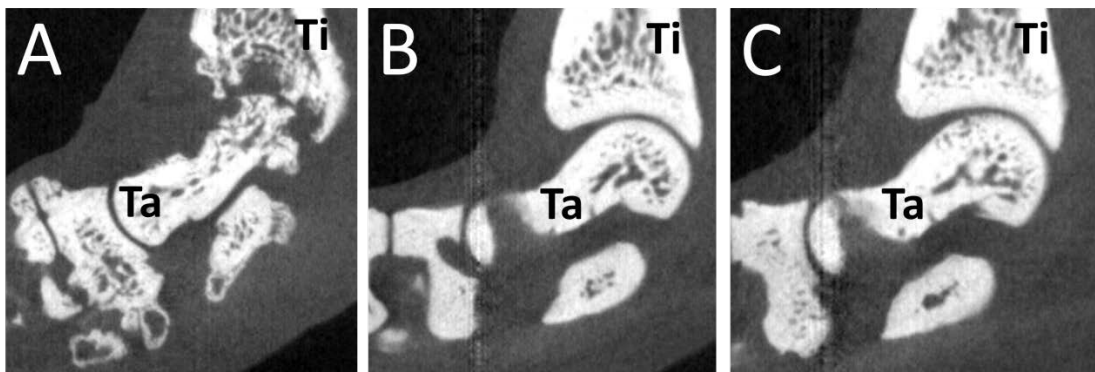


Figure 22. 各グループにおけるラット足関節 micro CT の代表画像

A : siRNA Control、 B : siRNA ① (s139320)、 C : siRNA② (s139321)

Ti: Tibia, Ta: Talus.

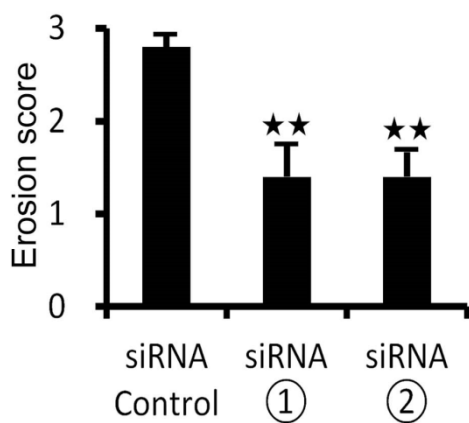


Figure 23. 各グループにおけるラット足関節 micro CT の骨びらんスコア

データは平均±標準誤差で示した。

Kruskal-Wallis test with post-hoc test. ★★: $p < 0.01$.

5.4.3 組織学的評価

5.4.3.1 ラット滑膜組織のヒト RasGRP4 抗体による染色

トルイジンブルー染色で異染性を示すラットマスト細胞はヒト RasGRP4 抗体で染色された。また、滑膜表層の FLS もヒト RasGRP4 で染色され、ヒト RasGRP4 抗体はラットの滑膜組織でも適切に使用できることを証明した (Figure 24)。

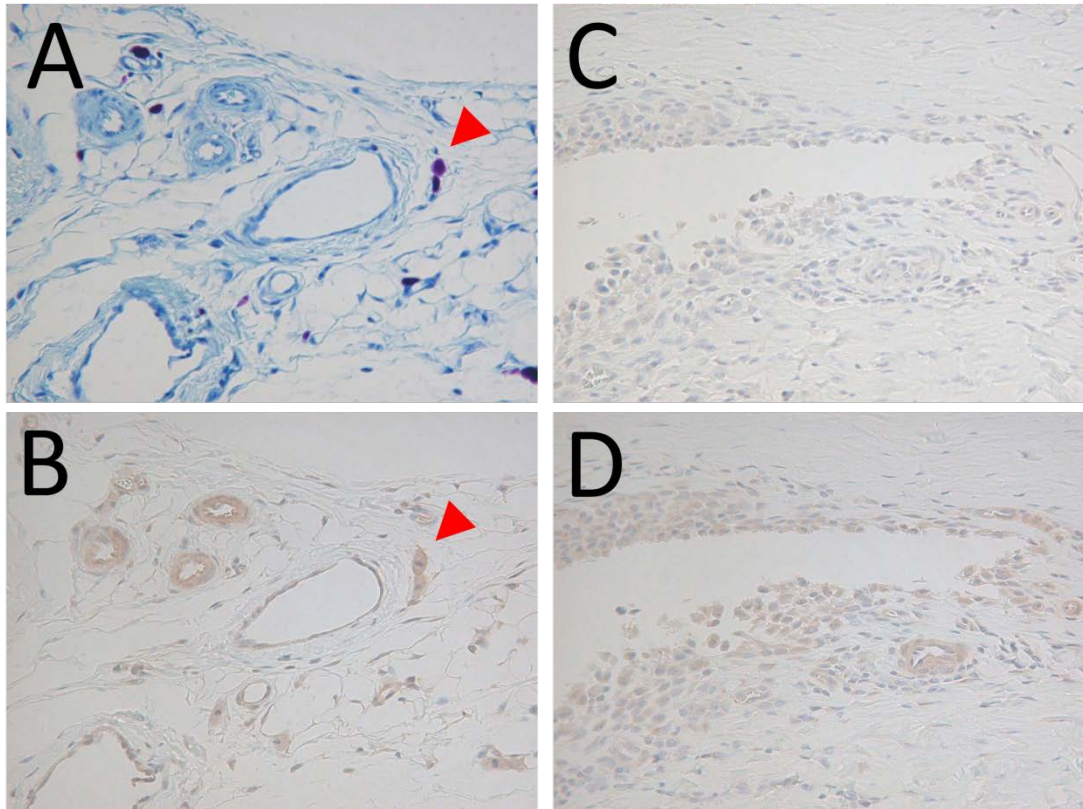


Figure 24. ラット滑膜組織のトルイジンブルー染色、RasGRP4 染色

A : トルイジンブルー染色、B、D : RasGRP4 染色(2 µg/ml)、

C : Control rabbit IgG (2 µg/ml)

A と B、C と D はミラー染色。

赤矢印 : マスト細胞、倍率 : 200 倍。

5.4.3.2 RasGRP4 の knockdown の証明

各グループの HE 染色と RasGRP4 染色の代表画像を Figure 25 に示す。RasGRP4 に特異的な siRNA の関節注射により RasGRP4 陽性領域は減少した (Figure 25、26)。

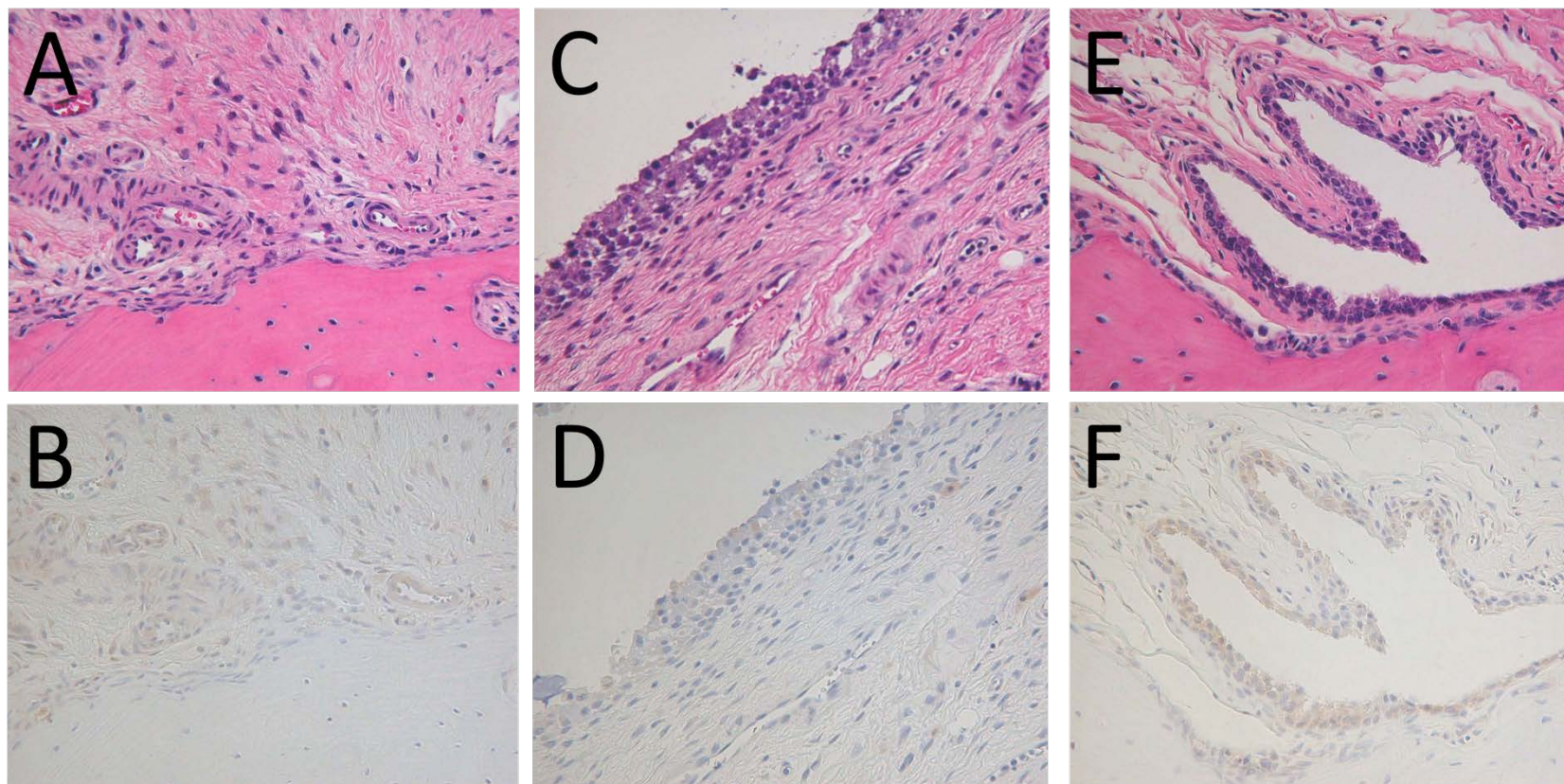


Figure 25. ラット滑膜組織の HE 染色と RasGRP4 染色

A、B : siRNA Control、C、D : siRNA① (s139320)、E、F : siRNA② (s139321)

A、C、E : HE 染色、B、D、F : RasGRP4 染色。A と B、C と D、E と F はミラー切片。

HE : hematoxylin-eosin。倍率 : 200 倍。

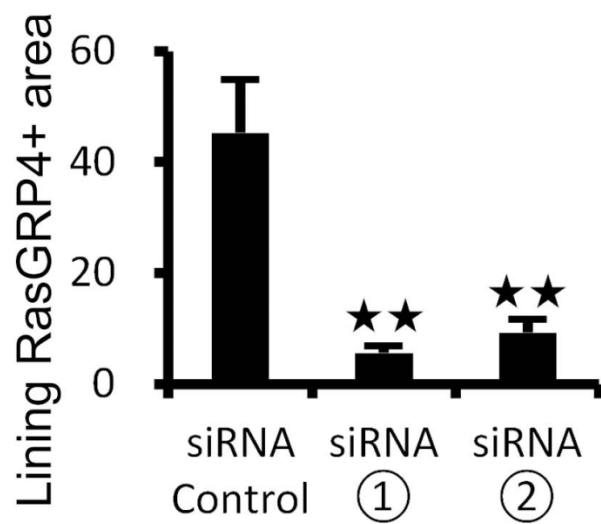


Figure 26. 各グループの滑膜表層の RasGRP4 陽性領域の比較

siRNA ① : s139320、siRNA② : s139321

データは平均±標準誤差で示した。

Kruskal-Wallis test with post-hoc test. ★★: $p < 0.01$.

5.4.3.3 各グループの組織学的評価

各グループの HE 染色の代表例を Figure 27 に示す。滑膜腔への炎症細胞浸潤、滑膜組織への炎症細胞浸潤、軟骨破壊、骨破壊はいずれも RasGRP4 に特異的な siRNA の関節注射で抑制された(Figure 27、28)。

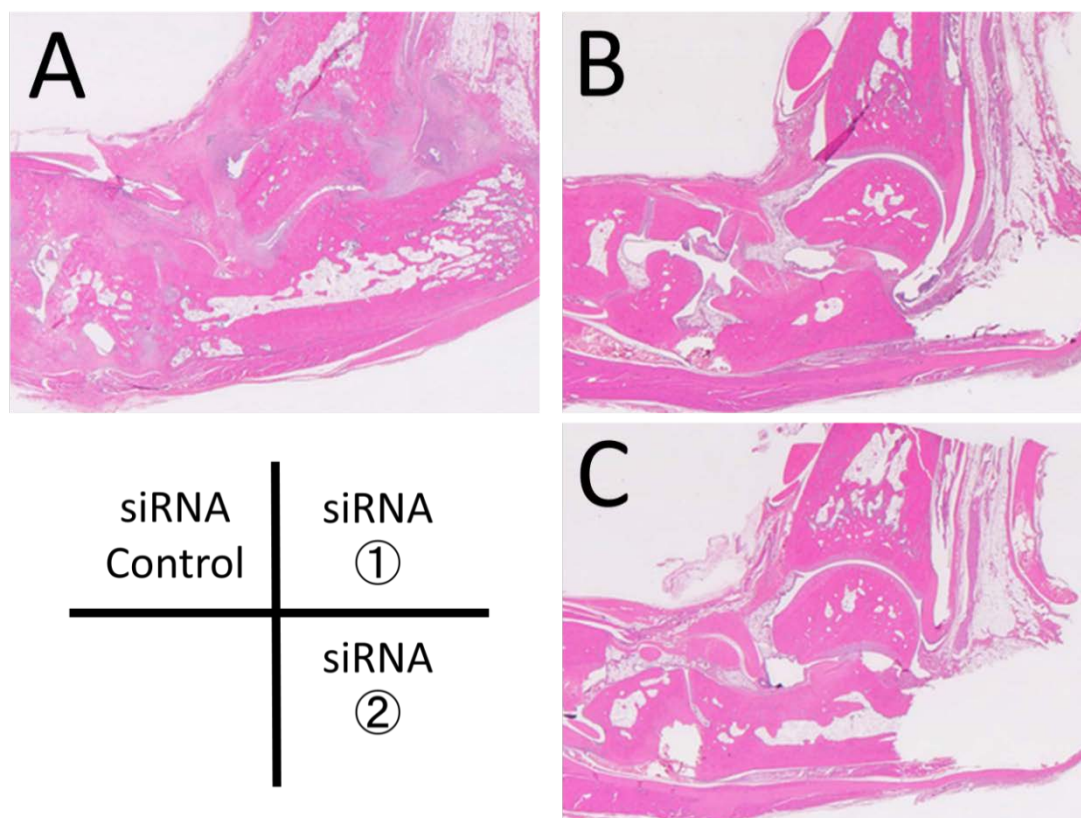


Figure 27. 各グループの HE 染色

A : siRNA Control、 B : siRNA ① (s139320)、 C : siRNA② (s139321)

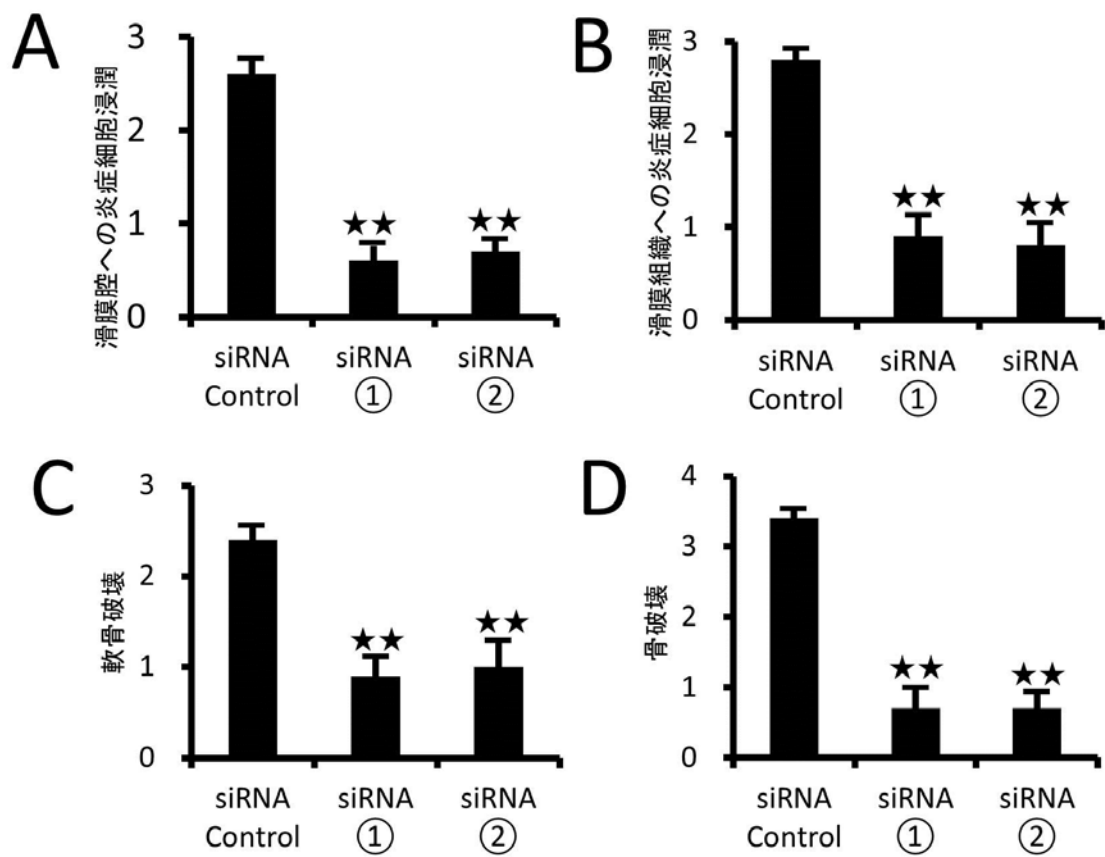


Figure 28. ラットの組織学的評価。

A：滑膜腔への炎症細胞浸潤、B：滑膜組織への炎症細胞浸潤、

C：軟骨破壊、D：骨破壊

データは平均±標準誤差で示した。

Kruskal-Wallis test with post-hoc test. ★★：p < 0.01.

5.5 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⁵⁶、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-18 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⁹¹。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-18 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⁷²。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^{73,74}、一部のマスト細胞欠損マウスでは関節炎の抑制は起きない^{75,76}。

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。

5.6 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。

6. 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(Figure 29)。

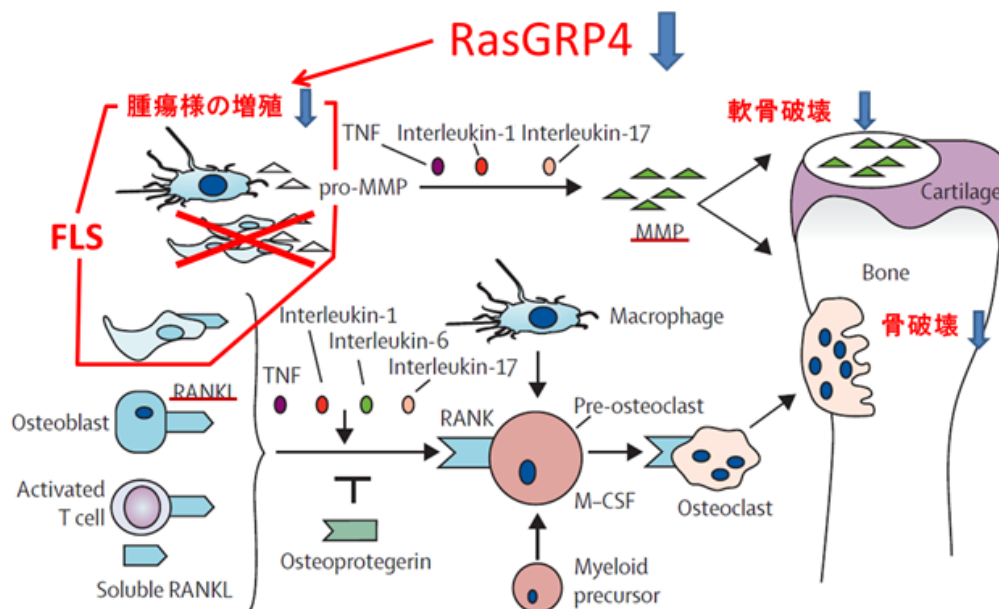


Figure 29. RasGRP4 の阻害は FLS の増殖を抑制し、骨・軟骨破壊を軽減する (Klareskog et al. Lancet 2009 を改変)

FLS: Fibroblast-like synoviocytes, MMP: Matrix Metalloproteinase

RANKL: receptor activator of nuclear factor- κ B ligand

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かどうか、副作用を認めるかどうかなど、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。

7. 謝辞

本論文は筆者が北海道大学大学院医学研究科内科学講座 免疫・代謝内科学分野博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものです。同分野教授 渥美達也先生には指導教官として本研究の実施の機会を与えていただき、その遂行にあたって終始、御指導をいただきました。ここに深謝の意を表します。

本分野膠原病グループ講師 保田晋助先生には本研究の遂行にあたり、終始御指導、適切な御助言をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。

Brigham and Women's Hospital Division of Rheumatology, Immunology, and Allergy, Department of Medicine の Richard L Stevens 先生には実験の細部にわたって御指導をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。

北海道大学大学院医学研究科名誉教授 小池隆夫先生は教授退官まで親身になって御指導、御助言を賜り、退官後も熱いエールを送っていただきました。ここに深く感謝の意を表します。

北海道大学病院客員臨床教授 眞島任史先生には本研究の遂行にあたり、滑膜の提供ならびに本研究の御指導をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。

本分野膠原病グループ講師 堀田哲也先生、助教 Olga Amengual 先生、坊垣暁之先生、奥健志先生、大学院生の栗田崇史先生、金塚雄作先生、清水裕香先生には研究遂行にあたり日頃より有益な御討論、御助言をいただきました。心より感謝を申し上げます。当科実験助手の小出秀之さん、久保田絢香さん、下道真由美さんの御協力なしに実験を遂行することは不可能でした。感謝を申し上げます。この他にも、この論文作成にあたり、御協力、御助言、ご支援をいただきました多くの諸先輩方、同僚、後輩の皆様に対しまして、心より感謝を申し上げます。

そして温かい励ましや癒しを常に与えてくれた妻、息子に感謝いたします。最後に、温かく時には厳しく接し、この道を進むきっかけを与え、どんな時でも常に自分の意思を尊重してくれた両親に心から感謝いたします。

8. 引用文献

- 1 McInnes, I. B., Schett, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 365, 2205-2219, (2011).
- 2 Symmons, D. *et al.* The prevalence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: new estimates for a new century. *Rheumatology.* 41, 793-800, (2002).
- 3 Scott, D. L., Wolfe, F., Huizinga, T. W. Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 376, 1094-1108, (2010).
- 4 Rasch, E. K., Hirsch, R., Paulose-Ram, R., Hochberg, M. C. Prevalence of rheumatoid arthritis in persons 60 years of age and older in the United States: effect of different methods of case classification. *Arthritis Rheum.* 48, 917-926, (2003).
- 5 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).
- 6 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).
- 7 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).
- 8 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).
- 9 Liew, F. Y., McInnes, I. B. The role of innate mediators in inflammatory response. *Mol Immunol.* 38, 887-890, (2002).
- 10 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).
- 11 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).
- 12 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).
 - 13 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).
 - 14 Nigrovic, P. A., Lee, D. M. Synovial mast cells: role in acute and chronic arthritis. *Immunol Rev.* 217, 19-37, (2007).
 - 15 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).
 - 16 Miossec, P., Korn, T., Kuchroo, V. K. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med.* 361, 888-898, (2009).
 - 17 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).
 - 18 Gravallesse, 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).
 - 19 Schett, G., Teitelbaum, S. L. Osteoclasts and Arthritis. *J Bone Miner Res.* 24, 1142-1146, (2009).
 - 20 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).
 - 21 Suarez-Almazor, M. E. *et al.* Methotrexate for rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev*, CD000957, (2000).
 - 22 Suarez-Almazor, M. E. *et al.* Sulfasalazine for rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev*, CD000958, (2000).
 - 23 Feldmann, M., Brennan, F. M., Maini, R. N. Rheumatoid arthritis. *Cell.* 85, 307-310, (1996).
 - 24 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).

- 25 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).
- 26 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).
- 27 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).
- 28 Klareskog, L., Catrina, A. I., Paget, S. Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 373, 659-672, (2009).
- 29 Yazici, Y. Treatment of rheumatoid arthritis: we are getting there. *Lancet.* 374, 178-180, (2009).
- 30 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).
- 31 Singh, J. A. *et al.* Biologics for rheumatoid arthritis: an overview of Cochrane reviews. *Cochrane Database Syst Rev*, CD007848, (2009).
- 32 Maxwell, L. J., Singh, J. A. Abatacept for rheumatoid arthritis: a Cochrane systematic review. *J Rheumatol.* 37, 234-245, (2010).
- 33 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).
- 34 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).
- 35 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).
- 36 Strangfeld, A. *et al.* Risk of herpes zoster in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF- α agents. *JAMA.* 301, 737-744, (2009).
- 37 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).
- 38 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).
 - 39 Bartok, B., Firestein, G. S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* 233, 233-255, (2010).
 - 40 Huber, L. C. *et al.* Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 45, 669-675, (2006).
 - 41 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).
 - 42 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).
 - 43 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).
 - 44 Lee, D. M. *et al.* Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. *Science.* 315, 1006-1010, (2007).
 - 45 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).
 - 46 Xiao, C. Y. *et al.* Expression of beta-catenin in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Scand J Rheumatol.* 40, 26-33, (2011).
 - 47 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).
 - 48 Kiener, H. P. *et al.* Cadherin 11 promotes invasive behavior of fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheum.* 60, 1305-1310, (2009).
 - 49 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).

- 50 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).
- 51 Shigeyama, Y. *et al.* Expression of osteoclast differentiation factor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43, 2523-2530, (2000).
- 52 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).
- 53 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).
- 54 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).
- 55 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).
- 56 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).
- 57 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).
- 58 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).
- 59 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).
- 60 Suire, S. *et al.* GPCR activation of Ras and PI3Kc in neutrophils depends on PLCb2/b3 and the RasGEF RasGRP4. *Embo J.* 31, 3118-3129, (2012).
- 61 Ebinu, J. O. *et al.* RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science.* 280, 1082-1086, (1998).
- 62 Tognon, C. E. *et al.* Regulation of RasGRP via a phorbol ester-responsive C1 domain. *Mol Cell Biol.* 18, 6995-7008, (1998).
- 63 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).
- 64 Yamashita, S. *et al.* CalDAG-GEFIII activation of Ras, R-ras, and Rap1. *J Biol Chem.* 275, 25488-25493, (2000).
- 65 Reuther, G. W. *et al.* RasGRP4 is a novel Ras activator isolated from acute myeloid leukemia. *J Biol Chem.* 277, 30508-30514, (2002).
- 66 Li, J. *et al.* Leukaemia disease genes: large-scale cloning and pathway predictions. *Nat Genet.* 23, 348-353, (1999).
- 67 Suzuki, T. *et al.* New genes involved in cancer identified by retroviral tagging. *Nat Genet.* 32, 166-174, (2002).
- 68 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).
- 69 Kouskoff, V. *et al.* Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell.* 87, 811-822, (1996).
- 70 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).
- 71 Korganow, A. S. *et al.* From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity.* 10, 451-461, (1999).
- 72 Adachi, R. *et al.* Ras guanine nucleotide-releasing protein-4 (RasGRP4) involvement in experimental arthritis and colitis. *J Biol Chem.* 287, 20047-20055, (2012).
- 73 Lee, D. M. *et al.* Mast cells: a cellular link between autoantibodies and

- inflammatory arthritis. *Science*. 297, 1689-1692, (2002).
- 74 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).
- 75 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).
- 76 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).
- 77 Arnett, F. C. *et al*. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 31, 315-324, (1988).
- 78 Aletaha, D. *et al*. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 62, 2569-2581, (2010).
- 79 Arao, Y., Carpenter, K., Hewitt, S., Korach, K. S. Estrogen down-regulation of the Scx gene is mediated by the opposing strand-overlapping gene Bop1. *J Biol Chem*. 285, 4806-4814, (2010).
- 80 Bottini, N., Firestein, G. S. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol*. 9, 24-33, (2013).
- 81 Dougados, M., Aletaha, D., van Riel, P. Disease activity measures for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 25, S22-29, (2007).
- 82 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).
- 83 Paunovic, V., Harnett, M. M. Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets for rheumatoid arthritis. *Drugs*. 73, 101-115, (2013).
- 84 Nah, S. S. *et al*. Epidermal growth factor increases prostaglandin E₂ production via ERK1/2 MAPK and NF-kappaB pathway in fibroblast like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 30, 443-449, (2010).

- 85 Barchowsky, A., Frleta, D., Vincenti, M. P. Integration of the NF-kappaB 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).
- 86 Kojima, F. *et al.* Potential roles of microsomal prostaglandin E synthase-1 in rheumatoid arthritis. *Inflamm Regen*. 31, 157-166, (2011).
- 87 Earp, J. C. *et al.* Modeling corticosteroid effects in a rat model of rheumatoid arthritis I: mechanistic disease progression model for the time course of collagen-induced arthritis in Lewis rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 326, 532-545, (2008).
- 88 Siebuhr, A. S. *et al.* Matrix metalloproteinase-dependent turnover of cartilage, synovial membrane, and connective tissue is elevated in rats with collagen induced arthritis. *J Transl Med*. 10, 195, (2012).
- 89 Pine, P. R. *et al.* Inflammation and bone erosion are suppressed in models of rheumatoid arthritis following treatment with a novel Syk inhibitor. *Clin Immunol*. 124, 244-257, (2007).
- 90 Coppieters, K. *et al.* Formatted anti-tumor necrosis factor α VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 54, 1856-1866, (2006).
- 91 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).