



Title	関節リウマチ患者の合併症評価ならびに病態解明に関する研究
Author(s)	吉村, 大
Description	配架番号 : 2794
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15476号
Issue Date	2023-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15476
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90063
Type	doctoral thesis
File Information	YOSHIMURA_Masaru.pdf



学位論文

関節リウマチ患者の合併症評価ならびに病態解
明に関する研究

(Research on evaluation of complications and
elucidation of pathophysiology in patients with
rheumatoid arthritis)

2023 年 3 月

北海道大学

吉村 大

学位論文

関節リウマチ患者の合併症評価ならびに病態解
明に関する研究

(Research on evaluation of complications and
elucidation of pathophysiology in patients with
rheumatoid arthritis)

2023 年 3 月

北海道大学

吉村 大

目次

発表論文目録および学会発表目録	1
1. 要旨	3
2. 略語表	6
3. 緒言	9
4. 第一章 関節リウマチ患者における合併症に関する臨床研究	13
第一節 関節リウマチ患者における疾患活動性と静脈血栓塞栓症発症との関連性 13	
4.1 緒言	14
4.2 目的	17
4.3 方法	18
4.3.1 対象者と方法	18
4.3.2 評価項目	18
4.3.3 疾患活動性評価	19
4.3.4 統計解析	19
4.4 結果	21
4.4.1 患者背景	21
4.4.2 VTE 群と非 VTE 群の臨床的特徴の比較	21
4.4.3 ROC 解析による time-averaged DAS28CRP と VTE 発症の関連性	26
4.5 考察	28
4.6 結語	30
5. 第二節 関節リウマチ患者のニューモシスチス肺炎に対するサラゾスルファピリジンの一次予防効果	31
5.1 緒言	32
5.2 目的	34
5.3 方法	35
5.3.1 研究デザイン	35
5.3.2 評価項目	37
5.3.3 PCP の診断	37

5.3.4 SASP の副作用評価	37
5.3.5 変数.....	37
5.3.6 統計解析.....	38
5.4 結果.....	39
5.4.1 患者背景.....	39
5.4.2 PCP の発生率, 臨床的および診断的情報.....	43
5.4.3 SASP 治療の PCP 発症予防効果	45
5.4.4 SASP 治療の安全性評価	49
5.5 考察.....	51
5.6 結語.....	53
6. 第三章 オートファジーに着目した関節リウマチの滑膜線維芽細胞における 抗シトルリン化タンパク質産生機序の解明	54
6.1 緒言.....	55
6.1.1 関節リウマチ	55
6.1.2 オートファジーと関節リウマチ	60
6.2 目的.....	66
6.3 方法.....	67
6.3.1 オートリソソーム阻害による cVIM 発現量の検討	67
6.3.1.1 対象患者.....	67
6.3.1.2 患者 SFs の分離.....	67
6.3.1.3 Chloroquine 刺激による SFs における cVIM 発現量の変化の確認.....	68
6.3.1.4 WB 法を用いた SFs における STX17 発現の確認.....	69
6.3.1.5 STX17 siRNA トランスフェクション	70
6.3.1.6 STX17 ノックダウンによる cVIM 発現量変化の評価.....	70
6.3.1.8 Proximity Ligation Assay を用いた STX17 ノックダウン細胞における HLA-DR と cVIM の結合の検討	71
6.3.1.9 Proximity Ligation Assay を用いた CQ 刺激における HLA-DR と cVIM の結合の 検討.....	72

6.3.2 p62 阻害によるシトルリン化タンパク質発現量の検討	73
6.3.2.1 対象患者	73
6.3.2.2 siRNA トランスフェクション	73
6.3.2.3 p62 ノックダウンによるシトルリン化タンパク質発現量の確認	74
6.3.2.4 統計学的解析	74
6.4 実験結果	75
6.4.1 オートリソソーム阻害による cVIM 発現量の検討	75
6.4.1.1 Chloroquine 刺激による SFs における cVIM 発現量の変化の確認	75
6.4.1.2 WB 法を用いた SFs における STX17 発現の確認	81
6.4.1.3 STX17 siRNA トランスフェクション	83
6.4.1.4 STX17 ノックダウンによる cVIM 発現量変化の評価	87
6.4.1.5 Proximity Ligation Assay を用いた STX17 ノックダウン細胞における HLA-DR と cVIM の結合の検討	90
6.4.1.6 Proximity Ligation Assay を用いた CQ 刺激における HLA-DR と cVIM の結合の 検討	92
6.4.2 p62 阻害によるシトルリン化タンパク質発現量の検討	95
6.4.2.1 p62 siRNA トランスフェクション	96
6.4.2.2 p62 ノックダウンによるシトルリン化タンパク質発現量の評価	100
6.5 考察	103
6.6 結語	106
7. 総括および結論	107
8. 謝辞	109
9. 利益相反	110
10. 引用文献	111

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として投稿した.

1. Masaru Yoshimura, Yuichiro Fujieda, Masanari Sugawara, Michihito Kono, Masaru Kato, Isao Yokota, Olga Amengual, Yoichi M Ito, Tatsuya Atsumi.
Disease activity as a risk factor for venous thromboembolism in rheumatoid arthritis analysed using time-averaged DAS28CRP: a nested case-control study.
Rheumatology International. 42, pages1939–1946 (2022)

本研究の一部は下記の学会で発表した.

1. Masaru Yoshimura, Yuichiro Fujieda, Michihito Kono, Masaru Kato, Kenji Oku, Olga Amengual, Tatsuya Atsumi.
The risk assessment of developing deep venous thrombosis in patients with rheumatoid arthritis
第 64 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2020 年 8 月 17 日 - 9 月 15 日,
WEB 開催
2. Masaru Yoshimura, Yuichiro Fujieda, Michihito Kono, Masaru Kato, Kenji Oku, Olga Amengual, Tatsuya Atsumi.
The Association between the Risk of Venous Thromboembolism and Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis: A Retrospective Observational Study. The American College of Rheumatology/The Association of Rheumatology Health Professionals 2020 Annual Meeting, November 5-9, 2020, held online only.
3. Masaru Yoshimura, Nobuya Abe, Michihito Kono, Yuichiro Fujieda, Masaru Kato, Kenji Oku, Olga Amengual, Tatsuya Atsumi.
Prophylactic effect of salazosulfapyridine for pneumocystis pneumonia in rheumatoid arthritis : A propensity score matching retrospective cohort study
第 65 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2021 年 4 月 26 日 - 4 月 28 日,
WEB 開催
4. Masaru Yoshimura, Nobuya Abe, Michihito Kono, Yuichiro Fujieda, Masaru Kato, Olga Amengual, Tatsuya Atsumi.

Salazosulfapyridine as prophylaxis for pneumocystis pneumonia in patients with rheumatoid arthritis: A retrospective propensity score-matched cohort study

第 66 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2022 年 4 月 25 日 - 4 月 27 日, 横浜

5. 吉村 大、河野通仁、阿部靖矢、久田 諒、藤枝雄一郎、加藤 将、大庭幸治、渥美達也

関節リウマチ患者のニューモシスチス肺炎に対するサラゾスルファピリジンの一次予防効果

第 37 回臨床リウマチ学会, 2022 年 10 月 29 日 - 10 月 30 日, 札幌

1. 要旨

関節リウマチ (RA) は主として関節滑膜を病変の首座とする全身性炎症性疾患である。慢性かつ持続的な滑膜の炎症に伴い同組織の肥厚・絨毛組織の増殖が起こることで骨・軟骨が破壊され不可逆的な関節機能障害に至り、日常生活動作の障害や生活の質の低下の原因となる。近年, RA を早期に診断し疾患活動性の評価を行いながら早期から積極的に治療を行うことの意義が注目されるとともに, TNF 阻害薬や IL-6 阻害薬などの生物学的製剤や JAK 阻害薬に代表される分子標的型抗リウマチ薬が登場したことにより RA の治療は劇的な進歩を遂げている。このため, 現在ではこれまでと比べ多くの患者が良好な経過をたどることとなったが, 一方で依然として問題も多く残されている。本研究において, 我々は RA 患者における静脈血栓塞栓症 (VTE) とニューモシスチス肺炎 (PCP) という予後を左右する 2 つの重大な合併症に関する臨床研究と, 病態解明に関する基礎研究を行った。

第一章 関節リウマチ患者における合併症に関する臨床研究

第一節 関節リウマチ患者における疾患活動性と静脈血栓塞栓症発症との関連性

【目的】 RA 患者における VTE の臨床的特徴および危険因子を明らかにする。

【方法】 2010 年から 2019 年に北海道大学病院を受診し, 2 年以上経過した RA 患者における VTE の有病率を後方視的に検討した。VTE と関連する因子を同定するため, VTE 発症例 (VTE 群) 26 例に対して VTE を発症していない RA 患者 (非 VTE 群) 260 名を密度サンプリングで抽出し, 多変量ロジスティック回帰分析により解析を行った。

【結果】 単変量条件付きロジスティック回帰分析により, 高齢 ($P < 0.0001$, Odds Ratio [OR] 1.08, 95% Confidence Interval [CI] 1.04-1.14), BMI ($P = 0.001$, OR 1.17, 95% CI 1.06-1.31), RA 関連肺疾患 ($P = 0.002$, OR 2.10, 95% CI 1.33-3.30), グルココルチコイドの使用 ($P = 0.001$, OR 2.09, 95% CI 1.34-3.51) が VTE 発症と有意に関連していた。さらに, VTE 群では, time-averaged DAS28CRP が有意に高かった ($P < 0.0001$, OR 3.25, 95% CI 1.94-6.12)。多変量ロジスティック回帰分析においても, time-averaged DAS28CRP は VTE 発症と有意に関連していた ($P = 0.0001$, adjusted OR 3.40, 95% CI 1.77-7.85)。

【結論】 疾患活動性は RA 患者における VTE の主要な危険因子として同定され, 臨床的寛解の持続は VTE リスクの低減に有益であることが示唆された。

【結論】 疾患活動性は RA 患者における VTE の主要な危険因子として同定さ

れ、臨床的寛解の持続は VTE リスクの低減に有益であることが示唆された。

第二節 RA 患者のニューモシスチス肺炎に対するスルファピリジンの一次予防効果

【背景と目的】 PCP は, *Pneumocystis jirovecii* を起因菌として, RA 患者を含む免疫抑制状態の患者に発症する重大な日和見感染症である。近年, 発症予防の第一選択薬として使用されるスルファメトキサゾール/トリメトプリムと同様の構造を有する抗リウマチ薬 (DMARDs) であるサラゾスルファピリジン (SASP) の PCP 発症予防効果が示唆されている。本研究は, RA 患者における PCP の一次予防としての SASP の可能性を検討することを目的とした。

【方法】 2006 年から 2021 年に当院に通院歴のある患者のうち PCP の既往ならびに PCP 予防薬の投与歴がない RA 患者を対象とした。DMARDs の投与を開始または増量された時点から 1 年間を治療エピソードと定義し, その期間における PCP 発症率を評価した。全ての治療エピソードをベースライン時における SASP 投与の有無によって SASP 群と対照群の 2 群に分類し, 2 群間の発症率を修正ポアソン回帰モデルにより評価した。PCP の診断は, 臨床的特徴, 特徴的な X 線所見, 血清 β -D-グルカン値の上昇, 喀痰 PCR 陽性, および微生物学的検査の有無に基づき行った。

【結果】 594 名の RA 患者を対象に 848 回の治療エピソードが登録され, SASP 群 181 エピソード, 対照群 667 エピソードであった。850.6 人年の観察期間中に 21 例が PCP 患者を発症し, 3 例 (14%) が PCP により死亡した。SASP 群では PCP 発症は見られなかった。多変量修正ポアソン回帰分析の結果, PCP の 1 年間の発症率は SASP 投与により有意に減少した ($P = 0.01$, risk ratio = 0.05 ; 95%CI 0.00-0.47)。

【結論】 本研究により, PCP に対する SASP の予防効果が検証された。この結果は, 今後の SASP 使用の選択肢の幅を広げることが示唆される。

第二章 オートファジーおよびオルガネラ間相互作用に着目した抗シトルリン化タンパク質抗体産生機序の解明

【背景と目的】 RA は関節滑膜を病変の首座とする全身性炎症性疾患である。抗シトルリン化ペプチド抗体 (ACPA) は RA において特異性が高い自己抗体であることが広く知られているが, その対応抗原であるシトルリン化タンパク質に対して自己免疫を示す機序や RA の発症メカニズムに関しては依然として不明な点が多い。我々の先行研究において, RA 患者の滑膜線維芽細胞 (SFs) (RA-SFs) はオートファジーの亢進によりその細胞内でシトルリン化ビメンチン (cVIM) が増加し, MHC クラス II (HLA-DR) と共局在することが認められてお

り、オートファジーと RA の病態形成との関連が示唆されている。

本研究は RA-SFs におけるビメンチン (VIM) のシトルリン化ならびに cVIM の抗原提示に対するオートファジーの関わりを明らかにし、ACPA の産生機序を解明することを目的とした。

【対象と方法】北海道大学病院整形外科で人工膝関節置換術を受けた RA 患者の滑膜から SFs を分離・培養し、飢餓刺激やプロテアソーム阻害薬である MG-132 によりオートファジーを誘導した。オートファジーの一連のプロセスにおいて、どの時点で VIM がシトルリン化されるのかを検証するため、オートファジー阻害薬であるクロロキン (CQ) による刺激ならびにオートファジー関連遺伝子である syntaxin17 (STX17), p62 のノックダウンの有無によって cVIM を含むシトルリン化タンパク質の産生量に差が見られるかどうかをウエスタンブロッティング (WB) 法、免疫染色によって確認した。また、これらのノックダウン細胞において cVIM-MHC クラス II 結合の影響を検証するために、オートファジーを誘導した後の cVIM-MHC クラス II 結合を proximity ligation assay や immunoprecipitation により定量し、こちらもノックダウン細胞とコントロール細胞で比較した。

【結果】免疫染色の結果から、無刺激と比べて CQ 刺激により cVIM の産生が増加することが示され、オートファゴソームとリソソームの融合に先立って cVIM の産生が増加していることが示唆された。また、STX17 ノックダウン細胞においても、cVIM は MHC クラス II と共局在を示しており、cVIM の産生ならびに MHC クラス II との共局在がオートファゴソーム形成の段階で生じていることが示唆された。次に、p62 をノックダウンした SFs で同様に cVIM の産生量を確認した。コントロールに比してノックダウン細胞で飢餓刺激により cVIM の産生量の低下が認められたが、今回の検討では有意な差を認めなかった。

【結論】本研究において、RA-SFs ではオートファゴソームとリソソームとの融合に先立ってタンパク質のシトルリン化が生じていることが示された。また、今回の検討においては p62 とシトルリン化の間に有意な関連は示されなかった。

RA の合併症評価において、RA 患者における血栓症発症には疾患活動性の持続が有意に関連していた。また、PCP 発症の一次予防に SASP の内服が有用である可能性が示された。

RA の病態評価に関する研究では、RA-SFs において VIM はオートファゴソームがリソソームと融合する前にシトルリン化されることが明らかとなった。

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。

3-MA 3-methyladenine

5-ASA 5-aminosalicylic acid

ABT abatacept

ACPA anti-citrullinated peptide antibodies

ACR American College of Rheumatology

AUC area under the curve

aPL antiphospholipid antibodies

aOR adjusted odds ratio

bDMARDs biological disease modifying anti rheumatic drugs

BAL broncho-alveolar lavage

BMI body mass index

BSA bovine serum albumin

CCP cyclic citrullinated peptide

CDAI clinical disease activity index

CI confidence interval

CKD chronic kidney disease

CRP C-reactive protein

csDMARDs conventional synthetic disease modifying anti rheumatic drugs

CT computed tomography

DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole

DAS disease activity score

DLp Dyslipidemia

DM diabetes mellitus

DMARDs disease modifying anti rheumatic drugs

DVT deep vein thrombosis

eGFR estimated Glomerular Filtration Rate

EGA estimator global assessment

ESR erythrocyte sedimentation rate

EULAR The European Alliance of Associations for Rheumatology

FBS fetal bovine serum

GC glucocorticoid

GWAS genome-wide association study
HDL high-density lipoprotein
HIV human immunodeficiency virus
HLA human leukocyte antigen
HT Hypertension
IFN- γ interferon gamma
IGT iguratimod
IL6 interleukin 6
ILD interstitial lung disease
IP immunoprecipitation
JAK Janus kinase
LC3 light chain 3
LDL low-density lipoprotein
LEF leflunomide
MHC class II major histocompatibility complex class II
MMP matrix metalloproteinase
MTX methotrexate
NinJa Nationwide Database of Rheumatoid Arthritis in Japan
OA osteoarthritis
OR odds ratio
PAD peptidylarginine deiminase
PBS phosphate-buffered saline
PCP pneumocystis pneumonia
PCR polymerase chain reaction
PGA patient global assessment
PSL prednisolone
PS propensity score
PTE pulmonary thromboembolism
RA rheumatoid arthritis
RA-LD rheumatoid arthritis associated lung disease
ROC receiver operating characteristic
RR risk ratio
RTX rituximab
SASP salazosulfapyridine
SDAI simplified disease activity index
SFs synovial fibroblasts

SLE systemic lupus erythematosus
SJC28 swollen joint count 28
SMX sulfamethoxazole
SNARE soluble N- ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
SP sulfapyridine
TAC tacrolimus
TBS Tris Buffered Saline
TCZ tocilizumab
THR total hip replacement
TJC28 total joint count 28
TKR total knee replacement
TMP trimethoprim
tsDMARDs targeted synthetic disease modifying anti rheumatic drugs
US ultrasonography
VAS visual analogue scale
VIM vimentin
VTE venous thromboembolism

3. 緒言

関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis: RA) は主として関節滑膜を病変の首座とする慢性炎症性疾患である。複数の遺伝的要因に環境因子が加わり自己免疫応答が惹起され、炎症カスケードの亢進を背景として関節炎を発症する。持続的な滑膜の炎症により同組織の肥厚・絨毛組織の増殖が起こることで骨・軟骨が破壊され不可逆的な関節機能障害へと至り、日常生活動作の障害や生活の質が低下する原因となる (Smolen et al., 2016)。また、肺病変や血管炎などの関節外症状や感染症や血栓症をはじめとする合併症など、呈する病変が多彩であることから RA は全身疾患としての診療が非常に重要である。近年、RA を早期に診断し (Table1), 疾患活動性の評価を行いながら早期から寛解を治療目標とし積極的に治療を行うことの意義が注目され、TNF 阻害薬や IL-6 阻害薬などの生物学的製剤や JAK 阻害薬に代表される分子標的型抗リウマチ薬の登場によって RA の治療はパラダイムの転換期を迎えた。かつての炎症や痛みを抑えることが主体の治療から、疾患進行を抑制し関節破壊を防ぎ、生活の質を高める治療へと変遷した。それにより、現在ではこれまでより多くの患者が良好な経過をたどることとなったが、一方で依然として問題も多く残されている。

本邦の RA 患者は 40~60 歳代での発症が多いとされているが、社会全体の少子高齢化に伴い RA 患者においても年々高齢化しており、約 30% が 75 歳以上の後期高齢者で発症年齢においても高齢発症の割合が増加傾向となっている (Kato et al., 2017) (Figure 1)。一般的に、高齢者は併存疾患が多く、種々の合併症に対してのリスクが高い集団である。高齢者でリスクが高まる合併症の例として感染症があるが、生物学的製剤や分子標的型抗リウマチ薬の標的とするサイトカインならびに分子の多くは宿主の免疫において重要な役割を果たしており、これらの阻害は宿主の感染防御の低下をもたらし、感染症、中でも特に呼吸器感染症の頻度の高いことが明らかとなっている。他にも高齢者でリスクが高い合併症として、糖尿病や心血管障害、骨粗鬆症、悪性腫瘍などが挙げられる。これらのうち、特に予防可能な合併症においては、RA 治療に並行して日々の診療においてコントロールすることがより一層重要となっている。

また、新規抗リウマチ薬の革新がもたらされた現在においても、今なお治療反応性に乏しい患者群が一定数存在することも事実であり、昨今の個別化医療に対する需要の高まりと同時に、RA の病態の分子レベルでの解明が求められている。抗シトルリン化ペプチド抗体 (anti-citrullinated protein antibodies: ACPA) は RA において特異性が高い自己抗体として、その検出が RA 診断に有用である一方で、RA の発症に先立って検出され APCA 陽性例は陰性例と比較して関節

破壊が進行しやすいことが示されている。また, ACPA の中でも抗シトルリン化ビメンチン (citrullinated vimentin: cVIM) 抗体陽性 RA は特に関節予後が不良であることが知られている。シトルリン化は peptidylarginine deiminase (PAD) により触媒されるタンパク質の翻訳後修飾であり, 電荷, 分子量およびタンパク構造の変化を伴いその抗原性を変化させるプロセスである。PAD のアイソタイプである PADI4 はゲノムワイド関連解析により RA の疾患感受性遺伝子のひとつとして同定され (Suzuki, et al., 2003), 過剰なシトルリン化が ACPA の産生に関与していることが推測されたが, TNF α 誘導性関節炎モデルマウスにおいて, PAD4 ノックアウトによる ACPA 産生の低下はみられず, ACPA の産生機序において不明な点が多い。先行研究において, RA の滑膜線維芽細胞 (synovial fibroblast: SFs) (RA-SFs) は変形性関節症 (osteoarthritis: OA) のそれと比較して高いオートファジー活性を有することが示され (Kato et al., 2014), さらに続いて RA-SFs においてオートファジーの亢進によるビメンチンのシトルリン化, ならびにオートファジーの亢進と IFN- γ 刺激による cVIM-MHC クラス II 結合の増加を示している (Sugawara et al., 2020)。

本研究において, 我々は RA 患者における合併症として静脈血栓塞栓症とニューモシスチス肺炎という, 予防可能ではあるがひとたび発症すると致命的となりうる 2 つの重要な合併症に関する臨床研究と, RA-SFs におけるオートファジーを介したシトルリン化タンパク産生の病態解明に関する基礎研究を行った。

Table 1. ACR/EULAR 2010 年分類基準 Aletaha, Neogi et al. 2010 (筆者和訳)

	スコア
対象集団	
1) 1ヶ所以上の関節に明確な臨床的滑膜炎がみられる	
2) 滑膜炎をより妥当に説明する他の疾患がみられない *	
RA 分類基準 (A~D を合計) スコア $\geq 6/10$ で RA と分類して良い.	
A.罹患関節	
大関節 1ヶ所 (肩, 肘, 股, 膝, 足)	0
大関節 2-10ヶ所	1
小関節 1-3ヶ所	2
小関節 4-10ヶ所	3
> 10ヶ所の関節 (1ヶ所以上の小関節) **	5
B.血清学的検査	
RF (-), 抗 CCP 抗体 (-)	0
いずれかが低値陽性	2
いずれかが高値陽性 (正常上限の3倍を超える)	3
C. 急性期反応物質	
CRP 正常, ESR 正常	0
いずれかが異常	1
D. 症状の持続期間	
6週未満	0
6週以上	1

* SLE, 乾癬性関節炎, 痛風などを除外する.

** 顎・胸鎖・肩鎖関節を含めてよい.

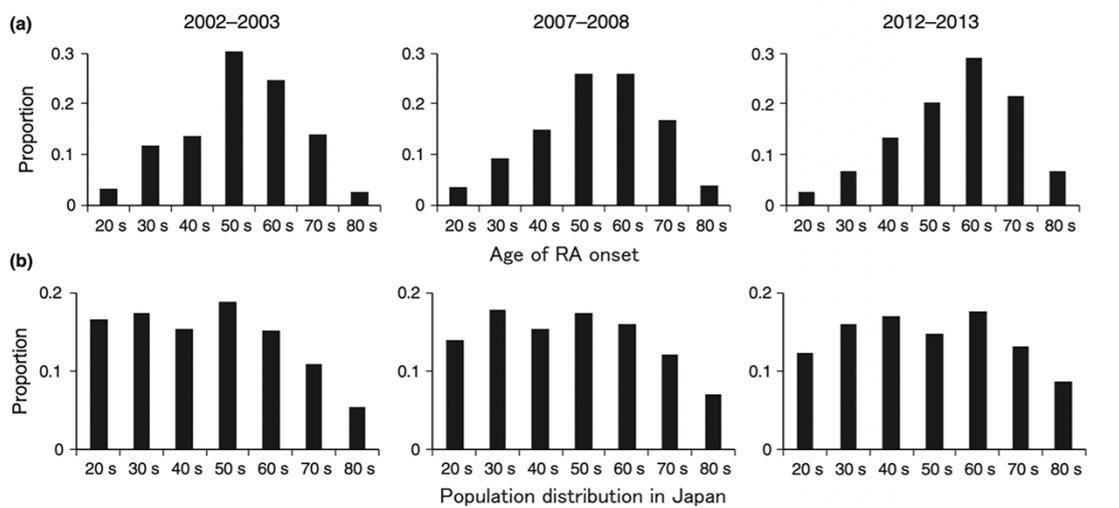


Figure 1. 全国規模の関節リウマチデータベース NinJa における 2002-2003 年, 2008-2009 年, 2012-2013 年の期間 RA 発症時の年齢分布 (10 年間隔) (a) と, 対応する期間の日本人一般集団の年齢分布 (b). (Kato et al., 2017)

(a) 各年齢層 (例: 20 代は 20-29 歳の年齢層) における RA 患者の割合を総患者数で割ったものが棒グラフで示されている.

(b) 2002-2003 年, 2008-2009 年, 2012-2013 年における各年齢層の日本人人口の割合.

4. 第一章

関節リウマチ患者における合併症に関する臨床 研究

第一節

関節リウマチ患者における疾患活動性と静脈血 栓塞栓症発症との関連性

4.1 緒言

静脈血栓塞栓症 (venous thromboembolism: VTE) は、一連の病態である深部静脈血栓症 (Deep vein thrombosis: DVT)と肺血栓塞栓症 (Pulmonary thromboembolism: PTE)を併せた疾患概念である。日常の内科診療においてよく遭遇するいわゆる“common disease”である一方で、時に致死的となることから早期の診断と治療が重要な疾患である。既知の VTE 発症のリスク因子としては、遺伝的要因や人種差のほか、高齢、長期臥床、担癌状態、外科手術、外傷、及び VTE の既往などが知られている (Crous-Bou et al., 2016, Khan et al., 2021)。加えて、慢性炎症が酸化ストレスや炎症性サイトカインの産生、ならびに組織因子などの誘導に関与していると言われており (Bisoendial et al., 2010, Borensztajn et al., 2011, Nieuwdorp et al., 2005, Van Doornum et al., 2003, Kang et al., 2011)、これらが内皮障害、血流の停滞、凝固能亢進といった Virchow の三徴に影響を及ぼし VTE の発症の一因となるとされる (Fox and Kahn, 2005)。

関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis: RA) は主として関節滑膜を病変の首座とする全身性炎症性疾患である (Smolen et al., 2018)。慢性的でかつ持続的な滑膜の炎症によって滑膜の肥厚や絨毛組織の増殖が起き、骨および軟骨が破壊され不可逆的な関節機能障害に至り、QOL の低下の原因となる。関節破壊の抑制や併存疾患の管理、血栓症を含む関節外症状のコントロールは RA 患者の予後と QOL の改善に必要不可欠である (Liang et al., 2006)。RA 患者は健常人と比較して VTE 発症のリスクが高いことが示されており (Chung et al., 2014, Kang et al., 2012, Kim et al., 2013, Holmqvist et al., 2012, Choi et al., 2013, Ungprasert et al., 2014, Hu et al., 2021)、RA 患者における血清中 CRP、インターロイキン

(Interleukin: IL) -6, IL-8, 腫瘍壊死因子 α (Tumor necrosis factor alpha: TNF α) の上昇が VTE 発症に寄与するとされる (Najem et al., 2020, Gao et al., 2016, Saghazadeh et al., 2015, Kunutsor et al., 2017) (Figure 2)。さらに、近年報告されたスウェーデンのコホート研究において、RA の疾患活動性 (DAS28 スコア) と VTE 発症に関連があることが示された (Molander et al., 2020)。DAS28 スコアとは圧痛関節数、腫脹関節数、患者 VAS (0-100 mm)、急性期反応物質 (CRP または ESR) を独自の計算式により数値化して疾患の活動性を表す指標である。近年、RA の診断と治療目標である「寛解」が明確に示されたことで、その両者を結ぶための治療指針として「Treat to Target (T2T)」の概念が提言され、その評価に DAS28 を含む疾患活動性指標が有用であることが示されている。しかしながら、疾患活動性はある一時点における関節障害の時間微分値の測定であり、

経時的な変化については論じられていない。悪性腫瘍や感染症などの併存疾患があると DAS28 スコアが変化する可能性があり、さらに重要なことに、DAS28 スコアは疾患の経過中に変動するため一点のみの評価では特定の患者における RA の疾患活動性を評価するには十分でない可能性がある。

RA 患者の総合的な疾患活動性を表す方法として、経時的な DAS28 値の時間積分値を用いて求める **time-averaged DAS28** (Tsuji et al., 2017) が知られている。この値は、RA における経時的な慢性炎症を反映しており、RA 患者の経時的な疾患活動性を表すのに適していることが示唆されている。

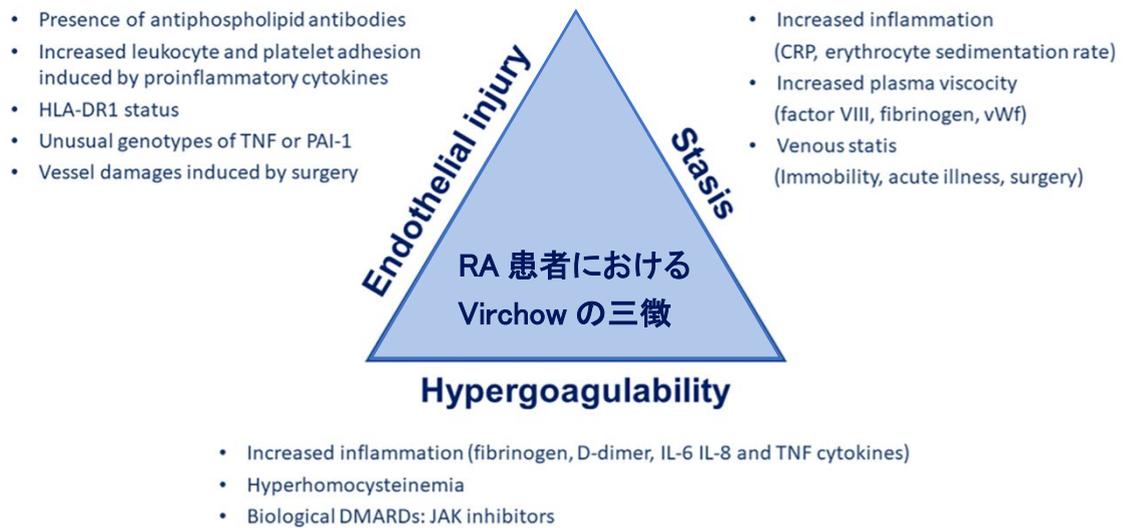


Figure 2. RA 患者における血栓リスクと Virchow の三徴 (Ketfi et al., 2021)より一部改編

RA によって引き起こされる全身性炎症により, Virchow の三徴のうち内皮機能障害や凝固亢進など少なくとも2つに影響を及ぼすとされる。

4.2 目的

本研究の目的は, VTE を発症した日本人 RA 患者の臨床的特徴を評価し, **time-averaged DAS28CRP** で評価した RA 疾患活動性と VTE 発症との関連を検討することである.

4.3 方法

4.3.1 対象者と方法

北海道大学病院倫理委員会（承認番号：020-0072）により承認されたヘルシンキ宣言の倫理原則および Good Clinical Practice ガイドラインに従い、北海道大学病院において単施設の後方視的研究を実施した。

2010年1月から2019年6月までに当院を受診した成人RA患者（18歳以上）のうち、2年以上のフォロー期間がある患者のデータを抽出した。すべての患者は、2010年米国リウマチ学会（American College of Rheumatology: ACR）/欧州リウマチ学会（European League Against Rheumatism: EULAR）の分類基準を満たした（Aletaha et al., 2010）。患者の電子カルテを後方視的に評価し、患者特性ならびに、臨床的および治療プロファイルを含むベースラインデータを収集した。

RA患者のカルテ記録に関して、テキストマイニングを用いてVTEの診断の有無を評価した。テキストマイニングによって血栓症の候補となる徴候や症状を電子カルテから自動的に抽出することができ、病名のみに基づく抽出よりも漏れの少ない候補患者の抽出が可能であった。すべてのVTE患者は静脈超音波検査（US）かつ/または造影コンピュータ断層撮影（CT）によって診断された。本研究ではVTE群を観察期間中に初発のVTEを発症したRA患者と定義した。観察期間前にVTEの既往がある患者や観察期間中に何らかの理由で抗血栓薬を投与された患者は、本研究から除外された。

RAにおけるVTE発症のリスク因子を評価するため、ある症例がVTE発生した時点においてVTEの既往がないRA患者を密度サンプリングにより10例対照群として選択した。

4.3.2 評価項目

高血圧（HT）は、降圧薬の使用または観察期間中に2回以上140/90mmHgを超える血圧の上昇と定義した（Unger et al., 2020）。糖尿病（DM）は、何らかのインスリンまたは血糖降下薬の使用または血清ヘモグロビンA1c > 6.5%と定義した（American Diabetes Association Professional Practice et al., 2022）。脂質異常症（DLp）は、患者が脂質低下薬の使用、血清LDLコレステロール値 140 mg/dL

以上, HDL コレステロール 40 mg/dL 未満, またはトリグリセリド 150 mg/dL 以上のうちの少なくとも一つを有する場合と定義した (Authors/Task Force et al., 2019, Virani et al., 2021). 慢性腎臓病 (CKD)は, 診察時に推定糸球体濾過量 (eGFR)が 45mL/分未満であった場合に分類した (Kidney Disease: Improving Global Outcomes Blood Pressure Work, 2021). 関節リウマチ関連肺疾患 (RA-LD) は, 胸部 X 線また胸部 CT によって診断された間質性肺疾患 (ILD), 気管支拡張症または胸膜疾患と定義した (Kadura and Raghu, 2021). 現在または過去に喫煙指数で計 10 以上の喫煙がある場合に喫煙歴ありと定義した (Bondy et al., 2009).

4.3.3 疾患活動性評価

DAS28ESR/CRP は, ベースライン時および患者が VTE を発症するまで, もしくは患者の観察が打ち切られるまで年 1 回収集した. これらは, 28 圧痛関節数 (28 Tender joint count: 28TJC) 、28 腫脹関節数 (28 Swollen joint count: 28SJC) , ESR, CRP, および患者全般評価 (Patient global assessment: PGA) によって構成されている. 最終測定日から 1 年後の診察日に DAS28ESR/CRP を算出するためのいずれかのデータが不足していた場合には, その診察日以降で収集可能な DAS28ESR/CRP を記録した. また, 経時的な炎症状態の蓄積の影響を調べるために, time-averaged DAS28CRP を計算した. これは, 観察期間 (各年) に測定された DAS28CRP スコアの曲線下面積を計算し, 総観察年数で割ることによって得た (Tsuji et al., 2017).

4.3.4 統計解析

カテゴリー変数はカウントとパーセンテージで表記した. データの正規性は, 分布の形状および Shapiro-Wilk 検定により確認した. 正規性検定の結果に基づいて, すべての連続変数 (年齢, 疾患期間, 肥満度指数 [BMI], 薬剤投与量, DAS28ESR/CRP, および time-averaged DAS28CRP) は, 中央値および四分位値で表現し, 二群比較にはノンパラメトリック検定を用いた. 単変量条件付きロジスティック回帰分析により, VTE と関連する有意な因子を評価し, オッズ比 (OR) を算出した. 条件付き多変量ロジスティック回帰モデルを作成し, time-averaged DAS28CRP と VTE 発症の関連性について評価した. 共変量の選択は,

単変量解析の結果および過去の文献に基づいて実施した。多変量ロジスティック回帰分析の前に、変数間の二変量相関を確認し、多重共線性の問題がないことを確認した。条件付きロジスティック回帰分析により、各潜在的危険因子と関連する調整オッズ比 (aOR) および 95%信頼区間 (CI) を算出した。Time-averaged DAS28CRP のカットオフ値について、ROC 曲線を用いて感度 70%以上で Youden Index を最大となる値と定義した。この因子のスクリーニング性能は、ROC 曲線下面積 (AUC) , 感度, 特異度として表した。AUC は 0.7 以上 0.9 未満を許容範囲, 0.9 以上を優秀とした。すべての統計解析において、 $P < 0.05$ を統計的に有意とした。すべての統計解析は JMP® Pro 14.2.0 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA)を用いて行った。

4.4 結果

4.4.1 患者背景

本研究では合計 1,379 名の RA 患者を登録した。78%が女性 (N=1076) , 診断時年齢の中央値は 54 歳 [第 1 四分位から第 3 四分位 (Q1-Q3) 42-64] であった。これらの対象患者のうち, 28 例が VTE を発症したが, VTE の既往がある 2 例除外し 26 例を VTE 群とした。2 例のうち 1 例は心疾患のため抗凝固療法を受けていた。VTE 群は, VTE 診断時の年齢中央値は 74 歳 (Q1-Q3 64-79) であった (Figure 3) 。 VTE の発症部位は下肢が最も多く, 最も頻度の高い症状は浮腫であった。入院理由は浮腫そのものが最も多く, 次いで感染症, 整形外科手術であった。VTE 群では, 血栓症の既知のリスク因子として知られている下肢麻痺やプロテイン C/S 欠乏症の患者はいなかった (Table 2)。

4.4.2 VTE 群と非 VTE 群の臨床的特徴の比較

VTE 発症と関連する因子を評価するため, 登録患者のうち VTE の既往がない RA 患者の中から密度サンプリングにより 1 例あたり 10 例を抽出し, 260 例を対照 (非 VTE) 群として割り付けた (Figure 3) (Table 3) 。 非 VTE 群 1351 例のうち, 心疾患により抗凝固療法を受けていた 61 例は密度サンプリングを用いて選択する前に除外した。VTE 群と非 VTE 群間で, RA の罹病期間, 入院歴の有無, 整形外科手術などの手術歴の有無, 悪性腫瘍の既往について統計的に有意な差を認めなかった。一方で, 年齢, BMI, DM, RA-LD, グルココルチコイドの使用は単変量解析で VTE 群において有意に割合が高かった。さらに, time-averaged DAS28CRP 値においても VTE 群で有意に高かった。既知のリスクであり単変量解析で有意な差が認められた年齢と BMI を共変量にして調整した多変量ロジスティック回帰分析においても, time-averaged DAS28CRP 値は VTE 群において有意に高かった (Table 4) 。

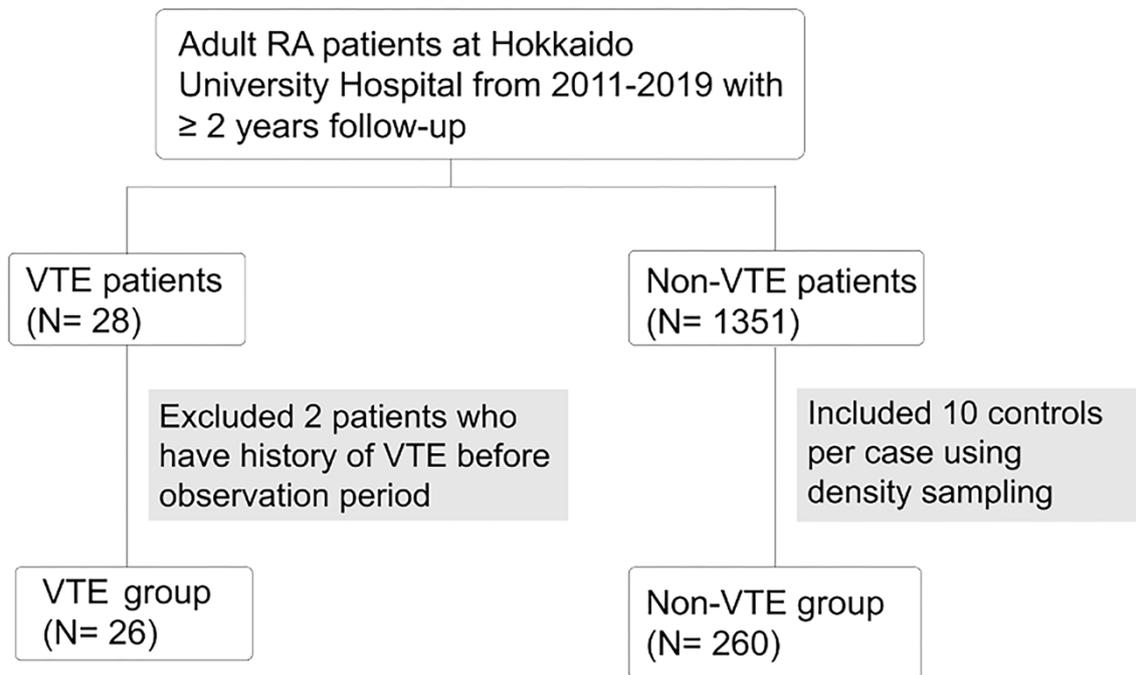


Figure 3. 患者抽出の流れ

2010年1月から2019年6月までに当院を受診した2年以上通院歴のあるRA患者1,379名を母集団とし、VTEと診断された計28例を登録した。観察期間前にVTEの既往があった2例を除外した残りの26例をVTE群とした。対照群については、各症例発生時に密度サンプリングにより260例を抽出した。

Table 2. VTE 発症患者のプロファイル

	N= 26
発生部位	
下肢	24 (92 %)
上肢	2 (8 %)
肺	4 (15 %)
診断検査	
超音波検査	13 (50 %)
造影 CT	13 (50 %)
症状/ VTE を示唆する検査所見	
D-dimer 上昇	13 (50 %)
浮腫	8 (32 %)
呼吸苦	3 (12 %)
その他	3 (12 %)
入院の原因	
浮腫 (VTE 自体)	6 (23 %)
感染症	5 (20 %)
整形外科手術	3 (12 %)
呼吸苦	2 (8 %)
悪性腫瘍	1 (4 %)
aPL の有無 (N= 14 tested)	1 (7 %)
PS の異常 (N=10 tested)	0 (0%)
PC の異常 (N=11 tested)	0 (0%)

CT: Computed tomography, aPL: antiphospholipid antibodies, PS: Protein S, PC: Protein C

Table3. Characteristics in RA patients with or without venous thromboembolism (VTE).

Factors	VTE (n=26)	Non-VTE (n=260)	OR (95%CI)	P value
年齢 (median, [Q1-Q3])	74.5 (63.8-79.3)	64.5 (55.0-73.0)	1.08 (1.04-1.14)	<0.0001*
観察期間 (週) (median, [Q1-Q3])	203.0 (87.3-75.0)	197.0 (104.5-366.8)	0.99 (0.99-1.00)	0.200
女性, No. (%)	21 (80.8)	209 (80.4)	1.01 (0.63-1.77)	0.963
喫煙歴, No. (%)	7 (33.3)	64 (38.6)	1.06 (0.65-1.65)	0.795
骨びらん, No. (%)	18 (78.3)	153 (64.0)	1.25 (0.82-1.98)	0.301
罹病期間 (年) (median, [Q1-Q3])	9.0 (2.8-18.0)	10.0 (6.0-17.0)	1.00 (0.96-1.03)	0.904
リウマチ因子, No. (%)	24 (92.3)	188 (72.9)	2.14 (1.15-5.39)	0.013*
ACPA, No. (%)	15 (78.9)	162 (76.1)	0.91 (0.60-1.39)	0.644
BMI (kg/ m ²) (median, [Q1-Q3])	25.7 (21.6-27.6)	21.9 (19.7-24.2)	1.17 (1.06-1.31)	0.001*
入院の既往, No. (%)	15 (57.6)	113 (43.5)	1.34 (0.89-2.06)	0.159
整形外科手術の既往, No. (%)	3 (12.0)	43 (16.5)	0.81 (0.39-1.41)	0.494
その他手術の既往, No. (%)	0 (0.0)	20 (7.8)	0.47 (0.04-1.30)	0.081
合併症				
糖尿病, No. (%)	12 (46.2)	59 (23.5)	1.69 (1.11-2.54)	0.014*
脂質異常症, No. (%)	7 (26.9)	112 (44.1)	0.70 (0.43-1.07)	0.105
慢性腎臓病, No. (%)	9 (34.6)	59 (22.7)	1.32 (0.85-1.99)	0.201
RA 関連肺疾患, No. (%)	10 (38.5)	34 (13.3)	2.10 (1.33-3.30)	0.002*
高血圧, No. (%)	10 (38.5)	102 (39.8)	0.98 (0.64-1.47)	0.939
悪性腫瘍, No. (%)	3 (11.5)	39 (15.0)	0.86 (0.41-1.50)	0.653
治療				
ステロイドの使用, No. (%)	20 (76.9)	113 (43.5)	2.09 (1.34-3.51)	0.001*
MTX の使用, No. (%)	13 (50.0)	144 (55.4)	0.90 (0.60-1.35)	0.598
SASP の使用, No. (%)	5 (19.2)	54 (20.8)	0.95 (0.55-1.52)	0.855
TNF 阻害薬の使用, No. (%)	7 (26.9)	41 (15.8)	1.38 (0.85-2.14)	0.179
TCZ の使用, No. (%)	0 (0.0)	23 (9.0)	0.44 (0.04-1.21)	0.058
ABT の使用, No. (%)	1 (3.8)	18 (7.0)	0.73 (0.17-1.67)	0.518
JAK 阻害薬の使用, No. (%)	2 (7.7)	15 (5.8)	1.17 (0.46-2.24)	0.707

NSAIDs の使用, No. (%)	5 (19.2)	56 (21.5)	0.93 (0.53-1.49)	0.785
Celecoxib の使用, No. (%)	1 (4.0)	28 (10.8)	0.57 (0.13-1.29)	0.209
RA disease activity				
Time-averaged DAS28CRP, (median, [Q1-Q3])	3.2 (2.6-4.5)	2.2 (1.7-2.8)	3.25 (1.94-6.12)	<0.0001*
DAS28CRP, (median, [Q1-Q3])	3.1 (2.5-4.2)	2.0 (1.4-3.0)	1.66 (1.04-2.71)	0.03*
DAS28ESR, (median, [Q1-Q3])	4.0 (2.3-5.2)	2.8 (2.0-3.6)	1.63 (1.05-2.60)	0.03*

連続値は中央値 (25 パーセントイル-75 パーセントイル) . 二項値は特に断りのない限り, n (%)
で示した. * Conditional logistic regression model, significance at P<0.05

No.: Number, Q1-Q3: first quartile to third quartile, OR: odds ratio, 95%CI: 95% confidence interval,
ACPA: anti-cyclic citrullinated peptide antibody, BMI: Body mass index, MTX: Methotrexate, SASP:
Salazosulfapyridine, TNF: Tumor Necrosis Factor, TCZ: Tocilizumab, ABT: Abatacept, JAK: Janus kinase,
NSAIDs: Non-steroidal anti-inflammatory drugs, DAS28: Disease Activity Score28, ESR: Erythrocyte
sedimentation rate, CRP: C-reactive protein,

Table 4. 多変量ロジスティック回帰分析による VTE 発症リスク評価

Items	推定値	SE	aOR	95%CI	P value
年齢	0.08	0.03	1.09	1.03-1.12	0.003
BMI	0.12	0.07	1.12	0.99-1.31	0.072
Time-averaged DAS28CRP	1.22	0.37	3.40	1.77-7.85	0.0001

SE: Standard error, aOR: adjusted odds ratio, 95%CI: 95% confidence interval, BMI: Body mass index, DAS28: Disease Activity Score28

4.4.3 ROC 解析による time-averaged DAS28CRP と VTE 発症 の関連性

ROC 曲線を用いて、感度が 70%以上で Youden Index が最大となる time-averaged DAS28CRP のカットオフ値を定義した。ROC 解析の結果, time-averaged DAS28CRP の VTE 発症予測因子としての AUC は 0.78 であった。さらに, time averaged DAS28CRP の最適なカットオフ値は 2.7 であり, 感度 78%, 特異度 72%であった (Figure 4).

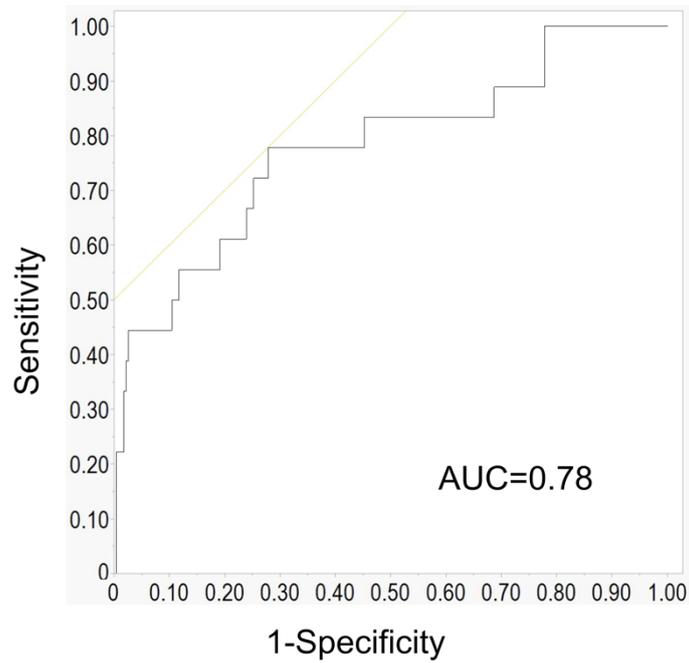


Figure 4. time-averaged DAS28CRP に対する Receiver operating characteristic (ROC) 曲線とカットオフ値

time-averaged DAS28CRP のカットオフ値は, ROC 曲線を用いて感度が 70% 以上で Youden Index が最大となるように定義した. 感度と特異度はそれぞれ 78%と 72%であった. モデルの AUC は 0.78 であった.

4.5 考察

今回, RA 患者において, 長期にわたる高疾患活動性の持続が VTE 発症と関連していることが明らかとなった.

RA 患者が健常人と比較して VTE の発症頻度が高いことは過去に比較的多く報告されている (Chung et al., 2014, Li et al., 2021) が, RA の疾患活動性と VTE 発症との関連を示す先行研究はこれまでほとんど見られなかった. 最近, スウェーデンにおける大規模コホートにおいて, RA の疾患活動性の一つである DAS28ESR が, VTE のリスク上昇と関連することが示された (Molander et al., 2020). しかしながら, この研究においては, 疾患活動性の指標としてベースライン時の一時点のみの DAS28 を用いており, CRP や ESR が上昇しうる疾患が併存している場合には DAS28 スコアがそれにより修飾を受ける可能性がある. また, 治療効果の違いによってその後の経過も異なるため, 単回の DAS28 の結果を以てして観察期間中の患者の疾患活動性を反映することは難しいと考える. 本研究は, 単施設研究ではあるが, 患者の記録から非常に詳細な臨床情報を収集することができ, 患者における VTE 発症と観察期間中の経時的な疾患活動性との関連を明らかにすることができた. Time-averaged DAS28CRP は感染症, 骨折, 手術といった, RA の疾患活動性によらない CRP 値の一過性上昇の影響を受けにくいいため, DAS28 の単回測定よりも RA 患者の疾患活動性を総合的評価に有用であると思われる. Time-averaged DAS28CRP が高い患者は, 低い患者と比較して VTE 発症が多く, RA による慢性炎症性状態が VTE 発症に関与していることが示唆された. さらに, ROC 解析の結果で time-averaged DAS28CRP のカットオフ値は 2.7 であった. DAS28CRP において 2.7 未満であることは低疾患活動性~寛解であることを意味しており, 長期にわたって寛解を維持することは関節破壊を防ぐだけでなく, VTE 発症のリスクを低減するためにも重要であることが示唆された.

Virchow の三徴の一つである静脈うっ滞は, 長時間の手術, 入院などの長期の不動, 静脈瘤などが関与すると考えられている. 特に, 膝関節全置換術 (Total Knee Replacement: TKR) および股関節全置換術 (Total Hip Replacement: THR) は血栓症の発症と強く関連していることから, 観察期間中に TKR または THR の既往がある VTE 群 3 例と, それとマッチングした非 VTE 群 30 例を除外して感度分析を行ったが, 結果は除外前と同じであった. また, 他の VTE のリスクとして四肢麻痺がある患者や経口避妊薬やホルモン補充療法を受けている患者は本研究においては認められなかった. 慢性炎症は Virchow の三徴の要因のう

ち、主に血管内皮の損傷と凝固の亢進に関連することが示されている (Bisoendial et al., 2010, Borensztajn et al., 2011, Nieuwdorp et al., 2005) が、これらに加えて、疾患活動性の高い RA 患者では疼痛による可動制限や滑液貯留が血流に影響を及ぼすことで静脈うっ滞も存在している可能性がある。疾患活動性をコントロールすることは、これらの要因のいずれをも改善させることで VTE 発症のリスクを低減できると思われる。

既報から、一般的に遺伝的背景の違いにより血栓症の発生率は白人よりもアジア人で低いとされており (Zakai and McClure, 2011, White and Keenan, 2009)、実際、VTE の発生率はスウェーデンの別のコホートでは 1000 人年当たり 5.9 人 (Holmqvist et al., 2012) であったのに対し、台湾では 1000 人年当たり 1.3 人 (Chung et al., 2014)、本研究では 1000 人年当たり 2.7 人だった (データ未掲載)。その一方、本研究における RA の疾患活動性と VTE 発生との関連は、スウェーデンの研究で観察されたものと一致しており、高い疾患活動性が人種差によらず RA 患者の VTE 発症に大きく寄与している可能性があることが示唆された。

本研究には考慮すべきいくつかの重要な限界がある、まず、後方視的な研究デザインのため、患者データの入手は電子カルテからの収集に限定された。また、家族歴やプロテイン C/S 欠乏症、抗リン脂質抗体の有無など血栓症の素因を示唆する情報が一部不十分であり、これらや他の潜在的な交絡因子の影響を評価することができなかった。

第二に、観察期間中のすべての患者が US や CT などで VTE スクリーニングを受けたわけではなく、無症状または軽微な症状の VTE 患者が含まれていない可能性があることである。第三に、本研究は VTE 発症の遺伝的危険因子がヨーロッパ人集団とは異なる日本人集団のみを対象とされており、本研究の結果の一貫性は異なる集団で確認する必要がある。

4.6 結語

結論として、本研究において慢性的な RA の疾患活動性の持続は VTE 発症と有意に関連していることが示された。臨床的寛解を維持することは RA に起因する疼痛の消失や骨・軟骨破壊を防ぐのみならず RA の重要合併症の一つである VTE のリスク低減に有益であることを示した。

第一章

5. 第二節

関節リウマチ患者のニューモシスチス肺炎に対するサラゾスルファピリジンの一次予防効果

5.1 緒言

ニューモシスチス肺炎 (Pneumocystis pneumonia: PCP) は *Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*) を起因菌とする日和見感染症の一つとして広く知られている (Thomas and Limper, 2007, Thomas and Limper, 2004). これまで PCP はヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染者における最も一般的な死因であったが, 有効な抗レトロウイルス療法とスルファメトキサゾール/トリメトプリム (SMX/TMP) による予防戦略により, その発生率は著しく低下した (San-Andres et al., 2003). また, PCP はリウマチ性疾患を含む HIV に感染していない免疫抑制状態の患者においても重篤で致命的となりうる重要合併症である (Stern et al., 2014). PCP のリスク因子としては, 免疫抑制剤, 特にグルココルチコイドの使用, 悪性腫瘍の併存, 抗がん剤による化学療法, 血液透析などが挙げられる (Ghembaza et al., 2020). したがって, これらのリスク因子を持つ患者には PCP 予防を行うことが推奨される. また, SMX/TMP はリウマチ性疾患患者の PCP 予防に有効であることが広く知られている (Schmajuk et al., 2019, Park et al., 2022, Green et al., 2007). これまでの報告では, 65 歳以上, 6 mg/日以上 of プレドニゾロン使用, 肺疾患の併存のうち 2 つ以上の危険因子を有する関節リウマチ (RA) 患者の PCP 予防に SMX/TMP 投与が有効であることが示されている (Harigai et al., 2007). しかし, 同薬剤は発疹, 肝障害, 電解質異常, 骨髄抑制などの副作用が比較的多いとされており, 一般的に臓器機能が低下し, 複数の併存疾患を有することの多い高齢者ではその使用が難しい場合がある (Smilack, 1999).

サラゾスルファピリジン (SASP) は, スルファサラジンとも呼ばれ, 従来の合成疾患修飾性抗リウマチ薬 (csDMARDs) の一つである. SASP は 1942 年に RA の治療薬として, 当時 RA は感染症に起因すると考えられていたため, 抗菌剤であるスルファピリジン (SP) と抗炎症剤である 5-アミノサリチル酸 (5-ASA) をアゾ結合させることで開発された (Svartz, 1941, Mushtaq and Sarkar, 2020). SMX などのサルファ剤は, *P. jirovecii* の酵素であるジヒドロプテロ酸合成酵素を競合阻害することにより, 抗ニューモシスチス活性を有すると考えられている (Walzer et al., 1992, Hong et al., 1995). SP もまたサルファ剤であり, SMX と同様にスルホンアミド構造を有している. また, マウスモデルにおいて SASP が肺胞マクロファージの貪食を促進することにより *P. jirovecii* のクリアランスを向上させる報告もあり, SASP が他のサルファ剤とは異なる抗 PCP 作用を示す可能性も示唆されている (Wang et al., 2010, Hoy et al., 2020). しかしながら, 現在までのところ, SASP が PCP の一次予防に有用であることを示す証拠

はほぼない。そこで、本研究では、成人 RA 患者における PCP の一次予防としての SASP の効果について検討した。

5.2 目的

本研究では, RA 患者における PCP に対する一次予防としての SASP 投与の有効性について検証することとした.

5.3 方法

5.3.1 研究デザイン

北海道大学病院において、ヘルシンキ宣言の倫理原則および北海道大学病院臨床研究認定審査委員会が承認した（承認番号：019-0146）Good Clinical Practiceガイドラインに従い、単施設の後方視的コホート研究を実施した。2006年1月から2021年7月までに、csDMARDs およびヤヌスキナーゼ（JAK）阻害剤、生物学的製剤（bDMARDs）の新規治療開始や追加、用量増量、プレドニゾロン10mg/日超の治療開始があったRA患者を北海道大学病院の電子カルテベースで抽出した。すべての患者は、2010年米国リウマチ学会（ACR）/欧州リウマチ連盟（EULAR）の分類基準（Aletaha et al., 2010）を満たした。本試験において、csDMARDs はメトトレキサート（MTX）、タクロリムス（TAC）、イグラチモド（IGT）、レフルノミド（LEF）、bDMARDs はTNF阻害薬、抗インターロイキン（IL）-6阻害薬、アバタセプト（ABT）、リツキシマブ（RTX）と定義した。PCP および HIV 感染、癌、固形臓器移植の既往がある患者、および18歳未満の患者は除外した。また、観察期間中にPCPの一次予防としてSMX/TMP、ダブソン、アトバコン、ペンタミジンなどの抗菌薬を投与された患者も除外した。ベースラインは、新たな治療エピソードの開始日とした。PCPの多くは治療開始ならびに変更後1年以内に発症するという既報に基づき、各治療エピソードの観察期間はベースラインから1年とした。ベースラインから1年以上経過してから治療が変更された場合は、別の治療エピソードとしてカウントした（Figure 5）。SASPは500mgを1日1回または2回投与された。そして、すべての治療エピソードをベースライン時に患者がSASPを併用したか否かによって2群に分類した。ベースライン日から1年以内に治療用量の変更またはSASPの投与を中止した患者は、治療エピソードから除外した。

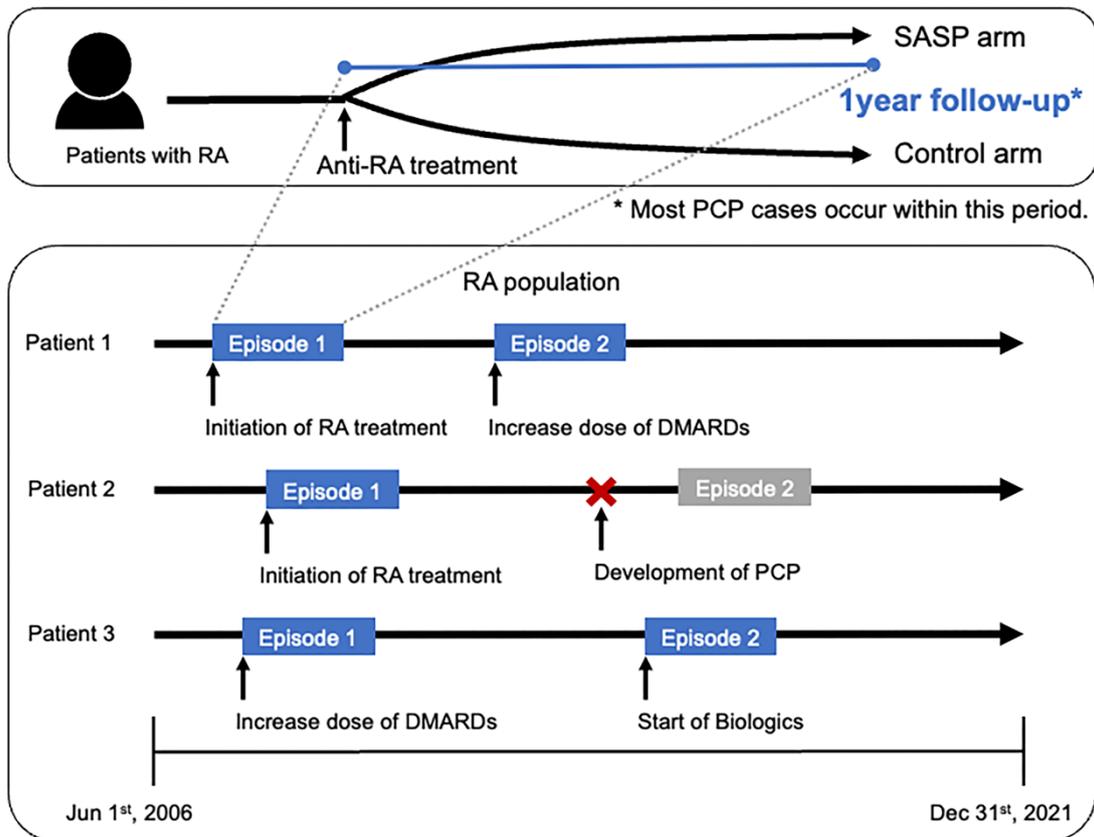


Figure 5. 対象患者の登録

ベースラインは、新たなりウマチ薬による治療エピソードが開始された日とした。PCPの多くは治療開始ならびに変更後1年以内に発症するという既報に基づき、各治療エピソードの観察期間はベースラインから1年とした。ベースラインから1年以上経過してから治療が変更された場合は、別の治療エピソードとしてカウントした。PCPを発症した場合やフォロー不能となった場合に打ち切りとした。

5.3.2 評価項目

主要評価項目は観察期間中の治療エピソードごとの各群の PCP 発症率とした。副次的評価項目は、PCP による死亡率、登録患者の初回治療に限定した場合の各群の PCP 発症率および SASP に関連する有害事象の発症率とした。有害事象と疑われるものはすべて調査し、副作用の発現時期や既知のパターンに基づき因果関係が疑われる事象を特定した。

5.3.3 PCP の診断

対象 RA 患者の電子カルテをスクリーニングし、観察期間中のすべての PCP 症例を把握した。発熱や急性呼吸困難などの PCP に合致する臨床的特徴、特徴的な胸部 CT 所見、血中 β D-グルカンの上昇の 3 つの所見がすべて揃った患者を PCP と診断した。PCR や誘発喀痰・気管支肺胞洗浄液の直接蛍光抗体染色などの微生物学的確定検査のデータは PCP の診断の参考に用いた。

5.3.4 SASP の副作用評価

SASP の安全性を検討するため、全観察期間中に対象症例に発現した SASP 関連の副作用を評価した。NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events Version 5 を参考に、自覚症状や不快な反応はあるが日常生活に支障のないものを軽症、日常生活に支障があるが簡単な外来治療で通常改善されるものを中等症、日常生活を著しく制限し入院に至ったものを重症と定義し、SASP の副作用を評価した。

5.3.5 変数

糖尿病 (DM) は、経口血糖降下薬の使用または血漿ヘモグロビン A1c が 6.5%以上と定義した。関節リウマチ関連肺疾患 (RA-LD) は、胸部 X 線または CT 検査により診断された間質性肺疾患 (ILD) 、気管支拡張症、または胸膜疾患と定義した。現在または過去に喫煙指数が合計で 10 を超える喫煙歴がある場合に喫煙歴ありとした。疾患活動性の評価に関しては、ベースライン時に SDAI

(Simplified Disease Activity Index) /CDAI (Clinical Disease Activity Index) を収集した. SDAI は, 28 圧痛関節数 (TJC28) と 28 腫脹関節数 (SJC28), 患者活動性評価 (PGA visual analogue scale (VAS) 0-10 cm), 医師活動性評価 (EGA VAS 0-10 cm), CRP (mg/dL) を合計したもので, CDAI は, TJC28 と SJC28, PGA, EGA を合計してそれぞれ算出した.

5.3.6 統計解析

ベースラインの連続またはカテゴリーデータは, Wilcoxon の順位和検定または χ^2 検定を用いて比較した. 転帰に対する SASP の効果の推定には, 修正ポアソン回帰モデルを用いた. リスク比 (RR) は, 転帰と関連する考えられるベースライン時の背景因子で調整した. 初回エピソードに限定した解析では, ベースライン特性の群間差に対して, キャリパー 0.20 の最近傍マッチングを用いて 1 対 1 の傾向スコア (PS) マッチングを適用し, 生存解析を行った. PS マッチングの際の共変量としては, 患者の年齢, 性別, リウマトイド因子 (RF) および/または抗シトルリン化ペプチド抗体 (ACPA) 陽性の有無, 罹病期間, ベースライン前の 6 ヶ月間の累積ステロイド投与量を用いて実施した. グルココルチコイド, MTX, TAC, IGT, bDMARDs, JAK 阻害剤の併用, MTX の併用量, RA-LD, DM, リンパ球減少 (1000/ μ L 未満) の有無とした. マッチング後, Cox ハザード比例回帰モデルを用いて, マッチング後の集団における SASP の転帰への影響を推定した. 完全分離または準完全分離が生じた場合, 最尤推定量のバイアスを軽減するために Firth の方法を用いることとした. マッチング前後の 2 群間の差のバランスは, 標準化差 (Standardized difference: Std.diff.) を算出することで評価した. 標準化差が 0.10 未満であれば, PS マッチング後のバランスが適切であると判断した. 統計解析は R version 4.2.0 と JMP® Pro 16.2.0 で行い, P 値 < 0.05 を統計的に有意とみなした.

5.4 結果

5.4.1 患者背景

594名の患者から合計848の治療エピソードが基準を満たした。181エピソードがSASPで治療され(SASP群)、ほとんどの患者は500mgを1日2回投与されていた(170/181例93.9%)。SASP群と対照群の全治療エピソードベースラインにおける患者背景をTable 5に示す。SASP群の患者は高齢で、糖尿病や肺疾患を有しグルココルチコイド(GC)やMTX以外のcsDMARDsによる治療を受けている割合が高かった。また、bDMARDsを含む分子標的薬の使用も少なかった。両群のベースラインの疾患活動性に有意な差は認められなかった。傾向スコアマッチング前の初回エピソード時の集団でも同様の傾向が見られ(Table 6)、マッチング後の集団ではこれらのベースラインのアンバランスが軽減された(Table 7)。

Table 5. 全治療エピソードのベースライン時における患者背景

	Control (n=667)	SASP 群 (n=181)	P 値
女性	566 (84.9)	141 (77.9)	0.03
年齢	59 (48-67)	63 (54-71.5)	<0.0001
罹病期間	2 (0-8)	3 (0-9)	0.10
喫煙歴	206 (42.0)	77 (52.0)	0.03
骨びらん	328 (49.4)	86 (48.3)	0.79
RF	478 (72.0)	128 (71.1)	0.82
ACPA	454 (70.5)	121 (68.4)	0.58
間質性肺疾患	65 (9.7)	30 (16.6)	0.01
糖尿病	53 (7.9)	26 (14.3)	0.008
併用薬			
GC 使用	314 (47.1)	104 (57.5)	0.02
GC 量, mg/day	0 (0-5)	2.5 (0-5))	0.06
MTX 使用	552 (82.8)	118 (65.2)	<0.0001
MTX 量, mg/week	8 (6-10))	6 (0-10)	<0.0001
生物学的製剤 or JAK 阻害薬	297 (44.5)	65 (35.9)	0.04
TNF 阻害薬	142 (21.2)	25 (13.8)	0.02
IL-6 阻害薬	86 (12.9)	17 (9.4)	0.24
アバタセプト	48 (7.1)	20 (11.1)	0.09
JAK 阻害薬	28 (4.2)	4 (2.2)	0.21
リツキシマブ	3 (0.5)	1 (0.6)	0.86
タクロリムス	44 (6.6)	29 (16.9)	<0.0001
イグラチモド	22 (3.3)	22 (12.2)	<0.0001
リンパ球減少 (<1000 / μ L)	105 (16.5)	22 (13.0)	0.27
CDAI	16 (9-24)	15,7 (11.2-23.1)	0.83
SDAI	16.7 (9.8-26.2)	17.7 (12.9-24.7)	0.45

値は n (%) または中央値 (四分位範囲) で示した. P 値は Mann-Whitney の U 検
定または χ^2 検定により算出した.

Table 6. 全患者におけるベースライン時における患者背景

	Control (n=469)	SASP 群 (n=125)	std.diff
女性	392 (83.6)	94 (75.2)	0.21
年齢	59.0 (47.0-67.0)	64.0 (53.0-71.5)	0.43
罹病期間	1.0 (0.0-7.0)	1.0 (0.0-8.5)	0.04
喫煙歴	155 (45.5)	47 (48.0)	0.05
骨びらん	226 (48.5)	55 (45.1)	0.07
RF	344 (73.8)	84 (67.7)	0.13
ACPA	326 (73.3)	81 (66.4)	0.15
間質性肺疾患	51 (10.9)	21 (16.8)	0.17
糖尿病	45 (9.6)	17 (13.6)	0.13
累積 GC 投与量	0.0 (0.0-450.0)	0.0 (0.0-750.0)	0.14
併用薬			
GC 使用	227 (48.4)	72 (57.6)	0.19
GC 量, mg/day,	0.0 (0.0-5.0)	2.5 (0.0-5.0)	0.02
MTX 使用,	395 (84.2)	88 (70.4)	0.33
MTX 量, mg/week	8.0 (6.0-10.0)	6.0 (0.0-10.0)	0.31
生物学的製剤 or JAK 阻害薬	195 (41.6)	35 (28.0)	0.29
TNF 阻害薬	94 (20.0)	15 (12.0)	0.22
IL-6 阻害薬	54 (11.5)	9 (7.2)	0.15
アバタセプト	37 (7.9)	12 (9.6)	0.06
JAK 阻害薬	16 (3.4)	0 (0.0)	0.27
リツキシマブ	1 (0.2)	1 (0.8)	0.08
タクロリムス	25 (5.3)	17 (13.6)	0.29
イグラチモド	7 (1.5)	6 (4.8)	0.19
リンパ球減少 (<1000 / μ L)	72 (16.1)	17 (14.4)	0.05
CDAI	18.0 (11.9-26.4)	15.8 (10.9-23.2)	0.18
SDAI	19.5 (12.2-28.1)	17.7 (13.0-24.1)	0.13

累積 GC 投与量はベースライン以前 6 ヶ月間の累積 GC 量とした。値は n (%) または中央値 (四分位範囲) で示した。

Table 7. 傾向スコアマッチング後の集団におけるベースライン時の患者背景

	Control (n=111)	SASP use (n=111)	Std.diff
女性	84 (75.7)	85 (76.5)	0.02
年齢	65 (55.0-73.0)	65 (53.0-72.0)	0.02
罹病期間	1.0 (0.0-7.0)	0.0 (0.0-5.0)	0.02
喫煙歴	33 (49.3)	39 (48.1)	0.02
骨びらん	52 (42.3)	49 (45.0)	0.05
RF	73 (65.7)	75 (67.6)	0.04
ACPA	68 (65.4)	70 (64.8)	0.01
間質性肺疾患	18 (16.2)	16 (14.4)	0.05
糖尿病	15 (13.5)	16 (14.4)	0.03
累積 GC 量, mg	0.0 (0.0-750.0)	0.0 (0.0-900.0)	0.09
併用薬			
GC の使用	62 (55.9)	63 (56.7)	0.02
GC の量, mg/day	2.5 (0.0-5.0)	2.5 (0.0-5.0)	0.04
MTX の使用	86 (77.5)	82 (73.9)	0.08
MTX の量, mg/week	8.0 (4.0-8.0)	6.0 (0.0-10.0)	0.06
生物学的製剤 or JAK 阻害薬	29 (26.1)	32 (28.9)	0.06
TNF 阻害薬	15 (13.5)	14 (12.6)	0.03
IL-6 阻害薬	9 (8.1)	9 (8.1)	0.00
アバタセプト	6 (5.4)	10 (9.0)	0.14
JAK 阻害薬	0 (0.0)	0 (0.0)	NA
リツキシマブ	0 (0.0)	1 (0.0)	0.13
タクロリムス	13 (11.7)	14 (12.6)	0.03
イグラチモド	5 (4.5)	3 (2.7)	0.10
リンパ球減少 (<1000 / μ L)	17 (15.3)	17 (15.3)	0.00
CDAI	14.0 (10.5-24.9)	16.0 (12.1-23.8)	0.03
SDAI	17.6 (11.8-26.9)	19.2 (13.2-24.2)	0.04

累積 GC 投与量はベースライン以前 6 ヶ月間の累積 GC 量とした。値は n (%) または中央値 (四分位範囲) で示した。

5.4.2 PCP の発生率, 臨床的および診断的情報

850.6 人年の観察期間中, PCP 発症例は 21 人であった. 対照群における発症率 (95%CI) は 2.47 (1.62-3.77) /100 人年であった. 14 名 (66.7%) の患者が最初の 6 ヶ月間に PCP を発症したが, SASP 群では PCP を発症した患者はいなかった. 注目すべき点として, 対照群のうち 2 例がベースラインの 2 カ月前に SASP を中止したばかりであった. PCP 症例のうち, 2 例は BAL 検体から *Pneumocystis jirovecii* が検出された. PCR 検査は 7 例で陽性であった (Table 8). 4 例は人工呼吸管理され, 3 例は死亡し, 全例に SMX/TMP と高用量プレドニゾロンが投与された.

Table 8. PCP 症例の臨床症状および診断時の所見

臨床徴候	N=21
発熱	16 (76.2)
酸素化不良	12 (57.1)
呼吸苦, n (%)	12 (57.1)
乾性咳嗽, n (%)	14 (71.4)
倦怠感	9 (42.9)
診断的検査	
β-D グルカン値の上昇	21 (100)
CT 検査上のびまん性すりガラス陰影	21 (100)
喀痰 PCR 陽性	7 (33.3)
BAL 検査による菌体検出	2 (9.52)

5.4.3 SASP 治療の PCP 発症予防効果

治療エピソードの解析では、単変量解析では SASP 投与を含めて PCP 発症に関連する変数はなかったが、多変量修正ポアソン回帰分析では、既知の PCP 発症リスクに加え、SASP 投与が 1 年間の PCP 発症を有意に減少させた (Table 9). これらの結果は、傾向スコアマッチングを行った集団における log-rank 検定でも確認され、予防投与により PCP の 1 年発症率が有意に低下することが示された (Figure 6). また、結果の頑健性を調べるために感度分析を行った. 全体集団 594 例において、アウトカムとしての PCP 発症率に Cox 比例ハザード回帰モデルを適用し、単変量解析および多変量解析でも上記の結果と同様に SASP 治療による PCP 発症率の有意な減少を認めた (Table 10).

Table 9. 全エピソードにおける SASP と 1 年間の PCP 発症率の関係 (n=848)

	単変量解析		多変量解析	
	RR (95%CI)	P value	RR (95%CI)	P value
年齢	1.06 (1.02-1.10)	0.003*	1.06 (1.02-1.06)	0.006*
女性	8.63 (0.50-142)	0.13	7.78 (1.18-719)	0.034*
ILD	3.36 (1.35-8.40)	0.01*		
DM	4.21 (1.68-10.51)	0.002*	4.59 (1.73-11.15)	0.001*
SASP	0.09 (0.01-1.50)	0.09	0.05 (0.00-0.35)	0.0003*
MTX	1.02 (0.36-2.88)	0.97		
b/tsDMARDs	1.22 (0.53-2.81)	0.65		
GC 用量	1.06 (1.03-1.09)	0.0002*	1.07 (1.03-1.07)	0.002*

* 修正ポアソン回帰モデル, P < 0.05

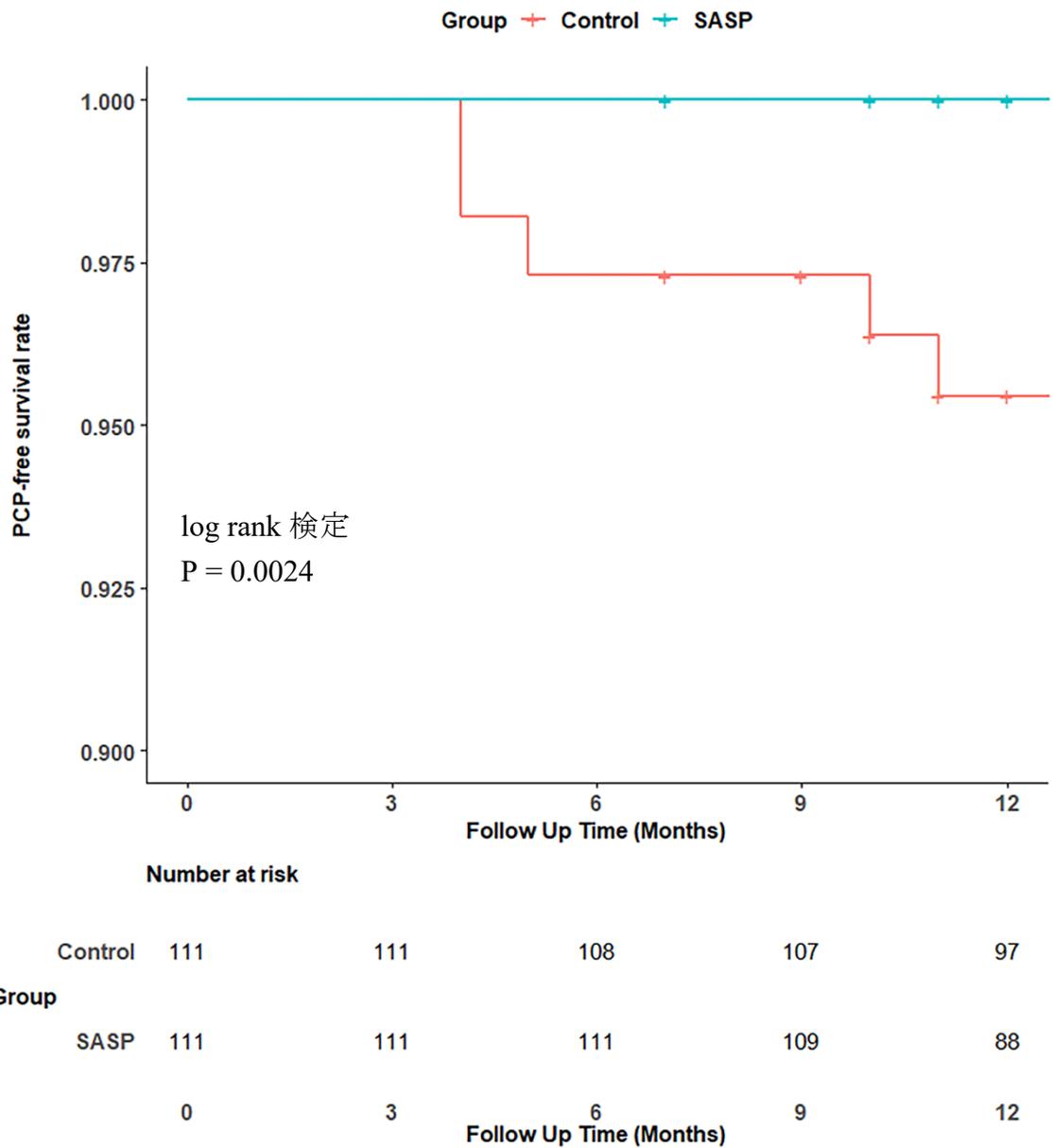


Figure 6. 傾向スコアマッチング集団における PCP 発症のカプランマイヤー曲線
 SASP 群は Control 群と比べて有意に PCP 発症率が低く, SASP の予防投与により PCP の 1 年発症率が有意に低下することが示された.

Table 10. 全患者における SASP と 1 年間の PCP 発症率の関係 (n=594)

	単変量解析		多変量解析	
	HR (95%CI)	P value	HR (95%CI)	P value
年齢	1.05 (1.008-1.01)	0.016*	1.05 (1.00-1.10)	0.033*
女性	7.45 (1.01-950.05)	0.048*	7.08 (0.95-950.14)	0.059
ILD	2.62 (0.79-7.21)	0.107	-	-
DM	4.18 (1.39-11.10)	0.013*	3.90 (1.27-10.70)	0.012*
SASP	0.11 (0.001-0.83)	0.027*	0.09 (0.001-0.67)	0.012*
MTX	1.33 (0.41-6.76)	0.663	-	-
b/tsDMARDs	1.59 (0.60-4.18)	0.344	-	-
GC 用量	1.07 (1.01-1.11)	0.037*	1.06 (0.99-1.01)	0.062
累積 GC 用量	1.00 (0.99-1.00)	0.065	-	-

ILD: interstitial lung disease, DM: diabetes mellitus

* Cox 比例ハザードモデル, P < 0.05

累積 GC 投与量はベースライン以前 6 ヶ月間の累積 GC 量とした。

5.4.4 SASP 治療の安全性評価

全 594 例中 233 例が全観察期間中のいずれかの時点で SASP の投与を受けていた。SASP 投与期間 1036.7 人年に 45 件の副作用（種類を問わない）が発生し（4.34/100 人年；95%CI 3.26-5.78），44%（20/45）の患者が SASP 開始後 1 カ月以内に副作用を発現した（Table 11）。最も多かった症状は皮疹（1.54/100 人・年）で、次いで消化器症状（1.16/100 人・年）であった。その重症度は、ほとんどが軽度から中等度であった（44/45，94.4%）。入院を余儀なくされた重篤な副作用は、薬剤性過敏症症候群 1 例（0.67/100 人年，95%CI 0.32~1.41）のみであり，SASP の投与中止後速やかな症状の改善を認めた。また，SASP の予防投与に関するリスク-ベネフィット分析を行った。重篤な薬物有害反応の 1 例に基づく NNH（Number needed to harm）は 233（95%CI 79~∞）である一方で，全患者の PCP1 例を予防するための NNT（Number needed to treat）は 32（95%CI 23~57）であり，SASP による予防効果は有用と考えられる。

Table 11. SASP による有害事象の発生率

	イベント数 *	発生率 (95%CI) [†]
有害事象	45	4.34 (3.26-5.78)
皮疹	16	1.54 (0.95-2.51)
消化器症状	12	1.16 (0.66-2.03)
肝酵素上昇	5	0.48 (0.20-1.16)
倦怠感	2	0.19 (0.05-0.77)
白血球減少	1	0.10 (0.01-0.68)
血小板減少	1	0.10 (0.01-0.68)
薬剤性過敏症症候群	1	0.10 (0.01-0.68)
その他**	7	0.67 (0.32-1.41)

* 233 症例の観察期間は 1036.5 人年であった。

** その他は味覚異常 (2) , 発熱 (2) , 動悸 (1) , 関節痛 (1) , 血清クレアチンキナーゼ上昇 (1) であった。

[†] 100 人年当たりの割合。

5.5 考察

近年、RA の治療は Treat-to-Target 戦略による早期診断と疾患活動性の評価の確立、TNF 阻害剤、IL-6 阻害剤などの生物学的製剤、JAK 阻害剤に代表される分子標的抗リウマチ薬の台頭により飛躍的に進歩している。その結果として、重篤化する可能性があり、予後に重大な影響を及ぼす感染性合併症に、より注意を払う必要が出ている。PCP を含む呼吸器感染症は RA 患者の主な死亡原因となっており、適切なリスク管理が不可欠である (Mori and Sugimoto, 2012)。

過去に日本で行われた 2 つの研究において、従来の csDMARDs の 1 つである SASP の投与が RA 患者における PCP の発症予防に有用である可能性を示唆されている (Nunokawa et al., 2019a, Nunokawa et al., 2019b)。しかし、これらの研究は症例対照研究の性質上、時間の方向性が現在から過去に向かっており、症例と対照の間の患者特性などの交絡因子の評価が不十分であることが多く、PCP の発症率を評価することができないという欠点を有している。また、SASP 投与に伴う副作用の評価も不明であり、PCP の一次予防としての SASP 投与の有用性は不明なままであった。今回、本研究は、SASP が成人 RA 患者の PCP の発症率を有意に低下させることを示したことに加えて、副作用についての評価も行い、SASP の PCP 一次予防における有用性を検証した。

RA のガイドライン (Smolen et al., 2020) では RA 治療の第一選択薬として MTX が推奨されているが、特に高齢者において腎障害や肺疾患などで MTX の使用が困難な場合なども多く、現在でも SASP は多くの場面で使用されている。本研究の RA 集団において、SASP を投与された患者は、SASP を投与されていない患者に比べ高齢で、DM や肺疾患の併存率が高く、PSL を併用していることが判明した。このことから、SASP は高齢などを理由に感染症や臓器機能障害のリスクが高い患者に使用される傾向があり、この結果は RA 治療における SASP という抗リウマチ薬の現在の位置づけを示唆している。このような患者集団の割合が多い SASP 群において PCP 症例がみられなかったことは特筆すべきことである。SASP は末梢性脊椎関節炎にも有効であるとされており同疾患の患者にも同様の効果が想定されるが、これを確認するためにはさらなる研究が必要である。

SMX/TMP は PCP 予防の第一選択薬であるが (Thomas and Limper, 2004, Stern et al., 2014)、副作用や薬物相互作用の頻度が比較的高いことが知られており (Smilack, 1999)、PCP の危険因子を有する患者での使用が困難な場合も多い。本研究では、SASP の投与歴のある患者における副作用の発現率を評価し、副作用

は軽度であることが多く、安全に使用できることを示した。SASP は SMX/TMP と同様にサルファ基を有しており、サルファ剤として皮疹など同様の有害事象はある (Khan et al., 2019)が、サルファ剤に過敏な患者を除いて禁忌なく使用できるため、高齢者や透析患者への使用も比較的容易であると考えられる。SASP は他の薬剤との併用が可能であり、安価で比較的安全な抗リウマチ薬としてそれなりに優れた薬剤であり、さらに本研究で PCP の一次予防効果について新たな知見が得られたことにより、SASP 投与の意義が今後より高まる可能性がある。

本研究には一般化される可能性に影響を与えるいくつかの限界がある。まず、これは交絡の可能性を除しきれない後ろ向き観察研究の不可避な限界であるが、SASP 群と非 SASP 群において PS マッチングを用いて可能な限りベースライン特性を揃えたが、完全には一致できておらず、未知の交絡についての調整もできていない。また、本研究では PCP の症例数が少ないこともあり、SASP 群と非 SASP 群の PCP 症例が完全に分離されたことで、標準誤差が大きくなった。

5.6 結語

本研究の結果は, RA 患者における PCP に対する SASP の一次予防効果を検証するものであった. この効果は, RA 患者における治療選択肢に影響を与え広げられると思われる.

6. 第三章

オートファジーに着目した関節リウマチの滑膜
線維芽細胞における抗シトルリン化タンパク質
産生機序の解明

6.1 緒言

6.1.1 関節リウマチ

関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) は関節滑膜の持続的な炎症により、滑膜の肥厚・絨毛組織の増殖によって骨・軟骨の破壊へと至る慢性多発性関節炎を特徴とする自己免疫疾患の一つである (McInnes and Schett, 2011). 主に朝方で見られる関節のこわばりや、関節の疼痛ならびに腫脹からはじまり、無治療のまま進行すると関節の変形、腱損傷、関節脱臼、ひいては関節強直癒合などを呈する。骨破壊や関節破壊の進行により関節の構造が不可逆的な変化へ至ると、患者の日常生活動作が著しく障害される (Klareskog et al., 2009, Maxwell and Singh, 2010). RA の罹患頻度は 0.5~2.0% であり男女比はおよそ 1:3 と女性に多く、好発年齢は 40-50 歳代と言われており、労働人口の中核を担う集団であることから労働生産性にも大きく影響を与え社会的にも重要な疾患の一つである。

RA の発症率に人種差があることや家族内発症の報告もされており (Silman and Pearson, 2002), RA の発症には遺伝学的素因が関連していると考えられている。ゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study: GWAS) の結果では 100 以上の RA 疾患感受性遺伝子座が特定されており (Okada et al., 2014), 中でも HLA-DRB1 が特に強い関連を示し、抗原提示が RA の病態形成に大きく関与することが示唆された。その他にも CD28 などの T 細胞の活性化に必要な共刺激分子や Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 (PTPN22) など T 細胞内でシグナル伝達を行う分子や、TNF- α , IFN- γ , IL-6 などの炎症性サイトカインなどが疾患感受性遺伝子座位として同定されている (Okada et al., 2014). これらの遺伝的素因に加え、喫煙 (Smolen et al., 1996) や歯周病、腸内細菌叢の異常 (Scher et al., 2016) といった環境要因を背景として、ヒストンのアセチル化, DNA のメチル化などの遺伝子のエピジェネティック修飾が加わることで滑膜線維芽細胞 (synovial fibroblasts; SFs) や好中球が活性化され, RA の病態が形成されることが報告されている (Klein and Gay, 2015) (Figure 6).

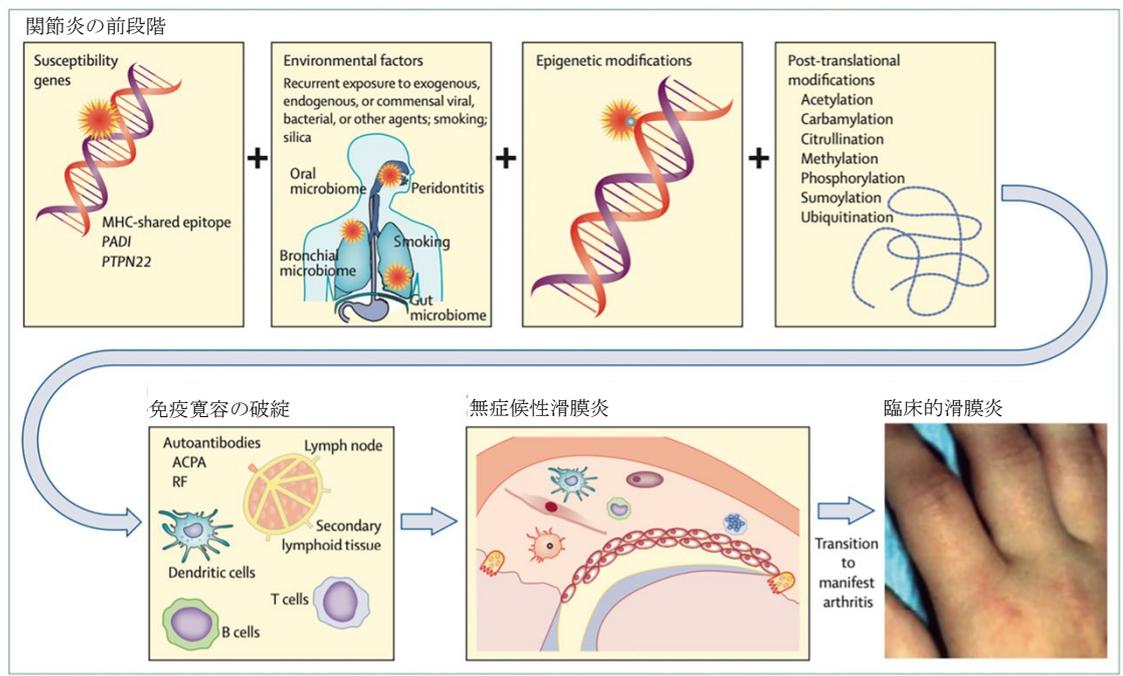


Figure 6. RA 発症へと至る機序 (Smolen et al., 2016) より改編.

遺伝的素因を持つ患者において、喫煙や歯周病、腸内細菌叢の変化などの環境要因に加えて、DNA のメチル化やヒストンのアセチル化などのエピジェネティックな修飾およびタンパク質のシトルリン化やカルバミル化などの翻訳後修飾が生じる。その結果、免疫寛容の破綻を呈し、無症候性滑膜炎を経て最終的に臨床的関節炎を引き起こすとされる。

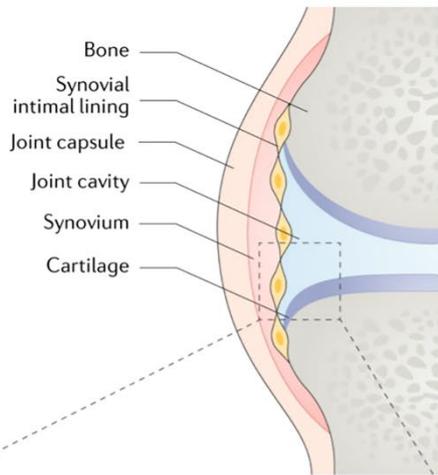
発症の免疫学的機序として、樹状細胞やマクロファージ、B細胞などの抗原提示細胞 (antigen-presenting cells: APC) の Major histocompatibility complex class II (MHC クラス II) を介して、RA に関連した対応自己抗原が T 細胞に抗原提示されることで免疫反応が起こると考えられている。B 細胞は形質細胞に分化しリウマチ因子 (rheumatoid factor: RF) や抗シトルリン化ペプチド抗体 (anti-citrullinated peptide antibodies: ACPA) などの自己抗体の産生に関与し、自己抗体は免疫複合体を形成し補体や Fc レセプターの活性化を介して TNF- α , IL-6, IL-1 などの炎症性サイトカインの産生を促進する (Volkov et al., 2020)。炎症性サイトカインにより活性化された SFs は腫瘍様に増殖し、炎症性サイトカイン、ケモカイン、マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase: MMP), receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) を産生し軟骨破壊や破骨細胞の分化および骨破壊を促進し (Sabeih et al., 2010, Bottini and Firestein, 2013), RA の病態において中心的役割を担っている (Figure 7)。

近年、こうした炎症性サイトカインやその受容体をターゲットとした治療によって、病態の制御において飛躍的な成果を上げているが、その一方で、詳細なメカニズムについては未だ不明な部分も残されている。急速に関節破壊が進行する症例や、多剤抵抗性の難治症例も一定数存在することも事実であり、昨今の個別化医療に対する需要の高まりと同時に、RA の病態の分子レベルでの解明が求められている。

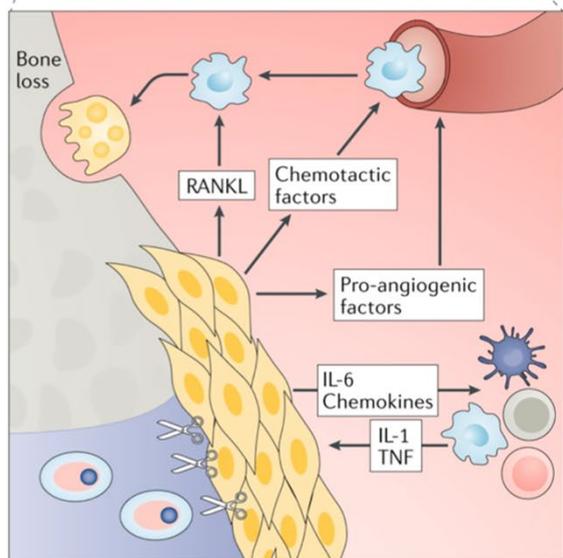
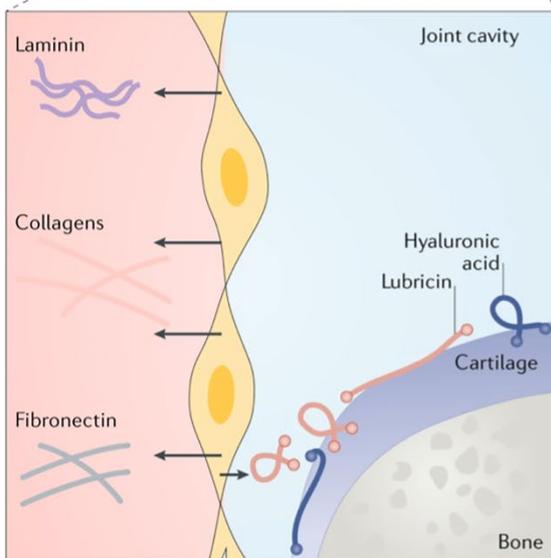
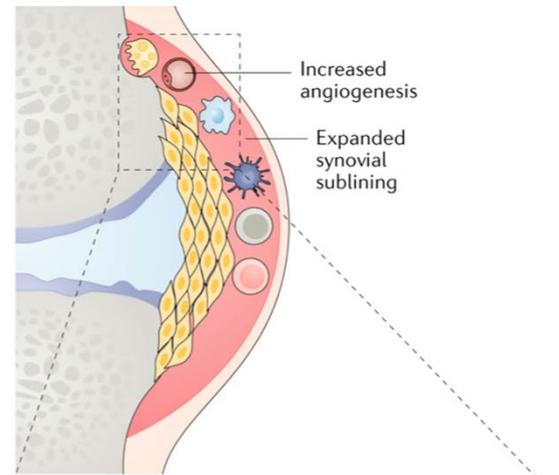
ACPA は RA において特異性が高い自己抗体であり、その検出は RA の診断に有用であることが示されている。ACPA は RA の発症に先立って検出され (Rantapaa-Dahlqvist et al., 2003), ACPA 陽性例は陰性例と比較して関節破壊が進行しやすく (van den Broek et al., 2012), 治療反応性も異なると言われている (van Dongen et al., 2007)。また、マウスにおいてシトルリン化フィブリノゲンに対する自己抗体が関節炎を誘発するという報告 (Kuhn et al., 2006) や、コラーゲン誘発性関節炎モデルマウスにおいて、コラーゲンのシトルリン化により関節炎が増強された (Lundberg et al., 2008) とする報告などから、シトルリン化抗原に対する自己抗体が病原性を有することが示唆されている。シトルリン化は peptidylarginine deiminase (PAD) により触媒されるタンパク質の翻訳後修飾であり、ペプチド中の塩基性アミノ酸であるアルギニンが中性アミノ酸であるシトルリンに修飾することで、電荷、分子量およびタンパク構造が変容し、結果としてその抗原性を変化させるプロセスである (Fuhrmann and Thompson, 2016)。PAD の活性化には、高濃度のカルシウムイオンが必要であり、定常状態における細胞内カルシウム濃度では PAD は活性化されないが、細胞傷害性の刺激などによってカルシウムイオンが細胞質内に流入することで PAD が活性化されてシトルリン化が起こることが示されている (Mondal and Thompson, 2019)。

PAD は組織発現の異なる 5 つのアイソザイムからなることが知られており、PAD1 は主として表皮と子宮に、PAD2 は脳、子宮、脾、膵、骨格筋、分泌腺など多くの組織に発現し、PAD3 は表皮と毛包に発現している。PAD4 は主として好中球や単球などの白血球に発現しているが、病的状態においては種々の腫瘍組織で発現することが注目されている。また、細胞内では核にも局在し、ヒストンなどいくつかの核内蛋白のシトルリン化により核の機能に関与していることが明らかとなっている。PAD6 は、ヒトでは卵巣、精巣、末梢血白血球などに発現しているが、初期胚発生での役割も注目されている。そのうち、PAD のアイソタイプである PAD4 は GWAS により RA の疾患感受性遺伝子のひとつとして同定され (Suzuki et al., 2003), 過剰なシトルリン化が ACPA の産生に関与していることが推察されている。しかし、TNF α 誘導性関節炎モデルマウスにおいては PAD4 ノックアウトで ACPA 産生の低下はみられず、ACPA の産生には PAD4 の作用以外の機序が関与している可能性が示唆されている。

a. 健常人



b. 関節リウマチ患者



FLS in healthy joints:
 • Shape and maintain the ECM
 • Produce joint lubricants
 • Provide structure between synovium and the joint cavity

FLS in the joints in RA:
 • Marked increase in number
 • Important role in cartilage destruction
 • Produce inflammatory cytokines and chemokines
 • Facilitate the influx, proliferation and survival of immune cells
 • Delay the resolution of inflammation
 • Contribute to bone erosion and interfere with bone repair
 • Stimulate angiogenesis

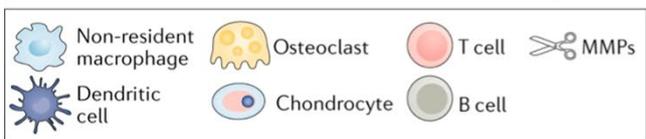


Figure 7. 健常人と RA における滑膜関節 (Nygaard and Firestein, 2020)より改編

a | 健常な関節の深さは1,2層の細胞層のみであり、滑膜内膜のSFsはヒアルロン酸などを産生している。b | RA滑膜は、内膜の増殖が見られ侵襲的な過形成性パンヌスに変化する。SFsはマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)を産生し、軟骨や非骨質支持構造の破壊に寄与している。これらの細胞は炎症性サイトカインやケモカインなどを産生し、関節炎の促進・維持に寄与している。

6.1.2 オートファジーと関節リウマチ

オートファジーは、通常、細胞成分のリソソームまたは液胞における分解と定義され、細胞質物質の除去、分解産物の生成、細胞質からリソソームへの輸送など、細胞内のいくつかの生理的機能を仲介している。その様式の違いからマクロオートファジー、ミクロオートファジー、マイトファジー、ゼノファジーなどに分けられる。そのうち、マクロオートファジー（以下、オートファジー）は細胞内における細胞質成分の分解システムの一つであり、隔離膜を伸長しながら細胞質の一部を取り囲み（オートファゴソーム）リソソームと融合する（オートリソソーム）ことで、内容物を分解する (Figure 8,9)。一方で、細胞内浄化や飢餓適応のほか、生体防御にも深く関与しており、その一つとして細胞外タンパクだけでなく細胞内タンパクにおいてもオートファジーによって MHC クラスII分子と結合するペプチドが生成され抗原提示に寄与することが報告されている (Figure 5)。

当研究室では、これまでに RA の SFs において変形性関節症 (osteoarthritis: OA) のそれと比較して高いオートファジー活性を有しており、抗アポトーシス作用を有していることを示した (Kato et al., 2014)。また、RA-FLS の抗原提示能と同細胞内に存在する ACPA の対応抗原であるシトルリン化ビメンチン (citrullinated vimentin: cVIM) を確認し、さらにオートファジーによるビメンチンのシトルリン化ならびにオートファジーと IFN- γ による cVIM-MHC クラスII 結合の増加を示している (Sugawara et al., 2020)。またここで MHC クラスII と結合する cVIM は Full-length であったことから、オートファジーがタンパク質の分解を伴わずにシトルリン化という翻訳後修飾に関わっていることが示唆された。ただ一方で、オートファジーフラックスにおいて、通常隔離膜が伸長しオートファゴソームが形成されると速やかにリソソームと融合しオートリソソームとなることで内容物が分解されるが、リソソーム内は酸性環境であり、塩基性アミノ酸であるアルギニン残基を中性シトルリンに変える酵素である PAD の至適環境とはいえず、現在主に知られている PAD のみではシトルリン化を説明できない可能性がある。リソソーム内においてシトルリン化活性を持つ酵素、もしくはリソソームとの融合以前にビメンチンがシトルリン化を受けていることが示唆される。

また、近年オートファジーはある状況下においてポリユビキチン化タンパク質を選択的に分解することが知られている。これは、選択的オートファジーと呼ばれ、凝集したタンパク質や不要なオルガネラ、病変体などを分解し恒常性を維持していることがわかっている。分解される基質とオートファゴソームをつ

なぐアダプタータンパク質として、p62 (Figure 6) や Optineurin (OPTN), neighbor of BRCA1 gene 1 (NBR1) などが知られており、先行研究において、p62 や OPTN は、RASFs においても重要な役割を担っていることが示されている (Lee et al., 2020, Kato et al., 2014). それ自体はオートファジーに必須な因子ではなく p62 欠損細胞においてもオートファジーは正常に起こるが、p62 はオートファゴソーム膜の形成に必須な LC3 と相互作用し、オートファジーにより選択的に分解される基質であることが明らかとなっている。近年、p62 が抗酸化ストレスのマスター転写因子 Nrf2 を分解に導く Keap1 を隔離することで Nrf2 を活性化する機能的液滴であること示唆されている (Kageyama et al., 2021) が、生理機能に関しては未だ解明されていない点も多い。

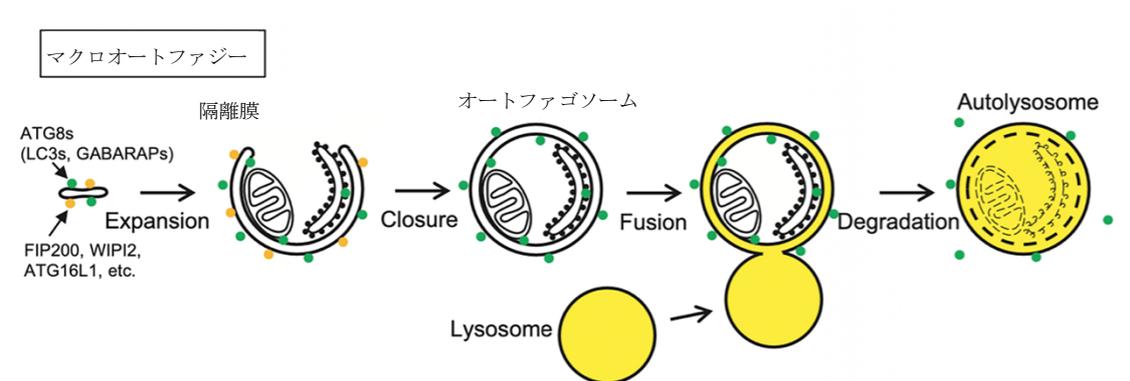


Figure 8. (マクロ) オートファジーの概略図 (Mizushima and Murphy, 2020) より改編

オートファジーは細胞のストレス状態に応じて、細胞内のオルガネラのターンオーバーやタンパク質の凝集体の除去に関与している。隔離膜が伸長して細胞質の一部を包み込み、オートファゴソームとなる。そして、リソソームと融合してオートリソソームとなることで、細胞質由来の物質や小器官が分解される。ATG8 タンパク質（緑色の点）と FIP200, WIPI2, ATG16L1 などの隔離膜のマーカー（オレンジ色の点）の局在がそれぞれ示されている。

Atg8: Autophagy-related gene 8, FIP200: FAK-family interacting protein of 200 kDa, WIPI2: WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2, ATG16L1: Autophagy related 16 like 1.

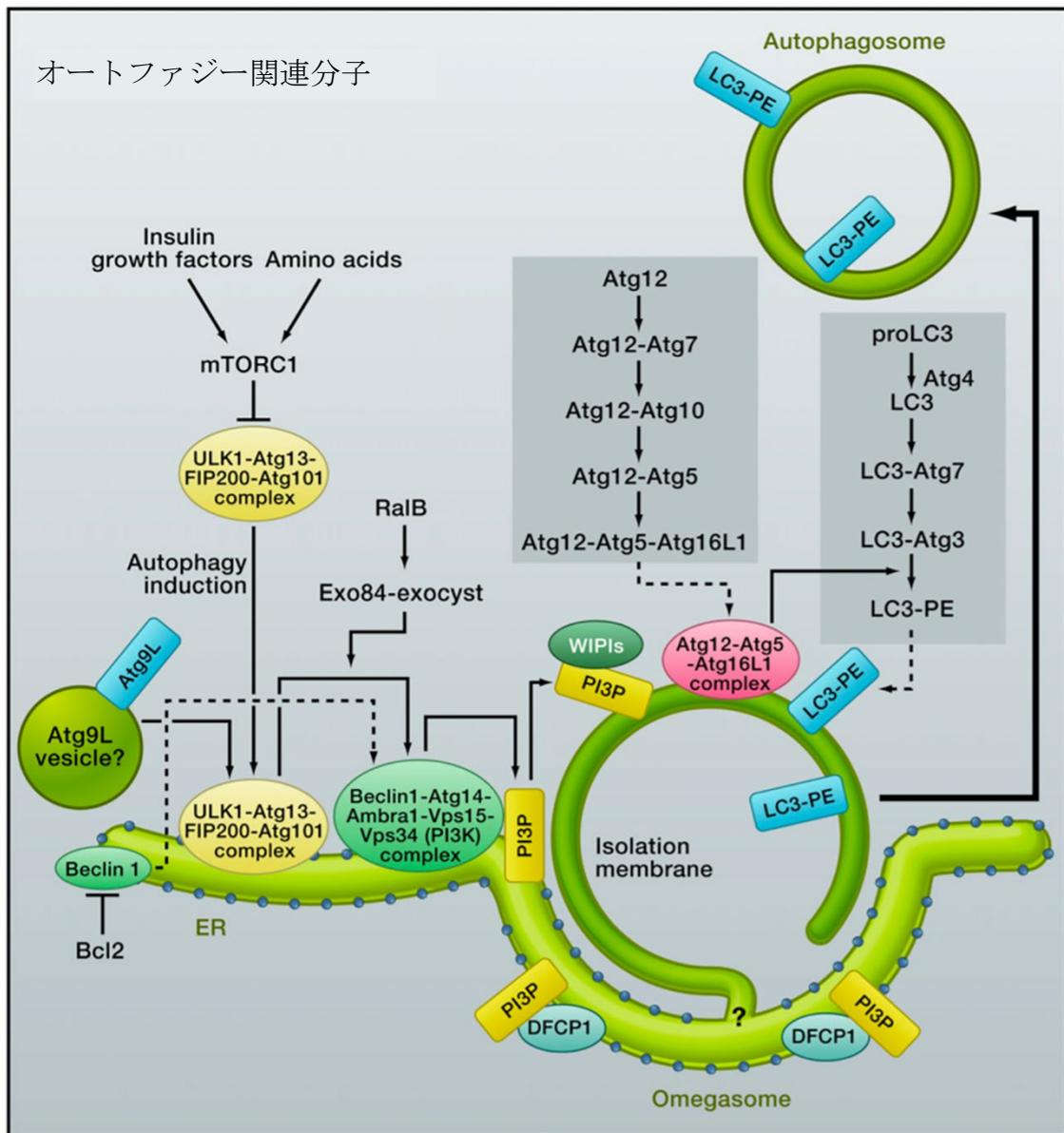


Figure 9. オートファジー関連分子 (Mizushima and Komatsu, 2011)より改編
 mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)は unc-51 like autophagy activating kinase 1 (ULK1) 複合体の上流でオートファジーを抑制している. 富栄養条件下では mTORC1 によるリン酸化で不活性化されているが, 飢餓状態によりこの抑制が外れると ULK1 複合体が活性化し小胞体膜へ移動する. そして, 活性化 ULK1 複合体が phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) 複合体を活性化し, phosphatidylinositol-3 phosphate (PIP3) が形成される. PIP3 は Autophagy-related protein 8 (Atg8) ファミリー分子の microtubule-associated protein light chain-3 (LC3)を脂質修飾し, 細胞質内のタンパク質が二重膜に包まれオートファゴソームが形成される. その後, リソソームとの融合より分解される.

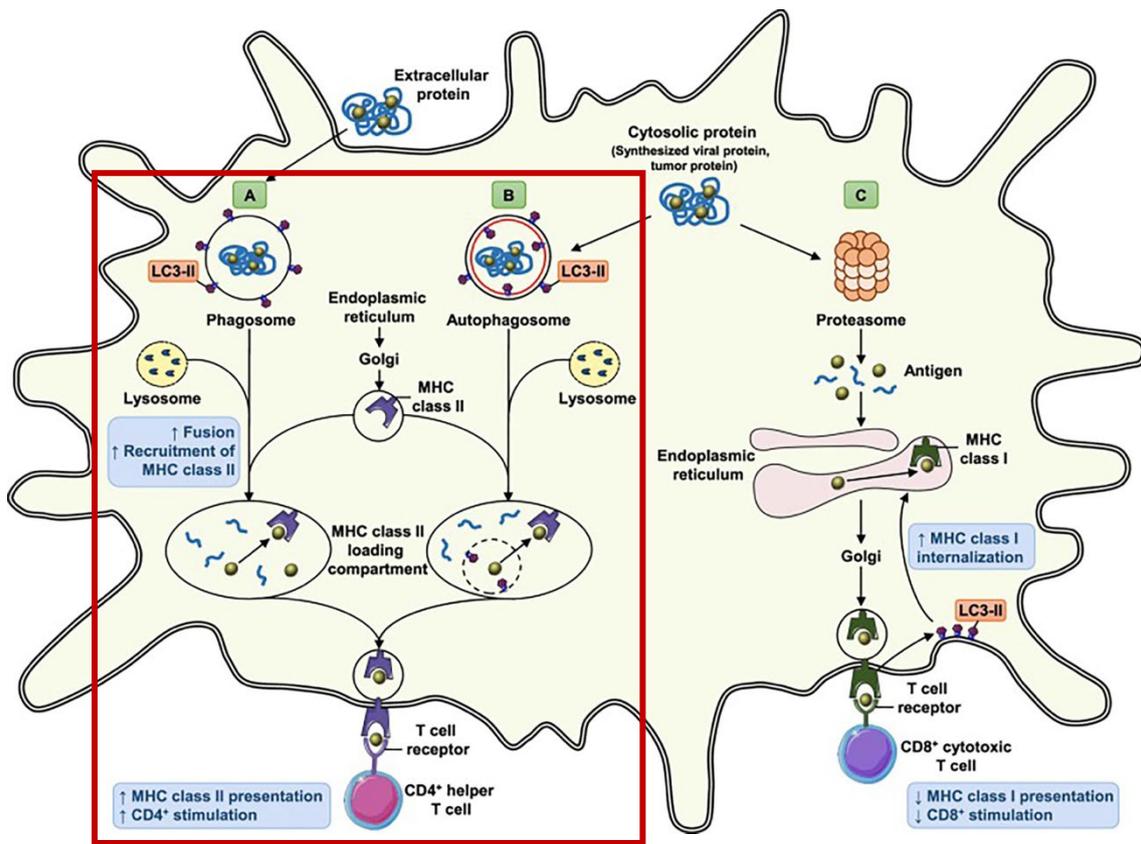
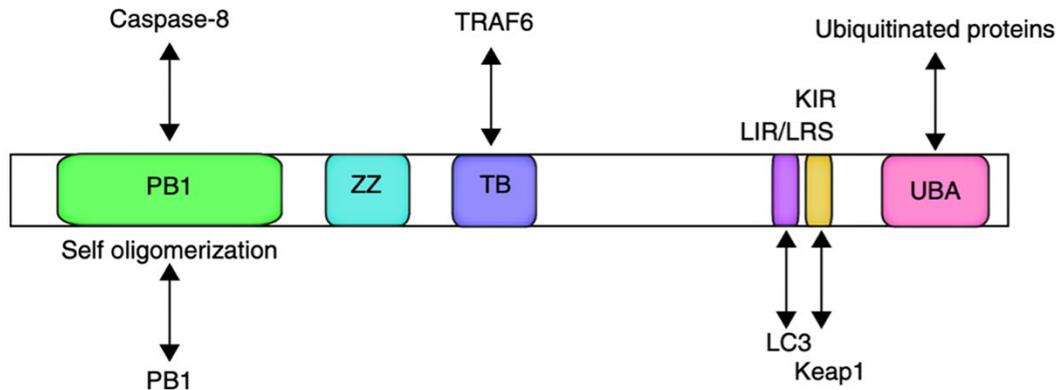


Figure 10. 抗原提示におけるオートファジーの役割 (Germic et al., 2019)より一部改編

a オートファジーは、貪食した外来抗原の MHC class II 分子への提示をサポートする。細胞外タンパク質が貪食されると、LC3-II がファゴソーム膜に動員され、ファゴソームとリソソームの融合が促進される。MHC class II 分子のファゴリソソームへのリクルートと抗原ペプチドのロードが促進され、細胞表面の MHC class II 分子のアップレギュレーションと CD4+ヘルパーT 細胞の刺激につながる。b オートファゴソームは、リソソームの分解のために細胞質タンパク質をターゲットにして、MHC class II へと輸送することができる。この古典的なオートファジー経路は、細胞内抗原の MHC class II 提示を可能にし、CD4+ヘルパーT 細胞応答を生じさせる。c オートファジーは、MHC class I 分子上の抗原の提示をそれらの内在化の増加を通して低減させる。

A. p62 のドメイン構造



B. ユビキチン化タンパク質の受容体としての p62

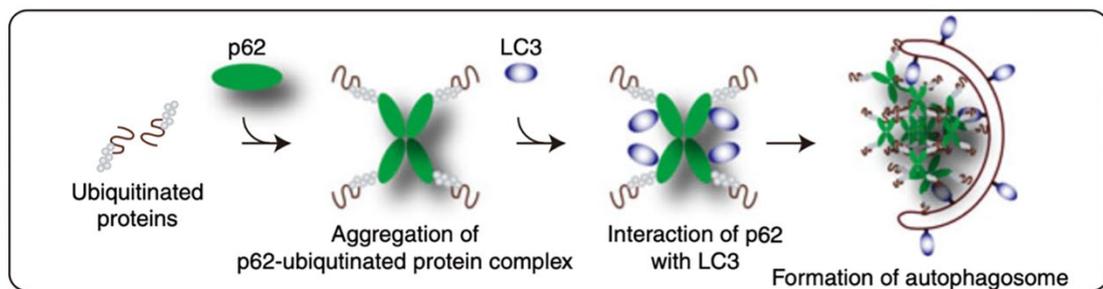


Figure 11. p62 の構造とオートファジーにおける p62 の役割 より改編

A. p62 のドメイン構造.

PB1 が自己オリゴマー化の役割を果たす。LC3 は LIR (LC3- interacting region)/LRS (LC3 recognition sequence)を介して p62 を認識する。 p62 は KIR (Keap1-interacting region)を介して Keap1 と相互作用している。ZZ zinc finger domain, TB TRAF6-binding (TB) domain, UBA ubiquitin associated domain.

B. ユビキチン化タンパク質の受容体としての p62

p62 は UBA ドメインを介してポリユビキチン化タンパク質と相互作用する。この複合体は LIR/LRS-LC3 との相互作用により、オートファゴソーム内に選択的に隔離される。この過程は、PB1 ドメインを介した p62 の自己多量化によって促進される。

KIR: Keap1-interacting region, ZZ: zinc finger domain, TB: TRAF6-binding domain, UBA: ubiquitin-associated domain.

6.2 目的

今回我々は、オートファジーの一連のプロセスの中において、どの時点でシトルリン化タンパク質の産生が行われているか、シトルリン化タンパク質産生機序のメカニズムを解明する目的に研究を行った。

6.3 方法

6.3.1 オートリソソーム阻害による cVIM 発現量の検討

6.3.1.1 対象患者

2015年4月から2021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、ヘルシンキ宣言に基づいた文書による説明と同意を得られたRA患者を対象とした。すべてのRA患者は、2010年米国リウマチ学会 (American College of Rheumatology: ACR) /欧州リウマチ学会 (European League Against Rheumatism: EULAR) (Aletaha et al., 2010) の分類基準に基づいて診断された (Table 1)。

本研究は北海道大学臨床研究審査委員会 (Hokkaido University Certified Review Board) の承認の下で行った (承認番号 008-0103, 「関節リウマチの滑膜におけるシグナル分子発現およびバイオロジー解明に関する研究」)。

6.3.1.2 患者 SFs の分離

当院整形外科による人工関節置換手術により得られたRA患者の滑膜組織検体から結合組織や脂肪を除去し、できるだけ小さく裁断し分離した。5 mg/mL の type I コラゲナーゼ (Sigma-Aldrich) を含んだ Hank's balanced salt solution (HBSS) を入れ、37 °C で2時間インキュベートを行った。その後、セルストレイナーに通して 500 G, 5 分間で遠心分離を行い、10%ウシ胎児血清 (FBS) (コスモバイオ社), 100 IU/mL ペニシリンおよび 100 µg/mL ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich) 含有 Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM, Sigma-Aldrich) で培養した。

すべての SFs は 4-8 継代で実験に使用した。

6.3.1.3 Chloroquine 刺激による SFs における cVIM 発現量の変化の確認

1.0 × 10⁶ 個の SFs を PBS で洗浄したのち, RA-SFs を 8 well chamber slide および 6 well plate に播種し, 一晚インキュベートした後, Chloroquine (CQ, Sigma-Aldrich) 25μM を培養液に加え, 24 時間インキュベートした. 最終の 2 時間で培地を無血清の IMDM に置換して飢餓刺激を与え, オートファジーを誘導した.

8 well chamber slide は 4% paraformaldehyde を用いて常温で 15 分間インキュベートし, SFs を固定した. その後, PBS で洗浄し 70%メタノールに置換して, -20°C で 1 分間インキュベートし, 透過処理を行った. 処理後, 再度 PBS で洗浄し, 3% BSA in TBST で 37°C にて 30 分間インキュベートし, ブロッキングを行った. ブロッキング後, PBS で洗浄し 0.1% BSA in TBST に 1:200 で希釈した anti-citrullinated vimentin mouse polyclonal antibody (Cayman Chemical) を 4°C で over night した. 次に PBS で洗浄した後, Alexa Flour[®] 594 anti-rabbit antibody, Alexa Flour[®] 488 anti-mouse antibody を 0.1% BSA in TBST に 1:200 で希釈して常温で 3 時間インキュベートした. インキュベート後, PBS で洗浄し 1% BSA in TBST で 300nM に希釈した 4'6-diamidno-2-phenylindole (DAPI; Biolegend) でカバーし, 核の染色を行った. 各種染色後には蛍光顕微鏡 BZ-X800 (Keyence) で観察した.

6 well plate に播種した細胞は, 各々の well に対して刺激を行った後, PBS (Wako) で洗浄しトリプシンで細胞を剥離してエッペンチューブに回収し, 50 G 5 分間で遠心した. 上澄みを除去しペレットを PBS で洗浄してさらに 50 G 5 分間で遠心し, 再度上澄みを除去した. ペレットに CellLytic M Cell lysis reagent (Sigma-Aldrich) を 20μL 添加し, 室温で 15 分間インキュベートした. インキュベート後, 15000 G 10 分間で強遠心を行い, 上澄みをライセートとして回収した. 回収したライセートに Laemmli Buffer x4 (BioRad) および 2- mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) を添加し, 95°C のヒートブロックで 5 分間加熱しサンプルを作成した. 10%アクリルアミドゲルを作成し, 各レーンにアプライした. 100 V で 90 分間電気泳動を行い, 終了後に, polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレンに Transfer Buffer 中で 100V 30 分間転写を行った. 転写後のメンブレンは 0.5% BSA in TBS-tween (TBST) で 37°C 30 分間のブロッキングを行った. anti-Citrullinated Vimentin Monoclonal Antibody (Clone 12G11, Cayman) を Signal Enhancer HIKARI Solution A (ナカライテスク) を用いて 500 対 1 に希釈し, 4°C over night でインキュベートした. その後, 2 次抗体として anti-Mouse IgG

antibody を Signal Enhancer HIKARI Solution B (ナカライテスク) を用いて 20000 対 1 に希釈し, 4°C over night でインキュベートした. その後, TBST で洗浄し, 検出試薬として enhanced chemiluminescence Western blot detection reagents (GE healthcare) を使用して, LAS-4000 imaging system (Fujifilm) を用いてバンドの観察を行った.

6.3.1.4 WB 法を用いた SFs における STX17 発現の確認

T-75 フラスコで培養した RA 患者の SFs を 2mL のトリプシンを用いて剥離した後, 10%非働化 FBS 含有 IMDM を 8mL 加え, 500 G 5 分間で遠心を行った. 上清を除去したのち, ペレットを 1mL の 10%非働化 FBS 含有 IMDM に溶解させ, 6 well plate に播種し 10%非働化 FBS 含有 IMDM で培養を行った.

SFs のオートファジーを誘導するため MG-132 (10 μ M) を添加および無血清培地を用いて, 回収の 2 時間前に飢餓刺激を与えた. 各条件を組み合わせて培養をおこなった後, PBS (Wako) で洗浄しトリプシンで細胞を剥離してエッペンチューブに回収し, 50 G 5 分間で遠心した. 上澄みを除去しペレットを PBS で洗浄してさらに 50 G 5 分間で遠心し, 再度上澄みを除去した. ペレットに CelLytic M Cell lysis reagent (Sigma-Aldrich) を 20 μ L 添加し, 室温で 15 分間インキュベートした. インキュベート後, 15000 G 10 分間で強遠心を行い, 上澄みをライセートとして回収した. 回収したライセートに Laemmli Buffer x4 (BioRad) および 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) を添加し, 95°C のヒートブロックで 5 分間加熱しサンプルを作成した. 10%アクリルアミドゲルを作成し, 各レーンにアプライした. 100 V で 90 分間電気泳動を行い, 終了後に, polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレンに Transfer Buffer 中で 100 V 30 分間転写を行った.

転写後のメンブレンは 0.02%BSA in TBST で室温 30 分間のブロッキングを行った. Anti-Syntaxin-17 (Human) mAb (Clone 2F8, MBL) を Signal Enhancer HIKARI Solution A (ナカライテスク) を用いて 500 対 1 で希釈し, 4°C over night でインキュベートした. その後, 2 次抗体として anti-Mouse IgG antibody を Signal Enhancer HIKARI Solution B (ナカライテスク) を用いて 20000 対 1 で希釈し, 4°C over night でインキュベートした. その後, TBST で洗浄し, 検出試薬として enhanced chemiluminescence Western blot detection reagents (GE healthcare) を使用して, LAS-4000 imaging system (Fujifilm) を用いてバンドの観察を行った.

6.3.1.5 STX17 siRNA トランスフェクション

RA の SFs を 6 well plate に 1×10^5 細胞/well の密度で一晩播種し, Lipofectamine RNAiMAX (Thermofisher) を用いて STX siRNA (Thermofisher) またはネガティブコントロール siRNA を 24 時間トランスフェクションさせた. ノックダウン効率は, トランスフェクション後 24 時間の RA-SFs の RT-qPCR 分析, およびトランスフェクション後 48 時間の WB 法によって検証した.

6.3.1.6 STX17 ノックダウンによる cVIM 発現量変化の評価

STX17 の発現量を解析するため, 6 well plate に播種した RA-SFs に対して Lipofectamine RNAiMAX で siRNA を導入した. 24 時間トランスフェクションさせた後, IMDM に培地を交換し 48 時間インキュベートした. その後, PBS (Wako) で洗浄しトリプシンで細胞を剥離してエッペンチューブに回収し, 50 G 5 分間で遠心した. 上澄みを除去しペレットを PBS で洗浄してさらに 50 G 5 分間で遠心し, 再度上澄みを除去した. ペレットに CellLytic M Cell lysis reagent (Sigma-Aldrich) を $20 \mu\text{L}$ 添加し, 室温で 15 時間インキュベートした. インキュベート後, 15000 G 10 分間で強遠心を行い, 上澄みをライセートとして回収した. 回収したライセートに Laemmli Buffer x4 (BioRad) および 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) を添加し, 95°C のヒートブロックで 5 時間加熱しサンプルを作成した. 10%アクリルアミドゲルを作成し, 各レーンにアプライした. 100V で 90 時間電気泳動を行い, 終了後に, polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレンに Transfer Buffer 中で 100V 30 時間転写を行った.

転写後のメンブレンは 0.02%BSA in TBST で室温 30 時間のブロッキングを行った. Anti-Syntaxin-17 (Human) mAb (MBL) を Signal Enhancer HIKARI Solution A (ナカライテスク) を用いて 500 対 1 で希釈し, 4°C over night でインキュベートした. その後, 2 次抗体として anti-Mouse IgG antibody を Signal Enhancer HIKARI Solution B (ナカライテスク) を用いて 20000 対 1 で希釈し, 4°C over night でインキュベートした. その後, TBST で洗浄し, 検出試薬として enhanced chemiluminescence Western blot detection reagents (GE healthcare) を使用して, LAS-4000 imaging system (Fujifilm) を用いてバンドの観察を行った.

6.3.1.8 Proximity Ligation Assay を用いた STX17 ノックダウン細胞における HLA-DR と cVIM の結合の検討

T-75 フラスコで培養した RA 患者の SFs を 2mL のトリプシンで処理して剥離し, 10%非働化 FBS 含有 IMDM を 8mL 加え 500 G 5 分間で遠心した. 遠心後, 上清を除去し, ペレットを 1mL の 10%非働化 FBS 含有 IMDM に溶解させ, 8 well slide chamber に均等に播種し, 10%非働化 FBS 含有 IMDM で培養を行った.

HLA-DR の発現を促進するために 100 ng/mL の IFN- γ (Biolegend) で 72 時間刺激した. また, オートファジーを誘導するため SFs は回収の 2 時間前に無血清培地に置換することで飢餓刺激を与えた. 刺激後, 4%paraformaldehyde を用いて常温で 15 分間インキュベートし, 細胞を固定した. その後 PBS で洗浄し, 70%メタノールに置換して-20°Cで 1 分間インキュベートし, 透過処理を行った. 処理後再度 PBS で洗浄し, Duolink[®]Blocking Solution を用いて 37 °Cで 30 分間インキュベートしブロッキングを行った. Duolink[®]Antibody Diluent で 500 倍希釈した anti-HLA-DR rabbit polyclonal antibody (Abcam)ならびに anti-citrullinated vimentin mouse polyclonal antibody (Cayman Chemical) を 4°Cで over night でインキュベートした. 洗浄の後, Duolink[®]Ligation Buffer で 40 倍希釈した Ligase と 37 °Cで 30 分間インキュベートしライゲーションを行い, その後遮光下で Duolink[®]Amplification buffer を用いて 80 倍希釈した polymerase と 37°Cで 100 分間反応させ増幅反応を行った. 洗浄後, 1%BSA 含有 PBS で 300 nM に希釈した DAPI で常温 5 分間インキュベートし, 核を染色した. スライドを fluorescent mounting medium でカバーし蛍光顕微鏡 BZ-X800 (Keyence) で観察した.

6.3.1.9 Proximity Ligation Assay を用いた CQ 刺激における

HLA-DR と cVIM の結合の検討

T-75 フラスコで培養した RA 患者の SFs を 2mL のトリプシンで処理して剥離し, 10%非働化 FBS 含有 IMDM を 8mL 加え 500 G 5 分間で遠心した. 遠心後, 上清を除去し, ペレットを 1mL の 10%非働化 FBS 含有 IMDM に溶解させ, 8 well slide chamber に均等に播種し, 10%非働化 FBS 含有 IMDM で培養を行った.

HLA-DR の発現を促進するために 100 ng/mL の IFN- γ (Biolegend) で 72 時間刺激した. 最終の 24 時間で CQ (Sigma-Aldrich) 25 μ M を培養液に加え, インキュベートした. また回収前 2 時間で培地を無血清の IMDM に置換して飢餓刺激を与え, オートファジーを誘導した. 刺激後, 4% paraformaldehyde を用いて常温で 15 分間インキュベートし, 細胞を固定した. その後 PBS で洗浄し, 70%メタノールに置換して-20 $^{\circ}$ Cで 1 分間インキュベートし, 透過処理を行った. 処理後再度 PBS で洗浄し, Duolink[®]Blocking Solution を用いて 37 $^{\circ}$ Cで 30 分間インキュベートしブロッキングを行った. Duolink[®]Antibody Diluent で 500 倍希釈した anti-HLA-DR rabbit polyclonal antibody (Abcam)ならびに anti-citrullinated vimentin mouse polyclonal antibody (Cayman Chemical) を 4 $^{\circ}$ Cで over night でインキュベートした. 洗浄の後, Duolink[®]Ligation Buffer で 40 倍希釈した Ligase と 37 $^{\circ}$ Cで 30 分間インキュベートしライゲーションを行い, その後遮光下で Duolink[®]Amplification buffer を用いて 80 倍希釈した polymerase と 37 $^{\circ}$ Cで 100 分間反応させ増幅反応を行った. 洗浄後, 1%BSA 含有 PBS で 300 nM に希釈した DAPI で常温 5 分間インキュベートし, 核を染色した. スライドを fluorescent mounting medium でカバーし蛍光顕微鏡 BZ-X800 (Keyence) で観察した.

6.3.2 p62 阻害によるシトルリン化タンパク質発現量の検討

6.3.2.1 対象患者

2015年4月から2021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、ヘルシンキ宣言に基づいた文書による説明と同意を得られたRA患者を対象とした。すべてのRA患者は、2010年米国リウマチ学会 (American College of Rheumatology: ACR) /欧州リウマチ学会 (European League Against Rheumatism: EULAR) (Aletaha et al., 2010) の分類基準に基づいて診断された。

本研究は北海道大学臨床研究審査委員会 (Hokkaido University Certified Review Board) の承認の下で行った (承認番号 008-0103, 「関節リウマチの滑膜におけるシグナル分子発現およびバイオロジー解明に関する研究」)。

6.3.2.2 siRNA トランスフェクション

RA の SFs を 6 well plate に 1×10^5 細胞/well の密度で播種し一晩インキュベートした。その後, Lipofectamine[®] RNAiMAX (Thermofisher) を用いて p62 siRNA (Thermofisher), またはネガティブコントロール siRNA を 24 時間トランスフェクションさせた。ノックダウン効率は, トランスフェクション後 24 時間の RA-SFs の RT-qPCR 分析, およびトランスフェクション後 48 時間の WB 法によって検証した。

6.3.2.3 p62 ノックダウンによるシトルリン化タンパク質発

現量の確認

RA-SFs を 6 well plate に播種し, Lipofectamine[®] RNAiMAX で RA-SFs に p62 の siRNA を導入した. 導入 24 時間後に, IMDM に培地を交換し 48 時間インキュベートした. その後, PBS (Wako) で洗浄しトリプシンで細胞を剥離してエッペンチューブに回収し, 50 G 5 分間で遠心した. 上澄みを除去しペレットを PBS で洗浄してさらに 50 G 5 分間で遠心し, 再度上澄みを除去した. ペレットに CelLytic M Cell lysis reagent (Sigma-Aldrich) を 20 μ L 添加し, 室温で 15 時間インキュベートした. インキュベート後, 15000 G 10 分間で強遠心を行い, 上澄みをライセートとして回収した. 回収したライセートに Laemmli Buffer x4 (BioRad) および 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) を添加し, 95°C のヒートブロックで 5 分間加熱しサンプルを作成した. 10% アクリルアミドゲルを作成し, 各レーンにアプライした. 100V で 90 分間電気泳動を行い, 終了後に, polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレンに Transfer Buffer 中で 100V 30 分間転写を行った.

転写後のメンブレンは 0.02% BSA in TBST で室温 30 分間のブロッキングを行った. Anti-p62 antibody (abcam) を Signal Enhancer HIKARI Solution A (ナカライテスク) を用いて 500 対 1 で希釈し, 4°C over night でインキュベートした. その後, 2 次抗体として anti-Mouse IgG antibody を Signal Enhancer HIKARI Solution B (ナカライテスク) を用いて 20000 対 1 で希釈し, 4°C over night でインキュベートした. その後, TBS-tween で洗浄し, 検出試薬として enhanced chemiluminescence Western blot detection reagents (GE healthcare) を使用して, LAS-4000 imaging system (Fujifilm) を用いてバンドの観察を行った.

6.3.2.4 統計学的解析

実験 6.4.1.1 および 6.4.1.2 における統計学的評価は ANOVA test を用い, 実験 6.4.1.3 における統計学的評価は Student's t-test で行った. 実験 6.4.2.1 における統計学的評価は Student's t-test で行い, 実験 6.4.2.2 における統計学的評価は ANOVA test を用いた. P 値は 0.05 未満を有意とした. すべての統計解析は GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, U.S.A.) を用いて行った.

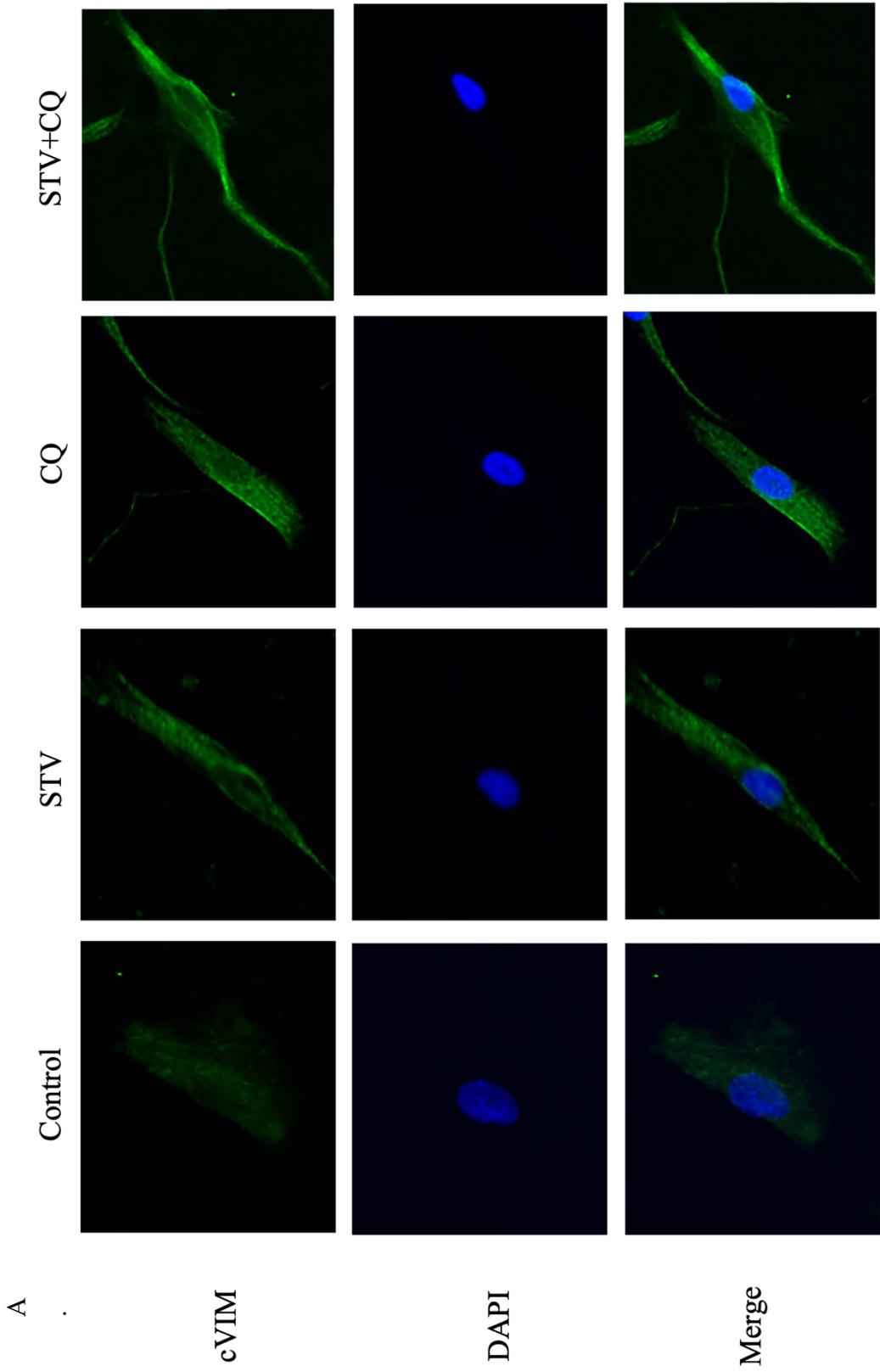
6.4 実験結果

6.4.1 オートリソソーム阻害による cVIM 発現量の検討

6.4.1.1 Chloroquine 刺激による SFs における cVIM 発現量の変化の確認

CQ 25 μ M で 24 時間刺激した場合と、またはオートファジーを誘導するため回収 2 時間前に培地を無血清培地に変更して培養し飢餓刺激を与えた場合とで各条件を組み合わせて免疫染色法ならびに WB 法で cVIM の発現を確認した。免疫染色の結果を Figure 12, WB の結果を Figure13 にそれぞれ示す。CQ 刺激によりリソソーム阻害を行うことで cVIM の発現は有意に増加し、飢餓刺激を与えることでさらに亢進した。

また、今回の免疫染色で使用した RA 患者 5 例のデータを Table 12 に、WB に使用した RA 患者 4 例のデータを Table 13 にそれぞれ示す。



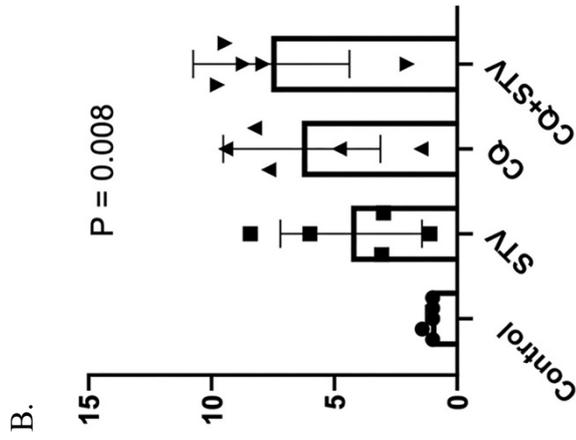


Figure 12. 免疫細胞染色によるSFs内のcVIMの発現の解析

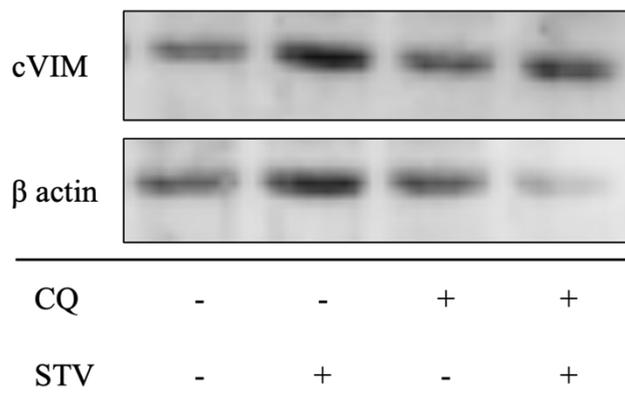
- A. SFsをCQ(25 μ M)で24時間刺激し、最終の2時間を無血清培地(STV)に変更し飢餓刺激を加えた。固定透過処理の後、cVIMおよび核(DAPI)の発現を免疫細胞染色で評価した。CQ刺激と飢餓刺激を両方行うと、コントロールと比較してcVIM(緑)の発現が増加した。
- B. Image Jを用いてpixel毎の蛍光の発現を定量した。コントロールと比較し、CQ(25 μ M)によると飢餓刺激により有意にシグナルが増強した。統計学的評価はone-way ANOVAで行った。

A.

Table 12. RA 患者 5 名の背景

	Age (y)	Sex	Disease duration (y)	CRP (mg/dL)	ESR (mm/h)	RF (IU/mL)	ACPA (U/mL)	DAS28	Treatment
RA1	76	F	28	3.06	57	68.7	292.8	3.6	MTX + PSL
RA2	78	F	10	4.35	83	51.7	> 300	4.4	SASP + IGU + PSL
RA3	70	F	7	0.17	44	18.6	5.3	5.3	SASP + IGU + PSL
RA4	60	F	9	0.11	16	1802.7	> 300	3.1	GLM + PSL
RA5	61	F	15	0.36	7	185	134.2	3.0	TCZ + MTX

M: male, F: female, CRP: C-reactive protein, ESR: erythrocyte sedimentation rate, RF: rheumatoid factor, ACPA: anti-citrullinated peptide antibodies, DAS-28: disease activity score, MTX: methotrexate, BUC: bucillamine, PSL: prednisolone, SASP: salazosulfapyridine, IGU: iguratimod, GLM: golimumab, TCZ: tocilizumab.



B.

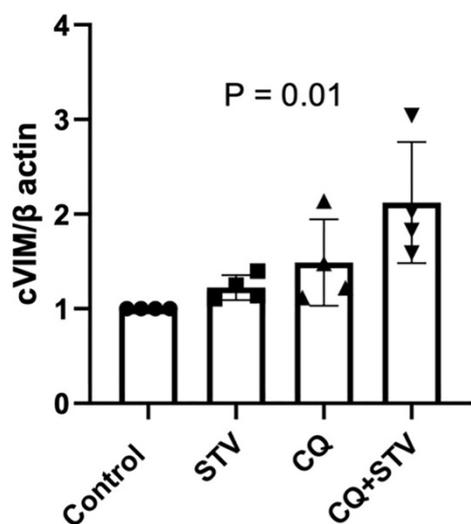


Figure 13. CQ 刺激による cVIM 発現量の変化

- A. CQ (25 μ M) 刺激の有無と飢餓刺激によるオートファジーの誘導の有無の条件を組み合わせて培養した SFs のライセートを用いた WB の結果である.
- B. メンブレンの各バンドを Image J で定量し, cVIM/ β -Actin 比を算出することで各条件間の比較を行った. 統計学的解析には one-way ANOVA で行った.

Table 13. RA 患者 4 名の背景

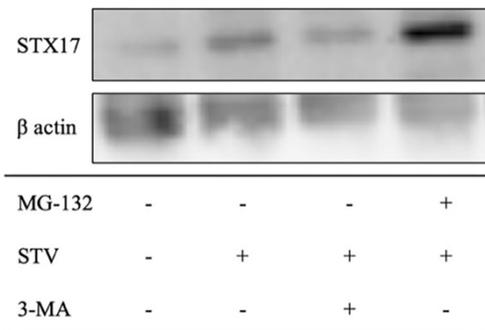
	Age (y)	Sex	Disease duration (y)	CRP (mg/dL)	ESR (mm/h)	RF (IU/mL)	ACPA (U/mL)	DAS28	Treatment
RA1	76	F	28	3.06	57	68.7	292.8	3.6	MTX + PSL
RA2	78	F	10	4.35	83	51.7	> 300.0	4.4	SASP + IGU + PSL
RA3	70	F	7	0.17	44	18.6	5.3	5.3	SASP + IGU + PSL
RA4	61	F	15	0.36	7	185	134.2	3.0	TCZ + MTX

M: male, F: female, CRP: C-reactive protein, ESR: erythrocyte sedimentation rate, RF: rheumatoid factor, ACPA: anti-citrullinated peptide antibodies, DAS-28: disease activity score, MTX: methotrexate, BUC: bucillamine, PSL: prednisolone, SASP: salazosulfapyridine, IGU: iguratimod, TCZ: tocilizumab.

6.4.1.2 WB 法を用いた SFs における STX17 発現の確認

MG-132 (10 μ M) による刺激, または飢餓刺激によりオートファジーを誘導し, 各条件の下で STX17 の発現を確認した (Figure 14). 実験に使用した 3 名の RA 患者を Table 14 に示す.

A.



B.

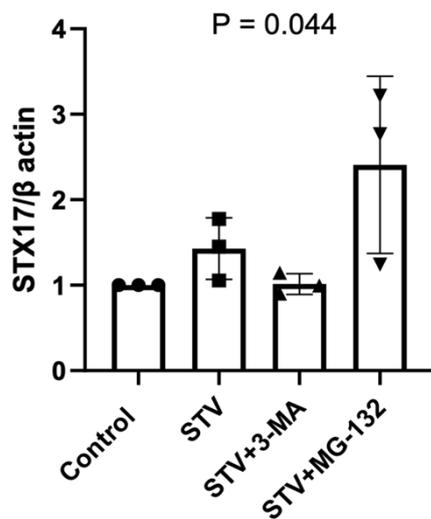


Figure 14. オートファジー亢進による STX17 発現の影響

A. SFs を MG-132 (10 μ M) で 24 時間刺激または無血清培地 (STV) による 2 時間の飢餓刺激によりオートファジーを誘導した. 一方で, 3-MA (5 mM) を添加しオートファジーを阻害しライセートをウエスタンブロットで解析した.

B. A の densitometric analysis. 統計学的解析には ANOVA test を用いた.

STX17: syntaxin 17, STV: starvation, 3-MA: 3-methyladenine.

Table 14. RA 患者 3 名の背景

	Age (y)	Sex	Disease duration (y)	CRP (mg/dL)	ESR (mm/h)	RF (IU/mL)	ACPA (U/mL)	DAS28	Treatment
RA1	76	F	28	3.06	57	68.7	292.8	3.6	MTX + PSL
RA2	70	F	7	0.17	44	18.6	5.3	5.3	SASP + IGU + PSL
RA3	69	M	7	1.19	55	96.8	> 300	4.9	Bari + MTX

M: male, F: female, CRP: C-reactive protein, ESR: erythrocyte sedimentation rate, RF: rheumatoid factor, ACPA: anti-citrullinated peptide antibodies, DAS-28: disease activity score, MTX: methotrexate, PSL: prednisolone, SASP: salazosulfapyridine, IGU: iguratimod, Bari: baricitinib.

6.4.1.3 STX17 siRNA トランスフェクション

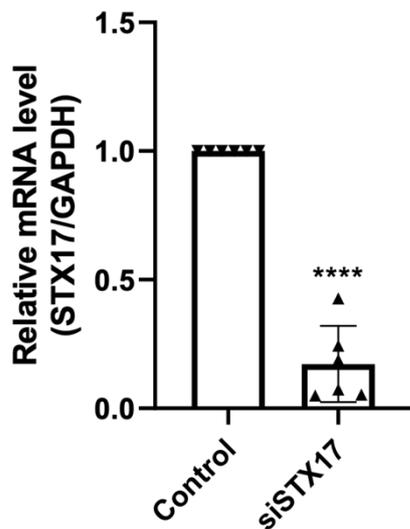
SFs を Lipofectamine RNAiMAX (Thermofisher) を用いて STX17 siRNA (Thermofisher) またはネガティブコントロール siRNA を 24 時間トランスフェクションさせ, STX17 ノックダウン SFs を作成した. ノックダウン効率は, トランスフェクション後 24 時間における SFs の RT-qPCR 分析, およびトランスフェクション後 48 時間の WB 法によって検証した (Figure 15). 使用したプライマーの配列を Table 15 に示す.

また, 実験に使用した RA 患者 6 例の背景を Table 16 に示した.

Table 15. 使用したプライマーの塩基配列

Gene name	Primer
<i>GADPH</i> Forward	5'-GGGAAGCTTGTCATCAATGGA-3'
<i>GADPH</i> Reverse	5'-TCTGGCTCCTGGAAGATGGT-3'
<i>STX17</i> Forward	5'-GGACAAGTTGCATGAAGAGC-3'
<i>STX17</i> Reverse	5'-GTACTAGGTCATCCTTTCGGAC-3'

A.



B.

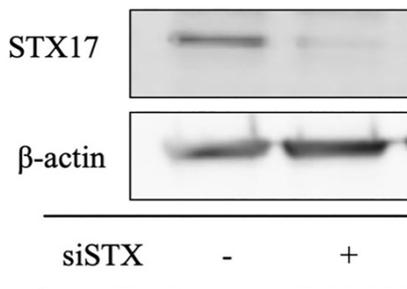


Figure 15. STX17 siRNA のノックダウン効率の評価

A. SFs に対して Lipofectamine RNAiMAX (Thermofisher) を用いて STX17 siRNA (Thermofisher) またはネガティブコントロール siRNA を 24 時間トランスフェクションさせた。その後、IMDM に培地を交換し 24 時間インキュベートした後に回収しライセートを作成した。作成したライセートで cDNA 合成を行いリアルタイム PCR 法で STX17 の発現を評価した。相対的な定量は $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて行い、STX17 の Ct 値を GAPDH 転写物の Ct 値で補正して最終的な定量値を算出した。

B. A と同様の方法で siRNA をトランスフェクションした。その後、IMDM に培地を交換し 48 時間インキュベートした後に回収しライセートを作成し WB 法で STX17 の発現を確認した。

Table 16. RA 患者 6 名の背景

	Age (y)	Sex	Disease duration (y)	CRP (mg/dL)	ESR (mm/h)	RF (IU/mL)	ACPA (U/mL)	DAS28	Treatment
RA1	76	F	28	3.06	57	68.7	292.8	3.6	MTX + PSL
RA2	78	F	10	4.35	83	51.7	> 300	4.4	SASP + IGU + PSL
RA3	70	F	7	0.17	44	18.6	5.3	5.3	SASP + IGU + PSL
RA4	60	F	9	0.11	16	1802.7	> 300	3.1	GLM + PSL
RA5	69	M	7	1.19	55	96.8	> 300	4.9	Bari + MTX
RA6	61	F	15	0.36	7	185	134.2	3.0	TCZ + MTX

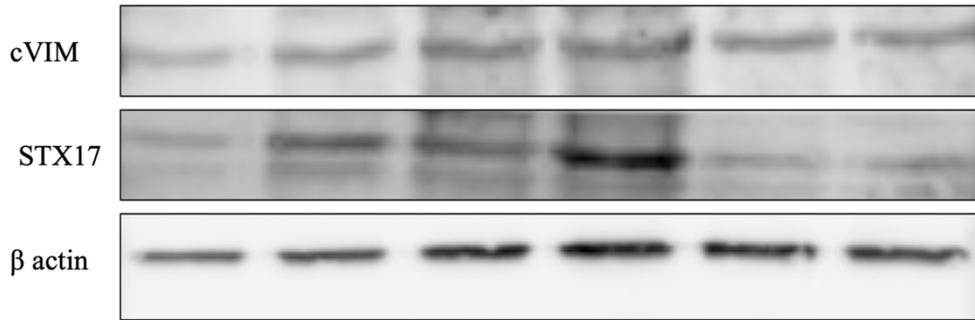
M: male, F: female, CRP: C-reactive protein, ESR: erythrocyte sedimentation rate, RF: rheumatoid factor, ACPA: anti-citrullinated peptide antibodies, DAS-28: disease activity score, MTX: methotrexate, BUC: bucillamine, PSL: prednisolone, SASP: salazosulfapyridine, IGU: iguratimod, GLM: golimumab, Bari: baricitinib, TCZ: tocilizumab.

6.4.1.4 STX17 ノックダウンによる cVIM 発現量変化の評価

STX17 のノックダウンによる cVIM の発現量の変化を評価するために WB 法で評価した. 実験に用いた RA 患者 2 例のデータを Table 17 に示す.

MG-132 (10 μ M) 24 時間による刺激や無血清培地 2 時間による飢餓刺激によるオートファジーの誘導により cVIM の増加が認められた. 一方で, siSTX17 ノックダウン細胞とコントロールにおいて cVIM 発現量に差は認められなかった (Figure 16).

A.



MG-132	-	-	-	-	+	+
STV	-	-	+	+	-	-
siSTX17	-	+	-	+	-	+

B.

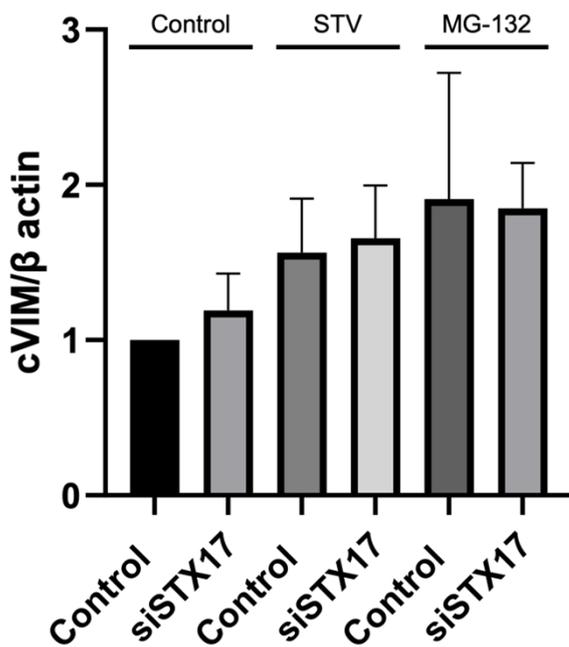


Figure 16. STX17 ノックダウン細胞とコントロールにおける cVIM 発現量の比較

MG-132 (10 μM)や飢餓刺激によるオートファジーの誘導で cVIM の発現量は増加する傾向を認めたが, STX17 ノックダウンによっては cVIM の発現に差は認められなかった.

cVIM: citrullinated vimentin, STV: starvation, STX17: syntaxin17

Table 17. RA 患者 2 名の背景

	Age (y)	Sex	Disease duration (y)	CRP (mg/dL)	ESR (mm/h)	RF (IU/mL)	ACPA (U/mL)	DAS28	Treatment
RA1	76	F	28	3.06	57	68.7	292.8	3.6	MTX + PSL
RA2	66	F	12	1.36	4	185	134.2	2.7	MTX + PSL

M: male, F: female, CRP: C-reactive protein, ESR: erythrocyte sedimentation rate, RF: rheumatoid factor, ACPA: anti-citrullinated peptide antibodies, DAS-28: disease activity score, MTX: methotrexate, PSL: prednisolone.

6.4.1.5 Proximity Ligation Assay を用いた STX17 ノックダウン細胞における HLA-DR と cVIM の結合の検討

cVIM と HLA-DR の共発現を Proximity Ligation Assay で評価した。SFs を IFN- γ (100 ng/mL) で 72 時間刺激し, HLA-DR の発現を促進した。そして, 最終の 2 時間を無血清培地で培養し飢餓刺激を与えた。また, オートファジー阻害薬である 3-MA (5 mM) による刺激をそれぞれ行った。ライゲーシオン後に撮像した蛍光顕微鏡の結果を Figure 17 に示す。

また, 実験に用いた RA 患者 1 例を Table 18 に示す。

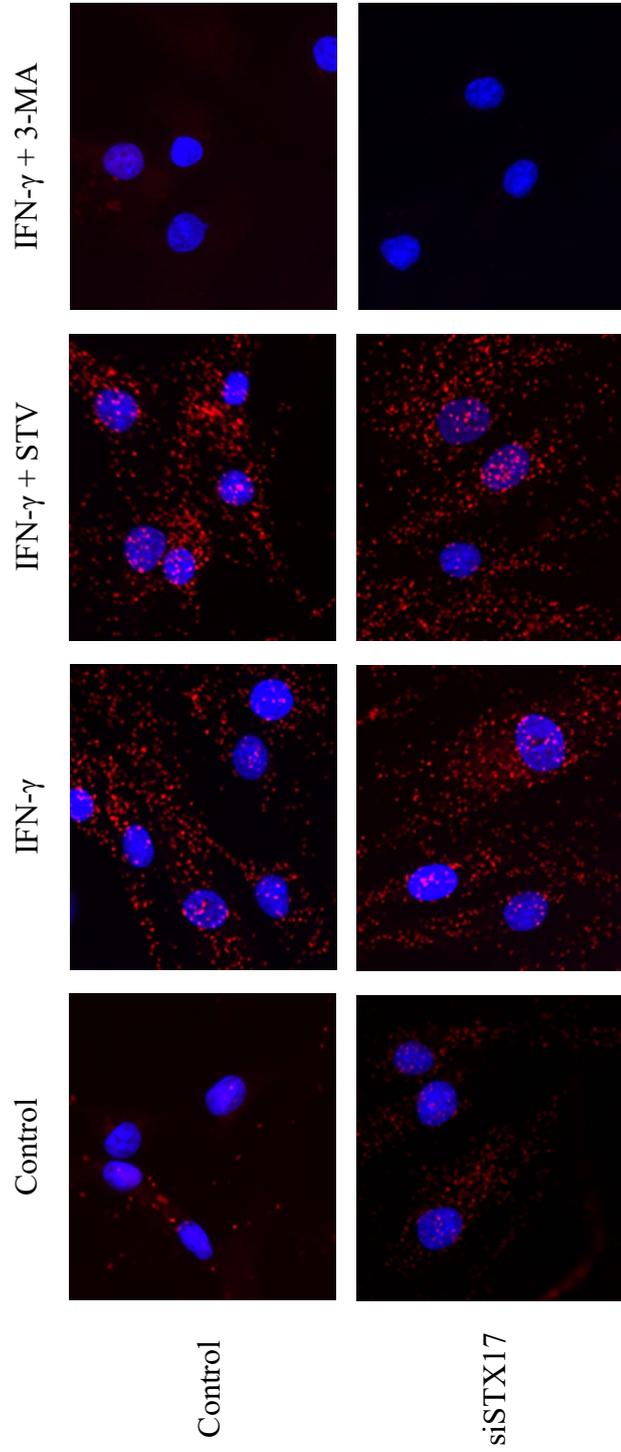


Figure 17. Proximity ligation assay による HLA-DR/cVIM の複合体の評価

SFs を 100 ng/mL の IFN- γ で 72 時間刺激し、最終の 2 時間無血清培地で飢餓刺激を加えた。固定透過処理の後、HLA-DR/シトルリン化ビメンチンの共局在を Proximity ligation assay で評価した。IFN- γ 刺激下で無血清培地による飢餓刺激を加えると、HLA-DR/cVIM の共局在が増強され、3-MA により阻害された。これらの結果は、STX17 ノックダウン細胞とコントロールとの間で明らかかな差は認められなかった。

cVIM: citrullinated vimentin, IFN- γ : interferon-gamma, 3-MA: 3-methyladenine, STX17: syntaxin 17, HLA: human leukocyte antigen

Table 18. RA 患者 1 名の背景

	Age (y)	Sex	Disease duration (y)	CRP (mg/dL)	ESR (mm/h)	RF (IU/mL)	ACPA (U/mL)	DAS28	Treatment
RAI	76	F	28	3.06	57	68.7	292.8	3.6	MTX + PSL

M: male, F: female, CRP: C-reactive protein, ESR: erythrocyte sedimentation rate, RF: rheumatoid factor, ACPA: anti-citrullinated peptide antibodies, DAS-28: disease activity score, MTX: methotrexate, PSL: prednisolone.

6.4.1.6 Proximity Ligation Assay を用いた CQ 刺激における

HLA-DR と cVIM の結合の検討

cVIM と HLA-DR の共発現を Proximity Ligation Assay で評価した。SFs を IFN- γ (100 ng/mL) で 72 時間刺激し, HLA-DR の発現を促進した。そして, 最終の 24 時間を CQ (25 μ M) で刺激を加えた。また, 無血清培地による飢餓刺激やオートファジー阻害薬である 3-MA (5 mM) による刺激をそれぞれ行った。ライゲーション後に撮像した蛍光顕微鏡の結果を Figure 18 に示す。また, 実験に用いた RA 患者 1 例を Table 19 に示す。

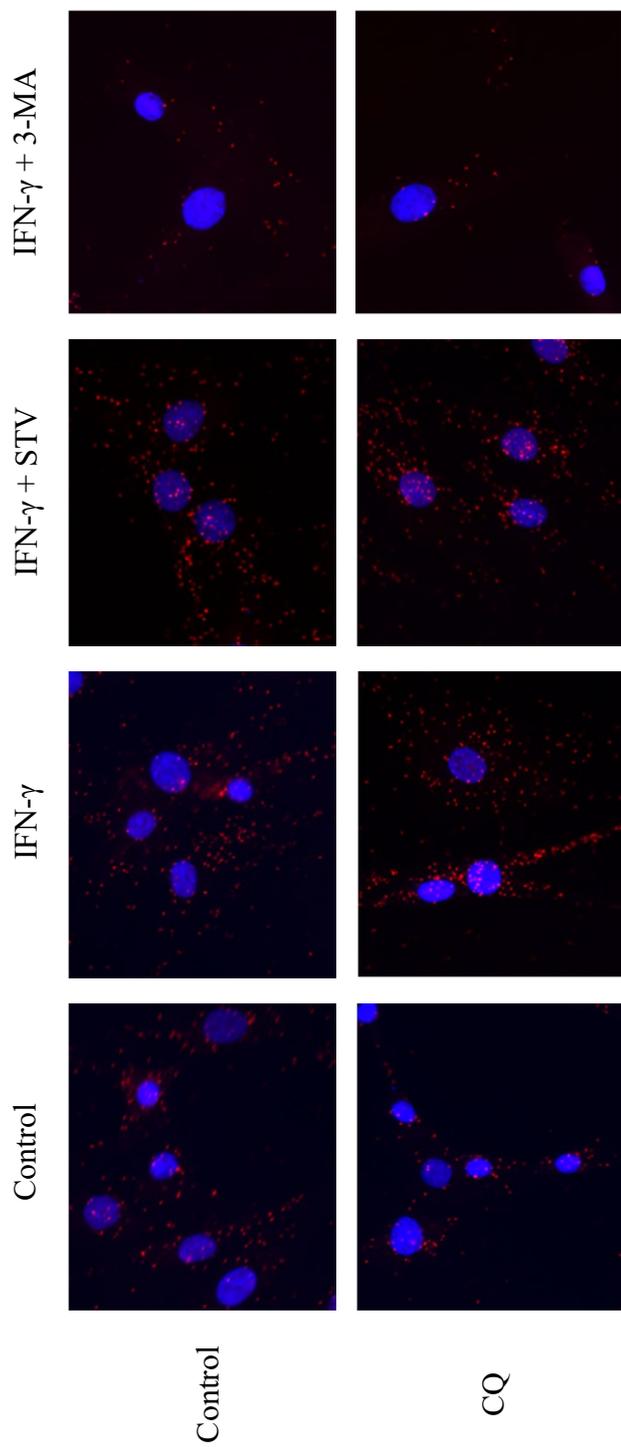


Figure 18. Proximity ligation assay における CQ 刺激の有無による HLA-DR/cVIM の複合体の評価

SFs を 100 ng/mL の IFN- γ で 72 時間刺激し、最終の 24 時間を CQ 25 μ M で刺激した。また、回収の 2 時間前に無血清培地 (STV) で飢餓刺激を加えた。固定透過処理の後, HLA-DR/シトルリン化ビメンチンの共局在を Proximity ligation assay で評価した。IFN- γ 刺激下で無血清培地による飢餓刺激を加えると, HLA-DR/cVIM の共局在が増強され, 3-MA により阻害された。これらの結果は, CQ 刺激の有無で明らかな差は認められなかった。CQ: chloroquine, cVIM: citrullinated vimentin, IFN- γ : interferon-gamma, 3-MA: 3-methyladenine, STV: starvation, HLA: human leukocyte antigen

Table 19. RA 患者 1 名の背景

	Age (y)	Sex	Disease duration (y)	CRP (mg/dL)	ESR (mm/h)	RF (IU/mL)	ACPA (U/mL)	DAS28	Treatment
RA1	69	M	7	1.19	55	96.8	> 300	4.9	Bari + MTX

M: male, F: female, CRP: C-reactive protein, ESR: erythrocyte sedimentation rate, RF: rheumatoid factor, ACPA: anti-citrullinated peptide antibodies, DAS-28: disease activity score, MTX: methotrexate, Bari: baricitinib.

6.4.2 p62 阻害によるシトルリン化タンパク質発現量の検討

6.4.2.1 p62 siRNA トランスフェクション

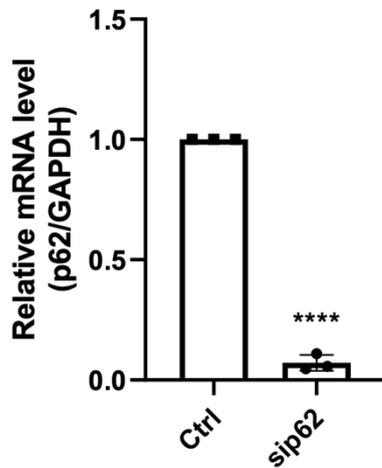
SFs を Lipofectamine RNAiMAX (Thermofisher) を用いて p62 siRNA (Thermofisher) またはネガティブコントロール siRNA を 24 時間トランスフェクションさせ、p62 ノックダウン SFs を作成した。ノックダウン効率は、トランスフェクション後 24 時間における SFs の RT-qPCR 分析、およびトランスフェクション後 48 時間の WB 法によって検証した (Figure 19)。使用したプライマーの配列を Table 20 に示す。

また、実験に使用した RA 患者 3 例の背景を Table 21 に示した。

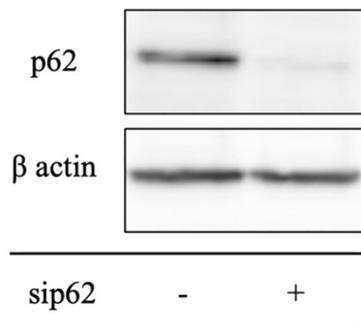
Table 20. 使用したプライマーの塩基配列

Gene name	Primer
<i>GADPH</i> Forward	5'-GGGAAGCTTGTCATCAATGGA-3'
<i>GADPH</i> Reverse	5'-TCTGGCTCCTGGAAGATGGT-3'
<i>p62</i> Forward	5'-AAGCCGGGTGGGAATGTTG-3'
<i>p62</i> Reverse	5'-GCTTGGCCCTTCGGATTCT-3'

A.



B.



C.

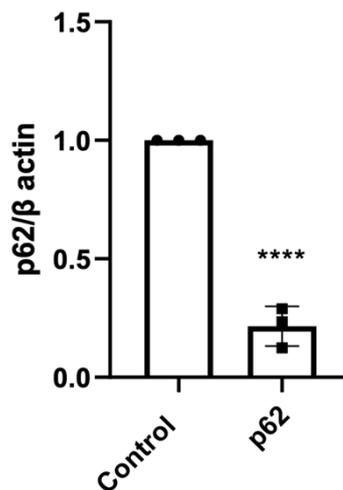


Figure 19. p62 siRNA のノックダウン効率の評価

A. SFs に対して p62 siRNA (Thermofisher) またはネガティブコントロール siRNA を 24 時間トランスフェクションさせた. その後, IMDM に培地を交換し 24 時間インキュベートした後に回収しライセートを作成した. 作成したライセートで cDNA 合成を行いリアルタイム PCR 法で p62 の発現を評価した. 相対的な定量は $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて行い, p62 の Ct 値を GAPDH 転写物の Ct 値で補正して最終的な定量値を算出した. B. A と同様の方法で siRNA をトランスフェクションした. その後 IMDM に培地を交換し 48 時間インキュベートした後に回収しライセートを作成し WB 法で p62 の発現を確認した. C. B の densitometric analysis. 統計学的解析には student's t test を用いた. ****: $p < 0.01$.

Table 21. RA 患者 3 名の背景

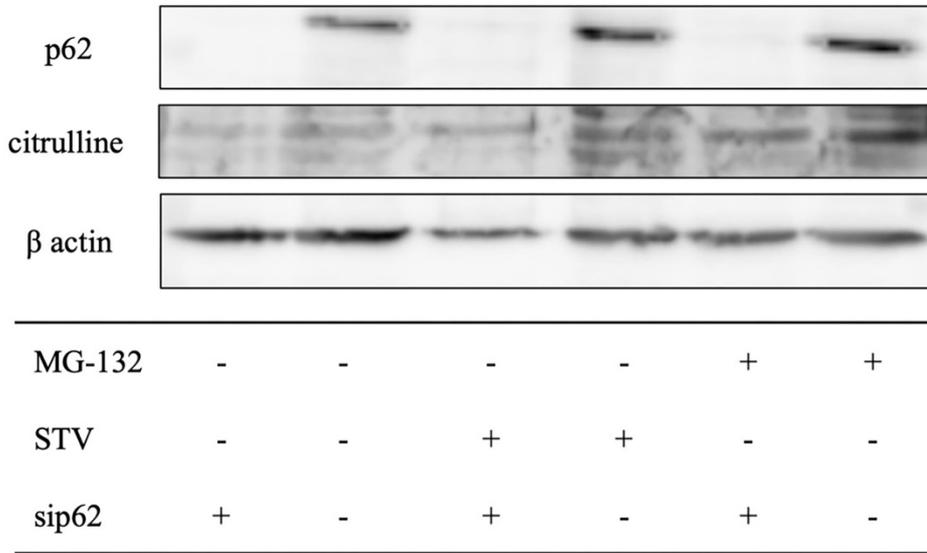
	Age (y)	Sex	Disease duration (y)	CRP (mg/dL)	ESR (mm/h)	RF (IU/mL)	ACPA (U/mL)	DAS28	Treatment
RA1	76	F	28	3.06	57	68.7	292.8	3.6	MTX + PSL
RA2	60	F	9	0.11	16	1802.7	> 300	3.1	GLM + PSL
RA3	66	F	12	1.36	4	185	134.2	2.7	MTX + PSL

M: male, F: female, CRP: C-reactive protein, ESR: erythrocyte sedimentation rate, RF: rheumatoid factor, ACPA: anti-citrullinated peptide antibodies, DAS-28: disease activity score, MTX: methotrexate, PSL: prednisolone, GLM: golimumab.

6.4.2.2 p62 ノックダウンによるシトルリン化タンパク質発現量の評価

p62 のノックダウンによるシトルリン化タンパク質の発現量の変化を評価するために WB 法で評価した. 実験に用いた RA 患者 6 例のデータを Table 22 に示す. MG-132 (10 μ M) 24 時間による刺激および無血清培地 2 時間による飢餓刺激によるオートファジーの誘導によりシトルリンの増加が認められた. 一方で, p62 ノックダウン細胞とコントロールにおいて, 飢餓刺激により軽度シトルリン化タンパク質の発現量は低下したが統計学的な差は認められなかった (Figure 20).

A.



B.

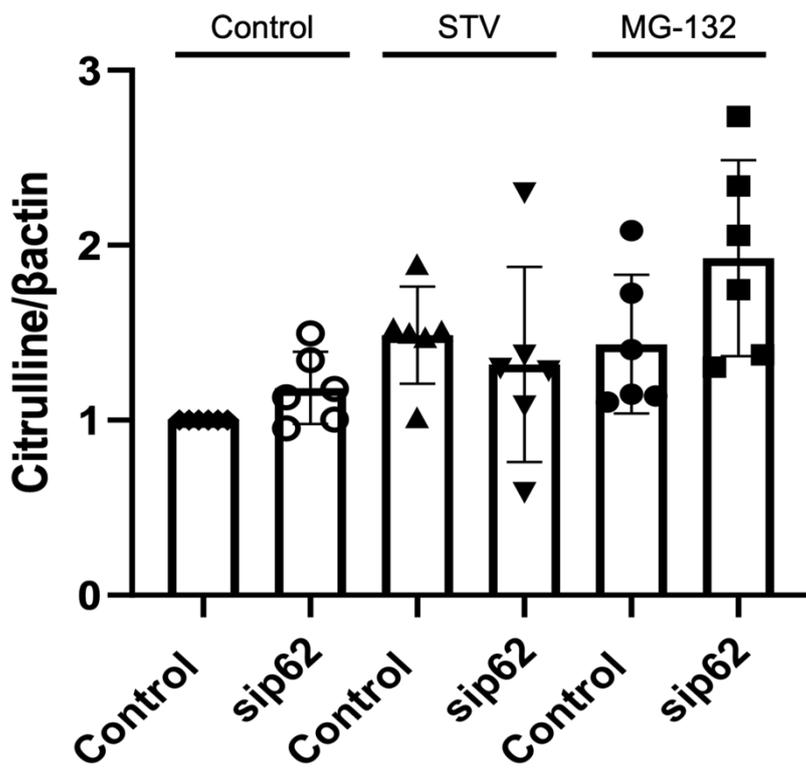


Figure 20. p62 ノックダウン細胞とコントロールにおけるシトルリンの比較

A. MG-132 (10 μ M) や飢餓刺激によるオートファジーの誘導でシトルリンの発現量は増加する傾向を認めた. 一方で, 飢餓刺激時において p62 ノックダウン細胞はコントロールと比べてややシトルリンの発現低下が認められたが, 統計学的な差は認められなかった. B. A の densitometric analysis.

STV: starvation.

Table 22. RA 患者 6 名の背景

	Age (y)	Sex	Disease duration (y)	CRP (mg/dL)	ESR (mm/h)	RF (IU/mL)	ACPA (U/mL)	DAS28	Treatment
RA1	76	F	28	3.06	57	68.7	292.8	3.6	MTX + PSL
RA2	78	F	10	4.35	83	51.7	> 300	4.4	SASP + IGU + PSL
RA3	70	F	7	0.17	44	18.6	5.3	5.3	SASP + IGU + PSL
RA4	60	F	9	0.11	16	1802.7	> 300	3.1	GLM + PSL
RA5	69	M	7	1.19	55	96.8	> 300	4.9	Bari + MTX
RA6	66	F	12	1.36	4	185	134.2	2.7	MTX + PSL

M: male, F: female, CRP: C-reactive protein, ESR: erythrocyte sedimentation rate, RF: rheumatoid factor, ACPA: anti-citrullinated peptide antibodies, DAS-28: disease activity score, MTX: methotrexate, PSL: prednisolone, SASP: salazosulfapyridine, IGU: iguratimod, GLM: golimumab, Bari: baricitinib.

6.5 考察

本研究において、我々はオートファジーとシトルリン化タンパク質の産生機序の解明を目的に実験を行った。まず、オートファジーフラックスの最終段階であるオートファゴソームとリソソームとの融合に着目し、CQ 刺激および Syntaxin 17 (STX17) ノックダウン細胞によりそれぞれオートリソソームへの形成を阻害することでリソソームとシトルリン化との関わりについて調べることにした。STX17 は、オートファジーに関与する小胞体常在 SNARE タンパク質である。STX17 は形成途中のオートファゴソームには局在せず、成熟したオートファゴソームの外膜に取り込まれ、細胞質 SNAP29 (Synaptosomal-associated protein 29kDa) やリソソーム VAMP8 (Vesicle Associated Membrane Protein 8) と相互作用し、オートファゴソームとリソソームの融合を促進することが研究により示されている (Xian et al., 2019)。また、STX17 のノックダウンによりオートファゴソームの内容物は分解されずに蓄積することから STX17 はオートファゴソームとリソソームとの融合に必須であると考えられている (Itakura et al., 2012)。今回、オートファゴソームとリソソームとの融合について、CQ 刺激においてはシトルリン化ビメンチンの産生が増加したものの STX17 のノックダウンにおいては差が認められなかった。また、シトルリン化ビメンチンと HLA-DR との共局在に関して、これらの細胞において明らかな減少は認められなかった。この結果からは、ビメンチンはオートファゴソームがリソソームと融合される前にシトルリン化を受けており、また、オートファゴソームの段階で HLA-DR と共局在している可能性が示唆された。これは、先行研究におけるシトルリン化ビメンチンが Full-length の状態で HLA-DR と共局在していたとする結果 (Sugawara et al., 2020) を支持するものである。MHC クラス II 分子には小胞体内でミスフォールドタンパク質と結合すると、それらを分解せずに細胞外へ輸送するという報告 (Jiang et al., 2013) もあり、RA-SFs においては、シトルリン化ビメンチンは分解を受けずに MHC クラス II 分子へとオートファジーによって輸送されることで抗原提示される可能性がある。RASFs においては慢性炎症状態の環境下で IFN- γ などの炎症性サイトカインによる刺激がされることで、非炎症環境において本来発現しないはずの MHC クラス II 分子が発現誘導されてしまっていることも ACPA 産生に関わっていると考えられる。

次に、我々は選択的オートファジーに関わるタンパク質である、p62 に着目して、それらとタンパク質のシトルリン化との関わりについて調べることにした。p62 はユビキチン鎖を認識して特異的なタンパク質やオルガネラをオートファジーへと導く受容体タンパク質である p62 の機能解析によりオートファゴソーム局在タンパク質である LC3 と相互作用することや、RA をはじめとする炎症性

疾患においても重要な酸化ストレス応答システムである Keap1-Nrf2 経路との関連も知られている。その生理機能に関して、未解明な部分も多いが、近年 p62 顆粒が機能的液滴であることが示唆されている。また、当研究室においては、p62 の RA-SFs におけるストレス誘発性細胞死の制御 (Kato et al., 2014) や、TNF- α と IFN- γ による p62 発現増加 (Lee et al., 2020) を報告しており、RA 病態形成への関与が示唆されている。siRNA により p62 をノックダウンした細胞を作成し、シトルリン化タンパク質の産生量の違いを評価した。本研究では、p62 のノックダウンによって飢餓刺激によりシトルリン化タンパク質の産生量はやや低下したが、統計学的に有意な差は認められなかった。この原因としては、p62 がシトルリン化への必要十分条件ではなくその他のタンパク質などとの相互作用により生じる可能性や、残存した p62 による効果の可能性、試薬によるオフターゲット効果などが考えられる。これらに関して、今後は p62 と同様に選択的オートファジーに関わっているとされる optineurin や NBR1 のノックダウンによる評価や、複数の siRNA を用いた検討、これらのタンパク質を同時にノックダウンして評価することを予定している。また、PAD 阻害薬によるシトルリン化タンパク質の発現量の変化などオートファゴソーム内における PAD の関与について検討していく予定である。

6.6 結語

本研究において, RA-SFs 内でビメンチンはオートリソソームの形成以前にシトルリン化を受けており, MHC class II 分子と共局在していることが明らかとなった. また, 選択的オートファジーに関わるタンパク質である p62 のノックダウンによってはシトルリンの有意な産生低下は認められず, オートファジーによるシトルリン化の亢進には複数の分子が関わっている可能性が示唆された.

7. 総括および結論

本研究では、第一章では RA 患者の合併症に関する臨床研究を行った。第一章の第一節では、RA 患者における疾患活動性の持続が血栓症発症と関連があることを示した。第二節では RA 患者におけるニューモシスチス肺炎の発生率とその SASP における一次予防の有用性について検証した。

また、第二章では、RA-SFs におけるシトルリン化産生機序の研究を行った。本研究から得られた新知見は以下の通りである。

第一章

第一節

- RA 患者における VTE 発症のリスク因子として既知の年齢や BMI の他に、time-averaged DAS28CRP が高いことが明らかとなった。
- time-averaged DAS28 は経時的な慢性炎症を反映していると言われており、RA の疾患活動性をコントロールすることは、RA そのものによる骨破壊や関節の変形のみならず、血栓症という合併症の発症も抑えられる可能性が示唆された。

第二節

- RA 患者におけるニューモシスチス肺炎の一次予防に SASP が有用であることが明らかとなった。
- SASP は他の DMARDs と比較して、高齢者や肺疾患などリスクが高い患者に使用される傾向にあることが示された。
- SASP の有害事象はほとんどが軽症であり、高齢者や合併症が多い患者においても比較的安全に使用できる可能性があることが明らかとなった。

第二章

- RA-SFs 内においてビメンチンのシトルリン化はオートリソソーム形成以前に起きており、オートファゴソームが完成するまでの段階で生じていることが明らかとなった。
- また、cVIM と MHC class II との共局在はオートファゴソームの段階で生じていることが明らかとなった。

今後の課題として、今回の RA 合併症に関する臨床研究はいずれも後ろ向き

研究であり，結果を前向き研究によってより交絡因子を排除した上で因果関係を検証する必要がある．また，オートファジーとシトルリン化タンパク質の産生機序ならびにシトルリン化ビメンチンの抗原提示に及ぼす影響は未解明であり，今後の研究課題である．

8. 謝辞

本論文は筆者が北海道大学大学院医学研究院免疫・代謝内科学教室博士課程に在籍中の研究結果をまとめたものです。同分野教授である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頂き、その遂行にあたって終始ご指導を頂きました。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 加藤将先生には本研究の遂行にあたり、仮説の立案から終始熱心な指導ならびに適切なお助言を頂きました。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 Olga Amengual 先生、助教 藤枝雄一郎先生、助教 河野 通仁先生、助教 久田 諒先生には研究の遂行にあたり、日頃より有益なお討論、お助言を頂きました。同期の大学院生の菅原正成先生は臨床・研究のどちらにおいても深い知識と高い意欲を持っておられ、常に切磋琢磨しあえる大事な仲間でした。蜷川慶太先生は実験グループの先輩として、多方面にわたりご指導頂き、大変感謝しております。工藤友喜大学院生は私が実験を始めた当初から実験の先輩としてサポートして頂き、大変感謝しております。また、ご卒業された大西直樹先生、尾形裕介先生、阿部靖矢先生、狩野皓平先生、下山修平先生、麻生邦之先生、佐藤太貴先生、大学院生の竹山脩平先生、垂水政人先生、小住由衣先生、Jiang Wei 先生、崎山広大先生、多田麻里亜先生、土田真央先生、安田充孝先生、守谷悠先生、西野慶先生、鎌田和郎先生、沖庸太郎先生はともに学び励ましあい大学院生活の支えとなってくれました。心より感謝申し上げます。特に蜷川慶太先生、工藤友喜大学院生は同じ研究グループとして長く苦楽を共にした大切な同僚であり、大学院生活を続ける中でとても大きな助けになってくれて、大変感謝しております。阿部靖矢先生も日頃の実験の悩みを聞いて頂き、アドバイスを頂いて大変感謝しております。

当科実験助手の金子由美子さん、石倉唯さん、寿楽弘子さん、藤田雄介さん、のご協力なしには実験を遂行することは不可能でした。心より感謝申し上げます。この他にも、この論文作成にあたりご協力・ご指導・お助言を頂きました。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申し上げます。

また、両親ならびに弟には見守り、励ましなど大きなサポートを頂いたこと、大変感謝しております。

最後に、妻の麻里にはいつも陰ながら心配しつつも応援してもらい、とても励みになりました。この場を借りて日頃の感謝を記させていただきます。

9. 利益相反

本研究に際し、開示すべき利益相反状態はありません。

10. 引用文献

Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, *et al.* (2010). 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 62, 2569-81.

American Diabetes Association Professional Practice Committee. (2022). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. *Diabetes Care* 45, S17-S38.

Authors/Task Force Members; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG); ESC National Cardiac Societies. (2019). 2019 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 290, 140-205.

Bisoendial RJ, Levi M, Tak PP, and Stoes ES. (2010). The prothrombotic state in rheumatoid arthritis: an additive risk factor for adverse cardiovascular events. *Semin. Thromb. Hemost.* 36, 452-7.

Bondy SJ, Victor JC, and Diemert LM. (2009). Origin and use of the 100 cigarette criterion in tobacco surveys. *Tob. Control* 18, 317-23.

Borensztajn, K. S., von der Thusen, J. H., and Spek, C. A. (2011). The role of coagulation in chronic inflammatory disorders: a jack of all trades. *Curr. Pharm. Des.* 17, 9-16.

Bottini, N., and Firestein, G. S. (2013). Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat. Rev. Rheumatol.* 9, 24-33.

Choi, H. K., Rho, Y. H., Zhu, Y., Cea-Soriano, L., Avina-Zubieta, J. A., and Zhang, Y. (2013). The risk of pulmonary embolism and deep vein thrombosis in rheumatoid arthritis: a UK population-based outpatient cohort study. *Ann. Rheum. Dis.* 72, 1182-7.

Chung, W. S., Peng, C. L., Lin, C. L., Chang, Y. J., Chen, Y. F., Chiang, J. Y., Sung, F.

C., and Kao, C. H. (2014). Rheumatoid arthritis increases the risk of deep vein thrombosis and pulmonary thromboembolism: a nationwide cohort study. *Ann. Rheum. Dis.* *73*, 1774-80.

Crous-Bou, M., Harrington, L. B., and Kabrhel, C. (2016). Environmental and Genetic Risk Factors Associated with Venous Thromboembolism. *Semin. Thromb. Hemost.* *42*, 808-820.

Fox, E. A., and Kahn, S. R. (2005). The relationship between inflammation and venous thrombosis. A systematic review of clinical studies. *Thromb. Haemost.* *94*, 362-5.

Fuhrmann, J., and Thompson, P. R. (2016). Protein Arginine Methylation and Citrullination in Epigenetic Regulation. *ACS Chem. Biol.* *11*, 654-68.

Gao, Q., Zhang, P., Wang, W., Ma, H., Tong, Y., Zhang, J., and Lu, Z. (2016). The correlation analysis of tumor necrosis factor-alpha-308G/A polymorphism and venous thromboembolism risk: A meta-analysis. *Phlebology* *31*, 625-31.

Germic, N., Frangez, Z., Yousefi, S., and Simon, H. U. (2019). Regulation of the innate immune system by autophagy: monocytes, macrophages, dendritic cells and antigen presentation. *Cell Death Differ.* *26*, 715-727.

Ghembaza, A., Vautier, M., Cacoub, P., Pourcher, V., and Saadoun, D. (2020). Risk Factors and Prevention of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in Patients With Autoimmune and Inflammatory Diseases. *Chest* *158*, 2323-2332.

Green, H., Paul, M., Vidal, L., and Leibovici, L. (2007). Prophylaxis of *Pneumocystis pneumonia* in immunocompromised non-HIV-infected patients: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Mayo Clin. Proc.* *82*, 1052-9.

Harigai, M., Koike, R., Miyasaka, N., and Pneumocystis Pneumonia under Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy Study, G. (2007). *Pneumocystis pneumonia* associated with infliximab in Japan. *N. Engl. J. Med.* *357*, 1874-6.

Holmqvist, M. E., Neovius, M., Eriksson, J., Mantel, A., Wallberg-Jonsson, S., Jacobsson, L. T., and Askling, J. (2012). Risk of venous thromboembolism in patients

with rheumatoid arthritis and association with disease duration and hospitalization. *JAMA* 308, 1350-6.

Hong, Y. L., Hossler, P. A., Calhoun, D. H., and Meshnick, S. R. (1995). Inhibition of recombinant *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthetase by sulfa drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1756-63.

Hoy, Z., Wright, T. W., Elliott, M., Malone, J., Bhagwat, S., Wang, J., and Gigliotti, F. (2020). Combination Immunotherapy with Passive Antibody and Sulfasalazine Accelerates Fungal Clearance and Promotes the Resolution of *Pneumocystis*-Associated Immunopathogenesis. *Infect. Immun.* 88.

Hu, L. J., Ji, B., and Fan, H. X. (2021). Venous thromboembolism risk in rheumatoid arthritis patients: a systematic review and updated meta-analysis. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 25, 7005-7013.

Itakura, E., Kishi-Itakura, C., and Mizushima, N. (2012). The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* 151, 1256-69.

Jiang, Y., Arase, N., Kohyama, M., Hirayasu, K., Suenaga, T., Jin, H., Matsumoto, M., Shida, K., Lanier, L. L., Saito, T., and Arase, H. (2013). Transport of misfolded endoplasmic reticulum proteins to the cell surface by MHC class II molecules. *Int. Immunol.* 25, 235-46.

Kadura, S., and Raghu, G. (2021). Rheumatoid arthritis-interstitial lung disease: manifestations and current concepts in pathogenesis and management. *Eur. Respir. Rev.* 30, 210011

Kageyama, S., Gudmundsson, S. R., Sou, Y. S., Ichimura, Y., Tamura, N., Kazuno, S., Ueno, T., Miura, Y., Noshiro, D., Abe, M., et al. (2021). p62/SQSTM1-droplet serves as a platform for autophagosome formation and anti-oxidative stress response. *Nat. Commun.* 12, 16.

Kang, B. J., Lee, Y. K., Kim, H. J., Ha, Y. C., and Koo, K. H. (2011).. Deep venous thrombosis and pulmonary embolism are uncommon in East Asian patients after total

hip arthroplasty. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 469, 3423-8.

Kang, J. H., Keller, J. J., Lin, Y. K., and Lin, H. C. (2012). A population-based case-control study on the association between rheumatoid arthritis and deep vein thrombosis. *J. Vasc. Surg.* 56, 1642-8.

Kato, E., Sawada, T., Tahara, K., Hayashi, H., Tago, M., Mori, H., Nishino, J., Matsui, T., and Tohma, S. (2017). The age at onset of rheumatoid arthritis is increasing in Japan: a nationwide database study. *Int. J. Rheum. Dis.* 20, 839-845.

Kato, M., Ospelt, C., Gay, R. E., Gay, S., and Klein, K. (2014). Dual role of autophagy in stress-induced cell death in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheumatol.* 66, 40-8.

Ketfi, C., Boutigny, A., Mohamedi, N., Bouajil, S., Magnan, B., Amah, G., and Dillinger, J. G. (2021). Risk of venous thromboembolism in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 88, 105122.

Khan, D. A., Knowles, S. R., and Shear, N. H. (2019). Sulfonamide Hypersensitivity: Fact and Fiction. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 7, 2116-2123.

Khan, F., Tritschler, T., Kahn, S. R., and Rodger, M. A. (2021). Venous thromboembolism. *Lancet* 398, 64-77.

Kidney Disease: Improving Global Outcomes Blood Pressure Work, G. (2021). KDIGO 2021 Clinical Practice Guideline for the Management of Blood Pressure in Chronic Kidney Disease. *Kidney Int.* 99, S1-S87.

Kim, S. C., Schneeweiss, S., Liu, J., and Solomon, D. H. (2013). Risk of venous thromboembolism in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res. (Hoboken)* 65, 1600-7.

Klareskog, L., Catrina, A. I., and Paget, S. (2009). Rheumatoid arthritis. *Lancet* 373, 659-72.

Klein, K., and Gay, S. (2015). Epigenetics in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin.*

Rheumatol. 27, 76-82.

Kuhn, K. A., Kulik, L., Tomooka, B., Braschler, K. J., Arend, W. P., Robinson, W. H., and Holers, V. M. (2006). Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis. *J. Clin. Invest.* 116, 961-73.

Kunutsor, S. K., Seidu, S., Blom, A. W., Khunti, K., and Laukkanen, J. A. (2017). Serum C-reactive protein increases the risk of venous thromboembolism: a prospective study and meta-analysis of published prospective evidence. *Eur. J. Epidemiol.* 32, 657-667.

Lee, W. S., Kato, M., Sugawara, E., Kono, M., Kudo, Y., Kono, M., Fujieda, Y., Bohgaki, T., Amengual, O., Oku, K., et al. (2020). Protective Role of Optineurin Against Joint Destruction in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. *Arthritis Rheumatol.* 72, 1493-1504.

Li, L., Lu, N., Avina-Galindo, A. M., Zheng, Y., Lacaille, D., Esdaile, J. M., Choi, H. K., and Avina-Zubieta, J. A. (2021). The risk and trend of pulmonary embolism and deep vein thrombosis in rheumatoid arthritis: a general population-based study. *Rheumatology (Oxford)* 60, 188-195.

Liang, K. P., Liang, K. V., Matteson, E. L., McClelland, R. L., Christianson, T. J., and Turesson, C. (2006). Incidence of noncardiac vascular disease in rheumatoid arthritis and relationship to extraarticular disease manifestations. *Arthritis Rheum.* 54, 642-8.

Lundberg, K., Kinloch, A., Fisher, B. A., Wegner, N., Wait, R., Charles, P., Mikuls, T. R., and Venables, P. J. (2008). Antibodies to citrullinated alpha-enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase. *Arthritis Rheum.* 58, 3009-19.

Maxwell, L. J., and Singh, J. A. (2010). Abatacept for rheumatoid arthritis: a Cochrane systematic review. *J. Rheumatol.* 37, 234-45.

McInnes, I. B., and Schett, G. (2011). The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 365, 2205-19.

Mizushima, N., and Komatsu, M. (2011). Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147, 728-41.

Mizushima, N., and Murphy, L. O. (2020). Autophagy Assays for Biological Discovery and Therapeutic Development. *Trends Biochem. Sci.* 45, 1080-1093.

Molander, V., Bower, H., Frisell, T., and Askling, J. (2020). Risk of venous thromboembolism in rheumatoid arthritis, and its association with disease activity: a nationwide cohort study from Sweden. *Ann. Rheum. Dis.* 80, 169-175

Mondal, S., and Thompson, P. R. (2019). Protein Arginine Deiminases (PADs): Biochemistry and Chemical Biology of Protein Citrullination. *Acc. Chem. Res.* 52, 818-832.

Mori, S., and Sugimoto, M. (2012). *Pneumocystis jirovecii* infection: an emerging threat to patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 51, 2120-30.

Mushtaq, S., and Sarkar, R. (2020). Sulfasalazine in dermatology: A lesser explored drug with broad therapeutic potential. *Int. J. Womens Dermatol.* 6, 191-198.

Najem, M. Y., Couturaud, F., and Lemarie, C. A. (2020). Cytokine and chemokine regulation of venous thromboembolism. *J. Thromb. Haemost.* 18, 1009-1019.

Nieuwdorp, M., Stoes, E. S., Meijers, J. C., and Buller, H. (2005). Hypercoagulability in the metabolic syndrome. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5, 155-9.

Nunokawa, T., Yokogawa, N., Shimada, K., and Sugii, S. (2019). Effect of sulfasalazine use on the presence of *Pneumocystis* organisms in the lung among patients with rheumatoid arthritis: A test-negative design case-control study with PCR tests. *Mod. Rheumatol.* 29, 436-440.

Nunokawa, T., Yokogawa, N., Shimada, K., Sugii, S., Nishino, J., Gosho, M., Wagatsuma, Y., and Tohma, S. (2019). Prophylactic effect of sulfasalazine against *Pneumocystis pneumonia* in patients with rheumatoid arthritis: A nested case-control study. *Semin. Arthritis Rheum.* 48, 573-578.

Nygaard, G., and Firestein, G. S. (2020). Restoring synovial homeostasis in rheumatoid arthritis by targeting fibroblast-like synoviocytes. *Nat. Rev. Rheumatol.* *16*, 316-333.

Okada, Y., Wu, D., Trynka, G., Raj, T., Terao, C., Ikari, K., Kochi, Y., Ohmura, K., Suzuki, A., Yoshida, S., et al. (2014). Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* *506*, 376-81.

Park, J. W., Curtis, J. R., Jun, K. I., Kim, T. M., Heo, D. S., Ha, J., Suh, K. S., Lee, K. W., Lee, H., Yang, J., et al. (2022). Primary Prophylaxis for *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in Patients Receiving Rituximab. *Chest* *161*, 1201-1210.

Rantapaa-Dahlqvist, S., de Jong, B. A., Berglin, E., Hallmans, G., Wadell, G., Stenlund, H., Sundin, U., and van Venrooij, W. J. (2003). Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *48*, 2741-9.

Sabeh, F., Fox, D., and Weiss, S. J. (2010). Membrane-type I matrix metalloproteinase-dependent regulation of rheumatoid arthritis synoviocyte function. *J. Immunol.* *184*, 6396-406.

Saghazadeh, A., Hafizi, S., and Rezaei, N. (2015). Inflammation in venous thromboembolism: Cause or consequence? *Int. Immunopharmacol.* *28*, 655-65.

San-Andres, F. J., Rubio, R., Castilla, J., Pulido, F., Palao, G., de Pedro, I., Costa, J. R., and del Palacio, A. (2003). Incidence of acquired immunodeficiency syndrome-associated opportunistic diseases and the effect of treatment on a cohort of 1115 patients infected with human immunodeficiency virus, 1989-1997. *Clin. Infect. Dis.* *36*, 1177-85.

Scher, J. U., Littman, D. R., and Abramson, S. B. (2016). Microbiome in Inflammatory Arthritis and Human Rheumatic Diseases. *Arthritis Rheumatol.* *68*, 35-45.

Schmajuk, G., Jafri, K., Evans, M., Shiboski, S., Gianfrancesco, M., Izadi, Z., Patterson, S. L., Aggarwal, I., Sarkar, U., Dudley, R. A., et al. (2019). *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PJP) prophylaxis patterns among patients with rheumatic diseases receiving high-risk immunosuppressant drugs. *Semin. Arthritis Rheum.* *48*, 1087-1092.

Silman, A. J., and Pearson, J. E. (2002). Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. 4 Suppl 3*, S265-72.

Smilack, J. D. (1999). Trimethoprim-sulfamethoxazole. *Mayo Clin. Proc. 74*, 730-4.

Smolen, J. S., Aletaha, D., Barton, A., Burmester, G. R., Emery, P., Firestein, G. S., Kavanaugh, A., McInnes, I. B., Solomon, D. H., Strand, V., et al. (2018). Rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Dis. Primers 4*, 18001.

Smolen, J. S., Aletaha, D., and McInnes, I. B. (2016). Rheumatoid arthritis. *Lancet 388*, 2023-2038.

Smolen, J. S., Landewe, R. B. M., Bijlsma, J. W. J., Burmester, G. R., Dougados, M., Kerschbaumer, A., McInnes, I. B., Sepriano, A., van Vollenhoven, R. F., et al. (2020). EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann. Rheum. Dis. 79*, 685-699.

Smolen, J. S., Tohidast-Akrad, M., Gal, A., Kunaver, M., Eberl, G., Zenz, P., Falus, A., and Steiner, G. (1996). The role of T-lymphocytes and cytokines in rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol. 25*, 1-4.

Stern, A., Green, H., Paul, M., Vidal, L., and Leibovici, L. (2014). Prophylaxis for *Pneumocystis pneumonia* (PCP) in non-HIV immunocompromised patients. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD005590.

Sugawara, E., Kato, M., Kudo, Y., Lee, W., Hisada, R., Fujieda, Y., Oku, K., Bohgaki, T., Amengual, O., Yasuda, S., et al. (2020). Autophagy promotes citrullination of VIM (vimentin) and its interaction with major histocompatibility complex class II in synovial fibroblasts. *Autophagy 16*, 946-955.

Suzuki, A., Yamada, R., Chang, X., Tokuhira, S., Sawada, T., Suzuki, M., Nagasaki, M., Nakayama-Hamada, M., Kawaida, R., Ono, M., et al. (2003). Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat. Genet. 34*, 395-402.

Svartz, N. (1941). Ett nytt sulfonamidpreparat. Forelopande meddelande. Nord. med. 9, 544.

Thomas, C. F., Jr., and Limper, A. H. (2004). Pneumocystis pneumonia. N. Engl. J. Med. 350, 2487-98.

Thomas, C. F., Jr., and Limper, A. H. (2007). Current insights into the biology and pathogenesis of Pneumocystis pneumonia. Nat. Rev. Microbiol. 5, 298-308.

Tsuji, H., Yano, K., Furu, M., Yamakawa, N., Ikari, K., Hashimoto, M., Ito, H., Fujii, T., Yamamoto, W., Ohmura, K., et al. (2017). Time-averaged disease activity fits better joint destruction in rheumatoid arthritis. Sci. Rep. 7, 5856.

Unger, T., Borghi, C., Charchar, F., Khan, N. A., Poulter, N. R., Prabhakaran, D., Ramirez, A., Schlaich, M., Stergiou, G. S., Tomaszewski, M., et al. (2020). 2020 International Society of Hypertension Global Hypertension Practice Guidelines. Hypertension 75, 1334-1357.

Ungprasert, P., Srivali, N., Spanuchart, I., Thongprayoon, C., and Knight, E. L. (2014). Risk of venous thromboembolism in patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. Clin. Rheumatol. 33, 297-304.

van den Broek, M., Dirven, L., Klarenbeek, N. B., Molenaar, T. H., Han, K. H., Kerstens, P. J., Huizinga, T. W., Dijkmans, B. A., and Allaart, C. F. (2012). The association of treatment response and joint damage with ACPA-status in recent-onset RA: a subanalysis of the 8-year follow-up of the BeSt study. Ann. Rheum. Dis. 71, 245-8.

van Dongen, H., van Aken, J., Lard, L. R., Visser, K., Roday, H. K., Hulsmans, H. M., Speyer, I., Westedt, M. L., Peeters, A. J., Allaart, C. F., et al. (2007). Efficacy of methotrexate treatment in patients with probable rheumatoid arthritis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. Arthritis Rheum. 56, 1424-32.

Van Doornum, S., McColl, G., Jenkins, A., Green, D. J., and Wicks, I. P. (2003) Screening for atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis: comparison of two in

vivo tests of vascular function. *Arthritis Rheum.* 48, 72-80.

Virani, S. S., Morris, P. B., Agarwala, A., Ballantyne, C. M., Birtcher, K. K., Kris-Etherton, P. M., Ladden-Stirling, A. B., Miller, M., Orringer, C. E., and Stone, N. J. (2021). 2021 ACC Expert Consensus Decision Pathway on the Management of ASCVD Risk Reduction in Patients With Persistent Hypertriglyceridemia: A Report of the American College of Cardiology Solution Set Oversight Committee. *J. Am. Coll. Cardiol.* 78, 960-993.

Volkov, M., van Schie, K. A., and van der Woude, D. (2020). Autoantibodies and B Cells: The ABC of rheumatoid arthritis pathophysiology. *Immunol. Rev.* 294, 148-163.

Walzer, P. D., Foy, J., Steele, P., Kim, C. K., White, M., Klein, R. S., Otter, B. A., and Allegra, C. (1992). Activities of antifolate, antiviral, and other drugs in an immunosuppressed rat model of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother.* 36, 1935-42.

Wang, J., Gigliotti, F., Bhagwat, S. P., George, T. C., and Wright, T. W. (2010). Immune modulation with sulfasalazine attenuates immunopathogenesis but enhances macrophage-mediated fungal clearance during *Pneumocystis* pneumonia. *PLoS Pathog.* 6, e1001058.

White, R. H., and Keenan, C. R. (2009). Effects of race and ethnicity on the incidence of venous thromboembolism. *Thromb. Res.* 123 Suppl 4, S11-7.

Xian, H., Yang, Q., Xiao, L., Shen, H. M., and Liou, Y. C. (2019). STX17 dynamically regulated by Fis1 induces mitophagy via hierarchical macroautophagic mechanism. *Nat. Commun.* 10, 2059.

Zakai, N. A., and McClure, L. A. (2011). Racial differences in venous thromboembolism. *J. Thromb. Haemost.* 9, 1877-82.