特集：From bedside to Bench—臨床が基礎医学・生物学に与えたインパクト—
総 説

ベッドサイドからの関節リウマチ病因・病態・治療へのアプローチ

宗 像 靖 彦^{*1,*2}

Approach from bedside to etiology/pathophysiology/treatment of rheumatoid arthritis

Yasuhiko MUNAKATA^{*1,*2}

^{*1}Department of Rheumatology and Hematology, Tohoku University Graduate School of Medicine

^{*2}Innovatis Pharma Corporation

(Received August 15, 2006)

summary

Rheumatoid arthritis (RA) is a disease full of variety. We need to elucidate various clinical doubts for the complete cure of RA. We observed a lot of patients with human parvovirus B19 (B19) infection who developed to RA till now. We investigated B19 infection in relation with RA etiology. B19 infects persistently to immune cells through cell surface Ku80 autoantigen as a cellular receptor. We are able to detect B19 in immune cells which infiltrate in synovial tissues of patients with RA. B19 is activated in infected cells, and functional viral protein NS1 induces over production of inflammatory cytokine TNF α . As a result, it promotes a neutrophil activation and migration to the synovium where there are B19-infected immune cells. This may cause arthritis and create a vicious circle of chronic inflammation that develops into RA. As for the B19 persistent infection to immune cells, abnormality of anti-B19 humoral immunity may participate in imperfection of B19 neutralization of a host. It is expected the development of effective treatment that cure progressing RA from B19 infection. NS1 may be one of the candidates of therapeutic target.

Key words—human parvovirus B19; rheumatoid arthritis; Ku80; NS1; TNF α

抄 録

関節リウマチ (RA) は多様性に富む疾患であるが、臨床現場で感じる疑問を研究室で解明し治療法に結び付けてゆくことで、多様な RA 病態に対して適切な治療提供が可能となる。我々は、これまでにパルボウイルス B19 (B19) 感染症例が RA へと進展していった例を数多く観察し、B19 感染と RA との関連を追及してきた。B19 は持続感染様式を取り、この際の感染標的は免疫細胞である。免疫細胞への B19 感染は Ku80 を感染受容体として成立するものと推定される。RA 症例の関節病変に浸潤する免疫細胞には B19 が高頻度に検出されるが、細胞内で B19 は活性化され、ウイルス蛋白 NS1 の作用により炎症性サイトカイン TNF α の産生亢進が誘導される。その結果、B19 感染免疫細胞が存在する関節滑膜局所への好中球遊走、および活性化を促し、関節炎の惹起と同時に持続性関節炎に至る悪循環が形成され、RA 病態の完成につながっていくものと考えられる。免疫細胞への B19 持続感染は宿主の抗 B19 中和能不全など抗 B19 液性免疫異常が関与している可能性がある。B19 感染から進展する RA の治療には NS1 を標的とした治療が有効であると期待される。

関節リウマチ (RA) は臨床症状、治療反応性、臨床経過などの点から見て極めて多様性に富む疾患である。RA の病変は関節のみにとどまらず多臓器に及ぶため、生命予後も一般健常人よりおよそ 10 年短いとされている。一方、RA の有病率は約 0.5% と極めて高く、Common Disease とみなしても過言ではない。このような背景から、RA 治療への社会的関心は高く、RA の完全制圧が望まれている。

近年、RA の治療方法はめざましい進歩を遂げている。炎症性サイトカインを標的とした生物学的製剤の登場がその根幹であることは論を待たない。様々な生物学的製剤が開発・臨床応用され寛解導入率の向上が得られてはいるものの、RA の完全制圧には程遠く、いまだ満足できる治療成績とは言い難い。生物学的製剤の登場をもってしても乗り越えられない壁は、RA の多様性に起因しているものと推定される。これは、我々臨床医が日常的に遭遇している RA 患者に見出される問題点や疑問に他ならな

^{*1}東北大学大学院免疫血液病制御学分野

^{*2}イノバティスファーマ株式会社

い。臨床現場で感じる疑問を研究室で解明し治療法に結び付けてゆくことで、多様な RA 病態に対して適切な治療提供が可能になり、RA の完全制圧が現実のものになってゆくことが期待される。

我々は、これまでに急性パルボウイルス B19 (B19) 感染症例が RA へと進展していった例を数多く観察してきた。このような臨床経験を踏まえ、ベッドサイドで発生した問題点を研究テーマとして、ベンチワークに転換してきた。本稿では、ベッドサイドからスタートした我々の研究テーマを中心に紹介し、臨床から基礎研究へのリンケージを示してゆきたい。

パルボウイルスが RA の病因として注目される背景

古文書、絵画、骨学の分野から欧州における RA の歴史を検討した結果、興味深い事実が判明している。RA はコロンブスの新大陸発見 (15 世紀後半) を機に、こつぜんと出現するのである。それ以前の年代に由来する人骨には RA の関節びらんは全く認められておらず、RA を示唆する記述も絵画も見当たらないのである。RA は新大陸から輸入され瞬く間に欧州に広がったように見えるのである。

一方、B19 は小児における伝染性紅斑の原因ウイルスとして知られているが、欧州における伝染性紅斑の初めての記載は 1797 年であることから、B19 自体、欧州にとってはまだ登場が新しいウイルスと考えられている。欧州における RA 登場と伝染性紅斑登場の年代的一致は、RA が B19 感染に起因することを示唆するのではなかろうかと推測されている。興味深いことにコロンブス自身も、晩年、関節リウマチに罹患していたという。

ベッドサイドからの関節リウマチ病因へのアプローチ

東北大学病院リウマチ膠原病外来に膠原病疑いで紹介された患者で IgM 型抗 B19 抗体陽性患者 (急性 B19 感染症例とみなされる) 35 例を解析すると、関節痛・こわばりなどの関節リウマチ様症状にくわえて、リウマトイド因子陽性などの免疫異常も高頻度に認められている (表 1)。実際、急性 B19 感染では、リウマチ様多発関節炎を呈する症例がある。このような例を長期的に観察してゆくと、骨髄に B19 が持続感染し、関節炎が遷延して RA の診断基準を満足するようになり、RA としての対応が必要

表 1 成人 B19 急性感染の特徴
IgM 型抗 B19 抗体陽性患者 35 名における検討
(全例が膠原病疑いとして紹介されている)

主訴	
関節痛	50%
手指腫脹・こわばり	22%
発熱 (不明熱)	22%
発疹	6%
検査成績の特徴	
抗核抗体陽性	100%
(1:80 以上)	47%
高 LDH 血症	35%
低補体血症	31%
貧血	23%
リウマトイド因子陽性	21%
白血球減少	12%

表 2 滑膜組織からの B19-DNA, VP1 の検出

疾 患	B19 DNA		VP1 抗原
	PCR	ISH	
RA	30/39	11/15	32/40
OA	4/26	0/25	0/36
Trauma	5/31	0/16	0/22

RA: rheumatoid arthritis, OA: osteoarthritis

となってくることがある (図 1)¹⁾。このような例で、B19 は RA の滑膜炎病変組織に浸潤するリンパ球などの免疫細胞に高頻度に検出される²⁾。われわれは、B19-DNA に特異的なプライマーによる PCR 法を用いて、RA 患者由来の関節滑膜組織、およびコントロールとして変形性関節症患者と外傷患者由来の関節滑膜組織における B19-DNA の存在を対比した。その結果、コントロール群では B19-DNA の検出率が 16% だったのに対し、RA 群では 78% に検出された。一方、B19 構造蛋白 (VP1) の検出を免疫組織学的に試みたところ、コントロール群の 0% に対し、RA 群では 80% の検出率だった。RA 症例のすべてではないにしても、約 80% という高率で B19 が関節病変局所で検出されていた (表 2)。従来、B19 は赤血球膜型物質 P 抗原を受容体として知られていたが、RA 症例の病変部位では、病因論的に意義深い免疫細胞中に検出されたのである。ではなぜ B19 が免疫細胞に感染するのか？ B19 が RA の病態形成に直接関わるのか？ ベットサイドから発せられたこのような疑問が、ベンチでの研究テーマとなり、免疫細胞への B19 感染機序

図1 急性 B19 感染症から RA への移行症例 (47 歳男性) 経過図

の解明, B19 感染による RA 病態形成機序の解明を追及することとなったのである。

1. 免疫細胞における B19 感染受容体の解明

B19 の感染受容体は赤血球の型物質である P 抗原であり, P 抗原を欠失した赤血球細胞への B19 感染は成立しない³⁾。しかし, 生体で観察される B19 感染標的細胞は P 抗原発現が確認されない (または乏しい) リンパ球や樹状細胞などの免疫細胞も含まれることがわかってきており²⁾, B19 感染効率が必ずしも P 抗原の発現レベルと相関せず⁴⁾, 更に B19 と P 抗原との直接結合も実験上成立しない⁵⁾などの事実から, P 抗原以外の B19 感染受容体の存在が予想されていた。これまでに B19 感染関連分子としては P 抗原³⁾の他に coreceptor として $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン⁶⁾が報告されている。coreceptor は感染標的細胞の特異性や感染効率に関連して機能することが予想され, B19 感染病態の理解に大変重要な概念と位置付けられる。我々は最近 Ku80 自己抗原が B19 感染の coreceptor として機能することを証明した^{7,8)}。Ku80 は B19 の特徴的な感染様式である「持続感染」からの RA 病態形成に関連する可能性がある と推定される。

関節リウマチ患者滑膜病変部位に浸潤したリンパ球などの免疫細胞に B19 が局在することが観察さ

れたものの末梢血リンパ球における B19 感染受容体 P 抗原の発現はフローサイトメトリー法では検出限界以下である (未発表成績)。リンパ球などの免疫細胞では B19 の感染効率を規定する第三の分子が存在する可能性が推定されたため, T 細胞株 H9 を用いて, B19 感染に関連する第三の分子を同定することを試みた (H9 では P 抗原の発現は認められないが, B19 の付着が認められ, P 抗原以外の B19 レセプターの存在が示唆された)。H9 細胞膜分画を可溶化し, リコンビナント B19 被殻蛋白 (rB19ECP) によるアフィニティー精製で B19 の細胞膜レセプターを得ることを試みた。図 2 に示すように, 細胞表面をビオチンラベルした H9 細胞膜分画からは rB19ECP 結合セファロースビーズで約 80 kDa の蛋白が共沈された。この分子を Muldi-ToF 蛋白解析に供したところ, 解析対象となったペプチドはすべて Ku80 自己抗原とのホモロジーを示し, H9 細胞膜上の B19 被殻蛋白との結合能を有する分子は Ku80 であることが推定されるに至った。抗 Ku80 抗体によるイムノブロット法で rB19ECP との共沈蛋白を検定したところ, 陽性を示し, これが Ku80 であることが証明された。H9 細胞表面には $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンも陽性であるが rB19ECP との共沈は得られていない。B19 との結合アフィニティーは Ku80 と $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンが細胞表面上で共存

図2 H9細胞株からのB19結合蛋白の検出

H9細胞株細胞表面からのB19結合蛋白の単離。細胞表面をビオチン標識したH9 (1×10^4)の可溶化細胞膜分画からリコンビナントB19被殻蛋白(rB19ECP)結合セファロースビーズ結合蛋白を共沈単離し、SDS-PAGE後にPVDF膜に転写、化学発光法により可視化した。陰性コントロールとしてBSA結合セファロースビーズを用いた。

する場合Ku80の方が優勢であることが示唆された。

Ku80がB19の感染レセプターであることを証明するために、HeLa細胞を用いたKu80の再構築実験をおこなった(図3)。HeLa細胞は細胞表面上のP抗原は陽性だがB19感染(細胞内Entry)は認められない。この時、HeLa細胞表面でのKu80の発現は認められていないことから、Ku80遺伝子を発現ベクターpcDに挿入した後HeLa細胞に導入し、Ku80の強制発現により細胞表面にKu80が発現されたトランスフェクタントを得た(HeLa-Ku80)。HeLa-Ku80とB19との共培養実験では、B19の細胞内Entryが観察された。一遺伝子の導入によりB19の細胞内Entryが可能になったことはKu80がP抗原を発現するHeLa細胞にとってB19感染特に細胞内Entryにとっては十分条件であることを示す結果と言える。また、HeLa-Ku80細胞内でB19とKu80は同一の局在を示しておりB19とKu80は細胞表面で直接結合し細胞内に移動することが示唆される。

2. B19遺伝子導入によるRAモデルマウスの作製

B19感染はヒトに限定されるため、単純感染を期待したモデル動物の作製は不可能である。そこでわれわれは、これまでにRA患者由来のB19が、試験管内で単球系細胞株U937に感染し、RAにおけ

図3 Ku80遺伝子のHeLa細胞株へのトランスフェクション

A: Ku80遺伝子導入されたHeLa細胞表面でのKu80発現。pcD発現ベクターにKu80のcDNAを挿入し、リポフェクション法によりHeLa細胞に遺伝子導入した(HeLa-Ku80)。陰性コントロールにはpcDを用いた(HeLa-mock)。FACS解析を行い、P抗原及びKu80の発現を観察した。B: HeLa-Ku80細胞へのB19感染。HeLa-Ku80細胞またはHeLa-mock細胞それぞれ 2×10^5 に対してB19 (2×10^{11} copies of B19 DNA)を感染させ、抗B19抗体でB19の細胞内感染状態を観察した。

る炎症反応の起点となるサイトカインTNF α の産生を亢進させることを見だし²⁾、遺伝子レベルでの詳細な解析でB19によるTNF α 産生亢進は、B19の機能蛋白であるNS1に起因すること明らかにしてきた⁹⁾ことからNS1に注目した。RA患者の関節滑膜組織由来B19-DNAよりNS1遺伝子を単離し、この遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製した¹⁰⁾。導入を施したマウスはC57BL/6マウスで、関節炎を起こしにくい遺伝的特徴を有している。NS1トランスジェニックマウスでは自然経過での関節炎発症は認められなかったが、タイプIIコラーゲンの免疫によりCIA(コラーゲン誘発関節炎)が高頻度で発現することが見いだされた。元来、関節炎を起こしにくい遺伝的特徴を保有するC57BL/6マウスがNS1という単一遺伝子の導入でその遺伝的制約を越えて、CIAを遺伝的に起こしやすいDBAマウスに近い性状を示したのである(図4)。NS1トランスジェニックマウスがコラーゲン誘発性関節炎を呈し、RAモデルマウスになることが判明し、B19が少なくとも一部のRAにおいては病因となりうることが証明された。

図4 NS1 トランスジェニックマウスにおけるコラーゲン誘発性関節炎の発症頻度

野生型 C57BL/6 (B6) マウス 46 匹, DBA/1 マウス 55 匹, NS1 トランスジェニックマウス 54 匹でタイプ II コラーゲン誘発性関節炎の発症頻度を解析した。

図5 B19 遷延感染患者（36 歳女性）における抗 B19 中和能の推移と臨床経過図

ベッドサイドからの関節リウマチ病態へのアプローチ

B19 感染は多くの健常人に感染し、その多くは伝染性紅斑として経過し一過性の急性期病態を呈するにとどまるが、一部の症例で RA 病態へと進展してゆくのはなぜなのか？ B19 感染の特徴である持続感染の原因およびメカニズムはいかようなものなのか？

生体での B19 感染防御は液性免疫に担われている。B19 持続感染・RA の進展に抗 B19 中和能が関連している可能性が推定された。この可能性について検証するために、B19 感染高感受性細胞株 KU812Ep6 を用いた抗 B19 中和能測定系を開発し^{11,12)}、健常人・RA 例の抗 B19 中和能測定をおこなった。抗 B19 中和能測定が臨床病態をきわめてよく反映することを示す一例を図 5 に提示した。B19 遷延感染状態を呈し、B19 急性感染病態から様

々な症状が持続した症例である。この症例では IgG 型抗 B19 抗体が検出されるにもかかわらず B19 感染の中和能は検出されなかった。各種臨床症状の遷延が抗 B19 中和能獲得不全に起因することを推定し、免疫グロブリンの点滴静注を行った。その結果、この症例では B19 感染の中和能を受動的に獲得させることができ、臨床症状の消失を得ることに成功した。図 6 に示すように、実際 RA 群では健常人群に比し抗 B19 中和能が低下していることが示されており、B19 持続感染から RA 病態への進展に低抗 B19 中和能が関与していることが強く示唆された。

また、RA 例では B19 ウイルス血症を呈しているも、IgM 型抗 B19 抗体は陰性で、貧血を呈することがほとんどないことから (表 3)、RA 例において、B19 は Erythrovirus としての感染様式をとらず免疫細胞などを主な感染標的細胞としているものと推定される。また、IgG 型抗 B19 抗体を有するにもかかわらず B19 ウイルス血症を許容していることが

ら、宿主側の抗 B19 免疫反応が抗 B19 中和能不全などの特殊免疫状態であるか、B19 ウイルスそのものが抗 B19 液性免疫からエスケープしている可能性が示されている¹³⁾。一方、B19 が免疫細胞に感染した場合 TNF α 産生亢進が示されることも観察されていることから⁹⁾、B19 感染の RA 病態との直接的なリンケージが推定されている。

ベッドサイドからの関節リウマチ治療へのアプローチ

急性 B19 感染から RA への進展に抗 B19 中和能が関与している可能性があるため、治療手段として、理論的には B19 中和を企図した大量 γ グロブリン投与が有効であると推定される。しかし、免疫細胞を感染標的とするウイルスでは抗ウイルス抗体がウイルスと免疫複合体を形成し Fc レセプターにトラップされこのことが逆にウイルスの感染効率を増加させてしまうことがある (Antibody-dependent-enhancement: ADE)¹⁴⁾。我々は B19 が単球系細胞株 U937 に感染し炎症性サイトカイン TNF α の産生を誘導することを報告してきたが⁹⁾、同様に B19 の U937 への感染系において、抗 B19 中和抗体が B19 の感染阻止に作用することなく逆に感染効率を増加させることを示した (図 7)¹⁵⁾。B19 感染では血清中に抗 B19 中和抗体が検出されるにもかかわらず、持続感染を呈することがあり¹³⁾、中和抗体による ADE は B19 感染において推定可能な現象であると言える。我々は、急性 B19 感染から RA への進展例で各種 DMARDs に治療抵抗性を示したため、B19 中和を企図した大量 γ グロブリン投与を行い、良好な治療成績をおさめた¹⁾ことを報告してきたが、このような症例のなかには、後に RA の再

図 6 IgG 型抗 B19 抗体力価と中和能
RA 症例群、急性 B19 感染症例群、B19 持続感染症例群において IgG 型抗 B19 抗体力価と血清抗 B19 中和能を測定した。

表 3 B19 ウイルス血症患者の骨髓中 B19DNA と貧血の関連

Cases	Age	Original Disease*	Anti-B19 Abs		Copy number of B19 (copies/ μ gDNA)	RBC ($\times 10^4/\mu$ l)	Hemoglobin (g/dl)
			IgM	IgG			
1	27	RA	+	+	2081	460	14.1
2	41	RA	+	+	6929508	260	7.7
3	40	RA	+	+	881938788	282	8.6
4	75	RA	—	+	1863	291	9.2
5	63	SLE	—	+	2287	372	10.0
6	43	RA	—	+	2472	453	13.7
7	37	RA	—	+	5867	368	11.6
8	35	RA	—	+	1084	455	11.0
9	28	RA	—	+	330	546	13.2

* All study patients with RA and SLE were diagnosed according to the American College of Rheumatology classification criteria.

図7 U937細胞におけるB19感染とADE

単球系細胞株U937へのB19感染実験を10 μg/mlの抗B19中和抗体またはB19感染中和能を有さないコントロール抗体存在下で行った。同時に抗Fcレセプター抗体またはコントロール抗体を競合抗体として添加した(0, 1, 5 μg/ml)。8日間の培養後、DNAを抽出しB19DNAに対する定量的PCRを行った。

燃を来たしている例もあることから、B19持続感染からRAへの進展を阻止しうより根治的な抗B19薬剤の開発・スクリーニングが必要とされる。

B19感染からRAに至る推定機構と期待される治療法

B19はもともと持続感染様式を取ることが知られている。この際の感染標的は免疫細胞であると推定される。RA症例では免疫細胞内でB19が活性化され、ウイルス蛋白NS1の作用により炎症性サイトカインTNFαの産生亢進が誘導される。その結果、B19の感染する免疫細胞が存在する関節滑膜局所への好中球遊走、および活性化を促し、関節炎の惹起と同時に持続的な関節炎に至る悪循環が形成され、RA病態の完成につながっていくものと考えられる。

今後RA発症におけるB19の役割についてさらに深い追求が必要である。更に、RA治療の観点より、有害なB19(持続)感染を予防するためのワクチン療法の開発、RA発症初期における抗B19療法(修飾モノクローナル抗体、アンチセンス医薬)の開発などが今後の研究対象となっていくことが見込まれる。また、これまでに述べてきたように、B19感染におけるRA病態形成にはNS1ウイルス遺伝子が大きく関与していることが推定されていること

から、NS1を標的とした治療が有効なRA治療法となる可能性がある。

おわりに

ベッドサイドからベンチに持ち込まれ、問題解決の糸口が発見された場合、これをシーズとしてベッドサイドへ再度還元してゆくことが望まれる。臨床が基礎医学に与えたインパクトは臨床に与える更に大きなインパクトとして還元されることになる。

文 献

- 1) Murai C, Munakata Y, Takahashi Y, et al. : Rheumatoid arthritis after human parvovirus B19 infection. *Ann. Rheum. Disease.* **58** : 130, 1999.
- 2) Takahashi Y, Murai C, Shibata S, et al. : Human parvovirus B19 as a causative agent for rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95** : 8227-8232, 1998.
- 3) Brown KE, Anderson SM, Young NS. : Erythrocyte P antigen : cellular receptor for B19 parvovirus. *Science.* **262** : 114-117, 1993.
- 4) Weigel-Kelley KA, Yoder MC, Srivastava A. Recombinant human parvovirus B19 vectors : erythrocyte P antigen is necessary but not sufficient for successful transduction of human hematopoietic cells. *J. Virol.* **75** : 4110-4116, 2001.
- 5) Kaufmann B, Baxa U, Chipman PR, Rossmann MG, Modrow S, Seckler R. : Parvovirus B19 does not bind to membrane-associated globo-side in vitro. *Virology.* **332** : 189-198, 2005.
- 6) Weigel-Kelley KA, Yoder MC, Srivastava A. : α5β1 integrin as a cellular co-receptor for human parvovirus B19 : requirement of functional activation of {beta} 1 integrin for viral entry. *Blood.* **102** : 3927-3933, 2003.
- 7) Munakata Y, Saito-Ito T, Kumura-Ishii K, et al. : Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection. *Blood.* **106** : 3449-3456, 2005.
- 8) 特許公開 2005-053787.
- 9) Fu Y, Ishii KK, Munakata Y, Saito T, Kaku M, Sasaki T. : Regulation of tumor necrosis factor α. promoter by human parvovirus B19 NS1 through activation of AP1 and AP2. *J. Virol.* **76** : 5359-5403, 2002.
- 10) Takasawa N, Munakata Y, Ishii KK, et al. : Human parvovirus B19 transgenic mice become

- susceptible to polyarthritis. *J Immunol.* **173** : 4675–4683, 2004.
- 11) Saito T, Munakata Y, Fu Y, et al. : Evaluation of anti-parvovirus B19 activity in sera by assay using quantitative polymerase chain reaction. *J Virol Method.* **107** : 81–87, 2003.
- 12) 特許公開 2003–315339.
- 13) Munakata Y, Saito T. : Human parvovirus B19 viremia is associated with neither IgM positivity nor anemia in patients with rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis.* **65** : 272–273, 2006.
- 14) Peiris JS, Gordon S, Unkeless JC, Porterfield JS. : Monoclonal anti-Fc receptor IgG blocks antibody enhancement of viral replication in macrophages. *Nature.* **289** : 189–191, 1981.
- 15) Munakata Y, Kato I, Saito T, Koder T, Kumura-Ishii K, Sasaki T. : Human parvovirus B19 infection of monocytic cell line U937 and antibody dependent enhancement. *Virology.* **345** : 251–257, 2006.