

Thesis

関節リウマチにおけるBAFFと臨床的指標ならびに疾患活動性との関連

大学病院 リウマチ膠原病科

※ 現所属：国立病院機構東埼玉病院 リウマチ科

中嶋 京一

【目的】関節リウマチ (RA) などの自己免疫疾患において、B細胞刺激因子 (B-cell-activating factor belonging to the TNF family: BAFF) が上昇することが知られている。本研究では、まずRA滑膜組織におけるBAFFとBAFF-Rの分布と機能ならびに血清と関節液中の可溶性BAFF濃度について検討した。次に、RAにおける臨床的指標と血清中の可溶性BAFF濃度との相関の有無をACPA陽性群に注目して臨床的な検討を加えた。疾患活動性指標は、SDAIおよびCDAIを使用した。

【結果】RAの滑膜組織から分離したB細胞・T細胞・CD14陽性単球でBAFFが発現し、BAFF-RはB細胞とT細胞で発現していた。mRNAレベルでは、滑膜単核細胞においてBAFFとBAFF-Rのいずれも発現を認めた。免疫組織化学染色では、滑膜組織中に単核細胞の局所的もしくはびまん性の浸潤と一部胚中心様構造を認め、いずれにおいてもBAFFとBAFF-RがT細胞とB細胞で発現していた。またCD3陰性CD20陰性BAFF陽性細胞が滑膜表層ではなく深層に存在し、BAFF-Rは表層および深層のいずれにも発現していなかった。RA患者滑膜検体を処理し4から6継代して得た線維芽細胞様滑膜細胞 (RA-FLS) は無刺激の状態では細胞質にBAFF蛋白およびmRNAを発現していたが細胞表面にBAFF蛋白は存在せず、BAFF-Rは蛋白ならびにmRNAいずれのレベルでも発現していなかった。関節液中の可溶性BAFF濃度を同じ日に採取した血清中の可溶性BAFF濃度と比較すると、関節液中の可溶性BAFF濃度が常に高値だった。臨床的評価では、全症例において可溶性BAFF濃度とプレドニゾン投与量に関連を認め、罹病期間とも弱い関連を認めた。ACPA陽性群においては、可溶性BAFF濃度と罹病期間が関連し、プレドニゾン投与量と軽度関連していた。ACPA陽性群において、SDAIと各臨床的指標との単回帰分析で関連した項目 (可溶性BAFF濃度、IgM-RF、赤沈、MMP-3、HAQ、プレドニゾン投与量) を説明変数、SDAIを目的変数として重回帰分析を施行したところ、可溶性BAFF濃度・IgM-RF・HAQ・プレドニゾン投与量が有意な説明変数だった (自由度調整 $R^2 = 0.64$)。一方、ACPA陽性群においてCDAIと単回帰分析で関連を認めたのはIgM-RF・赤沈・MMP-3・HAQ・プレドニゾン投与量で、これらを説明変数としSDAIを目的変数とした重回帰分析を施行したところ、IgM-RF・HAQが有意な説明変数 (自由度調整 $R^2 = 0.58$) だった。CDAIと可溶性BAFF濃度は軽度の関連を認めたが、有意ではなかった。また、CRPと血清中の可溶性BAFF濃度は相関しなかったが、関節液中の可溶性BAFF濃度とは有意な相関を認めた。

【結論】RAの滑膜組織にBAFF陽性細胞を認め、血清および関節液中の可溶性BAFF濃度が上昇していることから、RAとBAFFとの関連が示唆された。またACPA陽性RAにおいて血清中の可溶性BAFF濃度とSDAIに関連を認めており、臨床的に有用な予後予測因子になる可能性がある。

緒言

関節リウマチ (RA) は、関節滑膜の慢性炎症により多発関節炎をきたし関節破壊に至る自己免疫性疾患である¹⁾。関節破壊には種々のサイトカイン (腫瘍壊死

因子 (TNF α)、インターロイキン-1 (IL-1)、IL-6など) や炎症細胞が関与しており、TNF α とIL-6の阻害薬ならびにT細胞の共刺激調節薬は最も有効な治療法の一つとして、実臨床で使用されている²⁻⁷⁾。

RAの病態におけるB細胞の関与が推測されている。RAの滑膜組織では、約10-23%のRA滑膜組織において異所性リンパ濾胞である胚中心 (GCs) に似た、T

医学博士 乙第1222号 平成25年2月22日 (埼玉医科大学)

○著者は本学位論文の研究内容について他者との利害関係を有しません。

細胞, B細胞, 濾胞樹状細胞の集族像があり, そこでは抗原特異的なB細胞の分化を含む, いくつかの典型的なGCsとしての機能が認められる^{8,9}. またRA患者ではリウマトイド因子(IgM-RF)などの自己抗体が産生される⁹が, IgM-RF値が異所性GCs形成と相関するとの報告もある¹⁰. RAモデル動物からのB細胞除去による発症抑制効果¹¹や, 抗CD20抗体(リツキシマブ)によるB細胞を標的とした治療がRAに有効である事実は¹², RAにB細胞が関与することを強く示唆している.

B細胞刺激因子(B-cell-activating factor belonging to the TNF family: BAFF)は, RAの病態との関連が示唆されるサイトカインである. BAFFはB細胞の生存・分化・抗体産生に必須の因子である^{9,13,14}, RAの血清ならびに関節液中では可溶性BAFF濃度が上昇し滑膜中にはBAFF発現細胞が存在すること¹⁵⁻¹⁷が知られている. 抗BAFF抗体は新規治療薬の候補であり, 現在国内外で抗BAFF抗体(ベリムマブ, タバルマブ)の治療が進行している^{20,21}.

近年, RAの臨床において重要性を増した指標がある. 一つは抗環状シトルリン化ペプチド抗体(Anti-cyclic citrullinated peptide antibody: ACPA)で, 関節破壊の予後不良因子である^{22,23}. もう一つは, simplified disease activity index (SDAI) と clinical disease activity index (CDAI)で, 疾患活動性と臨床的寛解の評価に簡便かつ有用であり²⁴⁻²⁶, 28-joint disease activity score (DAS28)²⁷とともに使用されている.

本研究においては, RAにおけるBAFFの関与を明らかにするために, 2つの観点から検討した. まず滑膜組織におけるBAFFとBAFF-Rの分布と機能ならび

に血清と関節液中の可溶性BAFF濃度について検討した. 次に, RAにおける臨床的指標と血清中の可溶性BAFF濃度との相関の有無をACPA陽性群に注目して臨床的な検討を加えた. 疾患活動性指標であるSDAIおよびCDAIにおけるBAFFの影響については, 多変量解析を使用した.

方法と材料

1. 患者および検体

アメリカリウマチ学会(ACR)の分類基準²⁸を満たし, 関節置換術を施行した12名のRA患者から滑膜検体を採取した. 各患者の背景については, Table1に示した. 変形性関節症(OA)の滑膜検体, 健常成人からの扁桃組織ならびにリンパ節組織は, コントロールとして使用した. 可溶性BAFF濃度は, 治療目的に関節穿刺が必要だった20名の異なるRA患者の関節液, ならびにRA患者28名と健常人31名から採取した血清を用いて解析した. 血清C反応性蛋白(CRP)は診療時に採取し, 臨床検査室にてラテックス免疫比濁法で計測した. 本研究に参加した全ての患者及び健常人はヘルシンキ宣言に基づくインフォームドコンセントを受けている. 本研究は, 国立国際医療研究センター倫理委員会の承認を受けた.

臨床的な評価は, 埼玉医科大学病院リウマチ膠原病科外来通院中または入院中の62名のRA患者を対象とした(Table 2). 通常診察により, 関節評価(圧痛関節数, 腫脹関節数)と患者評価(患者全般評価, HAQ(生活機能評価))を施行した. 診療時採取した血液により, 赤沈(Westergren法), CRP, MMP-3(マトリックスメタロプロテアーゼ-3, ラテックス免疫比濁法),

Table 1. 検体種類別患者背景

検体	滑膜 (n=12)	関節液 (n=20)	血清 (n=28)
年齢	63.7±13.2	63.3±12.6	62.9±12.3
男女比(男/女)	2/12	6/14	8/20
CRP値(mg/dl)	3.7±3.3	2.9±2.8	3.9±3.5
IgM-RF値(IU/ml)	166±137	247±390	250±348
治療内容			
非ステロイド性抗炎症薬	5(41.7)	9(45.0)	10(35.7)
疾患修飾性抗リウマチ薬			
メトトレキサート	7(58.3)	9(45.0)	11(39.3)
サラズスルファピリジン	6(50.0)	10(50.0)	14(50.0)
ブシラミン	3(25.0)	1(5.0)	7(25.0)
プレドニゾロン	7(58.3)	13(65.0)	17(60.7)
投与量(mg/day)	6.7±2.3	5.7±1.1	6.1±3.0

CRP; C-反応性蛋白, IgM-RF; リウマトイド因子. 数値は平均±標準偏差または患者数(%)を示す(別途記載のあるものを除く).

IgG (免疫グロブリンG, 免疫比濁法), IgM-RF (ラテックス凝集法), ACPA (酵素結合免疫吸着法) を計測した. X線は, 診察を担当する医師以外の熟練した2名が臨床的な情報なくシャープスコア変法 (関節裂隙狭窄化スコア (joint narrowing score), 骨びらんスコア (erosion score), 総シャープスコア (modified total Sharp score)) にて評価した. この臨床評価に関する研究は埼玉医科大学病院 IRB の承認を受けており, この研究に参加した全ての患者はヘルシンキ宣言に基づくインフォームドコンセントを受けている.

Table 2. 患者背景

年齢 (歳)	59.5
男女比 (男/女)	15/47
罹病期間 (年)	5.0
可溶性 BAFF 濃度 (pg/ml)	1429
IgM-RF 陽性 (%)	42 (68)
IgM-RF (IU/L)	55.5
ACPA 陽性 (%)	50 (81)
ACPA (IU/L)	61.4
CRP (mg/dl)	0.45
赤沈 (mm/h)	46
MMP-3 (ng/ml)	96.4
IgG (mg/dl)	1340
圧痛関節数	2
腫脹関節数	1
患者全般評価 (mm)	24
医師評価 (mm)	20
SDAI	10.22
CDAI	8.65
DAS28-ESR4	3.98
DAS28-CRP4	3.19
HAQ	0.625
関節裂隙狭窄化スコア	12
骨びらんスコア	11
総シャープスコア	22
メトトレキサート投与量 (mg/週)	8
プレドニゾン投与量 (mg/日)	1.5
生物学的製剤使用者数 (%)	34 (55)

数値は中央値または患者数 (%) を示す. ACPA: 抗シトルリン化ペプチド抗体, BAFF: B細胞刺激因子, IgM-RF: リウマトイド因子, CRP: C-反応性蛋白, MMP-3: マトリックスメタロプロテアーゼ-3, IgG: 免疫グロブリンG, SDAI: simplified disease activity index, CDAI: clinical disease activity index, DAS28-ESR4: 疾患活動性スコア, HAQ: 生活機能評価.

2. 細胞処理

関節置換術施行時に採取した滑膜検体を細切後, デオキシリボヌクレアーゼ I (Worthington, Lakewood, NJ, USA), コラーゲナーゼ IV (Worthington), ヒアルロニダーゼ (Sigma, St Louis, MO, USA) にて処理した. その後Ficoll (Muto Pure Chemicals Co.Ltd, Tokyo, Japan) を用いた濃度勾配遠心法にて, 単細胞浮遊液を得た. RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) に10% ウシ胎児血清 (FCS; ICN Biomedicals, Irvine, CA, USA), ペニシリン-ストレプトマイシン (Invitrogen Life Technologies), ゲンタマイシン (Sigma) を加えた培養液中で一晩培養後, 附着細胞を線維芽細胞様滑膜細胞 (fibroblast-like synoviocytes: FLS) として回収した. FLSは4から6継代したものを, 実験に使用した. 末梢血単核細胞 (PBMCs) はFicoll (Muto Pure Chemicals) を用いて健常人より採取した. CD19陽性細胞は, CD19-MicroBeadsキット (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) のプロトコールに従い分離した. 分離された細胞のうちB細胞の占める割合が95%以上であることは, フローサイトメトリーにて確認している.

3. フローサイトメトリー

滑膜の単核細胞とFLSは, マウス抗ヒトmAbであるCD3-FITC (SK7; BD Biosciences, San Diego, CA, USA), CD19-FITC (4G7; Beckton Dickinson, San Jose, CA, USA), CD14-FITC (M ϕ PQ; BD Biosciences), BAFF-PE (137314; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), BAFF-R-PE (11C1; BD Biosciences) にて染色した. 細胞には50 μ g/mlのmAbと, 2% FCSを含むリン酸緩衝液 (PBS) を加え, 30分間氷上に静置した. 細胞質のBAFFを染色する前には, PBSで4%に調整した冷却パラホルムアルデヒド (PFA) を細胞に加え室温で10分間静置して細胞固定し, Hanks塩類溶液 (HBSS) で0.05%に調整したサポニン (ICN) で透過膜処理を行った²⁹⁾. 解析にはBD FACS Calibur (BD immunocytometry Systems) とFlowJo 6.1.1ソフトウェア (Tree Star Inc. Ashland, OR, USA) を使用した. RA-FLSにおける細胞質BAFF, 膜結合BAFF, BAFF-Rは, 10 ng/mlのリコンビナントTNF- α (RELIAtech GmbH, Wolfenbüttel, Germany) で刺激する前後で染色を行った.

4. RNA抽出と逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (Reverse transcriptase polymerase chain reaction: RT-PCR)

トータルRNAは, TRI REAGENT (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) を用いて滑膜の単核細胞, FLS, コントロール用細胞から抽出した. 1 μ gのトータルRNAに対して, 200Uのモロニーマウス白血球ウイルス (Moloney murine leukaemia virus:

M-MLV) 逆転写酵素 (Invitrogen Life Technologies), 25 mM デオキシリボヌクレオシド三リン酸 (dNTPs) ミックス (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 50 μ g オリゴ (dT) 12-18 プライマー (Invitrogen Life Technologies) を用いて相補的 DNA (cDNA) を合成した. PCR 反応では次のオリゴヌクレオチドプライマーと, GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems) を使用した: BAFF, 5'-CCCCAACCTTCAAAGTTCAAGTAG-3' (forward), 5'-TGAGTGACTGTTTCTTCTGGACCC-3' (reverse); BAFF-R, 5'-GGTCCTGGTGGGTCTGGTGAG-3' (forward), 5'-GGCTGAATGCTGTGGTCTGTAGTG-3' (reverse); GAPD, 5'-GAAATCCCATCACCATCTTCCAG-3' (forward), 5'-ATGAGTCCTTCCACGATACCAAAG-3' (reverse).

5. 免疫組織化学

免疫組織化学染色では, 500 倍希釈ラット抗ヒト BAFF モノクローナル抗体 (mAb) (Buffy-2; Alexis Corporation, Lausen, Switzerland), 1000 倍希釈マウス抗ヒト BAFF-R mAb (11C1; Alexis Corporation), 200 倍希釈マウス抗ヒト CD3 mAb (F7.2.38; DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA), 200 倍希釈マウス抗ヒト CD20 mAb (L26; DakoCytomation) を使用した. パラフィンで包埋切片は, まずクエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で 121 $^{\circ}$ C 10 分間オートクレーブにて前処理を行った. 次に上記の抗体を用いて, DakoCytomation Autostainer (DakoCytomation) と Mouse EnVision HRP (DakoCytomation) システムにより切片を免疫染色した. 発色剤はジアミノベンジン (DakoCytomation) を使用し, 最後にヘマトキシリン染色を施行した.

6. 血清ならびに関節液中の可溶性 BAFF の測定

血清中および関節液中の可溶性 BAFF 濃度は診察時に採取した血清の一部を使用し, Quantikine Human BAFF Immunoassay kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を用いたサンドイッチ ELISA 法により, プロトコールに従い測定した. 吸光度の計測は Model 680 Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) もしくは ImmunoMini NJ-2300 plate reader (InterMed, Tokyo, Japan) を使用した.

7. 疾患活動性スコア

RA 疾患活動性の指標として, DAS28, SDAI, CDAI を使用した.

8. データ解析

データは JMP 9.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) にて解析した. 二群間の比較は Mann-Whitney test または

Fisher's exact test, 相関関係の検定には Spearman rank test を使用した. 重回帰分析は, 全症例ならびに ACPA 陽性群に対して行った. SDAI および CDAI と各臨床的指標との単回帰分析で有意 ($p < 0.05$) だった臨床評価項目を説明変数, SDAI と CDAI を目的変数とした.

結果

1. RA 滑膜組織における BAFF と BAFF-R 発現とその分布

RA 患者の滑膜組織では単核細胞の浸潤様式により 3 つのカテゴリーに分類されることが知られており^{8,9,18}, 本研究でも同様の結果を得た¹⁷. ほとんどの組織検体では単核細胞がびまん性に浸潤し GCs の形成を認めなかったが (Fig. 1B, C), 1 検体で GCs 様構造を伴うリンパ濾胞 (いわゆる「異所性 GCs」) 像が認められた (Fig. 1A). 異所性 GCs における BAFF と BAFF-R, および T 細胞と B 細胞の発現様式は, 報告されている正常リンパ節と同様だった³⁰. またびまん性浸潤もしくは集簇像を示す T 細胞と B 細胞いずれにおいても, BAFF と BAFF-R が発現しており (Fig. 1), 正常リンパ器官と同様の結果だった³⁰. 注目すべきことは, BAFF が滑膜表層細胞ではなく深層細胞で発現していたことである. BAFF を発現していたほとんどの細胞は CD3 と CD20 が陰性で, 核小体が目立つ大きな核と大きな細胞質を持っており, 滑膜細胞と同定された. 尚, この滑膜深層にある非リンパ細胞は, BAFF-R を発現していなかった (Fig. 1C, D, 矢印).

2. 滑膜単核細胞における BAFF と BAFF-R 発現

RA 滑膜中の細胞における BAFF と BAFF-R 発現を確認する目的で, 方法と材料の項で述べた手法で滑膜組織中の単核細胞を得た. フローサイトメトリーを用いた解析より, BAFF 蛋白は T 細胞 (平均蛍光強度 (MFI) = 8.4; $p < 0.01$), B 細胞 (MFI = 17.1; $p < 0.01$), CD14 陽性単球 (MFI = 7.694; $p < 0.05$) の細胞質で有意に多く発現していた (Fig. 2A, B).

一方, BAFF-R は T 細胞 (MFI = 9.79; $p < 0.01$), B 細胞 (MFI = 170.9; $p < 0.01$) の細胞表面に有意に多く発現していたが, CD14 陽性単球の細胞表面には認めなかった (MFI = 6.7; $p = 0.08$) (Fig. 2A, B).

3. RA-FLS における BAFF と BAFF-R 発現

滑膜細胞は FLS として分離してから, 解析を行った. 4 から 6 継代した RA-FLS は, 無刺激の状態での細胞質での BAFF 蛋白 (Fig. 3 中央) および mRNA (Fig. 4 中央) を発現していた. 一方, 細胞表面には発現が認められなかった (Fig. 3 左). 尚, BAFF-R は mRNA ならびに蛋白質いずれのレベルでも発現は見られなかった (Fig. 3 右, Fig. 4 中央). OA から分離した FLS はわずかに BAFF mRNA を発現していたが, BAFF-R mRNA は認めなかった (Fig. 4 右).

4. RA 患者の関節液と血清中における可溶性 BAFF 濃度の上昇

RA 患者から採取した血清 (n = 28) と関節液 (n = 20) を用いて可溶性 BAFF 濃度を解析した。Fig. 5A に示すように、RA 血清では健常人血清と比較して可溶性 BAFF 濃度が有意に高値だった (中央値 1.348 vs. 0.818 ng/ml, $p < 0.05$)。更に RA 血清よりも関節液中の可溶性 BAFF 濃度が高値であり (4.085 vs. 1.348 ng/ml, $p < 0.05$)、これまでの報告と同様の結果だった^{15, 16, 31}。5 名の RA 患者において血清と関節液を同時に採取して比較すると、血清よりも関節液中の可溶性 BAFF 濃度が常に高値であり ($p < 0.05$, Mann-Whitney test) (Fig. 5B)、関節組織中に BAFF 産生細胞が存在する可能性が唆された。

血清または関節液の可溶性 BAFF 濃度を測定した患者の一部において血清 CRP を同日に測定し (血清: n = 27; 関節液: n = 16)、CRP と可溶性 BAFF 濃度の相関を検討した。その結果、CRP と血清中の可溶性 BAFF 濃度は従来の報告同様^{32, 33} 相関関係を認めなかったが ($r = -0.03$, $p = 0.88$) (Fig. 5C)、CRP と関節液中の可溶性 BAFF 濃度には有意な相関を認め ($r =$

0.64, $p = 0.01$) (Fig. 5D)、RA の関節炎と BAFF の関連が推測された。

5. 可溶性 BAFF 濃度と臨床的指標との相関

臨床的指標との関連を検討した RA 患者における可溶性 BAFF 濃度 (Fig. 6) は、ACPA 陽性群と陰性群で有意差を認めなかった ($p = 0.9168$)。

全症例においては、可溶性 BAFF 濃度とプレドニゾン投与量は逆相関 ($r = -0.28$, $p = 0.03$) した (Table 3, Fig. 7H)。また罹病期間についても弱い逆相関を認めた ($r = -0.24$, $p = 0.06$) が、その他の臨床評価項目とは相関を認めなかった (Fig. 7A-G)。ACPA 陽性群においては、可溶性 BAFF 濃度と罹病期間は逆相関 ($r = -0.32$, $p = 0.02$) しており (Table 3, Fig. 7I)、プレドニゾン投与量とは軽度逆相関していた ($r = -0.26$, $p = 0.07$)。ACPA 陰性群では、いずれの項目とも有意な相関を認めなかった。

6. 可溶性 BAFF 濃度と SDAI・CDAI との関連

SDAI と CDAI を測定し得た 52 例で、それぞれ各臨床的指標との単回帰分析を施行した。SDAI に

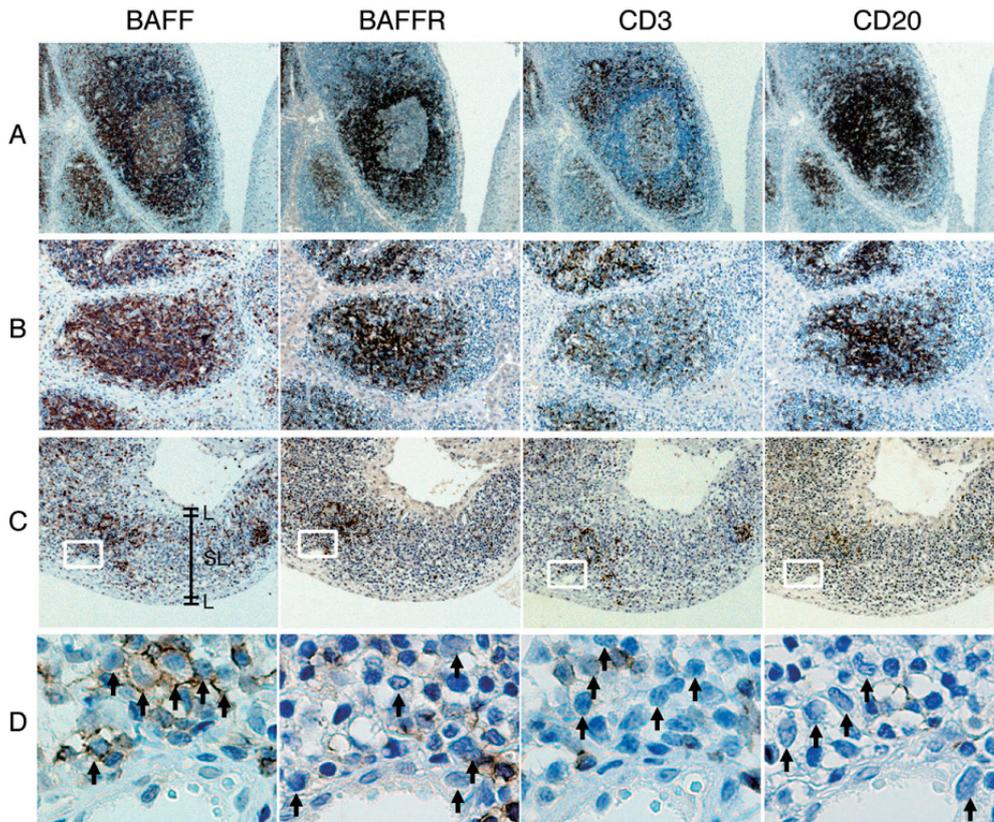


Fig. 1. 3 種類の浸潤パターンを呈した RA 滑膜組織中 MNCs における BAFF および BAFF-R 発現の免疫組織化学染色。(A) 異所性 GCs を伴うリンパ濾胞。(B) リンパ球集簇。(C, D) びまん性浸潤。滑膜表層細胞は L、深層細胞は SL で示した。C の枠内の強拡大が D。倍率は 20 倍 (A-C)、400 倍 (D)。(Nakajima K, et al. Scand J Rheumatol 2007;36:365-72 の Fig. 1 を許可を得て転載)

おいては、可溶性BAFF濃度 ($p = 0.030$), ACPA ($p = 0.011$), IgM-RF ($p < 0.001$), 赤沈 ($p < 0.001$), CRP ($p < 0.001$), MMP-3 ($p = 0.029$), HAQ ($p < 0.001$), プレドニゾン投与量 ($p = 0.005$) で関連を認めた (Table 4). これらの臨床的指標を説明変数, SDAI を目的変数として重回帰分析を施行したところ (赤沈とCRP は強い相関を認めた ($r = 0.83$) ため赤沈のみ使用), 可溶性BAFF濃度 ($p = 0.015$), IgM-RF

($p = 0.012$), HAQ ($p < 0.001$), プレドニゾン投与量 ($p = 0.032$) が有意な説明変数 ($p < 0.0001$) であった (自由度調整 $R^2 = 0.66$).

ACPA陽性群 (42 例) では、可溶性BAFF濃度 ($p = 0.026$), IgM-RF ($p < 0.001$), 赤沈 ($p < 0.001$), CRP ($p < 0.001$), MMP-3 ($p = 0.012$), HAQ ($p < 0.001$), プレドニゾン投与量 ($p = 0.032$) が単回帰分析にてSDAIと関連していた. 重回帰分析では、可溶性BAFF濃度 ($p = 0.015$), IgM-RF ($p = 0.017$), HAQ ($p < 0.0001$), プレドニゾン投与量 ($p = 0.031$) が有意な説明変数であり、全症例と同様の結果 ($p < 0.0001$) であった (自由度調整 $R^2 = 0.64$).

一方、CDAIと関連していたのは、全症例ではACPA ($p = 0.010$), IgM-RF ($p < 0.001$), 赤沈 ($p < 0.001$), CRP ($p < 0.001$), HAQ ($p < 0.001$), プレドニゾン投与量 ($p = 0.006$) であり、ACPA陽性群ではIgM-RF ($p < 0.001$), 赤沈 ($p < 0.001$), CRP ($p < 0.001$), MMP-3 ($p = 0.044$), HAQ ($p < 0.001$), プレドニゾン投与量 ($p = 0.033$) だった (Table 3). 可溶性BAFF

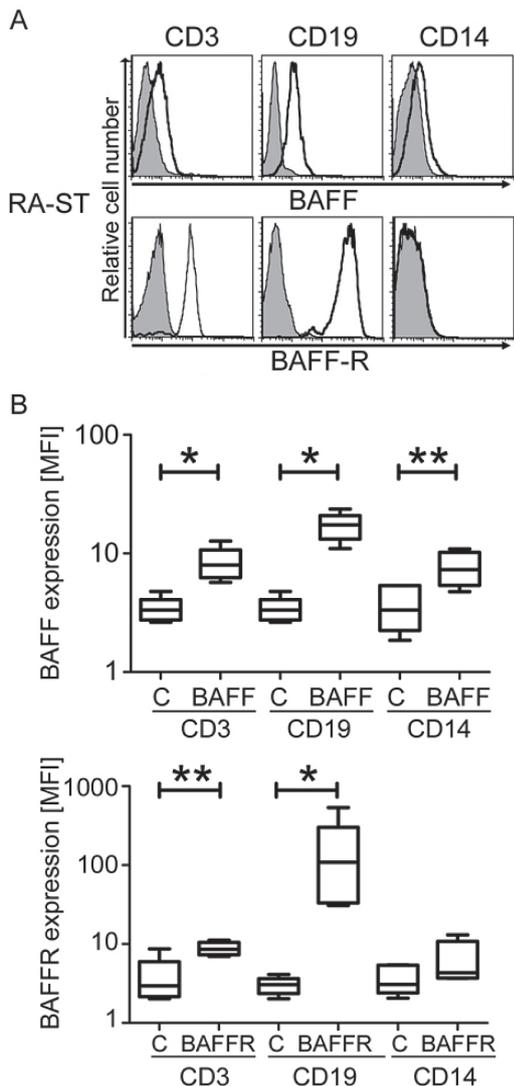


Fig. 2. RA滑膜組織 (RA-ST) に浸潤した単核細胞 (MNCs) におけるBAFFおよびBAFF-R蛋白発現. (A) 細胞質内BAFFと細胞膜上BAFF-Rに特異的なモノクローナル抗体で染色したRA滑膜組織中MNCsの代表的ヒストグラム (CD3, CD19, CD14陽性細胞をゲーティング). 灰色のヒストグラムはアイソタイプコントロール. (B) RA滑膜組織中MNCsのBAFFおよびBAFF-R蛋白レベルの分布. 箱の中央線は中央値, 箱の上下辺は四分位範囲, 線の上下辺は10および90パーセントイルを示す. C: アイソタイプコントロール. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$. MFI, 平均蛍光強度.

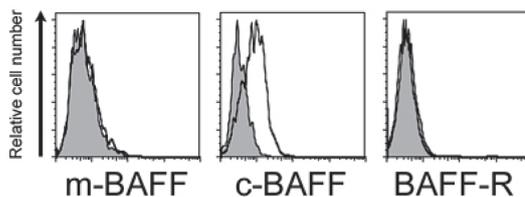


Fig. 3. RAの繊維芽細胞様滑膜細胞 (RA-FLS) におけるBAFFおよびBAFF-R蛋白発現. BAFFとBAFF-Rに特異的なモノクローナル抗体で染色した細胞質内BAFF (c-BAFF), 細胞膜上BAFF (m-BAFF), BAFF-R RA-FLSの代表的ヒストグラム. 灰色のヒストグラムはコントロール.

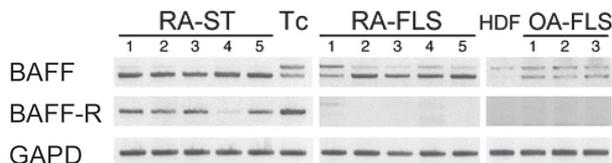


Fig. 4. RAの滑膜組織 (RA-ST) ならびにRA-FLSにおけるBAFFおよびBAFF-RのmRNA発現. RA-STの下番号とRA-FLSの下番号が同一の場合は同じ患者の検体であることを示す. 扁桃組織 (Tc) はリンパ組織の代表的なコントロールとして使用した. 健康人の皮膚繊維芽細胞 (HDF) を正常コントロール, 変形性関節症のFLS (OA-FLS) を疾患コントロールとした. (Nakajima K, et al. Scand J Rheumatol 2007;36:365-72のFig. 5を許可を得て転載)

濃度は両群で軽度の関連を認めたが ($p = 0.065$ ならびに $p = 0.053$), 有意ではなかった. CDAI を目的変数とした重回帰分析では, IgM-RF ($p = 0.004$ ならびに $p = 0.007$) と HAQ ($p < 0.001$ ならびに $p = 0.001$) が両群において有意な説明変数 ($p < 0.0001$) であった (自由度調整 $R^2 = 0.61$ ならびに 0.58).

ACPA 陰性群 (10 例) における単回帰分析では, SDAI と IgM-RF ($p = 0.0475$), 赤沈 ($p = 0.0165$), CRP ($p = 0.0235$), 罹病期間 ($p = 0.0002$), HAQ ($p = 0.0054$) が関連し ACPA 陽性群とほぼ同じ傾向だった. CDAI と関連していたのは罹病期間 ($p = 0.0031$), HAQ ($p < 0.0001$) だった. いずれにおいても, 可溶性 BAFF 濃度は関連を認めなかった.

可溶性 BAFF 濃度と SDAI・CDAI を構成する 5 つの要素 (圧痛関節数, 腫脹関節数, CRP, 患者全般評価, 医師評価) との相関係数は, 全症例および ACPA 陽性群いずれも有意ではなく (Table 3), 特定の要素との関連を認めなかった.

考 察

今回免疫組織化学染色により, RA の滑膜組織における BAFF と BAFF-R の正確な発現様式を示した. 解析

した全ての滑膜組織において, リンパ球が局所性もしくはびまん性に浸潤していた. ほとんどのリンパ球は集簇像を形成していたが, 1 検体で異所性 GCs 構造が認められた. RA の関節滑膜におけるこれらの異所性 GCs は, クロウンの増幅や, 新規点突然変異の集積として測定される免疫グロブリン (Ig) 可変領域遺伝子の多様性に寄与すると推測されている. このことが, 個々の抗原に対する親和力を備えた B 細胞の多様性を生み出している^{34,35}.

BAFF は元々単球と樹状細胞で発現が認められていたが, RA の滑膜組織に浸潤した T 細胞と B 細胞でも BAFF と BAFF-R を発現していた. これまでの報告では滑膜表層細胞でのみ¹⁹, もしくは CD68 陽性マクロファージでのみ BAFF が発現したとしている¹⁸. 今回の研究において, BAFF と BAFF-R は RA と健常人の PBMC での発現様式および RA の滑膜組織での発現様式が同じだったことから, 我々は滑膜組織で BAFF を発現していたリンパ球が特別なリンパ球ではないと考えている. この結果から推測すると, 滑膜組織に浸潤している成熟した B 細胞と T 細胞は, BAFF シグナルを相互にやりとりできるのかもしれない. また滑膜組織の異所性 GCs における BAFF と BAFF-R の発現

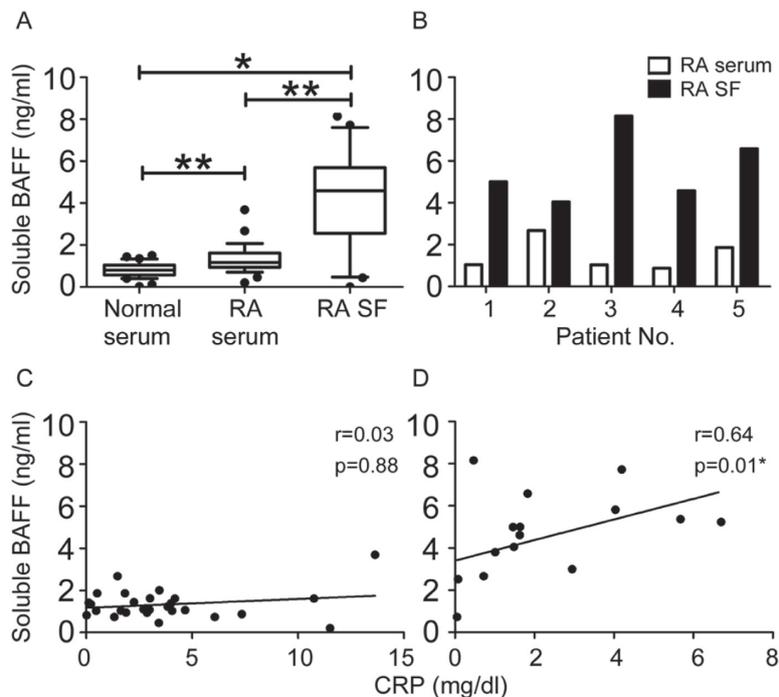


Fig. 5. RA 患者における血清ならびに関節液中の可溶性 BAFF 濃度. (A) RA 患者の血清 (RA serum, $n = 28$) ならびに関節液中 (RA SF, $n = 20$) の可溶性 BAFF 濃度. コントロールは 31 名の健常人血清 (Normal serum). 箱の中央線は中央値, 箱の上下辺は四分位範囲, 線の上下辺は 10 および 90 パーセントイルを示す. * $p < 0.01$. ** $p < 0.05$. (B) RA 患者における血清 (RA serum) と関節液 (RA SF) を同時に採取した時の可溶性 BAFF 濃度. 5 名の患者より同じ日に両方の検体を採取した. 棒グラフは白色が RA 血清, 黒色が RA SF を示す. (C) 血清 CRP と血清中可溶性 BAFF 濃度の相関. (D) 血清 CRP と関節液中可溶性 BAFF 濃度の相関.

様式は正常リンパ節と同一であることが観察されており³⁰⁾, RAの滑膜組織でBAFFが作用することで異所性GCsの反応を促進している可能性が示唆される。

我々は当初, RAの関節では滑膜細胞とリンパ球が局所的にポジティブフィードバックを形成して相互に刺激し合っており, BAFFはその刺激に関わる因子の一つだと仮定していた. 今回の研究では, 滑膜深層細胞はBAFFを発現していたが表層細胞は発現

しておらず, 以前の報告と結果が異なっていた¹⁹⁾. その後, 早期RAにおいて滑膜表層細胞ではなく深層細胞にMig/CXCL9が発現し, 滑膜組織に浸潤した形質細胞上の受容体CXCR3に作用を及ぼしていることが報告された³⁰⁾. このことは, 滑膜細胞は滑膜深層に浸潤した細胞と相互作用していることを示唆している. 注目すべきは, 継代培養にて純化したRA-FLSがBAFF mRNAとBAFF蛋白を無刺激で発現し続けていることである. 今回, BAFFを発現した滑膜深層FLSとBAFFを発現していない表層FLSを分離していないためこれらFLSの違いは不明であるが, 滑膜深層のFLSがRA特異的で元々(もしくは遺伝的に)健常人のFLSと異なりBAFFを無刺激で発現していることは考えにくい. むしろFLSは, おそらくリンパ球から刺激を受けて, BAFFを発現したと考えられる. ただし滑膜表層細胞も深層細胞もBAFF-Rを発現していなかったことから, BAFFのみに反応している訳ではないことが示唆される.

SDAIは, ACPA陽性群において可溶性BAFF濃度と関連を認めた. 近年, shared epitopeと呼ばれるHLA class IIの特徴的なアミノ酸配列の重要性, 喫煙の影響, さらに臨床的に典型的な経過と関節破壊の進行および不良な予後という観点から, RAはACPA

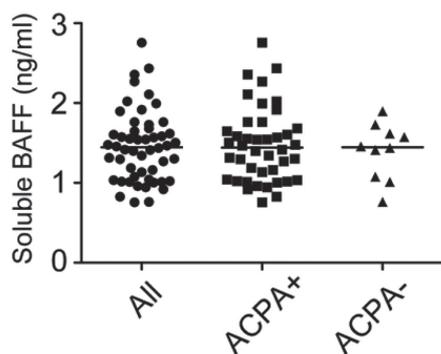


Fig. 6. 全症例, ACPA陽性, およびACPA陰性RAにおける可溶性BAFF濃度. 線は中央値.

Table 3. RA患者における可溶性BAFF濃度と臨床評価項目との相関関係

臨床評価項目	全症例		ACPA陽性		ACPA陰性	
	r	p	r	p	r	p
年齢(歳)	0.19	0.12	0.19	0.18	0.17	0.59
罹病期間(年)	-0.24	0.06	-0.32	0.02*	0.05	0.86
IgM-RF(IU/L)	-0.02	0.83	-0.01	0.94	-0.20	0.52
ACPA(IU/L)	0.09	0.44	0.19	0.17	-0.56	0.06
CRP(mg/dl)	0.05	0.67	0.13	0.36	-0.31	0.32
赤沈(mm/h)	-0.04	0.75	0.03	0.82	-0.19	0.55
MMP-3(ng/ml)	0.04	0.71	0.02	0.85	0.22	0.48
IgG(mg/dl)	-0.00	0.99	0.20	0.21	-0.49	0.13
圧痛関節数	0.08	0.50	0.22	0.11	-0.56	0.05
腫脹関節数	-0.00	0.99	0.05	0.70	-0.37	0.23
患者全般評価(mm)	0.02	0.82	0.14	0.31	-0.38	0.22
医師評価(mm)	0.01	0.92	0.09	0.57	-0.41	0.24
DAS28-ESR4	0.09	0.49	0.23	0.10	-0.35	0.26
DAS28-CRP4	0.07	0.60	0.20	0.17	-0.35	0.26
HAQ	0.01	0.90	0.11	0.44	-0.56	0.07
関節裂隙狭小化スコア	-0.06	0.66	-0.17	0.29	0.21	0.55
骨びらんスコア	-0.18	0.21	-0.28	0.09	0.38	0.27
総シャープスコア	-0.14	0.33	-0.26	0.16	0.35	0.32
メトトレキサート投与量(mg/週)	-0.02	0.83	-0.10	0.46	0.48	0.11
プレドニゾン投与量(mg/日)	-0.28	0.03*	-0.26	0.07	-0.37	0.23

可溶性BAFF濃度と臨床的指標との関連. *p < 0.05.

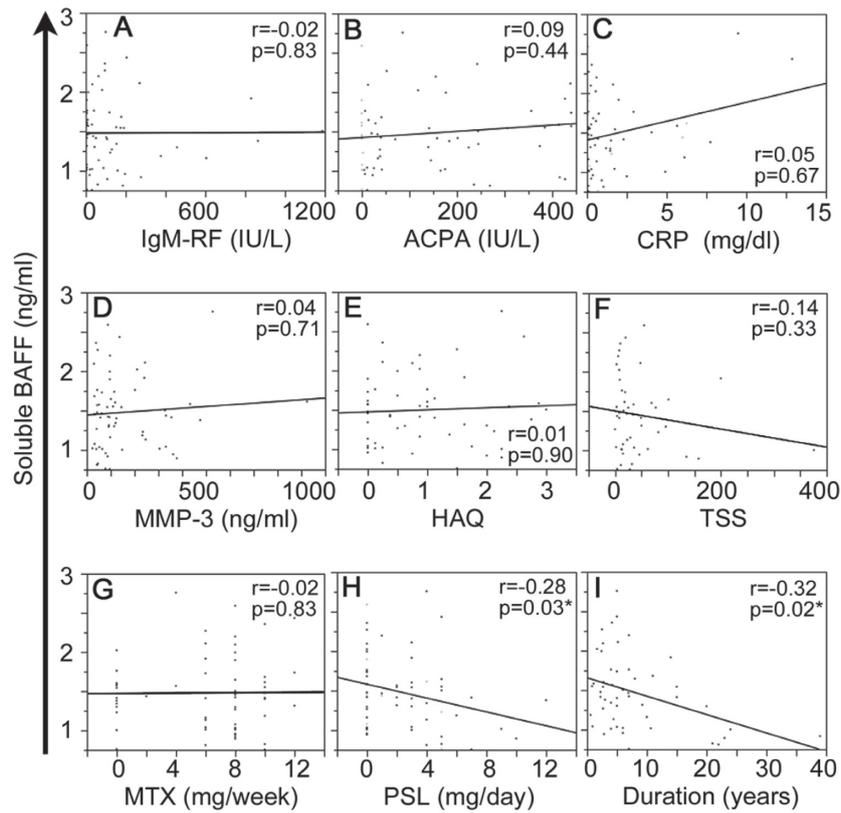


Fig. 7. 可溶性BAFF濃度と臨床的指標との相関. *p < 0.05. TSS; modified total sharp score.

Table 4. RAにおけるSDAI/CDAIと臨床的指標との関連

	SDAI				CDAI			
	全症例		ACPA 陽性		全症例		ACPA 陽性	
	単変量	多変量	単変量	多変量	単変量	多変量	単変量	多変量
	p	p	p	p	p	p	p	p
sBAFF	0.030*	0.015*	0.026*	0.015*	0.065		0.053	
ACPA	0.011*	0.441	0.078		0.010*	0.840	0.090	
IgM-RF	<0.001*	0.012*	<0.001*	0.017*	<0.001*	0.004*	<0.001*	0.007*
ESR	<0.001*	0.130	<0.001*	0.157	<0.001*	0.309	<0.001*	0.357
CRP	<0.001*		<0.001*		<0.001*		<0.001*	
MMP-3	0.029*	0.887	0.012*	0.817	0.149		0.044*	0.759
年齢	0.089		0.696		0.639		0.604	
罹病期間	0.186		0.314		0.088		0.190	
HAQ	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	0.001*
IgG	0.243		0.468		0.291		0.674	
TSS	0.086		0.168		0.072		0.165	
MTX 投与量	0.669		0.680		0.622		0.616	
PSL 投与量	0.005*	0.032*	0.032*	0.031*	0.006*	0.103	0.033*	0.128
自由度調整 R ²		0.66		0.64		0.61		0.58

SDAIまたはCDAIを目的変数とした重回帰分析. 説明変数は単回帰分析で有意だった臨床的指標. *p < 0.05.

陽性群と陰性群に分けて考えられる傾向がある¹⁾。特に病態を解析する場合には典型的なRAであるACPA陽性群に着目する意味がある。本研究においても同様の観点から、ACPA陽性群での臨床的検討を行った。SDAIとCDAIは、臨床的寛解およびX線上の骨病変の進行予測に有用とされる。まずこれまでにDAS28は可溶性BAFF濃度と相関することが報告されており³⁷⁾、DAS28と相関しなかった報告³³⁾においても治療後DAS28の改善とともに可溶性BAFF濃度が低下していることから、可溶性BAFF濃度はRAの疾患活動性と関連することが示唆された。

CDAIについては、可溶性BAFF濃度と軽度の相関を認めたが有意ではなかった。CDAIとSDAIの違いはCRPの有無のみであり、CRPと可溶性BAFF濃度の関連が疑われたが、可溶性BAFF濃度とCRPは相関していなかった(Table 2)。先行研究においても、血清中の可溶性BAFF濃度は赤沈やCRPといった炎症反応とは相関を認めていない^{32, 33)}。しかしながら、CRPと関節液中の可溶性BAFF濃度には有意な相関を認めており(Fig. 3B)、CRPはわずかに可溶性BAFF濃度の影響を受けてCDAIの相関が弱くなった可能性がある。

可溶性BAFF濃度は、プレドニゾン投与量と逆相関した。全症例ならびにACPA陽性群で同様の傾向だったが、ACPA陰性群では関連を認めなかった。RA患者から分離した線維芽細胞様滑膜細胞に*in vitro*で副腎皮質ステロイドを投与すると、BAFFのmRNA発現が抑制され可溶性BAFFの分泌が低下していた²⁸⁾。このことから、プレドニン投与量の少ない方が可溶性BAFF濃度が高値だったと推測される。

SDAIとCDAIは、HAQならびにIgM-RFと関連していた。HAQはSDAI、CDAIならびにDAS28とも相関することが知られている²⁹⁾。またIgM-RFも高疾患活動性例で上昇し、治療により活動性が低下すると減少する⁴⁰⁾。いずれの結果も、本研究と同様の傾向だった。尚、抗CD20抗体のリツキシマブ(RTX)治療によりDAS28とIgM-RFが低下する症例では形質細胞の減少が報告されており⁴¹⁾、IgM-RF産生細胞である形質細胞の関与が推測される。

可溶性BAFF濃度とACPA抗体価は、全症例ならびにACPA陽性群で関連を認めず、従来の報告と同様だった^{32, 42)}。我々はBAFFによりB細胞が成熟し形質細胞からのACPA産生⁴³⁾に影響すると予想したが、ACPA陽性群・陰性群いずれにおいても関連しなかった。ACPA産生に関与する形質細胞には長寿命(long-lived plasma cells (PCs))と短寿命(short-lived PCs)の2種類が存在する⁴⁴⁾。RTX治療後に総IgG値や細菌に対する抗体価が変化せずACPAなど自己抗体の抗体価が減少する⁴⁵⁾のは、RTXが自己抗体産生細胞であるCD20陽性short-lived PCsに影響したためと推測される^{44, 46)}。他方、可溶性BAFF濃度高値例とACPA抗

体価に関連を認めた報告もあり³³⁾、両者の関連については今後も検討を要する。

ACPA陰性群において、SDAIならびにCDAIと可溶性BAFF濃度は関連しなかった。可溶性BAFF濃度とSDAIを構成する5つの要素(圧痛関節数、腫脹関節数、CRP、患者全般評価、医師評価)にも、相関は認めていない。陽性群は全て正の相関で、陰性群は全て負の相関だったことが影響した可能性がある。(Table 2)。

CRPと関節液中の可溶性BAFF濃度に相関を認めた。BAFF発現細胞は関節炎のある滑膜組織に存在すること、関節液中の可溶性BAFF濃度は同日に採取した血清中の可溶性BAFF濃度よりも高値であることから^{17, 31)}、関節炎局所の影響をより反映しやすい関節液中の可溶性BAFF濃度のみCRPと相関したと推測される。この結果は可溶性BAFF濃度がRAの臨床的指標になり得ることを示しているが、治療の進歩により関節液が貯留する機会は残念ながら減少しており、関節液中の可溶性BAFF濃度が今後指標となる可能性は低い。

一方で、血清中の可溶性BAFF濃度はACPA陽性群の有効な指標となる可能性がある。SDAIは疾患活動性、身体機能、およびX線学的な関節破壊の進行度における予後と関連しており²⁰⁻²²⁾、本研究では血清中の可溶性BAFF濃度とSDAIが関連していたことから、血清中の可溶性BAFF濃度は典型的なRAと考えられるACPA陽性群における予後予測因子の一つになるかもしれない。

要 約

RAの滑膜組織にBAFF陽性細胞を認め、血清および関節液中の可溶性BAFF濃度が上昇していることから、RAとBAFFとの関連が示唆された。またACPA陽性RAにおいて血清中の可溶性BAFF濃度とSDAIに関連を認めており、臨床的に有用な予後予測因子になる可能性がある。

本研究の内容の一部は、第56回日本リウマチ学会(2012年4月、東京)にて発表した。

本論文は

Nakajima K, Itoh K, Nagatani K, Okawa-Takatsuji M, Fujii T, Kuroki H, Katsuragawa Y, Aotsuka S, Mimori A. Expression of BAFF and BAFF-R in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2007;36:365-72.

中嶋京一, 進藤靖史, 神津教倫, 三村俊英. 関節リウマチにおけるBAFFと臨床的指標ならびにSDAIとの関連. *埼玉医科大学雑誌* 2013;39:113-20. の一部を含む。

謝 辞

稿を終えるにあたり、研究および論文作成にご指導頂いた埼玉医科大学リウマチ膠原病科 三村俊英教授に深謝致します。また、検体採取に御協力いただいた埼玉医科大学リウマチ膠原病科医局員、検体処理に御協力いただいた相崎良美さん、白石尚美さん、古賀典子さん、山田裕加里さんに深謝致します。

引用文献

- 1) McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2011;365:2205-19.
- 2) Maini R, St Clair WE, Breedveld F, Furst D, Kalden J, Weisman M, et al. Infliximab (chimeric anti-tumor necrosis factor α monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomized phase III trial. *Lancet* 1999;354:1932-9.
- 3) Bathon JM, Martin RW, Fleischmann RM, Tesser JR, Schiff MH, Keystone EC, et al. A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2000;343:1586-93.
- 4) Keystone EC, Kavanaugh AF, Sharp JT, Tannenbaum H, Hua Y, Teoh LS, et al. Radiographic, clinical, and functional outcomes of treatment with adalimumab (a human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody) in patients with active rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate therapy. *Arthritis Rheum* 2004;50:1400-11.
- 5) Keystone EC, Genovese MC, Klareskog L, Hsia EC, Hall ST, Miranda PC, et al. Golimumab, a human antibody to tumor necrosis factor α given by monthly subcutaneous injections, in active rheumatoid arthritis despite methotrexate therapy: the GO-FORMAWD study. *Ann Rheum Dis* 2009;68:7889-96.
- 6) Nishimoto N, Hashimoto J, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, et al. Study of active controlled monotherapy used for rheumatoid arthritis, an IL-6 inhibitor (SAMURAI): evidence of clinical and radiographic benefit from an x ray reader-blinded randomised controlled trial of tocilizumab. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1162-7.
- 7) Kremer JM, Genant HK, Moreland LW, Russell AS, Emery P, Abud-Mendoza C, et al. Effects of abatacept in patients with methotrexate-resistant active rheumatoid arthritis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2006;144:865-76.
- 8) Magalhaes R, Stiehl P, Morawietz L, Berek C, Krenn V. Morphological and molecular pathology of the B cell response in synovitis of rheumatoid arthritis. *Virchows Arch* 2002;441:415-27.
- 9) Weyand CM, Goronzy JJ. Ectopic germinal center formation in rheumatoid synovitis. *Ann N Y Acad Sci* 2003;987:140-9.
- 10) Randen I, Mellbye OJ, Førre O, Natvig JB. The identification of germinal centers and follicular dendritic cell networks in rheumatoid synovial tissue. *Scand J Immunol* 1995;41:481-6.
- 11) Svensson L, Jirholt J, Holmdahl R, Jansson L. B cell-deficient mice do not develop type II collagen-induced arthritis (CIA). *Clin Exp Immunol* 1998;111:521-6.
- 12) Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, et al. Efficacy of B-cell targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2004;350:2572-81.
- 13) Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology /European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2010;62:2569-81.
- 14) Singh JA, Furst DE, Bharat A, Curtis JR, Kavanaugh AF, Kremer JM, et al. 2012 update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res* 2012;64:625-39.
- 15) Zhang J, Roschke V, Baker KP, Wang Z, Alarcon GS, Fessler BJ, et al. Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2001;166:6-10.
- 16) Tan SM, Xu D, Roschke V, Perry JW, Arkfeld DG, Ehresmann GR, et al. Local production of B lymphocyte stimulator protein and APRIL in arthritic joints of patients with inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:982-92.
- 17) Nakajima K, Itoh K, Nagatani K, Okawa-Takatsuji M, Fujii T, Kuroki H, et al. Expression of BAFF and BAFF-R in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2007;36:365-72.
- 18) Seyler TM, Park YW, Takemura S, Bram RJ, Kurtin PJ, Goronzy JJ, et al. BLYS and APRIL in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 2005;115:3083-92.

- 19) Ohata J, Zvaifler NJ, Nishio M, Boyle DL, Kalled SL, Carson DA, et al. Fibroblast-like synoviocytes of mesenchymal origin express functional B cell-activating factor of the TNF family in response to proinflammatory cytokines. *J Immunol* 2005;174:864-70.
- 20) Liu Z, Davidson A. BAFF inhibition: a new class of drugs for the treatment of autoimmunity. *Exp Cell Res* 2011;317:1270-7.
- 21) Genovese MC, Fleischmann RM, Greenwald M, Satterwhite J, Veenhuizen M, Xie L, et al. Tabalumab, an anti-BAFF monoclonal antibody, in patients with active rheumatoid arthritis with an inadequate response to TNF inhibitors. *Ann Rheum Dis* 2012. [Epub ahead of print]
- 22) Syversen SW, Gaarder PI, Goll GL, Odegard S, Haavardsholm EA, Mowinckel P, et al. High anti-cyclic citrullinated peptide levels and an algorithm of four variables predict radiological progression in patients with rheumatoid arthritis: results from a 10-year longitudinal study. *Ann Rheum Dis* 2008;67:212-7.
- 23) Willemze A, Trouw LA, Toes REM, Huizinga TWJ. The influence of ACPA status and characteristics on the course of RA. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:144-52.
- 24) Smolen JS, Breedveld FC, Schiff MH, Kalden JR, Emery P, Eberl G, et al. A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42:244-57.
- 25) Aletaha D, Funovits J, Keystone EC, Smolen JS. Disease activity early in the course of treatment predicts response to therapy after one year in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 2007;56:3226-35.
- 26) Klarenbeek NB, Koevoets R, van der Heijde DMFM, Gerards AH, ten Wolde S, Kerstens PJSM, et al. Association with joint damage and physical functioning of nine composite indices and the 2011 ACR/EULAR remission criteria in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2011;70:1815-21.
- 27) Prevoo ML, van't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995;38:44-8.
- 28) Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-24.
- 29) Grabner R, Till U, Heller R. Flow cytometric determination of E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular cell adhesion molecule-1 in formaldehyde-fixed endothelial cell monolayers. *Cytometry* 2000;40:238-44.
- 30) Ng LG, Sutherland AP, Newton R, Qian F, Cachero TG, Scott ML, et al. B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells. *J Immunol* 2004;173:807-17.
- 31) Cheema GS, Roschke V, Hilbert DM, Stohl W. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 2001;44:1313-9.
- 32) Becker-Merok A, Nikolaisen C, Nossent HC. B-lymphocyte activating factor in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in relation to autoantibody levels, disease measures and time. *Lupus* 2006;15:570-6.
- 33) Bosello S, Youinou P, Daridon C, Toluoso B, Bendaoud B, Pietrapertosa D, et al. Concentrations of BAFF correlate with autoantibody levels, clinical disease activity, and response to treatment in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatology* 2008;35:1256-64.
- 34) Shiokawa S, Matsumoto N, Nishimura J. Clonal analysis of B cells in the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2003;32:12-8.
- 35) Kim HJ, Krenn V, Steinhauser G, Berek C. Plasma cell development in synovial germinal centers in patients with rheumatoid and reactive arthritis. *J Immunol* 1999;162:3053-62.
- 36) Tsubaki T, Takegawa S, Hanamoto H, Arita N, Kamogawa J, Yamamoto H, et al. Accumulation of plasma cells expressing CXCR3 in the synovial sublining regions of early rheumatoid arthritis in association with production of Mig/CXCL9 by synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 2005;141:363-71.
- 37) Valleryskog T, Heimburger M, Gunnarsson I, Zou W, Wahren-Herlenius M, Trollmo C, et al. Differential effects on BAFF and APRIL levels in rituximab-treated patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R167.
- 38) Reyes LI, León F, González P, Rozas MF, Labarca C, Segovia A, et al. Dexamethasone inhibits BAFF

- expression in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine* 2008;42:170-8.
- 39) Rintelen B, Haindl PM, Maktari A, Nothnagl T, Hartl E, Leeb BF. SDAI/CDAI levels in rheumatoid arthritis patients are highly dependent on patient's pain perception and gender. *Scand J Rheumatol* 2008;37:410-3.
- 40) Kolarz B, Majdan M, Dryglewska M, Darmochwal-Kolarz D. Antibodies against cyclic citrullinated peptide don't decrease after 6 months of infliximab treatment in refractory rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2011;31:1439-43.
- 41) Dechanet J, Merville P, Durand I, Banchereau J, Miossec P. The ability of synoviocytes to support terminal differentiation of activated B cells may explain plasma cell accumulation in rheumatoid synovium. *J Clin Invest* 1995;95:456-63.
- 42) Gottenberg JE, Miceli-Richard C, Ducot B, Goupille P, Combe B, Mariette X. Markers of B-lymphocyte activation are elevated in patients with early rheumatoid arthritis and correlated with disease activity in the ESPOIR cohort. *Arthritis Res Ther* 2009;11:R114.
- 43) Rodríguez-Bayona B, Pérez-Venegas JJ, Rodríguez C, Brieva JA. CD95-mediated control of anti-citrullinated protein/peptides antibodies (ACPA)-producing plasma cells occurring in rheumatoid arthritis inflamed joints. *Rheumatology* 2007;46:612-6.
- 44) Townsend MJ, Monroe JG, Chan AC. B-cell targeted therapies in human autoimmune diseases: an updated perspective. *Immunol Rev* 2010;237:264-83.
- 45) Cambridge G, Leandro MJ, Edwards JCW, Ehrenstein MR, Salden M, Bodman-Smith M, et al. Serologic changes following B lymphocyte depletion therapy for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:2146-54.
- 46) Hoyer BF, Manz RA, Radbruch A, Hiepe F. Long-lived plasma cells and their contribution to autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1050:124-33.