

200/0814

厚生科学研究費補助金
特定疾患対策研究事業

自己免疫疾患の病因・病態解析と
新たな治療法の開発に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

平成14年3月

主任研究者 小池隆夫

—目次—

(1) 構成員名簿	3
(2) 総括研究報告書	7
自己免疫疾患の病因・病態解析と新たな治療法の開発に関する研究 小池 隆夫(北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学講座・第二内科)	
(3) 分担研究報告書	17
1. HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラット(env-pX ラット)に認める関節炎の発症機序に関する検討	19
石津 明洋(北海道大学大学院医学研究科病態制御学専攻病態解析学講座分子病理学分野)	
2. PD-1 受容体欠損マウスにおける自己免疫性拡張型心筋症の解析	22
篠原 隆司(京都大学大学院医学研究科生体統御学)	
3. 実験的腎盂腎炎によるマウス全身性エリテマトーデス様病変の誘導	27
三村俊英(東京大学大学院医学系研究科内科学専攻・アレルギー・リウマチ内科)	
4. Th1/Th2 バランス制御の免疫病発症における役割	32
西村 孝司(北海道大学遺伝子病制御研究所・免疫制御)	
5. 全身性エリテマトーデス(SLE)患者に認められる T 細胞レセプター (TCR) ゼータ鎖異常の分子機序とその制御について	34
竹内 勤(埼玉医科大学総合医療センター第二内科)	
6. HLA 分子を介したシグナル伝達による抗原提示細胞の応答	37
松下 祥(埼玉医科大学・免疫学)	
7. 全身性自己免疫疾患発症における CD40 リガンド過剰発現の役割	43
鏑田 武志(東京医科歯科大学難治疾患研究所免疫疾患)	
8. 抗リン脂質抗体症候群の診断における抗プロトンピン抗体の測定意義について	47
小池 隆夫(北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学・第二内科)	
9. 酸化 LDL の測定法と抗リン脂質抗体症候群における酸化 LDL の臨床意義	52
松浦 栄次(岡山大学大学院医歯学総合研究科細胞化学)	
10. IL-6 阻害による間質性肺炎の治療法の開発	55
西本 憲弘(大阪大学健康体育部健康医学第一部門)	
11. 多発性筋炎・皮膚筋炎に合併した間質性肺炎の治療法に関する全国調査	65
宮坂 信之(東京医科歯科大学医学部 膠原病・リウマチ内科)	

12. 多発性筋炎/皮膚筋炎に合併する間質性肺炎と関連する自己抗体の追究	72
平形 道人(慶應義塾大学内科)	
13. シェーグレン症候群唾液腺培養上皮細胞における細胞増殖およびアポトーシスに関する研究	83
菅井 進(金沢医科大学血液免疫内科)	
14. シェーグレン症候群の発症におけるIL-10の遺伝子多型の関与	93
江口 勝美(長崎大学医学部第一内科)	
15. Fcgr2b 遺伝子プロモーター領域多型の機能解析	100
広瀬 幸子(順天堂大医学部第二病理)	
16. 候補遺伝子アプローチを用いた全身性エリテマトーデス疾患感受性遺伝子の検討	105
徳永 勝士(東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学教室)	
17. ステロイド抵抗性SLE患者リンパ球における多剤耐性遺伝子産物の関与:基礎的理論と臨床応用	115
田中 良哉(産業医科大学医学部第一内科)	
18. SLEにおける病像・病態の規定因子に関する研究(第三報)	118
橋本 博史(順天堂大学膠原病内科)	
19. 全身性エリテマトーデス(SLE)例の活動性, 臓器障害発現と食事要因の関連	122
佐々木 毅(東北大学免疫・血液病制御学)	
20. リンパ球表面抗原の植分子に関する研究	126
加藤 智啓(聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター)	
21. スタチン類のアポトーシス誘導作用を介した免疫抑制作用機序の解析	129
箕田 清次(自治医科大学内科アレルギー膠原病学部門)	
22. 全身性エリテマトーデス患者末梢血リンパ球におけるinducible co-stimulatory molecule(ICOS)の発現 および機能に関する研究	131
原 まさ子(東京女子医大膠原病リウマチ痛風センター)	
23. 抗リン脂質抗体症候群の治療指針試案について	135
小池 隆夫(北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学・第二内科)	
(4) 研究成果の刊行に関する一覧	139

(1) 構成員名簿

平成十三年度 「自己免疫疾患の病因・病態解析と
新たな治療法の開発に関する研究」 班員名簿

区分	氏名	所属	職名
主任研究者	小池 隆夫	北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学講座・第二内科	教授
分担協力者	竹内 勤	埼玉医科大学総合医療センター	教授
	鏑田 武志	東京医科歯科大学難治疾患研究所ウイルス・免疫疾患研究部門免疫疾患分野	教授
	西本 憲弘	大阪大学健康体育部健康医学第一部門	助教授
	広瀬 幸子	順天堂大学医学部病理学第二講座	助教授
	松下 祥	熊本大学大学院医学研究科脳免疫統合科学系・免疫識別学講座	教授
	宮坂 信之	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科生体環境応答学系生体応答学講座	教授
研究協力者	石津 明洋	北海道大学大学院医学研究科病態制御学専攻 病態解析講座 分子病理学分野	助手
	原 まさ子	東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター	教授
	平形 道人	慶応義塾大学医学部内科リウマチ研究室	講師
	加藤 智啓	聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター第一部門	助教授
	田中 良哉	産業医科大学内科学第一講座	教授
	篠原 隆司	京都大学大学院医学研究科分子生体統御学分子生物学教室	教授
	江口 勝美	長崎大学医学部内科学第一講座	教授
	菅井 進	金沢医科大学血液免疫内科学	教授
	佐々木 毅	東北大学大学院医学系研究科医科学専攻病態制御学講座免疫・血液病制御学分野	教授
	徳永 勝士	東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学教室	教授
	橋本 博史	順天堂大学医学部内科学膠原病内科	教授
	簗田 清次	自治医科大学アレルギー膠原病科・リウマチ講座	教授
	三村 俊英	東京大学医学部附属病院内科アレルギー・リウマチ内科	助手
	篠原 隆司	京都大学大学院医学研究科生体統御学分子生物学教室	助手
松浦 栄次	岡山大学医学部附属分子細胞医学研究施設細胞工学部門	助教授	
(事務局) 経理事務連絡 担当責任者	渥美 達也	北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学講座・第二内科 ☎060-8638 札幌市北区北15条西7丁目 TEL (011) 716-11616 (内5913) FAX (011) 706-7710	講師

(2) 総括研究報告書

平成 13 年度 厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
総括研究報告書

自己免疫疾患の病因・病態解析と新たな治療法の開発に関する研究

主任研究者 小池 隆夫

北海道大学大学院医学研究科
分子病態制御学講座・第二内科

A.研究目的

自己免疫疾患の中から研究調査の対象を全身性エリテマトーデス(SLE)、抗リン脂質抗体症候群(APS)、多発性筋炎／皮膚筋炎(PM/DM)、Sjogren 症候群(SjS)の4疾患に絞り、各々の疾患における免疫系の異常の特徴を明らかにし、疾患特異的治療戦略を構築し、患者のQOLの向上を計り、さらには病気の治癒を目指すことが本研究の最終目的である。

B.研究方法

- ① HTLV-I 遺伝子導入ラットに認められる関節炎の発症機序。
- ② PD-1 受容体欠損マウスにおける自己免疫性拡張型心筋症の解析。
- ③ 実験的腎盂腎炎による SLE 様病変の誘導。
- ④ Th 1 /Th2 バランス制御の免疫病発症における役割。
- ⑤ SLE 患者に認められる T細胞レセプター(TCR)ゼータ鎖異常の分子機序とその制御。
- ⑥ HLA 分子を介したシグナル伝達による高抗原提示細胞の応答。
- ⑦ 全身性自己免疫疾患における CD40 リガンド過剰発現の役割。
- ⑧ 抗リン脂質抗体症候群の診断における抗プロトロンビン抗体の測定意義について。
- ⑨ 酸化 LDL の測定法と抗リン脂質抗体症候

群における酸化 LDL の臨床意義。

- ⑩ IL-6 阻害による間質性肺炎の治療法の開発。
- ⑪ PM/DM に合併した間質性肺炎の治療法に関する全国調査。
- ⑫ PM/DM 二合併する間質性肺炎と関連する自己抗体の追及。
- ⑬ SjS 唾液腺培養上皮細胞における細胞増殖およびアポトーシス。
- ⑭ SjS の発症における IL-10 の遺伝子多型の関与。
- ⑮ Fcgr2b 遺伝子プロモーター領域多型の機能解析。
- ⑯ 候補遺伝子アプローチを用いた SLE 疾患感受性遺伝子の検討。
- ⑰ ステロイド抵抗性 SLE 患者リンパ球における多剤耐性遺伝子産物の関与。
- ⑱ SLE における病像・病態の規定因子に関する研究（第三報）
- ⑲ SLE 例の活動性、臓器障害発現と食事要因の関連。
- ⑳ リンパ球表面抗原の植分子
- 21 スタチン類のアポトーシス誘導作用を介した免疫抑制作用機序
- 22 SLE 患者末梢血リンパ球における inducible co-stimulatory molecule (ICOS) の発現および機能に関する研究。

C.研究結果及び考察

- ① HTLV-1 遺伝子導入ラットを用いた臓器特異的自己免疫疾患の発症機序を検討した結果 LTR-env-pX ラットに認める自己免疫疾患は、標的となる臓器により発症機序が異なる事、正常ラット脾細胞中には、自己免疫反応抑制作用をもつ細胞が存在する事、LTR-env-pX ラットの CD4CD25 陽性細胞は、免疫反応抑制機能に障害がある事などから LTR-env-pX ラットはヒト自己免疫疾患のプロトタイプ・モデルと考えられるた。LTR-env-pX ラットの病態を明らかにすることは、ヒト膠原病の病因解明につながると思われる。また、本ラットを治療実験に用いることにより、自己免疫疾患の新しい治療法の開発が容易になると期待される。
- ② ヒトの自己免疫疾患を研究する上で、遺伝子欠損マウスは非常に有用なモデルになる。我々の単離した PD-1 遺伝子は免疫グロブリンファミリーに属する膜蛋白質をコードし、その細胞質領域に免疫反応を負に制御する ITIM motif を持つ。昨年我々は BALB/c の遺伝的背景において PD-1 の欠損マウスは拡張型心筋症の症状を呈することを見だし、その発症には自己抗体が深く関わりと結果を得るに至った。本年度はこのマウスの病態を解析するために、心臓における自己抗原の同定を試みた。生化学的手法により、抗原分子は約千倍程度に濃縮され、現在そのアミノ酸配列の決定を行いつつある。拡張型心筋症は現段階では極めて治療の困難な疾患であるが、この結果は、PD-1 分子による免疫反応の抑制性シグナルがこの病態の成立に関わりうることを示し、これまで心臓移植しか治療法がなかったこの難治性疾患にも新たな治療法の確立への発展性を示唆した
- ③ 自己免疫疾患の発症に感染が関与しているという可能性がありことから、本研究に

おいては、マウスにおける尿路感染が自己免疫現象を誘導し得るか否かを検討した。その結果、MRL+/+マウスにおいては、1回の実験的腎盂腎炎惹起2-3ヶ月後に血清学的・免疫組織学的に高率に抗核抗体、糸球体腎炎など SLE 様病変が誘導された。今回の結果からヒト SLE の発症に関しても、遺伝的背景を有する患者においては、尿路感染症が SLE の発症機序において何らかの関与を成している可能性が示唆された。

- ④ 自己免疫病の発症においては Th1/Th2 バランス制御が重要であることが知られている。そこで、本研究においては、Th1/Th2 バランス制御に重要である、初期免疫調節細胞の機能解析に関する研究を行った。その結果、最も強い抗原提示能力をもつ樹状細胞(DC)のうち、Th1 サイトカインで活性化された骨髄細胞由来 DC (BMDC1) が Th1 免疫や細胞性免疫の活性化に重要であり、Th2 サイトカインで活性化誘導された BMDC2 は Th2 免疫の促進はできるが、細胞性免疫の促進には関与できないことを明らかにした。また、初期免疫エフェクターのうち、IFN- γ 産生型の細胞について解析した結果、NKT, NK 細胞と共に、AsialoGM1⁺CD8⁺T 細胞が、抗 CD3 抗体投与後、早期に活性化される調節 T 細胞であることが明確にされた。興味深いことに、Th1 型の自己免疫病(肝炎、糖尿病、EAE)を発症しやすい C57BL/6 マウスにおいては、Th2 型自己免疫病を起こしやすい BALB/c マウスに比して、AsialoGM1⁺CD8⁺T 細胞の存在比が高かった。今後これら免疫調節細胞の自己免疫病発症における意義を追求する予定である。
- ⑤ 全身性エリテマトーデス (SLE) における末梢血 T 細胞機能の分子機序として、T 細胞レセプター・CD3 複合体からの早期シグナル伝達に欠陥が存在し、解析した症例の 60% に、TCR ζ -タ鎖の蛋白合成低下が、一部の症例には異常スプライシングを伴

ったメッセージ異常が見い出された。TCR・鎖蛋白合成障害に、この異常スプライシングを受けた TCR・鎖 mRNA ヴァリアントがどのように関与しているかは不明である。その分子機序を *in vitro* 翻訳システムで検証し、short 3' UTR ヴァリアントは wild フォームに比べ、TCR・鎖蛋白およびその 2 量体形成が低下することが明らかとなった。

- ⑥ TCR-ペプチド-MHC 複合体が形成されると、MHC 分子を介して抗原提示細胞側にもシグナルが伝達される。B 細胞に DR を介した刺激を入れると、Syk の活性化とともに膜型ならびに分泌型・鎖の発現増強が観察された。Monocytes では DR からのシグナルにより MAPK/Erk・p38 の活性化とともに IL-1・などの炎症性モノカインの産生が、DQ/DP からのシグナルにより MAPK/p38 の活性化とともに IL-10 などの抗炎症性モノカインの産生がより強く誘導された。抗原提示分子の種類によって自己免疫病の標的細胞に異なる応答が誘導される可能性が示唆された。
- ⑦ SLE 患者 B 細胞で CD40L の異所性の発現が示され、CD40L を B 細胞で異所性発現するマウスでは SLE 様の自己免疫疾患を発症するので、CD40L の過剰または異所性発現は SLE 発症に関与すると考えられる。B 細胞での CD40L の発現の検索は容易ではなかったが、我々は、的確に B 細胞の CD40L の発現を検索する方法を開発した。また、末梢リンパ組織の成熟 B 細胞段階で自己反応性 B 細胞が死滅し、CD40L がこの自己反応性 B 細胞の死滅を阻害し、自己トレランスの破綻を引き起こすことを明らかにした。B 細胞上での CD40L の発現検出法の開発により、今後 SLE 患者 B 細胞での CD40L の発現の検索が可能になると考えられる。また、末梢組織での自己トレランスの異常は、今後、SLE のより根本的な治療法開発の標的となると考えられる。さらに、我々のマウス系が末梢トレランス制御

による SLE 治療法の開発の良い評価系となることが強く示唆された。

- ⑧ 抗プロトロンビン抗体は重要な抗リン脂質抗体のひとつであるが、抗リン脂質抗体症候群 (APS) の臨床症状との相関が疑問視され、APS の診断には採用されていなかった。これまでの検討から、ホスファチジルセリンを固相化してカルシウムの存在下でプロトロンビンとの複合体をつくってこれを抗原とするホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体 (aPS/PT) が APS のマーカーとなりうるということがわかった。本研究では抗プロトロンビン抗体の測定意義について検討した。その結果 aPS/PT は APS に特異性の極めて高いマーカーとして有用であることが明らかになり、モノクローナル aPS/PT を用いることにより LA の半定量化に使用可能で、これを利用すれば LA の標準化が可能である。
- ⑨ 抗 $\beta 2$ -グリコプロテイン I 抗体 (抗 $\beta 2$ -GPI 抗体) に特異的な酸化 LDL 由来のリガンドの 1 つ (oxLig-1) が、7-ketocholesteryl-9-carboxynonanoate であることを特定した。さらに硫酸銅処理による酸化 LDL より、新たに oxLig-2 を単離精製し、その構造が 7-ketocholesteryl-12-carboxy (keto) dodecanoate であることを明らかにした。また、 $\beta 2$ -GPI リガンドのアナログとして、7-ketocholesteryl-13-carboxytridecanoate (13-COOH-7KC) を合成した。これら全てのリガンドは、*in vitro* の実験系で、明らかに $\beta 2$ -GPI および抗 $\beta 2$ -GPI 自己抗体の標的になっており、マクロファージの Fc γ 受容体を介する酸化 LDL の取り込みに関与していることが示された。さらに、これらのリガンドに共通して存在するカルボキシル基をメチル化すると、 $\beta 2$ -GPI との反応性が完全に消失してしまうことが、TLC によるリガンドプロット、ELISA、およびマクロファージの培養系で示された。これまでの一連の結果より、 $\beta 2$ -GPI

のリガンドがcholesteryl linoleateの酸化体で、 ω 位のカルボキシル基が活性中心であることが明らかになった。一方、 β 2-GPI リガンド、 β 2-GPI、および β 2-GPI 自己抗体の三者間の反応性を利用して酸化LDLの測定系を確立し、抗リン脂質抗体症候群(APS)およびSLEを中心に血中酸化LDLの臨床意義について検討を行った。その結果、酸化LDLがAPSにおける動脈血栓症のリスクファクターであることが明らかとなったほか、APS患者の血中を酸化LDLが β 2-GPI および抗 β 2-GPI 抗体との免疫複合体として循環していることが判明した。

- ⑩ 間質性肺炎は膠原病患者の予後を左右する合併症の一つである。間質性肺炎の病態は炎症細胞浸潤と組織修復機転としての肺の繊維化からなる。ラット肺への遺伝子導入実験により前者には interleukin-6 (IL-6)が、後者には transforming growth factor β (TGF- β) が関与することが示唆されている。過去2年間の研究で、IL-6 トランスジェニックマウスの肺病変が multicentric Castleman's disease (MCD) 患者に合併した lymphocytic interstitial pneumonia (LIP) と類似の病理所見を呈したことから、IL-6 トランスジェニックマウスがヒトのLIPのモデルとなること、また、全身的な高IL-6血症によりLIPが生じることが明らかとなった。このマウスに抗IL-6受容体(IL-6R)抗体を投与すると気管支血管束や肺胞隔壁への炎症細胞浸潤や浮腫状の変化が改善されたことから、ヒトのLIPでもIL-6阻害治療が有効である可能性が示唆された。今回MCDにLIPを合併した患者に対してヒト型化抗IL-6R抗体治療を行い、治療効果を高分解能CT(HRCT)を用いて評価した。スリガラス陰影、小葉中心性粒状影、小葉間隔壁の肥厚、気管支血管束の肥厚に関しては改善が認められた。これらのCT所見は炎症細胞浸潤を反映し、IL-6阻害

により可逆的に改善することが示唆された。浸潤影と嚢胞については改善が見られなかった。IL-6阻害治療は炎症細胞浸潤が主体のLIPの治療に有効であること、その治療の評価にHRCTが有効であることが明らかとなった。またIL-6阻害によりTGF β が低下すること、ならびに肺間質へのコラーゲン沈着を抑制すると考えられる matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)が増加することからIL-6阻害が繊維化をも抑制する可能性がある。

- ⑪ 難治性とされる皮膚筋炎(PM/DM)に合併した急性型の間質性肺炎(IP)に対するシクロホスファミド(CPA)療法について、レトロスペクティブに検討を行った。その結果、CPA内服療法の80%、CPAパルス療法の25%が治療に反応し、転帰を考慮すると約半数に有効性が認められた。一方で、治療抵抗例も少なからず認められた。また、治療中の感染症による死亡例もみられ、感染症合併には留意する必要があると考えられた。さらに、多数例で検討すると、一次治療の方が二時治療に比べ有効性が高かった。このように、DMに合併した急性型IPに対し、CPA内服療法・パルス療法は有効性が認められ、一次治療について前向き試験を行う価値があると考えられるが、その有効性はCyA療法を凌駕するほどではなかった。
- ⑫ 多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)において、間質性肺炎(Interstitial Lung Diseases, ILD)は重要な予後因子の一つである。そこで、ILD関連自己抗体の追究および急速進行性間質性肺炎(AIP)併発PM/DMと関連する自己抗体の追及を行った。その結果、ILD関連自己抗体である抗アミノアシル tRNA 合成酵素抗体(抗ARS抗体)は、IIPおよびBOOP患者にも認められた。免疫プロット法では、30,35,37,45,75 kDa 蛋白がA549細胞でのみ確認された。免疫沈降法では、8個の蛋白が反応し(34,35,45,52,70,75,80,100 kDa)、その中で52kDa蛋白はサイトケラチン8(CK8)

と考えられた。抗 CK8 抗体陽性例は、全例 UIP で、関節炎・レイノー現象・皮疹・他の自己抗体は認めなかった。AIP を併発した Amyopathic DM (ADM) 患者 5 血清のうち、2 例が免疫ブロット法で 52kDa 蛋白を認識し、CK8 と反応した。免疫沈降法では、140kDa 蛋白を認識する新たな自己抗体が見出された。以上の結果から、ILD 患者血清中に II 型肺胞上皮細胞蛋白成分を認識する自己抗体の存在が示唆された。また、急速進行性 ILD 合併 ADM 患者血清中に、免疫沈降法で 140kDa 蛋白を認識する新たな自己抗体の存在が示唆された。

- ⑬ シェーグレン症候群（以下 SS）唾液腺においては、リンパ球からなる細胞浸潤が生じ、腺細胞死、腺機能廃絶へと至る。我々はこれまでにヒト唾液腺上皮細胞の特異的培養法を確立し、研究に供してきた。今回、唾液腺組織障害の分子機構解析を目的としてヒト唾液腺上皮細胞を用いて、サイトカインに対する増殖反応、HLA-DR および Fas の発現、副刺激分子の発現、アポトーシスに関する検討を行った。その結果、1) SS 唾液腺上皮細胞は、EGF、IL-1 β 、IL-4、IL-10 に対し増殖反応を示し、IFN γ 、TNF α は増殖抑制的に作用した。2) IFN γ は SS 唾液腺上皮細胞に HLA-DR、Fas 発現を誘導した。3) IFN γ は SS 唾液腺上皮細胞に CD40 発現を誘導したが、CD80、CD86 は誘導しなかった。4) SS 唾液腺上皮細胞は IFN γ 刺激後、抗 Fas 抗体と抗 CD40 抗体の存在下においてアポトーシスが効率的に誘導された。以上より、SS 唾液腺においては IFN γ などのサイトカインにより活性化された唾液腺上皮細胞が Fas および CD40 を介する刺激を同時に受けるとアポトーシスにより死に至ることが示唆された。
- ⑭ シェーグレン症候群（SS）の発症および進展機序について研究した。疫学的に HTLV-I は SS 発症に関与することが立証されているが、HTLV-I tax 遺伝子導入細胞

を用いた検討ではこれら細胞は種々のアポトーシス刺激（細胞死受容体依存性および細胞死受容体非依存性のアポトーシス刺激）に抵抗性を示した。また、HTLV-I 関連脊髄症（HAM）患者は高率に SS を合併するが、HAM 患者末梢血 CD4+T 細胞自身はアポトーシス刺激には抵抗性を示すも、Fas 陽性細胞への細胞傷害性を強く保持していた。次に抗 HTLV-I 抗体陽性 SS および抗 HTLV-I 抗体陰性 SS 群間に差異が認められるか否かを検討した。生検小唾液腺組織のアポトーシス関連蛋白の発現（免疫組織染色）および IL-10 プロモーター領域の遺伝子多型（末梢血からの直接シーケンス法および RFLP 法）を検討したが、SS ではコントロール群に比べアポトーシス関連蛋白の強い発現および ACC haplotype の低頻度が認められたが、抗 HTLV-I 抗体の有無で分けた 2 群間では有意な差異は検出できなかった。以上より、HTLV-I 感染はアポトーシス関連蛋白発現およびサイトカインプロファイル（IL-10）を調節し SS の発症・進展のリスクファクターとなりうるものの、これら SS の発症機序には HTLV-I 感染以外の多くのファクターの存在が示唆された。

- ⑮ B 細胞上に発現している重要な免疫抑制分子である Fc γ RIIB1 分子をコードする Fc γ RIIB 遺伝子のプロモーター領域には、SLE 自然発症マウス系に共通して 13 塩基と 3 塩基の欠損が認められる。この欠失に相関して、脾臓リンパ濾胞胚中心の活性化 B 細胞上での Fc γ RIIB1 分子の発現低下と IgG 抗体応答の亢進が認められる。今回、ルシフェラーゼレポーター法およびゲルシフト法を用いて、Fc γ RIIB 遺伝子の転写制御部位ならびに転写制御に働く核蛋白の同定を行い、SLE 自然発症マウス系に共通して見られるプロモーター領域欠失部位が転写制御に必須の部位であること、この部位に AP-4 蛋白が結合することを明らかにした。

- ①⑥ 前年度に cDNA を用いて全身性エリテマトーデス (SLE) との関連を検出した *FCGR2B*-I232T について、ゲノム DNA を用いたタイピング系を作製し、SLE193 例、対照健常者 303 例について、*FCGR2A*, *2B*, *3A*, *3B* の遺伝子型を決定した結果、*FCGR2B*-232T/T 遺伝子型と、*FCGR3A*-176F/F 遺伝子型のいずれもが、SLE との関連を有することを見出した。また、*BLYS* の上流領域に 4 個所の単一塩基多型 (SNP) を見出し、それらによって精製されるハプロタイプの一つが単球の *BLYS* mRNA 量と関連し、抗 Sm 抗体陽性 SLE 患者に増加傾向があることを検出した。さらに、一般集団中に *NKG2C* 遺伝子を欠失したアリルが高頻度に存在することを見出した。
- ①⑦ 多剤耐性遺伝子 *MDR-1* の産物である P-糖蛋白質 P-gp は、細胞内薬物を細胞外に能動排出して多剤抵抗性を齎す。ステロイド薬長期連用全身性エリテマトーデス SLE 患者末梢血リンパ球でも、*MDR-1* 特異的転写因子 YB-1 の細胞内発現と P-gp の細胞膜上での発現が増強し、細胞内ステロイド濃度が減少した。また、シクロスポリン (CyA) は、SLE 患者リンパ球では P-gp と拮抗的に結合し、ステロイド薬の細胞外排出を抑制し、細胞内濃度を維持した。実際、ステロイド薬を長用量使用し、臨床的にステロイド薬耐性を有すると考えられた SLE 及び MCTD 患者 27 症例に CyA の併用投与を行った結果、22 例で臨床症候、検査所見等の改善を認め、ステロイド薬維持量の減量を可能にした。一方、IL-2 などの添加によりリンパ球を活性化すると YB-1 の核内移行と P-gp の発現が誘導され、P-gp を介する薬剤不応性を引き起こす可能性が示された。以上、SLE に於ける長期薬物連用によるステロイド耐性獲得に P-gp が関与すること、CyA によって拮抗的に薬剤耐性を克服しうること、さらに、疾患活動性が高い SLE の活性化リンパ球ではすでに P-gp が発現し、治療不応性を齎すこと等が示唆された。
- ①⑧ 昨年までの研究で SLE の病像の規定因子の一つとして Th1/Th2 バランスの重要性を指摘してきたが、血中と T 細胞とで差違を認める問題があり、原因の究明のため、IL-13 を用いた細胞内染色とリンパ球の IL-13 産生能について検討した。IL-13 を用いた細胞内染色では Th1・Th2 に差はなく、これまでの IL-4 を用いた Th1 優位の結果と異なっていた。また、無刺激培養の系での検討から IL-13 はリンパ球以外の細胞の産生の可能性が出てきた。これらの結果は血中と T 細胞の差違が IL-4 を用いた細胞内染色と非リンパ球の Th2 サイトカインの産生に起因することを示唆していた。一方、この Th1/Th2 バランスの他、腎症に関連する B 細胞上の CD72 及び、重症度に関連する IL-15 も病像を規定する新たな因子として加えられた。
- ①⑨ 非活動期の女性 SLE 患者集団を 4 年間追跡調査し、活動期及び臓器障害発現と食事要因との関連を調べた。活動期発現に関する分析には比例ハザードモデルを用い、交絡要因を補正した上で各食事要因の相対危険度を算出した。その結果、ビタミン C 摂取が活動期発現のリスクを有意に低下させていた (p for trend=0.005)。また、血管性臓器障害を発症した患者では、発症しなかった患者に比べてベースライン時の植物性脂肪摂取量が有意に多かった ($p=0.04$)。これらの結果は、食事要因が SLE の予後に影響を与えることを示しており、食事療法の可能性が示唆された。
- ①⑩ 全身性自己免疫疾患の治療において、細胞膜上のレセプターを介したシグナル伝達を制御することが重要な治療方法論のひとつであることは、慢性関節リウマチにおける TNF- α の阻害治療の有効性をみても明らかである。そのための方法論のひとつとして、細胞外から生きた細胞の細胞膜上に膜蛋白分子そのものを直接導入する方法を開発した。遺伝子導入によらず、膜分子の導入ができることは、細胞膜上の分子の機能を人為的に制御する新たな生物

学的製剤開発の基礎となり、幅広い応用が期待される。

- 21 スタチン類の多面的効果としての免疫抑制作用の機序をアポトーシス誘導作用の観点から、そのシグナル伝達機構を含めて明らかにすることを目的とした。脂溶性スタチンのフルバスタチンは T 細胞株 (Jurkat) とヒト活性化 T 細胞とに対して *in vitro* でアポトーシス誘導能を示し、その誘導機序として protein farnesylation 阻害に基づくことが示唆された。
- 22 全身性エリテマトーデス (SLE) は末梢血リンパ球活性化とそれに基づく多彩な自己抗体産生・臓器障害を特徴とする代表的な自己免疫疾患である。近年、T 細胞活性化における副刺激分子として、CD28 family に属する inducible co-stimulatory molecule (ICOS) が同定された。ICOS は T 細胞活性化において重要な役割を担っていることが明らかにされつつある。そこで、本研究では SLE 末梢血 T 細胞活性化における ICOS の役割を明らかにすることを目的とした。CD4⁺CD45RO⁺T 細胞および CD8⁺CD45RO⁺T 細胞における ICOS の発現は非活動期 SLE に比較し活動期 SLE 患者で有意に高かった。抗 CD3 抗体+抗 ICOS 抗体刺激および抗 CD3 抗体+抗 CD28 抗体刺激は共に健常人 T 細胞の ³H-thymidine の取り込みを増加させた。また、非活動期 SLE 患者は健常人と同等な反応性を示したが、活動期 SLE 患者の一部はこれらの刺激に対して低反応性を示した。抗 CD3 抗体+抗 ICOS 抗体刺激および抗 CD3 抗体+抗 CD28 抗体刺激は共に健常人 T 細胞の IFN- γ および IL-10 産生を亢進させた。非活動期 SLE では健常人に比較し、いずれの刺激による IFN- γ 産生も有意に亢進していた。活動期 SLE 患者末梢血リンパ球を抗 ICOS 抗体存在下に培養したところ抗 dsDNA 抗体産生の抑制が認められた。これらの実験結果より、ICOS は SLE の T 細胞活性化、サイトカイン産生、自己抗体

産生において重要な役割を有することが示唆された。

D. 知的所有権の取得状況

- (1) 特許取得 なし
- (2) 実用新案登録 なし
- (3) その他 なし

(3) 分担研究報告書

HTLV-1 env-pX 遺伝子導入ラット（env-pX ラット）に認める 関節炎の発症機序に関する研究

石津 明洋（北海道大学・大学院医学研究科・分子病理）

研究要旨

HTLV-1 env-pX 遺伝子導入ラット（env-pX ラット）は慢性持続性の破壊性関節炎を発症する。本ラットに認める関節炎の発症機序を明らかにするために、関節局所の炎症浸潤リンパ球を用いた関節炎移入実験を行った。関節炎局所浸潤リンパ球を同系正常ラットの関節内に注入することにより一過性の関節炎が誘導された。同浸潤リンパ球を肉眼的に関節炎未発症の env-pX ラットに移入した場合には、関節腫脹が持続する個体と一過性に消退する個体が観察された。関節炎の発症にはリンパ球が重要な役割を果たしていると考えられる。一方、env-pX ラット関節炎の持続には関節組織における env-pX 導入遺伝子の発現が必要と考えられる。しかしながら、そのみでは十分ではなく、その他の要因も関与している可能性がある。env-pX ラットから単離した関節滑膜細胞は、正常ラット由来の同細胞と比較して有意に高い IL-6 産生を示した。関節炎の持続する機序として、炎症のエフェクターであるリンパ球側の要因のみならず、滑膜におけるサイトカイン産生など関節組織側の要因も関与している可能性があり、これらの組織細胞の病理学的特性を是正する治療が、関節炎の新たな治療法となりえるものと考えられる。

A. 研究目的

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型（HTLV-1）の env-pX 遺伝子を導入したトランスジェニックラット（env-pX ラット）はヒト慢性関節リウマチに類似した慢性持続性の破壊性関節炎を発症する。関節炎の発症機序に関わる現象として、これまでに以下のことが明らかとなっている。

1. env-pX 導入遺伝子は全身臓器に構成的に発現している。
2. 血中にはリウマトイド因子をはじめ種々の自己抗体が検出される。
3. 関節炎局所に浸潤する炎症細胞の主体は CD4 陽性 T 細胞である。
4. 関節炎局所に浸潤する T 細胞はオリゴクローナルであるが、どの個体にも共通する特定の抗原に対する T 細胞クローンは確認されない。
5. env-pX ラットの末梢リンパ球は疾患発症以前から活性化準備状態にあり、種々の刺激に対して過剰な増殖反応を示す。

6. 疾患発症以前の env-pX ラットの脾細胞または骨髄細胞を、致死的に放射線照射した同系正常ラットに移入しても関節炎は誘導されない。

本研究では、env-pX ラットに認める関節炎の発症機序を明らかにし、病因・病態に即した関節炎の新たな治療法の開発のための基礎的研究を行うことを目的とする。

B. 研究方法

env-pX ラットの関節炎局所から浸潤リンパ球を抽出し、同系正常ラットや肉眼的に関節炎未発症の env-pX ラットの関節内に注入して関節炎の発症を経時的に観察した。同数の正常ラットリンパ節細胞や同量の PBS を関節内注入したラットを対照とした。また、env-pX ラットおよび同系正常ラットから関節滑膜細胞を単離し、その生物学的特性を比較した。

C. 研究結果

env-pX ラットの関節炎浸潤リンパ球を

関節内注入した同系正常ラットでは一過性の関節炎が誘導された(図1)。対照として注入した同数の正常ラットリンパ節細胞や同量のPBSでは関節炎は誘導されなかった。関節炎浸潤リンパ球を肉眼的に疾患未発症のenv-pXラットの関節内に注入した場合には、関節腫脹が持続する個体と一過性に消退する個体が観察された(図2)。

また、env-pXラットから単離した関節滑膜細胞は同系正常ラット由来の同細胞と比較して有意に高いIL-6の産生を示した(図3)。培養上清中におけるIL-1 α およびTNF- α の量はいずれもELISAの検出感度以下で、env-pXラット由来の滑膜細胞と正常同系ラット由来の細胞とで明らかな差は認められなかった。なお、両者の滑膜細胞の増殖性や細胞表面抗原についても明らかな差は見い出されなかった。

D. 考察

関節炎局所浸潤リンパ球を用いた関節炎移入実験から、以下のことが考えられる。すなわち、関節炎の発症にはリンパ球が重要な役割を果たしている。一方、env-pXラット関節炎の持続には関節組織におけるenv-pX導入遺伝子の発現が必要と考えられる。env-pXラットから関節滑膜細胞を単離培養してその特性を正常ラット由来の同細胞と比較したところ、IL-6の産生能が有意に高かった。env-pX導入遺伝子産物であるp40Taxは宿主細胞のさまざまな遺伝子発現の調節や分子機能の修飾に関与することが知られている。env-pX遺伝子を発現す関節滑膜細胞にも種々の分子異常が誘導されている可能性がある。IL-6高産生もそのひとつと考えられるが、IL-6が関節炎の持続にどのように関与しているかは今後の検討課題である。また、DNAアレイ法を用いた包括的遺伝子発現の解析などにより、滑膜細胞で生じている分子異常の詳細を明らかにする必要もある。なお、今回の検討から、env-pXラットの関節炎の持続には、関節組織におけるenv-pX遺伝子発現以外の要因も関与している可能性が考えられた。例えば、リンパ球に対する持続的な刺激の必要性や関節に対する荷重などの物理的

因についても、今後検討する予定である。

E. 結論

env-pXラットの関節炎の発症機序に関するこれまでの検討から、関節炎の発症にはリンパ球が重要な役割を果たしていると考えられる。一方、関節炎の持続には炎症のエフェクターであるリンパ球側の要因のみならず、滑膜におけるサイトカイン産生など関節組織側の要因も関与している可能性があり、これらの組織細胞の病理学的特性を是正する治療が、関節炎の新たな治療法となりえるものと考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sugaya T, Ishizu A, Ikeda H, Nakamaru Y, Fugo K, Higuchi M, Yamazaki H, Imai K, Yoshiki T. Clonotypic analysis of T cells accumulating at arthritic lesions in HTLV-I env-pX transgenic rats. *Exp Mol Pathol* 72: 56-61, 2002.
2. Nakamaru Y, Ishizu A, Ikeda H, Sugaya T, Fugo K, Higuchi M, Yamazaki H, Yoshiki T. Immunological hyperresponsiveness in HTLV-I LTR-env-pX transgenic rats: a prototype animal model for collagen vascular and HTLV-I-related inflammatory diseases. *Pathobiology* 69: 11-18, 2001.
3. Ishizu A, Ogawa Y, Ishikura H, Yoshiki T. Anti-Thy-1 monoclonal antibody with specific reactivity with vascular endothelial cells in rat glomeruli. *Acta Histochem* 103: 279-286, 2001.

2. 学会発表

1. Ishizu A, Higuchi M, Fugo K, Tsuji M, Abe A, Ikeda H, Yoshiki T: Functional abnormality of CD25+CD4+ T cells in HTLV-I LTR-env-pX transgenic rats: a model for collagen vascular diseases in humans. 10th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related

- Viruses, Dublin, Ireland, 2001. AIDS Res Hum Retroviruses 17: S-46, 2001.
2. Fugo K, Ishizu A, Higuchi M, Tsuji M, Abe A, Ikeda H, Yoshiki T: Pathogenesis of autoimmune diseases in transgenic rats carrying HTLV-I LTR-env-pX gene. 10th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, Dublin, Ireland, 2001. AIDS Res Hum Retroviruses 17: S-46, 2001.
 3. Fugo K, Ishizu A, Higuchi M, Tsuji M, Abe A, Ikeda H, Yoshiki T: Pathogenesis of autoimmune diseases in transgenic rats carrying HTLV-I LTR-env-pX gene. 11th International Congress of Immunology, Stockholm, Sweden, 2001. Scand J Immunol 54: (Thur)65, 2001.
 4. Higuchi M, Ishizu A, Fugo K, Ikeda H, Yoshiki T: Dynamics and function of CD25+CD4+ T cells in HTLV-I LTR-env-pX transgenic rats, a model for collagen vascular diseases. 11th International Congress of Immunology, Stockholm, Sweden, 2001. Scand J Immunol 54: (Thur)67, 2001.
 5. Ishizu A: Pathogenesis implicated in the necrotizing arteritis in transgenic rats carrying HTLV-I LTR-env-pX gene. International Symposium: Current Progress in Vasculitis Syndrome, 第45回日本リウマチ学会総会・学術集会, 東京, 2001. リウマチ 41: 259, 2001.
 6. 富居一範、池田 仁、樋口正人、辻 宗啓、阿部麻美、石津明洋、吉木 敬: HTLV-I LTR-env-pXトランスジェニックラットにおける自己免疫疾患発症に関する検討. 第90回日本病理学会総会、東京、2001. 日本病理学会会誌 90: 156, 2001.
 7. 富居一範、池田 仁、樋口正人、辻 宗啓、阿部麻美、石津明洋、吉木 敬: HTLV-I LTR-env-pX トランスジェニックラットにおける臓器特異的自己免疫疾患の発症機序に関する検討. 第45回日本リウマチ学会総会・学術集会、東京、2001. リウマチ 41: 472.
 8. 早瀬広子、池田 仁、富居一範、辻 宗啓、阿部麻美、石津明洋、吉木 敬: HTLV-Iトランスジェニックラットにおける壊死性血管炎発症機序の解析. 第31回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、2001. 日本免疫学会総会・学術集会記録 31: 76, 2001.
- F. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし.

PD-1 欠損マウスにおける自己免疫性拡張型心筋症に関する研究

篠原隆司（京都大学大学院医学研究科、分子生物学）

研究要旨

ヒトの自己免疫疾患を研究する上において、遺伝子欠損マウスは非常に有用なモデルになる。我々の単離した PD-1 遺伝子は免疫グロブリンファミリーに属する膜蛋白質をコードし、その細胞質領域に免疫反応を負に制御する ITIM motif を持つ。昨年我々は BALB/C の遺伝的背景において PD-1 の欠損マウスは拡張型心筋症の症状を呈することを見だし、その発症には自己抗体が深く関わると結果を得るに至った。本年度はこのマウスの病態を解析するために、心臓における自己抗原の同定を試みた。生化学的手法により、抗原分子は約千倍程度に濃縮され、現在そのアミノ酸配列の決定を行いつつある。拡張型心筋症は現段階では極めて治療の困難な疾患であるが、この結果は、PD-1 分子による免疫反応の抑制性シグナルがこの病態の成立に関わりうることを示し、これまで心臓移植しか治療法がなかったこの難治性疾患にも新たな治療法の確立への発展性を示唆した

A. 研究目的

PD-1 がいかなる機構を用いて自己免疫疾患の発症を制御するのかを、PD-1 欠損マウスにより、1) 免疫学的観点、2) 分子生物学的観点から証明する。このことは自己免疫疾患の病因論を直接的に解明することになる。今年度は BALB/C-PD-1 欠損マウスで見られてた自己免疫性拡張性心筋症の病態を解析する目的で、心臓における自己抗原の同定を試みた

B. 研究方法

昨年度我々は BALB/C-PD-1 欠損マウスの血清中には心筋に対する自己抗体が存在することを明らかにした。この抗体はウエスタンブロットによる解析では、心筋に特異的な 33kD の分子を認識しており、かつ、健常な PD-1 欠損マウスの血清中には存在せず、拡張性心筋症を発症したマウスの血清中にのみ認められるものである。

我々はこのウエスタンブロットをアッセイ系とすることにより、心臓特異

的な抗原分子の同定を試みた。マウスもしくはラット心臓を出発材料とし、たんぱく質を抽出、まず、陰イオン交換カラムにかけ、分画化を行う。ここで分離された分画をそれぞれ、自己抗体を含む血清でウエスタンブロットを行い、陽性分画を決定する。次に今年度はこの陽性分画を陽イオン交換カラムに通し、さらなる分画化を行う。先と同様にウエスタンブロットを行うことで、陽性分画を決定後、SDS ゲル泳動を行い、該当タンパク質部分を切り出し、アミノ酸配の決定を行う

C. 研究結果

大腸菌を尿道から膀胱内にカテーテルを逆行性に挿入し、大腸菌を注入したところ、1週間後の組織所見で、腎間質の多核白血球を中心とした細胞浸潤と尿細管の破壊像を一部に認め、急性腎盂腎炎の所見と考えた。注入前には認めなかったが、注入2ヶ月後より血清中に抗核抗体が出現し4ヶ月後には speckled パターン用に見える抗核抗

体染色を示した(図1)。また、大腸菌注入マウスにおける血清抗核抗体は、経時的に陽性率・抗体価が上昇したが、大腸菌を注入していないシャム操作のみのコントロール群では抗核抗体は観察期間中全て陰性であった。(図2)。また、10~20%のマウスで大腸菌注入3ヶ月以降に抗RNP抗体、抗Sm抗体、抗ds-DNA抗体が出現した。細菌注入群では1回の注入操作にもかかわらず蛋白尿が持続し、注入2ヶ月以降の腎では、糸球体におけるメサンギウム基質の増生と軽度細胞浸潤を認めた(図3)。さらに免疫グロブリン(IgG)、補体(C3)の糸球体領域への沈着が認められた(図4および5)。間質領域においては尿細管の萎縮も認めた。コントロール群の腎にはこれらの変化は認めなかった。また細菌注入群の中には脱毛・紅斑等の皮膚病変を呈するものも認められた。

D. 考察

我々はまず、この心筋に対する自己抗体がマウス以外の種の心臓にも反応するか否かを検討した。その結果、ラット心臓にはこの抗体が反応するが、ヒト心臓には反応しないことが分かった。ラットはマウスの心臓よりも約5倍程度の重量があり、我々はラット心臓を出発材料にし、以下の実験を行った。ラット心臓80個よりタンパクを抽出し、始めにMonoSカラム(陰イオン交換カラム)により分画化を行い、ウエスタンブロットにより、抗原の存在を検討したところ、22番目のフラクションに目的の分子が存在することが明らかになった(図1)。引き続き、MonoQカラム(陽イオン交換カラム)を用いて、この22番目のフラクションをさらに細分画化を行ったところ、33番目のフラクションに目的とする分子が濃縮されてくることが分かった。二つのカラムにより濃縮されたフラクションの純度を検討するべく、SDSタンパク泳動・ウエスタンブロットを行

ったところ、当初のラット心臓粗抽出液に比較して、最終の分画は約1000倍程度の目的タンパク質を含むことが分かった(図2)。我々は現在、この最終分画由来の33kD分子を切り出し、プロテアーゼ処理後、アミノ酸配列を決定を試みている。

E. 結論

拡張型心筋症は現段階では心臓移植しか治療法のない難治性疾患であるが、我々

のBALB/C-PD-1欠損マウスの一連の実験結果は、マウスにおいては少なくとも自己免疫性の拡張型心筋症が存在することを示すものである。この病態とPD-1分子が如何に関わるかを明らかにすることは、自己免疫疾患の発症機序を考えていく上で、貴重な情報をもたらすものであろう。また、B6-PD-1欠損マウスとの症状の差は、自己免疫病発症と遺伝的背景の関係を調べる上で興味深いモデルとなる。これらのマウスモデルにおける結果はヒトにおいても同様のメカニズムによるPD-1遺伝子欠損による自己免疫疾患の存在を強く示唆するものであり、マウスモデルを用いた病態解析、治療はヒト自己免疫疾患治療へのユニークなモデルになることが期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Latchman, Y., Wood, C. R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A. J., Brown, J. A., Nunes, R., Greenfield, E. A., Bourque, K., Boussiotis, V., Carter, L. L., Carreno, B. M., Malenkovich, N., Nishimura, H., Okazaki, T., Honjo, T., Sharpe, A. H., Freeman, G. J. : PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. Nat.

Immunol. 2001, 2: 261-268.

2) Nishimura, H., Honjo, T.: PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. Trends Immunol. 2001, 22: 265-268.

3) Okazaki, T., Maeda, A., Nishimura, H., Honjo, T.: PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology

2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 2001, 98: 13866-13871.

4) Carter, L., Fouser, L., Jussif, J., Fitz, L., Deng, B., Wood, C.,

Collins, M., Honjo, T., Freeman, G., Carreno, B. PD-1:PD-L inhibitory

pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. Eur.

J. Immunol. 2002, 32: 634-643.

2. 学会発表

1) 日本免疫学会総会・学術集会記録第31巻・8頁・2001年

2) The CREST international symposium on immunoglobulin-like receptors, 2001, 17.

3) 11th International Congress of Immunology, Scand. J. of Immunol. 2001, 54, suppl.: 35.

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

1. 「PD-1 欠損マウスおよびその用途」(日本、海外特許申請中)

2. 「PD-1 に対し特異性を有する物質」(日本特許申請中)

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

特になし。