

## 変異ペプチドを用いた免疫難病の治療アプローチに関する研究

分担研究者 住田 孝之 筑波大学臨床医学系内科 教授

**研究要旨** 免疫難病の抗原特定の治療の確立を目的とした研究である。関節リウマチ(RA)およびシェーグレン症候群(SS)において、T細胞が認識する自己抗原のT細胞エピトープを決定し、それぞれのアナログペプチドを明らかにした。RAにおいては、II型コラーゲン(CII)のGKPGIAGFKGEQGPKG(AA256-271)がT細胞エピトープの一つとなっており、GKPGIAD/AFKGEQGPKGがアナログペプチドの候補として明らかとなった。SSにおいては、 $\alpha$ -アミラーゼのT細胞エピトープ(NPFRPWWERYQPV, AA68-80)から、NPFRPWWVRYQPVがアナログペプチドの候補として選定された。以上の結果から、免疫難病の抗原特異的治療戦略が進められよう。

### A. 研究目的

免疫難病である関節リウマチ(RA)やシェーグレン症候群(SS)において、発症機序として、臓器に浸潤した自己反応性T細胞が重要な役割を果たしている。その病因T細胞が認識するT細胞エピトープをアミノ酸レベルで明らかにし、変異ペプチドを用いて抗原特異的に免疫難病を治療することを目的とする。

### B. 研究方法

1) コラーゲンタイプII：HLA-DR B1\*0101陽性RA患者におけるコラーゲンタイプII(CII)のT細胞エピトープの一つはGKPGIAGFKGEQGPKG(AA256-271)であることが判明した。予想されるアナログペプチドを21種類合成し、末梢血T細胞および樹立したT細胞株を用いて、細胞増殖反応、IL-2産生能、IFN- $\gamma$ を指標としたMACSサイトカイン産生アッセイを指標としてアナログペプチドの選択を行った。

2) GPI：一部のRA患者において

glucose-6-phosphate isomerase に対する自己抗体、T細胞が存在する。GPIのT細胞エピトープを決定するために、まずリコンビナント蛋白を作成した。抗GPI抗体陽性RA患者において、リコンビナントGPIに対するT細胞反応を末梢血T細胞の細胞増殖反応、FN- $\gamma$ を指標としたMACSサイトカイン産生アッセイで検定した。

3)  $\alpha$ -アミラーゼ：HLA-DR B1\*0405陽性SS患者における $\alpha$ -アミラーゼのT細胞エピトープは、NPFRPWWERYQPV(AA68-80)であることが判明した。そこで、6種類のアナログペプチドを合成し、1)と同様の方法でアナログペプチドを選定した。

4) ムスカリン作動性アセチルコリン受容体：ムスカリン作動性アセチルコリン受容体(M3R)の細胞外第2ドメインをコードする25マーの合成アミノ酸(KRTVPPGECFIQLSEPTITFGTAI, AA212-236)を作成しB細胞、T細胞の抗原として用いた。24%のSS患者においてM3R抗体が認められたため、同一患者にお

いて T 細胞反応を細胞増殖反応、FN- $\gamma$ を指標とした MACS サイトカイン産生アッセイで検定した。

### C. 結果

1) HLA-DR B1\*0101 陽性 RA 患者における CII の T 細胞エピトープを決定した。T 細胞株を用いたアナログペプチドの選定研究の結果、10 種類の変異ペプチドが T 細胞の増殖反応を 60%以上抑制する効果を示しアナログペプチドとして機能していることが明らかとなった。それらは、GKPGIS/DGFKGEQGPKG, GKPGIAD/AFKGEQGPKG, GKPGIAGD/QKGEQGPKG, GKPGIAGFA/VGEQGPKG, GKPGIAGFKGV/MQGPKG であった。特に、GKPGIAD/AFKGEQGPKG の 2 種類のペプチドは予想される 2 つの HLA 結合モデルの両者において抑制効果を示し、アナログペプチドとして強く期待される。

2) GPI のリコンビナント蛋白を作成し、それに対する T 細胞反応陽性 RA 患者を選択した。その結果、1 例においては、GPI に対し優位な IFN- $\gamma$ 産生 T 細胞の存在が明らかにされた。

3) HLA-DR B1\*0405 陽性 SS 患者における  $\alpha$ -アミラーゼの T 細胞エピトープ (NPFRPWWERYQPV, AA68-80)を決定した。それを基に 6 種類の変異ペプチドを合成しアナログペプチドの検定を行った。その結果、NPFRPWWYRYQPV を抗原として用いた場合に、IFN- $\gamma$ 産生 T 細胞の増加を 50%以上抑制することができた。従って、この変異ペプチドがアナログペプチドの候補として明らかにされた。

4) M3R の T 細胞エピトープの一つは細胞外第 2 ドメインであることが判明した。

### D. 考察と E. 結論

RA における自己抗原の一つである CII の T 細胞エピトープのアミノ酸を少し変えた変異ペプチドを作成することにより、CII 反応性 T 細胞を抑制することができるアナログペプチドが選定された。さらに、SS においても、 $\alpha$ -アミラーゼの T 細胞エピトープのアミノ酸構造から、 $\alpha$ -アミラーゼ反応性 T 細胞の増殖を抑制するアナログペプチドが選定された。以上の結果から、T 細胞エピトープを決定し、アナログペプチドを選定することにより、免疫難病の病因 T 細胞を抗原特異的に制御することが現実的となってきた。今後、SCID-hu マウスなどヒトの臓器病変モデルを用いてアナログペプチドの効果を検定する。このような抗原特異的な治療戦略の開発は、現行の抗原非特異的な治療と異なり、感染症などの多くの副作用を引き起こさずに効率良く免疫難病を治療することが期待されよう。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Shimizudani N, Murata H, Keino H, Kojo S, Nakamura H, Morishima Y, Sakamoto T, Ohtsuka M, Sekisawa K, Sumida M, Sumida T, and Matsuoka K. Conserved CDR3 region of TCR BV gene in bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Clin. Exp. Immunol. 129: 140-149, 2002.
- 2) Murata H, Matsumura R, Koyama A, Sugiyama T, Sueishi M, Shibuya K, Tsutsumi A, and Sumida T. T cell receptor repertoire of T cells in the kidney from patients with lupus nephritis. Arthritis Rheum. 46:

2141-2147, 2002.

3) Ohnishi Y, Tsutsumi A, Sakamaki T, and Sumida T. T cell epitopes of type II collagen in HLA-DRB1\*0101 or DRB1\*0405-positive Japanese patients with rheumatoid arthritis. Int. J. Mol. Med. 11:331-335, 2003.

4) Ohnishi Y, Tsutsumi A, and Sumida T. Antibodies to type II collagen and their association with HLA DR1 allele in Japanese patients with rheumatoid arthritis. Mod. Rheumatol. (in press)

5) Matsumoto I, Lee DM, Goldbach-Mansky R, Sumida T, Hitchon CA, Schur PH, Anderson RJ, Coblyn JS, Weinblatt ME, Brenner M, Duclos B, Pasquali J-L, El-Gabalawy H, Mathis D, and Benoist C. Low prevalence of antibodies to glucose-6-phosphate isomerase in patients with rheumatoid arthritis and a spectrum of other chronic autoimmune disorders. Arthritis Rheum. (in press)

6) Yoshida K, Tsutsumi A, Onishi Y, Akimoto T, Murata H, and Sumida T. T cell epitopes on prothrombin in patients with antiphospholipid syndrome. Ann. Rheum. Dis. (in press)

2. 学会発表  
特になし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし

## 自己免疫疾患のNKT細胞糖脂質リガンド療法開発に関する研究

分担研究者 山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 部長

研究協力者 荒木 学、三宅 幸子 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部

**研究要旨** 分担研究課題である「NKT細胞糖脂質リガンドを用いた自己免疫病治療法の開発」に向けて、多発性硬化症患者末梢血NKT細胞の機能解析、および健常者NKT細胞の糖脂質抗原認識に関する研究を進めた。その結果、多発性硬化症の寛解期では主にCD4<sup>+</sup>NKT細胞のIL-4産生亢進を介したTH2偏倚が確認された。またマウスNKT細胞にTH2偏倚を誘導する糖脂質OCHは、健常者由来のCD4<sup>+</sup>NKT細胞クローンにTH2偏倚を誘導した。以上の結果は、糖脂質による多発性硬化症病態の改善が可能であることを示唆している。

### A. 研究目的

CD1d拘束性NKT細胞は顕著なサイトカイン産生能を有し、さまざまな免疫病態で調節細胞として機能すると考えられている。分担研究者らはNKT細胞を刺激する糖脂質リガンドの中から、Th1細胞を介する自己免疫疾患を抑制する活性を持つものを探索し、NKT細胞の選択的なIL-4産生を促す新規糖脂質リガンドOCHの発見に至った。OCHはNKT細胞の雛形リガンドであるアルファ・ガラクトシルセラミド（ $\alpha$ -GalCer）のスフィンゴシン鎖を短縮したアナログである<sup>1)</sup>。本研究では、OCHの臨床応用の可能性を探るために、多発性硬化症（multiple sclerosis; MS）におけるNKT細胞のサイトカイン・プロファイルを明確にし、あわせてヒトNKT細胞クローンのOCHに対する反応性を検討した。

### B. 研究方法

1) 健常者およびMS患者末梢血よりPBMCを分離し、 $\alpha$ -GalCerで刺激してNKT細胞ラインを培養・誘導した。培養開始3週目にCD4<sup>+</sup>およびCD4<sup>-</sup>NKT細胞（V $\alpha$ 24<sup>+</sup>V $\beta$ 11<sup>+</sup>）をセ

ル・ソーターで分離し、抗CD3抗体+抗CD28抗体を結合したビーズで刺激。培養上清を回収し、IL-4およびIFN- $\gamma$ の濃度をELISA法で測定した。

2) 健常者の末梢血より、single cell sortingと自己フィーダー細胞+PHA刺激を繰り返す方法により、CD4<sup>+</sup>およびCD4<sup>-</sup>NKT細胞クローンを樹立した。クローン細胞の $\alpha$ -GalCerまたはOCHに対する反応性は、自己PBMCまたはCD1d発現CHO細胞（抗原呈示細胞）の存在下で評価した。

### C. 研究結果

1) 健常者由来のCD4<sup>+</sup>NKT細胞についてはIL-4、IFN- $\gamma$ ともに産生したが、CD4<sup>-</sup>NKT細胞では、IL-4の産生が相対的に少なかった。一方、MS寛解期由来のCD4<sup>+</sup>NKT細胞についてはIL-4産生の著しい亢進が認められた。IFN- $\gamma$ の産生については亢進、低下いずれも認められなかった。MS寛解期のCD4<sup>-</sup>NKT細胞では、IL-4、IFN- $\gamma$ ともに低下傾向が見られた。個々のサンプルにつきIL-4/IFN- $\gamma$ 比を求めたところ、CD4<sup>+</sup>NKT細胞がMS寛解期には有意

に TH2 偏倚していることが明らかになった。  
2) 一人の健常者末梢血より、DN NKT 細胞クローンと CD4<sup>+</sup> NKT 細胞クローンが複数樹立された。DN クローンは $\alpha$ -GalCer に反応して強い増殖反応を示したが OCH には反応しなかった。一方、CD4<sup>+</sup> NKT 細胞クローンは、高濃度の OCH に対して $\alpha$ -GalCer に対するそれと同等の増殖反応を示した。CD4<sup>+</sup> NKT 細胞クローンでは、OCH 刺激により TH2 偏倚の傾向が見られた (特に IL-5 と IL-10 産生)。現在、さらにクローンを樹立して解析を加えている。

#### D. 考察

NKT 細胞糖脂質リガンドによる自己免疫疾患の治療の可能性については、現在複数の研究室で検討が進められている。米国では $\alpha$ -GalCer 投与により NOD マウスの自己免疫性糖尿病が抑制されたという結果が示されている<sup>2)3)</sup>。この結果は、分担研究者らの研究室でも追試確認できた。一方、 $\alpha$ -GalCer が EAE を抑制するという米国での実験結果<sup>4) 5)</sup>は、再現できていない。 $\alpha$ -GalCer は OCH ほど顕著な TH2 偏倚を誘導する能力がないので、特殊なプロトコール (アジュバントと混和) によってのみ、EAE を抑制できるものと理解される。

TH2 誘導能力の優れている OCH を臨床に導入する前段階として、本年度は二つの課題につき検討した。第一は、MS 患者の末梢血 NKT 細胞がどのような変化を示しているか確認すること、第二番目には、OCH によってヒト NKT 細胞を刺激した場合、マウスの NKT 細胞で見られたような TH2 偏倚が見られるかどうかを検討した。

最初の課題については、MS の寛解期に CD4<sup>+</sup> NKT 細胞が有意に TH2 偏倚していることを明らかにした<sup>6)</sup>。1 型糖尿病で NKT 細胞の著しい TH1 偏倚が見られたという報告があるが、MS 寛解期では逆に TH2 偏倚が確認された。

最近、CD4<sup>+</sup> NKT 細胞と CD4<sup>-</sup> NKT 細胞が異なる機能系列に属することが定説になりつつあるが<sup>7) 8)</sup>、この説を支持・補強する研究結果と思われる。第二の課題について、CD4<sup>+</sup> NKT 細胞クローンが OCH に反応して TH2 偏倚することを示した。ヒト、マウス NKT 細胞抗原認識が種差を超えて保存されていることを意味するだけでなく、OCH 療法が TH1 細胞の介在する病態を矯正する可能性を示唆する重要な結果と考えている。しかし、さらにクローン数を増やして解析を進める必要がある。

#### E. 結論

MS の寛解期では CD4<sup>+</sup> NKT 細胞が機能的に TH2 偏倚して寛解の維持に貢献する可能性が示された。

OCH はヒト CD4<sup>+</sup> NKT 細胞を TH2 偏倚させる能力があり、MS に代表される自己免疫疾患の治療薬として期待できる。

#### 参考文献

- 1) Miyamoto K, Miyake S and Yamamura T. *Nature* 413: 531, 2001.
- 2) Hong S et al. *Nat. Med.* 7:1052, 2001.
- 3) Sharif S et al. *Nat. Med.* 7:1057, 2001.
- 4) Jahng AW et al. *J. Exp. Med.* 194:1789, 2001.
- 5) Singh AK et al. *J. Exp. Med.* 194: 1801, 2001.
- 6) Araki M et al. *Int. Immunol.* 15: 279, 2003.
- 7) Gumperz JE et al. *J. Exp. Med.* 195: 625, 2002.
- 8) Lee PT et al. *J. Exp. Med.* 195: 637, 2002.

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Araki M, Kondo T, Gumperz JE, Brenner MB, Miyake S and Yamamura T: Th2 bias of CD4<sup>+</sup> NKT cells derived from multiple sclerosis in

remission. *Int. Immunol.* 15: 279-288, 2003

2) Yamamura T, Miyamoto K, Illes Z, Pal E, Araki M, and Miyake S: Synthetic glycolipids as potential therapeutics for autoimmune disease.

*Curr. Topics. Medic. Chem.* (in press) 2003

3) Chiba A, Miyamoto K, Hashimoto H, Yamamura T, and Miyake S: Natural killer T-cell activation by OCH, a sphingosine truncated analogue of  $\alpha$ -galactosylceramide, prevents collagen-induced arthritis. *J. Clin. Invest.* (submitted)

## 2. 学会発表

特になし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特になし

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他

特になし

## 抗原特異的 CD8T 細胞の細胞増殖とその制御に関する研究

分担研究者 上阪 等 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 助教授  
研究協力者 杉原毅彦 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 大学院生

**研究要旨** 多発筋炎、1型糖尿病、橋本病などの免疫疾患では、自己反応性 CD8T 細胞が組織破壊をきたしていることが知られている。元来、CD8T 細胞は、CD4T 細胞と比べて増殖性に富み、抗原特異的刺戟で末梢血中にクローン性増殖し易い。実際に、昨年度報告したように、多発筋炎患者末梢血でも、病態形成性 CD8T 細胞と考えられる細胞のクローン性増殖を認める。今年度は、このような CD8T 細胞を標的とした治療の開発の為、CD8T 細胞の細胞増殖性を制御する因子を検討した。【方法】健常者末梢 T リンパ球を PHA と IL-2 で刺激して CD8、CD4T 細胞の増殖を観察し、両者における遺伝子やタンパク発現の差を DNA アレイ法、ウェスタンブロット法、フローサイトメトリ法で解析した。【結果】末梢 T 細胞をバルクで刺激したところ、CD8T 細胞は CD4T 細胞より増殖が速いことが観察された。IL-2 で刺激していることから、両サブセットにおける CD25 の発現を比較したところ、CD4T 細胞のほうが高頻度だった。そこで、IL-2 刺激によるアポトーシス誘導性に差がある可能性を考え、annexinV の発現を比較したところ、差異は認められなかった。次に、ウェスタンブロット法でサイクリン依存性キナーゼ阻害因子の発現を検討したところ、CD8T 細胞で p27<sup>Kip1</sup> の発現が低下していた。さらに、両サブセットにおける遺伝子発現の差を DNA アレイ法による遺伝子解析で検討したところ、両サブセットの増殖性を制御する因子の候補として、IL-10 レセプターや、CD27 などが考えられた。IL-10 レセプターと CD27 の発現をフローサイトメトリ法で検討したところ、CD8T 細胞で IL-10 レセプターの発現低下が認められた。CD27 は CD4T 細胞のほうが高頻度であった。【結論】in vivo における CD8T 細胞の増殖特性を in vitro でも再現できた。両者の増殖性の差は p27<sup>Kip1</sup> 発現の差を反映していた。IL-2 レセプターの発現やアポトーシス誘導性の差よりも、T 細胞増殖を抑制することが知られる IL-10 に対するレセプターの発現の差が、その原因の一つとして推測された。

### A. 研究目的

我々の分担研究の目的は、免疫・アレルギー疾患の病態の主要な役割を演じる抗原特異的リンパ球の細胞増殖制御機構を解析し、新規治療法開発の可能性を探ることである。本研究班で扱う免疫疾患には、多発筋炎、1型糖尿病、橋本病など、自己反応性 CD8T 細胞が組織破壊をきたしている疾患群がある。元来、CD8T 細胞は CD4T 細胞と比べて増殖性に富み、抗原特異的刺戟で末梢血中にクローン性増殖し易い。実際に、

昨年度報告したように、多発筋炎患者末梢血では、病態形成性 CD8T 細胞と考えられる細胞のクローン性増殖を認める。そこで、今年度は、病態形成性 CD8T 細胞の増殖を阻止する方法を探るため、CD8T 細胞に特徴的な細胞増殖性を in vitro で再現し、そのメカニズムを解析した。

### B. 研究方法

健常成人末梢血由来のリンパ球を、バルクで、PHA により 3 日間、続いて

IL-2 で刺激し、CD8T 細胞と CD4T 細胞の増殖を比較した。次に、両サブセットにおける CD25 と annexinV の発現をフローサイトメトリ法で解析した。さらに、両サブセットの増殖に差が認められる時期に、磁気ビーズで両サブセットを分取してタンパクを抽出し、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子の発現の差をウェスタンブロット法で検討した。両サブセットにおける遺伝子発現の差は、両サブセットの増殖に差が認められる時期に、磁気ビーズで両サブセットを分取して RNA を抽出し、DNA アレイ法による遺伝子解析で検討した。その結果から、両サブセットの増殖性の差を制御する因子の候補を挙げ、それについて、タンパク発現の差をフローサイトメトリ法で検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では、検体の起源の匿名性に配慮し、倫理委員会の承諾を得て行った。

### C. 研究結果

健常者末梢血リンパ球をバルクで刺激したところ、CD4T 細胞と比べて CD8T 細胞は増殖速度が速いことが観察された。IL-2 で刺激していることから、両サブセットにおける CD25 の発現頻度の差が原因で増殖性が異なっていることが予測されたため、フローサイトメトリ法で CD25 の発現を検討したところ、刺激開始後どの時点でも、CD4T 細胞のほうが CD8T 細胞よりも CD25 の発現頻度が増加していた (図 2)。そこで、IL-2 刺激により CD8T 細胞より CD4T 細胞でアポトーシスが誘導されている可能性が考えられたため、annexinV の発現を検討したところ、両サブセットで差異は認められなかった

(図 3)。

次に、細胞増殖を制御するサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 7 種類の発現をウェスタンブロット法で検討したところ、CD8T 細胞で p27<sup>kip1</sup> の発現の低下が認められた (図 4)。他のサイクリン依存性キナーゼ阻害因子では、CD8T 細胞における発現の低下は認められなかった。したがって、p27<sup>kip1</sup> が両サブセットの増殖性の差を制御していると考えられた。

そこで、両サブセットにおける p27<sup>kip1</sup> の発現の差を決める因子が何であるかを検討するため、増殖速度の差が顕著であった 6 日目と、それに続く 13 日目に、DNA アレイ法による遺伝子解析を行った。CD4T 細胞と比較して、CD8T 細胞で発現が高まっていた遺伝子は、6 日目で 1300 遺伝子中 105 遺伝子、13 日目で 118 遺伝子あった。この中には、CD8、接着分子、CD27 などの共刺激分子、IL-15 レセプター $\alpha$ 、グランザイム B、インテグリン、ケモカイン、PCNA などの細胞周期関連の遺伝子、さまざまな転写因子、Lck などのシグナル伝達物質、ヒートショックプロテインなどが含まれていた。CD4T 細胞と比較して CD8T 細胞で発現が低下していた遺伝子は、6 日目で 288 遺伝子、13 日目で 80 遺伝子あった。CD4、IL-10 レセプターなどのサイトカインレセプター、リンホトキシンなどのサイトカイン、転写因子、PKA 等のシグナル伝達物質などが含まれていた。これらの遺伝子の中で、増殖性の差を制御する因子の候補の一つとして、IL-10 レセプターや CD27 などが考えられた。そこで、フローサイトメトリ法で IL-10 レセプターと CD27 の発現を確認したところ、IL-10 レセプターは、両サブセッ



トの増殖速度に差がでる時期に、CD8 T細胞で IL-10 レセプターの発現頻度の低下を認め、CD4 T細胞で発現頻度の増加を認めた(図4)。CD27は両サブセットで差異は認められなかった。

#### D. 考察

多発筋炎患者末梢血では、病態形成性 CD8T 細胞と考えられる細胞のクローン性増多を認め、また、元来 CD8T 細胞は CD4T 細胞と比べて増殖性に富むことが *in vivo* で報告されている。今回の研究で、健常人の末梢血 T 細胞を刺激して CD4T 細胞と CD8T 細胞増殖を観察することによって、*in vitro* でも、CD8T 細胞の増殖特性が再現された。そのメカニズムを検討したところ、CD8T 細胞でサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p27<sup>kip1</sup> の発現が低下することによって、両サブセットの増殖性の差は制御されていると考えられた。両サブセットの増殖性の差を制御する因子として、両サブセットでの IL-2 レセプターの発現の差による IL-2 に対する反応性の差や、IL-2 刺激により CD8T 細胞より CD4T 細胞でアポトーシスが誘導されている可能性は否定的であった。IL-10 レセプターは T 細胞の増殖を抑制することが知られているが、CD8T 細胞での IL-10 レセプターの発現低下が、両サブセットの増殖性の差を制御している可能性が考えられた。

#### E. 結論

CD8T 細胞と CD4T 細胞の増殖性の差は、p27<sup>kip1</sup> の発現によって制御されていると考えられた。CD8T 細胞で、IL-10 レセプターの発現が低下していることが、その原因の一部として推測された。今後、このような解析を進め

ることで、抗原特異的 CD8T 細胞の細胞増殖機構が明らかとなり、その制御法の示唆を得ることができると考えている。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

特になし

##### 2. 学会発表

1) 杉原毅彦、鈴木美穂子、西尾純子、宮坂信之、上阪等：CD8T 細胞と CD4T 細胞における増殖性の差を支配する因子。第 32 回 日本免疫学会・学術集会(ワークショップ)、東京、2002 年 12 月

#### H. 知的財産権の出願・登録

##### 1. 特許取得

特になし

##### 2. 実用新案登録

特になし

##### 3. その他

特になし

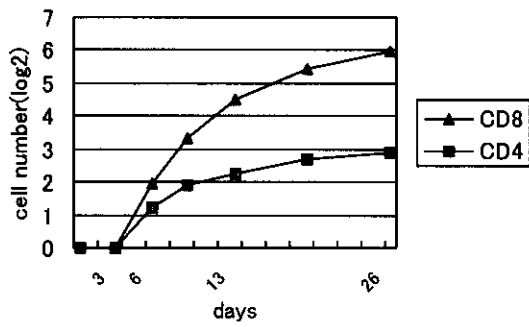


図1 PHAとIL-2で健常者末梢T細胞を刺激すると、CD8T細胞はCD4T細胞より増殖速度が速いことが観察された。縦軸に刺激前を1としたときの細胞数を対数表示で示した。

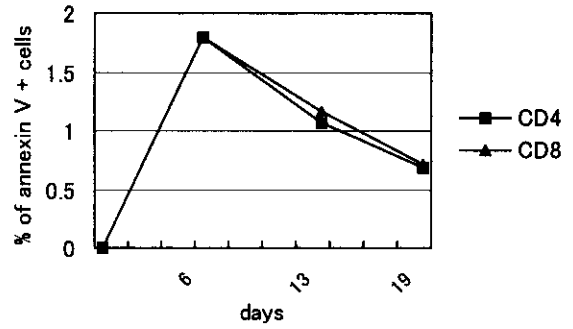


図3 両サブセットで annexin V の発現に差異は認められなかった。縦軸は各サブセットにおける annexinV 陽性 T 細胞の頻度

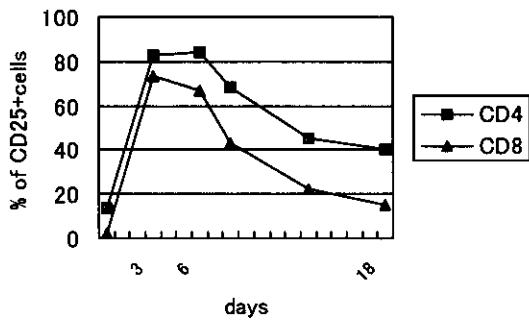


図2 CD25 の発現は、CD4T細胞のほうがCD8T細胞より発現頻度が増加していた。縦軸は各サブセットにおけるCD25陽性T細胞の頻度。

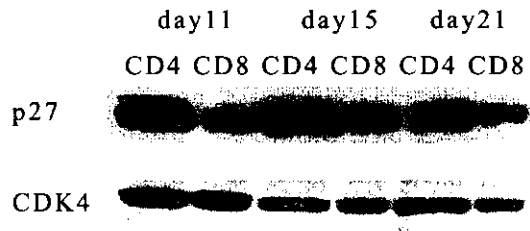


図4 CD8T細胞で p27<sup>kip1</sup> の発現の低下が認められた。

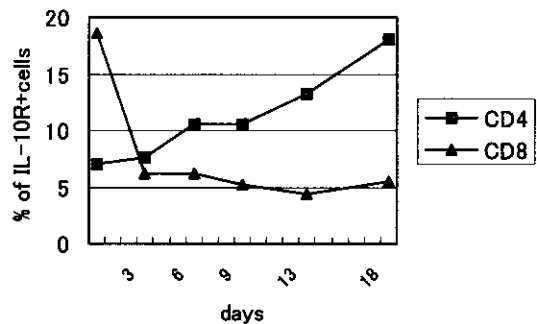


図5 CD8 T細胞でIL-10レセプターの発現頻度の低下を認め、CD4 T細胞で発現頻度の増加を認めた。縦軸は各サブセットにおけるIL-10レセプター陽性T細胞の頻度。

## 制御性 T 細胞に関する研究

分担研究者 坂口 志文 京都大学再生医科学研究所 教授

**研究要旨** Foxp3 遺伝子が、正常個体に内在する制御性 T 細胞の発生・分化のマスター制御遺伝子であることを明らかにした。また正常 T 細胞に Foxp3 遺伝子を導入・発現させることで制御性 T 細胞に変換できることを示した。このようにして作製した制御性 T 細胞は、マウスの自己免疫病モデルで自己免疫病の発症を抑制した。この結果は、制御性 T 細胞を用いた新しい免疫病の治療法の可能性を示す。

### A. 研究目的

免疫自己寛容の一面は、制御性 T 細胞による自己反応性 T 細胞の制御によって維持されている。本研究では、制御性 T 細胞による制御の分子的基础を解明する。またその操作による自己免疫病の治療法を探る。

### B. 研究方法

(1) マウスを用いて、CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>制御性 T 細胞による制御に関する遺伝子を探索・同定する。(2) 制御を媒介する遺伝子の導入による制御性 T 細胞の機能強化、あるいは、ナイーブ T 細胞から制御性 T 細胞の新たな作製を試みる。(3) 作製した制御性 T 細胞について、自己免疫病の治療が可能か、マウスを用いて検討する。(4) ヒト末梢血中の制御性 T 細胞を用いた細胞療法を確立すべく、遺伝子導入による試験管内でのヒト制御性 T 細胞の作製を試みる。

(倫理面への配慮)

当研究所の動物実験指針、また倫理

規定に則り実験を行なった。

### C. 研究結果

ヒトの遺伝性疾患 IPEX (Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) syndrome は、CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>制御性 T 細胞の除去によりマウスに誘導される自己免疫病および炎症性腸疾患 (IBD) と酷似している。IPEX の原因遺伝子である Foxp3 の発現を正常マウスについて検索したところ、Foxp3 は胸腺、末梢の CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞に特異的に発現していた。レトロウイルスベクターに Foxp3 遺伝子を組み込み、正常マウスのナイーブ T 細胞に導入したところ、導入された CD4<sup>+</sup>T 細胞は、T 細胞抗原レセプターを介する刺激に対して増殖を示さず、また IL-2, IL-4, IFN-g の産生が顕著に低下した。また制御に関する分子 (CTLA-4, GITR など) の発現が誘導された。さらに、他の T 細胞の活性化・増殖を強力に抑制した。また、

SCID マウスに制御性 T 細胞の不全状態を作り自己免疫病、IBD を誘導するモデルにおいて、Foxp3 を導入した T 細胞は自己免疫病、IBD の発症を抑制した。現在、ヒト末梢 T 細胞における Foxp3 の発現を検索している。また、Foxp3 遺伝子導入によるヒト制御性 T 細胞の作製を試みている。

#### D. 考察

Foxp3 は、制御性 T 細胞の発生・分化を司るマスター遺伝子と考えられる。その異常は、制御性 T 細胞の量的、機能的不全をもたらし、自己免疫病、IBD を惹起すると考えられる。

#### E. 結論

Foxp3 遺伝子の導入により制御性 T 細胞を作製し、それを用いた自己免疫病の細胞療法が可能である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hori S, Takahashi T, and Sakaguchi S. Control of autoimmunity by natural regulatory T cells. *Adv. Immunol.* In press.
- 2) Sakaguchi S. Control of immune responses by naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory T cells that express T<sub>H</sub>1-like receptors. *J. Exp. Med.* 197: 397-401, 2003.
- 3) Hori S, Nomura T, and Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor

FOXP3. *Science.* 299: 1057-1061, 2003.

- 4) Wood K and Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation. *Nature Rev. Immunol.* 3: 199-210, 2003.
- 5) Sakaguchi S. Regulatory T cells: mediating compromises between host and parasite. *Nature Immunol.* 4: 10-11, 2003.
- 6) Sakaguchi S., Hori S, Fukui Y, Sasazuki T, Sakaguchi N, and Takahashi T. Thymic generation and selection of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells: Implications of their broad repertoire and high self-reactivity for the maintenance of immunologic self-tolerance. Novartis Foundation Symposium. In press.
- 7) Wood K J, H, Ushigome M, Karim A, Bushell H S and S Sakaguchi. Regulatory T cells in transplantation. Novartis Foundation Symposium. In press.
- 8) Sakaguchi S. Immunologic tolerance maintained by regulatory T cells: Implications for autoimmunity, tumor immunity and transplantation tolerance. *Vox Sang* 83: S151-S153, 2002.
- 9) Gallimore A, and Sakaguchi S. Regulation of tumor immunity by CD25<sup>+</sup> T cells. *Immunology* 107: 5-9, 2002.
- 10) Takahashi T, and Sakaguchi S. The role of regulatory T cells in controlling immunologic self-tolerance. *Int. Rev. Cytoll.* In press.
- 11) Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, and Sakaguchi S. Stimulation of CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulat

ory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nature Immunol.* 3: 135-142, 2002.

## 2. 学会発表

- 1) T Takahashi, Y Fukui, T W Mak, T Sasazuki, S Sakaguchi : Thymic generation of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>regulatory T cells: their possible high self-reactivity. The 3rd International Workshop Kyoto T Cell Conference (2002.4.3-5 Kyoto)
- 2) T Takahashi, S Hori, Y Fukui, T Sasazuki, S Sakaguchi : Broad TCR repertoire and high self-reactivity of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>regulatory T cells. Gordon Research Conferences, Immunochimistry and Immunobiology (2002.8.18-23 New Hampshire USA)
- 3) 畑洋, 吉富啓之, 坂口教子, 中村孝志, 坂口志文 : 慢性関節リウマチ様関節炎を自然発症する SKG マウスにおける炎症性サイトカインの役割. 第 32 回日本免疫学会(2002.12.4-6 東京)
- 4) 瀬戸口留可, 堀昌平, 高橋武司, 坂口志文 : 免疫制御性 CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞の維持における IL-2 の役割. 第 32 回日本免疫学会(2002.12.4-6 東京)
- 5) 八木治彦, 北脇年雄, 門脇則光, 内山卓, 藤井信吾, 坂口志文 : ヒト末梢単核球における GITR および GITR リガンドの発現解析. 第 32 回日本免疫学会(2002.12.4-6 東京)
- 6) 高貴範, 山崎小百合, 清水淳, 千葉勉, 坂口志文 : CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>制御性 T 細胞の操作による腫瘍免疫の誘導: 第 32 回日本免疫学会(2002.12.4-6 東京)
- 7) 西村英士, 先浜俊子, 田中紘一,

坂口志文 : CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>制御性 T 細胞による移植免疫寛容の導入. 第 32 回日本免疫学会(2002.12.4-6 東京)

- 8) 牛込秀隆, キャサリンウッド, 堀昌平, 吉村了勇, 坂口志文 : 抗 GITR 抗体投与によるアロ免疫反応の促進. 第 32 回日本免疫学会(2002.12.4-6 東京)
- 9) 片貝智哉, 高橋武司, 坂口志文, 増田徹, 清水章 : マウス自己免疫性胃炎における炎症組織構造とプロトンポンプ反応性 TCR トランスジェニックマウスの作成. 第 32 回日本免疫学会(2002.12.4-6 東京)
- 10) Sakaguchi S. Possible Role of AIRE in Thymic Production of Regulatory T Cells. AIRE 2002 Meeting (2002.2.8-9 Tokyo)
- 11) Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>regulatory T cells. The 3rd International Workshop Kyoto T Cell Conference (2002.4.3-5 Kyoto).

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

Foxp3 発現リンパ球による免疫病の治療法 (特許出願中)

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他

特になし

## SLE に対する抗体療法、拮抗薬療法に関する研究

分担研究者 田中 良哉 産業医科大学医学部第一内科学講座 教授

**研究要旨** 全身性エリテマトーデス SLE の病態形成過程には、Th2 細胞依存性/非依存性の B 細胞のポリクローナル活性化と自己抗体の過剰産生を中心とした免疫異常が関与する。本研究では、SLE 患者リンパ球の細胞活性化や細胞間相互作用に機能する標的分子の発現を検討し、B 細胞活性化の機序を解明した。その結果、SLE 患者 B 細胞、特に IL-4 産生性 B<sub>RO2</sub> 細胞は、Th2 サイトカインと CD40-CD40L を介する直接経路を介して活性化され、細胞死から免れて残存する事が示唆された。また、Th2 サイトカイン産生性サブセットの細胞特性に基づく質的異常により B 細胞活性化が齎されるものと考えられた。斯様な結果を礎にし、B 細胞過剰活性化を主たる病態とした治療抵抗性、致死性 SLE 一症例に対し、CD20 抗体を使用し、救命し得た。症例は、35 歳女性で、ループス腎炎、CNS ループスに対して、意識正常化、自己抗体や尿蛋白の著減を得、B 細胞障害・除去作用を有する CD20 抗体の有用性が示された。今後、既存の薬剤の適応拡大も含め、細胞レベル、動物レベルで基礎的エビデンスの蓄積を行い、研究者を主導とした免疫難病の新規治療法の開発を行う。

### A. 研究目的

SLE の病態形成過程には、自己反応性 T 細胞や Th2 細胞依存性/非依存性の B 細胞のポリクローナル活性化と自己抗体の過剰産生を中心とした免疫異常が関与する。本研究では、細胞レベルでの基礎的研究に於いてリンパ球とその表面に発現する細胞活性化や細胞間相互作用に機能する最適の標的分子を探索する。さらに、抗体医薬療法や拮抗薬療法に関して細胞レベルでの基礎的研究、動物レベルでの前臨床試験、さらに、治験への移行を目的とした探索的臨床研究を遂行する事を目的とする。抗体医薬療法や拮抗薬療法は、代表的先端医療に位置づけられ、例えば、B 細胞に対する CD20 抗体は非ホジキンリンパ腫に対して臨床展開される。しかし、SLE などの膠原病疾患は難治性であるにも拘らず、新

規治療法の組織的開発が遅延している。本研究では、既存の薬剤の適応拡大も含め、研究者を主導とした免疫難病の新規治療法の迅速なる開発を目的とする。

### B. 研究方法

疾患活動性の高い SLE 患者末梢血単核球を 3 日間無刺激下で培養し、CD45RA<sup>+</sup> 細胞を除去後固定してサポニン処理し、各種抗体で細胞表面、および細胞内分子を（三重）染色し、フローサイトメーターで解析した。

### 倫理面への配慮

臨床検体使用や臨床応用では、倫理委員会の規約を遵守し、informed consent を得た上で施行し、患者は如何なる不利益も被らない事を明確にする。

### C. 研究結果

SLE 患者末梢血単核球を亜分画したところ、CD19<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>B 細胞が健常人と比較して著増し、さらに、CD19<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>IL-2<sup>+</sup>細胞 (B<sub>RO1</sub> 細胞) と CD19<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>IL-4<sup>+</sup>細胞 (B<sub>RO2</sub> 細胞) の双方が増加する事を認めた。これらのサイトカイン産生性リンパ球サブセットにおける細胞表面及び細胞内抗原の発現に関しては、SLE では、B<sub>RO2</sub> 細胞で CD40 の発現増強と Th2 及び Tc2 細胞における CD40L の発現増強を認め、さらに B<sub>RO2</sub> 細胞における Bcl-2 の発現増強を認めた。

### D. 考察

SLE 患者 B 細胞、特に IL-4 産生性 B<sub>RO2</sub> 細胞は、Th2 サイトカインと CD40-CD40L を介する直接経路を介して活性化され、細胞死から免れて残存する事が示唆された。また、SLE の病態は、Th2 サイトカイン産生性サブセットの細胞特性に基づく質的異常によるもので、その結果、B 細胞活性化が齎されるものと考えられた。

斯様な結果を礎にし、致死性 SLE に対し CD20 抗体 (Rituximab) を使用し、救命し得た一症例を経験した。症例は、35 歳女性で、1991 年 SLE 発症、ステロイド大量療法にも拘らず 1995 年ループス腎炎 V 型、1999 年 CNS ループスが出現。更に、ステロイドパルス療法 (10 回)、IVCY (21 回)、CsA、血漿交換等を併用するが、2002 年 5 月高熱、CNS ループス増悪による重篤な意識障害が出現。ds-DNA 抗体異常高値など B 細胞過剰活性化が主たる病態でその制御が不可欠と考え、CD20 抗体を投与した。速やかな解熱、意識正常化、自己抗体や尿蛋白の著減を得、B 細胞障害・除去作用を有する CD20 抗体の有用性が示された。

### E. 結論

SLE の病態形成過程には、自己反応性 T 細胞や B 細胞の活性化と自己抗体過剰産生が関与する。斯様な活性化 B 細胞の表面分子は治療標的としても重要である。殊に、CD20 抗体については、B 細胞活性化、並びに、抗原提示細胞としての B 細胞による T 細胞活性化の制御機構を解明し、CD20 抗体療法を治療抵抗性重症 SLE に対して極めて有用な新規治療として提唱し、本研究班を中心に適応拡大治験導入の為の専門委員会を開設し、SLE 症例などに対して CD20 抗体の探索的臨床試験を開始する予定である。また、CD40L 抗体 (IDEC-131 等)、CCR5 拮抗薬、MDR-1 拮抗薬、bcl-2 アンチセンス等を用いた細胞活性化、遊走、薬剤耐性獲得の制御を、細胞レベル、及び、モデル動物レベルで基礎的エビデンスの蓄積を行い、新規治療の探索に努める。

### F. 研究危険情報

特になし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Yasuda M, Nakano K, Yasumoto K, Tanaka Y: CD44: functional relevance to inflammation and malignancy. *Histol Histopathol* (2002) 17, 945-950
- 2) Toda Y, Tsukada J, Misago M, Kominato Y, Auron PE, Tanaka Y: Autocrine induction of the human prointerleukin 1 $\beta$  gene promoter by interleukin 1 $\beta$  in monocytes. *J Immunol* (2002) 168, 1984-1991.
- 3) Iida T, Mine S, Fujimoto H, Suzuki K, Minami Y, Tanaka Y: Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  induces cell cycle arrest of endothelial cells. *Genes Cells* (2002) 7, 143-149.
- 4) Tanaka Y, Nakayamada S, Fujimoto H,

Okada Y, Umehara H, Kataoka T, Minami Y: H-Ras/mitogen-activated protein kinase pathway inhibits integrin-mediated adhesion and induces apoptosis in osteoblasts. *J Biol Chem* (2002) **277**, 21446-21452.

5) Kamizono J, Okada Y, Shirahata A, Tanaka Y: Bisphosphonate induces remission of refractory osteolysis in Langerhans cell histiocytosis. *J Bone Miner Res* (2002) **17**, 1926-1928.

6) Nakayamada S, Saito K, Fujii K, Yasuda M, Tamura M, Tanaka Y:  $\beta$ 1 integrin-mediated signaling induces ICAM-1 and Fas and Fas-mediated apoptosis of rheumatoid synovial cells. *Arthritis Rheum* (in press)

7) Fujii Y, Fujii K, Nakano K, Tanaka Y: Crosslinking of CD44 on human osteoblastic cells upregulates ICAM-1 and VCAM-1. *FEBS Letters* (in press)

8) 田中良哉, 辻村静代, 河野公俊. 膠原病に於けるステロイド薬抵抗性の分子機構とその対策. *内科* (2002) **89**, 216-220.

9) 田中良哉, 辻村静代, 齋藤和義, 河野公俊. 膠原病・リウマチ性疾患に於けるシクロスポリン療法の理論と実際. *日本臨床免疫学会雑誌* (2002) **25**, 110-114.

10) 田中良哉: 全身性エリテマトーデスとサイトカイン. 新・膠原病: 診断と治療の最新のポイント; 皮膚から内臓へ. 竹原和彦, 桑名正隆, 宮地良樹編, 診断と治療社: 14-15頁, 2002. 東京

## 2. 学会発表

1) 田中良哉: 炎症細胞の遊走機序. 第52回日本アレルギー学会総会(教育講演)横浜, 平成14年11月

2) Nakayamada S, Saito K, Nakano K, Tsukada J, Tanaka Y: Effective combination therapy of cyclophosphamide, vincristine and prednisolone for refractory lupus nephritis.

26th International Congress of Internal Medicine, Kyoto, 平成14年5月

3) 田中良哉, 徳永美貴子, 辻村静代, 高澤(小野)亜希子, 齋藤和義. SLEのB細胞異常とその制御. 第46回日本リウマチ学会総会(シンポジウム)神戸, 平成14年4月

4) 田中良哉. 関節リウマチの病態と治療の最近の考え方. 第25回日本内科学会九州支部生涯教育講演会(教育講演)福岡, 平成14年4月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし



### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・頁・出版年
Kawahata K, Misaki Y, Yamaguchi M, Tsunekawa S, Setoguchi K, Miyazaki J, and <u>Yamamoto K</u> .	Peripheral tolerance to a nuclear autoantigen:dendritic cells expressing a nuclear autoantigen lead to persistent anergic state of CD4 <sup>+</sup> autoreactive T cells after proliferation.	J Immunol.	168:1103-1112, 2002.
Kawahata K, Misaki Y, Yamauchi M, Tsunekawa S, Setoguchi K, Miyazaki J, and <u>Yamamoto K</u> .	Generation of CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> regulatory Tcells from autoreactive Tcells simultaneously with their negative selection in the thymus and from nonautoreactive Tcells by endogeneous TCR expression.	J Immunol.	168:4399-4405, 2002.
Kono H, Suzuki T, <u>Yamamoto K</u> , Okada M, Yamamoto T, and Honda Z.	Spatial raft coalescence represents an initial step in Fc $\gamma$ $\beta$ R signaling.	J Immunol.	169:193-203, 2002.
Takahama H, Masuko-hongo K, Tanaka A, Kawa Y, Ohta N, <u>Yamamoto K</u> , Mizoguchi M, Nishioka K, and Kato T.	T-cell clonotypes specific for dermatophagoides pteronyssinus in the skin lesions of patients with atopic dermatitis.	Human Immunol.	63:558-566, 2002.
Iikura M, Yamaguchi M, Hirai K, Suenaga A, Fujiwara T, Fujii T, Taketani Y, and <u>Yamamoto K</u> .	Streptomycininduced anaphylactic shock during oocyte retrieval procedures for in vitro fertilization.	J Allergy Clin Immunol.	109:571-572, 2002.
Sekiya T, Yamada H, Yamaguchi M, <u>Yamamoto K</u> , Ishii A, Yoshie O, Sano Y, Morita A, Matsushima K, and Hirai K.	Increased levels of a TH-type CC chemokine thymus and activation-regulatedchemokine (TARC) in serum and Induced sputum of asthmatics.	Allergy.	57:173-178, 2002.
Nagase H, Miyamasu M, Yamaguchi M, Imanishi M, Tsuno NH, Matsushima K, <u>Yamamoto K</u> , Morita Y, and Hirai K.	Cytokine-mediated regulation of CXCR4 expression in human neutrophils.	J Leukocyte Biol.	71:711-717, 2002.
Yoshimura C, Yamaguchi M, Iikura M, Izumi S, Kudo K, Nagase H, Ishii A, Wall AF, Ra C, Iwata T, Igarashi T, <u>Yamamoto K</u> , and Hirai K.	Activation makers of human basophils : CD69 expression is strongly and preferentially induced by IL-3.	J Allergy Clin Immunol.	109:817-823, 2002.
Isobe H, <u>Yamamoto K</u> , and Cyong JC.	Components of hachimi-jio-gan (ba-wei-di huang-wan) and changes in blood flow in the human central retinal artery.	J Trad Med.	19:105-113, 2002
Ohsima N, Nagase H, Koshino T, Miyamasu M, Yamaguchi M, Hirai K, <u>Yamamoto K</u> , Fujisawa T, Nakagawa N, and Morita Y.	A functional study on CysLT1 receptors in human eosinophils. Int Arch	Allergy Immunol.	129:67-75, 2002.
Desaki M, Sugawara I, Iwakura Y, <u>Yamamoto K</u> , and Takizawa H.	Role of interferon-g in the development of murine bronchus-associated lymphoid tissues unduced by silica in vivo.	Toxicol Appl Pharmacol.	185:1-7, 2002.

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・頁・出版年
Horita T, Tsutsumi A, Takeda T, Yasuda S, Takeuti R, Amasaki Y, Ichikawa K, Atsumi T, <u>Koike T.</u>	Significance of magnetic resonance imaging in diagnosis of nodular regenerative hyperplasia of the liver complicated with systemic lupus erythematosus: a case report and review of the literature.	Lupus.	11: 193-196. 2002
Okamoto T, Tanaka S, Stan C A, <u>Koike T.</u> , Kas M, Makita Z, Sawa Hirofumi Nagashima K.	Advanced glycation end products induce angiogenesis in vivo.	Mol Res	3:186-195.2002.
Atsumi T, <u>Koike T.</u>	Clinical relevance of antiprothrombin antibodies.	Autoimmunity Reviews.	1: 49-53. 2002.
Ieko M, Nakabayashi T, Takeda T, Naitoh S, Atsumi T, <u>Koike T.</u>	The inhibition of protein C anticoagulant activity by anti- $\beta$ 2-glycoprotein I ( $\beta$ 2GPI) antibodies isolated from patients with antiphospholipid syndrome by chromatography methods.	Mod Rheumatol.	12: 44-49. 2002.
Matsuura E, Kobayashi K, Kasahara J, Yasuda T, Makino H, <u>Koike T.</u> , Shoenfeld Y.	Anti- $\beta$ 2-glycoprotein I antibodies and atherosclerosis.	Int. Rev. Immunol.	21. 51-66. 2002.
Yasuda S, Tsutsumi A, Atsumi T, Bertolaccini M L, Ichikawa K, Khamashta M A, Hughes R V, <u>Koike T.</u>	Gene polymorphisms of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 patients with antiphospholipid antibodies.	J. Rheumatol.	29:6. 1192-1197. 2002.
Koizumi K, Haseyama Y, Machino R, Sato Y, Sawada K, <u>Koike T.</u>	The hemophagocytic syndrome in prostate cancer revealed by disseminated carcinomatosis of the bone marrow.	J. Urology.	168, 1101-1102. 2002.
Yamaguchi M, Hirayama F, Murahashi H, Azuma H, Sato N, Miyazaki H, Fukazawa K, Sawada K, <u>Koike T.</u> , Ikeda H, Ikebuchi K.	Ex vivo expansion of human UC blood primitive hematopoietic progenitors and transplantable stem cells using human primary BM stromal cells and human AB serum.	Cytotherapy.	4: 2. 109-118. 2002.
Tyndall A, <u>Koike T.</u>	High-dose immunoablative therapy with hematopoietic stem cell support in the treatment of severe autoimmune disease: current status and future direction.	Int. Med.	41: 8. 608-612. 2002.
Miyoshi H, Taguchi T, Sugiura M, Takeuchi M, Yanagisawa K, Watanabe Y, Miwa I, Makita Z, <u>Koike T.</u>	Aminoguanidine pyridoxal adduct is superior to aminoguanidine for preventing diabetic nephropathy in mice.	Horm Metab Res.	34. 371-377. 2002.
Takeuchi R, Atsumi T, Ieko M, Amasaki Y, Ichikawa K, <u>Koike T.</u>	Suppressed intrinsic fibrinolytic activity by monoclonal anti-beta2 glycoprotein I antibodies: possible mechanism for thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome.	Brit J hematol.	119, 781-788. 2002.
Ambrozic A, Avicin T, Ichikawa K, Kvedar T, Matsuura E, Hojnik M, Atsumi T, Rozman B, <u>Koike T.</u>	Anti- $\beta$ 2-glycoprotein I antibodies in children with atopic dermatitis.	Int Immunol.	14. 823-830. 2002.

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・頁・出版年
Shimizudani N, Murata H, Keino H, Kojo S, Nakamura H, Morishima Y, Sakamoto T, Ohtsuka M, Sekisawa K, Sumida M, Sumida T, and Matsuoka K.	Conserved CDR3 region of TCR BV gene in bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes from patients with idiopathic pulmonary fibrosis.	<u>Clin. Exp. Immunol.</u>	129: 140-149, 2002.
Matsumoto I, and <u>Sumida T.</u>	B cells and Immunoglobulins dependent mechanisms in rheumatoid arthritis.	<u>Therapeutic Apheresis.</u>	6:317-319 2002
Tsutsumi A, Ebitsuka T, Murata H, Takemura H, and <u>Sumida T.</u>	A case of HLA B27 positive coxitis diagnosed 15 years after onset.	<u>Mod. Rheumal.</u>	12:349-353, 2002.
Murata H, Matsumura R, Koyama A, Sugiyama T, Sueishi M, Shibuya K, Tsutsumi A, and <u>Sumida T.</u>	T cell receptor repertoire of T cells in the kidney from patients with lupus nephritis.	<u>Arthritis Rheum.</u>	46: 2141-2147, 2002.
Yasukochi T, Ozawa K, Sato M, Tsutsumi A, Sumida T, and Shibana Y.	Evaluation of the improvement of IGCR technique.	<u>Nucleic Acids Res. Suppl.</u>	2:199-200, 2002.
Ohnishi Y, Tsutsumi A, Sakamaki T, and <u>Sumida T.</u>	T cell epitopes of type II collagen in HLA-DRB1*0101 or DRB1*0405-positive Japanese patients with rheumatoid arthritis.	<u>Int. J. Mol. Med.</u>	11:331-335, 2003.
Ohnishi Y, Tsutsumi A, and <u>Sumida T.</u>	Antibodies to type II collagen and their association with HLA DR1 allele in Japanese patients with rheumatoid arthritis.	<u>Mod. Rheumatol.</u>	(in press)
Adachi Y, Tsutsumi A, Murata H, Takemura H, Chino Y, Takahashi R, Ebitsuka T, and <u>Sumida T.</u>	Behcet's disease accompanied by myelodysplastic syndrome with trisomy 8: Two case reports and review of 15 Japanese cases.	<u>Mod. Rheumatol.</u>	(in press)
Matsumoto I, Lee DM, Goldbach-Mansky R, <u>Sumida T</u> , Hitchon CA, Schur PH, Anderson RJ, Coblyn JS, Weinblatt ME, Brenner M, Duclos B, Pasquali J-L, El-Gabalawy H, Mathis D, and Benoist C.	Low prevalence of antibodies to glucose-6-phosphate isomerase in patients with rheumatoid arthritis and a spectrum of other chronic autoimmune disorders.	<u>Arthritis Rheum</u>	(in press)
Yoshida K, Tsutsumi A, Onishi Y, Akimoto T, Murata H, and <u>Sumida T.</u>	T cell epitopes on prothrombin in patients with antiphospholipid syndrome.	<u>Ann. Rheum. Dis.</u>	(in press)
Araki M, Kondo T, Gumperz JE, Brenner MB, Miyake S and <u>Yamamura T</u>	Th2 bias of CD4 <sup>+</sup> NKT cells derived from multiple sclerosis in remission.	<u>Int. Immunol.</u>	15: 279-288, 2003
<u>Yamamura T</u> , Miyamoto K, Illes Z, Pal E, Araki M, and Miyake S	Synthetic glycolipids as potential therapeutics for autoimmune disease.	<u>Curr. Topics. Medic. Chem.</u>	(in press) 2003
Chiba A, Miyamoto K, Hashimoto H, <u>Yamamura T</u> , and Miyake S	Natural killer T-cell activation by OCH, a sphingosine truncated analogue of $\beta$ -galactosylceramide, prevents collagen-induced arthritis.	<u>J. Clin. Invest.</u>	(submitted)