

厚生労働科学研究費補助金  
(免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業)

免疫疾患に対する免疫抑制療法等先端的新規治療法に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山 本 一 彦

平成16年3月

## 目 次

I. 総括研究報告書	1
免疫疾患に対する免疫抑制療法等先端的新規治療法に関する研究 東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 主任研究者 山本 一彦	
II. 分担研究報告	
病変集積 T 細胞の解析と T 細胞レセプター遺伝子導入による抗原特異性の再構築	9
東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 山本 一彦	
難治性自己免疫疾患に対する造血幹細胞移植に関する研究	11
北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学 小池 隆夫	
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	15
筑波大学臨床医学系内科 住田 孝之	
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	20
国立精神・神経センター神経研究所疾病第六部研究部 山村 隆	
抗原特異的 CD8T 細胞の細胞増殖とその制御に関する研究	23
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科生体応答調節学 上阪 等	
制御性 T 細胞に関する研究	25
京都大学再生医科学研究所 坂口 志文	
SLE に対する抗 CD20 抗体療法に関する研究	28
産業医科大学医学部第一内科学講座 田中 良哉	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	35
IV. 研究成果の刊行物・別刷	45

# I. 総括研究報告

免疫疾患に対する免疫抑制療法等先端的新規治療法に関する研究

主任研究者 山本 一彦 東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 教授

**研究要旨** 免疫難病に対する治療法は現在のところ満足するものがない。この現状を打開する目的で、我が国から発したオリジナルな概念である、CD25 陽性 CD4 陽性制御性 T 細胞、NKT 細胞の制御法、T 細胞レセプター遺伝子導入をはじめとして、欧米でホットに研究開発が展開されている末梢血幹細胞移植、抗体療法、変異ペプチド、シグナル伝達分子などについて、それぞれの第一人者を集め、世界的に高いレベルの研究を推進した。

**分担研究者**

小池 隆夫 北海道大学大学院医学研究科

分子病態制御学 教授

住田 孝之 筑波大学臨床医学系内科 教授

山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所

疾病第六部研究部 部長

上阪 等 東京医科歯科大学大学院医歯学総

合研究科生体応答調節学 助教授

坂口 志文 京都大学再生医科学研究科

生体機能調節学分野 教授

田中 良哉 産業医科大学医学部

第一内科学講座 教授

**A. 研究目的**

全身性自己免疫疾患を中心とした免疫難病についての現在の治療法は、副腎ステロイドや免疫抑制薬が中心であり、一定の効果はあるものの、免疫系全体に対する抑制作用などの副作用が患者にとって不利に働くことが少なくない。したがって、より選択的、特異的で副作用の少ない治療法を開発することは緊急の課題となっている。しかし、我が国ではベンチャー企業の立ち後れ、基礎免疫と臨床免疫の相互交流の少なさなどから、この方面の研究が進んでいないのが現状である。

そこで、本研究は、我が国で確立されつつあるオリジナルな概念を中心に、近未来的に実際の患者に応用可能な先端的新規治療法について、ヒト及びモデル動物での治療法を確立する事を目的とした。

**B. 研究方法**

山本は、全身性エリテマトーデスなどの動物モデルについて、病変臓器に浸潤している T 細胞クローンの動きを、独自に開発したクローン解析法で解析し、種々のパラメーターから病変特異的であると判定出来るクローンについて、その一つの細胞に発現している T 細胞レセプターの 2 つの鎖の全長 cDNA をクローニングする技術の完成を目指した。さらに複数の遺伝子を効率よくリンパ球に導入出来るベクターの開発を進め、自己のリンパ球に 2 つの T 細胞レセプター遺伝子に加えて 3 つ目の機能遺伝子を導入することで、人工改変による抗原特異的機能的 T 細胞を作成する技術の完成を目指した。これにより全身性自己免疫疾患をはじめとする種々の免疫疾患に対する免疫細胞療法の技術が可能であることを示すことを目指した。

坂口はマウスの系で、自身が発見した CD25 陽

性 CD4 陽性の制御性 T 細胞自体を制御する分子の検索と同定を行った。モノクローナル抗体の作成などと同時に、Foxp3 遺伝子に注目して、レトロウイルスベクターにて正常マウスのナイーブ T 細胞に遺伝子導入してその機能と自己免疫疾患の制御の可能性を調べた。山村は、すでに Nature 誌に発表している免疫制御物質 OCH の細胞内メカニズムを詳細に検討した。これにより NKT 細胞が産生するサイトカインのバランスを調節することで、免疫疾患を制御する方法の確立を目指した。

住田はヒトや動物モデルで既に同定してきた病因 T 細胞が認識するエピトープについて、その配列を一部改変することで病因 T 細胞の機能を修飾する方法を検討した。具体的にはコラーゲンタイプ II のエピトープの検索とそれを改変したアナログペプチドを作成し、T 細胞株の反応を検討した。また  $\alpha$ -アミラーゼ Glucose-6-phosphate isomerase (GPI) などの T 細胞エピトープをリコンビナント蛋白や合成ペプチドで決定した。

上阪は病態形成に関わる CD8 陽性 T 細胞に注目し、その増殖の速さの原因を追及した。本年度は特に細胞内シグナル分子に注目し CD4 陽性 T 細胞との差異を検討した。

田中は、B 細胞に注目し、既に欧米では癌や一部の自己免疫疾患の治療に用いられている抗 CD20 抗体の全身性自己免疫疾患治療への適応を検討した。小池は、既に自らが確立している自家末梢血純化 CD34 陽性細胞移植による免疫疾患の治療法のさらなる改良を目指し、治療前後の免疫学的変化を自己抗体価、末梢血リンパ球表面マーカー、細胞内サイトカインの発現、DNA マイクロアレイによる種々の遺伝子変化などで解析した。

#### (倫理面への配慮)

動物モデルでの研究は指針に従った。ヒトの培養細胞を用いた研究はインフォームドコンセントを取得した後に行った。患者への治療に関しては

各施設の倫理委員会の承認を得た、または得る予定である。以上のことで倫理上問題ないとする。

#### C. 研究結果

山本は昨年度の難治性ループスモデルの NZB/W F1 マウスにおける、ヌクレオソームに対する T 細胞レセプター遺伝子と抑制性の CTLA4Ig 分子をコードする遺伝子の導入による抑制実験の研究を続けると同時に、コラーゲン誘導関節炎の病変局所の 1 つの細胞から 2 つの T 細胞レセプター遺伝子をクローニングすることに成功した。さらにこれを用いて関節炎を制御する T 細胞を作成した。以上の成果により、このような制御性 T 細胞による治療法が可能であることが判明した。坂口は Foxp3 遺伝子を導入することにより、自らが発見し世界的に注目されている CD25 陽性 CD4 陽性制御性 T 細胞の発生、分化を司るマスター遺伝子であることを見いだした。さらに Foxp3 遺伝子導入により、マウス及びヒトで制御性 T 細胞を作成出来ることを示した。山村は自己免疫疾患の制御で注目されている NKT 細胞を刺激する変異ペプチドについて、スフィンゴシン鎖の異なる OCH が CD1 分子との結合安定性が低いことで、Th2 サイトカインが選択的に産生されることを示した。

住田はコラーゲンタイプ II の T 細胞エピトープを決定し、アナログペプチドを作成し T 細胞株の反応を検討した。また GPI、 $\alpha$ -アミラーゼ、ムスカリン作動性アセチルコリン受容体のアピトープの決定を進めた。上阪は増殖の速い CD8 陽性 T 細胞と CD4 陽性 T 細胞を比較し、JAK1、JAK3 がより強く活性化されることを示した。

田中は CD20 抗体を用いて重症 SLE 患者を治療した例を報告し、その有用性を示した。小池は強皮症 4 例の自己末梢血 CD34 陽性細胞移植について検討し、特に皮膚硬化所見の明らかな改善が見られ、その機序を cDNA アレイ法などを解析した。

#### D. 考察

欧米では、免疫担当の細胞や分子に対するモノクローナル抗体療法、小分子の阻害薬、遺伝子療法、細胞療法など、多くの分野の技術・資源を動員して、免疫疾患に対する種々の治療法の開発が進められている。本研究にも含まれる骨髄幹細胞移植も数年前から実際の患者で治療研究が進められている。しかし、実際には少数の抗体療法を除いて未だに世界的に認められたものは多くないことから、さらに研究を進める必要性が提言されている。

一方、我が国では基礎免疫学は世界的なレベルにあるが、基礎免疫学と臨床免疫学を結び合わせる応用免疫学の領域の発展が種々の理由で十分ではない。従来個々の研究室レベルからは、それぞれ新しい治療法の可能性についての検討の報告は散見されているが、研究者の組織または領域として新規治療法開発を推進するような土壌がほとんどなかったのが現状である。そこで、本研究は我が国で独自の新規治療法の開発に積極的な一流の基礎免疫学者と一定のレベル以上の基礎的な研究を行いつつ疾患研究を進めている臨床免疫学者を比較的少数集め、近未来的に応用可能であることに焦点を絞り、お互いに情報・技術を交換しながら、それぞれが独自の治療法を目指した。2年目の成果としては、かなりの達成度であると考えられる。

#### E. 結論

これまで我が国から発したオリジナルな概念である、CD25 陽性 CD4 陽性制御性 T 細胞、NKT 細胞の制御法、T 細胞レセプター遺伝子導入をはじめとして、欧米でホットに研究開発が展開されている末梢血幹細胞移植、抗体療法、変異ペプチド、シグナル伝達分子などについて、それぞれの第一人者を集め、世界的に高いレベル研究を推進できた。また臨床への応用に関してはすでにヒトでの治療を始めているものから、マウスでの治療

法の開発の段階までの種々の段階のものがあり、近未来的に応用可能なことを目指して、各段階での実際的な問題点を明らかにして、各プロジェクトがスムーズに開発に向けられるようにする必要がある。

#### F. 健康危険情報

治療期間中、感染性と思われる発熱、ウイルス感染によると思われる出血性膀胱炎、血球貪食症候群、心膜炎、骨髄抑制等を認めた。抗生剤、抗ウイルス剤等の使用により加療可能であったが、1 症例で自家末梢血幹細胞非選択移植を必要とした。いずれの症状も造血能回復とともに軽快傾向を示した。(小池隆夫)

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tokuhiko S, Yamada R, Chang X, Suzuki A, Kochi Y, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Ohtsuki M, Ono M, Furukawa H, Nagashima M, Yoshino S, Mabuchi A, Sekine A, Saito S, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K. An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. *Nature Genet.* 35:341-348, 2003.
- 2) Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhiko S, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Nakayama-Hamada M, Kawaida R, Ono M, Ohtsuki M, Furukawa H, Yoshino S, Yukioka M, Tohma S, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Nishioka Y, Sekine A, Iida A, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 34:395-402, 2003.
- 3) Tahara H, Fujio K, Araki Y, Setoguchi K, Misaki Y, Kitamura T, Yamamoto K. Reconstitution of CD8<sup>+</sup> T cells by retroviral transfer of the TCR  $\alpha\beta$ -chain genes

isolated from a clonally expanded P815-infiltrating lymphocyte<sup>1</sup>. *J Immunol.* 171:2154-2160, 2003

4) Yamamoto K. Pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Autoimmun Rev.* 2:13-18, 2003.

5) Yamada R, Suzuki A, Chang X, Yamamoto K. Peptidylarginine deiminase type4: identification of a rheumatoid arthritis-susceptible gene. *Trends Mol Med.* 9:503-508, 2003.

6) Sekiya T, Tsunemi Y, Miyamasu M, Ohta K, Morita A, Saeki H, Matsushima K, Yoshie O, Tsuchiya N, Yamaguchi M, Yamamoto K., Tamaki K and Hirai K. Variations in the human Th2-specific chemokine TARC gene. *Immunogenetics.* 54:742-745, 2003.

7) Suzuki K, Sawada T, Murakami A, Matsui T, Tohma S, Nakazono K, Takemura M, Takasaki Y, Mimori T, Yamamoto K. High diagnostic performance of ELISA detection of antibodies to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 32:197-204, 2003.

8) Li, N., Nakamura, K., Jiang, Y., Tsurui, H., Matsuoka, S., Abe, M., Ohtsui, M., Nishimura, H., Kato, K., Kawai, T., Atsumi, T., Koike, T., Shirai, T., Ueno, H., Hirose, S. Gain-of-function polymorphism in mouse and human Ltk: implications for the pathogenesis of lupus erythematosus. *Hum Mol Genet* 13:2 171-179. 2004

9) Amengual O, Atsumi T, Koike T. Specificities, properties, and clinical significance of antiprothrombin antibodies. *Arthritis Rheum* 48(4):886-895 2003

10) Sakai Y, Atsumi T, Itoh T, Koike T. Uveitis, pancarditis, haemophagocytosis, and abdominal masses. *Lancet* 361 : 9360 834 2003

11) Matsumoto, I., Lee, D.M., Goldbach-Mansky, R., Sumida, T., Hitchon, C.A., Schur, P.H., Anderson, R.J., Coblyn, J.S., Weinblatt, M.E., 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* 48: 944- 954, 2003.

12) Shibuya, K., Shirakawa, J., Kameyama, T., Honda, S.-I., Tahara-Hanaoka, S., Miyamoto, A., Onodera, M., Sumida, T., Nakauchi, H., Miyoshi, H., and Shibuya, A. CD226 (DNAM-1) is involved in LFA-1 costimulatory signal for naïve T cell differentiation and proliferation. *J. Exp. Med.* 198:1829-1839, 2003.

13) Arakaki, R., Ishimaru, N., Saito, I., Kobayashi, M., Yasui, N., Sumida, T., and Hayashi, Y. Development of autoimmune exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in adoptively transferred mice with autoreactive CD4+ T cells. *Arthritis Rheum.* 48: 3603-3609, 2003.

14) Koike, F., J-i. Satoh, T. Kondo, S. Miyake, T. Yamamoto, M. Kawai, S. Kikuchi, K. Nomura, K. Yokoyama, K. Ota, T. Kanda, T. Fukazawa, and T. Yamamura: Microarray analysis identifies IFN $\beta$ -regulated genes in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 139: 109-118, 2003.

15) Bedoui, S., S. Miyake, Y. Lin, K. Miyamoto, S. Oki, N. Kawamura, A. Beck-Sickingler, S. von Hoersten, and T. Yamamura: Neuropeptide Y (NPY) suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: NPY Y1 receptor-specific inhibition of autoreactive Th1 responses in vivo. *J. Immunol.* 171: 3451-3458, 2003.

16) Chiba, A., S. Oki, K. Miyamoto, H. Hashimoto, T. Yamamura, and S. Miyake: Natural killer T-cell activation by OCH, a sphingosine truncated analogue of  $\alpha$ -galactosylceramide, prevents collagen-induced arthritis. *Arthritis. Rheumat.* 50:305-313, 2004.

17) Illes, Zs., M. Shimamura, J. Newcombe, N. Oka, and T. Yamamura: Accumulation of V $\alpha$ 7.2J $\alpha$ 33 invariant T cells in autoimmune inflammatory lesions of the nervous system. *Int. Immunol.* 16: 223-230 , 2004.

18) Nishio J, Suzuki M, Nanki T, Miyasaka N and

Kohsaka H. Development of TCRB CDR3 length repertoire of human lymphocytes. *Int Immunol* 16, 423-431, 2004.

19) Sakaguchi, S. The origin of FOXP3-expressing CD4+ regulatory T cells: thymus or periphery. *J. Clin. Invest.* 112: 1310-1312, 2003.

20) Sakaguchi, N., Takahashi, T., Hata, H., Nomura, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Sakihama, T., Matsutani, T., Negishi, I., Nakatsuru, S., and Sakaguchi, S.: Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature.* 426:454-60, 2003.

21) Sakaguchi, S. Taming transplantation by regulatory T cells. *Nature Medicine* 9:1117-1118, 2003.

22) Sakaguchi, S. Control of immune responses by naturally arising CD4+ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 197: 397-401, 2003.

23) Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 299: 1057-1061, 2003.

24) Sakaguchi, S. Regulatory T cells: mediating compromises between host and parasite. *Nature Immunol.* 4: 10-11, 2003.

25) Fujii Y, Fujii K, Nakano K, Tanaka Y : Crosslinking of CD44 on human osteoblastic cells upregulates ICAM-1 and VCAM-1. *FEBS Letters* (2003) 539,45-50.

26) Nakayamada S, Okada Y, Saito K, Tamura M, Tanaka Y :  $\beta$ 1 Integrin/Focal Adhesion Kinase-mediated Signaling Induces Intercellular Adhesion Molecule 1 and Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligand on Osteoblasts and Osteoclast Maturation. *J Biol Chem* (2003) 278,45368-45374.

27) Nakayamada S, Saito K, Fujii K, Yasuda M, Tamura M, Tanaka Y :  $\beta$ 1 integrin-Mediated Signaling Induces Intercellular Adhesion Molecule 1 and Fas on Rheumatoid Synovial Cells and Fas-Mediated Apoptosis.

*Arthritis Rheum* (2003) 48, 1239-1248.

28) Yamamoto A, Fukuda A, Seto H, Miyazaki T, Kadono Y, Sawada Y, Nakamura I, Katagiri H, Asano T, Tanaka Y, Oda H, Nakamura K, Tanaka S : Suppression of arthritic bone destruction by adenovirus-mediated dominant-negative Ras gene transfer to synoviocytes and osteoclasts. *Arthritis Rheum* (2003) 48: 2682-2692

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許出願

Foxp3 発現リンパ球による免疫病の治療法 (出願中・坂口志文)

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



## II. 分担研究報告

## 病変集積 T 細胞の解析と T 細胞レセプター遺伝子導入による抗原特異性の再構築

分担研究者 山本 一彦 東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 教授

**研究要旨** T 細胞レセプター (TCR) に関するクロナリティ解析により、膠原病モデルマウスにおいて、病態形成に関与していると考えられる CD4 陽性クローンを同定することが可能であることが判明した。この TCR の cDNA を回収し、自らのリンパ球に遺伝子導入することで抗原特異的 T 細胞の再構築が可能であり、さらに機能分子の cDNA を追加導入することで、抗原特異的免疫応答制御が可能であることを明らかにした。

### A. 研究目的

膠原病など難治性免疫疾患の病変部に集積している T 細胞を詳細に調べることで、病態との関わりを推察し、さらにそこで使われている T 細胞レセプター (TCR) の機能を遺伝子導入により再構築することで、新しい抗原特異的免疫療法を確立することを目的とした。特に病態形成との関係が深いと考えられる CD4 陽性の T 細胞に焦点を当てた。まず、マウスの SLE のモデルである NZB/W F1 の腎病変やコラーゲン誘発性関節炎 (CIA) の関節病変における CD4、CD8 など亜分画別のクロナリティ解析を行った。また CIA において炎症部位に浸潤・増殖している T 細胞の TCR  $\alpha/\beta$  鎖を同定し、炎症部位に集積している TCR が関節への浸潤を規定しているかどうか、これらの TCR の治療への応用が可能かどうかを遺伝子導入法により検討した。

### B. 研究方法

NZB/W F1 マウスの腎病変および CIA の関節病変から単一細胞分画を作成し、CD4、CD8 陽性に分画後 RNA を抽出し、TCR に関する RT-PCR/SSCP 法で集積クローンを分析した。また CIA の関節病変から CD4 陽性 V $\beta$ 8.1/8.2 陽性 T 細胞を単一細胞ソーティングにより回収した。並行して CD4 陽性 V $\beta$ 8.1/8.2 陽性 T 細胞分画における病変集積クローンを解析した。病変部に集積しているクローンと同一の  $\beta$  鎖をもつクローンを単一細胞ソーティングの中から拾い出し、その cDNA

から V $\alpha$ 1-22 までの  $\alpha$  鎖について PCR によるスクリーニングを行い、 $\alpha$  鎖を同定した。このようにして同定した  $\alpha$ 、 $\beta$  鎖の cDNA を全長にした後、レトロウイルスベクターの pMX に組み込み、DBA/1 マウスの脾臓細胞に遺伝子導入した。

(倫理面への配慮)

マウスでの研究であり、実験指針に従って行った。

### C. 研究結果

NZB/W F1 マウスの腎病変、CIA の関節病変には、CD4 陽性の T 細胞クローンの集積が観察され、特にこれらのクローンは病変部位が異なっても同一クローンが存在することから、病態形成との関係が示唆された。次に CIA の関節病変に集積している  $\beta$  鎖を発現するクローン 20B47 を同定した。20B47 TCR は  $\alpha$  鎖は AV2 サブファミリー、 $\beta$  鎖は BV8S2 サブファミリーに属していた。20B47 TCR  $\alpha/\beta$  鎖をレトロウイルスベクターにより導入した脾細胞由来 CD4 陽性 T 細胞は、関節病変に近い鼠径リンパ節由来樹状細胞に特異的な自己反応性を示し、II 型コラーゲン免疫前の鼠径リンパ節由来樹状細胞よりも II 型コラーゲン免疫後の鼠径リンパ節由来樹状細胞に対して強い増殖反応を示した。この増殖反応は II 型コラーゲン添加によっても増強されず、20B47 TCR は II 型コラーゲン以外の関節内自己抗原を認識していると考えられた。20B47 導入 T 細胞を CFSE で蛍光標識して生体

内での動態を検討すると、無処置の DBA1 マウスと比較して関節炎発症マウスの鼠径リンパ節・炎症部位で強い分裂と集積を認めた。さらに 20B47TCR に加え抑制性分子 IL-10 を共導入した細胞を II 型コラーゲン免疫後に移入することにより、関節炎の抑制が認められた。

#### D. 考察

種々の病変に病態形成性と考えられる CD4 陽性のクローンが関与していることが示された。また CIA の病態形成に II 型コラーゲン以外の自己抗原が関与していることが示唆された。

#### E. 結論

我々の手法により病変の抗原に特異的で、病態の発症時に所属リンパ節、炎症部位に均一に集積する TCR を同定し、その遺伝子導入による CD4 陽性 T 細胞上の抗原特異性の再構築が可能であることが示された。この TCR に加え抑制性分子を導入した細胞の移入により CIA の関節炎を抑制することが可能であったことから、今後この手法を用いてさらに炎症関連抗原の同定や細胞治療等に広く応用が可能と考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Sekiya T, Tsunemi Y, Miyamasu M, Ohta K, Morita A, Saeki H, Matsushima K, Yoshie O, Tsuchiya N, Yamaguchi M, Yamamoto K, Tamaki K and Hirai K. Variations in the human Th2-specific chemokine TARC gene. *Immunogenetics*. 54:742-745, 2003.
- 2) Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhiko S, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Nakayama-Hamada M, Kawaida R, Ono M, Ohtsuki M, Furukawa H, Yoshino S, Yukioka M, Tohma S, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Nishioka Y, Sekine A, Iida A, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine

deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet*. 34:395-402, 2003

3) Tahara H, Fujio K, Araki Y, Setoguchi K, Misaki Y, Kitamura T, Yamamoto K. Reconstitution of CD8<sup>+</sup> T cells by retroviral transfer of the TCR  $\alpha\beta$ -chain genes isolated from a clonally expanded P815-infiltrating lymphocyte<sup>1</sup>. *J Immunol*. 171: 2154-2160, 2003.

4) Tokuhiko S, Yamada R, Chang X, Suzuki A, Kochi Y, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Ohtsuki M, Ono M, Furukawa H, Nagashima M, Yoshino S, Mabuchi A, Sekine A, Saito S, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K. An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. *Nat. Genet*. 35:341-348, 2003.

5) Suzuki K, Sawada T, Murakami A, Matsui T, Tohma S, Nakazono K, Takemura M, Takasaki Y, Mimori T, Yamamoto K. High diagnostic performance of ELISA detection of antibodies to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*. 32:197-204, 2003.

6) Yamada R, Suzuki A, Chang X, Yamamoto K. Peptidylarginine deiminase type4: identification of a rheumatoid arthritis-susceptible gene. *Trends Mol Med*. 9:503-508, 2003.

7) Yamamoto K. Pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Autoimmun Rev*. 2:13-18, 2003.

##### 2. 学会発表

- 1) 山本一彦：ゲノム解析理解のための基礎知識。第 47 回日本リウマチ学会(2003. 4. 24-26 東京都)
- 2) 荒木靖人, 藤尾圭志, 中川洋子, 高橋秀実, 山本一彦：第 33 回日本免疫学会(2003. 12. 8-10 福岡市)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## 難治性自己免疫疾患に対する造血幹細胞移植に関する研究

分担研究者 小池 隆夫 北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学・第二内科 教授

**研究要旨** 既存の治療に抵抗を示す難治性自己免疫疾患(全身性エリテマトーデス、全身性硬化症(強皮症))患者を対象として磁気細胞分離システム(AM9802)により純化した自家末梢血純化 CD34 陽性細胞移植を超大量免疫抑制療法(conditioning)に継いで行うことで、従来の治療法に抵抗性の症例における本治療法の有効性ならびに安全性を検討し、本邦におけるその標準的方法を確立することを目的とする。同時に免疫学的な解析を行うことにより難治性自己免疫疾患の病態の解明を目的とする。現在までに全身性強皮症患者 5 例に対して自家末梢血純化 CD34 陽性細胞移植併用超大量免疫抑制療法を施行した。この内、3 症例は 30 ヶ月以上の経過観察が行えている。いずれの症例も移植後比較的早期より皮膚症状の改善が確認され、長期観察施行例において臨床効果は持続性であった。しかしながら、皮膚症状の改善と血清学的検査所見、末梢血リンパ球分画、末梢血単核球における炎症および免疫関連遺伝子発現変化の間に一定の傾向は認められなかった。今後、症例の蓄積による治療の標準化が望まれるとともに、同療法の病態関与の程度およびその効果発現機序、長期予後の評価が必要である。

### A. 研究目的

自己免疫疾患は、自己組織に反応してこれを傷害する自己反応性リンパ球クローンや自己抗体によって発症する自己免疫疾患と考えられ、その臨床像は多彩であり、現時点において根治的治療法は確立されていない。これまでのところ副腎皮質ステロイド剤や免疫抑制剤による免疫抑制療法が治療の主体となっており予後の改善が認められている。しかしながら、これらの治療法に抵抗を示す難治性症例も少なからず存在し、このような例は生命予後ならびに社会的予後が極めて不良である。その病態改善のため自己反応性リンパ球クローンの除去が有効であると考えられている。その1つの方法として超大量免疫抑制療法が挙げられ有効性が認められつつある。この際、超大量免疫抑制療法による骨髄不全回避のため造血幹細胞移植による支持療法が不可欠である。そこで、難治性自己免疫疾患に対する自家末梢血純化 CD34 陽性細胞移植併用超大量免疫

抑制療法の治療法確立のため、その有効性、安全性を検討するとともに難治性自己免疫疾患の病態解明を行うことを目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. 対象症例

副腎皮質ステロイド剤、免疫抑制剤を含む既存の治療法に抵抗を示す全身性エリテマトーデス、強皮症等の自己免疫疾患患者を対象とする。治療実施に際しては、60歳以上、高度の心不全、コントロール不能な不整脈、高度の腎障害等を有する症例は除外例とする。当科で適応症例となった5例は、いずれも発症3年以内で高度の皮膚硬化を認め、d-ペニシラミン、副腎皮質ステロイド剤、プロスタグランジン製剤等のさまざまな治療歴を有していた。

#### 2. 治療法

Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) 単独もしくは、Cyclophosphamide (CPA) 2 g/m<sup>2</sup> x 2

日間投与後 G-CSF 併用で末梢血中へ血液幹細胞を動員 (mobilization)、採取を行う。採取した末梢血幹細胞を磁気細胞分離システムを用いて CD34 positive selection を行い純化し凍結保存する。同時に CD34 純化を行わない末梢血幹細胞を back up 用として凍結保存する。CPA 200 mg/kg を 4 日間に分けて投与し移植前処置を行う。この際、出血性膀胱炎予防のため Mesna を併用する。前処置後、純化凍結保存しておいた自己末梢血 CD34 陽性細胞を輸注し、その後、G-CSF 投与を行い造血能の回復を促す。治療期間中、輸血療法、感染症対策としての抗生剤投与等の支持療法を合わせて行った。

### 3. 免疫学的検討

治療前後における末梢血リンパ球サブセットおよびサイトカイン産生能の変化を評価する。また、末梢血単核球を対象として治療過程における免疫・炎症関連遺伝子発現レベルの変化について cDNA アレイ法を用いて検討した。

#### (倫理面への配慮)

事前に本人および家族へインフォームドコンセントを行い、文書による同意を得る。さらに当院医の倫理委員会判定委員会の承認を得た症例に限るものとする。

## C. 研究結果

### 1. 臨床症状

当科において移植療法を施行した強皮症 5 症例の内、3 症例は 30 ヶ月以上の観察期間を有し、2 症例については平成 15 年から本年にかけて同療法を施行した。いずれの症例も造血能の回復は速やかであった。皮膚所見については、初期 3 症例はともに modified Rodnan total thickness skin score (mRodnan TSS) で 25% 以上の改善を認め、modified Health Assessment Questionnaire (mHAQ) についても症例 3 を除いて著明な改善を認めた。症例 3 については、移植後、全身状態の悪化のため、mHAQ の悪化を認めた。腎機能、呼吸機能より診た臓器障害に対する効果は、移植後、一過性に検査上低値を示すものの約

1 年で移植前値に復し、以降、安定して推移している。

### 2. 安全性に関する検討

前述のプロトコールで mobilization を施行し、5 症例ともに十分量の CD34 陽性細胞が採取され、移植後の造血能回復は速やかであった。移植後、3 症例でサイトメガロウイルス抗原血症を認め、ガンシクロビルによる加療を行った。症例 2 については、移植後に血球貪食症候群の合併を認め、移植後 7 ヶ月後には自己免疫機序によると考えられる血小板減少を来した。症例 3 については、移植後、貧血を伴う出血性膀胱炎、心膜炎、心嚢液貯留による心機能低下、骨髄抑制を認め、最終的に自己末梢血幹細胞非選択移植を必要とし、長期入院による経過観察を要した。症例 4、5 については移植後観察期間が短いものの特に移植関連合併症を認めていない。何れの症例も、現在、外来通院中であり、定期的全身精査で異常を認めていない。

### 3. 免疫学的検討

血清学的検査では、ガンマグロブリン値、抗核抗体、抗 TOPO-I 抗体等は低下例もみられたが、一定の傾向を認めず皮膚病変の改善と相関しなかった。免疫学的には CD56<sup>+</sup>、CD19<sup>+</sup>分画および CD45RO<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>分画の回復は比較的速やかであったが、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比は移植後長期にわたり低値を示した。cDNA アレイ法による末梢血単核球における炎症、免疫関連遺伝子発現の検討では移植後、IL-1 $\beta$ 、IL-12 p35、IL-15R $\alpha$ 、MCP-3、TACE、Db1、TNF $\alpha$ 、TGF $\beta$ 等の変化が認められ、現在さらに解析中である。

## D. 考察

膠原病をはじめとした自己免疫疾患に対する根治的治療は現時点では存在せず、副腎皮質ステロイド剤、免疫抑制剤等による免疫抑制療法により病態の改善が得られている。しかしながら、これらの治療に抵抗し生命的、社会的予後が不良な症例も多く存在する。近年、このような難治性自己免疫疾患に対して造血幹細胞移植併用超大量免疫抑制療法が

有効であることが報告されている。これまで、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、強皮症、成人発症スティル病、筋炎等への治療成績が報告されており程度の差はあれ病態の改善が得られたとの報告が多い。強皮症に対する適応症例は 1997 年の Tyndall A, et al による報告が最初であり、2000 年の EBMT/EULAR (European League Against Rheumatism and European Group for Blood and Marrow Transplantation) の報告によれば、約 70% の症例で skin score で 25%以上の改善が認められている。皮膚病変の著明な改善に比して臓器合併症への治療効果は確立しておらず、長期経過観察が必要である。特に、強皮症においては、初期に 17%と高い治療関連死亡率が報告された。その後、conditioning として肺野への放射線照射を避けることや、適応患者選択基準変更により治療関連死亡率は約 10%へ改善したことが報告されている。これらの点から、適応除外基準、移植前処置の検討を重ねることにより、より安全かつ効果的な治療法となる可能性が考えられる。

現在までのところ、病態改善の機序は現時点では不明である。当初、超大量免疫抑制療法および純化 CD34 陽性細胞輸注による免疫システムの完全な再構築再構築による結果と説明された。しかしながら、当科強皮症症例における血清学的推移、FACS、cDNA アレイによる検討において本療法後にいずれも正常化していないことより、最近では有効性の機序は免疫システムの“調節”にあるものと考えられている。

以上のことを踏まえて自己免疫疾患の病態解明を進めるとともに、本治療法の有効性ならびに安全性を検討し、本邦における難治性自己免疫疾患に対する造血幹細胞移植療法の標準的治療の確立が望まれる。

#### E. 結論

全身性強皮症 5 症例に自家末梢血純化 CD34 陽性細胞移植併用超大量免疫抑制療法を施行した。この

内、初期の 3 症例は約 3 年間の経過観察期間において皮膚症状の改善の持続および臓器機能の安定化を認めている。治療関連合併症は感染症が主なものであった。いずれの症例においても臨床所見、免疫システムの検討期間が短く、長期的な本療法の効果および影響は不明である。今後、症例の蓄積による適応除外基準、移植前処置の標準化および病態解明が望まれる。

#### F. 健康危険情報

治療期間中、感染性と思われる発熱、ウイルス感染によると思われる出血性膀胱炎、血球貪食症候群、心膜炎、骨髄抑制等を認めた。抗生剤、抗ウイルス剤等の使用により加療可能であったが、1 症例で自家末梢血幹細胞非選択移植を必要とした。いずれの症状も造血能回復とともに軽快傾向を示した。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Li, N., Nakamura, K., Jiang, Y., Tsurui, H., Matsuoka, S., Abe, M., Ohtsuji, M., Nishimura, H., Kato, K., Kawai, T., Atsumi, T., Koike, T., Shirai, T., Ueno, H., Hirose, S. Gain-of-function polymorphism in mouse and human Ltk: implications for the pathogenesis of lupus erythematosus. *Hum Mol Genet* 13:2 171-179. 2004

2) Shimizu, C., Koike, T., Sawamura, Y. Double pituitary adenomas with distinct histological features and immunophenotypes. *J Neuro Neurosurg Psychiatry* 5.140. 2004

3) Endo, T., Nakao, S., Koizumi, K., Nishio, M., Fujimoto, K., Sakai, T., Kuwano, K., Obara, M., Koike, T. Successful treatment with rituximab for autoimmune hemolytic anemia concomitant with proliferation of Epstein-Barr virus and monoclonal gammopathy in a post-nonmyeloblastic stem cell transplant patient. *Ann Hematol.* 83.114-116. 2004

4) Amengual O, Atsumi T, Koike T. Specificities, properties, and clinical significance of antiprothrombin

antibodies. *Arthritis Rheum* 48(4):886-895 2003

5) Hashimoto S, Shiroshita K, Sakurai T, Takeda A, Kawata T, Koike T, Sato H, Ueda T. Unilateral renal cortical necrosis with contralateral hydronephrosis after surgery for uterus carcinoma. *Clin Exp Nephrol* 2003; 7: 72

6) Higuchi M, Ishizu A, Ikeda H, Hayase H, Fugo K, Tsuji M, Abe A, Sugaya T, Suzuki A, Takahashi T, Koike T, Yoshiki T. Functional alteration of peripheral CD25(+)CD4(+) immunoregulatory T cells in a transgenic rat model of autoimmune diseases. *J Autoimmun* 20: 143-49 2003

7) Kawakubo K, Endo T, Koizumi K, Nishio M, Fujimoto K, Sakai T, Sawada K, Koike T. Granular lymphocyte proliferative disorder after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma. *Eur J Haematol* 71:124-127 2003

8) Kobayashi K, Kishi M, Atsumi T, Bertolaccini ML, Makino H, Sakurai N, Yamamoto I, Yasuda T, Khamashta MA, Hughes GR, Koike T, Voelker DR, Matsuura E. Circulating oxidized LDL forms complexes with beta2-glycoprotein I: implication as an atherogenic autoantigen. *J Lipid Res* 44(4):716-726 2003

9) Koizumi K, Nakao S, Haseyama Y, Kato H, Ohi M, Motohara T, Endo T, Sawada K, Koike T. Severe aplastic anemia associated with thymic carcinoma and partial recovery of hematopoiesis after thymectomy. *Ann Hematol* 82(6):367-370 2003

10) Oku K, Atsumi T, Furukawa S, Horita T, Sakai Y, Jodo S, Amasaki Y, Ichikawa K, Amengual O, Koike T. Cerebral imaging by magnetic resonance imaging and single photon emission computed tomography in systemic lupus erythematosus with central nervous system involvement. *Rheumatology* 2003;42(6) 773-777

11) Sakai Y, Atsumi T, Itoh T, Koike T. Uveitis, pancarditis, haemophagocytosis, and abdominal masses. *Lancet* 361:9360-834 2003

12) Shoenfeld Y, Krause I, Kvapil F, Sulkes J, Lev S, Landenberg P, Font J, Zaech J, Cervera R, Piette J, Boffa M, Khamashta M, Bertolaccini M, Hughes G, Youinou P, Meroni P, Pengo V, Alves J, Tincani A, Szegedi G, Lakos G, Sturfelt G, Jonsen A, Koike T, Sanmarco M, Ruffatti A, Ulcova-gallova Z, Praprotnic S, Rozman B, Lorber M, Vriezman V. Prevalence and Clinical Correlations of Antibodies Against Six  $\beta$ 2-Glycoprotein-I-Related Peptides in the Antiphospholipid Syndrome. *J Clin Immunol* 23(5):375 2003

13) Wu R, Shoenfeld Y, Sherer Y, Patnaik M, Matsuura E, Gilburd B, Koike T, Peter JB. Anti-idiotypes to oxidized LDL antibodies in intravenous immunoglobulin preparations—possible immunomodulation of atherosclerosis. *Autoimmunity* 2003;36:291-97

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## 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、GKPGIAGFKGEQGPKGがアナログペプチドの候補として明かとなった。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、NPFRPWWERYQPVが、また、ムスカリン作動性アセチルコリン受容体(M3R)のT細胞エピトープ(VPPGECFIQFLSEPT, AA215-229)から、VPPGECFKQFLSEPT, VPPGECFIQFLSEPT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。GPIに対するT細胞応答が認められたHLA-DR B1\*0901の2名のRA患者において、3種類の合成ペプチド(GPI 58-79; TEDVMRMLVDLAKSRGVEAA, GPI 258-277; IDPQNMFEFWDWVGGRYSLW, GPI 282-301; LSIALHVGFDNFEQLLAGAH)を用いてアナログペプチドの選定を1)と同様の方法で行った。

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(NPFRPWWA~~V~~MYQPV, NPFL~~A~~MPWWERYQPV)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(KRTVPPGECFIQFLSEPTITFTGTAL, 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。M3R 反応性 T 細胞が認められた HLA-DR B1\*0901 陽性 SS 患者において、9 種の変異ペプチド(M3R215-229;VPPGECFE/K/LQFLSEPT, VPPGECFIA/V/MFLSEPT, PPGECFIQFM/E/KSEPT) を作成してアナログペプチドの選定を 1) と同様の方法で行った。

### 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 患者を選択したところ、41%(7/17)の患者において T 細胞反応が認められた。7 名のうち 5 名で HLA-DR B1\*0405 が陽性であり、2 名で B1\*0901 が陽性であった。そのため、両方の DR のアンカーモチーフを有する 3 種類の合成ペプチドを用いて、T 細胞エピトープの選定を行った。その結果、3 名の RA 患者において、LSIALHVGFDNFE(AA282-292) (マウスモデルにおける GPI の T 細胞エピトープと同一部分) が T 細胞エピトープとして機能している可能性が強く示唆された。

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、NPFRPWWVRYQPV(75E→V)を抗原として用いた場合に、2 例の SS 患者において 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考えられた。

4) M3R の T 細胞エピトープの一つは細胞外第 2 ドメインにあり、さらに、T 細胞応答を抑制するアナログペプチドは VPPGECFKQFLSEPT(222I→K)と VPPGECFIAFLSEPT(223Q→A)であることが判明した。

### D. 考察, 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、 $\alpha$ -アミラーゼおよびムスカリン作動性アセチルコリン受容体 (M3R) 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

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Matsumoto, I., Lee, D.M., Goldbach-Mansky, R., Sumida, T., Hitchon, C.A., Schur, P.H., Anderson, R.J., Coblyn, J.S., Weinblatt, M.E., 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* 48:944- 954, 2003.

2. Tsutsumi, A., Ikegami, H., Takahashi, R., Murata, H., Goto, D., Matsumoto, I., Fujisawa, T., and Sumida, T. Mannose binding lectin gene polymorphism in patients with type I diabetes. *Human Immunol.* 64:621-624, 2003.

3. 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.* 62:1-2,2003

4. Kojo, S., Tsutsumi, A., Goto, D., and Sumida, T. Low expression of soluble CD1d gene in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 30: 2524 -2528, 2003.

5. Shibuya, K., Shirakawa, J., Kameyama, T., Honda, S.-I., Tahara-Hanaoka, S., Miyamoto, A., Onodera, M., Sumida, T., Nakauchi, H., Miyoshi, H., and Shibuya, A. CD226 (DNAM-1) is involved in LFA-1 costimulatory signal for naïve T cell differentiation and proliferation. *J. Exp. Med.* 198:1829-1839, 2003

6. Arakaki, R., Ishimaru, N., Saito, I., Kobayashi, M., Yasui, N., Sumida, T., and Hayashi, Y. Development of autoimmune exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in adoptively transferred mice with autoreactive CD4+ T cells. *Arthritis Rheum.* 48: 3603-3609, 2003.

7. 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.* 13:69-72, 2003

8. Adachi, Y., Tsutsumi, A., Murata, H., Takemura, H., Chino, Y., Takahashi, R., Ebisuka, T., and Sumida, T. Behcet's disease accompanied by myelodysplastic syndrome with trisomy 8: Two case reports and review of 15 Japanese cases. *Mod. Rheumatol.* 13:90-94, 2003

9. 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.

10. Murata, H., Adachi, Ebisuka, T., Chino, Y., Takahashi, R., Hayashi, T., Goto, D., Matsumoto, I., Tsutsumi, A., Akaza, H., and Sumida, T. Reiter's syndrome following

intravesical Bacillus bilie de Calmette-Guerin treatment for superficial bladder carcinoma. Report of six cases. *Mod. Rheumatol.* (in press)

11. Muraki, Y., Tsutsumi, A., Takahashi, R., Suzuki, E., Hayashi, T., Chino, Y., Goto, D., Matsumoto, I., Murata, H., and Sumida, T. Polymorphisms of IL-1b gene in Japanese patients with Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* (in press)

12. Tsutsumi, A., Adachi, Y., Murata, H., Kojo, S., Shibuya, K., Nakamura, H., and Sumida, T. G0S24, a gene that regulates TNF $\alpha$  production, is highly expressed in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* (in press)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

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

図 1 RA における CII のアナログペプチド

図 2 RA における GPI のアナログペプチド

図 3 SS における $\alpha$ アミラーゼのアナログペプチド

図 4 SS における M3R のアナログペプチド

图 1

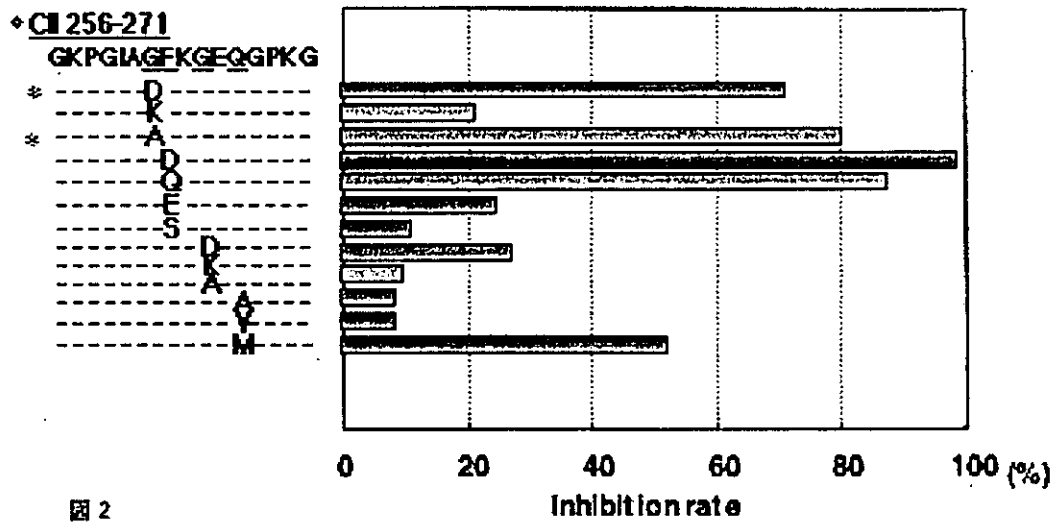
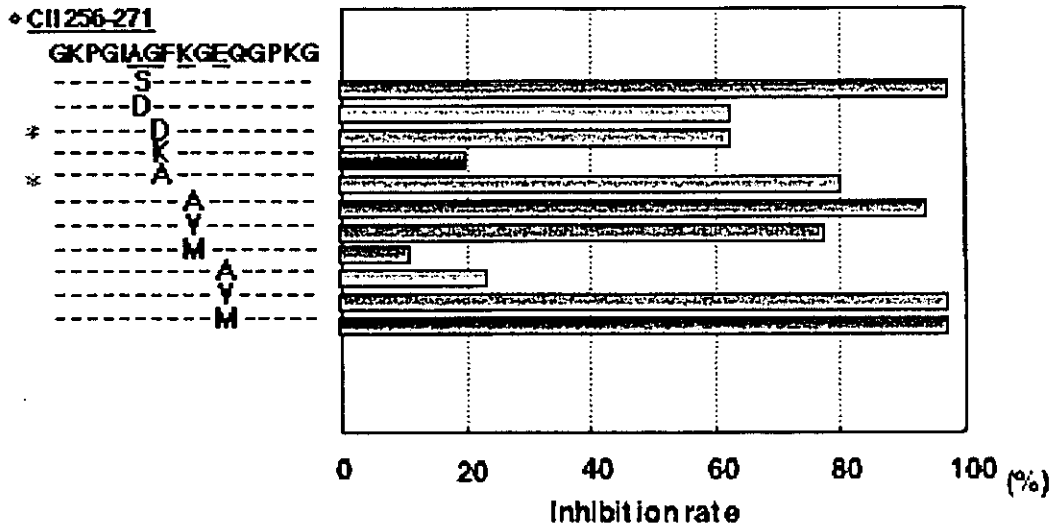


图 2

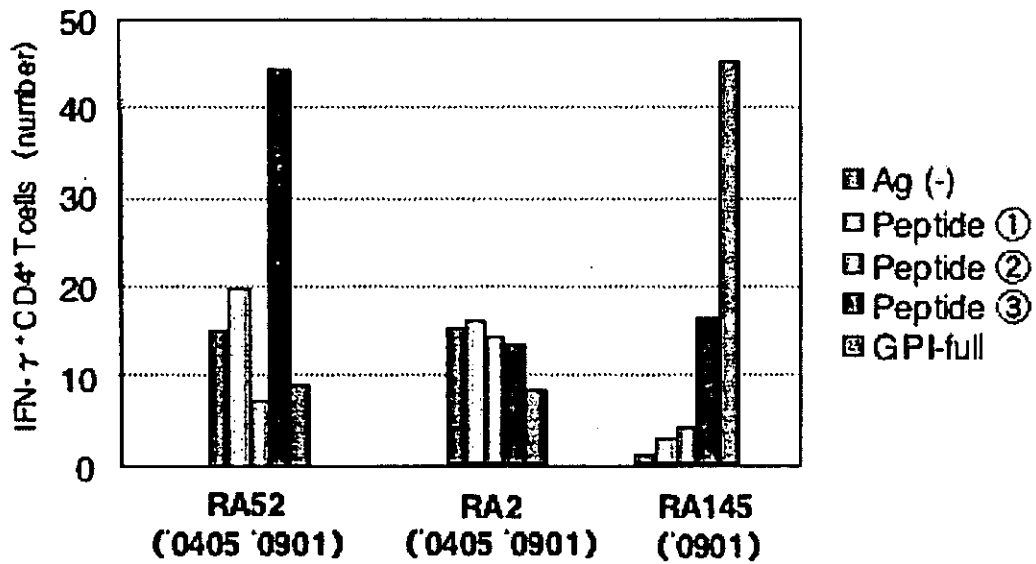


图 3

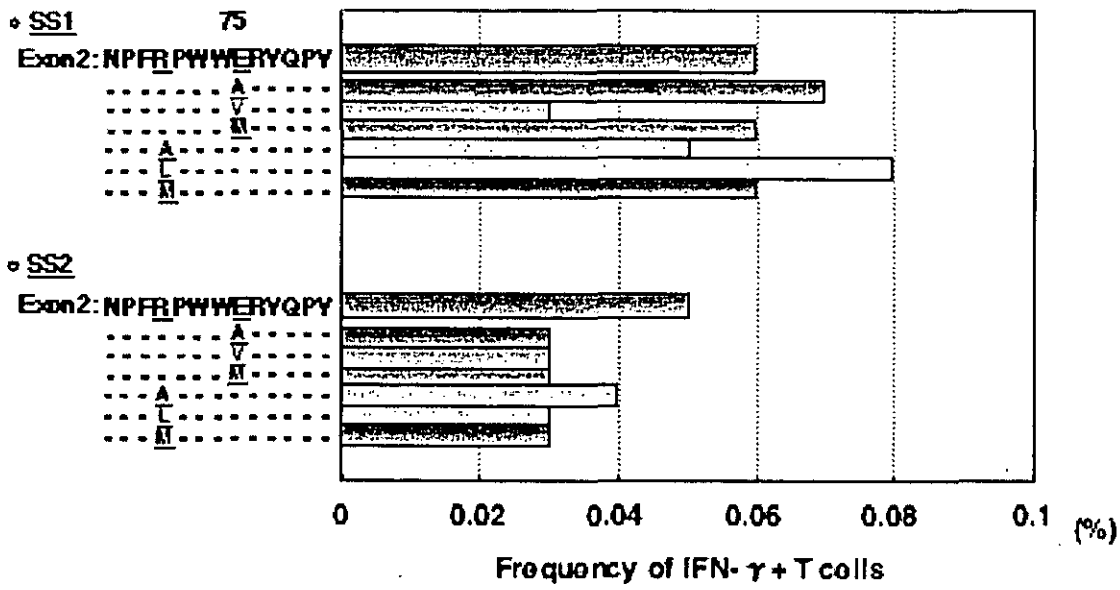


图 4

