

は、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ を産生している細胞と IL-6を産生している滑膜細胞とは異なる。

#### F. 健康危険情報

該当せず。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Sakaguchi, S.: Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature Immunol.* In press.

Chai, J-G., Xue, S., Coe, D., Addey, C., Bartok, I., Scott, D., Simpson, E., Stauss, H. J., Hori, S., Sakaguchi, S., and Dyson, J. P.: T regulatory cells, derived from naive CD4+CD25- T cells by in vitro Foxp3 gene transfer, can induce transplantation tolerance. *Transplantation.* In press.

Sakaguchi, S., and Sakaguchi, N.: History of CD25+CD4+ regulatory T cells. *Progress in Inflammation Research.* In press.

Nomura, T., and Sakaguchi, S.: Regulatory T cells in tumor immunity. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* In press.

Sakaguchi, S.: Preface: Regulatory T cells in autoimmune diseases. *Int. Rev. Immunol.* In press.

Sakaguchi, S. and Sakaguchi, N.: Regulatory T cells in self-tolerance and autoimmune diseases. *Int. Rev. Immunol.* In press.

Fehervari, Z. and Sakaguchi, S.: A common basis

of self-tolerance and transplantation tolerance: a simple way of inducing transplantation tolerance with naturally arising CD25+CD4+ regulatory T cells. *Philosophical Transactions: Biological Sciences.* In press.

Fehervari, Z. and Sakaguchi, S.: T lymphocytes: Regulatory. *Nature Encyclopedia of Life Sciences.* In press.

Matsubara, Y., Hori, T., Morita, R., Sakaguchi, S., and Uchiyama, T.: Phenotypic and functional relationship between adult T cell leukemia and regulatory T cells. *Leukemia* In press.

Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., and Sakaguchi, S. A crucial role of IL-2 in the homeostatic maintenance of CD25+CD4+ regulatory T cells: induction of autoimmune disease by neutralization of IL-2. *J. Exp. Med.* In press.

Yoshitomi, H., Sakaguchi, N., Brown, G., Tagami, T., Sakihama, T., Nomura, T., Akira, S., Gordon, S., Nakamura, T., and Sakaguchi, S. Environmental stimulation of innate immunity triggers chronic arthritis in mice genetically prone to produce arthritogenic autoimmune T cells: a key role of fungal  $\beta$ -glucans and their receptor Dectin-1. *J. Exp. Med.* In press.

Fehervari, Z., and Sakaguchi, S.: Regulatory T cells. In "Measuring Immunity" eds. M. T. Lotze and A. W. Thompson, Elsevier. p322-335, 2005.

Gondek, D. C., Lu, L-F., Quezada, S. A., Sakaguchi, S., and Noelle, R. J. *Cutting Edge: Contact-mediated suppression by CD4+CD25+*

- regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol.* 174: 1783–1786, 2005.
- Turk MJ, Guevara-Patino JA, Rizzuto GA, Engelhorn ME, Sakaguchi, S., and Houghton AN.: Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 200:771–82, 2004.
- Sakaguchi, N., Takahashi, T., Hata, H., Nomura, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Sakihama, T., Negishi, I., Nakatsuru, S., and Sakaguchi, S.: Altered thymic T-cell selection due to a spontaneous mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis. *Immunology* 2004. Medimond S.r.l., Bologna, Italy. p239–242, 2004.
- Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., and Sakaguchi, S.: A crucial role of IL-2 in the homeostatic maintenance of CD25+CD4+ regulatory T cells. *Immunology* 2004. Medimond S.r.l., Bologna, Italy. p341–344, 2004.
- Ono, M., Shimizu, J., Miyachi, Y., and Sakaguchi, S.: Induction of fatal autoimmune myocarditis and other autoimmune diseases in mice by depleting Foxp3-expressing T cells. *Immunology* 2004. Medimond S.r.l., Bologna, Italy. p193–195, 2004.
- Muriglian, S. J., Ramirez-Montagut, T., Alpdogan, O., Van Huystee, T. W., Eng, J. M., Hubbard, V. M., Kochman, A. A., Tjoe, K. H., Riccardi, C., Pandolfi, P. P., Sakaguchi, S., Houghton, A. N., and Van Den Brink, M. R.: GITR activation induces an opposite effect on alloreactive CD4+ and CD8+ T cells in graft-versus-host disease. *J. Exp. Med.* 200:149–157, 2004.
- Ying Li, Y., Koshiba, T., Yoshizawa, A., Yonekawa, Y., Ito, A., Mori, T., Kawamoto, H., Tanaka, Y., Sakaguchi, S., Minato, N., Wood, K. J., and Tanaka, K: Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *American J. Transplantation.* 4:2118–2125, 2004.
- Fehervari, Z., and Sakaguchi, S.: CD4+ regulatory T cells and immune control. *J. Clin. Invest.* 114:1209–117, 2004.
- He, H., Messer, R.J., Sakaguchi, S., Yang, G., Robertson, S. J., and Hasenkrug, K. J. Reduction of retrovirus-induced immunosuppression by in vivo modulation of T cells during acute infection. *J. Virology.* 78:11641–7, 2004.
- Takahata, Y., Nomura, A., Takada, H., Ohga, S., Furuno, K., Hikino, S., Nakayama, H., Sakaguchi, S., Hara, T.: CD25+CD4+ T cells in human cord blood: an immunoregulatory subset with naive phenotype and specific expression of forkhead box p3 (Foxp3) gene. *Exp Hematol.* 32:622–629, 2004.
- Yagi, H., Nomura, T., Nakamura, K., Kitawaki, T., Hori, S., Maeda, M., Onodera, M., Uchiyama, T., Fujii, S., and Sakaguchi, S.: Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int. Immunol.* 16: 1643–1656, 2004.
- Kanamaru, F., Youngnak, P., Hashiguchi, M., Nishioka, T., Takahashi, T., Sakaguchi, S.,

- Ishikawa, I., and Azuma, M. Costimulation via glucocorticoid-induced TNF receptor in both conventional and CD25<sup>+</sup> regulatory CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol.* 172: 7306-7314, 2004.
- Fehervari, Z., and Sakaguchi, S.: Control of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cell activation and function by dendritic cells. *Int. Immunol.* 16:1769-1780, 2004.
- Hata, H., Sakaguchi, N., Yoshitomi, H., Iwakura, Y., Sekikawa, K., Rennick, D., Azuma, Y., Kanai, C., Moriizumi, E., Nakamura, T., and Sakaguchi, S. Distinct contribution of IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1, and IL-10 to T cell-mediated spontaneous autoimmune arthritis in mice. *J. Clin. Invest.* 114: 582-588, 2004.
- Nishimura, E., Sakihama, T., Setoguchi, R., Tanaka, K., and Sakaguchi, S.: Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *Int. Immunol.* 16: 1189-1201, 2004.
- Dittmer, U., He, H., Messer, R. J., Schimmer, S., Olbrich, A. R., Ohlen, C., Greenberg, P. D., Stromnes, I. M., Iwashiro, M., Sakaguchi, S., Evans, L. H., Peterson, K. E., Yang, G., Hasenkrug, K. J.: Functional impairment of CD8<sup>+</sup> T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection. *Immunity.* 20: 1-20, 2004.
- Suri, A., Shimizu, J., Katz, J. D., Sakaguchi, S., Unanue, E. R., and Kanagawa, O.: Regulation of autoimmune diabetes by non-islet-specific T cells - a role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Eur. J. Immunol.* 34: 447-454, 2004.
- Kajiura, F., Sun, T., Nomura, K., Izumi, T., Ueno, Y., Bando, N., Kuroda, H., Han, Yi Li, A., Matsushima, Y., Takahama, S., Sakaguchi, T., Mitani and M. Matsumoto.: NF- $\kappa$ B-inducing kinase establishes self-tolerance in a thymic-stroma dependent manner. *J. Immunol.* 172: 2067-2075, 2004.
- Hori, S., and Sakaguchi, S.: Foxp3, a critical regulator of regulatory T cell development and function. *Microbes and Infection.* 6: 745-51, 2004.
- Choi, B. K., Bae, J. S., Choi, E. M., Kang, W. J., Sakaguchi, S., Vinay, D. S., and Kwon, B. S. 4-1BB-dependent inhibition of immunosuppression by activated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *J. Leukoc. Biol.* 75: 785-791, 2004.
- Sakaguchi, S.: Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Ann. Rev. Immunol.* 22:531-562, 2004.
- Zhang, X., Koldzix, D.J., Izikson, L., Reddy, J., Nazareno, R. F., Sakaguchi, S., Kuchroo, V. K., and Weiner, H. L. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *Int. Immunology.* 16: 1-8, 2004.
- Fehervari, Z., and Sakaguchi, S.: Development and function of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *Curr. Opinion in Immunol.* 16:203-208, 2004.
- Fehervari, Z. and Sakaguchi, S.: A paragon of

self-tolerance:Regulatory T cells and the control of immune responses. *Arthritis Res. Ther.* 6: 19-25, 2004.

## 2. 学会発表

Haruhiko Yagi, Takashi Nomura, Kyoko Nakamura, Toshio Kitawaki, Masafumi Onodera, Takashi Uchiyama, Shingo Fujii, and Shimon Sakaguchi: Crucial role of FOXP3 in the development of human CD25+4+ regulatory T cells. *Keystone Symposia Regulatory/Suppressor T Cells* (2004. 3.10-15. Banff Canada).

Zoltan Fehervari and Shimon Sakaguchi: Dendritic cells and the control CD25+4+ T cells. *Keystone Symposia Regulatory/Suppressor T Cells* (2004. 3.10-15. Banff Canada).

Shohei Hori, Takashi Nomura, and Shimon Sakaguchi: The transcription factor Foxp3 controls the development and function of naturally occurring CD4+ regulatory T cells. *Keystone Symposia Regulatory/Suppressor T Cells* (2004. 3.10-15. Banff Canada).

Masahiro Ono, Jun Shimizu, Yoshiki Miyachi, and Shimon Sakaguchi : Elimination of Foxp3+ T cells by depleting GITR<sup>high</sup> T cells induces multiple severe organ-specific autoimmune diseases including fatal myocarditis. *Keystone Symposia Regulatory/Suppressor T Cells* (2004. 3.10-15. Banff Canada).

Ruka Setoguchi and Shimon Sakaguchi: Neutralization of IL-2 breaks immunological self-tolerance by reducing the number of CD25+4+ regulatory T cells. *Keystone Symposia Regulatory/Suppressor T Cells* (2004. 3.10-15.

Banff Canada).

Keiji Hirota, Kwiboom Ko, Sayuri Yamazaki, Jun Shimizu, Kyoko Nakamura, Tomoyuki Yamaguchi, Takashi Nomura, and Shimon Sakaguchi: Tumor Immunotherapy with anti GITR monoclonal antibody in mice. *Keystone Symposia Regulatory/Suppressor T Cells* (2004. 3.10-15. Banff Canada).

BR Blazar, A Panoskaltsis-Mortari, JS Serody, CJ Lees, MJ Ehrhardt, JM Swedin, WJ Murphy, RJ Noelle, BL Levine, CH June, S Sakaguchi, PA Taylor : The Role of CD25+4+ regulatory (Treg) cells in allogeneic bone marrow transplantation. *Keystone Symposia Regulatory/Suppressor T Cells* (2004. 3.10-15. Banff Canada).

Sergio A. Ouezada, Kathy A. Bennett, Shimon Sakaguchi and Randolph J. Noelle : Visualizing in vivo regulatory T cell control induced by CD154 blockade and alloantigen during graft tolerance. *Keystone Symposia Regulatory/Suppressor T Cells* (2004. 3.10-15. Banff Canada).

瀬戸口留可、堀昌平、高橋武司、坂口志文：IL-2の機能阻害による免疫自己寛容の破綻 第14回 Kyoto T Cell Conference (2004. 6. 4-5 京都).

小野昌弘、清水淳、山口智之、ゾルタン=フェヘバリ、宮地良樹、坂口志文：GITR-HIGH T細胞の除去はFoxp3+T細胞を駆逐し致死的自己免疫性心筋炎および多臓器の自己免疫病・湿疹様病変を誘導する 第14回 Kyoto T Cell Conference (2004. 6. 4-5 京都).

ゾルタン=フェヘヴァリ、坂口志文：Dendritic

cells and the control CD25+CD4+T cells  
第 14 回 Kyoto T Cell Conference (2004. 6. 4-5  
京都).

M Ono, J Shiraizu, Y Miyachi, and S Sakaguchi :  
Elimination of Foxp3+ T Cells by Depleting  
GITR-high T Cells Induces Multiple Severe  
Organ-Specific Autoimmune Diseases Including  
Fatal Myocarditis. 12th International Congress of  
Immunology(2004. 7.18-23.Montreal Canada).

R Setoguchi , S Hori, T Takahashi, S Sakaguchi:  
Neutralization of IL-2 Breaks Immunological  
Self-Tolerance by Reducing CD25+4+ Regulatory  
T Cells. 12th International Congress of  
Immunology (2004. 7.18-23.Montreal Canada).

瀬戸口留可、堀昌平、高橋武司、坂口志文：  
CD25highCD4+制御制 T 細胞の生体内維持に  
必須である IL-2 の供給源 第 34 回日本免疫学  
会学術集会 (2004. 12. 1-3 札幌).

小野昌弘、清水淳、山口智之、ゾルタン=フェヘ  
バリ、宮地良樹、坂口志文:Foxp3 発現 T 細胞の  
除去による広範な自己免疫病の誘導 第 34 回  
日本免疫学会学術集会 (2004. 12. 1-3 札幌).

山口智之、高橋武司、坂口志文:制御制 T 細胞  
と活性化 T 細胞を区別する抗体の作製とその腫  
瘍免疫への応用 第 34 回日本免疫学会学術  
集会 (2004. 12. 1-3 札幌).

中村恭子、廣田圭司、ゾルタン=フェヘバリ、山  
口智之、野村尚志、坂口志文:CD25+ CD4+制  
御制 T 細胞における FoxP3, CTLA-4 の役割 第  
34 回日本免疫学会学術集会 (2004. 12. 1-3 札  
幌).

西岡朋尚、廣田圭司、清水淳、坂口志文：  
CD25+ CD4+制御制 T 細胞に対する GITRL の  
役割と腫瘍免疫誘導 第 34 回日本免疫学会学  
術集会 (2004. 12. 1-3 札幌).

八木治彦、野村尚志、藤井信吾、坂口志文:抗ヒ  
ト GITR モノクローナル抗体による CD25+ CD4+  
制御制 T 細胞の in Vitro 増殖抑制能の解除 第  
34 回日本免疫学会学術集会 (2004. 12. 1-3 札  
幌).

Fehervari Zoltan, Takahashi Takeshi, Hirota  
Keiji, Sakaguchi Shimon: Generation of a novel  
antibody with a unique distribution pattern and  
capable of effectively perturbing both regulatory  
cell mediated suppression and boosting T cell  
responses 第 34 回日本免疫学会学術集会  
(2004. 12. 1-3 札幌).

廣田圭司、吉富啓之、野村尚志、坂口教子、坂  
口志文:ZAP-70 突然変異の結果自己免疫性  
関節炎を自然発症する SKG マウスの末梢  
CD4+T 細胞動態 第 34 回日本免疫学会学術集  
会 (2004. 12. 1-3 札幌).

杉本直志、Fehervari Zoltan、小野昌弘、内山卓、  
坂口志文:TGF- $\beta$ によるナイーブ CD4+T 細胞の  
Foxp3 遺伝子発現誘導の定量的解析 第 34 回  
日本免疫学会学術集会 (2004. 12. 1-3 札幌).

田中聡、吉富啓介、廣田圭司、野村尚志、坂口  
教子、坂口志文:SKG マウスの ZAP-70 遺伝子  
突然変異による胸腺 T 細胞選択の偏倚と、その  
結果誘導される自己免疫疾患スペクトラムの変  
化 第 34 回日本免疫学会学術集会 (2004. 12.  
1-3 札幌).

吉富啓介、田中聡、野村尚志、坂口教子、中村

孝志、坂口志文:真菌—glucanによるSKGマウス自己免疫性関節炎の惹起 第34回日本免疫学会学術集会(2004.12.1-3 札幌).

松本満、黒田範行、石丸直澄、新垣理恵子、林良夫、野村尚志、坂口志文、上野智雄、高浜洋介、松島明美:遺伝性自己免疫疾患の原因遺伝子AIRE(Autoimmune regulator)の機能解析 第34回日本免疫学会学術集会(2004.12.1-3 札幌).

岩井秀之、矢野倫子、橋口昌章、宮坂信之、坂口志文、東みゆき:CD25<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞およびCD25<sup>+</sup>Tregに対する供刺激とCD25<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞から供刺激によって誘導されるIL-10産生細胞による制御 第34回日本免疫学会学術集会(2004.12.1-3 札幌).

Li Ying, Koshiba Takaaki, Yosizawa Atushi, Ito Atushi, Egawa Hiroto, Sakaguchi Shimon, Minato Nagahiro, Wood Kathryn, Tanaka Kouichi: Analysis of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after living-donor liver transplantation. 第34回日本免疫学会学術集会(2004.12.1-3 札幌).

#### H. 知的財産権の出願・取得状況(予定を含む)

##### 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)

新規単クローン性抗体による制御性T細胞の操作(特許出願中)

## 膠原病に於ける IFN などのサイトカインシグナル異常の解明とその制御に関する研究

分担研究者 高柳 広 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子細胞機能学 特任教授

### 研究要旨

IFN シグナルとのクロストークが知られているサイトカイン RANKL は、破骨細胞の制御で重要であるだけでなく、自己免疫疾患における免疫系の活性化への関与も注目されている。本年度は、この RANKL の細胞内シグナル伝達における免疫グロブリン様受容体シグナルとの協調の必要性を解明し、新たな膠原病治療標的経路が示唆された。

### A.研究目的

膠原病の発症原因や病態にはいまなお不明の部分が多く、根治療法がない疾患が多い。本研究では、IFN などのサイトカインの細胞内シグナルを制御するメカニズムを解析することで、自己免疫疾患の発症に関わるシグナル伝達機構を明らかにし、新たな治療に結びつけるための分子の同定することをめざす。

### B.研究方法

免疫細胞に発現する受容体には、immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)と呼ばれるアミノ酸配列が共通して見られ、リン酸化依存性の下流にシグナル伝達を行う。ITAM モチーフは T 細胞受容体、B 細胞受容体、Fc 受容体のコンポーネントに含まれているが、NK 細胞や myeloid 系細胞においては、ITAM をもつアダプター分子が種々の免疫グロブリン受容体と会合してシグナル伝達に寄与していることが知られている。このような ITAM アダプター分子である DNAX activating protein 12 (DAP12)と Fc receptor common  $\gamma$  subunit (FcR $\gamma$ ) のダブルノックアウトマウスを作成し、そのマウス由来の細胞におけるシグナル伝達を解析した。特に、われわれが IFN 系とのクロストークを解明した TNF ファミリーのサイトカインである receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) によるカルシウムシグナル活性化と転写因子 NFATc1 の誘導に注目して解析した。

### (倫理面への配慮)

動物実験、遺伝子組み換え実験に関する施設内委員会の承認に基づいて実験を遂行した。個人情報を含むヒトの試料を用いた実験は含まれていない。

### C.研究結果

ダブルノックアウトマウス由来のマクロファージ系細胞を RANKL で刺激すると、野生型細胞において観察されるカルシウムシグナルの活性化、PLC $\gamma$  の活性化、NFATc1 の誘導などが障害されていることが明らかになった。また、これらの細胞内で DAP12 や FcR $\gamma$  と会合している受容体を検索した結果、FcR $\gamma$  と会合する受容体は paired immunoglobulin-like receptor (PIR)-A, osteoclast-associated receptor (OSCAR)であり、DAP12 と会合する受容体は triggering receptor expressed by myeloid cells (TREM)-2, signal-regulatory protein (SIRP) $\alpha$  であることが明らかになった。ITAM シグナルが障害された細胞においては、NFATc1 誘導が障害された結果、RANKL 誘導性の破骨細胞分化が障害された。以上から、RANKL のシグナル伝達においては、免疫グロブリン様受容体が共刺激分子として重要な役割を果たすことが明らかになった。DAP12 や FcR $\gamma$  の ITAM モチーフを介したシグナルはカルシウムシグナルの活性化と転写因子 NFATc1 を誘導することで、RANKL シグナルの増幅に必要であった。

## D. 考察

RANKL は、T 細胞や骨芽細胞に発現し、樹状細胞や破骨細胞の分化を制御するサイトカインであり、自己免疫疾患や炎症性骨破壊に関与すると考えられている。例えば、T 細胞活性化に関与するという報告は、TRANCE, a tumor necrosis factor family member critical for CD40 ligand-independent T helper cell activation. *J Exp Med.* 1999 Apr 5;189(7):1025-31. などがある。また、自己免疫性糖尿病に関与するという研究は、Pancreatic lymph node-derived CD4(+)CD25(+) Treg cells: highly potent regulators of diabetes that require TRANCE-RANK signals. *Immunity.* 2002 Feb;16(2):183-91. で示されている。さらに、自己免疫性腸炎に関与することを示した Colonic dendritic cells, intestinal inflammation, and T cell-mediated bone destruction are modulated by recombinant osteoprotegerin. *Immunity.* 2003 Dec;19(6):849-61. においては、RANKL の阻害タンパク OGP が腸炎制御に有効であったことが示されており、RANKL 経路の制御が自己免疫疾患の新たな治療標的となる可能性が多方面から示唆されつつある。本研究によって、RANKL シグナルにおける免疫グロブリン様受容体とそのアダプター分子の ITAM シグナルが共刺激シグナルとして必須であることが明らかになり、今後の RANKL シグナル制御に関する新たな治療標的となる可能性が示された。

## E. 結論

DAP12 や FcR $\gamma$  を介した ITAM シグナルが RANKL シグナルの共刺激シグナルとして機能し、カルシウムシグナルと NFATc1 誘導に重要であることを解明した。これは、RANKL 制御における新たな治療標的候補なる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Gohda, J., Akiyama, T., Koga, T., Takayanagi, H., Tanaka, S. and Inoue, J. RANK-mediated amplification of

TRAF6 signaling leads to NFATc1 induction during osteoclastogenesis. *EMBO* 24(4),790-799(2005)

Takatsuna, H., Asagiri, M., Kubota, T., Oka, K., Osada, T., Sugiyama, C., Saito, H., Aoki, K., Ohya, K., Takayanagi, H. and Umezawa K.

Inhibition of RANKL-induced Osteoclastogenesis by (-)-DHMEQ, a Novel NF- $\kappa$ B Inhibitor, through Downregulation of NFATc1. *J Bone Mineral Res* (in press)

Matsumoto, M., Kogawa, M., Wada, S., Takayanagi, H., Tsujimoto, M., Katayama, S., Hisatake, K., Nogi, Y. Essential role of p38 MAP kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1. *J Biol Chem.* 279(44),45969-79 (2004)

Koga, T., Inui, M., Inoue, K., Kim, S., Suematsu, A., Kobayashi, E., Iwata, T., Ohnishi, H., Matozaki, T., Kodama, T., Taniguchi, T., Takayanagi, H.\*, and Takai, T.\* Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature* 428,758-763 (2004) \*Corresponding authors

Urushibara, M.\*, Takayanagi, H.\*, Koga, T., Kim, S., Isobe, M., Morishita, Y., Nakagawa, T., Loeffler, M., Kodama, T., Kurosawa, H., and Taniguchi, T. The antirheumatic drug leflunomide inhibits osteoclastogenesis by interfering with receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand-stimulated induction of nuclear factor of activated T cells c1. *Arthritis Rheum* 50(3), 794-804 (2004) \*Equal contributors

Takayanagi H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *J Periodontal Res* (in press)

Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol Med* [26 Jan.



2005 Epub ahead of print]

Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T. and Taniguchi, T.  
Stat1-mediated cytoplasmic attenuation in  
osteimmunology. J Cell Biochem 94, 232-240(2005)

高柳 広: 関節リウマチにおける骨破壊の分子機構  
内科、95(2)338-342、2005

高柳 広: 免疫系と骨代謝  
日本臨床、63 増刊 1、87-95、2005

高柳 広: 関節リウマチにおける軟骨破壊の分子機構  
内科、95(1)136-139、2005

高柳 広: 骨免疫学 オステオimmunロジー  
感染炎症免疫、34(4)22-32、2004

高柳 広: RANKLによる破骨細胞分化制御と関節リウマチ  
免疫 2005 Molecular Medicine 臨時増刊号、vol.41、  
p343-351、2004

高柳 広: 運動器の形成・維持・老化にかかわる遺伝子制  
御ネットワークの解明  
ゲノムネットワーク、蛋白質核酸酵素 2004 年 12 月増刊、  
49(17)2943-2949、2004

高柳 広: オステオimmunロジー  
細胞工学、23(12)1424-1430、2004

高柳 広: Stat1 と Runx ファミリー転写因子: 自己免疫疾患  
における役割  
分子リウマチ、1(3)168-175、2004

高柳 広: 骨免疫制御とサイトカイン  
分子細胞治療、3(4)52-60、2004

高柳 広: ITAM を介した共刺激シグナルと RANKL による

骨代謝の維持機構

実験医学、22(12)1726-1729、2004

高柳 広: 破骨細胞活性化  
医学のあゆみ、209(10)771-778、2004

高柳 広: RA における免疫系と骨代謝の相互作用  
分子リウマチ、6(2)74-81、2004

高柳 広: 破骨細胞活性化と人為的制御  
臨床免疫、41(3)284-290、2004

高柳 広: 骨免疫学の世界・骨疾患と免疫異常  
(編集主幹および「はじめに」)  
医学のあゆみ、208(11)899、2004

金宣和、高柳広: IFN-Stat シグナルと骨代謝  
医学のあゆみ、208(11)920-925、2004

高柳 広: 骨と免疫のクロストーク  
現代医療、36(3)697-704、2004

## 2. 学会発表

高柳 広: 骨免疫制御における RANKL の補助シグナル  
第 27 回日本分子生物学会、2004.12.8、神戸

高柳 広: 炎症性骨破壊と破骨細胞の制御  
日本リウマチ学会関東支部ランチョンセミナー、2004.12.4、  
東京

高柳 広: Regulation of RANKL by NFAT and ITAM  
signal in osteoclast differentiation  
第34回日本免疫学会総会・学術集会、2004.12.2、札幌

乾匡範、古賀貴子、井上和也、谷口維紹、高柳広、高井  
俊行  
アダプター分子 DAP12 および FcRγを介する ITAM シグナ  
ルは破骨細胞分化に必須である

第 34 回日本免疫学会総会・学術集会、札幌、2004.12.2

高綱大士、長田年弘、杉山千枝、朝霧成挙、高柳広、梅沢一夫

NFκB 阻害剤 DHMEQ による破骨細胞分化と活性化の抑制

第 34 回日本免疫学会総会・学術集会、札幌、2004.12.2

高柳 広: 関節リウマチ骨破壊の制御

日本整形外科学会リウマチ研修会、2004.11.28、東京

高柳 広: 骨免疫学における破骨細胞分化の制御機構

第 52 回国際歯科研究学会日本部会 (JADR) 総会・学術大会、2004.11.27、東京

高柳 広: 破骨細胞分化の制御メカニズム

Bone & Joint Research Club「骨と関節の代謝調節を考える基礎の会」、2004.11.14、木更津

高柳 広: 骨免疫学の新展開

第 8 回 Omiya Forum on Rheumatoid Arthritis、2004.11.12、大宮

高柳 広: RA 骨破壊と破骨細胞の制御

第 4 回リウマチ性疾患と骨粗鬆症治療研究会、2004.11.5、熊本

高柳 広: 破骨細胞を制御する新たな免疫シグナル

バイオサイエンスシンポジウム、2004.10.29、湘南

高柳 広: 破骨細胞の起源と分化誘導機構・創薬の観点から

第 19 回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー「骨・軟骨研究の最前線・新たな治療を目指して」、2004.10.26、東京

高柳 広: Regulation of osteoclastogenesis by RANKL and ITAM signals

Bone Biology Forum、2004.10.22、静岡

高柳 広: 骨免疫学への遺伝子チップ応用

第 32 回日本臨床免疫学会総会、2004.10.8、東京

H. Takayanagi: Integration of RANKL Signaling by NFATc1 in Osteoclastogenesis.

26th Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, 2004.10.3, Seattle

T. Koga, M. Inui, A. Suematsu, T. Taniguchi, T. Takai, H. Takayanagi: ITAM-mediated costimulatory signals cooperate with RANKL for osteoclastogenesis

26th Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, 2004.10.3, Seattle (Young Investigator's Award)

H. Takayanagi: Novel regulators of RANKL-induced osteoclastogenesis

The 11th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress, 2004.9.15, Jeju Island, Korea

古賀貴子、乾匡範、末松綾子、谷口維紹、高井俊行、高柳広

ITAM を介した共シグナルは RANKL による破骨細胞分化に必須である

第 22 回日本骨代謝学会、大阪、2004.8.6

高柳 広: RANKL シグナル制御と骨免疫学

第 8 回 Molecular Cardiovascular Conference、2004.9.4、北海道

高柳 広: 破骨細胞をターゲットとした炎症性骨破壊の制御

第 25 回日本炎症・再生医学会ランチョンセミナー、2004.7.13、東京

高柳 広: Costimulatory signals in osteoclast

differentiation

第1回 ABJS 国際ワークショップ骨と関節の先端的疾患分子医学、2004,6,22、東京

H. Takayanagi: Leflunomide inhibits bone destruction by interfering with RANKL signaling and osteoclastogenesis  
Annual European Congress of Rheumatology "EULAR 2004", 2004.6.11, Berlin

高柳 広:破骨細胞分化を制御する新たな免疫シグナル  
第13回東京免疫フォーラム、2004.5.18、東京

高柳 広:関節破壊の分子機序解明による RA 治療の新時代・新規DMARDレフルノミドの破骨細胞への直接作用と骨破壊抑制・  
第48回日本リウマチ学会総会ランチョンセミナー、  
2004.4.15、岡山

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

特になし

## 全身性エリテマトーデス患者 T 細胞のゼータ鎖異常によって誘導される病態関連分子の検索

分担研究者 竹内 勤 埼玉医科大学総合医療センター第二内科 教授

### 研究要旨

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 細胞レセプターと 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と鎖の蛋白合成低下が、20%前後の症例にはエクソン 7(-), short エクソン 8 などのスプライシングヴァリエントが見い出された。TCRと鎖蛋白合成障害に、この異常スプライシングを受けた TCRと鎖 mRNA ヴァリエントが、どのような機序を介して関与しているかは不明であった。その分子機序を明らかにするため、これらヴァリエント mRNA を安定して発現する T 細胞株を樹立した。それら T 細胞株の TCRと鎖 mRNA 安定性を検討した所、exon7(-)ヴァリエント、short 3'-UTR ヴァリエントの両者において mRNA 不安定性が確認され、それが TCRと鎖蛋白発現低下を引き起こすことが明らかにされた。

### A.研究目的

SLE は自己免疫疾患の原型で、多彩な自己抗体産生とそれに引き続く組織障害を特徴とする。これには、B 細胞の自己抗体産生や自己反応性 T 細胞のエフェクター活性をコントロールすべき調節性 T 細胞の機能不全が重要な役割を演じている。T 細胞機能不全の本態の一つに早期シグナル伝達分子の機能異常が関与する事が指摘されていたため、チロシン酸化を指標として異常分子の同定を試みた。その結果、TCR からのシグナル伝達で中心的役割を演じている TCRと鎖の蛋白発現が低下し、一部の症例には mRNA のスプライシング・ヴァリエントが存在する事が明らかとなった。スプライシング・ヴァリエントが、どのような機序によって蛋白発現低下を惹起しているかは、不明であった。そこで、これらヴァリエントを遺伝子導入した T 細胞株を用いて、その分子機序を明らかにする。

### B.研究方法、結果、考察

1) SLE 患者における short exon8 ヴァリエントの発現: 350bp の short exon8 スプライシングヴァリエントが SLE 患者 T 細胞で優位に認められるかどうかを定量的に検討するため、半定

量 PCR 法を用いて鎖 mRNA の発現を比較した。その結果、健常人コントロールでは全例で野生型 3'UTR が short exon8 ヴァリエントよりも優位に強く発現していたが、SLE 患者 7 例では全例で、short exon8 ヴァリエントが野生型よりも優位に検出された。特に 5 例の SLE 患者では、野生型が検出不能な程度まで発現低下していた。

2) SLE 患者における exon7 (-)ヴァリエントの発現: 2例で、エクソン7に相当する 36bp を欠いた exon7 (-)が見い出され、exon7 前後に存在するスプライス・ドナー、アクセプター部位を介して生成されたスプライス・ヴァリエントと考えられた。一例では、ほぼ100%に、もう一例では約50%にこのヴァリエントが検出された。

3) short-exon8 ヴァリエント TCRと鎖遺伝子導入 T 細胞株の樹立: short-exon8 のヴァリエント TCRとメッセージが、どのような機序を介して蛋白発現低下に関わっているかを明らかにするため、以下の検討を行った。すなわち、レトロウイルスベクターに wild 型あるいはヴァリエント TCR・鎖遺伝子を組み込み、TCRと鎖欠損マウス T 細胞ハイブリドーマ MA5.8 にトランスフェクトして細胞株を樹立、その性状を検討した。short exon8 株は、wild TCRと株に比し、TCRと鎖の表

面発現が有意に低下し、同時に CD3  $\epsilon$  鎖の発現も低下していた。免疫プロットによって蛋白合成を検討したところ、short exon8 株の CD3  $\epsilon$  鎖は wild 株と同等であることが確認され、CD3  $\epsilon$  鎖の表面発現低下は TCR  $\zeta$  鎖の産生低下による2次的現象と考えられた。アクチノマイシン処理によって TCR  $\zeta$  鎖 mRNA 安定性を検討したところ、short exon8 株では wild 株に比べ mRNA の消滅は明らかで、安定性が低下していることが明らかとなった。一方、CD3  $\epsilon$  鎖の安定性は short exon8 株でむしろ亢進し、この安定性低下は TCR  $\zeta$  鎖 mRNA に特異的なものであった。

4) exon7(-) ヴァリアント TCR・鎖遺伝子導入 T 細胞株の樹立: 36bp の exon7 を欠いたヴァリアントをレトロウイルスベクターに組み込み、TCR・鎖欠損マウス T 細胞ハイブリドーマ MA5.8 にトランスフェクトして細胞株を樹立した。short exon8 ヴァリアントと同様に、TCR  $\zeta$  CD3  $\epsilon$  鎖の表面発現が有意に低下していた。その mRNA 安定性を SLE の病態形成において鍵を握る分子を探索するため、ヴァリアント TCR  $\zeta$  鎖を遺伝子導入し TCR  $\zeta$  鎖蛋白発現低下を来した2つのクローンをを用いて、遺伝子チップによって網羅的 mRNA 発現解析を行った。両者に共通して発現亢進する分子として、TXK などのシグナル伝達分子、転写因子、WASP などのアダプター分子、 $\beta$ 7 インテグリン、シンデカン・1 などの接着分子が明らかとなった。一方、発現低下する分子として、IL-2 を初めとする種々のサイトカインが明らかとなった

5) シンデカン・1 : ヴァリアント TCR  $\zeta$  鎖 mRNA 導入によって2次的に発現亢進する分子の中で、実際の患者 T 細胞において同様の発現亢進が認められる分子を検索した所、シンデカン・1 分子は、正常人 T 細胞に比し、SLE 患者 T 細胞で異常な発現様式を示すことが明らかとなり、しかも、その異常発現様式は、 $\zeta$  鎖発現低下と逆相関することが示された。

#### D. 結論

長い間分子機序の不明であった SLE において、シグナル伝達分子の機能異常に焦点を当て解析した結果、その分子機序の一部が明らかとなった。この研究により、分子異常が特定され、異常分子そのものその生成機序が蛋白あるいは遺伝子レベルで明らかになれば、それを指標とした発症前診断、原因療法の開発が可能と考えられる。特に、TCR・鎖蛋白発現低下を是正するような遺伝子治療は、今後も基礎的検討を積み重ね、臨床応用の可能性を検討していく必要がある。一方、今回明らかになった TCR  $\zeta$  鎖下流で発現異常

を来すシンデカン・1 分子などは、新たな治療標的となりうる可能性を秘めており、より原因に近い治療法開発に大きな進歩をもたらすものと期待される。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Takeuchi T, Tsuzaka K, Abe T. Altered expression of the T cell receptor-CD3 complex in systemic lupus erythematosus. *Int Rev Immunol* 23: 273-291, 2004
2. Tsuzaka K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Shiraishi K, Suzuki K, Abe T, Takeuchi. A splice variant of the TCR  $\zeta$  mRNA lacking exon 7 leads to the down-regulation of TCR  $\zeta$ , the TCR/CD3 complex, and IL-2 production in SLE T cells. *J Immunol.* 174:3518-3525,2005
3. Takeuchi T, Tsuzaka K, Abe T, Yoshimoto K, Shiraishi K, and Amano K. T cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* in press.
4. Takeuchi T, Tsuzaka K, Kameda H, and Amano K. Therapeutic targets in misguided T cells in systemic lupus erythematosus. *Current Drug Target* in press.

##### 2. 学会発表

1. Yoshimoto K, Nudejima M, Ogasawara M, Setoyama Y, Suzuki K, Tsuzaka K, Abe T, Takeuchi T. Possible involvement of BAFF in the overproduction of IFN-gamma from PBL in SLE patients. The EULAR annual congress of rheumatology, Berlin, Germany, June, 2004
2. Sekiguchi N, Kameda H, Nagasawa H, Ogawa H, Takei H, Tsuzaka K, Amano K, Takeuchi T. The efficacy and safety of bucillamine, a D-penicillamine analogue, in patients with active rheumatoid arthritis. The EULAR annual congress of rheumatology, Berlin, Germany, June, 2004
3. Tsuzaka K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Shiraishi K, Suzuki K, Abe T, Takeuchi T. DNA microarray gene expression profile of T cells with the splice variants of TCR  $\zeta$  mRNA observed in SLE. American College of Rheumatology, 68th Annual Meeting, San Antonio,

U.S.A., October, 2004

4. Shiraishi K, Tsuzaka K, Abe T, Takeuchi T. The 5th domain of E-cadherin is a site responsible for heterophilic adhesion with  $\alpha_E\beta_7^+$  cells, but not for homophilic adhesion. 68th Annual Meeting, San Antonio, U.S.A., October, 2004
5. 全身性エリテマトーデス患者T細胞のゼータ鎖異常によって誘導される病態関連分子の検索 厚生労働省班研究 平成16年度合同班会議報告会 2004.12.17 東京ガーデンパレス 東京
6. 膠原病におけるT細胞シグナル伝達異常の解明と異常分子是正による新規治療法開発に関する研究 リウマチ治療の最前線 特別講演 第14回静岡県東部リウマチ膠原病医会 2004.6.26 三島グランドホテル 静岡

#### H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

##### 1. 特許取得

1. T細胞リセプターと鎖タンパク、これをコードする遺伝子若しくはその一部を含む精製された核酸又は該タンパク若しくは該核酸に基づく自己免疫疾患検出方法(特願平9-309302)
2. 分泌腺細胞とリンパ球との接着阻害剤(08/946838)

##### 2. 実用新案登録

##### 3. その他

全身性エリテマトーデス末梢血 T 細胞における CD154 発現異常に関する研究

分担研究者 田村直人 順天堂大学膠原病内科 講師

研究要旨

全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus: SLE)では CD154 発現異常が病態に強く関与していると考えられる。今回、SLE 末梢血 T 細胞刺激後の CD154 発現における mitogen-activated protein kinase (MAPK)の関与について検討を行った。MAPK のひとつである extracellular signal-regulated kinase (ERK)の阻害により、抗 CD3 および CD28 抗体で刺激 24 時間後の CD154 発現の減弱が認められた。また phosphoimmunoblot 法で ERK のリン酸化を検索したところ、健常人に比べ SLE では刺激後の ERK のリン酸化が長時間認められ、SLE における CD154 発現異常に関与している可能性があると考えられた。

A.研究目的

全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus: SLE)では、腎症をはじめとする種々の難治性病態の形成に抗 DNA 抗体を含む免疫複合体が直接的に関与している。活性化 T 細胞上に一過性に発現する CD154 (CD40 ligand)は B 細胞上の CD40 を介し、抗体産生・クラススイッチの誘導など重要な機能をもつ細胞表面分子で SLE では過剰発現が認められ、抗 DNA 抗体など自己抗体産生に深く関与していると推察されている。これまでの我々の研究から、CD154 過剰発現の原因のひとつとして、CD154mRNA の安定化が考えられたが、最近、CD154 と相同性をもつ TNF をはじめとする early activated gene において、その mRNA の発現・安定性に細胞活性化の主要なシグナル経路である mitogen-activated protein kinase (MAPK)が関与していることが報告されている。本研究では SLE における CD154 発現に関する MAPK の関与について検討した。

B.研究方法

健常人および SLE 患者末梢血単核球を分離し、PMA と ionomycin、あるいは抗 CD3 と抗 CD28 モノクローナル抗体で刺激し、MAPK である extracellular signal-regulated

kinase (ERK)、p38MAPK、JNK それぞれの阻害薬の存在下における6時間、24 時間後の CD4 陽性 T 細胞上の CD154 の発現の変化を flow cytometry にて解析した。また、同様の刺激における6、24、48 時間後の MAPK のリン酸化を phosphoimmunoblot 法にて検索した。

(倫理面への配慮)

検体採取についてはインフォームドコンセントのもとに行い、検体管理も当施設のみにて行った。

C.研究結果

SLE 患者末梢血単核球を抗 CD3 と抗 CD28 モノクローナル抗体にて刺激した時の CD4 陽性 T 細胞上の CD154 の発現は、ERK 阻害薬の存在下で減弱が認められた。この減弱は6時間後よりも 24 時間後の発現で強く認められた。また、p38MAPK 阻害薬でも 24 時間後の CD154 発現の軽度の減弱傾向が認められた。しかし PMA と ionomycin で刺激した場合には、いずれの阻害薬でも発現の減弱は認められなかった。また、JNK 阻害薬は CD154 発現に影響を及ぼさなかった。

SLE および健常人末梢血単核球を抗 CD3 および抗

CD28 抗体で刺激し、6 時間、24 時間、48 時間後の ERK および p38MAPK の発現を phosphoimmunoblot 法にて検索したところ、SLE では ERK のリン酸化が健常人に比べ長時間認められた。

#### D. 考察

CD154 の過剰発現は SLE の病態に強く関与していると考えられるが、CD4 陽性 T 細胞上の CD154 は SLE では恒常的に発現しており、また in vitro で刺激した場合には健常人に比べ強くまた長時間発現の持続が認められる。この過剰発現はシクロスポリンにより抑制されるが、刺激後半に加えても抑制効果は認められないことから、カルシニューリン、NF-AT 以外のシグナル伝達経路が関与していると考えられている。今回の研究において、SLE では刺激後の T 細胞で MAPK のひとつである ERK のリン酸化が長時間認められ、これを阻害することにより、24 時間後の発現が阻害されたことから、ERK を介したシグナル伝達経路が SLE における CD154 の発現の持続に関与していることが示唆された。また、PMA と ionomycin 刺激では阻害が認められなかったが、この刺激においては、それ以外の経路からも刺激が伝達されることによると推察された。

抗 CD154 モノクローナル抗体による治験が海外で行われ、ループス腎炎に対して有効であったが、血栓症発症により中止されている。また、一方では関節リウマチの動物モデルにおいて MAPK 阻害薬による治療効果が報告されている。SLE においても MAPK 阻害により CD154 発現減弱効果が期待できる可能性があり、今後の治療薬としての可能性に向けて、さらなる検討が必要であると考えられる。

#### E. 結論

MAPK のうち ERK は SLE 末梢血リンパ球における CD154 の発現に関与している可能性があり、MAPK 阻害が治療に応用できる可能性がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kimura K, Tsuda H, Kwangseok Y, Tamura N, Kanai Y, Kobayashi S, Hashimoto H. Study of plasma levels of soluble CD40 ligand in systemic lupus erythematosus patients who have undergoing plasmapheresis. Ther apher 9:64-8, 2005.

##### 2. 学会発表

秋元智博, 小林茂人, 田嶋美智子, 春田和彦, 田村直人, 池田真, 多田久里守, 鐘彬彬, 橋本博史. 悪性関節リウマチ由来免疫複合体による好中球 L-セレクトイン shedding の機序解析, 日本リウマチ学会総会・学術集会, 岡山, 4 月 15 日, 2004.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

##### 1. 特許取得

##### 2. 実用新案登録

##### 3. その他



## IL-6 シグナル阻害による免疫難病の治療法の開発に関する研究

分担研究者 西本憲弘 大阪大学大学院生命機能研究科免疫制御学講座 教授

### 研究要旨

IL-6 のシグナル阻害による難治性自己免疫疾患の治療法の開発を目指した。難治性自己免疫性溶血性貧血ならびに難治性 SLE の患者にヒト化抗 IL-6 レセプター抗体による探索的治療を行った。ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体投与にて抗赤血球抗体価は減少し、溶血発作が消失、ヘモグロビンは 15g/dl まで改善した。すなわち II 型アレルギーに対し、IL-6 のシグナル阻害治療が有効であることがわかった。難治性 SLE に対する治療に関しては更なる検討を要する。

### A. 研究目的

膠原病は多臓器病変を特徴とする原因不明の免疫難病である。従来、ステロイド剤や免疫抑制剤による非特異的免疫抑制療法が用いられてきたが、治療効果・副作用ともに満足できるものではなく、新規治療法の確立は急務である。IL-6 は免疫応答や炎症反応を調節する情報伝達分子であり、IL-6 の過剰産生が全身性エリテマトーデス (SLE) や血管炎症候群の自己免疫病態に関与することが示唆されている。そこで、IL-6 のシグナルを特異的に阻害するヒト化抗 IL-6 レセプター抗体による難治性自己免疫疾患の治療法の開発を目指した。今年度は、難治性自己免疫性溶血性貧血ならびに難治性 SLE の患者に探索的治療を行った。

### B. 研究方法

従来の免疫抑制療法に抵抗性を示した極めて難治性の自己免疫性溶血性貧血、SLE ならびに大動脈炎症候群の患者に、ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体による探索的治療を行った。また、昨年度報告した血管炎症候群患者 2 例に対する抗体治療の長期有効性を評価した。大阪大学附属病院先進医療審査会、産業医科大学附属病院倫理委員会、田附興風会医学研究所北野病院倫理委員会の許可、ならびに厚生労働省監視指導課の許可の下に、ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体、MRA (一般名 tocilizumab) を使用した。MRA は GMP に準拠している。臨床症状ならびに臨床検査値、画像検査による有効性の評価を行うとともに、IL-6、可溶性 IL-6 受容体、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  などのサイトカインの体内プロファイルやリンパ球サブセットの推移を検討した。また、DNA マイクロアレイを用いて、末梢血での 3 万個の分子の mRNA 発現量の推移を MRA の投与前後で検討した。

### (倫理面への配慮)

ヘルシンキ宣言ならびに厚生労働省の「臨床研究に関する倫理指針」を遵守して行った。各施設の倫理委員会の

承認の下、患者のインフォームドコンセントを得て行った。

### C. 研究結果

【症例1】42 歳男性。1999 年に自己免疫性溶血性貧血が発症。Prednisolone (PSL)、Melphalan、Cyclophosphamide (CPA)、Ciclosporin (CyA)、Azathioprine (AZP) などによる治療を行い一時的に軽快していたが、再発。溶血発作を繰り返し、ヘモグロビン 5.1g/dl、総ビリルビン 4.6mg/dl と低下。mPSL パルス療法、CPA 大量静注療法 (IVCY)、血漿交換、脾照射などを施行したが、効果は不十分であり輸血依存性は改善しなかった。サイトカインプロファイルでは、IL-6 の増加を認め、IL-6 の過剰が抗赤血球抗体の産生を介して溶血に関与している可能性が考えられた。MRA (8mg/kg) 投与にて抗赤血球抗体価は減少し、溶血発作が消失、ヘモグロビンは 15g/dl まで改善した。

【症例2】35 歳女性。1991 年に SLE (ループス腎炎 WHO II 型) が発症、1995 年ループス腎炎 V 型に進行、1999 年 11 月中枢性ループスを発症した。計 12 回のパルス療法を含むステロイド療法、mizoribine、CyA、計 21 回の IVCY、AZP、methotrexate (MTX) などの免疫抑制療法、DNA 吸着療法、血漿交換療法を併用するも抵抗性を示し、寛解・増悪を繰り返した。一時的に悪性リンパ腫の治療に準じた COP 療法 (9 回) が奏功したが、Vincristine による末梢神経障害のため中止。2002 年ループス腎炎、中枢性ループスの増悪 (アルブミン 1.2g/dl、意識消失+) に対して Rituximab (500mg $\times$ 2 回) が著効し、Betamethasone を 4mg から 1mg まで減量し得たが、2004 年 4 月より抗 ds-DNA 抗体漸増、低補体血症の進行、ループス腎炎が再燃した。2004 年 6 月 Rituximab (600mg $\times$ 2 回) 再投与、ステロイド増量を行うも改善なく、中枢性ループスも悪化したため、10 月より MRA を開始した。MRA 投与開始後、血清アルブミン増加 (2.6 $\rightarrow$ 3.3g/dl) を認めたが 2 週後に TTP を併発したため MRA は中止した。さらに 4 週目には、中枢性ループスが悪化したため、それまで無効であったステロイドが奏効し、コントロールできた。

また、SLE患者の末梢血細胞中 mRNA の DNA マイクロアレイによる網羅的検索では、健常人女性との比較により、IFN 誘導蛋白を含む分子群が検出された。さらに、IL-6 阻害による発現変動を解析したところ、機能が未知の分子を含む 5 つの分子が同定された。

【症例 3】33 歳女性。1992 年発症の大動脈炎症候群で潰瘍性大腸炎を合併。従来ステロイド 5・20mg でコントロール可能であったが、2002 年に悪化を認め CyA、MTX 併用するも無効。6 月大動脈弁置換術施行。2003 年 MTX、AZP 併用するも無効。ステロイドパルス療法を間歇的に行い維持。Mycophenolate mofetil は一時効果を認めたが、薬疹のため中止。11 月より IVCY 3 回行うも効果なく薬疹出現にて中止。本年 4 月より Tacrolimus 開始し効果認めたが、神経症状出現し中止。左頸動脈の狭窄、弓部、腕頭動脈の起始部の狭窄、右鎖骨下動脈は閉塞、左右総頸動脈の狭窄が進行したため MRA の投与を開始した。現在、効果を検討中である。

【長期継続 2 例】いずれの症例も再燃は認めずステロイドの減量が可能であった。

#### D. 考察

ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体を用いた IL-6 シグナル阻害は、II 型アレルギーに基づく自己免疫溶血性貧血を改善することがわかった。III 型アレルギーである SLE に関しては更なる検討が必要である。また、DNA マイクロアレイを用いた解析により、新たな治療標的分子が同定できる可能性がある。

#### E. 結論

難治性自己免疫溶血性貧血に対する IL-6 シグナル阻害治療の可能性が示された。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Hashimoto J, Azuma J, Kishimoto T. Treatment of Rheumatoid Arthritis with Humanized Anti-interleukin 6 Receptor Antibody. *Arthritis Rheum* 2004, 50: 1761-69.
2. Nishimoto N, Kishimoto T. Inhibition of IL-6 for the treatment of inflammatory diseases. *Curr Opin Pharmacol* 2004, 4: 386-91.
3. Ito H, Takazoe M, Fukuda Y, Hibi T, Kusugami K, Andoh A, Matsumoto T, Yamamura T, Azuma J, Nishimoto N, Yoshizaki K, Shimoyama T, Kishimoto T. A Pilot Randomized Trial of a Human Anti-Interleukin-6 Receptor Monoclonal Antibody in Active Crohn's Disease. *Gastroenterol* 2004, 126: 989-96.
4. Kunitomi A, Konaka Y, Yagita M, Nishimoto N, Kishimoto T, Takatsuki K. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody induced long-term remission in a patient with life-threatening refractory autoimmune hemolytic anemia. *Int J Hematol* 2004, 80: 246-9.
5. Mihara M, Shiina M, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Akamatsu K. Anti-interleukin-6 receptor antibody inhibits murine AA-amyloidosis. *J Rheumatol* 2004, 31: 1132-8.
6. Becker C, Fantini MC, Schramm C, Lehr HA, Wirtz S, Nikolaev A, Burg J, Strand S, Kiesslich R, Huber S, Ito H, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Galle PR, Blessing M, Rose-John S, Neurath MF. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity* 2004, 21: 491-501.
7. Yoshio NH, Watanabe D, Adachi Y, Nishimoto N. The blockade of interleukin-6 receptor as a therapeutic strategy for chronic inflammatory diseases. *Therapy* 2004, 1: 267-75.
8. Saiki O, Uda H, Nishimoto N, Miwa T, Mima T, Ogawara T, Azuma N, Katada Y, Sawaki J, Tsutsui H, Matsui K, Maeda A, Nakanishi K. Adult Still's disease reflects a Th2 rather than a Th1 cytokine profile. *Clin Immunol*. 2004, 112: 120-125.
9. Doganci A, Eigenbrod T, Krug N, De Sanctis GT, Hausding M, Erpenbeck VJ, Haddad el-B, Schmitt E, Bopp T, Kallen KJ, Herz U, Schmitt S, Luft C, Hecht O, Hohlfeld JM, Ito H, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Rose-John S, Renz H, Neurath MF, Galle PR, Finotto S. The IL-6R alpha chain controls lung CD4+CD25+ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo. *J Clin Invest* 2005 115: 313-325.
10. Nishimoto N. Clinical study in patients with Castleman's disease, Crohn's disease and rheumatoid arthritis in Japan. *Clin Rev Allegy and Immunol* (in press)
11. Yokota S, Miyamae T, Imagawa T, Iwata N, Katakura S, Mori M, Woo P, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T. Therapeutic Efficacy of Humanized Recombinant Anti-IL 6-Receptor Antibody for Children with Systemic-Onset Juvenile Idiopathic Arthritis. *Arthritis Rheum* (in press)
12. Shima Y, Iwano M, Yoshizaki K, Tanaka T, Kawase I, Nishimoto N. All-trans retinoic acid inhibits the development of mesangial proliferative glomerulonephritis in interleukin-6 transgenic mice.

Nephron. (in press)

2004.10.16-21.

- 13. Mihara M, Nishimoto N, Ohsugi Y. Effect of anti-mouse interleukin-6 receptor antibody in autoimmune mouse models. *Prog Monoclon Antibody Res* (in press)
- 14. Nishimoto N. Cytokine signal regulation and autoimmune disorders. *Autoimmunity* (in press)

- 3. 西本憲弘. Anti-IL-6 receptor antibody therapy for rheumatoid arthritis. 第 34 回日本免疫学会総会. 2004.12.01-03.
- 4. Nishimoto N. Anti-IL-6 receptor antibody therapy for immunological diseases. 2005 Keynote Symposia-Cytokines, Disease and Therapeutic Intervention. 2004. 2.12-17.

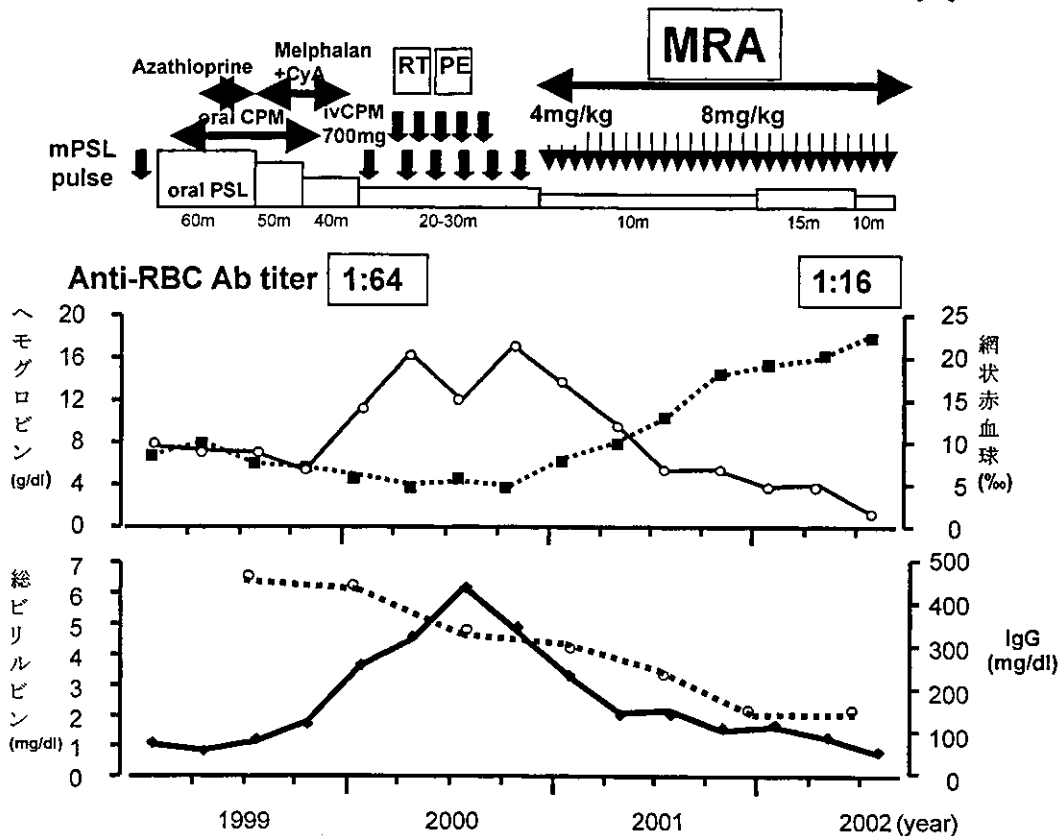
2. 学会発表

- 1. Nishimoto N, *et al*. Repeated treatments with anti-IL-6 receptor antibody(MRA) lead to extended clinical response rheumatoid arthritis even after cessation of MRA. ACR/ARHP 68th Annual Scientific Meeting 2004. 2004.10.16-21.
- 2. Nishimoto N, *et al*. Increase in serum levels of IL-6 and soluble IL-6 receptor after anti-IL-6 receptor antibody therapy in patients with rheumatoid arthritis. ACR/ARHP 68th Annual Scientific Meeting 2004.

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

- 1. 特許取得  
特記すべきことなし。
- 2. 実用新案登録  
特記すべきことなし。
- 3. その他  
特記すべきことなし。

### ヒト化抗IL-6受容体抗体による 自己免疫性溶血性貧血の改善



# ヒト化抗IL-6受容体抗体による SLE治療

