

厚生労働科学研究研究費補助金  
免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

免疫難病のシグナル異常と  
病態解明・治療応用に関する研究

平成14年～16年度 総合研究報告書

平成17年 3月

主任研究者 田中 良哉

## 【目 次】

I. 構成員名簿 .....	1
II. 総括研究報告	
免疫難病のシグナル異常と病態解明・治療応用に関する研究 田中 良哉 (産業医科大学 医学部 第一内科学講座) .....	3
III. 分担研究報告	
1. 細胞活性化シグナルにおけるlipid raft-スフィンゴ脂質の機能解析に関する研究 梅原 久範 (金沢医科大学大学院医学研究科 血液免疫制御学) .....	15
2. 免疫抑制性シグナル異常と経口免疫寛容の誘導に関する研究 駒形 嘉紀 (東京大学医学部附属病院 アレルギーリウマチ内科) .....	20
3. 膠原病における免疫寛容シグナル異常に関する研究 坂口 志文 (京都大学再生医科学研究所 生体機能調節学分野) .....	23
4. 膠原病における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 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) .....	29
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 竹内 勤 (埼玉医科大学総合医療センター 第二内科) .....	37
6. 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 田村 直人 (順天堂大学 医学部 膠原病内科) .....	41
7. 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 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) .....	43
8. 新しい抑制性シグナリングシステムCD47/SHPs-1系の自己免疫疾患における機能解析 野島 美久 (群馬大学大学院医学系研究科 生体統御内科) .....	47
9. 全身性エリテマトーデス末梢血T細胞における共刺激分子シグナル異常に関する研究 針谷 正祥 (東京医科歯科大学 医学部 臨床試験管理センター) .....	49
10. 免疫難病のシグナル伝達異常と病態解析・治療応用に関する研究 南 康博 (神戸大学大学院医学系研究科 ゲノム科学講座) .....	52
11. SLEリンパ球における免疫シグナル異常に関する研究 田中 良哉 (産業医科大学 医学部 第一内科学講座) .....	55
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	61
V. 研究成果の刊行物・別刷 .....	81

## 【 I 】構成員名簿

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）

「免疫難病のシグナル異常と病態解明・治療応用に関する研究」構成員名簿

区分	氏名	所 属	職 名
主任研究者	田中 良哉	産業医科大学 医学部 第一内科学講座	教授
分担研究者	梅原 久範	金沢医科大学大学院医学研究科 血液免疫制御学	教授
	駒形 嘉紀	東京大学医学部附属病院 アレルギーリウマチ内科	助手
	坂口 志文	京都大学再生医科学研究所 生体機能調節学分野	教授
	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	教授
	竹内 勤	埼玉医科大学総合医療センター 第二内科	教授
	田村 直人	順天堂大学 医学部 膠原病内科	講師
	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
	野島 美久	群馬大学大学院医学系研究科 生体統御内科	教授
	針谷 正祥	東京医科歯科大学 医学部 臨床試験管理センター	助教授
	南 康博	神戸大学大学院医学系研究科 ゲノム科学講座	教授

## 【Ⅱ】総括研究報告

免疫難病のシグナル異常と病態解明・治療応用に関する研究(H14-免疫-016)

主任研究者 田中良哉

産業医科大学医学部第一内科学講座教授

分担研究者	梅原久範	金沢医科大学大学院医学研究科血液免疫制御学教授
	駒形嘉紀	東京大学医学部附属病院アレルギーリウマチ内科助手
	坂口志文	京都大学再生医科学研究所・生体機能調節学分野教授
	高柳 広	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科特任教授
	竹内 勤	埼玉医科大学総合医療センター第2内科教授
	田村直人	順天堂大学医学部膠原病内科講師
	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
	野島美久	群馬大学大学院医学系研究科生体統御内科教授
	針谷正祥	東京医科歯科大学膠原病・リウマチ内科/臨床試験管理センター助教授
	南 康博	神戸大学大学院医学系研究科ゲノム制御科学講座教授

研究要旨

全身性エリテマトーデス(SLE)をはじめとする膠原病は、多臓器病変を特徴とする全身性自己免疫疾患であり、免疫難病に位置付けられる。病因・病態形成に関与する賦活化・抑制性免疫シグナルの分子・遺伝子レベルでの特定、並びに、制御・修復すべき標的の解明は治療に多大な進歩を齎すはずである。本研究では、斯様な背景を踏まえ、膠原病の病因や病態形成に本質的に関与する免疫シグナルの異常な賦活化、及び、免疫抑制性シグナルの機能異常を究明し、SLE 患者 T 細胞の T 細胞受容体(TCR)と共刺激分子を介するシグナルに焦点を絞り、賦活化シグナル、並びに、抑制性シグナルの異常に関与する分子、遺伝子を同定し、免疫シグナル異常の是正という視点から疾患制御を実践した。

免疫抑制性シグナルの機能異常に関しては、SLE 患者 T 細胞に TCR と鎖のエクソン 7 を欠く変異が見出され、TCR からの抑制性シグナル伝達に重大な欠損を及ぼす点を示され、TCR と鎖の下流に位置する ZAP-70 遺伝子の変異の結果、胸腺での T 細胞選択異常、関節炎惹起性 T 細胞の産生がおき、自己免疫疾患の発症に至る事が解明された。

免疫シグナルの異常な賦活化に関しては、SLE 患者自己反応性 T 細胞の TCR 共刺激分子のシグナル賦活化には、 $\beta 1$ インテグリンを介するシグナルの亢進による CD40L の発現誘導を介した CD28 非依存性のシグナルが関与し、自己反応性 T 細胞の過剰な活性化、ループス腎炎などの臓器病変の進展に寄与する可能性が示唆された。

免疫シグナル異常の是正という視点から疾患制御に関しては、ノックアウトマウスを用いた検討から自己免疫性関節炎の発症に IL-6 が必須である事、また、ヒトでも IL-6 によるシグナル伝達系は、自己反応性 T 細胞と抗体産生性 B 細胞の活性化の双方に必須である事を解明した。斯様な基礎的検討を背景に、治療抵抗性膠原病の症例に対して、ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体を使用し、臨床症候や検査成績の速やかな改善が得られ、血管炎や難治性 SLE をはじめとする膠原病の新しい治療法となりうる事が示唆された。以上、SLE 等の免疫難病の発症原因の一つとして T 細胞の TCR シグナル伝達異常の重要性とシグナル異常の是正に基づく新しい治療法の可能性が考えられた。

## A. 研究目的

免疫難病である膠原病は多臓器病変を特徴とする全身性自己免疫疾患である。代表的膠原病である SLE だけでも 6 万人余の特定疾患医療費受給者数を数え、患者総数と医療費支給額は増大の一途を辿る。しかし、免疫難病の治療は、ステロイド薬中心の副作用の多い非特異的免疫療法に終止し、長期予後や QOL の向上に繋がる治療法の開発は途上にあり、病態解明と疾患特異的な新規治療開発は社会的にも急務である。

SLE の発症過程には、発症過程には自己反応性 T 細胞のシグナルの異常が関与する事が解明されてきた。これらの背景を踏まえ、本研究では、膠原病の病因や病態形成に本質的に関与する免疫シグナルの異常な賦活化、及び、免疫抑制性シグナルの機能異常を究明し、免疫シグナル異常の是正という視点から疾患制御を追求する事を主目的とする。平成 14, 15 年度には、TCR を介するシグナル伝達に於ける遺伝子変異、共刺激系のシグナル異常活性化、並びに、制御性刺激シグナルの欠損が、自己反応性 T 細胞活性化を齎し、膠原病を引き起こす事を解明した。平成 16 年度は、モデル動物の T 細胞の TCR と共刺激分子を介するシグナルに焦点を絞り、賦活化シグナル、並びに、抑制性シグナルの異常に関与する分子、遺伝子の同定を試みた。また、昨年度明らかにした IL-6 を介するシグナルを制御する事を目的として、難治性膠原病に IL-6R 抗体を投与するパイロットスタディを開始した。

## B. 方法

膠原病の病因や病態形成に直接関与する、自己免疫系シグナルの過剰賦活化、免疫抑制性シグナルの機能異常を同定する。その際、①リンパ球の細胞間相互作用を担う細胞間シグナル伝達分子の質的、量的異常、②リンパ球の活性化、細胞死、サイトカイン産生などを担う細胞内シグナル伝達分子の質的、量的異常、③これらの異常に関与する細胞内外のシグナル伝達分子の蛋白質レベル、遺伝子レベルでの特定を行う。膠原病患者検体のみならず、基礎的エビデンスを確立するために、正常リンパ球、リンパ系細胞株、動物モデルを用いた研究を駆使する。さらに、治療抵抗性の難治性膠原病患者を対象にヒト

化抗 IL-6 レセプター抗体による探索的治療研究を行った。大阪大学附属病院先進医療審査会の許可の下に、ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体、MRA、を使用した。なお、臨床検体を使用する場合には、研究分担者の所属機関の倫理委員会で承認を得た研究に限定し、患者及び家族からインフォームドコンセントを得た上で、倫理委員会の規約を遵守し、所属機関の現有設備を用いて行う。患者の個人情報が入属機関外に漏洩せぬよう、試料や解析データは万全の安全システムをもって厳重に管理し、患者は、経済的負担を始め如何なる不利益も被らない事を明確にする。また、動物実験は、各動物実験施設指針等に則り、材料、モデルともに、動物愛護上の十分な配慮をもって行った。

### (倫理面への配慮)

被験者およびその関係者の尊厳、人権および利益を保護することを目的とし、厚生科学審議会において作成された「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」の中の第二群試料等提供者を対象とする。同審議会の手引きに沿って、1) 遺伝子の分析を行うこと、2) 研究協力の任意性と撤回の自由、3) 研究目的、4) 研究方法、5) 研究計画書等の開示試料提供者にもたらされる利益および不利益、6) 個人情報の保護、7) 遺伝子解析結果の開示、8) 研究成果の公表、9) 研究から生じる知的財産権の帰属、10) 遺伝子解析研究終了後の試料等の取扱の方針、11) 費用負担に関する事項、12) 遺伝カウンセリングの体制などの点を具体的に説明し、同意を得る。また、研究分担者の所属機関の倫理委員会で承認を得た研究に限定し、患者及び家族からインフォームドコンセントを得た上で、倫理委員会の規約を遵守し、所属機関の現有設備を用いて行う。患者の個人情報が入属機関外に漏洩せぬよう、試料や解析データは万全の安全システムをもって厳重に管理し、患者は、経済的負担を始め如何なる不利益も被らない事を明確にする。大阪大学における IL-6R 抗体の投与は、ヘルシンキ宣言の精神を遵守し、患者ならびに保護者のインフォームドコンセントを得た上で、大阪大学附属病院先進医療審査会の許可のもとに治療を行った。一方、動物実験は、各動物実験施設指針等に則り、材料、モデル共に、動物愛護上の十分な配慮で行う。

### C. 結果

自己免疫疾患の発症には、免疫担当細胞のシグナル伝達異常による免疫自己寛容の破綻が関与し、その過程に於いて T 細胞受容体 (TCR) を介する抗原シグナルと細胞膜共刺激分子シグナルの共存が中心的役割を担う。竹内は、SLE 患者 T 細胞に TCR と鎖のエクソン 7 を欠く変異、及び、short 3'-UTR 変異を見出した。エクソン 7 は、TCR と鎖のシグナル伝達に必須の ITAM3 の N 末端-チロシン残基を含み、TCR と鎖欠損マウス T 細胞ハイブリドーマ MA5.8 に、short 3'-UTR 変異を遺伝子導入すると、TCR と鎖蛋白質と CD3 ε 鎖の発現を低下させ、これらの SLE に特徴的な TCR と鎖変異は TCR からの抑制性シグナル伝達に重大な欠損を及ぼす点が示された。さらに、TCR と鎖異常によって 2 次的に誘導される分子として、Syndecan-1、β 7 インテグリン、種々のキナーゼ分子群が同定され、新しい治療標的としての可能性が示唆された。

坂口は、リウマチ様関節炎を自然発症する SKG マウスの疾患原因遺伝子として TCR と鎖の下流の ZAP-70 の一塩基突然変異である事を解明した。また、トランスジェニックマウスを作製し、SKG マウスに正常 ZAP-70 遺伝子を発現させた結果、関節炎の発症は阻止された。さらに、SKG マウス T 細胞の TCR を刺激すると、TCR と鎖、ZAP-70、LAT、PLC-γ 等のシグナル分子のチロシンリン酸化は全て低下していた。以上、TCR と鎖を介するシグナルの下流に位置する ZAP-70 遺伝子変異の結果、T 細胞シグナルの異常、胸腺での T 細胞選択異常、関節炎惹起性 T 細胞の産生がおき、その結果としてヒトのリウマチ様関節炎と酷似した病変が発症する可能性が示された。さらに、サイトカインのノックアウトマウスを用いた研究から、IL-6 は SKG マウス関節炎の発症に必須で、IL-1α/β、TNF-α も重要であるが、IL-4、IL-10 は関節炎の進行に対し抑制的に働き、IFN-γ は発症に関与しない点が示された。

さらに、野島は、自己免疫性溶血性貧血の病態形成における CD47/SHPS-1 シグナル系の脾臓内マクロファージに与える抑制性シグナルを解明した。また、駒形は、T 細胞において TGF-β を介するシグナルを阻害すると各種の自己免疫疾患類似の病態を示す事から、T 細胞特異

的な TGF-β ノックアウトマウスを作成し、経口免疫寛容の中心的メカニズムを担う抑制性 T 細胞への TGF-β の関与を明らかにした。高柳は、免疫系を制御して自己免疫疾患の原因に関与する Runx2 に対して、Stat1 は直接結合を介して抑制作用を有することを認め、治療応用への可能性を示した。以上、SLE の発症に於ける制御性シグナルの異常の関与が明らかとなった。

一方、SLE の発症に於いて、自己反応性 T 細胞のシグナル賦活化には、TCR 共刺激分子が関与し、田中、田村、針谷、南もこの点を検討し、SLE の T 細胞では、代表的な共刺激分子である CD28 の減弱、或は、消失、さらに、CD28 を介するシグナル伝達の異常を見出し、正常 T 細胞と異なる刺激伝達系の存在を示してきた。また、SLE 患者リンパ球に於いて、梅原はラフト発現が増強していること、南は、SLEDNA 損傷応答シグナル伝達系異常が存在する事を示し、T 細胞がすでに活性化を受けている可能性を示した。その機序として田中は、活動期 SLE の T 細胞に於いて、β 1 インテグリンを介するシグナルが量的、及び、質的に亢進し、CD40L 等の他の共刺激分子の発現誘導を介して、共刺激分子として機能する事を明らかにした。さらに、斯様な自己反応性 T 細胞の活性化は FAK の優勢抑制型変異体、或は、PTEN の遺伝子導入により、特異的に制御しうる事が示された。血管炎を伴う SLE に於ける VLA-4 の高発現を認めた竹内らの報告と併せ、β 1-FAK を介する賦活化シグナルの亢進は、CD28 非依存性の共刺激として作用し、自己反応性 T 細胞の活性化、ループス腎炎などの臓器病変の進展に寄与する可能性が示された。実際、CD29 発現量は SLE 患者血清補体値と負相関し、ループス腎炎合併例で CD29 は有意に発現増強し、CD29 陽性 T 細胞の病態組織への集積と関連性が認められた。さらに田村は、SLE 患者 T 細胞に於いて、CD29 の刺激によって誘導される CD40L の転写、発現、並びに、血清可溶性 CD40L 値は、疾患活動性と極めて高く相関する事を明らかにした。

一方、SLE の臓器障害は、T 細胞依存性に活性化された B 細胞より過剰に産生される自己抗体の沈着と免疫複合体による補体の活性化により齎される。IL-6 およびそれを介するシグナル伝達系は、自己反応性 T 細胞と抗体産



生性 B 細胞の活性化の双方に必須である。坂口は、IL-6 をノックアウトすると SKG マウスの発症が完全に抑制できる事を認め、関節炎の発症に必須である事を示した。西本は、膠原病の中でも特に難治性病態とされる治療抵抗性血管炎、難治性溶血性貧血、SLE の 3 症例に対して、ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体を使用し、種々のサイトカインの体内プロフィールやリンパ球サブセットの変化を解析、血管炎に対する治療効果の検討を行った。ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体 (MRA) 200mg/週を点滴静注使用した結果、血中 IL-6 の低下に伴い血管炎の改善、即ち、発熱、紅斑、皮膚潰瘍などの臨床症候、頸動脈の血流、CRP 値は速やかに改善し、また、溶血性貧血は完全に制御できた。特に、治療により IL-6 の低下に加え、血中 TNF $\alpha$  の一時的増加もあった点より、IL-6 阻害治療の効果は単に抗炎症作用によるのではなく血管炎の根本に作用している可能性が示され、IL-6 阻害治療は血管炎を伴う難治性 SLE 等の膠原病の新しい治療法となりうる事が示唆された。

#### D. 考察

膠原病の発症原因のひとつとして T 細胞の TCR シグナル伝達異常の重要性とシグナル異常の是正に基づく新しい治療法の可能性が考えられた。即ち、SLE 患者 T 細胞に TCR $\zeta$  鎖のエクソン 7 を欠く変異が見出され、TCR からの抑制性シグナル伝達に重大な欠損を及ぼす点が示され、TCR $\zeta$  鎖の下流に位置する ZAP-70 遺伝子の変異の結果、胸腺での T 細胞選択異常、関節炎惹起性 T 細胞の産生がおき、自己免疫疾患の発症に至る事が解明された。また、斯様な抑制性シグナルの欠損は、SHPS-1 の制御、TGF- $\beta$ 、Stat1 などにより回復する可能性が示唆された。一方、SLE 患者自己反応性 T 細胞の TCR 共刺激分子のシグナル賦活化には、 $\beta$  1 インテグリンを介するシグナルの亢進による CD40L の発現誘導を介した CD28 非依存性のシグナルが関与し、自己反応性 T 細胞の過剰な活性化、ループス腎炎などの臓器病変の進展に寄与する可能性が示唆された。

一方、ノックアウトマウスを用いた検討から自己免疫性関節炎の発症に IL-6 が必須である事、また、ヒトでも IL-6 によるシグナル伝達系は、自己反応性 T 細胞と抗体産生性

B 細胞の活性化の双方に必須である事を解明した。斯様な基礎的検討を背景に、治療抵抗性膠原病の症例に対して、ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体を使用し、臨床症候や検査成績の速やかな改善が得られ、血管炎や難治性 SLE をはじめとする膠原病の新しい治療法となりうる事が示唆された。

以上、膠原病の発症原因として、T 細胞の TCR $\zeta$  鎖とその下流のシグナル分子 ZAP-70 の遺伝子変異によって制御性刺激シグナルの欠損が生じ、その結果、CD29 や CD40L などの共刺激系のシグナル異常活性化が生じ、自己反応性 T 細胞活性化を齎し、膠原病を引き起こすことが解明された。また、更に下流に位置する IL-6 を介するシグナルの制御に関する臨床的検討により、血管炎や難治性 SLE をはじめとする膠原病の新しい治療法となりうる事が示唆された。今後、斯様な結果やコンセプトに基づく免疫シグナル異常の是正は、免疫難病に対する新規治療軸の確立に繋がるものと期待される。

本研究の目的の達成度に関しては、膠原病の発症原因として、自己反応性 T 細胞のシグナル活性化、並びに、それを制御する抑制性 T 細胞のシグナル異常を解明し、シグナル異常の是正に基づく新しい治療法の可能性が考えられた。即ち、前者として  $\beta$  1 シグナルの亢進による CD40L の発現誘導、後者として TCR $\zeta$  鎖の欠損と下流に位置する ZAP-70 遺伝子の変異を解明した。さらに、ノックアウトマウスを用いた検討から IL-6 シグナル伝達系の異常を明らかにし、治療抵抗性膠原病症例に対し、ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体を使用したパイロットスタディを行い、難治性膠原病の新しい治療法となりうる事が示唆された。以上より、免疫難病のシグナル異常を解明し、臨床試験を開始するとの目的を、ほぼ 100% 達成できたと思われる。

次に、本研究の研究成果の意義に関しては、膠原病の発症原因として、自己反応性 T 細胞のシグナル活性化として  $\beta$  1 シグナルの亢進による CD40L の発現誘導が関与すること、また、自己反応性 T 細胞を制御する抑制性 T 細胞のシグナル異常として TCR $\zeta$  鎖の欠損と下流に位置する ZAP-70 遺伝子の変異を解明した。膠原病の発症その機序を明確にした点は、国際的に高い評価を受けている。さらに、治療抵抗性膠原病症例に対し、ヒト化抗 IL-6 レセ

プター抗体を使用したパイロットスタディを行い、臨床症候や検査成績の速やかな改善が得られ、本格的な根本療法薬として期待された。

今後の展望については、自己反応性 T 細胞のシグナル活性化を担う共刺激シグナルの制御としては、PTEN などの選択的なアプローチが明らかになり、今後の研究継続の必要性が示された。また、抑制性 T 細胞のシグナル異常として TCR と鎖の欠損と下流に位置する ZAP-70 遺伝子の変異を解明し、SHPS-1 の制御、TGF-β、Stat1 などにより回復する可能性が示唆され、研究継続の必要性が示された。一方、これらの基礎的検討を基に開始された難治性膠原病に対するヒト化抗 IL-6 レセプター抗体のパイロットスタディは、臨床症候や検査成績の速やかな改善が得られ、膠原病の新しい治療法となりうることが示唆され、臨床試験へ進展する事を展望している。

研究内容の効率性については、3年間の研究期間で、免疫難病のシグナル異常を解明し、臨床試験を開始するとの目的を達成でき、効率性という点でも高い評価と思われる。

### E. 結論

免疫難病の発症機序として、T 細胞の TCR シグナル伝達異常とシグナル異常の是正に基づく新規治療法が考えられた。自己反応性 T 細胞の TCR 共刺激分子のシグナル賦活化には、β1シグナルの亢進による CD40L の発現誘導が関与し、自己反応性 T 細胞の過剰な活性化、ループス腎炎などの臓器病変の進展を齎した。

また、T 細胞の活性化は、抑制性シグナルの異常、即ち、T 細胞の TCR と鎖のエクソン 7 を欠く変異が見出され、TCR からの抑制性シグナル伝達に重大な欠損を及ぼす点が示され、TCR と鎖の下流に位置する ZAP-70 遺伝子の変異の結果、胸腺での T 細胞選択異常、関節炎惹起性 T 細胞の産生がおき、自己免疫疾患の発症に至る事が解明された。

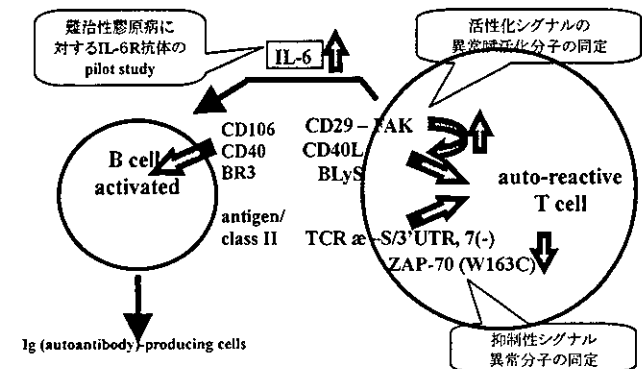
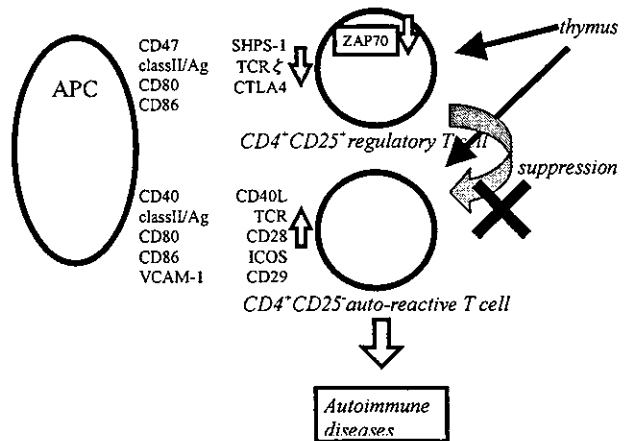
さらに、ノックアウトマウスや SLE 症例を用いた検討から膠原病の発症に IL-6 が必須である事を解明し、斯様な基礎的検討を背景に、治療抵抗性膠原病症例に対し、ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体を使用し、臨床症候や検査成績

の速やかな改善が得られ、治性膠原病の新しい治療法となりうることが示唆された。

以上、膠原病の発症原因として、T 細胞の TCR と鎖とその下流のシグナル分子 ZAP-70 の遺伝子変異によって抑制性刺激シグナルの欠損が生じ、その結果、CD29 や CD40L などの共刺激系のシグナル異常活性化が生じ、自己反応性 T 細胞活性化を齎し、膠原病を引き起こすことが解明された。また、更に下流に位置する IL-6 を介するシグナルの制御に関する臨床的検討により、血管炎や難治性 SLE をはじめとする膠原病の新しい治療法となりうることが示唆された。今後、斯様な結果やコンセプトに基づく免疫シグナル異常の是正は、免疫難病に対する新規治療軸の確立に繋がるものと期待される。

### F. 健康危険情報

特になし。



## G.研究発表

(主任研究者)

田中良哉

- Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, Nakano K, Tanaka Y. Clinical relevance of expression of P-glycoprotein on peripheral lymphocytes to steroid-resistance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* (in press)
- Nakayamada S, Kurose K, Saito K, Mogami A, Tanaka Y. Small GTP-binding protein rho-mediated signaling promotes proliferation of rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* (in press)
- Saito K, Nakayamada S, Nakano K, Tokunaga M, Tsujimura S, Nakatsuka K, Adachi T, Tanaka Y. Detection of *Pneumocystis carinii* by DNA amplification in patients with connective tissue diseases: Reevaluation of clinical features of *P. carinii* pneumonia in rheumatic diseases. *Rheumatology* (2004) 43, 479-485
- Nakano K, Okada Y, Saito K, Tanaka Y. Fibroblast growth factor-2 induces receptor activator of nuclear factor kappa B ligand expression and osteoclast maturation by binding to heparan sulfate proteoglycan on rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* (2004) 50, 2450-2458
- Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, Nakano K, Tsukada J, Kohno K, Tanaka Y. Transcriptional regulation of multidrug resistance-1 gene by interleukin-2 in lymphocytes. *Genes Cells* (2004) 9, 1265-1273
- Tokunaga M, Fujii K, Saito K, Nakayamada S, Tsujimura S, Nawata M, Tanaka Y. Down-regulation of CD40 and CD80 on B cells in patients with life-threatening systemic lupus erythematosus after successful treatment with rituximab. *Rheumatology* (2005) 44: 176-182
- Nakayamada S, Fujimoto H, Okada Y, Umehara H, Kataoka T, Minami Y: 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* (2003) 48, 1239-1248
- Saito K, Nawata M, Nakayamada S, Tokunaga M, Tsukada J, Tanaka Y. Successful treatment with anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) of life-threatening refractory systemic lupus erythematosus with renal and central nervous system involvement. *Lupus* (2003) 12, 798-800
- 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 osteoblast and osteoclast maturation. *J Biol Chem* (2003) 278: 45368-45374
- 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 Biochem Chem* (2002) 277, 21446-21452.
- 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
- 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.

(分担研究者)

梅原久範

- Chida Y, Itoh M, Kitano T, Kondo T, Umehara H, Ichikawa S, Hirabayashi Y, Holleran WM Okazaki T. Anthracycline resistance in HL-60/ADR cells via transcriptional up-regulation of glucosylceramide

synthase and reversal by Sp1 (GC-rich) decoy oligodeoxynucleotides. *J Biol Chem* (in press)

- Taguchi Y, Kondo T, Watanabe M, Miyaji M, Umehara H, Uchiyama T, Kozutumi Y, Okazaki, T. Interleukin-2-induced survival of natural killer(NK) cells involving phosphatidylinositol-3 kinase-dependent reduction of ceramide through acid sphingomyelinase, sphingomyelin synthase and glucosylceramide synthase. *Blood* (in press)
- Y Yamaoka S, Miyaji M, Kitano T, Umehara H, Okazaki T. Expression cloning of a human cDNA restoring sphingomyelin synthesis and cell growth in sphingomyelin synthase-defective lymphoid cells. *J Biol Chem*. 2004; 279: 18688-18693.
- Kawabata D, M Tanaka, T Fujii, H Umehara, Y Fujita, H Yoshifuji, T Mimori, S Ozaki. Ameliorative effects of follistatin-related protein/TSC-36 on joint inflammation in a mouse model of arthritis. *Arthritis Rheum* (2004) 50: 660-607
- Yoneda O, Imai T, Inoue H, Nishimura M, Minami Y, Bloom ET, Mimori T, Domae N, Umehara H: Membrane bound form of fractalkine induces IFN- $\gamma$  production by NK cells: A role for Th1 response. *Eur J Immunol* (2003) 33, 53-58
- Inoue H, O Yoneda, Y Minami, Y Tanaka, T Okazaki, H Imai, E Bloom, N Domae, and H Umehara. 2002. Lipid rafts as the signaling scaffold for NK cell activation: Tyrosine phosphorylation and association of LAT with PI 3-kinase and PLC— following CD2 stimulation. *Eur. J. Immunol.* (2002) 32, 2188-2196

#### 駒形嘉紀

- Sagawa K, Nagatani K, Komagata Y, and Yamamoto K. Angiotensin receptor blockers (ARBs) suppress antigen specific T cell responses and ameliorate collagen induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum* (in press)
- Kobari Y, Misaki Y, Setoguchi K, Zhao W, Komagata

Y, Kawahata K, Iwakura Y, and Yamamoto K. T cells accumulating in the inflamed joints of a spontaneous murine model of rheumatoid arthritis become restricted to common clonotypes during disease progression. *Int Immunol* 16: 131-138, 2004

- Maron R, Slavin AJ, Hoffmann E, Komagata Y, Weiner HL. Oral tolerance to copolymer 1 in myelin basic protein (MBP) TCR transgenic mice: cross-reactivity with MBP-specific TCR and differential induction of anti-inflammatory cytokines. *Int Immunol.* (2002) 14:131-138

#### 坂口志文

- Sakaguchi, S.: Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature Immunol* (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.: T lymphocytes: Regulatory. *Nature Encyclopedia of Life Sciences.* (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.

- 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.
- 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.
- Fehervari, Z., and Sakaguchi, S.: CD4+ regulatory T cells and immune control. *J. Clin. Invest.* 114:1209-117, 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+ regulatory CD4+ T cells. *J. Immunol.* 172: 7306-7314, 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.
- 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+ T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection. *Immunity.* 20: 1-20, 2004.
- Kajiura, F., S. 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.
- Sakaguchi, S.: Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Ann. Rev. Immunol.* 22:531-562, 2004
- 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
- Sakaguchi, S.: The origin of *FOXP3*-expressing CD4+ regulatory T cells: thymus or periphery. *J. Clin. Invest.* 112: 1310-1312, 2003.
- Sakaguchi, S.: Taming transplantation by regulatory T cells. *Nature Medicine* 9: 1117-1118, 2003.
- Hori, S., Takahashi, T., and Sakaguchi, S. Control of autoimmunity by natural regulatory T cells. *Adv. Immunol.* 81: 329-369, 2003.
- Sakaguchi, S. Control of immune responses by naturally arising CD4+ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 197: 397-401, 2003.
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S.: Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 299: 1057-1061, 2003.
- Wood, K. and Sakaguchi, S. Regulatory T cells in transplantation. *Nature Rev. Immunol.* 3: 199-210, 2003.
- Sakaguchi, S. Regulatory T cells: mediating

compromises between host and parasite. *Nature Immunol.* 4: 10-11, 2003.

- Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S: Stimulation of CD25+ CD4+ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nature Immunol.* 3: 135-142, 2002

#### 高柳 広

- Gohda, J., Akiyama, T., Koga, T., Takayanagi, H., 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)
- Tanaka, S. and Inoue, J. RANK-mediated amplification of TRAF6 signaling leads to NFATc1 induction during osteoclastogenesis. *EMBO* 24(4),790-799(2005)
- Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T. and Taniguchi, T. Stat1-mediated cytoplasmic attenuation in osteoimmunology. *J Cell Biochem* 94, 232-240(2005)
- 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

- Kim, S., Koga, T., Isobe M, Kern BE, Yokochi T, Chin YE, Karsenty G, Taniguchi T, Takayanagi H: Stat1 functions as a cytoplasmic attenuator of Runx2 in the transcriptional program of osteoblast differentiation. *Genes Dev* (2003)17, 1979-1991
- Takayanagi, H., Kim, S., Matsuo, K., Suzuki, H., Suzuki, T., Sato, K., Yokochi, T., Oda, H., Nakamura, K., Ida, N., Wagner, E. F. & Taniguchi, T. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of IFN- $\beta$ . *Nature* (2002) 416, 744-749
- Takayanagi, H., Kim, S., Koga T., Nishina H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J-I, Wagner, E. F., Mak T. W., Kodama, T., and Taniguchi, T. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling for terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* (2002) 3, 889-901
- Ogasawara, K., Hida, S., Weng, Y., Saiura, A., Sato, K., Takayanagi, H., Sakaguchi, S., Yokochi, T., Kodama, T., Naitoh, M., De Martino, J. A. & Taniguchi, T. Requirement of the IFN- $\alpha$  /  $\beta$ -induced CXCR3 chemokine signalling for CD8+ T cell activation. *Genes Cells* (2002) 7, 309-320

#### 竹内 勤

- Takeuchi T, Tsuzaka K, and Abe T. Altered expression of the T cell receptor-CD3 complex in systemic lupus erythematosus. *Int Rev Immunol* in press
- Tsuzaka K, Fukuhara I, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, and Takeuchi T. Forced

expression of TCR  $\zeta$  mRNA with alternatively spliced 3' untranslated region found in SLE patients lead to decreased production and cell surface expression of TCR  $\alpha$ - and TCR-CD3 complex. *J Immunol* 171: 2496-2503, 2003

- Pang M, Setoyama Y, Tsuzaka K, Yoshimoto K, Amano K, Abe T, and Takeuchi T. Defective expression and tyrosine phosphorylation of the T cell receptor  $\zeta$  chain in peripheral blood T cells from systemic lupus erythematosus patients. *Clin Exp Immunol* (2002) 129: 160-169.
- Tsuzaka T, Onoda N, Yoshimoto K, Zhang L, Pang M, Abe T, and Takeuchi T. Alternatively spliced 3' untranslated region of TCR  $\zeta$  mRNA in the peripheral blood T cells of systemic lupus erythematosus patients. *Modern Rheum* (2002) 12: 167-173

#### 田村直人

- 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
- Takaya M, Tamura N, Kato K, Kobayashi S, Haruta K, Tajima M, Hara M, Yang K, Tsuda H, Hashimoto H: CD154 expression and mRNA stability of activated CD4 positive T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol* 13: 220-6, 2003

#### 西本憲弘

- 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* 52:818-825, 2005.

- 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* 50:1761-1769, 2004.

- 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* 21:491-501, 2004

- Nishimoto N, Yoshizaki K, Maeda K, Kuritani T, Deguchi H, Sato B, Imai N, Suemura M, Kakei T, Takagi N, Kishimoto T. Toxicity, pharmacokinetics, and dose-finding study of repetitive treatment with the humanized anti-Interleukin 6 receptor antibody MRA in rheumatoid arthritis. Phase I/II clinical study. *J Rheum* 2003; 30: 1426-1435.

- Nakahara H, Song J, Sugimoto M, Hagihara K, Kishimoto T, Yoshizaki K, Nishimoto N. Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor (VEGF) production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003; 48: 1521-1529.

- Choy EH, Isenberg DA, Garrood T, Farrow S, Ioannou Y, Bird H, Cheung N, Williams B, Price R, Yoshizaki K, Nishimoto N, Kishimoto T, Panay GS. Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin 6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Arthritis Rheum* (2002) 46: 3143-3150.

#### 野島美久

- Ikeuchi H, Nojima Y, et al. Expression of Interleukin-22 in Rheumatoid Arthritis: A potential role of proinflammatory cytokine. *Arthritis Rheum* (in

press)

- Yamashita S, Maeshima A, Kojima I, Nojima Y. Activin A is a potent activator for renal interstitial fibroblasts. *J Am Soc Nephrol* 15: 91–101, 2004
- Ota F, Maeshima A, Yamashita S, Ikeuchi H, Kaneko Y, Kuroiwa T, Hiromura K, Ueki K, Kojima I, Nojima Y. Activin A induces cell proliferation of fibroblast-like synoviocytes of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48:2442–2449, 2003
- Takagi C, Ueki K, Ikeuchi H, Kuroiwa T, Kaneko Y, Tsukada Y, Mawzawa A, Mitaka T, Sasaki T, Nojima Y: Increased expression of cell adhesion kinase – in human and rat crescentic glomerulonephritis. *Am J Kid Dis*, 2002, 39:174–82
- Tanaka T, Kuroiwa T, Ikeuchi H, Ota F, Kaneko Y, Ueki K, Tsukada Y, McInnes IB, Boumpas DT, Nojima Y. Human platelets stimulate mesangial cells to produce monocyte chemoattractant protein-1 via the CD40/CD40 ligand pathway and may amplify glomerular injury. *J Am Soc Nephrol* 2002, 13:2488–96
- Maeshima A, Maeshima K, Nojima Y, Kojima I: Involvement of Pax-2 in the action of activin A on tubular cell regeneration. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13: 2850–2859

#### 針谷正祥

- Gotoh H, Kawaguchi Y, Harigai M, Hara M, Saito S, Yamaguchi T, Shimada K, Kawamoto M, Tomatsu T, Kamatani N. Increased CD40 expression on articular chondrocytes from patients with rheumatoid arthritis: contribution to production of cytokines and matrix metalloproteinases. *J Rheumatol* 31: 1506–12, 2004
- Harigai M, Hara M, Kawamoto M, Kawaguchi Y, Sugiura T, Tanaka M, Nakagawa M, Ichida H, Takagi K, Higami-Ohsako S, Shimada K, Kamatani N. Amplification of the synovial inflammatory response

through activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor kappaB using ligation of CD40 on CD14+ synovial cells from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50: 2167–77, 2004.

- Kawaguchi Y, Takagi K, Hara M, Fukasawa C, Sugiura T, Nishimagi E, Harigai M, Kamatani N. Angiotensin II in the lesional skin of systemic sclerosis patients contributes to tissue fibrosis via angiotensin II type 1 receptors. *Arthritis Rheum* 50: 216–26, 2004.
- Fukasawa C, Kawaguchi Y, Harigai M, Sugiura T, Takagi K, Kawamoto M, Hara M, Kamatani N. Increased CD40 expression in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis (SSc): role of CD40-CD154 in the phenotype of SSc fibroblasts. *Eur J Immunol* 33: 2792–800, 2003.
- Kawaguchi Y, Tochimoto A, Ichikawa N, Harigai M, Hara M, Kotake S, Kitamura Y, Kamatani N. Association of IL1A gene polymorphisms with susceptibility to and severity of systemic sclerosis in the Japanese population. *Arthritis Rheum* 48: 186–92, 2003.
- Sugiura T, Harigai M, Kawaguchi Y, Takagi K, Fukasawa C, Ohsako-Higami S, Ohta S, Tanaka M, Hara M, Kamatani N. Increased IL-15 production of muscle cells in polymyositis and dermatomyositis. *Int Immunol* 14: 917–24, 2002.

#### 南康博

- Sakakida, Y., Miyamoto, Y., Nagoshi, E., Akashi, M., Nakamura, T. J., Mamino, T., Kasahara, M., Minami, Y., Yoneda, Y., and Takumi, T.: Importin mediates nuclear transport of a mammalian circadian clock component, mCRY2, together with mPER2 through a bipartite nuclear localization signal. *J. Biol. Chem.*, (in press)
- Schwabe, G. C., Trepczyk, B., Suring, K., Brieske,



- N., Tucker, A., Sharpe, P. T., Minami, Y., and Mundlos, S.: The Ror2 knock out mouse as a model for the developmental pathology of autosomal recessive Robinow syndrome. *Dev. Dyn.* 229: 400-410, 2004.
- Kondo, T., Kobayashi, M., Tanaka, J., Yokoyama, A., Suzuki, S., Kato, N., Onozawa, M., Chiba, K., Hashino, S., Imamura, M., Minami, Y., Minamino, N., and Asaka, M. Rapid degradation of Cdt1 upon UV-induced DNA damage is mediated by SCFSkp2 complex. *J. Biol. Chem.* 279: 27315-27319, 2004.
- Kani, S., Oishi, I., Yamamoto, H., Suzuki, H., Yoda, A., Suzuki, H., Nomachi, A., Iozumi, K., Nishita, M., Takumi, T., Kikuchi, A., and Minami, Y.: The receptor tyrosine kinase Ror2 associates with and is activated by casein kinase I $\gamma$ . *J. Biol. Chem.* 279: 50102-50109, 2004.
- Sammar, M., Stricker, S., Schwabe, G., Seiber, C., Hartung, A., Hanke, M., Oishi, I., Pohl, J., Minami, Y., Sebald, W., Mundlos, S., and Knaus, P.: Modulation of GDF5/BRI $\gamma$  signaling through interaction with the tyrosine kinase receptor Ror2. *Genes Cells* 9: 1227-1238, 2004.
- Kato, N., Fujimoto, H., Yoda, A., Oishi, I., Matsumura, N., Kondo, T., Tsukada, J., Tanaka, Y., Imamura, M., and Minami, Y.: Regulation of Chk2 gene expression in lymphoid malignancies: involvement of epigenetic mechanisms in Hodgkin's lymphoma cell lines. *Cell Death Diff.*, 2 (S): 153-161, 2004.
- Oishi I, Suzuki H, Onishi N, Takada R, Kani S, Ohkawara B, Koshida I, Suzuki K, Yamada G, Mundlos S, Shibuya H, Takada S, Minami Y: The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signaling pathway. *Genes Cells* 8: 645-654, 2003
- Matsuda T, Suzuki H, Oishi I, Kani S, Kuroda Y, Komori T, Sasaki A, Watanabe K, Minami Y: The receptor tyrosine kinase Ror2 associates with the MAGE-family protein Dlxin-1 and regulates its intracellular distribution. *J Biol Chem* 278: 29057-29064, 2003
- Yoneda, O., Imai, T., Nishimura, M., Miyaji, M., Mimori, T., Okazaki, T., Domae, N., Fujimoto, H., Minami, Y., Kono, T., Bloom, E. T., and Umehara, H.: Membrane bound form of fractalkine induces IFN- $\gamma$  production by NK cells. *Eur. J. Immunol* (2003) 33, 53-58
- Tanaka, Y., Nakayamada, S., Fujimoto, H., Okada, Y., Umehara, H., Kataoka, T., and 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

## H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

### 1. 特許取得

田中良哉

- Fas 抗原発現増強剤(特開 2003-171282)

坂口志文

- Foxp3 発現リンパ球による免疫病の治療法(特許)  
○ 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)

竹内勤

- 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)  
○ 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

該当なし。

### 3. その他

該当なし。

## 【Ⅲ】総合研究報告

## 細胞活性化シグナルにおける lipid raft-スフィンゴ脂質の機能解析に関する研究

分担研究者 梅原 久範 金沢医科大学血液免疫制御学 教授

### 研究要旨

本研究は、全身性エリテマトーデスにおける免疫異常を細胞活性化シグナル伝達の中心である細胞膜マイクロドメイン(lipid raft)の面から明らかにすることにある。基礎的検討として、Fas 発現 WR19L 細胞よりスフィンゴミエリン欠損株 WR/Fas-SM(-)を樹立し、我々がクローニングした sphingomyelin synthase gene(SMS-1)を遺伝子導入したスフィンゴミエリン合成回復株(WR/Fas-SMS1)を樹立した。両細胞における Fas 誘導アポトーシスの差異を検討した結果、Fas 抗体架橋刺激により、SMS1 細胞は SM(-)細胞に比べ、有意に Fas の凝集、アポトーシスシグナルが誘導された。ラフトへの Fas の移動およびラフトでのセラミド合成能は、WR/Fas-SMS1 細胞で有意に増加していた。このことは細胞膜におけるスフィンゴミエリンが、ラフトの形成およびアポトーシスシグナル伝達に重要であることを示唆している。臨床的検討として、全身性エリテマトーデス患者リンパ球のラフト発現を解析し、SLE 患者 T 細胞および B 細胞におけるラフト発現が増強していることを認めた。T 細胞分画では、調節性 T 細胞と思われる CD25 陽性分画およびメモリー細胞である CD45 陽性分画におけるラフト発現が増強しており、SLE 患者における免疫異常にラフト機能の異常が関与している可能性がある。

### A. 研究の目的:

膠原病では、免疫系の異常な賦活化により自己反応性T細胞の出現や自己抗体の産生など多彩な免疫異常が起こる。臨床的には多臓器に細胞浸潤による臓器傷害が認められる。近年、細胞の活性化にスフィンゴミエリンとコレステロールからなる細胞膜脂質ドメイン (lipid rafts:ラフト)が重要な役割を担っていることが報告されている。しかし、ラフトを本質的に構成しているスフィンゴミエリンそのものについての解析はほとんど見られない。我々はスフィンゴミエリン合成酵素の遺伝子同定を行い、細胞活性化のシグナル伝達におけるスフィンゴミエリンの重要性を明らかにする。また、膠原病における免疫異常を、末梢血リンパ球におけるラフト発現の面より解析する。

### B. 研究方法:

- 1) ヒト Fas 発現マウス胸腺細胞株(WR19L/Fas)から、スフィンゴミエリン合成酵素欠損細胞株 (WR/Fas-SM(-))を樹立した。
- 2) 樹立されたスフィンゴミエリン合成酵素欠損細胞株

にスフィンゴミエリン合成酵素を導入した回復株 (WR/Fas-SMS1)を樹立した。

- 3) スフィンゴミエリン欠損/回復 両細胞株のスフィンゴミエリン量、ガングリオシド GM1 量、Fas 発現量をフローサイトメトリー(FACS)および共焦点顕微鏡で検討した。
- 4) スフィンゴミエリン欠損/回復細胞株における、Fas 架橋刺激によるアポトーシスの相違を FACS を用いた sub-G1 法で検討した。
- 5) スフィンゴミエリン欠損/回復細胞株におけるラフトおよび Fas の凝集を共焦点顕微鏡で検討した。
- 6) スフィンゴミエリン欠損/回復細胞株において、Fas 架橋刺激によるアポトーシスシグナルの相違をカスパーゼ活性により検討した。
- 7) スフィンゴミエリン欠損/回復細胞株において、Fas のラフトへの移行をシヨ糖密度比重遠心法を用いて検討した。
- 8) スフィンゴミエリン欠損/回復細胞株におけるラフト内セラミド産生について検討した。
- 9) SLE 患者および正常者末梢血より単核球を分離し、

PE 標識-抗 CD3, CD4, CD8, CD19, CD14, CD56 抗体と FITC 標識 cholera toxin B とで 2 重染色しラフト発現強度を FACS 解析した。

- 10) T 細胞を CD25 陽性調節性 T 細胞分画と CD45 陽性メモリー分画に細分し、ラフトの発現を解析した。
- 11) 末梢リンパ球を PMA およびイオノマイシンで刺激し、リンパ球活性化経過における CD45RO およびリポドラフト発現について経時的变化を解析した。

(倫理面への配慮)

当該年度は、臨床検体や実験動物を使用しておらず、倫理的問題に抵触しない。

### C. 研究結果

- 1) マウス胸腺細胞株(WRL19)にヒト Fas 遺伝子を導入した細胞株(WR/Fas)から、スフィンゴミエリンに特異的に結合するライセニンを用いて、スフィンゴミエリン欠損株、WR/Fas-SM(-)を樹立した。
- 2) 次に、多剤耐性を示す HL60 細胞株から我々がクローニングしたスフィンゴミエリン合成酵素遺伝子(SMS-1)を WR/Fas-SM(-)細胞に遺伝子導入し、G418 およびグルコシルセラミド合成酵素阻害剤の存在下に培養を継続し、スフィンゴミエリン合成回復株 WR/Fas-SMS1 を樹立した。
- 3) WR/Fas-SM(-)と WR/Fas-SMS1 における細胞膜脂質含量を FACS にて検討したところ、ガングリオシド GM1 および Fas の発現は両細胞で同程度であったが、スフィンゴミエリンに特異的に結合するライセニンによる染色は WR/Fas-SMS1 においてのみ認められた。
- 4) 同様に、WR/Fas-SM(-)と WR/Fas-SMS1 における細胞膜脂質含量を共焦点顕微鏡にて検討したところ、ガングリオシド GM1 および Fas は両細胞で同程度に染色されたが、ライセニンによる染色は WR/Fas-SMS1 においてのみ確認された。
- 5) IgM anti-Fas Ab(CH11)による架橋刺激により、WR/Fas-SMS1 は WR/Fas-SM(-)に比べ、有意に高頻度にアポトーシスを起こした。
- 6) 両細胞の CH11 架橋刺激によるアポトーシスシグナル経路を検討した結果、WR/Fas-SM S1 細胞では、有意に Fas の凝集が亢進していた。同様に、

WR/Fas-SM S1 細胞では DISC の形成、カスパーゼの活性化が増強していた。

- 7) 両細胞における Fas のラフトへの局在を検討したところ、非刺激時には両細胞に同程度の Fas が存在するが、Fas 架橋刺激により WR/Fas-SM S1 細胞では多量の Fas がラフト内へ移行した。
- 8) 両細胞におけるラフト内セラミド量を測定したところ、WR/Fas-SM S1 細胞では Fas 架橋刺激により有意な産生亢進が確認された。
- 9) 細胞外セラミド添加によるアポトーシスおよび Fas 凝集について検討したところ、両細胞におけるアポトーシスは増強したが、WR/Fas-SM (-)細胞のアポトーシスは WR/Fas-SM S1 細胞レベルには回復しなかった。
- 10) 非刺激末梢リンパ球のラフト発現は低値であるが、SLE 患者 T 細胞および B 細胞のラフト発現は正常者にくらべて有意に増強していた。
- 11) CD14 陽性単球および CD56 陽性 NK 細胞のラフト発現はリンパ球に比べ高く、SLE 患者でリンパ球と同様に増強していた。
- 12) SLE 患者 T 細胞分画では、調節性 T 細胞と思われる CD25 陽性分画およびメモリー細胞である CD45 陽性分画におけるラフト発現が増強していた。
- 13) リンパ球の PMA とイオノマイシン刺激により、細胞表面の CD45RO およびラフト発現量が増加した。

### D. 考察

細胞膜レセプターは、細胞接着時およびそのリガンドによる活性化の際に凝集しラフトに集積することが明らかになっている。今回我々は、ラフト構成に重要なスフィンゴミエリン欠損株 SM(-)とスフィンゴミエリン合成回復株(SMS-1)の樹立に成功した。両細胞株は Fas を含め他の細胞膜蛋白の発現および脂質組成に差が無く、細胞活性化シグナルにおけるラフト機能およびスフィンゴミエリン解析のモデルになると確信する。WR/Fas-SM S1 細胞では Fas 架橋刺激によるアポトーシス、death シグナル、Fas の凝集能が有意に増強していた。このことは、細胞膜スフィンゴミエリンが、ラフトの形成および活性化刺激の足場となるラフトの凝集に重要であることを示している。スフィンゴミエリンは活性化によりセラミドに代謝されるが、ラフト内におけるセラミド産生は、WR/Fas-SM S1 細胞でのみ産生が増強された。しかし、