

厚生科学研究費補助金
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17年度 総括・分担研究報告書

平成18年3月

主任研究者
小池 隆 夫

－ 目 次 －

(1) 構成員名簿	1
(2) 総括報告書	3
(3) 分担研究報告書	7
1. 膠原病の難治性病態である自己免疫性血栓形成に関する研究 小池 隆夫	7
2. 免疫・炎症反応の抑制に関与するユビキチン化酵素の解析 畠山 鎮次	12
3. TGF- β アンタゴニストを介した自己免疫疾患の制御に関する研究 住田 孝之	14
4. 新規サイトカイン Interleukin-32 による炎症性関節炎の病態への関与に関する研究 山本 一彦	19
5. 新規多発性筋炎モデルマウスの確立に関する研究 上阪 等	22
6. NKT 細胞を指標的とした治療戦略に関する研究 山村 隆	26
7. 制御性T細胞を用いた自己免疫の抑制に関する研究 坂口 志文	30
8. SLE に対する抗 CD20 抗体療法の開発に関する研究 田中 良哉	34
9. 難治性自己免疫疾患に対する自己末梢血 CD34 陽性細胞移植に関する研究 原田 実根	38
10. 自己免疫疾患における自己抗体産生 B 細胞を標的とした治療の開発 長澤 浩平	42
(4) 研究成果の刊行に関する一覧	51

(1) 構成員名簿

平成17年度 構成員名簿
(H17-免疫-011)

区 分	氏 名	所 属	職名
主任研究者	小池 隆夫	北海道大学大学院医学研究科 病態内科学講座・第二内科	教授
分担研究者 (50音順)	上阪 等	東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科膠原病・リウマチ内科学	助教授
	坂口 志文	京都大学再生医科学研究所 生体機能調節学	教授
	住田 孝之	筑波大学大学院人間総合科学研究科 先端応用医学専攻臨床免疫学分野	教授
	田中 良哉	産業医科大学医学部 第一内科学講座	教授
	畠山 鎮次	北海道大学大学院医学研究科 分子生化学講座分子医化学分野	教授
	原田 実根	九州大学大学院医学研究院 病態修復内科学	教授
	長澤 浩平	佐賀大学医学部 内科学講座、膠原病・リウマチ部門	教授
	山村 隆	国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第六部	部長
	山本 一彦	東京大学大学院医学系研究科 内科学専攻アレルギーリウマチ学	教授
事務局	渥美 達也	北海道大学大学院医学研究科 病態内科学講座・第二内科 〒060-8638 札幌市北区北15条西7丁目 TEL (011) 706-5915 FAX (011) 706-7710	講師
経理事務担当	新見 雅之	北海道大学大学院医学研究科 経理掛 TEL (011) 706-5009 FAX (011) 706-7873 e-mail:keiri@med.hokudai.ac.jp	

(2) 総括研究報告書

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）
総括報告書

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 小池 隆夫

北海道大学大学院医学研究科 病態内科学講座・第二内科 教授

分担研究者

畠山 鎮次	北海道大学大学院医学研究科 分子生化学講座分子医化学分野 教授
住田 孝之	筑波大学大学院人間総合化学研究科先端応用医学専攻臨床免疫学分野 教授
山本 一彦	東京大学大学院医学系研究科 内科学専攻アレルギーリウマチ学 教授
上坂 等	東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 膠原病・リウマチ内科学 教授
山村 隆	国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第六部 部長
坂口 志文	京都大学再生医科学研究所 生体機能調節学 教授
田中 良哉	産業医科大学医学部 第一内科学講座 教授
原田 実根	九州大学大学院医学研究院 病態修復内科学 教授
長澤 浩平	佐賀大学医学部 内科学講座 膠原病・リウマチ部門 教授

研究総括要旨

本研究班は、基礎免疫学、臨床免疫学ならびに分子生物学の分野で世界をリードしている 10 人で研究組織を構成し、難治性の全身性の自己免疫疾患を中心とした新規治療法の確立と開発を目指している。本年度の研究対象は多岐にわたり、すでに臨床応用されたものから、近未来に应用可能なものまで多大な成果を上げることができた。今後、本研究班員の議論と技術的交流を通じて、免疫疾患の克服にむけてさらなる先端的かつオリジナリティーの高い研究成果を目指したい。

A.研究目的

わが国では、免疫難病の治療開発という領域は未だ未成熟であり、欧米の後塵を拝しているのが現状である。しかし、本研究班は基礎および臨床免疫学の分野で世界をリードしている 10 人で研究組織を構成し、班員の議論と技術的交流を通じて、先端的かつオリジナリティーの高い研究成果を目指している。

B.研究方法

- ① 小池は、SLE の死因の 25%を占める難治性病態である抗リン脂質抗体症候群（APS）の発症機構を解明し、さらには APS の病態制御を図ることを目的に、抗リン脂質抗体による細胞刺激シグナル、細胞活性化メカニズムについての検討を行った。さらに、生化学的に単球系細胞の細胞表面タ

- ンパク質のなかで抗リン脂質抗体の対応抗原である β_2 GPI と相互作用する分子を同定することで、細胞内シグナルの下流の解明の検討を試みた。
- ② 畠山はリウマチ性疾患を含む炎症性疾患のサイトカイン、特に TNF α 、インターロイキン-1、LPS 受容体などの炎症誘発性サイトカインが、NF- κ B の活性化を通じてその作用が仲介されることに注目し、ユビキチン化を進行させる酵素（ユビキチンリガーゼ）とユビキチンを基質タンパク質からは必ず脱ユビキチン化酵素としての活性の両方を有するユビキチン化修飾酵素（ubiquitin editing enzyme）として報告されている A20 を中心に、A20 結合タンパク質を同定することで A20 の上流の制御分子及び下流の基質分子を網羅的に同定することを目指し、分子レベルでの NF- κ B シグナルにおける抑制機序を解明した。
- ③ 住田は強皮症の皮膚硬化病変、肺病変やループス腎炎は難治性の病態形成に、免疫制御作用や催線維化作用を有するサイトカインである TGF- β の作用や発現量の過剰が関与していることに注目し、TGF- β の作用に拮抗する薬剤のこれらの疾患治療に対する有効性、安全性を検討した。
- ④ 山本は新規サイトカイン Interleukin-32 (IL-32) が TNF- 産生を誘導するヒトサイトカインであることに注目し、関節リウマチの病態形成に強く TNF- が関与していることから、IL-32 も炎症性関節炎の重要なメディエーターであることが予想され、IL-32 による炎症性関節炎の病態形成への関与を検討した。
- ⑤ 上坂は通常の免疫操作で作成できる筋炎とは異なる、純化抗原として組換えヒト骨格筋 C 蛋白を用いて、種々の遺伝子変異マウスが知られている C57BL/6 マウスで筋炎モデルマウスを確立し、詳細な検討を加えた。
- ⑥ 山村は多発性硬化症、関節リウマチなどの自己免疫疾患における invariant V 24 NKT (iNKT) 細胞の役割を研究するとともに、iNKT を特異的に刺激することによって自己免疫疾患病態を抑制する合成糖脂質抗原の探索を行ってきたが、これらの研究の過程で、関節リウマチのモデルである K/BxN 血清移入関節炎を強く抑制する合成糖脂質群を発見しその詳細な特異性を検討した。
- ⑦ 坂口は自身が発見した、CD25 陽性 T 細胞の約 10% を占める制御性 T 細胞につき、CD25 分子とともに転写因子 Foxp3 を恒常的に発現することを示し、その異常が自己免疫病の原因となるとともに、内在性制御性 T 細胞の強化により自己免疫病の治療・予防が可能である点に研究の主眼をおいている。マウス、ヒトの CD25 陽性 CD4 陽性の制御性 T 細胞を、それぞれラット、マウスに免疫し、制御性 T 細胞特異的マーカーを認識する単クローン抗体、および制御性 T 細胞機能を操作できるアゴニステックあるいはブロック抗体を作製し、試験管内での制御性 T 細胞機能の解析、および得られた単クローン抗体をマウスに投与し、免疫応答におよぼす効果を解析した。
- ⑧ 田中は B 細胞リンパ腫を対象に使用されている SLE はリツキシマブを用いた CD20 抗体療法を、これまで既存の治療に抵抗性の重症 SLE 5 症例を対象に用いたパイロットスタディを実践し、高い臨床効果を得てきた。今回、ステロイドや免疫抑制剤などの既存の治療に抵抗性を示した重症 SLE の 8 症例に対し、CD20 抗体リツキシマブ 375mg/m²/週を 2 回投与し、臨床症候、検査成績、画像所見などを検討した。また、治療抵抗性の SLE に対して新 GCP 準拠第 I / II 相臨床試験を実践した。
- ⑨ 原田はあらゆる治療に抵抗性で予後不良または著しい QOL の低下を来す自己免疫疾患に対する新規治療法としての自己末梢血幹細胞移植(auto-PBSCT)の安全性と有効性を検討した。末梢血幹細胞の動員には CY4g/m²に引き続き G-CSF を投与しアフエレーシスによって大量の末梢血幹細胞採取

を行った。採取した末梢血単核球は自己反応性のリンパ球を除去する目的で CliniMACS を用いて CD34 陽性細胞に純化した。移植前治療としては CY200mg/kg を単独投与し、移植当日に 2×10^6 /kg 以上の CD34 陽性細胞を輸注した。

- ⑩ 長澤は正常 B 細胞に発現する RP105 に注目し、B 細胞活性化が存在する全身性エリテマトーデス(SLE)などの自己免疫疾患で、RP105 分子の発現を解析し、疾患活動性や自己抗体産生との関連を検討した。また、RP105 陰性 B 細胞のフェノタイプの FACS 解析を行った。RP105 陰性 B 細胞が自己抗体産生を行うかを *in vitro* で確認した。さらに RP105 陰性 B 細胞を標的とするために同細胞に特異的に発現している分子の同定を試みた。

C.研究結果

- ① ヒトモノクローナル β_2 グリコプロテイン I 依存性抗カルジオリピン抗体 (抗 CL/ β_2 GPI 抗体) の刺激による遺伝子に発現の変動を検討したところ、MAPK 経路の変動が認められた。抗 CL/ β_2 GPI 抗体刺激による MAPK の影響を詳細に調べたところ、特に p38 MAPK のリン酸化の上昇が観察された。またリコンビナント FLAG タグ β_2 GPI を使用した抗 FLAG 抗体アフィニティークロマトグラフィーにより β_2 GPI 関連プロテオームを分離し、質量分析解析により複数のタンパク質が同定された。
- ② 酵母ツーハイブリッド法により、ユビキチン化修飾酵素 A20 の結合タンパク質として C3orf6 (チロシンリン酸化を高度に受けるタンパク質) が同定された。生化学的解析より、C3orf6 は NF- κ B 経路と Ras-MAP キナーゼ経路をリンクし、細胞増殖や細胞死を制御していることが推測された。
- ③ TGF- β 拮抗阻害薬の生体長期投与は安全であることが確認された。今後は自己免疫疾患に合併する線維化病変、間質性病変に

対する有効性について検討すると共に、自己免疫性炎症を増悪する副作用の可能性について検討を重ねる。

- ④ IL-32 は炎症性関節炎の重要なメディエーターのひとつであり、RA の病態形成に関与していると考えられた。IL-32 は RA 治療の新たなターゲットとなりうる。
- ⑤ 組換え C 蛋白フラグメントを C57BL/6 マウスに免疫して、新たな多発性筋炎のモデルマウスを作成した。この筋炎モデルは、簡便な手技で、短期に作成が出来、しかも遺伝子改変マウスを使用した解析が可能であるという特長がある。また、 γ グロブリン大量療法が効果を示し、今後、筋炎の治療効果の判定や新規治療法の開発に有用なモデルであることが示された。
- ⑥ 合成糖脂質(SGL)を用いた NKT 細胞の機能調節は、多発性硬化症、関節リウマチなどの自己免疫疾患の新しい治療戦略となりうるということが明らかになった。
- ⑦ 活性化 T 細胞と制御性 T 細胞を弁別できる抗体を作製した。この抗体の認識する分子をマーカーとして、進行中の生理的、病的免疫応答を操作できた。この分子マーカーは、自己免疫病における制御性 T 細胞の役割を解析するのに有用である。また、この分子を発現する T 細胞を選択的に採取、増殖させれば、自己免疫病の治療に適用できる。
- ⑧ B 細胞に特異的に発現する CD20 抗原を標的とする CD20 抗体リツキシマブは、従来の治療に抵抗性の難治性 SLE に奏効し、寛解導入を齎した。
- ⑨ 治療不応性の自己免疫疾患に対する auto-PBSCT の安全性および有効性が確認された。大量免疫抑制療法と auto-PBSCT を受けた 11 例では 1 例も治療関連死を認めず、安全性に関しては良好な結果であった。しかし移植片よりリンパ球が除去されているため高頻度にウイルス感染を認めた。
- ⑩ 正常 B 細胞は RP105 を発現するが、SLE で

は、RP105 の発現を欠損した B 細胞が出現していた。また、RP105 陰性 B 細胞数は SLE の疾患活動性と相関し、疾患活動性マーカーとして有用であった。自己抗体産生 RP105 陰性 B 細胞を標的とすることにより、病的細胞に限定した、より効果的かつ安全な治療法が開発できると考えられた。

D. 考察

欧米では、免疫担当細胞分子に対するモノクローナル抗体療法、小分子による遺伝子阻害薬遺伝子治療、細胞療法など、多岐にわたる免疫疾患の治療法が開発が進んでいる。しかし、実際には一部の抗体療法(関節リウマチに対する TNF α 阻害療法など)を除いては未だ世界的なコンセンサスを得たものではなく、さらなる研究開発の必要性が提言されている。

わが国の基礎免疫学は世界的レベルにあり多くの研究成果を輩出してきた。その中には、純生物学的な成果のみならず、免疫疾患の治療にも応用可能なものが含まれている。しかし、基礎免疫学の成果と臨床免疫学を橋渡しする、いわば「応用免疫学」とでもよばれる分野の発達はわが国ではかならずしも十分ではなく、むしろ欧米の後塵を拝しているのが現状であった。

しかし今回の報告でも示したように、リツキサンや造血幹細胞移植等すでに他分野で使用されている薬剤や治療の方法論が、自己免疫疾患の分野でも現実的に応用が可能となった。さらには、分子阻害による抗リン脂質抗体症候群の新たな治療法の確立、TGF β アゴニストによる強皮症やループス腎炎等の繊維化病変の治療応用、ユビキチン化酵素や NKT 細胞の機能調節による免疫・炎症反応の抑制、新規際とカイン IL-32 をターゲットとした新たな関節リウマチの治療戦略、CD4 陽性 CD25 陽性の抑制性 T 細胞や自己抗体産性 B 細胞を弁別できる方法論の確立等、新しい治療に応用可能な確実な研究成果が得られた。

E. 総括

「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」を基礎免疫学、臨床免疫学ならびに分子生物学の分野で世界をリードしている 10 人で本年度から開始したが、すでに臨床応用されたものから、近未来に応用可能なものまで多大な成果を上げることができた。

(3) 分担研究報告書

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）
分担研究報告書

抗リン脂質抗体による向血栓細胞活性化の機序に関する研究

主任研究者 小池 隆夫 北海道大学大学院医学研究科病態内科学講座・第二内科 教授
研究協力者 渥美 達也 北海道大学大学院医学研究科病態内科学講座・第二内科 講師
坊垣 幸 北海道大学大学院医学研究科分子生化学講座 医員

研究要旨

抗リン脂質抗体症候群 (Antiphospholipid syndrome: 以下 APS) は $\beta 2$ グリコプロテイン I (以下 $\beta 2$ GPI) 依存性抗カルジオリピン抗体 (以下抗 $\beta 2$ GPI 抗体) をはじめとする抗リン脂質抗体と総称される一群の自己抗体が引き起こす自己免疫性血栓性疾患である。血管内皮細胞や単球系細胞に直接作用し、凝固のイニシエーターである組織因子 (tissue factor: 以下 TF) を細胞表面に発現することにより凝固系を活性化することにより、易血栓性が誘導されることが知られている。抗リン脂質抗体の主要な対応抗原として、 $\beta 2$ GPI やプロトロンビン等の、リン脂質に結合した凝固・線溶を制御するタンパクがあげられるが、抗体が結合した後の細胞刺激シグナルについては明らかにされていない点が多い。今回我々は、抗リン脂質抗体による細胞刺激シグナルおよび $\beta 2$ GPI と抗 $\beta 2$ GPI 抗体と細胞膜表面分子との相互作用について検討を行った。抗 $\beta 2$ GPI 抗体の刺激によりヒト末梢血単核球で発現が増強する遺伝子発現の挙動について、cDNA アレイおよびリアルタイム PCR を用いて検討を行った。その結果、MAPK 経路が抗 $\beta 2$ GPI 抗体刺激による TF 発現に関わっていることが示唆された。さらに、単球系細胞株 RAW 264.7 を用い抗 $\beta 2$ GPI 抗体刺激による MAPK 経路のリン酸化についてウエスタンブロッティング法で検討したところ、p38 MAPK のリン酸化および NF- κ B 活性化が認められた。また特異的 p38 阻害薬 (SB203580) により p38 MAPK リン酸化が阻害され、TF 発現も抑制された。また、抗 $\beta 2$ GPI 抗体による p38 MAPK リン酸化は、 $\beta 2$ GPI 依存性であった。以上の結果より、p38 MAPK 経路は、抗リン脂質抗体刺激による単球からの TF 発現に重要な役割を果たしていると考えられ、また、p38 MAPK 経路の制御は、APS 患者の血栓向性に対する新たな治療法と成り得る可能性が示唆された。また、リコンビナント FLAG タグ $\beta 2$ GPI を使用した抗 FLAG 抗体アフィニティークロマトグラフィーにより $\beta 2$ GPI 関連プロテオームを分離し、質量分析解析により複数の $\beta 2$ GPI 結合タンパク質が同定され、 $\beta 2$ GPI 結合タンパクの制御という APS の新たな治療法の可能性が広がった。

A. 研究目的

抗リン脂質抗体症候群 (Antiphospholipid syndrome: 以下 APS) とは、多彩な動・静脈血栓症、習慣流産および血小板減少を主要徴候として、抗カルジオリピン抗体、ループスアンチコアグラントなどの抗リン脂質抗体 (リン脂質やリン脂質結合タンパク) に対する自己抗体の出現を特徴とする、難治性の自己免疫疾患である。抗リン脂質抗体症候群の本態は血栓症であ

り、現在ではリスクファクターの存在しない患者に認められる動・静脈血栓症のなかでも最も頻度が高いものとして位置づけられている。また最近では抗カルジオリピン抗体の存在と動脈硬化の関連も指摘されている。これまでの *in vitro* および *in vivo* の研究により、抗リン脂質抗体症候群では、 $\beta 2$ GPI 依存性抗カルジオリピン抗体をはじめとする一群の自己抗体が血管内皮細胞や単球系細胞などを刺激し、凝固反応のイ

ニシエーターとなる組織因子 (TF) を細胞表面に発現し凝固系を活性化することにより、易血栓性が誘導されるということを明らかにされてきた。さらに、抗 β 2GPI モノクローナル抗体や抗プロトロンビンモノクローナル抗体、または抗リン脂質抗体症候群患者から分離した抗リン脂質抗体を含むサンプルを用いて、血管内皮細胞・単球・マクロファージ細胞株に反応させ、MyD-88, NF- κ B の活性化を介して、組織因子の発現が起きることを明らかにしているが、抗体が対応抗原である β 2GPI やプロトロンビン等のリン脂質に結合した凝固・線溶を制御するタンパクに結合した後の細胞刺激シグナルについては明らかにされていない点が多い。抗リン脂質抗体による細胞刺激シグナル、細胞活性化メカニズムについて検討を行うことにより抗リン脂質抗体症候群発症機構を解明し、さらにシグナル伝達制御による病態制御を可能とすることを目的とした。さらに、生化学的に単球系細胞の細胞表面タンパク質のなかで β 2GPI と相互作用する分子を同定することで、細胞内シグナルの下流を解明することを目的とする。

B. 研究方法

末梢血単核球 (PBMC) および単球系細胞株を用いて、APS 患者の末梢血リンパ球より樹立したヒトモノクローナル IgM 型抗 β 2GPI 抗体により刺激し、検討を行った。cDNA アレイ、リアルタイム PCR 法により、抗 β 2GPI 抗体の刺激によるヒト PBMC での各種遺伝子の発現の変動を解析した。遺伝子発現解析の結果から、TNF α 、IL-1 β などの炎症性サイトカインやケモカインの発現亢進が認められた。さらに、単球系細胞株 RAW264.7 において、ウエスタンブロッティング法にて抗 β 2GPI 抗体刺激による p38 MAPK のリン酸化が検討した。また特異的 p38 阻害薬により、p38 MAPK リン酸化及び、TF 発現変動も調べた。

FLAG タグ β 2GPI 発現ベクターを構築し、HEK293T 細胞に発現させる。その後、培養上清中に分泌されるリコンビナント FLAG タグ

β 2GPI を、RAW264.7 の細胞溶解液と混合する。その混合物を使用し、抗 FLAG 抗体アフィニティークロマトグラフィーにより FLAG タグ β 2GPI と複合体を形成するタンパク質 (β 2GPI 関連プロテオーム) を網羅的に分離する。このサンプルを SDS-PAGE により分離しバンドとして確認できるものは MALDI-TOF を使用してタンパク質を同定する。もしくは SDS-PAGE のバンドに関係なくゲルを数 10 に均等に切り出し、すべてを ESI-LC-MS/MS により解析する。

C. 研究結果

末梢血単核球 (PBMC) および単球系細胞株に対してヒトモノクローナル IgM 型抗 β 2GPI 抗体により刺激した結果、cDNA アレイ、リアルタイム PCR 法により多くの遺伝子に発現の変動が認められた。そのなかでも、特に MAPK 経路の変動に注目した。そして抗 β 2GPI 抗体刺激による MAPK の影響を調べたところ、特に p38 MAPK のリン酸化が上昇することを認めた。さらに特異的 p38 阻害薬により、p38 MAPK リン酸化や TF 発現の変化が抑制された。また、 β 2GPI の非存在下では、抗 β 2GPI 抗体による p38 MAPK リン酸化は認められなかったため、この現象は β 2GPI 依存性であることが確認された。

シグナル配列を有した FLAG タグ β 2GPI 発現ベクターを HEK293T 細胞に発現させ、リコンビナント FLAG タグ β 2GPI を作製した。フローサイトメーターにより細胞表面結合能を検討したところ、リコンビナント FLAG タグ β 2GPI は内在性の β 2GPI とほぼ同じ活性を有することが確認された。また、抗 FLAG 抗体を使用することにより、ヒトモノクローナル IgM 型抗 β 2GPI 抗体より高親和性を有したアフィニティークロマトグラフィーが可能となった。RAW264.7 の細胞溶解液とリコンビナント FLAG タグ β 2GPI 混合し、抗 FLAG 抗体アフィニティークロマトグラフィーにより β 2GPI 関連プロテオームを分離した。このサンプルを ESI-LC-MS/MS により解析したところ、複数のタンパク質が同定された。現在、候補タンパク質のなかから β 2GPI 実際に

結合し、細胞内にシグナルを伝えることに関与しているか検討中である。

D. 考察

p38MAPK 経路は、抗リン脂質抗体刺激による単球からの TF 発現に重要な役割を果たしていると考えられた。抗 β 2GPI 抗体による刺激により p38 MAPK のリン酸化に引き続き、NF- κ B が核内へと移行し、TF プロモーターに結合し、TF 転写が誘導されてくる可能性が考えられる。これまでの研究から、抗リン脂質抗体症候群患者由来のモノクローナル抗 β 2GPI 抗体は、培養内皮細胞に接着因子 (ICAM-1、VCAM-1、E-セレクチン) の発現を誘導し、さらにモノクローナル抗 β 2GPI 抗体は、単球や内皮細胞にも外因系凝固反応のトリガーである TF の mRNA や蛋白を誘導することが示されている。また、抗 β 2GPI 抗体による TF の発現は β 2GPI が存在しているときにのみ認められることより、単球の細胞活性化は単球の細胞活性化は β 2GPI に依存する、すなわち細胞と β 2GPI に結合した自己抗体との interaction によるものであると考えられ、そこには受容体分子や共役分子の存在が想定される。今回同定したタンパク質のなかで抗 β 2GPI 抗体による刺激に関与する分子の機能を解析することが今後重要な課題と言える。

また、TF を中心にした向凝固性の蛋白誘導の細胞内刺激伝達システムをより詳細に解析することにより、APS 発症のメカニズムを解明するのみならず、難治性である抗リン脂質抗体症候群の新しい治療法の確立が期待される。p38MAPK 経路の制御による TF 発現の制御は、APS の血栓向性に対する特異的な治療の一つとなる可能性がある。

E. 結論

IgM 型抗 β 2GPI 抗体の刺激による遺伝子に発現の変動を検討したところ、MAPK 経路の変動が認められた。抗 β 2GPI 抗体刺激による MAPK の影響を詳細に調べたところ、特に p38 MAPK のリン酸化の上昇が観察された。またリコンビ

ナント FLAG タグ β 2GPI を使用した抗 FLAG 抗体アフィニティークロマトグラフィーにより β 2GPI 関連プロテオームを分離し、質量分析解析により複数のタンパク質が同定した。今後は、実際に β 2GPI と結合するタンパク質を決定し、細胞内シグナルに関する機能的解析を行う。

F. 健康危険情報

現在のところ、APS における in vivo での p38 阻害薬の使用は行っていない。p38 MAPK 経路は TF 発現のみならず種々の生体反応における重要な経路であり、種々の副作用の発現の可能性も予想される。抗リン脂質抗体-p38 MAPK 経路の詳細な解明をさらに行い、より APS に特異的な部分をターゲットとすることにより、将来的により安全な治療法が見いだされる可能性が考えられ得る。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yasuda,S., Atsumi,T., Matsuura,E., Kaihara.K., Yamamoto, D., Ichikawa,K., Koike, T. Significance of valine/leucine247 polymorphism of β 2-glycoprotein I in antiphospholipid syndrome: increased reactivity of anti- β 2-glycoprotein I autoantibodies to the valine 247 β 2-glycoprotein I variant. *Arthritis Rheum*: 52 (1); 212-218.2005
- 2) Kataoka,H., Takahashi,S., Takase,K., Yamasaki, S., Yokosuka,T., Koike,T., Saito,T. CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells exert in vitro suppressive activity independent of CTLA-4. *Int Immunol*:17(4); 421-427.2005
- 3) Jodo,S., Pidiyar,VJ., Xiao,S., Furusaki,A., Sharma,R., Koike,T., Ju,ST. Cutting Edge: Fas Ligand (CD178) Cytoplasmic Tail Is a Positive Regulator of Fas Ligand-Mediated Cytotoxicity. *J. Immunol*:174(8);4470-4474.2005
- 4) Nishio,S.,Hatano,M.,Nagata,M.,Horie,S.,Koike,T.,

- Tokuhisa,T.,Mochizuki,T. Pkd1 regulates immortalized proliferation of renal tubular epithelial cells through p53 induction and JNK activation. *J Clin Invest*: 115(4);910-918.2005
- 5) Kochi,Y., Yamada,R., Suzuki,A., Harley,JB. Shirasawa,S., Sawada,T., Bae,SC., Tokuhiro,S., Chang,X., Sekine,A., Takahashi,A., Tsunoda,T., Ohnishi,Y., Kaufman,KM., Kang,CP., Kang,C., Otsubo,S., Yumura,W., Mimori,A., Koike,T., Nakamura,Y., Sasazuki,T., Yamamoto,K. A functional variant in FCRL3, encoding Fc receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities. *Nat Genet*: 37(5); 478-485.2005
- 6) Imai,Y., Chou,T., Tobinai,K., Tanosaki,R., Morishima,Y., Ogura,M., Shimazaki,C., Taniwaki,M., Hiraoka,A., Tanimoto,M., Koike,T., Kogawa,K., Hirai,H., Yoshida,T., Tamura,K., Kishi,K., Horita,T. CliniMACS Study Group. Isolation and transplantation of highly purified autologous peripheral CD34⁺ progenitor cells: purging efficacy, hematopoietic reconstitution in non-Hodgkin's lymphoma (NHL): results of Japanese phase II study. *Bone Marrow Transpl*: 35(5); 479-487.2005
- 7) Bando,H., Atsumi,T., Nishio,T., Niwa,H., Mishima,S., Shimizu,C., Yoshioka,N., nBucala,R., Koike,T. Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of glycolytic regulators in human cancer. *Clin Cancer Res*: 11; 5784-5792.2005
- 8) Atsumi,T., Furukawa,S., Amengual,O., Koike,T. Antiphospholipid antibody associated thrombocytopenia and the paradoxical risk of thrombosis. *Lupus*: 14; 499-504.2005
- 9) Bohgaki,T., Amasaki,Y., Nishimura,N., Bohgaki,M., Yamashita,Y., Nishio,M., Sawada,KI., Jodo,S., Atsumi,T., Koike,T. Up regulated expression of tumour necrosis factor α converting enzyme in peripheral monocytes of patients with early systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*: 64; 1165-1173.2005
- 10) Atsumi,T., Amengual,O., Yasuda,S., Matsuura,E., Koike,T. Research around β 2-glycoprotein I: A major target for antiphospholipid antibodies. *Autoimmunity*: 38(5); 377-381 2005
- 11) Fukae,J., Amasaki,Y., Yamashita,Y., Bohgaki,T., Yasuda,S., Jodo,S., Atsumi,T., Koike,T. Butyrate suppresses tumor necrosis factor α production by regulating specific messenger RNA degradation mediated through a cis-acting AU-rich element. *Arthritis Rheum*: 52(9); 2697-2707.2005
- 12) Koike,T., Atsumi,T. Antiphospholipid antibodies and cell activation: crucial role of p38 MAPK pathway. *Lupus*: 14(10); 799-801.2005
- 13) Atsumi,T., Nishio,T., Niwa,H., Takeuchi,J., Bando,H., Shimizu,C., Yoshioka,N., Bucala,R., Koike,T. Expression of inducible 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Bisphosphatase/PFKFB3 isoforms in adipocytes and their potential role in glycolytic regulation. *Diabetes*: 54(12); 3349-3357. 2005
- 14) Kasahara,H., Matsuura,E., Kaihara,K., Yamamoto,D., Kobayashi,K., Inagaki,J., Ichikawa,K., Tsutsumi,A., Yasuda,S., Atsumi,T., Yasuda,T., Koike,T. Antigenic structures recognized by anti-B2-glycoprotein I auto-antibodies. *Int immunol*: 17(12); 1533-1542. 2005
- 15) Yasuda,S., Bohgaki,M., Atsumi,T., Koike,T. Pathogenesis of antiphospholipid antibodies: impairment of fibrinolysis and monocyte activation via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Immunobiology*: 210; 775-780.2005

16) Nakabayashi,T., Mizukami,K., Naitoh,S., Takeda,M., Shikamoto,Y., Nakagawa,T., Kaneko,H., Tarumi,T., Mizoguchi,I., Mizuno,H., Ieko,M., Koike,T. Protein C Sapporo (protein C Glu 25 → Lys): A heterozygous missense mutation in the Gla domain provides new insight into the interaction between protein C and endothelial protein C receptor. *Thromb Haemost*: 94; 942-950. 2005

17) Goto,H., Nishio,M., Endo,T., Sato,N., Koizumi,K., Fujimoto,K., Sakai,T., Kumano,K., Obara,M., Koike,T. Effective in vivo purging with rituximab and autologous peripheral blood stem cell transplantation in a woman with CD5 positive primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Haematol*: 74(6); 526-528. 2005

18) Nakamura,A., Simizu,C., Nagai,S., Taniguchi,S., Umetsu,M., Atsumi,T., Yoshioka,N., Ono,Y., Tajima,T., Kubo,M., Koike,T. A rare case of Gitelman's syndrome presenting with hypocalcemia and osteopenia. *J Endocrinol Invest*: 28; 464-468. 2005

19) Nishio,M., Endo,T., Fujimoto,K., Sato,N., Sakai,T., Obara,M., Kumano,K., Minauchi,K., Koike,T. Persistent panhypogammaglobulinemia with selected loss of memory B cells and impaired isotype expression after rituximab therapy for post-transplant EBV-associated autoimmune hemolytic anemia. *Eur J Haematol.*: 75(6); 527-529. 2005

20) Matsumoto,R., Shimizu,C., Nagai,S., Taniguchi,S., Umetsu,M., Kimura,Y., Atsumi,T., Yoshioka,N., Kubo,M., Koike,T. Cat-eye syndrome with isolated idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Internal Med*: 44(10); 1069-1073. 2005

21) Ieko,M., Tarumi,T., Nakabayashi,T., Yoshida,M., Naito,S., Koike,T. Factor Xa inhibitors: new

anti-thrombotic agents and their characteristics. *Frontiers in Bioscience*: 11; 232-248. 2006

22) Yasuda S, Atsumi T, and Koike T. β 2-glycoprotein I and Anti- β 2-glycoprotein I antibodies In. *Khamashta MA. Hughes Syndrome*. Springer. London. 307-318, 521-531. 2006

2.学会発表

1) β 2 グリコプロテイン I 依存性抗カルジオリピン抗体による細胞刺激シグナルの検討. 坊垣幸, 山下由美, 渥美達也, 保田晋助, 酒井良江. 古崎章, 坊垣暁之, 天崎吉晴, 小池隆夫. 第34回日本免疫学会

2) 抗リン脂質抗体症候群発症機構の解析
坊垣幸, 小池隆夫

3) 第49回日本リウマチ学会総会・学術集会/
第14回国際リウマチシンポジウム

H.知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得
特記事項なし

2. 実用新案登録
特記事項なし

3. その他
特記事項なし

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)
分担研究報告書

免疫・炎症反応の抑制に関与するユビキチン化酵素の解析

分担研究者 島山 鎮次 北海道大学大学院医学研究科分子生化学講座 教授

研究要旨

リウマチ性疾患を含む炎症性疾患には、多くのサイトカインが関与していることが知られている。特に腫瘍壊死因子 TNF やインターロイキン-1 や LPS 受容体などの炎症誘発性サイトカインは、NF- κ B という転写因子の活性化を通じてその作用が仲介される。A20 は NF- κ B の強力な阻害分子として報告されているが、その作用機序に関しては不明な点が多い。申請者は、本研究において新たな A20 結合タンパク質として C3orf6 を同定し、生化学的に解析したところ C3orf6 は NF- κ B シグナルに抑制的に働くことが明らかとなった。

A.研究目的

NF- κ B シグナルに対して抑制的に働く A20 は、分子酵素学的にはユビキチン化を進行させる酵素(ユビキチンリガーゼ E3)とユビキチンを基質タンパク質からはずす脱ユビキチン化酵素としての、両方の活性を有するユビキチン化修飾酵素(ubiquitin editing enzyme)として報告されている。本研究課題では A20 結合タンパク質を同定することで A20 の上流の制御分子及び下流の基質分子を網羅的に同定することを目指し、分子レベルでの NF- κ B シグナルにおける抑制機序を解明する。

B.研究方法

ヒト B 細胞株 cDNA ライブラリーより全長 A20 cDNA をクローニングする。その cDNA を bait としてヒト B 細胞株 cDNA ライブラリーから酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行う。A20 結合タンパク質と推定されたタンパク質と A20 の結合を、in vitro 及び in vivo で確認する。また、A20 結合タンパク質に対する抗体を作製し、内在性の結合も確認する。さらに、NF- κ B シグナルに対して作用を調べるために、A20 結合タンパク質存在下での κ B-ルシフェラーゼレポーターへの転写活性化の影響を検

討する。

(倫理面への配慮)

特に該当せず。

C.研究結果

ヒト B 細胞株 cDNA ライブラリーより A20 cDNA をクローニングし、その cDNA を bait として酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行ったところ、現在まで機能が未知のタンパク質である C3orf6 が同定された。C3orf6 を細胞内に発現させたところ、A20 との結合が確認された。また、C3orf6 に対する抗体を作製し、内在性の A20 と C3orf6 の結合も確認済みである。また、Src ファミリーチロシンキナーゼにより、C3orf6 は高度にチロシンリン酸化を受けることを確認しており、部位特異的の変異体を作製することにより C3orf6 上のチロシンリン酸化部位も同定済みである。さらに、 κ B-ルシフェラーゼレポーターにおける転写活性化に対して、C3orf6 は A20 と共に抑制的に作用することが判明した。

D.考察

本研究結果は、NF- κ B 経路における制御酵素

(ユビキチン化修飾酵素)であるA20と、チロシンキナーゼ経路(Ras-MAPキナーゼ経路)に関与すると予想されるC3orf6のクロストークを、分子レベルで示唆するものである。これらの2つの細胞内シグナル経路におけるepistaticな関係を明らかにすることは、免疫系細胞の活性化及び増殖抑制の機序に重要な知見と言える。また現在、個体レベルで免疫細胞及び炎症関連細胞における機能を明らかにするために、C3orf6の遺伝子破壊マウス及びトランスジェニックマウスを作製することが重要であると考えられる。

E. 結論

NF- κ Bの強力な阻害分子であるA20の結合タンパク質としてC3orf6を同定し、NF- κ Bシグナルにおける抑制作用を明らかにした。

F. 健康危険情報

特に該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Matsumoto, M., Hatakeyama, S., Oyamada, K., Oda, Y., Nishimura, T. and Nakayama, K-i.: Large-scale analysis of the human ubiquitin-related proteome. *Proteomics*, 5, 4145-4151, 2005.

2) Pushkarsky, T., Yurchenko, V., Vanpouille, C., Brichacek, B., Vaisman, I., Hatakeyama, S., Nakayama, K.I., Sherry, B. and Bukrinsky M.I.: Cell surface expression of CD147/emmprin is regulated by cyclophilin 60. *J. Bio. Chem.*, 280, .27866-27871, 2005.

3) Hatakeyama, S., Watanabe, M., Fujii, Y. and Nakayama, K-i.: Targeted destruction of c-Myc by an engineered ubiquitin ligase suppresses cell transformation and tumor formation. *Cancer Res.* 65, 7874-7879, 2005.

4) Hatakeyama, S., Matsumoto, M. and Nakayama, K-i.: Mapping of ubiquitination sites on target proteins. *Methods Enzymol.* 399, 277-286, 2005

5) Kaneko-Oshikawa, C., Nakagawa, T., Yamada, M., Yoshikawa, H., Matsumoto, M., Yada, M., Hatakeyama, S., Nakayama, K. and Nakayama, K-i.: Mammalian E4 is required for cardiac development and maintenance of the nervous system. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10953-10964, 2005.

6) Yogosawa, S., Hatakeyama, S., Nakayama, K-i., Miyoshi, H., Kohsaka, S., and Akazawa, C.: Ubiquitylation and degradation of polo-like kinase SNK by hVPS18, a RING-H2 type ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* 280, 41619-41627, 2005

7) Makino, Y., Tsuda, M., Ichihara, S., Watanabe, T., Sawa, H., Nagashima, K., Hatakeyama, S. and Tanaka, S: Elmo1 inhibits ubiquitylation of Dock180. *J. Cell Sci.* in press.

2. 学会発表

1) (発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)
畠山鎮次: 炎症反応に関与するユビキチン化とリン酸化、第42回日本臨床分子医学会学術集会、京都、2005(7/23)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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)
分担研究報告書

TGF- β アンタゴニストを介した自己免疫疾患の制御に関する研究

分担研究者 住田 孝之

筑波大学大学院人間総合科学研究科先端応用医学専攻・臨床免疫学 教授

研究要旨

有効な治療法が無い難治性自己免疫疾患の中で線維化や細胞外基質の増生を促進する Transforming growth factor- β (TGF- β)が病態に深く関与している疾患に対し、TGF- β のシグナル伝達を阻害する薬剤が治療有効性を有するか検討する。

A.研究目的

強皮症の皮膚硬化病変、肺病変やループス腎炎、関節リウマチは難治性の病態であり、有効かつ副作用が僅少な治療法の開発が望まれている。TGF- β の作用や発現量の過剰がこれらの病態形成に関与していることが知られており、その作用を拮抗阻害する薬剤が治療に有効であるか否かを検討する。

B.研究方法

強皮症モデル(Tsk マウス、GVHD モデル)、ループスモデル(MRLlpr、NZB/WF1)、関節炎モデル(コラーゲン誘導性)を用いて、TGF- β I 型受容体(ALK V)から TGF- β 細胞内シグナル伝達分子 SMADs を介したシグナル伝達を阻害する ALK V 阻害薬 2-pyridinil-[1,2,3]triazole (DaeKee Kim, In2Gen, Korea)の治療効果を判定する。単独投与の効果判定後、従来の免疫抑制薬との併用効果を検討する。

(倫理面への配慮)

筑波大学動物実験取り扱い規程に則り実験を行う。

C.研究結果

ALK V 阻害薬と同様に TGF- β の作用を阻害する可溶性 TGF- β II 型受容体 Fc 融合タンパクを高

発現したトランスジェニックマウス(Lalage Wakefield, National Cancer Institute, NIH, USA)が、コントロール群の野生型と同様に正常に発育し、野生型と同様の寿命であること、TGF- β I ノックアウトマウスでみとめられるような炎症性所見を示さず、自己抗体の産生もみとめないことより、長期にわたるリガンドレベルにおける TGF- β 作用の阻害は生体に安全であることが示唆された。

片側尿管を結紮することにより尿管閉塞を起こし、腎線維化を誘導するマウスモデルにおいて ALK V 阻害薬(IN-1130, DaeKee Kim, In2Gen, Korea)を腹腔内投与したところ、10mg/kg で有効、20mg/kg で著効であった。また、この線維化モデルに対する ALK V 阻害薬投与は自己免疫能賦活化を惹起しなかった。

D.考察

TGF- β が病態に関与している疾患に対し、ALK V 阻害薬は副作用が僅少で、かつ有効な薬剤として用いることが可能であると考えられた。

E.結論

TGF- β 拮抗阻害薬は自己免疫疾患治療に対し副作用が僅少であり、線維化疾患治療薬として有用である。

F.健康危険情報

特記事項なし

G.研究発表

1. 論文発表

1) Suzuki, E., Tsutsumi, A., Goto, D., Matsumoto, I., Ito, S., Otsu, M., Onodera, M., Takahashi, S., Sato, Y., and Sumida, T. Gene transduction of tristetraprolin or its active domain reduces TNF- α production in Jurkat T cells. *Int. J. Mol. Med.* (in press)

2) Kori, Y., Matsumoto, I., Zhang, H., Muraki, Y., Yasukochi, T., Hayashi, T., Iwanami, K., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A. and Sumida, T. Characterization of Th1 type, glucose-6-phosphate isomerase reactive T cells in the generation of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* (in press)

3) Chino, Y., Murata, H., Goto, D., Matsumoto, I., Tsutsumi, A., Sakamoto, T., Ohtsuka, M., Sekisawa, K., Ito, S., and Sumida, T. T cell receptor BV gene repertoire in lymphocytes from bronchoalveolar lavage fluid of polymyositis/dermatomyositis patients with interstitial pneumonitis. *Int. J. Mol. Med.* 17:101-109, 2006

4) Naito, Y., Matsumoto, I., Wakamatsu, E., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T. Altered peptide ligands regulate muscarinic acetylcholine receptor reactive T cells from patients with Sjogren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 65:269-271, 2006.

5) Matsumoto, I., Hua, Z., Muraki, Y., Hayashi, T., Yasukochi, T., Kori, Y., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T. A functional variant of Fc γ receptor IIIA is associated with rheumatoid arthritis in anti-glucose-6-phosphate isomerase antibodies positive individuals. *Arthritis Res. Ther.* 7: 1183- 1188, 2005

6) Matsumoto, I., Muraki, Y., Yasukochi, T., Hua, Z., Kori, Y., Hayashi, T., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., Ikeda, K., Sumitaka, H., and Sumida, T. The exploration of joint specific immunoreactions on immunoglobulins G anti-glucose-6-phosphate isomerase antibodies from patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Med.* 16:793-800, 2005.

7) Ohnishi, Y., Tsutsumi, A., Goto, D., Itoh, S., Matsumoto, I., Taniguchi, M., and Sumida, T. TCRVa14 + NKT cells function as effector T cells in collagen -induced arthritis mice. *Clin. Exp. Immunol.* 141: 47-53, 2005.

8) Tomoo, T., Tsutsumi, A., Yasukochi, T., Ikeda, K., Ochiai, N., Ozawa, K., Shibana, Y., Ito, S., Matsumoto, I., Goto, D., and Sumida, T. Analysis of abnormally expressed genes in synovium from patients with rheumatoid arthritis using a column gel electrophoresis- coupled subtractive hybridization technique. *Int. J. Mol. Med.* 15:453-457, 2005.

9) Naito, Y., Matsumoto, I., Wakamatsu, E., Goto, D., Tsutsumi, A., and Sumida, T. Muscarinic acetylcholine receptor autoantibodies in patients with Sjogren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis* 64:510-511, 2005.

10) Takahashi, R., Tsutsumi, A., Ohtani, K., Muraki, Y., Goto, D., Matsumoto, I., Wakamiya, N., and Sumida, T. Association of mannose-binding lectin (MBL) gene polymorphism and serum MBL concentration with characteristics and progression of systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 64:311-314, 2005.

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

申請準備中

2. 実用新案登録
なし

3. その他
特記事項なし