

## 新しい治療薬の開発

分担研究者 首藤紘一 財団法人 乙卯研究所 所長

**研究要旨** レチノイドの作用の主なものとして免疫機能への効果は著しい。既に医薬品として用いられている受容体選択性に優れたレチノイド、Am80（タミバロテン）、は免疫疾患として理解される乾癬に対して有効であり、リウマチモデル、多発性硬化症モデルでも顕著な作用がある。さらに、ジニトロベンゼンスルホン酸によって誘起される腸炎モデルに有効であった。これらの結果を総合すると、タミバロテンは Th1 型の自己免疫疾患、SLE やクローン病などに臨床に応用できると考える。

### A. 研究目的

ビタミンAの活性体であるレチノイン酸に代表されるレチノイドは核内受容体 RAR を介して特定の遺伝子の発現を調節する。免疫機能にかかわる分子群も制御する。Am80（タミバロテン）は、RAR $\alpha,\beta$  に選択的に結合し活性化する合成レチノイドである。Am80 は、MMP および IL-6 の産生抑制、IL-6 受容体の発現抑制等の機能があり、強い抗炎症作用を示す。コラーゲン誘起リウマチモデルにおいて、本レチノイドは強く炎症を抑制し、Th1 経路の抑制傾向をしめす。また、Th1 傾向の強いとされる乾癬において臨床的に十分な効果を示すことがわかっている。従って、その他の Th1 型の自己免疫疾患にも有用な治療薬となりうる。ここでは、Am80 の自己免疫疾患への治療薬としての応用を図るための研究をおこなう。本薬はタミバロテンとして 2005 年に非細胞障害性の分子標的医薬品として急性前骨髄球性白血病の治療薬として承認されているので、自己免疫抑制作用が明確になれば、SLE を含む種々の自己免疫疾患の治療薬として臨床試験が開始できる環境にある。

### B. 研究方法

典型的な Th1 優位の自己免疫疾患とされる多発性硬化症のモデル実験的自己免疫脳脊髄炎の症状の抑制にタミバロテンは有効である。したがって、今年度においては、かなり Th1 的な疾患と見られるクローン病ないし炎症性大腸炎のモデルにおけるタミバロテンの効果を確認する。本研究は通常の動物実験であり、倫理面の問題はないと考える。

### C. 研究結果

ジニトロベンゼンスルホン酸（DNBS）を用いて炎症性腸疾患モデルラットを作成し、Am80 が腸炎に与える影響を調べた。Am80 を 1 日 1 回 7 日間継続的に経口投与したラットに対し、2 日目に DNBS を結腸内に注入し、腸炎を誘発した。陽性対照としては、スルファサラジンを用いた。8 日目にラットの結腸を切り出し、病理解析を行った。

スルファサラジン及び Am80 投与群では、対照群と比較してラットの体重増加が見られた。体重辺りの結腸重量についても、スルファサラジン及び Am80 投与群では著しい減少が見られた。下痢、腸の潰瘍化にも、対照群と比較して改善が見られた。特に Am80 投与群では、腸の

他臓器への癒着の無さがスルファサラジンより有意に観察された。

#### D. 考察

クローン病の代表的なモデルを用いてこの実験をおこなった。Am80 はここで有効性を示した。対照薬スルファサラジンにくらべて非常に低濃度で有効である。しかし、このモデルがクローン病の適切なモデルかどうかは議論のあるところである。さらに病理組織的な詳細な検討をする予定である。

レチノイドの薬理作用についてはまだまだ未知の部分が多い。動脈硬化の発症、心血管系のリモデリング、さらには脳神経系の疾患、特に神経の再生を必要とする疾患や増殖性疾患においても、本剤による自己免疫を抑制する要素をもとにこれらの疾患の治療にも可能性を持つ。そのための基礎研究や関連研究も同時に進めている。

#### E. 結論

合成レチノイド Am80 は、炎症性腸疾患に対して治療効果を持つことが示唆された。多発性硬化症モデルでの有効性や、臨床における乾癬での有効性を考えると、Am80 は Th1 性の強い疾患に有効であると見られ、臨床試験を行えるかどうかの具体的な検討に進みたい。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Sanda T, Tkuwano T, Nakao T, Iida S, Ishida T, Komatsu H, Shudo K, Kuwano M, Ono M, Ueda R. Antimyeloma effects of a synthetic retinoid Am80 (Tamibarortene) through inhibition of angiogenesis. *Leukemia* 19, 901-909, 2005.

2. Fujiu K, Manabe I, Ishihara A, Oishi Y, Iwata H,

Nishimura G, Shindo T, Maemura K, Kagechika H, Shudo K, Nagai R. Synthetic retinoid Am80 suppresses smooth muscle phenotypic modulation and in-stent neointima formation by inhibiting KLF5. *Circ. Res.* 25;97(11):1132-41, 2005.

##### 2. 学会発表

炎症性腸疾患モデルラットにおける合成レチノイド Am80 の治療効果。石堂美和子、山形尚子、深沢弘志、影近弘之、首藤紘一 日本レチノイド研究会 第16回学術集会 p. 74 (Nov.10-11, 2005) 東京。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特になし

##### 2. 実用新案登録

特になし

##### 3. その他

特になし

## 免疫寛容に重要な分子に関する研究

分担研究者 三宅 幸子 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 室長

**研究要旨** 全身性エリテマトーデス（SLE）の病態解明と新規治療の標的を探索することを目的とし、免疫寛容維持に重要な分子機構についての研究を行った。特に、近年注目されている GRAIL 分子の機能解明のため、ノックアウトマウスの作製を行い、現在キメラマウスまで作製した。また、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動法を用いて基質の同定を試み、候補となる蛋白の選定を行った。

### A. 研究目的

SLE リンパ球の自己寛容破綻の機序と寛容導入を目指し、免疫寛容維持に重要な経路を発見し新規治療につなげる。免疫寛容に重要な分子として、E3 リガーゼが注目されている。Cbl-b や、Itch などのリガーゼは、各々その基質としてチロシンキナーゼ関連のシグナル伝達分子や PLC $\gamma$ などが報告されているが、GRAIL 分子はその制御する経路が不明である。そこで、本研究では GRAIL 分子の基質の同定をこころみ、免疫寛容維持の機構について検討する。

### B. 研究方法

GRAIL 分子の基質を同定するため、AE7 細胞株ならびに DO11.10 の脾臓細胞にレンチウイルスベクターを用いて GRAIL 分子を強制発現させ、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動（2D Difference Gel Electrophoresis: 2D DIGE）技術を用いた定量的な蛋白質発現差異解析法にて GRAIL の基質の同定を行う。また、DO11.10 の脾臓細胞を Ovalbumin 蛋白で刺激し、10 日後にイオノマイシン処理、イオノマイシン+サイクロスポリン A 処理群を比較し、蛋白発現を網羅的に解析し、GRAIL 強制発現細胞との比較を行うことによって、生理的な標的蛋白かどうかについて検討する。GRAIL の基質の同定並びに、各種自己免疫モデルにおける GRAIL 分子の機能を検討するために、GRAIL の遺伝子欠損マウスを作製する。

（倫理面への配慮） 動物実験に関しては、当研究所動物実験の規定に従い、実験計画書の承認を受けて行った。

### C. 研究結果

GRAIL 分子 cDNA を、C57BL6 (B6) マウスの脾臓細胞を固相化 CD3 抗体で刺激後に抽出した mRNA から RT-PCR 法を用いてクローニングし、pLenti6/V5-D-TOPO ベクターにくみこんだ。また、Site-directed mutagenesis 法にて RING フィンガー部位の H2N2 mutant (dominant negative mutant) を作製した。また DO11.10 の脾臓細胞をイオノマイシン処理し、GRAIL の蛋白発現が増強することを Western blot 法にて確認した。2D DIGE 法により、イオノマイシン処理後にて低下し、イオノマイシン+サイクロスポリン A 処理群では低下しない蛋白を選定した。GRAIL ノックアウトマウスについては、B6 由来 ES 細胞を使用して作製し、キメラマウスまでの作製に成功した。

### D. 考察

自己免疫疾患の治療は、近年関節リウマチなどの臓器特異的自己免疫疾患においては、サイトカインや抗サイトカイン製剤などの分子標的薬の開発が進みその発展は著しい。しかしながら、SLE においては、これまで使用されている TNF $\alpha$ 拮抗薬や Type I interferon などのサイトカイン関連薬剤については、むしろ病態悪化に寄与する可能性があり使用困難である。SLE の

治療薬としては、いまだ糖質コルチコイドや非特異的免疫抑制剤しか選択の余地がなく、新規の治療戦略が望まれる。SLEの病態にみられる、自己抗原へ免疫寛容破綻を修正するには、まず免疫寛容の機序を理解することが不可欠である。近年、免疫寛容の分子機構に関する研究から、E3リガーゼが免疫寛容の機序に重要であることが明らかとなってきた。その中でも、Cblは、チロシンキナーゼが関与するシグナル伝達経路の抑制に関与し、ItchはPLC $\gamma$ の経路を制御することが報告されているが、GRAIL分子についての機能は不明である。したがってその基質を解明することは、免疫寛容に関する新規の経路の発見につながることで期待される。さらに、新規経路の発見は、新規治療薬の標的の発見につながる可能性があり、重要な研究課題である。

## E. 結論

GRAIL分子の機能解析、基質同定に必要な reagent を作製した。今後、これらを用いて、GRAIL分子の解析を進めることは、免疫寛容の機序の解明につながる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ueno, Y., S. Tanaka, M. Sumii, S. Miyake, S. Tazuma, M. Taniguchi, T. Yamamura and K. Chayama: Single dose of OCH improves mucosal Th1/Th2 cytokine balance and prevents experimental colitis in the presence of V $\alpha$ 14 NKT cells in mice. **Inflamm. Bowel Disease** 11(1): 35-41, 2005
- 2) Hashimoto D, Asakura S, Miyake S, Yamamura T, van Kaer L, Liu C, Tanimoto M and Teshima T. Stimulation of host natural killer T cells by synthetic glycolipid regulates acute graft-versus-host disease by inducible Th2 polarization of donor T cells. **J.Immunol.** 174(1): 551-6, 2005
- 3) Murata K, Toba T, Nakanishi K, Takahashi B,

Yamamura T, Miyake S and Annoura H. Total synthesis of an immunosuppressive glycolipid, (2S,3S,4R)-1-O-( $\alpha$ -D-galactosyl)-2-tetracosanoylamino-1,3,4-nonanetriol. **J.Org.Chem.** 70(6): 2398-401, 2005

4) Yu KO, Im JS, Molano A, Dutronc Y, Illarionov PA, Forestier C, Fjiwara N, Arias I, Miyake S, Yamamura T, Chang YT, Besra GS, and Porcellini SA. Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acylvariants of  $\alpha$ -galactosylceramides. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA.** 102(9): 3383-8, 2005

5) Ota T, Takeda K, Akiba H, Hayakawa Y, Ogasawara K, Ikarashi Y, Miyake S, Wakasugi H, Yamamura T, Kronenberg M, Raulet DH, Kinoshita K, Yagita H, Smyth MJ, Okumura K. IFN- $\gamma$ -mediated negative feedback regulation of NKT cell function by CD94/NKG2. **Blood**, 106(1): 184-92, 2005

6) Chiba A, Kaieda S, Oki S, Yamamura T and Miyake S. The involvement of V $\alpha$ 14 NKT cells in the pathogenesis of arthritis in murine models. **Arthritis Rheum.** 52:1941-8, 2005

7) Toba T, Murata K, Yamamura T, Miyake S and Annoura H. A concise synthesis of (3S, 4S,5R) -1-( $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-3-tetracosanoylamino-4,5-decanediol, a C-glycoside analogue of immunomodulating  $\alpha$ -galactosylceramide OCH. **Tetrahedron Letters** 46: 5043-7, 2005

8) Ronet C, Darche S, de Moraes ML, Miyake S, Yamamura T, Louis JA, Kasper LH, Buzoni-Gatel D. NKT Cells Are Critical for the Initiation of an Inflammatory Bowel Response against *Toxoplasma gondii*. **J.Immunol.** 175(2): 899-908, 2005

9) Oki S, Tomi C, Yamamura T and Miyake S. Preferential Th2 polarization by OCH is supported by incompetent NKT cell induction of CD40L and following production inflammatory cytokines by bystander cells in vivo. **Int.Immunol.** 17(12): 1619-29, 2005

10) Miyake S and Yamamura T. Therapeutic potential of glycolipid ligands for natural killer

(NK) T cells in the suppression of autoimmune diseases. **Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.** 5 (3): 315-22, 2005

## 2. 学会発表

1) Kaieda S, Chiba A, Oki S, Yamamura T, Miyake S. The involvement of CD1-restricted NKT cells in the pathogenesis of collagen-induced and antibody-induced arthritis. 5<sup>th</sup> Annual Conference of FOCIS, Boston, May 13, 2005

2) Sakuishi K, Miyake S, Yamamura T. Exogenous IL-2 promotes IL-5 production by human CD4+ NKT cell clones: The role of IL-2 in the immune regulation. 5<sup>th</sup> Annual Conference of FOCIS, Boston, May 13, 2005

3) Kaieda S, Oki S, Yamamura T, Miyake S. A new synthetic glycolipid suppresses murine models of arthritis by blocking of natural killer T cell activation. American College of Rheumatology 69<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting, Orlando, Florida. October 25, 2004 (Arthritis Rheum. 52:S445, 2005)

4) 中原とも子、阿部香織、千葉麻子、山村隆、橋本博史、三宅幸子：膠原病患者における CD1d 拘束性 NKT 細胞の糖脂質抗原に対する反応性の検討、第 49 回日本リウマチ学会、横浜、4 月 20 日、2005

5) 海江田信二郎、千葉麻子、Ludovic Croxford, 大木伸司、山村隆、三宅幸子：マウス関節炎モデルにおける V $\alpha$ 14NKT 細胞ならびに V $\alpha$ 19NKT 細胞の機能解析 第 49 回日本リウマチ学会、横浜、4 月 19 日、2005

6) 水野美歩、大木伸司、海江田信二郎、任海千春、山村隆、三宅幸子：新規糖脂質リガンドによる NKT 細胞を介した病態制御。第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005

7) 塚本和行、林青順、大辻季樹、鶴井博理、三宅幸子、山村隆、広瀬幸子：SLE における NKT 細胞の役割。第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005

8) 任海千春、大木伸司、山村隆、三宅幸子：OCH による NKT 細胞依存性 Th2 誘導における

免疫ネットワークの関与、第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005

9) 作石かおり、荒波利昌、大木伸司、三宅幸子、山村隆：Exogenous IL-2 promotes IL-5 production by human CD4+ NKT cell clones: The role of IL-2 in the immune regulation.第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005

10) Croxford Ludovic, Miyake Sachiko, Shimamura Michio, Yamamura Takashi: V $\alpha$ 19-J $\alpha$ 33 invariant NKT cells regulated experimental autoimmune encephalomyelitis.第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005

11) 大木伸司、海江田信二郎、山村隆、三宅幸子：新規糖脂質リガンドによる NKT 細胞を介した病態制御-マウス気道アレルギーモデルにおける抑制効果-第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005

12) 海江田信二郎、大木伸司、山村隆、三宅幸子：NKT 細胞活性制御作用を介した新規合成糖脂質によるマウスモデル関節炎の抑制：第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

### 1. 特許取得

特になし

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他

特になし

## 自己免疫疾患関連血中ペプチドの同定システムに関する研究

分担研究者 加藤智啓 聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター  
生体機能・プロテオーム制御部門 部門長/助教授

**研究要旨** 全身性自己免疫疾患の病態解明や早期診断に有用な血中ペプチドを検索する目的で、血清中の疾患特異的ペプチドを検索する手法の確立を試みた。具体的には、検索対象を分子量 5,000 程度以下のペプチドとし、疎水性担体の結合したビーズを用いて、それらペプチドを濃縮精製、質量分析によるペプチドの直接的検出を行った。強皮症、全身性エリテマトーデス、および関節リウマチなど患者血清を用いて、検出解析を行なった結果、試料中にそれぞれの疾患に特異的なペプチドの検出が可能であることが判明した。さらに、その一部は同定まで行えることも判明した。今後、さらに同定を進め、同定したペプチドの生物学的活性を検討していくことで、それぞれの全身性自己免疫疾患の病態解明と診断・治療法の開発に貢献すると考えられた。

### A. 研究目的

本研究は血清中のペプチドを検索同定する方法を開発し、全身性自己免疫疾患の病態解明や早期診断に有用なペプチドを得ることを目的とする。強皮症、全身性エリテマトーデス、多発性筋炎あるいは関節リウマチといった全身性自己免疫疾患は、一般に難治性かつ予後不良であり、病因解明が社会的要請である。発症機序として自己免疫機序が中心と考えられているが、その詳細は不明である。こうした病因不詳の疾患の解明を目指した研究においては、従来研究成果を基礎にして病態的役割をもつ可能性のある分子を検討していく方法、すなわち、候補分子のアプローチに加えて、特定の分子を設定しないで疾患関連分子を検索していく方法、すなわち仮説フリーの網羅的スクリーニングも必要かつ有効となる。ここでは、その網羅的検索方法として、検索対象を分子量が 5,000 程度以下のペプチドに限定し、血清中に存在する全身性自己免疫疾患の特異的ペプチドを検索する手法の確立を試みた。

分子量 5,000 程度以下のペプチドは、アミノ酸残基数で 40 強までのペプチドに相当する。これらは、血清中の蛋白質において、アルブミンや免疫グロブ

リンなど主要な蛋白質を除いた残り 1% 程度のいわゆるディーププロテオームと呼ばれる部分のさらに一部であり、量的にも極めて微量である。これまでの蛋白質解析手法では、分子量が小さすぎることで、微量であることから、検索の対象にならなかった分子群である。我々は疎水性担体を用いてそれらペプチドを濃縮精製、質量分析によるペプチドの直接的検出を行うことでこの難点を克服した。各種全身性自己免疫疾患患者血清を用いた検討で疾患特異的なペプチドの検出と同定が可能であることが判明した。本アプローチにより全身性自己免疫疾患の病態解明や早期診断に有用なペプチドを得る可能性がある。

### B. 研究方法

強皮症、全身性エリテマトーデスあるいは関節リウマチなどの全身性自己免疫疾患患者血清各 5 $\mu$ l を、疎水性担体の結合したビーズである MB-C18 と混合し、MB-C18 に小ペプチドを吸着させた。これを洗浄後、結合した小ペプチドを、アセトニトリルを用いて抽出した。これを CHCA などマトリックスと混合し、MALDI-TOF 型質量分析器を用いて、その試

料中に含まれるペプチドの検出と質量の測定を同時に行った。質量測定の結果は、ブルカー社製 ClinProt プログラムを用いたコンピュータ解析により、各疾患群に特異的なペプチドピークを抽出した。さらにこれら検出した疾患特異的なペプチドピークを同定するために、別途、血清 150 $\mu$ l から、分子フィルターにより高分子を取り除いた後、C18 チップを用いてペプチドを濃縮清製し、MALDI-TOF/TOF 型質量分析器をもちいて、de novo アミノ酸配列決定を行った。

### C. 研究結果

強皮症患者血清を用いて行った検討では 5 $\mu$ l の血清から MALDI-TOF 型質量分析器により 100 以上のペプチドが検出され、本法がペプチドの網羅的解析に有用であることが判明した。さらに、20 個以上の強皮症特異的ペプチドが検出され、疾患関連ペプチドの網羅的検索にも有用なことが判明した。MALDI-TOF/TOF 型質量分析器を用いたペプチド同定で、強皮症に特異的なペプチドは補体 C3f ペプチドから C 末端のアルギニン残基が離脱した des-Arg-C3f とその派生ペプチド、補体 C4 の断片である C4adg がメチル化されたペプチドなどが含まれていた。興味深いことには、メチル化されていない同配列の C4 断片には強皮症特異性はなく、側鎖修飾の違いが疾患特異性に貢献していることが判明した。さらに全身性エリテマトーデスについても同様の検討を行い、やはり全身性エリテマトーデスに特異的に出現するペプチドピークを検出した。現在、同定を進めている。

### D. 考察

全身性自己免疫疾患に特異性の高い分子、すなわち疾患関連分子を検索することは、全身性自己免疫疾患の病因解明による新規治療法の開発と、診断あるいは治療モニタリングなど臨床経過把握において、重要である。本研究では、これまで技術的に顧みられることのなかった分子量約 5,000 以下の小ペプチドに着目し、疾患特異的小ペプチドの検出法の確立を試みた。その結果、強皮症や全身性エリテマトーデスにおける検討で疾患特異的ペプチドの存

在を確認し、さらにその一部についてペプチドのアミノ酸配列まで同定できた。

### E. 結論

ペプチドの網羅的解析法、すなわちペプチドミクスより得られた各種全身性自己免疫疾患特異的血清ペプチドは、当該全身性自己免疫疾患の病因関連分子として、診断あるいは治療モニタリングなど臨床経過把握分子として有用である可能性があり、全身性自己免疫疾患の克服に貢献しうる。今後、得られたペプチドの病態的意義を探っていく必要がある。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Guo-Hua Yuan, Atsuyuki Shibakawa, Michiaki Tanaka, Kayo Masuko-Hongo, Tomohiro Kato, Kusuki Nishioka, Hiroshi Nakamura. Characterization of Cells from Pannus-like Tissue over Articular Cartilage of Advanced Osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004 Jan; 12(1):38-45.
2. Yao Z, Kurokawa MS, Masuko-hongo K, Tsuruha J, Sakata M, Nakamura H, Nishioka K, Kato T. Characterization of arthropathy in mice immunized with cartilage intermediate layer protein. *Ann Rheum Dis*. 2004 Mar; 63(3):252-8.
3. Takata S, Nakamura H, Umemoto S, Yamaguchi K, Sekine T, Kato T, Nishioka K, Matsuzaki M. Identification of autoantibodies with the corresponding antigen for repetitive coxsackievirus infection-induced cardiomyopathy. *Circ J*. 2004 Jul; 68(7):677-82.
4. Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Ohmi S, Fukuda H, Nishioka K, Kato T. Proteomic surveillance of autoimmunity in osteoarthritis: Identification of triose phosphate isomerase as an autoantigen in patients with osteoarthritis. *Arthritis & Rheum* 2004; 50:1511-1521.
5. Nakamura M, Tsutsumi, Sekine T, Koizuka, Nishioka K, Kato T. Identification of  $\beta$ -tubulin isoform as an autoantigen in allergic rhinitis. *Microbiol. Immunol.*

2004; 48:427-434.

6. Kato T, Asahara H, Suzuki-Kurokawa M, Fujisawa K, Hasunuma T, Inoue H, Motokawa S, Sumida T, Nishioka K. HTLV-I env protein acts as a major antigen in patients with HTLV-I associated arthropathy. *Clin Rheumatol* 2004 Oct; 23(5):400-9.

7. Tanaka M, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K, Nakamura H. Suppressive effects of hyaluronan on MMP-1 and RANTES production from chondrocytes. *Rheumatol Int.* 2004 Dec 3 (in press)

8. Kato T, Xiang Y, Nakamura H, Nishioka K. Neo-antigens in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16:604-608.

9. Nakamura H, Shibakawa A, Tanaka M, Kato T, Nishioka K. Effects of glucosamine hydrochloride on the production of prostaglandin E2, nitric oxide and metalloproteases by chondrocytes and synoviocytes in osteoarthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22:293-299.

10. Shan ZZ, Masuko-Hongo K, Dai SM, Nakamura H, Kato T, Nishioka K. A role of 15d-PGJ2 in chondrocyte apoptosis. *JBC* 2004; 279:37939-37950.

11. Fukuda Y, Yotsuyanagi H, Ooka S, Sekine T, Koike J, Takano T, Suzuki M, Itoh F, Nishioka K, Kato T. Identification of a New Autoantibody in Patients With Chronic Hepatitis. *Hum Immunol.* 2004 Dec; 65(12): 1530-8.

12. Karasawa R, Ozaki S, Nishioka K, Kato T. Autoantibodies to Peroxiredoxin I and IV in patients with systemic autoimmune diseases. *Microbiol. Immunol.* 2005; 49(1): 57-65.

13. Yudoh K, Trieu NV, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K. Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis Res Ther.* 2005; 7: R380-R391.

14. Orita M, Masuko-Hongo K, Yotsuyanagi H, Matsui T, Suzuki-Kurokawa M, Nishioka K, Kato T. Molecular Transplantation: Delivery of membranous proteins onto live cells. *Anal Biochem.* 2005; 340: 184-186.

15. Yudoh K, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T,

Nishioka K. Catabolic stress induces expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  in articular chondrocytes: involvement of HIF-1 $\alpha$  in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2005; 7: R904-R914.

16. Shibakawa A, Yudoh K, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K, Nakamura H. The role of subchondral bone resorption pits in osteoarthritis: MMP production by cells derived from bone marrow. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005 Aug;13(8):679-87.

17. Du H, Masuko-Hongo K, Nakamura H, Xiang Y, Bao CD, Wang XD, Chen SL, Nishioka K, Kato T. The prevalence of autoantibodies against cartilage intermediate layer protein, YKL-39, osteopontin, and cyclic citrullinated peptide in patients with early-stage knee osteoarthritis: evidence of a variety of autoimmune processes. *Rheumatol Int.* 2004 Sep 18; [Epub ahead of print]

18. Matsuoka A, Kato T, Soma Y, Takahama H, Nakamura M, Matsuoka H, Mizoguchi M. Analysis of T cell receptor (TCR) BV-gene clonotypes in NC/Nga mice developing dermatitis resembling human atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* 2005 Apr; 38(1):17-24. Epub 2005 Jan 12.

19. Masuko-Hongo K, Kato T. Recent developments in treatment of osteoarthritis. *Current Drug Inflammation and Allergy* (in press).

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

名称：強皮症の診断方法、強皮症の診断薬及び強皮症診断マーカー

出願番号：特願 2006-3783

出願日：平成 18 年 1 月 11 日

##### 2. 実用新案登録

特になし

##### 3. その他

特になし



## 複合遺伝性疾患としての自己免疫疾患とその基礎となる自己免疫現象の 遺伝因子解析の理論研究とその実践的活用

分担研究者 山田 亮 京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター  
疾患ゲノム疫学解析分野 助教授

**研究要旨** SNPを用いた連鎖不平衡マッピングを実施するための研究体制・データ解析環境の整備を進めた。また、連鎖不平衡マッピングの新規探索手法の開発のための予備的検討を行った。

### A. 研究目的

自己免疫疾患感受性遺伝因子の解析により、自己免疫現象・自己免疫疾患の機構解明・新規臨床応用の可能性を探索する。自己免疫疾患において、その家族集積性・発病率、および、過去の遺伝因子解析の知見の蓄積から、好適と考えられる全身性エリテマトーデスを標的に、ケース・コントロール関連アプローチによる感受性遺伝子探索を行う。

### B. 研究方法

探索にあたっては、1塩基多型(SNP)を遺伝マーカーとし、個別サンプルのジェノタイピングを実施し、連鎖不平衡マッピングにより関連ローカスの同定・関連多型の特定を目指す。

また、同定ローカスの多型解析の手法の1つとして、提唱されている、アンセストラル・リコンビネーション・グラフ(ARG)の再構成に基づく手法について、その複合性遺伝性疾患モデルへの適合性を検証し、実データへの応用について検討する。

(倫理面への配慮) ヒトゲノム情報を用いた解析であるので、ヒトゲノム解析の指針に則り、計画の審査・承認手続きを進めている。

### C. 研究結果

連鎖不平衡マッピングの基盤整備として、また、連鎖不平衡マッピングのための新規手

SNPを用いた連鎖不平衡マッピングを行うための基礎的な手法を大規模データに適用するための解析環境整備を以下のように行った。

- ・ Pairwise LD
  - $r^2$  を中心に  $D'$  を併用
- ・ LD block
  - Solid Spine of LD を中心に Gabriel 法、Four gamete test 法を併用
- ・ Recombination rate 推定
  - Coalescent model based-RJMCMC
- ・ Haplotype 推定
  - PLEM
  - SNPHAP
  - Phase
  - EM for 2-individual pooled data
- ・ 関連検定
  - 単一 SNP・ハプロタイプ アレル頻度分割表検定
  - 一般線形回帰法・尤度解析(尤度比検定とスコア検定)
  - Permutation 補正
- ・ TagSNP 選別
  - $r^2$ -greedy 法
  - Optinum solution 法

法の開発の一環として、ARG手法の検証と応用のために次のことを行った。疾患ローカス・疾患多型を有する集団のシミュレシヨナルな作成方法を実装した。またそれに対する、基礎的なARG再構築プログラムの実装を終了。また、実用に耐えるコンピュータ環境整備の一環としてPCクラスタの導入し、構築を開始した。

#### D. 考察

SNPを用いた連鎖不平衡マッピングを実施するための、基本的解析環境の整備が進んだ。また、新規手法の開発の予備的検討が終了した。

#### E. 結論

自己免疫疾患のゲノム解析を開始する基盤の整備を進めており、その具体化に向けた次年度に向けた計画策定を行う段階である。

#### F. 健康危機情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Association of a single-nucleotide polymorphism in the immunoglobulin  $\mu$ -binding protein 2 gene with immunoglobulin A nephropathy/J. Hum. Genet. 50 30-35 2005/Ohtsubo S. Iida A. Nitta K. Tanaka T. Yamada R. Ohnishi Y. Maeda S. Tsunoda T. Takei T. Obara W. Akiyama F. Ito K. Honda K. Uchida K. Tsuchiya K. Yumura W. Ujiie T. Nagane Y. Miyano S. Suzuki Y. Narita I. Gejyo F. Fujioka T. Nihei H. and Nakamura Y.
2. Comparison of enzymatic properties between hPADI2 and hPADI4/Biochem. Biophys. Res. Commun. 327 192--200 2005/Nakayama M. Horiguchi A. S. Kubota K. Takazawa T. Ohsaka M. Kawaida R. Ono M. Kasuya A. Furukawa H. Yamada R. and Yamamoto K.
3. Inhibition of antithrombin by hyaluronic acid

may be involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis/Arthritis Res. Ther. 7 R268--R273 2005/Chang X. Yamada R. and Yamamoto K.

4. Recent findings on genes associated with inflammatory disease/Muta. Res./Fund. Mol. Mech. Mutagen. 573 136--151 2005/Yamada R. and Yamamoto K.

5. Peptidylarginine deiminase type 4, anticitrullinated peptide antibodies, and rheumatoid arthritis/Autoimmun. Rev. 4 201--206 2005/Yamada R.

6. Anti-citrullinated collagen type I antibody is a target of autoimmunity in rheumatoid arthritis/Biochem. Biophys. Res. Commun. 333 41--426 2005/Suzuki A. Yamada R. Yamanaka M. Okazaki Y. Sawada T. and Yamamoto K.

7. Ethnic differences in allele frequency of autoimmune-disease-associated SNPs/J. Hum. Genet. 50 264--266 2005/Mori M. Yamada R. Kobayashi K. Kawaida R. and Yamamoto K.

8. A functional variant in FCRL3, encoding Fc receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities/Nat. Genet. 37 No. 5 478--485 2005/Kochi Y. Yamada R. Suzuki A. Harley J. B. Shirasawa S. Sawada T. Bae S. Tokuhira S. Chang X. Sekine A. Takahashi A. Tsunoda T. Ohnishi Y. Kaufman K. M. Kang C. P. Kang C. Ostubo S. Yumura W. Mimori A. Koike T. Nakamura Y. Sasazuki T. and Yamamoto K.

9. Anti-citrullinated collagen type I antibody is a target of autoimmunity in rheumatoid arthritis/Biochem. Biophys. Res. Commun. 333 418--426 2005/Suzuki A. Yamada R. Yamanaka M. Okazaki Y. Sasada T. and Yamamoto K.

10. Peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) identified as a conformation-dependent autoantigen in rheumatoid arthritis/Scand J Rheumatol 34 212--215 2005/Takizawa Y. Sawada T. Suzuki A. Yamada R. Inoue T. and Yamamoto K.

11. CUL1, a component of E3 ubiquitin ligase, alters lymphocyte signal transduction with possible effect on rheumatoid arthritis./ Gen. Immun. 6 194--202 2005/KawaidaR. YamadaR. KobayasiK. TokuhiroS. SuzukiA. KochiY. ChangX. SekineA. TsunodaT. SawadaT. FurukawaH. NakamuraY. and YamamotoK.

## 2. 学会発表

<海外>

1.Genome-wide map of gene-based and block-based haplotypes and tag SNPs and comparison of power for association study/13th Takeda Science Foundation Symp. on Bioscience on Genome Analysis and Medicine/ Tokyo/ Dec. 2004/TsunodaT. LathropG. M. SekineA. YamadaR. TakahashiA. OhnishiY. TanakaT. and NakamuraY.

2. The quantification of the allelic variations of gene expression by real-time TaqMan PCR/The American Society of Human Genetics 55th Annual Meeting (ASHG 2005)/ Salt Lake City/USA/2005 Oct./ KobayasiK., SuzukiA., KochiY., YamadaR., and YamamotoK.

<国内>

1.自己免疫疾患感受性 SNP の人種差の検討/第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会/横浜/2005 年 4 月/森美賀子, 山田亮, 小林香子, 川井田礼美, 山本一彦

2. 関節リウマチとの関連が報告された SNPs についての日本人での追認関連解析/第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会/横浜/2005 年 4 月/小林香子, 高地雄太, 山田亮, 森美賀子, 川井田礼美, 山本一彦

3. 関節リウマチ感受性遺伝子 FCRL3 の同定/第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会/横浜/2005 年 4 月/高地雄太, 山田亮, 山本一彦

4. ユビキチンリガーゼの構成成分 CUL1 は血球のシグナル伝達系を介して RA の罹患率へ影響を与える可能性を持つ/第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会/横浜/2005 年 4 月/川井田礼美, 山田亮, 小林香子, 高地雄太,

沢田(哲治), 山本一彦

5. SNP による大規模 LD マッピング/第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会/横浜/2005 年 4 月/川口喬久, 川上弘人, 山田亮, 関根章博, 中村祐輔, 山本一彦, 角田達彦

6. 免疫スクリーニング法による関節リウマチ関連遺伝子 peptidylarginine deiminase type four (PADI4) の基質同定/第 28 回日本分子生物学会年会/福岡/2005 年 12 月/山中美弥子, 鈴木亜香里, 菅野栄美, 岡崎優子, 沢田哲治, 山田亮, 山本一彦

7. シトルリン化フィブリノーゲンにおける関節リウマチの自己抗原部位の同定/第 35 回免疫学会総会・学術集会/横浜/2005 年 12 月/菅野栄美, 山田亮, 山中美弥子, 瀧澤泰伸, 沢田哲治, 山本一彦

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

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

サイトカインシグナルの抑制と自己免疫疾患の治療に関する研究  
—IL-6 阻害による難治性 SLE の探索的治療と DNA チップを用いた病態関連分子の解析—

分担研究者 西本憲弘 大阪大学大学院生命機能研究科 教授

**研究要旨** IL-6 は免疫や炎症反応にかかわるサイトカインであり、SLE の難治性病態への関与が考えられる。ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体 (tocilizumab) による SLE 治療の可能性を検討するとともに、DNA マイクロアレイを用いて、SLE の病態ならびに IL-6 阻害治療に関連する分子の同定を試みた。SLE 患者と健常人との比較によりインターフェロン $\alpha$ によって誘導される 9 分子ならびに defensin- $\alpha$  などの分子が検出された。これらの分子群は SLE の疾患活動性を反映した。また、IL-6 阻害治療により defensin- $\alpha$  を含む 5 分子が有意な変動を示した。これらの分子は SLE の病態にかかわると考えられる。

**A. 研究目的**

SLE はステロイド剤や免疫抑制剤に抵抗性を示す難治症例も多く、新しい治療法の開発が望まれている。IL-6 は免疫や炎症反応にかかわるサイトカインであり、ループス腎炎や CNS ループスなどの難治性病態への関与が示唆されている。そこで、ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体 (tocilizumab) による治療の可能性を検討するとともに、DNA マイクロアレイを用いて、SLE の病態ならびに IL-6 阻害治療に関連する分子を同定することを目的とした。

**B. 研究方法**

インフォームドコンセントを得た SLE 患者 11 例と健常成人女性 6 例の末梢血全血より PAX gene™ ならびに RNA Blood Kit™ (PreAnalytiX, Hombrechtikon, Switzerland) を用いて total RNA を抽出した。Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, California) により純度を確認した後、Amino Allyl MessageAmp™ aRNA kit (Ambion Inc. Austin, Texas) にて増幅した。増幅したアミノアリル RNA を蛍光色素 Cy3、Cy5 で間接標識後、ヒトの 3 万個の遺伝子からデザインしたオリゴ DNA 搭載マイクロアレイ DNA チップ (Human Oligo Chip Human 30K, AceGene®, DNA Chip Research Inc. & Hitachi Software Engineering Co., Ltd., Yokohama) にハイブリダイゼーションを行い、蛍光スキャナーで末梢血細胞中に発現している分子の RNA 発現量を測定した。個々の症例における発現量を比較するために基

準となる標準 (レファランス) は、健常成人女性 12 例の末梢血より抽出した RNA を用いて aRNA を増幅後プールし作成した。個々の症例の aRNA とレファランスを競合ハイブリさせ、それぞれの蛍光強度の比を用いて発現量を表した。

SLE 患者 11 例と健常人 6 例とで比較し、健常人と比較し発現量に差がある分子 (SLE の病態関連分子) を網羅的に検索した。これらの分子の中から特に有意差の強い分子かつ健常人で変動しない分子を選択した。

次に、エンドキサンパルス療法を行った新規の患者ならびに従来の免疫抑制療法に抵抗性で、tocilizumab による探索的治療を行った難治性の SLE 患者において、その治療前後で発現量が変化する分子を DNA チップにより検索した。エンドキサンパルス療法前後の分子発現プロフィールを前述の SLE 患者 11 例と健常成人女性 6 例と共にクラスター解析を行った。その際、前述の病態関連分子を用いてクラスタリングを行った。

同様に、IL-6 阻害治療前後でクラスター解析を行うと共に、IL-6 阻害治療によって有意に変動する分子をしぼりこんだ。

データ解析は蛍光スキャナーで読み取った画像を DNASIS Array (Hitachi Software Engineering Co., Ltd., Yokohama) を用いて蛍光強度を数値化し、Global Ratio Normalization 法を使用して補正し、解析した。統計解析ソフト Avadis (Strand Life Sciences) を使用した。

(倫理面への配慮) 本研究は大阪大学の臨床研究倫理委員会の承認の下に行った。また、被験者の文書による同意の取得のうえ行った。診療記録や採取した検体は、氏名・生年月日・住所などの情報を削除し、匿名化した。

### C. 研究結果

SLE患者で median intensity  $\geq 500$  を満たした分子のうち、活動性 SLE 患者群で有意差をもって発現が増強または減少していた分子は  $p < 0.05$  で 1641 分子、 $p < 0.005$  で 295 分子であった。これらの分子のうち発現量が mean で健常人群の 2 倍以上または 2 分の 1 以下の分子は  $p < 0.05$  で 41 分子、 $p < 0.005$  で 24 分子であり、それらの上位にはインターフェロン $\alpha$ によって誘導される 9 分子ならびに抗菌ペプチドである defensin- $\alpha$ が含まれていた(表 1 参照)。

次に、これらの分子が疾患活動性を反映するかどうかを検証するために、増殖性糸球体腎炎 (ISN/RPS 分類の IV 型) の患者に対しエンドキサンパルス療法を行った新たな症例の DNA チッププロフィールを追加し、前述の 24 分子を用いて再度クラスタリング解析を行ったところ、治療前の mRNA 発現プロフィールは SLE 群に、治療後の mRNA 発現プロフィールは健常人群に分類され、これらの分子は疾患活動性を反映することが確認された。また、免疫抑制療法や rituximab に抵抗性を示した難治性 SLE 患者に、ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体 tocilizumab による探索的治療を行い、tocilizumab の投与前と投与後の末梢血細胞中の mRNA 発現変動の比較を行ったところ defensin- $\alpha 3$  と  $\alpha 4$  を含めた 5 分子が IL-6 阻害に伴い変動する事がわかった。

### D. 考察

SLE 患者末梢血の DNA マイクロアレイを用いた解析により SLE の疾患活動性を反映すると考えられる分子群が同定された。その中には、インターフェロン $\alpha$ により誘導される分子群が含まれており、SLE 病態にインターフェロン $\alpha$ の関与が示唆された。末梢血全血での解析では単核球を分離する必要がなく便利であり、今後応用性が広がると考えられる。

また、IL-6 阻害治療に関連する候補分子として defensin を含む 5 分子が絞り込まれた。現在、これらの分子の SLE 病態形成における役割を知るために個々の分子の機能解析を行っている。IL-6 疎外の有効性に関しては現時点では評価困難であり、今後症例を重ねる必要がある。なお米国で行われている SLE に対する臨床第 1 相試験では、tocilizumab の投

与により、SLE の活動性の低下と T 細胞、B 細胞ともにメモリーのマーカーを持つ細胞が減少し、ナイーブ細胞が増加したとの報告があり、有効性が期待される。

### E. 結論

DNA マイクロアレイによる患者末梢血全血を用いた解析により SLE の病態に関連する候補分子が同定できた。

### F. 健康危機情報

特記すべきことなし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Doganci A, Eigenbrod T, Krug N, De Santis,GT, Hausding M, Erpenbeck VJ, Haddad, E,Bopp T, Kallen KJ, Herz U, Schmitt S, Luft C, Hecht O, Hohlfeld JM, Nishimoto N, et al. The IL-6  $\alpha$ chain controls lung CD4+CD25+ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo. *J. Clin. Invest.* 115: 313-325, 2005
2. Yokota S, Miyamae T, Imagawa T, Iwata N, Katakura S, Mori M, Woo P, Nishimoto N, et al. Therapeutic Efficacy of Humanized Recombinant Anti-IL-6-Receptor Antibody for Children with Systemic-Onset Juvenile Idiopathic Arthritis. *Arthritis Rheum.* 52: 818-825, 2005
3. Miyamae T, Malehorn DE, Lemster B, Mori M, Imagawa T, Yokota S, Bigbee WL, Welsh M, Klarskov K, Nishimoto N, et al. Serum protein in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis differentiates response versus nonresponse to therapy. *Arthritis Res. & Therapy.* 7: R746- R755, 2005
4. 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.* 100: e54-e62, 2005
5. Mihara M, Nishimoto N, Ohsugi Y. The therapy of autoimmune diseases by anti-interleukin-6 receptor antibody. *Expert Opin. Biol. Ther.* 5:683-690, 2005
6. Nishimoto N. Clinical study in patients with Castleman's disease, Crohn's disease and rheumatoid arthritis in Japan. *Clin. Rev. in Allergy and Immunol.* 28:221-230, 2005
7. Nishimoto N. Cytokine signal regulation and

autoimmune disorders. *Autoimmunity* 38:359- 367, 2005

8. Sugimoto K, Nishimoto N, Kishimoto T, et al. Imaging of lesions in a murine rheumatoid arthritis model with a humanized anti- interleukin-6 receptor antibody. *Ann Nucl Med.* 19:261-266, 2005
9. Yamamoto M, Nishimoto N, Davydova J, et al. Suppressor of Cytokine Signaling-1 (SOCS-1) Expression by Infectivity Enhanced Adenoviral Vector Inhibits IL-6 Dependent Proliferation of Multiple Myeloma Cells. *Cancer Gene Ther.* 2005 Aug 5; [Epub ahead of print]
10. Nishimoto N, Kanakura Y, Aozasa K, et al. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman's disease. *Blood* 106:2627-2632, 2005.
11. Mihara M, Nishimoto N, Ohsugi Y. Effect of anti-mouse interleukin-6 receptor antibody in autoimmune mouse models. *In Monoclonal Antibodies: New Research, Nova Science Publishers, Inc. Edited by Simmons MA.* pp151-162, 2005

## 2. 学会発表

1. Nishimoto N. Anti-IL-6 receptor antibody therapy for immunological diseases. Keystone Symposia: Cytokines, Disease and Therapeutic Intervention. 2005.2.12-17.
2. Nishimoto N. et al. Blocking interleukin-6 (IL-6) by tocilizumab (a humanized anti-IL-6 receptor antibody) monotherapy reduces joint damage in active rheumatoid arthritis –evidence from an X-ray reader-blinded randomized controlled trial-. ACR/ARHP 69th Annual Scientific Meeting 2005. 2005.11.17.

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

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

表 1. SLE 群と健常人群とで発現に有意差 (P<0.005) があり平均で 2 倍以上動いた分子。

Description	p-value	増・減
il129 protein precursor; th29	0.0000000	↑
defensin, alpha 3, preproprotein; defa3	0.0000022	↑
metallothionein 1h; mt1h	0.0000027	↑
cyclin-e binding protein 1; loc51191	0.0000111	↑
hypothetical protein, expressed in osteoblast; gs3686	0.0000191	↑
interferon-stimulated protein, 15 kda; isg15	0.0000382	↑
putative breast epithelial stromal interaction protein; epst1l	0.0000561	↑
guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kd; gbp1	0.0000872	↑
interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1; ifit1	0.0001339	↑
interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 4; ifit4	0.0001386	↑
2'-5'oligoadenylate synthetase-like; oasl	0.0002148	↑
complement component 1 inhibitor precursor; serping1	0.0003027	↑
tercd	0.0006238	↓
mhc class ii hla-dq-alpha chain; hla-dqa1	0.0009238	↓
ribosomal protein l22 proprotein; rpl22	0.0014889	↓
hypothetical protein xp_016170; loc88021	0.0022996	↓
edrf	0.0028210	↑
tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10; tnfrsf10	0.0029265	↑
killer cell lectin-like receptor subfamily b, member 1; klrk1	0.0032226	↓
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6; tnfaip6	0.0035589	↑
ensembl gencode prediction	0.0037061	↑
ribosomal protein l13; rpl13	0.0040575	↓
ribosomal protein l18; rpl18	0.0047146	↓
ribosomal protein s23; rps23	0.0048156	↓

 : IFN inducible gene

## ループス腎炎感受性遺伝子オステオポンチンのタンパク質多型による機能的差異の 責任構造に関する研究

分担研究者 能勢真人 愛媛大学医学部 病因・病態学講座ゲノム病理学分野 教授  
研究協力者 宮崎龍彦 愛媛大学医学部 病因・病態学講座ゲノム病理学分野 助教授

**研究要旨** ループスモデルマウス MRL/lpr のループス腎炎感受性を規定する位置的候補遺伝子として同定したオステオポンチン(*Opn*)に関し、腎炎好発型の MRL 型、腎炎嫌発型の C3H 型との間で複数あるアミノ酸多型部位のどれがループス腎炎の発症に関与するかについて明らかにすることを目的とした。PCR-based mutagenesis の手法で OPN の MRL 型、C3H 型のそれぞれの多型部位のアミノ酸を対立 allele のものに入れ替えたタンパク質をコムギ胚芽による無細胞タンパク質合成系で作製し、それぞれのマクロファージ活性化能、T 細胞活性化能について解析した。MRL 型 OPN は、マクロファージあるいは脾細胞に TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ あるいは IFN- $\gamma$ の発現亢進を誘導し、その効果は C3H 型に比べて有意に高かったが、RGDS モチーフ近傍の MRL 型 Asn126 を Asp に置換した変異合成蛋白では、その効果は wild type に比し激減した。逆に C3H 型 OPN の Asp127 を Asn に置換した OPN では、その効果が MRL 型 OPN の効果にまで回復した。OPN のタンパク質多型による機能的差異を規定しているサイトの少なくとも 1 つは、RGDS モチーフ近傍にあるアミノ酸置換部位であることを明らかにした。

### A. 研究目的

自己免疫性糸球体腎炎や難治性血管炎を含む膠原病疾患群は、その背景に宿主免疫異常の存在が示唆されているが、その発症・進展に直接関与する責任因子はその多くが未だ不明である。特に、この責任因子が免疫系の異常制御によって起こるものか否かを明らかにすることは、治療方法の開発の上でも非常に重要な課題となっている。我々は従来、免疫異常を誘導する *lpr* 遺伝子(Fas 抗原の欠損ミュータント)をもち、糸球体腎炎、全身性肉芽腫性動脈炎、多発性関節炎、唾液腺炎など、多彩な膠原病疾患群を自然発症する MRL/Mp-*lpr/lpr* (以下 MRL/lpr)マウスを用い、膠原病疾患群の発症機序の解析を行ってきた。申請者らはこれまでに、①*lpr* 遺伝子のみでは膠原病疾患群の発症には不十分で、MRL/Mp 系マウス固有の背景遺伝子群の存在が必須であること、②個々の疾病に対応する遺伝的に分離可能な疾患感受性遺伝子および疾患抑制遺伝子群が存在することを遺伝学的に明らかにしてきた<sup>1-5)</sup>。

その中で申請者は、少なくとも 5 番染色体上の *Opn* 遺伝子座を自己免疫性糸球体腎炎の発症感受性候補遺伝子座の一つとしてマップした。Eta-1/オステオポンチン(*Opn*)は、骨芽細胞、マクロファージ、活性化リンパ球、動脈硬化巣の血管内皮細胞や平滑筋細胞により産生される細胞外マトリックス、または接着分子として分類されるタンパク質であるが、①上皮や血管内皮に作用して NO 合成酵素の産生を抑制する、②B-cell の抗体産生能や増殖を活性化する、③マクロファージの分化、遊走化、活性化誘導因子として働く、というサイトカインとしての機能をも有し、④マウス同種間でリケッチア感染感受性遺伝子とのリンカージが存在すること、⑤MRL 系と C3H 系マウス間で *Opn* の cDNA に遺伝子多型が認められ、しかもその多型は機能的差異を生み出し得る蛋白構造変異であることが示されている<sup>6)</sup>。最近、我々は MRL/lpr と同じ H2 プロタイプおよび *lpr* 遺伝子を持ちながら膠原病を発症しない C3H/lpr と MRL/lpr との交配マウスにおいて、OPN 遺伝子型が糸球体腎炎

の疾感受性を規定している、即ち MRL 型の *Opn* allele は C3H 型 allele に対し半優性に、糸球体腎炎発症促進的に作用することを明らかにしている。両者間には 10 ヶ所のアミノ酸置換があり、そのうち 7 ヶ所は三次元構造を修飾して OPN の機能的差異を誘導する可能性がある。この多型のどの部位が、ループス腎炎の発症に関与するかについて明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

① PCR-based-site-directed mutagenesis による改変合成蛋白の作成: コムギ胚芽を用いた無細胞蛋白合成システムにより<sup>7)</sup>、PCR-based-site-directed mutagenesis の手法を用い、アミノ酸置換を一カ所ずつ MRL 型 OPN と同じにした改変合成蛋白を作成した。同様に MRL 型の *Opn* cDNA を操作してアミノ酸置換を C3H 型 OPN と同じにした合成蛋白も同様に作製して解析した (図 1)。

② 合成多型 OPN による脾細胞、及び骨髄由来マクロファージに対するサイトカイン分泌誘導の定量的解析: MRL/Mp-+/+マウスの脾細胞、腹腔Mφおよび骨髄由来マクロファージを採取し、上記①で作成した改変合成 OPN を種々の濃度で加えて短期培養した。時間軸を追って細胞を採取し、mRNA を採取した。これをもとにリアルタイム PCR による遺伝子発現定量システムを用いた RT-PCR により、蛋白多型によるサイトカイン発現誘導能の差異を解析した。また、分泌されたサイトカインを ELISA で定量した。

(倫理面への配慮) 動物実験は、全て愛媛大学総合科学研究支援センター生物資源分野、動物実験ガイドラインに沿って行った。

## C. 研究結果

TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ を指標としたマクロファージ活性化能、脾細胞に於ける IFN- $\gamma$ を指標とした T 細胞活性化能(Th1 誘導能)において、wild type において MRL 型で強く、C3H 型は非常に弱い誘導能しか示さなかった。一方、RGDS モチーフ近傍の MRL 型 Asn126 を Asp に置換した変異合成蛋白では、その効果は wild type に比し激減した。逆に C3H 型 OPN の Asp127 を Asn に置換した OPN では、その効果が MRL 型 OPN の効果にまで回復した。(図 2)

## D. 考察

これらのことは、少なくとも in vitro における OPN のマクロファージの活性化能には、RGDS モチーフ近傍の Asn126 が強く関与していることを示唆している。

## E. 結論

ループスモデルマウス MRL/lpr のループス腎炎感受性遺伝子である OPN のタンパク質多型による機能的差異を規定しているサイトの少なくとも 1 つは、RGDS モチーフ近傍にあるアミノ酸置換部位であることを明らかにした。

## [参考文献]

1. Wang, Y., Nose, M., Kamoto, T., Nishimura, M. and Hiai, H. Host modifier genes affect mouse autoimmunity induced by the lpr gene. *Am. J. Pathol.* 1997. 151: 1791-1798.
2. Nakatsuru, S., Terada, M., Nishihara, M., Kamogawa, J., Miyazaki, T., Qu, W. M., Morimoto, K., Yazawa, C., Ogasawara, H., Abe, Y., Fukui, K., Ichien, G., Ito, M. R., Mori, S., Nakamura, Y. and Nose, M. Genetic dissection of the complex pathological manifestations of collagen disease in MRL/lpr mice. *Pathol. Int.* 1999. 49: 974-982.
4. Nishihara, M., Terada, M., Kamogawa, J., Ohashi, Y., Mori, S., Nakatsuru, S., Nakamura, Y. and Nose, M. Genetic basis of autoimmune sialadenitis in MRL/lpr lupus-prone mice: additive and hierarchical properties of polygenic inheritance. *Arthritis Rheum.* 1999. 42: 2616-2623.
5. Kamogawa, J., Terada, M., Mizuki, S., Nishihara, M., Yamamoto, H., Mori, S., Abe, Y., Morimoto, K., Nakatsuru, S., Nakamura, Y. and Nose, M. Arthritis in MRL/lpr mice is under the control of multiple gene loci with an allelic combination derived from the original inbred strains. *Arthritis Rheum.* 2002. 46: 1067-1074.
6. Ono, M., Yamamoto, T. and Nose, M. Allelic difference in the nucleotide sequence of the *Eta-1/Op* gene transcript. *Mol. Immunol.* 1995. 32: 447-448.
7. Madin, K., Sawasaki, T., Ogasawara, T. and Endo, Y. A highly efficient and robust cell-free protein



synthesis system prepared from wheat embryos: plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2000. 97: 559-564.

## F. 健康危機情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Inoue A, Hasegawa H, Kohno M, Ito MR, Terada M, Imai T, Yoshie O, Nose M, Fujita S.: Antagonist of fractalkine (CX3CL1) ameliorates the initiation and progression of lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum* 52: 1522-33, 2005.
2. Oishi H, Miyazaki T, Mizuki S, Kamogawa J, Lu L-M, Tsubaki T, Arita N, Ono M, Yamamoto H, Nose M.: Accelerating effect of an MRL gene locus on the severity and onset of arthropathy in DBA/1 mice. *Arthritis Rheum* 52: 959-66, 2005.
3. Tsubaki T, Arita N, Kawakami T, Shiratsuchi T, Yamamoto H, Takubo N, Yamada K, Nakata S, Yamamoto S, Nose M.: Characterization of histopathology and gene-expression profiles of synovitis in early rheumatoid arthritis using targeted biopsy specimens. *Arthritis Res Ther* 7: 825-36, 2005.
4. Tsubaki T, Takegawa S, Hanamoto H, Arita N, Kamogawa J, Yamamoto H, Takubo N, Nakata S, Yamada K, Yamamoto S, Yoshie O, and Nose M.: Accumulation of plasma cells expressing CXCR3 in the synovial sublining regions of rheumatoid arthritis in association with production of Mig/CXCL9 by synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 141: 363-71, 2005.
5. Miyazaki T, Ono M, Qu WM, Zhang MC, Mori S, Nakatsuru S, Nakamura Y, Sawasaki T, Endo Y, Nose M.: Implication of allelic polymorphism of osteopontin in the development of lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Eur J Immunol* 35: 1510-20, 2005.
6. Zhang MC, Misu N, Furukawa H, Watanabe Y, Terada M, Komori H, Miyazaki T, Nose M, Ono M.: An epistatic effect of the female-specific loci on the development of autoimmune vasculitis and anti-nuclear autoantibody in murine lupus. *Ann Rheum Dis* : 2005. (in press)
7. Komori, H. Furukawa, H. Mori, S. Ito, M R. Terada, M. Zhang, M C. Ishii, N. Sakuma, N. Nose, M. Ono, M.: A signal adaptor SLAM-associated protein regulates spontaneous autoimmunity and Fas-dependent lymphoproliferation in MRL-Faslpr lupus mice. *J Immunol* 176: 395-400, 2006.
8. 小森浩章, 能勢真人: 自己免疫疾患のモデル動物とゲノム解析. *医学のあゆみ* 213: 5-9, 2005
9. 能勢真人: 血管炎のポリジーンネットワーク. *医学のあゆみ* 214:5-8,2005
10. 能勢真人: 膠原病の概念. *病理と臨床* 23 臨時増刊号 膠原病の病理診断マニュアル: 2-6, 2005
11. 椿崇仁, 有田典正, 能勢真人: 【最新関節リウマチ診断・治療マニュアル】 リウマチ性疾患の基礎知識 リウマチ性疾患と炎症 早期 RA 滑膜組織における遺伝子発現プロファイル. *Orthopaedics* 18: 8-16, 2005
12. 鴨川淳二, 水木伸一, 大石久史, 能勢真人: 【関節リウマチとゲノム】 関節リウマチモデルのゲノム解析から学ぶもの. *ゲノム医学* 5:11-19, 2005
13. 能勢真人, 小森浩章: 膠原病のゲノム病理ー病像多様性のポリジーンネットワーク. *Annual Review* 2006 免疫, 中外医学社, p211-223, 2005
14. 能勢真人: 膠原病の病理所見とその読み方 基本的組織病変. *病理と臨床* 23 臨時増刊号 膠原病の病理診断マニュアル (能勢真人, 尾崎承一編), 文光堂, p53-58, 2005
15. 伊藤美津子: 膠原病の病理所見とその読み方 病理検査法. *病理と臨床* 23 臨時増刊号 膠原病の病理診断マニュアル (能勢真人, 尾崎承一編), 文光堂, p59-69, 2005
16. 能勢真人: 臓器病変と鑑別診断 中～小血管. *病理と臨床* 23 臨時増刊号 膠原病の病理診断マニュアル (能勢真人, 尾崎承一編), 文光堂, p91-104, 2005
17. 猿井宏, 武田則之, 能勢真人: 壊死性筋炎を合併したベーチェット病. *病理と臨床* 23 臨時増刊号 膠原病の病理診断マニュアル (能勢真人, 尾崎承一編), 文光堂, p222-225, 2005
18. 能勢真人, 栗原憲二, 塩出昌弘: 顕微鏡的多

- 発血管炎の開胸肺生検,腎生検例. 病理と臨床 23 臨時増刊号 膠原病の病理診断マニュアル (能勢真人, 尾崎承一編), 文光堂, p248-249, 2005
19. 伊藤美津子, 高梨哲生, 藤井博司, 奥田恭章, 能勢真人: 皮膚血管炎を伴った非定型的バージャー病. 病理と臨床 23 臨時増刊号 膠原病の病理診断マニュアル (能勢真人, 尾崎承一編), 文光堂, pp282-286, 2005
  20. 宮崎龍彦, 能勢真人: 抗リン脂質抗体症候群病理編. 血管炎アトラス (吉木敬, 尾崎承一編), 厚生労働省難治性疾患克服研究事業難治性血管炎に関する調査研究班, pp59-60, 2005
  21. 能勢真人, 松本俊一: 全身性エリテマトーデスの血管病変. 血管炎アトラス (吉木敬, 尾崎承一編), 厚生労働省難治性疾患克服研究事業難治性血管炎に関する調査研究班, pp73-74, 2005
  22. 岩崎美津子, 能勢真人: サルコイドーシスの血管病変. 血管炎アトラス (吉木敬, 尾崎承一編), 厚生労働省難治性疾患克服研究事業難治性血管炎に関する調査研究班, pp89-90
  23. 能勢真人, 村上一宏: ウィルス関連血管炎. 血管炎アトラス (吉木敬, 尾崎承一編), 厚生労働省難治性疾患克服研究事業難治性血管炎に関する調査研究班, pp93-94, 2005
- ## 2. 学会発表
1. 宮崎龍彦, 小野栄夫, 能勢真人: オステオポンチン遺伝子多型による機能的差異の責任多型部位の検索. 日本病理学会総会. 横浜. 2005.4.15
  2. 小森浩章, 森士朗, 能勢真人: 組換え近交系を用いたヒ素急性毒性ならびに免疫毒性のゲノム解析. 日本病理学会総会. 横浜. 2005.4.16
  3. 三須直子, 張明才, 寺田美穂, 宮崎龍彦, 能勢真人, 小野栄夫: 自己免疫性糸球体腎炎と自己抗体の遺伝的関連性 ループスマウスの遺伝解析. 日本病理学会総会. 横浜. 2005.4.16
  4. 古川宏, 小森浩章, 能勢真人, 小野栄夫: SLE モデルマウスにおけるSAPとSLAMファミリー受容体の重要性. SLE モデルマウスにおけるSAPとSLAMファミリー受容体の重要性. 日本病理学会総会. 横浜. 2005.4.16
  5. 椿崇仁, 有田典正, 山本晴康, 能勢真人, 川上琢磨, 白土敬之, 山田一人, 田窪伸夫, 仲田三平, 山本純己: 少関節型と多関節型滑膜炎局所における発現遺伝子プロファイルの比較解析. 日本リウマチ学会総会. 横浜, 2005.4.17
  6. 三須直子, 吉田美奈子, 古川宏, 佐々木毅, 能勢真人, 小野栄夫: 自己免疫性糸球体腎炎と自己抗体の遺伝的関連性 ループスマウスの遺伝解析. 日本リウマチ学会総会. 横浜, 2005.4.17
  7. 村岡正武, 長谷川均, 河野政志, 井上淳, 宮崎龍彦, 岩崎美津子, 能勢真人, 藤田繁: IK factor によるループス腎炎の抑制効果. 日本リウマチ学会総会. 横浜, 2005.4.17
  8. 井上淳, 長谷川均, 河野政志, 村岡正武, 岩崎美津子, 寺田美穂, 能勢真人, 藤田繁: NF- $\kappa$ B decoy を用いた免疫寛容誘導性樹状細胞によるループス腎炎の治療. 日本リウマチ学会総会. 横浜, 2005.4.18
  9. 小森浩章, 寺田美穂, 岩崎美津子, 小野栄夫, 森士朗, 能勢真人: 組換え近交系マウスを用いた poly I:C による膠原病病態促進効果のゲノム解析. 日本リウマチ学会総会. 横浜, 2005.4.18
  10. 吉本宗平, 中谷公彦, 浅井修, 長谷川均, 岩野正之, 原田幸児, 赤井靖宏, 西野俊彦, 椎木英夫, 能勢真人, 斎藤能彦: Involvement of fractalkine in proliferative lupus nephritis. 第48回日本腎臓学会総会. 横浜, 2005.6.24
  11. 井上淳, 長谷川均, 河野政志, 村岡正武, 寺田美穂, 宮崎龍彦, 能勢真人: Effect of IP-10 antagonist on autoimmune sialadenitis in MRL/lpr mice. 日本免疫学会総会. 横浜, 2005.12.13
  12. 村岡正武, 長谷川均, 河野政志, 井上淳, 寺田美穂, 宮崎龍彦, 能勢真人: IK factor 投与によるSLE モデルマウスの病態への影響. 日本免疫学会総会. 横浜, 2005.12.14
- ## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得  
特になし
  2. 実用新案登録  
特になし
  3. その他  
特になし

図1. Mutated OPNの作成と精製

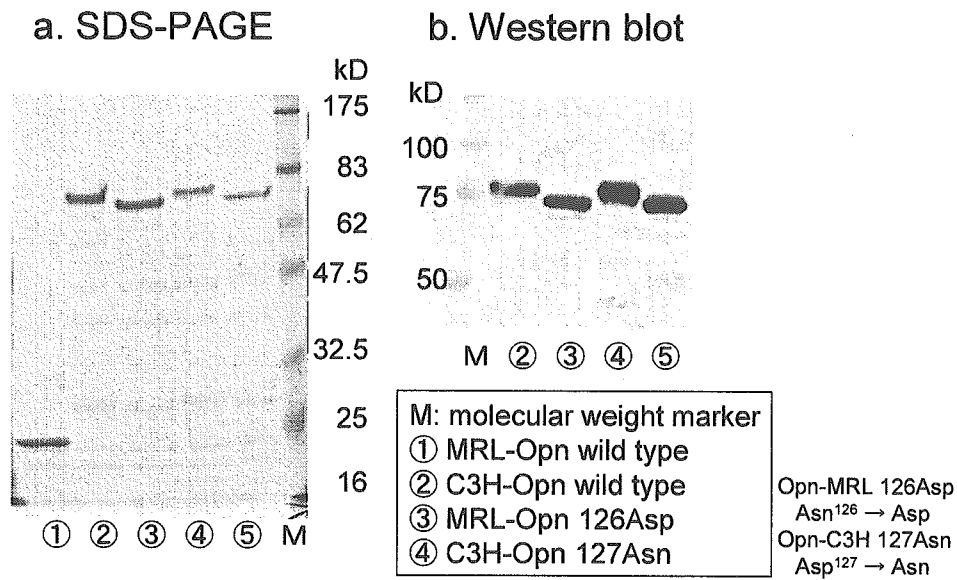
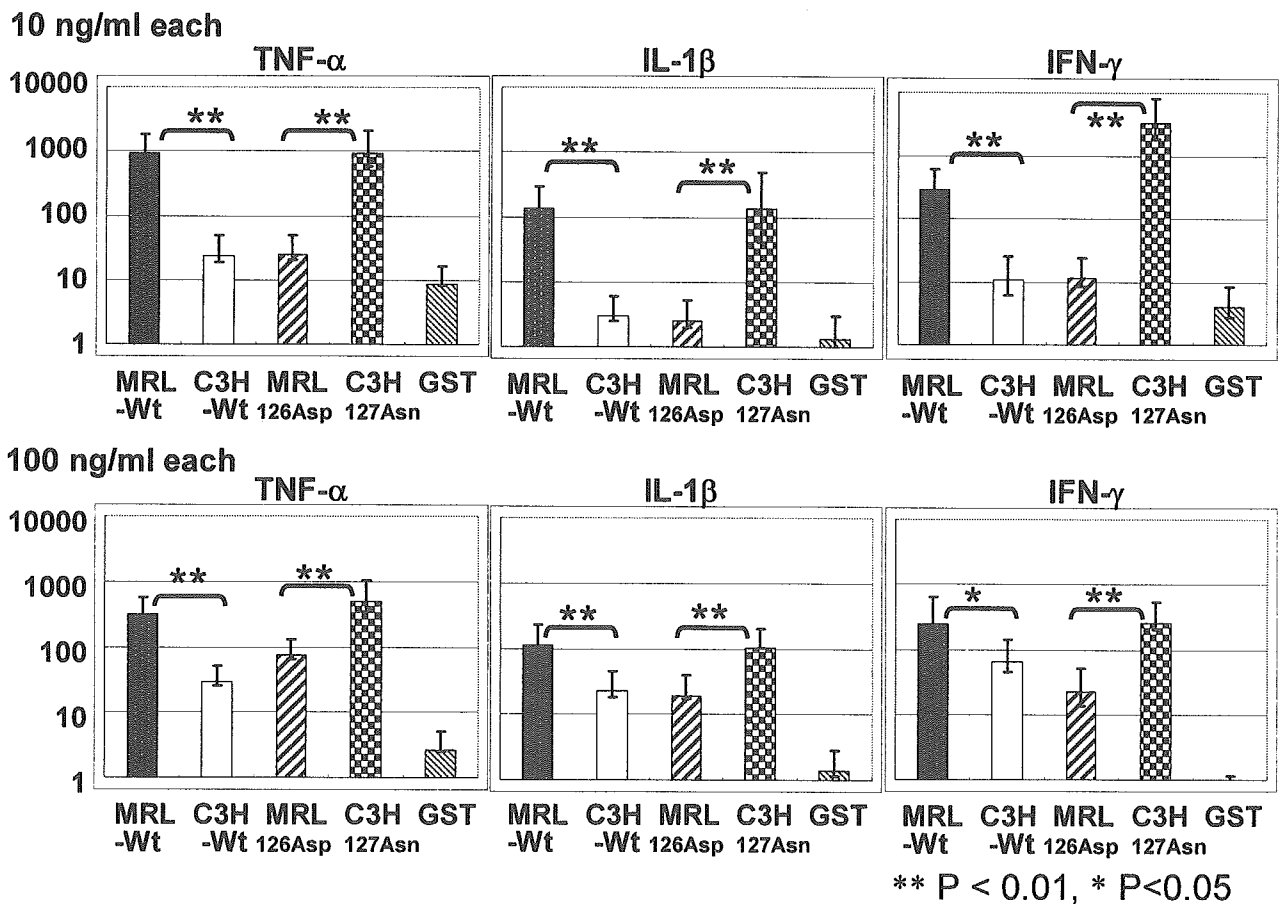


図2. 脾細胞におけるTNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ のmRNA発現量



## CD20 抗体を用いた全身性エリテマトーデス治療の開発に関する研究

分担研究者 田中良哉 産業医科大学医学部第一内科学講座 教授

**研究要旨** 全身性エリテマトーデス（SLE）は、多臓器病変を特徴とする全身性自己免疫疾患であるが、その治療はステロイド薬のみが保険収載されている現状である。自己免疫疾患の発症と維持に於いて、B 細胞は抗原提示を担う stimulator、T 細胞依存性に自己抗体を産生する responder として重要な役割を担ことから、B 細胞と B 細胞表面抗原は治療標的として重要である。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、精神神経 SLE、ループス腎炎、血管内赤血球溶血・凝集、心筋症などの臨床症候や検査成績の改善が得られ、6 例は 1 年以上の長期的寛解を維持した。CD20 抗体の作用機序として、共刺激分子を発現するメモリー B 細胞の質的、量的減衰を介して B 細胞-T 細胞間相互作用を制御し、免疫異常を是正して自己免疫を一時的にリセットしている可能性が示唆され、実際、SLE の疾患活動性とリツキシマブによる治療反応性を B 細胞上の CD40、CD80 の発現量から推測できる可能性が考えられた。

### A. 研究目的

全身性エリテマトーデス（SLE）は、活性化 B 細胞から産生された自己抗体による免疫複合体の形成と組織への沈着により、皮膚、関節、心、腎、漿膜、神経、血管などの多臓器を障害する代表的な全身性自己免疫疾患である。疾患活動性が高く、重症臓器病変を有する症例には、ステロイド薬大量療法に免疫抑制薬を併用する。しかし、ステロイド薬を中心とした非特異的免疫療法では、臓器障害や予後の改善には不十分で、副作用の問題も山積している。また、その治療はステロイド薬のみが保険収載されている現状である。斯様な課題を背景に、生物学的製剤を用いた治療に期待が高まってきた。

自己免疫疾患の発症と維持に於いて、B 細胞は抗原提示を担う stimulator、T 細胞依存性に自己抗体を産生する responder として重要な役割を担ことから、B 細胞と B 細胞表面抗原は治療標的として重要である。B 細胞抗原 CD20 に対する抗体リツキシマブは、B 細胞リンパ腫を対象に保険収載され、高い認容性が実証されている。リツキシマブは、著者らの治療抵抗性 SLE

10 症例に対するパイロットスタディでも多様な臓器病変に奏功した。リツキシマブは SLE に加え、RA、皮膚筋炎、血管炎症候群、シェーグレン症候群などにも有効性が報告される。本研究では、SLE 患者リンパ球を用いてリツキシマブの作用機序を検討した。

### B. 研究方法

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 10 症例に対し、本学倫理委員会承認後に、インフォームドコンセント取得の上、原則として CD20 抗体リツキシマブ 375mg/m<sup>2</sup>/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、末梢血リンパ球の表面抗原をフローサイトメトリーで検出した。

（倫理面への配慮） 臨床検体を使用する場合には、所属機関の倫理委員会、或は、IRB で承認を得た研究に限定し、患者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所機関外に漏洩せぬよう、