

平成18年度 総括・分担研究報告書

# 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

平成19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. 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 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	11
3. TGF- $\beta$ 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	13
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	16
5. 多発性筋炎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 上阪 等	19
6. 病原性 T 細胞のサイトカイン産生制御機構に関する研究 山村 隆	22
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	27
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	32
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	37
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法の開発 長澤 浩平	41
(4) 研究成果の刊行に関する一覧	45

## (1) 構成員名簿

平成18年度 構成員名簿  
(H17-免疫-一般-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

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、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、多発性硬化症、強皮症、多発性筋炎などの難治性の全身性自己免疫疾患に対する先端的新規治療法の確立と開発を行うことが本研究班の目的である。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ったために、欧米に比して画期的治療法を創出しえなかったが、本年度は、班員相互の議論と技術的交流を通じて、先端のかつオリジナリティーの高い研究成果を上げることが出来た。

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、先端の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；SLEの死因の25%を占める難治性病態である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 $\beta_2$ 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；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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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。新たな A20 結合タンパク質として Ymer/C3orf6 を同定し、生化学的に解析した。
- ③ 住田；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- $\beta$  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した。
- ④ 山本；新規サイトカイン Interleukin-32 (IL-32) はマウスマクロファージ及びヒト単球に対して TNF- $\alpha$  産生を誘導するヒトサイトカインとして報告された (Kim SH et al, Immunity 22; 131-142, 2005)。4 つの splice variants が知られているが、発現量が多いものは IL-32 $\alpha$ 、IL-32 $\beta$  であり、IL-32 $\alpha$  は細胞内に存在し、IL-32 $\beta$  は分泌型であると報告されている。関節リウマチの病態形成に強く TNF- $\alpha$  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；多発性筋炎(PM)は原因不明の炎症性筋疾患で、非特異的な免疫抑制療法が行われてきた。しかし、副作用顕在化や治療抵

抗性の症例も認められ、PM の病態に合わせたより選択的な治療法の開発が望まれる。

新たに開発しえた多発性筋炎 (PM) マウス実験モデルである C タンパク誘導性筋炎 (CIM) は、ミオシン粗精製物中の骨格筋 C 蛋白を主要抗原とし、ヒト PM で想定しているのと同様に、細胞障害性 CD8T 細胞による筋傷害が筋炎の病態に重要であるという特性を持っており、PM に対する新規治療法の開発に寄与するモデルであることを昨年報告した。

今年度は、既に臨床使用可能な生物学的製剤が標的とするサイトカインの遺伝子を欠損するマウスを用いて、CIM 発症における各サイトカインの重要性を検討した。また、各製剤マウス代用体による治療を試み、これらを治療標的とすることの妥当性を検討する。また、PM の病態解析へ向け、CIM の発症と自然寛解における獲得並びに自然免疫系の関与を検討した。

- ⑥ 山村；これまで多発性硬化症 (Multiple Sclerosis: MS) 患者由来末梢血 T 細胞において、健康人に比して発現亢進する遺伝子群を、DNA マイクロアレイを用いて解析し報告してきた。今回その中で最も有意な発現差異を認めた分子 NR4A2 に着目し、病態との関連を解析した。NR4A2 は、Steroid thyroid hormone receptor superfamily に属するオーファン核内受容体で、さまざまな生体応答に関わる分子である。今回は、T 細胞における NR4A2 の機能を、病態との関連に焦点を絞って解析した。
- ⑦ 坂口；正常個体中には、CD4 + T 細胞の約 10% を占める制御性 T 細胞が存在する。この T 細胞群は、CD25 分子および転写因子 Foxp3 を恒常的に発現する。その異常は自己免疫病の原因となる。一方、この内在性制御性 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。坂口は、内在性制御性 T 細胞の分子マーカーの検索と制御性 T 細胞の抑制機能の分子的基础の解明、それ

を用いた自己免疫反応の制御を検討した。

- ⑧ 田中；全身性エリテマトーデス（SLE）は、多臓器障害を伴う代表的な自己免疫疾患であるが、急性期治療に関しては明確な指標はなく、ステロイド薬と免疫抑制薬の併用による非特異的治療が中心を成す。しかし、免疫抑制薬は保険未収載で、臨床試験を経た薬剤の開発が必至である。SLEは、B細胞による過剰な自己抗体産生により齎される免疫複合体病であり、CD20等のB細胞特異的表面抗原は治療標的として重要である。リツキシマブを用いたCD20抗体療法は、B細胞リンパ腫を対象に保険収載されるが、申請者らは、既存の治療に抵抗性の重症SLE 15症例を対象に、B細胞を標的としたCD20モノクローナル抗体リツキシマブを用いたパイロットスタディを実践し、高い臨床効果を確認した。今回、当該班の構成員を中心にGCP準拠第I/II相臨床試験を実践し、有効性、副作用、HACA産生などの問題点の検証を行った。
- ⑨ 原田；これまで、14例の難治性自己免疫疾患患者に対し、自己末梢血CD34陽性細胞移植(自己PBSCT)を施行し、有効例の多くにおいて2年以上効果が持続することを確認している。本研究では、最も症例数の多い全身性硬化症(SSc)に焦点を絞り、自己PBSCT後の免疫学的再構築の解析による長期寛解の機序の解明を目的とした。
- ⑩ 長澤；自己免疫疾患において最近、B細胞を標的とした治療法が有用であることが証明されている。自己免疫疾患におけるB細胞異常の中でも、自己抗体産生B細胞は病態形成の重要な部分を占めている。したがって自己抗体産生B細胞を標的とした治療は理論上、最も有用な方法の一つである。しかし、自己抗体産生B細胞を標的とした治療法は未だ確立されていない。そこで、SLEなどの自己免疫疾患で出現する自己抗体産生RP105陰性B細胞を標的として、病的細胞に限定した有効かつ安全な治療法が

開発できないかを検討した。今回、RP105陰性B細胞の維持機構についても検討を試みた。

## C.研究結果

- ① 小池；抗CL/β<sub>2</sub>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、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<sub>2</sub>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<sub>2</sub>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を同定した。そのなかで、ゲルゾリンがβ<sub>2</sub>GPIと結合することが確認され、さらにインテグリンα5β1と共役して抗CL/β<sub>2</sub>GPI抗体による細胞刺激シグナルに関与していることが示唆された。
- ② 畠山；NF-κBの強力な阻害分子であるA20の結合タンパク質としてYmerを同定し、NF-κBシグナルにおける抑制作用を明らかにした。
- ③ 住田；TGF-βI型受容体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、有効である可能性が示唆された。
- ④ 山本；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 上坂；IL1、TNFα、IL6阻害剤ともに筋炎治療に有用と考える根拠が得られた。また、CIM筋炎惹起は主にCD8T細胞が担う。免疫後、内因性筋抗原により自己免疫T細胞反応は拡大するにもかかわらず、筋炎は自然消退する。CFA再投与で再燃すること、およびT細胞養子移入による筋炎発症にCFA局所投与が必須であることは、筋炎顕在化には、末梢での自己反応性T細胞の存在と筋組織の自然免疫活性化の双方が必要であることを示すものである。
- ⑥ 山村；MS患者における選択的なNR4A2発現亢進と、T細胞のIL-17産生制御能から、



NR4A2 が MS をはじめとする種々の自己免疫疾患の新規治療ターゲット分子となりうる可能性が示された。

- ⑦ 坂口；ヒトでもマウスでも、転写因子 Foxp3 は、転写因子 AML1 と結合することで、その機能を発揮する。AML1 の遺伝的異常は、制御性 T 細胞の発生、機能の異常をもたらし、自己免疫病の原因となりうる。また、この相互作用を操作し制御性 T 細胞機能を強化することによる新しい免疫制御法は、将来的に、自己免疫病を含む様々な免疫疾患の治療法となりうる。
- ⑧ 田中；中～重度の flare を有する SLE に対して抗 CD20 抗体リツキシマブ療法を用いた第 I/II 相臨床試験を実施し、安全性と有効性が確認された。今後、そのメカニズムの解明と共に、SLE を対象としたリツキシマブの多施設間二重盲検比較試験を実施し、安全性と有効性を再確認し、新規治療法の確立を目指す。
- ⑨ 原田；自己 PBSCT を施行した SSc 症例において皮膚硬化の改善や自己抗体の低下は 2 年後も持続していた。CD4 陽性 T 細胞の減少や Th1/Th2 バランスの変化が本療法後 2 年間持続しており、病態の改善に関与している可能性が示唆された
- ⑩ 長澤；RP105 陰性 B 細胞は、自己抗体を産生し自己免疫病態に深く関与している。RP105 陰性 B 細胞は、抗原刺激が存在しない状態でも自己抗体産生を行うエフェクター B 細胞であり、そのフェノタイプはこれまでに知られていない新たなヒト B 細胞サブセットを形成していると考えられた。B 細胞を標的とした治療法に rituximab(抗 CD20 抗体)があり、その高い有効性が示唆されている。さらに特異度の高い自己抗体産生 B 細胞を標的とすることで、新たな免疫学的治療法が開発される可能性がある。

## D. 考察

免疫調節細胞である CD4 陽性 CD25 陽性の抑制性 T 細胞や NKT 細胞の機能調節による免疫・炎症反応の抑制、さらには自己抗体産生 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。分子標的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 $\beta$  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新規サイトカイン 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が現実性を帯びてきた。抗 CD20 抗体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。いままで存在しなかった、多発性筋炎のモデルマウスの作成に成功し、今後の治療法の開発に弾みがついた。

## 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 人で昨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 CL/ $\beta_2$ 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く、我々は、抗リン脂質抗体による細胞刺激シグナルについて検討を行った。末梢血単核球 (PBMC) および単球系細胞株において、ヒトモノクローナル抗 CL/ $\beta_2$ GPI 抗体での刺激により p38 MAPK のリン酸化が上昇し、NF- $\kappa$ B の活性化をひきおこし、TF が発現することを認めた。また、マウス単球細胞株 RAW264.7 を用いて $\beta_2$ GPI 関連プロテオームを分離し、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。候補の細胞膜タンパク質の中で、ゲルゾリンが $\beta_2$ GPI と結合していることがウエスタンブロッティング法にて確認された。また、フローサイトメーターによりゲルゾリンが細胞膜表面上でインテグリン $\alpha 5\beta 1$  と結合することが確認され、さらに $\beta_2$ GPI がゲルゾリン、インテグリン $\alpha 5\beta 1$  を含む複合体と結合することが確認された。また、ルシフェラーゼアッセイにより、抗インテグリン抗体によるインテグリン $\alpha 5\beta 1$  阻害により、抗 CL/ $\beta_2$ GPI 抗体による細胞刺激シグナルが減弱することが確認された。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、ゲルゾリン、インテグリン $\alpha 5\beta 1$  を含む複合体が $\beta_2$ GPI の細胞膜表面への結合に関与することが想定され、APS 患者の血栓向性に対する新たな治療の標的と成り得る可能性が示唆された。

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、抗 CL/ $\beta_2$ GPI 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 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示唆されてきた。さらに、抗 $\beta_2$ GPI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- $\kappa$ Bの活性化を介して、TF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。

## B. 研究方法

$\beta_2$ GPIと結合する細胞表面タンパク質の検出のため、まず、FLAGタグ $\beta_2$ GPI発現ベクターを構築する。発現させたリコンビナントFLAGタグ $\beta_2$ GPI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 $\beta_2$ GPIと複合体を形成するタンパク質( $\beta_2$ GPI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。

解析の結果得られたタンパク質につき、 $\beta_2$ GPIとの結合をFACS法およびウエスタンブロットング法にて確認をする。さらにそのタンパク質の存在の有無による抗CL/ $\beta_2$ GPI抗体による細胞刺激シグナルの変動について、ウエスタンブロットング法およびルシフェラーゼアッセイにより解析を行った。

## C. 研究結果

前年度までの結果より、末梢血単核球(PBMC)

および単球系細胞株において、ヒトモノクローナル抗CL/ $\beta_2$ GPI抗体での刺激によりp38 MAPKのリン酸化が上昇し、NF- $\kappa$ Bの活性化をひきおこし、TFが発現することを認めた。また、RAW264.7の細胞溶解液とリコンビナントFLAGタグ $\beta_2$ GPIを混合し、抗FLAG抗体アフィニティークロマトグラフィーにより $\beta_2$ GPI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。候補の細胞膜タンパク質の中で、ゲルゾリンが $\beta_2$ GPIと結合していることがウエスタンブロットング法にて確認された。また、フローサイトメーターによりゲルゾリンが細胞膜表面上でインテグリン $\alpha 5\beta 1$ と結合することが確認され、さらに $\beta_2$ GPIがゲルゾリン、インテグリン $\alpha 5\beta 1$ を含む複合体と結合することが確認された。また、ルシフェラーゼアッセイにより、抗インテグリン抗体によるインテグリン $\alpha 5\beta 1$ 阻害により、抗CL/ $\beta_2$ GPI抗体による細胞刺激シグナルが減弱することが確認された。

## D. 考察

抗CL/ $\beta_2$ GPI抗体による刺激により、細胞表面のインテグリン $\alpha 5\beta 1$ を介して、p38 MAPKのリン酸化が起こり、NF- $\kappa$ 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。また、抗CL/ $\beta_2$ GPI抗体によるTFの発現は $\beta_2$ GPIが存在しているとき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 $\beta_2$ GPIに依存する、すなわち細胞と $\beta_2$ GPI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、ゲルゾリンはインテグリン $\alpha 5\beta 1$ と共役し、抗CL/ $\beta_2$ GPI抗体による細胞刺激に関与している可能性が示唆された。今後、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。

## E. 結論

抗 CL/ $\beta_2$ 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、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 $\beta_2$ 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タンパク質を同定した。そのなかで、ゲルゾリンが $\beta_2$ GPI と結合することが確認され、さらにインテグリン $\alpha 5\beta 1$  と共役して抗 CL/ $\beta_2$ GPI 抗体による細胞刺激シグナルに関与していることが示唆された。

## 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) Koike T, Atsumi T.

“Resurrection of Thrombin ”in the pathophysiology of the antiphospholipid syndrome.

*Arthritis Rheum.* (in press)

2) Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RHW, de Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA.

International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome.

*J Thromb Haemost.* 4:295-306,2006

3) Mizumoto H, Maihara T, Hiejima E, Shiota M, Hata A, Seto S, Atsumi T, Koike T, Hata D.

Transient antiphospholipid antibodies associated with

acute infections in children: a report of three cases and a review of the literature.

*Eur J Pediatr.* 165:484-488,2006

4) Minauchi K, Nishio M, Itoh T, Yamamoto S, Fujimoto K, Sato N, Koike T.

Hepatosplenic alpha/beta T cell lymphoma presenting with cold agglutinin disease.

*Ann Hematol.* 86(2):155-157,2007

5) Nakamura A, Shimizu C, Nagai S, Taniguchi S, Umetsu M, Atsumi T, Wada N, Yoshioka N, Ono Y, Tanizawa Y, Koike T.

A novel mutation of *WFS1* gene in a Japanese man of Wolfram syndrome with positive diabetes-related antibodies.

*Diabetes Res Clin Pract.* 73(2):215-217,2006

6) Nagai S, Shimizu C, Kimura Y, Umetsu M, Taniguchi S, Takeuchi J, Atsumi T, Yoshioka N, Kubo M, Koike T.

A case of reversed pituitary dysfunction with intrasellar mass.

*J Endocrinol Invest.* 29(4):367-372,2006

7) Amengual O, Atsumi T, Koike T.

Pathophysiology of the antiphospholipid syndrome: roles of anticardiolipin antibodies in thrombosis and fibrinolysis.

*APLAR J Rheumatol.* 9:377-386,2006

8) Mizukami K, Nakabayashi T, Naitoh S, Takeda M, Tarumi T, Mizoguchi I, Ieko M, Koike T. One novel and one recurrent mutation in the *PROS1* gene cause type I protein S deficiency in patients with pulmonary embolism associated with deep vein thrombosis.

*Am J Hematol.* 81:787-797,2006

9) 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

10) Furusaki A, Judo S, Yamashita Y, Amasaki Y, Atsumi T, Koike T.

TRAIL-mediated cytotoxicity: Impacts of sTRAIL

and vTRAIL microvesicles.

*J Biol Sci.* 6(1):150-159,2006

11) Niwa H, Koumoto C, Shiga T, Takeuchi J, Mishima S, Segawa T, Atsumi T, Shimizu C, Koike T, Yoshioka N.

Clinical analysis of cognitive function in diabetic patients by MMSE and SPECT.

*Diabetes Res Clin Pract.* 72:142-147,2006

12) Hashimoto T, Nishio M, Sakai T, Fujimoto K, Sato N, Endo T, Koike T.

Acute schizophrenic symptoms as the initial manifestation of HIV infection that respond to highly active antiretroviral therapy.

*Clinical Infectious Diseases.*

42:1653-1655,2006

13) Furukawa S, Yasuda S, Amengual O, Horita T, Atsumi T, Koike T.

Protective effect of pravastatin on vascular endothelium in patients with System Sclerosis: a pilot study.

*Ann Rheum Dis.* 65(8):1118-1120,2006

14) Nishio M, Fujimoto K, Yamamoto S, Endo T, Sakai T, Obara M, Kumano K, Minauchi K, Yamaguchi K, Takeda Y, Sato N, Koizumi K, Mukai M, Koike T.

Hypogammaglobulinemia with a selective delayed recovery in memory B cells and an impaired isotype expression after rituximab administration as an adjuvant to autologous stem cell transplantation for non-Hodgkin lymphoma.

*Eur J Haemato.* 77:226-232,2006

## 2. 学会発表

$\beta 2$  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

## 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 畠山 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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 Ymer/C3orf6 を同定し、生化学的に解析したところ Ymer は NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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  $\kappa$ 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 Ymer が同定された。Ymer 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、Ymer に対する抗体を作製し、内在性の A20 と Ymer 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、Ymer 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 Ymer 上のチロシンリン酸化部位も同定済みである。さらに、 $\kappa$ 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、Ymer 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- $\kappa$ 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Ymer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、Ymer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- $\kappa$ Bの強力な阻害分子であるA20の結合タンパク質としてYmerを同定し、NF- $\kappa$ 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) Mayuko Matsuda, Tadasuke Tsukiyama, Miyuki Bohgaki, Katsuya Nonomura, Shigetsugu Hatakeyama: Establishment of a newly improved detection system for NF- $\kappa$ B activity. Immunol. Lett., in press.

##### 2. 学会発表

1) 畠山鎮次: ユビキチンリガーゼエンジニアリングによるがん治療、第3回日本癌学会カンファレンス(動物モデルによる新時代のがん研究 発症機構から治療まで セッション: 生体を用いた蛋白合成・分解制御システムの解明)、茅野市蓼科高原、2006

2) Shigetsugu Hatakeyama: A novel protein interacts with ubiquitin modifying protein A20. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress. Kyoto, 2006

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

#### 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- $\beta$ 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- $\beta$ (TGF- $\beta$ )が病態に深く関与している疾患に対し、TGF- $\beta$ 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- $\beta$ 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

1)強皮症モデル(GVHDモデル)、ループスモデル(MRL/lpr)、関節炎モデル(コラーゲン誘導性)において、TGF- $\beta$ が病態形成に関与しているか否かを検討する。TGF- $\beta$ I型受容体(ALK V)からTGF- $\beta$ 細胞内シグナル伝達分子Smad2/Smad3を介したシグナル伝達を阻害するALK V阻害薬(IN1130: 2-pyridinil-[1,2,3]triazole, DaeKee Kim, In2Gen, Korea)の治療効果を判定する。

2)ALK V阻害薬の標的分子であるSmad2、Smad3をノックアウトしたマウスの表現型と各種自己免疫疾患モデルの罹患感受性について検討する。

(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

1)MRL/lprマウスの腎病変部位には重症度に相関してSmad2のリン酸化がみとめられた。

2)18週齢MRL/lprマウス(末期ループス腎炎モデル)にIN1130(20mg/kg)を42日間連日腹腔内投与したところ、PBS投与群(各群n=5)に比べ、蛋白尿、BUN、糸球体病変、血管病変に軽快傾向がみとめられた(図1-3)。

3)8週齢MRL/lprマウス(早期ループス腎炎モデル)にIN1130(20mg/kg)を63日間連日腹腔内投与したところ、投与開始2週後の蛋白尿を有意に抑制したが、糸球体病変や血管病変に対する長期効果はみとめられなかった(図4,5)。

4)いずれもIN1130投与群においてリンパ腫、T細胞の活性化の増悪や制御性T細胞(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>foxp3<sup>+</sup>)の減少はみとめられなかった。

5)SPF条件下に飼育したSmad2コンディショナルノックアウトマウス、Smad3ノックアウトマウスにおいて、自己免疫性炎症性疾患の自然発症はみとめられなかった一方、Smad2、Smad3の下流のシグナル伝達分子であるSmad4のコンディショナルノックアウトマウスには免疫異常がみとめられた。

## D. 考察

ループス腎炎に対して有効である可能性が示唆された。

また、ALK V 阻害薬の直接の標的分子である Smad2、Smad3 の発現が免疫担当細胞において減少または消失している、TGF- $\beta$ 1 ノックアウトマウスや TGF- $\beta$ II 型受容体ノックアウトマウスにみられるような自己免疫性炎症の発症をみとめず、長期にわたる MRL/lpr マウスへの投与も病態を増悪させなかったことから、TGF- $\beta$ I 型受容体阻害薬は懸念されてきたような自己免疫疾患の増悪を副作用として惹起しないことが示唆された。

## E. 結論

TGF- $\beta$ I 型受容体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、有効である可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Wakamatsu, E., Nakamura, Y., Matsumoto, I., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T. DNA microarray analysis of labial salivary glands from patients with Sjogren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis. (in press)*
- 2) Yoshioka, H., Ito, S., Handa, S., Tomiha, S., Kose, K., Haishi, T., Tsutsumi, A., and Sumida, T. Low-field compact magnetic resonance imaging system for the hand and wrist in rheumatoid arthritis. *J. Magn. Res. Im. 23:370-376, 2006.*
- 3) Wakamatsu, E., Matsumoto, I., Naito, Y., Goto, D., Mamura, M., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T. Overexpression of phosphorylated STAT-1 $\alpha$  in the labial salivary glands from patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum 54:3476-3484, 2006.*
- 4) Kori, Y., Matsumoto, I., Zhang, H., Yasukochi,

T., Hayashi, T., Iwanami, K., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A. and Sumida, T. Characterization of Th1/Th2 type, glucose-6-phosphate isomerase reactive T cells in the generation of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis. 65: 968-969, 2006.*

5) 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.*

6) Suzuki, E., Tsutsumi, A., Sugihara, M., Mamura, M., Goto, D., Matsumoto, I., Ito, S., Ikeda, K., Ochiai, N., Sato, Y., and Sumida, T. Expression of TNF- $\alpha$ , tristetraprolin, T-cell intracellular antigen-1 and Hu antigen R genes in synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Med. 18: 273-278, 2006.*

7) 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- $\alpha$  production in Jurkat T cells. *Int. J. Mol. Med. 17:801-809, 2006.*

8) 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*

## 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  
特記事項なし

図 1

ALK V阻害薬(IN-1130)のタンパク尿への効果  
(末期ループス腎炎)

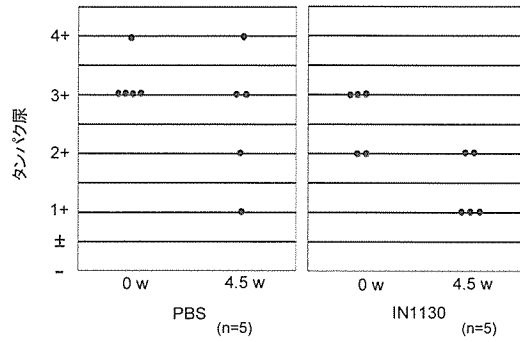


図 4

ALK V阻害薬(IN-1130)のタンパク尿への効果  
(初期ループス腎炎)

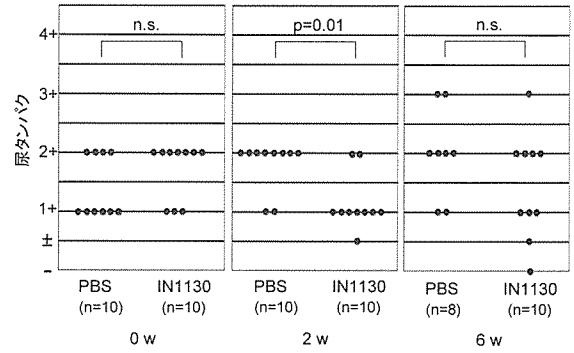


図 2

ALK V阻害薬(IN-1130)投与後の腎組織(H&E染色)  
(末期ループス腎炎)

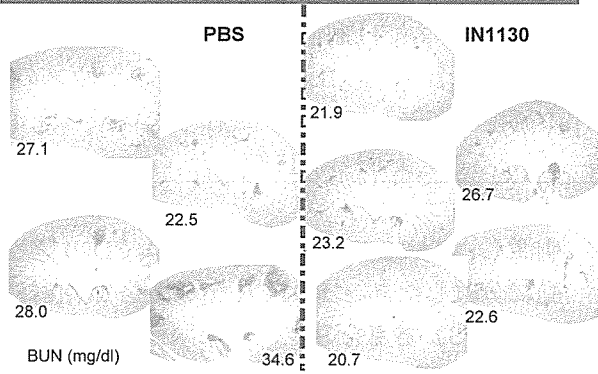


図 5

ALK V阻害薬(IN-1130)投与後の腎病変病理評価  
(初期ループス腎炎)

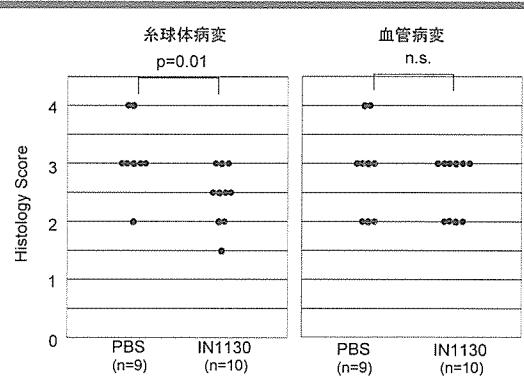
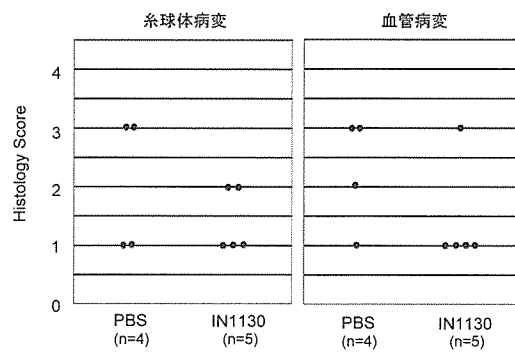


図 3

ALK V阻害薬(IN-1130)投与後の腎病変病理評価  
(末期ループス腎炎)



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

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

分担研究者 山本 一彦 東京大学アレルギーリウマチ科 教授  
研究協力者 藤尾 圭志 東京大学アレルギーリウマチ科 助手

研究要旨

新規サイトカイン Interleukin-32 (IL-32)はマウスマクロファージ及びヒト単球に作用して TNF- $\alpha$ 産生を誘導するヒトサイトカインとして報告された。関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) の病態形成に TNF- $\alpha$ が強く関与していることから、本研究では IL-32 が生体内で関節炎に関与しているかどうか検討した。ヒト末梢血単核球を用いた検討では T 細胞は重要な IL-32 の発現細胞であり、RA 患者の滑膜組織においてもリンパ球における強い IL-32 発現を認めた。レトロウイルスを用いて IL-32 をマウス CD4 陽性 T 細胞に導入し、関節炎発症直前のコラーゲン誘発関節炎誘導マウスに移入すると関節炎の増悪が確認された。IL-32 を発現する骨髄キメラマウスでは血清中に高濃度の TNF- $\alpha$ が検出され、抗 II 型コラーゲン抗体により誘導した関節炎の増悪を認めた。IL-32 骨髄キメラマウスの脾臓では F4/80 マクロファージにおける TNF- $\alpha$ ・IL-1 $\beta$ の発現が亢進していた。これらの結果より IL-32 が TNF- $\alpha$ 産生の亢進を介して関節炎の増悪に関与していることが明らかになった。

A.研究目的

新規サイトカイン Interleukin-32 (IL-32)はマウスマクロファージ及びヒト単球に対して TNF- $\alpha$ 産生を誘導するヒトサイトカインとして報告された (Kim SH et al, Immunity 22; 131-142, 2005)。4つの splice variants が知られているが、発現量が多いものは IL-32 $\alpha$ , IL-32 $\beta$ であり、IL-32 $\alpha$ は細胞内に存在し、IL-32 $\beta$ は分泌型であると報告されている。関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) の病態形成に強く TNF- $\alpha$ 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明らかにすることを目的とした。

B.研究方法

ヒト末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell; PBMC) を Con A,  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 Abs で

刺激し、MACS により CD3, CD14, CD20 陽性細胞に分離したあと RT-PCR により各細胞群における IL-32 発現をみた。更に同様の実験を刺激前に CD3 陽性 T 細胞を除去した上で行った。末梢血 CD4, CD8 陽性 T 細胞を IL-23, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$ の存在下で培養し、IL-32 の発現を調べた。RA 患者の滑膜組織における IL-32 発現を RT-PCR, *in situ* hybridization で調べた。IL-32 $\alpha$ , IL-32 $\beta$ を、レトロウイルスを用いてマウス CD4 陽性 T 細胞に導入し、コラーゲン誘発関節炎 (collagen-induced arthritis; CIA) マウスの発症直前に移入し、関節炎の増悪効果を調べた。IL-32 $\beta$ をマウス骨髄細胞に導入し、骨髄移植により IL-32 $\beta$  大量発現モデルを作成した。

(倫理面への配慮)

すべての研究は各施設の遺伝子倫理委員会の審査を受け、承認を受けた研究計画に則って実