

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

# 自己免疫疾患に関する調査研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山 本 一 彦

平成19年3月

## 目 次

I. 総括研究報告書 -----	1
自己免疫疾患の調査研究 東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 主任研究者 山本 一彦	
II. 分担研究報告	
自己免疫疾患における抗原提示細胞およびT細胞の役割と新規治療法の開発に関する研究 ---	9
東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 山本 一彦	
抗プロトンビン自己抗体の血栓原性に関する研究 -----	12
北海道大学大学院医学研究科・病態内科学講座 渥美 達也	
抗DNA抗体の産生機序に関する研究 -----	15
東北大学大学院医学系研究科 平林 泰彦	
脂質関連物質の免疫抑制作用の解析 -----	17
自治医科大学内科学講座アレルギー膠原病学講座 箕田 清次	
Laser-microdissection(LMD)法によるMRL/lprマウス腎浸潤T細胞の解析に関する研究 ---	19
筑波大学大学院人間総合科学研究科臨床免疫学 伊藤 聡	
SLE患者末梢血由来T細胞におけるTh17サブセットに関する研究 -----	24
埼玉医科大学リウマチ膠原病科 三村 俊英	
自己免疫疾患の病態形成に関わる分子機序の解析 - T細胞-上皮細胞ヘテロ接着による組織障害の基礎的検討- -----	28
埼玉医科大学総合医療センターリウマチ・膠原病内科 竹内 勤	
多発性筋炎・皮膚筋炎に合併する間質性肺炎に対するタクロリムスの有用性の検討 -----	31
東京医科歯科大学膠原病・リウマチ内科 高田 和生	

SLE 治療の標準化を確立する研究	-----	40
国立国際医療センター 第一病棟 三森 明夫		
抗 EJ(glycyl tRNA 合成酵素)抗体の臨床・免疫遺伝学的特徴的に関する研究	-----	51
慶應義塾大学医学部内科 平形 道人		
全身性エリテマトーデスモデルマウスにおける単球由来樹状細胞に関する研究	-----	54
順天堂大学医学部膠原病内科 天野 浩文		
IL-4 産生能に関わる IL-4 受容体・鎖遺伝子多型とループス腎炎感受性との相関	-----	56
順天堂大学医学部病理 広瀬 幸子		
新しい治療薬の開発	-----	60
財団法人 乙卯研究所 首藤 紘一		
「免疫寛容に重要な分子」に関する研究	-----	61
国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 三宅 幸子		
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	-----	65
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 加藤 智啓		
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	-----	68
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 山田 亮		
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	-----	70
大阪大学大学院生命機能研究科免疫制御学講座 西本 憲弘		
<i>Open</i> コンジェニックマウスにおける自己免疫疾患発症感受性の解析	-----	73
愛媛大学大学院医学系研究科ゲノム病理学分野 能勢 真人		

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 ----- 77

産業医科大学医学部第一内科学講座 田中 良哉

RNA スプライシング異常による SLE 発症機序の解明と新規治療法の開発 ----- 81

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科病態解析・制御講座 江口勝美

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 85

# I. 総括研究報告

## 自己免疫疾患の調査研究

主任研究者 山本 一彦 東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 教授

**研究要旨** 全身性エリテマトーデス（systemic lupus erythematosus, SLE）、多発性筋炎・皮膚筋炎（polymyositis/dermatomyositis, PM/DM）、シェーグレン症候群（Sjogren's syndrome, SS）、成人スティル病（adult onset Still disease, AOSD）などの自己免疫疾患は、原因が不明で、適切な治療法がなく、いわゆる難治性疾患とされている。本研究では、共同研究事業として、これら疾患の原因研究を目的としたゲノムの解析の為のサンプル収集、SLEの治療の標準化の検討、新規治療法の導入のための臨床治験の推進を行い、さらに個別研究としてSLE、PM/DMを中心とした病態解明、先端的治療法の開発などの研究を推進した。

### 分担研究者

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

平林泰彦 東北大学大学院医学系研究科 講師

簗田清次 自治医科大学内科学講座  
アレルギー-膠原病学講座 教授

伊藤 聡 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 講師

三村俊英 埼玉医科大学リウマチ膠原病科 教授

竹内 勤 埼玉医科大学総合医療センター  
リウマチ・膠原病内科 教授

高田和生 東京医科歯科大学  
膠原病・リウマチ内科 講師

三森明夫 国立国際医療センター第一病棟 部長

平形道人 慶應義塾大学医学部内科 講師

天野浩文 順天堂大学医学部膠原病内科 助手

広瀬幸子 順天堂大学医学部病理学 助教授

首藤絃一 財団法人乙卯研究所 所長

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

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

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

西本憲弘 大阪大学大学院生命機能研究科  
免疫抑制学講座 教授

能勢真人 愛媛大学大学院医学系研究科病態解析学講座ゲノム病理学分野 教授

田中良哉 産業医科大学医学部第一内科学講座 教授

江口勝美 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科  
病態解析・制御講座 教授

### A. 研究目的

当研究事業の対象とする疾病は、全身性エリテマトーデス（SLE）、多発性筋炎・皮膚筋炎（PM/DM）、シェーグレン症候群(SS)、成人発症スティル病である。

研究内容は大きく、これら自己免疫疾患、特にSLEの遺伝要因の研究、T細胞、樹状細胞などの免疫担当細胞の研究、自己抗体などの液性因子の研究、疾患活動性に関する研究、新しい治療法に関する研究に分けることができる。

## B. 研究方法 及び C. 研究結果

### 1. 自己免疫疾患の遺伝要因の研究

広瀬分担研究者は、Th2 の代表的サイトカインである IL-4 が、抗体依存性の自己免疫疾患の発症増悪に関わっている可能性を考えた。IL-4 受容体  $\alpha$  鎖遺伝子多型を発見し、この多型により、ナイーブ T 細胞の IL-4 産生量が規定されることを見いだした。さらに BXSB マウスのループス腎炎は、IL-4 低産生性の IL-4 受容体  $\alpha$  鎖遺伝子多型と相関することを見いだした。一方、能勢分担研究者は、MRL/lpr マウスのループス腎炎に関して、疾患感受性を示すオステオポンチン (*Opn*) の遺伝子多型について検討するため、*Opn* allele 特異的コンジェニック系マウスを確立した。この結果、*Opn* allele の遺伝子多型が糸球体腎炎の発症感受性を規定していることを見いだした。

山田分担研究者は、SLE の疾患感受性遺伝子検索の為に、連鎖不平衡マッピングによるケース・コントロール関連解析の重要性を検討し、本年度から始められたサンプル収集体制の構築についての状況を報告した。

SLE の病態に関係しては、江口分担研究者は、活動性のある SLE 患者の末梢血単核細胞において、caspase-8 のスプライズバリエーションである caspase-8L の発現が低下していることを示した。また種々の刺激による mRNA スプライシングの変化があることを見だし、細胞間ネットワークを介した T 細胞の活性化の変化が示唆されることを報告した。竹内分担研究者は、 $\alpha_E\beta_7$  陽性 T 細胞が自己免疫疾患患者の皮膚、肺、唾液腺などに浸潤し、病態形成に関与している可能性を検討した。そして、 $\alpha_E\beta_7$  と E カドヘリンの接着により誘導される T 細胞内情報伝達機構を検討した。

### 2. 免疫担当細胞の研究

山本分担研究者は、SLE モデルマウスにおける腎炎と強い関連があるヌクレオソームに対する免疫応答を如何に制御するかについて検討した。ヌクレオソームに対する T 細胞認識機能を、遺伝子導入により再構築するシステムを用い、脾臓のマクロファージを中心とした食細胞が、ヌクレオソームを抗原提示していることを突き止め、これをクロドロネート・リポソームにより除去することで腎炎が抑制されることを示した。

伊藤分担研究者は MRL/lpr ループスモデルの腎炎とヒトループス腎炎について、浸潤 T 細胞に発現している遺伝子を調べる目的で laser-microdissection 法を用いた研究を行った。特に発現サイトカインについては、糸球体病変では CD4 陰性 CD8 陰性の double negative T 細胞が Th1 タイプとして機能しており、血管炎病変では、Th1 と Th2 タイプの両方のサイトカインが病態形成に関与している可能性が判明した。三村分担研究者は、末梢リンパ球のサイトカインの mRNA の発現量を検討し、異なる病態には異なるサイトカインが関与する可能性が強く、特に Th17 が臓器障害に重要であること報告した。三宅分担研究者は、リンパ球の免疫寛容に重要な分子として同定された GRAIL に注目し、その機能を調べる為に、基質の同定を網羅的な蛋白質発現差異解析法で検討し、さらにノックアウトマウスの作成中であることを報告した。

### 3. 自己抗体などの液性因子の研究

渥美分担研究者は、SLE で高頻度に見られる抗リン脂質抗体症候群の責任自己抗体を検討する目的で、ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体の機能を検討し、モノクローナル抗体 (231D) がプロトロンビナーゼによる

トロンビン生成を増強するだけでなく、対応抗原であるプロトロンビンを介して直接向血栓細胞に結合し、血栓傾向を誘導している可能性を示した。平形分担研究者は、多発性筋炎に見られる抗アミノアシル tRNA 合成酵素抗体の 1 つである抗 EJ (glycyl tRNA 合成酵素) 抗体陽性例の臨床的検討を行った。抗 EJ 抗体は筋炎などの膠原病所見を持たない特発性間質性肺炎例にも検出され、大多数の抗 EJ 抗体陽性筋炎例では皮膚筋炎の皮疹を有することを見いだした。

平林分担研究者は、SLE に特徴的な抗 DNA 抗体の産生機序に関する研究を行った。ヒト腎障害性抗 DNA 抗体が結合する小胞体ストレス応答性蛋白 Herp に注目し、免疫寛容が不完全であること、ヒトで DNA と分子相同性を持つこと、抗 DNA 抗体産生 B 細胞を刺激することを見いだした。

#### 4. 新しい治療法に関する研究

田中分担研究者は自己抗体を産生する B 細胞の表面抗原である CD20 に対するモノクローナル抗体を SLE の治療に用いる試みを推進した。この抗体は B 細胞リンパ腫を対象に認可されているリツキシマブであり、世界的にも SLE と関節リウマチでの治療の可能性が検討されているものである。田中分担研究者はパイロットスタディで、副作用なく著効を示したことから第 I/II 相の臨床試験を実施し、安全性と有効性を確認した。作用機序として、B 細胞の除去による自己抗体産生などにより腎障害が改善した可能性、B 細胞-T 細胞間相互作用の制御による可能性などが示唆された。次年度は第 II/III 相試験を実施する計画を検討中である。西本分担研究者は、自身らのグループにより関節リウマチの為に開発中の抗 IL-6 受容体抗体を用い、SLE に対して探索的治療を行い、さらにその治

療の前後で発現量の変化する遺伝子を DNA チップで解析した。その結果、インターフェロンと TGF $\beta$  のシグナルの増強と TNF のシグナルの抑制が SLE の病態形成に関与していることが示唆された。

首藤分担研究者は Th1 優位の自己免疫疾患に効果が期待され、クローン病で治験が開始された合成レチノイド Am80 の有用性を動物実験で示し、NOD マウスにおいて、膵臓と唾液腺における病変の発現を抑制することを見いだした。高田分担研究者は PM/DM の難治性病態である間質性肺炎に対してタクロリムスの研究者主導の開発を、日本医師会治験促進センターのサポートを受けながら進めた。箕田分担研究者はスタチン類が滑膜細胞に対してアポトーシス誘導能のあることを示した。

三森分担研究者は SLE の治療を標準化するため、病歴の統計分析を行った。ループス腎炎で発症し治療された SLE は、非ループス腎炎より寛解率が良好であり、IV 型は予後不良因子でないことを示した。また初期治療内容は SLE の予後を規定し、十分量を標準治療として実行すれば、腎不全例を大幅に減らせる可能性を報告した。

#### D. 考察 及び E. 結論

平成 18 年度は、新しい研究体制での 2 年目であり、多くの分担研究者が独自の研究を展開した。また、本年度から、研究組織を挙げて、SLE を中心としたゲノム解析の為に DNA の収集を開始した。さらに、SLE の治療を標準化する必要から、共通の作業班を組織することなどの必要性が議論された。平成 19 年度には個別の研究を推進するだけでなく、このような共通の課題を推進する必要があると考える。



## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

山本 一彦 (主任研究者)

1. Shoda H, Fujio K, Yamaguchi Y, Okamoto A, Sawada T, Kochi Y, Yamamoto K. Interactions between IL-32 and tumor necrosis factor alpha contribute to the exacerbation of immune-inflammatory diseases. *Arthritis Res Ther*. 8:R166, 2006.

2. Fujio K, Okamoto A, Araki Y, Shoda H, Tahara H, Tsuno NH, Takahashi K, Kitamura T, Yamamoto K. Gene therapy of arthritis with TCR isolated from the inflamed paw. *J Immunol*. 177:8140-8147, 2006.

3. Yamamoto K, Okamoto A, Fujio K. Antigen-specific immunotherapy for autoimmune diseases. *Expert Opin. Biol. Ther*. 2007; 7(3):359-367.

渥美 達也(分担研究者)

1. 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

2. Furukawa S, Yasuda S, Amengual O, Horita T, Atsumi T, Koike T. Protective effect of pravastatin on vascular endothelium in patients with systemic sclerosis: a pilot study. *Ann Rheum Dis* 65; 1118-20, 2006.

3. Koike T, Atsumi T. "Resurrection of Thrombin" in the pathophysiology of the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* (in press)

平林 泰彦 (分担研究者)

1. Ohguchi H, Hirabayashi Y, Koderu T, Ishii T, Munakata Y, Sasaki T. Q fever with clinical features resembling systemic lupus erythematosus. *Internal Medicine* (2006) 45, 3232-326.

2. Munakata Y, Kato I, Saito T, Koderu T, Ishii KK, Sasaki T. Human parvovirus B19 infection of monocytic cell line U937 and antibody-dependent enhancement. *Virology* (2006) 345, 251-257.

3. Hirabayashi Y, Oka Y, Tada M, Takahashi R, Ishii T. A potential trigger of nephritogenic anti-DNA antibodies in lupus nephritis. *Annals of the New York Academy of Sciences* (2007) in press.

藁田 清次 (分担研究者)

1. Yoshio, T., Onda, K., Nara, H., Minota, S. Association of IgG Anti-NR2 glutamate receptor antibodies in cerebrospinal fluid with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 54: 675-678, 2006

2. Nagashima, T, Okazaki, H, Yudoh, K, Matsuno, H, Minota, S. Apoptosis of rheumatoid synovial cells by statins through blocking of protein geranylgeranylation. A potential therapeutic approach to rheumatoid arthritis. *Arthritis. Rheum.* 54:579-586, 2006.

3. Nara, H., Okamoto, H., Minota, S., Yoshio, T. Mouse monoclonal anti-human thrombomodulin antibodies bind to and activate endothelial cells through NF- $\kappa$ B activation In vitro. *Arthritis Rheum* 54: 1629-1637, 2006

伊藤 聡 (分担研究者)

1. Ito S, et al. Rheumatology in Japan, Germany, and Egypt: Comparison of Medical Practices. *Acta Med Biol* 54:51-58, 2006

2. Tsutsumi A, Hayashi T, Chino Y, Goto D, Matsumoto I, Ito S, et al. Significance of

antiprothrombin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus: clinical evaluation of the antiprothrombin assay and the antiphosphatidylserine/prothrombin assay, and comparison with other phospholipids antibody assays. *Mod.Rheumatol* 16:158-164,2006

3. Kobayashi T, Ito S, et al. The Combined Genotypes of Stimulatory and Inhibitory Fcγ Receptor Associated with Systemic Lupus Erythematosus and Periodontitis in Japanese. *J Periodontology* (in press)

三村 俊英 (分担研究者)

1. Yokota, K., Miyazaki, T., Hirano, M., Akiyama, Y., Mimura, T. Simvastatin Inhibits Production of IL-6 and IL-8 and Cell Proliferation Induced by TNF-α in the Fibroblast-Like Synoviocytes from Rheumatoid Arthritis Patients. *J. Rheumatol.* 33:463-71, 2006

竹内 勤 (分担研究者)

1. Tsuzaka K, Nozaki K, Kumazawa C, Shiraishi K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, and Takeuchi T. DNA microarray gene expression profile of T cells with splice variants of TCRζ mRNA observed in SLE. *J Immunol* 176:949-56, 2006.

2. Abe T, Takeuchi T, Miyasaka N, et al. A multi-center, double-blind, placebo-controlled trial of infliximab combined with low dose methotrexate in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *J Rheum* 33:37-44, 2006.

3. Yoshimoto K, Takahashi Y, Ogasawara M, Setoyama Y, Suzuki K, Tsuzaka K, Abe T, and Takeuchi T. Aberrant expression of BAFF in T cells of systemic lupus erythematosus, which is recapitulated by a human T cell line, Loucy. *Int Immunol* 18: 1189-96, 2006.

高田 和生 (分担研究者)

1. Takada, K., J. Kishi, N. Miyasaka, “Step-up versus primary intensive approach to the treatment of interstitial pneumonia associated with dermatomyositis/polymyositis:a retrospective study”. *Modern Rheumatol*, in press.

三森 明夫 (分担研究者)

1. Itoh K., Kano T., Nagashio C., Mimori A., Kinoshita M. and Sumiya M: Progressive multifocal leuko-encephalopathy in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 54:1020-1025, 2006

平形 道人 (分担研究者)

1. Nakamura M, Tanaka Y, Satoh T, Kawai M, Hirakata M, Kaburaki J, Kawakami Y, Ikeda Y, Kuwana M. Autoantibody to CD40 ligand in systemic lupus erythematosus: association with thrombocytopenia but not thromboembolism. *Rheumatology (Oxford)* 45: 150-156, 2006.

2. Sato S, Kuwana M, Hirakata M. Clinical Characteristics of Japanese patients with anti-OJ (anti-isoleucyl-tRNA synthetase) autoantibodies. *Rheumatology (Oxford)* (in press)

3. Hirakata M, Suwa A, Takada T, Sato S, Nagai S, Genth E, Song YW, Mimori T, Targoff IN. Clinical and immunogenetic features of patients with autoantibodies to asparaginyl-transfer RNA synthetase. *Arthritis Rheum.* (in press)

天野 浩文 (分担研究者)

1. Lin Q, Xiu Y, Jiang Y, Tsurui H, Nakamura K, Kodera S, Ohtsuji M, Ohtsuji N, Shiroya W, Tsukamoto K, Amano H, Amano E, Kinoshita K, Sudo K, Nishimura H, Izui S, Shirai T, Hirose S. Genetic dissection of the effects of stimulatory and inhibitory IgG Fc receptors on murine lupus. *J Immunol.* 1;177(3):1646-54, 2006

2. Kikuchi S, Santiago-Raber ML, Amano H, Amano E, Fossati-Jimack L, Moll T, Kotzin BL,

Izui S. Contribution of *Nba2* to *Yaa*-induced monocytosis in association with murine systemic lupus. *J Immunol.* 1;176:3240-7, 2006

広瀬 幸子 (分担研究者)

1. Lin Q, Xiu Y, Jiang Y, Tsurui H, Nakamura K, Kodera S, Ohtsuji M, Ohtsuji N, Shiroyiwa W, Tsukamoto K, Amano H, Amano E, Kinoshita K, Sudo K, Nishimura H, Izui S, Shirai T, and Hirose S. Genetic Dissection of the Effects of Stimulatory and Inhibitory IgG Fc Receptors on Murine Lupus. *J. Immunol.* 177:1646-1654, 2006.

4. Hamano Y, Tsukamoto K, Abe M, Sun G, D, Zhang D, Fujii H, Matsuoka S, Tanaka M, Ishida-Ogawara A, Tachikawa H, Nishimura H, Tokunaga K, Hirose S, and Suzuki K: Genetic dissection of vasculitis, myeloperoxidase-specific antineutrophil cyto-plasmic autoantibody production, and renal traits in spontaneous crescentic glomerulonephritis-forming /Kinjo mice. *J. Immunol.* 176:3662-3673, 2006.

6. Shiroyiwa W, Tsukamoto K, Ohtsuji M, Lin Q, Ida A, Kodera S, Ohtsuji Nishimura H, Tsurui H, Kinoshita K, Nishimura H, Shirai T, and Hirose S. IL-4R $\alpha$  polymorphism in regulation of IL-4 synthesis by T cells: implication in susceptibility to a subset of murine lupus. *Int. Immunol.* 19:175-183, 2006.

首藤 紘一 (分担研究者)

1. 深沢弘志、影近弘之、首藤紘一：レチノイドによる自己免疫疾患の治療。日本臨床免疫学会誌 29 (3) 114-126 (2006)

2. 首藤紘一：タミバロテン製剤 (アムノレイク状 2 mg)。化学療法の領域 23 (4) 印刷中 (2007)

三宅 幸子 (分担研究者)

1. Pyz E, Naidenko O, Miyake S, Yamamura T, Berberich I, Cardell S, Kronenberg M, Herrmann T.

The complementarity determining region 2 of BV8S2 (V beta 8.2) contributes to antigen recognition by rat invariant NKT cell TCR. *J.Immunol.* 176: 7447-55, 2006

2. Croxford JL, Miyake S, Huang Y-Y, Shimamura M and Yamamura T. Invariant V $\alpha$ 19i T cells regulate autoimmune inflammation. *Nat.Immunol.* 7:987-94, 2006

3. Aranami T, Miyake S and Yamamura T. Differential expression of CD11c by peripheral blood NK cells reflects temporal activity of multiple sclerosis. *J.Immunol.* 177: 5659-67, 2006

加藤 智啓 (分担研究者)

1. Dai SM, Shan ZZ, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K, Yudoh K. Catabolic stress induces features of chondrocyte senescence through overexpression of caveolin 1: possible involvement of caveolin 1-induced down-regulation of articular chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54:818-831.

2. Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Imajoh-Ohmi S, Fukuda H, Yudoh K, Masuko-Hongo K, Nishioka K, Kato T. Fibulin-4 is a target of autoimmunity predominantly in patients with osteoarthritis. *J Immunol.* 2006;176(5): 3196-3204

3. Takahashi H, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Koibuchi T, Suzuki M, Kato T, Nakamura T, Iwamoto A, Nishioka K, Iino S, Koike K, Itoh F. Molecular epidemiology of hepatitis A virus in metropolitan areas in Japan. *J Gastroenterol.* 41:981-6. Epub 2006 Nov 9.

山田 亮 (分担研究者)

1. Gotoh N, Yamada R, Hiratani H, Renault V, Kuroiwa S, Monet M, et al. No association between complement factor H gene polymorphism and exudative age-related macular degeneration in Japanese. *Hum Genet.* 2006 Aug;120:139-43.

2. Okazaki Y, Suzuki A, Sawada T, Ohtake-Yamanaka M, Inoue T, Hasebe T, Yamada R, et al. Identification of citrullinated eukaryotic translation initiation factor 4G1 as novel autoantigen in rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Mar 3;341:94-100.
3. Yamada R, Yamamoto K, Holmdahl RE. Gene-based large scale LD-mapping of rheumatoid arthritis-associated genes. *The Hereditary Basis of Rheumatic Diseases*. 2006.
- 西本 憲弘 (分担研究者)
1. Nishimoto N, Kishimoto T. Interleukin 6: from bench to bedside. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006 Nov;2(11):619-26.
2. Straub RH, Harle P, Yamana S, Matsuda T, Takasugi K, Kishimoto T, Nishimoto N. Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy favors adrenal androgen secretion in patients with rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum*. 2006 Jun;54:1778-85
3. Nishimoto N. Interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2006 ;18:277-81.
- 能勢 眞人 (分担研究者)
1. Muraoka, M., Hasegawa, H., Kohno, M., Inoue, A., Miyazaki, T., Terada, M., Nose, M., Yasukawa, M. IK cytokine ameliorates the progression of lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum* 54:3591-3600, 2006.
2. Yoshida, M., Saiga, K., Hato, T., Iwaki, S., Niiya, T., Arita, N., Komori, H., Tsubaki, T., Furukawa, H., Terada, M., Maeyama, K., Nemoto, K., Nose, M., Ono, M. Cappuccino mutation in an autoimmune-prone strain of mice suggests a role of platelet function in the progression of immune complex crescentic glomerulonephritis. *Arthritis Rheum* 54:2934-2943, 2006.
3. 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.
- 田中 良哉 (分担研究者)
1. Tsujimura S, Saito K, Kohno K, Tanaka Y. Fragmented hyaluronan induces transcriptional up-regulation of the multidrug resistance-1 gene in CD4+ T cells. *J Biol Chem* (2006) 281, 38089-97
2. Tanaka Y, Tokunaga M. Rituximab reduces both quantity and quality of B cells in SLE. *Rheumatology* (2006) 45: 122-123
3. Nakayamada S, Saito K, Nakano K, Tanaka Y.  $\beta 1$  integrin transduces an activation signal in T cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* (in press)
- 江口 勝美 (分担研究者)
1. Izumi Y, Ida H, Huang M, Iwanaga N, Tanaka F, Aratake K, Arima K, Tamai M, Kamachi M, Nakamura H, Oroguchi T, Kawakami A, Anderson P, Eguchi K. Characterization of peripheral natural killer cells in primary Sjogren's syndrome: impaired NK cell activity and low NK cell number. *J Lab Clin Med*. 147 :242-249, 2006
2. Tamai M, Kawakami A, Tanaka F, Miyashita T, Nakamura H, Iwanaga N, Izumui Y, Arima K, Aratake K, Huang M, Kamachi M, Ida H, Origuchi T, Eguchi K. Significant inhibition of TRAIL-mediated fibroblast-like synovial cell apoptosis by IFN-gamma through JAK/STAT pathway by translational regulation. *J Lab Clin Med*. 147:182-190, 2006
3. Tanaka F, Kawakami A, Iwanaga N, Tamai M, Izumi Y, Aratake K, Arima K, Kamachi M, Nakamura H, Huang M, Ida H, Origuchi T, Eguchi

K Infliximab is effective for Takayasu arteritis refractory to glucocorticoid and methotrexate. Intern Med. 45:313-316, 2006

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

1)名称： Fas 抗原発現増強剤

出願番号：特開 2003-171282

出願者：田中 良哉

2)名称： Akt シグナル経路の活性化阻害を目的として使用するレフルノミド

出願番号：特願 2005-81972

出願者：田中 良哉

##### 2. 実用新案登録

特になし

##### 3. その他

特になし

## II. 分担研究報告

## 自己免疫疾患における抗原提示細胞および T 細胞の役割と新規治療法の開発に関する研究

分担研究者 山本 一彦 東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 教授

**研究要旨** 自己抗原に対する免疫学的寛容の破綻は、自己免疫疾患の病態に密接に関与すると考えられる。しかし、免疫学的寛容の破綻に結びつく自己抗原の提示様式については今までほとんど解析されていない。そこで、全身性エリテマトーデス（SLE）モデルマウスにおいて、重要な自己抗原であるヌクレオソームに特異的な T 細胞を高効率レトロウイルスベクターにより再構築し、ヌクレオソームの局在を検討した。ヌクレオソーム提示は脾臓に優位であった。さらに脾臓抗原提示細胞のうち、F4/80 陽性マクロファージと CD11b 陽性樹状細胞は腎炎発症前からヌクレオソームを提示していた。F4/80 陽性マクロファージは脾臓において最も豊富な抗原提示細胞であった。クロドロネート・リポソーム静注により脾臓貪食細胞を除去すると、脾臓細胞のヌクレオソーム提示は減弱し、抗ヌクレオソーム抗体および蛋白尿発症率も低下したが、全般的な免疫抑制は認めなかった。発症前マウスに脾臓マクロファージを移入すると、血清抗ヌクレオソーム抗体価と蛋白尿発症率が有意に上昇したが、脾臓樹状細胞の移入では有意な上昇を認めなかった。したがって、SLE モデルマウスでは、脾臓マクロファージの核抗原提示が自己抗体産生などの異常な免疫応答、ひいては自己免疫疾患を惹起する可能性が示された。アポトーシス細胞の除去に影響を与えず脾臓マクロファージの自己抗原提示を抑制できれば、SLE の新規治療法開発への糸口となりうる。

### A. 研究目的

貪食細胞においてアポトーシス細胞断片を除去する機能が低下した場合に、全身性エリテマトーデス（SLE）様の病態を呈することは報告されているが、SLE における自己抗原提示能については未だにほとんど解析されていない。そこで我々は病態に即した新規治療法開発を目標とし、SLE モデルマウスを用いて重要な自己抗原であるヌクレオソームの提示について検討を行った。ヌクレオソームは、ヒストンと 2 本鎖 DNA からなるクロマチンの構成単位で、アポトーシスを起こした細胞から放出される。

### B. 研究方法

高効率レトロウイルスベクターシステムを用いて再構築したヌクレオソーム特異的 T 細胞を NZB/W F<sub>1</sub> マウスに移入して抗原提示の局在を検討した。脾臓における各抗原提示細胞サブセットを分離し、ヌクレオソーム特異的 T 細胞の増殖を検討した。腎炎発症前からヌクレオソームを提示している脾臓貪食細胞を、クロドロネート・リポソーム静注により生体内で除去し、抗原提示、自己抗体価および蛋白尿発症率を検討した。さらに脾臓マクロファージもしくは樹状細胞を発症前マウスに繰り返し移入し、ループス発症が促進されるか検討した。

（倫理面への配慮）実験動物に対しては過度の苦

痛を与えないなど、動物愛護上の十分な配慮を行った。

### C. 研究結果

ヌクレオソーム特異的 T 細胞は腎炎発症前から SLE モデルマウス脾臓で優位に刺激されていた。中でも脾臓の F4/80<sup>+</sup>マクロファージと CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>樹状細胞はヌクレオソーム特異的 T 細胞を強く刺激した。SLE モデルマウスの脾臓において、F4/80<sup>+</sup>マクロファージは最も豊富な抗原提示細胞サブセットであった。生体内でクロドロネート・リポソーム静注により F4/80<sup>+</sup>マクロファージを主とした脾臓貪食細胞を除去したところ、脾臓細胞のヌクレオソーム提示能は減弱し、マウスの血清自己抗体価および蛋白尿発症率も低下した。しかし、クロドロネート・リポソーム静注による全般的な免疫抑制は認めなかった。発症前マウスに脾臓マクロファージを移入すると、血清抗ヌクレオソーム抗体価と蛋白尿発症率が有意に上昇したが、脾臓樹状細胞の移入では有意な上昇を認めなかった。

### D. 考察

貪食細胞における核抗原の提示が異常な免疫応答の引き金となり、自己免疫疾患を惹起する可能性が示された。脾臓の F4/80<sup>+</sup>マクロファージは CD11c<sup>+</sup>樹状細胞の約 4 倍存在し、ヌクレオソーム提示に重要な役割を果たすと考えられた。SLE においてマクロファージは①アポトーシス細胞の除去②自己抗原提示、の 2 つの機能を持ち、これらのバランスが発症に大きく関与すると考えられる。貪食細胞による T 細胞への自己抗原提示自体が異常なのか、自己抗原提示に続く T 細胞や B 細胞の活性化が異常なのかという問題に関しては更に検討が必要である。

### E. 結論

SLE モデルマウスにおいて、脾臓マクロファージは自己抗原を提示し、自己抗体産生を促すことにより病態形成に関与する。アポトーシス細胞の除去に影響を与えず脾臓マクロファージの自己抗原提示を抑制できれば、SLE の新たな治療アプローチとなりうる。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Shoda H, Fujio K, Yamaguchi Y, Okamoto A, Sawada T, Kochi Y, Yamamoto K. Interactions between IL-32 and tumor necrosis factor alpha contribute to the exacerbation of immune-inflammatory diseases. *Arthritis Res Ther*. 8:R166, 2006.
2. Fujio K, Okamoto A, Araki Y, Shoda H, Tahara H, Tsuno NH, Takahashi K, Kitamura T, Yamamoto K. Gene therapy of arthritis with TCR isolated from the inflamed paw. *J Immunol*. 177:8140-8147, 2006.
3. Okazaki Y, Suzuki A, Sawada T, Ohtake-Yamanaka M, Inoue T, Hasebe T, Yamada R, Yamamoto K. Identification of citrullinated eukaryotic translation initiation factor 4G1 as novel autoantigen in rheumatoid in rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun*. 341:94-100, 2006.
4. Nakagome K, Dohi M, Okunishi K, To Y, Sato A, Komagata Y, Nagatani K, Tanaka R, Yamamoto K. Antigen-sensitized CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup> memory/effector T helper 2 cells can induce airway hyperresponsiveness in an antigen free setting. *Respir Res*. 28:6-46, 2006.
5. Nagatani K, Dohi M, To Y, Tanaka R, Okunishi K, Nakagome K, Sagawa K, Tanno Y, Komagata Y, Yamamoto K. Splenic dendritic cells induced by oral antigen administration are important for the transfer of



oral tolerance in an experimental model of asthma. J Immunol.176:148-1489, 2006.

6. Yamamoto K, Okamoto A, Fujio K. Antigen-specific immunotherapy for autoimmune diseases. Expert Opin. Biol. Ther. 2007; 7(3):359-367.

7. Fujio K, Okamura T, Okamoto A, Yamamoto K. T cell receptor gene therapy for autoimmune disease. Ann N Y Acad Sci. 2007; in press.

## 2. 学会発表

Okamoto A, Fujio K, Yamamoto K. Autoantigen-presentation of Phagocytes Leads to Autoantibody production in Lupus-prone mice. Proceeding of the Japanese Society for Immunology. 36:100, 2006.

## 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

## 抗プロトロンビン自己抗体の血栓原性に関する研究

分担研究者 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

**研究要旨** これまでの検討から、主要なループスアンチコアグラントの責任自己抗体のひとつはホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体(aPS/PT)である。本研究では aPS/PT の病原性を検討するため、モノクローナル aPS/PT を作成し(231D)、その *in vitro* での向血栓細胞への効果を調べた。231D はプロトロンビンとカルシウムの存在下で単球系細胞株を活性化し、外因系凝固反応のイニシエータである組織因子の発現を増強させた。この 231D による組織因子発現は、Lipid Scramblase 1 (LSC1)を強く誘導するインターフェロン $\alpha$ であらかじめ処理しておいた細胞ではより強くおこった。231D は細胞膜ホスファチジルセリンに結合したプロトロンビンを介して細胞活性化を促進するが、その効果は LSC1 による細胞膜リン脂質不平衡の消失が重要な役割を演じていて、LSC1 があらたな抗リン脂質抗体症候群の治療ターゲットとなる可能性が考えられた。

### A. 研究目的

抗リン脂質抗体症候群(APS)は血栓傾向を主症状とする自己免疫疾患で、それ単独で存在、または全身性エリテマトーデスの代表的な合併症のひとつでもある。APS 患者に存在する抗リン脂質抗体は血栓症をひきおこす病原性自己抗体と考えられている。抗リン脂質抗体の主要な対応抗原は $\beta$ 2-グリコプロテイン I とプロトロンビンであり、とりわけ抗プロトロンビン抗体は *in vitro* で抗凝固活性を示すループスアンチコアグラントの責任抗体であるとされる。分担研究者は、ホスファチジルセリンに結合したプロトロンビンを認識する「ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体(aPS/PT)」が血栓症の存在と強く相関し、真の血栓原性抗体である可能性を示してきた。昨年の本研究では、aPS/PT が *in vivo* および *in vitro* においてプロトロンビン生成を亢進させることを示した。本年度は、さらにそのメカニズムを詳細に検討した。

### B. 研究方法

Balb/c マウスをヒトプロトロンビンで免疫して、aPS/PT アッセイでスクリーニングし、モノクローナル aPS/PT である 231D を樹立した。次に、ヒトプロトロンビンをプロトロンビン処理して切断し、イオン交換クロマトグラフィーで分離してプロト

ロンのリン脂質結合ドメインを欠くプレトロンビン-1 を調整した。同様に Balb/c マウスをプレトロンビン-1 で免疫し、リン脂質の関与なしにプロトロンビンに結合するモノクローナル抗体 51A6 を得た。

単球系細胞株である RAW264.7 と 231D および 51A6 との反応性をフローサイトメトリーで検討した。さらに細胞からの組織因子 mRNA 発現をリアルタイム PCR で確認した。細胞膜内側に分布する陰性リン脂質を能動的に細胞外へくみ出す Lipid Scramblase 1 (LSC1)の発現もリアルタイム PCR で検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は培養細胞を用いた *in vitro* の実験によるもので、倫理的な問題は少ない。

### C. 研究結果

231D, 51A6 とも aPS/PT 活性をもったが、231D が 51A6 よりも強くホスファチジルセリン-プロトロンビン複合体(PS/PT)に結合した。一方、プロトロンビンを直接酸化 ELISA プレートに固相化した場合は、51A6 が 231D に比べて強く結合した(図 1)。231D は PS/PT 上で APS 患者の IgG との結合と競合したが、51A6 は競合しなかった。ウェスタンブロットでは 51A6 はプロトロンビンに結合したが、231D はしなかった。231D は正常血漿に混

合すると非常に強いループスアンチコアグラント活性を有し、それは 51A6 に比べて強かった。

231D はプロトロンビンとカルシウム (2.5mM) の存在下でのみ単球系細胞と強く結合した。51A6 も結合を示したが、231D より結合は弱かった (図 2)。

単球系細胞をプロトロンビンの存在下と非存在下で 231D で処理すると、プロトロンビンの存在下で処理した細胞にのみ組織因子 mRNA が強く誘導された。単球系細胞をインターフェロン $\alpha$  で刺激すると、LSCR1 の mRNA の発現増強とともに細胞表面にホスファチジルセリンが誘導された。単球系細胞をあらかじめインターフェロン $\alpha$  で処理してからプロトロンビンとカルシウムの存在下で 231D を加えると、組織因子 mRNA の誘導が有意に増強された (図 3)。

#### D. 考察

231D は、PS/PT への結合性やループスアンチコアグラント活性に関して、APS 患者にみられる aPS/PT と共通の特徴を有していた。患者 IgG との PS/PT 上での部分的な競合は、231D が一部 aPS/PT 自己抗体とエピトープをシェアしていることを示す。すなわち、231D は APS 患者にみられる aPS/PT の免疫学的小および凝血学的性質を代表していると考えられる。

昨年までの検討で、通常はプロトロンビン生成を抑制する (すなわちループスアンチコアグラント活性をもつ) モノクローナル aPS/PT である 231D が、条件によってはプロトロンビナーゼによるプロトロンビン生成を増強することが示された。本年さらに 231D が直接向血栓細胞に対応抗原であるプロトロンビンを介して結合し、刺激的に作用して組織因子を誘導し、血栓傾向となる可能性が示された。抗プロトロンビン抗体の結合は、231D と 51A6 の反応性を考慮すると、細胞表面ホスファチジルセリンに結合したプロトロンビンを介していることが推定された。231D はホスファチジルセリンに結合したプロトロンビンに比較的選択的に結合すること、LSCR1 を強く誘導するインターフェロン $\alpha$  がこの作用を増強することから、細胞表面のホスファチジルセリンの適量の存在が一連の 231D の向血栓作用に重要であると考えられる。そして、LSCR1 が新たな APS の特異的な治療ターゲット

の候補として重要である。

#### E. 結論

APS 患者において、抗プロトロンビン抗体が生体内で複数の向血栓機序に関与している可能性が示された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Atsumi T, Amengual O. Genetics of antiphospholipid syndrome, In: Khamashta MA, editor. Hughes Syndrome. London: Springer; 2006. p.521-31.
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; 484-8, 2006
4. Furukawa S, Yasuda S, Amengual O, Horita T, Atsumi T, Koike T. Protective effect of pravastatin on vascular endothelium in patients with systemic sclerosis: a pilot study. *Ann Rheum Dis* 65; 1118-20, 2006.
5. Amengual O, Atsumi T, Koike T. Pathophysiology of the antiphospholipid syndrome: roles of anticardiolipin antibodies in thrombosis and fibrinolysis. *APLAR J Rheumatol* 9; 377-86, 2006.
6. Koike T, Atsumi T. "Resurrection of Thrombin" in the pathophysiology of the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* (in press)

##### 2. 学会発表

1. Amengual O, Atsumi T, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Koike T. Beta2glycoprotein I-dependent anticardiolipin antibodies-induced tissue factor expression is enhanced by interferon alpha; a crucial role for lipid scramblase 1. American College of Rheumatology 70th National Scientific Meeting,

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

I. 謝辞

本研究は、北海道大学大学院医学研究科・病態内科学オルガ・アメンゲル先生の御協力および小池隆夫教授の御指導でおこなわれた。各先生に深謝する。

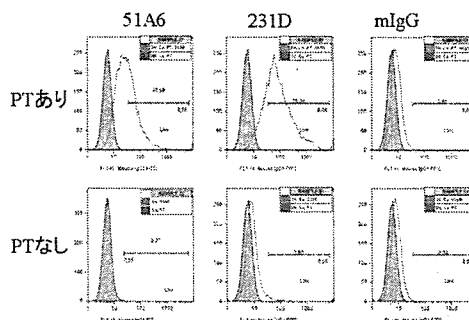


図2 フローサイトメトリによる検討

231Dおよび51A6のRAW264.7への結合をフローサイトメトリで検討した。上段はプロトロンビンの存在下、下段は非存在下。

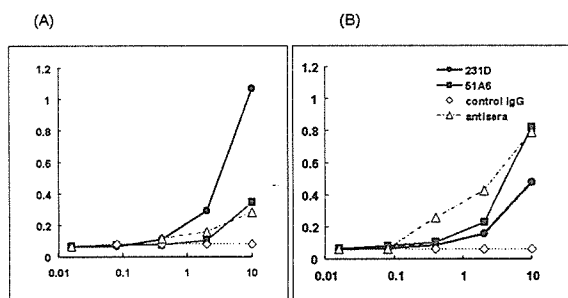


図1 231Dと51A6の反応

231Dと51A6の結合をELISAで調べた。

(A) ホスファチジルセリン-プロトロンビン複合体への結合

(B) プロトロンビン単独(酸化プレート)への結合

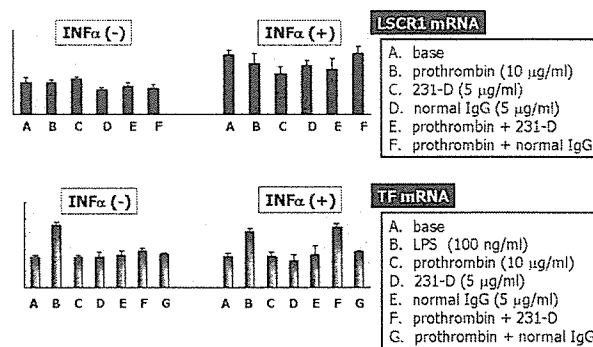


図3 LSCR1および組織因子 mRNA の発現

インターフェロンαであらかじめ処理した、あるいは処理しない RAW264.7 細胞をそれぞれの物質の存在下でインキュベートし、LSCR1(上段)および組織因子(下段)の mRNA 発現をリアルタイム PCR で検討した。