

唆された。

## E. 結論

SLE のモデルマウスのひとつである、BXS<sup>B</sup> *Yaa* マウスにおける単球及び単球由来樹状細胞の役割と病態形成との関与を更に詳細に調べることで、将来的にヒトの SLE 治療に応用されることが期待される。

## F. 健康危機情報

今回の実験では、ウイルス、放射性物質等を用いず、健康面での危機は極めて少ないと思われる。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Lin Q, Xiu Y, Jiang Y, Tsurui H, Nakamura K, Kodera S, Ohtsuji M, Ohtsuji N, Shirowa 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. Suzuki J, Nakano S, Nakairi Y, Mitsuo A, Amano H, Morimoto S, Tokano Y, Takasaki Y. CD19/22 balance relates to improvement of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol.* 16(4):235-8, 2006
3. 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(5):3240-7, 2006
4. Tokano Y, Morimoto S, Amano H, Kawanishi T, Yano T, Tomyo M, Sugawara M, Kobayashi S, Tsuda H, Takasaki Y, Hashimoto H. The relationship between initial clinical manifestation and long-term prognosis of patients with systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol* 15:275-282, 2005
5. Amano H, Amano E, Santiago-Raber ML, Moll T, Martinez-Soria E, Fossati-Jimack L, Iwamoto M, Rozzo SJ, Kotzin BL, Izui S. Selective expansion of a monocyte subset expressing the CD11c dendritic cell marker in the *Yaa* model of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 52(9):2790-8, 2005

6. Identification of 2 major loci linked to autoimmune hemolytic anemia in NZB mice. *Blood.* 106(4):1323-9, 2005 Kikuchi S, Amano H, Amano E, Fossati-Jimack L, Santiago-Raber ML, Moll T, Ida A, Kotzin BL, Izui S
7. Differential role of three major new zealand black-derived Loci linked with *yaa*-induced murine lupus nephritis. *J Immunol.* 15;174(2):1111-7, 2005 Kikuchi S, Fossati-Jimack L, Moll T, Amano H, Amano E, Ida A, Ibnou-Zekri N, Laporte C, Santiago-Raber ML, Rozzo SJ, Kotzin BL, Izui S.
8. Differential Activation of Anti-Erythrocyte and Anti-DNA Autoreactive B Lymphocytes by the *Yaa* Mutation. *J Immunol.* 15;174(2):702-9, 2005 Moll T, Martinez-Soria E, Santiago-Raber ML, Amano H, Pihlgren-Bosch M, Marinkovic D, Izui S.

### 2. 学会発表

1. 2006 年日本内科学会発表
2. 2006 年日本リウマチ学会発表
3. 2006 年日本免疫学会発表

## 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

## IL-4 産生能に関わる IL-4 受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子多型とループス腎炎感受性との相関

分担研究者 広瀬 幸子 順天堂大学医学部病理 助教授

**研究要旨** ループス腎炎自然発症モデルマウス系である New Zealand マウスおよび BXSB マウスを用いて、ループス腎炎における IL-4 産生性 Th2 細胞の役割を、遺伝学的に解析した。その結果、Th2 細胞による IL-4 産生能は、IL-4 受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子多型によって規定されており、NZB および BXSB マウスは IL-4 低産生性の多型を、NZW マウスは IL-4 高産生性の多型を示すことが明らかとなった。さらに、IL-4 受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子多型とループス腎炎との相関を解析した結果、IL-4 低産生性 IL-4 受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子多型は BXSB のループス腎炎の感受性遺伝子として機能しているのに対して、New Zealand マウスのループス腎炎には関与していないことが判明した。本研究結果は、ループス腎炎は遺伝的に均一な疾患ではないことを如実に示すものであり、ループス腎炎の治療を考える上でも、感受性遺伝子解析が重要な示唆を与える。

### A. 研究目的

CD4 陽性 T 細胞は、IFN $\gamma$ 産生性の Th1 型および IL-4 産生性の Th2 型に分類され、Th1/Th2 バランスが自己免疫疾患の病態を大きく左右する。臓器特異的自己免疫疾患では、Th1 型 T 細胞が病態発症に寄与し、Th2 型へのシフトで治療が可能である。一方、全身性自己免疫疾患の代表であるループス腎炎においては、Th1/Th2 型 T 細胞の役割については、一定の見解が得られていない。本研究では、ループス腎炎における IL-4 産生性 Th2 細胞の役割を、ループス腎炎を自然発症するモデルマウスである New Zealand マウス系および BXSB マウス系を用いて、遺伝学的に解析することを目的とした。

### B. 研究方法

(1) *In vitro* サイトカイン産生能の測定：脾臓細胞あるいは FACS で分画した脾臓 CD3 陽性 T 細胞を、抗 CD3 抗体をコートしたプレートで 2 日間培養し、培養上清中の IL-4 産生量を ELISA にて測定した。

(2) マイクロサテライト多型および IL-4 受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子多型の解析：マウスの尾より抽出した DNA を用いて、マイクロサテライト多型を解析した。IL-4 受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子多型は、5' primer:5'-CGCTGTATGGAGCTGTTTGA-3' および

3' primer: 5'-CCTCCAACAAGTCGGAAAAC-3' を用いて、PCR-SSCP にて解析した。

(3) IL-4 受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子の塩基配列解析：脾臓から RNA を抽出し、報告された配列をもとに primer を設定し、BALB/c, C57BL/6, NZB, NZW, BXSB マウスの IL-4 受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子の cDNA の塩基配列を比較解析した。

(4) QTL 解析：142 匹の(NZB x NZW) F1 x NZW 退交配マウスの脾臓細胞による *in vitro* IL-4 産生量に関する QTL 解析を、117 のマイクロサテライトマーカーを行ってゲノムワイドに行い、LOD score 3.3 以上を示す場合を統計学的有意とした。  
(倫理面への配慮)

マウスの実験は、本研究施設の定める動物実験指針に基づいて行った。

### C. 研究結果

(1) 脾臓 T 細胞による *in vitro* の IL-4 産生能の比較：図 1 に、NZB, NZW, BXSB およびこれらの交配 F1 マウスの脾臓 CD3 陽性 T 細胞による *in vitro* の IL-4 産生量を比較して示した。NZB および BXSB で産生能が低く、NZW では高いことが解る。なお、F1 マウスでは両親系の間であった。

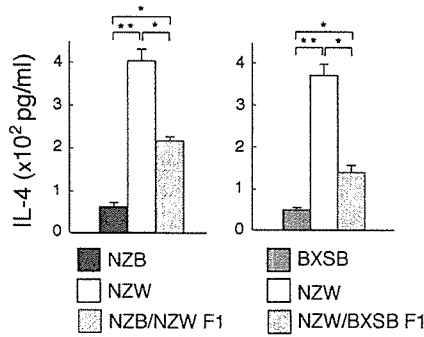


図1 抗 CD3 抗体刺激による 2 ヶ月齢マウス脾臓 T 細胞の *in vitro* IL-4 産生能の比較。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

(2) IL-4 産生能を規定する遺伝子の解析：(NZB x NZW) F1 x NZW 退交配マウスの脾臓細胞を抗 CD3 抗体で刺激して産生される IL-4 量に関する QTL 解析をゲノムワイドに行った結果、図 2 A に示すように、LOD 3.3 を超える領域が第 7 染色体テロメア領域に存在した。LOD のピークの部位に候補遺伝子と考えられる IL-4 受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子が存在していた (図 2 B)。

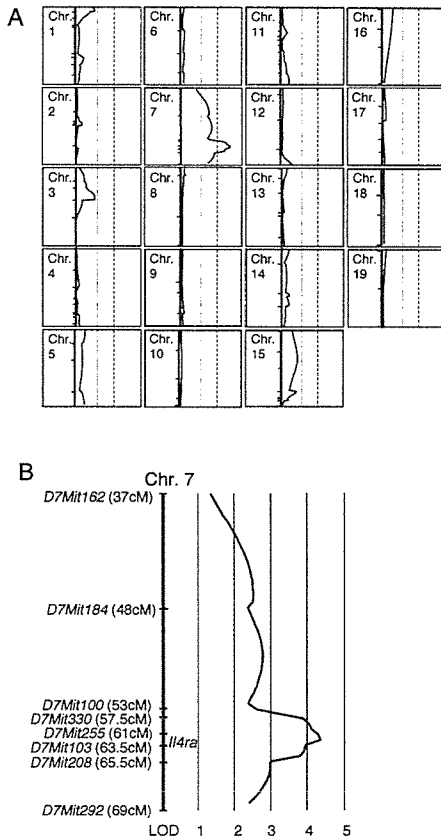
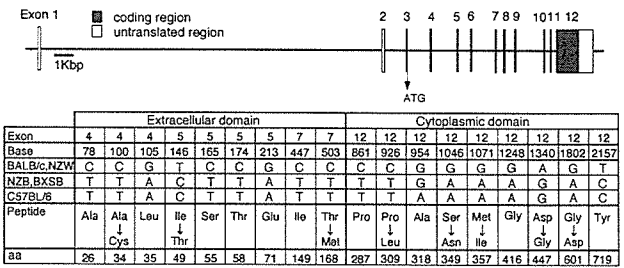


図2 抗 CD3 抗体刺激による脾臓細胞の *in vitro* IL-4 産生量の QTL 解析。(A) 2 ヶ月齢の 142 匹の (NZB x NZW) F1 x NZW 退交配マウスを用いたゲノムワイド解析結果で、点線は LOD 1.9 (suggestive linkage level) および LOD 3.3 (significant linkage level) を示す。(B) 第 7 染色体での QTL 解析結果。

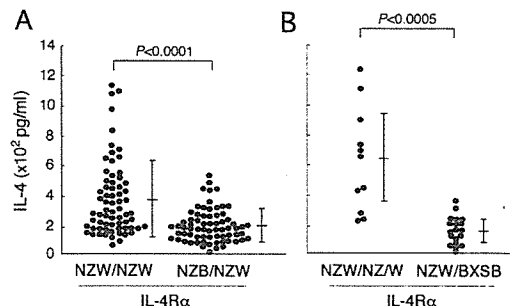
(3) IL-4 受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子多型の解析：IL-4 受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子が感受性遺伝子である可能性を知るために、IL-4 受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子 cDNA の塩基配列を解析して、多型の有無を調べた。その結果、図 3 に示す様に、NZW は BALB/c と同じ配列であり、一方、NZB と BXSB は一塩基を除き C57BL/6 と同じ配列であった。この一塩基の違いはアミノ酸置換を伴わなかった。従って、NZW と NZB および BXSB の間には、IL-4 受容体 $\alpha$ 鎖の細胞外ドメインおよび細胞内ドメインに合計 8 つのアミノ酸置換を伴う多型が存在することが明らかとなった。



た。

図3 IL-4 受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子の構造と遺伝子多型部位

(4) IL-4 受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子多型と IL-4 産生能の相関：142 匹の (NZB x NZW) F1 x NZW および 30 匹の NZW x (NZW x BXSB) F1 退交配マウスを用いて、抗 CD3 抗体刺激脾臓細胞による *in vitro* の IL-4 産生能と IL-4 受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子多型との相関を解析した。その結果、図 4 に示すように、いずれの退交配マウスにおいても、IL-4 受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子型が NZW/NZW 型のマウス群で、NZB/NZW 型あるいは NZW/BXSB 型のマウス群に比較して



有意に高い IL-4 産生能を示した。

図4 IL-4 受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子多型と抗 CD3 抗体刺激脾臓細胞による *in vitro* IL-4 産生能の相関。(NZB x NZW) F1 x NZW (A) および NZW x (NZW x BXSB) F1 (B) 退交配マウスを IL-4 受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子型によって 2 つの群に分け、IL-4 産生量を比較した。

(5) IL-4 受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子多型とループス腎炎との相関:219 匹の雌(NZB x NZW) F1 x NZW および 117 匹の雄 NZW x (NZW x BXSB) F1 退交配マウスを用いて、蛋白尿出現率と IL-4 受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子多型との関連を解析した。その結果、前者の退交配マウスでは相関が認められなかったが、後者の退交配マウスにおいて、図5に示すように有意な相関が認められ、IL-4 高産生性の NZW/NZW 型で蛋白尿の出現率が低く、IL-4 低産生性の NZW/BXSB 型で蛋白尿の出現率が高いことが判明した。

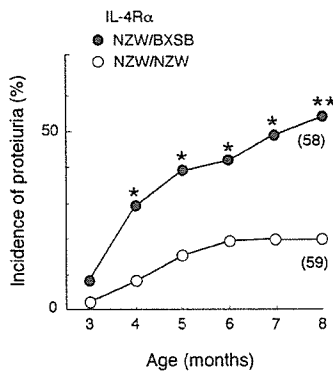


図5 IL-4 受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子多型とループス腎炎との相関。117 匹の♂NZW x (NZW x BXSB) F1 退交配マウスの蛋白尿量を経時的に測定し、333 mg/100 ml 以上の尿蛋白を認めるものを陽性として、IL-4 受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子型が NZW/BXSB 型および NZW/NZW 型の群に分けて、蛋白尿出現率を比較した。( ) 内はマウスの匹数。\* $P < 0.005$ , \*\* $P < 0.0001$ 。

#### D. 考察

第11染色体上にマップされる Tim (T cell Ig mucine) family 遺伝子多型が、抗原刺激をうけた T 細胞の IL-4 産生能を左右するという報告が見られるが、本研究は、マウスの IL-4 受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子多型が、naïve T 細胞による IL-4 産生能を規定していることを初めて明らかにしたものである。IL-4 受容体 $\alpha$ 鎖欠損マウスでは、抗 CD3 抗体刺激による脾臓 T 細胞の IL-4 産生能が障害されることから、IL-4 の産生は autocrine mechanism によることが示されている。このことは、IL-4 受容体 $\alpha$ 鎖の遺伝子多型が、IL-4 との結合能およびシグナルの強弱に影響を与え、結果的に IL-4 産生能に影響する可能性を示すものである。

(NZB x NZW) F1 および BXSB マウスはいずれも SLE に伴うループス腎炎を自然発症するモデル系である。BXSB マウスでは、Y 染色体上に存在する *Yaa* (Y-linked autoimmune acceleration) 遺伝子

の作用で、雌に比べて雄に強い病態が発症する。これらのマウス系の腎炎は、病理形態学的には同様の変化を示すが、各病態に及ぼす IL-4 の影響は全く異なっている。抗 IL-4 抗体投与で IL-4 を低下させると、(NZB x NZW) F1 マウスの腎炎は抑制されるが、IL-4 遺伝子を欠損させても BXSB マウス系の腎炎の程度は変化しない。むしろ、IL-4 遺伝子導入で *Yaa* 遺伝子によって誘導される腎炎は改善することが報告されている。これらの所見は、IL-4 低産生性の IL-4 受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子多型と BXSB マウスの腎炎との相関を認めた今回の我々の解析結果から矛盾無く説明される。

一方、(NZB x NZW) F1 マウスの腎炎は IL-4 受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子多型と相関しなかった。これらの結果は、形態学的に同様に見えるループス腎炎においても、関与する素因遺伝子の違いを示すもので、ヒト SLE の病因を考える上で、重要な示唆を与えるものである。

#### E. 結論

IL-4 受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子多型が naïve CD4T 細胞による IL-4 産生能を規定していることを初めて明らかにした。さらに、IL-4 受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子多型と BXSB マウスのループス腎炎との相関を認めたが、(NZB x NZW) F1 マウスのループス腎炎とは相関が無かった。本研究成果は、ループス腎炎が遺伝的に均一な疾患ではないこと示すもので、サイトカインの関与が、特定のループス腎炎患者で異なることを示す重要な発見である。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Lin Q, Xiu Y, Jiang Y, Tsurui H, Nakamura K, Kodera S, Ohtsuji M, Ohtsuji N, Shirowa 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.

2. Hirose S, Jiang Y, Nishimura H, and Shirai T.

Significance of MHC class II haplotypes and IgG Fc receptors in SLE. *Springer Semin. Immun.* 28:163-174, 2006.

3. Shirai T and Hirose S. Molecular pathogenesis of SLE. Springer Semin. Immun. 28:79-82, 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.
5. Fujii T, Iida Y, Yomogida M, Ikeda K, Haga T, Jikumaru Y, Ninami M, Nishimura N, Kodera Y, Inada Y, Shirai T, Hirose S, and Nishimura H. Genetic control of the spontaneous activation of CD4+ Th cells in systemic lupus erythematosus-prone (NZB x NZW) F1 mice. Genes Immun. 7:647-654, 2006.
6. Shiroiwa 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.

## 2. 学会発表

1. Qingshun Lin, Kazuyuki Tsukamoto, Hiromichi Tsurui, Kazuhiro Nakamura, Mareki Ohtsuji, Toshikazu Shirai, Sachiko Hirose. Role of positive and negative receptors for IgG in murine lupus. 11th International Conference on Mechanisms Lymphocyte Activation and Immune Regulation: B Cell Biology, Feb 2-5, 2006, Newport Beach, California
2. Hirose Sachiko, Ohtsuji Mareki, Shiroiwa Wakana, Tsukamoto Kazuyuki, Lin Qingshun, Tsurui Hiromichi, Nakamura Kazuhiro, Nishimura Hiroyuki, Shirai Toshikazu. IL-4R $\alpha$  polymorphism and its association with lupus nephritis. 日本免疫学会・学術集会記録 第36巻 83頁 2006
3. Lin Qingshun, Tsurui Hiromichi, Nakamura Kazuhiro, Ohtsuji Mareki, Tsukamoto Kazuyuki, Shiroiwa Wakana, Nishimura Hiroyuki, Shirai Toshikazu, Hirose Sachiko. Genetic dissection of the effects of stimulatory and inhibitory IgG Fc receptors on murine lupus. 日本免疫学会・学術集会記録 第36巻 102頁 2006
4. 芳賀俊明、藤井琢磨、軸丸由梨、稲田祐二、

- 広瀬幸子、白井俊一、西村裕之 NZB 系マウスの自己寛容破綻における抑制性Fc受容体Fc $\gamma$ RIIBの役割 日本免疫学会・学術集会記録 第36巻 102頁 2006
5. Tsurui Hiromichi, Hirose Sachiko. Calculation of MHC-peptide binding energy by molecular dynamics. 日本免疫学会・学術集会記録 第36巻 88頁 2006
  6. Ohtsuji Mareki, Shiroiwa Wakana, Tsukamoto Kazuyuki, Lin Qingshun, Tsurui Hiromichi, Nakamura Kazuhiro, Kadowaki Naomi, Nishimura Hiroyuki, Shirai Toshikazu, Hirose Sachiko. Possible contribution of neutrophil activation to lupus lupus. 日本免疫学会・学術集会記録 第36巻 103頁 2006
  7. 藤井琢磨、飯田行恭、蓬田雅人、池田賢一、芳賀俊明、軸丸由梨、西村尚樹、稲田祐二、広瀬幸子、白井俊一、西村裕之 自己免疫疾患モデルマウスにおける自発的T細胞活性化を規定している遺伝子 日本免疫学会・学術集会記録 第36巻 103頁 2006
  8. 森山優子、関根知世子、川崎明美、小山典子、小瀬英子、大辻希樹、広瀬幸子、八木田秀雄、奥村康 Delta1 発現細胞による辺縁帯B細胞形成・維持の解析 日本免疫学会・学術集会記録 第36巻 181頁 2006
  9. Tsukamoto Kazuyuki, Lin Qingshun, Ohtsuji Mareki, Nakamura Kazuhiro, Tsurui Hiromichi, Miyake Sachiko, Yamamura Takashi, Hirose Sachiko. Role of NKT cells in systemic lupus erythematosus. 日本免疫学会・学術集会記録 第36巻 247頁 2006
  10. Amano H, Amano Eri, Lin Qingshun, Nakano Souichirou, Nozawa Kazuhiko, Morimoto Shinji, Takano Yoshiaki, Hirose Sachiko, Takasaki Yoshinari. Efficient differentiation of Gr-1 positive to Gr-1 negative monocytes and dendritic cells in the Yaa model of systemic lupus erythematosus. 日本免疫学会・学術集会記録 第36巻 105頁 2006

## 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

## 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** レチノイドの特徴ある免疫機能の調節作用を自己免疫疾患の臨床へ応用するための研究を行う。免疫異常の動物モデル NOD マウスはタミバロテンの経口投与により分泌腺障害が改善されることを示した。

### A. 研究目的

タミバロテンはレチノイン酸受容体 RAR- $\alpha$  と RAR- $\beta$  を介して特定の遺伝子の発現を調節する。本薬は現在では免疫性疾患と位置づけられている乾癬に有効であることが報告されている。動物モデルでは、リウマチモデル、クローン病モデル、実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）などで著明な効果を示した。そして、クローン病では治験が開始されたところである。この薬剤のいっそうの展開を期して免疫異常の動物モデルである NOD マウスをもちいて免疫異常に対する効果を検証する。本薬は承認薬である。

### B. 研究方法

6週令の NOD マウスに19週間にわたりタミバロテンを混餌投与する。体重、尿糖測定を行い、膵臓と唾液腺（顎下腺、耳下腺、舌下腺）の病理組織の解析を行う。

### C. 研究結果

非投与群については、尿糖が一部の個体に発生し、病理解析では全例で膵臓ランゲルハンス氏島におけるリンパ球浸潤を伴う崩壊と、顎下腺におけるリンパ球浸潤が明らかに認められた。耳下腺および舌下腺については、本系では明確な病変は観察されなかった。Am80 を投与した群は、非投与群に比べ、尿糖の発生が抑制された。さらに、病理解析では、膵臓ランゲルハンス氏島の崩壊が明確に減少し、顎下腺でもリンパ球浸巢の発現が低下していた。

### D. 考察

タミバロテンは NOD マウスにおいて膵臓と唾液腺における病変の発現を明らかに抑制することが示された。これらの結果より、タミバロテンにシェーグレン症候群に対して治療効果を期待できること、および、1型糖尿病の予防にも効果が示唆される。

### E. 結論

レチノイド、とくに、受容体選択的なタミバロテンは広く自己免疫疾患の治療にもちいえることが示された。現在進行中のクローン病についての治験結果が判明すれば、SLE やループス腎炎などにも応用可能であろう。さらに進んだ自己免疫疾患の研究のためにタミバロテンを供給することができる。

### F. 健康危機情報

特になし。

### G. 研究発表

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2mg）。化学療法の領域 23（4）印刷中（2007）

### 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

## 「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。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免疫不応答状態（アナジー）において、発現の低下している蛋白を同定し、現在その機能を解析中である。また、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。

### 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分子機序を発見し新規治療につなげる。近年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、その基質として PLC $\gamma$  などのシグナル伝達分子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中心に、免疫寛容維持の機構について検討する。

### B. 研究方法

DO11.10 の脾臓細胞を OVA 蛋白で刺激し、10 日後に ionomycin 処理、ionomycin+cyclosporin A 処理群を比較し、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蛋白発現を網羅的に解析する。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 とその変異体の作製を行う他、GRAIL の遺伝子欠損マウスを作製する。

### C. 研究結果

上記 2D DIGE 法により、アナジー状態で特異的に発現が低下する蛋白について、未知、既知を含め約 30 の蛋白質を同定した。これらの蛋白には、細胞骨格に関する蛋

白、酵素、転写因子などが含まれていた。現在これらの蛋白質のアナジーへの関与について検討を行っている。また、GRAIL の基質同定については、Ring finger domain の欠損変異体を作製し、強制発現系の解析を行っている。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中であるが、キメラ化率が極めて悪く、F1 作製が困難であったため、現在ベクター設計を変更し、作製中である。

### D. 考察

自己免疫疾患の治療は、近年関節リウマチや多発性硬化症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 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を期待される。

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。今回同定した蛋白については、まずアナジーへの関与を明らかにし、GRAIL 分子の基質になり得るかどうかについて検討することが必要である。プライマリーの T 細胞での解析が容易でないため、今後はリンパ球系以外の細胞株も使用して検討することが重要となる。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中であるが、X 染色体上に存在するためかキメラマウス以降の作製が困難をきわめているが、現在ベクターを3回作製しなおし検討中である。

## E. 結論

アナジーにより特異的に発現量の低下がみられる蛋白を同定した。これらの蛋白の機能解析と、GRAIL 分子との関連を今後明らかにする必要がある。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

原著

- 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(12): 7447-55, 2006
- 2) Miyamoto K, Miyake S, Mizuno M, Oka N, Kusunoki S and Yamamura T. Selective COX-2 inhibitor celecoxib prevents experimental autoimmune encephalomyelitis through COX-2 independent pathway. **Brain** 129: 1984-92, 2006
- 3) Croxford JL, Miyake S, Huang Y-Y, Shimamura M and Yamamura T. Invariant V $\alpha$ 19i T cells regulate autoimmune inflammation. **Nat.Immunol.** 7(9):987-94, 2006
- 4) 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(8): 5659-67, 2006

## 総説

- 1) 三宅幸子: iNKT 細胞: 多彩な機能と病態への関与について **Jpn. J. Clin. Immunol.** 29(1): 27-36, 2006
- 2) 三宅幸子: NKT 細胞 分子リウマチ 3(3): 26-33, 2006
- 3) 三宅幸子: 多発性硬化症における免疫制御細胞の役割とその賦活法 多発性硬化症研究・治療の現状 2006 50(4): 636-643, 2006

## 2. 学会発表

### 国際学会

- 1) Sakuishi K, Aranami S, Miyake S, Yamamura T. IL-2 costimulates IL-5 production by CD1d-reactive human CD4+ NKT cells: a novel pathway controlling NKT cell-mediated Th2 response. . Annual meeting of the American association of immunologists, Boston, May 14, 2006
- 2) Kaieda J, Oki S, Yamamura T, Miyake S. New synthetic glycolipid ligands for NKT-cells suppresses antibody-induced arthritis. 6<sup>th</sup> Annual Conference of FOCIS, San Francisco, June 2, 2006
- 3) Doi Y, Oki S, Satoh J-I, Aranami T, Miyake S, Yamamura T. NR4A2(Nurr1), an orphan nuclear receptor, is overexpressed in peripheral blood T lymphocytes of multiple sclerosis. The 8<sup>th</sup> International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 178 S1,p78, 2006)
- 4) Croxford JL, Miyake S, Shimamura M, Yamamura T. Invariant V $\alpha$ 19-J $\alpha$ 33 NKT cells promote ICOS-dependent IL-10 production by B cells which regulated inflammation in a model of multiple sclerosis. The 8<sup>th</sup> International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 85 S1,p85, 2006)
- 5) Aranami T, Miyake S, Yamamura T. CD11c on NK cells mirrors the disease activity of multiple sclerosis. The 8<sup>th</sup> International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 178 S1,p102, 2006)



- 6) Miyamoto K, Miyake S, Kusunoki S, Yamamura T. Selective COX-2 inhibitor celecoxib prevents experimental autoimmune encephalomyelitis through COX-2 independent pathway. The 8<sup>th</sup> International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 117 S1,p117, 2006)
  - 7) Sakuishi K, Miyake S, Yamamura T. Control of IL-5 production in CD1d-reactive human CD4+ NKT cell clones from MS patients following exogenous IL-2 co-stimulation. The 8<sup>th</sup> International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 147 S1,p102, 2006)
  - 8) Oki S, Yamamura T, Miyake S. Natural killer T cell ligand OCH as a potential therapeutics for multiple sclerosis: Mechanism for OCH-induced TH2 polarization in vivo. The 8<sup>th</sup> International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 148 S1,p102, 2006)
  - 9) Lin Y, Miyake S, Yamamura T. Induction of adaptive regulatory T cells during recovery of EAE sensitized with PLP136-150 in SJL/J mice: The presence of suppressor epitope within PLP. The 8<sup>th</sup> International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 151 S1,p102, 2006)
  - 10) Nagayama S, Miyake S, Yamamura T. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by transfer of lymphokine-activated natural killer (NK) cells. The 8<sup>th</sup> International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 169 S1,p102, 2006)
  - 11) Kaieda S, Oki S, Yamamura T, Miyake S. Activation of natural killer T cells with synthetic glycolipid suppresses antibody-induced arthritis. American College of Rheumatology 70<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting, Washington, DC, November 13, 2006 (Arthritis Rheum. 54:S358, 2006)
- 国内学会
- 1) Croxford JL, Miyake S, Shimamura M, Yamamura T: Invariant V $\alpha$ 19-J $\alpha$ 33 NKT cells promote ICOS-dependent IL-10 production by B cells which regulate inflammation in a model of multiple sclerosis. 第 18 回日本神経免疫学会学術集会、名古屋、3 月 2 日、2006
  - 2) 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等脂質によるマウスモデル関節炎の抑制 第 50 回日本リウマチ学会、長崎、4 月 24 日、2006
  - 3) 大塚敬男、三宅幸子、林幼偉、山村隆: 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) における Neuropeptide Y (NPY) の役割 第 47 回日本神経学会、東京、5 月 13 日、2006
  - 4) Croxford JL, Miyake S, Shimamura M, Yamamura T: Invariant V $\alpha$ 19-J $\alpha$ 33 NKT cells promote ICOS-dependent IL-10 production by B cells which regulate inflammation in a model of multiple sclerosis. 第 18 回日本神経免疫学会学術集会、名古屋、3 月 2 日、2006
  - 5) 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等脂質によるマウスモデル関節炎の抑制 第 50 回日本リウマチ学会、長崎、4 月 24 日、2006
  - 6) 大塚敬男、三宅幸子、林幼偉、山村隆: 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) における Neuropeptide Y (NPY) の役割 第 47 回日本神経学会、東京、5 月 13 日、2006
  - 7) 作石かおり、三宅幸子、山村隆: IL-2 を介した CD4 陽性 NKT 細胞クローンにおける Th2 サイトカインの選択的産生 第 36 回日本免疫学会、大阪、12 月 11-13 日、2006
  - 8) Lin Y, Croxford L, Miyake S, Yamamura T. Induction of adaptive regulatory T cells expressing CD103 besides CD25 and Foxp3 during recovery of EAE. The presence of suppressor epitope within encephalitogenic peptide. 第 36 回日本免疫学会、大阪、12 月 11-13 日、2006
  - 9) Croxford JL, Miyake S, Shimamura M, Yamamura T. Invariant V $\alpha$ 19-J $\alpha$ 33 NKT cells promote ICOS-dependent IL-10 production by B cells which regulated inflammation in a model of multiple sclerosis. 第 36 回日本免疫学会、大阪、12 月 11-13 日、2006
  - 10) Doi Y, Oki S, Miyake S, Yamamura T. Functional analysis of NR4A2, an orphan nuclear receptor, on the development of autoimmune encephalomyelitis. 第 36

回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006

- 11) Fujita M, Ootsuka T, Oki S, Mizuno M, Tomi C, Kaieda S, Miyake S, Yamamura T. Role of carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. 第36回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006
- 12) Tsukamoto K, Lin Q, Ohtsuji M, Nakamura K, Tsurui H, Miyake S, Yamamura T, Hirose S. Role of NKT cells in systemic lupus erythematosus. 第36回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006
- 13) 海江田信二郎、水野美歩、大木伸司、坂口志文、坂口敦子、山村隆、三宅幸子：SSKG マウスにおける結核死菌投与による関節炎の誘導：第36回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006

#### 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

## 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** 全身性エリテマトーデスをはじめとする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し、その同定を試みた。分子量 5,000 程度以下のペプチドを検索対象とし、疎水性担体の結合したビーズを用いて、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。強皮症における検討で疾患特異的と考えられるペプチドを検出同定に成功した。同定されたペプチドを化学合成し内皮細胞に転化すると増殖の増強が認められた。全身性エリテマトーデスの患者血清を用いて検出解析を行なった結果では、健常人では認められないペプチドが約 20 個検出された。強皮症との比較した結果、そのなかで 7 個は全身性エリテマトーデスで増加しており、今後そのアミノ酸配列の同定を進めて、生理活性を検討することが必要である。

### 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、従来の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、候補分子的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、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精製し、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

まず行った強皮症患者血清を用いた検討では 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、この des-Arg-C3f を化学合成し、内皮細胞に添加すると、内皮細胞の増殖が増強されることが判明した。次に、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で健常人にはほとんど認められないペプチドピークが約 20 個観察された。しかしながら、その中で同定された 7 つのペプチドは、強皮症においてより強く出現するものであった。残りのうち 7 つは強皮症に比べても全身性エリテマトーデスで強く検出されるペプチドピークであったが、現在まで同定には至っていない。今後、この全身性エリテマトーデス特異的な可能性のある 7 つのペプチドについて同定と生理活性を検討していきたい。

#### D. 考察

全身性エリテマトーデスをはじめとする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、病因解明に基づいた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小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

本研究で行った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. Suppressing 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 metalloproteinases 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).
  20. Yudoh K, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K. Correction: 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;7:225
  21. 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.* 2006;26(3):185-190.
  22. 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(3):818-831.
  23. Tanaka Y, Nakamura M, Matsui T, Iizuka N, Kondo H, Tohma S, Masuko K, Yudoh K, Nakamura H, Nishioka K, Koizuka I, Kato T. Proteomic Surveillance of Autoantigens in Relapsing Polychondritis. *Immunol Microbiol.* 2006;50(2):117-126.
  24. 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
  25. Nakamura H, Tanaka M, Masuko-Hongo K, Yudoh K, Kato T, Beppu M, Nishioka K. Enhanced production of MMP-1, MMP-3, MMP-13, and RANTES by interaction of chondrocytes with autologous T cells. *Rheumatol Int.* 2006;9:1-7.
  26. Murata M, Yudoh K, Nakamura H, Kato T, Inoue K, Chiba J, Nishioka K, Masuko-Hongo K. Distinct signaling pathways are involved in hypoxia- and IL-1-induced VEGF expression in human articular chondrocytes. *J Orthop Res.* 2006;24(7):1544-1554.
  27. Shimada S, Nakamura M, Tanaka Y, Tsutsumi K, Katano M, Masuko K, Yudoh K, Koizuka I, Kato T. CrossLinking of the CD69 Molecule Enhances S100A9 Production in Activated Neutrophils. *Microbiol Immunol.* 2007;51(1):87-98.
  28. 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.* 2006 Oct;41(10):981-6. Epub 2006 Nov 9.
  29. Nakamura H, Masuko K, Yudoh K, Kato T, Kamada T, Kawahara T. Effects of glucosamine administration on patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2007 Jan;27(3):213-8. Epub 2006 Sep 5.
- 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

## 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。前年度に構築した解析環境を、ゲノムワイドスタディデータの規模に対応できるよう拡張した。特に Fisher の正確確率検定とパーミュテーションテストをゲノムワイド規模で実施可能なような処理フローを構築した。

### 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カスの同定・関連多型の特定を目指す。パーソナルコンピュータ上で動作可能であり、かつ、100万マーカー、数千検体の SNP データに対して、ケース・コントロール SNP 解析を実施できることを目指し、データ処理フローを改善する。  
(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、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整備していた。

- ・ 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
  - SNP HAP
  - 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
  - Optimum solution 法

これに加え、Fisher の正確確率検定、および、パーミュテーションテストを 100 万マーカー・数千検体において実施できるツールを実装した。また、パーミュテーションテストにおいては、従来よりゲノム解析にて用いられてきている、Tippette 関数による補正のほか、2 種類の補正方法(Fisher 関数・Liptak logit 関数)も組み込み、より、柔軟な解析条件にて実施できるよう配慮した。また、フォ

ールスディスカバリーレート (FDR) 補正も併せて実施するよう、解析ツールに組み込んだ。

#### 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、従来法による SNP データ解析手法に不足している点を改良した。

#### 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. 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(1):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(1):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.

##### 2. 学会発表

1. Yamada R. et al. Inference of polyphyletic SNP-ratio by zero-distance limit of fraction of SNP pairs in complete linkage disequilibrium. New Orleans, LA, USA, 2006
2. Yamada R. Location-oriented extraction and visual presentation of association strength for case-control SNP genotype data in a candidate region. Poster presentation at Genetic Analysis Workshop 15,

Tampa, FL, 2006

3. Yamada R. et al. Multiple marker LD index of SNPs and the method to plot their pertinent components. Tampa, FL, USA, 2006

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

## 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

分担研究者 西本 憲弘 大阪大学大学院生命機能研究科免疫制御学講座 教授

**研究要旨** SLE の病態を明らかにするため、DNA マイクロアレイを用いて患者末梢血における遺伝子発現を網羅的に解析した。発現異常を認めた 1641 分子を Gene Ontology 解析により機能分類し、SLE で見られる細胞機能異常を検索した。その結果、SLE では defense response の異常に加え、protein biosynthesis の亢進、proteolysis の抑制がみられた。さらに defense response のカテゴリーに含まれる分子のネットワーク解析より、TNF のシグナル伝達異常の存在が示唆された。

### A. 研究目的

全身性エリテマトーデス (SLE) で異常発現する分子を特定するために、末梢血における遺伝子発現を DNA マイクロアレイを用いて解析し、これまでに健常人に比べて有意差を持って発現する 1641 分子を同定した。その中に Interferon-inducible gene が含まれていることを昨年度報告した。今回、SLE で有意差を持って発現する全ての分子 (1641 分子) を Gene Ontology 解析を用いて分類し、SLE の病態を形成する機能異常の同定を試みた。さらにネットワーク解析により分子間の関連についても検討した。

### B. 研究方法

DNA マイクロアレイを用いた SLE 患者 11 例と同年齢の健常女性 6 例の末梢血細胞における遺伝子発現の比較によって有意差の認められた 1641 分子を用いて以下の解析を行った。

発現が増加する遺伝子群と減少する遺伝子群に対し、Gene Ontology に基づく機能分類を行い、異常な発現を示す遺伝子数が特定の機能に偏りがみられるか否かを検討した。この検定には Expression Analysis Systematic Explorer (EASE)を用いた。

偏りの見られた機能カテゴリーに含まれる遺伝子群の分子間相互関係を明らかにすること、およびその分子群が関わるネットワーク、カスケードを検索するために、Ingenuity Pathways Analysis (IPA, Ingenuity® Systems)を用いてネットワーク解析を行った。

(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、被験者の文章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 で有意差を持つ 1641 分子の内、発現の増加していたのは 752 分子、減少していたのは 889 分子であった。

増加した 752 分子の内、Gene Ontology により機能分類されている 382 分子について EASE 解析を行ったところ、defense response、proteolysis、cell cycle などに関わる機能カテゴリーに分子数の偏りが見られた。

一方、減少した 889 分子の内、Gene Ontology により機能分類されている 533 分子について EASE 解析を行ったところ、defense response、protein biosynthesis に分子数の偏りが見られた。

以上からこれらの機能に異常が存在することが示唆された。

次に、SLE での機能異常が示唆された defense response に含まれる遺伝子群の分子間相互作用を明らかにすること、およびその分子の関わるネットワークの検索を目的とし、IPA を用いて解析した。その結果、TNF、IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$  が構成するネットワークの存在が明らかとなった。TNF のネットワークにおいては、TNF によって誘導される分子群の発現量の有意な減少が見られた。これは



TNF 自体の遺伝子発現が増加している SLE 患者においても見られた。

#### D. 考察

Defense response に関わる機能カテゴリーに異常が見られたことから、SLE の病態における免疫系の異常の存在が強く示唆された。ネットワーク解析によって免疫系の異常には TNF、IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$  などのサイトカインを中心とするカスケードの異常の存在が示唆された。その内 TNF のカスケードに関しては、これまでに SLE 患者において TNF の発現が増加していることが報告されている。しかし、実際に TNF が高発現していた患者においても TNF によって誘導されている分子の発現は低下していたことから、SLE 患者において TNF のシグナル伝達に異常があることが示唆された。

また、SLE で高発現する分子における EASE 解析で proteolysis のカテゴリーに、低発現する分子を用いた解析で protein biosynthesis のカテゴリーに異常が見られたことから、SLE においては catabolism の亢進と protein biosynthesis の抑制が示唆された。ステロイドパルス療法を行った患者においてこれらのカテゴリーに含まれる分子の発現が変化していることから、これは治療に用いたステロイドによる影響の可能性が考えられる。

現在 SLE 患者における TNF のシグナル伝達異常に関する解析を行っている。

#### E. 結論

DNA マイクロアレイで同定した分子群を用いた Gene Ontology 解析、ネットワーク解析により、SLE 患者における TNF シグナルカスケードの異常が示唆された。

#### 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. Yoshio-Hoshino N, Adachi Y, Aoki C, Pereboev A, Curiel DT, Nishimoto N. Establishment of a new interleukin-6(IL-6) receptor inhibitor applicable to the gene therapy for IL-6-dependent tumor. *Cancer Res*. 2007 Feb 1;67(3):871-5.

2. Nakahara H, Nishimoto N. Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy in rheumatic diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2006 Dec;6(4):373-81. Review.
3. Nishimoto N, Kishimoto T. Interleukin 6: from bench to bedside. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006 Nov;2(11):619-26.
4. 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(6):1778-85
5. Adachi Y, Aoki C, Yoshio-Hoshino N, Takayama K, Curiel DT, Nishimoto N. Interleukin-6 induces both cell growth and VEGF production in malignant mesotheliomas. *Int J Cancer*. 2006 Sep 15;119(6):1303-11.
6. Nishimoto N. Interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2006 May;18(3):277-81.

##### 2. 学会発表

1. 石川悟, 他. DNA チップを用いた末梢血遺伝子プロファイルによる若年性特発性関節炎(JIA)の病態関連分子の解析. 第50回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2006.4.23-26.
2. Nishimoto N. Humanized anti-IL-6 receptor antibody treatment of rheumatoid arthritis. The 15th International Rheumatology Symposium. Nagasaki Japan 2006.4.24
3. Nishimoto N. Effect of IL-6 blockade on bone and muscle in human and animal model in the unloading condition. The 27th Annual International Gravitation Physiology Meeting. Osaka Japan. 2006 4.27
4. Nishimoto N. Anti-IL-6 therapy for Anemia of inflammation and chronic disease. Workshop on Anemias of Inflammation and Chronic Disease. Annapolis, USA. 2006.5.1-2
5. Nishimoto N, Kishimoto T. Autoimmune diseases. Antibody Engineering Conference. Inamori Auditorium, Kagoshima. 2006.6.16-17
6. Nishimoto N. Benefits of IL-6 inhibition in adult

rheumatoid arthritis: an international experience. Tocilizumab Satellite Symposium in the Annual European Congress of rheumatology EULAR 2006. Amsterdam, The Netherlands. 2006

7. Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Azuma J, Kishimoto T. Efficacy and safety of tocilizumab in monotherapy, an anti-IL-6 receptor monoclonal antibody, in patients with active rheumatoid arthritis: results from a 24 week double-blind phase III study. Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2006. Amsterdam, The Netherlands. 2006.6.21-24

8. Yokota S, Imagawa T, Mori M, Takei S, Kawano Y, Iwata N, Tomiita M, Miyoshi M, Aihara Y, Murata T, Abukawa D, Nishimoto N, Kishimoto T. A multi-center, randomized, double-blinded, placebo-controlled study of tocilizumab, an anti-IL-6 receptor monoclonal antibody, in children with systemic juvenile idiopathic arthritis. Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2006. Amsterdam, The Netherlands. 2006.6.21-24

9. Hashimoto J, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Yoshikawa H, Kshimoto T, Nishimoto N. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody (tocilizumab) in monotherapy prevents the loss of lumbar and femoral bone mineral density in patients with early rheumatoid arthritis. Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2006. Amsterdam, The Netherlands. 2006.6.21-24

10. Ishikawa S, Aoki C, Yoshio N, Nakahara H, Saito K, Tanaka Y, Kishimoto T, Nishimoto N. DNA microarray analysis of SLE related genes that respond to IL-6 blockade with tocilizumab, an anti-IL-6 receptor monoclonal antibody. Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2006. Amsterdam, The Netherlands. 2006.6.21-24

11. Nishimoto N. IL-6 blockade in Crohn's disease and rheumatoid arthritis –anti-inflammatory efficacy and effects on metabolism-. The 3rd International Symposium Molecular and Clinical Aspects of Cellular Signalling. Kiel, Germany 2006 8.24-26

12. Tanaka Y, Yamamoto K, Takeuchi T, Nishimoto N, Miyasaka N, Sumida T, Koike T. Multi-center

phase I/II trial of Rituximab for treatment of refractory systemic lupus erythematosus.ACR2006. Washington, DC. 2006.11.10-15

13. Hashimoto J, Patrick G, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Murata N, Yoshikawa H, Kishimoto T, Nishimoto N. Early changes in biochemical markers of cartilage turnover and synovial inflammation predict the effects of monotherapy on one-year radiographic patients with early rheumatoid arthritis. ACR2006. Washington, DC. 2006.11.10-15

14. Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Azuma J, Kishimoto T. Consistent clinical response resulted from three Japanese randomized controlled trials of tocilizumab, humanized anti-IL-6 receptor antibody, in active rheumatoid arthritis(RA) patients. ACR2006. Washington, DC. 2006.11.10-15

15. Imagawa T, Mori M, takei S, Kawano Y, Iwata N, Miyoshi M, Murata T, Nishimoto N, Kishimoto T, Yokota S. Efficacy and safety of tocilizumab, an anti-IL-6 receptor monoclonal antibody, in patients with polyarticular or oligoarticular onset juvenile idiopathic arthritis. ACR2006. Washington, DC. 2006.11.10-15

16. Yokota S, Imagawa T, Mori M, Takei S, Kawano Y, Iwata N, Tomiita M, Miyoshi M, Aihara Y, Murata T, Abukawa D, Nishimoto N, Kishimoto T. Rapid improvement of signs and symptoms associated with systemic juvenile idiopathic arthritis(sJIA) by interleukin-6(IL-6) blockade results from a tocilizumab sJIA phase III clinical trial. ACR2006. Washington,DC. 2006.11.10-15

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

## Opn 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

分担研究者 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

研究協力者 宮崎 龍彦 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 助教授

**研究要旨** 膠原病モデルマウスの糸球体腎炎感受性を規定する候補遺伝子として同定した *Opn* に関し、実際 *in vivo* において *Opn* allele が糸球体腎炎を含む膠原病の発症感受性を規定するかを明らかにすることを目的とした。[MRL/lpr x (MRL/lpr x C3H/lpr)F1] - N2 マウスを作製し、*Opn* allele が C3H 型となっている個体を選別し、selective congenic による MRL/lpr との戻し交配を 1-3 代続けた後、兄妹交配して *Opn* allele 特異的コンジェニック系マウスを確立した。*Opn* allele が MRL ホモ型の群では、他の二群に比べて、生存率が有意に低かった。また、*Opn* allele が C3H 型ホモの群では、他の群に比べて有意に糸球体腎炎発症率・重症度が抑制されており、ヘテロの群も MRL 型ホモの群に比べるとこれらが有意に低かった。また、*Opn* allele が C3H ホモ型のマウスの脾細胞では、同領域が MRL 型ホモのものにくらべ、炎症性サイトカインの発現が概ね低く、Th2 にシフトしていた。*Opn* allele の遺伝子型は糸球体腎炎発症感受性を規定しており、その差異に少なくとも Th1/Th2 バランスが関与しているものと考えられた。

### 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>。

その中で我々は、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遺伝子座(*Agm3*)の一つとしてマップし、その候補遺伝子としてオステオポンチン(*Opn* / *Spp1*)を同定した。*Opn* は、マクロファージ、活性化リンパ球、骨芽細胞、動脈硬化巣の血管内皮細胞や平滑筋細胞など幅広い種

類の細胞により産生される蛋白質で、細胞外マトリックス、インテグリンとの接着分子として分類される一方、NO 合成酵素の産生を抑制、B-cell の活性化、マクロファージの分化・遊走化・活性化誘導などサイトカインとしての機能も有し、マウス同種間でリケッチア感染感受性遺伝子とのリンケージが存在すること、MRL 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>。我々は MRL/lpr と C3H/lpr の F2 世代を用いた解析により、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た<sup>7)</sup>。両者間には 10ヶ所のアミノ酸置換があるが、そのうち少なくとも *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最近明らかにしている(昨年度報告)。

そこで今年度は、これらの結果を基に *in vivo* において、実際 *Opn* allele が糸球体腎炎を含む疾患発症感受性を規定するかを明らかにすることを目的とした。

### B. 研究方法

[MRL/lpr x (MRL/lpr x C3H/lpr)F1] - N2 マウスを作製し、*Opn* allele が C3H 型となっている個体を選別し、

selective congenic による MRL/lpr との戻し交配を13代続けた後、兄妹交配して *Opn* allele 特異的なリコンビナント・コンジェニック系マウスを確立した。*Opn* allele が MRL 型ホモ、C3H 型ホモおよびヘテロ接合となっているマウス群間で生存曲線の比較、各個体に於ける糸球体腎炎の病理組織学的解析による比較を行った。さらに、脾臓に於けるサイトカイン、ケモカインおよびそのレセプターの発現パターンを PCR array を用いて網羅的に解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、全て愛媛大学動物実験指針に基づいて行った。

### C. 研究結果

*Opn* allele が MRL ホモ型の群では、他の二群に比べて、生存率が有意に低かった(図1)。病理組織学的解析の結果、*Opn* allele が C3H 型ホモの群では、他の群に比べて有意に糸球体腎炎発症が抑制されており、また、ヘテロの群も発症率は MRL 型ホモの群に比べて有意に低かった。その他の自己免疫疾患発症には有意な差は認めなかった。また、*Opn* allele が C3H ホモ型のマウスの脾細胞では、同領域が MRL 型ホモのものにくらべ、Th2 サイトカインおよび Th2 関連分子の発現が高かった。(図2a, b)

### D. 考察

今回新たに作出したリコンビナント・コンジェニックマウスの *in vivo* での解析において、*Opn* allele の遺伝子型は糸球体腎炎発症感受性を規定しており、その差異に少なくとも Th1/Th2 バランスが関与しているものと考えられた。

### E. 結論

*Opn* allele の遺伝子型が *in vivo* に於ける糸球体腎炎の発症感受性を規定していた。

### [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. 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.

### F. 健康危機情報 特になし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

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