

200729011A

厚生科学研究費補助金
免疫・アレルギー疾患予防・治療研究事業

免疫疾患に対する免疫抑制療法等先端的新規治療法に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

平成20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- β ブロッカーによる間質性肺炎の制御戦略に関する研究 住田 孝之	13
4. IL-17 サイトカインファミリーIL-17B および IL-17C の関節炎との関連に関する研究 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. 自己免疫誘導性 Th17 細胞の分化制御メカニズムに関する研究 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	25
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	30
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	33
10. 自己免疫疾患における RP105 欠損 B 細胞のフェノタイプ解析と治療標的としての可能性 長澤 浩平	36
(4) 研究成果の刊行に関する一覧	39

(1) 構成員名簿

平成19年度 構成員名簿
(H17-免疫-011)

区分	氏名	所属	職名
主任研究者	小池 隆夫	北海道大学大学院医学研究科 内科学講座・第二内科	教授
分担研究者	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	准教授
(50音順)	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	教授
	田中 良哉	産業医科大学医学部 第一内科学講座	教授
	島山 鎮次	北海道大学大学院医学研究科 医学専攻生化学講座 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	共同研究員
		国立病院機構 大牟田病院	院長
	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 免疫研究部	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 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	白取 靖子	北海道大学医学系事務部 会計課外部資金担当 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）
統括報告書

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生化学講座 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 教授
山本 一彦	東京大学医学部アレルギーリウマチ内科 教授
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 准教授
山村 隆	国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 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
長澤 浩平	佐賀大学医学部内科 教授
原田 実根	九州大学大学院医学研究院 病態修復内科学分野・共同研究員 国立病院機構・大牟田病院・院長

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、多発性筋炎、多発性硬化症などの難治性全身性自己免疫疾患や間質性肺炎などの難治性病態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。我が国では、免疫難病の治療開発という領域は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得なかったが、本年度は班員相互の議論と技術的交流を通じて、先端的かつオリジナリティーの高い研究成果をあげることができた。

A.研究目的

我が国では、免疫難病の治療開発という領域は未成熟であり、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、班員相互の議論と技術的交流を通じて、先端的かつオリジナリティーの高い研究成果を目指している。

B.研究方法

①小池；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。 β_2 GPI と結合する細胞表面タンパク質の検出のため、リコンビナント FLAG タグ β_2 GPI を、RAW264.7 の細胞溶解液と混合し、抗 FLAG 抗体アフィニティークロマトグラフィーにより FLAG タグ β_2 GPI と複合体を形成するタンパク質（ β_2 GPI 関連プロテオーム）を網羅的に分離する。MALDI-TOF もしくは ESI-LC-MS/MS により解析し、結果として得られたタンパク質につき、 β_2 GPI との結合を FACS 法およびウエスタンブロットリ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/ β_2 GPI 抗体による細胞刺激シグナルの変動について、インテグリン直下の FAK のリン酸化をウエスタンブロ

ッティングにて解析した。次に、RAW264.7にNF- κ B レポーターベクターをトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイにて解析した。

②島山；NF- κ B シグナルに対して抑制的に働くA20は、ユビキチン化酵素と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として報告されている。A20結合タンパク質として同定されたYmerとA20との結合をin vitro及びin vivoで確認する。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した。さらに、NF- κ Bシグナルに対して作用を調べるために、A20結合タンパク質存在下での κ B-ルシフェラーゼレポーターへの転写活性化の影響を検討した。

③住田；間質性肺炎は自己免疫疾患における難治性病態のひとつであり、依然として主たる死亡原因となっている。TGF- β が間質性肺炎発症に関わるという数多くの報告に基づき、TGF- β プロセッサのTGF- β I型受容体(ALK-5) inhibitor (GB-431542)による間質性肺炎に対する制御の可能性を検討した。間質性肺炎モデルとして、C57BL/6マウスを用いて、IL-2とIL-18のサイトカインのみで誘導されるモデルを選択した。間質性肺炎の誘導と同時にGB-431542の腹腔内投与を行い、コントロール(DMSO)投与群と組織所見、ならびに炎症・線維化に関与する分子の発現量の比較を行った。TGF- β シグナル伝達分子のSmad3のノックアウトマウスを用いて、IL-2とIL-18による間質性肺炎を誘導した。発症の程度や上記線維化関連の発現分子を解析し、間質性肺炎発症におけるSmad3を介したTGF- β シグナル制御の重要性をさらに検証した。

④山本；IL-17BとIL-17Cは、ヒト単球様細胞株に対してIL-17Aよりも強いTNF- α 産生誘導活性を持ち、in vivoにおいてもIL-17Aと同様に好中球遊走作用がみられ、炎症性関節炎の病態形成への関与が示唆される。マウスIL-17BおよびIL-17CのcDNA-IRES-GFPコンストラクトを、レトロウイルスベクターを用いて脾臓CD4陽性細胞に遺伝子導入し、この細胞をマウスに移入することによるCIAへの影響を検討した。同手法にて骨髓前駆細胞へ遺伝子導入し骨髓移植を行うことで、IL-17BおよびIL-17Cの骨髓キメラマウスを作成した。これらのマウスにCIAを誘導し、脾臓細胞における炎症性サイトカインの発現および血中炎症性サイトカイン濃度を測定した。さらに、CIA誘導マウスの関節炎発症直後に抗IL-17B抗体を腹腔内投与し、関節炎の抑制効果を検討した。

⑤上阪；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。局所自然免疫活性化にて放出されるI型IFNと炎症性サイトカインのうち、IL-6やI型IFNの筋炎発症における役割と、それらを治療標的とすることの妥当性を検討するため、IL-6ノックアウト(KO)マウス、IFN受容体KOマウス、IL-17KOマウスに、CIMを誘導し、免疫後21日目の筋組織を観察した。さらに、筋傷害の主要なエフェクター細胞である、細胞傷害性T細胞が認識するMHCクラスIエピトープのマッピングも試みた。

⑥山村；近年、多発性硬化症(Multiple Sclerosis: MS)の病態形成におけるTh17細胞の関与が示されている。一方、ビタミンA代謝産物であるATRAの存在下でTh17細胞分化が著しく抑制されることが示され、合成レチノイドによる自己免疫性脳脊髄炎の治療法が模索されている。急性前骨髄球性白血病(APL)および乾癬の治療薬として用いられている合成レチノイドAm80(タミバロテン)のMS治療薬としての可能性を、Th17細胞の分化制御能とEAEに対する抑制効果の2点に絞って検討した。

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。制御性T細胞の機能は転写因子FoxP3によって制御されており、FoxP3はRunx1と結合することを介して制御性T細胞の抑制機能および特有の転写制御を作り出している。細胞特異的Cre発現マウスを用いて、制御性T細胞特異的にRunx蛋白複合体の機能を阻害し、Runx1欠損および、Runx蛋白とヘテロダイマーを形成してターゲット遺伝子の転写制御をするCBF β (core-binding factor- β)欠損について解析した。

⑧田中；SLEの病態形成過程でB細胞はstimulator及びresponderとして重要な役割を担う。治療抵抗性の重症SLE 20症例を対象にB細胞抗原CD20に対する抗体リツキシマブ(IDECC-2B8)を用いたパイロットスタディを実践し、長期有効性、長期安全性の検討を行った。作用機序の検討として、末梢血リンパ球の表面抗原をフローサイトメトリーで検出した。またDNAマイクロアレイを用い、末梢血mRNA発現量の推移を投与前、投与後2週間目で比較検討した。

⑨長澤；自己免疫疾患における B 細胞異常の中で、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。しかしながら、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、全身性エリテマトーデス (SLE) をはじめとした難治性自己免疫疾患における自己抗体産生 RP105 陰性 B 細胞を標的とした治療の開発について検討した。SLE などの自己免疫疾患で、RP105 分子の発現や、疾患活動性との関連、自己抗体産生等を検討した。さらに RP105 陰性 B 細胞のフェノタイプ解析を行い B 細胞分化での位置づけを行った。B 細胞活性化や分化に関与する BAFF, APRIL, CD40L の RP105 陰性 B 細胞の生存に対する影響を *in vitro* において検討した。さらに RP105 陰性 B 細胞を治療標的とするために DNA Chip を利用して特異的に発現する膜表面分子の同定を試みた。

⑩原田；難治性自己免疫疾患患者に対する自己末梢血 CD34 陽性細胞移植 (自己 PBSCT) の安全性と有効性を検討すると共に、11 例の全身性硬化症 (SSc) における自己 PBSCT 後の免疫学的再構築の解析を目的とした。免疫学的再構築の検討のためフローサイトメトリーを用いて自己 PBSCT 前後のリンパ球サブセット、Th1/Th2 バランス (CD4 陽性細胞内 IFN γ /IL-4 比) の解析を行った。

C. 研究結果

①小池；ゲルゾリンが β_2 GPI と結合していることがウエスタンブロット法にて確認された。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 β_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、抗 β_2 GPI 抗体刺激によりインテグリン直下の FAK のリン酸化の亢進が認められ、抗インテグリン抗体の存在下では FAK のリン酸化が減弱した。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/ β_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。

②畠山；Ymer と A20 との結合が *in vitro* 及び *in vivo* で確認された。また、Ymer はリジン 63 を介したユビキチン鎖を認識し、RIP1 の安定性に影響を及ぼすことが判明した。さらに、 κ B-ルシフェラーゼレポーターにおける転写活性化に対して、Ymer は A20 と共に抑制的に作用することが判明した。

③住田；IL-2 と IL-18 を同時投与することにより間質性肺炎を誘導し、これに対して ALK-5

inhibitor である GB-431542 の腹腔内投与において、組織学的に間質性肺炎の著明な発症予防効果が認められた。

④山本；CIA マウス炎症肢における IL-17B、IL-17C の発現は亢進していた。IL-17B、IL-17C はマウス腹腔マクロファージの TNF- α 産生を誘導した。また、IL-17B および IL-17C を遺伝子導入したマウス脾臓 CD4 陽性細胞を、関節炎発症前の CIA マウスに移入すると関節炎の増悪を認めた。IL-17B および IL-17C の骨髄キメラマウスは CIA 誘導において関節炎発症は早まらなかったが、発症後関節炎スコアの有意な増悪を示し、血清中の TNF- α 濃度の亢進を認めた。さらに、CIA 誘導マウスの関節炎発症直後に抗 IL-17B 抗体を投与することにより、関節炎スコアおよび組織学的スコアの改善を認めた。

⑤上阪；IFN 受容体 KO マウスでは、野生型マウスと同様に CIM を発症したが、IL-6KO マウスでは、CIM の発症は抑制された。一方、IL-17KO マウスでは、野生型マウスと同様に CIM を発症した。抗 IL-6 受容体抗体 (100~200mg/kg) 投与は、誘導免疫時から筋炎発症後からでも CIM を改善させた。合成した 24 個のペプチドのうち、RMA-S 細胞のクラス I 発現を誘導したのは 18 個であり、最も強く誘導した Kb 拘束性ペプチドを提示させた EL-4 細胞に対して、C 蛋白フラグメント免疫マウス脾細胞は細胞傷害性があった。CIM マウスリンパ節細胞にも弱い細胞傷害性が見られた。

⑥山村；Am80 も、再刺激後の IL-17 産生を ATRA 同様顕著に抑制した。Am80 の作用点は、Th17 細胞分化誘導時に限られており、IL-6/TGF- β 非存在下の 1 次刺激時および Th17 細胞分化誘導後の 2 次刺激時のみにこれらのレチノイドを添加した場合は、IL-17 産生への影響は認められなかった。さらに、EAE 発症に対する各種統制レチノイドの抑制効果を調べた結果、EAE 誘導開始時より Am80 を経口投与 (3 mg/kg；隔日投与) すると、未処理群に比べて EAE の発症が有意に抑制された。

⑦坂口；制御性 T 細胞特異的 CBF β 欠損により、マウスはリンパ増殖症・自己免疫病・高 IgE 血症を発症した。また、CBF β 欠損により制御性 T 細胞の FoxP3 発現は 1/2 から 1/3 程度低下し、同時にエフェクター・サイトカインを産生するように形質転換した。同様の結果が Runx1 欠損により確認された。

⑧田中；疾患活動性スコア SLEDAI は 28 日後に有意に改善し、20 例中 13 例で 1~17 ヶ月以内に寛解導入 (SLEDAI=0) を可能とし、寛解は 5 例で 2

年以上維持した。中枢神経 SLE を伴う 13 例は全例回復し、意識障害、神経症、癲癇は一部の症例では 1 週間以内に回復した。ループス腎炎を伴う 11 例では、8 例で尿蛋白 0.5g/day 以下まで改善した。5 例が 7~23 ヶ月後に再燃した。末梢血 CD20 陽性 B 細胞数は全例で 14 日以内に消失し、3~9 ヶ月間維持された。B 細胞表面抗原の解析では、CD19 陽性細胞上の CD40 と CD80 は投与後速やかに発現分子数が減少し、半年後も減弱が維持された。CD19+IgD+CD27-ナイーブ B 細胞は速やかに消失したが、IgD-CD27+形質細胞は 4 週間残存した。また、CD4 陽性細胞上の CD40L と ICOS の発現も低下した。さらに、DNA マイクロアレイによりリツキシマブ投与による末梢血 mRNA の発現変動解析では、RANKL、IL-32、TCP1 などリンパ球や脳に発現する分子などが低下し、B 細胞除去による発現頻度はむしろ軽微だった。

⑨長澤；健康者の B 細胞は RP105 を発現していたが、SLE では RP105 陰性 B 細胞が多数出現していた。SLE 患者由来の RP105 陰性 B 細胞は、*in vitro* において T 細胞存在下で IgG クラスの抗 ds-DNA 抗体を産生した。RP105 陰性 B 細胞は自己抗体産生細胞であると考えられた。また、RP105 陰性 B 細胞は、CD19(+), CD20(-), CD27(+), CD5(-), 表面 IgG(-)、細胞内 IgG(+), CD38(++), CD138 (dull) のフェノタイプを示し、最近発見されたマウスの新たな B 細胞サブセットである early pre-plasma cell に対応するヒトの新たな B 細胞サブセットを形成していた。BAFF 存在下では RP105 陰性 B 細胞の生存率の増加が誘導されたが、RP105 陽性 B 細胞や健康者由来の RP105 陰性 B 細胞では、生存率の増加はほとんど誘導されなかった。CD40L シグナルの RP105 陰性 B 細胞への影響についても検討を行った。*in vitro* における RP105 陰性 B 細胞相対比率の増加は単量体 sCD40L では誘導されなかったが、3 量体 sCD40L の強い刺激で誘導された。

⑩原田；原疾患に対する効果では、スキンスコアが 12 ヶ月後には約 70%の改善を示し、36 ヶ月後も効果は持続していた。抗 Scl-70 抗体価は、自己 PBSCT6 ヶ月後に治療前の 1/4 まで低下しその効果は 36 ヶ月後まで持続した。免疫学的再構築の解析では、CD4 陽性 T 細胞の回復は自己 PBSCT 後 1~6 ヶ月は著しく抑制され、36 ヶ月後も CD4/CD8 比は 0.5 未満に留まった。CD4CD45RA 陽性 T 細胞の回復は、CD4CD45RO 陽性 T 細胞の回復に比較し著しく遅延した。B 細胞は 12 ヶ月後に治療前値まで回復し、内訳では CD27 陽性 B 細胞

に比し CD27 陰性 B 細胞の割合が増加した。Th1/Th2 バランスは自己 PBSCT 後 36 ヶ月間 Th1 優位の状態が持続した。

D. 考察

多発性筋炎に対する IL-6 標的治療、自己抗体産生 RP105 陰性 B 細胞を標的とした治療法、IL-17B および IL-17C の阻害による関節炎治療、レチノイン酸受容体リガンドを用いた Th17 細胞分化制御による新規治療法、間質性肺炎に対する TGF- β 標的治療は、いずれも自己免疫疾患に対する新規の分子標的療法として、臨床応用が可能であり、既存療法に抵抗性の病態を改善しうる研究成果が得られた。また SLE の治療における B 細胞を標的とした治療法およびは、難治性病態の切り札として期待できる結果であった。また抗 β 2-GPI 抗体/ β 2-GPI 複合体受容体のシグナル伝達経路やユビキチン化酵素、制御性 T 細胞機能制御における Runx 複合体の機能に関する検討から、自己免疫疾患の病態解明の新たな視点を得ることができ、免疫制御療法の新規治療標的としてより具体化された。

E. 総括

「免疫疾患に対する免疫抑制療法等先端的新規治療法に関する研究」を基礎免疫学、臨床免疫学ならびに分子生物学の分野で世界をリードしている 10 人で平成 17 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 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 β_2 グリコプロテイン I（以下 β_2 GPI）依存性抗カルジオリピン抗体（以下抗 CL/ β_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、 β_2 GPI を代表とするリン脂質結合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/ β_2 GPI 抗体での刺激により p38 MAPK のリン酸化が上昇し、NF- κ 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 β_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 β_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 β_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、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/ β_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 β_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 患者の血栓傾向性に対する新たな治療の標的となりう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/ β_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明らかにされてきた。さらに、抗 β_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- κ B の活性化を介して、TF の発現が起きることを明らかになっているが、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

β_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 β_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 β_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 β_2 GPI と複合体を形成するタンパク質 (β_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、 β_2 GPI との結合を FACS 法およびウエスタンブロッティ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/ β_2 GPI 抗体による細胞刺激シグナルの変動について解析を行った。具体的には、まず抗 β_2 GPI 抗体刺激によるインテグリン直下の FAK のリン酸化をウエスタンブロッティングにて解析した。次に、RAW264.7 に NF- κ B レポーターベクターをトランスフェクションし、24 時間後に種々の刺激を行いつェラーゼアッセイにて解析した。

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/ β_2 GPI 抗体での刺激により p38 MAPK のリン酸化が上昇し、NF- κ 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 β_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 β_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 β_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 β_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、抗 β_2 GPI 抗体刺激によりインテグリン直下の FAK のリン酸化の亢進が認められ、抗インテグリン抗体の存在下では FAK のリン酸化が减弱した (図 1)。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/ β_2 GPI 抗体による細胞刺激シグナルが减弱することが確認された。

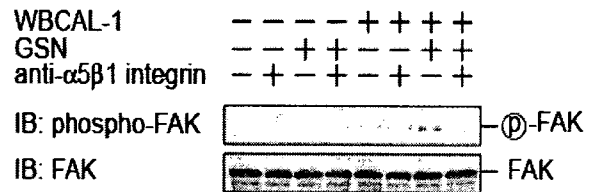


図 1. 抗 β_2 GPI 抗体刺激による FAK のリン酸化。GSN;ゲルゾリン

D. 考察

抗 CL/ β_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- κ B が核内へと移行し、TF プロモーターに結合し、TF 転写が誘導されてくる可能性が考えられる。また、抗 CL/ β_2 GPI 抗体による TF の発現は β_2 GPI が存在しているときにのみ認められることより、単球の細胞活性化は単球の細胞活性化は β_2 GPI に依存する、すなわち細胞と β_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/ β_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 (図 2)。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。

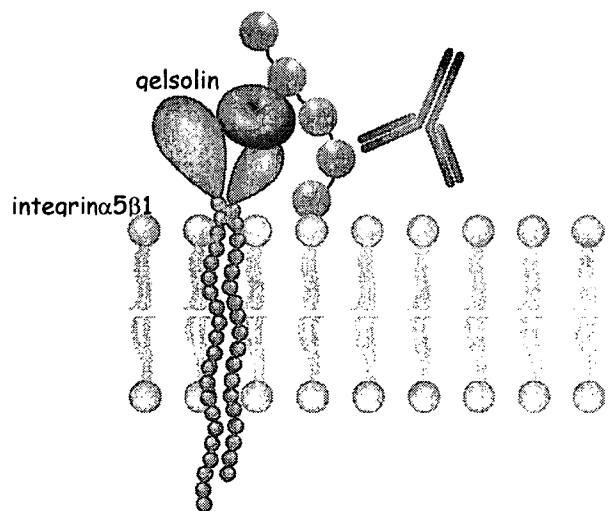


図 2. 抗 β_2 -GPI 抗体/ β_2 -GPI 複合体受容体の模式図

E. 結論

抗 CL/ β_2 GPI 抗体 の刺激による遺伝子に発現の変動を検討したところ、p38 MAPK のリン酸化の上昇が観察された。またリコンビナント FLAG タグ β_2 GPI を使用した抗FLAG抗体アフィニティークロマトグラフィーにより β_2 GPI 関連プロテオームを分離し、質量分析解析により複数のタンパク質を同定した。そのなかで、ゲルゾリンが β_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/ β_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

Nishio M, Endo T, Nakao S, Sato N, Koike T.
Reversible cardiomyopathy due to secondary hemochromatosis with multitransfusions for severe aplastic anemia after successful non-myeloablative stem cell transplantation.
*Int J Cardiol.*2007 (in press)

Kataoka H, Atsumi T, Hashimoto T, Horita T, Yasuda S, Koike T.
Polymyalgia rheumatica as the manifestation of unclassified aortitis.
*Mod Rheumatol.*18(1):105-108,2007

Bohgaki T, Atsumi T, Koike T.
Multiple autoimmune diseases after autologous stem-cell transplantation.
*New Engl J Med.*357(26):2734-2736,2007

Chida D, Nakagawa S, Nagai S, Sagara H, Katsumata H, Imaki T, Suzuki H, Mitani F, Ogishima T, Shimizu C, Kotaki H, Kakuta S, Sudo K, Koike T, Kubo M, Iwakura Y.
Melanocortin 2 receptor is required for adrenal gland development, steroidogenesis, and neonatal gluconeogenesis.
*PNAS.*104(46):18205-18210,2007

Gatanaga H, Hayashida T, Tsuchiya K, Yoshino M, Kuwahara T, Tsukada H, Fujimoto K, Sato I, Ueda M, Horiba M, Hamaguchi M, Yamamoto M, Takata N, Kimura A, Koike T, Gejyo F, Matsushita S, Shirasaka T, Kimura S, Oka S.
Successful efavirenz dose reduction in HIV type 1-infected individuals with cytochrome P450 2B6 *6 and *26.
*CID.*45(9):1230-1237,2007

Ieko M, Nakabayashi T, Tarumi T, Naito S, Yoshida M, Kanazawa K, Mizukami K, Koike T.
Soluble fibrin monomer degradation products as a potentially useful marker for hypercoagulable states with accelerated fibrinolysis.
*Clin Chim Acta.*386(1-2):38-45,2007

Yasuda S, Stevens RL, Terada T, Takeda M, Hashimoto T, Fukae J, Horita T, Kataoka H, Atsumi T, Koike T.
Defective expression of ras guanyl nucleotide-releasing protein 1 in a subset of patients with systemic lupus erythematosus.
*J. Immunol.*179(7):4890-4900,2007

Atsumi T, Cho YR, Leng L, McDonald C, Yu T, Danton C, Hong EG, Mitchell RA, Metz C, Niwa H, Takeuchi J, Onodera S, Umino T, Yoshioka N, Koike T, Kim JK, Bucala R.
The proinflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor regulates glucose metabolism during systemic inflammation.
*J. Immunol.*179(8):5399-5406,2007

Atsumi T, Chiba H, Yoshioka N, Bucala R, Koike T.
Increased fructose 2,6-bisphosphate in peripheral blood mononuclear cells of patients with diabetes.
*Endocr J.*57(4):517-520,2007

Natsuga K, Sawamura D, Homma E, Nomura T, Abe M, Muramatsu R, Mochizuki T, Koike T, Shimizu H.
Amicrobial pustulosis associated with IgA nephropathy and Sjögren's syndrome.
*J Am Acad Dermatol.*57:523-526,2007

Horita T, Ichikawa K, Kataoka H, Yasuda S, Atsumi T, Koike T.
Human monoclonal antibodies against the complex of phosphatidylserine and prothrombin from patients with the antiphospholipid antibodies.
*Lupus.*16(7):509-516,2007

Amengual O, Atsumi T, Komano Y, Kataoka H,

Horita T, Yasuda S, Koike T.
A polymorphism in human platelet antigen 6b and risk of thrombocytopenia in patients with systemic lupus erythematosus.
*Arthritis Rheum.*56(8):2803-2809,2007

Masuda H, Atsumi T, Fujisaku A, Shimizu C, Yoshioka N, Koike T.
Acute onset of type 1 diabetes accompanied by acute hepatitis C: the potential role of proinflammatory cytokine in the pathogenesis of autoimmune diabetes.
*Diabetes Res Clin Pract.*75(3):357-361,2007

Nishio M, Fujimoto K, Yamamoto S, Endo T, Sakai T, Obara M, Kumano K, Yamaguchi K, Takeda Y, Goto H, Sato N, Koizumi K, Mukai M, Koike T.
Delayed redistribution of CD27, CD40 and CD80 positive B cells and the impaired in vitro immunoglobulin production in patients with non-Hodgkin lymphoma after rituximab treatment as an adjuvant to autologous stem cell transplantation.
*Br J Haematol.*137(4):349-354,2007

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

Nakamura A, Shimizu C, Nagai S, Taniguchi S, Umetsu M, Atsumi T, Wada N, Yoshioka N, Ono Y, Sasano H, Koike T.
Unilateral adrenalectomy improves insulin resistance and polycystic ovaries in a middle-aged woman with virilizing adrenocortical adenoma complicated with Cushing's syndrome.
*J Endocrinol Invest.*30:65-69,2007

Koike T, Atsumi T.
"Resurrection of thrombin" in the pathophysiology of the antiphospholipid syndrome.
*Arthritis Rheum.*56(2):393-394,2007

2. 学会発表

Koike, T. : " Antiphospholipid antibodies and cell activation" 12th International Congress on Antiphospholipid Antibodies , Florence, Italy, April 18, 2007

Koike, T. : "Recent Progress in Systemic Autoimmune Diseases" 第8回国際 SLE 学会、上海、May 23-25, 2007

Koike, T. : " Multiple autoimmune diseases after CD34+- selected autologous hematopoietic stem cell transplantation in a patient with systemic sclerosis" The Mosaic of Autoimmunity , Kfar Maccabiah, Israel, February 11, 2008

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生化学講座 教授

研究要旨

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

(倫理面への配慮)
特に該当せず。

C. 研究結果

ヒト B 細胞株 cDNA ライブラリーより A20 cDNA をクローニングし、その cDNA を bait として酵母ツー

ハイブリッドスクリーニングを行ったところ、現在まで機能が未知のタンパク質である Ymer が同定された。Ymer は、これまでに EGF 受容体刺激下でチロシンリン酸化を受けるタンパク質として報告されているのみである。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 の結合も確認された。また、Ymer はリジン 63 を介したユビキチン鎖を認識し、RIP1 の安定性に影響を及ぼすことが判明した。さらに、 κ B-ルシフェラーゼレポーターにおける転写活性化に対して、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- κ B 経路における制御酵素 (ユビキチン化修飾酵素) である A20 の制御機構を解明したものである。これらの解明は、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。今後、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

A20 は NF- κ B の強力な阻害分子として報告されているが、本研究において新たな A20 結合タンパク質として Ymer を同定し、生化学的及び細胞生物学的に解析したところ Ymer は NF- κ B シグナルに抑制的に働くことが明らかとなった。

F. 健康危険情報

該当せず

G.研究発表

1. 論文発表

1) Bohgaki, M., Tsukiyama, T., Nakajima, A., Maruyama, S., Watanabe, M. Koike T. and Hatakeyama, S.: Involvement of Ymer in suppression of NF- κ B activation by regulated interaction with lysine-63-linked polyubiquitin chain, *BBA-Mol. Cell Res.*, in press.

2) Takahata, M., Bohgaki, M., Tsukiyama, T., Kondo T., Asaka, M. and Hatakeyama, S.: Ro52 functionally interacts with IgG1 and regulates its quality control via the ERAD system, *Mol Immunol.*, in press.

3) Matsuda, M., Tsukiyama, T., Bohgaki, M., Nonomura, K. and Hatakeyama, S.: Establishment of a newly improved detection system for NF- κ B activity. *Immunol. Lett.*, 109, 175-181, 2007.

2. 学会発表

特記事項なし

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

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金（免疫・アレルギー-疾患予防・治療研究事業）
分担研究報告書

TGF- β ブロッカーによる間質性肺炎の制御戦略に関する研究

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
研究協力者 後藤 大輔 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

研究要旨

有効な治療法が無い難治性自己免疫疾患の中で線維化や細胞外基質の増生を促進する Transforming growth factor- β (TGF- β) が病態に深く関与している疾患に対し、TGF- β のシグナル伝達を阻害する薬剤による治療応用について検討する事を目的とした。本研究では、IL-2+IL-18 で誘導された間質性肺炎モデルマウスにおいて、TGF- β シグナル阻害剤 (ALK-5 阻害剤) がその発症予防に有効である事を明らかにした。

A. 研究目的

間質性肺炎は自己免疫疾患における難治性病態のひとつであり、依然として主たる死亡原因となっている。生体での線維化に関わる重要な分子のひとつに TGF- β があり、これまでに間質性肺炎発症に関わるという報告が数多く存在する。生体内での線維化の治療の試みとして、全身性強皮症患者に対して抗 TGF- β 抗体を投与する試験が行われたが、45 名中 4 名が死亡するという結果となった (Denton CP. et al. Arthritis Rheum. 2007)。したがって、ヒトにおいて抗 TGF- β 抗体を用いた線維化の制御は非現実的と考えられる。そこで最近着目されているのは、TGF- β ブロッカーの TGF- β I 型受容体 (ALK-5) inhibitor である。本研究は、間質性肺炎に対する ALK-5 inhibitor (GB-431542) による制御の可能性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

間質性肺炎モデルとして、C57BL/6 マウスを用いて、生体内に存在しない Bleomycin で誘発するのではなく、より生体に近いモデルとして IL-2 と IL-18 のサイトカインのみで誘導されるモデルを選択した (Okamoto M. et al. Blood. 2002)。
1) ALK-5 inhibitor の経口投与 (10-30mg/kg) の研究を参考に、腹腔内投与の至適量を検討するため、投与量: 1mg/kg, 3mg/kg, 10mg/kg (各 2 回/日) の投与を実験予定期間 (5 日間) 行った。
2) 同モデルマウスに対して、間質性肺炎の誘導と同時に GB-431542 の腹腔内投与を行い、コントロール (DMSO) 投与群と組織所見、ならびに炎

症・線維化に関与する分子 (TGF- β , TNF- α , IL-1, IL-6, IL-13, IL-17, CTGF, PDGF, MIP-1 α , MCP-1, IGF-1, type I/III collagen, fibronectin) の発現量の比較を行った。3) TGF- β シグナル伝達分子の Smad3 のノックアウトマウスを用いて、IL-2 と IL-18 による間質性肺炎を誘導した。発症の程度や上記線維化関連の発現分子を解析し、間質性肺炎発症における Smad3 (ALK-5 にてリン酸化を受ける) を介した TGF- β シグナル制御の重要性をさらに検証した。

(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った。

C. 研究結果

1) 腹腔内投与により GB-431542 の効果も高まるが、毒性も上がり致死になる可能性が懸念されたが、一日 2 回投与 1mg/kg, 3mg/kg, 10mg/kg、いずれにおいても致死にはならず、10mg/kg までの投与が可能であった。

2) IL-2 と IL-18 を同時投与することにより間質性肺炎を誘導し、これに対して ALK-5 inhibitor である GB-431542 の腹腔内投与において、組織学的に間質性肺炎の著明な発症予防効果が認められた。

3) Smad3 ノックアウトマウスを維持し、2) と同様に TGF- β シグナル制御機構の解析を行っている。

D. 考察

TGF- β ブロッカーが間質性肺炎に有効である傍証は多いが、抗 TGF- β 抗体での治療は危険性が高く、ALK-5 inhibitor である GB-431542 が注目されている。GB-431542 は経口投与も可能であり、投与の面で利点がある。Bleomycin による間質性肺炎では、ALK-5 inhibitor が有効であったと報告された (Higashiyama H. et al. *Exp. Mol. Pathol.* 2007)。本研究では、ヒトの初期の間質性肺炎により近いとされるサイトカイン誘導間質性肺炎においても ALK-5 inhibitor による発症予防効果を証明することができたので、今後、TGF- β を標的とした間質性肺炎の治療戦略の発展が期待される。

E. 結論

間質性肺炎モデルマウスにおいて、ALK-5 inhibitor 治療が発症予防に有効であるが示された。今後、関節性肺炎の発症抑制機序の解析とともに、臨床応用へのステップアップをはかりたい。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Iwanami, K., Matsumoto, I., Watanabe, Y., Mihara, M., Ohsugi, Y., Mamura, M., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., Kishimoto, T., and Sumida, T. Crucial role of IL-6/IL-17 cytokine axis in the induction of arthritis by glucose-6-phosphate-isomerase. *Arthritis Rheum.* (in press)

2. Matsui, H., Tsutsumi, A., Sugihara, M., Suzuki, T., Iwanami, K., Kohno, M., Goto, D., Matsumoto, I., Ito, S., and Sumida, T. Expression of Visfatin (pre-B cell colony-enhancing factor) gene in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* (in press)

3. Nakamura, Y., Wakamatsu, E., Tomiita, , Kohno, Y., Yokoka, J., Goto, D., Ito, S., Matsumoto I., Tsutsumi, A., and Sumida, T. High prevalence of autoantibodies to muscarinic 3 acetylcholine receptor in patients with juvenile Sjogren's

syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 67:136-137,2008.

4. Harashi, T., Matsumoto, I., Yasukochi, T., Chino, Y., Mamura, M., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T. Biased usage of snovial immunoglobulin heavy chain variable regions 4 by the anti-glucose-6-phosphate isomerase antibody in patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Med.* 20:247-253, 2007.

5. Sugihara, M., Tsutsumi, A., Suzuki, E., Suzuki, T., Ogishima, H., Hayashi, T., Chino, Y., Ishii, W., Manura, M., Goto, D., Matsumoto, I., Ito, S., and Sumida, T. The gene expressions of TNFa, TTP, TIA-1 and HuR in the peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis before and after infliximab therapy. *Arthritis Rheum.* 56: 2160-2169, 2007.

6. 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.* 66:844-845, 2007.

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 TGF-βシグナル阻害薬(ALK-5 抑制剤)の作用機序

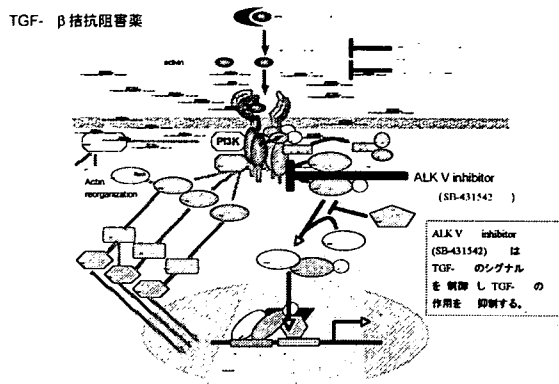
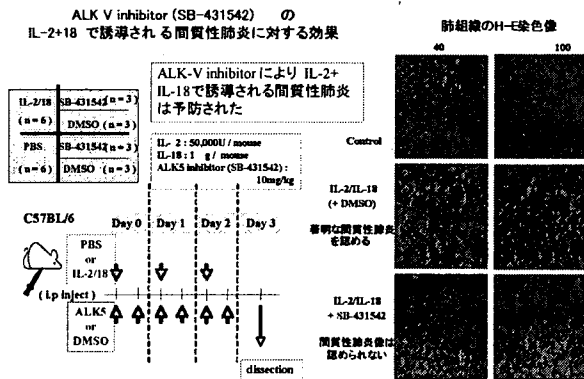


図2 IL-2+IL-18 で誘導された間質性肺炎モデルマウスに対する ALK-5 抑制剤の発症予防効果



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

IL-17 サイトカインファミリーIL-17B および IL-17C の関節炎との関連に関する研究

分担研究者 山本 一彦 東京大学医学部アレルギーリウマチ内科 教授
研究協力者 藤尾 圭志 東京大学医学部アレルギーリウマチ内科 助教

研究要旨

Interleukin-17(IL-17A)は T 細胞由来の *proinflammatory cytokine* であり、関節リウマチの病態形成に関与する。本研究では IL-17 サイトカインファミリーである IL-17B および IL-17C の関節炎との関連を検討した。コラーゲン誘発性関節炎マウス(CIA)の炎症肢では、IL-17A、IL-17B、IL-17C および IL-17F の発現は亢進しており、発現部位として IL-17B は軟骨組織に、IL-17C は CD4 陽性細胞・MHC クラス II 陽性細胞に発現していた。また、IL-17A、IL-17B、IL-17C および IL-17F は、マウス腹腔マクロファージの TNF- α 産生を誘導した。レトロウイルスを用いて IL-17B と IL-17C 各々をマウス脾臓 CD4 陽性細胞に遺伝子導入し、関節炎発症前の CIA マウスに移入すると関節炎の増悪を認めた。IL-17B と IL-17C 各々を強発現する骨髄キメラマウスに CIA を誘導すると関節炎発症は早まらなかったが、関節炎スコアの有意な増悪を示し、血清中に高濃度の TNF- α が認められた。さらに、CIA マウスの関節炎発症直後に抗 IL-17B 抗体を投与することにより、関節炎の進展が抑制された。これらの結果より IL-17B および IL-17C は TNF- α 産生誘導に関連し、関節炎の増悪に関与することが明らかになった。

A.研究目的

Interleukin-17(IL-17A)は T 細胞由来の *proinflammatory cytokine* であり、関節炎における重要な炎症性メディエーターである TNF- α の産生と関連し、関節リウマチの病態形成に関与する。IL-17 サイトカインファミリーは IL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E および IL-17F の 6 つの分子から成る。中でも IL-17B と IL-17C は、ヒト単球様細胞株に対して IL-17A よりも強い TNF- α 産生誘導活性を持ち、*in vivo* においても IL-17A と同様に好中球遊走作用がみられ、炎症性関節炎の病態形成への関与が示唆されるが、いままで IL-17B および IL-17C の関節炎との関連は殆ど報告されていない。そこで、本研究では IL-17B および IL-17C の関節炎との関連を検討した。

B.研究方法

マウスコラーゲン誘発性関節炎(CIA)炎症肢における IL-17 サイトカインファミリー (IL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17F) の発現を検討した。さらに、IL-17 サイトカインファミリーのマウス線維芽細胞および腹腔マクロファージへの作用を検討した。マウス IL-17B および IL-17C の cDNA-IRES-GFP コンストラクトを、レトロウイルスベクターを用いて脾臓 CD4 陽性細胞に遺伝子導入し、この細胞をマウスに移入することによる CIA への影響を検討した。同手法にて骨髄前駆細胞へ遺伝子導入し骨髄移植を行うことで、IL-17B および IL-17C の骨髄キメラマウスを作成した。これらのマウスに CIA を誘導し、脾臓細胞における炎症性サイトカインの発現および血中炎症性サイトカイン濃度を測定した。さ