

200729011B

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17年度～19年度  
総括研究報告書

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 .....	9
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 .....	9
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 .....	15
3. TGF- $\beta$ アンタゴニストを介した自己免疫疾患の制御に関する研究 住田 孝之 .....	17
4. 関節炎に関連する新しいサイトカインに関する研究 山本 一彦 .....	20
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 .....	23
6. 病原性 T 細胞の分化およびサイトカイン産生制御機構に関する研究 山村 隆 .....	27
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 .....	32
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 .....	44
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 .....	49
10. 自己免疫疾患における自己抗体産生 B 細胞を標的とした治療法の開発 長澤 浩平 .....	52
(4) 研究成果の刊行に関する一覧 .....	59

## (1) 構成員名簿

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 (50音順)	上阪 等	東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科膠原病・リウマチ内科学	准教授
	坂口 志文	京都大学再生医科学研究所 生体機能調節学	教授
	住田 孝之	筑波大学大学院人間総合科学研究科 先端応用医学専攻臨床免疫学	教授
	田中 良哉	産業医科大学医学部 第一内科学講座	教授
	畠山 鎮次	北海道大学大学院医学研究科 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

研究要旨

以下の項目を分担研究として行った。

- 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、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、③TGF- $\beta$  アンタゴニストを介した自己免疫疾患の制御に関する研究、④関節炎に関連する新しいサイトカインに関する研究、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、⑥病原性T細胞の分化およびサイトカイン産生制御機構に関する研究  
⑦、⑧SLEに対する抗CD20抗体療法の開発に関する研究、⑨自己免疫疾患における自己抗体産生B細胞を標的とした治療法の開発、⑩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

A. 研究目的

本研究の目的は、難治性の自己免疫疾患における免疫系の異常の特徴を明らかにし、先端的新規治療法を確立・開発し、患者の生活の質を向上させ、さらには疾患の治癒を目指すことである。

B. 研究方法

全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、多発性筋炎、強皮症、多発性硬化症と難治性病態である間質性肺炎を対象として、これらの疾患・病態における免疫系の異常の特徴を明らかにし、先端的新規治療法を確立・開発するため以下の研究を行った。

- 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  
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  
③TGF- $\beta$  アンタゴニストを介した自己免疫疾患の制御に関する研究  
④関節炎に関連する新しいサイトカインに関する研究  
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  
⑥病原性 T 細胞の分化およびサイトカイン産生制御機構に関する研究  
⑦;制御性 T 細胞を用いた自己免疫の抑制に関する研究

⑧SLE に対する抗 CD20 抗体療法の開発に関する研究

⑨自己免疫疾患における自己抗体産生 B 細胞を標的とした治療法の開発

⑩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  
(倫理面への配慮)

研究対象者に対する人権擁護に関しては、最大の配慮を行い、また研究による不利益や危険性の可能性とそれらを可能な限り排除する方法などについても十分説明を行い、理解いただいた後に、インフォームド・コンセントの書式で各説明項目にチェックと署名をしていただいた。動物実験に関しては、過度の苦痛を与えないように十分配慮し、必要最低限にとどめた。

C. 研究結果

①RAW264.7 の細胞溶解液とリコンビナント FLAG タグ  $\beta$  2GPI を混合し、抗 FLAG 抗体アフィニティークロマトグラフィーにより  $\beta$  2GPI 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。そのうちゲルゾリンが  $\beta$  2GPI と結合していることがウエスタンブロットング法にて確認された。また、フローサイトメーターによりゲルゾリンが細胞膜表面上でインテグリン  $\alpha$  5  $\beta$  1 と結合することが確認され、さらに  $\beta$  2GPI

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  $\beta 2$ 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/ $\beta 2$ GPI 抗体による細胞刺激シグナルが減弱することが確認された。ゲルゾリンはインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  と共役し、抗 CL/ $\beta 2$ GPI 抗体による細胞刺激に関与している可能性が示唆された。

②ヒト B 細胞株 cDNA ライブラリーより A20 cDNA をクローニングし、その cDNA を bait として酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行ったところ、現在まで機能が未知のタンパク質である Ymer が同定された。Ymer を細胞内に発現させたところ、A20 との結合が確認された。また、Ymer に対する抗体を作製し、内在性の A20 と Ymer の結合も確認された。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、 $\kappa$  B-ルシフェラーゼレポーターにおける転写活性化に対して、Ymer は A20 と共に抑制的に作用することが判明した。

③MRL/lpr マウスに ALK-5 阻害薬を腹腔内投与したところ、PBS 投与群 (各群 n=5) に比べ、蛋白尿、BUN、糸球体病変、血管病変に軽快傾向がみとめられた。IL-2/IL-18 誘導性関節炎に対する ALK-5 阻害薬の腹腔内投与を行った実験群においては、病理組織学上著明な改善が認められた。

④RA 患者の滑膜組織では OA 患者と比較して RT-PCR で IL-32 発現が著しく亢進していた。In situ hybridization では関節リウマチ (RA) 患者の滑膜に浸潤するリンパ球に IL-32 の発現亢進がみられた。CIA マウスにおいて、関節炎発症直前に IL-32  $\beta$  導入 CD4 陽性 T 細胞を移入すると、関節炎の発症が早まり、関節炎スコアも有意に上昇した。IL-32  $\beta$  骨髄キメラマウスに抗 II 型コラーゲン抗体を投与して関節炎を誘導すると、IL-32  $\beta$  骨髄キメラマウスで明らかな増悪が認められた。CIA マウス炎症肢では IL-17B、IL-17C の発現は亢進していた。IL-17B、IL-17C は腹腔マクロファージの TNF- $\alpha$  産生を誘導した。IL-17B 及び IL-17C を遺伝子導入した CD4 陽性細胞の移入により CIA は増悪した。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、関節炎スコア及び組織学的スコアの改善を認めた。

⑤ヒトまたはマウス組換え C 蛋白フラグメントを B6 マウスに 1 回免疫することで、病理組織学的に多発性筋炎に類似する筋炎を起こすことに成功した。IL-1 $\alpha$  /  $\beta$  欠損マウスや IL-6 欠損マウスでは、CIM の発症が

抑制された。ヒト多発性筋炎で治療効果のある免疫グロブリン大量療法は CIM にも奏功した。また、抗 TNF- $\alpha$  抗体、IL-1 受容体アンタゴニスト、抗 IL-6 受容体抗体投与は全て、CIM 発症後からでも治療効果を発揮した。理論的に MHC クラス I (Kb ないし Db) 親和性の高い 24 個の合成ペプチドのうち、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。

⑥定量 PCR 法により、MS 患者由来末梢血 T 細胞で有意な NR4A2 の発現亢進 (約 5 倍) を確認した。B6 マウスに MOG35-55 ペプチドを免疫して誘導した EAE において、CNS 浸潤 T 細胞で、病勢に相関した NR4A2 の発現亢進を認めた。同じ CNS 浸潤 T 細胞のサイトカイン産生能を調べると、細胞内染色法で約 30% の細胞が IL-17 産生細胞であった。T 細胞株を用いたレポータージーンアッセイでは、NR4A 発現プラスミドの導入で、IL-17、IFN- $\gamma$ 、IL-2 の産生が増強した。レトロウイルスベクターを用いて、ヒト末梢血 CD4 T 細胞に NR4A2 分子を過剰発現させると、IL-17 および IFN- $\gamma$  産生が亢進した。ヒト末梢血 CD4 T 細胞に、NR4A2 の siRNA を導入すると、抗 CD3 抗体刺激後の IL-17、IFN- $\gamma$ 、IL-2 の産生は有意に抑制された。NR4A2 の siRNA は、PLP 特異的マウス T 細胞の移入による passive EAE の発症をも抑制した。ATRA を Th17 細胞分化誘導時に添加することで、抗 CD3 抗体による再刺激後の IL-17 産生は顕著に抑制された。また合成レンチノイド Am80 (タミバロテン) も、再刺激後の IL-17 産生を ATRA 同様顕著に抑制した。さらに、EAE 誘導開始時より Am80 を経口投与すると、未処理群に比べて EAE の発症が有意に抑制された。

⑦正常個体中には、CD4<sup>+</sup>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  $\beta$  (core-binding factor- $\beta$ ) 欠損について解析した。制御性 T 細胞特異的 CBF  $\beta$  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  $\beta$  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パイロットスタディを行った重症 SLE 20 症例の疾患活動性スコア SLEDAI は、リツキシマブ投与 28 日後に有意に改善した。20 例中 13 例でリツキシマブ投与 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。5 例が 7~23 ヶ月後に再燃した。臨床第 I / II 相試験では、リツキシマブ 500 mg/kg x4 群 (5 例)、1000 mg/kg x2 群 (10 例) とも重篤な有害事象はなかった。全例において末梢血 CD20 陽性 B 細胞数は 14 日以内に消失し、3~6 ヶ月間維持された。有効性評価としては、14 例中 2 例が Major clinical response (MCR; 28 週目までに新たな flare を発症することなく、疾患活動性が BILAG カテゴリー C 以下まで低下)、7 例が Partial clinical response (PCR) を示したが、5 例は non-response (NR) であった。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。リツキシマブ治療により、CD4 陽性細胞上の CD40L と ICOS の発現も低下した。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、シャペロン蛋白質群、LCK などのシグナル関連蛋白質群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。

⑨RP105 陰性 B 細胞比率の解析を行ったところ、SLE 患者では  $15.9 \pm 11.7\%$  で正常の  $1.7 \pm 1.1\%$  に比較して有意な増加がみられた ( $p < 0.01$ )。また、疾患活動期は、寛解期に比し、RP105 陰性 B 細胞数の増加がみられた ( $p < 0.001$ )。ステロイド治療前には活動性 SLE 患者で RP105 陰性 B 細胞数の増加がみられたが、ステロイド治療後、1 ヶ月で速やかな RP105 陰性 B 細胞数の正常化がみられた。RP105 陰性 B 細胞はデキサメサゾン存在下 (22.7%) で、アポトーシス細胞の比率が非存在下 (12.5%) の 2 倍近くに増加していた。RP105 陰性 B 細胞は、無刺激の状態でも IgG を産生するが、SAC 刺激、IL-6 刺激によりさらに IgG の産生の増加がみられた。また、抗 IL-6 抗体により、IgG の産生は抑制された。RP105 陰性 B 細胞は、抗 ssDNA 抗体と抗 dsDNA 抗体の産生を行っていた。皮膚筋炎やシェーグレン症候群では、炎症局所への RP105 陰性 B 細胞の集積と炎症への関与が示唆された。

⑩SSc11 例、皮膚筋炎 2 例、ウェゲナー肉芽腫症 1 例に対し自己 PBSCT を施行した。原疾患に対する効果について、SSc 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。皮膚筋炎症例では合併する進行性間質性肺炎や難治性皮膚潰瘍の改善がみられた。ウェゲナー肉芽腫症の症例は、自己 PBSCT 後眼窩内腫瘍の改善を認め、感染症の合併もなかったが、19 ヶ月後に眼窩内腫瘍の再増大傾向を認めた。SSc11 例における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

① 抗 CL/β2GPI 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-κB 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/β2GPI 抗体による TF の発現は β2GPI 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 β2GPI に依存する、すなわち細胞と β2GPI 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/β2GPI 抗体による細胞刺激に関与している可能性が示唆された。今後、向凝固性の蛋白誘導の細胞内刺激伝達システムをより詳細に解析することにより、APS 発症のメカニズムを解明するのみならず、難治性である抗リン脂質抗体症候群の新しい治療法の確立が期待される。

②NF-κB 経路における制御酵素 (ユビキチン化修飾酵素) である A20 と、チロシンキナーゼ経路 (Ras-MAP キナーゼ経路) に関与すると予想される Ymer のクロストークを、分子レベルで示唆するものである。これらの 2 つの細胞内シグナル経路における epistatic な関係を明らかにすることは、免疫系細胞の活性化及び増殖抑制の機序に重要な知見と言える。また現在、個体レベルで免疫細胞及び炎症関連細胞における機能を明らかにするために、Ymer の遺伝子破壊マウス及びトランスジェニックマウスを作製することが重要であると考えられる。

③TGF-β 阻害薬 (ALK-5 阻害薬, IN1130 および GB-431542) は、全身性エリテマトーデスモデルマウ



ス、IL-2/IL-18誘導間質性肺炎モデルマウスにおいて、それぞれ、腎炎の治療効果、間質性肺炎の予防効果が認められた。今後は、ALK-5阻害薬の細胞内シグナル変化に関して、smad3ノックアウトマウスを用いて、さらに、安全性の検討後臨床試験へ進む予定である。

④ IL-32は炎症性関節炎の重要なメディエーターのひとつであり、RAの病態形成に関与していると考えられた。IL-32はRA治療の新たなターゲットとなりうると考えられる。IL-17B及びIL-17Cは関節炎局所で発現しており、どちらも生体内で過剰発現させると血清TNF- $\alpha$ 濃度の亢進を伴う関節炎の増悪を認めた。さらに抗IL-17B抗体投与により関節炎の抑制効果が認められたことから、IL-17Bは関節炎の病態形成において重要な役割を果たしていると考えられた。

⑤CD8陽性細胞傷害性T細胞によって筋障害が起こっている多発性筋炎の病態を反映するモデルマウスを、遺伝解析の容易なB6マウスに筋抗原であるC蛋白フラグメントを免疫することで確立し、C蛋白誘導性筋炎(CIM)と名付けた。CIMは、B細胞非依存性に発症するため、病態には抗体の関与はないものと考えられるが、皮膚筋炎や多発性筋炎と同様、高用量ガンマグロブリン療法が奏効した。CIMにおいて、自己反応性T細胞成立と、局所の自然免疫活性化にて、そのT細胞が筋組織破壊を許される過程を分離出来る筋炎の養子移入システムも確立した。このモデルのMHCクラスIエピトープ候補も見出された。モデルの洗練化には、さらなる検証が必要である。自然免疫活性化で産生される炎症性サイトカインでは、IL-1とIL-6はCIM発症に必須であったが、TNF- $\alpha$ やIL-17は必須でなかった。また、抗TNF- $\alpha$ 抗体は、CIMでは治療効果があった。今後は、IL-1受容体アンタゴニスト、抗IL-6受容体抗体も、自己免疫性筋炎への治療応用が期待できる。

⑥DNAマイクロアレイ解析により、MS患者末梢血で遺伝子発現の亢進を認めたNR4A2は、MSのマウスモデルであるEAEでも、CNS浸潤T細胞に発現の亢進を認めた。CNSに浸潤したT細胞には、Th17細胞が多数含まれており、一連の解析からNR4A2の有無がT細胞からのIL-17産生を変化させることから、NR4A2はIL-17の産生制御を介してMSの病態に深く関わる分子である可能性が示された。MSをはじめとする種々の自己免疫疾患に対するNR4A2をターゲットとした新規治療法の開発につながるものと期待している。RAR $\alpha$ / $\beta$ 受容体選択的アゴニストAm80は、Th17細胞分化抑制作用を示し、Am80の経口投与により、EAEの発症が抑制された。高い受容体サブタイプ選択性を有するAm80は、副作用の

リスクだけでなく脂溶性や血中半減期など医薬品としての体内動態もATRAより優れており、すでに治療薬として臨床上使用されていることから、適用拡大による有望な新規自己免疫性脳脊髄炎治療薬候補であると考えている。

⑦Foxp3とAML1の相互作用に基づくT細胞機能制御の解明は、自己免疫疾患の病態解明および新しい免疫制御方法の開発の基礎となると考えられる。すなわち、AML1の活性化を制御することが、制御性T細胞の機能制御につながる可能性がある。また、AML1による転写制御異常が、ヒトにおいてSLE、RA、乾癬などの自己免疫・炎症性疾患の原因となりうるということが、遺伝学の研究で明らかになっている。これらの疾患におけるAML1のT細胞での役割、特に制御性T細胞における役割の解明は、病態解明のみならず、AML1を介した新しい治療法につながると考えられる。

⑧既存の治療に抵抗性の重症SLE20症例を対象に、B細胞抗原CD20に対する抗体リツキシマブを用いたパイロットスタディを実践し、高い臨床効果を確認した。さらに、中～重度のflareを有するSLEに対して抗CD20抗体リツキシマブ療法を用いた第I/II相臨床試験を実施し、安全性と有効性等が明らかになった。リツキシマブの作用機序としては、B細胞分化を制御してナイーブB細胞の再構築を生じ、長期寛解導入と免疫複合体が関与する腎障害などが改善したと考えられた(液性免疫の制御)。また、中枢神経症状の速やかな改善については、共刺激分子を発現するメモリーB細胞を優先的に除去してB-T細胞間相互作用を制御し、血管障害などを改善した(細胞性免疫の制御)可能性も考えられた。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、シャペロン蛋白質、LCKなどのシグナル関連分子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で、B細胞のみならず幅広い免疫系への影響が示唆された。

⑨B細胞恒常性維持にかかわるRP105が欠損した場合、B細胞の異常活性化が持続し自己免疫病態に寄与する可能性が考えられる。RP105陰性B細胞は自己抗体産生B細胞であり、B細胞分化の過程で新たなヒトB細胞サブセットを形成している。このような自己抗体産生B細胞サブセットの末梢での病的集積が自己免疫病態に大きく寄与している可能性がある。RP105陰性B細胞を制御する方法として、RP105陰性B細胞の除去が挙げられる。そのために、RP105陰性B細胞に特異的に発現する抗原を同定し特異的抗体を作成する方法が考えられる。RP105

陰性 B 細胞特異的分子の同定を試みるとともに新分子に対する抗体を開発中である。今後、これらの抗体を利用して生物学的製剤の臨床的開発にあたる。もう一つの方法として、RP105 陰性 B 細胞クローン拡大の制御がある。RP105 陰性 B 細胞数の拡大をきたすような要因であるサイトカイン、共刺激分子、感染因子、細胞因子、遺伝的素因などを解明し、それを抑制する方法である。RP105 陰性 B 細胞は、BAFF/3 量体 sCD40L により生存が維持され、BCMA の発現が増強している。これらは治療標的として有用であると考えられる。RP105 陰性 B 細胞を標的とした新規治療の開発上の利点として、治療標的のスペクトラムが狭い特異的治療であり、正常 B 細胞に対する影響が少ないために、安全性や副作用の面で優れている可能性が考えられる。しかし、ヒトにおける RP105 陰性 B 細胞には、未知の部分が多く、臨床応用に向けて今後も研究が必要である。

⑩治療不応性の自己免疫疾患に対する自己 PBSCT の安全性および有効性が確認された。自己 PBSCT36 ヶ月後でも CD4 陽性 T 細胞の低下が遷延していることが明らかになった。特にナイーブ T 細胞と考えられる CD4CD45RA 陽性 T 細胞の回復が遅延しており、胸腺を介した CD4 陽性 T 細胞の成熟の遅延が示唆された。SSc は Th1/Th2 バランスでは Th2 優位の疾患といわれているが、自己 PBSCT 後は Th1 ヘシフトしており、病態改善と関連している可能性がある。

## E. 結論

- ①ゲルゾリンが  $\beta$  2GPI と結合することが確認され、さらにインテグリン  $\alpha$  5  $\beta$  1 と共役して抗 CL/  $\beta$  2GPI 抗体による細胞刺激シグナルに関与していることが示唆された。
- ②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- $\kappa$  B シグナルに抑制的に働くことが明らかとなった。
- ③自己免疫疾患の難治性病態（腎炎、間質性肺炎）に対する TGF- $\beta$  阻害薬による治療戦略の有効性を示す事ができた。
- ④関節炎に関与する複数の新規サイトカインを同定した。
- ⑤多発性筋炎の病態を反映するモデルマウスを、遺伝解析の容易な B6 マウスで確立しえた。自己反応性 T 細胞成立と、局所の自然免疫活性化にて、その T 細胞が筋組織破壊を許される過程を分離出来る養子移入システムも確立した。モデルマウスにおける筋

炎発症に関与するサイトカインを同定した。

⑥MS 患者 T 細胞の DNA マイクロアレイ解析を通じて同定した NR4A2 は、IL-17 をはじめとする炎症制サイトカイン産生制御能を有する分子であることが示された。また ATRA 同様の機能を想定して解析をすすめた合成レチノイド Am80 は、RAR を介した Th17 細胞分化制御能を有することが明らかとなった。

⑦制御性 T 細胞による抑制機能の発揮と自己免疫反応の回避のために、AML1 の機能が必須であることが明らかになった。AML1 複合体による転写制御メカニズムの解明は、制御性 T 細胞の分化・抑制機能の解明につながる事が判明した。

⑧SLE の治療における B 細胞を標的とした生物学的製剤が、病態解明や治療にブレークスルーを齎す可能性が明らかになった。また、抗 CD20 抗体の作用機序として、CD20 陽性 B 細胞を除去することにより B 細胞分化を初期の段階で制御してナイーブ B 細胞の再構築を生じたと共に、共刺激分子を高発現するメモリー B 細胞を優先的に除去して、B-T 細胞間相互作用を制御した可能性が示唆された。

⑨自己抗体産生 RP105 陰性 B 細胞を標的とすることにより、病的細胞に限定した、より効果的かつ安全な治療法が開発できると考えられる。

⑩難治性自己免疫疾患患者に対する自己 PBSCT は安全かつ有効な治療法である事が示されるとともに、その臨床効果は 3 年以上持続することが示唆された。

## F. 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 人の先鋭により進めてきたが、難治性の自己免疫疾患における免疫系の異常の特徴に関する理解が格段に深まり、患者の生活の質を向上させ、さらには疾患の治療をもたらさう先端的新規治療法の確立・開発に関して大きな進展が得られた。

### (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 $\beta_2$ グリコプロテイン I（以下 $\beta_2$ GPI）依存性抗カルジオリピン抗体（以下抗 CL/ $\beta_2$ GPI 抗体）をはじめとする抗リン脂質抗体と総称される一群の自己抗体が引き起こす自己免疫性血栓性疾患である。血管内皮細胞や単球系細胞に直接作用し、凝固のイニシエーターである組織因子（tissue factor：以下 TF）を細胞表面に発現し凝固系を活性化することにより、易血栓性が誘導されることが知られている。抗リン脂質抗体の主要な対応抗原として、 $\beta_2$ GPI 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/ $\beta_2$ GPI 抗体での刺激により p38 MAPK のリン酸化が上昇し、NF- $\kappa$ B の活性化をひきおこし、TF が発現することを認めた。また、マウス単球細胞株 RAW264.7 を用いて $\beta_2$ GPI 関連プロテオームを分離し、ESI-LC-MS/MS により解析したところ、複数のタンパク質が同定された。候補の細胞膜タンパク質の中で、ゲルゾリンが $\beta_2$ GPI と結合していることがウエスタンブロッティング法にて確認された。また、フローサイトメーターによりゲルゾリンが細胞膜表面上でインテグリン $\alpha 5\beta 1$  と結合することが確認され、さらに $\beta_2$ GPI がゲルゾリン、インテグリン $\alpha 5\beta 1$  を含む複合体と結合することが確認された。また、抗インテグリン抗体によるインテグリン $\alpha 5\beta 1$  阻害により、抗 CL/ $\beta_2$ GPI 抗体による細胞刺激シグナルが減弱することが確認された。以上の結果より、p38 MAPK 経路は、抗リン脂質抗体刺激による単球からの TF 発現に重要な役割を果たしていると考えられ、また、ゲルゾリン、インテグリン $\alpha 5\beta 1$  を含む複合体が $\beta_2$ GPI の細胞膜表面への結合に関与することが想定され、APS 患者の血栓向性に対する新たな治療の標的と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/ $\beta_2$ GPI 抗体をはじめとする一群の自己抗体が血管内皮細胞や単球系細胞などを刺激し、凝固反応のイニシエーターとなる TF を細胞表面に発現し凝固系

を活性化することにより、易血栓性が誘導されるということを明らかにされてきた。さらに、抗 $\beta_2$ GPI モノクローナル抗体や抗プロトロンビンモノクローナル抗体、または抗リン脂質抗体症候群患者から分離した抗リン脂質抗体を含むサンプルを用いて、血管内皮細胞・単球・マクロファージ細胞株に反応させ、MyD-88、NF- $\kappa$ B の活性化を介して、TF の発現が起きることを明らかになっているが、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

$\beta_2$ GPI と結合する細胞表面タンパク質の検出のため、まず、FLAG タグ $\beta_2$ GPI 発現ベクターを構築する。発現させたリコンビナント FLAG タグ $\beta_2$ GPI を、RAW264.7 の細胞溶解液と混合する。その混合物を使用し、抗 FLAG 抗体アフィニティークロマトグラフィーにより FLAG タグ $\beta_2$ GPI と複合体を形成するタンパク質 ( $\beta_2$ GPI 関連プロテオーム) を網羅的に分離する。このサンプルを SDS-PAGE により分離しバンドとして確認できるものは MALDI-TOF を使用してタンパク質を同定する。もしくは SDS-PAGE のバンドに関係なくゲルを数 10 に均等に切り出し、すべてを ESI-LC-MS/MS により解析する。

解析の結果得られたタンパク質につき、 $\beta_2$ GPI との結合を FACS 法およびウエスタンブロッ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/ $\beta_2$ 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  $\beta_2$ 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- $\kappa$ 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ルシフ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/ $\beta_2$ GPI 抗体での刺激により p38 MAPK のリン酸化が上昇し、NF- $\kappa$ B の活性化をひきおこし、TF が発現することを認めた。また、RAW264.7 の細胞溶解液とリコンビナント FLAG タグ $\beta_2$ GPI を混合し、抗 FLAG 抗体アフィニティークロマトグラフィーにより  $\beta_2$ GPI 関連プロテオームを分離した。このサンプルを ESI-LC-MS/MS により解析したところ、複数のタンパク質が同定された。候補の細胞膜タンパク質の中で、ゲルゾリンが  $\beta_2$ GPI と結合していることがウエスタンブロッティング法にて確認された。また、フローサイトメーターによりゲルゾリンが細胞膜表面上でインテグリン $\alpha 5\beta 1$  と結合することが確認され、さらに  $\beta_2$ GPI がゲルゾリン、インテグリン $\alpha 5\beta 1$  を含む複合体と結合することが確認された。また、抗  $\beta_2$ 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 (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/ $\beta_2$ GPI 抗体による細胞刺激シグナルが減弱することが確認された。

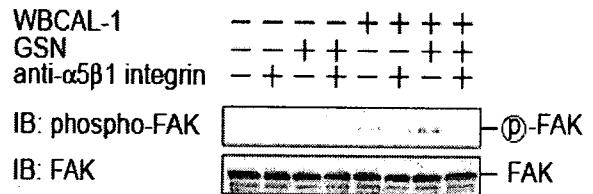


図 1. 抗  $\beta_2$ GPI 抗体刺激による FAK のリン酸化。GSN:ゲルゾリン

### D. 考察

抗 CL/ $\beta_2$ GPI 抗体による刺激により、細胞表面のインテグリン $\alpha 5\beta 1$  を介して、p38 MAPK のリン酸化が起こり、NF- $\kappa$ B が核内へと移行し、TF プロモーターに結合し、TF 転写が誘導されてくる可能性が考えられる。また、抗 CL/ $\beta_2$ GPI 抗体による TF の発現は  $\beta_2$ GPI が存在しているとき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  $\beta_2$ GPI に依存する、すなわち細胞と  $\beta_2$ GPI に結合した自己抗体との interaction によるものであると考えられ、そこには受容体分子や共役分子の存在が想定される。今回同定したタンパク質のなかで、ゲルゾリンはインテグリン $\alpha 5\beta 1$  と共役し、抗 CL/ $\beta_2$ GPI 抗体による細胞刺激に関与している可能性が示唆された (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。

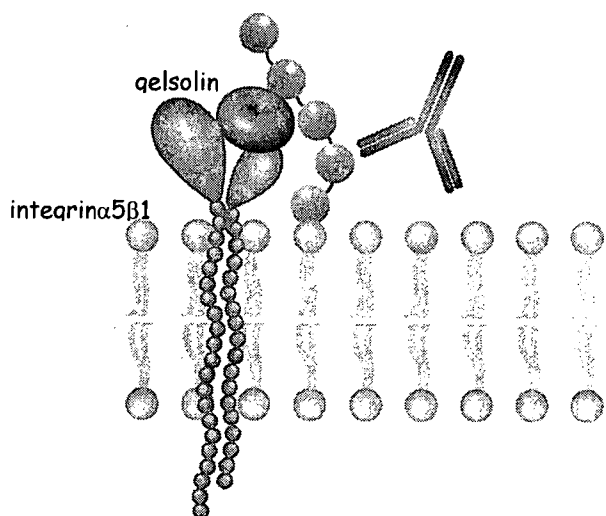


図 2. 抗  $\beta_2$ -GPI 抗体/ $\beta_2$ -GPI 複合体受容体の模式図

## E. 結論

抗 CL/ $\beta_2$ GPI 抗体の刺激による遺伝子に発現の変動を検討したところ、p38 MAPK のリン酸化の上昇が観察された。またリコンビナント FLAG タグ $\beta_2$ GPI を使用した抗FLAG抗体アフィニティークロマトグラフィーにより $\beta_2$ GPI 関連プロテオームを分離し、質量分析解析により複数のタンパク質を同定した。そのなかで、ゲルソリンが $\beta_2$ GPI と結合することが確認され、さらにインテグリン $\alpha 5\beta 1$  と共役して抗 CL/ $\beta_2$ GPI 抗体による細胞刺激シグナルに関与していることが示唆された。

## F. 健康危険情報

現在のところ、APS における in vivo での p38 阻害薬の使用は行っていない。p38 MAPK 経路は TF 発現のみならず種々の生体反応における重要な経路であり、種々の副作用の発現の可能性も予想される。抗リン脂質抗体-p38 MAPK 経路の詳細な解明をさらに行い、より APS に特異的な部分をターゲットとすることにより、将来的により安全な治療法が見いだされる可能性が考えられ得る。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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
- 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
- Mizumoto H, Maihara T, Hiejima E, Shiota M, Hata A, Seto S, Atsumi T, Koike T, Hata D. Transient antiphospholipid antibodies associated with acute infections in children: a report of three cases and a review of the literature. *Eur J Pediatr.* 165:484-488,2006
- Nakamura A, Shimizu C, Nagai S, Taniguchi S, Umetsu M, Atsumi T, Wada N, Yoshioka N, Ono Y, Tanizawa Y, Koike T. A novel mutation of *WFS1* gene in a Japanese man of Wolfram syndrome with positive diabetes-related antibodies. *Diabetes Res Clin Pract.* 73(2):215-217,2006
- Nagai S, Shimizu C, Kimura Y, Umetsu M, Taniguchi S, Takeuchi J, Atsumi T, Yoshioka N, Kubo M, Koike T. A case of reversed pituitary dysfunction with intrasellar mass. *J Endocrinol Invest.* 29(4):367-372,2006
- Amengual O, Atsumi T, Koike T. Pathophysiology of the antiphospholipid syndrome: roles of anticardiolipin antibodies in thrombosis and fibrinolysis. *APLAR J Rheumatol.* 9:377-386,2006
- Mizukami K, Nakabayashi T, Naitoh S, Takeda M, Tarumi T, Mizoguchi I, Ieko M, Koike T. One novel and one recurrent mutation in the *PROS1* gene cause type I protein S deficiency in patients with pulmonary embolism associated with deep vein thrombosis. *Am J Hematol.* 81:787-797,2006
- Ieko M, Tarumi T, Nakabayashi T, Yoshida M, Naito S, Koike T. Factor Xa inhibitors: new anti-thrombotic agents and their characteristics. *Front Biosci.* 11:232-248,2006
- Furusaki A, Judo S, Yamashita Y, Amasaki Y, Atsumi T, Koike T. TRAIL-mediated cytotoxicity: Impacts of sTRAIL and vTRAIL microvesicles. *J Biol Sci.* 6(1):150-159,2006
- Niwa H, Koumoto C, Shiga T, Takeuchi J, Mishima S, Segawa T, Atsumi T, Shimizu C, Koike T, Yoshioka N. Clinical analysis of cognitive function in diabetic patients by MMSE and SPECT. *Diabetes Res Clin Pract.* 72:142-147,2006
- Hashimoto T, Nishio M, Sakai T, Fujimoto K, Sato N, Endo T, Koike T. Acute schizophrenic symptoms as the initial manifestation of HIV infection that respond to highly active antiretroviral therapy. *Clinical Infectious Diseases.* 42:1653-1655,2006
- Furukawa S, Yasuda S, Amengual O, Horita T, Atsumi T, Koike T. Protective effect of pravastatin on vascular endothelium in patients with System

Sclerosis: a pilot study. *Ann Rheum Dis*. 65(8):1118-1120,2006

Nishio M, Fujimoto K, Yamamoto S, Endo T, Sakai T, Obara M, Kumano K, Minauchi K, Yamaguchi K, Takeda Y, Sato N, Koizumi K, Mukai M, Koike T. Hypogammaglobulinemia with a selective delayed recovery in memory B cells and an impaired isotype expression after rituximab administration as an adjuvant to autologous stem cell transplantation for non-Hodgkin lymphoma. *Eur J Haematol*. 77 : 226-232,2006

Yasuda,S.,Atsumi,T.,Matsuura,E.,Kaiharu.K.,Yamamoto,D.,Ichikawa,K.,Koike,T. Significance of valine/leucine<sup>247</sup> polymorphism of  $\beta$ 2-glycoprotein I in antiphospholipid syndrome: increased reactivity of anti- $\beta$ 2-glycoprotein I autoantibodies to the valine<sup>247</sup> $\beta$ 2-glycoprotein I variant. *Arthritis Rheum* 52:1 212-218.2005

Kataoka,H.,Takahashi,S.,Takase,K.,Yamasaki,S.,Yokosuka,T.,Koike,T.,Saito,T. CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells exert in vitro suppressive activity independent of CTLA-4. *Int Immunol* 17:4 421-427.2005

Jodo,S.,Pidiyar,VJ.,Xiao,S.,Furusaki,A.,Sharma,R.,Koike,T.,Ju,ST. Cutting Edge: Fas Ligand (CD178) Cytoplasmic Tail Is a Positive Regulator of Fas Ligand-Mediated Cytotoxicity. *J Immunol* 174 :4470-4474.2005

Nishio,S.,Hatano,M.,Nagata,M.,Horie,S.,Koike,T.,Tokuhisa,T.,Mochizuki,T. Pkd1 regulates immortalized proliferation of renal tubular epithelial cells through p53 induction and JNK activation. *J Clin Invest* 115:4 910-918.2005

Kochi,Y.,Yamada,R.,Suzuki,A.,Harley,JB.,Shirasawa,S.,Sawada,T.,Bae,SC.,Tokuhira,S.,Chang,X.,Sekine,A.,Takahashi,A.,Tsunoda,T.,Ohnishi,Y.,Kaufman,K.M.,Kang,CP.,Kang,C.,Otsubo,S.,Yumura,W.,Mimori,A.,Koike,T.,Nakamura,Y.,Sasazuki,T.,Yamamoto,K. A functional variant in FCRL3, encoding Fc receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities. *Nat Genet* 37:5 478-485.2005

Imai,Y.,Chou,T.,Tobinai,K.,Tanosaki,R.,Morishima,Y.,Ogura,M.,Shimazaki,C.,Taniwaki,M.,Hiraoka,A.,Tanimoto,M.,Koike,T.,Kogawa,K.,Hirai,H.,Yoshida,T.,Tamura,K.,Kishi,K.,Hotta,T; CliniMACS Study Group. Isolation and transplantation of highly purified autologous peripheral CD34<sup>+</sup> progenitor cells: purging efficacy, hematopoietic reconstitution in non-Hodgkin's lymphoma (NHL): results of Japanese phase II study. *Bone Marrow Transpl* 35:5 479-487.2005

Bando,H.,Atsumi,T.,Nishio,T.,Niwa,H.,Mishima,S.,Shimizu,C.,Yoshioka,N.,Bucala,R.,Koike,T. Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of glycolytic regulators in human cancer. *Clin Cancer Res* 11 5784-5792.2005

Atsumi,T.,Furukawa,S.,Amengual,O.,Koike,T. Antiphospholipid antibody associated thrombocytopenia and the paradoxical risk of thrombosis. *Lupus* 14 499-504.2005

Bohgaki,T., Amasaki,Y., Nishimura,N., Bohgaki,M., Yamashita,Y., Nishio,M., Awada,KI., Jodo,S., Atsumi,T., Koike,T. Up regulated expression of tumour necrosis factor  $\alpha$  converting enzyme in peripheral monocytes of patients with early systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 64 1165-1173.2005  
Atsumi,T., Amengual,O., Yasuda,S., Matsuura,E., Koike,T. Research around  $\beta$ 2-glycoprotein I: A major target for antiphospholipid antibodies. *Autoimmunity*. 38(5) 377-381.2005

Fukae,J., Amasaki,Y., Yamashita,Y., Bohgaki,T., Yasuda,S., Jodo,S., Atsumi,T., Koike,T. Butyrate suppresses tumor necrosis factor  $\alpha$  production by regulating specific messenger RNA degradation mediated through a cis-acting AU-rich element. *Arthritis Rheum*. 52(9) 2697-2707.2005

Koike,T., Atsumi,T. Antiphospholipid antibodies and cell activation: crucial role of p38 MAPK pathway. *Lupus* 14(10) 799-801.2005



- Atsumi, T., Nishio, T., Niwa, H., Takeuchi, J., Bando, H., Shimizu, C., Yoshioka, N., Bucala, R., Koike, T. Expression of inducible 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Bisphosphatase/PFKFB3 isoforms in adipocytes and their potential role in glycolytic regulation. *Diabetes* 54(12) 3349-3357.2005
- Kasahara, H., Matsuura, E., Kaihara, K., Yamamoto, D., Kobayashi, K., Inagaki, J., Ichikawa, K., Tsutsumi, A., Yasuda, S., Atsumi, T., Yasuda, T., Koike, T. Antigenic structures recognized by anti-B2-glycoprotein I auto-antibodies. *Int Immunol* 17(12) 1533-1542.2005
- Yasuda, S., Bohgaki, M., Atsumi, T., Koike, T. Pathogenesis of antiphospholipid antibodies: impairment of fibrinolysis and monocyte activation via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Immunobiology* 210 775-780.2005
- Nakabayashi, T., Mizukami, K., Naitoh, S., Takeda, M., Shikamoto, Y., Nakagawa, T., Kaneko, H., Tarumi, T., Mizoguchi, I., Mizuno, H., Ieko, M., Koike, T. Protein C Sapporo (protein C Glu 25 → Lys): A heterozygous missense mutation in the Gla domain provides new insight into the interaction between protein C and endothelial protein C receptor. *Thromb Haemost* 94 942-950.2005
- Goto, H., Nishio, M., Endo, T., Sato, N., Koizumi, K., Fujimoto, K., Sakai, T., Kumano, K., Obara, M., Koike, T. Effective in vivo purging with rituximab and autologous peripheral blood stem cell transplantation in a woman with CD5 positive primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Haematol.* 74 526-528.2005
- Nakamura, A., Simizu, C., Nagai, S., Taniguchi, S., Umet su, M., Atsumi, T., Yoshioka, N., Ono, Y., Tajima, T., Kubo, M., Koike, T. A rare case of Gitelman's syndrome presenting with hypocalcemia and osteopenia. *J Endocrinol Invest* 28 464-468.2005
- Nishio, M., Endo, T., Fujimoto, K., Sato, N., Sakai, T., Obara, M., Kumano, K., Minauchi, K., Koike, T. Persistent panhypogammaglobulinemia with selected loss of memory B cells and impaired isotype expression after rituximab therapy for post-transplant EBV-associated autoimmune hemolytic anemia. *Eur J Haematol.* 75(6) 527-529.2005
- Matsumoto, R., Shimizu, C., Nagai, S., Taniguchi, S., Umet su, M., Kimura, Y., Atsumi, T., Yoshioka, N., Kubo, M., Koike, T. Cat-eye syndrome with isolated idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Internal Med* 44(10) 1069-1073.2005
2. 学会発表  
 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
- Koike, T. : " Antiphospholipid antibodies and cell acyivation" 12<sup>th</sup> 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. : 11<sup>th</sup> International Symposium of Immunology of Reproduction, Varna, Bulgaria, June 3, 2006
- Koike, T. : "Antiphospholipid Antibodies: Lessons from the Bench", 5<sup>th</sup> International Congress on Autoimmunity, Sorrento, Italy, December 1, 2006
- 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 島山 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- $\kappa$ B という転写因子の活性化を通じてその作用が仲介される。A20 は NF- $\kappa$ B の強力な阻害分子として報告されているが、その作用機序に関しては不明な点が多い。申請者は、本研究において新たな A20 結合タンパク質として Ymer/C3orf6 を同定し、生化学的に解析したところ Ymer は NF- $\kappa$ B シグナルに抑制的に働くことが明らかとなった。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

(倫理面への配慮)

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、 $\kappa$ B-ルシフェラーゼレポーターにおける転写活性化に対して、Ymer は A20 と共に抑制的に作用することが判明した。

D. 考察

本研究結果は、NF- $\kappa$ B 経路における制御酵素(ユビキチン化修飾酵素)である A20 と、チロシンキナーゼ経路(Ras-MAP キナーゼ経路)に関与すると予想される Ymer のクロストークを、分子レベルで示唆するものである。これらの2つの細胞内シグナル経路における epistatic な関係を明らかにすることは、免疫系細胞の活性化及び増殖抑制の機序に重要な知見と言える。また現在、個体レベルで免疫細胞及び炎症関連細胞における機能を明らかにするために、Ymer の遺伝子破壊マウス及びトランスジェニックマウスを作製することが重要であると考えられる。

E. 結論

リウマチ性疾患を含む炎症性疾患には、多くのサイトカインが関与していることが知られている。特に腫瘍壊死因子 TNF やインターロイキン-1 や LPS 受容体などの炎症誘発性サイトカインは、NF- $\kappa$ B という転

写因子の活性化を通じてその作用が仲介される。  
A20 は NF- $\kappa$ B の強力な阻害分子として報告されているが、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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ B activity. *Immunol. Lett.*, 109, 175-181, 2007.

### 1.学会発表

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

なし

### 2.実用新案登録

なし

### 3.その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(免疫・アレルギー疾患予防・治療研究事業)  
分担研究報告書(平成 17-19 年度)

TGF- $\beta$ アンタゴニストを介した自己免疫疾患の制御に関する研究

分担研究者 住田 孝之  
筑波大学大学院人間総合科学研究科先端応用医学専攻臨床免疫学 教授  
研究協力者 後藤 大輔、真村 瑞子  
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- $\beta$ (TGF- $\beta$ )が病態に深く関与している疾患に対し、TGF- $\beta$ のシグナル伝達を阻害する薬剤が治療有効性を有するか検討することを目的とした。本研究では、ループス腎炎モデルマウス、サイトカイン誘導間質性肺炎モデルマウスにおいて、TGF- $\beta$ シグナル抑制剤(ALK-5阻害剤)がループス腎炎の治療、間質性肺炎の予防に有効である事が示された。

A.研究目的

強皮症の皮膚硬化病変、肺病変やループス腎炎、関節リウマチは難治性の病態であり、有効かつ副作用が僅少な治療法の開発が望まれている。TGF- $\beta$ の作用や発現量の過剰がこれらの病態形成に関与していることが知られており、その作用を拮抗阻害する薬剤が治療に有効であるか否かを検討する。

B.研究方法

- (1) ループスモデル(MRL/lpr)において、TGF- $\beta$ が病態形成に関与しているか否かを検討する。TGF- $\beta$ I型受容体(ALK V)からTGF- $\beta$ 細胞内シグナル伝達分子Smad2/Smad3を介したシグナル伝達を阻害するALK-5阻害薬(IN1130: 2-pyridinyl-[1,2,3]triazole, DaeKee Kim, In2Gen, Korea)の治療効果を判定した。
- (2) C57BL/6マウスにIL-2とIL-18を投与して誘導される間質性肺炎モデルマウス(Okamoto M. et al. Blood. 2002)において、TGF- $\beta$ 阻害薬であるALK-5阻害薬の予防効果を検討した。
  - 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(DIMSO)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- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-13, IL-17, CTGF, PDGF, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, IGF-1, type I/III collagen, fibronectin)の発現量の比較を行った。

- 3)TGF- $\beta$ 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する。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- $\beta$ シグナル制御の重要性をさらに検証する。

(倫理面への配慮)

動物実験においては、過度の苦痛や恐怖を与えないように配慮する。遺伝子改変マウスを用いた実験では、当該施設の組換えDNA実験および動物実験の学内規定を遵守して行う。

C.研究結果

(1)MRL/lprマウスにおける腎炎に対するTGF- $\beta$ 阻害薬の効果:

- 1)MRL/lprマウスの腎病変部位には重症度に相関してSmad2のリン酸化がみとめられた。
- 2)18週齢MRL/lprマウス(末期ループス腎炎モデル)にIN1130(20mg/kg)を42日間連日腹腔内投与与したところ、PBS投与群(各群n=5)