

新しい治療法の開発

分担研究者 首藤 紘一 財団法人 乙卯研究所 所長

研究協力者 石堂美和子 財団法人 乙卯研究所

研究要旨 実験的多発性筋炎に対するタミバロテン（Am80）の治療効果を明らかにした。過去の実験結果と併せて、タミバロテンはリウマチ、シェーグレン、I型糖尿病、クローン病など幅広く自己免疫疾患の治療に有効であることが示唆された。

A. 研究目的

Am80（タミバロテン）はレチノイン酸受容体RAR α とRAR β を介して特定の遺伝子の発現を調節する。本薬は急性前骨髄球性白血病の治療薬として承認されているものであるが、乾癬の治療にも有効である。動物モデルにおいては、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膜炎（EAE）、間質性膀胱炎モデル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進められているところである。免疫異常マウスであるNODマウスではタミバロテンの混餌投与により膵臓ランゲルハンス氏島におけるリンパ球浸潤が抑えられ、尿糖の発生も抑制された。引き続き、自己免疫疾患の臨床応用に向けてのデータの集積を行う。

B. 研究方法

Am80および関連の誘導体を供給し、研究目的にむけた動物試験データを集めると共に、免疫学的な背景についての知見をうる。

C. 研究結果

(1) 実験的多発性筋炎に対するAm80経口投与による効果が報告された。ウサギミオシン免疫によりS/JL/Jマウスに筋炎を発生させ、Am80の経口投与による効果が報告された。すなわち、Am80投与によって筋炎スコアは有意に低下し、炎症細胞浸潤数は減少し、IgG1抗ミオシン抗体産生

は変化しなかったが、IgG2a, 2b抗ミオシン抗体は低下した。TNF α 、IL1 β の産生は減少した。

(2) レチノイドによる自己免疫性疾患の治療効果はTh1/Th2の制御によると考えてきたところであるが、昨今では、より直接的な効果はTh17/Tregの制御によっている可能性が論じられている。具体的には、レチノイン酸、および我々の合成したレチノイドアゴニストAm580（Am80の異性体）、レチノイドアンタゴニスト（LE540）によって、RARアゴニストがTh17細胞を減少させ、Tregを増加させることが示された（F. Schmbach, et al. Eur. J. Immunol. web. Journal 2007, 37, 2396; D. Mucida et al., Science, 2007, 317, 256; H. von Boehmer, J. Exp. Med. 2007, 204, 1737; K. Elias et al, Blood, 2008, 111, 1013.）

D. 考察

レチノイド、特にRAR α ないしRAR β に選択的な化合物は自己免疫疾患の治療に有効であることがほぼ十分に示され、その機構としてはTh17の抑制によるTregの増加によって説明されつつある。

E. 結論

タミバロテンは特に、その受容体選択性と臨床

での副作用を考えると、自己免疫疾患治療薬として有用性が期待できる。この文脈にあって、レチノイドが本格的に開発されるためには、新規な化合物であって、よりRAR α ないし β 選択性の高いものの合成が必要であろう。しかし、タミバロテンは既承認薬であるから、医師主導試験や小規模の第2a相試験は、必ずしも多額の費用なくして、可能であり、まずはタミバロテンをもって臨床効果を確認すべきと考えている。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

・ S. Ishida, H. Tanabe, Y. Shimozaki, S. Koyano, H. Kagechika, K. Shudo, S. Ozawa, J. Sawada, Y. Ohno, K. Inoue. How DNA microalley technology contributes to the retinoid evaluations “Vitamin A: New Research” Ed. I.T.Loessing 71—92, 2007.

・ 首藤紘一. タミバロテン. 化学療法の領域
23,609-613

2. 学会発表

・ 大柳、南木、石堂、窪田、宮坂
筋炎モデルにおける Am80 の効果
日本リウマチ学会 2007 年

・ 南木、大柳、石堂、窪田、宮坂
筋炎モデルにおける Am80 の治療効果
日本リウマチ学会 2008 年 4 月

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

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た。RhoGDI, Coronin 1a, Arp2/3 complex などの細胞骨格に関する経路を標的とする分子が、GRAIL の基質である可能性が示唆された。また、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、現在解析中である。

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構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 γ 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

D011.10 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した。

（倫理面への配慮）

動物実験に関しては、当研究所の動物実験規定に従い、実験計画書の承認を受けて行った。

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。IMAP4, FBP1, RhoGDIb については、強制発現により増殖反応が回復した。RhoGDIb については、in vitro のユビキチンアッセイにて、GRAIL によりユビキチン化された。また、Coronin 1a は、GRAIL の強制発現により発現が低下するが、RING finger ドメインの変異体でも発現回復が見られなかった。GRAIL ノックアウトマウスについては、ホモマウスが誕生し、現在解析を開始した。

D. 考察

これまで、GRAIL により制御される経路は不明であったが、2D DIGE を用いた解析から、RhoGDI, Coronin 1a, Arp2/3 complex などの細胞骨格に関する経路を標的とする分子が GRAIL の基質である可能性が示唆された。RhoGDI については、GRAIL によるユビキチン化が示されたが、Coronin については、GRAIL RING finger 変異体を強制発現させた場合でも発現の低下がみられるところから、ユビキチン非依存性の蛋白発現調節に関与する可能性も考えられ、今後の検討が必要と思われる。GRAIL ノックアウトマウスについては、129 ならびに B6 由来 ES 細胞を用いたノックアウトマウスを得たので、今後解析をすすめている。

これらのマウスを用いて、GRAIL の機能解析が進むことが期待される。

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。RhoGDI, Coronin 1a, Arp2/3 complex などの細胞骨格に関する経路を標的とする分子が、GRAIL の基質である可能性が示唆された。また、GRAIL 分子ノックアウトマウスの作製に成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

原著

1) Toba T, Murata K, Nakanishi K, Takahashi B, Takemoto N, Akabane M, Nakatsuka T, Imajo S, Yamamura T, Miyake S and Annoura H. Minimum structure requirement of immunomodulatory glycolipids for predominant Th2 cytokine induction and the discovery of non-linear phytosphingosine analogs. *Bioorganic Med.Chem.Let.* 17:2781-4, 2007.

2) Kaieda S, Tomi C, Oki S, Yamamura T and Miyake S. Activation of iNKT cells by synthetic glycolipid ligands suppresses autoantibody-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 56:18365-45, 2007.

3) Sakuishi K, Oki S, Araki M, Porcelli SA, Miyake S, Yamamura T. Invariant NKT cells biased for IL-5 production act as crucial regulators of inflammation. *J.Immunol.* 179:3452-62, 2007.

4) Ambrosino E, Terabe M, Halder RC, Peng J, Takaku S, Miyake S, Yamamura T, Kumar V, Berzofsky. Cross-regulation between Type I and Type II NKT cells in regulating tumor immunity: A new immunoregulatory axis. *J.Immunol.* 179:5126-36, 2007.

総説

1) Oki S, Miyake S. Invariant Natural Killer (iNKT) cells

in asthma: A novel insight into the pathogenesis of asthma and the therapeutic implication of glycolipid ligands for allergic diseases. *Allergol Int.* 56:7-14, 2007.

2) Miyake S and Yamamura T. Glycolipid autoimmunity. *Int. Rev. Immunol.* 26:73-94, 2007.

3) Miyake S and Yamamura T. NKT cells and autoimmune diseases: unrabeling the complexity. *Cur. Top. Microbiol. Immunol.* 314:251-67, 2007.

4) Yamamura T, Sakuishi K, Illes Z and Miyake S. Understanding the behavior of invariant NKT cells in autoimmune diseases. *J. Neuroimmunol.* 1914:8-15, 2007.

5) 大木伸司、三宅幸子: 改変糖脂質抗原による iNKT 細胞を介した免疫制御 *生化学* 79:357-62, 2007.

6) 山村隆、三宅幸子: NKT 細胞の糖質認識と免疫制御 *実験医学増刊* 25: 72-77, 2007.

2. 学会発表

国際学会

1) Miyake S, Oki S, Yamamura T. Activation of macrophages by glycolipid ligands for iNKT cells. Keystone symposia, The Macrophage, Colorado, April 11, 2007

2) Miyake S, Kaieda S, Oki S, Yamamura T. IFN-gamma inhibits inflammatory arthritis via suppression of mast cell activation. The American Association of Immunologists 94th Annual Meeting, Maimai, Florida, May 18, 2007

3) Yago T, Tajima R, sdKaieda S, Oki S, Yamamura T, Miyake S. MR1-restricted V α 19i T cells ameliorate murine models of arthritis. American College of Rheumatology 71th Annual Scientific Meeting, Boston, MA, November 6, 2007 (*Arthritis Rheum.* 56:S387, 2007.

国内学会

- 1) 三宅幸子：インバリアント NKT 細胞による自己免疫の制御、第 51 回日本リウマチ学会、横浜、4 月 26 日、2007
- 2) 林幼偉、三宅幸子、山村隆：EAE 寛解期に誘導される CD69⁺CD103⁺の制御性 T 細胞は EAE 寛解維持・再誘導抑制を担う、第 19 回日本神経免疫学会学術集会、金沢、4 月 12 日、2007
- 3) 土居芳充、大木伸司、三宅幸子、山村隆：多発性硬化症における病原性 T 細胞のサイトカイン産生制御機構、第 19 回日本神経免疫学会学術集会、金沢、4 月 12 日、2007
- 4) 荒浪利昌、三宅幸子、山村隆：MS 寛解期ナチュラルキラー細胞 CD11c は疾患活動性を反映する、第 19 回日本神経免疫学会学術集会、金沢、4 月 12 日、2007
- 5) 横手裕明、Croxford J.L., 水澤英洋、三宅幸子、山村隆：実験的自己免疫性脳脊髄炎における腸内フローラの役割に関する検討、第 19 回日本神経免疫学会学術集会、金沢、4 月 12 日、2007
- 6) 海江田信二郎、田島良亮、大木伸司、坂口志文、三宅幸子：SKG マウスにおける結核死菌投与による関節炎の誘導 第 51 回日本リウマチ学会、横浜、4 月 26 日、2007
- 7) 田島良亮、海江田信二郎、大木伸司、三宅幸子：抗体誘導性関節炎における NKT 細胞の機能解析 第 51 回日本リウマチ学会、横浜、4 月 26 日、2007
- 8) 林幼偉、三宅幸子、山村隆：CD69 陽性 CD103 陽性の CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性 T 細胞は EAE の寛解維持と再誘導抑制を担う、第 48 回日本神経学会総会、名古屋、5 月 16 日、2007
- 9) 横手裕明、Croxford J.L., 水澤英洋、三宅幸子、山村隆：実験的自己免疫性脳脊髄炎における腸内フ

ローラの役割に関する検討、第 48 回日本神経学会総会、名古屋、5 月 16 日、2007

- 10) 土居芳充、大木伸司、三宅幸子、山村隆：多発性硬化症における病原性 T 細胞のサイトカイン産生制御機構：第 35 回日本臨床免疫学会、大阪、10 月 19 日、2007
- 11) 横手裕明、Croxford J.L., 水澤英洋、大木伸司、三宅幸子、山村隆：実験的自己免疫性脳脊髄炎における腸内フローラの役割に関する検討：第 35 回日本臨床免疫学会、大阪、10 月 19 日、2007
- 12) 大木伸司、市川大樹、山村隆、三宅幸子：プロテオミクスを用いたアナジ T 細胞内タンパク質の解析：第 37 回日本免疫学会、東京、11 月 20 日、2007
- 13) 八子徹、海江田信二郎、大木伸司、山村隆、三宅幸子：MR1 拘束性 T 細胞によるマウス関節炎モデルの抑制：第 37 回日本免疫学会、東京、11 月 20 日、2007
- 14) 横手裕明、Croxford J.L., 水澤英洋、大木伸司、三宅幸子、山村隆：実験的自己免疫性脳脊髄炎における腸内フローラの役割に関する検討：第 37 回日本免疫学会、東京、11 月 20 日、2007
- 15) 林幼偉、三宅幸子、山村隆：危険な自己ペプチドが用いる手段としての制御性 T 細胞の阻害：第 37 回日本免疫学会、東京、11 月 20 日、2007

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 疾患プロテオーム・分子病態治療学 教授

研究要旨 血清中にはアミノ酸残基数が数十以下のペプチドが多数存在する。昨年度まで、それらのペプチドから疾患特に全身性自己免疫疾患特異的ペプチドを検出同定する方法の確立を目指してきた。具体的には分子量 5kD 程度以下のペプチドを対象として、疎水結合あるいはイオン結合などを利用し、血清中からペプチドを分離精製した。さらに質量分析によりイオン化したペプチドを質量と共に直接検出を行い、例として強皮症にて疾患特異的ペプチドの検出同定に成功した。今回、全身性エリテマトーデスでも解析を行い、疾患に特異的なペプチドの検出と一部同定を行った。各臓器障害に関連するペプチドの同定と同定したペプチドの生物学的活性の検討が今後の課題である。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス、強皮症、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。網羅的スクリーニングには遺伝子レベル、遺伝子発現 (mRNA) レベル、蛋白質レベルなど様々なレベルの解析があるが、蛋白質が分解されて生成する、アミノ酸残基数が数十以下の短いペプチドもまた検索対象となる。

本研究は血清中のペプチドのなかで、各種全身性自己免疫疾患に特異的な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。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 5kD 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 5kD 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 deep proteome と呼ばれる部分のさらに一部であり、量的にも微量である。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。我々は疎水性担体など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。昨年度までの強皮症血清を用いた条件検討と実際の探索で、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。すなわち約 5・1 の血清からマトリックス支援レーザー脱離イオン化 - 飛行時間型 (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization-Time of Flight、MALDI-TOF) 型質量分析器により 100 以上のペプチドを検出した。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。この中で、20 個以上の強皮症に特異的と思われるペプチドを検出した。同方法が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。さらに、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。これらのことから、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と言える。また、技術的にはペプチドの側鎖修飾が疾患特異性に大きく影響することが判明したことから、側鎖修飾（翻訳後修飾）も考慮に入れる必要がある。これらの背景を踏まえ、全身性エリテマトーデスにおける血清ペプチドプロファイルの同定を試みた。

B. 研究方法

ペプチドの分離精製

全身性自己免疫疾患患者血清各 5・1 程度から、小ペプチドを疎水性結合、金属アフィニティー、あるいはイオン結合を利用して、磁気ビーズに吸着させた。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。

ペプチドのイオン化と質量測定

これを α -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid などの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イオン化ペプチドピークを抽出した。

ペプチドのアミノ酸配列の同定と合成

さらにこれら検出した疾患特異的なペプチドのアミノ酸配列を同定するために、別途、血清 150 μ l 程度から、分子量別フィルターにより高分子を取り除いた後、前述と同様のペプチドの分離精製を行い、MALDI-TOF/TOF 型質量分析器をもちいて、Collision-Induced Dissociation (CID) を使用し de novo アミノ酸配列決定を行った。さらに、一部は当該ペプチドを化学合成し、その生理活性を検討した。

C. 研究結果

全身性エリテマトーデスについて、その血清中のペプチドの検出では、強皮症同様 100 以上のペプチドを検出した。イオン化強度の強いペプチドとして

同定したものには、C3f, DRC3f, C4b, C4adg, 第二凝固因子およびアポリポ蛋白 J の断片ペプチドなど、強皮症で増えているペプチドと重なるものが多かった。そのイオン強度は強皮症のそれと比べ、むしろ弱かった。一方、健常人、関節リウマチ、強皮症の患者血清中のペプチドと比較して、全身性エリテマトーデスで増加しているペプチドとしては、分子量 1.5 kD から 5.0 kD の範囲に少なくとも 9 個が検出された。しかしながら、これらのペプチドピークのイオン強度は比較的弱く、同定までには至らなかった。また、臓器症状として、中枢神経症状を呈する全身性エリテマトーデス (CNS ループス) に関連するペプチドの検出を試みたが、血清を用いた解析においては検出は難しかった。

D. 考察

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、全身性自己免疫疾患の病因解明による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。その網羅的解析手段として、遺伝子、遺伝子発現、および蛋白質などのさまざまなレベルのものがある。本研究では、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 kD 以下の小ペプチドに着目し、全身性エリテマトーデスでのペプチドを探索した。全身性エリテマトーデスで増加しているペプチドは強皮症のそれと重複する部分が多く、両者の病因基盤が一部共通であることが窺われた。しかしながら、全身性エリテマトーデス特異的と思われるペプチドも存在し、その配列と側鎖修飾を探っていく必要があると思われた。また、CNS ループスにおいて特徴的ペプチドが血清中で認められなかったことについては、髄液など罹患臓器に近い部位の探索が必要と考えられた。

E. 結論

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る。様々

な罹患臓器に適した材料から、側鎖修飾を含めてペプチドを探っていくことが必要である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakamura, H. K. Masuko, K. Yudoh, T. Kato, T. Kamada and T. Kawahara. Effects of glucosamine administration on patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.*: 27: 213-218, 2007.
2. 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.* 51: 87-98, 2007.
3. Nakamura, H. K. Masuko, K. Yudoh, T. Kato, T. Kamada and T. Kawahara. Effects of celecoxib on human chondrocytes-enhanced production of chemokines. *Rheumatol Int.* 25:11-16, 2007.
4. Masuko, K. M. Murata, H. Nakamura, K. Yudoh, K. Nishioka and T. Kato. Sphingosine-1-phosphate attenuates proteoglycan aggrecan expression via production of prostaglandin E2 from human articular chondrocytes. *BMC Musculoskelet Disord.* 8:29, 2007.
5. Okunuki, Y. Y. Usui, M. Takeuchi, T. Kezuka, T. Hattori, K. Masuko, H. Nakamura, K. Yudoh, M. Usui, K. Nishioka, and T. Kato. Proteomic surveillance of autoimmunity in Behcet's disease with uveitis: Selenium binding protein is a novel autoantigen in Behcet's disease. *Exp Eye Res.* 84: 823-831, 2007.
6. Xiang Y, Matsui T, Matsuo K, Shimada K, Tohma S, Nakamura H, Masuko K, Yudoh K, Nishioka K, disease-specific short peptides in sera from patients with systemic sclerosis: Complement C3f-des-arginine, detected predominantly in

systemic sclerosis sera, enhances proliferation of vascular endothelial cells. *Arthritis Rheum.* 56: 2018-30, 2007.

7. Nakamura, H. K. Masuko, K. Yudoh, T. Kato, K. Nishioka, T. Sugihara and M. Beppu. Positron emission tomography with (18)F-FDG in osteoarthritic knee. *Osteoarthritis Cartilage.* 15: 673-81, 2007.
8. Yudoh K., Shishido K., Murayama H., Yano M., Matsubayashi K., Takada H., Nakamura H., Masuko K., Kato T. Water-soluble fullerene (C60) prevents degeneration of articular cartilage in osteoarthritis (OA): C60 downregulates catabolic activity of chondrocytes and inhibits degeneration of articular cartilage during the development of OA. *Arthritis Rheum.* 56:3307-18, 2007.
9. Yamakawa K, Yoshida K, Nishikawa H, Kato T, Iwamoto T. Comparative analysis of interindividual variations in the seminal plasma proteome of fertile men with identification of potential markers for azoospermia in infertile patien. *J Andrology.* 28: 858-65, 2007.
10. Masuko K, Murata M, Xiang Y, Nakamura H, Yudoh K, Nishioka K, Beppu M, Kato T. Tryptase enhances release of vascular endothelial growth factor from human osteoarthritic chondrocytes. *Clin Exp Rheumatol.* 25:860-65, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

名称：強皮症の診断方法、強皮症の診断薬及び強皮症診断マーカー

出願番号：特願 2006-3783

出願日：平成 18 年 1 月 11 日

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

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 患者の末梢血細胞において DNA チップ解析により見出された異常発現分子 1641 分子に対しカテゴリー解析とネットワーク解析を行ったところ、サイトカインネットワークの異常が描出された。このネットワークから $\text{INF}\alpha$ と TNF をはじめ複数のサイトカインの相互作用の存在が示唆された。患者ならびに健常人末梢血由来単核球を用いて、ネットワーク構成分子に対する $\text{INF}\alpha$ と TNF の相互作用をリアルタイム PCR で検討したところ、TNF は $\text{INF}\alpha$ の作用を競合的に抑制することがわかった。

A. 研究目的

SLE は従来の治療に抵抗例も多く、病態に基づいた新たな治療法の開発が望まれている。SLE の病態形成には種々のサイトカインの関与が報告されており、サイトカインの役割を明らかにすることは新たな治療法の開発につながる可能性がある。H17 年度から H18 年度の研究で、活動性のある SLE 患者の末梢血細胞における遺伝子発現について DNA チップを用いて解析し、健常女性に比べ発現が大きく異なる 24 分子を同定した。この中には $\text{INF}\alpha$ で誘導される分子が含まれ、 $\text{INF}\alpha$ の病態への関与が確認された。これらの分子は、エンドキサンパルス治療により発現が正常パターンに向かったことから、疾患活動性を反映していることも明らかになった。さらに、SLE 患者で健常女性と比べ発現に有意な差がみられた 1641 分子（増加：752、減少：889）を用いてカテゴリー解析とネットワーク解析を行ったところ、TNF、 $\text{INF}\gamma$ 、IL-4 や IL-13 を含むネットワークが描出され、これらのサイトカインネットワークに異常が示唆された。

今回、*in vitro* において上記のサイトカインの細胞内シグナル伝達に異常があるか否かを確認するため、患者末梢血由来単核球を用いてこれらのネットワークを構成する個々の分子の発現に対する TNF、 $\text{INF}\gamma$ 、IL-4、IL-13 の影響をリアルタイム PCR で検討した。また、 $\text{INF}\alpha$ との相互作用を検討した。

B. 研究方法

SLE 患者 7 例と健常人 3 例より得た末梢血単核球を TNF 20ng/ml の存在または非存在下で 24 時間培養し、細胞から RNA を抽出した。抽出した RNA を用いて、TNF ネットワークを構成し発現が亢進していた 12 分子 (IFIT1, IFIT3, IFIT5, IFITM1, ISG15, IRF7, IL1R2, OASL, IL8RA, FPR1, CLEC4E, BDKRB1) と低下していた 6 分子 (CD40, CD1c, PTGES, IL12B, CLU) について発現量を TaqMan PCR で測定した。その発現量を無刺激と比較し、TNF による発現誘導または抑制効果を検討した。さらに、TNF に対する反応性を健常人と比較した。次に、TNF 20ng/ml と $\text{INF}\alpha$ 1000 unit/ml との共存下で培養を行い上記分子の発現誘導における相互作用を検討した。

（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、被験者の文書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

TNF ネットワークを構成し発現が亢進していた 12 分子中 4 分子 (IL-1R2, FPR1, CLEC4E, BDKRB1) は SLE 患者で TNF 刺激により発現が増強された。ところが、刺激前健常人に比べ SLE 患者で発現が亢進していた IFIT3 については、健常

人では TNF 刺激により発現に変化は見られなかったが、SLE 患者ではむしろ発現が抑制された。一方、in vivo で低下していた分子 6 分子中 1 分子 CD1c は TNF により発現が抑制されたが、4 分子 (CD40, PTGES, CCR7, IL-12B) は in vitro における TNF 刺激で発現が誘導された。これらの分子の発現誘導について、SLE 患者と健常人間で有意な差は認めなかった。

TNF と IFN α との相互作用の検討では、IFN α は IFIT1, IFIT3, ISG15 の発現を増強したが、TNF 共存下では、その発現が抑制され、TNF と IFN α が競合することがわかった。

D. 考察

健常人と SLE 患者間で IFIT3 以外の分子について TNF 刺激に対する反応性の違いが認められなかったことから、細胞内シグナルの異常ではなく、TNF 以外のサイトカインの影響が示唆された。SLE 患者で発現が亢進していた IFIT3 に対して、in vitro においては、IFN α は発現を誘導し、TNF は発現抑制に働いており、IFN α と TNF の拮抗作用が考えられた。TNF 阻害治療中に見られる抗 DNA 抗体や抗核抗体、SLE 様症状の出現は、TNF による抑制作用が消されたことによる IFN α 刺激の増加によって説明できるかもしれない。

E. 結論

SLE の病態に IFN と TNF の相互作用が関与することが考えられる。

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. Ishizaki M, Sasada T, Kunitomi A, Konaka Y, Yagita M, Gunji S, Kanai M, Nishimoto N, Takabayashi A. Uneventful splenectomy and cholecystectomy in a patient treated with anti-interleukin-6 receptor antibody therapy. *Langenbecks Arch Surg.* 2007; Aug17 [Epub

ahead of print]

2. Nishimoto N. Interleukin-6 and Castleman's Disease. In: Micheael A Caligiuri, Micheal T. Lotze, eds. *Cancer Drug Discovery and Development: cytokines in the Genesis and Treatment of Cancer.*: Humana Press. 155-163, 2007.
3. Nishimoto N, Kishimoto T. Humanized Antihuman IL-6 Receptor Antibody, Tocilizumab. In: Chernajovsky Y, Nissim A, eds. *Therapeutic Antibodies. Handbook of Experimental Pharmacology*: Springer-verlag Berlin Heiderberg. 151-160, 2007.
4. Nishimoto N, Kishimoto T. Update on interleukin-6 In: Smolen J, Lipsky P, eds. *Contemporary Targeted Therapies in Rheumatology.*: London Martin Dunitz. 149- 158, 2007.
5. Nishimoto N, Hashimoto J, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Murata N, van der Heijde D, Kishimoto T. Study of active controlled monotherapy used for rheumatoid arthritis, an IL-6 inhibitor(SAMURAI):evidence of clinical and radiographic benefit from an X ray reader-blinded randomised controlled trial of tocilizumab. *Ann Rheum Dis.* 66:1162-1167, 2007.
6. Finotto S, Eigenbrod T, Karwot R, Boross I, Doganci A, Ito H, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Rose-John S, Galle PR, Neurath MF. Local blockade of IL-6R signaling induces lung CD4+ T cell apoptosis in a murine model of asthma via regulatory T cells. *Int Immunol.* 19:685-693, 2007.
7. 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.* 67:871-875, 2007.
8. Tanaka Y, Yamamoto K, Takeuchi T, Nishimoto N, Miyasaka N, Sumida T, Shima Y, Takada K, Matsumoto I, Saito K, Koike T. A multicenter

phase I/II trial of rituximab for refractory systemic lupus erythematosus. *Med Rheumatol.* 17:191-197, 2007.

2. 学会発表

1. 美馬亨、石川悟、青木千恵子、吉雄直子、中原英子、西本憲弘. DNA マイクロアレイとバイオインフォマティクスを用いた全身性エリテマトーデス (SLE) における機能異常の解析 第 51 回日本リウマチ学会総会・学術集会 パシフィコ横浜. 横浜.2007.4.26
2. Nishimoto N. IL-6 inhibitor The 16th International Rheumatology Symposium. Yokohama 2007.4.27
3. Hashimoto J, Garnero P, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Murata N, Yoshikawa H, Nishimoto N. Humanized Anti-Interleukin-6 Receptor Antibody (Tocilizumab) is Effective in Suppression of Radiographic Progression in Patients with Early Rheumatoid Arthritis, Regardless of Baseline Levels of The Predictors : SAMURAI STUDY. EULAR2007.Barcelona, Spain.2007.6.13-16
4. Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Azuma J, Kishimoto T. Long-Term Safety and Efficacy of Tocilizumab(an Anti-IL-6 Receptor Monoclonal Antibody)in Monotherapy, in Patients with Rheumatoid Arthritis. EULAR2007. Barcelona.Spain.2007.6.13-16
5. Tsuru T, Terao K, Suzaki M, Nakashima H, Amamoto T, Akiyama A, Kakehi T, Nishimoto N. Immune Response to Influenza Vaccine in Patients with Tocilizumab. EULAR2007. Barcelona, Spain. 2007.6.13-16
6. Yokota S, Imagawa T, Mori M, Ozawa R, Miyamae T, Ito S, Aihara Y, Nerome Y, Imanaka H, Takei S, Kawano Y, Iwata N, Tomiita M, Miyoshi M, Murata T, Umabayashi H, Nishimoto N, Kishimoto T. Efficacy and Safety in 48-Week Treatment of Tocilizumab in Children with Polyarticular Course Juvenile Idiopathic Arthritis with Polyarticular Course Juvenile Idiopathic Arthritis with Polyarticular or Oligoarticular Onset. EULAR2007. Barcelona, Spain. 2007. 6.13-16
7. Inaba Y, Ozawa R, Imagawa T, Miyamae T, Mori M, Nishimoto N, Kishimoto T, Saito T, Yokota S. Radiologic Improvement of Damaged Large Joints in Children with Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis Following Treatment with Tocilizumab, ANTI-IL-6 Receptor Monoclonal Antibody. EULAR2007. Barcelona, Spain. 2007. 6.13-16
8. Ishikawa S, Mima T, Aoki C, Yoshio-Hoshino N, Adachi Y, Imagawa T, Mori M, Tomita M, Iwata N, Murata T, Miyoshi M, Takei S, Aihara Y, Yokota S, Matsubara K, Nishimoto N. Bioinformatics Analysis of the Genes Abnormally Expressed in Patients with Juvenile Idiopathic Arthritis (JIA). EULAR2007. Barcelona, Spain. 2007.6.13-16
9. Yamanaka H, Nishimoto N, Inoue E, Hara M, Tomatsu T, Kamatani N. Incidence of Malignancies in Japanese Rheumatoid Arthritis Patients Treated with Tocilizumab in Comparison to Those in an Observational cohort of Japanese Patients and a Japanese Population Database. EULAR2007.Barcelona,Spain.2007.6.13-16
10. Yokota S, Imagawa T, Mori M, Ozawa R, Miyamae T, Ito S, Aihara Y, Nerome Y, Imanaka H, Takei S, Kawano Y, Iwata N, Tomiita M, Miyoshi M, Murata T, Umabayashi H, Nishimoto N, Kishimoto T. Efficacy and Safety of Tocilizumab in 48-week Treatment in Children with Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis. EULAR2007.Barcelona, Spain.2007.6.13-16
11. Nishimoto N, Adachi Y, Yoshio-Hoshino N, Aoki C, Mima T.Anti-IL-6 receptor antibody therapy for IL-6-related tumors such as malignant mesothelioma, multiple myeloma and Castleman's diseases.12th World Congress on Advances in Oncology and 10th International Symposium on

Molecular Medicine.Creta,Greece.2007.10.11-13

12. Hirano M, Hashimoto J, Tsuboi H, Nakahara H, Yoshio N, Yoshikawa H, Nishimoto N. Clinical and laboratory features after orthopedic surgery in tocilizumab-treating patients with rheumatoid arthritis.ACR2007.Boston,USA.2007.11.6-11.
13. Tsuru T, Terao K, Suzaki M, Nakashima H, Amamoto T, Akiyama A, Kakehi T, Nishimoto N. Immune Response to pneumococcal vaccine in Patients with Tocilizumab. ACR2007. Boston, USA. 2007.11.6-11.
14. Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Azuma J, Kishimoto T. Long-term Safety and Efficacy of Tocilizumab (anti-IL-6 Receptor Monoclonal Antibody)in Monotherapy, in Patients with Rheumatoid Arthritis. ACR2007. Boston,USA.2007.11.6-11.
15. 美馬亨, 石川悟, 青木千恵子, 吉雄直子, 李慧敏, 西本憲弘. DNA マイクロアレイとバイオインフォマティクスより特定された全身性エリテマトーデス (SLE) におけるサイトカインシグナルの異常. 第22回日本臨床リウマチ学会. 鹿児島 2007.11.30

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

CD20 抗体を用いた全身性エリテマトーデス治療の開発に関する研究

分担研究者 田中 良哉 産業医科大学医学部第一内科学講座 教授

研究要旨 全身性エリテマトーデス (SLE) は、多臓器病変を特徴とする自己免疫疾患であるが、保険収載されている治療はステロイド薬のみである。その発症と維持に於いて、B 細胞は抗原提示を担う stimulator、T 細胞依存性に自己抗体を産生する responder として重要な役割を担ことから、B 細胞と B 細胞表面抗原は治療標的として重要である。申請者らは、当該班の構成員を中心に GCP 準拠第 I / II 相臨床試験を実践し[全薬工業 (株) 主導]、有効性、副作用、HACA 産生などの問題点の検証を行い、さらにその作用機序に関して検討を行った。その結果、中～重度の flare を有する SLE に対して抗 CD20 抗体リツキシマブ療法を用いた第 I / II 相臨床試験を実施し、安全性と有効性が確認された。作用機序としては、B 細胞の除去による自己抗体産生、ひいては免疫複合体が関与する腎障害などを改善しえたものと考えられる。今回、リツキシマブ治療の長期的有効性と安全性を確認するために、2 年間の追跡調査を行い、これらの問題点の検証を行った。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス (SLE) は、多臓器病変を特徴とする自己免疫疾患であるが、保険収載されている治療はステロイド薬のみである。その発症と維持に於いて、B 細胞は中心的な役割を担ことから、B 細胞は治療の標的として重要である。これまで、当該班の構成員を中心に、既存の治療に抵抗性の SLE を対象に、B 細胞リンパ腫を対象に保険収載される B 細胞抗原 CD20 に対する抗体リツキシマブを用いた GCP 準拠第 I / II 相臨床試験を実践し[全薬工業 (株) 主導]、有効性、副作用を検討した。今回、リツキシマブ治療の長期的有効性と安全性を確認するために、2 年間の追跡調査を行い、これらの問題点の検証を行った。

B. 研究方法

リツキシマブ (IDEC-C2B8) の SLE を対象とした臨床第 I / II 相試験 (新 GCP 準拠) を実施した (全薬工業主導)。対象は、ACR 規準にて SLE と診断し、ステロイド (PSL 換算 ≥ 0.4 mg/kg/day) による治療にもかかわらず、中～重度の flare (BILAG カテゴリー A 症状を 1 つ以上、或いは、カテゴリー B 症状を 2 つ以上) を有する症例とした。主要評価

項目は安全性、副次的評価項目は有効性とした。悪性リンパ腫に用いる用法用量の安全性・忍容性について検討後 (5 例)、欧米に於ける SLE 対象の用法用量の安全性・認容性を検討した (10 例)。さらに、リツキシマブ治療の長期的有効性と安全性を確認するために、2 年間の追跡調査を行った。

(倫理面への配慮)

臨床検体を使用する場合には、所属機関の倫理委員会、或は、IRB で承認を得た研究に限定し、患者からインフォームドコンセントを得た上で、倫理委員会の規約を遵守し、所属機関の現有設備を用いて行う。患者の個人情報が入所機関外に漏洩せぬよう、試料や解析データは万全の安全システムをもって厳重に管理し、人権擁護に努めると共に、患者は、経済的負担を始め如何なる不利益や危険性も被らない事を明確にする。

C. 研究結果

(1) 24 週間経過観察期間中は、リツキシマブ 500 mg/kg x4 群、1000 mg/kg x2 群とも重篤な有害事象はなかった。注射時反応については、浮腫や倦怠感等が認められたが、一過性で軽微であった。

(2) 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。(3) HACA は、7 例中 3 例で陽性であった。(4) 生化学検査に有意な異常を認めず、また、血清自己抗体値は減少傾向、血清補体価は上昇傾向にあったが、血清 IgG, IgA, IgM 値は不変であった。(5) 28 週目までの有効性評価としては、14 例中 2 例が Major clinical response、7 例が Partial clinical response を示した。(6) 追加調査期間中、14 例中 7 例は 24 週以降疾患活動性が徐々に改善傾向を呈した。BILAG スコアは平均 12.5 (n=14) から、2 年後に 4.6 (n=12) にまで改善した。3 例は BILAG スコア 0 にまで改善した。2 年後に 5 例が major clinical response (MCR)、6 例が partial clinical response (PCR)、1 例は non-response (NR) であった。(7) 平均ステロイド量はプレドニゾン換算 25.2mg から 7.7mg に減量した。14 例中 6 例で再燃したためリツキシマブの再投与、うち 2 例では再々投与を行った。再投与 6 例中 3 例、再々投与 2 例は、第 I/II 相試験で HACA 産生が確認され、2 例では再投与時に重度の infusion reaction を呈した。再投与後 28 週目の評価では、6 例中 3 例が PCR を示した。(8) 2 年間の経過中、7 例で重篤な有害事象を認めた。うち、2 例は死亡、1 例は横断性脊椎炎であった。(9) 死亡 1 例目は、リツキシマブ投与 7 月後に薬剤アレルギーによる血球貪食症候群と脳出血を伴い、脳ヘルニアで死亡 (因果関係は否定的)。2 例目は、再投与 7 ヶ月後に無菌性髄膜炎と急性肺血栓塞栓症を発現し、劇症型 APS で死亡 (因果関係は否定できず)。横断性脊髄炎の 1 例は、再投与約 1 月後に発症。再投与時に HACA の産生と、強い infusion reaction の発現を認めた。(10) 3 症例とも抗リン脂質抗体症候群 (APS) を合併し、後者 2 例では、再投与による治療と HACA の出現を共通所見として認めた。

D. 考察

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、2 年間の追加調査を行い、効果不応症例の存在、抗キメラ抗体の問題、抗リン脂質抗

体症候群併発例に於ける血栓症の問題などが浮上した。特に、再投与に伴う有害事象発現の共通事項として APS 合併が挙げられ、APS 合併例ではリツキシマブ再投与に伴う infusion reaction の発現時に補体活性化やサイトカイン産生による血栓形成が促進した可能性が考えられる。また、進行性多巣性白質脳症の併発についても留意すべきである。今後、多数症例に於いて、長期的な有効性、再燃、再投与の問題などを検証する必要があると再認識された。

E. 結論

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た。現在、臨床第 II/III 相臨床試験を実施中であるが、多くの症例で長期的な有効性、寛解導入、再燃、再投与の問題などを検証する必要がある。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsujimura S, Saito K, Nawata M, Nakayamada S, Tanaka Y. Overcoming drug resistance induced by P-glycoprotein on lymphocytes in patients with refractory rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. in press
2. Tanaka Y. B cell-targeting therapy using anti-CD20 antibody rituximab in inflammatory autoimmune diseases. Internal Medicine. in press
3. Tanaka Y, Yamamoto K, Takeuchi T, Nishimoto N, Miyasaka N, Sumida T, Shima Y, Takada K, Matsumoto I, Saito K, Koike T. A multi-center phase I/II trial of rituximab for refractory systemic lupus erythematosus. Mod Rheumato. 17:191-197, 2007.
4. Tokunaga M, Saito K, Kawabata D, Imura Y,

Fujii T, Nakayamada S, Tsujimura S, Nawata M, Iwata S, Azuma T, Mimori T, Tanaka Y. Efficacy of rituximab (anti-CD20) for refractory systemic lupus erythematosus involving the central nervous system. Ann Rheum Dis. 66:470-475, 2007.

5. Nakayamada S, Saito K, Nakano K, Tanaka Y. $\beta 1$ integrin transduces an activation signal in T cells of patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 56:1559-1568, 2007.
6. Sawamukai N, Saito K, Yamaoka K, Nakayamada S, Ra C, Tanaka Y. Leflunomide inhibits PDK1/Akt pathway and induces apoptosis of human mast cells. J Immunol. 179: 6479-84, 2007.
7. Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, Tanaka Y. Relevance of multidrug resistance 1 and P-glycoprotein to drug resistance in patients with systemic lupus erythematosus Histol Histopathol. 22:465-468, 2007.

2. 学会発表

1. Tanaka Y. An emerging strategy for the treatment of SLE: Can B-cell-targeting biologics break through the treatment? The 1st Lupus International Symposium: Clinical Science (シンポジウム), Seoul. 平成 19 年 5 月 21-22 日
2. Tanaka Y, Tokunaga T, Nawata M, Suzuki K, Iwata S, Yamaoka K, Nakayamada S, Saito K. Long-term Benefits of Rituximab (Anti-CD20) for Refractory Systemic Lupus Erythematosus. Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2007, Barcelona. 平成 19 年 6 月 13-17 日
3. Tanaka Y, Tokunaga M, Nawata M, Suzuki K, Iwata S, Yamaoka K, Saito K. Long-term follow up of rituximab (anti-CD20) therapy for refractory systemic lupus erythematosus. The 71st National Meeting of

American college of Rheumatology, Boston.
平成 19 年 11 月 6-11 日

4. 田中良哉. SLE の新規治療への挑戦 ~薬物抵抗性の克服と新規生物学的製剤の導入~. 第 51 回日本リウマチ学会総会学術集会 (シンポジウム) 横浜. 平成 19 年 4 月 26-29 日
5. B 細胞を標的とした炎症性免疫疾患の制御. 第 28 回日本炎症・再生医学会 (シンポジウム) 東京. 平成 19 年 8 月 2-3 日
6. 田中良哉. B 細胞. 第 35 回日本臨床免疫学会総会 (シンポジウム) 東京. 平成 19 年 10 月 19-20 日
7. 田中良哉. 抗 CD20 抗体による治療 ~基礎から臨床での新展開まで~. 第 57 回日本アレルギー学会総会 (シンポジウム) 横浜. 平成 19 年 11 月 1-3 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
 - 1) Fas 抗原発現増強剤 (特許出願番号: 特開 2003-171282)
 - 2) Akt シグナル経路の活性化阻害を目的として使用するレフルノミド (特願 2005-81972)
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

RNA スプライシング異常による SLE 発症機序の解明と新規治療法の開発

分担研究者 江口 勝美 長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科展開医療科学講座 教授

研究協力者 蒲池 誠 長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科展開医療科学講座 客員研究員

研究要旨 リンパ球活性化に伴う生理的 RNA スプライシング変化(caspase-8 の splice variant : SV の発現低下)はスプライシング因子 (SR 蛋白質) の生理的リン酸化や細胞周期の進展に伴うことを報告してきた。抗原やサイトカイン刺激は RNA スプライシング変化や細胞周期の進展を誘導するが、細胞周期制御因子(CDKs/cyclin 複合体)は細胞周期の進展制御だけでなく SR 蛋白質のリン酸化を介して RNA 転写や RNA スプライシングにも影響を及ぼすことが最近明らかにされつつある。一方ウイルス感染では非生理的な RNA スプライシング変化が誘導される。このような非生理的 RNA スプライシング誘導の特異的阻害はスプライシング被誘導細胞に対して選択毒性を示すことから、この選択毒性を利用してウイルス感染細胞を排除する試みがなされている。しかし、生理的 RNA スプライシング変化は基本的には可逆的であるため、生理的な変化を阻害しないような modality を有する制御方法を適用する必要がある。そこで RNA スプライシングと CDKs/cyclin 複合体の生理的制御を意図して、ミゾリビン(MZR)を用いた RNA スプライシング調節を試みた。MZR は関節リウマチや SLE の治療に用いられているがその免疫抑制作用機序として核酸(DNA-RNA)合成阻害作用によるリンパ球増殖抑制効果が知られているが、今回はこれらの古典的免疫作用機序以外の MZR の薬理作用の探求を行った。その結果、MZR は CDKs/cyclin 複合体や CDK の生理的インヒビターの発現を調節して細胞周期の進展を制御しているだけでなく、スプライシング因子(SR 蛋白質)のリン酸化を制御して caspase-8 の SV 発現を調節する作用を有することが明らかとなった。これらの調節作用は抗原刺激が減弱した寛解維持療法で有効に発揮されることが示唆された。

A. 研究目的

Caspase-8 の full activation はアポトーシスを誘導するが、limited activation は免疫の活性化に関与する(Chun HJ, 2002)。Caspase-8 の limited activation がシグナル伝達経路依存性に RNA スプライシングにより誘導されること、active な SLE では caspase-8 の splice variant (SV) の発現が低下しており(RT-PCR)治療経過(SLEDAI の改善)に従って SV の発現が回復することを報告し(蒲池誠、江口 勝美等、日本免疫学会 2007、日本リウマチ学会 2007)、caspase-8 の RNA スプライシング制御による SLE の新規治療法を模索してきた。Caspase-8 の RNA スプライシング制御をスプライシング因子(SR 蛋白質)

の kinase の特異的阻害剤(ATP 結合部位の競合阻害剤)を用いて実施したが、PPBMC の実験系では RNA スプライシング制御が困難だった。そこで、薬剤により誘導される toxicity を最小にしつつスプライシング因子のリン酸化制御と CDKs /cyclin 複合体活性の生理的制御を意図した。寛解維持療法において極めて副作用の少ないことが臨床的に確認されているミゾリビン(MZR : 核酸 (DNA, RNA) 合成阻害剤)を用いて caspase-8 の RNA スプライシング制御を試みた。RNA スプライシング制御機序に関与する薬理作用の解明を旭化成ファーマからの受託研究として行った(受託研究者：蒲池誠)。

B. 研究方法

健康人リンパ球をPMAで刺激してcaspase-8のSVの発現をdownregulateしactiveなSLEと同様の状態にした。リンパ球刺激が減弱した寛解維持療法の状態を模して、PMAのwash outすることによりリンパ球刺激を減弱させ、その後MZR(0.3~30 μ g/ml)を加えて培養を継続し(24~72時間)caspase-8のSV発現(RT-PCR)、CDKs/cyclin複合体の発現(WB)、splicing因子のリン酸(WB)、を解析してMZRのスプライシング制御に関する作用機序を検討した。

(倫理面への配慮)

対象者にはあらかじめ本研究の目的と方法を十分に説明し同意を得た。遺伝子解析についてもプロトコルを長崎大学遺伝子解析倫理委員会に提出し承認を得た(許可番号:0502020074, RNAスプライシングによる自己免疫疾患発症機序の解明と新規治療法の開発)。

C. 研究結果

1)Caspase-8のRNAスプライシング制御:PMA刺激はcaspase-8のSV発現をdownregulateし、擬似血漿交換はSV発現を軽度回復させたが、MZR追加投与により容量依存性にSV発現がさらに回復した(RT-PCR)。MZR(1.0 μ g/ml)でcaspase-8のSV発現が時間依存性に回復した(RT-PCR)。

2)DNA合成阻害:PMA刺激によりRbがリン酸化されたが擬似血漿交換によりRbのリン酸化が消失した(WB)。MZRを追加投与することによりRbの蛋白質発現が容量依存性に低下した(WB)。

3)CDKs/cyclin複合体の発現調節:PMA刺激でcyclin B, Eの発現が増加したが、擬似血漿交換+MZRでcyclin B, Eの発現が有意に低下した。

4)P27(CDKsの生理的インヒビター)の発現調節:p27はPMA刺激で顕著に低下した。P27の発現回復は擬似血漿交換では軽度で、MZR追加投与で発現が顕著に回復した(WB)。

5)SR蛋白質のリン酸化レベル変化:PMA刺激により

SR蛋白質のリン酸化が促進するが、擬似血漿交換+MZRによりSR蛋白質のリン酸化レベルが減少した(WB)。

D. 考察

今回の解析により擬似血漿交換+MZR投与はCDKs/cyclin複合体の発現を変化し、caspase-8のRNAスプライシング制御に寄与することが明らかとなった。G1からS期への細胞周期の進展にはCDK2/cyclin Eの活性化が必須である。Cyclin Eの発現量低下はG1~S期への細胞周期の進展阻止に寄与すると考えられた。CDK1/cyclin BはG2後期から活性化してM期への進展に寄与するが、cyclin Bの発現低下はG2~M期への進展阻止に寄与すると考えられた。CDK1やCDK2の発現量に著明な変化は見られなかったがMZR投与によりCDK1, CDK2の生理的インヒビターであるp27の発現が増加したことは、MZRはCDK1, CDK2自体に対しても抑制的に作用することが示唆された。CDK1にはSR蛋白質をリン酸化してRNAスプライシング制御に関与することからCDK1とカップリングするcyclin Bの発現低下はcaspase-8のスプライシング制御に関与することが示唆された。MZR投与によりp27の発現が顕著に回復したことはMZRによるCDKs/cyclin複合体の活性制御が極めて生理的に行われていることを示唆している。このような生理的制御を支持しているメカニズムが他に存在すると思われ、今後はその解明を行う必要がある。

E. 結論

MZRはリンパ球刺激が減弱した寛解維持療法では細胞周期制御因子の発現やその蛋白質活性を調節することが明らかとなった。このような作用はcaspase-8のスプライシング調節作用を生み出すことが示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kamachi M, Eguchi K et al. Activation of protein phosphatase causes alternative splicing of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): potential effect on immune surveillance. *Biochem Biophys Res Commun.* 360:280-285, 2007.

2) Iwanaga N, Kamachi M, Eguchi K et al. Membranous glomerulonephritis and non-Hodgkin's lymphoma in a patients with primary Sjögren's syndrome. *Internal Med.* 46:191-194,2007.

3) Humg M, Ida H, Arima K, Kamachi M, Eguchi K et al. La autoantigen translocates to cytoplasm after cleavage during granzyme B-mediated cytotoxicity. *Life Science.* 81:1461-1466, 2007.

総説

1) 蒲池 誠、江口勝美 細胞内シグナル伝達を介した alternative splicing の誘導：その生物学的意義と制御メカニズム、*日本炎症再生医学会雑誌*,27(6):575-578,2007

2) 蒲池 誠、江口勝美 SR蛋白質のリン酸化、脱リン酸化と alternative splicing 制御—SLE(全身性エリテマトーデス)における病態的意義と新規治療法への展望—、*リウマチ科*,38(2):109-112,2007.

2. 学会発表

1) Makoto Kamachi, Katsumi Eguchi, et al. Importance of intra- and intercellular signaling pathways in dual activation of NF- κ B and CDKs/Cyclin complexes associated with mRNA splicing (oral) (2007年 日本免疫学会総会・学術記録集 第37巻 p146, 2-C-W22-6-O/P)

2) 蒲池 誠、江口勝美等 免疫細胞間ネットワークを介した刺激により誘導される caspase-8,CD28, CTLA-4 の alternative splicing の抑制とサイトカイン産生及びヒト T リンパ球活性化の検討(oral) 2007年 第51回日本リウマチ学会総会・学術集会プログラム・抄録集 p257

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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻	頁	出版年
<u>Yamamoto K</u> , <u>Yamada R</u> .	Lessons from a Genomewide Association Study of Rheumatoid Arthritis.	N Engl J Med	357	1250-51	2007
Yamaguchi Y, Fujio K, Shoda H, Okamoto A, <u>Yamamoto K</u>	IL-17B and IL-17C are associated with TNF-alpha production and contribute to the exacerbation of inflammatory arthritis.	J Immunol.	179	7128-36	2007
<u>Yamamoto K</u> , Okamoto A, Fujio K.	Antigen-specific immunotherapy for autoimmune diseases.	Expert Opin. Biol. Ther.	7	359-67	2007
Fujio K, Okamura T, Okamoto A, <u>Yamamoto K</u> .	T cell receptor gene therapy for autoimmune disease.	Ann N Y Acad Sci.	1110	222-32	2007
Bohgaki T, <u>Atsumi T</u> , Koike T.	Autoimmune disease after autologous hematopoietic stem cell transplantation.	Autoimmun Rev		in press	
Kataoka H, Atsumi T, Hashimoto T, Horita T, Yasuda S, Koike T.	Polymyalgia rheumatica as the manifestation of unclassified aortitis.	Mod Rheumatol		in press	
<u>Atsumi T</u> , Horita T, Minori T, Koike T.	Exchange of information in Rheumatology between East and West : From Man'yo-shu to the Future.	Arthritis Rheum		in press	
Kon Y, <u>Atsumi T</u> , Hagiwara H, Furusaki A, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Amengual O, Takao K.	Thrombotic microangiopathy in patients with phosphatidylserine dependent antiprothrombin antibodies and antiphospholipid syndrome.	Clin Exp Rheumatol		in press	
Koike T, <u>Atsumi T</u> .	"Resurrection of Thrombin" in the pathophysiology of the antiphospholipid syndrome.	Arthritis Rheum	56	393-4	2007
Amengual O, <u>Atsumi T</u> , Komano Y, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Koike T.	A polymorphism in the Human Platelet Antigen 6b represents a risk factor for thrombocytopenia in patients with systemic lupus erythematosus.	Arthritis Rheum	56	2803-9	2007
Horita T, Ichikawa K, Kataoka H, Yasuda S, <u>Atsumi T</u> , Koike T.	Human monoclonal antibodies against the complex of phosphatidylserine and prothrombin from patients with the antiphospholipid syndrome.	Lupus	16	509-16	2007
Yasuda S, Stevens RL, Terada T, Horita T, Kataoka H, Takeda M, Fukae J, <u>Atsumi T</u> , Koike T.	Defective Expression of Ras Guanine Nucleotide Releasing Protein 1 in a Subset of Patients with Systemic Lupus Erythematosus.	J Immunol	179	4890-900	2007
Koike T, Bohgaki M, Amengual O, <u>Atsumi T</u> .	Antiphospholipid antibodies: lessons from the bench.	J Autoimmun	28	129-33	2007
<u>Atsumi T</u> .	Therapeutic targets for antiphospholipid syndrome.	Blood	110	4141	2007