

添付資料 2

項目	内容
評価・解析方法	<p>副腎皮質ステロイド薬のみによる初期治療が行われた症例よりなる Historical control 群のデータを下記「パート B : Historical control 群データ収集」実施計画の要約に記載したとおり別途抽出し、パート A におけるデータと比較することにより、副腎皮質ステロイド薬およびタクロリムスの併用療法の本疾患における治療的位置づけを検討する。</p> <p>データ比較においては、上記主要評価項目および副次的評価項目に関し、パート A の初発例とパート B (こちらは初発例を対象としている) との比較を行う。特に Overall survival および Progression-free survival の比較はログランク検定を用いて行う。また、パート B の総症例数に基づき、補正すべき予後因子に関しマッチングを行う。マッチング手法としては propensity score を用いることを検討するが、パート B のデータを勘案の上、統計アドバイザーと治験調整医師によりマッチング手法の最終決定を行う。パート A の初発例にパート B を上述のようにマッチングさせ、両側 5% で有意差を出すことを目標とする。</p>

添付資料 2

「パート B: Historical control 群データ収集」実施計画の要約

項目	内容
目的	副腎皮質ステロイド薬のみによる初期治療が行われた症例よりなる Historical control 群のデータを用い、タクロリムスと副腎皮質ステロイド薬併用療法の本疾患における治療的位置づけを検討する。
デザイン 対象期間	Historical control 群データ抽出にあたっての selection bias、およびパート A データとの比較検討において non-contemporaneous control bias を最小限に抑えるために、各治験実施医療機関において 2000 年 1 月 1 日以降で本治験 IRB 承認までの間に、本疾患の初発に対しての初期治療として副腎皮質ステロイド薬が他の免疫抑制薬との併用なしに少なくとも 2 週間以上投与された症例をまず網羅するために同意を取得し、そのうち Control 群としての治療法基準を満たし、またパート A の主な選択基準に適合し除外基準に抵触しない全症例において、副腎皮質ステロイド薬開始 52 週後までのデータを抽出する。
選択基準	<p>(1) Bohan and Peter による診断基準^{1, 2}において、PM または DM の「probable」または「definite」の基準を満たす、または Sontheimer により提案された定義 (Sontheimer, 2002 85 /id) により CADM と分類される (ただし発病からの期間は問わない)</p> <p>(2) 肺 CT (副腎皮質ステロイド薬投与開始前 6 週 (42 日) 以内に得られたもの) (できる限り肺高分解能 CT が望ましい) が、以下にあげた特徴的な所見をとり (すべての所見を持つ必要はない)、放射線科医により IP の診断に合致するとされる。ただし、肺 CT 所見として浸潤影 (コンソリデーション) のみを呈する症例は、既に肺生検により BOOP 以外の IP 病理組織型が認められた場合を除いて除外する。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 両側性で中下肺野を中心とした胸膜直下の陰影分布 ・ 網状線状影 ・ 蜂巣肺 ・ 牽引性気管支炎・細気管支拡張 ・ すりガラス陰影 ・ 均等影 (コンソリデーション) <p>(3) 以下の (ア) を満たし、更に (イ)、(ウ)、(エ) または (オ) の少なくとも一つを満たす ((ア)、(イ)、(ウ) および (エ) は下記 (4) 該当副腎皮質ステロイド薬投与開始前 2 週 (14 日) 以内に得られた所見より判断する)</p> <ul style="list-style-type: none"> (ア) 血清 KL-6 値が基準範囲上限を超える (イ) Mahler Baseline Dyspnea Index の「問 2」で「2」以下の労作時呼吸苦の存在 (ウ) 動脈血ガス分析における PaCO₂ 上昇を伴わない PaO₂ の低下 (<80mmHg) (エ) 呼吸機能検査において %VC<80 または %DLCO<65 (オ) 下記 (4) 該当副腎皮質ステロイド薬投与開始前 12 週 (84 日) 以内に、以下のいずれかを認める <ul style="list-style-type: none"> ① 吸機能検査において、%VC または %DLCO の 1 割以上の増悪 ② 胸部 CT における間質性肺炎所見の明らかな増悪 (放射線科医による) <p>(4) 病歴・経過中、本疾患が (3) を初めて満たした期日以降に、本疾患の治療目的でプレドニゾロン換算で 0.6mg/kg/日以上 1.0mg/kg/日以下の副腎皮質ステロイド薬が 14 日以上投与された (ステロイドパルス療法は本基準該当副腎皮質ステロイド薬投与開始後 28 日目までであれば 2 回まで施行可)</p> <p>(5) 上記 (4) 該当副腎皮質ステロイド薬投与開始日が 2000 年 1 月 1 日以降で本治験 IRB 承認までの期間である</p> <p>(6) 上記 (4) 該当副腎皮質ステロイド薬投与開始日における年齢が、満 16 歳以上満 75 歳未満</p>

添付資料 2

項目	内容
除外基準	<p>(1) 選択基準 (4) 該当副腎皮質ステロイド薬投与開始前 12 週 (84 日) および開始後 2 週 (14 日) 以内に副腎皮質ステロイド薬以外の免疫抑制薬が投与された</p> <p>(2) 薬剤性間質性肺炎 (抗生剤、漢方薬、抗癌剤、メトトレキサートなど)、塵肺 (アスベスト、珪肺など)、過敏性肺炎 (夏型、鳥飼病など)、放射性肺炎を、臨床的に否定・除外できない</p> <p>(3) 選択基準 (4) 該当副腎皮質ステロイド薬投与開始前 12 週 (84 日) 以内または開始後 2 週 (14 日) 以内に行われた呼吸機能検査において (行われた場合のみ)、%VC<45、%DLCO<30、または肺高分解能 CT において蜂巣肺のみを呈した</p> <p>(4) 選択基準 (4) 該当副腎皮質ステロイド薬投与開始日に、肺炎を有した</p> <p>(5) 選択基準 (4) 該当副腎皮質ステロイド薬投与開始日に、糖尿病を有した (ただし、その原因が副腎皮質ステロイド薬によると考察され、コントロール良好 (HbA1c が 6.5%未満) である場合を除く)</p> <p>(6) 選択基準 (4) 該当副腎皮質ステロイド薬投与開始日に、<u>血清クレアチニン値が 1.5mg/dL 以上</u></p> <p>(7) 選択基準 (4) 該当副腎皮質ステロイド薬投与開始日に、<u>肝機能障害 (AST(GOT)または ALT(GPT)が測定機関の基準範囲上限の 2.5 倍以上)</u>を有した (ただし、その原因が筋炎によると考察され、筋逸脱酵素値の上昇も認められる場合を除く)</p> <p>(8) 選択基準 (4) 該当副腎皮質ステロイド薬投与開始日に、<u>高カリウム血症 (血清カリウム値が測定機関の基準範囲上限を超える)</u>を有した</p> <p>(9) 選択基準 (4) 該当副腎皮質ステロイド薬投与開始日に、虚血性心疾患、加療を要する不整脈、心不全の合併およびその既往、加療を要する肺高血圧症を有した</p> <p>(10) 選択基準 (4) 該当副腎皮質ステロイド薬投与開始日に、悪性腫瘍の合併およびその既往を有した (ただし、5 年以上治療が行われず、再発が認められない症例を除く)</p> <p>(11) 選択基準 (4) 該当副腎皮質ステロイド薬投与開始日に、重篤な感染症を有した (抗 HIV 抗体、HBs 抗原または抗 HCV 抗体陽性患者を含む)</p> <p>(12) その他、治験責任医師または治験分担医師が参加を医学的根拠から不適当と判断する</p>
目標症例数	<p>本治験実施医療機関における対象全症例を網羅し、うち上記選択基準に適合し除外基準に抵触しない全症例におけるデータ抽出を行うものである。</p>
データ抽出対象症例	<p>治験責任医師は、各実施医療機関において選択基準に適合し除外基準に抵触しない全症例を網羅するための再現性のある方法を考案し、「データ抽出方法」に記載する。そしてその方法に従い、該当症例全例を同定し、「データ抽出対象症例リスト」に患者名および医療機関カルテ番号を記載する。記載したすべての症例が同意取得の対象となる。治験責任医師等は同意を取得した場合、同意取得の時点で「登録」となり、同意取得日を記載し、被験者識別コードを設定し、データを抽出する。治験責任医師等は、同意取得に至らなかった症例については、その理由を「データ抽出対象症例リスト」に記載する。また、同意取得後に選択基準に適合しないまたは除外基準に抵触することが判明した症例については、不適格であることとその理由を「データ抽出対象症例リスト」に記載する。</p>
同意取得方法	<p>治験責任医師等は同意説明文書を用いて、以下に従って文書により自由意思による同意を得る。</p> <p>(ア) 患者が 20 歳以上の場合：患者本人</p> <p>(イ) 患者が 16 歳以上 20 歳未満の場合：患者本人および代諾者となるべき者</p> <p>(ウ) 患者が既に死亡している場合：代諾者となるべき者^{注)}</p> <p>(エ) 患者が、または患者が既に死亡している場合は該当者^{注)}が、転居その他の理由で接触できず同意取得が不可能な場合：理由を「データ抽出対象症例リスト」に記載し、データ抽出は行わない</p> <p>注) 同意取得時に既に死亡している患者においては、代諾者に対し同意説明文書を用いて説明を行い同意を得ることとする。その際、治験責任医師等は、患者の家族構成や置かれていた状況、慣習等を勘案して、以下に定める者の中から患者の生前の意思を代弁できると考えられる者を代諾者として選定することを基本とする。</p> <p>患者の配偶者、成人の子、父母、成人の兄弟姉妹若しくは孫、祖父母、同居の親族またはそれらの近親者に準ずると考えられる者</p>

項目	内容
抽出対象データ	<p>(1) 被験者背景 診療録から、また直接被験者より診察時または電話等で問い合わせ、症例報告書に記載する。なお、治療薬に関しては、名称、投与理由、用法用量、投与経路、投与開始日および終了日を可能な限り聴取し、症例報告書に記載する。</p> <ul style="list-style-type: none"> ◇ 被験者の基礎疾患 (PM・DM・CADM) の病歴 (初めてその症状が出現した時期、同疾患と診断された時期、治療歴、既往歴、合併症他) ◇ 被験者の IP の病歴 (初めてその症状が出現した時期、同疾患と診断された時期、治療歴、既往歴、合併症他) ◇ 基礎疾患 (PM・DM・CADM)・IP 以外の既往歴・合併症・服用薬剤 ◇ 生活歴 (喫煙・飲酒) <p>(2) 一般理学的所見など 治験責任医師等は以下情報が診療録に存在する場合にはそこから入手し、症例報告書に記載する。</p> <p style="margin-left: 2em;">身長・体重： 身長、体重</p> <p style="margin-left: 2em;">一般理学的所見： 血圧、脈拍数、呼吸数、体温、酸素飽和度</p> <p>(3) Mahler Baseline/Transition Dyspnea Index 選択基準 (4) 該当副腎皮質ステロイド薬投与開始 14 日前 (最も同薬投与開始日に近い検査が同薬投与開始 14 日以上前の場合には最高 28 日前まで許容する) より投与開始 52 週後までの間に行われた場合にその結果を症例報告書に記載する。</p> <p>(4) 治療薬 選択基準 (4) 該当副腎皮質ステロイド薬投与開始 52 週後までの同薬投与量、および同薬投与開始 12 週 (84 日) 前より投与開始 52 週後までのその他の免疫抑制薬の使用につき、名称、用法用量、投与経路、投与開始日および終了日などに関する情報を可能な限り入手し症例報告書に記載する。</p> <p>(5) 血清免疫学的検査他： ① 白血球数、白血球分画、CPK、アルドラーゼ、ミオグロビン、HbA1c、KL-6、SP-D、IgG、β-D グルカン 選択基準 (4) 該当副腎皮質ステロイド薬投与開始 14 日前 (最も同薬投与開始日に近い検査が同薬投与開始 14 日以上前の場合には最高 28 日前まで許容する) より投与開始 52 週後までの間に測定された場合にその結果を症例報告書に記載する。</p> <p>② 抗 Jo-1 抗体 選択基準 (4) 該当副腎皮質ステロイド薬投与開始前 28 日 (最も同薬投与開始日に近い検査が同薬投与開始 28 日以上前の場合には最高 84 日 (12 週) 前まで許容する) または開始後 14 日以内に採取された血液より測定された場合に限り、結果を症例報告書に記載する。</p> <p>(6) 肺 CT (できる限り肺高分解能 CT が望ましい) 選択基準 (4) 該当副腎皮質ステロイド薬投与開始 14 日前 (最も同薬投与開始日に近い検査が同薬投与開始 14 日以上前の場合には最高 28 日前まで許容する) より投与開始 52 週後までの間に撮影された肺 CT につき、フィルムまたはデジタル化画像データを治験中央事務局が回収し、肺 CT 解析機関に送付する。</p> <p>(7) 呼吸機能検査および動脈血ガス分析値 選択基準 (4) 該当副腎皮質ステロイド薬投与開始 14 日前 (最も同薬投与開始日に近い検査が同薬投与開始 14 日以上前の場合には最高 28 日前まで許容する) より投与開始 52 週後までの間に行われた呼吸機能検査結果を症例報告書に記載する。</p> <p>(8) 入退院の記録</p> <p>(9) 感染症情報 (発症時期、診断方法、治療法および転帰)</p> <p>(10) 生存情報</p>

項目	内容
データ集計・解析	<p>パートAで用いる主要評価項目および副次的評価項目に関するデータをパートBにおいても算出し、パートAのデータと比較検討する。特に副次的評価項目のProgression-free survivalに関し、複合Endpointである「増悪（"Progression"）」は、この場合以下のように定義する（変更部分は下線で提示）。パートBにおいては免疫抑制薬の追加において、パートAでの併用禁止薬使用に関する参考基準（特に呼吸機能検査所見に関して）は存在しないため、パートAにて組織されるEndpoint評価委員会により免疫抑制薬追加使用にあたって「2. ①」と同等以上の増悪があったか否かにつき判断を行う。</p> <p>Historical control 群症例における「増悪（"Progression"）」の定義</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 死亡 または 2. 増悪：以下の①、②、③の全てを満たす症例、または①を満たさないが②および③を満たし「IPの増悪」の判断のもと以下^{注)}の治療法が使用された症例でEndpoint評価委員会が①と同等以上の増悪であると判定する場合 <ol style="list-style-type: none"> ① 次のいずれかまたは両方を満たす <ol style="list-style-type: none"> a. %FVC における選択基準 (4) 該当副腎皮質ステロイド薬投与開始前値からの10%以上の低下 b. 安静時 P[A-a]O₂ における選択基準 (4) 該当副腎皮質ステロイド薬投与開始前値からの15mmHg 以上の上昇 ② 胸部 CT における間質性肺炎所見の明らかな増悪（直近のものとの比較） （放射線科医による） ③ ニューモシスチス肺炎、サイトメガロウイルス肺炎などの感染症を臨床的に除外・否定できる <p>注) 以下のうちいずれかが使用された場合。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 副腎皮質ステロイド薬以外の免疫抑制薬 ・ ステロイド大量療法 <ul style="list-style-type: none"> ➢ パルス療法：選択基準 (4) 該当副腎皮質ステロイド薬投与開始後 29 日目以降 ➢ プレドニゾン換算で 1mg/kg/day 超の副腎皮質ステロイド薬の投与（パルス療法に関しては 7.3(1)-④に定める通りである） ・ 大量免疫グロブリン療法 ・ 血漿交換療法

全身性エリテマトーデスモデルマウスにおける Fcレセプターと単球由来樹状細胞に関する研究

分担研究者 天野 浩文 順天堂大学医学部膠原病・リウマチ内科 准教授

研究要旨 【目的】BXSBマウスは、SLE類似の腎症発症に伴い末梢血で単球増加と単球分画の変化が生じる。我々は、刺激性Fcレセプターを欠くBXSB γ 鎖欠損マウス（BXSB $\gamma^{-/-}$ ）での末梢血単球について解析した。【方法】1)末梢血のGr-1⁺とGr-1⁻単球分画についてフローサイトメトリーで解析した。2)Gr-1⁺単球分画細胞を分離しGM-CSF存在下で培養した。3)OVA特異的T細胞の増殖反応について解析した。【結果】BXSB $\gamma^{-/-}$ マウスでは、1)明らかな単球増加抑制を認め、Gr-1⁻分画で顕著であった。2)Gr-1⁺からGr-1⁻単球分画へ、更に樹状細胞(DC)への分化が抑制された。3)OVA特異的T細胞の増殖反応が抑制された。【結論】BXSB $\gamma^{-/-}$ マウスでは、末梢血のGr-1⁻分画の増加が抑制され、更にDCへの分化とT細胞の増殖反応を抑制することで、SLEの病態を制御していると考えられた。

A. 研究目的

BXSBマウスは、全身性エリテマトーデス(SLE)類似の自己免疫疾患の発症に伴い末梢血において単球増加と単球サブセットの変化が生じる。Linらは、刺激性(Fc γ RIとFc γ RIII)と抑制性のIgG Fcレセプター(Fc γ RIIB)がBXSBマウスにおける自己免疫疾患の発症とその抑制に重要であることを報告している(J. Immunol. 2006)。今回我々は、刺激性IgG Fcレセプターを欠くBXSB γ 鎖欠損マウス(BXSB. $\gamma^{-/-}$)と抑制性IgG FcレセプターがC57BL/6由来であるBXSBマウス(BXSB. IIB^{B6/B6})における末梢血での単球増加と単球サブセットの変化について解析し、BXSBマウスの樹状細胞(DC)への分化におけるFcレセプターの関与について調べた。

B. 研究方法

- 1) BXSB、BXSB. $\gamma^{-/-}$ 、BXSB. IIB^{B6/B6}の各マウスにおける月齢毎の末梢血中の単球と単球サブセットについてCD11b、CD11c、Gr-1の各モノクローナル抗体を用いてフローサイトメトリーで解析した。
- 2) BXSBマウス、BXSB. $\gamma^{-/-}$ マウス末梢血単核球から磁気細胞分離システムを用いてCD11b⁺細胞を分離後、Gr-1⁺とGr-1⁻の単球分画細胞に分けGM-CSFの存在下でCD11b⁻の細胞と共培養した。
- 3) BXSBマウス、BXSB. $\gamma^{-/-}$ マウスの末梢血から

CD11b⁺細胞を分離し、GM-CSF存在下で10日間培養。培養液にOVAを添加後、OVA特異的T細胞受容体を有するOT-IIマウスのT細胞を分離し混合培養した。OT-IIマウスT細胞の増殖をBrdUで染色し解析した。

(倫理面への配慮)

今回の研究で用いたマウスは順天堂大学疾患モデル研究センターで飼育し、「順天堂大学医学部動物実験に関する指針」もとづき、動物福祉の観点から実験を行っており、実験動物委員会にて審査、承認を受けている。

C. 研究結果

- 1) BXSBマウスでは、Gr-1⁻の単球サブセットが6ヶ月齢から著明に増加するのに対し、BXSB. $\gamma^{-/-}$ マウス、BXSB. IIB^{B6/B6}マウスではこの単球サブセットの増加は有意に抑制されていた。
- 2) BXSB. $\gamma^{-/-}$ マウスでは、Gr-1⁺からGr-1⁻単球サブセットへ、更にDCへの分化がBXSBマウスと比較し明らかに抑制されていた。
- 3) BXSBマウスのCD11b⁺細胞は、GM-CSF存在下で培養後、OVA添加によりOVA特異的T細胞の増殖を促したのに対し、BXSB. $\gamma^{-/-}$ マウスでは抑制されていた。

D. 考察

SLEのモデルマウスの一つであるBXSJマウスにおいて、その病態を抑制する2系統の変異マウスであるBXSJ. $\gamma^{-/-}$ マウス、BXSJ. IIB^{B6/B6}マウスで末梢血の単球増加、特にCD11b⁺Gr-1⁻のサブセットの増加が有意に抑制されており、更にBXSJ. $\gamma^{-/-}$ マウスで単球サブセットとDCへの分化成熟が抑制されたことより、BXSJマウスの病態におけるFcレセプターの重要性が示唆された。

E. 結論

SLEのモデルマウスである、BXSJマウスにおける単球サブセットの変化とFcレセプターの関与が示された。今後更に解析を進めることで、将来的にヒトのSLE治療に応用されることが期待される。

F. 健康危機情報

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

G. 研究発表

1. 論文発表

・ Amano H, Furuhashi N, Tamura N, Tokano Y, Takasaki Y. Hypocomplementemic Urticarial Vasculitis with Jaccoud's Arthropathy and Valvular Heart Disease (case report and review of the literature) *Lupus* 2008 in press

・ Nakano S, Morimoto S, Suzuki J, Nozawa K, Amano H, Tokano Y, Takasaki Y. Role of pathogenic auto-antibody production by Toll-like receptor 9 of B cells in active systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 47:145-9, 2008.

・ Watanabe T, Suzuki J, Mitsuo A, Nakano S, Tamayama Y, Katagiri A, Amano H, Morimoto S, Tokano Y, Takasaki Y. Striking alteration of some populations of T/B cells in systemic lupus erythematosus: relationship to expression of CD62L or some chemokine receptors. *Lupus*. 17:26-33, 2008.

・ Nakano S, Morimoto S, Suzuki J, Mitsuo A, Nakiri Y, Katagiri A, Nozawa K, Amano H, Tokano Y, Hashimoto H, Takasaki Y. own-regulation of CD72 and increased surface IgG on B cells in patients with lupus nephritis.

Autoimmunity. 40:9-15, 2007.

・ Morimoto S, Nakano S, Watanabe T, Tamayama Y, Mitsuo A, Nakiri Y, Suzuki J, Nozawa K, Amano H, Tokano Y, Kobata T, Takasaki Y. Expression of B-cell activating factor of the tumour necrosis factor family (BAFF) in T cells in active systemic lupus erythematosus: the role of BAFF in T cell-dependent B cell pathogenic autoantibody production *Rheumatology*. 46:1083-6, 2007.

・ Nakiri Y, Minowa K, Suzuki J, Mitsuo A, Amano H, Morimoto S, Tokano Y, Takasaki Y. Expression of CD22 on peripheral B cells in patients with rheumatoid arthritis: relation to CD5-positive B cells. *Clin Rheumatol*. 26:1721-3, 2007.

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

・ Suzuki J, Nakano S, Nakiri Y, Mitsuo A, Amano H, Morimoto S, Tokano Y, Takasaki Y. CD19/22 balance relates to improvement of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol*. 16:235-8, 2006.

・ Kikuchi S, Santiago-Raber ML, Amano H, Amano E, Fossati-Jimack L, Moll T, Kotzin BL, Izui S. Contribution of *Nba2* to *Yaa*-induced monocytosis in association with murine systemic lupus. *J Immunol*. 1;176:3240-7, 2006.

・ Tokano Y, Morimoto S, Amano H, Kawanishi T, Yano T, Tomyo M, Sugawara M, Kobayashi S, Tsuda H, Takasaki Y, Hashimoto H. The relationship between initial clinical manifestation and long-term prognosis of patients with systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol* 15:275-282, 2005.

・ Amano H, Amano E, Santiago-Raber ML, Moll T, Martinez-Soria E, Fossati-Jimack L, Iwamoto M, Rozzo SJ, Kotzin BL, Izui S. Selective expansion of a monocyte subset expressing the CD11c dendritic cell marker in the *Yaa* model of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 52:2790-8,2005.

・ Kikuchi S, Amano H, Amano E, Fossati-Jimack L, Santiago-Raber ML, Moll T, Ida A, Kotzin BL, Izui S. Identification of 2 major loci linked to autoimmune hemolytic anemia in NZB mice. *Blood.* 106:1323-9, 2005.

・ Kikuchi S, Fossati-Jimack L, Moll T, Amano H, Amano E, Ida A, Ibnou-Zekri N, Laporte C, Santiago-Raber ML, Rozzo SJ, Kotzin BL, Izui S. Differential role of three major new zealand black-derived Loci linked with *yaa*-induced murine lupus nephritis. *J Immunol.* 15;174:1111-7, 2005.

・ Moll T, Martinez-Soria E, Santiago-Raber ML, Amano H, Pihlgren-Bosch M, Marinkovic D, Izui S. Differential Activation of Anti-Erythrocyte and Anti-DNA Autoreactive B Lymphocytes by the *Yaa* Mutation. *J Immunol.* 15;174:702-9, 2005.

2. 学会発表

・ SLEモデルマウスにおける *Yaa* 遺伝子と末梢血中の単球増加との関係
日本免疫学会総会 (第34回)

・ SLEモデルマウスにおける *Yaa* 遺伝子による末梢血中の単球増加の機序
日本リウマチ学会総会 (第49回)

・ 全身性エリテマトーデスにおける末梢血の単球サブセットの解析
日本臨床免疫学会総会 (第33回)

・ 全身性エリテマトーデス患者では CD62L^{low} 単球サブセットの増加を認める
日本リウマチ学会総会 (第50回)

・ BXSBBマウスの単球由来の樹状細胞は抗原特異的T

細胞の増殖を誘導する
日本リウマチ学会総会 (第51回)

・ Efficient Differentiation of Gr-1 Positive Monocytes to Gr-1 Negative Monocytes and Dendritic Cells in the *Yaa* Model of Systemic Lupus Erythematosus
日本免疫学会総会 (第36回)

・ BXSBBマウスの単球由来の樹状細胞は抗原特異的T細胞の増殖を誘導する
日本リウマチ学会総会 (第51回)

・ BXSBBマウスの末梢血単球増加における Fc γ レセプターの役割
日本臨床免疫学会総会 (第35回)

・ IgG Fc Receptor Contribution to the Development of Monocytosis in Lupus Prone BXSBB Mice
日本免疫学会総会 (第36回)

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

SLE における免疫担当細胞の異常活性化に係わる遺伝要因の解明と治療への応用

分担研究者 広瀬 幸子 順天堂大学医学部分子病態病理学 准教授

研究要旨 SLE は代表的な多遺伝子疾患であり、疾患の根底にある免疫系細胞の異常活性化に関わる遺伝要因の解析は、病因解明に不可欠である。この点をふまえ、我々は SLE モデルマウスを用いた解析で、B 細胞の異常活性化の一要因として、第 1 染色体テロメアに存在する B 細胞活性化抑制分子 FcγRIIB の遺伝子プロモーター領域多型が関与すること、T 細胞による IL-4 産生能が第 7 染色体上の IL-4 受容体α鎖の遺伝子多型に左右され、一方、NKT 細胞による IL-4 産生能が第 1 1 染色体テロメアに存在する遺伝子により左右されること、これらが SLE の病態を左右する可能性のあること、などを見出した。ヒトの多遺伝子疾患の解析は、ヒト遺伝子の多様性や著しい多型性、またこれに基づく遺伝様式の複雑さ、或は環境要因の不均一性などの理由から困難な点が多い。モデルマウス系を用いた上記の研究成果は、ヒト SLE の感受性遺伝子解析に有用な情報を提供する。

A. 研究目的

SLE 感受性遺伝子の同定をめざし、SLE モデルマウス系を用いて、免疫細胞の異常活性化の原因となる遺伝要因をゲノムワイドに解析し、これらの遺伝要因が実際に SLE 病態の増悪に関わっているかを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. B 細胞活性化抑制分子 FcγRIIB の遺伝子プロモーター領域には、SLE モデルマウス系に共通して、転写因子 AP-4 の結合領域欠損を伴う多型が存在する。この多型の SLE 病態における役割を確認する目的で、SLE モデル系である BXSB マウスの FcγRIIB 遺伝子プロモーター領域を、AP-4 結合領域の欠損を伴わない正常型に入れ替えたコンジュニクマウス(BXSB.IIB^{B6/B6})を樹立し、その SLE 病態について解析した。
2. CD4T 細胞による *in vitro* の IL-4 の産生能を規定する遺伝子の検索を目的に、142 匹の(NZB x NZW) F1 x NZW 退交配マウスの抗 CD3 抗体刺激脾臓細胞を用いて、ゲノムワイドな QTL 解析を行った。また、この QTL と SLE 病態との相関を、219 匹の

- 雌(NZB x NZW) F1 x NZW および 117 匹の雄 NZW x (NZW x BXSB) F1 退交配マウスを用いて行った。
3. NKT 細胞による *in vitro* の IL-4 の産生能を規定する遺伝子の検索を目的に、205 匹の(NZB x NZW) F1 x NZW 退交配マウスのαGalCel 刺激脾臓細胞を用いて、ゲノムワイドな QTL 解析を行った。また、この QTL と SLE 病態との相関を、262 匹の雌(NZB x NZW) F1 x NZB 退交配マウスを用いて行った。

(倫理面への配慮)

マウスの実験は、本研究施設の定める動物実験指針に基づいて行った。

C. 研究結果

1. BXSB.IIB^{B6/B6}では、本来の BXSB に比較して、SLE 病態であるループス腎炎、血中 IgG 抗 DNA 抗体価の上昇、脾腫、など全ての病態が抑制され、生存率の著しい改善が認められた。従って、FcγRIIB 遺伝子プロモーター多型の SLE における役割が確認された。
2. CD4T 細胞による *in vitro* の IL-4 の産生能は第 7 染色体テロメアに存在する IL-4 受容体α鎖遺伝子多型により規定されること、この遺伝子多型が、

BXSB マウスのループス腎炎発症に関わる可能性
があることが、雄 NZW x (NZW x BXSB) F1 退交
配マウスを用いた交配実験により示された。

3. NKT 細胞による *in vitro* の IL-4 の産生能を規定す
る遺伝子は第 11 染色体テロメアに存在すること、
この遺伝子が、(NZB x NZW) F1 マウスのループス
腎炎発症に関わる可能性が、262 匹の雌(NZB x
NZW) F1 x NZB 退交配マウスを用いた交配実験に
より示された。

D. 考察

SLE 病態の多様性に加えて、ヒト遺伝子は多型性
および多様性が極めて高度で、素因遺伝子解析には
かなりの困難が伴う場合が多く、モデルマウスでの
解析が有用な情報を提供する。

今回の解析から、SLE 型の *Fcgr2b* 遺伝子プロモ
ーター領域の AP-4 結合部位の欠損を伴う多型が
SLE 素因遺伝子として機能していることが示され
た。ヒト SLE の素因遺伝子の一つが *Fcgr2b* 遺伝子
の存在する第 1 染色体テロメア領域にマップされ
ており、さらに、マウスの場合と同様に、ヒト SLE
においても *Fcgr2b* 遺伝子プロモーター領域多型が
素因遺伝子として働いている可能性が最近報告さ
れている。

第 7 染色体上の IL-4 受容体 α 鎖遺伝子多型は T 細
胞による IL-4 産生能を、また、第 1 1 染色体テロメ
アの遺伝子は、NKT 細胞の IL-4 産生能を規定して
いる。これらの遺伝子が SLE 病態に相関することか
ら、この相関のメカニズムの解明が、今後に残され
た重要な研究テーマである。

E. 結論

SLE の素因遺伝子として、B 細胞の活性化抑制分
子 Fc γ RIIB をコードする *Fcgr2b* 遺伝子のプロモ
ーター領域の転写活性の低下を伴う多型が機能して
いることが明らかとなった。また、T 細胞や NKT 細胞に
よるサイトカイン産生能が遺伝的に規定されており、
これらが SLE 病態を左右することも示された。SLE
の治療法を考える上で、有益な情報を提供すると考
えられる。

F. 健康危機情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

・ Tsukamoto H, Ohtsuji M, Shiroya W, Lin Q,
Nakamura K, Tsurui H, Jiang Y, Sudo K, Nishimura H,
Shirai T, and Hirose S. Aberrant genetic control of
invariant TCR-bearing NKT cell function in New
Zealand mouse strains: possible involvement in SLE
pathogenesis. *J. Immunol.* 2008, in press.

・ Nakamura K, Hirai H, Torashima T, Miyazaki T, Tsurui
H, Xiu Y, Ohtsuji M, Qing Shun Lin Q, Tsukamoto K,
Nishimura H, Ono M, Watanabe M and Hirose S. CD3
and IgG Fc receptor regulate cerebellar functions. *Mol.
Cell. Biol.* 27:5128-5134, 2007.

・ Nakamura K, Sugawara Y, Sawabe K, Ohashi A, Tsurui
H, Xiu Y, Ohtsuji M, Lim Q, Nishimura H, Hasegawa H,
and Hirose S. Late developmental stage-specific role of
tryptophan hydroxylase 1 in brain serotonin levels. *J.
Neuroscience* 26:530-534, 2006

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

・ Hirose S, Jiang Y, Nishimura H, and Shirai T.
Significance of MHC class II haplotypes and IgG Fc
receptors in SLE. *Springer Semin. Immun.* 28:163-174,
2006.

・ Shirai T and Hirose S. Molecular pathogenesis of SLE.
Springer Semin. Immun. 28:79-82, 2006.

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

・Fujii T, Iida Y, Yomogida M, Ikeda K, Haga T, Jikumaru Y, Ninami M, Nishimura N, Kodera Y, Inada Y, Shirai T, Hirose S, and Nishimura H. Genetic control of the spontaneous activation of CD4⁺ Th cells in systemic lupus erythematosus-prone (NZB x NZW) F1 mice. *Genes Immun.* 7:647-654, 2006.

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

・Suzuki H, Suzuki Y, Yamanaka T, Hirose S, Nishimura H, Toei J, Horikoshi S, Tomino Y: Genome-wide scan in novel IgA nephropathy model identifies susceptibility locus on murine chromosome 10, in a region syntenic to human *IGAN1* on chromosome 6q22-23. *J Am Soc Nephrol*, 16:1289-1299, 2005.

・Shike T, Gohda T, Tanimoto M, Kobayashi M, Makita Y, Funabiki K, Horikoshi, Hirose S, Shirai T, Tomino Y: Chromosomal mapping of a quantitative trait locus for the development of albuminuria in diabetic KK/Ta mice. *Nephrol Dial Transplant*, 20:879-885, 2005.

・Mehmut M, Takeda K, Abe M., Ogara H, Hirose S, Okumura K, Fujime M: Fas ligand and TNF-related apoptosis-inducing ligand induction on infiltrating lymphocytes in bladder carcinoma by bacillus Calmette-Guérin treatment. *Urol Int*, 75:80-87, 2005.

・Qi Z, Wang J, Sun Z, Ma F, Zhang Q, Hirose S, Jiang Y: Polymorphism of the mouse gene for the interleukin 10 receptor alpha chain (*Il10ra*) and its association with the autoimmune phenotype. *Immunogenetics* 57:697-702, 2005.

・Nakamura K, Nishimura H, Hirose S: Correlation of aggression with serum IgM level in autoimmune-prone NZB mice. *Developmental Brain Research*, 159:145-148, 2005.

・杉田玄、鶴井博理、藤森正登、榎本冬樹、池田勝久、東みゆき、広瀬幸子：口蓋扁桃胚中心における新規共刺激分子とそのレセプターの発現に関する組織学的、細胞学的解析 日本耳鼻咽喉科学会会報

108:31-37, 2005.

2. 学会発表

・林青順、天野浩文、天野理恵、出井章三、白井俊一、広瀬幸子 Role of IgG Fc receptors on BXSB disease シンポジウム11 自己免疫疾患発症の分子機構と制御 第49回に本リウマチ学会総会・学術集会 117 ページ 2005/4/17-20 パシフィコ横浜

・林青順、修 岩、塚本和行、鶴井博理、中村和裕、広瀬幸子 活性型および抑制型 IgG Fc receptor による SLE 病態への影響 第2回日本病理学会カンファレンス 2005 道後 2005/7/29-30

・塚本和行、林 青順、大辻希樹、鶴井博理、三宅幸子、山村隆、広瀬幸子 SLE における NKT 細胞の役割 第35回日本免疫学会・学術集会 2005/12/13-15 横浜

・高橋宜聖、加地友弘、稲嶺絢子、橋本修一、広瀬幸子、竹森利忠 マウス記憶 B 細胞に発現増強するアポトーシス抑制分子の作用機序 第35回日本免疫学会・学術集会 2005/12/13-15 横浜

・白岩和香苗、大辻希樹、林 青順、塚本和行、鶴井博理、西村裕之、木下勝之、広瀬幸子 (NZB x NZW) F1 マウスにおける SLE 発症への estrogen の影響 第35回日本免疫学会・学術集会 2005/12/13-15 横浜

・Fujii Takuma, Jikumaru Yuri, Ikeda Kenichi, Nishimura Naoki, Xiu Yan, Nakamura Kazuhiro, Toei Junichi, Kodera To, Inada Yuji, Hirose Sachiko, Shirai Toshikazu, Nishimura Hiroyuki Genome-wide mapping of genes involved in defective immune tolerance in New Zealand Black mice. 第35回日本免疫学会・学術集会 2005/12/13-15 横浜

・大辻希樹、白岩和香苗、鶴井博理、大辻奈穂美、西村裕之、白井俊一、広瀬幸子 ループス腎炎発症における G-CSF の役割 第35回日本免疫学会・学術集会 2005/12/13-15 横浜

・Lin Qingshun, Tsukamoto Kazuyuki, Tsurui Hiromichi, Ohtsuji Mareki, Amano Hirofumi, Amano Eri, Izui Shozo, Shirai Toshikazu, Hirose Sachiko Impact of positive and negative IgG Fc receptors on murine lupus.

第35回日本免疫学会・学術集会 2005/12/13-15
横浜

・森山優子、関根知世子、川崎明美、森山優子、山口典子、小瀧英子、大辻希樹、広瀬幸子、八木田秀雄、奥村 康 抗Delta1モノクローナル抗体投与による辺縁体B細胞の消失 第35回日本免疫学会・学術集会 2005/12/13-15 横浜

・鶴井博理、広瀬幸子 Molecular dynamicsによるマウスMHC Class II結合ペプチドの挙動の解析 第35回日本免疫学会・学術集会 2005/12/13-15 横浜

・Qingshun Lin, Kazuyuki Tsukamoto, Hiromichi Tsurui, Kazuhiro Nakamura, Mareki Ohtsuji, Toshikazu Shirai and Sachiko Hirose Role of positive and negative receptors for IgG in murine lupus. 11th International Conference on Mechanisms Lymphocyte Activation and Immune Regulation: B Cell Biology, Feb 2-5, 2006, Newport Beach, California

・Qingshun Lin, Kazuyuki Tsukamoto, Hiromichi Tsurui, Kazuhiro Nakamura, Mareki Ohtsuji, Toshikazu Shirai, Sachiko Hirose. Role of positive and negative receptors for IgG in murine lupus. 11th International Conference on Mechanisms Lymphocyte Activation and Immune Regulation: B Cell Biology, Feb 2-5, 2006, Newport Beach, California

・Hirose Sachiko, Ohtsuji Mareki, Shiroiwa Wakana, Tsukamoto Kazuyuki, Lin Qingshun, Tsurui Hiromichi, Nakamura Kazuhiro, Nishimura Hiroyuki, Shirai Toshikazu. IL-4R α polymorphism and its association with lupus nephritis. 日本免疫学会・学術集会記録 第36巻 83頁 2006

・Lin Qingshun, Tsurui Hiromichi, Nakamura Kazuhiro, Ohtsuji Mareki, Tsukamoto Kazuyuki, Shiroiwa Wakana, Nishimura Hiroyuki, Shirai Toshikazu, Hirose Sachiko. Genetic dissection of the effects of stimulatory and inhibitory IgG Fc receptors on murine lupus. 日本免疫学会・学術集会記録 第36巻 102頁 2006

・芳賀俊明、藤井琢磨、軸丸由梨、稲田祐二、広瀬幸子、白井俊一、西村裕之 NZB系マウスの自己寛容破綻における抑制性Fc受容体Fc γ RIIBの役割 日本免疫学会・学術集会記録 第36巻 102頁 2006

・Tsurui Hiromichi, Hirose Sachiko. Calculation of

MHC-peptide binding energy by molecular dynamics. 日本免疫学会・学術集会記録 第36巻 88頁 2006

・Ohtsuji Mareki, Shiroiwa Wakana, Tsukamoto Kazuyuki, Lin Qingshun, Tsurui Hiromichi, Nakamura Kazuhiro, Kadowaki Naomi, Nishimura Hiroyuki, Shirai Toshikazu, Hirose Sachiko. Possible contribution of neutrophil activation to lupus lupus. 日本免疫学会・学術集会記録 第36巻 103頁 2006

・藤井琢磨、飯田行恭、蓬田雅人、池田賢一、芳賀俊明、軸丸由梨、西村尚樹、稲田祐二、広瀬幸子、白井俊一、西村裕之 自己免疫疾患モデルマウスにおける自発的T細胞活性化を規定している遺伝子 日本免疫学会・学術集会記録 第36巻 103頁 2006

・森山優子、関根知世子、川崎明美、小山典子、小瀧英子、大辻希樹、広瀬幸子、八木田秀雄、奥村 康 Delta1発現細胞による辺縁帯B細胞形成・維持の解析 日本免疫学会・学術集会記録 第36巻 181頁 2006

・Tsukamoto Kazuyuki, Lin Qingshun, Ohtsuji Mareki, Nakamura Kazuhiro, Tsurui Hiromichi, Miyake Sachiko, Yamamura Takashi, Hirose Sachiko. Role of NKT cells in systemic lupus erythematosus. 日本免疫学会・学術集会記録 第36巻 247頁 2006

・Amano H, Amano Eri, Lin Qingshun, Nakano Souichirou, Nozawa Kazuhiko, Morimoto Shinji, Takano Yoshiaki, Hirose Sachiko, Takasaki Yoshinari. Efficient differentiation of Gr-1 positive to Gr-1 negative monocytes and dendritic cells in the *Yaa* model of systemic lupus erythematosus. 日本免疫学会・学術集会記録 第36巻 105頁 2006

・阿部康治、大辻希樹、須藤カツ子、広瀬幸子 (BXSB x NZB) F1雄マウスに誘発される硬直性関節症 第54回日本実験動物学会総会 講演要旨集 124頁 2007/5/23-25 東京

・Hirose S, Tsukamoto K, Ohtsuji M, Lin Q, Tsurui H, Nishimura H, Shirai T. Association of NKT cell function with systemic lupus erythematosus. 第37回日本免疫学会・学術集会記録 143頁 2007/11/20-22 東京

・Lin Q, Ohtsuji M, Amano H, Amano E, Tsurui H,

Nishimura H, Shirai T, Hirose S. Protection from autoimmune disease by restoration of impaired FcγRIIB expression. 第 37 回日本免疫学会・学術集会記録 142 2007/11/20-22 東京

・Ohtsuji M, Lin Q, Tsurui H, Kadowaki N, Nishimura H, Shirai T, Hirose S. Genetic control of neutrophil count and its possible contribution to lupus nephritis. 第 37 回日本免疫学会・学術集会記 143 2007/11/20-22 東京

・Tsurui H, Hirose S. Phagocytotic behavior of macrophages and dendritic cells in peripheral organs based on the autofluorescence specific for phagocytosis. 第 37 回日本免疫学会・学術集会記録 113 頁 2007/11/20-22 東京

・軸丸由梨、藤井琢磨、池田賢一、大木麻紀子、吉澤侑也、小寺洋、広瀬幸子、白井俊一、西村裕之。末梢性の免疫寛容誘導における抑制性 Fc 受容体 FcγRIIB の役割。第 37 回日本免疫学会・学術集会記録 113 頁 2007/11/20-22 東京

・Kitabayashi M, Igarashi H, Toda T, Ohtsuji M, Tsurui H, Hirose S, Sakaguchi N. Role of G5PR in the development of autoimmune disease. 第 37 回日本免疫学会・学術集会記録 142 2007/11/20-22 東京

・天野浩文、天野恵理、安藤誠一郎、仲野総一郎、森本真司、戸叶嘉明、林青順、西村裕之、広瀬幸子、高崎芳成。BXS B マウスの末梢血単核球増加における IgG Fc レセプターの役割。第 37 回日本免疫学会・学術集会記録 144 頁 2007/11/20-22 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

複合遺伝性疾患としての自己免疫疾患とその基礎となる自己免疫現象の 遺伝因子解析の理論研究とその実践的活用

分担研究者 山田 亮

東京大学 医科学研究所 附属ヒトゲノム解析センター ゲノム機能解析分野 准教授

研究要旨 自己免疫疾患の代表である全身性エリテマトーデスの発病リスク遺伝子多型をゲノムワイドに探索するために克服すべき統計解析手法には複数の課題がある。本研究では、大規模化に伴って、その問題がクローズアップされているマルチプルテスト補正を中心に、検討を行った。同検討を行うにつき、遺伝子多型解析の一般的解析手法の特性を検証するし、それを実用的解析ツールとして実装・公開するとともに、それを用いて、ゲノムワイドスタディにおける未解決課題の解明に取り組んだ。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデスを標的に、ゲノムワイド関連解析を行うための解析手法についての検討を行い、それを実装したツールを開発する。

B. 研究方法

初年度・第2年度・最終年度、それぞれ、シミュレーションデータを作成し、段階的に解析手法の特性の解明とその実用的運用上の課題の整理を行い、ツールとして実装した。

（倫理面への配慮）

遺伝子多型データを解析するツールとして情報セキュリティを満足するため、隔離された機器で独立して動作するツールを開発する。

3. 研究結果及び考察

マーカー数 100 万以上、サンプル数 2 万以上の SNP ジェノタイプデータにつき、個別 SNP 関連検定に関する考察結果を発表し、それを実装した java ツールを完成した。

C. 研究結果

初年度・第2年度においては、SLE を含む複合遺伝性疾患のゲノムワイド SNP 連鎖不平衡マッピング解析を実施するための、標準的解析環境の構築と、そのための実験データ管理環境の整備を行った。また、解析統計手法を小-中規模に運用する環境を構築

した。年度別には以下の通り。

初年度は以下を実施した。

連鎖不平衡マッピングの基盤整備として、SNP を用いた連鎖不平衡マッピングを行うための基礎的な手法を大規模データに適用するための解析環境整備を以下のように行った。

- ・ Pairwise LD
 - r^2 を中心に D' を併用
- ・ LD block
 - Solid Spine of LD を中心に Gabriel 法、Four gamete test 法を併用
- ・ Recombination rate 推定
 - Coalescent model based-RJMCMC
- ・ Haplotype 推定
 - PLEM
 - SNP HAP
 - Phase
 - EM for 2-individual pooled data
- ・ 関連検定
 - 単一 SNP・ハプロタイプ アレル頻度分割表検定
 - 一般線形回帰法・尤度解析(尤度比検定とスコア検定)
 - Permutation 補正
- ・ TagSNP 選別
 - r^2 -greedy 法

- Optimum solution 法

また、連鎖不平衡マッピングのための新規手法の開発の一環として、ARG 手法の検証と応用のために次のことを行った。疾患ローカス・疾患多型を有する集団のシミュレシヨナルな作成方法を実装した。またそれに対する、基礎的なARG再構築プログラムの実装を終了。また、実用に耐えるコンピュータ環境整備の一環としてPCクラスタの導入し、構築を開始した。

第2年度は以下を実施した。

初年度の成果に加え、Fisher の正確確率検定、および、パーミュテーションテストを100万マーカー・数千検体において実施できるツールを実装した。また、パーミュテーションテストにおいては、従来よりゲノム解析にて用いられてきている、Tippette 関数による補正のほか、2種類の補正方法(Fisher 関数・Liptak logit 関数も組み込み、より、柔軟な解析条件にて実施できるよう配慮した。また、フォールスディスクバリレート (FDR) 補正も併せて実施するよう、解析ツールに組み込んだ。

最終年度は、ここ数年間に、さらに大規模化をしているゲノムワイド SNP 連鎖不平衡マッピングデータのハンドリングに耐えうる解析体制への移行を行うとともに、スタディの大規模化に伴って、深刻化しているマルチプルテスト補正のための手法の検討と実用的ツールの開発を進めた。

同開発にあたっては、SLE を標的疾患とし、疾患側形質因子(多様な臨床情報)とゲノムワイド SNP ジェノタイプデータ(単純なデータ構造であるが、大量かつ相互に非独立な因子情報)を用いた疾患関連遺伝子解析手法構築上の課題を補足しその構築を目指した。

大きく分けて、疾患側形質因子は、疾患亜分類、臨床マーカーに分けられ、その内訳は非常に多様である。SNP ジェノタイプは個々のマーカーに関する限り、非常に単純なデータ(3カテゴリ)であるが、マーカー間には、連鎖不平衡・集団構造化に伴う相互非独立性が存在し、また、遺伝子-遺伝子相互作用、遺伝子・環境相互作用を視野に入れるとさらに複雑なマーカー間相互作用の検討が必要である。さ

らに、マーカー数が10万超であるなど、計算機によるデータハンドリングにあたって、量的に解決する課題もある。

本研究では、主にこの3点につき、バランスをとって検討し、実用的な解析手法の構築を志向する。

本分担研究開始時と比較し、疾患遺伝子解析の規模は予想を超える速度で大規模化した。その大規模化に対応する解析ツールの実装に成功した。

D. 考察

SNP および CNP を用いた疾患遺伝子解析はますます盛んである。その解析手法には、従来の統計検定手法を遺伝疫学・多型マッピングに適した形式に修正して使用することが望ましい。本研究では、その修正に関して、体系的に検討を加え、適切な修正を加えた上で、一般に公開し、広く、遺伝疫学研究者の便宜を図っていると考えられる。

E. 結論

全身性エリテマトーデス関連遺伝子解析はその成果が強く期待されているが、それを遂行するための、統計解析ツールの開発に成功した。

F. 健康危機情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamamoto, K. & Yamada, R. Lessons from a Genomewide Association Study of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med.* 357, 1250-1251, 2007.
2. Yamada, R. & Yamamoto, K. Mechanisms of disease: genetics of rheumatoid arthritis--ethnic differences in disease-associated genes. *Nat Clin Pract Rheumatol* 3, 644-50, 2007.
3. Suzuki, A., Yamada, R. & Yamamoto, K. Citrullination by peptidylarginine deiminase in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 1108, 323-39, 2007.
4. Yamada R, Matsuda F. A novel method to express SNP-based genetic heterogeneity, Ψ , and its use

to measure linkage disequilibrium for multiple SNPs, Dg, and to estimate absolute maximum of haplotype frequency. *Genetic Epidemiology*. 31, 709-726, 2007.

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

6. Okazaki Y, Suzuki A, Sawada T, Ohtake-Yamanaka M, Inoue T, Hasebe T, Yamada R, et al. Identification of citrullinated eukaryotic translation initiation factor 4G1 as novel autoantigen in rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun*. 341:94-100, 2006.

7. Yamada R, Yamamoto K, Holmdahl RE. Gene-based large scale LD-mapping of rheumatoid arthritis-associated genes. *The Hereditary Basis of Rheumatic Diseases*. 2006.

8. Ohtsubo S, Iida A, Nitta K, Tanaka T, Yamada R, Ohnishi Y, Maeda S, Tsunoda T, Takei T, Obara W, Akiyama F, Ito K, Honda K, Uchida K, Tsuchiya K, Yumura W, Ujiie T, Nagane Y, Miyano S, Suzuki Y, Narita I, Gejyo F, Fujioka T, Nihei H, and Nakamura Y. Association of a single-nucleotide polymorphism in the immunoglobulin μ -binding protein 2 gene with immunoglobulin A nephropathy/*J. Hum. Genet*. 50 30-35 2005.

9. Nakayama M, Horiguchi A, S. Kubota K, Takazawa T, Ohsaka M, Kawaida R, Ono M, Kasuya A, Furukawa H, Yamada R, and Yamamoto K. Comparison of enzymatic properties between hPADI2 and hPADI4/*Biochem. Biophys. Res. Commun*. 327 192--200 2005.

10. Chang X, Yamada R, and Yamamoto K. Inhibition of antithrombin by hyaluronic acid may be involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis/*Arthritis Res. Ther*. 7 R268--R273 2005.

11. Yamada R, and Yamamoto K. Recent findings on genes associated with inflammatory disease/*Muta. Res./Fund. Mol. Mech. Mutagen*. 573 136--151 2005.

12. Yamada R. Peptidylarginine deiminase type 4,

anticitrullinated peptide antibodies, and rheumatoid arthritis/*Autoimmun. Rev*. 4 201--206 2005.

13. Suzuki A, Yamada R, Yamanaka M, Okazaki Y, Sawada T, and Yamamoto K. Anti-citrullinated collagen type I antibody is a target of autoimmunity in rheumatoid arthritis/*Biochem. Biophys. Res. Commun*. 333 41--426 2005.

14. Mori M, Yamada R, Kobayasi K, Kawaida R, and Yamamoto K. Ethnic differences in allele frequency of autoimmune-disease-associated SNPs/*J. Hum. Genet*. 50 264--266 2005.

15. Kochi Y, Yamada R, Suzuki A, Harley J. B, Shirasawa S, Sawada T, Bae S, Tokuhira S, Chang X, Sekine A, Takahashi A, Tsunoda T, Ohnishi Y, Kaufman K, M. Kang C, P. Kang C, Ostubo S, Yumura W, Mimori A, Koike T, Nakamura Y, Sasazuki T, and Yamamoto K. A functional variant in FCRL3, encoding Fc receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities/*Nat. Genet*. 37 No. 5 478--485 2005.

16. Suzuki A, Yamada R, Yamanaka M, Okazaki Y, Sasada T, and Yamamoto K. Anti-citrullinated collagen type I antibody is a target of autoimmunity in rheumatoid arthritis/*Biochem. Biophys. Res. Commun*. 333 418--426 2005.

17. Takizawa Y, Sawada T, Suzuki A, Yamada R, Inoue T, and Yamamoto K. Peptidylarginine deiminase 4(PADI4) identified as a conformation-dependent autoantigen in rheumatoid arthritis/*Scand J Rheumatol* 34 212--215 2005.

18. Kawaida R, Yamada R, Kobayasi K, Tokuhira S, Suzuki A, Kochi Y, Chang X, Sekine A, Tsunoda T, Sawada T, Furukawa H, Nakamura Y, and Yamamoto K. CUL1, a component of E3 ubiquitin ligase, alters lymphocyte signal transduction with possible effect on rheumatoid arthritis/*Gen. Immun*. 6 194--202 2005.

2. 学会発表

<海外>

1. Ryo Yamada SNP-pair Tetrahedron: Geometric Presentation of Haplotype Space of Pairwise SNPs. International Genetic Epidemiology Meeting

(2007)York, Great Britain

2. Yamada, R. et al. Inference of polyphyletic SNP-ratio by zero-distance limit of fraction of SNP pairs in complete linkage disequilibrium. New Orleans, LA, USA, 2006

3. Yamada, R. Location-oriented extraction and visual presentation of association strength for case-control SNP genotype data in a candidate region. Poster presentation at Genetic Analysis Workshop 15, Tampa, FL, 2006

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

5. The quantification of the allelic variations of gene expression by real-time TaqMan PCR/The American Society of Human Genetics 55th Annual Meeting (ASHG 2005)/ Salt Lake City/USA/2005 Oct./ KobayasiK., SuzukiA., KochiY., YamadaR., and YamamotoK.

<国内>

1. 自己免疫疾患感受性 SNP の人種差の検討/ 第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会/横浜/2005 年 4 月/森美賀子, 山田亮, 小林香子, 川井田礼美, 山本一彦

2. 関節リウマチとの関連が報告された SNPs についての日本人での追認関連解析/第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会/横浜/2005 年 4 月/小林香子, 高地雄太, 山田亮, 森美賀子, 川井田礼美, 山本一彦

3. 関節リウマチ感受性遺伝子 FCRL3 の同定/ 第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会/横浜/2005 年 4 月/高地雄太, 山田亮, 山本一彦

4. ユビキチンリガーゼの構成成分 CUL1 は血球のシグナル伝達系を介して RA の罹患率へ影響を与える可能性を持つ/第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会/横浜/2005 年 4 月/川井田礼美, 山田亮, 小林香子, 高地雄太, 沢田(哲治), 山本一彦

5. SNP による大規模 LD マッピング/第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会/横浜/2005 年 4 月/川口喬久, 川上弘人, 山田亮, 関根章博, 中村祐輔,

山本一彦, 角田達彦

6. 免疫スクリーニング法による関節リウマチ関連遺伝子 peptidylarginine deiminase type four (PADI4)の基質同定/第 28 回日本分子生物学会年会/福岡/2005 年 12 月/山中美弥子, 鈴木亜香里, 菅野栄美, 岡崎優子, 沢田哲治, 山田亮, 山本一彦

7. シトルリン化フィブリノーゲンにおける関節リウマチの自己抗原部位の同定/第 35 回免疫学会総会・学術集会/横浜/2005 年 12 月/菅野栄美, 山田亮, 山中美弥子, 瀧澤泰伸, 沢田哲治, 山本一彦

8. 岡田随象・山本一彦・山田亮 集団構造化補正、Genomic Control 法のフィッシャー正確確率検定への応用 日本人類遺伝学会(2007) 東京

9. 廣澤 桂 山田 亮 松田文彦 一塩基多型(SNP)を用いた有意検定における、観測ジェノタイプ情報の組み込みに関する検討 日本人類遺伝学会(2007) 東京

3. 成果公開

研究室ウェブサーバにて、ツール公開 (平成 19 年度より)

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。

新しい治療薬の開発

分担研究者 首藤 紘一 財団法人 乙卯研究所 所長

研究要旨 主なレチノイドの作用として免疫機能への効果は著しい。既に医薬品として用いられている受容体選択性に優れたレチノイド、Am80（タミバロテン）、は免疫疾患として理解される乾癬に対して有効であり、リウマチモデル、多発性硬化症モデルでも顕著な作用がある。さらに、ジニトロベンゼンスルホン酸によって誘起される腸炎モデルに有効であった。免疫特に分泌腺に異常の顕著なNODマウスへAm80を投与すると糖尿の発生や分泌腺の病変が抑制された。また、筋炎モデルにおいてもAm80は病理スコアの改善した。これらの結果を総合すると、タミバロテンは自己免疫疾患の治療や進行の防止に臨床的に用いると判断される。これらの治療結果はレチノイドがT細胞の分化をTh17からTregへと強く傾けることによる効果が大きく寄与していると思われる。

A 研究目的

ビタミンAの活性体であるレチノイン酸に代表されるレチノイドは核内受容体RARを介して特定の遺伝子の発現を調節する。免疫機能にかかわる分子群も制御する。Am80（タミバロテン）は、RAR α , β に選択的に結合し活性化する合成レチノイドである。Am80は、MMPおよびIL-6の産生抑制、IL-6受容体の発現抑制等の機能があり、強い抗炎症作用を示す。コラーゲン誘起リウマチモデルにおいて、本レチノイドは強く炎症を抑制し、Th1傾向の強いとされる乾癬において臨床的に十分な効果を示し、細胞レベルにおいてもTh1経路の抑制をしめすことがわかっている。従って、その他のTh1型の自己免疫疾患にも有用な治療薬となりうる。

ここでは、Am80の自己免疫疾患への治療薬としての応用を図るための研究をおこなう。本薬はタミバロテンとして2005年に非細胞障害性の分子標的医薬品として、急性前骨

髄球性白血病の治療薬としての効能で承認されている。自己免疫抑制作用が明確になれば、SLEを

含む種々の自己免疫疾患の治療薬として臨床試験を開始できる環境にある。

B 研究方法

典型的なTh1優位の自己免疫疾患とされる多発性硬化症のモデル実験的自己免疫脳脊髄炎の症状の抑制にタミバロテンは有効である。したがって、かなりTh1的な疾患と見られるクローン病ないし炎症性大腸炎のモデルにおけるタミバロテンの効果を確認することから開始する。その結果にもとづいて、免疫異常マウス、筋炎モデルにおける治療効果を明確にする。

C 研究結果

(1) ジニトロベンゼンスルホン酸 (DNBS) を用いて炎症性腸疾患モデルラットを作成し、Am80が腸炎に与える影響を調べた。Am80を1日1回7日間継続的に経口投与したラットに対し、2日目にDNBSを結腸内に注入し、腸炎を誘発した。陽性対照としては、スルファサラジンを用いた。8日目にラットの結腸を切り出し、病理解析を行った。

スルファサラジン及びAm80投与群では、対照群と比較してラットの体重増加が見られた。体重あたりの結腸重量についても、スルファサラジン及びAm80投与群では著しい減少が見られた。下痢、腸の潰瘍化にも、対照群と比較して改善が見られた。特にAm80投与群では、腸の他臓器への癒着の無さがスルファサラジンより有意に観察された。

(2) 6週令の免疫異常マウスNODマウスに19週間にわたりタミバロテンを混餌投与する。体重、尿糖測定を行い、膵臓と唾液腺(顎下腺、耳下腺、舌下腺)の病理組織の解析を行う。

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

(3) 実験的多発性筋炎に対するAm80の効果: 南木、石堂らによって、ウサギミオシン免疫によりSJL/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優位に低下し、炎症細胞浸潤数は減少し、IgG1抗ミオシン交代賛成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

(4) 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.). Am80も同様な効果を有する(未発表)。

D 考察

クローン病の代表的なモデルを用いて実験をおこなった。Am80はここで有効性を示した。対照薬スルファサラジンにくらべて非常に低濃度で有効である。

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

E 結論

合成レチノイドAm80は、炎症性腸疾患に対して治療効果を持つことが示唆された。現在クローン病を対象に第2相試験がおこなわれている。多発性硬化症モデルでの有効性や、臨床における乾癬での有効性を考えると、Am80はTh1性の強い疾患に有効であると見られ、Tregへの分化の促進が確かめられつつあり、多くの自己免疫疾患の治療への適用を考えられる。

レチノイドの薬理作用についてはまだまだ未知の部分が多い。動脈硬化の発症、心血管系のリモデリング、さらには脳神経系の疾患、特に神経の再生を必要とする疾患や増殖性疾患においても、本剤による自己免疫を抑制する要素をもとにこれらの疾患の治療にも可能性を持つ。そのための基礎研究や関連研究も同時に進めている。

Am80は他の多くのレチノイドと比較し、RAR α への結合性を有さず、また活性化もしない。

RAR γ はむしろ炎症誘起性であるので、Am80は皮膚炎をはじめとする副作用が少ない。自己免疫疾患の治療には受容体選択性の高いAm80ないしAm580がより好ましい。

F. 健康危機情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

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

・Shid.S.,H.Tanabe,Y.Shimozaki,S.Koyano,
H.Kagechika,K.Shudo,S.Ozawa,J.Sawada,Y.Ohno,K.I
noue How DNA microalley technology contributes to
the retinoid evaluations

“Vitamin A: New Research” Ed. I.T.Loessing 71—92,
2007.

・深沢弘志、影近弘之、首藤紘一：レチノイドによる自己免疫疾患の治療。

日本臨床免疫学会誌 29:114—126,2006.

・Sanda T, Tkuwano T, Nakao T, Iida S, Ishida T,
Komatsu H, Shudo K, Kuwano M, Ono M, Ueda R,
Antimyeloma effects of a synthetic retinoid Am80
(Tamibarortene) through inhibition of angiogenesis.
Leukemia. 19, 901-909, 2005.

・Fujii K, Manabe I, Ishihara A, Oishi Y, Iwata H,
Nishimura G, Shindo T, Maemura K, Kagechika H,
Shudo K, Nagai R. Synthetic retinoid Am80
suppresses smooth muscle phenotypic modulation and
in-stent neointima formation by inhibiting KLF5.
Circ. Res. 25;97:1132-41, 2005.

2. 学会発表

・山形尚子、深沢弘志、影近弘之、首藤紘一炎症性腸疾患モデルラットにおける合成レチノイド

Am80の治療効果。石堂美和子、日本レチノイド研究会 第16回学術集会 p. 74
(Nov.10-11, 2005) 東京

・石堂、山形、影近、首藤

NODマウスにおける合成レチノイドAm80の治療効果。日本レチノイド研究会第17回学術集会
(2006)

・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）

・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）

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