

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った。

A. 研究目的

SLE リンパ球の自己寛容破綻の機序と寛容導入を目指し、免疫寛容維持に重要な分子機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

DO11.10 の脾臓細胞を OVA 蛋白で刺激し、10 日後に ionomycin 処理、ionomycin+cyclosporin A 処理群を比較し、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動 (2D Difference Gel Electrophoresis: 2D DIGE) 技術を用いた定量的な蛋白質発現差異解析法にて蛋白発現を網羅的に解析する。GRAIL の基質の同定並びに、各種自己免疫モデルにおける GRAIL 分子の機能を検討するために、GRAIL とその変異体の作製を行う他、GRAIL の遺伝子欠損マウスを作製した。

(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 DIGE2 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.
- 5) Pyz E, Naidenko O, Miyake S, Yamamura T, Berberich I, Cardell S, Kronenberg M, Herrmann T. The complementarity determining region 2 of BV8S2 (V beta 8.2) contributes to antigen recognition by rat invariant NKT cell TCR. *J.Immunol.* 176(12): 7447-55, 2006.
- 6) Miyamoto K, Miyake S, Mizuno M, Oka N, Kusunoki S and Yamamura T. Selective COX-2 inhibitor celecoxib prevents experimental autoimmune encephalomyelitis through COX-2 independent pathway. *Brain* 129: 1984-92, 2006.
- 7) Croxford JL, Miyake S, Huang Y-Y, Shimamura M and Yamamura T. Invariant V α 19i T cells regulate autoimmune inflammation. *Nat.Immunol.* 7:987-94, 2006.
- 8) Aranami T, Miyake S and Yamamura T. Differential expression of CD11c by peripheral blood NK cells reflects temporal activity of multiple sclerosis. *J.Immunol.* 177: 5659-67, 2006.
- 9) Ueno, Y., S. Tanaka, M. Sumii, S. Miyake, S. Tazuma, M. Taniguchi, T. Yamamura and K. Chayama: Single dose of OCH improves mucosal Th1/Th2 cytokine balance and prevents experimental colitis in the presence of V α 14 NKT cells in mice. *Inflamm. Bowel Disease* 11: 35-41, 2005.
- 10) Hashimoto D, Asakura S, Miyake S, Yamamura T, van Kaer L, Liu C, Tanimoto M and Teshima T. Stimulation of host natural killer T cells by synthetic glycolipid regulates acute graft-versus-host disease by inducible Th2 polarization of donor T cells. *J.Immunol.* 174: 551-6, 2005.
- 11) Murata K, Toba T, Nakanishi K, Takahashi B, Yamamura T, Miyake S and Annoura H. Total synthesis of an immunosuppressive glycolipid, (2S,3S,4R)-1-O-(alpha-d-galactosyl)-2-tetracosanoylamino-1,3,4-nonanetriol. *J.Org.Chem.* 70: 2398-401, 2005.
- 12) Yu KO, Im JS, Molano A, Dutronc Y, Illarionov PA,

- Forestier C, Fjiwara N, Arias I, Miyake S, Yamamur T, Chang YT, Besra GS, and Porcellli SA. Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acylvariants of α -galactosylceramides. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 102: 3383-8, 2005.
- 13) Ota T, Takeda K, Akiba H, Hayakawa Y, Ogasawara K, Ikarashi Y, Miyake S, Wakasugi H, Yamamura T, Kronenberg M, Raulet DH, Kinoshita K, Yagita H, Smyth MJ, Okumra K. IFN- γ -mediated negative feedback regulation of NKT cell function by CD94/NKG2. *Blood*, 106: 184-92, 2005.
- 14) Chiba A, Kaieda S, Oki S, Yamamura T and Miyake S. The involvement of V α 14 NKT cells in the pathogenesis of arthritis in murine models. *Arthritis Rheum.* 52:1941-8,2005.
- 15) Toba T, Murata K, Yamamura T, Miyake S and Annoura H. A concise synthesis of (3S,4S,5R)-1-(α -D-galactopyranosyl)-3-tetracosanoylamino-4,5-decanediol, a C-glycoside analogue of immunomodulating α -galactosylceramide OCH. *Tetrahedron Letters* 46: 5043-7, 2005.
- 16) Ronet C, Darche S, de Moraes ML, Miyake S, Yamamura T, Louis JA, Kasper LH, Buzoni-Gatel D. NKT Cells Are Critical for the Initiation of an Inflammatory Bowel Response against *Toxoplasma gondii*. *J.Immunol.*175: 899-908, 2005.
- 17) Oki S, Tomi C, Yamamura T and Miyake S. Preferential Th2 polarization by OCH is supported by incompetent NKT cell induction of CD40L and following production inflammatory cytokines by bystander cells in vivo. *Int.Immunol.* 17:1619-29, 2005.
- the therapeutic implication of glycolipid ligands for allergic diseases. *Allergol Int.* 56(1):7-14, 2007
- 2) Miyake S and Yamamura T. Glycolipid autoimmunity *Int. Rev. Immunol.* 26(1&2):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(1-2):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(4): 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(7): 72-77, 2007
- 7) 三宅幸子：iNKT 細胞：多彩な機能と病態への関与について *Jpn.J.Clin.Immunol.* 29(1): 27-36, 2006
- 8) 三宅幸子：NKT 細胞 分子リウマチ 3(3): 26-33, 2006
- 9) 三宅幸子：多発性硬化症における免疫制御細胞の役割とその賦活法 *多発性硬化症研究・治療の現状* 2006 50(4): 636-643, 2006
- 10) Miyake S and Yamamura T. Therapeutic potential of glycolipid ligands for natural killer (NK) T cells in the suppression of autoimmune diseases. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 5 (3): 315-22, 2005
- 11) 三宅幸子： α -ガラクトシルセラミドとその誘導態分子リウマチ 2(1): 39-46, 2005
- 12) 三宅幸子：免疫調節細胞と自己免疫疾患 *Mol. Med.*

総説

- 1) Oki S, Miyake S. Invariant Natural Killer (iNKT) cells in asthma: A novel insight into the pathogenesis of asthma and

42(4): 385-91, 2005

13) 三宅幸子 : 自己免疫病態調節と治療標的としての NKT 細胞 医学のあゆみ 213(1): 59-64, 2005

14) 三宅幸子 : OCH と CD1D 炎症と免疫 13(4): 134-6, 2005

15) 三宅幸子 : 多発性硬化症 最新医学 60(6): 183-92, 2005

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, Kaieda 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(9):S387, 2007)
- 4) Sakuishi K, Aranami S, Miyake S, Yamamura T. IL-2 costimulates IL-5 production by CD1d-reactive human CD4⁺ NKT cells: a novel pathway controlling NKT cell-mediated Th2 response. . Annual meeting of the American association of immunologists, Boston, May 14, 2006
- 5) Kaieda J, Oki S, Yamamura T, Miyake S. New synthetic glycolipid ligands for NKT-cells suppresses antibody-induced arthritis. 6th Annual Conference of FOCIS, San Francisco, June 2, 2006
- 6) Doi Y, Oki S, Satoh J-I, Aranami T, Miyake S, Yamamura T. NR4A2(Nurr1), an orphan nuclear receptor, is overexpressed in peripheral blood T lymphocytes of multiple sclerosis. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16, 2006 (J. Neuroimmunology. 178 S1,p78, 2006)
- 7) Croxford JL, Miyake S, Shimamura M, Yamamura T. Invariant V α 19-J α 33 NKT cells promote ICOS-dependent IL-10 production by B cells which regulated inflammation in a model of multiple sclerosis. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16, 2006 (J. Neuroimmunology. 85 S1,p85, 2006)
- 8) Aranami T, Miyake S, Yamamura T. CD11c on NK cells mirrors the disease activity of multiple sclerosis. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16, 2006 (J. Neuroimmunology. 178 S1,p102, 2006)
- 9) Miyamoto K, Miyake S, Kusunoki S, Yamamura T. Selective COX-2 inhibitor celecoxib prevents experimental autoimmune encephalomyelitis through COX-2 independent pathway. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16, 2006 (J. Neuroimmunology. 117 S1,p117, 2006)
- 10) Sakuishi K, Miyake S, Yamamura T. Control of IL-5 production in CD1d-reactive human CD4⁺ NKT cell clones from MS patients following exogenous IL-2 co-stimulation. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16, 2006 (J. Neuroimmunology. 147 S1,p102, 2006)
- 11) Oki S, Yamamura T, Miyake S. Natural killer T cell ligand OCH as a potential therapeutics for multiple sclerosis: Mechanism for OCH-induced TH2 polarization in vivo. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16, 2006 (J.

Neuroimmunology. 148 S1,p102, 2006)

- 12) Lin Y, Miyake S, Yamamura T. Induction of adaptive regulatory T cells during recovery of EAE sensitized with PLP136-150 in SJL/J mice: The presence of suppressor epitope within PLP. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16, 2006 (J. Neuroimmunology. 151 S1,p102, 2006)
- 13) Nagayama S, Miyake S, Yamamura T. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by transfer of lymphokine-activated natural killer (NK) cells. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16, 2006 (J. Neuroimmunology. 169 S1,p102, 2006)
- 14) Kaieda S, Oki S, Yamamura T, Miyake S. Activation of natural killer T cells with synthetic glycolipid suppresses antibody-induced arthritis. American College of Rheumatology 70th Annual Scientific Meeting, Washington, DC, November 13, 2006 (Arthritis Rheum. 54:S358, 2006)
- 15) Kaieda S, Chiba A, Oki S, Yamamura T, Miyake S. The involvement of CD1-restricted NKT cells in the pathogenesis of collagen-induced and antibody-induced arthritis. 5th Annual Conference of FOCIS, Boston, May 13, 2005
- 16) Sakuishi K, Miyake S, Yamamura T. Exogenous IL-2 promotes IL-5 production by human CD4⁺ NKT cell clones: The role of IL-2 in the immune regulation. 5th Annual Conference of FOCIS, Boston, May 13, 2005
- 17) Kaieda S, Oki S, Yamamura T, Miyake S. A new synthetic glycolipid suppresses murine models of arthritis by blocking of natural killer T cell activation. American College of Rheumatology 69th Annual Scientific Meeting, Orlando, Florida. October 25, 2004 (Arthritis Rheum. 52:S445, 2005)

国内学会

- 1) 中原とも子、阿部香織、千葉麻子、山村隆、橋本博史、三宅幸子：膠原病患者における CD1d 拘束性 NKT 細胞の糖脂質抗原に対する反応性の検討、第49回日本リウマチ学会、横浜、4月20日、2005
- 2) 海江田信二郎、千葉麻子、Ludovic Croxford, 大木伸司、山村隆、三宅幸子：マウス関節炎モデルにおける V α 14NKT 細胞ならびに V α 19NKT 細胞の機能解析 第49回日本リウマチ学会、横浜、4月19日、2005
- 3) 水野美歩、大木伸司、海江田信二郎、任海千春、山村隆、三宅幸子：新規糖脂質リガンドによる NKT 細胞を介した病態制御。第35回日本免疫学会、横浜、12月13日、2005
- 4) 塚本和行、林青順、大辻季樹、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、横浜、12月13日、2005
- 5) 任海千春、大木伸司、山村隆、三宅幸子：OCH による NKT 細胞依存性 Th2 誘導における免疫ネットワークの関与、第35回日本免疫学会、横浜、12月13日、2005
- 6) 作石かおり、荒浪利昌、大木伸司、三宅幸子、山村隆：Exogenous IL-2 promotes IL-5 production by human CD4⁺ NKT cell clones: The role of IL-2 in the immune regulation. 第35回日本免疫学会、横浜、12月13日、2005
- 7) Croxford Ludovic, Miyake Sachiko, Shimamura Michio, Yamamura Takashi: V α 19-J α 33 invariant NKT cells regulated experimental autoimmune encephalomyelitis. 第35回日本免疫学会、横浜、12月13日、2005
- 8) 大木伸司、海江田信二郎、山村隆、三宅幸子：新規糖脂質リガンドによる NKT 細胞を介した病態制御—マウス気道アレルギーモデルにおける抑制効果—第35回日本免疫学会、横浜、12月13日、2005

- 9) 海江田信二郎、大木伸司、山村隆、三宅幸子 : NKT 細胞活性制御作用を介した新規合成糖脂質によるマウスモデル関節炎の抑制 : 第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005
- 10) Croxford JL, Miyake S, Shimamura M, Yamamura T: Invariant V α 19-J α 33 NKT cells promote ICOS-dependent IL-10 production by B cells which regulate inflammation in a model of multiple sclerosis. 第 18 回日本神経免疫学会学術集会、名古屋、3 月 2 日、2006
- 11) 海江田信二郎、大木伸司、山村隆、三宅幸子 : NKT 細胞活性制御作用を介した新規合成等脂質によるマウスモデル関節炎の抑制 第 50 回日本リウマチ学会、長崎、4 月 24 日、2006
- 12) 大塚敬男、三宅幸子、林幼偉、山村隆 : 実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)における Neuropeptide Y (NPY) の役割 第 47 回日本神経学会、東京、5 月 13 日、2006
- 13) Croxford JL, Miyake S, Shimamura M, Yamamura T: Invariant V α 19-J α 33 NKT cells promote ICOS-dependent IL-10 production by B cells which regulate inflammation in a model of multiple sclerosis. 第 18 回日本神経免疫学会学術集会、名古屋、3 月 2 日、2006
- 14) 海江田信二郎、大木伸司、山村隆、三宅幸子 : NKT 細胞活性制御作用を介した新規合成等脂質によるマウスモデル関節炎の抑制 第 50 回日本リウマチ学会、長崎、4 月 24 日、2006
- 15) 大塚敬男、三宅幸子、林幼偉、山村隆 : 実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)における Neuropeptide Y (NPY) の役割 第 47 回日本神経学会、東京、5 月 13 日、2006
- 16) 作石かおり、三宅幸子、山村隆 : IL-2 を介した CD4 陽性 NKT 細胞クローンにおける Th2 サイトカインの選択的産生 第 36 回日本免疫学会、大阪、12 月 11 日、2006
- 17) Lin Y, Croxford L, Miyake S, Yamamura T. Induction of adaptive regulatory T cells expressing CD103 besides CD25 and Foxp3 during recovery of EAE. The presence of suppressor epitope within encephalitogenic peptide. 第 36 回日本免疫学会、大阪、12 月 11 日、2006
- 18) Croxford JL, Miyake S, Shimamura M, Yamamura T. Invariant V α 19-J α 33 NKT cells promote ICOS-dependent IL-10 production by B cells which regulated inflammation in a model of multiple sclerosis. 第 36 回日本免疫学会、大阪、12 月 11 日、2006
- 19) Doi Y, Oki S, Miyake S, Yamamura T. Functional analysis of NR4A2, an orphan nuclear receptor, on the development of autoimmune encephalomyelitis. 第 36 回日本免疫学会、大阪、12 月 11 日、2006
- 20) Fujita M, Ootsuka T, Oki S, Mizuno M, Tomi C, Kaieda S, Miyake S, Yamamura T. Role of carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. 第 36 回日本免疫学会、大阪、12 月 11 日、2006
- 21) Tsukamoto K, Lin Q, Ohtsuji M, Nakamura K, Tsurui H, Miyake S, Yamamura T, Hirose S. Role of NKT cells in systemic lupus erythematosus. 第 36 回日本免疫学会、大阪、12 月 11 日、2006
- 22) 海江田信二郎、水野美歩、大木伸司、坂口志文、坂口敦子、山村隆、三宅幸子 : SSKG マウスにおける結核死菌投与による関節炎の誘導 : 第 36 回日本免疫学会、大阪、12 月 11 日、2006
- 23) 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
- 24) 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
- 25) 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
- 26) 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
- 27) 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
- 28) 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
- 29) 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
- 30) 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
- 31) 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
- 32) 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
- 33) 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
- 34) 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ー 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
- 35) 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
- 36) 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
- 37) 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。本研究の目的は、それらのペプチドから、疾患特異的ペプチドを検出同定する方法を確立し、全身性エリテマトーデスをはじめとする全身性自己免疫疾患の病態解明や早期診断に有用な血中ペプチドを探索することである。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った。強皮症、全身性エリテマトーデス、および関節リウマチなど患者血清を用いて、検出解析を行なった結果、試料中にそれぞれの疾患に特異的なペプチドの検出が可能であることが判明した。さらに、その一部はアミノ酸配列も同定可能であった。同手法を利用は全身性自己免疫疾患の病態解明と診断・治療法の開発に貢献するペプチドの同定につながる可能があり、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

本研究は血清中のペプチドを検索同定する方法を開発し、全身性自己免疫疾患の病態解明や早期診断に有用なペプチドを得ることを目的とする。強皮症、全身性エリテマトーデス、多発性筋炎あるいは関節リウマチといった全身性自己免疫疾患は、一般に難治性かつ予後不良であり、病因解明が社会的要請である。発症機序として自己免疫機序が中心と考えられているが、その詳細は不明である。こうした病因不詳の疾患の解明を目指した研究においては、従来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、候補分子のアプローチに加えて、特定の分子を設定しないで疾患関連分子を検索していく方法、すなわち仮説フリーの網羅的スクリーニングも必要かつ有効となる。ここでは、その網羅的検索方法として、検索対象を分子量が 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で、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。各種全身性自己免疫疾患患者血清を用いた検討で疾患特異的なペプチドの検出と同定が可能であることが判明した。本アプローチにより全身性自己免疫疾患の病態解明や早期診断に有用なペプチドを得る可能性がある。

B. 研究方法

ペプチドの分離精製

全身性自己免疫疾患患者血清各 50 μ l 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、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

全身性自己免疫疾患のうち、強皮症患者血清を用いて行った最初の検討では 5 μ l の血清から MALDI-TOF 型質量分析器により 100 以上のペプチドが検出され、本法がペプチドの網羅的解析に有用であることが判明した。さらに、20 個以上の強皮症特異的ペプチドが検出され、疾患関連ペプチドの網羅的検索にも有用なことが判明した。MALDI-TOF/TOF 型質量分析器を用いたペプチド同定で、強皮症に特異的なペプチドは補体 C3f ペプチドから C 末端のアルギニン残基が離脱した des-Arg-C3f とその派生ペプチド、補体 C4 の断片である C4adg がメチル化されたペプチドなどが含まれていた。興味深いことには、メチル化されていない同配列の C4 断片には強皮症特異性はなく、側鎖修飾の違いが疾患特異性に貢献していることが判明した。さらに全身性エリテマトーデスについても同様の検討を行い、やはり全身性エリテマトーデスに特異的に出現するペプチドピークを検出した。また、全身性エリテマトーデスの臓器症状に関連するペプチドの検出を開始し、現在検討を進めている。

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、疾患特異的小ペプチドの検出および同定法の確立を試みた。その結果、強皮症や全身性エリテマトーデスにおける検討で疾患特異的ペプチドの存在を確認し、さらにその一部についてペプチドのアミノ酸配列まで同定できた。

E. 結論

ペプチドの網羅的解析法、すなわちペプチドミクスより得られた各種全身性自己免疫疾患特異的血清ペプチドは、当該全身性自己免疫疾患の病因関連分子として、診断あるいは治療モニタリングなど臨床経過把握分子として有用である可能性があり、全身性自己免疫疾患の克服に貢献しうる。今後、得られたペプチドの病態的意義を探っていく必要がある。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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, Kato T. Comprehensive investigation of 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: 2018-2030, 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: 673-681, 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: 3307-3318, 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: 858-865, 2007.
 10. Masuko K, Murata M, Xiang Y, Nakamura H, Yudoh K, Nishioka K, Beppu M, Kato T. Trypsase enhances release of vascular endothelial growth factor from human osteoarthritic chondrocytes. *Clin Exp Rheumatol.*: 25:860-865, 2007.
 11. Tanaka M, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K, Nakamura H. Suppressive effects of hyaluronan on MMP-1 and RANTES production from chondrocytes. *Rheumatol Int*. 26: 185-190, 2006.
 12. Tanaka Y, Nakamura M, Matsui T, Iizuka N, Kondo H, Tohma S, Masuko K, Yudoh K, Nakamura H, Nishioka K, Koizuka I, Kato T. Proteomic surveillance of autoantigens in relapsing polychondritis. *Microbiol Immunol*. 50: 117-126, 2006.
 13. Ishiyama M, Teramura M, Iwabe K, Kato T, Motoji T. Clonally expanded T-cells in the peripheral blood of patients with idiopathic Thrombocytopenic purpura and Helicobacter pylori infection. *Int J Hematol*. 83: 147-151, 2006.
 14. Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Imajoh-Ohmi S, Fukuda H, Yudoh K, Masuko-Hongo K, Nishioka K, Kato T. Fibulin-4 is a target of autoimmunity predominantly in patients with osteoarthritis. *J Immunol*. 176:3196-3204, 2006.
 15. Dai SM, Shan ZZ, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K, Yudoh K. Catabolic stress induces features of chondrocyte senescence through overexpression of caveolin 1: possible involvement of caveolin 1-induced down-regulation of articular chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 54: 818-831, 2006.
 16. Murata M, Yudoh K, Nakamura H, Kato T, Inoue K, Chiba J, Nishioka K, Masuko-Hongo K. Distinct signaling pathways are involved in hypoxia- and IL-1-induced VEGF expression in human articular chondrocytes. *J Orthop Res*: 24: 1544-1554, 2006.
 17. Nakamura H, Tanaka M, Masuko-Hongo K, Yudoh K, Kato T, Beppu M, Nishioka K. Enhanced production of MMP-1, MMP-3, MMP-13, and RANTES by interaction of

- chondrocytes with autologous T cells. *Rheumatol Int.* 26: 984-990, 2006.
18. Takahashi H, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Koibuchi T, Suzuki M, Kato T, Nakamura T, Iwamoto A, Nishioka K, Iino S, Koike K, Itoh F. Molecular epidemiology of hepatitis A virus in metropolitan areas in Japan. *J Gastroenterol.*: 41: 981-986, 2006.
 19. Xiang Y, Masuko-Hongo K, Sekine T, Nakamura H, Yudoh K, Nishioka K, Kato T. Expression of proteinase-activated receptors (PAR)-2 in articular chondrocytes is modulated by IL-1beta, TNF-alpha and TGF-beta. *Osteoarthritis Cartilage.*: 14: 1163-1173, 2006.
 20. Kosuke Matsuo, Yang Xiang, Hiroshi Nakamura, Kayo Masuko, Kazuo Yudoh, Koji Noyori, Kusuki Nishioka, Tomoyuki Saito, Tomohiro Kato. Identification of novel citrullinated autoantigens of synovium in rheumatoid arthritis using a proteomic approach. *Arthritis Research & Therapy*: 8: R175, 2006.
 21. Matsuoka A, Kato T, Soma Y, Takahama H, Nakamura M, Matsuoka H, Mizoguchi M. Analysis of T cell receptor (TCR) BV-gene clonotypes in NC/Nga mice developing dermatitis resembling human atopic dermatitis. *J. Dermatol. Sci.* 38:17-24, 2005.
 22. Orita M, Masuko-Hongo K, Yotsuyanagi H, Matsui T, Suzuki-Kurokawa M, Nishioka K, Kato T. Molecular transplantation: delivery of membranous proteins onto live cells. *Anal Biochem.* 340: 184-186, 2005.
 23. Yudoh K, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K. Catabolic stress induces expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 alpha in articular chondrocytes: involvement of HIF-1 alpha in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 7:R904-914, 2005.
 24. Shibakawa A, Yudoh K, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K, Nakamura H. The role of subchondral bone resorption pits in osteoarthritis: MMP production by cells derived from bone marrow. *Osteoarthritis Cartilage.* 13: 679-687, 2005.
 25. Du H, Masuko-Hongo K, Nakamura H, Xiang Y, Bao CD, Wang XD, Chen SL, Nishioka K, Kato T. The prevalence of autoantibodies against cartilage intermediate layer protein, YKL-39, osteopontin, and cyclic citrullinated peptide in patients with early-stage knee osteoarthritis: evidence of a variety of autoimmune processes. *Rheumatol Int.* 26: 35-41, 2006.
- 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 サイトカインは免疫応答や炎症反応の調節にかかわる機能分子であり、サイトカインの調節異常が SLE の病態に関わる可能性が考えられる。SLE の病態形成にかかわる分子を見出すために、DNA マイクロアレイを用いて患者末梢血中に発現する分子群を網羅的に解析した結果、健康人に比べて SLE 患者で 1641 分子に発現の異常が見られた。その上位には IFN α によって誘導される 9 分子ならびに defensin- α を含む24分子があり、これらの分子群は SLE の疾患活動性を反映した。また、上記の 1641 分子を Gene Ontology 解析により機能分類し、SLE で見られる細胞機能異常を検索したところ、SLE では defense response の異常がみられ、この defense response のカテゴリーに含まれる分子のネットワーク解析より、TNF を含むサイトカインカスケードの異常が示唆された。しかも SLE のサイトカイン異常の中心的役割をなす IFN α に対し TNF は拮抗した。一方、SLE 病態形成に関わるサイトカインの 1 つである IL-6 の作用を阻害するヒト化抗 IL-6 レセプター抗体 (tocilizumab) によるパイロットスタディを行った。IL-6 阻害治療により、defensin- α を含む5分子が有意に改善したことから、これらの分子の SLE 病態への関与が考えられた。

A. 研究目的

サイトカインは免疫応答や炎症反応の調節にかかわる機能分子であり、SLE の病態形成への関与が考えられる。IL-6 は免疫や炎症反応にかかわるサイトカインであり、ループス腎炎や、CNS ループス、血管炎などの難治性病態の形成において重要な役割を果たしていることが示唆される。実際に、活動性のループス腎炎患者の尿中や、CNS ループス患者の髄液中、血管炎患者血液中には高濃度の IL-6 が検出され、疾患活動性を反映することが報告されている。そこで、ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体 (tocilizumab) による SLE 治療の可能性を検討した。一方、DNA マイクロアレイ技術の進歩とバイオインフォーマティクスを組み合わせることにより、DNA の発現を網羅的に解析するのみならず分子間の相互作用を描出することが可能になった。そこで、SLE の病態形成にかかわる分子を見出すために、DNA マイクロアレイを用いて患者末梢血中に発現する分子群の網羅的な解析を行った。また、同手法を用いて IL-6 阻害治療に関連する分子の同定を試みた。

B. 研究方法

インフォームドコンセントを得た SLE 患者 11 例と健康成人女性 6 例の末梢血全血より PAX geneTM ならびに RNA Blood KitTM (PreAnalytiX, Hombrechtikon, Switzerland)を用いて total RNA を抽出し、Amino Alkyl MessageAmpTM aRNA kit (Ambion Inc. Austin, Texas)にて増幅後標識し、ヒトの 3 万個の遺伝子からデザインしたオリゴ DNA 搭載マイクロアレイ DNA チップ (Human Oligo Chip Human 30K, AceGene®, DNA Chip Research Inc. & Hitachi Software Engineering Co., Ltd., Yokohama) にハイブリダイゼーションを行い、末梢血細胞中に発現している分子の RNA 発現量を測定した。個々の症例における発現量は、健康成人女性 12 例の末梢血より抽出した標準 RNA を用いた。SLE 患者と健康人女性と比べ発現に有意差がみられた分子を同定するとともにクラスター解析を行った。

ISN/RPS 分類の VI 型ループス腎炎に対しエンドキサンパルス療法を行った新規患者ならびに従来の免疫抑制療法に抵抗性で、tocilizumab による探索的治療を行った難治性の SLE 患者において、その治療

前後で発現量が変化する分子を DNA チップにより検索した。エンドキサンパルス療法前後の分子発現プロフィールを前述の SLE 患者 11 例と健常成人女性 6 例と共にクラスター解析を行った。その際、前述の病態関連分子を用いてクラスタリングを行った。また、IL-6 阻害治療によって有意に変動する分子をしぼりこんだ。

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。これにより描出された TNF、INF γ 、IL-4 や IL-13 を含むサイトカインネットワークを構成する分子の発現に対する TNF、INF γ 、IL-4、IL-13 ならびに IFN α の相互作用をリアルタイム PCR で検討した。

（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

H17 年度には、SLE 患者と健常人との比較により発現の異常が見られる 1641 分子（増加：752、減少：889）を同定した。その上位 24 分子には IFN α によって誘導される 9 分子ならびに defensin- α ファミリー分子があった。IV 型ループス腎炎の患者に対しエンドキサンパルス療法を行った症例の mRNA 発現プロフィールを治療前後で比較したところ、上記 24 分子は疾患活動性を反映することが確認された。

また、免疫抑制療法や rituximab に抵抗性を示した難治性 SLE 患者に、ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体 (tocilizumab) による探索的治療を行い、tocilizumab の投与前後の末梢血細胞中の mRNA 発現変動の比較を行ったところ defensin- α 3 と α 4 を含めた 5 分子が IL-6 阻害に伴い変動する事を明らかにした。これらの分子は SLE の病態にかかわると考えられた。

H18 年度には、DNA マイクロアレイを用いて患者末梢血における遺伝子発現を網羅的に解析して得られた 1641 分子を Gene Ontology 解析により機能分類し、SLE で見られる細胞機能異常を検索した。そ

の結果、SLE では defense response の異常に加え、protein biosynthesis の抑制、proteolysis の亢進がみられた。さらに defense response のカテゴリーに含まれる分子のネットワーク解析より、TNF を含むサイトカインネットワークカスケードの異常の存在が示唆された。さらに INF γ 、IL-4、IL-13 のカスケード異常も描出され、これらのサイトカインが病態形成にかかわる可能性を明らかにした。

H19 年度は、上記 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) についてこれらの発現調節に対するサイトカインの相互作用を検討した。TNF による *in vitro* 刺激実験では、IFIT3 を除き SLE 患者と健常人間で基本的に差は認めなかった。しかし、IFIT3 については、IFN α は発現を増強し、TNF は IFN α と拮抗してそれを抑制することを示し、IFN と TNF の相互調節機構の存在を明らかにした。

D. 考察

SLE の病態に IFN α が関与することが確認されたが、TNF、INF γ 、IL-4、IL-13 を含め複数のサイトカインが相互に調節していると考えられる。すなわち病態解析には複数のサイトカインのネットワークを常に検討しなくてはならない。

DNA チップで同定された 24 分子を用いることにより病勢の診断が可能であるかもしれない。また、他の自己免疫疾患の鑑別にも有用である可能性がある。

今回 IL-6 阻害治療は、1 例のみであり、このことから有用性を評価することはできないが、米国での第 1 相臨床試験でネガティブなデータは出でおらず、今後、臨床研究の中でその有用性が明らかになると思われる。

E. 結論

DNA チップとバイオインフォーマティクスを用いた病態解析によりサイトカインネットワークの異常が見出された。また、病態形成にかかわると考えられるいくつかの分子が見出された。IL-6 阻害治療

の有用性は今後の研究が必要である。

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. Nishimoto N, Kishimoto T. Update on interleukin-6 In: *Smolen J, Lipsky P, eds. Contemporary Targeted Therapies in Rheumatology*: London: martin Dunitz. p149- 158, 2007
2. 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.
3. 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.
4. Nakahara H, Nishimoto N. Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy in rheumatic diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 6:373-81, 2006.
5. Nishimoto N, Kishimoto T. Interleukin 6: from bench to bedside. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2:619-26, 2006
6. Nishimoto N, Interleukin-6 in rheumatoid arthritis.*Curr Opin Rheumatol*. 18:277-81, 2006.
7. Doganci A, Eigenbrod T, Krug N, De Santis,GT, Hausding M, Erpenbeck VJ, Haddad, E,Bopp T, Kallen KJ, Herz U, Schmitt S, Luft C, Hecht O, Hohlfeld JM, Nishimoto N, et al. The IL-6 chain controls lung CD4+CD25+ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo. *J. Clin. Invest*. 115: 313-325, 2005.

8. Yokota S, Miyamae T, Imagawa T, Iwata N, Katakura S, Mori M, Woo P, Nishimoto N, et al. Therapeutic Efficacy of Humanized Recombinant Anti-IL 6-Receptor Antibody for Children with Systemic-Onset Juvenile Idiopathic Arthritis. *Arthritis Rheum*. 52: 818-825, 2005.
9. Mihara M, Nishimoto N, Ohsugi Y. The therapy of autoimmune diseases by anti-interleukin-6 receptor antibody. *Expert Opin Biol Ther*. 5:683-690, 2005.
10. Nishimoto N. Clinical study in patients with Castleman's disease, Crohn's disease and rheumatoid arthritis in Japan. *Clin. Rev. in Allergy and Immunol*. 28:221-230, 2005.
11. Nishimoto N. Cytokine signal regulation and autoimmune disorders. *Autoimmunity* 38:359-367, 2005.
12. Nishimoto N, Kanakura Y, Aozasa K, et al. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman's disease. *Blood* 106:2627-2632, 2005.

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ー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 第 16 回国際リウマチシンポジウム パシフィコ横浜. 横浜.2007.4.26
2. 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ー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
3. 石川悟, 他. DNA チップを用いた末梢血遺伝子プロファイルによる若年性特発性関節炎(JIA)の病態関連分子の解析. 第 50 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2006.4.23-26.
4. Nishimoto N. IL-6 inhibitor The 16th International Rheumatology Symposium.

Yokohama 2007.4.27

5. 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
6. Nishimoto N. Humanized anti-IL-6 receptor antibody treatment of rheumatoid arthritis. The 15th International Rheumatology Symposium. Nagasaki Japan 2006.4.24
7. Nishimoto N. Benefits of IL-6 inhibition in adult rheumatoid arthritis: an international experience. Tocilizumab Satellite Symposium in the Annual European Congress of rheumatology EULAR 2006. Amsterdam, The Netherlands. 2006
8. Nishimoto N. Miyasaka N. Yamamoto K. Kawai S. Takeuchi T. Azuma J. Kishimoto T. Efficacy and safety of tocilizumab in monotherapy, an anti-IL-6 receptor monoclonal antibody, in patients with active rheumatoid arthritis: results from a 24 week double-blind phase III study. Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2006. Amsterdam, The Netherlands. 2006. 6.21-24
9. Ishikawa S. Aoki C. Yoshio N. Nakahara H. Saito K. Tanaka Y. Kishimoto T. Nishimoto N. DNA microarray analysis of SLE related genes that respond to IL-6 blockade with tocilizumab, an anti-IL-6 receptor monoclonal antibody. Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2006. Amsterdam, The Netherlands. 2006.6. 21- 24
10. Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Azuma J, Kishimoto T. Consistent clinical response resulted from three Japanese randomized controlled trials of tocilizumab, humanized anti-IL-6 receptor antibody, in active rheumatoid arthritis(RA) patients. ACR2006. Washington, DC. 2006.11.10-15
11. Nishimoto N. Anti-IL-6 receptor antibody therapy for immunological diseases. Keystone Symposia: Cytokines, Disease and Therapeutic Intervention.

2005.2.12-17.

12. Nishimoto N. et al. Blocking interleukin-6 (IL-6) by tocilizumab (a humanized anti-IL-6 receptor antibody) monotherapy reduces joint damage in active rheumatoid arthritis –evidence from an X-ray reader-blinded randomized controlled trial-. ACR/ARHP 69th Annual Scientific Meeting 2005. 2005.11.17

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。

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、既存の治療に抵抗性の重症 SLE 20 症例を対象に、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パイロットスタディを実践し、高い臨床効果を確認した。また、当該班の構成員を中心に中～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 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った。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い、これらの問題点の検証を行った。一方、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る(液性免疫の制御)。一方、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。

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 細胞は重要な役割を担い、また、B 細胞は治療標的として重要である。申請者らは、既存治療に抵抗性の重症 SLE 20 症例を対象に、B 細胞リンパ腫に保険収載される B 細胞抗原 CD20 に対する抗体リツキシマブを用いたパイロットスタディを実践し、高い臨床効果を確認した。本研究では、当該班の構成員を中心に中～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 GCP 準拠第 I / II 相臨床試験を実践し、有効性、副作用、HACA 産生などの問題点の検証を行った。また、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。さらに、リツキシマブの作用機序を解析した。

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属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) 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。24 週間経過観察期間中の有害事象は、3 例に感染症を併発したが、いずれも経口抗生剤の投与により改善した。注射時反応は、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 例で陽性であったが、疾患活動性には影響がなかった。
- (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) 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。
- (6) 中枢神経系と腎障害に於いて、改善傾向が顕著であった。
- (7) 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 MCR、6 例が PCR、1 例は NR であった。
- (8) 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。

- (9) 2 年間の経過中、7 例で重篤な有害事象を認めた(2 例は死亡、1 例は横断性脊椎炎)。
- (10) 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脳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。
- (11) 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。
- (12) B 細胞表面抗原の解析では、CD19 陽性細胞上の CD40 および CD80 は、投与後速やかに発現分子数が減少し、半年後にも減弱が維持された。CD4 陽性細胞上の CD40L と ICOS、CD69 の発現低下も認められた。

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、安全性と有効性等が明らかになった。末梢血 CD20 陽性 B 細胞数は全例に於いて、14 日以内に消失し、3~6 ヶ月間維持され、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。また、HACA は、7 例中 3 例で陽性(リツキシマブの検出限界以下)であったが、疾患活動性には影響がなかった。一方、有効性評価としては、14 例中 2 例が MCR、7 例が PCR を示し、特に、中枢神経系と腎障害に於いて、改善傾向が顕著であった。

その後、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た。

一方、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。今後、寛解導入や臨床症状改善に伴い減弱する遺伝子に関する DNA マイクロアレイ解析とも併せて、より効率的な疾患制御の可能性を探求する。

以上から、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、現在、臨床第 II/III 相臨床試験(現在約 40 施設を認定)を実施中である。

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、安全性と有効性が確認された。さらに、2 年間の追跡調査を行い、長期的有効性の確認と問題点の検証を行った。現在、全国で臨床第 II/III 相臨床試験を実施し、有用性と安全性を検討中である。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka Y. B cell-targeting therapy using anti-CD20 antibody rituximab in inflammatory autoimmune diseases. Internal Medicine (in press)
2. 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.

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 Rheumatol . 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. β 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. Tanaka Y., Tokunaga M. Rituximab reduces both quantity and quality of B cells in SLE. Rheumatology. 45: 122-123, 2006.
8. Tsujimura S, Saito K, Kohno K, Tanaka Y. Fragmented hyaluronan induces transcriptional up-regulation of the multidrug resistance-1 gene in CD4+ T cells. J Biol Chem. 281, 38089-97, 2006.
9. Tanaka Y. Anti-CD20 and other novel biotherapies for systemic lupus erythematosus. APLAR J Rheumatol. 9, 413-418, 2006.
10. Tokunaga M, Fujii K, Saito K, Nakayamada S, Tsujimura S, Nawata M, Tanaka Y. Down-regulation of CD40 and CD80 on B cells in patients with life-threatening systemic lupus erythematosus after

successful treatment with rituximab. *Rheumatology*. 44: 176-182, 2005.

11. Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, Nakano K, Tanaka Y. Clinical relevance of expression of P-glycoprotein on peripheral lymphocytes to steroid-resistance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 52, 1676-1683, 2005.
 12. Saito K, Nawata M, Iwata S, Tokunaga M, Tanaka Y. Extremely high titre of antihuman chimeric antibody following re-treatment with rituximab in a patient with active systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*. 44, 1462-1464, 2005.
- ## 2. 学会発表
1. Tanaka Y, Tokunaga M, Kawabata D, Imura Y, Fujii T, Nawata M, Tsujimura S, Nakayamada S, Mimoro M, Saito K. Efficacy of Rituximab (anti-CD20) for Refractory Systemic Lupus Erythematosus Involving the Central Nervous System. The 69th National Meeting of American college of Rheumatology, San Diego. 2005 年
 2. 田中良哉. 生物学的製剤と膠原病の臨床：治療のブレークスルーを目指して. 第 102 回日本内科学会総会(教育講演)大阪. 平成 17 年
 3. 田中良哉. B 細胞を標的とした SLE の治療. 第 49 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 17 年
 4. 田中良哉. 膠原病における免疫抑制 — 生物学的製剤によるパラダイムシフト —. 第 26 回日本炎症・再生医学会総会(シンポジウム)東京. 平成 17 年
 5. 田中良哉. SLE に対する抗 CD20 抗体療法. 第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会(シンポジウム)盛岡, 平成 17 年
 6. 田中良哉. 炎症性免疫疾患に対する抗 CD20 抗体療法. 第 103 回日本内科学会(シンポジウム)横浜. 平成 18 年 4 月 14-16 日
 7. 田中良哉. B 細胞の CD20 をターゲットとしたリウマチ性疾患の治療戦略. 第 50 回日本リウマチ学会総会・学術集会(シンポジウム)長崎. 平成 18 年 4 月 23-26 日
 8. 田中良哉, 山本一彦, 竹内勤, 西本憲弘, 宮坂信之, 住田孝之, 三森経世, 小池隆夫. 全身性エリテマトーデスを対象とした抗 CD20 モノクローナル抗体リツキシマブの臨床第 I / II 相試験(中間報告). 第 50 回日本リウマチ学会総会・学術集会(シンポジウム)長崎. 平成 18 年 4 月 23-26 日
 9. 田中良哉. 治療抵抗性 SLE の免疫抑制薬療法. 第 27 回日本炎症・再生学会(シンポジウム)東京. 平成 18 年 7 月 11 日~7 月 12 日
 10. 田中良哉. CD20 抗体療法による炎症性免疫疾患の治療. 第 27 回日本臨床薬理学会年会(シンポジウム)東京. 平成 18 年 11 月 29 日-12 月 1 日
 11. 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
 12. 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
 13. 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
 14. 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

15. 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
16. 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
17. 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

なし

3. その他

なし