

## 1. 論文発表

なし

## 2. 学会発表

Yousuke Murakami, Tohru Akahoshi, Naoko Aoki, Masayasu Toyomoto, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka. TREM-1 blockade suppressed the development of collagen-induced arthritis. Keystone symposium February 24-29, 2008, Keystone

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

出願準備中

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

免疫制御性分子発現多機能ウイルスベクターを用いた疾患特異的免疫制御法の  
開発に関する研究

分担研究者 三森 経世 京都大学大学院医学研究科臨床免疫学 教授  
研究研究者 白井 崇 京都大学大学院医学研究科臨床免疫学 助教

研究要旨

本研究の目的は、未だに特異的な治療法が存在しないリウマチ性疾患治療の新たな治療戦略を確立することである。そのためにはまず病態を正確に解析・把握し、そのデータに基づき特異的な制御法を構築することが重要である。その一つの可能性として関節リウマチモデルマウスにおける遺伝子改変活性化型 TGF- $\beta$  を発現する抗原特異的 CD4<sup>+</sup> T 細胞を用いた細胞移入療法の可能性について解析・検討をすすめてきた。本年度は、これまで Th1 病と認識されてきた関節リウマチや II 型コラーゲン誘導関節炎モデルマウス(CIA)が実は Th17 病であるとの報告が相次いだため、その Th17 分化に TGF- $\beta$  が悪影響を及ぼす可能性がないかどうかについて in-vitro および in-vivo (CIA)実験系を用いて解析した。その結果、少なくとも in-vivo において活性化型 TGF- $\beta$  産生細胞が他の T 細胞に働き Th17 分化を促進して pro-inflammatory に働く可能性は否定された。また最近ヒトにおいては、TGF- $\beta$  は Th17 分化に何ら寄与しないとの報告もあり、活性化型 TGF- $\beta$  を用いた遺伝子治療において Th17 病態を悪化させる可能性は否定的と考えられた。また予想に反して、CIA 罹患関節局所での主たる IL-17 産生細胞が  $\gamma\delta$ T 細胞であることが判明し、CIA の系でも自然免疫の持つ役割が大きいことが示唆された。今後この IL-17 産生  $\gamma\delta$ T 細胞がどこからどのように刺激を受けホーミングしてくるのが分かれば病態の理解が深まり、新たな免疫制御物質の選択あるいは開発に有用な情報になると考えられた。

A. 研究目的

現在、関節リウマチを始めとする自己免疫疾患に対する治療は、副腎皮質ホルモンや免疫抑制剤の全身投与に頼らざるをえない。これらの治療法はいずれも疾患非特異的・臓器非特異的な治療法ばかりであり、その薬理効果は全身の副作用となって現れる。本研究の目的は、未だに特異的な治療法が存在しないリウマチ性疾患治療の新たな治療戦略として、免疫制御性遺伝子を発現する抗原特異的 CD4<sup>+</sup> T 細胞を用いた細胞移入療法の可能性について解析・検討することである。我々は、まず Th1 あるいは Th17 反応過剰が病態の中心であり、膠原病の中で最も頻度が高い関節リウマチ(RA)に対する新規治療戦略の構築に集中してきた。特に新しい遺伝子治療のひとつとして、ウイルスベクターを用いて獲得免疫制御性遺伝子を試験管内で抗原特異的エフェクター CD4<sup>+</sup> T 細胞に導入し体内に戻すという細胞移入治療の可能性を探るため、まず II 型コラーゲン誘導関節炎(CIA)マウスを用いて検討し、さらにヒトでの臨床応用の可能性を追求してきた。

本年度は、これまで Th1 病と認識されてきた関節リウマチや II 型コラーゲン誘導関節炎モデルマウス(CIA)が実は Th17 病であるとの報告が相次いだため、その Th17 分化に TGF- $\beta$  が悪影響を及ぼす可能性がないかどうかについて我々の in-vitro および in-vivo (CIA)実験系を用いて解析するとともに、CIA 罹患関節局所に浸潤してくる細胞を直接かつ経時的に解析す

ることによって、本病態の詳細な機序を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) II 型コラーゲンで免疫した DBA/1J マウスの所属リンパ節および脾臓より CD4<sup>+</sup> T 細胞を分離し、in-vitro で polyclonal な刺激下に mock, IL-17 あるいは活性化型 TGF- $\beta$  発現レトロウイルスを高率に感染させ、IL-2 により維持・増殖させたのち、CIA 誘導後の DBA/1J マウス腹腔内に細胞移入し、関節炎の程度を定量的に評価するとともに、関節より mRNA を分離し IL-17 の mRNA を定量解析した。

2) マウス nave CD4<sup>+</sup> T 細胞から Th1, Th2, Th17 それぞれを分化させる in-vitro の系において活性化型 TGF- $\beta$  の影響を解析した。

3) CIA マウスの関節局所に浸潤してくる細胞を詳細に解析するため、CII 免疫後経時的に罹患関節局所、所属リンパ節等から単細胞浮遊液を調整し、細胞表面分子およびサイトカインプロファイルを解析した

(倫理面への配慮)

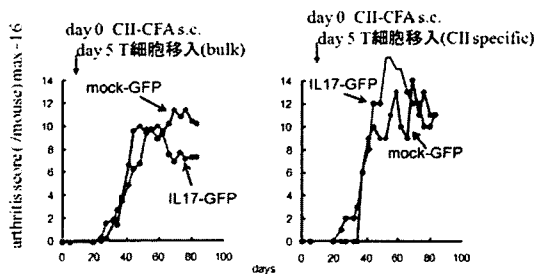
我々の有するレトロウイルスベクターは自己複製不可である。さらに感染終了した CD4<sup>+</sup> T 細胞をマウスに移入する手法のため、マウスにおいてもウイルス増殖の危険はなく、また京都大学で所定の承認も得ており、問題は無い。

### C. 研究結果

活性型 TGF-β 発現細胞移入群で関節炎は明らかに抑制され、また mRNA レベルでの IL-17 の明らかな誘導も観察されなかった。また IL-17 発現細胞移入群においては、明らかな関節炎悪化は観察されず、むしろ関節炎極期以降は mock と比較して関節炎スコアがやや低下する傾向を観察した (図 1)。

図 1

Effect of IL-17 producing CII specific CD4<sup>+</sup> T cell transfer on CIA model



さらにマウス nave CD4<sup>+</sup> T 細胞を用いて Th17 分化条件を in-vitro で再検討した。すると過去の報告にもあるように、anti-CD3/28 刺激後 3-4 日目さらに PMA/Ionomycin 再刺激するという非常に人工的で強い刺激を用いる系では確かに活性型 TGF-β が存在しないと IL-17 産生細胞の割合が低下することを確認したが、ヘルパー T 細胞分化が完成するのに必要とされる anti-CD3/28 刺激後 7 日目における解析では、活性型 TGF-β が存在すると IL-17 産生細胞の割合は増加するが、その絶対数は活性型 TGF-β の T 細胞増殖抑制効果により激減することを観察した (図 2)。これらの結果は活性型 TGF-β が積極的に Th17 分化を誘導しているというよりは、活性型 TGF-β は Th1, Th2 両分化を抑制することにより間接的に Th17 細胞の出現頻度を増加させているに過ぎないことを示唆している (図 3)。

図 2

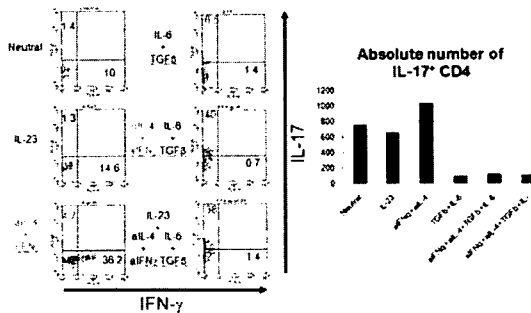
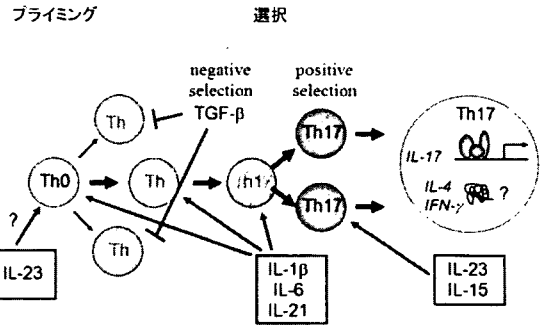


図 3



次に CIA マウスの関節局所に浸潤してくる細胞を詳細に解析するため、CII 免疫後経時的に罹患関節局所、所属リンパ節等から単細胞浮遊液を調整し、細胞表面分子およびサイトカインプロファイルを解析したところ、意外なことに、CIA 関節局所に浸潤してくる細胞はほぼ純粋に IL-17 を産生する細胞であり IFN-γ を産生する細胞はほとんど経過中見られず、さらにその IL-17 産生細胞は CD4<sup>+</sup> T 細胞よりも γδT 細胞の割合の方が明らかに多く、両者とも CCR6<sup>+</sup>であることが分かった (図 4)。さらにこの IL-17 産生 γδT 細胞は IL-23 により増殖が促進された (図 5)。

図 4

CIA 罹患関節局所浸潤単核球

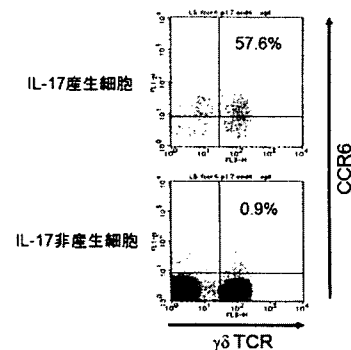
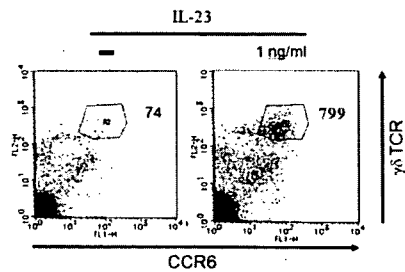


図 5

CIA 罹患関節所属リンパ節 γδT 細胞の IL-23 反応性



### D. 考察

今回の我々の解析結果は少なくとも in-vivo において活性型 TGF-β 産生細胞が他の T 細胞に働き Th17 分化を促進して pro-inflammatory に働く可能性を否定している。また最近ヒトにおいては、TGF-β は Th17 分化に何ら寄与しないとの報告がなされ、活性型

TGF- $\beta$ を用いた遺伝子治療において Th17 病態を悪化させる可能性は否定的と考えられた。また予想に反して、CIA 罹患関節局所での主たる IL-17 産生細胞が $\gamma\delta$ T 細胞であることが判明し、CIA の系でも自然免疫の持つ役割が大きいことが示唆された。今後この IL-17 産生 $\gamma\delta$ T 細胞がどこからどのように刺激を受けホーミングしてくるのが分かれば病態の理解が深まり、新たな免疫制御物質の選択あるいは開発に有用な情報になると考えられた。

## E. 結論

抗原特異的 CD4<sup>+</sup> T 細胞に活性型 TGF- $\beta$  遺伝子導入し細胞移入によって疾患特異的な治療法とする戦略について、基礎実験での有効性が確認され、また予測される有害性も現在考え得る事案においてはほぼ否定されたと考えられる。ヒト関節リウマチ患者においても CII に対する自己抗体、およびそれに反応する特異的 CD4<sup>+</sup> T 細胞の存在もすでに確認できており、さらに primary T 細胞にウイルスベクターを用いない遺伝子導入法も確立された。後はヒト症例からの抗原特異的 CD4<sup>+</sup> T 細胞分離・樹立法の確立が残された課題である。これらの技術的諸問題および倫理的な問題が解決されれば、本法による臨床応用が可能になると考えられた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Mimori T, Imura Y, Nakashima R, Yoshifuji H. Autoantibodies in idiopathic inflammatory myopathy: an update on clinical and pathophysiological significance. *Curr Opin Rheumatol*. 19(6): 523-9, 2007.
2. Handa T, Nagai S, Miki S, Ueda S, Yukawa N, Fushimi Y, Ito Y, Ohta K, Mimori T, Mishima M, Izumi T. Incidence of pulmonary hypertension and its clinical relevance in patients with interstitial pneumonias: comparison between idiopathic and collagen vascular disease associated interstitial pneumonias. *Intern Med*. 46(12):831-7, 2007.
3. 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(4):470-5, 2007.
4. Hirakata M, Suwa A, Takada T, Sato S, Nagai S, Genth E, Song YW, Mimori T, Targoff IN. Clinical and immunogenetic features of patients with autoantibodies to asparaginyl-transfer RNA synthetase. *Arthritis Rheum*. 56(4):1295-303, 2007.
5. Fujita Y, Fujii T, Takeda N, Tanaka M, Mimori T. Successful treatment of primary Sjögren's syndrome with chronic natural killer lymphocytosis by high-dose

prednisolone and indomethacin farnesil. *Intern Med*. 46(5):251-4, 2007.

6. Ito Y, Kawabata D, Yukawa N, Yoshifuji H, Usui T, Tanaka M, Fujii T, Mimori T. Severe subcutaneous generalized edema in a patient with dermatomyositis. *Mod Rheumatol*. 17(2):171-3, 2007.

7. Murakami K, Fujii T, Yukawa N, Yoshifuji H, Kawabata D, Tanaka M, Usui T, Mimori T. Successful treatment of a patient with refractory adult Still's disease by tacrolimus. *Mod Rheumatol*. 17(2):167-70, 2007.

### 2. 学会発表

1. 寺尾知可史 大村浩一郎 山田亮 島田 浩太 高杉潔 吉藤元 野島崇樹 臼井 崇 藤井隆夫 松田文彦 三森経世: 日本人 RA 患者を用いた TRAF1/C5 遺伝子の多型と疾患感受性の検討。第 52 回日本リウマチ学会総会。2008 年 4 月 20 日~23 日、札幌。
2. 三森経世: RA の臨床経過予測マーカーとしての抗 CCP 抗体 (シンポジウム)。第 51 回日本リウマチ学会総会、2007 年 4 月 26 日~29 日、横浜。

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

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研究

分担研究者 山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第六部部长  
研究協力者 大木伸司 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第六部室長  
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

自己免疫疾患の発症機転における腸内細菌の役割を検証するために、多面的に研究を進めて来た。本年度は、腸管非吸収性の抗生物質（カナマイシン、コリスチン、バンコマイシン）の経口投与による腸内細菌叢の偏倚によって、自己免疫病モデル EAE が軽快することを明らかにした。EAE の軽快に伴い、1) 腸内細菌叢の有意な偏倚、2) 腸間膜リンパ球の IL-17 産生能の顕著な低下、3) 糞便抗原成分のリンパ球刺激による IL-17 誘導活性の低下、が見られた。以上の結果から、腸内細菌偏倚による Th17 細胞の抑制が、EAE の抑制につながっている可能性が示唆された。さらに、同じ実験を  $\beta 2$ -microglobulin 欠損マウスで行ったところ、抗生物質投与の効果は見られなかった。抗生物質投与による自己免疫疾患の修飾において、MHC クラス I 依存性の CD8+ T 細胞、MHC クラス Ib 依存性 T 細胞（NKT 細胞、MAIT 細胞を含む）が、必須であることが推測された。Th17 細胞の介在する病態を修飾する方法として、抗生物質の有用性が示唆される。

### A. 研究目的

自己免疫疾患の発症には、遺伝因子と非遺伝因子が関与する。最近になって、非遺伝因子の中でも腸内細菌叢および腸内環境の重要性が注目されている。腸管リンパ球は全リンパ球の 60% を占めるが、その中には腸内細菌依存性の免疫制御細胞（MAIT 細胞）が存在することを、これまでに明らかにしてきた（Nature Immunology 7:987-994, 2006）。

本研究では腸内細菌叢を偏倚させることによって、自己免疫疾患の発症が抑制（または促進）されることを証明するために、経口抗生物質投与がマウスの免疫系および自己免疫疾患発症に及ぼす影響を明らかにすることを目指した。

### B. 研究方法

マウスは、C57BL/6J (B6) マウスおよび B6 バックグラウンドの  $\beta 2$ -microglobulin ノックアウトマウスを用いた。抗生物質投与実験では、腸管非吸収性の抗生物質 3 種類（カナマイシン 1 mg/ml、コリスチン 2000 U/ml、バンコマイシン 0.1 mg/ml）を溶解した水を、7 日間マウスに与えた。その後、糞便、腸間膜リンパ節（MLN）及び脾臓（SPL）を採取。糞便からはゲノム DNA を抽出し、ゲノムライブラリを作製。それをもとにアレイ（フローラアレイ）を作製し、腸内細菌叢の変化を解析した。

MLN および SPL からリンパ球を分離し、固相化

した抗 CD3 抗体で 72 時間刺激した後、培養上清中のサイトカイン量を cytometric bead array 及び ELISA 法を用いて測定した。また細胞増殖反応は  $^3\text{H}$ -チミジンの取り込みによって評価した。

抗生物質の投与開始後 7 日目に、MOG 35-55 ペプチドの感作によって EAE を誘導し、臨床スコアと病理所見を、抗生物質比投与対照群と比較した。

(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

フローアレイの検討により、1 週間の抗生物質投与により、腸内細菌叢が著明に変化することが明らかになった。また、抗生物質投与群では MLN 由来の T 細胞増殖能は有意に低下し、IL-17、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6 などの炎症性サイトカインの産生も抑制されていたが、抗炎症性サイトカインである IL-10 は有意に上昇していた。一方、SPL 由来の T 細胞については、抗生物質投与の影響は見られなかった。

対照群の糞便から Elsen らの方法により抽出した可溶性成分 (fecal antigen) で刺激すると、MLN 由来 T 細胞は大量の IL-17 を産生した。しかし、抗生物質投与群から抽出した fecal antigen では、IL-17 の誘導能が顕著に低下していた。以上の結果から、抗生物質投与は、腸内細菌叢を偏倚させ、その結果、腸管関連リンパ球の IL-17 産生が抑制されることが示唆された。

MOG35-55 ペプチドによって EAE を誘導したところ、抗生物質投与群では、EAE の臨床症状および病理学的変化が有意に軽減されることがわかった (EAE の max score:  $3.2 \pm 0.2$  versus  $1.8 \pm 0.2$ )。しかし、同じ実験を  $\beta 2$ -microglobulin 欠損マウスで行ったところ、抗生物質の影響は見ら

れず、抗生物質による EAE 抑制には、MHC クラス I または MHC class Ib 依存性 T 細胞の存在が必須であることが示唆された。

### D. 考察

本研究では、抗生物質投与によって腸内細菌を偏倚させると腸間膜リンパ節 T 細胞の IL-17 産生能が低下し、それに合わせて EAE の発症も抑制されることを示した。また抗生物質投与によって、腸内抗原の Th17 細胞刺激能が低下し、糞便には抗生物質感受性の Th17 細胞誘導因子が存在することが推測される。抗生物質の EAE 抑制効果は、 $\beta 2$ -microglobulin 欠損マウスでは再現できなかった。同マウスでは、MHC クラス I 依存性 CD8+ T 細胞、および MHC クラス Ib 依存性 T 細胞 (NKT 細胞、MAIT 細胞を含む) を欠損している。したがって、これらの細胞が、腸内環境偏倚による自己免疫疾患修飾の鍵を握ることが推測される。現在、MR1 欠損マウス、CD1d 欠損マウス、J $\alpha$ 281 欠損マウス (それぞれ、MAIT 細胞、NKT 細胞、invariant NKT 細胞を欠損) を用いて、同様の実験を進行中であるが、近日常に、抗生物質投与の EAE 抑制効果に決定的な役割を果たす細胞集団が同定できると思われる。

腸管粘膜に存在する樹状細胞 (DC) は、腸管腔に foot process を伸張させている。この突起を介して DC は腸内内容物 (ペプチド等) を取り込み、さらに所属リンパ節まで移動して T 細胞に提示する。このように、免疫系は腸内環境に関する情報を、常時モニターしていることが、最近の実験で明らかにされている。我々のデータも、糞便成分が、消化管免疫、さらには全身の免疫系を修飾することを意味している。

まだ研究は始まったところであるが、今回得られた実験結果は、腸内細菌叢と免疫系の密接な関連を確認するものであり、また MS 等の自己免疫疾患の発症が、腸内細菌の状態を整えることによ

って抑制される可能性を示唆している。

## E. 結論

抗生物質による腸内環境の修飾は、EAEの発症を修飾する。今後、そのメカニズムを分子レベルで解明する必要がある。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

[国際雑誌原著]

Kaieda, S., S. Oki, C. Tomi, T. Yamamura and S. Miyake: Activation of invariant natural killer T cells by synthetic glycolipid ligands suppresses autoantibody-induced arthritis. *Arthr. Rheumat.* 56:1836-1845, 2007

Sato, W., T. Aranami, and T. Yamamura: Cutting Edge. Human Th17 cells are identified as bearing CCR2+CCR5-phenotype. *J. Immunol.* 178:7525-7529, 2007

Satoh, J., Z. Illes, A. Peterfalvi, H. Tabunoki, C. Rozsa, and T. Yamamura: Aberrant transcriptional regulatory network in T cells of multiple sclerosis. *Neurosci. Lett.* 422: 30-33, 2007

Sakuishi, K., S. Oki, M. Araki, S.A. Porcelli, S. Miyake, and T. Yamamura: Invariant NKT cells biased for IL-5 production act as crucial regulators of inflammation. *J. Immunol.* 179 : 3452-3462, 2007

Ambrosino, E., M. Terabe, R.C. Halder, J. Peng, S. Takaku, S. Miyake, T. Yamamura, V. Kumar, and J.A. Berzofsky: Cross-regulation between type I and type II NKT cells in regulating tumor immunity: A new immunoregulatory axis. *J. Immunol.* 179:5126-5136, 2007

Croxford, J.L., G. Pryce, S.M. Jackson, C. Ledent, G. Giovannoni, R.G. Pertwee, T. Yamamura, and D. Baker: Cannabinoid-mediated neuroprotection, not immunosuppression, may be more relevant to multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 193: 120-129, 2008

[国際雑誌総説]

Miyake S., and T. Yamamura: Therapeutic potential of CD1d-restricted invariant natural killer T cell-based treatment for autoimmune diseases. *Int Rev Immunol* 26:73-94, 2007

Yamamura, T.: Interleukin 17-producing T-helper cells and autoimmune diseases: Time for a paradigm shift? *Current Rheumatology Reports* 9:93-95, 2007

Miyake, S. and T. Yamamura: NKT cells and autoimmune diseases: Unraveling the complexity. In T cell activation by CD1 and lipid antigens. (Edited by Branch D. Moody; Springer-Verlag), *Current Topics in Microbiology and Immunology* 314:251-265, 2007

Yamamura, T., K. Sakuishi, Zs. Illes, and S. Miyake: Understanding the behavior of invariant NKT cells in autoimmune diseases. *J. Neuroimmunol.* 191:8-15, 2007

[国際著書]

Yamamura, T.: Invariant NKT cells and immune regulation in multiple sclerosis. In *Immune Regulation and Immunotherapy in Autoimmune Disease*. (Editor Jingwu Zhang). Springer, pp139-151, 2007

### 2. 学会発表

[国際学会]

Terabe M, Ambrosino E, Takaku S, Peng J, Miyake S., Halder R, Yamamura T., Kumar V, Berzofsky JA: Type II NKT cells suppress tumor immunosurveillance enhanced by type I NKT cells. 94th Annual Meeting of The American Association of Immunologists, Inc. Miami Beach, Florida, USA, 5.19, 2007

Aranami T, Miyake S, and Yamamura T: CD11c on NK cells mirrors the temporal disease activity of multiple sclerosis. FOCiS 2007, San Diego, USA, 6.10, 2007

Doi Y, Oki S, Miyake S, and Yamamura T: Functional involvement of NR4A2 in the pathogenesis of multiple sclerosis. FOCiS 2007, San Diego, USA, 6.10, 2007

Oki S, Fujita M, Ootsuka T, Tomi C, Mizuno M, Kaieda S, Yamamura T, and Miyake S: Functional analysis of carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. FOCiS 2007, San Diego, USA, 6.10, 2007

Lin, Y., S. Miyake, and T. Yamamura: Obstructing regulatory T cells as a strategy used by dangerous self-peptide. Mini-symposium-35. Regulatory T cells I. 13<sup>th</sup> International Congress of Immunology. 8.23, 2007

Yago, T., R. Tajima, S. Kaieda, S. Oki, T. Yamamura, and S. Miyake: MR1-Restricted V $\alpha$  19i T Cells Ameliorate Murine Models of Arthritis. 2007 ACR (American College of Rheumatology), Annual Scientific Meeting, Boston, 11.9, 2007

Terabe, M., E. Ambrosino, R. Halder, J. Peng, S. Takaku, S. Miyake, T. Yamamura, F. Kumar, and J.A. Berzovsky: A new immunoregulatory axis defined by type I and type II NKT cells to regulate tumor immunity. Keystone Symposium. Keystone, Colorado, 2.24-2.29, 2008

[国内学会]

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，2007。4.12

横手裕明、Croxford J. Ludovic、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，2007。4.13

横手裕明、Croxford Ludovic、三宅幸子、水澤英洋、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学術集会，名古屋，2007。5.17

横手裕明、J. Ludovic Croxford、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。ワークショップ2，第35回日本臨床免疫学会，大阪，2007。10.19

Yago, T., S. Kaieda, S. Oki, T. Yamamura, and S. Miyake: MR1 拘束性 T 細胞によるマウス関節炎モデルの制御。第35回日本臨床免疫学会，大阪，2007。11.21

Yokote, H., J.L. Croxford, H. Mizusawa, S. Oki, S. Miyake, and T. Yamamura: 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。ワークショップ40 臓器特異的自己免疫疾患 I: 自己免疫疾患の病因。第37回日本免疫学会総会，東京，2007。12.22

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

免疫性血小板減少性紫斑病における *Helicobacter pylori* 除菌効果  
発現機序に関する研究

分担研究者 桑名 正隆 慶應義塾大学医学部内科 准教授  
研究協力者 池田 康夫 慶應義塾大学医学部内科 教授  
研究協力者 西本 哲也 慶應義塾大学大学院医学研究科

研究要旨

免疫性血小板減少性紫斑病 (ITP) の病態における *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) の役割を追究するため、*H. pylori* 除菌の自己免疫応答、血小板回転、単球フェノタイプに与える影響を検討した。ITP34 例（うち *H. pylori* 陽性 23 例）を対象とし、*H. pylori* 感染の有無にかかわらず全例で標準的除菌療法を施行した。0, 12, 24 週後の血小板数、抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞、血小板関連抗 GPIIb/IIIa 抗体、GPIIb/IIIa に対する T 細胞増殖反応、網状血小板比率、血漿トロンボポエチン、末梢血単球における FcγRI、FcγRII、CD86 発現レベルおよび非特異的貪食能を調べた。単球における FcγRIIB/IIA 発現比は定量的 PCR により評価した。また、*H. pylori* 陽性健常人 9 名に除菌療法を施行し、末梢血単球のフェノタイプ、貪食能の推移を調べた。さらに、*H. pylori* 感染 C57BL/6 マウスに除菌療法を行い、末梢血、脾臓、骨髓単球の FcγRI、FcγRII 発現変化を調べた。【成績】 *H. pylori* 陽性全例で除菌に成功し、うち 13 例 (57%) が血小板反応例であった。一方、*H. pylori* 陰性 11 例はすべて無効例であった。除菌療法前には *H. pylori* 陽性例は陰性例に比べて単球における FcγRI 発現と貪食能が高く、FcγRII の発現が低かった。各パラメータの除菌療法後の経時的な変化を調べると、*H. pylori* 陽性反応例でのみ抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞、血小板関連抗 GPIIb/IIIa 抗体、網状血小板比率、単球での FcγRI 発現と貪食能が減少し、FcγRII 発現が増加した。*H. pylori* 陽性反応例の除菌 1 週目に有意な変化を示したパラメータは血小板数と単球貪食能のみであった。単球の FcγRIIB/IIA 比は *H. pylori* 陽性例で陰性例に比べて高く、除菌による反応例では上昇した FcγRIIB/IIA 比が有意に低下した。一方、健常人 9 名のうち除菌に成功した 7 例では、除菌後に単球での FcγRI 発現と貪食能が減少し、FcγRII 発現が増加する傾向がみられた。*H. pylori* 感染マウスでは末梢血、脾臓、骨髓の単球における FcγRII 発現が低下しており、除菌後に上昇した。【結論】 *H. pylori* 陽性 ITP では単球における非特異的貪食能が亢進し、除菌後に FcγRIIB 発現上昇とともに是正された。*H. pylori* 感染が貪食細胞の Fcγ 受容体発現を変化させることで ITP の病態を促進する可能性が考えられた。

A. 研究目的

免疫性血小板減少性紫斑病 (ITP) は薬剤などの原因や基礎疾患が明らかでないにもかかわらず、血小板破壊が亢進し、血小板減少をきたす後天性疾患である。その血小板破壊の機序は、血小板膜表面の GPIIb/IIIa など糖蛋白に対する自己抗体が結合してオプソニン化された血小板が網内系で

Fcγ 受容体を介してマクロファージなどの貪食細胞に捕捉され、貪食される自己免疫病態である。

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染は胃粘膜局所の慢性炎症を引き起こすだけでなく、ITP など消化管以外の疾患との関与も報告されている。

Gasbarrini らは *H. pylori* を保菌する ITP 患者で除菌療法後に血小板が増加したことを報告した。我が

国におけるアンケート調査でも、*H. pylori*陽性患者の中で除菌療法後に除菌が確認された163例のうち103例(63%)で血小板増加がみられた。このようにプロトンポンプ阻害薬(PPI)と2種類の抗菌薬を1週間服用するだけの*H. pylori*除菌療法はステロイド療法に比べて寛解導入率が高く、副作用もはるかに少ない。そのため、*H. pylori*陽性例では除菌療法を第一選択とする治療指針が提案されている。血小板膜蛋白と*H. pylori*構成蛋白との交差反応や胃粘膜への*H. pylori*の持続感染による宿主の免疫機構の変化などの仮説が提唱されているが、*H. pylori*除菌療法がどのような作用機序を介して血小板数を増やすかは現状で明らかでない。そこで、本研究では*H. pylori*除菌療法前後の各種パラメータの変化を追跡することで、*H. pylori*除菌が血小板数を増やす機序を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 対象

当院通院中のITP患者34例を対象とした。選択基準はエントリー3ヶ月前から血小板数が10万/ $\mu\text{l}$ 未満で、薬物療法の変更がない成人例とした。また、*H. pylori*感染を有する健常人9名も解析に用いた。

### 2. *H. pylori*感染の検索

*H. pylori*感染は尿素呼気試験、IgG抗*H. pylori*抗体、便中*H. pylori*抗原により検索し、呼気試験に加えて抗体あるいは抗原陽性を*H. pylori*感染あり、すべて陰性を*H. pylori*感染なしとした。

### 3. *H. pylori*除菌療法

標準的*H. pylori*除菌療法として、アモキシシリン1.5g、ランソプラゾール60mg、クラリスロマイシン800mgの3剤を7日間投与した。除菌の効果は12週後の尿素呼気試験により確認した。除菌療法開始12週後に血小板数が10万/ $\mu\text{l}$ を越えた症例を反応例とした。

### 4. *H. pylori*除菌療法前後の各種パラメータ解析 全例において除菌療法開始前、開始12および24

週後に末梢血を採取し、以下の検討を行った。一部の症例では除菌開始1週後に末梢血検体を得た。抗血小板自己抗体産生の指標としてIgG抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞、血小板関連IgG抗GPIIb/IIIa抗体、血小板に対するT細胞反応の指標として末梢血T細胞のGPIIb/IIIaトリプシン断片および破傷風トキソイドに対する増殖反応、血小板回転の指標として網状血小板比率と血漿トロンボポエチン、単球活性化状態の指標としてフロサイトメトリーによる末梢血CD14<sup>+</sup>単球におけるFc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII、CD86の発現レベル、デキストラン取りこみによる非特異的貪食能を調べた。

### 5. Fc $\gamma$ RIIA/IIB発現比

磁気ビーズ結合抗CD14抗体により精製した末梢血単球から全RNAを分離し、一本鎖RNAへと逆転写した。Fc $\gamma$ RIIAとFc $\gamma$ RIIBを区別する細胞内ドメインの配列で設定したプライマーを用いた定量的なTaqman PCRを行い、Fc $\gamma$ RIIA/IIB発現比を求めた。

### 6. マウスにおける*H. pylori*感染と除菌

C57BL/6マウスに*H. pylori*を感染させ、12週間後にアモキシシリン、ランソプラゾール、クラリスロマイシンによる除菌療法を行った。感染の有無は胃粘膜の培養により検索した。末梢血、脾臓、骨髄のCD11b<sup>+</sup>単球のFc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII発現をフローサイトメトリーを用いて調べた。

### 7. 計学的解析

2群間の比較はFisherの2-tailed testまたはMann-Whitney U-testにより行った。*H. pylori*除菌療法前後のパラメータの推移は治療前に対する変化の有意性をpaired t-testにより検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は学内の倫理委員会での承認後に行った。薬剤投与や検体採取の際には、事前に文書によるインフォームドコンセントを得た。

## C. 研究結果

ITP 患者 34 例のうち 23 例 (68%) が *H. pylori* 陽性であった。除菌療法前の各種パラメータを *H. pylori* の有無で比較すると、*H. pylori* 陽性例では陰性例に比べて GPIIb/IIIa に対する T 細胞増殖反応 ( $p = 0.04$ )、網状血小板比率 ( $p = 0.009$ )、単球の貪食能 ( $p = 0.01$ ) が有意に高く、Fc $\gamma$ RII 発現が有意に低かった ( $p = 0.03$ )。また、単球上の Fc $\gamma$ RI 発現は *H. pylori* 陽性例で高い傾向を認めた ( $p = 0.06$ )。

*H. pylori* 感染の有無にかかわらず全例で標準的除菌療法を行い、陽性全例で除菌に成功した。*H. pylori* 陽性 23 例のうち 13 例 (57%) が血小板数が増加したが、*H. pylori* 陰性 11 例はすべて非反応例であった。各パラメータを除菌療法前と開始後 12、24 週間後の間で比較すると、*H. pylori* 陽性反応例でのみ抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞、血小板関連抗 GPIIb/IIIa 抗体、網状血小板比率、単球上の Fc $\gamma$ RI 発現と貪食能が有意に減少し、Fc $\gamma$ RII 発現が有意に増加した (図 1)。これら *H. pylori* 除菌後に有意な変動を示したパラメータの中で最初に変化したものを捉えるため、*H. pylori* 陽性反応例については除菌療法開始 1 週目 (薬剤中止時点) の結果を投与前値と比較した。その結果、1 週目に有意な変化を示したパラメータは血小板数の増加 ( $p = 0.003$ ) と単球の貪食能の低下 ( $p = 0.02$ ) のみであった。

さらに、単球における非特異的貪食能の低下の上流に存在する機序を追究するため、末梢血単球における抑制性 Fc $\gamma$ RIIB と刺激性 Fc $\gamma$ RIIA の遺伝子発現比を検討した。除菌療法前には Fc $\gamma$ RIIA/RIIB 発現比は *H. pylori* 陽性例で陰性例に比べて有意に高かった ( $p = 0.008$ )。*H. pylori* 陽性反応例では、除菌療法後 1 週目に Fc $\gamma$ RIIB/IIA 比が有意に低下したが、*H. pylori* 陽性非反応例や *H. pylori* 陰性例では変化を認めなかった。

一方、健常人 9 名のうち除菌に成功した 7 例では、除菌後に単球での Fc $\gamma$ RI 発現と貪食能が減少し、Fc $\gamma$ RII 発現が増加する傾向がみられた。*H. pylori* 感染マウスでは末梢血、脾臓、骨髄の単球における Fc $\gamma$ RII 発現が低下しており、除菌後に上昇した。

## D. 考察

本研究成果から、*H. pylori* 陽性 ITP 患者では単球/マクロファージの機能亢進がみられ、それらが除菌後に血小板増加と共に是正されることが明らかとなった。*H. pylori* 除菌後の抗血小板抗体産生と血小板回転の低下はいずれも単球の活性化抑制による結果と考えられた。したがって、*H. pylori* 感染が単球/マクロファージの Fc $\gamma$  受容体発現を変化させることで一義的に ITP の病態を促進する。さらに、*H. pylori* 陽性例にみられた単球活性化は刺激性 Fc $\gamma$  受容体 (Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIA) の発現上昇と抑制性 Fc $\gamma$  受容体 (Fc $\gamma$ RIIB) の発現低下による相対的な Fc $\gamma$  受容体シグナルバランスの活性化への偏倚によることが示された。

網内系マクロファージは Fc $\gamma$  受容体を介してオプソニン化血小板を貪食するのみならず、血小板膜糖蛋白由来の潜在性ペプチドを多量に提示することで自己反応性 T 細胞を活性化し、ITP 病態の中心的役割を果たしている。したがって、*H. pylori* 感染は網内系マクロファージの Fc $\gamma$  受容体バランスを活性化に偏倚させることで ITP 病態を促進する。その機序は明らかでないが、健常人やマウスでも同様の傾向がみられたことから、病原微生物の排除に働く感染防御機能のひとつであるかもしれない。今後、Fc $\gamma$  受容体シグナルの制御が ITP に対する新たな治療戦略となる可能性がある。

## E. 結論

*H. pylori* 感染は、抑制性 Fc $\gamma$ RIIB 発現低下を介して単球・マクロファージを活性化することで ITP 病態を促進することが明らかにされた。今後、Fc $\gamma$  受容体シグナル制御が ITP に対する新たな治療戦略となる可能性がある。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kuwana M, Iki S, Urabe A. The role of autoantibody-producing plasma cells in

immune thrombocytopenic purpura refractory to rituximab. *Am. J. Hematol.* 2007; 82(9): 846-8.

2. Yamaguchi Y, Seta N, Kaburaki J, Kobayashi K, Matsuura E, Kuwana M. Excessive exposure to anionic surfaces maintains autoantibody response to  $\beta_2$ -glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome. *Blood.* 2007; 110(12): 4312-8.
3. 桑名正隆: 自己免疫疾患に伴う血管・血液病変—分子病態と治療—;血小板の自己免疫学の進歩. *分子リウマチ* 4(3): 45-51, 2007.
4. 桑名正隆: SLE の発症機序と新たな治療法の検索; SLE の血小板減少における抗トロンボポエチン受容体抗体. *リウマチ科* 38(2): 146-51, 2007.

## 2.学会発表

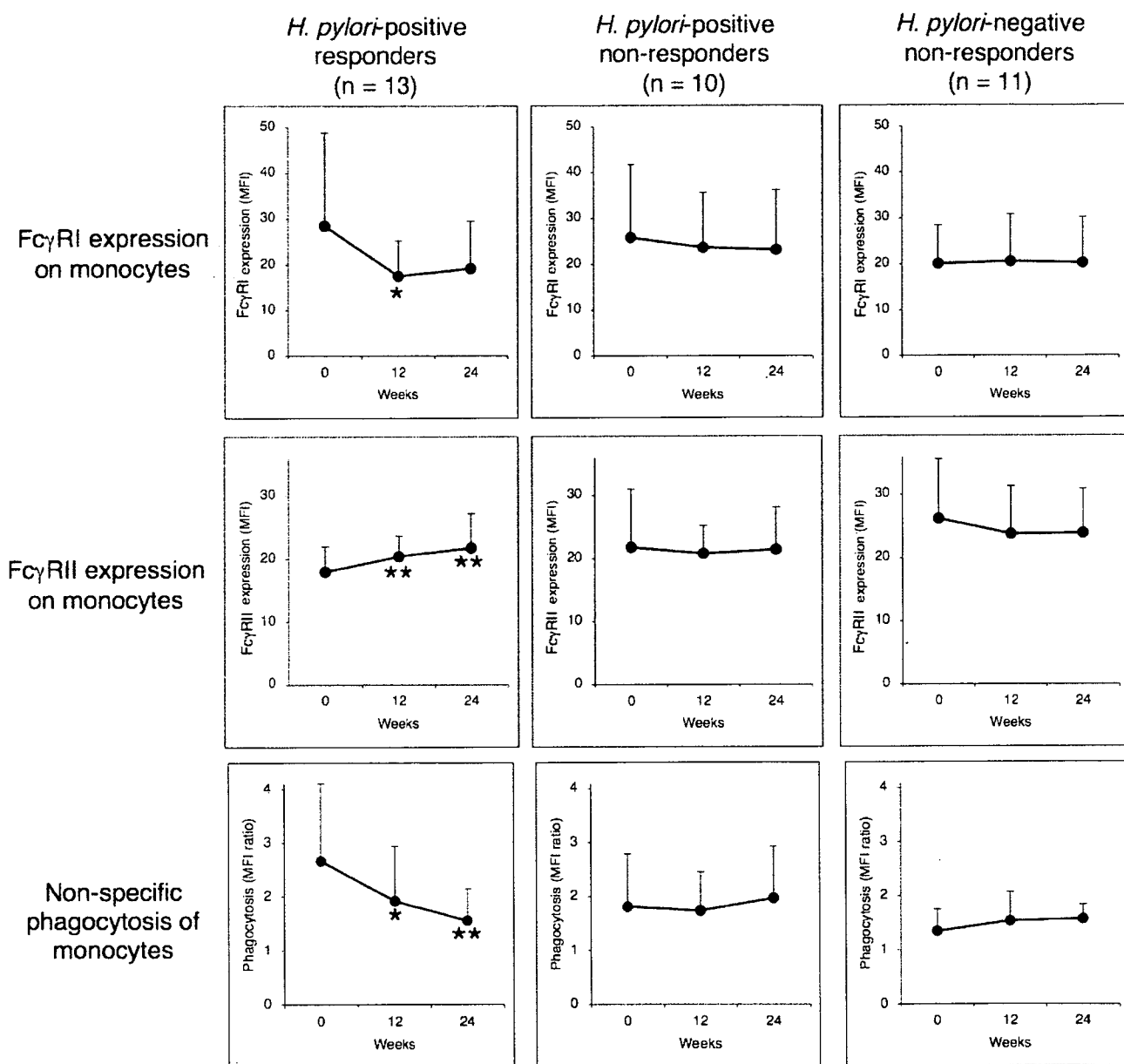
1. Takahashi H, Amagai M, Nishikawa T, Kawakami Y, Kuwana M : A novel system for evaluation of *in vivo* pathogenicity of

desmoglein 3-reactive T cell clones: a critical role of interleukin-4 in the mouse pemphigus vulgaris model. The Society for Investigative Dermatology 68th Annual Meeting (Los Angeles). 2007 年 5 月.

2. 高橋勇人、天谷雅行、河上裕、桑名正隆: Interleukin-4 as a critical mediator derived from desmoglein 3-reactive T cells in the mouse pemphigus vulgaris model. 第 37 回日本免疫学会 (東京). 2007 年 12 月.

## H.知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

- 1.特許取得  
なし。
- 2.実用新案登録  
なし。
- 3.その他  
なし。



\*P < 0.05 and \*\*P < 0.005 , compared with pre-treatment (week 0).

図1. *H. pylori* 陽性反応例、*H. pylori* 陽性非反応例、*H. pylori* 陰性例における標準的除菌療法後の末梢血単球上の FcγRI、FcγRII の発現レベルおよび非特異的貪食能の変化。

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

自己抗原および関節炎誘導分子修飾による自己抗体産生制御

分担研究者 松本 功（筑波大学人間総合科学研究科臨床免疫 准教授）

**研究要旨**

関節リウマチの病因については未だ不明な点が多いが、解糖系酵素 G P I に対する抗体が単独で関節炎を誘導できることがマウスで明らかになっている。また、この自己抗原 GPI を免疫して発症する関節炎モデルではわずか 1 週間で病気が発症する。我々は RA 患者において抗 G P I 抗体を保持する患者が多いことも明らかにしてきたが、これら 2 つの GPI 関連関節炎モデル、および RA での抗 GPI 抗体陽性者の共通点を見出すことにより、関節炎を修飾する分子の同定、およびそれらをターゲットにした関節炎制御療法を模索し、新規治療法の開発をめざす。

**A.研究目的**

ユビキタスな解糖系酵素 glucose-6-phosphate isomerase (GPI) に対する自己免疫応答は関節炎に直接関与することが K/BxN 関節炎モデルで示され、ヒトでも RA 患者に多く抗 GPI 抗体が存在する。RA における GPI に対する免疫応答の意義をさらに理解する為に、もう 1 つの GPI 依存性モデルである GPI 誘導性関節炎モデルを用いて更に解析を行った。昨年度までに抗 TNF $\alpha$ 抗体、抗 IL-6 抗体や CTLA-4 Ig などの RA での有効性が証明されている生物学的製剤による関節炎治療効果について明らかにしてきた。本年度は、昨年度にも少し述べた新しい effector T 細胞である T<sub>H</sub>17 細胞に注目し、関節炎における IL-6 受容体抗体の関節炎抑制効果発現機構についてさらに解析した。また、抗 GPI 抗体や B 細胞の病的意義に関しても SCID マウスを用いた adoptive transfer モデルを用いて更なる解析を加えた。

**B.研究方法**

1) GPI 免疫後 day7, day14 に抗 IL-17 抗体投与を行った。また、その分化に必要である IL-6 に対する受容体抗体 (MR16-1) を用いて、関節炎に対する予防的効果 (day0, day3)、および治療的効果 (day8, day14) を詳細に検討した。予防的投与に関しては各 effector T 細胞 lineage への分化 (T<sub>H</sub>1, 2, 17, Treg) を所属リンパ節のサイトカイン及び Foxp3 細胞内染色で同定し、さらに MR16-1 投与治療群における抗原特異的 T 細胞の増殖を CFSE ラベルにて確認し、同時に抗 GPI 抗体産生への影響を検討した。

2) GPI 誘導マウス脾臓を d14 に摘出し、脾細胞、あるいは CD19+細胞や CD4+細胞を除去した脾細胞群 (10<sup>7</sup>細胞) を抗原 GPI と同時投与し、関節炎発症及び組織学的に検討した。さらに、CD19+細胞除去群に関節炎マウスより得られた IgG やアフィニティー精製した抗

GPI 抗体 3 mg を SCID マウス腹腔内に投与し、関節炎の発症を検討した。また SCID マウス血清中の抗 GPI 抗体価を測定した。また、脾細胞 (CD19+除去、CD4+除去) を抗原 GPI あるいはコントロール蛋白と in vitro で培養し、TNF $\alpha$ , IL-6 の産生を ELISA で検討した。

(倫理面への配慮)

筑波大学の医の倫理特別委員会はすでに承認済みである。

**C.研究結果**

1) 抗 IL-17 抗体を day 7 に投与することにより関節炎は有意に抑制された。また MR16-1 を day 0 または day 3 に投与した群では GPI 誘導性関節炎の発症はほぼ完全に抑制され、day 8 に投与した群でも関節炎は減弱された。MR16-1 を day 0 または day 3 に投与した群では所属リンパ節中の T<sub>H</sub>17 細胞への分化のみ著明に抑止され、その他の Th1, 2, Treg 分画には影響を与えなかった。MR16-1 投与群では抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の増殖が抑制され、抗 GPI 抗体産生の抑制効果も認められた。

2) 関節炎を起こした DBA/1 マウスの脾細胞と抗原の移入により、SCID マウスにおいて関節炎が認められ、組織学的に滑膜増生や関節軟骨表面への IgG, C3 の沈着が観察された。GPI 誘導マウスの脾臓から CD19+細胞や CD4+細胞を除去した細胞群の移入では SCID マウスに関節炎を誘導できなかった。GPI 誘導マウスの IgG のみの移入では SCID マウスに関節炎は誘導されなかったが、CD19+細胞を除去した細胞群と上記 IgG、あるいは抗 GPI 抗体を腹腔内投与した SCID マウスで関節炎が誘導された。In vitro の解析では脾細胞で GPI 特異的な TNF $\alpha$ , IL-6 の産生が認められ (p<0.05) 特に CD19+細胞を除去した細胞群での産生が多く認められた。

## D. 考察 E. 結論

IL-6 は T<sub>H</sub>17 を選択的に誘導することにより GPI 誘導性関節炎の発症に重要な役割を果たしていることが明らかになり、抗原特異的 CD4+細胞の増殖や自己抗体の産生誘導にも関わる可能性が示唆された。また、adoptive transfer モデルでは B 細胞は抗体産生細胞として機能していると考えられ、B 細胞以外の脾細胞が産生する TNF $\alpha$  や IL-6 と協調して、自己抗体が関節炎を誘導している可能性が示唆された。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Wakamatsu E, Nakamura Y, Matsumoto I, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. DNA microarray analysis of labial salivary gland of patients with Sjogren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 66:844-845, 2007.
2. Yamada H, Ishii W, Ito S, Iwanami K, Ogishima H, Suzuki T, Mamura M, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Sumida T. Sarcoid myositis with muscle weakness as a presenting symptom *Mod Rheumatol* 17 : 243-246, 2007
3. Matsuyama M, Suzuki T, Tsuboi H, Ito S, Mamura M, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Sumida T. Anti-interleukin-6 receptor antibody (tocilizumab) treatment of multicentric Castleman's disease. *Intern Med* 46, 771-774, 2007
4. Sugihara M, Tsutsumi A, Suzuki E, Suzuki T, Ogishima H, Hayashi T, Chino Y, Ishii W, Mamura M, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Sumida T. The gene expressions of TNF $\alpha$  TTP, TIA-1 and HuR in the peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis before and after infliximab therapy. *Arthritis Rheum* 56:2160-2169,2007
5. 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* 2007;17:191-7
6. Enami T, Suzuki T, Ito S, Yoshimi A, Sugihara M, Mamura M, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Sumida T. Cyclosporine treatment in the refractory thrombotic thrombotic thrombocytopenic purpura associated with systemic lupus erythematosus. *Intern Med* 2007; 46: 1033-7.
7. Hayashi T, Matsumoto I, Yasukochi T, Mamura M, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. Biased usage of synovial immunoglobulin heavy chain variable region 4 by the anti-glucose-6-phosphate isomerase antibody in patients

with rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Med.* 20:247-253,2007

8. Nakamura Y, Wakamatsu E, Matsumoto I, Tomiita M, Kohno Y, Mori M, Yokota S, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. High prevalence of autoantibodies to muscarinic-3 acetylcholine receptor in patients with juvenile-onset Sjogren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 67:136-137, 2008

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

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

11. Kohno M, Tsutsumi A, Matsui H, Sugihara M, Suzuki T, Mamura M, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Suguro T, Sumida T. Interleukin 17 gene expression in patients with rheumatoid arthritis *Mod.Rheumatol* (in press)

12. Ishii W, Ito S, Kondo Y, Tsuboi H, Mamura M, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Okoshi Y, Hasegawa Y, Kojima H, Sakashita S, Aita K, Noguchi M, Sumida T. Intravascular large B-cell lymphoma with acute abdomen as a presenting symptom in a patient with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Oncol.* (in press)

13. Sumida T, Wakamatsu E, Nakamura Y, Matsumoto I. Autoantibodies against muscarinic acetylcholine receptor in patients with Sjogren's syndrome.(review) In *Textbook of autoantibodies* Second edition 681-686, 2007.

14. 松本功 解糖系酵素と自己免疫疾患 Annual review 免疫 2008、中外医学社 in press

### 2. 学会発表

松本 功、岩波 慶一、渡辺 陽子、井上 明日香、後藤 大輔、伊藤 聡、堤 明人、住田 孝之 CTLA-4 Ig, TNF $\alpha$  アンタゴニストは GPI 誘導関節炎を抑制する 第51回日本リウマチ学会総会・学術集会(横浜) 4月、2007

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

1 件予定

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

全身性エリテマトーデス（SLE）における  
Ras-guanyl releasing protein 1（RasGRP1）発現異常に関する研究

分担研究者 小池隆夫 北海道大学大学院医学研究科 内科学講座・第二内科（教授）  
研究研究者 保田晋助 北海道大学大学院医学研究科 内科学講座・第二内科（助教）

### 研究要旨

RasGRP1 は T 細胞に高発現して Ras を活性化し、欠損マウスで SLE 様症状を認める。今回、SLE 患者および健康人末梢血における RasGRP1 の発現を検討した。RNA レベルでは 17 種の新たなスプライス異常を認め、異常を有する割合は SLE 患者において有意に高かった。末梢血 T 細胞における正常 RasGRP1 蛋白の発現は、スプライス異常を有する患者において有意に低く、細胞株の検討からはサイトカイン刺激による蛋白発現調整も示唆された。RasGRP1 のスプライス異常が SLE における病態形成に影響を与える可能性が示唆された。

### A. 研究目的

全身性エリテマトーデス（Systemic lupus erythematosus:SLE）の病態において、胸腺・末梢における T 細胞の分化・成熟に関わる分子群に異常があることが示されてきた。T 細胞に多く発現する Ras-guanyl releasing protein 1（RasGRP1）は、胸腺における T 細胞の正の選択に重要な分子であることが知られている。RasGRP1 欠損マウスにおいては胸腺における T 細胞の成熟が障害され、リンパ球減少の時期を経て自己反応性 T 細胞の増加をともなうリンパ節腫脹が出現、抗核抗体、抗 DNA 抗体、糸球体腎炎等 SLE 様症状を自然発症することが報告された。本研究では SLE 患者において RasGRP1 の発現を検討し、SLE の病態の一部を明らかにすることを目的とする。

### B. 研究方法

**対象；**  
健康人 33 名（男性 12 名，女性 21 名，平均年齢 31 歳），SLE 患者 60 名（男性 15 名，女性 45 名，平均年齢 34 歳），RA 患者 14 名（男性 1 名，女性 13 名，平均年齢 57 歳），他の自己免疫疾患 16 名（男性 4 名，女性 12 名，平均年齢 47 歳）を対象として、末梢血 10cc を採血、単核球より RNA を抽出した。また、蛋白レベルでの検討を目的に、健康人 4 名，SLE 患者 12 名より末梢血 T 細胞を分離した。

**方法；**  
**mRNA レベルの検討** - スクリーニングとして、健康人、SLE 患者、他の膠原病の患者数名ずつから末梢血単核球を分離、RNA から cDNA を合成し、全長 RasGRP1 を PCR にて増幅して泳動パターンを観察した。次に、上記の健康、SLE 患者、RA 患者および他の自己免疫疾患患者の末梢血単核球より RNA を抽出、cDNA を合成した。ヒト RasGRP1 特異的プライマーを設定し、PCR に

て増幅後、ひとりあたり 5 クロンの塩基配列を決定した。

**蛋白レベルでの検討** - 一部の患者および健康人末梢血より negative selection beads を用いて T 細胞を分離し、cell lysate を調整、ウサギを免疫して作成した RasGRP1 抗体を用いて蛋白レベルでの発現検討を行った。また、今回発見された代表的スプライスバリエントを発現するベクターを作成し、HEK293 細胞に導入してその挙動を検討した。

**T 細胞の活性化の検討** - 健康人 8 名，SLE 患者 5 名の末梢血より CD4+細胞を negative selection beads を用いて分離し、プレートに固層化した抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体にて 3.5 時間刺激した。RNA を分離、DNase 処理後に RT-PCR を行い、IL-2 転写産物をリアルタイム PCR にて評価、無刺激のものと比較した。

**T 細胞株を用いた RasGRP1 発現の検討** - ヒト T 細胞株である Jurkat 細胞は RasGRP1 を発現することが知られている。われわれは、Jurkat 細胞における RasGRP1 スプライスバリエントの有無を検討したところ、半数近いクローンでスプライス異常を認めた。そこで、IFN $\alpha$  および TNF $\alpha$  にて 48 時間刺激後に RasGRP1 の発現を mRNA、蛋白レベルで検討した。

### （倫理面への配慮）

本研究は北海道大学倫理委員会の承認を得て、文書による同意を得た上で厳重な個人情報管理のもと行われている。

### C. 研究結果

**mRNA レベルの検討** - スクリーニングとして行った末梢血単核球における全長 RasGRP1 発現検討の結果、健康人および多くの SLE 患者、他の膠原病患者では約 2400bp の全長 RasGRP1 産物が主なバンドとして検出さ



れたが、一部の SLE 患者において多数のバンドが観察され、全長 RasGRP1 に相当するバンドをほとんど検出できない者もあった。

この結果から、一部の SLE 患者における RasGRP1 のスプライス異常が予想されたので、健常人および SLE 患者および他の自己免疫疾患患者より末梢血単核球由来の RasGRP1 PCR 産物を一人あたり 5 クローンずつシークエンスした。末梢血 SLE 患者および健常人サンプルからエクソン 11 欠損、エクソン 11, 16 欠損などサイズの異なる 17 種の新たなスプライスバリエントが検出された (図 1)。エクソン 4, 5, 8, 10, 11 または 15 の欠損では下流も in frame に保たれるが、他のスプライスバリエントでは図中に\*で示す休止コドンが出現していた。スプライスバリエント E および H では、それぞれ黒のバーで示したイントロン 16, 12 のスプライスが行われず、休止コドンが出現していた。

何れかのスプライス異常を有する確率は、SLE 患者クローン中で 32.0%、健常人で 13.9% ( $p=0.00002$ ) と SLE 患者で有意に高かった (表)。RA、他の自己免疫疾患においてもスプライス異常を有する確率は健常人と比較して高い傾向にあったが、有為差はなかった。

表; 疾患ごとの RasGRP1 スプライス異常のクローン頻度 (%)

	(%)	OR	95%CI	p-value
健常人	13.9			
SLE	32.0	2.91	1.76-4.80	0.00002
RA	22.9	1.83	0.90-3.72	0.093
他の疾患	19.3	1.20	0.57-2.51	0.631

OR; odds ratio, CI; confidential interval

**蛋白レベルでの検討** - 蛋白レベルの RasGRP1 発現検討では、まずウサギを免役して作製したポリクローナル抗体をウェスタンブロットを用いて評価した。今回作製したリコンビナント RasGRP1 および胸腺の lysate、末梢血 T 細胞の lysate 中の約 95kDa 蛋白を認識し、この反応は免疫に用いたペプチドによって阻害された。従って、今回作製した抗体はヒト RasGRP1 を特異的に認識することが確認された。次に、末梢血より分離した T 細胞を用いて、ウェスタンブロットにて RasGRP1 およびコントロールとしてアクチンの蛋白発現を検討した (図 2A, B)。約 95kDa の全長 RasGRP1 に相当するシグナルを、多くの健常人および SLE 患者において認めた。一部の患者ではこのシグナルが弱く、特に SLE11 においてはほとんど検出できなかった。一方、スプライスバリエントに相当すると考えられる小サイズのシグナルは、少なくとも SLE11, 12 を除いて蛋白レベルでは検出されなかった。シグナルの強度をアクチンに対する比で検討したところ、健常人-SLE 患者間で有意差はないが、患者の中には発現レベルの明らかに低い者があった。また、スプライスバリエントを持つ者で有意に RasGRP1 の発現が低いことがわかった ( $p=0.027$ ) (図 2C)。

**T 細胞の活性化の検討** - ほとんどの健常人および SLE 患者において CD3+28 刺激によって著明な IL-2 の産生亢進を認めたが、RasGRP1 スプライス異常を有する健常人・SLE 患者それぞれ 1 名において反応性が低下していた。

**T 細胞株を用いた RasGRP1 発現の検討** - IFN および TNF で Jurkat 細胞を 48 時間刺激した (図 3)。上段に全長 RasGRP1 の PCR 産物を示すが、サイトカイン刺激によって全長とは異なるサイズの RasGRP1 転写産物が増加することが示唆された。一方、中・下段に示すように、特に IFN 刺激後に RasGRP1 蛋白の発現が低下する傾向を認めた。

## D. 考察

RasGRP1 は、T 細胞の分化にとって重要なシグナル分子であり、T 細胞レセプターの下流でジアシルグリセロールなどによって活性化を受け、Ras を主にゴルジ体上で活性化する。RasGRP1 の欠損では CD4+/CD8-、CD4-/CD8+ の T 細胞が減少し、さらに SLE 様の病態を発症する。このマウスでは、自己反応性 Th2 細胞の増殖および B 細胞の活性化を認めた。今回の我々の検討で、SLE 患者において初めて RasGRP1 の発現異常を認めた。RNA レベルで RasGRP1 のスプライス異常が SLE 患者において高頻度に認められたが、少なくとも無刺激の T 細胞では今回発見されたスプライスバリエントに相当する蛋白発現を認めなかった。RasGRP1 のスプライス異常は正常 RasGRP1 分子の低発現に関与していることが末梢血 T 細胞の検討から明らかとなった。また、SLE において重要な役割をはたすと考えられる IFN $\alpha$  刺激によって T 細胞株における RasGRP1 蛋白発現量が低下したことも、臨床献体での観察を裏付けるものと考えられる。以上より、RasGRP1 のスプライス異常は SLE 患者においては RasGRP1 の機能不全に伴うリンパ球減少や自己反応性 T 細胞の出現および B 細胞の多クローン性増殖など SLE の病態に何らかの影響を与えることが示唆された。

## E. 結論

健常人および SLE 患者において、RNA レベルで RasGRP1 の発現を検討した。新たなスプライス異常が発見され、その出現頻度は SLE 患者において有意に高率であった。また、末梢血 T 細胞においてスプライス異常は正常 RasGRP1 の蛋白発現を負に調整している可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Nishio M, Endo T, Nakao S, Sato N, Koike T. Reversible cardiomyopathy due to secondary hemochromatosis with multitransfusions for severe aplastic anemia after successful non-myeloablative stem cell transplantation. *Int J Cardiol.* 2007 (in press)
- Kataoka H, Atsumi T, Hashimoto T, Horita T, Yasuda S, Koike T. Polymyalgia rheumatica as the manifestation of unclassified aortitis. *Mod Rheumatol.* 18(1):105-108, 2007
- Bohgaki T, Atsumi T, Koike T. Multiple autoimmune diseases after autologous stem-cell transplantation. *New Engl J Med.* 357(26):2734-2736, 2007
- Chida D, Nakagawa S, Nagai S, Sagara H, Katsumata H, Imaki T, Suzuki H, Mitani F, Ogishima T, Shimizu C, Kotaki H, Kakuta S, Sudo K, Koike T, Kubo M, Iwakura Y. Melanocortin 2 receptor is required for adrenal gland development, steroidogenesis, and neonatal gluconeogenesis. *PNAS.* 104(46):18205-18210, 2007
- Gatanaga H, Hayashida T, Tsuchiya K, Yoshino M, Kuwahara T, Tsukada H, Fujimoto K, Sato I, Ueda M, Horiba M, Hamaguchi M, Yamamoto M, Takata N, Kimura A, Koike T, Gejyo F, Matsushita S, Shirasaka T, Kimura S, Oka S. Successful efavirenz dose reduction in HIV type 1-infected individuals with cytochrome P450 2B6 \*6 and \*26. *CID.* 45(9):1230-1237, 2007
- Ieko M, Nakabayashi T, Tarumi T, Naito S, Yoshida M, Kanazawa K, Mizukami K, Koike T. Soluble fibrin monomer degradation products as a potentially useful marker for hypercoagulable states with accelerated fibrinolysis. *Clin Chim Acta.* 386(1-2), 38-45, 2007
- Yasuda S, Stevens RL, Terada T, Takeda M, Hashimoto T, Fukae J, Horita T, Kataoka H, Atsumi T, Koike T. Defective expression of ras guanyl nucleotide-releasing protein 1 in a subset of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 179(7):4890-4900, 2007
- Atsumi T, Cho YR, Leng L, McDonald C, Yu T, Danton C, Hong EG, Mitchell RA, Metz C, Niwa H, Takeuchi J, Onodera S, Umino T, Yoshioka N, Koike T, Kim JK, Bucala R. The proinflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor regulates glucose metabolism during systemic inflammation. *J. Immunol.* 179(8):5399-5406, 2007
- Atsumi T, Chiba H, Yoshioka N, Bucala R, Koike T. Increased fructose 2,6-bisphosphate in peripheral blood mononuclear cells of patients with diabetes. *Endocr J.* 57(4):517-520, 2007
- Natsuga K, Sawamura D, Homma E, Nomura T, Abe M, Muramatsu R, Mochizuki T, Koike T, Shimizu H. Amicrobial pustulosis associated with IgA nephropathy and Sjögren's syndrome. *J Am Acad Dermatol.* 57:523-526, 2007
- Horita T, Ichikawa K, Kataoka H, Yasuda S, Atsumi T, Koike T. Human monoclonal antibodies against the complex of phosphatidylserine and prothrombin from patients with the antiphospholipid antibodies. *Lupus.* 16(7):509-516, 2007
- Amengual O, Atsumi T, Komano Y, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Koike T. A polymorphism in human platelet antigen 6b and risk of thrombocytopenia in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 56(8):2803-2809, 2007
- Masuda H, Atsumi T, Fujisaku A, Shimizu C, Yoshioka N, Koike T. Acute onset of type 1 diabetes accompanied by acute hepatitis C: the potential role of proinflammatory cytokine in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 75(3):357-361, 2007
- Nishio M, Fujimoto K, Yamamoto S, Endo T, Sakai T, Obara M, Kumano K, Yamaguchi K, Takeda Y, Goto H, Sato N, Koizumi K, Mukai M, Koike T. Delayed redistribution of CD27, CD40 and CD80 positive B cells and the impaired in vitro immunoglobulin production in patients with non-Hodgkin lymphoma after rituximab treatment as an adjuvant to autologous stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 137(4):349-354, 2007
- Minauchi K, Nishio M, Itoh T, Yamamoto S, Fujimoto K, Sato N, Koike T. Hepatosplenic alpha/beta T cell lymphoma presenting with cold agglutinin disease. *Ann Hematol.* 86(2):155-157, 2007

Nakamura A, Shimizu C, Nagai S, Taniguchi S, Umetsu M, Atsumi T, Wada N, Yoshioka N, Ono Y, Sasano H, Koike T.

Unilateral adrenalectomy improves insulin resistance and polycystic ovaries in a middle-aged woman with virilizing adrenocortical adenoma complicated with Cushing's syndrome. *J Endocrinol Invest.* 30:65-69, 2007

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

## 2. 学会発表

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

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

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

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

○ なし

図1: RasGRP1 新規スプライス異常

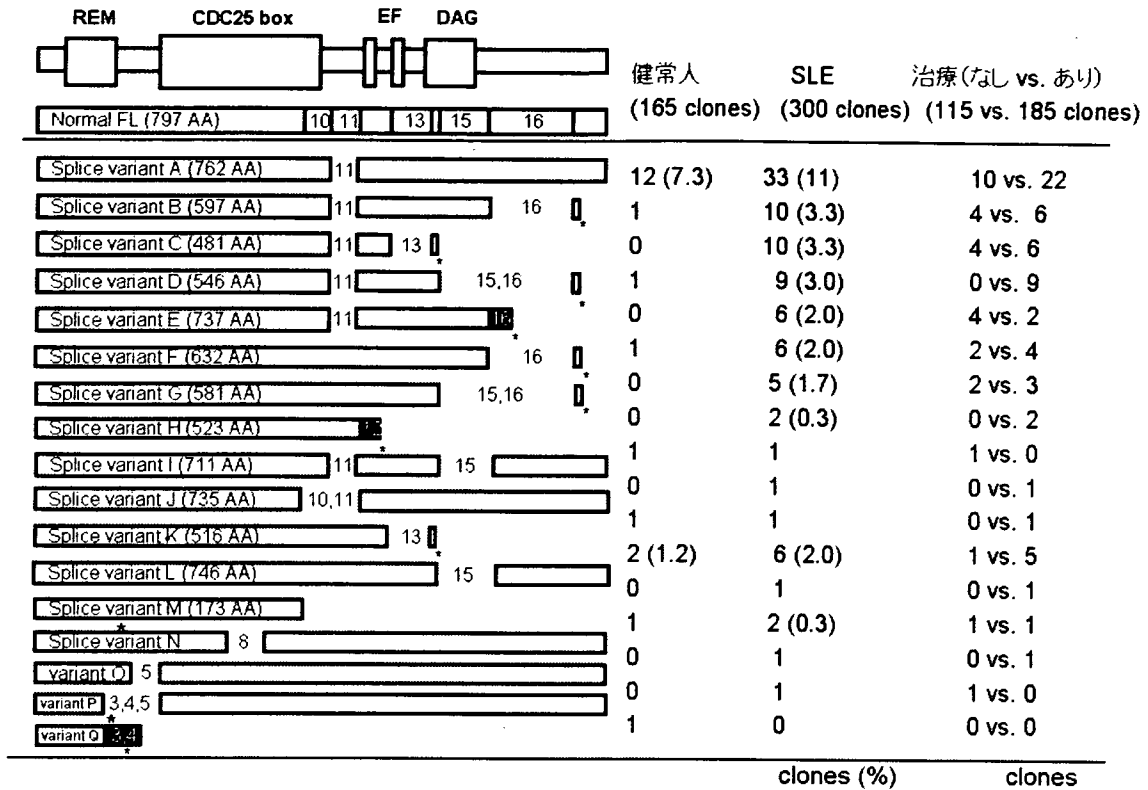


図2: 末梢血T細胞におけるRasGRP1蛋白発現の検討

