

D. 考 察

ヒト RA の発症に、IL-17 が重要な役割を果たす可能性が指摘されてきた。動物モデルを用いた今回の実験結果は、 β glucan などの innate immunity を刺激して Th-17 細胞を増殖させるような環境因子が、自己免疫性関節炎発症のトリガーとなりうることを示した。 β glucan は真菌を構成する主要成分であるが、現在のところ、真菌感染と RA の発症のかかわりを示す報告はない。今後、より一般的に Th-17 細胞を増殖、活性化させるような他の環境因子が、自己免疫性関節炎の発症に関わっているか検討が必要である。

E. 結 論

以上の結果は、自己免疫性関節炎の発症における、環境因子と Th-17 細胞とのかかわりを示した。感染などの環境刺激による Th-17 細胞の増殖を抑制することが、RA の発症予防・重症化抑制につながる可能性がある。今後、より一般的な Th-17 細胞の増殖を促す環境因子の検索と、制御性 T 細胞による Th-17 細胞の分化・増殖の制御について、研究を進めたい。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, **Sakaguchi S**. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. **Science**. 322 (5899): 271-5, 2008.
- 2) Wakasa-Morimoto C, Toyosaki-Maeda T, Matsutani T, Yoshida R, Nakamura-Kikuoka S, Maeda-Tanimura M, Yoshitomi H, Hirota K, Hashimoto M,

Masaki H, Fujii Y, Sakata T, Tsuruta Y, Suzuki R, Sakaguchi N, **Sakaguchi S**. Arthritis and pneumonitis produced by the same T cell clones from mice with spontaneous autoimmune arthritis. **Int Immunol**. 20 (10): 1331-42, 2008.

- 3) Onishi Y, Fehervari Z, Yamaguchi T, Sakaguchi S. Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. **Proc Natl Acad Sci USA**. 105 (29): 10113-8, 2008.
 - 4) **Sakaguchi S**, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. **Cell** 133 (5): 775-87, 2008.
 - 5) **Sakaguchi S**. Regulatory T cells in the past and for the future. **Eur J Immunol**. 2008 38(4):901-37.
 - 6) Fehervari Z, et al. T lymphocytes: Regulatory. **Nature Encyclopedia of Life Sciences**. Wiley Interscience, Available at www.els.net. 2008.
 - 7) Nagahama K, et al. Differential control of alloantigen-specific regulatory T cells and effector T cells by anti-CD4 and other agents in establishing transplantation tolerance. **Int. Immunol**. In press.
- ### 2. 学会発表
- 1) **Sakaguchi S**. The role of natural regulatory T cells in autoimmunity. 12th International Conference on Lymphocyte Activation and Immune Regulation, 2008.2.8-10, California, USA.
 - 2) **Sakaguchi S**. Role of regulatory T cells in tolerance and autoimmunity. EurAPS International Symposium on Molecular Background of Tolerance and Autoimmunity, 2008.4.10, Helsinki, Finland.

- 3) **Sakaguchi S.** Regulatory T cells for self-tolerance and immune homeostasis. 2nd International Conference on Cutaneous Lupus Erythematosus , 2008.5.11-13, Kyoto.
 - 4) **Sakaguchi S.** Regulatory T cells for immune tolerance and homeostasis. International Investigative Dermatology 2008 , 2008.5.14-17, Kyoto.
 - 5) **Sakaguchi S.** Regulatory T cells for self-tolerance and immune homeostasis. 13th Congress of the Asia Pacific League of Association for Rheumatology (APLAR2008) , 2008.9.23-27, Yokohama.
 - 6) **Sakaguchi S.** The role of CTLA-4 in self-tolerance and immune homeostasis mediated by regulatory T cells. The 10th International Symposium on Dendritic Cells, 2008.10.1-5, Kobe.
 - 7) **Sakaguchi S.** Regulatory T cells for immune tolerance and homeostasis. The 11th Kyoto University International Symposium 2008 Frontier Bioscience in Modern Medicine, 2008.10.9-11, Shanghai, China.
 - 8) **Sakaguchi S.** Regulatory T cells for immune tolerance and homeostasis. The 4th Congress of the Federation of Immunology Societies of Asia-Oceania 2008, 2008.10.17-20, Taipei, Taiwan.
 - 9) **Sakaguchi S.** Regulatory T cells for immune tolerance and homeostasis. Keynote Lecture International Conference on Regulatory T Cells and Clinical Application in Human Diseases , 2008.10.25-27, Beijing, China.
 - 10) **Sakaguchi S.** T reg cells primer on tumor immunology and biological therapy of cancer. iSBTe, 2008.10.30, San Diego, USA.
 - 11) **Sakaguchi S.** Regulatory T cells for immune tolerance and homeostasis. International Conference on Immune Regulation in Health and Disease Japan-German Immunology Seminar 2008, 2008.11.3-6, 福岡.
 - 12) **Sakaguchi S.** Regulatory T cells: Key controllers of immune responses. The Seventh Kimishige and Teruko Ishizaka Lecture in Immunology 2008 La Jolla Institute for Allergy and Immunology , 2008.11.12, La Jolla, USA.
 - 13) **Sakaguchi S.** Regulatory T cells for the control of immunological diseases. 2008 Keio Medical Science Prize Commemorative Symposium , 2008.11.22, 東京.
 - 14) 橋本 求. SKG マウスの関節炎発症における Decti-1 依存的、非依存的経路の解析. 第 38 回日本免疫学会, 2008.12.1, 京都.
 - 15) 前田伸治. TCR シグナル伝達の補正による SKG マウスの自己免疫性関節炎の発症抑制. 第 38 回日本免疫学会, 2008.12.1, 京都.
 - 16) 野村尚史. TCR シグナル不全による制御性 T 細胞分化障害と自己免疫病の発症. 第 38 回日本免疫学会, 2008.12.1, 京都.
 - 17) 坂口志文. 関節リウマチと T 細胞異常. 第 12 回リウマチフォーラム, 2008.1.19, 東京.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
 - 出願番号 12/339,129
 - 出願日 2008.12.19
 - 発明者 坂口志文
 - 発明の名称 4 型葉酸受容体の発現を指標とした制御性 T 細胞の検出方法、及び免疫賦活剤
 2. 実用新案登録
 - なし
 3. その他
 - なし

関節リウマチに関連する自己抗原に対するT細胞免疫応答の解析に関する研究

研究分担者：藤尾 圭志

東京大学医学部アレルギーリウマチ内科 助教

研究協力者：庄田 宏文

東京大学医学部アレルギーリウマチ内科 医員

研究要旨

関節リウマチ (RA) において熱ショック蛋白 70 (HSP70) ファミリーに属する BiP に対する抗体はリウマトイド因子と同等の感度・特異度を示すことが知られている。昨年度は RA 患者及びマウスにおいてこの BiP に対する免疫応答と抗シトルリン化ペプチド抗体 (抗 CCP 抗体) 産生の関連を検討し、RA 患者血清において抗シトルリン化 BiP 抗体価と抗 CCP 抗体価、抗抗酸菌 HSP70 抗体価と抗 CCP 抗体価の有意な相関を見出した。さらに BiP、シトルリン化 BiP、抗酸菌 HSP70 の B6 マウスへの免疫により、抗 CCP 抗体が誘導されることが分かった。また DBA1 マウスを抗酸菌 HSP70 または BiP 免疫後に II 型コラーゲン誘発性関節炎を惹起すると、抗酸菌 HSP70 免疫では関節炎の増悪を認めた。これらのことから RA 患者において、抗酸菌 HSP70 及びシトルリン化 BiP に対する免疫応答が抗 CCP 抗体産生および関節炎の進行に関与している可能性があると考えられた。本年度は BiP、抗酸菌 HSP70 の全長をカバーするエピトープライブラリーを作製し、HLA-DR4 を含む shared epitope (SE) 陽性の RA 患者末梢血で高頻度に増殖反応を誘導するエピトープ BiP-Ep と MHSP-Ep を同定した。BiP-Ep と MHSP-Ep は高い相同性をもち、HLA-DR4 タンパクと高い結合性を示した。今後 BiP-Ep と MHSP-Ep により活性化される T 細胞の解析を進めることにより、BiP-Ep と MHSP-Ep を用いた抗原特異的免疫制御療法の開発につながる可能性がある。

A. 研究目的

関節リウマチ (RA) 発症に最も強く影響する遺伝子はヒト MHC クラス II 分子をコードする HLA-DR である。RA 発症と関連する HLA-DRB1 0401, 0405 などは可変領域に共通したアミノ酸配列を持ち、これを RA 感受性 HLA に共有された配列という意味で shared epitope (SE) という。従来 RA 感受性 HLA 上で T 細胞に提示される抗原が想定されていたが、この抗原は分かっていなかった。昨年度までの研究で、熱ショック蛋白 70 (HSP70) ファミリーに属する BiP に対する免疫応答は、RA の重要な抗体である抗 CCP 抗体と密接な関連があることが分かった。本年度は BiP、抗酸菌 HSP70 の全長をカバーするエピトープライブラリーを作製し、BiP、抗酸菌 HSP70 の HLA-DR4 を含む

shared epitope (SE) 陽性の RA 患者 T 細胞を刺激するエピトープの同定を試みた。さらに抗体レベルでのエピトープを同定し、BiP と抗酸菌 HSP70 に対する免疫応答の類似性を検討した。

B. 研究方法

BiP、抗酸菌 HSP70 の全長をカバーするエピトープライブラリーを作製し、SE 陽性 RA 患者末梢血の増殖反応を検討した。リコンビナントの HLA-DR4 タンパクを作製し、HLA-DR4 への高い親和性が判明している HA ペプチドをコントロールとして、同定したエピトープの結合実験を行った。また RA 患者血清を用いて抗 BiP 抗体、抗抗酸菌 HSP70 抗体のエピトープを検索した。

(倫理面への配慮)

すべての研究は各施設の遺伝子倫理委員会の審査を受け、承認を受けた研究計画に則って実施された。

C. 研究結果

SE 陽性の RA 患者末梢血で高頻度に増殖反応を誘導するエピトープ BiP-Ep と MHSP-Ep を同定した。BiP-Ep と MHSP-Ep は高い相同性を持っていた。RA 患者末梢血の BiP-Ep と MHSP-Ep への反応率は SE がホモの個体では 95%、ヘテロでは 50%、SE を持たない個体では 0%であり、SE との強い関連を示した。HLA-DR4 タンパクとの結合性は、コントロールの HA ペプチドが 30 nM の条件下で、BiP-Ep は IC₅₀ 40nM、MHSP-Ep は IC₅₀ 200 nM とそれぞれ高い結合性を示した。また RA 患者血清を用いて抗 BiP 抗体、抗抗酸菌 HSP70 抗体のエピトープを検索したところ、抗 BiP 抗体のエピトープは BiP の N 末側に、抗抗酸菌 HSP70 抗体のエピトープは抗酸菌 HSP70 の C 末側に同定された。

D. 考 察

BiP および抗酸菌 HSP70 において、RA 患者末梢血に SE と関連した増殖反応を誘導するエピトープ BiP-Ep と MHSP-Ep を同定した。特に SE がホモの患者での BiP-Ep と MHSP-Ep への反応率は 9 割以上であることから、BiP-Ep と MHSP-Ep が RA の病態形成に深く関わっている可能性が考えられた。T 細胞エピトープの BiP-Ep と MHSP-Ep は高い相同性を持っていたが、B 細胞エピトープは異なっていた。このことから、RA の病態は外来抗原に対する免疫応答と自己抗原に対する免疫応答がある程度独立して成立しつつ相互に影響しあって形成されている可能性が示唆された。今後 BiP-Ep と MHSP-Ep により活性化される T 細胞の解析を進めることにより、BiP-Ep と MHSP-Ep を用いた抗原特異的免疫制御療法の開発につながる可能性がある。

E. 結 論

BiP および抗酸菌 HSP70 において、RA 患者末梢血に SE と関連した増殖反応を誘導するエピトープ BiP-Ep と MHSP-Ep を同定し、HLA-DR4 との結合性を確認した。BiP-Ep と MHSP-Ep が RA の病態形成に深く関わっている可能性が考えられた。

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

なし

2. 学会発表

- 1) Shoda H, **Fujio K**, Yamaguchi Y, Yamamoto K. Mycobacterium HSP70 immunization induces anti-citrullinated peptide antibody and exacerbates mouse models of inflammatory arthritis. 第 38 回 日本免疫学会総会・学術集会, 2008.12.1-12.3, 京都.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2009 年度特許出願予定

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

コラーゲンタイプIIをターゲットとした関節リウマチの抗原特異的制御法の確立に関する研究

研究分担者：住田 孝之

筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻臨床免疫学 教授

研究協力者：若松 英、坪井 洋人、飯塚 麻菜、松本 功

筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻臨床免疫学

高岩 文雄

農業生物資源研究所遺伝子組み換え作物開発センター センター長

研究要旨

関節リウマチの抗原特異的治療法を開発し、副作用の少ない効率的な新規予防および治療戦略を開発する事を目的とした。自己抗原のコラーゲンタイプII(CII)を標的分子として、そのアナログペプチドを *in vitro* で選定し、CIIで誘導される関節炎マウスモデルにおいて *in vivo* での予防、治療効果を検討した。その結果、アナログペプチドの一部(APL6)は、関節炎を予防および治療することが判明した。本年度は、アナログペプチド発現米の作製に成功した。蛋白を高発現する米を用いて関節炎に対する予防・治療実験、さらに臨床試験を展開していく。

A. 研究目的

関節リウマチ(RA)において、タイプIIコラーゲン(CII)に対する自己抗体、自己反応性T細胞が検出され、CIIに対する自己免疫応答はRAの発症に大きく関わっていることが判明している。本研究では、CIIのT細胞エピトープを明らかにし、アナログペプチドあるいはT細胞エピトープ自身を用いたRAの抗原特異的制御法を確立することである。

B. 研究方法

1)HLA-DR B1*0101, 0401, 0405に共通なHLA結合アンカーモチーフを有するCIIのT細胞エピトープを検索する。2)HLA-DR B1*0101陽性RA患者から樹立したT細胞株、B細胞株を用いて、作製した変異ペプチドからCIIのアナログペプチドを *in vitro* で選定する。3)コラーゲン誘導関節炎(CIA)マウスモデルを用いて、CIIアナログペプチドを皮下注射あるいは経口投与して、その治療、予防効果について *in vivo* で検定する。4)遺伝子工学的手法を用いてCIIアナログペプチドを産生する米を作製し、CIAモデルマウスにおける関節炎に対する治療、予防効果を検討する。5)CIIアナログペプチド米を用いて

RAにおける臨床試験を実施する。

(倫理面への配慮)

ヒトの検体を使用する際には、大学の倫理委員会の承認を得た上で、患者さんにインフォームド・コンセントを施行し、十分に研究内容を理解してもらい、本人の同意を得た上で研究を実行した。マウスの実験においては疼痛を与えないために麻酔科で対処した。

C. 研究結果

1)HLA-DR B1*0101, 0401, 0405に共通に結合するアンカーモチーフを有するCIIペプチドはGEPGIAGFKGEQGP(K)G(AA256-271)であることが判明した。2)21個の変異ペプチドから10個のアナログペプチドを選定した。特にAA262G→D、Aが有力候補と考えられた。3)CIAマウスモデルにおける *in vitro* での解析では、AA262G→D(APL4)、AA262G→K(APL5)、AA262G→A(APL6)、AA264K→A(APL7)の4個がアナログペプチドとして機能していた。4)CIAモデルマウスを用いた *in vivo* の解析では、APL6が関節炎の治療、予防効果を、APL7が予防効果のみを認めた。一方、APL4、APL5は *in vivo* においては抑制効果を示さなかった。5)CII(AA256-271)、APL4、APL6、APL7をそれぞれ3連結したペプチドを発現ベクタ

一に組み込み、米に発現させた。収穫した稲から得られた米に関して、SDS-PAGEおよびWesternブロット解析で蛋白発現を検討したところ、APL4、APL6、APL7ともに高発現していることが判明した。

D. 考 察

RAにおけるCIIのT細胞エピトープ、およびそのアナログペプチドを*in vitro*で明らかにした。さらに、CIAマウスモデルにおいて、アナログペプチドによる治療、予防効果も証明した。本研究結果から、CIIをターゲットした関節炎の制御が可能であることが判明した。今後、作製したCIIアナログペプチド高発現米を用いて、CIAマウスにおける関節炎の予防・治療実験、臨床試験への準備を進めていく。

E. 結 論

関節リウマチにおける自己抗原(コラーゲンタイプII)を標的とした抗原特異的制御戦略は、モデル動物において治療および予防効果が認められた。

今後、CIIアナログペプチド高発現米をもちいてマウスモデルでの関節炎抑制効果の検討を行い、将来的には、関節リウマチ患者を対象とした臨床試験を進めていく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwanami K, Matsumoto I, Tanaka Y, Inoue A, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, **Sumida T**. Arthritogenic T cell epitope in glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis. **Arthritis Res. Ther** 10: R130, 2008.
- 2) Tanaka Y, Matsumoto I, Iwanami K, Inoue A, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, **Sumida T**. B cells play a crucial role as antigen-presenting cells and collaborate with inflammatory cytokines in glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis. **Clin Exp Immunol** 155: 285-294, 2008.
- 3) Ito I, Kawasaki A, Ito S, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Hom G, Graham

RR, Takasaki Y, Hashimoto H, Ohashi J, Behrens TW, **Sumida T**, Tsuchiya N. Replication of the association between C8orf13-BLK region and systemic lupus erythematosus in a Japanese population. **Arthritis Rheum** (in press).

- 4) Kawasaki A, Ito I, Hikami K, Ohashi J, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Tsutsumi A, Koga M, Arinami T, Graham RR, Hom G, Takasaki Y, Hashimoto H, Behrens TW, **Sumida T**, Tsuchiya N. Role of STAT4 polymorphisms in systemic lupus erythematosus in a Japanese population: a case-control association study of the STAT1-STAT4 region. **Arthritis Res Ther** (in press).
- 5) Matsumoto I, Zhang H, Yasukochi T, Iwanami K, Tanaka Y, Inoue A, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, **Sumida T**. Therapeutic effects of antibodies to TNF α and IL-6 and CTLA-4 Ig in mice with glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis. **Arthritis Res Ther** 10: (in press).
- 6) Kawaguchi Y, Wakamatsu E, Matsumoto I, Nishimagi E, Kamatani N, Satoh T, Kuwana M, **Sumida T**, Hara M. Muscarinic-3 acetylcholine receptor autoantibody in patients with systemic sclerosis: contribution to severe gastrointestinal tract dysmotility. **Ann Rheum Dis** (in press).
- 7) Iwanami K, Matsumoto I, Watanabe Y, 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** 58: 754-763, 2008.
- 8) Nakamura Y, Wakamatsu E, Tomiita M, Kohno Y, Yokoka J, Goto D, Ito S, Matsumoto I, Tsutsumi A, **Sumida T**. High prevalence of autoantibodies to muscarinic 3 acetylcholine receptor in patients with juvenile 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** 67: 571-572, 2008.
- 10) Yoshiga Y, Goto D, Segawa S, Ohnishi Y, Matsumoto I, Ito S, Tsutsumi A, Taniguchi

- M, **Sumida T.** Invariant NKT cells are novel accelerator of IL-17 in the pathogenesis of collagen-induced arthritis. **Int J Mol Med** 22: 369-374, 2008.
- 11) Wang Y, Ito S, Chino Y, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, **Sumida T.** Use of laser microdissection in the analysis of renal-infiltrating T cells in MRI-lpr mice. **Mod Rheumatol** 18: 385-393, 2008.
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
申請準備中
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特記事項なし

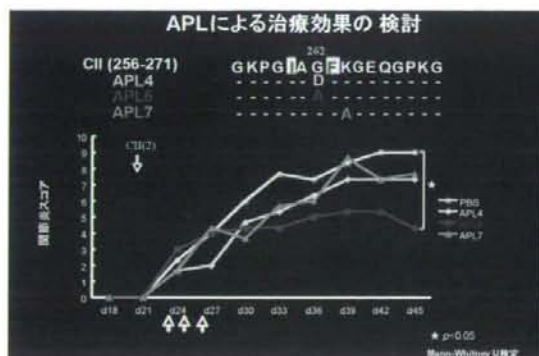


図1 CIIのアナログペプチド (APL6) によるCIAの治療効果

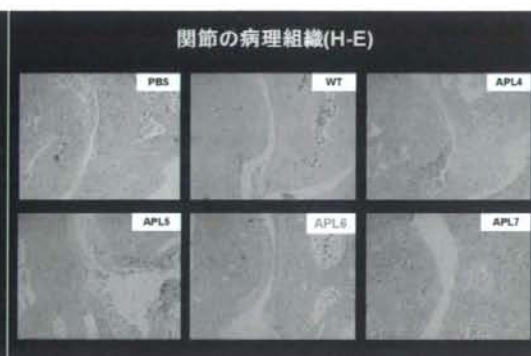


図3 APL6によるCIA組織に対する治療効果(H-E染色像)

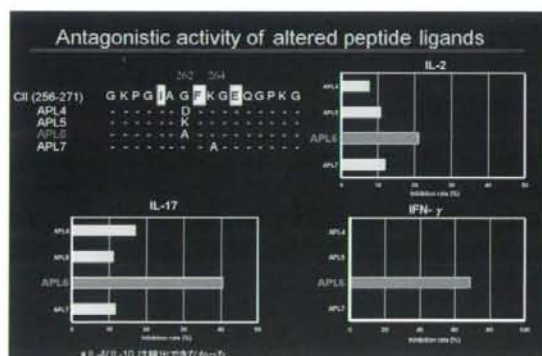


図2 APL6によるCII反応性T細胞のサイトカイン産生に対する影響

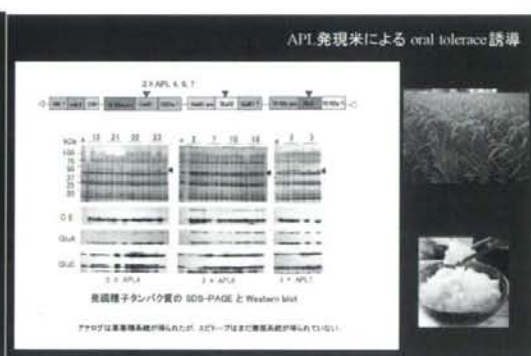


図4 APL4、APL6、APL7アナログペプチド遺伝子導入米における蛋白発現

免疫アレルギー疾患の経口免疫寛容療法に向けた新規濾胞被覆上皮M細胞
特異的マーカーの同定とそれに対するモノクローナル抗体の樹立

研究分担者：清野 宏

東京大学医科学研究所 炎症免疫学分野 教授

研究要旨

免疫寛容を含む、より効率的・効果的な粘膜免疫応答を誘導させるためには、パイエル板などの粘膜誘導組織における抗原感作が必要である。このことから、抗原取り込み細胞として知られている M 細胞の中でも、特に濾胞被覆上皮 (Follicle-associated epithelium:FAE) -M 細胞の膜表面に特異的に発現する分子を標的とした抗原送達系の構築が望まれる。そこで本年度は、FAE-M 細胞特異的分子の同定、ならびにそれに対するモノクローナル抗体の作製を試み、経口免疫寛容療法の開発に向けた研究を行った。DNA マイクロアレイ法を用いて包括的遺伝子発現解析を行い、FAE-M 細胞に特異的に発現する遺伝子として GP2 分子を同定した。また、抗 GP2 抗体の作製に成功し、この抗体を用いた免疫組織学的解析から、実際に GP2 が FAE-M 細胞の管腔面表面に発現しており、抗原送達系における標的分子となり得ることを明らかにした。

A. 研究目的

抗原取り込み細胞として知られている M 細胞は、その亜集団も含め、1) パイエル板・孤立リンパ小節といった誘導組織の上皮層にのみ存在する濾胞被覆上皮 (Follicle-associated epithelium:FAE) -M 細胞、2) 絨毛上皮層に存在し、FAE-M 細胞と相同の形質を示す絨毛 M 細胞、3) 誘導組織と実効組織の両方の上皮層に存在する M-like 細胞に区別される。我々はこれまでに、M 細胞特異的抗体 (NKM16-2-4) の作出に成功し (Nochi, T et al., J. Exp. Med. 204: 2789-2796, 2007)、この抗体をデリバリー分子として用いることで、経口ワクチンによる抗原特異的免疫応答を粘膜系のみならず全身系に誘導できることを確認している。しかし、免疫寛容を含む、より効率的・効果的な粘膜免疫応答を誘導させるためには、パイエル板などの粘膜誘導組織における抗原感作が必要であることから、FAE-M 細胞の膜表面に特異的に発現する分子を標的とした抗原送達系

の構築が望まれる。そこで本年度は、FAE-M 細胞特異的分子の同定、ならびにそれに対するモノクローナル抗体の作製を試み、経口免疫寛容療法の開発に向けた研究を行った。

B. 研究方法

FAE-M 細胞、吸収上皮細胞、M-like 細胞をそれぞれマウス小腸より調整した。各細胞から mRNA を調整し、DNA マイクロアレイ法を用いて包括的遺伝子発現解析を行った。得られた遺伝子発現プロファイルをもとに、FAE-M 細胞に特異的に発現する遺伝子の候補をスクリーニングし、最終候補遺伝子については *in situ* ハイブリダイゼーション法による同定を行った。同定された分子が細胞表面に発現するもの場合はさらに、その分子をラット上皮細胞株に強制発現させ、これらをラットに免疫してそれらに対するモノクローナル抗体を作製した。

(倫理面への配慮)

実験動物使用にあたっては、独立行政法人国立大学実験動物施設協議会指針に基づき、当機関動物実験施設の管理下で実験を行った。

C. 研究結果

遺伝子発現プロファイルにおける候補遺伝子の基準を「FAE-M 細胞においてのみ raw value が 100 以上であり、「Present」もしくは「Marginal」として判断される」かつ「FAE-M 細胞における平均発現値が他の 2 つの細胞画分のより 2 倍以上である」と設定した結果、1272 個の遺伝子が選択された。これらの中で上位に位置する MARCKS-like protein および glycoprotein 2 (GP2) について *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、どちらも FAE-M 細胞に特異的に発現する遺伝子であることを確認した。さらに、GP2 を強制発現させた細胞株を樹立し、これを用いてサブクラスが IgG2a であるラットモノクローナル抗体の作製に成功した。

D. 考 察

今回得られた遺伝子発現プロファイルには、FAE-M 細胞特異的発現遺伝子であることがすでに報告されている PGRP-S、Sgna-1、annexin V などの遺伝子を見て取ることができ、この結果は発現プロファイル全体の信頼性を裏付けるものであった。GP2 は GPI アンカープロテインであり、今回樹立した抗 GP2 抗体を用いた免疫組織学的解析から、実際に FAE-M 細胞の管腔面表面に発現しており、抗原送達系における標的分子となり得ることが期待される。今後は、抗 GP2 抗体の抗原送達系における効果を、免疫寛容の誘導を指標に、先に樹立した NKM16-2-4 抗体とも比較して検討することが必要であると考えられる。

E. 結 論

本研究で構築された遺伝子発現プロファイルは、FAE-M 細胞特異的発現遺伝子の同定のみならず、亜集団を含む M 細胞の免疫生物学的機能における分子機序の理解においても寄与するものと考えられる。また、抗 GP2 抗体がより効果的な経口抗原のデリバリー分子となり得ることが示された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Terahara T, Igarashi O, Yoshida M, Nochi T, Kurokawa S, Takayama N, Yuki Y, Low AW, **Kiyono H**. Comprehensive gene expression analysis among Peyer's patch M cells, villous M cells and intestinal epithelial cells by DNA microarray analysis. **J Immunol** 180: 7840-7846, 2008.
- 2) Kunisawa J, Gohda M, Kurashima Y, Ishikawa I, Higuchi M, **Kiyono H**. Sphingosine 1-phosphate-dependent trafficking of peritoneal B cells requires functional NF κ B-inducing kinase in stromal cells. **Blood** 111: 4646-4652, 2008.
- 3) Gohda M, Kunisawa J, Miura F, Kagiya Y, Kurashima Y, Higuchi M, Ishikawa I, Ogahara I, **Kiyono H**. Sphingosine 1-phosphate regulates the egress of IgA plasmablasts from Peyer's patches for intestinal IgA responses. **J Immunol** 180: 5335-5343, 2008.
- 4) Chang SY, Cha HR, Igarashi O, Rennert PD, Kissenpfennig A, Malissen B, Nanno M, **Kiyono H**, Kweon MN. Cutting edge: Langerin+ dendritic cells in the mesenteric lymph node set the

- stage for skin and gut immune system cross-talk. **J Immunol** 180: 4361-5, 2008.
- 5) Chang SY, Cha HR, Uematsu S, Akira S, Igarashi O, **Kiyono H**, Kweon MN. Colonic patches direct the cross-talk between systemic compartments and large intestine independently of innate immunity. **J Immunol** 180: 1609-18, 2008.
- 6) Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH, Yang BG, Jung YJ, Nishiyama M, Sato S, Tsujimura T, Yamamoto M, Yokota Y, **Kiyono H**, Miyasaka M, Ishii KJ, Akira S. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. **Nat Immunol** 9: 769-776, 2008.
- 7) Kobayashi T, Takahashi K, Nagai Y, Shibata T, Otani M, Izui S, Akira S, Gotoh Y, **Kiyono H**, Miyake K. Tonic B cell activation by Radioprotective105/MD-1 promotes disease progression in MRL/lpr mice. **Int Immunol** 20: 881-91, 2008.
- 8) Hashizume T, Togawa A, Nochi T, Igarashi O, Kweon MN, **Kiyono H**, Yamamoto M. Peyer's patches are required for intestinal IgA responses to Salmonella. **Infect Immun** 76: 927-934, 2008.
- 9) Momoi F, Hashizume T, Kurita-Ochiai T, Yuki Y, **Kiyono H**, Yamamoto M. Nasal vaccination with the 40-kilodalton outer membrane protein of porphyromonas gingivalis and a nontoxic chimeric enterotoxin adjuvant induces long-term protective immunity with reduced levels of immunoglobulin E antibodies. **Infect Immun** 76: 2777-2784, 2008.
- 10) Kunisawa J, Nochi T, **Kiyono H**. Immunological commonalities and distinctions between airway and digestive immunity. **Trends Immunol** 29: 505-513, 2008.
2. 学会発表
特になし
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

<書籍>

主任研究者：江口勝美

著者名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	出版社名	出版年
		書籍名	出版地	ページ
江口勝美	再発性多発軟骨炎	山口 徹, 北原光夫, 福井次矢 今日の治療指針	医学書院 東京	2009 631-632
折口智樹, 江口勝美	その他のリウマチ性疾患	貴和敏博, 堀 正二, 永井良三, 他 新臨床内科学 第9版	医学書院 東京	2009 1488-1496
江口勝美	検査	宮坂信之 関節リウマチ	最新医学社 大阪	2008 128-142
江口勝美	早期関節リウマチ	宮坂信之 関節リウマチ	最新医学社 大阪	2008 270-278
江島英理, 江口勝美	内分泌疾患	日本病態栄養学会 内分泌疾患	メディカル レビュー社 大阪	2008 224-229
江口勝美	関節リウマチの早期診断による発症及び重症化予防	平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金 (免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業) 総括・分担研究報告書		2008 3-28
江口勝美	病態形成における TH17 細胞と制御性 T 細胞の役割とその統御方法の開発 早期診断予防基準と早期関節破壊進行基準の妥当性の研究	平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金 (免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業) 総括・分担研究報告書		2008 63-74
江口勝美	臨床免疫学概論	木本雅夫, 阪口薫雄, 山下優毅 免疫学コア講義 改訂 2 版	南江堂 東京	2007 169-175
江口勝美	関節リウマチ	木本雅夫, 阪口薫雄, 山下優毅 免疫学コア講義 改訂 2 版	南江堂 東京	2007 203-208
江口勝美, 折口智樹	感染性関節炎	杉本恒明, 矢崎義雄 内科学	朝倉書店 東京	2007 1104-1105
江口勝美	関節リウマチの早期診断法の確立及び臨床経過の予測に関する研究	平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金 (免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業) 総括・分担研究報告書		2007 1-12
江口勝美	関節リウマチに進展する早期関節炎の鑑別と早期からの関節破壊の予知に関する研究	平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金 (免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業) 総括・分担研究報告書		2007 31-42
江口勝美	RNA スプライシング異常による			2007

蒲池 誠	SLE 発症機序の解明と新規治療法の開発	平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業) 総括・分担研究報告書		81-83
------	----------------------	-----------------------------------------------	--	-------

分担研究者：寺井千尋

著者名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	出版社名	出版年
		書籍名	出版地	ページ
寺井千尋	アミロイドーシス	水島裕, 高久文麿	南江堂	2007
		今日の処方	東京	355-358

分担研究者：三森経世

著者名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	出版社名	出版年
		書籍名	出版地	ページ
三森経世	混合性結合組織病(mixed connective tissue disease ; MCTD) 1. 混合性結合組織病とはどういう病気か	井村裕夫/編集主幹	文光堂	2008
		わかりやすい内科学	東京	414-417
藤井隆夫, 三森経世	混合性結合組織病	竹内勤/編 からだの科学-リウマチ・膠原病のすべて	日本評論社 東京	2008 79-84
野島崇樹, 三森経世	リウマチ・膠原病の検査	竹内勤 からだの科学-リウマチ・膠原病のすべて	日本評論社 東京	2008 30-33
三森経世	膠原病および類縁疾患の治療の動向	山口徹, 北原光夫, 福井次矢	医学書院	2008
		今日の治療指針 2008 年版-私はこう治療している(Volume50)	東京	613
三森経世	免疫学的検査	住田孝之	医薬ジャーナル	2008
		やさしいシェーグレン症候群の自己管理	東京	49-52
三森経世	膠原病	大橋優美子, 永野志朗, 吉野肇一, 大竹政子	学研	2008
		看護学学習辞典	東京	973-975
三森経世	診断鑑別診断	宮坂信之	最新医学社	2008
		最新医学別冊新しい診断と治療の ABC 「免疫1 関節リウマチ」	大阪	154-161
白井 崇, 三森経世	抗リウマチ薬	高久史麿	じほう	2007
		治療薬ハット・アッパー薬剤選択と処方のポイント2008	東京	1061-1068
三森経世	1. 膠原病	山本一彦	羊土社	2007
		ステロイド薬の選び方・使い方ハット・アッパー	東京	54-82
吉藤 元, 三森経世	多発性筋炎・皮膚筋炎 (PM/DM)	太田健, 奈良信雄	南江堂	2007
		今日の診断基準	東京	660-661

研究成果の刊行に関する一覧表

< 雑 誌 >

主任研究者：江口勝美

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tateishi Y, Iguchi Y, Kimura K, Kobayashi K, Shibazaki K, Eguchi K.	Right-to-left shunts may be not uncommon cause of TIA in Japan.	J Neurol Sci	277(1-2)	13-16	2009
Miyaaki H, Zhou H, Ichikawa T, Nakao K, Shibata H, Takeshita S, Akiyama M, Ozawa E, Miuma S, Eguchi K.	Study of liver-targeted regulatory T cells in hepatitis B and C virus in chronically infected patients.	Liver Int			In press
Iwamoto N, Kawakami A, Tamai M, Fujikawa K, Arima K, Aramaki T, Kawashiri S, Ichinose K, Kamachi M, Nakamura H, Origuchi T, Ida H, Eguchi K.	Determination of the subset of Sjögren's syndrome with articular manifestations by anticyclic citrullinated peptide antibodies.	J Rheumatol			In press
Kawasaki E, Awata T, Ikegami H, Kobayashi T, Maruyama T, Nakanishi K, Shimada A, Uga M, Kurihara S, Kawabata Y, Tanaka S, Kanazawa Y, Eguchi K.	Genetic association between the IL2RA and mode of onset of type 1 diabetes in the Japanese population.	J Clin Endocrinol Metab			In press
Tamai M, Kawakami A, Uetani M, Takao S, Arima K, Iwamoto N, Fujikawa K, Aramaki T, Kawashiri S, Ichinose K,	A prediction rule for disease outcome in patients with undifferentiated arthritis using MRI of wrists and finger joints and serologic autoantibodies.	Arthritis Care & Research			accept

Kamachi M, Nakamura H, Origuchi T, Aoyagi K, Eguchi K					
Miyasaka N, Eguchi K, the CHANGE study Investigators	Clinical investigation in highly disease-affected rheumatoid arthritis patients in Japan with adalimumab applying standard and general evaluation: the CHANGE study 【別冊】	Mod Rheumatol	18 (3)	252-262	2008
Yoshizaki A, Kawakami A, Aramaki T, Ida H, Eguchi K	Preferential recovery by an intensive initial therapy from hemophagocytic syndrome complicated with adult onset Still's disease presenting as agranulocytosis and hypercytokinemia.	Clin Exp Rheumatol	26(2)	383	2008
Kasagi S, Kawano S, Nakazawa T, Sugino H, Koshihara M, Ichinose K, Ida H, Eguchi K, Kumagai S	A case of periodic-fever-syndrome-like disorder with lipodystrophy, myositis, and autoimmune abnormalities.	Mod Rheumatol	18(2)	203-207	2008
Hida A, Akahoshi M, Takagi Y, Ashizawa K, Imaizumi M, Soda M, Maeda R, Nakashima E, Ida H, Kawakami A, Nakamura T, Eguchi K	Prevalence of Sjögren syndrome among Nagasaki atomic bomb survivors.	Ann Rheum Dis	67(5)	689-695	2008
Fujikawa K, Kawakami A, Eguchi K	Recovery from multiple cranial nerve palsy of Wegener granuloma with infliximab.	J Rheumatol	35(7)	1471	2008
Nakamura H, Takagi Y, Kawakami A, Ida H, Nakamura T, Nakamura T, Eguchi K	HTLV-I infection results in resistance toward salivary gland destruction of Sjögren's syndrome.	Clin Exp Rheumatol	26(4)	653-655	2008
Nakamura H, Tateishi S, Kawakami A, Ida H, Fukuda T, Sasaki M, Koide Y, Ashizawa N, Seto S, Hayashi T, Sato S	A case of mixed connective tissue disease complicated with hypertrophic obstructive cardiomyopathy.	Rheumatol Int	28(12)	1273-1275	2008

Eguchi K.					
Nakamura H, Kawakami A, Iwamoto N, Ida H, Koji T, Eguchi K.	Rapid and significant induction of TRAIL-mediated type II cells in apoptosis of primary salivary epithelial cells in primary Sjögren's syndrome.	Apoptosis	13(11)	1322-1330	2008
Nakamura H, Usa T, Motomura M, Ichikawa T, Nakao K, Kawasaki E, Tanaka M, Ishikawa K, Eguchi K.	Prevalence of interrelated autoantibodies in thyroid disease and autoimmune disorders.	J Endocrinol Invest	31(10)	861-865	2008
Migita K, Abiru S, Tanaka M, Ito M, Miyashita T, Maeda Y, Koga T, Nakamura M, Komori A, Yatsuhashi H, Ida H, Eguchi K, Hirayama K, Yasunami M, Ishibashi H.	Acute hepatitis in a patient with familial Mediterranean fever.	Liver Int	28(1)	140-142	2008
Fukushima K, Abiru N, Nagayama Y, Kobayashi M, Satoh T, Nakahara M, Kawasaki E, Yamasaki H, Ueha S, Matsushima K, Liu E, Eguchi K.	Combined insulin B 9-23 self-peptide and polyinosinic-polycytidylic acid accelerate insulinitis but inhibit development of diabetes by increasing the proportion of CD4+ Foxp3+ regulatory T cells in the islets in non-obese diabetic mice. 【別冊】	Biochem Bioph Res Com	367 (4)	719-724	2008
Kawasaki E, Kuriya G, Satoh T, Fujishima K, Moriuchi A, Fukushima K, Ozaki M, Abiru N, Yamasaki H, Eguchi K.	Humoral immune response to islet autoantigens in Japanese patients with type 1 diabetes.	ANNALS of The New York Academy of Sciences	1150	248	2008
Kawasaki E, Uga M, Nakamura K, Kuriya G.	Association between anti-ZnT8 autoantibody specificities and SLC30A8 Arg325Trp variant in Japanese patients with type 1 diabetes.	Diabetologia	51(12)	2299-2302	2008

Satoh T, Fujisjima K, Ozaki M, Abiru N, Yamasaki H, Wenzlau JM, Davidson HW, Hutton JC, Eguchi K.					
Akiyama M, Miyaaki H, Miura S, Shibata H, Fujimoto M, Takeshita S, Ozawa E, Ichikawa T, Nakao K, Eguchi K.	Significance of trans-hepatic arterial chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombus.	Oncol Rep	20 (2)	353-357	2008
Kusumoto K, Yatsuhashi H, Nakao R, Hamada R, Fukuda M, Tamada Y, Taura N, Komori A, Daikoku M, Hamasaki K, Nakao K, Ishibashi H, Miyakawa Y, Eguchi K.	Detection of HBV core promoter and precore mutations helps distinguish flares of chronic hepatitis from acute hepatitis B.	J Gastroenterol Hepatol	23(5)	790-793	2008
Miyaaki H, Ichikawa T, Nakao K, Yatsuhashi H, Furukawa R, Ohba K, Omagari K, Kusumoto Y, Yanagi K, Inoue O, Kinoshita N, Ishibashi H, Yano M, Eguchi K.	Clinicopathological study of nonalcoholic fatty liver disease in Japan: the risk factors for fibrosis.	Liver International	28 (4)	519-524	2008
Shibata H, Ichikawa T, Nakao K, Miyaaki H, Takeshita S, Akiyama M, Fujimoto M, Miura S, Kanda S, Yamasaki H, Eguchi K.	A high glucose condition sensitizes human hepatocytes to hydrogen peroxide-induced cell death.	Mol Med Rep	1	379-385	2008

Satoh K, Shirabe S, Eguchi H, Tsujino A, Motomura M, Satoh A, Tsujihata M, Eguchi K.	Chronological changes in MRI and CSF biochemical markers in Creutzfeldt-Jakob disease patients.	Dement Geriatr Cogn Disord	23 (6)	272-281	2007
Moriuchi A, Yamasaki H, Shimamura M, Kita A, Kuwahara H, Fujishima K, Satoh T, Fukushima K, Fukushima T, Hayakawa T, Mizuguchi H, Nagayama Y, Abiru N, Kawasaki E, Eguchi K.	Induction of human adiponectin gene transcription by telmisartan, angiotensin receptor blocker, independently on PPAR-gamma activation.	Biochem Biophys Res Commun	356 (4)	1024-1030	2007
Kobayashi M, Abiru N, Arakawa T, Fukushima K, Zhou H, Kawasaki E, Yamasaki H, Liu E, Miao D, Wong FS, Eisenbarth GS, Eguchi K.	Altered B 9-23 insulin, when administered intranasally with cholera toxin adjuvant, suppresses the expression of insulin autoantibodies and prevents diabetes. 【別冊】	J Immunol	179(4)	2082-2088	2007
Fukushima N, Nishiura Y, Nakamura T, Kohno S, Eguchi K.	Blockade of IL-2 receptor suppresses HTLV-I and IFN-gamma expression in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis.	Intern Med	46 (7)	347-351	2007
Migita K, Maeda Y, Abiru S, Nakamura M, Komori A, Miyazoe S, Nakao K, Yatsuhashi H, Eguchi K, Ishibashi H.	Polymorphisms of interleukin-1beta in Japanese patients with hepatitis B virus infection.	J Hepatol	46 (3)	381-386	2007
Ando T, Yasui J, Inokuchi N, Usa T, Ashizawa K, Kamihara S, Eguchi K.	Non-specific activities against ruthenium crosslinker as a new cause of assay interference in an electrochemiluminescent immunoassay.	Intern Med	46 (15)	1225-1229	2007

Iwanaga N, Kamachi M, Fujikawa K, Aramaki T, Izumi Y, Arima K, Tamai M, Aratake K, Nakamura H, Origuchi T, Ida H, Kawakami A, Taguchi T, Eguchi K.	Membranous glomerulonephritis and non-Hodgkin's lymphoma in a patient with primary Sjögren's syndrome.	Internal Med	46 (4)	191-194	2007
Yamasaki S, Yagishita N, Sasaki T, Nakazawa M, Kato Y, Yamadera T, Bae E, Toriyama S, Ikeda R, Zhang L, Fujitani K, Yoo E, Tsuchimochi K, Ohta T, Araya N, Fujita H, Aratani S, Eguchi K, Komiya S, Maruyama I, Higashi N, Sato M, Senoo H, Ochi T, Yokoyama S, Amano T, Kim J, Gay S, Fukamizu A, Nishioka K, Tanaka K, Nakajima T.	Cytoplasmic destruction of p53 by the endoplasmic reticulum-resident ubiquitin ligase 'Synoviolin'. 【別冊】	EMBO J	26(1)	113-122	2007
Tamai M, Kawakami A, Uetani M, Takao S, Tanaka F, Fujikawa K, Aramaki T, Nakamura H, Iwanaga N, Izumi Y, Arima K,	Bone edema determined by magnetic resonance imaging reflects severe disease status in patients with early-stage rheumatoid arthritis. 【別冊】	J Rheumatol	34(11)	2154-2157	2007