

20083203/A

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

免疫疾患の病因・病態解析と その制御戦略へのアプローチ

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 住田 孝之

平成21(2009)年3月

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

免疫疾患の病因・病態解析と その制御戦略へのアプローチ

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 住田 孝之

平成21(2009)年3月

新規 IL-10 産生制御性 T 細胞の分化機構に関する研究	22
東京大学医学部アレルギーリウマチ内科 藤尾 圭志	
NKT 細胞を介した自己免疫性脳炎抑制の機序に関する研究	24
国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部 山村 隆	
SLE における自己抗体産生機構と B 細胞を分子標的とした治療戦略に関する研究	27
産業医科大学医学部第一内科学講座 田中 良哉	
自己免疫疾患における免疫担当細胞のシグナル異常とその制御（自己免疫疾患に おける RasGRP の発現検討）	30
北海道大学大学院医学研究科 内科学講座・第二内科 小池 隆夫	
IV 研究成果の刊行に関する一覧表	35
V 平成 20 年度班会議プログラム	43
VI 研究成果刊行物・別刷	45

I 平成20年度構成員名簿

免疫疾患の病因・病態解析とその制御戦略へのアプローチに関する研究班

区分	氏名	所属	職名
研究代表者	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
研究分担者	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
	山村 隆	国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部	部長
	田中 良哉	産業医科大学医学部第一内科学講座	教授
	小安 重夫	慶応義塾大学医学部微生物学・免疫学教室	教授
	高橋 智	筑波大学大学院人間総合科学研究科生命システム医学専攻分子発生生物学	教授
	石川 昌	東京大学医学部分子予防医学教室	准教授
	上阪 等	東京医科歯科大学大学院歯学総合研究科膠原病・リウマチ内科学	准教授
	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分野	准教授
	藤尾 圭志	東京大学医学部アレルギーリウマチ内科	助教
事務局	辻 奈津子	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分野 〒305-8575 茨城県つくば市天王台1-1-1 TEL 029-853-3221 FAX 029-853-3222 e-mail : riumachi@md.tsukuba.ac.jp	
経理事務 担当者	佐藤 寛子	筑波大学医学系支援室会計係 TEL 029-853-3017 FAX 029-853-6309 e-mail : hsatoh@sec.tsukuba.ac.jp	

II 平成20年度総括研究報告

平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
総括研究報告書

免疫疾患の病因・病態解析とその制御戦略へのアプローチに関する研究

研究代表者 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）

研究要旨

本研究プロジェクトにおいては、免疫疾患とくに自己免疫疾患に焦点を当て、その発症に関わる免疫担当細胞、免疫分子を明らかにし、それらを標的とした疾患特異的な治療法、予防法を開発することを目的とする。具体的な研究テーマは以下のとおりである。

自然免疫系において重要な役割を果たしている樹状細胞(DC)上の Toll 様受容体(TLR)および産生された IL-15 をターゲットとした治療戦略を開発する(小安)。T細胞の活性化に重要な分子である CD86 や MHC class II を標的分子とした E3 ユビキチンリガーゼ c-MIR による関節炎の制御(上阪)。DC などに提示された抗原を認識した T細胞は活性化され TH1, TH2, TH17 細胞などに分化し様々なサイトカインを産生し、細胞傷害性 T細胞の誘導も促し、最終的に炎症や臓器破壊にいたる。そこで、T細胞活性化の初期段階において抗原認識を抗原特異的に制御する戦略(住田)、免疫疾患における TH1, TH2 および TH17 細胞の機能解析およびそれらを標的とした治療戦略の開発(高橋、松本)をめざす。免疫応答をネガティブに調節している新規調節性 T細胞による制御法(藤尾)、Treg 細胞と B1 細胞との相互作用阻害による治療法(石川)、調節機能を有する NKT 細胞を標的とした治療戦略(山村)の開発を進める。自己抗体の産生機構、免疫担当細胞の分化・シグナル異常の解明と制御法の開発(小池)、自己抗体産生機構の解析と B細胞を標的とした治療戦略の開発(田中)。

研究分担者

- 小池隆夫 北海道大学大学院医学研究科
教授
- 山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所
部長
- 田中良哉 産業医科大学医学部第一内科学講座
教授
- 小安重夫 慶応義塾大学医学部 免疫学
教授
- 高橋 智 筑波大学大学院人間総合科学研究科
教授
- 石川 昌 東京大学大学院医学系研究科
准教授
- 上阪 等 東京医科歯科大学大学院医歯学総合
研究科 准教授
- 松本 功 筑波大学大学院人間総合科学研究科
准教授
- 藤尾圭志 東京大学医学部アレルギーリウマチ内科
助教

A. 研究目的

難治性疾患に制定されている疾患の多くは自己免疫疾患である。しかし、その発症の分子機構はいまだ明らかにされておらず、疾患特異的な治療法は開発されていない。現在の治療の主体は、副腎皮質ホルモンや免疫抑制剤などの非特異的治療であり、感染症など種々の副作用が認められ、患者の QOL 低下の一因になっている。本研究では、自然免疫系および獲得免疫系において重要な役割を果たしている免疫担当細胞、免疫分子の機能を分子レベルで明らかにし、免疫疾患の発症機構を明らかにする。さらに、それらの細胞や分子をターゲットとした抜本的な治療・予防戦略を開発することを目的とする。厚生労働省の特定疾患対策として、病因解明、発症機序に基づく疾患特異的治療の開発は急務であり、本研究による新しい予防、治療法による患者の QOL 改善が期待される。

具体的には、1) 自己抗原の T細胞エピトープ解析、アナログペプチドを用いた自己反応性 T細胞の抗原特異的制御法の開発(住田)、2) 抗原提示細胞として重要な樹状細胞(DC)に焦点をあて、Toll 様受容体(TLR)を介したシグナル、IL-15 の制御を中心に遺伝子改変マウスを用いて自己免疫寛容破綻機序を解明する(小安)、3) T細胞の活性化に重要な分子である CD86 や MHC class II を標的分子とし

た E3 ユビキチンリガーゼ c-MIR による関節炎の制御 (上阪)、4) TH1 細胞、TH2 細胞、TH17 細胞の役割を T-bet、GATA3、ROR γ T トランスジェニックマウスを用いて解明し新規治療法開発を目指す (高橋)、5) TH17 細胞に焦点をあて免疫疾患発症機構とその制御法を開発 (松本)、6) B1 細胞と Treg 細胞の相互作用の解析、抗ケモカイン抗体による治療戦略の開発 (石川)、7) IL-10 を産生する新規 Treg 細胞に注目し免疫疾患発症機構の解明 (藤尾)、8) NKT 細胞の機能解析と NKT 細胞を介した治療法の開発 (山村)、9) B 細胞の活性化機構、自己抗体産生機序の解析と B 細胞を標的とした新規治療法の臨床応用 (田中)、10) 免疫担当細胞のシグナル異常の解析と制御 (小池)。

本研究の独創的な点は、新しく発見された重要な免疫担当細胞、免疫分子の視点から免疫疾患の発症機構を分子レベルで解析し、それらを標的とした新規治療・予防戦略を開発する点にある。国内・国外の研究においても極めてユニークな研究プロジェクトといえよう。

B. 研究方法

1. (住田) 1) シェーグレン症候群や関節リウマチを対象として、自己反応性 T 細胞エピトープ (M3R、CII、GPI) を明らかにし、病因 T 細胞をトランスに誘導するアナログペプチドを選択する。2) M3R 誘導唾液腺炎マウス、コラーゲン誘導関節炎マウス、GPI 誘導関節炎マウスを用いて、アナログペプチドによる免疫疾患の抗原特異的治療法の確立をめざす。3年目にはアナログペプチドを用いた clinical trial を進める。

2. (小安) 1) CIA や抗原特異的関節炎 (AIA) をモデルとし、自然免疫に重要な DC における細胞内のレドックス、PI3K 経路、HIF1 経路 (低酸素) と炎症との関連性、2) IL-15 による炎症の誘導と維持機構を明らかにする。

3. (上阪) 1) CIA マウスに組換え c-MIR アデノウイルスを移入し関節炎のスコアおよび組織学的検討を行った。2) *in vitro* で CIA マウス関節組織由来の細胞に組換え c-MIR アデノウイルスを感染させ、TNF- α 刺激による IL-6 産生を検討した。3) c-MIR トランスジェニックマウス由来骨髄マクロファージ (BMM) においても、TNF- α 刺激で誘導される IL-6 mRNA、TNF 受容体発現を解析した。

4. (高橋) 既に確立された T-bet を過剰発現する (TH1 優位) マウス、GATA-3 を過剰発現する (TH2 優位) マウス、ROR γ T を過剰発現する (TH17 優位) マウスにて、様々な免疫疾患モデルを誘導し、疾患発症の経過を観察する。交配するモデルマウスとして、BSA 腎炎や EAE モデルマウスを使用する。

5. (松本) 1) GPI ペプチド誘導関節炎マウスにおい

て、TH17 細胞を制御する戦略を明らかにする。具体的には、抗 IL-6 受容体抗体、抗 TNF- α 抗体、CTLA-4Ig などによる治療効果判定を行う。2) TNF- α で誘導される新たな制御分子 TIARP (ヒト STEAP4) に機能を解析し新規治療法を開発する。

6. (石川) SLE のモデルである BWF1 マウスを用いて、1) 自己抗体産生に関わる B1 細胞、TB1 細胞とそれを制御する Treg 細胞の細胞間相互作用、2) 抗ケモカイン抗体 (抗 BLC 抗体) による免疫異常の治療効果を検討する。

7. (藤尾) 1) 遺伝子改変マウスにおいて、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の分化を検討する。特に CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の発現遺伝子解析において、B 細胞に関連した遺伝子が発現しており、B 細胞の分化における役割を検討する。2) 腸炎の抑制から外来抗原による分化誘導メカニズムも想定され、自然免疫系と CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞分化の関連を解明する。

8. (山村) 1) 抗生物質投与マウスより脂質分画を分離精製し、NKT 細胞刺激活性、EAE 修飾活性を評価する。2) 多発性硬化症患者にインフォームド consent の上、抗生物質投与を行い、末梢血中の Th17 細胞活性の変化について検証する。

9. (田中) 1) 抗 CD20 抗体療法により変動する細胞表面分子、サイトカイン発現、mRNA 発現などを解析する。2) B 細胞の活性化、抑制機序について、APRIL/BAFF と TACI/BAFFR の相互作用、B 細胞受容体やサイトカインシグナルを解析する。3) 難治性 SLE 症例に対して、抗 CD20 抗体、抗 CD22、TACI-Ig 複合蛋白質を用いた臨床試験を進める。

10. (小池) 1) RasGRP1, 4 スプライス異常のコンストラクトを細胞株に導入しその下流シグナルについて検討する。2) スプライスに与えるサイトカイン等の外的因子を明らかにする。3) T 細胞特異的プロモータを用いて T 細胞特異的 RasGRP1 スプライスバリエント発現マウスを作製する。

(倫理面への配慮)

ヒトの検体を用いる研究に関しては、各施設における倫理委員会での承諾を得た上で、患者および健常者に十分なインフォームド・コンセントを行い、理解と同意を得る。動物実験においては、過度の苦痛や恐怖を与えないように配慮する。遺伝子改変マウスを用いた実験では、当該施設の組換え DNA 実験および動物実験の学内規定を遵守して行う。

C. 研究結果

1) 住田: 1) CIA 誘導マウスにおいて、関節炎を抑制、予防するアナログペプチド (APL) を選定した。2) GPI 免疫関節炎マウスにおいても APL を決定した。3) M3R 誘導唾液腺炎モデルマウスの樹立に成

功した。

- 2) 小安：脂質リン酸化酵素 PI3K の下流にある mTOR と GSK3 がサイトカイン発現を異なる分子機構で調節すること、酵素を阻害することで炎症反応を制御できることを示した。
- 3) 上阪：c-MIR 遺伝子導入により関節炎抑制効果が認められた。その機序として、c-MIR 遺伝子発現により IL-6 発現、産生が低下したことが一因だが、それは TNF 受容体の下流シグナルへの影響によると考えられた。
- 4) 高橋：3 系統のトランスジェニックマウスモデルは既に確立されており、研究計画は順調に進行している。
- 5) 松本：GPI ペプチド誘導性関節炎モデルマウスを確立し、自己抗原、Th17 細胞、自己抗体による関節炎発症機構の解明を進めている。
- 6) 石川：BWF1 マウスにおいてループ腎炎発症に伴い Treg が増加していること、発症に伴い Treg のケモカイン受容体発現が変化している事を明らかにした。
- 7) 藤尾：Egr2 遺伝子を高発現する IL-10 産生 CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞を同定した。この新規抑制性 T 細胞は腸炎を抑制し Foxp3 陽性制御性 T 細胞と分化が異なることを明らかにした。
- 8) 山村：自己免疫性腸炎において NKT 細胞の関与を証明した。
- 9) 田中：治療抵抗性 SLE に対して抗 CD20 抗体リツキシマブ療法の安全性と有効性を確認した。リツキシマブの作用機序として、メモリー B 細胞の優先的な除去を明らかにした。
- 10) 小池：末梢血単球、樹状細胞・マクロファージや RA 患者滑膜 CD68 陽性細胞に RasGRP4 が発現していること、RasGRP4 の異常発現が SLE ばかりでなく RA 病態形成に影響を与えることを明らかにした。

D. 考察と E. 結論

本研究では、自然免疫系および獲得免疫系において重要な役割を果たしている免疫担当細胞、免疫分子の機能を分子レベルで明らかにし、免疫疾患の発症機構を明らかにする。さらに、それらの細胞や分子をターゲットとした抜本的な治療・予防戦略を開発することを目的とした。本年度の研究成果では、自己免疫疾患における DC 細胞、T 細胞抗原エピソード、TH1、TH2、TH17 細胞の関与、Treg 細胞や NKT 細胞などの調節性 T 細胞、B 細胞の関与等について明らかにする事ができ一定の研究成果が得られたと考えられる。本研究成果は、自己免疫疾患の発症機構を分子、細胞レベルで解析する基盤研究であり、次年度以降は、本研究成果に基づいた具体的な新規治療

戦略の開発をめざす。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

分担研究報告書参照

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

分担研究報告書参照

III 分担研究報告

アナログペプチドによる抗原特異的免疫分子制御法の開発に関する研究

研究代表者 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: 岩波 慶一、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

研究要旨

免疫難病の代表的疾患である関節リウマチ(RA)およびシェーグレン症候群(SS)において、各臓器に浸潤した自己反応性 T 細胞がその発症に重要な役割を果たしている。本研究では、自己反応性 T 細胞の対応自己抗原の T 細胞エピトープをアミノ酸レベルで明らかにし、そのアナログペプチドを用いた抗原特異的治療戦略を開発することを目的としている。RA モデルとしては、CII 誘導関節炎(CIA)モデルマウスと GPI 免疫関節炎モデルマウスを用い、SS モデルとしては、M3R 免疫モデルマウスの作製を試みた。結果として、1)アナログペプチドが CIA を抑制、予防すること、2)アナログペプチドが GPI 蛋白および GPI ペプチド誘導関節炎を抑制すること、3)M3R を M3R ノックアウトマウスに免疫して脾細胞を Rag-1 ノックアウトマウスに細胞移入することにより SS と類似した唾液腺炎モデルを作製することに成功した。今後は、以上の基盤研究に基づき、病原因 T 細胞が認識する抗原をターゲットとした抗原特異的治療法の開発を進める。

A. 研究目的

免疫難病である関節リウマチ(RA) およびシェーグレン症候群(SS)において、発症機序として、臓器に浸潤した自己反応性 T 細胞が重要な役割を果たしている。その病原因 T 細胞が認識する T 細胞エピトープをアミノ酸レベルで明らかにし、変異ペプチドを用いて抗原特異的に免疫難病を治療することを目的とする。

B. 研究方法

- 1) タイプ II コラーゲン: HLA-DR B1*0101, 0401, 0405 陽性 RA 患者および DBA/1 において CII (GKPGIAGFKGEQPKG, AA256-271) のアナログペプチドはともに、APL4-7 (AA262G→D, K, A, 264K→A) であることが判明した。In vivo の解析では、APL6 が治療効果と予防効果を示した。APL6 を発現した米を作製するために、タンデムに 3 連結した APL6 を発現ベクターに組み込み箱を作製した。
- 2) glucose-6-phosphate isomerase: RA 患者では glucose-6-phosphate isomerase (GPI) に対する自己抗体、T 細胞が存在し発症との関連性が報告されている。DBA/1 マウス (I-Aq) に結合するアンカーモチーフを有する GPI 部位を選定し、ドミナントな T 細胞エピトープ (GPI325-339) を DBA/1 マウスで同定した。さらに、その 15 マーの合成ペプチドを 1 回免疫することにより関節炎を誘導することに成功した。本研究では、20 種類の変異ペプチドを合

成し、GPI325-339 に対する T 細胞応答を減弱させるアナログペプチドの選定をおこなった。方法は、変異ペプチドを pre-culture してから GPI325-339 と共培養し、IFN- γ および IL-17 の産生を ELISA 法および細胞内サイトカイン染色法で解析した。さらに、選定したアナログペプチドを GPI325-339 抗原とともに DBA/1 に共免疫することにより関節炎抑制効果について検討した。

- 3) ムスカリン作働性アセチルコリン受容体: SS 患者末梢血において、ムスカリン作働性アセチルコリン受容体 (M3R) に対する T 細胞応答、自己抗体が検出される。本研究では、M3R を標的とした抗原特異的治療戦略を確立するために、M3R 誘導唾液腺炎モデルマウス作成を試みた。方法として、M3R の細胞外第 2 ドメインをコードする 25 マーの合成アミノ酸 (KRTVPPGECFIQLSEPTITFGTAI, AA212-236) を M3R ノックアウト (M3R KO) マウスに免疫し、その脾臓細胞を Rag1 ノックアウト (Rag1 KO) マウスに細胞移入した。組織学的解析により唾液腺炎の発症について検討した。

(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) CII (AA256-271)、APL4 (コントロール)、APL6、APL7 を高発現した米を作成した。
- 2) *in vitro* の実験結果から、GPI325-339 のアナログペプチド候補として、GPI329N→S (APL6)、GPI329N→T (APL7)、GPI332G→A (APL12)、GPI332G→V (APL13) の4つが選定された。さらに、GPI325-339 誘導関節炎マウスにおいて、APL6, APL7, APL12 と APL13 が有意な治療効果を呈した。APL 投与により治療効果を示した関節炎マウスにおいては、いずれも IL-17 の産生が有意に減少していた。
- 3) B6 バックの M3R KO マウスと Rag1 KO マウスを用いることにより、唾液腺炎モデルマウスの作成に成功した。現在、唾液腺量、抗 M3R 抗体の産生、M3R に対する T 細胞応答、サイトカイン産生などについて、検討中である。

D. E. 考察と結論

ドミナント T 細胞エピトープのアナログペプチドを選定することにより、免疫難病の病因 T 細胞を抗原特異的に制御することが可能となる。モデル動物での有効性を検定できれば、免疫難病をターゲットとした clinical trial に進むことができよう。

F. 研究発表

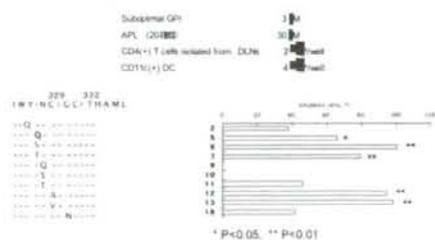
論文発表

1. Iwanami, K., Matsumoto, I., Tanaka, Y., Inoue, A., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T. The dominant arthrogenic T cell epitope in glucose-6-phosphate isomerase (GPI)-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.* (in press).
2. Tanaka, Y., Matsumoto, I., Iwanami, K., Inoue, A., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T. B cells have crucial role as autoantibody producers in arthritis mediated by glucose-6-phosphate isomerase. *Clin. Exp. Immunol.* (in press)
3. Ito, I., Kawasaki, A., Ito, S., Hayashi, T., Goto, D., Matsumoto, I., Tsutsumi, A., Hom, G., Graham, R.R., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Ohashi, J., Behrens, T.W., Sumida, T., and 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, R. R., Hom, G., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Behrens, T.W., Sumida, T., and Tsuchiya, N. Association of STAT4 polymorphisms with systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Arthritis Res. Ther.* (in press).
5. Matsumoto, I., Zhang, H., Yasukochi, T., Iwanami, K., Tanaka, Y., Inoue, A., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and 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: Epub 2008 Jun 5, 2008.
6. Kawaguchi, Y., Wakamatsu, E., Matsumoto, I., Nishimagi, E., Kamatani, N., Satoh, T., Kuwana, M., Sumida, T., and 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., and 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., and 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., and Sumida, T. Expression of Visfatin (pre-B cell colony-enhancing factor) gene 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., and Sumida, T. NKT cells are novel accelerator of IL-17 in the pathogenesis of collagen-induced arthritis. *Int. J. Mol. Med.* 22: 369-374, 2008.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

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

APLs suppress in vitro IL-17 production



APL 6, 7, 12, 13 inhibited IL-17 production

図1 GPI アナログペプチドの選定

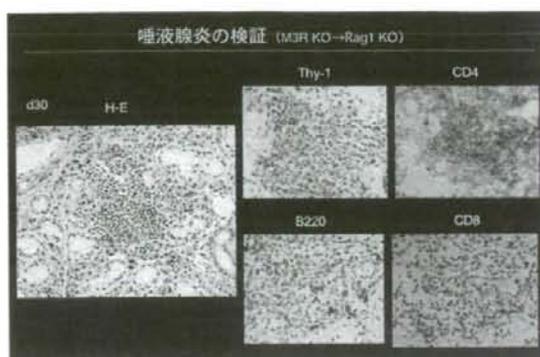


図4 M3R 免疫唾液腺炎モデルマウスにおける唾液腺組織(H-E)と免疫組織化学的解析

Oral administration of APLs on GPI induced arthritis

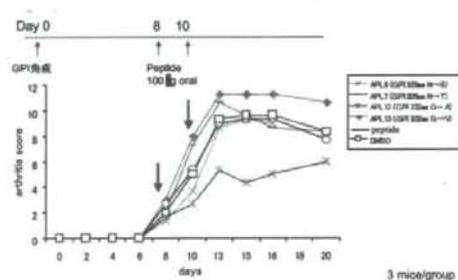


図2 ヒトリコンピナント GPI 誘導関節炎モデルにおけるアナログペプチド治療効果

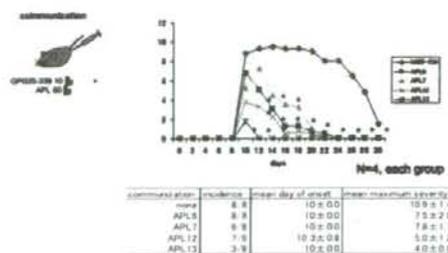


図3 GPI ドミナントペプチド免疫関節炎モデルにおけるアナログペプチド治療効果

自己免疫性炎症におけるサイトカインと自然免疫の機能

研究分担者 小安重夫 慶應義塾大学医学部 微生物学・免疫学教室 教授

研究協力者 永井重徳 慶應義塾大学医学部 微生物学・免疫学教室 助教

研究協力者 吉澤彰宏 慶應義塾大学医学部 微生物学・免疫学教室 共同研究員

研究協力者 松井多美子 慶應義塾大学医学部 微生物学・免疫学教室 共同研究員

研究要旨

我々は自己免疫性炎症におけるサイトカインと自然免疫の機能を解析すべく、本年度は以下の2つの研究を行った。1) **FDG-PET** によるリウマチの活動度の評価。関節リウマチの炎症部位におけるサイトカインや低酸素の影響を糖の取り込みで検討すべく、炎症関連細胞の *in vitro* における糖の取り込み能を様々な炎症性サイトカインの存在下や低酸素状態で検討し、さらに **FDG-PET** による *in vivo* の評価を試みた。その結果、**FDG-PET** によってパンス形成と炎症の活動度を評価できる可能性が示唆された。*in vitro* ではマクロファージと線維芽細胞が高い糖の取り込み能を示し、取り込み能は炎症性サイトカイン **TNF α** や **IL-1 β** によってさらに上昇することが示された。炎症部位は一般に低酸素状態になることが知られるが、マクロファージや線維芽細胞による糖の取り込みは酸素分圧の低下によっても上昇することが示された。これらの事実から **FDG-PET** による造影が関節リウマチの活動度を評価する一つの手段となる可能性が示された。2) **自己免疫性炎症の起動における自然免疫の役割**。以前に尋常性天疱瘡モデルマウスの作製に用いた方法を応用して、これまでに2型のムスカリン性アセチルコリン受容体 (**M2**) を標的とした自己免疫反応の誘導を報告した。**M2** は心臓特異的に発現していることから、自己免疫性心筋症に関連する可能性が考えられる。マウス **M2** の細胞外ドメインからなるタンパク質とアジュバンの混合物の投与によって **M2 KO** マウスにおいて抗 **M2** 抗体の誘導が確認される。その後、免疫した **M2 KO** マウスの脾細胞を **rag-2 KO** マウスに移植すると、**M2 KO** マウス脾細胞移入後に心臓へのリンパ球の浸潤、組織傷害ならびに心肥大を認め、拡張性心筋症に移行し得るマウスの心筋炎モデルを作成することができた。以前に行なったデスマグレイン3を標的とした尋常性天疱瘡モデルの場合には無処理の **KO** マウスの脾細胞を **rag-2 KO** マウスに移植することで発症を誘導できたが、本心筋炎モデルの場合には無処理の **M2 KO** マウスの脾細胞の移植では発症に至らなかった。この事実は抗原特異的なリンパ球の存在のみならずアジュバントに代表される自然免疫系のシグナルが必要であることを示唆している。

A. 研究目的

自己免疫性の炎症疾患の発症機序の理解は治療法の開発を考えるためにも重要である。これまでの免疫学研究が示すところは獲得免疫系の起動にも自然免疫反応が重要な役割を果たし、特に **TLR** シグナルに代表されるアジュバントの役割は自然免疫系と獲得免疫系の橋渡しに重要であることが示されている。また、樹状細胞やマクロファージなどの自然免疫系の細胞が発現するサイトカインは様々な場面で重要な役割を果たすことも明らかにされている。炎症部位は多くの場合に低酸素状態になることが知られるが、これまでに我々の研究も含め細胞内レドックス状態の違いがサイトカイン発現に大きな影響を与えることが示されてきた。そこで本研究において我々は自己免疫性炎症におけるサイトカインと自然免疫の機能を解析することを目的とした。このために2つの方向からアプローチを行なっている。一つは関節リウマチをモデルとしてサイトカインと自然免疫の機能を解析するアプローチである。もう一つは2型のムスカリン性アセチルコリン受容体 (**M2**) を標的とした自己免疫心筋炎モデル用いてサイトカインと自然免疫の機能を解析するアプローチである。この2つのモデルを用いることによって自己免疫性

炎症におけるサイトカインと自然免疫の機能を明らかにしたい。

B. 研究方法

1) 関節リウマチにおける炎症活動と糖の取り込み能の検討。コラーゲン誘導関節炎 (**CIA**) ラットを作製し、関節炎誘発後10、14、17日目に¹⁸F-FDG-PETイメージ及びオートラジオグラフィにて解析し、¹⁸F-FDGの集積と組織学的所見とを比較した。また、様々な炎症関連細胞を調製し、様々な培養条件下における³H-FDGの取り込み量を測定し、¹⁸F-FDG集積における炎症細胞（好中球、マクロファージ、T細胞、線維芽細胞）の関与の度合いを推定した。また、炎症性サイトカイン (**TNF α** , **IL-1 β** , **IL-6**) の存在下あるいは低酸素状態といった炎症局所環境における³H-FDG取り込みの影響を検討した。2) 自己免疫性心筋炎の発症における自然免疫系の機能解析。自己免疫性心筋炎モデルは尋常性天疱瘡モデルマウスの作製に用いた方法、すなわち「自己抗原ノックアウトマウスを用いた新たな自己免疫疾患モデル動物の作製法」（特許第3306625号ならびに特許第3326770号）を応用した。具体的には2型のムスカリン性アセチルコリン受容体 (**M2**) を標的

とした自己免疫モデルマウスの作製を行なった。**C57BL/6** マウスに最低 8 代の戻し交配をした **M2 KO** マウスと **C57BL/6** マウスに 12 代戻し交配をした **rag-2 KO** マウスを用いた。免疫原として、N 端にグルタチオン S トラंसフェラーゼ (GST) タグを付加したマウス **M2** の第 2 細胞外ループをリコンビナント分子として発現精製したものを用意し、アジュバントとして **ImmuneEazy (QIAGEN)** を用い **M2 KO** マウスに免疫をした。ELISA 法によって **M2** に対する抗体価の上昇を確認した後に **rag-2 KO** マウス 1 頭あたり 5×10^7 の脾細胞を尾静脈より移植し、その後 15 週間にわたってマウスを観察した。観察期間中特に体重減少は見られなかった。

C. 研究結果

1) 関節リウマチにおける炎症活動と糖の取り込み能の検討。 ^{18}F -FDG-PET イメージングの結果、関節の腫脹に伴って ^{18}F -FDG 集積の増大が観察された。組織学的には、関節周囲における炎症細胞の浸潤よりもむしろパンヌス形成との相関がみられた。同様の結果は CIA マウスにおいても観察された。 ^3H -FDG の取り込みアッセイの結果から、繊維芽細胞が特によく ^3H -FDG を取り込むことが明らかになった。マクロファージでは、休止状態において低レベルの取り込みが見られるが、 $\text{TNF}\alpha$ 及び $\text{IL-1}\beta$ の存在下あるいは低酸素状態において、著しい ^3H -FDG の取り込みが観察された。好中球においては定常的に ^3H -FDG の取り込みが見られたが、炎症性サイトカインによって取り込みは変化しなかった。一方、T 細胞では活性化状態であっても ^3H -FDG の取り込み量は少なかった。

2) 自己免疫性心筋炎の発症における自然免疫系の機能解析。免疫した **M2 KO** マウス由来の脾細胞の移植後 1、2 週間で、心室中隔から右室自由壁にかけて、芽球化したリンパ球と形質細胞が心筋線維間に層状に浸潤している像が観察され、心筋炎の像を呈した。約 3 週間後には全体的な浸潤の程度は軽度となったが、炎症細胞に囲まれた心筋の壊死が見られた。また、炎症細胞浸潤の周囲に、細胞の肥大に伴った核の腫大像が認められたが、これは運動負荷などによる生理的な肥大とは異なる像を示した。6 週間目以降は全体的な浸潤の程度は軽度となり、10 週間目以降は浸潤がほとんど認められなくなった。それに代わって異常な走行を示す心筋線維や、多核化した細胞が認められるようになった。血清中の **M2** に対する抗体価を ELISA 法にて測定したところ、免疫に使用した **M2** の第 2 細胞外ループに対する抗体価は、移植後すぐに検出された。興味深いことに、通常は免疫系に曝されていないはずの **M2** の第 3 細胞内ループに対する抗体価の上昇が観察された。これは炎症細胞の浸潤に伴い、実際に心筋細胞の破壊が起きていることを示唆している。また脾細胞の移植後 15 週目には、心重量がコントロール群と比較して有意に増加した。それらの心筋において、蛍

光抗体法により IgG の沈着が観察されたが、IgM、IgA、C3、フィブリノーゲンの沈着は認められなかった。

一方、リコンビナントタンパク質によって免疫をしなかった **M2 KO** マウスや **GST** のみによって免疫をした（この場合にはアジュバントとは用いている）**M2 KO** マウス由来の脾細胞の移植によってはこれらの変化は観察されなかった。

D. 考察

1) 関節リウマチにおける炎症活動と糖の取り込み能の検討。繊維芽細胞や活性化マクロファージがパンヌス形成における ^{18}F -FDG の取り込みに主に関与し、患部における炎症性サイトカインや低酸素による刺激によって、これらの細胞で優位に ^{18}F -FDG の取り込みが増大するため、 ^{18}F -FDG-PET イメージによる患部の ^{18}F -FDG 集積像が検出されると考えられた。なお、この成果は *The Journal of Nuclear Medicine* に受理され、印刷中である。

発症には樹状細胞が重要な役割を果たすと考えられるが、次年度以降は本年度の成果を踏まえ、発症における樹状細胞の機能を IL-15 や γ 型インターフェロンなどの炎症性サイトカインの役割に注目しつつ解析したい。さらに低酸素状態や細胞内レドックスの観点からも検討を進めてゆく予定である。

2) 自己免疫性心筋炎の発症における自然免疫系の機能解析。以前に行なった **Desmoglein 3** を標的とした尋常性天疱瘡モデルの場合には無処理の **KO** マウスの脾細胞を **rag-2 KO** マウスに移植することで発症を誘導できたが、本心筋炎モデルの場合には無処理の **M2 KO** マウスの脾細胞の移植では発症に至らなかった。この事実は抗原特異的なリンパ球の存在のみならずアジュバントに代表される自然免疫系のシグナルが必要であることを示唆している。

臨床において拡張型心筋症は、重篤な心不全をきたす予後不良の難治性疾患であり、その発症機序や治療法開発の観点からモデル動物の作製は極めて重要である。心筋炎は、拡張型心筋症に至る過程で起こるという考え方がある。その証拠として、急性心筋炎の原因となるウイルスゲノムや、急性心筋炎患者において見出される抗心筋抗体が、拡張型心筋症患者でも検出されることが知られている。今後はなぜ **M2** を介した自己免疫性心筋炎の場合に発症に自然免疫系のシグナルが必要であるかを検討していきたい。

E. 結論

1) 関節リウマチにおける炎症活動と糖の取り込み能の検討。RA 患者における ^{18}F -FDG の集積は、炎症性サイトカイン及び低酸素状態により増大するパンヌス形成や炎症度を反映している。このことから、 ^{18}F -FDG-PET は RA 患者の炎症度を定量的に評価するのに有用であると考えられる。

2) 自己免疫性心筋炎の発症における自然免疫系の

機能解析。M2 の場合には自己寛容が破綻していたとしてもアジュバンとを介した自然免疫系のシグナルが供給されないと自己反応性のリンパ球の活性化が誘導されない。この事実は発症に感染などが関わる可能性を示唆しており、今後の重要な課題である。

F. 研究発表 (平成 20 年度)

1. 原著論文

- 1) Suzue, K., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Suzuki, M. and Koyasu, S. (2008) Critical role of dendritic cells in determining the Th1/Th2 balance and the disease outcome upon *Leishmania major* infection. *Int. Immunol.* 20:337-343.
- 2) Doi, T., Obayashi, K., Kadowaki, T., Fujii, H. and Koyasu, S. (2008) PI3K is a negative regulator for IgE production. *Int. Immunol.* 20:499-508.
- 3) Fujii, Y., Matsuda, S., Takayama, G. and Koyasu, S. (2008) ERK5 is involved in TCR-induced apoptosis through the modification of Nur77. *Genes Cells* 13:411-419.
- 4) Ohtani, M., Nagai, S., Kondo, S., Mizuno, S., Nakamura, K., Tanabe, M., Takeuchi, T., Matsuda, S. and Koyasu, S. (2008) mTOR and GSK3 differentially regulate LPS-induced IL-12 production in dendritic cells. *Blood* 112:635-643.
- 5) Sawatani, Y., Miyamoto, T., Nagai, S., Maruya, M., Imai, J., Miyamoto, K., Fujita, N., Ninomiya, K., Suzuki, T., Iwasaki, R., Toyama, Y., Shinohara, M., Koyasu, S. and Suda, T. (2008) The role of DC-STAMP in maintenance of immune tolerance through regulation of dendritic cell function. *Int. Immunol.* 20:1259-1268.
- 6) Ota, T., Aoki-Ota, M., Tsunoda, K., Nishikawa, T., Koyasu, S. and Amagai, M. (2008) Autoreactive B cell elimination by pathogenic IgG to the autoantigen: implications for peripheral tolerance. *Int. Immunol.* 20:1351-1360.
- 7) Matsuda, S., Mikami, Y., Ohtani, M., Fujiwara, M., Hirata, Y., Minowa, A., Terauchi, Y., Kadowaki, T. and Koyasu, S. (2009) Critical role of class IA PI3K for c-Rel expression in B lymphocytes. *Blood* 5:1037-1044.

- 8) Suzuki, M., Mimuro, H., Kiga, K., Fukumatsu, M., Ishijima, N., Morikawa, H., Nagai, H., Koyasu, S., Gilman, R. H., Kersulyte, D., Berg, D. E. and Sasakawa, C. (2009) The non-phosphorylated status of CagA is pivotal for *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cell Host Microb.* 5:23-34.

- 9) Matsui, T., Nakata, N., Nakatani, A., Nagai, S. and Koyasu, S. (2009) Inflammatory cytokine and hypoxia contribute to fluoro-2-deoxy glucose uptake by cells involved in pannus formation in rheumatoid arthritis. *J. Nuc. Med.* in press.

2. 学会発表

- 1) 小安重夫.
樹状細胞による免疫制御。
第 20 回日本神経免疫学会学術集会 (2008 年 4 月 17-18 日) (新潟)
2008 年 4 月 17 日発表 (特別講演)
- 2) 中田徳仁, 松井多美子, 中谷暁, 小安重夫.
コラーゲン誘発性関節炎ラットを用いた炎症活動性バイオマーカーとしての FDG の有用性の検討。
第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会 (2008 年 4 月 20-23 日) (札幌)
2008 年 4 月 21 日発表 (ポスター)
- 3) Shigeo Koyasu, Akiko Minowa, Satoshi Matsuda.
The role of PI3K for the function of gastrointestinal mast cells.
27th Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum "Environmental and Genetic Factors in Allergy and Clinical Immunology" (May 1-6, 2008) (Curaçao, Netherland)
2008 年 5 月 2 日発表 (ポスター)
- 4) 中田徳仁, 松井多美子, 中谷暁, 永井重徳, 小安重夫.
ラットコラーゲン関節炎を用いた炎症活動性指標マーカーとしての FDG の有用性の検討。
第 3 回日本分子イメージング学会総会・学術集会 (2008 年 5 月 22-23 日) (埼玉)
2008 年 5 月 23 日発表 (ポスター/講演)
- 5) Shigeo Koyasu.
Regulation of cytokine production by phosphoinositide-3 kinase in dendritic cells.
The 10th International Symposium on Dendritic Cells. (2008 年 10 月 1-5 日) (兵庫)
2008 年 10 月 5 日発表 (講演)

6) 松井多美子, 中田徳仁, 中谷暁, 百瀬敏光, 高橋美和子, 大友邦, 小安重夫.
関節リウマチの関節炎バイオマーカーとしての FDG 集積メカニズムの検討.
第 48 回日本核医学会学術総会 (2008 年 10 月 24-26 日) (千葉)
2008 年 10 月 26 日発表 (講演)

7) 中田徳仁, 松井多美子, 中谷暁, 百瀬敏光, 高橋美和子, 大友邦, 小安重夫.
ラットカラーゲン関節炎を用いた炎症活動性指標としての FDG の有用性の検討.
第 48 回日本核医学会学術総会 (2008 年 10 月 24-26 日) (千葉)
2008 年 10 月 26 日発表 (講演)

8) 紅林泰, 永井重徳, 馬場夕紀子, 小安重夫.
Th17 分化における IA 型 PI3K の役割.
第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 (2008 年 12 月 1-3 日) (京都)
2008 年 12 月 1 日発表 (ポスター/口頭)

G. 知的財産権の出願・登録状況

登録済特許 3 件、特許出願 1 件

1) 登録番号: 特許第 3306625 号
発明者: 天谷雅行、西川武二、小安重夫

発明の名称: 「自己免疫疾患モデル動物の作製方法」

出願人: 慶應義塾

出願日: 2001/05/24

査定日: 2002/4/11

2) 登録番号: 特許第 3326770 号 (米国特許 # 7,060,868)

発明者: 天谷雅行、西川武二、鈴木春巳、小安重夫

発明の名称: 「自己免疫疾患モデル動物」

出願人: 慶應義塾

出願日: 2000/03/30

査定日: 2002/6/16 (米国特許 2006/6/13)

3) 登録番号: 特許第 3817587 号

発明者: 角田和之、天谷雅行、西川武二、小安重夫

発明の名称: 「天疱瘡モノクローナル抗体」

出願人: 慶應義塾

出願日: 2001/09/04

公開日: 2006/6/23

4) 出願番号: 特願 2008-125248 号

発明者: 矢原一郎、今井純、小安重夫

発明の名称: 「MHC クラス I 分子と結合し癌細胞の表面に表出されるペプチド候補の選択方法」

出願人: 慶應義塾、(株) 医学生物学研究所

出願日: 2008/05/12 (国内)

E3 ユビキチンリガーゼ c-MIR の抗炎症効果による関節炎治療に関する研究

研究分担者 上阪 等 東京医科歯科大学大学院 膠原病・リウマチ内科学（准教授）
研究協力者 豊本 雅靖 東京医科歯科大学大学院 膠原病・リウマチ内科学

研究要旨

関節リウマチ（RA）治療で使用される免疫抑制薬は、抗炎症効果ももたらすため、大きな治療効果を期待できる。しかし、すべての症例に効果のある治療薬は存在せず、様々な治療薬を組み合わせても、その副作用が懸念されることから、新しいメカニズムで作用する治療薬の開発が望まれている。そこで我々は免疫抑制分子「E3 ユビキチンリガーゼ c-MIR」に着目した。c-MIR は、RA 発症に重要とされる MHC クラス II や CD86 の発現を減少させることが知られている。我々は、c-MIR が自己免疫病の治療標的分子になりうるとの仮説を立て、RA モデル動物である II 型コラーゲン誘導関節炎モデルマウス（CIA）において、アデノウイルスベクターの移入による c-MIR 遺伝子治療を行った。この遺伝子治療は、CIA において全身性の免疫抑制が見られないにもかかわらず、c-MIR 発現アデノウイルスベクター移入部の関節炎が抑制され、局所的治療効果が見られた。

A. 研究目的

抗原提示分子（MHC class II, CD86）を抑制するとされる E3 ユビキチンリガーゼ c-MIR の炎症局所における発現誘導が、関節リウマチモデルの治療に有効であるかを検討する。

B. 研究方法

1. 関節炎モデルマウスにおける c-MIR 遺伝子治療の検討

DBA/1J マウスに II 型コラーゲン（CII）を免疫して関節炎（CIA）を発症させ、後肢関節内へ組換え c-MIR アデノウイルスを移入し、関節炎の程度をスコア化した。経過観察後に関節の組織学的検討を行った。さらに、CIA マウスから血清と脾臓を取得し、抗 CII 抗体価と脾臓細胞の CII 反応性について検討した。

2. 細胞における c-MIR 遺伝子機能の解析

in vitro で CIA マウス関節組織由来の細胞に組換え c-MIR アデノウイルスやコントロール LacZ ウイルスを感染させて、TNF- α で刺激し、培養上清の IL-6 濃度を ELISA で測定した。また、細胞表面上の TNF 受容体発現をフローサイトメトリーで解析した。さらに、c-MIR トランスジェニックおよび正常マウス由来骨髄マクロファージ（BMM）においても、TNF- α の刺激で誘導される IL-6 mRNA を比較するとともに、細胞表面上の TNF 受容体発現をフローサイトメトリーで解析した。

（倫理面への配慮）

実験は「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（平成 18 年文部科学省告示第 71 号）」に則って行った。

C. 研究結果

1. 関節炎モデルマウスにおける c-MIR 遺伝子治療の検討

組換え c-MIR アデノウイルスによる CIA 後肢への遺伝子治療は、後肢の関節炎スコアの改善をもたらし、組織学的にも関節炎の抑制効果が認められた。一方、前肢の関節には治療効果が認められなかった。また、血清中の抗 CII 抗体価や CII に対する脾臓 T 細胞の増殖反応は治療による影響を受けなかった。

2. 細胞における c-MIR 遺伝子機能の解析

CIA マウス関節組織由来細胞は c-MIR 遺伝子発現により、TNF- α 刺激による IL-6 の産生が低下した。c-MIR トランスジェニックマウス BMM は、c-MIR 遺伝子発現により、TNF- α 刺激による IL-6 mRNA の発現が低下した。フローサイトメトリーでは、IL-6 発現低下を裏付ける TNF 受容体発現低下が認められなかった。

D. 考察

c-MIR は未知のメカニズムにより TNF 受容体の発現を下げることなく、その機能を抑制する。この分子の関節局所での発現は、TNF 受容体の機能を抑制し、局所的な関節炎治療効果を示す。

E. 結論

関節滑膜での c-MIR 遺伝子発現誘導は、当初意図したメカニズムとは異なるものの、RA の新治療戦略になり得ると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

豊本 雅靖、石戸 聡、宮坂 信之、上阪 等.
E3 ユビキチンリガーゼ c-MIR の抗炎症効果による関節炎治療 第 29 回日本炎症・再生医学会
東京、2008 年 7 月

豊本 雅靖、石戸 聡、宮坂 信之、上阪 等.
E3 ユビキチンリガーゼ c-MIR の抗炎症効果による関節炎治療 第 36 回日本臨床免疫学会総会
東京、2008 年 10 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

c-MIR を利用した CD40 の発現調節、及びそのスクリーニング方法 (出願番号: 2007-146706)

2. 実用新案登録

なし

3. その他