

Fcgr2b 遺伝子多型は SLE の感受性を左右する

研究分担者 広瀬 幸子 順天堂大学医学部分子病態病理 准教授

研究要旨 ヒトおよびマウスの第一染色体テロメアには複数の SLE 感受性遺伝子が集積して存在する。そのなかでも、B 細胞活性化の抑制分子 *FcγRIIB1* をコードする *Fcgr2b* 遺伝子のプロモーター領域多型、および、この遺伝子に連鎖して存在する SLAM/Cd2 family をコードする *Slam/Cd2* 遺伝子多型の役割が注目されている。今回、これらの多型を分離して持つコンジェニックマウス系 BXS.B.IIB^{B6} を作製し、これを用いて (NZW x BXS.B.IIB^{B6}) F1 と (NZW x BXS.B.IIB^{B6}) F1 雌マウスの SLE 病態を比較した結果、*Slam/Cd2* 遺伝子多型とは関係なく、*Fcgr2b* 遺伝子多型が SLE 感受性を左右することを見出した。

A. 研究目的

NZW 型の *Slam/Cd2* 遺伝子多型は、SLE 感受性遺伝子である可能性が報告されている。一方、我々は以前に、自己免疫促進変異遺伝子 *Yaa* を持つ BXS.B 雄マウスの自己免疫型 *Fcgr2b* 遺伝子を、正常 B6 マウス型に入れ替えたコンジェニック BXS.B.IIB^{B6} マウスを作製したところ、SLE 病態が高度に抑制されることを見出した。BXS.B マウスの *Slam/Cd2* 遺伝子型は NZW 型と同じである。従って、この実験結果から、*Yaa* によって惹起される SLE では、*Slam/Cd2* 遺伝子型に拘らず、自己免疫型 *Fcgr2b* 遺伝子が SLE 感受性を左右すると考えられた。

しかしながら、*Yaa* 変異遺伝子を持たない BXS.B 雌マウスにおいては、NZW 型の *Slam/Cd2* 遺伝子多型および自己免疫型 *Fcgr2b* 遺伝子多型の両方が存在するにも拘らず、高度の SLE 病態は発症しない。従って、*Yaa* 非関連 SLE において、自己免疫型 *Fcgr2b* 遺伝子多型が実際に SLE 感受性にどの程度関わっているかについては明らかではない。

本研究では、この点を明らかにするために、(NZW x BXS.B) F1 雌マウスに見られる高度の SLE 病態に対して、自己免疫型 *Fcgr2b* 遺伝子多型がどのような影響を及ぼすかを解析した。

B. 研究方法

1. BXS.B マウスの自己免疫型 *Fcgr2b* 遺伝子を正常 B6 マウス型に入れ替えたコンジェニック BXS.B.IIB^{B6} マウスを作製し、このマウス系について、第一染色体テロメア領域の遺伝型を解析し、*Fcgr2b* 遺伝子は B6 由来であり、*Slam/Cd2* 遺伝子は BXS.B 由来であるこ

とを確認した (図 1)。

2. (NZW x BXS.B) F1 および (NZW x BXS.B.IIB^{B6}) F1 マウスを作製し、その雌マウスの SLE 病態ならびにリンパ球の活性化の状態を比較した。

(倫理面への配慮)

マウスの実験は、本研究施設の定める動物実指針に基づいて行った。

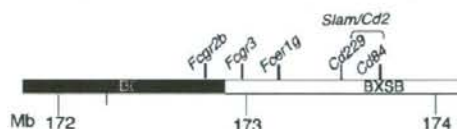


図 1 BXS.B.IIB^{B6} マウスの第一染色体テロメア領域の遺伝子地図。BXS.B マウスの背景に導入された B6 マウス由来の領域を黒で示した。

C. 研究結果

1. SLE 病態の比較

図 2 に、両 F1 雌マウスにおける蛋白尿の累積出現率を、図 3 に血中の IgG 抗 DNA 抗体価を比較して示した。(NZW x BXS.B.IIB^{B6}) F1 雌マウスではいずれも高度に抑制された。

2. B 細胞上の抑制分子 *FcγRIIB* 発現レベルの比較

図 4 に、脾臓の胚中心活性化 B 細胞(PNA⁺)および非胚中心 B 細胞(PNA⁻)における *FcγRIIB* の発現レベルを比較して示した。図に示すように、(NZW x BXS.B.IIB^{B6}) F1 雌マウスでは、(NZW x BXS.B) F1 雌マウスに比べて、胚中心 B 細胞での発現が約 5 倍高いことがわかる。一方、非胚中心 B 細胞での発現には差が認められなかった。

3. リンパ球活性化の比較

図5に CD69 の発現を指標にした B 細胞および T 細胞の活性化の程度を比較した。図からも明らかのように、(NZW x BXS.B.IIB^{B6}) F1 雌マウスでは、(NZW x BXS.B) F1 雌マウスに比べて、CD69 を発現した細胞比率が有為に減少していた。

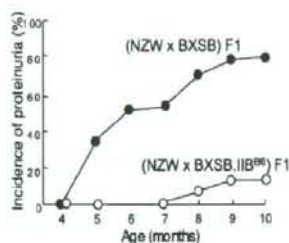


図2 蛋白尿の累積出現率の比較

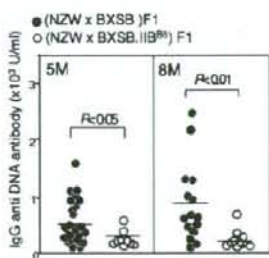


図3 血中 IgG 抗 DNA 抗体価の比較

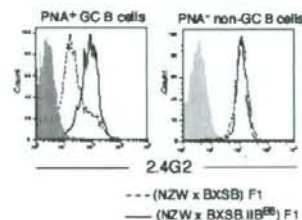


図4 B 細胞上の抑制分子 FcγRIIB 発現レベルの比較

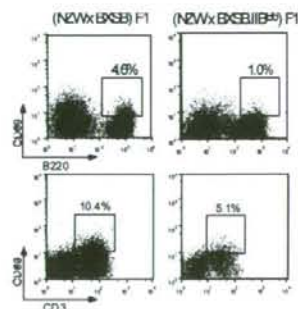


図5 リンパ球活性化の比較

D. 考察

BXS.B 雌マウスには高度の SLE は発症しないが、NZW および BXS.B 両親系由来の遺伝子の相互作用により、(NZW x BXS.B) F1 雌マウスには加齢に伴って高度の SLE が発症する。この病態は、(NZW x BXS.B.IIB^{B6}) F1 雌マウスで高度に抑制されたことから、BXS.B の自己免疫型 *Fcgr2b* 遺伝子を正常 B6 型に入れ替えることで SLE 病態を抑制できることが明らかとなった。BXS.B.IIB^{B6} マウス系では *Fcgr2b* 遺伝子に近接して存在する *Slam/Cd2* 遺伝子型は B6 型に入れ替わっていないので、(NZW x BXS.B.IIB^{B6}) F1 雌マウスにおける病態抑制は *Fcgr2b* 遺伝子型の違いによる効果である。

Fcgr2b 遺伝子多型は、活性化 B 細胞での FcγRIIB 発現を左右し、かつ T 細胞活性化にも影響を与えることが示された。これは、B 細胞が抗原提示細胞として T 細胞機能に影響を与えるためと考えられる。

E. 結論

本解析から、自己免疫型 *Fcgr2b* 遺伝子型を正常型に入れ替えて、抑制分子 FcγRIIB の発現レベルを正常化することで SLE 発症を抑制できることが示された。その効果は、*Yaa* 変異遺伝子によって誘発される SLE のみでなく、雌マウスにみられる *Yaa* 非関連の SLE においても、認められることが明らかとなった。従って、FcγRIIB の発現レベルのコントロールが SLE 治療に有効であると考えられる。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hou R, Ohtsui M, Ohtsui N, Zhang L, Adachi T, Hirose S, and Tsubata T. Centromeric interval of chromosome 4 derived from C57BL/6 mice accelerates type 1 diabetes in NOD.CD72^b congenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* In press, 2009.

2. Tsukamoto H, Ohtsui M, Shirowa W, Lin Q, Nakamura K, Tsurui H, Jiang Y, Sudo K, Nishimura H, Shirai T, and Hirose S. Aberrant genetic control of invariant TCR-bearing NKT cell function in New Zealand mouse strains: possible involvement in SLE pathogenesis.

J. Immunol. 180:4530-4539, 2008.

3. Moriyama Y, Sekine C, Koyanagi A, Koyama N, Ogata H, Chiba S, Hirose S, Okumura K, and Yagita H. Delta-like 1 is essential for the maintenance of marginal zone B cells in normal mice but not in autoimmune mice. *Int. Immunol.* 20:763-773, 2008.

4. Baudino L, Yoshinobu K, Morito N, Kikuchi S, Fossati-Jimack L, Morley BJ, Vyse TJ, Hirose S, Jørgensen TN, Tucker RM, Roark CL, Kotzin BL, Evans LH, and Izui S. Dissection of genetic mechanisms governing the expression of serum retroviral gp70 implicated in murine lupus nephritis. *J. Immunol.* 181:2846-2854, 2008.

5. Okamoto A, Fujio K, van Rooijen N, Tsuno NH, Takahashi K, Tsurui H, Hirose S, Elkon KB, and Yamamoto K. Splenic phagocytes promotes to nucleosomes in (NZB x NZW) F1 mice. *J. Immunol.* 181:5264-5271, 2008.

2. 学会発表

1. 天野浩文、天野恵理、安藤誠一郎、仲野総一郎、森本真司、戸叶嘉明、林青順、西村裕之、広瀬幸子、高崎芳成. BXSb マウスの末梢血単球増加における Fc γ レセプターの役割. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会記録・プログラム 382 頁 2008

2. 安藤誠一郎、天野浩文、天野恵理、仲野総一郎、名切裕、森本真司、戸叶嘉明、広瀬幸子、高崎芳成. BXSb マウスに対する FTY720 の免疫抑制効果. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会 プログラム 383 頁 2008

3. 藤尾圭志、岡本明子、鶴井博理、広瀬幸子、山本一彦. SLE 動物モデルにおける T 細胞の活性化. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会プログラム 160 頁 2008

4. 林青順、天野浩文、天野恵理、白井俊一、広瀬幸子. 抑制型 IgG Fc レセプターによる B 細胞分化の制御. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会 プログラム 239 頁 2008

5. 大辻希樹、大辻奈穂美、林青順、鶴井博理、中江進、西村裕之、白井俊一、須藤カツ子、広瀬幸子. IL-17 および IFN- γ 産生亢進を伴う新しい強直性関節炎モデル. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会記録 108 頁 2008

6. Turui Hiromi and HIROSE Sachiko. Phagocytotic behavior of macrophages and dendritic cells in central nervous system based on the auto-fluorescence specific for phagocytosis. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会記録 116 頁 2008

7. 尾畑賢臣、池田賢一、小寺洋、大辻希樹、広瀬幸子、西村裕之. アスパラギン除去によって誘導される免疫抑制の細胞機序. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会記録 128 頁 2008

8. AMANO Hirofumi, AMANO Eri, LIN Qingshun, Ando Seiichiro, NISHIMURA Hiroyuki, MORIMOTO Shinji, HIROSE Sachiko, TAKASAKI Yoshinari. Fc γ R-dependent Expansion of Gr-1-Monocyte Subset in Lupus Prone Mice. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会記録 133 頁 2008

9. KITABATAKE Masahiro, IGARASHI Hideya, TODA Teppei, OHTSUJI Mareki, TURUI Hiromichi, HIROSE Sachiko, SAKAGUCHI Nobuo. NZB-like autoimmunity was induced in the transgenic mice of B cell survival molecule G5PR. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会記録 133 頁 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
該当なし

2. 実用新案登録
該当なし

3. その他
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
研究分担報告書

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

研究分担者 山田 亮 東京大学医科学研究所附属ヒトゲノム解析センターゲノム機能解析分野 准教授

研究要旨 自己免疫疾患の代表である全身性エリテマトーデスの発病リスク遺伝子多型をゲノムワイドに探索するために克服すべき課題である、SNP解析検定手法を開発するとともに、コピーナンバー多型検定を大規模に実施するためのアプリケーションを実装し、公開した。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデスを標的に、ゲノムワイド関連解析を行うための解析手法・ツールを開発する。ゲノムマッピングにおいて、一塩基多型に加えて、コピーナンバー多型を用いたアプローチに注目が集まっている。本年度は、コピーナンバー多型のタイピングデータ構造の特性を研究し、そのマッピング用統計検定手法の理論的理解とその解析ツールの実装を行う。また、一塩基多型とコピーナンバー多型に共通する、カテゴリカルジェノタイプにおけるケース・コントロール検定手法に関する理論的背景を究明する。

B. 研究方法

遺伝子多型タイピング出力の大部分は、一塩基多型タイピングデータであるが、そのデータを用いて、領域別にコピーナンバー多型ジェノタイプを求めるアルゴリズムが、アッセイプラットフォームより提供されるにいたっている。本研究では、そのようなコピーナンバー多型そのプロトタイプ出力ファイルを検討し、それを利用可能なツールを構築するための予備的検討を行った。また、多型ケース・コントロールマッピングの基礎となる分割表検定手法につき、理論的解釈を行った。

（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果

SNPを用いて、ケース・コントロール関連

検定を行うことは、 2×3 分割表の検定であり、ごく単純な構図であるが、実際には、ディプロタイプ検定(自由度2)、トレンド検定、優性・劣性モデル検定など、いくつもの検定手法が存在し、利用されている。SNPを用いた疾患関連遺伝子解析においては、非常に多数のSNPに対して、検定手法を適用するという条件があることから、複数の検定手法を併用することは、ときとして大きな不都合を生む。また、SNPの作るケース・コントロール 2×3 分割表においては、3ディプロタイプに対応する3カラムの間に想定すべき制約は、非生物学的現象に対して有効な統計検定手法をそのままあてはめることが不適当な場合が存在する。生物学的には、3ディプロタイプのうち、ヘテロ接合体に対して関連アレルがもたらす影響は、2種類のホモ接合体のそれの間のどこかであることが、もっとも適当であるが、それを検定に反映させることは、容易ではない。本分担研究では、 2×3 分割表検定の構造を理論的に解釈することを通じて、生物現象・疾患リスク発生を標的にしてSNPを用いるときに適当な検定手法を考案し、その理論的背景を明らかにし、アプリケーションを実装し公開した。

コピーナンバー多型を用いたケース・コントロール検定手法のツール化に成功した。コピーナンバー多型は、SNPよりも疾患形質影響の大きい多型として着目されている多型であるが、そのタイピング実験技法が未成熟な段階であることもあり、ケース・コントロール関連解析の枠組みにおいて、どのような検定手法を用いるのが適切であるかについての定見が得られていない。本分担研究では、過去3年間にコピーナンバー多型と2値

型形質との間の関連を報告している論文を体系的に調査し、その中で用いられている、検定手法を網羅・分離した。そして、その検定手法が、数千人規模の大規模遺伝子多型マッピングスタディにおいて、不都合なく解析できるよう、アプリケーション化した。また、コピーナンバー多型における検定結果を大規模マッピングの文脈で解釈するために、SNPマッピングにて培われた経験を敷衍するために、両多型における検定手法の異同についての考察を行った。

D. 考察

解析手法としての新規性を有し、解析ツールとして利便性のあるツールを開発できた。

E. 結論

全身性エリテマトーデス関連遺伝子解析はその成果が強く期待されているが、それを遂行するための、統計解析上の理論的、実用的進展に寄与した。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shimane K, Kochi Y, Yamada R, Okada Y, Suzuki A, Miyatake A, Kubo M, Nakamura Y, Yamamoto K. 2008. A single nucleotide polymorphism in the IRF5 promoter region is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in the Japanese patients. *Ann Rheum Dis*.

2. Yamada R, Okada Y. 2008. An optimal dose-effect mode trend test for SNP genotype tables. *Genet Epidemiol*.

3. Gotoh N, Yamada R, Matsuda F, Yoshimura N, Iida T. Manganese Superoxide Dismutase Gene (SOD2) Polymorphism and Exudative Age-related Macular Degeneration in the Japanese Population. *Am J Ophthalmol* 146:146, 2008.

4. Nakayama-Hamada M, Suzuki A, Furukawa H,

Yamada R, Yamamoto K. Citrullinated fibrinogen inhibits thrombin-catalyzed fibrin polymerization. *J Biochem* 144:393-8, 2008

5. Okada Y, Mori M, Yamada R, Suzuki A, Kobayashi K, Kubo M, Nakamura Y, Yamamoto K. SLC22A4 Polymorphism and Rheumatoid Arthritis Susceptibility: A Replication Study in a Japanese Population and a Metaanalysis. *J Rheumatol* 35:1273-8, 2008.

6. Suzuki A, Yamada R, Kochi Y, Sawada T, Okada Y, Matsuda K, Kamatani Y, Mori M, Shimane K, Hirabayashi Y and others. Functional SNPs in CD244 increase the risk of rheumatoid arthritis in a Japanese population. *Nat Genet* 40:1224-9, 2008.

7. Yamada R. Primer: SNP-associated studies and what they can teach us. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4:210-7, 2008.

2. 学会発表

Yamada R, Hirose K. and Okada Y. An Optimal Dose-effect Mode Trend Test for SNP Genotype Tables. Human Genome Variation Meeting 2008 (HGV2008) Toronto, Canada

3. 成果公開

研究室ウェブサーバにて、公開アプリケーションの拡充

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

新しい治療法の開発

研究分担者 首藤 絢一 財団法人 乙卯研究所 所長

A. 研究目的

Am80 (タミバロテン) はレチノイン酸受容体 RAR α と RAR β を介して特定の遺伝子の発現を調節する。本薬は急性前骨髄球性白血病の治療薬として承認されている薬剤であるが、乾癬にも有効である。動物モデルでは、リウマチ、クローン病、実験的自己免疫性脳脊髄炎、間質性膀胱炎などで顕著な効果を示した。免疫異常マウスであるNODマウスではタミバロテンの混餌投与によりすい臓ランゲルハンス氏島におけるリンパ球浸潤が抑えられ、尿糖の発生も抑制されたことを報告した。昨年は実験的多発性筋炎に対する効果を報告した。以上の結果はタミバロテンが多く自己免疫疾患の治療に有効であることを強く示唆する。本課題ではタミバロテンのいっそうの可能性を追求する。

B. 研究方法

タミバロテン及び関連誘導体を提供し、研究目的に向けた動物試験データを集め、対象になる難治性疾患についての知見をうる。

C. 研究結果

(1) 協力研究者により、タミバロテンはT細胞の分化において、IL17産生を顕著に抑制し、FoxP3を発現するTregへの分化へ促進することにより、多発性硬化症モデルにおいて治療効果を示すことが示された(大木ほか、2008年日本レチノイド研究会)。

(2) 培養中脳組織切片へLPS処置によるドパミンニューロンの変性がタミバロテンにより顕著に抑制され、BDNF mRNAの発現上昇が関与することが示された。この結果はLPSの黒質内投与による組織中のBDNF mRNA量によっても確かめられた(香月ほか、2008年日本レチノイド研究会)。

(3) アルツハイマー病についても自己免疫病の関与を考え、APP-TGマウスへのタミバロテン投与の効果を進めつつある。

(4) 新しい構造の受容体選択的なレチノイドを合成した。

D. 考察

レチノイド、特にタミバロテンは自己免疫性の脳神経疾患の治療に用いる可能性を示した。多くの論

文を考察すると(Shudo et al, Cur. Alz. Res, 2009, in press)、アルツハイマー病も自己免疫疾患の関与する疾患とみなすことができ、レチノイドが治療効果を発揮する可能性がある。

E. 結論

タミバロテンは自己免疫疾患の治療において、Th1, Th2, Th17, Treg を自己免疫疾患の抑制方向に変化させ、動物モデルにおいて有効性を示すことが確かめられた。承認医薬品であるので、所定の手順の元で臨床試験が可能である。薬理試験をすすめるため新規のレチノイドを合成した。

F. 研究発表

1. M. Takenaga, Y. Ohta, Y. Tokura, A. Hamaguchi, K. Shudo, H. Okano, and R. Igarashi The effects of Am80, a synthetic retinoid, on spinal cord injury-induced motor dysfunction in rats. *Bio l. Pharm. Bull.* 32:225, 2009.

2. I. Miwako, K. Shudo Oral administration of synthetic retinoid Am80 inhibits the development of type 1 diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice. *Biol. Pharm. Bull.* 32:157, 2009.

3. 香月博志ほか(協力研究者) RARアゴにストによるBDNF発現増大と中脳ドパミンニューロン保護 日本レチノイド研究会 第9回学術集会 59(2008)

4. 川原浩一ほか(協力研究者) Abクリアランスから見たレチノイドのアルツハイマー病治療の可能性 日本レチノイド研究会 第9回学術集会 58(2008)

5. 天野洋平ほか 疎水性領域に新規骨格を有するレチノイドの創製 第27回メジナルケミストリーシンポジウム 2P78 (2008)

6. 野口真行ほか ヘテロ5員環構造を疎水性ファーマコフォアとして有する新規レチノイドの創製 第27回メジナルケミストリーシンポジウム 2P79 (2008)

免疫寛容に重要な分子に関する研究

研究分担者 三宅 幸子 国立精神・神経センター 神経研究所免疫研究部 室長

研究要旨 全身性エリテマトーデス (SLE) の病態解明と新規治療の標的を探索することを目的とし、免疫寛容維持に重要な分子機構についての研究を行った。蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動法を用いて免疫不応答状態（アナジー）において、発現の低下している蛋白を同定した。RhoGDI, Coronin 1a, Arp2/3 complex などの細胞骨格に関する経路を標的とする分子が、GRAIL の基質である可能性が示唆された。また、GRAIL 分子の機能解明のため、ノックアウトマウスの作製を行い、現在解析中である。

A. 研究目的

SLE リンパ球の自己寛容破綻の機序と寛容導入を目指し、免疫寛容維持に重要な分子機構を発見し新規治療につなげる。近年免疫寛容に重要な分子として、E3リガーゼが注目されている。Cbl-b や、Itch などのリガーゼは、その基質として PLC γ などのシグナル伝達分子が報告されているが、GRAIL 分子はその制御する経路が不明である。そこで、本研究では GRAIL 分子の基質の同定ならびにノックアウトマウスを用いて、免疫寛容維持の機構について検討する。

B. 研究方法

DO11.10 の脾臓細胞を OVA 蛋白で刺激し、10 日後に ionomycin 処理、ionomycin+cyclosporin A 処理群を比較し、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動 (2D Difference Gel Electrophoresis: 2D DIGE) 技術を用いた定量的な蛋白質発現差異解析により候補となった蛋白質より GRAIL の基質を同定した。GRAIL の遺伝子欠損マウスを作製し、フェノタイプならびに自己免疫モデルについて解析を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、当研究所の動物実験規定に従い、実験計画書の承認を受けて行った。

C. 研究結果

上記 2D DIGE 法により、アナジー状態で特異的に発現が低下する蛋白について、未知、既知を含め約

30 の蛋白質を同定した。その中で、GRAIL の基質となる蛋白質として、RhoGDI $\alpha\beta$, IMAP4, Arp2/3-5, coronin1a を同定した。GRAIL ノックアウトマウスについては、preliminary な結果であるが、129 バック、B6 バックともに、末梢血中の Gr1+単球の減少と、CD4T 細胞の軽度上昇をみとめた。また 129 バックグラウンドマウスでは、6 ヶ月で唾液腺、肺、腎臓、大腸に細胞浸潤をみとめた。GRAIL KO マウスにおける自己免疫誘発モデルにおいては、抗体誘導性関節炎は増悪し、実験的自己免疫性脳脊髄炎では早期発症がみられた。

D. 考察

GRAIL は、同定された基質から、細胞骨格系の制御に重要な E3 キナーゼであると考えられた。GRAIL ノックアウトマウスでは、T 細胞の他に、単球系により変化がみられた。また、経過とともに様々な臓器への細胞浸潤がみられ、自己免疫寛容に関する機能が明らかとなった。GRAIL ノックアウトマウスについては、129 ならびに B6 バックでさらに解析をすすめるとともに、NOD マウスや Balb バックでの自己免疫自然発症について検討する予定である。

E. 結論

アナジーにより特異的に発現量の低下がみられる蛋白を同定した。RhoGDI, Coronin 1a, Arp2/3 complex などの細胞骨格に関する経路を標的とする分子が、GRAIL の基質である可能性が示唆された。また、GRAIL 分子ノックアウトマウスでは、臓器炎症が自

然発症し、免疫系の調節に重要であることがわかった。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

I 論文発表

原著

- 1) Theil MM, Miyake S, Croxford J, Mizuno M, Yokote H, Hosoda H, Schween J, von Horsten S, Chiba A, Lin Y, Oki S, Akamizu T, Kanagawa K, Yamamura T: Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by Ghrelin. *J Immunol.* (in press)
- 2) Dondji B, Deak E, Goldsmith-Pestana K, Perez-Jimenez E, Esteban M, Miyake S, Yammaura T, McMahon-Pratt D: Intradermal NKT cell activation during DNA priming in heterologous prime-boost vaccination enhances T cell responses and protection against Leishmania. *Eur J Immunol* 38:706-19, 2008.
- 3) Doi Y, Oki S, Ozawa T, Hohjoh H, Miyake S, Yamamura T: Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:8381-8386, 2008.
- 4) Sekine C, Sugihara T, Miyake S, Hirai H, Yoshida M, Miyasaka N, Kohsaka H. Successful treatment of animal models of rheumatoid arthritis with small-molecule cyclin-dependent kinase inhibitors. *J Immunol* 180:1954-1961, 2008.
- 5) Yokote H, Miyake S, Croxford JL, Oki S, Mizusawa H, Yamamura T. NKT cell-dependent amelioration of a mouse model of multiple sclerosis by altering gut flora. *Ame J Patho* 173:1714-23, 2008.

総説

- 1) Okamoto T, Ogawa M, Lin Y, Murata M, Miyake S,

Yamamura T: Treatment of neuromyelitis optica: Current debate. *Therapeutic Advances Neurol* 1:43-52, 2008.

- 2) Araki M, Miyake S, Yamamura T: Synthetic glycolipid ligands for human iNKT cells as potential therapeutic agents for immunotherapy. *Curr Med Chem* 15:2337-2345, 2008.

- 3) 三宅幸子: NKT細胞と自己免疫. *医学のあゆみ* 225:145-150, 2008.

- 4) 三宅幸子: 自己免疫病態とその制御. *日本臨床* 66:1073-1079, 2008.

II 学会発表

国際学会

- 1) Miyake S, Croxford JL, Yamamura T: The role of MR1-restricted Va19i T cells in autoimmune disease models. Keystone symposia, Tolerance in Transplantation and autoimmunity, Colorado, January 29, 2008
- 2) Yokote H, Miyake S, Croxford JL, Mizusawa H, Yamamura T: Alteration of gut flora ameliorates the disease course of experimental autoimmune encephalomyelitis in association with contraction of inflammatory Th17 cells. 8th Annual Conference of FOCIS, Boston, June 5, 2008
- 3) Miyake S, Mizuno M, Kaieda S, Sakaguchi N, Sakaguchi S, Yamamura T: Activation of innate immunity breaks tolerance and induces autoimmune arthritis in genetically susceptible mice. American College of Rheumatology 71th Annual Scientific Meeting, Washington, DC, November 13, 2006 (*Arthritis Rheum.* 58:S266, 2008)
- 4) Seta N, Komori A, Kimura N, Kaieda S, Okada Y, Miyake S, Kuwana A: A role of bone marrow-derived monocyte lineage cells in antibody-induced arthritis. American College of Rheumatology 71th Annual Scientific Meeting, Washington, DC, November 13,

国内学会

- 1) 林幼偉、三宅幸子、山村隆、: EAE の寛解維持を担う機能的 Treg は寛解期に誘導され、その誘導脳は脳炎惹起性ペプチドの末端配列に依存する。第 20 回日本神経免疫学会、新潟、4 月 17 日、2008 (神経免疫学 15 巻 : p34, 2008)
- 2) 山村隆、林幼偉、横手裕明、三宅幸子 : 免疫制御システムと神経免疫疾患 : 第 20 回日本神経免疫学会、新潟、4 月 18 日、2008 (神経免疫学 15 巻 : p21, 2008)
- 3) 八子徹、田島良亮、海江田信二郎、大木伸司、三宅幸子 : MR1 拘束性 V α 19iT 細胞のコラーゲン誘導関節炎 (CIA) における機能解析。第 52 回日本リウマチ学会、札幌、4 月 22 日、2008 (第 52 回日本リウマチ学会総会抄録集 p264)
- 4) 瀬田範行、海江田信二郎、岡田保典、三宅幸子、桑名正隆 : 関節炎モデルの病態形成における骨髄由来細胞の関与の検討。第 52 回日本リウマチ学会、札幌、4 月 22 日、2008 (第 52 回日本リウマチ学会総会抄録集 p382)
- 5) 田島良亮、八子徹、海江田信二郎、三宅幸子 : MR1 拘束性 V α 19iT 細胞の抗体誘導関節炎における機能解析。第 52 回日本リウマチ学会、札幌、4 月 21 日、2008 (第 52 回日本リウマチ学会総会抄録集 p384)
- 6) 三宅幸子、横手裕明、宮崎雄生、Croxford J. L., 山村隆 : iNKT 細胞を介した腸内フローラ変化による実験的自己免疫性脳脊髄炎。第 36 回日本臨床免疫学会、東京、10 月 17 日、2008 (日本臨床免疫学会会誌 31 巻 : 292, 2008)
- 7) 宮崎雄生、三宅幸子、山村隆 : ハプテン誘導性腸炎における mucosao associated invariant T 細胞の役割。第 36 回日本臨床免疫学会、東京、10 月 17 日、2008 (日本臨床免疫学会会誌 31
- 8) 林幼偉、三宅幸子、山村隆 : 脳炎惹起性ペプチドの優位性が機能的な制御性 T 細胞の誘導・維持能を左右する。第 38 回日本免疫学会、京都、12 月 1 日、2008 (第 38 回日本免疫学会総会抄録集 p90)
- 9) 田島良亮、山村隆、宮崎雄生、市川大樹、三宅幸子、: MR1 拘束性 V α 19iT 細胞の抗体誘導関節炎における機能解析。第 38 回日本免疫学会、京都、12 月 1 日、2008 (第 38 回日本免疫学会総会抄録集 p91)
- 10) 宮崎雄生、田島良亮、市川大樹、八子徹、三宅幸子、山村隆 : 腸管免疫制御における mucosao associated invariant T 細胞の役割。第 38 回日本免疫学会、京都、12 月 1 日、2008 (第 38 回日本免疫学会総会抄録集 p98)

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

自己抗原の翻訳後修飾に関する研究

加藤 智啓 聖マリアンナ医科大学大学院疾患プロテオーム・分子病態治療学 教授

研究要旨 全身性自己免疫疾患における標識自己抗体の産生機序を抗原修飾の観点から検討する目的で、自己抗原の翻訳後修飾を探索する方法の確立を試みた。具体的には、抗 RNP 抗体陽性患者および健常人の末梢血単核球から RNP 抗原を単離し、プロテアーゼ分解後に質量分析を行い、生成するペプチドの分子量比較で翻訳後修飾による差異を検討する方法を試みた。RNP-A 抗原については 10ml の末梢血より解析が可能であることが判明し、今後、検出諸条件の最適化と症例数の増加により自己抗体陽性患者における当該自己抗原の翻訳後修飾が進められうると考えられた。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス (SLE)、シェーグレン症候群 (SjS)、あるいは混合性結合組織病 (MCTD) などの多くの全身性自己免疫疾患で、標識自己抗体が出現する。その産生機序の詳細は不明であるが、産生機序のひとつとして自己抗原の修飾が提唱されている。例えば、抗 RNP 抗体の対応抗原のひとつである U1-RNP の 70kD 蛋白質は細胞のアポトーシス過程で切断され、その断片がより高い抗原性を有するなどの報告がある。また、SLE においても蛋白質に過酸化脂質が付加しているなどの報告がある。しかしながら、上記標識自己抗体の対応抗原が当該疾患で特異的になんらかの修飾をうけているか否かについてはほとんど検索されていない。本研究ではこれを検索する。

蛋白質の翻訳後修飾の解析については、従来特定の修飾に焦点を当て、抗体などを使って検出するのが通常である。しかし、ここで検索対象となる自己抗原の翻訳後修飾についてこれまで知見はほとんどないため、特定の翻訳後修飾に限定せず、網羅的に探索する必要がある。そのために本研究では、質量分析法を用いて対応抗原蛋白質の翻訳後修飾を検出同定する方法の確立を試みる。

B. 研究方法

本研究では、抗 U1-RNP 抗体の対応抗原である RNP-A,C、および 68kD 抗原を対象とした。抗 U1-RNP 抗体陽性の MCTD 患者および対照として健常人より、末梢血 10ml から末梢血単核球を分離し、その中に存在する上記自己抗原を検討した。

まず、上記の末梢血単核球の細胞溶解液から、U1-RNP の A,C、および 68kD 抗原に対する抗体が陽性の MCTD 患者血清とプロテインGを用

いて、U1-RNP 複合体を免疫沈降した。その沈降物を 1 次元の SDS-PAGE で展開し、膜転写後、同一血清でウエスタンブロットを行った。同様に沈降物を 1 次元の SDS-PAGE で展開し、ゲル上の蛋白質をシプロルビーで染色した。蛋白質の同定と検索は、シプロルビー染色のゲルから目的蛋白質のバンドを切り出し、トリプシンでゲル内消化を行った後、ブルカー製 MALDI-TOF 型質量分析器で行った。

(倫理面への配慮)

本研究は所属大学の生命倫理審査委員会の承認を得ており、臨床検体は提供者の文書による同意のもとに得られている。

C. 研究結果

用いた抗 U1-RNP 抗体陽性血清が、ウエスタンブロットで RNP-A、C に強く反応し、68kD 蛋白質には弱く反応することを確認した後、免疫沈降を行った。免疫沈降を行って単離した沈降物の SDS-PAGE/ウエスタンブロットでは RNP-A が強く反応した。シプロルビー染色のゲル上で、その RNP-A に相当するバンドが検出された。そのバンドから RNP-A 蛋白質をゲル内トリプシン消化後に回収し、質量分析を行ったところ、健常人サンプルからも MCTD 患者からもアミノ残基番号で 53-70、123-152、124-152、239-261、244-268 に相当する質量をもつペプチドが得られ、MS/MS 解析でも確認した。この 2 サンプルで較べる限りこれらの領域には MCTD に特異的な修飾はないと考えられた。健常人では、上記のほか、71-83、89-98 に相当するペプチドも検出されたが、MCTD ではこれらは検出されなかった。これらの領域には翻訳後修飾の余地があると考えられた。また、RNP-A 蛋白質のアミノ酸配列に対する検出ペプチド

のカバー率は30%前後であった。

D. 考察

本研究では自己抗体の対応抗原に疾患特異的翻訳後修飾があるか否かを探索する方法の確立を試みた。量的には、ヒト末梢血 10ml から分離した単核球からの蛋白質で解析が可能と考えられた。自己抗原の免疫沈降は可能であったが、質量分析上のノイズが高く、より純度の高い分離法が必要と考えられた。本研究では、全身性自己免疫患者と健康人の末梢血単核球から、双方の RNP-A 抗原由来の複数のペプチドを同定できたが、RNP-A 蛋白質のアミノ酸配列に対するカバー率が30%前後とやや低く、抗原の精製純度と回収率を上げる必要があると考えられた。

E. 結論

質量分析を用いることにより自己抗原の疾患特異的翻訳後修飾を検出解析することが可能と考えられた。今後、この方法を最適化し、症例を増やして検討することで、自己抗体の産生機序として翻訳後修飾が寄与するか否か明らかにできると期待される。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Katano M, Okamoto K, Arito M, Kawakami Y, Kurokawa S M, Suematsu N, Shimada S, Nakamura H, Xiang Y, Masuko K, Nishioka K, Yudoh K, Kato T. : Implication of GM-CSF Induced neutrophil gelatinase-associated lipocalin in pathogenesis of rheumatoid arthritis revealed by proteome analysis. : *Arthritis Res & Ther* : in press.
2. Minako M, Yudoh K, Nakamura H, Chiba J, Okamoto K, Suematsu N, Nishioka K, Kato T., Masuko K.: Hypoxia upregulates the expression of angiopoietin-like-4 in human articular chondrocytes: Role of angiopoietin-like-4 in the expression of matrix metalloproteinases and cartilage degradation.: *J Orthop Res.*: 27:50-57, 2009.
3. Duc PA, Yudoh K, Masuko K, Kato T.,

Nishioka K, Nakamura H.: Development and characteristics of pannus-like soft tissue in osteoarthritic articular surface in rat osteoarthritis model.: *Clin Exp Rheumatol*: 26: 589-595, 2008.

4. Okunuki Y, Usui Y, Kezuka T, Hattori T, Masuko K, Nakamura H, Yudoh K, Goto H, Usui M, Nishioka K, Kato T., Takeuchi M.: Proteomic surveillance of retinal autoantigens in endogenous uveitis: implication of esterase D and brain type creatine kinase as novel autoantigens.: *Molecular Vision*: 14: 1094-1104, 2008.
 5. Fujisawa H, Ohtani-Kaneko R, Naiki M, Okada T, Masuko K, Yudoh K, Suematsu N, Okamoto K, Nishioka K, Kato T.: Involvement of Post-Translational Modification of Neuronal Plasticity-Related Proteins in Hyperalgesia Revealed by a Proteomic Analysis.: *Proteomics*: 8: 1706-1719, 2008.
- #### 2. 学会発表
1. 増子 佳世、村田三奈子、中村洋、遊道和雄、加藤智啓: 関節軟骨細胞におけるプロスタグランジン(PG)E2 の作用: 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会: W31-6 (P.293): 4/20-23; 2008
 2. 川上雄起、松尾光祐(2)、増子佳世、稲葉裕(2)、遊道和雄、齋藤知行(2)、加藤智啓: プロテオミクスを用いた RA 滑膜における新規シトルリン化自己抗原の解析: 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会: P2-197: 4/20-23; 2008 ;(2) 横浜市立大学大学院医学研究科 運動器病態学
 3. 加藤智啓、唐澤里江、遊道和雄、増子佳世、尾崎承一: プロテオミクス・ペプチドミクスを用いた血管炎関連自己抗体および血清ペプチドの探索: 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会: S03-4 (P.157): 4/20-23; 2008
 4. 加藤智啓、増子佳世、中村洋、西岡久壽樹、遊道和雄: プロテオミクスを用いた変形性関節症関連自己抗原およびペプチドの探索: 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術

集会 : S06-3 (P.168) : 4/20-23 ; 2008

7/29-7/30 : 2008

5. 岡本一起、増子佳世、末松直也、遊道和雄、磯橋文秀、加藤智啓: ポリアルギニンと融合した核内受容コアクティベーター (MTI-II) の細胞内導入と活性: 第 60 回日本ビタミン学会: VITAMIN 2008 ; vol.4 ; P39 : 6/13-6/14 : 2008
6. 藤澤裕樹 2) 金子律子、内木充 2)、岡田智之、増子佳世、遊道和雄、末松直也、岡本一起、西岡久壽樹、加藤智啓: 痛覚過敏モデルラットの脳における蛋白質翻訳後修飾の変化: 日本プロテオーム機構第 6 回大会 一創薬、バイオマーカー探索に向けて一: 大会要旨集: P15 (S2-6) : 7/29-7/30 : 2008 : 2) : 日本臓器製薬
7. 飯塚進子、広畑俊成 2)、岡本一起、増子佳世、末松直也、黒川真奈絵、松下礼子 2)、加藤智啓: プロテオミクスを用いた、ループ精神病における抗神経細胞抗体の認識エピトープの検出: 日本プロテオーム機構第 6 回大会 一創薬、バイオマーカー探索に向けて一: 大会要旨集: P21 (S8-3) : 7/29-7/30 : 2008 : 2) 北里大学医学部大学院医療系研究科膠原病感染内科学
8. 黒川真奈絵、有戸光美、増子佳世、末松直也、岡本一起、鈴木登、加藤智啓: ベーチェット病末梢血単核球における発現蛋白の網羅的検討: 日本プロテオーム機構第 6 回大会 一創薬、バイオマーカー探索に向けて一: 大会要旨集: P25 (P-13) : 7/29-7/30 : 2008
9. 金城永幸、岡本一起、有戸光美、黒川真奈絵、増子佳世、末松直也、木村健二郎、加藤智啓: IgA 腎症の扁桃を用いた病因抗原のプロテオーム探索: 日本プロテオーム機構第 6 回大会 一創薬、バイオマーカー探索に向けて一: 大会要旨集: P25 (P-14) : 7/29-7/30 : 2008
10. 片野雅淑、松尾光祐、黒川真奈絵、有戸光美、増子佳世、末松直也、岡本一起、加藤智啓: 関節リウマチ滑膜細胞のリン酸化プロテオーム解析: 日本プロテオーム機構第 6 回大会 一創薬、バイオマーカー探索に向けて一: 大会要旨集: P27 (P-24) : 7/29-7/30 : 2008
11. Xiang Yang, Matsui T, Arito M, Suematsu N, Yudoh K, Kato T : Disease-Specific Serum Peptides In Patients With Systemic Sclerosis : HUP02008 : 2008
12. Kurokawa M, Mtsuo K, Nakamura H, Masuko K, Okamoto K, Kato T : Arthriitis-Inducible Protein, Annexin VII: High Phosphorylation In Rheumatoid Arthritis : HUP02008 : 2008
13. 飯塚進子、廣畑俊成、岡本一起、黒川真奈絵、増子佳世、末松直也、松下礼子、加藤智啓: ループ精神病における抗神経細胞抗体の対応抗原のプロテオーム解析: 第 6 回北里疾患プロテオーム研究会: 要旨集 P52 ポスター番号 21 : 8/31 : 2008
14. 金城永幸、岡本一起、黒川真奈絵、有戸光美、増子佳世、末松直也、木村健二郎、加藤智啓: IgA 腎症の血清と特異的に反応する扁桃タンパク質の網羅的解析 一病因抗原のプロテオーム探索一: 第 6 回北里疾患プロテオーム研究会: 要旨集 P53 ポスター番号 22 : 8/31 : 2008
15. 加藤智啓: Analysis of Brain Proteome in SART Rat's, a Model of Hyperalgesia : APLAR 2008 : Fibromyalgia:Therapeutic Strategies : 2008
16. Kurokawa S M, Arito M, Masuko K, Suematsu N, Okamoto K, Suzuki N, Kato T : Comprehensive analysis of protein expression in peripheral blood mononucleocytes from patients with Behcet's disease : APLAR 2008 : 2008
17. 加藤智啓: 膠原病研究におけるプロテオミクスの有用性: 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会: シンポジウム 8「膠原病の病態解明と新しい治療戦略」: 2008
18. 岡本一起、末松直也、増子佳世、黒川真奈絵、有戸光美、遊道和雄、加藤智啓: 細胞内導入配列を付加した核内受容体コアクティベーター (MTI-II) の細胞内への取り込みと転写促進活性: 第 31 回日本分子生

物学会 第 81 回日本生化学会大会 合同
大会：抄録 P209 ポスター番号 1P-0390：
2008

19. 有戸光美、松尾光祐、末松直也、増子佳世、
黒川真奈絵、岡本一起、加藤智啓：関節リ
ウマチ関連分子アネキシン VII の機能解
析：第 31 回日本分子生物学会 第 81 回日
本生化学会大会 合同大会：抄録 P482 ポ
スター番号 1P-0390：2008
20. 深澤雅彦、岡本一起、中村学、有戸光美、
黒川真奈絵、増子佳世、末松直也、肥塚泉、
加藤智啓：片側内耳破壊後の前庭代償にお
けるラット小脳片葉タンパク質のプロテ
オーム解析：第 31 回日本分子生物学会
第 81 回日本生化学会大会 合同大会：抄
録 P656 ポスター番号 3P-1124：2008

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

本研究は以下の医師・研究者の協力を得て
行われた。有戸光美、岡本一起、尾崎承一、
黒川真奈絵、末松直也、高桑由希子、永井宏
平、増子佳世、遊道和雄（50音順、敬称略）。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
研究分担報告書

サイトカインシグナル抑制による自己免疫疾患の治療と
DNA マイクロアレイによる病態解析に関する研究

研究分担者 西本 憲弘 和歌山県立医科大学医学部免疫制御学講座 教授

研究要旨 成人スティル病は、全身型若年性特発性関節炎（sJIA）の成人発症型であり、両者の病態はサイトカインプロファイルを含め酷似している。今回、DNA マイクロアレイを用いて sJIA で異常発現する分子を特定した。これらの分子について、機能カテゴリー解析と分子ネットワーク解析を行ったところ、IL-18、IFN- γ と TNF を中心としたマクロファージ活性化に関わるサイトカインの発現増加とミトコンドリアの遺伝子にコードされた酸化リン酸化に関与する分子の発現低下を認め、実際にミトコンドリア機能は低下していた。IL-6 阻害治療は、これらの異常は改善したことより IL-6 の過剰産生の関与が確認された。成人スティル病でも類似の病態が関与する可能性がある。

A. 研究目的

成人スティル病は、従来の治療に抵抗性の患者も多く、病態に基づいた新規治療法の開発が望まれている。我々は、これまでに IL-6 阻害治療が治療抵抗性の成人スティル病の治療に有効であることを報告した (Iwamoto et al Arthritis Rheum 2002, Nakahara et al Mod Rheum 2008)。さて、成人スティル病は、全身型若年性特発性関節炎(sJIA、従来のスティル病)の成人発症型で、両者の病態はサイトカインプロファイルを含め酷似している。今回、DNA マイクロアレイを用いた網羅的な解析から、sJIA で異常発現する分子を特定し、これらの分子に対する Bioinformatics 解析により細胞機能の異常とサイトカインネットワークの異常を検索した。さらに、これらの異常が IL-6 阻害治療により改善するか否か検討した。

B. 研究方法

sJIA 患者の末梢血細胞の mRNA 発現について DNA マイクロアレイを用いて測定し、健常児と比較して発現が有意に亢進または低下した分子を特定した。特定した分子がどのような細胞機能に関わっているかについて、分子の持つ機能からカテゴリーに分類し (Gene Ontology 解析)、異常を呈する細胞機能を検索した。さらに、異常があると予測された機能カテゴリーに含まれる分子を用いて Network 解析を行い、病態に関わる分子ネットワークを検索した。また、トシリズマブを用いた IL-6 阻害治療により改

善するか否かも検討した。研究協力施設を以下のとおりである：横浜市立大学医学部小児科(研究責任者 横田俊平教授、森雅亮 先生、今川智之先生)、鹿児島大学医学部小児科(研究責任者 武井修治教授)、千葉大学医学部小児科(研究責任者 富板美奈子先生)、大阪医科大学小児科 (研究責任者 村田卓士先生)、あいち小児総合保健医療センター(研究責任者 安藤嘉浩先生、岩田直美先生)、兵庫県立こども病院免疫アレルギー科(研究責任者 三好麻里先生)、横浜市立大学附属市民総合医療センター小児総合医療センター(研究責任者 相原雄幸先生) この場を借りてご協力に心より感謝いたします。

(倫理面への配慮)

本研究は各研究協力施設の臨床研究倫理委員会の承認の下におこなった。西本は9月に現所属先に移動したため、旧所属の大阪大学の臨床研究倫理委員会の承認の下に行った。すべての被験者あるいは保護義務者の文書による同意の取得のうえ行った。診療記録や採取した検体は、氏名・生年月日・住所などの個人情報を削除し、匿名化した。

C. 研究結果

sJIA 患者の DNA マイクロアレイを用いた解析により、健常児に比べ有意に増加もしくは低下した 3491 分子 (増加：1273 分子、低下：2218 分子) を特定した。増加した分子について機能カテゴリー解析を行ったところ defense response のカテゴリーに分子の有意な集積がみられた。さらに、このカatego

リーに含まれる分子を用いてネットワーク解析を行ったところ、IL-18/IFN- γ または TNF を中心とするネットワークが見出された。これらのネットワークを構成し発現が亢進していた分子のほとんどは、マクロファージ活性化に関わる分子であった。一方、低下した分子を用いた機能カテゴリー解析では、酸化リン酸化のカテゴリーに異常がみられ、含まれる分子のほとんどはミトコンドリア DNA でコードされる分子であった。さらに、ミトコンドリアの障害時や修復時に誘導される分子 SLC25、A4NRF1、OPA1 の発現が増加していた。以上より、ミトコンドリアの障害が示唆された。実際に機能の保たれているミトコンドリアに選択的に取り込まれるテトラメチルローダミンエステルによる解析でもミトコンドリア機能は低下していた。これらの異常は、IL-6 阻害治療により疾患活動性の低下とともに改善した。

D. 考察

sJIA では、成人スティル病と同様に IL-18, IFN- γ ならびに TNF に関連したサイトカインのマクロファージ活性化病態への関与とミトコンドリア機能の低下が示唆された。IL-6 阻害治療はこれらの異常を改善したことから、IL-6 の過剰シグナルがマクロファージの活性化に関連したサイトカインネットワークの調節ならびにミトコンドリア機能に関与すると考えられる。成人スティル病においても同様の病態が存在すると考えられ、今後 IL-6 阻害治療の臨床研究を行うとともにマクロファージ機能、ミトコンドリア機能について検討する予定である。

E. 結論

sJIA の病態に IL-18, IFN- γ と TNF を中心とした複数のサイトカインによるマクロファージ活性化とミトコンドリア機能の低下があり、IL-6 の過剰産生がそれらの異常にかかわっていることがわかった。成人スティル病でも類似の病態が関与する可能性がある。

F. 健康危機情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Lee HM, Mima T, Sugino H, Aoki C, Adachi Y,

Yoshio-Hoshino N, Matsubara K, Nishimoto N. Interactions among type I and II interferon, tumor necrosis factor, and beta-estradiol in the regulation of immune response-related gene expressions in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2009 Jan 3;11(1):R1. [Epub ahead of print]

2. Ishikawa S, Mima T, Aoki C, Yoshio-Hoshino N, Adachi Y, Imagawa T, Mori M, Tomiita M, Iwata N, Murata T, Miyoshi M, Takei S, Aihara Y, Yokota S, Matsubara K, Nishimoto N. Abnormal expression of the genes involved in cytokine networks and mitochondrial function in systemic juvenile idiopathic arthritis identified by DNA microarray analysis. *Ann Rheum Dis*. 68:264-72, 2009.
3. Nakahara H, Mima T, Yoshio-Hoshino N, Matsushita M, Hashimoto J, Nishimoto N. A case report of a patient with refractory adult-onset Still's disease who was successfully treated with tocilizumab over 6 years. *Mod Rheumatol*. 2008 Sep 2. [Epub ahead of print]
4. Mima T, Ishikawa S, Aoki C, Yoshio-Hoshino N, Adachi Y, Imagawa T, Mori M, Tomiita M, Iwata N, Murata T, Miyoshi M, Takei S, Aihara Y, Yokota S, Matsubara K, Nishimoto N. Interleukin 11 and paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha expression correlates with the number of joints with active arthritis in systemic juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis*. 68:286-7, 2009.
5. Nishimoto N, Kishimoto T. Humanized antihuman IL-6 receptor antibody, tocilizumab. *Handb Exp Pharmacol*. 181:151-60, 2008.
6. Yokota S, Imagawa T, Mori M, Miyamae T, Aihara Y, Takei S, Iwata N, Umebayashi H, Murata T, Miyoshi M, Tomiita M, Nishimoto N, Kishimoto T. Efficacy and safety of tocilizumab in patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, withdrawal phase III trial. *Lancet*. 371:998-1006, 2008.

7. Nishimoto N, Terao K, Mima T, Nakahara H, Takagi N, Kakehi T. Mechanisms and pathologic significances in increase in serum interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor after administration of an anti-IL-6 receptor antibody, tocilizumab, in patients with rheumatoid arthritis and Castleman disease. *Blood*. 112:3959-64, 2008.
2. 学会発表
1. 美馬亨, 石川悟, 青木千恵子, 吉雄直子, 安達康雄, 今川智之, 森雅亮, 富板美奈子, 岩田直美, 村田卓士, 三好麻里, 武井修治, 松原謙一, 横田俊平, 西本憲弘. 全身型若年性特発性関節炎で低下を認めたミトコンドリア機能はトシリズマブにより回復する. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会 第 17 回国際リウマチシンポジウム ロイトン札幌 札幌. 2008.4.20-23
2. Lee HM, Mima T, Sugino H, Aoki C, Adachi Y, Matsubara K, Nishimoto N. Network-based Analysis of Immune Response-Related Genes Expressed in Systemic Lupus Erythematosus-An Interaction among Type I and II Interferon, Tumor Necrosis Factor, and Beta-estradiol. 第 36 回日本臨床免疫学会総会. 京王プラザ. 2008.10.17-18
3. 美馬亨, 青木千恵子, 李 慧敏, 今川智之, 森 雅亮, 富板美奈子, 岩田直美, 村田卓士, 三好麻里, 相原雄幸, 武井修治, 横田俊平, 西本憲弘. Tocilizumab therapy improves the expression of genes related to IFN γ /IL-18 and TNF networks in active systemic juvenile idiopathic arthritis. 第 38 回日本免疫学会. 京都国際会議場. 京都. 2008.12.1-3
4. Nishimoto N, Ishikawa S, Lee H, Aoki C, Mima T. Anti-IL-6 receptor antibody therapy for autoimmune diseases. ICCLE2008. 京都. 2008.5.11-13
5. Lee H, Mima T, Ishikawa S, Sugino H, Yoshio N, Aoki C, Nishimoto N. Repressive effect of tumor necrosis factor (TNF) on interferon (IFN) signatures in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) of systemic lupus erythematosus (SLE) patients. EULAR2008. Paris. France. 2008. 6.11-14
6. Mima T, Adachi Y, Yoshio-Hoshino N, Aoki C, Ishikawa S, Imagawa T, Mori Masaaki, Tomiita M, Iwata N, Murata T, Miyoshi M, Takei S, Aihara Y, Yokota S, Matsubara K, Nishimoto N. Tocilizumab therapy suppresses the expression of genes related to the macrophage activation in systemic juvenile idiopathic arthritis (SJIA). EULAR2008. Paris, France. 2008.6.11-14
7. Lee HM, Mima T, Sugino H, Aoki C, Adachi Y, Matsubara K, Nishimoto N. Interactions among Type I and II IFN, TNF, and Beta-estradiol Involve in Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. APLAR2008. パシフィコ横浜. 横浜. 2008.9.23-27.
8. Mima T, Aoki C, Adachi Y, Sugino H, Lee HM, Yoshio-Hoshino N, Imagawa T, Mori M, Tomita M, Iwata N, Murata T, Miyoshi M, Takei S, Aihara Y, Yokota S, Matsubara K, Nishimoto N. Tocilizumab Therapy Improves Abnormal Mitochondrial Function in Patients with Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis (sJIA). ACR2008. San Francisco, USA. 2008.10.24-10.29
9. Yokota S, Imagawa T, Miyamae T, Mori M, Nishimoto N, Kishimoto T. Long-term Safety and Efficacy of Tocilizumab in Patients with systemic Juvenile Idiopathic Arthritis (JIA) Under the Extension and Long-term. ACR2008. San Francisco, USA. 2008.10.24-10.29
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

B細胞を標的とした全身性エリテマトーデスの治療の開発に関する研究

研究分担者 田中 良哉 産業医科大学医学部第一内科学講座 教授

研究要旨 全身性エリテマトーデス(SLE)は、多臓器病変を特徴とする自己免疫疾患であるが、その発症と維持に於いて、B細胞は重要な役割を担い、また、B細胞は治療標的として重要である。これまで、治療抵抗性の重症 SLE 20 症例を対象に B 細胞抗原 CD20 に対する抗体リツキシマブを用いたパイロットスタディを実践してきた。平成 20 年度は、SLE に対する B 細胞標的治療の長期有効性と安全性を検討すると共に、CD20 抗体の作用機序を解明することを目的とした。その結果、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長期有効性が確認された。リツキシマブは、中枢神経系には速やかな効果を発揮したが、その機序としては、共刺激分子を発現するメモリーB細胞を優先的に除去して B-T 細胞間相互作用を抑制した(細胞性免疫の制御)可能性も考えられた。また、リツキシマブ投与により蛋白尿の改善を中心とした SLE の長期改善を可能とした。その作用機序としては、メモリーB細胞の再出現を制御してナイーブ B 細胞の再構築を生じて長期寛解導入をもたらした(液性免疫の制御)ものと考えられた。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス(SLE)は、多臓器病変を特徴とする自己免疫疾患であるが、保険収載されている治療はステロイド薬のみである。その発症と維持に於いて、B細胞は重要な役割を担い、また、B細胞は治療標的として重要である。これまで、治療抵抗性の重症 SLE 20 症例を対象に B 細胞抗原 CD20 に対する抗体リツキシマブを用いたパイロットスタディを実践してきた。平成 20 年度は、SLE に対する B 細胞標的治療の長期有効性と安全性を確認するために、2 年間の追跡調査を行い、これらの問題点の検証を行った。さらに、細胞表面抗原の発現や末梢血 mRNA 発現量の推移を検討して、CD20 抗体の作用機序を解明することを目的とした。

B. 研究方法

ステロイドや免疫抑制剤などの既存の治療に抵抗性を示した重症 SLE 20 症例(BILAG カテゴリーA を 1 項目以上満たす)に対し、本学倫理委員会承認後に、インフォームドコンセント取得の上、原則として CD20 抗体リツキシマブ 375mg/m²/週を 2 回投与し、臨床症候、検査成績、画像所見などを検討した。また、末梢血リンパ球の表面抗原をフローサイトメトリーで検出した。また、DNA マイクロアレイを用い、末梢血 mRNA 発現量の推移を投与前、投与後 2 週間目で比較検討した(和医大西本憲弘教授と共同研究)。

(倫理面への配慮)

臨床検体を使用する場合には、所属機関の倫理委員会、或は、IRB で承認を得た研究に限定し、患者からインフォームドコンセントを得た上で、倫理委員会の規約を遵守し、所属機関の現有設備を用いて行う。患者の個人情報が入所機関外に漏洩せぬよう、試料や解析データは万全の安全システムをもって厳重に管理し、人権擁護に努めると共に、患者は、経済的負担を始め如何なる不利益や危険性も被らない事を明確にする。

C. 研究結果

①疾患活動性スコア SLEDAI は 28 日後に有意に改善し、20 例中 13 例で 6 ヶ月以内に寛解導入(SLEDAI=0)を可能とし、寛解は 6 例で 2 年以上維持した。②中枢神経 SLE を伴う 13 例は全例回復し、意識障害、神経症、癲癇は一部の症例では 1 週間以内に回復した。ループス腎炎を伴う 11 例では、1 年後に 7 例で尿蛋白 10mg/dl 以下まで改善した。③3 例で带状疱疹ヘルペス、肺炎、褥瘡感染症を認めた。1 例はリツキシマブ投与 7 ヶ月後にくも膜下出血で、1 例は再投与後 6 ヶ月後に皮質下出血で死亡したが、因果関係は認めなかった。5 例が 7~23 ヶ月後に再燃した。2 例はリツキシマブ再投与、2 例は IV-CY で改善した。④末梢血 CD20 陽性 B 細胞数は全例で 14 日以内に消失し、3~9 ヶ月間維持された。⑤B 細胞表面抗原の解析では、CD19 陽性細胞上の CD40 と CD80 は投与後速やかに発現分

子数が減少し、半年後も減弱が維持された。⑥CD4 陽性細胞上の CD40L と ICOS の発現も低下した。⑦ CD19⁺IgD⁺CD27⁺ナイーブ B 細胞は速やかに消失したが、IgD⁺CD27^{hi}形質細胞は4週間残存した。⑧長期寛解維持症例では、CD19⁺IgD⁺CD27⁺ナイーブ B 細胞は回復したが、IgD⁺CD27⁺メモリーB 細胞の再出現は抑制された。逆に、再燃症例では、ナイーブB細胞とメモリーB細胞の再上昇が見られた。⑨DNA マイクロアレイによりリツキシマブ投与による末梢血 mRNA 発現の短期的変動解析では、p38MAPK などのシグナル関連分子の低下を認め、リンパ球の活性化制御が示唆された。

D. 考察

リツキシマブ療法の安全性と有効性が確認された。リツキシマブの作用機序としては、メモリーB細胞の再出現を制御してナイーブB細胞の再構築を生じ、長期寛解導入と免疫複合体が関与する腎障害などが改善したと考えられる(液性免疫の制御)。一方、中枢神経症状の速やかな改善については、共刺激分子を発現するメモリーB細胞を優先的に除去してB-T細胞間相互作用を抑制し、リンパ球の活性化の制御を介して血管障害などを改善した(細胞性免疫の制御)可能性も考えられる。即ち、リツキシマブによる治療効果は、SLEの病態形成において液性免疫のみならず、細胞性免疫も介在することを示唆する。今後、寛解導入に伴い減弱する遺伝子に関するDNAマイクロアレイ解析とも併せて、より効率的な疾患制御の可能性を探索する。

E. 結論

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長期有効性が確認されたCD20抗体の作用機序としては、メモリーB細胞の再出現を制御してナイーブB細胞の再構築を生じて長期寛解導入を齎した(液性免疫の制御)と同時に、共刺激分子を発現するメモリーB細胞を優先的に除去してB-T細胞間相互作用を抑制した(細胞性免疫の制御)可能性も考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsujimura S, Saito K, Nawata M, Nakayamada S, Tanaka Y. Overcoming drug resistance induced by P-glycoprotein on lymphocytes in patients with refractory rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 67,

380-388, 2008.

2. Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, Tanaka Y. Bolus infusion of human urinary trypsin inhibitor improves intractable interstitial pneumonia in patients with connective tissue diseases. *Rheumatology*47, 907-913, 2008.
3. Nakano K, Higashi T, Hashimoto K, Takagi R, Tanaka Y, Matsushida S. Antagonizing dopamine D1-like receptor inhibits Th17 cell differentiation: Preventive and therapeutic effects on experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biochem Biophys Res Commun* 373, 286-291, 2008.
4. Takeuchi T, Tatsuki T, Nogami N, Ishiguro N, Tanaka Y, Yamanaka H, Harigai M, Ryu J, Inoue K, Kondo H, Inokuma S, Kamatani N, Ochi T, Koike T: Post-marketing surveillance of the safety profile of infliximab in 5,000 Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 67, 189-195, 2008.
5. Nishida K, Okada Y, Nawata M, Saito K, Tanaka Y. Induction of hyperadiponectinemia following long-term treatment of patients with rheumatoid arthritis with infliximab (IFX), an anti-TNF-alpha antibody. *Endocrine J* 55, 213-216, 2008.
6. Tanikawa R, Okada Y, Nakano K, Tanikawa T, Hirashima M, Yamauchi A, Hosokawa R, Tanaka Y. Interaction of galectin-9 with lipid rafts induces osteoblast proliferation through the c-Src/ERK signaling pathway. *J Bone Miner Res* 23, 278-86, 2008.
7. Mototani H, Iida A, Nakajima M, Furuichi T, Miyamoto Y, Tsunoda T, Sudo A, Kotani A, Uchida A, Ozaki K, Tanaka Y, Nakamura Y, Tanaka T, Notoya K, Ikegawa S. A functional SNP in EDG2 increases susceptibility to knee osteoarthritis in Japanese. *Hum Mol Genet* 17, 1790-1797, 2008.
8. Yoda A, Toyoshima K, Onishi N, Hazaka Y,

- Tsukuda Y, Tsukada J, Kondo T, Tanaka Y, Minami Y. Arsenic trioxide augments chk2/p53-mediated apoptosis by inhibiting oncogene wip1 phosphatase. *J Biol Chem* 283, 18969-18979, 2008.
9. Takizawa Y, Inokuma S, Tanaka Y, Saito K, Atsumi T, Hirakata M, Kameda H, Hirohata S, Kondo H, Kumagai S, Tanaka Y. Clinical characteristics of cytomegalovirus infection in rheumatic diseases: multicentre survey in a large patient population. *Rheumatology* 47, 1373-1378, 2008.
10. Okada Y, Nawata M, Nakayama S, Saito K, Tanaka Y. Commencing use of alendronate protects premenopausal women from bone loss and fracture associated with high-dose glucocorticoid therapy. *J Rheumatol* 35, 2249-2255, 2008.
2. 学会発表
1. Tanaka Y, Yamamoto K, Takeuchi T, Nishimoto N, Miyasaka N, Sumida T, Sawada T, Kohsaka H, Matsumoto I, Saito K, Koike T. A 2 year-extended follow-up of the phase I/II trial of rituximab for treatment of refractory systemic lupus erythematosus. Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2008, Paris 平成 20 年 6 月 11-14 日
2. Tanaka Y, Tokunaga M, Nawata M, Iwata S, Nakano K, Yamaoka K, Mima T, Nishimoto N, Saito K. Different mechanisms are involved in different organ manifestation in SLE: learning from treatments with rituximab (anti-CD20) therapy. The 72nd National Meeting of American college of Rheumatology, San Francisco. 平成 20 年 10 月 25-29 日
3. Tanaka Y. Lessons learned from rituximab development in Japan. Asian SLE Summit Meeting, Tokyo, 平成 20 年 12 月 11 日
4. 田中良哉. 重症 SLE 患者に対するリツキシマブ治療. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会 (シンポジウム) 札幌. 平成 20 年 4 月 20-23 日
5. 田中良哉. 抗 B 細胞療法. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会 (シンポジウム) 札幌, 平成 20 年 4 月 20-23 日
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得
- 1) Fas 抗原発現増強剤 (特許出願番号: 特開 2003-171282)
- 2) Akt シグナル経路の活性化阻害を目的として使用するレフルノミド (特願 2005-81972)
2. 実用新案登録
- 特になし
3. その他
- 特になし

Nitric Oxide (NO)及び Histone deacetylase 阻害剤(HDACI)を用いた制御性 T 細胞の誘導に関する研究

研究分担者 蒲池 誠 長崎大学医歯薬学大学院総合研究科・展開医療科学講座 客員研究員

研究要旨 SLE では制御性T細胞 (Treg)の個数及び機能低下が報告されており、Treg の量的質的回復は免疫応答制御の観点から極めて重要な課題である。また最近では抗原刺激によるヒト末梢ナイーブ T 細胞での Foxp3 発現が報告されており、末梢性の Foxp3 陽性 T 細胞の誘導と Treg への分化誘導が免疫応答制御に関与することも示唆されている。SLE 治療での強力な介入治療である寛解導入療法と寛解維持療法において、後者の寛解維持療法は長期に及ぶため、特に生理的な免疫自己寛容の維持が好ましい。従って、このような視点からの末梢性 Treg の分化誘導への着目は治療過程の病態把握のみならず治療薬のモダリティ把握においても非常に重要である。本研究では、制御性 T 細胞 (Treg)とエフェクター T 細胞 (Teff)の発現・機能のバランス操作を意図した実験系を組んだ。そこで Nitric Oxide (NO)と Histone deacetylase 阻害剤(HDACI)による Treg 誘導の検討を行った。NO は生理的な拡散性シグナル伝達分子であり、免疫抑制作用を有すること、SLE 患者血清中 NO レベルの上昇が報告されている。こうした事実を鑑み、抗原刺激下において NO が Teff のキャラクターをどのように変化させて、Treg 誘導に寄与するかを検討した。また SLE では IL-2 産生が転写因子レベルで抑制されているため Treg と Teff の発現・機能のバランス操作には IL-2 非依存性のモダリティも必要と考えられた。そこで、Histone deacetylase 阻害剤(HDACI)を用いたクロマチン構造のリモデリングが IL-2 非依存性に Treg を誘導するかどうかを検討した。実験には、健康人リンパ球を用いた培養液中の NO 導入には NO ドナーを用いた。その結果、1.NO および HDACI は抗原刺激下における Treg の誘導を顕著に増加させた、2. 両者の誘導機序は NO が IL-2 依存性で HDACI が IL-2 非依存性であることが示唆された。

A. 研究目的

末梢における Treg の分化・誘導の可能性が最近報告されており、TGF-βなどの分化誘導因子の解明が急速に行なわれている。CD3/CD28-抗原をコートした expansion beads (Bs)刺激も Foxp3 発現を増強することがヒトリンパ球で報告されている。こうした末梢性の Foxp3 発現誘導は Treg 発現誘導を介して末梢性 Treg の誘導を促して、寛解導入療法のみならず寛解維持療法においても重要なキーファクターとなる可能性がある。そこで、本研究では、Bs を用いたポリクローナルな刺激下で、NO や HDACI が Foxp3 の発現をどのように変化させるかの検討を行った。

B. 研究方法

I. [NO による Treg 誘導の検討]

1. NO による CD4⁺CD25⁺T細胞(Teff)の分化誘導の検討

健康者 PBMC から Teff を分離後、培養液中に NO ドナーを加え CD3/CD28-Ab ビーズ(Bs)で6日間刺激し

た。その後、Teffの細胞分化を表面マーカー(CD4, CD25, CD122)、サイトカイン産生(IL-2, -4, -6, -10, IL-17), mRNA 発現(T-bet, IFN-γ, GATA-3)で検討した。

2. NO 分化誘導 T 細胞(NODT 細胞:実験 1.で NO により分化した T 細胞)の免疫抑制能力の検討
NODT 細胞あるいは Teff と CFSE でラベルした PBMC(CSFE-PBMC)を Bs で6日間刺激後、NODT 細胞の免疫抑制作用(PBMC の増殖抑制で評価)と Foxp3 発現を FACS で検討した。

3. PBMC 中 CD4⁺ T細胞の Foxp3 発現レベルに及ぼす NO の影響の検討
PBMC 培養液中に NO ドナーを加え Bs で6日間刺激後に、CD4⁺T細胞での Foxp3 発現を検討した。

II. [HDACI を用いたクロマチン構造のリモデリングによる Treg 誘導の検討]

1. 健康者 PBMC 培養液中に HDACI:TsA(トリコスタチン A), SAHA (Suberoylanilide hydroxamic acid), バルプロ酸ナトリウム(VPA)あるいは NO ドナーを加え、