

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

**新たな診断・  
治療法開発のための  
免疫学的手法の開発**

平成20年度 総括・分担研究報告書

平成21年3月

主任研究者  
小池 隆夫

- 目次 -

(1) 構成員名簿 .....	1
(2) 総括報告書 小池 隆夫 .....	3
(3) 分担研究報告書 .....	9
1. 自己免疫疾患に関与するユビキチン関連分子の治療に向けた応用 畠山 鎮次 .....	9
2. 抗プロトロンビン自己抗体による向血栓細胞活性化のメカニズム 渥美 達也 .....	11
3. IL-17 産生 NKT 細胞を介した関節炎の制御に関する研究 住田 孝之 .....	15
4. 新規 IL-10 産生制御性 T 細胞の IL-10 産生機序に関する研究 山本 一彦 .....	18
5. 多発性筋炎に対する免疫抑制療法等先端的新規治療法に関する研究 上阪 等 .....	20
6. 核内受容体をターゲットとした新規自己免疫疾患制御法の探索に関する研究 山村 隆 .....	23
7. 全身性エリテマトーデス(SLE)における末梢血抗二本鎖 DNA 抗体産生細胞に関する研究 桑名 正隆 .....	26
8. 制御性 T 細胞を用いた自己免疫の抑制に関する研究 坂口 志文 .....	30
9. 全身性自己免疫疾患における IL-17 の病態学的意義の解析と細胞移入による特異的治療法 の開発に関する研究 三森 経世 .....	34
10. 免疫抑制性遺伝子を強制発現させたアロ・マウス ES 細胞由来の樹状細胞によるアロ移植臓器 に対する免疫寛容の誘導 千住 覚 .....	37
(4) 研究成果の刊行に関する一覧 .....	41
(5) 平成 20 年度班会議プログラム・抄録 .....	49

(1) 構成員名簿

平成20年度 構成員名簿  
(H20-難治-一般-036)

区 分	氏 名	所 属	職 名
主任研究者	小池 隆夫	北海道大学大学院医学研究科内科学講座・第二内科	教 授
研究分担者	畠山 鎮次	北海道大学大学院医学研究科生化学講座	教 授
	渥美 達也	北海道大学大学院医学研究科内科学講座・第二内科	講 師
	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
	山本 一彦	東京大学大学院医学系研究科内科学専攻アレルギー・リウマチ学	教 授
	上阪 等	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科膠原病・リウマチ内科学	准教授
	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
	桑名 正隆	慶應義塾大学内科	准教授
	坂口 志文	京都大学再生医科学研究所 生体機能調節学	教 授
	三森 経世	京都大学大学院医学研究科・臨床免疫学	教 授
	千住 覚	熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学	准教授
事務局	大澤 知子	北海道大学大学院医学研究科内科学講座・第二内科 〒060-8638 札幌市北区北15条西7丁目 TEL(011)706-5913 FAX(011)707-7710	
経理事務担当	小笠原 美勝	北海道大学大学院医学研究科・医学部 医学系事務部会計課 TEL(011)706-5512 FAX(011)706-7873 e-mail gaibu@med.hokudai.ac.jp	係 長



(2) 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業  
統括報告書

新たな診断・治療法開発のための免疫学的手法の開発

主任研究者 小池 隆夫

北海道大学大学院医学研究科内科学講座・第二内科 教授

分担研究者

畠山 鎮次	北海道大学大学院医学研究科生化学講座 教授
渥美 達也	北海道大学大学院医学研究科内科学講座・第二内科 講師
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
山本 一彦	東京大学医学部アレルギーリウマチ内科 教授
上阪 等	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科膠原病・リウマチ内科学 准教授
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
桑名 正隆	慶應義塾大学内科 准教授
坂口 志文	京都大学再生医科学研究所 生体機能調節学 教授
三森 経世	京都大学大学院医学研究科・臨床免疫学 教授
千住 寛	熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学 准教授

研究総括要旨

難治性全身性自己免疫疾患は自己免疫現象がその発症機序といわれるが、その分子機構は未だ明らかではない。本研究では、自己免疫疾患の発症機序を分子レベルで明らかにし、その分子をマーカーにした診断法や、それをターゲットとした特異的治療法の開発を目的としている。

具体的には、1) 自己免疫の機序解明: 樹状細胞、Th17 細胞、制御性T細胞、NKT細胞等の免疫担当細胞の機能と自己免疫における意義(千住、山村、坂口、山本、住田)、2) 自己免疫疾患成立の機序解明: 自己抗体の産生機序と自己抗体の病原性の検討(桑名、渥美、小池)、3) 治療法開発: 新規自己免疫疾患動物モデルでの疾患発症や増悪にかかわる分子の検討(上阪)、および抗原特異的 T 細胞や転写因子に関与する新規分子を用いた疾患発症制御の検討(三森、畠山)を分担研究のテーマとして研究を推進している。

国内外で、免疫関連分子をターゲットにした治療は、一部の抗体療法を除いては未だ世界的なコンセンサスを得たものではなく、さらなる研究開発の必要性が提言されている。わが国の基礎免疫学は世界的レベルにあり多くの研究成果を輩出してき、基礎免疫学の成果と臨床免疫学を橋渡しする、いわば「応用免疫学」とよばれる分野の発達はわが国ではかならずしも十分とはいえない現状である。本研究は、基礎免疫学、臨床免疫学ならびに分子生物学の分野で世界をリードしている研究者で研究組織を構成し、難治性の全身性自己免疫疾患に対する診断法および先端的新規治療法の確立と開発を共同的かつ相乗的に行っている。

A. 研究目的

難治性の免疫疾患の治療は、現在ステロイド薬や免疫抑制薬による非特異的な免疫抑制療法が中心であり、一定の効果はあるものの、様々な合併症が患者のQoLを著しく損なうことが少なくない。より選択的、特異的かつ合併症

の少ない、難治性免疫疾患の完治をめざした新規治療法の開発、さらに適切な診断ツールにより早期診断法の確立が厚生労働省の特定疾患対策として緊急の課題である。本研究班は基礎免疫学、臨床免疫学ならびに分子生物学の分野で世界をリードしている10人で研究組織を構成し、

班員相互の議論と技術的交流を通じて、先端的かつオリジナリティーの高い研究成果を目指している。

## B. 研究方法

① 島山; NF- $\kappa$ B シグナルは上流の多様な膜受容体タンパク質の活性化の結果起こるが、NF- $\kappa$ B が核内に移行し転写活性化に影響をもたらす経路にはまだ分子論的には未解決な部分が多い。NF- $\kappa$ B の活性化機構には特に IKK キナーゼ複合体の活性化が知られているが、その上流には特殊なユビキチン化反応が重要である。このユビキチン化に関与する酵素である A20 の上流の制御分子及び下流の基質分子を網羅的に同定することで、分子レベルでの NF- $\kappa$ B シグナルにおける抑制機構を解明する。

② 渥美; 主要なループスアンチコアグラントの責任自己抗体のひとつはホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体 (aPS/PT) である。aPS/PT の病原性を検討する為、モノクローナル aPS/PT を作成し (231D)、その内皮細胞への効果を *in vitro* で調べた。内皮細胞は活性化時に外因系凝固カスケードのイニシエーターである組織因子を発現する主要な向凝固細胞と認識されている。

③ 住田; natural killer T (NKT) 細胞は NK マーカーと T 細胞抗原受容体 (TCR) を併せ持つユニークな細胞群である。その TCR  $\alpha$  鎖はマウスでは TCRV  $\alpha$  14、ヒトでは TCRV  $\alpha$  24 の均一な遺伝子を有する。CD1d 分子上に発現した糖脂質を抗原として認識し、INF- $\gamma$  および IL-4 を産生する。代表的な糖脂質は、合成  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GC) であり、自然に存在する抗原は iGb3 などである。本研究では関節リウマチにおける NKT 細胞の機能を検討した。

④ 山本; 自己免疫応答を抑制する制御性 T 細胞として CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞が知られている。しかし機能的 Foxp3 欠損マウスで炎症を生じない臓器も複数みられ、CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞以外の免疫寛容メカニズムの存在が推測されている。従来 IL-10 を産生する制御性 T 細胞として試験管内で誘導される Tr1 が報告されているが、マーカーなど生物学的特性が明らかでないことから生体内で恒常的に存在するかどうかは分かっていなかった。分担研究者らは最近生体内で恒常的に存在する CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞を同定し

た。この CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の IL-10 産生機構を検討した。

⑤ 上阪; 多発性筋炎 (PM) の新規マウスモデルである C 蛋白誘導性筋炎 (CIM) の特性を解析するとともに PM の新治療法を開発する。CIM 発症には自己反応性 T 細胞の存在と CFA 皮内投与による筋局所の自然免疫活性化とが必要であること、その中でも、CFA 処理により放出される炎症性サイトカインが、筋炎発症において重要であることが判明した。CIM の養子移入系は、CFA を下肢に皮内投与しておかないと、自己反応性 T 細胞を移入しても、筋炎を起こさないとという系であり、自己反応性 T 細胞の存在と筋局所の自然免疫活性化とを分けて検討できる。この養子移入系を用いて、どの炎症性サイトカインが治療標的としてより妥当であるかを検討した。さらに、CIM 誘導性 C 蛋白第 2 断片の内、細胞傷害性 T 細胞が認識する MHC クラス I エピトープ候補を見出し、このペプチドを用いて、細胞傷害性 T 細胞誘導性自己免疫性筋炎の誘導を試みた。

⑥ 山村; 近年、多発性硬化症 (Multiple Sclerosis: MS) に代表される種々の自己免疫疾患に対して、ATRA をはじめとするレチノイドによる Th17 細胞機能制御を介した新規治療アプローチの可能性が注目されている。本研究では、EAE と EAU という 2 種類のマウス病態モデルを併用することにより、合成レチノイド Am80 の病態抑制メカニズムの詳細を、Th17 細胞、制御性 T 細胞、抑制性サイトカイン IL-10 の挙動を中心に検討した。

⑦ 桑名; SLE の約 70% で抗二本鎖 DNA (dsDNA) 抗体が検出される。しかし抗 dsDNA 抗体は疾患活動性の低い症例でも陽性となることがしばしばあり、必ずしも疾患活動性を反映しない。一方、B 細胞に代表される抗体産生細胞は抗原特異的 T 細胞による刺激後、骨髄や脾臓から末梢血へ動員されることが知られている。したがって SLE 患者の一部、特に抗 dsDNA 抗体陽性例では末梢血中に抗 dsDNA 抗体産生細胞が存在する可能性が高い。そこで SLE 患者末梢血中の抗 dsDNA 抗体産生細胞を直接検出するアッセイを確立し、その診断や疾患活動性評価に対する有用性を検討した。さらに、抗 dsDNA 抗体産生細胞が末梢血中へ動員されるメカニズムもあわせて追究した。

⑧ 坂口; 制御性 T 細胞の免疫抑制機能の分子メカニズムに着目して研究することで、病的状態における制御性 T 細胞の機能評価方法の確立および制御性 T 細胞の機能制御による自己免疫反応の



制御法開発を目指す。制御性T細胞のマスター制御遺伝子FoxP3の分子レベルでの働きが明らかになれば、制御性T細胞の機能を動的にとらえることが出来る。また、CTLA-4は制御性T細胞の抑制機能に必要であり、CTLA-4による免疫制御メカニズムの解明は、制御性T細胞による抑制メカニズムの解明につながる。これらにより制御性T細胞の機能を評価するためのバイオマーカー候補と制御性T細胞の機能調節を目指した分子標的候補の検索を行った。

⑨三森;自己免疫疾患の治療は、疾患特異的な分子を標的にする方法があり、抗TNF- $\alpha$ 製剤を初めてとして大きな成功を収めている製剤がある。しかしこれらの製剤によってもコントロールできない症例があること、感染症・悪性腫瘍という副作用問題が存在すること、コスト面などまだまだ理想的な治療法とは言えない。近年IL-17を産生するTh17細胞の膠原病への関係が示唆され注目を集めている。しかし、これまでのデータの多くはモデル動物から得られたものであり、ヒトにおけるデータはまだ少ない。例えば関節炎モデルマウスにおけるIL-17産生細胞の病態への関与は、様々な実験結果より明らかであるが、関節リウマチ(RA)症例を用いた解析では否定的な報告もあり、まだ結論が出ていない。そこで関節炎モデルとしてコラーゲン誘導関節炎(CIA)およびSKGマウスという2つの関節炎モデルと、RAにおける罹患関節病変局所における浸潤細胞動態を詳細に解析し、IL-17がヒトRAの治療ターゲットに成り得るのか検証した。

⑩千住;マウスのES細胞をin vitroにおいて樹状細胞(ES-DC)へ分化させる技術、さらに遺伝子導入したES細胞をES-DCに分化させることにより、任意の遺伝子を発現するES-DCを作製する技術を開発した。これらの技術を用いて、種々の免疫抑制性分子を発現するES-DC(MHCハプロタイプ:H-2k/b)を作製し、これらの免疫抑制性ES-DCを、実験的に糖尿病を誘導したCBAマウス(MHCハプロタイプ:H-2k)に投与することにより、ES-DCと同系であるF1(CBA x C57BL/6)マウス(MHCハプロタイプ:H-2k/b)の膵島に対する免疫寛容を誘導して、膵島の生着を促進できるかどうか検討した。

## C. 研究結果

①畠山;ヒトB細胞株cDNAライブラリーよりA20

cDNAをクローニングし、そのcDNAをbaitとして酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行ったところ、現在まで機能が未知のタンパク質であるYmerが同定された。Ymerは、これまでにEGF受容体刺激下でチロシンリン酸化を受けるタンパク質として報告されているのみである。Ymerを細胞内に発現させたところ、A20との結合が確認された。また、Ymerに対する抗体を作製し、内在性のA20とYmerの結合も確認された。また、Ymerはリジン63を介したユビキチン鎖を認識し、RIP1の安定性に影響を及ぼすことが判明した。さらに、 $\beta$ -B-ルシフェラーゼレポーターにおける転写活性化に対して、YmerはA20と共に抑制的に作用することが判明した。Ymerの過剰発現により、足場非依存性増殖能が亢進することが明らかとなった。

②瀧美;231Dはプロトロンビンとカルシウムの存在下で内皮細胞を活性化し、細胞内シグナルであるp38 MAPKのリン酸化と、組織因子の発現亢進を認めた。組織因子の発現はp38MAPKのリン酸化に依存しており、p38阻害剤(SB203580)によって抑制された。aPS/PTによる細胞活性化は単球、血管内皮細胞に共通にp38-MAPK経路に依存することが判明した。

③住田;1)NKT KOマウスにおいては、関節炎の頻度および関節炎スコアがともにB6マウス(コントロールマウス)と比較して有意に低下していることが判明した。2)IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10はコントロールと比べて有意差は認められなかったが、IL-17の産生がNKT KOマウスにおいて有意に低下していた。3)NKT KOマウスにおいては、 $\alpha$ -GCによるIL-17の産生は全く認められなかった。一方、NKT細胞自身がIL-17を産生していた。4)NKT細胞は、Th17細胞と同様にROR $\gamma$ TおよびIL-23Rを発現していた。5) $\alpha$ -GC刺激によるNKT細胞からのIL-17産生はIL-23非依存的であることが判明した。

④山本;LAG-3をマーカーとして発現する細胞集団を、マウス脾臓のFACS解析で検討したところ、CD4陽性CD25陰性CD45RB陰性LAG3陽性T細胞(以下CD4陽性CD25陰性LAG3陽性T細胞と記載)を同定した。CD4陽性CD25陰性LAG3陽性T細胞はIL-10を高産生し、RAG1ノックアウトマウスへのCD45RB高発現CD4陽性T細胞の移入による腸炎の発症をIL-10依存的に抑制した。マイクロアレイ解析においても、CD4陽性CD25陰性LAG3陽性T細胞はEgr2、IL-10、LAG3、Blimp-1を高発現し、CD4陽性CD25陽性Foxp3陽性制御性T



細胞とは明らかに異なる遺伝子発現プロファイルであった。アナジ-関連遺伝子 Egr-2 に着目し解析したところ、Egr-2 遺伝子導入 CD4 陽性 T 細胞で IL-10, LAG-3, Blimp-1 の発現の亢進を認めた。さらに Egr-2 遺伝子導入 CD4 陽性 T 細胞は OVA によるマウス遅延型過敏反応を抑制した。機能的 Foxp3 欠損 Scurfy マウスにおいては、試験管内での抑制活性のある CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞が増加していた。

⑤上阪; CIM 養子移入系では、レシピエントへの IL-1 または TNF $\alpha$  標的療法は奏功したが、IL-6 標的療法は効果がなかった。エピトープ候補を、抗 CD40 抗体・poly (I:C)・百日咳毒素の組み合わせ方法で免疫したが、病理組織学的に大腿筋に筋炎を認められなかった。ただし、抗 CD40 抗体・poly (I:C)・百日咳毒素すべてを使用して免疫したマウスのリンパ節細胞または脾臓細胞は、ペプチド提示 EL-4 細胞への細胞傷害活性が認められた。また、ペプチド提示骨髄誘導性樹状細胞移入では、大腿筋に筋炎を確認できた。

⑥山村; 0.5%カルボキシメチルセルロース (CMC) に懸濁した Am80 の経口投与により、EAE に対する病態改善効果が得られた。このとき CNS 浸潤 T 細胞の IL-17 産生と ROR $\gamma$ t 発現は、Am80 投与により有意に減少したが、Foxp3 の発現増加は認められなかった。CNS 浸潤細胞の IL-17 産生と ROR $\gamma$ t 発現は、ずっと抑制され続けていたにもかかわらず、EAE 後期では Am80 の治療効果が減弱する傾向が認められた。このとき Am80 の投与群では、CNS 浸潤細胞の IL-10 産生が有意に抑制されており、Am80 の効果の消失に関わる可能性が考えられた。さらに CNS 中の IL-10 は、ROR $\gamma$ t/Foxp3 両陽性のユニークな細胞集団が産生することが示された。IRBP1-20 ペプチドを免疫した EAU マウスでは、Am80 投与群では、全観察期間を通じて眼球への細胞浸潤がほとんど消失し、総浸潤細胞数は CMC 投与群に対して 10% 以下に抑制された。眼球浸潤 CD4+T 細胞における ROR $\gamma$ t 発現および Foxp3 発現を調べたところ、Am80 は病態形成に伴う ROR $\gamma$ t の発現増加を抑制し Foxp3 発現の著明な増強を誘導することが明らかとなった。

⑦桑名; 末梢血中の抗 dsDNA 抗体産生細胞は SLE 患者 29 例 (22%) に検出された。SLE 患者を抗 dsDNA 抗体産生 B 細胞の有無で層別化すると、その存在は男性、抗 dsDNA 抗体価高値、リンパ球数低値、持続性蛋白尿、SLEDAI・SLAM 高値、多い PSL 投与量と関連した。SLE における IgG 抗 dsDNA 抗体産生 B 細胞数と IgG 抗 dsDNA 抗体価は

関連したが、相関係数は低かった ( $R^2=0.19$ ,  $p=0.026$ )。IgG 抗 dsDNA 抗体高値陽性 43 例 ( $>100$  IU/mL) を対象とすると、抗 dsDNA 抗体産生 B 細胞が検出された 25 例は、検出されない 18 症例に比べて SLEDAI、SLAM がいずれも有意に高かった ( $p<0.01$ ,  $p<0.01$ )。したがって抗 dsDNA 抗体産生細胞の検出は抗 dsDNA 抗体高値例の中で疾患活動性が高い症例の抽出に有用であった。CD19 および CD138 陽性細胞を除去した細胞集団を対象に ELISPOT 法を行ったところ、いずれの処理においても抗 dsDNA 抗体産生細胞数は減少したが、少数ながらもスポットが残存した。従って末梢血に抗 dsDNA 抗体を産生する細胞は B 細胞と CD138 陽性形質細胞の両者を含むことが明らかとなった。

⑧坂口; FoxP3 の転写因子 Runx1 などの結合因子を同定し、その分子メカニズムをこれまでに明らかにした。また、制御性 T 細胞の抑制活性に CTLA-4 が必要であることを示した。今後の FoxP3/Runx1 による遺伝子制御の全体像の解明、および CTLA-4 による免疫抑制機能の分子メカニズムの解析による制御性 T 細胞の免疫抑制機能の解明により、病的状態における制御性 T 細胞の機能を評価するためのバイオマーカー候補と制御性 T 細胞の機能調節を目指した分子標的の検索が可能になると考える。

⑨三森; CIA マウス罹患関節局所からは、ほぼ純粋な IL-17 産生細胞のみが検出され、IFN- $\gamma$  産生細胞は非常に少数であった。さらに、この IL-17A 産生細胞の大部分は Th17 細胞ではなく  $\gamma\delta$  T 細胞であり、CCR6、ROR $\gamma$ t を Th17 細胞同様発現していた。しかし特異抗原である II 型コラーゲン (CII) や TCR 刺激には低反応であり、IL-1 および IL-23 存在下で相乗的な IL-17A 産生誘導を認め、Th17 細胞の反応性と逆であった。次に関節炎を誘導した SKG マウスの罹患関節局所を解析したところ、意外な事に CIA マウスと比較して IL-17A 産生細胞はほぼすべて Th17 細胞であった。次に RA 症例から得られた、局所単核球サンプルを同様に解析したところ、IFN- $\gamma$  産生細胞が主であり IL-17A 産生  $\gamma\delta$  T 細胞はほとんど検出されなかった。

⑩千住; TRAIL を遺伝子導入した ES-DC (ES-DC-TRAIL) を先行投与したマウスにおいて、未治療コントロール群やその他の ES-DC 投与群に比べて、アロ腫島移植後に血糖値が正常化した期間の延長が観察された。さらに、ES-DC-TRAIL を投与した群では、末梢血液中の CD4+T 細胞に占

める Foxp3+制御性 T(Treg)細胞の頻度の増加が認められた。したがって、ES-DC-TRAIL は、Treg細胞の誘導を介して、アロ移植免疫における免疫寛容を誘導する可能性が示唆された。

#### D. 考察と総括

「新たな診断・治療法開発のための免疫学的手法の開発」を、基礎免疫学、臨床免疫学ならびに分子生物学の分野で世界をリードしている10人で各分担研究を開始した。あらたな病態解明のツールの構築から、近未来に治療応用可能なものまで、はばひろく多大な成果を上げつつある。来年度も本年度の成果を継承しつつ、免疫疾患の克服のための先端的研究を継続していく予定である。

### (3) 分担研究報告書



## 自己免疫疾患に関するユビキチン関連分子の治療に向けた応用

分担研究者 畠山 鎮次 北海道大学大学院医学研究科生化学講座 教授

### 研究要旨

自己免疫疾患を含む炎症性疾患には、多くのサイトカインが関与していることが知られている。特に腫瘍壊死因子 TNF やインターロイキン-1 や LPS 受容体などの炎症誘発性サイトカインは、NF- $\kappa$ B という転写因子の活性化を通じてその作用が仲介される。ユビキチン化修飾酵素 A20 は NF- $\kappa$ B の強力な阻害分子として報告されているが、その作用機序に関しては不明な点が多い。本研究において、A20 結合タンパク質を同定解析することで、診断や治療に役立つ知見を得る。

### A. 研究目的

NF- $\kappa$ B シグナルは上流の多様な膜受容体タンパク質の活性化の結果起こるが、NF- $\kappa$ B が核内に移行し転写活性化に影響をもたらす経路にはまだ分子論的には未解決な部分が多い。NF- $\kappa$ B の活性化機序には特に IKK キナーゼ複合体の活性化が知られているが、その上流には特殊なユビキチン化反応が重要である。本研究申請ではこのユビキチン化に関与する酵素である A20 の上流の制御分子及び下流の基質分子を網羅的に同定することで、分子レベルでの NF- $\kappa$ B シグナルにおける抑制機序を解明することを目的とする。

### B. 研究方法

ヒト B 細胞株 cDNA ライブラリーより全長 A20 cDNA をクローニングする。その cDNA を bait としてヒト B 細胞株 cDNA ライブラリーから酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行う。A20 結合タンパク質と推定されたタンパク質と A20 の結合を、in vitro 及び in vivo で確認する。さらに、NF- $\kappa$ B シグナルに対して作用を調べるために、A20 結合タンパク質存在下での  $\kappa$ B-ルシフェラーゼレポーターへの転写活性化の影響を検討する。A20 結合タンパク質の細胞増殖への影響を考察するために、足場非依存性増殖能を調べる。さらに、A20 結合タンパク質のトランスジェニックマウスを作製し、個体での機能を調べる。  
(倫理面への配慮)

動物実験に際しては「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」を遵守し、遺伝子改変マウス作製等に使用する実験用マウスは、使用数を必要最小限に抑えた上で頸椎脱臼等による安楽死で犠牲化を行う。

遺伝子組み換え体の取り扱いについては、「遺伝子組み換え等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」、ならびに「北海道大学遺伝子組み換え実験等安全管理規則」を遵守し施行する。また、遺伝子組み換え体についての実験は、既に大学内に申請及び許可済みの P1 (P1A)-P2 実験室にて行う。

### C. 研究結果

ヒト B 細胞株 cDNA ライブラリーより A20 cDNA をクローニングし、その cDNA を bait として酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行ったところ、現在まで機能が未知のタンパク質である Ymer が同定された。Ymer は、これまでに EGF 受容体刺激下でチロシンリン酸化を受けるタンパク質として報告されているのみである。Ymer を細胞内に発現させたところ、A20 との結合が確認された。また、Ymer に対する抗体を作製し、内在性の A20 と Ymer の結合も確認された。また、Ymer はリジン 63 を介したユビキチン鎖を認識し、RIP1 の安定性に影響を及ぼすことが判明した。さらに、 $\kappa$ B-ルシフェラーゼレポーターにおける転写活性化に対して、Ymer は A20 と共に抑制的に作用することが判明した。Ymer の過剰発現により、足場足場非依存性増殖能が亢進することが明らかとなった。また、全身性発現の Ymer トランスジェニックマウスを 2 系統樹立できた。

### D. 考察

本研究結果は、NF- $\kappa$ B 経路における制御酵素(ユビキチン化修飾酵素)である A20 の制御機構を解明したものである。これらの解明は、免疫系細胞の活性化及び増殖抑制の機序に重要な知見と言える。現在、Ymer のトランスジェニックマウスを作製できており、今後個体レベルで免疫細胞及び炎症関連細胞

における機能解析を遂行することが重要と考えられる。

#### E. 結論

A20 は NF- $\kappa$ B の強力な阻害分子として報告されているが、本研究において新たな A20 結合タンパク質として Ymer を同定し、生化学的及び細胞生物学的に解析したところ Ymer は NF- $\kappa$ B シグナルに抑制的に働くことが明らかとなった。

#### F. 健康危険情報

該当せず

#### G. 研究発表論文発表

##### 1. 論文発表

1) Kameda, H., Watanabe, M., Bohgaki, M., Tsukiyama, T. and Hatakeyama, S.: Inhibition of NF- $\kappa$ B signaling via tyrosine phosphorylation of Ymer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 378, 744-749, 2009.

2) Oshiumi, H., Matsumoto, M., Hatakeyama, S. and Seya, T: Riplet/RNF135, a RING-finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon- $\beta$  induction during the early phase of viral infection. *J. Biol. Chem.*, 284, 807-817, 2009.

3) Kano, S., Miyajima, N., Fukuda, S. and Hatakeyama, S.: TRIM32 facilitates cell growth and migration via degradation of Abl-interactor 2, *Cancer Res.*, 68, 5572-5580, 2008.

4) Miyajima, N., Maruyama, S., Bohgaki, M., Kano, S., Shigemura, M., Shinohara, N., Nonomura, K. and Hatakeyama, S.: TRIM68 regulates ligand-dependent transcription of androgen receptor in prostate cancer cells, *Cancer Res.*, 68, 3486-3494, 2008.

5) Takahata, M., Bohgaki, M., Tsukiyama, T., Kondo, T., Asaka, M. and Hatakeyama, S.: Ro52 functionally interacts with IgG1 and regulates its quality control via the ERAD system, *Mol. Immunol.*, 45, 2045-2054, 2008.

6) Bohgaki, M., Tsukiyama, T., Nakajima, A., Maruyama, S., Watanabe, M. Koike T. and Hatakeyama, S.: Involvement of Ymer in suppression of NF- $\kappa$ B activation by regulated interaction with lysine-63-linked polyubiquitin chain, *BBA-Mol. Cell Res.*, 1783 (5), 826-837, 2008.

7) Maruyama, S., Miyajima, N., Bohgaki, M.,

Tsukiyama, T., Shigemura, M., Nonomura, K. and Hatakeyama, S.: Ubiquitylation of  $\epsilon$ -COP by PIRH2 and regulation of the secretion of PSA, *Mol. Cell. Biochem.*, 307, 73-82, 2008

##### 2. 学会発表

1) 築山忠維、畠山鎮次: K63-ポリユビキチン鎖を介して NF- $\kappa$ B シグナルを抑制する Ymer 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・神戸・2008(12/9-12/12)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

##### 1. 特許取得

○なし

##### 2. 実用新案登録

○なし

##### 3. その他

○なし



## 抗プロトロンビン自己抗体による向血栓細胞活性化のメカニズム

分担研究者 渥美達也 北海道大学大学院医学研究科・内科学講座・第二内科 講師

### 研究要旨

主要なループスアンチコアグラントの責任自己抗体のひとつはホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体(aPS/PT)である。我々はこれまで aPS/PT の病原性を検討する為、モノクローナル aPS/PT を作成し(231D)、その単球への効果を *in vitro* で調べた。単球は活性化時に外因系凝固カスケードのイニシエーターである組織因子を発現する主要な向凝固細胞と認識されている。231D はプロトロンビンとカルシウムの存在下で単球細胞を活性化し、細胞内シグナルである p38 MAPK のリン酸化と、組織因子の発現亢進を認めた。組織因子の発現は p38MAPK のリン酸化に依存しており、p38 阻害剤 (SB203580) によって抑制された。一方、血管内皮細胞は単球と並んで主要な向凝固細胞である。今回、本研究において血管内皮細胞への 231D の効果を検討した。231D で処理した臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) はプロトロンビンとカルシウムの存在下に組織因子や接着因子 mRNA の発現亢進を認め、組織因子 mRNA の発現亢進は SB203580 によって抑制された。aPS/PT による細胞活性化は単球、血管内皮細胞に共通に p38-MAPK 経路に依存することが判明した。以上より、抗リン脂質抗体症候群の血栓傾向の病態のひとつとして、抗プロトロンビン抗体による向血栓細胞活性化とその経路が明らかとなった。

### A. 研究目的

抗リン脂質抗体症候群(APS)は血栓傾向を主症状とする自己免疫疾患で、それ単独で存在、または全身性エリテマトーデスの代表的な合併症のひとつでもある。APS 患者に存在する抗リン脂質抗体は血栓症をひき起こす病原性自己抗体と考えられている。抗リン脂質抗体の主要な対応抗原は $\beta$ 2-グリコプロテイン1とプロトロンビンであり、とりわけ抗プロトロンビン抗体は *in vitro* で抗凝固活性を示すループスアンチコアグラントの責任抗体であるとされる。分担研究者は、ホスファチジルセリンに結合したプロトロンビンを認識する「ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体(aPS/PT)」が血栓症の存在と強く相関し、真の血栓原性抗体である可能性を示し、また aPS/PT が *in vivo* および *in vitro* においてトロンビン生成を亢進させることを示した。更にこれまでの研究ではモノクローナル aPS/PT(231D)を作成し、*in vitro* での単球活性化能を有することを示した。これは aPS/PT の血栓原性のメカニズムの1つとして自己抗体による向凝固細胞活性化を示唆するものである。

本年は単球と並び主要な向凝固細胞である血管内皮細胞における aPS/PT による活性化を検討した。

### B. 研究方法

Balb/c マウスをヒトプロトロンビンで免疫して、aPS/PT アッセイでスクリーニングし、モノクローナル aPS/PT である 231D を樹立した。231D は APS 患者の aPS/PT とエピトープを共有し、高力価の lupus anticoagulant (LAC) 活性を有する。

細胞は、臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いて、プロトロンビン、CaCl<sub>2</sub> の共存下に 231D で刺激した。組織因子 mRNA 及び接着因子(PCAM-1、VCAM-1、selectin) mRNA は real time PCR で定量した。更に、aPS/PT の組織因子 mRNA 誘導における p38 阻害剤 (SB203580) の効果も検討した。

#### (倫理面への配慮)

本研究は培養細胞を用いた *in vitro* の実験によるもので、倫理的な問題は少ない。

### C. 研究結果

HUVEC における組織因子 mRNA、接着因子 mRNA の発現は、PT の存在下で 231D により増強された (図1、図2)。PSB203580 を加えることにより、231D による組織因子 mRNA 発現は抑制された (図3)。

### D. 考察

231D は、PS/PT への結合性やループスアンチコ



アグラント活性に関して、APS 患者にみられる aPS/PT と共通の特徴を有している。患者 IgG との PS/PT 上での部分的な競合は、231D が一部 aPS/PT 自己抗体とエピトープをシェアしていることを示す。すなわち、231D は APS 患者にみられる aPS/PT の免疫学のおよび凝血学的性質を代表していると考えられる。

一昨年までの検討で、通常はトロンビン生成を抑制する(すなわちループスアンチコアグラント活性をもつ)モノクローナル aPS/PT である 231D が、条件によってはプロトロンビナーゼによるトロンビン生成を増強することが示された。さらに、231D が直接向血栓細胞にその対応抗原であるプロトロンビンを介して結合し、刺激的に作用して組織因子を誘導し、血栓傾向となる可能性が示された。抗プロトロンビン抗体の結合は、231D とホスファチジルセリン非依存性モノクローナル抗体である 51A6 の反応性を考慮すると、細胞表面ホスファチジルセリンに結合したプロトロンビンを介していることが推定された。231D はホスファチジルセリンに結合したプロトロンビンに比較的選択的に結合すること、PLSCR1 を強く誘導するインターフェロン $\alpha$ がこの作用を増強することから、細胞表面のホスファチジルセリンの適量の存在が一連の 231D の向血栓作用に重要であると考えられていた。更に昨年及び本年の研究結果から、231D が p38MAPK を特異的にリン酸化して単球や血管内皮細胞を活性化することが示され、つまり p38MAPK は向血栓細胞共通に 231D による細胞刺激を伝達し向血栓傾向に至ると考えられた。この経路は、抗 $\beta$ 2-グリコпротеイン I 抗体(抗カルジオリピン抗体)による向血栓細胞活性化と共通である。まったく異なる対応抗原をもつ 2 種類の自己抗体が共通の機序で細胞の活性化と症候群(臨床症状)をおこすことは非常に興味深い。

#### E. 結論

APS 患者において、抗プロトロンビン自己抗体の病原性とその機序の一部が明らかとなった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Atsumi T, Amengual O, Koike T. Etiopathology of the Antiphospholipid syndrome, In: Tanaka K, Davie EW, editor. Recent Advances in Thrombosis and Haemostasis 2008. Tokyo: Springer Japan KK; 2008. p.521-35.

2. Amengual O, Atsumi T, Koike T. Antiphospholipid antibodies and the Antiphospholipid syndrome, In: Columbus F editor. New Research on Autoantibodies. NY: Nova Science Publishers (in press)

3. Bohgaki T, Atsumi T, Koike T. Autoimmune disease after autologous hematopoietic stem cell transplantation. Autoimmun Rev 7; 198-203, 2008

4. Kataoka H, Atsumi T, Hashimoto T, Horita T, Yasuda S, Koike T. Polymyalgia rheumatica as the manifestation of unclassified aortitis. Mod Rheumatol 18; 105-8, 2008

5. Atsumi T, Horita T, Minori T, Koike T. Exchange of information in Rheumatology between East and West : From Man'yo-shu to the Future. Arthritis Rheum 58; S140-2, 2008

6. Kon Y, Atsumi T, Hagiwara H, Furusaki A, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Amengual O, Takao K. Thrombotic microangiopathy in patients with phosphatidylserine dependent antiprothrombin antibodies and antiphospholipid syndrome. Clin Exp Rheumatol 26; 129-32, 2008

7. Oku K, Atsumi T, Amengual O, Koike T. Antiprothrombin antibody testing: detection and clinical utility. Semin Thromb Hemost 34; 335-9, 2008

8. 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; 1373-8, 2008

9. Oku K, Atsumi T, Bohgaki M, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Koike T. Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome. Ann Rheum Dis (in press)

10. Horita T, Atsumi T, Yoshida N, Nakagawa H,

Kataoka H, Yasuda S, and Koike T. STAT4 single nucleotide polymorphism, rs7574865 G/T, as a risk for antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* (in press)

11. Fukaya S, Yasuda S, Hashimoto T, Oku K, Kataoka H, Horita T, Atsumi T, Koike T. Clinical Features of Haemophagocytic Syndrome in Patients with Systemic Autoimmune Diseases: Analysis of 30 Cases. *Rheumatology* 47, 1686–91, 2008

12. Bohgaki T, Atsumi T, Bohgaki M, et al. Immunological reconstitution after autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with systemic sclerosis: relationship between clinical benefits and intensity of immunosuppression. *J Rheumatol* (in press)

13. Yamada H, Atsumi T, Kobashi G, Ota C, Kato EH, Tsuruga N, Ohta K, Yasuda S, Koike T, Minakami H. Antiphospholipid antibodies increase the risk of pregnancy-induced hypertension and adverse pregnancy outcomes. *J Reprod Immunol* 79, 188–95, 2009.

14. Harris AA, Kamishima T, Horita T, Atsumi T, Fujita N, Omatsu T, Onodera Y, Terae S, Koike T, Shirato H. Splenic Volume in Systemic Lupus Erythematosus. *Lupus* (in press)

15. Sakai Y, Atsumi T, Ieko M, Amengual O, Furukawa S, Furusaki A, Bohgaki M, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Koike T. The effects of phosphatidylserine dependent antiprothrombin antibody on thrombin generation. *Arthritis Rheum* (in press)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）  
該当なし

#### I. 謝辞

本研究は、北海道大学大学院医学研究科・内科学 奥健志大学院生の御協力および小池隆夫教授の御指導でおこなわれた。各先生に深謝する。

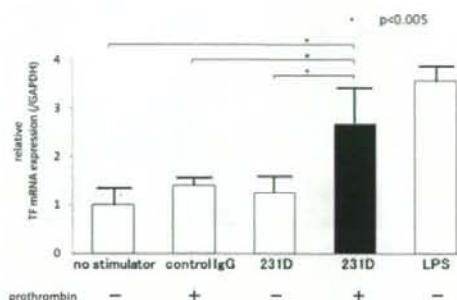


図1 231D 投与下の HUVEC における組織因子 mRNA の発現

231D をプロトロンビンとカルシウムの存在下に HUVEC に投与し組織因子 mRNA を定量した。

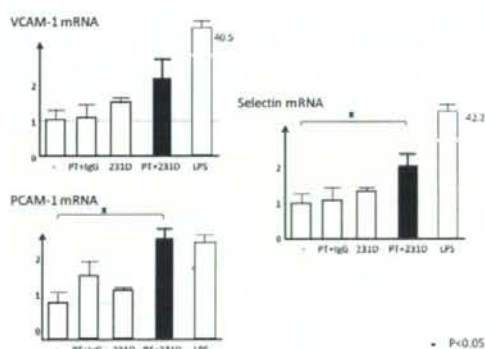


図2 231D 投与下の HUVEC における接着因子 mRNA の発現

231D をプロトロンビンとカルシウムの存在下で HUVEC に加え、接着因子 mRNA を定量した。

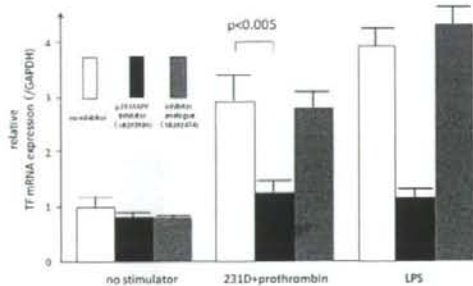


図3 組織因子 mRNA の発現における p38MAPK インヒビターの効果

231D をプロトロンビンとカルシウムの存在下で HUVEC に加え、組織因子 mRNA 発現に対する SB203580 の効果をリアルタイム PCR で検討した。



## IL-17 産生 NKT 細胞を介した関節炎の制御に関する研究

分担研究者 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: 吉賀 洋平、瀬川 誠司、後藤 大輔

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

関節リウマチにおける NKT 細胞の機能を解析するために、NKT ノックアウトマウスとコラーゲンタイプ II(CII)誘導関節炎を組み合わせることで検討した。その結果、1)NKT 細胞が関節炎発症に重要である事、2)NKT 細胞が CII 反応性 T 細胞からの IL-17 産生を誘導すること、3)NKT 細胞自身が IL-17 を産生すること、4)IL-17 産生 NKT 細胞は主に NK1.1-NKT 細胞であること、5) NKT 細胞からの IL-17 産生機序は、IL-23R を介した pathway と  $\alpha$ -GC-TCR を介した IL-23 非依存的な pathway の二通りがあること、が判明した。今後、本研究成果をふまえて、NKT 細胞をターゲットとした関節炎治療戦略の開発を進める。

### A. 研究目的

natural killer T (NKT)細胞は NK マーカーと T 細胞抗原受容体(TCR)を併せ持つユニークな細胞群である。その TCR  $\alpha$  鎖はマウスでは TCRV  $\alpha$  14、ヒトでは TCRV  $\alpha$  24 の均一な遺伝子を有する。CD1d 分子上に発現した糖脂質を抗原として認識し、INF- $\gamma$  および IL-4 を産生する。代表的な糖脂質は、合成  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GC)であり、自然に存在する抗原は iGb3 などである。関節リウマチにおける NKT 細胞の役割は未だ明らかにされていない。本研究の目的は、関節リウマチにおける NKT 細胞の機能を明らかにすることである。

### B. 研究方法

1) C57BL/6(B6)マウスバックグラウンドの TCRV  $\alpha$  14J  $\alpha$  281 遺伝子ノックアウトマウス(NKT KO マウス)を用いて、コラーゲンタイプ II (CII) を CFA をアジュバントとして二回免疫することにより関節炎(CIA)の誘導を試みた。2)NKT KO マウスから所属リンパ節細胞より採取したリンパ球を用いて、CII に対する Th1、Th2、Th17 細胞由来サイトカインの産生を ELISA 法および細胞内サイトカイン産生検出法により検討した。3)NKT KO マウス由来の脾細胞を用いて  $\alpha$ -GC で *in vitro* で刺激して IL-17 産生細胞について ELISA 法およびフローサイト法で検討しコントロールの B6 マウスと比較した。4)  $\alpha$ -GC で刺

激した NKT 細胞について、ROR  $\gamma$ T、IL-23R の発現について RT-PCR 法で検討した。5)IL-17 産生における IL-23 の関与を明らかにするために、APC (CD11c+細胞)と NKT 細胞 (CD3+CD1d+tet+) とを IL-23、 $\alpha$ -GC、IL-23+ $\alpha$ -GC と共培養し IL-17 の産生について ELISA 法で検討した。

### (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)NKT KO マウスにおいては、関節炎の頻度および関節炎スコアがともに B6 マウス (コントロールマウス)と比較して有意に低下していることが判明した。2)INF- $\gamma$ 、IL-4、IL-10 はコントロールと比べて有意差は認められなかったが、IL-17 の産生が NKT KO マウスにおいて有意に低下していた。3)NKT KO マウスにおいては、 $\alpha$ -GC による IL-17 の産生は全く認められなかった。一方、NKT 細胞自身が IL-17 を産生していた。4)NKT 細胞は、Th17 細胞と同様に ROR  $\gamma$ T および IL-23R を発現してい

た。5)  $\alpha$ -GC 刺激による NKT 細胞からの IL-17 産生は IL-23 非依存的であることが判明した。

#### D. E. 考察と結論

NKT 細胞自身が  $\alpha$ -GC 刺激により IL-17 を産生することが判明した。その機序は ROR  $\gamma$ T を介しているが、IL-23 には非依存的である。CIA において、NKT 細胞は自らおよび Th17 細胞を介して IL-17 を産生し関節の増悪に関わっていることが明らかにされた。今後、IL-17 産生 NKT 細胞の抗原特異的制御法を確立し CIA のあらたな治療戦略の開発を目指す。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 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 $\alpha$  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.

#### H. 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



**結果1**  
NKT細胞欠損マウスにおけるコラーゲン誘導性関節炎の発症

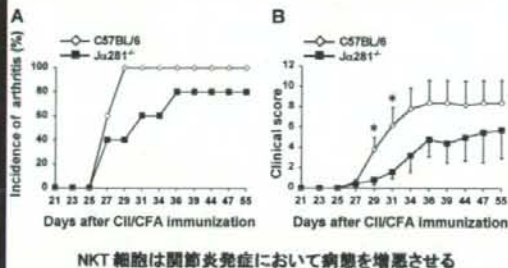


図1 NKTKO マウスにおいて CIA の発症頻度、関節炎スコアが低下

**結果 2-1**  
NKT細胞欠損マウスにおける自己反応性 T細胞応答

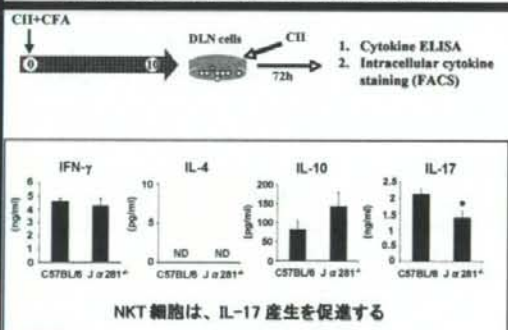


図2 NKTKO マウスにおいて CII 反応性 T細胞からの IL-17 産生が有意に低下

**結果 2-2**  
NKT細胞欠損マウスにおける自己反応性 T細胞応答

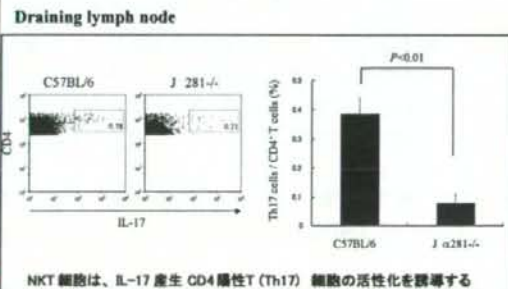


図3 NKTKO マウスにおいて IL-17 産生は抑制されている

**結果 4**  
IL-17 産生 NKT細胞の機能解析

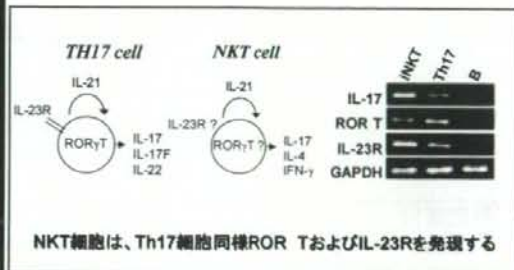


図4 NKT細胞も RORyt および IL-23R を発現

**結果 5-1**  
IL-17 産生 NKT細胞の IL-23 依存性

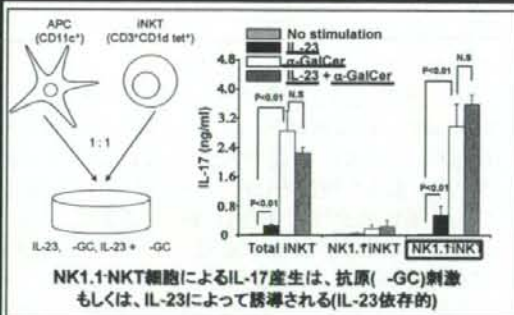


図5 IL-17 の産生は NK1.1-NKT 細胞から産生され、IL-23 依存性的および IL-23 非依存性的な機序がある

**結果 5-2**  
IL-17 産生 NKT細胞の IL-23 依存性

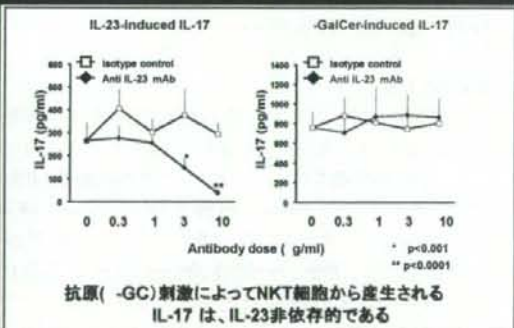


図6 NKT細胞は $\alpha$ -GCにより IL-23 非依存的に IL-17 を産生する