

- Kanmaru Y, Ohsawa I, Tomino Y, Takasaki Y. Improvement of rapidly progressive lupus nephritis associated MPO-ANCA with tacrolimus. *Mod Rheumatol*. 2010 Jan 15. [Epub ahead of print]
2. Santiago-Raber ML, Amano H, Amano E, Fossati-Jimack L, Kim Swee L, Rolink A, Izui S. Evidence that Yaa-induced Loss of Marginal Zone B Cells is a Result of Dendritic Cell-mediated Enhanced Activation *J Autoimmun*. 2010 in press.
 3. Shimane K, Kochi Y, Horita T, Ikari K, Amano H, Hirakata M, Okamoto A, Yamada R, Myouzen K, Suzuki A, Kubo M, Atsumi T, Koike T, Takasaki Y, Morohara S, Yamanaka H, Nakamura Y, Yamamoto K. The association of nonsynonymous single-nucleotide polymorphism in TNFAIP3 with systemic Lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Arthritis Rheumatism*. 62:574-579, 2010.
 4. Lin Q, Hou R, Sato A, Ohtsuiji M, Ohtsuiji N, Nishikawa K, Tsurui H, Amano H, Amano E, Sudo K, Nishimura H, Shirai T, Hirose S. Inhibitory IgG Fc receptor promoter region polymorphism is a key genetic element for murine systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun*. 2009 Sep 14.
 5. Minowa K, Nakiri Y, Lee S, Amano H, Morimoto S, Tamura N, Tokano Y, Takasaki Y. Examination of availability of the criteria for protective therapy against *Pneumocystis pneumonia*. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 32:256-62, 2009.
 6. Santiago-Raber ML, Amano H, Amano E, Baudino L, Otani M, Lin Q, Nimmerjahn F, Verbeek JS, Ravetch JV, Takasaki Y, Hirose S, Izui S. Fcγ receptor-dependent expansion of a hyperactive monocyte subset in lupus-prone mice. *Arthritis Rheum*. 60:2408-17, 2009.
2. 学会発表
 1. 天野浩文, 天野恵理, 仲野総一郎, 安藤誠一郎, 箕輪健太郎, 渡邊崇, 森本真司, 林青順, 広瀬幸子, 戸叶嘉明, 高崎芳成. Toll-like receptor(TLR)とリウマチ性疾患. 第53回日本リウマチ学会総会・学術集会. 東京 2009.4.23-26.
 2. 仲野総一郎, 天野浩文, 田嶋美智子, 安藤誠一郎, 箕輪健太郎, 渡邊崇, 森本真司, 戸叶嘉明, 高崎芳成. 全身性エリテマトーデスにおける UNC93B 発現の検討. 第53回日本リウマチ学会総会・学術集会. 東京 2009.4.23-26.
 3. 森本真司, 渡邊崇, 仲野総一郎, 天野浩文, 高崎芳成. 増殖性ループス腎炎におけるタクロリムスの効果の検討<寛解維持療法における有用性を中心に>. 第53回日本リウマチ学会総会・学術集会. 東京 2009.4.23-26.
 4. 箕輪健太郎, 安藤誠一郎, 渡邊崇, 仲野総一郎, 名切裕, 満尾晶子, 天野浩文, 森本真司, 戸叶嘉明, 高崎芳成. 橋本脳症を合併した SLE 患者の1例. 第53回日本リウマチ学会総会・学術集会. 東京 2009.4.23-26.
 5. 杉崎良親, 森本真司, 小笠原倫大, 天野浩文, 田村直人, 高崎芳成. ステロイド治療で発熱・耳鳴・難聴・眩暈症状の改善をみた Cogan 症候群の1例. 第53回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2009.4.23-26.
 6. 森本真司, 玉山容碩, 仲野総一郎, 渡邊崇, 天野浩文, 戸叶嘉明, 小暮敏明, 高崎芳成. コラーゲン誘発性関節炎における補中益気湯の IL-17 抑制による関節炎抑制効果の検討. 第53回日本リウマチ学会総会・学術集会. 東京 2009.4.23-26.
 7. 森本真司, 玉山容碩, 安藤誠一郎, 渡邊崇, 仲野総一郎, 天野浩文, 小暮敏明, 高崎芳成. コラーゲン誘発性関節炎における補中益気湯に IL-17 抑制による関節炎抑制効果の検討. 第37回日本臨床免疫学会総会. 東京 2009.11.13-15.
 8. 渡邊崇, 仲野総一郎, 天野浩文, 森本真司, 戸叶嘉明, 高崎芳成. 急性期 SLE を中心とする異所性リンパ組織の産生及び免疫反応の有無についての検討. 第37回日本臨床免疫学会総会. 2009.11.13-15.
 - H. 知的財産権の出願・登録状況
 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 細胞免疫寛容破綻における *Fcgr2b* および *Slam* 遺伝子多型効果の分離に関する研究

研究分担者 広瀬 幸子 順天堂大学医学部分子病態病理学 先任准教授

研究要旨 第1染色体テロメアには多くの SLE 感受性遺伝子が存在し、中でも *Fcgr2b* および *Slam* 遺伝子多型の関与が注目される。正常 B6 マウス系に SLE 型 *Fcgr2b* 多型と SLE 型 *Slam* 多型を導入したマウス系には、自己抗体産生および腎炎の発症がみられ、また、SLE 型 *Slam* 多型のみを導入すると、自己抗体産生の亢進が見られると報告されている。本研究では、B6 マウス系に SLE 型 *Fcgr2b* 多型のみを導入したマウス系の作製により、SLE 型 *Slam* 多型の効果から分離して、SLE 型 *Fcgr2b* 多型の役割について解析した。

A. 研究目的

我々は、BXS B マウスの SLE 型 *Fcgr2b* 多型と SLE 型 *Slam* 多型のうち、前者を正常マウス型に入れ換えると、自己抗体産生が抑制されたのに対して、後者を正常マウス型に入れ換えても高度の自己抗体産生に変化が見られなかったことから、BXS B においては、SLE 型 *Fcgr2b* が B 細胞免疫寛容破綻の主要因であるという結果を得た。

一方、正常 B6 マウス系に SLE 型 *Fcgr2b* 多型と SLE 型 *Slam* 多型を導入したマウス系には、自己抗体産生および腎炎の発症がみられ、また、SLE 型 *Slam* 多型のみを導入すると、自己抗体産生の亢進が見られ、さらに *Yaa* 遺伝子の導入を追加すると腎炎発症に至ると報告されている。この結果は、*Fcgr2b* および *Slam* 遺伝子多型は SLE 感受性に対して相加的、相乗的に作用する可能性を示唆している。

本研究では、これら2つの遺伝子効果を分離して解析することを目的とする。

B. 研究方法

1) B6 マウスに SLE 型 *Fcgr2b* 多型(Ly17.1)を導入したコンジュニックマウス(B6.Ly17.1)、これに *Yaa* (Y chromosome-linked autoimmune acceleration)遺伝子変異を追加導入したコンジュニックマウス(B6.Ly17.1.*Yaa*)を作製した。

2) *Yaa* を持つ B6.*Yaa*、BXS B および今回樹立した B6.Ly17.1.*Yaa* を用いて、自己抗体産生能、

ループス腎炎の発症の程度について、比較解析を行なった。

(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験指針に基づいて行なった。

C. 研究結果

1) B6.*Yaa* には自己抗体産生、腎炎の発症は見られなかったが、B6.Ly17.1.*Yaa* には、BXS B マウスと同様に高力価の自己抗体の産生と、高度の腎病変の発症が認められた (図1 A, B)。

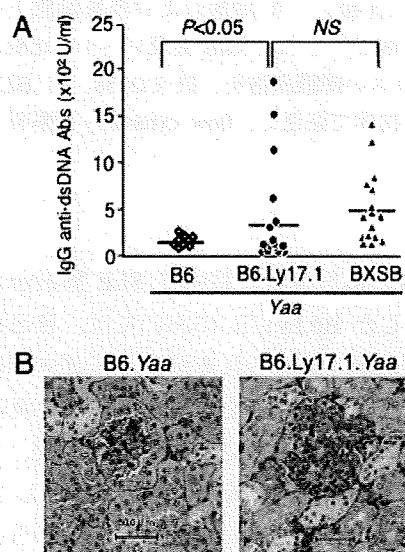


図1. (A) B6.*Yaa*, B6.Ly17.1.*Yaa* および BXS B マウスの6ヶ月齢における血中IgG抗dsDNA抗体価の比較。(B) B6.*Yaa* および B6.Ly17.1.*Yaa* マウスの8ヶ月齢における腎系球体病変の比較(PAS染色)。

2) B6.*Yaa* および B6.Ly17.1.*Yaa* マウスの脾臓における形質細胞の比率および *Fcgr2b* 遺伝子にコードされる抑制型 $Fc\gamma$ RIIB 分子の発現レベルを比較した。その結果、形質細胞比率は、前者に比べて後者で高く、また、2.4G2 抗体で解析した $Fc\gamma$ RIIB 分子の発現レベルは前者で高く、後者では発現レベルが高度に抑制されていた。一方、B 細胞上の $Fc\gamma$ RIIB 発現レベルには両者で差は見られなかった (図 2)。

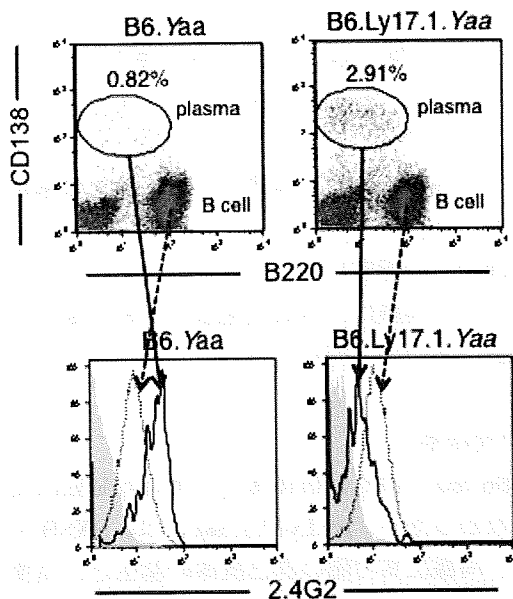


図 2. B6.*Yaa* および B6.Ly17.1.*Yaa* マウスの脾臓の形質細胞比率の比較と、B 細胞および形質細胞上の 2.4G2 抗体で解析した $Fc\gamma$ RIIB 発現レベルの比較。8ヶ月齢マウスの脾臓細胞を、抗 CD138、抗 B220 抗体、2.4G2 抗体で染色し、flow cytometry で解析した。

D. 考察

B6 マウスの遺伝背景において、SLE 型 *Fcgr2b* 多型を導入した B6.Ly17.1 においては、自己抗体産生能の亢進は認められるが、ループス腎炎の発症には至らないことを、我々は以前に見出している (J. Immunol. 169:4340, 2002)。今回、さらに *Yaa* 遺伝子変異を追加導入した B6.Ly17.1.*Yaa* マウス系を樹立したところ、BXSB と同程度の自己抗体産生と高度のループス腎炎の発症が認められた。B6.*Yaa* には自己抗体産生は認められないことから、SLE 型 *Fcgr2b* 多型 (Ly17.1) が、B6.Ly17.1.*Yaa* マウスの SLE 発症に関与している。また、B6.Ly17.1.*Yaa* マウス

の形質細胞上の抑制分子 $Fc\gamma$ RIIB 発現レベルの低下が、形質細胞のアポトーシスを抑制し、その結果 B6.*Yaa* に比較して形質細胞比率が増すと考えられた。

B6.Ly17.1.*Yaa* は SLE 型 *Fcgr2b* 多型および B6 型 *Slam* 多型を持ち、BXSB は SLE 型 *Fcgr2b* 多型および SLE 型 *Slam* 多型を持っている。B6.Ly17.1.*Yaa* は BXSB と同様に高度のループス腎炎を発症するが、現在までの解析では、その発症時期は BXSB に比較してやや遅れる傾向が見られている。今後、病態の差を詳細に検討し、SLE 型 *Slam* 多型の役割を明らかにしたい。

E. 結論

SLE 型 *Fcgr2b* 多型は、B 細胞免疫寛容破綻をきたす素因を提供し、*Yaa* 変異遺伝子の存在の下で高度のループス腎炎を誘発することが明らかとなった。また、SLE 型 *Slam* 多型は、この病態の発症を促進する可能性が示唆され、今後その機序について解析する予定である。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Abe Y, Ohtsuji M, Ohtsuji N, Lin Q, Tsurui H, Nakae S, Shirai T, Sudo K, Hirose S. Ankylosing enthesitis associated with up-regulated IFN- γ and IL-17 production in (BXSB x NZB) F1 male mice; a new mouse model. Mod. Rheum. 19:316-322, 2009.

2. Hou R, Ohtsuji M, Ohtsuji N, Zhang L, Adachi T, Hirose S, 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. 380:193-197, 2009.

3. Santiago-Raber M-L, Amano H, Amano E, Baudino L, Otani M, Lin Q, Nimmerjahn F, Sijf Verbeek J, Ravetch JV, Takasaki Y, Hirose S, Izui S. $Fc\gamma$ R-dependent expansion of a hyperactive

monocyte subset in lupus-prone mice. *Arthritis Rheum.* 60:2408-2417, 2009.

4. Kamimura Y, Kobori H, Piao J, Hashiguchi M, Matsumoto K, Hirose S, Azuma M. Possible involvement of soluble B7-H4 in T cell-mediated inflammatory immune responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 389:349-353, 2009.

5. Lin Q, Hou R, Sato A, Ohtsuiji M, Ohtsuiji N, Nishikawa K, Tsurui H, Amano H, Amano E, Sudo K, Nishimura H, Shirai T, Hirose S. Inhibitory IgG Fc receptor promoter region polymorphism is a key genetic element for systemic lupus erythematosus. *J. Autoimmun.* 33: in press, 2009.

6. Shimura E, Hozumi N, Kanagawa O, Chambon P, Freddy Radtke F, Hirose S, Nakano N. Epidermal precancerous cellular dysregulation triggers inhabitant $\gamma\delta$ T cells to initiate immune responses. *Int. Immunol.* 2010, in press

2. 学会発表

1. 天野浩文、天野恵理、仲野総一郎、安藤誠一郎、箕輪健太郎、渡辺崇、森本真司、林青順、広瀬幸子、戸叶嘉明、高崎芳成. Toll-like receptor(TLR)とリウマチ性疾患:第53回日本リウマチ学会総会・学術集会記録 121頁 2009

2. 大辻希樹、林青順、西村裕之、須藤カツ子、白井俊一、広瀬幸子. IFN- γ およびIL-17産生亢進を伴う新しい関節炎モデル:第53回日本リウマチ学会総会・学術集会記録 374頁 2009

3. 広瀬幸子、林青順、大辻希樹、大辻奈穂美、白井俊一 ワークショップ2 動物モデルを用いた治療戦略の開発 WS2-4 抑制性IgG Fcレセプターの発現亢進によるSLEの抑制 第98回日本病理学会総会 日本病理学会会誌 98(1):165, 2009

4. TSURUI Hiromichi, HIROSE Sachiko. Phagocytosis specific autofluorescence observed in marginal metallophilic macrophages. 第39回日本

免疫学会総会・学術集会記録 28頁 2009

5. Wang Yingge, ITO Satoshi, SUZUKI Mizuho, SUGIHARA Makoto, HAYASHI Taichi, GOTO Daisuke, MATSUMOTO Isao, LIN Qingshun, HIROSE Sachiko, SUMIDA Takayuki, Laser microdissection analysis of T cells infiltrating in kidney lesions of lupus-prone mouse models. 第39回日本免疫学会総会・学術集会記録 71頁 2009

6. 福永加奈美、相澤ゆかり、大辻希樹、西川桂子、大辻奈穂美、鶴井博理、中江進、須藤カツ子、白井俊一、小寺洋、広瀬幸子、西村裕之. 新しい硬直性腱付着部炎モデルマウスを用いた疾患感受性遺伝子解析の試み 第39回日本免疫学会総会・学術集会記録 154頁 2009

7. HOU Rong, OHTSUJI Mareki, OHTSUJI Naomi, ZHANG Li, ADACHI Takahiro, HIROSE Sachiko, TSUBATA Takeshi. Centromeric interval of chromosome 4 derived from C57BL/6 mice accelerates type I diabetes in NOD.CD72b congenic mice. 第39回日本免疫学会総会・学術集会記録 162頁 2009

8. OBATA Masaomi, FUJII Makuma, KODERA Yo, OHTSUJI Mareki, SHIRAI Toshikazu, HIROSE Sachiko, NISHIMURA Hiroyuki. Mechanism of Th-cell tolerance induced with tolerogenic protein antigen conjugated with polyethylene glycol(PEG). 第39回日本免疫学会総会・学術集会記録 176頁 2009

9. SATO Aya, HOU Rong, LIN Qingshun, OHTSUJI Mareki, ADACHI Takahiro, HIROSE Sachiko, TSUBATA Takeshi. Role of CD72 polymorphism for autoimmune disease. 第39回日本免疫学会総会・学術集会記録 252頁 2009

10. XU Miduo, HOU Rong, OHTSUJI Mareki, OHTSUJI Naomi, ADACHI Takahiro, HIROSE Sachiko, TSUBATA Takeshi. CD72 modulates the development of lupus-like disease in B61pr/lpr

mice. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会記録 252 頁 2009

11. LIN Qingshun, HOU Rong, SATO Aya, TSURUI Hiromichi, OHTSUJI Mareki, OHTSUJI Naomi, NISHIKAWA Keiko, NISHIMURA Hiroyuki, SUDO Katsuko, SHIRAI Toshikazu, HIROSE Sachiko. Fcgr2b promoter region polymorphism is a key genetic element for breakdown of self-reactive B cell tolerance. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会記録 253 頁 2009

12. 北畠正大、五十嵐英哉、戸田哲平、大辻希樹、鶴井博理、広瀬幸子、坂口薫雄. G5PR that suppresses JNK-mediated Bim phosphorylation is increased in B-1 cells associated with autoimmunity. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会記録 256 頁 2009

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

全身性エリテマトーデス感受性遺伝子探索用いる 2 x 3 分割表の幾何学的研究に関する研究

研究分担者 山田 亮 京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター統計遺伝学分野 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として、低検定P値領域での統計量の挙動、並びに、低アレル頻度多型に対する検定統計量の挙動が、定型的検定手法においてゆがむという問題がある。本研究では、その歪みの定性的・定量的評価をするとともに、その補正方法について考察を進めた。

A. 研究目的

全身性ループスエリテマトーデスの発病感受性遺伝子多型の同定にあたり、低頻度多型を標的にすることの重要性が認識されている。低頻度多型に対して統計学的検定が繰り返し実施されることになるが、その結果をゲノムワイドスタディの文脈で解釈するために、最も基本となる 2 x 3 分割表の検定手法について検討する。

B. 研究方法

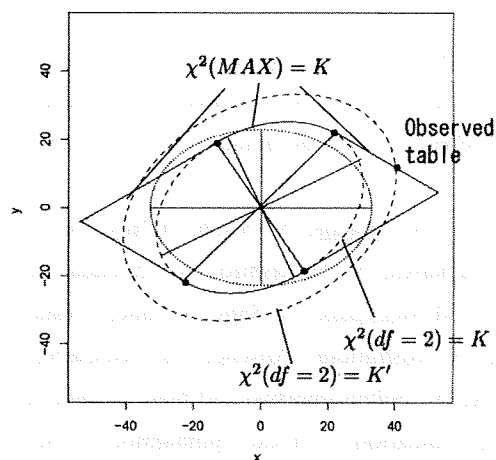
2 x 3 分割表の独立性検定は自由度 2 である。この検定を幾何学的に解釈し、遺伝学的・生物学的に妥当な統計量である MAX 統計量検定 (OMTT 検定) の統計量の幾何学的特徴を探索することで、その統計量の評価法を考案する。

(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

3 ジェノタイプの頻度分布の図示方法として、集団遺伝学で用いられてきた de Finetti diagram を 2 x 3 表用に拡張し、新規図示方法 Double Trianglediagram を考案した。さらに、SNP の 2 x 3 分割表に適用される複数の検定統計量が同 diagram 上での挙動を明らかにした。



D. 考察

ゲノムワイドスタディでは、従来の統計手法で用いられた近似が成り立ちにくい場合を対象にすることが少なくない。マルチプルテストニングによるタイプ 1 エラー閾値の変化もその 1 つである。そのような場合には、従来からの統計手法を再評価することで、適切な活用方法を見いだすことが適切である。評価方法を新しくすることは、根本的な再評価を可能にすることから、本研究によって考案された新規 diagram の意義は大きい。

E. 結論

MAX 検定 (OMTT 検定) は遺伝学的に最も適切な 2 x 3 表用の検定手法であるが、実用にあたっては、P 値の算出をはじめとするいくつかの課題が残っている。本研究では、2 x 3 分割表を幾何学的に考察することにより、その課題克服のための問題設定を可能とした。

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. Y Okada, A Suzuki, R Yamada, Y Kochi, K Shimane, K Myouzen, M Kubo, Y Nakamura, K Yamamoto. HLA-DRB1*0901 lowers anti-cyclic citrullinated peptide antibody levels in Japanese patients with rheumatoid arthritis Ann Rheum Dis. (in press)
2. Y Kochi, A Suzuki, R Yamada, K Yamamoto. Genetics of rheumatoid arthritis : underlying evidence of ethnic differences. J Autoimmun 32: 3-4. 158-62, 2009.
3. H Nakanishi, R Yamada, N Gotoh, H Hayashi, A Otani, A Tsujikawa, K Yamashiro, N Shimada, K Ohno-Matsui, M Mochizuki, M Saito, K Saito, T Iida, F Matsuda, N Yoshimura. Absence of association between COL1A1 polymorphisms and high myopia in the Japanese population Invest Ophthalmol Vis Sci 50: 2. 544-50, 2009.
4. Y Kochi, K Myouzen, R Yamada, A Suzuki, T Kurosaki, Y Nakamura, K Yamamoto. FCRL3, an autoimmune susceptibility gene, has inhibitory potential on B-cell receptor-mediated signaling J Immunol 183: 9. 5502-10, 2009.
5. N Gotoh, H Nakanishi, H Hayashi, R Yamada, A Otani, A Tsujikawa, K Yamashiro, H Tamura, M Saito, K Saito, T Iida, F Matsuda, N Yoshimura. ARMS2 (LOC387715) variants in Japanese patients with exudative age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. Am J Ophthalmol 147: 6. 1037-41, 2009.
6. H Nakanishi, R Yamada, N Gotoh, H Hayashi, K Yamashiro, N Shimada, K Ohno-Matsui, M Mochizuki, M Saito, T Iida, K Matsuo, K Tajima, N Yoshimura, F Matsuda. A genome-wide association analysis identified a novel susceptible locus for pathological myopia at 11q24.1 PLoS Genet 5: 9, 2009.
7. Yuta Kochi, Keiko Myouzen, Ryo Yamada, Akari Suzuki, Tomohiro Kurosaki, Yusuke Nakamura,

Kazuhiko Yamamoto. FCRL3, an autoimmune susceptibility gene, has inhibitory potential on B-cell receptor-mediated signaling. J Immunol 183: 9. 5502-5510, 2009.

8. R Yamada, Y Okada. An optimal dose-effect mode trend test for SNP genotype tables Genet Epidemiol 33: 2. 114-127, 2009.

9. R Yamada. How to measure genetic heterogeneity Journal of Physics. : Conference Series 197, 2009.

10. Y Okada, R Yamada, A Suzuki, Y Kochi, K Shimane, K Myouzen, M Kubo, Y Nakamura, K Yamamoto. Contribution of a haplotype in the HLA region to anti-cyclic citrullinated peptide antibody positivity in rheumatoid arthritis, independently of HLA-DRB1 Arthritis Rheum 60: 12. 3582-359, 2009.

11. K Shimane, Y Kochi, R Yamada, Y Okada, A Suzuki, A Miyatake, M Kubo, Y Nakamura, K Yamamoto. A single nucleotide polymorphism in the IRF5 promoter region is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in the Japanese population Ann Rheum Dis 68: 3. 377-83, 2009.

12. M Wada, H Marusawa, R Yamada, A Nasu, Y Osaki, M Kudo, M Nabeshima, Y Fukuda, T Chiba, F Matsuda. Association of genetic polymorphisms with interferon-induced haematologic adverse effects in chronic hepatitis C patients J Viral Hepat 16: 6. 388-96, 2009.

2. 学会発表

なし

3. 成果公開

京都大学に異動し、新規に研究室ウェブサーバを構築の上、既公開のアプリケーションを再公開するとともに、アプリケーションを拡充した。

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 財団法人乙卯研究所 首藤 紘一 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。本薬は非常に有効な急性前骨髄球性白血病の治療薬として承認されている。それとは独立にあるいは関係して、本薬は自己免疫性疾患の治療(たとえば乾癬)に有効であり、多くの動物の自己免疫疾患モデルで明確な治療効果をしめす。このことは、レチノイン酸あるいは本薬は近年の研究でT細胞の分化において、Th1への分化を抑制することが明らかになった事に加え、タミバロテンなどはTh17細胞への分化を抑え、制御性T細胞への著しい分化促進作用を持つ。このことは昨年、一昨年の本会議においても報告した。

B. 研究方法

タミバロテン及び関連誘導体を供給し動物実験データを集めるとともに、自己免疫疾患の臨床での治療へむけた研究をすすめる。特に、今年度は免疫異常マウス(NOD)を用いて、投与法の検討をおこなう。また、唐突とおもわれようが、アルツハイマー病においても免疫と炎症が関与するという観点からの研究をすすめる。

C. 研究結果

(1) タミバロテンによるループス腎炎の治療のための第2相試験実施計画書を作成した。

(2) タミバロテンはT細胞分化: ミエリンにより免疫したマウス自己免疫性脳脊髄炎モデルにおいてタミバロテンは症状を有

意に改善する。この時、IL17の産生が抑えられ、FoxP3の産生が強く促進される(山村、大木)。

(3) LPS/IFN γ により引き起こされる中脳の炎症がタミバロテンにより vivo, vitro において、明確におさえられる(香月ら)。

(4) NODマウスを用いた長期投与による膵臓や唾液腺の障害が押さえられることを本会議においても報告しているが、投与法を検討した。投与を間歇的にすると治療効果が上がらないか、むしろ悪化させる(未完)。

(5) アルツハイマー氏病と免疫炎症との関連を示唆する多くの文献がある。また、レチノイドは神経分化を強く促進するので、レチノイドはアルツハイマー病に有効である可能性がある。このため、APP-トランスジェニックマウスおよび老化促進マウス(SAMPマウス)もちいた試験を進めた。APPマウスへのタミバロテンの長期投与では不溶性アミロイド β の量を対象群に比較して有意に減少させる。ミクログリアの貧食促進あるいは α -セクターゼの増強によるものと考えている。SAMPマウスでは特に大幅に減少しているトランススレチンが正常値に回復した。また、行動試験では再現性を持って、低不安行動が正常化した。スコポラミンによって引き起こされる記憶傷害のレチノイドによる回復についてはすでに報告している。レチノイン酸をもちいた類似の結果が米国のDingらによって報告された。

D. 考察及びE. 結論

過去及び本年度の研究により、自己免疫疾患の治療においてレチノイド、特にタミバロ

テンが治療効果を持つと見られるに至ったので、対象疾患としてループス腎炎の治療の臨床研究にすすむべく準備中である。また、アルツハイマー病への有効性を示すかなりの根拠を得たところである。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. K. Shudo, H. Fukasawa, M. Nakagomi and N. Yamagata: Towards Retinoid Therapy for Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res*, 6, 302-311, 2009.

2. C. Klemann, B.J. Raveney, A.K. Klemann, T. Ozawa, K. Shudo, S. Oki, T. Yamamura: Synthetic Retinoid AM80 Inhibits Th17 Cells and Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Am. J. Pathol.* 174, 2234-2245, 2009.

3. M. Nakagomi, K. Shudo, H. Nakayama et al: Oral Administration of Synthetic Retinoid Am80 (Tamibarotene) Decreases Brain β -Amyloid Peptides in APP23 Mice. *Biol. Pharm. Bull.* 32, 1307-1309, 2009.

4. H. Kagechika, K. Shudo, M. Yokoyama et al: Encapsulation of the synthetic retinoids Am80 and LE540 into polymeric micelles and the retinoids' release control. *J. Control. Release*, 136, 187-195, 2009.

5. M. Ishido, 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, 157-159, 2009.

6. H. Kagechika, K. Shudo, D. Lévesque et al: The transcription factors Nur77 and retinoid X receptors participate in amphetamine induced locomotor activities. *Psychopharmacology (Berl)*, 202, 635-648, 2009.

7. H. Katsuki, E. Kurimoto, et al. *J. Neurosci*, 110, 707-718, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

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

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 の基質であることを明らかにした。また、これら基質のユビキチン化の必須なドメインとして、GRAIL の RING finger ドメイン, coiled-coil ドメインを同定した。

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序を明らかに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。E3 リガーゼのひとつである Cbl-b は、リン酸化チロシンを介した調節でシグナル伝達を抑制し、Itch は c-Jun, JunB をユビキチン化することで、IL-4 の産生を抑制することが報告されている。一方、GRAIL に関して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発現差異解析により候補となった蛋白から GRAIL の基質を同定した。また、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 の蛋白を同定した。この中で GRAIL の基質となる蛋白と

して、RhoGDI α & β , Arp2/3-5, coronin1a を同定した。これらの蛋白質を DO11.10 CD4⁺ T 細胞に過剰発現させる事により、Ionomycin で誘導されるアナジーが部分的に解除され、増殖が回復した。また、これら基質のユビキチン化の必須なドメインとして、GRAIL の RING finger ドメイン, coiled-coil ドメインを同定した。Arp2/3-5 のユビキチン化においては、さらに GRAIL の C 末端領域が重要であった。また、GRAIL ノックアウトマウスについては、生後 12 ヶ月において腸炎が認められた。

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 キナーゼである事が考えられた。そして、Arp2/3-5 や coronin1a といったアクチン再構成に関与する蛋白質が T 細胞アナジーの誘導及び維持に関与していると考えられた。これらの分子は T 細胞と抗原提示細胞間に形成される immunological synapse 形成に関与していると考え、現在 immunological synapse 形成に与える影響を検討中である。GRAIL ノックアウトマウスでは、T 細胞では増殖反応の亢進が見られた。また、末梢血における Gr1⁺単球の頻度が低下し、単球における役割も重要であることが示唆された。GRAIL ノックアウトマウスについては、129Sv ならびに C57BL/6J 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。

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, Coronin1a, 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の基質であり、そしてこれらの基質がT細胞アナジーの制御に重要であることが示唆された。

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, Mizuno M, Tomi C, Croxford J, Hosoda H, Theil J, von Horsten S, Yokote H, Chiba A, Lin Y, Oki S, Akamizu T, Kanagawa K, Yamamura T: Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by Ghrelin. *J Immunol.* 83(4):2859-66, 2009
- 2) Fujia M, Otsuka T, Mizuno M, Tomi C, Yamamura T, Miyake S. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 modulates experimental autoimmune encephalomyelitis via iNKT cell-dependent mechanism. *Ame J Patho* 175(3):1116-23, 2009

総説

- 1) Sakuishi K, Miyake S, Yamamura T: Role of NKT cells in multiple sclerosis: In a quest to understand and overcome their highly efficient double edged swords. *Molecular Basis of Multiple Sclerosis. The Immune System Series "Results and Problems in Cell Differentiation"* Gramm U, ed, Springer-Verlag, Heidelberg (in press)

2) Miyake S, Yamamura T. Ghrelin: friend or foe for neuroinflammation. *Deicov Med* 8(41):64-67, 2009

3) 三宅幸子: 腸管免疫と神経免疫のクロストーク. *BIO Clinica* in press

4) 三宅幸子: NKT 細胞と疾患. *臨床リウマチ* in press

5) 三宅幸子: Carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 と自己免疫. *臨床免疫・アレルギー科* 51(4):339-342, 2009

6) 千葉麻子, 三宅幸子: NKT 細胞と関節リウマチ. *リウマチ科* 41(4):410-416, 2009

7) 山村隆, 横手裕明, 三宅幸子: 腸内細菌と自己免疫. *Neurological Science* 17(3):10-11, 2009

8) 三宅幸子: 新しいパラダイム? Th17 と神経免疫疾患. *Clinical Neuroscience* 28(2):154-155, 2009

II 学会発表

国際学会

- 1) Miyake S, Yokote H, Lin Y, Yamamura T. The role of regulatory cells in the regulation of EAE. 2nd German-Japanese Neuroimmunology Symposium, Eibsee, 10th, July 2009
- 2) Chiba A, Tajima R, Miyazaki Y, Ichikawa D, Yamamura T, Miyake S: The role of MR-1 restricted MAIT cells in the pathogenesis of arthritis. American College of Rheumatology 73rd Annual Scientific Meeting, Philadelphia, 10.19, 2009
- 3) American College of Rheumatology 71th Annual Scientific Meeting, Washington, DC, November 13, 2006 (*Arthritis Rheum.* 58:S508, 2008)

国内学会

- 1) 三宅幸子: 免疫制御細胞による自己免疫性疾患. 第 53 回日本リウマチ学会, 横浜, 4 月 24 日,

- 2) 宮崎雄生, 三宅幸子, 山村 隆: ヒト末梢血における mucosal associated invariant T 細胞に関する研究. 第37回日本臨床免疫学会総会, 東京, 11. 13, 2009
- 3) 宮崎雄生, 千葉麻子, 水野美歩, 任海千春, 市川大樹, Iraide Alloza, 山村 隆, Koen Vandebroek, 三宅幸子: 新規 celecoxib アナログは Th17, Th1 細胞の抑制を介して多発性硬化症, 関節リウマチのマウスモデルを抑制する. ワークショップ18, 第39回日本免疫学会総会, 大坂, 12. 2, 2009
- 4) 市川大樹, 水野美歩, 大木伸司, 山村 隆, 三宅幸子: T 細胞アナジーに関連した E3 リガーゼ GRAIL の基質同定. 第39回日本免疫学会, 大坂, 12. 2, 2009
- 5) 千葉麻子, 宮崎雄生, 市川大樹, 山村隆, 三宅幸子: 炎症性関節炎における MR1 拘束性 MAIT 細胞の役割. 第39回日本免疫学会総会・学術集会, 大坂, 12. 2, 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

自己抗原の翻訳後修飾に関する研究

研究分担者 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 混合性結合組織病や全身性エリテマトーデスにおける代表的自己抗体である抗U1-snRNP抗体を対象とし、その主要な対応抗原である68k subunit (snRNP68k)の疾患特異的翻訳後修飾の有無について方法論を含めて検討した。末梢血単核球の核画分蛋白質を二次元電気泳動で展開後、抗U1-snRNP抗体陽性血清によるウエスタンブロットと質量分析により、snRNP68kを同定した。snRNP68kは分子量65kDa-68kDa、等電点6.0-7.5の領域に20個以上のスポット群として検出され、従来の報告より多くの修飾亜型があることが判明した。次に、抗U1-snRNP抗体陽性患者群と健常者群でsnRNP68kスポット群を比較したところ、分子量67kDa、等電点7.5のスポットの比率が患者群で有意に高いことが判明し、本スポットの形成する翻訳後修飾が抗U1-snRNP抗体の産生機序に関わっている可能性が示唆された。

A. 研究目的

一般に自己抗体の産生機序としては、対応抗原の修飾、交差反応、あるいは免疫担当分子の異常などいくつかの仮説がある。しかしながら、ヒト疾患において産生機序の確定した自己抗体はほとんどない。

対応抗原の修飾は古くから提唱されている産生機序の一つである。たとえば、近年、関節リウマチにおいて蛋白質のシトルリン化が亢進していることなどが判明し、関節リウマチにおける自己免疫との関連が注目されている。しかしながら、網羅的なスクリーニング法が確立していないため、一般的には自己抗原の翻訳後修飾の解析は進んでいないのが現状である。今回、混合性結合組織病や全身性エリテマトーデスで出現する代表的自己抗体である抗U1-snRNP抗体を対象とし、主要な対応抗原であるU1-snRNP 68k subunit (snRNP68k)の疾患特異的翻訳後修飾の有無を方法論を含めて検討した。

抗U1-snRNP抗体の中でも、snRNP68kに対する抗体は、A、Cなどの他のsubunitに対する抗体に先駆けて出現することが多く、本蛋白質が抗U1-snRNP抗体の産生機序に深く関わっていることが予想されている。一方で、近年の質量分析法の発展によって生体内の蛋白質の翻訳後修飾の解析が可能になりつつあり、snRNP68kにおいても、リン酸化やアセチル化などの様々な翻訳後修飾を受けていることが明らかとなってきた。これらの

翻訳後修飾の異常が抗U1-snRNP抗体産生機序に関わっている可能性は十分に考えられる。そこで本研究では、抗U1-snRNP抗体陽性患者、もしくは健常者の末梢血単核球(PBMC)中のsnRNP68kを、二次元ウエスタンブロット法により検出し、その等電点、および分子量を比較することによって、疾患特異的な翻訳後修飾が存在するかどうかを検討した。

B. 研究方法

抗U1-snRNP抗体陽性患者および健常者の末梢血単核球(PBMC)、もしくはヒトT細胞由来のJurkat細胞より核画分を調整し、蛋白質を抽出した。抽出した蛋白質を二次元電気泳動で展開した後、PVDF膜に転写し、抗U1-snRNP68k抗体単独陽性血清もしくはsnRNP68kのC末端18残基を認識する抗体を用いたウエスタンブロットを行った。検出された蛋白質スポットをトリプシン処理し、生成したペプチドをMALDI-TOF/TOF型質量分析計で解析することで、snRNP68kであることを確認した。以上の方法で検出されたsnRNP68kの等電点もしくは分子量を患者と健常者で比較し、疾患特異的な翻訳後修飾の有無を検討した。

なお本研究は所属大学の生命倫理審査委員会の承認を得て行われている。

C. 研究結果

二次元ウエスタンブロット法により、PBMC、あ

るいは Jurkat 細胞の核画分の二次元電気泳動ゲルにおける snRNP68k のスポットを特定した。snRNP68k は等電点 6.0-7.5 の領域に 20 個以上のスポット群として検出された。これらのスポットは分子量 65kDa、67kDa、68kDa の 3 群に分けることができ、各群に 6 個以上の等電点の異なるスポットが存在した。また、PBMC と Jurkat 細胞の間でスポットの数、分子量と等電点に差は見られなかった。

Jurkat 細胞核画分蛋白質を用いて検出されたスポット群を質量分析したところ、3 群ともに snRNP68k であることが確認された。検出されたトリプシン消化断片の全アミノ酸配列に対する割合(配列カバー率)は、18-35%であった。また、これらのスポットは snRNP68k の C 末端 18 残基に対する抗体を用いたウエスタンブロットによっても同様に検出された。

さらに二次元ウエスタンブロット法により、抗 U1-snRNP 抗体陽性患者 3 例および年齢と性別を合わせた健常者患者 3 例の PBMC 中の snRNP68k のスポット群を検出した。各スポットの強度を計測し、全スポット強度の総和に対する比率を測定した。その結果、分子量 67kDa、等電点 7.5 のスポットの割合が抗 U1-snRNP 抗体陽性患者群で有意に高いことが判明した ($P < 0.01$)。

D. 考察

二次元ウエスタンブロット法により、抗 U1-snRNP 抗体陽性患者および健常者の PBMC の核画分から snRNP68k を検出し、その等電点と分子量を測定する方法を確立した。snRNP68k は、分子量と等電点の異なる 20 個以上のスポット群として検出され、プロテアーゼによる分解や、アミノ酸側鎖の化学修飾など生体内で複雑な翻訳後修飾を受けていることが示唆された。snRNP68k に等電点の異なる亜型が存在することは以前から報告されているが (Woppman et al, 1990)、各スポットを形成する翻訳後修飾は現在まで特定されていない。分子量の異なる亜型の存在が示唆されたのは今回が初めてである。分子量が異なる理由としては、N 末端配列もしくは C 末端配列の切断、オルタナティブスプライシング産物、あるいはアミノ酸側鎖の修飾などの可能性が考えられる。現在のところ、C 末端 18 残基に対する抗体によって、抗 U1-snRNP

抗体陽性患者血清と同様のスポット群が検出されたことから、snRNP 68k の分子量の異なる亜型は、少なくとも C 末端配列の切断によって生じるものではないと考えられた。

さらに本手法を用いて、抗 U1-snRNP 抗体陽性患者では、分子量 67kDa、等電点 7.5 のスポットの比率が健常者に比べ高いことが示された。本スポットを特徴付ける翻訳後修飾が、抗 U1-snRNP 抗体の産生機序にかかわっている可能性があると考えられた。今後、質量分析などの手法を用いてこの翻訳後修飾を特定していく予定である。今回、質量分析計で検出された snRNP68k のトリプシン消化物の配列カバー率は、最大 35%であり、翻訳後修飾の網羅的な同定を行うためには、更なる配列カバー率の向上が必要と思われた。蛋白質消化法や、生成ペプチドの抽出法などの効率化の検討と共に、ペプチドの翻訳後修飾解析に有利とされる電子補足解離 (Electron transfer dissociation, ETD) による MS/MS 解析も導入し、上記翻訳後修飾の同定を検討して行きたい。

E. 結論

末梢血単核球 (PBMC) 中の snRNP 68k の等電点および分子量を、二次元ウエスタンブロット法により測定する方法を確立した。本法により、snRNP 68k において、抗 RNP 抗体陽性患者に特異的な翻訳後修飾が存在する可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hatsugai M, Kurokawa M, Kouro T, Nagai K, Arito M, Masuko K, Suematsu N, Okamoto K, Ito F, Kato T: Protein profiles of peripheral blood mononuclear cells are useful for differential diagnosis of ulcerative colitis from Crohn's disease. J Gastroenterol (in press)
2. Iizuka N, Okamoto K, Matsushita R, Kimura M, Nagai K, Arito M, Kurokawa M, Masuko K, Suematsu N, Hirohata S, Kato T: Identification of autoantigens specific for

systemic lupus erythematosus with central nerve system involvement. Lupus (in press)

3. Masuko K, Murata M, Suematsu N, Okamoto K, Yudoh K, Shimizu H, Beppu M, Nakamura H, Kato T: A suppressive effect of prostaglandin (PG) E2 on the expression of SERPINE1/plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 in human articular chondrocytes - an in vitro pilot study. : Open Access Rheumatol Res Rev: 1: 9-15: 2009.
4. Xiang Y, Kurokawa MS, Kanke M, Takakuwa Y, Kato T: Peptidomics: identification of pathogenic and marker peptides. Peptidomics Protocol (in press)
5. Masuko K, Murata M, Yudoh K, Kato T, Nakamura H: Anti-inflammatory effects of hyaluronan in arthritis therapy: Not just for viscosity. Int J General Med 2: 77-81: 2009.
6. Yudoh K, Karasawa R, Masuko K, Kato T: Water-soluble fullerene (C60) inhibits the receptor activator of NFkB (RANK)-induced osteoclast differentiation and bone destruction in arthritis. Int J Nanomed 4: 1-7: 2009.
7. Kaneshiro N, Xiang Y, Nagai K, Kurokawa MS, Okamoto K, Arito M, Masuko K, Yudoh K, Yasuda T, Suematsu N, Kimura K, Kato T: Comprehensive analysis of short peptides in sera from patients with IgA nephropathy. : Rapid Commun Mass Spect: 23: 3720-3728: 2009

2. 学会発表

1. 岡本一起、永井宏平、有戸光美、黒川真奈絵、増子佳世、末松直也、遊道和雄、磯橋文秀、加藤智啓 ビタミン B6 酵素の転写を促進する核内受容体コアクティベーター(MTI-II)のホモログタンパク質 (prothymisin) の活性。日本ビタミン学会第 61 回大会 : 2009
2. 唐澤里江、遊道和雄、村田美奈子、尾崎承一、西岡久寿樹、加藤智啓 : 高安動脈炎の疾患特異的マーカー。第 53 回リウマチ学会 : 2009
3. 増子佳世、村田美奈子、遊道和雄、中村洋、別府諸兄、加藤智啓 : 変形性関節症における軟

骨変性と血管新生 : 第 53 回リウマチ学会総会・学術集会 第 18 回国際リウマチシンポジウム。2009

4. 村田三奈子、遊道和雄、唐澤里江、加藤智啓、千葉純司、別府諸兄、西岡久寿樹、井上和彦、増子佳世 : 関節軟骨におけるヒアルロン酸レセプターLayilin についての検討。第 53 回リウマチ学会 : 2009
5. 川上雄起、増子佳世、遊道和雄、齋藤知行 1)、加藤智啓 : 関節軟骨細胞におけるアンギオテンシン II レセプターの発現。第 53 回リウマチ学会 : 2009
6. 中村浩士、松崎益徳 1)、加藤智啓 : 拡張型心筋症の発症と進展機序に関する抗心筋抗体の検討 : 第 53 回リウマチ学会。2009 :
7. 有戸光美、黒川真奈絵、増子佳世、岡本一起、永井宏平、末松直也、加藤智啓 : 「アセチル化」プロテオミクスによる関節リウマチ (RA) 関連分子の探索。日本プロテオーム機構第 7 回大会 : 2009
8. 初谷守朗、黒川真奈絵、紅露剛史、永井宏平、有戸光美、増子佳世、末松直也、岡本一起、伊東文生、加藤智啓 : 末梢血単核球のプロテオーム解析による潰瘍性大腸炎クローン病の鑑別診断。 : 日本プロテオーム機構第 7 回大会 : 2009
9. 飯塚進子、岡本一起、有戸光美、永井宏平、黒川真奈絵、増子佳世、末松直也、廣畑俊成、加藤智啓 : 中枢神経ループスにおける抗神経細胞抗体の対応抗原の検出。日本プロテオーム機構第 7 回大会 : 2009
10. 高桑由希子、黒川真奈絵、大岡正道、永井宏平、有戸光美、増子佳世、末松直也、岡本一起、尾崎承一、加藤智啓 : 顕微鏡的多発血管炎患者血清ペプチドの網羅的探索。日本プロテオーム機構第 7 回大会 : 2009
11. 深澤雅彦、岡本一起、中村学、永井宏平、有戸光美、黒川真奈絵、増子佳世、末松直也、肥塚泉、加藤智啓 : めまいモデルラット前庭代償期における小脳片葉プロテオーム解析。日本プロテオーム機構第 7 回大会 : 2009
12. 金城永幸、小坂橋賢一郎、Yang Xiang、永井宏平、黒川真奈絵、岡本一起、有戸光美、増子佳世、遊道和雄、安田隆、末松直也、木村健二郎、加藤智啓 : 血清ペプチドミクス解析に

よる IgA 腎症の診断マーカーの探索。日本プロテオーム機構第 7 回大会：2009

13. 加藤智啓：リウマチ性疾患におけるプロテオミクス解析。日本プロテオーム機構第 7 回大会：2009

14. 安藤敬永、永井宏平、近田正英、岡本一起、黒川真奈絵、増子佳世、有戸光美、末松直也、小林俊也、加藤智啓、幕内晴朗：プロテオミクスによる腹部大動脈瘤形成機序の解明。第 50 回日本脈管学会総会：2009

15. 長田賢一、増子佳世、竹鼻健司、田中孝幸、安東利彦、松本美富士、加藤智啓、西岡久寿樹：血清アミノ酸成分解析による線維筋痛症とうつ病の判別の検討。第 1 回日本線維筋痛症学会：2009

16. Arito M, Kurokawa M, Masuko K, Okamoto K, Nagai K, Suematsu N, Kato T : Acetyl-Proteomics for the Investigation of Pathological Molecules in Rheumatoid Arthritis. WHUPO: 2009

17. Nagai K, Kaneshiro N, Xiang Y, Kurokawa M, Okamoto K, Arito M, Masuko K, Yudoh K, Yasuda T, Suematsu N, Kimura K, Kato T : Comprehensive analysis of short peptides in sera from patients with IgA nephropathy. WHUPO: 2009

18. Fukasawa M, Okamoto K, Nakamura M, Nagai K, Arito M, Kurokawa M, Masuko K, Suematsu N, Koizuka I, Kato T : Proteomics of Cerebellar Floccules during Vestibular Compensation of A Rat Vertigo Model. WHUPO 2009

19. Hatsugai M, Kurokawa M, Kouro T, Nagai K, Arito M, Masuko K, Suematsu N, Okamoto K, Ito F, Kato T : Protein Profiles of Peripheral Blood Mononucleocytes are Useful for Discrimination of Ulcerative Colitis from Crohn's Disease. WHUPO 2009

20. 有戸光美、松尾光祐、黒川真奈絵、永井宏平、岡本一起、増子佳世、末松直也、加藤智啓：関節リウマチ関連分子アネキシン A7 の機能解析。第 82 回日本生化学会大会：2009

21. 初谷守朗、黒川真奈絵、紅露剛史、永井宏平、有戸光美、増子佳世、末松直也、岡本一起、伊東文生、加藤智啓：末梢血単核球のプロテオ

ーム解析による潰瘍性大腸炎とクローン病の鑑別診断。第 82 回日本生化学会大会：2009

22. 高桑由希子、黒川真奈絵、大岡正道、永井宏平、有戸光美、増子佳世、末松直也、岡本一起、尾崎承一、加藤智啓：顕微鏡的多発血管炎患者血清ペプチドの網羅的探索。第 82 回日本生化学会大会：2009

23. 岡本一起、末松直也、増子佳世、黒川真奈絵、有戸光美、永井宏平、遊道和雄、加藤智啓：新規の核内レセプター・コアクティベーター (MTI-II) の立体構造と転写促進活性。第 82 回日本生化学会大会：2009

24. 深澤雅彦、岡本一起、中村学、永井宏平、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 82 回日本生化学会大会：2009

25. 永井宏平、金城永幸、Yang Xiang、黒川真奈絵、岡本一起、有戸光美、増子佳世、遊道和雄、安田隆、末松直也、木村健二郎、加藤智啓：多変量解析 OPLS-DA を用いた IgA 腎症の血清ペプチドマーカーの検索。第 82 回日本生化学会大会：2009

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。

I. 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。永井宏平*、佐藤利行*、黒川真奈絵*、有戸光美*、岡本一起*、末松直也*、尾崎承一**、大岡正道**、高桑由希子**、遊道和雄***。(*聖マリアンナ医科大学 疾患プロテオーム・分子病態治療学、**同大学 リウマチ・膠原病・アレルギー内科学、***同大学 難治性疾患制御学)

DNA チップによる SLE の病態解析—DNA 修復酵素 XPD と XPG の発現低下—

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

SLEの発症には遺伝的素因と環境因子が関与すると考えられている。我々はこれまでにDNAチップを用いて患者の末梢血細胞における遺伝子発現の網羅的な解析を行ってきた。そしてimmune responseカテゴリーに含まれる分子群において、IFNを中心とするサイトカインネットワーク制御の異常が存在すること、さらにTNF、IFN- γ 、IL-4やIL-13もそのネットワークに関わっており、IFNとTNFネットワークは拮抗する作用を有することを報告した（Lee HM, et al. Interactions among type I and II interferon, tumor necrosis factor, and beta-estradiol on the regulation of immune response-related gene expressions in systemic lupus erythematosus. Arthritis Res Ther 2009 Jan 3;11(1):R1）。しかし、SLEは多臓器疾患であることから、“immune response”カテゴリー以外の生物学的機能にも異常が見られる可能性がある。そこで今回は、発現が低下した分子群の中から特に“sensory perception”、“response to radiation”のカテゴリーに分類される分子群についてバイオインフォマティクスによる解析を行い、SLEの病態との関連が示唆される分子群の検索を行った。

B. 研究方法

SLE患者21例と健常成人45例の末梢血細胞のmRNA発現についてDNAマイクロアレイを用いて測定し、健常成人と比較してSLE患者で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（Expression Analysis Systematic Explorer, EASE解析）。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。特に“Sensory perception”（外部刺激）に関与する分子群の分子間相互作用をIngenuity Pathway Analysis（IPA）で解析した。（倫理面への配慮）

本研究は臨床研究倫理委員会の承認の下におこなった。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情報を削除し、匿名化した。

C. 研究結果

SLE患者群では健常人と比較して、2329分子の発現が亢進しており、1884分子の発現が減少していた。発現が減少していた分子のGene Ontologyに基づくExpression Analysis Systematic Explorer（EASE）解析により、“perception of external stimuli”、中でも“sensory perception”カテゴリーと“response to radiation”がEASE scoreでそれぞれ0.00749と0.00748の統計学的有意差を持って描出された。

次に、これらのカテゴリーに含まれる分子群を用いてネットワーク解析を行ったところ、主に

“visual system development”、“auditory diseases”、“genetic disorder”、“embryonic development”などに関連したネットワークが描出された。“sensory perception”に分類される分子群には、ミトコンドリア DNA にコードされる遺伝子すなわち ATP6、COX1、COX3、CYTB、ND1、ND2 が含まれており、SLE 患者において oxidative phosphorylation の低下も示唆された。また、“sensory perception”には遺伝子修復酵素 ERCC2(XPD)、ERCC5(XPG)が含まれており、ERCC2 と ERCC5 の発現は健康成人に比べて有意に低下（それぞれ $p=0.0005$ 、 $p=0.0017$ ）していた。さらに、これらの分子群のネットワーク解析から IL-6、TGF β 、TNF、NF κ B と HNF4A がこれらの分子の発現を制御している可能性が示唆された。

D. 考察

SLE 患者ではミトコンドリア DNA にコードされる oxidative phosphorylation に関与する遺伝子が低下しており、ATP 産生の低下が示唆された。すなわちミトコンドリア機能の低下が疑われる。同様の遺伝子発現プロファイルは全身型若年性特発性関節炎患者でも認められ、これらの疾患の間に共通の病態が存在すると考えらる。

ERCC2 と ERCC5 はともに DNA 修復酵素であり、ERCC2 は損傷した二本鎖 DNA を一本鎖 DNA へ開裂する ATP 依存性ヘリカーゼ活性を有する。ヒト ERCC2 遺伝子の変異は色素性乾皮症(XP)、色素性乾皮症とコケイン症候群の合併症(XP/CS)、硫黄欠乏性毛髪發育異常症(TTD)を引き起こし、光線過敏という共通性がある。すなわち SLE 患者における光線過敏に関わる可能性がある。さらにこれらの酵素が ATP 依存性であり、SLE における ATP 産生低下が SLE の光線過敏症にも関与する可能性が示唆される。

E. 結論

SLE 患者において ATP 産生の低下とともに遺伝子修復酵素である ERCC2 と ERCC5 の遺伝子発現低下が認められ、これらは光線過敏症の病態に関わる可能性がある。

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*. 68:264-7,2009.
3. 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.

2. 学会発表

1. 李 慧敏. 美馬亨. 杉野英彦. 安達康雄. 青木千恵子. 西本憲弘. DNA チップによる SLE の遺伝子発現解析-ループス腎炎に対するエンドキサン大量療法により、インターフェロンによって誘導される遺伝子発現は低下した. 第 53 回日本リウマチ学会. 東京. 2009. 4. 24
2. Lee H, Mima T, Sugino H, Aoki C, Nishimoto N. Tumor Necrosis Factor(TNF)Emerged as A Dominant Cytokine in Peripheral Blood Immunoregulatory Network of Lupus Nephritis

Patient after Treatment. EULAR2009.
Copenhagen.2009.6.11

3. Nishimoto N, Sugino H, Aoki C, Lee H, Matsubara K, Mima T. Gene expression profiling of S100 protein families in the peripheral blood from patients with RA, SLE, polyJIA and sJIA-correlation between S100A4 expression and joint destruction-. EULAR2009.Copenhagen. 2009.6.12
4. Lee H, Sugino H, Adachi Y, Ochi T, Nishimoto N. DNA Microarray Analysis Revealed Abnormal Networks of Immune Response Molecules in Bone Marrow Cells from Patients with Rheumatoid Arthritis(RA). ACR/ARHP2009. Philadelphia. USA.
5. Sugino H, Aoki C, Lee H, Adachi Y, Matsubara K, Ochi T, Nishimoto N. About half of S100 cluster genes on chromosome 1q21.1 are up-regulated in patients with rheumatoid arthritis(RA),systemic lupus erythematosus (SLE),polyarticular type juvenile idiopathic. ACR/ARHP2009. Philadelphia. USA.
6. 李 慧敏. 杉野英彦. 安達康雄. 青木千恵子. 西本憲弘. Up-regulation of hemophilic cell adhesion-related molecules in peripheral blood may contribute to patho-genesis of rheumatoid arthritis (RA). 第 37 回日本臨床免疫学会. 東京. 2009. 11. 13-15

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

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

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

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)の発症過程には、T 細胞や B 細胞の活性化と自己抗体産生による多臓器障害が生ずる。平成 20 年度は、SLE に対する B 細胞標的治療の有効性とその作用機序を解明した。本年度は、抗 CD20 抗体リツキシマブの短期的な作用機序を解明する事を目的として in vitro 研究を行った。SLE 患者に CD20 抗体リツキシマブ 375mg/m²/週を 2 回投与した結果、疾患活動性スコア SLEDAI は 28 日後に有意に改善した。特に、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。末梢血 CD20⁺ B 細胞数、特に、CD19⁺IgD⁺CD27⁻ナイーブ B 細胞、IgD⁻CD27⁺メモリー B 細胞は速やかに消失したが、IgD⁻CD27^{high} 形質細胞は 4 週間残存した。また、CD19 陽性細胞上の CD40 と CD80 の発現分子数も減少した。さらに、CD4 陽性細胞上の CD69、CD40L と ICOS の発現が低下した。一方、DNA マイクロアレイによる末梢血 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た。また、治療抵抗性 SLE 患者では、多剤耐性遺伝子 MDR-1 の産物である P-糖蛋白質の発現が亢進していたが、リツキシマブ治療により CD19⁺B 細胞、CD4⁺T 細胞の双方にて発現量、発現率が低下した。以上、治療抵抗性 SLE に対して抗 CD20 抗体リツキシマブ療法は早期効果を示したが、その機序として、単なる B 細胞除去によるものに加えて、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(細胞性免疫制御)可能性も考えられた。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス(SLE)は代表的な膠原病で、20~30 歳代の女性に好発し、本邦でも約 10 万人の患者数が推定される。SLE の発症過程には、T 細胞や B 細胞の活性化と自己抗体による免疫複合体の形成とその組織沈着により多臓器障害が生ずる。平成 20 年度は、SLE に対する B 細胞標的治療の有効性とその作用機序を解明した。平成 21 年度は、抗 CD20 抗体リツキシマブの短期的な作用機序を解明する事を目的として細胞表面抗原や mRNA の発現量を指標にして in vitro 研究を行った。

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

SLE 患者に CD20 抗体リツキシマブ 375mg/m²/週を 2 回投与した結果、疾患活動性スコア SLEDAI は 28 日後に有意に改善した。特に、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。

末梢血 CD20⁺ B 細胞数は全例で 2 週間以内に消失し、3~9 ヶ月間維持された。B 細胞の分化段階を検討したところ、CD19⁺IgD⁺CD27⁻ナイーブ B 細胞、IgD⁻CD27⁺メモリー B 細胞は速やかに消失したが、IgD⁻CD27^{high} 形質細胞は 4 週間残存した。また、