

200936044A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者
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. 抗リン脂質抗体による向血栓細胞活性化のメカニズム 渥美 達也	12
3. 新規糖脂質 α -carba-galactosylceramide を介した関節炎の制御に関する研究 住田 孝之	16
4. ヒト CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞の同定に関する研究 山本 一彦	19
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	21
6. 核内受容体を標的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	24
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	27
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	32
9. 新たな免疫制御戦略の探索に関する研究 三森 経世	35
10. 免疫抑制性分子 TRAIL による自己免疫疾患の発症抑制機序に関する研究 千住 覚	38
(4) 研究成果の刊行に関する一覧	41
(5) 平成 21 年度班会議プログラム・抄録	49

(1) 構成員名簿

平成21年度 構成員名簿
(H20-難治-一般-036)

区 分	氏 名	所 属	職 名
研究代表者	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分野	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	熊本大学大学院生命科学研究部 免疫識別学分野	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

研究代表者 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分野 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	熊本大学大学院生命科学研究部 免疫識別学分野 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。

炎症性疾患に対しては、特定の炎症関連分子をターゲットにした治療が確立されつつあり、とりわけ関節リウマチにおいては人類は世界レベルで輝かしい実績を残してきた。一方、膠原病を代表とする自己免疫疾患に対する免疫関連分子をターゲットにした治療は、未だ世界的なコンセンサスを得たものはなく、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、先端かつオリジナリティーの高い研究成果を目指している。本年度は昨年度の継続として各分担研究者の進捗状況を報告する。

B. 研究方法

① 畠山； NF- κ 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- κ 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。

② 渥美；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ある。今年度は、抗リン脂質抗体 (β 2-グリコプロテイン I 依存性抗カルジオリピン抗体およびホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体の両者) と向血栓細胞との interaction に関与する細胞表面分子の候補として、スカベンジャーレセプターのひとつである CD36 分子の関与につき、患者ゲノムを用いて検討を加えた。

③ 住田；コラーゲン誘導性関節炎 (CIA) などの自己免疫性関節炎発症には Th17 細胞が関わっており、一方、Th1 細胞 (IFN- γ) は Th17 細胞への分化を抑制することが知られている。本研究では、特異的に NKT 細胞から INF- γ 産生を誘導する新規糖脂質 α -carba-galactosylceramide (α -c-GC) に注目し、 α -c-GC 投与による CIA 抑制効

果について検討した。

④ 山本；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。山本らは最近マウス生体内で恒常的に存在する CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞を同定した。マウス CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞はアナジー関連転写因子 Egr-2 や Blimp-1 を高発現していた。本研究ではヒトにおける CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の同定・解析を試みた。

⑤ 上阪；新しい多発性筋炎 (PM) マウスモデルである C 蛋白誘導性筋炎 (CIM) の特性の解析を進めるとともに PM 新治療法を開発する。これまでに、CIM でも、PM と同様に、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) がエフェクター細胞であることが示唆されてきた。今年度は CTL が直接筋障害を起こしていることを明確にする。また、昨年報告したように、CIM を誘導する C 蛋白第 2 断片のなかに、筋炎を惹起することができるペプチド配列が存在する。そこで、今年度は、このペプチドを実際に細胞傷害性 T 細胞が認識するかどうかを検討した。

⑥ 山村；これまで多発性硬化症 (MS) の病原性に関わる自己反応性 T 細胞の機能制御法の確立を目的として、網羅的遺伝子発現解析による病原性 T 細胞の性状解析を進め、MS 患者由来末梢血 T 細胞で選択的に発現亢進しているオーファン核内受容体 NR4A2 分子が、活性化 T 細胞からの炎症性サイトカイン産生を制御することを見出した。今回、T 細胞における NR4A2 の機能解析をさらに詳細にすすめ、MS の病態形成における NR4A2 機能の分子メカニズムの解明を試みた。

⑦ 桑名；抗二本鎖 DNA (dsDNA) 抗体は SLE の疾患標識抗体であり、その抗体価は疾患活動性と関連するとされるが、必ずしもその相関は強くない。

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、骨髓や脾臓から末梢血へ動員されることが知られている。昨年度の本研究で SLE の一部で末梢血中に抗 dsDNA 抗体産生細胞が検出されることを報告した。そこで本年度は SLE 患者末梢血中の抗 dsDNA 抗体産生細胞を直接検出することにより、疾患活動性の評価が可能かどうかを検討することを目的とした。

⑧坂口; FoxP3⁺CD4⁺制御性 T 細胞は、過剰な免疫応答を抑制し、正常な免疫系を維持するため必須の役割を担っている。制御性 T 細胞の欠損・機能不全は自己免疫病の原因となるのみならず、制御性 T 細胞は様々な免疫疾患の病態に関与している可能性が高い。これまでの研究で、制御性 T 細胞で重要な働きを担っている可能性のある分子が複数知られている。各遺伝子の重要領域を flox 配列で挟んだノックインマウスを作成し、FoxP3 発現細胞特異的に Cre recombinase を発現するマウスを交配し、制御性 T 細胞特異的に遺伝子を欠損するマウスを作成した。これらの遺伝子改変マウスを用いて各分子の制御性 T 細胞での重要性、役割を明らかにした。

⑨三森; 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、IL-17 中和抗体の開発・治験も盛んに行われている。しかし抗体製剤は高薬価であり医療経済を圧迫する原因ともなっている。今回我々は、抗体製剤に頼らない IL-17 産生あるいは Th17 分化を抑制する戦略の一つとして、カルパスタチンの可能性を解析した。

⑩千住; Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) は、T 細胞の細胞増殖と B 細胞の抗体産生の抑制、ならびに腫瘍細胞へのアポトーシスの誘導などの機能を有することが知られている。マウスの ES 細胞から *in vitro* で樹状細胞 (ES-DC) を分化誘導する方法を開発し、さらに遺伝子改変により自己抗原 MOG と TRAIL を強制発現さ

せたマウス ES-DC (ES-DC-TRAIL/MOG) を作製して、これをマウス個体へ投与することにより、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の発症を予防できることを報告した。この EAE の発症抑制に

ES-DC-TRAIL/MOG による CD4⁺CD25⁺ 制御性 T 細胞の誘導、あるいは増殖促進が関与していることを明らかにした。そこで本年度は、TRAIL^{-/-} マウスに自己抗原 MOG を免疫して EAE を誘導することにより、TRAIL が制御性 T 細胞を中心とした T 細胞の免疫応答に、どのような影響を与えるか検討した。

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 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、κB-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。Ymer トランスジェニックマウスは、TNFR や TLR4 下流のシグナルが抑制されることが判明した。また Ymer トランスジェニックマウスでは、Fas や EGFR の下流のシグナルは促進状態になっていることが判明した。

②渥美; CD36 欠損と関連する遺伝子変異のひとつである rs3765187 の minor allele 頻度は、APS

患者において健常人と比較し有意に少なかった (2.8% (3/108) vs. 10.2% (43/422), $p=0.024$ (Fisher 直接比較法))。rs1049654 の allele 頻度には APS 患者と健常人とでは差がなかった。SLE 患者ではいずれの遺伝子多型の頻度も健常人とは差がなかった。

③住田; 1) α -c-GC により *in vitro* において NKT 細胞から IFN- γ 産生が特異的に産生された、2) α -c-GC 投与マウスにおいて CIA が有意に抑制された、3) CIA 抑制効果は抗 IFN- γ 中和抗体により解除された、4) 血清中の抗 CII 抗体が減少していた、5) CII 反応性 T 細胞による IL-17、IFN- γ 産生が抑制されていた、6) Treg 細胞数、アポトーシス細胞数に有意な変化は認められなかった事を明らかにしてきた。

④山本; ヒト扁桃腺 CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞は定量的 PCR において IL-10, Egr-2 を高発現していた。また T 細胞の IL-10 産生に重要と考えられる Blimp-1 も発現していた。さらに TCR 刺激に対し分裂しないアナジューの性質をもつ一方で、高い IL-10 産生を示した。マイクロアレイ解析ではヒトとマウスの CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の間に多くの類似性を認めた。

⑤上阪; 1) β 2ミクログロブリン欠損マウス、パーフォリン欠損マウスとも、野生型マウスと比べ、CIMの発症率・重症度ともに抑制された。特に筋壊死部位を計測すると、その減少が著明であった。2) CIMマウスのCD8 T細胞のみで、筋壊死像の強い筋炎を養子移入出来た。CD4 T細胞のみでも、ごく弱い筋炎が移入できたが、これは、レシピエントへの抗CD8除去抗体投与に影響されなかった。3) ペプチドHILYSDV誘導性筋炎は、CD8除去にて発症率が抑制された。

⑥山村; MOG 誘導性 EAE を発症したマウスの中樞神経系 (CNS) に浸潤した T 細胞の中には、大量の IL-17 産生細胞および IFN- γ 産生細胞が認められ、

さらに IL-17 と IFN- γ を同時に産生する細胞も一部確認できた。Cytokine Secretion Assay Kit を組み合わせて、IL-17 と IFN- γ の産生を指標に得られた細胞を4群に分画し、各画分に含まれる T 細胞から抽出した RNA を用いて NR4A2 発現を定量 PCR 解析した。その結果、IFN- γ 産生とは無関係に、IL-17 産生細胞選択的な NR4A2 の高発現が認められ、標的臓器浸潤 T 細胞の IL-17 産生能と NR4A2 発現が強く相関することが明らかとなった。また Th17 細胞の *in vitro* 分化時に NR4A2 特異的 siRNA を導入すると、IL-17 産生をほぼ完全に抑制することができた。この時、Th17 細胞中の NR4A2 発現の著明な減少が認められたのに対し、ROR γ t 発現は若干の減少傾向を認めるにとどまった。この時 *in vitro* 分化 Th1 細胞の IFN- γ 産生は、siRNA 処理により全く影響を受けなかった。HIRBP₁₋₂₀ ペプチドを免疫することにより誘導した EAU マウスでは、標的臓器に浸潤した T 細胞の NR4A2 発現亢進が発症期にピークを迎え、その後減弱したのに対し、末梢血 T 細胞の NR4A2 発現亢進はより遅れてピークを迎え、病態スコアと良い相関を示す傾向にあった。この T 細胞の NR4A2 発現の経時変化は、EAE マウスの場合と完全に一致しており、Th17 依存性の自己免疫応答時に普遍的に見られる現象である可能性が示唆された。

⑦桑名; 末梢血抗 dsDNA 抗体産生細胞は SLE 患者で特異的に検出されたが、感度は 22% と低かった。一方、末梢血抗 dsDNA 抗体産生細胞の存在は持続性蛋白尿、男性、リンパ球減少、高疾患活動性 (SLEDAI や SLAM 高値) と相関し、臓器病変としては腎炎 15 例 (生検施行 7 例: ISN/RPS IV 型: 3 例、III 型: 2 例、V 型: 2 例) が最も多かった。末梢血抗 dsDNA 抗体陽性 SLEDAI 5 以下の 28 例を、前向きに検討した結果、末梢血抗 dsDNA 抗体産生細胞陽性例 8 例中 4 例が 20 か月以内に再燃した ($p<0.001$)。以上より、抗 dsDNA 抗体産生細胞は SLE の活動性に伴って末梢血中へ動員

され、SLEの病態形成に関与する可能性が示された。

⑧坂口; (1) 制御性T細胞のマスター制御遺伝子FoxP3はRunx1およびCBFβからなる転写因子複合体と直接的に結合し、多数の遺伝子発現を調節していることが示された。特に、FoxP3自体の発現維持とTh2サイトカインであるIL-4の発現抑制に重要な役割を担っていた。その結果、CBFβ欠損制御性T細胞は十分に機能することができず、自己免疫性胃炎や高IgE血症を呈する。(2) 制御性T細胞に発現するCTLA-4は免疫抑制機能に必須であり、CTLA-4欠損制御性T細胞は免疫応答を抑制できない。制御性T細胞上のCTLA-4を欠損したマウスでは、過剰なリンパ球増殖、致死的自己免疫性心筋炎を呈する。

⑨三森; 内因性レトロウイルスを用いたカルパスタチンの過剰発現はTh1およびTh17分化を抑制し、その機序としてIL-2産生への直接的な抑制およびSTAT3のリン酸化抑制を認めた。また線維芽細胞におけるカルパスタチンの過剰発現は、LPS、IL-17によって誘導されるIL-6産生をブロックし、T細胞同様STAT3シグナルの減弱がその一因と考えられた。さらにカルパスタチン最小機能ドメイン発現コラーゲン特異的T細胞を、CIAマウスに移入したところ、関節炎抑制効果を認めた。以上の結果より、カルパイン阻害剤、あるいは分泌・膜透過型カルパスタチンによるカルパイン阻害療法は、関節リウマチ等の治療に有用である可能性があることが明らかになった。

⑩千住; EAEを誘導したTRAIL^{-/-}マウスでは、TRAIL^{+/+}マウスと比較して臨床症状の重症化と遷延化が観察され、これと相関するように脾臓および所属リンパ節細胞中のCD4⁺Foxp3⁺制御性T細胞の減少と、IFN- γ 産生性CD4⁺T細胞の増加が観察された。さらに、*in vitro*の実験では、CD4⁺CD25⁻T細胞の増殖反応は、可溶性TRAILに

より濃度依存性に抑制されたのに対して、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞は影響を受けなかった。一方、TRAILのレセプターであるmDR5の発現量については、2種類のCD4⁺T細胞群の間に差は認められなかった。以上より、免疫抑制性分子TRAILは、IFN- γ 産生性CD4⁺T細胞や通常のCD4⁺T細胞に対して増殖抑制作用を示す一方で、制御性T細胞に対しては増殖促進作用を示す可能性が考えられた。

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人で各分担研究を継続している。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。来年度も本年度まで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

自己免疫疾患に関与するユビキチン関連分子の治療に向けた応用

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

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- κ 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- κ 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- κ 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- κ 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- κ 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- κ 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- κ 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 κ 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、 κ 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。Ymer トランスジェニックマウスは、TNFR や TLR4 下流のシグナルが抑制されることが判明した。また Ymer トランスジェニックマウスでは、Fas や EGFR の下流のシグナルは促進状態になっていることが判明した。

D. 考察

本研究結果は、NF- κ 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。Ymer のトランスジェニックマウスの解析により、個体レベルで Ymer の免疫細胞及び炎症関連細胞における機能が判明し、今後は自己免疫疾患マウスとの関係を明らかにすることが重要と考えられる。

E. 結論

A20 は NF- κ 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- κ B シグナルに抑制的に働くことが明らかとなった。また、Ymer トランスジェニックマウスの樹立を解析により、機能的な解析が進んだ。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

論文発表

- 1) Oshiumi, H., Matsumoto, M., Hatakeyama, S. and Seya, T.: Riplet/RNF135, a RING-finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon- β induction during the early phase of viral infection. *J. Biol. Chem.*, 284, 807-817, 2009.
- 2) Kameda, H., Watanabe, M., Bohgaki, M., Tsukiyama, T. and Hatakeyama, S.: Inhibition of NF- κ B signaling via tyrosine phosphorylation of Ymer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 378, 744-749, 2009.
- 3) Miyajima, N., Maruyama, S., Nonomura, K. and Hatakeyama, S.: TRIM36 interacts with the kinetochore protein CENP-H and delays cell cycle progression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 381, 383-387, 2009.
- 4) Matsumoto, M., Oyamada, K., Takahashi, H., Sato, T., Hatakeyama, S. and Nakayama, K.I.: Large-scale proteomic analysis of tyrosine phosphorylation induced by TCR or BCR activation reveals new signaling pathways. *Proteomics*, 9, 3549-3563, 2009.
- 5) Kimura, T., Sakai, M., Tabu, K., Wang, L., Tsunematsu, R., Tsuda, M., Sawa, H., Nagashima, K., Nishihara, H., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Ladanyi, M., Tanaka, S. and Nakayama, K.I.: Human synovial sarcoma proto-oncogene Syt is essential for early embryonic development through the regulation of cell migration. *Lab. Invest.*, 89, 645-656, 2009.
- 6) Maeda, H., Miyajima, N., Kano, S., Tsukiyama, T., Okumura, F., Fukuda, S. and Hatakeyama, S.: Ubiquitin-conjugating enzyme UBE2Q2 suppresses cell proliferation and is down-regulated in recurrent head and neck cancer. *Mol. Cancer Res.*, 7, 1553-1562, 2009.
- 7) Watanabe, M., Tsukiyama, T. and Hatakeyama, S.: TRIM31 interacts with p52Shc and inhibits Src-induced anchorage-independent growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 388, 422-427, 2009.
- 8) Yoshida, K., Watanabe, M. and Hatakeyama, S.: ZNRF1 interacts with tubulin and regulates cell morphogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 389, 506-511, 2009.
- 9) Kikuchi, M., Okumura, F., Tsukiyama, T., Watanabe, M., Miyajima, N., Tanaka, J., Imamura, M. and Hatakeyama, S.: TRIM24 mediates ligand-dependent activation of androgen receptor and is repressed by a bromodomain-containing protein, BRD7, in prostate cancer cells. *BBA-Mol. Cell Res.*, 1793, 1828-1836, 2009.
- 10) Suizu, F., Hiramuki, Y., Okumura, F., Matsuda, M., Okumura, A.J., Hirata, N., Narita, M., Kohno, T., Yokota, J., Bohgaki, M., Obuse, C., Hatakeyama, S., Obata, T. and Noguchi, M.: The E3 ligase TTC3 facilitates ubiquitination and degradation of phosphorylated Akt. *Dev. Cell*, 17, 800-810, 2009.
- 11) Bohgaki, M., Matsumoto, M., Atsumi, T., Kondo, T., Yasuda, S., Horita, T., Nakayama, K.I., Okumura, F., Hatakeyama, S. and Koike, T.: Plasma gelsolin facilitates interaction between β 2 glycoprotein I and α 5 β 1 integrin. *J. Cell. Mol. Med.*, in press. *corresponding author
- 12) Sasai, M., Tatematsu, M., Oshiumi, H., Funami, K., Matsumoto, M., Hatakeyama, S. and Seya,

T.: Direct binding of TRAF2 and TRAF6 to TICAM-1/TRIF adaptor participates in activation of the Toll-like receptor 3/4 pathway, Mol. Immunol., in press.

学会発表

- 1) 築山忠維、坊垣幸、松田真由子、畠山鎮次：
Ymer トランスジェニックマウスの解析・第32回日本分子生物学会・横浜・2009(12/9-12/12)
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

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

抗リン脂質抗体による向血栓細胞活性化のメカニズム

研究分担者 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

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ある。今年度は、抗リン脂質抗体（ β 2-グリコプロテイン I 依存性抗カルジオリピン抗体およびホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体の両者）と向血栓細胞との interaction に関与する細胞表面分子の候補として、スカベンジャーレセプターのひとつである CD36 分子の関与につき、患者ゲノムを用いて検討を加えた。CD36 は主要なスカベンジャー受容体で、様々なリガンドを認識し動脈硬化や血栓症に関与している。CD36 遺伝子多型と APS との関連を検討した。原発性 APS39 名、全身性エリテマトーデス(SLE)合併 APS69 名、APS 非合併 SLE265 名、健常人 422 名を対象とし、CD36 欠損に関わる主要な一塩基多型 rs3765187, 及び 5'非翻訳領域 rs1049654 を TaqMan PCR genotyping 法で検索した。rs3765187 の minor allele 頻度は、APS 患者において健常人と比較し有意に少なかった(2.8%(3/108) vs. 10.2%(43/422), $p=0.024$ (Fisher 直接比較法))。rs1049654 の allele 頻度には APS 患者と健常人とは差がなかった。SLE 患者ではいずれの遺伝子多型の頻度も健常人とは差がなかった。したがって、抗リン脂質抗体による向血栓細胞の活性化に CD36 の機能が関与する可能性がはじめて示された。

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ある。抗リン脂質抗体の主要な対応抗原は β 2-グリコプロテイン I とプロトロンビンである。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てきた。昨年度の研究では、そのメカニズムを向血栓細胞内のシグナル伝達分子と、それに関連する細胞表面分子の役割をメインに検討した。その結果、抗 aPS/PT による向血栓細胞活性は p38MAPK を介する経路に依存しており、それは抗カルジオリピン抗体(抗 β 2-グリコプロテイン I 抗体:aCL/ β 2GPI)による細胞活性化経路と共通していた。そこで今年度は、aPS/PT と aCL/ β 2GPI の両者と向血栓細胞との interaction に関与する細胞表面分子の候補として、スカベンジャーレセプターのひとつで

ある CD36 分子の関与につき、患者ゲノムを用いて検討を加えた。

B. 研究方法

CD36 は主要なスカベンジャー受容体で、様々なリガンドを認識し動脈硬化や血栓症に関与している。CD36 遺伝子多型と APS との関連を検討した。本研究では、原発性 APS39 名、全身性エリテマトーデス(SLE)合併 APS69 名、APS 非合併 SLE265 名、健常人 422 名を対象とし、CD36 欠損に関わる主要な一塩基多型 rs3765187, 及び 5'非翻訳領域 rs1049654 を TaqMan PCR genotyping 法で検索した。

(倫理面への配慮)

本研究は北海道大学遺伝子研究倫理審査委員会の承認を得ておこなわれた。データは完全に匿名化して扱われ、個人情報の保護には細心の注意はらった。

C. 結果

CD36 欠損と相関する遺伝子変異のひとつである rs3765187 の minor allele 頻度は、APS 患者において健常人と比較し有意に少なかった (2.8%(3/108) vs. 10.2%(43/422), $p=0.024$ (Fisher 直接比較法)) (表)。rs1049654 の allele 頻度には APS 患者と健常人とでは差がなかった。SLE 患者ではいずれの遺伝子多型の頻度も健常人とは差がなかった。

D. 考察

APS において、aCL/ β 2GPI 陽性患者と aPS/PT 陽性患者の頻度はほぼ同じであり、かつ臨床症状との相関は aCL/ β 2GPI と aPS/PT とでは相違点がない。すなわち、aCL/ β 2GPI と aPS/PT は対応抗原がまったく異なる分子であるにもかかわらず、それらと相関する、もしくはそれらがひきおこす症状は同一であり、さらに *in vitro* での向血栓細胞活性化の経路も同一である。そこで、APS として共通の細胞刺激レセプターとして、自己抗原に対するレセプターとは別に、自己抗原とリン脂質との結合という特質から、スカベンジャーレセプターを想定した。遺伝子多型解析の結果、CD36 欠損と関連する遺伝子多型をもつ個体は APS を発症しにくいことが示された。この事実から、CD36 が APS の血栓病態に関与する可能性が考えられる。現在、抗リン脂質抗体の細胞活性化における CD36 の関与につき、*in vitro* での検討をすすめている。

E. 結論

抗リン脂質抗体による向血栓細胞の活性化に CD36 の機能が関与する可能性がはじめて示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

<著書>

1. 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*)

2. Atsumi T, Amengual O, Koike T. Antiphospholipid syndrome: pathogenesis. In: Lahita RG, editor. Systemic Lupus Erythematosus 5th edition. San Diego: Academic Press (*in press*).

<論文>

1. 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* 68, 1366-7, 2009
2. Bohgaki T, Atsumi T, Bohgaki M, Furusaki A, Kondo M, Sato-Matsumura K, Abe R, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Amasaki Y, Nishio M, Sawada K, Shimizu H, Koike T. Immunological reconstitution after autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with systemic sclerosis: relationship between clinical benefits and intensity of immunosuppression. *J Rheumatol* 36, 1240-8, 2009
3. 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.
4. 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* 18, 1119-20, 2009.
5. 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* 60, 2457-67, 2009
6. Kiyohara C, Washio M, Horiuchi T, Tada Y, Asami T, Ide S, Atsumi T, Kobashi G,

- Takahashi H. Cigarette smoking, STAT4 and TNFRSF1B polymorphisms, and systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *J Rheumatol* 36, 2195-203, 2009
7. Nakagawa H, Yasuda S, Matsuura E, Kobayashi K, Ieko M, Kataoka H, Horita T, Atsumi T, Koike T. Nicked beta2-glycoprotein I binds angiotensin4.5 (plasminogen kringle 1-5) and attenuates its anti-angiogenic property. *Blood* 114, 2553-9, 2009.
8. Koike R, Harigai M, Atsumi T, Amano K, Kawai S, Saito K, Saito T, Yamamura M, Matsubara T, Miyasaka N. Japan College of Rheumatology 2009 guidelines for the use of tocilizumab, a humanized anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody, in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 19, 351-7, 2009
9. 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, Momohara S, Yamanaka H, Nakamura Y, Yamamoto K. The association of a non-synonymous SNP in the TNFAIP3 gene with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Arthritis Rheum* (in press)
10. Bohgaki M, Matsumoto M, Atsumi T, Kondo T, Yasuda S, Horita T, Nakayama KI, Okumura F, Hatakeyama S, Koike T. Plasma gelsolin facilitates interaction between $\beta 2$ glycoprotein I and $\alpha 5 \beta 1$ integrin. *J Cell Mol Med* (in press)
11. Fukae J, Kon Y, Henmi M, Sakamoto F, Narita A, Shimizu M, Tanimura K, Matsubashi M, Kamishima T, Atsumi T, Koike T. Change of Synovial Vascularity in Single Finger Joint assessed by Power Doppler sonography correlated with radiographic change in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* (in press)
12. Yamada H, Atsumi T, Amengual O, Koike T, Furuta I, Ohta K, Kobashi G. Anti-beta2 glycoprotein-I antibody increases the risk of pregnancy-induced hypertension: a case-control study. *J Reprod Immunol* (in press)
13. 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* 68 ; 1030-5, 2009
- 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・内科学講座の加藤将大学院生、奥健志助教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。

表 CD36 rs3765187 マイナー多型の頻度と健常人との比較

		p value	Odds ratio (95% CI)
Healthy subjects (n = 422)	10.2% (43/422)	-	-
All APS (n = 108)	2.8% (3/108)	0.024	0.25 (0.08 to 0.83)
All SLE (n = 334)	6.9% (23/334)	0.11	0.65 (0.38 to 1.11)
Primary APS (n = 39)	2.6% (1/39)	0.15	0.23 (0.03 to 1.73)
SLE+APS (n = 69)	2.9% (2/69)	0.085	0.26 (0.06 to 1.11)
SLE/non-APS (n = 265)	7.9% (21/265)	0.32	0.76 (0.44 to 1.31)

新規糖脂質 α -carba-galactosylceramide を介した関節炎の制御に関する研究

研究分担者 住田 孝之

筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻臨床免疫学 教授

研究協力者: 古賀 洋平、瀬川 誠司、堀越 正信、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

コラーゲン誘導性関節炎 (CIA) などの自己免疫性関節炎発症には Th17 細胞が関わっており、一方、Th1 細胞 (IFN- γ) は Th17 細胞への分化を抑制することが知られている。本研究では、特異的に NKT 細胞から INF- γ 産生を誘導する新規糖脂質 α -carba-galactosylceramide (α -c-GC) に注目し、 α -c-GC 投与による CIA 抑制効果について検討することを目的とした。その結果、1) α -c-GC により *in vitro* において NKT 細胞から INF- γ 産生が特異的に産生された、2) α -c-GC 投与マウスにおいて CIA が有意に抑制された、3) CIA 抑制効果は抗 INF- γ 中和抗体により解除された、4) 血清中の抗 CII 抗体が減少していた、5) CII 反応性 T 細胞による IL-17、IFN- γ 産生が抑制されていた、6) Treg 細胞数、アポトーシス細胞数に有意な変化は認められなかった事を明らかにしてきた。今後、本研究成果をふまえて、新規糖脂質抗原 α -c-GC による 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 α 鎖はマウスでは TCRV α 14、ヒトでは TCRV α 24 の均一な遺伝子を有する。CD1d 分子上に発現した糖脂質、代表的な糖脂質は合成 α -galactosylceramide (α -GC)、を抗原として認識し INF- γ および IL-4 を産生する。近年、Th1 タイプのサイトカインを主に誘導する新規糖脂質 α -carba-galactosylceramide (α -c-GC) が NKT 細胞の新たな抗原として注目されてきた。コラーゲン誘導性関節炎 (CIA) においては、Th17 細胞が関節炎発症に重要であること、一方、Th1 サイトカインは Th17 細胞を抑制する事が知られている。そこで、本研究では、 α -c-GC により NKT 細胞を介した CIA 制御の可能性およびその機序を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) DBA/1 マウス由来の脾細胞を *in vitro* で α -GC あるいは α -c-GC (1 μ g/ml) と 72 時間共培養して上清中の IL-17、IL-4、INF- γ を ELISA 法にて測定した。
2) DBA/1 マウスを用いて CIA の誘導した。初回 CII 免疫時と同時に α -GC あるいは α -c-GC をそれぞれ 2 μ g 皮下注射して、関節炎スコアおよび発症頻度について検討した。

3) 初回免疫時に抗 INF- γ 抗体を 160 μ g 腹腔内投与することにより関節炎スコアおよび発症頻度への影響を検討した。
4) α -GC あるいは α -c-GC を投与した CIA マウス (day35) において、血清中の抗 CII 抗体価を ELISA 法にて測定した。
5) day12 に採取したリンパ節由来細胞を *in vitro* で CII とともに 72 時間培養して、上清中の INF- γ および IL-17 について ELISA 法にて解析した。
6) foxp3 陽性 Treg 細胞数、Annexin V 陽性アポトーシス細胞数をフローサイトメトリーで解析した。

(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) α -c-GC により NKT 細胞から INF- γ が特異的に産生されていた。
2) α -c-GC 投与マウスにおいて CIA が有意に抑制されていた。
3) 抗 INF- γ 抗体投与により α -c-GC による CIA 抑制効果が解除された。

- 4) 抗 CII IgG 抗体、抗 CII IgG2a 抗体が有意に抑制された。
- 5) CII 反応性 T 細胞は INF- γ および IL-17 とともに産生低下を示した。
- 6) α -c-GC 免疫マウスにおいて、Treg 細胞数、アポトーシス細胞数に有意な変化は認められなかった。

D. E. 考察と結論

NKT 細胞から INF- γ を有意に産生させる糖脂質抗原 α -c-GC により、CIA を制御することができた。その関節炎抑制機序は、INF- γ 依存性であり、CII 反応性 T 細胞および B 細胞をアナジーに誘導している可能性が示唆された。関節炎の新しい抗原特異的治療戦略として期待したい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- Iwanami, K., Matsumoto, I., Tanaka, Y., Inoue, A., Minami, R., Hayashi, T., Goto, D., Ito, S., Nishimura, Y., and Sumida, T. Altered peptide ligands inhibit glucose-6-phosphate isomerase (GPI) peptide-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther. (in press)*
- Ito, I., Kawasaki, A., Ito, S., Kondo, S., Sugihara, M., Horikoshi, M., Hayashi, T., Goto, D., Matsumoto, I., Tsutsumi, A., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Matsuta, K., Sumida, T., and Tsuchiya, N., Replication of association between FAM167A(C8orf13)-BLK region and rheumatoid arthritis in a Japanese population. *Ann. Rheum. Dis. (in press)*.
- Segawa, S., Goto, D., Yoshiga, Y., Sugihara, M., Hayashi, T., Chino, Y., Matsumoto, I., Ito, S., Ito, S., and Sumida, T. Inhibition of TGF- β signaling attenuates IL-18 plus IL-2-induced interstitial lung disease. *Clin. Exp. Immunol. (in press)*
- Wang, Y., Ito, S., Chino, Y., Goto, D., Matsumoto, I., Murata, H., Tsutsumi, A., Uchida, K., Usui, J., Yamagata, K., and Sumida, T. Analysis of cytokine balance in lupus nephritis by laser-microdissection. *Clin. Exp. Immunol. (in press)*
- Inoue, A., Matsumoto, I., Tanaka, Y., Iwanami, K., Goto, D., Ito, S., and Sumida, T. Role of tumor necrosis factor- α -induced adipose-related protein in autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum. Ther. (in press)*
- Tanaka-Watanabe, 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. 155: 285-294, 2009.*

7. 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. 60: 553-558, 2009.*

8. 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. 68: 710-714, 2009.*

9. Wakamatsu, E., Matsumoto, I., Yoshiga, Y., Iwanami, K., Tsuboi, H., Hayashi, T., Goto, D., Ito, S., and Sumida, T. Altered peptide ligands regulate type II collagen-induced arthritis in mice. *Mod. Rheumatol. 19:366-371, 2009.*

10. Segawa, S., Goto, D., Yoshiga, Y., Hayashi, T., Matsumoto, I., Ito, S., and Sumida, T. The decrement of soluble CD1d proteins affects the function of NKT cells in patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Med. 24:481-486, 2009.*

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

- 特許取得
申請準備中
- 実用新案登録
なし
- その他
特記事項なし