

160:292-310, 2010

17. Wang Y, Ito S, Chino Y, Goto D, Matsumoto J, Murata H, Tsutsumi A, Hayashi T, Uchida K, Usui J, Yamagata K, Sumida T. Laser Microdissection-based Analysis of Cytokine Balance in the Kidneys of Patients with Lupus Nephritis. *Clin. Exp. Immunol.* 159:1-10, 2010
18. Umeda N, Ito S, Hayashi T, Goto D, Matsumoto J, Sumida T. A patient with rheumatoid arthritis who had a normal delivery under etanercept treatment. *Intern. Med* 49:187-9, 2010

著書

1. 松本功 サイトカインのすべて TGF- β 臨床免疫・アレルギー科増刊号 科学評論社 in press
2. 松本功 免疫グロブリン・補体・免疫複合体 リウマチ・膠原病内科 クリニカルスタンダード 文光堂 30-34, 2010
3. 松本功 多発性筋炎/皮膚筋炎 COLOR ATLAS 膠原病・リウマチ 改訂第2版 住田孝之編集 診断と治療社 100-105, 2010
4. 松本功 再発性多発軟骨炎 GUIDELINE 膠原病・リウマチ 改訂第2版、小池隆夫、住田孝之編集、診断と治療社、123-126, 2010
5. 松本功 薫風吹く膠原病診療—臨床を駆ける進歩の風—シェーグレン症候群 内科 in press
6. 松本功 K/BxN マウス—血清移入関節炎— Clinical Calcium in press
7. 松本功 関節リウマチにおける自己抗体の病態への関与 リウマチ科 in press
8. 井上明日香、松本功、住田孝之 TIARP による炎症性サイトカインの産生抑制 臨床免疫・アレルギー科 in press
9. 松本功 関節リウマチを疑ったら 診断治療の update と鑑別すべき膠原病—シェーグレン症候群— medicina in press
10. 明石直嗣、松本功、住田孝之 関節リウマチ治療におけるイマチニブの可能性 分子リウマチ治療 3; 179-182, 2010
11. 松本功、井上明日香、田中陽子 関節炎における TNF α -induced adipose related protein (TIARP) リウマチ科 44:354-360, 2010
12. 坪井洋人、松尾直美、飯塚麻菜、中村友美、松本功、住田孝之 シェーグレン症候群における M3 ムスカリン作動性アセチルコリン受容体抗体のエピトープと機能解析 日本臨床免疫学会雑誌 33:222-228, 2010
13. 明石直嗣、松本功、住田孝之 RA の治療標的としての immunoproteasome *Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology* 4:181-184,

2010

14. 松本功、井上明日香、田中陽子、明石直嗣、岩波慶一、住田孝之 TNF・誘導分子 TIARP と自己免疫疾患 *Mebio* 27:68-75, 2010
15. 住田孝之、坪井洋人、飯塚麻菜、中村友美、松本功 M3R 反応性 T 細胞とシェーグレン症候群 *Mebio* 27:84-93, 2010
16. 松本功 膠原病—病態への新たなアプローチと治療展開— 関節リウマチの分子標的と制御 最新医学 65:960-964, 2010
17. 松本功 実験的関節炎に対するリボゾームを用いた抗原特異的治療戦略 リウマチ科 43:385-393, 2010
18. 飯塚麻菜、若松英、松本功、坪井洋人、中村友美、松井稔、住田孝之 シェーグレン症候群の病態形成における M3 ムスカリン作動性アセチルコリン受容体に対する自己免疫応答の解明 日本臨床免疫学会雑誌 33:87-91, 2010
19. 井上明日香、松本功、住田孝之 自己免疫関節炎における TNF α -induced adipose related protein(TIARP) の役割 医学のあゆみ 232:818-819, 2010
20. 松本功 関節炎における自己抗体の病因的意義 最新医学 65: 280-285, 2010

特許

特願 2008-022714 号 “関節炎誘発ペプチド”

TREM1 及びそのリガンド修飾による免疫疾患制御法の開発

研究分担者 上阪 等 東京医科歯科大学 膠原病・リウマチ内科（職名）准教授

研究要旨

TREM1 阻害療法は既存の生物学的製剤とは異なり、結核や重症感染症といった副作用を増加させない関節炎治療法となることが期待される。昨年度までに明らかとなったこととして TREM1 は関節炎滑膜に発現しており、TREM1-Ig 投与によりマウス関節炎モデルで改善を認めた。本年度は TREM1 リガンドの同定に成功した。同リガンドに対する抗体投与でも関節炎は改善した。今後、TREM1 と TREM1 リガンドとの相互作用、機能の解析を行うとともに、感染防御への影響を調べ、TREM1 阻害療法を新規関節炎治療法として開発していく。

A. 研究目的

TREM1 は、炎症性サイトカインの分泌を促す。一方、マウスの敗血症モデルにおいて TREM1-TREM1-Ligand (TREM1-L) 阻害は炎症を抑制し、生存率を改善させる。これは TREM1 阻害では感染防御に必要な最低限の炎症性サイトカインが温存されることを示唆する。TREM1 阻害療法の開発は既存の生物学的製剤とは異なり、結核や重症感染症といった副作用を増加させない関節炎治療法の開発となることが期待される。

昨年度までに TREM1 阻害が関節リウマチ動物モデルを治療しうることを TREM1 細胞外ドメイン融合蛋白

(TREM1-Ig) を用いて明らかにした。一方、TREM1-L 側の役割は未知であるだけでなく、TREM1 阻害療法は特許関係から実用化が阻まれている。そこで、本年度は未知である TREM1 リガンド (TREM1-L) を同定し、TREM1-TREM1-L 相互作用を阻害する化合物や抗 TREM1-L 抗体を開発して、安全な関節リウマチなどの免疫疾患への治療法を開発する。

B. 研究方法

昨年度まで関節炎における TREM1 の関与を見るべく、関節炎滑膜における TREM1 の発現を免疫染色で確認した。アデノウイルスを用い TREM1-Ig や阻害化合物をマウス膠原ゲン誘導関節炎 (Collagen-Induced Arthritis: CIA) に投与し治療効果を検討した。また、TREM1-L を同定すべく、TREM1-Ig 等の細胞外ドメイン融合蛋白を作製し、TREM1-L が発現する細胞の同定を試みた。TREM1-L の発現が確認された細胞の cDNA ライブラリーを用い発現クローニングを行った。同定された TREM1-L に対するモノクローナル抗体を作製し、CIA で関節炎治療効果を確認し、その機序解析を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は東京医科歯科大学動物実験ガイドラインに従い、必要最低限の数で動物福祉に十分配慮する。本動物実験計画書を東京医科歯科大学動物実験委員会に提出し認可を得ている。

C. 研究結果

昨年度までに関節炎滑膜における TREM1 の発現を確認した。アデノウイルスを用い TREM1-Ig を CIA に投与したところ用量依存性に治療効果を認めた。TREM1-Ig による感染防御能を落とさない程度の TREM1 阻害が関節リウマチ動物モデルを治療しうることを明らかにした。これらを踏まえ、今年度は、新規に作製した TREM1 細胞外ドメイン融合蛋白を用いたフローサイトメトリー解析により既報告とは異なる新規 TREM1-L 発現細胞を発見した。同細胞の cDNA ライブラリー及び TREM1 融合蛋白を用いた発現クローニングにより TREM1-L を同定した。同分子に対するモノクローナル抗体を複数作製し、TREM1-TREM1-L 相互作用を阻害するクローンを選別した。同抗体を CIA に投与したところ、発症前及び発症後投与において関節炎の改善をきたすことができた。

D. 考察

TREM1 阻害では感染防御に必要な最低限の炎症性サイトカインが温存されることが示唆されている。TREM1-Ig や抗 TREM1-L 抗体投与による TREM1 阻害が自己免疫疾患治療に有効であることを昨年度までに明らかにした。今回の TREM1-L 同定は世界初である。今後、TREM1-L 発現細胞の役割、TREM1-TREM1-L 相互作用の解析、修飾法の改変により、更に効果的で、既存の生物学的製剤とは異なり、結核や重症感染症といった副作用を増加させない新規の治療法として臨床応用へ開発していきると期待される。

E. 結論

感染防御能を落とさない程度の TREM1 阻害が関節リウマチ動物モデルを治療しうることを明らかになった上で、今年度は TREM1-L の同定に成功した。さらに同分子に対する抗体投与により関節リウマチ動物モデルを改善することができた。今後、感染防御への影響を調

べ、新規関節炎治療法として開発していく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Murakami, Y. Akahoshi, T. Aoki, N. Toyomoto, M. Miyasaka, N. Kohsaka, H. : Intervention of an inflammation amplifier, triggering receptor expressed on myeloid cells 1, for treatment of autoimmune arthritis. *Arthritis Rheumatism* 60(6):1615-23,2009

2. 学会発表

1. 村上洋介、宮坂信之、上阪等: 疾患の制御 臨床から免疫へ 関節リウマチの新しい標的分子

Triggering receptor expressed on myeloid cells-1、日本臨床免疫学会 2008. 08

2. 上阪等、村上洋介、野々村美紀、宮坂信之: 疾患の病態と分子医学 関節リウマチ治療の新たな標的分子、日本臨床分子医学会学術総会 2008. 07

3. 村上洋介、赤星透、宮坂信之、上阪等: 関節炎治療の新たな標的分子 Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1)、日本リウマチ学会総会・学術集会 2008. 04

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

なし

自己免疫疾患における免疫担当細胞のシグナル異常とその制御
（関節リウマチにおける RasGRP4 の発現検討）

分担研究者 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）
研究研究者 保田晋助 北海道大学大学院医学研究科 内科学講座・第二内科（助教）

研究要旨

関節リウマチ(RA)の滑膜炎形成において、マスト細胞・マクロファージおよび樹状細胞など単球系細胞の働きは不可欠である。Ras-guanyl releasing protein 4 (RasGRP4) はマスト細胞に発現するが、末梢血単核球 (PBMCs)における発現も知られている。これまでの検討で、RasGRP4 は末梢血において CD14 陽性単球に高発現していることを明らかにした。RA 患者末梢血においては健常人と比較して RasGRP4 転写産物が高発現しているが、一方蛋白レベルでの発現は低かった。RasGRP4 転写産物の質的検討において 12 種のスプライス異常を認め、異常を有する頻度は RA 患者において健常人と比較して有意に高かった。RA 滑膜において RasGRP4 陽性細胞の浸潤を認め、今年度の研究では、これらがおもに CD14 陽性単球であることを明らかにした。一方 CD68 陽性の RA 滑膜マクロファージにおいては RasGRP4 の発現をほとんど認めず、また試験管内で作製したマクロファージ・破骨細胞においても RasGRP4 の発現は低値であった。これらより、RasGRP4 は単球分化と共にその発現を低下させることがわかった。単球における RasGRP4 スプライス異常および蛋白レベルの低下が RA における病態形成に影響を与える可能性が示唆された。また、RasGRP4 が単球分化に与える影響を解明することが RA の新たな治療法の開発に繋がる可能性が期待される。

A. 研究目的

RasGRP (Ras-guanyl releasing protein)はRasを活性化する guanine nucleotide exchanging factor であるが、ファミリー分子として RasGRP1-4 が知られている。

RasGRP1 は T 細胞に発現し、その分化に関わるが、T 細胞機能の異常が報告されている全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus: SLE) 患者においては、RasGRP1 のスプライス異常が有意に高頻度で、全長 RasGRP1 の蛋白発現レベルが低いことを過去に報告した (Yasuda S et al. J Immunol. 2007)。RasGRP4 はマスト細胞に発現し、その分化に重要であるが、末梢血単核球 (PBMC) にも発現し、T、B 細胞には発現しないと報告されていることから、単球での発現が示唆される。マスト細胞・単球系細胞ともに関節リウマチ (RA) の病態形成において必須の炎症性細胞であり、本研究では、RA 患者における RasGRP4 の発現を検討することによってその病態の一部を明らかにすることを目的として H20 年度からの研究を行ってきた。

これまでに、RasGRP4 が健常人末梢血のうち CD14 陽性単球に高発現することを示した。また、RA 患者末梢血においては健常人と比較して RasGRP4 転写産物が高発現しているが、一方蛋白レベルでの発現は低かった。RasGRP4 転写産物の質的検討においてスプライス異常を認め、その頻度は RA 患者において健常人と比較して有意に高いことを示した。RA 滑膜において RasGRP4 陽性細胞の浸潤を認めていたが、当初これら

を滑膜マクロファージと予測していた。今年度の研究では、RA 滑膜に浸潤する RasGRP4 陽性細胞の由来を明らかにすると共に、RasGRP4 の細胞分化に伴う発現量の変化について検討した。

B. 研究方法

健常人末梢血における RasGRP4 発現細胞の同定；健常人 PBMC より CD14 陽性単球、T 細胞、CD14, 3, 19 陰性細胞を分離し、それぞれにおける RasGRP4 の発現を検討した。mRNA レベルの検討では、正常 RasGRP4 の翻訳部位全長を増幅するプライマーを用いて RT-PCR を行った。加えて、エクソン 7-8 接合部を認識するプライマーセットを用いて real-time PCR を行い、それぞれの細胞分画における RasGRP4 の発現を定量的に評価した。蛋白レベルの検討では、RasGRP4 蛋白の N 端に相当するペプチドを用いてポリクローナル抗体を作製した。この抗 RasGRP4 抗体を用いてスライドグラスに固着した単球・T 細胞・RasGRP4 を強制発現させた HEK293 細胞に対して免疫染色を行った。また、In-vitro で培養したマクロファージおよび破骨細胞における RasGRP4 の発現を定量的 PCR にて評価した。マクロファージは、健常人 CD14 陽性単球より M-CSF 刺激下に 7 日間培養して作製し、破骨細胞については破骨細胞前駆細胞 (Lonza) を RANK ligand および M-CSF の存在下に 14 日間培養して作製した。

RA 患者 PBMC における RasGRP4 転写産物の量的、質的検討；

次に、文書による同意を得た健常人 42 名(男性 6 名、女性 36 名、平均年齢 50 歳)、RA 患者 57 名(男性 16 名、女性 41 名、平均年齢 61 歳)および他の自己免疫疾患患者 36 名の末梢血単核球より total RNA を抽出、cDNA を合成、RasGRP4 の発現を real-time PCR にて定量した。また、上記のうち 16 名の健常人、23 名の RA 患者および 20 名の自己免疫疾患患者について全長 RasGRP4 を PCR にて増幅後、ベクターにサブクローニングしてひとりあたり 5 クローンの塩基配列を決定した。

RA 患者末梢血における RasGRP4 蛋白発現；

RA 患者および健常人由来の PBMC または末梢血 CD14 陽性細胞を、抗 RasGRP4 抗体によるウエスタンブロッティング法を用いて RasGRP4 蛋白レベルを評価した。

RA 患者滑膜における RasGRP4 発現細胞の同定；

膝関節滑膜切除術を受けた RA 患者より同意の下に切除滑膜を得、抗 RasGRP4 抗体による発色染色、抗 RasGRP4 抗体と抗 CD14 抗体を用いた蛍光二重染色および抗 RasGRP4 抗体と抗 CD68 抗体を用いた組織染色を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は北海道大学倫理委員会の承認を得て、文書による同意を得た上で厳重な個人情報管理のもと行われている。

C. 研究結果

健常人末梢血における RasGRP4 発現細胞の同定

-RasGRP4 を強制発現させた HEK293 細胞は今回作製した抗 RasGRP4 抗体で染色されたが、操作を加えていない HEK293 細胞では染色が見られず、また免疫に用いたペプチドによる吸収試験の結果からも、免疫染色における抗 RasGRP4 抗体の特異性と有用性が示された。PBMC における RasGRP4 の発現は、mRNA レベルにおいても蛋白レベルにおいても、CD14 陽性単球で最も高く、T 細胞では低値であった(Figs. 1,2)。

Figure 1. 末梢血単球・T 細胞における RasGRP4 発現

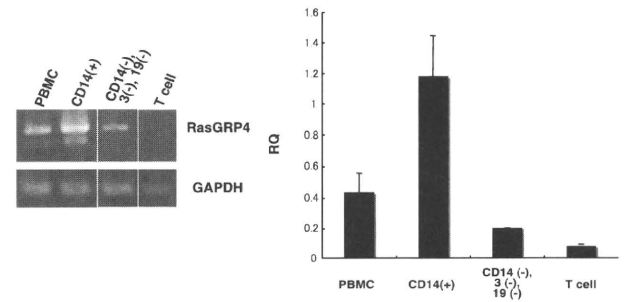
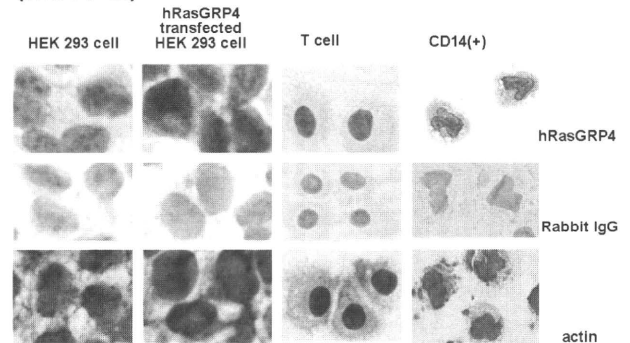


Figure 2. RA 末梢血における RasGRP4 の蛋白発現 (免疫染色)



健常人および関節リウマチ・自己免疫疾患患者末梢血における RasGRP4 転写産物の定量的・質的解析

-RasGRP4 の PBMC における発現を real-time PCR を用いて定量的に評価した。PBMC における RasGRP4 発現の RasGRP4 発現は、健常人と比較して RA 患者において優位に発現が高かった(健常人における平均発現量+2SD を正常上限とし、これを超えた検体を異常高値とした。統計学的解析には Student's t-test を用いた。p = 0.044)。他の自己免疫疾患患者においても検体数は少ないものの RasGRP4 発現は優位に高値である場合が高かった。

RA 患者および健常人サンプルからサイズの異なる 14 種のスプライスバリエントが検出され、そのうち 12 種 (variant 5-14) は新規スプライスバリエントであった。(Fig. 3)。Exon 9 全体を欠損する RasGRP4 スプライスバリエント 5、exon 9 の 5'側 207 塩基を欠損するスプライスバリエント 6 の頻度が高かった。スプライスバリエントを有する頻度は優位に RA 患者で高かった (クローン頻度で健常人 22.5%、RA 67.3%、p < 0.0001)、(Table 1)。

Figure 3. RA 患者末梢血における RasGRP4 のスプライス異常

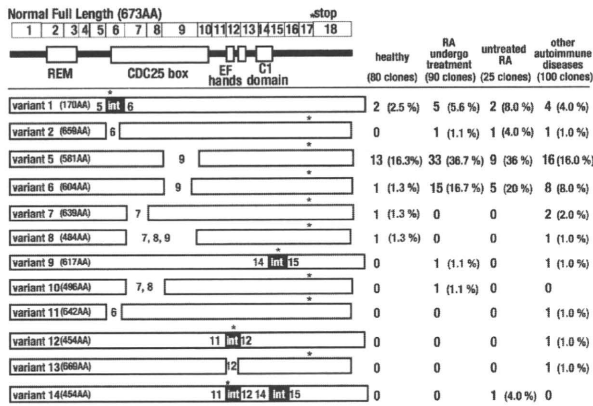


Table 1. RasGRP4 スプライス異常の頻度

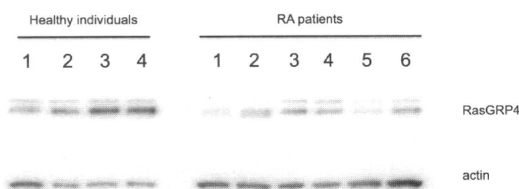
	normal	variant (%)	OR	95% C.I.	P value
<u>Any variants</u>					
Healthy subjects	62	18 (22.5)			
RA patients (total)	47	74 (67.3)	5.42	2.86 – 10.28	<0.0001
RA patients (untreated)	9	16 (64.0)	6.12	2.32 – 16.17	0.00029
Autoimmune controls	69	31 (31.0)	1.55	0.79 – 3.04	0.27

また、スプライスバリエント 6 を有する患者では、これを有しない患者に比較して PBMC における RasGRP4 の発現量が優位に高かった ($p = 0.02$)。一方、スプライスバリエントの有無と疾患活動性との間に有意な相関はなかった。

健康人および関節リウマチ患者末梢血における RasGRP4 蛋白の発現

-ウエスタンブロット法にて検討した PBMC における RasGRP4 発現は、健康人と比較して RA 患者では低値であった (Fig. 4)。

Fig.4 PBMC における RasGRP4 の蛋白発現

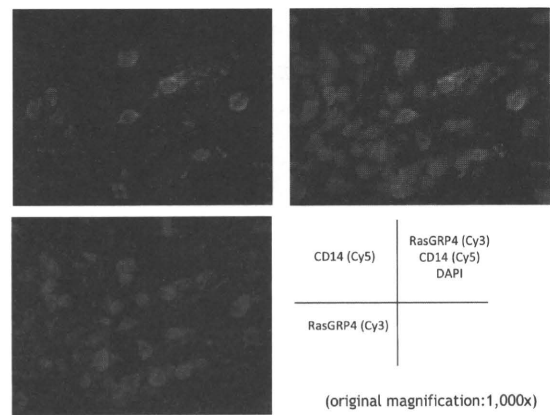
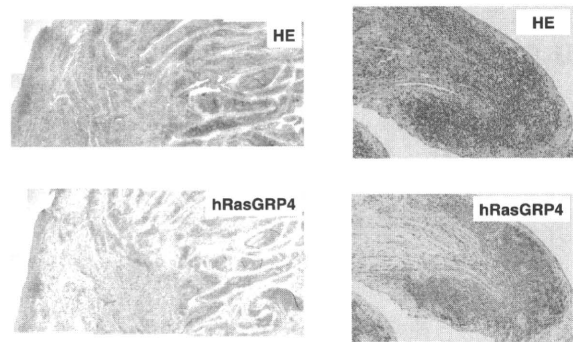


また、スプライスバリエントに相当するようなサイズの異なるバンドは、RA patient 2 でわずかにみられる以外は少なくとも検出感度以下であった。また、末梢血単球に純化して行った検討においても同様の結果を得た。

関節リウマチ滑膜における RasGRP4 蛋白の発現

- RA 滑膜において、RasGRP4 陽性細胞は広く炎症滑膜に存在したが、リンパ濾胞には存在しなかった。CD14, CD68 抗体を用いた二重染色による検討では、RasGRP4 も発現していたのはおもに単球系であることが示された (Fig. 5)。一方、CD68 陽性マクロファージにおいて RasGRP4 はほとんど発現していなかった。

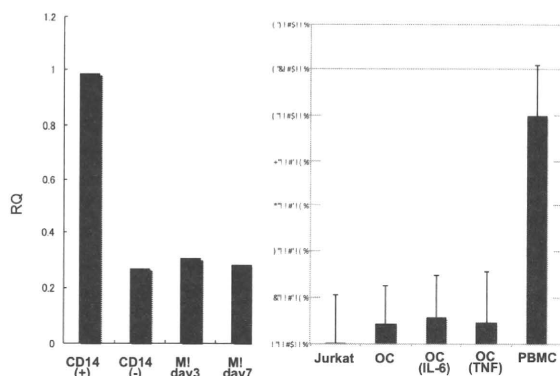
Fig.5 RA 患者滑膜における RasGRP4 蛋白の発現



In vitro で作成したマクロファージおよび破骨細胞における RasGRP4 の発現

- in vitro で作製したマクロファージ・破骨細胞における RasGRP4 発現を real-time PCR にて評価した。単球に比較し、マクロファージでは RasGRP4 の転写は低下しており (Fig.6 左)、また破骨細胞においても末梢血単核球と比較して RasGRP4 の発現は著しく低下していた (Fig.6 右)。破骨細胞を IL-6, TNF で刺激した際にも RasGRP4 の発現は上昇しなかった。

Fig.6 マクロファージ・破骨細胞における RasGRP4 蛋白の発現



D. 考察

RA における関節局所では、さまざまな免疫細胞が滑膜へ集簇し活性化する。このとき、マスト細胞からは IL-1, IL-6, TNF- α , 血管内皮細胞増殖因子(VEGF), プロスタグランジン, 線維芽細胞増殖因子, ヘパリン, プロテアーゼなどが産生され、これらの炎症性メディエータを介した炎症性細胞の関節局所への遊走、マクロファージの活性化、線維芽細胞の分化、増殖滑膜における血管新生の促進がおこる。一方、末梢血中の単球は、組織においてマクロファージ、樹状細胞、破骨細胞へと分化する。RA の滑膜炎や滑膜増殖に関与する IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β を主に産生するのは関節局所で活性化したマクロファージであり、活性化マクロファージはこれらの炎症性サイトカインを大量に産生する。滑膜組織において成熟した樹状細胞は IL-1, IL-6, TNF- α , IL-10 などの炎症性サイトカインを産生するほか、クラス I, II MHC 分子を高発現しており、自己反応性 T 細胞の活性化を促していると考えられている。このようにマスト細胞や単球系細胞は、関節炎の形成におけるエフェクターとして重要であり、RA の病態生理に深く関与しているといえる。

今回、マスト細胞および PBMC 分画に発現するとされる RasGRP4 に注目し、まず RasGRP4 が PBMC 分画においては主に単球に発現していることを示した。

RA 患者では PBMC における RasGRP4 mRNA の発現量が高く、またスプライス異常を高頻度に認めた。今回 real-time PCR に用いたプライマーセットはエクソン 7-8 接合部を認識するため、今回同定されたスプライスバリエーションのほとんどを認識する。特にスプライスバリエーション 6 は RasGRP4 RNA の高発現と関連していたことから、異常 RNA を代償する目的で単球が RasGRP4 を高発現している可能性が示唆された。RA 患者では RasGRP4 の mRNA が高発現していることに反して蛋白レベルでは低発現であることも、この仮説に矛盾しないと考える。RasGRP4 スプライスバリエーションが蛋白発現に与える影響については今後の検討を要するが、少

なくともこれまでの検討からは、バリエーション自体は転写後調整をうけている可能性が高く、スプライスバリエーションに相当する mRNA が正常 RasGRP4 の発現を負に調整している可能性が考えられる。

末梢血で低発現である一方で滑膜局所における発現を認める点に関しては、検出法による感度の違いも考慮すべきであるが、局所における炎症性サイトカインによってその発現が調整されている可能性が考えられた。滑膜における RasGRP4 発現細胞はおもに CD14 陽性単球であり、CD68 陽性マクロファージにおいてはその発現が減弱していた。このことより、RA 滑膜における RasGRP4 発現細胞は、局所に浸潤して間もない単球を観察しているものと考えられた。実際に、試験管内で成熟させたマクロファージ・破骨細胞で RasGRP4 の発現が低下していることがわかった。このことより、RasGRP4 の発現はこれらの前駆細胞である単球では高発現であるが分化と共に発現が低下することが示された。つまり、RasGRP4 の発現調整によって単球系細胞の分化を修飾できる可能性も考えられる。これについては、今後 siRNA などを用いた検討を行ってゆく必要があると考えられる。仮説が正しければ、関節リウマチの新たな治療ターゲットとなり得ると考えられる。

E. 結論

1. 末梢血単核球に RasGRP4 が高発現するが、単球・破骨細胞ではむしろ低発現であり、分化と共に発現調整されていることが明らかとなった。
2. RA 患者末梢血における RasGRP4 転写産物のスプライス異常および発現量の増加を認めたが、タンパク量としてはむしろ低発現であった。
3. RA 滑膜では CD14 陽性単球における RasGRP4 の発現を認めた。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujieda Y, Kataoka H, Odani T, Otomo K, Kato M, Fukaya S, Oku K, Horita T, Yasuda S, Atsumi T, **Koike T**. Clinical features of reversible posterior leukoencephalopathy syndrome in patients with systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol (in press)*
2. 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-controlled study. *J Reprod Immunol. 84(1) : 95-99, 2010*

3. Nakamura A, Shimizu C, Nagai S, Yoshida M, Aoki K, Kondo T, Miyoshi H, Wada N, Tajima T, Terauchi Y, Yoshioka N, Koike T. Problems in diagnosing atypical Gitelman's syndrome presenting with normomagnesaemia. Clin Endocrinol (Oxf).72(2):272-276,2010
 4. Miyoshi H, Souza SC, Endo M, Sawada T, Perfield JW 2nd, Shimizu C, Stancheva Z, Nagai S, Strissel KJ, Yoshioka N, Obin MS, Koike T, Greenberg AS. Perilipin overexpression in mice protects against diet-induced obesity. J Lipid Res. 51(5):975-982,2010
 5. 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 nonsynonymous single-nucleotide polymorphism in TNFAIP3 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in the Japanese population. Arthritis Rheum.62(2):574-579,2010
 6. Kondo T, Yasumoto A, Arita K, Sugita J, Shigematsu A, Okada K, Takahata M, Onozawa M, Kahata K, Takeda Y, Obara M, Yamamoto S, Endo T, Nishio M, Sato N, Tanaka J, Hashino S, Koike T, Asaka M, Imamura M. Successful treatment of acute myelogenous leukemia with favorable cytogenetics by reduced-intensity stem cell transplantation. Int J Hematol. 91(2) :310-321,2010
 7. Suzuki E, Amengual O, Atsumi T, Oku K, Hashimoto T, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Ieko M, Fukushima K, Koike T. Increased expression of phospholipid scramblase 1 in monocytes from patients with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol.37(8):1639-1645,2010
 8. Ieko M, Yoshida M, Naito S, Nakabayashi T, Kanazawa K, Mizukami K, Mukai M, Atsumi T, Koike T. Increase in plasma thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor may not contribute to thrombotic tendency in antiphospholipid syndrome because of inhibitory potential of antiphospholipid antibodies toward TAFI activation. Int J Hematol. 91:776-783,2010
 9. Nanjo K, Nagai S, Shimizu C, Tajima T, Kondo T, Miyoshi H, Yoshioka N, Koike T. Identification and functional analysis of novel calcium-sensing receptor gene mutation in familial hypocalciuric hypercalcemia. Endocrine J. 57(9): 787-792, 2010
 10. Takahata M, Hashino S, Okada K, Onozawa M, Kahata K, Sugita J, Shigematsu A, Kondo T, Yamamoto S, Endo T, Nishio M, Ito Y, Tanaka J, Koike T, Asaka M, Imamura M. Reduced intensity conditioning regimen with fludarabine, busulfan, and low-dose TBI(Flu-BU2-TBI): Clinical efficacy in high-risk patients. Am J Hematol. 84:243-248, 2010
 11. Fukae J, Kon Y, Henmi M, Sakamoto F, Narita A, Shimizu M, Tanimura K, Matsushashi M, Kamishima T, Atsumi T, Koike T. Change of synovial vascularity in a single finger joint assessed by power Doppler sonography correlated with radiographic change in rheumatoid arthritis: Comparative study of a novel quantitative score with a semiquantitative score. Arthritis Care Res.62(5):657-663,2010
 12. Kamishima T, Fujieda Y, Atsumi T, Mimura R, Koike T, Terae S, Shirato H. Contrast-Enhanced Whole Body Joint MR Imaging in Patients with Unclassified Arthritis Developing Early Rheumatoid Arthritis in 2 Years: Feasibility Study and Correlation with MR Imaging Findings of the Hands. Am J Roentgenol.195: 287-92,2010
2. 学会発表
1. Atsumi T, Amengual O, Koike T. Antiphospholipid syndrome: pathogenesis. In: Lahita RG, editor. Systemic Lupus Erythematosus 5th edition. San Diego: Academic Press; p.945-66. 2010
- 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
○ なし

関節炎モデルにおける MR1 拘束性 MAIT 細胞の役割に関する研究

研究分担者 山村 隆 (独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部 部長
研究協力者 三宅 幸子 (独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部 室長

研究要旨

Mucosal associated invariant T (MAIT)細胞は、MR1 分子に拘束され T 細胞受容体にインバリアントな α 鎖（マウス $V\alpha 19 J\alpha 33$ 、ヒト $V\alpha 7.2 J\alpha 33$ ）を発現する T 細胞である。我々は MAIT 細胞を欠損する $MR1^{-/-}$ マウスを用い、コラーゲン関節炎 (CIA) ならびに抗体誘導関節炎 (AIA) における MAIT 細胞の役割を解析した。CIA, AIA とともに臨床スコア、病理スコアともに、同腹の野生型マウスと比較して $MR1^{-/-}$ DBA/1J マウスで有意に軽症であった。CII に対するリコール反応における $IFN-\gamma$ および $IL-17$ 産生ならびに血清中抗 CII 抗体価は、 $MR1^{-/-}$ DBA/1J マウスにおいて時に低下していたが常に有意差が得られず、T 細胞への影響は少ないと考えられ、MAIT 細胞は主に炎症に関与し炎症を増幅する細胞であると考えられた。

A. 研究目的

Mucosal associated invariant T (MAIT)細胞は、MR1 分子に拘束され T 細胞受容体にインバリアントな α 鎖（マウス $V\alpha 19 J\alpha 33$ 、ヒト $V\alpha 7.2 J\alpha 33$ ）を発現する T 細胞である。我々は MAIT 細胞を欠損する $MR1^{-/-}$ マウスを用い、コラーゲン関節炎ならびに抗体誘導関節炎における MAIT 細胞の役割を解析することを目的とした。

B. 研究方法

コラーゲン関節炎 (Collagen-induced arthritis: CIA) は $MR1^{-/-}$ マウスを DBA/1J マウスに 10 回戻し交配を行った $MR1^{-/-}$ DBA/1J マウスを使用した。CII を FCA と共に Day 0、21 に免疫し誘導し、抗体誘導関節炎は C57BL/6J (B6) マウスもしくは $MR1^{-/-}$ マウスおよびその littermate、ならびに $V\alpha 19$ トランスジェニック $CD1^{-/-}$ マウスから NKT 細胞を分離し、 $MR1^{-/-}$ マウスに移入後に抗 CII モノクローナル抗体カクテルを 2mg/mouse で静脈投与し二日後に LPS を腹腔内投与して誘導した。関節炎は、臨床症状と病理所見にて評価を行った。CII に対するリコール反応、ならびに血清中の CIA 誘導後抗 CII 抗体を ELISA 法にて測定した。

（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

CIA では臨床スコア、病理スコアともに、同腹の野生型マウスと比較して $MR1^{-/-}$ DBA/1J マウスで有意に軽症であった。CII に対するリコール反応における $IFN-\gamma$ および $IL-17$ 産生ならびに血清中抗 CII 抗体価は、 $MR1^{-/-}$ DBA/1J マウスにおいて時に低下していたが常に有意差が得られず、T 細胞への影響は少ないと考えられた。抗体誘導関節炎においては、臨床スコア、病理スコアともに、同腹の野生型マウスと比較して $MR1^{-/-}$ DBA/1J マウスで有意に軽症であった。

D. 考察

$MR1$ 拘束性 MAIT 細胞は実験的自己免疫性脳脊髄炎では抑制的に働くが、コラーゲン関節炎ならびに抗体誘導関節炎の炎症増悪に関与する可能性が示唆された。関節炎では、炎症性サイトカインが大量に産生されていることから、強い炎症局所では MAIT 細胞は炎症の増悪因子として機能する可能性が考えられた。MAIT 細胞はその頻度がヒトで多いことが知られており、今後はヒトでの MAIT 細胞の生理的機能の解析や、自己免疫病態における役割についての解析が重要である。

E. 結論

$MR1$ 拘束性 MAIT 細胞は、コラーゲン関節炎ならびに抗体誘導関節炎においては、炎症増悪に関与する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

（英文原著）

1. Chihara, N., Aranami, T., Sato, W., Miyazaki, Y., Miyake, S., Okamoto, T., Ogawa, M., Toda, T., and Yamamura, T.: Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica *PNAS (in press), 2011*

2. Chang YJ, Kim HY, Albacker LA, Lee HH, Baumgarth N, Akira S, Savage PB, Endo S, Yamamura T, Maaskant J, Kitano N, Singh A, Bhatt A, Besra GS, van den Elzen P, Appelmelk B, Franck RW, Chen G, DeKruyff RH, Shimamura M, Illarionov P, Umetsu DT. Influenza A infection in suckling mice expands a population of NKT cells that protects mice

as adults from airway hyperreactivity. J. Clin. Invest.
121:57-69, 2010

(和文総説)

1. 荒浪利昌, 山村 隆: 炎症と T 細胞サブセット. 特集抗体療法. 治療学 44:11-13, 2010
2. 能登大介, 山村 隆: <Special Article> 免疫性神経疾患の免疫学. 内科 105:756-761, 2010
3. 三宅幸子, 山村 隆: NKT 細胞と多発性硬化症. Mebio 27: 94-101, 2010
4. 荒浪利昌, 山村 隆: Th17 細胞のケモカインレセプターの発現. Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology 4: 156-160, 2010
5. 千原典夫, 山村 隆: 神経疾患と炎症 –多発性硬化症を中心に– 最新医学 65: 2390-2395, 2010

2. 学会発表

1. Yamamura T: Invariant T cells as sensors and regulators of commensal flora. 14th International Congress of Immunology (ICI), Kobe, Japan, 8. 24, 2010
2. Yamamura, T.: Keynote lecture. Immunology of NK and NKT cells in MS. Multiple Sclerosis Immunology: A foundation for Current and Future Treatments. Nottingham, UK, 10.31, 2010
3. Yamamura, T.: IL-6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica (NMO). 2010 Neuromyelitis optica roundtable conference. A rare approach to a rare disease. The Beverly Hilton. Los Angeles, CA, 11.8, 2010

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
なし

CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞の抗体産生抑制能に関する研究

研究分担者 藤尾圭志 東京大学医学部アレルギーリウマチ内科 助教
研究協力者 岡村僚久 東京大学医学部アレルギーリウマチ内科 特任助教

研究要旨

自己免疫寛容において、CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞は大きな役割を果たしている。しかし機能的 Foxp3 を欠損したマウス・ヒトの表現型は、全身性エリテマトーデス（SLE）などの全身性自己免疫疾患とは異なっており、全身性自己免疫疾患では CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞以外の制御機構も重要と考えられる。分担研究者らは最近、転写因子 Egr2 を発現する CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞を同定した。T 細胞特異的 Egr2 ノックアウトマウスが SLE 様の病態になることが報告されていることから、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞の SLE モデルマウスに対する治療効果及び、抗体産生抑制能を検討した。SLE モデルマウスである MRL/lpr マウスに、MRL/+マウス由来の CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞及び CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞を移入すると、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞のみ自己抗体産生、臓器障害を抑制した。RAG1 ノックアウトマウスに B6 マウス由来の B 細胞と OT-II マウス由来の CD4 陽性 T 細胞を移入し NP-OVA で免疫する系で、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞の共移入により抗体産生は抑制された。また OVA-NP で免疫した C57/B6 マウス由来の B 細胞と OT-II マウス由来のヘルパー T 細胞を試験管内で共培養して抗 NP 抗体を産生させる実験系において、OT-II マウス由来の CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞は抗体産生を抑制した。これらのことから CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞は、試験管内・生体内で強い抗体産生抑制能を発揮する点で、CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞とは異なる新たな制御性 T 細胞サブセットであると考えられた。今後 CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞の抗体産生抑制メカニズムの検討を進めることで、新たな自己抗体産生抑制法を提示できる可能性があると考えられた。

A. 研究目的

自己免疫寛容において、CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞は大きな役割を果たしている。しかし機能的 Foxp3 を欠損したマウス・ヒトの表現型は、全身性エリテマトーデス（SLE）などの全身性自己免疫疾患とは異なっており、全身性自己免疫疾患では CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞以外の制御機構も重要と考えられる。分担研究者らは最近、転写因子 Egr2 を発現する CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞を同定した。T 細胞特異的 Egr2 ノックアウトマウスが SLE 様の病態になることが報告されていることから、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞の SLE モデルマウスに対する治療効果及び、抗体産生抑制能を検討した。

B. 研究方法

SLE モデルマウスである MRL/lpr マウスに、MRL/+マウス由来の CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞及び CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞を移入し、自己抗体産生、臓器障害を評価した。RAG1 ノックアウトマウスに、OT-II マウス由来の T 細胞と C57/B6 マウス由来の B 細胞を移入後に OVA-NP で免疫する実験系に、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞を共移入することで、抗体産生への影響を検討した。また OVA-NP で免疫した C57/B6 マウス由来の B 細胞と OT-II マウス由来のヘルパー T 細胞を試験管内で共培養して抗 NP 抗体を産生させる実験系に、OT-II マウス

由来の CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞を加えて抗体産生への影響を検討した。

（倫理面への配慮）

すべての研究は各施設の遺伝子倫理委員会の審査を受け、承認を受けた研究計画に則って実施された。

C. 研究結果

CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞を移入した MRL/lpr マウスでは、自己抗体産生・腎障害が抑制されなかったが、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞を移入では抑制された。C57/B6 マウス由来の CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞は生体内での抗 NP 抗体産生を抑制した。また OT-II 由来の CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞は、共培養による試験管内の抗 NP 抗体産生能を著明に抑制した。

D. 考察

CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞は、CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞とは異なり、SLE モデルマウスの自己抗体産生・腎障害を抑制した。さらに CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞は試験管内、生体内での抗体産生抑制能があることが確認された。

E. 結論

CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞は、試験管内・生体内で強い抗体産生抑制能を発揮する点で、

CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞とは異なる新たな制御性 T 細胞サブセットであると考えられた。今後 CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞の抗体産生抑制メカニズムの検討を進めることで、新たな自己抗体産生抑制法を提示できる可能性があると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Okamoto A, Fujio K, Yamamoto K .: The future of lupus therapy modulating autoantigen recognition.

Lupus. 19:1474-81, 2010.

2. Fujio K, Okamura T, Yamamoto K .: The family of IL-10-secreting CD4+ T cells. Adv Immunol. 105: 99-130, 2010.

99-130, 2010.

3. Myouzen K, Kochi Y, Shimane K, Fujio K, Okamura T, Okada Y, Suzuki A, Atsumi T, Ito S, Takada K, Mimori A, Ikegawa S, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K .: Regulatory polymorphisms in EGR2 are associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. Hum Mol Genet. 19: 2313-20, 2010.

2. 学会発表

1. Fujio K.: New regulatory T cell subset producing IL-10 and its role in autoimmune diseases.: The 19th International Rheumatology Symposium 2010.4.23

2. Fujio K.: Immunological intervention strategies aimed at regulatory T cells. 14th International Congress of Immunology Lunchtime Lecture 1-4 2010.8.23

3. Fujio K.: CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells in the treatment of inflammatory diseases. The 5th Chiba University Global COE Symposium 2010.12.4

4. 藤尾圭志、岡村僚久、住友秀次、山本一彦: 新規 Treg 細胞による自己免疫制御 (マウスとヒト)、第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会、2010.11.26

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

SLE モデルにおける抗 BLC 中和抗体の治療効果に関する研究

研究分担者 石川 昌 東京大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨

分担研究者はこれまでに、SLE モデルである BWF1 マウスにおいて、B 細胞ケモカイン（BLC/CXCL13）の異所性高発現が SLE 病態形成に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきたことから、その制御戦略として抗 BLC 中和抗体の治療効果を検討した。その結果、蛋白尿を発現した BWF1 マウスに対して著明な延命効果が認められた。さらにそのメカニズムとして、IgG レベルや抗 DNA 抗体レベルに対する影響より、IL-17 レベルの低下をもたらすことによる可能性が示唆された。

A. 研究目的

これまで我々は、SLE モデルである BWF1 マウスを用いて、B 細胞ケモカイン BLC/CXCL13 の異所性高発現が B1 細胞の遊走異常をもたらし、 T_{FH} 様自己反応性 CD4T 細胞を活性化することが病態形成に重要な役割を果たしている可能性を示唆してきたが、今年度は抗 BLC 中和抗体の治療効果を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

ラット抗マウス BLC 中和抗体（R&D）およびコントロールラット IgG を加齢 BWF1 マウスに腹腔内注射し、抗 DNA 抗体、蛋白尿、生存率に及ぼす影響を検討した。また FACS 解析、免疫染色などにより B1 細胞、 T_{FH} 細胞の動態に及ぼす影響を検討した。サイトカイン発現は PCR や ELISA により測定した。

（倫理面への配慮）

東京大学動物実験指針に基づき適正に行われた。

C. 研究結果

抗 BLC 抗体は、作いば言う遊走試験において B1 細胞の遊走を効果的に阻止することを確認した。また BWF1 マウスにおける BLC の異所性発現の経時的変化を調べたところ、5 ヶ月齢になると発現増加が認められるのに対して SDF-1、SLC に関しては相対的変化は認められなかった。蛋白尿が出現した 7 ヶ月齢 BWF1 マウスに抗 BLC 抗体を 100 μ g、8 回投与したマウスでは生存曲線の改善、蛋白尿の一時的改善が認められた。抗 DNA 抗体も低下する傾向が見られたが、統計学的有意差は認められなかった。再現実験においても血清 IgG レベルや抗 DNA 抗体レベルに対する効果は一定でなかった。さらに 5 ヶ月齢の BWF1 マウスに中和抗体 100 μ g を 19 回投与した実験においても、延命効果が確認された。抗体投与による B1 細胞の頻度に及ぼす影響を FACS により調べたところ、末梢血中の B1 細胞の増加を認めたが、脾臓、胸腺、腹腔においては有意な差を認めなかった。末梢血中や脾細胞中の T_{FH}

（CXCR5⁺CD4T 細胞）に関しても抗体投与による有意な変化は見られなかった。 T_{FH} の胚中心局在に及ぼす影

響は現在検討中である。一方、血清中の IL-17 レベルは加齢 BWF1 マウスにおいて上昇することが ELISA により明らかとなった。脾臓、肺、肝、胸腺、腎における IL-17 発現を PCR により調べたところ、若齢マウスでは胸腺、加齢マウスでは胸腺、肺、腎臓などにおいても発現が認められた。さらに抗 BLC 中和抗体は血清 IL-17 レベルを低下させることが ELSA により明らかとなった。

D. 考察

抗 BLC 中和抗体が蛋白尿を来たした SLE の病態改善に有効である可能性が示唆された。メカニズムについては、現時点では詳細不明であるが、抗 DNA 抗体レベルに対する影響は一定せず、むしろ IL-17 レベルを低下させる可能性が示唆された。抗 DNA 抗体レベルと SLE 病態はかならずしも相関しないこともよく知られており、近年 SLE 患者や動物モデルで発現増加が明らかになりつつある IL-17 と治療効果の関連が示唆された点で興味深い。以前 B1 細胞により活性化される CD4T 細胞の性状について報告しているが、Th17 との関連で検討する必要があると考えられた。B1 細胞は試験管内で T_{FH} 様の自己 CD4T 細胞を誘導するが、この CD4T 細胞は IL-21 を強く発現していることから、Th17 の増殖、分化に関与している可能性が考えられる。また局所の微小環境の中で、たとえば TGF β や IL-6 存在下では Th17 を直接誘導することも考えられる。

SLE に対する生物学的製剤に関しては、抗 CD20 抗体や抗 BAFF 抗体などが臨床試験で有効なエンドポイントに到達しなかったことが最近報告され、SLE に対する有望な生物学的製剤が待たれているのが現状である。この意味で本研究において、B 細胞ケモカイン中和抗体の SLE における生物学的製剤としての可能性が示唆されたことで、将来の進展が期待される。同時に、BLC 中和抗体の治療効果の機序として Th17 の制御が示唆されたことは、SLE の病態形成における B1 細胞や B 細胞ケモカインの病理学的意義を Th17 誘導という切り口から明らかにする重要な知見であると考えられる。

E. 結論

抗 BLC 中和抗体が SLE の病態改善に有効であることが明らかにされた。そのメカニズムとして、IgG レベルや抗 DNA 抗体レベルを抑制するのではなく、Th17 の誘導を制御することによることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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

なし

SLE における自己抗体産生機構と B 細胞を分子標的とした治療戦略に関する研究

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
研究協力者 山岡邦宏 同 講師、岩田慈 同 大学院生

研究要旨 全身性エリテマトーデス(SLE)の発症過程では、T細胞やB細胞の活性化とともに自己抗体による免疫複合体の形成とその組織沈着による多臓器障害が生ずる。平成21年度には、抗CD20抗体リツキシマブの長期的な作用機序を検討し、B細胞の再構成、T細胞の活性化および分化の制御により長期寛解を齎すことを解明した。しかし、欧米のSLEを対象とした抗CD20抗体等の生物学的製剤を用いた治験では芳しい結果が得られなかった。一方、経口摂取可能な低分子量化合物を用いた細胞内シグナル伝達の制御が改めて注目され始めた。本年度は、B細胞受容体の細胞内アダプター蛋白のITAMに結合してシグナルを伝達するチロシンキナーゼであるSykのB細胞の活性化における役割を解明し、Sykを標的とした治療応用への可能性を追求することを目的とした。その結果、B細胞の活性化は、BCRと共刺激分子を介するシグナルに加えて、TLRシグナルの共存により最大限に誘導された。BCR-Sykの刺激は、TLRの発現を誘導してB細胞の増殖、炎症性サイトカイン産生、抗体産生を誘導した。Syk阻害薬はBCR、共刺激シグナル、TLRシグナルにより誘導されたB細胞の活性化をほぼ完全に抑制し、SLEなどのB細胞活性化が関与する自己免疫疾患の治療への臨床応用が期待された。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス(SLE)の発症過程では、T細胞やB細胞の活性化とともに自己抗体による免疫複合体の形成とその組織沈着による多臓器障害が生ずる。平成21年度には、抗CD20抗体リツキシマブの長期的な作用機序を検討し、B細胞の再構成、またT細胞の活性化および分化の制御により長期寛解を齎すことを解明した。欧米のSLEを対象とした抗CD20抗体等の生物学的製剤を用いた治験では芳しい結果が得られず、経口摂取可能な低分子量化合物を用いた細胞内シグナル伝達の制御が改めて注目され始めた。本年度は、B細胞受容体の細胞内アダプター蛋白のITAMに結合してシグナルを伝達するチロシンキナーゼであるSykのB細胞の活性化における役割を解明し、Sykを標的とした治療応用への可能性を追求することを目的とした。

B. 研究方法

ヒト末梢血ナイーブ(CD19+CD27-)およびメモリーB細胞(CD19+CD27+)に対し、SLEの病態モデルに適すると考えられるBCR架橋、sCD40L、TLR9のリガンドであるCpG-ODNによる刺激を施し、増殖、活性化マ-

ーカー(共刺激分子)、サイトカイン産生、抗体産性能に対する影響を確認すると共に、特異性の高いSyk阻害剤を用いて、その効果および作用機序について検討した。

(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属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

①BCR架橋、sCD40L、CpG-ODNによる刺激は、メモリーB細胞に於いてナイーブB細胞に比し強力な細胞周期の進行に伴う増殖、CD80/86の発現、サイトカインTNF- α 、IL-6、IL-10の産生、分化誘導因子であるXbp-1、Blimp-1の発現亢進、およびそれに伴う抗体産生能の増強を誘導した。②Syk阻害剤(BAY61-3606)は、B細胞の増殖、共刺激分子発現、サイトカイン産生、

抗体産生細胞への分化をいずれも濃度依存性にほぼ完全に無刺激状態まで抑制した。③ナイーブ、メモリーB細胞に於いてBCR架橋はCD40、TLR9シグナルとの組み合わせにより、TLR9の発現、TRAF-6の発現、NF κ Bのリン酸化を強く誘導した。④TLR9、TRAF6の発現、NF κ Bのリン酸化は、Syk阻害薬によりほぼ完全に抑制された。⑤無刺激下でTRAF-6やNF κ Bの活性化状態にあるB細胞株Rajiでも、Syk阻害薬によりほぼ完全に抑制された。

D. 考察

これまでヒトメモリーB細胞は、BCRを介する抗原シグナル、および、CD40などの共刺激シグナルの共存により活性化されるとされてきた。しかし、今回の結果は、BCRを介するシグナルはSykを介してTLR9およびTRAF-6を強力に発現誘導し、BCRと共刺激分子を介するシグナルに加えて、TLRシグナルの共存により、B細胞の活性化が最大限に誘導され、強力な増殖、分化誘導が齎されることが明らかとなった。SLEなどの自己免疫疾患の発症、及び、増悪の際には、ss-DNA、ds-DNA、ウイルス蛋白、細菌の膜蛋白などによる刺激がトリガーとなるが、これらの結果はBCR-Sykの刺激がTLRを誘導して、これらのトリガーを受容するメカニズムを明らかにしたものである。さらに、Syk阻害により3者のシグナルをほぼ完全に遮断することが可能であることから、Sykを標的とした低分子量化合物を用いたB細胞活性化の制御を介してSLEへの治療応用が示唆された。

E. 結論

B細胞の活性化は、BCRと共刺激分子を介するシグナルに加えて、TLRシグナルの共存により最大限に誘導された。BCR-Sykの刺激は、TLRの発現を誘導してB細胞の増殖、炎症性サイトカイン産生、抗体産生を誘導した。Syk阻害薬はBCR、共刺激シグナル、TLRシグナルにより誘導されたB細胞の活性化をほぼ完全に抑制し、SLEなどのB細胞活性化が関与する自己免疫疾患の治療への臨床応用が期待された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Iwata S, Saito K, Tokunaga M, Yamaoka K,

Nawata M, Yukawa S, Hanami K, Fukuyo S, Miyagawa I, Kubo S, Tanaka Y. Phenotypic changes of lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus who are in longterm remission after B cell depletion therapy with rituximab. *J Rheumatol* (in press)

2. Tanaka Y, Takeuchi T, Mimori T, Saito K, Nawata M, Kameda H, Nojima T, Miyasaka N, Koike T. Discontinuation of infliximab after attaining low disease activity in patients with rheumatoid arthritis, RRR (remission induction by remicade in RA) study. *Ann Rheum Dis* **69**, 1286-1291, 2010

3. Sawamukai N, Yukawa s, Saito K, Nakayamada S, Kambayashi T, Tanaka Y. Mast cell-derived tryptase inhibits apoptosis of human rheumatoid synovial fibroblasts via rho-mediated signaling. *Arthritis Rheum* **62**, 952-959, 2010

4. Choo Q-Y, Ho PC, Tanaka Y, Lin H-S. Histone deacetylase inhibitors MS-275 and SAHA induced growth arrest and suppressed lipopolysaccharide-stimulated NF-kappaB p65 nuclear accumulation in human rheumatoid arthritis synovial fibroblastic E11 cells. *Rheumatology* **49**, 1447-1460, 2010

5. Suzuki K, Saito K, Tsujimura S, Nakayamada S, Yamaoka K, Sawamukai N, Iwata S, Nawata M, Nakano K, Tanaka Y. A calcineurin inhibitor, tacrolimus overcomes treatment-unresponsiveness mediated by P-glycoprotein on lymphocytes in refractory rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **37**, 512-520, 2010

2. 学会発表

1. Y. Tanaka. Clinical development and Phase III studies of tocilizumab. 7th International Congress on Autoimmunity, Ljubljana, Slovenia. 平成22年5月5-9日

2. Y Tanaka, M Suzuki, H Nakamura, S Toyoizumi, SH Zwillich. The oral JAK inhibitor tasocitinib (CP-690,550 (CP)) in combination with methotrexate (MTX) is efficacious in a dose-dependent manner in active rheumatoid arthritis (RA). The Annual European Congress of Rheumatology 2010, Rome, Italy. 平成22年6月15-19日

3. Y. Tanaka, T. Takeuchi, T. Mimori, N. Miyasaka, T. Koike. The possibility of maintaining low disease activity after discontinuation of infliximab in RA patients: An interim report for the second year of the RRR study. The Annual European Congress of Rheumatology 2010, Roma, Italy, 平成22年6月15-19日

4. Y. Tanaka, T. Abe, T. Takeuchi, A. Yamamoto, N. Miyasaka. Abatacept demonstrated long-term safety and efficacy in active RA patients who showed inadequate response to methotrexate: an analysis of the Japanese phase III open-label, long-term extension trial. The 14th Asian Pacific League of Associations for Rheumatology (APLAR) Congress, Hong Kong, China. 平成 22 年 7 月 11-15 日
5. Tanaka Y. Paradigm shift of the treatment of rheumatoid arthritis by TNF-targeting biologics. The 14th International Congress of Immunology (ICI), Kyoto. 平成 22 年 8 月 22-27 日
6. Tanaka Y. B cell depletion in systemic lupus erythematosus. The 14th International Congress of Immunology (ICI), Kyoto, 平成 22 年 8 月 22-27 日
7. Tanaka Y. Safety profiles of tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis in the post-marketing surveillance program. International symposium for Safety of Biologics in Patients with Rheumatoid Arthritis: Merging evidence from large-scale cohort studies in Japan and overseas . Tokyo, 平成 22 年 10 月 9 日
8. Y. Tanaka, M Harigai, T Takeuchi, H Yamanaka, N Ishiguro, K Yamamoto, TMU Rahman, T Yoshinari, N Miyasaka, T Koike. Golimumab, a Human Anti-TNF α Monoclonal Antibody Administered Subcutaneously Every Four Weeks in Patients with Active Rheumatoid Arthritis Despite Methotrexate Therapy: 24-Week Results of Clinical and Radiographic Assessments. The 74th National Meeting of American College of Rheumatology, Atlanta, USA, 平成 22 年 11 月 6-12 日
- 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

IV 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表・平成22年度

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻	頁	出版年
Yoshiga, Y., Goto, D., Segawa, S., Horikoshi, M., Hayashi, T., Matsumoto, I., Ito, S., Taniguchi, S., and Sumida, T.	Activation of natural killer T cells by α -carba-GalCer (RCAI-56), a novel synthetic glycolipid ligand, suppresses murine collagen-induced arthritis.	Clin. Exp. Immunol.		in press	
Segawa, S., Goto, D., Yoshiga, Y., Horikoshi, M., Sugihara, M., Hayashi, T., Chino, Y., Matsumoto, I., Ito, S., and Sumida, T.	NK1.1+ gdT cells attenuates IL-18 plus IL-2-induced murine interstitial lung disease.	Am. J. Res. Cell. Mol. Biol.		in press	
Hikami, K., Kawasaki, A., Koga, M., Ito, S., Hayashi, T., Matsumoto, I., Tsutsumi, A., Kusaoi, M., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Arinami, T., Sumida, T., and Tsuchiya, N.	Association of a functional polymorphism in the 3' untranslated region of SP11 with systemic lupus erythematosus.	Arthritis Rheum.		in press	
Kawasaki, A., Ito, S., Furukawa, H., Hayashi, T., Goto, D., Matsumoto, I., Ohashi, J., Graham, R.R., Matsuta, K., Behrens, T.W., Tohma, S., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Sumida, T., and Tsuchiya, N.	Association of TNFAIP3 interacting protein 1, TNIP1 with systemic lupus erythematosus in a Japanese population: a case-control association study.	Arthritis Reas.Ther.	12(5)	R174	2010
Iizuka, M., Wakamatsu, E., Matsumoto, I., Tsuboi, H., Nakamura, Y., Hayashi, T., Goto, D., Ito, S., and Sumida, T.	M3 muscarinic acetylcholine receptor reactive immune response induces Sjogren's syndrome-like sialoadenitis.	J. Autoimmunity	35	383-389	2010
Shen, N., Fu, Q., Deng, Y., Qian, X., Zhao, J., Kaufman, K.M., Tang, Y., Chen, J-Y, Yang, W., Wong, M., Kawasaki, A., Tsuchiya, N., Sumida, T., Kawaguchi, Y., Yum C-Y, Takasaki, Y., Hashimoto, H., Harley, J.B., Guthridge, J.M., Grossman, J.M., Cantor, R.M., Song, Y.W., Bae, S, Cehn, S, Hahn, B.H., Lau, Y.L., and Tsao, B.P.	Gender specific association of X-linked TLR7 with male systemic lupus erythematosus.	Proc. Natl. Acad. Sci.	107	15838-15843	2010
Tsuboi, H., Matsumoto, I., Wakamatsu, E., Iizuka, M., Nakamura, Y., Hayashi, T., Goto, D., Ito, S., and Sumida, T.	The new epitopes of anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies in patients with Sjogren's syndrome.	Clin. Exp. Immunol.	162	53-61	2010
Sumida, T., Tsuboi, H., Iizuka, M., Nakamura, Y., and Matsumoto, I.	Functionla role of M3 muscarinic acetylcholine receptor (m3R) reactive T cells and anti-M3R autoantibodies in patients with Sjogren's syndrome.	Autoimmunity Reviews	9	615-617	2010
Tashiro, T., Nakagawa, R., Inoue, S., Omori-Miyake, M., Chiba, T., FUjii, S-I, Shimizu, K., Mori, K., Yoshiga, Y., Sumida, T., Watarai, H., and Taniguchi, M.	Induction of Th1-biased cytokine production by α -carba-GalCer, a neoglycolipid ligand for natural killer T cells.	Int. Immunol.	22	319-328	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻	頁	出版年
Segawa, S., Goto, D., Yoshiga, Y., Sugihara, M., Hayashi, T., Chino, Y., Matsumoto, I., Ito, S., Ito, S., and <u>Sumida, T.</u>	Inhibition of TGF- β signaling attenuates IL-18 plus IL-2-induced interstitial lung disease.	Clin. Exp. Immunol.	160	394-402	2010
Chen, Q., Lamphier, M., Muramoto, K., Ding, Y., Ynag, H., Mackey, M., Li, W., Liu, D., Inoue, Y., Massaki, N., Patel, T., Groom, A., Reynolds, D., Perron, S., Shirota, H., Matsumoto, I., <u>Sumida, T.</u> , Spyvee, M., Schiller, S., ZGusovsky, F., and Marc, K.	Prostaglandin E2 stimulation of EP4 promotes Th1 differentiation and Th17 expansion and is critical for autoimmune disease.	Br. J. Pharmacol.	160	292-310	2010
Kiwamoto T, Ishii Y, Morishima Y, Yoh K, Kikuchi N, Haraguchi N, Masuko H, Kawaguchi M, Nomura A, Sakamoto T, <u>Takahashi S.</u> , and Hizawa N.	Blockade of cysteinyl leukotriene-1 receptors efficaciously suppresses airway remodeling in Th2-biased mice.	Clin. Exp. Allergy.	41	116-128	2011
Li, Y.J., Takizawa, H., Azuma, A., Kohyama, T., Yamauchi, Y., <u>Takahashi, S.</u> , Yamamoto, M., Kawada, T., Kudoh, S., and Sugawara, I.	Nrf2 is closely related to allergic airway inflammatory responses induced by low-dose diesel exhaust particles in mice.	Clin. Immunol.	137	234-241	2010
Mizuki, S., Oishi, H., Zhang, M.C., Kamogawa, J., Miyazaki, T., Ono, M., <u>Takahashi, S.</u> , Yamamoto, H., and Nose, M.	Genetic heterogeneity in rheumatoid arthritis mouse models induced by extrinsic and intrinsic factors.	Pathol. Int.	60	430-437	2010
Togayachi, A., Kozono, Y, Ikehara Y, Ito H, Suzuki N, Tsunoda Y, Abe S, Sato T, Nakamura K, Suzuki M, Goda HM, Ito M, Kudo T, <u>Takahashi S.</u> , and Narimatsu H.	Lack of lacto/neolacto-glycolipids enhances the formation of glycolipid-enriched microdomains, resulting in hyperactivation of B cells.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	107	11900-11905	2010
Haraguchi, N., Ishii, Y., Morishima, Y., Yoh, K., Matsuno, Y., Kikuchi, N., Sakamoto, T., <u>Takahashi, S.</u> , and Hizawa, N.	Impairment of host defense against disseminated candidiasis in mice overexpressing GATA-3.	Infect. Immun.	78	2302-2311	2010
<u>Koyasu, S.</u> and Moro, K.	Innate Th2-type immune responses and the Natural Helper Cell, a newly identified lymphocyte population.	Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.	in press		
<u>Koyasu, S.</u> and Moro, K.	Type 2 innate immune responses and the natural helper cell.	Immunology	in press		
Chiba, S., Nagai, T., Hayashi, T., Baba, Y., Nagai, S. and <u>Koyasu, S.</u>	Listerial invasion protein internalin B promotes the entry into ileal Peyer's patches in vivo.	Microbiol. Immunol.	55	123-129	2011
<u>Koyasu, S.</u> , Moro, K., Tanabe, M. and Takeuchi, T.	Natural Helper Cells: a new player in the innate immune response against helminth infection.	Adv. Immunol.	108	21-44	2010
Yoshiga Y, Goto D, Segawa S, Horikoshi M, Hayashi T, <u>Matsumoto I.</u> , Ito S, Taniguchi S, Sumida T.	Activation of natural killer T cells by α -carba-GalCer (RCAI-56), a novel synthetic glycolipid ligand, suppresses murine collagen-induced arthritis.	Clin. Exp. Immunol.	in press		