

201023006B

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

免疫疾患の病因・病態解析と その制御戦略へのアプローチ

平成20－22年度 総合研究報告書

研究代表者 住田 孝之

平成23（2011）年3月

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

免疫疾患の病因・病態解析と その制御戦略へのアプローチ

平成20－22年度 総合研究報告書

研究代表者 住田 孝之

平成23(2011)年3月

目 次

I	構 成 員 名 簿	1
II	総 合 研 究 報 告	3
	免疫疾患の病因・病態解析とその制御戦略へのアプローチ	
	研究代表者 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	
	住田 孝之	
III	研究成果の刊行に関する一覧表	17
IV	研究成果刊行物・別刷	37

I 構成員名簿

免疫疾患の病因・病態解析とその制御戦略へのアプローチに関する研究班

区分	氏名	所属	職名
研究代表者	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
研究分担者	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
	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
	田中 良哉	産業医科大学医学部第一内科学講座	教授
	小安 重夫	慶応義塾大学医学部微生物学・免疫学教室	教授
	高橋 智	筑波大学大学院人間総合科学研究科生命システム医学専攻分子発生生物学	教授
	石川 昌	東京大学医学部分子予防医学教室	准教授
	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
	松本 功	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分野	准教授
	藤尾 圭志	東京大学医学部アレルギーリウマチ内科	助教
事務局	辻 奈津子	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分野 〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1 TEL 029-853-3221 FAX 029-853-3222 e-mail : riumachi@md.tsukuba.ac.jp	
経理事務 担当者	梅村 定延	筑波大学 医学系支援室 外部資金会計係 TEL 029-853-3028 FAX 029-853-6309 e-mail : umemura.sadanobu.fe@un.tsukuba.ac.jp	

II 総合研究報告

平成 20-22 年度厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
総合研究報告書

免疫疾患の病因・病態解析とその制御戦略へのアプローチに関する研究

研究代表者 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）

研究要旨

本研究プロジェクトにおいては、免疫疾患とくに自己免疫疾患に焦点を当て、その発症に関わる免疫担当細胞、免疫分子を明らかにし、それらを標的とした疾患特異的な治療法、予防法を開発することを目的とする。具体的な研究テーマは以下のとおりである。

自然免疫系において重要な役割を果たしている樹状細胞(DC)は To11 様受容体(TLR)により活性化され IL-15 等のサイトカインを産生し免疫系を動かす。DC や DC 制御分子である TREM1 などをターゲットとした治療戦略を開発する（小安、上阪）。CD11b 細胞に発現し関節炎を制御する TIARP 分子や単球に発現する RasGRP4 分子も治療標的とする（松本、小池）。DC などに提示された抗原を認識した T 細胞は活性化され TH1, TH2, TH17 細胞などに分化し様々なサイトカインを産生し、細胞傷害性 T 細胞の誘導も促し、最終的に炎症や臓器破壊にいたる。そこで、T 細胞活性化の初期段階において抗原認識を抗原特異的に制御する戦略(住田)、TH1、TH2、TH17 細胞を標的とした治療戦略の開発(住田、高橋)をめざす。免疫応答をネガティブに調節している新規調節性 T 細胞(CD4+CD25-LAG3+Treg 細胞)による制御法(藤尾)、調節機能を有する NKT 細胞(TCRVa7.2-Ja33+MAIT 細胞)を標的とした治療戦略(山村)の開発を進める。Treg 細胞-TFH 細胞-B1 細胞の相互作用に係わるケモカイン/ケモカイン受容体阻害による治療戦略(石川)、自己抗体産生機構の解析と B 細胞および細胞内チロシンキナーゼ(Syk)を標的とした新規治療法の開発も進めている(田中)。

研究分担者

- 小池隆夫 北海道大学大学院医学研究科 教授
山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所 部長
田中良哉 産業医科大学医学部第一内科学講座 教授
小安重夫 慶応義塾大学医学部 免疫学 教授
高橋 智 筑波大学大学院人間総合科学研究科 教授
石川 昌 東京大学大学院医学系研究科 准教授
上阪 等 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 准教授
松本 功 筑波大学大学院人間総合科学研究科 准教授
藤尾圭志 東京大学医学部アレルギーリウマチ内科 助教

A. 研究目的

難治性疾患に制定されている疾患の多くは自己免疫疾患である。しかし、その発症の分子機構はいまだ明らかにされておらず、疾患特異的な治療法は開発されていない。現在の治療の主体は、副腎皮質ホルモンや免疫抑制剤などの非特異的な治療であり、感染症など種々の副作用が認められ、患者の QOL 低下の一因になっている。本研究では、自然免疫系および獲得免疫系において重要な役割を果たしている免疫担当細胞、免疫分子の機能を分子レベルで明らかにし、免疫疾患の発症機構を明らかにする。さらに、それらの細胞や分子をターゲットとした抜本的な治療・予防戦略を開発することを目的とする。厚生労働省の免疫アレルギー疾患対策として、病因解明、発症機序に基づく疾患特異的な治療の開発は急務であり、本研究による新しい予防、治療法による患者の QOL 改善が期待される。

具体的には、1)自己抗原の T 細胞エピトープ解析、アナログペプチドを用いた自己反応性 T 細胞の抗原特異的な制御法の開発(住田)、2) TH1 細胞、TH2 細胞、TH17 細胞の役割を T-bet, GATA3, ROR γ t トランスジェニックマウスを用いて解明し新規治療法開発を目指す(高橋、住田)、3)抗原提示細胞として

重要な樹状細胞(DC)に焦点をあて、Toll 様受容体(TLR)を介したシグナル、IL-15 の制御を中心に遺伝子改変マウスやコラーゲンタイプ II(CII)誘導関節炎(CIA)モデルマウスを用いて自己免疫寛容破綻機序を解明する(小安)、4)CD11b 細胞に発現する TNF- α 誘導蛋白 TIARP による関節炎制御法の開発(松本)、5)DC からのサイトカイン産生を調整する E3 ユビキチンリガーゼ c-MIR や TERM1-TERM1-L 相互作用を分子標的とした治療法の開発(上阪)、6)単球系細胞に発現する RasGRP4 分子による自己免疫疾患制御法の開発(小池)、7)新規 NKT 細胞(MAIT 細胞)の機能解析と NKT 細胞を介した治療法の開発(山村)、8)IL-10 を産生する新規 Treg 細胞(CD4+CD25- LAG3+Treg)に注目し免疫疾患発症機構の解明(藤尾)、9) Treg 細胞-TFH 細胞-B1 細胞の相互作用解析およびケモカイン・ケモカインレセプター阻害による治療戦略開発(石川)、10)自己抗体産生機序の解析と B 細胞表面分子(CD20)および B 細胞内チロシンキナーゼ(Syk)を標的とした新規治療法の臨床応用(田中)。

本研究の独創的な点は、新しく発見された重要な免疫担当細胞、免疫分子の視点から免疫疾患の発症機構を分子レベルで解析し、それらを標的とした新規治療・予防戦略を開発する点にある。国内・国外の研究においても極めてユニークな研究プロジェクトといえよう。

B. 研究方法

(住田)

(A)アナログペプチドによる抗原特異的制御：

- 1)タイプ II コラーゲン(CII): HLA-DR B1*0101、0401、0405 陽性 RA 患者および DBA/1 において CII (GKPGIAGFKGEQPKG, AA256-271)のアナログペプチドはともに、APL4-7(AA262G→D, K, A, 264K→A)であることが判明した。In vivo の解析では、APL6 が治療効果と予防効果を示した。APL6 を発現した米を作製するために、タンデムに 3 連結した APL6 を発現ベクターに組み込み稲を作製した。
- 2)glucose-6-phosphate isomerase(GPI)： RA 患者では GPI に対する自己抗体、T 細胞が存在し発症との関連性が報告されている。DBA/1 マウス(I-Aq)に結合するアンカーモチーフを有する GPI 部位を選定し、ドミナントな T 細胞エピトープ(GPI325-339)を DBA/1 マウスで同定した。さらに、その 15 マーの合成ペプチドを 1 回免疫することにより関節炎(GIA)を誘導することに成功した。本研究では、20 種類の変異ペプチドを合成し、GPI325-339 に対する T 細胞応答を減弱させるアナログペプチドの選定をおこなった。方法は、変異ペプチドを pre-culture してから GPI325-339 と共培養し、IFN- γ および IL-17 の産生を ELISA 法および細胞内サイトカイン染色法で解析した。さらに、選定したアナログペプチドを GPI325-339 抗原とともに DBA/1 に共免疫することにより関節炎抑制効果について検討した。

- 3)ムスカリン作働性アセチルコリン受容体(M3R)： SS 患者末梢血において、M3R に対する T 細胞応答、自己抗体が検出される。本研究では、M3R を標的とした抗原特異的治療戦略を確立するために、M3R 誘導唾液腺炎モデルマウス作成を試みた。方法として、M3R の細胞外第 2 ドメインをコードする 25 マーの合成アミノ酸 (KRTVPPGECFIQFLSEPTITFGTAI, AA212-236) を M3R ノックアウト(M3R KO)マウスに免疫し、その脾臓細胞を Rag1 ノックアウト(Rag1 KO)マウスに細胞移入した。組織学的解析により唾液腺炎の発症について検討した。

(B)T-bet TG マウスを用いた自己免疫性関節炎に関する研究：

- 1)T-bet TG (B6 バック)に CIA を誘導して関節炎スコア、発症頻度を検討した。2)血清中の CII に対する抗体価を ELISA 法で測定した。3)CII 反応性 T 細胞応答(IL-17、IFN-g)について細胞内サイトカインアッセイと ELISA 法にて検討した。4)リンパ節、脾臓、胸腺における T 細胞サブセットの絶対数について検討した。5)CD4+T 細胞の機能異常の有無を検討するために、T-bet TG および B6 マウス由来の CD4+T 細胞と CD11c+細胞を MACS で分離して、CII とともに in vitro で共培養し IL-17 および IFN-g 産生を ELISA で検討した。6)T-bet TGxIFN γ -マウスにおいて、Th17 細胞分化条件での IL-17 産生細胞数をフローサイトメトリーで解析した。

(C)ROR γ t TG マウスを用いた自己免疫性唾液腺炎および自己免疫性関節炎の解析：

- 1)ROR γ t TG マウス (B6 バック)における唾液腺炎： (1)12 週令において、唾液腺について H-E 染色で組織学的に検討し、IF 染色、フローサイトメトリーで浸潤細胞の性状について検討した。(2)脾細胞および所属リンパ球を in vitro で PMA+Ionomycin で刺激してサイトカイン産生、Treg 細胞数を検討した。(3)脾細胞を in vitro で抗原 (M3R、CII、GPI) と共培養しサイトカイン産生を検討した。
- 2)ROR γ t TG (B6 バック)における CIA：(1)ROR γ t TG に CIA を誘導して関節炎スコア、関節炎発症頻度を検討した。(2)所属リンパ節 CD4+T 細胞における ROR γ t 発現をフローサイトメトリーで解析した。(3)所属リンパ節 CD3+T 細胞を in vitro で PMA+Ionomycin で刺激し IL-17 発現細胞をフローサイトメトリーで測定した。(4)CII 免疫したマウスから所属リンパ節を摘出し in vitro で CII と共培養しサイトカイン産生をフローサイトメトリーおよび ELISA で解析した。(5)CII 2 回免疫後の血清中の抗 CII 抗体を ELISA 法で測定した。

(高橋班員)

T 細胞系に発現する CD2 プロモータを有する VA vector に、TH1 誘導転写因子 T-bet、TH2 誘導転写因子 GATA-3、TH17 誘導転写因子 ROR γ t を挿入し、それらを用いて遺伝子改変マウスを作製した。その結果、T 細胞系に T-bet、GATA-3、ROR γ t を過剰発

現するトランスジェニック (Tg) マウスの作製に成功した。それらのマウスについて以下の解析を行った。

- 1) 作製したTgマウスを自己免疫腎炎自然発症マウス (BXSB/MpJ-*Yaa*マウス) と交配して自己免疫腎炎を誘導し、腎炎の発症および進行と転写因子T-bet、GATA-3との関連について検討した。
- 2) ROR γ t Tgの表現型の解析を行い、ROR γ tの過剰発現により免疫システムにどのような変化が現れるかを解析した。
- 3) T-bet、GATA-3、ROR γ t Tgマウスを用いて、潰瘍性大腸炎モデル (Dextran Sulfate Sodium(DSS) 投与実験) の検討を行った。DSSは2.5%で経口投与し、7日後に腸炎評価を実施した。

(小安班員)

1) 新規 CIA モデルにおける TLR リガンドの影響

従来、CIA には DBA/1 系統のマウスが用いられてきたが、様々な遺伝子改変マウスを用いることができるという点で C57BL/6 系統のマウスを用いることが望ましい。Kai らによって、アジュバントに用いる結核菌死菌(Tb)を増量することで C57BL/6 系統のマウスにも効率よく CIA を誘導できることが報告されたことから、本研究では C57BL/6 系統のマウスを用いることとした。

まず脾臓樹状細胞(DC)を単離し、(a) 何も加えない群、(b) 抗原としてトリ II 型コラーゲン(CII) 40 μ g/ml を加える群、(c) CII 40 μ g/ml およびアジュバントとしてリポ多糖 (LPS) 1 μ g/ml を加える群について、それぞれ 24 時間培養した。培養後の細胞を回収し、樹状細胞表面に発現する MHC class II、CD40、CD86 の発現強度を測定し、培養前の発現強度と比較した。一方で、24 時間培養した樹状細胞を 2 度洗浄の後、マウス 1 匹あたり 2.5×10^5 個を静脈内投与した。その 10 日後に、CII 4 μ g/ml、Tb 5 μ g/ml、等量の不完全フロイントアジュバント(IFA)をエマルジョンにし、これをマウス 1 匹あたり 100 μ l 皮内投与した。その後約 1 ヶ月にわたり、経時的に採血および経過観察を行い、コラーゲン特異的抗体価、発症率および重症度を測定した。発症したマウスについては、ホルマリン固定の後にパラフィンに包埋・薄切し、H&E 染色を行った。また、腫脹した関節を collagenase 及び DNase で処理した後、Percoll による密度勾配遠心法によって白血球を分離し、細胞内サイトカイン染色法によって浸潤したヘルパー T 細胞サブセットを検討した。

2) 新規 CIA モデルにおける抗原提示の影響

ヘルパー T(CD4⁺ T)細胞に対する抗原提示能の違いが及ぼす影響を調べるため、上記 1) の方法を改変して行った。すなわち、(a) DC を CII および LPS で刺激する群、(b) DC を CII および LPS で刺激する際に 2.5×10^6 個の CD4⁺ T を共培養する群について、細胞を回収および洗浄の後にマウスに投与し、1 度

目の免疫とした。以降は 1) と同様に操作し、抗体価、発症率および重症度を測定した。

3) TLR リガンドが CIA 発症に及ぼす影響に関する予備的検討

TLR はマウスでは TLR1 から TLR9 までが知られ、様々な微生物成分を認識することが出来る。それぞれの受容体に対するリガンドによって、DC から産生されるサイトカインの種類やその量は異なることが予想され、この違いが CIA の発症率や重症度に対して、どのような影響を及ぼすかを明らかにしたいと考えている。その予備的な検討として、様々な TLR リガンド刺激により DC から産生されるサイトカインについて、リウマチ発症に関係の深い TNF α や、Th1 あるいは Th17 細胞分化に重要な IL-12 および IL-6 の産生を測定した。TLR リガンドとして、Pam3CSK4 (TLR1/2)、zymosan (TLR2/6)、poly I:C (TLR3)、peptidoglycan (TLR2/6)、poly U (TLR7)、CpG-DNA (TLR9)を用い、それぞれを DC と 37°C で培養し、6 時間後の細胞を回収して RNA を抽出し、RT-PCR により遺伝子発現解析を行った。また同様に 37°C で 24 時間培養した上清を回収し、ELISA 法にて産生されたサイトカイン量を測定した。

4) TLR 刺激により樹状細胞からのサイトカイン産生と CIA 発症との相関

前年度に行った 3) の結果から、CpG-DNA 500 nM および zymosan 10 μ g/ml 刺激により炎症性サイトカイン産生が高かったため、この 2 種類の TLR リガンドで DC を処理した場合の CIA について、同様に発症率、重症度および抗コラーゲン抗体について、LPS 1 μ g/ml 処理の場合と比較検討した。

5) IL-15 産生と CIA 発症との相関

申請者らは、IL-15 が樹状細胞の関わる炎症反応の惹起に重要であることを報告している (*J Exp Med* 203 p2329 (2006))。そこで CIA の惹起にも樹状細胞から産生される IL-15 が重要であるかを調べるため、IL-15 欠損(IL-15 KO)マウスの脾臓から DC を単離し、これを LPS で刺激して野生型(WT)マウスに投与し CIA を誘導し、発症率、重症度および抗コラーゲン抗体価について検討した。また DC からの IL-15 産生が減少している、サイトカイン共通ガンマ鎖遺伝子および rag2 遺伝子を欠損する二重欠損(γ c-rag2 DKO)マウス由来 DC についても、併せて検討を加えた。

6) TLR リガンドの違いによる DC における IL-15 遺伝子発現の検討

5) に関連して、もし IL-15 が CIA 発症に関わるサイトカインである場合に、DC に発現する IL-15 がどの TLR リガンドによって調節されるかを知ることが重要である。そこで脾臓 DC に様々な TLR リガンドを作用させ、刺激 24 時間後に発現する IL-15 遺伝子の量を定量 RT-PCR にて解析した。

7) TLR リガンド刺激 DC が産生する IL-15 による CD4⁺ T 細胞応答の解析

CD6) に付随して、DC から抗原提示を受ける

CD4⁺ T 細胞の増殖が、DC から産生される IL-15 によって変わるかどうかについて、WT マウスあるいは IL-15 KO マウス由来 DC を、それぞれの TLR リガンドで刺激した DC に卵白アルブミン(OVA)を取り込ませ、OVA 特異的 CD4⁺ T 細胞を持つ TCR トランスジェニックマウスである OT-II マウス由来の CD4⁺ T 細胞 (CFSE でラベル) に提示させ、増殖に変化があるかを検討した。

(松本班員)

1) human GPI アミノ酸配列から I-Aq (DBA/1 マウス) の binding motif に結合するペプチドを合成し、human GPI-primed CD4⁺ T 細胞の反応性を IL-17, IFN γ の cytokine ELISA で検討し、T 細胞エピトープを同定、更にそのペプチドを DBA/1 マウスに免疫し、関節炎スコアおよび抗 GPI 抗体価を検討した。

2) GPI 誘導関節炎における 脾臓での TIARP 発現変動を定量 PCR 法及びウエスタンブロット法で解析した。また、関節炎マウス脾細胞における TIARP mRNA 発現細胞の同定を試み、抗 TNF α 抗体投与による TIARP 変動を確認した。また、上記同様に関節での TIARP 変動を確認し、免疫組織化学染色で TIARP の局在を検討した。

3) ヒト ortholog STEAP4 の末梢血 (RA, 健康人)、RA 関節滑膜での STEAP ファミリー分子 (STEAP2,3,4) の発現を半定量 RT-PCR にて比較した。また、RA 及び変形性関節症 (OA) 滑膜での STEAP4 発現を定量 PCR で比較し、RA, OA 滑膜での STEAP4 局在を蛍光免疫組織化学染色で比較検討した。

4) RA 滑膜由来 MH7A 細胞株に TNF α を投与し (2ng/ml)、STEAP4 の発現を蛋白レベルで解析した。MH7A にプラスミドベクターを用いて STEAP4 を過剰発現、また siRNA により STEAP4 の発現を抑制し、IL-6 mRNA 発現への影響を検討した。

5) C57BL/6 系統の TIARP 欠損マウスを作製し、phenotype 解析を行い、コラーゲン誘導関節炎 (CIA) を誘導し発症率、重症度を検討した。また、関節炎マウスにおける CII 特異的抗体産生および T 細胞応答を検討し、免疫 60 日後の血清中および関節局所での IL-6、TNF α 発現解析を行った。

(上阪班員)

(A) TREM-1 制御による治療

関節炎滑膜における TREM1 の発現を確認する。アデノウイルスを用い TREM1-Ig をマウスコラーゲン誘導関節炎 (Collagen-Induced Arthritis: CIA) に投与し治療効果を検討する。TREM1-Ig 等の細胞外ドメイン融合蛋白を用いて新たな TREM1-L が発現する細胞を同定する。同細胞を利用して TREM1-TREM1-L 阻害化合物をスクリーニングする。また、免疫沈降や cDNA ライブラリー発現細胞のスクリーニングにより TREM1-L を同定する。同分子に対する抗体や阻害化合物を作製し、CIA で関節炎治療効

果を確認し、感染防御への影響を調べ、その機序解析を行う。

(B) cMIR による治療

CIA マウスの後肢関節内へ組換え c-MIR アデノウイルスを移入し、関節炎への治療効果を検討する。In vitro では、滑膜線維芽細胞のサイトカイン産生に対する c-MIR 強制発現の影響の解析するため CIA マウス関節組織由来の細胞 (FLS) に c-MIR アデノウイルスやコントロール LacZ ウイルスを感染させて、TNF- α で刺激し、IL-6 産生を検討する。また、マクロファージへの影響の解析するために c-MIR トランスジェニックおよび正常マウス由来骨髄マクロファージ (BMM) を IFN- γ で刺激し、c-MIR トランスジェニックを強制発現させた後、LPS 刺激を行って、TNF- α や IL-6、IL-1 β 産生を検討する。樹状細胞のサイトカイン産生に対する影響の検討のために、c-MIR Tg や WT 由来の骨髄樹状細胞 (BMDC) を分化誘導し、LPS 刺激を行って、TNF- α や IL-6、IL-10 産生を比較する。

(小池班員)

In-vitro で培養したマクロファージ・樹状細胞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。健康人 42 名、RA 患者 57 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、一部患者の cDNA より RasGRP4 の塩基配列を決定した (5 クローン/人)。ウエスタンブロット法にて患者および健康人末梢血単核球における RasGRP4 の蛋白発現を検討した。また、RA 患者滑膜を抗 CD14, CD68 抗体、抗 RasGRP4 抗体で免疫染色、蛍光顕微鏡にて観察した。また、in vitro において作製したマクロファージ・樹状細胞・破骨細胞における RasGRP4 の発現を、定量的 PCR 法にて評価した。

(山村班員)

1) NKT 細胞欠損マウス、MAIT 細胞欠損マウスを用いて、NKT 細胞、MAIT 細胞各々が腸内細菌依存性の免疫修飾に及ぼす影響を解析した。2) ヒト MAIT 細胞を同定する抗体を用いて、MAIT 細胞のヒト自己免疫疾患における動態や機能を解析した。3) MAIT 細胞欠損マウスを用いて、コラーゲン誘導関節炎の発症に及ぼす MAIT 細胞の役割を解析した。

(藤尾班員)

抑制性分子 LAG-3 に着目し C57BL/6 マウス脾臓において FACS 解析を行った。LAG-3 をマーカーとしてマウス脾臓よりソーティングにより細胞集団を分取し、マイクロアレイ解析・培養実験・生体への移入実験を行った。マイクロアレイ解析において発現が亢進していたアナジー関連遺伝子 Egr2 に着目し、レトロウイルスベクターによるマウス CD4 陽性 T 細胞への Egr2 遺伝子導入により誘導される遺伝子を定量 PCR により検討した。さらに Egr2 遺伝子導

入細胞による遅延型過敏反応の抑制実験を行った。また B 細胞を欠損する mMT ノックアウトマウス、無菌状態の Germ free マウスにおいても解析を行った。また SLE モデルマウスである MRI/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。非自己免疫炎症下の、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞の機能を検討するために、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。

(石川班員)

BW1 マウスにおける Treg 動態を明らかにするために、SLE 発症の過程における Foxp3⁺CD25⁺CD4T 細胞の動態やケモカイン受容体を含む細胞表面マーカー発現を FCM により解析し、その機能を試験管内 T 細胞増殖抑制試験により検討した。さらにリンパ組織や腎臓、肺などの標的臓器の凍結切片の免疫蛍光染色により Treg の局在や発症に伴う変化を調べた。

また近年、Treg から T_{FH} への直接的分化経路が明らかにされたことから、SLE モデルにおける T_{FH} 動態を明らかにし、B1 細胞により活性化される自己反応性 CD4T 細胞との関係を FACS 解析などにより検討した。

ラット抗マウス BLC 中和抗体およびコントロールラット IgG を加齢 BW1 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、FACS 解析、免疫染色などにより B1 細胞、T_h 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。

(田中班員)

SLE 患者に於いてリツキシマブで、治療前、及び治療の経過に伴い、患者より末梢血リンパ球を抽出し、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、健常人の B 細胞の増殖、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 Syk 阻害薬の影響を確認し、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)

ヒトの検体を用いる研究に関しては、各施設における倫理委員会での承諾を得た上で、患者および健常者に十分なインフォームド・コンセントを行い、

理解と同意を得る。動物実験においては、過度の苦痛や恐怖を与えないように配慮する。遺伝子改変マウスを用いた実験では、当該施設の組換え DNA 実験および動物実験の学内規定を遵守して行う。

C. 研究結果

(住田)

(A)アナログペプチドによる抗原特異的制御：

1) CII: CII(AA256-271)、APL4 (コントロール)、APL6、APL7 を高発現した米を作成した。

2) GPI: *in vitro* の実験結果から、GPI325-339 のアナログペプチド候補として、GPI329N→S(APL6)、GPI329N→T(APL7)、GPI332G→A(APL12)、GPI332G→V(APL13) の4つが選定された。さらに、GPI325-339 誘導関節炎マウスにおいて、APL6、APL7、APL12 と APL13 が有意な治療効果を呈した。APL 投与により治療効果を示した関節炎マウスにおいては、いずれも IL-17 の産生が有意に減少していた。

3) M3R: B6 バックの M3R KO マウスと Rag1 KO マウスを用いることにより、唾液腺炎モデルマウスの作成に成功した (MIS)。本疾患マウスモデルでは、CD3+T 細胞の移入のみで唾液腺炎を発症した。唾液量の減少、抗 M3R 抗体の検出、M3R を認識する T 細胞から IFN- γ および IL-17 の産生が認められた。

(B) T-bet TG マウスを用いた自己免疫性関節炎に関する研究：

1) CIA の関節炎スコアおよび発症頻度は著明に低下していた。2) 抗 CII 抗体は、総 IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b すべてのクラスにおいて著明に減少していた。3) CII 反応性 CD4+T 細胞からの IL-17 および IFN- γ 産生は低下していた。4) リンパ節、脾臓、胸腺の総 T 細胞数および CD4+T 細胞は有意に減少していた。5) T-bet TG 由来の CII 反応性 CD4+T 細胞の機能低下が認められた。6) T-bet TGxIFN- γ - マウスにおいても IL-17 産生 CD4+T 細胞数は減少していた。

(C) ROR γ t TG マウスを用いた自己免疫性唾液腺炎および自己免疫性関節炎の解析：

1) ROR γ t TG における唾液腺炎：(1) 著明な自然発症唾液腺炎および涙腺炎が認められた。局所浸潤細胞は CD4+T 細胞および B 細胞が主体であり ROR γ t 発現が認められた。唾液腺組織には IFN- γ および IL-17 の発現は認められなかった。(2) 脾細胞で IL-6 のみが増加し Treg 細胞数は減少していた。(3) M3R、CII を認識して IL-17 産生が増強していた。

2) ROR γ t TG における CIA：(1) 関節炎発症頻度および関節炎スコアの有意な低下が認められた。(2) T 細胞における ROR γ t 蛋白の著明な増加が認められた。(3) CD4+T 細胞において IL-17 産生細胞の増加が認められた。(4) CII 反応性 CD4+T 細胞において IL-17 産生細胞が増加し、IL-17 産生の増強がみられた。(5) 血清中の総抗 CII 抗体価が低下していた。

(高橋班員)

1) TH1 優位であることが報告されている

BXSB/MpJ-*Yaa* マウスと T-bet Tg とを交配することにより、腎機能が低下するとともに、平均寿命が短縮して自己免疫腎炎の増悪が認められた。細胞内サイトカインでは、IFN- γ の上昇、IL-5 の低下が認められた(研究業績の3)。一方、BXSB/MpJ-*Yaa* マウスを GATA-3 Tg マウスと掛け合わせたところ、尿蛋白減少、腎機能改善、平均寿命が延長し、自己免疫腎炎の増悪緩和が認められた。また、細胞内サイトカインの解析および血中免疫グロブリンの解析から、IFN- γ の低下、IL-5 の上昇、IgG1 の増加、IgG3 の低下など、TH1 優位な状態から TH2 背景ヘシフトしていることを確認することができた。

- 2) C57BL/6J (B6) の遺伝的背景を有する ROR γ t Tg マウスの解析を行った。ROR γ t Tg マウスでは、高ガンマグロブリン血症を呈し、肺、脾臓などに形質細胞の浸潤が認められた。また、ROR γ t Tg マウスを B6 背景から Balb/c 背景に移行するに伴い、形質細胞の浸潤の増加、貧血の進行、寿命の短縮が認められた。ROR γ t Tg マウスでは、血清 IL-17 の上昇を認めた他、肺を含む多臓器に形質細胞の浸潤が確認された。また血清 IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 が上昇し、高ガンマグロブリン血症を呈していた。そのほか、血清 IL-6 の上昇が認められ、脾臓においては CD11b 陽性 IL-6 陽性細胞の増加が確認された(投稿準備中)。
- 3) 潰瘍性大腸炎モデルである Dextran Sulfate Sodium (DSS)投与実験を T-bet Tg、GATA-3 Tg、ROR γ t Tg および野生型の4群のマウスに行った。実験終了時の平均体重減少率および腸管長は、それぞれ T-bet Tg が 3.5%、6.87cm、GATA-3 Tg が -13.3%、6.13cm、ROR γ t Tg が -8.2%、6.67cm、野生型が -8.3%、6.63cm であった。4群間では、T-bet Tg マウスで DSS 腸炎が最も軽く、ROR γ t Tg は野生型とほぼ同等で、GATA-3 Tg マウスが最も重篤であった。

(小安班員)

1) 新規 CIA モデルにおける TLR リガンドの影響

皮内投与 20-30 日後に、(b)および(c)群において、軟骨のびらんおよび細胞浸潤による関節破壊を伴う関節リウマチを発症し、関節は著しく変形していた。関節に浸潤した細胞には、Th1 細胞および Th17 細胞が含まれていた。樹状細胞表面抗原の発現強度については、MHC class II、CD40、CD86 のいずれについても、培養前、(a)群、(b)群、(c)群の順に発現強度が増強した。抗 CII IgG および IgG_{2c} 抗体価については、各群とも皮内免疫 14 日後から徐々に抗体価が上昇したが、群間で有意な差が見られなかった。また発症率については、(b)群では発症率は 2 割程度であったが、(c)群では約 4 割に上昇した。重症度においても、(c)群では(b)群に比べて高い重症度の個体が多く見られた。

2) 新規 CIA モデルにおける抗原提示能の影響

皮内投与 20-30 日に、両群とも 1) と同様に関節リウマチを発症した。抗 CII IgG 抗体価について、両群とも皮内免疫 14 日後から徐々に抗体価が上昇したが、(a)群に比べて(b)群ではやや低い傾向が見られた。発症率は(a)群では 4 割程度だったのに対し、(b)群では約 8 割に上昇した。重症度に関しては、(a)群に比べて(b)群の方が高い傾向にある個体数が多く見られた。

3) TLR リガンドが CIA 発症に及ぼす影響における予備的検討

TLR 刺激 6 時間後における遺伝子発現について、IL-12p40 は 500 nM の CpG-DNA で、IL-6 は 100 μ g/ml poly U および 500 nM の CpG-DNA で、TNF α は 500 nM の CpG-DNA および 10 μ g/ml の zymosan で発現が高かった。また、24 時間刺激後の培養上清中のサイトカイン産生量について、IL-12p40 および IL-6 は 500 nM の CpG-DNA で、TNF α は 500 nM の CpG-DNA および 10 mg/ml の zymosan で発現量が高く、先に示した遺伝子発現とほぼ関連していた。

4) TLR 刺激により樹状細胞からのサイトカイン産生と CIA 発症との相関

CpG-DNA 処理 DC を投与した場合の発症率は約 4 割であり、また、重症度および抗コラーゲン抗体価も LPS 処理群と同程度であり、より重症化する傾向は見られなかった。また、zymosan 処理群では全く CIA を発症せず、抗体価も LPS 処理群と比較して低かった。

5) IL-15 産生と CIA 発症との相関

DC からの IL-15 遺伝子発現の低い γ_c -rag2 DKO マウス、あるいは IL-15 KO マウス由来の DC では、CIA 発症が遅れる上に抗コラーゲン抗体価も低く、発症率および重症度が低下していた。

6) TLR リガンドの違いによる DC における IL-15 遺伝子発現の検討

樹状細胞における IL-15 遺伝子の発現は、CpG-DNA や LPS に比べて poly I:C 刺激で高く、zymosan 刺激では低かった。

7) TLR リガンド刺激 DC が産生する IL-15 による CD4⁺ T 細胞応答の解析

どの TLR リガンドを用いた場合でも CD4⁺ T 細胞は増殖し、WT マウスあるいは IL-15 KO マウス由来 DC の間で CD4⁺ T 細胞の増殖に差は見られなかった。

(松本班員)

1) human GPI₃₂₅₋₃₃₉ を抗原としたときに human GPI-primed CD4⁺ T 細胞より著しい IL-17、IFN γ の産生を認めた。human GPI₃₂₅₋₃₃₉ を免疫することにより組織学的にも明らか関節炎が誘導された、mouse GPI に対する抗体価を認めた。

2) TIARP mRNA および蛋白は関節炎発症初期の脾臓で強発現し、中でも CD11b⁺細胞で強く、抗 TNF α 抗体投与により発現が激減した。一方関節での発現は関節腫脹に伴って増加し、免疫組織化学染色で

は増殖滑膜組織に強く局在していた。

3) ヒトの解析において STEAP4 が STEAP ファミリー分子の中で特異的に関節滑膜組織に強発現し、RA 滑膜における STEAP4 発現は OA の発現と比較し有意差は確認されなかった。免疫組織化学染色で RA 患者 CD68⁺ 滑膜細胞に局在していたが、OA 患者では滑膜線維芽細胞に発現が強く認められた。

4) MH7A を TNF α 刺激すると STEAP4 蛋白の発現亢進が観察された。また、滑膜細胞にベクター導入で STEAP4 を過剰発現させると IL-6 産生が抑制され、逆に siRNA による STEAP4 抑制により IL-6 mRNA の発現が亢進した ($p < 0.05$)。

5) TIARP 欠損マウスでは脾臓にて CD11b⁺ 細胞が著明に増加していた。CIA 誘導により発症率、臨床スコアは野生型に比し著明に悪化していた。CII 特異的抗体価および *in vitro* での CII 再刺激による CD4⁺T 細胞の IFN γ 、IL-17 産生は野生型と TIARP 欠損マウス間で有意な差は認められなかった。一方、血清中 IL-6 濃度および関節局所の IL-6、TNF α mRNA 発現は野生型と比較して TIARP 欠損マウスで有意に高値を示した。

(上阪班員)

(A) TREM-1 制御による治療

TREM-1Ig による感染防御能を落とさない程度の TREM-1 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。さらに、TREM1 細胞外ドメイン融合蛋白により既報告とは異なる新規 TREM-1 リガンド(L)発現細胞を発見した。この細胞の cDNA を用い、cDNA ライブラリー発現細胞スクリーニングを行い TREM1-L を同定できた。同分子に対するモノクローナル抗体を複数作製し、TREM-1 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。

(B) cMIR による治療

c-MIR アデノウイルスによる CIA 後肢への遺伝子治療は、後肢の関節炎スコアの改善をもたらす、組織学的にも関節炎の抑制効果が認められた。一方、前肢の関節には治療効果が認められなかった。また、血清中の抗 CII 抗体価や CII に対する脾臓 T 細胞の増殖反応は治療による影響を受けなかった。

In vitro では、c-MIR 強制発現によって、TNF- α /IL-1 β 刺激下 FLS の IL-6 産生は低下していたが、IL-6 mRNA 発現レベルには差がなかった。LPS 刺激下 BM からの TNF- α 、IL-6 の産生は、c-MIR Tg 由来 BMM で低下した。しかし、IL-1 β 産生に差はなかった。BMDC における TNF- α や IL-6 の産生は、c-MIR Tg 由来 BMDC で低下した。

(小池班員)

RasGRP4 は末梢血単球で高発現していたが、マクロファージ・樹状細胞および破骨細胞に分化すると発現が低下する傾向にあった。一方樹状細胞を IL-6 で

刺激した際には RasGRP4 蛋白の発現が亢進した。PBMC における RasGRP4 発現は、real-time PCR による定量評価では RA 患者において優位に発現が高かった ($p < 0.0001$) が、疾患活動性との相関はなかった。RA 患者および健康人 mRNA からサイズの異なる 13 種の新規スプライスバリエントが検出され、その頻度は有意に RA 患者で高かった ($p < 0.0001$)。Exon 9 全体を欠損する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 の頻度が優位に高く、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と比較して PBMC における RasGRP4 の発現量が有意に高かった ($p = 0.02$)。一方、ウエスタンブロット法で評価した RasGRP4 蛋白発現は、RA 患者由来の末梢血において健康人と比較して低値であり、またスプライスバリエントに相当するサイズのバンドは検出されなかった。活動性の関節リウマチ滑膜に RasGRP4 陽性細胞の浸潤を多数認めたが、その発現はおもに CD14 陽性において認められた。RasGRP4 の発現は、単球がマクロファージ・樹状細胞・破骨細胞に分化するに従って低下していた。

(山村班員)

- 1) 抗生物質投与によって自己免疫性脳炎 EAE が軽症化することを見出したが、この現象は NKT 細胞欠損マウスでは見られないことを明らかにした。NKT 細胞が腸内細菌の介在する免疫調節で鍵を握る可能性が推測された (Yokote et al. Am J Pathol 2008)。
- 2) MAIT 細胞は多発性硬化症患者の末梢血で減少し、特に再発時に減少することを明らかにした。また同細胞を除去することによって、T 細胞のインターフェロン γ 産生が亢進することから、MAIT 細胞が Th1 細胞反応の制御細胞である可能性を示した (論文投稿中)。
- 3) MAIT 細胞欠損マウスでは EAE は重症化するが、関節炎は軽症化することを示した。MAIT 細胞が病態に応じて、異なる制御機能を発揮することが推測される。

(藤尾班員)

LAG-3 をマーカーとして発現する細胞集団を、マウス脾臓の FACS 解析で検討したところ、CD4 陽性 CD25 陰性 CD45RB 陰性 LAG3 陽性 T 細胞 (以下 CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞と記載) を同定した。CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞は IL-10 を高産生し、RAG1 ノックアウトマウスへの CD45RB 高発現 CD4 陽性 T 細胞の移入による腸炎の発症を IL-10 依存的に抑制した。マイクロアレイ解析においても、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞は Egr2、IL-10、LAG3、Blimp-1 を高発現し、CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞とは明らかに異なる遺伝子発現プロファイルであった。アナジー関連遺伝子 Egr2 に着目し解析したところ、Egr2 遺伝子導入 CD4 陽性 T 細胞で IL-10、LAG-3、Blimp-1

の発現の亢進を認めた。さらに Egr2 遺伝子導入 CD4 陽性 T 細胞は OVA によるマウス遅延型過敏反応を抑制した。機能的 Foxp3 遺伝子欠損 Scurfy マウスにおいては、試験管内での抑制活性のある CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞が増加していた。CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の分化機構を解明するために様々なマウスにおける CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞を検討した。まず B 細胞を欠損する muMT ノックアウトマウスを解析したところ、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞は脾臓においてもパイエル板においても著明に減少していた。また GermfreeC57BL6 マウスにおいても SPF C57BL6 マウスと比較して CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞が脾臓においてもパイエル板においても著明に減少していた。

興味深いことに、最近 T 細胞特異的 Egr2 ノックアウトマウスが SLE 様の病態を示すことが報告された (J Exp Med 2008;205:2295)。また分担研究者と理化学研究所ゲノム医科学研究センターとの共同研究により、Egr2 が SLE の感受性遺伝子の一つであることが判明した。これらの事実から CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞が SLE の病態のコントロールに関与している可能性が考えられた。そこで MRL/lpr マウスに MRL/+マウス由来の CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞を移入すると、自己抗体産生・腎障害が抑制されたが、CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞の移入では抑制されなかった。さらに C57/B6 マウス由来の CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞は、NP-OVA 免疫による生体内での抗 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。

(石川班員)

若齢 BWF1 マウスに比べて加齢 BWF1 マウスにおいては、CD25 陽性 CD4T 細胞が著明に増加しており、その 95%以上が Foxp3 陽性であった。さらに若齢および加齢どちらのマウスの脾臓 CD25 陽性 CD4T 細胞も細胞増殖抑制試験において制御活性を示した。またリンパ組織の免疫蛍光染色において、若齢マウスでは Treg のほとんどが T 細胞領域に局限して存在するのに対して、加齢 BWF1 マウスにおいては赤脾髄や B 細胞濾胞にも多数存在することが明らかになった。さらに、標的臓器においても多数の Foxp3 陽性 CD4T 細胞の存在が認められた。FCM による細胞表面マーカーの解析では CD69、ICOS、OX40 などの発現が上昇しており、ケモカイン受容体に関しては CCR7 の発現低下と CXCR4 の発現増強が認められた。

BWF1 マウスでは加齢に伴い、CXCR5、MHC クラス II、ICOS、CD69 発現など、いわゆる濾胞性ヘルパー T 細胞のフェノタイプを有する CD4T 細胞が増加していることが明らかになった。さらにこの

CXCR5 陽性 CD4T 細胞が B1 細胞の IgG 抗体産生を促進することも明らかとなった。一方、B1 細胞は B2 細胞よりはるかに強い抗原提示能を有し、自己 CD25⁺CD4T 細胞を活性化し、Foxp3 陽性細胞を誘導する一方で、CD25⁺CD4T 細胞における Foxp3 の発現は低下させることが明らかとなった。さらに B1 細胞により活性化された T 細胞 (CFSE^{low}CD4T 細胞) も T_{FH} のフェノタイプを一部共有しており、B1 細胞や B2 細胞の IgG 抗体産生を促進した。B1 細胞の移入実験では Foxp3 陽性細胞と B1 細胞が近接する像も認められた。

抗 BLC 抗体は、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抗 DNA 抗体レベルに対する効果は一定でなかった。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。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。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。抗 BLC 中和抗体は血清 IL-17 レベルを低下させる傾向が認められた。

(田中班員)

リツキシマブの作用機序としては、IgD-CD27+メモリー B 細胞の再出現を制御して CD19+IgD+CD27-ナイーブ B 細胞の再構築を生じ、長期寛解導入と免疫複合体が関与する腎障害などが改善したと考えられた (液性免疫の制御)。また、リツキシマブにより SLE 患者末梢血の CD40 や CD80 等の共刺激分子を高発現するメモリー B 細胞が優先的に減少することを認め、中枢神経症状の速やかな改善については、共刺激分子を発現するメモリー B 細胞の優先的除去により、リンパ球の活性化の制御を介して血管障害などを改善した (細胞性免疫の制御) 可能性も考えられた。一方、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。その過程に於いて、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。

D. 考察

(住田)

ドミナント T 細胞エピトープのアナログペプチドを選定することにより、免疫難病の病因 T 細胞を抗原特異的に制御することが可能となる。アナログペプチド発現米を作製しモデル動物での有効性を検定できれば、免疫難病をターゲットとした clinical trail に進むことができよう。

T-bet 分子の T 細胞での強発現により、CIA の発症が著明に減少した。その機序として、1)CII 反応性 T 細胞からの IL-17 および IFN γ 産生が低下していた、2)CII 反応性 CD4⁺T 細胞の機能低下が認められた、3)T-bet の強発現による Th17 細胞への分化誘導抑制、などが考えられた。ROR γ t 分子の T 細胞における強発現により、自己免疫性唾液腺炎および涙腺炎が発症した。

ROR γ t 分子の T 細胞での強発現により、唾液腺炎および涙腺炎が発症した。その発症機序に、脾細胞における M3R に対する Th17 細胞の増加、IL-6 産生亢進、Treg 細胞の減少などの関与が推測された。一方、CII 反応性 T 細胞からの IL-17 産生は増加していたが、抗 CII 抗体価の低下などにより CIA は有意に抑制された。以上より、T 細胞分化に関わる転写因子の発現が自己免疫疾患発症および調節に重要でありことが判明し、これらの分子を標的とした治療戦略の開発を進める。

(高橋班員)

TH1/TH2 疾患における病態改善の試みとして、これまではサイトカイン投与や抗体投与が行われてきた。本研究では、転写因子による病態制御を試み、TH1 優位の自己免疫疾患における TH2 誘導により、疾患改善の有効性を確認した。また、Balb/c 背景の ROR γ t Tg マウスにおける高ガンマグロブリン血症の原因としては、IL-17、IL-6 高値の関与が推測される。ROR γ t Tg マウスでは、TH17 細胞分化誘導に伴う IL-17 の産生増加が認められた。その後、Balb/c の遺伝的背景に移行することにより、全身の形質細胞の増殖が認められた。IL-17 はマクロファージからの IL-6 産生を誘導することが知られており、IL-17 上昇に伴う IL-6 の上昇が形質細胞の増殖に関与したと考えられる。DSS 投与実験では、T-bet Tg マウスでは比較的軽症で、ROR γ t Tg は野生型とほぼ同等、GATA-3 Tg マウスでは病態が最も重篤化していた。炎症性腸疾患では Th17 の役割が注目されているが、DSS 投与による本研究では、TH2 が TH17 より病態の増悪に関与し、また TH1 では病態を抑制する結果であった。

(小安班員)

CIA における樹状細胞の関与・機能を解析するため、従来法を改良し、1 度目の免疫を細胞移植する

ことによる免疫法を用いた。これにより従来法と遜色のない CIA を発症した。TLR の刺激により、樹状細胞上の抗原提示関連分子の発現が上昇し、この現象と CIA の発症率・重症度が相関した。また、予めヘルパー T 細胞を樹状細胞によって *in vitro* で刺激しておくこと、さらに発症率や重症度が上昇することから、一次応答期における抗原提示の強さが、CIA 病態形成に重要であることが示唆された。一方、CII に対する抗体価については、発症に重要であると言われているものの、本 CIA モデルにおいては、発症するか否かにかかわらず上昇してくることから、一次応答期における抗原提示の強さは、抗体産生とは直接関係ないことが示唆された。

TLR リガンドの種類によって、樹状細胞から産生される炎症性サイトカインの種類や異なり、特に CpG-DNA によって、関節リウマチ発症に関わるサイトカイン産生が増強されることが明らかになった。そこで次年度以降は、などのサイトカイン産生不全マウス由来樹状細胞を移植した場合に、発症率や重症度が低くなるかについて検討を加える予定である。

樹状細胞から産生され、Th1 あるいは Th17 細胞を誘導する IL-12 あるいは IL-6 などのサイトカイン産生は、LPS 刺激に比較して CpG-DNA 刺激や zymosan 刺激で多いにもかかわらず、CIA を重篤化しなかった。一方で、IL-15 KO マウス由来樹状細胞を移入した場合に、抗コラーゲン抗体価が下がり CIA 発症が軽減したことから、樹状細胞の産生する IL-15 が、CIA 発症に重要であることが示唆された。しかしながら、IL-15 KO マウス由来樹状細胞は CD4⁺T 細胞の増殖を抑制しなかったことから、抗コラーゲン抗体価が低いために IL-15 KO マウスでは発症しなかったと考えられる。すなわち樹状細胞からの IL-15 産生は、抗コラーゲン抗体産生に重要な役割を果たしていることが示唆された。今後は、抗体産生にどのように IL-15 が関わるかを明らかにするとともに、樹状細胞からの IL-15 発現を強く促す poly I:C 処理により、CIA 発症が重篤化するかについて検討を加える予定である。

(松本班員)

- GPI 誘導性関節炎において human GPI₃₂₅₋₃₃₉ が T 細胞エピトープと考えられ、このペプチドだけの免疫で関節炎が惹起されることを世界で初めて証明した。

- TIARP は脾臓にて関節炎初期に誘導され、CD11b⁺細胞に過剰発現し、関節滑膜では腫脹とともに増強した。

- ヒト STEAP 4 は関節滑膜に局在し、TNF α 刺激で発現が誘導され、IL-6 の発現を調節している可能性が示され、RA の病態に関与する”新たな関節炎制御分子”である可能性が示唆された。

- TIARP 欠損マウスの解析より、この分子が関節炎の制御分子であり、IL-6 産生制御により関節炎を抑

止している可能性が示唆された。

(上阪班員)

(A) TREM-1 制御による治療

TREM-1 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。その TREM-1 阻害が RA モデルに有効であることを明らかにした。今回の TREM1-L 同定は世界初であり、同分子に対する抗体投与により関節炎の改善が確認された。今後、TREM1-L 側への影響の解析、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、結核や重症感染症などの副作用を増加させない新規の治療法として臨床応用していくと期待される。

(B) cMIR による治療

関節局所での c-MIR 強制発現による CIA 治療効果は、c-MIR の過剰発現が、IL-6 や TNF- α の産生を抑制することで関節炎を改善したと考えられる。c-MIR 強制発現による IL-6 や TNF- α の分泌抑制は、LPS 刺激で同時に産生される IL-1 β や IL-10 の産生が抑制されないことから、サイトカイン産生全般を抑制したものではない。既知の c-MIR のユビキチン化標的分子は、MHC class II や CD86 であり、これらは膜貫通型の表面分子である。しかし、c-MIR は、IL-6 と TNF- α という特定のサイトカインの産生も転写後制御で抑制した。この機能は、c-MIR の新機能と考えられる。

(小池班員)

RasGRP4 は PBMC 分画においては主に単球に発現していた。分化と共に発現が低下することから、肥満細胞と同様にその分化に重要である一方で終末分化段階での機能は高くない可能性が示唆された。ただし炎症性サイトカインの影響を受けて再度発現が亢進する状況もあり得ることが示唆された。RA 患者では PBMC における RasGRP4 mRNA が高発現しており、スプライス異常とも関連していた。末梢血単球における RasGRP4 蛋白の発現は RA 患者では低く、代償機構が働いて単球が RasGRP4 mRNA を高発現している可能性が示唆された。一方、滑膜局所での RasGRP4 発現については、動員された単球を観察していると考えられた。単球が破骨細胞へと分化する能力を RasGRP4 の阻害で抑制できれば治療に繋がる可能性がある。

(山村班員)

NKT 細胞と MAIT 細胞はインバリアント抗原受容体アルファ鎖を発現することや、non-classical MHC I に拘束されるという共通点を有するが、自己免疫疾患における関与の仕方はかなり異なることが推測される。MAIT 細胞数はヒトよりもマウスで多く、NKT 細胞機能はヒトとマウスで異なることが報告されている。今後ヒトの血液や髄液などのサンプルを用いて、NKT 細胞や MAIT 細胞の研究を進展

させる必要がある。その際に、治療薬による修飾を加えるなどによって、多くの情報が得られる可能性が高い。

(藤尾班員)

以上の結果から IL-10 を高産生する Egr2 発現 CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞は、Tr1 類似の新規制御性 T 細胞サブセットと考えられた。CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞は機能的 Foxp3 欠損マウスでも分化が認められ、その分化メカニズムは CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞とは異なると考えられた。そして CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の分化には B 細胞及び腸内細菌叢が重要と考えられた。Egr2 遺伝子近傍に回腸型クローン病の感受性 SNP が存在することが報告されており (Nature Genetics 2007;39:596)、腸管免疫における CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の機能と炎症性腸疾患発症が関連している可能性が推測される。また 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抑制能、および自己免疫性炎症の存在しない生体内での抗体産生抑制能を持つことが確認された。今後この新規制御性 T 細胞の分化機構および CD4 陽性 T 細胞での Egr2 の発現機構を解明することで、新たな自己免疫疾患治療法の開発につながる可能性があると考えられる。

(石川班員)

加齢 BWF1 マウスにおける SLE 発症に伴い、Treg は著明に増加しており、ナイーブ CD4T 細胞増殖制御活性を有していたが、発症の過程でケモカイン受容体の変化による局在異常をきたし、Tfh 様活性化 CD4T 細胞による IgG 抗体産生を抑制しないことが末梢免疫寛容の破綻をもたらしていることが考えられる。また、B 細胞ケモカイン BLC/CXCL13 の異所性高発現による B1 細胞のリンパ組織や標的臓器への遊走異常が、その微小環境下で Treg から T_{FH} への分化を促進、あるいは直接 T_{FH} を誘導し、免疫寛容の破綻をもたらす可能性も示唆された。抗 BLC 中和抗体が蛋白尿を来した 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。

(田中班員)

リツキシマブにより SLE 患者末梢血の CD40 や CD80 等の共刺激分子を高発現するメモリー B 細胞が優先的に減少することを認め、中枢神経症状の速やかな改善については、共刺激分子を発現するメモ

リーB細胞の優先的除去により、リンパ球の活性化の制御を介して血管障害などを改善した（細胞性免疫の制御）可能性も考えられた。しかし、米国のSLEを対象としたリツキシマブ第Ⅱ/Ⅲ相試験（EXPLORER試験）は失敗し、ループス腎炎に対して別の試験が進行中である。今後、CD20に加えてCD22やTACI等のB細胞特異的の表面抗原、および、B細胞受容体やサイトカイン等のシグナルを伝達する細胞内蛋白質の重要な治療標的に対する疾患制御を目指した細胞やモデルマウスレベルでの研究を遂行し、臨床応用の基礎成績を確立する。いっぽう、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

本研究では、自然免疫系および獲得免疫系において重要な役割を果たしている免疫担当細胞、免疫分子の機能を分子レベルで明らかにし、免疫疾患の発症機構を明らかにすること、そして、それらの細胞や分子をターゲットとした抜本的な治療・予防戦略を開発することを目的とした。3年間の研究成果では、難治性免疫疾患におけるDC細胞、TH1、TH2、TH17細胞、新規Treg細胞やユニークなNKT細胞などの調節性T細胞、B細胞などの免疫細胞がその発症に関与していることを明らかにしてきた。さらに、T細胞エピトープ、T細胞分化誘導転写因子、サイトカイン制御分子（TIARP、TERM1、RasGRP4など）、ケモカイン-ケモカイン受容体相互作用、B細胞活性化シグナル分子などの免疫分子の重要性も明らかにしてきた。今後は、このような免疫細胞、免疫分子を治療標的として副作用の無い疾患特異的な治療戦略の開発を進める。本研究成果は、免疫疾患の発症機構を分子、細胞レベルで解析する基盤研究であり、一定の研究成果が得られたと考えられる。次年度以降は、本研究成果に基づいた具体的な新規治療戦略の開発が望まれる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

(住田)

1. 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)*
2. 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 SPI1 with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum. (in press)*
3. 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. 2010 Sep 17;12(5):R174. [Epub ahead of print]*
4. 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.*
5. 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 lypus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. 10715838-43, 2010.*
6. 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.*
7. 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.*
8. 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.* 22:319-28. Epub 2010 Feb 24.
9. 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.* 160: 394-402. Epub 2010 Jan 19.
10. 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., Shiota, H., Matsumoto, I., Sumida, T., 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.
11. 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.* 11:R167. Epub 2009 Nov.
12. 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.* 159:1-10. Epub 2009 Oct 6.
13. 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.* 11:R118. Epub 2009 Aug 6.
14. 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.
15. Tanaka, Y., Matsumoto, I., Iwanami, K., Inoue, A., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T. B cells have crucial role as autoantibody producers in arthritis mediated by glucose-6-phosphate isomerase. *Clin. Exp. Immunol.* 155:285-294, 2009.
16. 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.
17. Iwanami, K., Matsumoto, I., Tanaka, Y., Inoue, A., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T. Arthrogenic T cell epitope in glucose-6-phosphate isomerase (GPI)-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 10:R130. Epub 2008. Nov. 7.
18. Kawasaki, A., Ito, I., Hikami, K., Ohashi, J., Hayashi, T., Goto, D., Matsumoto, I., Ito, S., Tsutsumi, A., Koga, M., Arinami, T., Graham, R. R., Hom, G., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Behrens, T.W., Sumida, T., and Tsuchiya, N. Association of STAT4 polymorphisms with systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Arthritis Res. Ther.* 10:R113. Epub 2008 Sep 9.
19. Matsumoto, I., Zhang, H., Yasukochi, T., Iwanami, K., Tanaka, Y., Inoue, A., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T. Therapeutic effects of antibodies to TNF α and IL-6 and CTLA-4 Ig in mice with glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 10: Epub 2008 Jun 5, 2008.
20. Yoshiga, Y., Goto, D., Segawa, S., Ohnishi, Y., Matsumoto, I., Ito, S., Tsutsumi, A., Taniguchi, M., and Sumida, T. NKT cells are novel accelerator of IL-17 in the pathogenesis of collagen-induced arthritis. *Int. J. Mol. Med.* 22: 369-374, 2008.
21. Iwanami, K., Matsumoto, I., Watanabe, Y., Mihara, M., Ohsugi, Y., Mamura, M., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., Kishimoto, T., and Sumida, T. Crucial role of IL-6/IL-17 cytokine axis in the induction of arthritis by glucose-6-phosphate-isomerase. *Arthritis Rheum.* 58:754-763, 2008.
22. Matsui, H., Tsutsumi, A., Sugihara, M., Suzuki, T., Iwanami, K., Kohno, M., Goto, D., Matsumoto, I., Ito, S., and Sumida, T. Expression of Visfatin (pre-B cell colony-enhancing factor) gene in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 67:571-572, 2008.
23. Nakamura, Y., Wakamatsu, E., Tomiita, M., Kohno, Y., Yokoka, J., Goto, D., Ito, S., Matsumoto, I., Tsutsumi, A., and Sumida, T. High prevalence of autoantibodies to muscarinic 3 acetylcholine receptor in patients with juvenile Sjogren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 67:136-137, 2008

(高橋班員)

1. Kiwamoto T, Ishii Y, Morishima Y, Yoh K, Kikuchi N, Haraguchi N, Masuko H, Kawaguchi M, Nomura A, Sakamoto T, Takahashi S, Hizawa N. Blockade of cysteinyl leukotriene-1 receptors efficaciously suppresses airway remodeling in Th2-biased mice. *Clin. Exp. Allergy, in press.*
2. Li YJ, Takizawa H, Azuma A, Kohyama T, Yamauchi Y, Takahashi S, Yamamoto M, Kawada T, Kudoh S, 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.

3. Mizuki S, Oishi H, Zhang MC, Kamogawa J, Miyazaki T, Ono M, Takahashi S, Yamamoto H, Nose M. Genetic heterogeneity in rheumatoid arthritis mouse models induced by extrinsic and intrinsic factors. Pathol. Int., 60; 430-437, 2010.

4. 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, Takahashi S, 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.

5. Haraguchi N, Ishii Y, Morishima Y, Yoh K, Matsuno Y, Kikuchi N, Sakamoto T, Takahashi S, Hizawa N. Impairment of host defense against disseminated candidiasis in mice overexpressing GATA-3. Infect. Immun., 78; 2302-2311, 2010.

6. Honda, S.I., Kurita, N., Miyamoto, A., Cho, Y., Usui, K., Takeshita, K., Takahashi, S., Yasui, T., Kikutani, H., Kinoshita, T., Fujita, T., Tahara-Hanaoka, S., Shibuya, K., Shibuya, A. Enhanced humoral immune responses against T-independent antigens in Fc{alpha}{micro} R-deficient mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 106; 11230-11235, 2009.

7. Shimohata H, Yamada A, Yoh K, Ishizaki K, Morito N, Yamagata K, Takahashi S. Overexpression of T-bet in T-cell accelerates autoimmune glomerulonephritis in mice with a dominant Th1 background. J. Nephrol., 22; 123-129, 2009.

8. Yano M, Kuroda N, Han H, Horike M, nishikawa Y, Kiyonari H, Maemura K, Yanagawa Y, Obata K, Takahashi S, Ikawa T, Satoh R, Kawamoto H, Mouri Y, Matsumoto M. Aire controls differentiation program of thymic epithelial cells in the medulla for the establishment of self-tolerance. J. Exp. Med., 205; 2827-2838, 2008.

9. Li YJ, Takizawa H, Azuma A, Kohyama T, Yamauchi Y, Takahashi S, Masayuki Y, Kawada T, Kudoh S, Sugawara I. Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to airway inflammatory responses induced by low-dose diesel exhaust particulate in mice. Clin. Immunol., 128; 366-373, 2008.

(小安班員)

1. Matsui, T., Nakata, N., Nagai, S., Nakatani, A., Takahashi, M., Momose, T., Ohtomo, K. and Koyasu, S.: Inflammatory cytokine and hypoxia contribute to 18F-FDG uptake by cells involved in pannus formation in rheumatoid arthritis. J. Nuc. Med. 50:908-914,2009.

(松本班員)

1. Inoue A, Matsumoto I, Tanaka Y, Iwanami K, Kanamori A, Ochiai N, Goto D, Ito S, Sumida T. Tumor necrosis factor alpha-induced adipose-related protein expression in experimental arthritis and in rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther. 11:R118, 2009

2. Iwanami K, Matsumoto I, Watanabe Y, Mihara M, Ohsugi Y, Mamura M, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Kishimoto T, Sumida T.:Crucial role of IL-6/IL-17 cytokine axis in the induction of arthritis by glucose-6-phosphate-isomerase. Arthritis Rheum. 58:754-763, 2008

3. Matsumoto I, Zhang H, Yasukochi T, Iwanami K, Tanaka Y, Inoue A, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. Therapeutic effects of antibodies to TNF alpha and IL-6 and CTLA-4 Ig in mice with glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis. Arthritis Res Ther. 10:R66, 2008

(上阪班員)

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 Rheum 60 (6), 1615-1623, 2009

(小池班員)

1. Koike, T.: "Antiphospholipid antibodies: from bench to bedside", 14th Congress of Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (APLAR 2010), Hong Kong, July 13, 2010

2. Koike, T.: "What is APS in the third millennium?", The 4th Asian Congress on AUTOIMMUNITY, Singapore, September 11, 2009

3. Koike, T.: "Development of Autoimmune Diseases : A Lesson from Stem Cell Transplantation", 6th International Congress on Autoimmunity, Porto, Portugal, September 13, 2008

(山村班員)

1. Fujita, M., T. Otsuka, M. Mizuno, C. Tomi, T.M. Gallagher, T. Yamamura, and S. Miyake: Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 modulates experimental autoimmune encephalomyelitis via iNKT cell-dependent mechanism. Am J Pathol 175: 1163-1123, 2009

2. Theil, M.M., S. Miyake, M. Mizuno, C. Tomi, J.L. Croxford, H. Hosoda, J. Theil, S. von Hoersten, H. Yokote, A. Chiba, Y. Lin, S. Oki, T. Akamizu, K. Kangawa, and T. Yamamura: Suppression of

experimental autoimmune encephalomyelitis by Ghrelin. *J Immunol* 183: 2859-2866, 2009

3. Yokote, H., S. Miyake, J.L. Croxford, S. Oki, H. Mizusawa, and T. Yamamura: NKT cell-dependent amelioration of a mouse model of multiple sclerosis by altering gut flora. *Am J Pathol* 173: 1714-1723, 2008

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

(藤尾班員)

1. Fujio K, Okamura T, Yamamoto K.: The Family of IL-10-secreting CD4+ T cells. *Advances in Immunology*. 105:99-130,2010

2. 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: 2313-2320,2010

3. Okamura T, Fujio K, Shibuya M, Sumitomo S, Shoda H, Sakaguchi S, Yamamoto K.: CD4+CD25+LAG3+ regulatory T cells controlled by the transcription factor Egr-2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106:13974-13979,2009.

(石川班員)

1. Ishikawa S.: Children's immunology, what can we learn from animal studies (3): Impaired mucosal immunity in the gut by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD): A possible role for allergic sensitization. *J. Toxicol. Sci.* 34:SP349-361, 2009.

2. Abe J., Ueha S., Suzuki J., Tokano Y., Matsushima K., and Ishikawa S.: Increased Foxp3+CD4+ regulatory T cells with intact suppressing activity but altered cellular localization in murine lupus. *Am. J. Pathol.* 173:1682-1692, 2008.

(田中班員)

1. 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

2. 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

3. Nakayamada S, Fujimoto T, Nonomura A, Saito K, Nakamura S, Tanaka Y.: Usefulness of initial histological features for stratifying Sjogren's syndrome responders to mizoribine therapy. *Rheumatology* 48: 1279-82,2009

4. Suzuki K, Nakawaga H, Kameda H, Amano K, Kondo T, Itoyama S, Tanaka Y, Takeuchi T.: Severe acute thrombotic exacerbation in two cases with anti-phospholipid syndrome after retreatment with rituximab in phase I/II clinical trial for refractory systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 48, 198-199,2009

5. Tsujimura S, Saito K, Nawata M, Nakayamada S, Tanaka Y.: Overcoming drug resistance induced by P-glycoprotein on lymphocytes in patients with refractory rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 67, 380-388,2008

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1) 特許取得

(住田、松本)

申請準備中

(上阪班員)

c-MIR を利用した CD40 の発現調節、及びそのスクリーニング方法 (出願番号:2007-146706)

2) 実用新案登録

なし

3) その他

特に無し