

German-Japanese Neuroimmunology Symposium,
Eibsee, 10th, July 2009

14. Chiba A, Tajima R, Miyazaki Y, Ichikawa D, Yamamura T, Miyake S: The role of MR-1-restricted MAIT cells in the pathogenesis of arthritis. American College of Rheumatology 73rd Annual Scientific Meeting, Philadelphia, 10.19, 2009
15. Miyake S, Croxford JL, Yamamura T: The role of MR1-restricted Va19i T cells in autoimmune disease models. Keystone symposia, Tolerance in Transplantation and autoimmunity, Colorado, January 29, 2008
16. Yokote H, Miyake S, Croxford JL, Mizusawa H, Yamamura T: Alteration of gut flora ameliorates the disease course of experimental autoimmune encephalomyelitis in association with contraction of inflammatory Th17 cells. 8th Annual Conference of FOCIS, Boston, June 5, 2008
17. Miyake S, Mizuno M, Kaieda S, Sakaguchi N, Sakaguchi S, Yamamura T: Activation of innate immunity breaks tolerance and induces autoimmune arthritis in genetically susceptible mice. American College of Rheumatology 71th Annual Scientific Meeting, Washington, DC, November 13, 2006 (Arthritis Rheum. 58:S266, 2008)
18. Seta N, Komori A, Kimura N, Kaieda S, Okada Y, Miyake S, Kuwana A: A role of bone marrow-derived monocyte lineage cells in antibody-induced arthritis. American College of Rheumatology 71th Annual Scientific Meeting, Washington, DC, November 13, 2008 (Arthritis Rheum. 58:S508, 2008)

国内学会

1. 千原典夫, 佐藤和貴郎, 荒浪利昌, 宮崎雄生, 三宅幸子, 岡本智子, 小川雅文, 山村隆: 視神経脊髄炎(NMO)におけるB細胞の役割について. 第22回日本神経免疫学会学術集会、東京、3.18, 2010
2. 宮崎雄生, 三宅幸子, Olivier Lantz, 山村 隆: 多発性硬化症における Mucosal Associated Invariant T細胞に関する研究. 第22回日本神経免疫学会学術集会、東京、3.18, 2010
3. 能登大介, 高橋和也, 山村隆, 三宅幸子: 末梢血単球からミクログリアへの分化誘導法に関する

検討. 第22回日本神経免疫学会学術集会、東京、3.19, 2010

4. 三宅幸子: NKT細胞と自己免疫. 第53回日本リウマチ学会、横浜、4月23日、2010(第54回日本リウマチ学会総会抄録集 p243)
5. 千葉麻子, 三宅幸子: 関節リウマチなど関節炎におけるMR1拘束性MAIT細胞の役割. 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会、神戸、4.22, 2010(第54回日本リウマチ学会総会抄録集 p500)
6. 三宅幸子: 免疫制御細胞による自己免疫性疾患. 第53回日本リウマチ学会、横浜、4月24日、2009(第53回日本リウマチ学会総会抄録集 p122)
7. 宮崎雄生, 三宅幸子, 山村 隆: ヒト末梢血における mucosal associated invariant T細胞に関する研究. 第37回日本臨床免疫学会総会、東京、11.13, 2009
8. 宮崎雄生, 千葉麻子, 水野美歩, 任海千春, 市川大樹, Iraide Alloza, 山村 隆, Koen Vandebroek, 三宅幸子: 新規 celecoxib アナログはTh17, Th1細胞の抑制を介して多発性硬化症, 関節リウマチのマウスモデルを抑制する. ワークショップ18, 第39回日本免疫学会総会, 大阪, 12.2, 2009
9. 市川大樹, 水野美歩, 大木伸司, 山村 隆, 三宅幸子: T細胞アナジーに関連したE3リガーゼGRAILの基質同定. 第39回日本免疫学会, 大阪, 12.2, 2009
10. 千葉麻子, 宮崎雄生, 市川大樹, 山村隆, 三宅幸子: 炎症性関節炎におけるMR1拘束性MAIT細胞の役割. 第39回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、12.2, 2009
11. 宮崎雄生, 千葉麻子, 水野美歩, 任海千春, 市川大樹, Iraide Alloza, 山村 隆, Koen Vandebroek, 三宅幸子: 新規 celecoxib アナログはTh17, Th1細胞の抑制を介して多発性硬化症, 関節リウマチのマウスモデルを抑制する. ワークショップ18, 第39回日本免疫学会総会, 大阪, 12.2, 2009
12. 三宅幸子: NKT細胞の糖脂質認識と免疫制御. 第128回日本薬学会、横浜、3月28日、2008
13. 林幼偉, 三宅幸子, 山村隆: EAEの寛解維持を担う機能的Tregは寛解期に誘導され、その誘導脳は脳炎惹起性ペプチドの末端配列に依存する. 第20回日本神経免疫学会、新潟、4月17日、2008(神経免疫学 15巻: p34, 2008)

14. 山村隆、林幼偉、横手裕明、三宅幸子：免疫制御システムと神経免疫疾患：第20回日本神経免疫学会、新潟、4月18日、2008（神経免疫学 15巻：p21, 2008）

15. 八子徹、田島良亮、海江田信二郎、大木伸司、三宅幸子：MR1拘束性V α 19iT細胞のコラーゲン誘導関節炎(CIA)における機能解析。第52回日本リウマチ学会、札幌、4月22日、2008(第52回日本リウマチ学会総会抄録集 p264)

16. 瀬田範行、海江田信二郎、岡田保典、三宅幸子、桑名正隆：関節炎モデルの病態形成における骨髄由来細胞の関与の検討。第52回日本リウマチ学会、札幌、4月22日、2008(第52回日本リウマチ学会総会抄録集 p382)

17. 田島良亮、八子徹、海江田信二郎、三宅幸子：MR1拘束性V α 19iT細胞の抗体誘導関節炎における機能解析。第52回日本リウマチ学会、札幌、4月21日、2008(第52回日本リウマチ学会総会抄録集 p384)

18. 三宅幸子：自己免疫疾患の治療薬、とくに多発性硬化症の新しい治療標的の検索。慶應大学薬学部大学院特別講義、東京、7月14日、2008

19. 三宅幸子：動物モデルから観るMSの病態。第6回MSワークショップ、大阪、8月2日、2008

20. 三宅幸子：動物モデルから観るMSの病態。第7回東京MS研究会、東京、9月12日、2008

21. 三宅幸子、横手裕明、宮崎雄生、Croxford J. L., 山村隆：iNKT細胞を介した腸内フローラ変化による実験的自己免疫性脳脊髄炎。第36回日本臨床免疫学会、東京、10月17日、2008（日本臨床免疫学会会誌 31巻:292, 2008）

22. 宮崎雄生、三宅幸子、山村隆：ハプテン誘導性腸炎におけるmucosao associated invariant T細胞の役割。第36回日本臨床免疫学会、東京、10月17日、2008（日本臨床免疫学会会誌 31巻:266, 2008）

23. 林幼偉、三宅幸子、山村隆：脳炎惹起性ペプチドの優位性が機能的な制御性T細胞の誘導・維持能を左右する。第38回日本免疫学会、京都、12月1日、2008（第38回日本免疫学会総会抄録集 p90）

24. 田島良亮、山村隆、宮崎雄生、市川大樹、三宅幸子、：MR1拘束性V α 19iT細胞の抗体誘導関節炎における機能解析。第38回日本免疫学会、京都、12月1日、2008(第38回日本免疫学会総会抄録集 p91)

25. 宮崎雄生、田島良亮、市川大樹、八子徹、三宅幸子、山村隆：腸管免疫制御におけるmucosao associated invariant T細胞の役割。第38回日本免疫学会、京都、12月1日、2008（第38回日本免疫学会総会抄録集 p98）

26. 三宅幸子：膠原病とMS。第5回多発性硬化症フォーラム、東京、12月13日、2008

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

自己抗原の翻訳後修飾に関する研究

研究分担者 加藤 智啓 聖マリアンナ医科大学大学院疾患プロテオーム・分子病態治療学 教授

研究要旨 混合性結合組織病(MCTD)や全身性エリテマトーデス(SLE)における代表的自己抗体である抗U1-snRNP抗体を対象とし、その主要な対応抗原である68k subunit (snRNP68k)の疾患特異的翻訳後修飾の有無について方法論を含めて検討した。末梢血単核球の核画分蛋白質を二次元電気泳動で展開後、抗U1-snRNP抗体陽性血清によるウエスタンブロットと質量分析により、snRNP68kを同定した。snRNP68kは分子量65kDa-68kDa、等電点6.0-7.5の領域に20個以上のスポット群として検出され、従来の報告より多くの修飾亜型があることが判明した。これらスポット群の分子量や等電点の違いは、N末端配列の切断、C末端配列の切断、オルタナティブスプライシングの違いに由来せず、何らかの翻訳後修飾の違いを反映していると考えられた。次に、MCTD、SLE、関節リウマチ(RA)の患者群、および、健常者群でsnRNP68kの翻訳後修飾プロファイルを比較したところ、最も等電点が高く、他の亜型に比べてリン酸化レベルが低い亜型(分子量67kDa、等電点7.5)の割合がMCTDやSLE群で有意に高かった。ここから、snRNP68kの脱リン酸化が抗RNP抗体の産生や病態形成に関与している可能性が考えられた。

A. 研究目的

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

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

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

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

B. 研究方法

MCTD患者4例、抗U1-snRNP抗体陰性のSLE患者3例、対照疾患として関節リウマチ(RA)患者4例、および健常者3例の末梢血単核球(PBMC)、あるいはヒトT細胞由来のJurkat細胞より核画分を調整し、蛋白質を抽出した。抽出した蛋白質を二次元電気泳動で展開した後に、抗U1-snRNP抗体陽性患者血清もしくはsnRNP68kのC末端18残基を認識する抗体を用いたウエスタンブロットを行った。検出されたスポット群を質量分析で解析し、snRNP68kであることを確認した。

以上の方法で検出されたsnRNP68kの各スポットの発現量を群間で比較し、疾患特異的に増加する翻訳後修飾亜型の有無を検討した。また検出されたsnRNP68kのスポット群のリン酸化レベルをリン酸化蛋白質に特異的に結合する蛍光試薬(ProQ

diamond, Invitrogen 社) を用いて解析した。

なお本研究は所属大学の生命倫理審査委員会の承認を得て行われている。

C. 研究結果

抗 U1-snRNP68k 陽性患者血清を用いた二次元ウエスタンブロット法により、PBMC、あるいは Jurkat 細胞の核画分の二次元電気泳動ゲルにおける snRNP68k のスポットを特定した。snRNP68k は等電点 6.0-7.5 の領域に 20 個以上のスポット群として検出された。これらのスポットは分子量 65kDa、67kDa、68kDa の 3 群に分けることができ、各群に 6 個以上の等電点の異なるスポットが存在した。PBMC と Jurkat 細胞の間でスポットの数、分子量と等電点に差は見られなかった。また、これらのスポットは snRNP68k の C 末端 18 残基に対する抗体を用いたウエスタンブロットによっても同様に検出された。

Jurkat 細胞核画分蛋白質を用いて検出されたスポット群を質量分析したところ、3 群ともに snRNP68k であることが確認された。検出されたトリプシン消化断片の全アミノ酸配列に対する割合(配列カバー率)は、3.4-43%であった。3 群ともに一番目の Met 残基が除去され 2 番目の Thr 残基がアセチル化された N 末端配列が検出された。また、snRNP68k の 4 つの splicing variant のうち、分子量 67kDa の 2 スポット、分子量 65kDa の 1 スポットが最も分子量の高い splicing variant 1 であることが確定した。

さらに二次元ウエスタンブロット法により、MCTD 患者 4 例、抗 RNP 抗体陰性の SLE 患者 3 例、RA 患者 3 例、および健常者 3 例の PBMC 中の snRNP68k のスポット群を検出した。各スポットの強度を計測し、全スポット強度の総和に対する比率を測定した。その結果、分子量が中間で等電点が最も高いスポット(分子量 67kDa、等電点 7.5)の割合が健常者群や RA 群に比べて、MCTD 群や SLE 群で有意に高かった($P < 0.001$)。また、ProQ diamond を用いた解析から、本疾患特異的亜型のリン酸化レベルが他の亜型に比べて低いことが示唆された。

D. 考察

二次元ウエスタンブロット法により、自己免疫疾患患者および健常者の PBMC から snRNP68k を検出し、その等電点と分子量を測定する方法を確立した。

snRNP68k は、分子量と等電点の異なる 20 個以上のスポット群として検出され、生体内で複雑な翻訳後修飾を受けていることが示唆された。snRNP68k に等電点の異なる亜型が存在することは以前から報告されており、何らかの翻訳後修飾の関与が示唆されているが (Woppman et al, 1990)、分子量の異なる亜型の存在が示唆されたのは今回が初めてである。

分子量が異なる理由としては、N 末端配列もしくは C 末端配列の切断、オルタナティブスプライシング産物、あるいはアミノ酸側鎖の修飾などの可能性が考えられる。このうち、N 末端や C 末端配列の切断の可能性は質量分析と C 末端配列を認識する抗体により否定された。また、オルタナティブスプライシングについても、分子量の小さな 67kDa、65kDa のスポットのいくつかは、最も分子量の高い Splicing Variant 1 であることが確定しており、分子量の違いをスプライシングの違いにより説明することができない。したがって、snRNP68k スポット群の分子量の違いは、糖鎖などの分子量の大きな修飾や、リン酸化など SDS-PAGE の泳動速度に影響を与える修飾の関与によるものであると考えられた。

さらに本手法により、MCTD や SLE など抗 RNP 抗体の陽性頻度の高い疾患では、分子量が中間で最も等電点が高いスポット(分子量 67kDa、等電点 7.5)の割合が高いことが明らかとなった。このスポットのリン酸化レベルは他の亜型に比べて低いことから、脱リン酸化による等電点の増加や SDS-PAGE における移動度の変化が本疾患特異的スポットの形成に関与している可能性が考えられた。

snRNP68k は、mRNA のスプライシングに関わる U1-snRNP 分子の構成要素であるが、この U1-snRNP 分子の機能に snRNP68k の C 末端領域のリン酸化が深く関与していることが指摘されている。例えば、Tazi らは snRNP68k のリン酸化部位をチオリン酸化すると U1-snRNP 分子の活性が完全に阻害されることを明らかにしている (Tazi et al, 1993)。したがって、MCTD や SLE 患者の PBMC 中で脱リン酸化された snRNP68k の割合が増加していることは、患者の PBMC 中で U1-snRNP 分子の機能障害が起こっている可能性を示唆している。

以上のことから、患者体内における snRNP68k の翻訳後修飾の異常が、抗原性の変化を引き起こして自己抗体の産生のきっかけとなる一方で、mRNA のスプライシング異常を引き起こすことで、PBMC の機能異

常による病態形成に関わっている可能性が示唆された。今後、snRNP68k の疾患特異的亜型の形成に関与している脱リン酸化部位を同定し、その抗原性や機能に与える影響を解析すること、あるいは、患者 PBMC における mRNA のスプライシング活性を調査することで、これまで不明であった U1-RNP 抗体の産生機序と病態形成機序との関係が明らかとなるかもしれない。

E. 結論

末梢血単核球 (PBMC) 中の snRNP68k の等電点および分子量を、二次元ウエスタンブロット法により測定する方法を確立した。本法により、MCTD や SLE など抗 RNP 抗体の陽性頻度が高い疾患において増加する snRNP68k の疾患特異的翻訳後修飾亜型を発見し、脱リン酸化が本亜型の形成に関与している可能性を示した。本亜型の脱リン酸化部位を同定することが抗 RNP 抗体の産生機序や病態形成機序の解明につながると期待される。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ando T, Nagai K, Chikada M, Okamoto K, Kurokawa MS, Kobayashi T, Kato T, Makuuchi H. Proteomic analyses of aortic wall in patients with abdominal aortic aneurysm. *J Cardiovasc Surg.* in press.
2. Karasawa R, Yudoh K, Ozaki S, Kato T. Anti-endothelial cell antibodies (AECA) in patients with systemic vasculitis: our research using proteomics. *Expert Opin Biol Ther.* 2011;11(1):77-87.
3. Koitabashi K, Okamoto K, Arito M, Sato T, Nagai K, Kurokawa MS, Suematsu N, Yasuda T, Kimura K, Kato T. Micro-Sieving: Isolation of Whole Glomeruli from a Single Renal Needle Biopsy Sample. *Nephron. Clinical practice.*2010;117:c225-c229.
4. Karasawa R, Kurokawa MS, Yudoh K, Masuko K, Ozaki S, Kato T. Peroxiredoxin 2 is a novel autoantigen for anti-endothelial cell antibodies in systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol.* 2010;161(3):495-470.
5. Ooka S, Nakano H, Matsuda T, Okamoto K, Suematsu N, Kurokawa MS, Ohtani-Kaneko R, Masuko K, Ozaki

S, Kato T. Proteomic surveillance of autoantigens in patients with Behcet's disease by a proteomic approach. *Microbiol Immunol.*2010;54(6):354-361.

6. Fukasawa M, Okamoto K, Nakamura M, Mikami K, Shimada S, Tanaka Y, Nagai K, Arito M, Kurokawa MS, Masuko K, Suematsu N, Koizuka I, Kato T. Proteomic analysis of the rat cerebellar flocculus during vestibular compensation. *J Vestib Res.*2010;19(3-4):83-94.
7. Xiang Y, Kurokawa MS, Kanke M, Takakuwa Y, Kato T. Peptidomics: identification of pathogenic and marker peptides. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*.2010;615: 259-271.
8. Masuko K, Murata M, Yudoh K, Shimizu H, Beppu M, Nakamura H, Kato T. Prostaglandin E2 regulates the expression of connective tissue growth factor(CTGF/CCN2)in human osteoarthritic chondrocytes via the EP4 receptor. *BMC Res Notes.*2010;3(5).
9. Hatsugai M, Kurokawa MS, Kouro T, Nagai K, Arito M, Masuko K, Suematsu N, Okamoto K, Ito F, Kato T. Protein profiles of peripheral blood mononuclear cells are useful for differential diagnosis of ulcerative colitis from Crohn's disease. *J Gastroenterol.*2010;45(5):488-500.
10. Kurokawa MS, Imamura Y, Noguchi Y, Hatsugai M, Tsukikawa S, Matsuda T, Suzuki N, Kato T. Intestinal Behcet's disease. *Curr Trends Immunol.* 2009; 10:P79-91.
11. Kaneshiro N, Xiang Y, Nagai K, Kurokawa MS, Okamoto K, Arito M, Masuko K, Yudoh K, Yasuda T, Suematsu N, Kimura K, Kato T. Comprehensive analysis of short peptides in sera from patients with IgA nephropathy. *Rapid Commun Mass Spectrom.*2009;23:3720-3728.
12. Iizuka N, Okamoto K, Matsushita R, Kimura M, Nagai K, Arito M, Kurokawa MS, Masuko K, Suematsu N, Hirohata S, Kato T. Identification of autoantigens specific for systemic lupus erythematosus with central nerve system involvement. *Lupus.*2009;19:717-726.
13. Yudoh K, Karasawa R, Masuko K, Kato T. Water-soluble fullerene (C60) inhibits the development of arthritis in the rat model of arthritis. *International Journal of Nanomedicine.* 2009;4:217-225.

14. Yudoh K, Karasawa R, Masuko K, Kato T. Water-soluble fullerene(C60) inhibits the osteoclast differentiation and bone destruction in arthritis. *International Journal of Nanomedicine*. 2009;4:233-239.
15. Masuko K, Murata M, Yudoh K, Kato T, Nakamura H. Anti-inflammatory effects of hyaluronan in arthritis therapy -not just for viscosity. *International Journal of General Medicine*. 2009;2:77-81.
16. Masuko K, Murata M, Suematsu N, Okamoto K, Yudoh K, Shimizu H, Beppu M, Nakamura H, Kato T. A suppressive effect of prostaglandin E2 on the expression of SERPINE1/plasminogen activator inhibitor-1 in human articular chondrocytes: An in vitro pilot study. *Rheumatology Research and Reviews*. 2009;1:9-15.
17. Katano M, Okamoto K, Arito M, Kawakami Y, Kurokawa MS, Suematsu N, Shimada S, Nakamura H, Xiang Y, Masuko K, Nishioka K, Yudoh K, Kato T. Implication of GM-CSF induced neutrophil gelatinase-associated lipocalin in pathogenesis of rheumatoid arthritis revealed by proteome analysis. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(1):R3.
18. Murata M, Yudo K, Nakamura H, Chiba J, Okamoto K, Suematsu N, Nishioka K, Beppu M, Inoue K, Kato T, Masuko K. Hypoxia upregulates the expression of angiopoietin-like-4 in human articular chondrocytes: role of angiopoietin-like-4 in the expression of matrix metalloproteinases and cartilage degradation. *J Orthop Res*. 2009;27:50-57.
19. Duc PA, Yudoh K, Masuko K, Kato T, Nishioka K, Nakamura H. Development and characteristics of pannus-like soft tissue in osteoarthritic articular surface in rat osteoarthritis model. *Clin Exp Rheumatol*. 2008;26(4):589-595.
20. Okunuki Y, Usui Y, Kezuka T, Hattori T, Masuko K, Nakamura H, Yudoh K, Goto H, Usui M, Nishioka K, Kato T, Takeuchi M. Proteomic surveillance of retinal autoantigens in endogenous uveitis: implication of esterase D and brain type creatine kinase as novel autoantigens. *Molecular Vision*. 2008;14:1094-1104.
21. Fujisawa H, Ohtani-Kaneko R, Naiki M, Okada T, Masuko K, Yudoh K, Suematsu N, Okamoto K, Nishioka K, Kato T. Involvement of Post-Translational Modification of Neuronal Plasticity-Related Proteins in Hyperalgesia Revealed by a Proteomic Analysis. *Proteomics*. 2008; 8(8):1706-1719.
2. 学会発表
<海外>
1. Yoshioka T, Kurokawa MS, Sato T, Nagai K, Arito M, Suematsu N, Okamoto K, Suzuki N, Kato T. Comprehensive Analysis of Protein Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells from patients with Behcet's Disease. HUP0 2010, 2010/09/19-2010/09/23, オーストラリア・シドニー
2. Noguchi Y, Kurokawa M, Okuse C, Nagai K, Arito M, Sato T, Suematsu N, Okamoto K, Itoh F, Kato T. Prediction of the Effect of Pegylated Interferon Alpha and Ribavirin Therapy by Serum Peptidomics in Patients with Chronic Hepatitis C. HUP0 2010, 2010/09/19-2010/09/23, オーストラリア・シドニー
3. Nagai K, Kurokawa MS, Okamoto K, Uchida T, Takakuwa Y, Ooka S, Arito M, Satoh T, Suematsu N, Kato T. Analysis of Disease-Specific Post-Translational Modifications on a U1 Small Nuclear Ribonucleoprotein 68k Subunit, a Major Antigen for Anti-RNP Autoantibodies. HUP0 2010, 2010/09/19-2010/09/23, オーストラリア・シドニー
4. Arito M, Nagai K, Takakuwa Y, Ohoka M, Kurokawa M, Okamoto K, Masuko K, Suematsu N, Kato T. Acetyl-Proteomics for the Investigation of Pathological Molecules in Rheumatoid Arthritis. HUP0 2010, 2010/09/19-2010/09/23, オーストラリア・シドニー
5. Noguchi M, Kurokawa M.S, Utagawa I, Nagai K, Arito M, Sato T, Suematsu N, Okamoto K, Yamaguchi N, Kato T. Comprehensive Analysis of Serum Peptides in Patients with Alzheimer's Disease. HUP0 2010, 2010/09/19-2010/09/23, オーストラリア・シドニー
6. Ooka Seido, Nakano H, Matsuda T, Okamoto K, Suematsu N, Kurokawa SM, Ohtani-Kaneko R, Masuko K, Ozaki S, Kato T. Long-term survival of 188 Japanese patients with adult-onset inflammatory myopathy; a retrospective study from a single institute. 14th International Congress of Immunology. 2010/8/23 神戸
7. Iizuka N, Okamoto K, Mastushita R1), Arito M, Nagai K, Kurokawa MS, Suematsu N, Masuko K, Hirohata T, Kato T. Proteomic analysis of autoantigens in SLE patients with CNS involvement American College

- of Rheumatology. 71th scientific meeting, 2009.
2009/10/17-2009/10/21, アメリカ
8. Takakuwa Y, Kurokawa MS, Ooka S, Nagai K, Arito M, Masuko K, Suematsu N, Okamoto K, Ozaki S, Kato T. Comprehensive Analyses of Serum Peptides in Microscopic Polyangiitis. American College of Rheumatology. 71th scientific meeting, 2009. 2009/10/17-2009/10/21, アメリカ
9. Hatsugai M, Kurokawa M, Kouro T, Nagai K, Arito M, Masuko K, Suematsu N, Okamoto K, Ito F, Kato T. Protein Profiles of Peripheral Blood Mononucleocytes are Useful for Discrimination of Ulcerative Colitis from Crohn's Disease. HUPO.8th Annual World Congress, Toronto 2009. 2009/9/26-2009/9/30. カナダ
10. Fukasawa M, Okamoto K, Nakamura M, Nagai K, Arito M, Kurokawa M, Masuko K, Suematsu N, Koizuka I, Kato T. Proteomics of Cerebellar Floccules during Vestibular Compensation of A Rat Vertigo Model. HUPO.8th Annual World Congress, Toronto 2009. 2009/9/26-2009/9/30. カナダ
11. Nagai K, Kaneshiro N, Xiang Y, Kurokawa M, Okamoto K, Arito M, Masuko K, Yudoh K, Yasuda T, Suematsu N, Kimura K, Kato T. Comprehensive analysis of short peptides in sera from patients with IgA nephropathy Proteomics of Cerebellar Floccules during Vestibular Compensation of A Rat Vertigo Model. HUPO.8th Annual World Congress, Toronto 2009. 2009/9/26-2009/9/30. カナダ
12. Arito M, Kurokawa M, Masuko K, Okamoto K, Nagai K, Suematsu N, Kato T. Acetyl-Proteomics for the Investigation of Pathological Molecules in Rheumatoid Arthritis. HUPO.8th Annual World Congress, Toronto 2009. 2009/9/26-2009/9/30. カナダ
13. Murata M, Yudoh K, Karasawa R, Nakamura H, Nishioka K, Kato T, Masuko K. Layilin, a novel hyaluronan receptor, is expressed in human articular chondrocytes. The 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2009/2/22-2009/2/25, ラスベガス、アメリカ
14. Masuko K, Murata M, Yudoh K, Nakamura H, Kato T. The Potential Role of Angiogenic Factors in Osteoarthritis. KONKUK International Symposium for Biomedical Science 2008 "Aging and Age-Related Diseases" 2008/11/18, 韓国
15. Kurokawa MS, Arito M, Masuko K, Suematsu N, Okamoto K, Suzuki N, Kato T. Comprehensive analysis of protein expression in peripheral blood mononucleocytes from patients with Behcet's disease. APLAR 2008, 2008/9/23-2008/9/27, 横浜
16. Kato T. Analysis of Brain Proteome in SART Rat's, a Model of Hyperalgesia. APLAR 2008, 2008/9/23-2008/9/27, 横浜
17. Kurokawa M, Matsuo K, Nakamura H, Masuko K, Okamoto K, Kato T. Arthritis-Inducible Protein, Annexin VII: High Phosphorylation In Rheumatoid Arthritis. HUPO2008. 2008/8.
18. Xiang Yang, Matsui T, Arito M, Suematsu N, Yudoh K, Kato T. Disease-Specific Serum Peptides In Patients With Systemic Sclerosis. HUPO2008. 2008/8.
- <国内>
1. 野口 陽平, 黒川 真奈絵, 奥瀬 千晃, 松本 伸行, 松永 光太郎, 永井 宏平, 有戸 光美, 佐藤 利行, 末松 直也, 岡本 一起, 伊東 文生, 加藤 智啓
Prediction of the effect of pegylated interferon alpha and ribavirin therapy by serum peptidomics in patients with chronic hepatitis C. 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会 合同大会 2010 年 12 月 7 日(火)~12 月 10 日 (金) 神戸ポートアイランド
2. 黒川 真奈絵, 吉岡 拓也, 佐藤 利行, 永井 宏平, 有戸 光美, 末松 直也, 岡本 一起, 鈴木 登, 加藤 智啓
ペーチェット病患者末梢血単核球における発現蛋白の網羅的検討
第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会 合同大会 2010 年 12 月 7 日(火)~12 月 10 日 (金) 神戸ポートアイランド
3. 岡本 一起, 三井 寛之, 末松 直也, 黒川 真奈絵, 有戸 光美, 永井 宏平, 佐藤 利行, 遊道 和雄, 加藤 智啓
グルココルチコイドレセプター・コアクティベーター (MTI-II) による抗炎症作用
第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会 合同大会。2010 年 12 月 7 日(火)~12 月 10 日 (金) 神戸ポートアイランド
4. 三井 寛之, 岡本 一起, 末松 直也, 黒川 真奈絵, 有戸 光美, 永井 宏平, 佐藤 利行, 遊道 和雄, 別府 諸兄, 加藤 智啓

新規の核内レセプター・コアクティベーター
(MTI-II) タンパク質の細胞内への導入

第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学
会大会 合同大会。2010年12月7日(火)~12月10
日(金) 神戸ポートアイランド

5. 有戸 光美, 松尾 光祐, 黒川 真奈絵, 永井 宏平,
増子 佳世, 岡本 一起, 末松 直也, 加藤 智啓
関節リウマチ関連分子アネキシン VII (Anx7)の機能
解析

第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学
会大会 合同大会 2010年12月7日(火)~12月10日
(金) 神戸ポートアイランド

6. 佐藤 利行, 有戸 光美, 永井 宏平, 黒川 真奈絵,
岡本 一起, 末松 直也, 加藤 智啓
関節リウマチ特異的に糖鎖構造変異を有する糖タン
パク質の探索

第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学
会大会 合同大会 2010年12月7日(火)~12月10日
(金) 神戸ポートアイランド

7. 永井 宏平, 黒川 真奈絵, 岡本 一起, 内田 貞輔,
高桑 由希子, 大岡 正道, 有戸 光美, 佐藤 利行,
末松 直也, 加藤 智啓

自己抗原 U1-small nuclear ribonucleoprotein 68k
subunit における疾患特異的翻訳後修飾亜型の解析
第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学
会大会 合同大会 2010年12月7日(火)~12月10日
(金) 神戸ポートアイランド

8. 小坂橋 賢一郎, 岡本 一起, 有戸 光美, 佐藤 利
行, 永井 宏平, 黒川 真奈絵, 末松 直也, 安田 隆,
木村 健二郎, 加藤 智啓

腎生検1検体から単離した糸球体抽出タンパク質の
2次元電気泳動~糸球体腎炎研究への応用~

第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学
会大会 合同大会 2010年12月7日(火)~12月10日
(金) 神戸ポートアイランド

9. 野口美和, 黒川真奈絵, 宇田川至, 永井宏平, 有
戸光美, 佐藤利行, 末松直也, 岡本一起, 山口登,
加藤智啓

アルツハイマー病に関与する血清ペプチドの探索
日本プロテオーム機構第8回大会(日本プロテオー
ム学会2010)/第7回日本臨床プロテオーム研究会,
2010/7/26-2010/7/27、舞浜 東京ベイホテル東急

10. 永井宏平, 黒川真奈絵, 岡本一起, 内田貞輔,
高桑由希子, 大岡正道, 有戸光美, 佐藤利行, 末松

直也, 加藤智啓

自己抗原蛋白質 U1-small nuclear ribonucleoprotein
68k subunit における疾患特異的翻訳後修飾の解析
日本プロテオーム機構第8回大会(日本プロテオー
ム学会2010)/第7回日本臨床プロテオーム研究会,
2010/7/26-2010/7/27、舞浜 東京ベイホテル東急

11. 高桑由希子, 黒川真奈絵, 大岡正道, 永井宏平,
有戸光美, 佐藤利行, 末松直也, 岡本一起, 永淵裕
子, 湯村和子, 山縣邦弘, 山田秀裕, 熊谷俊一, 石
津明洋, 須賀万智, 尾崎承一, 加藤智啓

顕微鏡的多発血管炎患者血清ペプチドの網羅的探索
日本プロテオーム機構第8回大会(日本プロテオー
ム学会2010)/第7回日本臨床プロテオーム研究会,
2010/7/26-2010/7/27、舞浜 東京ベイホテル東急

12. 野口陽平, 黒川真奈絵, 奥瀬千晃, 松本伸行,
松永光太郎, 永井宏平, 有戸光美, 佐藤利行, 末松
直也, 岡本一起, 伊東文生, 加藤智啓
血清ペプチドプロフェイルによる、C型慢性肝炎の
ペグインターフェロン・リハビリ併用療法の効果
予測

日本プロテオーム機構第8回大会(日本プロテオー
ム学会2010)/第7回日本臨床プロテオーム研究会,
2010/7/26-2010/7/27、舞浜 東京ベイホテル東急

13. 小坂橋賢一郎, 岡本一起, 有戸光美, 佐藤利行,
永井宏平, 黒川真奈絵, 末松直也, 安田隆, 木村健
二郎, 加藤智啓

腎生検検体からの糸球体の単離と、その抽出蛋白質
の2次元電気泳動

日本プロテオーム機構第8回大会(日本プロテオー
ム学会2010)/第7回日本臨床プロテオーム研究会,
2010/7/26-2010/7/27、舞浜 東京ベイホテル東急

14. 吉岡拓也, 黒川真奈絵, 佐藤利行, 永井宏平,
有戸光美, 末松直也, 岡本一起, 鈴木登, 加藤智啓
ベーチェット病患者末梢血単核球における発現蛋白
の網羅的検討

日本プロテオーム機構第8回大会(日本プロテオー
ム学会2010)/第7回日本臨床プロテオーム研究会,
2010/7/26-2010/7/27、舞浜 東京ベイホテル東急

15. 有戸光美, 永井宏平, 高桑由希子, 大岡正道,
黒川真奈絵, 増子佳世, 岡本一起, 末松直也, 加藤
智啓

「アセチル化」プロテオミクスによる関節リウマチ
(RA) 関連分子の探索

日本プロテオーム機構第8回大会(日本プロテオー

- ム学会 2010) / 第7回日本臨床プロテオーム研究会、2010/7/26-2010/7/27、舞浜 東京ベイホテル東急
16. 加藤智啓、永井宏平、有戸光美、佐藤利行、黒川真奈絵、末松直也、岡本一起
リウマチ性疾患における蛋白質翻訳後修飾
日本プロテオーム機構第8回大会 (日本プロテオーム学会 2010) / 第7回日本臨床プロテオーム研究会、2010/7/26-2010/7/27、舞浜 東京ベイホテル東急
17. 増子佳世、村田三奈子、遊道和雄、別府諸兄、中村 洋、加藤智啓
ヒト関節軟骨細胞における CTGF/CCN2 のプロスタグランジンによる制御
第54回日本リウマチ学会総会・学術集会 / 第19回国際リウマチ学会 2010/4/22-2010/4/25、神戸ポートピアホテル
18. 永井宏平、金城永幸、Yang Xiang、黒川真奈絵、岡本一起、有戸光美、増子佳世、遊道和雄、安田隆、末松直也、木村健二郎、加藤智啓
多変量解析 OPLS-DA を用いた IgA 腎症の血清ペプチドマーカーの検索
第82回日本生化学会大会、2009/10/21-2009/10/24、神戸国際会議場
19. 深澤雅彦、岡本一起、中村学、永井宏平、有戸光美、黒川真奈絵、増子佳世、末松直也、肥塚泉、加藤智啓
片側内耳破壊後の前庭代償におけるラット小脳片葉タンパク質のプロテオーム解析
第82回日本生化学会大会、2009/10/21-2009/10/24、神戸国際会議場
20. 岡本一起、末松直也、増子佳世、黒川真奈絵、有戸光美、永井宏平、遊道和雄、加藤智啓
新規の核内レセプター・コアクティベーター(MTI-II)の立体構造と転写促進活性
第82回日本生化学会大会、2009/10/21-2009/10/24、神戸国際会議場
21. 高桑由希子、黒川真奈絵、大岡正道、永井宏平、有戸光美、増子佳世、末松直也、岡本一起、尾崎承一、加藤智啓
顕微鏡的多発血管炎患者血清ペプチドの網羅的探索
第82回日本生化学会大会、2009/10/21-2009/10/24、神戸国際会議場
22. 初谷守朗、黒川真奈絵、紅露剛史、永井宏平、有戸光美、増子佳世、末松直也、岡本一起、伊東文生、加藤智啓
末梢血単核球のプロテオーム解析による潰瘍性大腸炎とクローン病の鑑別診断
第82回日本生化学会大会、2009/10/21-2009/10/24、神戸国際会議場
23. 有戸光美、松尾光祐、黒川真奈絵、永井宏平、岡本一起、増子佳世、末松直也、加藤智啓
関節リウマチ関連分子アネキシン A7 の機能解析
第82回日本生化学会大会、2009/10/21-2009/10/24、神戸国際会議場
24. 安藤敬、永井宏平、近田正英、岡本一起、黒川真奈絵、増子佳世、有戸光美、末松直也、小林俊也、加藤智啓、幕内晴朗
プロテオミクスによる腹部大動脈瘤形成機序の解明
第50回日本脈管学会総会、2009/10/30、ハイアットリージェンシー東京、2009
25. 加藤智啓
リウマチ性疾患におけるプロテオミクス解析
日本プロテオーム機構第7回大会、2009/7/27-2009/7/28、北里大学、2009
26. 金城永幸、小坂橋賢一郎、向 陽、永井宏平、黒川真奈絵、岡本一起、有戸光美、増子佳世、遊道和雄、安田隆、末松直也、木村健二郎、加藤智啓
血清ペプチドミクス解析による IgA 腎症の診断マーカーの探索
日本プロテオーム機構第7回大会、2009/7/27-2009/7/28、北里大学、2009
27. 深澤雅彦、岡本一起、中村学、永井宏平、有戸光美、黒川真奈絵、増子佳世、末松直也、肥塚泉、加藤智啓
めまいモデルラット前庭代償期における小脳片葉プロテオーム解析
日本プロテオーム機構第7回大会、2009/7/27-2009/7/28、北里大学、2009
28. 高桑由希子、黒川真奈絵、大岡正道、永井宏平、有戸光美、増子佳世、末松直也、岡本一起、尾崎承一、加藤智啓
顕微鏡的多発血管炎患者血清ペプチドの網羅的探索
日本プロテオーム機構第7回大会、2009/7/27-2009/7/28、北里大学、2009
29. 飯塚進子、岡本一起、有戸光美、永井宏平、黒川真奈絵、増子佳世、末松直也、廣畑俊成、加藤智啓
中枢神経ループスにおける抗神経細胞抗体の対応抗原の検出

- 日本プロテオーム機構第7回大会、
2009/7/27-2009/7/28、北里大学、2009
30. 初谷守朗、黒川真奈絵、紅露剛史、永井宏平、
有戸光美、増子佳世、末松直也、岡本一起、伊東文
生、加藤智啓
末梢血単核球のプロテオーム解析による潰瘍性大腸
炎クローン病の鑑別診断
日本プロテオーム機構第7回大会、
2009/7/27-2009/7/28、北里大学、2009
31. 有戸光美、黒川真奈絵、増子佳世、岡本一起、
永井宏平、末松直也、加藤智啓
「アセチル化」プロテオミクスによる関節リウマチ
(RA)関連分子の探索
日本プロテオーム機構第7回大会、
2009/7/27-2009/7/28、北里大学、2009
32. 岡本一起、永井宏平、有戸光美、黒川真奈絵、
増子佳世、末松直也、遊道和雄、磯橋文秀、加藤智
啓
ビタミン B6 酵素の転写を促進する核内受容体コア
クティベーター(MTI-II)のホモログタンパク質
(prothymisin) の活性
日本ビタミン学会第61回大会、2009/5/30-2009/5/31、
京都学園大学、2009
33. 中村浩士、松崎益徳、加藤智啓
拡張型心筋症の発症と進展機序に関する抗心筋抗体
の検討
第53回リウマチ学会総会・学術集会 第18回国際
リウマチシンポジウム、2009/4/23-2009/4/26、グラン
ドプリンスホテル新高輪 国際館パミール、2009
34. 川上雄起、増子佳世、遊道和雄、齋藤知行、加
藤智啓
関節軟骨細胞におけるアンギオテンシンIIレセプター
の発現
第53回リウマチ学会総会・学術集会 第18回国際
リウマチシンポジウム、2009/4/23-2009/4/26、グラン
ドプリンスホテル新高輪 国際館パミール、2009
35. 村田三奈子、遊道和雄、唐澤里江、加藤智啓、
千葉純司、別府諸兄、西岡久寿樹、井上和彦、増子
佳世
関節軟骨におけるヒアルロン酸レセプターLayilinに
ついての検討
第53回リウマチ学会総会・学術集会 第18回国際
リウマチシンポジウム、2009/4/23-2009/4/26、グラン
ドプリンスホテル新高輪 国際館パミール、2009
36. 増子佳世、村田美奈子、遊道和雄、中村洋、別
府諸兄、加藤智啓
変形性関節症における軟骨変性と血管新生
第53回リウマチ学会総会・学術集会 第18回国際
リウマチシンポジウム、2009/4/23-2009/4/26、グラン
ドプリンスホテル新高輪 国際館パミール、2009
37. 唐澤里江、遊道和雄、村田美奈子、尾崎承一、
西岡久寿樹、加藤智啓
高安動脈炎の疾患特異的マーカー
第53回リウマチ学会総会・学術集会 第18回国際
リウマチシンポジウム、2009/4/23-2009/4/26、グラン
ドプリンスホテル新高輪 国際館パミール、2009
38. 深澤雅彦、岡本一起、中村学、有戸光美、黒川
真奈絵、増子佳世、末松直也、肥塚泉、加藤智啓
片側内耳破壊後の前庭代償におけるラット小脳片葉
タンパク質のプロテオーム解析
第31回日本分子生物学会 第81回日本生化学会大
会 合同大会、2008/12/9-2009/12/12、神戸ポートア
일랜드
39. 有戸光美、松尾光祐、末松直也、増子佳世、黒
川真奈絵、岡本一起、加藤智啓
関節リウマチ関連分子アネキシン VII の機能解析
第31回日本分子生物学会 第81回日本生化学会大
会 合同大会、2008/12/9-2009/12/12、神戸ポートア
일랜드
40. 岡本一起、末松直也、増子佳世、黒川真奈絵、
有戸光美、遊道和雄、加藤智啓
細胞内導入配列を付加した核内受容体コアクティベ
ーター(MTI-II)の細胞内への取り込みと転写促進活
性
第31回日本分子生物学会 第81回日本生化学会大
会 合同大会、2008/12/9-2009/12/12、神戸ポートア
일랜드
41. 金城永幸、岡本一起、黒川真奈絵、有戸光美、
増子佳世、末松直也、木村健二郎、加藤智啓
IgA 腎症の血清と特異的に反応する扁桃タンパク質
の網羅的解析-病因抗原のプロテオーム探索-
第6回北里疾患プロテオーム研究会、2008/8/31、北
里大学相模原キャンパス
42. 飯塚進子、廣畑俊成、岡本一起、黒川真奈絵、
増子佳世、末松直也、松下礼子、加藤智啓
ループス精神病における抗神経細胞抗体の対応抗原
のプロテオーム解析
第6回北里疾患プロテオーム研究会、2008/8/31、北

里大学相模原キャンパス

43. 片野雅淑、松尾光祐、黒川真奈絵、有戸光美、増子佳世、末松直也、岡本一起、加藤智啓
関節リウマチ滑膜細胞のリン酸化プロテオーム解析
日本プロテオーム機構第6回大会 -創薬、バイオマーカー探索に向けて-2008/7/29-2008/7/30、大阪
44. 金城永幸、岡本一起、有戸光美、黒川真奈絵、増子佳世、末松直也、木村健二郎、加藤智啓
IgA腎症の扁桃を用いた病因抗原のプロテオーム探索
日本プロテオーム機構第6回大会 -創薬、バイオマーカー探索に向けて-2008/7/29-2008/7/30、大阪
45. 黒川真奈絵、有戸光美、増子佳世、末松直也、岡本一起、鈴木登、加藤智啓
ベーチェット病末梢血単核球における発現蛋白の網羅的検討
日本プロテオーム機構第6回大会 -創薬、バイオマーカー探索に向けて-2008/7/29-2008/7/30、大阪
46. 飯塚進子、広畑俊成、岡本一起、増子佳世、末松直也、黒川真奈絵、松下礼子、加藤智啓
プロテオミクスを用いた、ループス精神病における抗神経細胞抗体の認識エピトープの検出
日本プロテオーム機構第6回大会 -創薬、バイオマーカー探索に向けて-2008/7/29-2008/7/30、大阪
47. 藤澤裕樹、金子律子、内木充、岡田智之、増子佳世、遊道和雄、末松直也、岡本一起、西岡久壽樹、加藤智啓
痛覚過敏モデルラットの脳における蛋白質翻訳後修飾の変化
日本プロテオーム機構第6回大会 -創薬、バイオマーカー探索に向けて-2008/7/29-2008/7/30、大阪
48. 岡本一起、増子佳世、末松直也、遊道和雄、磯橋文秀、加藤智啓
ポリアルギニンと融合した核内受容コアクティベーター (MTI-II) の細胞内導入と活性
第60回日本ビタミン学会、2008/6/13-2008/6/14、仙台
49. 加藤智啓、増子佳世、中村洋、西岡久壽樹、遊道和雄
プロテオミクスを用いた変形性関節症関連自己抗原およびペプチドの探索
第52回日本リウマチ学会総会・学術集会、2008/4/20-2008/4/23、札幌
50. 加藤智啓、唐澤里江、遊道和雄、増子佳世、尾

崎承一

- プロテオミクス・ペプチドミクスを用いた血管炎関連自己抗体および血清ペプチドの探索
第52回日本リウマチ学会総会・学術集会、2008/4/20-2008/4/23、札幌
51. 川上雄起、松尾光祐(2)、増子佳世、稲葉裕、遊道和雄、齋藤知行、加藤智啓
プロテオミクスを用いたRA滑膜における新規シトルリン化自己抗原の解析
第52回日本リウマチ学会総会・学術集会、2008/4/20-2008/4/23、札幌
52. 増子佳世、村田三奈子、中村洋、遊道和雄、加藤智啓
関節軟骨細胞におけるプロスタグランジン(PG)E₂の作用
第52回日本リウマチ学会総会・学術集会、2008/4/20-2008/4/23、札幌

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

I. その他

本研究は、以下の医師・研究者の協力を得て行われた。永井宏平*、佐藤利行*、黒川真奈絵*、有戸光美*、岡本一起*、末松直也*、尾崎承一**、大岡正道**、高桑由希子**、遊道和雄***。(*聖マリアンナ医科大学 疾患プロテオーム・分子病態治療学、**同大学 リウマチ・膠原病・アレルギー内科学、***同大学 難治性疾患制御学)

サイトカインシグナル抑制による自己免疫疾患の治療と DNA マイクロアレイによる病態解析

研究分担者 西本 憲弘 和歌山県立医科大学医学部免疫制御学講座 教授

研究要旨 全身性エリテマトーデス（Systemic lupus erythematosus、SLE）をはじめとする免疫疾患の根本的な原因は未だ明らかではないが、病態には様々な免疫担当細胞やサイトカインの産生異常が関わっている。SLEや成人スティル病の病態形成にIL-6の過剰産生が関わることから、IL-6 阻害治療の可能性を検討した。また、SLEならびに成人スティル病と類似の病態を呈する全身型若年性特発性関節炎(systemic onset juvenile idiopathic arthritis、sJIA)において、DNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析とバイオインフォーマティクスを組み合わせて用い、病態形成に関わる免疫システムのネットワーク異常を解析した。IL-6阻害治療は成人スティル病とSLEの治療に有効である可能性が示唆された。また、DNAマイクロアレイを用いた研究から、SLEの病態に、IFNとTNFを中心としたサイトカインネットワーク異常の関与が示された。免疫以外の細胞機能としては、ミトコンドリア機能異常によるATP産生の低下とDNA修復酵素の発現低下が関与する可能性が明らかになった。一方、成人スティル病と類似の病態を示すsJIAにおいて、IL-18、IFN- γ とTNFを中心としたマクロファージ活性化に加えてSLEと類似のミトコンドリア機能の低下の存在が示唆された。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス（SLE）や成人スティル病をはじめとする多くの炎症性免疫疾患の根本的な原因は未だ明らかではない。しかし、病態形成には免疫担当細胞の機能異常や複数のサイトカインの産生異常が関わっている。サイトカインの中でもIL-6の産生異常は、これら病態の中心的な役割を果たしていることから、IL-6を標的とした分子標的治療の可能性がある。成人スティル病と類似の病態を呈する小児疾患である全身型若年性特発性関節炎（従来のスティル病、sJIA）に対し、抗IL-6受容体抗体トシリズマブは著効することが臨床試験で明らかになり、すでに、本邦で承認された。また、SLEに対する第I相臨床試験が米国で行われ有効性が示唆されている。そこで成人スティル病ならびにSLE患者に対する探索的治療研究を行うことを第1の目的とした。

一方、免疫システムは、細胞間相互作用やサイトカインネットワークにより精巧に制御されていると考えられ、免疫疾患の病態を理解するには、個々の細胞や分子の機能異常のみならず分子間の相互作用の検討が必要であると思われる。近年のDNAマイクロアレイ技術の進歩と生物学的データベースの蓄積、バイオインフォーマティクスの応用によ

り、炎症性免疫疾患の病態形成に関わる細胞機能異常を、複数の分子間ネットワークの異常として把握することが可能になった。そこで、SLEならびにsJIA患者の全血を用いて、DNAマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行い、バイオインフォーマティクス技術を利用して、細胞機能の異常、特にネットワーク異常を明らかにすることを第2の目的とした。

また、IL-6阻害治療の前後で、DNAマイクロアレイを用いて末梢血遺伝子発現量の変化を網羅的に解析し、免疫システムがどのように変化するかを検討した。

B. 研究方法

①探索的治療：大阪大学（前所属）医学部先進医療審査会の許可の下に、再発を繰り返す難治性成人スティル病患者に対するトシリズマブ治療を行った。インフォームドコンセントを得た患者にトシリズマブを原則2週間隔で点滴にて投与した。また血中のIL-6ならびにトシリズマブの濃度をモニタリングしドラッグフリー寛解の可能性を検討した。

②SLE患者の末梢血細胞から、PAX gene TM ならびにRNA Blood Kit TM (PreAnalytiX, Hombrechtikon, Switzerland)を用いて total RNA を抽出し、Amino

Allyl MessageAmp™ aRNA kit (Ambion Inc. Austin, Texas)にて増幅後標識し、ヒトの3万個の遺伝子からデザインしたオリゴDNA搭載マイクロアレイDNAチップ (Human Oligo Chip Human 30K, AceGene®あるいはAgilent Whole Human Genome4x44K®, DNA Chip Research Inc. & Hitachi Software Engineering Co., Ltd., Yokohama)にハイブリダイゼーションを行い、末梢血細胞中に発現している分子のRNA発現量を測定した。健常人との比較により、発現が有意に亢進または低下した分子を抽出し、これらの分子のもつ細胞機能をカテゴリーに分類し (Gene Ontology 解析)、異常が示唆される細胞機能を Expression Analysis Systematic Explorer (EASE) 解析により検索した。また、H22年度には、光線過敏症の病歴を有する患者を中心に、新たにSLE患者の末梢血全血における遺伝子発現を、DNAマイクロアレイを用いて解析し、光線過敏症の病歴がある患者群と無い患者群との間で、ミトコンドリアDNAにコードされる分子群とDNA修復酵素関連分子の遺伝子発現量の比較を行った。さらに、DNA修復機能カテゴリーに含まれる分子について、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いてNetwork解析を行い、病態に関わる分子間相互作用を解析した。

③SLEと同様に、sJIA患者末梢血に発現するRNA量をDNAマイクロアレイを用いて解析し、健常児に比べ有意に増加もしくは低下する分子を特定した。それらの分子についてEASE解析ならびにIPAによるネットワーク解析を行った。また、異常があると予測された機能カテゴリーに含まれる分子を用いてNetwork解析を行い、病態に関わる分子ネットワークを検索した。さらに、defense responseのカテゴリーに分子群ならびに酸化的リン酸化に関わるカテゴリーの遺伝子群に関して、トシリズマブを用いたIL-6阻害治療前後での発現量の比較を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は臨床研究倫理委員会の承認の下におこなった。すべての被験者あるいは保護義務者の文書による同意の取得のうえ行った。診療記録や採取した検体は、氏名・生年月日・住所などの個人情報情報を削除し、匿名化した。

C. 研究結果

①SLE患者の探索的治療研究は、残念ながら製薬会社の協力が得られず、新たに行うことはできなかったが、海外での第I相試験で有効性が示唆された。本邦では、我々がそれ以前に行った探索的治療例1症例のみである。

一方、成人ステイル病に関しては、我々をはじめ、複数の施設で探索的治療が行われた。我々の症例は既存の免疫抑制薬やステロイドに抵抗性で、短期間に再燃を繰り返していたが、トシリズマブにより、疾患活動性がコントロールできたばかりでなく、トシリズマブ中断後も21カ月にわたってバイオフィリア寛解を維持することができた。また、特記すべき副作用は認めず、優れた認容性が見られた。さらに、その後再燃時に、トシリズマブを再投与したところ、初回投与時と同等の効果を示した。

②SLE患者末梢血細胞における遺伝子発現プロファイルを、DNAマイクロアレイで網羅的に解析し、健常人と比べて発現が亢進あるいは低下する分子群の機能を検討したところ、immune response、apoptosis、response to radiationなどに関わる分子群に、有意に発現異常が見られることがわかった。

immune response 関連分子群では、type I interferon (IFN)によって誘導される分子群の発現増加 (IFN signature) が見られ、これらの分子の発現は疾患活動性と相関した。同時にネットワーク解析を行ったところ、INF γ 、TNF、IL-4やIL-13が同じネットワークに含まれており、これらの相互作用の存在が示唆された。INF- α とINF- γ 、TNFの相互作用をin vitroで検討したところ、INF- α とTNFは競合的に作用した。また、INF- α とINF- γ は相乗効果を示した。

SLE患者で発現が低下する分子群のうちresponse to radiationの機能に関与する分子には、ミトコンドリアDNAにコードされる分子群(ATP6、COX1、COX3、CYTB、ND1、ND2)とDNAの修復に関わる分子(ERCC2、ERCC5)が含まれていることが21年度に明らかになった。ERCC2、ERCC5はATP依存性のDNA修復酵素であり、色素性乾皮症、コケイン症候群、硫黄欠乏性毛髪発育異常症などの責任遺伝子でもある。これらの疾患を有する患者に共通する病態として、光線過敏症が見られることから、SLEの光線過敏症の病態に関与する可能性がある。そこで、22年度にはこれらの分子群と光線過敏症との関連

について検討した。新たな患者での検討でも response to DNA damage stimulus、DNA repairに関わる分子の発現が低下し、DNA修復分子のXPCと ERCC4を含む26分子が同定された。また、これらの分子でネットワーク解析したところ、TP53とATPを中心としたネットワークが描出された。ミトコンドリアDNAにコードされる遺伝子COX1とCYTBの発現低下も再確認され、ATP産生に重要なNADH dehydrogenase 5 (ND5)の発現低下も見られた。しかし、これらの分子(COX1, CYTB, ERCC4, XPC, ND5)の遺伝子発現は、光線過敏症の病歴を有する患者と病歴を有さない患者との間で、統計学的な有意差は認められなかった。

③ sJIA患者のDNAマイクロアレイを用いた解析により、健常児に比べ有意に増加もしくは低下した分子を特定した。増加した分子について機能カテゴリー解析を行ったところ defense response のカテゴリーに分子の有意な集積がみられた。さらに、このカテゴリーに含まれる分子を用いてネットワーク解析を行ったところ、IL-18/IFN- γ またはTNFを中心とするネットワークが見出された。これらのネットワークを構成し発現が亢進していた分子のほとんどは、マクロファージ活性化に関わる分子であった。一方、発現が低下した分子を用いた機能カテゴリー解析では、酸化リン酸化のカテゴリーに異常がみられ、ミトコンドリアDNAでコードされる分子が多く含まれていた。さらに、ミトコンドリアの障害時や修復時に誘導される分子SLC25、A4NRF1、OPA1の発現が増加していた。以上より、ミトコンドリアの障害が示唆された。実際に、ミトコンドリアに選択的に取り込まれるテトラメチルローダミンエステルによる解析によりミトコンドリア機能の低下が確認された。

なお、これらの異常は、IL-6阻害治療による疾患活動性の低下とともに改善した。

D. 考察

①20-22年度にトシリズマブを用いたIL-6阻害治療の探索的研究は十分に行えなかった。しかし、sJIAの治療成績から、成人スティル病に対しても有効性が示唆され、実際に我々を含めて有効であったとする複数の症例報告がなされた。SLEに関しては、米国での第I相試験で有効性が示唆されており、今

後、適応拡大が期待される。

②SLE患者末梢血におけるDNAマイクロアレイを用いた病態解析では、すでに報告されているIFNを中心としたサイトカインネットワークの異常が再確認されるとともに、INF- α とINF- γ 、TNFの相互作用が明らかになった。

また、免疫関連以外には、ERCC2、ERCC4、ERCC5といったDNA修復酵素ならびにミトコンドリアDNAにコードされたATP産生に関わる酵素の遺伝子発現が低下していた。ERCCは損傷した領域の二本鎖DNAを二本の一本鎖DNAへ開裂するATP依存性ヘリカーゼ活性を有し、これらの遺伝子の変異は色素性乾皮症(XP)、色素性乾皮症とコケイン症候群の合併症(XP/CS)、硫黄欠乏性毛髪発育異常症(TTD)を引き起こす。また、これに関連するアミノ酸置換が、ATP結合領域にあることが報告されている。これらの共通の病態として、光線過敏を呈することに加え、SLE患者においてもATP産生の低下も示唆されることから、SLEの光線過敏症にこれらの発現異常が関与する可能性がある。なお、今のところSLEにおいて遺伝子の変異の報告はない。今後、皮膚組織での発現異常の有無を含めさらなる検討が必要である。

③成人スティル病と類似の病態のsJIAにおいて、IL-18、IFN- γ ならびにTNFのマクロファージ活性化病態への関与とミトコンドリア機能の低下が示唆された。ミトコンドリア機能異常はSLE患者でも示唆されたことから、自己免疫疾患に共通の病態なのかもしれない。しかし、今のところ、関節リウマチや多関節型JIAでは認められていない。

一方、IL-6阻害治療は上記マクロファージ活性化関連分子の高発現とミトコンドリア機能の低下などの異常を改善したことから、IL-6の過剰シグナルがマクロファージの活性化に関連したサイトカインネットワークの調節ならびにミトコンドリア機能に関与すると考えられる。成人スティル病においても同様の病態が存在すると考えられ、今後IL-6阻害治療の臨床研究を行うとともにマクロファージ機能、ミトコンドリア機能について検討したい。

E. 結論

IL-6阻害治療は成人スティル病とSLEの治療に有効である可能性が示唆された。

また、DNA マイクロアレイを用いた研究から、SLE の病態に、ミトコンドリア機能異常と DNA 修復酵素の機能異常が関与する可能性がある。

成人ステイル病においても、IL-18, IFN- γ と TNF を中心としたマクロファージ活性化とミトコンドリア機能の低下が示唆された。

F. 健康危機情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishimoto N. Interleukin-6 as a therapeutic target in candidate inflammatory diseases. *Clin Pharmacol Ther* 2010; 87:483-487.

2. Sugino H, Lee HM, Nishimoto N. DNA microarray analysis of rheumatoid arthritis susceptibility genes identified by genome-wide association studies (GWAS). *Arthritis Res Ther* 12:401, 2010. Epub 2010 Mar 12

3. Lee HM, Sugino H, Nishimoto N. Cytokine networks in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:676284. Epub 2010 Apr 15

4. Ishikawa S, Mima T, Aoki C, Yoshio-Hoshino N, Adachi Y, Imagawa T, Mori M, Tomiita M, Iwata N, Murata T, Miyoshi M, Takei S, Aihara Y, Yokota S, Matsubara K, Nishimoto N. Abnormal expression of the genes involved in cytokine networks and mitochondrial function in systemic juvenile idiopathic arthritis identified by DNA microarray analysis. *Ann Rheum Dis*. 2009;68: 264-272.

5. Nakahara H, Mima T, Yoshio-Hoshino N, Matsushita M, Hashimoto J, Nishimoto N. A case report of a patient with refractory adult-onset Still's disease who was successfully treated with tocilizumab over 6 years. *Mod Rheumatol*. 2009; 19:69-72.

6. Lee HM, Mima T, Sugino H, Aoki C, Adachi Y, Yoshio-Hoshino N, Matsubara K, Nishimoto N. Interactions among type I and II interferon, tumor necrosis factor, and beta-estradiol in the regulation of immune response-related gene expressions in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2009 Jan 3;11(1):R1. [Epub ahead of print]

7. Mima T, Ishikawa S, Aoki C, Yoshio-Hoshino N,

Adachi Y, Imagawa T, Mori M, Tomiita M, Iwata N, Murata T, Miyoshi M, Takei S, Aihara Y, Yokota S, Matsubara K, Nishimoto N. Interleukin 11 and paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha expression correlates with the number of joints with active arthritis in systemic juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2009;68:286-287.

8. Nishimoto N, Kishimoto T. Humanized antihuman IL-6 receptor antibody, tocilizumab. *Handb Exp Pharmacol*. 2008;181:151-60.

9. Yokota S, Imagawa T, Mori M, Miyamae T, Aihara Y, Takei S, Iwata N, Umabayashi H, Murata T, Miyoshi M, Tomiita M, Nishimoto N, Kishimoto T. Efficacy and safety of tocilizumab in patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, withdrawal phase III trial. *Lancet*. 2008;371:998-1006.

2. 学会発表

1. 李 慧敏. 杉野英彦. 安達康雄. 青木千恵子. 西本憲弘. DNA チップによる SLE の遺伝子発現解析-光感受性遺伝子の発現異常- 第 54 回日本リウマチ学会. 神戸.2010.4.22

2. Lee H, Sugino H, Aoki C, Adachi Y, Nishimoto N. DNA microarray analysis revealed mitochondrial dysfunction and underexpressions of excision repair cross-complementing genes in peripheral blood cells from patients with systemic lupus erythematosus. *International Immunology* 2010. Kobe. 2010.8.24

3. 李 慧敏. 美馬亨. 杉野英彦. 安達康雄. 青木千恵子. 西本憲弘. DNA チップによる SLE の遺伝子発現解析-ループス腎炎に対するエンドキサン大量療法により、インターフェロンによって誘導される遺伝子発現は低下した. 第 53 回日本リウマチ学会. 東京.2009.4.24

4. Lee H, Mima T, Sugino H, Aoki C, Nishimoto N. Tumor Necrosis Factor(TNF)Emerged as A Dominant Cytokine in Peripheral Blood Immunoregulatory Network of Lupus Nephritis Patient after Treatment. *EULAR2009*. Copenhagen. 2009.6.11

5. Nishimoto N, Sugino H, Aoki C, Lee H, Matsubara K, Mima T. Gene expression profiling of S100 protein families in the peripheral blood from patients with RA,

SLE, polyJIA and sJIA-correlation between S100A4 expression and joint destruction-. EULAR2009. Copenhagen. 2009. 6.12

6. Sugino H, Aoki C, Lee H, Adachi Y, Matsubara K, Ochi T, Nishimoto N. About half of S100 cluster genes on chromosome 1q21.1 are up-regulated in patients with rheumatoid arthritis(RA),systemic lupus erythematosus (SLE), polyarticular type juvenile idiopathic. ACR/ARHP2009. Philadelphia. USA.

7. 李 慧敏. 杉野英彦. 安達康雄. 青木千恵子. 西本憲弘. Up-regulation of hemophilic cell adhesion-related molecules in peripheral blood may contribute to pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA). 第37回日本臨床免疫学会.東京.2009.11.13-15

8. 美馬亨, 石川悟, 青木千恵子, 吉雄直子, 安達康雄, 今川智之, 森雅亮, 富板美奈子, 岩田直美, 村田卓士, 三好麻里, 武井修治, 松原謙一, 横田俊平, 西本憲弘.全身型若年性特発性関節炎で低下を認めたミトコンドリア機能はトシリズマブにより回復する. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会 第 17 回国際リウマチシンポジウム ロイトン札幌札幌. 2008.4.20-23

9. Nishimoto N, Ishikawa S, Lee H, Aoki C, Mima T. Anti-IL-6 receptor antibody therapy for autoimmune diseases. ICCLE2008.京都. 2008.5. 11-13

10. Lee H, Mima T, Ishikawa S, Sugino H, Yoshio N, Aoki C, Nishimoto N. Repressive effect of tumor necrosis factor (TNF) on interferon (IFN) signatures in peripheral blood mononuclear cell (PBMC)of systemic lupus erythematosus (SLE) patients. EULAR2008. Paris. France. 2008.6.11- 14

11. Mima T, Adachi Y, Yoshio-Hoshino N, Aoki C, Ishikawa S, Imagawa T, Mori Masaaki, Tomiita M, Iwata N, Murata T, Miyoshi M, Takei S, Aihara Y, Yokota S, Matsubara K, Nishimoto N. Tocilizumab therapy suppresses the expression of genes related to the macrophage activation in systemic juvenile idiopathic arthritis(sJIA). EULAR2008. Paris, France. 2008.6.11-14

12. Lee HM, Mima T, Sugino H, Aoki C, Adachi Y, Matsubara K, Nishimoto N. Interactions among Type I and II IFN, TNF, and Beta-estradiol Involve in Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus .

APLAR2008.パシフィコ横浜. 横浜. 2008.9.23-27.

13. Mima T, Aoki C, Adachi Y, Sugino H, Lee HM, Yoshio-Hoshino N, Imagawa T, Mori M, Tomita M, Iwata N, Murata T, Miyoshi M, Takei S, Aihara Y, Yokota S, Matsubara K, Nishimoto N. Tocilizumab Therapy Improves Abnormal Mitochondrial Function in Patients with Systemic Juvenile idiopathic Arthritis (sJIA). ACR2008. San Francisco, USA. 2008.10.24-10.29

14. Yokota S, Imagawa T, Miyamae T, Mori M, Nishimoto N, Kishimoto T. Long-term Safety and Efficacy of Tocilizumab in Patients with systemic Juvenile Idiopathic Arthritis(JIA) Under the Extension and Long-term. ACR2008. San Francisco, USA .2008.10.24-10.29

15. 美馬亨.青木千恵子.李 慧敏.今川智之.森雅亮.富板美奈子.岩田直美.村田卓士.三好麻里.相原雄幸.武井修治.横田俊平.西本憲弘. Tocilizumab therapy improves the expression of genes related to IFN γ /IL-18 and TNF networks in active systemic juvenile idiopathic arthritis. 第38回日本免疫学会.京都国際会議場. 京都. 2008.12.1-3

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

B細胞を標的とした全身性エリテマトーデスの治療の開発に関する研究

研究分担者 田中 良哉 産業医科大学医学部第一内科学講座 教授

研究協力者 齋藤 和義 産業医科大学医学部第一内科学講座 准教授

山岡 邦弘 産業医科大学医学部第一内科学講座 講師

岩田 慈 産業医科大学医学部第一内科学講座 大学院

研究要旨 全身性エリテマトーデス(SLE)の発症過程には、B細胞の自己抗体産生による多臓器障害が生ずる。平成20、21年度は、SLEに対するB細胞標的治療の有効性とその作用機序を解明した。SLE患者にCD20抗体リツキシマブ 375mg/m²/週を2回投与した結果、疾患活動性スコアSLEDAIは28日後に有意に改善した。特に、中枢神経SLEを伴う13例は全例回復した。末梢血CD20⁺B細胞数、特に、CD19⁺IgD⁺CD27⁻ナイーブB細胞、IgD⁻CD27⁺メモリーB細胞は速やかに消失したが、IgD⁻CD27^{high}形質細胞は4週間残存した。また、CD19陽性細胞上のCD40とCD80の発現分子数も減少した。さらに、CD4陽性細胞上のCD69、CD40LとICOSの発現が低下した。以上、治療抵抗性SLEに対して抗CD20抗体リツキシマブ療法は早期効果を示したが、その機序として、単なるB細胞除去によるものに加えて、共刺激分子を発現するメモリーB細胞を優先的に除去してB-T細胞間相互作用を抑制した可能性も考えられた。しかし、海外に於いてSLEに対するCD20抗体の治験は悉く失敗した。そこで、平成22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を標的とした臨床応用を目指す事を目的とした。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)は代表的な膠原病で、20～30歳代の女性に好発し、本邦でも約10万人の患者数が推定される。SLEの発症過程には、B細胞の自己抗体産生による多臓器障害が生ずる。平成20年度は、SLEに対する抗CD20抗体リツキシマブによるB細胞標的治療の有効性と作用機序を解明してきた。平成21年度は、抗CD20抗体リツキシマブの短期的な作用機序を解明する事を目的として細胞表面抗原を指標にしてin vitro研究を行った。しかし、海外ではSLEに対するCD20抗体の治験は悉く失敗し、新たな治療標的が急務となった。そこで、平成22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を標的とした臨床応用を目指す事を目的とした。

B. 研究方法

ステロイドや免疫抑制剤などの既存の治療に抵抗性を示した重症SLE 20症例(BILAG カテゴリーAを1項目以上満たす)に対し、本学倫理委員会承認後に、インフォームドコンセント取得の上、原則としてCD20抗体リツキシマブ 375mg/m²/週を2回投与し、臨床症候、検査成績、画像所見などを検討した。また、末梢血リンパ球の表面抗原をフローサイトメトリーで検出した。

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BCR架橋、sCD40L、TLR9リガンドCpG-ODNによる刺激を施し、増殖、共刺激、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

(1) SLE 患者に CD20 抗体リツキシマブ 375mg/m²/週を 2 回投与した結果、疾患活動性スコア SLEDAI は 28 日後に有意に改善した。特に、中枢神経 SLE を伴う 13 例は全例回復し、意識障害、神経症、癲癇は一部の症例では 1 週間以内に回復した。

(2) リツキシマブ投与により SLE 患者の末梢血 CD20⁺ B 細胞数は全例で 2 週間以内に消失し、3 ~ 9 ヶ月間維持された。B 細胞の分化段階を検討したところ、CD19⁺IgD⁺CD27⁻ ナイーブ B 細胞、IgD⁻CD27⁺メモリーB 細胞は速やかに消失したが、IgD⁻CD27^{high} 形質細胞は 4 週間残存した。また、CD19 陽性細胞上の CD40 と CD80 は投与後速やかに発現分子数が減少し、半年後も減弱が維持された。

(3) 興味深いことに、治療 4 週後も CD4⁺CD45RO⁺メモリーT 細胞数は変化がなかったが、CD4 陽性細胞上の CD69、CD40L と ICOS の発現が低下した。

(4) 2 年後に寛解を維持した症例では、ナイーブ B 細胞は回復したが、メモリーB 細胞の消失が持続した。また、B 細胞上の CD40 と CD80 の発現量、発現 B 細胞数も低下したが、2 年間に亘って低値を維持した。寛解維持症例では、メモリーT 細胞も減少し、特に、CD4⁺T 細胞上の CD69、CD40L と ICOS の発現も低下し、2 年間低発現を維持した。

(5) 再燃例では、1 例は CD40 と CD80 を発現したメモリーB 細胞が再燃に先立ち増加したが、別の 1 例はメモリーB 細胞数に変化はないが、再燃に先立ち CD4⁺T 細胞上の ICOS の高発現を認めた。

(6) BCR 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 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。

(7) Syk 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。

(8) 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、Syk のリン酸化、NF κ B のリン酸化を強く誘導した。TLR9、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。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。

(9) SLE 患者末梢血 B 細胞では、無刺激下でも Syk のリン酸化が検出された。

D. 考察

リツキシマブの作用機序としては、メモリーB 細胞の再出現を制御してナイーブ B 細胞の再構築を生じ、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てきた(液性免疫の制御)。しかし、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 細胞を優先的に除去して B-T 細胞間相互作用を抑制し、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)可能性も考えられる。これらの結果は、SLE の病態形成において液性免疫のみならず、細胞性免疫も介在することを示唆する。また、DNA アレイでもシグナル関連分子の発現低下を認め、リンパ球の活性化の制御が示唆された。

また、SLE 再燃症例に於ける長期寛解後の IgD⁻CD27⁺メモリーB 細胞の再出現、もしくは CD4⁺T 細胞上の ICOS 高発現は、それぞれ B 細胞、T 細胞を主体とした病勢再燃が示唆され、多様な SLE 病態の一側面と考えられた。実際、リツキシマブにより dsDNA 抗体価は減少するが、その他の自己抗体や抗細菌抗体は変化せず、メモリーB 細胞や dsDNA 抗体価の増加に引き続いて寛解後に再燃する傾向があった。また、T 細胞を主体として再燃した病態では、リツキシマブの有効性は期待でき

ず、CTLA4-IgアパセプトなどによるT細胞制御の必要性が示唆された。

しかし、抗 CD20 抗体をはじめ SLE に対して生物学的製剤を用いた治験は、疾患の多様性、評価方法、PML などの有害事象の問題があり、捗々しい結果が得られていない。今後、寛解導入に伴い減弱する遺伝子に関する DNA マイクロアレイ解析とも併せて、より効率的な疾患制御の可能性を探求する。さらに、CD20 に加えて CD22 や TACI 等の B 細胞特異的表面抗原、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 (JAK3 や Syk など) の重要な治療標的に対する疾患制御を目指した細胞レベルでの研究を遂行した。

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 のリン酸化を介して TLR9 および TRAF-6 を強力に発現誘導すること、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ることが示された。また、B細胞の強力な増殖、分化誘導には BCR - Syk - TLR9 - TRAF6 - NF- κ B のシグナル伝達経路が介在す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

抗 CD20 抗体リツキシマブは、メモリーB細胞の再出現を制御してナイーブ B 細胞の再構築を生じて長期寛解導入を齎した。また、細胞内チロシンキナーゼ Syk の阻害により、活性化メモリーB細胞の選択的制御の可能性が示唆され、SLE への臨床応用が期待された。また、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. Nakano K, Yamaoka K, Hanami K, Saito K, Sasaguri Y, Yanagihara N, Tanaka S, Katsuki I, Matsushita S, Tanaka Y. Dopamine induces IL-6-dependent IL-17 production via D1-like receptor on CD4 naïve T-cells and a D1-like receptor antagonist SCH-23390 inhibits cartilage destruction in a human rheumatoid arthritis/SCID mouse chimera model. *J Immunol* (in press)
2. Oshita K, Yamaoka K, Udagawa N, Fukuyo S, Sonomoto K, Maeshima K, Kurihara R, Nakano K, Saito K, Okada Y, Chiba K, Tanaka Y. Human mesenchymal stem cells inhibit osteoclastogenesis through osteoprotegerin production. *Arthritis Rheum* (in press)
3. 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)
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- κ B p65 nuclear accumulation in human rheumatoid arthritis synovial fibroblastic E11 cells. *Rheumatology* (2010) 49, 1447-1460
5. 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* (2010) 69,

1286-1291

6. Suzuki K, Saito K, Tsujimura S, Nakayamada S, Yamaoka K, Sawamukai N, Iwata S, Nawata M, Tanaka Y. A calcineurin inhibitor, tacrolimus overcomes treatment-unresponsiveness mediated by P-glycoprotein on lymphocytes in refractory rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* (2010) 37, 512-520
7. 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* (2010) 62, 952-959
8. Tanikawa R, Tanikawa T, Hirashima M, Yamauchi A, Tanaka Y. Galectin-9 induces osteoblast differentiation through the CD44/Smad signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* (2010) 394, 317-322
9. Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, Tanaka Y. Etanercept overcomes P-glycoprotein-induced drug resistance in lymphocytes of patients with intractable rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* (2010) 20, 139-146
10. Ikenouchi-Sugita A, Yoshimura R, Kishi T, Umene-Nakano W, Katsuki A, Saito K, Iwata H, Tanaka Y, Nakamura J. No association between BDNF^{Val66Met} polymorphism and emergence of psychiatric symptoms in systemic lupus erythematosus. *World J Biol Psychiatry* (2010) 11, 121-128
11. 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* (2009) 48, 198-199
12. Iwata S, Saito K, Yamaoka K, Tsujimura S, Nawata M, Suzuki K, Hanami K, Tanaka Y. Effects of anti-TNF- α antibody infliximab in refractory entero-Beçet's disease. *Rheumatology* (2009) 48, 1012-1013
13. Nakano K, Higashi T, Takagi R, Hashimoto K, Tanaka Y, Matsushita S. Dopamine released by dendritic cells polarizes Th2 differentiation. *Int Immunol* (2009) 21, 645-654
14. 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* (2009) 48: 1279-82
15. 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* (2008) 67, 380-388
16. Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, Tanaka Y. Bolus infusion of human urinary trypsin inhibitor improves intractable interstitial pneumonia in patients with connective tissue diseases. *Rheumatology* (2008) 47, 907-913
17. Takeuchi T, Tatsuki T, Nogami N, Ishiguro N, Tanaka Y, Yamanaka H, Harigai M, Ryu J, Inoue K, Kondo H, Inokuma S, Kamatani N, Ochi T, Koike T: Post-marketing surveillance of the safety profile of infliximab in 5,000 Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* (2008) 67, 189-195
18. Tanikawa R, Okada Y, Nakano K, Tnikawa t, Hirashima M, Yamauchi A, Hosokawa R, Tanaka Y. Interaction of galectin-9 with lipid rafts induces osteoblast proliferation through the c-Src/ERK signaling pathway. *J Bone Miner Res* (2008) 23, 278-86
19. Mototani H, Iida A, Nakajima M, Furuichi T, Miyamoto Y, Tsunoda T, Sudo A, Kotani A, Uchida A, Ozaki K, Tanaka Y, Nakamura Y, Tanaka T, Notoya K, Ikegawa S. A functional SNP in EDG2 increases susceptibility to knee osteoarthritis in Japanese. *Hum Mol Genet* (2008) 17, 1790-1797
20. Yoda A, Toyoshima K, Onishi N, Hazaka Y, Tsukuda Y, Tsukada J, Kondo T, Tanaka Y, Minami Y. Arsenic trioxide augments chk2/p53-mediated apoptosis by inhibiting oncogene wip1 phosphatase. *J Biol Chem* (2008) 283, 18969-18979