

201024036A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

新たな診断・ 治療法開発のための 免疫学的手法の開発

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小池隆夫

平成23年3月

— 目次 —

(1)構成員名簿	1
(2)総括報告書 小池 隆夫	3
(3)分担研究報告書	11
1. 自己免疫疾患に関与するユビキチン関連分子の治療に向けた応用 畠山 鎮次	11
2. 抗リン脂質抗体症候群による向血栓細胞活性化のメカニズムに関する研究 渥美 達也	13
3. 新規糖脂質 α -carba-galactosylceramide を介した関節炎制御機構に関する研究 住田 孝之	17
4. CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞による自己抗体産生抑制能に関する研究 山本 一彦	21
5. 多発性筋炎に対する免疫抑制療法等先端的新規治療法に関する研究 上阪 等	24
6. 核内受容体を標的とした新規自己免疫疾患制御法の探索に関する研究 山村 隆	27
7. 全身性エリテマトーデス (SLE) における CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ T 細胞の異常に関する研究 桑名 正隆	29
8. 制御性 T 細胞を用いた自己免疫の抑制に関する研究 坂口 志文	34
9. 新たな免疫制御戦略の探索に関する研究 三森 経世	39
10. NOD マウス ES 細胞由来の樹状細胞 (ES-DC)による 1 型糖尿病発症の抑制に関する研究 西村 泰治	42
(4)研究成果に関する刊行物一覧	47
(5)平成 22 年度班会議プログラム・抄録	55

(1) 構成員名簿

平成22年度 構成員名簿
(H20-難治-一般-036)

区 分	氏 名	所 属	職 名
研究代表者	小池 隆夫	北海道大学大学院医学研究科内科学講座・第二内科	教 授
研究分担者	畠山 鎮次	北海道大学大学院医学研究科生化学講座	教 授
	渥美 達也	北海道大学大学院医学研究科内科学講座・第二内科	准教授
	住田 孝之	筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻臨床免疫学	教 授
	山本 一彦	東京大学大学院医学系研究科内科学専攻アレルギー・リウマチ学	教 授
	上阪 等	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科膠原病・リウマチ内科学	准教授
	山村 隆	国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部	部 長
	桑名 正隆	慶應義塾大学内科	准教授
	坂口 志文	京都大学再生医科学研究所生体機能調節学分野	教 授
	三森 経世	京都大学大学院医学研究科・臨床免疫学	教 授
	西村 泰治	熊本大学大学院生命科学研究部 免疫識別学分野	教 授
事務局	大澤 知子	北海道大学大学院医学研究科内科学講座・第二内科 〒060-8638 札幌市北区北15条西7丁目 TEL(011)706-5913 FAX(011)707-7710	
経理事務担当	小笠原 美勝	北海道大学大学院医学研究科・医学部 医学系事務部会計課 TEL(011)706-5512 FAX(011)706-7873 e-mail gaibu@med.hokudai.ac.jp	係 長

(2) 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
統括報告書

新たな診断・治療法開発のための免疫学的手法の開発

研究代表者 小池 隆夫
北海道大学大学院医学研究科内科学講座・第二内科 教授

研究要旨

難治性全身性自己免疫疾患は自己免疫現象がその発症機序といわれるが、その分子機構は未だ明らかではない。本研究では、自己免疫疾患の発症機序を分子レベルで明らかにし、その分子をマーカーにした診断法や、それをターゲットとした特異的治療法の開発を目的とした。

具体的には、1) 自己免疫の機序解明: 樹状細胞、Th17 細胞、制御性T細胞、NKT細胞等の免疫担当細胞の機能と自己免疫における意義(千住、山村、坂口、山本、住田、桑名)、2) 自己免疫疾患成立の機序解明: 自己抗体の産生機序と自己抗体の病原性の検討(桑名、渥美、小池)、3) 治療法開発: 新規自己免疫疾患動物モデルでの疾患発症や増悪にかかわる分子の検討(上坂)、および抗原特異的 T 細胞や転写因子に關与する新規分子を用いた疾患発症制御の検討(三森、島山)を分担研究のテーマとして研究を推進した。

本研究は、基礎免疫学、臨床免疫学ならびに分子生物学の分野で世界をリードしている研究者で研究組織を構成し、難治性の全身性自己免疫疾患に対する診断法および先端的新規治療法の確立と開発を共同かつ相乗的に行った。

島山 鎮次
北海道大学大学院医学研究科生化学講座 教授
渥美 達也
北海道大学大学院医学研究科内科学講座・第二内科 准教授
住田 孝之
筑波大学大学院総合科学研究科疾患制御医学専攻臨床免疫学 教授
山本 一彦
東京大学医学部アレルギーリウマチ内科 教授
上坂 等
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科膠原病・リウマチ内科学 准教授
山村 隆
国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部部長
桑名 正隆
慶應義塾大学内科 准教授
坂口 志文
京都大学再生医科学研究科生体機能調節学 教授

三森 経世
京都大学大学院医学研究科・臨床免疫学 教授
西村 泰治
熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学 教授

A. 研究目的

難治性の免疫疾患の治療は、現在ステロイド薬や免疫抑制薬による非特異的な免疫抑制療法が中心であり、一定の効果はあるものの、様々な合併症が患者のQoLを著しく損なうことが少なくない。より選択的、特異的にかつ合併症の少ない、難治性免疫疾患の完治をめざした新規治療法の開発、さらに適切な診断ツールにより早期診断法の確立が厚生労働省の特定疾患対策として緊急の課題である。本研究班は基礎免疫学、臨床免疫学ならびに分子生物学の分野で世界をリードしている10人で研究組織を構成し、班員相互の議論と技術的交流を通じて、先端的かつオリジナリティーの高い研究成果を目指してきた。最終年度に得られた結果を報告する。

B. 研究方法

① 畠山；ユビキチン化修飾酵素 A20 は NF- κ B の強力な阻害分子として報告されているが、その作用機序に関しては不明な点が多い。本研究においては、A20 の上流の制御分子及び下流の基質分子を網羅的に同定することで、分子レベルでの NF- κ B シグナルにおける抑制機序を解明する。酵母ツーハイブリッド法や質量分析計を使った高感度プルダウン法により、A20 結合タンパク質を同定し、A20 の上流の制御分子及び下流の基質分子を網羅的に同定する。さらに A20 関連タンパク質の遺伝子改変マウスもしくはトランスジェニックマウスを作製し、疾患モデルマウスとしての検討を試みた。

② 渥美；抗リン脂質抗体症候群 (APS) は血栓傾向を主症状とする自己免疫疾患である。CD36 は陰性荷電リン脂質、酸化 LDL など様々なリガンドを認識し、動脈硬化、血栓など様々な機能を調節する。CD36 が向血栓細胞に発現していること、陰性荷電リン脂質をリガンドとしていること、血栓に関与していることより、CD36 が APS の病態における細胞表面受容体の 1 つとして関与している可能性を考え、分子生物学的検討を行った。CD36 欠損マウス、CD36 に対し中和作用を有する抗 CD36 抗体を用い、aPL 誘導 TF 発現モデルに CD36 が与える影響をリアルタイム PCR 法で調べた。

③ 住田；Th1 タイプのサイトカインを主に誘導する新規糖脂質-carba-galactosylceramide (α -c-GC) が NKT 細胞の新たな抗原として注目されてきた。コラーゲン誘導性関節炎 (CIA) においては、Th17 細胞が関節炎発症に重要であること、一方、Th1 サイトカインは Th17 細胞を抑制する事が知られている。そこで、本研究では、 α -c-GC により NKT 細胞を介した CIA 制御の可能性およびその機序を明らかにすることを目的とした。

DBA/1 マウス由来の脾細胞を *in vitro* で α -GC あるいは α -c-GC (1 μ g/ml) と 72 時間共培養して上清中の IL-17、IL-4、INF- γ を ELISA 法にて測定した。また、DBA/1 マウスを用いて CIA を誘導した。抗 INF- γ 抗体の効果、採取したリンパ節由来細胞を *in vitro* で CII とともに 72 時間培養して、上清中の INF- γ および IL-17 について ELISA 法にて解析、CII 単独免疫あるいは CII+ α -c-GC 共免疫後のリンパ節から CD4⁺T 細胞と CD11c/b⁺細胞 (APC) をクリスクロスで共培養して IL-17 産生を ELISA 法にて解析などを順次おこなった。

④ 山本；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。またヒト扁桃腺 CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の抗体産生抑制能についても検討した。MRL/lpr SLE モデルマウスに、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。

⑤ 上阪；ヒトの病態により近いマウス筋炎モデル (C-protein induced myositis; CIM) の開発に成功した。この CIM の移入実験の結果から、CIM 発症マウスより回収した CD8 陽性 T 細胞のみではレシピエントマウスに CIM を発症させることが出来ず、complete Freund's adjuvant の免疫の併用が発症の誘導に必須であった。このため、筋炎発症において自然免疫活性化因子が重要と考えている。そこで、本研究は、この新規筋炎モデルを用いて、自然免疫活性化因子としてのケモカインについて解析を行い、筋炎発症のメカニズムを明らかにすることを目的とした。多発性筋炎における筋局所自然免疫活性化因子を探るために、CIM の筋炎組織、筋線維芽細胞株 (C2C12) やマウス骨格筋より回収した satellite 細胞から *in vitro* で分化した筋線維、*in vivo* における bupivacaine により誘導された再生筋線維が産生するサイトカインやケモカインの発現を検討した。

⑥ 山村；多発性硬化症 (MS) 患者由来末梢血 T 細胞で選択的に発現が亢進する分子として新規に同定したオーファン核内受容体 NR4A2 分子が、活性化 T 細胞の IL-17 等の炎症性サイトカイン産生と、EAE に代表されるマウス自己免疫モデルの病態形成過程に関与することを明らかにしてきた。今回、病原性 T 細胞の分化における NR4A2 の機能解明と、自己免疫病態制御因子としての NR4A2 の *in vivo* 機能評価を、詳細に行った。C57BL/6J (B6)

マウスの脾臓からナイーブ T 細胞

(CD4+CD44⁻CD25⁻CD62L^{high}) を分離し、Th17 細胞分化条件下 (IL-6/TGF- β) で抗 CD3/CD28 抗体刺激した。培養開始時に NR4A2 特異的 siRNA あるいは対照 siRNA を導入し、IL-17、ROR γ t、NR4A2 などの Th17 細胞関連因子の変動を経時的に解析した。B6 マウスに MOG35-55 ペプチドを免疫することで、EAE を誘導した。市販のコラーゲンマトリックスに封入して安定化した siRNA を EAE マウスに静脈投与し、病態抑制効果を解析した。

⑦桑名; SLE では過剰な免疫反応が自己免疫病態に関わることから、Treg をはじめとした免疫制御機構の破綻が想定されている。そのため、SLE 患者を対象とした Treg の検討がこれまで行われてきたが、Treg の減少あるいは増加と相反する報告があり、一定の結論が得られていない。そこで、本研究では SLE 患者における Treg 分画を CD4⁺Foxp3⁺をマーカーとして検討し、その病態における役割を検討した。対象はアメリカリウマチ学会の分類予備基準を満たす SLE 患者 39 例と健康人 19 例。フローサイトメトリーを用いて、CD4⁺細胞中における Foxp3⁺細胞の比率 (%) と CD4⁺Foxp3⁺細胞上に発現する CXCR3、CCR4、CCR6、CXCR4 の発現量 (MFI) と陽性細胞頻度 (%) を測定した。

⑧坂口; 制御性 T 細胞の機能に最も重要な転写因子は Foxp3 である。Foxp3 を中心とした転写因子複合体の構成要素を、免疫沈降法などを用いて明らかにした。さらに、複合体を形成する分子の遺伝子座を flox 配列で挟んだノックインマウスを作成し、FoxP3 発現細胞特異的に Cre recombinase を発現するマウス等と交配することで、制御性 T 細胞特異的に遺伝子を欠損するマウスを作成する。また、ROSA26 遺伝子座に、複合体を形成する各分子の cDNA を flox 配列で挟まれた転写抑制配列とともに挿入したノックインマウスを作成し、FoxP3 発現細胞特異的に Cre recombinase を発現するマウス等と交配することで、制御性 T 細胞特異的に遺伝子を過剰発現するマウスを製作する。これらの遺伝子改変マウスを用いることで各分子の制御性 T 細胞での重要性、役割を明らかにする。

⑨三森; 抗体製剤に頼らない IL-17 産生あるいは Th17 分化を抑制する戦略の一つとして、カルパスタチンの可能性を新たに見出す。カルパイン、カルパスタチンおよびカルパスタチンの最小機能ドメインを含む cDNA をそれぞれクローニングし、レトロウイルスベクター発現系に組み込んで、

マウス T 細胞、線維芽細胞 (NIH-3T3) におけるサイトカイン産生修飾効果を解析した。同時に既存の膜透過性カルパイン阻害剤である E-64-d で同様の実験を行った。最後にコラーゲン特異的 T 細胞に、レトロウイルスベクター系を用いてカルパスタチン最小機能ドメインを含む cDNA を導入・発現させ、コラーゲン誘導関節炎 (CIA) マウスに細胞移入し、その病態修飾効果を解析した。

⑩西村; 1型糖尿病を自然発症する NOD マウスにおいても、免疫抑制性分子とその自己免疫疾患を誘導する自己抗原の遺伝子を導入した遺伝子改変マウス ES-DC (マウスの ES 細胞から *in vitro* で誘導した樹状細胞) を前投与することにより、1型糖尿病の発症を抑制することが可能かどうかについて検討した。NOD マウス由来の ES 細胞 (NOD-ES 細胞) に電気穿孔法を用いて、免疫抑制性分子である TRAIL あるいは PDL1 遺伝子を導入し、NOD-ES-TRAIL および NOD-ES-PDL1 細胞株を樹立した。次いで、NOD-ES、NOD-ES-TRAIL、および NOD-ES-PDL1 の各々の細胞株に、NOD マウスの糖尿病発症に関与する自己抗原である、GAD65 あるいは insulin 由来のペプチドをコードする遺伝子を同様の手法で導入し、NOD-ES-insulin、NOD-ES-GAD65、NOD-ES-TRAIL/insulin、NOD-ES-TRAIL/GAD65、NOD-ES-PDL1/insulin、ならびに NOD-ES-PDL1/GAD65 の6種類の細胞株を樹立した。以上の8種類の細胞株から分化誘導した遺伝子改変 ES-DC と遺伝子改変を加えない ES-DC も加えた合計9種類の ES-DC を、4週齢の雌の糖尿病未発症 NOD マウス (各6匹) に腹腔内投与を行い、その後の糖尿病発症の有無について観察した。

C. 研究結果

①島山; 細胞レベルの解析において、Ymer は NF- κ B シグナルを抑制的に機能することが判明した。さらに、全身発現型の Ymer トランスジェニックマウスを樹立し、*in vivo* での Ymer の機能解析を進めた。個体における Ymer の高発現により、LPS に対する反応は低下した。また TNF 添加によっても、NF- κ B により発現制御される多くの遺伝子の発現が抑制された。抗 Fas 抗体投与での肝臓障害モデルにおいては、Ymer 過剰発現によって、肝臓障害が亢進されることが判明した。

②瀧美; aPL が誘導する TF の遺伝子発現は野生型マウスと比較して CD36 欠損マウス腹腔マクロファージにおいて低く、健康人末梢血単核球において抗 CD36 抗体により濃度依存的に抑制された。同様の傾向は代表的な炎症性サイトカインであ

る IL-6 の遺伝子発現においても認められた。

③住田； 1) α -c-GC により NKT 細胞から IFN- γ が特異的に産生されていた。2) α -c-GC 投与マウスにおいて CIA が有意に抑制されていた。3) 抗 IFN- γ 抗体投与により α -c-GC による CIA 抑制効果が解除された。4) 抗 CII IgG 抗体、抗 CII IgG2a 抗体が有意に抑制された。5) CII 反応性 T 細胞からの IFN- γ および IL-17 産生は低下していたが、IFN- γ /IL-17 産生比は α -c-G 投与群において優位に増加していた。6) α -c-GC 免疫マウスにおいて CII 反応性 CD4+T 細胞の IFN- γ 産生増加が認められた。7) α -c-GC 投与により肝臓、脾臓、所属リンパ節由来の NKT 細胞からの IFN- γ 産生が増加した。

④山本；自己抗体産生・腎障害は、CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞を移入した MRL/lpr マウスでは抑制されなかったが、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞の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。またヒト扁桃腺 CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞も B 細胞と follicular helper T 細胞による抗体産生を有意に抑制した。

⑤上阪；CIM の筋組織、in vitro における筋線維芽細胞株および筋 satellite 細胞から分化誘導した筋線維、in vivo における再生筋線維について、4 種類のケモカインが mRNA レベルで共通して発現していることを明らかにした。また、これらのケモカインのうち3種類は satellite 細胞の in vitro 分化誘導系において、培養上清中に発現していることを蛋白質レベルで確認できた。

⑥山村；In vitro で分化させた Th17 細胞の IL-17 遺伝子転写は、刺激後 72 時間に顕著に増大し、その後持続的に推移したが、NR4A2 特異的 siRNA 処理によりほぼ完全に抑制された。一方、Th17 細胞の ROR γ t 遺伝子の転写は刺激開始後数時間以内に上昇し、NR4A2 特異的 siRNA 処理によりほとんど影響を受けなかった。IL-17 細胞の増殖に関わる IL-21 遺伝子の転写は、刺激後 24 時間に一過性に上昇し、また IL-17 細胞の安定化に関わる IL-23 受容体遺伝子の転写は、刺激後 24~48 時間に上昇したが、これらの転写活性化はいずれも NR4A2 特異的 siRNA 処理によりほぼ消失した。NR4A2 特異的 siRNA による IL-23 受容体の発現抑制は、培養系に IL-21 を添加することにより回復し、同時に培養上清中への

IL-17 産生も、対照群と同レベルまで回復した。

MOG ペプチド免疫時 siRNA を単回静脈投与したマウスでは EAE の発症が顕著に遅延したが、後期には対照群と同程度の臨床スコアを示した。CNS に浸潤した T 細胞の IL-17 産生は siRNA 投与により顕著に抑制された。NR4A2 特異的 siRNA は、発症時の単回静脈投与でも有意な病態抑制効果を示した。

⑦桑名；予想に反して、CD4+細胞中における Foxp3+細胞の比率は SLE 患者で健常人に比べて有意に増加していた。さらに、CD4+細胞中における Foxp3+細胞の比率は抗二本鎖 DNA 抗体価と正の相関を、血清総補と負の相関を示した。経時的な解析では、CD4+Foxp3+細胞の比率が疾患活動性低下に伴って減少した。

SLE 患者の CD4+Foxp3+細胞上では健常人と比較して CCR6 の発現量、陽性細胞頻度が低下していた。また、CXCR4 の発現量、陽性細胞頻度が上昇していた。SLE 患者では、ケモカイン受容体の発現量や陽性細胞頻度と臨床症状との間に関連はみられなかった。

⑧坂口；制御性 T 細胞のマスタ制御遺伝子 Foxp3 は Runx1 および CBF β からなる転写因子複合体と直接的に結合し、Foxp3 自体の発現維持や IL-4 発現抑制をはじめとする多数の遺伝子発現を調節していることが示された。さらに、免疫沈降法を用いた網羅的解析により、Foxp3 は SatB1, Bcl11b などとも合体を形成している可能性が示された。SatB1 は制御性 T 細胞で発現が低く、in vitro での SatB1 の過剰発現は制御性 T 細胞の特徴・機能を阻害する傾向にあった。さらに、in vitro での SatB1 の発現の抑制は制御性 T 細胞の特徴・機能には影響を与えなかった。

⑨三森；Naïve T 細胞からの Th1, Th2, Th17 細胞分化において、カルパインとカルパスタチン発現の経時的变化パターンは異なっており、カルパイン発現は Th1 細胞で優位、カルパスタチンの発現は Th2, Th17 の順で優位となる傾向を認めた。レトロウイルスを用いたカルパスタチンの過剰発現は Th1 および Th17 分化を抑制し、その機序として IL-2 産生への直接的な抑制および STAT3 のリン酸化抑制を認めた。以上のことは E-64-d によっても再現された。さらに線維芽細胞におけるカルパスタチンの過剰発現は、LPS, IL-17 によって誘導される IL-6 産生をブロックし、T 細胞同様 STAT3 シグナルの減弱がその一因と考えられた。ルパスタチン最小機能ドメイン発現コラーゲン特異的 T 細胞を、CIA マウスに移入したところ、関節炎抑制効果を認めた。

⑩西村; 50 週齢まで経過観察を行った結果、各々の群での糖尿病の発症は、無治療群で 17/19 匹、非遺伝子改変 ES-DC 投与群で 0/6 匹、ES-DC-TRAIL 投与群で 0/6 匹、ES-DC-TRAIL/insulin 投与群で 0/6 匹、ES-DC-TRAIL/GAD65 投与群で 1/6 匹、ES-DC-PDL1 投与群で 2/6 匹、ES-DC-PDL1/insulin 投与群で 1/6 匹、ES-DC-TRAIL/GAD65 投与群で 2/6 匹、ES-DC-insulin 投与群で 2/6 匹、および ES-DC-GAD65 投与群で 0/6 匹であった。

D. 考察と総括

畠山の検討により、A20 は NF- κ B の強力な阻害分子として報告されているが、本研究において新たな A20 結合タンパク質として Ymer を同定し、生化学的及び細胞生物学的に解析したところ Ymer は NF- κ B シグナルに抑制的に働くことが明らかとなった。渥美は遺伝学的、分子生物学的の両面から CD36 が抗リン脂質抗体症候群の病態形成に関与している可能性があり、CD36 は新たな、より病態に即した治療標的となる可能性があることを示唆した。住田は NKT 細胞から INF- γ を有意に産生させる糖脂質抗原 α -c-GC により、CIA の制御に成功した。その関節炎抑制機序は、INF- γ 依存性であり、CII 反応性 T 細胞および B 細胞をアナジーに誘導している可能性が示唆され、関節炎の新しい抗原特異的治療戦略として期待できる。山本は、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ことを見出し、その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を示した。上阪は、筋炎のマウスモデルを用いて筋再生時のケモカイン発現の解明により、多発性筋炎・皮膚筋炎の病態の理解を深めるとともに、新規治療法の開発のたがかりを得た。山村により、NR4A2 は、自己免疫応答に関連した Th17 細胞の機能に密接に関わる極めて重要な免疫応答制御因子であり、機能制御により新しい自己免疫疾患治療法を提供する有力な治療標的となりうることを示された。桑名は CD4+Foxp3+細胞が SLE の診断、疾患活動性評価に有用なバイオマーカーとなるとともに、SLE に対する新たな治療標的となる可能性があることを示した。坂口は、FoxP3, Runx-CBF β , CTLA-4 は制御性 T 細胞による免疫抑制機能に必須の分子であり、これら加えて、SatB1, Bcl11b などさまざまな分子も Foxp3 と複合体を形成していることを示した。すなわ

ち、これらの分子は、病的状態における制御性 T 細胞の機能評価方法および制御性 T 細胞を操作する医薬の有力な標的分子候補となることを意味する。三森の検討により、カルパイン阻害剤、あるいは分泌・膜透過型カルパスタチンによるカルパイン阻害療法は、関節リウマチ等の治療に有用である可能性があることが示された。西村により、何らかの遺伝子改変を行った ES-DC を投与した群は、無治療群と比較して、著明に糖尿病の発症が抑制されることが明らかとなった。さらに、遺伝子改変を行われない ES-DC の投与群においても、糖尿病発症が抑制されたことより、ES-DC 自身が免疫抑制性もしくは免疫制御性の機構を有する可能性が示唆された。すなわち、NOD-ES-DC は、免疫抑制性あるいは免疫制御性の機構を有し、NOD マウスにおける糖尿病の発症を抑制する可能性が示唆された。

「新たな診断・治療法開発のための免疫学的手法の開発」を、基礎免疫学、臨床免疫学ならびに分子生物学の分野で世界をリードしている 10 人で各分担研究をおこなった。最終年度は、昨年度以上にはばひろく多大な成果を上げることができた。

E. 研究発表

1. 研究発表

1) 国内 論文発表

瀬川 誠司、後藤 大輔、住田 孝之：可溶性 CD1d による NKT 細胞の抑制、臨床免疫・アレルギー科 53 (2) : 147-152, 2010

小森宏之、中面哲也、別府 透、馬場秀夫、西村泰治「XIII 腫瘍マーカーGPC3 (Glypican-3)」広範囲 血液・尿科学検査 免疫学的検査—その数値をどう読むか—第 7 版 日本臨牀, 68 巻(増刊号 7): 833-836, 2010.

学会発表

畠山鎮次: ユビキチンシステム関連酵素の多様性と機能、第 10 回日本蛋白質科学会年会 (セッション: ユビキチンシステムにおける酵素タンパク質の

多様な生体機能)、札幌、2010 (6/17)

瀬川 誠司、後藤 大輔、吉賀 洋平、堀越 正信、杉原 誠人、林 太智、千野 祐介、松本 功、伊藤 聡、住田 孝之: IL-2+IL-18 誘導性間質性肺炎モデルにおけるNK1.1+ γ δ T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月23日、2010

Yoshiga Y, Goto D, Segawa S, Sugihara M, Hayashi T, Chino Y, Matsumoto I, Ito S, Taniguchi M, Sumida T.: Suppression of collagen-induced arthritis by natural killer T cell activation with α -carba-GalCer, a novel synthetic glycolipid ligand、第54回日本リウマチ学会総会・学術集会(神戸)4月24日、2010

西村泰治:理想的ながん抗原を標的とするがん免疫療法の開発。第14回日本がん免疫学会総会 総会長講演、KKRホテル熊本、2010年7月22日~23日

杉原 毅彦、沖山 奈緒子、宮坂 信之、上阪 等 多発性筋炎モデルマウスを用いた新治療法の開発第54回 日本リウマチ学会総会・学術集会 神戸 平成22年4月22-25日

2) 海外 論文発表

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

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.

Segawa S, Goto D, Yoshiga Y, Sugihara M, Hayashi T, Chino Y, Matsumoto I, Ito S, Sumida T.: Inhibition of transforming growth

factor- β signaling attenuates IL-18 plus IL-2-induced interstitial lung disease in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 160:394-402,2010

Shen N, Fu Q, Deng Y, Qian X, Zhao J, Kaufman KM, Wu YL, Yu CY, Tang Y, Chen JY, Yang W, Wong M, Kawasaki A, Tsuchiya N, Sumida T, Kawaguchi Y, Howe HS, Mok MY, Bang SY, Liu FL, Chang DM, Takasaki Y, Hashimoto H, Harley JB, Guthridge JM, Grossman JM, Cantor RM, Song YW, Bae SC, Chen S, Hahn BH, Lau YL, Tsao BP.: Gender Specific Association of X-linked TLR7 with Male Systemic Lupus Erythematosus. *PNAS* 107(36):15838-15843, 2010

Iizuka M, Wakamatsu E, Tsuboi H, Nakamura Y, Hayashi T, Matsui M, Goto D, Ito S, Matsumoto I, Sumida T.: Pathogenic role of immune response to M3 muscarinic acetylcholine receptor in Sjogren's syndrome-like sialoadenitis. *J.Autoimmunity* 35(4):383-9,2010

Kochi Y, Okada Y, Suzuki A, Ikari K, Terao C, Takahashi A, Yamazaki K, Hosono N, Myouzen K, Tsunoda T, Kamatani N, Furuichi T, Ikegawa S, Ohmura K, Mimori T, Matsuda F, Iwamoto T, Momohara S, Yamanaka H, Yamada R, Kubo M, Nakamura Y, Yamamoto K. A regulatory variant in CCR6 is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Nat Genet.* 42:515-9, 2010.

Kohsaka H, Current insights in polymyositis and dermatomyositis., *Clin Exp Neuroimmunol*, 1(1):22-23, 2010

Yamaguchi Y, Takahashi H, Satoh T, Okazaki Y, Mizuki N, Takahashi K, Ikezawa Z, Kuwana M. Natural killer cells control a T helper 1 response in patients with Behçet's disease. *Arthritis Res. Ther.* 2010; 12(3): R80.

Hashimoto, M., Hirota, K., Yoshitomi, H., Maeda, S., Teradaira, S., Akizuki, S., Prieto-Martin, P., Nomura, T., Sakaguchi, N., Köhl, J., Heyman, B., Takahashi, M., Fujita, T., Mimori, T., Sakaguchi, S. Complement drives Th-17 cell differentiation

and triggers autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 207:1135-43, 2010.

Hashimoto M, Hirota K, Yoshitomi H, Maeda S, Teradaira S, Akizuki S, Prieto-Martin P, Nomura T, Sakaguchi N, Köhl J, Heyman B, Takahashi M, Fujita T, Mimori T, Sakaguchi S. Complement drives Th17 cell differentiation and triggers autoimmune arthritis. *J Exp Med* 207(6):1135-43, 2010.

Ikeda, T., Hirata, S., Fukushima, S., Matsunaga, Y., Ito, T., Uchino, M., Nishimura, Y. and Senju, S.: Dual effects of TRAIL to suppress autoimmunity: the inhibition of Th1 cells and the promotion of regulatory T cells. *J.Immunol.* 185: 5259-5267, 2010.

学会発表

Atsumi T. Antiphospholipid antibodies and thrombophilia in the antiphospholipid syndrome. The 9th International Congress on Systemic Lupus Erythematosus, Vancouver, 26 June 2010

Otomo K, Atsumi T, Fujieda Y, Kato M, Amengual O, Horita T, Yasuda S, Koike T. Antiphospholipid Score (aPL-S) : a comprehensive predictive marker of developing thrombosis in autoimmune diseases. The 74th annual meeting of the American College of Rheumatology, Atlanta, 7-11 Nov. 2010

Takahiko Sugihara, Naoko Okiyama, Naoto Watanabe, Nobuyuki Miyasaka and Hitoshi Kohsaka. Blockade of TNF α or IL-1 ameliorates ongoing C-protein induced myositis of mice. American College of Rheumatology 74th National Meeting, Atlanta, Georgia, November 6-11, 2010

Ayaka Maeda, Shinya Hirata, Naoko Okiyama, Takahiko Sugihara, Eri Yoshimoto, Nobuyuki Miyasaka and Hitoshi Kohsaka Inflammatory chemokines expressed by differentiating myofibroblasts and the muscles affected by mouse model of polymyositis. International Congress of Immunology Osaka, August 22-27, 2010

Naoko Okiyama, Takehiko Sugihara, Hiroo Yokozeiki, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka. Identification of CD8 T cell epitopes in skeletal muscle C-protein that induces experimental myositis of mice. International Congress of Immunology Osaka, August 22-27, 2010

Takahiko Sugihara, Naoko Okiyama, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka TNF α and IL-1 blockade for treatment of a murine model of polymyositis International Congress of Immunology Osaka, August 22-27, 2010

Shimon Sakaguchi: T cell signaling, regulatory T cells, and self-tolerance. 97th Annual Meeting of the American Association of Immunologist (2010. 5. 7-11. Baltimore, USA)

Shimon Sakaguchi: Regulatory T Cells in Innate and Adaptive Immunity. 2010 Keystone Symposia Innate Immunity: Mechanisms Linking with Adaptive Immunity (2010. 6.7-12. Dublin Ireland)

Shimon Sakaguchi: T cell signaling, regulatory T cells and self-tolerance 40th Annual Meeting German Society for Immunology (2010. 9.22-25. Leipzig Germany)

Nakashima R, Imura Y, Kobayashi S, Hosono Y, Yukawa N, Kawabata D, Nojima T, Ohmura K, Usui T, Fujii T, Seto M, Murakami A, Mimori T: A New ELISA System for Detecting Autoantibodies to aminoacyl-tRNA Synthetases: Usefulness in Myositis and Interstitial Pneumonia. 73rd American College of Rheumatology 2010, Atlanta, November 13-18, 2010.

T. Ikeda, S. Hirata, S. Fukushima, T. Ito, M. Uchino, S. Senju, Y. Nishimura : Effects of TRAIL to suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. **14th International Congress of Immunology**, Kobe Portopia Hotel, Kobe International Exhibition Hall, Aug,21~27, 2010.

S. Senju, M. Haruta, K. Matsumura, Y. Matsunaga, S. Fukushima, T. Ikeda, K. Takamatsu, A. Irie, Y. Nishimura : Generation of dendritic cells and macrophages from human iPS cells aiming at application to cell therapy. **14th International Congress of Immunology**, Kobe Portopia Hotel, Kobe International Exhibition Hall, Aug,21~27, 2010.

S. Fukushima, S. Senju, Y. Nishimura, H. Ihn :
Immunotherapy with genetically modified dendritic
cells derived from pluripotent stem cells against mouse
melanoma. **14th International Congress of
Immunology**, Kobe Portopia Hotel, Kobe International
Exhibition Hall, Aug,21~27, 2010

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

なし

(3) 分担研究報告書

自己免疫疾患に関与するユビキチン関連分子の治療に向けた応用

研究分担者 島山 鎮次 北海道大学大学院医学研究科生化学講座 教授

研究要旨

自己免疫疾患を含む炎症性疾患には、多くのサイトカインが関与していることが知られている。特に腫瘍壊死因子 TNF やインターロイキン-1 や LPS 受容体などの炎症誘発性サイトカインは、NF- κ B という転写因子の活性化を通じてその作用が仲介される。ユビキチン化修飾酵素 A20 は NF- κ B の強力な阻害分子として報告されているが、その作用機序に関しては不明な点が多い。本研究において、A20 結合タンパク質を同定解析することで、診断や治療に役立つ知見を得る。

A. 研究目的

NF- κ B シグナルは上流の多様な膜受容体タンパク質の活性化の結果起こるが、NF- κ B が核内に移行し転写活性化に影響をもたらす経路にはまだ分子論的には未解決な部分が多い。NF- κ B の活性化機序には特に IKK キナーゼ複合体の活性化が知られているが、その上流には特殊なユビキチン化反応が重要である。本研究申請ではこのユビキチン化に関与する酵素である A20 の上流の制御分子及び下流の基質分子を網羅的に同定することで、分子レベルでの NF- κ B シグナルにおける抑制機序を解明することを目的とする。

B. 研究方法

ヒト B 細胞株 cDNA ライブラリーより全長 A20 cDNA をクローニングする。その cDNA を bait としてヒト B 細胞株 cDNA ライブラリーから酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行う。A20 結合タンパク質と推定されたタンパク質と A20 の結合を、in vitro 及び in vivo で確認する。さらに、NF- κ B シグナルに対して作用を調べるために、A20 結合タンパク質存在下での κ B-ルシフェラーゼレポーターへの転写活性化の影響を検討する。A20 結合タンパク質の細胞増殖への影響を考察するために、足場非依存性増殖能を調べる。さらに、A20 結合タンパク質のトランスジェニックマウスを作製し、個体での機能を調べる。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」を遵守し、遺伝子改変マウス作製等に使用する実験用マウスは、使用数を必要

最小限に抑えた上で頸椎脱臼等による安楽死で犠牲化を行う。

遺伝子組み換え体の取り扱いについては、「遺伝子組み換え等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」、ならびに「北海道大学遺伝子組み換え実験等安全管理規則」を遵守し施行する。また、遺伝子組み換え体についての実験は、既に大学内に申請及び許可済みの P1 (P1A)-P2 実験室にて行う。

C. 研究結果

ヒト B 細胞株 cDNA ライブラリーより A20 cDNA をクローニングし、その cDNA を bait として酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行ったところ、現在まで機能が未知のタンパク質である Ymer が同定された。 κ B-ルシフェラーゼレポーターにおける転写活性化に対して、Ymer は A20 と共に抑制的に作用することが判明した。今回、全身性発現の Ymer トランスジェニックマウスを 2 系統樹立した。Ymer トランスジェニックマウスは、TNFR や TLR4 下流のシグナルが抑制されることが判明した。また Ymer トランスジェニックマウスを B6/1pr マウスと交配することにより、自己免疫疾患の発症が抑制されることが判明した。

D. 考察

本研究結果は、NF- κ B 経路における制御酵素(ユビキチン化修飾酵素)である A20 の制御機構を解明したものである。これらの解明は、免疫系細胞の活性化及び増殖抑制の機序に重要な知見と言える。Ymer のトランスジェニックマウスの解析により、個体レベルで Ymer の免疫細胞及び炎症関連細胞における機能が判明したが、今後は Ymer ノックアウトマウ

スを作製することが機能解析のために重要と考えられる。

E. 結論

A20 は NF- κ B の強力な阻害分子として報告されているが、本研究において新たな A20 結合タンパク質として Ymer を同定し、生化学的及び細胞生物学的に解析したところ Ymer は NF- κ B シグナルに抑制的に働くことが明らかとなった。また、Ymer トランスジェニックマウスの樹立を解析により、機能的な解析が進んだ。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

論文発表

1. Shinada, K., Tsukiyama, T., Sho, T., Okumura, F., Asaka, M. and Hatakeyama, S.: RNF43 interacts with NEDL1 and regulates p53-mediated transcription, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 404, 143-147, 2011.
2. Benirschke, R.C., Thompson, J.R., Nominé, Y., Wasielewski, E., Juranić, N., Macura, S, Hatakeyama, S., Nakayama, K.I., Botuyan, M.V. and Mer, G.: Molecular basis for the association of human E4B U-box ubiquitin ligase with E2 conjugating enzymes UbcH5c and Ubc4, *Structure*, 8, 955-965, 2010.
3. Okumura, F., Matsunaga, Y., Katayama, Y., Nakayama, K.I. and Hatakeyama, S.: TRIM8 modulates STAT3 activity through negative regulation of PIAS3, *J. Cell. Sci.*, 123, 2238-2245, 2010.
4. Okumura, F., Kameda, H., Ojima, T. and Hatakeyama, S.: Expression of recombinant sea urchin cellulase SnEG54 using mammalian cell lines, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 395, 352-355, 2010.
5. Bohgaki, M., Matsumoto, M., Atsumi, T., Kondo, T., Yasuda, S., Horita, T., Nakayama, K.I., Okumura, F., *Hatakeyama, S. and Koike, T.: Plasma gelsolin facilitates interaction between β 2 glycoprotein I and α 5 β 1 integrin. *J. Cell. Mol. Med.*, in press.
*corresponding author
6. Sasai, M., Tatematsu, M., Oshiumi, H., Funami, K., Matsumoto, M., Hatakeyama, S.

and Seya, T.: Direct binding of TRAF2 and TRAF6 to TICAM-1/TRIF adaptor participates in activation of the Toll-like receptor 3/4 pathway, *Mol. Immunol.*, 47, 1283-1291, 2010.

学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

1. 特許取得

○なし

2. 実用新案登録

○なし

3. その他

○なし

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

抗リン脂質抗体による向血栓細胞活性化のメカニズムに関する研究

研究分担者 渥美 達也 北海道大学第二内科 准教授
研究協力者 奥 健志 北海道大学第二内科 助教
研究協力者 加藤 将 北海道大学第二内科 医員
研究代表者 小池 隆夫 北海道大学第二内科 教授

研究要旨

抗リン脂質抗体症候群 (APS) において、組織因子 (TF) の向血栓細胞における発現上昇が最も重要な病態と考えられているが、細胞表面受容体については多くの報告があつて一定の見解が得られていない。CD36 はクラス B スカベンジャー受容体ファミリーに属し、動脈硬化、血栓など様々な機能を調節する。そこで本研究では CD36 が APS の病態に関与している可能性を考え、検討を行うこととした。

研究は、CD36 欠損マウス、抗 CD36 抗体を用い、抗リン脂質抗体誘導組 TF 発現モデルに CD36 が与える影響をリアルタイム PCR 法で調べた。抗リン脂質抗体誘導 TF 発現は、野生型と比べ CD36 欠損マウス腹腔マクロファージで低く、健康人末梢血単核球で抗 CD36 抗体により濃度依存的に抑制された。CD36 の機能異常が APS 発症を抑制している可能性が示唆された。

A. 研究目的

抗リン脂質抗体症候群 (antiphospholipid syndrome: APS) は抗リン脂質抗体 (antiphospholipid antibodies: aPL) が持続的に検出され、血栓症または妊娠合併症を呈する自己免疫疾患である。外因系凝固反応のイニシエーターである組織因子 (tissue factor: TF) の向血栓細胞における発現上昇が APS の病態において最も重要な因子と考えられている。しかし、これらの反応における細胞表面受容体については多くの報告があつて一定の見解が得られていない。CD36 はクラス B スカベンジャー受容体ファミリーに属する膜貫通型糖タンパクで、単球、マクロファージ、血小板、毛細血管内皮細胞に発現し、陰性荷電リン脂質、酸化 LDL など様々なリガンドを認識し、動脈硬化、血栓など様々な機能を調節する。そこで本研究では CD36 が APS の病態における細胞表面受容体の 1 つとして関与している可能性を考え、分子生物学的検討を行うこととした。

B. 研究方法

1. マウス腹腔マクロファージ刺激実験

CD36 ノックアウト (knock out: KO) および C57BL/6J 野生型 (wild type: WT) マウスより採取したマウス腹腔マクロファージ (Mouse peritoneal macrophages: MPM) を aPL で刺激し、TF の遺伝子発現解析を real-time PCR 法により行った。細胞を刺激する aPL として、抗カルジオリウピン抗体またはホ

スファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体いずれか一方が陽性の APS 患者の血清より精製した全 IgG (それぞれ Pt-aCL, Pt-aPS/PT) およびループスアンチコアグラント活性を有するマウスモノクローナルホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体 (231D) を用いた。

2. ヒト末梢血単核球刺激実験

マウス腹腔マクロファージ刺激実験と同様の検討を健康人より採取した末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells: PBMC) およびヒト CD36 に対し中和作用を有するマウスモノクローナル抗 CD36 抗体 (aCD36, FA6-152) を用いて行った。

(倫理面への配慮)

患者検体を使用した実験は当院倫理委員会の承認を得た上で行い、動物実験は北海道大学動物実験委員会の承認のもと北海道大学大学院医学研究科附属動物実験施設内にて行った。

C. 研究結果

1. マウス腹腔マクロファージ刺激実験

実験に用いた 3 種類の aPL (Pt-aCL, Pt-aPS/PT, 231D) はいずれも陰性対照と比較し MPM において有意に TF 遺伝子の発現を誘導したが、aPL が誘導した TF 遺伝子の発現は WT マウスと比較して CD36KO マウスにおいて有意に低かった。Pt-aCL,

Pt-aPS/PT, 231D による TF 遺伝子の誘導は WT マウスと比較して CD36KO マウスにおいてそれぞれ 38%, 40%, 41%抑制された(図 1)。

2. ヒト末梢血単核球刺激実験

実験に用いた 3 種類の aPL(Pt-aCL, Pt-aPS/PT, 231D)はいずれも健常人 PBMC において陰性対照と比較し有意に TF 遺伝子の発現を誘導したが、aCD36 は aPL が誘導する TF 遺伝子の発現を濃度依存的に抑制した。また、aCD36 による TF 遺伝子の抑制は aCD36 が 1 μ g/ml の濃度でプラトーに達する傾向であった。Pt-aCL, Pt-aPS/PT, 231D による TF 遺伝子の誘導は 1 μ g/ml の aCD36 によりそれぞれ 45%, 45%, 27%抑制された(図 2)。

D. 考察

本研究により、CD36 の欠損および機能低下が aPL により誘導される単球 TF 遺伝子の発現を抑制することが示された。これらの結果より、CD36 は複数存在する細胞表面受容体の 1 つとして、また他の受容体と協調して APS の病態形成に関与している可能性が考えられた。また、CD36 の発現や機能を抑制することが APS の治療選択肢の 1 つとなりうる可能性が示唆された。CD36 欠損者が易出血性を含む重篤な臨床症状を呈さないことより、CD36 を標的とした治療は高い認容性が期待できる。

E. 結論

本研究において、CD36 が抗リン脂質抗体症候群の病態形成に関与している可能性が示唆された。CD36 は新たな、より病態に即した治療標的となる可能性がある。

F. 健康危険情報

本年度は特に健康危険情報として報告すべきものはなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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.

Yamada H, Atsumi T, Amengual O, Koike T, Furuta I, Ohta K, Kobashi G. Anti-beta2 glycoprotein-I antibody increases the risk of pregnancy-induced hypertension: a case-control study. *J Reprod Immunol* 84, 95-99, 2010

Shimane K, Kochi Y, Horita T, Ikari K, Amano H, Hirakata M, Okamoto A, Yamada R, Myouzen K, Suzuki A, Kubo M, Atsumi T, Koike T, Takasaki Y, Momohara S, Yamanaka H, Nakamura Y, Yamamoto K. The association of a non-synonymous SNP in the TNFAIP3 gene with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Arthritis Rheum* 62, 574-9, 2010

Bohgaki M, Matsumoto M, Atsumi T, Kondo T, Yasuda S, Horita T, Nakayama KI, Okumura F, Hatakeyama S, Koike T. Plasma gelsolin facilitates interaction between β 2 glycoprotein I and α 5 β 1 integrin. *J Cell Mol Med* (in press)

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, 1639-45, 2010

Shimada S, Yamada H, Atsumi H, Yamada H, Sakuragi N, Minakami H. Intravenous immunoglobulin therapy for aspirin-heparinoid-resistant antiphospholipid syndrome. *Reproductive Medicine and Biology* (in press)

Atsumi T, Koike T. Antiprothrombin antibody: why do we need more assays? *Lupus* 19, 436-9, 2010

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 Hemato* 91, 776-83, 2010

Kato M, Kataoka H, Odani T, Fujieda Y, Otomo K, Oku K, Horita T, Yasuda S, Atsumi T, Tsujino I, Nishimura M, Koike T. The short-term role of corticosteroid therapy for pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue diseases: report of five cases and a literatural review. *Lupus* (in press)

Bertolaccini M, Amengual O, Atsumi T, Binder W, Laat B, Forastiero R, Kutteh W, Lambert M, Matsubayashi H, Murthy V, Petri M, Rand J, Sanmarco M, Tebo A, Pierangeli S. 'Non-criteria' aPL tests: report of a task force and preconference workshop at the 13th

International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Galveston, TX, USA, April 2010. *Lupus* 20, 191-205, 2011.

Ioannou Y, Zhang JY, Qi M, Gao L, Qi CJ, Yu DM, Lau H, Sturgess AD, Vlachoyiannopoulos PG, Moutsopoulos HM, Rahman A, Pericleous C, Atsumi T, Koike T, Heritier S, Giannakopoulos B, Krilis SA. Novel assays of thrombogenic pathogenicity for the antiphospholipid syndrome based on the detection of molecular oxidative modification of the major autoantigen beta2-glycoprotein I. *Arthritis Rheum* (in press)

2. 学会発表

Kato M, Atsumi T, Oku K, O Amengual, Fujieda Y, Otomo K, Horita T, Yasuda S, Koike T. The involvement of CD36 in the monocyte activation by antiphospholipid antibodies. American College of Rheumatology 74th Annual Scientific Meeting, Atlanta, USA, 6-11 Nov. 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

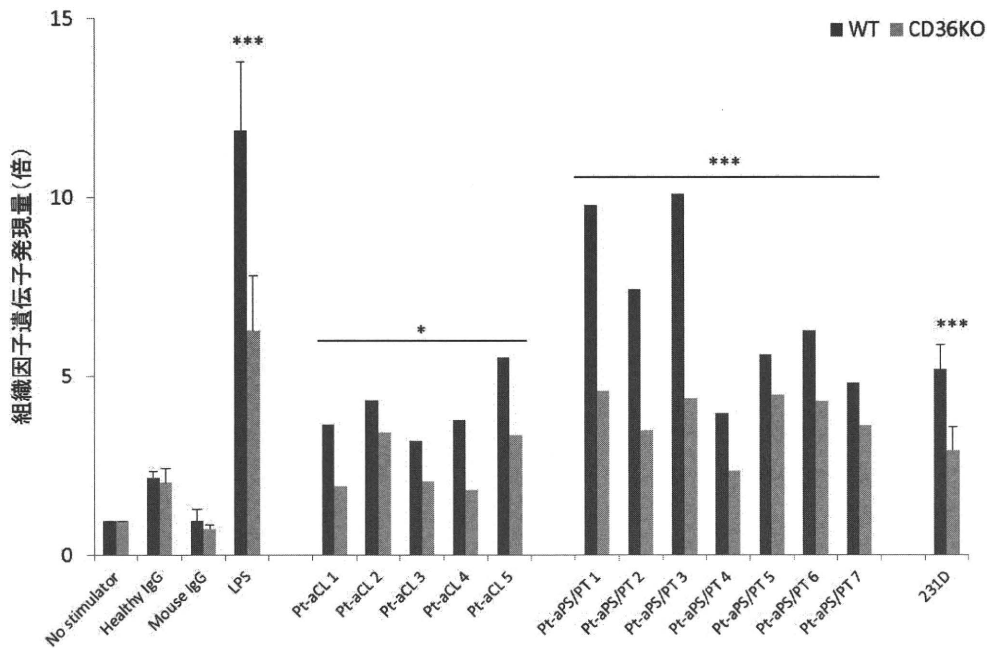


図1. マウス腹腔マクロファージにおいて抗リン脂質抗体が誘導する組織因子遺伝子発現. Y軸は $\cdot\cdot$ CT法により相対定量化した遺伝子発現レベルを示す. エラーバーは5回以上の実験により得られた標準誤差を示す. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. p値はStudentのt検定を用い野生型(WT)とCD36ノックアウト(KO)との比較により算出した.

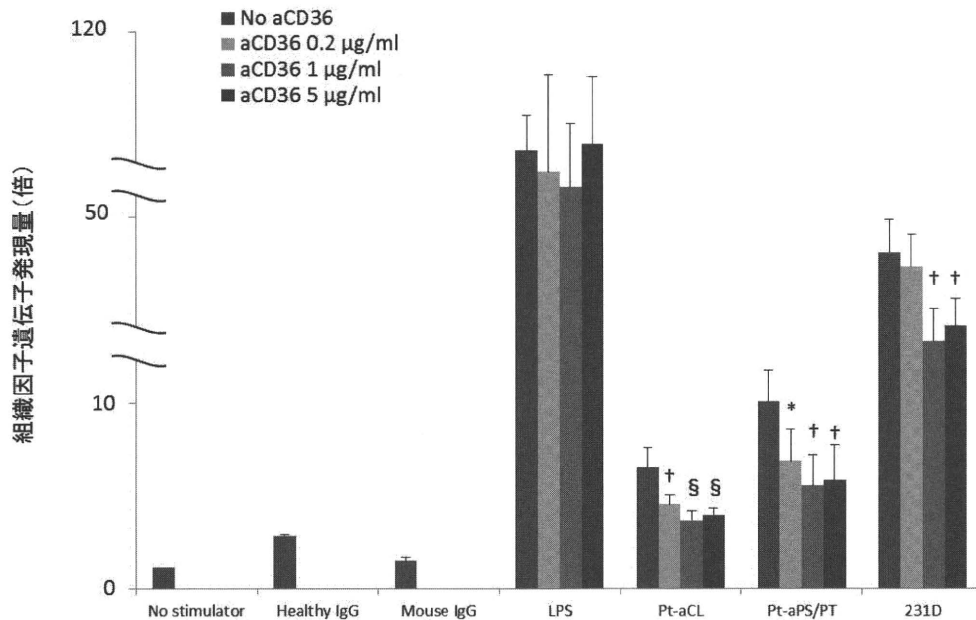


図2. ヒト末梢血単核球において抗リン脂質抗体が誘導する組織因子遺伝子発現. Pt-aCL, Pt-aPS/PTはマウス腹腔マクロファージ刺激実験で最も強くTF遺伝子発現を誘導したそれぞれ1種類を用いた. Y軸は $\cdot\cdot$ CT法により相対定量化した遺伝子発現レベルを示す. エラーバーは5回以上の実験により得られた標準誤差を示す. *: $p < 0.05$, †: $p < 0.01$, §: $p < 0.001$. p値はStudentのt検定を用い抗CD36抗体(aCD36)を加えないものとの比較により算出した.