

201024036B

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20～22年度 総合研究報告書

平成23年3月

研究代表者 小 池 隆 夫

— 目次 —

(1)構成員名簿	1
(2)総合総括報告書 小池 隆夫	3
(3)分担研究報告書	
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	15
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	18
3. NKT細胞を介した関節炎発症機構および制御機構に関する研究 住田 孝之	24
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	30
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	34
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	39
7. 全身性エリテマトーデス(SLE)におけるリンパ球の機能異常に関する研究 桑名 正隆	43
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	49
9. 新たな免疫制御戦略の探索に関する研究 三森 経世	60
10. 免疫抑制分子TRAILの機能解析ならびにTRAILを強制発現させたマウスES細胞由来 の樹状細胞を用いた免疫抑制療法の開発 西村 泰治	66
(4)研究成果に関する刊行物一覧	73

(1) 構成員名簿

平成20～22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 ※H20～21年 度研究分担者 ※H22年度研 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
	千住 覚	熊本大学大学院生命科学研究部 免疫識別学分野	准教授
	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）
総合総括研究報告書

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 細胞や転写因子に関する新規分子を用いた疾患発症制御の検討(三森、畠山)を分担研究のテーマとして研究を推進した。

膠原病や多発性硬化症を代表とする自己免疫疾患に対する免疫関連分子をターゲットにした治療は、未だ世界的なコンセンサスを得たものではなく、さらなる研究開発の必要性が提言されてきた。わが国の基礎免疫学は世界的レベルにあり多くの研究成果を輩出してき、基礎免疫学の成果と臨床免疫学を橋渡しする、いわば「応用免疫学」とよばれる分野の発達はわが国ではかならずしも十分とはいえない現状である。本研究は、基礎免疫学、臨床免疫学ならびに分子生物学の分野で世界をリードしている研究者で研究組織を構成し、難治性の全身性自己免疫疾患に対する診断法および先端的新規治療法の確立と開発を共同的かつ相乗的に行った。

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所生体機能調節学 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。3年間の研究を終えるにあたり、各分担研究者の研究結果と今後の展望を報告する

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**瀧美**；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、遺伝学的ならびに分子生物学的検討を行った。初めに、APS 患者 108 名、健康人 422 名を対象とし、CD36 欠損に関わる一塩基多型である rs3765187 (Pro90Ser) のアレル頻度を TaqMan PCR ジェノタイピング法を用いて調べた。次に、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 -c-GC あるいは α -c-GC ($1 \mu\text{g/ml}$) 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。MRI/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作成する。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畠山;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渥美； rs3765187 (Pro90Ser) のマイナーアレル頻度は健常人と比べ APS 患者で低かった (2.8% (3/108) vs. 10.2% (43/422), $p=0.024$)。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、健常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 細胞のマスター制御遺伝子 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。カルパスタチン最小機能ドメイン発現コラーゲン特異的T細胞を、CIAマウスに移入したところ、関節炎抑制効果を認めた。

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てがかりを得た。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。あらたな病態解明のツールの構築から、近未来に治療応用可能なものまで、はばひろく多大な成果を上げることができた。

E. 研究発表

1. 研究発表

1) 国内

口頭発表 484 件
原著論文による発表 96 件
それ以外(レビュー等)の発表 126 件

そのうち主なもの

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

Klemann, C., B. Raveney, S. Oki, and T. Yamamura: Retinoid signals and Th17-mediated pathology. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi. 32: 20-28, 2009

桑名正隆：解説；感染によって自己免疫疾患は誘導されるのか？ リウマチ科 41(2)：222-228, 2009.

桑名正隆：診断を的確に下すために；自己免疫疾患を示す検査異常とその対処。日本内科学会雑誌 98(10)：2446-2452, 2009

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 卷(増刊号 7)：833-836, 2010.

西村泰治、中面哲也、千住覚 新規癌胎児性抗原 Glypican-3 の肝細胞癌の診断と免疫療法への応用、特集「特異抗原をターゲットとした Immunotherapy」Jpn. J. Clin. Immunol., 31(5)：383-391, 2008.

千住覚、西村泰治 ES 細胞由来の樹状細胞による抗腫瘍免疫応答の誘導 腫瘍内科 2(2)：164-170, 2008.

沖山奈緒子、上阪等 診療科の壁を越える共通語 -IL-6 を例として-多発性筋炎・皮膚筋炎の研究の発展、日本臨床免疫学会誌 31 卷 2 号、85-92、Apr. 2008

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

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)

畠山鎮次：免疫系に關与するユビキチンシステム、第 4 回リウマチヤングアカデミー、札幌、2008 年 (7/20)

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

吉賀 洋平、後藤 大輔、瀬川 誠司、林 太智、松本 功、伊藤 聡、谷口 克、住田 孝之：新規 NKT 細胞抗原 Alpha-carba-galcer によるコラーゲン誘導性関節炎(CIA)の制御、第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会 (東京) 4 月 24 日、2009

山村 隆：免疫性神経疾患の治療戦略。日本レチノイド研究会第 20 回学術集会「AM80 の開発から臨床まで」、慈恵医大、11.21, 2009

桑名正隆：感染と自己免疫。第 52 回日本リウマチ学会総会 (札幌)。2008. 4.

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

千住覚、春田美和、松村桂子、池田徳典、松永雄亮、福島聡、入江厚、西村泰治：ヒト iPS 細胞からの樹状細胞の作製。第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、大阪国際会議場、2009 年 12 月 2 日~4 日

西村泰治：HLA と癌の免疫療法。第 18 回日本組織適合性学会 シンポジウム 2 「HLA Revisited」、名古屋国際会議場、2009 年 9 月 26 日~27 日 (発表日 9/27)

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

沖山奈緒子、杉原毅彦、横関博雄、宮坂信之、上阪 等、新たな多発性筋炎モデルにみる獲得免疫と自然免疫の協調関係、第 37 回 日本臨床免疫学会総会、東京、平成 21 年 11 月 13 日

上阪 等、沖山奈緒子、杉原毅彦、宮坂信之、新たな多発性筋炎動物モデルによる治療標的分子の探索、第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会、秋田、平成 21 年 10 月 30 日

沖山奈緒子、杉原毅彦、横関博雄、宮坂信之、上阪 等、自己免疫性筋炎発症には自己反応性 T 細胞と局所自然免疫の協調が必要である、第 53 回 日本リウマチ学会総会・学術集会、東京、平成 21 年 4 月 24 日

杉原毅彦、沖山奈緒子、渡部直人、鈴木美穂子、宮坂信之、上阪 等 新規多発性筋炎モデルマウスに対する IL-1 阻害療法の検討 東京 平成 20 年 10 月 17-18 日 第 36 回日本臨床免疫学会

2) 海外

口頭発表 123 件

原著論文による発表 183 件

それ以外(レビュー等)の発表 26 件

そのうち主なもの

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

Fukae J, Kon Y, Henmi M, Sakamoto F, Narita A, Shimizu M, Tanimura K, Matsushashi M, Kamishima T, Atsumi T, Koike T. Change of synovial vascularity in a single finger joint assessed by power Doppler sonography correlated with radiographic change in rheumatoid arthritis: Comparative study of a novel quantitative score with a semiquantitative score. *Arthritis Care &*

Research .62(5) :657-663,2010

Horita T, Atsumi T, Yoshida N, Nakagawa H, Kataoka H, Yasuda S, Koike T. STAT4 single nucleotide polymorphism, rs7574865 G/T, as a risk for antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis*.68(8):1366-1367,2009

Bohgaki T, Atsumi T, Koike T. Autoimmune disease after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Autoimmun Rev*. 7(3):198-203,2008

Nakagawa H, Yasuda S, Matsuura E, Kobayashi K, Ieko M, Kataoka H, Horita T, Atsumi T, Koike T. Nicked β 2-glycoprotein I binds angiotatin 4.5 (plasminogen kringle 1-5) and attenuates its antiangiogenic property. *Blood*. 114(12) : 2553-2559,2009
Bohgaki T, Atsumi T, Koike T. Autoimmune disease after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Autoimmun Rev*. 7(3): 198-203,2008

Bohgaki, M., Tsukiyama, T., Nakajima, A., Maruyama, S., Watanabe, M. Koike T. and Hatakeyama, S.: Involvement of Ymer in suppression of NF- κ B activation by regulated interaction with lysine-63-linked polyubiquitin chain, *BBA-Mol. Cell Res.*, 1783 (5), 826-837, 2008.

Takahata, M., Bohgaki, M., Tsukiyama, T., Kondo T., Asaka, M. and Hatakeyama, S.: Ro52 functionally interacts with IgG1 and regulates its quality control via the ERAD system, *Mol. Immunol.*, 45, 2045-2054, 2008.

Kameda, H., Watanabe, M., Bohgaki, M., Tsukiyama, T. and Hatakeyama, S.: Inhibition of NF- κ B signaling via tyrosine phosphorylation of Ymer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 378, 744-749, 2009

Sakai Y, Atsumi T, Ieko M, Amengual O, Furukawa S, Furusaki A, Bohgaki M, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Koike T. The effects of phosphatidylserine dependent antiprothrombin antibody on thrombin generation. *Arthritis Rheum* 60, 2457-67,

2009

Oku K, Atsumi T, Bohgaki M, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Koike T. Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 68; 1030-5, 2009

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.

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.* 106:13974-79, 2009.

Suzuki A, Yamada R, Kochi Y, Sawada T, Okada Y, Matsuda K, Kamatani Y, Mori M, Shimane K, Takahashi A, Tsunoda T, Miyatake A, Kubo M, Kamatani N, Nakamura Y, Yamamoto K Functional SNPs in CD244 gene increase the risk of rheumatoid arthritis in a Japanese population. *Nat Genet.* 40:1224-9, 2008.

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.

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.* 106:13974-79, 2009. Suzuki A, Yamada R, Kochi Y, Sawada T, Okada Y, Matsuda K, Kamatani Y, Mori M, Shimane K, Takahashi A, Tsunoda T, Miyatake A, Kubo M, Kamatani N, Nakamura Y, Yamamoto K Functional SNPs in CD244 gene increase the risk of rheumatoid arthritis in a Japanese population. *Nat Genet.* 40:1224-9, 2008.

Sugihara, T., N. Okiyama, M. Suzuki, K. Kohyama, Y. Matsumoto, N. Miyasaka, and H. Kohsaka. 2010. Definitive engagement of cytotoxic CD8 T cells in C protein-induced myositis, a murine model of polymyositis., *Arthritis Rheum* 62:3088-3092.

- Okiyama N, Sugihara T, Iwakura Y, Yokozeki H, Miyasaka N, Kohsaka H, Therapeutic effects of IL-6 blockade on a murine model of polymyositis that does not require IL-17A., *Arthritis Rheum*, 60(8):2505-2512, 2009
- Kohsaka H, Current insights in polymyositis and dermatomyositis., *Clin Exp Neuroimmunol*, 1(1):22-23, 2010
- 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
- Klemann, C., B.J.E. Raveney, A.K. Klemann, T. Ozawa, S. von Hörsten, K. Shudo, S. Oki and T. Yamamura: Synthetic retinoid AM80 inhibits Th17 cells and ameliorates EAE. *Am. J. Pathol.* 174(6): 2234-2245, 2009
- Doi, Y., S. Oki, T. Ozawa, H. Hohjoh, S. Miyake, and T. Yamamura: Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci U SA* 105: 8381-8386, 2008
- Asahi A, Nishimoto T, Okazaki Y, Suzuki H, Masaoka T, Kawakami Y, Ikeda Y, Kuwana M. *Helicobacter pylori* eradication shifts monocytes' Fcγ receptor balance toward inhibitory FcγRIIB in immune thrombocytopenic purpura. *J. Clin. Invest.* 2008; 118(8): 2939-2949.
- Takahashi H, Kuwana M, Amagai M. A single helper T-cell clone is sufficient to commit polyclonal naïve B cells to produce pathogenic IgG in experimental pemphigus vulgaris. *J. Immunol.* 2009; 182(3): 1740-1745.
- 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.
- Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., and Sakaguchi, S. CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science*. 322:271-275, 2008.
- Miyara, M., Shima, T., Kitoh, A., Yoshioka, Y., Niwa, A., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., Mathian, A., Nakahata, T., Yamaguchi T., Nomura, T., Wing, K., Ono, M., Amoura, Z., Gorochoy, G., and Sakaguchi, S. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4(+) T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*. 30:899-911, 2009.
- 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.
- Fujii T, Okada M, Fujita Y, Sato T, Tanaka M, Usui T, Umehara H, Mimori T: Vaccination with autoreactive CD4(+)Th1 clones in lupus-prone MRL/Mp-Fas(lpr/lpr) mice. *J Autoimmun.* 33(2):125-34, 2009.
- Ito Y, Usui T, Kobayashi S, Iguchi-Hashimoto M, Ito H, Yoshitomi H, Nakamura T, Shimizu M, Kawabata D, Yukawa N, Hashimoto M, Sakaguchi N, Sakaguchi S, Yoshifuji H, Nojima T, Ohmura K, Fujii T, Mimori T: Gamma/delta T cells are the predominant source of interleukin-17 in affected joints in collagen-induced arthritis, but not in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 60(8):2294-303, 2009.

Senju, S., Haruta, M., Matsumura, K., Matsunaga, Y., Fukushima, S., Ikeda, T., Takamatsu, K., Irie, A., and Nishimura, Y.: Generation of dendritic cells and macrophages from human induced pluripotent stem cells aiming at cell therapy *Gene Therapy* in press

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.

Senju, S., Haruta, M., Matsunaga, Y., Fukushima, S., Ikeda, T., Takahashi, K., Okita, K., Yamanaka, S., and Nishimura, Y.: Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27: 1021-1031, 2009.

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

Otomo K, Atsumi T, Fujieda Y, Kato M, Miyamoto E, Oku K, Amengual O, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Koike T. Antiphospholipid Score (aPL-S) in the Antiphospholipid Syndrome: Diagnostic Significance and Predictive Value for the Development of Thrombotic Events in Autoimmune Diseases The 73rd annual meeting of the American College of Rheumatology, Philadelphia, 18-21 Oct. 2009

Yoshiga Y, Goto D, Segawa S, Sugihara M, Hayashi T, Chino Y, Matsumoto I, Ito S, Sumida

T.: Suppression of Collagen-Induced Arthritis by Natural Killer T Cell Activation with α -Carba-GalCer, a Novel Synthetic Glycolipid Ligand. 2009 ANNUAL SCIENTIFIC MEETING on the ACR (US) October 19,2009

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 Yokozeki, 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

Okiyama N, Sugihara T, Yokozeki H, Miyasaka N, Kohsaka H, Effector CD8 T cells and local innate immunity need to act in concert for development of autoimmune myositis., *Keystone Symposia*, Banff, Alberta, April 1, 2009

Oki S, Doi Y, Ozawa T, Miyake S, Yamamura T.

Functional involvement of NR4A2 in the pathogenesis of inflammatory demyelinating disease. Keystone Symposia 'Nuclear Receptors: Orphan Brothers', Whistler, CA, 4.1, 2008

Klemann C, Oki S, Klemann AK, Ozawa T, Doi Y, Shudo K, and Yamamura T: Synthetic retinoid AM80 ameliorates EAE by attenuating TH17-mediated inflammation. 9th International Congress of Neuroimmunology, 10.29, 2008

Raveney B, Oki S, Yamamura T: Expression of the orphan nuclear receptor NR4A2 is required for IL-17 production by Th17 cells. Federation of Clinical Immunology Societies (FOCIS), San Francisco, 6.13, 2009

Raveney BJE, Oki S, and Yamamura T: Expression of the orphan nuclear receptor NR4A2 is required for IL-17 production by TH17 cells. 2nd European Congress of Immunology, Berlin, Germany, 9.15, 2009

Asahi A, Nishimoto T, Okazaki Y, Suzuki H, Masaoka T, Kawakami Y, Ikeda Y, Kuwana M. *Helicobacter pylori* eradication shifts monocytes' Fcγ receptor balance toward inhibitory FcγRIIB in immune thrombocytopenic purpura. *J. Clin. Invest.* 2008; 118(8): 2939-2949.

Takahashi H, Kuwana M, Amagai M. A single helper T-cell clone is sufficient to commit polyclonal naïve B cells to produce pathogenic IgG in experimental pemphigus vulgaris. *J. Immunol.* 2009; 182(3): 1740-1745.

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.

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.

Mimori T: Autoantibodies in Clinical Practice of Systemic Autoimmune Diseases. First Indonesia-Japan Rheumatology Forum, Bali, December 16-19, 2009.

Terao C, Ohmura K, Yamada R, Shimada K, Takasugi K, Kamatani N, Nakagome K, Lathrop M, Mimori T, Matsuda F: Identification of a novel genetic determinant of rheumatoid arthritis at chromosome 18q by a genome-wide association study (GWAS) approach using large-scale Japanese cohorts. EULAR2009, Copenhagen, June 11, 2009.

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

花岡洋成、桑名正隆：全身性エリテマトーデス(SLE)の診断・活動性評価キット 特許出願 2008-237479(出願日 2008年9月17日)出願人：学校法人 慶應義塾

佐藤慎二、桑名正隆、藤田尚志：皮膚筋炎の診断方法および診断キット 特許出願 2008-223789(出願日 2008年9月1日)出願人：学校法人 慶應義塾

[特許出願番号] 61/217, 133(米国仮出願番号)[出願日] 2009年5月26日 [発明者] 西村泰治、富田雄介、角田卓也、中村祐輔 [発明の名称] **CDC45L epitope peptides and vaccines containing the same** [出願人] オンコセラピー・サイエンス (株)

[特許出願番号] 61/265, 657 (米国仮出願番号)[出願日] 2009年12月1日 [発明者] 西村泰治、原尾美智子、富田雄介、角田卓也、中村祐輔 [発明の名称] **IMP-3 oligopeptides and vaccines including the same** [出願人] オンコセラピー・サイエンス (株)

[特許出願番号] 61/197, 106 (米国仮出願) [出願日] 2008年10月22日 [発明者] 西村泰治、今井克憲、角田卓也、中村祐輔 [発明の名称] **RAB6KIFL/KIF20A PEPTIDES** [出願人] オンコセラピー・サイエンス (株)

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 畠山 鎮次 北海道大学大学院医学研究科生化学講座 教授

研究要旨

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

(倫理面への配慮)

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

最小限に抑えた上で頸椎脱臼等による安楽死で犠牲化を行う。

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

C. 研究結果

ヒト B 細胞株 cDNA ライブラリーより A20 cDNA をクローニングし、その cDNA を bait として酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行ったところ、現在まで機能が未知のタンパク質である Ymer が同定された。Ymer は、これまでに EGF 受容体刺激下でチロシンリン酸化を受けるタンパク質として報告されているのみである。Ymer を細胞内に発現させたところ、A20 との結合が確認された。また、Ymer に対する抗体を作製し、内在性の A20 と Ymer の結合も確認された。また、Ymer はリジン 63 を介したユビキチン鎖を認識し、RIP1 の安定性に影響を及ぼすことが判明した。さらに、 κ B-ルシフェラーゼレポーターにおける転写活性化に対して、Ymer は A20 と共に抑制的に作用することが判明した。Ymer の過剰発現により、足場足場非依存性増殖能が亢進することが明らかとなった。また、全身性発現の Ymer トランスジェニックマウスを 2 系統樹立できた。Ymer トランスジェニックマウスは、TNFR や TLR4 下流のシグナルが抑制されることが判明した。また Ymer トランスジェニックマウスを B6/lpr 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.
7. Oshiumi, H., Matsumoto, M., Hatakeyama, S. and Seya, T.: Riplet/RNF135, a RING-finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon- β induction during the early phase of viral infection. *J. Biol. Chem.*, 284, 807-817, 2009.
8. Kameda, H., Watanabe, M., Bohgaki, M., Tsukiyama, T. and Hatakeyama, S.: Inhibition of NF- κ B signaling via tyrosine phosphorylation of Ymer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 378, 744-749, 2009.
9. Miyajima, N., Maruyama, S., Nonomura, K. and Hatakeyama, S.: TRIM36 interacts with the kinetochore protein CENP-H and delays cell cycle progression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 381, 383-387, 2009.
10. Matsumoto, M., Oyamada, K., Takahashi, H., Sato, T., Hatakeyama, S. and Nakayama, K.I.: Large-scale proteomic analysis of tyrosine phosphorylation induced by TCR or BCR activation reveals new signaling pathways. *Proteomics*, 9, 3549-3563, 2009.
11. Kimura, T., Sakai, M., Tabu, K., Wang, L., Tsunematsu, R., Tsuda, M., Sawa, H., Nagashima, K., Nishihara, H., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Ladanyi, M., Tanaka, S. and Nakayama, K.I.: Human synovial sarcoma proto-oncogene Syt is essential for early embryonic development through the regulation of cell migration. *Lab. Invest.*, 89, 645-656, 2009.
12. Maeda, H., Miyajima, N., Kano, S., Tsukiyama, T., Okumura, F., Fukuda, S. and Hatakeyama,