

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

SLE/ASOD の遺伝因子解析に関する研究

研究分担者 山田 亮 京都大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

全身性エリテマトーデス (SLE) の遺伝因子探索をするために 2 つの研究を進めた。1 つは臨床調査個人票によって集められた日本の SLE の臨床像を体系的に集計・解析し、疾病表現型の構造を明らかにするものであり、もうひとつは、多彩な臨床像を多次元空間座標の分布として捉え、その分布を用いて遺伝的多様性との関連を解析したり、診断・患者分類に応用するための統計学的理論構築をするものである。前者は前年度から引き続き実施し、本年度は、ほぼ終了に至った。後者は、前年度の設計に引き続き、シミュレーション・データを用いた予備解析のためのプログラム実装を実施した。

A. 研究目的

SLE の遺伝因子解析は、ゲノムワイドアソシエーションスタディ等で疾患発病遺伝子の同定が進んでいる。SLE は非常に多彩なフェノタイプからなる疾患であり、さらなる遺伝因子の解明のためには、より精細なフェノタイプ情報に立脚した遺伝因子解析が欠かせないと考えられている。本研究は、自己免疫疾患のフェノタイプ情報と遺伝因子情報とを活用した解析手法の開発を目的とする。

B. 研究方法

今年度は、昨年度に引き続き、SLE のフェノタイプの実態を把握し、そのデータハンドリング基盤を整備するため、厚生労働省が行っている臨床調査個人票を過去 10 年間にさかのぼって集計し、基本的な疫学解析、SLE 分類項目の相互関係に関する集計・検定を実施した。

また、臨床所見・検査項目と遺伝因子との多因子情報が得られたときに、その情報を総合的に解釈して疾患を持つか否かの尤度判定をするための手法として、多因子空間の分布をグラフ理論的に捕捉しグラフ上での尤度比を算出する手法を考案した。

(倫理面への配慮)

臨床調査個人票の集計にあたっては京都大学医学研究科の研究倫理委員会の審査承認を受け、承認された方法で実施した。

C. 研究結果

(1) SLE 臨床項目の集計・検定について
男女別有病率、発病年齢分布、項目別陽性率とその性別、項目陽性のクラスター、患者のクラスターをそれぞれ算出・推定した。得られた知見の主なもの以下のとおりである。有病率・罹患率は既報とほぼ同じ値

が得られた。分類基準 11 項目の陽性率は男女に差があることが認められた。また、11 項目が保有されるパターンがクラスタ解析により検出された。免疫・血清学的異常が幅広く認められるのに対し、臓器・系特異的な項目の陽性には特徴的な偏りが認められた。また、その陽性項目パターンにより、SLE 患者が亜群に分けられる可能性が示唆された。さらに、SLE 経過中の併発症・合併症が一般集団に比べ有意に高いことも大規模データにて裏付けられた。

(2) 多因子空間分布のグラフ化と尤度比算出について
SLE をはじめとする複数の因子を総合的に判断することで捉えられる疾患においては、その因子の情報を用いて、個人を多次元空間に配置した。(1)でも示すようにこれらの因子の間には強い相互関係が存在することから、個人の多次元空間配置は不均一であった。この不均一配置を最小全域木グラフとしてとらえることにより、データ次元を縮約し、また、この木状空間にフェノタイプに関する尤度分布を算出することができることを示した。

この方法を用いることにより、過去の既診断例によって木グラフとグラフ上の尤度分布を作ることができ、それを新規未診断患者に対して適用することにより、重み付き診断情報を得る可能性があることを示した。

D. 考察

貴重な資料である臨床調査個人票を用いて SLE の臨床像を把握した。その結果、多因子間の相互関係が強く、また患者が臨床像によって特徴づけられることが示された。今後も引き続き、SLE の病像の把握のためにも、疾病情報に基づく医療資源の効率的活用のためにも、情報収集を続けることが適切であると考えられる。また、その収集にあたっては、情報の使用用途に照らして正確かつ有用でありながら、収集コストの上でも適

切な仕組みへの改善が望ましいと考えられた。
このように多様度が高い疾患において、多因子を総合的に用いて下す判断を援助する方法を考案したことは、症候群的要素の強い自己免疫疾患の病像把握・診断支援の点でも有益であった。

E. 結論

本臨床調査個人票は、本来、疾患の疫学調査を目的としたものではないが、非常に有用な疫学情報が得られるものと考えられる。未解明な点が残る自己免疫疾患において適切な方法で情報を蓄積することは、その情報を用いて様々な目的に応じた判断をするために不可欠である。また、目的ごとに判断を下すためには、従来の判断基準や新発の基準などの検討とともに、新規方法の作出も重要である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawaguchi T, Sumida Y, Umemura A, et al. Genetic polymorphisms of the human PNPLA3 gene are strongly associated with severity of non-alcoholic fatty liver disease in Japanese. *PLoS One*. 2012;7(6):e38322. doi:

2012;7(6):e38322. doi:

10.1371/journal.pone.0038322.

2. Onuki R, Yamada R, Yamaguchi R, Kanehisa M, Shibuya T. Population model-based inter-diplo-type similarity measure for accurate diplo-type clustering. *J Comput Biol*. 2012;19(1):55-67. doi: 10.1089/cmb.2010.0227.

3. Terao C, Ohmura K, Ikari K, et al. ACPA-negative RA consists of two genetically distinct subsets based on RF positivity in Japanese. *PLoS One*. 2012;7(7):e40067. doi:

2012;7(7):e40067. doi:

10.1371/journal.pone.0040067.

4. Terao C, Ohmura K, Kawaguchi Y, et al. PLD4 as a novel susceptibility gene for systemic sclerosis in a Japanese population. *Arthritis Rheum*. 2012. doi: 10.1002/art.37777; 10.1002/art.37777.

5. Okada Y, Shimane K, Kochi Y, et al. A genome-wide association study identified AFF1 as a susceptibility locus for systemic lupus erythematosus in Japanese. *PLoS Genet*.

2012;8(1):e1002455. doi:

10.1371/journal.pgen.1002455.

2. 学会発表

1. Kajimoto, S. & Yamada, R. (2012) An Orthogonal Matrix, Which Is Useful to Interpret the Restriction of Marginal Counts of Multi-Way Tables. Abstracts for the XXVth International Biometric Conference, 26-31 August, 2012, Kobe, Japan. International Biometric Society

2. Narahara, M., Tamaki, K., Yamada, R. (2012) DNA-Based Identifications in Mass Fatality Incidents Based on Probabilities Conditional on an Entire Dataset. Abstracts for the XXVth International Biometric Conference, 26-31 August, 2012, Kobe, Japan. International Biometric Society

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

成人スティル病の全国疫学調査に関する研究

研究分担者 三村俊英 埼玉医科大学医学部リウマチ膠原病科 教授
研究協力者 舟久保ゆう 埼玉医科大学医学部リウマチ膠原病科 講師
研究協力者 三由文彦 埼玉医科大学医学部リウマチ膠原病科 特任研究員
研究協力者 坪井洋人 筑波大学大学院人間総合科学研究科 講師

研究要旨

今回、成人スティル病の全国疫学調査を実施した。一次調査からは全国の患者総数は 4760 症例と推定された。二次調査においては、過去の調査に比べて関節症状、咽頭痛、リンパ節腫脹、脾腫、筋肉痛などの頻度が少ない傾向にあることが示された。また、検査所見では、白血球増加、肝機能障害の頻度が低かった。治療法に関しては、副腎皮質ステロイドに加えて、抗リウマチ生物学的製剤の使用頻度が多かった。今回の二次調査では死亡患者は無く、治療法の進歩に伴い比較的予後が良好化している可能性があると考えられた。

A. 研究目的

成人スティル病は、原因不明の全身性炎症性疾患で発熱、多発関節炎、高炎症性サイトカイン血症を示し、時に生命予後不良となることもある。また、不明熱の鑑別疾患として重要である。本邦における成人スティル病の疫学調査は過去に 2 回行われている。今回、新たに全国調査を行いその特徴を確認するとともに最近の治療法についても解析することを目的とする。

B. 研究方法

全国の大学病院、500 床以上の病院および全国に約 1 万ある全ての病院から無作為に 20% を抽出して、一次調査票を郵送し、回答を得た病院に二次調査表を郵送し回答を解析した。二次調査表は、過去のものを参考にして、治療法や検査値など現状にあった形で修正を加えた。

（倫理面への配慮）

調査票は全て匿名化し、個人情報漏洩することの無いようにした。

C. 研究結果

一次調査の結果は、送付数 2586 に対して、返信数 500 で症例数は 956 例であった。対象科数を 8935 と推定した結果、平成 23 年現在の総全国症例数 = Σ (各症例数 / 各返信数 \times 対象科数) = 4760 症例と推定された。また、今回二次調査表をまとめて 168 症例の結果が集計された。男女比は、1:2.57 で女性が多かった。死亡患者はいなかった。臨床所見の集計結果の一部を表 1-3 に示す。経過中の血清フェリチン最高値と相関の見られた検査値の中では特に LDH との相関が強かった (図)。

また、治療法に関しては、経口副腎皮質ステロイド使

用が 96% に見られ、ステロイドパルス療法は 28% であった。また、生物学的製剤は延べ 31 例に使用されており、その中ではトシリズマブが 68% を占めた (表 4 & 5)。

D. 考察

今回の成人スティル病の全国疫学調査にて、168 名の成人スティル病症例の回答が得られた。初診時の症状および診断時の症状は過去の調査に比べて関節症状、咽頭痛、リンパ節腫脹、脾腫、筋肉痛の頻度が少なかった。一方、検査所見では、白血球増加、肝機能障害の頻度が低かった。これらの相違の原因は不明であるが、診断精度の向上に伴い、以前には診断されなかったような非典型的な成人スティル病が含まれているのかも知れない。治療法に関しては、副腎皮質ステロイドの使用がほとんどの症例で見られていた。生物学的製剤は延べ 18% の症例で使用されていた。特に、トシリズマブの使用症例が多かった (68%)。これは、成人スティル病の病態に IL-6 の関与が明らかであるためと想像される。

E. 結論

新たに、成人スティル病の全国疫学調査を行った。過去の調査と比較して、臨床所見などに軽度の変化が見られた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) The pattern-recognition receptor NOD1 promotes production of inflammatory mediators in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. Yokota K, Miyazaki T, Hemmatazad H, Gay RE, Kolling C, Fearon U, Suzuki H, Mimura T, Gay S, Ospelt C. *Arthritis Rheum.* 2012;64(5):1329-1337
- 2) Serum osteoprotegerin concentration is associated with carotid atherosclerotic plaque in patients with rheumatoid arthritis. Asanuma YF, Shimada Y, Kouzu N, Yokota K, Nakajima K, Sato K, Akiyama Y, Isozaki M, Mikami AS, Kobayashi H, Mimura T. *Mod Rheumatol.* 2012[Epub ahead of print]
- 3) Acute- or Subacute-Onset Lung Complications in Treating Patients with Rheumatoid Arthritis. Nakajima R, Sakai F, Mimura T, Tokuda H, Takahashi M, Kimura F. *Can Assoc Radiol J.* 2012 [Epub ahead of print]

2. 学会発表

- 1) 関節リウマチ治療におけるB型肝炎再活性化の現状とその対策—リウマチ専門医の立場から— 三村俊英. 第56回日本リウマチ学会総会・学術集会 第21回国際リウマチシンポジウム(2012年4月26日)抄録集, 2012 : P 727
- 2) 膠原病のレイノー現象に対するボセンタンの有効性 秋山雄次, 中嶋京一, 井熊大輔, 坂本真裕子, 島田祐樹, 山本晃範, 太田宗夫, 進藤靖史, 吉田佳弘, 横田和浩, 荒木靖人, 梶山浩, 秋葉春彦, 佐藤浩二郎, 舟久保ゆう, 三村俊英. 第56回日本リウマチ学会総会・学術集会 第21回国際リウマチシンポジウム(2012年4月28日)抄録集, 2012 : P 660
- 3) 全身性エリテマトーデスにおける血漿 Pentraxin 3 濃度 : 重症度予測マーカーとしての有用性 舟久保ゆう, 島田祐樹, 横田和浩, 吉田佳弘, 進藤靖史, 中嶋京一, 梶山浩, 佐藤浩二郎, 秋山雄次, 三村俊英. 第56回日本リウマチ学会総会・学術集会 第21回国際リウマチシンポジウム(2012年4月28日)抄録集, 2012 : P 427
- 4) 慢性腎臓病合併RA患者における3年間の機能変化の検討 梶山浩, 井熊大輔, 和田琢, 山本晃範, 進藤靖史, 吉田佳弘, 横田和浩, 荒木靖人, 秋葉春彦, 中嶋京一, 佐藤浩二郎, 舟久保ゆう, 秋山雄次, 三村俊英. 第56回日本リウマチ学会総会・学術集会 第21回国際リウマチシンポジウム(2012年4月28日)抄録集, 2012 : P 442
- 5) The Pattern-Recognition Receptor NOD1 Promotes Production of Inflammatory Mediators in Rheumatoid Arthritis Kazuhiro Yokota, Toshihide Mimura, Renate. E Gay, Steffen Gay, Caroline Ospelt. 第56回日本リウマチ学会総会・学術集会 第21回国際リウ

- マチシンポジウム(2012年4月26日)抄録集, 2012 : P 334
- 6) 当科におけるアダリムマブ使用例の継続率を中心とした1年間の追跡結果 吉田佳弘, 秋山雄次, 和田琢, 三由文彦, 太田宗夫, 坂本真裕子, 島田祐樹, 山本晃範, 進藤靖史, 横田和浩, 荒木靖人, 梶山浩, 秋葉春彦, 中嶋京一, 佐藤浩二郎, 舟久保ゆう, 三村俊英. 第56回日本リウマチ学会総会・学術集会 第21回国際リウマチシンポジウム(2012年4月26日)抄録集, 2012 : P 490
- 7) Phase Contrast Radiography (PCR) と単純X線からみた2010ACR/EULARの関節リウマチ(RA)分類新基準における診断率の比較 進藤靖史, 秋山雄次, 神津教倫, 井熊大輔, 和田琢, 太田宗夫, 坂本真裕子, 島田祐樹, 山本晃範, 吉田佳弘, 横田和浩, 荒木靖人, 中嶋京一, 梶山浩, 秋葉春彦, 佐藤浩二郎, 舟久保ゆう, 織田弘美, 田中淳司, 三村俊英. 第56回日本リウマチ学会総会・学術集会 第21回国際リウマチシンポジウム(2012年4月27日)抄録集, 2012 : P 593
- 8) 関節リウマチ患者由来滑膜細胞におけるIL-17応答遺伝子のトランスクリプトーム解析 太田宗夫, 佐藤浩二郎, 和田琢, 坂本真裕子, 三由文彦, 横田和浩, 荒木靖人, 秋山雄次, 三村俊英. 第56回日本リウマチ学会総会・学術集会 第21回国際リウマチシンポジウム(2012年4月26日)抄録集, 2012 : P 339
- 9) ウステキヌマブが奏功した難治性乾癬性関節炎の1例 坂本真裕子, 中嶋京一, 秋山雄次, 三村俊英, 中村晃一郎. 第56回日本リウマチ学会総会・学術集会 第21回国際リウマチシンポジウム(2012年4月27日)抄録集, 2012 : P 622
- 10) 当院におけるアバタセプト使用例の検討 和田琢, 秋山雄次, 丸山崇, 柳澤麻依子, 井熊大輔, 太田宗夫, 坂本真裕子, 島田祐樹, 山本晃範, 進藤靖史, 吉田佳弘, 横田和浩, 荒木靖人, 梶山浩, 秋葉春彦, 中嶋京一, 佐藤浩二郎, 舟久保ゆう, 三村俊英. 第56回日本リウマチ学会総会・学術集会 第21回国際リウマチシンポジウム(2012年4月26日)抄録集, 2012 : P 503
- 11) 2年間ににおけるエタネルセプトの継続率と有効性について患者背景からの検討 井熊大輔, 秋山雄次, 三由文彦, 丸山崇, 柳澤麻依子, 和田琢, 太田宗夫, 坂本真裕子, 島田祐樹, 山本晃範, 進藤靖史, 吉田佳弘, 横田和浩, 荒木靖人, 梶山浩, 秋葉春彦, 中嶋京一, 佐藤浩二郎, 舟久保ゆう, 三村俊英. 第56回日本リウマチ学会総会・学術集会 第21回国際リウマチシンポジウム(2012年4月26日)抄録集, 2012 : P 345
- 12) RAにおける臨床的指標とB細胞刺激因子(BAFF)についての検討 中嶋京一, 秋山雄次, 神津教倫, 進藤靖史, 井熊大輔, 和田琢, 太田宗夫, 坂本真裕子, 島田祐樹, 山本晃範, 吉田佳弘, 横田和浩, 荒木靖人, 秋葉春彦, 梶山浩, 佐藤浩二郎, 舟久保ゆう, 三村俊英. 第56回日本リウマチ学会総会・学術集会 第

21 回国際リウマチシンポジウム(2012年4月26日)抄録集, 2012 : P482

1 3) 慢性腎臓病合併RA患者における3年間の腎機能変化の検討 梶山浩, 三村俊英. 第55回日本腎臓学会学術集会(2012年6月3日)日本腎臓学会誌, 2012 ; 54(3) :P251

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

該当せず

2. 実用新案登録

該当せず

3. その他

無し

表 1. 臨床症状、検査所見および合併症の比較

臨床症状	Ohta et al, 1990 (%)	厚労省, 2012 初診時(%)	厚労省, 2012 診断時(%)
発熱(≥38°C)	100	95	92 (*1)
関節症状	100	81	83 (*2)
そのうち関節炎	72	66	ND
定型的皮疹	87	75	62
咽頭痛	70	54	59
リンパ節腫脹	69	36	45
脾腫	65	22	32
筋肉痛	56	23	26
薬剤アレルギー	54	ND	18
胸膜炎	12	5	6
心膜炎	10	4	3

検査所見	Ohta et al, 1990 (%)	厚労省, 2012 初診時(%)	厚労省, 2012 診断時(%)
赤沈亢進(≥40mm/時)	96	83 (*3)	69
リウマトイド因子陰性	94	ND	80
抗核抗体陰性	93	ND	74
白血球増加(≥10,000/mm ³)	89	63	79
そのうち好中球増加	83	ND	63
肝機能異常	85	65	74
血清フェリチン増加	82	80	89
著増(正常上限の5倍以上したもの)	69	ND	81

今回改めて加えた項目	Ohta et al, 1990 (%)	厚労省, 2012 初診時(%)	厚労省, 2012 診断時(%)
間質性肺炎	ND	2	3
CRP 陽性	ND	83 (*3)	92
薬剤アレルギー	ND	ND	18
合併症有無	ND	ND	24

*1 発熱(≥39°C, 1 週間以上持続)、*2 2 週間以上継続したもの、*3 赤沈亢進(40mm/時以上)あるいは CRP 陽性

表 2. 臨床経過

	臨床経過パターン					
	単周期全身型	多周期全身型	慢性関節炎 単周期全身型	慢性関節炎 多周期全身型	その他	不明
症例数	58	50	15	23	0	23
頻度 (%)	39.73	34.25	10.27	15.75	0	15.75

表 3. 合併症

	アミロイドーシス	DIC	血球貪食症候群	マクロファージ活性化症候群
あり	0	8	17	3
なし	126	119	110	124
不明	43	42	42	42
頻度 (%)	0.00	6.30	13.39	2.36

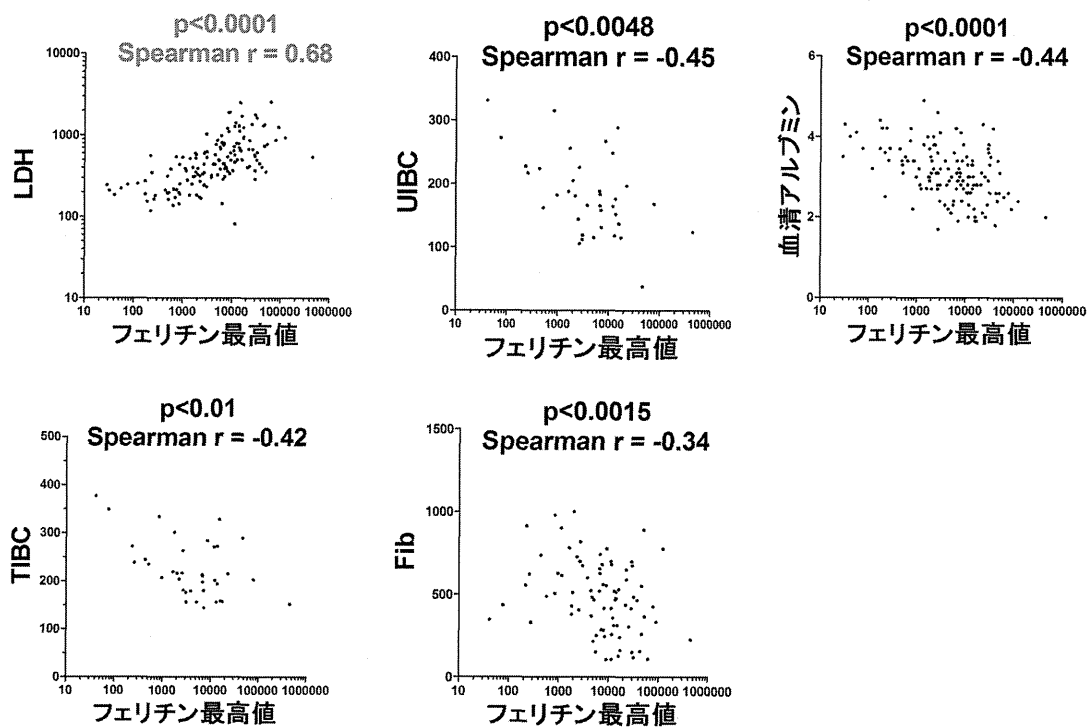
表 4. 治療薬 (ステロイド)

	治療中の薬剤	NSAID	経口ステロイド	ステロイドパルス	最大量 PSL 換算 (mg/日)
あり	162	76	158	46	45.2
なし	3	89	7	119	
ND	4	4	4	4	
頻度 (%)	98.18	46.06	95.76	27.88	

表 5. 治療薬 (ステロイド以外)

免疫抑制薬					DMARDs						生物学的製剤					血液濾過
MTX	CyA	AZT	MZR	TAC	SASP	GSK	LFM	CPA	GST	VP16	TCZ	IFX	ADA	ETN	L-CAP	
65	42	1	2	11	4	1	1	1	1	1	21	7	1	2	1	1

図 血清フェリチン最高値と相関の見られた検査値



厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

SLE 発症に対する FcγRIIB 発現欠損の影響に関する細胞特異的解析

研究分担者 広瀬幸子
研究協力者 林 青順

順天堂大学大学院医学研究科分子病理病態学 准教授
順天堂大学大学院医学研究科分子病理病態学 助教

研究要旨

FcγRIIB の発現低下は自己免疫疾患を誘導する。FcγRIIB は代表的 B 細胞活性化抑制分子で、この発現低下は自己抗体の産生をきたす。一方、FcγRIIB は樹状細胞、マクロファージ/単球系細胞、好中球上にも発現している。現在、これらの細胞上の FcγRIIB 発現低下が、自己免疫疾患発症にどのように関わっているかは明らかではない。本研究では、全ての細胞系で FcγRIIB 発現を欠損するマウス系、B 細胞のみで FcγRIIB 発現を欠損するマウス系、樹状細胞のみで FcγRIIB 発現を欠損するマウス系を作製し、自己免疫疾患発症における FcγRIIB 分子の役割を細胞特異的に解析した。その結果、全ての細胞系で FcγRIIB 発現を欠損する場合には早期に高度のループス腎炎が発症するが、その発症は、B 細胞のみで FcγRIIB 発現を欠損する場合には高度に抑制されることが明らかとなった。従って、B 細胞以外の細胞における FcγRIIB 発現低下が、ループス腎炎の増悪に関与することが示された。また、樹状細胞上の FcγRIIB は SLE 発症には関与していないことも明らかとなった。

A. 研究目的

IgG Fc 受容体には活性型と抑制型が存在し、人およびマウスのいずれにおいても、抑制型受容体として FcγRIIB が存在する。FcγRIIB は、B 細胞の代表的な活性化抑制分子で、その発現低下は自己反応性 B 細胞の活性化による自己抗体産生亢進をきたす。一方、FcγRIIB は樹状細胞やマクロファージ上にも発現しており、樹状細胞の抗原提示能や、マクロファージの活性化に影響を与えられ考えられるが、その自己免疫疾患発症における効果については現在明らかではない。そこで、本研究では、全ての細胞系で FcγRIIB 発現を欠損するマウス系、および B 細胞あるいは樹状細胞において細胞特異的に FcγRIIB 発現を欠損するマウス系を用いて、自己免疫疾患発症における FcγRIIB 分子の役割を細胞特異的観点から解析することを目的とした。

B. 研究方法

C57BL/6 (B6) マウス由来の ES 細胞を用いて、全ての細胞系で FcγRIIB 発現を欠損するマウス系 B6. CD32^{Null}、B 細胞のみで欠損するマウス系 B6. CD19^{Cre}CD32^{Flox}、樹状細胞のみで欠損するマウス系 B6. CD11c^{Cre}CD32^{Flox} を作製した。これら自身には、いずれも自己免疫疾患の発症は見られな

かった。そこで、これらに *Yaa* 変異遺伝子を導入し、自己免疫疾患の発症の有無を観察した。

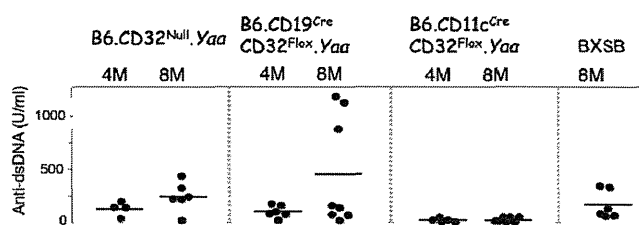
(倫理面への配慮)

マウスの実験は、本研究施設の定める動物実験指針に基づいて行なった。

C. 研究結果

1) 血中自己抗体価の比較

図 1 に 4 ヶ月齢および 8 ヶ月齢における血中 IgG 抗 dsDNA 抗体価を B6. CD 32^{Null}. *Yaa*、B6. CD 19^{Cre} CD32^{Flox}. *Yaa*、B6. CD11c^{Cre} CD32^{Flox}. *Yaa* の 3 系のマウス系で比較して示した。前 2 者では、加齢に伴って自己抗体産生の亢進が認められたが、後者の 1 系統では加齢に伴う自己抗体産生亢進は見られ



なかった。

図 1 血中 IgG 抗 dsDNA 抗体価の 4 ヶ月齢および 8 ヶ月齢における比較。BXSB は陽性対照として示した。各個体の測定値と平均値を示した。

2) 尿中アルブミン量および血中 BUN の比較

図 2 に 4 ヶ月齢および 8 ヶ月齢における尿中アルブミン量および血中 BUN を比較して示した。B6. CD32^{Null}. *Yaa* マウスでは 8 ヶ月齢で BXSb と同程度の高度の尿中アルブミン量および血中 BUN の増加が認められ、この時点で約 50% のマウスが死亡した。一方、B6. CD19^{Cre}CD32^{Flox}. *Yaa* および B6. CD11c^{Cre}CD32^{Flox}. *Yaa* マウスでは、8 ヶ月齢でも尿中アルブミン量および血中 BUN の増加は認められず、死亡するマウスは認められなかった。しかし、12 ヶ月齢で解剖した数匹のマウスの解析では、B6. CD19^{Cre}CD32^{Flox}. *Yaa* マウスでは晩年に IgG 免疫複合体の沈着を伴うループス腎炎像が認められた。これに対して、B6. CD11c^{Cre}CD32^{Flox}. *Yaa* マウスでは腎糸球体所見は全く認められなかった。

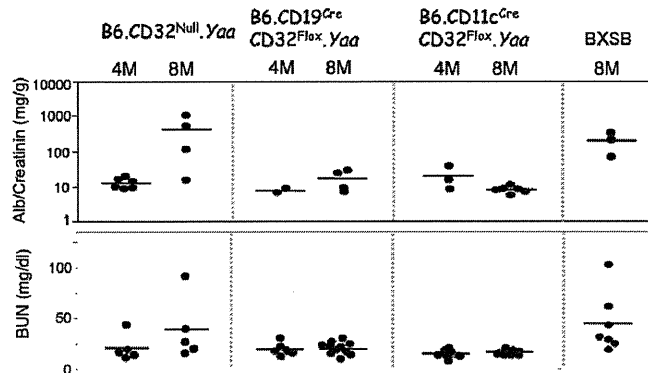


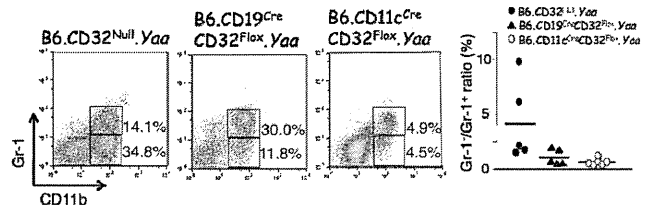
図 2 尿中アルブミン量(Albumin/Creatinin ratio)および血中BUNの4ヶ月齢および8ヶ月齢における比較。BXSb は陽性対照として示した。各個体の測定値と平均値を示した。

3) 末梢血 monocyctosis の解析

Flow cytometry を用いて、8 ヶ月齢マウスの末梢血における CD11b 陽性の monocyte 比率を、Gr-1 陽性と陰性の細胞群に分けて解析した。図 3 には、3 系統のマウス系における代表的な FACS profile を示した。B6. CD32^{Null}. *Yaa* マウスおよび B6. CD19^{Cre}CD32^{Flox}. *Yaa* マウスでは monocyctosis が見られたが、B6. CD11c^{Cre}CD32^{Flox}. *Yaa* マウスでは見られなかった。興味深いことに、B6. CD32^{Null}. *Yaa* マウスでは Gr-1 陰性 monocyte の増加が、B6. CD19^{Cre}CD32^{Flox}. *Yaa* マウスでは Gr-1 陽性 monocyte の増加が主体であり、個別別に調べても、Gr-1 陰性/Gr-1 陽性比率は B6. CD32^{Null}. *Yaa* マウスで極めて高いことが示された。

D. 考察

上記の結果から、全ての細胞系で FcγR II B 発現



を欠損する B6. CD32^{Null}. *Yaa* マウスでは、早期に図 3 8 ヶ月齢マウスの末梢血中の CD11b 陽性 monocyte の代表的な FACS 解析の profile。末梢血を CD11b および Gr-1 に対する抗体で染色し、Gr-1 陽性と陰性の細胞群に分けてその比率を示した。Gr-1⁺/Gr-1⁻比率を個別別に解析して、個別別の値と平均値を右の図に示した。

高度のループス腎炎が発症するが、その発症は、B 細胞のみで FcγR II B 発現を欠損する B6. CD19^{Cre}CD32^{Flox}. *Yaa* マウスでは高度に抑制されることが明らかとなった。従って、B 細胞以外の細胞における FcγR II B 発現低下が、ループス腎炎の増悪に関与することが示された。B 細胞以外の細胞としてマクロファージ/単球系細胞の可能性はある。その理由として、今回の末梢血の解析から、B6. CD32^{Null}. *Yaa* の高度のループス腎炎発症に CD11b⁺Gr-1⁻ monocyte が関わる可能性が考えられる。すなわち、B6. CD19^{Cre}CD32^{Flox}. *Yaa* では、B 細胞上の FcγR II B 発現欠損により、自己抗体の産生と糸球体メザンギウム領域への免疫複合体の沈着は見られるが、monocyte 上には FcγR II B が発現しているため活性化が抑制され、CD11b⁺ Gr-1⁻ monocyte から活性化型 CD11b⁺Gr-1⁻ monocyte への分化が抑制されることで、腎糸球体への浸潤が阻止され、結果的にループス腎炎の進展を抑制する可能性が示唆される。

E. 結論

近年、CD11b⁺Gr-1⁻ monocyte は CD11b⁺Gr-1⁻ monocyte とは機能が異なり、ヒト CD14⁻ monocyte に匹敵する patrolling monocyte として、局所の炎症部位に浸潤する細胞群として注目されている。今後、マクロファージ/単球系細胞で FcγR II B 発現を欠損するマウス系 B6. CEBPa^{Cre}CD32^{Flox} を作製し、これに *Yaa* を導入して、CD11b⁺Gr-1⁻ monocyte 出現の程度や、ループス腎炎の発症への関与について解析する予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kawano S, Amano H, Lin Q, Ishihara N, Sato-Hayashizaki A, Kaneko T, Nishikawa K, Ohtsuji N, Okazaki H, Tsurui H, Tada N, Nishimura H, Takai T, Toshikazu Shirai T, Takasaki Y and Sachiko Hirose. Phenotype conversion from rheumatoid arthritis to systemic lupus erythematosus by introduction of *Yaa* mutation into FcγRIIB-deficient C57BL/6 mice. *Eur. J. Immunol.* in press.

Okazaki K, Suzuki Y, Ohtsuji M, Suzuki H, Kihara M, Kajiyama T, Hashimoto A, Nishimura H, Novak J, Brown R, Hall S, Izui S, Hirose S, and Tomino Y. Development of a model of early-onset IgA nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 23:1364-1374, 2012.

Kitabatake M, Toda T, Kuwahara K, Igarashi H, Ohtsuji M, Tsurui H, Hirose S, and Sakaguchi N. Transgenic overexpression of G5PR that is normally augmented in centrocytes impairs the enrichment of high-affinity antigen-specific B cells, increases peritoneal B-1a cells, and induces autoimmunity in aged female mice. *J. Immunol.* 189:1193-1201, 2012.

Shirai N, Ohtsuji M, Hagiwara K, Tomisawa H, Ohtsuji N, Hirose S, Hagiwara H. Nephrotoxic effect of subchronic exposure to S-(1,2-dichlorovinyl)-L-cysteine in mice. *J. Toxicol. Sci.* 37:871-878, 2012.

2. 学会発表

広瀬幸子、佐藤綾、林青順、天野浩文、大辻希樹、西村裕之 重篤な関節リウマチを自然発症する FcγレセプターIIB 欠損マウスの樹立 第56回 日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 419 頁 2012/4/26-28 東京

河野晋也、天野浩文、金子俊之、佐藤綾、林青順、広瀬幸子、高崎芳成 FcγレセプターIIB 欠損マウスにおける *Yaa* 遺伝子の与える影響 第56回 日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 596 頁 2012/4/26-28 東京

Qingshun Lin, Mareki Ohtsuji, Aya Hayashizaki, Hiroyuki Nishimura, Masao Ono, Sachiko Hirose Effect of SAP-deficiency on B cell-mediated autoimmune disease. 第56回 日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 520 頁 2012/4/26-28 東京

OBATA Masaomi, OHTSUJI Mareki, SHIRAI Toshikazu, HIROSE Sachiko, NISHIMURA Hiroyuki. Mechanism of Th cell tolerance induced with tolerogenic polyethylene glycol(PEG)-conjugate of protein antigen. 第41回 日本

免疫学会総会・学術集会記録 41 巻 53 頁 2012/12/5-7 神戸

TSURUI Hiromichi, HIROSE Sachiko. Thorough characterization of TCR-pMHC binding free energy estimated by string model and Miyazawa-Jernigan matrix. 第41回 日本免疫学会総会・学術集会記録 41 巻 110 頁 2012/12/5-7 神戸

KAWANO Shinya, AMANO Hirofumi, LIN Qingshun, KANEKO Toshiyuki, NISHIKAWA Keiko, OKAZAKI Hideki, TSURUI Hiromichi, NISHIMURA Hiroyuki, SHIRAI Toshikazu, TAKASAKI Yoshinari, HIROSE Sachiko. Phenotype conversion from RA to SLE in FcγRIIB-deficient B6 mice by *Yaa* mutation. 第41回 日本免疫学会総会・学術集会記録 41 巻 194 頁 2012/12/5-7 神戸

LIN Qingshun, TSURUI Hiromichi, NISHIKAWA Keiko, OKAZAKI Hideki, OHTSUJI Mareki, NISHIMURA Hiroyuki, ONO Masao, SHIRAI Toshikazu, HIROSE Sachiko. The role of SAP-signal in SLE. 第41回 日本免疫学会総会・学術集会記録 41 巻 197 頁 2012/12/5-7 神戸

KITABATAKE Masahiro, TODA Teppei, KUWAHARA Kazuhiro, IGARASHI Hideya, OHTSUJI Mareki, HIROSE Sachiko, SAKAGUCHI Nobuo. Survival of antigen-derived germinal center B-cell is controlled by centrocyte-associated expression of apoptosis-regulator G5PR. 第41回 日本免疫学会総会・学術集会記録 41 巻 198 頁 2012/12/5-7 神戸

KANEKO Toshiyuki, AMANO Hirofumi, OHTSUJI Mareki, NISHIKAWA Keiko, KAWANO Shinya, OHTSUJI Naomi, Lin Qingshun, OKAZAKI Hideki, TSURUI Hiromichi, NISHIMURA Hiroyuki, SHIRAI Toshikazu, TAKASAKI Yoshinari, HIROSE Sachiko. A novel locus of B6 mice on chromosome 12 plays a role in common process shared by SLE, RA, and Sjögren syndrome. 第41回 日本免疫学会総会・学術集会記録 41 巻 196 頁 2012/12/5-7 神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

Fc γ レセプターIIB 欠損マウスにおける *Yaa* 遺伝子変異の与える影響

研究分担者	天野 浩文	順天堂大学	膠原病内科	准教授
研究協力者	高崎 芳成	順天堂大学	膠原病内科	教授
	広瀬 幸子	順天堂大学	分子病理病態学	准教授
	河野 晋也	順天堂大学	膠原病内科	
	金子 俊之	順天堂大学	膠原病内科	
	林 青順	順天堂大学	分子病理病態学	

研究要旨

(背景) 抑制性のシグナルを伝える Fc γ 受容体である Fc γ RIIB を C57BL/6(B6)マウスで欠損した B6.Fc γ RIIB $^{-/-}$ マウスでは、リウマトイド因子(RF)の出現とともに関節破壊と変形を伴う関節リウマチ(RA)の病態を呈した。我々はこのマウスに Toll 様受容体(TLR)7 の重複である *Yaa* 遺伝子を導入することで病態の変化が生じるかを確認する目的で B6.Fc γ RIIB $^{-/-}$ *Yaa* マウスを作製し解析したところ RA の病態は呈さず、SLE に類似した腎炎を発症した。今回このマウスで血清中の自己抗体と脾臓におけるサイトカインの発現を調べ、病態変化のメカニズムを探索した。(方法) 血清中の自己抗体を ELISA で測定し、サイトカイン mRNA の発現についてリアルタイム PCR 法を用いて解析した。(結果) B6.Fc γ RIIB $^{-/-}$ *Yaa* マウスは B6.Fc γ RIIB $^{-/-}$ マウスと比較し RA 関連・SLE 関連両者の自己抗体の上昇を認めた。B6.Fc γ RIIB $^{-/-}$ *Yaa* マウスでは、脾臓細胞で有意に IL-6, IL-10, IL-21 の発現が B6.Fc γ RIIB $^{-/-}$ マウスと比較して高く、特に IL-10 においてその差は最も顕著であった。(考察) RA と SLE では、共通の遺伝子背景が存在し、TLR の刺激など自然免疫系の腑活が加わることが自己免疫疾患の発症における疾患特異性を決定している可能性がある。

A. 研究目的

抑制性のシグナルを伝える Fc γ 受容体である Fc γ RIIB を C57BL/6(B6)マウスで欠損した B6.Fc γ RIIB $^{-/-}$ マウスでは、リウマトイド因子(RF)の出現とともに関節破壊と変形を伴う関節リウマチ(RA)の病態を呈した (Sato-Hayashizaki ら Arthritis Rheum 2011)。我々は、この RA を自然発症する B6.Fc γ RIIB $^{-/-}$ マウスに Toll like receptor (TLR)7 の重複が存在する *Yaa* 遺伝子を導入し B6.Fc γ RIIB $^{-/-}$ *Yaa* マウスを作製したところ RA の病態を呈することはなく、SLE に類似した腎炎を呈した。今回このマウスにおける自己抗体と脾臓におけるサイトカインの発現を調べ、RA から SLE の病態に変化するメカニズムを探ることを目的とした。

B. 研究方法

2ヶ月齢、6ヶ月齢における B6.Fc γ RIIB $^{-/-}$ *Yaa* マウスと B6.Fc γ RIIB $^{-/-}$ マウスの血清中 RA 関連自己抗体 (RF, 抗タイプ II コラーゲン, 抗 CCP 抗体) と SLE 関連自己抗体 (抗 ds-DNA 抗体, 抗クロマチン抗体, 抗 RNP 抗体) を測定した。また、B6.Fc γ RIIB $^{-/-}$ *Yaa* マウス 4ヶ月齢における脾臓のサイトカイン mRNA の発現についてリアルタイム

PCR 法を用いて解析し、B6.Fc γ RIIB $^{-/-}$ マウスと比較した。

(倫理面への配慮)

今回の研究で用いたマウスは順天堂大学疾患モデル研究センターで飼育し、「順天堂大学医学部動物実験に関する指針」もとづき、動物福祉の観点から実験を行っており、実験動物委員会にて審査、承認を受けている。

C. 研究結果

B6.Fc γ RIIB $^{-/-}$ *Yaa* マウスでは 2ヶ月齢で B6.Fc γ RIIB $^{-/-}$ マウスと比較し SLE 関連のみならず、RA 関連の自己抗体も有意に上昇していた。脾臓細胞におけるサイトカインの発現については、B6.Fc γ RIIB $^{-/-}$ *Yaa* マウスにおいて有意に IL-6, IL-10, IL-21 の発現が B6.Fc γ RIIB $^{-/-}$ マウスと比較して高く、特に IL-10 においてその差は最も顕著であった。さらに IL-10 を発現する細胞を解析したところ、濾胞ヘルパー T 細胞のフェノタイプを有していた。

D. 考察

IL-10 は B 細胞の抗体産生を亢進させる免疫賦活作用を有するとともに、T 細胞やマクロファージによる炎症性サイトカイン産生を抑制する作用を合わせ持つサイトカインである。RA は炎症性サイトカイン産生を特徴とする疾患であり、濾胞ヘルパー T 細胞による IL-10 の発現亢進が、B6.Fc γ RIIB $^{-/-}$ Yaa マウスにおける RA から SLE への表現型の変化に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

B6.Fc γ RIIB $^{-/-}$ マウスは RA の病態を、B6.Fc γ RIIB $^{-/-}$ Yaa マウスは SLE の病態を示し、RA と SLE では共通の疾患関連遺伝子が存在し、さらに他の自己免疫感受性遺伝子の異常が加わることで自然免疫系の賦活化などの環境要因が加わることでそれらの疾患特異性が決定されている可能性がある。

F. 健康危険情報

今回の実験では、ウイルス、放射性物質等を用いず、健康面での危機は極めて少ないと思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawano S, Lin Q, Amano H, Kaneko T, Nishikawa K, Tsurui H, Tada N, Nishimura H, Takai T, Shirai T, Takasaki Y, Hirose S. Phenotype conversion from rheumatoid arthritis to systemic lupus erythematosus by introduction of Yaa mutation into Fc γ RIIB-deficient C57BL/6 mice. *Eur J Immunol*. 2012 in print.
- 2) Ikeda T, Toyama S, Ogasawara M, Amano H, Takasaki Y, Morita H, Ishizuka T. Rheumatoid arthritis complicated with immunodeficiency-associated lymphoproliferative disorders during treatment with adalimumab. *Mod Rheumatol*. 22(3):458-62, 2012
- 3) Ogasawara M, Tamura N, Kageyama M, Onuma S, Kusaoi M, Toyama S, Sekiya F, Matsudaira R, Nawata M, Tada K, Matsushita M, Kempe K, Amano H, Morimoto S, Yamaji K, Takasaki Y. Single-center, retrospective analysis of efficacy and safety of tacrolimus as a second-line DMARD in combination therapy and the risk factors contributing to adverse events in 115 patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2012 31(2):251-7.
- 4) Okada Y, Shimane K, Kochi Y, Tahira T, Suzuki A, Higasa K, Takahashi A, Horita T, Atsumi T, Ishii T, Okamoto A, Fujio K,

Hirakata M, Amano H, Kondo Y, Ito S, Takada K, Mimori A, Saito K, Kamachi M, Kawaguchi Y, Ikari K, Mohammed OW, Matsuda K, Terao C, Ohmura K, Myouzen K, Hosono N, Tsunoda T, Nishimoto N, Mimori T, Matsuda F, Tanaka Y, Sumida T, Yamanaka H, Takasaki Y, Koike T, Horiuchi T, Hayashi K, Kubo M, Kamatani N, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K. A genome-wide association study identified AFF1 as a susceptibility locus for systemic lupus erythematosus in Japanese. *PLoS Genet*. 2012 Jan;8(1):e1002455.

2. 学会発表

1. 金子 俊之, 天野 浩文, 河野 晋也, 箕輪 健太郎, 安藤 誠一郎, 渡邊 崇, 仲野 総一郎, 鈴木 淳, 森本 真司, 高崎 芳成. 膠原病に伴う間質性肺炎患者における IgA サブクラス、BAFF/APRIL の関与について. 第 40 回日本臨床免疫学会総会. 2012.9.27-29.
2. 渡邊 崇, 仲野 総一郎, 天野 浩文, 森本 真司, 高崎 芳成. RA 治療における HLA-G 発現の検討. 第 40 回日本臨床免疫学会総会. 2012.9.27-29.
3. 安藤 誠一郎, 天野 浩文, 松平 蘭, 高崎 芳成. 関節リウマチに対しインフリキシマブまたはトシリズマブで治療した患者の末梢血ヘモグロビン値・ヘプシジン-25 濃度の治療前後データ比較. 第 40 回日本臨床免疫学会総会. 2012.9.27-29.
4. 河本 敏雄, 蛭間 香織, 松下 雅和, 李 鍾碩, 天野 浩文, 山路 健, 田村 直人, 高崎 芳成. 全身性エリテマトーデス(SLE)に蛋白漏出性胃腸症を合併して、ステロイド投与が奏功した一例. 第 40 回日本臨床免疫学会総会. 2012.9.27-29.
5. 金子 俊之, 天野 浩文, 西川 桂子, 河野 晋也, 大辻 希樹, 西村 裕之, 廣瀬 幸子, 高崎 芳成. SLE と RA の疾患特異性を決定する遺伝要因の解析. 第 40 回日本臨床免疫学会総会. 2012.9.27-29.
6. 天野 浩文, 河野 晋也, 金子 俊之, 林 青順, 安藤 誠一郎, 渡邊 崇, 仲野 総一郎, 出井 章三, 廣瀬 幸子, 高崎 芳成. B 細胞・抗原提示細胞・自己抗体 SLE モデルマウスにおける Fc レセプターを介した単球の活性化と自己抗体の産生について. 第 40 回日本臨床免疫学会総会. 2012.9.27-29.
7. 河野 晋也, 天野 浩文, 金子 俊之, 佐藤 綾, 林 青順, 廣瀬 幸子, 高崎 芳成. 疾患関連遺伝子 Fc γ RIIB 欠損 B6 マウスへの Yaa 遺伝子導入

- による RA から SLE への表現型移行.第 40 回日本臨床免疫学会総会.2012.9.27-29.
8. 村山 豪, 中嶋 志穂子, 午來 美沙, 山田 祐介, 安藤 誠一郎, 仲野 総一郎, 関谷 文男, 鈴木 淳, 小笠原 倫大, 天野 浩文, 山路 健, 田村 直人, 高崎 芳成.FDG-PET で診断された高齢発症の高安動脈炎の 1 例.第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会.2012.4-26-28.
 9. 山田 里沙, 草生 真規雄, 根本 卓也, 寶達 桂, 景山 倫彰, 河本 敏雄, 杉本 郁, 小笠原 倫大, 李 鍾碩, 天野 浩文, 山路 健, 津田 裕士, 高崎 芳成.未治療の混合性結合組織病に血栓性血小板減少性紫斑病を合併し、単純血漿交換のみで寛解した一例.第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会.2012.4-26-28.
 10. 中嶋 志穂子, 仲野 総一郎, 林 絵利, 関谷 文男, 小笠原 倫大, 天野 浩文, 田村 直人, 高崎 芳成.SLE に多発脳動脈炎を併発した一例.第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会.2012.4-26-28.
 11. 頭山 尚子, 小笠原 倫大, 天野 浩文, 高崎 芳成.SLE に合併した脳静脈血栓症の一例.第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会.2012.4-26-28.
 12. 河本 敏雄, 蛭間 香織, 松下 雅和, 李 鍾碩, 天野 浩文, 山路 健, 田村 直人, 高崎 芳成.著明な眼瞼浮腫で発症し、蛋白漏出胃腸症を合併した全身性エリテマトーデス(SLE)の一例. .第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会.2012.4-26-28.
 13. 河野 晋也, 天野 浩文, 金子 俊之, 佐藤 綾, 林 青順, 広瀬 幸子, 高崎 芳成.Fcg レセプターIIB 欠損マウスにおける Yaa 遺伝子変異の与える影響.第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会.2012.4-26-28.
 14. 広瀬 幸子, 佐藤 綾, 林 青順, 天野 浩文, 大辻 希樹, 西村 裕之.リウマチ性疾患の動物モデル(1) 重篤な関節リウマチを自然発症する Fc γ レセプターIIB 欠損マウスの樹立.第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会.2012.4-26-28.
 15. 金子 俊之, 天野 浩文, 河野 晋也, 箕輪 健太郎, 安藤 誠一郎, 渡邊 崇, 仲野 総一郎, 鈴木 淳, 森本 真司, 高崎 芳成.リウマチ性疾患の肺病変(2) 膠原病に伴う間質性肺炎患者における IgA サブクラスと BAFF/APRIL の関与について.第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会.2012.4-26-28.
 16. Shinya Kawano, Hirofumi Amano, Qingshun Lin, Toshiyuki Kaneko, Keiko Nishikawa, Hideki Okazaki, Hiromichi Tsurui, Hiroyuki Nishimura, Toshikazu Shirai, Yoshinari Takasaki, Sachiko Hirose. Phenotype conversion from RA to SLE in Fc γ RIIB-deficient B6 mice by Yaa mutation 第 41 回日本免疫学会学術集会.2012.12-5-7.
 17. Toshiyuki Kaneko, Hirofumi Amano, Mareki Otsuji, Keiko Nishikawa, Shinya Kawano, Naomi Ohtsuji, Qingshun Lin, Hideki Okazaki, Hiromichi Tsurui, Hiroyuki Nishimura, Toshikazu Shirai, Yoshinari Takasaki, Sachiko Hirose. A novel locus of B6 mice on chromosome 12 plays a role in common process shared by SLE, RA, and Sjögren syndrome 第 41 回日本免疫学会学術集会.2012.12-5-7.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

SLE 病態診断法の開発、Still 病治療法の改良に関する研究

研究分担者 三森明夫 国立国際医療研究センター（副院長、膠原病科科长）
研究協力者 高橋裕子（膠原病科医員）、土屋遙香 & 坂内穎（膠原病科レジデント）、
芳賀しおり（同センター研究所研究員）、石坂幸人（研究部長）

研究要旨

1) 我々が同定した ACE2 (angiotensin converting enzyme 2: 血管保護分子) 阻害自己抗体について、昨年度報告に検討数を追加した: 抗 ACE2 抗体は、SLE の PAH/末端壊死で全例陽性 (7/7)、SLE 一般で活動期に高率陽性 (33/35)。抗体の ACE2 阻害作用は、PAH/末端壊死で高率 vs 非血管病態で低率 (6/7 vs 4/21 $p=0.0033$) だった。すなわち抗 ACE2 抗体は、SLE 活動期に高率陽性、かつ ACE2 阻害抗体のみが血管病態と強く相関する。

2) random peptide library 法+BLAST 検索コンピュータアルゴリズムでみつけた自己抗原候補の 1 つ GABA-R (gamma aminobutyric acid receptor) は、希少な神経免疫病 (辺縁系脳炎など) で自己抗体標的として知られるものだった。GABA-B-R 組み替え蛋白発現させて ELISA を行うと、SLE 活動期に高率陽性、非活動期に低値、対照疾患 (強皮症、筋炎、血管炎) ではほぼ陰性だった。血清抗体価は、活動期 SLE に特異的だが、NP-SLE と相関しなかった。髄液抗体価は NP-SLE の半数に陽性、対照髄液 (NP-SLE を否定した SLE、感染症) で陰性だった。抗 GABA-B-R 抗体は、SLE 活動性の新規血清マーカーになりうる。NP-SLE での診断価値は未定である。

3) ステロイド抵抗性の成人発症 Still 病 8 例に tocilizumab/TCZ 併用治療を行なった病歴を検討し、安全な寛解導入、ステロイド迅速減量、寛解維持を実現する暫定案を求めた。
「初期の高用量 PSL」、「PSL 迅速減量で CRP 0 を維持できれば、TCZ 開始」の日程が適切と考えた。

A. 研究目的

SLE 病態における、病因分子、新規病勢マーカーを探索する 1, 2)。Still 病の治療法を改良する 3)。

1) 抗 ACE2 (angiotensin converting enzyme-2) 抗体の、SLE 患者における病原性 (末端壊死、pulmonary arterial hypertension/PAH) を解明する。

2) random peptide library との反応から同定した自己抗体候補のうち、抗 GABA 受容体 B 抗体 (SLE での新規自己抗体) の出現頻度を、SLE で検討した。

3) 成人発症 Still 病に対し、tocilizumab/TCZ の併用でステロイド量をなるべく減らし、寛解に導入・維持する治療プログラムを検討する。

B. 研究方法

1) 組み替えヒト ACE2 を用いた ELISA 系、SLE 患者および対照の血清 IgG 分画を精製し、in vitro ACE2 活性への阻害作用を測る系を用いている。

昨年度の検討に加え、SLE-PAH 1 例を追加し、阻害作用を調べる SLE 検体数も増やした。これまでの総計: PAH 3 人、末端壊死 4 人、血管病のない SLE で抗 ACE2 抗体価の高い 21 人。

2) GABA-R: 組み替え GABA-B1b-R, B2-R を作成し、抗原に用いた ELISA で、SLE 86 人と対照患者の血清自己抗体を測定した。GABA-B1b-R; 細胞外ドメ

イン (1-475 amino acids 相当) を PCR 増幅し

(amplicons) pcDNA3.1 (-) に導入・クローン化し、8 アミノ酸相当の FLAG 配列を挿入した。GABA-B2-R (細胞外ドメイン 1-480 aa 相当) を、同様にクローン化し FLAG を付けた。これら組み替え DNA を、293 FreeStyle cells (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で蛋白発現させ、精製後に ELISA 抗原とした。

3) 当科、成人発症 Still 病の難治例 8 人の病歴を、後ろ向き分析し、tocilizumab の適正プログラムを検討した。

(倫理面への配慮)

血清利用、髄液利用、病歴調査それぞれの本研究計画が、当センター倫理審査会で承認されている。

C. 研究結果

1) SLE 血管病態 (PAH, 末端壊死) 7 人は、7 人とも抗 ACE2 抗体陽性だった。

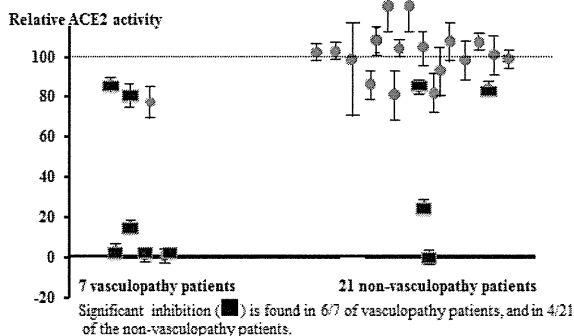
血清 IgG 分画 (1 μ g IgG) 添加による、in vitro ACE2 活性の抑制は、PAH 2/3、末端壊死 4/4 にみられた: ACE2 阻害を示さなかった 1 例の SLE は、10 年以上前に PAH を発症し、現在まで再燃なく維持されている患者だったので、阻害抗体が低下した可能性がある。

血管病変なしの SLE も、活動期患者は高率 (33/35) に抗 ACE2 抗体陽性だった (非活動性 SLE 30 人で抗 ACE2 抗体価が低値、という結果は昨年度報告書に記した)。活

動期 SLE 患者から、抗体価が高い順に 21 人選び、血清 IgG 分画による in vitro ACE2 活性阻害の有無をみた。阻害を示したのは 4/21 と低率だった (6/7 vs 4/21, $p=0.0033$)。 (図 1)

すなわち、抗 ACE2 抗体は、SLE 活動性の高率な新規マーカーになるが、ACE2 阻害自己抗体は、血管病態と関連する。

図1 In vitro ACE2 activity assay in the presence of serum IgG fraction from SLE patients



注釈：上記結果（患者 IgG の共存による、in vitro ACE2 活性の阻害評価）は、各患者につき 3 回以上の測定を行い、健常人 IgG 共存での ACE2 活性を reference (100%) とし、t-検定で有意な低下を阻害ありと判定した。阻害幅は、反応系バッファの違いにより、相対的に異なることが最近分かったので、現在バッファを統一し、全サンプルの測定を再検している途中である。すなわち上記の図は、最終的（論文投稿時）に多少異なるものになる筈であるが、結論には影響しないと考えている。

2) 抗 GABA-B1b または B2-R 抗体の ELISA 測定系の抗原特異性について (SLE 血清が組み替え蛋白の FLAG 部分と反応しているのではないことの確認) :

市販の抗 FLAG 抗体は、我々の組み替え GABA-B-R と反応して高い ELISA 値を示したが、FLAG peptide で吸収すると ELISA 値は消失した。一方、患者血清での ELISA 値は、FLAG peptide による吸収でまったく影響されなかった (図は省略)。

また、random peptide library 法で我々が得た自己抗原候補 CD109 を、同様に作製し (FLAG 付き発現蛋白)、ELISA を行なった結果、SLE 血清は、CD109 組み替え蛋白と反応しなかった (図は省略)。すなわち CD109 は、真の自己抗体標的でなかったわけだが、この結果から、SLE 血清が FLAG 部分と反応するのではないことも分かった。

以上の前提で、下記のことがいえる。

SLE 患者は活動期に、抗 GABA-B1b or -B2-receptor 抗体が高率に陽性になると分かった (図 2, 3)。

健常人の最高 ELISA 値を cut off 値とすれば、筋炎、強皮症には弱陽性者が 1-2 例みられるのみだった。

抗 GABA-B-R 抗体は、膠原病の中で、SLE 特異的に活動期に高率陽性と分かった。血清抗 GABA-B-R 抗体価と神経精神症状の有無は、相関しなかった。

図2 SLE血清(x1000希釈) GABA-B1b、GABA-B2受容体に対するELISA値は、他疾患患者血清(強皮症、vasculitis、筋炎)に比べ、有意に高かった。

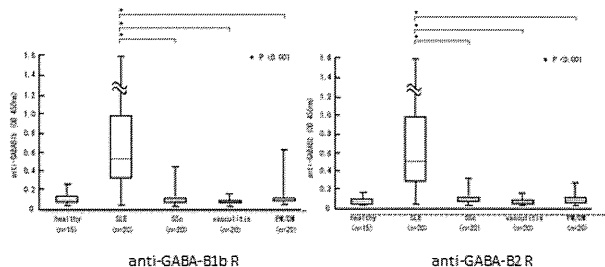
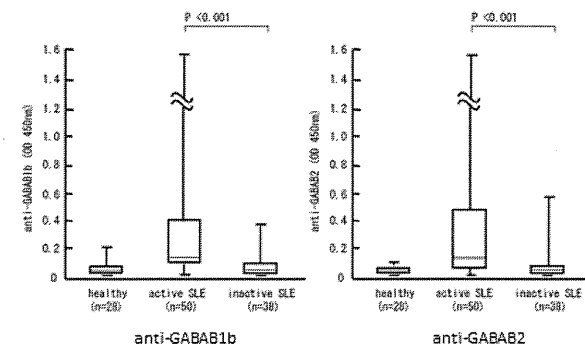


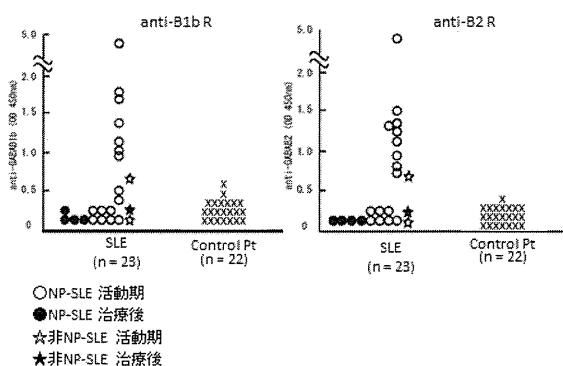
図3 SLE血清中のGABA-B1b、GABA-B2受容体に対する抗体価は、活動期で非活動期と比較し有意に高値だった。



当科に保存していた髄液で調べると、NP-SLE においてのみ、抗 GABA-B-R 抗体が陽性だった (図 4)。

ただし、非 NP-SLE において髄液の抗体価を偶然検討できた症例は少なかったため、髄液陽性が、NP-SLE に特異的かどうかの統計的検討はできなかった。

図4 髄液(原液)による、抗GABA-B R抗体ELISA



3) 再発反復または高用量ステロイドを要する Still 病に TCZ を使用した 8 人の病歴を分析し、どの時点で tocilizumab/TCZ を開始すれば安全か検討した。

DIC または MAS 所見を 4 人に認めた。

初期ステロイド治療中に、CRP 3mg/dl の時点で TCZ を開始した 1 例で、MAS 所見の続発があり、TCZ を中止して lipo-dexamethasone + cyclosporine DIV で軽快した。CRP 2.7mg/dl の時点で TCZ を開始した 1 例は、初期の MAS 所見も消失して Still 病が寛解した。

他は、初期に MAS 所見を伴った 2 例を含む全例で、ステロイド治療により CRP 値 0 を達成した時点で TCZ を開始しており、悪化なく Still 病が寛解した。

8 例検討の範囲では、初期 prednisolone (PSL) 1-2 mg/kg/d で、CRP 0 が維持できて、ferritin の低下相にあるときは、TCZ の導入は安全と思われた。

D. 考察

1) 血清抗 ACE2 阻害抗体の存在は、今までの検討範囲で、末端壊死・PAH と強く関連し、SLE、MCTD、強皮症に共通である。SLE での検討で、ステロイド治療によって抗 ACE2 抗体価が低下することも（昨年報告、7 人のデータから）示された。

SLE-PAH にステロイドが効くことを説明する可能性があるが、強皮症-PAH に効きが悪い理由は、抗体の存在だけでは説明できない。他の付加要因が探索課題と思われる。

2) 抗 GABA-B-R 抗体は、SLE 活動期に高率陽性になることが分かった。新たな SLE 活動性マーカーになりうる。

髄液の抗 GABA-B-R 抗体高値は、今回の検討範囲で NP-SLE にのみみられたが、血清抗体価と関連しただけかもしれない。NP-SLE での診断価値は未定である（神経精神症状がない患者では、髄液抗体価を評価する機会がないので、NP-SLE 患者の髄液抗体価と比較できないからである）。

患者血清と反応する random peptide library のペプチド配列の所属蛋白を推定する、我々の BLAST 検索コンピュータアルゴリズムは、実際、抗 GABA-B-R 抗体（特殊な神経免疫病で知られる抗体）に例示されるように、有効性が示された。すなわち、我々はこれまでに、種々の候補のうち細胞外分子を優先して、CD109、killer cell immunoglobulin-like receptor 3DL1、GABA-B1b-R、GABA-B2-R の 4 つの候補について、発現蛋白で ELISA を行ない、うち 3 つが真の自己抗原だった。

3) Still 病の適正 TCZ 治療は、多施設の病歴を供覧すれば、割り出せると思われる。

E. 結論

1) 抗 ACE2 抗体は、SLE 活動性の新規マーカーになりうる。ACE2 阻害抗体は、収縮性血管病態 (PAH、末端壊死) と関連する。

2) 抗 GABA-B-R 抗体は、SLE 活動性の新規マーカーになりうる。

3) Still 病において、ステロイド十分量で CRP を 0 にした後に、tocilizumab を加え、ステロイド迅速減量する方法は、安全かつステロイド副作用を回避できる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamashita H, Kubota K, Takahashi Y, Minamimoto R, Morooka M, Kaneko H, Kano T, **Mimori A**: Similarities and differences in fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography findings in spondyloarthritis, polymyalgia rheumatica and rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2012, Jun 29. [Epub ahead of print]
2. Yamashita H, Eri T, Ueda Y, Ozaki T, Takahashi H, Tsuno T, Takahashi Y, Kano T, **Mimori A**. Diagnosis and treatment of primary Sjögren syndrome-associated peripheral neuropathy: a six-case series. *Mod Rheumatol*. 2012 Sep 28. [Epub ahead of print]
3. Ito K, Minamimoto R, Yamashita H, Yoshida S, Morooka M, Okasaki M, **Mimori A**, Kubota K. Evaluation of Wegener's granulomatosis using 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography. *Ann Nucl Med*. 2012 Dec 16. [Epub ahead of print]
4. Yamashita H, Inoue M, Takahashi Y, Kano T, **Mimori A**: The natural history of asymptomatic positron emission tomography: positive giant cell arteritis after a case of self-limiting polymyalgia rheumatica. *Mod Rheumatol* 2012, Jun 19. [Epub ahead of print]
5. Yamashita H, Matsuki Y, Shimizu A, Mochizuki M, Takahashi Y, Kano T, **Mimori A**: Haemophagocytic lymphohistiocytosis complicated by central nervous system lesions in a patient with dermatomyositis: a case presentation and literature review. *Mod Rheumatol* 2012 May 11. [Epub ahead of print]
6. Yamashita H, Suzuki A, Takahashi Y, Kubota K, Kano T, **Mimori A**: Intravascular large B-cell lymphoma with diffuse FDG uptake in the lung by 18FDG-PET/CT without chest CT findings. *Ann Nucl Med*. 2012 Apr 27. [Epub ahead of print]
7. Yamashita H, Takahashi Y, Kano T, **Mimori A**. A case of systemic lupus erythematosus with bamboo joint-like corditis as an antecedent symptom. *Rheumatology (Oxford)*. 2012 Oct 4. [Epub ahead of print]

8. Yamashita H, Kubota K, Takahashi Y, Kaneko H, Kano T, **Mimori A**. Inflammation surrounding the vertebral spinous processes as spondylarthritis in Behçet's disease. *Mod Rheumatol*. 2012 Jul 14. [Epub ahead of print]
9. Yamashita H, Takahashi Y, Kaneko H, Kano T, **Mimori A**: Thrombotic thrombocytopenic purpura with an autoantibody to ADAMTS13 complicating Sjögren's syndrome: two cases and a literature review. *Mod Rheumatol* 2012 Apr 21. [Epub ahead of print]
10. Yamashita H, Ueda Y, Suzuki A, Takahashi Y, Kaneko H, Kano T, **Mimori A**. Systemic lupus erythematosus complicated by Crohn's disease: a case report and literature review. *BMC Gastroenterol* 2012, 12(1):174
11. Matsuki Y, Yamashita H, Takahashi Y, Kano T, Shimizu A, Itoh K, Kaneko H, **Mimori A**: Diffuse alveolar damage in patients with dermatomyositis: a six-case series. *Mod Rheumatol* 2012, 22(2):243-8.
12. Mori S, Tokuda H, Sakai F, Johkoh T, **Mimori A**, Nishimoto N, et al and the NTM-BIORA (NTM infection in Biologic-treated RA patients) Study Investigators.: Radiological features and therapeutic responses of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease in rheumatoid arthritis patients receiving biological agents: a retrospective multicenter study in Japan. *Mod Rheumatol*. 2012, 22:727-737
13. Yamashita H, Takahashi Y, Ishiura H, Kano T, Kaneko H, **Mimori A**: Hypertrophic pachymeningitis and tracheobronchial stenosis in immunoglobulin G4-related disease: case presentation and literature review. *Intern Med*. 2012;51(8):935-41.
14. Yoshida Y, Takahashi Y, Minemura N, Ueda Y, Yamashita H, Kaneko H, **Mimori A**. Prognosis of pneumocystis pneumonia complicated in patients with rheumatoid arthritis (RA) and non-RA rheumatic diseases. *Mod Rheumatol*. 2012, 22:509-5142.

和文論文

1. 高橋裕子、三森明夫、関谷文男、松平蘭、山路健、田村直人、高崎芳成：混合性結合組織病に対する初期ステロイド治療の意義：順天堂医学 2012, 58(1): 54-58
2. 津野宏隆、高橋裕子、吉田祐志、新井憲俊、中村洋介、八代成子、牧角祥美、山下裕之、金子礼志、狩

- 野俊和、三森明夫：早期治療介入により寛解の得られた Cogan 症候群の 1 例。日臨免会誌 2012, 35(1)92-96
3. 山下裕之、高橋裕子、狩野俊和、金子礼志、三森明夫：不明熱・不明炎症の原因としての悪性リンパ腫の重要性。日臨免会誌 2012;35(2):136-43
4. 山下裕之、上田洋、高橋裕子、三森明夫：成人に発症した水痘再感染による水痘肺炎及び水痘-帯状疱疹ウイルス髄膜炎の 1 例。感染症学会雑誌 2012, 86(3):306-309

学会発表

1. Takahashi Y, Haga S, Ishizaka Y, **Mimori A**: Prevalence of inhibitory or non-inhibitory autoantibodies to angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in patients with systemic lupus erythematosus. The 80th American College of Rheumatology, Annual Scientific Meeting, Washington DC, Nov, 2012
2. Haga S, Takahashi Y, Ishizaka Y, **Mimori A**: The small molecule activator to ACE2 prevents the inhibition of ACE2 activity by autoantibodies. The 80th American College of Rheumatology, Annual Scientific Meeting, Washington DC, Nov, 2012
3. Yamashita H, Takahashi Y, Kaneko H, Kubota K, Kano T, **Mimori A**: Differential FDG-PET/CT findings for spondylarthropathies, PMR, and RA. European League of Rheumatoid Arthritis, Annual Scientific Meeting, Berlin, May, 2012

H.知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

全身性エリテマトーデスにおける MAIT 細胞の解析に関する研究

研究分担者 三宅 幸子 (独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部 室長
研究協力者 千葉 幸子 (独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部 研究員

研究要旨

新規 Natural Killer T (NKT)細胞集団である Mucosal Associated Invariant T (MAIT)細胞の全身性エリテマトーデス (SLE) における役割を検討した。健常人においては、抗 V α 7.2 抗体陽性の MAIT 細胞は末梢血の $\alpha\beta$ T 細胞の数%~10%を占めるが、SLE 患者末梢血においてはその頻度が 1%以下と著減していた。MAIT 細胞は、CD3+CD28 刺激では、通常の T 細胞や $\gamma\delta$ T 細胞よりも増殖能が低かったが、IL-15 もしくは IL-12, IL-18 存在下では T 細胞受容体の刺激を介さずに増殖することが可能であった。SLE 患者においては、CD3+CD28 刺激による増殖反応に健常人との差はなかったが、IL-15 刺激による増殖反応は低下していた。SLE 患者 MAIT 細胞では、Fas、活性型カスパー 3 の発現が高く、また 7AAD 陽性細胞も増加しており、末梢血における減少の原因は細胞死の亢進と考えられた。

A. 研究目的

Mucosal associated invariant T (MAIT)細胞は、MR1 分子に拘束され T 細胞受容体にインバрианトな α 鎖 (マウス V α 19 J α 33、ヒト V α 7.2 J α 33) を発現する T 細胞である。我々は MAIT 細胞を欠損する MR1^{-/-}マウスを用い、コラーゲン関節炎ならびに抗体誘導関節炎が軽症化する一方、実験的自己免疫性脳脊髄炎は悪化することを報告し、MAIT 細胞は自己免疫病態の増悪にも抑制にも関与する可能性を示してきた。本研究では、MAIT における MAIT 細胞の動態を明らかにし、病態における関連を明らかにする。

B. 研究方法

健常人ならびに SLE 患者末梢血の MAIT 細胞の頻度を抗 V α 7.2 抗体にて染色後に Flowcytometer を用いて解析した。また、Cell sorter を用いて、末梢血の抗 V α 7.2 抗体陽性細胞の cell sorting を行い、増殖能、細胞死、発現遺伝子の解析を行った。

(倫理面への配慮)

対象より血液サンプル採取は、文書を用いて説明し、同意を得た上で行った。

C. 研究結果

健常人においては、抗 V α 7.2 抗体陽性の MAIT 細胞は末梢血の $\alpha\beta$ T 細胞の数%~10%を占めるが、

SLE 患者末梢血においてはその頻度が 1%以下と著減していた。MAIT 細胞は、CD3+CD28 刺激では、通常の T 細胞や $\gamma\delta$ T 細胞よりも増殖能が低かった。しかし、IL-15 もしくは IL-12, IL-18 存在下では T 細胞受容体の刺激を介さずに増殖することが可能であった。SLE 患者においては、CD3+CD28 刺激による増殖反応に健常人との差はなかったが、IL-15 刺激による増殖反応は低下していた。SLE 患者 MAIT 細胞では、Fas、活性型カスパー 3 の発現が高く、また 7AAD 陽性細胞も増加しており、細胞死が亢進していた。

D. 考察

MAIT 細胞は、健常人末梢血の $\alpha\beta$ T 細胞の数%~10%を占める大きな細胞集団であるが、SLE では 1%以下と著減していた。他の自己免疫疾患と比較すると、関節リウマチや多発性硬化症では軽度低下にとどまり、SLE のみ著明に減少していたことから、SLE 病態を考える上で重要な細胞と考えられた。また、SLE において MAIT 細胞は、細胞死が亢進しており、末梢血における減少の原因と考えられた。MAIT の細胞死の原因として、恒常的活性化が疑われたが、それが血清中のサイトカイン増加と関連があるかどうか現在検討中である。いずれにしても、SLE においては疾患活動性が低い時期においても MAIT 細胞など常に刺激されている

という特殊な病態があることが推定された。また最近 MAIT 細胞は、腸内細菌の代謝産物を抗原として認識するという報告がなされたことから、今後は抗原特異的の反応や腸内細菌との関連も重要な研究課題である。

E. 結論

SLE 患者末梢血において MAIT 細胞は著明に減少しており、その原因は細胞死の亢進であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Chiba A, Tajima R, Tomi C, Miyazaki Y, Yamamura T, Miyake S: Mucosal-associated invariant T cells promote inflammation and exacerbate disease in murine models of arthritis. **Arthritis Rheum** 64:153-61, 2012

2) Chiba A, Mizuno M, Tomi C, Tajima R, Alloza I, di Penta A, Yamamura T, Koen Vandebroek, Miyake S: A 4-trifluoromethyl analogue of celecoxib inhibits arthritis by suppressing innate immune cell activation. **Arthritis Res Ther** 14:R9, 2012

3) Toba T, Murata K, Futamura J, Nakanishi K, Takahashi B, Takemoto N, Tomino M, Nakatsuka T, Imajo S, Goto M, Yamamura T, Miyake S, Annoura H. Synthesis and biological evaluation of truncated a-galactosylceramide derivatives focusing on cytokine induction profile. **Bioorg Med Chem** 20:2850-2859, 2012

4) Araki M, Aranami T, Matsuo T, Nakamura M, Miyake S, Yamamura T. Clinical improvement in a patient with neuromyelitis optica following therapy with the anti-IL-6 receptor monoclonal antibody tocilizumab. **Mod Rheum Epub ahead**.

5) Sato W, Tomita A, Ichikawa D, Lin Y, Kishida H, Miyake S, Ogawa M, Okamoto T, Murata M, Kuroiwa Y, Aranami T, Yamamura T. CCR2+CCR5+ T cells producing matrix metalloproteinase-9 and osteopontin in the pathogenesis of multiple sclerosis. **J Immunol** 189:5057-5065, 2012

2. 学会発表

1) Miyake S. Innate lymphocytes in autoimmune diseases. 8th International Congress on Autoimmunity, Granada, Spain, 10 May, 2012

2) Miyake S. MAIT cells in autoimmune diseases. FOCIS (Federation of Clinical Immunology Societies) 12th Annual Meeting, Vancouver, Canada, 20 June, 2012

3) Miyake S. Regulation of autoimmune responses in multiple sclerosis. Joint Symposium MPI of Psychiatry and NCNP (Japan), Munich, Germany, 4 October, 2012

4) Chiba A, Tamura N, Matsudaira R, Yamamura T, Takasaki Y, Miyake S: Mucosal associated invariant T cells are inactivated by IFN α and reduced in systemic lupus erythematosus. American College of Rheumatology 75th Annual Scientific Meeting, Washington DC, November 13, 2012

5) 三宅幸子: 自然リンパ球と自己免疫. 第 56 回日本リウマチ学会, 東京、4 月 27 日、2012

6) 三宅幸子: MAIT 細胞と自己免疫. 第 40 回日本臨床免疫学会シンポジウム, 東京、9 月 27 日、2012

7) 三宅幸子: 自己免疫と腸管免疫・腸内免疫. 第 27 回日本臨床リウマチ学会シンポジウム, 神戸、11 月 24 日、2012

8) Chiba A, Naoto T, Hayashi E, Matsudaira R, Toyama S, Takasaki Y, Miyake S: Mucosal associated invariant T cells in patients with autoimmune diseases. 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会、東京、4.26, 2012

9) 中村雅一、松岡貴子、山口広美、三宅幸子、荒木学、岡本智子、林幼偉、小川雅文、村田美穂、荒浪利昌、山村隆: 多発性硬化症における Fingolimod 投与の末梢血 B 細胞サブセットへの影響. 第 24 回日本神経免疫学会、長野、9.20, 2012

10) 荒木学、荒浪利昌、松岡貴子、中村雅一、三宅幸子、岡本智子、村田美穂、山村隆: Tocilizumab