

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

複合遺伝性疾患であり、その疾患表現型が複合的である自己免疫疾患の代表である全身性エリテマトーデスを主な対象とし、その臨床像の疫学研究を臨床調査個人票に基づいて行うとともに、遺伝因子情報を含めた多様な情報を用いた診断・治療法選択・予後予測のためのベイズ理論的情報集約手法の構築に向けた理論的考察を実施した。

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個別化医療のための統計学的手法の開発を目的とする。

B. 研究方法

今年度は、昨年度にほぼ終了した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・検定を論文にまとめ投稿した。

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をさらに発展させるべく決定理論を取り入れ、その課題を検討した。多彩なデータ型を持つ情報を統合して活用するためには、データ型に依存しない尺度の取り入れが重要であり、そのために情報エントロピーを活用し、データ型に依存した推定手法・検定手法をデータ型非依存的に取り扱うための理論的考察を進めた。また、情報量の増大に伴って、少標本数の情報に基づく判断・決断に関する決定理論的情報活用を臨床展開するための知見の整理と課題を調査し、その予備的手法の考案を行った。

（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 臨床調査個人票の疫学解析

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投

稿中である。

(2) 多因子空間分布からの尤度比算出とその決定理論的活用について

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、その因子の情報をを用いて、個人を多次元空間に配置することができる。これを用いて疾病であるかの判断を尤度によって判断する方法を昨年度までに考案したが、本年は、さらに、これを発展させ、統計的有意差が得られない少標本サイズの状況における臨床判断を支援する手法へと応用するための理論的研究を進めた。具体的には、ある疾患に複数の治療法などの選択肢があり、その選択肢の良悪が患者個人に関する個別化情報によって異なる可能性がある場合に、どのように判断すればよいのかに関するベイズ理論的アプローチの可能性について検討した。この検討により、いわゆる大規模治験などによって確度の高いエビデンスが得られない患者（治験クライテリアからわずかにずれる患者や、特殊病態を含む患者など）に対する臨床判断を支援できる可能性が示唆された。

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。また、SLE をはじめとする病態多様性が大きい疾患を例に、個別化医療の枠組みでの臨床判断を支援するベイズ理論的手法のアイデアが有効である可能性を見出した。この成果は、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

本臨床調査個人票を用いて、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、

従来の大規模エビデンスを用いた判断に加えて、小規模データからも有用な判断材料を引き出せる可能性を示唆し、医療分野での情報ビッグバンの動きとも連携の可能性が見出された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Narahara M, Tamaki K, Yamada R. Application of permanents of square matrices for DNA identification in multiple-fatality cases. *BMC Genet* 14 72 (2013)

Hamaguchi Y, Fujimoto M, Matsushita T, Kaji K, Komura K, Hasegawa M, Kodera M, Muroi E, Fujikawa K, Seishima M, Yamada H, Yamada R, Sato S, Takehara K, Kuwana M. Common and Distinct Clinical Features in Adult Patients with Anti-Aminoacyl-tRNA Synthetase Antibodies: Heterogeneity within the Syndrome. *PLoS One* 8(4) e60442 (2013)

Shimane K, Kochi Y, Suzuki A, Okada Y, Ishii T, Horita T, Saito K, Okamoto A, Nishimoto N, Myouzen K, Kubo M, Hirakata M, Sumida T, Takasaki Y, Yamada R, Nakamura Y, Kamatani N, Yamamoto K. An association analysis of HLA-DRB1 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in a Japanese population: effects of *09:01 allele on disease phenotypes. *Rheumatology(Oxford)* 52(7) 1172-1178 (2013)

Terao C, Yoshifuji H, Kimura A, Matsumura T, Ohmura K, Takahashi M, Shimizu M, Kawaguchi T, Chen Z, Naruse TK, Sato-Otsubo A, Ebana Y, Maejima Y, Kinoshita H, Murakami K, Kawabata D, Wada Y, Narita I, Tazaki J, Kawaguchi Y, Yamanaka H, Yurugi K, Miura Y, Maekawa T, Ogawa S, Komuro I, Nagai R, Yamada R, Tabara Y, Isobe M, Mimori T, Matsuda F. Two susceptibility loci to Takayasu arteritis reveal a synergistic role of the IL12B and HLA-B regions in a Japanese population. *Am J Hum Genet* 93(2) 289-297 (2013)

2. 学会発表

Narahara M, Matsuda F, Yamada R, et al. Establishing an eQTL map of the Japanese population. American Society of Human Genetic Annual Meeting Oct 22-26, 2013 Boston (USA)

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

全身性エリテマトーデスにおける尿中ポドサイトマーカーに関する研究

研究分担者 三村 俊英 埼玉医科大学リウマチ膠原病科 教授
研究協力者 梶山 浩 埼玉医科大学リウマチ膠原病科 助教

研究要旨

ポドサイト(P)は腎糸球体臓側上皮細胞で、高分子蛋白の漏出を防ぐ分子篩として働く。P 障害は、重度の蛋白尿や非可逆的腎機能低下の原因となる。P 障害を SLE で評価する為、尿中 P マーカーの尿中ポドサイト数(U-Pod)と尿中ポドカリキシン濃度(U-PCX)を測定。その結果 ISN/RPS 分類 IV 型で U-Pod が、V 型で U-PCX が高値となり、組織型を予測できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

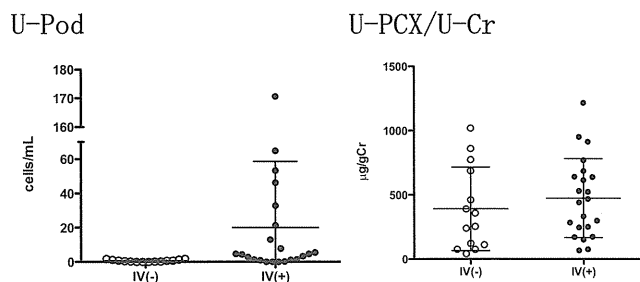
ポドサイト(P)は腎糸球体臓側上皮細胞で、高分子蛋白の漏出を防ぐ分子篩として働く。細胞死や尿中への脱落によるポドサイト数の減少は、重度の蛋白尿、非可逆的腎機能低下の原因となる。ポドカリキシン(PCX)はポドサイトマーカーの一つで、尿中 PCX 関連バイオマーカーの尿中 PCX 陽性細胞数と尿中 PCX 値は、IgA 腎症や糖尿病性腎症の糸球体病変と関連があると報告されている。本研究では、全身性エリテマトーデス(SLE)における尿中 PCX 関連バイオマーカーの意義を明らかにする。

(-)症例に比べ U-Pod は有為に高値(IV(+) 20.0 ± 38.6 cells/mL vs IV(-) 0.7 ± 0.6 cells/mL $P=0.0025$) (図 1)。一方、V 型病変(+)症例にて、V 型病変(-)症例に比べ、U-PCX/Cr は高い傾向(V(+) 549.1 ± 344.5 cells/mL vs V(-) 347.8 ± 274.0 cells/mL, $P=0.058$) (図 2)。ROC curve 解析では、U-Pod cutoff >0.9 cells/mL で、sensitivity 81.0%, specificity 71.4% で pure IV 型を予測($P=0.004$) (図 3、表 1)、U-Pod cutoff <1.25 cells/mL かつ U-PCX cutoff >686.0 $\mu\text{g/gCr}$ で、sensitivity 60.0%, specificity 96.7% で pure V 型を予測した($P<0.001$)。

B. 研究方法

関節蛍光抗体法で、尿沈渣中の尿中 PCX 陽性細胞(U-Pod)をカウント。尿中 PCX は sandwich ELISA 法にて測定し、得られた値を ELISA で決定した尿中 Cr 濃度で補正した(U-PCX/UCr)。1997 年の分類基準で 2009 年 10 月から 2013 年 3 月までに SLE と診断された患者 83 人を登録。尿タンパククレアチニン比(PCR)が 0.2 以上でかつ/または概算 GFR が $60 \text{ mL/min./1.73m}^2$ 未満を KD(+), それ以外を KD(-)とした。

図 1
IV 型病変の有無



C. 研究結果

SLE では KD(+)群は、男性 5 名、女性 56 名、平均年齢 $\pm\text{SD} = 38.0 \pm 13.5$ 。KD(-)群は、男性 3 名、女性 19 名、平均年齢 $\pm\text{SD} = 40.3 \pm 18.2$ 。83 人のうち 36 人が腎生検でループス腎炎を診断。内訳は ISN/RPS 分類にて、class II 1 名、class III 4 名、class IV 15 名、class III+V 5 名、class IV+V 6 名、class V 5 名。U-Pod、U-PCX/Cr は、KD(-)よりも KD(+)で有意に高値であった (U-Pod KD(+) $:7.9 \pm 24.9$ cells/mL vs KD(-) $:0.2 \pm 0.6$ cells/mL, $P<0.0001$, U-PCX/Cr KD(+) $:362.2 \pm 298.8$ $\mu\text{g/gCr}$ vs KD(-) $:128.9 \pm 113.5$ $\mu\text{g/gCr}$, $P=0.0012$)。IV 型病変(+)症例にて IV 型病変

図 2
V 型病変の有無

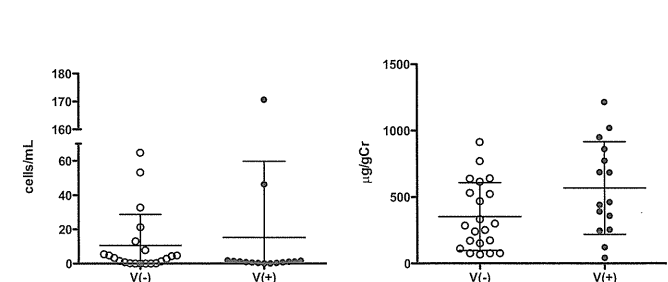
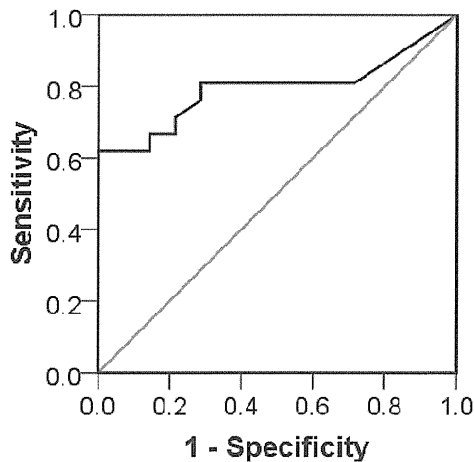


図3 IV型 ROC curve 解析



AUC (95% CI) of U-Pod;
0.794 (0.642-0.947) , p = 0.004

cutoff of U-Pod; 0.90 cells/ml
Sensitivity; 81.0%
Specificity; 71.4%
(If higher, seems to be LN IV)

表1
V型 ROC curve 解析で得た

Cut off	Values
Cut off of U Pod	1.25 cells/ml
Cut off of U Pod	686.0 μ g/gCr

上記 cut off 値を用いて χ 二乗テストで判定すると

Sensitivity;	60.0%
Specificity;	96.7% P=0.00059

D. 考察

SLE の腎障害において、U-Pod は増殖性活動性病変との関連、U-PCX/Cr は膜性病変との関連が示唆された。U-Pod の値は糸球体硬化や慢性組織変化との関連も報告されており、U-Pod の経時的採取による積算値が、ループス腎炎(LN)の腎機能予後と関連する可能性がある。現在、longitudinal study が進行中であり、U-Pod 積算値と LN 腎機能予後の関連の検討、より詳細な U-PCX/Cr の意義の検討を行う。In vitro study, animal study により U-Pod、U-PCX/Cr 上昇機序の検討も予定している。

E. 結論

SLE の腎障害では U-Pod, U-PCX/Cr は高値を示し、両者を用いて、ループス腎炎の組織型を予測できる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wada TT, Araki Y, Sato K, Aizaki Y, Yokota K, Kim YT, Oda H, Kurokawa R, Mimura T. Aberrant histone acetylation contributes to elevated interleukin-6 production in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *BBRC*. In press.
- 2) Yokota K, Sato K, Miyazaki T, Kitaura H, Kayama H, Miyoshi F, Araki Y, Akiyama Y, Mimura T. Combination of tumor necrosis factor α and interleukin 6 induces osteoclast-like cells with Bone-resorption activity both in vitro and in vivo. *Arthritis Rheumatol*. 66(1):121-9, 2014.
- 3) Shimada Y, Asanuma YF, Yokota K, Yoshida Y, Kajiyama H, Sato K, Akiyama Y, Mimura T. Pentraxin 3 is associated with disease activity but not atherosclerosis in patients with Systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol*. 24(1):78-85, 2014
- 4) Asanuma YF, Shimada Y, Kouzu N, Yokota K, Nakajima K, Sato K, Akiyama Y, Isozaki M, Mikami AS, Kobayashi H, Mimura T. Serum osteoprotegerin concentration is associated with carotid atherosclerotic plaque in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*. 23(2):269-75. 2013
- 5) Zhou H, Kajiyama H, Tsuji T, Hu X, Leelahavanichkul A, Vento S, Frank R, Kopp JB, Trachtman H, Star RA, Yuen PS Urinary exosomal Wilms' tumor-1 as a potential biomarker for podocyte injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013 Aug 15;305(4):F553-9.

2. 学会発表

- 1) Yu F, Asanuma, Takashi Maruyama, Maiko Yanagisawa, Kazuhiro Yokota, Yoshihiro Yoshida, Hiroshi Kajiyama, Kojiro Sato, Yuji Akiyama and Toshihide Mimura, "Evaluation Of Disease Activity By The Routine Assessment Of Patient Index Data 3 In Patients With Rheumatoid Arthritis Receiving Tocilizumab" 2013 ACR/ARHP Annual Meeting, October 27, 2013 (San Diego, USA)
- 2) Hiroshi Kajiyama, Keiju Hiromura, Daisuke Ikuma, Hidekazu Ikeuchi, Hiroyuki Kurosawa, Yoshiaki Hirayama, Fumio Gondaira, Masanori Hara, Yoshihisa Nojima and Toshihide Mimura, "Role Of Urinary Podocyte Number and Urinary Podocalyxin Level As Biomarkers Of Glomerulonephritis In

- Systemic Lupus Erythematosus and ANCA-Associated Vasculitis" 2013 ACR/ARHP Annual Meeting, October 27, 2013 (San Diego, USA)
- 3) .Fumihiko Miyoshi, Kyoko Honne, Seiji Minota, Masato Okada, Noriyoshi Ogawa and Toshihide Mimura, "A Novel Method Predicting Good Response Using Only Background Clinical Data In RA Patients Treated With Infliximab" 2013 ACR/ARHP Annual Meeting, October 28, 2013 (San Diego, USA)
 - 4) Takuma Tsuzuki Wada, Yasuto Araki, Kazuhiro Yokota, Fumihiko Miyoshi, Kojiro Sato and Toshihide Mimura, "Histone Modifications In The Interleukin-6 Gene Promoter Region Of Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts" 2013 ACR/ARHP Annual Meeting, October 28, 2013 (San Diego, USA)
 - 5) Hiroshi Kajiyama, Daisuke Ikuma, Muneo Ota, Yuki Shimada, Kazuhiro Yokota, Yasuto Araki, Kojiro Sato, Yu F. Asanuma, Yuji Akiyama and Toshihide Mimura, "Maintenance Therapy With Tacrolimus and Mizoribine Pulse In SLE" 2013 ACR/ARHP Annual Meeting, October 28, 2013 (San Diego, USA)
 - 6) Yasuto Araki, Takuma Tsuzuki Wada, Kojiro Sato, Kazuhiro Yokota, Fumihiko Miyoshi, Yu F. Asanuma, Yuji Akiyama and Toshihide Mimura, "Altered Histone Methylation Is Associated With IL-6 Dependent Matrix Metalloproteinases Gene Transcriptional Activation In Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts" 2013 ACR/ARHP Annual Meeting, October 29, 2013 (San Diego, USA)
 - 7) Kazuhiro Yokota, Kojiro Sato and Toshihide Mimura, "Combination Of TNF and IL-6 Induces Osteoclast-Like Cells With Bone-Resorption Activity Both In Vitro and In Vivo" 2013 ACR/ARHP Annual Meeting, October 29, 2013 (San Diego, USA)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特に無し

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

細胞特異的 FcγRIIB 欠損マウスを用いたループス腎炎発症機序の解析

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 は B 細胞、樹状細胞、およびマクロファージ/単球/好中球/マスト細胞などの myeloid 系細胞など種々の細胞に発現し、細胞の機能を負に制御している。自己免疫促進遺伝子 *Yaa* を導入した C57BL/6 マウスでは自己免疫疾患は発症しないが、FcγRIIB 欠損を導入すると高度のループス腎炎が発症する。本研究では、ループス腎炎発症に関わる FcγRIIB 発現欠損効果を、細胞特異的に解析する目的で、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、myeloid 系細胞で FcγRIIB 発現を欠損するマウス系を作製した。各マウス系に *Yaa* 遺伝子を導入してループス腎炎の程度を比較解析した結果、自己抗体産生には、B 細胞上での FcγRIIB 発現欠損が必須であるが、高度のループス腎炎発症には、B 細胞以外の細胞上での FcγRIIB 発現欠損が必要であり、その候補として単球上の FcγRIIB 発現欠損が関与する可能性を得た。

A. 研究目的

ループス腎炎自然発症系マウスには共通して、抑制性 IgG Fc 受容体 FcγRIIB をコードする *Fcgr2b* 遺伝子プロモーター領域に AP-4 結合領域の塩基欠損を伴う多型が認められる。我々は以前に、この多型により活性化 B 細胞上の FcγRIIB 分子の発現が低下し、自己抗体産生を誘導することを見出した。本研究では、ループス腎炎の発症における FcγRIIB 分子の役割を細胞レベルで解析するために、細胞特異的に FcγRIIB 発現を欠損するマウス系を樹立して、その役割を細胞・分子レベルで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、全ての細胞で FcγRIIB 発現を欠損するマウス系 B6.FcγRIIB^{Null}、B 細胞のみで欠損するマウス系 B6.CD19^{Cre}FcγRIIB^{Flox}、樹状細胞のみで欠損するマウス系 B6.CD11c^{Cre}FcγRIIB^{Flox}、myeloid 系細胞で FcγRIIB 発現を欠損するマウス系 B6.C/EBPα^{Cre}FcγRIIB^{Flox} を作製した。さらにこれら 4 系統のマウス系を B6.*Yaa* マウスと交配して *Yaa* 変異遺伝子を導入した。これらのマウス系の病態を経時的に観察した。

(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

B6.FcγRIIB^{Null}.*Yaa* マウスおよび B6.CD19^{Cre}FcγRIIB^{Flox}.*Yaa* マウスには同程度の高力価の血中抗 ds DNA 抗体価が見られたが、B6.CD11c^{Cre}FcγRIIB^{Flox}.*Yaa* マウスでは、自己抗体産生は見られなかった。B6.C/EBPα^{Cre}FcγRIIB^{Flox}.*Yaa* は現在解析中である。

2) 蛋白尿の出現率

B6.FcγRIIB^{Null}.*Yaa* マウス(●)、B6.CD19^{Cre}FcγRIIB^{Flox}.*Yaa* マウス(△)、B6.CD11c^{Cre}FcγRIIB^{Flox}.*Yaa* マウス(◇)、B6.C/EBPα^{Cre}FcγRIIB^{Flox}.*Yaa* マウス(○)6ヶ月齢まで観察)の累積蛋白尿出現率を図1に示した。B6.CD19^{Cre}FcγRIIB^{Flox}.*Yaa* マウスでは、B6.

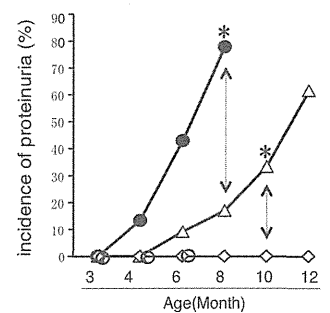


図1 蛋白尿の出現率の比較

* P < 0.01

FcγRIIB^{Null}. *Yaa* マウスと同程度の自己抗体産生が認められたにも関わらず、蛋白尿出現率は有為に抑制された。B6.CD11c^{Cre}FcγRIIB^{Flox}. *Yaa* および B6.C/EBPα^{Cre}FcγRIIB^{Flox}. *Yaa* マウスには蛋白尿の出現は認められない。

3) ループス腎炎像と腎組織による MCP-1 産生能

図 2 A に三系統のマウスの 8 ヶ月齢における腎糸球体病変の組織学的スコアを比較して示した。B6.FcγRIIB^{Null}. *Yaa* マウスでは高度のループス腎炎像が認められたが、B6.CD19^{Cre}FcγRIIB^{Flox}. *Yaa* マウスでは、腎炎の程度は高度の抑制されていた。図 2 B には同じく 8 ヶ月齢における腎組織の mRNA を用いた real time PCR による MCP-1 発現の程度を比較して示した。正常 B6 マウスの値を 1 とし、相対的な倍率で発現量を比較した。B6.FcγRIIB^{Null}. *Yaa* マウスでは高度の MCP-1 発現が見られたが、B6.CD19^{Cre}FcγRIIB^{Flox}. *Yaa* および B6.CD11c^{Cre}FcγRIIB^{Flox}. *Yaa* マウスでは B6 マウスと同程度であり、MCP-1 発現の亢進は見られなかった。

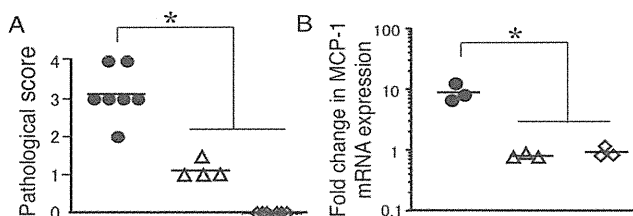


図 2 ループス腎炎の病理像のスコア(A)と腎組織における MCP-1 発現程度(B)の 8 ヶ月齢における比較。* $P < 0.01$

4) 末梢血中の単球比率の解析

図 3 に 8 ヶ月齢における末梢血中の CD11b 陽性単球比率を Gr1 陽性と Gr1 陰性の subset に分けて比較して示した。Gr1 陰性単球は、Gr1 陽性単球に比較して、活性化 FcγRIV 分子を高度に発現し、より活性化状態にあると考えられている。図からも明らかなように、B6.FcγRIIB^{Null}. *Yaa* マウスでは Gr1 陰性 subset 比率の増加が見られたが、B6.CD19^{Cre}FcγRIIB^{Flox}. *Yaa* および B6.CD11c^{Cre}FcγRIIB^{Flox}. *Yaa* マウスでは増加は見られなかった。

D. 考察

上記の結果から、B 細胞上での FcγRIIB 発現欠損は、自己抗体産生や腎糸球体への免疫複合体の沈着をきたすが、腎不全を伴う高度のループス腎

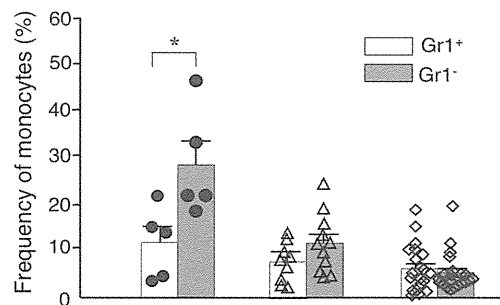


図 3 末梢血単球の Gr1 陽性、Gr1 陰性 subset の比率の比較。
* $P < 0.01$

炎の発症には、B 細胞以外での FcγRIIB 発現欠損が必要であることが明らかとなった。ループス腎炎の発症は、メザンギウムによる MCP-1 の産生および末梢血の CD11b⁺Gr1⁺FcγRIV⁺の形質を示す活性化単球 subset の増加と関連していた。MCP-1 の産生にはメザンギウム上での FcγRIIB 発現欠損が、単球の活性化には、単球上の FcγRIIB 発現欠損が関与すると考えられる。今後、B6.CD19^{Cre}C/EBPα^{Cre}FcγRIIB^{Flox}. *Yaa* マウスの作製とその病態解析を行い、B6.CD19^{Cre}FcγRIIB^{Flox}. *Yaa* あるいは B6.FcγRIIB^{Null}. *Yaa* マウスの病態と比較することで、メザンギウム上あるいは単球上の FcγRIIB 発現の関与を明らかにしたい。

E. 結論

腎糸球体への IgG 免疫複合体の沈着のみでは、腎不全を伴うループス腎炎の発症には至らない。メザンギウム細胞によるケモカイン産生と活性化型の末梢単球の炎症局所への浸潤がループス腎炎の進展に大きく寄与しており、この過程はメザンギウム細胞および単球上の FcγRIIB 分子の発現によって抑制されていると考えられる。これらの細胞・分子をターゲットとしたループス腎炎抑制療法の可能性が示唆される。

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.* 43:770-778, 2013.

Xu M, Hou R, Sato-Hayashizaki A, Man R, Zhu C, Wakabayashi C, Hirose S, Adachi T and Tsubata T. *Cd72^c* is a modifier gene that regulates *Fas^{lpr}*-induced autoimmune disease. *J. Immunol.* 190:5436-5445, 2013.

2. 学会発表

Qingshun Lin, Hirofumi Amano, Hiroyuki Nishimura, Keiko Nishikawa, Sachiko Hirose. Clarification of the role of FcγRIIB for autoimmune disease using the cell-specific FcγRIIB conditional knockout mice. 第57回 日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 372 頁 2013年4月18日-20日 京都

Toshiyuki Kaneko, Hirofumi Amano, Mareki Ohtsuji, Keiko Nishikawa, Shinya Kawano, Naomi Ohtsuji, Qingshun Lin, Hideki Okazaki, Hiromichi Tsurui, Hiroyuki Nishimura, Toshikazu Shirai, Yoshinori Takasaki, and Sachiko Hirose. A novel locus of B6 mice on chromosome 12 plays a role in common process shared by SLE, RA, and Sjögren syndrome. EAGOR 韓国ソウル 2013年5月31日-6月1日

Sachiko Hirose, Shinya Kawano, Qingshun Lin, Hirofumi Amano, Toshiyuki Kaneko, Keiko Nishikawa, Hiromichi Tsurui, Hiroyuki Nishimura, Toshikazu Shirai. Phenotype conversion from rheumatoid arthritis to systemic lupus erythematosus by introduction of *Yaa* mutation into FcγRIIB-deficient C57BL/6 mice. International Congress of Immunology, August 22-27, 2013, Milan, Italy

OBATA Masaomi, OHTSUJI Mareki, SHIRAI Toshikazu, HIROSE Sachiko, NISHIMURA Hiroyuki. Peripheral tolerance of antigen-specific Th cells induced with polyethylene glycol-conjugate of protein antigen. 第42回 日本免疫学会総会・学術集会記録 42 巻 42 頁 2013年12月11日-13日 幕張

LIN Qingshun, NISHIKAWA Keiko, TSURUI Hiromichi, OKAZAKI Hideki, OHTSUJI Mareki, NISHIMURA Hiroyuki, AMANO Hirofumi, SHIRAI Toshikazu, HIROSE Sachiko. B cell specific deficiency of FcγRIIB results in high levels of autoantibodies without severe lupus nephritis in C57BL/6.*Yaa* mice. 第42回 日本免疫学会総会・学術集会記録 42 巻 100 頁 2013年12月11日-13日 幕張

XU Miduo, HIROSE Sachiko, ADACHI Takahiro, TSUBATA Takeshi. *Cd72^c* is a modifier gene that regulates *FAS^{lpr}*-induced autoimmune disease. 第42回 日本免疫学会総会・学術集会記録 42 巻 159 頁 2013年12月11日-13日 幕張

TSURUI Hiromichi, HIROSE Sachiko. Thorough characterization of TCR-pMHC binding free energy estimated by string model and Miyazawa-Jernigan matrix (III). 第42回 日本免疫学会総会・学術集会記録 42 巻 91 頁 2013年12月11日-13日 幕張

OKAZAKI Hideki, LIN Qingshun, NISHIKAWA Keiko, TSURUI Hiromichi, OHTSUJI Mareki, NISHIMURA Hiroyuki, SHIRAI Toshikazu, HIROSE Sachiko. Blockade of TNFα, but not IL-17, ameliorates spontaneously occurring autoimmune arthritis in FcγRIIB-deficient mice. 第42回 日本免疫学会総会・学術集会記録 42 巻 100 頁 2013年12月11日-13日 幕張

H. 知的財産権の出願・登録状況

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 欠損マウスを用いた RA と SLE の特異性を決める
遺伝的要因の解析

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

【目的】Fc γ RIIB は B 細胞や単球系細胞で抑制性のシグナルを伝え、自己免疫疾患の発症に重要であることが知られている。我々は、この KO1 マウスに SLE の病態を促進させる NZW 系遺伝子を導入することによる病態の変化とその遺伝的要因を調べることを目的とした。【方法】(KO1xNZW)F1 マウスおよび(KO1xNZW)F2 マウスの病態を解析した。また、(KO1xNZW)F2 マウスを用いてループス腎炎および RA の発症に関わる原因遺伝子のマッピングを行った。【成績】(KO1xNZW)F1 マウスにおいて 6~8 ヶ月齢で関節炎の発症は認めず、ループス腎炎に類似した糸球体腎炎を発症した。血清中抗 CCP 抗体、抗 ds-DNA 抗体は、B6、KO1 マウスと比較して有意に上昇していた。(KO1xNZW)F2 マウスの解析では、ループス腎炎が約 33.7%、唾液腺炎が約 27.6%、RA 類似関節炎が 6.1%に認められ、これらの病態を重複して発症するマウスの存在も認められた。F2 マウスを用いた QTL マッピングでは、第 1、4、7、9、13、17 番染色体の領域にループス腎炎に関連した遺伝子群を認め、第 12 番染色体領域にループス腎炎、RA、唾液腺炎を合併する遺伝子がマップされた。【結論】第 1 染色体 Fc γ RIIB の欠損に加え、NZW 系遺伝子が加わることで RA 類似の病態は SLE 類似の病態へ変化した。

A. 研究目的

Fc γ RIIB は B 細胞や単球系細胞で抑制性のシグナルを伝え、自己免疫疾患の発症に重要であることが知られている。この Fc γ RIIB を欠損する C57/BL6(B6)マウス(KO1 マウス)は、関節リウマチ(RA)に類似した病態を発症する。我々はこの KO1 マウスに、それ自身のみでは SLE の病態を発症しないが、他の遺伝的背景の存在下で SLE の病態を発症させる NZW 系遺伝子を導入することによる病態の変化とその遺伝的要因を調べることを目的とした。

B. 研究方法

(KO1xNZW)F1 マウスおよび(KO1xNZW)F2 マウスの病態を解析した。また、(KO1xNZW)F2 マウスを用いてループス腎炎および RA の発症に関わる原因遺伝子のマッピングを行った。

(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

(KO1xNZW)F1 マウスにおいて 6~8 ヶ月齢で関節炎の発症は認めず、ループス腎炎に類似した糸球体腎炎を発症した。血清中抗 CCP 抗体、抗 ds-DNA 抗体は、どちらも B6、KO1 マウスと比較して有意に上昇していた。脾臓細胞を抗 CD3 抗体刺激後、サイトカインの産生について解析したところ、(KO1xNZW)F1 マウスでは、KO1 マウスと比較し IL-10 の上昇を認めた。(KO1xNZW)F2 マウスの解析では、ループス腎炎が約 33.7%、唾液腺炎が約 27.6%、RA 類似関節炎が 6.1%に認められ、これらの病態を重複して発症するマウスの存在も認められた。F2 マウスを用いた QTL マッピング解析では、第 1、4、7、9、13、17 番染色体の領域にループス腎炎に関連した遺伝子群を認め、第 12 番染色体領域にループス腎炎、RA、唾液腺炎を合併する遺伝子が同定された。

D. 考察

以前我々は、KO1 マウスに SLE の疾患促進遺伝子である Yaa 遺伝子を導入した、KO1Yaa マウスを解析したところ、濾胞ヘルパーT 細胞による IL-10 の発現亢進が KO1.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を示した。今回の結果からは、RA から SLE への表現型の変化には KO1.Yaa マウスと同様に脾臓細胞の IL-10 発現亢進が関与していると考えられた。また、F2 マウスの結果からは、ループス腎炎に関与する遺伝子、自己免疫疾患を重複する病態に関与する遺伝子が示された。

E. 結論

Fc γ RIIB の欠損に加え、NZW 系遺伝子が加わることで RA 類似の病態は SLE 類似の病態へ変化し、この表現型の変化には、複数の遺伝子群が関与することが示された。

F. 健康危険情報

今回の実験では、ウィルス、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*. 43:1-9,2013
- 2) Kaneko T, Amano H, Kawano S, Minowa-K, Ando S, Watanabe T, Nakano S, Suzuki J, Morimoto S, Tokano Y, Takasaki Y. Increased serum concentration of BAFF/APRIL and IgA2 subclass in patients with mixed connective tissue disease complicated by interstitial lung disease. *Mod Rheum*. In print 2013
- 3) 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
- 4) 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.

2. 学会発表

1. 天野 浩文, 金子 俊之, 河野 晋也, 林 青順, 西川 桂子, 鶴井 博理, 大辻 希樹, 西村 裕之, 広瀬 幸子, 高崎 芳成. Fc γ レセプターIIB 欠損マウスを用いた RA と SLE の特異性を決める遺伝的要因の解析. 第 41 回日本臨床免疫学会総会.2013.11.27-29.
2. 天野 浩文.SLE の新規治療 : BAFF 抗体、Syk inhibitor など. 日本リウマチ学会総会・学術集会.2013.4-18-20.
3. 天野 浩文.全身性エリテマトーデスにおける TLR の役割. 日本リウマチ学会総会・学術集会.2013.4-18-20.
4. 今 高之, 山路 健, 杉本郁, 小笠原 倫大, 建部 一夫, 天野 浩文, 津田 裕士, 橋本 博史, 高崎 芳成. 全身性エリテマトーデス男性患者剖検例 10 症例に関する検討~女性 70 例と比較して~. 日本リウマチ学会総会・学術集会.2013.4-18-20.
5. 鈴木 淳, 天野 浩文, 森本 真司, 高崎 芳成. アレルギー性肉芽腫性血管炎の実態調査. 日本リウマチ学会総会・学術集会.2013.4-18-20.
6. 安藤 誠一郎, 箕輪 健太郎, 松平 蘭, 天野 浩文, 森本 真司, 高崎 芳成.生物製剤治療を検討中の関節リウマチへプシジン-25 濃度の測定意義. 日本リウマチ学会総会・学術集会.2013.4-18-20.
7. Qingshun Lin, Keiko Nishikawa, Hiromichi Tsurui, Hideki Okazaki, Mareki Otsuji, Shinya Kawano, Naomi Ohtsuji, Hiroyuki Nishimura, Hirofumi Amano, Toshikazu Shirai, Sjef Verbeek, Sachiko Hirose. B cell specific deficiency of Fc γ RIIB results in high levels of autoantibodies without severe lupus nephritis in C57BL/6.Yaa mice. 第 42 回日本免疫学会学術集会.2012.12.11-13.
8. Shinya Kawano, Toshiyuki Kaneko, Aya Sato-Hayashizaki, Lin Qingshun, Hirofumi Amano, Sachiko Hirose, Yoshinari Takasaki. Phenotype conversion from rheumatoid arthritis to systemic lupus erythematosus by introduction of Yaa mutation into Fc γ RIIB-deficient C57BL/6 mice. 5th East Asian Group of Rheumatology. 2013.5.31.

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

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、膠原病科科長）
研究協力者 高橋裕子（膠原病科医員）、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（難治性疾患研究部長）

研究要旨

1) 成人発症 Still 病（当科 9 例＋関連施設の併診 1 例）の経過分析から、初期十分量ステロイド（prednisolone 1.5-2 mg/kg/day）、その後の迅速減量が可能かつ有効であること、tocilizumab 使用下にステロイド中止で寛解維持できる可能性が示唆された。我々は経験の集積とともに減量速度を速め、macrophage activation syndrome (MAS) を伴った近年の重症 3 例で、3 例とも迅速ステロイド減量が実現したので、一般的に成り立つ治療法と考えられた。
2) in vitro ACE2 による AngII→Ang(1-7)変換が、患者血清 IgG 添加によって抑制されることを、新たに HPLC 法で検量し、SLE-肺動脈性肺高血圧症・末端壊死と、ACE2 阻害自己抗体の存在が相関することを再確認した。

A.研究目的

- 1) 成人発症 Still 病（AOSD）の難治例に対する、tocilizumab (TCZ) 併用下の、ステロイド迅速減量法を検討する。
- 2) SLE を含む膠原病の、収縮性血管病態（PAH, 末端壊死）患者において、我々が同定した血清抗 ACE2（angiotensin converting enzyme 2）自己抗体の病原性を検討する。

B.研究方法

1) AOSD 治療経過の分析：昨年度の記載 8 例の経過追跡に加え、PSL 1mg/kg/day で抑制できずに当科を紹介受診した新規 1 例で、急性期と現在までの経過を、「大量ステロイド短期で寛解導入、その後の迅速減量の妥当性、および寛解維持」の観点から、分析した。さらに関連施設の新規 1 例を、考察の項に記す。
2) SLE-PAH/末端壊死の患者血清 IgG 分画（抗 ACE2 抗体含有）による、in vitro ACE2 抑制を検討した：今回は、昨年報告の合成基質 Mca-APK-Dnp による活性測定でなく、angiotensin II (Ang II) が、Ang 1-7 に変換される、生理的反応そのものを HPLC で解析する方法を試みた。
抗 ACE2 抗体の ELISA 測定系に用いる、組み替えヒト ACE2 の大量作成を意図して、カイコ発現系でヒト ACE2 を作成した。
(倫理面への配慮)
血清利用、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) **TCZ 治療した AOSD 10 人の内訳**：MAS 合併 5 人、PSL 1mg/kg/d で抑制できない炎症病態 1 人、軽快後の再燃反復に対する再治療 1 人。このうち 7 人の経過分析は、論文報告した（本項末尾、文献 6）。

TCZ 導入の時期：当科 9 人、関連施設併診 1 人（考察の項）で、CRP 陰性化と血清フェリチン値、肝機能、血小板数の確実な正常化傾向が、TCZ 開始およびステロイド迅速減量開始の目安と示唆された。
維持ステロイド量：当科 9 人中、転医 1 人を除く 8 人全てで再燃は認めず、TCZ 維持下 0.5～2.5 年までの現在 PSL 0mg/d; 3 例、1mg/d; 1 例、5mg/d 以下; 4 人。
ステロイド迅速減量について：我々は経験の集積とともに急性期ステロイド治療の減量速度を速め、3 人（当科 2、関連施設 1）で「初期大量後の迅速減量」を行なった：マクロファージ活性化 (MAS) 所見での発症例（図 1）、PSL 1mg/kg/d に抵抗例（図 2）で、CRP 陰性化後、TCZ 開始し、PSL 120mg または 80mg/d → 約 1 ヶ月で 20mg/d と減量して寛解した。
図 1 の例は、退院 1 年後に PSL 0mg/d、図 2 の例は退院 3 ヶ月後に PSL 5mg/d 隔日で、寛解維持している。

図 1

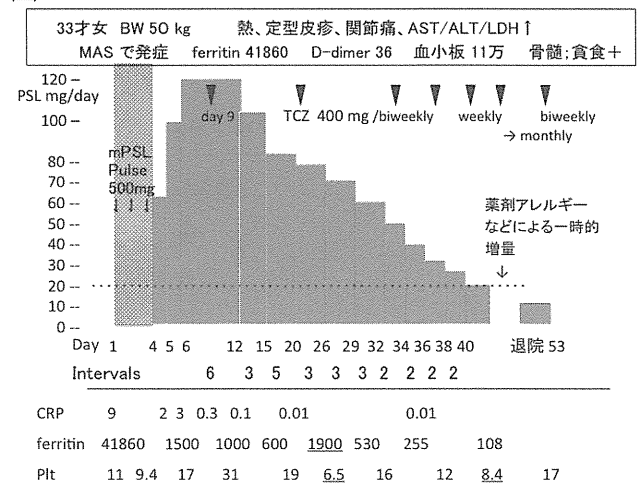
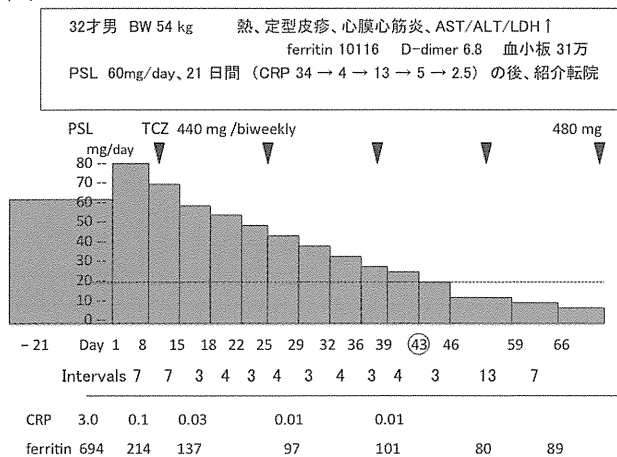
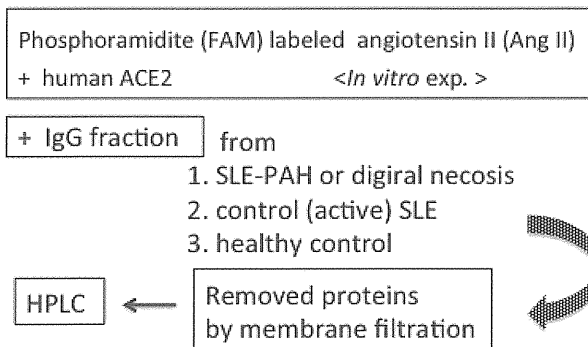


図 2

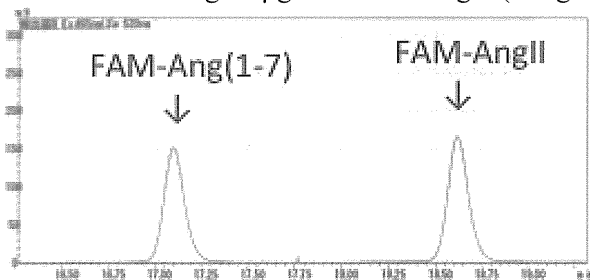


2-1) SLE-PAH/末端壊死の患者血清 IgG 分画(抗 ACE2 抗体含有)による、in vitro ACE2 抑制



昨年度報告の SLE 患者のうち、constrictive vasculopathy 5 人 (PAH 2、digital necrosis 既往 3)、および対照 SLE 22 人 (血管病変なし、SLE 活動性あり、かつ血清抗 ACE2 抗体-ELISA 高値) について、血清 IgG 分画による、in vitro ACE2 活性の抑制の有無を検討した。すなわち Ang II が、Ang (1-7) に変化する程度を、HPLC (high performance liquid chromatography) で定量した。

図 A FAM-AngII 1μg + hACE2 3 ng (no IgG)



FAM-AngII のみを HPLC にかけて、AngII のみ

のピークがみられ (図省略)、hACE2 との反応 60 分後には、Ang(1-7)のピークも生じる (図 A)。この系に血清 IgG 分画を共存させ、反応停止後、分子篩で蛋白 (IgG、ACE2) を除き、HPLC にかけた。2 種の代表パターンを示す (図 B、C)。

図 B FAM-AngII (1μg) + hACE2 (3 ng) + IgG (15μg) from a control (active) SLE Pt

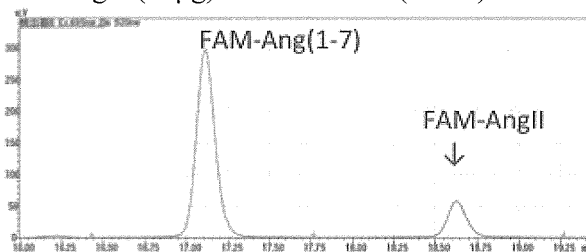


図 C FAM-AngII (1μg) + hACE2 (3 ng) + IgG (15μg) from a SLE-PAH Pt

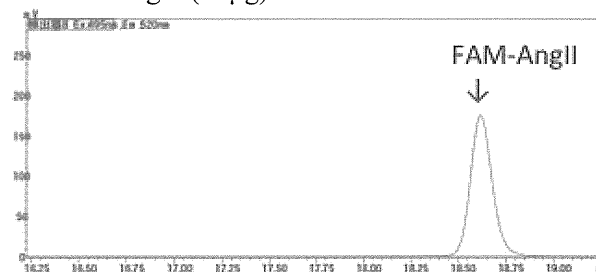


図 B は、in vitro ACE2 活性が、添加 IgG で抑制されないことを示す。(図 A に比べ) Ang(1-7)への変換が増強された。健康者 IgG による ACE2 活性の増強作用は、ACE2 (3ng) に対する添加 IgG の相対量に依存する傾向があり、健康 IgG 15μg で再現性よく増強され、1μg まで下げると増強されなくなった (図 A と類似パターンとなった)。増強作用は、合成基質を用いた ACE2 活性測定法でも同様にみられ、理由は未解明である。

図 C は、Ang(1-7) 生成が 0、すなわち in vitro ACE2 活性が、添加 IgG で完全に抑制されたことを示唆する。完全な抑制は、血管病変患者 IgG 15μg で再現性よくみられ、1μg まで下げるとみられなくなった (図 A と類似パターンとなった)。合成基質を用いた ACE2 活性測定の場合、(t 検定での有意な抑制は再現性よく得られても) 抑制幅は、施行毎に変動した。一方、Ang(1-7) の HPLC 定量では、完全な抑制が再現性よくみられた。

結果のまとめ：血清 IgG による、ACE2 活性阻害すなわち Ang(1-7)消失は、SLE-血管病変群 5/5 vs 対照 SLE 群 2/22 (p = 0.00026; Fisher's exact probability)にみられた。

2-2) カイコ発現系を用いた、human ACE2 を抗原とした ELISA 系の作製

我々の従来法 FreeStyle 系発現 human ACE2 を抗原とした ELISA で、抗 ACE2 抗体抗体を示した SLE 血清が、カイコ系 ACE2-ELISA で反応しなかった（呈示省略）。一方、市販抗 ACE2 抗体は強く反応した。

SLE 患者の抗 ACE2 自己抗体が、糖鎖修飾によって形成されたエピトープと反応している可能性があるが、詳細は未検討である。

D. 考察

1) Still 病には、ステロイド抵抗性とみなされる例が稀でないが、経験上、2mg/kg/d までの経口 PSL で CRP 0 が達成され、その後に、TCZ 併用下で PSL を迅速減量する試みを、我々は行なっている。経験とともに減量を速め、近年の重症 2 例で 2-5 日毎の減量が成功したので、Still 病一般に応用できる可能性がある。TCZ 開始と PSL 迅速減量開始の時期は、比較研究でなく、症例観察の集積によって標準化できると思われる。

関連施設・併診例の追記：国立国際医療研究センター一国府台病院の Still 病初発 31 才女性（主治医、吉川玲欧）は、MAS・汎血球減少を伴って発症し、mPSL パルス 1g, 3 日（2013 年 11/20 開始）で CRP が消失せず、lipo-dexamethasone 12.5 mg/d + cyclosporine 持続点滴 5 日で、CRP 0、血算正常化を達成した。PSL 70mg/d 経口から、2-3 日毎に 10 mg/d 減量し 12/19（治療開始から 30 日目）に PSL 20 mg/d、さらに減量して寛解退院、2014 年 2 月現在も再燃がない。本例では、TCZ による悪心が 3 回繰り返されて TCZ を断念し、ステロイド単独で寛解維持されている。したがって、「初期の十分量ステロイド」が、「その後の迅速減量」実現にとって重要であり、TCZ の意義は寛解導入において補助的、ないし維持期のステロイド中止の実現にとって本質的な可能性もある。

以上から、Still 病の寛解導入と維持のステロイド日程が、SLE などの膠原病と大きく異なり、少ないステロイド総量で治療できると示唆される。

2) SLE の収縮性血管病態（PAH または末端壊死）と強く相関する ACE2 阻害自己抗体の存在（我々の既報）は、AngII → Ang (1-7) の変換阻害という方法で、明瞭に同定できると考えられた。

E. 結論

1) 成人発症 Still 病の治療は、約 1 週間で CRP 0 を実現する十分量の初期ステロイド、その後の迅速減量が合理的と考えられ、tocilizumab 併用が有用と示唆された。

2) SLE の肺動脈性肺高血圧症、末端壊死は、ACE2 阻害自己抗体と相関すると示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsuchiya H, Haga S, Takahashi Y, Ishizaka Y, **Mimori A**: Identification of novel autoantibodies to GABA-B receptors in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* (in press)
2. Takahashi H, Yamashita H, Morooka M, Kubota K, Takahashi Y, Kaneko H, Kano T, **Mimori A**: The utility of FDG-PET/CT and other imaging techniques in the evaluation of IgG4-related disease. *Joint Bone Spine* (in press)
3. Yamashita H, Takahashi Y, Kaneko H, Kano T, **Mimori A**: A patient with diffuse cutaneous systemic sclerosis complicated by antineutrophil-cytoplasmic-antibody-associated vasculitis showing honeycomb lung without volume loss. *Int Med* (in press)
4. Yoshida Y, Takahashi Y, Yamashita H, Kano T, **Mimori A**: The incidence of methotrexate-related lymphoproliferative disorders in RA patients. *Mod Rheumatol* (in press)
5. Yamashita H, Takahashi H, Kubota K, Ueda T, Ozaki T, Yorifuji H, Bannai E, Minamimoto, R, Morooka M, Miyata Y, Okazaki M, Takahashi Y, Kaneko H, Kano T, **Mimori A**: Utility of fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography for early diagnosis and evaluation of disease activity of relapsing polychondritis: a case series and literature review. *Rheumatology (Oxford)* (in press)
6. Bannai E, Yamashita H, Kaneko S, Ueda Y, Ozaki T, Tsuchiya H, Takahashi Y, Kaneko H, Kano T, **Mimori A**: Successful tocilizumab therapy in seven patients with refractory adult-onset Still's disease. *Mod Rheumatol* (in press)
7. Ueda Y, Yamashita H, Takahashi Y, Kaneko H, Kano T, **Mimori A**: Refractory hemophagocytic syndrome in systemic lupus erythematosus successfully treated with intermittent intravenous cyclophosphamide: three case reports and literature review. *Clin Rheumatol*. 2014, 33(2):281-6.
8. Ito K, Minamimoto R, Yamashita H, Morooka M, Okasaki M, **Mimori A**, Kubota K: 18F-FDG PET/CT findings preceded elevation of serum proteinase 3 antineutrophil cytoplasmic antibodies in Wegener granulomatosis. *Clin Nucl Med*. 2014 Jan;39(1):e67-8.
9. Inoue M, Kano T, Ozaki T, Takahashi Y, Yamashita H, Kaneko H, **Mimori A**: Rheumatic manifestations and an epipharyngeal mass accompanied by myelodysplastic syndrome. *Mod Rheumatol*. 2013 Dec 9. [Epub ahead of print]
10. Yamashita H, Ueda Y, Ozaki T, Tsuchiya H, Takahashi Y, Kaneko H, Kano T, **Mimori A**: Characteristics of 10 patients with paraneoplastic rheumatologic musculoskeletal manifestations. *Mod Rheumatol*. 2013 Nov 5. [Epub ahead of print]
11. Yamashita H, Kubota K, Takahashi Y, Minamimoto R,

- Morooka M, Kaneko H, Kano T, **Mimori A**: Clinical value of 18F-fluoro-dexoxyglucose positron emission tomography/computed tomography in patients with adult-onset Still's disease: A seven-case series and review of the literature. *Mod Rheumatol*. 2013 Nov 4. [Epub ahead of print]
12. Ozaki T, Yamashita H, Hosono Y, Nakashima R, Mimori T, Takahashi Y, Kaneko H, Kano T, **Mimori A**: Two patients in the same family with anti-ARS antibody-associated myositis. *Mod Rheumatol*. 2013 Oct 21. [Epub ahead of print]
13. Yamashita H, Muto G, Hachiya R, Sugiyama H, Takahashi Y, Kaneko H, Kano T, **Mimori A**: A case of Sjögren's syndrome complicated by protein-losing gastroenteropathy with unprecedented pulmonary interstitial lesions. *Mod Rheumatol*. 2013 Oct 21. [Epub ahead of print]
14. Ozaki T, Yamashita H, Kaneko S, Yorifuji H, Takahashi H, Ueda Y, Takahashi Y, Kaneko H, Kano T, **Mimori A**: Cytomegalovirus disease of the upper gastrointestinal tract in patients with rheumatic diseases: a case series and literature review. *Clin Rheumatol*. 2013, 32(11):1683-90.
15. Tsuchiya H, Tsuno H, Inoue M, Takahashi Y, Yamashita H, Kaneko H, Kano T, **Mimori A**: Mycophenolate mofetil therapy for rapidly progressive interstitial lung disease in a patient with clinically amyopathic dermatomyositis. *Mod Rheumatol*. 2013 Apr 25. [Epub ahead of print]
16. 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*. 2013, 27(3):209-16.
17. 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*. 2013, 23(5):925-33.
18. 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)*. 2013, 52(4):759-61.
19. 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*. 2013, 23(4):823-6.
20. 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*. 2013, 80(2):171-7.
21. 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*. 2013, 23(2):365-73.
22. Yamashita H, Matsuki Y, Shimizu A, Mochizuki M, Takahashi Y, Kano T, **Mimori A**: Hemophagocytic lymphohistiocytosis complicated by central nervous system lesions in a patient with dermatomyositis: a case presentation and literature review. *Mod Rheumatol*. 2013, 23(2):386-92.

学会発表

1. Tsuchiya H, Haga S, Takahashi Y, Ishizaka Y, **Mimori A**: Autoantibodies to GABA-B receptors detected in patients with systemic lupus erythematosus. EULAR 2013 congress, Madrid, Spain, 12-15 June 2013
2. Yamashita H, Kubota K, Takahashi Y, Kaneko H, Kano T, **Mimori A**: Clinical Value Of 18f-Fluoro-Dexoxyglucose Positron Emission Tomography In Patients With Adult-Onset Stills Disease. ACR 2013 congress, San Diego, USA, 21 Oct 2013

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 順天堂大学医学部免疫学 教授
研究協力者 千葉 幸子 順天堂大学大学院細胞機能研究室 助教

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。SLE 患者末梢血においてはその頻度が 1%以下 (健康人 5- 10%) と著減していた。SLE 患者においては、CD3+CD28 刺激による増殖反応ならびに IL-15 刺激による増殖反応が低下していた。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。SLE 患者で軽度減少のみられた $\gamma\delta$ T 細胞においてはナイーブ細胞が増加していたが、MAIT 細胞はほぼ全てエフェクターメモリーの表現型を呈し、胸腺からの補充も少ないと考えられた。また長期培養により $\gamma\delta$ T 細胞の増加がみられたが、MAIT 細胞は増殖しなかった。これらのことから、MAIT 細胞の減少は細胞死の亢進によるが、MAIT 細胞の供給が少ないことも著減の一因と考えられた。

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リアントな 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、SLE 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

健康人ならびに 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

健康人においては、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 刺激および 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 の発現が高く、活性型カスパー 3 および 7AAD 陽性細胞も増加しており、細胞死が亢進していた。SLE 患者で軽度減少のみられた $\gamma\delta$ T 細胞においてはナイーブ細胞が増加していたが、MAIT 細胞はほぼ全てエフェクターメモリーの表現型を呈していた。長期培養により $\gamma\delta$ T 細胞の増加がみられたが、MAIT 細胞は増殖しなかった。

D. 考察

MAIT 細胞は、健康人末梢血の $\alpha\beta$ 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。γδT 細胞においてはナイーブ細胞の比率が増加していたのに対し MAIT 細胞のナイーブ細胞は見られず、MAIT 細胞については胸腺から末梢へ補充されないことが示唆された。MAIT 細胞が長期培養により増殖しなかったことから、SLE において活性化した MAIT 細胞は増加せず細胞死に陥ると考えられた。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) Noto D, Sakuma H, Takahashi K, Yamada M, Yamamura T, Miyake S. Development of a culture system to induce microglia-like cells from hematopoietic cells. **Neuropathol Appl Neurobiol** (Epub ahead), 2013
- 2) Chihara N, Aranami T, Oki S, Matsuoka T, Nakamura M, Kishida H, Yokoyama K, Kuroiwa Y, Hattori N, Okamaoto T, Murata M, Toda T, Miyake S, Yamamura T. Plasmablasts as migratory IgG-producing cells in the pathogenesis of neuromyelitis optica. **PLOS one** 8(12):e83036, 2013
- 3) Di Penta A, Chiba A, Alloza I, Wyssenbach A, Yamamura T, Villoslada P, Miyake S, Vandenberg K. A trifluoromethyl analogue of celecoxib exerts beneficial effects in neuroinflammation. **PLOS one** 8(12):e83119, 2013

4) Araki M, Matsuoka T, Miyamoto K, Kusunoki S, Okamoto T, Murata M, Miyake S, Aranami T, Yamamura T. Efficacy of the anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab in neuromyelitis optica: A pilot study. **Neurology**, in press

2. 学会発表

- 1) Miyake S. Gut regulates autoimmunity. Autoimmunity Congress Asia, Hong Kong, 21 October, 2013
- 2) Araki M, Matsuoka T, Aranami T, Nakamura M, Okamoto T, Murata M, Miyake S, Yamamura T. Clinical Efficacy of Anti-IL-6 Receptor Monoclonal Antibody Tocilizumab in Patients with Neuromyelitis Optica. PACTRIMS 2013, Kyoto, Japan, 11.7, 2013
- 3) Nakamura M, Matsuoka T, Araki M, Lin Y, Sato W, Okamoto T, Murata M, Miyake S, Aranami T, Yamamura T. IL-6 Signaling As a Potential Therapeutic Target In Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis with An Increased Plasmablast Frequency. PACTRIMS 2013, Kyoto, Japan, 11.6, 2013
- 4) Kadowaki A, Miyake S, Chiba A, Yamamura T. Myelin Specific T Cells in the Gut Regulate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). PACTRIMS 2013, Kyoto, Japan, 11.6, 2013
- 5) 三宅幸子：腸管免疫による自己免疫調節. 第 41 回日本臨床免疫学会シンポジウム, 下関, 11 月 28 日、2013
- 6) 松岡貴子、千葉麻子、荒浪利昌、荒木学、中村雅一、三宅幸子、山村隆。視神経脊髄炎におけるヒト化抗 IL-6 受容体モノクローナル抗体トシリズマブの免疫調節効果について. 第 41 回日本臨床免疫学会総会、下関、11 月 28 日、2013
- 7) 中村雅一、松岡貴子、荒木学、林幼偉、佐藤和貴郎、岡本智子、村田美穂、三宅幸子、荒浪利昌、山村隆。再発寛解型多発性硬化症の病態における IL-6 依存性プラズマブラスト. 第 41 回日本臨床免疫学会総会、下関 11 月 28 日、2013

- 8) 荒木学、松岡貴子、中村雅一、三宅幸子、岡本智子、村田美穂、荒浪利昌、山村隆. 視神経脊髄炎に対する Tocilizumab 療法、第 41 回日本臨床免疫学会総会 下関 11 月 27 日、2013
- 9) 門脇淳、三宅幸子、千葉麻子、山村隆. 腸管の自己反応性 T 細胞は自己免疫を制御する. 第 41 回日本臨床免疫学会総会 下関 11 月 27 日、2013
- 10) 林幼偉、三宅幸子、山村隆. 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の寛解維持を担う 'armoured Treg' の誘導: dominant epitope によるペプチドワクチンへの可能性. 第 41 回日本臨床免疫学会総会 下関 11 月 27 日、2013
- 11) 中村雅一、松岡貴子、荒木学、林幼偉、佐藤和貴郎、岡本智子、村田美穂、三宅幸子、荒浪利昌、山村隆. 再発寛解型多発性硬化症における抗 IL-6 受容体抗体治療の可能性. 第 25 回日本神経免疫学会学術集会、下関 11 月 27 日、2013
- 12) 佐藤和貴郎、荒浪利昌、富田敦子、千原典夫、岡本智子、林幼偉、村田美穂、三宅幸子、山村隆. 多発性硬化症における脳脊髄炎 T 細胞のケモカイン受容体解析. 第 41 回日本臨床免疫学会総会 下関 11 月 27 日、2013
- 13) 門脇淳、三宅幸子、千葉麻子、山村隆. 腸管のミエリン反応性 T 細胞は EAE を制御する第 25 回日本神経免疫学会総会 下関 11 月 27 日、2013
- 14) 荒木学、松岡貴子、荒浪利昌、中村雅一、岡本智子、村田美穂、三宅幸子、山村隆. 難治性 Neuromyelitis Optica に対する抗 IL-6 受容体抗体 tocilizumab の臨床効果の検討. 第 25 回日本神経免疫学会総会 下関 11 月 27 日、2013
- 15) Nakamura M, Araki M, Lin Y, Sato W, Miyake S, Aranami T, Yamamura T: Multiple sclerosis patients with an increased plasmablast frequency may respond to IL-6R blocking therapy. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013. Chiba, Japan, 12.11, 2013
- 16) Chiba A, Tamura N, Yamamura T, Takasaki Y, Miyake S: Reduced cell proliferation and enhanced cell death of MAIT cells in systemic lupus erythematosus. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013. Chiba, Japan, 12.11, 2013
- 17) Kadowaki A, Miyake S, Chiba A, Yamamura T: Auto-reactive T cells in the gut regulate autoimmunity. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013. Chiba, Japan, 12.12, 2013
- 18) Saika R, Sakuma H, Noto D, Yamamura T, Miyake S: IL-34 induces differentiation of microglia-like cells from bone marrow lineage-negative cells and monocytes. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013. Chiba, Japan, 12.11, 2013
- 19) Shimano K, Satoh M, Okuno H, Suzan G, Miyake S, Yamamura T, Ogura H, Iwabuchi K: Atherosclerotic lesion development in MR1/apolipoprotein E-deficient mice. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013. Chiba, Japan, 12.11, 2013
- 20) Lin Y, Miyake S, Yamamura T: Dominancy of encephalitogenic peptide itself directs sustainable regulation of a model of multiple sclerosis: autoimmune vaccination. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013. Chiba, Japan, 12.12, 2013
- 21) Kamachi F, Harada N, Nishiyama C, Izawa K, Kitaura J, Okumura K, Miyake S, Akiba H. Soluble form of tim-4 regulates mast cell activation by binding to LMIR5 and TIM-3. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013. Chiba, Japan, 12.12, 2013

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

自己免疫応答を制御する転写因子 Egr2 の機能解析と誘導機構に関する研究

研究分担者	山本 一彦	東京大学医学部アレルギー・リウマチ内科	教授
研究協力者	藤尾 圭志	東京大学医学部アレルギー・リウマチ内科	講師
	岩崎 由紀子	東京大学医学部アレルギー・リウマチ内科	助教

研究要旨

マウス新規制御性 T 細胞 CD4⁺CD25⁻LAG3⁺ T 細胞 (LAG3⁺ Treg) は、IL-10 を産生しつつ転写因子 early growth response gene-2 (Egr-2) を発現し、強力な自己抗体産生抑制能を示す。よって LAG3⁺ Treg の誘導法が確立できれば、自己抗体を産生する自己免疫疾患の治療につながると考えられる。LAG3⁺ Treg は転写因子 Egr2 を特徴的に発現しており、Egr2 の遺伝子導入により LAG3⁺ Treg の形質が誘導できることから、Egr2 の誘導条件の解明は LAG3⁺ Treg の誘導法の手がかりになると考えられる。CD4 陽性 T 細胞の IL-10 産生を誘導する IL-27 による Egr2 誘導を解析した。IL-10 産生を誘導する各種サイトカインの中で、IL-27 だけが CD4 陽性 T 細胞の Egr2 と LAG3 発現を誘導し、IL-27 による Egr2 誘導は STAT3 依存性であった。Blimp-1 は IL-10 産生に必須であることが知られているが、IL-27 による Blimp-1 発現には Egr2 が必要であり、クロマチン免疫沈降法とルシフェラーゼアッセイにより Egr2 が Blimp-1 のプロモーターに結合することが判明した。Egr2 欠損 CD4 陽性 T 細胞は、IL-27 存在下で IFN- γ と IL-17 を産生し、Egr2 は炎症性サイトカイン産生を抑制していることも明らかとなった。また Egr3 は Egr2 とともに T 細胞アナジーに重要とされるが、T 細胞特異的 Egr2 ノックアウトマウスの CD4 陽性 T 細胞では Egr3 の発現が亢進していた。T 細胞特異的 Egr2/3 ダブルノックアウトマウスを作製したところ、T 細胞特異的 Egr2 ノックアウトマウスが約 12 か月で SLE 様になるのに対し、4 か月で SLE 様となった。この結果は Egr2 だけでなく Egr3 も協働することで自己免疫応答が抑制されていることを示唆した。本研究により Egr2 誘導機構の一端が明らかとなった。さらなる解析により Egr2、LAG3⁺ Treg の誘導法が確立すれば SLE、RA のより良い治療法の解明につながることが期待される。

A. 研究目的

我々が同定したマウス新規制御性 T 細胞 CD4⁺CD25⁻LAG3⁺ T 細胞 (LAG3⁺ Treg) は、転写因子 early growth response gene-2 (Egr-2) を発現し、強力な自己抗体産生抑制能を示す。さらにヒト CD4⁺CD25⁻LAG3⁺ T 細胞もマウス CD4⁺CD25⁻LAG3⁺ T 細胞と同様に試験管内の抗体産生抑制能を発揮するが、関節リウマチ (RA) と全身性エリテマトーデス (SLE) の患者では健常人よりも減少していることも判明している。よって LAG3⁺ Treg の誘導法が確立できれば、自己抗体を産生する自己免疫疾患の治療につながると考えられる。LAG3⁺ Treg は転写因子 Egr2 を特徴的に発現しており、Egr2 の遺伝子導入により LAG3⁺ Treg の形質が誘導できることから、Egr2 の誘導条件の解明は LAG3⁺ Treg の誘導法の手がかりになると考えられる。本研究では CD4 陽性 T 細胞の IL-10 産生を誘導する IL-27 による Egr2 誘導を解析した。また Egr3 は Egr2 とともに T 細胞アナジーに重要とされるが、T 細胞特異的 Egr2 ノックアウトマウスの CD4 陽性 T 細胞では Egr3 の発現が亢進していた。そこで T 細胞特異的 Egr2/3 ダブルノックアウトマウスを作製し、Egr2 と Egr3 の協働による自己免疫抑制への寄与を検討した。

B. 研究方法

野生型 C57/B6 マウス、T 細胞特異的 Egr2 欠損マウス、T 細胞特異的 Blimp-1 欠損マウス、T 細胞特異的 STAT3 欠損マウス、STAT1 欠損マウス由来の CD4 陽性 T 細胞に IL-27 を含む各種サイトカインを作用させ、抗 Egr2 抗体による細胞内染色および上清の ELISA で評価した。抗 Egr2 抗体によるクロマチン免疫沈降法による解析と、Blimp-1 プロモーターを用いたルシフェラーゼ解析を行った。また Egr3-floxed マウスを作製し、T 細胞特異的 Egr2 ノックアウトマウスと掛け合わせて T 細胞特異的 Egr2/3 ダブルノックアウトマウスを作製した。

(倫理面への配慮)

すべての研究は各施設の遺伝子倫理委員会の審査を受け、承認を受けた研究計画に則って実施された。

C. 研究結果

IL-10 産生を誘導する各種サイトカインの中で、IL-27 だけが CD4 陽性 T 細胞の Egr2 と LAG3 発現を誘導し、IL-27 による Egr2 誘導は STAT3 依存性であった。Blimp-1 は IL-10 産生に必須であることが知られてい

るが、IL-27 による Blimp-1 発現には Egr2 が必要であり、クロマチン免疫沈降法とルシフェラーゼアッセイにより Egr2 が Blimp-1 のプロモーターに結合することが判明した。また Egr2 欠損 CD4 陽性 T 細胞は、IL-27 存在下で IFN- γ と IL-17 を産生し、Egr2 は炎症性サイトカイン産生を抑制していることも明らかとなった。また Egr2/3 ダブルノックアウトマウスを作製したところ、T 細胞特異的 Egr2 ノックアウトマウスが約 12 か月で SLE 様になるのに対し、約 4 か月で SLE 様となった。

D. 考察

IL-27 は強い Egr2, LAG3, IL-10 の誘導活性を示し、IL-27 が LAG3⁺ Treg に近い細胞集団を誘導できることが示された。本研究により IL-10 産生に関わる分子として従来知られていた c-Maf, AhR, E4BP4 に加えて、Egr2 から Blimp-1 の関与が明らかとなった。SLE モデルマウス MRL/lpr に IL-27 レセプターを過剰発現させると病態が改善することが報告され、IL-27 と自己免疫抑制の関連が注目されている。この作用の一部は Egr2 誘導の影響の可能性がある。また T 細胞上の Egr2/3 の欠損により Egr2 単独欠損よりも SLE 様の病態が悪化したことから、Egr2 だけでなく Egr3 も協働することで自己免疫応答が抑制されていることを示唆した。これまでの解析で、Egr3 は Egr2 と同様に LAG-3 と IL-10 の発現を誘導するが、TGF- β 1 の誘導は Egr3 のみが示す特徴であることが分かっている。Egr3 が Egr2 の機能を代償する可能性があることから、今後 Egr2 の解析と併せて Egr3 の機能も解析することが重要でと考えられた。

Egr2 の発現誘導は SLE, RA など多くの自己免疫疾患において治療的アプローチとなる可能性があり、今後さらに解析を進める意義があると思われる。

E. 結論

本研究により複数の Egr2 誘導機構が解明され、T 細胞において Egr3 が Egr2 と協働する可能性も示唆された。これらの機構の共通点を検索することで、Egr2 の誘導に必須の部分が分かれば、自己免疫疾患の新規治療法の開発に向けた前進になると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sumitomo S, Fujio K, Okamura T, Morita K, Ishigaki K, Suzukawa K, Kanaya K, Kondo K, Yamasoba T, Furukawa A, Kitahara N, Shoda H, Shibuya M, Okamoto A, Yamamoto K. Transcription factor early growth

response 3 is associated with the TGF- β 1 expression and the regulatory activity of CD4-positive T cells in vivo. *J Immunol.* 2013;191:2351-9.

Sumitomo S, Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. Egr2 and Egr3 are the unique regulators for systemic autoimmunity. *JAKSTAT.* 2013 Apr 1;2(2):e23952.

Iwasaki Y, Fujio K, Okamura T, Yanai A, Sumitomo S, Shoda H, Tamura T, Yoshida H, Charnay P, Yamamoto K. Egr-2 transcription factor is required for Blimp-1 mediated IL-10 production in IL-27 stimulated CD4(+) T cells. *Eur J Immunol.* 2013 Apr;43(4):1063-73.

Fujio K, Okamura T, Sumitomo S, Yamamoto K. Regulatory cell subsets in the control of autoantibody production related to systemic autoimmunity. *Ann Rheum Dis.* 2013 Apr;72 Suppl 2:ii85-9.

2. 学会発表

Keishi Fujio, Tomohisa Okamura, Shuji Sumitomo, Kaoru Morita, Mariko Inoue, Yukiko Iwasaki, Nakachi Shinichiro, Hirofumi Shoda, Kazuyoshi Ishigaki, Kazuhiko Yamamoto. The role of CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells in autoimmune diseases. 第 42 回日本免疫学会学術総会 国際シンポジウム 平成 25 年 12 月 11 日

Keishi Fujio, Tomohisa Okamura, Shuji Sumitomo, Kaoru Morita, Mariko Inoue, Yukiko Iwasaki, Kazuhiko Yamamoto. The B cell control by Egr2-expressing CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells. 2013 アジア国際自己免疫学会 平成 25 年 11 月 21 日

Keishi Fujio, Tomohisa Okamura, Shuji Sumitomo, Yukiko Iwasaki, Kazuyoshi Ishigaki, Akiko Okamoto, Kazuhiko Yamamoto. Egr2-mediated control of autoimmunity. *JSCIR-MMCB 2013 symposium* 平成 25 年 5 月 21 日

Yukiko Iwasaki, Keishi Fujio, Tomohisa Okamura, Atsushi Yanai, Shuji Sumitomo, Hirofumi Shoda, Kazuhiko Yamamoto. Novel IL-10 induction pathway mediated by Egr2 in IL-27-stimulated T cells. 第 57 回日本リウマチ学会学術集会 ワークショップ 平成 25 年 4 月 20 日

藤尾圭志、岡村僚久、住友秀次、岩崎由紀子、岡本明子、山本一彦
全身性エリテマトーデスと免疫制御細胞 第57回日本リウマチ学会学術集会 シンポジウム 平成25年4月19日

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