

201442026A

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患等克服研究事業  
(難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患等実用化研究事業))

## 自己免疫疾患のイノベーション研究

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 住田 孝之

平成 27 (2015) 年 3 月



本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業による委託業務として、住田孝之が実施した平成26年度「自己免疫疾患のイノベーション研究」の成果を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患等克服研究事業  
(難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患等実用化研究事業))

## 自己免疫疾患のイノベーション研究

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 住田 孝之

平成 27 (2015) 年 3 月

# 目 次

I	構成員名簿	1
II	委託業務成果報告（総括）	3
	自己免疫疾患のイノベーション研究	
	研究代表者 筑波大学医学医療系内科(膠原病・リウマチ・アレルギー) 住田 孝之	
III	委託業務成果報告（業務項目）	
1.	疾患特異的 iPS 細胞研究プロジェクト	
	(1) SLE	
	自己免疫疾患の病因、病態に関する研究	13
	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 山本 一彦	
	(2) PM/DM	
	ヒト iPS 細胞を用いた多発性筋炎/皮膚筋炎の筋組織における自然免疫活性化機序の解明に関する研究	16
	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 上阪 等	
	(3) SS	
	シェーグレン症候群由来 iPS 細胞を用いた疾患特異的治療戦略開発に関する研究	19
	筑波大学医学医療系内科(膠原病・リウマチ・アレルギー) 住田 孝之	
	(4) AOSD	
	成人スチル病由来 iPS 細胞を用いた疾患特異的治療戦略開発に関する研究	
	筑波大学医学医療系内科(膠原病・リウマチ・アレルギー) 住田 孝之	
2.	ゲノム研究プロジェクト	
	(1) SLE	
	[A] ゲノム開成に基づく新規分子標的の検索と治療戦略開発	
	1. 全身性エリテマトーデス病因遺伝子調節分子の検索	24
	慶應義塾大学医学部リウマチ内科 竹内 勤	
	2. 全身性エリテマトーデス患者の末梢血 T 細胞サブセットの可塑性・多様性とエピゲノム制御に関する研究	26
	産業医科大学医学部第一内科学講座 田中 良哉	

3. ゲノム情報による全身性エリテマトーデス疾患関連遺伝子の病態への関与に関する研究 ……	28
順天堂大学免疫学 三宅 幸子	
4. シェーグレン症候群の疾患感受性遺伝子に関する研究 ……	31
北海道大学大学院医学研究科免疫・代謝内科学分野 渥美 達也	
5. 細胞特異的Fc $\gamma$ RIIb欠損マウスの作製による新規治療法開発に向けたSLE発症機序の解明 ……	33
順天堂大学大学院医学研究科・分子病理病態学 広瀬 幸子	
6. Fc $\gamma$ RIIb遺伝子欠損マウス、SLAM遺伝子異常マウス、Yaa遺伝子異常マウスを用いた自己免疫疾患の病態におけるそれらの遺伝子の役割についての研究 ……	36
順天堂大学膠原病・リウマチ内科 天野 浩文	

(2)PM/DM

[A] GWAS 解析

自己免疫疾患の病因、病態に関する研究 ……	13
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 山本 一彦	

[B] ゲノム解析に基づく新規分子標的の検索と治療戦略開発

1. ヒト筋微小血管内皮細胞株におけるバリア関連分子の遺伝子発現に関する研究 ……	40
山口大学大学院医学系研究科神経内科 神田 隆	
2. 抗ARS抗体陽性筋炎合併間質性肺炎における早期免疫抑制薬併用の有効性に関する研究 ……	45
京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学 三森 経世	
3. マウス筋炎モデルにおける細胞接着分子をターゲットにした治療に関する研究 ……	48
筑波大学医学医療系皮膚科 藤本 学	

(3)SS

[A] GWAS 解析

自己免疫疾患の病因、病態に関する研究 ……	13
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 山本 一彦	

[B] ゲノム解析に基づく新規分子標的の検索と治療戦略開発

1. DNAマイクロアレイを用いたシェーグレン症候群の口唇唾液腺における遺伝子発現解析 ……	51
筑波大学医学医療系内科（膠原病・リウマチ・アレルギー） 坪井 洋人	

2. シェーグレン症候群の病態進展と IL-33 遺伝子との関連に関する研究 .....	54
九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座 中村 誠司	
3. シェーグレン症候群唾液腺における Toll-like receptors の発現に関する研究.....	56
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻展開医療科学講座 川上 純	
4. シェーグレン症候群患者における microRNA の発現の検討に関する研究 .....	58
兵庫医科大学リウマチ膠原病内科 佐野 統	

(4) AOSD

[A] ゲノム解析に基づく新規分子標的の検索と治療戦略開発

1. 膠原病患者末梢血有核細胞におけるエピジェネティック異常に関する研究 .....	60
埼玉医科大学医学部リウマチ膠原病科 三村 俊英	

IV	学会等発表実績 .....	63
V	平成 26 年度班会議プログラム .....	69
VI	研究成果の刊行物・別刷 .....	73



# I 平成 26 年度構成員名簿

自己免疫疾患のイノベーション研究

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研 究 代 表 者	住田 孝之	筑波大学医学医療系内科（膠原病・リウマチ・アレルギー）	教授
研 究 分 担 者	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	教授
	竹内 勤	慶應義塾大学医学部リウマチ内科	教授
	田中 良哉	産業医科大学医学部第一内科学講座	教授
	渥美 達也	北海道大学大学院医学研究科免疫・代謝内科学分野	教授
	天野 浩文	順天堂大学膠原病・リウマチ内科	准教授
	広瀬 幸子	順天堂大学大学院医学研究科・分子病理病態学	准教授
	三宅 幸子	順天堂大学順天堂大学医学部免疫学	教授
	三森 経世	京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学	教授
	神田 隆	山口大学大学院医学系研究科神経内科学教室	教授
	藤本 学	筑波大学医学医療系皮膚科学	教授
	川上 純	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科展開医療科学講座	教授
	佐野 統	兵庫医科大学内科学講座リウマチ膠原病科	主任教授
	中村 誠司	九州大学大学院歯学研究院 口腔顎顔面病態学講座	教授
	坪井 洋人	筑波大学医学医療系内科（膠原病・リウマチ・アレルギー）	講師
三村 俊英	埼玉医科大学リウマチ膠原病科	教授	
事 務 局	飯田 美智子	〒305-8575 茨城県つくば市天王台1-1-1 TEL 029-853-7388 FAX 029-853-7388 e-mail riumachi@md.tsukuba.ac.jp	
経 理 事 務 担 当 者	浅野 早苗	〒305-8575 茨城県つくば市天王台1-1-1 TEL 029-853-3017 FAX 029-853-6309 e-mail asano.sanae.fu@un.tsukuba.ac.jp	



## II 委託業務成果報告（総括）

H26年度厚生労働科学研究委託費 難治性疾患等克服研究事業  
(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業))  
総括研究報告書

自己免疫疾患のイノベーション研究

研究代表者 住田孝之  
筑波大学医学医療系内科(膠原病・リウマチ・アレルギー) 教授

研究要旨

本班では、自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)、皮膚筋炎・多発性筋炎(PM/DM)、シェーグレン症候群(SS)、成人ステイル病(AOSD)の4疾患に焦点を当て、主に以下の二つの研究プロジェクトにより病因・病態の解析および新たな分子標的治療戦略を開発することを目的とした。

第一の研究は、疾患特異的iPS細胞を用いた病因・病態解明と創薬の開発である。本研究では、文部科学省「疾患特異的iPS細胞を活性化した難病研究」拠点機関(京都大学 中畑龍俊、東京大学医科研大津真)との共同研究である。SSプロジェクトにおいては、SS患者末梢血中のM3R反応性Th1細胞よりT-iPS細胞の作成に成功し、CD4+細胞、Treg細胞への分化条件を設定中である。PM/DMプロジェクトにおいては、健康人末梢血CD34+細胞よりiPS細胞を作成し、MyoD遺伝子導入より筋繊維細胞への分化に成功した。SLE研究およびAOSD研究プロジェクトも着実に進行しており、今後の研究成果が待たれる。

第二の研究は、ゲノム解析による疾患感受性遺伝子の解明およびそれに基づく新規分子標的の検索と治療戦略開発である。SSプロジェクトにおいては、656検体を対象としたGWAS解析からHLA-DPA2、STAT4およびDGUOK-TET3遺伝子のSNPに関連を認めた。PM/DMプロジェクトでは、561検体を対象としたGWAS解析から、PM+DM全体ではLOC645120、DM単独ではPFKFB3、PM単独ではESRRG遺伝子のSNPに最も強い関連を認めたが、いずれもゲノムワイド水準の有意性を示さなかった。現在追認研究を模索中である。

その他に、以下の遺伝子や分子を標的とした病因解明および新規治療戦略の開発を進めている。1)SLE研究プロジェクト:Blk、STAT4、IRF5、Prdm1、CCR5、FcγRII、SLAM、Yaa、IFNsignal、LAG3、EGR2など、2)PM/DM研究プロジェクト:HLA、Claudin-5、ARS、Mi-2、TIF1γなど、3)SS研究プロジェクト:HLA-DPA2、STAT4、TET3、NR4A2、DPP4、IL-33、TRL-7、TLR-9、miRNAなど、4)AOSD研究プロジェクト:H3K4me3、H3K27me3など。

本研究成果により、上記4つの免疫難病の発症機序に基づく分子標的治療となる創薬開発を目指す。

研究分担者

山本一彦	東京大学大学院医学系研究科 教授	三宅幸子	順天堂大学医学部免疫学 教授
上阪 等	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 教授	三森経世	京都大学大学院医学研究科 教授
竹内 勤	慶應義塾大学医学部リウマチ内科 教授	神田 隆	山口大学大学院医学系研究科 教授
田中良哉	産業医科大学医学部第一内科学講座 教授	藤本 学	筑波大学医学医療系皮膚科 教授
渥美達也	北海道大学大学院医学研究科 教授	川上 純	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 教授
天野浩文	順天堂大学膠原病・リウマチ内科 准教授	佐野 統	兵庫医科大学内科学講座リウマチ膠原病科 主任教授
広瀬幸子	順天堂大学大学院医学研究科 准教授	中村誠司	九州大学大学院歯学研究院 教授
三村俊英	埼玉医科大学リウマチ膠原病科 教授	坪井洋人	筑波大学医学医療系 講師

## A. 研究目的

自己免疫疾患の発症機序は不明であるため、副腎皮質ホルモンや免疫抑制薬による治療が中心である。その結果、感染症、腫瘍併発などの副作用により、患者の生命予後やquality of life (QOL)の低下、医療費の高騰化が社会問題となっている。

本研究プロジェクトにおいては、自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)、皮膚筋炎・多発性筋炎(PM/DM)、シェーグレン症候群(SS)、成人ステイル病(AOSD)の4疾患に焦点を当て、主に以下の二つの研究プロジェクトにより病因・病態の解析および新たな分子標的治療戦略を開発することを目的とした。第一の研究は、疾患特異的iPS細胞を用いた病因・病態解明と創薬の開発である。本研究では、文部科学省「疾患特異的iPS細胞を活性化した難病研究」拠点機関(京都大学 中畑龍俊、東京大学医科研 大津真)との共同研究であり、本班の前身である厚労科研難治性疾患等克服研究事業自己免疫疾患に関する調査研究班(研究代表者:住田)としてH25年度からすでに4疾患を対象としたiPS研究プロジェクトをスタートした。第二の研究は、ゲノム解析による疾患感受性遺伝子の解明およびそれに基づく新規分子標的の検索と治療戦略開発である。本研究においても前身の自己免疫疾患に関する調査研究班(研究代表者:山本、住田)において、SLEのゲノムワイド関連解析(GWAS)研究を終了し(PLoS Gene, 2012)、本年度、SSおよびPM/DM患者を対象としてGWAS解析を進めてきた。

本研究プロジェクトでは、疾患ごとに4つの分科会に分けて研究を進めた。具体的には、1)SLE分科会(リーダー:山本):(1)iPS細胞研究、(2)ゲノム解析データに基づく新規標的分子の選定と治療開発。2)PM/DM分科会(上阪):(1)iPS細胞研究、(2)GWAS解析、(3)ゲノム解析とそれに基づく発症因子の解明、新規分子標的治療開発。3)SS分科会(住田):(1)iPS細胞解析、(2)GWAS解析、(3)ゲノム解析とそのデータに基づく発症機構解析と分子標的治療戦略の開発。4)AOSD分科会(住田):(1)iPS細胞解析と創薬、等を推進した。

本研究成果により、疾患特異的治療が可能となり、効率的で安全性の高い医療が普及することとなり、患者の予後、QOLの改善、医療費の節約化につながると期待される。

## B. 研究方法

### 1. 疾患特異的 iPS 細胞研究プロジェクト

#### (1)SLE (山本) :

1) 健常人、SLE 患者の末梢血における T 細胞分画について FACS 解析を行い、特に制御性 T 細胞について検討を行った。

2) 末梢血単核細胞および種々の検討を踏まえて決定した分画の T 細胞を用いて iPS 細胞株を作成する計画である。

3) 2) で作成した iPS 細胞株を用いて、フィーダ

ー細胞上で IL-7, FLT3L 存在下に培養し、T-lineage 細胞へ分化を試みる。

4) iPS 細胞から DC を作成し、DC と T-lineage 細胞をサイトカイン環境下に培養し、LAG3 陽性細胞への分化を試みる。

5) iPS 細胞由来 T-lineage 細胞、LAG3 陽性 T 細胞、DC における健常人と SLE 患者の差について、発現遺伝子解析やサイトカイン産生・抑制能などの機能解析により検証する。

#### (2)PM/DM (上阪) :

1) 健常人の血液中の CD34 陽性の非リンパ球細胞に対し、山中 4 遺伝子(ヒト OCT4, SOX2, KLF4, MYC) を導入して hiPS 細胞を樹立した。

2) 既報を基に、hiPS 細胞に MyoD を含む薬剤誘導性ベクターを PiggyBac 法にて導入し、ドキシサイクリン(Dox)存在下でのみ MyoD を発現する MyoD-hiPS 細胞を 2 クローン樹立した。hiPS 細胞維持培地で培養中の MyoD-hiPS 細胞に対して(6×10<sup>5</sup> cells/6 well dish)、培養培地中に Dox を加え(day 1~7)、MyoD の発現を誘導し、培地を hiPS 細胞維持培地(~day 4)から筋分化培地(day 5~7)、筋成熟培地(day 8~10)へと交換することで筋分化を誘導した。

3) 培養中の MyoD-hiPS 細胞の形態学的変化を顕微鏡下で観察した。

4) MyoD-hiPS 細胞の培養上清を day 4~10 まで連日回収し、各培地における各種サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、CCL2、CXCL8、活性型 TGF- $\beta$ -1)濃度を ELISA にて定量した。

#### (3)SS (住田) :

##### a. M3R 反応性 Th1 bulk 細胞 :

1) SS 患者由来末梢血単核球を採取し M3R ペプチドを用いて in vitro で培養し、M3R 反応性 Th1 細胞(M3RTh1)を flowcytometry により分離した。

2) 山中 4 因子(OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC)をセンダイウイルスにより遺伝子導入し、T-iPS 細胞(T-iPSM3RTh1)を樹立した。

3) 2) で樹立した T-iPSM3RT した細胞に関して、OCT3/4 発現を flowcytometry で確認した。

4) T-iPSM3RT 細胞が使用している TCR 遺伝子に関して、23 個の TCRV $\beta$  特異的プライマーおよび 30 個の TCRV $\alpha$  特異的プライマーを用いて、RT-PCR およびシーケンシング法で決定した。

5) T-iPSM3RTh1 細胞を in vitro において CD4+T 細胞に分化誘導するために、feeder 細胞として C3H10T1/2 細胞、OP9-DL1 細胞を使用し、VEGF $\rightarrow$ SCF+IL7+Fit3L 等を添加した。

6) Treg 細胞への分化条件に関しては、現時点は未知の領域であるが、Notch ligand を発現した OP9-DL1 細胞株上で T-iPS 細胞を培養し、TGF- $\beta$  + レチノイン酸等の追加条件を検討した。

##### b. M3R 反応性 Th1 および Th17 クローン細胞 :

1) 上記 a-(1)と同様の方法で single cell として M3R 反応性 Th1 (M3RTh1) 及び Th17 (M3RTh17) 細胞を分離する。細胞の維持には、放射線照射した auto-LCL(Auto-lymphoblastoid cell line)あるいは allo-PBMC 細胞を feeder 細胞と



して使用し、M3R 抗原および PHA を加えて Th1 細胞および Th17 細胞クローンを樹立した。

2) 1) で樹立した M3RTh1 および M3RTh17 細胞クローンについて、IFN- $\gamma$ 、IL-17 産生の CBA アッセイにより測定し抗原特異性について *in vitro* で確認した。

3) T 細胞クローンが使用している TCR 遺伝子に関して、23 個の TCRV $\beta$  特異的プライマーおよび 30 個の TCRV $\alpha$  特異的プライマーを用いて、RT-PCR およびシーケンシング法で決定した。

4) 山中 4 因子を用いて T-iPS 細胞 (T-iPSM3RTh1、T-iPSM3RTh17) を樹立した。

#### (4) AOSD (住田) :

1) 活動性 AOSD、非活動性 AOSD、および健常人 (HS) の末梢血からフローサイトメトリーを用いて、CD14+単球 (AMo、IAMo、HMo) を単離した。

2) 今後、単離した AMo、IAMo、HMo 細胞からそれぞれ mRNA を抽出し、DNAarray 法により、AOSD 特異的な mRNA を選定する。

3) AOSD 患者末梢血から単離した AMo および IAMo 細胞から AMo-iPS 細胞および IAMo-iPS 細胞を樹立する。(東京大学 iPS 拠点)。

4) 樹立した AMo-iPS 細胞、IAMo-iPS 細胞を *in vitro* で活性化し、3) で選定した活性化抑制分子あるいは活性化抑制誘導分子を投与することにより AMo-iPS 細胞と IAMo-iPS 細胞からのサイトカイン産生抑制を検証する。5) 4) で検証された制御分子あるいは制御誘導分子に関して創薬化を進める。

## 2. ゲノム研究プロジェクト

### (1) SLE :

[A] ゲノム解析に基づく新規分子標的の検索と治療戦略開発 (竹内、田中、三宅、渥美、広瀬、天野)

#### 1. 竹内

1) SLE の難治性病態の原因候補分子と臨床情報の関連を確認するために、SLE13 例、健常人 (HC) 5 例の計 18 検体の末梢血全血を PAXgene RNA 採血管 (BD) にて採取後、Total RNA を抽出した。

2) 最新の高密度 DNA マイクロアレイ (Human 8X60k Ver2.1 1 色法、Agilent technologies) により、non-coding RNA を含め、網羅的に RNA 発現量を定量した。

3) 主成分分析、差次的遺伝子発現解析、パスウェイ解析、臨床情報との相関解析、候補遺伝子によるクラスタリング解析を行った。

#### 2. 田中

1) SLE 患者のヘルパー T 細胞サブセットの“可塑性”と“多様性”を明らかにするために、39 例の SLE 患者末梢血リンパ球の細胞表現型を NIH/FOCIS が Human Immunology Project として提唱した抗体セット、及び、ケモカイン受容体抗体を含む独自の抗体セットを用いて 8 カラーフローサイトメトリーで解析した。

2) T 細胞のマスター転写因子遺伝子座におけるヒストン修飾を H3K4me3 (促進型)、H3K27me3

(抑制型) で評価した。

#### 3. 三宅

1) SLE 患者および健常者の末梢血より Ficoll 比重分離液を用いて末梢血単核球 (PBMC) を分離し、T 細胞、B 細胞、単球 (CD14, 16 分画)、NK 細胞、樹状細胞 (myeloid DC、plasmacytoid DC、CD123<sup>-</sup>CD11c<sup>-</sup> DC) と各群の CCR5 発現頻度についてフローサイトメトリー法を用いて解析し SLE 群と健常者群を比較した。

#### 4. 渥美

1) 対象は厚生労働省の SS の診断基準を満たし SLE を合併しない SS 患者 190 名と健常人 428 名とし、末梢血よりゲノム DNA を抽出した。

2) SLE の疾患感受性遺伝子多型として報告されている、IRF-5 (rs20040640)、STAT4 (rs7574865)、BLK (rs13277113)、BANK1 (rs10516487)、TNFAIP3 (rs2230926)、TNFSF4 (rs844644)、1q25.1 領域の SNP (rs10798269) につき TanMan Genotyping Assay を用いて解析した。

3) 統計解析はカイ 2 乗検定を用いた。

#### 5. 広瀬

1) B6 マウス由来の ES 細胞を用いて、*Fcgr2b* 遺伝子の 2 カ所に loxP site を導入したマウス系 (*FcgRIIb<sup>fl/fl</sup>*) を作製し、これに CD19、C/EBP $\alpha$ 、および CD11c のプロモーター領域に Cre を導入した B6 マウス系と交配し、B 細胞、myeloid 系細胞、樹状細胞で特異的に *FcgRIIb* 発現を欠損するマウスを得た。

2) これらを B6. *Yaa* マウスとの交配して *Yaa* 遺伝子を導入し、B 細胞特異的に発現欠損する CD19<sup>Cre</sup>. *Yaa* マウス、myeloid 系細胞で発現欠損する C/EBP $\alpha$ <sup>Cre</sup>. *Yaa* マウス、樹状細胞特異的に発現欠損する CD11c<sup>Cre</sup>. *Yaa* マウス系を樹立した。

3) これらのマウス系の病態を経時的に観察した。

#### 6. 天野

1) B6 マウスで *SLAM* 遺伝子部分を 129 型に置換した *Slam129* マウスを作製した。

2) *Yaa* 遺伝子を導入した *Slam129*. *Yaa* マウスを作製し、これらのマウスの病態について自己抗体の産生と腎糸球体・肺の免疫病理組織学的検討を行い、K01 (*Yaa*) マウス、K02 (*Yaa*) マウスとの比較を行った。

### (2) PM/DM :

[A] GWAS 解析 (山本、上阪) :

1) 561 名の PM/DM 患者 (PM345 名、DM242 名) および対照群 6270 人を解析対象とした。

2) 常染色体上の 615, 594 SNP について関連解析を行った。

3) ゲノム解析については、DNA は各疾患患者の末梢血白血球より抽出した。

4) 一塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) のジェノタイプングは、OmniExpressExome-8v12 (Illumina 社) を用いて行った。

- 5) ジェノタイピングの quality control (QC) として、SNP のコールの成功率が 99%以下のもの、コントロールで多型性を認めないもの、Hardy-Weinberg 平衡を満たさないもの ( $P < 1 \times 10^{-6}$ ) は除外した。
- 6) identity-by-state で近親関係にあるもの、主成分分析で非日本人であると考えられる検体は除外した。
- 7) GWAS では、Cochran-Armitage の傾向性検定によって、疾患との関連を検定し、 $P = 5 \times 10^{-8}$  を有意水準とした。

[B] ゲノム解析に基づく新規分子標的の検索と治療戦略開発 (神田、三森、藤本) :

1. 神田

- 1) 髄膜癌腫症の患者の筋組織から細切した組織を 0.25% type I コラゲナーゼで 2 時間消化し、デキストラン溶液で遠沈・洗浄後、コラーゲンを塗布した dish に播種した。
- 2) 37°C の培養で内皮細胞のコロニーが散見された時点で温度感受性ラージ T 抗原およびヒト telomerase の cDNA を保持したレトロウイルスを感染させた。
- 3) 33°C での培養を継続し、内皮細胞群をペニシリンカップを用いてトリプシンで pick up し、別の dish に播種した。この操作を 2-3 回繰り返す、純粋な微小血管内皮細胞候補細胞株を単離した。
- 4) 得られた細胞株の TJ 関連分子の遺伝子発現解析を行い、ヒト BBB 由来内皮細胞株と電気抵抗値を比較することによりバリア機能を検討した。

2. 三森

- 1) 2005 年から 2014 年に京都大学医学部附属病院で加療した抗ARS 抗体陽性 PM/DM および ILD 症例を対象とした。
- 2) 抗ARS 抗体は HeLa 細胞を用いた RNA 免疫沈降法によって測定した。
- 3) ステロイド大量療法による初期治療から 1 年以内にシクロホスファミド静注療法 (IVCY) を除く免疫抑制薬 (シクロスポリン: CSP、タクロリムス: TAC およびアザチオプリン: AZP) 併用を開始した早期併用群、1 年以上間隔をあけて導入した遅延併用群、および免疫抑制薬非併用群の 3 群に層別化し、臨床的特徴、在宅酸素療法導入率、再燃頻度、および生命予後の差異について後向きに検討を行った。

3. 藤本

セレクチンを標的とした治療薬の候補の一つとして、Dendritic polyglycerol sulfates (dPGS) がある。dPGS は、主に L-selectin と P-selectin の機能を阻害することが報告されている。本研究では、C タンパク誘導筋炎モデルを用いて dPGS の有効性について検討を加えた。

- 1) 合成したマウス C タンパク (200  $\mu$ g) と heat-killed *Mycobacterium butyricum* を含んだ Freund の完全アジュバントを混合したもの

を、C57BL/6 マウスに経皮的に免疫して筋炎を誘導した。

- 2) 免疫 3 日後から 11 日間、連日で dPGS (0.3 mg) を皮下に投与した。
- 3) 筋炎誘導 14 日後に筋組織を採取し、筋炎の重症度、炎症細胞浸潤について組織学的に評価した。

(3) SS :

[A] GWAS 解析 (山本、住田) :

- 1) 656 名の SS 患者および対照群 6270 人を解析対象とした。
- 2) 常染色体上の 615,594 SNP について関連解析を行った。
- 3) ゲノム解析については、DNA は各疾患患者の末梢血白血球より抽出した。
- 4) 一塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) のジェノタイピングは、OmniExpressExome-8v12 (Illumina 社) を用いて行った。
- 5) ジェノタイピングの quality control (QC) として、SNP のコールの成功率が 99%以下のもの、コントロールで多型性を認めないもの、Hardy-Weinberg 平衡を満たさないもの ( $P < 1 \times 10^{-6}$ ) は除外した。
- 6) identity-by-state で近親関係にあるもの、主成分分析で非日本人であると考えられる検体は除外した。
- 7) GWAS では、Cochran-Armitage の傾向性検定によって、疾患との関連を検定し、 $P = 5 \times 10^{-8}$  を有意水準とした。

[B] ゲノム解析に基づく新規分子標的の検索と治療戦略開発 (坪井、中村、川上、佐野) :

1. 坪井

- 1) SS (N=5)、IgG4-RD (N=5)、健常人 (N=3) から採取された LSG の遺伝子発現を、DNA マイクロアレイを用いて比較し、主成分分析によるクラスタリングを行った。
- 2) SS と IgG4-RD の 2 群間のペアワイズの比較から Rank products 法により発現変動遺伝子 (Differentially expressed genes; DEGs) (False discovery rate < 0.05) を抽出した。
- 3) SS で相対的に発現が増加していた DEGs のうち、Rank products 法によるランクが 150 位以内で、発現量が高値であり (Fold change > 2.00)、群内の分散が小さく、T 細胞機能との関連が報告されている DEGs を抽出し、SS (N=11)、IgG4-RD (N=11)、健常人 (N=3) の LSG から抽出した RNA を用いて定量 PCR による validation を行った。
- 4) 上記 3) で SS の LSG における高発現が確認された分子に関して、SS および IgG4-RD の LSG における蛋白レベルでの発現を免疫蛍光法 (CD3、NR4A2、DPP4 (CD26)) で比較した。

2. 中村

- 1) SS 患者 15 例、健常者 15 例を対象とした。
- 2) 口唇腺における IL-33、ST2、Th2 サイトカイン (IL-4、IL-13) の発現は real-time PCR 法

で解析した。

- 3) 局在については免疫組織化学染色を行った。
- 4) 血清 IL-33 値については ELISA にて濃度を測定した。
- 5) 血清 IL-33 値が高かった症例については、臨床的特徴を検索した。

### 3. 川上

- 1) TLR3 リガンド刺激による下流シグナルおよびリン酸化 Akt の発現を、SS および正常コントロール口唇小唾液腺の免疫組織染色により確認した。
- 2) SS 培養唾液腺上皮細胞を poly I:C 刺激した時の TLR3 下流分子発現を検討した。
- 3) EGF で増加する唾液腺上皮細胞ライセートにおける生存因子発現は抗体アレイを用いて検討した。
- 4) poly I:C で発現が誘導される分子に対する EGF の効果も蛍光染色にて確認した。
- 5) SS (11 例) とコントロール (5 例) の小唾液腺における TLR7-9 の発現を免疫染色にて確認した。
- 6) TLR7 については他の浸潤細胞フェノタイプとの共染色も行った。

### 4. 佐野

- 1) ACA 陽性 SS 患者、ACA 陰性 SS 患者 (抗 SS-A 抗体陽性または抗 SS-B 抗体陽性患者)、悪性リンパ腫合併 SS 患者、健常者を対象とした。
- 2) 血清、体液中の miRNA 発現について TORAY の miRNA oligo chip を用いて網羅的解析をおこなった。
- 3) ホルマリン固定パラフィン包埋組織に関して miRNA の網羅的解析を施行した。

### (4) AOSD :

#### [A] ゲノム解析に基づく新規分子標的の検索と治療戦略開発 (三村) :

##### 1. 三村

- 1) AOSD 患者および健常人の末梢血有核細胞をフローサイトメトリーにより、好中球、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、 $\gamma\delta$  陽性 T 細胞、B 細胞に分画した。
- 2) 各細胞群におけるエピジェネティックな変化を、ヒストン 3 (H3) のトリメチル化リシン 4 (H3K4me3) およびトリメチル化リシン 27 (H3K27me3) に対する特異的抗体を用いた核内染色によりフロー・サイトメトリーにて解析した。
- 3) エピジェネティック変化と病態の関係を解析した。

#### (倫理面への配慮)

ヒトの検体を用いる研究に関しては、各施設における倫理委員会での承諾を得た上で、患者および健常者に十分なインフォームド・コンセントを行い、理解と同意を得る。動物実験においては、過度の苦痛や恐怖を与えないように配慮する。遺伝子改変マウスを用いた実験では、当該施設の組換え DNA 実験および動物実験の学

内規定を遵守して行う。なお、ヒトゲノム・遺伝子解析研究、免疫研究、並びに臨床研究に関する倫理指針等は徹底して厳守した。

### C. 研究結果

#### 1. 疾患特異的 iPS 細胞研究プロジェクト

##### (1) SLE (山本) :

- 1) SLE 患者において健常人と比較して CD25 陽性制御性 T 細胞は増加していた。特に、CD25 陽性 LAG3 陽性 T 細胞が出現しており、関節リウマチなどの他の自己免疫疾患にない特徴であった。
- 2) 定量的 PCR では IL-10, Egr2, Foxp3 遺伝子発現の増強が見られた。
- 3) 上記細胞はステロイド等の免疫抑制療法を行うと末梢血より消失することがわかった。
- 4) 現在、東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター幹細胞プロセッシング分野 (大津 真准教授) と共同で、SLE 患者末梢血単核細胞由来の iPS 株作成を計画中である。

##### (2) PM/DM (上阪) :

- 1) サイトカインに関しては、Dox (+) 群の MyoD-hiPS 細胞では、CCL2 と活性型 TGF- $\beta$ 1 の有意な産生を筋分化培地、筋成熟培地中に認めた。
- 2) TNF- $\beta$  と CXCL8 産生は筋成熟培地中で明らかな上昇を認めた。
- 3) TNF- $\beta$ 、CCL2、CXCL8 の産生量は筋分化の進展に伴い増大したのに対し、活性型 TGF- $\beta$ 1 の産生量は筋分化の前半に多かった。
- 4) Dox (-) 群の筋細胞に分化していない MyoD-hiPS 細胞においても、hiPS 細胞維持培地や筋分化培地中に CCL2 や TGF- $\beta$ 1 を産生していたが、両サイトカイン産生は筋分化により増加していた。
- 5) TNF- $\beta$  産生は Dox (-) 群の MyoD-hiPS 細胞の筋成熟培地中にも認めたが、Dox (+) 群の MyoD-hiPS 細胞からの TNF- $\beta$  産生とは時相が異なっていた。
- 6) MyoD-hiPS 細胞の形態学的変化や各種サイトカイン産生能は 2 クローンで同様の結果であり、クローン間でのばらつきはなかった。

##### (3) SS (住田) :

###### a. M3R 反応性 Th1 bulk 細胞 :

- 1) bulk 細胞として IFN- $\gamma$  を産生する M3R 反応性 Th1 細胞を分離した。
- 2) 1) 由来の T-iPS 細胞が形態上確認できた。
- 3) 少なくとも 3 個の T-iPS 細胞 (TkSS1-1, TkSS1-2, TkSS1-3) において OCT3/4 発現が 92.8-97.8% に認められた。
- 4) TkSS1-2 クローンにおいて、TCRV  $\beta$  12 遺伝子が再構成されていることが判明した。
- 5) 6) 現在進行中。

###### b. M3R 反応性 Th1 および Th17 クローン細胞 :

- 1) 同一 SS 患者末梢血から、IFN- $\gamma$  を産生する M3R 反応性 Th1 細胞および IL-17 を産生する M3R 反応性 Th17 細胞を single cell として分離、培養に成功した。
- 2) 3-A2 クローンにおいて、M3R 抗原特異的に反応し IFN- $\gamma$  を産生していることを確認した。
- 3) 4) 現在進行中。



#### (4) AOSD (住田) :

- 1) 活動性 AOSD 患者 4 名、非活動性 AOSD 患者 8 名、および健康人 (HS) 7 名の末梢血から CD14<sup>+</sup>単球 (AMo, IAMo, HMo) を分離した。
- 2) 単離した AMo, IAMo, HMo 細胞からそれぞれ mRNA を抽出し、DNAarray 法により AOSD と特異的な mRNA を抽出する準備を進めている。

## 2. ゲノム研究プロジェクト

### (1) SLE :

[A] ゲノム解析に基づく新規分子標的の検索と治療戦略開発 : (竹内、田中、三宅、渥美、広瀬、天野) :

#### 1. 竹内

- 1) SLE 患者と HC との差次的遺伝子発現解析の結果、2 倍以上発現変動があり、統計学的に有意 ( $P < 0.05$ , Welch t-test) であった遺伝子プローブ数は、558 (上昇)、289 (低下) であった。
- 2) パスウェー解析では、インターフェロンシグナル関連遺伝子群が最も変動しており、既報と一致していた。酸化ストレス関連のメタロチオネイン遺伝子の有意な変動が認められた。
- 3) 腎炎、初発、自己抗体、治療の有無、SLEDAI で層別化解析を行い、腎炎に特徴的な 14 遺伝子が 10 (上昇)、4 (低下) 等を抽出した。
- 4) 約 3 万遺伝子と 50 以上の臨床項目との総当たりの相関解析を行ったところ、10% 以上の遺伝子と相関係数が 0.8 以上を示す臨床検査指標として、血清 LDH と  $\beta 2$  ミクログロブリンが抽出された。
- 5) 分子標的治療のよりよい対象者の絞り込みに、標的経路の遺伝子発現異常の有無の有用性を検討するための予備解析として、候補遺伝子クラスター解析により試みたところ、B 細胞系の治療標的であるプラズマブラスト関連遺伝子群の発現上昇が認められた患者群を絞り込むことができた。

#### 2. 田中

- 1) 健康人に比して SLE 患者の T 細胞では、Th1 (18% vs 19%)、Th17 (11% vs 13%) に変化は認めなかったが、SLE において Tfh (0.8% vs 1.5%) および Treg (5% vs 7%) の割合が有意に上昇していた。
- 2) サブセット間におけるクラスター解析では、Tfh が Th1、plasmablast と正相関する一方で、activated Treg が activated Th17、IgM memory B cell と正相関した。Treg、Th17、IgM memory B cell は疾患活動性と逆相関したが、Tfh とは相関性は認められなかった。
- 3) Tfh が増加する症例のみでサブ解析を行うと、Tfh は BILAG index と正の相関を示した。
- 4) Tfh 細胞は Th1 のフェノタイプ、即ち、CXCR5<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T 細胞の割合が上昇し、可塑性を有する Tfh/Th1 細胞が SLE の病態形成に関与している可能性が示唆された。
- 5) Th1, Th2, Th17 細胞における Tbx21、Gata3、Rorc の遺伝子座は夫々で促進型修飾を受けていたが、in vitro、あるいは in vivo で誘導された Tfh 細胞においては、これらのマスター転

写因子は促進型と抑制型の両方のヒストン修飾を受けており (bivalent domain)、Tfh 細胞の可塑性を示唆していた。逆に、Tfh 細胞のマスター転写因子である Bcl6 (及びその抑制転写因子 Blimp-1) の遺伝子座は、Tfh のみならず、Th1, Th2, Th17 などの他のサブセットにおいても同様に、促進型と抑制型の両方のヒストン修飾を受けており (bivalent domain)、Tfh 細胞の分化は、multifactorial であることが示唆された。

#### 3. 三宅

- 1) 細胞頻度の比較では、SLE 患者群では健康者群と比較し、単球と CD123<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup> DC の頻度が増加し、myeloid DC、NK 細胞の頻度が低下していた。
- 2) 単球における分画の頻度については、健康人と有意差は見られなかった。
- 3) 単球分画における CCR5 の発現を検討したところ、CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>分画において陽性細胞が増加し、CD14<sup>+</sup>16<sup>-</sup>分画において低下を認めた。
- 4) CCR5 陽性 CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>細胞の頻度と SLE の疾患活動性に正の相関を認めた。
- 5) B 細胞においても CCR5 の発現率が有意に増加していたが、疾患活動性との相関は認めなかった。

#### 4. 渥美

- 1) IRF5、STAT4、BLK、1q25.1 領域の SNP は SLE を合併しない SS との関連が認められた。
- 2) BANK1、TNFAIP3、TNFSF4 は SS との有意な関連は認められなかった。
- 3) SLE の疾患感受性遺伝子の一部は SLE を合併しない SS でも関連が認められることが明らかとなった。

#### 5. 広瀬

- 1) Fc $\cdot$ RIIb<sup>-/-</sup>. *Yaa* マウスには高力価の自己抗体産生が見られた。CD19<sup>Cre</sup>. *Yaa* マウスでは、自己抗体価は Fc $\cdot$ RIIb<sup>-/-</sup>. *Yaa* マウスに比較して有意に低かった。C/EBP $\cdot$ Cre. *Yaa* マウスでも、Fc $\cdot$ RIIb 発現欠損を伴わない Fc $\cdot$ RIIb<sup>fl/fl</sup>. *Yaa* マウスに比較して有意に高い抗体価が認められた。CD11c<sup>Cre</sup>. *Yaa* マウスでは自己抗体価の上昇は見られなかった。
- 2) Fc $\cdot$ RIIb<sup>-/-</sup>. *Yaa* マウスには高度の蛋白尿の出現が見られ、10 ヶ月齢で 80% 以上が腎不全で死亡した。一方、CD19<sup>Cre</sup>. *Yaa* マウスでは腎炎の発症は高度に抑制され、10 ヶ月齢での死亡率は 30% であった。C/EBP $\cdot$ Cre. *Yaa* マウスでも CD19<sup>Cre</sup>. *Yaa* マウスと同程度の蛋白尿出現率が認められた。CD11c<sup>Cre</sup>. *Yaa* および Fc $\cdot$ RIIb<sup>fl/fl</sup>. *Yaa* マウスには病態は全く発症しなかった。
- 3) 単球上で Fc $\cdot$ RIIb 発現を欠損する Fc $\cdot$ RIIb<sup>-/-</sup>. *Yaa* および C/EBP $\cdot$ Cre. *Yaa* マウスでは、Gr1<sup>+</sup>単球 subset に比較して Gr1<sup>-</sup>Fc $\cdot$ RIV<sup>+</sup>の活性型単球 subset が有意に増加していた。一方、末梢血中の好中球比率は各マウスに有意差は認められなかった。

## 6. 天野

- 1) *Slamf29* マウス、*Slamf29. Yaa* マウスでは、関節炎の発症は認めなかった。
- 2) *Slamf29. Yaa* マウスにおいてはループス腎炎様の糸球体腎炎を呈した。
- 3) *Slamf29. Yaa* マウスでは、腎病変の組織学的スコアは K01. *Yaa* マウス、K02. *Yaa* マウスと比較した際には、有意に低かった。
- 4) *Slamf29. Yaa* マウスの血清中抗 ds-DNA 抗体の上昇は認めなかった。
- 5) 肺病理では、*Slamf29. Yaa*、K01. *Yaa* マウスマウスにおいて肺血管周囲に著明な細胞浸潤を認めたが、K02 マウス、K02. *Yaa* マウスでは認めなかった。

### (2) PM/DM :

#### [A]GWAS 解析 : (山本、上阪ほか) :

- 1) PM+DM 全体では、LOC645120 の SNP に最も強い関連を認め ( $P = 2.0 \times 10^{-7}$ )、DM 単独では *PFKFB3* 遺伝子の SNP (rs12571538, オッズ比 1.53, 95%信頼区間 1.29 - 1.82,  $P = 8.4 \times 10^{-7}$ )、PM 単独では *ESRRG* 遺伝子の SNP に最も強い関連を認めたが (rs12089054 オッズ比 1.94, 95%信頼区間 1.47 - 2.53,  $P = 4.6 \times 10^{-7}$ )、いずれもゲノムワイド水準の有意性を示さなかった。

#### [B]ゲノム解析に基づく新規分子標的の検索と治療戦略開発 : (神田、三森、藤本) :

##### 1. 神田

- 1) 得られたヒト筋微小血管内皮細胞 (human muscle microvascular endothelial cells: HMMEC) 株は我々が樹立したヒト脳微小血管内皮細胞株 (TY10 株) と同じくバリア構成細胞である spindle-fiber shaped morphology を呈しており、vWF を発現していた。
- 2) HMMEC 株は mRNA および蛋白レベルで TY10 株と同様に claudin-5、ZO-1 などの TJ 関連分子を発現しており、TY10 株と同程度の高い電気抵抗値を示した。

##### 2. 三森

- 1) 131 例 (PM 51、DM 40、およびILD 40 例、男女比31 : 100) で抗ARS 抗体を検出した (抗 Jo-1 : 46、EJ : 25、PL-7 : 24、PL-12 : 16、OJ : 12 およびKS : 8 例)。早期併用群は41 例 (CSP 33、TAC6、AZP 2 例)、遅延併用群は42 例 (CSP 20、TAC 16、AZP 6 例)、非併用群48 例であった。
- 2) 15 年生存率は、3 群比較で早期併用群が最も良好で (90%)、遅延併用群が中間 (80%)、非併用群が最も低率 (68%) であった ( $P < 0.05$ )。
- 3) 在宅酸素療法導入は早期併用群20%、遅延併用群36%および非併用群17%で、遅延併用群で有意に高かった ( $P < 0.05$ )。IVCY 導入は非併用群 (6%) と比較して早期併用群 (41%)、遅延併用群 (40%) で多く導入されていた。
- 4) 免疫抑制薬併用後のILD 再燃率は、早期併用群34%と遅延併用群26%の間で有意差は認められなかったものの、各群の死因は遅延併用群で

は1 例を除く全例がILD 増悪であった。

- 5) 早期併用群ではILD 増悪による死亡は認めず (86%vs 0%、 $P < 0.10$ )、非併用群では半数にとどまった。

## 3. 藤本

- 1) dPGS 投与群ではコントロール群に比べて、筋の壊死面積は有意に縮小し、CD4 陽性 T 細胞や CD8 陽性 T 細胞の浸潤も有意に減少した。
- 2) dPGS 投与群ではコントロール群に比べて組織学的スコアが 52%低下した ( $p < 0.05$ )。
- 3) dPGS はマウスの C タンパク誘導筋炎を改善する働きを持つと考えられた。

### (3) SS :

#### [A]GWAS解析 : (山本、住田ほか) :

- 1) SS においては、*HLA-DPA2* 遺伝子の SNP に最も強い関連を認めた (rs2068204, オッズ比 1.52, 95%信頼区間 1.35 - 1.71,  $P = 7.7 \times 10^{-13}$ )。その他 STAT4 (rs11889341) 及び DGUOK-TET3 (rs6546883) 遺伝子の SNP にも関連を認めた。

#### [B]ゲノム解析に基づく新規分子標的の検索と治療戦略開発 : (坪井、中村、川上、佐野) :

##### 1. 坪井

- 1) 主成分分析では SS、IgG4-RD、健常人の遺伝子発現パターンは互いに異なっていた。
- 2) SS で発現が増加した DEGs は 1320 遺伝子、減少した遺伝子は 1321 遺伝子抽出された。
- 3) CXCL9、NR4A2、DPP4 (CD26)、SGK1、PKD1 を validation 候補遺伝子として抽出した。定量 PCR による validation では、NR4A2、DPP4 (CD26) は IgG4-RD と比較して、SS の LSG で有意に高発現していた ( $P < 0.05$ )。
- 4) NR4A2、DPP4 (CD26) は、SS の LSG に浸潤した T 細胞において特異的に発現を認めた。NR4A2 は主に核内に局在し、DPP4 (CD26) は主に細胞表面に局在していた。

##### 2. 中村

- 1) SS 患者では健常者と比較して、IL-33、ST2、IL4、IL-13 のいずれの分子についても mRNA 発現の亢進を認めた。
- 2) 免疫組織化学染色では、健常者では IL-4、ST2 の発現はほとんど認められず、IL-33 も導管上皮内のみ弱い発現を認めた。
- 3) リンパ球の浸潤程度が重度の症例は軽度の症例と比較して、IL-4 と IL-33 は導管上皮とその周囲に強い発現を認め、ST2 も多くの浸潤リンパ球に発現を認めた。
- 4) 血清 IL-33 の平均値は有意差を認めなかったものの、SS 患者で高値であった。
- 5) SS 患者をリンパ球の浸潤程度で軽度と重度に 2 群に分けると、重度の群で IL-33 は有意に高かった。
- 6) 特に血清 IL-33 が高かった SS 患者 4 例は、ともに自己抗体値 (抗 SS-A/B 抗体、ANA、RF、IgG) が著明に高く、さらに 1 例は悪性リンパ腫を合併していた。

### 3. 川上

- 1) TLR3 下流シグナルについて in vitro では poly I:C 刺激により RIPK3 を含め、p-FADD や cleaved caspases 発現の増強が認められた。
- 2) 小唾液腺組織では EGFR 発現が確認されたが、培養唾液腺上皮細胞の EGF 刺激では HO-2, HSP-27 発現が増強し、これらの分子とリン酸化 Akt との共発現が認められた。
- 3) Poly I:C による p-FADD および cleaved-caspase 8 発現は、EGF 濃度依存性に抑制された。
- 4) TLR7 は全ての SS 唾液腺の殆どの浸潤細胞に強く発現しており、浸潤細胞近傍の導管上皮にも強い発現が見られた。
- 5) TLR7 は CD4+T 細胞よりむしろ CD8+T 細胞と共に発現しており、CD20 上の TLR7 発現が特に強かった。一部の形質細胞や樹状細胞マーカーである CD303 との共発現も明らかにされた。
- 6) TLR8/9 は SS 浸潤細胞や導管には有意な発現は見られなかった。

### 4. 佐野

- 1) 現在、協力施設からの患者情報も収集し、解析中である。

#### (4) AOSD :

[A]ゲノム解析に基づく新規分子標的の検索と治療戦略開発 (三村) :

##### 1. 三村

- 1) 健常人において、末梢血白血球の各細胞群において、ヒストン修飾変化をフローサイトメトリー法により検出することが可能が判明した。
- 2) AOSD 患者の解析に関しては、現在、進行中である。

#### D. 考察と E. 結論

##### 1. 疾患特異的 iPS 細胞研究プロジェクト

###### (1) SLE :

SLE 患者由来 iPS 細胞を用いた研究により、SLE 病態の解明を目指すとともに、制御性 T 細胞分化による治療法の開発を目指したい。

###### (2) PM/DM :

筋原性遺伝子 MyoD を導入し強制発現させた hiPS 細胞は筋細胞への分化過程において、クローン間によるばらつきなく、ヒト筋芽細胞と同様に、サイトカイン産生能を有することを TNF- $\alpha$ 、CCL2、CXCL8、TGF- $\beta$ 1 の定量を通じて示した。hiPS 細胞を用いた筋組織における自然免疫活性化機序の解明は、PM/DM に対する新規薬剤開発への応用が期待できる。

###### (3) SS :

SS 患者末梢血単核球由来の M3R 反応性 Th1 バルク細胞から T-iPS 細胞の樹立に成功した。現在、M3R 反応性 Th1 および Th17 クローン細胞からの T-iPS 細胞の樹立及び T-iPS 細胞から CD4+T 細胞、Treg 細胞への分化誘導条件を検討している。

###### (4) AOSD :

活動性 AOSD、非活動性 AOSD、健常人の末梢血 CD14+ 単球の採取は順調に進んでいる。DNAarray により、疾患特異的分子を選定する。

##### 2. ゲノム研究プロジェクト

###### (1) SLE :

[A]ゲノム解析に基づく新規分子標的の検索と治療戦略開発 :

###### 1. 竹内

網羅的遺伝子解析により、これまで覆われていた SLE の遺伝子発現プロファイルと臨床情報との関連の一端を明らかにすることができた。これらの情報は本疾患の病態解明、治療法の確立に寄与するものと考えられた。

###### 2. 田中

疾患活動性に応じて Tfh/Th1-plasmablast の相関による促進的な制御、および Treg/Th17-IgM memory B 細胞の相関による抑制的な制御が存在し、それらのバランス破綻を介した病態の多様性が示唆された。また、Tfh と Th1 には可塑性が示唆された。今後、斯様な T 細胞サブセットの多様性と可塑性に関与する細胞表面抗原解析、エピゲノム解析により制御すべき標的分子を特定する。

###### 3. 三宅

ゲノム解析により SLE 疾患関連遺伝子は、B 細胞とミエロイド系の細胞に関連のある遺伝子が多い。CCR5 陽性 CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> (Intermediate) 単球の末梢血における頻度が SLE の疾患活動性に相関しており、SLE 病態への関与が示唆された。

###### 4. 渥美

SLE の疾患感受性遺伝子の一部は SS でも関連が認められることが明らかとなった。自己免疫疾患に共通の遺伝的背景の存在が示唆された。

###### 5. 広瀬 :

本研究結果から、B 細胞のみをターゲットとしたループス腎炎の治療では不十分なことを示しており、単球系細胞をターゲットとした新たな治療法の開発に、本モデル系は有用な情報を提供する。

###### 6. 天野

*Yaa* 遺伝子が介在する自己免疫異常の病態形成には、第 1 染色体に存在する *Fc $\gamma$ R2b* の欠損、そして/または *SLAM* 遺伝子異常が重要であり、*Fc $\gamma$ R2b* 遺伝子欠損マウスと *SLAM* 遺伝子異常マウスを比較した際には、腎炎においては *Fc $\gamma$ R2b* 遺伝子欠損が、肺の細胞浸潤については *SLAM* 遺伝子異常がより大きく影響した。

###### (2) PM/DM :

[A]GWAS 解析 :

PM/DM においては、ゲノムワイド水準を満たす領域がなく、検出力不足が考えられた。候補領



域に存在する *PFKFB3* および *ESRRG* 遺伝子は筋肉組織で発現する遺伝子であり、真の関連である可能性があるため、別検体セットを用いて追認解析する必要がある。

[B]ゲノム解析に基づく新規分子標的の検索と治療戦略開発：

1. 神田

ヒト筋微小血管内皮細胞株の樹立に成功した。ヒト筋微小血管内皮細胞株はヒト BBB 構成内皮細胞株と共通のバリア関連分子を発現しておりかつ同等のバリア機能を有していた。今後、筋微小血管に特化したあらたな皮膚筋炎治療法を開発する。

2. 三森

疾患活動性を有する抗ARS 抗体陽性ILD に対して、ステロイドに加えて早期からの免疫抑制薬併用によって長期生命予後の改善が期待できる。

3. 藤本

マウスにおいて L-selectin を標的とした分子治療は有効と考えられ、今後炎症性ミオパチーに対して、本薬剤や類似の作用をもつ他の薬剤を用いた治療法の開発が有望であると考えられた。

(3) SS :

[A]GWAS解析：

ゲノム解析では、他の多くの自己免疫疾患と同様に、SSにおいては HLA多型が最も強い関連を認めため、何らかの自己抗原の提示が病態に大きく関与しているものと思われた。また、*STAT4*, *DGUOK-TET3*などの遺伝子領域が、SLEと共有されているため、2疾患共通の病態が考えられた。

[B]ゲノム解析に基づく新規分子標的の検索と治療戦略開発：

1. 坪井

NR4A2, DPP4 (CD26) は、SSの新規治療標的分子となりえる疾患関連遺伝子である可能性が示唆された。

2. 中村

SSの唾液腺導管上皮から分泌されたIL-33が、ST2を介してTh2に作用することで、Th2サイトカインの産生が誘導され、SSの病態進展に関与していることが示唆された。

3. 川上

SS 唾液腺における TLR3 シグナル制御機構および TLR7 による唾液腺炎発症への関与が示された。TLR7 の発現パターンや抗原認識、炎症細胞惹起機序を検討することにより、SS の治療に有用な創薬に繋げて行く研究が必要である。

(4) AOSD :

[A]ゲノム解析に基づく新規分子標的の検索と

治療戦略開発：

末梢血白血球における細胞重集団のヒストン修飾変化をフロー・サイトメトリーにて検出する事が可能となった。この変化が、診断や活動性と関係しているか否かを検討することにより、病態や免疫系機能異常を解析することが可能となろう。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし

G. 研究発表

分担研究報告書参照

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

分担研究報告書参照

### III 委託業務成果報告（業務項目）

厚生労働科学研究委託業務 難治性疾患等克服研究事業  
(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業))  
分担研究報告書

## 自己免疫疾患の病因、病態に関する研究

研究分担者 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  
研究協力者 藤尾 圭志 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 講師  
庄田 宏文 東京大学医学部附属病院アレルギー・リウマチ内科 助教  
住友 秀次 東京大学医学部附属病院アレルギー・リウマチ内科 助教  
高地 雄太 理化学研究所統合生命医科学研究センター 上級研究員

### 研究要旨

全身性エリテマトーデス(SLE)の免疫担当細胞の解析として、マウスで同定したLAG3陽性制御性T細胞のヒトでの相同性細胞を同定し、その性状を解析した。また、この細胞のさらなる解析を目指す為、iPS技術を用いる研究を進めている。一方、当班の共同研究としてシェーグレン症候群および多発筋炎・皮膚筋炎のゲノムワイド関連解析を実施した。

### A. 研究目的

全身性エリテマトーデス(SLE)は遺伝的要因、環境的要因をベースとして、自己反応性T細胞、B細胞の活性化により発症する自己免疫疾患である。我々はマウスモデルにおいて抗体産生を制御するLAG3陽性制御性T細胞を同定し、ループスモデルマウスへの移入による自己抗体産生抑制、腎障害軽減作用を証明している。ヒトにおいても*in vitro*においてLAG3陽性T細胞による抗体産生抑制を証明している。一方、SLEにおいては樹状細胞(DC)の異常も指摘されており、疾患感受性遺伝子との関連が指摘されている。本研究はSLE患者由来iPS細胞を用いてのT細胞、樹状細胞の分化異常の検討とその原因の解明を目的とする。この点で、どの細胞由来のiPS細胞を作成するかは重要な点である。すなわち末梢血T細胞からiPS細胞を作成する場合、再構成後のT細胞受容体を有することになるが、T細胞受容体の抗原特異性は再分化後のT細胞の機能に影響を与えることが想定される。実際にマウスでのスクレオソーム特異的T細胞受容体再構成とCTLA-4遺伝子導入によるSLEモデルマウス治療実験ではT細胞受容体の特異性が重要であることが示している(Fujio K, et al. J Immunol. 2004)。特定の末梢血T細胞サブセットからのiPS細胞作製は、臨床応用にあたり重要となる可能性がある。

さらに、シェーグレン症候群(SS)および皮膚筋炎・多発筋炎(PM/DM)は、SLEと同様に複数の遺伝・

環境因子によって発症する多因子疾患であるが、その遺伝的背景の詳細については明らかでない。本研究では、班員全員の共同研究によりゲノムワイド関連解析(genome-wide association study; GWAS)によって、これらの疾患の遺伝因子を網羅的に同定することを目的としており、これに関するゲノム解析の部分を中心として受け持った。

### B. 研究方法

健常人、SLE患者の末梢血におけるT細胞分画についてFACS解析を行い、特に制御性T細胞について検討を行った。さらに末梢血単核細胞および種々の検討を踏まえて決定した分画のT細胞を用いてiPS細胞株を作成する計画である。このiPS細胞株を用いて、フィーダー細胞上でIL-7、FLT3L存在下に培養し、T-lineage細胞へ分化を試みる。同時にiPS細胞からDCを作成し、このDCとT-lineage細胞をサイトカイン環境下に培養し、LAG3陽性細胞への分化を試みる。iPS細胞由来T-lineage細胞、LAG3陽性T細胞、DCにおける健常人とSLE患者の差について、発現遺伝子解析やサイトカイン産生・抑制能などの機能解析により検証する。

一方、ゲノム解析については、DNAは各疾患患者の末梢血白血球より抽出した。一塩基多型(single nucleotide polymorphism; SNP)のジェノタイプピングは、OmniExpressExome-8v12(Illumina社)を用いて行った。ジェノタイプピングのquality control(QC)として、SNPのコールの成功率が99%以下の