

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19390155  
 研究課題名（和文） 転写因子を標的とする蛍光相関分光法を用いた新規病態検査法の開発  
 研究課題名（英文） Development of a new assay system for transcription factor activity using FCS  
 研究代表者  
 熊谷 俊一 (KUMAGAI SHUNICHI)  
 神戸大学・大学院医学研究科・教授  
 研究者番号：00153346

研究成果の概要（和文）：①蛍光相関分光法を用いて、転写因子活性の測定法の基礎的検討を行った。既存の ELISA 法とほぼ変わらないものであった。②既存の ELISA 法を用いて、関節リウマチ患者の末梢血単核球における転写因子活性を測定した。転写因子 NFκB は RA 患者で様々な値を取り、STAT3 は高値の傾向があった。そこで、生物製剤投与前後で、4 人の患者で啓示的に転写因子 NFκB、STAT3、AP-1、NFAT を測定したところ、NFκB が活動性を反映すると考えられた。そこで、NFκB ファミリー 5 種類について測定したところ、p50 と p65 のみが末梢血で上昇しており、この 2 者は相関することが判明した。結果として、RA に指標には NfκBp65 が最も適切な転写因子と考えられた。③そこで、RA 患者の治療前後で臨床指標と、転写因子活性を測定したところ、現在のところ良好な相関が得られた。今後症例の蓄積により、反応性予測へと結び付けたい。

研究成果の概要（英文）：First, we tried to develop a new method to measure transcription activity in clinical samples. We did so using FCS technology and ELISA technique, which showed a good correlation with each other. Second, We measured transcriptional activity in PBMC of rheumatoid arthritis patients (RA) and found that NFκB show variable titers in RA patients. In four patients receiving biologics treatment, NFκB was considered best as a marker for disease activity among NFκB, STAT3, AP-1, and NFAT. Then we checked NFκB family activity and found p50 and p65 were elevated in RA patients. Finally, we showed that p65 activity correlates with RA activity in RA patients receiving biologics therapy. Further experiments will be needed to determine whether this technique is useful to predict the efficacy of biologic therapies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2008 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2009 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：自己免疫疾患・転写因子・生物製剤・蛍光相関分光法

### 1. 研究開始当初の背景

免疫応答の調節、自己寛容の成立および維持（自己と非自己の識別）にかかわる中心的な免疫担当細胞はT細胞である。胸腺で成熟したナイーブCD4+T細胞は、さらに抗原刺激を受けることによりTh1あるいはTh2細胞へと分化する。Th1細胞はT細胞の増殖を制御するサイトカインIL-2や炎症反応を制御するIFN- $\gamma$ 、TNF- $\beta$ などのサイトカインを産生し、主に細胞性免疫機能に関与する。一方、Th2細胞はB細胞による抗体産生制御に重要なサイトカインIL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-13などを産生し、主に液性免疫機能に関与する。すなわちこの2つの細胞集団は産生するサイトカインの違いを反映して免疫反応において異なる機能を有し、相互のバランスにより感染防御や免疫性疾患における免疫応答を制御している。膠原病をはじめとする自己免疫疾患は原因不明であるが、その病態としてはこのTh1/Th2型細胞のバランスが崩れ免疫寛容の破綻を来していることが想定されており、Th1/Th2バランス異常の是正の一つの方法として、異常に分泌されているサイトカインの機能を抑制することが考えられる。その目的のために抗TNF- $\alpha$ 抗体などのモノクローナル抗体を中心とした生物学的製剤がすでに臨床応用されており、実際に生物学的製剤の効果は大きく、Th1/Th2バランスの異常の是正が病態の改善につながると考えられる。しかしながらこうした生物学的製剤に対し抵抗性を示す患者も多く、またアナフィラキシー反応や結核をはじめとする感染症に対する抵抗力低下などの重篤な副作用も知られている。そこで、こうした免疫制御に、より中心的な役割を果たしている転写因子に着目した。

### 2. 研究の目的

本研究では、末梢血リンパ球の分化や機能を規定する転写因子の簡便な測定系を開発する。次にその測定系を利用して関節リウマチや全身性エリテマトーデスをはじめとする膠原病の病態における転写因子の意義を明らかにする。さらに副腎皮質ステロイド薬や免疫抑制薬投与による転写因子活性の変化を薬剤反応良好群と不良群で比較検討し、それぞれの患者における治療反応性をエピジェネティックに予測する方法を確立することで、難治性自己免疫疾患である膠原病に対するテーラーメイド医療を確立する。

### 3. 研究の方法

(1)末梢血リンパ球の分化や機能を規定する転写因子活性の簡便な測定系を開発する。  
(2)関節リウマチや全身性エリテマトーデスをはじめとする膠原病で転写因子活性を測定し、転写因子活性からみた個々の疾患の特

徴を明らかにする。

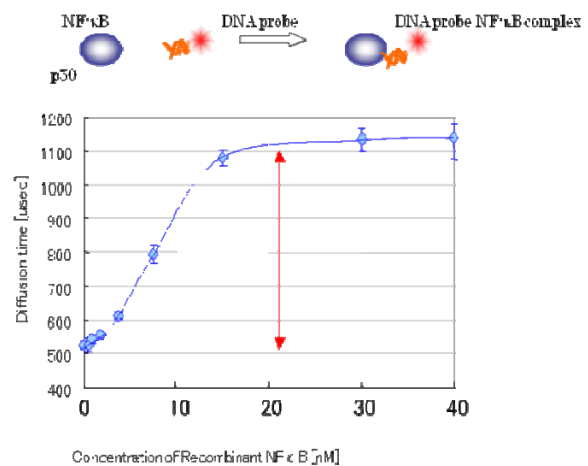
(3)生物製剤や免疫抑制薬による治療の前後で転写因子活性がどのように変化するかを明らかとする。転写因子活性プロファイルと治療反応性の関連をレトロスペクティブに比較検討し、治療反応性予測に役立つ転写因子活性を明らかにする。

(4)将来的には、プロスペクティブスタディーを行い、転写因子活性プロファイル測定に基づく膠原病に対するテーラーメイド医療を確立する。

### 4. 研究成果

#### (1)蛍光相関分光法の基礎的検討

- ①本システムでは、転写因子を特異的に認識する蛍光標識DNAプローブを用いて、フリーのプローブとDNAプローブ-転写因子複合体の分子量の違いに基づく拡散時間の違いを測定することで転写因子の検出を行う。
- ②システムが動いているかを検討するために、ELISA法との比較検討を行う。
- ③明らかに動いているサンプルを調整し、WBで確認した後に、奔放と比較検討する。
- ④リコンビナント蛋白を用いて標準曲線を描かせると、下記のようにNF $\kappa$ Bに関しては良好な曲線が得られた。2-15nMあたりで測定可能であると思われた。



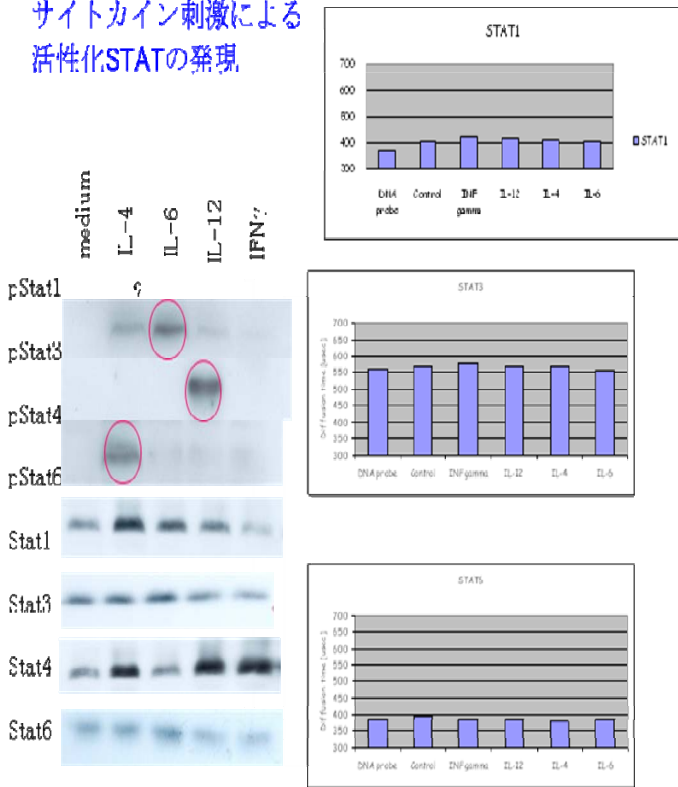
シスメックス研究所データ

#### (2)活性化リンパ球抽出サンプルによるFCSによる活性化STATの検討

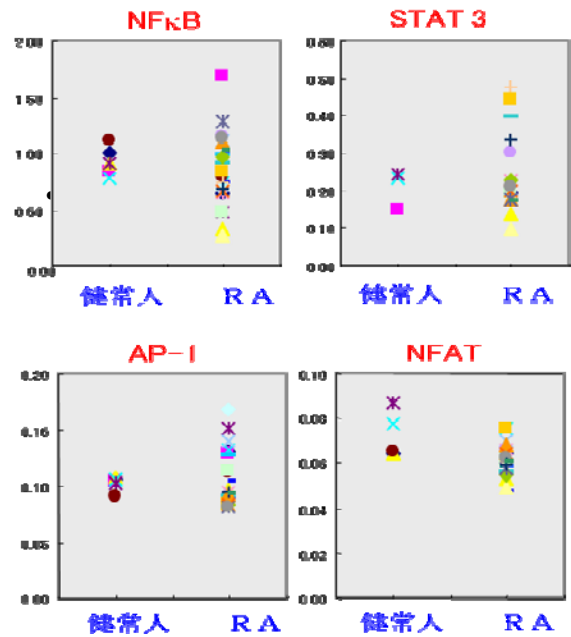
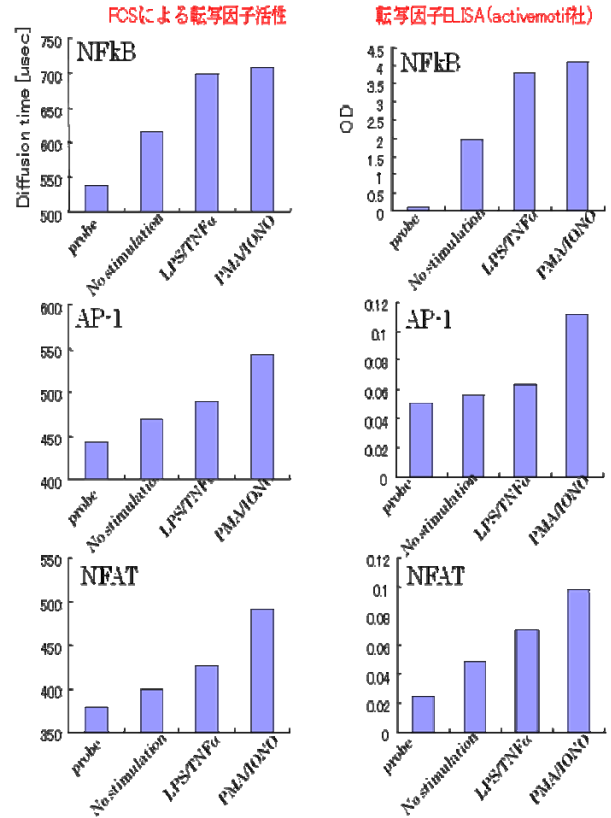
- ①培養リンパ球を各種サイトカインを用いて刺激し、STATリン酸化をWBで検討したところ、良好なリン酸化シグナルを得た。
- ②同時にFCSで測定したところ、しかしながら、必ずしも良好な増加は認められな

かった。  
 ③標準蛋白もないことから、STAT 活性の検出は困難であると考えられた。

サイトカイン刺激による  
 活性化STATの発現



- (3) 活性化リンパ球抽出サンプルによる検討  
 ①PBMCを単離、LPS ないしはPMAにて刺激をした。前後において核内蛋白を抽出し、HCS および転写因子 ELISA 法を用いて、NFkB、Ap-1、NFAT の活性を測定し、比較した。下記のグラフで示すように良好な活性増強を認め、両者の間で結果が一致していた。  
 ②FCS、ELISA ともにこれらの転写因子に関しては測定可能であると考えられた。
- (4) 関節リウマチ患者末梢血転写因子活性  
 ①以上の結果を踏まえ、健常人、及び、関節リウマチ患者末梢血より核内蛋白を抽出し、ELISA 法にて、各転写因子活性を測定した。  
 ②PBMC で測定可能であったのは NFkB、STAT3、Ap-1、NFAT の4者であり、他のSTAT、Ap-1 は測定不能であった。  
 ③患者群では健常人に比べ、ばらつきが大きく、個々の病態によって異なる事が予想された。意外にもNFATは低い傾向が見られた。



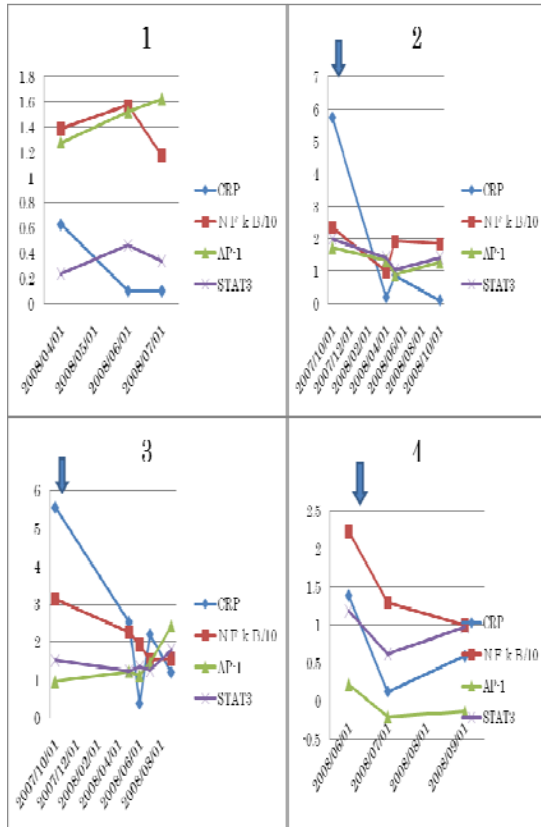
- (5) 生物製剤投与による転写因子活性の変化  
 ①NFkB、Ap-1、STAT3 に関し、生物製剤 (抗TNF 製剤) 投与前後での活性の変化を検討した。  
 ②症例1では遅れながらもNFkBは低下したが、Ap-1、STAT3は逆に最終的に上昇した。  
 ③症例2では、3者が同様の動きを示し、

低下した。

④症例 3 でも NFkB は低下したが、Ap-1、STAT3 は逆に最終的に上昇した。

⑤症例 4 では、3 つともに低下した。

以上のことから、NFkB は常に低下したが、Ap-1 と STAT3 は反対に上昇する例もあり、crP を反映しないものと考えられた。NFkB が、最も反映するのかもしれないと考えられた。



(6) 関節リウマチ患者における NFkB ファミリーの活性化

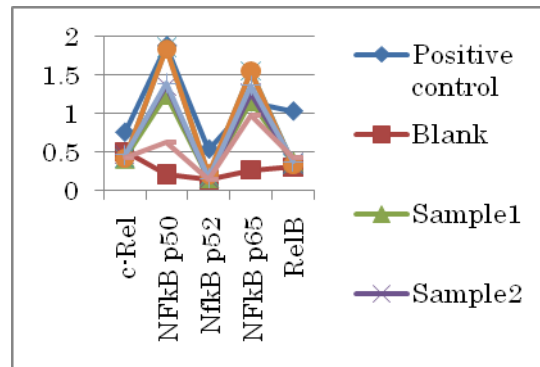
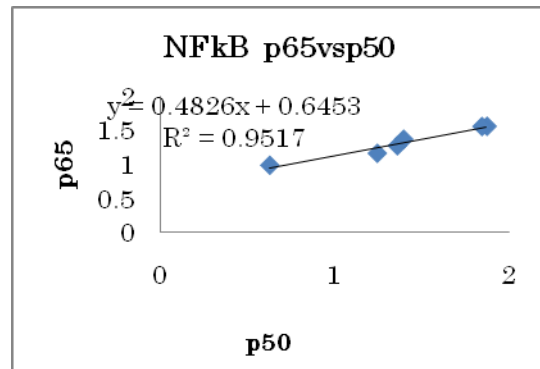
①NFkB ファミリーには、c-Rel、p50、p52、p65、Re1B などが存在する。P65 以外のファミリー分子の活性化を検討した

②c-Rel、p52、Re1B の測定結果は、全てのサンプルでほとんど陰性コントロールと差がなく、またサンプル間での差も検出できなかった。これにより、この 3 者は PBMC では測定できないと考えられた。

③p50 と p65 は十分な OD が検出された為に測定でき、また、サンプル間でのばらつきも認められた。

③p50 と p65 は、下のグラフに示すように、良好な相関を示した。R2 乗は 0.95 であった。

以上より、PBMC では p50 と p65 が活性化しており、両者は相関して動く。p65 でモニターすることとした。



(7) 抗 TNF 製剤投与による NFkB の変化

①関節リウマチ患者 9 名につき、TNF 製剤投与前後での、疾患活動性、CRP、NFkB 転写因子活性に関し検討した。

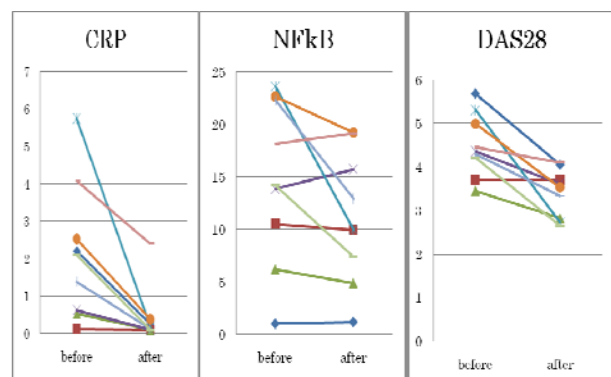
②ほとんどの例で、DAS の低下を認めたが、同時に NFkB の低下も認めた。

③但し、2 例では、転写因子活性の低下は認められなかった。

④この 2 例はもともと活動性が高く、DAS の低下も 4 程度までにはしか低下していない症例であった。

⑤但し、NFkB の高値が必ずしも低下しないわけではなかった。

⑥今後の更なる検討を要すると考えられる。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 9 件)

- ① Sugiyama D, Nishimura K, Tamaki K, Tsuji G, Nakazawa T, Morinobu A, Kumagai S. Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann Rheum Dis*. 査読有, 69 2009 70-81
- ② Nakamachi Y, Kawano S, Takenokuchi M, Nishimura K, Sakai Y, Chin T, Saura R, Kurosaka M, Kumagai S. MicroRNA-124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 査読有, 60(5) 2009 1294-304
- ③ Kyogoku C, Morinobu A, Nishimura K, Sugiyama D, Hashimoto H, Tokano Y, Mimori T, Terao C, Matsuda F, Kuno T, Kumagai S. Lack of association between tyrosine kinase2(TYK2) gene polymorphisms and susceptibility to SLE in a Japanese population. *Modern Rheumatology*, 査読有, 19(4) 2009 401-6
- ④ Tamaki K, Kogata Y, Sugiyama D, Nakazawa T, Hatachi S, Kageyama G, Nishimura K, Morinobu A, Kumagai S. Diagnostic accuracy of serum procalcitonin concentrations for detecting systemic bacterial infection in patients with systemic autoimmune diseases. *Journal of Rheumatology*, 35(1) 2008 114-9
- ⑤ Hayashi N, Koshihara M, Nishimura K, Sugiyama D, Nakamura T, Morinobu S, Kawano S, Kumagai S. Prevalence of disease-specific antinuclear antibodies in general population: estimates from annual physical examinations of residents of a small town over a 5-year period. *Modern Rheumatology*, 査読有, 18(2) 2008 153-60
- ⑥ Morinobu A, Biao W, Tanaka S, Horiuchi M, Jun L, Tsuji G, Sakai Y, Kurosaka M, Kumagai S.  
(-)Epigallocatechin-3-gallate suppresses osteoclast differentiation and ameliorates experimental arthritis in mice.
- ⑦ Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, Tsuji G, Nakazawa T, Kawano S, Saigo K, Morinobu A, Koshihara M, K. M. Kuntz, Kamae I, Kumagai S. Meta-Analysis: Diagnostic Accuracy of Anti-CCP Antibody and Rheumatoid Factor for Rheumatoid Arthritis. *Ann Intern Med*, 査読有, 146 2007 797-813
- Arthritis & Rheumatism*, 査読有, 58(7) 2008 2012-8

- ⑧ Nobuhara Y, Kawano S, Kageyama G, Sugiyama D, Saegusa J, Kumagai S. Is SS-A/Ro52 a hydrogen peroxide-sensitive signaling molecule? *Antioxid Redox Signal*, 査読有, 9(3) 2007 385-91
- ⑨ Wang B, Morinobu A, Kanagawa S, Nakamura T, Kawano S, Koshihara M, Hashimoto H, Kumagai S. Transforming Growth Factor Beta 1 Gene Polymorphism in Japanese Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Kobe J Med Sci*. 査読有, 53(1) 2007 15-23

〔学会発表〕 (計 9 件)

- ① Kasagi S, Kawano S, Okazaki T, Honjo T, Morinobu A, Hatachi S, Shimatani K, Tanaka Y, Minato N, Kumagai S. Anti-PD-1 Antibody Reduces CD4+PD-1+ T Cells and Relieves the Lupus-Like Nephritis of NZB/W F1 Mice. 第 75 回米国リウマチ学会 2009 年 10 月 20 日  
フィラデルフィア
- ② Saegusa J, Fujita M, Tanaka S, Morinobu A, Kawano S, Takada Y, Kumagai S. Secretary Phospholipase A2 Group Binds to Integrin v3 and Induces Proinflammatory Signaling. 第 75 回米国リウマチ学会 2009 年 10 月 20 日  
フィラデルフィア
- ③ Kumagai S, Hayashi N, Kawano S, Sugiyama D, Nishimura K, Kasagi S, Saegusa J, Morinobu A. Prevalence of Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibody and Its Association with Smoking in General Population: a Cross Sectional Study. 第 75 回米国リウマチ学会 2009 年 10 月 20 日  
フィラデルフィア
- ④ 熊谷俊一、関節リウマチ診断と治療の最前線  
— 第 56 回日本臨床検査医学会・学術集会  
2009 年 8 月 27 日 札幌
- ⑤ 西田美和、林宏樹、辻剛、三枝淳、杉本健、河野誠司、森信暁雄、熊谷俊一、エタネルセプト (Eta.) 投与下にリステリア髄膜炎を発症した関節リウマチ (RA) の一例 第 53 回日本リウマチ学会 2009 年 4 月 23 日 東京
- ⑥ 上田奈つき、中澤隆、綾野雅宏、西川あゆみ、横田敏彦、杉山大典、熊谷俊一、生物学的製剤を投与中の関節リウマチ患者における感染症の危険因子の検討 第 53 回日本リウマチ学会 2009 年 4 月 23 日 東京
- ⑦ 林伸英、生戸健一、河野誠司、熊谷俊一、膠原病診断におけるマルチプレックス技術を用いた自己抗体スクリーニングの有効性の検討 第 53 回日本リウマチ学会 2009 年 4 月 23 日 東京
- ⑧ 熊谷俊一、西村邦宏、森信暁雄、RA の早期診断と抗 CCP 抗体 (シンポジウム) 第 52 回日本リウマチ学会 2008 年 4 月 23 日 札幌
- ⑨ 笠木伸平、河野誠司、中澤隆、熊谷俊一、井田弘明 自己免疫異常を認めた周期性発熱症候群の一例 (会議録/症例報告) 第 51

〔図書〕(計5件)

- ①熊谷俊一、宇宙堂八木書店「検査値アプローチ  
症候疾患 検査の評価法」2009年 5頁
- ②熊谷俊一、中外医学社「チャート内科学診断」  
2009年 2頁
- ③辻剛、熊谷俊一、臨床病理刊行会「臨床病理  
レビュー」2009年 8頁
- ④熊谷俊一、財団法人神戸市産業振興財団発行、  
七旺社「第3章診断学総論. 社会人が学ぶ医療技術・  
医療用機器. 熊谷俊一、永井千秋、森脇俊道編。」  
2008年
- ⑤熊谷俊一、小柴賢洋 南江堂「NEW薬理学  
改訂第5版(編者: 田中千佳子、加藤隆一)  
2007年 5頁

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

熊谷 俊一(KUMAGAI SHUNICHI)  
神戸大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 00153346

### (2) 研究分担者

森信 暁雄(MORINOBU AKIO)  
神戸大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号: 10294216

西村 邦宏(NISHIMURA KUNIHIRO)  
神戸大学・大学院医学研究科・客員准教授  
研究者番号: 70397834

三枝 淳(SAEGUSA JUN)  
神戸大学・大学院医学研究科・特命助教  
研究者番号: 20514970