

199800551A

慢性関節リウマチの病因解明に関する研究

(研究課題番号：H10-免疫-010)

平成10年度厚生科学研究費補助金

感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業

研究報告書

研究代表者： 西岡久寿樹

聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター

目 次

西岡久寿樹 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター	P 1 – P 7
岩倉洋一郎 東京大学医科学研究所	P 8 – P11
大久保光夫 埼玉医科大学総合医療センター	P12 – P14
塩澤 俊一 神戸大学医学部保健学科	P15 – P16
能勢 真人 愛媛大学医学部第二病理学	P17 – P20
満屋 裕明 熊本大学医学部第二内科学	P21
森本 幾夫 東京大学医科学研究所	P22 – P26
八木田秀雄 順天堂大学医学部免疫学	P27 – P28
吉木 敬 北海道大学医学部第一病理学	P29 – P31
米原 伸 京都大学ウイルス研究所	P32 – P34

課題名 慢性関節リウマチの病因解明に関する研究

氏名 主任研究者 西岡 久寿樹

所属機関 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター

<研究要旨> 慢性リウマチの病因について、これまでは次の諸点を明らかにしている。

滑膜細胞の増殖機構

RAの病変である滑膜増殖のメカニズムを解析することが、慢性関節リウマチ（以下RA）の病因を解明する最も直接的な方法であると考え、滑膜細胞の増殖と細胞死の二つの視点から分子機構を解析し、次のような成果が得られた。

- ①RAの滑膜細胞には、腫瘍細胞に類似した性質を有する単一細胞由来の細胞群が存在することを明らかにした。この細胞は、X染色体の解析から遺伝的に単一細胞由来であり、自律増殖能を有し、特に骨破壊と密接に関連するいわゆるパンヌス領域に高密度に分布することが解明された。また、これらの細胞群ではcfosの強発現p53の変異も一部確認されたが、これらの変異が一次的なものか種々のサイトカインの影響により変異したものかについての研究をすすめている。
- ②形態形成遺伝子であるHomeobox遺伝子群のうち、HoxD9遺伝子がCBP等の転写因子を介して、滑膜増殖と分化を調節している遺伝子であること、HoxDの遺伝子がRAの滑膜細胞の増殖のプロセスに密接に関連していること、さらに、本遺伝子座は第2染色体に存在しており、その近傍に転写系および四肢形成に重要な役割を為す種々の形態形成遺伝子の存在が明らかにされており、この領域の遺伝子座について検討を加えている。
- ③感染要因に関与する遺伝子として我々の研究班で、初めて明らかにされたHTLV-I tax 遺伝子が挙げられるが、その産物である可溶性タンパクであるTaxタンパクが内因性物質である種々のサイトカインと同様に滑膜細胞の増殖に重要な役割を担うことが明らかにされた。

滑膜細胞の細胞死の分子機構

- ①我々の研究班では、世界に先駆けRAの滑膜細胞の変異にアポトーシスによる細胞死の調節機構の攪乱があることが明らかにされたが、今年度はさらにRA滑膜細胞におけるFas分子の細胞内伝達機構が解明された。
- ②Fas分子によるアポトーシスを誘導するサイトカインと逆に阻害するサイトカインの二系統のサイトカイン群によって、滑膜細胞は増殖とアポトーシスに陥ることが解明された。この事実は、サイトカイン標的治療戦略を構築する上でも極めて重要な示唆を与えている。
- ③アポトーシスを調節する鍵のプロテアーゼであるカスパーゼ8と会合するFLIP やFLASH の役割が解明された。

滑膜T細胞の役割と自己抗原の解析

- ①滑膜T細胞の受容体のβ鎖におけるclonalityの解析の結果、一定のT細胞クローンの増殖が明らかにされてきているが、特定の抗原分子について研究班では、Cathepsin-D および type II collagen を構成している分子を解明している。特に滑膜細胞ライブラリーを用いての研究成果が大きく進展しており、さらに動物モデルでの再構築を試みている。またSingle Cell PCR の手法により、α鎖のclonality の解析も進んだ。
- ②T細胞の病原局所への遊走に、DPP とRANTESなどのβケモカインの役割が解明された。

動物モデル

動物モデルもさらに研究は進展し、次の成果が得られた。

- ①HTLV-I tax 遺伝子導入マウスおよびHTLV-I env PX 導入遺伝子ラットを初めとして、RAに酷似した全身的な免疫異常を有する骨・関節破壊のRAモデルが広く確立されている。
- ②IL-1, リセプターアンタゴニストノックアウトマウス (IL-1 KO マウス) が新たに確立された。
- ③RAの自然発症マウスであるSKGマウスを用いた解析が進んだ。

RA病因遺伝子の解析

今年度、研究班では、家族性のRA、RA動物モデルおよびRA滑膜細胞に關与する転写因子をコードする遺伝子坐の解析という3つの方法にRAの病因遺伝子の解析が進んでいる。

今年度の成果は、マイクロサテライトマーカーによる疾患遺伝子解析システムを通して、第1、第8、X染色体の疾患遺伝子坐が特定されている。さらに、Homeobox に結合する転写因子の解明から、第2染色体の一部にもRAの疾患遺伝子が存在することが強く示唆された。

<分担研究者>

岩倉洋一郎	東京大学医科学研究所教授
大久保光夫	埼玉医科大学総合医療センター講師
塩澤 俊一	神戸大学保健学科教授
能勢 眞人	愛媛大学第二病理学教授
満屋 裕明	熊本大学第二内科教授
森本 幾夫	東京大学医科学研究所教授
八木田秀雄	順天堂大学免疫学助教授
吉木 敬	北海道大学第一病理学教授
米原 伸	京都大学ウイルス研究所教授

A. 研究目的

リウマチ性疾患へ罹患する患者数は、人口の高年齢化に伴い、増加の一途にあり、行政面からも対応が急がれている。そのリウマチ性疾患の中心とも言うべき慢性関節リウマチの病因については、ここ数年大きな進展をみせているが、RAという疾患の臨床的多様性から、ヒトのRAを対象とした研究ではこれまでの班の研究成果を踏まえて、今年度は次の4つの重点研究課題を中心に研究を遂行する。

①RAの主病変である滑膜組成を構成する滑膜細胞の増殖および細胞系を調節している分子群とその細胞間伝達機構および転写調節の解明、特にTNF α 、FGFの役割とCBPと結合する転写因子の解析。

②滑膜細胞の認識している自己抗原の絞り込みと、T細胞への関節内遊走の分子機構。

③種々の動物モデルを確立し、それをヒトのRAの多様性と対応させることの試み、すなわち、早期RAに対応するRAの動物モデルや末期のRAである骨破壊の動物モデルと対応させるという画期的な成果が得られた。

④RAの疾患遺伝子坐の解析

マイクロサテライトマーカーによる遺伝子解析およびRAの関節という病変の「場」を決定している遺伝子を解明するため、形態形成遺伝子群に注目し、解析を進めた。

⑤感染性要因

レトロウイルスおよびフラビウイルス遺伝子由来のタンパクが、内因性サイトカインであるIL-1やIL-6、TNF α など同様の滑膜増殖能を有する事を明らかにし、また免疫応答にどのように分子レベルで関与しているかを検討した。

B. 研究方法および結果

RA滑膜細胞および滑膜T細胞、動物モデル、感染性、病因遺伝子坐の解析の手法は、本研究班の昨年度の報告書で述べた点と大きな変化はない。すなわち、滑膜細胞の研究では、患者の手術時に得られた生体試料を中心に、その増殖およびアポトーシスの分子機構の解明を行なった。また、ハツカネズミの関節系統発生を調節している形態形成遺伝子群の解析を行ない、その形態形成遺伝子の塩基配列は、種を越えて共通の配列を有している。その特性を利用してRAの滑膜増殖の調節機構にどのように関わっているかを解析した。

また、種々の滑膜増殖性サイトカインやプロトオンコジーンと転写因子の関連を究明した結果、CBPと結合している形態形成遺伝子の一つであるHoxD9およびHTLV-I tax遺伝子など、これまでRAの病因と深く関わりを有する遺伝子群が重要な役割を果たしていることが明らかにされた。滑膜アポトーシスについても大きく研究の進展がみられた。すなわち、Fasのシグナル伝達機構が解明され、Fas/FasL \rightarrow FADD \rightarrow caspase8 \rightarrow PARP 経路が解明され、特にcaspase に会合するFLIP、FLASHなどの新しいアポトーシス関連分子の調節障害がRAの病因、特に滑膜細胞の変異と密接に関連していることが明らかにされた。現在、動物モデルでもこれらの経路の分子レベルでの解明を検討している。

<滑膜T細胞>

1) 滑膜T細胞の受容体が一定のclonalityをもつ局所で増殖していることを明らかにし、そのT細胞集団が特定のペプチドを認識していることをペプチドライブラリーを用いて明らかにした。この解析からcathepsin群 type II collagen などが重要な病因peptideであることが明らかにされた。さらにSingle Cell PCRを用いて α 鎖のclonalityを検討している。また、それらのT細胞の多くはFas感受性であることも解明された。

2) HTLV-I 関節炎では、HTLV-I envP40Xが主要な自己抗原であり、その抗原認識のプロセスを解明した。これは、感染性レトロウイルスが、RAの免疫応答に直接関与している事を明らかにしたものとして極めて興味深い。

3) T細胞に関する特異的な活性化機構がインテグリンFamilyのシグナル伝達機構から解明されている。RAの滑膜の炎症局所にはCD29/VLA型がみられ、T細胞が密接にそのリガンドであるVCAM-1発現が滑膜細胞および血管または細胞で認められた。また、RNTESなどのβケモカインがT細胞の病巣局所へ密接に関与している。

4) RA発症における遺伝的解析としてHLA-DR4 (HDRB1*0405) が遺伝的要因の1つであることを明確にする上で、次の点を明らかにした。すなわち、健常人のDRB1*0405ホモ抗体及びDRB1*0405陰性RA滑膜T細胞よりDRB1*08032特異的アロ反応T細胞株の樹立及びその細胞clone認識するDRB10405ペプチドの解明。

5) TNF受容体ファミリー分子を介して、シグナル伝達に関する研究がRAの滑膜細胞を中心に研究が進められ、滑膜細胞のactivation processにおいてTRAF → NIK → IKKというNFκB活性に機序することが明らかにされた。

<動物モデル及び病因遺伝子の解明>

1) RA動物モデルとしてHTLV-1 Tax遺伝子導入マウス及び同ラットでの病態解析が進み、RAの炎症の解明にとって滑膜細胞及び免疫担当細胞の役割及び両者の分子間反応を介在する種々のサイトカインの役割が明らかにされた。また、種々のサイトカインノックアウトマウスが提示された。特に、IL-1Rアンタゴニストノックアウトマウスは、今回新たに確立された。RAとこれらの二系統の動物モデルは全体の免疫異常の強い、ヒトのRAに類似した動物モデルとして興味深い。また、taxのみを発現する遺伝子にfms及びCD4プロモーターの下流に結合してLTR-CD4-tax-LTR及びLTR-fms-tax-LTR-CD4-tax-LTR及びLTR-fms-tax-LTRのplasmidを遺伝子導入したCD4-Tax, fms-Taxマウス

(CH3/HeNマウス)が作製された。3ヵ月齢でそれぞれ50%, 100%に関節炎を発症することが明らかにされた。これらの動物モデルマウスの意義は、T細胞介路及びマクロファージ介路によるRA発症のモデルマウスとして確立された点である。

2) ヒトのRAに酷似した、自然発症モデル (SKG) マウスが確立され、その病因論的解析を加えている。このマウスは、単一遺伝子の変異によって発症している可能性が高く、RAの病因遺伝子を解明して行く上で極めて重要なものであると考え、さらに、遺伝子レベルからの解析を進めている。すなわち、SKGマウスはBALB/cバックグラウンドの単一遺伝子ミュータントマウスであり、その関節炎は常染色体性遺伝を示す。遺伝的浸透度は通常の飼育環境で6ヵ月齢で判定した場合、ほぼ100%である。関節

腫腸は、生後2ヵ月頃から主として前足指骨間関節にはほぼ左右対称性に始まり、その後、手関節、足、関節に及ぶ。雌雄とも関節腫腸は慢性に進行するが、雌の方が若干進行が早く、重症度も高い傾向がある。病理組織学的に、滑膜の増殖、滑膜下組織への炎症性細胞浸潤から始まり、関節周囲炎、パンスの形成、軟骨・軟骨下骨組織の破壊、線維化へと進み、関節強直に到る。関節外病変としては、間質性肺炎、皮膚炎、血管炎がみられる。血清中には、IgM型リウマチ因子、抗II型コラーゲン抗体、結核菌熱ショック蛋白70と反応する抗体が検出できる。以上の免疫病理学的所見は、このモデルがヒトのRAと酷似し、さらに、SKGマウスの関節炎は、末梢CD4+T細胞によって正常BALB/cヌードマウスに移入できる。従って、SKGマウスの関節炎は、T細胞性自己免疫によるものであり、関節炎を起すCD4+T細胞は、関節内正常自己抗原を認識し、攻撃すると考えられた。現在さらに本モデルについては、より詳細な解析が進んだ。

<RA病因遺伝子の解析>

RAの病因遺伝子については、動物モデル、RAの宿主由来のDNAを用いて、マクロサテライトマーカーによる宿主解析および関節病変を同定している形態形成遺伝子の解析からRA病因遺伝子として、第1、第2、第8、X染色体のそれぞれの染色体の特定の部位が候補遺伝子として特定されつつある。

C. 考察

1) 今年度の結果は、昨年度に引き続き大きな成果が得られた。特にRAの主病巣である滑膜組織の増殖と細胞死の分子及び遺伝子レベルの解明は、今後病因レベルから本症の発症に本質的に関わるものである。

2) 滑膜細胞増殖、アポトーシスおよびRAの基礎疾患である免疫系に関与する転写因子の異常解明へ向けて大きな展望が開けた。

3) T細胞を中心とする抗原ペプチドの解明もHTLV-1 関節炎では、その原因ウイルスの遺伝子産物が病巣局所で自己抗原として作用していることが解明された。また滑膜ライブラリーを用いた研究では、カテプロシンや一部の型コラーゲンのペプチドが自己抗原として作用しており、今後さらに分子生物学的手法で解明されると考えられる。これらの自己抗原ペプチドの投与により、リウマチ発症患者にトレランスを誘導し、症状の進展を抑制する特異的免疫療法への戦略が確立された。

4) 動物モデル「方法」のところでも述べたように、HTLV-I tax TGマウスとヒト破壊性関節炎 cfo-tax TGマウスと増殖性滑膜炎、HTLV-I env PX TGラットと血管炎を主体とするRA (MRA) などと

いったように、動物モデルとヒトのRAのsubset または臨床経過の一部が対応されだしたことは極めてその意義が大きい。

5) リウマチの病因は、T細胞介路とマクロファージ介路の二つの経路が現在提唱されているが、CD4-tax, fms-tax トランスジェニックマウスの確立により、この二つの経路が分子レベルで解明される可能性が得られた成果は大きい。また、SKGマウスは、ヒトRA病因遺伝子の究明に大きな示唆を与えるモデル動物であると考えられる。

6) 感染性要因としては、Tax類似の機能を有するレトロウイルス由来の産物がCREB結合タンパク(CBP)と結合している可能性が極めて強くなり、現在その解析を進めている。

7) RAの病因遺伝子として、ヒトの染色体のうち、第1、第2、第8、X染色体のある対象の部分、絞り込まれつつあることは、今回の研究の大きな成果である。特に、Homeobox の一群のうち、第2染色体上に位置するHoxD9のRAの病因への関与を解明した意義は大きい。

D. 結論

1) RAの主病変である滑膜細胞の増殖と細胞死(apoptosis)の分子機構が解明された。

2) 滑膜細胞の分化において形態形成遺伝子であるHox遺伝子(HoxD9)が関与しており、この遺伝子群の一部がRAの発病に密接に関与していることが明らかにされた。

3) RAの病巣局所のT細胞の解析から病因ペプチドが数種分離された。

4) RAの病因および病態形成を解明するため、これまでのモデルに加えて新しい動物モデルが確立された。

5) 新しいウイルス遺伝子産物とそのRA病因、特に滑膜増殖の機能が同定された。

6) RAの疾患遺伝子として、いくつかの染色体の特定の部位が解明されつつある。

以上の結果、RAの病因が病因遺伝子、病因ペプチド及び宿主の感受性因子、感染性の要因という4つの方向から解明されつつあり、昨年に引き続き1年間で大きな成果を挙げた。

<付記>

昨年、本研究班において指摘された全体試料を研究に使用する部分の倫理面には、十分に配慮した。すなわち、ヒト滑膜細胞等、生体試料を用いた実験は、すべてそれぞれの研究班の所属する機関の倫理委員会等で承認され、患者の同意を得ることを前提としている。

E. 発表論文

1. Suppression of Concanavalin A-Induced Hepatitis in IFN- γ Mice-/-, but Not in TNF- α -/- Mice. Y. Tagawa, K. Sekikawa, and Y. Iwakura. *J. Immunol.* 159: 1418-1428, 1997.

2. Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon- γ production from activated B cells. T. Yoshimoto, H. Okamura, Y. Tagawa, Y. Iwakura, and K. Nakanishi. *Immunology.* 94: 3948-3953, 1997.

3. Resistance to Fas-mediated Apoptosis of Peripheral T Cells in Human T Lymphocyte Virus Type I (HTLV-I) Transgenic Mice with Autoimmune Arthropathy. S. Kishi, S. Saijyo, M. Arai, S. Karasawa, S. Ueda, M. Kannagi, Y. Iwakura, M. Fujii, and S. Yonehara. *J. Exp. Med.* 186: 57-64, 1997.

4. Growth retardation and early death of β -1, 4-galactosyltransferase knockout mice with augmented proliferation and abnormal differentiation of epithelial cells. M. Asano, K. Furukawa, M. Kido, S. Matsumoto, Y. Umesaki, N. Kochibe, and Y. Iwakura. *The EMBO Journal.* 16: 1850-1857, 1997.

5. Presence of polysialic Acid and HNK-1 Carbohydrate on Brain Glycoproteins from β -1, 4-Galactosyltransferase-Knockout Mice. M. Kido, M. Asano, Y. Iwakura, M. Ichinose, K. Miki, and K. Furukawa. *Biochemical and Biophysical Research communications.* 245: 860-864, 1997.

6. Production of Mice Deficient in Genes for Interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-1 α/β , and IL-1 Receptor Antagonist Shows That IL-1 β Is Crucial in Turpentine-Induced Fever Development and Glucocorticoid Secretion. R. Horai, M. Asano, K. Sudo, H. Kanuka, M. Suzuki, M. Nishihara, M. Takahashi, and Y. Iwakura. *J. Exp. Med.* 187: 1463-1475, 1997.

7. Caspase 1-independent IL-1 β release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand. K. Miwa, M. Asano, R. Horai, Y. Iwakura, S. Nagata, and T. Suda. *Nature Medicine.* 4: 1287-1292, 1998

8. Involvement of Autoimmunity Against Type II collagen in the Development of Arthritis in Mice Transgenic for the Human T cell Leukemia Virus

- inducing kinase. H. Akiba, H. Nakano, S. Nishinaka, M. Shindo, T. Kobata, M. Atsuta, C. Morimoto, C. F. Ware, N. L. Malinin, D. Wallach, H. Yagita, and K. Okumura *The Journal of Bio. Chem.* 278: 13353-13358, 1998
25. Characterization of murine CD70 by molecular cloning and mAb. H. Oshima, H. Nakano, C. Nohara, T. Kobata, A. Nakajima, N. A. Jenkins, D. J. Gilbert, N. G. Copeland, T. Muto, H. Yagita, and K. Okumura *Int. Immunol.* 10: 517-526, 1998
26. Cutting edge: Chemotactic activity of soluble Fas ligand against phagocytes. K. Seino, K. Iwabuchi, N. Kayagaki, R. Miyata, I. Nagaoka, A. Matsuzawa, K. Fukao, H. Yagita, and K. Okumura *The J. of immunol.* 161: 4484-4488, 1998
27. Identification of rat OX40 ligand by molecular cloning. H. Akiba, M. Atsuta, H. Yagita, and K. Okumura *Biochemical and Biophysical Research communications.* 251: 131-136, 1998
28. A wide spectrum of collagen vascular and autoimmune diseases in transgenic rats carrying the *env-pX* gene of human T lymphocyte virus type I. H. Yamazaki, H. Ikeda, A. Ishizu, Y. Nakamaru, T. Sugaya, K. Kikuchi, S. Yamada, A. Wakisaka, N. Kasai, T. Koike, M. Hatanaka, and T. Yoshiki *Int. Immunol.* 9: 339-346, 1997
29. Molecular cloning and characterization of mouse caspase-8. K. Sakamaki, S. Tsukumo, and S. Yonehara *Eur. J. Biochem.* 253: 399-405, 1998
30. Proteolytic activation of MST/Krs, STE20-related protein kinase, by caspase during apoptosis. S. Yonehara *Oncogene.* 16: 3029-3037, 1998
31. Fas-Mediated apoptosis: Preparation of original monoclonal antibodies and biological functions. S. Yonehara
32. Apoptosis in Rheumatoid Arthritis. K. Nishioka, T. Kato, T. Sumida, T. Kobata *Arthritis Rheum.* 41: 1-9, 1998
33. Evidence for Autoantigens of Env/Tax Proteins in Human T Cell Leukemia Virus Type I Env-pX Transgenic Mice. K. Fujisawa, K. Okamoto, H. Asahara, T. Kobata, T. Kato, T. Sumida, K. Nishioka *Arthritis Rheum.* 41: 101-109, 1998
34. Rheumatoid Arthritis and Apoptosis (review). T. Sumida, K. Nishioka *Intern Med.* 37: 184-188, 1998
35. S. Suzuki, K. Masuko-Hongo, T.A. Höger, N.M. Hong, M. Kurokawa, M. Miura, F. Kurimoto, K. Hata, Y. Mizushima, T. Kobata, K. Nishioka, K. Yamamoto, and T. Kato *Cancer Immunol Immunother* 46: 93-103, 1998
36. Frequent clonal expansion of peripheral T cells in patients with autoimmune diseases: A novel detecting system possibly applicable to laboratory examination. K. Masuko-Hongo, T. Kato, S. Suzuki, T. Sekine, M. Kurokawa, S. Ueda, A. Yamada, K. Nishioka, and K. Yamamoto *J clin Lab Anal* 12: 162-167, 1998
37. Induction of apoptosis in the rheumatoid synovium by Fas ligand gene transfer. K. Okamoto, H. Asahara, T. Kobayashi, H. Matsuno, T. Hasunuma, T. Kobata, T. Sumida, and K. Nishioka. *Gene Therapy* 5: 331-338, 1998
38. Time Course of apoptosis in collagen-induced arthritis. I. Morita, H. Matsuno, K. Sakai, T. Nezuka, H. Tsuji, T. Shirai, and K. Nishioka *Int J Tissue React.* 20: 37-43, 1998
39. Potential withdrawal of rheumatoid synovium by the induction of apoptosis using a novel in vivo model of rheumatoid arthritis. K. Sakai, H. Matsuno, I. Morita, T. Nezuka, H. Tsuji, T. Shirai, S. Yonehara, T. Hasunuma, and K. Nishioka. *Arthritis Rheum* 41: 1251-1257, 1998
40. Prognostic value of Th1/ Th2 ratio in rheumatoid arthritis. K. Masuko-Hongo, T. Kato, and K. Nishioka *Lancet* 352: 988-989, 1998
41. Strain from a novel subfamily of hepatitis G virus/ hepatitis GB virus C isolated from a Japanese patient: sequence analysis of the envelope 1 region. J. K. Tong, K. Masuko-Hongo, K. Nishioka, T. Kato, F. Sugata, J. Akaogi, and S. Iino, *J Clin Microbiol* 36: 2797-2799, 1998
42. T-cell clonal change after allo-kidney transplantation in humans. M. Hagihara, S. Hiraga, F. Tsuchida, N. Morita, N. Kanai, G. Balgansuren, B. Munkhbat, K. Masuko, K. Yamamoto, S. Kato, K. Tsuji, K. Nishioka *Scand J Immunol.* 48: 300-306, 1998
43. Monoclonal expansion of synoviosytes in rheumatoid arthritis. F. Imamura, H. Aono, T. Hasunuma, T. Sumida, H. Tateishi, S. Maruo, and K. Nishioka *Arthritis Rheum* 41: 1979-1986, 1998
44. Extracellular human T cell leukemia virus type I tax protein stimulates the proliferation of human

- Type I Tax Gene. M. Kotani, Y. Tagawa, and Y. Iwakura. Eur. J. Immunol. (in press), 1998
9. The HTLV-I-tax gene is responsible for the development of both inflammatory polyarthropathy resembling rheumatoid arthritis and non-inflammatory ankylotic arthropathy in transgenic mice. K. Habu, J. Nakayama-Yamada, M. Asano, S. Saijo, K. Itagaki, R. Horai, H. Yamamoto, T. Sekiguchi, T. Nosaka, M. Hatanaka, and Y. Iwakura. J. Immunol. (in press), 1998.
 10. The development of autoimmune inflammatory arthropathy in mice transgenic for the HTLV- I *env*-pX region is not dependent on H-2 haplotypes and modified by the expression levels of Fas antigen. Y. Iwakura, K. Itagaki, C. Ishitsuka, Y. Yamasaki, A. Matsuzaka, S. Yonehara, S. Karasawa, S. Ueda, and S. Saijo. J. Immunol.(in press)1998
 11. Detection of TNF α and fas ligand mRNA within synovial mononuclear cells by fluorescence in-cell labeling PCR (FICL-PCR). M. Okubo, M. P. Brown, K. Chiba, R. Kasukawa, and T. Nishimaki. Molecular Bio. Reports. 25: 219-224, 1998
 12. Cloning of follistatin-related protein as a novel autoantigen in systemic rheumatic diseases. M. Tanaka, S. Ozaki, F. Osakada, K. Mori, M. Okubo, and K. Nakao. Int. immunol. 10: 1305-1314, 1998
 13. A Novel Molecular Biological Screening Method Revealed an Epitope Within Cathepsin D Could Bind To Both HLA DR B1 0401 Molecule and TCR V Beta3 Expanded in Arthritis Lesions. M. Okubo, R. Kasukawa, M. Tanaka, S. Ozaki, K. Nakao, M. Kurokawa, K. Yamamoto, K. Nishioka. Proceeding of Basic Research Conference American College of Rheumatology. 1: 27, 1998
 14. Apoptosis-mediated regulation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor production. M. Kokubun, A. Kume, M. Urabe, H. Mano, M. Okubo, R. Kasukawa, A. Kakizuka, and K. Ozawa. Gene Therapy. 5:923-929
 15. Identification of the gene loci that predispose to rheumatoid arthritis. S. Shiozawa, S. Hayashi, Y. Tsukamoto, H. Goko, H. Kawasaki, T. Wada, K. Shimizu, N. Yasuda, N. Kamatani, K. Takasugi, Y. Tanaka, K. Shiozawa, and S. Imura. Int. Immunol. 10: 1891-1895, 1998
 16. Genetic basis of collagen diseases in MRL mice with a deficit in Fas-mediated apoptosis: Dissection of the complex pathological manifestations. M. Nose Connective Tissue. 30: 17. Successful induction of severe destructive arthritis by the transfer of in vitro-activated synovial fluid T cells from patients with rheumatoid arthritis (RA) in severe combined immunodeficient (SCID) mice. A. Sakata, K. Sakata, P. Han, T. Ohmura, M. Tsukumo, and K. Kakimoto. Clin. Exp. Immunol. 104: 247-254, 1996
 18. Inappropriate apoptosis of salivary and lacrimal gland epithelium of immunodeficient NOD-scid mice. Kong L, Robinson CP, Peck AB, Vela-Roch N, Sakata A, Dang H. Taral N, and Humphreys-Beher MG. Clin Exp Rheumatol. 16: 675-681, 1998
 19. Fas (CD95)-transduced signal preferentially stimulates lupus peripheral T lymphocytes. K.Sakata, A. Sakata, N. Vela-Roch, A.Escalante, L.Kong, T. Nakabayashi, J. Cheng, N. Talal, and H. Dang. Eur. J. Immunol. 28: 2648-2660, 1998
 20. Bcl-2 family expression in salivary glands from patients with primary Sjögren's Syndrome: Involvement of Bax in salivary gland destruction. L. Kong, N. Ogawa, HS. McGuff, T. Nakabayashi, A. Sakata, A. Masago, N. Vela-Roch, N. Talan, and H. Dang. Clin. Immunol. Immunopathol. 88: 133-141, 1998
 21. CD26/ DPPIV differentially regulates the chemotaxis of T cells and monocytes toward RANTES. S. Iwata, N. Yamaguchi, Y. Munakata, H. Ikushima, O. Hosono, C. Morimoto Int. Immunol. (in press), 1998
 22. Expression and function of CD40 in rheumatoid arthritis synovium. C. Sekine, H. Yagita, N. Miyasaka, and K. Okumura J. Rheumatol. 25: 1048-1053, 1998
 23. Differential regulation of I κ B kinase α and β by two upstream kinases, NF- κ B-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ ERK kinase kinase-1. H. Nakano, M. Shindo, S. Sakon S. Nishikawa, M. Mihara, H. Yagita, and K. Okumura Biochemistry. 95: 3537-3542, 1998.
 24. CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, activates NF- κ B and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase via TRAF2, TRAF5, and NF- κ B-

synovial cells. H. Aono, K. Fujisawa, T. Hasunuma, S.J.Marriott, and K. Nishioka Arthritis Rheum 41: 1995-2003, 1998

45. Amelioration of lymphoid hyperplasia and hypergammaglobulinemia in lupus-prone mice (gld) by fas-ligand gene transfer. N.M. Hong, K. Masuko-Hongo, H. Sasakawa, T. Kato, T. Shirai, K. Okumura, K. Nishioka, and T. Kobata J Autoimmun 11: 301-307, 1998

46. Molecular mechanism of immune response, synovial proliferation and apoptosis in rheumatoid arthritis. T. Hasunuma, T. Kato, T. Kobata, K. Nishioka Springer Semin Immunopathol . 20: 41-52,1998

慢性関節炎におけるサイトカインの役割

岩倉洋一郎（東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター）

HTLV-Iの*tax*遺伝子を導入したトランスジェニックマウスによる関節リウマチモデルを用いて、自己免疫の発症機構、及び関節炎発症におけるサイトカインの役割を検討した。その結果、CD28を介する副シグナル系を阻害しても抗原に対するT細胞の応答性が阻害されなかったことから、副シグナルの恒常的な活性化が示唆された。また、このマウスではJNKの恒常的活性化がみられた。次に、サイトカインの関節炎発症における役割を検討したところ、IL-1、及びIL-6を欠損させると発症しなくなることから、これらのサイトカインが重要な役割を果たしていることがわかった。また、IL-1レセプター・アンタゴニストを欠損させると、それだけで自己免疫性の関節炎を発症することを見いだした。この結果は、IL-1が免疫系の恒常性の維持に重要な役割を果たしており、その異常は、関節リウマチの原因となりうることを示唆する。

A. 研究目的

我々は先にHTLV-Iの*tax*遺伝子を導入したトランスジェニックマウス(HTLV-I-Tgマウス)を作製し、このウイルスがヒトの慢性関節リウマチによく似た慢性関節炎を引き起こすことを示した。その後、疫学的にも関節リウマチへのHTLV-Iの関与が示唆されている。

これまでの解析から、このマウスの関節炎の発症にはT細胞に依存した、自己免疫の関与が示唆されている。このマウスのT細胞は発症前から活性化マーカーを発現していたことから、本年度はこのマウスのT細胞の異常が、T細胞レセプターの副シグナルの異常に基づく可能性について、検討した。また、このマウスの関節炎ではTNF- α やIL-1、IL-6などのサイトカインの発現が亢進しており、病態形成への関与が示唆されている。そこで、本研究ではHTLV-I-Tgマウス、及びコラーゲン関節炎モデルを用いて、これらの炎症性サイトカインの関節炎発症における役割を検討した。また、IL-4、およびIFN- γ ノックアウトマウスを用いることにより、Th1/Th2バランスの病態形成に与える影響を検討した。さらにこの解析の過程で、IL-1の内在性の阻害物質であるIL-1レ

セプターアンタゴニスト(IL-1ra)の欠損が、自己免疫を誘発し、関節炎を引き起こすことを見いだしたので、そのメカニズムについて、検討した。

B. 研究方法

KOマウス：IL-1 α 、およびIL-1 β は、それぞれエクソン5 およびエクソン3-5内にハイグロマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子を挿入して失活させた。また、IL-1 α / β ダブルKOマウスは、ES細胞の段階で両遺伝子に上記の変異を導入し、作製した。IL-1raKOマウスは、エクソン1-4をネオマイシン耐性遺伝子で置換することにより、作製した。これらのマウスはいずれもBALB/cAマウスに6世代以上戻し交配し、実験に供した。なお、マウスの飼育は全てSPF環境下で行っている。

C. 研究成果

1. DO11.10-TgマウスとHTLV-I-Tgマウスとを掛け合わせ、リンパ節T細胞のOVAに対する反応を検討したところ、野生型の反応がCTLA-4抗体によって阻害されるのに対し、HTLV-I-Tgの場合は阻害されず、副シグナ

ルの恒常的な活性化が示唆された。

2. CD28の下流のJNKの活性を調べたところ、HTLV-I-Tgでは亢進しており、副シグナルの恒常的な活性化が起こっていること支持した。

3. コラーゲン関節炎の発症は、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1 α/β 、IL-6、それぞれの欠損により、強く抑制されたので、これらのサイトカインが病態形成に重要な役割を果たしていることがわかった。

4. HTLV-I-Tgマウスの関節炎の発症はIL-6、IL-1 α/β の欠損で初期には強く抑制されたが、時間と共にやがて発症することがわかった。一方、TNF- α の欠損は影響を与えなかった。従って、刺激が長期間持続した場合、IL-1、IL-6の機能は他のサイトカインにより代替えられることがわかった。

5. いずれの系においてもIFN- γ 、IL-4欠損の影響はみられなかったので、Th1/Th2バランスはこれらの系では発症に大きな役割を果たしていないことがわかった。

6. IL-1 α/β KOマウスは正常であったが、IL-1ra KOマウスは3ヶ月令までに全例が多発性の慢性関節炎を発症した。その病理像は関節リウマチのものに非常によく似ており、IL-1ra 遺伝子が関節リウマチの原因遺伝子の一つである可能性が示唆された。

7. IL-1ra KOマウスでは、リウマチ因子、抗2型コラーゲン抗体、抗DNA抗体などのレベルが亢進しており、自己免疫になっていることが示唆された。この結果、IL-1raはIL-1を介した免疫系の制御において、きわめて重要な役割を果たしていることが示された。

8. この他、IL-1は発熱のコントロールやグルココルチコイドの分泌調節においても重要な役割を果たしていることがわかった。これらの事実は、IL-1が複数のレベルで関節リウマチの病態形成に関与していることを示唆する。

D. 結論

これまでIL-1やIL-1raの生理的、病的役割についてはあまり知られていなかったが、今回の研究により、IL-1系が免疫機能の調節にこれまで考えられていた以上に重要な役割を果たしていることが明らかになった。なかでもIL-1raはIL-1系のkey調節因子として免疫系の恒常性の維持に関与しており、その変異は自己免疫性の関節炎を誘発することを初めて明らかにした。さらに発熱やグルココルチコイドの分泌にも関与していることから、IL-1は複数のレベルで関節リウマチの病態形成に関与していることが示された。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sugawara I., Yamada, H., Kazumi, Y., Doi, N., Otomo, K., Aoki, T., Mizuno, S., Udagawa, T., Tagawa, Y., and Iwakura, Y. (1998) Granulomas in interferon- γ gene-disrupted mice are inducible by avirulent *Mycobacterium*, but not by virulent *Mycobacterium*. **J. Medical Microbiology** 47, 871-877.
- 2) Horai, R., Asano, M., Sudo, K., Kanuka, H., Suzuki, M., Nishihara, M., Takahashi, M., and Iwakura, Y. (1998) Production of mice deficient in genes for IL-1 α , IL-1 β , IL-1 α/β , and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1 β is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. **J. Exp. Med.** 187, 1463-1475.
- 3) Flamand, V., Donckier, V., Demoor, F. X., Le Moine, A., Matthys, P., Vanderhaeghen, M. L., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Billiau, A., Abramowicz, D., Goldman, M. (1998) CD40 ligation prevents neonatal induction of transplantation tolerance. **J. Immunol.** 160, 4666-4669.
- 4) Kido, M., Asano, M., Iwakura, Y., Ichinose,

- M., Miki, K., and Furukawa, K. (1998) Presence of polysialic acid and HNK-1 carbohydrate on brain glycoproteins from β -1,4-galactosyltransferase- knockout mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 245, 860-864.
- 5) Kyuwa, S., Tagawa, Y., Shibata, S., Doi, K., Machii, K., and Iwakura, Y. (1998) Murine coronavirus-induced subacute fatal peritonitis in C57BL/6 mice deficient for interferon- γ . **J. Virol.** 72, 9286-9290.
- 6) Tagawa, Y., Kakuta, S., and Iwakura, Y. (1998) Involvement of Fas/Fas ligand system- mediated apoptosis in the development of Concanavalin A-induced hepatitis. **Eur. J. Immunol.** 28, 4105-4113.
- 7) Iwakura, Y., Itagaki, K., Ishitsuka, K., Yamazaki, Y., Matsuzawa, A., Yonehara, S., Karasawa, S., Ueda, S., and Saijo, S. (1998) The development of autoimmune inflammatory arthropathy in mice transgenic for the HTLV-I *env-pX* region is not dependent on H-2 haplotypes and modified by the expression levels of Fas antigen. **J. Immunol.** 161, 6592-6598.
- 8) Miwa, K., Asano, M., Horai, R., Iwakura, Y., Nagata, S., and Suda, T. (1998) Caspase 1-independent IL-1 β release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand. **Nature Medicine** 4, 1287-1292.
- 9) Yano, A., Mun, H.-S., Yang, T.-H., Hata, H., Kobayashi, M., Norose, K., Hayakawa, S., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Nakazaki, S., Nakazaki, Y., Sekiya, S., Yamaura, A., Kubosawa, H., Yumoto, N., and Aosai, F. (1998) Role of IFN- γ in effector mechanisms and pathogenicity of HSPs in mice and human infected with *Toxoplasma gondii*. In "9th International Congress of Parasitology", (eds. I. Tada, S. Kojima, and M. Tsuji), Monduzzi Editore, pp. 457-465.
- 10) Tsuji, H., Mukaida, N., Harada, A., Kaneko, S., Matsushita, E., Nakanuma, Y., Tsutsui, H., Okamura, H., Nakanishi, K., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Kobayashi, K., and Matsushima, K. (1999) Alleviation of lipopolysaccharide-induced acute liver injury in *Propionibacterium acnes*-primed IFN- γ -deficient mice by a concomitant reduction of TNF- α , IL-12 and IL-18 production. **J. Immunol.** 162, 1049-1055 (1999).
- 11) Kotani, M., Tagawa, Y., and Iwakura, Y. (1999) Involvement of autoimmunity against type II collagen in the development of arthritis in mice transgenic for the human T cell leukemia virus type I *tax* gene. **Eur. J. Immunol.** 29, 54-64.
- 12) Hyodo, Y., Matsui, K., Hayashi, N., Tsutsui, H., Kashiwamura, S., Yamauchi, H., Hiroishi, K., Takeda, K., Akira, S., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Kayagaki, N., Yagita, H., Kurimoto, M., Okamura, H., Nakanishi, K., and Higashino, K. (1999) Interleukin 18 upregulates perforin-mediated NK activity without increasing perforin mRNA expression by binding to constitutively expressed IL-18R. **J. Immunol.** 162, 1662-1668.
- 13) Sawai, N., Kita, M., Kodama, T., Tanahashi, T., Yamaoka, Y., Tagawa, Y., Iwakura, Y., and Imanishi, J. (1999) The role of interferon- γ in Helicobacter pylori-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. **Infect. Immun.** 67, 279-285.
- 14) Habu, K., Nakayama-Yamada, J., Asano, M., Saijo, S., Itagaki, K., Horai, R., Yamamoto, H., Sekiguchi, T., Nosaka, T., Hatanaka, M., and Iwakura, Y. (1999) The HTLV-I-*tax* gene is responsible for the development of both inflammatory polyarthropathy resembling rheumatoid arthritis and non-inflammatory

- ankyrotic arthropathy in transgenic mice. *J. Immunol.*, in press.
- 15) 西城 忍、岩倉洋一郎：モデル動物と自己免疫疾患－慢性関節リウマチ。自己免疫疾患の臨床 1998、最新医学社、p139-147、1998.
- 16) 羽生清、岩倉洋一郎：自己免疫疾患モデル動物－慢性関節リウマチ。The Lung perspectives、メディカルレビュー社、6：305-311、1998.
2. 学会発表
- 1) Masahide Asano, Susumu Nakae, Reiko Horai, Katsuko Sudo, Kenji Sekikawa and Yoichiro Iwakura. Roles of IL-1 in inflammation and antibody production. CSH Meeting on Mouse Molecular Genetics. Sept. 2-6, 1998. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, p28.
- 2) Yoichiro Iwakura, Kiyoshi Habu, Motoko Kotani, Reiko Horai, Masahide Asano, Yoh-ichi Tagawa, Chiho Ishitsuka, and Shinobu Saijo. Development of rheumatoid-like chronic inflammatory arthropathy in HTLV-I transgenic mice is suppressed by the deficiency of IL-1 or IL-6, but not IFN- γ , IL-4, nor TNF- α . Oct. 25-30, 1998. Eur. Cytokine Netw., Vol.9, No. 3, p409.
- 3) Reiko Horai, Masahide Asano, Susumu Nakae, Shinobu Saijo, Katsuko Sudo, and Yoichiro Iwakura. Roles of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in the immune system. Oct. 25-30, 1998. Eur. Cytokine Netw., Vol.9, No. 3, p380.
- 4) IL-1レセプターアンタゴニスト遺伝子欠損マウス：新しい慢性関節リウマチモデル。宝来玲子、谷岡秀敏、中江進、西城忍、須藤カツ子、岡原明彦、生頼敏己、浅野雅秀、岩倉洋一郎。第63回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会。1998年7月30日-31日、東京、口頭発表（シンポジウム） p35.
- 5) IL-1の炎症反応における役割－IL-1KOマウスを用いた解析－。浅野雅秀、宝来玲子、須藤カツ子、関川賢二、岩倉洋一郎。第63回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会。1998年7月30日-31日、東京、口頭発表 p51.
- 6) ノックアウトマウスを用いたIL-1の炎症反応における役割解析。浅野雅秀、宝来玲子、須藤カツ子、関川賢二、岩倉洋一郎。第28回日本免疫学会学術集会、1998年12月2日-4日、神戸、ワークショップ口頭発表、ポスター発表 p113.
- 7) IL-1レセプターアンタゴニスト遺伝子欠損マウスの作製とリウマチ様慢性関節炎の発症。宝来玲子、中江進、西城忍、須藤カツ子、浅野雅秀、岩倉洋一郎（谷岡秀敏、岡原明彦、生頼敏己）。第28回日本免疫学会学術集会、1998年12月2日-4日、神戸、ワークショップ口頭発表、ポスター発表 p154.
- 8) HTLV-Iトランスジェニックマウスは骨髄幹細胞の異常により慢性関節炎を発症する。西城 忍、羽生 清、岩倉洋一郎。第28回日本免疫学会学術集会、1998年12月2日-4日、神戸、ワークショップ口頭発表、ポスター発表 p. 344.
- 9) HTLV-IトランスジェニックマウスにおけるT細胞機能異常の解析。小谷素子、羽生清、岩倉洋一郎。第28回日本免疫学会学術集会、1998年12月2日-4日、神戸、ワークショップ口頭発表、ポスター発表 p.230.
- 10) IL-1レセプターアンタゴニスト遺伝子欠損マウスの作製とリウマチ様慢性関節炎の発症。宝来玲子、中江進、谷岡秀敏、岡原明彦、西城忍、須藤カツ子、生頼敏己、浅野雅秀、岩倉洋一郎。第21回日本分子生物学会年会、1998年12月16日-19日、横浜、ポスター発表 p590.

慢性関節リウマチの自己抗原の解析(II報) : HLA DRB 1 *0401分子とT細胞レセプターに親和性を持つ自己抗原の検出と病巣局所へのT細胞集積機序の解明

(分担) 研究者 大久保光夫 埼玉医科大学 総合医療センター輸血部講師

慢性関節リウマチの病巣局所に存在するT細胞レセプターとクラスII分子に結合するポリペプチドつまりRAの自己抗原を求めることは病因解明の上からも重要である。Two-hybrid systemにてTCRV β との結合が推定された抗原候補cathepsinDのRA抗原としての妥当性について検討した。CathepsinDペプチドはHLADRB1*0401に対する親和性が高かった。DRB1*0401をhomozygousとしてもつ健常人末梢単核球をCathepsin B、G、D蛋白で刺激して増殖反応を測定したところCatBとDに増殖反応が認められた。B1*0401をもつ健常人の末梢単核球をCathepsinDペプチドで刺激したTCRV β 3のCDR3のアミノ酸配列を解析したところ、Two-hybrid systemに用いたRA患者TCRV β 3 CDR3と類似したGG、TS、SG というモチーフが検出された。T細胞は滑膜組織に由来するDRとの親和性の高いCathepsinDを認識しているものと考えられた。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ(RA)病巣局所ではT細胞の浸潤が認められる。クラスII分子の発現に富むこの病巣では、関節病巣から供給される自己抗原ペプチドが抗原提示細胞(APC)のMHC分子上に提示され、T細胞レセプター(TCR)に認識されてクローナルにT細胞が集積し、局所の自己免疫反応が遷延している可能性がある。この病巣局所に存在するクラスII分子と親和性を持ち、さらにTCRにも結合するポリペプチドつまりRAの自己抗原を求めることは病因解明の上からも重要であると考えられる。すでに、昨年までの成果としてWest-western法により、滑膜細胞cell line cDNA libraryをHLA DRB1* 0401分子でスクリーニングし、CENP-E、

CD37、CD53、snRNPE、CD95、heterochromatin protein、CD56、ribosomal protein、HSP 70、cathepsinDがRAの自己抗原の候補として検出された。このうちTwo-hybrid systemにてTCRV β との結合が推定された抗原候補はcathepsinD(以下CatD)であり、本年はCatDに対する生体の液性・細胞性免疫反応について解析し、RA抗原としての妥当性について検討した。

B. 研究方法

抗原としてヒト由来精製CatB、D、G、ウシ由来CatD、Two-hybrid systemから求められたCatDエピトープ部位の合成ペプチドDPLWILGDVFIGRとサイトメガロウイルス(CMV)ペプチド

DLPLWCLCRLKCER、コントロールとしてピオチン化したHAペプチドPKYVKQNTLKLATG、RNPAペプチドPNHILFLTNLPEETNELMLSMLを準備した。ペプチドとDRとの親和性はDRB1*0401、B1*0801をもつB cell lineとEBVをtransfectされたB1*0405のB細胞を用いた。臨床検体は少なくとも一方にはDRB1*0405あるいは*0401をもつ慢性関節リウマチ6例の関節液中の単核球とDRB1*0401をhomozygousにもつ健常人の末梢単核球を使用した。これらの細胞を各種抗原で刺激後、T細胞の増殖反応と培養液中のIL-2、IL-4、IFN γ を測定した。また、mRNAを回収し、TCRV β に関しRT-PCRを行い、V β 3のCDR3の塩基配列を解析した。

C. 研究結果

①精製CatD蛋白あるいはCatDペプチドを抗原としてRA患者血清との反応をELISAにて検討したところ患者血清では有意に抗体価が上昇していた。②CatDペプチドとDRB1*0801、HLADRB1*0401と0405の親和性はHAペプチドに対する% inhibition assayではDRB1*0401と0405に対する親和性が高かった。③DRB1*0405あるいは0401をもつ慢性関節リウマチ患者関節液の単核球を精製CatB、G、D蛋白で刺激して増殖反応を測定したが有意な差は認められなかった。また、IL-2に対する反応性も低かった。一方、DRB1*0401をhomozygousとしてもつ健常人末梢単核球を精製CatB、G、D蛋白で刺激して増殖反応を測定したところCatBとDに増殖反応が認められた。また、CatDペプチドに対する反応も認められた。

④B1*0401をもつ健常人の末梢単核球をCatDペプチドで刺激したTCRV β 3のCDR3のアミノ酸配列を解析したところ、Two-hybrid systemに用いたRA患者TCRV β 3CDR3と類似したGG、TS、SGというモチーフを持つクローンが検出された。⑤CatDのT細胞エピトープペプチドと類似するCMVペプチドでRA患者関節液中の単核球を刺激するとIL-2とIL-4産生が認められた。

D. 考察

CatDは酸性を至適条件とし蛋白の異化作用を行う酵素である。CatDは細胞内でペプチドをN末端から消化するエンドペプチダーゼでこの作用により、MHC上に提示されるペプチドの長さが決定され、T細胞エピトープの形成に影響を与える酵素と考えられている。その際にCatD自体がMHC上にペプチド共に提示されうるとの報告もあり興味深い。臨床的には乳癌などの転移マーカーとして有用であるとの報告がある。この様にCatDは炎症部位や細胞増殖の盛んな部位には過剰に存在しMHCの発現量とも関連すると考えられる。今回我々の検討ではCatDのエピトープ部位のペプチドはDRB1*0401と0405に親和性を持っておりAPC上での密度が高くなり、慢性関節リウマチの関節病巣でT細胞に認識される可能性が高い分子であると推測された。実際に、DRB1*0401の健常人末梢単核球とこのペプチドを反応させた後、TCRを解析すると慢性関節リウマチ患者関節液から回収されたCDR3と類似したモチーフを示したことから、同部位がTCRとも結合する可能性が高いことも示された。ところが慢性関節リウマチ患者局所から回収されたT細胞のCatDに対する反応は減弱していた。

そこでCatDと最も類似したCMVのエピトープ類似部位を合成ペプチドとして準備し、これで慢性関節リウマチ患者関節単核球を刺激すると陽性の反応が検出された。したがって、CatDのanalogはRAの病巣局所にT細胞を集積させる抗原のひとつとなりうる事が示された。慢性関節リウマチの病巣局所にT細胞が浸潤して、自己免疫反応が遷延している機序として、T細胞は滑膜組織に由来するDRとの親和性の高い抗原を特異的に認識しクローナルに集積し、その後anergyに至るが間欠的にウイルス抗原により刺激をうけて集積が繰り返されるものと考えられた。

E. 結論

T細胞は滑膜組織に由来するDRとの親和性の高いCathepsinDを認識しているものと考えられた。滑膜に浸潤したT細胞は、その後anergyに至るが間欠的にウイルス抗原により刺激をうけて集積が繰り返されるものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1, 大久保光夫、西間木友衛. ペプチドによる免疫寛容導入. 最新医学, 53, 276-283, 1998

2, 大久保光夫、鈴木修三. リウマチの呼吸器病変
Medical Practice, 15, 2048-2050, 1998

3, 大久保光夫. 混合性結合組織病の発症機序と診断および治療. 現代医療, 31, 115-119, 1999

4, 大久保光夫. 混合性結合組織病 疾患別最新処方改訂第3版, 矢崎義雄、戸田剛太郎 メジカルビュー 東京 1998, 548-549

5, 大久保光夫. 抗RNP抗体、抗Sm抗体, 検査の診断効率とピットフォール. 中井利昭 中外医学社東京 1998, 250-252

6, M. Okubo, M. P. Brown. Detection of TNF alpha and fas ligand mRNA within synovial mononuclear cells by fluorescence in-cell labeling PCR (FICL-PCR). Molecular Biology Reports, 25, 217 - 224, 1998

7, M Kokubun, A Kume, M Urabe, H Mano, M Okubo, R Kasukawa, A Kakizuka & K Ozawa Apoptosis-mediated regulation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor production by genetically engineered fibroblasts. Gene Therapy 5, 923-929, 1998

8, M. Tanaka, S. Ozaki, F. Osakada, K. Mori, M. Okubo, and K. Nakao. Cloning of folistatin-related protein as a novel autoantigen in systemic rheumatic diseases.
International Immunology 10, 1305-1314, 1998

9, De La Salle H, J. Zimmer, D. Fricker, C. Angenieux, J. P. Cazenave, M. Okubo, H. Maeda, A. Plebani, M.M. Tongio, A. Dormoy, and D. Hanau. HLA class I deficiencies due to mutations in the subunit 1 of the peptide transporter (TAP1).
Journal of Clinical Investigation
in press.

2. 学会発表

M. Okubo, M. Tanaka, M. Kurokawa, S. Ozaki, R. Kasukawa, H. Maeda, S. Muller, K. Nakao, K. Yamamoto, and K. Nishioka. A novel molecular biological screening method revealed an epitope within cathepsin D could bind to both HLA DR B1*0401 molecule and TCR V beta 3 expanded in arthritis lesions. Proceeding of Basic Research Conference American College of Rheumatology: 1, 27, 1998

分担研究報告書

慢性関節リウマチの滑膜増殖機構と疾患遺伝子の研究

分担研究者 塩沢俊一 神戸大学医学部保健学科教授

研究要旨 慢性関節リウマチ (RA) の発症には、環境と遺伝の二つの要因が関与する。前者には、免疫応答系の中心である T 細胞と、関節破壊に直接関与する滑膜間葉系細胞の二つが重要である。RA の遺伝的要因について詳細なマッピングにより、第 1 染色体と第 8 染色体の遺伝子座位を確認し、さらに X 染色体については従来の DXS1232 から 0.1cM 近傍の DXS984 に新たに Lod 値が 2.03 の頂値域を見出した。

A. 研究目的 慢性関節リウマチ (RA) の発症には、環境と遺伝の二つの要因が関与する。前者には、免疫応答系の中心である T 細胞と、関節破壊に直接関与する滑膜間葉系細胞の二つが重要である。血流に乗って関節に到達した抗原は、関節滑膜表層の fibroblast-like または macrophage-like の間葉系細胞に補足されて抗原提示され、T 細胞による免疫応答が関節局所で開始する。滑膜間葉系細胞は抗原を提示する他、パンヌスとして関節破壊に直接関与する。パンヌスの一見腫瘍様の強い滑膜増殖や RA 特有の骨粗鬆症状態は、増殖関連 c-fos 遺伝子を滑膜細胞や骨芽細胞に過剰発現させることにより実験的に作成できる。また抗原特異的 T 細胞に c-fos 遺伝子が過剰発現すると、T 細胞は c-fos 遺伝子の高発現下にアネルギーになり難く応答が亢進し、細胞周期の 4C(G2/M)へと移行して腫瘍にも似た異常な細胞周期を営む。

今回私どもは c-fos の動態を細胞周期蛋白との関連で究明するとともに、RA 全体を鳥瞰しこれを駆動する因子を明らかにする目的で、RA の遺伝的要因について、全染色体に分布する総計 358 箇所のマイクロサテライトマーカー部位を指標にマイクロサテライトマーカーによる家系解析を行い、Lod 値が 3 を越えて有意である第一染色体 D1S214、第 8 染色体 D8S556、X 染色体 DXS1232 の合計 3 つに RA の疾患遺伝子座位を特定し、さらに同一手法により部位を詳細に特定した。またさらに、同部位に位置する遺伝子を検索している。

B. 研究方法 c-fos 過剰発現抗原特異的 T 細胞ク

ローンを ConA で前処理し、抗原と APC で刺激 4hr 後 elk-1 の Ser383 のリン酸化を指標に MAPK を測定した。長期培養下に 4C 周期に移行したクローンを限界希釈法で取り出し、抗 CD3 で刺激後、c-fos, cdc2, cyclin B, cdc25B, wee1, chk1, p21, CBP の mRNA 発現を定量 RT-PCR/PCR (ABI7700)法にて、また蛋白をウエスタンブロットとゲルシフト法により調べた。ヒストンのアセチル化は ¹⁴C 標識 acetyl CoA と core histone を用いて測定した。テロメラーゼ活性は TRAP PCR ELISA 法により測定した。wee1 のプロモーターは、アダプターを付加したヒトゲノム DNA から PCR で wee1 kinase の 5'非翻訳領域を単離し塩基配列を決定した。また X 染色体領域の不十分であった位置の同定を、該当範囲のより詳細な遺伝子マッピングをマイクロサテライトマーカー解析を用いて行った。

C. 研究結果 ConA 処理により c-fos 過剰発現 T 細胞では対照に比して MAPK が減少し難く、この細胞のアナジー耐性機構が MAPK の上流への作用であることが示された。4C クローンは mRNA と蛋白量が c-fos, wee1, CBP で高く、p21 で減少しており、ヒストンアセチル化の亢進、テロメラーゼ活性の上昇がみられた。ヒト wee1 のプロモーター配列を決定したところ AP-1 サイトが存在しており、c-fos 遺伝子過剰発現時における wee1 亢進は c-Fos の wee1 プロモーターへの直接作用である可能性が示唆された。

また CBP および p300 は c-fos 過剰発現 T 細胞で著しく増加していたが、p53 には差がなかった。抗 p300 抗体により p53 が免疫沈降されたことから、

c-fos 過剰発現 T 細胞における p21 発現抑制は CBP/p300 と p53 の結合による可能性が示された。また c-fos 過剰発現 T 細胞は、抗原刺激後 3 日目にアポトーシスに陥った。c-fos 過剰発現 T 細胞にはアポトーシスに陥りやすいものとそうでないものがあり、前者はゲルシフト法による NFκB が元々低く後者は高値であったが、後者も培養の FCS を 10% から 0.5% に下げると NFκB が低下しアポトーシスに陥った。

RA の 4 1 家系で、平均ヘテロ接合率 0.79、平均幅 10.8cM のマーカー領域を選んで、全染色体 358 箇所においてマイクロサテライトマーカー解析を行った結果、第一染色体 D1S214、第 8 染色体 D8S556 において MLS 値が 3 を超えて有意の 3.27, 3.33 の結果を得た。IBD のシェアはそれぞれ、 $Z_0=0.065$ と 0.075 であった。同部位をさらに詳細に解析すると、第一染色体については D1S214 と D1S253 域に各々 3.77 と 3.58 の MLS 値(single point analysis) および 6.13 の値(multi-point analysis)を D1S253 域に得た。第 8 染色体については、4.20 (single point analysis)を得た。X染色体は 2 を超えれば有意と判定されるが DXS1232 域に 2.35 値を得た。これは multi-point analysis によれば 3.03 の MLS 値であった。さらに詳細なマッピングにより、第 1 染色体と第 8 染色体の遺伝子座位を確認し、さらに X 染色体については従来の DXS1232 から 0.1cM 近傍の DXS984 に新たに Lod 値が 2.03 の頂値域を見出した。

D. 考察 特定した疾患遺伝子座にある遺伝子を radiation hybrid mapping と定量 PCR で詳細に検

索しており、候補遺伝子の特定を急いでいる。

F. 結論 RA の遺伝要因について詳細なマッピングにより、第 1 染色体と第 8 染色体の遺伝子座位を確認し、さらに X 染色体については従来の DXS1232 から 0.1cM 近傍の DXS984 に新たに Lod 値が 2.03 の頂値域を見出した。

F. 研究発表

Shiozawa S, Hayashi S, Tsukamoto Y et al. Identification of the gene loci that predispose to rheumatoid arthritis. *Int. Immunol.* 10:1891-1895, 1998.

Shiozawa S, Tsukamoto Y, Hayashi S, Shiozawa S. Genetic predisposition to autoimmunity: Implication for rheumatoid arthritis. *J. Clin. Rheumatol.* 4:156-158, 1998.

塩沢俊一. 慢性関節リウマチの遺伝素因. *遺伝子医学* 2:251-258, 1998.

Xu H, Iijima K, Shiozawa S et al. Platelet-activating factor acetylhydrolase gene mutation in Japanese nephrotic children. *Kidney Int.* 54:1867-1871, 1998.

塩沢俊一、小西良武、林幸子、向江直子、山本絵理、駒井浩一郎、川崎博樹、塚本康夫、安田徳一、塩沢和子、居村茂明. *遺伝子医学* 3:32-37, 1999.

膠原病疾患群モデルマウスのポリジーン系遺伝の解析
環境要因としての *IRF-1* 遺伝子強制発現による疾患制御モデルの確立

分担研究者 能勢真人 愛媛大学医学部 教授

研究要旨

膠原病を含むポリジーン系疾患は環境因子の影響を受けやすいとされているがその機序は不明である。膠原病疾患群発症マウス MRL/lpr をモデルとし、インターフェロン転写活性化因子である *IRF-1* 遺伝子を強制発現させる系で環境因子のシミュレーションを行った。その結果、関節炎、腎炎、動脈炎の発症は、*IRF-1* 遺伝子を介して発現する因子により選択的に抑制されることが明らかとなった。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス、結節性多発動脈炎、慢性関節リウマチ、シェーグレン症候群などに代表される膠原病疾患群は、古くから遺伝要因と環境要因に規定される多因子疾患とされるもその実体は明らかでない。MRL/Mp-*lpr/lpr* (MRL/lpr)マウスは、同一個体に腎炎、動脈炎、関節炎、唾液腺炎、間質性肺炎などの膠原病様疾患群を自然発症し、上記問題点を説明する上での有用なモデルである。まず我々は、このマウスの遺伝形式の解析から、これらの個々の病変の発症が、Fas 欠損変異である *lpr* 遺伝子のみならず、MRL 系マウスの遺伝的に相互に分離可能な背景遺伝子群を必要とすること、さらに近年、連鎖解析により個々の病変に対応する互いに異なった複数の感受性遺伝子座の存在を明らかにし、膠原病

疾患群は、複数の遺伝子が同義的に補足し合って疾病という量的形質の発現に関与するとされるポリジーンに支配されていると考えるに至った。

一般にポリジーン系疾患は環境因子の影響を受けやすいとされている。それ故、感染などの外的因子は、膠原病の発症、病像を正あるいは負に修飾することが考えられる。今回、そのモデルとしてインターフェロン転写活性化因子である *IRF-1* 遺伝子を MRL/lpr マウスに導入し、異所的に強制発現させることによって、膠原病疾患群の発症機構における環境要因の役割を解析した。

B. 研究方法

ヒト *Em* をエンハンサーとするヒト *IRF-1* 遺伝子全長を導入した C57BL/6-h*IRF-*

1 (B6-hIRF-1)を MRL/lpr マウスに戻し交配し N7 世代を得、hIRF-1 遺伝子陽性個体を MRL/lpr-hIRF-1 マウス、hIRF-1 遺伝子陰性個体あるいはもとの MRL/lpr マウスをコントロールマウスとして実験に供した。また、諸臓器組織標本を光学顕微鏡下に観察し、個々の病変の有無、重症度を判定した。血清中の抗 dsDNA 抗体は ELISA で、IgG、IgM、IgG2a、IgG3 は SSRID 法あるいは ELISA 法により定量した。また、Thy-1.2、CD4、CD8、B220、IgM、Mac-2 に対する抗体による FACS にて、脾細胞あるいはリンパ節細胞中の T 細胞、B 細胞、マクロファージの相対的定量を行った。

C. 結果

MRL/lpr-hIRF-1 マウスでは、MRL/lpr マウス同様、全身性のリンパ節腫脹、脾腫、間質性肺炎、慢性唾液腺炎、涙腺炎の所見を呈したが、関節炎、および腎炎、動脈炎を発症する個体はほとんど認められなかった。血清中の IgG、IgM、IgG2a、IgG3 値、抗 dsDNA 抗体価は正常レベルで、脾細胞の FACS 解析の結果から、これらがプロ B 細胞を含めた B 細胞系列の細胞の分化抑制によると思われる。一方 CD4、CD8 陽性細胞の発現に明らかな差は認められなかった。MRL/lpr マウスでは全身性に Mac-2 抗原陽性活性化マクロファージが増加しているが、MRL/lpr-hIRF-1 マウスでは、これらが著しく減少していた。

D. 考察

MRL/lpr-hIRF-1 マウスにおいて、IRF-1 の結合配列をプロモーター部位に有する遺伝子のうちどの遺伝子の発現が、腎炎、動脈炎、関節炎の発症抑制にクリティカルに作用しているかは明らかではないが、hIRF-1 遺伝子の発現により、少なくとも B 細胞の分化抑制のみならず、マクロファージの活性化の抑制が誘導されていることが、関節炎、腎炎、動脈炎の抑制と密接な関係があると考えられた。即ち、MRL/lpr マウスの関節炎や動脈炎の発症には病変局所で活性化マクロファージが effector cell として関与することから、また、腎炎の発症は、血清中の IgG3 腎炎原性抗体の集積を必要とするところから、MRL/lpr-hIRF-1 マウスでの動脈炎、関節炎の抑制は、マクロファージの活性化抑制に起因し、腎炎の抑制は、B 細胞の分化抑制に起因すると考えるのが妥当であろう。一方、唾液腺炎や間質性肺炎は少なくとも抗体を介して発症するものではない可能性を示唆する。

現在我々は、動脈炎、糸球体腎炎、関節炎、唾液腺炎の疾患感受性遺伝子座のマッピングを C3H/HeJ-lpr/lpr マウスとの戻し交配系を用いて解析しているが、動脈炎では、既に報告した *Lprm 1* *Lprm 2* に加えて新たに、第 4 染色体上に劣性感受性遺伝子座をマップし、まとめてそれぞれ *Vas1*、*Vas2*、*Vas3* を得ている。糸球体腎炎に関しては、既報の *Lprm3* に加えて、第 4 染色体上に劣性感受性遺伝子座を同定し、加えて、F2 intercross 系を用いた解析に