

より、第5染色体上に劣性感受性遺伝子座を同定し、それぞれ *Gn1*、*Gn2*、*Gn3* を得た。関節炎に関しては、第15、7、2、1染色体上に、全部で6個の関節炎関連遺伝子座が同定され、それぞれ *Ra1*、*Ra2*、*Ra3*、*Ra4*、*Ra5*、*Ra6* を得た。うち *Ra4* のみが遺伝子型 *MRL/MRL* ホモで抵抗性を示し、他の5座は劣性感受性遺伝子座であった。また、唾液腺炎は、第10、18、4、1染色体上に4座、いずれも劣性感受性遺伝子座としてマップされている。

これらの事実は、膠原病疾患群をポリリン疾患として位置付けること、かつその病像多様性の起源に環境要因が関わりうることを明確にしている。即ち、IFN、TNF、IL-1等のサイトカインを誘導する感染要因などにより *IRF-1* 遺伝子が活性化され、その結果、上記膠原病関連遺伝子座に位置する遺伝子を含めて、IRF結合配列をプロモーター部位に有する遺伝子の転写活性化を介して膠原病の発症を修飾すると考えられるからである。このことは、例えば慢性関節リウマチ患者が、何故経過中に、重複してあるいは原疾患を離れて、血管炎やシェーグレン症候群、間質性肺炎を発症したりするのかを理解するに妥当な概念を呈示しているものと考えられる。

E. 結論

MRL/lpr マウスの膠原病疾患群中、関節炎、動脈炎、腎炎の発症は、インターフェロン転写活性化因子を介して発現する因子により選択的に抑制される。

F. 研究協力者

西原美由紀、寺田美穂（愛媛大・病理）、森 士朗（東北大・口腔外科）、伊藤美津子（東北大・第二内科）、小野栄夫（東北大加齢研・遺伝子導入）、高橋 智（筑波大・分子発生）、北川元生（千葉大・病理）、谷口維紹（東大・免疫）

G. 研究発表

A. 論文発表

1. Nose M, Terada M, Nishihara M, Kamogawa J, Miyazaki T, Mori S, Nishimura M, Wang Y, Kamoto Y, Hiai H. Vasculitis-susceptible genes in mice with a deficit in Fas-mediated apoptosis. *Int J Cardiol* 1998 66 (Suppl. 1): S37-S41.
2. Nose M. Genetic basis of collagen disease in MRL mice with a deficit in Fas-mediated apoptosis: Dissection of the complex pathological manifestations. *Connective Tissue* 1998 30: 297-300.
3. 能勢真人 膠原病疾患群における血管炎の遺伝的基盤：MRL/lpr モデルマウスからのアプローチ 最新医学 1998 53:1454-1465.
4. 能勢真人 血管炎の遺伝的要因：モデル動物からのアプローチ 病理と臨床 1998 16:292-299.
5. 宮崎龍彦、能勢真人 血管炎症候群：その発症進展の分子メカニズム 実験医学（増刊：血管の分子医学）1998 16: 751-757.

B. 学会発表

1. 宮崎龍彦、寺田美穂、西原美由紀、鴨川淳二、森士朗、能勢真人：膠原病疾患群の発症・進展機構におけるオステオポンチン遺伝子多型の役割、第87回日本病理学会、広島1998.4.15
2. Wang Y, Nose M, Komoto T, Nishimura M and Hiai Hi: Host Modifier genes affect mouse autoimmunity induced by the *lpr* gene、第87回日本

病理学会、広島 1998.4.15

3. 鴨川淳二、西原美由紀、森士朗、柴田大法、能勢真人：MRL/lpr マウスの関節炎感受性遺伝子群の解析、第 42 回日本リウマチ学会、東京 1998.5.7
4. 西原美由紀、鴨川淳二、森士朗、大橋裕一、能勢真人：MRL/lpr マウスの自己免疫性唾液腺炎発症における背景遺伝子の解析、第 42 回日本リウマチ学会、東京 1998.5.7
5. 能勢真人：難治性炎症性疾患と遺伝要因、第 19 回日本炎症学会、東京、1998.9.4
6. 能勢真人：リウマチ性疾患の動物モデル、RA の病態と治療をめぐるミニ・国際シンポジウム、東京 1998.11.22
7. 鴨川淳二、寺田美穂、水木伸一、西原美由紀、森士朗、柴田大法、平田勝豪、田畑栄美、長澤優子、日合弘、中鶴修一、中村祐輔、能勢真人：MRL マウスの関節炎感受性遺伝子群の解析：MSM 野生マウスとの交配による新たな関節炎の発現、第 28 回日本免疫学会、神戸 1998.12.2
8. Lu L, Qu W, Miyazaki T, Kamogawa J, Mizuki S, Nishihara M, Terada M, Nose M: QTL analysis of susceptibility loci to

lupus-like glomerulonephritis in MRL/lpr mice. 第 28 回日本免疫学会、1998.12.2

9. 宮崎龍彦、曲衛敏、路靈敏、森士朗、能勢真人：膠原病疾患群の発症・進展機構におけるオステオポンチン遺伝子多型の役割、第 28 回日本免疫学会、神戸 1998.12.3
10. Nose M, Terada M, Nishihara M, Kamogawa J, Miyazaki T, Mori S, Wang Y, Hiai H, Nakamura Y and Nakamura S : Genetic dissection of the complex pathological manifestations of autoimmune disease in MRL/lpr mice. 10th International Congress of Immunology. New Delhi, India 1998.11.3
11. Kamogawa J, Mizuki S, Nishihara M, Terada M, Miyazaki T, Mori S, Okumura H, Shibata T, Nakamura S, Nakamura Y and Nose M : Susceptible and resistant genes for autoimmune arthritis in MRL/lpr mice. 10th International Congress of Immunology. New Delhi, India 1998.11.3

抗塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)抗体の慢性関節リウマチ 滑膜増殖病変に対する治療応用に関する研究

坂田研明, 満屋裕明 熊本大学第二内科助手, 同 教授

研究要旨: SCIDマウスを用いたRA様関節炎モデルの解析から, RA様の持続性破壊性関節炎病態形成にbFGFが強く関与しており, さらに抗bFGF抗体投与により関節炎の出現が著明に抑えられることから, bFGF抑制効果による治療的アプローチの可能性が示唆された。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ(RA)の滑膜炎症病変形成で局所に浸潤するT細胞, とりわけ自己反応性T細胞の関与が強く示唆されており, すでに報告した我々の実験からも活性化T細胞の重要性が予想された。すなわち, 分離したRA患者滑液T細胞を無刺激のまま直接SCIDマウスに移入すると, 多くの場合, 一過性の弱い関節炎が惹起されるの比べ, 滑液T細胞を抗CD3抗体あるいはマイトジェンで刺激し再活性化した後, SCIDマウスへ移入すると, 持続性かつより高度の軟骨破壊を伴ったヒトRAに酷似した関節炎が誘導される(Clin. Exp. Immunol. 104:247-254, 1996)。このRA様関節炎モデルはとくにT細胞による滑膜初期病変形成機序を検討する上で有用な動物モデルと考えられる。

一方, RAにおける滑膜増殖病変形成には, これらT細胞ならびに滑膜構成細胞から産生遊離される種々の炎症性サイトカインの関与が指摘されており, 我々もRA患者由来関節液上清中に強い滑膜細胞に対して増殖増強活性が存在することを *In vitro*の系で確認した。さらにこの関節液上清中の増殖増強活性に及ぼす各種サイトカインに対するポリクローナル中和抗体の影響について調べた。その結果, 関節液上清の増殖増強活性は, IL-1 β , IL-6, GM-CSF, TNF α , TGF β , PDGF に対する中和抗体(100 μ g/mL)では影響を受けなかったが, 塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)の中和抗体(100 μ g/mL)で増殖増強活性が著明に阻害された。このことはRA患者由来関節液に存在する種々の因子の中でbFGFが最も強力に滑膜細胞増殖に働いている可能性を示唆した。また10%FCSのみを含む培養液中でのRA滑膜細胞の³H-チミジン取込みも抗bFGF抗体が抑制することから, bFGFはRA滑膜細胞の基本的な増殖にも重要な因子であり, おそらくはオートクライン的に自らbFGFを産生しているのではないかと推定された。実際, RT-PCR法で調べた結果, この培養滑膜細胞はbFGFおよびFGFレセプターのmRNAを発現していることを確認した。さらにヒトリコンビナントbFGFは滑膜細胞の増殖を促進することを観察したが, このことはbFGFが滑膜細胞の増殖に重要な役割を果たしていることを裏付けている。そこで本研究において, 我々がすでに作製したRA滑膜およびT細胞移入によるRAモデルにおいて, 抗bFGF抗体により, *in vivo*での破壊性増殖性関節炎を抑止できるか否かを調べた。

B. 研究方法

RA関節炎モデルは以下の方法で作製した。RA関節滑液を上清および細胞成分に分離した。細胞成分はさらにFicoll, SRBCによりT細胞分画に精製し, 抗CD3抗体またはPHAで刺激培養後, 合計200 μ lの細胞浮遊液をSCIDマウスの膝関節および腹腔内に投与した。移入後1-4週目から抗bFGF抗体150 μ gを毎週1回, 4週間にわたり腹腔内投与し, その後に病理組織学的検討を行なった。また滑膜細胞移入については, RA関節滑膜より酵素処理して滑膜

細胞を採取し, 2-3回継代培養後, SCIDマウスの膝関節および腹腔に投与し組織学的検討を行った。さらにリコンビナントbFGFをSCIDマウス膝関節および腹腔に投与後, 病理学的検索を行なった。

C. 研究結果および考察

RA滑液T細胞をSCIDマウスに移入し誘発させた破壊性増殖性関節炎は, 抗bFGF抗体を投与することにより著明に抑制された。またRA滑膜細胞移入によるSCIDマウス滑膜増殖病変も抗bFGF抗体を投与することにより抑制された。これらの結果からbFGFがRA患者関節由来の細胞移入による関節炎誘導に重要であると考えられた。そこでbFGFが直接的に増殖性関節病変を惹起できるか否かを検討した。ヒトリコンビナントbFGFをSCIDマウス関節ならびに腹腔に投与すると, 同様の滑膜増殖病変が形成された。以上の事実から, bFGFは滑膜細胞増殖に直接的に関与している可能性が示唆された。すなわち, bFGFはRA関節炎病態形成における滑膜細胞増殖を誘導する重要なメディエーターと考えられ, その生物活性の抑制はRA破壊性関節炎に対する治療的アプローチとしては十分な効果を期待できる方策となる可能性が示されたといつて良い。

D. 結論

SCIDマウスを用いたRA様関節炎モデルの解析から, RAの持続性破壊性関節炎病態形成にbFGFが強く関与しており, bFGF抑制効果による治療的アプローチの可能性が示唆された。

E. 研究業績

- 1) Kong L, Robinson CP, Peck AB, Vela-Roch N, Sakata KM, Dang H, Talal N, Humphreys-Beher MGI inappropriate apoptosis of salivary and lacrimal gland epithelium of immunodeficient NOD-scid mice. Clin Exp Rheumatol 16(6):675-81, 1998.
- 2) Sakata K, Sakata A, Vela-Roch N, Escalante A, Kong L, Nakabayashi T, Cheng J, Talal N, and Dang H. Fas (CD95) - transduced signal preferentially stimulates lupus peripheral T lymphocytes. Eur. J. Immunol. 28:2648-2660, 1998.
- 3) Kong L, Ogawa N, McGuff HS, Nakabayashi T, Sakata Km, Masago R, Vela-Roch N, Talal N, and Dang H. Bcl-2 family expression in salivary glands from patients with primary Sjogren's syndrome: Involvement of Bax in salivary gland destruction. Clin Immunol Immunopathol 88(2):133-141, 1998.
- 4) Sakata K, Sakata A, Kong L, Dang H, and Norman Talal N. Role of Fas/FasL interaction in Physiology and Pathology: A breakthrough for understanding autoimmunity. Clin. Immunol. Immunopathol. 87: 1-7, 1998.
- 5) Mitsuya H. and Erickson J. Discovery and development of antiretroviral therapeutics for HIV infection. In: Textbook of AIDS medicine, edited by Merigan, Bartlett, and Bolgnesi, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 751-780, 1998.
- 6) Sakata K, Sakata A, Kong L, Nakabayashi T, Ogawa N, Dang H, and Talal N. Fushi-ka (defective apoptosis) and rheumatic autoimmune diseases: an overview on the regulation of Fas-mediated T cell apoptotic signal transduction. Jap. J. Rheumatol. 7:211-234, 1997.

CD26/DPPIV 分子と β ケモカインの相互作用

— T 細胞遊走への役割の解析 —

分担研究者： 森本 幾夫
東京大学医科学研究所・教授

研究要旨

CD26 分子はメモリーT細胞の活性化や機能の鍵となる分子で DPPIV 酵素活性を有し、この酵素は N 末端から 2 番目のプロリンの C 末端側ペプチドを切断することで知られているが、免疫に関与する DPPIV の基質は明らかでなかった。RANTES などのケモカインは N 末端から 2 番目がプロリンで CD26/DPPIV の基質になりえ、また慢性関節リウマチ患者の滑膜などに多量に存在している。そこで CD26/DPPIV と RANTES などのケモカインの相互作用が慢性関節リウマチなどにおいて CD26 陽性 T 細胞の滑膜、滑液への遊走に関わっているかどうかを明らかにすることを目的とした。

野生型可溶性 CD26(DPPIV+) の存在下で RANTES による血管内皮細胞内での T 細胞の遊走が RANTES のみの場合と比較して亢進した。しかし、DPPIV 酵素陰性の変異型可溶性 CD26 を用いた場合は RANTES を組み合わせても遊走亢進は認められなかった。このように CD26/DPPIV は RANTES による T 細胞の遊走を亢進させ、また DPPIV 酵素活性が重要であることが明らかになった。RANTES と可溶性 CD26 を反応させアミノ酸配列を検討したところ、RANTES は N 末端 2 番目の所が切断された。しかし DPPIV-変異型可溶性 CD26 では RANTES は切断されず、RANTES は DPPIV 酵素の基質であることが明らかとなった。さらに単球に対して同様の実験を行った結果、T 細胞の場合と異なり RANTES と野生型可溶性 CD26 との組み合わせで単球の遊走は RANTES のみと比してその生理活性が著しく低下することが明らかになり、単球に対しては、DPPIV による RANTES の酵素切断は遊走をネガティブに調節していることが示唆された。このように CD26/DPPIV は *in vivo* において慢性関節リウマチなどの炎症反応を制御する分子として重要であることが明らかになった。

A. 【研究目的】

CD26 分子は 110kDa の膜糖蛋白でメモリーT細胞に選択的に発現され、細胞外ドメインに N 末端から 2 番目のプロリンの C 末端側ペプチド結合を切る酵素である dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) 活性を含んでいる。またこの分子は T 細胞受容体からのシグナル伝達を補助する CD28, CD5 と同様に costimulatory 分子の一つで T 細胞活性化にも重要である。さらに DPPIV 酵素活性が CD26 由来 T 細胞 costimulation に必要である。また CD26 は Adenosine deaminase (ADA) の結合蛋白であり、細胞表面上の ADA はユニークな免疫調節メカニズムに関与しており、細胞外から放出された ADA が T 細胞表面上の CD26 に結合し、これらの複合体がアデノシンの細胞外の濃度を減少させ、その結果アデノシンの T 細胞への機能抑制効果を遮断していくという結果も我々により報告されている。

一方、CD26 強陽性である CD45RO 陽性 T 細胞サブセットは接着分子として知られる β 1 インテグリン強陽性サブセットでもあり、その関連で T 細胞の血管内皮細胞を通過する遊走作用と CD26 分子の発現との相関が従来調べられており、血管内皮細胞を通過できる T 細胞集団の CD26 発現量はそうでない細胞に比較して有意に高いという報

告がなされている。このように T 細胞の遊走は生理学的に T 細胞の体内循環、免疫サーベイランス及び組織の炎症において重要な働きを担っていると考えられる。実際、慢性関節リウマチなどの慢性炎症疾患では末梢血や局所炎症部位で CD26 陽性 T 細胞が増加していることが知られており、CD26 陽性 T 細胞は炎症のエフェクター T 細胞としても重要と考えられている。

RANTES 等の β ケモカインは近年細胞の遊走だけでなく、そのレセプターは HIV のコレセプターとして注目されているが、慢性関節リウマチの局所炎症の場である滑膜は RANTES などの β ケモカインに富んでおり、CD4, CD8 細胞の炎症部位への遊走に重要な役割を果たしている。

さらに MIP-1 β , MCP-1 などの β ケモカインも炎症滑膜中のファイブロブラストやマクロファージから産生されるといわれている。RANTES, MCP-1, MIP-1 β などの β ケモカインは N 末端から 2 番目がプロリンであることから CD26 分子に含まれる DPPIV 酵素の基質となりうる。そこで CD26/DPPIV と RANTES などの β ケモカインの相互作用が慢性関節リウマチなどにおいて CD26 陽性 T 細胞の滑膜、滑液部位への遊走に関わっているかどうかを明らかにすることを目的とした。

B. 【方法】

1. T細胞及び単球の分離:

T細胞は健常人からの末梢血をFicoll上で遠心分離し、末梢血リンパ球を得た後、E-ロゼット法にて分離し、さらにプラスチックディッシュ上で培養して単球を除いた。T細胞のPHAによる刺激は1 μ g/mlで4日間行った。単球はE-細胞を抗CD3、抗CD20及び抗CD56抗体で処理してマグネティックビーズによるネガティブセレクションによって得られた。得られたT細胞の純度は99%以上であった。

2. 可溶性CD26分子の作製:

野生型可溶性CD26 (DPPIV+)はN末端から3番目から9番目の欠失CD26 cDNAをCHO細胞にトランスフェクトし、無血清培地を用いて培養したCHO-sCD26細胞の培養上清をADA-セファロースカラムにて精製した。変異型可溶性CD26 (DPPIV-)は、さらに629番目のセリンをアラニンに点変異させたcDNAをCHO細胞にトランスフェクトして野生型可溶性CD26同様に、その培養上清より精製した。得られた精製物はGly-Pro-pNAを基質としたDPPIVアッセイを行いその酵素活性が保たれていることを確認した。さらに変異型可溶性CD26はその酵素活性が存在しないことを同様のアッセイにて確認している。

3. トランスエンドテル ケモタキシス アッセイ:

血管内皮細胞のHUVEC及びECV304細胞を3.0 μ mの穴のあいたトランスウェルセルカルチャーチャンバーのインサート上に培養し、RANTES等のケモカインと可溶性CD26を混合してボトムカルチャーチャンバー中に600 μ lの容量で加えた。10⁶T細胞あるいは単球は100 μ lの容量にて、それぞれのアップカルチャーチャンバーのインサートにのせ、ケモタキシスアッセイは37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培養器中で4時間行い血管内皮細胞を通過してボトムチャンバー中に遊走した細胞を30秒間フローサイトメトリーにて数えた。

4. RANTESの可溶性CD26による酵素的消化:

RANTESは可溶性CD26(野生型及び変異型)と37 $^{\circ}$ C、4時間培養し、反応混合物はApplied 477液体シーケンサーにて蛋白配列を決定し、クリーブされたN末端のアミノ酸配列はApplied Biosystem 120A分析器にて解析した。

C. 【結果】

1. 末梢血T細胞を用いると、特にRANTESと可溶性CD26との組み合わせでRANTESのみの場合と比較して、末梢血T細胞のトランスエンドテリアルケモタキシスを亢進させた。この可溶性CD26によるRANTESの生理作用の増強は

RANTESの用量がsuboptimal(25ng/ml-50ng/ml)の場合によりはつきりと確認でき、最大用量である100ng/mlの場合にはドナーにより認めがたい場合もあった。PHA刺激T細胞を用いた場合は、RANTESのみならずMCP-1においても可溶性CD26との相互作用により、RANTES、MCP-1のみの場合の遊走に比べて、T細胞の遊走亢進が認められた。

2. RANTESと可溶性CD26の相互作用によるT細胞の遊走亢進はDPPIV酵素陰性の変異型可溶性CD26を用いた場合は、RANTESと組み合わせても遊走亢進は認められず、DPPIV酵素活性がRANTESによるT細胞遊走亢進に重要であることが明らかとなった。

3. RANTESのN末端からのアミノ酸配列はSPYSSDITであるが、RANTESと野生型CD26を培養した場合N末端からのアミノ酸配列はRANTES由来のペプチドのSP及びYSSXTT及び可溶性CD26の配列が検出された。しかしRANTESとDPPIV陰性変異型可溶性CD26と培養した場合は、正常なRANTESのアミノ酸配列が検出された。これらのことから可溶性CD26中に含まれるDPPIV酵素はRANTESをN末端から2番目のところで切断し、RANTESはDPPIV酵素の基質であることが明らかとなった。実際RANTESはGly-Pro-pNAを基質としてDPPIVアッセイにおいては可溶性CD26のDPPIV活性を抑制した。また、N末端のアミノ酸を欠失した合成RANTESではこのような抑制作用は認めなかった。MCP-1についても同様にDPPIVの基質であることが明らかになった。

4. 単球の遊走についてはT細胞の遊走とは異なり、RANTESと野生型可溶性CD26との組み合わせではRANTESのみの場合と比して単球の遊走能は減少した。しかしRANTESとDPPIV陰性可溶性CD26との組み合わせでは単球の遊走に変化は認められなかった。このようにDPPIV酵素によるRANTESの酵素切断は単球の血管内皮細胞間の遊走をネガティブに調節していることが示唆された。

D. 【考察及び結論】

RANTESをはじめとするケモカイン群とそのレセプター群は、その一部がHIV-コレセプターとして働くことが明らかとされて以来、にわかに注目を浴びようになってきた分野である。

我々は可溶性CD26はRANTESによるT細胞の血管内皮細胞間の遊走を亢進させるが、単球に関しては可溶性CD26はRANTESによる単球の遊走をむしろ減少させることを明らかにした。さら

に RANTES, MCP-1 は DPPIV 酵素の基質として働いていることが明らかになった。可溶性 CD26 による RANTES の活性制御が T 細胞と単球においてその機能発現が異なっているのはおそらく各々の細胞表面上に発現するレセプター (RANTES のレセプターは T 細胞では主に CCR5 で、単球では CCR3, CCR1 といわれる) の性質の相違から来るものと思われる。特に可溶性 CD26 で切られた RANTES は CCR5 に依然として結合するが、CCR3, CCR1 には結合しないことが考えられる。

可溶性 CD26 が T 細胞のケモカイン誘導 T 細胞遊走を亢進したことは、CD26 陽性 T 細胞が *in vitro* で最も遊走能が強く、さらに *in vivo* でも慢性炎症部位でドミナントになっている T 細胞フェノタイプであることをよく説明している。さらに RANTES などケモカインの生物学的活性は CD26/DPPIV によって調節されているということは CD26 分子そのものが幅広い免疫反応や炎症反応に大きく関与している可能性を強く示唆している。

慢性関節リウマチでは滑膜、滑液中には RANTES などのケモカインに富み、浸潤 T 細胞は CD26 強陽性であることが報告されているが、今回の我々の研究により慢性関節リウマチ患者では CD26 陽性 T 細胞が β ケモカインである RANTES との相互作用により滑膜などの炎症部位へ遊走されやすい機序が存在することが明らかにされた。

多くのケモカインやサイトカインは N 末端から 2 番目にプロリンやアラニンを含んでおり、DPPIV の基質となりうる。これらのサイトカイン、ケモカインと CD26/DPPIV の相互作用及び機能的意義のさらなる研究は慢性関節リウマチの病態解明のみならず、新しいタイプの抗リウマチ剤、抗炎症薬開発に結びつく可能性がある。

F. 【 研究発表 】

論文発表

1. Hegen M, Kameoka J, Dong RP, Schlossman SF, and Morimoto C. Cross-linking of CD26 by antibody induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase. *Immunol.* 1997; 90: 257-264.
2. Manie SN, Sattler M, Astier A, Phifer JS, Canty T, Morimoto C, Druker BJ, Salgia R, Griffin JD, and Fredman AS. Tyrosine phosphorylation of the product of the *c-bcl* protooncogene induced after integrin stimulation. *Experimental Hematology.* 1997; 25: 45-50.
3. Takahashi M, Ikeda U, Kasahara T, Kitagawa S, Takahashi Y, Shimada K, Kano S, Morimoto C, and Matsuyama J. Activation of human monocytes for enhanced production of interleukin 8 during transendothelial migration *in vitro*. *J. Clin. Immunol.* 1997; 17: 53-62.
4. Dong R-P, Umezawa Y, Ikushima H, Munakata Y, Schlossman SF, and Morimoto C. Different regulatory effects of pentoxifylline on human T cell activation pathways. *J. Clin. Immunol.* 1997; 17:247-252.
5. Jaquot S, Kobata T, Iwata S, Morimoto C, and Schlossman SF. CD154/CD40 and CD70/CD27 interactions have different and sequential functions in T-dependent B cell responses: enhancement of plasma cell differentiation by CD27 signaling. *J. Immunol.* 1997; 159:2652-2657.
6. Kanda H, Mimura T, Morino N, Hamasaki K, Nakamoto T, Hirai H, Morimoto C, Yazaki Y, and Nojima Y. Ligation of the T cell antigen receptor induces tyrosine phosphorylation of p130^{Cas}-related docking protein family, and its subsequent binding to the Src homology 2 domain of c-Crk. *Eur. J. Immunol.* 1997; 27: 2113-2117.
7. Jaquot S, Kobata T, Iwata S, Schlossman SF, and Morimoto C. CD27/CD70 interaction contributes to the activation and the function of human autoreactive CD27+ regulatory T cells. *Cell Immunol.* 1997; 179: 48-54.
8. Sato T, Ohashi Y, Tachibana K, Soiffer R, Ritz J, and Morimoto C. Altered tyrosine phosphorylation via the very late antigen (VLA)/ β 1 integrin stimulation is associated with impaired T cell signaling through VLA-4 after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood.* 1997; 90: 4222-4229.
9. Tachibana K, Urano T, Fujita H, Ohashi Y, Kamguchi K, Iwata S, Hirai H, and Morimoto C. Tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrate by focal adhesion kinase: a putative mechanism for the integrin-mediated tyrosine phosphorylation of Cas and the recruitment of Src family protein kinases to Cas. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 29083-29090.
10. Hoshino Y, Nagata Y, Gatana H, Hosono O, Morimoto C, Tachikawa N, Nomura K, Wakabayashi T, Oka S, Nakamura T,

- Iwamoto A. Cytomegalovirus reinitiation and CMV antigenemia as a clue to impaired advenocortical function in patients with AIDS. *AIDS*. 1997; 11: 1719-1724.
11. Dong RP, Tachibana K, Hegen M, Munakata Y, Cho D, Schlossman SF, and Morimoto C. Determination of adenosine deaminase binding domain on CD26 and its immunoregulatory effect on T cell activation. *J. Immunol.* 1997, 159: 6070-6076.
 12. Agematsu K, Nagumo H, Yang FC, Nakazawa T, Fukushima K, Ito S, Sugita K, Mori T, Kobata T, Morimoto C, and Komiyama A. B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+ B cells and helper T cells in immunoglobulin production. *Eur. J. Immunol.* 1997, 27: 2073-2079.
 13. Ohashi Y, Tachibana K, Kamiguchi K, Fujita H, and Morimoto C. T cell receptor-mediated tyrosine phosphorylation of Cas-L, a 105-kDa Crk-associated substrate-related protein, and its association of Crk and C3G. *J. Biol. Chem.* 1998, 273: 6446-6451
 14. Shioda T, Kato M, Ohnishi Y, Tashiro K, Ikegawa M, Nakayama E, Hu H, Kato A, Sakai Y, Liu H, Honjo T, Namoto A, Iwamoto A, Morimoto C, and Nagai Y. Anti-HIV-1 and chemotactic activities of human stromal cell-derived factor 1 α (SDF-1 α) and SDF-1 β are abolished by CD26/DPPIV-1 mediated cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998, 95: 6331-6336.
 15. Kawashima T, Kawasaki H, Kitamura T, Nojima Y, and Morimoto C. Interleukin-12 induces tyrosine phosphorylation of an 85-kDa protein associated with IL-12 receptor b1 submit. *Cell. Immunol.* 1998, 186: 39-44.
 16. Agematsu K, Nagumo H, Oguchi Y, Nakazawa T, Fukushima K, Yasui K, Ito S, Kobata T, Morimoto C, and Komiyama A. Generation of plasma cells from peripheral blood memory B cells: synergistic effect of IL-10 and CD27/CD70 interaction. *Blood.* 1998, 91: 173-180.
 17. Akiba H, Nakano H, Nishinaka S, Shindo M, Kobata T, Atsuka M, Morimoto C, Ware CF, Malinin N, Wallach D, Yagita H, and Okumura K. CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, activates NF- κ B and stress-activated protein kinase 10-jun N-terminal kinase via TRAF2, TRAF5, and NF- κ B inducing kinase. *J. Biol. Chem.* 1998, 273: 13353-13358.
 18. Dong R-P, Tachibana K, Hegen M, Soherpe S, Cho D, Schlossman SF, and Morimoto C. Correlation of the epitope defined by anti-CD26 mAbs and CD26 function. *Mol. Immunol.* 1998, 35: 13-21.
 19. Ohtsuki T, Hosono O, Kobayashi H, Munakata Y, Souta A, Shioda T, and Morimoto C. Negative regulation of the anti-HIV and chemotactic activity of human stromal cell-derived factor 1 α by CD26/DPPIV. *FEBS Lett.* 1998, 431: 236-240.
 20. Fujita H, Kamiguchi K, Cho D, Shibanuma M, Morimoto C, and Tachibana K. Interaction of Hic-5, a senescence-related protein, with focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.* 1998, 273: 26516-26521.
 21. Abe M, Yano S, Sakaba N, Kitamura K, Urasaki T, Nakada S, Kawasaki H, Morimoto C, and Masuho Y. Surrogate thrombopoietin. *Immunol. Lett.* 1998, 61: 73-78.
 22. Mukasa R, Homma T, Ohtsuki T, Hosono O, Souta A, Kitamura T, Fukuda M, Watanabe S, and Morimoto C. Core 2-containing O-glycans on CD43 are preferentially expressed in the memory subset of human CD4 T cells. *Int. Immunol.* 1999; 11: 259-268.
 23. Mukasa R, Homma T, Hosono O, Yoshino S, Nishioka K, Fukuda M, Morimoto C. Human T lymphocyte populations which bind to P- or E-selection are enriched with cells expressing core 2 O-glycans. *Immunol. Lett.* in press.
 24. Iwata S, Yamaguchi N, Munakata Y, Ikushima H, Lee JF, Hosono O, Schlossman SF, and Morimoto C. CD26/DPPIV differentially regulates the chemotaxis of T cells and monocytes toward RANTES. *Int. Immunol.* in press.
 25. Hosono O, Homma T, Munakata Y, Nojima Y, Iwamoto A, and Morimoto C. Decreased dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) enzyme activity of plasma soluble CD26 and its inverse correlation with HIV RNA in HIV-infected individuals. *Clin. Immunol.* in press.
 26. Munakata Y, Umezawa Y, Iwata S, Dong R-P, Yoshida S, Ishii T, Morimoto C. Specific

inhibition of Th2 type cytokine production from human peripheral T cells by terfenadine in vitro. Clin. Exp. Aller. in press.

課題名：TNF受容体ファミリー分子を介したシグナル伝達に関する研究

分担研究者 八木田 秀雄

所属機関 順天堂大学医学部免疫学助教授

新たなI κ B kinase (IKK β) を見出し、種々の TNF 受容体ファミリー分子を介したNF- κ B活性化は主に TRAF \rightarrow NIK \rightarrow IKK によって媒介されることを明らかにした。マウスCD70, CD30L, OX40L 及びラットOX40L に対する mAb を作製し、これらの分子の発現と機能を解析した。さらに可溶性 FasLの好中球に対する遊走活性を明らかにし、また、RA患者関節液中の単球における CD40 の発現と機能を解析した。

A. 研究目的

I型あるいはII型TNF受容体, lymphotoxin (LT)- β 受容体, Fas, CD40, CD30, CD27, OX40といったTNF受容体ファミリー分子とそのリガンドは、アポトーシスや炎症反応の惹起に関与し、RAの病態形成においても重要であることが示唆されている。本研究においては、これらのTNF受容体ファミリー分子の機能とシグナル伝達機構を解明し、RAにおける炎症反応とアポトーシスの新たな制御法を開発することを目的とする。

B. 方法と結果

1. IKK α と相同性を有する新たなI κ B kinase (IKK β)を見出し、その遺伝子がヒト染色体8p12-p11に存在することを示した。また、LT β 受容体, CD27, CD30, CD40あるいはTRAF2, 5, 6によるNF- κ B活性化はIKK α 及びIKK β によって媒介されることを示した。さらに、NIKはIKK α , β の両者を、MEKK1は主にIKK β を活性化することを明らかにした。

2. TRAF5はNIKに結合し、dn NIKによってTRAF5によるNF- κ Bの活性化が阻害されることから、TRAF2, 5共にNIKを介してIKKを活性化することが示された。また、CD40, CD27, CD30を介したNF- κ Bの活性化がdn NIKによって阻害されることから、TRAF \rightarrow NIK \rightarrow IKKがこれらの受容体を介したNF- κ B活性化の主要な経路であることが示された。

3. dn TRAF5によって293細胞でのTNFによるNF- κ B活性化が抑制されることから、TRAF2だけではなく、TRAF5もTNF受容体を介したNF- κ Bの活性化に関わることが示唆された。

4. CD27はTRAF2とTRAF5を直接に結合し、これらを介してNF- κ B及びJNKを活性化するこ

とを示した。

5. マウスCD70 (CD27リガンド) に対するmAbを作製し、活性化B細胞での発現とT細胞活性化への関与を明らかにした。

6. マウスCD30リガンド(CD30L) に対するmAbを作製し、活性化T細胞での発現とT細胞活性化への関与を明らかにした。

7. マウスOX40リガンド(OX40L) に対するmAbを作製し、活性化B細胞での発現とT細胞活性化への関与を明らかにした。また、DBA/1マウスでのコラーゲン誘発性関節炎(CIA) に対する抑制効果を認めた。

8. ラットOX40L cDNAをクローニングし、HTLV-1感染T細胞株での異常発現を認めた。ラットOX40Lに対するmAbを作製し、CIA及びアジュバンド関節炎(AA)への効果を検討している。

9. ヒト可溶性Fasリガンド(FasL) は好中球に対して直接的な遊走活性を有することを示した。Fasのdeath domainに機能的な変異を有する1pr^uマウス由来の好中球に対しても走化性を示すことから、アポトーシス誘導とは異なるシグナル伝達経路の関与が示唆された。

10. RA患者関節液中の単球には恒常的にCD40が発現しており、CD40リガンド(CD40L) 刺激によりTNF- α , IL-6, IL-8の産生亢進が認められた。RA患者関節液由来の単核球にみられる恒常的なTNF産生は可溶性CD40の添加により抑制されることから、RA患者の単球/マクロファージに恒常的に発現しているCD40は恒常的なTNF産生に関与していることが示唆された。

C. 考察と結論

TNF受容体ファミリー分子を介したNF- κ B活性化は、IL-6やIL-8といった炎症性サイトカイ

ンの産生やICAM-1やE-セレクトインといった接着分子の発現を誘導することにより炎症反応を惹起、増強する他、I型TNF受容体やDR4やDR5といったTRAIL受容体を介したアポトーシスに対して抑制的に働くことが示唆されている。本年度の解析によりTRAF → NIK → IKKというNF-κB活性化の主たる経路が明らかとなり、NIKやIKKを標的とした抗炎症剤の開発が期待される。さらに、これらのTNF受容体ファミリー分子のRAの病態形成への関与については、RA患者での発現の検討とともに、そのリガンドに対する中和抗体のCIAやAAに対する効果から明らかにしていく予定である。

D. 発表

1. Nakano, H., Shindo, M., Sakon, S., Nishinaka, S., Mihara, M., Yagita, H., and Okumura, K. Differential regulation of IKK α and IKK β by two upstream kinases, NIK and MEKK1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 3537-2542, 1998.
2. Akiba, H., Nakano, H., Nishinaka, S., Shindo, M., Kobata, T., Morimoto, C., Aizawa, S., Watanabe, T., Ware, C.F., Mosialos, G., Kieff, E., Malinin, N.L., Wallach, D., Yagita, H., and Okumura, K. CD27, a member of the TNF receptor superfamily, activates NF-κB and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase via TRAF2, TRAF5, and NF-κB-inducing kinase. J. Biol. Chem., 273: 13353-13358, 1998.
3. Oshima, H., Nakano, H., Nohara, C., Kobata, T., Nakajima, A., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Muto, T., Yagita, H., and Okumura, K. Characterization of murine CD70 by molecular cloning and mAb. Int. Immunol., 10: 517-526, 1998.
4. Sekine, C., Yagita, H., Miyasaka, N., and Okumura, K. Expression and function of CD40 in rheumatoid arthritis synovium. J. Rheumatol., 25: 1048-1053, 1998.
5. Seino, K., Iwabuchi, K., Kayagaki, N., Miyata, R., Nagaoka, I., Matsuzawa, A., Fukao, K., Yagita, H., and Okumura, K. Chemotactic activity of soluble Fas ligand against phagocytes. J. Immunol.,

161: 4484-4488, 1998.

6. Akiba, H., Atsuta, M., Yagita, H., and Okumura, K. Identification of rat OX40 ligand by molecular cloning. Biochem. Biophys. Res. Comm., 251: 131-136, 1998.

自己免疫疾患におけるレトロウイルスの病因論的関与に関する研究

分担研究者 吉木 敬 北海道大学医学部教授

研究要旨

当該分担研究者らが樹立したHTLV-I LTR-env-pXトランスジェニックラット (env-pXラット) では、リンパ球の機能亢進を背景にRAを始めヒト膠原病類 似の種々の疾患の発症や自己抗体の産生を見る。env-pXラットの関節炎局所 ではオリゴクローナルな浸潤T細胞の増加を観察したが、どの個体でも共通する クローンやTCRV β CDR3領域に特定のアミノ酸配列はなかった。正常ラットと の骨髄や脾細胞移入実験結果から、疾患によって導入遺伝子の必要とされる組 織が異なることが示唆された。正常ラット脾細胞は関節炎をはじめとする env-pXラットの疾患の発症を抑制するほか、II型コラーゲン投与によるenv-pX ラットの高度な関節炎の発症も抑制する傾向にあった。

A. 研究目的

リウマトイド因子 (RF) などの自己抗体産生を伴い、慢性関節リウマチ類似の関節炎など種々の自己免疫疾患を発症するHTLV-I LTR-env-pX トランスジェニックラット (env-pXラット) をモデルとして、自己免疫疾患におけるレトロウイルスの病因論的関与の可能性を明らかにし、慢性関節リウマチなど自己免疫疾患の発症機構解明に寄与することを目的としている。

B. 方法

動物は継代化したWKAH系env-pXラットを用いた。関節炎局所浸潤T細胞のクローナリティーについて、T細胞受容体CDR3を含む領域をPCR増幅したRT-PCR-SSCP法および一部は塩基配列を決定し検討した。骨髄および脾細胞移入実験はドナー、レシピエントとも6週齢

の疾患を発症していないenv-pXラットおよび正常WKAHラット間で行った。レシピエントは12Gyの致死線量の放射線で前処置し、ドナーから得た骨髄あるいは脾細胞を尾静脈より投与、約5ヵ月後に犠牲死させ解析した。II型コラーゲン (CII) による関節炎の誘導は8~10週齢のenv-pXラットあるいは正常ラットにフロイント完全アジュバントとCII (1 mg/rat) を背部皮内に投与し、3週後に関節の腫脹の有無によって判定した。また、この時に採取した血清中の抗CII抗体価やリウマチ因子はそれぞれELISA法あるいはPA法にて測定した。

C. 結果

env-pXラットの関節炎局所浸潤T細胞の多くはCD4陽性で、22種類のTCRV β についてRT-PCR-SSCP法によるT細胞受容体の解析ではそれぞれのV β で比較的オリゴ

クローナルなT細胞の増殖が確認された。しかし、それぞれのTCRV β で出現するクローン数には極端な偏りや検討した各ラットに共通するクローンの存在は確認されなかった。また、増加しているクローンのうち検索したCDR3領域アミノ酸配列に一定の傾向はみなかった。細胞移入実験ではenv-pXラットの骨髓細胞あるいは脾細胞を移入しても関節炎や心筋炎などを正常ラットに疾患移入はできなかったが、皮膚炎や唾液腺炎あるいは血管炎は正常ラットに再現できた。一方、正常ラット脾細胞を移入したenv-pXラットでは関節炎をはじめほとんどの疾患の発症が抑制された。方法で述べた如くCIIを投与するとenv-pXラットのみならず正常ラットにも同レベルの抗CII抗体価の上昇を認めるが、関節炎はenv-pXラットで高頻度に誘導されるものの、同様の投与をした正常WKAHラットにはほとんど誘導されなかった。一方、env-pXラットをあらかじめ正常ラット脾細胞あるいはリンパ節細胞で前処置しておくことこの関節炎の発症は抑制される傾向にあった。RFについてはCIIを投与の有無にかかわらずenv-pXラットのみにしか観察されなかった。

D. 考察

HTLV-I遺伝子のうち特にpX遺伝子産物p40Taxは宿主の遺伝子に対して免疫関連遺伝子など種々の遺伝子をトランス活性化することが知られており、本env-pXラットにおいてもp40Taxによる免疫関連遺伝子の活性化に伴う免疫応答関連分子の高発現、T細胞の高応答能の獲得が種々の疾患の発症に深く関与していると考え

られる。導入遺伝子産物が標的となっている可能性は、炎症局所でのT細胞クローンの一致率が低いことやenv-pXラットの皮膚が正常ラットに拒絶されないことから低いものと考えられる。それぞれのTCRV β で出現するクローン数には極端な偏りはなく、スーパー抗原の関与の可能性は低い。また各env-pXラットで共通するクローンはいずれのV β でも確認されず、すべてに共通の強力な抗原の存在は否定的であった。細胞移入実験の結果から考えるとenv-pXラットに発症する疾患は皮膚炎など一部を除き、関節炎などの発症にはリンパ球のみならず標的組織や胸腺などリンパ球成熟過程での導入遺伝子の存在が重要と思われる、いくつかの異なる発症機構が想定される。CIIによる関節炎の誘導実験の結果では、WKAHラットではenv-pXラットと同レベルの抗CII抗体価上昇を見るも関節炎は発症しないことからこの関節炎の発症には細胞性免疫が重要であるといえる。とくに正常ラット脾細胞やリンパ節細胞がこの関節炎の発症に抑制的に働くことから、env-pXラットでは免疫抑制機構を含む細胞性免疫機構の制御に異常をきたし、関節炎を発症している可能性が考えられる。今後はどの細胞でのenv-pX遺伝子の発現がこの制御が破綻し、疾患発症に至るか解明していく必要がある。

E. 結論

本研究の研究成果から考えても、このenv-pXラットモデルは単にHTLV-I関連疾患のモデルとしてのみでなく、慢性関節リウマチをはじめとする種々の自己免疫

疾患における病因の種類やその存在部位、発症機構を明らかとするためのモデルとしても有用であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kasai, T., Ikeda, H., Tomaru, U., Yamashita, I., Ohya, O., Morita, K., Wakisaka, A., Matsuoka, E., Moritoyo, T., Hashimoto, K., Higuchi, I., Izumo, S., Osame, M., Yoshiki, T. : A rat model of human T lymphocyte virus type I (HTLV-I) infection: in situ detection of HTLV-I provirus DNA in microglia/macrophages in affected spinal cords of rats with HTLV-I-induced chronic progressive myeloneuropathy. *Acta Neuropathol* 97: 107-112, 1999.

Nakagawa, I., Murakami, M., Ijima, K., Chikuma, S., Saito, I., Kanegae, Y., Ishikura, H., Yoshiki, T., Okamoto, H., Kitabatake, A., Uede, T. : Persistent and secondary adenovirus-mediated hepatic gene expression using adenovirus vector containing CTLA4 IgG. *Human Gene Therapy* 9: 1739-1745, 1998.

Katsumata, K., Ikeda, H., Sato, M., Harada, H., Wakisaka, A., Shibata, M., Yoshiki, T. : Tissue-specific high-level expression of human endogenous retrovirus-R in the human adrenal cortex. *Pathobiology* 66: 209-215, 1998.

Yamazaki, H., Kunisada, T., Ishizu, A., Ikeda, H., Miyoshi, I., Sudo, T., Hayashi, S., Yoshiki, T. : Promotion of early osteoclastogenesis and B lymphopoiesis in the bone marrow of transgenic rats with the env-pX gene of human T-cell lymphotropic virus type I. *Oncogene* 17: 2955-2960, 1998.

2. 学会発表

吉木 敬:教育講演「レトロウイルスと自己免疫」 第42回日本リウマチ学会総会 リウマチ 38: 153-154, 1998.

吉木 敬:HTLV-I Taxトランスジェニックラットを用いたATL及びHTLV-I関連疾患の発症機構の解析 第57回日本癌学会総会 第57回日本癌学会総会記事 53, 1998.

山崎英俊, 宮本顕友, 池田 仁, 石津明洋, 國貞隆弘, 林 眞一, 吉木 敬:シンポジウムII-1「HTLV-I env-pXトランスジェニックラットにおける破骨細胞とB細胞の分化、増殖への影響」 第38回日本リンパ網内系学会 日本リンパ網内系学会会誌 38: 39, 1998.

菅谷壽晃, 池田 仁, 石津明洋, 中丸裕爾, 菊池和徳, 田中 敏, 富居一範, 脇坂明美, 吉木 敬:膠原病発症HTLV-I遺伝子導入ラットの末梢血および炎症局所T細胞に関する検討 第42回日本リウマチ学会総会 リウマチ 38: 379, 1998.

富居一範, 池田 仁, 石津明洋, 菅谷壽晃, 中丸裕爾, 菊池和徳, 田中 敏, 山崎英俊, 脇坂明美, 吉木 敬:HTLV-I LTR-env-pXトランスジェニックラットに認められるcollagen vascular diseasesの発症機序の検討 第87回日本病理学会総会 日本病理学会会誌 87: 387, 1998.

富居一範, 池田 仁, 菅谷壽晃, 菊池和徳, 田中 敏, 山崎英俊, 脇坂明美, 吉木 敬:HTLV-I LTR-env-pXトランスジェニックラットにおける自己免疫疾患発症に関する検討 第57回日本癌学会総会 第57回日本癌学会総会記事: 90, 1998.

分担研究報告書

慢性関節リュウマチの発症に関わる Fas を介するアポトーシス誘導システムに関する研究

分担研究者 米原 伸 京都大学ウイルス研究所・教授

研究要旨

Fas は活性化した末梢の T 細胞や B 細胞の除去に関与することによって、自己反応性免疫担当細胞の除去を行う分子である。そして、Fas の機能不全はマウスにおいて全身性の自己免疫疾患を発症することが知られている。また Fas は、慢性関節リュウマチ発症時に炎症にともなって増殖する滑膜細胞の除去にも関わっているが、正常の滑膜細胞にはアポトーシスを誘導できない。これらの事実は、Fas システムの機能が慢性関節リュウマチの発症を阻止しており、その働きの抑制が慢性関節リュウマチの発症と増悪に関与することを示している。従って、Fas を介するアポトーシス誘導の細胞内シグナル伝達系や、Fas を介するアポトーシス誘導の感受性決定の分子機構を明らかにすることは、慢性関節リュウマチの発症機構を分子レベルで解明し、新たな治療法の開発につながると考えられる。今年度において、我々は Fas のシグナル伝達機構に深く関わる新規分子 FLASH の cDNA クローニングに成功した。FLASH は Fas の下流でカスパーゼ 8 の活性化に必須の分子であった。Fas を介するアポトーシス誘導のシグナル伝達機構を理解するうえで重要な発見であり、FLASH を介するアポトーシス誘導の調節機構の解明とそれに関連する疾病の治療につながると期待できる。また、慢性関節リュウマチの治療に向けて、新たな抗 Fas モノクローナル抗体を調製していたが、免疫担当細胞や活性化した滑膜細胞にはアポトーシスを誘導できるが肝臓には障害を与えない新たな抗体を調製できた。今後の慢性関節リュウマチの治療にもつながると期待される。

A. 研究目的

Fas は自己反応性免疫担当細胞が末梢で除去される時に機能する分子である。また、Fas は慢性関節リュウマチにおいて炎症にともなって増殖する滑膜細胞の除去にも関わっている。そして、Fas の機能不全は全身性の自己免疫疾患を発症することが知られている。これらの事実は、Fas システムが慢性関節リュウマチの発症を阻止しており、その働きの抑制が慢性関節リュウマチの発症と増悪に関与することを示している。従って、Fas を介するアポトーシス誘導の細胞内シグナル伝達経路や、Fas を介する

アポトーシス誘導の感受性決定機構を明らかにすることが、慢性関節リュウマチの発症機構を分子レベルで解明し、新たな治療法の開発にもつながると考えられる。一方、Fas を介するアポトーシス誘導の分子機構では、以下の点が明らかになっている。即ち、Fas が Fas リガンドやアゴニスティックな抗 Fas モノクローナル抗体で刺激されると、Fas の細胞内領域に FADD というアダプター分子が会合し、この複合体にさらにカスパーゼ 8 が会合する。そして、カスパーゼ 8 が活性化することにより、種々のカスパーゼが活性化して、アポトーシスが実行され

る。我々は、Fas を介する刺激の感受性が決定される分子機構を解析する中で、カスパーゼ 8 の活性化に関わる未知の分子が存在すると考え、カスパーゼ 8 に結合する新たな分子 (FLASH と命名) の cDNA クローニングを行った。

一方、マウスを用いた抗 Fas モノクローナル抗体投与実験から、抗体の種類によっては劇症肝炎を発症させるものや、肝臓の障害は少ないが自己免疫疾患を治療できるものの存在することを我々は示してきた。ヒトへの応用、ヒトへの毒性を検討することを考えた場合、ヒト Fas にもマウス Fas にも反応する抗 Fas モノクローナル抗体が必要と考え、調製を行った。その結果、免疫担当細胞や活性化した滑膜細胞にアポトーシスを誘導できるが、肝臓には毒性を示さない抗ヒト Fas モノクローナル抗体を調製することができた。

B. 研究方法

カスパーゼ 8 と結合する新規分子 FLASH の断片を酵母を用いた two-hybrid 法によってクローニングした。5'RACE 法とコロニーハイブリダイゼーション法によって全長の cDNA をクローニングした。得られた FLASH の cDNA およびそのミュータント cDNA を様々な細胞に導入・発現させて解析を行った。また、FLASH のペプチド抗体を調製することにより、FLASH とカスパーゼ 8 や FADD との会合を解析した。

ヒトの Fas とマウスの Fas を同時に認識するモノクローナル抗体を調製するために、Fas の KO マウスにレコンビナントのヒト Fas を免役する方法を採用した。この方法によってヒト Fas とマウス Fas を同時に認識するモノクローナル抗体を調製し、様々な細胞へのアポトーシス誘導能やマウスへ投

与した時の肝障害活性を解析した。

C. 研究結果

FLASH はカスパーゼ 8 と会合しており、Fas の刺激によってカスパーゼ 8 と共に Fas や FADD と会合することが明らかとなった。すなわち、Fas が刺激されると、Fas に FADD が会合し、その後にカスパーゼ 8 と FLASH の複合体が会合し、いわゆる DISC (death-inducing signaling complex) を形成することが分かった。そして、DISC のなかでカスパーゼ 8 の活性化が誘導される。また、FLASH を過剰発現させると Fas を介するカスパーゼ 8 の活性化が増強されること、FLASH のミュータント分子を過剰発現させるとカスパーゼ 8 の活性化が抑制されること (ドミナントネガティブ効果) が明らかとなった。さらに、FLASH は Bcl-2 やアデノウイルス E1 B19kDa タンパク質などの抗アポトーシス活性を有するタンパク質とも会合した。それだけでなく、これらの抗アポトーシス分子によって Fas を介するアポトーシス誘導を抑制しても、FLASH を過剰発現させるとこれらの抗アポトーシス活性を中和できることが明らかとなった。

Fas の KO マウスにヒト Fas を免役してヒトの Fas とマウスの Fas を同時に認識するモノクローナル抗体を調製できた。この抗体は、マウスの Tリンホーマ由来細胞株や胸腺細胞、ヒト Tリンホーマ由来細胞株、ヒト慢性関節リウマチ由来滑膜細胞に *in vitro* でアポトーシスを誘導できた。また、マウスに投与すると、胸腺等の免疫担当細胞に障害を与えたが肝臓の細胞には全く影響を与えなかった。

D. 考察

FLASH がカスパーゼ 8 と会合することが明らか

となった。FLASH は線虫のカパーゼ (CED-3) を活性化する CED-4 や、カパーゼ9の活性化に必須の哺乳類 CED-4 ホモログ Apaf-1 と類似したドメインを有していた。この事実は、カパーゼ8も CED-4 類似の分子によって活性化されることを示唆している。また、FLASH のミュータント (カパーゼ8結合ドメインだけ、あるいは CED-4 様ドメインだけ) を強発現させると、Fas を介するアポトーシスとカパーゼ8の活性化が抑制された。FLASH が Fas を介するアポトーシス誘導に必須であるカパーゼ8の活性化に深く関わることを示された。Fas を刺激すると、Fas の細胞内領域と FADD が会合し、これにカパーゼ8と FLASH の複合体がさらに会合する。そして、この複合体 (DISC) の中でカパーゼ8が活性化することが明らかとなった (図を参照)。Fas を介するアポ

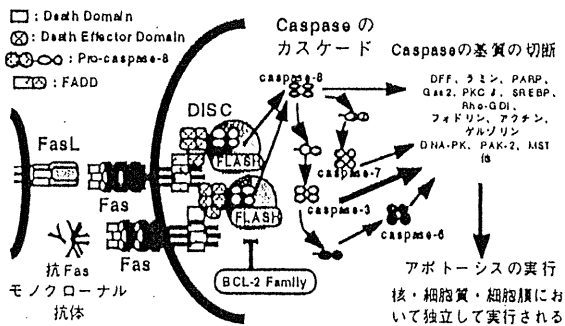


図 Fas を介するアポトーシス誘導シグナル

ーシス誘導に対する感受性が FLASH によって制御されるので、慢性関節リュウマチの発症との関係が興味深い。我々が以前明らかにしたように HTLV-1 の p40TAX が Fas を介するアポトーシス誘導を抑制するが、この分子機構は現在全く不明である。この TAX の作用機構に FLASH が関与しないか等の問題を解決する必要があると考えている。

新しく調製した抗ヒト Fas モノクローナル抗体

(マウス Fas にも反応する) が、肝毒性を示さずに免疫細胞と活性化滑膜細胞にアポトーシスを誘導できることが示された。今後は、ヒト関節リュウマチのモデル系などでの治療効果等の解析を試みていく必要が存在する。

E. 結論

① Fas を介するアポトーシス誘導とカパーゼ8の活性化に必須の新規シグナル伝達分子 FLASH を発見し、クローニングにも成功した。Fas を介するアポトーシス誘導の感受性決定機構と慢性関節リュウマチの発症や増悪との関連を今後分子レベルで明らかにする基礎となる発見である。

② ヒトの Fas とマウスの Fas を同時に認識する抗 Fas モノクローナル抗体を調製し、これが肝毒性を示さずに免疫担当細胞や活性化滑膜細胞にアポトーシスを誘導することが明らかとなった。ヒトの慢性関節リュウマチ等の自己免疫疾患に対する治療へ結びつく系を確立した。

F. 発表論文

1. Shin Yonehara. Fas-mediated apoptosis: Preparation of original monoclonal antibodies and biological functions. In Apoptosis: Its roles and mechanism. T. Yamada, and Y. Hashimoto, ed. pp1-15, Buisness Center for Academic Societies Japan, Tokyo, 1998.
2. Kazuhiro Sakamaki, Shin-ichi Tsukumo, and Shin Yonehara. Molecular cloning and characterization of mouse caspase-8. Eur. J. Biochem., 253: 399-405, 1998.
3. Kyung-Kwon Lee, Masao Murakawa, Eisuke Nishida, Satoshi Tsubuki, Sei-ichi Kawashima, Kazuhiro Sakamaki, and Shin Yonehara. Proteolytic activation of MST/Krs, STE20-related protein kinase, by caspase during apoptosis. Oncogene, 16: 3029-3037, 1998.