

厚生省

平成10年度厚生科学研究

感覚器障害および免疫・アレルギー等研究事業

「免疫の関与する難病の病因解明のための
基盤技術の開発に関する研究」

研究報告書

平成11年3月

主任研究者 山本 一彦

免疫の関与する難病の病因解明のための基盤技術の開発に関する研究

主任研究者 山本 一彦

所属機関 東京大学大学院医学系研究科内科学専攻・教授

研究要旨

本研究班の柱とするテーマは、「免疫疾患の病因となる特異抗原を検索する新たな技術、さらにその特異抗原に対する免疫応答を検出、解析し、制御する基盤技術を開発、推進する。」である。上述のテーマから、主として研究の対象とする分子群は、抗原提示細胞上の主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 分子、それに結合する抗原ペプチド、それらを認識する T 細胞レセプター (TCR)、さらにこれらの細胞間抗原認識に重要な役割をはたす細胞表面機能分子などである。本班は方法論が主眼なので、対象疾患は限定していない。

分担研究者

佐伯 行彦 大阪大学医学部第三内科 助手
西村 泰治 熊本大学大学院医学研究科 教授
中尾 真二 金沢大学医学部第三内科 講師
山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所
疾病研究第六部 室長
住田 孝之 筑波大学臨床医学系内科 教授
斉藤 隆 千葉大学大学院医学研究科遺伝子制御学 教授
東 みゆき 国立小児病院小児医療センター免疫研究室 研究員
高 昌星 信州大学医学部付属病院第三内科 助教授

えインバリアント鎖遺伝子を利用した HLA クラス II・ペプチド発現細胞ライブラリーの開発がある。免疫疾患の病態を解明し、より理想的な抗原特異的免疫療法を開発する上で、免疫応答の司令塔とも言うべき CD4 陽性 T 細胞の認識抗原を同定することは極めて重要である。しかし、CD4 陽性 T 細胞は抗体のように可溶性分子を認識せず、HLA クラス II 分子の上に結合した抗原ペプチドを認識することから分かるようにかなり複雑なメカニズムなので、その認識抗原を探すことは容易でない。今まで合成のペプチドを数多く作成しクラス II 分子に結合させるなどの方法で一定の成果をあげてきたが、限界も多かった。そこで、西村らはより高率良くクラス II 分子に抗原ペプチドを結合させ、T 細胞を刺激したのち、その抗原の情報を回収できる方法の開発を目指した。すなわち、細胞内でクラス II 分子に抗原ペプチドを結合させる時に決定的な役割をはたすインバリアント鎖に注目し、その中のクラス II 結合領域 (CLIP) に自由に目的抗原ペプチドを挿入できるベクターの開発し、それをヒトクラス II 分子を発現している細胞に導入した。結果は、2種類の抗原を用いて、このベクターが極めて高い効率で (微量培養の系で100個の細胞の存在でT細胞の刺激が確認された) 抗原提示させることを示した。以上より、高率良くクラス II 分子に抗原ペプチドを結合させ、T 細胞を刺激したのち、その抗原の情報を回収できるベクターを開発した。今後この部位にランダムな塩基配列を導入してペプチド発現ライブラリーが作成できることが明らかになった。

A. 研究目的

本研究班の柱とするテーマは、「免疫疾患の病因となる特異抗原を検索する新たな技術、さらにその特異抗原に対する免疫応答を検出、解析し、制御する基盤技術を開発、推進する。」である。上述のテーマから、主として研究の対象とする分子群は、抗原提示細胞上の主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 分子、それに結合する抗原ペプチド、それらを認識する T 細胞レセプター (TCR)、さらにこれらの細胞間抗原認識に重要な役割をはたす細胞表面機能分子などである。本班は方法論が主眼なので、対象疾患は限定していない。

B. 研究成果

特に重要な研究成果としては、まず西村らの組換

次に佐伯らの慢性関節リウマチ (RA) における病

態形成性 T 細胞の解析が挙げられる。

免疫疾患に関する多くの動物モデルでは、病変形成に関して抗原特異的 T 細胞の重要性が明らかにされており、それを制御することで抗原特異的免疫療法が可能であることが示されている。病変形成性 T 細胞はこれを別の動物に移入し病変を再構築できることで最終的に証明されている。しかし、ヒトの疾患においてこれを行うことは困難であり、したがって将来とも病因となる T 細胞を明確に同定することは極めて難しいと考えられている。この点で免疫不全であることからヒトの細胞を受け入れ可能な SCID マウスへの細胞移入は、一つの重要な方法になると期待されている。佐伯らはこの方法を用いて、RA の滑膜病変由来の T 細胞を解析し、病因となる T 細胞の同定と病因抗原の特定に向けた研究を進めた。方法は、RA 患者の末梢血と滑膜病変から mRNA を抽出し、ファミリー特異的プライマーを用いた方法で TCR のレパートリーの解析を行った。一方、RA 滑膜組織から酵素処理により単核球を得て、スーパー抗原刺激と限界希釈法により T 細胞クローンを得た。次に、この T 細胞クローンを SCID マウスに移入し関節滑膜病変を誘導できるか否かを検証した。結果は、滑膜病変に多く発現している T 細胞に V β 14 と V β 8 があることが判明し、それぞれを多く発現する患者の滑膜由来 T 細胞には、それぞれの V β ごとに共通なドミナントな CDR3 領域の配列があることが判明した。この共通配列を持つ T 細胞クローン G3 は、同じ患者由来の末梢血単核球とともに SCID マウスの関節腔内に移入することで、滑膜増殖を誘導できた。患者間で共通の T 細胞レセプター配列を持つ T 細胞クローンが、実際に病因 T 細胞である可能性が示された。ヒトの免疫疾患で、実際に病変を形成する T 細胞（病因 T 細胞）を同定することは非常に重要であるが、動物モデルの様に細胞移入実験が容易に行えないことなどから、困難であると考えられている。SCID マウスはこれを突破する一つの方法と考えられている。佐伯らの研究は、実際の RA 患者の病変にドミナントに存在し、かつ患者間で T 細胞レセプターの一部が共通のものを見だし、この共通配列を持つ T 細胞クローンを患者病変から樹立し、それを SCID マウスに移入することで病因 T 細胞であることを示したものである。

その他の研究では中尾らは、シクロスポリン依存性再生不良性貧血患者の骨髄中の T 細胞に注目し、異なる患者で V β 15 陽性で類似の CDR3 モチーフを持つ T 細胞がクローナルに増殖していることを既に

明らかにしている。そこで、今年度は限界希釈法と TCR に関する RT-PCR/SSCP 法を組み合わせ、注目する T 細胞クローンを同定し、さらに Herpesvirus saimiri で不死化し単離する技術を開発した。この方法が確立されれば、実際に患者で病態形成に関与する T 細胞の解析が容易になると考える。

山村らは、多発性硬化症患者およびマウスモデルにおける自己抗原特異的 T 細胞を解析している。今年度は、naive なマウス脾細胞から分離した CD4+CD25+ T 細胞の解析を行い、これらの中にドミナントなクローンが多くあり、その中の一つが脳炎惹起性 T 細胞の TCR α 鎖 CDR3 領域を認識することを RT-PCR/SSCP 法で示した。調節性 T 細胞の一つである可能性が高い。住田らは、SSCP 法とペプチドライブラリーを用いる法、West-Western 法を用いる法、TCR トランスフェクタントを用いる方法などにより、T 細胞の対応自己抗原を解析する手法の確立を目指し、実際にシェーグレン症候群患者の口唇唾液腺に集積している T 細胞クローンの標的抗原を決定することが可能であることを示した。さらに、自己抗原 α -アミラーゼに対する反応の解析を開始した。

一方、自己免疫疾患では現在のところ epitope spreading の概念が確立しつつあり、この考えに従えば、病気の始まりは限られた T 細胞クローンに限られた自己抗原エピトープを認識しているが、時間の経過とともに数限りないエピトープを認識する数限りない T 細胞クローンが活性化され病態が形成されることになる。そうであれば、これらの T 細胞を標的にした治療法は現実的でない。これを検証するために山本らは、既に確立している SSCP 法を用いた T 細胞クロータイプ解析法を用いて、自然発症自己免疫疾患モデルマウスでの臓器病変における抗原特異的 T 細胞クローンの動態を調べた。結果は、時間経過とともに、病変集積 T 細胞クローンは、数の減少と異なる病変でのクローンの同一性の増加が観察され、必ずしも epitope spreading ではなく、clonal な restriction の現象があることが判明した。

抗原認識以外の分子に関する研究では、東らは、共刺激分子の研究を続けている。本年は血管内皮細胞の様なノンプロフェッショナルな抗原提示細胞について解析した。抗原特異的 T 細胞刺激には、CD80/86-CD28 経路を介した共刺激の関与は少なく、CD2-CD58 や CD134-CD134L などが重要で、CD80/86 はむしろ CTLA4 と優位に結合し、IL-2 依存性のア

ポトーシスを回避させる方向に働いていることを示した。臓器病変の形成に重要な因子となる可能性がある。さらに高らはタイラー脳脊髓ウイルスによる免疫性脱髄疾患モデルにおいて、Fas/FasL 誘導のアポトーシスは抑制的に働いていることを示し、このメカニズムと病態形成との関係の重要性を示した。この点で、斉藤らは TCR を介した刺激においての活性化に伴うアポトーシスで、その極めて初期に Fas 非依存性の細胞死があることを見いだした。自己反応性 T 細胞の維持、増殖に重要なメカニズムである可能性があり、免疫の人為的干渉法を確立する上でも今後の進展が注目される。

C. 考察

本免疫班の研究は、基盤技術の確立を主としており、本年度の成果だけで十分満足できるものは多くはないが、病態を形成する T 細胞の解析技術、その特異抗原の決定法、クローン確立の新たな技術などは、欧米のそれと異なる我が国独自の方法を確立しつつあると考える。また共刺激分子と疾患との関連の解析でもユニークな成果が出ている。

わが国の免疫学の分野は、基礎的研究では国際的にリーダーの役割を果たしているが、疾患に関する研究は十分進んでいない。また抗原特異的免疫応答の解析については、国内外でまとまった研究体制が組まれる機会は多くない。しかし、各疾患の病因、病態の解析、将来的な抗原特異的免疫療法などの重要性を考慮すると、疾患における抗原特異的免疫異常を追及する手法を確立し、その異常を制御する方法の研究を推進することは大きな意義がある。今後もこの方向の研究の必要性は十分にある。

課題名 CLIP置換型インバリエント鎖遺伝子を利用したHLAクラスII・ペプチド複合体発現細胞ライブラリーの開発

氏名 西村泰治

所属機関 熊本大学大学院医学研究科免疫識別学講座

研究要旨

自己免疫疾患において自己反応性CD4⁺T細胞が認識するHLAクラスII・ペプチド複合体を解析することは、疾患の病因を解明する上で重要なテーマである。このような研究への応用をめざして、本研究は多様なHLAクラスII・ペプチド複合体を発現する細胞のライブラリーを構築することを究極の目的とする。このために、まず抗原ペプチドを効率よくHLAクラスII分子上に提示するために、CLIPペプチドを抗原ペプチドに置換した変異インバリエント (Ii) 鎖遺伝子を発現するベクターを開発し、HLA-DR分子を発現しているL細胞あるいはCHO細胞に導入した。抗原特異的T細胞クローンの応答は、増殖反応あるいはIFN- γ の産生として検出できた。さらに後者において1/300の割合でトランスフェクタントが存在すればT細胞クローンの応答を検出することができ、この方法でCHO細胞トランスフェクタントのライブラリーをスクリーニングすることが可能であることが確認できた。

A. 研究目的

本研究は遺伝子導入法を用いて、抗原ペプチドをHLAクラスII分子と結合した形で効率よく細胞表面に提示させるためのベクターを開発することを目的とする。さらに、このベクターを用いて多様なHLAクラスII・ペプチド複合体を発現する抗原提示細胞のライブラリーを作製することにより、CD4⁺T細胞クローンが認識できる抗原ペプチドおよびその多様性を同定するシステムを構築することを試みる。

B. 研究方法

- 1. CLIP置換型変異ヒトインバリエント (Ii) 鎖を発現するマウスL細胞およびチンネーヌ・ハムスター-CHO細胞の樹立** : ヒトIi鎖 (p33) cDNAを動物細胞発現ベクター (SR α プロモーター) に組み込み、そのCLIP部分 (731 酸残基81-104) の塩基配列を変異させて制限酵素 (*PinA I* および *Sac I*) の認識配列を導入し、pCIベクターを作製した。pCIを上記の制限酵素によって切断後、抗原ペプチドをコードする二本鎖複製DNAを挿入し、リポフェクション法を用いてそれぞれHLA-DR4あるいはDR53分子を発現するL細胞あるいはCHO細胞に導入した。一部の細胞は、薬剤選抜後、限界希釈法にてクローニングをおこない安定発現型トランスフェクタントを樹立した。抗原ペプチドとしては、 β 溶連菌M12蛋白由来のペプチド p55-68 (RDLEQAYNELSGEA) およびインスリン依存性糖尿病 (IDDM) における重要な自己抗原の一つである、ヒトグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD65) 由来のペプチド p116-129 (NILLQYVVKSFDRS) を用いた。以下、前者で組み換えたものをM12 / CLIP置換型Ii鎖、後者をGAD65 / CLIP置換型Ii鎖と呼ぶことにする。
- 2. HLA-DRおよびIi鎖の発現の確認** : 樹立したL細胞トランスフェクタントは、細胞表面をそれぞれFITC標識した抗HLA-DR抗体 (L243)、抗CLIP抗体 (CerCLIP.1) で細胞内を抗Ii鎖抗体 (M-B741) で染色した後にフローサイトメトリーを行ない、その発現を評価した。細胞内を染色する際には1%パラホルムアルデヒドで細胞を固定した後に、0.1% ナイシンで膜の透過性を亢進させる前処置を施した。
- 3. HLA-DR分子とIi鎖分子の細胞内における会合** : HLA-DR分子と会合するIi鎖分子の存在を免疫沈降

により確認した。免疫沈降は、トランスフェクタントを代謝的に放射性³⁵Sメチオニン/システインで標識して得た細胞溶解液を抗HLA-DR抗体 (HU4) と反応させた後、プロテインAガラースを用いて行った。得られた蛋白を煮沸後に11% SDS-PAGEで電気泳動して解析した。

4. L細胞トランスフェクタントに対するT細胞増殖反応 : 樹立したCLIP置換型Ii鎖発現L細胞を抗原提示細胞 (APC) として、HLA-DR4分子により提示されたM12p54-68ペプチドを認識するT細胞クローンYN 5-32の増殖応答を調べた。マイトマイシン処理したL細胞トランスフェクタントとT細胞クローンを2日間共培養し、3Hチミジンをパルスして16時間後にハーベストし、DNAの複製を定量することにより増殖反応を定量した。

5. CHO細胞トランスフェクタントを認識したT細胞によるIFN- γ の産生 : CHO細胞トランスフェクタントと、HLA-DR53分子により提示されたGAD65p116-129ペプチドに特異的なT細胞クローンSA32.5とを共培養し、48時間後に培養上清中に分泌されたIFN- γ をELISA法により定量した。

C. 研究結果

- 1. M12 / CLIP置換型Ii鎖発現細胞の抗原提示能** : HLA-DRおよび野生型Ii鎖遺伝子を発現するL細胞は、T細胞クローンYN5-32に対してペプチド存在下でのみ濃度依存性に増殖応答を誘導した。いっぽう、M12 / CLIP置換型Ii鎖遺伝子を発現する安定発現型トランスフェクタントはペプチドの非存在下においてもYN5-32に増殖応答を誘導した。さらにT細胞応答の強さは、トランスフェクタントにおけるIi鎖の発現量に比例して大きくなった。遺伝子のトランスフェクションの効率は、L細胞よりもCHO細胞の方が優れているのでM12 / CLIP置換型Ii鎖を発現するCHO細胞も作製した。しかしCHO細胞自身の増殖能を諸処理で阻止することは困難であったため、T細胞の増殖反応でTCRリガンドを検出することはあきらめた。そこで、CHO細胞トランスフェクタントを認識したT細胞が産生するIFN- γ を定量したところ、抗原特異的なT細胞応答が検出できた。
- 2. M12 / CLIP置換型Ii鎖発現細胞の検出限界** : 将来的にHLAクラスII・ペプチド複合体発現細胞ライブラリーをT細胞を用いてスクリーニングする為には、培養系の中のTCRリガ

ドを発現するごく少数のトランスフェクタントをT細胞が検出できるようなシステムを構築しなければならない。そこで、96穴プレート中にCHO細胞を総数が 3×10^4 個となるようにして、ただのCHO細胞とM12/CLIP置換型Ii鎖を発現するCHO細胞とを、種々の比率で混合した培養系を作製した。そこへYN5-32 T細胞クローンを 4×10^4 個添加して、48時間培養後に培養上清中のIFN- γ を定量したところ、トランスフェクタントの数が増すにつれIFN- γ の産生量も増加した。さらに、1ウェル中に100個のトランスフェクタントが存在すれば、T細胞の反応を検出できることがわかった。

3. GAD65 / CLIP置換型Ii鎖発現細胞の抗原提示能

：つぎに第二の抗原ペプチドとしてGAD65ペプチドを試してみた。この場合には、安定発現型トランスフェクタントを用いずにトランスフェクション後2日目で、20%の細胞しか変異Ii鎖を発現していない一過性発現型トランスフェクタントを利用した。その結果、T細胞クローンSA32.5はCHO細胞トランスフェクタントに反応してIFN- γ を産生した。

D. 考察

Ii鎖はCLIP部分でHLA-DR分子のペプチド収容溝に結合し、小胞体(ER)内でクラスII分子に結合すべきペプチドがDR分子に結合するのを阻止するとともに、そのN末端側の糖鎖部分を介して、DR分子をエンドソーム系へと導く役割を果たしている。通常、DM分子の存在下にCLIPはDR分子から遊離して、エンドソーム内に存在する他の自己あるいは非自己ペプチドでCLIPよりDRに親和性の高いものがDR分子に結合し細胞表面に発現する。DMを発現しない細胞では、この過程がないために、細胞表面の大部分のDR分子はCLIPを結合している。我々が用いたL細胞は、クラスII、Ii鎖、DM遺伝子のすべてを発現しない細胞であるため、CLIPを他の抗原ペプチドに置換した遺伝子が発現する細胞では、抗原ペプチドが非常に効率よくDR分子と結合してT細胞に提示され、これを活性化したものと考えられる。

我々は、このようなCLIP置換型Ii鎖が抗原提示を効率よく行うことを、すでに昨年度の研究で明らかにしていた。今年度の研究成果により、96穴プレートでの培養系に $100 / 3 \times 10^4 = 1 / 300$ の割合でTCRリガンドを発現するCHO細胞トランスフェクタントが存在すれば、T細胞の応答をIFN- γ の産生として検出できることが明らかとなった。我々は、現在CLIP置換型Ii鎖遺伝子のCLIP部分を、まったくランダムな13アミノ酸からなるペプチドをコードするオリゴDNAと組み換える作業を終了しており、これをうまくCHO細胞に発現させることができれば、多様なHLAクラスII・ペプチド複合体を発現し、抗原提示能を有する細胞のライブラリーを構築できることになる。そして、そのスクリーニングの際に96穴プレートで1/300の割合で一種類のHLAクラスII・ペプチド複合体を発現する細胞を培養する条件は、作製できると考えている。したがって、上記のライブラリーを用いてT細胞クローンのTCRリガンドを同定することは可能であると考えている。

ただし、この方法では多くのCHO細胞トランスフェクタントをスクリーニングするためには、大量のT細胞を必要とする点に問題が残る。この解決策としてT細胞クローンより

TCR遺伝子をクローニングして、これをマウスの不死化細胞株で、ヒトTCRを機能的に発現できるTG40細胞などにトランスフェクトして、その抗原特異的応答をIL-2などのサイトカイン産生として検出する方法も考えている。さらに、TCR遺伝子より可溶性リコンビナントTCRの多量体を作製して、これを蛍光標識した後にCHO細胞トランスフェクタントのライブラリーと反応させ、TCRが結合する細胞をフローサイトメトリーで同定する方法も考慮している。このような方法でTCRリガンドを発現するトランスフェクタントが同定できたら、細胞DNAよりPCR法によりIi鎖遺伝子のCLIP相当部分を増幅して、その塩基配列を決定しアミノ酸に翻訳すれば、TCRが認識できるペプチドの構造を決定できる。

我々が開発したシステムは、特定のペプチドを遺伝子導入により効率よくHLA-DR分子に提示させることを可能としたものである。今後、CLIP部分に種々のペプチドを組み換えてその細胞表面への提示や、Ii鎖-DR複合体の細胞内での移動を解析することにより、Ii鎖の機能発現におけるCLIPの役割も同時に明確になると期待される。多様なHLAクラスII・ペプチド複合体を発現する抗原提示細胞のライブラリーが実現できれば、抗原特異性が未知のT細胞クローンが認識するTCRリガンドおよびその多様性の程度をスクリーニングすることが可能となり、T細胞の免疫応答が一因となって発症する自己免疫疾患をはじめとする免疫疾患の病因、病態の解明に貢献するものと期待される。さらに特定の抗原ペプチドに対する強いT細胞応答を不活化させるDNAワクチンへの応用の可能性も期待できる。

E. 結論

Ii鎖遺伝子のCLIPをコードする部分を抗原ペプチドをコードする合成オリゴDNAで組み換えた遺伝子を、HLA-DR遺伝子と共にL細胞あるいはCHO細胞に発現させることにより、抗原ペプチドを効率よくHLA-DR分子により提示させるシステムを開発した。さらに、CLIP部分をランダム配列のペプチドライブラリーに組み換えて、TCRリガンドを同定するシステムを確立するために不可欠な、T細胞応答の検出方法を確立した。

自然発症自己免疫疾患の臓器病変における抗原特異的 T 細胞クローンの動態

主任研究者 山本 一彦

所属機関 東京大学大学院医学系研究科内科学専攻・教授

研究要旨

自己免疫疾患における抗原特異的 T 細胞の挙動について、現在広く受け入れられている epitope spreading が、必ずしも自然発症の自己免疫モデルでは当てはまらないこと、むしろ病態が完成される時期には病変に集積する T 細胞クローンはその数が限定される現象があることを、複数のモデルマウスで示した。

A. 研究目的

ヒト及びモデル動物における解析から、自己免疫疾患の傷害臓器に特定の T 細胞クローンが集積し病態形成に重要な役割を果たしていることが示唆されている。一方、幾つかの動物モデル、特に免疫により誘導する自己免疫疾患モデルにおいて、T 細胞の認識する自己抗原上のエピトープは時間経過とともに拡大するという、epitope spreading の現象が記載されている。もしこれが事実であれば、生体内で活性化される自己反応性 T 細胞は、疾患の進展とともにその数を増し、病変が形成されさらに増悪する過程で、数限りない種類の T 細胞が傷害臓器に集積していくことが予想される。そうであれば、これらの T 細胞を標的にした治療は事実上不可能となる。そこで、よりヒトの自己免疫疾患に近いと考えられる、代表的な自然発症自己免疫モデルにおいて、傷害臓器に集積する T 細胞クローンの動態を調べることでこれらを検証した。

B. 研究方法

自然発症 I 型糖尿病モデルである NOD マウス及び自然発症関節炎モデルである MRL/lpr マウス、SKG マウス（都老人研坂口博士の供与による）を用い、それぞれの傷害臓器の複数箇所より RNA を抽出し、T 細胞レセプター (TCR) β 鎖について RT-PCR にて増幅した後、SSCP 法で解析した。これは、リンパ球集団で発現している T 細胞レセプター遺伝子を PCR にて増幅させ、次に、DNA を一本鎖にした後、非変性ゲルにて電気泳動を行い、DNA の塩基配列の変異による高次構造の違いを移動度の差で検出するものである。集積している T 細胞レセプターのクローンタイプは、ヘテロな集団を示すスメアの上にバン

ドとして検出される。NOD マウスにおいては二分割した脾臓、MRL/lpr と SKG マウスにおいては異なる関節病変間で集積する T 細胞クローンを比較した。

C. 研究結果

10 週令の NOD マウスの脾臓には 40~50 種類の T 細胞クローンが集積していたが、それらのほとんどは脾臓の右と左で別々のクローンであった。この時期の NOD は膵島炎は呈しているが、糖尿病の所見はなく、最終病変の形成には至っていない段階のものである。ところが、すべてのマウスが糖尿病となる 25 週令の NOD マウスの脾臓では、集積している主な T 細胞は 30 種類程度となり、さらに左右の脾臓で同一クローンが高頻度に見られた。

MRL/lpr マウスでは、10 週令、20 週令、25 週令の関節病変について、前足と後足間のクローンリティを比較した。集積 T 細胞クローンの数は週令によって大差なかったが、関節間での同一クローンの頻度は、10 週令に比べ、20 週令、25 週令では明らかに高くなった。

同様に、SKG マウスの関節病変に集積する T 細胞クローンも、3 カ月齢では関節間でかなり異なるクローンであったが、8 カ月齢ではその数の若干の減少とともに、関節間で同一クローンが高頻度に検出された。

D. 考察

自然発症自己免疫モデルマウスにおいて、その傷害臓器に集積する T 細胞クローンは、もし epitope spreading の現象が正しいとすると、時間経過とともに種類が増加し、関節間でも異なったクローンが優性になることから、かなりランダムなものになる

ことが予想される。しかし、実際には時間経過とともに集積クローンの数は減少傾向を示し、さらに病変間で同一クローンが集積していることが明らかとなった。実際のヒトの疾患ではドミナントな同一クローンが異なる病変間検出されることから、このような状態であることが推定される。自己免疫疾患での臓器病変に関与する T 細胞に関しては、むしろ clonal restriction の現象が存在する可能性が示された。すなわち、病態の形成過程で刺激抗原は変化し、病変完成期には、比較的限定された抗原に対する免疫応答が前面に出てくることが予想される。この時期における抗原特異的免疫応答を解析することで、特異的免疫制御が可能となると考える。

E. 結論

自己免疫疾患の進んだ病態でも、臓器に集積する抗原特異的 T 細胞はむしろ限定される傾向にあり、これを標的とする治療法は重要であることが示された。

F. 研究発表

論文発表

1. Iikura M, Yamaguchi M, Fujisawa T, Miyamasu M, Takaishi T, Morita Y, Iwase T, Moro I, Yamamoto K, Hirai, K. Secretory IgA induces degranulation of IL-3-primed basophils, *J. Immunol.* 161:1510-1515, 1998.
2. Miyazawa K, Mori A, Yamamoto K, Okudaira H, Transcriptional roles of C/EBP β , NF- κ B, and CBF/m interleukin-1 β -induced interleukin-6 synthesis by human rheumatoid fibroblast-line synoviocytes. *J. Biol. Chem.* 273(13): 7620-7627, 1998.
3. Miyazawa K, Mori A, Yamamoto K, Okudaira H. Constitutive transcription of the human IL-6 gene by rheumatoid synoviocytes spontaneous activation of N- κ B and CBF1. *Am. J. Pathol.* 152(3):793-803, 1998.
4. Suzuki T, Shoji S, Yamamoto K, Nada S, Okada M, Yamamoto T, Honda Z, Essential role of I γ n in fibronectin-mediated filamentous actin assembly and cell motility in mast cells. *J. Immunol.* 161:3694-3701, 1998.
5. Kawahata K, Misaki Y, Komagata Y, Setoguchi K, Tsunekawa S, Yoshikawa Y, Miyazaki J, Yamamoto K,

Altered expression level of a systemic nuclear auto antigen determines the fate of immune response to self. *J. Immunol.* 1999.(in press)

課題名 免疫病発症・寛容誘導に関わる共刺激分子の解析
—ノンプロフェッショナル抗原提示細胞における CD80/86 分子の役割—

氏名 分担研究者 東 みゆき
研究協力者 大月典子、大木伸司、香坂隆夫
所属機関 児病院医療研究センター 免疫研究室

研究要旨

活性化 B 細胞・マクロファージ・樹状細胞などのプロフェッショナル抗原提示細胞(APC)に発現誘導される CD80/86 分子は、T 細胞の CD28 と結合し T 細胞の活性化に不可欠な costimulatory signal を伝達することが明らかにされたが、ノンプロフェッショナル APC におけるこれら分子の役割については明らかでない。炎症性サイトカインにより HLA-DR 抗原を発現した血管内皮細胞(EC)は、ノンプロフェッショナル APC として、CD4T 細胞増殖反応を惹起させるが、この反応系においては CD2/CD58 や CD134/CD134L 経路が IL-2 依存性の増殖シグナルを与え costimulatory に働くが、EC 上に僅かしか発現誘導されない CD80/86 分子はおそらく CTLA4 と結合し、IL-2 依存性のアポトーシスを回避させることによる反応性 CD4 T 細胞の維持に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

血管内皮細胞などのノンプロフェッショナル APC は、サイトカインによって活性化され、MHC class II 抗原を発現誘導することで、ある条件下では APC として働き得る。ヒト EC 上に発現される細胞表面分子の機能的役割を解析するとともに、その生物学的意義について検討した。

B. 研究方法

1. ヒト臍静脈血管内皮細胞(HUVEC)を IFNg あるいは TNF α で刺激後の、細胞表面機能分子発現の変化をフローサイトメトリーで解析した。
2. IFNg72 時間刺激 HUVEC とヒト末梢血 CD4T 細胞を至適濃度以下の SEB 存在下で培養し、EC 依存性の T 細胞増殖反応系を確立した。この増殖反応系における、EC あるいは T 細胞表面分子に対する抗体を添加し抑制 効果を検討した。
3. 抗体添加による増殖抑制 が IL-2 添加により回復されるかどうか検討した。
4. 抗サイトカイン中和抗体添加の影響および表面分子抗体添加によるサイトカイン発現に与える影響を ELISA および RT-PCR 法により検討した。
5. CD80/86 あるいは CD134L 抗体添加による、アポトーシス誘導および Bcl-xL の発現変化を検討した。

C. 研究結果

1. 未刺激 HUVEC において、CD54, CD40, CD134L の恒常的発現が認められ、前 2 者は、IFNg あるいは TNF α もしくは両者の刺激で発現増強が見られたが、CD134L は逆に減少した。CD80 および CD86 分子は、サイトカイン刺激後でも、僅かしか発現誘導されなかった(図 1)。

2. 抗 HLA-DR 抗体添加で完全に阻害され、抗 CD80+86, 抗 CD58+2, 抗 CD54, あるいは抗 CD134L 抗体により効果的に抑制された(図 2)。

3. 上記の抗体による増殖抑制のなかで、抗 CD80+86 抗体による抑制のみ IL-2 添加により回復しなかった(図 3)。

4. 抗 CD80+86 抗体添加は、増殖抑制されるにも拘らず、培養上清中の IL-2 産生は増強されていた(図 4)。この増殖反応系では、IL-10 および IL-4 が抑制的に働いていることが中和抗体実験から示された。

5. 抗 CD80+86 抗体添加は、抗 CD134L 抗体添加や無添加コントロールと比べ 24-72 時間後に見られるアポトーシスを増加させ、早期の Bcl-xL の発現を低下させる傾向にあった。

D. 考察

EC と CD4T 細胞の反応には、CD11a/18-CD54, CD2-CD58, CD134-CD134L, CD28/CTLA4-CD80/86 経路が関与し、前 3 者は IL-2 産生増強による増殖促進という costimulatory な役割を果たしていること

が確認されたが、逆に CD80/86 経路は、IL-2 産生抑制およびアポトーシス抑制に働いていることが示された。このことは、EC 上の CD80/86 が CD28 とではなく CTLA4 と優位に結合している可能性を強く示唆している。EC のみならず腸管上皮細胞などにおいても、サイトカイン刺激による HLA-DR 発現にも拘らず、CD80/86 発現誘導はほとんど認められない。このようなノンプロフェッショナル APC における CD80/86 が CTLA4 と結合することが、活性化された T 細胞を細胞死による終息に至らしめず、T 細胞維持による炎症の継続という方向に働くことによって、自己免疫疾患や難治性炎症性疾患の病態発症に関与している可能性が考えられた。

文献

1. 東 みゆき, 大月典子, 香坂隆夫. スーパー抗原によって惹起される T 細胞-血管内皮細胞相互反応に関する機能分子の解析 厚生省特定疾患免疫疾患調査研究班 難治性血管炎分科会平成 9 年度研究報告書: 26-29, 1997
2. Mogi, S, Ebata T, Setoguchi Y, et al. Efficient generation of autologous peripheral blood-derived cytotoxic T lymphocytes against poorly immunogenic human tumors using recombinant CD80-adenovirus together with interleukin-12 and interleukin-2. *Clin. Cancer. Res.* 4: 713-720, 1998
3. Saito K, Sakurai J, Ohata J, et al. Involvement of CD40L-CD40 and CTLA4-B7 pathways in murine acute graft-versus-host disease induced by allogeneic T cells lacking CD28. *J. Immunol.* 160: 4225-4231, 1998
4. Nakazaki Y., Tani K., Lin Z, et al. Vaccine effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or CD80 gene-transduced murine hematopoietic tumor cells and their cooperative enhancement of antitumor immunity. *Gene Therapy* 5: 1355-1362, 1998
5. Seko Y, Takahashi N, Ishiyama S, et al. Expression of costimulatory molecules B7-1, B7-2, and CD40 in the heart of patients with acute myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Circulation* 97: 637-639, 1998
6. Seko Y, Takahashi N, Azuma M, et al. Effects of in vivo administration of anti-B7-1/B7-2 monoclonal antibodies on murine acute myocarditis caused by coxsackievirus B3. *Circ. Res.* 82: 613-618, 1998
7. Matsumura R, Umemiya K, Kagami M et al. Glandular and extraglandular expression of the Fas-Fas ligand and apoptosis in patients with Sjogren's syndrome. *Clin. Exp. Rheumatol.* 559-566, 1998
8. Seko Y, Takahashi N, Azuma M, et al. Expression of costimulatory molecule CD40 in murine heart with acute myocarditis and reduction of inflammation by treatment with anti-CD40L/B7-1 monoclonal antibodies. *Circ. Res.* 83: 463-469, 1998
9. Nakajima A, Kodama T, Morimoto S, et al. Antitumor effect of CD40 ligand: Elicitation of local and systemic antitumor responses by IL-12 and B7. *J. Immunol.* 161: 1901-1907, 1998
10. Matsui T, Kurokawa M, Kobata T, et al. Autoantibodies to T cell co-stimulatory molecules in systemic autoimmune diseases. *J. Immunol.* in press

タイラー脳脊髄炎ウイルス (TMEV) によるマウス免疫性脱髄疾患 (TMEV-IDD) における Fas 誘導アポトーシスの役割

分担研究者：高 昌星 1)

研究協力者：井上 敦 1)、山崎正志 1)、八木田秀雄 2)、J.P.Palma 3) Byung S. Kim 3)

所属施設：信州大学・医学部第三内科 1)、順天堂大学・医学部免疫学 2)、
Northwestern University・医学部微生物学-免疫学 3)

感受性の SJL/J mice にタイラーウイルス(TMEV)を接種し免疫性脱髄疾患 (TMEV-IDD)を作成し、誘導期 または効果期に抗 Fas-L monoclonal 抗体 500 μ g を腹腔内に投与した。対照群には hamster IgG を同様に投与した。臨床症状は抗体投与群で誘導期、効果期いずれの群も早期に発症し、より重症化した。免疫組織染色では経過と共に Fas 陽性細胞の増加を認めたが、抗体投与群はいずれも有意に低下していた。DTH および TNF- α 産生細胞は抗体投与群で有意に増加し、一方 IL-4 産生細胞は抗体投与群で有意に低下した。TMEV 接種 Fas-L 欠損 C3H gld mice では抗体投与群と同様早期に発症し、より重症化した。以上より Fas/Fas-L 誘導 apoptosis は TMEV-IDD に対し抑制的に働いており、anti-Fas-L mAb 投与および Fas-L 欠損 C3H gld mice は、関与するリンパ球の apoptosis を抑制することで症状を増悪させることが示唆された。

目的

タイラー脳脊髄炎ウイルス (TMEV) によるマウス免疫性脱髄疾患 (TMEV-IDD) はヒトの多発性硬化症と、臨床的にも、組織学的にも類似しており、ヒトの多発性硬化症のよい動物実験モデルとされている。アポトーシスは成長や免疫系の成熟、調節に大きく関与していることが明らかになっているが、脱髄疾患におけるアポトーシスの役割については未だ不明である。我々は抗 Fas-L モノクローナル抗体および Fas-L 欠損 C3H gld マウスを用いて、TMEV-IDD における Fas/Fas-L 誘導アポトーシスの役割を検討した。

方法

モノクローナル抗体(mAb)の作製：

抗 Fas-L mAb (MFL-1)産生ハイブリドーマは各々培養増殖させた後ヌードマウス腹腔内に移入し抗体を得た。抗体は protein G column にて精製後使用した。

脱髄疾患動物モデルの誘導および mAb 投与：

TMEV-IDD は SJL/J マウスの右大脳半球にタイラー脳脊髄炎ウイルス BeAn8386 を脳内感

染させて誘導した。下記のようにマウスを 5 群に分け day-2, 6 (誘導期) または day 17, 25 (効果期) に mAb(500 μ g/100ml/mouse)を投与した。

A 群--none,

B 群-- 抗 Fas-L mAb (MFL-1) (day -2, 6);

C 群--control hamster IgG (day-2,6)

D 群--抗 Fas-L mAb (MFL-1)(day 17, 25)

E 群--control hamster IgG (day 17, 25)

臨床症状の観察, 症状の評価：

Normal: 0, Slight waddling gait:1, Waddling gait: 2, Spastic hind limb paralysis: 3, Severe hind limb paralysis accompanied by incontinence: 4

抗原特異的遅延型過敏反応：

脳内接種 50 日後各マウスの耳の厚さをデジタルマチックマイクロメータにて測定した。この後 10ml PBS 中 5 mg の精製 TMEV を耳の背側に注入し 24 時間後に同様に測定し耳の厚さの増加度を検討した。

抗原特異的 T 細胞増殖アッセイ：

各群のマウスあるいはラットをエーテル麻酔下にて屠殺後、脾細胞を取り出し、96 穴培養マイクロプレートにて 1 穴あたり 5×10^5 に調整

して RPMI1640, 0.5% 同種血清中で培養した。3 穴ずつ同条件で各穴に特異抗原を 1, 5mg ずつ加えて刺激し, 5% CO₂ インキュベーター内で 72 時間培養した。こののち各穴にトリチウムチミジンを 1mCi 加え 24 時間後にハーベストし, 液体シンチレーションカウンターにて細胞のトリチウムチミジンの取り込みを測定した。

抗 TMEV 抗体:

マウスは屠殺前に採血し, 血清を保存した。紫外線不活化精製 TMEV を抗原として ELISA 法にて抗 TMEV 抗体を測定した。

ELISPOT アッセイ:

個々の脾細胞のサイトカイン産生能について ELISPOT 法について検討した。培養マイクロプレートの各穴の底にニトロセルロース膜をしきに各種抗サイトカイン抗体を吸着させた。この膜上に脾細胞を 1X10⁵/穴の割合で入れ, 培養液中で 24 時間培養した。このニトロセルロース膜をウサギ抗マウスサイトカイン抗体と反応させ, さらにヤギアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ抗体と反応させた後基質を加え, 膜上のサイトカインをスポットとして出現させ拡大鏡下にてスポット数を算定した。

さらにまた TMEV 感受性の Fas-L 欠損 C3H gld マウスの大脳半球内に TMEV を接種し, TMEV-IDD を作成し, TMEV 接種 Fas-L 非欠損 C3H マウスと比較検討した。

結果

臨床症状は anti-Fas-L mAb 投与群で誘導期、効果期いずれの群も、対照群に比し、早期に発症し、より重症化した (図 1)。組織学的には発症マウスでは脊髄白質の広汎な脱髄と血管周囲のリンパ球浸潤を認めた。Fas の免疫組織染色では、経過と共に Fas 陽性細胞の増加を認めたが、anti-Fas-L mAb 投与群はいずれも対照群に比し、有意に低下していた (図 2)。TMEV 抗原特異的 DTH および脾細胞の TNF- α 産生細胞は anti-Fas-L mAb 投与群で対照群に比し、有意に増加していた (図 3)。一方 IL-4 産生細胞は anti-Fas-L mAb 投与群で対照

群に比し、有意に低下した (図 4)。TMEV 抗原特異的抗体価、IL-10 産生細胞、INF- γ 産生細胞は各群間に有意差はみられなかった。

TMEV 接種 Fas-L 欠損 C3H gld マウスでは TMEV 接種 Fas-L 非欠損 C3H マウスに比し、anti-Fas-L mAb 投与群と同様早期に発症し、より重症化した (図 5)。

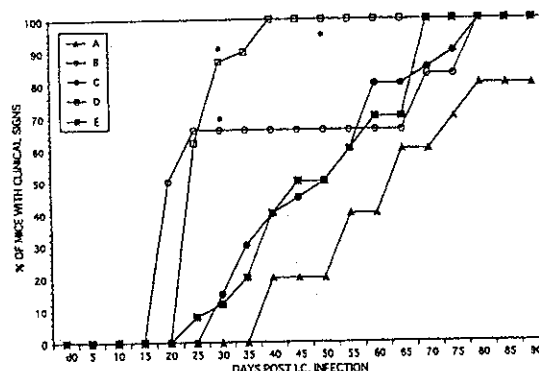


図 1

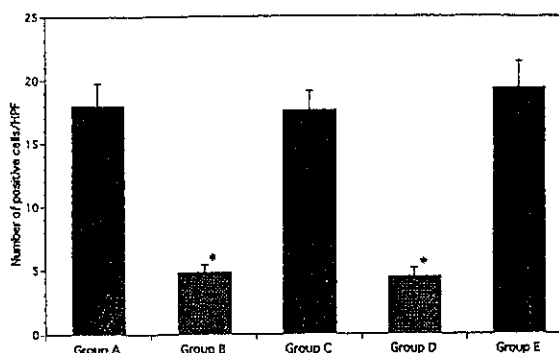


図 2

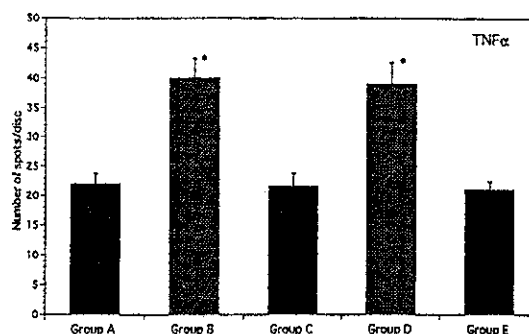


図 3

考察

本研究では我々は anti-Fas-L mAb を投与することにより、TMEV-IDD における Fas/Fas-L 誘導アポトーシスをブロックした。その結果、中枢神経系における単核細胞の Fas/Fas-L 誘導アポトーシスがブロックされ、TMEV-IDD が臨床的にも、組織学的にも増悪した。Fas-L 分子は CD8+細胞や Th1 細胞 (CD4+) のような cytotoxic T lymphocytes (CTLs)の主要な効果分子の一つであることが知られている。TMEV-IDD の脱髄機序は未だ不明であるが、中枢神経系における持続感染とそれに伴った免疫応答が重要な役割を果たしていると考えられている。TMEV-IDD の発症には TMEV の外殻蛋白に対する CD4+Th1 細胞の免疫応答が重要な役割を果たしていることが知られており、anti-Fas-L mAb 投与により、TMEV-IDD が抑制されることが期待されたが、実際は anti-Fas-L mAb 投与により TMEV-IDD が臨床的にも、組織学的にも増悪した。anti-Fas-L mAb 投与により脾細胞の TMEV 抗原特異的 DTH および TNF- α 産生細胞は増加し、一方、IL-4 産生細胞は低下した。中枢神経系におけるアポトーシス細胞も anti-Fas-L mAb 投与により低下した。アポトーシス細胞は主として CD4+細胞であった。Fas-L 分子は主として活性化 T 細胞に表現されるので、anti-Fas-L mAb 投与または TMEV 接種 Fas-L 欠損 C3H gld マウスにおける臨床症状の増悪は活性化された encephalitogenic T cell のアポトーシスをブロックすることによりもたらされたことが示唆される。encephalitogenic T cell を除去出来なかったことが TMEV-IDD の症状の増悪と広汎な脱髄をもたらしたことが考えられる。このことは Fas/Fas-L 誘導アポトーシスが選択的に encephalitogenic T cell を中枢神経系から排除するよう、すなわち TMEV-IDD を抑制する役割を果たしていることが示唆される。以上より、TMEV-IDD において Fas/Fas-L 誘導アポトーシスは TMEV-IDD に対し抑制的に働いており、anti-Fas-L mAb 投与および Fas-L 欠損 C3H gld マウスは、発症に関与しているリンパ球のアポトーシスを抑制することで症状を増悪させることが示唆された。

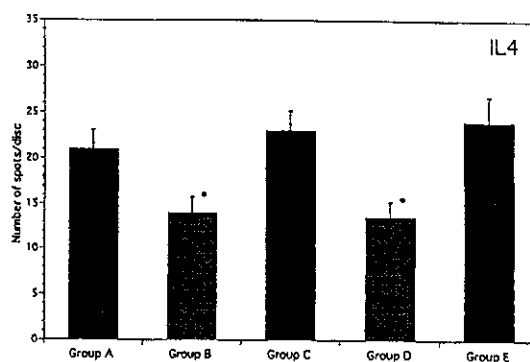


図 4

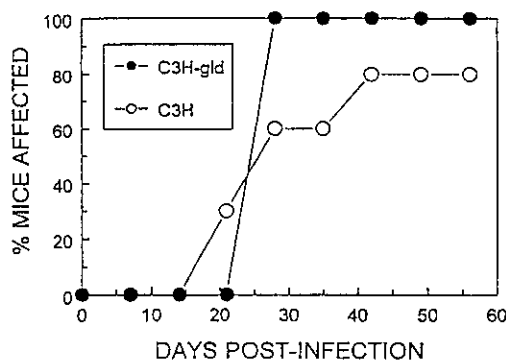


図 5

文献

- 1) Inoue A, Koh C-S, et al: The level of tumor necrosis factor- α producing cells in the spinal cord correlates with the degree of Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease. *Int Immunol* 8: 1837, 1996
- 2) Miller SD et al: Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nature Medicine* 3: 1133, 1997
- 3) Inoue A, Koh C-S, et al: Suppressive effect on Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease by the administration of anti-IL-12 antibody. *J Immunol* 5586, 1998
- 4) Yauch RL, Palma JP, Yahikozawa H, Koh C-S, Kim BS: Role of individual T-cell epitopes of Theiler's virus in the pathogenesis of demyelination correlates with the ability to induce a Th1 response. *J Virol* 72: 6169, 1998

自己免疫性腎炎の発症機序の多様性に関する研究

分担研究者 齊藤 隆

所属施設 千葉大学大学院医学研究科遺伝子制御学

研究要旨 自己免疫疾患の発症機序の多くに Fc レセプター (FcR) が関与していることが示唆されてきている。既に我々は、馬杉腎炎の発症には FcR が不可欠に関与していることを明らかにした。これに対して、自己免疫マウス *lpr/lpr* に由来するリウマチ因子活性とクリオグロブリン活性を有する自己抗体によって誘導される糸球体腎炎は、全く FcR に依存していないことが判明した。一方、このマウスでは血管炎も誘導されるが、血管炎誘導は FcR 依存性であることがわかった。これらの結果は、FcR が関与する自己免疫性の糸球体腎炎の発症機構の多様性を示しており、FcR 依存性と非依存性に分けられることが明らかになった。

A. 研究目的

自己抗原と自己抗体による免疫複合体による自己免疫性炎症の誘導は、多くの自己免疫疾患に共通する機序である。その典型であるアルザス反応の誘導が FcR に依存して起こることが判明して以来、より広く自己免疫疾患の発症に FcR が関与している可能性が示唆され、発症機序の見直しが必要となってきた。我々は FcR が実際に自己免疫性疾患の発症にどの程度関与しているかを解析した。我々の樹立した FcR 欠損マウスを用いることによって、既に抗糸球体基底膜抗体による馬杉腎炎の発症には FcR⁺細胞が不可欠であることを発見した。そこで、果たして全ての糸球体腎炎が FcR 依存性に誘導されているのかを解明するため、今回は自己免疫マウス *lpr/lpr* 由来の抗体によって誘導される糸球体腎炎および *lpr/lpr* 自体に誘導されてくる腎炎の発症における FcR の関与を解析した。

B. 研究方法

リウマチ因子活性のあるクリオグロブリンである単クローン抗体 6-19 を産生するハイブリドーマをマウスの腹腔に投与し、血管炎およびループス腎炎を誘導した。抗体投与のために Igb が a タイプにする必要があり、使用した FcR γ 欠損マウス、Fc γ RIII 欠損マウス、および TNF 欠損マウスは全て BALB/c と交配した上で使用した。

C. 研究結果

1. 6-19 による糸球体腎炎の誘導

6-19 ハイブリドーマを腹腔に投与した後、2週間ほどすると耳や手足が真っ赤になり血管炎が誘導

される。この時に腎臓を解析すると、*lpr/lpr* マウスと同様なワイヤー型の糸球体腎炎を起こしていることが判明した。この腎炎が FcR 依存性に発症するのかどうかを調べるために FcR 欠損マウスと同様な処理をした。6-19 投与後、日を追って血中 IgG3 抗体価 (6-19 の量を示している) を調べたところ、正常マウスと FcR 欠損マウスでは全く差はなかった。血管炎に関しては、正常マウスでは 100%耳が真赤になり、血管炎を起こしたにも関わらず、FcR 欠損マウスでは、全く発症しなかった。耳の切片を病理学的に解析した結果でも FcR 欠損マウスでは肥厚はなく、浸潤細胞も全く観察されなかったが、血管の内部に沈着物が観察され、投与した抗体の複合体であると思われた。一方、糸球体腎炎については、FcR 欠損マウスでも正常マウスと全く同様な腎炎が発症した。

2. 種々ノックアウトマウスにおける腎炎発症

FcR γ 鎖欠損マウスでも 6-19 で誘導される糸球体腎炎が誘導されたことは、同様に Fc γ RIII 欠損マウスを用いた実験からも示された。即ち、Fc γ RIII はアルザス反応等に重要であるが、6-19 誘導性の腎炎は Fc γ RIII 欠損マウスでも正常マウスと全く同様に誘導された。更に、我々が昨年報告したように、TNF 欠損マウスを用いることによって、6-19 で誘導される血管炎の誘導には TNF が重要であると思われるので、腎炎においてはどうかを調べた。ところが、TNF 欠損マウスにおいても、6-19 で誘導される糸球体腎炎は阻害されることはなかった。これらの結果から、発症機序については血管炎と糸球体腎炎では全く異なっていると考えられる。

3. *lpr/lpr* マウスにおける糸球体腎炎

6-19 は自己免疫マウス *lpr/lpr* 由来であり、自然抗体として樹立されたものである。そこで次に、6-19 によって誘導される糸球体腎炎が FcR 非依存性であることから、実際に *lpr/lpr* マウスに加齢と共に誘導されてくる糸球体腎炎も FcR 非依存性なのかを解析した。その為に、FcR γ 欠損マウスを MRL-*lpr/lpr* マウスと数世代バッククロスしたマウスを作製し、解析した。MRL-*lpr/lpr* マウスは糸球体腎炎のために死亡することが知られているが、死亡曲線を *lpr/lpr* と FcR γ -欠損 *lpr/lpr* マウスとで比べると、殆ど両者に差がないことが判明した。まだ基礎的な結果ではあるが、糸球体腎炎についてもほぼ同様に誘導されていると思われた。

D. 考察

抗原-抗体複合体による自己免疫性炎症に FcR が重要であることは、既に IgE による I 型アレルギーのみならず、アルザス反応、溶血性貧血、血小板減少症の各モデルによって示された。我々も一昨年度、抗糸球体基底膜抗体による馬杉腎炎においても FcR 欠損マウスでは全く発症しないことを示した。今回、リウマチ因子活性を有するクリオグロブリンによって誘導される糸球体腎炎は FcR γ 欠損マウス、Fc γ RIII 欠損マウス、および TNF 欠損マウスにおいても全く同様に誘導されることが判明した。6-19 の誘導する腎炎は MRL-*lpr/lpr* マウスに誘導される腎炎と同様にワイヤー型の糸球体腎炎であり、馬杉腎炎とは異なる。この結果は、糸球体腎炎の発症は全てが FcR 依存性では無いことを示しており、発症機構に多様性があることが判明した。一方、6-19 によって誘導される血管炎は馬杉腎炎と同様に FcR に完全に依存して発症することが明らかになった。

単一の抗体によって誘導される二つの疾患、血管炎と糸球体腎炎が FcR 依存性において全く異なるのは何故であろうか。血管炎の発症には IgG3 アイソタイプの抗体で、リウマチ因子とクリオグロブリンの両者の活性が不可欠である。リウマチ因子として複合体を IgG2a と作るが、IgG 欠損マウスを用いると血管炎は誘導されないことから、IgG2a との免疫複合体の形成が血管炎誘導に不可欠である。その免疫複合体を FcR 陽性細胞が認識して発症につながる訳である。一方、腎炎はクリオグロブリン活性だけで十分であり、リウマチ因子活性を必要としないことから、免疫複合体を形成することなく糸球体への沈着が起こり腎炎が誘導されるように考えられる。この場合には FcR に関係なく腎炎が起こると

考えられる。即ち、抗原抗体による免疫複合体の特異的沈着によって誘導される腎炎は FcR 依存性であると予想される。

6-19 は元々 MRL-*lpr* マウスから樹立されたものであり、このような抗体の生体内での役割に基づいて、*lpr/lpr* マウスには糸球体腎炎が誘導され、死に至ると考えられる。実際、今回の preliminary な結果でも FcR 欠損させた *lpr/lpr* マウスでもほぼ同様に糸球体腎炎が起きているようであり、それによる死亡曲線にも差がないことが判明した。

E. 結論

自己抗体による糸球体腎炎の発症においても、その発症機序において FcR の依存性に多様性のあることが判明した。抗基底膜抗体による馬杉腎炎の発症は完全に FcR 依存性であるのに対し、クリオグロブリンによって誘導される糸球体腎炎は FcR 非依存性であった。この差は、自己抗原との免疫複合体形成が誘導の原因となっているかの違いであると思われる。より多くの自己免疫性疾患における FcR 依存性を解析し、発症機序を大別して明らかにしていく必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表
1. van Egmond M, van Vuuren H, Morton H C et al. Human IgA receptor (FcaRI, CD89) function in transgenic mice requires both FcR γ chain and CR3(CD11 β /CD18). *Blood in press.*
2. Otsuji M, Aoe T, Kimura Y, Okamoto Y and Saito T. Oxidative stress by tumor-derived macrophages induces abnormal structure of T cell receptor complex. In: Yodoi, J. (ed) *Redox biology.* Academic Press. *in press.*
3. Regnault A, Lankar D, Lacabanne V et al. FcR γ -mediated induction of dendritic cell maturation and MHC class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med* 189:371-380, 1999.
4. Takase K, Okazaki Y, Wakizaka K, Shevchenko A, Mann M and Saito T. Molecular cloning of pTAC12, an alternative splicing product of the CD3 γ chain as a component of the pre-T cell antigen-receptor complex. *J Biol Chem* 273:30675-30679, 1998.
5. Gibbins J M, Briddon S, Shutes A et al. The p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase associates with the Fc receptor γ -chain and LAT in platelets stimulated by collagen and convulxin. *J Biol Chem*

- 273:34437-34443, 1998.
6. Ohno H, Aguilar R C, Yeh D, Taura D, Saito T and Bonifacino J S. The medium subunits of adaptor complexes recognize distinct overlapping sets of tyrosine-based sorting signals. *J Biol Chem* 273:25915-25921, 1998.
 7. Yamazaki T, Hamano Y, Takase K Mann M and Saito T. (1998) New components assembled with TCR or pre-TCR complex. In: G. P. Talwar, I. Nath., N. K. Ganguly., K. V. S. Rao. (eds), The 10th International Congress of Immunology. Monduzzi Editore S. p. A., Bologna-Italy. 189-194.
 8. Miyatake S, Nakaseko C, Umemori H, Yamamoto T and Saito T. Src family tyrosine kinases associate with and phosphorylate CTLA-4(CD152) *Biochem Biophys Res Commun* 249:444-448, 1998.
 9. Kametani Y, Goto H, Kobori A et al. Ex vivo evidence for asymmetric tyrosine phosphorylation of ZAP-70 on double-positive thymocytes in the positive selection process. *Int Immunol* 10:1203-1210, 1998.
 10. Park SY, Ueda S, Ohno et al. Resistance of Fc receptor-deficient mice to fatal glomerulonephritis. *J Clin Inv* 102:1229-1238, 1998.
 11. Saito T and Watanabe N. Positive and negative thymocyte selection. *Crit Rev Immunol* 18:359-370, 1998.
 12. Saito T. Negative regulation of T cell activation. *Curr Opin Immunol* 10:313-321, 1998.
 13. Adachi S, Yoshida H, Honda K et al. Essential role of IL-7 receptor α in the formation of Peyer's patch anlage. *Int Immunol* 10:1-6, 1998
 14. Wakizaka K, Masuda Y and Saito T. A novel 90kDa tyrosine-phosphorylated protein associated with TCR complex in thymocytes. *Eur J Immunol* 28:636-645, 1998.
2. 学会発表
1. Arase, H., Arase, N., Park, S.Y., Ohno, H., Ra, C. and Saito, T.: Association with FcR γ is essential for activation signal through NKR-P1(CD161) in NK cells and NK1.1+ T cells. International Symposium on Recent Advances of Human Tumor Immunology and Immunotherapy
 2. Saito, T., Shiratori, T., Ohno, H., Bonifacino, J.S., Miyatake, S. : Switching between signal transduction and endocytic pathway by tyrosine phosphorylation of CTLA-4 in T cells. Keystone Symposia (Lake Tahoe, NV. 3.1.-3.7., 1998)
 3. 中世古 知昭、宮武 昌一郎、大野 博司、齋藤 隆: T細胞活性化における CTLA-4 による IL-2 産生抑制機構. 第 57 回日本癌学会総会
 4. 荒瀬 尚、末永 忠広、木村 喜光、荒瀬 規子、大野 博司、齋藤 隆: CD3 ζ 鎖による NK 細胞 Fcレセプター機能の新たな制御機構. 第 57 回日本癌学会総会
 5. 宮武 昌一郎、中世古 知昭、大野 裕、齋藤 隆: src ファミリーキナーゼによる CTLA-4 (CD152)細胞内領域のチロシンリン酸化の制御. 第 57 回日本癌学会総会
 6. 齋藤 隆: Mechanism of Fc receptor-induced autoimmune diseases. 膠原病7フォーラム
 7. 荒瀬 規子、荒瀬 尚、八木田 秀雄、齋藤 隆:
 8. 渡辺 紀彦、出井 章三、齋藤 隆: 自己抗体による血管炎の発症の分子メカニズム. 第 28 回日本免疫学会総会・学術集会
 9. 中世古 知昭、宮武 昌一郎、大野 博司、齋藤 隆: CTLA-4 による IL-2 産生抑制機構: チロシンモチーフ非依存性のメカニズム. 第 28 回日本免疫学会総会・学術集会
 10. 飯田 智彦、荒瀬 佳奈子、荒瀬 尚、齋藤 隆: マウス NKR-P1/FcR γ 鎖導入細胞を用いた NKR-P1 の機能解析. 第 28 回日本免疫学会総会・学術集会
 11. 齋藤 隆、中世古 知昭、宮武 昌一郎、大野 博司: T細胞活性化の抑制メカニズム. 第 21 回日本分子生物学会年会
 12. 飯田 智彦、大野 博司、中世古 知昭、齋藤 隆: CTLA-4 の発現調節. 第 21 回日本分子生物学会年会

慢性関節リウマチ (RA) における原因抗原の特定に関する研究

RAにおける病因T細胞に共通なCDR3シーケンス

分担研究者：佐伯 行彦¹

研究協力者：美馬 亨²、大島 至郎¹、笹井光子¹、西岡克泰¹

所属機関：大阪大学医学部分子病態内科/第三内科¹
コロラド大²

【研究要旨】

これまでに滑膜増殖を誘導する、つまりRAの病因T細胞と考えられるT細胞亜集団がオリゴクローナルに関節局所に存在すること、これらのT細胞亜集団は特定のTCR/Vβ (Vβ 8、12、13、14) を好んでもつことを明らかにしてきた(1)。今回、これらのT細胞が特定の抗原により誘導されているかどうかを検討するために、Vβ14およびVβ8陽性T細胞についてCDR3のシーケンスを解析した。その結果、複数の患者間に共通なドミナントなシーケンス (Vβ14; CASS-PRERAT-YEQ, Vβ8; CASS-ENS-YE(N)Q(E), CASS-LTEP-DTQ) が存在することが明らかとなった。また、その共通なドミナントなCDR3シーケンスをもつT細胞クローン (G3) をSCIDマウスの関節腔に移入すると滑膜増殖が誘導された。以上のことから、RA患者の病変局所にオリゴクローナルに増加している病因T細胞と考えられるT細胞亜集団は、病変局所に存在する特定の抗原により誘導されていることが示唆された。

【目的】

これまでにsevere combined immunodeficiency (SCID) マウスへの細胞移入実験とT細胞レセプター (TCR) のレパトアの解析結果から、一部のRA患者の病変局所に滑膜増殖を誘導するT細胞、つまりRAにおける病因T細胞と考えられるT細胞亜集団がオリゴクローナルに存在すること、そして、これらのT細胞亜集団は特定のTCR/Vβ (Vβ 8、12、13、14) を好んでもつことを明らかにしてきた(1)。今回、これらのT細胞が特定の抗原により誘導されているかどうかを検討するために、Vβ14およびVβ8陽性T細胞についてCDR3のシーケンス解析を行った。

【方法・結果】

Vβ14およびVβ8に偏りのみられた患者 (Vβ14; 2名、Vβ8 4名) の滑膜組織由来の単核球およびPBMCより抽出したmRNAをCβとVβ14あるいはVβ8に特異的なプライマーによりRT-PCRで増幅後、そのPCR産物をTAクローニングキットでクローニングし、さらにそのプラスミッドDNAを直接dideoxy法を用いてCDR3のシーケンスを行った(2)。その結果、表1に示すようにVβ14に偏りのみられた患者 (Patient 1) では、滑膜組織にドミナントなクローン (15/15) が存在し、その予想アミノ酸配列は、CASS-PRERAT-YEQであった。しかしながら、末梢ではドミナントなクローンは存在せず、それらの予想アミノ酸配列に滑膜組織でみられたものと同じ配列はみられなかった。さらに、Vβ14に偏りのみられた別の患者 (Patient 7) でも、Patient 1と同様に滑膜組織では、ドミナントなクローン (9/10) が検出され、その予想アミノ酸配列は、Patient 1の場合と同じであった。一方、Vβ8については、Vβ8に偏りのみられた4名の患者の滑膜組織由来のVβ8陽性

T細胞にはVβ14の場合とは異なるふたつのドミナントCDR3シーケンス (CASS-ENS-YE(N)Q (E)、(CASS-LTEP-DTQ) がみとめられた。これらのCDR3シーケンスもVβ8に偏りのみられた複数の患者間で共通であった。また、末梢ではVβ14の場合と同じくドミナントなクローンは存在せず、共通なCDR3シーケンスは検出されなかった。また、このような共通なCDR3シーケンスが滑膜増殖を誘導するT細胞に特異的かどうかを検討するために、SCIDマウスでの細胞移入実験系において滑膜増殖を誘導しなかった患者の関節局所でのVβ14およびVβ8陽性T細胞のCDR3シーケンスを解析した。その結果、表2に示すようにすべての患者においてドミナントなクローンは検出されず、同一のシーケンスはみとめられなかった。さらに、これらのドミナントな共通なCDR3シーケンスがRAに特異的かどうかを検討するために、RA以外の関節炎 (変形性関節症など) 患者において関節局所でのVβ14およびVβ8陽性T細胞のCDR3シーケンスを解析した。その結果、表3に示すようにすべての患者においてドミナントなクローンは検出されず、同一のシーケンスはみとめられなかった。

以上の結果から、病変局所に滑膜増殖を誘導するT細胞が存在すると考えられる複数のRA患者にみとめられた共通なドミナントCDR3シーケンスは、RAに特異的であるとともに滑膜増殖を誘導するT細胞に特異的であることが示唆された。

つぎに、Patient 1の滑膜組織より分離した単核球をスーパーアンチゲン (SEB) で刺激し、Vβ14陽性T細胞を増幅後、限界希釈法にてクローニングし、共通なドミナントなシーケンス (CASS-PRERAT-YEQ) をもつVβ14陽性T細胞クローンの樹立を試みた。その結果、同一のCDR3シーケ

ンスをもつVβ14陽性T細胞クローンG3を樹立した。そして、このG3クローンが実際に滑膜増殖を誘導するかどうかを検討するために、G3クローンを autologous PBMC とともにSCIDマウスの関節腔内に移入した。その結果、G3クローンを移入したSCIDマウスでは、この患者の滑膜組織由来の単核球を移入した時と類似の滑膜増殖が3匹中2匹に誘導された。

【考察/結論】

SCIDマウスへの細胞移入実験系において病因T細胞（滑膜増殖を誘導するT細胞）が病変部に存在すると考えられるRA患者では、偏りのみられた特定のVβ（Vβ14あるいはVβ8）陽性T細胞のCDR3には複数の患者間で共通なドミナントなシークエンスが存在することが明らかになった。また、この共通なドミナントなシークエンスをCDR3にもつT細胞クローンであるG3が滑膜増殖を誘導したことから、これらのCDR3に共通なドミナントなシークエンスをもつT細胞はRAにおける病因T細胞である可能性がある。さらに、このような共通なドミナントシークエンスは複数存在することから、対応する抗原ペプチドは複数存在する可能性があるが、患者間で共通な関節局所に存在する抗原により誘導されていることが示唆された。尚、これまで報告されたTCR/VβのCDR3シークエンスのデータを比較検討したところ、我々の見出したシークエンスは、CM Weyand & JJ Goronzyらの報告(3)した病変部にオリゴクローナルに増殖したVβ14陽性T細胞のTCR/VβのCDR3シークエンス、CASS-PRRRAP-SYEQと強い相同性を有することが明らかとなった。とくに、CDR3のN-D-N領域は、ともに6つのアミノ酸で構成され、前半の5つのアミノ酸は、1番目が疎水性アミノ酸、2番から4番までは荷電性アミノ酸、5番目は疎水性のアミノ酸と酷似していた。抗原ペプチドとの結合には、とくにCDR3のN-D-N領域が重要であると考えられているが、この相似性は、明らかに異なるRA患者由来のふたつのT細胞が類似のペプチドを認識している可能性を示唆するものである。彼らのT細胞がautoreactivityを有し、関節外病変の存在と相関があるとのことからも、今回我々が見出したCDR3シークエンスをもつ滑膜増殖を誘導するT細胞がRAの病態（あるいは病因）に関連していることが示唆される。

今後、G3クローンあるいはそのTCR/VβCDR3シークエンスをプローベとして対応するペプチドを検索し、RAの病因となる抗原の特定をめざしたい。

【文献】

1. Mima T, Saeki Y, Ohshima, et al. Transfer of rheumatoid arthritis into severe combined immunodeficient mice. The pathogenetic implications of T cell populations oligoclonally expanding in the rheumatoid joints. *J Clin Invest* 96: 1746-1758,1995
2. Stoffel ES, Koeberl DD, Sanker G, and Sommer SS. Genomic amplification with transcript sequencing. *Science (Wash DC)* 239:491-494,1988
3. Rittner HL, Zettl A, Jendo MC, Bartz-Bazzanella P, Goronzy JJ, and Weyand CM. Multiple mechanisms support oligoclonal T cell expansion in rheumatoid synovitis. *Molecular Medicine* 3:452-465,1997

Patient	HLA-DR	Skewed Vβ	Joint (SPMNC or STMNC)						Periphery (PDMNC)										
			CDR3						CDR3										
			Vβ	NDN	Jβ	Freq.	Vβ	NDN	Jβ	Freq.									
Patient 1	DR2:DR4	Vβ14	CASS	EREAT	YDQ	08:23	15:15	CASS	SRCVFR	GYY	08:12	1:16							
Patient 7	DR4	Vβ14	CASS	PRIKAT	YEQ	08:23	9:10												
Patient 8	DR4:DR15	Vβ8	CASS	ENS	YFQ	08:23	12:13	CASS	GRD	YGY	08:12	1:13							
Patient 7	DR4	Vβ8	CASS	INS	YNQ	08:23	4:2												
Patient 4	DR4	Vβ8	CASS	SLGGQ	DTE	08:11	2:10												
Patient 2	DR4:DR15	Vβ8	CASS	PISD	SPL	08:16	1:12	CASS	EKGGDK	TEA	08:12	1:10							

表1. Vβ14あるいはVβ8に偏りのみられたSCIDマウスでの実験系で滑膜増殖を誘導したRA患者のTCR/Vβ CDR3シークエンス (予想アミノ酸シークエンス)

Patient	HLA-DR	Cell Source	Vβ14						Vβ8										
			CDR3						CDR3										
			Vβ	NDN	Jβ	Freq.	Vβ	NDN	Jβ	Freq.									
Patient 10	DR2:DR12	SPMNC	CA	HESTV	NIP	08:12	1:16	CA	RGDRAD	TEA	08:12	1:16							
GA #1	DR4:DR8	SPMNC	CASS	FGSD	YEQ	08:23	1:11	CASS	LSG	NIP	08:12	2:10							
GA #2	DR4:DR8	SPMNC	CASS	PQGGAPL5	TEA	08:12	1:15	CASS	SSVGGD	TEA	08:12	2:11							
GA #3	DR4:DR8	SPMNC	CASS	FGGYD	ORQ	08:15	7:11	CASS	LS	SYE	08:23	1:14							
GA #4	NT	SPMNC	CASS	FGGYV	TEA	08:11	2:15	CASS	EVMNKP	TEA	08:12	1:13							
GA #5	NT	SPMNC	CASS	YWGAT	YEQ	08:23	3:7	CASS	SQGS	EQY	08:23	1:15							

表3. RA以外の関節炎患者の関節局所のVβ14あるいはVβ8属性T細胞のTCR/Vβ CDR3シークエンス (予想アミノ酸シークエンス)

Patient	HLA-DR	Cell Source	Vβ14						Vβ8										
			CDR3						CDR3										
			Vβ	NDN	Jβ	Freq.	Vβ	NDN	Jβ	Freq.									
Patient 1*	DR4	SPMNC	CASS	FERRAT	YEQ	08:23	1:12	CASS	LAFT	YEQ	08:23	1:8							
Patient 21	DR4:DR1	SPMNC	CASS	KGGT	YGQ	08:12	1:14	CASS	SA	NYG	08:12	5:11							
Patient 32	DR4	SPMNC	CASS	FID	YGY	08:23	1:15	CASS	SLGGDT	LAQ	08:12	1:14							
Patient 3*	DR4	SPMNC	CASS	YEQDY	YEQ	08:23	1:8	CASS	LZFLGYG	TGE	08:12	1:8							

表2. SCIDマウスでの実験系で滑膜増殖を誘導しなかったRA患者の関節局所のVβ14あるいはVβ8属性T細胞のTCR/Vβ CDR3シークエンス (予想アミノ酸シークエンス)

課題名 シェーグレン症候群における唾液腺内T細胞のT細胞エピトープ解析に関する研究

氏名 分担研究者 住田孝之

所属機関 筑波大学臨床医学系内科教授

研究要旨

シェーグレン症候群(SS)の各臓器に浸潤したT細胞は抗原を認識して誘導される。その対応抗原をアミノ酸レベルで明らかにすることは、SSの病因解明、およびアナログペプチドを用いたSSの特異的制御を可能にする上で重要である。本研究では、SSの口唇唾液腺(LSG)内浸潤T細胞の対応抗原を明らかにするために、LSG特異的T細胞のTCR α 鎖、 β 鎖をそれぞれ単離してTCRトランスフェクタントを作製しSSに共通な新しい自己抗原の検索を進めている。一方で、唾液腺特異的自己抗原として明らかにしてきた α 型アミラーゼのT細胞エピトープの同定、アナログペプチドの選定を行っている。

A.研究目的

シェーグレン症候群(SS)の口唇唾液腺には、CD4⁺T細胞を中心とした著明な細胞浸潤が認められ自己免疫発症に重要な役割を果している。浸潤T細胞のT細胞抗原受容体(T cell receptor, TCR)の解析から、それらが抗原刺激により誘導されていることが判明してきた。本研究では、唾液腺に浸潤したT細胞を認識する対応抗原の解析、さらに、アナログペプチドの選定を目的とした。

B.研究方法

1) 唾液腺より分離したT細胞より、single cell sorting, single cell PCR法を用いてTCR α 鎖、および β 鎖を同定する。これらのcDNAを発現ベクター (pCR3.1、pcDNA3.1) に組み込み、G418とZeocinでdouble selectionする。選別されたTCRトランスフェクタントについて、TCR発現をフローサイトメトリーで確認する。ランダム合成アミノ酸ライブラリーを抗原の候補をととして、SSに共通な新たな自己抗原を検索する。

2) 1) で用いたTCR α 鎖と β 鎖cDNAをVAhCD2発現ベクターに組み込み、co-injection法によりTCRトランスジェニックマウスを作成する。そのマウスよりT細胞ラインを樹立することにより、自己抗原を検索する。

3) すでに明らかにされている唾液腺特異的自己抗原 α -アミラーゼのT細胞エピトープ(EKMSYLKNWGEG, AA287-298とNPFRPWWERYQWPV, AA68-80)のアナログペプチドを作成する。SS患者末梢血T細胞をin vitroで抗原と4日間培養し細胞内サイトカイン(IFN- γ)産生を解析することによりアナログペプチドの選別を行う。

C.研究結果

1) SSの唾液腺内浸潤T細胞からTCRAV2 α 鎖、およびTCRBV2 β 鎖の全長 (297AAと315AA)を単離し、発現ベクターに組み込んだ。現在、TCRトランスフェクタントを作成中。

2) 同上のTCR α 鎖と β 鎖cDNAをVAhCD2発現ベクターに組み込んだプラスミドを作成した。この二つのDNAを共に発現したトランスジェニックマウスを作成中。

3) SS患者末梢血中T細胞の7.49% (無刺激: 0.56%) が全長の α -アミラーゼに反応してIFN-gを産生していた。唾液腺特異的自己抗原 α -アミラーゼのT細胞エピトープ(EKMSYLKNWGEG, AA287-298とNPFRPWWERYQWPV, AA68-80)に関して、リジン(K)に一個ずつ置換したそれぞれ10個、14個の合成アミノ酸を作成した。SS患者末梢血リンパ球と合成アミノ酸とを培養し、細胞内IFN-g産生を指標として、アナログペプチドを選別中。

D.考察

SSの口唇唾液腺内浸潤T細胞の対応抗原について、本研究を含めていままで四つの異なる方法で解析してきた。その結果、唾液腺特異的自己抗原と臓器非特異的自己抗原が唾液腺内T細胞が認識する抗原として明らかにされた。唾液腺特異的自己抗原の一つとして、唾液腺型 α -アミラーゼが検出された。実際、33%のSS患者 (4/12) において、全長の α -アミラーゼに反応する自己反応性T細胞が唾液腺に集積している。さらに、 α -アミラーゼ反応性T細胞がIFN- γ を産生していることが確認されている。この場合の発症機序としては、唾液腺局所において α -アミラーゼの一部がHLA分子とともに抗原提示細胞上