

Journal of Cardiology 1998; 66 suppl 1: 135-138

25) Kiyosawa M, Baba T: Ophthalmological Findings in Patients with Takayasu Disease. International Journal of Cardiology 1998; 66 suppl 1: 141-147

26) Flamm SD, White RD, Hoffman GS: The Clinical Application of 'Edema Wighted' MR Imaging in the Assessment of Takayasu's Arteritis. International Journal of Cardiology 1998; 66 suppl 1: 151-159

27) Suwanwela NC, Suwanwela N: Takayasu Arteritis: Ultrasonographic evaluation of the cervico-cerebral arteries. International Journal of Cardiology 1998; 66 suppl 1: 163-173

28) Choe YH, Lee WR: Magnetic Resonance Imaging Diagnosis of Takayasu Arteritis. International Journal of Cardiology 1998; 66 suppl 1: 175-179

29) Baltazares M, Mendoza F, Dabague J, Reyes PA: Antiaorta antibodies and Takayasu arteriis. International Journal of Cardiology 1998; 66 suppl 1: 183-187

30) Hoffman GS, Ahmed AE: Surrogate markers of disease activity in patients with Takayasu arteritis. A preliminary report from the international network for the study of the systemic vasculitides (INSSYS). International Journal of Cardiology 1998; 66 suppl 1: 191-194

31) Amano J, Suzuki A, Tanaka H, Sunamori M: Surgical Treatment for Annuloaortic Ectasia in Takayasu Arteritis. International Journal of Cardiology 1998; 66 suppl 1: 197-202

32) Zheng D, Liu Lisheng, Dai R, Wu H, Liu Guozhang: Percutaneous transluminal renal angioplasty in Aortoarteritis. International Journal of Cardiology 1998; 66 suppl 1: 205-211

33) Bali HL, Jain S, Jain A, Sharma BK: Stent supported angioplasty in Takayasu arteritis. International Journal of Cardiology 1998; 66 suppl 1: 213-217

34) Nakabayashi K, Nitadori T, Kamiya Y, Nagasawa T: Atypical Takayasu arteritis: late onset and arthritic manifestations; report of two cases. International Journal of Cardiology 1998; 66 suppl 1: 221-227

35) Moncada G, Kobayashi Y, Kaneko E, Nishiwaki Y, Kishi Y, Numano F. Subclavian steal syndrome secondary to Takayasu arteritis. International Journal of Cardiology 1998; 66 suppl 1: 231-236

6. 抗リン脂質抗体症候群における β 2-GPI ペプチド反応性 T細胞の解析

分担研究者 西村泰治 (熊本大学大学院医学研究科免疫識別学講座)
研究協力者 伊藤裕志 (熊本大学大学院医学研究科免疫識別学講座、
熊本大学医学部第2内科)
松下 祥 (熊本大学大学院医学研究科免疫識別学講座)
戸叶嘉明 (順天堂大学医学部膠原病内科)
満屋裕明 (熊本大学医学部第2内科)
橋本博史 (順天堂大学医学部膠原病内科)

【研究要旨】

抗リン脂質抗体症候群(APS)では、リン脂質と結合して立体構造を変化させた血清蛋白 β 2-GPIに対する、IgGを主とする自己抗体の産生が病因として重要視されている。そこで抗 β 2-GPI I抗体陽性のAPSあるいはSLE患者から、自己抗体の産生に重要と考えられる β 2-GPI Iペプチド反応性CD4+ T細胞株を樹立して解析した。まず β 2-GPIの全体をカバーする40種類のオーバーラッピングペプチドを作製して、患者の末梢血単核細胞を刺激したところ、4名の患者からそれぞれ1種類の β 2-GPIペプチド反応性T細胞株が得られた。3種のT細胞株は第244-264番アミノ酸残基に対応するペプチド (p244-264)に、また1種はp154-174に反応した。さらに、P244-264に反応する3種のT細胞株は、各々DRB1*0403、DRB4*0103、DP拘束性であった。いずれのT細胞株もIL-4、およびIFN- γ を共に産生するTh0細胞であった。

EVIDENCE FOR β 2-GPI PEPTIDE-REACTIVE CD4+ T CELLS IN ANTI- β 2-GPI SEROPOSITIVE PATIENTS WITH ANTI-PHOSPHOLIPID SYNDROME OR SLE

Yasuharu Nishimura¹, Hiroshi Ito^{1,2}, Yoshiaki Tokano³, Hiroaki Mitsuya², Sho Matsushita¹ and Hiroshi Hashimoto³, ¹The Division of Immunogenetics, Department of Neuroscience and Immunology, Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences, ²The Second Department of Internal Medicine, Kumamoto University School of Medicine, ³The Department of Internal Medicine and Rheumatology, School of Medicine, Juntendo University .

In patients with anti-phospholipid syndrome (APS), autoantibodies directed against a serum protein, β 2-GPI, were evidenced. It has been recently reported that these autoantibodies recognizes conformational chan β 2-GPI autoantibodies belongs to IgG isotype and activation of CD4⁺ helper T cells is essential for production of IgG, we investigated CD4⁺ T cells reactive to β 2-GPI-derived peptides in 18 anti- β 2-GPI sero-positive patients with APS or SLE. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients were stimulated in vitro with a mixture of 40 overlapping peptides covering entire sequence of β 2-GPI molecule and four β 2-GPI peptide-reactive T cell lines were generated from four independent patients. Three of them recognized a fragment of β 2 - GPI residues 244-264 (p244-264) in the context of HLA-DRB1*0403, DRB4*0103 or DP molecules respectively. On the other hand, one T cell line recognized β 2-GPI p154-174. Three T cell lines reactive to p244-264 belonged to Th0 to produce both IL-4 and IFN-g in response to irradiated PBMC prepulsed with the peptides. All T cell lines did not respond to β 2-GPI protein purified from human sera suggesting that these T cells are reactive to cryptic self-determinants of β 2-GPI.

Pathogenic significance of these β 2-GPI-reactive T cells is still remained to be investigated by doing comparative study of healthy controls.

【研究目的】

APSにおいて抗リン脂質抗体が認識する自己抗原として血清蛋白の β 2-GPI が知られている[1, 2]。抗 β 2-GPI抗体中にはヘルパーT細胞の活性化を必要とする各クラスの抗体が認められること[3]、さらに、SLE患者において抗 β 2-GPI抗体陽性群は陰性群と比べてHLA-DRB1*0901陽性者の頻度が有意に高いこと[4]から、抗 β 2-GPI抗体の産生には β 2-GPI特異的 $CD4^+$ T細胞の活性化が関与していると推測される。本研究は、APSの病態形成機構の解析に資することを目的として、抗 β 2-GPI抗体陽性のAPSあるいはSLE患者から β 2-GPIペプチド反応性 $CD4^+$ T細胞株を樹立し、T細胞エピトープ、拘束分子およびサイトカイン産生について解析することを目的とした。

【研究方法】

1. 患者：いずれも β 2-GPI依存性抗カルジオリピン自己抗体が陽性のAPSあるいはSLE患者18名（男性4名、女性14名）を対象として、その末梢血単核細胞 (PBMC)を用いた。
2. β 2-GPI ペプチド反応性 T細胞クローンの樹立：326アミノ酸残基から成る β 2-GPIを、21アミノ酸残基長のオーバーラッピングペプチド40種類でカバーするペプチドライブラリーを作製した。これを抗原として患者PBMCを刺激し、ペプチド特異的自己反応性 $CD4^+\alpha\beta$ 細胞に増殖応答を誘導し、さらにペプチドをパルスしX線照射した自己のPBMCとIL-2の共存下に培養して、限界希釈法によりクローンを樹立した。
3. T細胞応答の定量：抗原提示細胞 (APC)としてペプチドをパルスしてX線照射した自己のPBMCを用い、これをT細胞と共に2日間培養し培養上清をサイトカイン測定用に採取した。残った培養系に 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観察した。T細胞培養上清中のサイトカインは、ELISAにより定量した。
4. T細胞が識別する拘束 HLAクラスII分子の同定：上記のT細胞のペプチドに特異的な増殖反応系に、各種の抗HLAクラスII単クローン抗体を添加して増殖応答の阻止を観察した。また、T細胞ドナーが所有するHLAクラスII遺伝子を発現させたマウスL細胞をAPCとして、T細胞の増殖応答の有無を検討することにより、T細胞にペプチドを提示するHLAクラスII分子を同定した。

【結果と考察】

1. β 2-GPI ペプチド反応性 T細胞が認識するエピトープの同定：4名の患者から、それぞれ1種類の β 2-GPIペプチド反応性T細胞株 AK1.2, NT5, KM27およびOAAが得られ、さらに前2株よりT細胞クローンAK2.2.9およびNT5.3.1が得られた。これらのT細胞を刺激に用いたペプチド混合物を構成する個々のペプチド、あるいはCおよびN末端を切断したペプチドと共に培養して増殖応答を調べ、T細胞が認識する最小のペプチドの構造を決定した。その結果、図1に示すようにAK2.2.9、NT5.3.1およびKM27の3種のT細胞は、第244-264番アミノ酸残基に対応するペプチド(p244-264)に、またOAAはp154-174に応答を示すことが明らかになった。

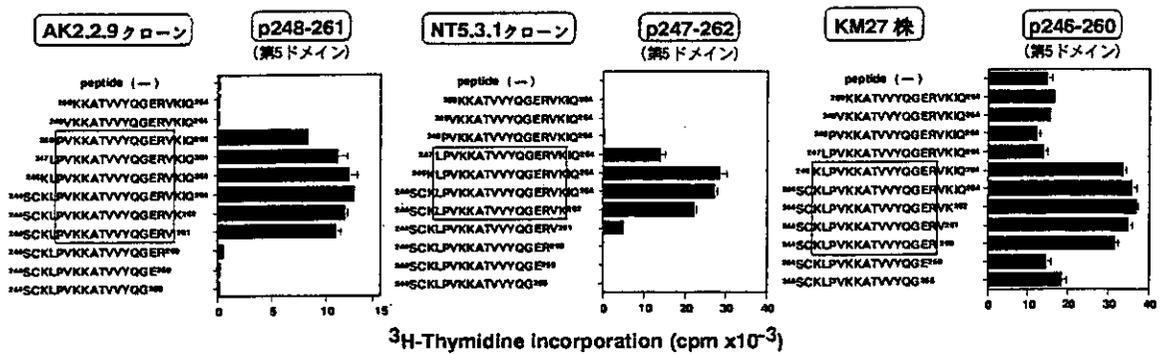


図1. β_2 -GPIペプチド反応性T細胞が認識するコアエピトープの同定

T細胞株あるいはクローンが増殖応答を示した β_2 -GPI由来のペプチドのNあるいはC末端を切断したペプチドを合成し、T細胞が認識可能な最小のペプチド(四角で囲んだ部分)を同定した。KM27には自己のAPCに反応するT細胞が混入しているためペプチド非存在下でも増殖反応が認められる。

2. β_2 -GPI ペプチド反応性 T細胞が産生するサイトカインの解析： AK2.2.9はHLAクラスII・抗原ペプチドを認識した後に、IL-4 1110 pg/ml、IFN- γ 1705 pg/ml (IL-4/IFN- γ = 0.65) を産生した。NT5.3.1はIL-4 915 pg/ml、IFN- γ 1275 pg/ml (IL-4/IFN- γ = 0.72) を、KM27はIL-4 535 pg/ml、IFN- γ 6620 pg/ml (IL-4/IFN- γ = 0.08) を、またOAAはIL-4 165 pg/ml、IFN- γ 489 pg/ml (IL-4/IFN- γ = 0.34) を産生した。いずれのT細胞もHLAクラスII・抗原ペプチドを認識した後に、IL-4、およびIFN- γ を共に産生することよりTh0細胞の性格を有すると考えられた。

3. β_2 -GPI ペプチド反応性 T細胞が認識する拘束分子の解析： 抗HLAクラスII抗体を用いた増殖阻止実験およびL細胞トランスフェクタントを抗原提示細胞とする増殖応答の観察により、P244-264に反応する3種のT細胞株AK1.2, NT5およびKM27は、それぞれDR4 (DRB1*0403)、DR53 (DRB4*0103)、DP拘束性であることが明らかとなった(図2)。

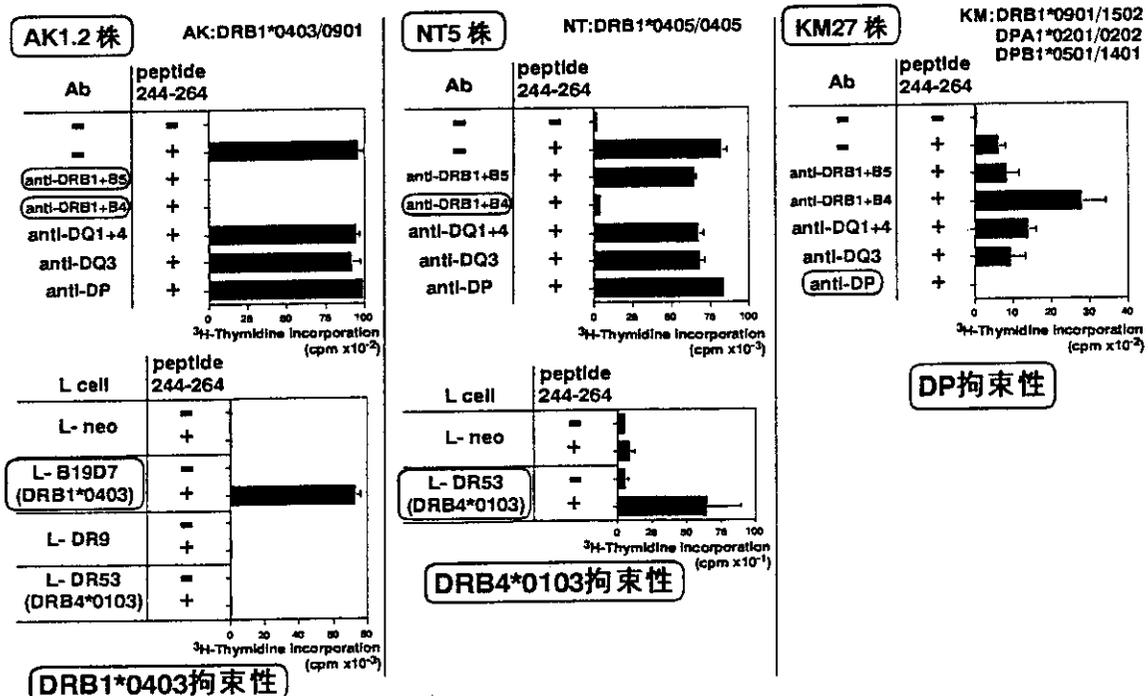


図2. β_2 -GPI反応性T細胞株が認識する拘束HLAクラスII分子の同定

抗HLAクラスII抗体による増殖反応の阻止(パネル上段)およびHLAクラスII分子を発現するマウスL細胞トランスフェクタントを抗原提示細胞として用いて(パネル下段)拘束分子を同定した。

APSは血栓形成を通じて動静脈血栓症や習慣性流産を引き起こす病態である。当初、抗カルジオリピン抗体としてとらえられていた自己抗体が認識するエピトープは、血清中に多く含まれる β_2 -GPI蛋白がリン脂質と結合した際にその立体構造を変化させることにより出現することが明らかとなった[5, 6]。多くの患者においてIgGアイソタイプの抗 β_2 -GPI自己抗体が優勢であり、その産生には免疫グロブリンのアイソタイプスイッチに必須の役割を果たす、抗原刺激により活性化されたCD4⁺ヘルパーT細胞の関与があると考えられる。そこで我々は、抗 β_2 -GPI自己抗体が陽性のACSあるいはSLE患者のPBMC中に、 β_2 -GPI自己反応性T細胞の存在の有無を検討することにした。

今回の研究成果は表1のようにまとめられ、患者のPBMC中にTh0に属する β_2 -GPIペプチド反応性T細胞の存在が明らかとなった。しかも拘束HLAクラスII分子が異なるにもかかわらず、3つの独立したT細胞クローンあるいは株が同じp244-264ペプチドを認識していた点は注目に値する。我々は以前、SLE患者において抗 β_2 -GPI自己抗体が陽性群では、陰性群に比べてHLA-DR9陽性者の頻度が有意に高いことを報告した。したがって、 β_2 -GPIペプチド反応性T細胞の拘束分子は、HLA-DR9ハプロタイプにコードされたHLAクラスII分子ではないかと考えていた。しかし今回調べた4名の患者のうちHLA-DR9陽性の3名において、このような β_2 -GPIペプチド反応性T細胞の存在を認めなかった。この点に関しては、今後とも症例数を増やして検討する必要がある。

表1. 本研究で樹立異したAPSあるいはSLE患者由来の β_2 -GPIペプチド反応性T細胞株あるいはクローンの特徴

	エピトープ (コアエピトープ)	HLAクラスII 拘束分子	Th分類 (IL-4/IFN- γ)	患者の 診断	血清抗 β_2 - GPI抗体#	患者の HLA-DRB1
AK2.2.9 クローン	p244-264 第5ドメイン (p248-261)	DRB1*0403 (DR4)	Th0 (0.65)	APS, SLE	>125	0403/0901
NT5.3.1 クローン	p244-264 第5ドメイン (p247-262)	DRB4*0103 (DR53)	Th0 (0.72)	— (SLEのcriteria 3つ満たす)	11.9	0405/0405
KM27 株	p244-264 第5ドメイン (p246-260)	DP	Th0 (0.08)	SLE	28.8	0901/1502 (DPA1*0201/0202) (DPB1*0501/1401)
OAA 株	p154-174 第3ドメイン (ND)	ND	Th0 (0.34)	APS (SLEのcriteria 2つ満たす)	67.7	0901/1401

単位はU/ml:正常値<3.5

T細胞をペプチドで刺激して得られたT細胞株の場合、ペプチドにのみ反応し、ペプチドが由来する蛋白には反応しないものがあることが知られている。このようなペプチドは、cryptic self peptide と呼ばれ、T細胞は以下の理由により免疫寛容（トレランス）を獲得していない[7]。cryptic self peptide を含む蛋白は、たとえAPCに取り込まれて蛋白分解酵素により分解されてもcryptic self peptideが産生されることはない。したがって、このようなペプチドはT細胞系からはまったく無視された存在となっており、T細胞の免疫寛容（トレランス）も成立していない。しかし、このようなcryptic self peptideに反応性を示しうるT細胞は、通常は生体内でペプチドが産生されることもないから活性化されてことはないため自己免疫疾患の原因となるとは考えにくい。今回、我々が樹立したT細胞株は、血清より精製した

β 2-GPI蛋白には増殖応答を示さなかったため、 β 2-GPI由来のcryptic self peptideを認識している可能性が高い。もし今回同定した自己抗原ペプチドがcryptic self peptideであれば、患者だけではなく健康対照群でもこれに反応する可能性がある。今後これらの点に関して、解析を重ねたうえで今回の研究成果を評価する必要がある。

【結 論】

APSおよびSLE患者18名中4名において、HLAクラスII拘束性に β 2-GPI p154-174あるいはp244-264ペプチドに増殖応答を示すTh0細胞の存在を示した。その病因との関連については、健康対照群の解析を含めて今後の検討を必要とする。

【参考文献】

1. Galli M, Bevers EM. et al Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990;335:1544-1547.
2. McNeil HP, Krilis SA. et al Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that induces a lipid-binding inhibitor of coagulation : β 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:4120-4124.
3. Tsutsumi A, Koike T. et al Antibodies to β 2-glycoprotein I and clinical manifestations in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1996;39:1466-1474.
4. Hashimoto H, Yamanaka K, Tokano Y, Iida N, Takasaki Y, Kabasawa K, and Nishimura, Y. HLA-DRB1 alleles and β 2 glycoprotein I-dependent anticardiolipin antibodies in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Clin.Exp.Rheumatol.* 1998;16: 423-427.
5. Matsuura E, Koike T. et al Heterogeneity of anticardiolipin antibodies defined by the anticardiolipin cofactor. *J.Immunol.* 1996;148:3885-3891.
6. Matsuura E, Koike T. et al Anticardiolipin antibodies recognize beta 2-glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. *J.Exp.Med.* 1994;179:457-462.
7. Gammon G, Sercarz EE and Benichou G. The dominant self and the cryptic self: shaping the autoreactive T-cell repertoire [Review]. *Immunol. Today* 1991;12:193-195.

【研究業績】

1. Chen Y-Z, Lai Z-F, Nishi K, and Nishimura Y. Modulation of calcium response by altered peptide ligands in a human T cell clone. *Eur.J.Immunol.* 1998;28:3929-3939.
2. Fujita H, Senju S, Yokomizo H, Saya H, Ogawa M, Matsushita S, and Nishimura Y. Evidence that HLA class II-restricted human CD4+ T-cells specific to p53 self peptides respond to p53 proteins of both wild and mutant forms. *Eur.J.Immunol.* 1998;28:305-316.
3. Yasukawa M, Ohminami H, Kaneko S, Yakushijin Y, Nishimura Y, Inokuchi K, Miyakuni T, Nakao S, Kishi K, Kubonishi I, Dan K, and Fujita S. CD4+ cytotoxic T-cell clones specific for bcr-abl b3a2 fusion peptide augment colony formation by chronic myelogenous leukemia cells in a b3a2-specific and HLA-DR- restricted manner. *Blood* 1998;92:3355-3361.
4. Ito H, Yamasaki K, Kawano Y, Horiuchi I, Nishimura Y, and Kira J. HLA-DP-associated susceptibility to optico-spinal from of multiple sclerosis in the Japanese. *Tissue Antigens* 1998;52:179-182.
5. Oiso M, Matsushita S, Nishi T, Ishikawa T, Yoshida K, Kikutani H, and Nishimura Y. Differential binding of peptides substituted at a put- ative C-terminal anchor residue to I-

- Ag7 β 56His57Ser and I-Ag7 β 56Pro57Asp. Immunogenetics 1998;47:411-414.
6. Tabata H, Kanai T, Yoshizumi H, Nishiyama S, Fujimoto S, Matsuda I, Yasukawa M, Matsushita, S, and Nishimura Y. Characterization of self-glutamic acid decarboxylase 65-reactive CD4+ T cell clones established from Japanese patients with insulin dependent diabetes mellitus. Human Immunol. 1998;59:549-560.
 7. Fujii S, Senju S, Chen Y-Z, Ando M, Matsushita S, and Nishimura Y. The CLIP-substituted invariant chain efficiently targets an antigenic peptide to HLA class II pathway in L cell. Human Immunol. 1998;59:607-614.
 8. Tanaka Y, Ogawa M, Nishimura Y, and Matsushita S. Efficient induction of human CD4+ T cell lines reactive with a self-K-ras-derived peptide in vitro, using a mAb to CD29. Human Immunol. 1998;52:179-182.
 9. Hashimoto H, Yamanaka K, Tokano Y, Iida N, Takasaki Y, Kabasawa K, and Nishimura, Y. HLA-DRB1 alleles and β 2 glycoprotein I-dependent anticardiolipin antibodies in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. Clin.Exp.Rheumatol. 1998;16:423-427.

7. E-セレクチン遺伝子導入によるラット大動脈への白血球接着の誘導

安河内幸雄 (東京医科歯科大学難治疾患研究所分子遺伝)
吉田 雅幸 (東京医科歯科大学難治疾患研究所分子遺伝)
沼野藤夫 (東京医科歯科大学第三内科)

【研究要旨】 E-セレクチンは血管内皮細胞上に発現する接着分子で、動脈硬化症や急性炎症などの炎症反応における白血球と血管内皮細胞の接着現象に深く関与している¹⁾。臨床的には、虚血再還流障害や動脈硬化症の発症進展に関与しているといわれ²⁾、セレクチンリガンド類似体の投与により、心筋梗塞巣が縮小したという報告もある³⁾。最近我々は、白血球と血管内皮細胞のE-セレクチンを介する接着の過程で、E-セレクチン分子が細胞骨格と結合することを見出し⁴⁾、セレクチンを介するシグナル伝達機構の可能性を示した^{5,6)}。従ってE-セレクチンを介する白血球接着現象の解析は炎症性疾患の病態解明にも重要なテーマである。

E-Selectin overexpressed on rat aortic segment supports neutrophil adhesion under flow

Yukio Yasukochi, Masayuki Yoshida, Fujio Numano*

Department of Molecular Genetics, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental

University, *Department of Medicine, School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University

E-selectin, a member of the Selectin family of adhesion molecules, plays an important role in leukocyte-endothelial (EC) interaction during inflammation and atherosclerosis. To critically examine the role of E-selectin in leukocyte-EC interaction in vascular system, we created a recombinant adenoviral vector contained the human E-selectin and overexpressed in rat aortic segment. A full length of human E-selectin cDNA (Esel) was inserted into a pAdRSV4 shuttle vector and recombinant adenovirus vector was established (AdRSVEsel). A segment of abdominal aorta (approximately 2cm in length) was isolated from male Sprague-Dewey rat (body weight 250-350g) after anesthesia with pentobarbital (20mg/kg). The isolated aortic segment was placed in DMEM containing 10% FBS and ligated on one end. The recombinant adenovirus vector (AdRSVEsel or a control vector, AdRSVLacZ), diluted into PBS was introduced into the aortic segment and a vascular clamp was placed for 24hr. The aortic segment was further incubated for 72hrs. The protein expression of transduced E-selectin from the aortic segment was measured by western blotting analysis using anti-E-selectin mAb. Immunoreactive E-selectin was detected from the aortic segment transduced with AdRSVEsel but not from those transduced with

AdRSVLacZ. Immunohistochemical analysis of these segments also revealed the E-selectin expression on AdRSVEsel transduced aortic segment. The segment was connected to a blood perfusion system and fluorescently labeled human neutrophils (PMN) were perfused in the segment for 15min. Adhered PMN were examined by a scanning electron microscopy. In another experiments, adhered PMN were collected and fluorescence intensity was measured. AdRSVEsel transduced segment supported significantly higher number of PMN adhesion than control segment. These data indicate that human E-selectin transduced in rat aortic segment was able to support PMN adhesion under flow condition. This model will be a powerful tool for the study of E-selectin function in vascular system.

【研究目的】 今回我々は E-セレクトイン遺伝子をラット大動脈へ導入し、E-セレクトインの過剰発現系を確立し、流速存在下での白血球接着現象を観察し、血管レベルでのこの接着因子の機能解析を行った。

【研究方法】 E-セレクトインcDNAをシャトルベクターpADRSV4に組み込み、非増殖型タイプ5 アデノウイルスゲノムとともに293細胞にトランスフェクションし、組み換えアデノウイルスベクター(AdRSVE-sel)を回収し、E-セレクトインの発現を確認し、白血球接着機能を対照アデノベクター (AdRSVLacZ)と比較した。さらに、腎動脈分岐部以下2cmの腹部大動脈をSprague DawleyRat (雄250-350g)より摘出、一端をクランプした後他端よりアデノウイルスベクターを注入し、72時間後にE-セレクトインの発現を免疫組織染色法およびウエスタンブロット法にて確認した。白血球の接着機能は組み換えウイルスベクター導入大動脈片を還流装置に装着し、10分間の白血球の還流を行ったのちに走査型電子顕微鏡および蛍光ラベル白血球をもちいた定量測定法にて検討した。

【結果と考察】 ラット大動脈への導入実験ではウイルスベクター導入後72時間後でAdRSVE-sel導入群にのみE-セレクトイン分子の発現が抗E-セレクトイン抗体を用いたウエスタンブロット法(図1)によって確認された。また、免疫組織染色でもAdRSVE-sel導入ラット大動脈上のE-セレクトイン分子の発現が確認された。次にこのラット大動脈片を還流装置に装着し、ヒト末梢血より抽出した好中球との接着現象を流速存在下で施行し、洗浄固定後に走査型電子顕微鏡によって観察した。図2に示すようにAdRSVE-sel導入ラット大動脈に著明な好中球の接着を認めた。この接着現象を定量化するため、蛍光ラベルした好中球を用いて還流接着実験を行ったところ、AdRSVE-sel導入ラット大動脈への有意な好中球接着が確認された。組み換えアデノウイルスベクターを利用することによって血管内皮E-セレクトインをラット大動脈上に発現させることに成功し、またこの導入されたE-セレクトインが白血球の接着を特異的に誘導することがわかった。

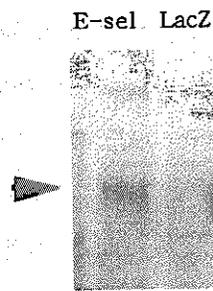


図1 ラット大動脈に対するヒトE-セレクトリン遺伝子導入
(LacZ: 対照ベクター)

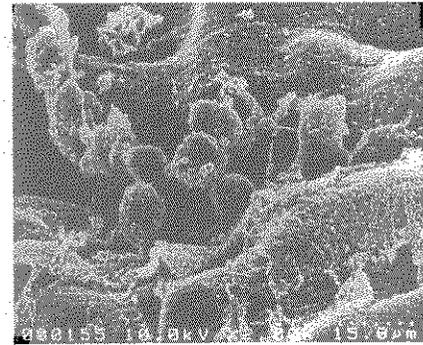


図2 E-selectin 遺伝子導入ラット大動脈に
対する白血球接着の走査電顕像

【結論】 この実験システムの確立によってこれまで血管レベルでの機能解析が困難であった血管内皮E-セレクトリンの白血球接着現象について、すでに報告したシグナル伝達機構を含め詳細にわたり検討することが可能となった。このモデルは急性炎症や動脈硬化症における白血球-内皮細胞間相互作用を研究する上で非常に重要であり、あらたな炎症性疾患の治療法の開発にも役立つものと考えられる。

【参考文献】

- 1) Bevilacqua MP, Nelson RM: Selectins. *J. Clin. Invest.* 91: 379-387, 1993
- 2) Albelda SM, Smith CW, Ward PA: Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J.* 8: 504-512, 1994
- 3) Kilgore KS, Tanhehco EJ, Park JL et al. : Reduction of myocardial infarct size in vivo by carbohydrate-based glycomimetics. *J. Pharm. Exp. Therap.* 284: 427-435, 1998
- 4) Yoshida M, Westlin WF, Wang N et al. : Leukocyte adhesion to vascular endothelium induces E-selectin linkage to the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 133: 445-455, 1996
- 5) Yoshida M, Gimbrone, MA: Novel roles for E-selectin in endothelial-leukocyte adhesion. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 811 493-497, 1997
- 6) Yoshida M., Szente B.E, Kiely J-M, Rosenzweig A., Gimbrone, Jr. M.A Phosphorylation of the cytoplasmic domain of E-selectin is regulated during leukocyte-endothelial adhesion. *J. Immunol.* 161, 933-941, 1998

平成10年度業績一覧

1. Yoshida, M., Szente, B.E., Kiely, J-M., et al. Phosphorylation of the cytoplasmic domain of E-selectin is regulated during leukocyte-endothelial adhesion. *J. Immunol.* 1998; 161: 933-941.
2. Yoshida, M., H. Ishi-i, H., Rosenzweig, A. et al. Overexpression of E-selectin via a recombinant adenovirus vector induces neutrophil adhesion to rat aortic segment under flow. *Circulation Suppl.* 1998; 98: I-241
3. Gerszten, R.E., Yoshida, M., Ding, H. et al. Critical roles for both endothelial and leukocyte adhesion in monocyte recruitment. *Circulation Suppl.* 1998; 98: I-591

8. ノンプロフェッショナル抗原提示細胞である血管内皮細胞における CD80/86 分子の役割

東 みゆき (国立小児病院医療研究センター免疫研究室)

大月 典子 (国立小児病院医療研究センター免疫研究室)

香坂 隆夫 (国立小児病院医療研究センター免疫研究室)

<KEYWORD>血管内皮細胞,T細胞活性化,costimulatory分子,IL-2

[目的] 血管炎を伴う難治性炎症性臓器疾患の発症に関与していると考えられる血管内皮細胞とT細胞上に発現している様々な細胞表面機能分子の役割について検討した。[方法] IFN γ あるいはTNF α 処理によって発現変化するヒト臍帯血管内皮(HUVEC)細胞上のcostimulatory分子を、T細胞増殖反応およびサイトカイン産生阻害実験により同定するとともに、それら分子の役割について詳細な検討を加えた。[結果] サイトカイン刺激HUVECとヒトCD4 T細胞との反応には、HUVEC上のCD58, CD54, CD134L, およびCD80/86の4経路が主に増殖反応に関与しているが、前3分子はIL-2産生増強に働きcostimulatoryな作用を持つが、CD80/86分子はIL-2産生抑制的に働き、アポトーシス抑制による活性化CD4 T細胞の維持に関与している可能性が示された。[結論] Professional 抗原提示細胞(APC)と異なり、CD80/86分子発現が僅かしか誘導されないNon-professional APCであるECにおいて、CD80/86分子はT細胞に対してユニークな役割をしていることが示唆された。

The role of CD80/86 molecules on endothelial cells as non-professional antigen-presenting cells

Azuma Mituki, Otsuki Noriko, Kohsaka Takao

National Children's Medical Research Center, Department of Immunology

[Purpose] We have investigated the roles of multiple cell surface functional molecules involved in the interaction between endothelial cells and T cells, which may contribute to the pathogenesis of intractable vasculitis syndromes. [Methods] We identified the functional costimulatory molecules induced on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) after treatment with IFN γ and/or TNF α by the blocking experiments in T cell proliferation and cytokine production. We further performed the detail investigation for the actual role in T cell activation and regulation. [Results] Four pathways, CD58, CD54, CD134L(OX40L) and CD80/86, on HUVEC are involved in CD4 T cell proliferative responses stimulated with cytokine-activated HUVEC. The former three molecules costimulated IL-2 production and resulted in augmentation of proliferation, while the CD80/86 molecules inhibited

production of IL-2, which regulates apoptosis of activated T cells, and may result in the maintenance of CD4 T cells.[Conclusion] Unlike professional APC, in non-professional APC such as endothelial cells, which fail to express high levels of CD80/86, CD80/86 may possess a unique role in T cell activation.

[目的]

我々は、サイトカインによって活性化されたヒト血管内皮細胞(EC)に発現される細胞表面分子の機能的役割を検討し、CD58, CD54, CD134L(OX40L) および CD80/86の4分子がT細胞反応に機能的に関与していることを昨年度までに明らかにしたが、これら分子群のT細胞反応における機能的関与の相違とその生物学的意義について検討した。

[方法]

1. ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)をIFN γ 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. IFN γ 72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。

[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、IFN γ 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¹⁾。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1)。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2)。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。

[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。この様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。

[結論]

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の様なノンプロフェッショナルAPCがCD4T細胞と反応する際は、CD80/86-CD28経路を介したcostimulatory signalの関与は少なく、CD2-CD58やCD134-CD134L経路によりcostimulatory signalが働いていることが明らかになった。また、この場合、CD80/86はおそらく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された。

[参考文献]

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.

[研究業績]

1. Mogi, S., T. Ebata, Y. Setoguchi, M. Fujime, Y. Heike, T. Kohsaka, H. Yagita, K. Okumura, M. Azuma. 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
2. Saito, K., J. Sakurai, J. Ohata, T. Kohsaka, H. Hashimoto, K. Okumura, R. Abe, M. Azuma. 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
3. Nakazaki, Y., Tani, K., Lin, Z. T., Sumimoto, H., Hibino, H., Tanabe, T., Wu, M., Izawa, K., Takahashi, S., Tojo, A., Azuma, M., Hamada, H., Mulligan, R. C., Mori, S., Asano, S. 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
4. Seko, Y., Takahashi, N., Ishiyama, S., Nishikawa, T., Kasajima, T., Hiroe, M., Suzuki, S., Ishiwata, S., Kawai, S., Azuma, M., Yagita, H., Okumura, K., Yazaki, Y. 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

5. Seko, Y., Takahashi, N., Azuma, M., Yagita, H., Okumura, K., Yazaki, Y. 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
6. Matsumura, R., Umemiya, K., Kagami, M., Tomioka, H., Tanabe, E., Sugiyama, T., Sueishi, M., Nakajima, A., Azuma, M., Okumura, K., Sumida, T. Glandular and extraglandular expression of the Fas-Fas ligand and apoptosis in patients with Sjögren's syndrome. *Clin. J. Rheumatol.* 559-566, 1998
7. Seko, Y., Takahashi, N., Azuma, M., Yagita, H., Okumura, K., Yamazaki, Y. 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
8. Nakajima, A., Kodama, T., S. Morimoto, M. Azuma, K. Takeda, H. Oshima, S. Yoshino, H. Yagita, K. Okumura. Antitumor effect of CD40 ligand: Elicitation of local and systemic antitumor responses by IL-12 and B7. *J. Immunol.* 161: 1901-1907, 1998
9. Matsui, T., Kurokawa, M., Kobata, T., Oki, S., Azuma, M., Tohma, S., Inoue, T., Yamamoto, K., Nishioka, K., Kato, T. Autoantibodies to T cell co-stimulatory molecules in systemic autoimmune diseases. *J. Immunol.*, in press

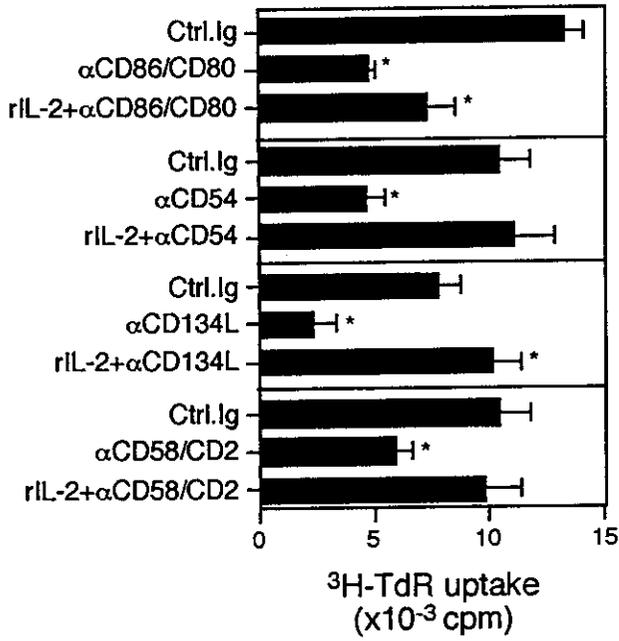


図1 ECに対する表面分子抗体によるCD4+T細胞増殖反応阻害とIL-2添加の影響. SEB(1pg/ml)とIFNg刺激HUVECによって誘導されるCD4+T細胞の増殖反応は、CD80/86、CD54、CD134LおよびCD58+2に対する抗体添加で阻害される。これらの増殖抑制のうち、抗CD80+86抗体によるもののみIL-2添加によって完全に回復されない。

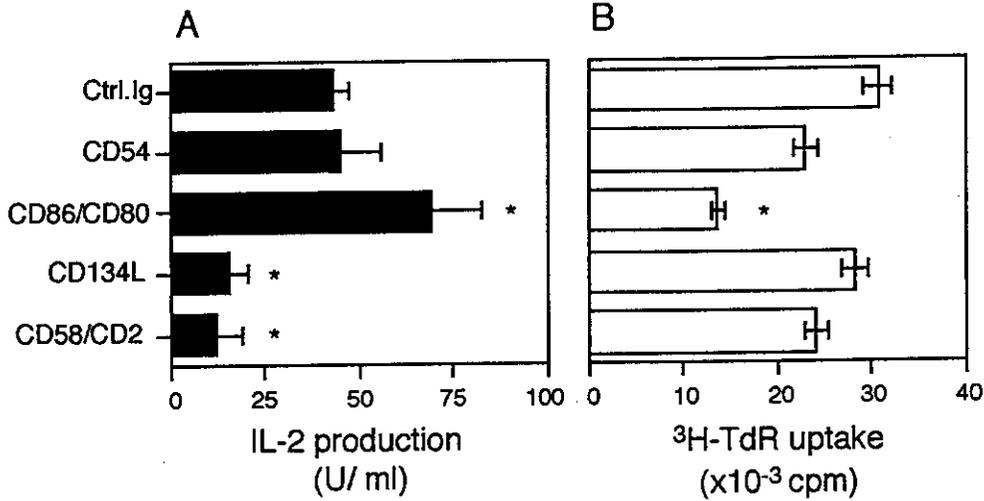


図2 SEB (1ng/ml)とIFNg刺激HUVECによって誘導されるCD4+T細胞によるIL-2産生(A)と増殖反応(B)の対比. 抗CD80+86抗体添加により、増殖反応は抑制されるが、逆にIL-2産生は増強される。

9. 悪性関節リウマチ患者における血清 soluble CD40 ligand 値 についての検討

小林茂人 (順天堂大学医学部膠原病内科)
田村直人 (順天堂大学医学部膠原病内科)
坂東秀明 (順天堂大学医学部膠原病内科)
高崎芳成 (順天堂大学医学部膠原病内科)
橋本博史 (順天堂大学医学部膠原病内科)

KEY WORD=慢性関節リウマチ,悪性関節リウマチ, CD40, CD40 ligand (CD154), soluble CD40 ligand

[研究要旨] 慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) 患者血清中における soluble CD40 ligand (sCD40L) 値を測定し、臨床症状、検査所見など病態との関連を検討した。

悪性関節リウマチ (malignant RA, MRA) 患者 9 名を含む RA 患者 39 名および健常人 20 名における血清中 sCD40L 値を ELISA 法により測定した。関節点数、関節外症状、および臨床的パラメーターを検索し、sCD40L 値との関連を検討した。血清中 sCD40L 値は RA 患者において健常人と比べ高値であり ($p < 0.01$)、RF および IgG-RF 値と有意な相関を認めた (各 $r = 0.64, 0.61$, 両者とも $p < 0.0001$)。また、MRA 患者においては血管炎を伴わない RA と比べ、sCD40L 値は有意に高値を示し ($p < 0.0001$)、陽性例も RA で 30 例中 10 例に対し、MRA は 9 例全例で陽性であった。血清中 sCD40L が血管炎の発症、病態形成に関与している可能性が示唆された。

Analysis of serum levels of soluble CD40 ligand in patients with rheumatoid vasculitis.

Shigeto Kobayashi (Department of Rheumatology and Internal Medicine, Juntendo University), Naoto Tamura (Department of Rheumatology and Internal Medicine, Juntendo University), Hideaki Bando (Department of Rheumatology and Internal Medicine, Juntendo University), Yoshinari Takasaki (Department of Rheumatology and Internal Medicine, Juntendo University), Hiroshi Hashimoto (Department of Rheumatology and Internal Medicine, Juntendo University)

The expression of CD40 ligand (CD40L) on the surface of peripheral and infiltrated T cells into the chronically inflamed synovium in the patients with rheumatoid arthritis (RA) has been recently reported. Another form of CD40L, soluble CD40L (sCD40L), has been identified and demonstrated to be biologically functional. To examine the serum levels of sCD40L in patients with RA, sCD40L was determined by ELISA.

Clinical symptoms and laboratory parameters were simultaneously examined in relation to association of levels of sCD40L.

Serum levels of sCD40L in RA patients (n=39) were significantly higher than those in normal donors (n=20, p<0.01), and statistically correlated with the values of RF and IgG-RF (r=0.64 and 0.61 respectively, both p<0.0001). However, correlation was not found between the levels of sCD40L and total serum IgG levels.

When serum sCD40L levels were compared between patients with and without vasculitis, sCD40L levels were more elevated in rheumatoid vasculitis(RV) than in RA without vasculitis (P<0.0001). Moreover, when normal range was set below the concentration of mean + 3S.D. of normal donors, elevated sCD40L was demonstrated in all nine patients with RV, whereas only 33.3% (10/30) of RA patients without vasculitis were positive for sCD40L.

These results indicate that the possibility that sCD40L might be involved in the development of vasculitis in patient with RA.

[研究目的] 慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) は関節を病変の主座とする全身性の自己免疫性疾患であり、炎症滑膜には CD4 陽性 T 細胞浸潤が認められる。悪性関節リウマチ(malignant RA, MRA)は、RA に関節外症状として、皮膚潰瘍、単神経炎、臓器病変などの血管炎症状を伴う難知性の病態で発症機序は不明である。CD40L (CD154) は主に活性化 CD4 陽性細胞上に一過性に発現し、B 細胞上の CD40 を介し抗体産生、クラススイッチなどの機能をもつ液性免疫における中心的な分子である¹⁾。RA では、末梢血中および関節液中の T 細胞表面上における CD40L の発現が報告されている²⁾。CD40L は活性化 T 細胞より soluble form としても分泌されることが知られており、細胞表面の CD40L と同様に生物学的活性を持つことが報告されている³⁾。今回、MRA を含む RA 患者血清中の sCD40L 値を測定し、病態との関連を検討した。

[研究方法] 悪性関節リウマチ(malignant RA, MRA)患者 9 名を含む RA 患者 39 名および健常人 20 名における血清中 sCD40L 値を測定した。測定はサンドイッチ ELISA 法にて行った。96 穴 ELISA プレートに抗ヒト CD40L モノクローナル抗体 (Anti-CD40L Mab)を固相化し、10 倍希釈した血清を室温で 1 時間反応させ洗浄したのちに、別のエピトープを認識するビオチン化 Anti-CD40L Mab と反応させ、アビジンペルオキシダーゼにて検出した。スタンダードとして、リコンビナント sCD40L を用いた。健常人血清での平均値プラス 3 S.D. 以上を陽性とした。関節点数、関節外症状、および血沈、CRP、血清 IgG、IgM 型リウマチ因子 (RF)、IgG 型 RF (IgG-RF)を検索し、sCD40L 値との関連を検討した。

[結果と考察] 血清中 sCD40L 値は RA 患者において健常人と比べ高値であり ($p < 0.01$, 図 1), RF および IgG-RF 値と有意な相関を認めた (各 $r = 0.64, 0.61$, 両者とも $p < 0.0001$)。血清 IgG 値との相関は認めなかった。関節点数、血沈、CRP との有意な相関は認めなかった。特に sCD40L 高値を示した症例を検索したところ、これらの多くは関節外症状として血管炎を伴う MRA であった。MRA においては血管炎を伴わない RA と比べ、血清 sCD40L 値は有意に高値を示していた ($p < 0.0001$)。陽性例は血管炎なしの RA で 30 例中 10 例 (33.3%) であったのに対し、MRA では 9 例全例 (100%) が陽性であった。全身性血管炎を伴った MRA 患者 1 例において血清 sCD40L 値を経時的に測定したところ、ステロイド治療による病態改善に伴い、sCD40L 値は炎症反応、血管障害を反映する血清トロンボモジュリン値とともに低下を認めた (図 2)。

血管炎は、血管壁の炎症を特徴とし、多彩な臓器症状を呈する疾患の総称で、EC が発症のメカニズムに強く関与していると考えられるがその機序は不明である。MRA は経過が長く関節症状の強い RA に発症し、血清 RF 値と病態が

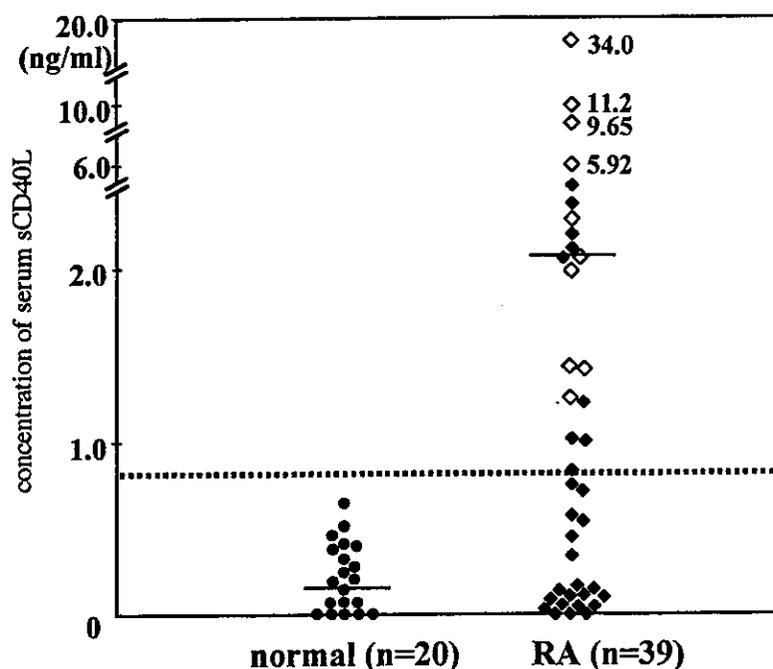


図1. 健常人およびRA患者血清中 sCD40L 値
 平均値±S.D. は 健常人 0.168 ± 0.19 , RA 2.53 ± 5.74 ($p < 0.01$).
 RAの白抜きはMRA, 実線は平均値, 破線はcut off値を示す。

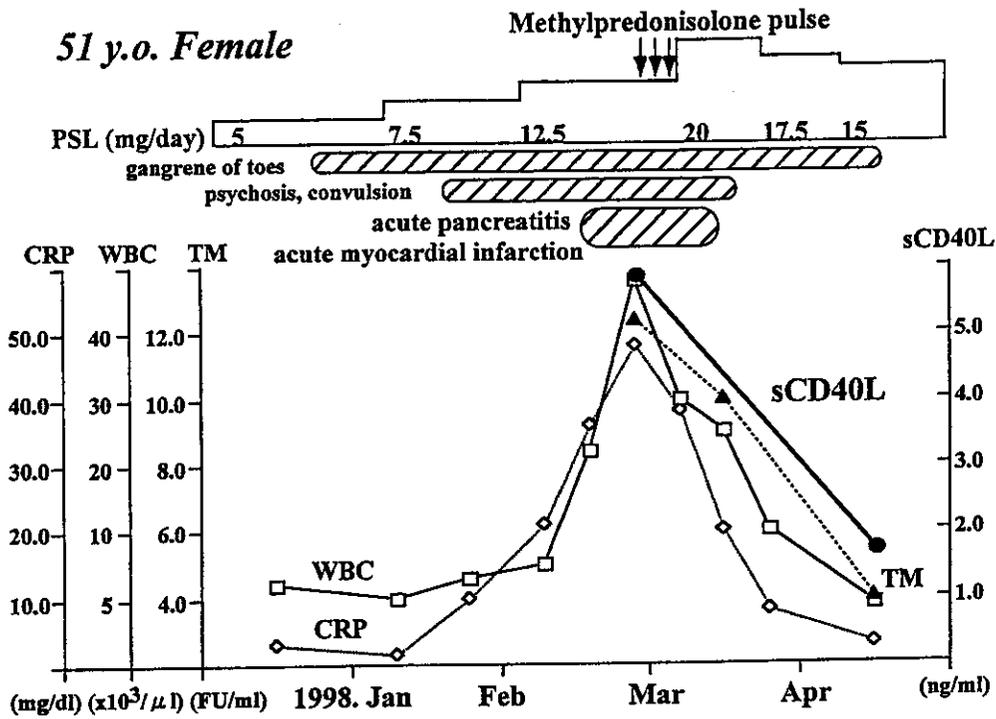


図2. 全身性血管炎を呈したMRA患者における血清sCD40L値の推移. TM:血清トロンボモジュリン.

相関することが知られている⁵⁾。近年、血管内皮細胞(EC)表面上にCD40が発現しており、炎症性サイトカインによって、その発現が増強することが報告された⁴⁾⁶⁾。また、CD40L-CD40からのシグナルでEC上の種々の接着分子の発現が増強し、炎症性サイトカイン、ケモカインの産生が増加することから、局所での炎症の進展に関与していると考えられ、実際に乾癬などの炎症性皮膚疾患ではEC上のCD40の発現の増強が報告されている⁴⁾。さらに、CD40を介し、MMPsの産生亢進や抗凝固に働くトロンボモジュリンの発現低下が起こることが報告されており⁷⁾⁸⁾、基底膜の破壊や微小血栓形成に関与している可能性もある。

一方、CD40Lは抗原刺激を受けた活性化CD4陽性T細胞上に一過性に発現するが、RAでは、末梢血中および関節液中のT細胞におけるCD40Lの発現が報告されている²⁾。さらに最近、CD40Lは*in vitro*で活性化した血小板の膜表面にも発現されることが報告された⁹⁾。sCD40Lは、刺激により細胞内においてfull-length CD40Lからproteolysisにより産生、分泌されると考えられており、native sCD40Lが生物学的活性を持つことから、サイトカイン様の作用を持つことが考えられている³⁾。RA滑膜ではCD4陽性T細胞の多くはCD45RO陽性でさらにCD45RB^{dim}陽性であることから、繰り返し抗原刺激を受けていると考えられ¹⁰⁾、これらの細胞からsCD40Lも産生分泌されていることが示唆される。血管炎を伴うMRA患者において、血清中sCD40Lは血管炎を伴わないRA患者に比し有意に高値であり、RAに伴う血管炎のマーカーとし

て有用である可能性があるとともに、*in vitro* で生物学的活性を持つことから血管炎の発症や病態形成に関与している可能性があると考えられた。

[結論] 血清中 sCD40L が RA における血管炎のマーカーとなるとともに、病態の形成に関与している可能性が示唆された。

[参考文献]

1. Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, et al. The CD40 antigen and its ligand. *Annu. Rev. Immunol.* 1994;12:881-922.
2. MacDonald PAK, Nishioka Y, Lipsky PE, et al. Functional CD40 ligand is expressed by T cells in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 1997;100:2404-2414.
3. Pietravalle F, Lecoanet-Henchoz S, Blasey H, et al. Human native soluble CD40L is a biologically active trimer, processed inside microsomes. *J. Biol. Chem.* 1996;271:5965-5967.
4. Hollenbaugh D, Mischel-Petty N, Edwards CP, et al. Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells. *J. Exp. Med.* 1995;182:33-40.
5. Voskuyl AE, Zwinderman AH, Westedt ML, et al. Factors associated with the development of vasculitis in rheumatoid arthritis : results of a case-control study. *Ann. Rheum. Dis.* 1996;55:190-192.
6. Yellin MJ, Brett J, Baum D, et al. Functional interaction of T cells with endothelial cells : The role of CD40L-CD40-mediated signals. *J. Exp. Med.* 1995;182:1857-1864.
7. Malik N, Greenfield BW, Wahl AF, et al. Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases. *J. Immunol.* 1996;156:3952-3960.
8. Miller DL, Yaron R, Yellin MJ. CD40L-CD40 interactions regulate endothelial cell surface tissue factor and thrombomodulin expression. *J. Leuko. Biol.* 1998;63:373-379.
9. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature.* 1998;391:591-594.
10. Horgan KJ, Tanaka Y, Luce GE, et al. CD45RB expression defines two interconvertible subsets of human CD4+ T cells with memory function. *Eur. J. immunol.* 1994;24:1240-1243.