

注射し、免疫前投与とした。10日後 K2 と CFA のエマルジョンでマウスを免疫し、さらに 10 日後リンパ節よりナイロンウールカラムを用いて T 細胞を回収し、抗原特異的 T 細胞増殖反応を計測した。2) 次に、抗原封入りリポソームの免疫前投与が実際に EAU で有効であるか検討した。方法は免疫 10 日前に無処置、リポソーム単独、K2 封入りリポソーム、および K2 封入りリポソームと抗 CD40 リガンド抗体投与の 4 群にわけそれぞれを皮下注射した。10 日後、K2 と CFA のエマルジョンを四肢の footpad, および tail base に皮下注射して免疫し、百日咳死菌を腹腔内に追加投与した。観察時には塩酸トロピカミドを点眼して散瞳し、隔日、倒像鏡レンズとボンノスコープを用いて眼底を観察した。重症度は NIH の Caspi らの分類に従い、変化のないものを 0、最高を 4 として臨床経過を観察した。3) 次に、この T 細胞増殖反応、および EAU の抑制効果が、T 細胞数の減少によるものか、または T 細胞の反応性の低下に起因するものか検討した。卵白アルブミン由来ペプチド (OVA323-339) 特異的 T 細胞レセプターの遺伝子を導入した、DO11.10 トランスジェニックマウスを用いた。このマウスでは、T 細胞の多くが、OVA323-339 に特異的に反応する。また、この OVA323-339 ペプチドは H-2A<sup>b</sup> に結合するという知見がすでに得られている。さらに、OVA323-339 を認識する TCR をもつ T 細胞は、抗 TCR クロノタイプ抗体 (KJ1.26) で認識されることもすでに判明している 2)。OVA323-339 特異的 TCR トランスジェニックマウス DO11.10 の脾臓から T 細胞を回収した。免疫 14 日前に、KJ1.26, CD4 ダブルポジティブ細胞をナイーブ BALB/c マウスに養子移入したさらに免疫 10 日、7 日、4 日前に、リポソーム単独、OVA323-339 封入りリポソームをそれぞれ皮下注射し、前処置とした。免疫は、OVA323-339 と CFA のエマルジョンで行い、3 日後に KJ1-26 を使用した FACS 解析と、抗原特異的 T 細胞増殖反応解析を行った。

#### [結果]

1) 前処置後もすべての群で、CFA に含まれる PPD に対して、一定の T 細胞増殖反応がみられた。図 1 縦軸は各群の T 細胞反応の値を、PPD に対する T 細胞反応の値で割った、Relative Response として表わす。B10.BR マウスに PBS 単独前投与した群に比べ、抗原 K2 を PBS に溶解して前投与した群

では、T細胞増殖反応は弱いながら抑制された。また、抗原 K2 をリポソームに封入して前投与した群では、PBSに溶解したときよりさらに抑制された。さらにK2封入りポソームと同時に抗 CD40 リガンド抗体投与した群では、より一層 T細胞増殖反応が抑制された（図1）。

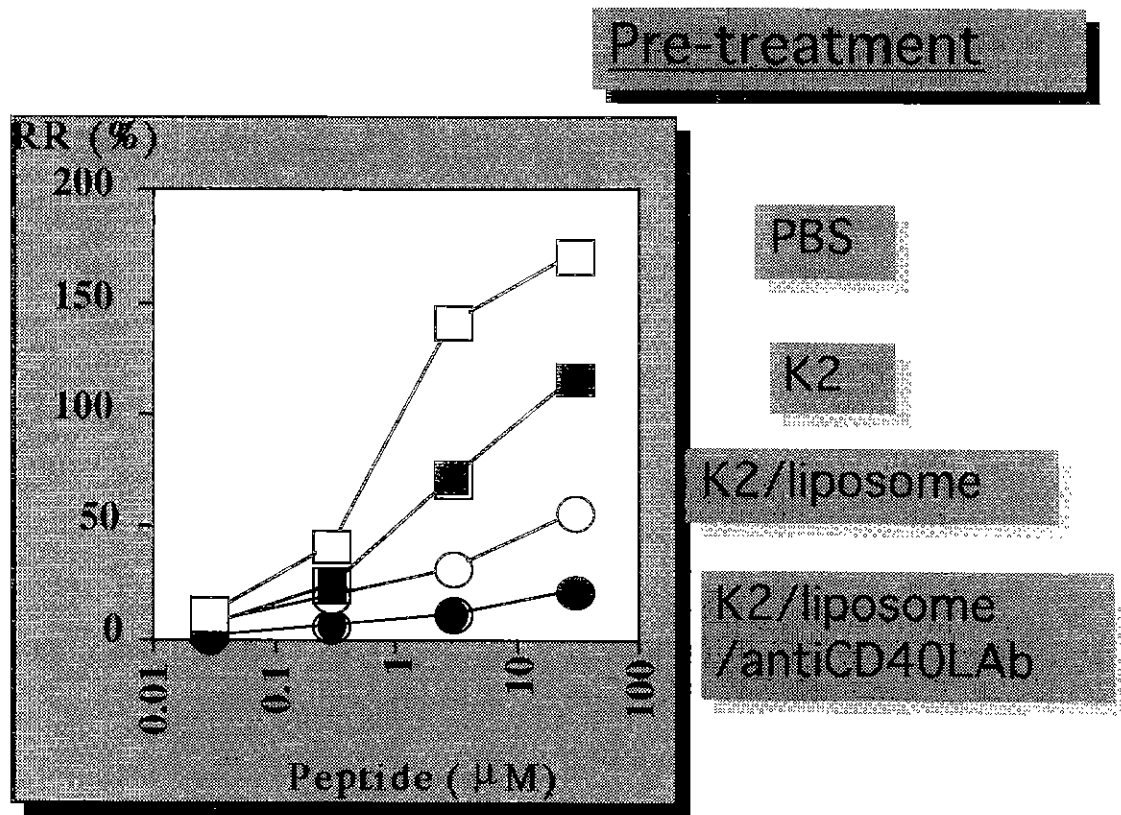


図1 抗原封入りポソーム免疫前投与による、T細胞増殖反応の低下

2)図2に臨床的重症度の経過を示す。無処置群とリポソーム単独処置群は同様の結果であったため今回はリポソーム単独投与群のみコントロールとして左のグラフに示す。コントロール群は全例がEAUを発症し、平均発症日は免疫後22.8日であった。一方、K2封入りポソーム投与群では5匹10眼中、4匹8眼でEAUが発症し、発症したマウスの免疫後発症までの期間は平均30.7日であった。発症までの期間の有意な遷延化と症状の軽症化を認めた。1例、2眼は観察期間内には発症しなかった。また、K2封入りポソームと抗CD40リガンド抗体で処置した群では、3匹4眼にEAUが発

症し、2匹6眼は観察期間内にはEAUは発症しなかった。発症したマウスの免疫後発症までの期間は平均35.5日で、発症までの期間はコントロール群、K2封入りポソーム投与群のいずれに対しても1%未満の危険率で有意に遅延化した。また、K2封入りポソームで処置した群と比較しても臨床的にはEAUの軽症化が認められた。

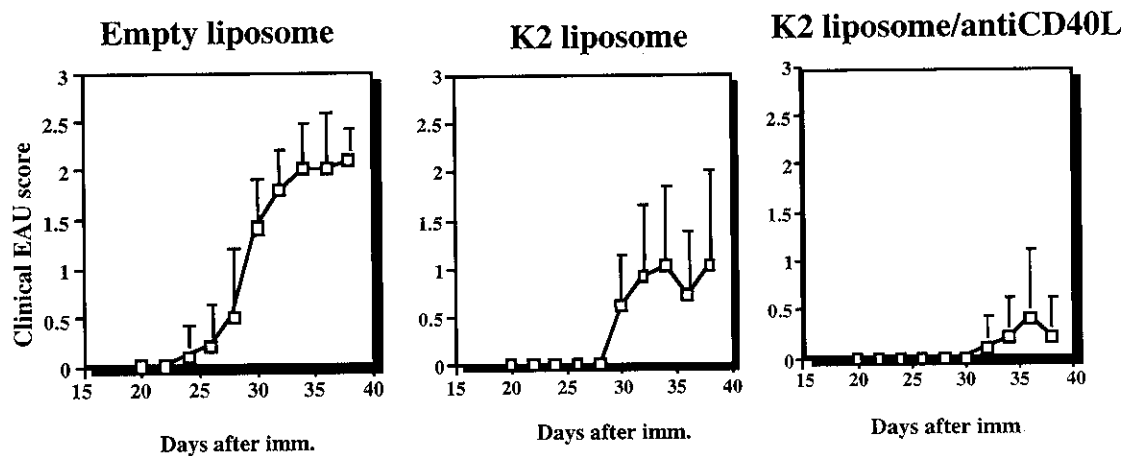


図2 EAUの臨床的重症度の経過

3) 図3にFACS解析とT細胞増殖反応の結果を示す。左はコントロールとしてのリポソーム単独投与群で、右はOVA封入りポソーム投与群を表わす。ナイロンウール処理後の、KJ1-26, CD4ダブルポジティブT細胞の数にはほとんど変化はみられないが、OVA封入りポソーム前処置群では、コントロール群と比較してT細胞全体の反応性が低下していた。

図4に図3で示した結果をKJ1-26, CD4ダブルポジティブT細胞5000個当たりの<sup>3</sup>Hチミチン取り込み量に換算して示す。抗原封入りポソーム投与群ではコントロール群に比べ、T細胞5000個当たりの反応性が低下しており、この処置によりT細胞アナジーが誘導されたと考えられた。

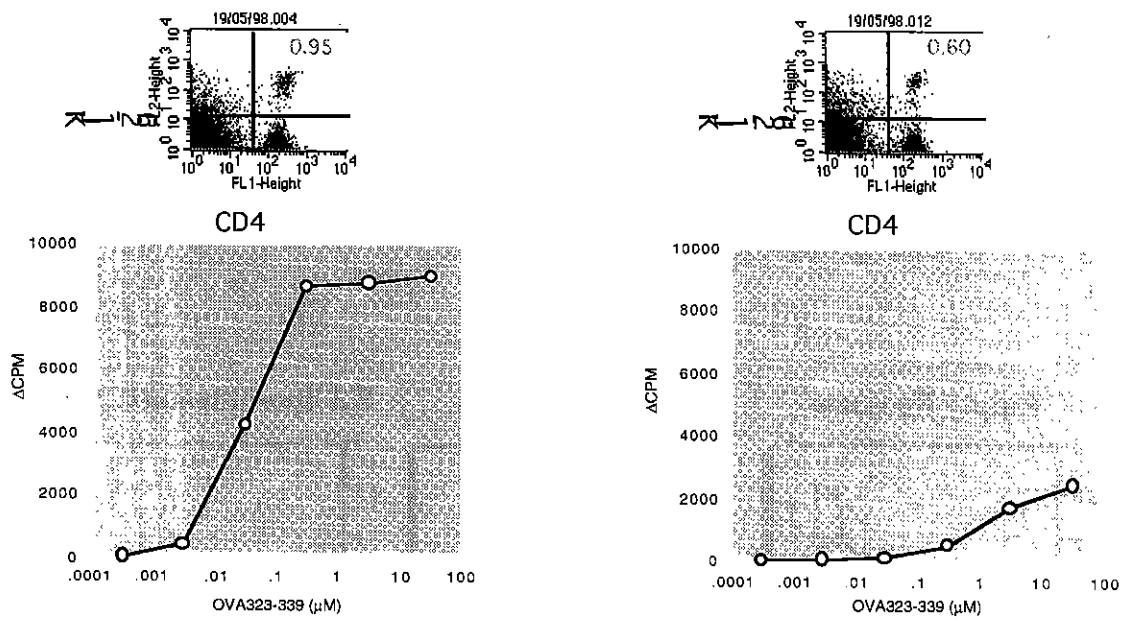


図3 DO11.10 T細胞増殖反応

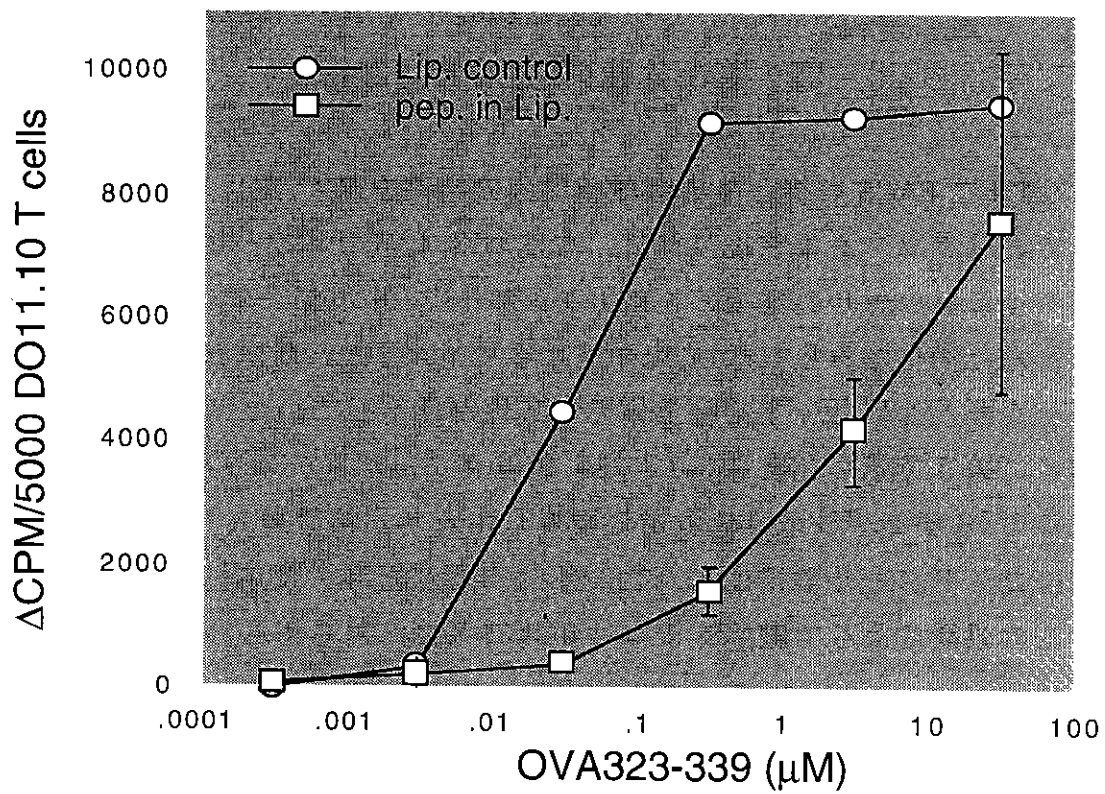


図4 KJ1.26<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T細胞の反応性

[まとめ]

抗原ペプチド封入リポソームを皮下に免疫前投与することにより、ペプチド特異的 T 細胞増殖反応が抑制された。抗原ペプチド封入リポソームと抗 CD40 リガンド抗体を免疫前投与することにより EAU は臨床的に著しく遅延化し、また軽症化した。さらに、その機序としては T 細胞アナジーが最も有力と考えられた。

[参考文献]

- 1) Namba K, Ogasawara K, Kitaichi N, Matsuki N, Takahashi A, Sasamoto Y, Kotake S, Matsuda H, Iwabuchi K, Ohno S, Onoé K : Identification of a peptide inducing experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in H-2<sup>k</sup>-carrying mice. *Clin Exp Immunol* 1998 ; 111 : 442-449.
- 2) Pape KA, Kearney ER, Khoruts A, Mondino A, Merica R, Chen ZM, Ingulli E, White J, Johnson JG, Jenkins MK : Use of adoptive transfer of T-cell-antigen-receptor-transgenic T cells for the study of T-cell activation in vivo. *Immunol Rev* 1997 ; 156 : 67-78.

## ベーチェット病患者血清中における マクロファージ遊走阻止因子の増加

小野江和則 (北海道大学免疫科学研究所,病理部門)  
北市 伸義 (北海道大学医学部,眼科)  
小竹 聡 (北海道大学医学部,眼科)  
笹本 洋一 (北海道大学医学部,眼科)  
西平 順 (北海道大学医学部,中央研究部)  
小笠原一誠 (北海道大学免疫科学研究所,病理部門)

**KEYWORD**=ベーチェット病、患者血清、マクロファージ遊走阻止因子

[目的] マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) は活性化 T 細胞より産生され、局所でのマクロファージ遊走を阻止する物質として報告された、最初のリンフォカインである。近年 MIF 遺伝子がクローニングされ、多彩な生理活性が報告されている。今回我々は、内因性ぶどう膜炎患者血清中における MIF 濃度を ELISA を用いて測定、検討した。[方法] ベーチェット病 24 例、Vogt-小柳-原田病(VKH) 9 例、サルコイドーシス 22 例、健常者 58 例より血清を採取し、MIF 濃度を測定した。[結果] 血清中 MIF 濃度は以下のとおりであった。ベーチェット病  $60.4 \pm 9.0$ 、VKH  $16.5 \pm 2.9$ 、サルコイドーシス  $27.1 \pm 5.6$ 、健常者  $5.4 \pm 0.04$  ng/ml。ぶどう膜炎患者では健常者に比べ、すべての検体で有意に高値であった ( $p < 0.001$ )。とくに活動性ベーチェット病患者と、強いぶどう膜炎をともなうサルコイドーシス患者においては、それぞれ非活動期に比べ高値であった ( $p < 0.05$ )。[考察] ベーチェット病患者血清中において MIF は著明に上昇し、ぶどう膜炎の活動性とも関連がみられた。従って、血清中 MIF 濃度はベーチェット病における臨床経過、病態の把握に有用なパラメーターになり得ると考えられた。高濃度 MIF がぶどう膜炎増強の誘導因子として働くのか、あるいは炎症の結果 MIF が高値となるのかに関して、現在検討中である。

**Prominent increase of macrophage migration inhibitory factor in the sera of patients with Behçet's disease**

Kazunori Onoé (Section of Pathology, Institute of Immunological Science, Hokkaido University), Nobuyoshi Kitaichi (Department of Ophthalmology,

Hokkaido University School of Medicine), Satoshi Kotake, Yoichi Sasamoto (Department of Ophthalmology, Hokkaido University School of Medicine), Jun Nishihira (Central Research Institute, Hokkaido University School of Medicine), Kazumasa Ogasawara (Section of Pathology, Institute of Immunological Science, Hokkaido University)

[PURPOSE] To investigate pathogenesis underlying Behçet's disease, macrophage migration inhibitory factor (MIF) was quantified in sera of patients with various uveitis and healthy donors, and compared among them. [METHODS] Sera were obtained from 55 patients with uveitis (24 with Behçet's disease; 9 with Vogt-Koyanagi-Harada's (VKH) disease; 22 with sarcoidosis) as well as 58 healthy individuals. MIF levels were determined by a human MIF enzyme-linked immunosorbent assay. [RESULTS] The mean MIF levels in the sera of patients with Behçet's disease, VKH disease, sarcoidosis, and healthy controls were  $60.4 \pm 9.0$  (mean  $\pm$  standard error) ng/ml,  $16.5 \pm 2.9$  ng/ml,  $27.1 \pm 5.6$  ng/ml and  $5.4 \pm 0.04$  ng/ml, respectively. The average level of MIF in the sera of each uveitis patients was significantly higher ( $p < 0.0001$ ) than that of healthy controls. Especially, the considerably high levels of MIF were shown in the patients with Behçet's disease at the ocular exacerbation stage. [CONCLUSIONS] Significant increase of MIF in sera was characteristics of uveitis, and MIF may be a useful laboratory parameter to comprehend the clinical course of uveitis including Behçet's disease.

#### [はじめに]

マクロファージ遊走阻止因子(MIF)は活性化 T 細胞より産生され、局所でのマクロファージ遊走を阻止する物質として報告された、最初のリンフォカインである 1)。また、MIF の産生は細胞性免疫に関係があると考えられてきたが、その生物学的役割については長い間不明であった。また、わが国においては、ベーチェット病、サルコイドーシス、Vogt-小柳-原田病は内因性ぶどう膜炎の原因として最も頻度が高く、我々の過去の調査では全ぶどう膜炎患者の約半数を占めている 2)。これらの 3 疾患はいずれも全身性の炎症性疾患で、免疫系の異常が関与していると考えられている。今回、我々は全身疾患に起因する、内因性ぶどう膜炎における、MIF の病理学的役割を検討するため、ぶどう膜炎患者血清中の MIF 濃度を測定した。

#### [対象と方法]

検体はベーチェット病 24 例、Vogt-小柳-原田病 9 例、サルコイドーシス 22 例の患者より採取した。コントロールとして、ほぼ同じ年齢層の 58 例の健常人よ

り血清を採取した。また、採血は全例、北海道大学眼科学教室外来の初回受診時に採取した。また、MIFの濃度はELISAにて測定した。ELISAはヒトMIFで免疫したウサギより得られた抗ヒトMIFポリクローナル抗体を用いており、本学中央研究部と札幌IDLの共同開発したものである3)。

[結果]

図1にそれぞれの検体の血清MIF濃度を示す。白丸は活動期のぶどう膜炎患者を示している。ベーチェット病の活動期と、サルコイドーシス、原田病の重篤なぶどう膜炎を呈している患者がこれに該当する。また、黒丸は活動性の低いぶどう膜炎患者を示している。これらには、非活動期、間欠期のベーチェット病患者と、サルコイドーシスのうちぶどう膜炎が軽度であった患者が該当する。原田病は初回受診時であるため、全例が活動性のぶどう膜炎の患者であった。患者血清中MIF濃度の平均は、ベーチェット病  $60.4 \pm 9.0$ 、VKH  $16.5 \pm 2.9$ 、サルコイドーシス  $27.1 \pm 5.6$ 、健常者  $5.4 \pm 0.04$  ng/mlであった。

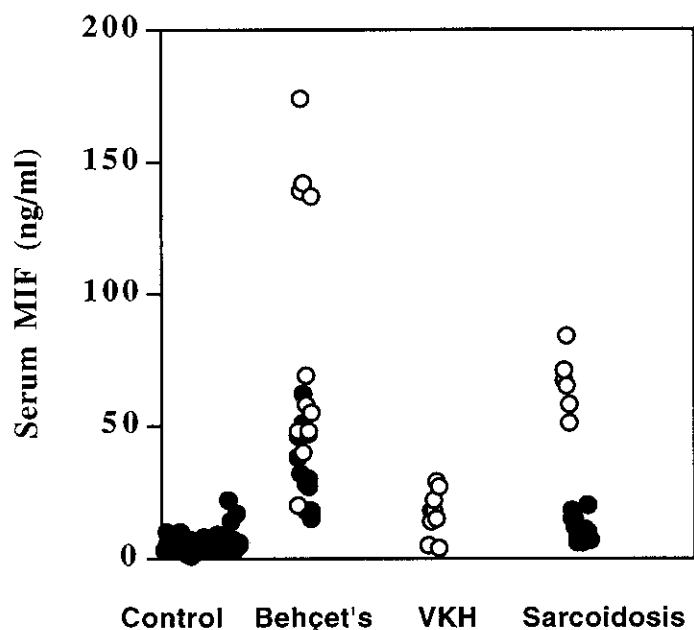


図1 ベーチェット病、原田病、サルコイドーシス患者、および健常者血清中MIF濃度。○：活動性ぶどう膜炎患者。活動期ベーチェット病患者、および、強いぶどう膜炎をともなう原田病、サルコイドーシス患者をしめす。●：非活動性ぶどう膜炎患者。非活動期ベーチェット病患者、および軽度のぶどう膜炎をともなうサルコイドーシス患者を示す。



これらぶどう膜炎3疾患の平均血清中 MIF 濃度はいずれも、健常コントロールに比べて Mann-Whitney U test にて有意に高値を示した。さらに、ぶどう膜炎患者でも、ベーチェット病患者血清中 MIF 濃度はサルコイドーシスや原田病に比べ、有意に高値を示した。また、ベーチェット病ではぶどう膜炎が非活動性であっても MIF が高値を示す場合が多くみられた (図 1)。

つぎに、ぶどう膜炎の活動性と、血清中 MIF 濃度との関係を検討した。ベーチェット病の患者中、活動性ぶどう膜炎を有する場合の MIF 濃度は 80.9ng/ml であり、非活動性ぶどう膜炎ベーチェット病の患者の MIF 濃度の 39.9ng/ml に比べ、有意に高値を示した。また、サルコイドーシスにおいてもぶどう膜炎重症例では 63.3ng/ml で、ぶどう膜炎軽症例の 10.3ng/ml に比べ有意に高値を示した (表 1)。

Disease	Stage	No. of samples	Serum MIF (ng/ml)		Median (ng/ml)
			Mean	± S.E.	
Sarcoidosis	Severe	7	63.3	±11.9*	57.2
	Mild	15	10.3	± 4.4	8.3
Behcet's	Exacerbation	12	80.9	± 15.4**	57.1
	Convalescent	12	39.9	± 4.1	30.1
Control		58	5.37	± 0.045	4.5

\*p<0.0001, compared with mild sarcoidosis, \*\*p<0.005, compared with convalescent Behçet's disease (Mann-Whitney U test)

表 1 サルコイドーシス、ベーチェット病患者血清中 MIF 濃度

図 2 に、ベーチェット病患者のうち 4 例について、個々の症例の眼病変の状態と、血清中 MIF 濃度との関係を示した。今回調査した 4 例とも、ぶどう膜炎の活動期で血清 MIF 濃度が高く、両側 t 検定では 5%未満の危険率で有意差がみられた。このように、活動期に MIF 濃度が上昇する理由の一つとして、活動期のベーチェット病やサルコイドーシスでは全身性に重篤で広範な血管炎をおこすことが多く、血管構造が破壊されることが考えられる。血管内皮は MIF を多量に含有しており、その MIF が血中に放出されていると想定される。また、全身性のアトピー性皮膚炎でも活動性と血中 MIF 濃度が相関しているとの報告もあり 4)、この場合も血管内皮の広範な破壊が一つの原因としては考えられる。しかしながら、全身の血管炎と眼科的ぶどう膜炎は必ずしも同時期に起きるとは限らず、眼球内での MIF の産生が血清中の MIF 濃度に反映されている可能性

も否定できない。

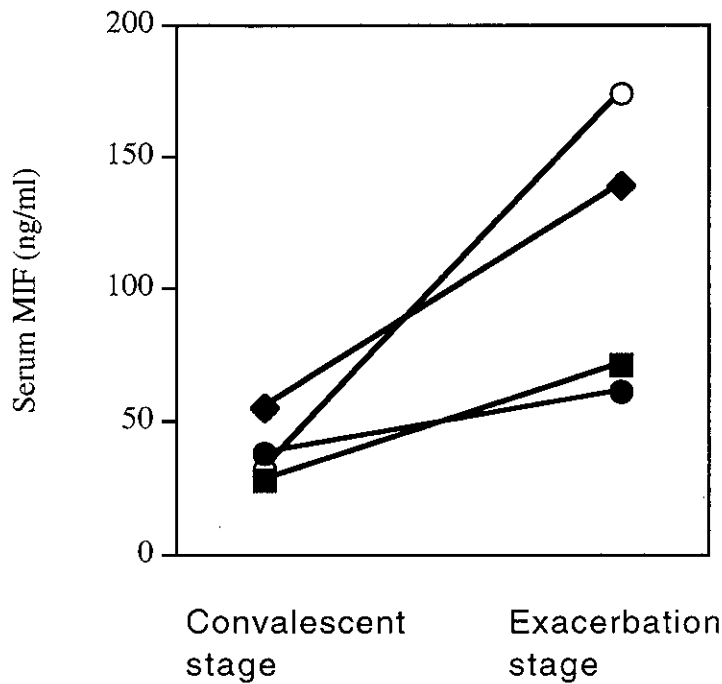


図2 ベーチェット病患者4例における、ぶどう膜炎の活動性と血清中 MIF 濃度の関係

[考案]

今回の調査で、我々はわが国における、3大ぶどう膜炎疾患では血清中 MIF 濃度が上昇していることを示した。また、ベーチェット病ではサルコイドーシスや原田病と比較して、血清 MIF 濃度は高値を示していた。さらに、ベーチェット病では非活動期においても、MIF が高値であった。これらのことから、ベーチェット病の病態形成においては、他の疾患以上に MIF が重要な役割を果たしている可能性が考えられた。いずれにしても、MIF はベーチェット病を含むぶどう膜炎疾患において、今後、診断、活動病期判定の有用なパラメーターになり得ると考えられる。また、MIF はこれまでの報告でも、炎症のごく初期から他の炎症性サイトカインにさきがけて上昇することが知られており、炎症の場で何らかの重要な役割を担っていると考えられている。さらに MIF は炎症性サイトカインとしての働き以外にも、細胞の分化、成長への関与や、酵素活性までも有することが徐々に明らかになってきている。今後、ぶどう膜炎におい

でも MIF のさまざまな役割を念頭にいれながら検討し、主な MIF の産生源がどこにあるのか、また、眼病変の形成に MIF がどのように関わっているのかについて研究が必要と考えている。

[参考文献]

- 1) Bloom BR, Bennett B : Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* 1966 ; 153 : 80-82.
- 2) Kotake S, Furudate N, Sasamoto Y, Yoshikawa K, Goda C, Matsuda H : Characteristics of endogenous uveitis in Hokkaido, Japan. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1996 ; 234 : 599-603.
- 3) Kitaichi N, Kotake S, Sasamoto Y, Namba K, Matsuda A, Ogasawara K, Onoé K, Matsuda H, Nishihira J : Prominent increase of macrophage migration inhibitory factor in the sera of uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999 ; 40 : 247-250.
- 4) Shimizu T, Abe R, Ohkawara A, Mizue Y, Nishihira J : Macrophage migration inhibitory factor is an essential immunoregulatory cytokine in atopic dermatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 ; 240 : 173-178.

## ベーチェット病モデルトランスジェニックマウス開発の試み

木村 穰	東海大学医学部,分子生命科学2
末水 洋志	東海大学医学部,分子生命科学2
後藤 香織	横浜市立大学医学部,眼科
矢吹 和朗	横浜市立大学医学部,眼科
木村 孝博	横浜市立大学医学部,眼科
野村 英一	横浜市立大学医学部,眼科
佐藤 正宏	東海大学総合医学研究所分子医学医療研究センター分子発生科学部門

<KEYWORD> ベーチェット病, トランスジェニックマウス, 疾患モデル動物, HLA-B, MICA, MICB

[目的] ベーチェット病疾患感受性遺伝子の候補と考えられた *MICA* 及び *MICB* 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (Tg) を作製し, 遺伝子の機能と発症機構の解明を目的とした. また HLA-B51 Tg も導入した. [方法] *MICA* 及び *MICB* cDNA を強力かつ全身の細胞での発現を促すプロモーター系の下流に連結させたミニ遺伝子 CAG-*MICA*, CAG-*MICB* を作成し, 顕微受精した. また, 抗 *MICA* 抗体作成のため CAG-*MICA* 遺伝子導入細胞をマウスに免疫した. [結果] CAG-*MICA* F<sub>0</sub> は 107 匹離乳し, 12 匹は PCR 法で遺伝子導入を確認した. うち 4 匹は genomic Southern 法を行い, 3 匹が Tg と判定された. 表現型の変化は今のところ見られない. CAG-*MICB* F<sub>0</sub> は 58 匹の離乳し, 27 匹のマウスは Tg であった. 27 匹の Tg マウスの内, 12 匹は, RT-PCR で *MICB* mRNA の発現が確認された. 皮膚の角化異常が一部の F<sub>1</sub> でみられた. *MICB* mRNA 発現群では非発現群に比べ, 有意にその体重の減少, 及び白血球の増加した. 被免疫マウス血清で Immunoblot 法で抗体価が上昇した. [まとめ] (1) *MICB* の過剰発現でマウスの低体重と白血球増多が起こった. (2) また, 皮膚の角化異常を起こす可能性が示唆された. (3) *MICA* Tg の作成に成功した. (4) 抗 *MICA* ポリクロナール抗体を得た.

### An attempt to construct transgenic mouse models for human Behcet's disease

Kimura Minoru, Tokai University, School of Medicine, Department of Genetic Information,  
Suemizu Hiroshi, Tokai University, School of Medicine, Department of Genetic Information,  
Gotoh Kaori, Yokohama City University School of Medicine, Department of Ophthalmology  
Yabuki Kazuro, Yokohama City University School of Medicine, Department of Ophthalmology  
Kimura Takahiro, Yokohama City University School of Medicine Department of Ophthalmology  
Nomura Eiichi, Yokohama City University School of Medicine, Department of Ophthalmology

Sato Masahiro, The Institute of Medical Sciences, Department of Molecular and Developmental Sciences

[Purpose]

The aims of this study were 1) to produce transgenic mice (Tg) carrying *MICA* (MHC class I chain-related gene A) or *MICB* (MHC class I chain-related gene B), both are thought to be candidate genes that cause human Behcet's disease, 2) to examine the mechanism of pathogenesis of this disease using these Tg mice.

[Method]

*MICA* and *MICB* minigenes were constructed by placing a human *MICA* cDNA or a human *MICB* cDNA downstream of the cytomegalovirus enhancer/chicken  $\beta$ -actin promoter, which confers strong and ubiquitous expression of a target cDNA in vivo. These minigenes were then microinjected into mouse fertilized eggs with B6C3F1 x B6 genetic background. We also made a *MICA*-transfected mouse myeloma cell line, derived from NS1, to prepare anti human *MICA* antibody. The *MICA*-expressing NS1 cells were used to immunize mice.

[Results]

1) In the case of CAG-*MICA* minigene, a total of 107 newborn mice were obtained, and 12 of 107 were judged to be *MICA* positive, based on the result of a polymerase chain reaction (PCR) analysis. 4 of these PCR positive mice were also subjected to a genomic southern analysis, and 3 out of 4 were confirmed to be transgenic. We have obtained more than 101 F1 mice to date, but only 5 of them were PCR positive. Transmission rate of the *MICA* gene is low, particularly when F0 is male. We have not observed any phenotype change. We plan to examine whether these mice express *MICA* mRNA. 2) In the case of CAG-*MICB* minigene, a total of 58 newborn mice were obtained. 27 mice out of 58 are transgenic, and 12 of the 27 Tg mice express human

*MICB* mRNA was expressed at variable levels, as shown by a RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) analysis. The mice that express the *MICB* transgene displayed retarded growth, and the numbers of leukocytes of them were increased. We examined keratosis of the skin at the age of 1 to 2 weeks in one of these strains, and found significant thickening of stratum corneum and corium. This phenotype was transmitted to F2. 3) With our newly prepared anti *MICA* antibody, we detected a 68-70kDa protein by an immunoblot analysis. The size of the observed protein is consistent with a previous published observation.

[Conclusion]

Our finding that the mouse *MICA* and *MICB* genes are evolutionary conserved suggests that they may play an important role in the development, growth and maintenance in mammals. Additionally, we have obtained an anti human *MICA* antibody, which will greatly facilitate our future studies.

## 【はじめに】

ベーチェット病は従来より HLA-B51 抗原との相関が知られており、*HLA-B51* 遺伝子あるいはその近傍に位置するある特定の遺伝的背景のもとに本病が発症すると考えられる。他の班員らとの共同研究により、*HLA-B* 遺伝子を含む HLA クラス I 遺伝子領域内の大規模塩基配列決定を行った結果、*MICA* (MHC class I chain-related gene A) 遺伝子、*MICB* (MHC class I chain-related gene B) 遺伝子の存在位置を特定した (Bahram *et al.*, 1996a; 1996b, Mizuki *et al.*, 1997)。両者は、共通の祖先遺伝子から発したと考えられる。

*MICA* は、その mRNA サイズが約 1.4 kb で、43 kDa 分子をコードし、その中には膜貫通領域や  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  等の様々なドメインを有し、HLA クラス I 抗原とのアミノ酸の相同性は低い、タンパク質の三次元構造は HLA クラス I 抗原と酷似する。その分子にはペプチド結合部位、T 細胞認識部位があると想像される (Bahram *et al.*, 1994)。また、膜貫通領域には遺伝的多型を示す部位が存在し、*MICA* 遺伝子の特定のアレルがベーチェット病発症と密接な関係があるのではないかと推察されている (Mizuki *et al.*, 1997)。一方、*MICB* は mRNA サイズが約 2.4 kb であるが、383 個のアミノ酸をコードし、*MICA* との相同性は高い (83%)。 *MICA* mRNA と *MICB* mRNA の長さの違いは、*MICB* の 3' 非翻訳領域が *MICA* のそれよりも大きいことによる (Bahram, S. and Spies, T., 1996)。

我々は *MICA* あるいは *MICB* の過剰発現がベーチェット病発症に関係すると考え、transgenic (Tg) マウス作製手法を用い、マウス組織内に *MICA* あるいは *MICB* タンパク質を構成的に過剰発現させる系を考えた。この Tg マウスでは、*MICA* あるいは *MICB* を大量に発現しているため、外からの抗原性誘発物質 (ペプチド等) に反応しやすくなっていると思われる。そこで、我々は、ヒト *MICA* cDNA (1.3 kb) 及びヒト *MICB* cDNA (2.4 kb) を Dr. Bahram (Basel Institute for Immunology, スイス) から入手し、これらを構成的に発現させるために cytomegalovirus enhancer/chicken-actin promoter 系 (CAG と称する) の下流 (Miyazaki *et al.*, 1989) に連結した遺伝子構築体を作製した。これら遺伝子構築体 (それぞれ、CAG-*MICA* 及び CAG-*MICB* と称する) をマウス受精卵に導入することにより、*MICA* Tg マウス及び *MICB* Tg マウスを作製し、これらマウスにおいて *MICA* 及び *MICB* 遺伝子が生体内でどのような機能を担うのかを探り、且つベーチェット病モデルマウスを作製することを目標とした。

また遺伝子の機能解析に必要となる抗 *MICA* 抗体をすることとした。同時に GFP (Green Fluoro Protein) を結合させた CAG-*MICA*-GFP 遺伝子を作成し *MICA* 蛋白質の細胞内局在解析に役立てることとした。

## 【対象と方法】

### a. 材料

ヒト *MICA* cDNA 及びヒト *MICB* cDNA を Dr. Bahram (Basel Institute for Immunology, スイス) から入手し、これらを構成的に発現する CAG promoter 系の下流に連結した遺伝子構築体 (CAG-*MICA* 及び CAG-*MICB*) を作製し (図 1)、これらをマウス受精卵への

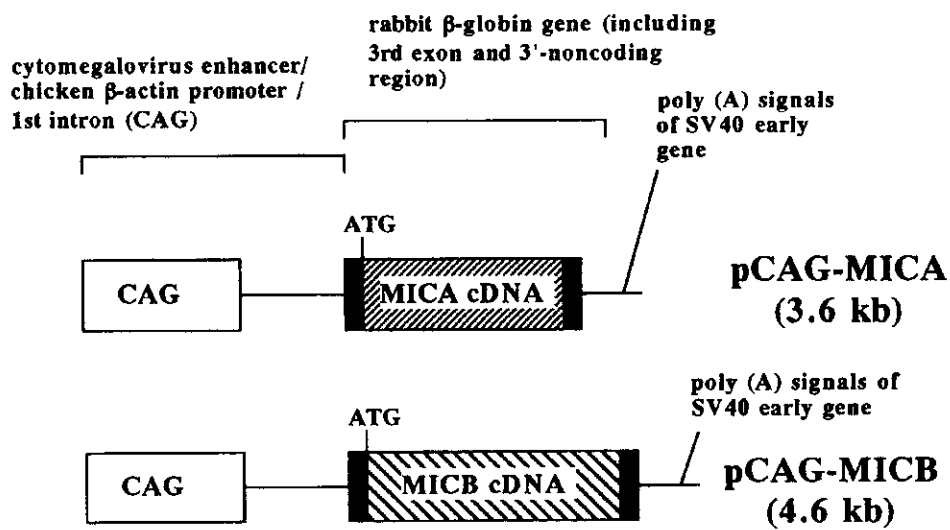


図1 human MICA 及び MICB cDNA 発現用 transgene の構築

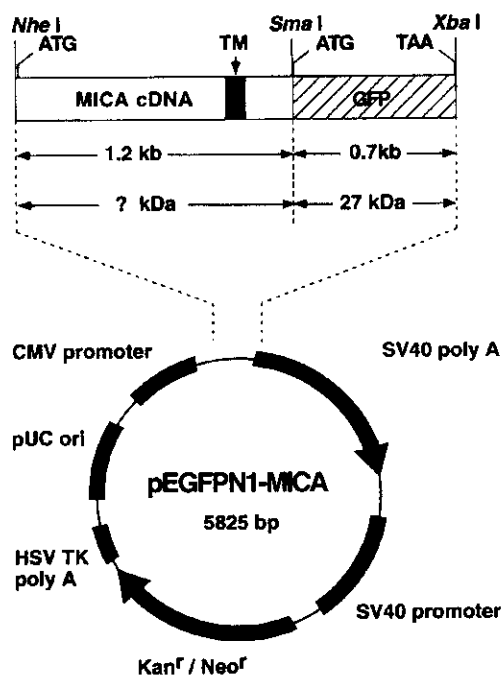


図2 MICA - GFP 融合蛋白の発現  
(ベクターの構築)

導入遺伝子として用いた。

#### b.方法

マウス受精卵への遺伝子導入法は、定法である顕微注入法を用いた。得られたマウスが外来性遺伝子を有しているかどうかの判定は、尾 DNA の genomic Southern 法(MICA Tg, MICB Tg)及び PCR-Southern 法(MICB Tg)で決定した。組織における外来性遺伝子の発現の有無は、RT-PCR 法,及び Northern 法にて決定した。この解析から、発現の高いマウス系統を選別する。この系統の維持を図る(受精卵の凍結保存も含まれる)と同時に、表現型の変化の観察(特に体重の推移、血液内細胞成分の変化、皮膚の変化、外性器の変化、眼の変化及び炎症の発症等を中心に)を行った。

抗 MICA 抗体を得るため、ヒト MICA cDNA を組み込んだ発現ベクター(pCAGGS-MICA)をマウスミエローマ(NS1)細胞にリポフェクション法で遺伝子導入し、ネオマイシン耐性細胞をクローン化した。得られた細胞を 4%パラフォルムアルデヒドで固定しマウスに免疫した。抗体価の上昇を Immunoblot 法で確認した。

MDCK 細胞(dog kidney)は特定の培養条件下で極性を持った構築をとるが、この細胞を用いることで腸管上皮のような極性のある組織における MICA タンパク質の局在を知ることができるのではないかと考えた。MICA cDNA を GFP 遺伝子の upstream に組み込んだ pEGFPN1-MICA (図 2) を MDCK 細胞に遺伝子導入し、MICA-GFP 蛋白質を蛍光顕微鏡で観察した。

#### [結果]

##### (1)CAG-MICA Tg 及び CAG-MICB Tg マウスの作成とその解析

CAG-MICA 新生仔 F<sub>0</sub>として合計 107 匹の離乳マウスを得た。そのうち 12 匹(♂5 匹♀7 匹)は MICA cDNA 内に検出領域を設定した PCR 法で陽性と判定された。(図 3) そのうち 4 匹については MICA cDNA をプローブとした genomic Southern 法を行い、3 匹が Tg と判定された。(図 4)PCR 法で陽性となった F<sub>0</sub>を C57/B6 と戻し交配し F<sub>1</sub>を作製した。101 匹以上の F<sub>1</sub>が産出されたが CAG-MICA の伝達率はプロモーターの影響のためか特に雄由来の場合悪いようである。現在 F<sub>0</sub>,F<sub>1</sub>共に RNA 発現解析を行い系統確立を目指している。また表現型の変化、臨床症状様所見は今のところ見られていない。なお、導入遺伝子を再度全長にわたってシーケンスしたところ MICA cDNA のアレルは A019 と判明した。

CAG-MICB 新生仔 F<sub>0</sub>として、合計 58 匹の離乳マウスを得た。この内、27 匹のマウスは Tg であった。27 匹の Tg マウスの内、12 匹は、ヒト MICB mRNA を発現することがマウス尾より抽出した RNA を用いた RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 解析から判明した。Northern 解析では皮膚、腎臓などで強く発現がみられた。

(図 5) ヒト MICB mRNA 発現群 (1 系統) では、非発現群 (non-Tg を含む) に比べ、有意にその体重の減少、及び白血球の増加が認められた。(図 6.7) また生後 1~2 週の間



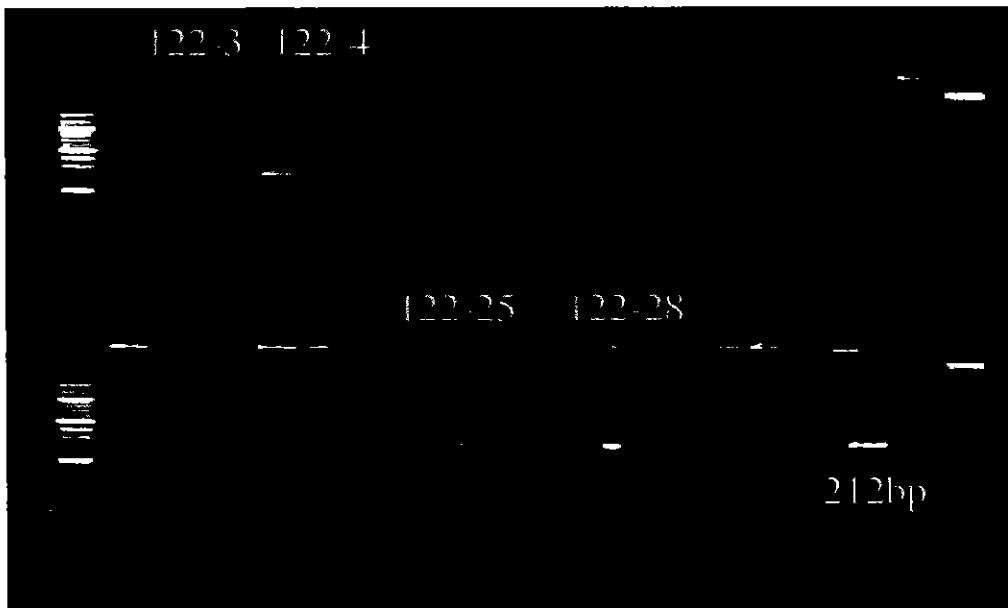


図3 MICA Transgenic mouse PCR の一部  
MICA cDNA の  $\alpha 1$  領域に 212bp の検出領域を設定し PCR 法を行った。

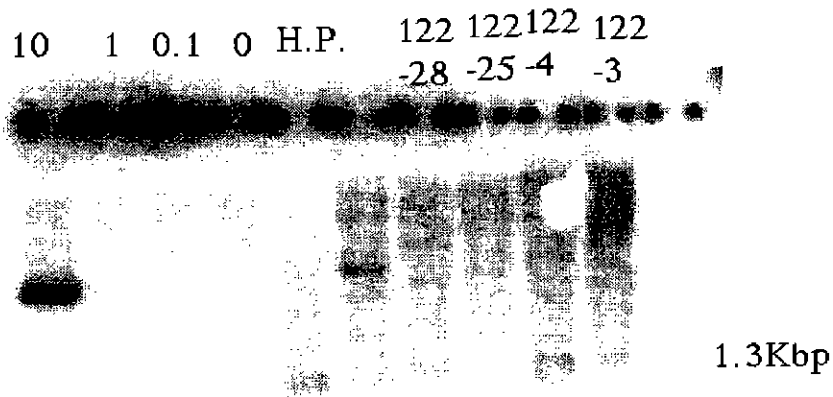


図4 MICA Transgenic mouse の genomic southern 法による解析  
尾から抽出した DNA を *EcoR I* で切断後電気泳動し、pCAGGS-MICA を  
プローブとして hybridization した。122-3,4,28 で期待される 1.3Kbp の  
バンドが検出された。

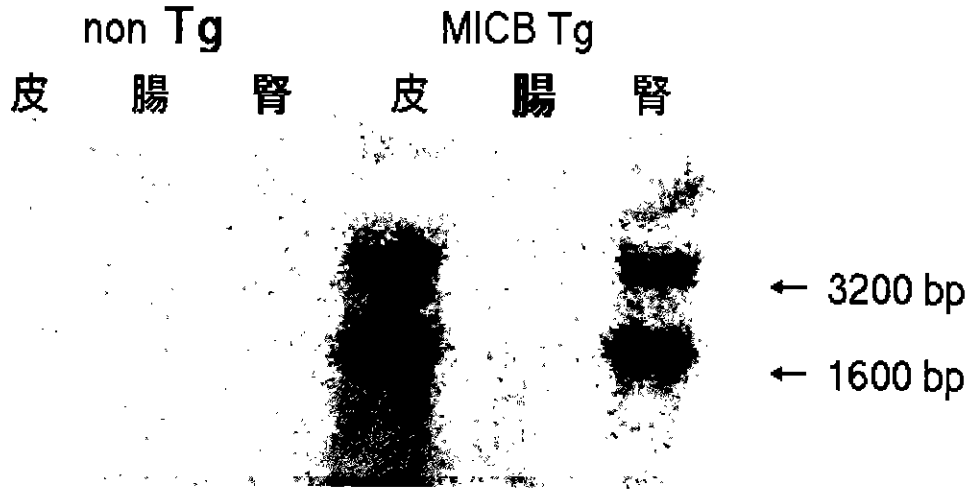


図5 MICB transgenic mouse Northern hybridization

生後 1 週で全身の皮膚に角化異常のみられた MICB T の皮膚，腸管，腎臓に対して行った。腸管は検体採取時に RNA が傷んだためか量は少ないが基本的にはどの臓器でも発現が確認された。

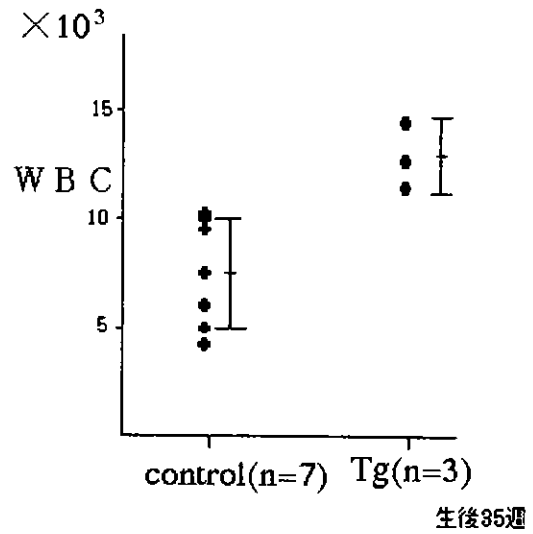
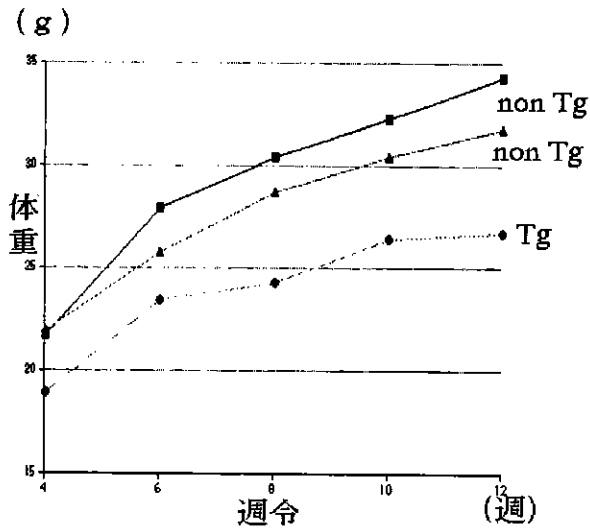


図6 MICA 07-1 F1(♂)の体重変化

図7 MICB Tg F0 (♂)の白血球数増加

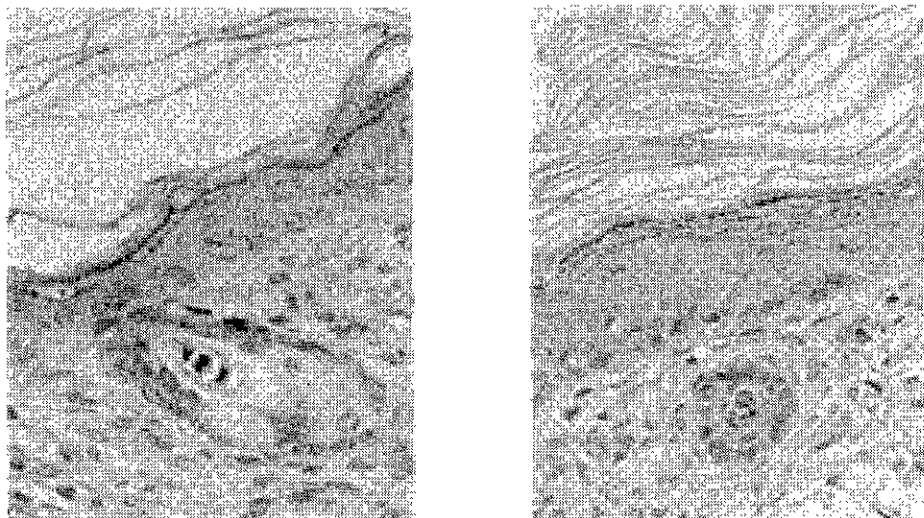
で皮膚の角化異常が認められた。病理学的には角質層の肥厚、表皮層の肥厚であった(図 8)。またこの表現系は  $F_1$ 、 $F_2$  へと伝達された。

### (2)抗 MICA 抗体の作成

MICA cDNA が遺伝子導入された NS1 細胞で免疫されたマウスの血清では、Immunoblot 法で 68-70kDa の蛋白質が確認された。(図 9 下段)これは報告されている分子量にほぼ等しく (Bahram *et al.*, 1996a), 抗ヒト MICA ポリクローナル抗体が作成されたと考えられる。

### (3)MICA-GFP 蛋白質の細胞内局在の解析

また MDCK 細胞のみでは GFP の蛍光は観察されず、MICA 遺伝子を挿入していない pEGFPN ベクターを導入した細胞では細胞質全体に GFP の蛍光が観察され、pEGFPN-MICA では細胞質の周囲に GFP の蛍光が強くみられた。(図 9 上段)



Non Tg

MICB Tg

図 8 MICB Tg の皮膚にみられた角化異常 (400倍)

### [考察]

今回の結果より MICA の発現系でも Tg が産出された。101 匹以上の  $F_1$  が産出されたが CAG-MICA の伝達率はメンデルの法則からは少し図 1 において特に雄由来の場合悪いようである。精巣における MICA の発現が精子形成に影響を与えている可能性が考えられた。現在  $F_0, F_1$  共に RNA 発現解析を行い系統確立を目指している。

今回の結果より MICB の過剰発現はマウスに低体重、白血球増多、角化異常といった表現系の変化を引き起こす可能性が示唆された。今のところ低体重、白血球増多は 3 系統で見られているため、外来遺伝子導入に伴う宿主遺伝子への影響によって引き起こされたとは考えにくく、MICB の過剰発現によるものと考えられる。特に MICB 発現 Tg マウスに見られる白血球数の顕著な増加は注目すべき点と思われる。ベーチェット病の最も特徴的な

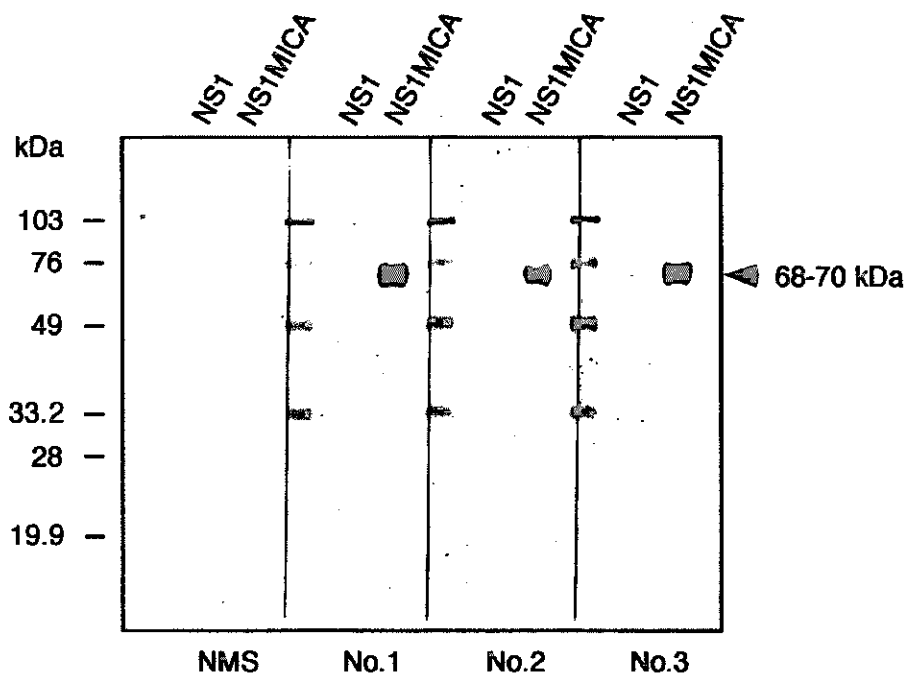
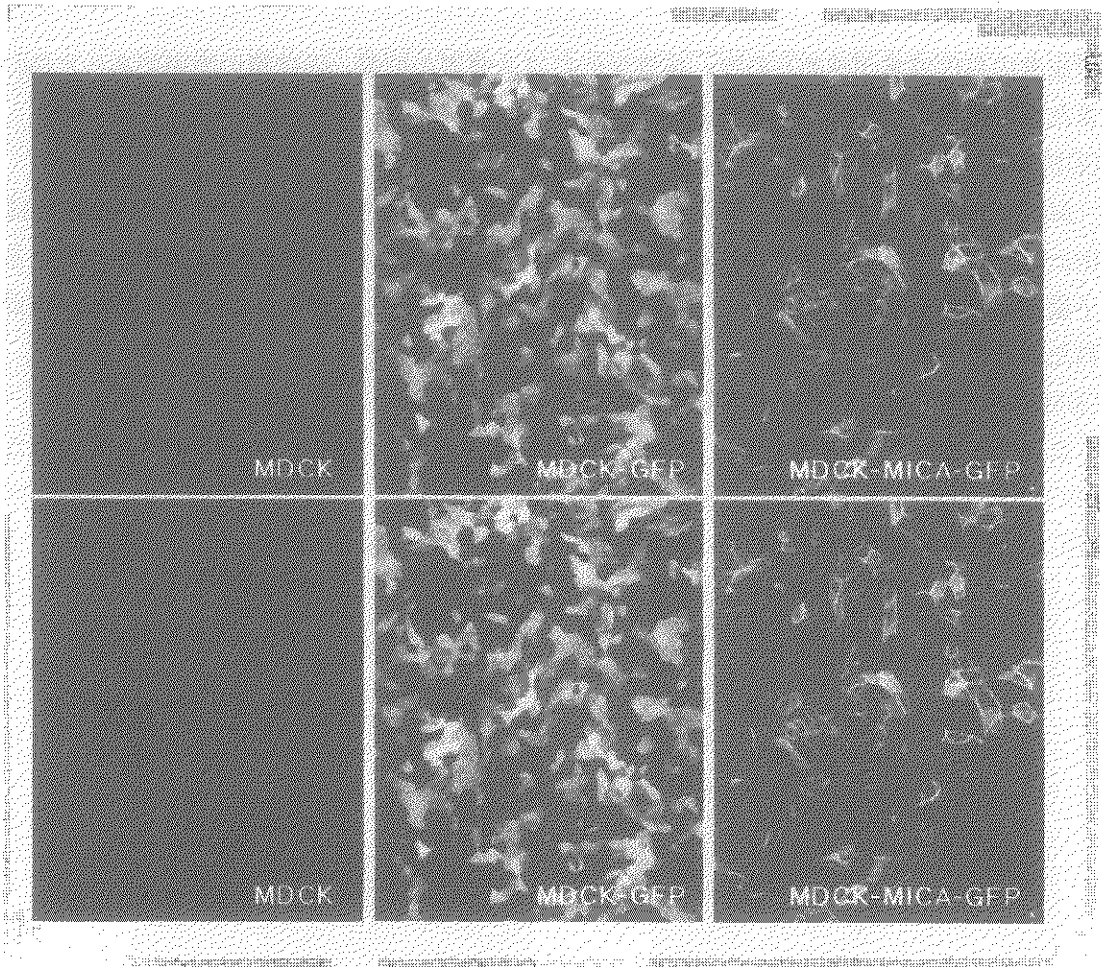


図 9

Immunoblot 法による抗体価上昇の確認