

2 クローンが、他のひとつは out of frame の 1 クローンが優位を占めた。なお、これらの TCR に使用されている BV 遺伝子には特定の偏りはなく、TCR CDR3 アミノ酸配列にも類似性はなかった (表)。

4. PM 患者と健常者との間で、増多クローンのサイズに有意差はなかった (表)。

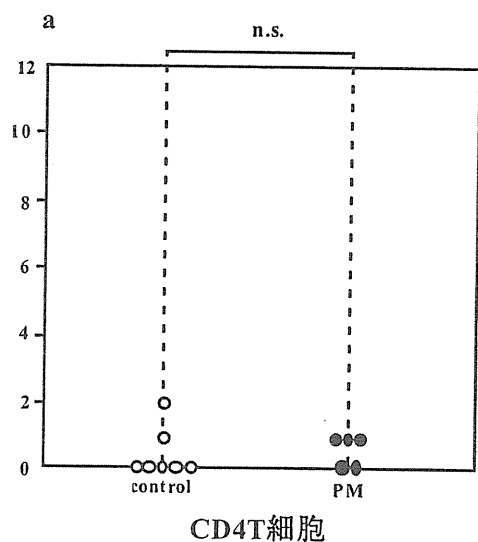


図 PM患者の末梢T細胞のクローン性増多：縦軸はクローン性増多ありと判定されたVB遺伝子数を示す。

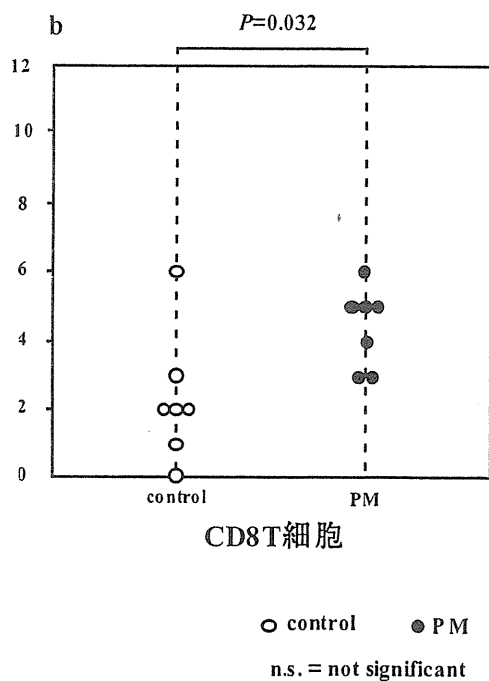


表 増多したCD8Tクローンが使用するTCRBV と clonal size

健常者			
V1. 27F	BV1(5.7%)	BV11(1.8%)	
V2. 52F	BV1(5.3%)	BV7(4.5%)	BV15(5.4%)
V3. 65M	BV21(1.3%)	BV22(3.3%)	BV23(2.1%)
V4. 41F	BV19(10.9%)		
PM患者			
P1. 35F	BV6S2/4 (<12.0%)*	BV9(7.8%)	BV23(1.4%)
P2. 41F	BV1(13.9%)	BV10(0.1%)	BV12S2(0.6%) BV22(7.38%)
P3. 55F	BV6S1(0.7%)	BV6S5(1.3%)	BV10(0.4%)
	BV12S1(<0.7%)*	BV18(1.2%)	BV23(0.04%)
P4. 43F	BV6S2/4(<17.0%)*	BV6S6(<18.0%)*	BV11(0.6%) BV17(0.2%)
P5. 54F	BV6S6(<7.0%)*	BV16(4.7%)	BV17(0.1%)
P6. 64M	BV6S1(1.5%)	BV10(0.8%)	BV11(1.9%) BV13S2/3/5(<3.9%)*
		BV23(1.0%)	
P7. 59F	BV11(4.4%)	BV15(0.8%)	BV16(0.1%)

\*: 概算値

#### D.E. 考察・結論

PMは末梢血CD8T細胞のクローン性増多を来すが、SSは有意な末梢血T細胞のクローン性増多を来さない。従って、標的臓器の炎症が末梢T細胞レパトワに及ぼす影響は個々の自己免疫疾患により異なる。PMでは、筋炎局所に浸潤しているCD8T細胞が末梢でもクローン性に増多している可能性が強い。従って、PM患者末梢血で増多するCD8T細胞クローンを解析することは、筋炎の病態解明に寄与するものと考えられる。今後、PM患者末梢で増えていたT細胞の病態への関わりを検討したい。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) McColl GJ, Kohsaka H, Szer J. and Wicks IP. High dose chemotherapy and syngeneic haematopoietic progenitor cell transplantation for severe, seronegative rheumatoid arthritis. *Ann Int Med* 131:507-509, 1999.

##### 2. 学会発表

2) Junko Nishio, Hitoshi Kohsaka, and Nobuyuki Miyasaka. Clonal CD8 T Cell Expansion in the Periphery of patients with Inflammatory Myopathy. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology 'Tolerance and Autoimmunity'. Keystone, Colorado, March 26-April 1, 1999

3) Junko Nishio, Hitoshi Kohsaka and Nobuyuki Miyasaka. Clonal CD8 T Cell Expansion in the Periphery of Patients with Inflammatory Myopathy. American College of Rheumatology. 63rd National Meetings, Boston, November 13-17, 1999.

性増多の解析 第 43 回日本リウマチ学会総会 札幌 1999 年 6 月 3-5 日

5)西尾純子、上阪 等、鈴木美穂子、宮坂信之 自己免疫疾患患者末梢血における T 細胞のクローン性増多 第 29 回日本免疫学会 京都 1999 年 12 月 1-3 日

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業）  
分担研究報告書

レトロウイルス発現ライブラリーによる抗原特異的 TCR の同定に関する研究

分担研究者 齊藤 隆 千葉大学大学院・医学研究科遺伝子制御学 教授

**研究要旨** 自己抗原を認識する T 細胞レセプター鎖を TCR ライブラリーとして導入することによって同定する方法を確立するためのシステム作りを行い、3つの成果を得た。1) TCR $\alpha\beta$ 鎖を導入して解析できる細胞株を樹立した。2) NFAT-GFP によって活性化された T 細胞を選択できるシステムが確立できた。3) マウス ecotropic virus 受容体を導入することで、ヒト細胞にマウスレトロウイルスを用いることができる系を確立した。

共同研究者

荒瀬 尚 千葉大学大学院医学研究科遺伝子  
遺伝子制御学 助手

横須賀忠 千葉大学医学部肺癌研究施設  
大学院生

A. 研究目的

自己抗原を認識する T 細胞レセプター (TCR) の $\alpha$ 鎖または $\beta$ 鎖を患者由来のサンプルから RT-PCR で同定することは比較的簡単になってきた。TCR $\beta$ 鎖については、ある種の自己免疫疾患では特異的なものが使われている例があり、しかもたかだか 20 種類の V $\beta$ 鎖しかないために解析は容易である。一方、TCR $\alpha$ 鎖はその V $\alpha$ のサブクラスが多いことや、J $\alpha$ が 100 近く存在することなどから、疾病に関する TCR $\alpha$ 鎖の解析はほとんどなされていない。これまで通常は、抗原に特異的な T 細胞クローンを樹立し、そのクローンをを用いて抗原の単離を目指した。単一細胞由来の TCR を単離しない限り、特定のペアとして単離するのは困難である。そこで、特定の T 細胞クローンを単離することなく、特異的 TCR の同定あるいは TCR レパートリー解析のできるシステムを開発する。

実際には、TCR $\beta$ の解析が楽なのにも関わらず、TCR $\alpha$ の困難性のために抗原認識にかかわる TCR を同定できないことを、TCR $\alpha$ 鎖ライブラリーを作製して、TCR(鎖を発現させた細胞に導入することによって、特異的な TCR $\alpha\beta$ ペアーを同定できるシステムの確立とその自己免疫疾患への応用を目指している。これを用いて、既に疾患を誘導する抗原の判明している系を用いて、疾患特異的な TCR 発現細胞を同定・作製することを旨とする。本年はそのシステム作りのために必要な細胞とシステムの確立を行った。

B. 研究方法

TCR $\alpha\beta$ 鎖の欠損細胞 TG40 は既に確立してあった。然し、この細胞での CD3 分子の発現がなかったため、CD3 $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$ の3鎖を遺伝子導入した細胞株 TGY40 を確立した。T 細胞活性化によって蛍光を発するように NFAT 配列を3回繰り返した配列と GFP をつないだ NFAT-GFP を作製し、抗原特異的 T 細胞ハイブリドーマ 2B4 に遺伝子導入した。この細胞を抗 TCR 抗体や、特異的な抗原ペプチドと MHC-トランスフェクタントを用いて刺激し、NFA が誘導されるかを解析した。一方、マウ

スレトロウイルスをヒト細胞にも用いることができるように、ヒト Jurkat 細胞にマウスレトロウイルス受容体を遺伝子導入した細胞を作製した。

### C. 研究結果

#### (1) TCR 遺伝子導入の宿主細胞株の樹立

まず TCR $\alpha\beta$ 鎖の transfection に用いることができる T 細胞株の再整備をした。既に樹立してあったマウス由来の TCR $\alpha$ - $\beta$ -細胞株 TG40 は、長期の培養によって CD3 $\delta$ がほとんど発現しなくなっており、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\xi$ とも極めて低い発現であることが判明した。そこで、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\xi$ を遺伝子導入し、これらを安定して高発現している細胞株 TGY40 を樹立した。この細胞に既知の TCR $\alpha\beta$ 鎖を遺伝子導入し、細胞表面の TCR/CD3 複合体の発現を確認した。更に、この細胞を抗 TCR 抗体、および抗原ペプチドと抗原提示細胞で刺激すると、活性化されることから、機能的な TCR を再構成できることが明らかになった。

#### (2) 活性化した T 細胞を選択回収できるシステムの樹立。

TCR のペアを発現させて、特異的な抗原を認識した数少ない T 細胞を選択するシステムとして、活性化の転写因子である NFAT が活性化されたときに GFP が光るようにするため、NFAT-GFP を作製し、抗原特異的 T 細胞ハイブリドーマに遺伝子導入した。この細胞を抗 TCR 抗体や抗原ペプチド、およびスーパー抗原で刺激すると GFP $^{+}$ になることを確認した。実際このポジティブ細胞をソートすることができた。GFP $^{+}$ 細胞は数日の間は安定であり、その間にソーティングをすれば選択回収できること、また数日後には消滅し、再活性化によって再び GFP $^{+}$ になることが判明した。

#### (3) マウスレトロウイルスを用いてヒト細胞に感染できるシステムの開発

ヒト Jurkat 細胞にヒトライブラリーを導入することを考えて、マウスレトロウイルスを感染させることができるようなマウスレトロウイルスレセプターを発現させた Jurkat トランスフェクタン

ト J.EcoR を作製した。この細胞には実際マウスレトロウイルスが高タイターで感染することができた。ecotropic マウスレトロウイルスによって IRES-GFP を有する遺伝子を感染させたところ、GFP の発現が検出され、システムが動くことが確認された。

### D. 考察

任意の TCR を導入して抗原特異的な反応を解析するための細胞株を目指して TCR $\alpha\beta$ 欠損細胞である TG40 が使われたが、実は共通して種々の CD3 分子がかなり欠落して行くことが判明し、逆に積極的に遺伝子導入することで、様々な系に使用可能な細胞株が樹立できた。実際に既知の TCR $\alpha\beta$ を導入することによって機能的な TCR の認識と活性化が起こることが判明し、広く使用可能と考えられる。実際には、TCR $\beta$ 鎖を導入した細胞を作り、そこに TCR $\alpha$ 鎖のライブラリーを導入して抗原刺激に反応する細胞を単離することに使用する予定である。

そのために第二に必要なシステムとして、特異的活性化に伴ってその細胞を選択・回収する方法であった。今回、NFAT に GFP をつないだ NFAT-GFP を T 細胞に導入し、抗原特異的に活性化させれば、数日間は GFP $^{+}$ となり安定したソーティングができることが解った。単離後は GFP $^{-}$ となり、再度の刺激で再び GFP $^{+}$ になることから、さまざまなシグナル伝達遺伝子欠損細胞を再構成する系にも TCR シグナル伝達系に重要な分子を単純に同定する方法としても使用できる利点がある。

第三の今回のシステム作りとしては、amphotropic ウイルス特にヒトの cDNA ライブラリーをレトロウイルスによって導入するという使用は、既知の単一遺伝子の扱いに比べて規制が厳しいため、マウス ecotropic ウイルスを用いてヒト細胞に感染できると便利である。そのためにモデル実験をしたところ、マウスレトロウイルス受容体を発現させた Jurkat 細胞 (J.EcoR) では確かに ecotropic ウイルスによって効率よく感染が成立した。実際、

ヒト遺伝子の発現をさせてみたが、高発現する細胞が得られたことから、今後気楽に使用可能であると考えられる。

こうした三種のトリアルから、特異的な TCR を片方の鎖が解っているところから、機能的には細胞活性化を用いて選択するシステムができたと思われる。

## E. 結論

TCR $\alpha\beta$ を発現し、その特異性を活性化 NFAT をマーカーにして蛍光を使って細胞を単離することが可能になった。ヒト細胞にマウスレトロウイルスライブラリーを発現させて、遺伝子クローニング、遺伝子導入が気楽に可能になった。これを用いて自己免疫抗原を認識する TCR 特異性を明らかにしたい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Suzuki, K., Nakajima, H., Saito, Y., Saito, T., Leonard, W. L. and Iwamoto, I.: Janus kinase 3 (Jak 3) is essential for common cytokine receptor  $\gamma$  chain ( $\gamma c$ )-dependent signaling: comparative analysis of  $\gamma c$ , Jak3, and  $\gamma c$  and Jak3 double deficient mice. *Int. Immunol.* 12:123-132, 2000.
2. Nakatsu, F., Kadohira, T., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Kakuda, H., Copeland, N. G., Saito, T. and Ohno, H.: Genomic structure and chromosomal mapping of the genes encoding clathrin-associated adaptor medium chains  $\mu 1A$  and  $\mu 1B$ . *Cytogenet Cell Genet* 87:53-58, 1999.
3. Watanabe, N., Park, S. Y., Ohno, H., Gessner, J.E., Schmidt, R.E., Verbeek, J.S., Izui, S. and Saito, T. : Mast cells induce the autoantibody-mediated vasculitis syndrome through Tumor Necrosis Factor production upon triggering Fc $\gamma$  receptors. *Blood* 94:3855-3863,

1999.

4. Nakaseko, C., Miyatake, S., Iida, T., Abe, R. and Saito, T.: CTLA-4 engagement delivers inhibitory signal upon T cell activation in the absence of its tyrosine motif in the cytoplasmic tail. *J. Exp. Med.* 190:765-774, 1999.
5. Arase, K., Saijo, K., Watanabe, H., Konno, A., Arase, H., and Saito, T.: Ablation of a specific cell population by the replacement of a uniquely expressed gene with a toxin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:9264-9268, 1999.
6. Wild, M.K., Cambiaggi, A., Brown, M.H., Davies, E.A, Ohno, H., Saito, T. and van der Merwe: Dependence of T cell antigen recognition on the dimensions of an accessory receptor-ligand complex. *J. Exp. Med.* 190:31-41, 1999.
7. Yamazaki, T., Hamano, Y., Tashiro, H., Ito, K., Nakano, H., Miyatake, S. and Saito, T.: CAST, a novel CD3  $\epsilon$ -binding protein transducing activation signal for IL-2 production in T cells. *J. Biol. Chem.* 274:18173-18180, 1999.
8. van Egmond, M., van Vuuren, H., Morton, H. C., va Spriell, A. B., Shen, L., Hofhuis, F. M. A., Saito, T., Mayadas, T. N., Verbeek, J. S. and van de Winkel, J. G. : Human IgA receptor (Fc $\alpha$ RI, CD89) function in transgenic mice requires both FcR $\gamma$  chain and CR3(CD11 $\beta$ /CD18). *Blood* 93:4387-4394, 1999.
9. Otsuji, M., Aoe, T., Kimura, Y., Okamoto, Y. and Saito, T. (1999): Oxidative stress by tumor-derived macrophages and abnormal structure of T-cell receptor complex. In: Packer, L. and Yodoi, J. (eds) *Redox Regulation of Cell Signaling and its Clinical Application*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp49-64.
10. Ohno, H., Tomemori, T., Nakatsu, F., Okazaki, Y., Aguilar, C., Foelsch, H., Saito, T., Shirasawa, T., Mellman, I. and Bonifacino,

J. S.:  $\mu$ 1B, a novel adaptor medium chain expressed in polarized epithelial cells. *FEBS Letters* 499:215-220, 1999.

11. Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., Théry, C., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P. and Amigorena, S.: FcR  $\gamma$  - mediated induction of dendritic cell maturation and MHC class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J. Exp. Med.* 189:371-380, 1999.

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

慢性関節リウマチ（RA）における原因抗原の同定に関する研究

分担研究者 佐伯 行彦 大阪大学大学院医学系研究科分子病態内科学（第三内科）

**研究要旨** 昨年までの研究により、一部の RA 患者の滑膜組織でオリゴクローナルに増加している T 細胞の抗原レセプターの V $\beta$ 鎖 (TCR/V $\beta$ ) 上の the third complementarity determining region (CDR3) に複数の患者間で共通なドミナントシーケンスが存在することを見出した。今回、この患者間で共通なドミナント CDR3 シーケンスが T 細胞の滑膜増殖誘導能と関連があるかどうか検討するために、共通なドミナントな CDR 3 シーケンスをもつ T 細胞クローン (G3) とそうでない T 細胞クローン (G2、D2) との間で SCID マウスへの細胞移入実験系において滑膜増殖誘導能を比較検討した。その結果、G3 は、滑膜増殖を誘導したが、G2、D2 は滑膜増殖を誘導しなかった。患者間で共通に認められたドミナント CDR 3 シーケンスをもつ T 細胞クローン (G3) は、滑膜増殖を誘導することから RA における病因 T 細胞の候補と考えられる。

**A. 研究目的**

昨年までの研究により、一部の RA 患者の滑膜組織ではオリゴクローナルに増加している T 細胞の亜集団が存在し、それらの T 細胞の抗原レセプターの V $\beta$ 鎖 (TCR/V $\beta$ ) 上の CDR3 領域に複数の患者間で共通なドミナントシーケンスが存在することを見出した。今回、この患者間で共通なドミナント CDR 3 シーケンスが T 細胞の滑膜増殖誘導能と関連があるかどうかを検討する。

**B. 研究方法**

以前報告したように、病変部にオリゴクローナルに増殖する V $\beta$ 14 陽性 T 細胞が存在し、それらの T 細胞の TCR/V $\beta$  の CDR 3 のシーケンス解析で患者

間で共通なドミナントシーケンス (CASS-PRERAT-YEQ) が見いだされたひとりの RA 患者の滑膜組織から分離した単核球を限界希釈法によりクローニングし樹立したクローンの中、上記のドミナントシーケンスを有する G3 クローンおよび有しないクローン、G2、D2 を実験に用いた。これらの T 細胞クローン ( $2 \times 10^6$  cells) を放射線照射した同じ患者由来の末梢血単核球 ( $2 \times 10^6$  cells) とともに SCID マウスの後肢の両側膝関節腔内に移入した。細胞移入後 4 週目に麻酔下にマウスを安楽死させ、両側の後肢を離脱し、病理組織学的に解析した。検体は、フォルマリン固定後、脱灰し、3  $\mu$ m の厚さでスライスし、H-E 染色し、7 枚の連続切片において滑膜増殖の有無を評価した。

### C. 研究結果 (表1)

ドミナント CDR3 シークエンスを有する G3 クローンを移入したマウスでは3匹中2匹において、同じ患者の滑膜組織由来の単核球 (STMNC) を移入したマウス (6匹中3匹) でみられた滑膜増殖と同様の滑膜増殖がみられた。一方、ドミナントシークエンスを有しない、G2、D2 クローンを移入したマウスではすべてのマウスにおいて有意な滑膜増殖は認められなかった。

### D. 考察

G3 クローンは、病変部でオリゴクローナルに増殖している V $\beta$ 14 T 細胞で、複数の RA 患者間で共通に見い出されたドミナント CDR3 シークエンスのひとつである CASS-PRERAT-YEQ という CDR3 シークエンスを有し、SCID マウスの細胞移入実験により滑膜増殖能をもつことが証明された。一方、ドミナント CDR3 シークエンスを有しない同じ患者由来の G2、D2 というふたつのクローンは滑膜増殖を誘導しなかった。以上のことから、CASS-PRERAT-YEQ という CDR3 シークエンスは、滑膜増殖能と関連があることが示唆された。

また、興味深いことに CM Weyand & JJ Goronzy らのグループは、我々と同様に RA 患者においてドミナントにみとめられる T 細胞の CDR3 シークエンスを解析し、CASS-PRRRAP-YEQ というドミナントなシークエンスが複数の患者間で共通に存在することを報告しており、このシークエンスは、G3 の CDR3 シークエンスと同様に N-D-N 領域が6つのアミノ酸から構成され、しかも G3 の CDR3 と非常に強いホモロジーを有する。このことは、もちろん TCR が  $\alpha$  鎖、 $\beta$  鎖というヘテロダイマーにより構成されていることから V $\alpha$  の解析も必要であるが、かれらの T 細胞クローンと我々の G3 クローンがよく似た抗原を認識している可能性を示唆するものと考えられる。

### E. 結論

患者間で共通なドミナント CDR3 シークエンス (CASS-PRERAT-YEQ) を有する G3 クローンは RA に

おける pathogenic T 細胞の候補のひとつと考えられる。そして、この G3 クローンの認識するペプチドは、RA の原因抗原である可能性があり、今後、G3 クローンをプローベとして原因抗原の特定が可能と考えられる。

表1. SCID マウスへの細胞移入による滑膜増殖

	移入した細胞			
	STMNC	G3	G2	D2
滑膜増殖	3/6	2/3	0/3	0/3

STMNC ; synovial tissue mononuclear cells

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

英文論文

1. Mima T, Ohshima S, Sasai M, Nishioka K, Shimizu M, Murata N, Yasunami R, Matsuno H, Suemura M, Kishimoto T, and Saeki Y. Dominant and shared T cell receptor  $\beta$  chain variable regions of T cell inducing synovial hyperplasia in rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Comm* 263:172-180, 1999
2. Sasai M, Saeki Y, Ohshima S, Nishioka K, Mima T, Tanaka T, Katada Y, Yoshizaki Y, Suemura M, and Kishimoto T. Delayed onset and reduced severity of collagen-induced arthritis in interleukin-6 deficient mice. *Arthritis Rheum* 42(8):1635-1643, 1999
3. Ohshima S, Saeki Y, Mima T, Sasai M, Nishioka K, Ishida H, Shimizu M, Suemura M, McCloskey RV, and Kishimoto T. Long-term follow-up of the changes in circulating cytokines, soluble cytokine receptors, and white blood cell subset counts in patients with rheumatoid arthritis (RA) after monoclonal anti-TNF $\alpha$  antibody therapy. *J Clin Immunol* 19(5):305-313, 1999
4. Ohshima S, Mima T, Sasai M, Nishioka K, Shimizu M, Murata N, Yoshikawa H, Nakanishi K, Suemura M, McCloskey RV, Kishimoto T, and Saeki Y.



Tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) interferes with Fas mediated apoptotic cell death on rheumatoid arthritis (RA) synovial cells: A possible mechanism of rheumatoid synovial hyperplasia and a clinical benefit of anti-TNF $\alpha$  therapy for RA. Cytokine (in press)

5. Okuda Y, Sakoda S, Fujimura H, Saeki Y, Kishimoto T, and Yanagihara T. IL-6 plays a crucial role in the induction phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein 35-55 induced experimental autoimmune encephalomyelitis.

J Neuroimmunol 101:188-196, 1999

6. Saeki Y, Ohshima S, Kurimoto I, Miura H, Suemura M. Maintaining remission of lupus erythematosus profundus (LEP) with cyclosporin A. Lupus (in press)

7. Nishioka K, Ohshima S, U-Sasai M, Yamaguchi N, Mima T, Nomura S, Murata N, Shimizu M, Miyake T, Yoshizaki K, Suemura S, Kishimoto T, and Saeki Y. Enhanced expression and DNA binding activity of the two C/EBP isoforms, C/EBP $\beta$  and  $\delta$ , in the rheumatoid synovium. Arthritis Rheum (in press)

#### 和文論文

1. 佐伯行彦:慢性関節リウマチ (RA) における病因 T 細胞クローンの樹立. リウマチ科 (印刷中)

2. 佐伯行彦:新しい膠原病の治療戦略. 現代医療 31 (3): 846-850, 1999

#### 2. 学会発表

佐伯行彦 他7名 W32-1 RA における病因 T 細胞クローンの樹立. 第43回日本リウマチ学会

笹井光子、大島至郎、西岡克泰、美馬亨、末村正樹、佐伯行彦 W16-8 IL-6 ノックアウトマウスを用いたコラーゲン誘導関節炎 (CIA) における IL-6 の役割の解析. 第43回日本リウマチ学会

佐伯行彦 シンポジウム9:膠原病をとりまく今日の問題. 膠原病の治療; より特異的な治療をめざし

て 第49回日本アレルギー学会

佐伯行彦 W5-2 慢性関節リウマチの炎症病態におけるサイトカインネットワーク. 第20回日本炎症学会

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## ヒト自己免疫疾患における NKT 細胞解析に関する研究

分担研究者 住 田 孝 之 筑波大学臨床医学系内科 教授

**研究要旨** 自己免疫病の末梢血において、調節性機能を有する NKT 細胞が減少している事が判明した。その一原因として、NKT 細胞自身の機能異常が明らかになった。

### A. 研究目的

NKT 細胞は、TCR と NK マーカー(CD161)とを合わせ持つ第四のリンパ球である。NOD マウス、(NZBxNZW)F1 マウスなどの自己免疫疾患モデルにおいて、発症後に減少したり、NKT 細胞に対する抗体投与により自己免疫病が増悪することが報告されている。このことから、NKT 細胞が自己免疫反応を制御する調節性 T 細胞として機能している可能性が示唆されている。本研究では、ヒト自己免疫疾患における NKT 細胞の意義を明らかにするために、フローサイトメトリーを用いた NKT 細胞の測定方法の確立、自己免疫疾患患者における NKT 細胞の定量、NKT 細胞増減の原因について検討することを目的とした。

### B. 研究方法

1) NKT 細胞の測定：健康人末梢血(PBL)を対象として、フローサイトメトリーを用いて、CD4-CD8-(DN)CD3+TCRAV24+T 細胞を single cell sorting 法により分画した。single cell PCR 法により TCRAV24 遺伝子の junctional sequence を決定し、invariant TCRAV24AJ18 遺伝子および TCRBV11 遺伝子の使用頻度について検討した。

2) 自己免疫疾患患者での NKT 細胞：健康人 13 名、慢性関節リウマチ患者(RA)20 名、全身性エリテマトーデス患者(SLE)18 名、全身性強皮症患者(SSc)13

名、シェーグレン症候群患者(SS)17 名由来の PBL を対象として、DNCD3+ TCRAV24+ BV11+NKT 細胞を定量した。

3)  $\alpha$ -GalCer 反応性：自己免疫疾患患者の NKT 細胞が抗原の一つである  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer)と反応するか否かを検討するために、in vitro で 10 日間  $\alpha$ -GalCer と培養して NKT 細胞の増加について検討した。

4)  $\alpha$ -GalCer 不応答の原因検索： $\alpha$ -GalCer に反応しない例(non-responder)では、その原因が APC にあるのかあるいは NKT 細胞それ自身であるかを検討するために、non-responder と健康人 responder とから、APC を含む分画と NKT 細胞を含む分画をそれぞれ sorting して採取した。それらを  $\alpha$ -GalCer と共に criss-cross で培養し NKT 細胞の抗原に対する反応性を検討した。

### C. 研究結果

1) TCRAV24+BV11+DNT 細胞：DN TCR AV24+T 細胞のうち 96%が TCRAV24AJ18 遺伝子を使用していた。TCRAV24AJ18+細胞のうち 96%が TCRBV11 を使用しており、すべて CD161 陽性であった。TCR AV24AJ18+CD161+DNT 細胞を NKT 細胞と定義すると、TCRAV24+BV11+DNT 細胞のうち 93%は NKT 細胞である。そこで、NKT 細胞を、TCRAV24+ BV11+DNT 細胞

として定量した。

2) NKT 細胞の減少 (図 1): 健常人の NKT 細胞は 290/ml であったのに対して、自己免疫疾患患者では 40.0-80.8/ml と有意に減少していた。

3) responder と non-responder (図 2): 解析したすべての健常人は  $\alpha$ -GalCer に反応した (responder) が、自己免疫疾患では responder と non-responder の 2 群が存在した。30%(RA), 50%(SLE), 50%(SSc), 66.7%(SS) と約半数が responder で残りが non-responder であった。

4) NKT 細胞の異常 (図 3): criss-cross の実験により、non-responder の原因は NKT 細胞それ自身にあることが判明した。

#### D. 考察と結論

ヒト NKT 細胞を TCRA24+BV11+DNT 細胞としてフローサイトメトリーで定量することができた。ヒト自己免疫疾患では、NKT 細胞が減少しており、 $\alpha$ -GalCer に反応する人と反応しない人の 2 群に分かれた。反応しない原因として NKT 細胞それ自身の異常が示唆された。 $\alpha$ -GalCer に反応する自己免疫疾患患者においては、in vivo あるいは ex vivo における  $\alpha$ -GalCer 投与により NKT 細胞を増幅して自己免疫病を制御することが可能であろうと考えられた。

#### F. 研究発表

- 1.Keino, H., et al.: A single cell analysis of TCR AV24AJ18+ DN T cells. Microbiol. Immunol. 43:577-584, 1999.
2. Maeda, T., et al.: Decreased TCR AV24AJ18+ double negative T cells in rheumatoid synovium. Rheumatol. 38: 186-188, 1999.
- 3.Kojo, S., et al.: Dysfunction of TCRAV24AJ18+ BV11+ double negative regulatory NKT cells in autoimmune diseases. submitted.

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

図1 自己免疫疾患におけるTCRAV24+BV11+DN NKT細胞

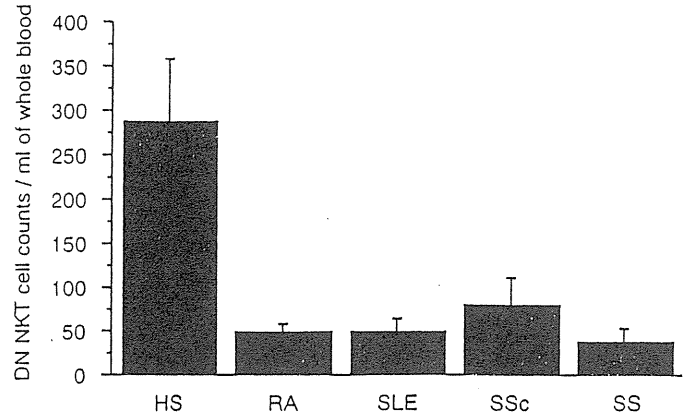


図2 α-GalCer反応性

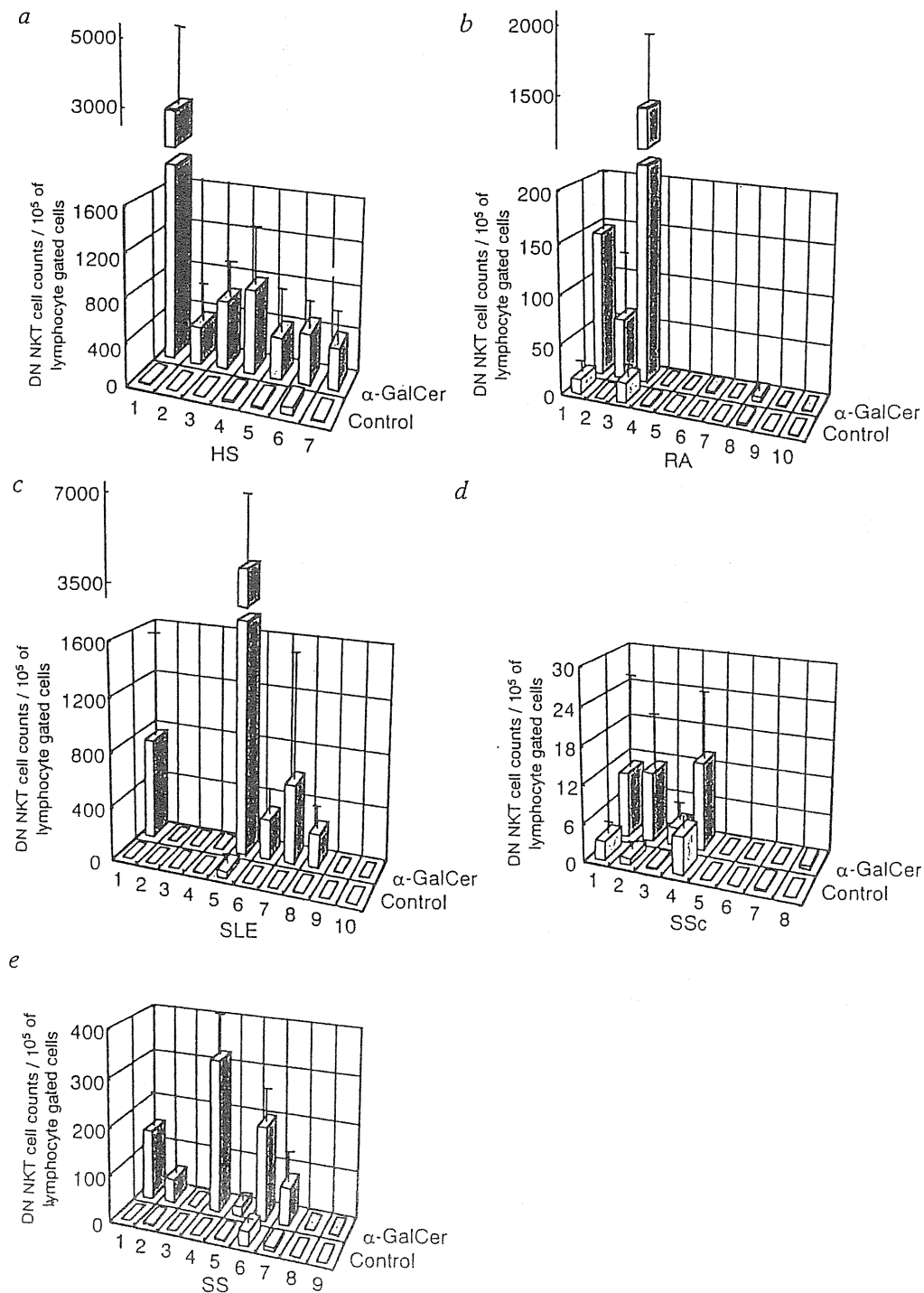
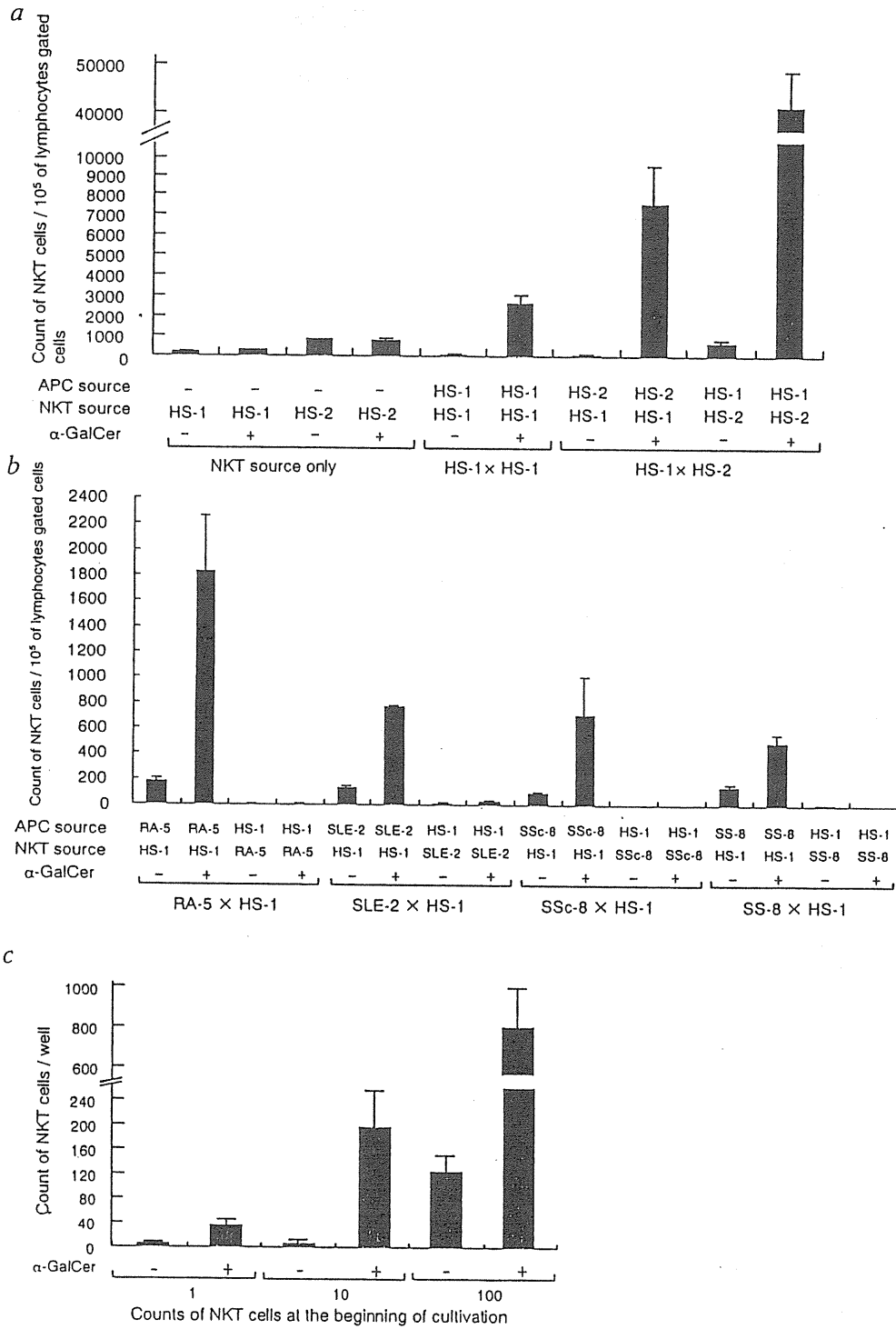


図3  $\alpha$ -GalCer不応答性の検討



SEREX 法を用いた再生不良性貧血における自己抗原の同定に関する研究

分担研究者 中尾 眞二 金沢大学医学部内科学第三講座 教授

**研究要旨** 自己免疫性の再生不良性貧血の発症に関与する自己抗原を明らかにするため、寛解期の患者骨髄から作成した cDNA ライブラリー由来の蛋白を、再発期に採取した患者血清でスクリーニングした。その結果、造血前駆細胞の一成分である  $\alpha$  グロビンと ribosomal protein s12 に類似の蛋白が同定された。また、同じ患者から、自己の造血細胞に対して強い細胞障害活性を示す CD4 陽性 T 細胞クローンを単離し、T 細胞レセプター  $\beta$  鎖の CDR3 領域の塩基配列を決定したところ、snRNP を認識する T 細胞クローンの一つと強い相同性を示すことが明らかになった。

A. 研究目的

再生不良性貧血の多くは免疫抑制療法に反応して改善することから、発症の機序として造血幹細胞に対する免疫学的な攻撃が存在すると考えられている。しかし、これまでのところ、自己免疫反応の標的となる抗原についてはまったく分かっていない。われわれは、自己免疫機序が濃厚なシクロスポリン依存性の再生不良性貧血患者の骨髄から病態に関与するいくつかの CD4 陽性 T 細胞クローンを単離し、そのエピトープの同定を試みてきたが、現存の技術では CD4 陽性 T 細胞の標的抗原を明らかにすることはできなかった。何らかの抗原に特異的な T 細胞が骨髄で増殖している再生不良性貧血患者では、その抗原に対して T 細胞だけではなく B 細胞の反応（抗体産生）も起こっていることが予想される。そこで、再生不良性貧血における自己抗原を明らかにするため、寛解期に患者から採取した骨髄細胞より cDNA ライブラリーを作成し、ベクターを用いて発現させた各クローンを、病極期に採取した血清でスクリーニングすることにより、自己免疫反応の標的となる骨髄細胞由来の蛋白の同定を試みた。さらに、細胞傷害性 T 細胞によって認識される造血細胞上のエピトープを推測するため、自己免疫性の再生不良性貧血患

者骨髄から単離した T 細胞クローンのクロナタイプを決定した。

B. 研究方法

シクロスポリンによる単剤療法が奏効し、一度も輸血を受けることなく寛解となった 67 歳男性から同

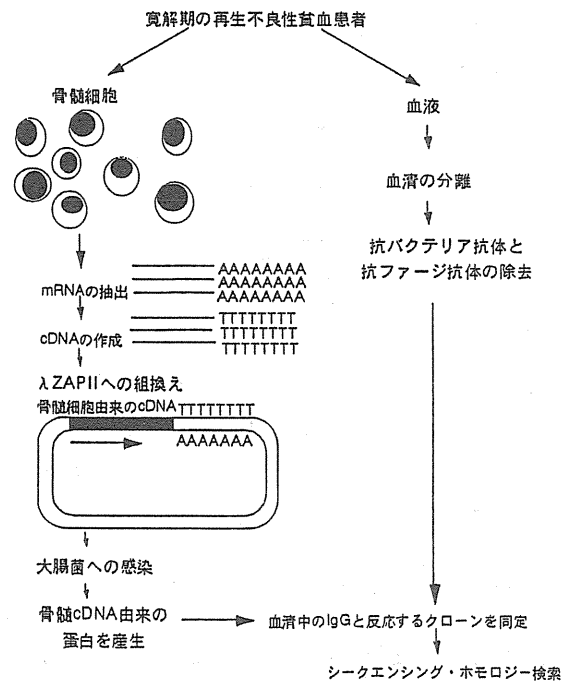


図1SEREX法の手順

意を得て  $10^8$  個の骨髓細胞を採取し、mRNA を抽出後  $1.5 \times 10^6$  個の独立したクローンからなる cDNA ライブラリーを作成した。λZAPII に発現させた各クローン由来の蛋白をニトロセルロース膜に移し、病極期の患者血清とインキュベートさせたのち、マウス抗ヒト IgG 抗体と反応させた。発色基質を添加後陽性ファージを採取し、2 次、3 次とスクリーニングを繰り返すことにより、患者血清と選択的に反応するクローンを同定した (図 1)。

ファージのインサートのシーケンスを決定し、既知の cDNA とのホモロジーを検索した。同じ患者の病極期に単離した造血前駆細胞傷害性 T 細胞クローン NT4.2 について、T 細胞レセプターβ鎖の CDR3 のアミノ酸配列を決定し、機能が分かっている T 細胞クローンのアミノ酸配列と比較した。

### C. 研究結果

約 100 万個の cDNA クローンを上記の serological identification of antigens by recombinant expression cloning (SEREX)法でスクリーニングしたところ、2 個のクローンが同定された。塩基配列を決定したところ、一つはヒトのαグロビンと 100% のホモロジーを示し、他の一つは ribosomal protein s12 と 96% のホモロジーを示した (表 1)。

表1. 単離されたcDNAクローン-既存のcDNAとの相同性

クローン	サイズ (bp)	相同性の高い蛋白	相同性
1	581	Hemoglobin alpha chain	100%
2	492	Ribosomal protein S12	96%

NT4.2 のβ鎖の N-D-N 配列は QGQGEV であった (表 2)。この CDR3 配列は、全身性エリテマトーデスの患者末梢血から単離された snRNP に対する T 細胞クローンの CDR3 配列 QMGQGHY と類似していた (表 2)。

表2 造血前駆細胞傷害性T細胞クローンのフェノタイプ

T細胞クローン	CDR3配列	文献
NT4.2	QGQGEV	Br J Haematol 107: 791, 1999
snRNP特異的		
T細胞クローン	QMGQGHY	Hum Immunol 60: 200, 1999

### D. 考察

SEREX 法は、悪性腫瘍における腫瘍関連抗原を同定するために開発された方法である。この方法を用いれば CD4 陽性 T 細胞の認識抗原も同定できることが確認されている。これまで数々の新しい腫瘍関連抗原が同定されているが、自己免疫疾患においては、SEREX 法によって自己抗原を同定できたという報告はまだみられない。また、骨髓細胞由来の cDNA を SEREX でスクリーニングした報告はいくつかあるが、αグロビンに対する抗体はこれまでのところ検出されていない。αグロビンは成熟した赤血球や赤芽球に加えて、エリスロポエチン反応性の造血前駆細胞も発現していることが知られている。したがって、HLA 分子を表出している造血前駆細胞においては、αグロビン由来のペプチドが細胞障害性 T 細胞の標的となる可能性がある。αグロビンに対する免疫反応が造血障害の発症に関与している否かは、精製蛋白を用いた検索によって今後明らかにしていく必要がある。

全身性エリテマトーデスの患者では、しばしば汎血球減少を伴うことが知られている。NT4.2 のクロナタイプが snRNP を認識する T 細胞のクロナタイプと似ていることから、この T 細胞クローンが in vivo においても造血抑制に関与している可能性がある。逆に、snRNP に対する免疫反応が起こっているエリテマトーデスの患者では造血傷害が生じやすいという可能性も考えられる。

### E. 結論

自己免疫性再生不良性貧血症例の骨髓 cDNA ライブラリーを患者血清でスクリーニングすることにより、造血細胞の一成分であるαグロビンが同定された。αグロビンに対する免疫反応が再生不良性貧血における造血傷害の発生に関与している可能性が示唆された。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Zeng W, Nakao S, Takamatsu H, Yachie A, Takami

A. Kondo Y. Sugimori N. Yamazaki H. Miura Y. Shiobara S. and Matsuda T. Characterization of T-cell repertoire of the bone marrow in immune-mediated aplastic anemia: evidence for the involvement of antigen-driven T-cell response in cyclosporine-dependent aplastic anemia. Blood.93:3008-3016, 1999

2. Takami A. Zeng W. Wang H. Matsuda T. and Nakao S. Cytotoxicity against lymphoblastoid cells mediated by a T-cell clone from an aplastic anaemia patient: role of CD59 on target cells. Br J Haematol.107:791-796, 1999

3. Takami A. Nakao S. Tatsumi Y. Wang H. Zeng W. Yamazaki H. Yasue S. Shiobara S. Matsuda T. and Mizoguchi H. High inducibility of heat shock protein 72 (hsp72) in peripheral blood mononuclear cells of aplastic anaemia patients: a reliable marker of immune-mediated aplastic anaemia responsive to cyclosporine therapy. Br J Haematol.106:377-384, 1999

4. Shinji Nakao. Role of T-lymphocytes in the pathophysiology of aplastic anemia. Aplastic anemia-pathophysiology, epidemiology, clinical presentation and treatment. Schrezenmeier H, Bacigalupo A. Cambridge University Press, London. 41-57, 2000

## 2. 学会発表

Nakao S. Zeng W. Murata R. and Kondo Y. Identification of a novel antigen derived from hematopoietic progenitor cells that is recognized by the immune system of a patient with aplastic anemia. The American Society of Hematology 41st Annual Meeting and Exposition. December 3-7, 1999. New Orleans, Louisiana

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



厚生科学研究費補助金（感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業）  
分担研究報告書

CLIP 置換型インバリエント鎖遺伝子発現ベクターを用いた CD4<sup>+</sup>T 細胞のエピトープ同定システムの開発

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 教授

**研究要旨** インバリエント (Ii) 鎖遺伝子発現ベクターの CLIP 部分に、ランダムなペプチドをコードするオリゴ DNA を挿入し、多様なペプチドを HLA クラス II 分子上に発現するプラスミドライブラリー（エピトープ発現ライブラリー）を作製した。この発現ライブラリーを、HLA クラス II 遺伝子の発現ベクターとともに COS-7 細胞に一過性発現させた状態で CD4<sup>+</sup>T 細胞と共培養した。T 細胞による IFN- $\gamma$  の産生を指標としたスクリーニングにより、ライブラリー中より当該 T 細胞が認識しうるエピトープを同定するための方法を確立した。我々のシステムは、 $10^5$  程度の多様性を有するエピトープライブラリーを 2～3 週間でスクリーニングでき、CD4<sup>+</sup>T 細胞が認識するエピトープを同定しうる実用的なものである。また、一度作製したライブラリーは、プラスミド DNA として保存しておき、異なる CD4<sup>+</sup>T 細胞クローンにより認識される、あるいは異なる拘束分子によって提示されるエピトープの同定にも利用が可能であるという汎用性を有する。

共同研究者

藤井 慎嗣 熊本大学大学院医学研究科  
植村 靖史 熊本大学大学院医学研究科  
安藤 正幸 熊本大学医学部 教授  
千住 覚 熊本大学大学院医学研究科 助手

システムを構築することを目的とした。

A. 研究目的

昨年までの研究で、インバリエント (Ii) 鎖遺伝子の CLIP 部分を抗原ペプチドをコードするオリゴ DNA と組み換えることにより、CD4<sup>+</sup>T 細胞へ抗原ペプチドを効率良く提示するベクター (pCI) を開発した<sup>1)</sup>。本年度は、この CLIP 置換型 Ii 鎖遺伝子発現ベクターを用いて多様な HLA クラス II 分子・ペプチド複合体を発現する細胞のライブラリーを作製し、これを用いて抗原特異性が未知の CD4<sup>+</sup>T 細胞の認識エピトープを同定すると共に、特定の T 細胞レセプターが認識しうる HLA クラス II 拘束性エピトープの多様性について解析する

B. 研究方法

$10^5 \sim 10^6$  の多様性を有するエピトープ発現ライブラリーを効率良く作製し、IDDM 患者より樹立した疾患感受性を示す HLA-DR53 に拘束されたヒト GAD65 p116-129 自己反応性 CD4<sup>+</sup>T 細胞クローンを用いて、簡便かつ確実にスクリーニングを行う方法を確立するために種々の条件・方法を比較検討した。エピトープ発現ライブラリーは、上記ベクター-pCI に任意の 13 個のアミノ酸からなるペプチドをコードする二本鎖オリゴ DNA を挿入し作製した。エピトープ発現ベクターを HLA-DR53 遺伝子と共に L 細胞、CHO 細胞、293 細胞あるいは COS 細胞に導入し、安定発現状態、あるいは一過性発現の状態と共培養し、T 細胞の増殖反応あるいはサイトカイン (IFN- $\gamma$ ) の産生によりその T 細胞刺激活性を評価した。

### C. 研究結果

エピトープ発現ライブラリーの作製およびスクリーニングについて、以下の方法が最も効率的かつ確実であるという結果を得た。1)ランダムなペプチドをコードする二本鎖DNAは、中央部にランダム化させた部分を含む115塩基の一本鎖DNAを鋳型とし、両端の定常部に対応するビオチン化したプライマ

ーを用いてPCRを行うことにより作製する(図1)。PCR産物を制限酵素(*Dra*Iおよび*Sac*I)で消化した後、アビジン-アガロースを用いて、プライマー部分を除去する。ランダムな部分を含む中央部の二本鎖オリゴDNAをベクターに挿入して大腸菌に導入し、 $10^5$ 程度のスケールのプラスミドライブラリーを作製し、DNAの状態で保存する。

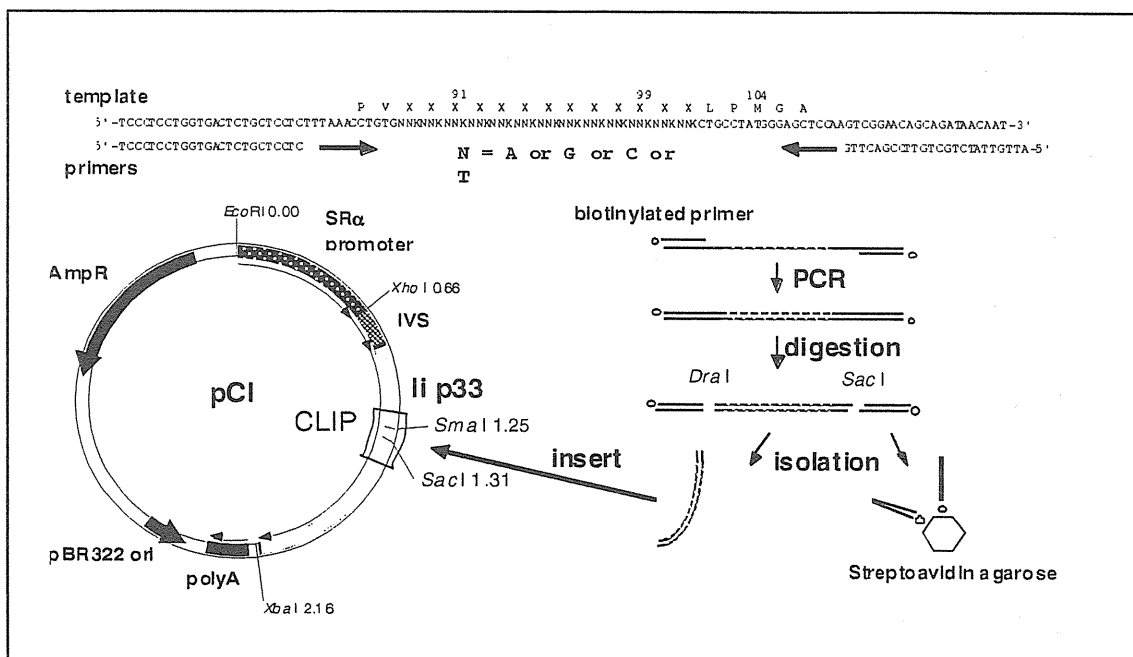


図1. CLIP置換型Ii鎖遺伝子を利用したエピトープライブラリーの作製

2)これを再度大腸菌に導入し、このライブラリーを500クローン前後のサイズに分けたサブライブラリーを作製する。大腸菌より抽出したDNAを96穴培養プレート中で培養している抗原提示細胞に導入し、これを用いて一次スクリーニングを行う。  
3)作製したプラスミドライブラリーを導入しT細胞刺激に用いる細胞としては、我々が検討したなかではCOS-7細胞が最も効率が良い。96穴培プレート中で $10^4$ 個のCOS細胞にリポフェクション法を用いた遺伝子導入により一過性発現させた状態でT細胞 $5 \times 10^4$ 個を加え、T細胞からのIFN- $\gamma$ の産生をELISA法

で検出するのが簡便かつ確実である。  
4)一次スクリーニングでT細胞の反応陽性のウェルが認められた場合は、そのウェルのトランスフェクションに用いたDNAプール(約500クローンを含む)を、再度大腸菌に導入し、このライブラリーを50個程度のサイズに分けたサブライブラリーを作製する。一次スクリーニングと同様の操作によって、このサブライブラリーのスクリーニングを行い、陽性クローンの絞りこみを行う。これを繰り返し、三~四次のスクリーニングによりクローンを単離することが可能である(図2)。

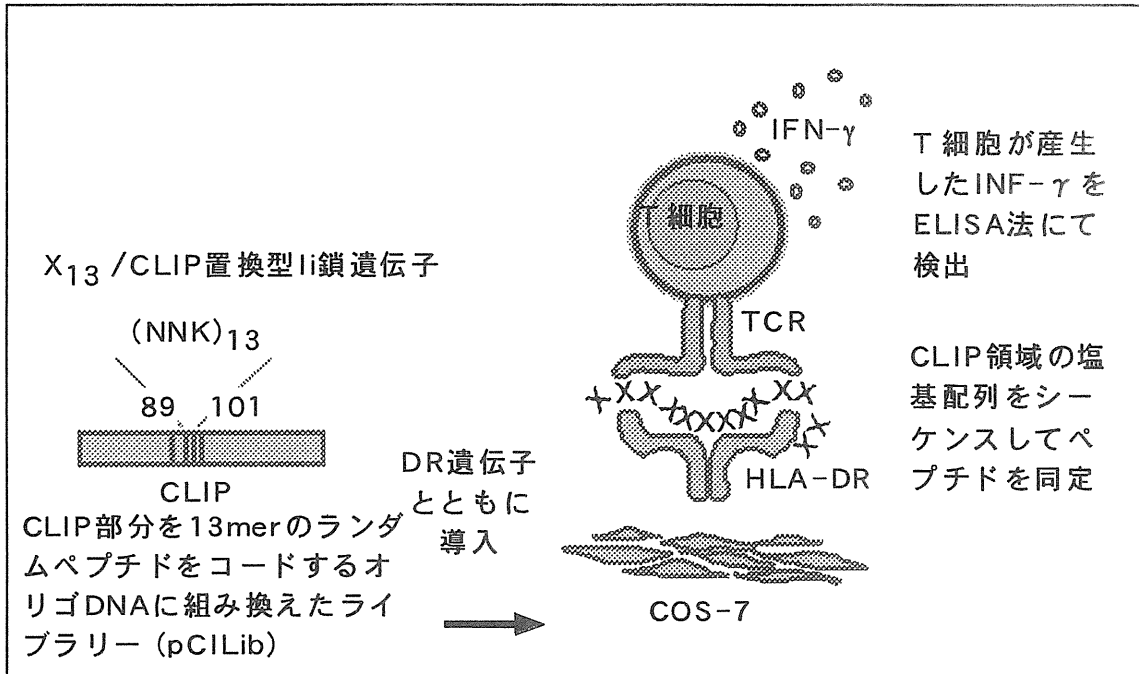


図2. CLIP置換型II鎖遺伝子を用いたエピトープ発現ライブラリーによるTCRリガンドの同定法のあらまし

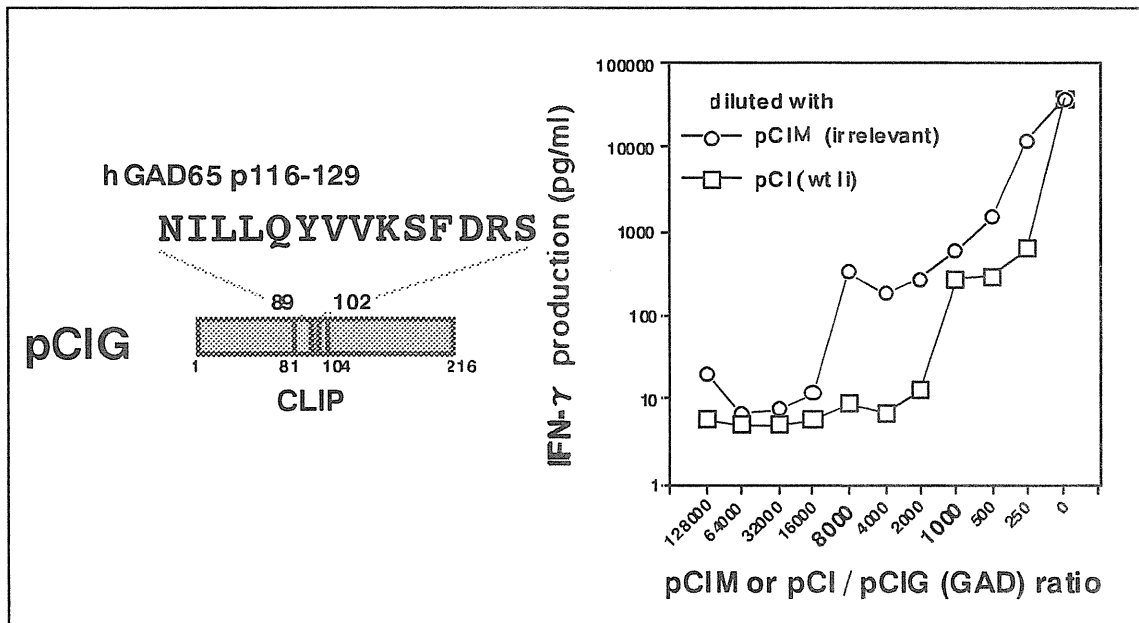


図3. IFN- $\gamma$ の産生を指標としたスクリーニングの感度の検討

5) pCIにヒトGAD p116-129ペプチドを発現させるベクターを作製し、これを無関係のエピトープを発現するプラスミドDNAで段階的に希釈し、このペプチドに特異的なT細胞

クローンを用いて検出するモデル実験により、スクリーニングの感度を検討した。この結果、96穴培養プレートにおいて1穴あたり最低でも1000種類のペプチドをスクリーニングする

ことが可能であることが判明した (図3)。

このようにして確立した方法により、HLA-DR53 拘束性ヒト GAD65 p116-129 自己反応性 CD4<sup>+</sup>T 細胞クローンを交叉反応により刺激しうるエピトープを  $2 \times 10^5$  スケールのエピトープライブラリーからスクリーニングした。その結果、一次スクリーニングにおいて3つの陽性プールを検出した。そのうち、1つについては、三段階のスクリーニングを経て単一クローンに到達し、エピトープ部の塩基配列の解析まで終了している。現在、この塩基配列によってコードされるペプチドを合成し、これがT細胞クローンを刺激しうるかどうか確認する作業を行っている。

#### D. 考察

本研究により確立した方法で、96 穴培養プレート1枚あたり  $5 \times 10^4 \sim 10^5$  種類のスケールのライブラリーの一次スクリーニングが可能であることが示された。また、プラスミドライブラリーの作製からスクリーニング、さらに陽性クローンの塩基配列の決定まで3週間程度で終了できる。オリジナルライブラリーおよびサブライブラリーはプラスミドDNAの状態では保存しているので、必要に応じ何回でもそのまま使用可能である。しかも、保存しておいたライブラリーは、異なるクラスII分子(異なるアレルのDR分子あるいはDQ、DP分子)を拘束分子とするT細胞のエピトープの同定にも利用が可能である。

このシステムを用いて、自己免疫疾患の炎症局所あるいは悪性腫瘍の組織に浸潤しているCD4<sup>+</sup>T細胞のエピトープを同定することが可能と考えられる。近年、特定のT細胞クローンを活性化しうる抗原ペプチドは単一ではなく、ある程度の多様性を有することが知られており、自己免疫疾患の発症機序の一つとして、微生物由来の抗原等の分子擬態による自己反応性T細胞の活性化が考えられている<sup>2) 3)</sup>。今後、特定のCD4<sup>+</sup>T細胞が認識しうるエピトープを多数同定し、データを蓄積することにより、分子擬態によりT細胞刺激を行いう

るエピトープの多様性がどのようなものであるかを、明らかにすることが可能であると考えられる。また、腫瘍浸潤T細胞を活性化しうるエピトープの情報を基に、ペプチドによる抗腫瘍ワクチン<sup>4)</sup>を作製するという応用も考えられる。

#### E. 結論

CLIP 置換型 Ii 鎖遺伝子発現ベクターを用いて、多様なHLAクラスII分子・ペプチド複合体を発現するライブラリーを作製し、スクリーニングするための方法を確立した。我々のシステムは、 $10^5 \sim 10^6$  の多様性を有するエピトープの集団の中から、特定のCD4<sup>+</sup>T細胞が認識しうるエピトープを短時間で同定しうる実用的なものであり、また一度作製したライブラリーは、多様なCD4<sup>+</sup>T細胞クローンのエピトープの同定にも利用が可能であり汎用性を有するという特徴をもつ。

#### F. 研究発表

1. Yun, C., Senju, S., Fujita, H., Tsuji, Y., Irie, A., Matsushita, S., and Nishimura, Y. Augmentation of immune response by altered peptide ligands of the antigenic peptide in human CD4<sup>+</sup>T cell clone reacting to TEL/AML1 fusion protein. *Tissue Antigens* 54: 153-161, 1999.
2. Yamasaki, K., Horiuchi, I., Minohara, M., Kawano, Y., Ohyaigi, Y., Yamada, T., Mihara, F., Ito, H., Nishimura, Y., Kira, J-I. HLA-DPB1\*0501-associated optico-spinal multiple sclerosis: clinical, neuroimaging and immunogenetic studies. *Brain* 122: 1689-1696, 1999.
3. Tanaka, Y., Ohyama, H., Ogawa, M., Nishimura, Y., and Matsushita, S. Identification of peptide superagonists for a self-K-ras-reactive CD4<sup>+</sup>T cell clone, using combinatorial peptide libraries and mass spectrometry. *J. Immunol.* 162: 7155-7161, 1999.