

厚生省 特定疾患対策研究事業

自己免疫疾患の病因・病態解析と
新たな治療法の開発に関する研究

平成11年度研究業績報告書

平成12年3月

主任研究者 小池 隆夫

— 目次 —

1. 構成員名簿 3

2. 総括研究報告書 7

3. 分担研究報告書 19

全身性エリテマトーデス・抗リン脂質抗体症候群

1. 抗リン脂質抗体症候群(APS)におけるT細胞応答の解析 21
熊本大学大学院医学研究科・免疫識別学 松下 祥

2. 抗リン脂質抗体症候群における自己抗体の関与した動脈硬化の発症機序の解明 35
岡山大学医学部附属分子細胞医学研究施設細胞工学部門 松浦栄次

3. 免疫血栓症の新たな指標としての抗血管内皮五糖体 (VPS) 自己抗体 41
東北大学 第二内科 (免疫・血液病制御学、分子診断学) 佐々木毅

4. 可溶性 CTLA-4 の検出と解析 46
北海道大学医学部第二内科 小池隆夫

5. 全身性自己免疫疾患における抗細胞表面抗体の検出と解析 55
聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター第一部門 加藤智啓

6. SLE 患者のリンパ球におけるステロイド抵抗性獲得の機序と多剤抵抗性遺伝子の発現との
関連性、及び、その制御 58
産業医科大学医学部第一内科 田中良哉

7. 全身性エリテマトーデス (SLE) 患者 T 細胞シグナル伝達異常に関する分子の免疫学的研究
. 64
埼玉医科大学総合医療センター 第二内科 竹内 勤

8. SLE における病態の規定因子に関する研究 67
順天堂大学膠原病内科 橋本博史

実験動物モデル

1. 自己免疫疾患発症における PD-1 の役割 74
京都大学大学院医学研究科生体統御学分子生物学 西村泰行

2. B細胞免疫応答における FcγRIIB 制御領域多型の役割 80
順天堂大学医学部、第二病理 広瀬幸子

3. 全身性自己免疫疾患発症における CD40 リガンド過剰発現の役割 83
東京医科歯科大学難治疾患研究所免疫 鏑田武志

PM/DM

1. 多発性筋炎・皮膚筋炎に合併した間質性肺炎に対するシクロスポリン療法に関する全国調査
..... 88
東京医科歯科大学医学部第一内科 宮坂信之
2. PM/DMにおけるIL-15の発現とその役割 98
東京女子医科大学付属膠原病リウマチ痛風センター 原まさ子
3. 炎症性筋疾患におけるARC (ARC, apoptosis repressor with caspase recruitment domain) の発現異常について 109
東京大学医学部アレルギーリウマチ内科 當間重人
4. プリステン投与による正常マウスにおける筋炎特異自己抗体産生誘導に関する研究 112
¹慶應義塾大内科 平形道人

シェーグレン症候群

1. シェーグレン症候群における唾液腺組織障害関連分子に関する研究 119
金沢医科大学血液免疫内科 菅井進
2. シェーグレン症候群 (SS) 唾液腺障害、特に唾液腺腺房および導管上皮細胞アポトーシスの制御機構の検討 127
長崎大学医学部第一内科 江口勝美

治療・その他

1. 新しい免疫抑制剤FTY720経口投与による自己免疫モデルマウスの治療の試み 134
自治医科大学アレルギー膠原病 箕田清次
2. 間質性肺炎線維化におけるIL-6の関与の解析 139
大阪大学健康体育部健康医学第一部門 西本憲弘

4. 研究成果の刊行に関する一覧表 147

(1) 構成員名簿

平成十一年度 「自己免疫疾患の病因・病態解析と
新たな治療法の開発に関する研究」 班員名簿

区分	氏名	所属	職名
主任研究者	小池 隆夫	北海道大学医学部内科学第二講座	教授
分担協力者	竹内 勤	埼玉医科大学総合医療センター第二内科	教授
	鏑田 武志	東京医科歯科大学難治疾患研究所ウイルス・免疫疾患研究部門	教授
研究協力者	広瀬 幸子	順天堂大学医学部病理学第二講座	助教授
	宮坂 信之	東京医科歯科大学医学部内科学第一講座	教授
	西本 憲弘	大阪大学健康体育部健康医学第一部門	助教授
	松下 祥	熊本大学大学院医学研究科脳免疫統合科学系・免疫識別学	助教授
	佐々木 毅	東北大学医学部病態制御学免疫・制御学	教授
	菅井 進	金沢医科大学血液免疫内科学	教授
	簗田 清次	自治医科大学アレルギー膠原病科・リウマチ講座	教授
	加藤 智啓	聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター第一部門	助教授
	當間 重人	東京大学医学部附属病院内科アレルギー・リウマチ内科	助手
	橋本 博史	順天堂大学医学部内科学膠原病内科	教授
原 まさ子	東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター	教授	
平形 道人	慶応義塾大学医学部内科リウマチ研究室	講師	
西村 泰行	京都大学大学院医学研究科生体統御学分子生物学教室	助手	
松浦 栄次	岡山大学医学部附属分子細胞医学研究施設細胞工学部門	講師	
田中 良哉	産業医科大学内科学第一講座	講師	
江口 勝美	長崎大学医学部内科学第一講座	教授	
(事務局) 経理事務連絡 担当責任者	渥美 達也	北海道大学医学部内科学第二講座 ☎060-8638 札幌市北区北15条西7丁目 TEL (011) 716-11616 (内5913) FAX (011) 736-0958	講師

(2) 平成11年度総括研究報告書
(特定疾患対策研究事業)

主任研究者 小池 隆夫

北海道大学医学部内科学第二講座

自己免疫疾患の病因・病態解析と新たな治療法の開発に関する研究

主任研究者 小池 隆夫
(北海道大学医学部内科学第二講座)

研究要旨

全身性エリテマトーデス(SLE)の病態には、T細胞の機能不全が深く関わっていることが明かとなっているが、その分子機序は不明のままであった。近年、免疫異常の一つがT細胞表面からサイトカイン転写に至るシグナル伝達系に存在する可能性が指摘されている。T細胞抗原リセプターからのシグナル伝達経路において、PKCより近位部に本質的な異常が存在すると考え、チロシンリン酸化を指標として、SLE患者T細胞に見いだされる異常分子の特定を試みてきた。その結果、60%以上のSLE患者において、T細胞リセプター(TCR)からのシグナル伝達に関与するzeta(ζ)鎖の蛋白発現が著明に低下していることを世界で始めて明らかにした。CTLA-4(CD152)は、T細胞活性化に伴って一過性に発現されるI型膜蛋白であり、T細胞活性化の負の調節分子として免疫応答の調節機能を担っている。T細胞活性化を特徴とするSLEにおいてCTLA-4の発現異常の有無を調べるために、末梢血単核細胞によるCTLA-4遺伝子の発現をRT-PCR解析した。その結果、SLE症例よりCTLA-4遺伝子変異体をクローニングし、塩基配列と蛋白発現解析から、それが可溶性CTLA-4遺伝子であることを明らかにした。また、可溶性CTLA-4分子に新たに付加されたアミノ酸配列を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製して、可溶性CTLA-4測定サンドイッチELISAを確立した。SLE群では血清可溶性CTLA-4レベルはむしろ健常者群よりも低下していた。

SLEで検出される抗リンパ球抗体は、抗核抗体と異なり直接リンパ球に結合することから、リンパ球機能、ひいては病態を修飾する可能性がある。CTLA-4に対する自己抗体が存在し、しかもこのCTLA-4自己抗体はリンパ球増殖を増強することを見出した。また、CD69に対する自己抗体を20%以上の頻度で検出した。

SLEの初期の病態の長期予後に対する影響と病態の規定因子の1つの候補としてTh1/Th2バランスを調べた。WHOⅢ型やネフローゼを伴う腎症、Organic brain syndromeを伴うCNSループス、間質性肺炎、抗リン脂質抗体症候群(APS)等の重篤または難治性の病態が初回診断時に主病変の症例は予後が不良で、ADLの障害も多かった。Th1/Th2バランスとの関連では、血中でTh2関連サイトカインのみが増加する群では腎症が多いのに対して、Th2・Th1両方のサイトカインが増加する群では非腎症特に肺病変が多く、IL-12の増加も認められた。

SLEの臨床では、副作用のためステロイドの減量を要するが長用量投与を余儀なくされる症例を多数経験し、治療に難渋する。SLE患者における多剤抵抗性遺伝子(MDR-1)の関与について検討した。その結果長期ステロイドを服用したSLE患者末梢血CD4、CD8、CD19リンパ球では、P-糖蛋白質とMDR-1遺伝子転写調節因子YB-1の発現が有意に増加し、また、細胞内ステロイド濃度は減少していることを見出した。

ステロイド抵抗性 SLE 患者では、MDR-1 の転写と P-糖蛋白質の発現が亢進する事、P-糖蛋白質高発現が細胞内ステロイド濃度の低下をもたらすステロイド抵抗性を誘導する事、サイクロスポリン(CyA) により細胞内ステロイド濃度が回復する事が明らかとなった。SLE 自然発症系モデルマウスを用いたゲノムワイドな遺伝学的解析で、B 細胞の異常活性化に伴う高 IgG 血症の素因遺伝子の候補として、第 1 染色体テロメアにマップされる FcγRIIB 遺伝子が推定された。FcγRIIB 遺伝子の塩基配列の解析の結果、プロモーター領域の転写制御部位を含む一部欠損を伴う遺伝子多型が存在すること、この多型がリンパ濾胞胚中心の活性化 B 細胞における FcγRIIB1 の発現低下をきたすこと、この低下により IgG 抗体応答が亢進することが明らかとなった。本研究によって、SLE 素因遺伝子の一つとして、FcγRIIB 遺伝子プロモーター領域多型が関与していることが初めて明らかにされた。

PD-1 遺伝子は免疫グロブリンファミリーに属する膜蛋白質をコードし、その細胞質領域に免疫反応を負に制御する ITIMモチーフをもつ。その欠損マウスの作成、解析を行い、PD-1 が自己免疫病発症の制御に関与することを証明し、特に PD-1 が末梢における自己免疫寛容の制御を行っていることを示した。

CD 40 シグナルは自己抗原と反応した B 細胞のクローン除去を阻害することが示唆され、SLE 患者や SLE モデルマウス B X S B では CD 40 L の過剰および異所性の発現が示されている。CD 40 シグナルの過剰が全身性自己免疫疾患をひきおこすか検索する目的で、CD 40 L を過剰発現する CD 40 L トランスジェニックマウスの解析を行なった。このトランスジェニックマウスでは、液性免疫応答の亢進、自己抗体の産生、SLE 様の全身性自己免疫疾患の発症がおこった。したがって、SLE の発症において CD 40 L が重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

抗リン脂質抗体症候群(APS)は比較的新しい疾患概念であり、その本態は血栓症であるがその発症機序の詳細は不明である。抗リン脂質抗体の中でも抗カルジオリピン抗体の研究が飛躍的に進んでおり、特に対応抗原であるβ2-グリコプロテイン I (β2-GPI) を中心に研究が進んでいる。

β2-GPI の全長をカバーするペプチドライブラリーを合成し、この混合物で APS 患者のリンパ球を刺激することにより T 細胞株を樹立した。これを用いて患者 T 細胞は主に p244-264 (第 5 ドメインの SCKLPVKKATVVYQGERVKIQ) を認識していること、拘束 HLA 分子は多様であること、患者β2-GPI 反応性 T 細胞は健康人のそれと比較して、特異的刺激で誘導される IFNγ 産生能が明らかに低く、Th2 寄りのフェノタイプを示すことなどを明らかにした。

APS と動脈硬化の進展との関係が注目されている。β2-GPI が特異的に認識するリガンドを酸化 LDL より精製し同定したところ、cholesteryl-linoleate の酸化物であることがあきらかになった。また本リガンド含有リポソームのマクロファージへの結合は、β2-GPI および APS 由来の抗β2-GPI 抗体存在下で有意に増加した。

皮膚筋炎/多発性筋炎(PM/DM)およびシェーグレン症候群(SS)も難治性自己免疫疾患

であるが、T細胞の機能異常がこれらの病態の中心と考えられる。

PM/DM患者の生検筋組織を酵素処理し得られた初代培養細胞から抗CD56抗体を用いて筋芽細胞を分離した。このようにして得られた培養ヒト筋芽細胞にリコンビナントCD40リガンド蛋白を用いてCD40架橋刺激を加えたところ、IL-6,8,15及びMCP-1の産生亢進が起こった。また免疫染色にてPM/DM患者の筋細胞は正常例に比べて強くIL-6、IL-15、MCP-1を発現していた。

14種の正常マウス系(B6, B10, BALB/c, C3H, CBA系など)にプリステンあるいは生理食塩水0.5mlを腹腔内投与し、経時的に採血、検討した。また自己抗体はアイソトープ標識細胞などを用いた免疫沈降法により、認識される核酸成分と蛋白成分を調べた。その結果、抗SRP抗体は種々のマウス系(B6(2/30), BALB/cBy(1/20), C3H/HeOuj(2/8), DBA/1(1/15))に広く認められた。

また、抗7-2 RNP抗体が抗SRP抗体を産生するマウス系(B6(6/30), C3H/HeOuj(2/8), その他(4/122))に共通して見出された。抗tRNA関連抗体がB6/B10(4/63), CBA/CaJ(1/12)に検出されたが、他の系では認めなかった。生理食塩水投与群では自己抗体は検出されなかった。

PM/DMについては予後規定因子は間質性肺炎(IP)の合併であり、その対策が急がれている。これまでの研究からサイクロスポリン(Cy)の有用性が提唱されている。PM/DMに合併したIPに対しCyAが投与された症例を対象にして全国アンケート調査を中心としたretrospective studyを行った。IPの分類は主治医の判定に基づき、急性の発症あるいは急激な増悪を急性型、慢性に進行したものを慢性型と定義した。アンケート調査は全国13施設より40症例の解答を得た(PM11例, DM29例)。全例がステロイド剤を内服しており、17例がステロイドパルス療法を併用していた。自覚症状、理学所見、画像所見、動脈血ガス分析の4項目についてCyA投与開始時および28日後の比較検討を行ったところ、自覚症状、理学所見、動脈血ガス分析について統計学的に有意な改善が認められた。本研究においてもPM/DMに合併する間質性肺炎に対するCyAの有効性が明らかとなった。また、これまでの報告と同様、予後不良群はDMに合併する急性間質性肺炎であった。

間質性肺炎の臨床病態におけるTGF- β 、IL-6の役割を明らかにするため、肺繊維化型間質性肺炎を合併した慢性関節リウマチ、PM/DM、強皮症、混合性結合病とLIPを合併したキャスルマン病患者血清中TGF- β およびIL-6、また間質性肺炎活動性のマーカーとしてKL-6を測定した。両群ともにTGF- β に有意な上昇は認めなかった。しかし、繊維化を伴わない間質性肺病変合併患者ではIL-6は有意に高いがKL-6は正常域にあり、一方、繊維化を伴う間質性肺炎ではKL-6は高値を示したがIL-6は前者に比べ低値を示した。したがってIL-6は肺の繊維化に対し抑制的に働くか、直接的な関与をしない可能性が明らかになった。

シェーグレン症候群(SS)における唾液腺組織障害に関与する分子を同定するため、ケモカイン、サイトカイン、アポトーシス関連分子、CD40/CD40リガンド(CD40L)について検討した。その結果、SS唾液腺では正常唾液腺と比較し、IP-10は 12.3 ± 8.6 倍、MIGは 6.8 ± 2.6 倍と有意にmRNA発現が増強していた。IP-10とMIGはSS唾液

腺の導管細胞に発現しており、浸潤リンパ球の多くが CXCR3 を発現していた。SS 唾液腺では IL-2、IL-6、IL-10 など様々なサイトカインの発現が認められた。TGFβは導管上皮細胞に発現が認められ、Focus score の高い症例にて発現が減少していた。

SS 唾液腺において導管上皮、腺房細胞ともにアポトーシスに陥っている細胞が認められた。Fas は導管上皮および浸潤細胞に発現しており、FasL は一部の導管上皮、腺房細胞、導管周囲の少数の浸潤細胞に発現が認められた。

唾液腺腺房および導管上皮細胞のアポトーシスによる細胞死は SS の口腔乾燥症状を引き起こす一要因と考えられており、その機序の解明は特異的な治療法の開発につながると思われる。そこでヒト唾液腺細胞株を用いて検討したが、同細胞株は TNF-α および IFN-γ によりアポトーシスが誘導され、この細胞株の Fas 依存性アポトーシスも TNF-α および IFN-γ により増強された。TNF-α および IFN-γ は唾液腺細胞株の抗アポトーシス分子の発現を抑制しこれら細胞株のアポトーシスを誘導することが示唆された。

自己免疫疾患の代表的な治療薬である副腎皮質 ステロイド薬はその免疫抑制機序の一つとしてアポトーシス誘導作用を有する。リンパ球のアポトーシス誘導作用を有し、グルココルチコイド作用のない物質は SLE の治療に有望であると考えられる。そのような物質として、アポトーシスを引き起こす細胞表面抗原 Fas の細胞内シグナル伝達物質の一つであるセラミドとセラミド様作用を有する新しい免疫抑制剤 FTY720 に着目し、ループモデルマウスに対する経口投与実験を遂行した。その結果、腎炎の軽減、自己抗体の産生低下、寿命の延長など治療効果を認めた。

A. 研究目的

本研究の目的は各々の自己免疫疾患における免疫系の異常の特徴を明らかにし、疾患特異的治療戦略を構築し、患者の QOL の向上を計り、さらには病気の治癒を目指す事である。

B. 研究方法

(1)全身性エリテマトーデス (SLE) および抗リン脂質抗体症候群(APS)の病因、病態および治療に関して以下の検討を行った。①患者 T 細胞シグナル伝達異常に関する分子の検討。②患者血中の可溶性 CTLA-4 の検出と解析。③抗リンパ球抗体の特異性の解析。④SLE 患者リンパ球のステロイド抵抗性獲得の機序の解明。⑤SLE における病態の規定因子に関する研究⑥ SLE 感受性遺伝子としての FcγRIIB 制御領域多型の役割の検討。⑦自己免疫疾患発

症における PD-1 の役割の検討。⑧全身性自己免疫疾患発症における CD40 リガンド過剰発現の役割の検討。⑨抗リン脂質抗体症候群(APS)における T 細胞応答の解析。⑩抗リン脂質抗体症候群における自己抗体の関与した動脈硬化の発症機序の解明。⑪新たな免疫血栓症の指標としての抗血管内皮五糖体(VPS)自己抗体の解析。(2)多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)およびシェーグレン症候群(SS)の病因、病態および治療に関して以下の検討を行った。①多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)合併した間質性肺炎に対するシクロスポリン療法に関する全国調査。②PM/DM における IL-15 の発現とその役割に関する検討。③炎症性筋疾患における ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment domain) の発現異常の解明。④プリスタン(pristane)投与による正常マウスにおける筋炎特異自己抗体産生誘導の解析。⑤間質性肺炎繊維

IL-6 の関与の解析。⑥シェーグレン症候群(SS)における唾液腺組織障害関連分子に関する検討。⑦シェーグレン症候群 (SS) 唾液腺障害、特に唾液腺腺房および導管上皮細胞アポトーシスの制御機構の検討。⑧新しい免疫抑制剤 FTY720 経口投与による自己免疫モデルマウスの治療の試み。

C. 研究結果と考察

SLE 患者 T 細胞に見いだされる異常分子の特定を試みた。その結果、60%以上の SLE 患者において、T細胞リセプター (TCR)からのシグナル伝達に関与する zeta (ζ) 鎖の蛋白発現が著明に低下していることを明らかにした。一部の症例では、エクソスキッピングを含めたメッセージ異常が見い出された。この分子異常に伴って、サイトカイン産生、接着分子発現の二次的異常が惹起される可能性を TCRと鎖ノックアウト細胞を用いた検討で明らかにした。

T細胞活性化を特徴とする SLE において CTLA-4 の発現異常の有無を調べるために、末梢血単核細胞による CTLA-4 遺伝子の発現を RT-PCR 解析した。SLE 症例より CTLA-4 遺伝子変異体をクローニングし、塩基配列と蛋白発現解析から、それが可溶性 CTLA-4 遺伝子であることを明らかにした。また、可溶性 CTLA-4 分子に新たに付加されたアミノ酸配列を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製して、可溶性 CTLA-4 測定サンドイッチ ELISA を確立した。SLE 群では血清可溶性 CTLA-4 レベルはむしろ健常者群よりも低下していた。

T 細胞活性化に関係する T 細胞共刺激分子である CTLA-4(CD152)、CD28、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)に対する自己抗体、また、T 細胞の活性化に関わると考えられる CD69 に対する自己抗体の検索を行った。その結果、前者の分子群では CTLA-4 に対する自己抗体が存在し、し

かもこの CTLA-4 自己抗体はリンパ球増殖を増強することを見出した。また、CD69 に対する自己抗体も 20%以上の頻度で検出された。

SLE 患者における多剤抵抗性遺伝子 (MDR-1)とステロイド抵抗性の関係について検討した。長期ステロイドを服用した SLE 患者末梢血 CD4、CD8、CD19 リンパ球では、P-糖蛋白質と MDR-1 遺伝子転写調節因子 YB-1 の発現が有意に増加し、また、細胞内ステロイド濃度は減少した。代表的な免疫抑制薬シクロスポリン(CyA)は、P-糖蛋白質と拮抗的に結合して薬剤耐性を改善する作用も有する。SLE 患者リンパ球を *in vitro* で CyA 処理すると、細胞内ステロイド濃度を 15 分以内に有意に上昇させた。これらの結果を基に、ステロイドを長用量使用し減量が困難な SLE 患者 18 症例に CyA の併用投与を行った結果、15 例で臨床症状・所見、免疫学的検査所見等の改善を認め、ステロイドの減量を可能にした。

SLE の初期の病態の長期予後に対する影響と病態の規定因子の 1 つの候補として Th1/Th2 バランスを調べた。WHO III 型やネフローゼを伴う腎症、Organic brain syndrome を伴う CNS ループス、間質性肺炎、抗リン脂質抗体症候群 (APS) 等の重篤または難治性の病態が初回診断時に主病変の症例は予後が不良で、ADL の障害も多かった。Th1/Th2 バランスとの関連では、血中で Th2 関連サイトカインのみが増加する群では腎症が多いのに対して、Th2・Th1 両方のサイトカインが増加する群では非腎症特に肺病変が多く、IL-12 の増加も認めた。産生細胞の 1 つとして T 細胞を細胞内染色検索すると IL-4 産生 (Th2) 細胞の減少に伴う Th1/Th2 の増加が認められた。

PD-1 遺伝子は免疫グロブリンファミリーに属する膜蛋白質をコードし、その

細胞質領域に免疫反応を負に制御する TIMモチーフをもつ。PD-1 欠損マウスの作成、解析を行い、PD-1 が自己免疫病発症の制御に関与することを証明し、特に PD-1 が末梢における自己免疫寛容の制御を行っていることを示した。また、胸腺細胞の分化においても、 β 選択に影響を与えることで正の選択における自己反応性 T 細胞の産出を制御している可能性を示した。PD-1 の分子レベル、細胞レベル、個体レベルの解析、ヒト自己免疫病疾患との関連を研究することは、今後、自己免疫病の病因の解明に、また、病状の予後、治療法の確立に関しても貢献することが期待される。

SLE 自然発症系モデルマウスを用いたゲノムワイドな遺伝学的解析で、B 細胞の異常活性化に伴う高 IgG 血症の素因遺伝子の候補として、第 1 染色体テロメアにマップされる Fc γ RIIB 遺伝子が推定された。Fc γ RIIB 遺伝子の塩基配列の解析の結果、プロモーター領域の転写制御部位を含む一部欠損に伴う遺伝子多型が存在すること、この多型がリンパ濾胞胚中心の活性化 B 細胞における Fc γ RIIB1 の発現低下をきたすこと、この低下により IgG 抗体応答が亢進することが明らかとなった。本研究によって、SLE 素因遺伝子の一つとして、Fc γ RIIB 遺伝子プロモーター領域多型が関与していることが初めて明らかにされた。

CD 40 シグナルは自己抗原と反応した B 細胞のクローン除去を阻害することが示唆され、SLE 患者や SLE モデルマウス BXSB では CD 40 L の過剰および異所性の発現が示されている。CD 40 シグナルの過剰が全身性自己免疫疾患をひきおこすか検索する目的で、CD 40 L を過剰発現する CD 40 L トランスジェニックマウスの解析を行なった。このトランスジェニックマウスでは、液性免疫応答の亢進、自己抗体の産生、SLE 様の全身性自己免疫疾患

の発症がおこる。したがって、SLE の発症において CD 40 L が重要な役割を果たしていることが強く示唆される。また、CD 40 存在下では CD 40 L の発現が減弱するため、強い免疫促進作用があってもその検出が困難となる。SLE 患者などで CD 40 L の発現を検索する際には、十分注意する必要がある。

抗リン脂質抗体症候群 (APS) 患者に認められる抗カルジオリオピン抗体はアポ蛋白である β 2-GPI を認識する。 β 2-GPI の全長をカバーするペプチドライブラリーを合成し、この混合物で APS 患者の末梢リンパ球を刺激することにより T 細胞株を樹立した。これを用いて、患者 T 細胞は主に β 2-GPI 蛋白の p244-264 (第 5 ドメインの SCKLPVKKATVVYQGGERVKIQ) を認識していること、拘束 HLA 分子は多様であること、一部の健康人からも同じ特異性を有する T 細胞株が樹立できること、 β 2-GPI 蛋白は血清中に存在するが、高濃度の β 2-GPI 蛋白で T 細胞株を刺激しても増殖反応を誘導できないこと、しかし、患者 β 2-GPI 反応性 T 細胞は健康人のそれと比較して、特異的刺激で誘導される IFN γ 産生能が明らかに低く、Th2 寄りのフェノタイプを示すことを明らかにした。さらに、T 細胞抗原認識における分子擬態 (molecular mimicry) を解析するための基礎的方法論の確立を目的として、コンビナトリアルペプチドライブラリーと質量分析装置を組み合わせることにより、スーパーアゴニストを効率良く同定する方法を開発した。

β 2-GPI が特異的に認識するリガンドを酸化 LDL より精製し同定したところ、cholesteryl-linoleate の酸化物であった。本リガンド含有リポソームのマクロファージへの結合は、 β 2-GPI および APS 由来の抗 β 2-GPI 抗体存在下で有意に増加した。一方、APS 患者血清中の β 2-GPI ・リガンド複合体に対する自己抗体の陽性例および

抗体産生を追究した。抗 SRP 抗体、抗 OJ 抗体を含む抗 tRNA 関連自己抗体がプリスタン投与後の B6, BALB/c などの正常マウス血清に検出された。この結果は、ある環境要因に曝露された正常マウスにおける筋炎特異自己抗体の産生が示している。本動物モデルは筋炎特異自己抗体産生に対する、遺伝、環境因子の役割を追究する上で有用と考えられた。

膠原病疾患における間質性肺炎において繊維化を起こすといわれている代表的なサイトカインである TGF- β の作用と IL-6 の作用は異なると考えられる。そこで、実際の間質性肺炎の臨床病態における TGF- β , IL-6 の役割を明らかにするため、肺繊維化型間質性肺炎を合併した慢性関節リウマチ、多発性筋炎/皮膚筋炎、強皮症、混合性結合病と LIP を合併したキャッスルマン病患者血清中 TGF- β および IL-6、また間質性肺炎活動性のマーカーとして KL-6 を測定した。両群ともに TGF- β に有意な上昇は認めなかった。しかし、繊維化を伴わない間質性肺病変合併患者では IL-6 は有意に高いが KL-6 は正常域にあり、一方、繊維化を伴う間質性肺炎では KL-6 は高値を示したが IL-6 は前者に比べ低値を示した。したがって IL-6 は肺の繊維化に対し抑制的に働くか、直接的な関与をしない可能性があると考えられた。

シェーグレン症候群(SS)における唾液腺組織障害に関与する分子を同定した。SS 唾液腺では正常唾液腺と比較し、IP-10 は 12.3 ± 8.6 倍、MIG は 6.8 ± 2.6 倍と有意に mRNA 発現が増強していた。SS 唾液腺では IL-2、IL-6、IL-10 など様々なサイトカインの発現が認められた。TGF- β は導管上皮細胞に発現が認められ、Focus score の高い症例にて発現が減少していた。SS 唾液腺において導管上皮、腺房細胞ともにアポトーシスに陥っている細胞が認められた。Fas は導管上皮お

よび浸潤細胞に発現しており、FasL は一部の導管上皮、腺房細胞、導管周囲の少数の浸潤細胞に発現が認められた。また腺房に Bax 陽性細胞を数多く認めた。唾液腺浸潤細胞は Bcl-2 を発現しており、アポトーシス細胞は少なかった。NZB/W F1 マウスに抗 CD40L 抗体を投与し、組織学的な変化を検討したところ、唾液腺、肺、腎においてリンパ球浸潤の著明な抑制が認められた。

唾液腺腺房および導管上皮細胞のアポトーシスによる細胞死は SS の口腔乾燥症状を引き起こす一要因と考えられており、その機序の解明は特異的な治療法の開発につながると思われる。そこでヒト唾液腺細胞株を用いて検討したが、同細胞株は TNF- α および IFN- γ によりアポトーシスが誘導され、この細胞株の Fas 依存性アポトーシスも TNF- α および IFN- γ により増強された。TNF- α および IFN- γ は唾液腺細胞株の抗アポトーシス分子の発現を抑制しこれら細胞株のアポトーシスを誘導することが示唆され、今後はアポトーシス制御分子をターゲットとした SS の治療法の開発が期待される。

自己免疫疾患の代表的な治療薬である副腎皮質ステロイド薬はその免疫抑制機序の一つとしてアポトーシス誘導作用を有する。リンパ球のアポトーシス誘導作用を有し、グルココルチコイド作用のない物質は SLE の治療に有望であると考えられる。そのような物質として、アポトーシスを引き起こす細胞表面抗原 Fas の細胞内シグナル伝達物質の一つであるセラミドとセラミド様作用を有する新しい免疫抑制剤 FTY720 に着目し既に自己免疫病を発症している生後 8 ヶ月齢の NZB/WF1 マウスに週 3 回経口投与した。FTY720 投与群では生存率の上昇 (13 ヶ月齢 66.7% vs コントロール群 25.0%)、腹腔内 CD5⁺ B 細胞数の減少 (0.2×10^7 vs コントロール群 1.0×10^7)、経時

的な血清抗 ds-DNA 抗体価の低下とさらに蛍光免疫組織学的検査で腎糸球体への IgG 沈着の減少とが観察された。FTY720 は NZB/WF1 ループスマウスに対しても治療効果を有し、SLE に対する新しい治療法となりうることが示された。

E. 結論

(1)SLE の免疫異常としての T 細胞シグナル伝達異常を解析し、T 細胞リセプター (TCR)からのシグナル伝達に参与する zeta (ζ) 鎖の蛋白発現が著明に低下していることを示した。また、SLE 患者血中には免疫制御分子である CTLA-4 の soluble form やそれに対する自己抗体が存在する事を明らかにした。(2)ステロイド抵抗性獲得の機序の一つとして、多剤抵抗性遺伝子(MDR-1)発現によるステロイドの細胞外への能動輸送に伴う細胞内ステロイド濃度の減少が想定される。ステロイド抵抗性 SLE 患者末梢血リンパ球において、MDR-1 遺伝子産物である P-糖蛋白質が発現し、ステロイド抵抗性を来す事が明らかになった。(3)SLE における病態の規定因子を初回診断時の病態と免疫異常の点から考察し、長期予後に及ぼす影響を明らかにした。(4)SLE 自然発症系モデルマウスを用いたゲノムワイドな遺伝学的解析で、B 細胞の異常活性化に伴う高 IgG 血症の素因遺伝子の候補として、第 1 染色体テロメアにマップされる FcγRIIB 遺伝子が推定され、SLE 素因遺伝子の一つとして、FcγRIIB 遺伝子プロモーター領域多型が関与していることが初めて明らかにされた。(5)PD-1 遺伝子は免疫グロブリンファミリーに属する膜蛋白質をコードし、その細胞質領域に免疫反応を負に制御する ITIM モチーフをもつ。その欠損マウスの作成、解析を行い、PD-1 が自己免疫病発症の制御に関与することを証明し、特に PD-1 が末梢における自己免疫寛容の制御を行っていることを示した。(6)動物モ

デルでの実験から SLE の発症において CD40L が重要な役割を果していることが強く示唆された。(7)抗リン脂質抗体症候群 (APS)では免疫系のみならず動脈硬化や血栓形成傾向の制御が重要であり、血栓形成メカニズムの解析が必須である。今回の研究で APS 患者 T 細胞が認識するエピトープペプチドが同定された。またβ2-GPI の結合する酸化 LDL 上のリガンドも同定され、APS と動脈硬化との接点が明らかになってきた。さらに抗リン脂質抗体とは別の血栓症診断のマーカーとなりうる自己抗体の存在も明らかになった。(8)多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)は、間質性肺炎をしばしば併発し、本症の予後規定因子となっている。本症に対するシクロスポリン(CyA)の投与に関して、全国にアンケート調査を実施し、CyA 療法の有効性の検討及び標準的治療指針をこの調査結果をもとに作成した。(9)筋生検より得られた PM/DM 患者由来の筋芽細胞を用いて CD40 架橋刺激を加え、これらサイトカインの産生、特に IL-15 についてその産生制御機構等につき検討したところ IL-6,8,15 及び MCP-1 の産生亢進を認めた。(10)多発性筋炎や皮膚筋炎の筋生検での ARC 分子の発現を RT-PCR 法により検討したところ、完全長の ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment domain) の発現は認められず、代わりに short forms の発現が認められた。一方、末梢神経障害患者や強皮症に伴う筋炎患者では完全長の ARC の発現を認めた。(11)プリステン投与による正常マウス系における筋炎特異自己抗体産生を追究した結果、抗 SRP 抗体は種々のマウス系に広く認められた。また、抗 7-2 RNP 抗体は抗 SRP 抗体を産生するマウス系に共通して見出された。しかし抗 tRNA 関連抗体は B6/B10 や CBA/CaJ マウスの一部に検出されたが、他の系には認められなかった。(12)間質性肺炎の臨床病態における TGF-β,

血清中酸化 LDL の異常高値例が動脈血栓症の既往例と有意に相関した。以上の結果より酸化 LDL に対する自己抗体の反応が APS における動脈血栓の発症に深く関与している可能性が考えられた。

動脈硬化症を有しない例での血栓症の原因は APS 等を除き、ほとんどの例で不明である。これまで自己免疫疾患患者の血中に血管内皮細胞上のヘパラン硫酸の ATIII 結合部位 (vascular pentasaccharide, VPS) を認識する自己抗体が存在することを報告してきた。本研究ではこの抗体が APS を含む血栓症診断の指標となりうるか否かを追求した。その結果、抗 VPS 抗体は抗リン脂質抗体症候群陰性例においても検出可能な、新たな血栓症の標識抗体となり得ると推定された。

PM/DM に伴う急速進行性間質性肺炎に対してシクロスポリン (CyA) が有効であるとする報告が散発的にみられていることから、CyA 療法の有効性の検討及び標準的治療指針を全国アンケート調査をもとに作成することにした。アンケート調査は全国 13 施設より 40 症例の解答を得た (PM11 例, DM29 例)。全例がステロイド剤を内服しており、17 例がステロイドパルス療法を併用していた。自覚症状, 理学所見, 画像所見, 動脈血ガス分析の 4 項目について CyA 投与開始時および 28 日後の比較検討を行ったところ、著効 27%, 有効 17%, やや有効 23%, 不変 13%, 増悪 20% であった。疾患別にみると、PM では著効 45%, 有効 22%, やや有効 33%, 不変および増悪は 0% であるのに対して、DM では著効 19%, 有効 14%, やや有効 19%, 不変 19%, 増悪 29% であった。

これまで、筋芽細胞 cell line を用い、CD40 架橋刺激にて筋芽細胞からの IL-6, 8, 15 及び MCP-1 の産生亢進が起こることを示してきた。今回筋生検より得られた患者由来の筋芽細胞を用いて CD40 架橋刺

激を加え、これらサイトカインの産生を検討した。また、特に IL-15 についてその産生制御機構等につき検討した。CD40 架橋刺激を加えたところ、IL-6, 8, 15 及び MCP-1 の産生亢進が起こった。また免疫染色にて PM/DM 患者の筋細胞は正常例に比べて強く IL-6, IL-15, MCP-1 を発現していた。培養筋芽細胞に各種 cytokine, LPS 刺激を加え、48 時間後の培養上清、細胞溶解液を回収し、IL-15 の濃度を ELISA にて測定した。IL-15 産生は IFN- γ , IL-1 α , LPS 刺激にて濃度依存的に亢進した。また、刺激後 6 時間にて RNA を抽出し、IL-15 mRNA 発現量を定量的に測定したところ、IFN- γ , IL-1 α 刺激は mRNA レベルにて IL-15 の発現亢進をおこすことが明らかとなった。

ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment domain) は筋組織で特異的に発現し、caspase-8 に結合しその作用を抑制することで筋細胞のアポトーシスを抑制する分子である。多発性筋炎や皮膚筋炎の筋生検での ARC 分子の発現を RT-PCR 法により検討したところ、完全長の ARC の発現は認められず、代わりに short forms の発現が認められた。一方、末梢神経障害患者や強皮症に伴う筋炎患者では完全長の ARC の発現を認めた。完全長 ARC の発現消失が筋細胞のアポトーシスを介して、多発性筋炎や皮膚筋炎の病態形成に関与する可能性が考えられた。

抗 SRP 抗体, 抗アミノアシル tRNA 合成酵素抗体などの筋炎特異自己抗体は特徴的臨床像と密接に関連し、診断, 病型分類, 症状発現の推測など臨床的に有用なばかりでなく、病因・病態を考える上でも大切である。本研究は、SLE 特異自己抗体などを誘導することが明らかとなったプリスタンを用いた 14 種の正常マウス系 (B6, B10, BALB/c, C3H, CBA 系など) に投与し、免疫沈降法により筋炎特異自己

IL-6 の役割を明らかにするため、肺繊維化型間質性肺炎を合併した各種自己免疫疾患と LIP を合併したキャスルマン病患者血清中 TGF- β および IL-6、また間質性肺炎活動性のマーカーとして KL-6 を測定した。両群ともに TGF- β に有意な上昇は認めなかった。しかし、繊維化を伴わない間質性肺病変合併患者では IL-6 は有意に高いが KL-6 は正常域にあり、一方、繊維化を伴う間質性肺炎では KL-6 は高値を示したが IL-6 は前者に比べ低値を示した。(13) シェーグレン症候群(SS)における唾液腺組織障害に関与する分子を同定した。またヒト唾液腺細胞株を用いたアポトーシス検討したが、同細胞株は TNF- α および IFN- γ によりアポトーシスが誘導され、この細胞株の Fas 依存性アポトーシスも TNF- α および IFN- γ により増強された。(14) セラミド様作用を有する新しい免疫抑制剤 FTY720 に着目し、ループモデルマウスに対する経口投与実験を遂行した。その結果、腎炎の軽減、自己抗体の産生低下、寿命の延長など治療効果を認めた。

(3) 平成11年度分担究報告書
(特定疾患対策研究事業)

抗リン脂質抗体症候群におけるT細胞応答の解析

分担研究者 松下 祥

(熊本大学大学院医学研究科免疫識別学講座)

研究要旨

β 2-GPIの全長をカバーするペプチドライブラリーを合成し、この混合物で抗リン脂質抗体症候群 (antiphospholipid syndrome; APS) 患者のPBMCを刺激することによりT細胞株を樹立し、これを用いて (1) 患者T細胞は主に p244-264 (第5ドメインの SCKLPVKKATVVYQGERVKIQ) を認識している、(2) 拘束 HLA 分子は多様である、(3) 一部の健康人からも同じ特異性を有するT細胞株が樹立できる、(4) β 2-GPI 蛋白は血清中に存在するが、高濃度の β 2-GPI 蛋白でT細胞株を刺激しても増殖反応を誘導できない、(5) しかし、患者 β 2-GPI 反応性T細胞は健康人のそれと比較して、特異的刺激で誘導される IFN γ 産生能が明らかに低く、Th2 寄りのフェノタイプを示すことを明らかにした。さらに、T細胞抗原認識における分子擬態 (molecular mimicry) を解析するための基礎的方法論の確立を目的として、コンビナトリアルペプチドライブラリーと質量分析装置を組み合わせることにより、野生型ペプチドよりも log オーダーで強いT細胞刺激活性を持つスーパーアゴニストを効率良く同定する方法を開発した。

A. 研究目的

抗リン脂質抗体症候群(APS)の血管病変発現においては、ヘルパーT細胞の関与が示唆され、その責任T細胞エピトープの供給源として β 2-glycoprotein I (β 2-GPI)が推定されている。本研究は、APSにおけるT細胞活性化のメカニズムを明らかにすることにより、APSの発症や進展に関与する免疫機構を解明することを目指す。本年度は (A) 患者T細胞によって認識される β 2-GPI 蛋白上のエピトープを同定するとともに β 2-GPI 反応性T細胞株の特徴を解析し、

(B) 分子擬態の解析を念頭において、野生型ペプチドよりも log オーダーで強いT細胞刺激活性を持つスーパーアゴニストを効率良く同定する方法を開発すること、の2点を目的とした。

B. 研究方法・結果・考察

末梢静脈血は18名の抗 β 2GPI IgG抗体陽性患者 (女15名、男3名、平均43.0歳、幅19-66歳)および10名の抗 β 2GPI IgG抗体陰性健康人 (女6名、男4名、平均25.8歳、幅22-32歳)から、順天堂大学医学部膠原病内科をはじめとする3施設の御協力を得てインフォームドコンセントのもと採取した。ヒト β 2GPIのアミノ酸配列の全長をカバーするように、オーバーラップする40種類のペプチドを合成し、ペプチドライブラリーとした。

PBMC 1.5×10^5 個/ウェルを96穴平底培養プレート中で、各ペプチド0.1mMずつの混合物で刺激した。さらに自己反応性T細胞株の樹立の効率を上げるために MAR4 (抗CD29モノクローナル抗体; Pharmingen) 2.5 mg/mlを加えた⁽¹⁾。 β 2GPIペプチド混合物 (各ペプチド0.5

mM) を 6 時間パルスして洗浄した自己の PBMC (3,000 cGy X 線照射) を、ヒト rIL-2 50 U/ml およびヒト rIL-4 10 U/ml とともにフィーディングする作業を 1 週間ごとにくり返した。クローニングは限界希釈法によった。

拘束 HLA クラス II 分子の同定は HLA-DR、DQ および DP 分子に特異的なモノクローナル抗体、アロ PBMC、もしくは特定の HLA クラス II 対立遺伝子産物を発現する L 細胞トランスフェクタントを用いて行った。T 細胞が産生するサイトカインの解析は培養 48 時間後に各ウエルから上清を採取し ELISA キットを用いて測定した。

4 名の患者および 2 名の健常人において β 2GPI ペプチド反応性 T 細胞の増殖を認め、患者由来の T 細胞株を 4 種類、および健常人由来の T 細胞株を 3 種類樹立することができた。ペプチド混合物で刺激して得られたこれら 7 種類の T 細胞株について、各ペプチドに対する増殖応答を調べた結果を図 1 に示した。まとめると、患者由来の 4 種類の β 2GPI ペプチド反応性 T 細胞株のエピトープは 2 つの β 2GPI ペプチドにマップされ、健常人由来の 3 種類の β 2GPI ペプチド反応性 T 細胞株のエピトープは、3 つの β 2GPI ペプチドにマップされた。その内の 1 つである p244-264 は、患者および健常人由来の T 細胞株に共通するエピトープであった。樹立された T 細胞株は CD4⁺、CD8⁻、abTCR⁺ 細胞株であった。同定された拘束 HLA クラス II 分子とともに一覧表にしたのが表 1 である。

本研究で解析の対象とした患者のほとんどは、治療として副腎皮質ステロイドやアザチオプリンなどの免疫抑制剤の投与を受けていた。したがって一定数の PBMC をペプチドで刺激した際に樹立できた T 細胞株の数を、単純に患者群と健常対照群との間で比較することにより β 2GPI ペプチド反

応性 T 細胞の頻度を比較検討することはできない。拘束 HLA クラス II 分子は多様であり、HLA-DR 分子に拘束されているものが優位であるということ以外は特定の傾向は認められなかった。過去に抗 β 2GPI 抗体もしくは抗カルジオリピン抗体 (aCL) が陽性の患者群において、多様な HLA クラス II 対立遺伝子との相関が報告されている⁽²⁻⁹⁾。メキシコ人などで DR53、DR4(-DQ8)ハプロタイプ、DR52(DRB3*0101)と連鎖不平衡にある DR5 (おそらく DRB1*1201) と抗 β 2GPI 抗体あるいは aCL との相関が報告されていることは、本研究で樹立した T 細胞株の拘束 HLA クラス II 分子と関連があり興味深い。日本人では抗 b2GPI 抗体陽性の SLE 患者と DR9 (DRB1*0901) との間に補正後に有意差が失われる程度の弱い相関が報告されているが、本研究では DR9 に拘束された T 細胞株は樹立されなかった。しかし、より大きな母集団で検討すれば日本人でも DRB1*0901 以外の対立遺伝子との相関が認められる可能性もあり、これは今後の検討課題である。ただし、DRB1*0901 遺伝子と連鎖不平衡にある何らかの未知の遺伝子が疾患感受性の形成に関与している可能性も否定できない。

以上を総合すると特定の HLA クラス II 対立遺伝子は、少なくとも部分的には b2GPI に関連する自己免疫現象において、自己反応性 T 細胞に β 2GPI ペプチドを提示して活性化しやすいという、いわゆる免疫応答遺伝子としての作用を発現している可能性が示唆された。

次にペプチド 10 mM (飽和濃度) による刺激後 48 時間の培養上清中のサイトカインを測定した (図 2 A)。IFN γ /IL-4 比は患者由来の T 細胞群のほうが平均値 4.57 (1.54-12.4) で、健常人由来の T 細胞群の平均値 149.8 (36.1-335.5) に比べて有意に低い値であった (p=0.028) (図 2 B)。

特に、患者由来の NT5.3.1 と健康人由来の SM21 は、同一の HLA クラス II 分子 (DR53 分子) に拘束された同一のペプチド (p244-264) を認識しているにもかかわらず、IFN γ /IL-4 はそれぞれ 1.39 と 336 であり、大きな差異が認められた。T 細胞株のサイトカイン産生パターンが患者と健康人で著しく異なることから、合成ペプチドを単なる非自己ペプチドとして認識する precursor T 細胞をとらえているとは考えにくい。すなわちこの結果は、 β 2-GPI ペプチド反応性 T 細胞が、特殊な条件下のみで抗原提示されるようなクリプティックなエピトープを認識している可能性を示唆している。T 細胞をより強く刺激できる自己・非自己のペプチドが存在する可能性も高い。

β 2-GPI ペプチド反応性 T 細胞株は患者のみならず健康人からも樹立された。多発性硬化症、インスリン自己免疫症候群、インスリン依存型糖尿病、特発性血小板減少性紫斑病、重症筋無力症などの自己免疫疾患における、自己抗原蛋白あるいは自己抗原ペプチドに反応する自己反応性 T 細胞が、健康人の末梢血中にも存在することは過去にも報告されている⁽¹⁰⁻¹⁸⁾。多発性硬化症の責任自己抗原の一つと考えられているミエリン塩基性蛋白 (myelin basic protein; MBP) に反応する T 細胞の得られる頻度は患者と健康人の間で差異が認められないが、抗 CD28 抗体でナイーブ T 細胞の活性化に必須である CD28 を介する補助刺激を阻害すると、MBP 反応性 T 細胞を得られる頻度が健康人では患者と比べて有意に減少するとの報告がある⁽¹⁹⁾。このことから健康人の生体内では MBP 自己反応性 T 細胞は主にナイーブ T 細胞として存在するのに対して、患者の生体内では MBP 反応性 T 細胞は、すでに一度は刺激を受けて活性化されたエフェクター T 細胞であり、これが発症に関与した可能性が推測される。このように、多

くの自己免疫疾患の病因となる自己抗原に反応する T 細胞は健康人の末梢血中にも存在しており、これが何らかの機序で実際に活性化されたヒトのみが自己免疫疾患の発症に至る場合があると考えられる。

次に、分子擬態解析のための基礎的方法論を確立することを目的として、superagonist 同定法の開発を試みた。 β 2-GPI ペプチド反応性 T 細胞の樹立と平行して行ったため、自己 ras ペプチド反応性 T 細胞をモデルとして用いた⁽²⁰⁾。抗原構造の修飾に関しては、一残基置換アナログペプチドによる免疫応答の修飾が数多く報告されているが、HLA との結合を増強するにしても TCR との結合を増強するにしても^(21,22)、log オーダーの増強はむつかしく、新たな戦略の開発が望まれていた。Hemmer らは combinatorial peptide library を用いた T 細胞エピトープの positional scanning により、野生型ペプチドよりも log オーダーで強い抗原刺激活性を有するペプチド (peptide superagonists) を同定した。これは一残基を置換したペプチドではなく、多残基を置換したペプチドであった⁽²³⁾。その後、我々を含めて複数のグループが異なる T 細胞クローンを用いて同様の戦略を試みたが、「ペプチド上のあるポジションにおいて免疫応答増強的に働くアミノ酸残基置換をすべてのポジションに有するペプチドは、必ずしもスーパーアゴニストではない」ことが明白になってきた⁽²⁴⁻²⁶⁾。これはペプチドの構造を考えれば自明であって、特定のアルファ炭素の周囲の回転角は数残基先のアルファ炭素の周囲の回転角にも影響を与えるからである⁽²⁷⁻²⁸⁾。よって、ちょうどチェスのゲームにおいてコンピューターがとる思考過程のようにファジーな戦略を取らないと、「最強の」ペプチドを同定することはむつかしい。簡略化のために、AAAAA を野生型ペプチドとする。仮に AEAAA と AAAQA がより強い T 細胞応答を誘導したとしよう。