

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

分担研究者： 竹内 勤
(埼玉医科大学総合医療センター、第二内科)

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らかとなっている。その分子機序は不明のままであったが、近年、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。私達は 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關与する 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。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 ζ 鎖ノックアウト細胞を用いた検討で明らかにした。今後、TCR ζ 鎖蛋白合成障害の分子機序をさらに追求すると共に、それがどのような機構を通じて病態形成に結びついているのかを明らかにする必要があるが、 ζ 鎖の発現低下は、SLE の病因、病態を考えるうえで、極めて重要な手掛かりであると考えられた。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス (SLE) は自己免疫疾患の原型で、多彩な自己抗体産生とそれに引き続く組織障害を特徴とする。これには、B 細胞の自己抗体産生や自己反応性 T 細胞のエフェクター活性をコントロールすべき調節性 T 細胞の機能不全が重要な役割を演じている。

T 細胞機能不全の本態はこれまで不明のままであったが、我々は、SLE の病態に關与する末梢血 T 細胞の機能異常が、T 細胞レセプター・CD3 複合体からの早期シグナル伝

達の欠陥による事を明らかにした。異常シグナル伝達のメカニズムとして、TCRゼータ鎖 (ζ 鎖) の蛋白産生異常を明らかにしてきたが、その分子機序、下流のシグナル伝達への影響、自己免疫病の病態形成における役割、治療応用への可能性など、解決しなければならない問題が残されていた。

本研究では、SLE T 細胞に発現される ζ 鎖を初めとするシグナル伝達分子の機能異常を明らかにし、その成立機序を、分子免疫学、分子生物学的手法によって解析する。それがどのような機序で自己免疫を誘導し、多臓器の炎症を引き起こすのかを明らかにし、その

結果得られた成績に基づいて、遺伝子治療を含めた根本的な治療法開発の基盤を築くことを目的とする。本年度は、分子機序の詳細な検討、下流のシグナル伝達への影響を明らかにする。

B. 研究方法・研究結果・考察

SLEおよびその他のリウマチ性疾患患者、健康人を対象として、その末梢血T細胞を分離し、TCR-CD3複合体の各サブユニットについて、表面発現はフローサイトメーター、T細胞全体での蛋白発現は免疫沈降-免疫プロット法、メッセージ量は、半定量RT-PCR法で解析した。SLE T細胞表面のTCR α , TCR β , CD3 ϵ , TCR ζ は、全体的に発現レベルが低下していたが、中でもTCR ζ の発現は著明に低下していた。これらTCR-CD3複合体の各サブユニットの表面発現低下は、CD4, CD8, CD45RO, CD45RAサブセットで偏りは見られなかった。T細胞表面での発現低下の原因として、細胞膜へのトランスポートに異常があるのか、細胞質全体での蛋白発現が低下しているのかを明らかにするため、T細胞を1%NP-40で溶解した全溶解液を用い、各サブユニットを免疫沈降し、その発現を検討した。その結果、TCR ζ は、60%のSLE症例で正常の半分以下に発現が低下していることが明かとなった。一方、発現低下しているTCR ζ とは対照的に、CD3 γ , CD3 δ 鎖では正常と同等かむしろ増加しており、TCR ζ などの他のサブユニットの発現低下を補っているものと考えられた。以上の結果から、TCR-CD3複合体の表面発現低下の原因として、TCR ζ 鎖蛋白の生成異常が重要な鍵を握っているものと考えられた。

SLE末梢血T細胞でのTCR ζ 生成異常の機序をさらに追求するため、 ζ 鎖メッセージ量を検討した。SLE末梢血T細胞では、健康に比較して ζ 鎖メッセージ量の軽度低下は見られるものの、著明な蛋白発現低下を説明できる異常は検出できなかった。一方、メッセージの質的異常を、RT-PCR産物をSSCP法によって解析して検討した。39例のSLE患者の中で、EX7(-)2例、EX8の3'UTR異常11例、1塩基置換8例が見い出された。この中で、EX8異常は、正常の910bpがpolyadenylation部位を含む560bpを欠いた350bpとなったもので、cryptic splicing部位を介して生成されたヴァリエーションと考えられた。 ζ 鎖蛋白発現低下には、これらの異常 ζ 鎖メッセージによるpost-transcriptional, post-translationalの機序が関与している可能性が示唆された。

C. 結論

ζ 鎖蛋白発現低下は、SLE T細胞機能異常の根本的な原因の一つである可能性が示唆され、実際の病態に、この異常が如何に関わっているのかを今後明らかにする必要がある。

D. 参考文献

1. Fujihara T, Fujita H, Tsubota K, Saito K, Abe T, and Takeuchi T. Preferential localization of CD8+ $\alpha^E\beta^7+$ T cells around acinar epithelial cells with apoptosis in patients with Sjögren's syndrome. *J Immunol*. 1999, 163:2226-2235.
2. Mori S, Maruyama H, Ito I, Tokuhira M, Koide J, Takeuchi T, Itoyama S, Masunaga A, Fukushima M, Suzuki H, and Abe T. Diggnosis of measeles viral pneumonia in a patient with

- Hodgkin's disease by reverse transcription-polymerase chain reaction of serum. *Intern J of Hematology*. 1999, 68:327-331.
3. Tsubota K, Fukagawa K, Fuguhara T, Shimmura S, Saito I, Saito K, and Takeuchi T. Regulation of human leukocyte antigen expression in human conjunctival epithelium. *Invest Ophthal Vis Sci*. 1999, 40:28-34.
 4. Tsuzaka K, Takeuchi T, Onoda N, Pang M, and Abe T. Mutations in T cell receptor zeta chain mRNA of peripheral blood T cells from systemic lupus erythematosus patients. *J Autoimmunity*. 1998, 11:381-385.
 5. Takeuchi T, Tsuzaka K, Pang M, Amano K, Koide J, and Abe T. Deletion of exon7 in T cell antigen receptor zeta chain in two patients with systemic lupus erythematosus. *Int Immunol*. 1998, 10:911-921.
 6. Pang M, Abe T, Fujihara T, Mori S, Tsuzaka K, Amano K, Koide J, and Takeuchi T. $\alpha^E\beta_7$ a novel integrin adhesion molecule is upregulated on T cells from SLE patients with epithelial involvement. *Arthritis Rheum*. 1998, 41: 1456-1463.
 7. Takeuchi T, and Abe T. Tyrosine phosphorylated proteins in synovial cells of rheumatoid arthritis. *Int R v Immunol*. 1998, 17:365-381.
 8. Saito K, Abe T, and Takeuchi T. Decreased Fc γ RIII(CD16) expression on peripheral blood mononuclear cells in patients with Sjögren's syndrome. *J Rheum*. 1998, 25:689-696.
 9. Fujihara T, Takeuchi T, Tsubota K, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K, and Abe T. Level of serum soluble Fas/APO-1 is increased in patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Rheum*, 1998, 17:496-499.
 10. Koide J, Okusawa E, Ito T, Mori S, Takeuchi T, Itoyama S, and Abe T. Granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* in a patient with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheum*. 1998, 17:329-332.

SLE における病態の規定因子に関する研究：Th1/Th2 バランスとの関連

研究協力者：橋本博史
(順天堂大学医学部内科学膠原病・リウマチ講座)

研究要旨

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。

A. 研究目的

SLE は多彩な病態・病像を呈する疾患である。この SLE の多彩な病像を規定する因子としては、特定の自己抗体の関与がこれまで指摘されてきた。我々はさらに HLA あるいは IgG サブクラス、可溶性の活性化マーカー等も病態・病像と関連することを報告してきた。これらの因子のうち、IgG サブクラスや活性化リンパ球のサブセットは近年の研究でサイトカンとの関連が示唆され、さらに SLE では種々のサイトカイン異常が報告されていることから、これらの異常が病態の多様性に関与する可能性は十分考えられる。一方、SLE で多彩な病態・病像が存在し、それに応じた治療をする方法はすでに確立されているが、長期予後にどう関与するかは不明である。今回の研究では長期予後を明らかにする目的で、SLE 患者を初回診断時

の病像によって分類し、長期予後を検討した。また、前項のサイトカインの病像への影響を明らかにする目的で急性期の患者血清中及び細胞内の Th1・Th2 関連サイトカインを測定して病像との関連を検討した。

B. 研究方法

1) 対象・方法

長期予後の追えた SLE 患者 661 例を表 1 に示すように主な病像により分類して、生存率・寛解率・Body Damage 等を最長 20 年まで観察して検討した。抗リン脂質抗体を保有する症例は主病変の病像の種類に関わらず、別グループ (Group X) に組み込んだ。寛解は腎症に関しては当科で以前報告した基準 (1) で判定し、他の病像が主病変の群ではその主病変の病態の改善を以って寛解と判断した。Body Damage は過去に報告のあった (2) Damage Index を用いて検討した。

このうち急性期 69 例では、モノクロナール

抗体を用いた Sandwich ELISA 法で血清中の各サイトカインを測定し、一部の症例では PMA・イオノマイシン刺激下で細胞内染色によるサイトカインの産生の解析を行った。さらに、一部の症例では末梢血の IL-12R 陽性細胞を細胞表面染色による FACS 解析で、CCR4・5 陽性細胞の測定を末梢血及び局所浸潤のリンパ球で FACS 解析または組織染色で行った。

C. 研究結果

1) 長期予後

①腎症 (Group I) 初回診断時の腎生検に行なわれた症例は WHO 分類により、生検の施行ができなかった症例は蛋白尿の程度(間歇的蛋白尿、持続的蛋白尿: 3.5g/日以下、ネフローゼ: 3.5g/日以上)でさらに細分化して予後を検討した。生命予後に関しては WHO III 型・ネフローゼのある症例は不良で腎不全による死亡が多かった。IV 型も他のグループに比し有意差はないが予後は不良で、生存例でも透析に移行する症例は多く、これらの症例で Damage Index が低かった。一方、WHO I・II 型や間歇的蛋白尿のある症例は予後は良好で死因も SLE 以外が多かった。一方、寛解率に関しては他の病像が主病変の群に比し、有意に悪かった (表 2)。これは WHO V 型が寛解率が悪いことが影響していた。

② CNS ループス (Group II 型)

CNS ループスはその病態により、Organic brainsyndrome (OBS) 型・脳血管障害型 Lupus Psychosis 型、その他 (髄膜炎、脳神経・末梢神経障害、Lupus Headache、横断性脊髄炎) に細分化して予後を検討した。生命予後は OBS 型、脳血管障害型が悪く、死因は痙攣重積発作、脳出血等が多かった。Lupus Psychosis 型も一部で死亡例が認められたが、大半の死因は自殺であった。生存例の寛解率は比較的良く、再発も少なかった。

一方、Damage Index は他の病像が主病変の群に比し、有意に高く (表 2)、これは特に Lupus Psychosis 型の症例で精神症状が持続した症例が多いことが影響していた。

③その他

①②以外の病像が主病変の群では、生命予後は間質性肺炎 (Group VI) 及び Group X の中でリン脂質抗体症候群 (APS) を伴う症例で予後不良であった。また、Group VI では寛解率が低く、再発も高頻度であった (表 2)。また、リン脂質抗体を保有する群 (Group X) では APS の有無及び主病変の種類に関わらず、寛解率が悪かった。一方、急性期は重篤な病態である血小板抗体に伴う血小板減少 (Group III) や溶血性貧血 (Group IV) が主病変の群は長期予後がいずれの因子も良かったのに対して、白血球減少 (Group VII) や関節炎 (Group IX) が主病変の群では病像の移行により、予後不良になる症例が散見された。特に Group IX では遅発性の腎症の後に透析に移行する症例があって、Damage Index が高かった (表 2)。

④病像の移行

長期経過観察中に他の病像に移行した症例は表 3 に示すように 9.7% に認め、溶血性貧血 (Group IV) や関節炎 (Group IX) が主病変の群に高頻度に認めた。移行する病態は CNS ループス、血小板減少、間質性肺炎が多かった。一般に移行した症例の病態は初発の群に比し、難治性であった。

2) Th1/Th2 バランス

急性期の血清中のサイトカイン (IL-2, IFN γ , IL-6, IL-10, IL-13) を測定すると、IFN- γ , IL-6, IL-13 は有意に高値で、他のサイトカインも高値の傾向を認めた。ただ、症例によりばらつきがあり、大きく分けて、IL-6・IL-13 を中心とする Th2 関連サイトカインが高値を示す群と Th1 関連サイトカインも増加している群に分かれた。この 2 つの群で病像を比較してみると、

前者は腎症が多いのに対して、後者は非腎症特に肺病変が多く、血中の IL-12 も高値を示した。一方、Th2 サイトカインは B 細胞やマクロファージ系細胞からも産生されることから、これらサイトカインの産生細胞を検索する目的で、細胞内染色を T 細胞で施行した。その結果、表 4 に示すように CD4 陽性 T 細胞において Th1 関連サイトカインの IFN γ 産生細胞の比率が高く、活動性と相関していた。絶対数での検討では、Th2 関連サイトカインの IL-4 産生細胞の低下が認められたが、症例により多様性があり、IFN γ 産生細胞 (Th1 細胞) が増加している群と IL-4 産生細胞 (Th2 細胞) が低下する群に大別できた。前者は非腎症の症例が多く一部の症例で胸水中に CCR5 陽性で示される Th1 細胞の浸潤を認めたのに対して、後者は腎症が多く一部の症例の腎臓間質中に CCR4 陽性の Th2 細胞の浸潤を認めた。一方、IL-12R はこれらの病態に関連なく高い傾向を示した。

D. 考察

SLE の長期予後には種々の報告があるが、再発例や病像の移行例を含む多種多様な集団を見ているため、必ずしも正確な予後の結果は示されていない。また、予後に対する危険因子として腎症(3)・血小板減少(4)等が挙げられているが、多臓器病変を持つ SLE では単一因子の有無の比較には限界がある。今回我々は 661 例の初回診断時の主病変の病像に応じて分類し、その長期予後を検討した。その結果、WHO III 型・IV 型・ネフローゼを伴う腎症・OBS や脳血管障害を伴う CNS ループス・間質性肺炎が生命予後や ADL の面で予後不良であった。これらの病態はいずれも SLE の中の所謂、重篤な病態に属し、予後が不良であることは当然の結果と言える。しかしながら、同じ重篤な病態と言われる血小板減少や溶血性貧血は急性期に適切な治療をすれば予後良好であった。一部の報

告で血小板減少を危険因子として挙げて我々の結果と相反していたが、これは血小板減少のある症例に APS のある症例が含まれていた可能性がある。実際、我々はリン脂質抗体陽性例は別グループに分類して検討したが、その結果ではこの群は難治性で特に APS の生命予後が不良であった。このようにリン脂質抗体陽性症例は他の SLE とは異なった管理が必要なが示唆された。また、主病変の病像が移行する症例は約 10%あり、その移行した病態の予後が不良であることも注目すべき結果である。このように、今回の研究では初期の病態・病像の詳細を把握することが治療上極めて重要であることが示唆された。

一方、この病態・病像の規定因子の 1 つとして Th1・Th2 サイトカインのバランスが考えられることから一部の症例で検討してみた。その結果、血清中の Th2 関連サイトカイン単独高値群は腎症が多く、Th1 関連サイトカインも高値の群では非腎症が多い傾向を示した。また、CD4 陽性細胞での検討では前者は恐らく局所への浸潤と思われる Th2 細胞の低下が、後者は Th1 細胞の増加が末梢血と局所で認めら、ここに IL-12 の関与も示唆された。これらの結果は SLE の病像が Th1/Th2 の微妙なバランスで調整されている可能性が示唆された。

E. 結論

1. SLE の長期予後は病像により異なり、重症腎症・間質性肺炎・APS は予後不良の因子であった。
2. 期経過観察中に病像の移行する症例があり、概して予後不良であった。
3. 像の規定に Th1/Th2 の微妙なバランスが関与している可能性が示唆された。

F. 参考文献

- 1) Hashimoto H, Sugawara M, Tsuda H, et al. Studies on the outcome of lupus nephritis according to long-term prognosis treatment employing different modes immunotherapy. *Jpn J Nephrol* 1992;34:1003-1009.
 - 2) Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, et al. The development and initial validation of the systemic lupus international collaborating clinic/American college of rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 363-369.
 - 3) McLaughlin JR, Bombardier C, Farewell VT, et al. Kidney biopsy in systemic lupus erythematosus. III. Survival analysis controlling for clinical and laboratory variables. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 559-567.
- Ward MM, Pyun E, Studenski S. Mortality risks associated with specific clinical manifestation of systemic lupus erythematosus. *Arch Int Med* 1996; 156: 1337-1344.

表 1 The definition and frequency of each groups

Manifestations	Group										
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	
Nephropathy	○	△	△	△	△	△	×	×	×	△	
CNS involvement	×	○	×	×	×	×	×	×	×	△	
Thrombocytopenia	×	△	○	×	×	×	×	×	×	△	
AIHA		×	△	△	○	×	×	×	×	×	△
Serositis	×	△	△	△	○	△	×	×	×	△	
Pneumonitis	×	△	△	△	×	○	×	×	×	△	
Leukopenia	△	△	△	△	△	△	○	×	×	△	
Skin involvement	△	△	△	△	△	△	△	○	×	△	
Joint		△	△	△	△	△	△	△	△	○	△
Patient number	296	34	24	17	23	11	58	91	27	80	
%(to total patients)	44.7	5.1	3.6	2.6	3.5	1.7	8.8	13.8	4.1	12.1	

○ : exist in all patients and main manifestation

△ : exist in some patients

× : does not exist

表 2

The rate of remission, relapse and damage index with each manifestation damage

	remission*		relapse**		index**
Group I (n=233)	112 cases(48.1%)†		25 cases (10.7%)		0.11±0.43
II (n=19)	16	(84.2)	2	(10.5)	0.19±0.4¶
III (n=20)	15	(75.0)	1	(5.0)	0.07±0.26
IV (n=13)	11	(84.6)	1	(7.7)	0.05±0.22
V (n=16)	15	(93.4)	0	(0)	0.04±0.2
VI (n=5)	3	(60.0)	2	(40.0)‡	0.6±0.54¶
VII (n=44)	21	(48.8) †	0	(0)	0.02±0.13
VIII (n=51)	33	(64.7)	0	(0)	0.08±0.38
IX (n=22)	16	(72.7)	3	(13.6)‡	0.18±0.62 ¶
X (n=56)	15	(26.8) †	14	(25.0)	0.21±0.57¶

* ; The rate was calculated after two years.

** ; The rate was calculated at final point at twenty years.

† ; Significantly lower rate (X versus II, IV, V : p<0.001, III, VIII : p<0.05 ; VII versus II, IV, V : p<0.01)

‡ ; Significantly higher rate (VI versus V, VII, VIII : p<0.01, III : p<0.05 ; X versus V, VII, VIII : p<0.05)

¶ ; Significantly higher level (VI versus III, IV, V, VII : p<0.001, I, VIII : p<0.01 ; X versus III, IV, V, VII : p<0.05, II versus IV, V, VII : p<0.05, IX versus VII : p< 0.05)

表 3 The development of new manifestation in each group

New manifestation	Group(total number)										Total(%*)
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	
	(296)	(34)	(24)	(17)	(23)	(11)	(58)	(91)	(27)	(56)	
Nephropaty				3	4		6	10	3		26(8.7%)
CNS lupus	6		2	2			1	2	2		14(29.2%)‡
Thrombocytopenia	5				1				4	1	10(29.4%)‡
Serositis	1						1	1			3(11.5%)
Pneumonitis	3	1	1								5(31.3%)‡
Others**	1										3 4
Total	16	1	3	5†	5	8	13	9†	4	64	
(%)	(5.4)	(2.9)	(12.5)	(29.4)	(21.7)	(13.7)	(14.3)	(33.3)	(7.1)	(9.7)	

* ; this number / this number + total number of involvement

** ; ulcerative colitis (group I) , autoimmune hepatitis · vasculitis · peripheral neuropathy (group X).

† ; Significantly high ratio (IV, IX versus I, II : p<0.05)

‡ ; Significantly high rate(CNS lupus, thrombocytopenia and pneumonitis versus nephrophaty : p<0.001)

表 4 The ratio of intracellular cytokine productions in stimulated PBMC.

	SLE (n=22)	RA (n=14)	Normal control (n=16)
CD4+ IFN γ + / CD4+	14.7±2.1% *	9.8±0.8%	9.3±0.7%
CD4+ IL-4+ / CD4+	1.8±0.2	2.1±0.3	2.5±0.3

* P<0.05

自己免疫疾患発症における PD-1 の役割

研究協力者 西村 泰行
(京都大学大学院医学研究科、分子生物学)

研究要旨

自己免疫疾患の発症の機序を述べる病因論についての研究は少ない。このような状況において、自己免疫病を発症する遺伝子欠損マウスは非常に有用である。我々の単離した 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。我々は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。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。

A. 研究目的

PD-1 がいかなる機構を用いて自己免疫疾患発症を制御するのかを、PD-1 欠損マウスにより、1) 免疫学的観点、2) 分子生物学的観点から、証明する。このことは自己免疫疾患の病因論を直接的に解明することになる。今年度は特に自己免疫寛容の維持に PD-1 が如何に関与しているかを研究した。

B. 研究方法

PD-1 が自己免疫疾患の制御に関与しているかを PD-1 欠損マウスを用いて解析した。また、自己免疫寛容の制御に関して、および、胸腺細胞の分化に対して T 細胞受容体トランスジェニックマウスと PD-1 欠損マウスの交配実験から、PD-1 の役割を検

討した。

C. 研究方法・結果・考察

PD-1 受容体は免疫グロブリンファミリーに属する膜蛋白質¹⁾で、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。その発現は、胸腺細胞において CD4⁻CD8⁻細胞から CD4⁺CD8⁺細胞に分化増殖する際に認められ²⁾、末梢においては活性化リンパ球に認められる¹⁾。PD-1 欠損マウスの解析により、末梢において軽度の脾腫を呈し、血清において IgG3 の増加を認め、また、T 細胞非依存性抗原の IgG3 における反応性の増強、培養系において抗原刺激における増殖反応の増強を認めた³⁾。これらのことは PD-1 受容体がある免疫反応を生体内にて負に制御していることを示している。我々は、この

PD-1 の負の制御が自己免疫疾患発症においても関与している可能性を検討したところ、C57BL/6 遺伝背景において、ループス様糸球体腎炎 (図A) と関節炎 (図B) を発症することを組織学的に発見した⁴⁾。また、PD-1 欠損マウスの糸球体において、IgG3 の沈着を認めた (図C)⁴⁾。PD-1 欠損マウスにおいて、ループス様の自己免疫疾患が発症したことより、PD-1 が自己免疫寛容の制御因子である可能性が示唆される。このことを直接的に証明するため、自己反応性T細胞受容体トランスジェニックマウスとの交配実験を行った。このトランスジェニックマウスは PD-1 欠損状態において、graft-versus-host 様の病状を呈した⁴⁾。体重の減少、皮膚炎の発症、そして、10 週零前後にて死に至った。組織学的解析より、全身性に炎症細胞の浸潤を認めた。とくに、心臓 (図D)、肺 (図E) において著名であった。また、実際、自己反応性T細胞 (2C細胞) の存在を、免疫組織化学的に皮膚を用いた染色により、証明した (図F)。

自己反応性細胞の非リンパ組織への浸潤は免疫学的自己免疫寛容の破綻を示唆する。そこで、フローサイトメーターによる解析を行ったところ、自己反応性2CT細胞の胸腺内におけるネガティブ選択は PD-1 欠損下においても正常に行われていた。しかし、脾細胞においては、PD-1 欠損状態にて細胞数の増加、および2C細胞の増加が認められ、また、その2C細胞において活性化抗原の発現はメモリー型 (CD45RB^{low}CD62L^{low}) を示した。PD-1 存在下においては、2C細胞はナイーブ型 (CD45RB^{high}CD62L^{high}) を示し、かつPD-

1 を発現している。このことから、自己反応性2C細胞が生体内において PD-1 により、その活性化、分化、増殖が抑制されていることが考えられ、PD-1 が末梢の自己免疫寛容を制御していることが示唆された⁴⁾。

自己反応性2C細胞はCD8⁺の細胞障害性T細胞であるが、この活性化にCD4⁺のヘルパーT細胞の活性化を必要とする否かを調べた。自己反応性T細胞受容体トランスジェニック PD-1 欠損マウスの生体内に抗CD8抗体、または、抗CD4抗体を注入し、その病状への効果を検討したところ、それぞれの抗体の投与により、graft-versus-host 様の病状の発症が抑制された。これらのことより、CD4⁺のヘルパーT細胞の活性化を必要とし、それらの多くも自己反応性T細胞の末梢における自己免疫寛容の破綻が PD-1 欠損下において起こったと考えられる。

そこで、次に PD-1 が胸腺細胞の分化に対していかなる制御をしているかを検討した。以前示したように、PD-1 の胸腺細胞における発現はCD4⁻CD8⁻細胞からCD4⁺CD8⁺細胞に分化増殖する際の未分化な段階に局限されている²⁾。そのため PD-1 欠損マウス単独を用いた解析において、PD-1 欠損の胸腺細胞への影響を認めることが出来なかった³⁾。この度、我々は、4種類のT細胞受容体トランスジェニックマウス (Vβ8, H-Y H-2^{d/d}, H-Y H-2^{b/b}, 2C H-2^{b/b}) を用い、PD-1 の発現を解析し、このマウスが PD-1 の胸腺細胞への役割を解析するのに適切であると考えた。PD-1 の発現は詳細にはCD4⁻CD8⁻細胞が、β鎖の再編成 (β鎖セレクション) に成功し、分化増殖する際に認められ、CD4⁺CD8

$^+$ 細胞においてその発現は消失する(図G、黒矢印)。その後の胸腺細胞のポジティブ選択においてはPD-1は発現しないことが確認された。これら4種類のT細胞受容体トランスジェニックマウスにおいてPD-1の発現は野性型のマウスに比べ、 $CD4^-CD8^-$ 細胞での発現が増強していた。この発現の意義を検討するため、PD-1欠損マウスを4種類のT細胞受容体トランスジェニックマウスに交配した。

Vβ8, H-Y H-2^{d/d}マウスといったβ鎖セレクションをT細胞受容体トランスジェンによって行い、ポジティブ選択を内因性のα鎖を用いて行う環境において、PD-1欠損マウスでは $CD4^+CD8^+$ 細胞の1.5倍の増加を呈したが、その後のポジティブ選択における影響は確認出来なかった。次にポジティブ選択をT細胞受容体トランスジェンを用いて行うH-Y H-2^{b/b}, 2C H-2^{b/b}マウスにて、PD-1欠損の影響を観察した。上記のマウス同様、H-Y H-2^{b/b}マウスでは $CD4^+CD8^+$ 細胞の1.5倍の増加を呈したが、T細胞受容体トランスジェンによってポジティブ選択を受ける $CD8^+$ 細胞の数は増加しないが、ポジティブ選択を内因性のα鎖を用いて行う $CD4^+$ 細胞の数は1.5倍の増加した。2C H-2^{b/b}マウスにおいても、同様にT細胞受容体トランスジェンによってポジティブ選択を受ける $CD8^+$ 細胞の数が減少することが解った。

以上図Gに示すように、PD-1欠損の影響として、1) $CD4^+CD8^+$ 細胞の増加(図G、黄丸)、2) T細胞受容体トランスジェンによってポジティブ選択を受ける $CD8^+$ 細胞の減少するが、 $CD4^+$ 細胞の数は

$CD4^+CD8^+$ 細胞に比例して増加する(図G、緑丸)、が認められた。PD-1の発現(図G、黒矢印)と考え併せると、PD-1は胸腺細胞が $CD4^-CD8^-$ 細胞から $CD4^+CD8^+$ 細胞に分化増殖する際、抑制的に働くことになる。このPD-1欠損状態にて増加した $CD4^+CD8^+$ 細胞はその数が増加したにもかかわらず、ポジティブ選択を受ける $CD8^+$ 細胞の減少させる。しかし、この際、PD-1の発現を認めないため、この効果は2次的なものと考えられる。

この2次的な影響を説明するための仮説として、以下のような事が考えられる。PD-1の抑制の欠損下において増加した $CD4^+CD8^+$ 細胞は本来、分化すべきでない細胞(図G、黄丸)、つまりシグナル伝達の装置の弱い細胞と考えられる。ゆえにT細胞受容体が固定した状態においてはその後の分化において不利になる。しかし、T細胞受容体を変化できる状態においては、その弱いシグナル伝達を補償することが可能であるが、その方法としてもっとも考えられることはT細胞受容体のAffinity/Avidityを増加させることである(図G、緑丸)。つまり、この結果、T細胞の分化において、自己反応性T細胞の産出される頻度が増加すると考えられる。PD-1欠損において自己免疫疾患発症することを考え合わせるとこの仮説は矛盾しない⁵⁾。今後、この仮説に対してはさらなる解析が必要である。

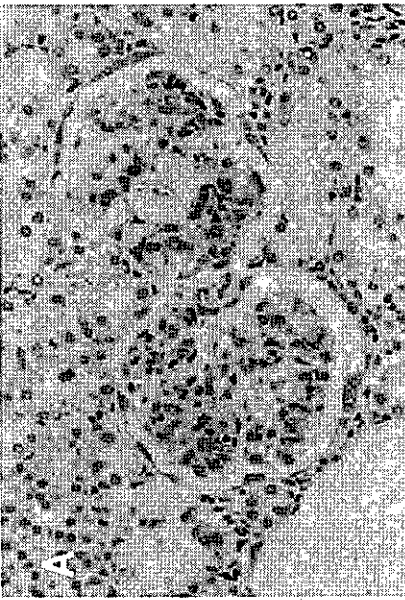
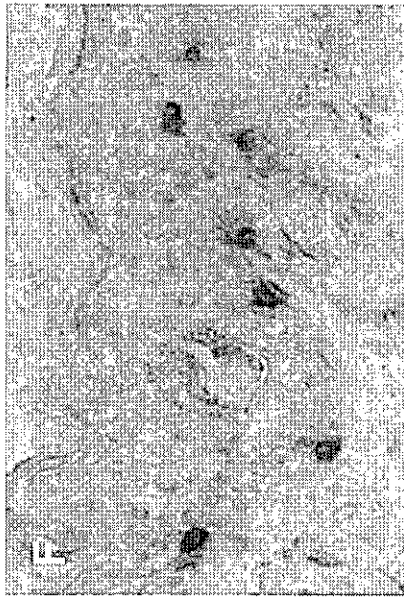
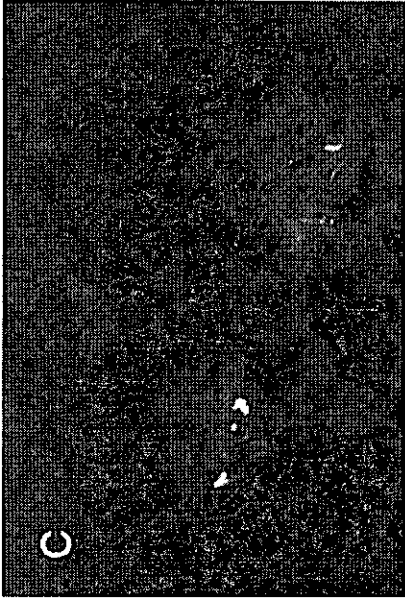
D. 結論

PD-1受容体は自己免疫病発症の制御因子である。この制御は、胸腺細胞の正の選択をβ選択に影響を与えることで間接的に

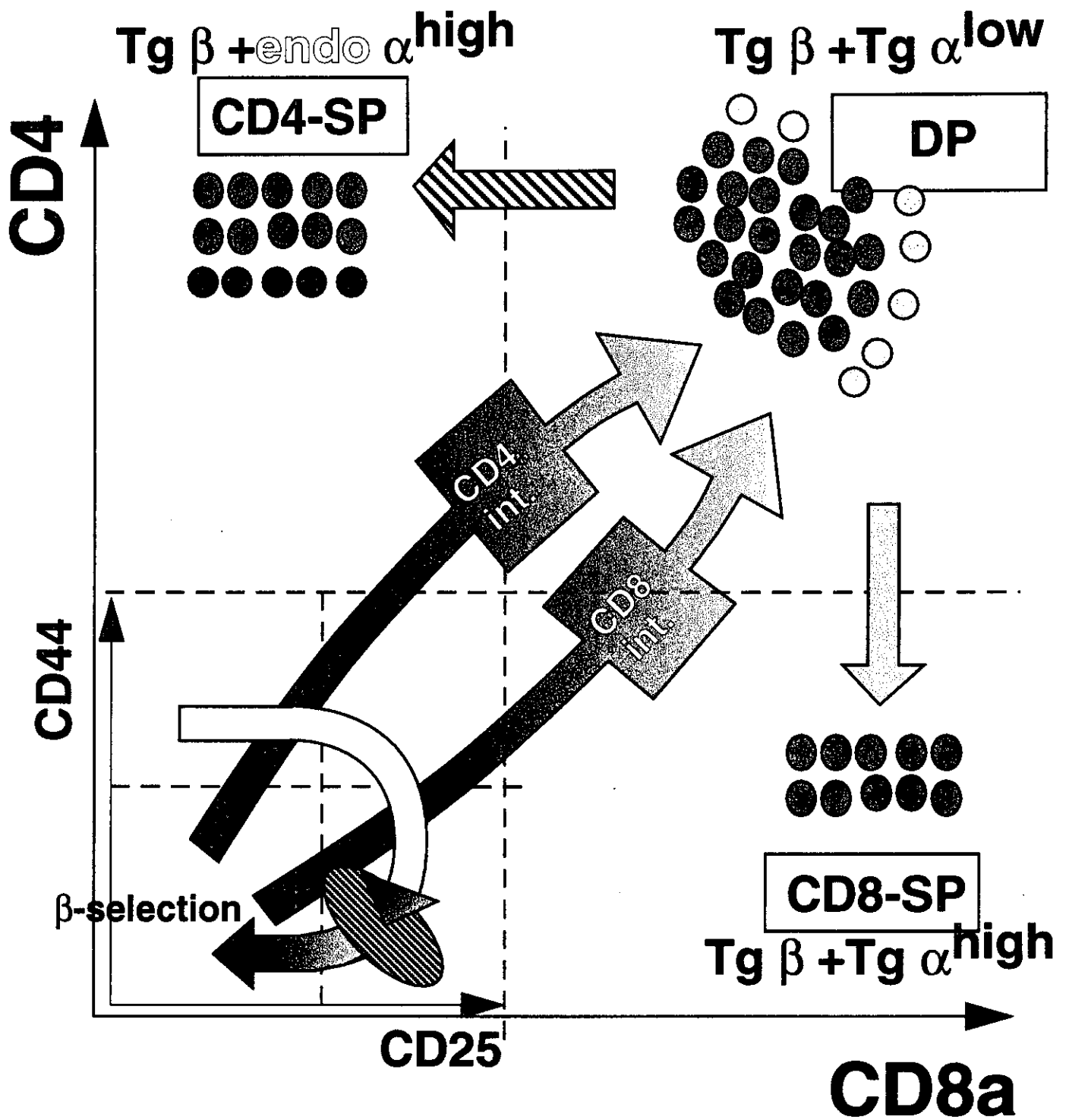
させている可能性があり、また、末梢においても、自己反応性細胞を分化、増殖、組織破壊をしないよう制御している。今後、さらなる PD-1 の機能解析が人の自己免疫病の病因の解明に、また、病状の予後、治療法の確立に関しても貢献することが期待される。

E. 参考文献

- 1) Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H., Honjo, T.: Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol.* 1996. 8 : 5, 765-772.
- 2) Nishimura, H., Agata, Y., Kawasaki, A., Sato, M., Imamura, S., Minato, N., Yagita, H., Nakano, T., Honjo, T.: Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative (CD4-CD8-) thymocytes. *Int Immunol.* 1996. 8 : 5, 773-780.
- 3) Nishimura, H., Nakano, T., Minato, N., Honjo, T.: Immunological Studies on PD-1 Deficient Mice: Implication of PD-1 as a Negative Regulator for B cell responses. *Int Immunol.* 1998. 10 : 10, 1563-1572.
- 4) Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., Honjo, T. Development of Lupus-like Autoimmune diseases by Disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM Motif-carrying Immunoreceptor. *Immunity.* 1999. 11:141-151.



G



SLE 感受性遺伝子としての FcγRIIB 制御領域多型の役割

分担研究者：広瀬幸子
(順天堂大学医学部病理学第二講座)

研究要旨

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。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス(SLE)はいくつかの素因遺伝子の組み合わせの結果として発症する多遺伝子疾患であり、特徴的病態の一つに、B 細胞の免疫寛容の破綻と異常活性化に伴う自己抗体を含む高 IgG 血症があげられる。この B 細胞異常も明らかに遺伝的に規定されており、その遺伝子作用は B 細胞の免疫能を司る重要な機能分子に関連したものと推察される。

B 細胞は多数の免疫機能分子の相互作用によりコントロールされており、特に B 細胞活性化の抑制分子の機能不全は B 細胞の異常活性化を来し、SLE 素因遺伝子の一つとなる可能性が示唆される。IgG Fc receptor のうち、低親和性の FcγRIIB 分子はその細胞内に immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) 分子を有しており、細胞の活性化抑制に重要な機能を発揮することが知られている。

FcγRIIB 分子には主に 3 つのアイソフォーム B1、B2、B3 が存在しており、そのうち B 細胞上に発現する FcγRIIB1 アイソフ

ォームは、B 細胞抗原受容体(BCR)からの活性化シグナルを制御する B 細胞の key inhibitor である。従って、FcγRIIB1 分子の機能不全が、SLE における B 細胞免疫寛容破綻の遺伝的素因の一つとなる可能性が示唆される。

本研究では、この点を明らかにするために、モデルマウス系を用いて FcγRIIB 遺伝子多型の有無、B 細胞上の FcγRIIB1 分子の発現レベルの差異、ならびに高 IgG 血症との関連に関して遺伝学的な解析を行うことを目的とした。

B. 研究方法

【方法・結果】

(1) (NZB x NZW) F1 マウスには加齢に伴い IgG 抗 DNA 抗体を含む高 IgG 血症が認められ、この現象には NZB 由来の感受性遺伝子および NZW 由来の修飾遺伝子の相互作用が関与している。今回、この NZB 由来の感受性遺伝子を解析するために、(NZB x NZW) F1 を NZW に退交配したマウス約 250 匹を作製し、マイクロサテライト DNA 多型を利用してゲノムワイドに血中

IgG 量に関する量的形質遺伝子 (QTL: quantitative trait loci) 解析を行った。その結果、NZB 由来の優性に働く一個の高 IgG 血症感受性遺伝子が、FcγRIIB 遺伝子に連鎖して第 1 染色体テロメアにコードされた。

(2) FcγRIIB 遺伝子が感受性遺伝子そのものである場合には、NZB と NZW の間に遺伝子多型が認められるはずである。そこで、両マウス間で、FcγRIIB 遺伝子の塩基配列を決定し比較検討を行った。その結果、構造遺伝子には差を認めなかったが、NZB では NZW に比較して、FcγRIIB 遺伝子プロモーター領域に 13 塩基ならびに 3 塩基の 2 カ所の塩基配列欠損部位が存在することを発見した。この 13 塩基の部位には AP-4 結合部位や S box などの転写制御に関わる consensus sequence が含まれていた。

(3) NZB 型の FcγRIIB 遺伝子プロモーター領域欠損が、B 細胞上の FcγRIIB1 分子の発現レベルに影響を与えるか否かを、keyhole lipmet hemocyanin (KLH) を免疫した NZB および NZW マウスの脾臓 B 細胞を用いて解析した。その結果、リンパ濾胞胚中心以外の非活性化 B 細胞ではいずれのマウスでも高い FcγRIIB1 の発現が認められたが、リンパ濾胞胚中心の活性化 B 細胞では、NZW に比べて NZB でその発現が有意に抑制されていた。また、この時点での血中 IgG 抗 KLH 抗体価を比較したところ、NZB で有意に高値を示した。

(4) FcγRIIB 遺伝子プロモーター領域多型と IgG 抗体応答との相関を確認するために、約 80 匹の (NZB x NZW) F2 マウスを作製し、プロモーター領域に関して、NZB/NZB 型、NZB/NZW 型および NZW/NZW 型の 3 群に分けて、KLH 免疫後の血中 IgG 抗 KLH 抗体価を比較した。

その結果、抗体価は高い方から NZB/NZB 型、NZB/NZW 型、NZW/NZW 型の順であり、プロモーター領域多型と抗体応答との相関が確認された。

(5) FcγRIIB 遺伝子プロモーター領域欠損が NZB マウスにのみ認められるものなのかを知るために、種々のマウス系でプロモーター領域の塩基配列の解析を行った。その結果、SLE 自然発症系である BXSB および MRL マウス、さらにインシュリン依存性糖尿病自然発症系 NOD マウスに、NZB マウスと同様のプロモーター領域欠損が認められた。

C. 考察

SLE 素因遺伝子を明らかにすることは、新しい SLE の理論的治療法を探る上で、極めて重要な情報を提供するものと期待される。しかしながら、ヒト SLE の素因遺伝子解析にはかなりの難点が含まれる。その原因に、ヒト遺伝子が極めて多様であること、prospective study が困難なこと、環境要因の関与を除外できないことなどが挙げられるが、最も大きな原因は、多遺伝子疾患の遺伝支配の複雑性にある。

多遺伝子疾患の疾患素因遺伝子は大きく分けて「疾患感受性遺伝子」と「疾患修飾遺伝子」とに分けられる。前者は、疾患の発症要因となっている遺伝子群であり、後者はこれらの働きを増強したり、抑制する遺伝子群である。SLE はこのような遺伝子群の総合された働きの上に成り立っており、SLE にみられる症状の多様性は関与する遺伝子の組み合わせの違いによって生じると考えられる。また、疾患感受性遺伝子には、一定の閾値を越えると病態発症効果を示す加算作用を示すものと、各々の遺伝子効果は少ないが複数の遺伝子間の相互作用で病態発症を誘発する相補効果を示すものが存在する。従って、SLE と診断されても皆が

同じ素因遺伝子によって発症しているものではないこと、SLE を発症していないからといって、素因遺伝子を持っていないとは限らないという極めて難解な現象が存在している。現在、動物モデルを用いた研究成果を基にヒト遺伝子に迫るというアプローチが広く行われているのはこのためであり、実際ヒト SLE の感受性遺伝子の一つがマウスの場合と同様にやはり FcγRIIB をコードする第 1 染色体テロメアに存在することが世界的に注目されている。本研究の結果から、ヒト SLE においても FcγRIIB 制御領域多型が関与している可能性が充分考えられる。疾患感受性遺伝子解析においては、構造遺伝子のみでなく制御領域多型の解析が必要であり、現在精力的に行われている human genome project が修了した後に残される重要な研究テーマの一つである。

D. 結論

今回の解析から、NZB 由来の高 IgG 血症感受性遺伝子が塩基配列欠損を示す FcγRIIB 遺伝子プロモーター領域多型である可能性が示された。この多型部位には転写制御分子の結合部位が存在し、しかもこの領域はリンパ濾胞胚中心の活性化 B 細胞での FcγRIIB1 分子の発現レベルの維持に重要な役割を担っていると推定される。

リンパ濾胞胚中心は T 細胞依存性に抗体の IgM から IgG へのクラス転換や抗体の親和性成熟が引き起こされる重要な部位であり、従って、プロモーター領域多型に基づく胚中心活性化 B 細胞上の FcγRIIB1 分子の発現レベルの低下が高 IgG 血症を伴う異常な B 細胞活性化をきたすと考えられる。NZB 型の多型は他の SLE 自然発症マウスにも共通して見られ、SLE 感受性遺伝子の重要な一要因であることが示された。

E. 参考文献

なし

全身性自己免疫疾患発症に CD40 リガンド過剰発現の役割

分担研究者： 鏑田武志

(東京医科歯科大学難治疾患研究所ウィルス・免疫疾患研究部門)

研究要旨

CD40 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BXS BではCD40Lの過剰および異所性の発現が示されている。CD40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、CD40Lを過剰発現するCD40L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CD40L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、CD40存在下ではCD40L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CD40Lの発現を検索する際には、十分注意する必要がある。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス (SLE) などの全身性自己免疫疾患では、自己抗体の産生がその発症に重要な役割を果たすが、その産生機構を含め、発症機構には不明な点が多い。全身性自己免疫疾患の発症機構の解明は、現在のところ対症療法や非特異的な免疫抑制により治療されている、これら疾患のより根本的な治療法の開発に必須である。我々は、抗原受容体シグナルにより正常マウスの成熟B細胞がアポトーシスをおこし⁽¹⁾、さらに、NZBやMRLなどのSLE自然発症マウスでB細胞の抗原受容体を介するアポトーシスに異常があることを明かにした^(2,3)。これらの結果から、抗原受容体を介するB細胞アポトーシスが自己反応性B細胞を除去することにより、B

細胞自己トレランスの維持に関与すると示唆される。また、我々は、抗原受容体を介するB細胞アポトーシスがCD40分子を介するシグナルにより阻害されることを明かにし^(3,4)、過剰なCD40シグナルが自己トレランスの異常を引き起こす可能性を示唆した。実際、SLE患者やSLE自然発症マウスBXS Bのリンパ球でCD40リガンド (CD40L) の過剰発現や異所性発現があることが報告された⁽⁵⁻⁷⁾。そこで、本研究ではCD40Lを過剰発現するマウスを解析することにより、CD40Lの過剰発現や異所性発現がSLE発症に関与するかを検索した。

B. 研究方法

マウス：CD40Lトランスジェニックマウスは我々の動物施設で飼育した。フロー