

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

特定疾患対策のための免疫学的手法の開発に関する研究班

平成11年度 研究報告書

平成12年3月

主任研究者 山本 一彦

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

特定疾患対策のための免疫学的手法の開発に関する研究班

平成11年度 研究報告書

平成12年3月

主任研究者 山本一彦

## 目 次

I. 構成員名簿	1
II. 平成11年度総括研究報告	3
東京大学大学院医学系研究科内科学専攻 主任研究者 山本 一彦	
III. 分担研究者報告	
自然発症型関節炎モデルマウス HTLV-I Tax トランスジェニックマウスにおける T細胞クローンタイプの変遷	7
東京大学大学院医学系研究科内科学専攻 主任研究者 山本 一彦	
免疫病発症/寛容誘導に関わる共刺激分子の解析 - T細胞機能発現にかかわる CD137L (4-1BBL) の役割 -	10
国立小児医療研究センター免疫研究室 東 みゆき	
protelipid protein (PLP)による実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)における OX40/OX30L の役割	13
信州大学医学部第三内科 高 昌星	
多発筋炎およびシェーグレン症候群患者末梢T細胞のクローン性増多の解析	17
東京医科歯科大学医学部内科学第一講座 上阪 等	
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	20
千葉大学大学院医学研究科遺伝子制御学 齋藤 隆	
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	24
大阪大学大学院医学系研究科分子病態内科学 佐伯 行彦	
ヒト自己免疫疾患における NKT 細胞解析に関する研究	27
筑波大学臨床医学系内科 住田 孝之	
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	31
金沢大学医学部内科学第三講座 中尾 眞二	

CLIP 置換型インバリア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 .....	34
熊本大学大学院医学研究科免疫識別学講座 西村 泰治	
糖脂質による NKT 細胞活性化を介した自己免疫性脳炎の治療 .....	39
国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 山村 隆	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧 .....	45
V. 平成 11 年度班会議プログラム .....	53

## I. 平成11年度構成員名簿

特定疾患対策のための免疫学的手法の開発に関する研究班

区 分	氏 名	所 属	職 名
主任研究者	山本 一彦	東京大学大学院医学系研究科内科学専攻 アレルギーリウマチ学	教 授
分担研究者	東 みゆき	国立小児医療研究センター免疫研究部	研 究 員
	高 昌 星	信州大学医学部附属病院第三内科	助 教 授
	上 阪 等	東京医科歯科大学医学部第一内科	助 手
	斉 藤 隆	千葉大学大学院医学研究科遺伝子制御学	教 授
	佐 伯 行 彦	大阪大学医学部第三内科	助 手
	住 田 孝 之	筑波大学臨床医学系内科	教 授
	中 尾 真 二	金沢大学医学部附属病院第三内科	教 授
	西 村 泰 治	熊本大学大学院医学研究科免疫識別学	教 授
	山 村 隆	国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部	部 長
(事務局) 経理事務連絡担当責任者	山本 一彦	東京大学大学院医学系研究科内科学専攻 アレルギーリウマチ学 〒113-8655 東京都文京区本郷 7-3-1 TEL (03)5800-8825 FAX (03)5802-4803	教 授

## II. 平成11年度総括研究報告

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

総括研究報告書

免疫の関与する難病の病因解明のための基盤技術の開発に関する研究

主任研究者 山本 一彦 東京大学大学院医学系研究科内科学専攻 教授

**研究要旨** 病態に関与する T 細胞の分析では、慢性関節リウマチ（RA）における病態形成性 T 細胞の解析と T 細胞クローンの樹立、SCID マウスへの移入が行われ、T 細胞レセプター（TCR）に関する RT-PCR/SSCP 法や CDR3 スペクトラタイプ法などによる解析がおこなわれた。また抗原と TCR の片方の鎖が分かっているときに、もう一つの TCR の鎖を同定する方法も開発した。一方、T 細胞の標的抗原の検索法に関しては、CD4 陽性 T 細胞の認識抗原を同定する目的で、インバリアント鎖を利用し、より高率良くクラス II 分子に抗原ペプチドを結合させ、T 細胞を刺激したのちその抗原の情報を回収できる方法の実用化に進展が見られ、ランダム化したヌクレオチドライブラリーを組み込める見通しができた。免疫制御の方法の開発では、第 4 のリンパ球といわれる NKT 細胞を用いることで自己免疫疾患が制御可能であることや、OX40 分子などの共刺激分子を介する方法などが検討された。

分担研究者

東みゆき 国立小児医療研究センター免疫研究室  
研究員  
住田孝之 筑波大学臨床医学系内科 教授  
斎藤 隆 千葉大学大学院医学研究科遺伝子制御学  
教授  
佐伯行彦 大阪大学医学部第三内科 助手  
西村泰治 熊本大学大学院医学研究科免疫識別学  
教授  
中尾真二 金沢大学医学部第三内科 教授  
上阪 等 東京医科歯科大学医学部第一内科 助手  
高 昌星 信州大学医学部第三内科助 教授  
山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所免疫  
研究部 部長

A. 研究目的

本研究班の柱とするテーマは、「免疫疾患の病因

となる特異抗原を検索する新たな技術、さらにその特異抗原に対する免疫応答を検出、解析し、制御する基盤技術を開発、推進する。」である。本研究班は、特定疾患に関する免疫研究班として、平成 8 年度に指定班員 5 名、公募班員 5 名、研究協力者 3 名、班長を加え 14 名でスタートした。さらに 9 年度から、班員の研究費の一部を厚生科学研究「免疫・アレルギー等研究事業」から得ることになり、また一部班員が科学技術庁の大型研究のため班を離れたため、若干班の構成を変更した。上述のテーマから、主として研究の対象とする分子群は、抗原提示細胞上の主要組織適合遺伝子複合体（MHC）分子、それに結合する抗原ペプチド、それらを認識する T 細胞レセプター（TCR）、さらにこれらの細胞間抗原認識に重要な役割をはたす細胞表面機能分子などである。本班は方法論が主眼なので、対象疾患は限定していない。



## B.研究方法・C.研究結果

西村班員はT細胞に抗原提示する分子の研究をすすめ、クラス II 分子の抗原提示に重要なインバリアント鎖に注目し、この中でクラス II 分子の抗原ペプチド結合溝にアフィニティのある CLIP 領域の遺伝子を、実際に提示したい抗原ペプチド遺伝子に変換させることで提示機能を増強させるベクターを開発した。このベクターを用いることで、目的とする抗原ペプチドを高い効率でクラス II 分子と結合させ、T細胞を刺激しうることが分かり、今年度はこれにランダム化したヌクレオチドのライブラリーを組み込みCOS細胞に遺伝子導入し、実際のT細胞を抗原刺激することが可能であることを示した。T細胞の標的抗原同定の為の新しいシステムとなりつつある。

齊藤班員は、抗原とTCRの片方の鎖が分かっているときに、もう一つの鎖を同定する方法を開発した。すなわち、遺伝子導入に耐えるT細胞株にCD3分子を強発現させた上で、TCRの $\alpha$ 鎖をまず発現させ、これにTCRの $\beta$ 鎖のライブラリーを遺伝子導入し、さらにこの様にして再構築されたT細胞だけに入った刺激をNFAT-GFPにより同定するシステムである。今年度はこれらのシステムが実際に動きうることを示す基礎実験の結果を報告した。

山本は、TCRに関するRT-PCRとSSCP法を用いたT細胞クロナイプ解析法を用いることで、種々の免疫疾患における抗原特異的T細胞の動態と病変間のクローンの比較が極めて容易であることを示した。これは我が国独自の方法であり、今後多くの疾患研究に応用可能と考える。ところで、自己免疫疾患ではepitope spreadingの概念が確立しつつあり、この考えに従えば、病気の始まりは限られたT細胞クローンが限られた自己抗原エピトープを認識しているが、時間の経過とともに数限りないエピトープを認識する数限りないT細胞クローンが活性化され病態が形成されることになる。そうであれば、これらのT細胞を標的にした治療法は現実的でない。これを検証するために自然発症自己免疫疾患モデルマウスの臓器病変における抗原特異的T細胞クローンの

動態を調べた。前年度に引き続き本年度はTaxトランスジェニックマウスについて詳細な分析を加えた。結果は、前年度のSKGマウスやlprマウスと同様に、病期の進行とともに、病変集積T細胞クローンは、その数の減少と異なる病変でのクローンの同一性の増加が観察され、epitope spreadingではなく、clonalなrestrictionの現象があることが判明した。臓器病変形成におけるこれらの限られたT細胞の重要性が示された。

上阪班員はCDRスペクトラタイプ法を用いて、自己免疫疾患患者の末梢血にCD8陽性のT細胞クローンが増加していることを示し、その病因との関係を検討した。佐伯班員は慢性関節リウマチにおける病態形成性T細胞の解析を行った。SCIDマウスへの細胞移入実験から、病態形成性T細胞が存在すると考えられる患者を同定し、その病変滑膜組織に集積したT細胞のTCR配列に患者間で共通なものがあることを見出した。さらにこの配列を持つT細胞クローンを樹立し、これをSCIDに移入することで病態形成性T細胞であることなど、昨年までの解析を続けておこないその結果を報告した。中尾班員は、昨年まで再生不良性貧血患者の抗原特異的T細胞の解析を行ってきたが、今年度はその特異抗原を明らかにする目的で患者血清を用いたSEREX法をおこない、 $\alpha$ グロビンがその抗原の候補であることを見いだした。

住田班員は、第4のリンパ球としてその免疫抑制作用が注目されているNKT細胞について、自己免疫疾患患者における意義付けをフローサイトメトリーで検討した。NKT細胞は慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患患者では、健康人に比べて減少していること、これを増加させるための人工的リガンドである $\alpha$ -GalCerに対して、反応群と無反応群があることを報告した。山村班員は、同じくNKT細胞に注目し、 $\alpha$ -GalCerを用いてMOG誘導性の実験的脳脊髄炎が制御可能であることを、抗原提示細胞にパルスする方法で示した。

東班員は、抗原特異的T細胞の反応に際しての共刺激分子の役割を、CD28との比較で行い、CD28と

は共通あるいは異なる役割で CD4、CD8 それぞれの T 細胞において共刺激シグナルを伝えていることを見いだした。高班員は TNF ファミリーに属する OX40 とそのリガンドに注目し、PLP 誘導脳脊髄炎モデルを抗OX40リガンド抗体が抑制することを報告した。

#### D. 考察・E. 結論

本免疫班の研究は、基盤技術の確立を主としており、3年間の成果だけで十分満足できるものは多くはないが、病態を形成する T 細胞の解析技術、その特異抗原の決定法、NKT 細胞に関する解析などは、欧米のそれと異なる我が国独自の方法を確立しつつあると考える。また共刺激分子と疾患との関連の解析でもユニークな成果を出すことができたと考える。

### III. 分担研究報告

自然発症型関節炎モデルマウス HTLV-I Tax トランスジェニックマウスにおける  
T細胞クロノタイプの変遷

分担研究者 山本 一彦 東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 教授

**研究要旨** 慢性関節リウマチの発症と関節炎の持続にはT細胞が重要な役割を果たしていると考えられている。病態進行に伴うT細胞の動態を解析することは慢性関節リウマチの病因解明の上で重要である。そこで自然発症型関節炎モデルマウス HTLV-I Tax トランスジェニックマウスを用いてT細胞クロノタイプの変遷を解析した。すなわち、病態の stage を初期、中期、晩期に分け、各期において四肢関節に浸潤するT細胞のクロノタイプを我々の研究室で確立したT細胞クロナリティ検出システム（T細胞レセプターRT-PCR/SSCP）を用いて解析した。その結果、T細胞のクロノタイプは、病期の進行に伴いその総数を減じながら、四肢足関節間で一致する方向に向かうことが判明した。また、この一致するクローンは関節に移行しやすいという性格を有し、病態形成に深く関与していることが示唆された。

#### A. 研究目的

慢性関節リウマチの発症と関節炎の持続にはT細胞が重要な役割を果たしていると考えられている。病期によってT細胞の役割が異なるのではないかとの考え方もある。特に最近の epitope spreading の考え方に従えば、病初期における反応エピトープは限られているが、病期の進行とともに反応エピトープは拡大し、それに反応するT細胞クローンは増大していくことになる。この点ではヒトの疾患では発症からの経過が長くまた一様ではないので、関節病変におけるT細胞の動態を解析してもその結果の解釈が難しい場合が多い。HTLV-I tax トランスジェニックマウスは、ヒトの慢性関節リウマチに類似して、慢性炎症性に滑膜増殖、破壊性の関節炎を生じるモデルマウスである。また、血中の免疫グロブリン量の増加、およびリウマトイド因子や抗II型コラーゲン抗体などの自己抗体の上昇が認められるなど、血清学的にもヒトと良く似ていることが示されており、更にその発症と経過についてマウス個体間の差が少ないことが知られている。そこで、このモデルマウ

スを用いて病期によるT細胞のクロノタイプの変遷を解析した。

#### B. 研究方法

HTLV-I pX(Tax)トランスジェニックマウスは、5-6週齢にて関節炎を発症し一年未満のうちに死亡する。そこで関節炎スコア及び病理学的検討から5-8週齢を初期、4-5ヶ月齢を中期、7-8ヶ月齢を晩期として、各期マウスを用いて四肢の足関節に浸潤するT細胞のクロノタイプをT細胞レセプターRT-PCR/SSCP法を用いて解析した。すなわち、左右関節から総RNAを抽出し、T細胞レセプター(TCR)β鎖についてRT-PCRにて増幅した後、SSCP法（single strand conformation polymorphisms）を実施した。SSCP法は具体的にはTCR Vβ遺伝子の塩基配列の違いにより生まれるゲル移動度の差をみることにより、そのT細胞集団のなかで高頻度に発現されているTCR鎖を検出する系であり、従来癌遺伝子の塩基配列変異の検出に使われていたものをT細胞のクロノタイプを解析する

方法として応用、確立したものである。

### C. 研究結果

初期、中期、晩期と進むにつれ四肢足関節間のクロノタイプの一致率が上昇し、晩期では四肢でほとんどの集積クローンが関節間で一致する  $V\beta$ が増加した。すなわちクロノタイプが四肢の間で、70%以上一致して  $V\beta$ レパトワの検出できた総  $V\beta$ レパトワ数に対する割合は各個体でそれぞれ、0/15、0/15、1/16、中期では 1/16、2/17、4/16、晩期では 8/17、12/17、8/17 であった。晩期ではクロノタイプが四肢でほぼ完全に一致するレパトワが多数認められた ( $V\beta$ 1,2,6,7,8.1,8.2,8.3,10, 11,16)。興味深いことに、検出されるクロノタイプ数は病期が進むにつれ全体的に減少した。特に  $V\beta$ 2,7,8.1 は減少が顕著で、晩期には初期のクローン数の 50%~60%に減少した。総じて言えば、関節における T細胞クロノタイプはその全体数を減らしながら一致する方向に向かうということになる。

これらの四肢足関節間で一致するクロノタイプの病態形成に対する意義を解析するために、HTLV-I Tax トランスジェニックマウス脾細胞を  $1 \times 10^7$  個ヌードマウスに移入した。移入したヌードマウスにおいて、移入後2週目に一過性ではあるが関節腫脹が認められ、そのレシピエント四肢に共通してみられたクロノタイプは、ドナーマウス四肢足関節に共通してみられたクロノタイプと一致した ( $V\beta$ 8,2,10,15)。関節腫脹が一過性であり、トランスジェニックマウス由来の T細胞のみでは関節炎を惹起する能力が十分ではないと考えられたので、次に若齢トランスジェニックマウス (7週令) に晩期の脾細胞  $4 \times 10^7$  個を移入した。その結果、関節炎の増悪とドナーマウスとの関節におけるクロノタイプの一一致が観察された ( $V\beta$ 2,9,10,11)。

### D. 考察

RA の疾患活動性の主座である関節滑膜には T細胞を中心としたリンパ球の著名な浸潤がみられること、RA の発症は HLA DR4 や DR1 タイプと相関す

ること、抗 T細胞抗体で T細胞を除去すると症状が軽快すること、RA の動物モデルで病態形成性の T細胞が見いだされていること (コラーゲン誘導関節炎マウスや自然発症型関節炎モデルマウス SKG において、発症した動物から得られた T細胞の移入により病態が正常個体へ養子移入できる)、さらに RA 患者の T細胞を SCID マウス (severe combined immunodeficiency mouse) に移入して慢性関節リウマチの病態を再現することができることなど、T細胞が RA 発症に中心的な役割を果たしていることを強く示唆する証拠は多数ある。したがって、病変に浸潤する T細胞の特徴を解析することは病因解明さらには治療法の開発という上で意義深い。本研究では、クロナリティ検出システム RT-PCR/SSCP 法によりこれまで分からなかった病巣部に浸潤した T細胞の新たな特徴が判明した。すなわち、T細胞のクロノタイプは病期の進行に伴い四肢足関節間で一致するようになる。このクローンは少なくとも関節に移行しやすい性格を持ち、関節炎の継続など病態形成に深く関与している可能性があると考えられる。また、全体のクローン数が減少の傾向を示すことから自己免疫疾患の病態形成には、epitope spreading の状態は必ずしも当てはまらないことが推測される。epitop が spread する場合は、刺激の程度が関節間で異なり、集積クローンの不均一性が見られるものと推測される。今回病態に深く関与していると考えられたクローンがどのような抗原を認識したものであるかが今後決定され、それらクローンが病態形成にいかなる関与をしているのか解明されればより有効な抗原特異的免疫療法につながると思われる。

### E. 結論

自然発症型関節炎モデルマウス HTLV-I Tax トランスジェニックマウスにおいて、関節病変における T細胞のクロノタイプは病期の進行に伴いクローン数減少の経過をたどりながら四肢足関節間で一致するようになるという動態を示した。さらにこの四肢足関節間で共通するクローンは関節に移行しやすい性格であるということが判明し、関節炎の持続など

病態形成に深く関与していることが示唆された。これらのT細胞を標的とする治療法の開発が今後重要となってくると思われる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Matsui T. Kurokawa M. Kobata T. Oki S., Azuma M. Tohma S. Inoue T. Yamamoto K. Nishioka K. and Kato T. Autoantibodies to Tcell co-stimulatory molecules in systemic autoimmune diseases. J.Immunol. 162:4328-4335,1999
- 2) Furukawa H. Murata S. Yabe T. Shimbara N. Keicho N. Kashiwase K. Watanabe K. Ishikawa Y. Akaza T. Tadokoro K. Tohma S. Inoue T. Tokunaga K. Yamamoto K. Tanaka K. and Juji T. Splice acceptor site mutation of transporter associated with antigen processig-1 gene in human bare lymphocyte yndrome.J.Clin.Invest.103:755-758,1999.
- 3) Sekine T. Kato T. Masuko-Hongo K. Nakamura H. Yoshino S. NishiokaK and Yamamoto K. Type II collagen is a target antigen of clonally expanded T cells in the synovium of patients with rheumatoid arthritis.Ann. Rheum. 58:446-450, 1999
- 4)Kawahata K. Misaki Y.,Komagata Y. Setoguchi K. Tsunekawa S.Yoshikawa Y.Miyazaka J. and Yamamoto K. Altered expression level of a systemic nuclear autoantigen determines the fate of immune responce to self. J.Immunol.162:6482-6491,1999
- 5) Kurokawa M. Furukawa H. Yabe T. Matsui M. Toda M. Hamada C. Kasukawa R. Yamamoto K. Nishioka K. and Kato T. Frequency of clonally expanded T cells evaluated by PCR from a single cell. J.Immunol.Methods.224:203-208,1999.

免疫病発症/寛容誘導に関わる共刺激分子の解析  
-T細胞機能発現にかかわる CD137L(4-1BB)の役割-

分担研究者 東 みゆき 国立小児医療研究センター免疫研究室研究員

**研究要旨** T細胞の新しい共刺激分子のひとつである CD137 (4-1BB)シグナルの機能を、マウス CD137L 遺伝子導入細胞株および抗 CD137 抗体を用いて検討した。低濃度抗 CD3 抗体存在下における CD4 T細胞の増殖反応は、CD80 刺激と同様に増強させるが、CD8 T細胞の IFN $\gamma$  産生能は CD137L 刺激の方が明らかに優れていた。CD137L 刺激の特に CD8 T細胞に対する働きは、マウス急性 GVHD モデルにおける CD137L 阻害による効果的な CTL 抑制効果からも示された。また、CD137L 刺激は、抗 CD3 抗体による CD4T 細胞の障害活性を早期に誘導した。この細胞障害機構は Fas 依存性のアポトーシスであり、CD137L 刺激は CD4T 細胞に早期の FasL 発現を誘導することが明らかになった。本研究から、CD137L は CD8 T細胞に対しては強力な活性化に、CD4 T細胞に対しては、activation-induced cell death (AICD)に関与し調節的に働いている可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

CD28 はナイーブ T細胞の抗原特異的活性化に不可欠な costimulatory 分子として知られているが、それ以外にも costimulatory シグナル伝達可能な多くの膜表面分子が見つかってきている。その中でも、TNF レセプターファミリーに属する CD137(4-1BB)は、ナイーブ T細胞の IL-2 産生増強が可能な T細胞 costimulatory 分子のひとつである。本研究は、マウス CD137ligand(L)に対するモノクローナル抗体および遺伝子導入細胞を用いて、CD137 の機能的役割を CD28 と比較検討した。

#### B. 方法

1. マウス形質細胞腫細胞株 P815 にマウス CD137L 遺伝子を導入し、細胞表面に CD137L を高発現させたトランスフェクタントを作製した。CD80 および CD137L-P815 を用いて、CD4 および CD8T 細胞の抗 CD3

抗体存在下における増殖/サイトカイン産生/細胞障害活性の機能発現に関わる costimulatory 能力を比較検討した。2. マウス急性 GVHD モデルに CD137L に対するモノクローナル抗体を投与しその効果を検討した。

#### C. 結果

1. CD137L 刺激は CD80 刺激と同様に CD4T 細胞の増殖反応を増強させたが、細胞障害活性においては CD137L 刺激が P815 に対する早期の活性を誘導させた。この細胞障害活性は、抗 FasL 抗体添加により顕著に抑制され、また、*gld* マウス CD4T 細胞からの活性発現はほとんど認められないこと、および caspase 阻害剤である z-VADfmk ペプチド添加によりこの活性が阻害されることから、Fas 依存性のアポトーシスであることが示された(図1AおよびB)。また RT-PCR 解析から、CD137L 刺激は CD4T 細胞に

早期の FasL 発現を誘導させることが示された(図 1C)。CD8T 細胞は CD80 刺激の方が高い増殖反応を示すものの、IFN $\gamma$  産生誘導能は CD137L 刺激の方が明らかに優れていた。

2. マウス骨髄移植後の急性 GVHD モデルにおける抗 CD137L 抗体投与は、移植早期の致死性回避能力は劣っていたが、生存マウスにおいては、抗 CD80+86 抗体投与群と同様に臨床的 GVHD 症状を緩和し、造血再構築機能に関しては優れていた。また、ホストアロ抗原に対する CD4T 細胞の増殖抑制効果は劣るものの、CD8T 細胞による細胞障害活性および IFN $\gamma$  産生は顕著に阻害されていた。

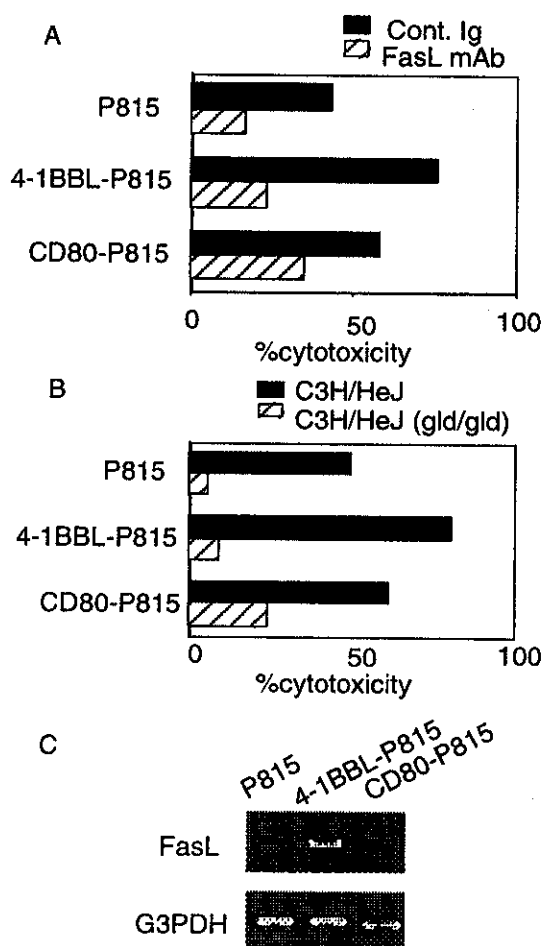


図 1 CD137 刺激は CD4 T 細胞の Fas 依存性の細胞障害活性を誘導する。

A. 抗 CD3 抗体による P815, 4-1BBL-P815, CD80-P815 に対する CD4 T 細胞の re-directed cytotoxicity, B. 正常 C3H および C3H(*gld/gld*) マウスより分離した CD4 T 細胞の re-directed cytotoxicity, C. CD4 T 細胞と各々の P815 トランスフェクタントを抗 CD3 抗体存在下に 2 時間培養した後の FasL 発現誘導を RT-PCR にて解析した。

#### D. 考察

CD137 はナイーブ T 細胞上には発現は認められないが、刺激により発現誘導が速やかに CD4 および CD8T 細胞に認められる。CD137L シグナルはナイーブ T 細胞における CD28 シグナル程顕著な costimulatory activity はないが、活性化された T 細胞に対して CD28 の機能を補うと共に、CD28 とはまた別の機構で T 細胞活性化反応に関わっている可能性が示されている。P815 トランスフェクタントを用いた *in vitro* の検討から、CD137 シグナルが CD4T 細胞に対して迅速な FasL 発現を誘導し、活性化 T 細胞の AICD に積極的に関与している可能性があることが示唆された。また、腫瘍拒絶および GVHD の *in vivo* 実験より、CD137-CD137L 経路が CD8 細胞の細胞障害活性発現に重要な役割を果たしていることが示された。

#### E. 結論

CD137L は CD8 T 細胞に対しては強力な活性化に、CD4 T 細胞に対しては、activation-induced cell death (AICD) に関与し調節的に働いている可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Seko Y, Takahashi N, Yagita H., Okumura K, Azuma M, Yazaki Y. Effects of *in vivo* administration of anti-B7-1/B7-2 monoclonal antibodies on the survival of mice with chronic ongoing myocarditis caused by coxsackievirus B3. *J. Pathol.* 188: 107-112, 1999



- 2) Yamamoto M, Kiyono H, Yamamoto S, Batanero E, Kweon NM, Otake S, Takeda Y, Azuma M, McGhee JR. Direct effects on antigen-presenting cells and T lymphocytes explain the adjuvanticity of a nontoxic cholera toxin mutant. *J. Immunol.* 162: 7015-7021, 1999
- 3) Oki, S., Kohsaka, M. Azuma. Augmentation of cell surface expression of CTLA4 by wortmannin: Involvement of lysosomal sorting properties of CTLA-4. *Int. Immunol.* 11: 1563-1571, 1999
- 4) Matui, T., M. Kurokawa, T. Kobata, S. Oki, M. Azuma, S. Tohma, T. Inoue, K. Yamamoto, K. Nishioka, T. Kato. Autoantibodies to T cell co-stimulatory molecules in systemic autoimmune diseases. *J. Immunol.* 162: 4328-4335, 1999
- 5) Nakazawa, A., Watanabe, M., Kanai, T., Yajima, T., Yamazaki, M., Ogata, H., Ishii, H., Azuma, M., Hibi, T. Functional expression of a costimulatory molecule, CD86 on epithelial cells in the inflamed colonic mucosa. *Gastroenterology* 117: 536-545, 1999
- 6) Kawamura, T., M. Azuma, N. Kayagaki, S. Shimada, H. Yagita, K. Okumura Fas/Fas ligand-mediated elimination of antigen-bearing Langerhans cells in draining lymph nodes. *British. J. Dermatol.* 141: 201-205, 1999
- 7) Seko, Y., N. Takahashi, H. Oshima, O. Shimosato, H. Akiba, T. Kobata, H. Yagita. , K. Okumura, M. Azuma, Yazaki, Y. Expression of tumour necrosis factor (TNF) receptor/ligand superfamily co-stimulatory molecules CD40, CD30L, CD27L. and OX40L in murine hearts with chronic ongoing myocarditis caused by coxsackie virus B3. *J. Pathol.* 188: 423-430, 1999
- 8) Sakurai, J., J. Ohata, K. Saito, H. Miyajima, T. Hirano, T. kohsaka, S. Enomoto, K. Okumura, M. Azuma. Blockade of CTLA-4 signals inhibits Th2-mediated murine chronic graft-versus-host disease by an enhanced expansion of regulatory CD8+ T cells. *J. Immunol.* 164: 664-669, 2000
- 9) Saegusa, K., Ishimaru, N., Yanagi, K., Haneji, N., Nishino, M., Azuma, M., Saito, I., Hayashi, Y. Treatment with anti-CD86 costimulatory molecule prevents the autoimmune lesions in murine Sjogren's syndrome (SS) through up-regulated Th2 response. *Clin. Exp. Immunol.* 119: 354-360, 2000
- 10) Oki S, Noriko O, Kohsaka T, Azuma M. Stat6 activation and Th2 cell differentiation driven by CD28 signals. *Eur. J. Immunol.* in press
2. 学会発表
- 1) Mogi S, Enomoto S, Kohsaka T, Azuma M. Efficient induction of anti-tumor immune responses by gene-transduction with 4-1BB ligand. The 5th annual Meeting The Japan Society of Gene Therapy (Tokyo), 1999.6.18-19
- 2) 茂木 世紀、畑 安浩、野沢和久、榎本昭二、東 みゆき 4-1BB シグナルによる CD4 T 細胞の細胞障害活性発現機構、第 58 回日本癌学会総会(広島)、1999.9.29-10.1
- 3) 野沢和久、大畑順子、桜井仁亨、香坂隆夫、八木田秀雄、奥村 康、東 みゆき. マウス急性 GVHD 発症における CD137 (4-1BB)/CD137L 経路の関与、第 29 回日本免疫学会総会(京都)、1999.12.1-3
- 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（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

proteolipid protein (PLP) による実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) における  
OX40/OX40L の役割

分担研究者 高 昌星 信州大学医学部第三内科 助教授

**研究要旨** proteolipid protein (PLP) により誘導される実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) における OX40/OX40L の役割を OX40L に対するモノクローナル抗体 (RM134L) を用いて検討した。臨床症状は RM134L 投与群で対照群に比し、発症が遅れる傾向にあり、また有意に抑制された。組織学的には対照群マウスでは脊髄白質の広汎な脱髄と血管周囲のリンパ球浸潤を認めた。抗原特異的リンパ球増殖反応は RM134L 投与群および対照群ともに PLP139-151 によく反応し、両者間に有意差はなかった。RM134L 投与群および対照群の PLP139-151 感作マウスから得たリンパ節細胞はいずれも細胞移入による受け身型 EAE を発症させ、両者間に差はみられなかった。一方、細胞移入による受け身型 EAE では RM134L 投与群で対照群に比し、臨床症状が有意に抑制された。培養上清中のサイトカインでは RM134L 投与群および対照群ともに IFN- $\gamma$  を除いて検出感度以下であったが、IFN- $\gamma$  は RM134L 投与群で減少しなかった。フローサイトメトリーを用いた末梢血リンパ球の解析では OX40<sup>+</sup>T 細胞は両者間に差はみられなかったが、脊髄浸潤リンパ球では OX40<sup>+</sup>T 細胞は RM134L 投与群で対照群に比し、有意に減少していた。以上よりマウス OX40L に対するラットモノクローナル抗体 (RM134L) は活性化 T 細胞の中枢神経実質内への遊走を阻害することにより、ラット EAE を抑制することが考えられ、OX40L に対するモノクローナル抗体は多発性硬化症 (MS) の治療薬として用い得る可能性が示唆された。

共同研究者

野原千洋子 順天堂大学医学部免疫学  
井上 敦 信州大学医学部第三内科  
八木田秀雄 順天堂大学医学部免疫学  
秋葉久弥 2 順天堂大学医学部免疫学

A. 研究目的

proteolipid protein (PLP) により誘導される実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) はヒトの多発性硬化症 (MS) と、臨床的にも、組織学的にも類似しており、ヒトの多発性硬化症のよい動物実験モデルとされている。MS の発症には髄鞘蛋白特異的 CD4<sup>+</sup>T 細胞の活性化が重要であることが明かにされている。TNF ファミリーに属する分子である OX40 (CD134) リガンド (OX40L) とそのレセプターである OX40 は T 細胞活性化に重要であると考えられている分子群

の一つである。今回、我々は PLP により誘導される EAE における OX40/OX40L の役割を OX40L に対するモノクローナル抗体を用いて検討した。

B. 研究方法

マウス OX40L に対するラットモノクローナル抗体 (RM134L) を作成した。PLP139-151 で SJL/J マウスを感作し、EAE を作成した。また PLP139-151 感作マウスリンパ節細胞を PLP139-151 で刺激培養し、細胞移入による受け身型 EAE も作成した。感作日、または細胞移入前日から連日、RM134L を最初の寛解が得られるまでマウス腹腔内に投与した。対照群のマウスには同様に非特異的ラット IgG を全く同じプロトコールで腹腔内に投与した。経時的に臨床症状を観察するとともに、屠殺後、脊髄を免疫組織学的に検索した。さ

図 1

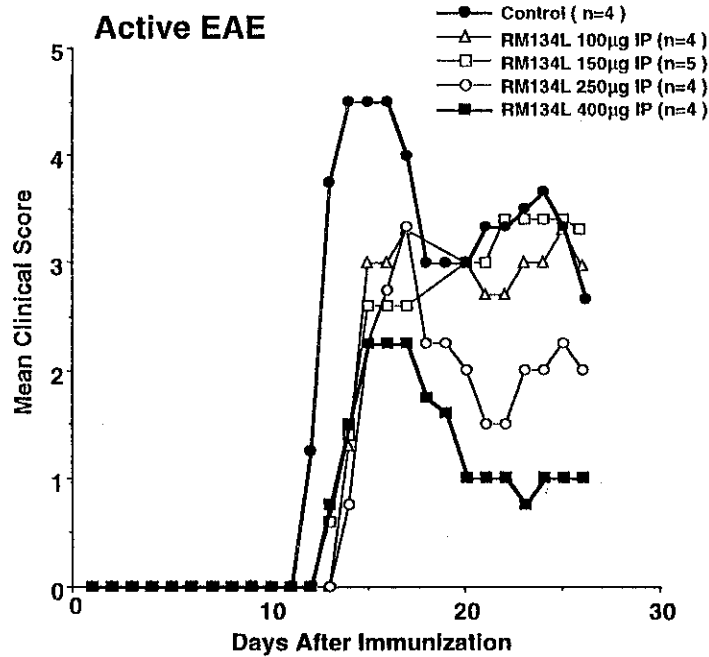
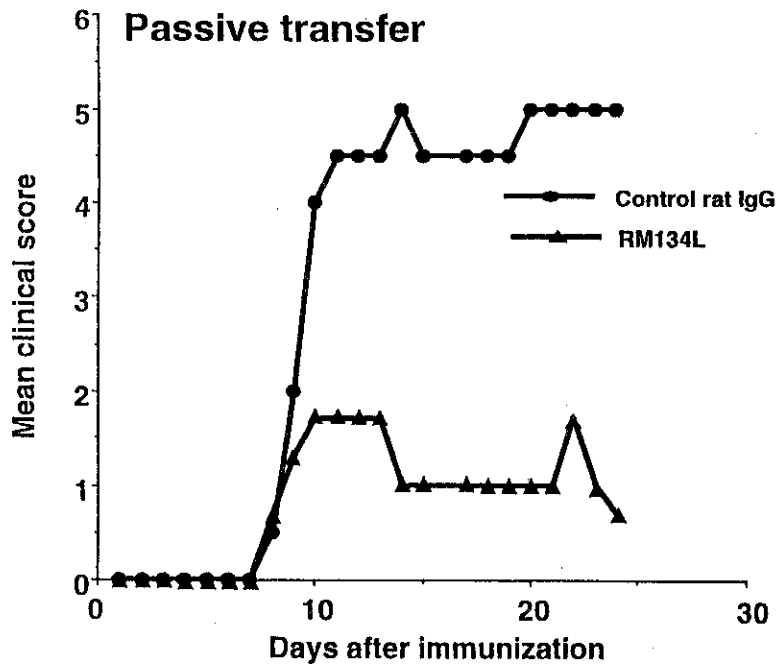


図 2



らに抗原特異的リンパ球増殖反応を定量した。また培養上清中の interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-10, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) を ELISA 法を用いて定量した。さらにまた脊髄浸潤リンパ球および末梢血リンパ球をフローサイトメトリーを用いて解析した。

**結果**

臨床症状は RM134L 投与群で対照群に比し、発症が遅れる傾向にあり、また有意に抑制された (図 1)。組織学的には対照群マウスでは脊髄白質の広汎な脱髄と血管周囲のリンパ球浸潤を認めた。抗原特異的リンパ球増殖反応は RM134L 投与群および対照群ともに PLP139-151 によく反応し、両者間に有意差

はなかった。RM134L 投与群および対照群の PLP139-151 感作マウスから得たリンパ節細胞はいずれも細胞移入による受け身型 EAE を発症させ、両者間に差はみられなかった。一方、細胞移入による受け身型 EAE では RM134L 投与群で対照群に比し、臨床症状が有意に抑制された (図 2)。培養上清中のサイトカインでは RM134L 投与群および対照群ともに IFN- $\gamma$  を除いて検出感度以下であったが、IFN- $\gamma$  は RM134L 投与群で減少しなかった。フローサイトメトリーを用いた末梢血リンパ球の解析では OX40+T 細胞は両者間に差はみられなかったが、脊髄浸潤リンパ球では OX40+T 細胞は RM134L 投与群で対照群に比し、有意に減少していた。

#### D. 考察

マウス OX40L に対するラットモノクローナル抗体 (RM134L) 投与により、EAE および細胞移入による受け身型 EAE の両者が抑制された。RM134L 投与群および対照群ともに末梢血中の OX40+T 細胞には差がなかったが、脊髄浸潤リンパ球では RM134L 投与群で OX40+T 細胞が有意に減少しており、RM134L は活性化 T 細胞の中枢神経実質内への遊走を阻害することにより、EAE を抑制する可能性が考えられた。こうした結果から、OX40L に対するモノクローナル抗体は MS の治療薬として用い得る可能性が示唆された。

#### E. 結論

マウス OX40L に対するラットモノクローナル抗体 (RM134L) は活性化 T 細胞の中枢神経実質内への遊走を阻害することにより、ラット EAE を抑制することが考えられた。OX40L に対するモノクローナル抗体は MS の治療薬として用い得る可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

1) Ichikawa M, \*Koh C-S, Hata Yukiko, Inaba Y, Inoue A, Itoh M, Ishihara Y, Bernard CCA, Komiyama A: IgG2b antibody is associated with the

severity of multiple sclerosis like demyelinating disease in NOD mice injected with myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide 35-55. *Cell Immunol*, 191: 97-104, 1999

2) Iwahashi T, Inoue A, \*Koh C-S, Shin T-K, Kim BS: Expression and potential role of inducible nitric oxide synthase in the central nervous system of Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease. *Cell Immunol*, 194: 186-193, 1999

3) Takahashi K, Arai M, Yamamoto M, Koh C-S, Fukutake K: Interaction of coagulation factors V and VIII on membranes containing phospholipids: Studies with confocal laser-scanning fluorescence microscopy. *Bioimages* 7: 36, 1999

4) Sakai T, Inoue A, \*Koh C-S, and Osame M: Serum levels of apoptosis related molecules in patients with multiple sclerosis and human T-lymphotropic virus type-I associated myelopathy. *J Interferon Cytokine Res*, 19: 999-1004, 1999

5) Inoue A, \*Koh C-S, Iwahashi T, : Detection of serum anti-cerebellar antibodies in patients with Miller Fisher syndrome (MFS). *Eur Neurol*, 42: 230-234, 1999

6) Inoue A, \*Koh C-S, Yamazaki M, Yagita H: Effect of anti-B7-1, B7-2 mAb on Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease. *J Immunol* 163: 6180-6186, 1999

7) Inaba Y, Ichikawa M, \*Koh C-S, Inoue A, Itoh M, Kyogashima M, Komiyama A: Suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Dermatan Sulfate. *Cell Immunol*, 198: 96-102, 1999

8) Ichikawa M, \*Koh C-S, Inoue A, Tsuyusaki J, Yamazaki M, Inaba Y, Sekiguchi Y, Itoh M, Yagita H, Komiyama A: Anti-IL-12 antibody prevents the development and progression of multiple sclerosis like demyelinating disease in NOD mice induced with myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide. *J Neuroimmunol* 102: 56-66, 2000