

# Chromosome 7

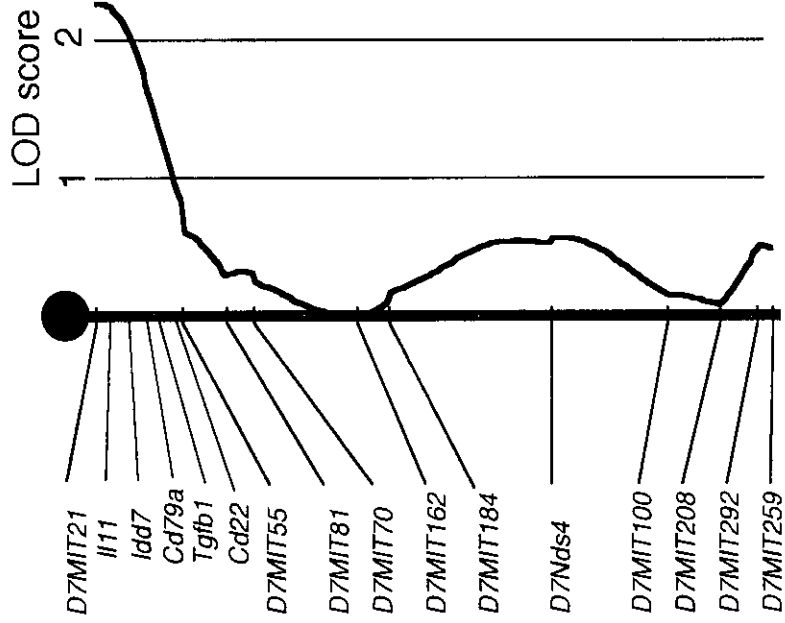


図1. MapManager QTLによるANCA産生感受性遺伝子座のマッピング。マウス第7染色体のセントロメアにQTLの存在の尤度比対数スコア (ロッドスコア) 曲線のピークが認められた。

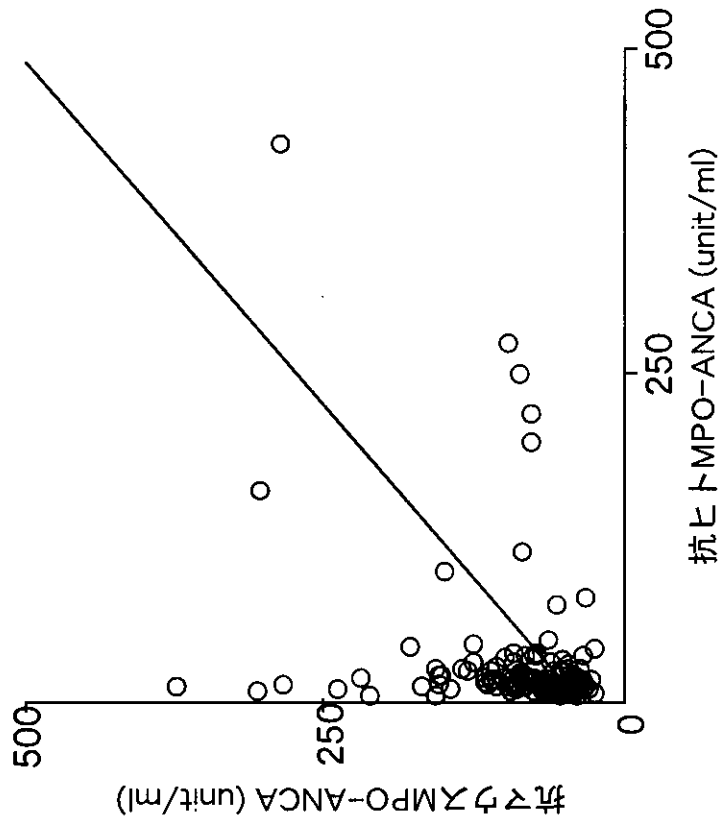


図2. 抗マウスMPO-ANCAと抗ヒトMPO-ANCAの間には有意の正の相関が認められた ( $P < 0.0001$ ,  $r = 0.531$ )。

## 8. 血管炎の血管キャリバー特異的感受性遺伝子の解析

能勢真人 (愛媛大学医学部病理学第二講座)  
山田明弘 (愛媛大学医学部病理学第二講座)  
宮崎龍彦 (愛媛大学医学部病理学第二講座)  
路靈敏 (愛媛大学医学部病理学第二講座)  
曲衛敏 (愛媛大学医学部病理学第二講座)  
森士朗 (東北大学歯学部口腔外科第二講座)  
中鶴修一 (KAN 研究所)

KEYWORDS = 血管炎、膠原病、感受性遺伝子座、血管キャリバー、MRL/lpr マウス

[研究要旨] 系統的血管炎の primary、secondary といった分類や血管キャリバーによる分類の是非について、ゲノムサイドから、膠原病モデルマウス MRL/lpr を用いての解析を行った。このマウスは、腎炎、関節炎、唾液腺炎と同時に、腎、心などの小-中型動脈や、大動脈主分枝などの大型動脈に動脈炎を発症する。このマウスと膠原病嫌発系 C3H/lpr マウスとの交配系マウス群のゲノム解析により、腎血管炎は、他の膠原病とは遺伝的に分離して発症すること、また、少なくとも第4染色体上の2つの感受性遺伝子座 *autoimmune renal vasculitis in MRL mice 1 (Arvm1)*、*Arvm2* と第3染色体上の1つの抵抗性遺伝子座に支配されており、一方、大動脈主分枝の大型血管炎はこのうち *Arvm1* にのみ感受性を有することを明らかにした。このことから、系統的血管炎の上述の分類は、個体の特定のアリルのそれぞれ異なった組み合わせで説明し得ると考えられた。

### **Vasculitis-susceptibility loci specific for the caliber of blood vessels in MRL/lpr lupus mice**

Masato Nose, Akihiro Yamada, Tatsuhiko Miyazaki, Ling-Min Lu, Wei-Min Qu, (Department of Pathology, Ehime University School of Medicine), Shiro Mori (Department of Oral Surgery, Tohoku University School of Dentistry) and Shuichi Nakatsuru (KAN Research Institute)

An MRL/Mp strain of mice with Fas deletion mutant gene *lpr* (MRL/*lpr*), develops systemic vasculitis, while C3H/*lpr* does not. We performed genome-wide screening on MRL/*lpr* x (MRL/*lpr* x C3H/*lpr*)F1 backcross (N2) mice and (MRL/*lpr* x C3H/*lpr*) F2 intercross mice, we defined three distinct susceptibility loci to vasculitic lesions in the kidney; two recessive susceptible loci on chromosome 4 (*Autoimmune renal vasculitis in MRL mice 1 and 2 (Arvm1, Arvm2)*) and one recessive resistant locus on chromosome 3 in both N2 and F2 progenies. While, we mapped one recessive susceptibility locus to vasculitic lesions in aortic branches on chromosome 4 (*Autoimmune aortitis in MRL mice 1 (Aaom1)*) in F2 progenies. Interestingly, *Aaom1* was shared with *Arvm1*, but not with *Arvm2*. Our data suggest that caliber- or organ-specificity of vasculitis may be under the control of different combinations of vasculitis-susceptibility genes.

#### [研究目的]

系統的血管炎の個々の疾患カテゴリーは、現在、主に血管のキャリバーによる分類に基盤が置かれている<sup>1)</sup>。しかし、実際には個々のカテゴリーには臨床症状、病理所見共にとともに種々のバリエーションを示す症例を認めることも多い。例えば、高安病にウェゲナー肉芽腫症を合併したという Meija の報告<sup>2)</sup>にもあるように、炎症が特定の太さの血管に限局せず、キャリバーによるカテゴリーを越えて複数の疾患基準を包含することがある。このような病態に対して polyangitis overlap syndrome という疾患概念を Fauci<sup>3)</sup>は提唱している。しかしながらこの概念の病理発生論上での本質的な解析はまったく解決されていない。最近の遺伝子多型との関連解析に伴って、これまでに我々は、血管炎の遺伝要因について、大型動脈を含め、全身性の動脈炎を多様に自然発症する MRL/Mp-*lpr/lpr* (MRL/*lpr*)マウスをモデルとして解析を進めてきた<sup>4)</sup>。即ち、MRL/Mp-*lpr/lpr* マウスと同一の H-2<sup>k</sup> ハプロタイプを持ち、このマウスと同様に免疫複合体、自己抗体を発現するにも関わらずこれらの膠原病疾患群を発症しない C3H/HeJ-*lpr/lpr* (C3H/*lpr*)マウスとのハイブリッドである MRL/*lpr* x (MRL/*lpr* x C3H/*lpr*)F1 マウスの解析から、これらの群には動脈炎、腎炎、あるいは関節炎をそれぞれ個別に発症する個体が認められることを明らかにしてきた。さらに動脈炎のみを発症する亜系(McH5-*lpr/lpr*) をこのハイブリッドマウス群より樹

立しており、*lpr* 遺伝子のみでは膠原病疾患群の発症には不十分で、MRL/Mp 系マウス固有の背景遺伝子群の存在が必須であること、また、個々の疾病に対応する遺伝的に分離可能な疾患感受性遺伝子および疾患抑制遺伝子群が存在することを明らかにしてきた。

そこで本研究では上記課題を解決するためのアプローチの一端として、血管のキャリバーあるいは臓器別に血管炎が発症するメカニズムという根本的課題についてゲノム解析からアプローチすべく、キャリバーあるいは臓器特異的な血管炎感受性遺伝子座の解析を行った。

#### [研究方法]

(MRL/*lpr* x C3H/*lpr*)F2 マウス 527 匹を作成し、以下の実験に供した。

組織学的評価：4～5ヶ月齢でエーテルによる全身麻酔下で屠殺後、腎と大動脈のホルマリン固定、パラフィン包埋切片を作成した。これらのヘマトキシリン・エオジン染色とエラスティカ・マッソン染色を行い、以下の基準に従って血管炎の病理組織学的評価を行った。Grade 0；正常または血管周囲にリンパ球浸潤を認めるにとどまる。Grade 1；リンパ球浸潤に加え、外弾性板の破壊を認める。Grade 2；grade 1 の所見に加え内弾性板破壊と内膜肥厚を認める。

遺伝子型分析：

①ゲノムワイドスクリーニング；マウス尻尾または肝臓から DNA を抽出し、各染色体を約 20 cM 間隔でカバーするように多型マイクロサテライトマーカーを選び、各 F2 個体をこれらのマーカー位置での simple sequence length polymorphism による遺伝子型解析を行った。前述の血管炎の組織学的 grading における grade 0 を血管炎（-）、grade 1, 2 を血管炎（+）として、各マーカー位置での遺伝子型と血管炎発症との関連解析を行い、2x2 または 2x3 の分割表による  $\chi^2$  検定にて候補染色体を同定した。Lander らの提唱<sup>5)</sup>に従い  $p < 0.0034$  (2x2 分割表)、 $p < 0.0016$  (2x3) を suggestive linkage、 $p < 0.0001$  (2x2)、 $p < 0.000052$  (2x3) を significant linkage とした。

②候補染色体に於ける感受性遺伝子座のマッピング；上記ゲノムワイドスクリーニングの結果、候補染色体とされた第 3、4 番染色体について、F2 マウス 526 匹を用いて、間隔を詰めてさらに詳細にマイクロサテライトマーカーの遺伝子型解析を行い、感受性遺伝子座をマップした。個別のマイクロサテライトマーカー遺伝子座に於ける関連解析とともに、MAPMAKER/QTL software を使用し

て血管炎の病理組織学的 grading 値 (0、1、2 の 3 段階) に基づき QTL 解析をおこなった<sup>6)</sup>。LOD score 3.3 以上を significant linkage とした<sup>5)</sup>。

#### [結果]

腎血管の動脈炎は 526 匹中の 61 匹 (11.5%) に認められた。QTL 解析により、*D4Mit213* (13.3 cM) 近傍と *D4Mit147* (57.6 cM) 近傍の 2ヶ所にそれぞれ LOD score 6.8 および 6.5 を peak とする significant linkage を示す疾患感受性遺伝子座を認めた。そこで *D4Mit213* 近傍と *D4Mit147* 近傍の遺伝子座をそれぞれ *Arvm1* (*Autoimmune renal vasculitis in MRL mice 1*)、*Arvm2* と命名した。

大動脈の主分枝の動脈炎は 517 例中の 36 例 (6.9%) に発症した。第 4 番染色体の QTL 解析を行ったところ、13.3cM に位置する *D4Mit213* 近傍に LOD score 3.73 を peak とする significant linkage を示す疾患感受性遺伝子座を認めた。この感受性遺伝子座を *Aaom1* (*Autoimmune aortitis in MRL mouse 1*) と命名した。*Arvm1,2*、*Aaom1* の 3ヶ所の遺伝子座に於ける疾患感受性の遺伝様式はいずれも MRL 対立遺伝子劣性感受性であった。

第 3 番染色体において、QTL 解析にて雌に MRL 対立遺伝子劣性抵抗性を示す peak を 58.5 cM 付近に認められたが、Lander らの定義による suggestive linkage を確認するには至らなかった。

#### [考察]

MRL/lpr と C3H/lpr の F2 交配系において、少なくとも腎血管炎の感受性遺伝子座を第 4 番染色体上の二カ所にマップした。これらの感受性遺伝子座は、N2 戻し交配系 MRL/lpr x (MRL/lpr x C3H/lpr)F1 の解析により得られていた遺伝子座と一致した。さらに、N2 系においては、第 3 番染色体の 58.5 cM 付近に雌に於ける劣性抵抗性遺伝子座をマップしており、これら三つの疾患感受性遺伝子座の間には、相加性と、*Arvm1* を上位とする階層性を認めている<sup>7)</sup>。今回の F2 系の解析において第 3 番染色体の抵抗性遺伝子座に有意な関連を確認できなかったのは、兄妹交配系においては疾患発症の閾値が上がることにより発症率を低下せしめることによると考えられる。実際、F2 系においても *Arvm1* と *Arvm2* の間には相加性が認められた。すなわち、*Arvm1* の遺伝子型が MRL ホモである群においては、*Arvm2* が MRL ホモ(MM)、ヘテロ(MC)、C3H ホモ(CC)の順に発症率が低下していた(MM:MC:CC= 31.7% : 22.4% : 18.2%)。さらに *Arvm1* がヘテ

口群の腎血管炎発症については発症率が顕著に低下し、この群の中での *Arvm2* の遺伝子型による発症率のグラデーションも同様の階層性をしめした (MM:MC:CC= 11.3% : 6.8% : 8.2%)。

一方、大動脈主分枝血管炎の感受性遺伝子座 *Aaom1* は *Arvm1* と重なりを持ったが、興味あることに *Arvm2* とはまったく関連しなかった。このことは *Arvm2* が腎臓の血管炎に特異的な疾患感受性遺伝子座であることを示しており、同一個体に発症する血管炎であっても、その疾患感受性は臓器特異的もしくはキャリアー特異的な疾患感受性遺伝子座に規定されていることが明らかとなった。

Kussmaul と Maier が最初に報告した *peri-arteritis nodosa* は腎臓に好発するとされたものの、その後、全身性に発症する *poly-arteritis nodosa* という疾患カテゴリーに修正されるに至ったが、このことは、我々のモデル系が示す如く、実は宿主の遺伝的背景に規定された一現象であったと推定される。さらに、高安病のモデルともされてきた MRL/lpr 系における大動脈主分枝血管炎の疾患感受性遺伝子座が腎臓の血管炎の疾患感受性遺伝子座と共有を持つことは、この遺伝子座に血管炎の *common gene* が存在している可能性を示している。さらに、血管炎症候群自体が複数の感受性遺伝子座に規定されたポリジーン疾患であり、異なった感受性遺伝子の組み合わせにより各カテゴリーの血管炎が発症する可能性を示唆する。

血管炎感受性遺伝子座の一つである *Arvm1* および *Aaom1* に共有される領域には、位置的候補遺伝子として *Cd72*、*Pax5* などがある。これらの遺伝子多型につき検索したところ、我々は、MRL 系マウスの *Cd72* mRNA には C3H 系マウスのそれとは明らかに異なる *alternative splicing* のあることを見いだした<sup>7)</sup>。さらに、MRL 系マウスでは、MRL 系では、*exon 7* に 3 塩基の挿入と *exon 8* に 21 塩基の欠失があった。ゲノム DNA のシーケンス解析により、この *exon 8* の欠失は *intron7/exon8 junction* の DNA 多型 (AG→CT) のために AG splice site が 21 塩基下流側にずれるためであった<sup>7)</sup>。

CD72 は主に B 細胞に発現する II 型膜貫通性蛋白で、細胞内領域に B 細胞の分化、活性化に対して負のシグナルを誘導するとされる ITIM モチーフ (*immuno-receptor tyrosine-based inhibition motif*) を持っており、*Cd72* ノックアウトマウスでは B 細胞の抗原刺激に対する増殖、分化が促進されるとされている<sup>8)</sup>。MRL 系マウスの *Cd72* は、ITIM モチーフは保存されているものの、上記細胞外領域の少なくとも 2ヶ所の顕著な変異は CD72 の機能的差異を生み出し、

このことが血管炎の発症プロセスにおけるカスケード反応にクリティカルな作用を及ぼすものと推定される。

我々のアプローチは、ヒトと相同疾患をもつモデル動物とその交配系を用いて疾患感受性遺伝子座を同定し、これをヒト-マウス間の染色体相同領域にあてはめてヒト疾患に於ける疾患感受性素因を明らかにしようとするものである。他方、患者群と健常対照を用いたヒトに於ける疾患感受性素因の研究も報告されているが、この方法では候補遺伝子をあらかじめ仮定して解析を進める演繹的方法論であり、未知、あるいは予想し得ない感受性遺伝子を発見し難い。我々のアプローチは、ポリジーン系に規定されている疾患感受性素因を効率よく同定することに貢献するものと考えられている。

#### [参考文献]

1. Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, Bacon PA, Churg J, Gross WL, et al.: Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum* **37**: 187-192, 1994.
2. Meija.HC, Alvarvez MA, Deleon BB: Takayasu's arteritis coexisting with Wegener's granulomatosis in a teenager with renal insufficiency: case report. *Pediatr Dev Pathol* **2**: 385-388, 1999.
3. Fauci AS: The spectrum of vasculitis: Clinical, pathological, immunologic and therapeutic considerations. *Ann Intern Med* **89**: 660-75, 1978.
4. 能勢真人: 膠原病の病像多様性、類似性の起源—モデルマウスのゲノム解析によるアプローチ. *日病会誌* **89**: 41-59, 2000.
5. Lander E, Kruglyak L: Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* **11**: 241-247, 1995.
6. Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L: MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* **1**: 174-181, 1987.
7. Qu WM, Miyazaki T, Terada M, Lu L-M, Nishihara M, Yamada A, Mori S, Nakamura Y, Ogasawara H, Yazawa C, Nakatsuru S, Nose M: Genetic dissection of vasculitis in MRL/lpr lupus mice: a novel susceptibility locus involving the *CD72c* allele. *Eur J Immunol* **30**: 2027-37, 2000.
8. Pan C, Baumgarth N, Parnes JR: CD72-deficient mice reveal nonredundant roles of

CD72 in B cell development and activation. *Immunity* 11:495-506, 1999.



## 9. HTLV-I LTR-env-pX 遺伝子導入ラット (env-pX ラット) に認める血管炎の発症機序の解析と治療

吉木 敬 (北海道大学大学院医学研究科 病態・分子病理)  
石津 明洋 (北海道大学大学院医学研究科 病態・分子病理)  
池田 仁 (北海道大学大学院医学研究科 病態・分子病理)  
富居 一範 (北海道大学大学院医学研究科 病態・分子病理)  
樋口 正人 (北海道大学大学院医学研究科 病態・分子病理)  
辻 宗啓 (北海道大学大学院医学研究科 病態・分子病理)  
阿部 麻美 (北海道大学大学院医学研究科 病態・分子病理)

KEY WORDS=血管炎、動物モデル、自己免疫、胸腺

【研究要旨】 env-pX ラットに発症する血管炎は、env-pX ラットの脾細胞で正常同系ラットに移入可能であり、正常血管構成分子が標的となっていると考えられる。一方、env-pX ラットの骨髄細胞では血管炎は正常同系ラットに移入されないことより、この血管を標的とした自己免疫現象の成立には胸腺の働きが重要と想像された。そこで、胸腺置換と骨髄細胞移入を組合せ、胸腺のフレームワークにのみ env-pX 遺伝子を発現するラットを作製したところ、このラットに血管炎の発症を認めた。従って env-pX ラットの血管炎は、リンパ球が胸腺で分化する過程において、env-pX 遺伝子を発現する胸腺フレームワークを通過することにより、自己の血管構成分子に対する反応性を有した状態で末梢に出現するため発症する自己免疫疾患と考えられる。現在、env-pX ラットの血管炎に対する FK506 等免疫抑制剤の効果を検討中である。

Pathogenetic analysis and therapy of necrotizing arteritis developed in transgenic rats carrying HTLV-I LTR-env-pX gene

Takashi Yoshiki (Department of Pathology, Hokkaido University Graduate School of Medicine), Akihiro Ishizu (Department of Pathology, Hokkaido University Graduate School of Medicine), Hitoshi Ikeda (Department of Pathology, Hokkaido University Graduate School of Medicine), Kazunori Fugo (Department of Pathology, Hokkaido University Graduate School of Medicine), Masato Higuchi (Department of Pathology, Hokkaido University Graduate School of Medicine), Muneharu Tsuji (Department of Pathology, Hokkaido University Graduate School of Medicine), Asami Abe (Department of Pathology, Hokkaido University Graduate School of Medicine)

Transgenic rats carrying HTLV-1 LTR-*env-pX* gene (*env-pX* rats) develop collagen vascular diseases with autoantibody production. To study the pathogenetic roles of the transgene, we carried out 3 sets of reciprocal transfer experiments, which are bone marrow cell transfer (BMT), spleen cell transfer (SCT) and a combination of BMT and the exchange of thymic framework, between *env-pX* and non-transgenic rats. As a result, 1) Necrotizing arteritis developed in lethally irradiated non-transgenic rats received SCT from *env-pX* rats, or in non-transgenic rats reconstituted by normal bone marrow cells following transplantation of thymic framework from *env-pX* rats. Molecules constitutively expressed in the arterial wall are likely to be the target of autoreactive T cells. Functional abnormality of thymic framework induced by the transgene appears to be essential in the development of arteritis. 2) Dermatitis developed in non-transgenic rats received either BMT or SCT from *env-pX* rats, indicating lymphocytes positive for the *env-pX* gene may induce dermatitis. 3) For other diseases such as arthritis, expression of the *env-pX* gene in the target organ is needed. Local autoimmune response may play a pathogenetic role, and T cells expressed the *env-pX* gene may aggravate disease severity.

#### 【研究目的】

我々が作製した*env-pX* ラットは様々な血管膠原病を発症する<sup>1,2</sup>。このうち血管炎は*env-pX* ラットの脾細胞で正常同系ラットに移入可能であり、正常血管構成分子が標的となっていると考えられる。一方、*env-pX* ラットの骨髄細胞では血管炎は正常同系ラットに移入されないことより、この血管を標的とした自己免疫現象の成立には胸腺の働きが重要と想像された<sup>3</sup>。そこで、我々は胸腺置換と骨髄細胞移入を組合せ、胸腺のフレームワークにのみ*env-pX* 遺伝子を発現するラットを作製し、血管炎の発症の有無について検討した。

#### 【研究方法】

(1) 生後24時間以内の*env-pX* ラットから胸腺を摘出し、2枚のディッシュで挟んで押しつぶすことにより約90%の胸腺リンパ球を除去した。残る組織を1.5mMの2-デオキシグアノシンを含むメディウム中で1週間培養後、胸腺フレームワークとして使用した。

(2) 生後6週齢の正常WKAHラットに致死量(12Gy)の放射線を照射し、胸腺を摘出した。このラットの腎被膜下に、(1)で作製した*env-pX* ラット由来の胸腺フレームワークを移植した。

(3) (2)のラットに正常骨髄細胞を静注し、骨髄を再建した。

(4) 6ヶ月の観察の後、病理組織学的に血管炎の有無を解析した。

## 【結果】

(1) 物理的処理と化学的処理を組み合わせることにより、移植に用いる胸腺から95%以上のリンパ球が除去された。

(2) 移植後50日の観察では、胸腺のフレームワークを移植した腎被膜下に皮髄構造を示す胸腺形態が確認された。また、同部から採取したリンパ球の85%以上がCD4CD8 double positiveであり、移植胸腺が機能的にも回復していることが示唆された。

(3) 胸腺フレームワークを移植されたラットの末梢血からDNAを抽出し、導入遺伝子に対するPCRを行ったが、特異的バンドは検出されず、移植胸腺由来のリンパ球の末梢血への混入はごくわずかと考えられた。

(4) 胸腺のフレームワークにのみenv-pX遺伝子を発現するように作製したラット11頭中4頭に血管炎の発症を認めた。組織学的には筋型動脈の壁および周囲に単核球主体の炎症細胞浸潤を認め、中膜弾性線維の断裂や消失、血管平滑筋の破壊やフィブリノイド変性を伴う動脈炎の所見であった。これはenv-pXラットに認める血管炎の組織像に類似していた。血管炎以外の疾患の発症は認められなかった。

## 【考案】

env-pXラットの血管炎は、リンパ球が胸腺で分化する過程において、env-pX遺伝子を発現する胸腺フレームワークを通過することにより、自己の血管構成分子に対する反応性を有した状態で末梢に出現するため発症する自己免疫疾患と考えられる。自己反応性リンパ球は胸腺でのnegative selectionの際に除去あるいは不応化されると考えられており、従ってenv-pXラットの胸腺ではnegative selectionの機構になんらかの不全が生じている可能性が高い。env-pX遺伝子がコードする蛋白のうちp40Taxは、様々な宿主細胞性遺伝子を活性化あるいは抑制することが知られている<sup>4</sup>。今後、env-pX遺伝子を発現する胸腺フレームワークの細胞にどのような分子異常が生じ、リンパ球の分化機構が障害されているかを明らかにする必要がある。また、血管炎局所でリンパ球の標的となっている分子の同定も行っていきたい。

ヒト血管炎に特効的な治療法は未だなく、モデル動物を用いた基礎的治療実験を行う意義は大きい。現在、env-pXラットの血管炎に対するFK506等免疫抑制剤により発症予防効果ならびに治療効果を検討中である。

【参考文献】

- 1 Yamazaki H, Ikeda H, Ishizu A, Nakamaru Y, Sugaya T, Kikuchi K, Yamada S, Wakisaka A, Kasai N, Koike T, Hatanaka M, Yoshiki T. A wide spectrum of collagen vascular and autoimmune diseases in transgenic rats carrying the env-pX gene of human T lymphocyte virus type I. *Int Immunol* 1997; 9: 339-346.
- 2 Yamazaki H, Kunisada T, Ishizu A, Ikeda H, Miyoshi I, Sudo T, Hayashi S, Yoshiki T. Promotion of early osteogenesis and B lymphopoiesis in the bone marrow of transgenic rats with the env-pX gene of human T-cell lymphotropic virus type I. *Oncogene* 1998; 17: 2955-2960.
- 3 吉木 敬, 柴田雅彦, 石津明洋, 池田 仁, 富居一範, 樋口正人. HTLV-I env-pX遺伝子導入ラットにおける自己免疫疾患発症機構の解析と治療 厚生省厚生科学特定疾患対策研究事業 難治性血管炎に対する調査研究班 平成11年度報告書. 1999; 64-68.
- 4 鈴木健之, 吉田光昭. HTLV-I Taxと細胞性因子との相互作用. 蛋白質核酸酵素. 1996; 41: 1249-1257.

## 10. 新規ヒト B7 分子の血管内皮細胞における発現と機能

東 みゆき (東京医科歯科大学大学院分子免疫学分野)

町田 詩子 (東京医科歯科大学大学院分子免疫学分野)

大月 典子 (東京医科歯科大学大学院分子免疫学分野)

KEYWORDS= 血管内皮細胞, T 細胞, B7-H1, B7h

[研究要旨] CD28-B7 ファミリーに属する新規 B7 分子である B7-H1 と B7h 分子の免疫細胞および血管内皮細胞における発現とその機能について解析した。B7-H1 およびそのリガンド PD-1 共に T 細胞および B 細胞に発現誘導されるが、単球においては、活性化に伴い急速な発現増強が B7-H1 のみに認められた。CD4 T 細胞の増殖反応は抗 B7-H1 抗体あるいは抗 PD-1 抗体添加により増強され、また、B7-H1 遺伝子導入株による刺激で抑制されることから、この経路は T 細胞の活性化に抑制的に働いていることが示された。B7h, B7-H1 共に培養 HUVEC に発現されているが、炎症性サイトカイン処理により発現は変化しなかった。血管内皮細胞上の B7h 発現は、T 細胞との相互反応に関与している可能性が示された。

### **Expression and function of novel B7 molecules, B7h and B7-H1 on endothelial cells**

Miyuki Azuma (Dept. of Immunology, Tokyo Medical & Dental University),

Utako Machida (Dept. of Immunology, Tokyo Medical & Dental University),

Noriko Otsuki (Dept. of Immunology, Tokyo Medical & Dental University)

We have investigated expression and function of novel CD28-B7 family molecules, B7-H1 and B7h and their ligands on immune cells and endothelial cells. Human B7-H1 and its ligand, PD-1 are both induced on T and B cells. B7-H1, but not PD-1, on monocytes is

rapidly induced by activation. Proliferative responses of CD4 T cells were augmented by the addition of anti-B7-H1 or anti-PD-1 mAb, and inhibited by the stimulation with B7-H1 transfectants, suggesting that B7-H1-PD-1 pathway may play a regulatory role in T cell activation. Both B7-H1 and B7h are expressed in cultured HUVEC cells and their expression was not affected by inflammatory cytokine treatment. B7h on HUVEC may be involved in interactions between T cells and EC.

#### [研究目的]

CD28-B7 ファミリーに属する新規分子として ICOS(AILIM)-B7h および PD-1-B7-H1(PD-L1)の存在が明らかになった。我々は、これら新規 B7 分子の免疫細胞および血管内皮細胞上の発現と機能について検討した。

#### [研究方法]

(1)ヒト B7-H1 cDNA は Dr. L. Chen (Mayo clinic)より供与を受け、hPD-1cDNA は PCR により作製し、遺伝子導入高発現安定株を作製した。(2)遺伝子導入細胞株を免疫原とし、モノクローナル抗体を作製した。(3)末梢血 T, NK, B 細胞, 単球, および培養臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) における両分子の発現, 刺激による発現増強および誘導をフローサイトメトリーにて検討した。(4)T 細胞の機能発現における PD-1/B7-H1 経路の役割を, B7-H1 遺伝子導入株刺激あるいは抗体添加による T 細胞増殖反応に与える影響を検討した。(5)ヒト HUVEC における B7h 発現の測定は, RT-PCR 法およびモノクローナル抗体 (Dr. L. Chen より供与) を用いて行なった。(6)T 細胞と HUVEC の相互作用における上記 B7 分子の関与をみるために, 至適濃度下の SEB 存在下にサイトカイン処理 HUVEC で CD4T 細胞を刺激する T 細胞の増殖反応系に抗 B7-H1 抗体あるいは F(ab')<sub>2</sub> 抗 ICOS 抗体 (JT より供与) を添加しその効果を検討した。

#### [研究結果]

(1) PD-1 および B7-H1 共に, 新鮮分離末梢 T 細胞の約 10%に僅かな発現を認めるのみであるが, 両分子は活性化に伴い CD4 および CD8T 細胞に同様に, また CD45RO 陽性メモリー分画に誘導された。末梢 B 細胞では, B7-H1 の恒常的発現が認められ,

PD-1 は抗 IgM 抗体, 抗 CD40 抗体, IL-4 などの活性化刺激により発現誘導されたが, B7-H1 においては活性化による大きな変化は認められなかった. 単球においては, 未刺激で僅かな B7-H1 および PD-1 発現を認めたが, LPS および炎症性サイトカインである TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ 等の数時間の刺激により, B7-H1は急速に発現増強された. PD-1 発現は変化しなかった.

(2) 精製した CD4T 細胞と付着細胞 (30% $>$  CD14 $^{+}$ ) とのアロ MLR において, 抗 PD-1 抗体あるいは抗 B7-H1 抗体添加は, 同様に増殖反応を増強させた. 至適濃度以下の抗 CD3 抗体あるいは抗 CD3 抗体+抗 CD28 抗体刺激によって誘導される CD4 $^{+}$ T 細胞の P815 細胞上の FcR を介した増殖反応は, B7-H1 遺伝子導入添加によりわずかに抑制され, これは抗 B7-H1 あるいは PD-1 抗体添加で強く増強されたが, この現象は B7-H1 発現のない親細胞 P815 によっても認められた. このことから, 遺伝子導入により強制発現された B7-H1 のみならず, 活性化に伴い共に T 細胞上に誘導された PD-1 と B7-H1 分子の反応が上記の増殖反応に関与している可能性が示された.

(3) 培養 HUVEC 上の B7h 発現を RT-PCR で, 同定したところ, 未刺激においても mRNA の発現が検出された (図 1A). 抗体を用いてフローサイトメトリーで検討したところ, 非常にわずかな表面発現が認められ, TNF $\alpha$ 処理によりわずかな増強が認められた. これに対して, B7-H1 は培養 HUVEC 上に恒常的な発現が認められ, IFN $\gamma$ あるいは TNF $\alpha$ 刺激ではほとんど変化は認められなかった (図 1B).

(4) SEB 存在下において IFN $\gamma$  処理 HUVEC によって誘導される CD4 T 細胞の増殖反応は, F(ab') $_2$  抗 ICOS 抗体により 20-30%の抑制がみられたが, 抗 B7-H1 抗体添加では変化しなかった.

#### [考察]

抗体添加による PD-1-B7-H1 経路の阻害は, CD4T 細胞の増殖反応を増強させることから, PD-1-B7-H1 経路は, T 細胞反応に抑制的に働いていることが示された. また, PD-1-B7-H1 経路は, メモリーT 細胞と単球/マクロファージあるいはメモリー

T細胞間において重要な抑制分子として機能している可能性が示された。このことから、B7-H1-PD-1 経路が、末梢免疫寛容誘導および維持に重要な働きをしている可能性が考えられる。血管内皮細胞上に B7-H1 の恒常的発現を認めたが、T細胞増殖反応における関与は認められず、逆に発現がわずかな B7h が T細胞との反応に関与している可能性が示唆された。

[結論]

ヒト B7-H1 分子を介した T細胞上の PD-1 分子へのシグナルは、T細胞の活性化に抑制的に働いていることが示された。血管内皮細胞と T細胞との相互反応においては ICOS-B7h 経路が関与している可能性が示された。

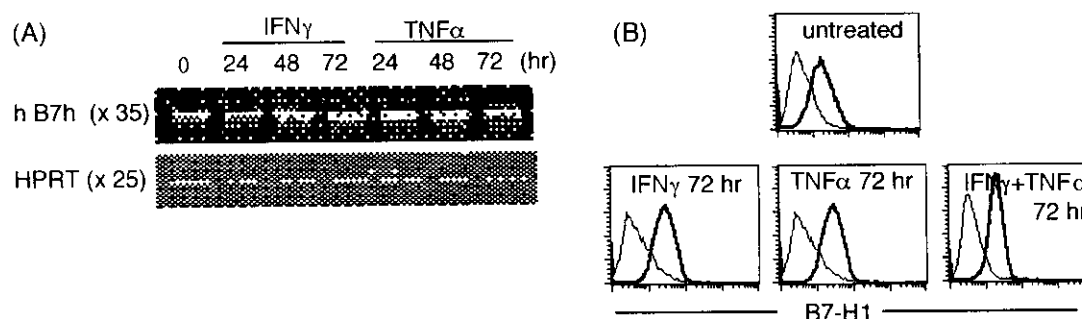


図1 血管内皮細胞における B7h および B7-H1 の発現



## 11. 血管病変における低酸素・再酸素化関連分子の発現について

由谷親夫 (国立循環器病センター臨床検査部病理)  
塚本吉胤 (国立循環器病センター臨床検査部病理)

KEY WORDS=ORP150、RA301/Tra2 $\beta$ 、高安大動脈炎

### [研究論旨]

我々は、以前より虚血および低酸素でのストレス応答を細胞レベルで解析し、病態との関連性を検討してきた。その過程で低酸素関連分子として ORP150 を、また低酸素・再酸素化関連分子として RA301/Tra2 $\beta$  をクローニングした。それぞれの分子の血管病変における発現を検討した。ORP150 は、動脈硬化においてはマクロファージに強い発現をみとめたが、癒痕化した大動脈炎組織においては、外膜近傍の形質細胞につよい発現をみた。RA301/Tra2 $\beta$  は、動脈硬化巣における新生内膜に発現をみとめた。血管障害モデルにおいても新生内膜に発現を認めしたが、早期においては外膜の myofibroblast に発現を認めた。双方の分子の発現形式は、炎症との関連性を示し、大動脈炎の病態生理を考えると興味深いものと思われた。

Expression of hypoxia/reoxygenation associated molecules in vascular lesions

Chikao Yutani (Department of Pathology, National Cardiovascular Center),  
Yoshitane Tsukamoto (Department of Pathology, National Cardiovascular Center)

We are interested in the cellular stress response to hypoxia/reoxygenation or ischemia/reperfusion. In the course of our research using rat astrocytes, two molecules are identified. The one is ORP150. ORP150 or 150-kDa oxygen-regulated protein is the endoplasmic reticulum resident protein induced mainly by hypoxia. First ORP150 was found to be expressed predominantly in macrophages in human atherosclerotic plaques. The other one is RA301/Tra2 $\beta$ . RA301/Tra2 $\beta$  is identified as the immediate responsive gene markedly elevated in the brief period of reoxygenation after hypoxia. In search of the stress response in vascular lesions, we tried to detect ORP150 and RA301/Tra2 $\beta$  antigens in vascular lesions using antibodies against both molecules. In the sample from a patient with Takayasu aortitis in the scarring stage, ORP150 was expressed in plasma cells near adventitia. RA301/Tra2 $\beta$  was expressed in proliferating smooth muscle cells in the neointima of human atherosclerotic aorta and also in the plasma cells around vasa vasorum. In the arterial injury model, RA301/Tra2 $\beta$  is

expressed in smooth muscle cells of the neointima and also in adventitial fibroblasts. Expression pattern of two stress-inducible molecules indicates that ORP150 and RA301/Tra2 $\beta$  are the possible participants in the repair or remodeling process associated with inflammation, for example, as in the case of Takayasu aortitis.

[研究目的] 生体内の血管を構成する細胞は、様々なストレス状況下にあると考えられる。我々は、そのうち低酸素・再酸素化（臓器レベルでは、虚血・再灌流）におけるストレス応答に興味をもって研究を行っている。その過程で、2種類の分子 ORP150 および RA301 が同定された。

ORP150 は、当初ラット・アストロサイトから低酸素にて誘導される蛋白としてクローニングされた小胞体局在の蛋白である。その後、動脈硬化巣においては、粥腫の周辺に位置するマクロファージに多く発現し、一部の平滑筋細胞にも発現していることが判明した。

また、RA301 は、ラット・アストロサイトを低酸素暴露し、再酸素化した直後に誘導される遺伝子として同定された。そのアミノ酸配列より、RNA splicing factor としてのモチーフを有しており、ショウジョウバエの性決定遺伝子である Transformer-2(Tra2)のホモログであることがわかった1)。さらなる検討によりヒト RA301 は、アミノ酸レベルでラットと全く同じであることが判明した。現在では、ほ乳類の Tra2 のホモログは何種類か同定されており、RA301 は、Tra2 $\beta$ と呼ばれている（以下 RA301/Tra2 $\beta$ と表記する）2、3 4)。さらに最近、human Tra2 $\beta$ は、Tra2 $\alpha$ とともにヒトで初めて RNA splicing factor としての活性が証明された5)。

上記2つの分子を用いて、血管病変の病態解明のためにその発現を検討することにした。

[研究方法] ORP150 および RA301/Tra2 $\beta$ に対する抗体を用いて、大動脈炎症例を含むヒト血管病変およびラット頸動脈バルーン障害モデルのサンプルにおける各々の抗原の局在を免疫染色にて検討した。

[結果] ORP150 は、動脈硬化においてはマクロファージに強い発現をみとめたが、癒痕化した大動脈炎組織においては、外膜近傍の形質細胞につよい発現をみた。RA301/Tra2 $\beta$ は、動脈硬化巣における新生内膜の平滑筋細胞および vasa vasorum 近傍の形質細胞に発現をみとめた。血管障害モデルにおいても新生内膜の発現を認めた。同時に早期においては外膜の myofibroblast に発現を認めた。

[考察] B cell hybridoma における免疫グロブリンの folding における ORP150/GRP170 の関与が示唆されており8)、形質細胞における ORP150 の発現は当然のことと考えられる。また、形質細胞における RA301/Tra2 $\beta$ の発現においても RNA splicing factor としての性質から考えると、免疫グロブリンの splicing に関与していると考えられ興味深い。また、双方の分子の形質細胞に

おける相互作用も示唆されると同時に、免疫応答における双方の分子の関与も十分考えられる。また、RA301/Tra2 $\beta$ の発現形式からは、この分子の組織修復との関連が示され、炎症との関連性も考えられる。

[参考文献]

- 1) Matsuo N, Ogawa S, Imai Y, Takagi T, Tohyama M, Stern D, Wanaka A: Cloning of a novel RNA binding polypeptide (RA301) induced by hypoxia/reoxygenation. *J Biol Chem* 1995, 270:28216-28222
- 2) Dauwalder B, Amaya-Manzanares F, Mattox W: A human homologue of the *Drosophila* sex determination factor transformer-2 has conserved splicing regulatory functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:9004-9009
- 3) Beil B, Screatton G, Stamm S: Molecular cloning of hTra-2beta-1 and hTra-2beta-2, two human homologs of tra-2 generated by alternative splicing. *DNA Cell Biol* 1997, 16:679-690
- 4) Nayler O, Cap C, Stamm S: Human transformer-2-beta gene (SFRS10): complete nucleotide sequence, chromosomal localization, and generation of a tissue-specific isoform. *Genomics* 1998;53:191-202
- 5) Tacke R, Tohyama M, Ogawa S, Manley JL: Human Tra2 proteins are sequence-specific activators of pre-mRNA splicing. *Cell* 1998, 93:139-148
- 6) Lin HY, Masso-Welch P, Di YP, Cai JW, Shen JW, Subjectk JR: The 170-kDa glucose-regulated stress protein is an endoplasmic reticulum protein that binds immunoglobulin. *Mol Biol Cell* 1993;4:1109-1119

## 12. CLIP 置換型 Ii 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

西村 泰治 (熊本大学大学院医学研究科免疫識別学講座)  
植村 靖史 (熊本大学大学院医学研究科免疫識別学講座)  
Leo K. Iwai (熊本大学大学院医学研究科免疫識別学講座)  
藤井 慎嗣 (熊本大学大学院医学研究科免疫識別学講座)  
千住 覚 (熊本大学大学院医学研究科免疫識別学講座)

KEY WORDS=HLA class II, Ii 鎖, CD4<sup>+</sup> T 細胞, エピトープ同定システム

【研究要旨】我々は、昨年までの研究で CLIP 置換型 Ii 鎖遺伝子発現ベクターを開発している。また、このベクターにランダムなペプチドをコードするオリゴ DNA を挿入し、多様なエピトープを HLA クラス II 分子上に発現するプラスミドライブラリーを作製している。本年度は、この発現ライブラリーを HLA クラス II 分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、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 細胞が認識するエピトープを同定するための方法を確立した。さらに、このシステムを用いて、HLA-DR53 拘束性ヒト GAD65 p116-129 自己反応性 CD4<sup>+</sup>T 細胞クローンが交差反応により認識する新規エピトープを同定した。このエピトープのアミノ酸配列 (PVQLSNQWHVVGATF) は、この T 細胞クローンが本来認識するエピトープ (GAD65 p116-129 : NILLQYVVKSFDR) とは、全く異なるものであったが、本来のエピトープとほぼ同程度の T 細胞刺激能を有していた。本システムは、このように既知の特異性を有する CD4<sup>+</sup>T 細胞クローンの交差反応性エピトープを同定するのみならず、特異性が全く不明の CD4<sup>+</sup>T 細胞クローンのエピトープを同定することにも有用であると考えられる。

**Development of the epitope library based on the CLIP-substituted epitope presenting vector and screening method for identifying epitopes recognized by human CD4<sup>+</sup> T cells.**

Yasuharu Nishimura (The Division of Immunogenetics, Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences), Yasushi Uemura (The Division of Immunogenetics, Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences), Shinji Fujii (The Division of