

Immunogenetics, Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences), Leo. K. Iwai (The Division of Immunogenetics, Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences), and Satoru Senju (The Division of Immunogenetics, Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences)

We had previously developed an epitope presenting vector, pCI, a derivative of a human invariant chain (Ii) expression vector, in which the CLIP region (Ii p89-101) could be substituted with epitopes. In the current study, we used this vector to establish a new expression cloning system to identify CD4⁺ T cell epitopes. We inserted double-stranded oligo DNAs of randomized sequences into this vector and prepared an epitope-presenting library which loads randomized 13-mer peptides onto HLA class II molecules co-expressed in COS-7 cells. By utilizing this library, we isolated a crossreactive epitope recognized by a GAD-65 autoreactive T cell clone. Although the newly identified epitope, (PVQLSNQWHVVGATF), was far different from the original epitope, GAD65 p116-128 (NILLQYVVKSFDR), it did stimulate almost same magnitude of response as did the GAD epitope. Our system may be applicable not only for identifying crossreactive epitopes recognized by CD4⁺ T cells of known specificity, but also for detection of epitopes stimulating CD4⁺ T cells the epitopes of which are unknown.

【研究目的】 昨年までの研究で、インバリアント(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⁺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。さらに、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ている。本年度の研究は、このライブラリーを用いて抗原特異性が未知のCD4⁺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システムを構築することを目的とした。

【研究方法】 昨年までの種々の条件・方法の比較検討の結果より、最も効率的かつ確実であると考えられる以下の方法を用いて研究を行った。

1)ランダムなペプチドをコードする二本鎖 DNA は、中央部にランダムに置かれた部分を含む 115 塩基の一本鎖 DNA を鋳型とし、両端の定常部に対応するピ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(DraI および SacI)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。

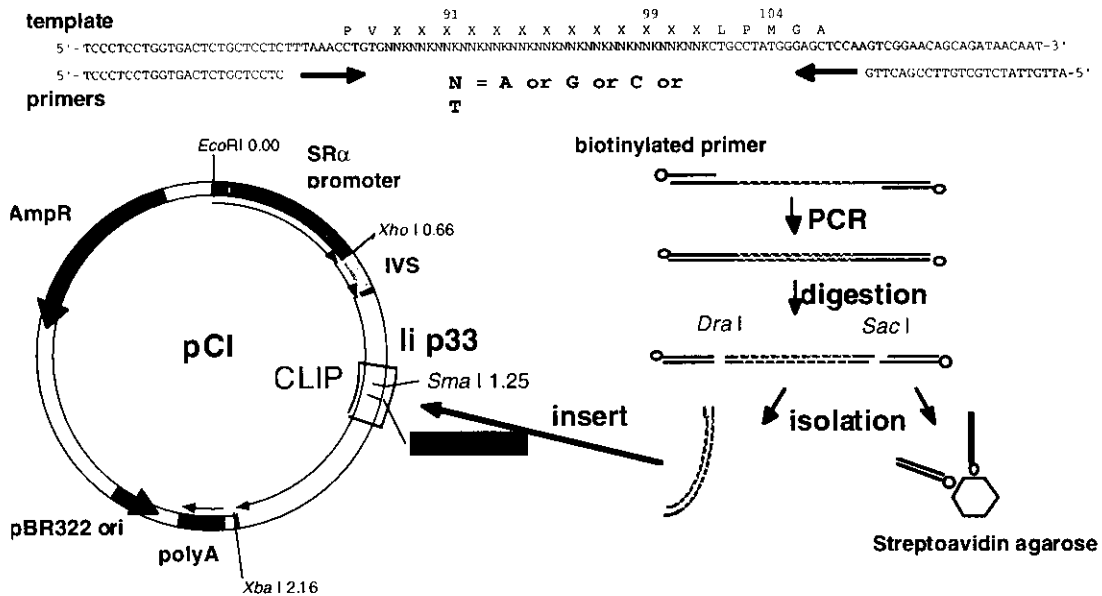


図 1 . CLIP 置換型 II 鎖遺伝子を利用したエピトープライブラリーの作製

- 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) 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 5×10^4 個を加え、T 細胞からの IFN- γ の産生を ELISA 法で検出する。
- 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、そのウェルの遺伝子導入に用いた 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。これを繰り返す、三～四次のスクリーニングによりクローンを単離する (図 2)。

【結果】 I 型糖尿病患者の末梢血リンパ球中から樹立された HLA-DR53 拘束性ヒト GAD65 p116-129 自己反応性 CD4⁺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 2×10^5 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、新規エピトープ(PVQLSNQWHVVGATF)を同定した。このエピトープのアミノ酸配列は、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。しかしながら、この新規エピトープを合成ペプチドにて作製し、これが T 細胞クローンを刺激しうるかどうか検討したところ、本来のエピトープと同程度の刺激活性を有していることが判明した (図 3)。

【考察】我々のシステムが、既知の特異性を有する CD4⁺T 細胞クローンの交差反応性エピトープを同定するのに有用であることが示された。本システムは、さらに、特異性が全く不明である CD4⁺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。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⁺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。

今回の研究では、 2.0×10^5 種類のランダムマイズしたエピトープから、1 つの特異的 TCR リガンドを同定できた。しかしながら、13mer の完全にランダムな配列を網羅的にカバーしたライブラリーを作製しスクリーニングすることは現実的には不可能である。そこで、現在、T 細胞を活性化するリガンドを予測する為の手法を確立するため、おのおの連続した 3 残基を 1 ブロックとしたランダムエピトープライブラリーを構築している。このライブラリーを同様にスクリーニングすることにより、交差反応を示すペプチドのシーケンスの多様性の検討を行っている。今後、特定の CD4⁺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。

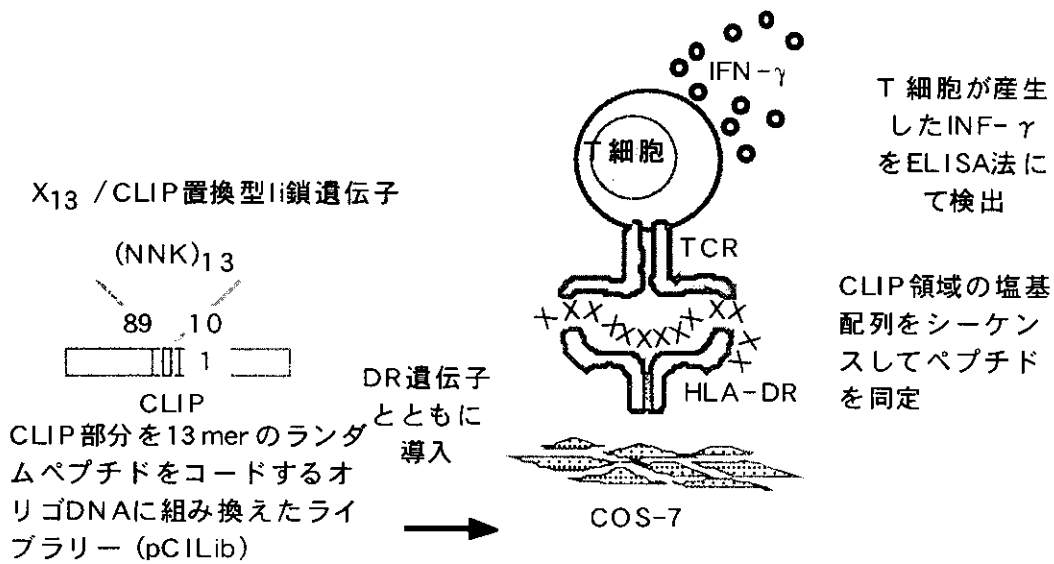


図 2. CLIP 置換型 Ii 鎖遺伝子を用いたエピトープ発現ライブラリーによる TCR リガンドの同定

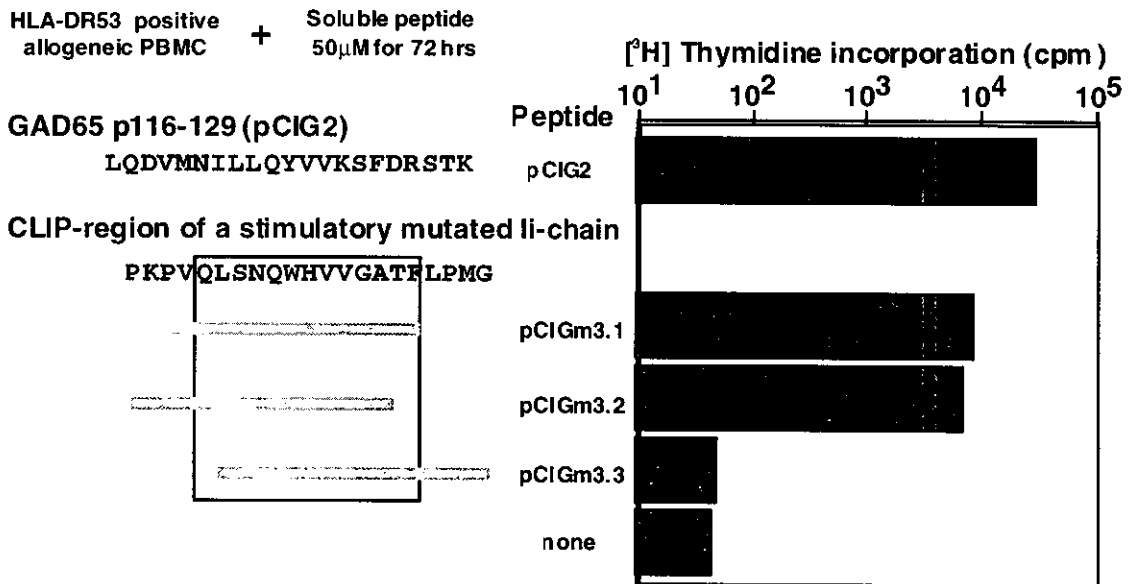


図 3. エピトープ発現ライブラリーにより同定した GAD65 特異的 T 細胞クローンの交差 T 反応性エピトープの解析

【参考文献】

1. Fujii S, Senju S, Chen YZ, Ando M, Matsushita S and Nishimura Y. The CLIP-substituted invariant chain efficiently targets an antigenic peptide to HLA class II pathway in L cells. *Human Immunol.* 1998; 59: 607-614.
2. Koch N, van Driel IR, and Gleeson PA. Hijacking a shaperone: manipulation of the MHC class II presentation pathway. *Immunol. Today.* 2000; 21: 546-550
3. Hemmer, B., B. T. Fleckenstein, M. Vergelli, G. Jung, H. McFarland, R. Martin, and K. H. Wiesmuller. Identification of high potency microbial and self ligands for a human autoreactive class II-restricted T cell clone. *J. Exp. Med.* 1997; 185: 1651-1659.
4. Rosenberg, S. A., J. C. Yang, D. J. Schwartzentruber, P. Hwu, F. M. Marincola, S. L. Topalian, N. P. Restifo, M. E. Dudley, S. L. Schwarz, P. J. Spiess, J. R. Wunderlich, M. R. Parkhurst, Y. Kawakami, C. A. Seipp, J. H. Einhorn, and D. E. White. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nature Med.* 1998; 4: 321-327.

13. 血管炎合併 SLE 患者末梢血 T 細胞における TCR ζ 鎖発現低下と TCR ζ 鎖 mRNA 3'UTR 異常との関連

津坂 憲政	(埼玉医科大学総合医療センター第二内科)
小野田 夏子	(埼玉医科大学総合医療センター第二内科)
吉本 桂子	(埼玉医科大学総合医療センター第二内科)
瀬戸山由美子	(埼玉医科大学総合医療センター第二内科)
鈴木 勝也	(埼玉医科大学総合医療センター第二内科)
安倍 達	(埼玉医科大学総合医療センター第二内科)
竹内 勤	(埼玉医科大学総合医療センター第二内科)

KEYWORDS = 血管炎, 全身性エリテマトーデス, TCR ζ 鎖, スプライシング異常, 3' UTR

【研究要旨】

昨年までの報告の中でわれわれは血管炎合併全身性エリテマトーデス (SLE) 患者末梢血 T 細胞では TCR ζ 鎖 (ζ 鎖) タンパクの発現が低下すること、そして alternative splicing で生じた短い 3'UTR をもつ ζ 鎖 mRNA (ζ mRNA/as-3'UTR) が優位に発現されることを指摘してきた。そこで本年度は ζ mRNA/as-3'UTR と ζ 鎖タンパク発現とを定量的に比較検討した。SLE 患者 7 例を対象とし、健常人 4 例を陰性コントロールとし、 ζ 鎖 3'UTR cDNA 発現は木下らの方法 (*Anal. Biochem.* 205: 1992) に準じた半定量 PCR 法によって定量化した。G3PDH cDNA を陽性対照とし、全 ζ 鎖 mRNA の定量には ζ 鎖 mRNA の open reading frame (ORF) をはさむプライマーを用いた。 ζ 鎖タンパクの発現はモノクローナル抗 ζ 鎖抗体 (TIA-2) を用いた western blot 法で定量化した。その結果、SLE 患者 T 細胞では健常人と比較して、wild form 3'UTR をもつ ζ 鎖 mRNA (ζ mRNA/w-3'UTR) 発現が有意 ($p < 0.01$) に低下し、 ζ mRNA/as-3'UTR 発現が有意 ($p < 0.01$) に亢進していた。その一方、ORF で比較した ζ 鎖 mRNA (ORF ζ mRNA) 発現に差はなかった。また ζ 鎖タンパク発現と ζ mRNA/w-3'UTR 発現とに有意な正相関 ($r=0.931$) が、 ζ mRNA/as-3'UTR 発現とに負相関 (-0.641) が認められた。しかし、ORF ζ mRNA 発現とは相関が認められなかった ($r=-0.296$)。以上から、SLE 患者 T 細胞では ζ mRNA/as-3'UTR が優位に発現されることで ζ 鎖発現が低下し、SLE 発症に結びつ

く可能性が示唆された。

Relationship between downregulation of the TCR ζ protein and 3' untranslated region of the TCR ζ mRNA in systemic lupus erythematosus patients with vasculitis

Kensei Tsuzaka (Dept. of Internal Medicine, Saitama Medical Center, Saitama Medical School) , Natsuko Onoda (Dept. of Internal Medicine, Saitama Medical Center, Saitama Medical School) , Keiko Yoshimoto (Dept. of Internal Medicine, Saitama Medical Center, Saitama Medical School) , Yumiko Setoyama (Dept. of Internal Medicine, Saitama Medical Center, Saitama Medical School) , Katsuya Suzuki (Dept. of Internal Medicine, Saitama Medical Center, Saitama Medical School) , Tohru Abe (Dept. of Internal Medicine, Saitama Medical Center, Saitama Medical School) , Tsutomu Takeuchi (Dept. of Internal Medicine, Saitama Medical Center, Saitama Medical School)

We reported predominant expression of the T-cell receptor ζ chain (TCR ζ) mRNA with alternatively spliced short 3'-untranslated region (3'UTR) (TCR ζ mRNA/as-3'UTR) accompanied by 562-bp deletion and decreased expression of TCR ζ mRNA with the wild form 3'UTR (TCR ζ mRNA/w-3'UTR) in the T cells from systemic lupus erythematosus (SLE) patients with vasculitis. To investigate the mechanisms of the decreased expression of TCR ζ in SLE T cells, we compared the expression level of the TCR ζ protein with that of each TCR ζ mRNA [TCR ζ mRNA encoding the open reading frame (ORF TCR ζ mRNA), TCR ζ mRNA/w-3' UTR, or TCR ζ mRNA/as-3' UTR] in the seven SLE patients and four normal controls. Each TCR ζ mRNA was quantified by the semi-quantitative PCR. As a result, TCR ζ protein expression evaluated by the Western blot using anti- ζ monoclonal antibody (TIA-2) correlated well with that of TCR ζ mRNA/w-3' UTR ($r=0.931$) and did reversibly with TCR ζ mRNA/as-3' UTR ($r=-0.614$) whereas they were unassociated with that of ORF TCR ζ mRNA ($r=-0.296$). From these observations, reduced expression of TCR ζ mRNA/w-3' UTR and predominant expression of TCR ζ mRNA/as-3' UTR might be associated with the downregulation of TCR ζ in SLE T cells because 3'UTR in mRNA plays a pivotal role in the post-transcriptional regulation.

【研究目的】

我々はこれまで SLE 患者、ことに血管炎合併例や抗リン脂質抗体陽性例で末梢血 T 細胞 TCR ζ 鎖 (と鎖) 発現がとくに低下していることを報告¹⁾²⁾し、と鎖発現低下に伴うシグナル伝達異常によって活性化された VLA-4 などの接着分子によりこのような血管炎様病態が惹起されている可能性を提示してきた³⁾。このような血管炎合併 SLE 患者 T 細胞でのと鎖タンパク発現低下がと鎖 mRNA 発現低下に伴うものであることが予想され、昨年度我々は mRNA の安定性・輸送・局在に関与する 3' untranslated region (3'UTR) をと鎖 mRNA について検討を行い、SLE 患者では、562bp 短い 3'UTR をもったと鎖 mRNA が正常な 3'UTR をもったと鎖 mRNA と比較し優位に発現していることを報告した。さらに、と鎖 mRNA 3'UTR には本来 splicing acceptor site と splicing donor site に相当する部位があり、短い 3'UTR をもったと鎖 mRNA (と鎖 mRNA/as-3'UTR) は、正常な 3'UTR をもったと鎖 mRNA (と鎖 mRNA/w-3'UTR) がこの部位でスプライスアウトされて生じた alternative spliced form mRNA の一部であることもわかった⁴⁾。そこで本年度は、これらと鎖 mRNA/as-3'UTR および と鎖 mRNA/w-3'UTR 発現程度とと鎖タンパク発現程度とを定量的に比較検討した。

【対象・方法】

1) 対象

埼玉医科大学総合医療センター第二内科を受診した SLE 患者 7 例を対象とし、健常人 4 例を陰性コントロールとした。

2) RT-PCR 法

末梢血より Ficoll 法を用いてリンパ球分画を抽出し、抽出した末梢血リンパ球 (PBL) から mRNA purification kit (Pharmacia 社) を用いて全 mRNA を抽出した。次に、全 mRNA 1 μ g を reverse transcriptase (Clontech 社) を用い一本鎖 cDNA に変換後、DNA polynucleotide kinase により二本鎖 cDNA に変換したものを半定量 PCR 法の鋳型 DNA として用いた。

3) と鎖 cDNA 半定量 PCR 法

半定量 PCR 法は木下らの方法⁵⁾に準じた。と鎖 mRNA 3'UTR をはさむプライマーを用いてと鎖 3'UTR cDNA を、と鎖 mRNA open reading frame (ORF) をはさむプライマーを用いてと鎖 mRNA ORF cDNA を PCR 法で増幅した。PCR 法では 21 cycle から 3 cycle

ごとの PCR 反応物をアガロースゲルで電気泳動させ、DNA バンドを densitometer で定量化した。次に、横軸に PCR cycle、縦軸に densitometer で定量化した O.D.値をプロットして反応曲線を参照に、陽性コントロールとした G3PDH cDNA の反応曲線との PCR cycle 数の差(Δ)を算出した。

4) Western blot 法

PBL を lysis buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 10 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF, 10 μ g/ml aprotinin, and 10 μ g/ml leupeptin)で溶解した後に超音波破碎したものを 10,000g、5 分間遠心し、上清を 15% SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、ニトロセルロース膜に電氣的に転写させた。ニトロセルロース膜はブロッキング液で 37°C 1 時間混和させた後にマウス抗ヒト α 鎖モノクローナル抗体 (TIA-2) と反応させた。洗浄後 HRP 標識抗マウス IgG と反応させタンパクバンドを化学蛍光法 (Amersham 社) で検出し densitometer で定量化した。

【結果】

SLE 患者 7 例と健常人コントロール 4 例の PBL から全 mRNA を抽出した。続いて reverse transcriptase を用いて全 mRNA を全 cDNA に変換した後に α 鎖 ORF cDNA、 α 鎖 3' UTR cDNA(917 bp と 355 bp)、G3PDH cDNA それぞれを連続して 3 サイクルごとに PCR 法で増幅し、1.5%アガロースゲル上で電気泳動後、それぞれの DNA バンドを densitometer で定量し G3PDH cDNA 反応曲線との PCR cycle 数の差[$\Delta_{1,n}$: Δ α 鎖 ORF cDNA; $\Delta_{2,n}$: Δ α 鎖 3'UTR cDNA (917 bp); $\Delta_{3,n}$: Δ α 鎖 3'UTR cDNA (355 bp)]を比較した (表 1)。その結果、健常人コントロールの $\Delta_{2,n}$ (4.4 ± 0.4) は SLE 患者の $\Delta_{2,n}$ (26.4 ± 13.0)と比較して有意($p < 0.01$)に低く、健常人では w-3'UTR (α 鎖 mRNA/wild-form 3'UTR)が優位に発現していることがわかった。いっぽう、SLE 患者の $\Delta_{3,n}$ (6.0 ± 1.9)は健常人コントロールでの $\Delta_{3,n}$ (20.2 ± 15.9)と比較して有意 ($p < 0.05$)に低く、SLE 患者では as-3'UTR (α 鎖 mRNA/alternative spliced form 3'UTR)が優位に発現されていることがわかった。しかし、 $\Delta_{1,n}$ については健常人コントロール ($\Delta_{1,n} = 3.7 \pm 0.6$)と SLE 患者 ($\Delta_{1,n} = 3.5 \pm 0.6$)間で差がなく、 α 鎖 mRNA の ORF 領域 (α 鎖 ORF mRNA)で比較した場合、 α 鎖 mRNA の発現レベルは、健常人と SLE 患者間で差は認められなかった。

つぎに、 α 鎖 mRNA 発現レベルと α 鎖タンパク発現レベルとの相関を検討するためにまず我々は、SLE 患者と健常人コントロールの PBL における α 鎖発現程度を定量化した。SLE 患者 7 例と健常人コントロール 4 例の PBL から lysis buffer を用いてそれぞれ

れの cell lysis を作製し、15% SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後にニトロセルロース膜上に電氣的に転写した。続いてニトロセルロース膜を抗鎖モノクローナル抗体と反応させ、洗浄後 HRP 標識抗マウス IgG と反応させタンパクバンドを化学蛍光法 (Amersham 社) で検出し densitometer で定量化し O.D.値で表した。その結果、SLE 患者 7 例の鎖発現程度 (O.D. = 23 ± 21) は健常人コントロール 4 例 (O.D. = 84 ± 12) と比較し有意 ($p < 0.001$) に低下していた。次に、各鎖 mRNA (鎖 mRNA/wild-form 3'UTR, 鎖 mRNA/alternative spliced form 3'UTR, 鎖 ORF mRNA) 発現レベルを $1/\Delta n$ として鎖タンパク発現レベル (O.D.値) と比較した結果、鎖タンパク発現と鎖 mRNA/wild-form 3'UTR 発現レベル間には有意な正相関 ($r=0.931$) が、また鎖 mRNA/alternative spliced form 3'UTR 発現レベル間には有意な負相関 ($r=-0.614$) が認められた。

【考察】

昨年度までに我々は、SLE 患者の大部分で疾患活動性の有無に関わらず末梢血 T 細胞での鎖発現が低下あるいは欠損していることを報告してきた¹⁾²⁾。臨床的にも、とくに血管炎合併例や抗リン脂質抗体陽性例で末梢血 T 細胞鎖発現が低下し、SLE 患者 T 細胞における鎖発現低下が血管炎や抗リン脂質抗体症候群を含む血管病変と関連することも報告してきた。さらに、このような SLE 患者末梢血 T 細胞における鎖発現低下や欠損の機序の一つとして、我々は最近鎖 mRNA 3'untranslated region (3' UTR) に注目してきた。一般に、mRNA の 3' UTR が mRNA の安定性に関与するだけでなく、mRNA の核から細胞質への輸送にも重要な役割を担っていることが近年報告されている。昨年度我々は、血管炎合併 SLE 患者で 3' UTR 上の 562bp がスプライスアウトされて生じた alternative spliced form 鎖 mRNA が正常鎖 mRNA と比較し優位に発現され、鎖 mRNA が不安定化する、あるいは鎖 mRNA の核から細胞質への輸送が障害されるために、鎖の発現が低下したり欠損する可能性を報告した⁴⁾。

本年度は、SLE 患者におけるこのような alternative spliced form 3' UTR をもつ鎖 mRNA の発現を半定量 PCR 法で測定することで健常人コントロールでの発現程度と比較し、さらに実際鎖タンパク発現程度とどのような相関が認められるかを検討した。SLE 患者 T 細胞では健常人と比較して、wild form 3'UTR をもつ鎖 mRNA (鎖 mRNA/w-3'UTR) 発現が低下する一方で alternative form 3' UTR をもつ鎖 mRNA (鎖 mRNA/as-3'UTR) 発現が亢進していたが、検索した結果このような一種の mRNA スプライシング異常を生じるような gene の異常 (とくに exon 7 あるいは exon 8 周辺部位)

は ζ 鎖 gene には認められなかったことから、SLE 患者 T 細胞ではスプライシングの過程自体に何らかの異常が存在する可能性が示唆された。さらに ζ 鎖タンパク発現が ζ mRNA/w-3'UTR 発現と正相関を、 ζ mRNA/as-3'UTR 発現と負相関が認められたことから、alternative splicing によって欠失した 562bp が ζ 鎖 mRNA のなかでも ζ 鎖タンパク発現亢進を規定する部位であると推察される。しかも、 ζ 鎖タンパク発現が ORF で比較した場合には ζ mRNA 発現とは相関が認められなかったことから、SLE 患者 T 細胞における ζ 鎖発現低下が transcriptional regulation によるものではなく、むしろ transcription 以降の段階で規定されている可能性、すなわち post-transcriptional regulation による可能性を示していると考えられた。実際、mRNA の 3'UTR が mRNA の核から細胞質への輸送、mRNA の細胞内局在、あるいは mRNA の安定性に関わることで mRNA 発現を調節していることが報告されており、mRNA ORF で比較すると SLE 患者と健常人コントロールとで ζ 鎖 mRNA 発現に差が認められなかったことは、SLE 患者 T 細胞では alternative spliced form 3'UTR をもつ ζ 鎖 mRNA が優位に発現して ζ 鎖 mRNA の輸送あるいは細胞内局在に異常が生じるために ζ 鎖タンパク発現が低下する可能性が今回示唆された。SLE における血管炎あるいは抗リン脂質抗体陽性例では、血管内皮細胞における接着分子の活性化がこれまで指摘されてきた。我々は以前血管炎合併 SLE 患者 T 細胞では、VLA4 発現が亢進していることを報告した³⁾。したがって、 ζ 鎖の発現が低下している SLE 患者 T 細胞では、種々の接着分子等の co-stimulatory pathway が異常に活性化されていることが予想でき、 ζ 鎖発現低下に伴うシグナル伝達異常によって活性化された接着分子によりこのような血管炎様病態が惹起されている可能性が示唆される。

【参考文献】

1. Takeuchi T, Tsuzaka K, Pang M, et al. TCR ζ chain lacking exon 7 in two patients with systemic lupus erythematosus. *Int. Immunol.* 1998; 10: 911-921.
2. Tsuzaka K, Takeuchi T, Onoda N, et al. Mutations in T cell receptor ζ chain mRNA of peripheral T cells from systemic lupus erythematosus. *J. Autoimmunity* 1998; 11: 381-385.
3. Takeuchi T, et al. Systemic lupus erythematosus with necrotizing vasculitis and upregulated expression of VLA-4. *Clin. Rheum.* 1995; 14: 370-.
4. Tsuzaka K, Natsuko Onoda, Keiko Yoshimoto, et al. Splicing aberration of the TCR ζ chain mRNA in peripheral blood T cells from SLE patients. *Arthritis Rheum.* 1999; S108.
5. Kinoshita T, Imamura J, Nagai H, et al. Quantification of gene expression over a wide range

by the polymerase chain reaction. Analytical Biochem. 1992; 206: 231-235.

6. 竹内 勤、津坂憲政、安倍 達。全身性エリテマトーデス。リウマチ 39;679-687, 1999
7. Pang M, Abe T, Fujiwara T, Mori S, Tsuzaka K, Amano K, Koide J, Takeuchi T: Up-regulation of $\alpha E\beta 7$, novel integrin adhesion molecule, on T cells from systemic lupus erythematosus patients with specific epithelial involvement. Arthritis Rheum. 41: 1456-1463, 1998

表 1. 半定量 PCR 法を用いた TCR と鎖 mRNA 発現の比較検討

	Δ_1	Δ_2	Δ_3
	TCR と ORF cDNA	TCR と 3'UTR cDNA (917bp)	TCR と 3'UTR cDNA(355bp)
Normal			
1	4.4	5	>33
2	2	3.5	>33
3	3.8	4	6.5
4	4.5	5	6.3
mean \pm SD	3.7 \pm 0.6	4.4 \pm 0.4	20.2 \pm 15.9
SLE			
NaY	3.3	>33	8.5
NoY	4.1	>33	5
YoT	1	>33	5
KaM	4	>33	5
MaS	1.5	>33	9
NIS	5.3	8.8	4
TaS	5	6	5.5
mean \pm SD	3.5 \pm 0.6	26.4 \pm 13.0	6.0 \pm 1.9

n.s. (between Normal and SLE Δ_1)
 p<0.01 (between Normal and SLE Δ_2)
 p<0.05 (between Normal and SLE Δ_3)

14. Nuc 遺伝子ノックアウトで PN 様血管炎を高率に発症する自己免疫マウスの病態解析

金井 芳之 (東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター)

KEYWORD=ヌクレオバインدين、MRL/lpr マウス、結節性多発動脈炎、サブヌクレオソーム、ヒストン H3 ダイマー

[研究要旨] 本研究における抗クロマチン抗体に対する抗原は人工的に作成したサブヌクレオソーム (SNS) とヒストンコアの分離精製中に得られたヒストン H3 ダイマー(H3D)を指す。本実験ではヒストンコア (H3,H2B,H2A と H4) に DNA を結合させたものを SNS として使用した。壊死性血管炎・糸球体腎炎モデルマウス(Nuc-KO)の 4 週齢から 24 週齢までの経時的採取した血清中の上記抗原に対する抗体を ELISA 及びウエスタンブロットで調べた。抗 SNS も抗 H3D 抗体も 4 週齢ですでに出現し、一端低下して再度上昇した。抗 H3D 抗体は血管炎発症直前の 12 週齢で増強され、さらにその直前に抗 SNS 抗体の増加が見られた。一方血管炎の主要組織である腎から抽出された抗体は経時的に増加し、そのアイソタイプは G3 であった。以上から、早急な結論は得られないが、wild と比較して、Nuc-KO マウスで、H3D に対する免疫応答が血管炎発症の直前に増強されたことは新知見であり、血管炎病態にもクロマチンの異常代謝の関与する可能性が示唆された。

Strong immunoreactivity against histone H3 dimer or subnucleosomes in necrotizing vasculitis model mice (Nuc-KO) obtained by deletion of nucleobindin from lupus-prone MRL/lpr mice. Yoshiyuki Kanai (Center for Experimental Medicine, Institute of Medical Science, University of Tokyo)

Previously, we have reported that autoimmune MRL/lpr mice, rendered genetically deficient for nucleobindin(Nuc), which is known to augment anti-DNA antibody production, developed periarteritis nodosa(PN)-like ANCA-positive necrotizing vasculitis accompanying crescentic glomerulonephritis(CrGN) at high frequency. The

characteristic was that the Nuc-deficient MRL/lpr mice(-/-) produced immune complexes(IC) in the serum 3 times as much as those in wild MRL/lpr mice(+/+). Given the focusing on the role of nucleosomes in systemic autoimmune disease such as SLE, systemic sclerosis and mixed connective tissue disease, we have tested for the occurrence of anti-subnucleosomes in this mice. For this purpose, we used H3D, as a kind of subnucleosome, which had been separated on SDS-PAGE during isolating histone core from total histones. Anti-H3D response was strong as compared with wild mice and was detected as early as 3 months of age. Incidentally, IgG isolated from kidneys of Nuc-KO mice began to increase from 3 months of age and its subclasses were restricted to LgG3/G2b. Meanwhile, against subnucleosome, dsDNA-H2a-H2b, their immunological responses were detected as early as two months of ages. However, the response finally reached the same levels as anti-dsDNA or anti-H2a-H2b. The interrelation between H3D and so called subnucleosome should be studied in the future.

[はじめに]

SLE 病態に特徴的な抗 DNA 抗体の実験的産生は、DNA をそれ自身色々修飾しても不可能である。以前金井らはこの産生には蛋白性のヘルパー因子が必要と考え、SLE モデルである MRL/lpr マウスの腫脹リンパ節細胞からその因子を同定し、それをヌクレオバインデイン(Nuc)と命名した。cDNA クローニングの結果 Nuc は抗 DNA 抗体の増強を説明する分子構造、即ち、ロイシンジッパー、NLS を含む塩基性ドメイン、とその因子が分泌性であることを証明するシグナルペプチド (SP)を有することが明らかにされた。さらに Nuc は Ca²⁺結合モチーフである EF-hand も二つ持つことがわかり、SP を考慮すると Nuc は転写因子とは異なる新規活性物質であることが示唆された。組換え (r) Nuc は生体内・外で天然 Nuc 同様抗 DNA 抗体産生増強活性を持つことが明らかにされたのを契機に MRL/lpr マウスの Nuc 遺伝子を KO して MRL/lpr マウスの自己免疫病態の軽減を試みた。結果は、予想に反して腎炎・血管炎の著しい増悪であった。このような背景でつくられた高頻度、重症度の高い Nuc-KO マウスを特徴づける病態の解析が行なわれている。

[目的] MRL/lpr マウス (野生型マウス, Wld) の Nuc 遺伝子をノックアウト (KO) して生じたマウス (Nuc-KO マウス) はと PN 様血管炎の発症頻度・重症度と

もに野生型マウスを凌駕する。本血管炎病態の解析でヒト難治性血管炎患者の GOL の向上に貢献しうる新知見をみいだすこと。今回は以上の血管炎モデルマウスに於ける抗クロマチン抗体の動態を調べた。

〔方法〕 Nuc-KO マウスの腫脹リンパ節由来の全ヒストンを Kanai らの方法 (Immunology, 1979) で抽出し、HitrapSP 陽イオンクロマトグラフィーにてヒストンコアを (H3, H2B, H3A, H4) 分離した。その分離過程で H3 ダイマー (H3D) を 15% SDS-PAGE 上で検出した。この H3D の形成は再現性が認められたので、PVDF 膜に転写して、ウエスタンブロット用の標的抗原として用いた。一方仔牛胸腺から精製しあらかじめ DNA をコートした、マイクロタイタープレートにコアヒストンまぶし、それをサブヌクレオソームとした。この抗原系を用いて ELISA を施行した。さらに血管炎を主病変として持つ腎抽出液の相対的含有量と IgG のサブクラスをウエスタンブロット法で調べた。

〔結果〕 抗 H3D 抗体活性は KO マウス 3 ヶ月齢で最も強い反応を示した。一端活性は減弱したが、再度 6 ヶ月で増強が認められた (図 1)。一方 Wild では反応は全般的に弱かった (図 1)。また、ヒストンサブヌクレオソーム (SNS) に対する免疫応答は H2A-H2B や DNA に対する応答と乖離し、2 ヶ月齢で増強を認めたが、血管炎が悪化する 4 ヶ月齢では SNS 及び DNA に対する反応は同等になった (図 2)。血管炎が集中する腎抽出液中の IgG サブクラスは IgG2a と IgG3 が 3 ヶ月齢以降、加齢に伴って顕著な増加を認めるが、IgG1 も軽度ながら、着実に増加した (図 3)。

〔考察〕 最近 SLE を中心とする膠原病の病態形成とヌクレオソーム (NS) に対する免疫応答との間に密接な関連性のあることが強調されている。一方壊死性血管炎では好中球 MPO に対する免疫応答の増強が知られている。健常人でも血中好中球のアポトーシスはよく知られているところで、これを勘案すれば血管炎でも核クロマチン、特にヌクレオソーム又はサブヌクレオソームに対する免疫応答を考慮すべきであろう。今回は血管炎モデルマウスでその可能性を調べた。その結果、抗 H3D や抗 SNS 抗体応答が認められた。特に KO マウスが wild に比べて、H3D に対する免疫応答が凌駕していたことは注目に値する。しかし NS と H3D との免疫学的関連がまだ不明である。これを明らかにすることと、

生化学的 H3D の精製とそれに対する免疫応答を定量化することが今後の課題である。また、病態悪化に伴い、腎に沈着する IgG が増加し、そのサブクラスに選択制 (G3/2b) がみとめられ、すでに IgG3 は腎に嗜好性のあることが知られているが、その自己抗体の正体を明らかにすることが課題である。

[参考文献]

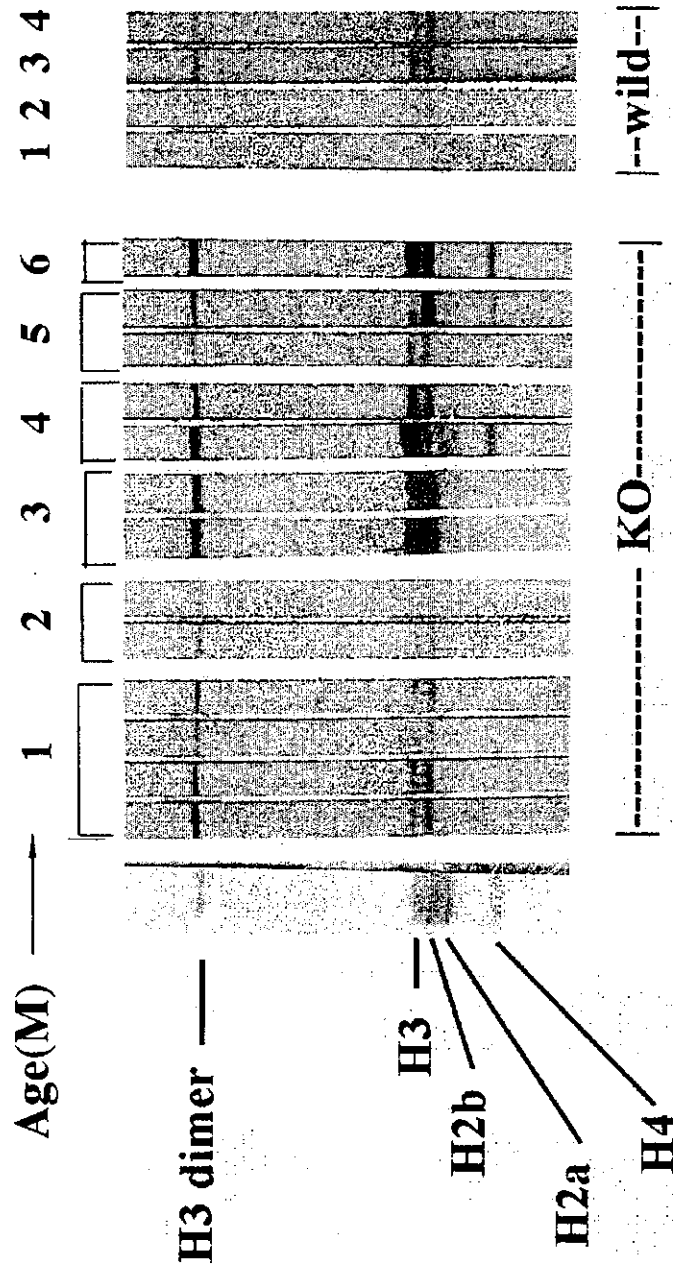
1. Takahashi, S., Nose, M., Sasaki, J., Yamamoto, T. and Kyougoku, M.: IgG3 production in MRL/lpr mice is responsible for development of lupus nephritis. *J. Immunol.* 147:515-519, 1991
2. Kanai, Y. and Tanuma, S. : Purification of a novel B cell growth and differentiation factor associated with lupus syndrome. *Immunol Lett.* 32:43-48, 1992
3. Miura, K., Titani, K., Kurosawa, K. and Kanai, Y. : Molecular cloning of nucleobindin , a novel DNA-binding protein that contains both a signal peptide and a leucine zipper structure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187:375-380, 1992
4. Miura, K., Kurosawa, K. and Kanai, Y. : Calcium-binding activity of nucleobindin mediated by an EF-hand moiety. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199:1388-1393, 1994
5. Kanai, Y., Takeda, O., Kubota, T., Amagai, M. et al. : Induction of autoantibodies in normal mice by injection of nucleobindin and natural occurrence of antibodies against nucleobindin in the sera of autoimmune MRL/lpr mice. *Immunol Lett.* 45:35-42, 1995
6. Kanai, Y. and Miura, K. Antibody against arginino-succinate synthase , a key enzyme in ornithine cycle, is an indicator of the early lesion of immune-based necrotizing vasculitis : Studies on gene-manipulated pre-existing autoimmune MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum.*, 41: S176, 1998
7. Kanai, Y., Tanuma, S., Kurosawa, Y. and Miura, K. A new variant DNase up-regulated in autoimmune MRL/lpr mice with severe necrotizing vasculitis

and/or glomerulonephritis--its implication in the disease activity. *Arthritis Rheum.* 42:S111, 1999

8. 金井芳之、佐々木慎二、黒澤良和、三浦恵二：ヌクレオパインデインと PN 様血管炎。 *腎と透析* 45：221-228、1998

9. 金井芳之：抗 DNA 抗体と抗ヌクレオソーム抗体。 *組織細胞工学* 印刷中

☒ 1 *Immune responses to H3 dimer are stronger in Ko mice compared with wild mice*



⊗ 2 Immune responses to nucleosomal components

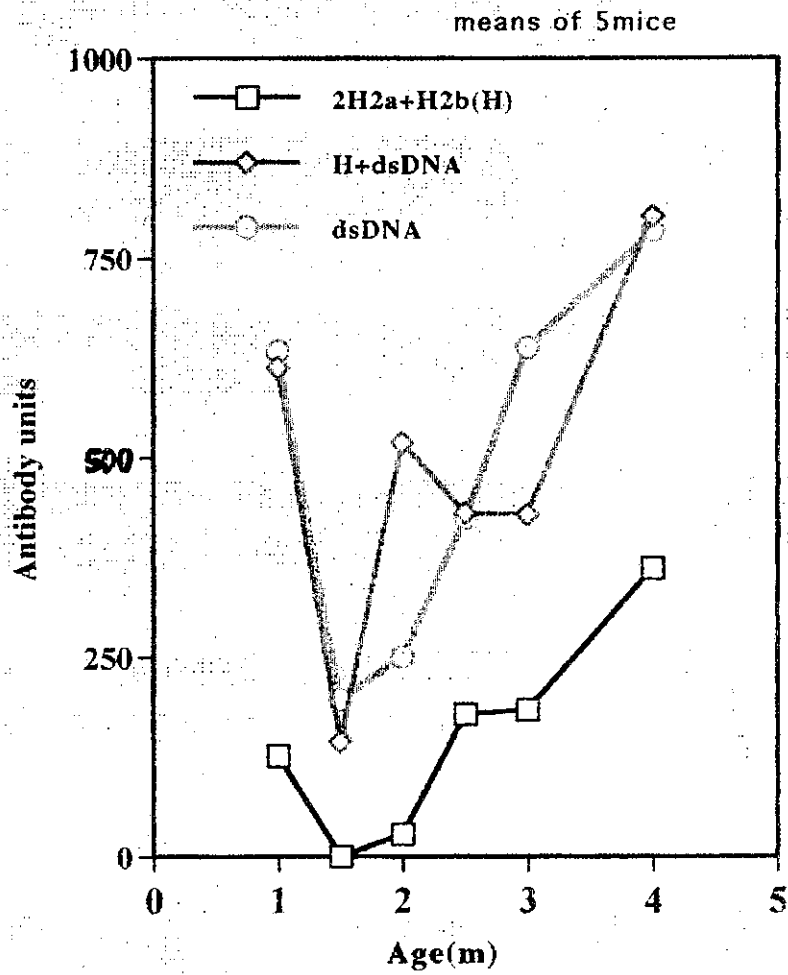


Figure 3 *Changes in amounts of IgG subclass in extracts from kidneys with ages of Nuc-ko MRL/lpr mice*

