

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

PD-1 欠損マウスにおける自己免疫性拡張型心筋症に関する研究

篠原隆司（京都大学大学院医学研究科、分子生物学）

研究要旨

ヒトの自己免疫疾患を研究する上において、遺伝子欠損マウスは非常に有用なモデルになる。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 motif を持つ。我々は以前、C57BL/6 の遺伝的背景において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。今回我々は、さらに BALB/C の遺伝的背景において PD-1 の欠損マウスは拡張型心筋症の症状を呈することを見だし、その発症には自己抗体が深く関わると結果を得るに至った。拡張型心筋症は現段階では極めて治療の困難な疾患であるが、この結果は、PD-1 分子による免疫反応の抑制性シグナルがこの病態の成立に関わりうることを示し、これまで心臓移植しか治療法がなかったこの難治性疾患にも新たな治療法の確立への発展性を示唆した。

A.研究目的

PD-1 がいかなる機構を用いて自己免疫疾患の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。今年度はとくに自己免疫疾患における遺伝的背景の影響を調べるために PD-1 欠損マウスを BALB/C の遺伝的背景にバッククロスし、これまでの C57BL/6 における自己免疫疾患症状との比較を行った。

B.研究方法

我々が以前作成した PD-1 欠損マウス (C57BL/6-PD-1 欠損マウス) を BALB/C の背

景に 8 世代交配を繰り返すことにより、BALB/C -PD-1 欠損マウスを作成し、その自己免疫症状の影響を検討する。

C.研究結果

PD-1 受容体は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する 55kD の I 型の膜蛋白質で、その細胞質領域には免疫反応を負に制御するとされる ITIM motif が存在する。その発現は胸腺においては CD4-CD8- 細胞から CD4+CD8+ 細胞へと分化する際に強く認められ、末梢においては活性化された T, B 細胞、およびミエロイド系の細胞に発現する。我々は以前、PD-1 分子の生体内に機能を調べるために PD-1 欠損マウスを作成した。このマ

ウスは C57BL/6 の遺伝背景において、生後 14 ヶ月齢前後より PAS 陽性物質の沈着を伴うループス様糸球体腎炎と関節炎を発症することを報告した。また更に、このマウスを C57BL/6- lpr/lpr マウスと交配し、自己免疫疾患発症における PD-1 欠損と lpr 遺伝子との関係を調べてみたところ、これらのマウスは 6 ヶ月齢にて糸球体腎炎と関節炎を発症し、更に骨髄の過形成、リンパ節腫張の増大傾向が認められ自己免疫症状の増悪像を呈した。以上、これらの結果は自己免疫疾患発症において、PD-1 受容体欠損と lpr とはその発症時期においても、またその症状においても相乗的に働くことが分かった。

PD-1 欠損マウスを用いたこれまでの実験結果は PD-1 遺伝子が自己免疫寛容の成立に必要なことを示すものであるが、本年度我々はさらにマウスの遺伝的背景の影響を調べるために C57BL/6-PD-1 欠損マウスを BALB/C の遺伝的背景にバッククロスを行った。マウスの背景遺伝子が自己免疫疾患の発症・症状を大きく変えうるということは過去にも報告されている。例えば C57BL/6-lpr/lpr マウスは MRL-lpr/lpr マウスに比べ自己免疫疾患を起こす頻度が低く、その症状も穏やかなものであることが知られている。我々も PD-1 遺伝子について同様の影響があるかを調べてみた。

BALB/C-PD-1 欠損マウスは生後 5 週齢より死亡するものが出現し、30 週齢にはその約 3 分の 2 が死亡してしまう (図 1)。死亡する 1,2 週まえより、このマウスには特徴的な眼球突出が認められる。また肉眼的剖検の結果によると PD-1 欠損マウスにおいては野生型のマウスに比較して、約 2 倍に拡張した心臓が観察され (図 2)、種々の度合いの

肝腫張が認められた。これらの症状は BALB/C-PD-1 欠損マウスは心不全の症状を示すものと考えられる。

そこでこのマウスの心臓を心エコーにより調べた結果、BALB/C-PD-1 欠損マウスにおいては M モードでは LVDd, LVDs の両者とも野生型マウスに比べ低下していることが観察され、EF が野生型の約 4 分の 1 に低下していることから、BALB/C-PD-1 欠損マウスでは心臓のポンプ機能が著しく障害をうけていることが分かった。これにより BALB/C-PD-1 欠損マウスは臨床的に拡張型心筋症と診断されるに至った。

元来 PD-1 はリンパ系細胞に強く発現されていることから、この拡張型心筋症の発症にはこれらの細胞の関与が想像される。この仮説に基づき、我々は BALB/C-PD-1 欠損マウスの脾細胞および骨髄細胞を RAG2 遺伝子欠損マウスに移植した。このマウスにおいては免疫グロブリンおよび T 細胞受容体の DNA 組み替えに関わる RAG2 遺伝子欠損のため、成熟した T, B 細胞を欠損している。いずれの細胞を用いた場合にもドナーと同様の拡張型心筋症の症状をホストマウスが示したことから (脾臓 3 例中 1 例、骨髄 2 例中 1 例)、BALB/C-PD-1 欠損マウスの自己免疫症状はリンパ球の関与であることが示唆される。この仮説をさらに確認するために我々は BALB/C-PD-1 欠損マウスを RAG2 遺伝子欠損マウスと交配し、BALB/C-PD-1, RAG2 欠損マウスを作成した。この BALB/C-PD-1, RAG2 欠損マウスでは拡張型心筋症の症状を呈するマウスは見られず、生存率もコントロール群と比較して差が認められなかった (図 1)。これらの結果は BALB/C-PD-1 欠損マウスに見られる症状は分化したリンパ球

によるものであることを強く示唆する。

そこで我々は心筋特異的な免疫反応の有無を調べた。コントロール群では IgM, IgG, C3 の沈着が認められなかったのに対し、PD-1 欠損マウスでは IgM の沈着は認められなかったものの、IgG と C3 の沈着が生じていることが分かった (図3)。またこの沈着は心筋の損傷部位に限らず、心筋全体に瀰漫性に認められた。C57BL/6- PD-1 欠損マウスでは糸球体に IgG の沈着が生じたが、このマウスでは心臓以外の他臓器で IgG の沈着は認められなかった。電子顕微鏡像によると、この心筋への IgG の沈着は心筋細胞の周辺のみ認められることから (図4)、この所見は心筋細胞の表面上の抗原に対して自己抗体によるものであることを示唆する。

心筋に対する自己抗体の存在を確認するために、野生型と PD-1 欠損マウスからの血清により正常心筋細胞由来の細胞に対し、ウエスタンブロットを行ったところ、自己免疫症状を呈する PD-1 欠損マウスの血清を用いた時にのみ、全例 (17 例中 17 例) で特徴的な 33kD のバンドを認めた (図5)。また興味深いことにこのバンドは調べた限りの他臓器には検出されず、また野生型 C57BL/6 もしくは C57BL/6-PD-1 欠損マウスの心筋でも認められなかった。これらの結果はこの 33kD の蛋白の存在と臨床像が非常に密接に関わっていることを示す。

この抗心筋抗体の特徴を調べるために、病気マウスの心臓から IgG を免疫沈降し、acid elution にて回収したところ、この IgG はウエスタンブロットにて 33kD 蛋白を特異的に認識した。これは血清中の抗体が心臓組織に特異的に沈着していることを示す直接的な根拠となるものである。さらに 33kD 蛋白を認

識している抗体を濃縮し、心筋を免疫染色したところ、そのパターンは筋肉の収縮に必須とされる T 管と呼ばれる構造物と非常に近いものであった (図6)。

D. 考察

この 33kD のバンドはごく希に病気を未発症のマウスにおいても認められることより、この蛋白は心筋の損傷の結果というよりも、この自己抗原に対する自己抗体が心筋に対して損傷を加えているという可能性が高いと我々は考えている。

我々は今年度 PD-1 のリガンドである PD-L1 の単離に成功したが、この蛋白は抗原提示細胞に加え、心臓を含めた末梢の臓器にも恒常的に発現されているということが最近分かった。PD-1 欠損マウスに認められる自己免疫症状とこのリガンドの心臓における発現との関係は不明であるが、この結果は心筋において発現されている PD-L1 が活性化した T および B 細胞の抑制に働いているという可能性を示唆するものである。PD-1 欠損マウスは単一遺伝子の欠損において自己免疫病を発症しうるユニークなモデルであり、したがって、なぜ自己免疫病が起こるかという病因論に迫ることができるという点で他のモデルマウスと大きく異なる。今回の BALB/C-PD-1 欠損マウスは末梢における自己免疫寛容の分子生物学的機構を明らかにする上でも極めて有用なものと考えられる。

現在我々は、この病気マウスの脾臓を用い、この蛋白に特異的なモノクローナル抗体の作成およびこの自己抗原の純化・同定を試みている。マウスにおいてこの試みを完成したのちには、ヒトからも相同分子を単離し、ヒト拡張型心筋症においても同様な自己免疫疾患

が存在するかどうかを明らかにしていきたいと考えている。

E. 結論

拡張型心筋症は現段階では心臓移植しか治療法のない難治性疾患であるが、今回の我々の結果はマウスにおいては少なくとも自己免疫性の拡張型心筋症が存在することを初めて報告するものであり、PD-1 分子による免疫反応の抑制性シグナルがこの病態の成立に関わりうることを示した。このマウスモデルにおける結果はヒトにおいても同様のメカニズムによる心筋症の存在を強く示唆するものであり、また新たな治療法の確立への発展性を示したものである。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nishimura, H., Honjo, T., Minato, N.: Facilitation of b selection and modification of positive selection in the thymus of PD-1-deficient mice. *J. Exp. Med.* 2000, 191: 5, 891-897.

2) Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovitch, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., Horton, H. F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M. R., Carreno, B. M., Collins, M., Wood, C. R., Honjo, T.: Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* 2000, 192: 7, 1027-1034.

3) Nishimura, H., Okazaki, T., Tanaka, Y.,

Nakatani, K., Hara, M., Matsumori, A., Sasayama, S., Mizoguchi, A., Hiai, H., Minato, N., Honjo, T. : Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 2001, 291, 319-322.

2. 学会発表

1) 日本免疫学会総会・学術集会記録第 30 巻・49 頁・2000 年

2) The CREST international symposium on immunoglobulin-like receptors ・ page 17 ・ 2000

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

特になし。

NKT 細胞リガンド α -GalCer による自己反応性 CD4⁺T 細胞の 活性化機構に関する研究

西村孝司（北海道大学遺伝子病制御研究所・免疫制御分野）

研究要旨

自己免疫病の原因究明において、自己反応性 CD4⁺T 細胞のトリガリング機構、さらには T 細胞により認識される自己抗原の同定は不可欠である。我々は NKT 細胞のリガンドである α -GalCer により活性化された抗原提示細胞が自己反応性 CD4⁺T 細胞の活性化を誘起することを明らかにした。

C57BL/6、BALB/c マウスの胸腺および脾臓より NK1.1⁺CD4⁺細胞を単離し、 α -GalCer と同系マウス脾細胞、または α -GalCer を投与した同系マウス脾細胞を共培養することにより自己反応性 CD4⁺T 細胞を誘導した。これら自己反応性 Th 細胞は同系の脾細胞、DC、B 細胞などで刺激することにより強いサイトカイン産生を認めた。このサイトカイン産生はクラス II 欠損マウス脾細胞による刺激では認められず、本系で誘導された自己反応性 Th 細胞は NKT 細胞以外のクラス II 拘束性 CD4⁺Th によるものと考えられる。これらの Th 細胞は生体内移入によっても自己反応性を示した。以上の結果は感染による自己免疫病憎悪機構の解明に有用な知見と考えられる。

A.研究目的

糖鎖化合物の一種である α -Galactocylceramide (α -GalCer)は、樹状細胞上の CD1d 分子に結合し、NKT 細胞を特異的に活性化するリガンドであることが明らかにされている。NKT 細胞は NK 細胞と同様に自然抵抗性免疫の重要なエフェクター細胞であると考えられるが、我々は最近、 α -GalCer による NKT の活性化に伴い、B 細胞や T 細胞が活性化されうることを明らかとした。すなわち、NKT 細胞はそれらのリガンドによって活性化されることによりキラー活性を獲得するのみならず、サイトカイン産生を介して自然免疫に引き続いて誘導される獲得性免疫を惹起する役割を持つ。このことは NKT 細

胞による初期の反応性が獲得性免疫の中心と考えらる Th1/Th2 バランスの制御に強く関与し、自然免疫と獲得免疫の橋渡しとなっているものと考えられる。したがって本研究では、 α -GalCer が NKT を活性化することで種々の細胞、特に APC の活性化を引き起こすことにより、自己反応性 T 細胞の増殖のトリガーとなり得るのか否かについて検討した。

B.研究方法

1. C57BL/6、BALB/c、NKT 欠損マウス (H-2^b)の各種マウス胸腺あるいは脾臓より NK1.1⁺ CD4⁺ 細胞を FACS Vantage にて分取した。これについて、 α -GalCer (500 ng/ml) 存在下、非存在下にてマイトマイシン C 処理

した同系マウス脾細胞と NK1.1 CD4⁺細胞の syngenic MLR を行った。³H-dTR による細胞増殖反応と培養上清中の IFN- γ , IL-4 level を ELISA により測定した。

2. さらに、20U/ml の IL-2 存在下、同系マウス脾細胞にて刺激を繰り返して得られた自己反応性 Th 細胞について、各 stimulator (DC, B 細胞、クラス I、クラス II 欠損マウス脾細胞、クラス II 陽性培養細胞)との反応性をサイトカインレベルの上昇を指標として検討した。

3. さらにこの Th 細胞を同系マウスに静注し、24 時間後の血清サイトカインレベルを ELISA にて測定した。

4. マウス脾細胞より CD4⁺NK 抗原陰性細胞を FACS Vantage にて分取し α -GalCer 2 μ g の静脈内投与により活性化した脾細胞と syngenic MLR を行った。また、 α -GalCer (2 μ g/mouse) 静注 8 時間後の脾細胞中の B 細胞、あるいは活性化 T 細胞におけるクラス II 分子や 補助刺激分子の発現を検討した

5. α -GalCer で刺激した細胞のうちどういう成分が自己反応性の T 細胞の増殖を刺激しているのかを検討するため、 α -GalCer にて活性化した B 細胞を FACS Vantage にて分取し、上記と同様の CD4⁺NK 抗原陰性細胞と syngenic MLR を行い、細胞増殖反応とサイトカインの産生を測定した。

C. 研究結果

1. 培養開始 2 日後に 1 U の IL-2 を添加することで、 α -GalCer 存在下の培養条件でのみ初期の顕著な細胞増殖と IL-4 および IFN- γ の産生が確認された。長期に培養した際には緩徐な自己反応性 CD4⁺T 細胞の誘導も可能であった。

2. 誘導された自己反応性 Th 細胞は、同系マウスの DC や B 細胞などの APC で刺激された場合に著明な IL-4 の産生を認めたが、IFN- γ の産生は認めず Th2 に偏向する傾向がみられた。またこの傾向はこれらの細胞を clone 化した場合にも同様であった。また V α 14 ノックアウトマウスでも同様の自己反応性 T 細胞の誘導が可能であり、クラス II ノックアウトマウスの脾細胞の刺激ではこれらの細胞は刺激を受けなかったことから、これらの細胞は NKT ではなく自己反応性のクラシカル CD4⁺T 細胞と考えられ、これら自己反応性 Th 細胞はクラス II に提示された自己抗原に反応することが示された。

3. 自己反応性 CD4⁺T 細胞の静脈内投与により生体内に存在する自己抗原に反応し、血清サイトカインレベルの上昇を認めた。

4. α -GalCer 投与により脾細胞 CD4⁺T 細胞、B 細胞で CD69 抗原の upregulation が認められ、これらの population において、B 細胞ではクラス II 分子や B7 分子の発現が、活性化 T 細胞では ICAM-1 などの補助刺激分子の発現の増強を認めた。これらの細胞を stimulator として用いることにより、自己反応性 CD4⁺T 細胞の活発な増殖とサイトカイン産生を認めた。

5. α -GalCer で活性化された B 細胞で刺激した場合に、より短期間の培養でも自己に反応し、サイトカインを産生する CD4⁺T 細胞の活発な増殖を認めた。

D. 考察

本研究において我々は、 α -GalCer が DC や NKT を相互に活性化するのみならず他の T 細胞や B 細胞に対しても強い活性化能を有することに着目し、これが自己反応性 CD4⁺

T 細胞産生のトリガーとなりうるか否かを検討した。その結果、胸腺、脾臓のいずれにおいても、 α -GalCer の存在下効率的に自己反応性 CD4⁺ T 細胞を誘導することが可能であった。この細胞は *in vitro*、*in vivo* 共に自己の細胞に強い反応性を示した。また、 α -GalCer による CD4⁺細胞、B 細胞の活性化に伴い、いずれにおいても co-stimulatory molecule の発現増強が起こることを示した。

すなわち、感染などにより NKT などの自然免疫機構が活性化されれば、獲得免疫を担う T 細胞や B 細胞の相互活性化作用を通して、自己反応性の T 細胞増殖が誘起されるものと考えられる。さらに、Th2 サイカイン産生、B 細胞の活性化と自己抗体の産生を引き起こすことも十分予想できる。本研究の成果は、感染による自己免疫病の急性増悪機構の解明において、新たな道を開く重要な知見と思われる。本研究によって、自己反応性 T 細胞の初期活性化に NKT 細胞が関与している事が示されたが、将来的には NKT 細胞の機能を制御することによって自己免疫病の制御が可能がある。また、NKT 細胞リガンドである α -GalCer を用いることによって再現性よく自己反応性 T 細胞を誘導できることから、本系を用いて自己反応性 T 細胞に認識される自己抗原の同定が可能になり、自己免疫病の新たな治療法開発に役立ち得るものと考えられる。

E. 結論

1. NKT リガンド α -GalCer により *in vitro* あるいは *in vivo* において活性化された抗原提示細胞により、マウス胸腺および脾臓細胞における自己反応性 CD4⁺T 細胞を効率的に誘導することが可能であった。

2. α -GalCer によって NKT 依存的に活性化された B 細胞では、高い CD69 抗原の発現および補助刺激分子の発現増強が見られ、自己反応性 CD4⁺T 細胞を誘導した。

3. 上記の方法で誘導された自己反応性 CD4⁺T 細胞は Th2 に偏向する傾向を認めた。

4. 上記の結果は、感染による自己免疫病の増悪機構解明において有用な知見と考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

2. Nakui, M., Ohta, A., Sekimoto, M., Sato, M., Iwakabe, K., Yahata, T., Kitamura, H., Koda, T., Kawano, T., Makuuchi, H., Taniguchi, M., and Nishimura, T.: Potentiation of antitumor effect of NKT cell ligands, α -galactosylceramide by combination with IL-12 on lung metastasis of malignant melanoma cells., *Clinic. Exp. Metastasis*, 2000, 18, 147-153.
3. Ohta, A., Sekimoto, M., Sato, M., Koda, T., Nishimura, S., Iwakura, Y., Sekikawa, K., and Nishimura, T., Indispensable Role for TNF- α and IFN- γ at the Effector Phase of Liver Injury Mediated by Th1 Cells Specific to Hepatitis B Virus Surface Antigen. *J. Immunol*, 2000, 165, 956-961.
4. Nishimura, T., Kitamura, H., Iwakabe, K., Yahata, T., Ohta, A., Sato, M., Takeda, K., Okumura, K., Van Kaer, L., Kawano, T., Taniguchi, M., Nakui, M., Sekimoto, M., and Koda, T., The interface between innate and acquired immunity: Glycolipid antigen presentation by CD1d-expressing dendritic cells to natural killer T cells induces the

- differentiation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int. Immunol.* , 2000, 12, 987-994.
5. Sato, M., Iwakabe, K., Ohta, A., Sekimoto, M., Nakui, M., Koda, T., Kimura, S., and Nishimura, T., Functional heterogeneity among bone marrow-derived dendritic cells conditioned by Th1- and Th2-biasing cytokines for the generation of allogeneic cytotoxic T lymphocytes.. *Int. Immunol.* , 2000, 12, 335-342.
 6. Kitamura, H., Ohta, A., Sekimoto, M., Sato, M., Iwakabe, K., Nakui, M., Yahata, T., Meng, H., Koda, T., Nishimura, S., Kawano, T., Taniguchi, M., and Nishimura, T., α -galactosylceramide induces early B-cell activation through IL-4 production by NKT cells, *Cell Immunol.* , 2000, 199, 37-42.
 7. Nishimura, T., Nakui, M., Sato, M., Iwakabe, K., Kitamura, H., Sekimoto, M., Ohta, A., Koda, T., and Nishimura, S., The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology, *Cancer Chemother. Pharmacol.* , 2000, 46, S52-S61.
 8. Fujio, K., Nosaka, T., Kojima, T., Kawashima, T., Yahata, T., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Yamamoto, K., Nishimura, T., and Kitamura, T., Molecular cloning of novel type I cytokine receptor, *Blood.* , 2000, 95,2204-2211.
 9. Yahata, T., Yahata, C., Ohta, A., Kitamura, H., Iwakabe, K., Habu S., Azuma, S., Nakui, M., Sato, M., Koda, T., and Nishimura, T., Interleukin-4-dependent induction of preproenkephalin in antigen-specific T helper-type 2 (Th2) cells, *J. Neuroimmunol.* , 2000, 105, 103-108.
 10. Sato, M., Iwakabe, K., Ohta, A., Sekimoto, M., Kimura, S., and Nishimura, T., Establishment of self priming cell culture system for monitoring genetically-controlled spontaneous cytokine-producing ability in mice, *Immunol. Lett.* , 2000, 70, 173-178.
2. 学会発表
 1. Nishimura, T., The pathogenic role of peripherally differentiated Th1 and Th2 cells in immune disease. 第30回日本免疫学会総会・学術集会 2000, S1-5
 2. 茶本健司、佐藤まりも、辻武正、関本征史、太田明夫、青木洋人、西村紳一郎、山口桂、幸田敏明、西村孝司、NKT細胞リガンド α -GalCerに対する免疫応答性の遺伝子支配：CD1d陽性の樹状細胞の重要性、第30回日本免疫学会総会・学術集会 2000,1-E-237
 3. 山本聡、辻武正、関本征史、佐藤まりも、太田明夫、澤田賢一、小池隆夫、幸田敏明、西村孝司、NKT細胞リガンド α -GalCerによる自己反応性CD4⁺T細胞の活性化増幅機構、第30回日本免疫学会総会・学術集会 2000, 1-E-239
 4. 辻武正、山本聡、佐藤まりも、関本征史、太田明夫、幸田敏明、西村孝司、NKT細胞依存的に活性化されたB細胞による自己反応性CD4⁺T細胞の活性化機構、第30回日本免疫学会総会・学術集会 2000, 1-E-240
 5. 佐藤まりも、茶本健司、辻武正、関本征史、山口桂、太田明夫、幸田敏明、西村孝司、Th1サイトカイン活性化樹状細胞サブセットによるCTL誘導機構の解析、第30回日本免疫学会総会・学術集会 2000,

2-A-011

6. 青木洋人、太田明夫、辻武正、関本征史、佐藤まりも、長澤滋治、幸田敏明、西村孝司、Th1 型肝障害に対するマウス感受性の遺伝子支配、第 30 回日本免疫学会総会・学術集会 2000, 3-A-020
7. 幸田敏明、青木洋人、李潔、関本征史、太田明夫、佐藤まりも、辻武正、西村孝司、抗原特異的 Th1 細胞、Th2 細胞に特異的な遺伝子発現の解析、第 30 回日本免疫学会総会・学術集会 2000, 3-A-021
8. 星野昭彦、朝倉祐美子、櫻井孝信、高岡明子、田中善孝、中池史郎、辻武正、太田明夫、西村孝司、マウス喘息モデルにおける STAT6 の関与-ケモカイン Eotaxin の役割第 30 回日本免疫学会総会・学術集会 2000, 1-A-029
9. 西村孝司、Th1 サイトカイン活性化樹状細胞の癌免疫療法への応用、第 59 回日本癌学会, 2000,1121
10. 佐藤まりも、太田明夫、関本征史、西村孝司、Th1 サイトカイン活性化 dendritic cell (BMDC1)による CTL 誘導メカニズム、第 59 回日本癌学会, 2000, 1620

SLE T細胞の raft 画分シグナル伝達分子の発現と機能に関する研究

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

TCRと鎖発現低下によって惹起される上流シグナル伝達の異常を、T細胞膜に存在してシグナル伝達に中心的役割を果たしている raft/GEM に着目して解析した。TCR 鎖は、細胞質、T細胞膜同様、raft/GEM 画分にも全く検出されなかった。一方、そのなかで分子足場形成に必須の LAT は、正常 T細胞と異なり、SLE T細胞では、無刺激の状態ですでに raft/GEM 画分にチロシンリン酸化を受けた状態で存在しており、同時に複数のアダプター蛋白が会合していた。TCRと鎖が raft/GEM 画分に存在しない事によって、負の制御の標的がなく、持続的な活性化が引き起こされている可能性が示唆された。これによって、インターフェロン- γ や、BAFF/zTNF4/BlyS/TALL-1 などのサイトカイン産生が亢進し、自己免疫現象を誘導したものと考えられた。

A.研究目的

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。その分子機序は不明のままであったが、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た。

そこで、T細胞抗原レ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が明かとなった。一部の患者では、健常人と異なったスプライシングを受けたヴァリエント TCRと鎖 mRNA が検出

され、活動性と無関係に年余に渡って末梢血 T細胞に存在している事が判明した。TCRと鎖蛋白の発現異常が T細胞膜分画の上流部シグナルにどのような異常をもたらし、それが自己免疫病の病態形成にどのように関わっているのかは不明で、今後の課題として残されていた。

TCRと鎖は、シグナル伝達の正の応答に関与するだけでなく、チロシンフォスファターゼなどの標的分子として、シグナルを収束に向かわせる負の制御にも極めて重要な役割を果たしている事が明かとなってきている。TCRと鎖を初めとする細胞表面のシグナルが実際に下流に伝達され、そして調節されている場合は、分子足場の形成に関与する LAT (Linkers for Activation of T cells) を中心とした raft/GEM (Glycolipid Enriched Microdomain)で、その役割は T

細胞シグナル伝達の制御の鍵を握るとして大きな注目を集めている。そこで本研究では、TCRと鎖の蛋白発現低下が raft/GEM 形成および、そこにリクルートされる LAT にどのような影響を及ぼし、最終的なエフェクター T 細胞の持続的活性化に至る下流のシグナル伝達にどのような異常をもたらしているのかを明らかにする事を目的とする。

2) 一方、無刺激 T 細胞では、細胞質画分の LAT 発現は、正常人、SLE T 細胞でほぼ同等であったが、正常人 T 細胞の raft/GEM 画分には LAT がリクルートされていなかった。

B. 研究方法

1) raft 画分：1%Triton-X 添加細胞溶解液を、sucrose グラディエントによって超遠心で分画し、1～12 フラクションを分取した。Raft/GEM 画分であるフラクション 10、11 を免疫ブロット、免疫沈降などのアッセイに用いた。

2) 免疫沈降、免疫ブロット法：細胞ライゼートあるいは raft/GEM 画分溶解液は、抗 TCR と鎖抗体、抗 LAT 抗体などで免疫沈降し、15%SDS-PAGE で展開後、PVDF 膜に転写した。これを抗チロシンリン酸化抗体や、各分子に対する特異的抗体によって検出し、ECL 試薬によって可視化し X 線フィルムに感光させた。

3) 半定量 PCR：末梢血 T 細胞から mRNA を抽出し、TCR と鎖、IFN γ 、BAFF/zTNF4/BlyS/TALL-1 の翻訳領域、非翻訳領域にプライマーを設定し、RT-PCR のサイクル数を変化させて、アガロースゲル上のバンドをデンシトメーターで取り込んで定量化した。

C. 研究結果

1) レクチンなどによって正常人 T 細胞を刺激すると、細胞質画分に多量に存在する

LAT が raft/GEM 画分に移動するとともに、c-cbl を初めとするアダプター蛋白、PI-3K、p95vav などのキナーゼも raft/GEM に移ることが免疫ブロット法で確認された。

一方、SLE T 細胞の raft/GEM 画分には LAT が多量に存在し、しかもチロシンリン酸化を受けていたことから、SLE T 細胞では、生体内ですでに raft/GEM 画分のシグナル伝達は、活性化が持続した状態となり、本来ならフォスファターゼをリクルートして、TCR と鎖のチロシンリン酸化を脱リン酸化してスイッチオフにするべきところが、TCR と鎖が発現されていないために負の制御がかからない、可能性が考えられた。

3) 負の制御分子として知られる c-cbl, などのアダプター蛋白や、フォスファターゼ、CTLA-4 はレクチン刺激でほぼ正常と同等に発現誘導される事が明かとなった。これら負の調節分子の標的である TCR と鎖が存在しない事によって、raft/GEM の持続的な活性化状態が解除できないものと推測された。

3) 負の制御分子として知られる c-cbl, などのアダプター蛋白や、フォスファターゼ、CTLA-4 はレクチン刺激でほぼ正常と同等に発現誘導される事が明かとなった。これら負の調節分子の標的である TCR と鎖が存在しない事によって、raft/GEM の持続的な活性化状態が解除できないものと推測された。

D. 考察および結論

TCR と鎖発現低下によって、raft/GEM を中心とするシグナル伝達の負の制御に失調を来たし、その持続的な活性化から、下流のインターフェロン- γ や、BAFF/zTNF4/BlyS/TALL-1 などのサイトカイン産生が亢進し、自己免疫現象の誘導につながったと考えられた。今後、この異常経路を是正するモノクローナル抗体やレセプタ

ーアンタゴニストの開発が進めば、より病態に則した、しかも副作用の少ない新規薬剤が生み出される可能性があり、さらなる検討が期待される。

E. 研究発表

1. Amano K, Maruyama H, and Takeuchi T. Nosocomial pneumonia likely caused by *Stenotrophomonas maltophilia* in two patients with polymyositis. *Intern Med* 38:910-6, 1999.
2. Kanemitsu S, Ihara K, Kira R, Kaku Y, Sakai K, Tsuzaka K, Takeuchi T, and Hara T. Complement component 9 deficiency is not a susceptibility factor for SLE. *Lupus* 9:456-7, 2000.
3. Tsubota K, Fujita H, Tsuzaka K, and Takeuchi T. Mikulicz' disease and Sjogren's syndrome. *Invest Ophthalmol & Vis Sci* 41:1666-73, 2000.
4. Aoki K, Tanji H, and Takeuchi T. Hydronephrosis and convulsion secondary to non-Hodgkin's lymphoma in a patient with systemic lupus erythematosus. *Modern Rheum* in press.
5. Ishihara O, Saitoh M, Hayashi N, Kinoshita K, and Takeuchi T. Failure of embryo implantation successfully treated with prednisolone in patients with Sjogren's syndrome. *Fertility & Sterility* in press.
6. Kawashima M, Yamamura M, Tani M, Yamauchi H, Tanimoto T, Kurimoto M, Miyawaki S, Amano T, Takeuchi T, and Makino H. Extremely increased levels of IL-18 and IL-18 binding protein in blood

circulation of patients with adult still's disease. *Arthritis & Rheum* in press.

10. Tsuzaka T, Onoda N, Yoshimoto K, Zhang L, Pang M, Abe T, and Takeuchi T. Alternatively spliced 3' untranslated region of TCR α mRNA in the peripheral blood T cells of systemic lupus erythematosus patients. *Int Immunol* in press.
11. Abe T and Takeuchi T. Rheumatoid Arthritis and tumor necrosis factor α . *J. Autoimmunol* in press.

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
Inhibitors for the adhesion of lymphocytes to glandular cells. Pat. No: 6146630
2. 特許出願
T細胞リセプターゼータ鎖タンパク、これをコードする遺伝子若しくはその一部を含む精製された核酸又は当該核酸に基づく自己免疫疾患検出法
特願平 9-309302

コンビナトリアルケミストリーを用いたT細胞エピトープの解析

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

抗リン脂質抗体症候群(APS)の責任自己抗原 β 2-glycoprotein I を認識するT細胞の特徴を解析し、交差反応性が成立する抗原を効率よく同定する方法を開発した。また、特異性未知の一個のT細胞を出発材料として、その細胞が認識するペプチドリガンドを効率良く同定する方法を確立した。

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し、昨年度は患者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た(表1;文献1)。主要T細胞エピトープはクリプティックであった。さらに、分子擬態の解析を念頭において、combinatorial peptide libraryと質量分析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²⁾。本年度は上記成果を応用して(A) β 2-GPI蛋白反応性患者T細胞クローンの抗原認識における免疫学的分子擬態を解析し、また、(B) 特異性未知の一個のT細胞を出発材料として、その細胞が認識するペプチドリガンド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

(A) 昨年度の研究から主要T細胞エピトープであることが判明した p244-264 (第5ドメインの SCKLPVKKATVVYQGERVKIQ) を認識する患者T細胞クローンの truncated peptides に対する反応性を評価し、認識のコア部分が共通していると考えられた2種類のクローンについて、KGXXXXXXXXXGK-based combinatorial library に対する反応性を検討した。このデータをもとにパターンマッチサーチを行った。
(B) X19 (random 19-mer)が幅広いT細胞レパートリーに対してアゴニスト活性を有することを見いだした。特定のサイトカインなど (IL-4,7,9,15 および agonistic 抗 CD29 抗体) と X19 でT細胞を刺激すると、一個のCD4T細胞を出発材料として、 10^7 のオーダーまでT細胞を増殖させることが可能となった。こうして増殖させたT細胞の反応性を combinatorial peptide library で評価することにより、T細胞が認識するペプチドリガンドを同定した。

C.研究結果

(A) に関して以下の点を明らかにした。

(1) p244-264 を N 末または C 末から truncate したペプチドを合成し、T 細胞クローンの増殖反応を評価した (図 1)。クローン AK2.2.9 (DRB1*0403 拘束性) と NT5.3.1 (DRB4*0103 拘束性) は共通のコア配列を認識していた。(2) AK2.2.9 と NT5.3.1 を用いて KGXXXXXXXXXGK-based combinatorial peptide library による positional scanning を行った結果、アゴニスト活性を発揮するために必要なアミノ酸残基を同定することができた (図 2)。(3) これを用いて非自己由来の擬態分子を同定するためのパターンマッチサーチを行った。図 3 には、野生型リガンド p244-264 が検出されるための条件を太字で示しているが、このような条件下では、非自己ペプチド断片が 1000 種類以上も検出されてしまう。また、図 2 で得られたパターンが AK2.2.9 と NT5.3.1 とでかなり異なっていることから、AK2.2.9 と NT5.3.1 にとっての mimicry peptide は異なっていると考えられた。

(4) そこで、単一の TCR ligand (BCGa84-100 + DRB1*1405) を異なる TCR を用いて認識する 2 種類の T 細胞クローン (BC20.7 と BC33.5; 文献 3) を用いて combinatorial peptide library による positional scanning を行ってみた (図 4)。その結果、予想されたようにそのパターンはまったく異なっており、たとえ単一の TCR ligand であってもそれを認識する TCR が異なっていれば、擬態分子はまったく異なると考えられた。

(B) に関しては以下の点を明らかにした。

(1) X19 (ランダムな配列を有する 19-mer) は IL-2 存在下に PBMC を増殖させる。この反応は HLA class II 分子に対する抗体により阻止される CD4T 細胞の増殖である (図 5)。(2) X19 はさまざまな特異性を有する CD4T 細胞クローンに対してアゴニスト活性を有している (図 6)。(3) 末梢血中の CD4T 細胞を分離直後から限界希釈し、feeder 細胞、X19, IL-4/7/9/15, agonistic 抗 CD29

抗体 4) と共培養することにより、クローナルに十分増殖させることができる (表 2)。

(4) このようにして増殖させた T 細胞クローンのうち、増殖のよいグループから 10 クローンを無作為に選択し、combinatorial peptide library に対する反応性を観察した。そのうち 4 クローンは combinatorial peptide library に対する反応が弱いためにパターンマッチサーチを行うに十分な情報を得る事ができなかった。情報が得られた 6 クローンのうちのひとつ (クローン名 19.6.47) に関して、combinatorial peptide library に対する反応性 (図 7) にもとづいて得られたパターンマッチサーチの結果 (表 3) をもとにペプチドリガンドを同定することを試みた。

(5) 19.6.47 T 細胞の供与者はスギ花粉症患者であり、また、19.6.47 の樹立はスギ花粉飛散後期に行われたため、表 3 に示したいくつかの非自己ペプチドのうち、Cry j I 断片 (p324-331) に反応する可能性が高いと考え、この部分を含む合成ペプチド (Cry j Ip301-321) と Cry j I 精製蛋白 5) に対する 19.6.47 の反応性を観察したところ、図 8 に示すように、19.6.47 は両者に対して濃度依存性に増殖反応を示した。19.6.47 にとっての最強の natural ligand が Cry j I であるとする根拠はないが、少なくとも X19 を用いて (Cry j I を用いてはいない!) CD4T 細胞を初期段階からクローナルに増殖させることができ、combinatorial peptide library を用いればそのペプチドリガンドを同定できる例が存在することを示すことができた。

D. 考察

(A) の結果は、 β 2-GPI ペプチド反応性 T 細胞が認識することができ、しかも野生型リガンドとは一次構造上まったく異なるようなペプチドを同定できる可能性を示唆している。T 細胞を野生型リガンドよりも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。ただし、本稿に示したように、

1) 単純なパターンマッチでは1000種類を越す候補ペプチドがリストアップされる、
 2) 単一の TCR ligand を認識する TCR の heterogeneity は従来考えられていたよりも高く6)、TCR が違えば mimicry peptide は全く異なる可能性が高い、などの解決されるべき問題が残されている。しかし、Wiley らの最近の研究にみられるように、crystallography の結果を手にしてもなお、full agonist、partial agonist、TCR antagonist、irrelevant MHC binder を区別することは困難である7)。まして言わんや、エネルギー最小法から TCR-peptide-MHC 相互作用を予測して分子擬態を解析するなどは、夢物語であるというのが現状である。つまりこの分野におけるコンビナトリアルペプチドライブラリーの存在意義は今後も小さくなることはないと考えられる。今後は我々が開発した質量分析と組み合わせる方法2) を用いることにより、より効率的な方法で擬態分子を同定することをめざす。また (B) の結果は、特異性未知の T 細胞を解析対象としてそのリガンドに関する研究を展開する道を開いた。APS のみならず、さまざまな自己免疫病への応用が可能であると考えられる。これらの成果により来年度は研究を進展させて、 β 2-GPI 蛋白反応性 T 細胞が活性化されるための内部環境（還元作用、非特異的炎症など）、ならびに外的要因（感染症などに起因する非自己抗原による分子擬態など）を明らかにしたい。

E. 結論

β 2-GPI 上の T 細胞エピトープを明らかにし、交叉反応するペプチドを同定する方法を開発した。クリプティックなエピトープが抗原提示される特殊な環境やメカニズムを解明することを含めたこれら一連の研究は、抗 β 2-GPI 抗体の産生および APS 発症の病因を理解し、さらには治療に応用するために重要なヒントを提供するものと期待される。

参考文献

- 1) Ito, H., Matsushita, S., Tokano, Y., Nishimura, H., Tanaka, Y., Fujisao, S., Mitsuya, H., Hashimoto, H. and Nishimura, Y. Analysis of T-cell responses to the β 2-glycoprotein I-derived peptide library in patients with anti- β 2-glycoprotein I antibody-associated autoimmunity. *Hum. Immunol.* 61: 366-377, 2000
- 2) Tanaka, Y., Ohyama, H., Ogawa, M., Nishimura, Y. and Matsushita, S. Identification of peptide superagonists for a self-K-ras-reactive CD4+ T cell clone by use of combinatorial peptide libraries and mass spectrometry. *J. Immunol.* 162: 7155-7161, 1999
- 3) Matsushita, S., Kohsaka, H. and Nishimura, Y. Evidence for self- and non-self-peptide partial agonists that prolong clonal survival of mature T cells in vitro. *J. Immunol.* 158: 5685-5691, 1997
- 4) Tanaka Y, Ogawa M, Nishimura Y, Matsushita S: Efficient induction of human CD4+ T cell lines reactive with a self-K-ras-derived peptide in vitro, using a mAb to CD29. *Hum Immunol* 59:343, 1998
- 5) Matsushita, S., Muto, M., Suemura, M., Saito, Y. and Sasazuki, T. HLA-linked nonresponsiveness to cryptomeria japonica pollen antigen. I. nonresponsiveness is mediated by antigen-specific suppressor T cell. *J. Immunol.* 138:109-115, 1987
- 6) Matsushita, S., Yokomizo, H., Kohsaka, H. and Nishimura, Y. Diversity of a human CD4+ T cell repertoire recognizing one TCR ligand. *Immunol. Lett.* 51: 191-194, 1996
- 7) JAPAN PRIZE 1999. The science and technology foundation of Japan. Pp110-118.

F. 健康危険情報

特記事項なし

G.研究発表

1.論文発表

1. Ito, H., Matsushita, S., Tokano, Y., Nishimura, H., Tanaka, Y., Fujisao, S., Mitsuya, H., Hashimoto, H., Nishimura, Y. : Analysis of T-cell responses to the β 2-glycoprotein I-derived peptide library in patients with anti- β 2-glycoprotein I antibody-associated autoimmunity. *Hum. Immunol.* 2000, 61, 366-377.
2. Tabata, H., Matsuoka, T., Endo, F., Nishimura, Y., Matsushita, S. : Ligatin of HLA-DR molecules on B cells induces up-regulated transcription of IgM heavy chain genes in association with Syk activation. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 34998-35005.
3. Shigematsu, H., Shimoda, S., Nakamura, M., Matsushita, S., Nishimura, Y., Sakamoto, N., Ichiki, Y., Niho, Y., Gershwin, E., Ishibashi, H. : Fine specificity of T cells reactive to human PDC-E2 163-176 peptide, the immunodominant autoantigen in primary biliary cirrhosis: Implications for molecular mimicry and cross-recognition among mitochondrial autoantigens. *Hepatology.* 2000, 32, 901-909.
4. Ohyama, H., Matsushita, S., Hatano, K., Meguro, M., Takeuchi, K., Nishimura, F., Takashiba, S., Murayama, Y. : Assessment of T cell response to IL-12 in humans with leprosy. In *Proceedings of 35th U.S.-Japan Conference on Tuberculosis / Leprosy.* 2000, p.p.88-92.
5. Matsuoka, T., Tabata, H., Matsushita, S. : Antigen-presenting cells are differentially activated through HLA-DR, -DQ and -DP molecules. *FASEB J.* 2000, 14, A1054.
6. Tabata, H., Matsuoka, T., Matsushita, S. : Ligatin of HLA-DR molecules on B cells induces up-regulated transcription of IgM heavy chain genes in association with Syk activation. *FASEB J.* 2000, 14, A1158.
7. Matsushita, S., H. Tabata, T. Matsuoka. : Signaling through class II HLA molecules expressed on B cells and monocytes. *Allergy & Clinical Immunology International, supplement.* 2000 No.2, p211.
8. Matsuoka, T., Tabata, H., Matsushita, S. : Monocytes are differentially activated through HLA-DR, -DQ, -DP molecules via MAP kinases. *J. Immunol.* 2001, 166, 2202-2208.
9. Matsushita, S., Tanaka, Y., Ohyama, H., Matsuoka, T., Nakashima, T. : Combinatorial peptide library for the analysis of T-cell antigen recognition. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening.* in press (2001).
10. Oyaizu, K., Ohyama, H., Nishimura, F., Kurihara, H., Matsushita, S., Maeda, H., Koikeguchi, S., Hongyo, H., Takashiba, S., Murayama, Y. : Identification and characterization of B-cell epitopes of a 53-kDa outer membrane protein from *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol. Immunol.* in press (2001).
11. Akaiwa, M., Yu, B., Umeshita, R., Terada, N., Suto, H., Ohshima, K., Koga, T., Arima, K., Matsushita, S., Saito, H., Ogawa, H., Furue, M., Hamasaki, N., Izuhara, K. : Localization of human interleukin-13 receptor in non-hematopoietic cells. *Cytokine.* in press (2001).
12. Nishimura, Y., Ito, H., Tabata, H., Fujii, S., Tokano, Y., Chen, Y-Z., Matsuda, I., Mitsuya, H., Kira, J-I, Hashimoto, H., Senju, S., Matsushita, S. : Molecular and cellular analyses of HLA class II - associated susceptibility to autoimmune diseases in the Japanese population. *Modern Rheumatology.* in press (2001).
13. 松下 祥。HLA とアレルギー。花粉症研究会会報第 11 号、2-9, 2000。
14. 松下 祥、大山秀樹、田中芳彦。ペプチ

ドスーパーアゴニスト同定法の開発とその応用：一残基置換から多残基置換へ。日本臨床免疫学会会誌 23、571-576, 2000。

15. 松下 祥、田畑博己、松岡多香子。HLA クラス II 分子を介したシグナル伝達と免疫制御：免疫応答遺伝子再訪。日本炎症・再生医学会会誌、印刷中, 2001。

16. 松下 祥。クラス II HLA 分子を介したシグナルによる免疫制御機構：免疫応答遺伝子再訪。臨床免疫、印刷中, 2001。

17. 松下 祥：免疫遺伝学, 中川武正、近藤直美、池沢善郎、竹中 洋、柳原行 義編：「コンパクト臨床アレルギー学」, 南光堂, (東京) 29-37, 2000。

18. 松下 祥：抗原と抗原提示, 森田 寛、永倉俊和、宮地良樹、岡本美孝編：「アレルギーナビゲーター」, メディカルレビュー社, (東京) 印刷中、2001。

19. 松下 祥、笹月健彦：日本人の免疫系, 片瀬一彦編：「日本人の事典」, 朝倉書店, (東京) 印刷中、2001。

20. 松下 祥：21 項目担当, 大沢利昭、小山次郎、奥田研爾、矢田純一編：「免疫学辞典」, 東京化学同人, (東京) 印刷中、2001。

21. 松下 祥：5 項目担当, 永田和宏、宮坂昌之、宮坂信之、山本一彦編：「分子生物学・免疫学キーワード辞典」, 医学書院, (東京) 印刷中、2001。

2. 学会発表

1. 伊上良輔 坂口平馬 近藤直実 松下 祥 西村泰治。抗原提示細胞とT細胞の結合様式がアレルギー病態における抗原特異性を決定する。第 103 回日本小児科学会総会、和歌山、2000 年 4 月 15 日

2. Matsuoka, T., Tabata, H. and Matsushita, S. Antigen-presenting cells are differentially activated through HLA-DR, -DQ and -DP

molecules. Immunology 2000, Seattle, Washington, USA, May 12-16, 2000.

3. Tabata, H., Matsuoka, T., and Matsushita, S. Ligatin of HLA-DR molecules on B cells induces up-regulated transcription of IgM heavy chain genes in association with Syk activation. Immunology 2000, Seattle, Washington, USA, May 12-16, 2000.

4. 三野原元澄、小副川 学、山崎賢智、堀内泉、松下 祥、西村泰治、吉良潤一。アジア型多発性硬化症におけるミエリン蛋白自己反応性 T 細胞の解析。第 41 回神経学会総会、松本、2000 年 5 月 24-26。

5. Ohyama H, Matsushita S, Hatano K, Meguro M, Takeuchi K, Nishimura F, Takashiba S and Murayama Y. The assessment of T cell response to IL-12 in humans with leprosy. 35th US-Japan Cooperative Medical Science Program Tuberculosis-Leprosy Research Conference, 横浜, 2000 年 7 月 19-21 日。

6. 松下 祥。ペプチドスーパーアゴニスト同定法の開発とその応用：一残基置換から多残基置換へ。第 28 回日本臨床免疫学会シンポジウム「免疫疾患における T 細胞：抗原認識と免疫制御の可能性」、東京、2000 年 9 月 28-30 日。

7. Minohara, M., Matsushita, S., Nishimura, Y. and Kira, J. Analysis of Myelin antigen specific autoreactive T cells from opticospinal multiple sclerosis patients. 125th Annual Meeting, American Neurological Association, Boston, October 15-18, 2000.

8. Matsushita, S., Tabata, H., and Matsuoka, T. Signaling through class II HLA molecules expressed on B cells and monocytes. XVII International congress of Allergy and Clinical Immunology, Sydney, Australia, October 15-20, 2000.

9. 松岡多香子、田畑博己、松下 祥。多重遺

伝子族として進化したクラス II HLA の機能的多様性。第 45 回日本人類遺伝学会、福岡、2000 年 10 月 25-27 日。

10. 田畑博己、松岡多香子、松下 祥。HLA-DR 分子を介したシグナル伝達は B 細胞に Syk の活性化と IgM 産生促進を誘導する。第 45 回日本人類遺伝学会、福岡、2000 年 10 月 25-27 日。

11. 田中芳彦、大山秀樹、松下 祥。コンビナトリアルケミストリーの免疫遺伝学への応用 (1) スーパーアゴニスト同定法の開発。第 45 回日本人類遺伝学会、福岡、2000 年 10 月 25-27 日。

12. 松下 祥、田中芳彦、松岡多香子。コンビナトリアルケミストリーの免疫遺伝学への応用 (2) T 細胞 1 個を材料としたリガンド同定。第 45 回日本人類遺伝学会、福岡、2000 年 10 月 25-27 日。

13. 大山秀樹、西村英紀、目黒道生、竹内加珠、松下 祥。繊維芽細胞が発現する HLA クラス II 分子の役割。第 45 回日本人類遺伝学会、福岡、2000 年 10 月 25-27 日。

14. 山田和博、千住覚、Toshimichi Shinohara、松下 祥、村田恭啓、中面哲也、石原麻美、中村聡、大野重昭、根木昭、西村泰治。疾患感受性が HLA と強く相関する Vogt-小柳-原田病における自己抗原の解析。第 45 回日本人類遺伝学会、福岡、2000 年 10 月 25-27 日。

15. 松岡多香子、田畑博己、松下 祥。HLA-DR, -DQ, -DP 分子は異なる MAP kinase を介して単球を活性化し異なる機能を発揮する。第 30 回日本免疫学会総会・学術集会、仙台、2000 年 11 月 14-16 日。

16. 田畑博己、松岡多香子、松下 祥。HLA-DR 分子を介したシグナル伝達は B 細胞に Syk の活性化と IgM 産生促進を誘導する。第 30 回日本免疫学会総会・学術集会、仙台、2000 年 11 月 14-16 日。

17. 松下 祥、田中芳彦、松岡多香子、中島

敏博。ランダムペプチドとコンビナトリアルケミストリーを用いれば一つの CD4T 細胞が認識するリガンドを同定できる。第 30 回日本免疫学会総会・学術集会、仙台、2000 年 11 月 14-16 日。

18. 三野原元澄、松下 祥、西村泰治、吉良潤一。アジア型多発性硬化症におけるミエリン蛋白自己反応性 T 細胞の解析。第 30 回日本免疫学会総会・学術集会、仙台、2000 年 11 月 14-16 日。

19. Ohyama, H., Meguro, M., Takeuchi, K., Takashiba, S. and Matsushita, S. IFibroblastic cells produce cytokines by signaling through HLA class II molecules without inducing T-cell proliferation. 第 30 回日本免疫学会総会、仙台、2000 年 11 月 14-16 日。

20. 田畑博己、松岡多香子、松下 祥。HLA-DR 分子を介したシグナル伝達は B 細胞に Syk の活性化と IgM 産生促進を誘導する。第 50 回日本アレルギー学会総会、横浜、2000 年 11 月 30 日-12 月 2 日。

21. 松岡多香子、田畑博己、松下 祥。HLA-DR, -DQ, -DP 分子は異なる MAP kinase を介して単球を活性化し異なる機能を発揮する。第 50 回日本アレルギー学会総会、横浜、2000 年 11 月 30 日-12 月 2 日。

22. 松下 祥。HLA-ペプチド複合体研究の新展開。第 1 回東京医科歯科大学学生体応答学セミナー、東京、2000 年 12 月 18 日。

23. 松下 祥、田畑博己、松岡多香子。クラス II HLA を介したシグナル伝達機構の解析。第 13 回日本神経免疫学会、東京、2001 年 2 月 1-2 日。(シンポジウム：自己免疫病と免疫調節の分子機構 -細胞内シグナル伝達とその異常を中心に-)

H.知的財産権の出願・登録状況
特記事項なし

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

鏑田 武志（東京医科歯科大学難治疾患研究所免疫疾患）

研究要旨

SLE患者やSLEモデルマウスBXSBではCD40Lの過剰およびB細胞での異所性の発現が示されている。CD40LをB細胞で異所性発現するCD40LトランスジェニックマウスではSLE様の自己免疫疾患を発症するので、CD40Lの過剰または異所性発現はSLE発症に関与すると考えられる。CD40Lは、骨髄内でのB細胞自己トレランスには影響を与えないが、末梢B細胞の自己トレランスの破綻を誘導する。したがって、末梢B細胞トレランス異常は、SLEのより根本的な治療法の標的となり、さらに、我々のマウス系が末梢トレランス制御によるSLE治療法の開発の良い評価系となることが強く示唆された。

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。

SLE患者やSLE自然発症マウスBXSBではCD40リガンド（CD40L）のT細胞での過剰発現やB細胞での異所性発現が報告されている。我々は、B細胞にCD40Lを異所性発現するCD40Lトランスジェニックマウスを樹立し、昨年度、このマウスで自己抗体の産生や免疫複合体沈着を伴う糸球体腎炎の発症など、SLE様の自己免疫疾患の発症があることを報告した。この結果は、CD40Lの異所性ないし過剰発現が全身性自己免疫疾患の発症に関与することを強く示唆する。本年度は、CD40Lの過剰発現が自己免疫疾患を発症する機構について検索を行い、

SLEのより根本的な治療法を開発する際の標的となる機構を明らかにした。

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。抗DNA IgM H鎖3H9または56Rを発現するトランスジェニックマウスはWeigert博士（Princeton大学）より供与を受けた。トランスジェンの有無については特異的プライマーを用いたPCRにより検索した。

細胞培養：脾細胞を塩化アンモニウム溶液で処理して赤血球を溶解後、抗Thy1抗体（F7D5）、抗CD4抗体（RL172.5）、抗CD8抗体（3.115）と補体で処理してT細胞を除去し、さらにパーコール密度勾配で65%パーコールと70%パーコールの境界面の細胞を回収し、精製B細胞分画とした。精製B細胞 $5-10 \times 10^5$ コを1mlの10%FCS添加RPMI1640培地（50 μ M 2ME, 2mM グルタミンを添加）でLPSとともに培養した。フローサイトメトリー：骨髄細胞の解析には、

PE 標識抗 B220 抗体、FITC 標識抗 IgM 抗体を用いた。脾細胞の解析には FITC 標識抗 CD 2 1 抗体、ビオチン標識抗 CD 2 3 抗体、PE 標識抗 IgM 抗体と CyChrome 標識アビジンの組み合わせを用いた。細胞の解析は FacsCalibur を用いて行った。

ELISA：総 IgM 量は、抗 IgM 抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法により測定した。IgM クラス抗 DNA 抗体は牛胸腺 DNA を固相化し、アルカリフォスファターゼ結合抗 IgM 抗体を用いてクラス別に測定した。

C. 研究結果

CD 4 0 L トランスジェニックマウスの自己トレランスについて検索する目的で、CD 4 0 L トランスジェニックマウスと抗 DNA 抗体トランスジェニックマウス 3 H 9 または 5 6 R と交配した。3 H 9 は種々の L 鎖と会合することにより主に抗一本鎖 DNA 抗体を形成する。5 6 R は 3 H 9 の変異体で、種々の L 鎖と会合することにより、主に抗二本鎖 DNA 抗体を形成する。すでに、Weigert らが報告しているように、5 6 R または 3 H 9 のみを発現するトランスジェニックマウスでは、血清中に自己抗体は検出できなかった。CD 4 0 L / 3 H 9 ダブルトランスジェニックマウスでも血清中に自己抗体の産生は無く、CD 4 0 L が一本鎖 DNA 反応性 B 細胞のトレランスに影響を及ぼさないことが示された。一方、CD 4 0 L / 5 6 R ダブルトランスジェニックマウスでは多量の自己抗体産生を認め、CD 4 0 L の発現が 5 6 R マウスの自己トレランスの破綻を誘導することが明らかとなった。

5 6 R マウスでは、二本鎖 DNA 反応性 B 細胞が骨髄内でクローン除去を受けて死滅するか、レセプターエディティングにより抗原特異性を変化させる。レセプターエディティングを受けた B 細胞は、一本鎖 DNA にのみ反応するようになるか、あるいは自己反応性を失う。なお、3 H 9 マウスで産生される一

本鎖 DNA 反応性 B 細胞および 5 6 R マウスでレセプターエディティングにより産生される一本鎖 DNA 反応性 B 細胞は不活化される。Rag 遺伝子欠損によりレセプターエディティングの起こらない 5 6 R マウスでは、ほとんど全ての B 細胞が骨髄の未熟 B 細胞段階で除去を受ける。したがって、5 6 R マウスの自己トレランスは基本的にはクローン除去によりおこるとされている。CD 4 0 L / 5 6 R ダブルトランスジェニックマウスの骨髄では、5 6 R マウスと同程度の未熟 B 細胞の除去を認めた。この結果は、骨髄の未熟 B 細胞段階でのトレランスは CD 4 0 L の発現により影響を受けないことを示している。

そこで、我々は、末梢リンパ組織の B 細胞について検索を行った。脾細胞のフローサイトメトリーにより、成熟 B 細胞の直接の前駆細胞である移行期 B 細胞と成熟 B 細胞のパーセンテージを求めた。正常マウスでは、未熟 B 細胞数は移行期 B 細胞数の約 8 倍であるが、3 H 9 マウスでは、成熟 B 細胞は移行期 B 細胞の約 3 倍と減少していた。この減少は、不活化された B 細胞が短寿命であるためと考えられる。実際、3 H 9 マウスの脾臓には多数の不活化された一本鎖 DNA 反応性 B 細胞の存在が示されている。5 6 R マウスの脾臓中にも、レセプターエディティングにより産生された一本鎖 DNA 反応性 B 細胞が不活化された状態で存在するが、5 6 R マウスの脾臓での成熟 B 細胞数は移行期 B 細胞の約 1.5 倍にまで減少していた。この結果は、5 6 R マウスでの成熟 B 細胞の減少は、不活化 B 細胞の短寿命のみでは説明できず、自己反応性 B 細胞の一部が移行期 B 細胞から成熟 B 細胞へと分化する段階で除去を受けていることが強く示唆される。さらに、CD 4 0 L / 3 H 9 ダブルトランスジェニックマウスでは脾臓成熟 B 細胞と移行期 B 細胞の比は、3 H 9 とほぼ同じで、CD 4 0 L により脾臓の B 細胞の寿命は変化しないと考えられる。一方、CD 4 0 L 発現により 5 6 R の脾臓成熟 B 細胞の割合は著明に増加し、移行期 B 細胞に対