

200100249A

厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

骨関節分野 関節疾患の原因解明及び発症の予防・治療方法

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 鈴木 登

平成 14 (2002) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	1
主任研究者 鈴木 登	
II. 分担研究報告	
1. 高齢者関節疾患におけるヒト Th1 細胞特異的転写因子 T _{bx} の発現の検討と ドミナントネガティブ T _{bx} を用いた新規治療法の開発	9
聖マリアンナ医大 免疫学・病害動物学 鈴木 登	
2. マウス胚性幹細胞からの軟骨細胞の分化誘導と軟骨細胞を用いた新規治療 法の開発	17
聖マリアンナ医大 免疫学・病害動物学 鈴木 登	
3. 慢性関節リウマチ患者滑液 T 細胞の RANTES への反応について	24
東京大学医科学研究所 森本幾夫	
4. 加齢と自己抗体-疾患モデルマウスを用いた研究	30
東京大学医科学研究所 森本幾夫	
5. 自己抗原 RO52 の T 細胞の IL-2 産生における役割について	41
東京大学医科学研究所 田中廣尋	
6. コラーゲン誘発性関節炎マウスに対する JunD 遺伝子療法	47
聖マリアンナ医大 免疫学・病害動物学 岳野 光洋	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	53
IV. 平成 13 年度班員名簿	59

I. 總 括 研 究 報 告

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

骨関節分野 関節疾患の原因の解明及び発症の予防・治療方法
(H12-長寿-031)

主任研究者 鈴木 登 聖マリアンナ医科大学免疫学・病害動物学・教授

研究要旨 現在の日本は既に高齢化社会となっており、高齢者の健康的な生活を増進できる施策が望まれている。慢性関節リウマチ(RA)や変形性関節症(OA)などの多発性関節疾患は、高齢者の身体の障害を引き起こしさらに介護の必要度を増加させる。高齢者の多発性関節疾患の原因解明を行い、新規の予防・治療法の開発が望まれている。RAではインターフェロン(IFN)- γ を産生するヘルパー T(Th)1 型細胞が関節滑膜に浸潤して発症に関与する。関節炎発症比較的早期の滑膜浸潤リンパ球では Th1 型細胞機能を制御する Th1 細胞特異的な転写因子 Txk が過剰に発現していた。過剰な Txk 発現を抑制することができるドミナントネガティブ txk 発現ベクターを作成し、Th1 型細胞機能を抑制することができた。今後、実験動物を用いて txk 発現抑制が関節炎の治療に応用できるのかを検討することが可能になった。

RA 患者関節滑液 T リンパ球のケモカイン受容体の発現とその機能を解析した。RA 滑液 T リンパ球では RANTES というケモカインに対する細胞遊走能の低下と RANTES に対する受容体である CCR5 の発現動態に異常を認め、これが RA における滑膜リンパ球浸潤に一定の役割を果たしていると考えられた。

高齢者においては高率に自己抗体の出現を認めるが、高齢者での自己抗体産生機構の詳細は不明である。そこで加齢に伴い高率に自己抗体を産生する MRL/lpr 又クレオバインディンノックアウトマウスにおいて、細胞核クロマチン抗原を用いて、加齢に伴う抗クロマチン抗体の変動を検討した。その過程で加齢に伴い出現する新規の自己抗原・自己抗体系を見出した。

RO52/SS-A 自己抗原に対する自己抗体は慢性関節リウマチやシェーグレン症候群患者血清中に特徴的に同定される。この RO52/SS-A 抗原が生体内で果たす役割について検討を行った。RO52/SS-A 抗原は T リンパ球のサイトカイン産生に繋がるシグナル経路の新しい構成成分であり、T 細胞活性化のシグナル伝達や高齢者免疫異常の解明に重要な分子と考えられた。

マウス胚性幹細胞から bone morphogenetic protein を用いて軟骨細胞を分化誘導することが可能になった。塩酸投与により膝関節軟骨を破壊したマウス膝関節に軟骨細胞移植を行なった。その結果、膝関節内での移植軟骨細胞の生着が確認できた。今後の軟骨細胞を用いた高齢者関節障害に対する再生医療の検討が可能になった。

分担研究者

森本 幾夫
東京大学医科学研究所・教授

田中 廣壽
東京大学医科学研究所・助教授

岳野 光洋
聖マリアンナ医科大学・講師

研究目的

日本においては少子・高齢社会を迎えている。そのような中で高齢者が日常生活において不便なく、健康的に生活できるような施策が望まれている。なかでも多発関節痛・関節炎をもたらす慢性関節リウマチ(RA)や変形性関節症(OA)などの関節疾患は高齢者の日常的な活動性を低下させるのみならず、進行した場合には介護の必要度を大きく増加させる。

高齢者の関節疾患においては現在用いられている治療法では治癒を期待する事ができないのみでなく、疼痛のコントロールすら難しいことも多い。即ち、高齢者の関節疾患の原因解明と予防・治療法の開発は難治性疼痛の緩和につながり、高齢者の生活の質の改善と、高齢者社会の活性化に必須である。

本研究では高齢者 RA を対象に、関節局所での免疫異常の解析および滑膜細胞増殖異常に関わる転写因子の解析を行なう。その知見に基づいてそれらの是正方法の確立を目指して研究を進める。さらに最近の再生医学の進歩にも配慮した研究を行う。

RA では T リンパ球が RA 発症の引き金となり、また RA の慢性炎症の維持に作用する。この異常な細胞は IFN- γ を産生する Th1 型に分類され、チロシンリン酸化酵素 Txk によりその機能が調

節されている。昨年度の研究から RA の T リンパ球機能異常に Txk が重要な役割を果たすことが明らかになった。本年度は RA 滑膜細胞浸潤リンパ球で Txk の過剰発現を引き起こす要因を検討する。さらに、アンチセンス遺伝子導入は炎症局所に応用するのが難しいことが判明したので、ドミナントネガティブ Txk 発現ベクターを作成し、関節炎モデル動物での治療研究を行う。ドミナントネガティブ Txk 遺伝子導入により Txk の機能調節を行い RA の T 細胞機能異常を是正することが可能であるかを検討する。この遺伝子治療は RA の慢性化を阻止できる最も有望な治療法と期待される。

高齢者における関節疾患では関節軟骨に異常をきたす場合が大多数で、外科的治療法を除けば、臨床的にはこれら軟骨の異常に対する有効な治療法はないといっても過言ではない。実際、高齢者関節病変の治療には難渋するケースが多い。さらに近年の再生医学・医療の進展に伴い、再生医療の骨・関節疾患での応用を目指して、マウス胚性幹細胞より軟骨細胞を分化誘導した後、これを変形性関節炎のモデル動物に投与し、その生着と治療効果を検討する。

RA 滑膜細胞では転写因子の発現に異常があり、JunD 発現の低下、NF- κ B、AP-1、CREB の過剰活性化が RA 病態の進行、悪化に関与する。なかでも JunD 発現の低下が炎症病変の進展に重要に関わることを既に明らかにした。本年度はコラーゲン関節炎モデルマウスを用いて JunD 発現の是正が関節病変の沈静化に結びつくのかを検討する。これら転写因子の異常活性化機構を解明し、転写因子活性を効率よく抑制する手法を開発する。

白血球の遊走をもたらす様々な細胞から産生されるペプチドをケモカインと呼ぶ。RA 関節局所でのケモカインの分泌は炎症反応の確立に必須のステップであるにも関わらず、RA 関節局所におけるケモカインと細胞遊走の関連は未だ不明である。そこで RA 患者関節滑液 T リンパ球のケモカイン受容体の発現とその機能を解析する。

高齢者においては高率に自己抗体の出現を認めるが、高齢者での自己抗体産生機構の詳細は不明である。その点を解明するべく加齢に伴い高率に自己抗体を産生する MRL/lpr ヌクレオバインディングノックアウトマウスにおいて、細胞核クロマチン抗原を用いて、加齢に伴う抗クロマチン抗体の変動を検討する。

RO52/SS-A 自己抗原に対する自己抗体は慢性関節リウマチやシェーグレン症候群患者血清中に特徴的に同定される。この RO52/SS-A 抗原が生体内で果たす役割についてはまったく分かっていない。そこで RA やシェーグレン症候群患者の T リンパ球活性化異常に RO52/SS-A 抗原が一定の役割を果たすのか、本年度は Jurkat 細胞株を用いて検討を行なった。

これらの検討を通じて、関節疾患の原因の解明及び発症の予防・治療方法の確立を行う。

研究方法

1. マウス胚性幹細胞からの軟骨細胞の分化誘導と軟骨細胞を用いた新規治療法の開発

マウス ES 細胞をゲラチンコートディッシュ、あるいはフィブロネクチンコートディッシュ上で BMP-2、BMP-4 とともに培養した。

軟骨組織に特異的に発現する転写因

子と collagen の mRNA は逆転写酵素を用いて PCR 法で増幅した。アルシアンプルー染色は常法に従って行った。

正常マウス膝関節に塩酸を投与し、関節滑膜細胞を脱落させ、変形性関節症モデルとした。膝関節内に ES 細胞から分化誘導させた軟骨細胞を移植し、その移植細胞の生着を組織学的に検討した。

2. 高齢者関節疾患におけるヒト Th1 細胞特異的転写因子 Txk の発現の検討とドミナントネガティブ Txk を用いた新規治療法の開発

正常人 T リンパ球および Jurkat 細胞に IL-2 (2ng/ml), IL-4 (100ng/ml), IL-10 (10ng/ml), IL-12 (4ng/ml), IL-13 (10ng/ml), IL-18 (50ng/ml), IFN- γ (1000u/ml) をそれぞれ添加し、24 時間細胞を培養し、1 時間ごとに回収した。回収した細胞から mRNA と細胞質蛋白を回収した。

Txk プロモーター領域を PCR 法によりヒトリンパ球より増幅した後、ルシフェラーゼ遺伝子の 5' 側に挿入したベクター (pTxk promoter (-1554)-luc) を作成した。同様にして pTxk promoter (-1014)-luc と pTxk promoter (-534)-luc を作成した Jurkat 細胞に pRSV-CAT と共に pTxk promoter-luc を電気穿孔法にて導入した。導入後 40 時間培養を継続した。その後各種サイトカインと共に 8 時間培養し、誘導されるルシフェラーゼ活性を測定した。

野生型 Txk 発現ベクターを鋳型として複数の突然変異体を作成した。それぞれの突然変異について、目的とする変異がプライマーの中央に位置するようにデザインしたプライマー 1 組 (センス鎖とアンチセンス鎖) と PfuTurbo DNA ポリメラーゼを用いて Txk 発現ベクタ

一を増幅した。増幅した産物を DpnI 制限酵素で処理し、鑄型とした野生型 Txk 発現ベクターを完全消化し、目的とする変異型ベクターを回収した。

3. コラーゲン誘発性関節炎マウスに対する JunD 遺伝子療法を検討

DBA1/J(6 週令雌)に牛 II 型コラーゲン 100 μ g を完全フロイトアジュバントとともに尾根部皮内に投与し、3 週後に同様の追加免疫を行い、コラーゲン誘発性関節炎を誘導した。

コラーゲン誘発性関節炎モデルマウス作成過程の免疫前後、すなわち免疫前 24 時間、免疫後 24 時間および 72 時間に 20 μ g の pRSV-CAT あるいは pRSV-junD を筋肉内投与した。

関節炎は四肢関節の腫脹を肉眼的に評価した。各肢ごと全く変化のないものを 0 点とし、1 指の腫脹を 1 点、2 指以上の腫脹あるいは足全体の僅かな浮腫を 2 点、足全体の激しい腫脹を 3 点と評価し、四肢関節の点数の合計 (12 点満点) を関節炎スコアとした。

血清 IgG 型抗 II 型コラーゲン抗体は ELISA 法にて測定した。

4. 慢性関節リウマチ患者滑液 T 細胞の RANTES への反応についての検討

ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) は Ficoll-Hypaque 法にて分離した。滑液中の単核細胞もヒザ関節よりのヘパリン含有滑液から分離した。T 細胞の分離は PBMC 中のマクロファージをディッシュに接着させて除き、さらに CD19、CD11b 及び CD56 抗体を用いて、マグネティックビーズを用いたネガティブ選択にて行った。CD45RO 陽性 T 細胞は CD45RA 抗体を用いたネガティブ選択法にて行った。H9T 細胞株、ヒト血管内皮細胞株である ECV304 細胞は ATCC より得た。

リンパ球集団のフローサイトメトリーによる解析は直接及び間接免疫蛍光染色法にてリンパ球を染色し、FACS-Calibur にて行った。

免疫沈降及び免疫プロットは細胞を融解した後、CCR5 抗体を結合したプロテイン G セファロースで免疫沈降し、12% SDS-PAGE で分離した後、トランスファーした。一次抗体、二次抗体と反応させた後、enhanced chemiluminescence (ECL) にて検出した。

細胞遊走は 24 ウェルで 3 μ m の穴サイズの 2 チャンバーカルチャープレートを用いて行った。

5. 加齢と自己抗体-疾患モデルマウスを用いた研究

マウスリンパ系細胞株 KML 1 細胞から核を分離、micrococcal nuclease (MN) で一定時間消化、不溶画分に 0.25 M NaCl を含む Tris 緩衝液 (pH 7.4) を添加、その結果得られた可溶画分を Superdex 200 ゲル濾過カラムにかけ、そのピークを集めた。モノヌクレオソーム (一般的にはこれを NS と称している) はサンプル投入後 11-12 分時の所に溶出された。この画分は限外濾過法で濃縮後、2-ME とプロテアーゼ阻害剤カクテルを添加、4 度 C で保存した。一方ヌクレオソーム (ns) DNA は上記の手法でえられた NS をさらに SDS とプロテイナーゼ K で消化、NaI 法 nsDNA を抽出した。以上のクロマチン成分に対する自己抗体は Immulon 2HB を固相用プレートとして使用、ELISA を確立した。

6. 自己抗原 RO52 の T 細胞の IL-2 産生における役割

RO52 の N 末端の GFP タグ型は PCR 法にて作成し、ほ乳類発現ベクターでサ

ブクローンした。Large T を発現する Jurkat LT 細胞を用いて X-tream GENE Q2 トランスフェクション試薬にて遺伝子導入を行った。

GFP 及び RO52GFP トランスフェクタント細胞は蛍光顕微鏡にて解析した。核は SYTO92 にて染色した。画像は LSN410 レーザースキャンを持つ Nikon ECLIPSE E80 蛍光顕微鏡にて解析した。

Jurkat LT 細胞及び GFP あるいは RO52・GFP トランスフェクタント Jurkat 細胞は CD3 抗体、CD28 抗体、CD3 及び CD28 抗体の組み合わせで刺激した。さらに CD3 抗体と PMA あるいは PMA のみ Ionomycin と PMA の組み合わせでも刺激した。刺激後 IL-2 産生はフローサイトメトリー及び ELISA にて同定した。

Jurkat、GFP トランスフェクタント、GFP-RO52 トランスフェクタント

Jurkat T 細胞に pBR322-3XNFAT-Luc vector、NF- κ B Luc vector、AP-1 Luc vector をトランスフェクトした。その後これらトランスフェクタントは CD3 抗体、CD28 抗体、あるいはその組み合わせ、PMA などで刺激した。一晩培養後、細胞を融解し、上清は Promega ルシフェラーゼアッセイキットにて NFAT、NF- κ B、AP-1 などのアッセイを行った。

7. 倫理面での配慮

血液、関節液、滑膜組織を含む生体サンプルの実験について患者には研究目的や趣旨を十分説明し、インフォームドコンセントを得た上で行った。さらに患者のプライバシーに関する情報の守秘義務を徹底するため個々の研究者は検体と ID 番号のみを用いて解析し、患者のプライバシーに関する情報が守られ

るように注意した。動物実験に関しては、実験前の飼育、実験中、実験後にいたるまで科学的かつ倫理的に対処し、動物の苦痛を排除するための麻酔による安楽死等の手法を用いた。

研究成果および考案

1. マウス胚性幹細胞からの軟骨細胞の分化誘導と軟骨細胞を用いた新規治療法の開発

マウス ES 細胞を 20%FCS を含む分化誘導用の培養液中で 2~4 日間培養することで、浮遊状態で球状の ES 細胞塊、EB を作成することができた。EB を 0.1%ゲラチンをコートしたプレートに移した後、bone morphogenetic protein (BMP)-2 あるいは BMP-4 を添加した。培養 2 週間目の EB では、軟骨細胞に特異的と考えられるアルシアンブルー陽性領域が出現した。抗マウス II 型コラーゲン抗体を用いて免疫細胞染色を行うと約半数が軟骨細胞に分化誘導されたことが明らかになった。残りの細胞も間葉系の細胞と考えられた。BMP 存在下に培養した EB では軟骨細胞特異的な転写因子である high-mobility-group (HMG) box 蛋白である Sox-9、Hox 遺伝子、basic-helix-loop-helix (bHLH) 蛋白である scleraxis の発現を認めた。同時に軟骨細胞特異的な II 型コラーゲンと IX 型コラーゲンの mRNA 発現を認めた。次に分化誘導した軟骨細胞の治療応用をモデル動物を用いて検討した。

あらかじめ塩酸投与により作成した変形性関節症のモデルマウス関節内に、分化誘導した軟骨細胞を移植することで、病変部関節面への軟骨細胞の生着が認められた。移植した関節内で奇形腫発生を認めることは無かった。この成績は

ES 細胞から分化誘導した軟骨細胞そのものが関節疾患の治療に応用可能であることを示している。

2. 高齢者関節疾患におけるヒト Th1 細胞特異的転写因子 Txk の発現の検討とドミナントネガティブ Txk を用いた新規治療法の開発

昨年度に永淵は慢性関節リウマチ滑膜浸潤リンパ球での Txk 発現を検討し、滑膜浸潤リンパ球では IFN- γ の産生と Txk の発現亢進を認め、疾患対照として検討した変形性関節症関節滑膜では IFN- γ の産生も Txk の発現も認められなかったと報告した。本年度は Txk の発現亢進に関わる要因を同定すべく、Txk 遺伝子の転写に関わるサイトカインを網羅的に検討した。その中では Th1 サイトカインである IFN- γ , IL-12, IL-18 が Txk の発現亢進に関与することが明らかになった。既に慢性関節リウマチ関節局所では IL-12, IL-18 の産生亢進が知られており、Txk 発現亢進に局所でのサイトカイン産生亢進が関与するものと考えられた。

慢性関節リウマチ滑膜浸潤リンパ球 Txk の発現亢進を是正する目的で、ドミナントネガティブ Txk 発現ベクターの作成を試みた。その結果、Txk の 299 番目のリジン残基をグルタミン酸残基に置換した変異 Txk は内因性 Txk の活性を抑制できることが明らかになった。本年度の成績から、この変異 Txk を遺伝子導入することで関節炎を治療することができるのか実験動物で検討することが可能になった。この成績は RA の病態形成に Txk が関与することを示し、ドミナントネガティブ Txk 発現ベクターを用いて RA の治療が可能であることを示唆する。

3. コラーゲン誘発性関節炎マウスに対

する JunD 遺伝子療法

慢性関節リウマチでは関節病変における滑膜細胞の異常活性化機構に転写因子 AP-1 は重要な役割を果たしている。我々は先にこの AP-1 活性を制御する JunD 遺伝子を RA 滑膜細胞株に導入することによって細胞増殖、炎症性サイトカインおよび蛋白分解酵素の産生が抑制されることを見出した。本年度はその知見に基き、JunD 遺伝子発現ベクター、pRSV-junD をコラーゲン誘発性関節炎モデルマウスに投与するその治療効果を検討した。本年度は JunD 遺伝子の治療的効果を検討する目的で、あらかじめ関節炎を発症させた後、遺伝子投与を行った。JunD 遺伝子投与により関節炎の症状軽減が認められた。そのメカニズムとして免疫系が関与するのかを検討した。JunD 遺伝子投与は血清中の IgG 型抗 II 型コラーゲン抗体価には影響しなかった。以上の結果から、JunD 遺伝子発現ベクターは直接、滑膜細胞の機能を制御することにより、滑膜炎の抑制をもたらすものと考えられた。

4. 慢性関節リウマチ患者滑液 T 細胞の RANTES への反応について

慢性関節リウマチ患者滑液 T 細胞は CCR5, CXCR4 及び CD45RO 陽性細胞が増加し、さらに自然細胞遊走活性が亢進していた。CCR5 のリガンドである RANTES ではさらなる遊走亢進は認められないが、CXCR4 のリガンドの SDF-1 α では遊走亢進は認められた。滑液 T 細胞の Cas-L のチロシンリン酸化は亢進していた。また H9T 細胞株は RANTES 刺激により FAK のみならず Cas-L のチロシンリン酸化の亢進及び遊走能の亢進も認められた。滑液 T 細胞の RANTES による CCR5 のダウンモデュレーションは低下し、CCR5 のリサ

イクルは亢進していた。末梢血由来の CD45RO 陽性 T 細胞を IL-2 と培養したところ、RANTES 刺激細胞遊走能の低下、自然細胞遊走の亢進、CD25 の発現増加、CCR5 の発現動態異常など、RANTES 刺激後の滑液 T 細胞で認められたような結果が得られた。これらのことから RA 患者の CCR5 陽性滑液 T 細胞は RANTES による細胞遊走反応への低下及び CCR5 の発現動態異常などが認められ、末梢血 T 細胞とは異なった性格を示していることが明らかになった。

5. 加齢と自己抗体-疾患モデルマウスを用いた研究

全身性エリテマトーデス(SLE)では加齢に伴う免疫学的変化と類似した変化が認められ老化の免疫学的側面を反映すると考えられる。例えば自己抗体は高齢者では若年者より高率に認められる。SLE では抗クロマチン抗体が認められる。SLE 発症の前後で抗クロマチン抗体の血中上昇が認められる例が多い。実験動物では SLE 病態を 100% 発現するモデルとして MRL/lpr マウスが知られている。分担研究者が発見した Nuc という遺伝子を欠損させると当該マウスの腎・血管病変の著しい増悪が見られる。本研究においては当該マウスの細胞核クロマチン抗原を用い、加齢に伴う抗クロマチン抗体の変動を新しい手法で調べた。その結果従来の MRL/lpr マウスでは検出できない新規の自己抗原・自己抗体系が加齢に伴い出現することが明らかになった。今後、加齢を反映する新規自己抗体を発見する可能性がある。特にこの自己抗体は抗体活性以外の生物活性、クロマチン関連老廃物の処理に関わる老化予防作用も期待される。

6. RA やシェーグレン症候群患者の T

リンパ球活性化異常に RO52/SS-A 抗原が果たす役割の検討;自己抗原 RO52 の T 細胞の IL-2 産生における役割について

自己抗体である RO52 抗体はシェーグレン症候群や全身性エリテマトーデス患者血清中などに頻回に同定されるがその対応抗原である RO52 の生理的な機能は未だ明らかでない。RO52 の Jurkat T 細胞トランスフェクタントを用いて RO52 は CD28 由来シグナルにおける IL-2 産生に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

RO52 を Jurkat T 細胞に強発現させると CD3 と CD28 とのクロスリンクにて IL-2 産生を非常に亢進させた。また RO52 トランスフェクタントでは CD28 刺激のみでも有意に IL-2 産生が誘導された。さらに RO52 の発現により NF- κ B や NFAT 転写活性を増強させた。もっと重要なことには RO52 は CD28 刺激による IL-2 の産生や分泌を調節することが明らかになった。さらに RO52 の細胞内局在は CD28 刺激によりドラマティックに変化し、RO52 は細胞内に凝集しかつ有意な量の RO52 は核内に移行した。これらの結果から RO52 はサイトカイン遺伝子特に NF- κ B の活性を通じて転写活性を調節する役割を演じ、結果的にサイトカイン産生やいろいろな T 細胞機能発現に貢献していると考えられた。

本年度の研究成果は次のとおりである。

過剰な Txk 発現を抑制することができるドミナントネガティブ txk 発現ベクターを作成し、期待どおりに IFN- γ 産生を抑制することができた。今後、実験動物を用いて txk 発現抑制が関節炎の治療に応用できるのかを検討するこ

とが可能になった。

RA 滑液 T リンパ球では RANTES に対する細胞遊走能の低下と RANTES に対する受容体である CCR5 の発現動態に異常を認め、これが RA における滑膜リンパ球浸潤に一定の役割を果たしていると考えられた。

加齢に伴い高率に自己抗体を産生する MRL/lpr ヌクレオバインディンノックアウトマウスにおいて、細胞核クロマチン抗原を用いて、加齢に伴う抗クロマチン抗体の変動を検討した。その過程で加齢に伴い出現する新規の自己抗原・自己抗体系を見出した。

RO52/SS-A 自己抗原に対する自己抗体は慢性関節リウマチやシェーグレン症候群患者血清中に特徴的に同定される。RO52/SS-A 抗原は T リンパ球のサイトカイン産生に繋がるシグナル経路の新しい構成成分であり、T 細胞活性化のシグナル伝達や高齢者免疫異常の解明に重要な分子と考えられた。

マウス胚性幹細胞から BMP を用いて軟骨細胞を分化誘導し軟骨細胞移植を行なった。その結果、膝関節内での移植軟骨細胞の生着が確認できた。今後の軟骨細胞を用いた高齢者関節障害に対する再生医療の検討が可能になった。

II. 分 担 研 究 報 告

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業） 分担研究報告書

高齢者関節疾患におけるヒト Th1 細胞特異的転写因子 Txk の発現の検討とドミナントネガティブ Txk を用いた新規治療法の開発

主任研究者 鈴木 登 (聖マリアンナ医大 免疫学・病害動物学)
共同研究者 岳野光洋 (聖マリアンナ医大 免疫学・病害動物学)
武半優子 (聖マリアンナ医大 免疫学・病害動物学)
柏倉淳一 (星薬科大学 生化学)

高齢者における慢性関節リウマチや変形性関節症などの関節疾患の原因解明と予防・治療法の開発を目指して、昨年度に永淵は慢性関節リウマチ滑膜浸潤リンパ球での Txk 発現を検討し、滑膜浸潤リンパ球では IFN- γ の産生と Txk の発現亢進を認め、疾患対照として検討した変形性関節症関節滑膜では IFN- γ の産生も Txk の発現も認められなかったと報告した。本年度は Txk の発現亢進に関わる要因を同定すべく、Txk 遺伝子の転写に関わるサイトカインを網羅的に検討した。その中では Th1 サイトカインである IFN- γ 、IL-12、IL-18 が Txk の発現亢進に関与することが明らかになった。慢性関節リウマチ滑膜浸潤リンパ球 Txk の発現亢進を是正する目的で、ドミナントネガティブ Txk 発現ベクターの作成を試みた。その結果、Txk の 299 番目のリジン残基をグルタミン酸残基に置換した変異 Txk は内因性 Txk の活性を抑制できることが明らかになった。本年度の成績から、この変異 Txk を遺伝子導入することで関節炎を治療することができるのか実験動物で検討することが可能になった。

A. 研究目的

日本は長寿・高齢化社会を迎え、高齢者の健康的な生活を維持・増進できる施策が必要になっている。多発関節痛・関節炎をもたらす慢性関節リウマチや変形性関節症などの関節疾患は高齢者の日常的な活動性を低下させ、介護の必要度を増加させる。高齢者の関節疾患の原因解明と予防・治療法の開発は難治性疼痛の緩和につながり、高齢者の生活の質の改善と高齢者社会の活性化に必須である。従来の内科的治療では慢性関節リウマチのみならず変形性関節症においても関節病変は寛恕にしかし確実に進行する。これらを克服するために新たな治療的アプローチを確立し、さらに各種薬剤で慢性関節リウマチ、変形性関節症罹患

関節の治療法の確立をめざす。慢性関節リウマチでは免疫異常として関節に浸潤する Tリンパ球が特徴的である。

ヘルパー T 細胞は、産生するサイトカインの種類によって Th1 型と Th2 型に分類される。Th1 細胞はインターロイキン(IL)-2、腫瘍壊死因子(TNF)- β 、インターフェロン(IFN)- γ などを産生することでマクロファージを活性化したり、細胞傷害性リンパ球を誘導し、主として細胞性免疫に関与している。これに対し、Th2 細胞はIL-4、IL-5、IL-10、IL-13などを産生することで B 細胞の増殖と分化を支持し、抗体産生を誘導する液性免疫に関与している。Th1/Th2 細胞は、それぞれのサブセットの細胞が産生するサイトカインにより、互いの活性を制

御し合いながら生体防御機構として働いている。

Th1/Th2 細胞のバランスの崩れが様々な感染症、自己免疫性疾患やアレルギー疾患の発症や病態形成に関与している。例えば、代表的なヒトの全身性自己免疫疾患である慢性関節リウマチは関節滑膜を病変の主座とする慢性疾患で、Th1 細胞の過剰な活性化によって引き起こされる。この過剰な Th1 細胞機能亢進を是正することが慢性関節リウマチの新規治療法となる可能性が高い。そのためには、Th1/Th2 細胞の分化を制御する機構を明らかにすることが重要であり、主任研究者はこの Th1/Th2 細胞の分化に重要な鍵を持つ Txk に着目した。

Txk は、Btk, Bmx, Fik, itk などが属する Tec family チロシンリン酸化酵素 (チロシンキナーゼ) の一つで主に T リンパ球に発現しサイトカイン産生を選択的に調節している。ヒト T リンパ球上にも Txk の発現が認められ、特に Th1、Th0 細胞に特異的に発現し、IFN- γ の産生を誘導し、Th1 細胞の機能発現に重要な役割を担っている。昨年度に永淵は、慢性関節リウマチ患者関節浸潤 T リンパ球における Txk の発現を検討し、Txk の発現異常を報告した。本年は Txk の発現異常をもたらす要因の解析と、Txk の発現異常を人為的に是正するためにドミナントネガティブ Txk の作製を行い、モデル動物での治療応用の基礎的検討を行なうことを目的とした。

B. 研究方法

(1) メッセンジャー RNA (mRNA) の回収および RT-PCR 法

正常人 T リンパ球および Jurkat 細胞 1×10^6 個に IL-2 (2ng/ml), IL-4 (100ng/ml), IL-10 (10ng/ml), IL-12 (4ng/ml), IL-13 (10ng/ml), IL-18 (50ng/ml), IFN- γ (1000u/ml) をそれぞれ添加し、24 時間細胞を培養し、1 時間ごとに回収した。回収した細胞は、テオシン酸グアニジンを加え溶解し、セシウムクロライド溶液に重層し、超遠心機で 85000r.p.m.4 時間遠心した。遠心後、total

RNA を回収した。この RNA に、oligo dT primer と MMLV reverse transcriptase を加え 37°C で酵素を反応させ、cDNA を合成した。Txk または β -actin 特異的 primer を加え、PCR を行った。PCR 産物は 2% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色しバンドを確認した。

(2) ルシフェラーゼ法を用いた Txk プロモーターの機能解析

Txk プロモーター領域を PCR 法によりヒトリンパ球より増幅した後、ルシフェラーゼ遺伝子の上流に挿入したベクター (pTxkpromoter(-1554)-luc) を作成した。同様にして pTxkpromoter(-1014)-luc と pTxkpromoter(-534)-luc を作成した Jurkat 細胞に pRSV-CAT と共に pTxkpromoter-luc を電気穿孔法にて導入した。導入後 40 時間培養を継続した。その後各種サイトカインと共に 8 時間培養し、誘導されるルシフェラーゼ活性を測定した (図 1)。

(3) ドミナントネガティブ Txk ベクターの作成

野生型 Txk 発現ベクターを鋳型として以下に示す突然変異体を作成した。それぞれの突然変異について、目的とする変異がプライマーの中央に位置するようにデザインしたプライマー一組 (センス鎖とアンチセンス鎖) と PfuTurbo DNA ポリメラーゼを用いて Txk 発現ベクターを増幅した。増幅した産物を DpnI 制限酵素で処理し、鋳型とした野生型 Txk 発現ベクターを完全消化し、目的とする変異型ベクターを回収した。目的とする突然変異がベクターに導入されたことは DNA シークエンス解析から確認した。

作成に用いたプライマーは次の通りである。

txk-K299E セン ス 鎖 5'-
CATATCCAGGTAGCTATCGAGGCCATCA
ATGAAGGCTCC-3',

ア ン チ セ ン ス 鎖 5'-
GGAGCCTTCATTGATGGCCTCGATAGCT
ACCTGGATATG-3'.

txk-K121E センズ鎖 5'-
AATCCTCACTGGTGGGAGGCAAGAGACC
GTTTG-3'

アンチセンス鎖 5'-
CAAACGGTCTCTTGCCTCCCACCAAGTGA
GGATT-3'.

txk-Y91A センズ鎖 5'-
CCAAGTCAAGGCACTTGCTGATTTTCTG
CCCAGAG-3'

アンチセンス鎖 5'-
CTCTGGGCAGAAAATCAGCAAGTGCCTT
GACTTGG-3'.

txk-Y420A センズ鎖 5'-
GTTTTGGATGATGAGGCTGTCAAGTCTTT
TGGAG-3'

アンチセンス鎖 5'-
CTCCAAAAGAACTGACAGCCTCATCATC
CAA AAC-3'.

(4)倫理面の配慮

血液などの生体サンプルを用いた実験については正常供血者に研究目的や趣旨を良く説明し、インフォームドコンセントを得た上で行なった。個人のプライバシーに関する情報の守秘義務を徹底するため、個々の研究者は検体と標識番号のみを用いて解析し、プライバシーに関する情報が守られるように注意した。動物実験に関しては、実験前の飼育、実験中、実験後に至るまで科学的かつ倫理的に対処し、動物の苦痛を排除するための麻酔による安楽死等の方法を用いた。

C.研究結果

(1) T リンパ球における Txk の発現に対するサイトカインの影響

昨年度に永淵は慢性関節リウマチ患者では滑膜浸潤リンパ球での Txk 発現が亢進していることを報告した。本年度は、この Txk 発現亢進の原因を検討するべく研究を開始した。はじめに Jurkat 細胞のサイトカイン刺激による Txk mRNA の発現を経時的に RT-PCR 法で検討した。Txk の発現は、刺激 18 時間後に Th1 サイトカインである IL-12, IL-18, IFN- γ で増強し、Th2 サイト

カインである IL-4, IL-13 で抑制された。IL-2, IL-10 は、Txk mRNA の発現に影響を与えなかった。ヒト末梢血 T リンパ球では Jurkat 細胞と同様に刺激 18 時間後に IL-12, IL-18, IFN- γ で、Txk mRNA の発現が増強し、IL-4, IL-13 で抑制した。ヒト末梢血 T リンパ球における Txk 蛋白の発現に対するサイトカインの影響について Western Blot 法、および免疫細胞染色を用いて検討したが両者でもほぼ同様の結果を得た。

(2) Txk 遺伝子転写に対するサイトカインの影響

Jurkat 細胞に pTxkpromoter(-1014)-luc を電気穿孔法で導入し、サイトカインを添加後のルシフェラーゼ活性を評価した。IL-12, IL-18, IFN- γ では Txk の遺伝子転写は亢進することが明らかになった。一方、IL-4, IL-13 では逆に転写は抑制された。この中で、Txk のプロモーター上には STAT の結合部位が複数存在し、これらが作用していることが示唆された (図 1、図 2)。

(3) コラーゲン関節炎における関節浸潤リンパ球での Txk 発現の検討

慢性関節リウマチ滑膜浸潤リンパ球で Txk 発現が亢進していることは既に報告した。モデル動物での治療研究を行なう目的で、マウスにコラーゲン関節炎を誘導した。コントロールマウスと関節炎マウス足関節からリンパ球を回収し、RT-PCR 法で Txk の発現を検討した。その結果、コラーゲン関節炎マウス関節浸潤リンパ球においても Txk の発現が亢進していることが明らかになった。

(4) ドミナントネガティブ Txk の作成

Jurkat 細胞に IFN- γ プロモーター+ルシフェラーゼプラスミドと共に、野生型や種々の変異体 Txk を導入した。マイトゲンである PHA 刺激後に誘導されるルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、txk-K299E は内因性の Txk 活性を抑制できることが明らかになった (図 3)。

D.考察

T 細胞は免疫応答の主役であり、特にへ

ルパー T 細胞は免疫応答の調節に重要な役割を果たしている。細胞性免疫に関わる Th1 細胞と、抗体産生に代表される液性免疫を担う Th2 細胞が相互に調節しあいながら生体の免疫応答が起こる。一方、感染症、自己免疫疾患、アレルギー疾患など免疫関連疾患において Th1/Th2 バランスの偏りが認められており、疾患の発症や病態形成に大きく関与している。

この Th1/Th2 細胞のバランスの崩れが様々な疾患の原因となっており、慢性関節リウマチ患者では Th1 細胞の過剰な活性化によって病態が形成される。Txk は Tec family チロシンキナーゼの一つで、Th0, Th1 細胞に特異的に発現し、Th1 サイトカインである IFN- γ の産生を選択的に調節し、Th1 細胞の機能発現に重要な役割を担っている。今回、慢性関節リウマチ関節病変部における Txk 過剰発現の原因を解明するため、正常人末梢血 T リンパ球および Jurkat 細胞における Txk の発現に対する Th1/Th2 サイトカインの影響を検討した。その結果、Txk は Th1 サイトカインである IL-12, IL-18, IFN- γ により発現が増強し、Th2 サイトカインである IL-4, IL-13 で発現が低下することが明らかになった。そして、そのような変化は Txk 遺伝子の転写レベルで調節されていた。既に、慢性関節リウマチ患者関節局所では、IL-12 や IL-18 の過剰産生が知られている。おそらくはリウマチ局所ではこれらのサイトカインに反応して Txk の過剰発現が認められるものと考えられる。

今回の II 型コラーゲン関節炎モデルマウスにおいても Txk の過剰発現を認め、Th1 細胞機能過剰が重要な役割を担っていることがモデル動物でも示された。昨年度に永淵は慢性関節リウマチ患者滑膜浸潤リンパ球において Txk は発現しており、IFN- γ の発現も認められたと報告している。即ちヒトにおいてもマウスにおいても関節炎発症に Txk の過剰発現が関与することが明らかになった。そこで Txk の過剰活性を抑制することが関節炎の治療をもたらすのか、モデル動物を用いて検討する必要がある。本

年度は Txk の機能を抑制することができるドミナントネガティブ Txk の作成を試みた。その結果、野生型 Txk に突然変異を導入した txk-K299E がドミナントネガティブ Txk として使用できることを明らかにした。次年度はこのドミナントネガティブ Txk を関節炎モデル動物に投与しその治療効果を検討する予定である。

E 結論

慢性関節リウマチ患者のみでなく、関節炎のモデル動物でも Txk の発現に異常が認められる事が明らかになった。今後、ドミナントネガティブ Txk 遺伝子の導入により抗原非特異的な様式で Th1/Th2 バランスを是正することが可能であるのか、そしてそれが新しい高齢者関節炎の治療戦略となりうるのか検討を加える予定である。

F. 健康危機情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

英文著書 (book)

1. Suzuki N.: The pathogenic role of prolactin in patients with rheumatoid arthritis. *Neuroimmune Biology*, vol.3: Growth and lactogenic hormones (Ed by R Rapaport and L Matera) Elsevier, Amsterdam, The Neitherlands (in press)
2. Sakane T, Suzuki N.: Neuro-endocrine-immune axis in human rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* Kluwer Academic Publishers, Wroclaw, Poland (in press)
3. Sakane T, Suzuki N.: Behcet's syndrome. *The Molecular Pathology of Autoimmunity*, Second Edition (Ed by A N Theofilopoulos and C A Bona), Gordon and Breach Science Publishers, Pennsylvania, USA (in press)
4. Suzuki N, Takeno M, Takeba Y, Nagafuchi H, Sakane T.: *Autoimmunity in*

Behcet's disease. Immunology of Behcet's disease (Ed by M Zierhut, S Ohno) Swets & Zeitlinger, Lisse, The Netherlands (in press)

5. Takeno M, Simoyama Y, Nagafuchi H, Suzuki N, Sakane T.: Neurophil hyperfunction on Behcet's disease. Immunology of Behcet's disease (Ed by M Zierhut, S Ohno) Swets & Zeitlinger, Lisse, The Netherlands (in press)

英文論文

1. Yokoe T, Suzuki N, Minoguchi K, Adachi M, Sakane T.: Analysis of IL-12 receptor β 2 chain expression of circulating T lymphocytes in patients with atopic asthma. Cell Immunol 208: 34-42, 2001.

2. Suzuki N, Takeno M, Takeba Y, Miyagi T, Ye JM, Nagafuchi H, Sakane T.: Induction of differentiation of mouse embryonic stem (ES) cells in culture. I. Treatment with BMP-2 and BMP-4 induces chondrocyte differentiation. The St. Marianna Medical Journal 29: 25-31, 2001.

3. Takeba Y, Suzuki N, Kaneko A, Asai A, Sakane T.: Endorphin and enkephalin ameliorate excessive synovial cell functions in patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol 28: 2176-2183, 2001.

4. Kasiwakura J, Suzuki N, Takeno M, Itoh S, Oku T, Sakane T, Nakajin S, Toyosima S.: Evidence of autophosphorylation in Txk: Y91 is autophosphorylation site. Biological&Pharmaceutical Bulletin 23(6) in press. 2002.

5. Takeba Y, Nagafuchi H, Takeno M, Kasiwakura J, Suzuki N.: Txk, a member of non-receptor tyrosine kinase of Tec family, acts as a Th1 cell specific transcription factor and regulates IFN-gamma gene transcription. J. Immunol., 168(5):2365-2370.

2002.

6. Mihara S, Suzuki N, Takeba Y, Soejima K, Yamamoto Y.: Combination of molecular mimicry and aberrant autoantigen expression is important for development of anti-Fas ligand autoantibodies in patients with SLE. Clin. Exp. Immunol., in press, 2002.

7. Nagafuchi H, Takeba Y, Miura K, Nara K, Sakane T, Suzuki N.: Involvement of RAG in secondary Ig gene rearrangement and subsequent apoptosis induction of human peripheral blood mature B lymphocytes. J. Immunol., in press 2002.

8. 高井憲治, 小川賢一, 岳野光洋, 鈴木登, 坂根剛: 聖マリアンナ医科大学免疫学・病害動物学教室において過去 8 年間に経験した寄生虫・衛生動物疾患の検討, 聖マリアンナ医科大学雑誌 29: 15-20, 2001.

9. 橋本博史・吉木敬・鈴木和男・徳永勝士・有村義宏・吉田雅治・沼野藤夫・安田慶秀・中林公正・小林茂人・居石克夫・津坂慶政・中島伸之・重松宏・小林靖・由谷親夫・能勢真人・尾崎承一・金井芳之・濱野慶朋・鈴木登・松岡康夫・吉田俊治・川崎富夫・森下竜一・東みゆき・西村泰治・稲葉裕・福原俊一: 厚生労働省厚生科学特定疾患・難治性血管炎に関する調査研究報告, 日本臨床免疫学会誌 24: 336-346, 2001.

和文著書

1. 鈴木登: 免疫不全の分子機構, わかりやすい内科学第 2 版 (井村裕夫編) 文光堂, 東京, 印刷中

2. 坂根剛, 鈴木登: 修飾自己抗原, 免疫学辞典 第 2 版 (大沢利昭, 小山次郎, 奥田研爾, 矢田純一 編) 東京化学同人, 東京, 印刷中

3. 坂根剛, 鈴木登: 皮膚分化抗原, 免疫学辞典 第 2 版 (大沢利昭, 小山次郎, 奥田研爾, 矢田純一 編) 東京化学同人, 東京, 印刷中

4. 坂根剛, 鈴木登: 老衰細胞抗原, 免疫学辞典 第 2 版 (大沢利昭, 小山次郎, 奥田研

爾, 矢田純一 編) 東京化学同人, 東京, 印刷中

和文論文

1. 武半優子, 鈴木 登: 神経ペプチドによる炎症の制御, 臨床免疫 35: 314-319, 2001.
 2. 鈴木登: 医学と医療の最前線. 膠原病と神経・内分泌・免疫系の関わり, 日本内科学会雑誌 90: 153-161, 2001.
 3. 鈴木登: ループス腎炎発症関連遺伝子とレセプターエディティング, 炎症・再生, 21(5): 557-563, 2001.9.
 4. 鈴木登: 膠原病における進歩と今後の展望: 全身性エリテマトーデス患者自己抗体産生細胞のアポトーシス回避機構の解析とその是正, 炎症・再生, 21: 635-638, 2001.11.
 5. 鈴木登: 膠原病 診断治療の進歩 Behcet 病, 医学のあゆみ, 199: 411-415, 2001.11.
 6. 鈴木登: RA における RA G 発現異常, RA & セラピー, 7: 32-39, 2001.11.
 7. 鈴木登: T_h1 による Th1 サイトカイン発現誘導, 臨床免疫, 36: 687-693, 2001.11.
 8. 鈴木登, 武半優子: オピオイドペプチドと関節炎, リウマチ科 25: 523-527, 2001.
 9. 鈴木 登. 検査値異常から読む病態と診断計画 リンパ球芽球化試験. 臨床医 28 巻 増刊号 印刷中 2002
2. 学会発表
1. Miyagi T, Suzuki N, Ye JM, Takeno M, Nagafuchi H, Takahashi M.: Successful induction of CD45+ leukocytes in the SCID mice engrafted with embryonic stem (ES) cell derived hematopoietic stem cells. The 30th annual meeting of the international society for experimental hematology, Tokyo, Japan, 2001.8.
 2. Takeno M, Nagafuchi H, Suzuki N, Ye JM, Matsuda H, Sakane T.: Frequency of IL-12 receptor bearing T cell is a simple

marker to monitor the disease activity in Behcet's disease, American College of Rheumatology: 65th Annual Scientific Meeting, San Francisco, USA, 2001.11.

3. Ciba S, Miyagi T, Nagafuchi H, Takeno M, Suzuki N.: Development of cartilage tissue from mouse Embryonic stem cell: possible therapeutic application for degenerative and inflammatory articular diseases, American College of Rheumatology: 65th Annual Scientific Meeting, San Francisco, USA, 2001.11.

4. 鈴木登, 岳野光洋, 武半優子: シンポジウム. リウマチ性疾患における Th1/Th2 バランスとその制御 (txk 遺伝子発現制御) 第45回日本リウマチ学会総会, 2001.5.

5. 鈴木登, 武半優子, 太田伸男, 青柳優: シンポジウム. 血管炎症候群における cANCA 対応抗原エピトープの解析, 第45回日本リウマチ学会総会, 2001.5.

6. 鈴木登: シンポジウム. ステムセルからのティッシュエンジニアリング, 再生医療公開シンポジウム. 人工角膜の設計とベンチャー化. 東京歯科大学市川総合病院, 2001.

7. Suzuki N: Symposium. Regulation by T_h1, a member of Tec family tyrosine kinase, of Th1 immune responses *in vitro* and *in vivo*.: MESS symposium, Advance in immunology and allergy research in skin. 日本皮膚科学学会第108回広島地方大会, 2001.3.

8. 横江琢也, 美濃口健司, 小田成人, 田中明彦, 鈴木登, 足立満: 急速減感作療法 RIT 前後での気管支喘息患者 CD4 陽性 T リンパ球における IL-12 receptor β 2 chain 発現の検討, 第13回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2001.4.

9. 武半優子, 鈴木登, 永淵裕子, 岳野光洋, 金子敦史, 浅井富明: ワークショップ. ヒト Th1 細胞特異的 Tec family チロシンキナーゼ蛋白, T_h1 の機能解析と各種免疫疾患における発現, 第45回日本リウマチ学会

総会, 2001.5.

10. 鈴木登, 武半優子, 岳野光洋, 永淵裕子: マウス胚性幹細胞 (embryonic stem cell;ES) より誘導した軟骨細胞を用いた関節炎モデルの治療. †軟骨細胞の分化誘導, 第45回日本リウマチ学会総会, 2001.5.

11. 岳野光洋, 鈴木登, 永淵裕子, 松田隆秀, 坂根剛: ベーチェット病患者 T リンパ球における IL-12 受容体の発現と Th1 型免疫応答, 第45回日本リウマチ学会総会, 2001.5.

12. 武半優子, 岳野光洋, 鈴木登: ヒト Th1 細胞特異的 Tec family チロシンキナーゼ蛋白、Txk の機能解析と各種免疫疾患における発現, 第22回日本炎症・再生医学会, 2001.7.

13. 宮城司, 葉俊明, 岳野光洋, 永淵裕子, 鈴木登: E S細胞の造血系細胞への分化誘導と骨髄移植への応用, 第22回日本炎症・再生医学会, 2001.7.

14. 鈴木登, 岳野光洋, 永淵裕子, 武半優子, 宮城司, 葉俊明: マウス胚性幹細胞 (embryonic stem cell)より誘導した軟骨細胞を用いた関節炎モデルの治療. †軟骨細胞の分化誘導, 第22回日本炎症・再生医学会, 2001.7.

15. 岳野光洋, 鈴木登, 永淵裕子, 松田隆秀, 坂根剛: ベーチェット病患者 T 細胞における IL-12 受容体の発現と疾患活動性との関連, 第22回日本炎症・再生医学会, 2001.7.

16. 武半優子, 脇坂秀繁, 岳野光洋, 金子敦史, 浅井富明, 鈴木登: 慢性関節リウマチ (RA) 患者関節滑膜細胞のアポトーシス抗原の作用, 第29回日本臨床免疫学会, 2001.

17. 岳野光洋, 永淵裕子, 鈴木登: ベーチェット病患者における疾患活動性と IL-12 受容体発現, 第31回日本免疫学会総会・学術集会, 2001.12.

18. 武半優子, 岳野光洋, 鈴木登: Tec family チロシンキナーゼ蛋白、Y x k の機能解析, 第31回日本免疫学会総会・学術集会, 2001.12.

H.知的財産権の出願・登録状況
特記事項なし

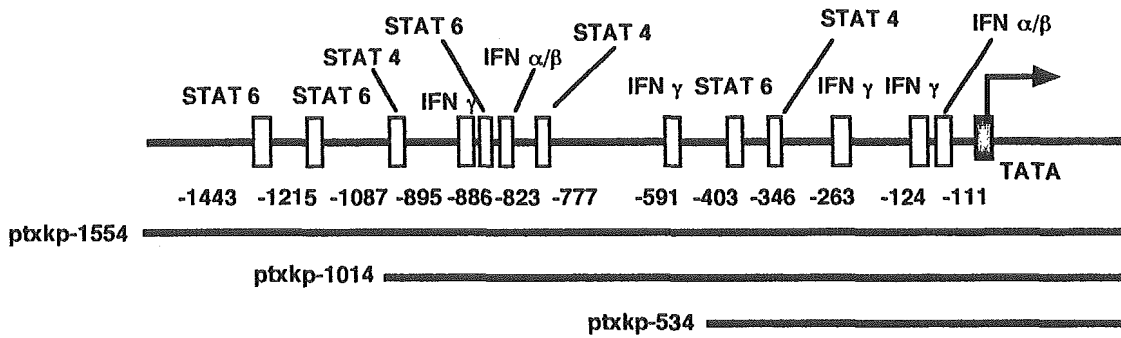


図1 ヒト Txk 遺伝子プロモーター領域とその反応エレメント

TATA;TATA BOX, IFN- γ ; IFN- γ 反応エレメント, IFN α/β ; IFN α/β 反応エレメント, STAT; signal transducer and activator of transcription 反応エレメント.

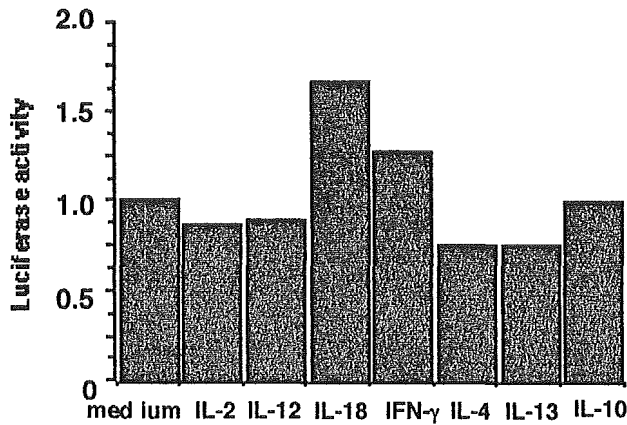


図2 Txk プロモータールシフェラーゼベクター(ptxkp-1014)遺伝子導入 Jurkat の Th1/Th2 サイトカイン刺激によるルシフェラーゼ活性の影響

Jurkat に ptxkp-1014 を遺伝子導入して 40 時間後種々のサイトカインで刺激した。

Txk は IL-18, IFN- γ で活性が増強し、IL-4, IL-13 で活性が減弱した。

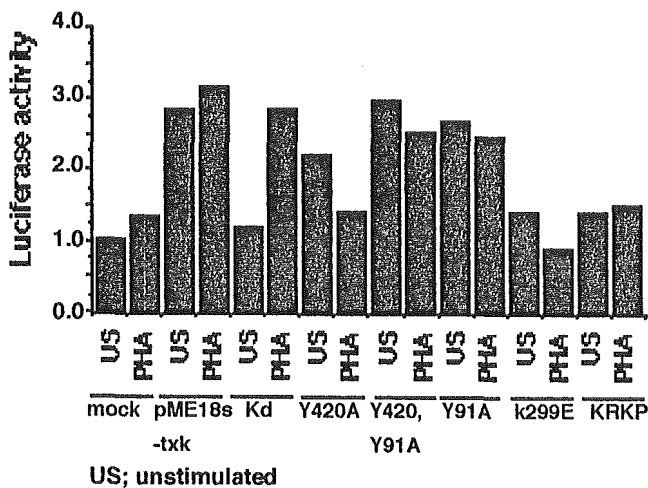


図3 Txk mutant ベクターの遺伝子導入におけるルシフェラーゼ活性の影響

Jurkat に txk mutant ベクターを遺伝子導入して 40 時間後、PHA で 8 時間刺激した。