

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

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

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）

高齢者における慢性関節リウマチ(RA)や変形性関節症(OA)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、今回我々は軟骨細胞の分化誘導とその治療応用をモデル動物を用いて検討した。マウスの胚性幹(embryonic stem cell; ES)細胞を bone morphogenetic protein 存在下に培養することで軟骨細胞を分化誘導することが出来る。この軟骨細胞は、約 50%程度の純度であったが、残りの細胞も間葉系の細胞と考えられた。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種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。

A. 研究目的

日本を含む多くの国において高齢社会を迎えている。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。その中で多発関節痛・関節炎をもたらず慢性関節リウマチ(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。

昨年度にマウス胚性幹(embryonic stem cell; ES)細胞から分化誘導した軟骨細胞に発現される転写因子を検討したが、その過程で効率よく軟骨細胞を分化誘導することが可能となった。そこで本年度は、より効率よく軟骨細胞を ES 細胞から分化誘導し、さらに変形性膝関節症モデル動物への移植を試みた。

B. 研究方法

マウス ES 細胞は胎児線維芽細胞と leukemia inhibitory factor(LIF) と共培養することで多分化能を維持したまま継代できる。この 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様々な濃度の BMP-2、BMP-4 とともに培養した。

軟骨細胞・軟骨組織であることの確認は軟骨組織に特異的に発現する転写因子 Sox9、Hox 遺伝子、scleraxis と II 型 collagen の mRNA は逆転写酵素を用いて PCR 法で増幅した。軟骨細胞を特異的に染色するアルシアンブルー染色は常法に従い行った。II 型 collagen の蛋白発現は免疫組織染色を行った。

分化誘導した軟骨細胞の SCID マウス背部皮下への移植

ES 細胞より分化誘導した軟骨細胞 1×10^6 個を SCID マウス背部皮下への移植した。1-2 週間後に細胞塊を回収し組織学的な検討を加えた。

膝関節内塩酸投与による変形性膝関節モデルマウスの作成と病変部関節への軟骨細胞移植

変形性関節症のモデルとして、膝関節内へ 1 規定塩酸 $10 \mu\text{l}$ を注入した。注入後 3-7 日目に膝関節を回収し、組織学的に検討した。更に、一部の実験では ES 細胞より分化誘導した軟骨細胞 1×10^6 個を関節内に移植した。移植後 2 週間後、同様に組織学的検討を行った。

(倫理面への配慮)

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。

C. 研究結果

1. マウスの ES 細胞から軟骨細胞の分化誘導

マウスの ES 細胞株はマイトマイシン C 処理を行ったマウス胎児線維芽細胞上で leukemia inhibitory factor (LIF) と共に培養し継代維持した。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、

embryoid body (EB) を作成することができた。その後、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、28 日間培養した。BMP 存在下に数日培養することで、EB の一部はプレートに付着するようになった。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。この細胞は軟骨細胞特異的転写因子である Sox9 や scleraxis を発現した。それ以降培養を継続することで、EB のアルシアンブルー陽性領域は増大した。この細胞は II 型コラーゲン陽性で軟骨細胞と考えられた。

2. 重症免疫不全(SCID)マウスを用いた軟骨組織の形成

ES 細胞から分化誘導した軟骨細胞を放射線照射した SCID マウス背部皮下に移植した。移植後 2 週間目に、組織を回収した。HE 染色では、移植した部位にはもっぱら軟骨組織が形成されており(図 1)、この方法では奇形種を思わせる組織は出現しなかった。

3. 変形性膝関節症モデルの作製

これまでもマウスを用いて変形性膝関節症モデルが報告されているが、その再現性に問題があり、新しいモデルマウスの作製を試みた。C57BL/6 マウスの膝関節内に 1 規定の塩酸 $10 \mu\text{l}$ を注入した。注入 3 日後に関節を観察した。アルシアンブルー染色で軟骨を染色すると塩酸注入マウスでは滑膜細胞がほとんど脱落・消失していた(図 2)。この成績から、軟骨組織の編成・摩耗を認め変形性膝関節症のモデルとして適切なモデルと考えられた。

4. 変形性膝関節症モデルマウスを用いた軟骨細胞移入療法

ES 細胞から分化誘導した軟骨細胞を用いて変形性膝関節症モデルマウスの治療研究を行った。塩酸注入によりマウス膝関節は軟骨の脱落した状態になっている。これに軟骨細胞 1×10^6 個を移入した。移植後

2 週めに関節を回収し、脱灰後 HE 染色を行った。図 3 に示すように、移入した軟骨細胞は大腿骨関節面や膝蓋部に生着していた。モデルマウスの膝関節が直径 1 ミリ程度と極めて小さいため、現在は関節面へ生着させる部位は十分コントロール出来ないが、これは今後実験動物を大型化して再検討すれば、関節面局所への移植が可能になると考える。

D. 考察

ここでは従来の内科的治療では効果が期待できない進行した破壊性の関節病変に対する新たな治療法を開発するため、ES 細胞から効率よく軟骨細胞を分化誘導する方法を確立し、これを変形性膝関節症モデルマウスに移植し、その生着を観察した。

BMP 存在下に ES 細胞は効率よく軟骨細胞に分化した。その純度は約 50%程度と考えられる。しかし混入している他の細胞群も間葉系の細胞が主体と思われ移植した局所で奇形腫の発生は全く認めていない。今回の検討はマウスをもちいての成績だが、今後はよりヒトに近い霊長類 ES 細胞を用いて軟骨細胞の分化を行い、これをマウスよりも大型の関節炎モデルで移植実験を行う必要がある。

ES 細胞は様々な細胞・組織への分化能を有し、多くの領域でその応用が期待されている。軟骨の再生による治療は、進行した破壊性の関節病変に対しても有用な手段となると考えられる。今回の検討では、およそ 50%の細胞が軟骨細胞に分化したが、この分化誘導をさらに高効率で行う必要がある、現在検討を加えている。実際、今回の検討から ES 細胞由来の軟骨細胞を移植することで関節疾患モデルマウスでの治療研究が可能になった。今回は組織学的検討を行ったが、次年度以降には、マウスの運動能力や膝の疼痛の緩和に関しても検討を加える必要がある。

E. 結論

マウス ES 細胞から BMP 存在下に軟骨細胞を特異的に分化誘導することが可能になった。これを変形性関節症のモデルマウスに移植したところ関節面に移植した軟骨細胞を生着させることが出来、近い将来の変形性関節症の治療に応用可能と考えられた。今後は、より大型の実験動物を用いて関節機能の検討を行うことが必要と考えられた。

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.: Neuroendocrine-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 hyperfinction 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RAG発現異常, RA&セラピー, 7: 32-39, 2001.11.
 7. 鈴木登: Txk 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 Emryonic 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 Txk, 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 FIT 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, Txk 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, 永瀧裕子: 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. I.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, 永瀧裕子, 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, 永瀧裕子, 鈴木登: ES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, 永瀧裕子, 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. I.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, 永瀧裕子, 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, 永瀧裕子, 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

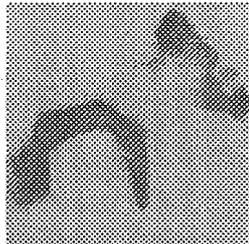


図1. ES細胞より分化誘導した軟骨細胞を重症免疫不全マウス皮下に移植した。移植部位をアルシアンブルー染色を行い、軟骨組織を同定した。

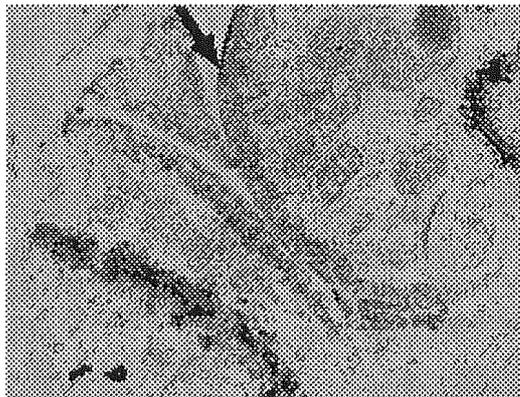


図2. 左 正常マウス膝関節 矢印は正常の軟骨組織を示す。
右 HCl投与により軟骨を破壊した。矢印はひ薄化した軟骨組織を示す。

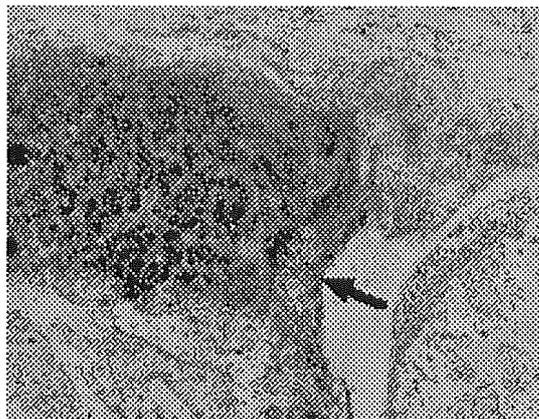


図3. HCl投与により軟骨を破壊したマウス膝にES細胞由来の軟骨細胞を移植した。矢印は移植した軟骨組織を示す。左では関節包内に、右では大腿骨関節面に軟骨細胞が生着している。

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

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

分担研究者：森本 幾夫 東京大学医科学研究所・教授

研究要旨：高齢者の慢性関節リウマチ（RA）などの関節炎患者の病態の詳細は、未だ明らかではない。我々は RA の病態を解析するために、RA 患者滑液 T 細胞のケモカイン受容体の発現とその機能を解析した。(1)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が、CCR5 のリガンドの 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。(2)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。(3)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。(4)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。

A.研究目的

慢性関節リウマチ（RA）は滑膜への白血球浸潤、滑膜細胞活性化の結果、軟骨及び骨破壊を伴う関節の慢性炎症疾患である。サイトカインや接着分子を含むいろいろなメディエーターが RA の病因として重要で、また T 細胞由来の自己免疫反応が病気の引き金や維持に重要とされている。ケモカインは白血球のケモタキシスを誘導する様々な細胞から産生されるペプチドのグループである。これらのケモカインは炎症や免疫反応にカギとなる役割を果たしている。例えば炎症細胞からのケモカインの分泌は局所炎症反応を確立するに必要な細胞をリクルートするための重要なステップである。ケモカインはそれらの受容体への結合により、G 蛋白、アデニルサイクラーゼ、ホスホリパーゼ、チロシン、セリン/スレオニンキナーゼ、small GTPases の Rho ファミリー、Stat1、Stat3 などのさ

まざまな細胞内シグナル分子の活性化が生じる。種々の異なったシグナル経路がそれぞれのケモカイン受容体に存在し、それらはリガンドや関与する細胞によっても異なって調節されている。例えば CC ケモカイン受容体である CCR5 はその対応するリガンドの RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β などが結合することにより、二つの異なったシグナル経路が活性化される。一つは G 蛋白のリクルートメントで他の一つはチロシンキナーゼの活性化で、それらによって受容体のインターナリゼーション、リサイクル、ケモタキシス、T 細胞増殖、IL-2 受容体の発現など様々な生物学的反応が生じる。いろいろなケモカインがカスケード的に産生されることが、RA 患者の炎症反応誘導に重要である。最近 RA 患者滑膜、滑液の T 細胞は末梢血 T 細胞と比べて、CCR5 や CCR3 などの炎症性ケモカイン受容体が高レベルに発現していることが報告されて

いる。さらに RANTES、MIP-1 α や MIP-1 β などは RA 患者の関節内に存在し、滑液で高レベルに検出されている。これらの結果より、CCR5 を発現する T 細胞はそのリガンドに反応して遊走し、CCR5 陽性滑液 T 細胞は IFN- γ や IL-2 を産生することから特に THI 型の炎症反応に関わっていることが示唆されている。

一方、RA 患者の滑液 T 細胞は慢性的に活性化され、CD45RO⁺CD29^{bright} のメモリー型を示し、in vitro でもケモアトラクタント非存在下での遊走能が亢進している。さて Cas-L (Crk associated substrate lymphocyte-型) はリンパ球に主として発現し、 β 1 インテグリン分子のクロスリンクにてチロシンリン酸化され、T 細胞遊走に重要な役割を果たしている。RANTES は FAK や ZAP-70、パキシリンなどの分子をチロシンリン酸化し、さらに FAK は Cas-L と直接会合していることも示されている。しかしながら、RA 患者におけるケモカイン系と細胞遊走との関係は未だ不明で、さらに CCR5 刺激は Cas-L にいかなる影響を与えるかも不明である。我々は上記の点を解明することを目的とした。多発性関節痛、関節炎をもたらす RA などの関節疾患は高齢者の日常的な活動性を低下させ、介護の必要を増加させるため、RA の原因や病態解明と予防法の開発は高齢者の生活の質の改善と、高齢者社会の活性化にも必須である。

B. 研究方法

1. 17 人の ACR の診断基準を満たす RA 患者、17 人の健常人及び 5 人の変形性関節症患者を用いた。全てのサンプルはインフォームドコンセントを得た後に集めた。

2. 単クローン抗体

CCR5、CXCR4、CCR2、CD45RO、CD19、CD11b、CD56 は Pharmingen 社より、CD45RA、CD26、CD3、CD4、CD8 は Beckman-Coulter 社から購入した。さらに FAK はトランスダクション社、抗チロシンリン酸化抗体はアップステイトバイオ社から購入した。

Cas-L へのポリクロナール抗体は我々の研究室で確立した。

3. 細胞分離

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。

4. 細胞株

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。H9 は 10%FCS-RPMI 1640 にて、ECV304 は 10%FCS-Medium199 にて培養した。

5. フローサイトメトリーによるリンパ球集団の解析

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。

6. 免疫沈降及び免疫プロット

細胞をバッファーにて融解した後、IgG プロテイン G セファロースと培養してプレクリアーし、CCR5 抗体に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、イモビロニン P 膜にトランスファーした。さらに CCR5 抗体との反応後にビオチンラベル IgG 抗体と反応させその後、ストレプトアビジン HRP と反応させた。またチロシンリン酸化の検出は SDS-PAGE で分離後、Cas-L 及び FAK 抗体と反応させ、さらに抗チロシンリン酸化抗体 (4G10) と反応させた後、enhanced chemiluminescence (ECL) にて検出した。

7. 細胞遊走アッセイ

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。コン

フルエントとなった単層モノレイヤーは 1×10^5 ECV304 をインサート上にて 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 下で一晩培養して確立した。インサートから培養液を除いた後、 $0.6\% \text{BSA}$ を含む RPMI1640 にて 100ng/ml に希釈した RANTES 及び SDF-1 α は下層のウェルに加えた。プレートは 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ インキュベーターにて 3 時間培養し、下層に遊走した細胞を回収し、FACS Calibur にてカウントした。

8. 滑液 T 細胞上の CCR5 の RANTES によるモデレーション及びリサイクルについて

細胞を 37°C 、60 分、 $0.6\% \text{BSA}$ を含む RPMI1640 で希釈した $1 \mu\text{g/ml}$ の RANTES と培養後洗浄し、さらに $0.6\% \text{BSA} \cdot \text{RPMI1640}$ にて 37°C でさまざまな時間培養した。その後 CCR5 抗体にて染色し、FACS Calibur にて解析した。

9. 統計処理について

3 群の比率は ANOVA を用いた統計的有意差で解析した。2 群の比率は Student t テストを用いて P-values 0.05 以下を統計的に有意とした。

10. 倫理面での配慮

血液、関節液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主旨を十分説明し、インフォームドコンセントを得た後で行った。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れるように注意した。

C. 研究結果

1. RA 患者滑液 T 細胞の CCR5 発現

健常人及び RA 患者末梢血 T 細胞の種々の細胞表面分子の発現を比較した。健常人及び RA 患者共に CXCR4、CCR2、CD45RO などほとんど変わりはないが、CCR5 は RA 患者で有意に低下していた。しかし RA 滑液 T 細胞は末梢血 T 細胞と比較して CCR2、CXCR4、CD45RO などの発現が有意に増加し、さらに CCR5 の発現も増加していた。多くの滑液 T 細胞は CXCR4、CCR5 ダブルポジティブで、

さらに CCR5 陽性のことからメモリー型 T 細胞であった。

2. RANTES の滑液 T 細胞の遊走におよぼす影響

CCR5 の発現増加は滑液 T 細胞の RANTES 誘導細胞遊走に影響するかどうか検討した。RA 患者からの滑液 T 細胞は自然細胞遊走能が増加していたが、変形性関節症患者の滑液 T 細胞は自然細胞遊走能の増加は認められなかった。健常人及び RA 患者からの末梢血 T 細胞は RANTES 刺激による細胞遊走は増加した。一方 RA 滑液 T 細胞は RANTES 刺激による遊走増加は認められなかった。この RANTES への不反応性については滑液 T 細胞はその受容体である CCR5 の発現が高いことから逆説的である。また SDF-1 α へは末梢血及び滑液 T 細胞共に遊走増加が認められることから、本実験にあたって滑液 T 細胞の生存率は維持されていると考えられた。このことから滑液 T 細胞の自然細胞遊走は亢進しているが RANTES への刺激には不反応性を示すことが明らかになった。

3. RA 滑液 T 細胞の Cas-L について

次に滑液 T 細胞の自然細胞遊走能亢進の機序を解析した。我々は以前に $\beta 1$ インテグリン刺激後 Cas-L のチロシンリン酸化が T 細胞遊走に重要な因子であることを報告した。そこで滑液 T 細胞を用いて Cas-L の発現を免疫プロット法にて検討した。滑液 T 細胞では末梢血 T 細胞と比して、110KD 蛋白の発現はやや低下していたが、70KD 前後にもバンドが認められた。次にチロシンリン酸化を検討した。FN で刺激した末梢血 T 細胞の Cas-L 分子はチロシンリン酸化が同定できたが、滑液 T 細胞では 110KD 蛋白のみならず、70KD 前後の蛋白もチロシンリン酸化され、さらにデンシトメトリーにて解析した結果では滑液 T 細胞は Cas-L の発現はやや低下しているもののチロシンリン酸化は FN 刺激による末梢血 T 細胞の Cas-L のリン酸化と比較しても有意に亢進していた。これらの結果は 5 例の RA 滑液 T 細胞についても認められた。

4. RANTES による H9 細胞株の Cas-L のリン酸化について

RANTES 刺激によって H9 の細胞遊走の亢進が認められたことから、RANTES 刺激による H9 細胞の Cas-L 及び FAK のチロシンリン酸化を検討した。RANTES 刺激により H9 細胞の Cas-L 及び FAK の発現の変化は認められなかった。一方、RANTES 刺激によって Cas-L および FAK のチロシンリン酸化は刺激後 1 分後に顕著に亢進し、約 5 分後に消失した。これらのことから H9T 細胞は CCR5 との相互作用によって RANTES と反応し、少なくとも一部は Cas-L 及び FAK のチロシンリン酸化によって細胞遊走能が増加することが示唆された。

5. RA 滑液 T 細胞上の CCR5 のモデュレーション及びリサイクルについて

RA 滑液 T 細胞上の CCR5 の発現増加と RANTES 刺激による細胞遊走能低下の食い違いについて検討した。末梢血及び滑液 T 細胞を RANTES で刺激し、その後 RANTES を除いた後、T 細胞上の CCR5 の発現を解析した。RANTES 刺激によって末梢血のみならず滑液 T 細胞の CCR5 のダウンモデュレーションが認められた。末梢血 T 細胞では RA 患者も健常人でも CCR5 のダウンモデュレーションの程度は同じであったが、滑液 T 細胞ではダウンモデュレーションの程度は低下していた。一方末梢血 T 細胞と比較すると滑液 T 細胞の CCR5 のリサイクリングは亢進していた。

6. IL-2 処理末梢血 T 細胞の RANTES への反応性の変化

次に滑液 T 細胞の RANTES への反応性低下の機序を明らかにした。慢性関節リウマチでは一般的に IL-2 などの Th1 型サイトカインの異常が言われているので、サイトカインの影響について検討した。IL-2 処理を行うことで健常人や RA 患者から分離した末梢血 CD45RO 陽性 T 細胞は CCR5 の発現が増加した。これらの T 細胞を用いて CCR5 のダウンモデュレーション及びリサイクルについて検討した。IL-2 未処理の CD45RO 陽性 T 細胞と比較し

て IL-2 処理 CD45RO 陽性 T 細胞は RANTES 刺激後の CCR5 のダウンモデュレーションが低下し、CCR5 のリサイクルが亢進した。さらに TNF- α 処理 T 細胞は自然細胞遊走活性は増加せず、RANTES へ反応して細胞遊走能は亢進したが、IL-2 処理 T 細胞は自然細胞遊走能は増加したが RANTES 刺激による細胞遊走の亢進は認められなかった。これらの結果から IL-2 処理 T 細胞は表現型のみならず機能的にも滑液 T 細胞に類似している可能性が示唆された。

D 考察

今回の研究により RA 患者では、滑液 T 細胞 CCR5 の発現は CXCR4 及び CD45RO 同様に増加し、自然細胞遊走能亢進が認められ、Cas-L のチロシンリン酸化も伴っていることが明らかになった。さらに CCR5 強陽性滑液 T 細胞は RANTES 刺激後の細胞遊走能は低下し、CCR5 のダウンモデュレーションが低下していること、しかし CCR5 のリサイクルは亢進していることを見出した。滑液 T 細胞は CCR5 の発現が高いが、末梢血 T 細胞ではむしろ発現は低下しており、RA の滑液では CCR5 のリガンドである RANTES などが高いことから、末梢血 T 細胞はケモカインの濃度によって関節の炎症部位に移動していく可能性が示唆された。

T 細胞の炎症部位への遊走は細胞接着分子とその対応する受容体との相互作用を含むいろいろな経路で調節されている。滑液 T 細胞は自然細胞遊走能が亢進していることはすでに報告されているが、ケモカインとその受容体との相互作用の役割はほとんど理解されていない。我々はすでに Cas-L のチロシンリン酸化は $\beta 1$ インテグリン由来 T 細胞遊走に重要であることを報告している。今回の研究により滑液 T 細胞は Cas-L のチロシンリン酸化が亢進していることから、細胞遊走能の亢進に Cas-L が関与している可能性が示唆された。さらに H9 細胞を用いた実験で RANTES 刺激により FAK のみならず Cas-L もチロシンリン酸化が誘導され

た。CCR5 は FAK と一緒に局在しているという報告を考えると、滑液 T 細胞の Cas-L は一部は RANTES と CCR5 との相互作用の結果、チロシンリン酸化され、自然細胞遊走能も亢進していると考えられた。しかし予想に反して RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β などの CCR5 へのリガンドに対しての細胞遊走反応は低下していた。これらの結果は滑液 T 細胞は CCR5 の発現は増加し、ケモカインとその受容体との相互作用を介して細胞遊走が誘導されることを考えると非常に逆説的である。このように T 細胞は炎症部位である関節滑膜、滑液に移行した後に CCR5 は発現のみならずそこからのシグナル伝達も変化していると考えられた。CCR5 のインターナリゼーションが低下しているもののリサイクリングが亢進していることは上記の説を支持するものである。滑液 T 細胞上の CCR5 の発現が常に高いことは CCR5 受容体のリサイクリングの異常によるためと考えられる。

いろいろな液性因子がケモカイン受容体の発現に影響を与えているものと思われるが、滑液 T 細胞の RANTES への反応性に影響を与える因子を探索した結果、末梢血 T 細胞を IL-2 で処理することにより、RANTES と CCR5 との相互作用による CCR5 のダウンモデュレーションが低下し、さらに CCR5 のリサイクルの亢進が認められ、一方 TNF- α で処理した末梢血 T 細胞は滑液 T 細胞のような性格にはならなかった。これらの研究から CCR5 の発現やその下流のシグナルは少なくとも免疫及び炎症反応のある種のメディエーターにより局所にて変化を受けることが強く示唆された。

さて滑液 T 細胞の CCR5 の発現増加及び CCR5 の RANTES への反応性低下の病因的意義はいかなるものであろうか？滑液 T 細胞は CXCR-4 の発現が増加し、またそのリガンドである SDF-1- α 刺激に対しては有意にその遊走亢進が誘導されることを示した。これらのことから末梢血 T 細胞は CCR5 のリガンドの濃度差によって炎症部位移動していき、その後はこれらのリガンドにさらされつつも

それ以上は反応しないが、さらに SDF-1 α などの他のケモカインにより現在進行している滑膜、滑液などの炎症部位に移動していくことが予想された。今後 RA 患者での CCR5 機能やその詳しいシグナル伝達をさらに明らかにすることは、RA の病因を深く理解し、また特に高齢者 RA の新しい治療法の開発にも繋がることが示唆された。

E 結論

RA 患者の滑液 T 細胞は CCR5 の発現が高いがそのリガンドの RANTES への刺激による遊走は低下し、さらに CCR5 の発現動態に異常を示していることを明らかにした。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1: Iwata S, Kobayashi H, Nishijima R, Sasaki T, Souta A, Nori M, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Morimoto C. Distinctive signaling pathways through CD82 and β 1 integrins in human T cells. *Eur. J. Immunol.* In press.

2: Hisakawa N, Tanaka H, Hosono O, Nishijima R, Ohashi Y, Saito S, Nishiya K, Hashimoto K, Morimoto C. Aberrant Responsiveness to RANTES in Synovial Fluid T cells from Patients with Rheumatoid Arthritis. *J. Rheumatol.* In press.

3: Suzuki T, Nakamoto T, Ogawa S, Seo S, Matsumura T, Tachibana K, Morimoto C, Hirai H. MICAL, a novel CasL interacting molecule, associates with vimentin. *J Biol Chem.* In press.

4: Gines S, Marino M, Mallol J, Canela EI, Morimoto C, Callebaut C, Hovanessian A, Casado V, Lluís C, Franco R. Regulation of epithelial and lymphocyte cell adhesion by adenosine deaminase-CD26 interaction. *Biochem J.* 2002; 361: 203-9.

5: Yoshikawa N, Makino Y, Okamoto K, Morimoto C, Makino I, Tanaka H. Distinct Interaction of Cortivazol

with the Ligand Binding Domain Confers Glucocorticoid Receptor Specificity. CORTIVAZOL IS A SPECIFIC LIGAND FOR THE GLUCOCORTICOID RECEPTOR. *J Biol Chem.* 2002; 277 :5529-5540.

6: Nakamura T, Ouchida R, Kodama T, Kawashima T, Makino Y, Yoshikawa N, Watanabe S, Morimoto C, Kitamura T, Tanaka H. Cytokine Receptor Common beta Subunit-mediated STAT5 Activation Confers NF-kappa B Activation in Murine proB Cell Line Ba/F3 Cells. *J Biol Chem.* 2002;277 :6254-6265.

7: Ohnuma K, Munakata Y, Ishii T, Iwata S, Kobayashi S, Hosono O, Kawasaki H, Dang NH, Morimoto C. Soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV induces T cell proliferation through CD86 up-regulation on APCs. *J Immunol.* 2001;167 :6745-55.

8: Ishii T, Ohnuma K, Murakami A, Takasawa N, Kobayashi S, Dang NH, Schlossman SF, Morimoto C. CD26-mediated signaling for T cell activation occurs in lipid rafts through its association with CD45RO. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98 :12138-43.

9: Aytac U, Claret FX, Ho L, Sato K, Ohnuma K, Mills GB, Cabanillas F, Morimoto C, Dang NH. Expression of CD26 and its associated dipeptidyl peptidase IV enzyme activity enhances sensitivity to doxorubicin-induced cell cycle arrest at the G(2)/M checkpoint. *Cancer Res.* 2001;61:7204-10.

10: Miura T, Ouchida R, Yoshikawa N, Okamoto K, Makino Y, Nakamura T, Morimoto C, Makino I, Tanaka H. Functional modulation of the glucocorticoid receptor and suppression of NF-kappaB-dependent transcription by ursodeoxycholic acid. *J Biol Chem.* 2001 ;276:47371-8.

11: Amano J, Morimoto C, Irimura T. Intestinal

epithelial cells express and secrete the CD43 glycoform that contains core 2 O-glycans. *Microbes Infect.* 2001 ;3:723-8.

12: Ho L, Aytac U, Stephens LC, Ohnuma K, Mills GB, McKee KS, Neumann C, LaPushin R, Cabanillas F, Abbruzzese JL, Morimoto C, Dang NH. In vitro and in vivo antitumor effect of the anti-CD26 monoclonal antibody 1F7 on human CD30+ anaplastic large cell T-cell lymphoma Karpas 299. *Clin Cancer Res.* 2001;7 :2031-40.

13: Jacquot S, Macon-Lemaitre L, Paris E, Kobata T, Tanaka Y, Morimoto C, Schlossman SF, Tron F. B cell co-receptors regulating T cell-dependent antibody production in common variable immunodeficiency: CD27 pathway defects identify subsets of severely immuno-compromised patients. *Int Immunol.* 2001 ;13:871-6.

14: Herrera C, Morimoto C, Blanco J, Mallo J, Arenzana F, Lluís C, Franco R. Comodulation of CXCR4 and CD26 in human lymphocytes. *J Biol Chem.* 2001 ;276:19532-9.

15: Homma T, Hosono O, Iwata S, Ando S, Sasaki K, Nishi T, Kawasaki H, Tanaka H, Morimoto C. Recognition of cell surface GD3 by monoclonal antibody anti-6C2 in rheumatoid arthritis synovial fluid: expression on human T cells with transendothelial migratory activity. *Arthritis Rheum.* 2001 ;44:296-306.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

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

加齢と自己抗体—疾患モデルマウスを用いた研究

分担研究者：森本幾夫 東京大学医科学研究所・教授
金井芳之 東京大学医科学研究所・助教授

研究要旨：ヒトの膠原病で最も代表的な全身性エリテマトーデス(SLE)の病態学的特徴は自己抗体の産生で、なかでも抗二本鎖(dsDNA)を含む抗クロマチン抗体がよく知られている。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が、その経時的および質的变化についての詳細は不明である。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。

A. 研究目的

所謂 SLE の診断には抗クロマチン自己抗体の測定が有用であるということが定着している。しかし、当該抗体産生に加齢がどのように影響するか詳細な解析はなされていない。その理由として、ヒトでは抗クロマチン抗体の長期つまり加齢に伴う変動を病態の良悪に関わらず追跡することが極めて困難であることがあげられる。これを明らかにしようとす

る場合 SLE 様病態を 100%発症するモデルマウスが有用である。分担研究者は従来の SLE モデルである MRL/lpr マウス（以後 Wild と呼ぶ）の重症型をヌクレオバインدين (Nuc) という遺伝子をノックアウトすることによって作出した（これを Nuc-Ko と呼ぶことにする）。一方自己抗原とは本来当該動物またはヒト由来抗原を用いるべきところを、入手し易い抗原で代用してきた。別の研究が

ら、クロマチンでも種が異なるとそれに対する免疫応答が著しく異なることが分かってきた。今回はその知見を踏まえ、マウス由来のクロマチンを精製し、それに対する免疫応答を Nuc-Ko マウスを使い経齡的に測定し、加齡にかかわり合う自己抗体を明らかにすることを試みた。われわれの生体では秒単位で数おおくの血液細胞例えばリンパ球・好中球が apoptotic に破壊され、自己抗原クロマチンが血中に放出されている。一方でこれを処理するために例えば DNA 分解酵素やマクロファージが現場に導入されてい

B. 研究方法

クロマチンの調整にはマウスリンパ系細胞株 KML1 細胞を用いた。2 x 10⁸ 個の細胞から核を分離、micrococcal nuclease(MN)で一定時間消化、不溶画分に 0.25MNaCl を含む Tris 緩衝液(pH 7.4) (A 液) を添加、その結果得られた可溶画分を Superdex 200 をゲル濾過カラムとしてもちいた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にかけ、大小数個のピークを集め、SDS-PAGE とアガロース電気泳動とでヌクレオソーム(NS)の純度を判定した。所謂モノヌクレオソーム(一般的にはこれを NS と称して

C. 研究結果

a. Nuc-Ko マウスの抗クロマチン抗体価

る。しかし加齡に伴ってこの導入速度は減速し、自己抗体の産生へと繋がる可能性が高まる。その際生体にとって有効なものとは有害なものとの両者ができる可能性がある。有効なものとは消化が間に合わない代謝産物に素早く結合して、処理できる抗体である。老化とは老廃物の生体内沈着と考えればこの種の自己抗体を正常異常に関わらず見出し、製品化することは重要な課題である。本研究はこの種の自己抗体を見出すための実験系の確立を目指すものである。

いる) はサンプル投入後 11-12 分時の所に溶出されることが確定した。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。これらの自己抗原の純度は SDS-PAGE、HPLC やアガロース電気泳動で確認された。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。

の変動

図 1 に抗 NS 抗体の経齡的变化を示し

た。三ヶ月齢で抗体価の上昇が見られ、その後概して高値を示すが、二例に著しく免疫応答の高いものが見られた。一方、図 2 に示されるように、抗 nsDNA 抗体も加齢に伴う抗体価の上昇傾向がみられ、著しい高値を示すものが抗 NS 抗体同様に見られた。

b. Wild マウスの抗クロマチン抗体価の変動

図 3 に示されているように、抗 nsDNA 抗体価は総じて低い上加齢による上昇傾向は窺える。ここでは 2ヶ月齢で一例が高値を示した。一方抗 NS 抗体の上昇は認められなかった(図 4)。

c. Nuc-ko マウスでいずれか高値を示した抗体と抗 nsDNA 抗体との相関
両者の相関関係を図 5 に示した。図で明らかのように、極めて明瞭な逆相関が示された。

D. 考察

従来指摘されてきた Wild マウスに於ける抗クロマチン抗体価と比べて本研究で得られた抗体価は著しく低値を示した。その理由は実験法の所でも指摘したように自己抗原として用いたクロマチンがマウス由来であることと考えられる。もう一つの大きな理由は nsDNA を PLL のような従来 DNA の付着効果を高めるために使われてきた塩基性タンパク質を今回用いなかったことがあげられる。これは分担研究者が他の実験から DNA と PLL が結合すると本来の DNA とは異なった抗原構造が形成され、真の DNA 抗原に

対する抗体が正確にはかかれていないと云う事実をえたからである。PLL をもちない今回の測定系で自己抗体が測定されていることは Nuc-ko マウスの結果から明らかであろう。抗 nsDNA 抗体のみならず、抗 NS 抗体も測定されていることが、図 1 から明らかである。一方抗 NS 抗体は抗 nsDNA 抗体そのもので、その交叉性を診ていると云う可能性が指摘される。確かに NS は約 160bp の DNA とコアヒストンの複合体で NS の両サイドにはフリーの DNA 末端が存在する可能性はある。したがって一部には DNA と交叉性の抗体も NS 抗原で捕捉される可能性はある。そこで両者の関係を比較検討したのが、図 5 である。今回の新しい測定系でえられた結果は信じられない程両抗体が乖離していた。ちなみに、NS も、プレートに吸着させる場合に、nsDNA と同様、PLL は用いていない。したがって、PLL と NS で形成される新たな構造体に関与することは極めて少ないといえる。

E. 結論

今回の新しい測定系を用いることで SLE 病態関連抗体とは別に加齢を反映する新規抗体を発見する可能性がある。特に高値を示した抗 NS 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。

F. 健康危険情報 (特になし)

G、研究発表

1. 論文発表

1: Iwata S, Kobayashi H, Nishijima R, Sasaki T, Souta A, Nori M, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Morimoto C. Distinctive signaling pathways through CD82 and β 1 integrins in human T cells. *Eur. J. Immunol.* In press.

2: Hisakawa N, Tanaka H, Hosono O, Nishijima R, Ohashi Y, Saito S, Nishiya K, Hashimoto K, Morimoto C. Aberrant Responsiveness to RANTES in Synovial Fluid T cells from Patients with Rheumatoid Arthritis. *J. Rheumatol.* In press.

3: Suzuki T, Nakamoto T, Ogawa S, Seo S, Matsumura T, Tachibana K, Morimoto C, Hirai H. MICAL, a novel CasL interacting molecule, associates with vimentin. *J Biol Chem.* In press.

4: Gines S, Marino M, Mallol J, Canela EI, Morimoto C, Callebaut C, Hovanessian A, Casado V, Lluís C, Franco R. Regulation of epithelial and lymphocyte cell adhesion by adenosine deaminase-CD26 interaction. *Biochem J.* 2002 ; 361: 203-9.

5: Yoshikawa N, Makino Y, Okamoto K, Morimoto C, Makino I, Tanaka H. Distinct Interaction of Cortivazol with the Ligand Binding Domain Confers Glucocorticoid Receptor Specificity. CORTIVAZOL IS A SPECIFIC LIGAND FOR THE GLUCOCORTICOID RECEPTOR. *J Biol Chem.* 2002; 277 :5529-5540.

6. Nakamura T, Ouchida R, Kodama T, Kawashima T, Makino Y, Yoshikawa N, Watanabe S, Morimoto C, Kitamura T, Tanaka H. Cytokine Receptor Common beta Subunit-mediated STAT5 Activation Confers

NF-kappa B Activation in Murine proB Cell Line Ba/F3 Cells. *J Biol Chem.* 2002;277 :6254-6265.

7: Ohnuma K, Munakata Y, Ishii T, Iwata S, Kobayashi S, Hosono O, Kawasaki H, Dang NH, Morimoto C. Soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV induces T cell proliferation through CD86 up-regulation on APCs. *J Immunol.* 2001;167 :6745-55.

8: Ishii T, Ohnuma K, Murakami A, Takasawa N, Kobayashi S, Dang NH, Schlossman SF, Morimoto C. CD26-mediated signaling for T cell activation occurs in lipid rafts through its association with CD45RO. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98 :12138-43.

9: Aytac U, Claret FX, Ho L, Sato K, Ohnuma K, Mills GB, Cabanillas F, Morimoto C, Dang NH. Expression of CD26 and its associated dipeptidyl peptidase IV enzyme activity enhances sensitivity to doxorubicin-induced cell cycle arrest at the G(2)/M checkpoint. *Cancer Res.* 2001;61:7204-

10: Miura T, Ouchida R, Yoshikawa N, Okamoto K, Makino Y, Nakamura T, Morimoto C, Makino I, Tanaka H. Functional modulation of the glucocorticoid receptor and suppression of NF-kappaB-dependent transcription by ursodeoxycholic acid. *J Biol Chem.* 2001 ;276:47371-8.

11: Amano J, Morimoto C, Irimura T. Intestinal epithelial cells express and secrete the CD43 glycoform that contains core 2 O-glycans. *Microbes Infect.* 2001 ;3:723-8.

12: Ho L, Aytac U, Stephens LC, Ohnuma K, Mills GB, McKee KS, Neumann C, LaPushin R, Cabanillas F, Abbruzzese JL, Morimoto C, Dang NH. In vitro and in vivo antitumor effect of the anti-CD26

monoclonal antibody 1F7 on human CD30+ anaplastic large cell T-cell lymphoma Karpas 299. Clin Cancer Res. 2001;7 :2031-40.

13: Jacquot S, Macon-Lemaitre L, Paris E, Kobata T, Tanaka Y, Morimoto C, Schlossman SF, Tron F. B cell co-receptors regulating T cell-dependent antibody production in common variable immunodeficiency: CD27 pathway defects identify subsets of severely immuno-compromised patients. Int Immunol. 2001 ;13:871-6.

14: Herrera C, Morimoto C, Blanco J, Mallol J, Arenzana F, Lluís C, Franco R. Comodulation of CXCR4 and CD26 in human lymphocytes. J Biol Chem. 2001 ;276:19532-9.

15: Homma T, Hosono O, Iwata S, Ando S, Sasaki K, Nishi T, Kawasaki H, Tanaka H, Morimoto C.

Recognition of cell surface GD3 by monoclonal antibody anti-6C2 in rheumatoid arthritis synovial fluid: expression on human T cells with transendothelial migratory activity. Arthritis Rheum. 2001 ;44:296-306.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

(なし)

2. 実用新案登録

(なし)

図の説明

図 1

Nuc-ko マウスの加齢に伴う抗 NS 抗体
の変化

図 2

Nuc-ko マウスの加齢に伴う抗 nsDNA 抗
体の変化

図 3

Wild マウスの加齢に伴う抗 nsDNA 抗体
の変化

図 4

Wild マウスの加齢に伴う抗 NS 抗体の
変化

図 5

抗 NS 抗体と抗 nsDNA 抗体との相関性

