

図3 抗ヒトMPO-ANCAレベルと血管炎及び染色体マーカーとの関連。退交配マウスを血管炎の有無あるいはD7MIT21の遺伝子型で各々2群に分類し抗ヒトMPO-ANCAレベル(平均値±標準誤差)を比較した。図中BWはNZB及びNZW由来のヘテロ型、WWはNZW由来のホモ型の遺伝子型を示す。

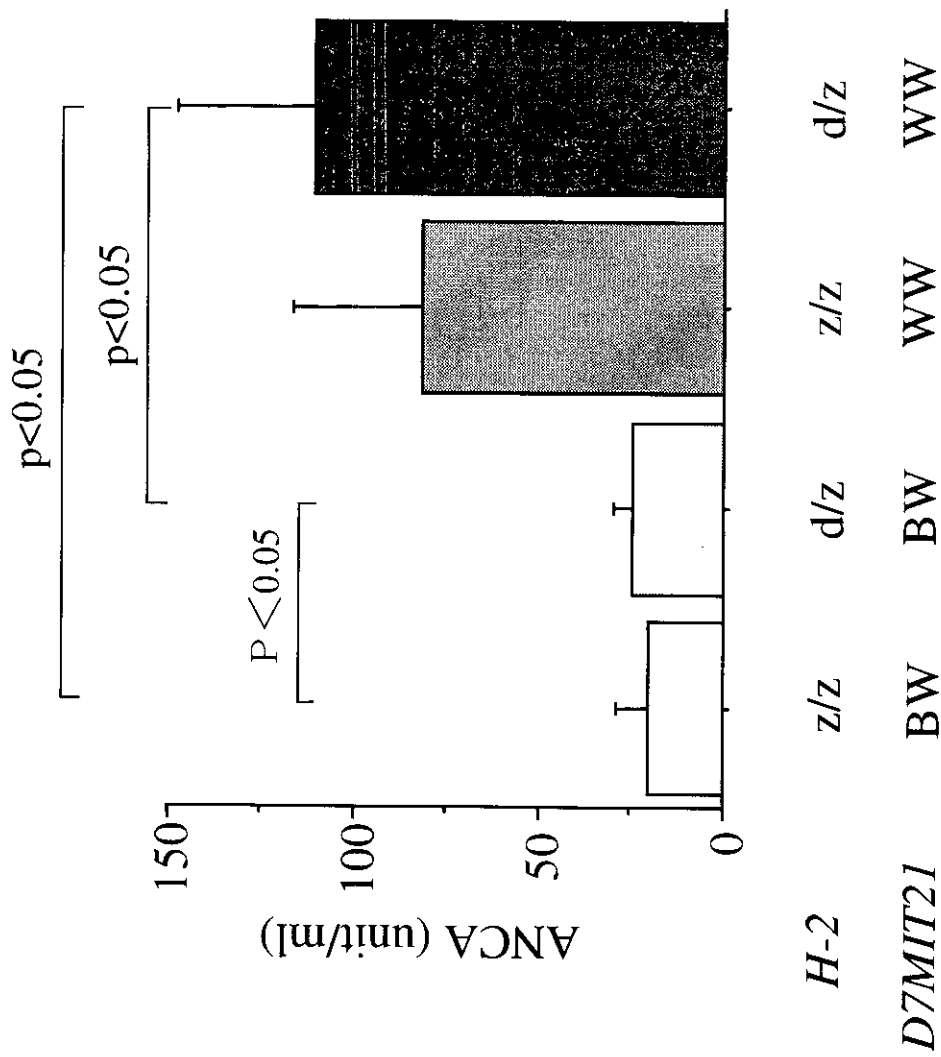


図4 H-2ハプロタイプ及びD7MIT21の遺伝子型と血清抗ヒトMPO-ANCAレベル. 退配マウスをH-2ハプロタイプとD7MIT21の遺伝子型により4群に分類し、血清中のMPO-ANCAレベル(平均値±標準誤差)を比較した.

形質 (相関係数)

	抗マウスMPO-ANCA	抗ヒトMPO-ANCA
血管炎	NS	$p < 0.05^*$
末梢血好中球数	NS	NS
蛋白尿	NS	NS
IgMクラス抗dsDNA抗体	$p < 0.0001 (0.529)$	$p < 0.0001 (0.409)$
IgGクラス抗dsDNA抗体	NS	$p < 0.005 (0.227)$
IgMクラス抗ssDNA抗体	$p < 0.0001 (0.509)$	$p < 0.0001 (0.390)$
IgGクラス抗ssDNA抗体	NS	$p < 0.05 (0.409)$
IgMクラス抗クロマチン抗体	$p < 0.0001 (0.359)$	$p < 0.0001 (0.365)$
抗ヒトMPO-ANCA	$p < 0.0001 (0.302)$	

表. 抗ヒト、マウスMPO-ANCA力価と他の形質との相関. *はStudentのt検定におけるp-value、他はピアソンの相関係数とそのp-valueを示す。

23. 血管炎合併 SLE 患者 T 細胞における TCR ζ 鎖 mRNA 3'UTR 異常の ζ 鎖タンパク発現に対する影響

分担研究者 津坂 憲政 埼玉医科大学総合医療センター第二内科

研究要旨：我々はこれまで、血管炎を合併する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)タンパクの発現が低下すること、そして alternative splicing で生じ 562bp 短い 3'UTR をもつ ζ mRNA (ζ mRNA/as-3'UTR) が優位に発現されることを報告してきた。そこで今回、wild form 3'UTR をもつ ζ mRNA (ζ mRNA/w-3'UTR) と ζ mRNA/as-3'UTR からの ζ タンパク発現を in vitro で比較し、 ζ mRNA における 3'UTR 異常が ζ タンパク発現に及ぼす影響を検討した。as-3'UTR と w-3'UTR をそれぞれ含んだ全長 ζ mRNA を pSP64Poly(A) vector に組み込み、in vitro transcription で mRNA 発現を誘導した。精製した mRNA を $[^{35}\text{S}]\text{Met}$ とともに wheat germ extract に加え、in vitro translation で誘導 0 分から 120 分後の ζ タンパク発現を SDS-PAGE および autoradiography で比較した。 ζ mRNA/as-3'UTR からの ζ monomer(16-kD)発現は ζ mRNA/w-3'UTR と比較して有意に低下した。さらに ζ mRNA/w-3'UTR から発現される ζ homodimer(32-kD)は、 ζ mRNA/as-3'UTR からは誘導されなかった。 ζ mRNA では、3'UTR の異常が ζ monomer 発現だけでなく ζ homodimer 発現も低下させる可能性が示唆された。 ζ homodimer 形成が TCR-CD3 複合体形成に不可欠な過程であることから、血管炎を合併する SLE 患者 T 細胞での ζ mRNA 3'UTR 発現異常が病態と関連する可能性があると考えられた。

A. 研究目的

我々はこれまで血管炎を合併する SLE 患者で末梢血 T 細胞 TCR ζ 鎖 (ζ 鎖) 発現がとくに低下していることを報告¹⁾²⁾³⁾し、 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 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⁴⁾。このような血管炎合併 SLE 患者 T 細胞で

の ζ 鎖タンパク発現低下が ζ 鎖 mRNA 発現低下に伴うものであることが予想され、一昨年度我々は mRNA の安定性・輸送・局在に参与する 3' untranslated region (3'UTR) を ζ 鎖 mRNA について検討を行い、SLE 患者では、alternative splicing によって生じ 562bp 短い 3'UTR をもった ζ 鎖 mRNA (ζ 鎖 mRNA/as-3'UTR) が正常な 3'UTR をもった ζ 鎖 mRNA (ζ

鎖 mRNA/w-3'UTR) と比較し優位に発現していることを報告した⁵⁾。昨年度には、 ζ 鎖タンパク発現を Western blot 法で定量化し ζ 鎖 mRNA 発現と比較検討したところ、 ζ 鎖タンパク発現と ζ 鎖 mRNA/w-3'UTR 発現とに有意な正相関が、 ζ 鎖 mRNA/as-3'UTR 発現とに負相関が認められることを報告し、このように SLE 患者 T 細胞では、短い 3'UTR をもつ ζ 鎖 mRNA が優位に発現するために ζ 鎖 mRNA の安定性、輸送、あるいは局在に異常が生じ、 ζ 鎖の発現低下に結びつく可能性が示唆された⁶⁾。

そこで本年度は、このような短い 3'UTR をもつ ζ 鎖 mRNA からの ζ 鎖タンパク発現が実際に低下するかどうかを *in vitro* translation を用いて検討してみた。

B. 研究方法

1) RT-PCR 法による全長 ζ 鎖 cDNA の増幅

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 PCR 法の鋳型 DNA として用いた。3'UTR を含む全長 ζ 鎖 cDNA は PCR 法によって増幅し、プ

ライマーには ζ 鎖 mRNA open reading frame (ORF)の上流部位に sense primer を、 ζ 鎖 mRNA exon 8 の 3'側に antisense primer を設定した。

2) *in vitro* transcription

PCR 産物は精製後 pTARGET Mammalian Expression Vector (Promega 社)に組み込んだ。次に XhoI と Sall を用いて pTARGET vector から insert DNA を切り出し、pSP64Poly(A) (Promega 社)に insert DNA 組み込んだ。さらに pSP64Poly(A)を EcoRI で処理して線状 DNA としたものを鋳型 DNA として、SP6 mMessage mMachine kit (Ambion 社)を用いて RNA を転写させた。

3) *in vitro* translation

精製した mRNA を 2 μ l の [³⁵S]methionine とともに Wheat Germ Extract system (Promega 社)に加え、タンパク発現を 25°C で誘導した。10 分から 210 分までの反応生成物 5 μ l ずつを 15%-SDS-PAGE で電気泳動させた後、タンパクバンドをオートラジオグラフィで解析した。

C. 研究結果

Alternatively spliced form 3'UTR (as-3'UTR)と wild form 3'UTR (w-3'UTR)をそれぞれ含んだ全長 ζ cDNA を PCR 法で増幅し、pTARGET vector に

組み込んだ。さらに続いて insert DNA を切り出し pSP64Poly(A) vector に組み込み線状化してこれを鋳型 DNA として *in vitro* transcription で ζ mRNA/w-3' UTR ならびに ζ mRNA/as-3' UTR を発現誘導した。精製した mRNA を [³⁵S]Met とともに wheat germ extract に加え、*in vitro* translation で誘導 0 分から 120 分後の ζ 鎖タンパク発現を SDS-PAGE および autoradiography で比較した。 ζ mRNA/as-3' UTR からの ζ monomer(16-kD) 発現は ζ mRNA/w-3' UTR と比較して有意に低下した。さらに ζ mRNA/w-3' UTR からの ζ homodimer(32-kD) 発現は経過とともに発現量は亢進したが、 ζ mRNA/as-3' UTR からは ζ homodimer(32-kD) 発現は誘導されなかった (図)。

D. 考察・結論

これまで我々は、血管炎合併 SLE 患者では末梢血 T 細胞での ζ 鎖発現が低下あるいは欠損し、これが分子生物学的には 3' UTR 上の 562bp がスプライスアウトされて生じた alternative spliced form ζ 鎖 mRNA が正常 ζ 鎖 mRNA と比較し優位に発現され、 ζ 鎖 mRNA が不安定化する、あるいは ζ 鎖 mRNA の核から細胞質への輸送が障害されるために、 ζ 鎖の発現が低下したり欠損する可能性を報告してきた⁵⁾。とくに昨年度は、 ζ 鎖タンパク発現と ζ mRNA/w-3' UTR 発現とに正相関

が、 ζ mRNA/as-3' UTR 発現とに負相関が認められることを報告し、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た。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ことも報告してきた⁶⁾。本年度はこれまで報告してきた ζ 鎖 mRNA 3' UTR 異常が実際に ζ 鎖タンパク発現に影響するかどうかをまず *in vitro* translation で確認することを目的とした。その結果、 ζ mRNA では、3' UTR の異常が ζ monomer 発現だけでなく ζ homodimer 発現も低下させる可能性が示唆された。

T 細胞表面上で TCR-CD3 複合体が発現されるためには、 ζ homodimer と ζ 鎖以外の TCR-CD3 複合体構成成分とが細胞内で会合することが不可欠な過程であることが報告されており、SLE 患者 T 細胞では ζ 鎖 homodimer 形成が低下することで T 細胞上の TCR-CD3 複合体発現も低下する可能性が示唆されたと考えられる。この知見は ζ 鎖 mRNA 3' UTR 発現異常と SLE の病態とを関連づける上で非

常に重要であると考えられた。

【参考文献】

1. Takeuchi T, et al. *Int Immunol* 10: 911-921, 1998
2. Tsuzaka K, et al. *J Autoimmunity* 11: 381-385, 1998
3. Pang M, et al. *Clin Exp Immunol* 2002 (in press)
4. Takeuchi T, et al. *Clin Rheum* 14: 370, 1995
5. Tsuzaka K, et al. *Modern Rheumatol* 2002 (in press)
6. Tsuzaka K, et al. *Arthritis Rheum* 44: S202, 2001

G. 研究発表

1) 論文発表

【原著】

1. Ashmed S, Ihara K, Kanematsu S, Nakashima H, Otsuka T, Tsuzaka K, Takeuchi T, Hara T: Association of CTLA-4 but not CD28 gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in the Japanese population. *Rheumatology* 40: 662-667, 2001
2. Ohishi T, Saito H, Tsuzaka K, Toda K, Inagaki H, Hamada Y, Kumagai N, Atsukawa K, Ishii H: Anti-fibrogenic effect of an

angiotensin converting enzyme inhibitor on chronic carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. *Hepatol Res* 21: 147-158, 2001

3. Tsuzaka K, Onoda N, Yoshimoto K, Setoyama Y, Suzuki K, Pang M, Abe T, Takeuchi T. T-cell receptor ζ mRNA with alternatively spliced 3' untranslated region is generated predominantly in the peripheral blood T cells of systemic lupus erythematosus patients. *Modern Rheumatol.* (in press), 2002

4. Pang M, Setoyama Y, Tsuzaka K, Yoshimoto K, Amano K, Abe T, Takeuchi T. Defective expression and tyrosine phosphorylation of the T cell receptor ζ chain in peripheral blood T cells from systemic lupus erythematosus patients. *Clin Exp Immunol* (in press), 2002

【著書】

1. 津坂憲政。リウマチ熱。リウマチ・膠原病の治療と看護。川合眞一、森脇美登里編集、南江堂（東京）。164-166, 2001
2. 津坂憲政。血管炎とサイトカイン。

血管炎。長澤俊彦監修、橋本博史編集、朝倉書店（東京）。46-48, 2001

3. 津坂憲政。アレルギー性肉芽腫性血管炎 (Churg-Strauss 症候群)。難病の診断と治療指針。疾病対策研究会編集、六法出版社（東京）。42-46, 2001

【総説】

1. 津坂憲政, 竹内勤。自己免疫疾患の発症機序からみた免疫抑制療法。炎症と免疫, 9: 3-7, 2001
2. 津坂憲政, 竹内勤。VEGF と阻害物質。リウマチ科。25: 162-165, 2001
3. 津坂憲政, 竹内勤。T細胞レセプターと鎖と全身性エリテマトーデスの治療。Molecular Medicine 38: 386-392, 2001
4. 津坂憲政。mRNA の 3'UTR 領域。炎症と免疫, 9:495-497, 2001
5. 津坂憲政, 竹内勤。CD3-TCR を介する情報伝達分子群。炎症と免疫, 9:611-613, 2001
6. 津坂憲政。全身性エリテマトーデス患者 T細胞における TCRと鎖発現低下の分子生物学的機序。Neuroimmunology, 9: 197-203, 2001
7. 津坂憲政。全身性エリテマトーデス患者 T細胞における protein

kinase PKR の発現異常。臨床免疫。36: 953-955, 2001

2) 学会発表

1. Tsuzaka K, Onoda N, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, Takeuchi T. Alternatively spliced 3' untranslated region of TCR ζ messenger RNA could lead to the downregulation of TCR ζ monomer and homodimer in the peripheral blood T cells of systemic lupus erythematosus patients. American College of Rheumatology, 65th Annual Meeting, San Francisco, U.S.A., November, 2001
2. Shiraishi K, Tsuzaka K, Tsubota K, Abe T, Takeuchi T. Increased expression of caspases, PARP, and DFF45 in the lacrimal gland of patients with Sjogren's syndrome. American College of Rheumatology, 65th Annual Meeting, San Francisco, U.S.A., November, 2001
3. Suzuki K, Tsuzaka K, Onoda N, Abe T, Takeuchi T. Molecular mechanism of BAFF expression in peripheral blood lymphocytes in systemic lupus erythematosus patients. American College of

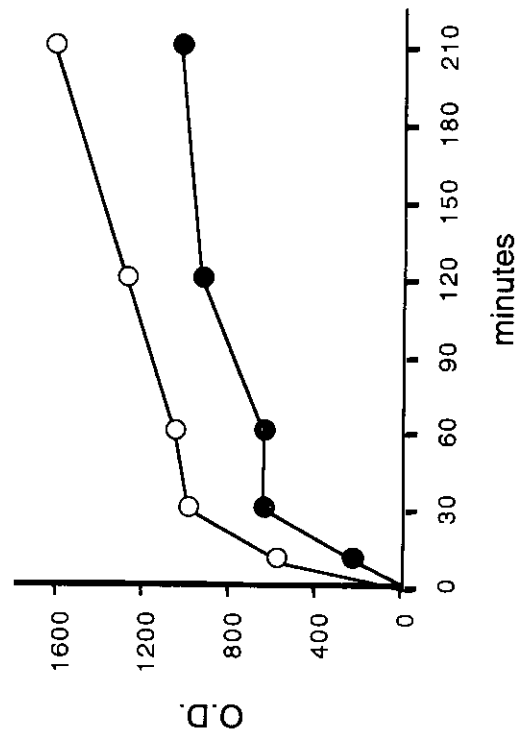
- Rheumatology, 65th Annual Meeting, San Francisco, U.S.A., November, 2001
4. 鈴木勝也、津坂憲政、小野田夏子、安倍 達、竹内 勤。全身性エリテマトーデス患者末梢血リンパ球中の α TNA mRNA 発現量の検討。第 45 回日本リウマチ学会総会, 2001 年 5 月
 5. 天野宏一、小川祥江、関口康亘、伊藤達也、亀田秀人、津坂憲政、安倍達、竹内勤。慢性関節リウマチに対する DMARD 併用療法。第 45 回日本リウマチ学会総会, 2001 年 5 月
 6. 吉本桂子、瀬戸山由美子、小野田夏子、津坂憲政、安倍達、竹内勤。SLE における TCR ζ 鎖発現低下と IL-2, IFN γ の産生制御機構。第 45 回日本リウマチ学会総会, 2001 年 5 月
 7. Tsuzaka K, Onoda N, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, Takeuchi T. Molecular mechanism of the decreased expression of TCR ζ in systemic lupus erythematosus patients. 第 45 回日本リウマチ学会総会, 2001 年 5 月
 8. 津坂憲政、小野田夏子、瀬戸山由美子、吉本桂子、鈴木勝也、安倍達、竹内勤。全身性エリテマトーデス患者 T 細胞における TCR ζ 鎖発現低下の分子生物学的機序。第 29 回日本臨床免疫学会総会。2001 年 11 月
 9. 津坂憲政、小野田夏子、瀬戸山由美子、吉本桂子、鈴木勝也、安倍達、竹内勤。SLE 患者 T 細胞における TCR ζ mRNA の 3'UTR 異常。第 31 回日本免疫学会総会, 2001 年 11 月

図：In vitro translation を用いたTCR と鎖発現の検討

Alternatively spliced formの3'UTR (as-3'UTR) と wild formの3'UTR (w-3'UTR) をそれぞれ含んだ全長 mRNA をそれぞれ pSP64Poly(A) vector に組み込み、in vitro transcription で mRNA 発現を誘導した。精製した mRNA を [³⁵S]Met とともに wheat germ extract に加え、in vitro translation で誘導0分から120分後のタンパク発現を SDS-PAGE および autoradiography で比較した。タンパク発現は densitometer で定量化した。その結果、(a) と mRNA/as-3'UTR からの mRNA/w-3'UTR と比較して有意に低下した。さらに (b) と mRNA/w-3'UTR からの mRNA/as-3'UTR と比較して有意に mRNA/as-3'UTR からは homodimer(32-kD) 発現は誘導されなかった。

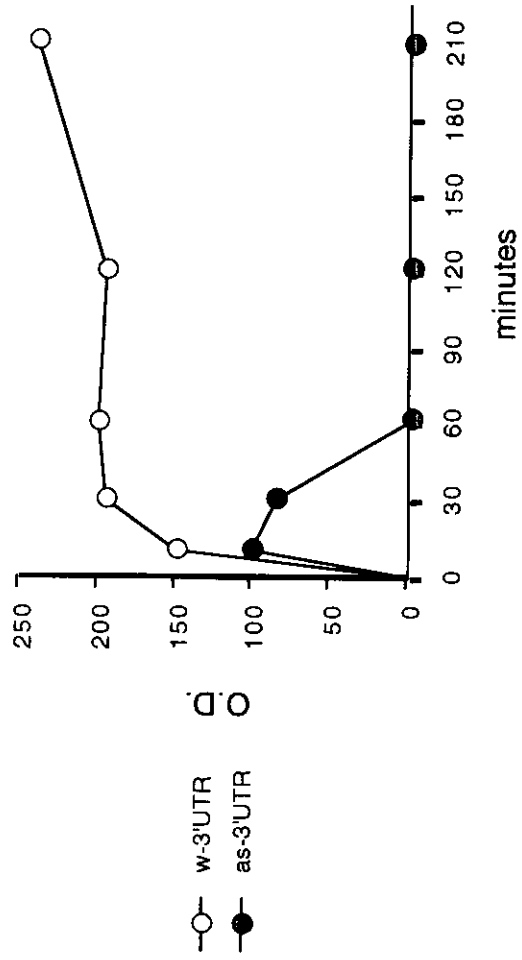
(a)

16-kD



(b)

32-kD



24. 新規 B7 分子, ICOS および PD-1 リガンドの機能解析

分担研究者 東 みゆき 東京医科歯科大学医歯学総合研究科分子免疫学分野

研究要旨 新規 B7 ファミリーに属する補助シグナル分子 B7h/B7-RP1 と PD-L1(B7-H1)および PD-L2(B7-DC)の発現および機能をモノクローナル抗体を作製し検討した。マウスコラーゲン(CII)誘導関節炎モデルにおける抗 B7h 抗体投与による ICOS 経路阻害により, 関節炎発症抑制効果が認められ, CII に対する Th1 および Th2 の両反応の抑制に加え, 抗炎症効果も認められた。以上の結果から, ICOS 補助シグナル阻害による関節リウマチ治療の可能性が示唆された。PD-1 リガンドである PD-L1 は, T, B, NK 細胞, マクロファージ, 樹状細胞(DC)にすでに発現が認められ, 活性化により増強されたが, PD-L2 の発現はサイトカイン刺激後の DC にかかなり限局していた。また, 免疫細胞以外では, 組織レベルで血管内皮細胞上に PD-1 が, 角化上皮細胞上に PD-L1 および PD-L2 発現が認められた。In vitro における抗 PD-L1 あるいは PD-L2 抗体および PD-L1Ig あるいは PD-L2Ig を用いた CD4⁺ T 細胞における PD-1 経路の機能解析では, 正および負の両方向性のシグナルの存在が示唆された。

A. 研究目的

新規 CD28-B7 ファミリーに属する補助シグナル分子として, ICOS リガンドである B7h/B7RP1 および PD-1 リガンドである PD-L1 (B7-H1)および PD-L2 (B7-DC)が同定されたがその機能は明らかでない。本研究では, 上記マウス分子に対するモノクローナル抗体と PD-L1Ig および PD-L2Ig 融合蛋白を作製し, その *in vitro* および *in vivo* における発現および機能について検討することを目的とした。

B. 研究方法

ICOS-B7h 経路

1) 抗マウス B7h 抗体をコラーゲン(CII)誘導関節炎(CIA)モデルおよび SLE 様の病態を自然発症する NZB/WF1 マウスに投与し, ICOS-B7h 補助シグナル経路を阻害することによる関節炎発症抑制効果を検討

すると共に, その効果発現機構を抗体投与マウス血清, 所属リンパ節および脾細胞, 滑膜組織をもちいて検討した。

PD-1-PD-L1/PD-L2 経路

2) マウス PD-L1 および PD-L2 に特異的に反応するモノクローナル抗体を作製した。作製した抗体を用いて, 脾細胞における PD-L1 および PD-L2 の発現および活性化刺激による誘導をフローサイトメトリーにて検討した。

3) PD-L1Ig および PD-L2Ig 架橋または抗 PD-L1/PD-L2 抗体添加の低濃度 CD3 刺激下のマウス CD4⁺ T 細胞の増殖反応に与える影響を検討した。

4) ハプテン(DNFB)塗布により誘導されたマウス接触性過敏症(CH)モデルにおいて, 感作時あるいは誘導時に抗 PD-1, PD-L1, PD-L2, PD-L1+L2 抗体を投与し, 耳介腫脹に与える影響を検討すると共に, 所属リ

ンパ節および耳介組織における上記分子の発現を検討した。

C. 研究結果

ICOS-B7h 経路

1) CIA モデルにおける抗 B7h 抗体の発症前投与は、臨床的および病理組織学的に関節炎の発症を抑制した。また、発症後の遅延投与においても同様の抑制効果が得られた。CIA マウスでは、関節局所における滑膜浸潤 T 細胞に ICOS 発現が認められた。抗 B7h 抗体投与により、所属リンパ節における ICOS 陽性 T 細胞の減少と滑膜組織炎症性サイトカイン TNF- α , IL-1 β , IL-6 の mRNA 発現低下が観察された。血中の CII 特異的 IgG1, IgG2a, IgG2b 抗体産生の減少および CII に対する T 細胞増殖反応と IFN γ および IL-10 産生抑制が認められた。

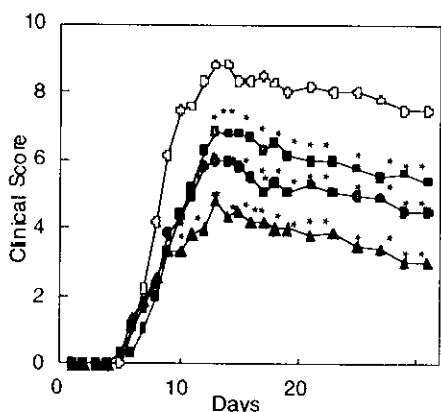


図1 CIAモデルにおける抗B7h抗体投与効果 Bovine type II collagenおよびCFAで2回免疫後、隔日に4回対照抗体(-○-)あるいは抗マウスB7h抗体(-■- 300, -●- 100, -▲- 50 μ g/body)を腹腔内投与後の臨床的関節スコア。

PD-1-PD-L1/PD-L2 経路

2) PD-L1 は、T, B, NK 細胞、マクロファージ、樹状細胞(DC)に恒常的に弱く発現されているが、様々な活性化刺激により発現増強された。これに対して、PD-L2

は、未刺激 T, B, NK 細胞、マクロファージ、DC 上では発現を認めず、活性化刺激により T およびマクロファージにわずかに誘導されたが、B 細胞上には誘導を認めなかった。DC 上には、GM-CSF 刺激により非常に高い発現が 24 時間で誘導された。

3) 至適濃度以下の抗 CD3 抗体刺激時における CD4⁺T 細胞増殖反応は、PD-L2Ig 架橋により濃度依存的に抑制されたが、PD-L1Ig 架橋の抑制効果は弱く明かでなかった。また、同様の至適濃度以下の抗 CD3 抗体刺激時による CD4⁺T 細胞増殖反応は、抗 PD-L1 あるいは抗 PD-L2 抗体添加により抑制された。

4) CH モデルにおける抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体あるいは抗 PD-L1+PD-L2 抗体の感作時における投与は、耳介腫脹を増強させると共に、腫脹の持続を引き起こした。腫脹耳介組織のほとんどの浸潤細胞に、PD-1, PD-L1, PD-L2 の発現が認められた。また、PD-1 発現は未感作耳介血管内皮細胞に既に認められ、PD-L1 および PD-L2 は 腫脹耳介組織の角化細胞に発現を認めた。

D. 考察

ICOS 共刺激経路は、ICOS 欠損マウスや、マウス疾患モデルにおける ICOSIg 投与の結果から、Th2 反応により関与していることを示唆する報告がされていたが、本研究で用いた CIA モデルにおいては、抗 B7h 抗体投与による ICOS-B7h 経路の阻害は、Th1 および Th2 細胞介在性の細胞性および液性免疫反応を効果的に抑制することが示された。また、局所における炎症性サイトカイン発現抑制の結果から、ICOS 阻害は T 細胞反応抑制のみならず抗炎症効果を発揮できる可能性が示唆された。ICOS 阻害は、ヒト関節リウマチやその他の自己免疫性炎症性疾患に治療の一手段として有効となるかもしれない。

PD-L1 と PD-L2 は、レセプター PD-1 を共有するが、発現分布はかなり異なり、

免疫担当細胞のみならず組織細胞上に誘導されることから、T細胞およびAPC間において主要な役割を果たしているCD28/CTLA-4-CD80/CD86経路とは異なる細胞-細胞間相互作用に参与している可能性が示唆された。既に報告されているPD-1遺伝子欠損マウスの結果から、PD-1分子が抑制的に働くことが示唆されるが、抗PD-L1あるいは抗PD-L2抗体を用いた*in vitro*の結果では、抑制シグナル分子としてでは説明しがたいので、相反する陽性シグナル分子としてのPD-1の関与あるいはPD-1とは異なる第2のレセプターの存在も示唆されるが、この点に関しては今後の課題として残された。

E. 結論

マウスCIAモデルにおける抗B7h抗体投与によるICOS-B7h経路阻害は、CIIに対するTh1およびTh2細胞の両反応の抑制と抗炎症作用により関節炎症状を抑制したと考えられた。また、PD-1-PD-L1/PD-L2は、発現誘導・分布や*in vivo/in vitro*における機能的な違いから、現在まで解析されてきたCD28/CTLA-4などのT細胞補助シグナル分子とは異なる役割を果たしている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okano, M., Nishizaki, K., Abe, M., Wang M-M., Yoishino, T., Satoskar A. R., Ogawa. T., Azuma, M., Nishizaki, K. Expression of costimulatory CD80/CD86-CD28/CD152 molecules in nasal mucosa of patients with perennial allergic rhinitis. Clin. Exp. Allergy 31: 1241-9, 2001
- 2) Nuriya, S., Enomoto, S., Azuma, M.

The role of CTLA-4 in murine contact hypersensitivity. J. Invest. Dermatol. 116: 764-768, 2001

- 3) Ebata, T., S. Mogi, Y. Hata, J. Fujimoto, K. Okumura, M. Azuma. Rapid induction of CD95 ligand and CD4⁺ T cell-mediated apoptosis by CD137 (4-1BB) costimulation. Eur. J. Immunol. 31: 1410-1416, 2001.

- 4) Nozawa, K., J. Ohata, J. Sakurai, H. Hashimoto, H. Yagita, K. Okumura, M. Azuma. Preferential blockade of CD8⁺ T cell responses by administration of anti-CD137 ligand monoclonal antibody results in differential effect on development of murine acute chronic graft-vs-host diseases. J. Immunol. 167: 4981-4986, 2001

- 5) Guo, Z., Wu, T., Kirchhof, N., Mital, D., Williams, J. M., Azuma, M., Sutherland, D. E. R., Hering, B. J. Immunotherapy with nondepleting anti-CD4 monoclonal antibodies but not CD28 antagonists protects islet graft in spontaneously diabetic NOD mice from autoimmune destruction and allogeneic and xenogeneic graft rejection. Transplantation 71: 1656-1665, 2001.

- 6) Okano, M., Azuma, M., Yoshino, T., Hattori, H., Nakada, M., Satoskar, AR., Harn, DA., Nakayama, E., Akagi, T., Nishizaki, K. Differential role of CD80 and CD86 molecules in the induction and the effector phases of allergic rhinitis in mice. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 164: 1501-1507, 2001

2. 学会発表

- 1) コラーゲン誘導関節炎発症におけるICOS/AILIM-B7h/B7RP-1の関与：岩井秀

之, Pornpan Yougnak, 津島文彦, 金丸史子, 大月典子, 小園裕子, 秋葉久弥, 八木田秀雄, 奥村康, 上阪等, 宮坂信之, 東みゆき. 第 31 回日本免疫学会, 大阪, 2001. 12. 11-13

2) Functional role of PD-L1 and PD-L2 in T cell activation : Pornpan YOUNGNAK, Yuko KOZONO, Hideyuki IWAI, Hisaya AKIBA, Ko OKUMURA, Hideo YAGITA, Ken OMURA, Miyuki AZUMA 第 31 回日本免疫学会, 大阪, 2001. 12. 11-13

3) マウス接触性過敏症モデルにおける PD-1 抑制シグナルの機能解析: 津島文彦, 茂木世紀, ヨアンナークポンパン, 金丸史子, 岩井秀之, 大月典子, 小園裕子, 小村健, 東みゆき. 第 31 回日本免疫学会, 大阪, 2001. 12. 11-13

4) PD-1/PD-1 リガンド経路によるヒト CD4+T 細胞反応制御機構の解析: 大月典子, 町田詩子, 津島文彦, 岩井秀之, 小園裕子, 東みゆき. 第 31 回日本免疫学会, 大阪, 2001. 12. 11-13

5) 新規 B7 ファミリー分子 PD-L1 と PD-L2 の発現と機能解析: 山崎智英, 秋葉久弥, 岩井秀之, 東みゆき, 八木田秀雄, 奥村康. 第 31 回日本免疫学会, 大阪, 2001. 12. 11-13

H. 知的財産権の出願・登録状況

a) 特許取得

なし

b) 実用新案特許

なし

c) その他

なし

25. マウス ES 細胞からの樹状細胞分化誘導法の開発

分担研究者 西村 泰治 熊本大学大学院医学研究科免疫識別学講座

研究要旨

感染性微生物の侵入に際し、樹状細胞 (DC) がこれを貪食・プロセスして抗原を T 細胞に提示し活性化することにより、免疫応答が開始される。一方で DC は自己抗原に対する T 細胞応答を抑制することにより、免疫寛容を維持していると考えられている。このように免疫応答を制御する機能をもつ DC の機能を人為的に修飾することにより、生体の免疫応答を抗原特異的に制御できる可能性が考えられる。そこで、遺伝子改変により特定の抗原と免疫制御分子を発現させた DC を生体に投与し、抗原に特異的な T 細胞の反応を制御することにより、自己免疫疾患・アレルギー疾患の治療を行うことを考えた。本研究では、マウス ES 細胞から *in vitro* で DC へ分化誘導する方法を開発し、さらに、ES 細胞に遺伝子導入したものを DC へ分化させ発現させるシステムを構築することを確認した。

A. 研究目的

樹状細胞の抗原提示機構ならびに T 細胞応答制御機構については、近年の研究により種々の知見が得られているが、未だ未知の部分が多い。また、生体内で樹状細胞が抗原提示細胞として免疫制御を中心的に担っていることより、樹状細胞を用いた免疫療法が新しい医療技術として有望視されている。本研究は、1) ES 細胞のレベルで遺伝子の標的破壊を行った樹状細胞を用いて抗原提示の分子機構の研究を行う。2) 種々の抗原遺伝子と免疫制御分子の遺伝子を ES 細胞に導入し、これを樹状細胞に分化させたものを生体移入し、個体の免疫応答を抗原特異的に制御する方法を開発する。を最終目標とし、ES 細胞から *in vitro* で樹状細胞を誘導する方法の開発を目的とする。

B. 研究方法

1. ES 細胞からの未成熟および成熟樹状細胞の *in vitro* における分化誘導 ES 細胞株として TT2 (C57BL/6 と CBA の F1 胚由来) を用いた。マウス ES

細胞を M-CSF を産生しない骨髄ストローマ細胞株である OP-9 と 5 日間共培養し、血球系細胞への分化を誘導した。次に、GM-CSF を添加した培養液中において M-CSF 産生性の骨髄ストローマ細胞である PA-6 とともに 5 日間培養を行った。この結果出現する ES 細胞由来の細胞を GM-CSF の存在下でさらに 3-7 日培養すると、不規則な形態と樹状突起を有する浮遊細胞 (未成熟樹状細胞) が誘導された。さらに、この細胞を IL-4 と TNF- α を用いて 2-4 日間刺激し、成熟樹状細胞への分化を誘導した。

2. ES 細胞由来の樹状細胞の形態と機能の解析 未成熟および成熟樹状細胞について、位相差顕微鏡による形態の観察とフローサイトメトリーによる細胞表面分子の解析を行った。また、一次アロ MLR 反応刺激活性を指標としてナイーブ T 細胞刺激活性の解析を行った。さらに、PCC (ハトチトクローム C) をモデル抗原として、抗原特異的な T 細胞に対する抗原提示活性を評価した。

3. ES 細胞への遺伝子発現ベクターの導

入と樹状細胞段階での機能発現の確認

β アクチンプロモーター + IRES-Puro-R を含むベクター (pCAGGSIRESPuro, 理化学研究所・丹羽仁史博士により供与) を用いて、抗原およびケモカイン等の発現ベクターを作製した。ES 細胞への遺伝子導入は、常法に基き電気穿孔法にて行った。遺伝子導入細胞クローンを単離したのち、上記の方法により、樹状細胞へ分化させた。

C. 研究結果

ES 細胞から *in vitro* において分化誘導の未成熟および成熟樹状細胞は、マウス骨髄から GM-CSF を用いて分化誘導した樹状細胞と同様の形態を有していた。また、MHC クラス II 分子、CD11c、CD86、CD40 分子等を発現しており、さらにこれらの分子の発現は、樹状細胞の成熟に伴って上昇し、この点でも骨髄細胞由来樹状細胞と類似した性質を有するものであった。ES 細胞由来の樹状細胞は、蛋白質抗原をプロセスしペプチド抗原として MHC クラス II 拘束性に CD4+T 細胞に提示する機能を有していた。また、未成熟および成熟樹状細胞は

一次アロ MLR 刺激活性を有しており、特に成熟樹状細胞は非常に強い刺激活性を有していた。以上のことから、我々が ES 細胞から誘導した樹状細胞は、生体内に存在する樹状細胞あるいはマウスの骨髄細胞から誘導される樹状細胞と同等の機能を有するものであると考えられる。また、 β アクチンプロモーター + IRES-Puro-R を含む発現ベクター (pCAGGSIRESPuro, 丹羽仁史博士により供与) を用いることにより、ES 細胞に導入した遺伝子を高い効率 (ES 細胞段階で選択したクローンのうち 60% 以上のクローン) で ES 細胞由来の樹状細胞に発現させることが可能であった。さらに、PCC エピトープを提示した樹状細胞、さらに、OVA (オブアルブミン) 抗原を発現する樹状細胞を作製し、これらが各々の抗原に特異的な T 細胞を刺激しうるということが確認された。

D. 考察

樹状細胞に遺伝子を導入して生体に投与する方法が、他の方法たとえば DNA ワクチンあるいは蛋白質・ペプチドワクチンより有効であることは、すでに報告

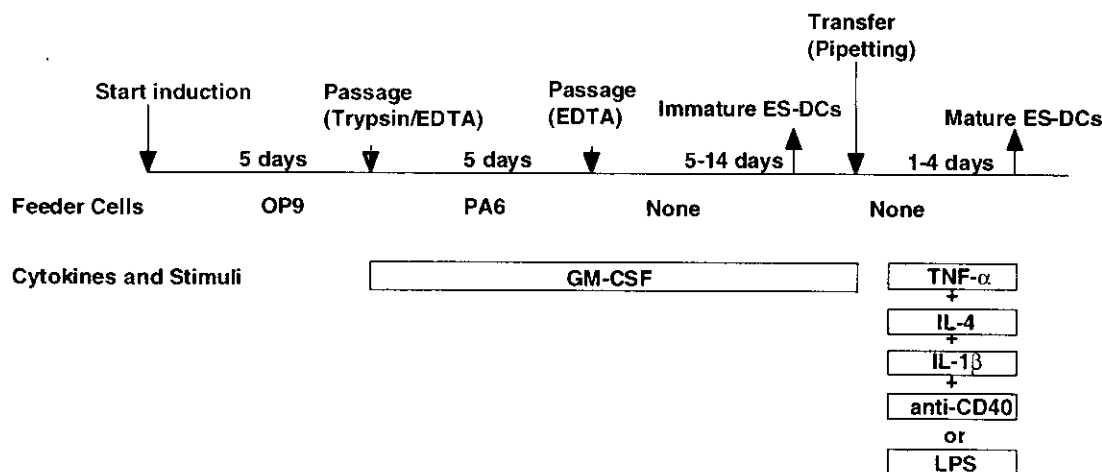


図1. マウスES細胞から樹状細胞への分化誘導法

されている。これまでに行われた樹状細胞における遺伝子改変では、腫瘍抗原遺伝子あるいはサイトカイン遺伝子を導入した樹状細胞を癌患者に移入し、抗腫瘍免疫応答を誘導する試みがなされている。その方法として、レトロウイルスあるいはアデノウイルスなどのウイルスベクターを用いて樹状細胞へ遺伝子を導入し生体へ投与する方法が行なわれている。一方、申請者らのES細胞を用いる方法は、ウイルスベクターを用いる方法に比べ、以下のような利点を有している。

1) ES細胞においては、電気穿孔法を用いる遺伝子導入法と薬剤耐性遺伝子による遺伝子改変細胞の選択法が確立されている。また、ES細胞はクローンとして維持・増殖・凍結保存することが容易に可能である。したがって、適切な遺伝子改変を行なったES細胞のクローンを単離したうえで増殖させ凍結保存したストックを作製しておき、必要時にこれを融解して樹状細胞へ分化させることにより、遺伝的に均一であり導入遺伝子を100%発現した樹状細胞を安定して治療に用いることが可能である。

2) ウイルスベクターを用いる場合、導入できる遺伝子の数(種類)と大きさ(サイズ)に制限がある。一方、ES細胞の場合、遺伝子の共導入(co-transfection)および複数の薬剤耐性遺伝子を用いた段階的導入により複数の遺伝子を導入できる。さらに、遺伝子の標的破壊・改変・導入を行なうことも可能である。これらの特性は、単に免疫効果の増強を目的として用いるのみでなく、免疫応答の抑制的あるいは質的な制御を行なう等の目的で、より複雑な遺伝子改変が必要とされる際には必須のものである。

3) ES細胞を用いる方法では、遺伝

子改変ES細胞クローンを樹立した時点で病原微生物の混入や発がん遺伝子の活性化等の有無を検査し、さらに樹状細胞へ分化した段階での特性を十分に検討したうえで治療に用いることが可能である。従って、野生型ウイルスとの組み換えあるいは混入など潜在的な危険性を有するウイルスベクターを用いる方法に比べ、より安全性が高いと考えられる。

本研究は、マウスのES細胞を用いるものであるが、同様の方法でヒトのES細胞からも樹状細胞の誘導が可能であると予想される。最近、マウスにおいては、体細胞からの核移植により、体細胞を分離した個体と同一の遺伝的背景を有するES細胞を作製しうるということが報告されている。このような近年のES細胞関連技術の進歩と組み合わせることにより、本研究の成果は、遺伝子改変を行った樹状細胞を生体移入することによる抗原特異的免疫制御療法への実現性を秘めている。

E. 結論

我々は、マウスES細胞をin vitroにおいて樹状細胞に分化させる方法を開発した。さらに、ベータアクチンプロモーターを含む発現ベクターを用いることにより、ES細胞の段階で遺伝子導入を行い樹状細胞に分化した後にその遺伝子を発現するES細胞を高い効率で得る方法を確立した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

発表論文

1. Yamada, K., Senju, S., Nakatsura, T.,

- Murata, Y., Ishihara, M., Nakamura, S., Ohno, S., Negi, A., and Nishimura, Y. Identification of a novel autoantigen UACA in patients with panuveitis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 280:1169-1176, 2001
2. Nakatsura, T., Senju, S., Yamada, K., Jyotsuka, T., Ogawa, M., and Nishimura, Y. Gene cloning of immunogenic antigens over-expressed in pancreatic cancer. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 281: 936-944, 2001
 3. Maeda, A., Ohguro, H., Nabeta, Y., Hirohashi, Y., Sahara, H., Maeda, T., Wada, Y., Sato, T., Yun, C., Nishimura, Y., Kuroki, Y., Sato, N. Identification of human antitumor cytotoxic T lymphocytes epitopes of recoverin, cancer-associated retinopathy antigen, to achieve a clinical better prognosis in a paraneoplastic syndrome. *Eur. J. Immunol.* 31: 563-572, 2001
 4. Minohara, M., Ochi, H., Matsushita, S., Irie, A., Nishimura, Y., and Kira, J-I. Differences between T cell reactivities to major myelin protein-derived peptides in opticospinal and conventional forms of multiple sclerosis and healthy controls. *Tissue Antigens* 57: 447-456, 2001
 5. Nishimura, Y., Ito, H., Tabata, H., Fujii, S., Tokano, Y., Chen, Y-Z., Matsuda, I., Mitsuya, H., Kira, J-I., Hashimoto, H., Senju, S., and Matsushita, S. (review) Molecular and cellular analyses of HLA class II - associated susceptibility to autoimmune diseases in the Japanese population. *Modern Rheumatology* 11: 103-112, 2001
 6. Inoue, R., Matsushita, S., Kaneko, H., Shinoda, S., Sakaguchi, H., Nishimura, Y. and Kondo, N. Identification of β - lactoglobulin-derived peptides and class II HLA molecules recognized by T Cells from patients with milk allergy. *Clin. Exp. Immunol.* 31: 1126-1134, 2001
 7. Fujii, S.*, Uemura, Y.*, Iwai, L.K., Ando, M., Senju, S. and Nishimura, Y. (*equal contribution) Establishment of an expression cloning system for CD4+ T cell epitopes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 284: 1140-1147, 2001
 8. Yamada, K., Senju, S., Shinohara, T., Nakatsura, T., Murata, Y., Ishihara, M., Nakamura, S., Ohno, S., Negi, A., and Nishimura, Y. Humoral immune response directed against LEDGF in patients with VKH. *Immunol. Letters* 78: 161-168
 9. Kamata, T., Tieu, K.K, Irie, A., Springer, T.A., and Takada, Y. Amino acid residues in the α IIb subunit that are critical for ligand binding to integrin α IIbb3 are clustered in the b-propeller model. *J. Biol. Chem.* In press
 10. Masuda, M., Senju, S., Fujii, S-I., Terasaki, Y., Takeya, M., Hashimoto, S-I., Matsushima, K., Yumoto, E., and Nishimura, Y.; Identification and

immunocytochemical analysis of DCNP1, a dendritic cell-associated nuclear protein *Biochem. Biophys. Res. Comm.* in press

11. Kudo, H., Matsuoka, T., Mitsuya, H., Nishimura Y., and Matsusita, S.; Cross-linking HLA-DR molecules on Th1 cells induces anaergy in association with increased level of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. *Immunol. Lts.* in press
12. Nakatsura, T., Senju, S., Ito, M., Nishimura, Y.*, and Itoh, K.* (*equal contribution); Cellular and Humoral Immune Responses to A Human Pancreatic Cancer Antigen, CLP, Originally Defined by the SEREX Method *Eur. J. Immunol.* in press

和文総説

1. 西村泰治, 「MHC による T リンパ球への抗原提示」, 特集: 免疫学研究の最新動向, 学術月報 Vol.54 No.7, pp685-689, 2001 年
2. 植村 靖史, 西村 泰治, 「CLIP 置換型インバリアント鎖遺伝子ライブラリーを用いた自己反応性 CD4+T 細胞が認識する抗原ペプチドの多様性の解析」, 臨床免疫, 第37巻2号, pp157-165, 2002 年

単行本

1. 西村泰治, 「組織適合性抗原」 「HLA」ほか, 南山堂医学大辞典, 南山堂 (東京), 印刷中

2. 西村泰治, 「免疫遺伝学」, 膠原病・リウマチ学, (宮坂信之 編), 膠原病・リウマチ疾患総論, 朝倉書店(東京), 印刷中, 2000.

3. 西村泰治, 千住 覚, 「HLA の構造と機能」, 新版・臨床免疫学, (宮坂信之, 鳥山 一, 浅川英男, 戸澤秀樹 編), 講談社 (東京) pp55-62, 2001 年

学会発表

1) 国際学会

1. Nishimura, Y. Identification of autoantigens associated with Vogt-Koyanagi-Harada disease by immunoscreening of a uveal cDNA expression library, Vogt-Koyanagi-Harada Syndrome second international workshop, 幕張プリンスホテル (千葉), 2001 年 6 月 27~28 日

2) 国内学会

1. ヒト CD4+T 細胞が認識する腫瘍関連抗原ペプチドの解析, 西村泰治, Yun Chuns, 横溝 博, 藤井慎嗣, 植村靖史, 松下 祥, 千住 覚, 第 5 回基盤的癌免疫研究会総会 (三重県津市), 2001 年 7 月 18~19 日
2. Degeneracy in recognition of antigenic peptides by human CD4+ T cell clones; it's possible implications to clinical medicine. , 西村泰治, 感染研学会シンポジウム「第 1 回 MHC と疾患セミナー」国立感染症研究所 (東京), 2001 年 8 月 8 日

3. SEREX 法にて同定した膵癌抗原 KM-PA-2 由来ペプチドに対する細胞性および液性免疫の解析, 中面哲也, 七条茂樹, 伊藤雅昭, 千住 覚, 小川道雄, 伊東恭悟, 西村泰治, 第 60 回日本癌学会 (横浜), 2001 年 9 月 26 日~28 日
4. I 型糖尿病患者より樹立した HLA-DR53 拘束性 GAD65 自己反応性 T 細胞により交差認識される多様なエピトープの解析, 西村泰治, 植村靖史, 藤井慎嗣, 田畑博己, 千住 覚, 日本人類遺伝学会第 46 回大会 (埼玉県大宮市), 2001 年 10 月 3~5 日
5. T 細胞クローンが認識する抗原ペプチドの多様性と自己免疫現象, 西村泰治, 第 51 回日本アレルギー学会シンポジウム (福岡市), 2001 年 10 月 29~31 日
6. HLA クラス II 多型と自己免疫疾患, 西村泰治, 第 10 回日本組織適合性学会, シンポジウム「多因子疾患の遺伝要因としての HLA」(福岡市), 2001 年 11 月 1 日~2 日
7. Vogt-小柳-原田病に関連する自己抗原の解析, 千住 覚, 山田和博, 篠原利通, 村田恭啓, 中面哲也, 石原麻美, 中村 聡, 大野重昭, 谷原秀信, 根木 昭, 西村泰治, 第 10 回日本組織適合性学会 (福岡), 2001 年 11 月 1 日~2 日
8. HLA 遺伝子の多型による IDDM への疾患感受性の決定機序の解析: CLIP 置換型インバリエント鎖遺伝子を用いた GAD65 自己反応性 TCR リガンドの多様性の解析, 植村靖史, 藤井慎嗣, 千住 覚, 田畑博己, 西村泰治, 第 10 回日本組織適合性学会 (福岡), 2001 年 11 月 1 日~2 日
9. SEREX 法により同定した膵癌抗原 Coactosin-like protein(CLP) に対する細胞性および液性免疫の解析, 中面哲也, 千住 覚, 伊藤雅昭, 西村泰治, 伊東恭悟, 第 31 回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪), 2001 年 12 月 11~13 日
10. マウス ES 細胞からの樹状細胞分化誘導法の開発, 千住 覚, 増田聖子, 松吉秀武, 平田真哉, 植村靖史, 荒木喜美, 山村研一, 西村泰治, 第 31 回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪), 2001 年 12 月 11~13 日
11. Characteristics of hyper-reactive T cells induced by long time exposure to IL-2 alone and derived from an activated CD4+ T cell clone, CHEN Yu-zhen, NISIMURA yasuharu, 第 31 回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪), 2001 年 12 月 11~13 日
12. 抗原ペプチドアナログに対するヒト CD4+ T 細胞応答の解析における HVS 不死化 T 細胞株の有用性, 塚本博丈, 入江 厚, CHEN Yu-Zhen, 西村泰治, 第 31 回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪), 2001 年 12 月 11~13 日
13. CLIP 置換型インバリエント鎖遺伝