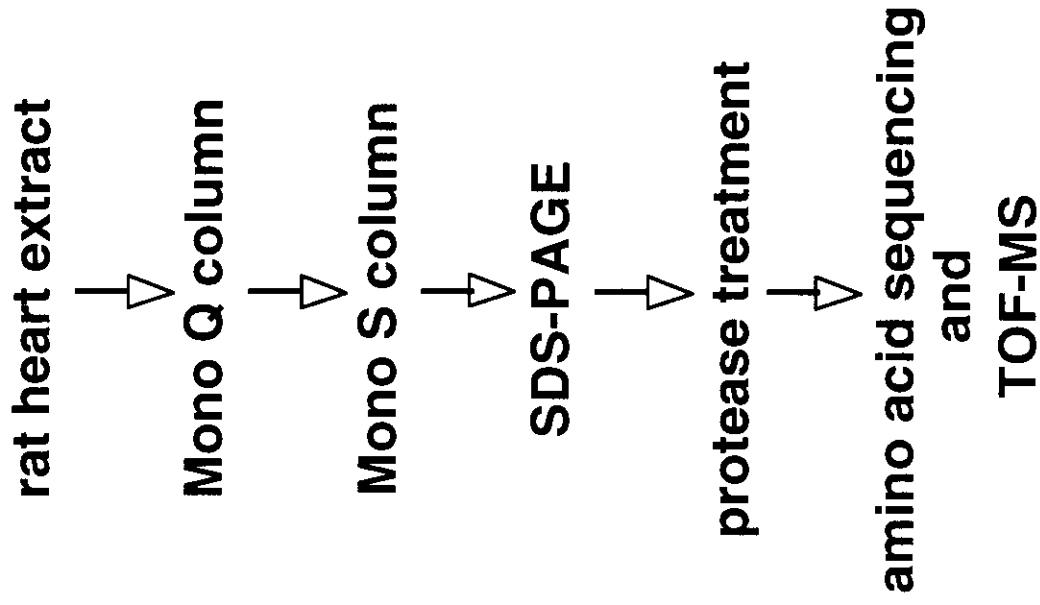
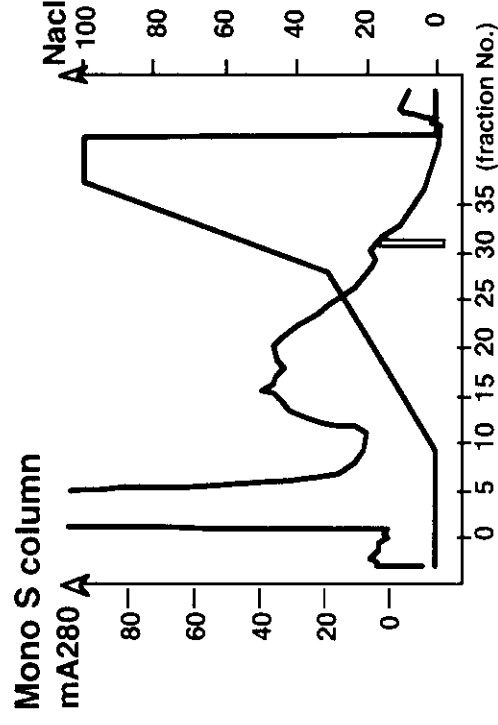
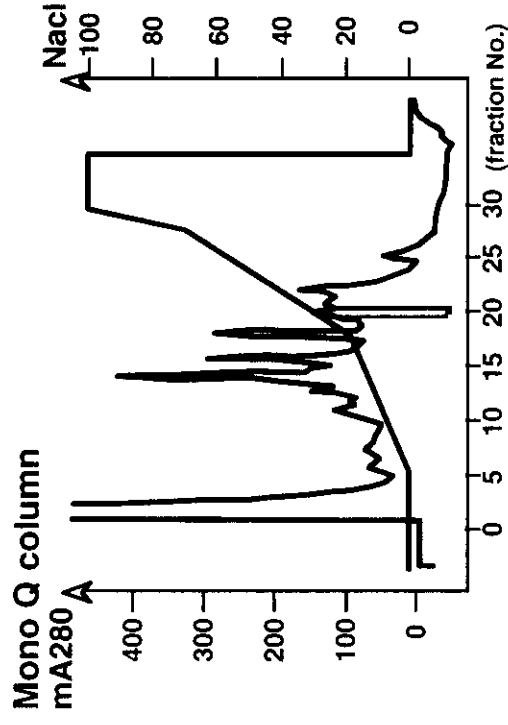


Purification of autoantigen by FPLC system

Purification strategy



Chromatogram



Purity of the 33kDa band

Silver staining

Western blotting

crude (+ NP40)

crude (- NP40)

Mono Q fr.22

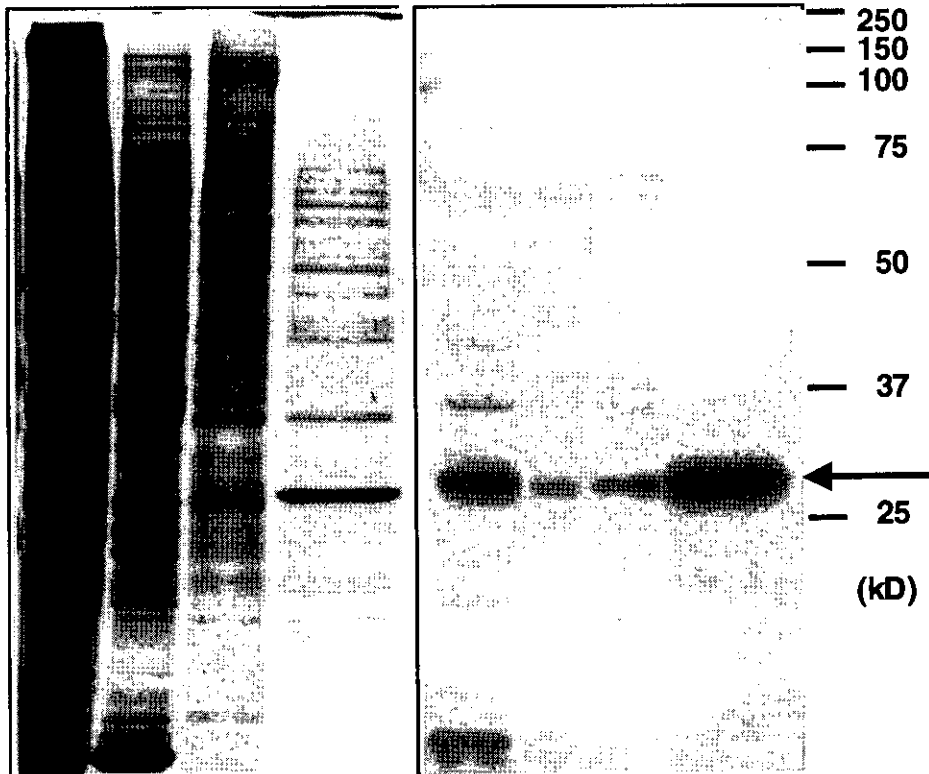
Mono S fr.33

crude (+ NP40)

crude (- NP40)

Mono Q fr.22

Mono S fr.33



実験的腎盂腎炎によるマウス全身性エリテマトーデス様病変の誘導

三村俊英（東京大学大学院医学系研究科内科学・アレルギー・リウマチ内科）

研究要旨

自己免疫疾患の発症に感染が関与しているという可能性がありことから、本研究においては、マウスにおける尿路感染が自己免疫現象を誘導し得るか否かを検討した。その結果、MRL+/+マウスにおいては、1回の実験的腎盂腎炎惹起2～3ヶ月後に血清学的・免疫組織学的に高率に抗核抗体、糸球体腎炎などSLE様病変が誘導された。今回の結果からヒトSLEの発症に関して、遺伝的背景を有する患者においては、尿路感染症がSLEの発症機序において何らかの関与を成している可能性が示唆された。

A. 研究目的

自己免疫疾患の発症には、様々な機序が想定されている。特に自己免疫疾患発症における感染症の関与は大きいと考えられている。感染症の場合としては、全身感染、上気道感染、腸管感染症などが挙げられ、これらの感染症と自己免疫の関係は様々に検討されている。一方腎臓は、自己免疫現象の発現場所としては、大いに注目されているが、自己免疫現象惹起における役割に関しては、未だあまり論じられてはいない。例えば、PBCと尿路感染症の関係、proteus感染症と慢性関節リウマチの関係などにおいて、尿路感染症が自己免疫現象惹起に関係する可能性が論じられているが、確立したものではない。一方、Klebsiella pneumoniae 尿路感染症と自己免疫現象の関係を論じた報告が1987年にShoenfeldのグループによって出されている。この報告では、52例のklebsiellaによる尿路感染または菌血症患者の血清中の抗DNA抗体、抗核抗体、抗カルジオリピン抗体、および抗DNAイデオタイプ16/6の存在を検討しており、その結果、27%に至る抗核抗体と37%の16/6イデオタイプの存在を認めた。Klebsiella以外のGram negative感染症におけるこれらの抗体検出頻度は17%および19%で、一方健常者対照群においてはどちらも5%以下であった。魅力的な検討で

あるがその後追試を含めてこのような研究は報告されてはいない。そこで、本研究においては、実験的腎盂腎炎をマウスに作製し、自己免疫現象が発症するかどうかを経時的に観察し、尿路感染症と自己免疫現象に関して検討し、自己免疫疾患の発症機序解明に寄与したい。

B. 研究方法

マウスおよび実験的腎盂腎炎作製

8週齢のMRL+/+マウスに、Khalilらの方法(J. Urol 1997)に従い、生理的食塩水に浮遊させた 5×10^8 個のE.coliを逆行性に尿道カテーテルを用いて膀胱内に注入し実験的腎盂腎炎を作成した。

対照群においては、細菌を混入していない生理食塩水を用いて同様の操作を行った。

血清免疫学的検査

大腸菌注入直前、4週後、8週後、12週後、16週後と経時的にマウスから採血・採尿を行った後に屠殺し、血清はマウス線維芽細胞を基質とした間接蛍光抗体法による抗核抗体測定および、ELISA法による抗RNP抗体・抗Sm抗体・抗ds-DNA抗体の測定に供した。尿は、蛋白、潜血の定性検査をテープ法にて行った。

組織学的検査

屠殺したマウスは、腎病変検索のため腎臓を摘出しホルマリン固定後にHE染色を

行った。また、腎凍結切片を用いて免疫グロブリン (IgG) およびC3の存在を直接蛍光抗体法により検討した。

C. 研究結果

大腸菌を尿道から膀胱内にカテーテルを逆行性に挿入し、大腸菌を注入したところ、1週間後の組織所見で、腎間質の多核白血球を中心とした細胞浸潤と尿細管の破壊像を一部に認め、急性腎盂腎炎の所見と考えた。注入前には認めなかったが、注入2ヶ月後より血清中に抗核抗体が出現し4ヶ月後には speckled パターン用に見える抗核抗体染色を示した (図1)。また、大腸菌注入マウスにおける血清抗核抗体は、経時的に陽性率・抗体価が上昇したが、大腸菌を注入していないシャム操作のみのコントロール群では抗核抗体は観察期間中全て陰性であった。(図2)。また、10~20%のマウスで大腸菌注入3ヶ月以降に抗RNP抗体、抗Sm抗体、抗ds-DNA抗体が出現した。細菌注入群では1回の注入操作にもかかわらず蛋白尿が持続し、注入2ヶ月以降の腎では、糸球体におけるメサンギウム基質の増生と軽度細胞浸潤を認めた (図3)。さらに免疫グロブリン(IgG)、補体(C3)の糸球体領域への沈着が認められた (図4および5)。間質領域においては尿細管の萎縮も認めた。コントロール群の腎にはこれらの変化は認めなかった。また細菌注入群の中には脱毛・紅斑等の皮膚病変を呈するものも認められた。

D. 考察

今回の研究により、逆行性腎盂腎炎作成によりマウスに自己免疫現象を誘導することができた。この機序としては、以下の可能性が考えられた。1. 腎臓における抗原提示を介して大腸菌菌体成分が免疫系に提示されるが、この時菌体成分と自己構成成分の分子相同性が高いことにより自己免疫現象が発症した。2. 腎臓における大腸菌感染が、腎臓局所の抗原提示能を変調させることで、増強された自己抗原提示が自己反応性 CD4+T 細胞を活性化した。3. 重症感染症を契機とした polyclonal

activation を介して、MRL +/+マウスに本来バックグラウンドとして存在している自己反応性クローンが活性化された。腎臓は尿路を介して外界とつながっている臓器の1つである。しかし、気道系や消化器系とは異なり、外界との交通は本来一方通行で、外界からの侵入は予想されていないためか、扁桃腺やパイエル板に相当するような所属リンパ節は発達していない。しかし、血流は豊富なため、樹状細胞 (DC) の侵入が容易に行われる可能性はある。一方、腎臓において、professional APC が存在し外来抗原などをT細胞に呈示するかどうかは議論の余地あるところである。腎臓は正常状態において抗原呈示能は高くはないが、共刺激分子を発現せずに MHC class II を弱く発現することで自己反応性T細胞の反応性を抑制するなど働く可能性がある。一方、ある種の状態においては RTEC は MHC class II は強く発現するが B7 は発現せず、移植腎の生着におけるアロ特異的T細胞の抑制において重要な機序をなしている可能性がある。さらに、ある種の感染症など特殊な状態においては MHC class II と B7 を共に発現し抗原特異的 CD4 T細胞を刺激し、臓器障害、全身的自己免疫に関与する可能性が考えられる。このように、腎臓においては、自己免疫現象発症機序のうち、感染症の場として molecular mimicry に関与し、さらに感染症などに際して抗原提示能に変化を示すことの2点を介して自己免疫疾患発症に関与する可能性が推定される。

E. 結論

一過性の腎盂腎炎作成により、自己免疫現象を発症させることに成功した。ヒト全身性自己免疫疾患の発症においても、腎盂腎炎の関与が考えられる。今後、遺伝的に自己免疫疾患発症の可能性が高い個体においては、積極的に腎盂腎炎などの予防を行うことにより自己免疫疾患の発症自体を予防することも可能となると期待できる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kanda, H., Kubo, K., Hamasaki, K., Kanda, Y., Nakao, A., Kitamura, T., Fujita, T., Yamamoto, K., and Mimura, T. Influence of various hemodialysis membranes on the plasma (1→3)-β-D-Glucan level. *Kid. Int.* 60, 319-323, 2001
- 2) Hagiwara, S., Yagisawa, M., Saeki, K., Iki, S., Urabe, A., Mimura, T., Miwa, A., Togawa, A., Higashihara, M., Takaku, F., and Yuo, A. Tyrosine phosphorylation of proteins in primary human myeloid leukemic cells stimulated by macrophage colony-stimulating factor: analysis by disease type and comparison with normal human hematopoietic cells. *Int. J. Hematol.* 73, 100-107, 2001

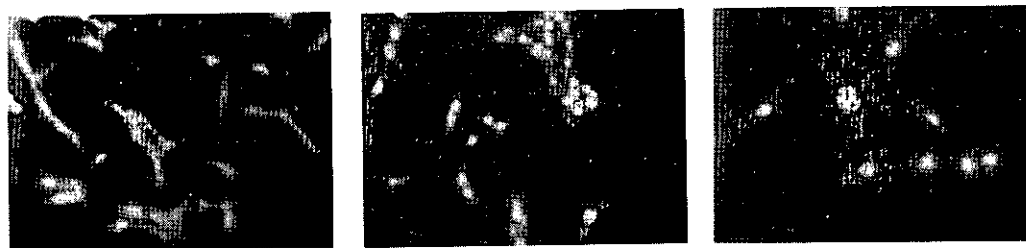
2. 学会発表

- 1) 浜崎 健、神田浩子、久保かなえ、立石晶子、米積亜紀、山本一彦、三村俊英. 実験的腎盂腎炎作成によるマウス全身性エリテマトーデス (SLE) 様病変の誘導；日本免疫学会総会（ワークショップ）2001（大阪）
- 2) Hiroko Kanda, Ken Hamasaki, Kanae Kubo, Akiko Tateishi, Aki Yonezumi, Kazuhiko Yamamoto, Toshiro Fujita, Shinichiro Takahashi, Toshihide Mimura. IGF-I suppresses collagen α1(I) and α2(I) mRNA expression via PTPase in pre-adhered mesangial cells. *ASN/ISN World Congress of Nephrology, Journal of American Society of Nephrology*, 707A, 2001
- 3) 神田浩子、浜崎 健、久保かなえ、山本一彦、藤田敏郎、三村俊英. IGF-1 は、接着後のメサンギウム細胞内の Phosphatase 活性を上昇させ、collagen の mRNA 発現を抑制する；第 44 回日本腎臓学会総会，2001（東京）
- 4) 久保かなえ、宮川 清、神田浩子、浜崎 健、藤田敏郎、山本一彦、三村

俊英. 進行性腎障害患者の尿中 wt1 mRNA 検出と isoform 分析の意義；第 44 回日本腎臓学会総会，2001（東京）

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし。

図1 大腸菌注入群のみにおいて血清中の抗核抗体の存在が認められた。



コントロール群
(4ヶ月後)

弱拡大(200倍)

細菌注入群
(4ヶ月後)

弱拡大(200倍)

細菌注入群
(4ヶ月後)

強拡大(400倍)

図2 大腸菌注入マウス血清中の抗核抗体価の上昇

大腸菌注入群においては、注入後の月数を経るに従い抗核抗体価の上昇と、抗核抗体陽性数の増加が認められる。

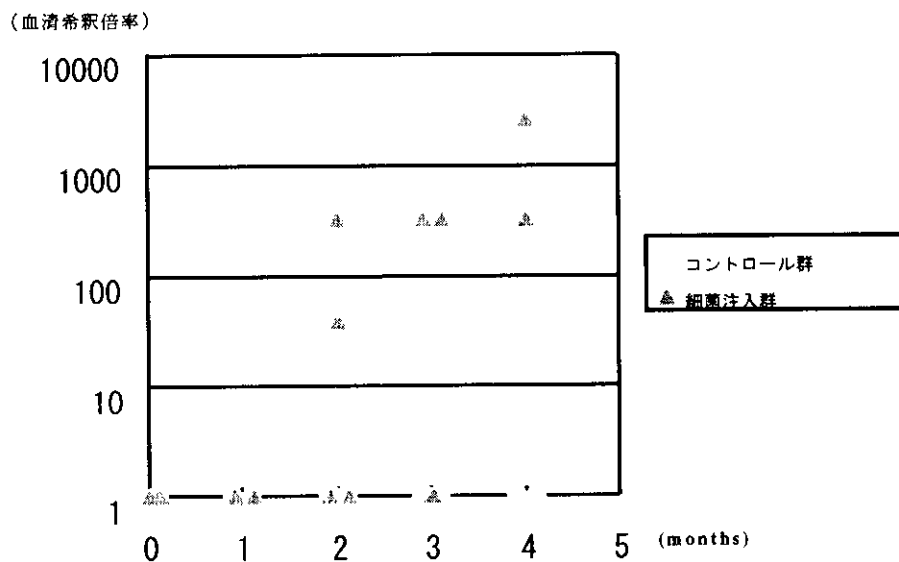
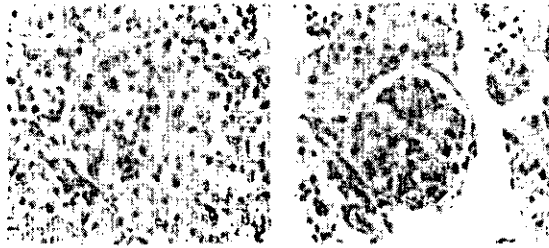


図3 大腸菌注入マウスにおける糸球体の変化

大腸菌注入後4ヶ月のマウス糸球体では、糸球体壁の肥厚と糸球体領域の細胞増加を示し、糸球体腎炎の所見と考えられた。



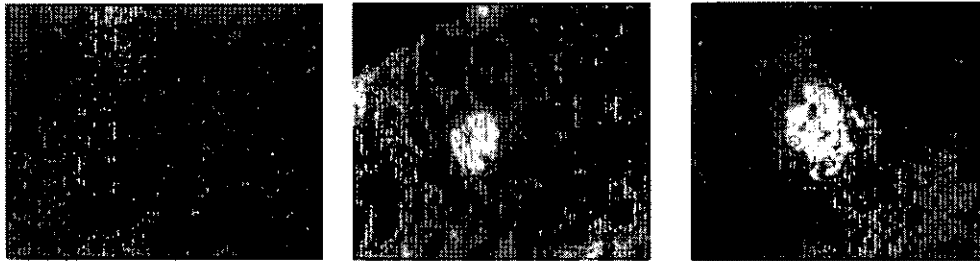
コントロール群

細菌注入群

(細菌注入4ヶ月後、HE染色、400倍拡大)

図4 腎盂腎炎マウス糸球体へのIgG沈着

FITC標識抗マウスIgG抗体を用いた直接免疫蛍光抗体法によりIgGの糸球体への沈着が認められる。



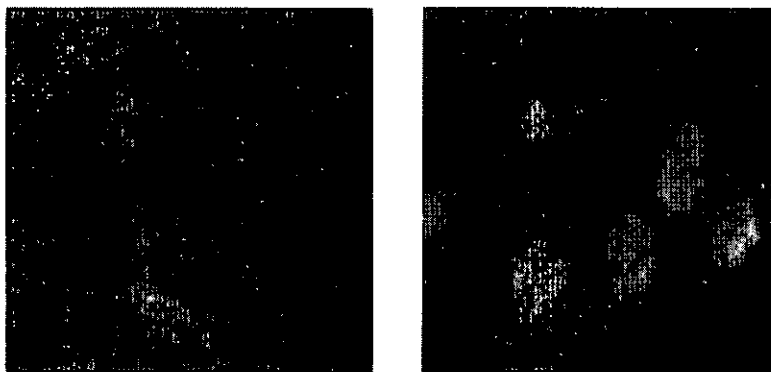
コントロール群
(4ヶ月後)
(400倍拡大)

細菌注入群
(3ヶ月後)
(200倍拡大)

細菌注入群
(4ヶ月後)
(400倍拡大)

図5 腎盂腎炎マウス糸球体へのC3沈着

FITC標識抗マウスC3抗体を用いた免疫蛍光抗体法により大腸菌注入群において糸球体へのC3の沈着が認められる。



コントロール群

細菌注入群

Th1/Th2 バランス制御の免疫病発症における役割に関する研究

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

自己免疫病の発症においては Th1/Th2 バランス制御が重要であることが知られている。そこで、本研究においては、Th1/Th2 バランス制御に重要である、初期免疫調節細胞の機能解析に関する研究を行った。その結果、最も強い抗原提示能力をもつ樹状細胞(DC)のうち、Th1 サイトカインで活性化された骨髄細胞由来 DC(BMDC1)が Th1 免疫や細胞性免疫の活性化に重要であり、Th2 サイトカインで活性化誘導された BMDC2 は Th2 免疫の促進はできるが、細胞性免疫の促進には関与できないことを明らかにした。また、初期免疫エフェクターのうち、IFN- γ 産生型の細胞について解析した結果、NKT, NK 細胞と共に、AsialoGM1+CD8+T 細胞が、抗 CD3 抗体投与後、早期に活性化される調節 T 細胞であることが明確にされた。興味深いことに、Th1 型の自己免疫病（肝炎、糖尿病、EAE）を発症しやすい C57BL/6 マウスにおいては、Th2 型自己免疫病を起こしやすい BALB/c マウスに比して、AsialoGM1+CD8+T 細胞の存在比が高かった。今後これら免疫調節細胞の自己免疫病発症における意義を追求する予定である。

A.研究目的

Th1/Th2 バランス制御に重要な初期免疫調節細胞の機能を詳細に検討し、それら細胞の機能的低下あるいは亢進が自己免疫病発症に関連性を持つか否かを追求する。今研究では、Th1/Th2 制御にかかわる DC サブセットの機能あるいは IFN- γ 産生型の初期免疫調節細胞群について焦点をしぼり検討する。

B.研究方法

1) マウス骨髄細胞由来 DC (BMDC) サブセットの機能解析：マウス骨髄細胞を GM-CSF+IL-3, GM-CSF+IL-3+IL-12+IFN- γ , GM-CSF+IL-3+IL-4 のいずれかの条件で培養し、それぞれを BMDC0, BMDC1,

BMDC2 と定義し、各サブセットの機能解析をおこなった。

2) IFN- γ 産生型初期免疫調節細胞の機能解析：C57BL/6 または BALB/c マウスに抗 CD3 抗体（2 μ g/マウス）を投与し 1,2,4 時間後に血中サイトカイン、および NKT, NK, CD8, CD4 細胞における IFN- γ , IL-4 産生能を測定した。

C.研究結果

樹状細胞(DC)のうち、IL-12, IFN- γ 等の Th1 サイトカインで活性化された骨髄細胞由来 DC(BMDC1)がナイーブ Th 細胞からの Th1 細胞の誘導を増強し、かつ allogeneic CTL の誘導も促進できた。しかし、Th2 サイトカインの存在下で活性化誘導された BMDC2

は Th2 免疫の促進はできたが、細胞性免疫の促進には関与できなかった。また、初期免疫エフェクターのうち、IFN- γ 産生型の細胞について解析した結果、NKT, NK 細胞と共に、AsialoGM1⁺CD8⁺T 細胞が、抗 CD3 抗体投与後、早期に活性化される調節 T 細胞であることが明確にされた。興味深いことに、Th1 型の自己免疫病(肝炎、糖尿病、EAE) を発症しやすい C57BL/6 マウスにおいては、Th2 型自己免疫病を起こしやすい BALB/c マウスに比して、AsialoGM1⁺CD8⁺T 細胞の存在比が高かった。以上の結果より、初期免疫活性化においては DC サブセット、NKT, NK, AsialoGM1⁺CD8⁺T 細胞が CD4⁺T 細胞に先立ち、Th1/Th2 バランス制御にかかわっているものと推定され、それらの機能異常や遺伝支配等が自己免疫病発症に関与することが十分考えられる。

D. 考察

自己免疫病発症要因を究明するためには、如何なる自己抗原に対する免疫応答が、どのような免疫調節異常によって引き起こされるかを明確にしなければいけない。Th1/Th2 バランスの不均衡が自己免疫病に関連性があることは疑いないが、その不均衡の誘導には、Th1, Th2 細胞が誘導されるまでに働く免疫調節細胞が重要であることが本研究によって示された。さらに、それらの調節細胞の存在比が遺伝的に制御されている可能性も示されたことより、このような遺伝子背景が自己免疫発症要因に関与することも考えられる。

E. 結論

自己免疫病の発症に重要と考えられる Th1/Th2 バランス制御においては、DC サブセットの他、NKT, NK, AsialoGM1⁺CD8⁺T 細胞等の初期免疫調節細胞が重要である。

F. 健康危険情報

Th1/Th2 バランスとアレルギー、自己免疫病発症における意義が明らかになってきており、今後は、Th1/Th2 免疫の良いパラメーターを定め、定期的な Th1/Th2 バランスチェックが疾病予防に有効な手段になる可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1: Sato, M., Chamoto, K., Tsuji, T., Iwakura, Y., Togashi, Y., Koda, T., Nishimura, T. : Th1 cytokine-conditioned bone marrow-derived dendritic cells can bypass the requirement for the functions during the generation of CD8(+) CTL. *J Immunol.* 167:3687-91.2001
- 2: Takaoka, A., Tanaka, Y., Tsuji, T., Jinushi, T., Hoshino, A., Asakura, Y., Mita, Y., Watanabe, K., Nakaike, S., Togashi, Y., Koda, T., Matsushima, K., Nishimura, T. : A critical role for mouse CXCL chemokine(s) in pulmonary neutrophilia during the type 1-dependent airway inflammation. *J Immunol.* 167 :2349-53.2001

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

全身性エリテマトーデス（SLE）患者に認められる T 細胞レセプター（TCR）ゼータ鎖異常の分子機序とその制御についてに関する研究

竹内 勤（埼玉医科大学総合医療センター第2内科教授）

研究要旨

全身性エリテマトーデス（SLE）における末梢血 T 細胞機能の分子機序として、T 細胞レセプター・CD3 複合体からの早期シグナル伝達に欠陥が存在し、解析した症例の 60% に、TCR と鎖の蛋白合成低下が、一部の症例には異常スプライシングを伴ったメッセージ異常が見い出された。TCR と鎖蛋白合成障害に、この異常スプライシングを受けた TCR と鎖 mRNA ヴァリエントがどのように関与しているかは不明である。その分子機序を *in vitro* 翻訳システムで検証し、short 3'UTR ヴァリエントは wild フォームに比べ、TCR と鎖蛋白およびその 2 量体形成が低下することが明らかとなった。

A. 研究目的

SLE は自己免疫疾患の原型で、多彩な自己抗体産生とそれに引き続く組織障害を特徴とする。これには、B 細胞の自己抗体産生や自己反応性 T 細胞のエフェクター活性をコントロールすべき調節性 T 細胞の機能不全が重要な役割を演じている。T 細胞機能不全の本態の一つに早期シグナル伝達分子の機能異常が関与する事が明かとなった。なかでも、TCR からのシグナル伝達で中心的役割を演じている TCR と鎖の蛋白発現が低下し、その mRNA に異常が存在する事を明らかにした。その生成機序を解明すると共に、どのような機構によって自己免疫現象が誘導されるのかを明らかにする。T 細胞機能異常の分子機序が解明されれば、より根本的で、理想的な治療薬の開発も期待でき、診断、分子異常の部位と病態との関連、予後、遺伝性などについて、これまでにない多くの情報を得る事ができると期待される。

B. 研究方法

- 1) TCR 架橋後のチロシンリン酸化：免疫ブロット法
- 2) 蛋白表面発現：フローサイトメーターおよび、ビオチン標識後免疫沈降

- 3) T 細胞での蛋白発現：全細胞分画ライゼートからの免疫沈降
- 4) メッセージ量：ribonuclease protection assay および、real time PCR
- 5) cDNA 塩基配列：RT-PCR 産物のダイレクトシーケンス
- 6) ゲノム塩基配列：ゲノム DNA のダイレクトシーケンス
- 7) *in vitro* 翻訳：wheat germ extract を用いた検討。
- 8) 安定発現株：TCR と鎖(-)ヒト T 細胞株および、マウス抗原特異的 T 細胞株 MA5.8 を用いて、これにスプライシングヴァリエントを発現させる。
- 9) 細胞機能：各種サイトカイン、自己抗体産生に関与することが示されている BAFF/zTNF/BlyS、*in vitro* 抗 DNA 抗体産生などを ELISA で測定し、細胞機能の指標とする。

C. 研究結果

1. TCR ゼータ鎖 mRNA short 3'UTR ヴァリエントは、正常のエクソン 8 の 910bp から polyadenylation 部位を含む 560bp を欠いた 350bp で、欠失部位にスプライシング・ドナー/アクセプター部位が存在する事から、cryptic splicing 部位を介し

て生成されたヴァリアントと考えられた。

1) このヴァリアント型が実際にゼータ鎖蛋白発現低下に関わっているかどうかを検討するため、in vitro 転写アッセイを行った。その結果、wild 型に比べヴァリアント型では、ゼータ鎖単量体およびホモ2量体の発現が有意に低下することが示された。

2) このヴァリアント型が、TCR 下流のシグナル伝達やサイトカイン産生にどのような影響を及ぼすかを検討するため、レトロウイルスベクターに組み込んで、一過性発現株を樹立した。

D. 考察と結論

TCR ゼータ鎖 mRNA short 3' UTR ヴァリアント型によってゼータ鎖蛋白発現低下が誘導されることが明らかとなった。今後、ヴァリアント型がどのような外的、内的要因によって生成されるかを解析する必要がある。一方、原因の特定と同時に、この異常を是正することによって異常 T 細胞の何が正常に戻るかという検討も必要である。レトロウイルスベクターに組み込んだ wild 型ゼータ鎖を、TCR ゼータ鎖発現低下した患者 T 細胞に感染させ、TCR ゼータ鎖ならびに TCR-CD3 複合体が正常に回復されるか検討する。その上で、かかる患者 T 細胞の機能について解析する。このようなアプローチによって患者 T 細胞機能、とりわけサイトカイン産生や自己抗体誘導能が正常に服することが明らかとなれば、遺伝子治療も含めより原因に近い治療法の開発に向けて大きな前進となる。

G. 研究発表

1. 論文発表

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

2) Tsuzaka T, Onoda N, Yoshimoto K, Zhang L, Pang M, Abe T, and Takeuchi T. Alternatively

spliced 3' untranslated region of TCR z mRNA in the peripheral blood T cells of systemic lupus erythematosus patients. *Modern Rheum* in press.

3) Abe T and Takeuchi T. Rheumatoid Arthritis and tumor necrosis factor α . *Autoimmunity* 34:291-303,2002.

4) Kameda H, Rinsinger JI, Han B-B, Baek SJ, Barrett JC, Abe T, Takeuchi T, Glasgow WC, and Elling TE. Expression of Gab1 lacking the Pleckstrin Homology domain is associated with neoplastic progression. *Mol Cell Biol* 21:6895-6905, 2001.

5) Amano K, and Takeuchi T. Amebiasis in acquired immunodeficiency syndrome. *Int Med* 40: 563-4,2001.

6) Ahmed S, Ihara K, Kanemitsu S, Nakashima H, Otsuka T, Tsuzaka K, Takeuchi T, and Hara T. Association of CTLA-4 but no CD28 gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in the Japanese population. *Rheumatology* 40: 662-7,2001.

7) Kawashima M, Yamamura M, Tani ai M, Yamauchi, H, Tanimoto T, Kurimoto M, Miyawaki S, Amano T, Takeuchi T, and Makino H. Levels of Interleukin-18 and its binding inhibitors in the blood circulation of patients with adult-onset still's disease. *Arthritis & Rheum* 44: 550-60,2001.

8) 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* 75: 640-1,2001.

9) Tsubota K, Fujita H, Tsuzaka K, and Takeuchi T. Lacrimal gland function, lymphocyte infiltration and apoptosis of aciner cells in Mikulicz's disease and Sjogren's syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 101-110,2001.

10) Abe T, and Takeuchi T. The other side of TNF-targeted therapy of patients with rheumatoid arthritis. *Curr Rheum Report* 3: 1-2,2001.

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) 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(国際シンポジウム)

HLA 分子を介したシグナル伝達による抗原提示細胞の応答の解析

松下 祥（埼玉医科大学医学部・免疫学講座）

研究要旨

TCR-ペプチド-MHC 複合体が形成されると、MHC 分子を介して抗原提示細胞側にもシグナルが伝達される。B細胞に DR を介した刺激を入れると、Syk の活性化とともに膜型ならびに分泌型 μ 鎖の発現増強が観察された。Monocytes では DR からのシグナルにより MAPK/Erk・p38 の活性化とともに IL-1 β などの炎症性モノカインの産生が、DQ/DP からのシグナルにより MAPK/p38 の活性化とともに IL-10 などの抗炎症性モノカインの産生がより強く誘導された。抗原提示分子の種類によって自己免疫病の標的細胞に異なる応答が誘導される可能性が示唆された。

A.研究目的

主要組織適合抗原複合体（major histocompatibility complex; MHC）+ペプチドが TCR（T cell receptor; T細胞抗原受容体）と相互作用を起こすと、T細胞側にシグナルが入り T細胞が活性化される。一方、T細胞-抗原提示細胞相互作用により誘導される抗原提示細胞側へのシグナリングに関しては CD40 などがよく知られているが、MHC そのものも重要な役割をになっているという報告は多く（1）、1990年前後に、主にB細胞を用いて PKC, Ca²⁺, cAMP などの動きに焦点をあてた解析が行われた。我々は HLA-ペプチド相互作用に関する長年の研究から、このシグナリングが免疫応答の制御に重要な役割を担っているという結論に到達した（2、3）。本年度はクラス II MHC からのシグナルがどのようなシグナル伝達と細胞応答を誘導するかについて、マクロファージ系の細胞と B細胞を用いて明らかにすることを目的とした。

B.研究方法

(A) まず生理的な HLA のリガンドである TCR を用いて検討した。T細胞上の TCR が B細胞上の HLA/ペプチド複合体を認識した際に、T細胞が活性化されて新しい膜蛋白の発現やサイトカインなどの可溶性因子の合成が起こり、B細胞の応答に影響を与える。

この可能性を除外するために、*de novo* 蛋白合成阻害剤であるエメチンで前処理した T細胞を使用して、すでに発現している TCR や他の膜蛋白のみで B細胞への刺激を試みた。その他にも固相化抗 HLA 抗体やビオチン化抗 HLA 抗体+アビジンを用いた（1）。

(B) 拘束分子の異なる3つのヒト Th0 クローン（BC20.7; DR14 拘束性、DT13.2; DQ6 拘束性、OT1.1; DP5 拘束性）をモデルとして選び、これらの T細胞クローンをエメチン処理して *de novo* 蛋白合成系を停止させておき、ペプチドをパルスした末梢血単球（マクロファージ）とを共培養することで産生されるモノカインを比較した。次に固相化抗 HLA 抗体による架橋で誘導される IL-1 β の産生系に対する各種シグナル伝達抑制剤の効果を検討した。また、ダニ粗抗原、PPD、X19 ランダムペプチドに特異的なヒト T細胞株を樹立した。樹立した DR 拘束性、DP 拘束性の T細胞株のリンホカイン産生パターンを調べた。

C.研究結果

HLA-DR を介した刺激により、増殖反応を伴わずに IgM の産生がアイソタイプ特異的に著明に増強した。固相化抗 DR 抗体を用いた刺激では増殖やアポトーシスは誘導されなかった。また、IgM 産生増強に CD40-CD154 分子の関与は否定的であった。この現象には膜型ならびに分泌型 μ 鎖の mRNA 発現増強を

伴っており、各種シグナル伝達抑制剤のなかでも、PTK 抑制剤、ならびに Syk 抑制剤の piceatannol が IgM 産生を効率良く抑制した。実際、DR 分子の架橋により、Syk のリン酸化ならびに Syk 活性の増強が誘導された。これらの結果は、B 細胞上の HLA-DR 分子がペプチドを T 細胞に提示するだけでなく、それ自身が B 細胞内部にシグナルを伝達する分子として機能しており、Syk の活性化を介して Ig 産生パターンの変化を誘導できることを示している。特に、膜型 IgM の発現増強は、T-B 相互作用のごく初期における BCR 発現レベルの維持に貢献しているのかもしれない。

拘束分子の異なる 3 つのヒト Th0 クローン (BC20.7; DR14 拘束性, DT13.2; DQ6 拘束性, OT1.1; DP5 拘束性) をモデルとして選び、これらの T 細胞クローンをエメチン処理して *de novo* 蛋白合成系を停止させておき、ペプチドをパルスした末梢血単球 (マクロファージ) とを共培養することで産生されるモノカインを比較した。DR 拘束性クローンは炎症性モノカインである IL-1 β や TNF α の産生をより強く誘導する傾向があった。一方、DQ 拘束性クローンと DP 拘束性クローンは、抗炎症性モノカインである IL-10 の産生をより強く誘導する傾向があった。このような傾向は固相化抗体を用いた刺激でも認められたので、これらのモノカイン産生の不均衡が、拘束分子でなく CDw150 (SLAM) 等の他の分子を介した現象である可能性は低いと考えられる。

次に固相化抗 HLA 抗体による架橋で誘導される IL-1 β の産生系に対する各種シグナル伝達抑制剤の効果を検討した。p38 阻害剤 (SB203580) と MEK-1 阻害剤 (PD98059) がこれを部分的に抑制した。また、PTK 阻害剤である genistein は二相性の効果を示し、低濃度では増強的、高濃度では抑制的であった。実際、MAPK/Erk の活性化は DR を介した刺激でのみ観察されたが、MAPK/p38 の活性化は DR, DQ, DP 全てを介した刺激により観察された。抗 DR 抗体で誘導されるこのような現象は F(ab')₂ でも観察される。また、TNF α で誘導される IL-1 β 産生に対して中和活性を有する抗 TNF α 抗体は、抗 DR 抗体で誘導さ

れる Erk の活性化を阻止することが出来なかった。すなわち Fc 部分や TNF α は HLA-DR の架橋によって誘導される Erk の活性化と IL-1 β の産生に関与していないと考えられた。

T-マクロファージ相互作用の系に対する抑制剤の効果も同様な結果を示した。IL-1 β の産生は PD でも SB でも部分的に抑制されたが、両者の効果は相加的であった。また IL-10 の産生に対して PD はむしろ増強的に作用し、SB は抑制的に作用した。このような結果から、DR は p38 と Erk の活性化を介して IL-1 β 産生を強く誘導しているのに対して、DQ/DP は p38 の活性化を介して IL-1 β 産生と IL-10 産生の両方を誘導していると考えられた。

そこでさらに、PBMC レベルでの検討を行った。そのためにまず、ダニ粗抗原特異的なヒト T 細胞株を樹立した。樹立した DR 拘束性、DP 拘束性の T 細胞株のリンホカイン産生パターンを調べたところ、完全に区別することはできないが、前者は Th1、後者は Th2 の傾向があった。この傾向は PPD 特異的な DR 拘束性、DQ 拘束性の T 細胞株のリンホカイン産生パターンにおいても同様であった。さらに、random 19-mer peptide 反応性 DR 拘束性 T 細胞も DQ/DP 拘束性 T 細胞に比べて、より Th1 寄りのサイトカイン産生パターンを示した (6)。すなわち、PBMC レベルで polyclonal な反応にも同様な傾向があることが確認された。

D. 考察

APC 上の発現レベルは、DR > DQ > DP であり、仮にペプチドがそれぞれ同程度の親和性を持つとすると、APC 表面での TCR リガンド密度は DR-ペプチド > DQ-ペプチド > DP-ペプチドである。したがって我々が観察した現象は高密度リガンドは Th1 を、低密度リガンドは Th2 を誘導するという現象 (7) と本質的には変わらない現象であるとも考えられる。しかし、DR 拘束性クローンで刺激する際のペプチドの濃度をいくら低くしても IL-10 / IL-1 β の比は DQ 拘束性や DP 拘束性のパターンにはならなかった。つまり、質的に異なる APC 応答であるということが出来る。すなわち、これらの現象はリガンド密度

だけでは説明ができない。

HLA-DR β 鎖は PKC の活性化や核内への移行に関与しているという報告がある (8) が、今回の研究では PKC 阻害剤は IgM やモノカイン産生に大きな影響を及ぼさなかった。IL-4 レセプター (9) や血小板由来成長因子レセプター (platelet-derived growth factor receptor; 10) で観察された現象と同じように、DR 分子からのシグナルは複数のシグナル伝達分子を活性化し (2)、それぞれが異なる生理活性を担っていると考えられる。また、DR 分子を介したシグナルが Erk や Syk を活性化したわけであるが、DR の α 鎖も β 鎖も ITAM モチーフを持っていない。IL-2 レセプター (11)、CD29 (12) や血小板インテグリン α IIb β 3 (13) は ITAM モチーフはもっていないが、Syk を活性化することができる。DR 分子が Syk を直接活性化した可能性は残っているが、DR 分子に会合していて、Syk の活性化に関与している蛋白が存在するのかもしれない。最近報告されたように、DR 分子からのシグナルが膜マイクロドメインの構築を変化させ (14)、これによって Syk の活性化が起こった可能性や、I γ α/β の会合がシグナルを制御している可能性もあり (15)、今後の検討課題である。

E. 結論

DR, DQ, DP 分子は MAPK family を介して異なるシグナルをマクロファージへ伝達し、*in vivo* において T 細胞応答に影響を与えていると結論した。多重遺伝子族として進化したクラス II 遺伝子はシグナル伝達機構においても多様性を獲得し、異なる機能を担っていると考えられる。換言すれば、抗原提示分子の種類によって自己免疫病の標的細胞に異なる応答が誘導される可能性が高いと言えよう。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. Tabata, H., Matsuoka, T., Endo, F., Nishimura, Y. and Matsushita, S. Ligation of

HLA-DR molecules on B cells induces enhanced expression of IgM heavy chain genes in association with Syk activation. (2000). *J. Biol. Chem.* 275: 34998-35005.

2. Matsuoka, T., Kohrogi, H., Ando, M., Nishimura, Y., and Matsushita, S. (1996). Altered TCR ligands affect antigen-presenting cell responses: up-regulation of IL-12 by an analogue peptide. *J. Immunol.* 157, 4837-43.

3. Matsuoka, T., Tabata, H., and Matsushita, S. (2001). Monocytes are differentially activated through HLA-DR, -DQ and -DP molecules via MAP kinases. *J. Immunol.* 166: 2202-2208.

4. Hirayama, K., Matsushita, S., Kikuchi, I., Iuchi, M., Ohta, N., and Sasazuki, T. (1987). HLA-DQ is epistatic to HLA-DR in controlling the immune response to schistosomal antigen in humans. *Nature* 327: 426-430.

5. Ikezawa, Z., Nagy, Z. A., Klein, J. Manipulation of anti-LDH-B response by T suppressor factors. (1984). *J. Immunol.* 132: 1605-1607.

6. Matsushita, S., Tanaka, Y., Matsuoka, T. and Nakashima, T. Clonal expansion of freshly isolated CD4T cells by randomized peptides and identification of peptide ligands using combinatorial peptide libraries. *Eur. J. Immunol.*, in press.

7. Hosken, N. A., Shibuya, K., Heath, A. W., Murphy, K. M., and O'Garra, A. O. (1995). The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model. *J. Exp. Med.* 182: 1579-1584.

8. Rich, T., Lawler, S. E., Lord, J. M., Blancheteau, V. M., Charron, D. J., and Mooney, N. A. (1997). HLA class II-induced translocation of PKC alpha and PKC beta II isoforms is abrogated following truncation of DR beta cytoplasmic domains. *J. Immunol.* 159, 3792-8.

9. Nelms, K., Keegan, A. D., Zamorano, J., Ryan, J. J., and Paul, W. E. (1999). The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 701-38.

10. Heldin, C. H., Ostman, A., and

Ronnstrand, L. (1998). Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochimica et Biophysica Acta* 1378, 79-113.

11. Minami, Y., Nakagawa, Y., Kawahara, A., Miyazaki, T., Sada, K., Yamamura, H., and Taniguchi, T. (1995). Protein tyrosine kinase Syk is associated with and activated by the IL-2 receptor: possible link with the c-myc induction pathway. *Immunity* 2, 89-100.

12. Miller, L. A., Hong, J. J., Kinch, M. S., Harrison, M. L., and Geahlen, R. L. (1999). The engagement of beta1 integrins on promonocytic cells promotes phosphorylation of Syk and formation of a protein complex containing Lyn and beta1 integrin. *European Journal of Immunology* 29, 1426-34.

13. Gao, J., Zoller, K. E., Ginsberg, M. H., Brugge, J. S., and Shattil, S. J. (1997). Regulation of the pp72syk protein tyrosine kinase by platelet integrin alpha IIb beta 3. *EMBO Journal* 16, 6414-25.

14. Anderson, H. A., Hiltboldm E. M., and Roche, P. A. (2000). Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation. *Nature Immunol.* 1, 156-162.

15. Lang, P., Stolpa J.C., Freiberg, B.A., Crawford, F., Kappler, J., Kupfer, A., Cambier, J.C. (2001). TCR-induced transmembrane signaling by peptide/MHC class II via associated Ig- α/β dimers. *Science* 291: 1537-1540.

F.健康危険情報

特記事項なし

G.研究発表

1.論文発表

1. Matsuoka, T., Tabata, H. and Matsushita, S. Monocytes are differentially activated through HLA-DR, -DQ and -DP molecules via mitogen-activated protein kinases. *J. Immunol.* 166: 2202-2208, 2001

2. Oyaizu, K., Ohyama, H., Nishimura, F., Kurihara, H., Matsushita, S., Maeda, H., Koikeguchi, S., Hongyo, H., Takashiba, S. and

Murayama, Y. Identification and characterization of B-cell epitopes of a 53-kDa outer membrane protein from *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol. Immunol.* 16: 73-78, 2001

3. Akaiwa, M., Yu, B., Umeshita, R., Terada, N., Suto, H., Koga, T., Arima, K., Matsushita, S., Saito, H., Ogawa, H., Furue, M., Hamasaki, N., Ohshima, K. and Izuhara, K. Localization of human interleukin-13 receptor in non-hematopoietic cells. *Cytokine* 13: 75-84, 2001

4. 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. Molecular and cellular analyses of HLA class II - associated susceptibility to autoimmune diseases in the Japanese population. *Modern Rheumatology* 11: 103-112, 2001

5. 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

6. Inoue, R., Matsushita, S., Kaneko, H., Shinoda, S., Ito, R., Nishimura, Y. and Kondo, N. Identification of b-lactoglobulin-derived peptides and class II HLA molecules recognized by T Cells from the patients with milk allergy. *Clin. Exp. Allergy* 31: 1126-1134, 2001

7. Matsushita, S., Tanaka, Y., Matsuoka, T. and Nakashima, T. Clonal expansion of freshly isolated CD4T cells by randomized peptides and identification of peptide ligands using combinatorial peptide libraries. *Eur. J. Immunol.* 31: 2395-2402, 2001

8. Ohyama, H., Matsushita, S., Hatano, K., Kato, N., Nishimura, F., Takashiba, S. and Murayama, Y. T cell responses to major membrane protein II (MMP II) of *Mycobacterium Lepae* are restricted by HLA-DR molecules in patients with leprosy. *Vaccine* 20: 475-482, 2001

9. Matsushita, S., Tanaka, Y., Ohyama, H., Matsuoka, T. and Nakashima, T. Combinatorial

peptide library for the analysis of T-cell antigen recognition.

Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening, in press (2002)

10. Matsushita, S., Tanaka, Y., Ohyama, H., Matsuoka, T. and Nakashima, T. Application of combinatorial chemistry for the identification of peptide ligands recognized by T cells.

Recent Research Developments in Immunology, in press (2002)

11. Ohyama, H., Nishimura, F., Meguro, M., Takashiba, S., Murayama, Y. and Matsushita, S. Counter-antigen presentation: fibroblasts produce cytokines by signaling through HLA class II molecules without inducing T-cell proliferation.

Cytokine, in press (2002)

12. Kudo, H., Matsuoka, T., Mitsuya, H., Nishimura, Y. and Matsushita, S. Cross-linking HLA-DR molecules on Th1 cells induces anergy in association with increased level of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1.

Immunol. Lett., in press (2002)

13. Sakaguchi, H., Inoue, R., Kaneko, H., Watanabe, M., Suzuki, K., Kato, Z., Matsushita, S. and Kondo, N. Interaction among HLA-Peptide-TCR Complexes in cow's milk allergy: Significance of HLA and TCR-CDR3 Loops.

Clin. Exp. Allergy, in press (2002)

14. 松下 祥: MHC 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 21、101-115、2001

15. 松下 祥、田畑博己、松岡多香子: クラス II HLA 分子を介した抗原提示細胞の活性化。日本アレルギー学会会誌 50、601-611、2001

16. 松下 祥: HLA-DR, -DQ, -DP を介したシグナル伝達とマクロファージ機能。臨床免疫 36、189-197、2001

17. 松下 祥: クラス II HLA 分子を介したシグナル伝達。日本神経免疫学会会誌 9、181-187、2001

18. 松下 祥: 改変ペプチドを用いた自己反応性 T 細胞の人為的制御。組織培養工学 27、4-7、2001

19. 中島敏博、松下 祥。ランダムペプチドとコンビナトリアルペプチドライブラリーを用いた新規 CD4T 細胞のクローン化方法とその認識エピトープ同定法の確立。組織培養工学 27、29-33、2001

20. 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) 172-173, 2001

21. 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 第 2 版」, 東京化学同人 (東京) 2001

22. 松下 祥、松岡多香子: MHC 研究の新展開: 抗原提示相における MHC クラス II と Ig α / β の相互作用。臨床免疫、印刷中、2002

23. 松下 祥: スギ花粉症の遺伝学。Modern Physician、印刷中、2002

24. 松下 祥: HLA と免疫応答。別冊医学のあゆみ「免疫疾患--state of arts」、印刷中、2002

25. 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、2002

26. 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、2002

27. 松下 祥: MHC 分子の構造、宮坂昌之、谷口克編: 「標準免疫学」改訂第 2 版、医学書院 (東京) 印刷中、2002

28. 松下 祥: MHC・ペプチド複合体と抗原提示、宮坂昌之、谷口克編: 「標準免疫学」改訂第 2 版、医学書院 (東京) 印刷中、2002

29. 松下 祥: 非典型的 MHC 分子とその抗原提示、宮坂昌之、谷口克編: 「標準免疫学」改訂第 2 版、医学書院 (東京) 印刷中、2002

2. 学会発表

1. 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」。東京、2001年2月1日。
2. 松下 祥：抗原特異的療法。第4回小児気道アレルギー研究会シンポジウム「小児気道アレルギーの発症要因と early intervention」。名古屋、2001年4月22日。
 3. 松下 祥：自己抗原認識のメカニズム。財団法人日本アレルギー協会「アレルギー・臨床免疫医を目指す人達の為の研修会」。福岡、2001年10月13日。
 4. 松下 祥：抗原認識メカニズムと素因をターゲットとした治療戦略。第51回日本アレルギー学会シンポジウム「アレルギー疾患克服への道を探る-疫学、遺伝学、免疫学、予防、診断、治療それぞれの立場から-」。福岡、2001年10月29日。
 5. 松下 祥：クラス II HLA を介したシグナル伝達機構と免疫制御。第10回日本組織適合性学会シンポジウム。福岡、2001年11月1日。
 6. 松下 祥：MHC とアレルギー。神奈川科学技術アカデミー平成13年度教育講座「分子細胞生物学から学ぶ免疫・アレルギー疾患コース：分子的創薬を支える免疫・アレルギー疾患の分子医学的理解のために」。川崎、2001年11月16日。
 7. 松下 祥：免疫関連疾患に対する分子予防医学的アプローチ。第1回分子予防医学研究会シンポジウム II. 免疫関連疾患、感染症-分子疫学・予防-。東京、2001年12月22日。
 8. 松下 祥：抗原ペプチドを用いた免疫療法の位置づけ。第14回日本アレルギー学会春季臨床大会シンポジウム「特異的免疫療法の奏効機序とアレルギー疾患治療における位置づけ」。千葉、2002年3月21日。
 9. 西村泰治, Yun Chuns, 横溝 博, 藤井慎嗣, 植村靖史, 松下 祥, 千住 覚。ヒト CD4+T 細胞が認識する腫瘍関連抗原ペプチドの解析。第5回基盤的癌免疫研究会総会、津、2001年7月18~19日。
 10. 松下 祥。ダニ主要抗原T細胞エпитープを用いた APC 応答の修飾。第13回日本アレルギー学会春季臨床大会、横浜、2001年5月10-12日。
 11. 松下 祥, 田畑博己, 松岡多香子。クラス II HLA 分子を介したシグナル伝達とその生物学的意義の解析。第22回日本炎症・再生医学会、東京、2001年7月2-3日。
 12. 大山秀樹, 竹内加珠, 目黒道生, 畑野研太郎, 松下 祥。ハンセン病患者T細胞における IL-12 レセプター遺伝子多型が IL-12 応答性に与える影響。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. 松岡多香子, 田畑博己, 松下 祥。HLA-DP 分子β鎖の細胞内ドメインは PKC の偽基質である。第31回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、2001年12月11~13日。
 14. 上平幸史, 下田慎治, 中村稔, 河野聡, 松下 祥, 石橋大海, 原田実根。PBC における自己抗原特異的 CD4 陽性 T cell clone と胆管上皮細胞との関係。第31回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、2001年12月11~13日。

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）

要旨

SLE患者B細胞でCD40Lの異所性の発現が示され、CD40LをB細胞で異所性発現するマウスでは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。B細胞でのCD40Lの発現の検索は容易ではなかったが、我々は、的確にB細胞のCD40Lの発現を検索する方法を開発した。また、末梢リンパ組織の成熟B細胞段階で自己反応性B細胞が死滅し、CD40Lがこの自己反応性B細胞の死滅を阻害し、自己トレランスの破綻を引き起こすことを明らかにした。B細胞上でのCD40Lの発現検出法の開発により、今後SLE患者B細胞でのCD40Lの発現の検索が可能になると考えられる。また、末梢組織での自己トレランスの異常は、今後、SLEのより根本的な治療法開発の標的となると考えられる。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、一昨年度および昨年度、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、さ

らに、B細胞上のCD40Lが自己免疫疾患を発症する機序を解明する目的で、Weigert博士（Princeton大学）より供与を受けた抗DNA抗体トランスジェニックマウスと交配することにより、CD40LがB細胞の自己トレランスの破綻をおこすことが明らかとなった。一方、B細胞が発現するCD40の存在下では、B細胞上のCD40Lの発現を正確に測定することが困難であることが明らかとなった。そこで、本年度は、CD40Lによる自己トレランス破綻機序について解明することにより、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するとともに、B細胞上のCD40Lを的確に測定する方法の開発を行い、SLE患者B細胞のCD40Lの発現の有無を検索する

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。トランスジー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。

フローサイトメトリー：脾細胞の解析にはFITC標識抗CD21抗体、ビオチン標識抗CD23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。DNA反応性の検出にはビオチン化2本鎖DNAを用い、BrdUの検出は既報のとおり行った。細胞の解析はFacsCaliburを用いて行った。

C. 研究結果

1. B細胞上のCD40L検出法の開発

我々の樹立したCD40LトランスジェニックマウスではCD40LがB細胞で特異的に発現し、免疫応答の亢進や自己免疫疾患の発症がおこるなどの作用が観察されるが、B細胞上でCD40Lの発現を観察することは困難である。CD40欠損マウスと交配し、CD40を欠損するCD40Lトランスジェニックマウスを作成するとB細胞上のCD40Lの発現は検出可能になる。したがって、B細胞上のCD40LはCD40と反応することにより、タンパク限定分解、または、インターナリゼーションにより、細胞表面上での発現が著明に低下すると考えられる。そこで、我々は、CD40Lトランスジェニックマウスから脾細胞を調整し、抗CD40抗体とともに12時間培養後フローサイトメトリーを行った。CD40Lトランスジェニックマウスから調整直後の脾細胞やコントロール抗体と共に培養した脾細胞では、B細胞上のCD40Lは検出できなかったが、抗CD40抗体と共に培養した脾細胞では、B細胞上にCD40Lが検出できた。この結果は、抗CD40抗体とともに培養し、CD40とC

D40Lの反応を阻害することにより、B細胞上のCD40Lの発現を検索できることを示している。

2. CD40Lトランスジェニックマウスの自己トレランス破綻機序の解明

CD40Lトランスジェニックマウスの自己トレランス破綻機序について検索する目的で、CD40L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56Rを交配した。56Rは、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、56Rのみを発現するトランスジェニックマウスでは、自己反応性B細胞のトレランスが誘導され、血清中に自己抗体は産生されない。一方、CD40L/56R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がおこり、CD40Lの発現が56R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。また、Weigertらは二本鎖DNA反応性B細胞は、骨髄の未熟B細胞の段階でおそらく細胞死を起こすことにより除去（クローン除去）され、トレランスが誘導されることを示している。しかし、CD40L/56Rダブルトランスジェニックマウスでも、自己反応性B細胞は骨髄の未熟B細胞段階で除去を受けていることが明らかとなった。この知見は、CD40Lが骨髄内での中枢トレランスには影響を与えないことを意味する。そこで、末梢リンパ組織におけるトレランスについて検索した。

56RマウスおよびCD40L/56Rダブルトランスジェニックマウスの脾臓での移行期B細胞、成熟B細胞数をフローサイトメトリーにより検索したところ、両方のマウスで、移行期B細胞数が正常マウスと同程度まで回復することが明らかとなった。また、移行期B細胞がDNAに反応するかをフローサイトメトリーで検索したところ、両方のマウスの移行期B細胞に、かなりのDNA反応性B細胞が存在することが明らかとなった。一