

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

特定疾患対策のための免疫学的手法の開発に関する研究班

平成13年度 総括・分担研究報告書

平成14年3月

主任研究者 山 本 一 彦

## 目 次

### I. 平成13年度総括研究報告書

特定疾患対策のための免疫学的手法の開発に関する研究 -----	3
---------------------------------	---

東京大学大学院医学系研究科内科学専攻 主任研究者 山本 一彦

### II. 平成13年度分担研究報告

抗原特異性と抑制機能に関する遺伝子導入再構築T細胞による ループス腎炎の抑制 -----	9
---	---

東京大学大学院医学系研究科内科学専攻 山本 一彦

新規B7分子, ICOSおよびPD-1リガンドの機能解析 -----	13
------------------------------------	----

東京医科歯科大学大学院分子免疫学分野 東 みゆき

タイラー脳脊髓炎ウイルス (TMEV) によるマウス免疫性脱髄疾患 (TMEV-IDD) における性バイアスに関する研究 -----	17
---	----

信州大学医療技術短期大学部衛生技術学科 高 昌星

多発性筋炎における筋傷害性CD8T細胞の同定に関する研究 -----	21
------------------------------------	----

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科生体応答調節学 上阪 等

CTLA-4を介したリンパ球異常増殖の抑制機構に関する研究 -----	23
-------------------------------------	----

千葉大学大学院医学研究科遺伝子制御学 斎藤 隆

対応抗原未知のT細胞が認識するペプチドの同定法に関する研究 -----	26
-------------------------------------	----

大阪大学大学院医学系研究科分子病態内科 佐伯 行彦

自己免疫病における抗原特異的分子制御に関する研究 -----	29
--------------------------------	----

筑波大学臨床医学系内科 住田 孝之

再生不良性貧血における抗 $\alpha$ グロビン抗体の意義—自己抗原の可能性 -----	31
金沢大学大学院医学系研究科細胞移植学 中尾 眞二	
マウス ES 細胞からの樹状細胞分化誘導法と遺伝子導入法の開発 -----	34
熊本大学大学院医学研究科免疫識別学講座 西村 泰治	
多発性硬化症寛解期における CD4 <sup>+</sup> NKT 細胞の Th2 偏倚 -----	41
国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 山村 隆	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	47
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	57
V. 平成13年度構成員名簿 -----	137
VI. 平成13年度班会議プログラム -----	141

## I . 平成13年度総括研究報告

## 厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

### 総括研究報告書

#### 特定疾患対策のための免疫学的手法の開発に関する研究

主任研究者 山本 一彦 東京大学大学院医学系研究科内科学専攻 教授

**研究要旨** 「免疫に関与する難病の原因解明のための基盤技術の開発に関する研究」に関して、最終年度の研究を行った。上阪班員は多発性筋炎患者の筋組織に浸潤している T 細胞の解析を進め、病態形成性 T 細胞の証明に向けた知見が得られた。佐伯班員は T 細胞が認識する抗原の同定システムを確立した。山本班員は T 細胞レセプターに注目した新しい抗原特異的免疫療法の可能性を示した。山村班員は NKT 細胞を刺激する変異ペプチドで、多発性硬化症の動物モデルが制御可能であることを示した。これは Nature に掲載された画期的な研究である。東班員は副刺激分子による各種免疫疾患の制御について詳細な解析を行った。齊藤班員は抑制性の分子である CTLA-4 の機能について研究を進めた。中尾班員は再生不良性貧血の自己免疫応答について、高班員はタイラー脳脊髄炎による免疫性脱髄疾患の解析を進めた。住田班員と西村班員は MHC 分子に提示される病因ペプチドの同定の方法について研究を進めた。

#### 分担研究者

東みゆき 東京医科歯科大学大学院分子免疫学  
分野 教授  
高 昌星 信州大学医療技術短期大学部 教授  
上阪 等 東京医科歯科大学大学院生体応答調  
節学助 教授  
齊藤 隆 千葉大学大学院遺伝子制御学 教授  
佐伯行彦 大阪大学大学院分子病態内科 助手  
住田孝之 筑波大学臨床医学系内科 教授  
中尾眞二 金沢大学大学院細胞移植学 教授  
西村泰治 熊本大学大学院免疫識別学 教授  
山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所免疫研  
究部 部長

#### A. 研究目的

本研究班は免疫に関与する特定疾患の横断的  
基盤的研究を推進することを目的としている。

特に「免疫疾患の病因となる特異抗原を検索する  
新たな技術、さらにその特異抗原に対する免疫応  
答を検出、解析し、制御する基盤技術を開発、推  
進する。」ということに班の目的を集中させ研究  
を行った。

すなわち、種々の免疫に関与する難病において  
1) 抗原特異的免疫応答が存在するのか？ 2) そ  
の標的抗原がなんであるか？ 3) 抗原特異的免疫  
応答が病態形成に関わっているか？ 4) その免疫  
応答を特異的に制御することは可能か？などを  
明らかとしていくことを目標とした。具体的には、  
MHC 分子に提示される病因ペプチド分子の同定、  
病態形成性 T 細胞とその抗原レセプターの解析、  
第二シグナルなどを介した抗原特異的免疫応答  
制御に関する研究について、成果を得ることを目  
標としてきた。

## B. 研究方法

本研究班は方法論を確立することが主な目的であるから、特に当面の対象疾患を設けず、健康人細胞、患者検体やモデル動物を研究プロジェクトにあわせ随時使用した。実際の研究手法は免疫細胞学的、分子生物学的手法を駆使して行い、新技術の創出に努めた（個々の研究結果参照）。倫理面への配慮に関しては、患者の個人情報の特定につながる様な研究はなかった。また遺伝子を用いた治療実験もモデル動物のレベルであり、現時点では問題はないが、将来ヒトへの応用に際しては厳密な議論が必要なものも含まれている。

## C. 研究結果 D. 考察

1) 病態形成性 T 細胞の研究と T 細胞レセプターを用いた免疫制御：

上阪班員は、昨年独自に開発した PCR-ELISA 法を用いて、多発性筋炎患者で末梢 CD8 陽性 T 細胞の多くのクローン性の増殖を認め、その一部が筋組織に検出されたことを報告している。本炎は多発性筋炎患者の筋組織切片から筋線維間（内鞘）に浸潤する単核球細胞をマイクロダイセクション法で切り出し解析することで、T 細胞レセプターの同定やパーフォリン遺伝子の発現を確認した。これはヒトの疾患における病態形成性 T 細胞の証明に向けた大きな進歩であると思われる。佐伯班員は T 細胞が認識する抗原を同定するシステムを開発するために、抗原提示細胞側で、実際に抗原提示をして T 細胞から CD40 分子を介してシグナルが入ったものだけを検出する系を確立した。NF- $\kappa$ B の response element と GFP を組み合わせたもので、今までにない新しいシステムを提供できることをマウスのモデルで示した。山本班員は T 細胞レセプターの 2 つの鎖の遺伝子導入によるリンパ球抗原認識機構再構築の成功と、機能遺伝子導入による改変 T リンパ球の実際の疾患モデルマウスにおいて、試験管内で再構築したヌクレオソーム特異的 CTLA-4/Ig 分泌抑制性 T 細胞の一回の移入で、その腎病変が抑制出来ることを示した。これは自己免疫疾患の新しい抗原特異的免疫

制御法の確立に向けて、実際の技術的可能性を明確に示した点で大きな進歩と言える。

2) 病態形成とその制御に関する研究：

山村班員は NKT 細胞の機能的偏りの研究で、多発性硬化症において、寛解期には CD4-CD8-の DN NKT は著名に減少していたが CD4+NKT は減少せず、リガンドの  $\alpha$ -galactosylceramide 刺激で IL-4 産生が亢進しており、Th2 に偏っていることを示した。これは全く新しい発見で、今後の臨床への応用が期待されており、実際に山村班員はリガンドを変化させることで多発性硬化症の動物モデル (EAE) が制御可能なことを示している (Nature 2001)。東班員は副刺激分子である PD-1 とそのリガンドの PD-L1 および PD-L2、ICOS とそのリガンドである B7h について、これらをブロックすることで各種自己免疫疾患が制御可能か否かについての詳細な研究を行った結果、ICOS-Bh7 経路の障害は自己免疫疾患の障害に有効である可能性を見いだした。また PD-L1 と PD-L2 はレセプターの PD-1 を共有するが、発現の分布はかなり異なっていることなどが判明し、将来的な免疫抑制法として重要な知見が得られたと思われる。西村班員はマウス ES 細胞を試験管内で樹状細胞に分化させる方法を開発し、これに遺伝子導入をすることで免疫制御を可能にするシステムを開発しつつある。斉藤班員は CTLA-4 の免疫抑制能について詳細な機構の研究を進め、ナイーブな T 細胞と活性化 T 細胞では CYLA-4 の抑制機序に違いがあることを見いだした。中尾班員は  $\alpha$  グロビンに対する自己抗体と細胞障害性 T 細胞が再生不良性貧血の病態形成に重要な働きをしている可能性を示した。高班員はタイラー脳脊髓炎ウイルスによるマウス免疫性脱髄疾患における性ホルモンの役割を検討し、テストステロンが発症に抑制的であること、その機序としてサイトカイン産生抑制が推測されることを示した。

3) MHC 分子に提示される病因ペプチドの同定：

住田班員はリコンビナント蛋白や合成アミノ酸を用いて、自己反応性 T 細胞の認識エピトープを検出するシステムを構築しつつあり、シェーグレン症候群での  $\alpha$  アミラーゼ、慢性関節リウマチ

でのタイプII コラーゲンについて解析を進めた。これらの研究は病因を明らかとするだけでなく、免疫の抗原特異的な制御を可能にするステップとして重要な研究と考える。

## E. 結論

抗原特異的免疫応答に焦点を絞って当班の研究を進めた。それぞれの班員はオリジナルな研究テーマを設定し、研究を展開した。時間的な制約を含めて十分な結論に達していないものもあるが、上述の結果で記載したように幾つかの目覚ましい成果が出て来ていると考える。

幾つかの成果については、未だに十分な完成の域に達していないものもあり、また欧米でのこの方面への積極的な研究推進から考えて、同様な方向での研究の推進が必要であると考ええる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kawahata K. Misaki Y. Yamaguchi M. Tsunekawa S. Setoguchi K. Miyazaki J. and Yamamoto K. Peripheral tolerance to a nuclear autoantigen:dendritic cells expressing a nuclear autoantigen lead to persistent anergic state of CD4 autoreactive T cells after proliferation. *J.Immunol.* 168:1103-1112, 2002
- 2) Gumperz J.E. Miyake S. Yamamura T. and Brenner M.B. CD1d tetramer staining reveals functionally distinct subsets of human CD1d-restricted NKT cells. *J.Exp.Med.*195:625- 636, 2002
- 3) Setoguchi K. Misaki Y. Terauchi Y. Yamauchi T. Kawahata K. Kadowaki K. and Yamamoto K. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  haploinsufficiency enhances B cell proliferative responses and exacerbates experimentally induced arthritis. *J.Clin.Invest.*108:1667-1675, 2001.
- 4) Yu X. Matsui T. Otsuka M. Sekine T. Yamamoto K. Nishoka K. and Kato T. Anti-CD69 autoantibodies cross react with low density lipoprotein receptor-related protein 2 in systemic autoimmune diseases. *J. Immunol.* 166:1360-1369, 2001
- 5) Nozawa K. J. Ohata J. Sakurai H. Hashimoto H. Yagita K. Okumura and M. Azuma. Preferential blockade of CD8<sup>+</sup> 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
- 6) Sekiguchi Y, Ichikawa M, Inoue A, Itoh M, and \*Koh C-S, Brain derived gangliosides suppress the chronic relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis in NOD mice induced with myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide. *J. Neuroimmunol,* 116:196-205, 2001
- 7) Nohara C, Akiba H, Nakajima A, Inoue A, Koh C-S, Ohshima H, Yagita H, Mizuno Y, and Okumura K. Amelioration of experimental auto-immune encephalomyelitis with anti-OX40 ligand monoclonal antibody: A critical role for OX40 ligand in migration, but not development, of pathogenic T cells. *J Immunol* 166: 2108-2115, 2001
- 8) Nishio J, Suzuki M, Miyasaka N, and Kohsaka H. Clonal biases of peripheral CD8 T cell repertoire directly reflect local inflammation in polymyositis. *J Immunol* 167:4051-8, 2001
- 9) Arase, H., Suenaga, T., Arase, N., Kimura, Y., Ito, K., Shiina, R., Ohno, H. and Saito, T. Negative regulation of expression and function of Fc $\gamma$ RIII by CD3 $\zeta$  in murine NK cells. *J. Immunol.* 166:21-25, 2001.
- 10) Yamasaki, S., Nishida, K., Hibi, M., Sakuma, M., Shiina, R., Takeuchi, A., Ohnishi, H., Hirano, T. and Saito, T. Docking protein Gab2 is phosphorylated by ZAP-70 and negatively regulates T cell receptor signaling by recruitment of inhibitory molecules. *J. Biol.Chem.* 276:45175- 45183, 2001.
- 11) Miura Y, Thoburn CJ, Bright EC, Sommer M, Lefell S, Ueda M, Nakao S, and Hess AD. Characterization

of the T-cell repertoire in autologous graft-versus-host disease (GVHD): evidence for the involvement of antigen-driven T-cell response in the development of autologous GVHD. *Blood* 98: 868-876, 2001

12) Myou S, Sano H, Fujimura M, Zhu X, Kurashima K, Kita T, Nakao S, Nonomura A, Shioya T, Kim KP, Munoz NM, Cho W, and Leff AR. Inhibition of cytosolic PLA2 and lysophospholipid synthesis blocks antigen-induced eosinophil migration and airway hyperresponsiveness. *Nat Immunol* 2:145-149, 2001

13) Takahashi K. Miyake S. Kondo T. Terao K. Hatakenaka M. Hashimoto S. and Yamamura T. Natural killer type 2 (NK2) bias in remission of multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* 107:R23-R29, 2001

14) Miyamoto K. Miyake S. and Yamamura T. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature* 413:531-534, 2001

15) Maeda M. Lohwasser S. Yamamura T. and Takei F. Regulation of NKT cells by Ly49: analysis of primary NKT cells and generation of NKT cell line. *J. Immunol.* 167: 4180-4186, 2001

16) Azeredo da Silveira, S., Kikuchi, S., Fossati-Jimack, L., Moll, T., Saito, T., Verbeek, J. S., Botto, M., Walport, M. J., Carroll, M. and Izui S.: Complement activation selectively potentiates the pathogenicity of the IgG2b and IgG3 isotypes of a high-affinity anti-erythrocyte autoantibody. *J. Exp. Med.* (In press)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実案新案登録  
なし
3. その他  
なし



## II. 平成13年度分担研究報告

## 抗原特異性と抑制機能に関する遺伝子導入再構築 T 細胞によるループス腎炎の抑制

主任研究者 山本 一彦 東京大学大学院医学系研究科内科学専攻 教授

**研究要旨** 自己免疫疾患に対する理想的な治療法として抗原特異的免疫療法が期待されており、抗原特異的 T 細胞を用いた臓器特異的自己免疫疾患の抑制が報告されている。今回は 1) 抗原特異的 T 細胞の人為的な作成法、2) 全身性自己免疫疾患である膠原病への応用可能性、の 2 点を検討した。SLE における標的抗原として近年ヌクレオソームが注目されている。そこで我々は高効率レトロウイルスベクター系を用いて、NZB/W F1 マウスの CD4 陽性 T 細胞にヌクレオソーム特異的 TCR $\alpha/\beta$  鎖遺伝子を導入し、抗原特異性を再構築した。さらに共刺激分子を阻害する CTLA4Ig 遺伝子を導入することにより抑制性細胞を作製し、若年 NZB/W F1 マウスへの移入による治療効果を検討した。その結果、CTLA4Ig 導入群、 $\alpha/\beta$  鎖導入群、mock 移入群及び無移入群では自己抗体産生及び腎炎発症に差は認められなかったのに対し、 $\alpha/\beta$  鎖+CTLA4Ig 移入群では自己抗体産生及び腎炎発症の抑制を認めた。

### 研究協力者

藤尾圭志、田原裕之

東京大学大学院医学系研究科

広瀬幸子、姜 奕、阿部雅明

順天堂大学医学部第二病理学教室

北村俊雄 東京大学医科学研究所先端医療研究センター細胞療法分野

### A. 研究目的

自己免疫疾患に対する治療法として抗原特異的免疫療法が期待されている。SLE における標的抗原としてヌクレオソームが注目されている。これまで抗二本鎖 DNA 抗体が SLE の疾患活動性を反映し、臓器への沈着など病変形成に関与することが分かっているが、抗二本鎖 DNA 抗体産生を誘導する抗原は分かっていた。近年ループス感受性マウスにおいて、B 細胞の抗二本鎖 DNA 抗体産生を誘導する T 細胞クローンはヌクレオソームに特異的であ

ること、若年ループス感受性マウスにヌクレオソームを免疫すると腎炎の発症が促進されること、ループス腎炎組織に抗ヌクレオソーム抗体が沈着していることが報告されている。またループス患者においても抗ヌクレオソーム抗体は抗二本鎖 DNA 抗体よりも疾患特異性に優れ、より鋭敏に活動性を反映することが報告され、ヌクレオソームの SLE の病態形成における重要性が明らかになってきている。今後ヌクレオソーム特異的 T 細胞の特性の理解、治療応用可能性の検討が必要である。我々は既に高効率パッケージング細胞 PLAT-E 及び、遺伝子導入試薬レトロネクチンを併用したレトロウイルスベクター系を用いて TCR $\alpha/\beta$  鎖をリンパ球に移入し、抗原特異的 T 細胞を大量に作製する方法を開発している。今回はその方法の応用により 1) ヌクレオソームに特異的な T 細胞の人為的な作成法、2) 全身性自己免疫疾患である膠原病への応用可能性、の 2 点を検討した。

## B. 研究方法

NZB/W F1 マウスの CD4 陽性 T 細胞にヌクレオソーム特異的 TCR $\alpha$  / $\beta$  鎖遺伝子を導入し、ヌクレオソーム特異性を再構築した。ヌクレオソーム特異的 TCR は報告されている配列を基に CDR3 領域を PCR で作製し、それぞれ V $\alpha$  13, V $\beta$ 4 フラグメントと結合させて作製し、レトロウイルスベクター-pMXW にサブクローニングした。ベクターを PLAT-E にトランスフェクションしてウイルスを作製し、レトロネクチンでコーティングしたプレート上で ConA+IL-2 で 48 時間培養した脾臓細胞に感染させた。さらに共刺激分子を阻害する CTLA4Ig 遺伝子を導入し抑制性細胞を作製し、若年 NZB/W F1 マウスへの移入による治療効果を検討した。

## C. 研究結果 D. 考察

ヌクレオソーム特異的 TCR を TCR を欠損したハイブリドーマに導入すると CD3 発現が回復し、導入した $\alpha$  / $\beta$  鎖の細胞内での複合体形成能が確認された。ヌクレオソーム特異的 TCR を導入した CD4 陽性細胞において、抗 V $\beta$ 4 抗体で確認した $\alpha$ 鎖あたりの導入効率は 60-70%であり、 $\alpha$ 鎖についても同様の効率と推測された。TCR $\alpha$  / $\beta$  導入細胞は NZB/W F1 マウスの B 細胞及びヌクレオソームの存在下で増殖した。 $\alpha$ 鎖または $\beta$ 鎖のみを導入した細胞は増殖を示さず、内因性 TCR と導入した $\alpha$ 鎖または $\beta$ 鎖がランダムに複合体を形成し、非特異的にヌクレオソームに反応を示す可能性は否定された。この TCR 導入細胞を蛍光物質である CFSE でラベルし、NZB/W F1 マウスに移入すると脾臓で分裂を確認でき、生体内でも抗原刺激を受けて機能的であると推測された。10 週齢の NZB/W F1 マウスに、TCR に加えて CTLA4Ig 遺伝子を導入した抑制性細胞を移入したものを治療群として、コントロール群と比較すると (1)コントロール群

の CTLA4Ig 導入群、TCR 導入群、mock 移入群及び無移入群では 24 週より蛋白尿が出現したのに対し、治療群では 30 週まで蛋白尿が出現しなかった (2) 22 週の時点で治療群ではコントロール群に対し抗二本鎖 DNA 抗体価及び抗ヒストン抗体価の著明な抑制を認めた (3) 30 週の時点で治療群では脾腫大・CD8 減少の抑制を認め、腎免疫組織染色ではコントロール群では糸球体係蹄への IgG, IgM, C3 の著明な沈着を認めたが、治療群ではほとんど沈着を認めなかった (4) 30 週の脾臓からの RT-PCR で移入した TCR 遺伝子及び CTLA4Ig 遺伝子の発現を確認した (5) 10 週で移入後 16 週の時点でトリオポアルブミン (OVA) で免疫すると治療群はコントロール群と同様の抗 OVA 抗体産生を示した。

## E. 結論

レトロウイルスベクターを用いてループス感受性マウスリンパ球上にヌクレオソーム特異性を移入することに成功し、ヌクレオソーム特異的 T 細胞はループス感受性マウス生体内で抗原刺激を受けていることを示した。さらにヌクレオソーム特異的 T 細胞に抑制性遺伝子を導入して作製した抑制性細胞による自己抗体産生の抑制及びループス腎炎治療の可能性が示唆された。また複数の遺伝子導入により特定の機能を付与した細胞の治療応用性も示唆された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kawahata K. Misaki Y. Yamaguchi M. Tsunekawa S. Setoguchi K. Miyazaki J. and

- Yamamoto K. Peripheral tolerance to a nuclear autoantigen:dendritic cells expressing a nuclear autoantigen lead to persistent anergic state of CD4 autoreactive T cells after proliferation. *J.Immunol.* 168:1103-1112, 2002
- 2) Yamamoto K. T cells and autoimmune diseases. *Allergy International.*50:1-4, 2001
- 3) Iikura M. Yamaguchi M. Hirai K. Miyamasu M. Yamada H. Nakajima T. Fujisawa T. Chisei R. Morita Y. and Yamamoto K. Regulation of surface Fc  $\epsilon$  RI expression on human eosinophils by IL-4 and IgE. *Allergy.Immunol.*124:470-477, 2001
- 4) Yoshimura C. Miyamasu M. Nagase H. Iikura M. Yamaguchi M. Kawanamai O. Morita Y. Iwata T. Yamamoto K. and Hirai K. Glucocorticoids induce basophil poptosis.*J.Allergy.Clin.Immunol.*108:201-220, 2001
- 5) Kawasaki S. Takizawa H. Takami K. Desaki M. Okazaki H. Kasama T. Kobayashi K. Yamamoto K. Nakahara K. Tanaka M. Sagai M. and Ohtoshi T. Benzene-extracted components are important for the major activity of diesel exhaust particles. *Am.J.Respir. Cell.Mol.Biol.*24:419-426, 2001
- 6) Hagiwara K. Yamaguchi A. Tsuchiya N. Kitamura S. Iwadare J. Sahara R. Yamamoto K. and Tokunaga K. Identification of genes upregulated in the inflamed colonic lesions of crohns disease. *Biochemical and biophysical research communications.* 283:130-135, 2001
- 7) Sakurai D. Yamaguchi A. Tsushiya N. Yamamoto K. and Tokunaga K. Expression of ID family genes in the synovia from patients with the rheumatoid arthritis. *Biochem.Biophy.Res.Comm.* 284:436-442, 2001
- 8) Yamada R. Tanaka T. Unoki K. Nagai T. Sawada T. Ohnishi Y. Tsunoda T. Yukioka M. Maeda A. Suzuki K. Tateishi H. Ochi T. Nakamura Y. and Yamamoto K. Association between a single-nucleotide polymorphism in the promoter of the human interleukin-3 gene and rheumatoid arthritis in Japanese patients, and maximum-likelihood estimation of combinatorial effect that two genetic loci have on susceptibility to the disease. *Am.J.Hum.Genet.*68:674-685, 2001
- 9) Itokazu N. Yamamoto K. Ouchi Y. and Cyong JC. Establishment of L-3,4-Dihydroxyphenilalanine-induced pharmacological dementia model mouse. *Neuroscience Letters.*305:123-126, 2001
- 10) Yamaguchi M. Chiba A. Yanagawa T. Mato T. Hirai K. Inoue T. Oya Y. Kusunoki S. Ito K. and Yamamoto K. Guillain-Barre syndrome following herpes zoster in a patient with systemic sclerosis. *Mod.Rheumatol.* 11: 251-254, 2001
- 11) Kawasaki S. Takizawa H. Yoneyama H. Nakayama T. Fujisawa R. Izumizaki M. Imai T. Yoshie O. Hommma I. Yamamoto K. and Matsushima K. Intervention of thymus and activation-regulated chemokine attenuates the development of allergic airway inflammation and hyperrespsiveness in mice. *J.Immunol.* 166:2055-2062, 2001
- 12) Nagase H. Kudo K. Izumi S. Ohta K. Kobayashi N. Yamaguchi M. Matsushima K. Morita Y. Yamamoto K. and Hirai K. Chemokine receptor expression profile of eosinophils at inflamed tissue sites: Dereased CCR3 and increased CXCR4 expression by lung eosinophils. *J.Allergy. Clin.Immunol.*108:563-569, 2001
- 13) To Y. Dohi. M. Tanaka R. Sato A. Nakagome K. and Yamamoto K. Early interleukin 4-dependent response can induce airway hyperreactivity before development of airway inflammation in a mouse model of asthma. *Lab.Invest.*81:1385-1396, 2001
- 14) Setoguchi K. Misaki Y. Terauchi Y. Yamauchi T. Kawahata K. Kadowaki K. and Yamamoto K. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  haploinsufficiency enhances B cell proliferative responses and exacerbates experimentally induced arthritis. *J.Clin.Invest.* 108:1667-1675, 2001.
- 15) Miyamasu M. Sekiya T. Ohta K. Ra C. Yoshie

O. Yamamoto K. Tsuchiya N. Tokunaga K. and Hirai K. Variations in the human CC chemokine eotaxin gene. *Genes and Immunol.* 2:461-463, 2001

16) Misaki Y. Ezaki I. Ariga T. Kawamura N. Sakiyama Y. and Yamamoto K. Gene-transferred oligoclonal T cells predominantly persist in peripheral blood from an adenosine deaminase-deficient patient during gene therapy. *Molecular Therapy.* 3:24-27, 2001

17) Iikura M. Miyamasu M. Yamaguchi M. Kawasaki H. Matsushima K. Kitaura M. Morita Y. Yoshie O. Yamamoto K. and Hirai K. Chemokine receptors in human basophils; Inducible expression of functional CXCR4. *J. Leukocyte Biol.* 70:113-120, 2001

18) Yamaguchi M. Hirai K. Komiya A. Miyamasu M. Fukumoto Y. Teshima R. Ohta K. Morita Y. Galli SJ. Ra C. and Yamamoto K. Regulation of mouse mast cell surface F $\epsilon$ RI expression by dexamethasone. *Int. Immunol.* 13:843-851, 2001

19) Yamaguchi M. Chiba A. Yanagawa T. Mato T. Hirai K. Inoue T. Oya Y. Kusunoki S. Ito K. and Yamamoto K. Guillain-Barre syndrome following herpes zoster in a patient with systemic sclerosis. *Modern Rheumatol.*

20) Nakajima T. Imanishi M. Yamamoto K. Cyong JC. and Hirai K. Inhibitory effect of baicalin, a flavonoid in scutellaria root, on eotaxin production by human dermal fibroblasts. *Planta Med.* 67:132-135, 2001

21) Matsui T. Yamamoto K. Nishioka K. and Kato T. Autoantibodies to CTLA-4 enhance T cell proliferation. *J. Rheumatol.* 28:220-221, 2001

22) Matsui T. Otsuka M. Maenaka K. Furukawa H. Yabe T. Yamamoto K. Nishioka K. and Kato T. Detection of autoantibodies to killer immunoglobulin-like receptors using recombinant fusion proteins for two killer immunoglobulin-like receptors in patients with systemic autoimmune diseases. *Arthritis Rheum.* 44:384-388, 2001

23) Yu X. Matsui T. Otsuka M. Sekine T.

Yamamoto K. Nishioka K. and Kato T. Anti-CD69 autoantibodies cross react with low density lipoprotein receptor-related protein 2 in systemic autoimmune diseases. *J. Immunol.* 166:1360-1369, 2001

24) Iikura M. Yamaguchi M. Hirai K. Suenaga A. Fujiwara T. Fujii T. Taketani Y. and Yamamoto K. Streptomycin-induced anaphylactic shock during oocyte retrieval procedures for in vitro fertilization. *JACI.* (in press)

25) Sekiya T. Yamada H. Yamaguchi M. Yamamoto K. Ishii A. Yoshie O. Sano Y. Morita A. Matsushima K. and Hirai K. Increased levels of a TH-type CC chemokine thymus and activation-regulated chemokine (TARC) in serum and induced sputum of asthmatics. *Allergy.* (in press)

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 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 東京医科歯科大学大学院分子免疫学分野 教授

**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。本結果から, 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 にかかなり限られていた。また, 免疫細胞以外では, 組織レベルで角化上皮細胞上に 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<sup>+</sup> T 細胞における PD-1 経路の機能解析では, 抑制シグナルの存在が示唆されたが, 相反する活性化シグナルの関与も否定できなかった。

### 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。また, 同様に PD-L1Ig および PD-L2Ig 融合蛋白および抗 PD-1 抗体と用いて, 活性化 T 細胞上の分子発現を検討した。

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<sup>+</sup> 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 (図 1)。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- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 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 $\gamma$  および IL-10 産生抑制が認められた (図 2 および図 3)。

### 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。PD-1 遺伝子導入細胞株上の PD-1 発現を抗体および PD-L1Ig および PD-L2Ig で検出したところ、抗体で強く検出できる PD-1 発現は、Ig 融合蛋白では非常に弱く親和性の低さが示唆された。また、活性化 T 細胞上の PD-1 発現は抗体では検出できるものの、Ig 融合蛋白では検出できなかった。

3) 至適濃度以下の抗 CD3 抗体刺激時における CD4<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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

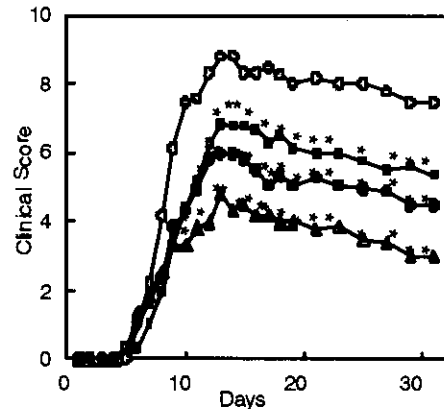


図1 CIAモデルにおける抗B7h抗体投与効果 Bovine type II collagenおよびCFAで2回免疫後、隔日に4回対照抗体(-○-)あるいは抗マウスB7h抗体(-■- 300, -●- 100, -▲- 50  $\mu$ g/body)を腹腔内投与後の臨床的関節スコア。

発現が認められた。また、PD-L1 および PD-L2 は 腫脹耳介皮膚組織の角化細胞に発現を認めた。

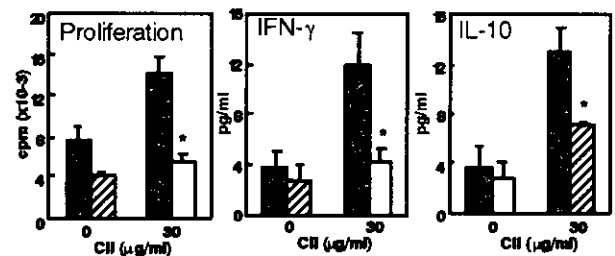


図2 抗B7h抗体投与によるCIIに対するT細胞増殖反応, IFN $\gamma$  および IL-10産生の抑制

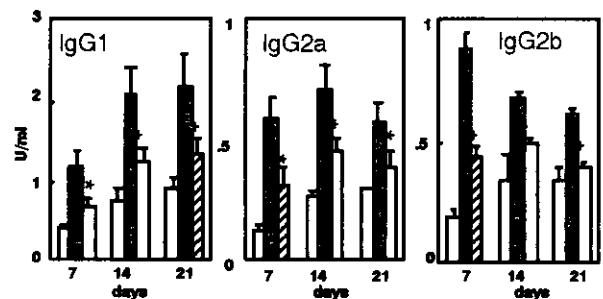


図3 抗B7h抗体投与による抗CII抗体価の抑制

#### 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 ICOSlg 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-細胞間相互作用に関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 抗体および PD-L1Ig, PD-L2Ig を用いた *in vitro* の結果では、抑制シグナル分子としてのみの機能では説明しがたい結果もあり、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) Hattori, H., M. Okano, T. Yoishino, T. Akagi, E. Nakayama, C. Saito, A. R. Satoskar, T. Ogawa, M. Azuma, and K. Nishizaki. Expression of costimulatory CD80/CD86-CD28/CD152 molecules in nasal mucosa of patients with perennial allergic rhinitis. Clin. Exp. Allergy 31: 1242-1249, 2001
- 2) Nuriya, S., Enomoto, S., and 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, and M. Azuma. Rapid induction of CD95 ligand and CD4<sup>+</sup> 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, and M. Azuma. Preferential blockade of CD8<sup>+</sup> 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., and 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., and 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

7) Iwakami, S-I., Y. Setoguchi, Y. Saijo, M. Azuma, and Y. Fukuchi. Replication-deficient adenovirus-mediated transfer of B7-1 (CD80)

cDNA induced anti-tumour immunity in isolated human lung cancer. Respirology 6: 135-144, 2001

8) Mogi, S., T. Ebata, and M. Azuma. The effect of recombinant CD80-Adenovirus and IL-12 on generation of autologous cytotoxic T lymphocytes in patients with oral squamous cell carcinoma. Oral Disease. in press

9) Ohata, J., J. Sakurai, K., Saito K. Tani, S. Asano, and M. Azuma. Differential graft-versus-leukemia effect by blockade of CD28 and CD40 costimulatory blockade after graft-versus-host disease prophylaxis. Clin. Exp. Immunol. in press

#### 1. 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，ヨアンナークボンパン，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

1. 特許取得

なし

2. 実用新案特許

なし

3. その他

なし

# タイラー脳脊髄炎ウイルス (TMEV) によるマウス免疫性脱髄疾患 (TMEV-IDD) における性バイアスに関する研究

分担研究者 高 昌星 信州大学医学部第三内科

**研究要旨** タイラー脳脊髄炎ウイルス (TMEV) によるマウス免疫性脱髄疾患 (TMEV-IDD) はヒトの多発性硬化症 (MS) の動物実験モデルである。自己免疫疾患発症における性差の原因の要因は不明である。我々は TMEV-IDD 疾患感受性における性バイアスを検討した。さらに精巣摘除 (castration) を施行し、estrogen を皮下接種した。SJL/J マウスでは雌雄のいずれも高率に TMEV-IDD を発症し、性バイアスに有意差はみられなかったが、C57L/J マウスでは発症率は低く、雄マウスで有意に発症が高かった。Sham operation を受けた雄 C57L/J の対照群では 50% の発症が見られ、castration を受けた群では 90% が発症しており、明らかな発症促進が見られた。castration の後に estrogen の投与を受けた群では対照群と比して臨床経過に差はなく、castration の効果を消失させた。TMEV 抗原特異的リンパ球増殖反応は castration の後に estrogen の投与を受けた群で最も低かった。対照的に TMEV 抗原特異的抗体価は castration の後に estrogen の投与を受けた雄 C57L/J 群で最も高値を示し、castration を受けた雄 C57L/J 群および sham operation を受けた雄 C57L/J の対照群の TMEV 抗原特異的抗体価は同程度であった。以上より SJL/J マウスでは TMEV-IDD の発症に性差はみられないが、C57L/J マウスでは明らかに性バイアスが存在し、雄で有意に TMEV-IDD の発症が高かった。Castration を受けた雄 C57L/J 群では明らかな発症促進が見られ、estrogen はいずれも castration により促進された発症を抑制し、その効果を消失させた。Castration の後に estrogen の投与を受けた雄 C57L/J 群は TMEV 抗原特異的リンパ球増殖反応は最も低く、逆に TMEV 抗原特異的抗体価は最も高く、TMEV-IDD の発症に性差のバイアスとともに性ホルモンの役割は単純ではないことが明らかになった。

## 研究協力者

矢彦沢裕之 小諸厚生総合病院  
井上 敦 長野県立木曽病院  
Byung S. Kim Northwestern 大学免疫学

## A. 研究目的

タイラー脳脊髄炎ウイルス (TMEV) によるマウス免疫性脱髄疾患 (TMEV-IDD) はヒトの多発性硬化症と、臨床的にも、組織学的にも類似しており、ヒトの多発性硬化症のよい動物実験モデルとされている。多発性硬化症は女性に

多く、性差の明らかな疾患である。自己免疫疾患発症における性差の原因の要因として性ホルモンが注目されているが、TMEV 感染による TMEV-IDD 疾患感受性における性差の生じる理由は研究されておらず、性ホルモンの果たす役割も不明である。今回、我々は TMEV-IDD 感受性における性バイアスの生じる要因について検討した。

## B. 研究方法

TMEV 感受性の雌雄の SJL/J マウスおよび

TMEV 抵抗性の雌雄の C57L/J マウスに TMEV を接種し、TMEV-IDD 疾患感受性における性バイアスを検討した。さらに TMEV 抵抗性の 5-6 週齢の雄 C57L/J マウスに精巣摘除

(castration) を施行し、estrogen を定期的に皮下接種した。対照群には sham operation を施行した。これらのマウス大脳半球内に TMEV を接種し、TMEV-IDD を作成した。経時的に臨床症状を観察するとともに、屠殺後、脊髄を免疫組織学的に検索した。さらに TMEV 抗原および TMEV ウイルスエピトープ特異的リンパ球増殖反応、TMEV 抗原特異的抗体価を定量した。また RT-PCR を用いて interleukin-4 (IL-4), IL-10, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) を定量した。さらにこれら IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  産生リンパ球を ELISPOT 法を用いて検索した。

### C. 研究結果

SJL/J マウスでは雌雄ののいずれも高率 TMEV-IDD を発症し、TMEV-IDD 疾患感受性における性バイアスに有意差はみられなかった (図 1)。C57L/J マウスでは発症率は低かったが、雄で明らかに有意に雄マウスで TMEV-IDD の発症が高かった (図 2)。Sham

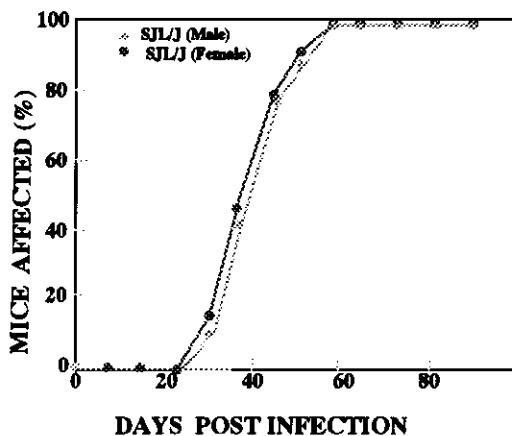


図 1

operation を受けた雄 C57L/J の control 群では 50% 程度の発症が見られた。これに対し

castration を受けた群では 90% が TMEV-IDD を発症しており、明らかな発症促進が見られた。更に castration の後に estrogen の投与を受けた群では対照 sham operation 群と比して臨床経過に差は見られず、castration の効果を消失させた (図 3)。組織学的には発症マウスでは脊髄白質の広汎な脱髄と血管周囲のリンパ球浸潤を認めた。

TMEV 抗原および TMEV ウイルスエピトープ特異的リンパ球増殖反応は castration の後に estrogen の投与を受けた群で最も低かった。

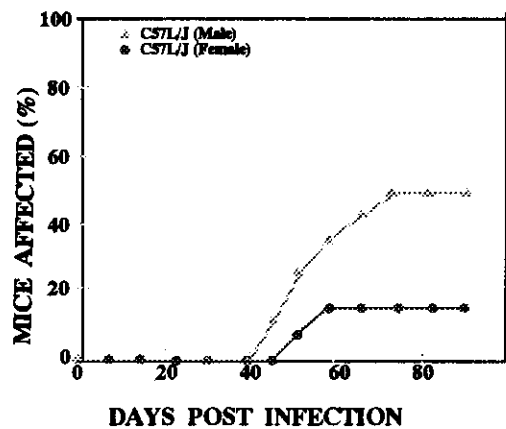


図 2

これとは対照的に TMEV 抗原特異的抗体価は castration の後に estrogen の投与を受けた雄 C57L/J 群で最も高値を示し、castration を受けた雄 C57L/J 群および sham operation を受けた雄 C57L/J の control 群の TMEV 抗原特異的抗体価は同程度であった。

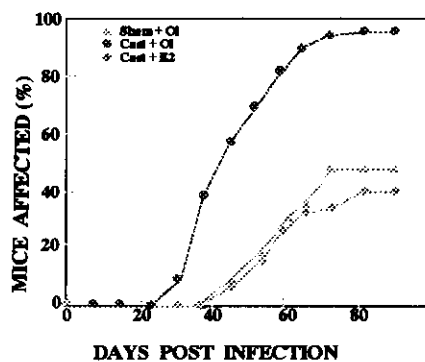


図 3

#### D. 考察

多くの自己免疫疾患では明らかな性差が存在するように、多発性硬化症は女性に多く、性差の明らかな疾患であるが、性差の生じる原因に関しては未だ不明であり、その原因解明が待たれている。タイラー脳脊髄炎ウイルス (TMEV) によるマウス免疫性脱髄疾患 (TMEV-IDD) はヒトの多発性硬化症と臨床的にも、組織学的にも類似しており、ヒトの多発性硬化症のよい動物実験モデルとされている。多発性硬化症における性差の要因として性ホルモンが注目されているが、TMEV-IDD における性差の生じる理由は研究されておらず、性ホルモンの果たす役割も不明である。今回の研究では TMEV-IDD は雄に疾患感受性が高いことが示された。さらにまた castration は雄 C57L/J マウスに於ける TMEV-IDD の発症を促進することが明らかになった。また estrogen はいずれも castration により促進された雄 C57L/J マウスの TMEV-IDD の発症を抑制することが初めて示された。TMEV 抗原および TMEV ウイルスエピトープ特異的リンパ球増殖反応は castration の後に estrogen の投与を受けた群で最も低かったことは興味深い。さらにまた TMEV 抗原特異的抗体価は castration の後に estrogen の投与を受けた雄 C57L/J 群で最も高値を示したことも大変興味深く、むしろパラドックスであり、TMEV-IDD の発症に性差のバイアスとともに性ホルモンの役割は単純ではなく、今後さらなる分子生物学的研究が必要である。

#### E. 結論

SJL/J マウスでは TMEV-IDD の発症に性差はみられないが、C57L/J マウスでは明らかに性バイアスが存在し、雄で有意に TMEV-IDD の発症が高かった。Castration を受けた雄 C57L/J 群では明らかな発症促進が見られ、estrogen は

いずれも castration により促進された

TMEV-IDD の発症を抑制し、その効果を消失させた。Castration の後に estrogen の投与を受けた雄 C57L/J 群は TMEV 抗原特異的リンパ球増殖反応は最も低く、逆に TMEV 抗原特異的抗体価は最も高く、TMEV-IDD の発症に性差のバイアスとともに性ホルモンの役割は単純ではないことが明らかになった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Sekiguchi Y, Ichikawa M, Inoue A, Itoh M, and \*Koh C-S. :Brain derived gangliosides suppress the chronic relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis in NOD mice induced with myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide. J.Neuroimmunol, 116:196-205, 2001
- 2) Inaba Y, Ichikawa M, Inoue A, Itoh M, Kyogashima M, Sekiguchi Y, Nakamura S, Komiyama A, and \*Koh C-S. : Plasma thrombin-antithrombin III complexis associated with the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. J.Neurol.Sci, 185:89-93, 2001
- 3) Nohara C, Akiba H, Nakajima A, Inoue A, Koh C-S, Ohshima H, Yagita H, Mizuno Y, and Okumura K: Amelioration of experimental auto-immune encephalomyelitis with anti-OX40 ligand monoclonal antibody: A critical role for OX40 ligand in migration, but not development, of pathogenic T cells. J.Immunol. 166:2108-2115, 2001
- 4) Yahikozawa H, Palma JP, Dalcanto M, Kang H-K, Koh C-S, and Kim BS: Increased susceptibility of C57L/J male mice after castration and restoration