

い進行した破壊性の関節病変に対する新たな治療法の開発を目的として、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た。さらにこれを変形性膝関節症モデルマウスに移植し関節面に生着することが明らかになった。

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。

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。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。

さらにこの軟骨細胞は骨欠損部では骨形成を認めた。関節内では長期間にわたり骨形成は認められないことから、今後この差異をもたらす要因についての検討が必要である。

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。今後、サルES細胞を用いてよりヒトに近い形での検討を行う予定である。

#### 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

英文原著 (original)

1. 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. *Biol Pharm Bull* 25(6); 718-721, 2002.
2. 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*, 168:2365-2370, 2002.
3. 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* 129;359-369, 2002.
4. Nagafuchi H, Takeno M, Takeba Y, Miyagi T, Chiba S, Sakane T, Suzuki N: Aberrant expression of Fas ligand on anti-DNA autoantibody secreting B lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus; "immune privilege" like state of the autoreactive B cells. *Clin Exp Rheumatol* 20;625-631, 2002.
5. Wakisaka S, Mihara S, Takeba Y, Takeno M, Yamamoto S, and Suzuki N: Aberrant fas ligand expression on lymphocytes in patients with Behcet's disease. *Int Arch Allergy Immunol* 129(2);79-84, 2002.
6. Miyagi T, Takeno M, Nagafuchi H, Takahashi M, and Suzuki N: Flk1 positive cells

derived from mouse embryonic stem (ES) cells reconstitutes hematopoiesis in vivo in SCID mice. *Exp Hematol* 30(12):1444-1453, 2002.

7. Nagafuchi H, Shimoyama Y, Kashiwakura J, Takeno M, Sakane T, and Suzuki N: Preferential expression of B7.2 (CD86), but not B7.1 (CD80), on B cells induced by CD40/CD40L interaction is essential for the anti-DNA autoantibody production in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol*. 21;71-77. 2002.

8. Suzuki N, Takeno M, Inaba, G: Bilateral subdural effusion in a patient with neuro-Behcet's disease. *Ann Rheum Dis*, in press, 2003.

9. Chiba S, Iwasaki Y, Sekino H, Suzuki N: Motoneuron enriched neural cells derived from mouse ES cells reconstitute neural network to improve motor function of hemiplegic mice, a model of cerebral vascular diseases. *Cell Transplant*, in press, 2003.

#### 和文原著

1. 鈴木登、山本仁、小坂橋靖: 孤発性と考えられる進行性化骨性筋炎の一例. *炎症・再生* 22(6);555-559, 2002.

2. 宮城司、千葉俊明、鈴木登: 再生医学. *聖マリアンナ医科大学雑誌* 30;121-129, 2002.

3. 千葉俊明、関野宏明、鈴木登: ナノ酸を用いたマウス胚性幹細胞における神経上皮型幹細胞への分化誘導. *炎症・再生* 22(6);543-549, 2002.

#### 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 Matera) pp.297-304, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2002.

2. Sakane T, Suzuki N: Behcet's syndrome. *The Molecular Pathology of Autoimmunity Second Edition* (Ed by A N Theofilopoulos and C A Bona), pp.828-840, Gordon and Breach Science Publishers, Pennsylvania, USA, 2002.

3. 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, 2003.

4. Takeno M, Shimoyama Y, Nagafuchi H, Suzuki N, Sakane T: Neurophil hyperfunction on Behcet's disease. *Immunology of Behcet's disease* (Ed by M Zierhut, S Ohno) Swets & Zeitlinger, Lisse, The Netherlands, in press, 2003.

5. Sakane T, Suzuki N: Neuro- endocrine-immune axis in human rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* Kluwer Academic Publishers, Wroclaw, Poland, in press, 2003.

#### 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, pp.310-313, 2002.

2. 鈴木登、宮城司: 膠原病類縁疾患に伴う関節炎(Behcet病など)「骨・関節疾患」, 朝倉書店 印刷中, 2003.

3. 鈴木登: 全身性エリテマトーデス 病因

インフォームドコンセントのための図説シリーズ 膠原病, 医薬ジャーナル社 印刷中, 2003.

#### 和文総説

1. 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 1169-1171, 2002.
2. 武半優子、岳野光洋、柏倉淳一、鈴木登: ヒト Th1 細胞特異的 Tec family チロシンリン酸化酵素、Txk の機能解析と各種自己免疫疾患における発現. 炎症・再生 22(5): 475-479, 2002.
3. 千葉俊明、鈴木登: 脳梗塞慢性期における移植治療. 救急医学 26(9):1094-1098.2002.
4. 本間龍介、鈴木登: 再生医療. Health Science 19(1):78-7, 2002.
5. 宮城 司、本間龍介、鈴木登: 呼吸器系の生物学. 1. 胚性幹細胞 (ES 細胞)と実験医学. Annual Review 呼吸器 2003 1-9, 2003.

#### 学会発表

##### 国際学会

1. Miyagi T, Takeno M, Takahasi M, Suzuki N: Hemangioblasts derived from embryonic stem (ES) cells can reconstitute hematopoiesis *in vivo* in SCID. The 31th Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology, 2002.7.
2. Takeno M, Takeba Y, Ishgatubo Y, Suzuki N: Administration of Txk gene selectively induces Th1 type immune receptor, American College of Rheumatology: 65th Annual Scientific Meeting, 2002.10.

##### 国内学会

1. 千葉俊明、岳野光洋、鈴木登、関野宏明: 虚血型脳外傷モデルマウスにおける ES 細胞由来神経幹細胞の神経再生・保護効果、第 25 回日本神経外傷学会、2002.3.
2. 千葉俊明、岳野光洋、鈴木登、関野宏明: ES 細胞由来神経細胞の脳内移植による神経網修復と機能改善、第 1 回日本再生医療学会総会、2002.4.
3. 千葉俊明、岳野光洋、鈴木登、関野宏明: ES 細胞における神経管形成と液性因子による位置制御、第 1 回日本再生医療学会総会、2002.4.
4. 鈴木登、岳野光洋: マウス胚性幹細胞・軟骨細胞を用いた関節炎モデルの治療、第 46 回リウマチ学会学術集会、2002.4.
5. 岳野光洋、武半優子、鈴木登: Txk 遺伝子治療による Th1 型免疫応答の誘導、第 46 回リウマチ学会学術集会、2002.4.
6. 千葉俊明、岳野光洋、鈴木登、関野宏明: ES 細胞由来神経幹細胞・血管内皮細胞の同時移植による虚血型脳損傷モデルの修復・機能改善、第 27 回日本脳卒中学会総会、2002.4.
7. 鈴木登、武半優子、脇坂秀繁、中辻憲夫、仁藤新治: 霊長類 (カニクイザル) 胚性幹細胞 (ES 細胞) からの軟骨細胞分化誘導、第 23 回日本炎症・再生医学会、2002.7.
8. 鈴木登、宮城司、岳野光洋、高橋正知: マウス ES 細胞由来の hemangioblast の移植による SCID マウスの骨髄再建能の検討、第 23 回日本炎症・再生医学会、2002.7.
9. 武半優子、金子敦史、浅井富明、鈴木登: 慢性関節リウマチ(RA)におけるニコチンが神経ペプチドの産生に与える影響、第 23 回日本炎症・再生医学会、2002.7.

10. 千葉俊明、岳野光洋、関野宏明、鈴木登：ES 細胞における神経管形成の模倣と morphogen による位置制御機構、第 23 回日本炎症・再生医学会、2002.7.

11. 宮城司、葉俊明、岳野光洋、永瀨裕子、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 23 回日本炎症・再生医学会、2002.7.

12. 千葉俊明、鈴木登、関野宏明：ES 細胞における神経分化と神経再生治療、第 43 回聖マリアンナ医科大学医学会・学術集会、2002.7.

13. 本間龍介、上野聡樹、鈴木登：マウス胚性幹細胞 (ES) の上皮細胞への分化誘導とその角膜移植への応用、第 2 回日本再生医療学会総会、2003.3.

14. 宮城司、高橋正知、鈴木登：マウス ES 細胞から分化誘導した血液血管芽細胞 (hemangioblast) の特性、第 2 回日本再生医療学会総会、2003.3.

15. 濱田真里、千葉俊明、明石勝也、青木治人、鈴木登：マウス胚性幹細胞からの神経幹細胞の分化誘導と脊髄損傷における移植治療の有用性、第 2 回日本再生医療学会総会、2003.3.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特記事項なし

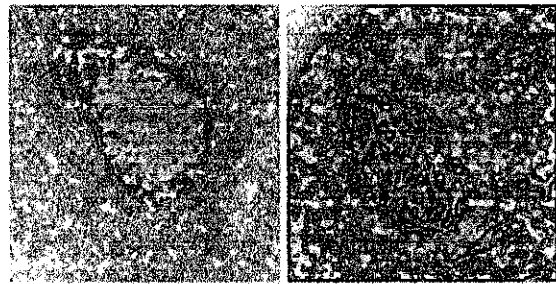


図 1. マウス ES 細胞由来軟骨細胞をマウス大腿筋内に移植した。右はアルシアンブルー染色で、左は HE 染色を示す。

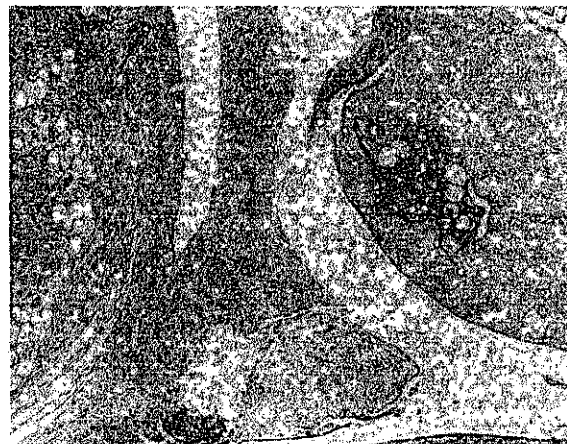


図 2. Berlin Blue 染色による ES 細胞由来軟骨細胞の関節内での同定



図 3. 骨欠損部への軟骨細胞移植後の X 線写真

厚生科学研究費補助金（特定疾患調査研究事業）  
分担報告研究

コラーゲン誘発性関節炎マウスに対する JunD 遺伝子療法

主任研究者 鈴木 登（聖マリアンナ医大 免疫学・病害動物学）

関節リウマチでは関節病変部において滑膜細胞が異常に増殖し過剰な炎症性サイトカインを産生する。この過程には転写因子 AP-1 が重要な役割を果たす。我々はこの AP-1 活性を制御する JunD 遺伝子を RA 滑膜細胞株に導入することによって細胞増殖、炎症性サイトカインおよび蛋白分解酵素の産生が抑制されることを報告した。昨年度はその知見に基づき、JunD 遺伝子発現ベクター、pRSV-junD をコラーゲン誘発性関節炎モデルマウスに投与し抗炎症作用を認めた。本年度は JunD 遺伝子発現ベクター投与が関節炎モデルマウスの炎症性サイトカイン産生と滑膜細胞の増殖を評価した。JunD 遺伝子発現ベクターは炎症性サイトカイン産生と滑膜細胞の過剰増殖を抑制し、直接滑膜細胞の機能を制御することにより、滑膜炎の抑制をもたらすことが示された。

A. 研究目的

関節リウマチ(rheumatoid arthritis:RA)は関節病変を主座とする慢性炎症疾患で、自己免疫応答を伴う。異常増殖した滑膜細胞や浸潤リンパ球は炎症性サイトカインや蛋白分解酵素を産生し病態を形成する。RAにおける滑膜細胞の増殖および異常活性には転写因子 AP-1 が関与する。AP-1 は c-Fos が c-Jun と二量体を形成することで転写因子としての活性を発揮するが、同じく Jun ファミリーに JunD はむしろ転写活性の制御に作用する。我々はこの点に着目し、*in vitro* において RA 滑膜細胞株に JunD 遺伝子を導入すると、細胞増殖、炎症性サイトカインおよび蛋白分解酵素の産生が抑制されることを見出した。本研究ではこの知見を応用し、コラーゲン誘発性関節炎モデルマウスに JunD 遺伝子を投与し、その治療効果を検討した。

B. 研究方法

- ①コラーゲン誘発性関節炎モデルマウスの作成：DBA1J(6週令雌)に牛Ⅱ型コラーゲン 100 $\mu$ g を完全フロイトアジュバントとともに尾根部皮内に投与し、3週後に同様の追加免疫を行い、関節炎を誘導した。
- ②JunD 遺伝子発現ベクターの作成：マウス *junD* cDNA を pRSV ベクターに挿入し、真核細胞系発現ベクター pRSV-*junD* を構築した。
- ③JunD 遺伝子治療：コラーゲン誘発性関節炎モデルマウス作成過程の免疫前後、すなわち免疫前 24 時間、免疫後 24 時間および 72 時間に 20 $\mu$ g の pRSV-cat あるいは pRSV-*junD* を筋肉内投与した。
- ④関節炎の評価：四肢関節の腫脹を肉眼的に評価した。各肢ごと全く変化のないものを 0 点とし、1 指の腫脹を 1 点、2 指以上の腫脹あるいは足全体の僅かな浮腫を 2 点、足全体の激しい腫脹を 3 点と評価し、四肢関節の点数の合計（12 点満点）を関節炎ス

コアとした。

⑤血清 IgG 型抗 II 型コラーゲン抗体の測定：96 ウェル ELISA プレートに 0.05M Tris-buffered saline に溶解したウシ II 型コラーゲン 10  $\mu$ g/ml でコートし、ブロッキング後、1% BSA 0.05% Tween20 PBS(-) で希釈した血清、HRP 標識抗マウス IgG を順次反応させ、TMB による発色を吸光光度計

(450nm) により測定した。抗体力価は任意のプラスミド非投与コラーゲン誘発性関節炎を発症したマウスの初回免疫より 7 週目の血清を標準血清とし、arbitrary unit で表した。

⑥組織学的検討：各マウスの膝関節をホルマリン固定後 EDTA にて脱灰した。薄切後 HE 染色を行った。一部では免疫染色を行った。

#### (倫理面への配慮)

動物実験では実験前の飼育から実験後にいたるまで科学的・倫理的に対処し動物の苦痛を排除するため麻酔や安楽死などの手法を用いた。組換え DNA および遺伝子導入動物は適当と判断される物理的封じ込め方法を採用した。すべての実験は学内 IRB の承認のもと、その規則にしたがい施行した。

### C. 研究結果

①JunD 遺伝子投与のマウス関節炎の発症率に与える影響：いずれかの関節の腫脹が初めて観察された時点を発症と定義した。II 型コラーゲンの免疫のみでプラスミドを投与しないコントロール群のマウスでは、初回免疫より 7 週目より関節炎の発症が観察され 10 週目で 83%、13 週目で 100% に達した。コントロールプラスミド pRSV-cat 投与

群の発症率は 10 週目で 91%、13 週で 100% であった。pRSV-junD 投与群の発症率は 10 週目で 80%、13 週で 90% で、JunD 遺伝子の投与により関節炎の発症はやや低下した印象があるものの有意な影響は与えなかった。

②JunD 遺伝子投与のマウス関節炎スコアに及ぼす影響：関節炎スコアを経時的に観察すると、pRSV-cat 投与群は 7 週目以降、コントロール群 (プラスミド非投与群) と比べ、関節炎スコアが有意に高かった (図 1)。これに対して、pRSV-junD 投与群は 7 週目以降、pRSV-cat 投与群より有意に低いスコアを示し、13 週目以降はコントロール群よりも有意に低いスコアであった。

③血清中 IgG 型抗 II 型コラーゲン抗体の推移：JunD 遺伝子投与の免疫系に及ぼす影響を検討するため、血清中 IgG 型抗 II 型コラーゲン抗体を測定した。免疫したマウスのすべてにおいて高力価の特異抗体が検出されたが、関節点数とは明らかな相関はなかった。さらに、コントロール群、pRSV-cat 投与群、pRSV-junD 投与群の各群で抗体力価に有意差は見られなかった。

④関節病変部を組織学的に観察した。コントロール群、pRSV-cat 投与群と比較して pRSV-junD 投与群では単核細胞浸潤も比較的穏やかであった。さらに滑膜細胞増殖、骨・軟骨破壊ともに軽微であった (図 2)。

### D. 考察

今回の検討により、JunD 遺伝子治療がコラーゲン誘発性関節炎マウスの関節病変に改善をもたらすことが明らかになった。対照とした pRSV-cat 投与群ではむしろ関節スコアの悪化を見たが、これはプラスミドの

CpG モチーフによる非特異的免疫刺激のための可能性がある。しかし、pRSV-junD 投与群では同じような非特異的免疫刺激活性が想定されるにもかかわらず、関節炎症状の改善を認めた。

組織学的にも pRSV-junD 投与群では関節破壊は著明に改善しており、junD 投与の有効性が確認された。予備的検討では浸潤炎症細胞からの炎症性サイトカインの産生を抑制するものと考えられた。

一方、AP-1 は免疫担当細胞の活性化機序にも関与することから、免疫系への影響も血清中 IgG 型抗 II 型コラーゲン抗体の力価を指標として解析した。しかし JunD 遺伝子投与の免疫系への影響は認められなかった。即ち投与した JunD 遺伝子は病変局所の滑膜細胞に取り込まれ、直接的に滑膜細胞の機能を制御しているものと考えられる。

#### E. 結論

JunD 遺伝子発現ベクターは滑膜細胞への直接的な作用により滑膜細胞の機能を制御することにより、滑膜炎の抑制をもたらすものと考えられた。

#### F. 健康危機情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

英文原著 (original)

1. 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. *Biol Pharm Bull* 25(6); 718-721, 2002.
2. 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*, 168:2365-2370, 2002.
3. 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* 129;359-369, 2002.
4. Nagafuchi H, Takeno M, Takeba Y, Miyagi T, Chiba S, Sakane T, Suzuki N: Aberrant expression of Fas ligand on anti-DNA autoantibody secreting B lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus; "immune privilege" like state of the autoreactive B cells. *Clin Exp Rheumatol* 20;625-631, 2002.
5. Wakisaka S, Mihara S, Takeba Y, Takeno M, Yamamoto S, and Suzuki N: Aberrant fas ligand expression on lymphocytes in patients with Behcet's disease. *Int Arch Allergy Immunol* 129(2);79-84, 2002.
6. Miyagi T, Takeno M, Nagafuchi H, Takahashi M, and Suzuki N: Flk1 positive cells derived from mouse embryonic stem (ES) cells reconstitutes hematopoiesis in vivo in SCID mice. *Exp Hematol* 30(12);1444-1453, 2002.
7. Nagafuchi H, Shimoyama Y, Kasiwakura J, Takeno M, Sakane T, and Suzuki N: Preferential expression of B7.2 (CD86), but not B7.1 (CD80), on B cells induced by CD40/CD40L interaction is essential for the anti-DNA autoantibody production in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp*

Reumatol 21;71-77,2003.

8. Suzuki N, Takeno M, Inaba, G : Bilateral subdural effusion in a patient with neuro-Behcet's disease. Ann Rheum Dis, in press, 2003.

9. Chiba S, Iwasaki Y, Sekino H, Suzuki N: Motoneuron enriched neural cells derived from mouse ES cells reconstitute neural network to improve motor function of hemiplegic mice, a model of cerebral vascular diseases. Cell Transplant, in press, 2003.

#### 和文原著

1. 鈴木登、山本仁、小坂橋靖: 孤発性と考えられる進行性化骨性筋炎の一例. 炎症・再生 22(6);555-559, 2002.

2. 宮城司、千葉俊明、鈴木登: 再生医学. 聖マリアンナ医科大学雑誌 30;121-129, 2002.

3. 千葉俊明、関野宏明、鈴木登: ヲノ酸を用いたマウス胚性幹細胞における神経上皮型幹細胞への分化誘導. 炎症・再生 22(6);543-549, 2002.

#### 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 Matera) pp.297-304, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2002.

2. Sakane T, Suzuki N: Behcet's syndrome. The Molecular Pathology of Autoimmunity Second Edition (Ed by A N Theofilopoulos and C A Bona), pp.828-840, Gordon and Breach Science Publishers, Pennsylvania, USA, 2002.

3. 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, 2003.

4. Takeno M, Simoyama Y, Nagafuchi H, Suzuki N, Sakane T: Neurophil hyperfunction on Behcet's disease. Immunology of Behcet's disease (Ed by M Zierhut, S Ohno)Swets & Zeitlinger, Lisse, The Netherlands, in press, 2003.

5. Sakane T, Suzuki N: Neuro- endocrine-immune axis in human rheumatoid arthritis. Autoimmunity Kluwer Academic Publishers, Wroclaw, Poland, in press, 2003.

#### 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, pp.310-313, 2002.

2. 鈴木登、宮城司: 膠原病類縁疾患に伴う関節炎(Behcet病など)「骨・関節疾患」, 朝倉書店 印刷中, 2003.

3. 鈴木登: 全身性エリテマトーデス 病因インフォームドコンセントのための図説シリーズ 膠原病, 医薬ジャーナル社 印刷中, 2003.

#### 和文総説

1. 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 1169-1171, 2002.

2. 武半優子、岳野光洋、柏倉淳一、鈴木登: ヒト Th1 細胞特異的 Tec family チロシンリン酸化酵素、Txk の機能解析と各種自己免疫疾患における発現. 炎症・再生 22(5): 475-479, 2002.



3. 千葉俊明、鈴木登: 脳梗塞慢性期における移植治療. 救急医学 26(9):1094-1098,2003
4. 本間龍介、鈴木登: 再生医療. Health Science 19(1):78-7, 2002.
5. 宮城 司、本間龍介、鈴木登: 呼吸器系の生物学. 1. 胚性幹細胞 (ES 細胞)と実験医学. Annual Review 呼吸器 2003 1-9, 2003.

学会発表  
国際学会

1. Miyagi T, Takeno M, Takahasi M, Suzuki N: Hemangioblasts derived from embryonic stem (ES) cells can reconstitute hematopoiesis *in vivo* in SCID. The 31th Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology, 2002.7.
2. Takeno M, Takeba Y, Ishigatubo Y, Suzuki N: Administration of Txx gene selectively induces Th1 type immune receptor, American College of Rheumatology: 65th Annual Scientific Meeting, 2002.10.

国内学会

1. 千葉俊明、岳野光洋、鈴木登、関野宏明: 虚血型脳外傷モデルマウスにおける ES 細胞由来神経幹細胞の神経再生・保護効果、第 25 回日本神経外傷学会、2002.3.
2. 千葉俊明、岳野光洋、鈴木登、関野宏明: ES 細胞由来神経細胞の脳内移植による神経網修復と機能改善、第 1 回日本再生医療学会総会、2002.4.
3. 千葉俊明、岳野光洋、鈴木登、関野宏明: ES 細胞における神経管形成と液性因子による位置制御、第 1 回日本再生医療学会総会、2002.4.
4. 鈴木登、岳野光洋: マウス胚性幹細胞・軟

- 骨細胞を用いた関節炎モデルの治療、第 46 回リウマチ学会学術集会、2002.4.
5. 岳野光洋、武半優子、鈴木登: Txx 遺伝子治療による Th1 型免疫応答の誘導、第 46 回リウマチ学会学術集会、2002.4.
6. 千葉俊明、岳野光洋、鈴木登、関野宏明: ES 細胞由来神経幹細胞・血管内皮細胞の同時移植による虚血型脳損傷モデルの修復・機能改善、第 27 回日本脳卒中学会総会、2002.4.
7. 鈴木登、武半優子、脇坂秀繁、中辻憲夫、仁藤新治: 霊長類 (カニクイザル) 胚性幹細胞 (ES 細胞) からの軟骨細胞分化誘導、第 23 回日本炎症・再生医学会、2002.7.
8. 鈴木登、宮城司、岳野光洋、高橋正知: マウス ES 細胞由来の hemangioblast の移植による SCID マウスの骨髄再建能の検討、第 23 回日本炎症・再生医学会、2002.7.
9. 武半優子、金子敦史、浅井富明、鈴木登: 慢性関節リウマチ(RA)におけるニコチンが神経ペプチドの産生に与える影響、第 23 回日本炎症・再生医学会、2002.7.
10. 千葉俊明、岳野光洋、関野宏明、鈴木登: ES 細胞における神経管形成の模倣と morphogen による位置制御機構、第 23 回日本炎症・再生医学会、2002.7.
11. 宮城司、千葉俊明、岳野光洋、永渕裕子、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 23 回日本炎症・再生医学会、2002.7.
12. 千葉俊明、鈴木登、関野宏明: ES 細胞における神経分化と神経再生治療、第 43 回聖マリアンナ医科大学医学会・学術集会、2002.7.
13. 本間龍介、上野聡樹、鈴木登: マウス胚性幹細胞 (ES) の上皮細胞への分化誘導と

その角膜移植への応用、第2回日本再生医療学会総会、2003.3.

14. 宮城司、高橋正知、鈴木登: マウス ES 細胞から分化誘導した血液血管芽細胞 (hemangioblast) の特性、第2回日本再生医療学会総会、2003.3.

15. 濱田真里、千葉俊明、明石勝也、青木治人、鈴木登: マウス胚性幹細胞からの神経幹細胞の分化誘導と脊髄損傷における移植治療の有用性、第2回日本再生医療学会総会、2003.3.

H 知的財産権の出願・登録状況  
特記事項なし

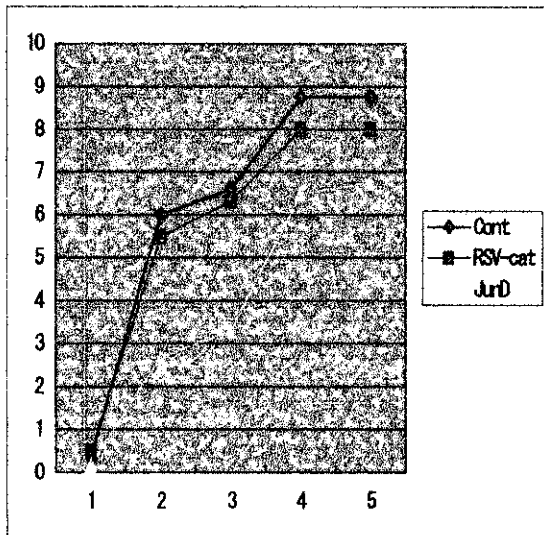
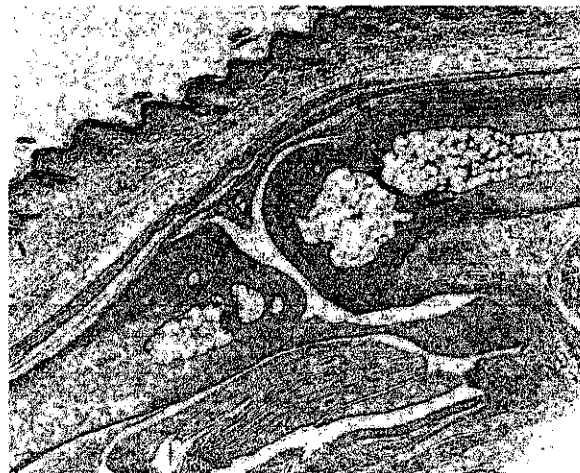


図1 JunD 遺伝子投与の関節スコアへの影響  
Control 群はプラスミド非投与マウス、  
RSV-cat は pRSV-cat、JunD は pRSV-junD 筋注マウス。



A. Control 群はプラスミド非投与マウス



B. pRSV-junD 筋注マウス



C. pRSV-cat 筋注マウス

図2 JunD 遺伝子投与の関節破壊の抑制効果(HE 染色 40 倍)

$\beta$ 1 インテグリン下流シグナル分子 Crk-associated substrate lymphocyte type(Cas-L) の  
関節リウマチの病態における役割について

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 $\beta$ 1 インテグリンシグナル分子の Cas-L の関節リウマチでの病態における意義を明らかにすることを目的とした。Tax トランスジェニックマウスにおける脾細胞遊走能は関節炎発症前の4週齢のマウスにおいて遊走能の亢進が認められた。さらに関節炎発症後の14週齢のマウスにおいても遊走能亢進が認められた。さらに Cas-L 蛋白発現とそのチロシンリン酸化も関節炎発症マウスにおいて両者ともに亢進が認められた。  
また14週齢の関節炎を発症した tax トランスジェニックマウスにおいて Src チロシンキナーゼの fyn,lck の発現、自己リン酸化の亢進が認められた。また Cas-L 陽性リンパ球は関節炎を生じた tax トランスジェニックマウスの関節に非常に多く浸潤していた。さらにヒト関節リウマチにおいても Cas-L 陽性リンパ球は炎症関節にその多くが浸潤していた。  
このように Cas-L は関節リウマチの病態に重要な役割を果たしていることが示唆された。

A. 研究目的

$\beta$ 1 インテグリンは細胞接着、細胞遊走、細胞増殖、サイトカイン産生、アポトーシス等の様々な生物学的機能に関与するだけでなく、細胞内シグナル伝達にも重要な役割を担っており、接着シグナルを細胞内シグナルに変換するシグナル伝達レセプターとして働く。関節リウマチ（RA）の炎症反応に $\beta$ 1 インテグリンを介する細胞の活性化やその後の T 細胞遊走能の亢進が関与するという証拠が多数蓄積している。RA 患者における滑膜細胞、滑液細胞や血管内皮細胞では $\beta$ 1 インテグリン及びそのリガンドであるフィブロネクチンや VCAM-1 等の発現が高まっている。本研究は、 $\beta$ 1 インテグリン下流の

シグナル分子であり、T 細胞の活性化に続く IL-2 産生および細胞遊走能に重要な Crk-associated substrate lymphocyte type(Cas-L)の RA での病態における意義を明らかにすることを目的とした。そこでまず、RA 様病態を呈する HTLV-I Tax transgenic mouse を用いて細胞遊走能と Cas-L の発現及びそのチロシンリン酸化、免疫組織学的検討を行った。更にそこで得られた知見に基づいて関節リウマチ患者滑膜を用いた免疫組織学的検討を行った。多発性関節病、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、介護の必要性を増加させるため、RA の原因や病態解明と予防法、治療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. 動物

HTLV-I Tax transgenic mouse 関節炎発症前の4週齢マウス、関節炎発症後の14週齢マウスおよび対照群として Littermate Control マウス (Ct)を各群3匹ずつ用いた。14週齢マウスでは、関節炎を発症したマウスを Atg、発症していないマウスを Ntg と分別した。

### 2. 細胞遊走能の測定

細胞遊走能は各群のマウスより脾細胞を分離し、マウス内皮細胞を単層に撒いたケモタキシスチャンパー(Transwell)に無刺激下で遊走した細胞数をフローサイトメーターで測定した。

3. Cas-L 蛋白質及び $\beta_1$ インテグリン下流シグナル蛋白質発現とチロシンリン酸化蛋白質発現及びチロシンリン酸化は各群のマウスより脾細胞、脾臓、リンパ節、胸腺を採取しライセートを作製後、免疫沈降に続くウェスタンブロット法により解析した。

### 4. Cas-L mRNA 発現

14週齢のマウス脾臓より tRNA を抽出後、ノーザンブロット法により解析した。

### 5. 細胞表面分子の発現

$\beta_1$ インテグリンを始めとする細胞表面分子の発現は、14週齢のマウス脾細胞を蛍光ラベル抗体で免疫染色後、フローサイトメーターにより陽性細胞率を解析した。

6. マウス関節組織、関節リウマチ患者滑膜組織における Cas-L 蛋白質発現

14週齢のマウスより関節組織切片を作製

後、ヘマトキシリン&エオジン染色と免疫染色(酵素抗体法)により解析した。関節リウマチ患者滑膜に関しても同様に解析した。対照として変形性関節症患者滑膜を用いた。

### 7. 倫理面での配慮

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

## C.研究結果

### 1. Tax transgenic mouse 脾細胞における細胞遊走能の変化

Tax transgenic mouse 脾細胞における細胞遊走能の変化を検討するため、無刺激下において遊走した細胞数をフローサイトメーターで測定した。4週齢のマウスにおいては、Littermate Control マウス(Ct)と比較して関節炎を起こしていないトランスジェニックマウス(Ntg)の脾細胞の遊走能は亢進していた。4週齢のマウスにおいては明らかな関節炎症状が認められなかった。また、14週齢のマウスにおいては、Ctと比較して Ntg の脾細胞の遊走能は変化が認められず、関節炎を起こしたマウス(Atg)の遊走能は著明な亢進を認めた。これらの結果より、Tax transgenic mouse 脾細胞においては関節炎発症前から細胞遊走能が既に亢進しており、関節炎を起こしたマウスにおいて特に細胞遊走能が亢進していることが明らかとなった。

2. Tax transgenic mouse 脾細胞における Cas-L 蛋白質発現及びチロシンリン酸化  
前項で確認された細胞遊走能に対して Cas-L 蛋白質発現及びチロシンリン酸化がどのように変化するかを検討するため、Tax transgenic mouse 脾細胞における Cas-L 蛋白質発現及びチロシンリン酸化を免疫沈降-ウエスタンブロット法で検討した。各 4 週齢のマウスにおいては、Cas-L 蛋白質の発現は Littermate Control マウス(Ct)と比較して関節炎を起こしていないトランスジェニックマウス(Ntg)では、分子量 105kD の Cas-L 蛋白質発現及びチロシンリン酸化の亢進が認められた。また、各 14 週齢のマウスにおいては、Cas-L の発現及びチロシンリン酸化は Ct と比較して Ntg では差が認められず、関節炎を起こしたマウス(Atg)では Cas-L 蛋白質発現及びチロシンリン酸化の亢進が認められた。更に予想に反して 78kD 付近に抗 Cas-L 抗体で免疫沈降され、更にチロシンリン酸化が強く認められるバンドが検出された。この 78kD のバンドは 105kDCas-L と同様に 4 週齢のマウスでは Ntg、14 週齢のマウスでは Atg で発現及びチロシンリン酸化が強く認められた。これまでに Cas-L 蛋白質は細胞のアポトーシス時に Caspase により分解を受けることが報告されていることから、本項で認められた 78kD のバンドが Cas-L 関連蛋白質である可能性が高いと考えた。

3. 78kD 蛋白質の Cas-L 特異性  
78kD 蛋白質の Cas-L に対する特異性を検討するため、この蛋白質が抗 Cas-L 抗体により認識されるかを検討した。78kD の蛋白質は、抗 Cas-L 抗体と抗チロシンリ

ン酸化抗体で免疫沈降された。一方、抗 p130Cas 抗体では 78kD 蛋白質は免疫沈降されなかった。また、マウス IgG においても 78kD 蛋白質は免疫沈降されなかった。これらの結果より 78kD の蛋白質は Cas-L に特異性があり、チロシンリン酸化された蛋白質であることが示された。

4. Tax transgenic mouse リンパ系臓器における Cas-L 蛋白質発現及びチロシンリン酸化

78kD の蛋白質が Cas-L の分解によるものか否かを検討するため、14 週齢の Tax transgenic mouse リンパ系臓器（脾臓、リンパ節、胸腺）における Cas-L 蛋白質発現及びそのチロシンリン酸化を検討した。細胞を分離する過程で Cas-L の分解が起こる可能性も考えられるため、リンパ系臓器は摘出後速やかに液体窒素中で凍結、粉碎しライセートを作製して分解を最小限に留めた。105kD の Cas-L 蛋白質の発現は脾臓、リンパ節、胸腺において、Littermate Control マウス(Ct)と比較して関節炎を起こしていないトランスジェニックマウス(Ntg)、関節炎を起こしたマウス(Atg)の順に Cas-L 蛋白質発現及びチロシンリン酸化の亢進が認められた。一方、2.で認められた 78kD の蛋白質は僅かに認められるか、または認められなかった。この結果から、78kD の蛋白質は Cas-L の分解産物である可能性が高いものと考えられた。

5. Tax transgenic mouse 脾臓における Cas-L mRNA 発現

Tax transgenic mouse の Cas-L の発現亢進は、単にリンパ球が臓器へ浸潤した結果によるものか、また単一細胞レベルでも

上昇しているか、またスプライシングフォームが存在するかを検討するため、14週齢の Tax transgenic mouse 脾臓における Cas-L mRNA レベルでの発現をノーザンブロット法で検出した。この結果は脾臓における Cas-L mRNA の発現は Littermate Control マウス(Ct)、関節炎を起こしていないトランスジェニックマウス(Ntg)、関節炎を起こしたマウス(Atg)順に亢進していた。さらに Cas-L 以外のサイズにバンドは検出されなかったことから、78kD 蛋白質は Cas-L のスプライシングフォームではなく、Cas-L の分解による産物である可能性が高いと考えられた。

#### 6. Tax transgenic mouse 脾臓、リンパ節における $\beta_1$ インテグリン関連チロシンキナーゼ及び Src ファミリーチロシンキナーゼの発現及びチロシンリン酸化

我々は以前に、FAK により Cas-L が直接チロシンリン酸化される経路のほかに Src family チロシンキナーゼによりリン酸化される経路があることを報告してきた。本研究で認められた Tax transgenic mouse の Cas-L チロシンリン酸化がその上流のいかなるチロシンキナーゼによってリン酸化されたかを明らかにするため、14週齢の Tax transgenic mouse リンパ節、脾臓におけるチロシンキナーゼの FAK、Pyk2、fyn、lck の発現及びチロシンリン酸化を免疫沈降-ウェスタンブロット法で検討した。その結果は、脾臓において FAK、Pyk2 蛋白質は、Littermate Control マウス(Ct)と比較して関節炎を起こしていないトランスジェニックマウス(Ntg)、関節炎を起こしたマウス(Atg)で明らかな発現亢進は認められず、チロシンリン酸

化も変化が認められなかった。リンパ節においては、FAK、Pyk2 蛋白質は、Ct と比較して Ntg、Atg で僅かに発現亢進が認められたものの、FAK に関してチロシンリン酸化は認められず、Pyk2 に関しても僅かに亢進しているに留まった。一方、fyn、lck 蛋白質の発現は脾臓、リンパ節共に特に Atg で Cas-L 発現及びチロシンリン酸化の著明な亢進が認められた。以上のことから、Cas-L は主に Src ファミリーチロシンキナーゼの fyn、lck によってチロシンリン酸化を受けた可能性が考えられた。

#### 7. Tax transgenic mouse 脾細胞における表面分子の発現

Tax transgenic mouse において Cas-L を含む  $\beta_1$  インテグリン下流のシグナル蛋白質の発現及びチロシンリン酸化の亢進が認められた理由として、 $\beta_1$  インテグリンなどの細胞表面分子の発現が変化していた可能性も考えられる。そこで、14週齢の Tax transgenic mouse 脾細胞における表面分子の発現を蛍光抗体法で検討した。T 細胞表面分子の CD4、CD8、インテグリン関連表面分子の CD29、CD49d、CD11a、CD44 の発現は Littermate Control マウス(Ct)と比較して関節炎を起こしていないトランスジェニックマウス(Ntg)、関節炎を起こしたマウス(Atg)において有意な変化が認められなかった。従って、本研究で認められた  $\beta_1$  インテグリン下流のシグナル蛋白質の発現及びチロシンリン酸化の亢進は細胞表面分子の発現変化によるものではないと考えられた。

## D 考察

本研究では、リウマチモデルマウスの Tax transgenic mouse を用いて脾細胞遊走能、脾臓、リンパ節における Cas-L 発現およびチロシンリン酸化、関節における Cas-L 発現を検討した。その結果、関節炎発症前及び関節炎発症後において脾細胞遊走能の亢進、Cas-L 蛋白質の発現及びチロシンリン酸化の亢進が認められた。

Cas-L 蛋白質の発現が亢進した理由として、臓器へのリンパ球浸潤による可能性が考えられたが、関節炎を発症したマウスにおいて Cas-L mRNA 発現が亢進していたことから、単一細胞レベルで Cas-L 発現が亢進していたと考えられる。また、 $\beta_1$  インテグリンを始めとする接着分子の発現及び T 細胞マーカの発現は変化が認められなかったことから、Cas-L の発現亢進が関節炎の発症及び炎症反応の遷延に関与した可能性が考えられる。Cas-L 蛋白質は従来  $\beta_1$  インテグリンから FAK または Src family チロシンキナーゼよりチロシンリン酸化を受けて下流へシグナルを伝達する。関節炎を発症したマウスで認められた Cas-L 蛋白質のチロシンリン酸化は、主として Src family チロシンキナーゼによりチロシンリン酸化を受けていた可能性が考えられた。更に関節炎症部位における Cas-L 蛋白質発現を検討した結果、浸潤した全ての細胞が Cas-L 陽性細胞ではなく、小結性集簇が認められる部分や関節腔と思われる部位に浸潤した細胞で特に Cas-L 陽性反応が認められたことから炎症部位への細胞浸潤に Cas-L が重要である可能性が考えられた。

最後に、関節リウマチ患者の炎症反応

の場である滑膜における Cas-L 蛋白質の発現を検討した結果、滑膜に浸潤した CD3 陽性 T 細胞に Cas-L 蛋白質の発現が認められた。このことから、ヒトにおいても Cas-L 蛋白質は関節リウマチにおいて関節部位への細胞浸潤や炎症の増悪、遷延に関与している可能性が考えられる。以上の結果より、 $\beta_1$  インテグリンのシグナル分子である Cas-L が関節リウマチの炎症に深く関与する可能性が示唆された。今後、関節リウマチモデルマウスにおける Cas-L 遺伝子アンチセンスの治療効果の検討、また野生型及びドミナントネガティブ Cas-L 遺伝子トランスジェニックマウスや Cas-L 遺伝子ノックアウトマウスの解析等の更なる検討を行うことは、関節リウマチの病因、病態を解明するのみならず、Cas-L 分子に基づく新しい治療法、治療薬の開発等臨床応用を可能にすると考えられる。

## E 結論

本研究では、関節リウマチモデルマウスの HTLV-I Tax transgenic mouse と関節リウマチ患者検体を用いた解析により、関節炎発症と炎症反応の遷延にはリンパ球における  $\beta_1$  インテグリン下流アダプター蛋白である Cas-L の発現とチロシンリン酸化が関与する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報 なし

## G 研究発表

### 1. 論文発表

1. Ouchida R, Kusahara M, Shimizu N,

- Hisada T, Makino Y, Morimoto C, Handa H, Ohsuzu F, Tanaka H. Suppression of NF-kappaB-dependent gene expression by a hexamethylene bisacetamide-inducible protein HEXIM1 in human vascular smooth muscle cells. *Genes Cells*. 2003 8:95-107.
2. Aytac U, Sato K, Yamochi T, Yamochi T, Ohnuma K, Mills GB, Morimoto C, Dang NH. Effect of CD26 /dipeptidyl peptidase IV on Jurkat sensitivity to G(2)/M arrest induced by topoisomerase II inhibitors. *Br J Cancer*. 2003 ;88:455-62.
  3. Watanabe S, Murakami T, Nakamura T, Morimoto C, Arai K. Human GM-CSF induces HIV-1 LTR by multiple signalling pathways. *Biochimie*. 2002;84: 633-42.
  4. Ohnuma K, Ishii T, Iwata S, Hosono O, Kawasaki H, Uchiyama M, Tanaka H, Yamochi T, Dang NH, Morimoto C. G1/S cell cycle arrest provoked in human T cells by antibody to CD26. *Immunology*. 2002;107:325-33.
  5. Dang NH, Morimoto C. CD26: an expanding role in immune regulation and cancer. *Histol Histopathol*. 2002;17:1213-26.
  6. Hase H, Kanno Y, Kojima H, Morimoto C, Okumura K, Kobata T. CD27 and CD40 inhibit p53-independent mitochondrial pathways in apoptosis of B cells induced by B cell receptor ligation. *J Biol Chem*. 2002;277:46950-8.
  7. Kobayashi H, Hosono S, Mimori T, Kawasaki H, Dang NH, Tanaka H, Morimoto C. Reduction of serum soluble CD26/DPPIV enzyme activity and its correlation with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *J.Rheumatol*. 2002;29:1858-66..
  8. Ikushima H, Munakata Y, Iwata S, Ohnuma K, Kobayashi S, Dang NH, Morimoto, C. Soluble CD26/DPPIV enhances transendothelial migration via its interaction with mannose 6-phosphate/insulin like growth factor II receptor. *Cell. Immunol*. 2002;215,106-10.
  9. 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  $\alpha$  integrins in human T cells. *Eur. J. Immunol*. 2002;32, 1328-37
  10. Sato K, Kawasaki H, Morimoto C, Yamashima N, Matsuyama T. An abortive ligand-induced activation of CCR1-mediated downstream signaling event and a deficiency of CCR5 expression are associated with the hyporesponsiveness of human naive CD4(+) T cells to CCL3 and CCL5. *J Immunol*. 2002;15, 6263-72
  11. 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. 2002;29, 1124-34.
12. 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. 2002; 277, 14933-41.
13. 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.
14. 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, 5529-40
15. 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, 6254-65.
- 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

自己抗原 RO52 の T 細胞のアポトーシスにおける役割について

分担研究者：田中 廣尋 東京大学医科学研究所・助教授  
森本 幾夫 東京大学医科学研究所・教授

研究要旨：自己抗体である RO52 抗体はシェーグレン症候群や全身性エリトマトーデス患者血清中などに頻回に同定されるがその対応抗原である RO52 の生理的な機能は未だ明らかでない。昨年我々は、Ro52 は CD28 由来 IL-2 産生に関与することを報告した。本年は RO52 の Jurkat T 細胞トランスフェクタントを用いて RO52 は T 細胞のアポトーシス誘導に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

RO52 を Jurkat T 細胞に強発現させると Fas 抗体刺激のみならず、高濃度の CD3 抗体刺激や、 $\gamma$ -ラディエーション刺激に対してアポトーシスへの感受性を亢進させた。さらにカスパー 8 の活性化フォームは Fas 抗体刺激で Ro52 強発現 Jurkat T 細胞で他の細胞株より早く検出され、また Ro52 は DISC (Death Induced Signal Complex) でのカスパー 8 の活性化に関与していることが考えられた。このように Ro52 が IL-2 産生のみならず、アポトーシスにも繋がるシグナル経路の新しい構成成分であるという結果は、T 細胞の活性化シグナル伝達機構のみならず自己免疫病の病態解明や高齢者に多いシェーグレン症候群への新しい治療法開発のためにも重要と考えられる。

A 研究目的

RO/SS-A や La/SS-B 自己抗原への自己抗体はシェーグレン症候群 (S.S) や全身性エリトマトーデス (SLE) 患者血清中に特徴的に同定される。さらにこれらは臨床的にも上記疾患のマーカーとして有用であるだけでなく特に RO/SS-A 抗体は乳児の全身性エリトマトーデスや先天的な心臓ブロックなどの病因にも関与しているとされている。RO52 の機能について、この分子は古典的な Zinc-finger DNA 結合ドメインを持つと言われているが、生物学的意義は明らかでない。さらに RO52 抗体を有するシェーグレン症候群などの自己免疫疾患の病因に RO52 がいかに関与しているか明らかでないが、その構造から RO52 が遺伝子の転写調節に関わっていることは想像される。

我々は昨年、Ro52 の Jurkat T 細胞トランスフェクタントを用いて、自己抗原 Ro52 は CD28 由来シグナルにおける IL-2 産生に重要な役割を果たしていることを報告した。高齢者の関節リウマチでは高頻度にシェーグレン症候群を合併し、その日常的な活動性を非常に低下させ、介護の必要性をさらに増加させるため、シェーグレン症候群や SLE の免疫マーカーである RO52 の機能を明らかにすることは、高齢者 RA や高齢者のシェーグレン症候群患者そのものの生活の質の改善と高齢者社会の活性化及び新しい治療法やその予防法開発のためにも必須である。

B.研究方法

1. 抗体及びその材料

CD3 抗体 (OKT3) 産生 Hybridoma は ATCC より得た。CD28 抗体 (4B10) は当研究

室にて開発した。Fas 抗体は Immunotech 社から Caspase-8, Caspase-9, Caspase-3, FADD, Bcl-2, Bax, Bid, cytochrome C, Annexin V の抗体は BD Pharmingen 社から購入した。PMA 及び Ionomycin は Sigma 社から購入した。

2. GFP (緑色蛍光蛋白) コンストラクト、細胞培養及びトランスフェクションについて

RO52 の N 末端の GFP タグ型は PCR 法にて作成し、ほ乳類発現ベクターでサブクローンした。Large T を発現する Jurkat LT 細胞は 10%FCS RPMI1640 にて維持し、37°C、5%CO<sub>2</sub> 培養器にて培養した。Jurkat LT 細胞へのトランスフェクションは X-tream GENE Q2 トランスフェクション試薬にて行った。

3. 細胞周期解析

Jurkat LT 細胞、Ro52-GFP JurkatLT 細胞、GFP Jurkat LT 細胞を Fas 抗体で刺激し、70%エタノールで固定する。RNase A を含む PBS に浮遊し、遠沈後にさらに SYTO59 を含む PBS に再度浮遊して、FACS キャリバーにて解析した。

4. Fas 抗原の発現解析

Jurkat LT 細胞、GFP Jurkat LT 細胞、Ro52-GFP Jurkat 細胞は Fas 抗体と 30 分 4°C で処理し、その後 FITC-ヒツジ抗マウス IgM+IgG FITC で染色し、FACS キャリバーで解析した。

5. フォスファチジルセリンの細胞外への露出の解析

フロサイトメーターによるフォスファチジルセリンの細胞外露出を検討するため Jurkat LT 細胞、LT GFP Jurkat 細胞 Ro52-GFP Jurkat LT 細胞の PE 標識

Annexin V の結合を FACS キャリバーにて解析した。

6. アポトーシス関連蛋白発現

FAS 抗体刺激による Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、Bcl-2、Bcl-XL、cytochrome-C、Bid、Bax の発現はウエスタンブロット法にて解析した。

C 研究結果

1. Ro52 強発現 JurkatLT 細胞アポトーシスの感受性について

いくつかの Ro52-GFPJurkat トランスフェクタントクローン、GFPJurkat トランスフェクタントクローンを確立した。自己抗原 Ro52 がアポトーシスに関係しているかどうか調べるため、様々なアポトーシス刺激後の Annexin V の細胞表面への結合を検討した。Fas 抗体刺激によるアポトーシスでは Ro52-GFP トランスフェクタントは親株の JurkatLT 細胞、GFPJurkatLT 細胞と比して非常に早い時間でアポトーシスが誘導された。同様の結果は高濃度の抗 CD3 抗体刺激や、 $\gamma$ -ラディエーション照射でも得られた。このように Ro52 は T 細胞のアポトーシスへの感受性を増加させる可能性が考えられた。また Fas 抗体刺激による DNA フラグメンテーションについても調べたところ、Ro52-GFP Jurkat LT 細胞は Jurkat LT 及び GFPJurkatLT 細胞と比してより多くの DNA フラグメンテーションが早期に出現した。

2. Ro52 強発現 JurkatLT 細胞の Fas 発現について

次に Ro52 強発現 JurkatT 細胞表面上の Fas 発現は Ro52 分子発現により調節されて

いるか検討した。Ro52-GFPJurkat LT細胞、GFP-JurkatLT 細胞、JurkatLT 親株ともに Fas 発現に差は見出せなかった。

3. Ro52 強発現 JurkatLT 細胞の Fas 抗体刺激による細胞質での FADD、カスパーズ、Bcl-2 族の発現について

次に Fas シグナル経路の細胞質組成タンパクの発現は Ro52 により調節されるか検討した。抗 Fas 抗体刺激なしでは FADD の細胞質の発現は Ro52-GFPJurkatLT、GFP・JurkatLT 及び JurkatLT 親株細胞とも差は見出せなかった。しかし細胞質 FADD の発現減少が Ro52GFPJurkatLT 細胞において、Fas 抗体刺激後 24 時間で認められた。

さらにカスパーズ 8 の活性化フォームは Fas 抗体刺激後少なくとも 6 時間で Ro52GFPJurkatLT 細胞において検出され、これは GFPJurkatLT 細胞や親株 JurkatLT 細胞よりもより早く、さらにそれに続いてカスパーズ 9 及びカスパーズ 3 の活性化が生じた。カスパーズ 8 の活性化はカスパーズの活性化経路の最も上流に位置するので、これらの結果は Ro52 はカスパーズ 8 の活性化フォームの産生に直接あるいは間接的に関与していることが示唆された。

さらにアンチアポトーシスメンバーである Bcl-2、Bcl-xL、プロアポトーシスメンバーの Bid 及び Bax の発現を検討した。これらの蛋白発現は Ro52GFPJurkatLT、GFPJurkatLT 及び JurkatLT 親株細胞間に差は認められなかった。しかし 15kD の Bid の活性化切断フォームは Ro52GFPJurkatLT 細胞において、GFPJurkatLT、JurkatLT 親株細胞と比して

より早期に検出されたことから、カスパーズ 8 の活性化フォームの増加は Ro52GFPJurkatLT 細胞の Bid をより多く切断することを示唆した。一方チトクローム C の細胞質発現については上記の細胞間でその差は認められなかった。

4. Ro52 強発現によるカスパーズ 8 の DISC における活性化について

Fas 抗体刺激によりプロカスパーズ 8 はアダプター分子を介して Fas にリクルートされ、DISC(Death Induced Signal Complex)を形作る。リクルートされたプロカスパーズ 8 は細胞質にカスパーズ 8 の活性化フォームを放出し、自己蛋白融解活性を持つ。我々の今までの結果から Ro52 は DISC でのカスパーズ 8 の活性化に関与している可能性が考えられた。

この点を検討するため我々は Fas 抗体で Fas を免疫沈降させ、その沈降物からのカスパーズ 8 について検討した。DISC 中のカスパーズ 8 の切断された中間フォームは Ro52GFPJurkatLT 細胞において GFPJurkatLT 及び JurkatLT 親株細胞より早く検出された。

<倫理面への配慮>

本研究は培養動物細胞および試験管内実験を用いたものであり、その点で倫理面への配慮は特に必要無いものと思われる。さらに遺伝子組み換え実験に関しては機関承認を得ている。

D 考察

自己抗体である抗 SSA/Ro 抗体はシェーグレン症候群や SLE などの自己免疫疾患血清中に頻繁に認められる。SSA/Ro52 抗原の機能は現在のところ明らかになって