

臓・リンパ節・骨髄細胞をマウスミエローマ細胞と融合し、ハイブリドーマを作製することにより、抗心臓自己抗体産生細胞の樹立を試みた。拡張型心筋症を発症した PD-1 欠損マウスが産生する心臓特異的自己抗体の抗原を、生化学的に精製し、部分アミノ酸配列を決定する事を試みた。得られたアミノ酸配列をもとに分子の同定、クローニングを試みた。この分子に対するモノクロナル抗体を作製し、野生型マウスに投与することにより、同一疾患の惹起を試みた。

C. 研究結果

拡張型心筋症を発症した PD-1 欠損マウスの脾臓・リンパ節・骨髄細胞をマウスミエローマ細胞と融合し、ハイブリドーマを作製した。心臓抗原に対する反応性を western blotting 法を用いて検討した。合計 10 匹のマウスを用いて約 10,000 クローン をスクリーニングしたところ、様々な分子量に対する自己抗体産生ハイブリドーマが得られたものの、血清と同一のサイズ及び組織特異性を有するクローンは得られなかった。

そこで、心臓抽出液から目的の抗原を生化学的に精製することを試みた。ラットの心臓抽出液に対する疾患マウス血清の反応性を検討したところ、良好な反応性が得られた為、80 匹のラットの心臓を用いて心臓抽出液を作製した。心臓抽出液を各種陰イオン交換カラム、陽イオン交換カラム、疎水性カラム等を用いて分画したところ、monoQ 陰イオン交換カラム および monoS 陽イオン交換カラムにより自己抗原の良好な分離が得られた。そこで、monoQ カラムで分画した後に monoS カラムで分画したところ、約 1,000 倍に抗原が濃縮された。自己抗原を含む画分を SDS-PAGE により分離し、約 30kD 付近のバンドを切り出し、ゲル内にてトリプシンで消化し、逆相 HPLC によりペプチド断片を分離・精製した。ペプチド断片の一つをアミノ酸シーケンスし、得られた配列をもとにデータベース検索したところ、心臓型トロポニン I の内部アミノ酸配列に完全一致した。

疾患マウス血清により認識される約 30kD のバンドは、心臓型トロポニン I に対する抗体による心臓抽出液の免疫沈降物中には含まれていたが、免

疫沈降のより抗原を除去した後の心臓抽出液には含まれていなかった。また、大腸菌を用いて精製した心臓型トロポニン I リコンビナント蛋白質が、疾患マウス血清と心臓抽出液との反応を量依存的に阻害した。これらのことから、疾患マウス血清中に含まれる心臓特異的抗体の抗原は、心臓型トロポニン I であると考えられた。

上記心臓型トロポニン I リコンビナント蛋白質を免疫した PD-1 欠損マウスの脾細胞をマウスミエローマ細胞と融合することにより、マウス心臓型トロポニン I に対するモノクロナル抗体を 3 種類樹立した。精製モノクロナル抗体を野生型マウスに 2 週間に 1 回、計 5 回投与し、心臓カテーテルを用いて血行動態を計測した。コントロール抗体投与群に比し抗心臓型トロポニン I 抗体投与群では、収縮後期左室容積が約 3 倍、拡張後期左室容積が約 1.3 倍に増加していた。また、心駆出率がコントロール抗体投与群の 80% に対し、抗心臓型トロポニン I 抗体投与群では 50% にまで減少していた。

D. 考察

この結果は、心臓抗原に対する自己抗体により拡張型心筋症が発症しうることを初めて示したものである。ヒト拡張型心筋症における心臓抗原に対する自己抗体の産生についてはこれまでに多くの報告がなされてきたが、それらの病原性については分かっていなかったが、今回の結果は、その解決に糸口を与えうると考えられる。また、これまで心臓移植しか治療法がなかったこの難治性疾患に対し、免疫抑制剤の使用、抗心臓型トロポニン I 抗体の除去、心臓型トロポニン I の保護等、新たな治療法確立への具体案を示した。

E. 結論

今回我々は、PD-1 欠損マウスに発症する拡張型心筋症が、心臓型トロポニン I に対する自己抗体により発症する事を示した。この結果は、心臓抗原に対する自己抗体により拡張型心筋症が発症しうることを初めて示したものであり、これまで心臓移植しか治療法がなかったこの難治性疾患に対し、新たな治療法確立への具体案を示した。

F.健康危険情報

該当なし。

G.研究発表

該当なし。

1. 論文発表

1) T. Okazaki, Y. Iwai, T. Honjo: New regulatory co-receptors: inducible co-stimulator and PD-1. *Curr Opin Immunol.* 2002,14:6, 779-782.

2) Y. Iwai, M. Ishida, Y. Tanaka, T. Okazaki, T. Honjo, N. Minato: Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002, 99:19, 12293-12297

3) M. Ishida, Y. Iwai, Y. Tanaka, T. Okazaki, G.J. Freeman, N. Minato, T. Honjo: Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues. *Immunol Lett.* 2002, 84:1, 57-62.

4) Y. Iwai, T. Okazaki, H. Nishimura, A. Kawasaki, H. Yagita, T. Honjo: Microanatomical localization of PD-1 in human tonsils. *Immunol Lett.* 2002, 83:3, 215-220

2. 学会発表

該当なし。

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

計画中。

2. その他

特になし。

免疫バランスの自己免疫病における意義

西村 孝司(北海道大学遺伝子病制御研究所免疫制御分野・教授)

研究要旨

本研究においては、免疫バランス制御に関与する免疫担当細胞の性状や調節機構を明確にするとともに、それらの自己免疫病発症における意義を明確にすることを目的とした。免疫バランス制御は自然免疫と獲得性免疫によって制御されており、前者の調節細胞としては DC, NKT, NK などが存在し、後者の制御には CD4⁺の Th1/Th2, CD8⁺の Tc1/Tc2 などが重要と考えられている。本研究においては、NKT, NK, T 細胞活性化における DC の役割を追求して自己免疫病発症感受性の異なる BALB/c と C57BL/6 マウスにおいては NKT 活性化における DC の機能が遺伝的に異なることを発見した。さらに、BALB/c や C57BL/6 マウスにおいては、CD4⁺T 細胞や、CD8⁺T 細胞の獲得性免疫に関与する細胞群のうち、いわゆるメモリータイプ T 細胞の機能に遺伝的差異があることも明確にした。すなわち、メモリータイプ T 細胞群の中で、すでに高いサイトカイン産生能を有している CD4⁺CD25⁺T 細胞の機能を調べると、BALB/c においては IL-4 高産生性の細胞が存在するが C57BL/6 マウスには存在しない。また、CD8⁺T 細胞のメモリータイプ細胞群の性状を調べてみると、C57BL/6 マウスには IFN- γ 高産性能を有した細胞群が存在するが、BALB/c マウスには頻度が少ないことが明確になった。リンパ球欠損マウスである RAG2 ノックアウトマウスに CD4⁺CD45RB⁺ のナイーブ T 細胞を移入すると、移入 2-3 週間後に、脾臓、リンパ節中に CD4⁺CD45RB^{low} の強いサイトカイン産生能を有するメモリータイプの T 細胞が誘導された。従って正常マウス中に存在するメモリータイプの T 細胞は生理的な homeostatic expansion によって誘導されたものと考えられる。従って、BALB/c と C57BL/6 マウスにおける自己免疫発症に対する感受性の差は、homeostatic expansion 維持機構の遺伝的差異によって、異なる性状を有したメモリータイプ T 細胞が末梢で誘導されることが 1 要因になっている可能性が示唆された。今後さらにその分子機構を追求する必要がある。さらに、臨床への応用としては、制癌剤や免疫抑制剤投与後のリンパ球減少時に起こる homeostatic expansion とその治療効果および自己免疫病誘発との関連性について精査する必要がある。

A. 研究目的

生体の免疫を制御する役割において、Th1, Th2 細胞による免疫バランスの制御がその一翼を担っていると考えられており、個々の個体が type 1 であるか、type 2 であるかについては、それぞれの遺伝的背景によりその傾向が左右される可能性が考えられている。たとえば、同じ病原体の感染や組織障害によっても、マウスにおける type 1 prone である

C57BL/6 と type 2 prone である BALB/c では、それぞれ異なる病態を呈する。しかし、現在のところ、この免疫バランスの遺伝子支配がいかなる因子で制御されるかは明確にされていない。免疫バランス制御には、自然免疫、獲得性免疫のいずれも関与していることから、前者の調節に関わる DC, NKT, NK, マクロファージ、あるいは、後者の制御に重要な CD4⁺T, CD8⁺T 細胞などの機能が遺伝

的な支配を受けて、異なった機能を有していることも十分考えられる。

そこで、本研究においては、遺伝的に自己免疫病発症に対する異なった感受性を有する C57BL/6 などの Th1 prone マウスと BALB/c に代表される Th2 prone マウスを用いて、(i) NKT 細胞活性化における DC 機能の遺伝的支配、(ii) メモリータイプ CD4⁺, CD8⁺ T 細胞における異なったサイトカイン産生能、(iii) メモリータイプ T 細胞産生における homeostatic expansion の意義、などについて精査した。さらにそれに伴う自己反応性 T 細胞の出現による自己免疫疾患の発症の可能性についても注目し、検討した。

B. 研究方法

1. NKT 細胞活性化における DC 機能の遺伝的差異

NKT 細胞の活性化は、 α -GalCer の in vivo または in vitro 刺激で誘導した。DC はマウス脾細胞のシャーレ付着性各分を 24 時間培養して、非付着性の細胞を用いた。

2. type 1 および type 2 prone mouse でのサイトカイン高産生性細胞の解析

type 1 prone である C57BL/6 マウスと type 2 prone である BALB/c マウスにおいて、CD8 陽性 T 細胞の細胞表面形質および機能としてのサイトカイン産生能を解析した。また、type 1 prone である B10D2 マウスと type 2 prone である BALB/c マウスにおいて、CD4 陽性 T 細胞の細胞表面形質および機能としてのサイトカイン産生能を解析した。

3. homeostatic expansion の過程における T 細胞の機能変化

B10.D2 マウスおよび BALB/c マウスをバックグラウンドとし、I-A^d 拘束性で OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチドに特異的な TCR を有した TCR トランスジェニックマウス脾細胞から、CD4⁺CD45RB⁺ のナイーブヘルパー T 細胞を分離した。得られたナイーブ T 細胞を BALB/c バックグラウンドの RAG2^{-/-} に 2×10^5 個静脈投与した。投与後の CD4⁺ T 細胞の細胞表面抗原の変化およびサイトカイン産生能について評価した。

C. 研究結果

1. α -GalCer によるサイトカイン産生の遺伝子支配

マウス遺伝子背景の違いによって免疫病に対する感受性には遺伝子支配があり、C57BL/6 は Th1 型、BALB/c は Th2 型に偏り易いことを筆者らは報告してきた。ここでは α -GalCer に対する免疫応答においても同様に C57BL/6 と BALB/c バックグラウンドのマウス間には遺伝的支配があることも確認した。すなわち BALB/c と C57BL/6 に α -GalCer を投与し血清中の IFN- γ を定量すると C57BL/6 に比べて常に BALB/c の方が高いことがわかった。また、IL-4 の産生も BALB/c が長時間、高レベルの値を維持した。NKT 細胞を用いて免疫バランスを制御する際、このようにサイトカイン産生パターンが異なる原因を追求することは非常に有意義であると思われる。そこで α -GalCer によるサイトカイン産生の違いが DC もしくは NKT 細胞のどちらかに起因するのかを調べるため BALB/c と B10D2 から NKT と DC を採取しそれぞれを α -GalCer 存在下共培養した後、それぞれの IFN- γ 、IL-4 レベルを測定した。その結果 BALB/c 由来の DC が存在するときのみサイトカインの高産生が再構築され B10D2 の DC が存在するときはサイトカインの高産生は見られないことがわかった (図 1)。つまり α -GalCer による IFN- γ や IL-4 産生能の差異は DC によって遺伝子レベルで支配されているのである。そこで、次に、C57BL/6 と BALB/c 両系統間で DC 上のいかなる遺伝子が異なるか否かを調べるために、リコンビナントインブリードマス CXB13 系統を用いて検討した。CXB とは B/c と C57/BL6 を遺伝子が安定するまで掛け合わされて作られた 13 系統のマウスのことで、各系統の SSLC マーカーが B/c 由来であるか C57/BL6 由来であるかがすでに知られている。CXB に α -GalCer を投与し Mapping manager ソフトを用いて chromosome mapping を行ったところ、第 10 染色体 D10Mid70 近傍に IFN- γ 高産生能と強い連鎖が認められた。よっておそらくは α -GalCer に対する免疫応答を支配しているであろう DC の遺伝子は、第 10 染色体 D10Mid70 付近に存在しているであろうと推測し

ている。

2. type 1およびtype 2 prone mouseでのサイトカイン高産生性細胞の解析

type 1 prone である C57B6 マウスと type 2 prone である BALB/c マウスにおいて、CD8 陽性 T 細胞の機能を解析したところ、C57B6 マウスにおいて、CD44 陽性のメモリータイプの形質を有する細胞は、強い IFN- γ 産生の能力を有していた(図2)。さらに中でもアジアロ GM1陽性細胞において、抗原刺激やサイトカイン刺激なしの TCR 刺激のみで、IFN- γ の高い産生能が認められた。また、CD4 陽性 T 細胞では、CD45RB 陰性、CD25 陰性の細胞群において TCR 刺激のみでサイトカイン産生能が見られた。さらに B10D2 においては IL-4 の産生はほとんど認められなかった。また、CD25 陽性細胞の存在下では、サイトカイン産生能の抑制が認められた(図2)。

1. Homeostatic expansion の過程における T 細胞の機能変化

2-1. ナイーブT細胞の細胞表面抗原の変化

経時的にそのナイーブ T 細胞の細胞表面抗原の変化をフローサイトメトリーにて解析した。投与後 2 週間で CD44^{lo}CD45RB^{hi} が CD44^{hi}CD45RB^{lo} に変化し、いわゆるメモリー T 細胞へと分化し、IL-4 高産生能も獲得していることが判明した。従って、正常マウス中に存在するサイトカイン高産生のメモリータイプ細胞は homeostatic expansion によって誘導された細胞群と考えられる。また、ナイーブ T 細胞の移入によって自己免疫性の疾患が発症することも確認されているので、自己反応性かつサイトカイン高産生能を有する細胞群が自己免疫病発症において重要な役割を担っているものと考えられる。

D. 考察

生体の遺伝的背景としての type 1, type 2 の免疫バランスにより、病態は修飾され、その病態の方向性の決定に関与する可能性がある。遺伝的背景が判明しているマウスを用いて NKT 細胞、DC、メモリー T 細胞の機能解析をすることにより、NKT 細胞活性時における DC 機能が遺伝的支配を受

けること、さらにバランスの偏向性を担うサイトカイン高産生能を有するメモリータイプ T 細胞の機能も遺伝支配されていることが明確にされた。

NKT や DC などの自然免疫を担う免疫担当細胞の機能がいかなる因子で支配されているか、また、抗原の感作がないにもかかわらず、メモリータイプの形質を有する T 細胞がいかにして誘導されるかは、非常に重要な問題であり、その現象は最近、「免疫系の維持機構において、末梢のリンパ球、特に T 細胞の数的分画および質的分画が一定状態にコントロールされている」という T cell homeostatic space という概念によって説明されてきている。末梢のリンパ球減少状態の後、元々の恒常状態を保つために、T 細胞は cognate antigen による活性化とは異なって増殖分化し、ある一定のプラトーに達する homeostatic expansion という機構が働いている。今回の研究結果にて、メモリータイプの形質および機能を有する T 細胞が分化増殖しており、数的な space のみならず、末梢ナイーブヘルパー T 細胞の一部が生体内においてその自己の抗原と反応して、メモリータイプのヘルパー T 細胞に分化することにより質的な T cell space が保たれていると考えられる。また、移入されたナイーブ T 細胞はレシピエント側の遺伝的要因に則した免疫バランスを有しており、個体の自己抗原の遺伝的背景がそのバランスを規定する要因と考えられる。NKT 細胞においても homeostatic expansion が起こることが確認されており、BALB/c と C57BL/6 マウスにおける NKT の反応性の違いは、DC などのストロマ細胞機能の遺伝子背景の違いに起因する可能性が高い。しかし homeostatic expansion の現象は免疫系の維持、特にメモリータイプ T 細胞誘導に重要である一方、異常な状態でおこった場合には、自己免疫疾患を誘発させるものと考えられる。メモリー T 細胞への形質変換に加えて、機能の獲得を伴うため、T 細胞レパトアが自己反応性サブセットへと向かってしまう危険性を有しており、その際に、自己免疫疾患を発症させてしまう危険性があり、今後、発症要因となりうる homeostatic expansion と自己免疫疾患との関連についての検討をさらに行っていく予定である。

E. 結論

マウスにおいて、遺伝的要因によりNKT活性化におけるDC機能や、メモリータイプT細胞でのサイトカイン産生能が異なることが示唆された。

BALB/c, C57BL/6マウスにおいてはNKTのサイトカイン産生能が異なるが、それを制御するのは、NKT そのものでなく、遺伝子支配されたDC機能であることが判明した。

Th1 proneのC57BL/6マウスにおいては、IFN- γ 高産生能を有したメモリータイプCD8⁺T細胞の頻度がBALB/cよりも多く、逆にTh2 proneのBALB/cマウスにおいては、IL-4産生能を有したメモリータイプCD4⁺T細胞が高頻度に存在していた。このような性状を有したメモリータイプ細胞群は、ナイーブT細胞をRAG2^{-/-}マウスに投与後2週間で出現し、サイトカイン産生能を示さないナイーブT細胞はメモリーT細胞へと分化することによりIFN- γ およびIL-4の産生能を獲得することが判明した。

以上よりNKT細胞が、分化。活性化を受ける際、あるいはナイーブからメモリータイプ細胞へと分化する際の反応するストロマの機能や自己抗原の遺伝的背景がTh1/Th2の偏りを規定している要因であることが示唆され、その異常が自己免疫病発症要因となりえると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. Tsuji, T., Chamoto, K., Funamoto, H., Kosaka, A., Matsuzaki, Z., Abe, H., Fujio, K., Yamamoto, K., Kitamura, T., Togashi, Y., Koda, T., and Nishimura, T., An efficient methods to prepare T cell receptor gene-transduced cytotoxic T lymphocytes type 1 applicable to tompr gene cell therapy. Cancer Science. 2002 in press
2. Sekimoto, M., Tsuji, T., Matsuzaki, J., Chamoto, K., Koda, T., Nemoto, K., Degawa, M., Nishimura, S., and Nishimura, T., Functional expression of TrkC gene encoding

a high affinity receptor for NT-3 in antigen-specific T helper-type 2 (Th2) cells. Immunol. Letters, 2002. in press.

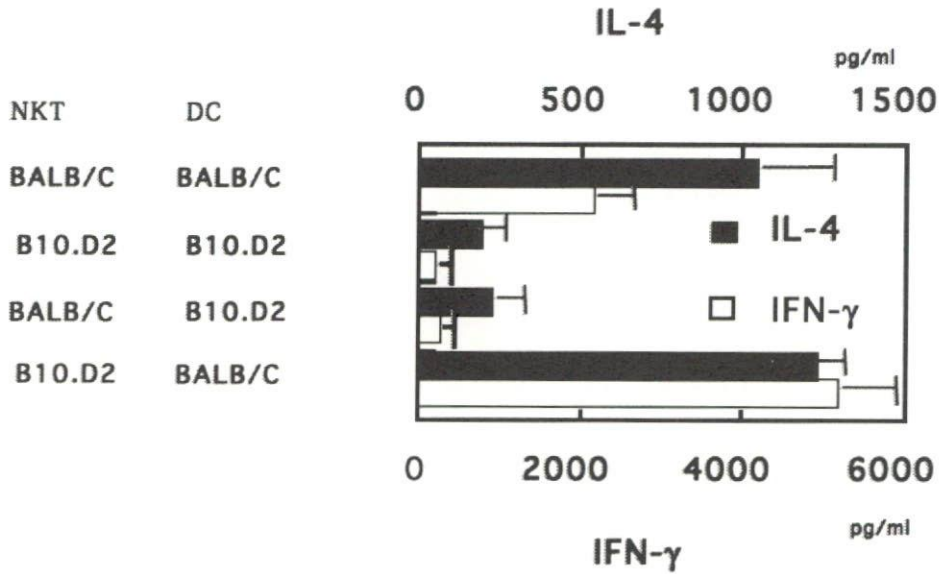


図1 NKT細胞活性化におけるDC機能の遺伝子支配

BALB/cおよびC57BL/6マウスからNKT, DCを分画して図中に示した種々の組み合わせで、NKT特異的 α -GalCerで刺激した。培養上清中のIL-4, IFN-gのレベルはELISAにて測定した。BALB/cのDCを加えた時のみ、高いサイトカイン産生が認められた。

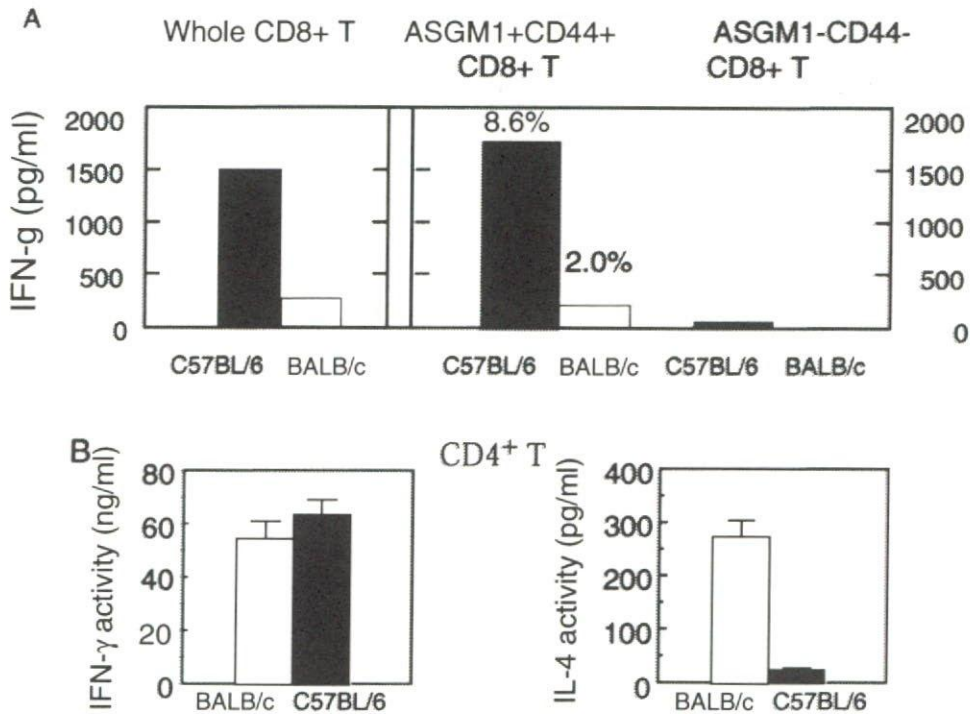


図2 メモリータイプCD8+, CD4+T細胞におけるサイトカイン産生能

CD44+ASGM1+の表面形質を有するCD8陽性T細胞が高いIFN-g産生能を示した。また本細胞はtype1 proneであるC57BL/6マウスには高頻度存在したが、BALB/cでは、認められなかった。逆に、CD4+T細胞においては、BALB/cにIL-4高産生のメモリータイプCD4+T細胞が存在したが、C57BL/6には認められなかった。

C1q 遺伝子多型が C1q 産生ならびにループス腎炎におよぼす影響

広瀬幸子（順天堂大学医学部・病理学第二講座）

研究要旨

SLE は多くの感受性遺伝子が関与する代表的多遺伝子疾患で、病因解明には遺伝要因の解明が必須である。今回我々は SLE 自然発症 New Zealand マウス系を用いて、ループス腎炎感受性遺伝子の QLT 解析を行った。その結果、第4染色体上にコードされる *C1q* 遺伝子の NZB 型多型が、C1q 産生能の低下を来とし、これがループス腎炎発症の一感受性要因として働いている可能性を見出した。

A. 研究目的

SLE は多くの感受性遺伝子が関与する代表的多遺伝子疾患で、その遺伝様式は極めて複雑である。今回我々は SLE 自然発症 (NZB x NZW) F1 マウスにおけるループス腎炎の感受性遺伝子を同定する目的で、(NZB x NZW) F1 x NZW 退交配マウスの尿蛋白量を指標とするゲノムワイドな連鎖解析を行い、NZB マウスの第4染色体 *C1q* 遺伝子に連鎖するマイクロサテライトマーカー *D4Mit70* 近傍にループス腎炎感受性遺伝子の存在を認めた。この発見に基づいて、*C1q* 遺伝子多型がループス腎炎発症に関与する可能性について解析した。

B. 研究方法

(1) 尿蛋白の測定：既知量のアルブミンを含む PBS を標準として尿中蛋白量を 0 (<37mg/dl) 1 (≥37mg/dl) , 2 (≥74mg/del) , 3 (≥111mg/dl) , 4 (≥333mg/dl) , 5 (≥1000mg/dl) , 6 (≥3000mg/dl) の 7 段階に分けた。111mg/dl 以上を陽性とした。

(2) 溶血法による C1q 活性の測定：C1q 欠損ヒト血清 (C1q-D) は、ヒト血清を IgG 結合 Sepharose 4B カラムを通過させることによって得た。1.5 x 10⁴M CaCl₂, 5 x 10⁴M MgCl₂ 及

び 0.1% geratin を含む veronal buffer (pH7.5) で適宜希釈したサンプル 100μl を、5μl の C1q-D 及び 100μl の 1 x 10⁸/ml に希釈した EA(IgM 抗体を付着させた羊赤血球)浮遊液と 37 度で 25 分反応させた後、0.01M EDTA を含む停止液 0.4ml を加えて反応を停止し、溶血により遊離したヘモグロビンを OD⁴¹² で測定して溶血の程度を測定した。

(3) マイクロサテライト多型の解析：PCR プライマーは Resarch Genetics (Huntsville, AL) より購入した。(NZB x NZW)F1 x NZW 退交配マウスの尾より抽出した DNA を用いて、NZB と NZW の間に多型の見られるマイクロサテライトマーカーについての遺伝子型を決定した。

(4) *C1q* 遺伝子塩基配列の解析：マウス脾臓から RNA を抽出し、oligo-dT primer を用いて cDNA を得た。報告されている配列を参考にして適宜プライマーを作成し、Taq polymerase による dye termination 法で、*C1qa*, *C1qb*, *C1qc* の coding region の塩基配列を決定した。各遺伝子のイントロンの塩基配列は尾部から得た genome DNA を用いて行った。

(5) Southern blot 法による多型解：マウス肝臓から抽出した DNA を、制限酵素 *Bam*H1

および *EcoRI* で消化し、0.6%アガロースゲルで電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、 P^{32} でラベルした probe で hybridization を行った。

C.研究結果

(1) ループス腎炎の主要感受性遺伝子座：(NZB x NZW) F1 マウスにおけるループス腎炎の発症には両親系由来の感受性遺伝子が寄与している。今回は NZB 由来の感受性遺伝子座を検索するために、207 匹の(NZB x NZW) F1 x NZW 退交配マウスについてマイクロサテライトマーカーを用いた QTL 解析を行った。その結果、以前に報告している第 17 染色体上の主要組織適合複合座 H-2^d 連鎖感受性遺伝子に加えて、図 1 に示すように第 4 染色体の *Clq* 遺伝子に連鎖する *D4Mit70* 近傍に NZB 由来のループス腎炎感受性遺伝子の存在が明らかとなった。

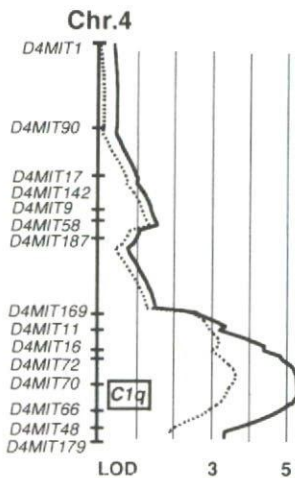


図 1 尿蛋白量および血中 Clq 活性の第 4 染色体における QTL 解析。(NZB x NZW) F1 x NZW 退交配マウス 207 匹を用いて、14 ヶ月齢までの尿蛋白量および 4 ヶ月齢での血中 Clq 活性を測定し、マイクロサテライト多型に基づく QTL 解析を行った。実線は尿蛋白量の、波線は血中 Clq 活性の LOD 値を示す。*Clq* 遺伝子は *D4Mit70* 近傍のセントロメアから 66cM の部位にマップされている。

(2) *Clq* 遺伝子多型の解析：*Clq* 遺伝子が候補遺伝子である可能性を調べるため、*Clq* 遺伝子多型を解析した。*Clq* 遺伝子の構造を図 2 A に示した。NZB と NZW マウスの *Clqa*, *Clqb*, *Clqc* 遺伝子の各々 2 個のエキソン及

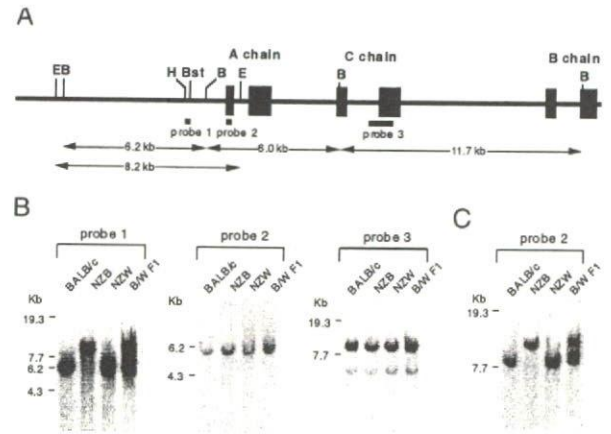


図 2 (A) *Clq* 遺伝子の構造。A 鎖, B 鎖, C 鎖をコードする遺伝子が *Clqa*, *Clqc*, *Clqb* の順で配列し、各々 2 つのエキソンとその間にはさまれたイントロンから構成されている。E: *EcoRI*, B: *BamHI*, Bst: *BstEII* cutting site, サザンプロット法で用いた probe 部位および各 cutting site 間の距離を図中に示した。(B) *BamHI* 消化 DNA を用いたサザンプロット法による RFLP 解析。(C) *EcoRI* 消化 DNA を用いたサザンプロット法による RFLP 解析。

び各 1 個のイントロンの塩基配列を比較検討した結果、両マウス系で塩基置換は認められなかった。次にサザンプロット法で PFLP 解析を行った。その結果、図 2 BC に示すように、*BamHI* 消化で probe 2 および 3 を用いたときには RFLP は見られなかったが、*BamHI* 消化で probe 1 を用いた時、および *EcoRI* 消化で probe 2 を用いた時には、NZB は BALB/c および NZW マウスに比較して、約 3.5 kb 長いバンドが認められた。従って、*Clqa* 遺伝子上流に合計約 3.5 kb の塩基挿入を伴う NZB 特有の多型が存在することが示された。

(3) *Clq* 遺伝子多型と血中 Clq 量との相関：6 週齢マウスの血中 Clq 量(図 3 A)および腹腔マクロファージによる Clq 産生能(図 3 B)を比較した。その結果、いずれの場合も NZB および (NZB x NZW) F1 マウスでは、BALB/c および NZW マウスに比較して Clq 活性が有意に低いことが明らかとなった。Clq 低値が、NZB 型 *Clq* 遺伝子多型による現象であること検証するために、4 ヶ月齢の 207 匹の(NZB x NZW) F1 x NZW 退交配マウスの血中 Clq 活性を測定し、QTL 解析を行った。その結果、図 1 に示すように、NZB マウスの第 4

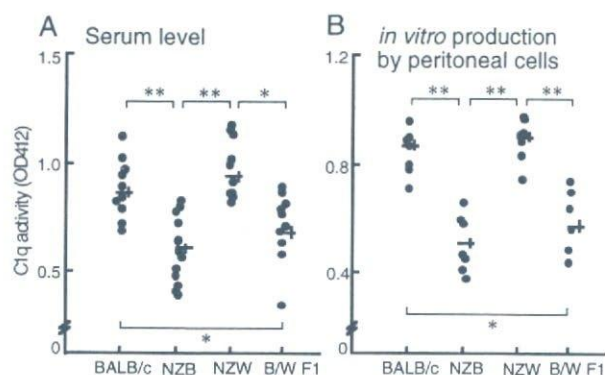


図3 溶血法による6週齢マウスの血中 C1q 量(A)および腹腔マクロファージによる C1q 産生能(B)の比較。各マウス系での平均値と SE を示した。** $P < 0.0005$, * $P < 0.005$ 。

染色体上のループス腎炎感受性遺伝子の存在部位と同様の *D4Mit70* 近傍に、LOD 値 3.6 を示す低 C1q 量との有意な連鎖が認められ、NZB マウスの *C1q* 遺伝子多型が C1q 産生量の低下の原因となっていることが示された。

D. 考察

C1q 遺伝子欠損症では 90%以上という高い頻度でループス腎炎を伴う SLE 症状が認められる。また、*C1q* ノックアウトマウスで約 25%にループス腎炎が発症することが報告され、*C1q* 欠損がループス腎炎発症に係わることが示されている。しかしながら、SLE 全般からみると *C1q* 欠損症の率は極めて低く、一般的には SLE における低補体価は、免疫複合体の形成に際して補体が消費される結果と考えられている。今回の解析結果は、SLE 患者の中には *C1q* 遺伝子欠損ではなく、*C1q* 産生量に影響を与える *C1q* 遺伝子制御領域多型が存在する可能性があること、また、この遺伝子多型がループス腎炎の感受性遺伝子の一つとなっている可能性を示唆するものである。

E. 結論

C1q は免疫複合体や apoptotic body のクリアランス機能を担っている。今回示した NZB 型の *C1q* 遺伝子多型は、呈示される自己抗原量や腎炎原性免疫複合体量などを増加させ

るという効果を通してループス腎炎の感受性に寄与しているものと推定される。ヒト SLE においてもこの見地からの検証が必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Miyamoto A, Nakayama K, Hirose S, Jiang Y, Abe M, Tsukiyama T, Nagahama H, Ohno S, Hatakeyama S, Nakayama K: Increased proliferation of B cells and auto-immunity in mice lacking protein kinase C δ . *Nature*, 416:865-869, 2002
- Miura-Shimura Y, Nakamura K, Ohtsuji M, Tomita H, Jiang Y, Abe M, Zhang D, Hamano Y, Tsuda H, Hashimoto H, Nishimura H, Taki S, Shirai T, Hirose S: *C1q* regulatory region polymorphism down-regulating murine C1q protein levels with linkage to lupus nephritis. *J Immunol*, 169:1334-1339, 2002.
- Xie Y, Nakamura K, Abe M, Li N, Wen X-S, Jiang Y, Zhang D, Tsurui H, Matsuoka S, Hamano Y, Fujii H, Ono M, Takai T, Shimokawa T, Ra C, Shirai T, Hirose S: Transcriptional regulation of *Fcgr2b* gene by polymorphic promoter region and its contribution to humoral immune responses. *J Immunol*, 169:4340-4346, 2002.
- Iwai H, Kozono Y, Hirose S, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Kohsaka H, Miyasaka N, Azuma M. Amelioration of collagen-induced arthritis by blockade of inducible costimulator-b7 homologous protein costimulation. *J Immunol*, 169:4332-4339, 2002.
- Shirai T, Nishimura H, Jiang Y, Hirose S: Genome screening for susceptibility loci in systemic lupus erythematosus. *Am J Pharmacogenomics* 2: 1-12, 2002
- Hirose S, Jiang Y, Hamano Y, Nishimura H: Genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Drugs of Today* 38:167-184, 2002

中山 玲慧、横山利幸、平塚義宗、中村淳夫、
広瀬幸子、白井俊一：全身性エリテマトー
デスにおける網脈絡膜症の発症機構の検討
-(NZB x NZW) F1 マウスを用いた解析-。
順天堂医学, 47:519-527, 2002

富田英明、三浦右子、中村和裕、津田裕士、
橋本博史、広瀬幸子：*C1q* 遺伝子多型が *C1q*
産生ならびにループス腎炎におよぼす影響。
順天堂医学, 48:355-363, 2002

三浦浩二、修 岩、鶴井博理、高橋和子、張 丹
青、広瀬幸子：SLE マウスにおける脾臓リン
パ濾胞胚中心の免疫組織化学的解析。順
天堂医学, 48:384-395, 2002

赤倉玲子、文 香淑、阿部雅明、姜 奕、広
瀬幸子：*Fas* 遺伝子多型による *Fas* 発現制
御と自己免疫疾患。順天堂医学, 48:364-
374, 2002

2. 学会発表

広瀬幸子 ワークショップ7 「遺伝子多型と
疾患」遺伝子制御領域多型と全身性エリテ
マトーデスにおける B 細胞異常活性化 第
91 回日本病理学会総会 2002, 3 月 26-
28 日、横浜

修 岩、中村和裕、姜 奕、小野栄夫、高井
俊行、広瀬幸子 ワークショップ57 「モ
デル動物によるリウマチ病研究」自己免疫
モデルにおける *Fcgr2b* 制御領域多型と高
IgG 第 46 回日本リウマチ学会総会・学
術集会 2002, 4 月 22-24 日 神戸

岩井秀之、阿部雅明、八木田秀雄、奥村 康、
広瀬幸子、上坂 等、宮坂信之、東みゆき
ワークショップ57 「モデル動物による
リウマチ病研究」慢性関節リウマチ及び
SLE モデルマウスを用いた ICOS-B7h 経
路関与の検討 第 46 回日本リウマチ学会
総会・学術集会 2002, 4 月 22-24 日 神
戸

藤尾圭志、田原裕之、広瀬幸子、姜 奕、阿
部雅明、白井俊一、山本一彦 ワークショ
ップ57 「モデル動物によるリウマチ病
研究」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 第 46 回日本リウマチ学会総会・学
術集会 2002, 4 月 22-24 日 神戸

Li N, Nakamura K, Ueno H, Yi J, Abe M,
Matsuoka S, Atsumi T, Koike T, Shirai T,
Hirose S: *Ltk* polymorphism in systemic
lupus erythematosus. 第 32 回日本免疫
学会総会・学術集会、シンポジウム, 2002,
12 月 4-6 日 東京

鶴井博理、阿部雅明、高橋和子、奥村康、白
井俊一、広瀬幸子：マウス脾臓樹状細胞サ
ブセットにおける TLR の発現。第 32 回日
本免疫学会総会・学術集会 2002, 12 月
4-6 日 東京

松岡周二、鶴井博理、阿部雅明、大辻希樹、
本間央之、小林哲人、滝口雅文、石井保之、
広瀬幸子：抗体の導く壊死、アポトーシス
でないリンパ球の新しい細胞死の解析。第
32 回日本免疫学会総会・学術集会 2002,
12 月 4-6 日 東京

宮本顕友、中山啓子、広瀬幸子、大野茂夫、
畠山鎮次、中山敬一：PKC- δ 遺伝子欠損マ
ウスにおける B 細胞の過剰増殖と自己寛容
の破綻。第 32 回日本免疫学会総会・学術
集会 2002, 12 月 4-6 日 東京

東みゆき、岩井秀之、阿部雅明、広瀬幸子、
手塚克成、八木田秀雄、奥村康、上阪等、
宮坂信之：ICOS-B7h 阻害によるマウスル
ープス腎炎抑制。第 32 回日本免疫学会総
会・学術集会 2002, 12 月 4-6 日 東京

Nakamura K, Xiu Y, Ohtsuji M,
Nishimura H, Shirai T, Hirose S:
Characterization of anxiety in
autoimmune-prone mice. 第 32 回日本免
疫学会総会・学術集会 2002, 12 月 4-6
日 東京

藤尾圭志、田原裕之、阿部雅明、姜奕、北村
俊雄、広瀬幸子、山本一彦：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。第 32 回日本
免疫学会総会・学術集会 2002, 12 月 4-
6 日 東京

- 藤井琢磨、黒沢大、斉藤滋、桐栄純一、小寺洋、松島瑞子、稲田祐二、尾崎承一、広瀬幸子、白井俊一、西村裕之：New Zealand系マウスにおける免疫寛容誘導能欠如を規定する遺伝子のゲノムマッピング。第32回日本免疫学会総会・学術集会 2002, 12月4-6日 東京
- Ohtsuji M, Nakamura K, Miura Y, Tomita H, Abe M, Taki S, Jiang Y, Tsuda H, Hashimoto H, Hirose S: Clq gene polymorphism associated with down-regulation of Clq protein levels and its possible contribution to lupus nephritis. 第32回日本免疫学会総会・学術集会 2002, 12月4-6日 東京
- Xiu Y, Nakamura K, Abe M, Jiang Y, Tsurui H, Matsuoka S, Ono M, Takai T, Shimokawa T, Ra C, Hirose S: Transcriptional regulation by polymorphic Fcgr2b promoter region and contribution to humoral immune responses. 第32回日本免疫学会総会・学術集会 2002, 12月4-6日 東京
- Wen X, Zhang D, Abe M, Jiang Y, Matsuoka S, Hamano Y, Takatsu K, Shirai T, Hirose S: Disease phenotype in interleukin-5 transgenic New Zealand mice. 第32回日本免疫学会総会・学術集会 2002, 12月4-6日 東京
- Takahashi K, Abe M, Tsurui H, Waldschmidt T, Hirose S: analysis of marginal zone B cells in autoimmune-prone NZB/W F1 mice. 第32回日本免疫学会総会・学術集会 2002, 12月4-6日 東京
- 阿部雅明、三浦浩二、修岩、高橋和子、張丹青、鶴井博理、広瀬幸子：SLEマウスにおける脾臓リンパ濾胞樹状細胞の免疫組織化学的特徴。第32回日本免疫学会総会・学術集会 2002, 12月4-6日 東京
- 張丹青、趙京元、阿部雅明、松岡周二、大辻希樹、鶴井博理、西村裕之、広瀬幸子：MHCⅡ領域による全身性エリテマトーデス拘束性の解析。第32回日本免疫学会総会・学術集会 2002, 12月4-6日 東京
- Hirose S, Hamano Y, Li N, Tsurui H, Jiang Y. Genetic basis of B-cell chronic lymphocytic leukemia model. Japanese Cancer Association Special Symposium on Mouse Models for Hematopoietic Neoplasm. January 24-25, 2003, Kyoto.
- H.知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）**
特になし

CD25+CD4+T 細胞による CD4+T 細胞の増殖抑制メカニズムの解析

佐藤 浩二郎(東京大学医学部アレルギーリウマチ内科)
山本 一彦(同上)
三村 俊英(埼玉医科大学リウマチ膠原病科)

研究要旨

ヘルパーT細胞(CD4+T細胞)の内、CD25+CD4+T細胞(抑制性T細胞;Treg)が免疫系において抑制的な役割を果たすことが明らかとなり、自己免疫疾患においてこの抑制性T細胞の果たす役割が注目されている。我々はこの抑制機序の少なくとも一部が抗原提示細胞の機能抑制であることを見出し、更にこれまでアナジールにあるとされてきた抑制性T細胞が他の活性化T細胞依存性に増殖することから、新たな免疫系のネガティブフィードバックシステムを提唱した。

A.研究目的

抑制性T細胞(Treg)が免疫応答を抑制する機構を、主として抗原提示細胞(APC)に対する影響の面から解析する。

B.研究方法

磁気ピーズ法を用いて野生型のBALB/cマウスあるいはDO11.10トランスジェニックマウスよりCD25-CD4+T細胞及びCD25+CD4+T細胞を調整した(Fig. 1A)。

in vitroの系ではこれらの細胞を単独あるいは1:1に混合し、SCIDマウス脾細胞をAPCとして共培養し抗CD3抗体にて刺激した。(トランスジェニックマウス由来のT細胞に関しては抗体の代わりに特異的ペプチドを用いて刺激した。)培養上清中のサイトカインはELISA法により測定した。T細胞の分裂回数はCFSEにより細胞を染色し、フローサイトメトリーによって評価した。細胞上の抗原はフローサイトメトリーにより解析した。

in vivoの系ではDO11.10トランスジェニックマウス由来のT細胞を調整し、野生型BALB/cマウスに移入後、特異的ペプチドで尾根部を免疫、4日後に所属リンパ節(鼠径リンパ節)を取り出し組織学的検索あるいはフローサイトメトリーによる解析を行った。

C.研究結果

CD4+T細胞、APCを共培養し抗CD3抗体で刺激するin vitroの系において、通常APCから産生されるIL-12はTregの存在により強く抑制された。これに対してT細胞から産生されるIL-2の量はCD25-CD4+T細胞数に比例していた(Fig. 1B)。APCがT細胞依存性にIL-12を産生する際には活性化CD4+T細胞表面に誘導されるCD40LがAPC上のCD40に結合することが必要とされている。このためCD40Lの発現をFACSにより解析したところ、確かにCD25-CD4+T細胞上には刺激後一過性にCD40Lが誘導されるが、Treg上にはCD40Lが誘導されにくいことが判明し、APCからのIL-12産生低下のメカニズムであると考えられた(Fig. 1A, B)。DO11.10トランスジェニックマウス由来の細胞を特異的ペプチドで刺激した場合も同様の結果を得た(Fig. 1E)。次にこのIL-12の産生抑制がT細胞増殖の減弱に関与するかどうかを確認するために、in vitroにおいて刺激72時間後のT細胞の分裂回数をCFSE染色により評価した(Fig. 2)。分裂回数の程度を数値化するために

Division Index (D.I.)を(3回以上分裂した細胞数)/(分裂していない細胞数)と定義した。予想通り、Tregは刺激後も殆ど分裂せず (Fig. 2A)、CD25-CD4+T細胞はその多くが分裂した (Fig. 2B, 破線は無刺激の場合)。CD25-CD4+T細胞はTregと共培養するとD.I.が1/6程度に減少したが、この減少はIL-12を添加することにより部分的であるがrescueされ、抗IL-12抗体を添加するとD.I.の更なる低下が見られた (Fig. 2C, 破線は単独培養の場合)。CD25-CD4+T細胞単独の場合はIL-12を添加してもD.I.の増加が見られずこの環境ではIL-12が既に飽和していることが示唆された (Fig. 2D, 破線はreagent非添加の場合)。一方Treg単独培養の場合はIL-12、抗IL-12抗体の添加は共にD.I.に影響を与えなかった (Fig. 2E, 破線はreagent非添加の場合)。このことからTregのCD25-CD4+T細胞に対する抑制メカニズムの少なくとも一部はAPCの機能抑制(即ちAPCよりのIL-12産生の抑制)であることが示された。またこの実験系から、興味深いことに、これまでアナジーに陥っているとされ、高濃度のIL-2を外部より添加するなどしなければ増殖しないとされていたTregが、CD25-CD4+T細胞との共培養によって明らかに増殖することが判明した (Fig. 2F)。in vivoにおいてもこの性質が見出せるかどうかを細胞移植の系を用いて解析した (Fig. 3)。in vivoにおいても、CD25-CD4+T細胞の存在下では非存在下よりも多数のTreg (CFSE染色済み)が免疫後の所属リンパ節に確認された (Fig. 3D, E, 矢頭で示す)。このCFSEの蛍光強度をフローサイトメトリーで解析することにより、CD25-CD4+T細胞存在下のTregは非存在下の場合に比べて、平均して約2回多く分裂していることが判明し(データ省略)、in vivoにおいてもTregの分裂は活性化CD25-CD4+T細胞に依存する可能性が示唆された。

D.考察

Tregの免疫抑制機序については他のT細胞に対する直接作用あるいはAPCの機能抑制の2つが考えられるが、今回の結果はAPCからのIL-12産生を制御するという意味で後者を支持するものである。TregがCD40Lを細胞表面に発現しないことがその機序の1つである可能性があるが、TregとCD25-CD4+T細胞とを共培養してもCD25-CD4+T細胞におけるCD40Lの誘導は抑制されないこと(データ省略)を考慮すると、APCがIL-12を産生できないのはAPCとCD25-CD4+T細胞との結合をTregが阻害しているのかもしれない。この点で、TregはAPC上のCD80、CD86に対してCD28よりも数十倍親和性が高いとされるCTLA-4をconstitutiveに発現していることは興味深い。また、IL-12はT細胞上にIL-2受容体 α 鎖(CD25)を誘導し、IL-2に対する高親和性受容体を形成させることにより細胞増殖を促進する作用があるとされている。Tregは刺激前から既にCD25を発現している細胞であるためIL-12の作用を受けにくいとも考えられる (Fig. 4A)。

もう一点の興味深い点として、これまでアナジーに陥っているとされてきたTregが活性化CD25-CD4+T細胞の存在下では明らかに分裂するという事実が挙げられる。これはin vitroでもin vivoでも確認されたが、元々CD25-CD4+T細胞の僅か1/10しか存在しないTregが免疫反応を抑制する機序として興味深いものとも考える。恐らく活性化CD25-CD4+T細胞が産生するIL-2がTregの増殖を誘導するものと思われる。(外部から高濃度のIL-2を加えた場合はTregのアナジーが破れることが知られている。またFig. 1Bにも示すように、TregはIL-2を自身では全く産生しないことが知られている。)このように、APCによりCD25-CD4+T細胞が活性化される過程でTregが増殖し、APCの機能を抑制することでCD25-CD4+T細胞の増殖が止まり免疫反応が終結に向かうという一種のネガティブ・フィードバックシステムと考えられる (Fig. 4B)。

今後このような抑制性T細胞の作用メカニズム

の研究を更に進め、IL-12 や CD40L/CD40 をターゲットにした分子レベルの治療実験などを行っていきたいと考えている。特に自己抗原特異的免疫現象が病態の中心を成す難治性自己免疫疾患においては、Treg の機能を高めることが自己免疫反応を終結させる可能性もあり、更なる研究は今までに類を見ない抗原特異的免疫抑制治療に結びつく可能性が期待される。

E. 結論

Treg の免疫抑制機序の少なくとも一部は APC からの IL-12 産生の抑制で説明可能である。また、これまでアナジーに陥っているとされていた Treg は、活性化 CD25-CD4+T 細胞依存性に増殖することが判明したが、これは APC、CD25-CD4+T 細胞、Treg の3者の中で新しいネガティブ・フィードバックのシステムを形成していることを示唆する。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta.

Sato K, Hida S, Takayanagi H, Yokochi T, Kayagaki N, Takeda K, Yagita H, Okumura K, Tanaka N, Taniguchi T, Ogasawara K. Eur J Immunol. 2001 Nov;31(11):3138-46.

2. Requirement of the IFN-alpha/beta-induced CXCR3 chemokine signalling for CD8+ T cell activation.

Ogasawara K, Hida S, Weng Y, Saiura A, Sato K, Takayanagi H, Sakaguchi S, Yokochi T, Kodama T, Naitoh M, De Martino JA, Taniguchi T. Genes Cells. 2002 Mar;7(3):309-20.

3. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta.

Takayanagi H, Kim S, Matsuo K, Suzuki H, Suzuki T, Sato K, Yokochi T, Oda H, Nakamura K, Ida N, Wagner EF, Taniguchi T. Nature. 2002 Apr 18;416(6882):744-9.

4. Antiinflammatory effect of simvastatin in patients with rheumatoid arthritis.

Kanda H, Hamasaki K, Kubo K, Tateishi S, Yonezumi A, Kanda Y, Yamamoto K, Mimura T. J Rheumatol. 2002 Sep;29(9):2024-6.

2. 学会発表

平成 15 年度日本リウマチ学会にて発表予定

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

特記すべきことなし

Fig. 1

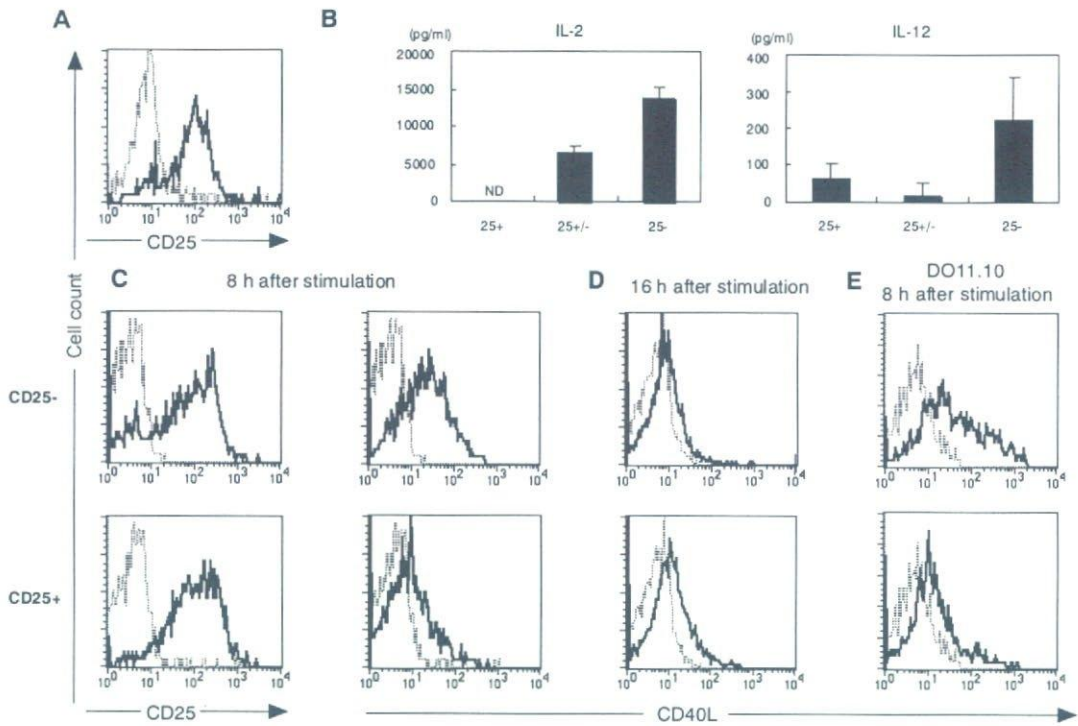


Fig. 2

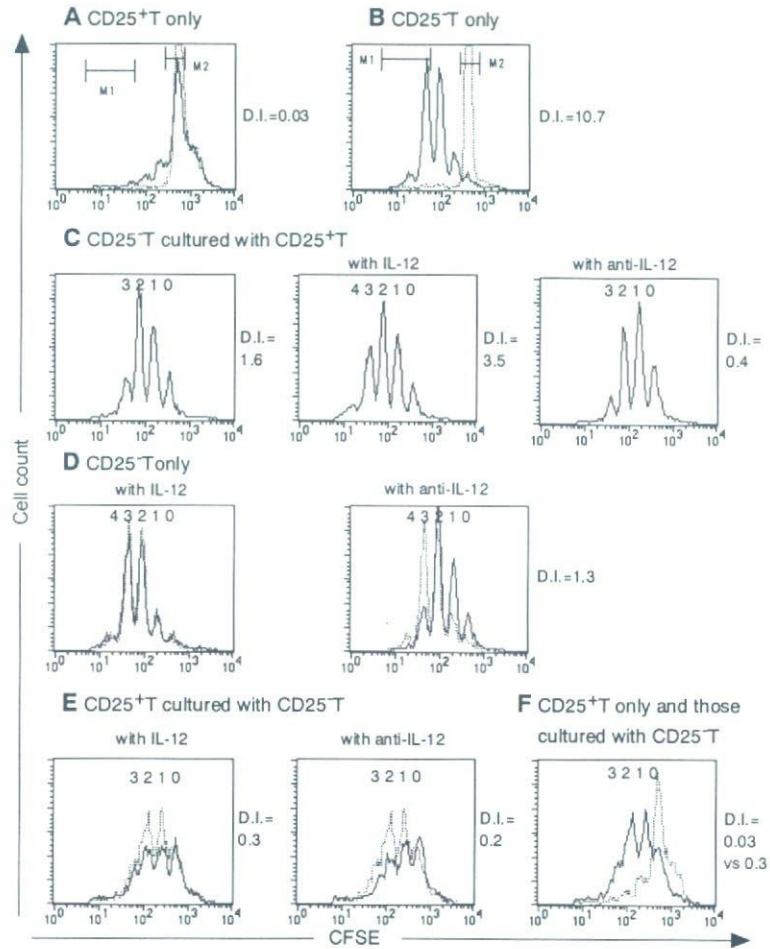


Fig. 3

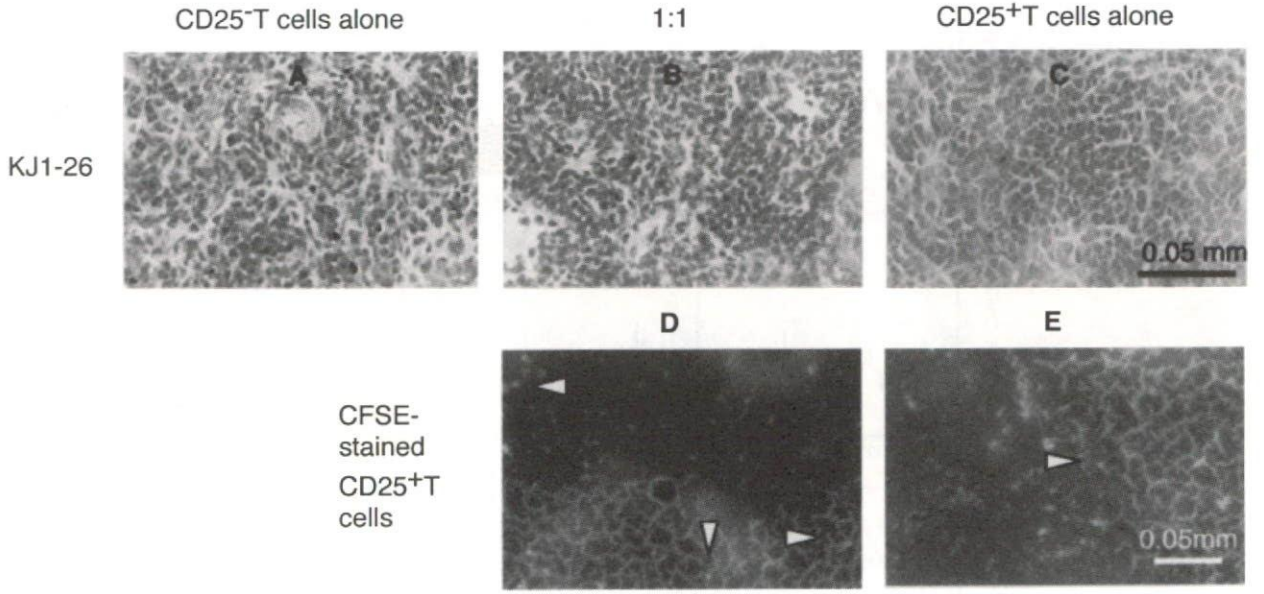
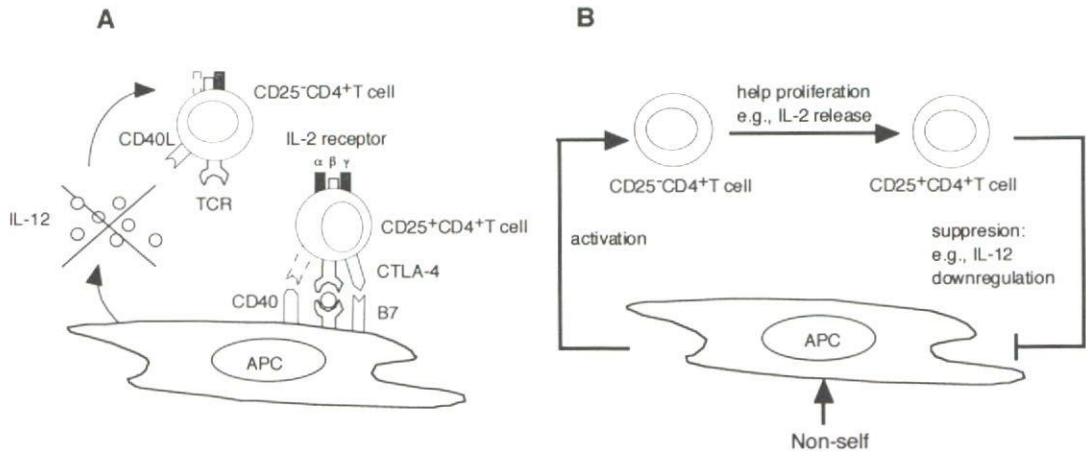


Fig. 4



全身性エリテマトーデス患者 T 細胞機能異常の分子機序に関する研究

竹内 勤 埼玉医科大学総合医療センター第二内科
津坂 憲政 埼玉医科大学総合医療センター第二内科
鈴木 勝也 千葉大学大学院医学研究科遺伝子制御学
吉本 桂子 慶応大学医学部総合医科学研究センター

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すると共に、これらヴァリエント mRNA を安定して発現する T 細胞株を樹立し、それを用いてこのヴァリエント TCR と鎖が、細胞内でどのような機能異常と関連しているのかを明らかにする。特に、T 細胞の負の制御機構における失調との関連に焦点をあてて、GEM/raft に集積するアダプター分子、Shp-2 などのフォスファターゼとの関連について検討を加える。これが、どのような機構を通じて病態形成に結びついているのか、患者末梢血 T 細胞を用い確認する。

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指摘されていたため、チロシンリン酸化を指標として異常分子の同定を試みた。その結果、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ことを目的とする。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. 結果と考察

1) SLE 患者 T 細胞における TCR ・ 鎖発現異常：全身性エリテマトーデス 39 例、他のリウマチ性疾患 19 例では、TCR 架橋後のチロシンリン酸化、末梢血 T 細胞の表面発現、全蛋白量、メッセージ量、cDNA 塩基配列の解析を終え、24 例 62% の SLE でゼータ鎖蛋白発現が正常の 50% 以下に低下していた。このような顕著な発現低下は、他の膠原病では認められなかった。SLE 患者の ζ 鎖 open reading frame (ORF) の mRNA を検索したところ約 20% 程にアミノ酸置換を伴う変異／欠失

が ITAM3 と呼ばれるシグナル伝達に必須のドメインに見い出された。中でも、エクソン7がスプライシングによって欠けたヴァリエントでは、ITAM3 の N 末端側チロシン残基がなく、シグナル伝達に重大な影響を及ぼすものと思われた。

2) SLE 患者 T 細胞における鎖 mRNA 3' UTR 異常： mRNA の 3' 非翻訳領域(UTR)は mRNA の安定性に関与するだけでなく、mRNA の細胞質への輸送にも重要な役割を担っていることが報告されている。そこで我々は鎖 mRNA の 3' UTR 異常が SLE 患者末梢血 T 細胞での鎖発現低下に関与する可能性を考え検討した。exon 8 を含む鎖 3' UTR cDNA を RT-PCR 法で増幅しアガロースゲルで電気泳動した結果、大部分の SLE 患者では、正常の野生型と思われる 910 bp の cDNA フラグメントと比較し 560bp も短い 350bp の cDNA フラグメントが優位に検出された。その一方で、正常コントロールでは全例で 910 bp の野生型 cDNA フラグメントが優位であった。この野生型 910 bp と短い 350 bp の cDNA フラグメントを比較した結果、野生型 mRNA の 3' UTR には splicing donor および acceptor site と考えられる配列が存在し、短い mRNA はこの部位でスプライシングが起こって 560bp がスプライスアウトされ、生成されたものと思われた。

3) SLE 患者における short exon8 ヴァリエントの発現： 350bp の short exon8 スプライシングヴァリエントが SLE 患者 T 細胞で優位に認められるかどうかを定量的に検討するため、半定量 PCR 法を用いて鎖 mRNA の発現を比較した。その結果、健常人コントロールでは全例で野生型 3' UTR が short exon8 ヴァリエントよりも優位に強く発現していたが、SLE 患者 7 例では全例で、short exon8 ヴァリエントが野生型よりも優位に検出された。特に 5 例の SLE 患者では、野生型が検出不能な程度まで発現低下していた。

4) ヴァリエント TCR ζ 鎖遺伝子導入 T 細胞株の樹立： これらヴァリエントの蛋白発現低下

および T 細胞機能に及ぼす影響を検討するため、レトロウイルスベクターに wild 型あるいはヴァリエント TCR ζ 鎖遺伝子を組み込み、TCR ζ 鎖欠損マウス T 細胞ハイブリドーマ MA5.8 にトランスフェクトして細胞株を樹立した。short 3' -UTR 株は、wild TCR ζ 株に比し、TCR ζ の表面発現が平均蛍光強度で 65.5 から 24.5 と有意に低下し、同時に CD 3 ζ 鎖の発現も 38.6 から 15.1 と低下していた。免疫プロットによって蛋白合成を検討したところ、short 3' -UTR 株の CD 3 ζ 鎖は wild 株と同等であることが確認され、CD 3 ζ 鎖の表面発現低下は TCR ζ 鎖の産生低下による二次的現象と考えられた。アクチノマイシン処理によって TCR ζ mRNA 安定性を検討したところ、short 3' -UTR 株では wild 株に比べ mRNA の消褪は明らかで、安定性が低下していることが明らかとなった。一方、CD 3 ζ 鎖の安定性は short 3' -UTR 株でむしろ亢進し、この安定性低下は TCR ζ 鎖 mRNA に特異的なものであった。

C. 結論

長い間分子機序の不明であった SLE において、シグナル伝達分子の機能異常に焦点を当て解析した結果、その分子機序の一部が明らかとなった。この研究により、分子異常が特定され、異常分子そのものその生成機序が蛋白あるいは遺伝子レベルで明らかになれば、それを指標とした発症前診断、原因療法の開発が可能と考えられる。特に、TCR ζ 鎖蛋白発現低下を是正するような遺伝子治療は、今後基礎的検討を積み重ね、臨床応用の可能性を検討していく必要がある。一方、TCR ζ 鎖の分子異常が免疫応答の正と負のシグナル伝達にいかなる影響を及ぼしているかが明らかにされれば、TCR ζ 鎖下流での新たな治療標的が判明し、原因療法に向けた治療法の実現に大きな進歩をもたらすものと期待される。

D. 健康危険情報

特になし

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsuzaka T, Onoda N, Yoshimoto K, Zhang L, Pang M, Abe T, and Takeuchi T. Alternatively spliced 3' untranslated region of TCR ζ mRNA in the peripheral blood T cells of systemic lupus erythematosus patients. *Modern Rheum* 12: 167-173 2002.
2. 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* 129: 160-169-8, 2002.
3. Tsubota K, Fujita H, Tadano K, Onoda N, Tsuzaka K, and Takeuchi T. Abnormal expression of Fas ligand of lacrimal glands and peripheral blood in Sjogren's syndrome patients with enlarged exocrine glands. *Clin Exp Immunol* 129: 177-182, 2002.
4. Takeuchi T, and Abe T. Role of adhesion molecules in vasculitis syndrome. *Int Med* 41: 41-44 2002.
5. Takeuchi T, Tsuzaka K, and Abe T. Altered expression of the T cell receptor-CD3 complex in systemic lupus erythematosus. *Int Rev Immunol* in press.
6. Tsuzaka K, Fukuhara I, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, and Takeuchi T. Forced expression of TCR ζ mRNA with alternatively spliced 3' untranslated region found in SLE patients lead to decreased production and cell surface expression of TCR ζ and TCR-CD3 complex. *J Immunol* in press.

2. 学会発表

1. シンポジウム SLE の病因・病態と治療戦略 第46回日本リウマチ学会 2002.4.23 神戸
2. シンポジウム RA の早期診断と早期治療 第46回日本リウマチ学会 2002.4.22 神戸
3. ワークショップ 新しい DMARDs 2002.4.22 第46回日本リウマチ学会 神戸
4. 国際シンポジウム リウマチ薬剤療法のエビデンスを考える RA 患者に対するインフリキシマブ療法の遠隔効果 第46回日本リウマチ学会 2002.4.24 神戸
5. New strategy for the treatment of RA 第26回国際内科学会議 2002.5.28 京都
6. 教育講演：抗 TNF 療法 第52回日本アレルギー学会 2002.11.28-30(パシフィコ横浜)
7. シンポジウム 自己免疫疾患研究の進歩基礎と臨床： TNF 阻害療法前後における RA 患者末梢血単核球の遺伝子発現網羅的プロファイル解析 第52回日本アレルギー学会 2002.11.28-30(パシフィコ横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- ① T細胞リセプターと鎖タンパク、これをコードする遺伝子若しくはその一部を含む精製された核酸又は該タンパク若しくは該核酸に基づく自己免疫疾患検出方法 (特願平 9-309302)
- ② 分泌腺細胞とリンパ球との接着阻害剤 (08/946838)

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし