

「細胞活性化シグナルにおける lipid raft-スフィンゴ脂質の機能解析」に関する研究
分担研究者 梅原 久範 京都大学大学院医学研究科 臨床生体統御医学講座臨床免疫学

研究要旨：本研究は、細胞活性化とシグナル伝達を中心とする細胞膜マイクロドメイン(lipid raft)における、スフィンゴミエリンの重要性を明らかにすることにある。マウス胸腺細胞株(WR19L)よりスフィンゴミエリン欠損株(PIR)を樹立した。PIR細胞に、多剤耐性を示す HL60 細胞株から調整した cDNA library を遺伝子導入し、スフィンゴミエリン合成回復株(WR22)を樹立した。PIR細胞とWR22細胞におけるガングリオシド GM1 および Fas の発現は両細胞で同程度であったが、スフィンゴミエリン発現は PIR細胞においてのみ認められた。Fas 抗体による架橋刺激により、WR22細胞は PIR細胞に比べ、有意にアポトーシスを起こした。このことは、細胞膜におけるスフィンゴミエリンが、活性化刺激の足場となるラフトの形成および活性化シグナル伝達に重要であることを示唆している。

A. 研究の目的:

膠原病では、免疫系の異常な賦活化により自己反応性T細胞の出現や自己抗体の産生が起こり、臨床的には細胞浸潤による臓器傷害が多臓器に認められる。細胞膜脂質2重層には、スフィンゴミエリンとコレステロールからなる細胞膜脂質ドメイン(lipid rafts:ラフト)が細胞活性化の足場になっている。しかし、その解析は主にラフトに共存するガングリオシド GM1 やコレステロールを介して間接的に行われ、ラフトを本質的に構成しているスフィンゴミエリンそのものについての解析はほとんど見られない。我々は、スフィンゴミエリンの面から細胞活性化のシグナル伝達におけるラフトの重要性を世界に先駆けて明らかにし、膠原病における免疫異常を、ラフト・スフィンゴミエリンの面より解析する。さらに、ラフト形成阻害剤の自己免疫反応抑制効果について検討し、新たな免疫調節剤開発に結びつける。

B. 研究方法:

- 1) ヒト Fas 発現マウス胸腺細胞株(WR19L)から、スフィンゴミエリン合成酵素欠損細胞株を樹立する。
- 2) 樹立されたスフィンゴミエリン合成酵素欠損細胞株にスフィンゴミエリン合成酵素を導入した回復株を樹立する。
- 3) スフィンゴミエリン欠損/回復 両細胞株のスフィンゴミエリン量、ガングリオシド GM1 量、Fas 発現量をフローサイトメトリー(FACS)および

共焦点顕微鏡で検討する。

- 4) スフィンゴミエリン欠損/回復細胞株における、Fas 架橋刺激によるアポトーシスの相違を FACS を用いた sub-G1 法で検討する。
- 5) スフィンゴミエリン欠損/回復細胞株におけるラフトおよび Fas の凝集を共焦点顕微鏡で検討する。
- 6) スフィンゴミエリン欠損/回復細胞株において、Fas 架橋刺激によるアポトーシスシグナルの相違をカスパーゼ活性により検討する。
- 7) スフィンゴミエリン欠損/回復細胞株において、Fas のラフトへの移行をシヨ糖密度比重遠心法を用いて検討する。
- 8) スフィンゴミエリン除去剤、ラフト合成阻害剤の細胞活性化シグナルに及ぼす効果について検討する。

(倫理面への配慮)

当該年度は、臨床検体や実験動物を使用しておらず、倫理的問題に抵触しない。

C. 研究結果

- 1) Fas 発現スフィンゴミエリン欠損細胞株およびその回復株の樹立:マウス胸腺細胞株(WR19L)にヒト Fas 遺伝子を導入した細胞株(WR/Fas)から、スフィンゴミエリンに特異的に結合するライセニンを用いて、スフィンゴミエリン欠損株(PIR)を樹立した。次に、多剤耐性を示す HL60 細胞株から調整した cDNA library を PIREs 2-EGFP ヒトベクターに組み込み、PIR

細胞に遺伝子導入した. G418 およびグルコシルセラミド合成酵素阻害剤の存在下に培養を継続す, スフィンゴミエリン合成回復株(WR22)を樹立した.

- 2) スフィンゴミエリン欠損株(PIR)とスフィンゴミエリン合成回復株(WR22)における細胞膜脂質含量を FACS にて検討したところ, ガングリオシド GM1 および Fas の発現は両細胞で同程度であったが, スフィンゴミエリンに特異的に結合するライセニンによる染色は PIR においてのみ認められた.
- 3) 同様に, PIR と WR22 における細胞膜脂質含量を共焦点顕微鏡にて検討したところ, ガングリオシド GM1 および Fas は両細胞で同程度に染色されたが, ライセニンによる染色は PIR においてのみ確認された.
- 4) IgM anti-Fas Ab(CH11)による架橋刺激により, WR22 は PIR に比べ, 有意に高頻度にアポトーシスを起こした.

D. 考察

細胞膜レセプターは, 細胞接着時およびそのリガンドによる活性化の際に凝集しラフトに集積することが明らかになっている. 今回我々は, ラフト構成に重要なスフィンゴミエリン欠損株(PIR)とスフィンゴミエリン合成回復株(WR22)の樹立に成功した. 両細胞株は, ラフト機能におけるスフィンゴミエリン解析のための貴重な実験モデルとなると確信する. 両細胞は, Fas を含め他の細胞膜蛋白の発現に差が無いにも関わらず, PIR では Fas 架橋刺激によるアポトーシスが有意差に低下していた. このことは, 細胞膜におけるスフィンゴミエリンが, 活性化刺激の足場となるラフトの形成に重要であることを表している. スフィンゴミエリンの欠損が, Fas を含む膜レセプターの凝集を低下させているのか, 細胞内へのシグナル伝達を低下させているのかを明らかにすることが今後の課題である. 現在, 刺激前後における細胞膜 Fas の凝集について共焦点顕微鏡で, Fas のラフト内への移行についてショ糖比重遠心法によって検討中である. さらに, 細胞内シグナル伝達の相違について, アポトーシスの下流シグナルとしてカスパーゼの活性化について検討中である.

E. 結論

ラフトにおけるスフィンゴミエリンの機能解析のために, スフィンゴミエリン欠損株(PIR)とスフィンゴミエリン合成回復株(WR22)の樹立に成功した. 両細胞は, Fas を含め他の細胞膜蛋白の発現に差が無いにも関わらず, スフィンゴミエリン合成回復株(WR22)では Fas 架橋刺激によるアポトーシスが有意に亢進していた.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watanabe, I., Kitano, T., Kondo, T., Yabu, T., Taguchi, Y., Tashima, M., Umehara, H., Domae, N., Uchiyama, T., and Okazaki, T.: Increase of the ceramide content in nuclei through caspase-3 dependent inhibition of sphingomyelin synthase in Fas-induced Jurkat T cell apoptosis. J.B.C. in press (2003)
- 2) Iwai, K., Kondo, T., Watanabe, M., Yabu, T., Taguchi, Y., Umehara, H., Takahashi, A., Uchiyama, T., and Okazaki, T.: Ceramide increases oxidative damage due to inhibition of catalase by caspase-3-dependent proteolysis in HL-60 cell apoptosis. J. Biol. Chem. (2003) in press.
- 3) Yoneda, O., Imai, T., Inoue, H., Nishimura, M., Minami, Y., Bloom, E.T., Mimori, T., Domae, N., and Umehara, H.: Membrane bound form of fractalkine induces IFN-g production by NK cells: A role for Th1 response. Eur. J. Immunol. (2003) 33, 53-58.
- 4) Umehara, H., Inoue, H., Huang, J.-Y., Kono, T., Minami, Y., Tanaka, Y., Okazaki, T., Bloom, E.T., and Domae, N.: Role for adapter proteins in costimulatory signals of CD2 and IL-2 on NK cell activation. Mol. Immunol. (2002) 38, 587-596.
- 5) Tanaka, Y., Fujimoto, H., Okada, Y., Umehara, H., Katoka, T., and Minami, Y.: H-Ras/Mitogen-activated protein kinase pathway inhibits

- integrin-mediated adhesion and induces apoptosis in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* (2002) 277, 21446-21452.
- 6) Nishimura, M., Umehara, H., Nakayama, T., Yoneda, O., Hieshima, K., Kakizaki, M., Domae, N., Yoshie, O., and Imai, T.: Dualfunctions of fractalkine/CX3CR1 in trafficking of circulating cytotoxic effector lymphocytes that are defined by CX3CR1 expression. *J. Immunol.* (2002) 168, 6173-6180.
- 7) Kondo, T., Suzuki, Y., Kitano, T., Iwai, K., Watanabe, M., Umehara, H., Daido, N., Domae, N., Tashima, M., Uchiyama, T., and Okazaki, T.: Vesnarinone causes oxidative damage by inhibiting catalase function through ceramide action in myeloid cell apoptosis. *Mol. Pharm.* (2002) 61, 620-627.
- 8) Kondo, T., Iwai, K., Kitano, T., Watanabe, M., Taguchi, Y., Yabu, T., Umehara, H., Domae, N., Uchiyama, T., and Okazaki, T.: Control of ceramide-induced apoptosis by IGF-1: involvement of PI-3 kinase, caspase-3 and catalase. *Cell Death Differnt* (2002) 9, 682-692.
- 9) Kawase, M., Watanabe, M., Kondo, T., Yabu, T., Taguchi, Y., Umehara, H., Uchiyama, T., Mizuno, K., and Okazaki, T.: Increase of ceramide in adriamycin-induced HL-60 cell apoptosis: detection by a novel anti-ceramide antibody. *BBA* (2002) 1584, 104-114.
- 10) Inoue, H., Yoneda, O., Minami, Y., Tanaka, Y., Okazaki, T., Imai, H., Bloom, E., Domae, N., and Umehara, H.: Lipid rafts as the signaling scaffold for NK cell activation: Tyrosine phosphorylation and association of LAT with PI 3-kinase and PLC-g following CD2 stimulation. *Eur. J. Immunol.* (2002) 32, 2188-2198.
- 11) 梅原久範, 宮地理彦, 岡崎俊朗: "Lipid rafts" 細胞活性化のための"脂肪の筏". *臨床免疫学会会誌* (2003) 印刷中.
- 12) 梅原久範, 宮地理彦, 岡崎俊朗: T細胞シグナル伝達における raft の役割. *炎症と免疫* (2003) 印刷中.
- ## 2. 学会発表
- 1) Umehara, H., Nishimura, M., Mimori, T., Domae, N., Yoshie, O., and Imai, T.: Fractalkine as the gatekeeper for cytotoxic lymphocytes. *日本免疫学会総会・学術集会記録* (2002) 32, 9. (シンポジウム)
- 2) 井上, 博, 宮地, 理彦, 永福, 正和, 小杉, 厚, 米田, 修, 三森, 経世, 堂前, 尚親, 梅原, 久範: NK 細胞活性化における lipid raft の関与. *日本免疫学会総会・学術集会記録*(2002) 32, 134.
- 3) 米田, 修, 井上, 博, 西村, 美由希, 今井, 俊夫, 南, 康博, 堂前, 尚親, 梅原, 久範: Fractalkine 刺激によるNK細胞の IFN- γ 産生とその解析. *日本免疫学会総会・学術集会記録* (2002) 32, 161.
- 4) 梅原, 久範, 米田, 修, 西村, 美由希, 宮地, 理彦, 井上, 博, 堂前, 尚親, 三森, 経世, 義江, 修, 今井, 俊夫: リンパ球と血管内皮細胞との接着における fractalkine の意義. *日本免疫学会総会・学術集会記録*(2002) 32, 167.
- 5) 宮地, 理彦, 尼川, 龍一, 福原, 資朗, 北野, 俊之, 岡崎, 俊朗, 三森, 経世, 梅原, 久範: raft 形成と apoptosis 誘導におけるスフィンゴミエリンの関与. *日本免疫学会総会・学術集会記録* (東京) (2002) 32, 180.

厚生労働科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業)

分担研究報告書

免疫シグナル異常におけるエピジェネティック遺伝子の解明に関する研究

分担研究者 小池 竜司 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

研究要旨

全身性エリテマトーデス(SLE)を代表とする免疫難病は、後天的疾患にもかかわらず放置すれば自律的に悪化、進行していき、その特徴はエピジェネティックな調節機構とよく合致する。また DNAメチル化を阻害する薬剤が類似の症候を誘発する事実と併せて、SLEの病態にシグナル分子のエピジェネティクス、特にDNAメチル化の変動が関与していると仮説を立て、IL-4、IFN γ 、CD40Lを対象に解析を行った。少数の患者検体を用いた検討では、これらの遺伝子のメチル化に一定の傾向は見出せなかったが、今後の検討の方向性を示すような結果も得られ、また本研究手法により班内の他研究との連係によって興味深い結果が期待されるとも考えられた。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス(SLE)を代表とする全身性免疫疾患においては、様々な免疫シグナル分子の発現や調節の異常が生じ、結果として免疫応答のバランスが崩れて病態が形成されている。こうした免疫シグナル分子の発現調節異常は多彩かつ流動的であり、常に一定の傾向を示さない場合も多く、把握が困難であった。また SLE などの免疫疾患は若干の家族集積はあるものの基本的には孤発的に発生する後天的疾患であり、体細胞ゲノムにおいて免疫シグナル分子の遺伝子に明らかな異常は存在しない。

いっぽうヒトゲノムプロジェクトが進展しつつある中で、遺伝情報の形質発現には塩基配列以外の多様なメカニズムによって制御がかけられていることが明らかとなってきた。こうした塩基配列によらない遺伝子発現の制御機構はエピジェネティックな調節と呼ばれ、数多くの生命現象に関与することが明らかになりつつある。さらにエピジェネティックな調節のユニークな点は、後天的かつ可逆的な機構であるにもかかわらず、遺伝子の複製やクローンの増殖に伴って継承されることであり、たとえば代表的メカニズムである DNA のメチル化は CG という塩基配列(CpG 配列)の大部分においてシトシンにメチル基が付加されることで周

辺の遺伝子発現を制御する機構であるが、DNA複製の際に新しく合成された1本鎖においては維持機構を持つメチル化酵素(Dnmt1)によって素早く感知され、付加されていく(hemimethylation)ことで、クローン増殖の際も継承、維持されていく。

このようなエピジェネティックな調節機構は、後天的かつ可逆的でありながらいったん発症した後は放置すれば自律的に持続し悪化していく免疫疾患の病像ときわめてよく一致している。さらに興味深いことに、SLEと類似した臨床症状や検査異常を呈する薬剤誘発性ループスという病態を高頻度で誘発する薬剤であるヒドララジンやプロカインアミドは、前述のDNAメチル化を阻害する作用を有していることがわかっており、DNAメチル化やエピジェネティクスの変動が免疫疾患の発病に関与する可能性がじゅうぶんに予想される。そこで本研究ではSLEを代表とする免疫疾患のシグナル異常に、エピジェネティックな調節機構がどのように関与しているかを明らかにすることを目的とする。そして、将来的にはエピジェネティクスを標的にした免疫疾患の新しい治療理論、治療戦略の構築を目指し、そのための基礎実験も開始、進行させていく。

B. 研究方法

エピジェネティクスはクロマチン構築、ヒストンアセチル化、タンパク質の修飾など多様な機構を包含する概念であるが、その中で最も基本的なメカニズムでありかつ、薬剤誘発性ループスとの関連性が指摘されている DNA メチル化に焦点を絞り、末梢血単核細胞由来のゲノム DNA を用いて、種々の免疫シグナル分子の遺伝子調節領域のメチル化の状態を bisulfite 法により検討する。非患者と比較して SLE 患者における CpG メチル化の状態に特異な傾向やクローンの存在を検証し、病態との関連性について考察を行うこととした。

Bisulfite 法は、ゲノム DNA を bisulfite (ピロ亜硫酸ナトリウム) で処理し、精製し denature した後一方のストランドに相補的に作成したプライマーを用いて PCR を行い、産物の塩基配列を決定する方法である。Bisulfite 処理によりすべてのシトシンがウラシルに変換し、最終的にはチミンに変換された配列に変わる。しかしメチル化されている CpG のシトシンは変換されず、区別が可能となる。メチル化の状態は細胞種やクローンにより異なると予想されるので、PCR 産物をクローン化し約 10 クローンを選んで塩基配列決定を行い、クローン集団の傾向を検討した。

対象とする遺伝子は、まず IL-4、IFN γ 、CD40L を選択し、それぞれの解析領域の選定、PCR のための条件検討を行いつつ少数の検体について試験的検討を行った。IL-4、IFN γ はマウスにおいて Th1、Th2 細胞への分化にそのプロモーターの DNA メチル化が関与していることが明らかになっており、SLE においても Th2 への偏りが病態に関与するという指摘があることより、また CD40L は SLE においてその発現異常を指摘する複数の報告があることより、最初の検討の対象に選んだ。

(倫理面の配慮)

ゲノム DNA は基礎研究に使用することをインフォームドコンセントを行った患者から採取した血液より抽出した。DNA メチル化は一時的

かつ可逆的な現象であり、いわゆるゲノム情報とは本来異なるものであるが、現状でその扱いについてじゅうぶんに議論されていないこともあり、その結果についてはゲノム情報と同様に厳重に管理し守秘を行う。

C. 研究結果

IL-4、IFN γ 、CD40L それぞれの遺伝子においてそれぞれ 1000bp、500bp、300bp 程度の調節領域において CpG 配列のメチル化検出のための条件検討を行い、検出可能であることを確認した。各領域内に 7ヶ所、6ヶ所、8ヶ所の CpG 配列が存在し、2-6名の患者、対象の検体を用いて検討を行った。

- ・検索したすべてのクローンにおいて一様にメチル化 CpG、ないし非メチル化 CpG であるサイトは存在しなかった。

- ・高頻度でメチル化 CpG、ないしは非メチル化 CpG であるサイトが存在したが、その傾向に SLE 患者における偏りは認められなかった。

- ・CD40L に関する検討において、8ヶ所の CpG 配列がすべて非メチル化 CpG であるクローンが SLE 患者において少ない傾向が見られた。しかし各 CpG 配列のメチル化の頻度自体は全体としては SLE 患者、非患者間で明らかな差は見られなかった。

D. 考察

遺伝子発現のエピジェネティック調節は多様なメカニズムを包含するが、DNA メチル化はその最も基本的な部分に位置する機構であり、それ自体がヒストンアセチル化やクロマチン構築といった高次のエピジェネティクスに影響を与えるメカニズムである。前述の薬剤誘発性ループスとの関連からも SLE の病態に関与するという発想は魅力的な仮説であると考えられるし、すでに SLE 患者における全体的な DNA メチル化の低下を指摘する報告も存在する。しかし実際に重要なのはどの遺伝子のどの領域のメチル化が重要であるかを明らかにすることであり、現時点ではまだその糸口はつかめていないと考える。また DNA メチル化は一般的

にはその周辺の遺伝子発現を抑制する方向に作用するが、すべての DNA 結合タンパクに対して拮抗するために結果的に遺伝子発現を増強する場合もありうる。今年度の研究結果においては、疾患との関連の根拠となるような知見は得られていないが、技術的な問題はほぼクリアできたとともに、CpG 配列の位置だけでなく連続的にどのようなメチル化パターンを有するクローンが存在するかという点も無視できず、得られた結果は多角的に解釈を行う必要性が示された。また今回の検討に用いた bisulfite 法は高感度に DNA メチル化を検出できる優れた方法であるが、特定の対象遺伝子についてのみ一度に1クローンの解析しか行えないという難点がある。そこで網羅的にメチル化を検出できる手法を併用したり対象遺伝子を広げていくことを考慮するとともに、本研究班の他の研究成果に着目し、病態への関与が予想されるシグナル分子の遺伝子や特殊なリンパ球亜集団から抽出したゲノム DNA について検討を行うことで、さらに有用な情報が得られるとともに研究班全体を有機的に連携できるとも考えている。

いっぽうエピジェネティクスが病態に関与していると仮定すると、治療として制御が可能であるかどうかの問題となる。DNA メチル化はすでに一部の癌に関与していることが報告され、その制御も検討されている。それらの研究の動向にも注目し、免疫難病治療への応用を視野に入れた治療理論の構築も行っていく必要がある。たとえば DNA メチル化阻害剤を用いてエピジェネティックな調節の狂いをいったんリセットする発想は、治療抵抗例で行われている骨髄移植治療などと相通ずる部分もあり、基礎的な解析の開始を考慮している。また既存の治療と組み合わせることで、個々の治療の副作用を軽減できることも期待でき、今後いっそう治療への応用を意識しつつ検討を進めて

いく予定である。

E. 結論

SLE 患者のゲノム DNA を用いて、IL-4、IFN γ 、CD40L 遺伝子の DNA メチル化を検討した。少数例の検討では SLE 患者において一定の傾向は認められなかったが、今後の研究の方向性を示唆するような結果も得られ、さらに本研究班内の他研究との関係に関する可能性も期待される。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1.論文発表

該当なし

2.学会発表

小池竜司、宮坂信之：SLE におけるサイトカイン遺伝子のメチル化の検討 第46回日本リウマチ学会総会・学術集会 平成14年4月 神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1.特許取得

該当なし

2.実用新案取得

該当なし

3.その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業)

分担研究報告書

全身性エリテマトーデス(SLE)末梢血リンパ球におけるシグナル伝達異常-CD154 発現異常への関与について

分担研究者 小林 茂人 順天堂大学膠原病内科講師

共同研究者 田村 直人 順天堂大学膠原病内科講師

高谷 磨紀代 順天堂大学膠原病内科大学院生

多田 久里須 順天堂大学膠原病内科助手

加藤 和則 札幌医科大学医学部分子医学研究部門助教授

研究要旨

全身性エリテマトーデス(SLE)では、抗DNA抗体を含む自己抗体による免疫複合体が難治性腎炎をはじめとする種々の病態形成に直接的に関与している。活性化T細胞上のCD154(CD40 ligand)はB細胞上のCD40を介し、活性化・抗体産生・クラススイッチなどを誘導する重要な細胞表面分子である。SLEではCD154の過剰発現が認められ、抗DNA抗体など自己抗体産生に深く関与していることが示唆されている。我々は、SLEの活性化T細胞におけるCD154発現について検討を行った。CD154mRNAはSLEでは健常者と比べより安定化しており、CD154発現異常の一因と考えられた。しかし、SLEのT細胞をin vitroにて96時間無刺激培養した後に活性化してもCD154の過剰発現は認められず、mRNAの安定性は健常人と同等であった。このことから、生体内での持続的なT細胞活性化がSLEにおけるCD154発現異常に関与していると考えられた。

A. 研究目的

CD154は、主にCD4陽性T細胞上に一過性に発現し、B細胞など多くの細胞に存在するCD40を介して、抗体産生をはじめとする様々な機能を示す分子であり、その発現は通常厳密に制御されている。SLEではその過剰発現が報告されており、また分担研究者らのこれまでの研究から、可溶性CD154は抗DNA抗体価と相関し、SLEの活動性の指標であるSLDAIと相関した。さらにCD154はBリンパ球以外に樹状細胞、内皮細胞などを活性化し慢性炎症

に関与することから、SLEの病態形成に重要な分子であると考えられる。分担研究者は、SLEにおけるCD154の発現亢進状態およびそのメカニズムを明らかにし、さらにSLEの病因、治療への応用を検討することを目的とする。

B. 研究方法

SLE患者および健常人の末梢血CD4陽性T細胞にPMA+ionomycin刺激を加え、CD154の蛋白発現をflow cytometryで、CD154mRNA発現およびmRNAの安定性をactinomycin Dに

て転写を抑制することにより、ノーザンブロット法にて比較検討した。また、mRNA の安定性に関与するとされている 3' untranslated region (UTR)の AU-rich element について、遺伝子配列の異常がないか解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究の目的および方法を説明し、理解および承諾が得られた後に、検体採取を行った。

C. 研究結果

PMA+ionomycin 刺激後の CD4 陽性 T 細胞における CD154 蛋白および mRNA 発現は、健康人と比べ SLE で明らか高く、また刺激後長時間持続した。刺激後の CD154mRNA は SLE でより安定化していた(図 1)。3' UTR の AU-rich element の遺伝子配列には、SLE28 例で特異的異常は認められなかった。SLE の CD4 陽性 T 細胞を分離後4日間非刺激下で培養したと、PMA+ionomycin 刺激後の CD154 蛋白の発現、CD154mRNA 発現量・時間および安定性は健康人と同じレベルにまで低下した(図 2)。

D. 考察

SLE では活性化 CD4 陽性 T 細胞における CD154mRNA の発現が高く長時間持続し、mRNA の安定化がその一因であると考えられた。またこの現象が可逆的であったことから、CD154 の過剰発現には生体内での T 細胞および細胞内シグナル伝達系の活性化が関与していると考えられた。

SLE に対する抗 CD154 モノクローナル抗体による治療が海外で開始されているが、生物学的活性をもつと考えられる可溶性 CD154 は他

のサイトカインと比べ血漿にかなり多く存在しており、中和抗体のみでの治療は困難であることが推測される。p38MAPK をはじめとする MAP キナーゼ(MAPK)は、サイトカインなど種々の early activated gene の mRNA を安定化に関与し、その発現を調節していると考えられているため、今後は SLE における MAPK (p38MAPK, ERK, JNK) 活性化の動態と CD154 発現の関連を明らかにし、さらに MAPK を特異的に阻害することにより SLE における CD154 発現およびその機能を抑制できるかを検討する。CD154 発現をより少ない検体で詳細に解析するため、real time PCR 法にて CD154mRNA の定量化を行う。

E. 結論

SLE における CD4 陽性 T 細胞の CD154 発現異常には CD154mRNA の安定化が関与しており、今後そのメカニズムを解明することにより、治療に結びつく可能性もあると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Takaya M, Tamura N, Kato K, Kobayashi S, Haruta K, Tajima M, Hara M, Yang K, Tsuda H, Hashimoto H: CD154 expression and mRNA stability of activated CD4 positive T cells in patients with systemic lupus erythematosus. Mod Rheumatol (in press)

Kobayashi S, Tamura N, Ikeda M, Sakuraba K, Matsumoto T, Hashimoto H: Uveitis in

adult patients with poststreptococcal reactive arthritis : the first two cases reported associated with uveitis. Clin Rheumatol (2002)21,533-535.

Kobayashi S, Yano T, Matsumoto Y, Numano F, Nakajima N, Yasuda K, Yutani C, Tamakoshi A, Kawamura T, Ohno Y, Inaba Y, Hashimoto H: Clinical and epidemiological analyze of giant cell (temporal) arteritis from a nationwide survey in 1998 in Japan: The first government supported nationwide survey. Arthritis Care Res (in press).

2.学会発表

Kobayashi S, Yano T, Matsumoto Y, Numano F, Nakajima N, Yasuda K, Yutani C, Tamakoshi A, Kawamura T, Ohno Y, Inaba Y, Hashimoto H. Clinical and epidemiological analyse of giant cell (temporal) arteritis from a nationwide survey in 1998 in Japan: The first governmentsupported nationwide survey. The 10th International vasculitis and ANCA Workshop. April 27, Cleveland, 2002.

Kobayashi S, Yano T, Matsumoto Y, Numano F, Nakajima N, Yasuda K, Yutani C, Tamakoshi A, Kawamura T, Ohno Y, Inaba Y, Hashimoto H. Clinical and epidemiological analyse of giant cell (temporal) arteritis from a nationwide survey in 1998 in Japan: The first government supported nationwide survey.

2002. 26th International Congress of Internal Medicine, May, Kyoto, 2002

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

3.その他

なし

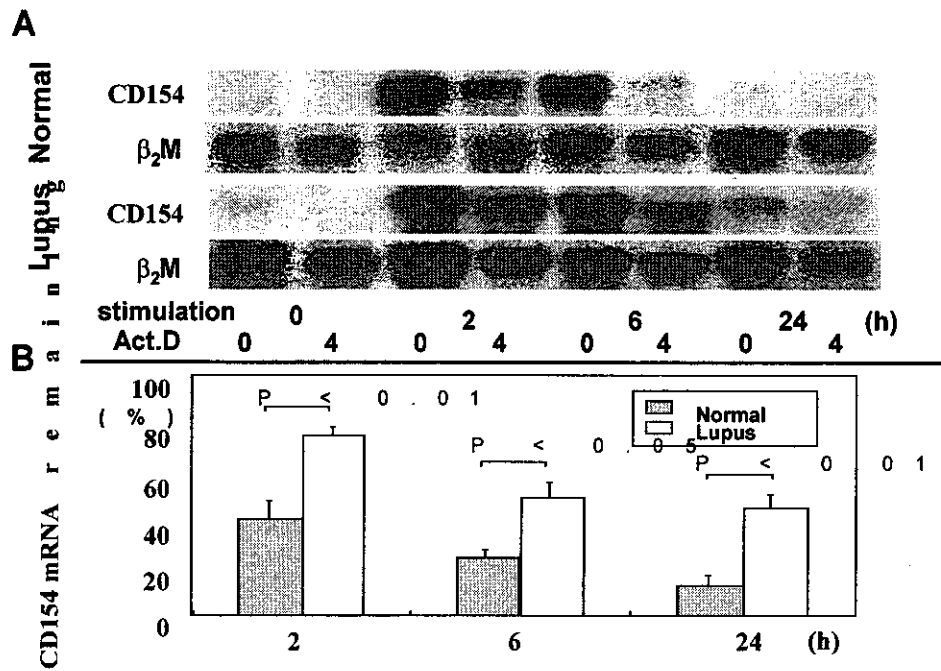


図 1. PMA+ionomycin 刺激後 SLE CD4+T 細胞における CD154mRNA 量と安定性の変化

CD154mRNA remaining = actinomycin 処理後 mRNA 量/処理前 mRNA 量(%)

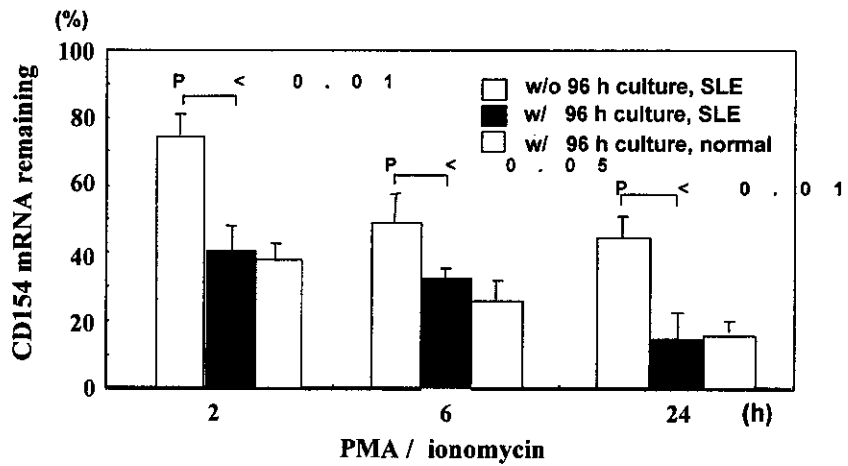


図 2. 96 時間無刺激培養後 PMA+ionomycin 刺激 SLE CD4+T 細胞における CD154mRNA 安定性の変化

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
分担研究報告書

免疫抑制性シグナル異常と経口免疫寛容の誘導に関する研究

分担研究者 駒形嘉紀 東京大学医学部附属病院アレルギーリウマチ内科 助手

研究要旨 腸管からの抗原に対する経口免疫寛容は種々の自己免疫疾患の治療への応用が期待されている。TGF- β はこのような経口免疫寛容の誘導や、そのほかにも末梢での自己抗原に対する寛容の維持、粘膜免疫システムでのIgA産生などで重要な役割を担っているといわれているが、T細胞を含めたどの細胞がその制御をしているのかは不明である。これらを解析するためT細胞でのみTGF- β 遺伝子の発現がみられないマウスをCre/loxPシステムを用いて作成した。現在、経口免疫寛容の誘導とT細胞による寛容の移入に与える影響を種々の抗原を用いて確認し、同時に腸管内リンパ組織でのIgA産生B細胞へのクラススイッチにおけるパイエル板T細胞の産生するTGF- β の役割も検討中である。

A. 研究目的

経口的に投与された非病原性抗原に対しては全身性の免疫寛容が誘導されることが知られており経口免疫寛容と呼ばれる。この現象を応用してアレルギー疾患や自己免疫疾患を治療する試みがなされており、動物モデルでは劇的な効果がみられヒトへの応用が期待されている。副作用もとくに見られず、抗原特異的な治療として今後大きく発展していくことが期待されている方法であるが、そのメカニズムについてはまだ不明な点が多い。経口免疫寛容をmediateするT細胞として、現在までに主にTGF- β を産生するCD4+調節性T細胞(Th3)が重要であるといわれており、その他にIL-10などの抑制性サイトカインと共にTGF- β も産生するT細胞(Tr1)などの報告があるが直接的証拠はない。

また、末梢での自己抗原に対するtoleranceの維持のメカニズムにおいてTGF- β が重要な役割を担っていることが様々な系において報告されてきた。しかしそのTGF- β が末梢局所においてどの細胞から分泌されているかについては、T細胞自身をはじめ様々な細胞が関わ

っていることが予想されるが詳細は不明である。抑制性T細胞としてCD4+CD25+細胞が注目され末梢の自己抗原に対するトレランスの維持においても重要な役割を果たしているという報告もあるが、その抑制メカニズムにおけるTGF- β の役割も最終的結論がでていない。

一方、粘膜免疫システムにおいても、IgA産生B細胞への分化やT細胞の免疫組織へのhomingに関与してTGF- β がTh2サイトカイン以上に重要であることがわかっているが、それを腸管内リンパ組織において分泌しているのはT細胞であるのか他のマクロファージや樹状細胞であるのかについては明らかでない。

TGF- β からの細胞内シグナル伝達に関しては比較的よく解明されており、T細胞においてそのシグナルをblockすると各種の自己免疫疾患類似の病態を示すことから、T細胞のホメオスタシス維持にTGF- β が深く関与していることがわかっている。ところが、TGF- β のノックアウトマウスは全身の激しい炎症をおこして3週から5週令で死亡してしまうため、これらの諸疑問を解決することができなかった。そこで、これらを明らかにすることを目的に我々はT細胞特異的なTGF- β ノ

ックアウトマウスを作成することとした。このマウスを解析することにより、経口免疫寛容の誘導、全身における炎症抑制、粘膜免疫システムでの IgA 産生などにおいて T 細胞が産生する TGF- β がどういう役割をもつのかを解析することとした。

B. 研究方法

T 細胞でのみ TGF- β 遺伝子の発現がみられないマウスを作成するため、Cre/loxP による conditional targeting 法を用いた。分泌型 (活性型) TGF- β をコードする exon 6 の上・下流に loxP 配列を挿入した Targeting construct を作成し、ES 細胞に導入した。G418 により selection したクローンを LA-PCR および Southern によりスクリーニングし、positive clone に対し Cre recombinase を一過性に発現させることにより neo 耐性遺伝子のみ除去し、blastocysto injection により loxP が exon6 上・下流にのみ挿入された変異マウスを作成した (TGF- β floxed mouse)。これを lck プロモータにより Cre recombinase を発現したトランスジェニックマウスとを交配する。lck-Cre マウスは熊本大学動物資源開発研究センターより供給をうける。作成したマウスにおいては、まず自己免疫様の病態が腸管をはじめとする各臓器において存在するかどうか確認する。その後 Balb/c にバッククロスし、OVA などの抗原に対し mucosal tolerance を誘導できるのかどうかと、T 細胞を介した tolerance の移入に与える影響を種々の抗原を用いて確認する。さらに、腸管内リンパ組織での IgA 産生 B 細胞へのクラススイッチにおけるパイエル板 T 細胞の産生する TGF- β の役割や、T 細胞の粘膜組織への homing、CD25 陽性 regulatory T 細胞の function についても検討する。また IgA 腎症の患者の CD4+T 細胞の TGF- β 産生が亢進しているという報告をはじめ、IgA 腎症への TGF- β の関与が示唆されているため、IgA 腎症自然

発症モデルである ddY マウスとの交配により発症への影響を解析する。

(倫理面への配慮)

当該マウスの作成およびその後の解析にあたっては、動物愛護上問題のないよう実験時および殺処分時にはマウスに苦痛を与えないようにする。したがって倫理面の問題はないと考えられる。

C. 研究結果

TGF- β 遺伝子の最重要 exon である exon6 の上・下流に loxP 配列が挿入された変異アレルをもつ ES 細胞クローンを 2 つ樹立した。それらを blastocysto injection することによりキメラマウスを作成した。このマウスを lck-Cre トランスジェニックマウスと交配中である。TGF- β の発現が T 細胞でみられないことを確認した後、tageted マウスの解析に移る予定である。

D. 考察

Mucosal tolerance は動物モデルを中心に種々の自己免疫疾患治療に応用されているが、そのメカニズムとしての regulatory T 細胞についての TGF- β の関与を含めた詳細は明らかでない。この研究によりこの regulatory T 細胞への TGF- β の関与の有無が明らかになり、複雑な mucosal tolerance のメカニズムの解明とその自己免疫疾患治療への応用に大きく寄与することが期待される。また、腸管免疫システムにおいて IgA 産生 B 細胞へのクラススイッチなどの重要なメカニズムに TGF- β が深く関わっているが、本研究はその詳細な解明に大きく貢献する。加えて、IgA 腎症の発症メカニズムにおける TGF- β の役割を明らかにすることができればその治療への糸口が見いだされることも期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

駒形嘉紀. 経口免疫寛容の基礎と応用. Bio
Clinica (2002) 17, 542-546

H. 知的財産権の出願・登録

該当なし

厚生労働科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業)

分担研究報告書

膠原病における免疫寛容シグナル異常に関する研究

分担研究者 坂口 志文 京都大学再生医科学研究所教授

免疫細胞のシグナル伝達の遺伝的異常の結果、免疫自己寛容が破綻し、ヒトの膠原病と酷似した病変を自然発症する動物モデルを確立した。このモデルの遺伝的解析を行ない、単一遺伝子の変異を原因として T 細胞シグナルの異常を来たし、その結果としてヒトのリウマチ様関節炎と酷似した病変を誘導出来る可能性を見出した。この結果から、ヒト膠原病の発症原因のひとつとして T 細胞のシグナル伝達異常が重要と考えられる。

A. 研究目的

免疫細胞のシグナル伝達の遺伝的異常の結果、免疫自己寛容が破綻し、ヒトの膠原病と酷似した病変を自然発症する動物モデルを確立した。このモデルを用いて、膠原病の原因・発症機構、治療法を探る。さらにヒト膠原病患者における同様の遺伝子異常について検索する。

B. 研究方法

我々の確立した自己免疫性関節炎自然発症マウスモデルを用いて以下の研究を行なう。(1)動物モデルで明らかとなった遺伝子異常について、それが免疫シグナル異常を起こす構造的基礎を解析する。(2)類似のシグナル異常が膠原病を誘導する可能性について、マウスを用い、レトロウイルスによる免疫細胞への遺伝子導入により検索する。(3)制御性 T 細胞を正常動物から作製し、マウスモデルでの膠原病発症阻止効果を検討する。(4)そのような遺伝子異常とヒトの膠原病の発症との関連について、患者の遺伝子異常、およびリンパ

球シグナル分子の機能的異常の面から解析する。

(倫理面への配慮)

当研究所の動物実験指針、また倫理規定に則り実験を行なった。

C. 研究結果

(1)ヒトのリウマチ様関節炎と酷似した病変を自然発症する SKG マウスの疾患原因遺伝子を同定したところ、T 細胞抗原レセプター近位のシグナル伝達分子の一塩基突然変異であった。トランスジェニックマウスを作製し、SKG マウスに正常遺伝子を発現させた結果、関節炎の発症は阻止された。(2)T 細胞抗原レセプター近位のシグナル伝達分子間の結合親和性を指標に、当該遺伝子変異の構造特性、シグナル伝達への影響を解析した。その結果、当該遺伝子の他の部位における変異によっても同様のシグナル異常、ひいては関節炎を惹起できる可能性を得た。現在、この変異をレトロウイルスを用いて T 細胞に導入し、関節炎が

惹起できるか検討している。(3)ヒトにおける同様、類似の遺伝子変異を検索している。現時点で、SKG マウスの原因遺伝子産物と結合する分子に変異のある症例を見出し、その変異の意味を解析している。

D. 考察

一遺伝子の変異の結果、T 細胞シグナルの異常を来とし、その結果としてヒトのリウマチ様関節炎と酷似した病変を誘導出来る可能性を見出した。この結果から、ヒト膠原病の発症原因のひとつとして T 細胞のシグナル伝達異常が重要と考えられる。

E. 結論

膠原病、特にリウマチ様関節炎について、シグナル異常の是正に基づく新しい治療法の可能性が考えられる。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hori, S., Takahashi, T., and Sakaguchi, S.
Control of autoimmunity by natural regulatory T cells. *Adv. Immunol.* In press.
Sakaguchi, S. Control of immune responses by naturally arising CD4+ regulatory T cells that express T_H1-like receptors. *J. Exp. Med.* 197: 397-401, 2003.
Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S.:
Control of regulatory T cell development

by the transcription factor FOXP3. *Science.* 299: 1057-1061, 2003.

Wood, K. and Sakaguchi, S. Regulatory T cells in transplantation. *Nature Rev. Immunol.* 3: 199-210, 2003.

Sakaguchi, S. Regulatory T cells: mediating compromises between host and parasite. *Nature Immunol.* 4: 10-11, 2003.

Sakaguchi, S., Hori, S., Fukui, Y., Sasazuki, T., Sakaguchi, N., and Takahashi, T. Thymic generation and selection of CD25+CD4+ regulatory T cells: Implications of their broad repertoire and high self-reactivity for the maintenance of immunologic self-tolerance. Novartis Foundation Symposium. In press.

Wood, K. J., H. Ushigome, M. Karim, A. Bushell, H. S and S. Sakaguchi. Regulatory T cells in transplantation. Novartis Foundation Symposium. In press.

Sakaguchi, S.: Immunologic tolerance maintained by regulatory T cells: Implications for autoimmunity, tumor immunity and transplantation tolerance. *Vox Sang* 83: S151-S153, 2002.

Gallimore, A., and Sakaguchi, S.: Regulation of tumor immunity by CD25+ T cells. *Immunology* 107: 5-9, 2002.

Takahashi, T., and Sakaguchi, S.: The role of regulatory T cells in controlling immunologic self-tolerance. *Int. Rev. Cytoll.* In press.

Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T.,

- Ishida, Y., and Sakaguchi, S.: Stimulation of CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nature Immunol.* 3: 135-142, 2002.
2. 学会発表
- T. Takahashi, Y. Fukui, T. W.Mak, T. Sasazuki, S. Sakaguchi : Thymic generation of CD25⁺CD4⁺regulatory T cells: their possible high self- reactivity. The 3rd International Workshop Kyoto T Cell Conference (2002.4.3-5 Kyoto)
- T. Takahashi, S. Hori, Y. Fukui, T. Sasazuki, S. Sakaguchi : Broad TCR repertoire and high self-reactivity of CD25⁺CD4⁺regulatory T cells. Gordon Research Conferences, Immunochemistry and Immunobiology (2002.8.18-23 New Hampshire USA)
- 畑洋, 吉富啓之, 坂口教子, 中村孝志, 坂口志文:慢性関節リウマチ様関節炎を自然発症する SKG マウスにおける炎症性サイトカインの役割. 第 32 回日本免疫学会(2002.12.4-6 東京)
- 瀬戸口留可, 堀昌平, 高橋武司, 坂口志文:免疫制御性 CD25+CD4+T 細胞の維持における IL-2 の役割. 第 32 回日本免疫学会(2002.12.4-6 東京)
- 八木治彦, 北脇年雄, 門脇則光, 内山卓, 藤井信吾, 坂口志文:ヒト末梢単核球における GITR および GITR リガンドの発現解析. 第 32 回日本免疫学会(2002.12.4-6 東京)
- 高貴範, 山崎小百合, 清水淳, 千葉勉, 坂口志文:CD25+CD4+制御性 T 細胞の操作による腫瘍免疫の誘導. 第 32 回日本免疫学会(2002.12.4-6 東京)
- 西村英士, 先浜俊子, 田中紘一, 坂口志文: CD25+CD4+制御性 T 細胞による移植免疫寛容の導入. 第 32 回日本免疫学会(2002.12.4-6 東京)
- 牛込秀隆, キャサリンウッド, 堀昌平, 吉村了勇, 坂口志文:抗 GITR 抗体投与によるアロ免疫反応の促進. 第 32 回日本免疫学会(2002.12.4-6 東京)
- 片貝智哉, 高橋武司, 坂口志文, 増田徹, 清水章:マウス自己免疫性胃炎における炎症組織構造とプロトンポンプ反応性 TCRトランスジェニックマウスの作成. 第 32 回日本免疫学会(2002.12.4-6 東京)
- Sakaguchi, S.: Possible Role of AIRE in Thymic Production of Regulatory T Cells. AIRE 2002 Meeting (2002.2.8-9 Tokyo)
- Sakaguchi, S.: Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+regulatory T cells. The 3rd International Workshop Kyoto T Cell Conference (2002.4.3-5 Kyoto).
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- Foxp3 発現リンパ球による免疫病の治療法(特許出願中)

厚生労働科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業)
分担研究報告書

膠原病に於ける IFN などのサイトカインシグナル異常の解明とその制御に関する研究

分担研究者 高柳 広 東京大学大学院医学系研究科・助手

研究要旨

膠原病に代表される自己免疫疾患の発症原因や病態にはいまなお不明の部分が多く、根治療法がない疾患が多い。本研究では、免疫系の制御で重要な役割をもつインターフェロン (IFN) 系のサイトカインとその細胞内シグナル伝達系に着目し、これらの経路に関与する分子の生体レベルでの機能や制御機構を解明することで、膠原病発症機構や病態の解明と新規治療標的の同定を目標にして研究を進めている。本年度は、IRF-2 遺伝子欠損マウスにみられる自己免疫性皮膚炎の発症で重要な意義をもつ CD8⁺T 細胞の活性化において、I 型 IFN が誘導するケモカインである CXCR3 が重要な意義を持つことを明らかにした。さらに、種々の自己免疫疾患の発症の背景に関与するヘルパーT細胞の Th1/2 分化機構に関する解析を進めた。特に、IRF-1 遺伝子欠損マウスにおけるヘルパーT細胞の分化異常などの分子メカニズムを検討した。さらに、リンパ節形成、T 細胞分化誘導、樹状細胞活性化、破骨細胞分化誘導において重要なサイトカインである RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) の標的遺伝子の解析から、IFN- β が誘導され、RANKL シグナルを自己制御すること、転写因子 NFATc1 を誘導・活性化することを解明した。

A. 研究目的

膠原病に代表される自己免疫疾患の発症原因や病態にはいまなお不明の部分が多く、根治療法がない疾患が多い。本研究では、このような膠原病の発症や病態形成に重要な免疫系の異常を分子レベルで解明し新規治療標的を同定するため、免疫系を制御する重要な液性因子であるサイトカインによる遺伝子制御ネットワークの解明を進める。特に、IFN 系は、自然免疫系および獲得免疫系の双方において重要な意義をもち、ウイルス感染防御、T 細胞制御、樹状細胞等の抗原提示細胞の活性化などにおいて必須の役割をもつことが明らかにされてきた。そこで、この IFN 系に注目し、IFN 受容体の欠損マウスやその細胞内シグナル伝達に関与する IRF (interferon regulatory factor)ファミリー転写因子の遺伝子欠損マウスを用いて、免疫系の機能における意義を解析する。これまでの研究により、IFN シグナルを負に制御する IRF-2 遺伝子の欠損マウスが自己免疫性皮膚炎を発症することが明らかにされている。このモデルマウスを用いて膠原病の発症機構における IFN シグナルの果たす役割を検討する。また IRF-1 欠損マウスにおけるヘルパーT細胞の分化異常などの分子メカニズムを解明する。一方、リンパ節形成、T 細胞分化誘導、樹状細胞活性化、破骨細胞分化誘導にお

いて重要なサイトカインである RANKL は、これまでの研究により IFN 系とのクロストークで制御されることが示されており、この RANKL の細胞内シグナル伝達に関しても、解析を進める。

B. 研究方法

I 型インターフェロン受容体のコンポーネント IFNAR1 の欠損マウスにおける T 細胞の活性化を検討した。また、I 型インターフェロンによる転写活性化に重要な IRF-9 の欠損マウスを用いて同様の検討した。特に IFN によって誘導される IP-10/CXCR3 系の発現や機能に関して検討を進めた。

IRF-1 欠損マウスのヘルパーT細胞の Th1 分化異常に関しては、抗原提示細胞からの IL-12 産生低下が一つの原因であることが明らかになっていたが、T 細胞単独での培養系においても分化異常が観察されたことから、内在的な異常の機構が存在するとしてその機構の解析を行った。

RANKL 標的遺伝子解析の中で IFN- α/β によって誘導される遺伝子発現が多数上昇していたことに注目し、IFNAR1 欠損マウス等を用いてこのシグナルの制御を生体レベルで解析した。さらに、活性化 T 細胞で重要と考えられてきた転写因子である NFATc1 が、RANKL によって非常に高度に誘導されることを

見だし、NFATc1 欠損 ES 細胞を用いてその機能を検討した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた実験に関しては、東京大学動物実験委員会の承認を受けた実験計画に従い、東京大学医学部動物実験施設の定める倫理規定を遵守して、実験を遂行した。

C. 研究結果

IFNAR1 欠損マウス由来の CD8⁺T 細胞において、抗 CD3/CD28 抗体刺激による活性化シグナルが減弱していることを見出し、この活性化経路には IFN- α/β による、転写因子 ISGF3 が必須であることを見出した。更に、この経路には ISGF3 によって制御される IP-10/CXCR3 ケモカイン系が関与することを見出し、ケモカイン系が T 細胞活性化に関与するという新しい知見を提供した。さらに、IRF-2 欠損マウスの CD8 陽性 T 細胞はアロ(同種異型)刺激の際に、過剰な活性化を示すことが自己免疫性皮膚炎発症に重要であることが明らかになっていた。この異常活性化過程において、IFN の標的遺伝子の一つである CXCR3 の過剰発現が関与しており、CD25 発現を制御し、IL-2 依存性の増殖反応を亢進させていることが明らかになった。

IRF-1 欠損マウスは、Th1 分化に異常が見られることが知られていたが、これは抗原提示細胞の IL-12 産生低下が一つのメカニズムであることが明らかになっていた。ところが、IRF-1 欠損マウスより分離した CD4 陽性 T 細胞は、抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体刺激による活性化の過程においても、野生型マウスと比較して IFN- γ 産生に異常があることが明らかになった。この異常は、分化段階に依存して変化することが明らかとなり、IRF-1 による Th1/2 分化の制御が、多くの step の制御に複雑に関与していることが明らかになった。

RANKL は c-Fos を介して IFN- β を誘導し、誘導された IFN- β は c-Fos 発現を抑制することで過剰なシグナルを抑制することが明らかになった。即ち、c-Fos は自らの抑制因子である IFN- β を誘導し、「自己制御」と呼べるフィードバックループを形成していた。RANKL によって誘導される転写因子 NFATc1 については、RANKL シグナルを伝達する最も重要な転写因子であることを示唆するデータが得られている。主な結果は、① RANKL は転写因子 NFATc1(NFAT2)を特異的に誘導し、その誘導の程度はあらゆる転写因子の中で最大レベルであり、20

倍を越えていた。②NFATc1 は RANKL 刺激により活性化し、核に集積し転写活性化していた。③RANKL による NFATc1 の活性化は、カルシウム依存性の脱リン酸化酵素であるカルシニューリンを介しており、この抑制剤である FK506 やサイクロスポリン A は RANKL シグナルを抑制した。④NFATc1 を欠損した ES 細胞は、RANKL による細胞分化誘導能が完全に障害されていた。

D. 考察

T 細胞とくに CD8⁺T 細胞の活性化において、IFN- α/β によって誘導される IP-10/I-TAC などのケモカインが、同じく IFN- α/β によって誘導されるケモカイン受容体である CXCR3 を介して反応を増幅することが効率よい免疫反応に必須であることが明らかになった。一方、このシステムを負に抑制している IRF-2 が欠損したマウスにおいては、膠原病様の症状を発症し、過剰な CD8⁺T 細胞の活性化が観察されることから、IFN 系の異常活性化による自己免疫反応発症の一つのメカニズムが明らかになった。CXCR3 のような標的遺伝子を用いた治療応用の可能性も示唆される。また、IRF-1 が Th1 分化においてステージ特異的な機能を果たすことが明らかになった。今後、この機能発現の意義を分子レベルで探索することで IRF-1 による T 細胞分化制御機構を解明できることが期待される。RANKL シグナルは、IFN 系とのクロストークの中で厳密に制御されており、IFN- β シグナルが負の制御で重要であること、NFATc1 がその遺伝子制御において中心的役割をもつことが解明された。

E. 結論

IFN 系のシグナル分子の欠損マウスを用いた検討により、膠原病などにおける免疫系の異常活性化に関与すると考えられる分子の解析が進行した。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Takayanagi, H., Kim, S., Koga T., Nishina H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J-I, Wagner, E. F., Mak T. W., Kodama, T., and Taniguchi, T. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling for terminal differentiation of

osteoclasts. *Dev Cell* 3, 889-901(2002)

Takayanagi, H., Kim, S., Matsuo, K., Suzuki, H., Suzuki, T., Sato, K., Yokochi, T., Oda, H., Nakamura, K., Ida, N., Wagner, E. F. & Taniguchi, T. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of *IFN- β* . *Nature* 416, 744-49 (2002).

Takayanagi, H., Kim, S., and Taniguchi, T. (2002). Signaling crosstalk between RANKL and interferons in osteoclast differentiation. *Arthritis Res* 4, S227-232

Nakamura, I., Kadono, Y., Takayanagi, H., Jimi, E., Miyazaki, T., Oda, H., Nakamura, K., Tanaka, S., Rodan, G. A. & Duong le, T. IL-1 regulates cytoskeletal organization in osteoclasts via TNF receptor-associated factor 6/c-Src complex. *J Immunol* 168, 5103-9. (2002).

Yamamoto, A., Miyazaki, T., Kadono, Y., Takayanagi, H., Miura, T., Nishina, H., Katada, T., Wakabayashi, K., Oda, H., Nakamura, K. & Tanaka, S. Possible involvement of $\text{I}\kappa\text{B}$ kinase 2 and MKK7 in osteoclastogenesis induced by receptor activator of nuclear factor κB ligand. *J Bone Miner Res* 17, 612-21. (2002).

Ogasawara, K., Hida, S., Weng, Y., Saiura, A., Sato, K., Takayanagi, H., Sakaguchi, S., Yokochi, T., Kodama, T., Naitoh, M., De Martino, J. A. & Taniguchi, T. Requirement of the $\text{IFN-}\alpha/\beta$ -induced CXCR3 chemokine signalling for CD8^+ T cell activation. *Genes Cells* 7, 309-320. (2002).

2. 学会発表

高柳広、金宣和、谷口維紹: Regulation of bone homeostasis by RANKL and IFNs

第 32 回日本免疫学会学術集会、シンポジウム (Homeostatic regulation and cytokines)、2002.12.5 東京

日本免疫学会総会・学術集会記録 32 15 (2002)

高柳 広: 免疫細胞と破骨細胞分化の接点

第 44 回歯科基礎医学会学術大会、シンポジウム免

疫の最前線、2002.10.4 東京

歯科基礎医学会雑誌 44(5)59 (2002)

高柳 広: インターフェロン系による破骨細胞分化制御

第 75 回日本生化学会、シンポジウム 70 「骨格系細胞の分化制御機構」2002.10.16

生化学 74 (8) 659 (2002)

H. Takayanagi, K. Sunhwa, T. Taniguchi

RANKL signaling network in positive and negative regulation of osteoclastogenesis

Meeting on genetic and molecular biology of skeletal development, Lucca, Italy

2002.10.14

抄録掲載号の雑誌なし

厚生科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業)
分担研究報告書

自己免疫疾患患者に認められる T 細胞レセプターシグナル伝達異常の分子機構に関する研究

| | |
|-------|--------------------|
| ○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)の病態には、T細胞機能不全が深く関わっていることが明らかとなっている。その分子機序は不明のままであったが、近年、T細胞表面からサイトカイン転写に至るシグナル伝達系に異常の一つが存在する可能性が指摘されている。

私達はT細胞抗原リセプターからのシグナル伝達経路において、PKCより近位部に本質的な異常が存在すると考え、チロシンリン酸化を指標として、SLE患者T細胞に見いだされる異常分子の特定を試みてきた。その結果、約60%のSLE患者において、T細胞リセプター (TCR)-CD3複合体を構成し、シグナル伝達に関与するzeta (ζ)鎖の蛋白発現が著明に低下していることを世界で始めて明らかにした。 ζ 鎖の発現低下は、SLEの病因、病態を考えるうえで、極めて重要な手掛かりと考えられる。

本研究では、SLE T細胞におけるTCR ζ 鎖異常の分子機序を明らかにする。その上で、TCR ζ 鎖異常の人為的制御法について検討し、SLE T細胞機能異常や活発な自己免疫応答を正常化する治療法の開発に応用する。

A.研究目的

全身性エリテマトーデス(SLE)の病態には、T細胞機能不全が深く関わっていることが明らかとなっている。その分子機序は不明のままであったが、近年、T細胞表面からサイトカイン転写に至るシグナル伝達系に異常の一つが存在する可能性が指摘されている。

私達は T細胞抗原リセプターからのシグナル伝達経路において、PKCより近位部に本質的な異常が存在すると考え、チロシンリン酸化を指標として、SLE患者T細胞に見いだされる異常分子の特定を試みてきた。その結果、約60%のSLE患者において、T細胞リセプター (TCR)-CD3複合体を構成し、シグナル伝達に関与する zeta (ζ)鎖の蛋白発現が著明に低下していることを明らかにした。 ζ 鎖の発現低下は、SLEの病因、病態を考えるうえで、極めて重要な手掛かりと考えられる。TCR ζ 鎖は T細胞活性化に伴う正のシグナル伝達のみならず、負のシグナル制御や、T細胞活性化の収束シグナルにも関与することが明らかにされている。T細胞活性化の重要なステップとして、Linkers of activation of T cells: LATを中心とした形成される glycopilid enriched microdomain: GEM にさまざまな

シグナル伝達分子が集属する過程がある。TCRからの正のシグナル伝達は、このステップを介して下流に伝達される。この活性化シグナルを収束させるのに、チロシンリン酸化された ζ 鎖とこれら活性化分子を脱リン酸化するチロシンフォスファターゼが関与するとされている。

この活性化収束機構に異常を来たせば、持続的な活性化シグナルが下流に伝達される可能性があり、SLE患者T細胞で観察された ζ 鎖の発現低下は、この機構に重大な影響を及ぼすものと考えられる。

本研究では、SLE T細胞におけるTCR ζ 鎖異常の分子機序を明らかにする。その上で、TCR ζ 鎖異常の人為的制御法について検討し、SLE T細胞機能異常や活発な自己免疫応答を正常化する治療法の開発に応用する。

B. 結果と考察:

1) SLE患者T細胞における ζ 鎖 mRNA 3' UTR異常: 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