

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。一方、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。まずSLE患者と陰性コントロールの末梢血T細胞から、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。その結果、大部分のSLE患者では、鎖 mRNA 3'UTRの野生型と思われる910 bpのcDNAフラグメントと比較し350 bpの短いcDNAフラグメントが優位に検出された。その一方で、陰性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910 bpと350 bpの短いcDNAフラグメントとのシーケンスを比較した結果、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生成されたものと思われた。

2) SLE患者におけるshort exon8ヴァリエントの発現: 310bp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。SLE患者7例と健常人コントロール4例の末梢血T細胞から、鎖ORF cDNA、鎖3'UTR cDNA(910 bpと350 bp)、G3PDH cDNAそれぞれを半定量的にPCR法で増幅し、G3PDH cDNA反応曲線とのPCR cycle数の差を比較した。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。その一方で、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。とくに5例のSLE患者では野生型がほとんど発現されていなかった。ここで興味深い点は、鎖mRNAのORF領域(ORF mRNA)で比較した場合、鎖mRNAの発現レベルは、健常人とSLE患者間で差は認められなかったことである。このことは、SLE患者T細胞における鎖発現低下が

transcriptional regulationによるものよりも、むしろtranscription以降の段階で規定されている可能性を示唆する成績である。

3) 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へと有意に低下し、同時にCD3 ϵ 鎖の発現も38.0から15.1へ低下していた。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CD3 ϵ 鎖はwild株と同等であることが確認され、CD3 ϵ 鎖の表面発現低下はTCR ζ 鎖の産生低下による2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 鎖mRNA安定性を検討したところ、short 3'-UTR株ではwild株に比べmRNAの消滅は明らかで、安定性が低下していることが明らかとなった。一方、CD3 ϵ 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て、その分子機序の一部が明かとなった。これまで、SLEは自己免疫疾患の原型として多くの成績が集積されたにも拘わらず、病態・病因に直結する異常は同定されなかった。このため、その治療も、副作用の多い非特異的免疫療法に終止し、長期予後、QOLの向上につながる新たな治療法は残念ながら開発されてこなかった。この研究により、分子異常が特定され、異常分子そのも常分子機能を修復すれば良いかが判明し、本疾患の予防、治療に多大な進歩をもたらすものと期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G.研究発表

1. 論文発表

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

厚生労働省科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業)
免疫難病のシグナル異常と病態解明・治療応用に関する研究

自己免疫疾患におけるヒト IL-1 遺伝子活性化の制御

分担研究者 塚田順一

産業医科大学医学部第一内科

研究要旨: 全身性エリテマトーデスや関節リウマチを代表とする自己免疫疾患において interleukin 1 (IL-1)は炎症を惹起する極めて重要なサイトカインである。単球・マクロファージにおいてヒト IL-1 β 遺伝子活性化は、2つの転写因子 NF-IL6 (C/EBP β)と Spi-1 (PU.1)に依存しており、両者はドメインを介して結合し相乗的に遺伝子を活性化している。興味あることに、これらの転写因子を不活化することによりヒト IL-1 β 遺伝子発現は強力に抑制され、これら転写因子の制御が自己免疫疾患の治療として検討するものであることが明らかとなった。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデスや関節リウマチを代表とする自己免疫疾患は関節、腎臓や肺など多臓器に強い炎症を惹起し臓器不全に陥る難病である。現在、日本において多くの患者さまがこれら疾患に罹患されており加療を受けているにも関わらず、その大部分の方が健康な日常生活を送ることができていない現状である。自己免疫疾患における強力な炎症反応は従来、tumor necrosis factor α (TNF α)および interleukin 1 (IL-1)という2つのサイトカインにより生じていることが証明されており、これらのサイトカイン産生を自己免疫疾患において制御することは、すなわち疾患の治療につながると考えられる。過去、様々な薬剤がこの目的で開発されたが十分な効果が得られておらず、今回我々は IL-1 遺伝子活性化機構を解明し、これを抑制することにより根本的に疾患を改善したいと考えた。

IL-1 β は単球・マクロファージが活性化されることにより産生されるサイトカインであり、強力な炎症惹起物質としてリンパ球・好中球や単球・マクロファージを活性化し、発熱や多臓器に炎症を誘導する。特に全身性エリテ

マトーデスや関節リウマチなどの自己免疫疾患ではこのような炎症性サイトカインを抑制することにより、疾患活動性が著明に低下することが近年知られている。さらに IL-1 β は単球だけではなくリンパ球や線維芽細胞からも産生され、これらの細胞間クロストークに不可欠な因子である。IL-1 β は種々の刺激により産生誘導され、IL-1 β mRNA 産生は静止期単球では認められず、エンドトキシンの活性本体である LPS 刺激では刺激 15 分後より mRNA が産生誘導され、1 時間後に最大値に達し、以後急速に減弱し、早期応答サイトカインとしての機能している。

ここにおいて我々は、単球における転写因子の活性化を制御することによる IL-1 遺伝子の転写能の変化を検討した。

B. 研究方法

1. 細胞:ヒト THP-1 単球細胞およびマウス RAW マクロファージ細胞を用いた。
2. 細胞培養:IL-1 は微量のエンドトキシンにて産生誘導されるため、培養液へのエンドトキシンの混入に注意し、上記細胞をエンドトキシンを含まない培養液にて培養した。
3. プラスミド作成:ヒト IL-1 β 遺伝子上流域の転写活性を検討する目的にて、遺伝子プ

ロモーター領域およびエンハンサー領域をクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)もしくはルシフェラーゼベクターに導入した。また、これら領域の転写活性をさらに検討するためにそれぞれの流域に点変異を挿入した。単球特異的核内転写因子である Spi-1 や NF-IL6 発現ベクターを使用した。また、必要によりこれら発現ベクターの野生型 cDNA の代わりに、点変異や欠損を有する cDNA を用いた。

4. 遺伝子導入:これら発現ベクターを IL-1 β 遺伝子上流域を有するレポーターと共に THP-1 もしくは RAW 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入は DEAE-Dextra 法もしくは Liposome 法にて行った。

5. IL-1 β 遺伝子上流域の転写活性:上記遺伝子導入された細胞の CAT もしくはルシフェラーゼ活性を測定した。

6. ゲルシフトアッセイ:THP-1 もしくは RAW 細胞の核蛋白を抽出した。放射性同位元素標識 IL-1 β 遺伝子上流域 DNA とこれら核蛋白を反応させ、ゲルシフトアッセイを行い、IL-1 β 遺伝子上流域に結合する核内蛋白を解析した。

C. 研究結果

ヒト IL-1 β 遺伝子は少なくとも 2 つの不可欠な転写活性化領域を有しており、TATA ボックス近傍にはプロモーター、約 3kb 上流にはエンハンサーが存在した。これら領域は LPS や IL-1 刺激により独立して活性化される。さらに、この 2 つの領域は相互作用を有し、転写をより活性化した。

ゲルシフトアッセイにて、ヒト IL-1 β 遺伝子転写活性化領域には 2 つの転写因子が結合した。一つは炎症性遺伝子で重要な役割をしている NF-IL6 (C/EBP β)、一つは単球特異的核内転写因子である Spi-1 (PU.1)であった。これらの転写因子の結合を阻害することにより、遺伝子の転写活性は極めて高度に抑制された。また、これらの転写因子は GST プ

ルダウン実験にて蛋白間結合能を示し、相乗的に遺伝子転写を誘導した。この Spi-1 による IL-1 遺伝子活性化は IL-1 レセプターシグナル蛋白である Traf6 活性化を必要とした。

NF-IL6 および Spi-1 蛋白 cDNA の活性化ドメインを欠失した発現ベクターを細胞に導入した所、ヒト IL-1 β 遺伝子活性化は強く抑制された。

D. 考察

遺伝子解析により、ヒト IL-1 β 遺伝子活性化は少なくとも 2 つの転写因子 NF-IL6 (C/EBP β)・Spi-1 (PU.1)に依存しており、これらの転写因子は、ある一定のシグナル存在下に TRAF6 等のシグナル伝達物質を介して活性化をうけ、標的 DNA であるヒト IL-1 β 遺伝子に結合する。さらに両者はドメインを介して結合し相乗的に遺伝子を活性化し、これらの転写因子を不活性化はヒト IL-1 β 遺伝子の制御につながることを明らかにした。

E. 結論

炎症性サイトカインに必須であるシグナル分子・転写因子を制御することにより炎症コントロールが可能となる。今回、ヒト IL-1 β 遺伝子転写には炎症性核内転写因子である NF-IL6 (C/EBP β)および単球特異的核内転写因子 Spi-1 (PU.1)が必須であり、これら転写因子の制御が極めて有効に IL-1 産生抑制となり、自己免疫疾患の治療として検討しうるものであることが明らかとなった。

IL-1 α および β 、IL-6、TNF- α 等の炎症性サイトカインの内、それぞれに特異的な因子が同定できると、疾患特異的な炎症制御も可能となる。近年、慢性骨髄性白血病に対するグリベック等、オリゴや small peptide の臨床応用が可能となり、我々の検討は臨床使用を視野に入れたものである。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tamura K, Matsuoka H, Tsukada J, Masuda M, Ikeda S, Matsuishi E, Kawano F, Izumi Y,

Uike N, Utsunomiya A, Saburi Y, Shibuya T, Imamura Y, Hanada S, Okamura S, Gondoh H. Cefepime or carbapenem treatment for febrile neutropenia as a single agent is as effective as a combination of 4th-generation cephalosporin + aminoglycosides: comparative study. Am J Hematol. 2002 ;71(4):248-55.

Kominato Y, Hata Y, Takizawa H, Matsumoto K, Yasui K, Tsukada J, Yamamoto F. Alternative promoter identified between a hypermethylated upstream region of repetitive elements and a CpG island in human ABO histo-blood group genes. J Biol Chem. 2002 4;277(40):37936-48.

Toda Y, Tsukada J, Misago M, Kominato Y, Auron PE, Tanaka Y. Autocrine induction of the human pro-IL-1beta gene promoter by IL-1beta in monocytes. J Immunol. 2002 Feb 15;168(4):1984-91.

Tsukada-J, Tanaka-Y, Auron-PE Molecular Mechanisms of the human prointerleukin 1 β gene activation. Research Advances in Blood Vol 1-2001 p137-52 GLOBAL ResearchNetwork

2. 学会発表

Autocrine Induction of the Human Prointerleukin 1 β Gene by Interleukin 1 β . Tsukada J, Toda Y, Kominato Y, Auron PE, Tanaka Y. 44th annual meeting, American Society of Hematology, Philadelphia USA

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

IL-6 シグナル阻害による免疫難病の治療法の開発に関する研究

西本 憲弘(大阪大学健康体育部健康医学第一部門・
大学院医学系研究科分子病態医学専攻生理病態学)

研究要旨

IL-6 阻害による免疫難病の治療を目的として、本年度は、感染性を修飾したアデノウイルスベクターを用いることにより、IL-6 の細胞内シグナルのネガティブフィードバック因子である suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1)分子の遺伝子導入を検討した。RGD を修飾した非増殖型アデノウイルスベクターは従来型ベクターに比べ、リンパ球系細胞への遺伝子導入を格段に向上させた。このベクターを用いた SOCS-1 遺伝子の導入により、IL-6 依存性の増殖を示すヒトミエローマ細胞、ヒト T 細胞リンパ腫細胞、マウスプラズマサイトーマハイブリドーマ細胞において IL-6 による STAT3 のリン酸化が阻害され、増殖が抑制された。今後、自己免疫マウスモデルでの SOCS-1 発現量の検討、遺伝子導入実験ならびに抗 IL-6 受容体抗体による治療実験を行いたい。

A.研究目的

自己免疫疾患に共通に認められる中心病態の1つに血管炎がある。炎症性サイトカインである IL-6 の遺伝子を強制発現させた IL-6 トランスジェニックマウスでは、血管周囲に炎症性細胞浸潤を生じることから、血管炎の発症に IL-6 の関与が示唆される。我々はこれまでに、関節リウマチやキャスルマン病の病態に IL-6 が関わっており、ヒト化抗 IL-6 受容体抗体による IL-6 シグナル阻害が新しい治療法となり得ることを示した。そこで本研究では、抗 IL-6 受容体抗体を用いた IL-6 シグナルの阻害が血管炎の治療法となり得るか否かを検討する。また、IL-6 の細胞内シグナルのネガティブフィードバック因子である suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1)分子による IL-6 シグナル異常の是正を目指す。今年度は、リンパ球への効率的な SOCS-1 遺伝子導入法の開発と、それを用いた IL-6 シグナル阻害の可能性を、IL-6 依存性細胞株を用いて検討した。

B.研究方法

従来のアデノウイルスベクターは、ウイルスの native tropism により感染する細胞が限られ、特にリンパ球には感染しにくい。その原因は、アデノウイルスの感染効率が、ウイルスの fiber knob が結合するコクサッキー・アデノウイルスレセプター(CAR)の宿主細胞上での発現量に依存するからである。アデノウイルスの fiber knob の HI loop 部位にフィブロネクチンの部分モチーフである RGD モチーフを発現させると、感染が CAR の発現量に依存しないことが Curiel らにより明らかにされた。そこで RGD を修飾した非増殖型アデノウイルスベクターに cytomegalo virus immediate early promoter、SOCS-1 cDNA、と simian virus 40 polyadenylation signal をこの順に組み込んだ RGDCMV SOCS-1 と従来型ベクターに組み込んだ AdCMVSOCS-1 を用い IL-6 阻害能を検討した。また、導入遺伝子の検出のために3'に FLAG epitope を挿入したベクターも作製した。

ベクターは E1 region の欠損した非増殖型であることを精製後に PCR で確認した。また、plaque assay と viral particle(vp)によりウイルス量を決定した。

感染効率の検討:感染効率は GFP の発現により検討した。IL-6 依存性ミエローマ細胞ならびに T 細胞リンパ腫などを含む種々の培養細胞 (5×10^4) と段階希釈を行ったウイルス ($10 - 10000$ vp/cell) を 2 時間インキュベートし、培養液に置換してさらに 48 時間培養を行った。GFP の発現を蛍光顕微鏡で数えた。

SOCS-1 の発現:SOCS-1 分子の発現を確認するため A539 細胞 (1×10^6) に RGDCMV SOCS-1 ならびに RGDCMV SOCS-1-FLAG を感染させ (5000 vp/cell、 ~ 50 plaque forming unit/cell)、48 時間後に RIPA buffer で溶解しウェスタンブロットを行った。また抗 FLAGM2 抗体にて免疫沈降を行い抗 SOCS-1 抗体にて検出した。

細胞増殖試験:IL-6 依存性ヒトミエローマ細胞ならびにヒト T 細胞リンパ腫細胞、ヒト B 細胞、マウスプラズマサイトーマハイブリドーマ細胞に、 1000 ならびに 10000 vp/cell のウイルスを感染させ、5 日間培養し、細胞増殖能を検討した。さらに IL-6 による STAT1 と STAT3 リン酸化を検討した。

C. 結果

感染効率の検討:RGD 修飾アデノウイルスは、検討した 12 種類のリンパ球系細胞すべてに効率良く感染し、8 種の細胞において従来型ベクターに比べて有意に優っていた (図 1)。他の 4 種類の細胞は従来型アデノウイルスにても十分な遺伝子発現が認められたため差は認められなかった。

SOCS-1 の発現:ウェスタンブロット法にて SOCS-1 の蛋白の発現が確認された。また、抗 FLAG 抗体による免疫沈降においては RGDCMV SOCS-1-FLAG の感染細胞でのみ SOCS-1 の蛋白が検出された。

細胞増殖試験:SOCS-1 の発現により、IL-6 依存性細胞株である S6B45、KPM2 ヒトミエローマ細胞、KT-3 ヒト T リンパ腫、MH60 ならびに B9 マウスハイブリドーマプラズマサイトーマの in vitro での増殖は阻害された (図 2)。しかし、IL-6 非依存性細胞ではその増殖をまったく抑制しなかった。また、ウェスタンブロット法による解析において、IL-6 刺激による STAT1 と STAT3 リン酸化は SSI-1/SOCS-1 の発現により抑制されていた (図 3)。

D. 考察

感染性を修飾したアデノウイルスベクターを用いることにより、リンパ球系の細胞へも遺伝子導入が可能であることがわかった。しかも、SOCS-1 は IL-6 のシグナルを効率良く阻害した。SOCS-1 は生理的シグナル調節分子であり、これを用いて IL-6 の過剰シグナルを調節できる可能性がある。今後、血管炎動物モデルでの SOCS-1 発現量の検討、遺伝子導入実験を行う。また、プロモーターの改変による SOCS-1 発現調節を行いたい。

E. 結論

感染性を修飾したアデノウイルスベクターを用いることにより、リンパ球系の細胞へも遺伝子導入が可能である。また SOCS-1 の遺伝子導入による IL-6 シグナル阻害の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) Song J, Ohkura T, Sugimoto M, Mori Y, Inagi R, Yamanishi K, Yoshizaki K, Nishimoto N. Human interleukin-6 induces human herpesvirus-8 replication in a body-cavity-based lymphoma cell line. *J.*

- Med. Virol.* 2002;68:404-411.
- 2) Okazaki M, Yamada Y, Nishimoto N, Yoshizaki K, Mihara M. Characterization of anti-mouse IL-6 receptor antibody. *Immunol. Lett.* 2002;84:231-240.
 - 3) Mihara M, Nishimoto N, Yoshizaki K, Suzuki T. Influences of anti-mouse IL-6 receptor antibody on immune responses in mice. *Immunol. Lett.* 2002;84:223-229.
 - 4) Choy EH, Isenberg DA, Garrood T, Farrow S, Ioannou Y, Bird H, Cheung N, Williams B, Price R, Yoshizaki K, Nishimoto N, Kishimoto T, Panay GS. Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin 6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Arthritis Rheum.* 2002;46:3143-3150.
 - 5) Iwamoto M, Nara H, Hirata D, Minota S, Nishimoto N, Yoshizaki K. Humanized monoclonal anti-interleukin 6 receptor antibody for treatment of intractable adult-onset Still's disease. *Arthritis Rheum.* 2002;46:3388-3389.
 - 6) Nishimoto N, Yoshizaki K, Maeda K, Kuritani T, Deguchi H, Sato B, Imai N, Kakehi T, Takagi N, Suemura M, Kishimoto T. Toxicity, pharmacokinetics, and dose finding study of repetitive treatment with humanized anti-interleukin 6 receptor antibody, MRA, in rheumatoid arthritis - a phase I/II clinical study of MRA for rheumatoid arthritis in Japan-. *J. Rheum.* 2003 (in press).
 - 7) Katsume A, Saito H, Yamada Y, Yorozu K, Ueda O, Akamatsu K, Nishimoto N, Kishimoto T, Yoshizaki K, Ohsugi Y. Anti-interleukin 6 (IL-6) receptor antibody suppresses Castleman's disease like symptoms emerged in IL-6 transgenic mice. *Cytokine* 2003 (in press).
 - 8) Goya S, Matsuoka H, Mori M, Morishita H, Kida H, Kobashi Y, Kato T, Taguchi Y, Osaki T, Tachibana I, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kawase I, Hayashi S. Sustained interleukin-6 signaling leads to the development of lymphoid organ-like structures in the lung. *J. Pathol.* 2003 (in press)
 - 9) Nakahara H, Song J, Sugimoto M, Hagihara K, Kishimoto T, Yoshizaki K, Nishimoto N. Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor (VEGF) production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003 (in press).
2. 学会発表
- 1) Nishimoto N,: Anti-interleukin-6 therapy of rheumatoid arthritis. 11th International Rheumatology Symposium. Kobe, Japan. 2002.04.22-24
 - 2) Nishimoto N, Maeda K, Kuritani T, Deguchi H, Sato B, Imai N, Kakehi T, Suemura M, Kishimoto T, Yoshizaki K,: Safety and efficacy of repetitive treatment with humanized anti-interleukin- 6 receptor antibody in rheumatoid arthritis. 6th International Symposium on the Immunotherapy. Limassol, Cyprus. 2002. 05.15 -19
 - 3) Yoshizaki K, Nishimoto N, Kishimoto T,: New therapeutic strategy by the way of interleukin 6 (IL-6) blocking with humanized anti IL-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis, a hyper IL-6 syndrome. 26th International Congress of Internal

Medicine. Kyoto. 2002.05.27

- 4) Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Hashimoto J, Azuma J, Kishimoto T,: A multi-center, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of humanized anti-interleukin-6 (IL-6) receptor monoclonal antibody (MRA) in rheumatoid arthritis (RA) (Oral). 66th National Annual Scientific Meeting of American Colloge of Rheumatology. New Orleans, USA. 2002.10.25-29
- 5) Nishimoto N, Nakahara H, Yoshizaki K,: Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy normalized serum vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with rheumatoid arthritis (RA). 66th National Annual Scientific Meeting of American Colloge of Rheumatology. New Orleans, USA. 2002.10.25-29
- 6) Nishimoto N, Kanakura Y, Aozasa K, Johkoh T, Nakano N, Nakamura M, Ikeda Y, Sasaki T, Nishioka K, Hara M, Taguchi H, Kimura Y, Kato Y, Kishimoto T, Yoshizaki K,: Improvement of wasting by treatment with a humanized anti-interleukin-6 receptor (IL-6R) monoclonal antibody, MRA in multicentric Castleman's disease, a phase II clinical trial of 28 patients. 44th Annual Meeting of the American Society of Hematologists. Philadelphia, USA. 2002.12.06-10
- 7) Yoshizaki K, Kanakura Y, Aozasa K, Johkoh T, Nakamura M, Kodama F, Kumagai S, Asaoku H, Kishimoto T, Nishimoto N,: A dose finding study of a humanized anti-interleukin-6 receptor (IL-6R) monoclonal antibody, MRA in multicentric Castleman's disease. 44th Annual Meeting of

the American Society of Hematologists. Philadelphia, USA. 2002.12.06-10

- 8) 西本憲弘、中原英子、萩原圭祐、吉崎和幸,: 多剤抵抗性 RA、アミロイドーシス合併 RA に対するヒト型化抗 IL-6 レセプター抗体治療. 第 46 回日本リウマチ学会. 神戸・神戸国際会議場. 2002.04.22-24
- 9) 西本憲弘,:IL-6 の病態意義と IL-6 阻害による治療的意義.日血・臨血合同シンポジウム. 2002.09
- 10)西本憲弘,:IL-6 を標的分子とする骨髄腫・Castleman 病の治療法の開発. 第 64 回日本血液学会・第 44 回日本臨床血液学会. 横浜・パシフィコ横浜. 2002.09.12-15

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

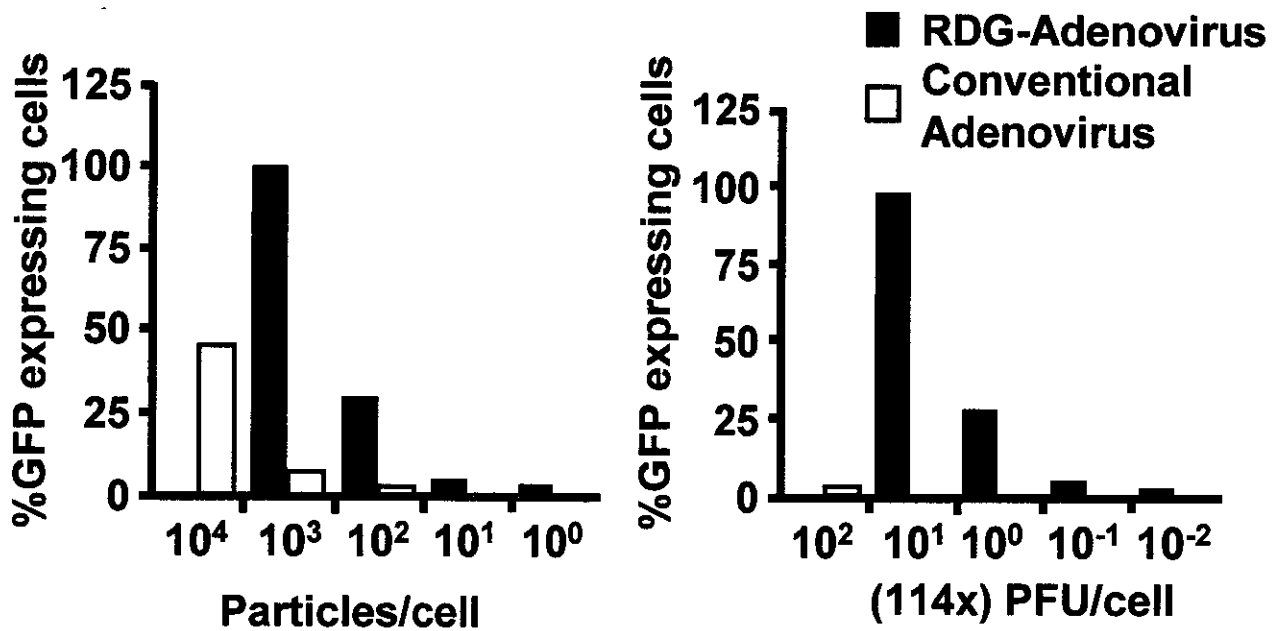


図1.RGD修飾アデノウイルスベクターと従来型アデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率の比較
 RGD修飾アデノウイルスはS6B45ヒトミエローマ細胞株への遺伝子導入を著しく増強した。

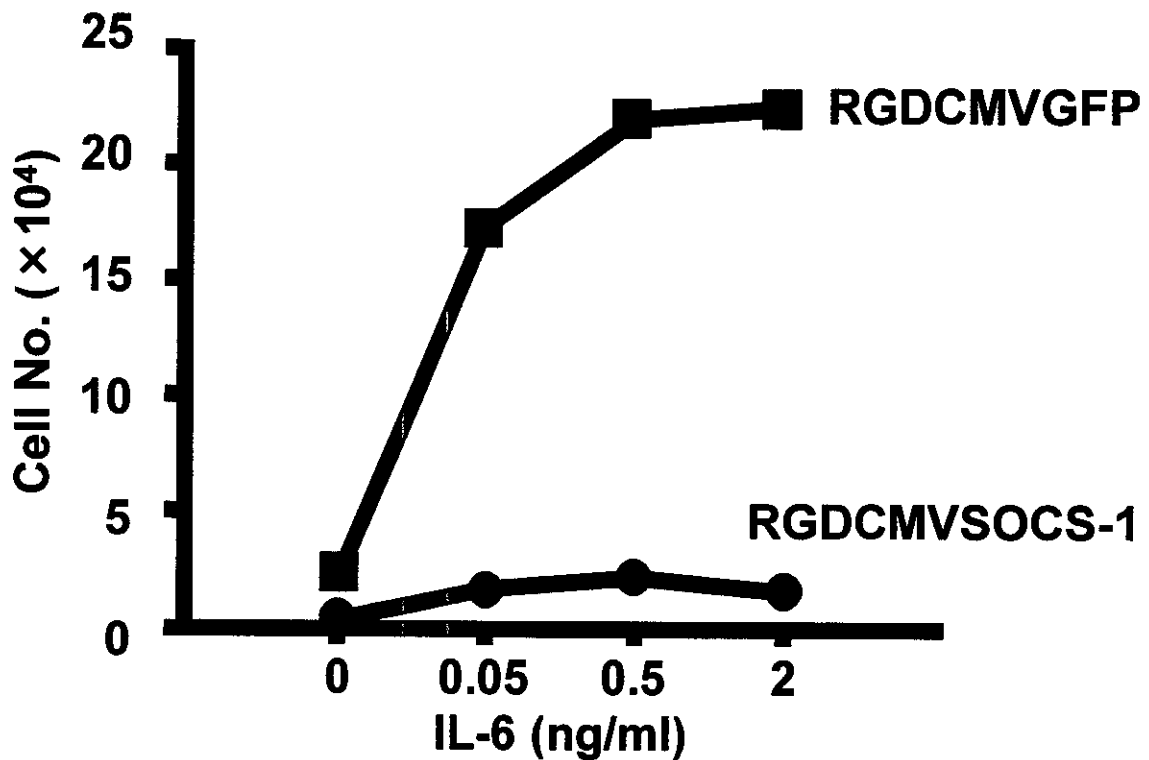


図2.SOCs-1遺伝子導入によるIL-6依存性細胞増殖の抑制
 RGD修飾アデノウイルスベクターを用いSOCs-1遺伝子を導入することによりIL-6依存性細胞の増殖は抑制された。

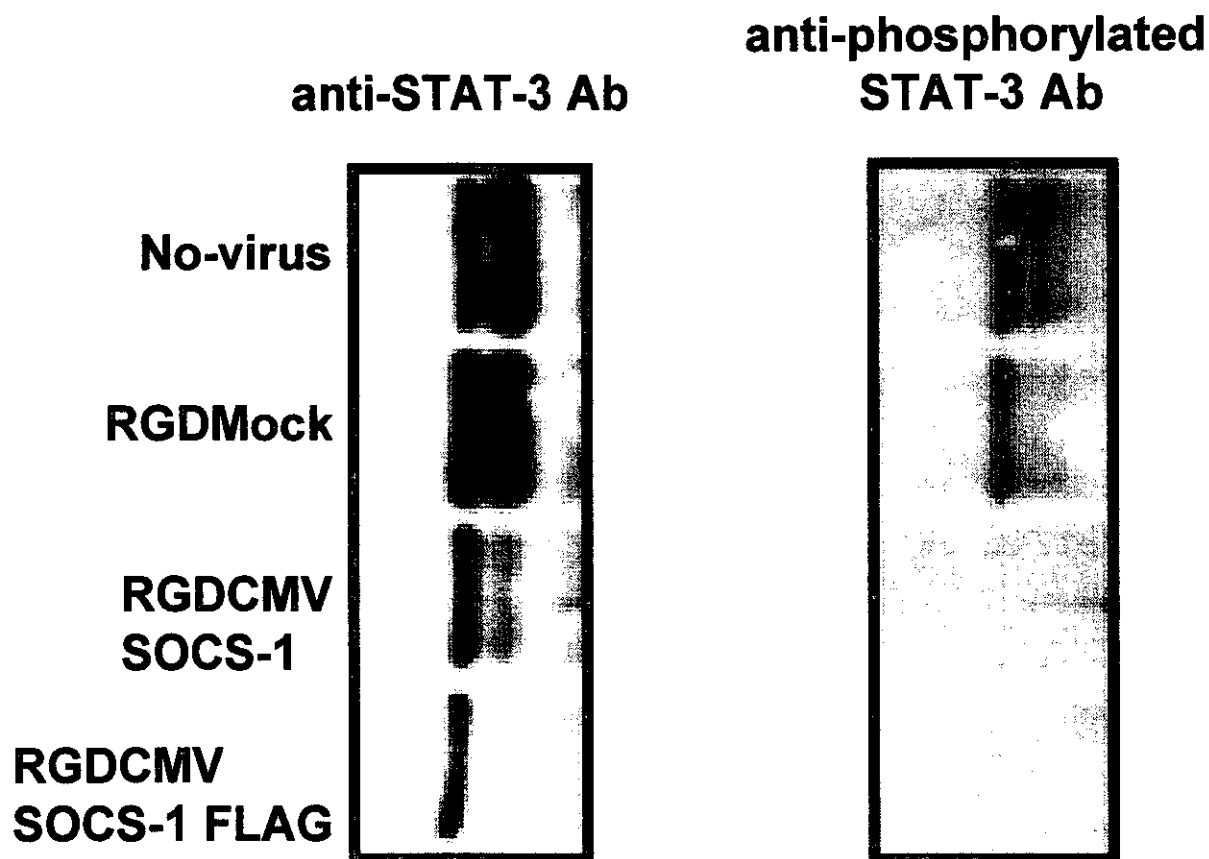


図3.SOCS-1遺伝子導入によるSTAT3リン酸化の抑制

RGD修飾アデノウイルスベクターを用いたSOCS-1遺伝子導入によりIL-6によるSTAT3のリン酸化が抑制された。

新しい抑制性シグナリングシステム CD47/SHPS-1 系の自己免疫疾患における機能解析に関する研究

分担研究者 野島美久 群馬大学 医学部 第3内科 教授

研究要旨 イムノグロブリンスーパーファミリーに属する2つの受容体型分子CD47とSHPS-1が免疫系においてレセプターリガンド関係を形成し、ともに抑制性のシグナル伝達分子として機能する事を明らかにしつつある。今回、CD47/SHPS-1 シグナル系の免疫系における生理的および病態的意義を解析する目的から、マウスのリンパ組織におけるCD47 および、SHPS-1 分子の発現に関し組織学的検討を行った。SHPS-1 knock-in マウスの脾臓は BXS マウスに類似した組織構造を有し、HE 染色で赤脾髄に巨核を有する細胞が出現し赤脾髄の細胞密度の増加が認められた。OVA を免疫した BALB/c マウスの脾臓において CD47 分子は、赤脾髄、白脾髄を構成する細胞に広範囲にわたり発現が認められた。SHPS-1 分子は赤脾髄に分布する細胞に加え、胚中心内に散見され、2次濾胞辺縁にも陽性細胞が認められた。以上、CD47 分子は脾臓内に広範囲に、また SHPS-1 分子は、2次濾胞周囲と胚中心部に存在し抗体産生等を含めT、B細胞の活性化に関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

自己免疫疾患の病因、病態の解析においてこれまで、B細胞やT細胞の活性化過程に関する広く研究されてきたが、最近では、活性化細胞を除去する過程で利用されるアポトーシスの研究が進み、自己免疫疾患の発症には細胞活性化過程の障害に加え、活性化細胞の除去過程の障害も重要な役割を果たす事が証明されている。

さらに、細胞質内に ITIM(Immunotyrosine Based Inhibitory Motif)と呼ばれる共通のアミノ酸配列を有する抑制性のシグナル伝達を行う受容体型膜タンパク質の解析が進んでおり、このような受容体タンパク質に属する PD-1 や、Fc γ RIIb の遺伝子欠損マウスにおいて、自己免疫疾患発症の感受性が増強することから、膠原病の病態形成における抑制性受容体の重要性が増している。

私共が最近発見した SHPS-1 は細胞内領域に Fc γ RIIb やPD-1と同様 ITIMモチーフを有する分子で、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する新しい受容体型の分子である。SHPS-1 は組織普遍的に発現

が認められるものの、マクロファージ等の単核球において特に高い発現を認める分子で、細胞内のチロシンがリン酸化を受ける事により脱リン酸化酵素である SHP-1、SHP-2 が会合する分子である。

SHPS-1 の細胞外領域と生理的な結合を示す CD47 分子は SHPS-1 と同様にイムノグロブリンスーパーファミリーに属する分子であり血球細胞をはじめ上皮細胞に広く発現の認められるタンパク質である。

SHPS-1 の抑制性機能に関しては、赤血球が脾臓内においてマクロファージにより貪食される過程において、赤血球に発現する CD47 分子が SHPS-1 を介してマクロファージの貪食能を抑制していることはすでに証明されており、また、我々のグループにおいても血小板が消費される過程においてマクロファージ上の SHPS-1 が CD47 を介し負の制御を受けている事実を確認している。

サイトカイン産生に関しては、ヒトの骨髄由来の樹状細胞において細胞表面上の SHPS-1 を刺激されることにより TNF や IL-12 などのサイトカイン産生を抑制する事も示されており、SHPS-1 分子が免疫系で抑

制性に機能することが判明しつつある。

CD47 分子は細胞内のシグナル伝達系に不明な事が多いが、ヒト T 細胞上の CD47 分子が刺激されることにより細胞死が誘導されることや IL-2 の産生障害により T 細胞のアナジーを誘導する事なども判明しつつある。

この様に SHPS-1 と CD47 分子はレセプターリガンド関係を形成しながら免疫系においてともに抑制性に機能することが想定され、自己免疫疾患発症においても重要な分子として機能している事も予想される。

そこで本研究では SHPS-1/CD47 シグナル系の免疫応答における生理的機能を明らかにするとともに、SHPS-1 の細胞内領域を欠損させたマウス (SHPS-1knock-in mouse) 等を用いる事により、自己免疫性疾患との関連を明らかにすること目標とした。

B. 研究方法

本年度において、CD47/SHP-1 シグナル系の生理的機能の解析および、自己免疫疾患との関連を明らかにするためマウス及びヒト組織における CD47, SHPS-1 分子の組織学的解析を以下の項目について行った。

1. CD47, SHPS-1 分子のマウスリンパ組織内における発現の検討。

抗原特異的 T 細胞の機能獲得にはリンパ組織での T 細胞と樹状細胞との相互作用が重要な要素を占めているが、これまで CD47 分子や SHPS-1 分子のリンパ組織における発現は解析されていない。今回我々は、CD47, SHPS-1 分子のマウス脾臓内の発現を検討するために以下の実験を行った。6 週齢の BALB/c マウスを OVA で CFA とともに免疫し、脾臓内に 2 次濾胞を形成させ SHPS-1、CD47 陽性細胞の分布を白脾髄、赤脾髄を含め検討した。胚中心の同定や、T、B 細胞の分布は抗 B220 抗体、抗 CD4、抗 CD8 抗体などを使用し二重染色することにより確定した。

2. SHPS-1 Knock-in マウス脾臓の組織学的検討。
SHPS-1 がマクロファージに高く発現し赤血球の処理

に関する分子である事はこれまで明らかになっているので、今回我々は 11 週齢の SHPS-1 Knock-in マウスの脾臓のヘマトキシリンエオシン染色を行い、組織学的検討を行った。

C. 研究結果

1. OVA を免疫した BALB/c マウスの脾臓において CD47 分子は、赤脾髄、白脾髄を構成する細胞に広範囲にわたり発現が認められた。SHPS-1 分子は赤脾髄に分布する細胞に加え 2 次濾胞内に散見され、濾胞辺縁にも SHPS-1 陽性細胞の分布が認められた。

2. SHPS-1knock-in マウスの脾臓は HE 染色により、脾臓内の特に赤脾髄を中心に、細胞密度の増加が認められた。また、巨核を有する細胞が赤脾髄に散見され、このような組織学的特徴は自己免疫疾患のモデルマウスである BXSB マウスに類似する所見であることが確認された。

D. 考察

1. CD47 分子はこれまでマクロファージを含め多くの血球系細胞に発現するとされているが、今回の我々の組織染色においても脾臓内において広範囲に CD47 陽性細胞の分布が確認された。今回の免疫組織染色で、SHPS-1 陽性細胞の存在が赤脾髄に加え、2 次濾胞内や濾方の辺縁部に認められたことは、CD47/SHP-1 シグナル系が脾臓内において単に赤血球の処理過程に関与するばかりでなく、T、B 細胞の活性化に関与する可能性を示すものであると考えられた。

2. SHPS-1 Knock-in mouse の脾臓の細胞成分が赤脾髄を中心に増加し、自己免疫疾患発症のモデルマウスである BXSB マウスの脾臓に類似した組織学的構造を呈する事から、CD47/SHP-1 シグナル系の生理的および病的免疫応答に関与する可能性が示唆された。

E. 結論

1. マウスの脾臓内において CD47 分子は赤脾髄、白

脾髄を含め広範囲に発現が認められ、SHPS-1 分子は2次濾胞内と濾胞周辺に存在することが確認された。

2. SHPS-1 分子の細胞内シグナルを遮断されたマウスでは、脾臓の細胞密度の増加が生じ自己免疫疾患のモデルマウスに類似する所見を呈することが確認された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka T, Kuroiwa T, Ikeuchi H, Ota F, Kaneko Y, Ueki K, Tsukada Y, McInnes IB, Boumpas DT, Nojima Y. Human platelets stimulate mesangial cells to produce monocyte chemoattractant protein-1 via the CD40/CD40 ligand pathway and may amplify glomerular injury. *J Am Soc Nephrol* 13:2488-96, 2002.
2. Maeshima A, Maeshima K, Nojima Y, Kojima I: Involvement of Pax-2 in the action of activin A on tubular cell regeneration. *J Am Soc Nephrol*, 13: 2850-2859, 2002.

2. 学会発表

1. Ota F, Maeshima A, Yamashita S, Ikeuchi H, Kuroiwa T, Kojima I, Nojima Y. Activin A is a potent inducer of cell proliferation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *ACR Annual Meeting, New Orleans, 2002*
2. Maeshima A, Yamashita S, Ota F, Kojima I, Nojima Y. Activin A is a survival factor for metanephric mesenchymal cells. *ASN Annual Meeting, Philadelphia, 2002*

H. 知的財産権の出願・登録

該当なし

免疫賦活化シグナルを伝達する T 細胞共刺激分子 ICOS/GL50 シグナル系の機能異常と自己免疫制御に関する研究

分担研究者 針谷正祥 東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 講師

研究協力者 原まさ子 東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 教授

研究要旨 A.研究目的 inducible costimulator (ICOS)は近年同定された副刺激分子で、CD28 ファミリーに属している。これまでに我々は全身性エリテマトーデス(SLE)末梢血リンパ球における ICOS の発現を検討し、CD4⁺CD45RO⁺T 細胞および CD8⁺CD45RO⁺T 細胞における ICOS の発現は活動期 SLE で健常人に比較して亢進していることを見出した。本研究では SLE 末梢血リンパ球における ICOS の機能を同じファミリー分子である CD28 と比較し、病態形成における ICOS の役割を明らかにすることを目的とした。B.方法 活動期 SLE 患者 17 例、非活動期 SLE 患者 17 例、健常人 14 例を対象とした。末梢血 T 細胞の刺激は、固相化抗 CD3 抗体+固相化抗 ICOS 抗体(抗 CD3+抗 ICOS)または固相化抗 CD3 抗体+液相抗 CD28 抗体(抗 CD3+抗 CD28)により行った。細胞増殖能は ³H-thymidine の取り込みにより測定した。培養上清中のサイトカイン、IgG、抗二本鎖 DNA 抗体(抗 dsDNA 抗体)は ELISA 法にて測定した。C.結果 (1)無刺激にて末梢血 T 細胞を 72 時間培養時の ³H-thymidine の取り込みは活動期 SLE で非活動期 SLE および健常人に比較して有意に高値を示した。抗 CD3+抗 ICOS 刺激、抗 CD3+抗 CD28 刺激のいずれも、活動期 SLE、非活動期 SLE、健常人の T 細胞増殖反応を誘導した。非活動期 SLE ではいずれの刺激に対する T 細胞増殖反応も健常人に比較して有意に高値を示した。活動期 SLE では一部の患者が低反応性を示し、他の 2 群との間に有意差を認めなかった。(2)無刺激にて末梢血 T 細胞を 72 時間培養時の IFN- γ 産生能は活動期 SLE で非活動期 SLE および健常人に比較して有意に高値を示した。抗 CD3+抗 ICOS 刺激、抗 CD3+抗 CD28 刺激のいずれも、活動期 SLE、非活動期 SLE、健常人の T 細胞 IFN- γ 産生を誘導した。活動期 SLE、非活動期 SLE ともに抗 CD3+抗 ICOS 刺激による IFN- γ 産生は健常人よりも有意に高値を示した。非活動期 SLE では抗 CD3+抗 CD28 刺激による IFN- γ 産生は健常人よりも有意に高値を示した。(3) SLE 患者末梢血リンパ球より T 細胞、B 細胞をそれぞれ分離し、1:1 の細胞数比で再構成培養を行った。無刺激、抗 CD3+抗 CD28 刺激、抗 CD3+抗 ICOS 刺激の 3 種類の条件下で培養し、7 日後の上清中の抗 dsDNA 抗体および total IgG を測定した。無刺激、抗 CD3+抗 CD28 刺激に比較して、抗 CD3+抗 ICOS 刺激により抗 dsDNA 抗体産生量の有意な増加を認めた。D.考察 今回私達が使用した *in vivo* の刺激条件下では、抗 CD3+抗 ICOS 刺激、抗 CD3+抗 CD28 刺激のいずれにおいても特に非活動期 SLE 患者 T 細胞の反応性が ³H-thymidine の取り込みおよび IFN- γ 産生の両者において亢進していることが示された。これらのデータは SLE 患者 T 細胞の過剰反応性を示唆するものと考えられる。ICOS が抗 dsDNA 抗体産生を誘導した実験結果から、ICOS と CD28 分子の SLE 病態形成における機能の相違が示唆された。E..結論 ICOS は SLE 患者末梢血 T 細胞の増殖あるいは IFN- γ 産生に関与すると共に、抗 dsDNA 抗体産生を誘導することにより SLE の病態に関与すると考えられる。今後、ICOS の下流のシグナル伝達機構を解明し、SLE への関与を明らかにする予定である。

A. 研究目的

inducible costimulator (ICOS)は近年同定された副刺激分子で、CD28 ファミリーに属している。ICOS は活性化 T 細胞に発現誘導される I 型の膜蛋白でヒトでは 199 アミノ酸から構成される。抗 CD3 抗体と抗 ICOS 抗体を用いて T 細胞を刺激すると、T 細胞は活性化され、増殖・サイトカイン産生などが誘導される。これまでに我々は自己免疫疾患のプロトタイプである全身性エリテマトーデス(SLE)末梢血リンパ球にお

ける ICOS の発現を検討してきた。その結果、CD4⁺CD45RO⁺T 細胞および CD8⁺CD45RO⁺T 細胞における ICOS の発現は活動期 SLE で健常人に比較して亢進していることを見出した。本研究では SLE 末梢血リンパ球における ICOS の機能を同じファミリー分子である CD28 と比較し、病態形成における ICOS の役割を明らかにすることを目的とした。

B.方法

活動期 SLE 患者 17 例、非活動期 SLE 患者 17 例、

健常者14例を対象とした。末梢血よりリンパ球を分離し、negative selectionによりT細胞をpositive selectionによりB細胞を精製した。T細胞の刺激は、固相化抗CD3抗体+固相化抗ICOS抗体(抗CD3+抗ICOS)または固相化抗CD3抗体+液相抗CD28抗体(抗CD3+抗CD28)により行った。細胞増殖能は³H-thymidineの取り込みにより測定した。培養上清中のサイトカイン、IgG、抗二本鎖DNA抗体(抗dsDNA抗体)はELISA法にて測定した。

C. 結果

(1)末梢血T細胞のICOS刺激に対する増殖反応 抗CD3+抗ICOS刺激により健常人末梢血T細胞を刺激すると、有意な³H-thymidineの取り込み増加が認められた。Wartmaninの添加によりこの取り込みは著明に抑制され、抗CD3+抗ICOS刺激経路へのphosphatidylinositol 3-kinase (PI3 kinase)の関与が示された。無刺激にて末梢血T細胞を72時間培養時の³H-thymidineの取り込みは活動期SLEで非活動期SLEおよび健常人に比較して有意に高値を示した。抗CD3+抗ICOS刺激、抗CD3+抗CD28刺激のいずれも、活動期SLE、非活動期SLE、健常人のT細胞増殖反応を誘導した。非活動期SLEではいずれの刺激に対するT細胞増殖反応も健常人に比較して有意に高値を示した。活動期SLEでは一部の患者が低反応性を示し、他の2群との間に有意差を認めなかった(図1)。

(2)末梢血T細胞のICOS刺激に対するinterferon- γ (IFN- γ)産生能 無刺激にて末梢血T細胞を72時間培養時のIFN- γ 産生能は活動期SLEで非活動期SLEおよび健常人に比較して有意に高値を示した。抗CD3+抗ICOS刺激、抗CD3+抗CD28刺激のいずれも、活動期SLE、非活動期SLE、健常人のT細胞IFN- γ 産生を誘導した。活動期SLE、非活動期SLEともに抗CD3+抗ICOS刺激によるIFN- γ 産生は健常人よりも有意に高値を示した。非活動期SLEでは抗CD3+抗CD28刺激によるIFN- γ 産生は健常人よりも有意に高値を示した(図2)。

(3)SLE末梢血T細胞の抗dsDNA抗体産生B細胞扶助能へのICOSの関与 SLE患者末梢血リンパ球よりT細胞、B細胞をそれぞれ分離し、1:1の細胞数比で再構成培養を行った。無刺激、抗CD3+抗CD28刺激、抗CD3+抗ICOS刺激の3種類の条件下で培養し、7日後の上清中の抗dsDNA抗体およびtotal IgGを測定した。無刺激、抗CD3+抗CD28刺激に比較して、抗CD3+抗ICOS刺激により抗dsDNA抗体産生量の有意な増加を認めた。Total IgGを測定し、抗dsDNA抗体/total IgGを検討したところ、抗dsDNA抗体と同様に抗CD3+抗ICOS刺激により上昇した。Inner wellを用いて、T細胞とB細胞を接触させない条件下で再構成刺激実験を行ったところ、抗CD3+抗ICOS刺激による抗dsDNA抗体産生増加

は認められず、抗CD3+抗ICOS刺激による抗dsDNA抗体産生亢進にはT細胞—B細胞間の接着が必要であることが示唆された。

D. 考察

SLE患者末梢血T細胞はT細胞受容体を介したシグナル伝達に異常があると報告されている。今回私達が使用したin vivoの刺激条件下では、抗CD3+抗ICOS刺激、抗CD3+抗CD28刺激のいずれにおいても特に非活動期SLE患者T細胞の反応性が³H-thymidineの取り込みおよびIFN- γ 産生の両者において亢進していることが示された。これらのデータはSLE患者T細胞の過剰反応性を示唆するものと考えられる。活動期SLE患者においては、生体内でT細胞が活性化状態にありin vivoでの再刺激に反応しにくいことが以前より示されている。今回活動期SLE患者において³H-thymidineの取り込みの亢進を認めなかったのは、かかるin vivoでの活性化によるものと考えられた。ICOSが抗dsDNA抗体産生を誘導した実験結果から、ICOSとCD28分子のSLE病態形成における機能の相違が示唆された。

E. 結論

ICOSはSLE患者末梢血T細胞の増殖あるいはIFN- γ 産生に関与すると共に、抗dsDNA抗体産生を誘導することによりSLEの病態に関与すると考えられる。今後、ICOSの下流のシグナル伝達機構を解明し、SLEへの関与を明らかにする予定である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) 未発表

2. 学会発表

Kawamoto M, Harigai M, Hara M, et al: Overexpression of inducible costimulator (ICOS) on peripheral blood T cells and its contribution to abnormal T cell function in patients with systemic lupus erythematosus. American College of Rheumatology, 64th Annual Scientific Meeting.

H. 知的財産権の出願・登録

特記事項なし

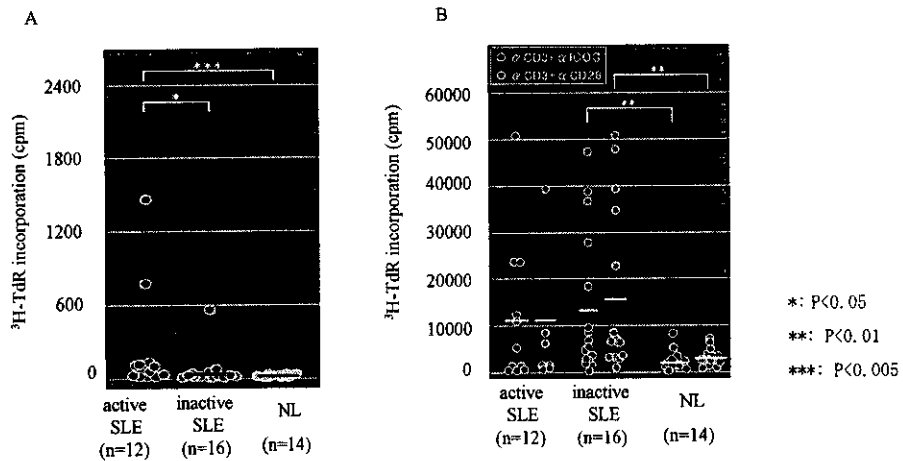


図1 末梢血 T 細胞の無刺激時および刺激時の ^3H -thymidine 取り込み能。A. 活動期 SLE、非活動期 SLE、健常人由来末梢血 T 細胞を無刺激にて 72 時間培養時。B. 活動期 SLE、非活動期 SLE、健常人由来末梢血 T 細胞を抗 CD3 抗体+抗 ICOS 抗体、抗 CD3 抗体+抗 CD28 抗体にて 72 時間刺激培養時。

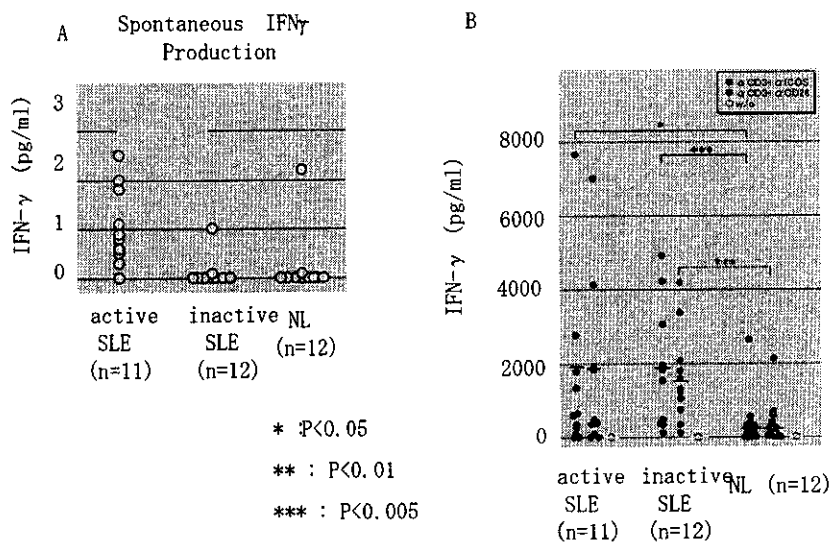


図2 末梢血 T 細胞の無刺激時および刺激時の IFN- γ 産生能。A. 活動期 SLE、非活動期 SLE、健常人由来末梢血 T 細胞を無刺激にて 72 時間培養時の IFN- γ 産生能。B. 活動期 SLE、非活動期 SLE、健常人由来末梢血 T 細胞を抗 CD3 抗体+抗 ICOS 抗体、抗 CD3 抗体+抗 CD28 抗体にて 72 時間刺激培養時の IFN- γ 産生能。

研究要旨

免疫難病におけるシグナル伝達異常を解明する目的で、本年度は核内癌関連分子群に焦点を当て、細胞外ストレスに対する細胞応答におけるこれらの分子群の機能解析を行った。その結果、細胞外ストレス(DNA 損傷ストレス)に対する細胞応答においては、癌遺伝子産物である Wip1 ホスファターゼ及び癌抑制遺伝子産物である Chk2 キナーゼ及び PML が重要な役割を担うことが明らかとなった。

A. 研究目的

本研究においては、膠原病を中心とする免疫難病における免疫細胞のシグナル伝達異常を、癌遺伝子産物である H-Ras, c-Myc, Wip1 (PPM1D), PML, Wnt5a 及び癌抑制遺伝子産物である Chk2 といった癌関連分子群に焦点を当てて解析し、免疫難病の病態と癌関連分子群の発現・機能の異常との関連を明らかにすることを目的とする。また、(免疫難病における)様々な細胞外ストレスに対する細胞応答における癌関連分子群の機能の解明も目指す。

B. 研究方法

様々な細胞外ストレスに対する細胞応答における癌関連分子群(Chk2, Wip1, PML)の機能解析を分子間相互作用に焦点を当てて行う。また、免疫系細胞株等の培養細胞を用い、遺伝子導入法、RNA 干渉法により癌関連分子の発現レベルを操作し、癌関連分子の発現動態・細胞機能との関連を詳細に解析する。さらに、膠原病罹患患者及び健常者由来の免疫細胞における一連の癌関連分子の発現動態を解析し、病態との関連を検討するとともに、focused プロテオーム解析を行い、癌

関連分子と共役する分子群についても比較検討を行う。

(倫理面への配慮)

本年度は患者由来の検体・遺伝子を用いる実験は行っておりません。

C. 研究結果

本年度の研究から、DNA 損傷ストレス時に ATM キナーゼにより Chk2 キナーゼがリン酸化、活性化され、細胞周期停止・アポトーシスの制御において重要な役割を担うこと、また DNA 損傷により誘導される Wip1 ホスファターゼが Chk2 と会合し、Chk2 を脱リン酸化し Chk2 を不活化するというフィードバック機構が存在することが示された。また、Chk2 の構成的発現によりアポトーシスが誘導されること、及び Wip1 は Chk2 と拮抗的に働き、Chk2 によるアポトーシスを抑制し細胞増殖をもたらすことを明らかにした。さらに、Chk2 (恐らくは Wip1 も)は核内 PML ボディーにも局在することを見出した。

D. 考察

本研究により、癌抑制遺伝子産物 Chk2 キナーゼと癌遺伝子産物 Wip1 ホスファターゼがストレス応答の制御において重要な役割を担うこと、また両分子が核内にお

いて拮抗的に働き、アポトーシス・細胞増殖を制御することが明らかとなり、両分子が免疫難病における細胞増殖・アポトーシスの制御において重要な役割を担う可能性が示唆される。また、核内構造体や核内ボディーの分子に対する自己抗体が免疫難病でしばしば見出されることが知られているが、Chk2, Wip1, PML は核内 PML ボディーに局在することが見出された。

E. 結論

本研究から、癌関連分子群 (Chk2, Wip1, PML) が細胞外ストレスに対する細胞応答において重要な役割を担うことが明らかとなった。今後、免疫難病における上記の分子をはじめとする癌関連分子群の動態・機能解析を行うことにより、これらの分子と免疫難病との関連が明らかになることが期待される。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Iida, T., Mine, S., Fujimoto, H., Suzuki, K., Minami, Y., and Tanaka, Y.: Hypoxia-inducible factor-1 α induces cell cycle arrest of endothelial cells. *Genes to Cells* 7: 143-149, 2002.

Iwai, K., Oishi, I., Xu, X-Z., Minami, Y., and Yamamura, H.: Physical interaction of Dmnk protein and mRNA with Orb protein: implication in the regulated localization of Orb by Dmnk during oogenesis and embryogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290: 225-229, 2002.

Tanaka, Y., Nakayamada, S., Fujimoto, H., Okada, Y., Umehara, H., Kataoka, T., and Minami, Y.: H-Ras/Mitogen-

activated protein kinase pathway inhibits integrin-mediated adhesion and induces apoptosis in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* 277: 21446-21452, 2002.

Yoneda, O., Imai, T., Nishimura, M., Miyaji, M., Mimori, T., Okazaki, T., Domae, N., Fujimoto, H., Minami, Y., Kono, T., Bloom, E. T., and Umehara, H.: Membrane bound form of fractalkine induces IFN- γ production by NK cells. *Eur. J. Immunol.* 33: 53-58, 2003.

Yoda, A., Oishi, I., and Minami, Y.: Expression and function of the Ror-family receptor tyrosine kinases during development: lessons from genetic analyses of the nematodes, mice, and human. *J. Receptor and Signal Transduction*, 2003, in press.

藤本浩子、加藤菜穂子、依田成玄、南康博: DNA 損傷応答における Chk2 キナーゼの機能及び Chk2 の異常と悪性腫瘍の関連: 放射線生物研究、37 (3), 289-298, 2002.

2. 学会発表

加藤菜穂子、藤本浩子、松村直樹、近藤健、依田成玄、大石勲、南康博: 悪性リンパ腫細胞株における DNA 損傷応答に関与する癌遺伝子及び癌抑制遺伝子の発現動態及び発現制御機構、第 25 回日本分子生物学会年会。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 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

SLE リンパ球における免疫シグナル異常と病態への関連性に関する研究

分担研究者 田中 良哉 産業医科大学 医学部 第一内科学講座 教授

研究要旨 全身性エリテマトーデス SLE の病態形成過程には、サイトカインと細胞表面抗原を介する細胞間相互作用による Th2 細胞依存性/非依存性の B 細胞ポリクローナル活性化と自己抗体の過剰産生を中心とした免疫異常が関与する。本研究では、SLE 患者リンパ球の細胞活性化や細胞間相互作用に機能する標的分子の発現を検討し、B 細胞活性化の機序を解明した。その結果、SLE 患者 B 細胞、特に IL-4 産生性 B_{RO2} 細胞は、Th2 サイトカインと CD40-CD40L を介する直接経路を介して活性化され、細胞死から免れて残存する事が示唆された。また、Th2 サイトカイン産生性サブセットの細胞特性に基づく質的異常により B 細胞活性化が齎されるものと考えられた。さらに、疾患活動性が高い SLE 症例に於いて、IL-2 等のサイトカイン刺激により活性化されたリンパ球では、多剤耐性遺伝子 MDR-1 の転写を介した P 糖蛋白質が発現し、治療不応性を齎す事が示された。今後、SLE のリンパ球の異常を齎す免疫シグナル異常に関与する分子群の特定を急ぎ、細胞レベル、動物レベルで基礎的エビデンスの蓄積を行い、研究者を主導とした免疫難病の新規治療法の開発を行う。

A. 研究目的

SLE は代表的な全身性自己免疫疾患であるが、免疫異常と炎症病態の制御を目的として、免疫担当細胞を標的としたステロイド薬等による薬物療法が治療の中心をなす。しかし、SLE の治療の過程に於いて、疾患活動性が高く薬剤不応性を呈する際には、生命的予後に直結する故に重大な問題である。しかし、如何なるシグナル異常が斯様な機序を齎し、その克服手段として有用かに関しては不詳であった。

SLE の病態形成過程では、自己反応性 T 細胞などの免疫担当細胞が集積して、B 細胞のポリクローナル活性化と自己抗体の過剰産生を中心とした免疫応答を司り、Th2 依存性の病態が展開される。疾患活動性の高い SLE 患者では、活性化されたリンパ球より過剰に産生される自己抗体とそれによる免疫複合体が介在した III 型アレルギー病態が齎される。その結果、接着分子やケモカインの発現誘導を介して細胞間相互作用を増強し、免疫担当細胞の組織内への遊出、組織内での抗原提示細胞による T 細胞の活性化や B 細胞の IL-4 等のサイトカイン産生を誘導し、

炎症病態の形成と遷延化に関与する。さらに、活性化リンパ球に於いて、多剤耐性遺伝子 MDR-1 の表現型として細胞膜に発現する P 糖蛋白質による薬物細胞外排出促進作用が亢進しているとの予備的成績を得た。MDR-1 は、第7染色体上に存在する P 糖蛋白質の責任遺伝子である。MDR-1 遺伝子上流域には、転写活性に必須な Y ボックスが存在し、NF- κ B と YB-1 が特異的転写因子として結合する。YB-1 は、抗癌剤投与や紫外線照射によって核内に移行し、転写活性を発揮する。

本研究では、細胞レベルでの基礎的研究に於いてサイトカイン産生性リンパ球とその表面に発現する細胞活性化や細胞間相互作用に機能する最適の標的分子を探索する。また、サイトカイン等によるリンパ球活性化、並びに、疾患活動性の高い SLE 患者リンパ球における MDR-1 転写を介する薬剤不応性誘導に関して検討した。

B. 研究方法

健常人、及び、疾患活動性の高い SLE 患者末梢血