

20030674

厚生労働科学研究研究費補助金
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

平成15年度 総括・分担研究報告書

平成16年 3月

主任研究者 田中 良哉

【目 次】

I	構成員名簿	1
II	総括研究報告	
	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 田中 良哉 (産業医科大学 医学部 第一内科学講座)	3
III	分担研究報告	
1	細胞活性化シグナルにおけるlipid raft-スフィンコ脂質の機能解析に関する研究 梅原 久範 (京都大学大学院医学研究科 内科学講座 臨床免疫)	11
2	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 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)	15
3	膠原病における免疫寛容シグナル異常に関する研究 坂口 志文 (京都大学再生医科学研究所 生体機能調節学分野)	18
4	膠原病における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 高柳 広 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 分子細胞機能学)	22
5	全身性エリテマトーデスに認められるTCRと鎖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)	25
6	慢性関節リウマチ血清による好中球L-セレクチンsheddingに関与する細胞内シグナル伝達経路に関する研究 田村 直人 (順天堂大学 医学部 膠原病内科)	28
7	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 (大阪大学大学院生命機能研究科 免疫制御学講座)	30
8	新しい抑制性シグナルリグナンシステムCD47/SHPs-1系の自己免疫疾患における機能解析 野島 美久 (群馬大学大学院医学系研究科 生体統御内科)	34
9	全身性エリテマトーデス末梢血T細胞における共刺激分子シグナル異常に関する研究 針谷 正祥 (東京医科歯科大学 医学部 臨床試験管理センター)	36
10	免疫難病における癌関連遺伝子産物の動態 機能解析に関する研究 南 康博 (神戸大学大学院医学系研究科 ゲノム科学講座)	40
11	SLEリンパ球における免疫シグナル異常に関する研究 田中 良哉 (産業医科大学 医学部 第一内科学講座)	42
IV	研究成果の刊行に関する一覧表	47
V	研究成果の刊行物 別刷	57

【 I 】構成員名簿

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）

「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」構成員名簿

区分	氏名	所 属	職 名
主任研究者	田中 良哉	産業医科大学 医学部 第一内科学講座	教授
分担研究者	梅原 久範	京都大学大学院医学研究科 内科学講座 臨床免疫	助教授
	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
	坂口 志文	京都大学再生医科学研究所 生体機能調節学分野	教授
	高柳 弘	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 分子細胞機能学	教授
	竹内 勤	埼玉医科大学総合医療センター 第二内科	教授
	田村 直人	順天堂大学 医学部 膠原病内科	講師
	西本 憲弘	大阪大学大学院生命機能研究科 免疫制御学講座	教授
	野島 美久	群馬大学大学院医学系研究科 生体統御内科	教授
	針谷 正祥	東京医科歯科大学 医学部 臨床試験管理センター	助教授
	南 康博	神戸大学大学院医学系研究科 ケノム科学講座	教授

【Ⅱ】総括研究報告

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(H14-免疫-016)

主任研究者 山中良哉 産業医科大学 医学部第一内科学講座 教授

分担研究者 梅原久範 京都大学大学院医学研究科内科学講座 臨床免疫助教授
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
坂口志文 京都大学再生医科学研究所 生体機能調節学分野教授
高柳 弘 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科特任教授
竹内 勤 埼玉医科大学総合医療センター第二内科教授
田村直人 順天堂大学医学部膠原病内科講師
西本憲弘 大阪大学大学院生命機能研究科免疫制御学講座教授
野島美久 群馬大学大学院医学系研究科生体統御内科教授
針谷正祥 東京医科歯科大学医学部臨床試験管理センター助教授
南 康博 神戸大学大学院医学系研究科ケノム科学講座教授

研究要旨

免疫難病である膠原病の病態形成に本質的に関与する免疫シグナルの異常な賦活化と免疫抑制性シグナルの欠損を究明し、免疫シグナル異常の是正という視点から疾患制御を迫ってきた。今年度は、代表的な膠原病である全身性エリテマトーデス(SLE)患者 T 細胞の T 細胞受容体(TCR)と共刺激分子を介するシグナルに焦点を絞り、賦活化シグナル、並びに、抑制性シグナルの異常に関与する分子、遺伝子を同定した。第一に、SLE 患者、及び、モデル動物に於いて、TCR 特異的シグナル分子 ZAP-70 遺伝子変異が自己免疫性関節炎を齎す原因遺伝子であること、TCR α 鎖の遺伝子変異が SLE 患者に特徴的に認められ、TCR を介するシグナル欠損を齎す事を明らかにし、制御性刺激シグナルの欠損か、自己反応性 T 細胞活性化を齎すことを解明した。さらに、斯様な抑制性シグナルの欠損は、SHPS-1 の制御、IGF- β 、Stat1 などにより回復する可能性が示唆された。第二に、SLE 患者 T 細胞では、インテグリン $\beta 1$ の質的・量的増強か、CD28 非依存性に共刺激シグナルの賦活化を齎し、CD40L の発現誘導、さらに、ラフト発現の増強などを介して自己反応性 T 細胞活性化や病態形成に寄与する事が示された。第三に、IL-6 を介するシグナルは自己免疫病態形成に於いて主要な役割を担うか、治療抵抗性血管炎症例に対して、ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体を使用し、有力な治療法の可能性が示された。以上、膠原病に於ける T 細胞のシグナル伝達異常の機序として、TCR の遺伝子変異による制御性刺激シグナルの欠損、並びに、共刺激系のシグナル異常活性化か、自己反応性 T 細胞活性化を齎し、膠原病を引き起こすことが解明された。今後、斯様な結果やコンセプトに基づき免疫シグナル異常の是正を目的として SLE 症例に対する新規治療軸の確立を目指す。

A 研究目的

免疫難病である膠原病は多臓器病変を特徴とする全身性自己免疫疾患である。代表的膠原病である全身性エリテマトーセス SLE たけても 6 万人余の特定疾患医療費受給者数を数え、患者総数と医療費支給額は増大の一途を辿る。しかし、免疫難病の治療は、ステロイド薬中心の副作用の多い非特異的免疫療法に終止し、長期予後や QOL の向上に繋がる治療法の開発は企上であり、病態解明と疾患特異的な新規治療開発は社会的にも急務である。

SLE の発症過程には、発症過程には自己反応性 T 細胞のシグナルの異常が関与する事が解明されてきた。これらの背景を踏まえ、本研究では、膠原病の病因や病態形成に本質的に関与する免疫シグナルの異常な賦活化、及び、免疫抑制性シグナルの機能異常を究明し、免疫シグナル異常の是正という視点から疾患制御を追求する事を目的とする。平成 14 年度には、膠原病の病態形成に於いて、CD40L 等の共刺激分子、IL-6 等のサイトカインを介する活性化シグナルの異常亢進、並びに、ICR と、 α 、TGF- β 、CD47 等の制御性シグナルの異常低下の存在が明らかになった。平成 15 年度は、SLE モデル動物の T 細胞の TCR と共刺激分子を介するシグナルに焦点を絞り、賦活化シグナル、並びに、抑制性シグナルの異常に関与する分子、遺伝子の同定を試みた。また、昨年度明らかにした IL-6 を介するシグナルを制御する事を目的として、血管炎を呈する難治性膠原病に IL-6R 抗体を投与するパイロットスタディの実践を開始した。

B 方法

膠原病の病因や病態形成に直接関与する自己免疫系シグナルの過剰賦活化、免疫抑制性シグナルの機能異常を同定する。その際、①リンパ球の細胞間相互作用を担う細胞間シグナル伝達分子の質的、量的異常 ②リンパ球の活性化、細胞死、サイトカイン産生などを担う細胞内シグナル伝達分子の質的、量的異常、③これらの異常に関与する細胞内外のシグナル伝達分子の蛋白質レベル、或は遺伝子レベルでの特定を行う。膠原病患者検体のみならず、基礎的エビデンスを確立するために、正常リ

ンパ球、リンパ系細胞株、動物モデルを用いた研究を実施する。さらに、治療に抵抗性の難治性血管炎症候群患者を対象にヒト化抗 IL-6 レセプター抗体による探索的治療研究を行った。大阪大学附属病院先進医療審査会の許可の下に、2例の患者にヒト化抗 IL-6 レセプター抗体 MRA を使用した。

(倫理面への配慮)

被験者およびその関係者の尊厳、人権および利益を保護することを目的とし、厚生科学審議会において作成された「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対するための指針」の中の第二群試料等提供者を対象とする。同審議会の手引きに沿って 1) 遺伝子の分析を行うこと、2) 研究協力の任意性と撤回の自由 3) 研究目的、4) 研究方法、5) 研究計画書等の開示試料提供者にもたらされる利益および不利益、6) 個人情報保護、7) 遺伝子解析結果の開示、8) 研究成果の公表、9) 研究から生じる知的財産権の帰属、10) 遺伝子解析研究終了後の試料等の取扱の方針、11) 費用負担に関する事項 12) 遺伝カウンセリングの体制のなどの点を具体的に説明し、同意を得る。また、研究分担者の所属機関の倫理委員会承認を得た研究に限定し、患者及び家族からインフォームドコンセントを得た上で、倫理委員会の規約を遵守し、所属機関の現有設備を用いて行う。患者の個人情報や所属機関外に漏洩せぬよう、試料や解析データは万全の安全システムをもって厳重に管理し、患者は、経済的負担を始め如何なる不利益も被らない事を明確にする。大阪大学における IL-6R 抗体の投与は、ヘルノキ宣言の精神を遵守し、患者ならびに保護者のインフォームドコンセントを得た上で、大阪大学附属病院先進医療審査会の許可のもとに治療を行った。一方、動物実験は、各動物実験施設指針等に則り、材料、モデルともに、動物愛護上の十分な配慮をもって行う。

C 結果

自己免疫疾患の発症には、免疫担当細胞のシグナル伝達異常による免疫自己寛容の破綻が関与し、その過程に於いて T 細胞受容体 (TCR) を介する抗原シグナルと細胞

膜共刺激分子シグナルの共存が中心的役割を担う。坂口は、ヒトのリウマチ様関節炎を自然発症する SKG マウスの疾患原因遺伝子を同定し、TCR 特異的シグナル分子 ZAP-70 の一塩基突然変異であることを突き止めた。また、トランスジェニックマウスを作製し、SKG マウスに正常 ZAP-70 遺伝子を発現させた結果、関節炎の発症は阻止された。さらに、SKG マウス T 細胞に於いて TCR を介して刺激した場合 TCR と鎖、ZAP-70, Lck, PLC- γ などのシグナル分子のチロシン酸化はすべて低下していた。この ZAP-70 遺伝子の異常は、胸腺における T 細胞の選択に異常をもたらした。その結果、関節炎発症能を持つ自己反応性 T 細胞が産生されると考えられた。以上より TCR を介するシグナル伝達に関与する細胞内シグナル分子である ZAP-70 遺伝子の変異の結果、T 細胞シグナルの異常、胸腺での T 細胞選択異常、関節炎発症性 T 細胞を誘導し、全身性自己免疫疾患が発症する可能性が示された。これらの結果は、ヒト膠原病の発症原因のひとつとしても ZAP-70 を介する TCR シグナル伝達異常が重要であり、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た。

竹内は、SLL 患者 T 細胞に TCR と鎖のエクソドンを欠く変異、及び、short 3'-UTR 変異を見出した。エクソドンは、TCR と鎖のシグナル伝達機能に必須の ITAM3 の、末端チロシン残基を含み、また TCR と鎖欠損マウス T 細胞ハイブリトーマ MA58 に、short 3'-UTR 変異を遺伝子導入すると TCR と鎖蛋白質と CD3 ϵ 鎖の発現を低下させ、これらの SLE に特徴的な TCR と鎖変異は TCR からの抑制性シグナル伝達に重大な欠損を及ぼすことが示唆された。これに対して、野島は、自己免疫性溶血性貧血におけるオプノン化赤血球脾臓内処理過程において、CD47/SHPs-1 シグナル系の脾臓内マクロファージに与える抑制性シグナルを解明した。また、駒形は、T 細胞において TGF- β を介するシグナルを阻害すると各種の自己免疫疾患類似の病態を示す事から、T 細胞特異的な TGF- β ノックアウトマウスを作成し、免疫抑制や免疫寛容の維持に於ける T 細胞産生 TGF- β の役割を検討した。

高柳は、免疫系の制御を介して種々の自己免疫疾患の原因に関与する Runx2 に対して、Stat1 は直接結合を介して抑制作用を有することを認め、治療応用への可能性を示した。以上より SLE の発症に関与する制御性シグナルの欠損は、SHPs-1 の制御 TGF- β Stat1 などにより回復する可能性が示唆された。

SLL の発症に於いて、自己反応性 T 細胞のシグナル賦活化には TCR 共刺激分子が関与する。田村、針谷、南は、この点を検討し、SLE の T 細胞では、代表的な共刺激分子である CD28 の減弱、乃至、消失、並びに、CD40L の量的、質的な増強を見出し、正常 T 細胞と異なる刺激伝達系の存在を示した。さらに、田中は、活動期 SLE の T 細胞に於いて、 β 1 インテグリンを介するシグナルが量的、質的に亢進し、CD40L 等の他の共刺激分子や IL-2 等の発現誘導を介して、共刺激分子として中心的役割を担うことが解明された。血管炎を伴う SLL に於ける VLA-1 の高発現を認めた竹内らの報告と併せ、 β 1-FAK を介する賦活化シグナルの亢進は、CD28 非依存性の共刺激として作用し、自己反応性 T 細胞の過剰な活性化、ルーフス腎炎などの臓器病変を齎す可能性が示された。梅原は、SLE 患者 T 細胞におけるラフトの集積、増強を明らかにし、TCR/共刺激を介するシグナル増強が裏付けられた。また、活性化 PKC theta は、TCR/CD28 への刺激を必要とせずに SLE 患者 T 細胞の共刺激分子シグナル伝達の下流に於いて、治療の標的遺伝子として、分子レベルでの修復、病態の正常化に有用と思われた。

一方、SLE の臓器障害は、T 細胞依存性に活性化された B 細胞より過剰に産生される自己抗体の沈着と免疫複合体による補体の活性化により齎される。IL-6 およびそれを介するシグナル伝達系は、自己反応性 T 細胞と抗体産生性 B 細胞の活性化の双方に必須である。西本は、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、抗 IL-6R 抗体により完全に抑制できる事を示し、血管炎の発症に於ける IL-6 の関与を明らかにし、関節リウマチやキャンスルマン病に対して、ヒト化 IL-6R 抗体が新しい治療法となり得ることを示した。これらの結果を踏まえ、膠原病の中でも特に難治性病態とされる治療抵抗性血管

炎の2症例に対して、ヒト化抗IL-6R抗体を使用し、種々のサイトカインの体内プロフィールやリンパ球サブセットの変化を解析、血管炎に対する治療効果の検討を行った。2症例ともヒト化抗IL-6R抗体(MRA)200mg/週を点滴静注使用した結果、血中IL-6の低下に伴い発熱、紅斑、皮膚潰瘍などの臨床症候、頸動脈の血流、CRP値の速やかな改善が得られた。治療によりIL-6の低下に加え、血中INF α の一時的増加もあった点より、IL-6阻害治療の効果は単に抗炎症作用によるのではなく血管炎の根本に作用している可能性が示され、IL-6阻害治療は血管炎を伴う難治性SLE等の膠原病の新しい治療法となりうることを示唆された。

D 考察

TCR特異的シグナル分子ZAP-70遺伝子の変異の結果、T細胞シグナルの異常、胸腺でのT細胞選択異常、関節炎若起性T細胞の産生がおき、その結果としてヒトの膠原病と酷似した病変が発症することか解明され、膠原病の発症原因のひとつとしてTCRシグナル伝達異常の重要性が示され、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た。また、SLE患者T細胞にTCRと鎖のエクソ7を欠く変異が見出され、TCRからの抑制性シグナル伝達に重大な欠損を及ぼす点か示された。さらに、斯様な抑制性シグナルの欠損は、SHPS-1の制御、TGF- β 、Stat1などにより回復する可能性が示唆された。

SLEの発症に於いて、自己反応性T細胞のシグナル賦活化には、ICR共刺激分子が関与するか、代表的な共刺激分子であるCD28の減弱とCD40L増強を見出し、正常T細胞と異なる刺激伝達系の存在を示した。これに対して、活動期SLEのT細胞では、 β 1-FAKを介する賦活化シグナルの亢進は、CD28非依存性の共刺激として作用し、CD40L等の他の共刺激分子の発現を誘導を介する自己反応性T細胞の過剰な活性化、ループス腎炎などの臓器病変の進展に寄与する可能性が示唆された。

一方、IL-6およびそれを介するシグナル伝達系は、自己反応性T細胞と抗体産生性B細胞の活性化の双方に必須であるか、西本は、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、抗IL-6R抗体により完全に抑制できる事を示した。さらに、治療抵抗性血管炎の2症例に対して、ヒト化抗IL-6R抗体を使用し、血中IL-6の低下に伴い発熱、紅斑、皮膚潰瘍などの臨床症候、頸動脈の血流、CRP値の速やかな改善が得られ、IL-6阻害治療は血管炎を伴う難治性SLE等の膠原病の新しい治療法となりうることを示唆された。

以上、膠原病の発症原因としてT細胞のシグナル伝達異常の機序としてT細胞のICRの遺伝子変異、共刺激系のシグナル異常活性化、並びに、制御性刺激シグナルの欠損か、自己反応性T細胞活性化を齎し、膠原病を引き起こすことか解明された。さらに、IL-6R抗体によるIL-6シグナル阻害は、難治性膠原病治療のプロトタイプとなる可能性が示唆された。

E 結論

平成15年度は、SLE患者、及び、モデル動物に於いてICR特異的シグナル分子ZAP-70遺伝子変異か自己免疫性関節炎を齎す原因遺伝子であること、TCRと鎖の遺伝子変異かSLE患者に特徴的に認められ、ICRを介するシグナル欠損を齎す事を明らかにし、制御性刺激シグナルの欠損か、自己反応性T細胞活性化を齎し、膠原病を引き起こすことを解明した。また、SLE患者自己反応性T細胞では、インテグリン β 1の質的、量的増強か、CD28非依存性に共刺激シグナルの賦活化を齎し、CD40LやIL-2等の発現誘導を介して、自己反応性T細胞活性化、ループス腎炎などの臓器病変に寄与する可能性が示された。一方、IL-6を介するシグナル伝達系は、自己免疫病態形成に於いて主要な役割を担うか、治療抵抗性血管炎の症例に対して、ヒト化抗IL-6レセプター抗体を使用し、臨床症候や検査成績が速やかに改善し、IL-6阻害治療は血管炎を伴う難治性SLE等の膠原病の最も有力な治療法となりうることを示唆された。以上、膠原病の発症原因としてT細胞のシグナル伝達異常の機序として、T細胞のTCRの遺伝子変異、共刺激系のシグナル異常活性化、並びに、制御性刺激シグナルの欠損か、自己反応性T細胞活性化を齎し、膠原病を引き起こすことか解明された。今後、斯様な結果やコンセプトに基づく免疫シグナル異常の

足元を目的として モデル動物や SLL 症例に対する新規治療軸の確立を目指している。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

(主任研究者)

田中良哉

- Nakavamada S, Fujimoto H, Okada Y, Umehara H, Kataoka T, Minami Y, Nakavamada S, Saito K, Fujii K, Yasuda M, Tamura M, Ianaka Y β 1 integrin-mediated signaling induces ICAM-1 and Fas and Fas-mediated apoptosis of rheumatoid synovial cells *Arthritis Rheum* (2003) **48**, 1239-1248
- Saito K, Nawata M, Nakavamada S, Iokunaga M, Tsukada J, Ianaka Y Successful treatment with anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) of life-threatening refractory systemic lupus erythematosus with renal and central nervous system involvement *Lupus* (2003) **12**, 798-800
- Nakavamada S, Okada Y, Saito K, Tamura M, Tanaka Y β 1 integrin/focal adhesion kinase-mediated signaling induces intercellular adhesion molecule 1 and receptor activator of nuclear factor κ B ligand on osteoblast and osteoclast maturation *J Biol Chem* (2003) **278** 45368-45374
- Nakano K, Okada Y, Saito K, Tanaka Y Fibroblast growth factor-2 induces receptor activator of nuclear factor kappa B ligand expression and osteoclast maturation by binding to heparan sulfate proteoglycan on rheumatoid synovial fibroblasts *Arthritis Rheum* (in press)

(分担研究者)

梅原久範

- Yoneda O, Inai I, Inoue H, Nishimura M, Minami Y, Bloom FT, Mimori T, Domae N, Umehara H Membrane bound form of fractalkine induces IFN-g production by NK cells A role for Th1 response *Liv Immunol* (2003) **33**, 53-58
- Chida Y, Itoh M, Kitano I, Kondo T, Umehara H, Ichikawa S, Hirabayashi Y, Holleran WM, Okazaki T Anthracycline resistance in HL-60/ADR cells via transcriptional up-regulation of glucosylceramide synthase and reversal by Sp1 (GC-rich) decoy oligodeoxynucleotides *J Biol Chem* (in press)
- Kawabata D, M Tanaka, I Fujii, H Umehara, Y Fujita, H Yoshifuji, T Mimori, S Ozaki Ameliorative effects of follistatin-related protein/TSC-36 on joint inflammation in a mouse model of arthritis *Arthritis Rheum* (2004) **50** 660-607

駒形嘉紀

- Kobari Y, Misaki Y, Setoguchi K, Zhao W, Komagata Y, Kawahata K, Iwakura Y, and Yamamoto K T cells accumulating in the inflamed joints of a spontaneous murine model of rheumatoid arthritis become restricted to common clonotypes during disease progression *Int Immunol* **16** 131-138, 2004

坂口志文

- Sakaguchi, N, Takahashi, T, Hata, H, Nomura, T, Tagami, T, Yamazaki, S, Sakihama, T, Matsutani, T, Negishi, I, Nakatsuru, S, and Sakaguchi, S Altered thymic I-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice *Nature* **426** 454-60, 2003
- Fehervari, Z, and Sakaguchi, S Development and function of CD25+CD4+ regulatory T cells *Curr Opin in Immunol* In press
- Sakaguchi, S The origin of FOXP3-expressing CD4+ regulatory T cells thymus or periphery *J*

Clin Invest 112 1310-1312, 2003

- Sakaguchi, S Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses *Ann Rev Immunol* In press
- Sakaguchi, S Taming transplantation by regulatory T cells *Nature Medicine* 9 1117-1118, 2003
- Hori, S, Takahashi, T, and Sakaguchi, S Control of autoimmunity by natural regulatory T cells *Adv Immunol* 81 329-369, 2003
- Sakaguchi, S Control of immune responses by naturally arising CD4+ regulatory T cells *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

高柳 広

- Koga T, Inui M, Inoue K, Kim S, Suematsu A, Kobayashi E, Iwata T, Ohnishi H, Matozaki T, Kodama T, Taniguchi T, Takayanagi H, Takai T ITAM-mediated costimulatory signals cooperate with RANKL for bone homeostasis *Nature* (2004) (in press)
- Urushibara, M*, Takayanagi H*, Koga T, Kim S, Isobe M, Morishita Y, Nakagawa T, Kurosawa H, Taniguchi T Antirheumatic drug, leflunomide, inhibits osteoclastogenesis by interfering with RANKL-stimulated induction of NFATc1 *Arthritis Rheum*(2004) (in press) *Equal contributors
- Kim, S, Koga, T, Isobe M, Kern BE, Yokochi T, Chin YE, Karsenty G, Taniguchi T, Takayanagi H

Stat1 functions as a cytoplasmic attenuator of Runx2 in the transcriptional program of osteoblast differentiation *Genes Dev* (2003)17, 1979-1991

竹内 勤

- Tsuzaka K, Ikuhara I, Setovama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe I, 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 and TCR-CD3 complex *J Immunol* 171 2496-2503, 2003
- 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

田村 直人

- Takaya M, Iamura 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* 13 220-6, 2003

西本 憲弘

- Nishimoto N, Yoshizaki K, Maeda K, Kuritani T, Deguchi H, Sato B, Imai N, Suemura M, Kakei T, Takagi N, Kishimoto T Toxicity, pharmacokinetics, and dose-finding study of repetitive treatment with the humanized anti-Interleukin 6 receptor antibody MRA in rheumatoid arthritis Phase I/II clinical study *J Rheum* 2003, 30 1426-1435
- Nakahara H, Song J, Sugimoto M, Haghara 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 48 1521-1529

- Nishimoto N, Yoshizaki K, Mivasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Iakeuchi I, Hashimoto J, Azuma J, Kishimoto T Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin 6 receptor antibody *Arthritis Rheum* (in press)
- Mihara M, Shima M, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto I, Akamatsu K Anti-interleukin-6 receptor antibody inhibits murine AA-amyloidosis *J Rheum* (in press)

野島美久

- Ota T, Maeshima A, Yamashita S, Ikeuchi H, Kaneko Y, Kuroiwa I, Hironura K, Ueki K, Kojima I, Nojima Y Activin A induces cell proliferation of fibroblast-like synoviocytes of rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 48 2442-2449, 2003
- Yamashita S, Maeshima A, Kojima I, Nojima Y Activin A is a potent activator for renal interstitial fibroblasts *J Am Soc Nephrol* 15 91-101, 2004

南康博

- Oishi I, Suzuki H, Oishi N, Takada R, Kami S, Ohkawara B, Koshida I, Suzuki K, Yamada G, Mundlos S, Shibuya H, Takada S, Minami Y The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signaling pathway *Genes Cells* 8 645-654, 2003
- Matsuda I, Suzuki H, Oishi I, Kami S, Kuroda Y, Komori T, Sasaki A, Watanabe K, Minami Y The receptor tyrosine kinase Ror2 associates with the MAGF-family protein Dlxin-1 and regulates its intracellular distribution *J Biol Chem* 278 29057-29064, 2003

H 知的財産権の出願 登録状況(予定も含む)

1 特許取得

坂口志又

- Foxp3 発現リンパ球による免疫系の治療法(特許)
竹内勤
- T 細胞リセプターと鎖タンパク これをコート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)
- 内分泌細胞とリンパ球との接着阻害剤(08/946838)

2 実用新案登録

該当なし。

3 その他

該当なし。

【Ⅲ】分担研究報告

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 大 予 院 医 予 研究科内科学講座臨床免疫 助教授

研究要旨

本研究は、全身性エリテマトーデスにおける免疫異常を細胞活性化シグナル伝達の中心である細胞膜マイクロドメイン (lipid raft) の面から明らかにすることにある Fas 発現 WR19L 細胞よりスフィンゴミエリン欠損株, SM(-) を樹立した SM(-) 細胞に、我々カクローニクに成功した sphingomyelin synthase gene(SMS-1) を遺伝子導入し、スフィンゴミエリン合成回復株(SMS-1)を樹立した。両細胞における Fas 誘導アポトーシスの差異を検査した結果、Fas 抗体架橋刺激により、SMS-1 細胞は SM(-)細胞に比べ、有意にアポトーシスが誘導された。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。全身性エリテマトーデス患者リンパ球のラフト発現解析では、SLE 患者 T 細胞および B 細胞におけるラフト発現は増強している傾向を認めた。T 細胞分画では、調節性 T 細胞と思われる CD25 陽性分画およびメモリー細胞である CD45 陽性分画におけるラフト発現が増強していた。CD14 陽性単球および CD56 陽性 NK 細胞のラフト発現はリンパ球に比べ高く、SLE 患者で増強している傾向を認めた。

A 研究目的

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、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、細胞活性化のシグナル伝達におけるスフィンゴミエリンの重要性を明らかにし、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 方法

- 1) ヒト Fas 発現マウス胸腺細胞株(WR19L/Fas)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、カンクリオン 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ョ糖密度比重遠心法を用いて検

計する

- 8) スフィンコミエリン除去剤、ラフト合成阻害剤の細胞活性化ノクナルに及ぼす効果について検討する
- 9) SLE 患者および正常者末梢血より単核球を分離し、PE 標識-抗 CD3, CD4, CD8, CD19, CD14, CD56 抗体と FITC 標識 cholera toxin B とで 2 重染色しラフト発現強度を FACS 解析した
- 10) T 細胞を CD25 陽性調節性 T 細胞分画と CD45 陽性メモリー分画に細分し、ラフトの発現を解析した

（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 結果

- 1) Fas 発現スフィンコ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(WRL19)にヒト Fas 遺伝子を導入した細胞株(WR/Fas)から、スフィンコミエリンに特異的に結合するライセニンを用いて、スフィンコミエリン欠損株、WR/Fas-SM(-)を樹立した。次に、多剤耐性を示す HL60 細胞株から我々がクローニングしたスフィンコミエリン合成酵素遺伝子を SM(-)細胞に遺伝子導入した G418 およびクルコンルセラミト合成酵素阻害剤の存在下に培養を継続し、スフィンコミエリン合成回復株 WR/Fas-SMS-1 を樹立した
- 2) スフィンコミエリン欠損株 SM(-)とスフィンコミエリン合成回復株 SMS-1 における細胞膜脂質含量を FACS にて検討したところ、カンクリオント GM1 および Fas の発現は両細胞で同程度であったか、スフィンコミエリンに特異的に結合するライセニンによる染色は SMS-1 においてのみ認められた
- 3) 同様に、SM(-)と SMS-1 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、カンクリオント GM1 および Fas は両細胞で同程度に染色されたか、ライセニンによる染色は SMS-1 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、SMS-1 は SM(-)に比べ、有意に高頻度にアポトーシスを起こした

- 5) リンパ球におけるラフト発現は低値であったか、SLE 患者 T 細胞および B 細胞におけるラフト発現は増強している傾向があった。CD14 陽性単核球および CD56 陽性 NK 細胞のラフト発現はリンパ球に比べ高く、SLL 患者で増強傾向を認めた

T 細胞分画では、調節性 T 細胞と呼ばれる CD25 陽性分画およびメモリー細胞である CD45 陽性分画におけるラフト発現が増強していた

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ト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コミエリン欠損株 SM(-)とスフィンコミエリン合成回復株(SMS-1)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コ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、SM(-)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コミエリンが、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示している。スフィンコミエリンが、Fas を含む膜レセプターの凝集を増強させているのか、細胞内へのノクナル伝達を増強させているのかを明らかにすることか今後の課題である。全身性エリテマトーテス患者リンパ球のラフト発現の解析より、各リンパ球サブセットでのラフト発現が増強していた。全身性エリテマトーテスにみられる免疫異常か、このラフト発現増強によりもたらされている可能性が強く推測される。

E 結論

ラフトにおけるスフィンコミエリンの機能解析のために、スフィンコミエリン欠損株 SM(-)とスフィンコミエリン合成回復株(SMS-1)の樹立に成功した。スフィンコミエリン合成回復株では Fas 架橋刺激によるアポトーシスが有意に亢進していた。全身性エリテマトーテス患者リンパ球でのラフト発現は増強していた。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

1 論文発表

- 1) Uchida, Y, Itoh, M, Kitano, T, Kondo, T, Umehara, H, Ichikawa, S, Hirabayashi, Y, Holleran, W M and Okazaki, I Anthracycline resistance in HL-60/ADR cells via transcriptional up-regulation of glucosylceramide synthase and reversal by Sp1 (GC-rich) decoy oligodeoxynucleotides J Biol Chem in press
- 2) Umehara, H, Bloom LI, Okazaki I, Yoshie O, Imai I Fractalkine and vascular biology from basic research to clinical diseases Arterio Thromb Vasc Biol (Review) (2004) 24 34-40
- 3) 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 Cancer Res (2004) 64 1000-1007
- 4) Kawabata, D, M Tanaka, T Fujii, Umehara, H, Y Fujita, H Yoshifuji, T Mimori, and S Ozaki 2004 Ameliorative effects of follistatin-related protein/TSC-36 on joint inflammation in a mouse model of arthritis Arthritis Rheum (2004) 50 660-607
- 5) 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) 278 9813-9822
- 6) Yoneda, O, Imai, T, Inoue, H, Nishimura, M, Minami, Y, Bloom, L I, Mimori, I, 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
- 7) Umehara, H, Inoue, H, Huang, J-Y, Kono, I, Minami, Y, Ianaka, Y, Okazaki, T Bloom, L I, 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
- 8) Ianaka, 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, 21146-21152
- 9) 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
- 10) Kondo, T, Suzuki, Y, Kitano, T, Iwai, K, Watanabe, M, Umehara, H, Daido, N, Domae, N, Tashima, M, Uchiyama, T, and Okazaki, I Vesnarinone causes oxidative damage by inhibiting catalase function through ceramide action in myeloid cell apoptosis Mol Pharm (2002) 61, 620-627
- 11) Kondo, T, Iwai, K, Kitano, T, Watanabe, M, Taguchi, Y, Yabu, T, Umehara, H, Domae, N, Uchiyama, T, and Okazaki, I Control of ceramide-induced apoptosis by IGF-1 involvement of PI-3 kinase, caspase-3 and catalase Cell Death Differnt (2002) 9, 682-692
- 12) Kawase, M, Watanabe, M, Kondo, T, Yabu,

- T, Taguchi, Y, Umehara, H, Uchiyama, T, Mizuno, K, and Okazaki, I Increase of ceramide in adriamycin-induced HL-60 cell apoptosis detection by a novel anti-ceramide antibody BBA (2002) 1584, 104-114
- 13) Inoue, H, Yoneda, O, Minami, Y, Tanaka, Y, Okazaki, T, Imai, H, Bloom, F, Domae, N, and Umehara, H Lipid rafts as the signaling scaffold for NK cell activation Tyrosine phosphorylation and association of LA1 with PI 3-kinase and PLC-g following CD2 stimulation Eur J Immunol (2002) 32, 2188-2198
- 14) 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” 臨床免疫学会誌 (2003) 26, 9-20
- 6) Umehara, H, Nishimura, M, Mimori, T, Domae, N, Yoshie, O, and Imai, I Fractalkine as the gatekeeper for cytotoxic lymphocytes 日本免疫学会総会 学術集会記録 (2002) 32, 9 (ノノホノウム)
- 7) 井上博, 宮地理彦, 永福正和, 小杉厚, 木田修, 三森経世, 室前尚親, 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
- 8) 米田修, 井上博, 西村美由希, 今井俊夫, 南康博, 室前尚親, 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
- 9) 梅原久範, 米田修, 西村美由希, 宮地理彦, 井上博, 室前尚親, 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
- 10) 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リエリンの関与 日本免疫学会総会 学術集会記録(東京) (2002) 32, 180

2 学会発表

- 1) 梅原久範, 今井俊夫, 吉藤元, 川端大介, 井村嘉孝, 藤田義正, 田中真生, 藤井隆夫, 三森経世 Fractalkine による NK 細胞の IFN- γ 産生と Th1 反応, 第47回リウマチ学会 2003
- 2) 宮地理彦, 梅原久範, 岡崎俊朗, 尼川龍一, 福原資朗 raft 形成と apoptosis 誘導におけるスフィンゴリエリンの関与 第65回日本血液学会総会 2003
- 3) 井上博, 梅原久範, 岡崎俊朗, 宮地理彦, 合田征司, 室前尚親 細胞膜構成脂質の相違による raft 形成および Fas 感受性の変化 第33回日本免疫学会学会総会 学術集会記録 2003
- 4) 宮地理彦, 尼川龍一, 福原資朗, 井上博, 合田征司, 岡崎俊朗, 梅原久範 Fas 依存性 Apoptosis におけるスフィンゴリエリンの関与 第33回日本免疫学会学会総会 学術集会記録 2003
- 5) Miyaji M, Amakawa R, Okazaki T, Umehara H, Fukuhara S Functional roles of sphingomyelin on lipid raft formation and Fas-mediated apoptosis 第76回日本生化学学会 2003

H 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

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。

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を誘導することにより種々の自己免疫疾患の治療を行う試みかなされており今後の発展が期待されている。この経口免疫寛容の誘導において I 細胞の産生する TGF- β が重要であるという報告があるが、未だ明らかではない。その他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 産生などにおいても重要な役割を担っているといわれているが、その制御については不明な点が多い。これらを解析するため T 細胞でのみ IGF- 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ている。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ハイユル板 T 細胞の産生する IGF- β の役割も検討する。

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かなされており動物モデルでは劇的な効果か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か。そのメカニズムについてはまた不明な点が多い。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 IGF- β も産生する I 細胞 (Tr1) などの報告があるか直接的証拠はない。

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、I 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か詳細は不明である。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ことがわかっている。その抑制メカニズムとして CTLA-4 を介した cell-cell contact が重要であるとされるか、細胞表面に膜型の TGF- β が発現して何らかの役割を果たしているという報告もあり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 IGF- 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か。それを腸管内リンパ組織において分泌しているのは I 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、I 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 IGF- β が深く関与していることがわかっている。ところが、IGF- 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かできなかった。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 かという役割をもつのかを解析することとした。

B 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 を blastocysto injection することにより loxP が exon6 上 下流にのみ挿入された変異マウスを作成、さらにこのマウスを、Embryo において Cre recombinase を発現するアテノウイルス Ella プロモーター-Cre マウスとかけあわせることにより in vivo で neo のみか partial に抜けたマウスを作成した(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 マウスは大阪大学竹田潤二先生より供給を受けた。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を確認する。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ハイエル板 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、CD4+CD25+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 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ليل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、germline に入ったヘテロマウスをアテノウイルス Ella-Cre マウスとかけあわせて TGF- β floxed mouse を完成した。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、targeted マウスの解析に移る予定である。

D 考察・結論

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か、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か期待される。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か 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か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

- 1 駒形嘉紀, 粘膜免疫と経口免疫寛容 内科 91
1271, 2003
- 2 駒形嘉紀 経口トレランスと関節炎治療への応用
Rheumatology Clinical Update 10 36-37, August
2003
- 3 駒形嘉紀 永谷勝也 山本一彦 経口トレランス 現
代医療 35 2515-2519, 2003
- 4 Kobari Y, Misaki Y, Setoguchi K, Zhao W, Komagata
Y, Kawahata K, Iwakura Y, and Yamamoto K T cells
accumulating in the inflamed joints of a spontaneous
murine model of rheumatoid arthritis become
restricted to common clonotypes during disease
progression Int Immunol 16 131-138, 2001

2 学会発表

- 1 K Nagatani, K Sagawa, Y Komagata, K Yamamoto
Peyer's patch dendritic cells capturing oral antigen
interact with antigen specific T cells and induce
gut-homing CD4+CD25+ regulatory T cells in Peyer
's patch Oral tolerance Mechanism and
Applications New York Academy of Science
Conferenc New York, USA Oct 2003
- 2 Y Komagata, K Nagatani, K Yamamoto Role of DC
and chemokines for the induction of gut-homing
CD4+CD25+ regulatory T cells in Peyer's patches
第31回日本臨床免疫学会, 東京, 2003 10

H 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

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。