

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生体機能調節学分野 教授

研究要旨

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、原因遺伝子が ZAP-70 であることを見出した。その異常は、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する。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 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 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、I 細胞特異的シグナル分子 ZAP-70 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 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。SKG マウス T 細胞を TCR を介して刺激した場合、TCR zeta 鎖、ZAP-70、LAT、PLC γ などのシグナル分子のチロシンリ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、その結果、関節炎惹起能を持つ自己反応性 I 細胞が産生されると考えられた。
- 2 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 結論

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、関節炎惹起性 T 細胞の産生

かおき、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が発症する可能性を見い出した。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。また 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。

E 結論

本研究により、癌関連分子群が細胞外ストレスに対する細胞応答制御において必須の役割を担うことが明らかとなった。今後免疫難病の病態とこれら癌関連分子群の発現 機能の異常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

特になし。

G 研究発表

1 論文発表

- 1 Suri, A , Shimizu, J , Katz, J D , Sakaguchi, S , Unanue, I R , and Kanagawa, O Regulation of autoimmune diabetes by non-islet-specific T cells - a role for the glucocorticoid-induced TNF receptor *Eur J Immunol* 34 447-454, 2004
- 2 Kajura, F , Sun, T , Nomura, K , Izumi, I , Ueno, Y , Bando, N , Kuwoda, H , Han, Y , Li, A , Matsushima, Y , Takahama, S , Sakaguchi, T , Mitani, M and M Matsumoto 2004 NF- κ B-inducing kinase establishes self-tolerance in a thymic-stroma dependent manner *J Immunol* 172 2067-2075, 2004
- 3 Hori, S , and Sakaguchi, S Foxp3, a critical regulator of regulatory T cell development and function *Microbes and Infection* In press
- 4 Fehervari, Z , and Sakaguchi, S CD25+CD4+ regulatory T cells In "Measuring Immunity" eds Michael Lotze and Angus Thompson, Elsevier In press
- 5 Choi, B K , Bae, J S , Choi, E M , Kang, W J , Sakaguchi, S , Vinay, D S , and Kwon, B S 2003 4-1BB-dependent inhibition of immunosuppression by activated CD4+CD25+ T cells *J Leukoc Biol* In press
- 6 Zhang, X , Koldzix, D J , Izikson, I , Reddy, J , Nazareno, R I , Sakaguchi, S , Kuchroo, V K and Weiner, H I IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25-CD4+ regulatory T cells *Int Immunology* 16 1-8, 2004
- 7 Fehervari, Z , and Sakaguchi, S Development and function of CD25-CD4+ regulatory T cells *Curr Opin in Immunol* In press
- 8 Fehervari, Z and Sakaguchi, S A paradigm of self-tolerance Regulatory T cells and the control of immune responses *Arthritis Res Ther* 6 19-25, 2004
- 9 Sakaguchi, S The origin of FOXP3-expressing CD4+ regulatory T cells thymus or periphery *J Clin Invest* 112 1310-1312, 2003
- 10 Sakaguchi, N , Takahashi, I , Hata, H , Nomura, T , Tagami, I , Yamazaki, S , Sakihama, T , Matsutani, T , Negishi, I , Nakatsuru, S , and Sakaguchi, S Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice *Nature* 426 454-60, 2003
- 11 Sakaguchi, S Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses *Annu Rev Immunol* In press
- 12 Sakaguchi, S Taming transplantation by regulatory T cells *Nature Medicine* 9 1117-1118, 2003
- 13 Hori, S , Takahashi, I , and Sakaguchi, S Control of autoimmunity by natural regulatory T cells *Adv Immunol* 81 329-369, 2003
- 14 Takahashi, T and Sakaguchi, S Naturally arising CD25+CD4+ regulatory T cells in maintaining immunologic self-tolerance and preventing autoimmune disease *Curr Mol Med* 3 693-706,

- 2003
- 15 Sakaguchi, S. Control of immune responses by naturally arising CD4⁺ regulatory T cells / *Exp Med* 197 397-401, 2003
 - 16 Hori, S, Nomura, I, and Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3 *Science* 299 1057-1061, 2003
 - 17 Wood, K and Sakaguchi, S. Regulatory T cells in transplantation *Nature Rev Immunol* 3 199-210, 2003
 - 18 Sakaguchi, S. Regulatory T cells mediating compromises between host and parasite *Nature Immunol* 4 10-11, 2003
 - 19 Takahashi, T, and Sakaguchi, S. The role of regulatory T cells in controlling immunologic self-tolerance *Int Rev Cytol* 225 1-32, 2003
 - 20 Sakaguchi, S., Hori, S, Fukui, Y, Sasazuki, I, 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* 252 6-16, discussion 16-23, 106-14, 2003
 - 21 Wood, K J, H Ushigome, M Karim, A Bushell, H S and S. Sakaguchi Regulatory T cells in transplantation *Novartis Foundation Symposium* 252 177-88, discussion 188-93, 203-10, 2003
 - 4 西岡朋向, 高橋武司, 坂口志文 マウス GITR-Ligand の発現と機能 第 33 回 日本免疫学会総会(2003 12 8-10 福岡)
 - 5 堀 昌平, 野村尚史, 坂口志文 転写因子 Foxp3 による制御性 T 細胞分化の制御 第 33 回 日本免疫学会総会(2003 12 8-10 福岡)
 - 6 八木治彦, 野村尚史, 堀 昌平, 中村恭子, 藤井信吾, 坂口志文 ヒト Foxp3 による制御性 T 細胞分化の制御 第 33 回 日本免疫学会総会(2003 12 8-10 福岡)
 - 7 小野昌弘, 清水淳, 堀昌平, フェハリノルタン, 野村尚史, 高橋武司, 宮地良樹, 坂口志文 GITRhigh1 細胞の除去による攻死的自己免疫性心筋炎および他の臓器特異的自己免疫病の誘導 制御性 T 細胞における GITR Foxp3 の発現相関 第 33 回 日本免疫学会総会(2003 12 8-10 福岡)
 - 8 高貴範, 野村尚志, 山崎小百合, 清水淳, 廣田圭司, 中村恭子, 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 33 回 日本免疫学会総会(2003 12 8-10 福岡)
 - 9 西村英士, 先坂俊子 瀬戸口留可, 田中祐一, 坂口志文 移植免疫寛容モデルにおける CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞の表現型・機能変化の解析 第 33 回 日本免疫学会総会(2003 12 8-10 福岡)
 - 10 瀬戸口留可, 堀 昌平, 高橋武司, 坂口志文 IL-2 の生体内中和による CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞の減少と自己免疫病の誘導 第 33 回 日本免疫学会総会(2003 12 8-10 福岡)
 - 11 Fehervari Zoltan, Shimon Sakaguchi The role of Dendritic cells in the in vivo activation of CD4⁺CD25⁺ regulatory cells 第 33 回 日本免疫学会総会(2003 12 8-10 福岡)
 - 12 田中聡, 野村尚志, 坂口教子, 坂口志文 SKG マウスの自己免疫性関節炎発症における制御性 T 細胞の役割 第 33 回 日本免疫学会総会(2003 12 8-10 福岡)
 - 13 吉富啓之, 田中聡, 野村尚志, 坂口教子, 中村高志, 坂口志文 環境因子としての真菌感染による SKG マ

2 学会発表

- 1 高橋武司 CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞による免疫の調節 第 15 回日本神経免疫学会学術集会(2003 3 12-14 長崎)
- 2 堀 昌平, 野村尚史, 坂口志文 転写因子 Foxp3 による制御性 T 細胞分化の制御 第 13 回 KTCC(2003 6 27-28 京都)
- 3 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 13 回 KTCC(2003 6 27-28 京都)

ウス自己免疫性関節炎の発起 第33回 日本免疫学会総会(2003 12 8-10 福岡)

- 14 廣田圭司、Lehervan Zoltan、吉田啓之、野村尚志、芹沢功、五十嵐美穂、若杉尋、坂口教子、坂口志文 SKGマウスにおけるiNKT細胞機能解析 第33回 日本免疫学会総会(2003 12 8-10 福岡)
- 15 岸佑介、養場祐一、坂口教子、坂口志文、菊谷仁、鐸田武志 B細胞特異的CD40シグナルによるSKGマウスRA様関節炎の発症 第33回 日本免疫学会総会(2003 12 8-10 福岡)
- 16 全丸史子、ホーンハンユアンナーク、高橋武司、坂口志文、東みゆき CD4+T細胞におけるGITRの(Costimulator)機能 第33回 日本免疫学会総会(2003 12 8-10 福岡)
- 17 松本満、野村尚志、上野智雄、松島明美、高野洋介、坂口志文、甲田範行 胸腺上皮細胞の形成障害にもとづく自己免疫疾患病態の解析 第33回 日本免疫学会総会(2003 12 8-10 福岡)
- 18 Sakaguchi, S SKG mice, a new genetic model of rheumatoid arthritis 3rd World Congress of the Global Arthritis Research Network (GARN) International Arthritis Summit (2003 9 14-17 宮崎)
- 19 高橋武司 CD25+CD4+制御性T細胞による免疫制御 第31回日本臨床免疫学会総会(2003 10 9-10 東京)
- 20 Sakaguchi, S Naturally arising CD25+CD4+regulatory T cells in immunologic self-tolerance Their role in self-tolerance and transplantation tolerance 日本免疫学会総会(2003 12 8-10 福岡)(2003 12 8-10 福岡)
- 21 Sakaguchi, N SKG mice, a new genetic model of rheumatoid arthritis 日本免疫学会総会(2003 12 8-10 福岡)(2003 12 8-10 福岡)
- 22 坂口志文 制御性T細胞による免疫応答の制御 第33回 日本免疫学会総会(2003 12 8-10 福岡)

Foxp3発現リンパ球による免疫病の治療法(特許)。

2 実用新案登録

該当なし

3 その他

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

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 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子細胞機能学 特任教授

研究要旨

IFN シグナル伝達において重要な役割をもつ分子である Stat1 の欠損マウスの解析から Stat1 が転写因子 Runx2 を細胞質にとどめることで抑制する機能をもつことが明らかになった。Runx ファミリーの転写因子は 近年 自己免疫疾患や CD4 遺伝子のサイレンシングへの関与が解明された重要な免疫制御分子であり Stat1 による抑制機構を用いて Runx ファミリー転写因子を制御できる可能性が見いだされた。

A 研究目的

膠原病の発症原因や病態にはいまなお不明の部分が多く 根治療法かない疾患が多い。本研究では、IFN などのサイトカインの細胞内シグナルを制御する遺伝子の欠損マウスにみられる免疫系の異常を解析することで、自己免疫疾患の発症に関わるシグナル伝達機構を明らかにし、新たな治療に結びつけるための分子の同定することをめざす。

B 方法

インターフェロンのシグナル伝達において重要な役割をもつ Stat1 の欠損マウスにおいて、Runx2 と呼ばれる転写因子の機能を検討した。Runx2 の属する runt ファミリー転写因子は免疫系の制御で重要な役割を担っており、種々の自己免疫疾患の原因に関与したり、CD4 分子遺伝子のサイレンシングなどといった免疫系の重要な制御分子として知られている。そこで、Stat1 欠損マウスの細胞を用いて、Stat1 による Runx2 の制御メカニズムをプロモーターアッセイ、免疫沈降 ケルンフトアッセイなどを用いて解析し、その抑制の分子機構を解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験、遺伝子組み換え実験に関する施設内委員会

の承認に基づいて実験を遂行した。個人情報を含むヒトの試料を用いた実験は含まれていない。

C 結果

Stat1 の欠損マウスにおいて 転写因子 Runx2 の機能が異常に亢進していた。免疫沈降実験によって、Stat1 と Runx2 の結合を見た結果 Stat1 は Runx2 と結合することか分かった。そして、欠変異体を用いた検討により、Stat1 の DNA 結合ドメインあるいはリンカードメインが Runx2 の runt ドメインと結合することか示された。一方、Stat1 のチロシンリン酸化部位である 701 番目のチロシンの変異体を用いても Runx2 の転写活性を抑制できることから Stat1 による Runx2 の制御は、チロシンリン酸化に依存しない機能であることか予想された。Runx2 は過剰発現すると効率よく核移行するか、Stat1 を同時に過剰発現させると、その核移行が阻害されることか明らかになった。その時に、細胞質に遍在した Stat1 と Runx2 の結合が高まっており、Stat1 は細胞質に Runx2 を引き止めて活性を制御する作用をもつことか明らかになった。

D 考察

IFN シグナルを抑制すると考えられていた IRF-2 において乾癬様の自己免疫性皮膚疾患が発症することか明らか

になっていた。一方、最近、乾癬や関節リウマチ患者においてRunx1の結合サイトの変異が同定され、runtファミリー転写因子の転写活性化能が自己免疫疾患と関与することが示された。Stat1はいFN系のシグナル伝達に関与する一方、Runxの抑制作用を持つことから、Statを利用したRunxファミリーの制御が新たな膠原病治療への道を開く可能性がある。

E 結論

Stat1を、膠原病発症に関与するruntファミリー遺伝子の活性を抑制する新たな制御因子として同定した。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

1 論文発表

- 1 高柳広 骨と免疫のクロストーク 現代医療(2004)36, 697-704
- 2 高柳広 免疫系シグナルによる破骨細胞分化制御 生化学(2003)75, 1535-1540
- 3 高柳広 Osteoimmunology 内科(2004)93, 223-228
- 4 高柳広 インターフェロンとRANKL シグナル制御 Molecular Medicine(2003)40, 1332-1340
- 5 高柳広 免疫と骨代謝のクロストーク リウマチ(2003)43, 624-31
- 6 高柳広 RANKLの骨吸収作用を制御するIFN- γ とIFN- γ の役割 THE BONE(2003)17, 51-59 (475-483)
- 7 高柳広 サイトカインシグナルのクロストーク RANKLの制御系をモデルとして 炎症と免疫(2003)11, 106-116
- 8 高柳広 関節リウマチにおける骨破壊機序 クリニカルカルネウム(2003)13, 16-23
- 9 高柳広 オステオイムノロジー Molecular Medicine (2003)40, 690-695
- 10 高柳広, 織田弘美 関節炎とインターフェロン リウマチ科(2003)29, 50-57
- 11 高柳広, 全百和, 谷口雅昭 サイトカインと骨代謝 実験医学増刊号「シグナル伝達研究2003」21, 91-96(209-214)
- 12 Koga I, Inui M, Inoue K, Kim S, Suematsu A, Kobayashi I, Iwata T, Ohnishi H, Matozaki I, Kodama T, Tamiguchi T, Takayanagi H, Takai H TNF-mediated costimulatory signals cooperate with RANKL for bone homeostasis Nature (2004) (in press)
- 13 Urushibara, M*, Takayanagi H*, Koga I, Kim S, Isobe M, Morishita Y, Nakagawa I, Kurosawa H, Tamiguchi T Antirheumatic drug, leflunomide, inhibits osteoclastogenesis by interfering with RANKL-stimulated induction of NFATc1 Arthritis Rheum(2004) (in press) *Equal contributors
- 14 Kim, S, Koga, I, Isobe M, Kern BL, Yokochi I, Chin Yi, Karsenty G, Tamiguchi T, Takayanagi H Stat1 functions as a cytoplasmic attenuator of Runx2 in the transcriptional program of osteoblast differentiation Genes Dev (2003)17, 1979-1991
- 15 高柳広 RANKLによる破骨細胞分化制御 Annual Review 2004 免疫 奥村康、平野俊夫 佐藤昇志編、中外医学社 143-153頁、2003 東京
- 16 高柳広 第一章 CIII 滑膜、第一章 G 筋 整形外科ルースス 改訂第4版 津山直一他編著 南山堂 42-43, 63-65頁、東京
- 17 高柳広 破骨細胞活性化の分子機構 先端医療シリーズ 19 アレルギー リウマチ 膠原病「アレルギー リウマチ 膠原病の最新医療」、先端医療技術研究所 235-241頁、2003 東京

2 学会発表

- 1 Hiroshi Takayanagi Regulation of RANKL signaling in osteoimmunology 2nd Wittgenstein Conference "Bone and Cartilage in Health and Disease" 2003 10 18, Vienna

- 2 Hiroshi Takavanagi Regulation of RANKL signaling in arthritic bone destruction 3rd Global Arthritis Research Network (GARN) 2003 9 15, Miyazaki
- 3 高柳広 骨とRANK遺伝子 日本骨形態計測学会 ノンホノウム「ケノムと骨」 2003 7 5、東京 日本骨形態計測学会雑誌 13(2), S20 頁
- 4 高柳広 RANK と骨疾患治療薬 第 108 回日本薬理学会関東部会、ノンホノウム「新しい薬物標的を用いた骨疾患治療薬の開発」、2003 6 14、千葉 日本薬理学会雑誌 122(4), 22 頁
- 5 Hiroshi Takavanagi Regulation of RANKL signaling in osteoclast differentiation 1st joint meeting of International Bone and Mineral Society/Japan Bone and Mineral Society, Plenary lecture 2003 6 3, Osaka
- 6 Hiroshi Takavanagi The positive and negative regulation of RANKL signaling in osteoclastogenesis 11th International Rheumatology Symposium 2003 4 25, Tokyo
- 7 高柳広 Regulatory mechanism of RANKL signaling 第3回 Bone Frontier Seminar、2003 2 22、熱海。

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。

全身性エリテマトーデス患者に認められる TCR ζ 鎖異常の分子機構に関する研究

分担研究者 竹内 勤 埼玉医科大学総合医療センター第二内科 教授

研究要旨

SLE 患者の ζ 鎖 mRNA を検索したところ種々のスプライスワリアントが存在することを明らかにし、エクソン7(-)ワリアントを2例に、3'-UTR910bp 中の560bp を欠く short 3'-UTR ワリアントを11例に見い出した。short 3'-UTR ワリアントは、正常より560bp 短いエクソン8からなり、この部位に mRNA 安定性に関与すると考えられる A-U-rich 配列を含む。エクソン7は TCR ζ 鎖のシグナル伝達機能に必須の ITAM3 の N 末端—チロシン残基を含み、TCR からのシグナル伝達に極めて重大な影響を及ぼす可能性が示唆されている。これらワリアントの蛋白発現低下および T 細胞機能に及ぼす影響を直接証明するため、レトロウイルスベクターに wild 型あるいはワリアント ICR ζ 鎖遺伝子を組み込み、ICR ζ 鎖欠損マウス T 細胞ハイブリトーマ 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 ICR ζ 株に比し ICR 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。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、エクソン7欠損ワリアントでは、short 3'-UTR ワリアントに比べより顕著な蛋白発現低下を来した。その分子機構について詳細な解析を施行した。この二つのトランスフェクタントに共通する病態関連分子を検索する目的で wild 株に比べ発現増強あるいは発現低下している分子を遺伝子チップにより解析した。TCR ζ 鎖の SLE 病態形成に関わる役割について考察する。

A 研究目的

全身性エリテマトーデス (Systemic Lupus Erythematosus SLE) の病態には、T 細胞の機能異常が密接に関連し、その分子機序解明が課題となってきた。T 細胞機能の指標として、T 細胞受容体からのシグナル伝達後早期に認められるチロシンリン酸化が低下する種々のシグナル伝達分子が明らかとなった。その中で、SLE 患者の7割に認められる TCR ζ 鎖異常の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

B 方法

ICR ζ 鎖発現低下をマーカーとして、SLE 低下群、SLE 正常群、健康人、疾患コントロールを対象とする。炎症

エフェクター分子については、遺伝子チップなどを用いて発現プロファイル解析し、目的とする分子を同定。2種類の異常 ICR ζ 鎖ワリアントの解析には、これら遺伝子を導入した T 細胞株と正常 TCR ζ 鎖発現株の遺伝子発現プロファイルを、遺伝子チップを用いて解析し、発現低下遺伝子群、発現亢進遺伝子群を明らかにし、病態と関連する分子を検索する。その上で、目的分子の役割は、in vitro, in vivo 実験系で SLE 様の病態が誘導されるか否かを検討する。

(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、「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等」に対応するための指

針」が作成されている。この中で第二群試料等提供者、すなわち遺伝素因の関与の程度が明らかでない病態を有する者およびその可能性のある者で、その病名などの告知を受けている人を対象に、研究協力へのインフォームト コンセントの内容が規定されている。当該研究では患者さん用説明文書 第二群用例文に準じた説明を行い、研究協力に同意が得られたものに対して対象とする予定である。項目としては、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) 個人情報の保護、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) 遺伝カウンセリクの体制のなどの点につき、同審議会の手引きに沿って具体的に説明し、同意を得ることとしている。なおこれらの詳細について 本学倫理委員会に申請し、承認が得らうえて当該研究に着手する予定である。

C 結果

- 1) SLE 患者末梢血 T 細胞における TCR セータ鎖発現は有意に低下し、蛋白発現低下 44 例中 2 例にエクソン7(-)、11例にエクソン8か 560bp 短いスプライス ハリアントを見いだした。
- 2) スプライス・ハリアントの役割を実証するために、TCR セータ鎖を欠いたマウス T 細胞ハイブリトーマにこれらハリアントを遺伝子導入し検討した。野生株の TCR セータ鎖トランスフェクタントに比し、両ハリアントをのトランスフェクタントはセータ蛋白発現低下が認められ、その原因は mRNA の不安定性に由来する事が証明された。TCR 刺激後のサイトカイン産生も低下し、SLE 患者末梢血 T 細胞の機能異常が、これらハリアントで再現され、その役割が明らかとなった。
- 3) この2つのハリアントに共通して発現増強あるいは発現低下する分子も、マイクロアレイによって網羅的に解析した。その結果、両ハリアントに共通して発現増強される分子群として、接着分子群、チロンキン

ーセノフォスファターセ群、アタプター分子群、転写因子群、などが同定された。

D 考察

SLL 患者 T 細胞に認められる TCR セータ鎖の分子機序を解析し 蛋白発現低下の原因として2種類のスプライス ハリアントの存在を明らかにした。エクソン7(-) および短エクソン8ハリアントは それぞれ mRNA の不安定性を介して蛋白発現低下を未事示されたか、特にエクソン8の 560bp 短い短エクソン8ハリアントでは、All-richドメイン w そ含む領域がスプライスアウトされたもので この領域に mRNA 安定化因子が結合し、安定性を調節している可能性が考えられる。一方、エクソン7は、TCR セータのシグナル伝達に必須の ITAM-3ドメインの N 末端チロンを欠いたもので野生型の 16kDa にくらへ短い 14kDa の分子が生成されるか、その構造上の理由から mRNA 安定性が低下したものと推定された。

E 結論

エクソン7(-) 短エクソン8スプライス ハリアントは、SLE T 細胞機能低下の一因となっている TCR セータ鎖の蛋白発現低下に直接関与している事が証明された。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

1 論文発表

- 1 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* 171 2496-2503, 2003
- 2 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

2 学会発表

- 1 Kameda H, Ishigami H, Abe T, Takeuchi I Expression of adapter proteins in rheumatoid synovial fibroblast-like cells and their involvements in the signaling from growth factor receptors 67th Annual Meeting, Orlando, U S A, October, 2003
- 2 Tsuzaka K, Fukuhara I, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe I, Takeuchi I A splice variant of the TCR ζ mRNA lacking exon 7 can lead to the down-regulation of TCR ζ protein and IL-2 production in SLE T cells American College of Rheumatology, 67th Annual Meeting, Orlando, U S A, October, 2003
- 3 リウマチ 膠原病の最新の進歩「関節リウマチの最新の治療 抗サイトカイン療法を中心として」日本医学会総会 ノンホノウム 2003 4 5 福岡
- 4 リウマチ薬物治療の最近の進歩「抗 TNF α 抗体インフリキシマブの臨床的効果と今後の課題」第 47 回日本リウマチ学会 ノンホノウム 2003 4 24-26 東京
- 5 5 リウマチ/膠原病の病態と薬物療法の進歩 日本内科学会生涯教育講演会 2003 東京/大阪/名古屋

H 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1 特許取得

- ① 1 細胞リセプターと鎮タンパク 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)
- 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

該当なし。

3 その他

該当なし。

悪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

分担研究者 田村直人 順天堂大学医学部膠原病内科 講師

研究要旨

悪性関節リウマチ患者血清由来の凝集 IgG は、好中球を活性化し好中球細胞表面の接着因子である L-セレクチンを shedding させる。この L-セレクチンの shedding に関与する細胞内シグナル伝達経路を明らかにするため、悪性関節リウマチ患者から採取した血清を健康者好中球に反応させ、細胞内 MAP キナーゼ (ERK、JNK、p38MAP キナーゼ) のリン酸化を解析したところ、患者血清では LPS 刺激に比へ緩徐に刺激 2 時間後に ERK、p38MAP キナーゼのリン酸化がみられた。次に L-セレクチン shedding に対する MAP キナーゼ阻害剤の影響を解析したところ、LPS 刺激による L-セレクチンの shedding は p38MAP キナーゼ阻害薬で抑制されたのに対し、患者血清による L-セレクチンの shedding は MEK 阻害剤で抑制された。またこの L-セレクチンの shedding は TNF α 変換酵素 (TACE) 阻害薬によって抑制された。患者血清中の凝集 IgG は、ERK のシグナル伝達経路を介し TACE により L-セレクチンを shedding させることが明らかとなった。

A 研究目的

好中球が活性化すると細胞表面分子である L-セレクチンが shedding される。悪性関節リウマチ患者血清由来の凝集 IgG は好中球を活性化し、L-セレクチンを shedding させることを以前報告した。今回、この好中球 L-セレクチン shedding に関与する細胞内シグナル伝達経路を明らかにするため、好中球 L-セレクチン発現における MAP キナーゼについての検討を行った。

B 方法

悪性関節リウマチ患者から採取した血清を 2% の濃度で健康者好中球に反応させ、経時的な細胞内 MAP キナーゼ (ERK、JNK、p38MAP キナーゼ) の蛋白量およびリン酸化について、ウェスタンブロット法により解析を行った。LPS 刺激においても同様の検討を行った。また、あらかじめ好中球を MAP キナーゼ阻害剤あるいは TNF α 変換酵素 (TACE) 阻害薬と 15 分間反応させた後に患者血清を添加し、細胞表面上の L-セレクチンの発現をフローサイトメトリー法にて解析した。

(倫理面への配慮)

検体採取についてはインフォームドコンセントのもとに行い、検体管理も当施設のみにて行った。

C 結果

以前の結果の要点は以下の通りである。好中球における L-セレクチンの shedding は関節リウマチ、特に悪性関節リウマチ患者血清での刺激で認められ、全身性エリテマトーテス患者血清では認められなかった。またこれは患者血清の IgG 分画での刺激で濃度依存性に認められた。TNF α での刺激では L-セレクチンの shedding は瞬時に起こるのに対し、患者血清による刺激では 2 時間くらいかけて緩徐に進み、特異的なシグナル経路を介している可能性が示唆された。

今回の MAP キナーゼの解析では、LPS による刺激では刺激後 30 分をピークに ERK、p38 MAP キナーゼのリン酸化が観察されたのに対し、患者血清による刺激では刺激 2

時間後に ERK、p38MAP キナーゼのリン酸化が認められた。JNK のリン酸化はいずれの刺激においても認められなかった。また、各 MAP キナーゼの経時的な蛋白量の変化は認められなかった。LPS 刺激による患者 L-セレクチンの shedding は p38MAP キナーゼ阻害薬により抑制されたのに対し、悪性関節リウマチ患者血清による L-セレクチンの shedding は ERK の経路である MEK 阻害剤では抑制され、p38MAP キナーゼ阻害剤では抑制されなかった。またこの L-セレクチンの shedding は LPS 刺激と同様に TACE によって抑制された。

D 考察

好中球における L-セレクチンの shedding は好中球活性化のひとつの指標であるか、悪性リウマチ患者血清中の凝集 IgG は LPS と同様に MAP キナーゼを介したシグナル伝達経路により L-セレクチンを shedding させることが明らかになった。しかし、その反応は LPS と比べ時間的に緩やかで、阻害薬による抑制結果から LPS による刺激とは異なり、p38MAP キナーゼは介さず、ERK のみを介していると考えられた。LPS 刺激による L-セレクチンの shedding は TACE によることが明らかにされており、患者血清での反応性の違いにより他の酵素が関与している可能性を考えたか、患者血清による L-セレクチンの shedding も LPS と同様に TACE によるものであった。以上のことから、悪性関節リウマチの好中球活性化には MAP キナーゼが関与している可能性が示唆された。

E 結論

悪性関節リウマチ患者血清に含まれる凝集 IgG は、ERK のシグナル伝達経路を介して好中球 L-セレクチンを shedding させることが明らかとなった。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

1 論文発表

- 1 Takaya M, Jamura 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
- 2 Bando H, Jamura N, Kobayashi S, Ohyanagi Hara M, Ichimura Y, Tajima M, Haruta K, Hashimoto H. Endothelial cell-binding antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. Mod Rheumatol 13:44-49, 2003

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

該当なし。

2 実用新案登録

該当なし。

3 その他

該当なし。

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

分担研究者 西木 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

研究要旨

血管炎は自己免疫疾患に共通に認められる難治性病態の一つであり、従来から用いられているステロイド剤や免疫抑制剤による治療に抵抗性を示す例も多く、新しい治療法の確立が望まれる。IL-6 シグナル阻害による免疫難病の治療法の開発を目的として、本年度は、従来の治療法に抵抗性の難治性血管炎症候群の患者に、ヒト化抗IL-6レセプター抗体を用いた探索的治療を行った。ヒト化抗IL-6レセプター抗体による治療により、血管炎症候群の患者の臨床症状や検査異常の改善が見られた。このことから、IL-6 シグナル阻害が血管炎の治療に有効である可能性が示唆されるとともに、IL-6 は血管炎症候群の病態形成に不可欠の分子であると考えられる。

A 研究目的

血管炎は自己免疫疾患に共通に認められる難治性病態の一つであり、従来から用いられているステロイド剤や免疫抑制剤による治療に抵抗性を示す例も多く、新しい治療法の確立が望まれる。したがって、血管炎の治療法の確立は多くの自己免疫疾患の制御につながる。血管炎症候群は種々のサイズの動脈に炎症を生じ、発熱や筋肉 関節の疼痛、血管閉塞や皮膚潰瘍、多発性単神経炎などを生じる疾患群である。

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の関与が示唆されており、IL-6阻害による血管炎症候群の治療の可能性がある。我々はこれまでに、関節リウマチやキャノスルマン病の病態にIL-6が関わっており、ヒト化抗IL-6レセプター抗体による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、従来の治療法に抵抗性の難治性血管炎症候群の患者に、ヒト化抗IL-6レセプター抗体を使用し、種々のサイトカインの体内プロファイルやリンパ球サブセットの変化を解析するとともに、血管炎に対する治療効果を明らかにすることを目的とした。

B 方法

従来用いられているステロイド剤ならびに免疫抑制剤を用いた治療に抵抗性の難治性血管炎症候群(大動脈炎症候群、結節性多発性動脈炎)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例の難治性血管炎の患者にヒト化抗IL-6レセプター抗体、MRA、を使用した。ヒト化抗IL-6レセプター抗体はGMPに準拠している。治療効果はMRI、CTを用いた画像評価の改善、皮膚症状の改善、CRPなど炎症マーカーの改善、QOL(疼痛、関節痛、倦怠感)の改善にて判定した。また、末梢血球、一般生化学、止血機能に加え、IL-6、可溶性IL-6受容体、血中ヒト化抗IL-6レセプター抗体、(MRA)の濃度を測定し、IL-6阻害治療における薬物濃度とIL-6の関係を検討した。さらに、代表的な炎症性サイトカインである $INF\ \alpha$ 、 $IL-1\ \beta$ 、ならびに血管新生と血管透過性の調節因子である血管内皮増殖因子(VEGF)を測定し、血管炎の病態におけるこれらの意義について検討を行った。

(倫理面への配慮)

ヘルン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。

C 結果

(症例 1) 19 歳の女性。平成 8 年に大動脈炎症候群と診断される。潰瘍性大腸炎の合併あり。プレトニロン (PSL) 60mg/日開始。シクロスポリンを併用するも PSL 20mg/日以下に減量できず。平成 10 年増悪に対しメチルプレトニロン (mPSL) ハルス療法に加えシクロフォスファミド 150mg/日を併用するも PSL 30mg 以下への減量は困難であった。ヘタメタノール 1mg/日を追加し、以後 7 回にわたって白血球除去療法を行うも無効。平成 12 年以降、mPSL ハルス療法を間歇的に使用するとともに、アサチオプリン 100mg/日、ミコフェノール酸モフェチル 2g/日、メトトレキサート 17.5mg/週の併用も無効であった。CT にて上行大動脈、大動脈弓 3 分岐、下行大動脈に著明な血管壁の肥厚あり。左鎖骨下動脈の狭窄あり。CRP 12.6 mg/dl と強い炎症を認め、強い持続性胸痛、1 ヶ月で 5kg の体重減少、意識消失発作を生じた。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下に、ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体、MRA による治療を行った。MRA は 200mg/週で治療を開始し、血中の MRA 濃度と炎症マーカーをモニタリングしながら至適用量を決定した。MRA は点滴静注にて使用した。MRA による治療開始 2 週間後には CRP が陰性化。1 ヶ月後には胸痛の改善に加え CT 上で大動脈壁の肥厚の改善、さらに頸動脈の血流の改善を認めた。また、便へモクロビウムも陰性化し、潰瘍性大腸炎の症状も消失した。一方、MRA 治療中に血中 TNF α の増加を認めたが、臨床症状ならびに検査値の悪化は認めなかった。血中 IL-1 β は経過を通して一度も検出されなかった。MRA はトラフ値を約 10 μ g/ml に維持することで CRP の完全な陰性化を維持した。MRA の継続使用により、血中 IL-6 は 1720pg/ml から 100pg/ml 以下に低下した。(症例 2) 42 歳男性。昭和 61 年に結節性動脈炎 (皮膚型) を発症し、PSL、アサチオプリン、コルヒチン、抗凝固剤

にて治療を行うも寛解増悪を繰り返す。平成 7 年以降は mPSL ハルス療法に加えシクロフォスファミドの併用も効果なく、平成 9 年より、アサチオプリン、シクロフォスファミド、シクロプリン大量療法。平成 12 年より、シクロフォスファミドパルス療法。白血球除去療法を行うも無効。血管炎に基づく皮膚潰瘍に対し植皮を行うも効果なく、悪化により右腓骨切除、さらには肘下切断を施行。さらに壊死性血管炎が悪化し、下肢の潰瘍も拡大傾向にあった。MRA 200mg/週による治療を開始後、それまで認めていた発熱や皮膚の紅斑、筋肉痛の改善を認めた。しかし、MRA 治療開始時にすでに悪化していた右肘下切断部の皮膚の壊死性病変のため、右大腿部での切断を余儀なくされた。その後、血中 IL-6 の低下に伴い白血球数も正常化し病態が安定した。

D 考察

従来は治療ではコントロール不可能であった難治性の血管炎患者に対し MRA が有効であった。わずか 2 例の患者ではあるが、MRA が有効であったことから、IL-6 阻害治療は血管炎の新しい治療法となりうることを示唆された。同時に、このことは IL-6 が血管炎の病態形成に不可欠な分子であることを示す。また、いずれの症例においても治療経過中に IL-6 そのものの低下を認めていることから、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ある。一方、大動脈炎症候群の患者において、IL-6 阻害治療中に血中 TNF α の増加を認めたが、臨床症状ならびに検査値の悪化は認めなかった。このことから、TNF α は大動脈炎症候群の症状ならびに検査値異常の発現に直接的には関与はしていないと思われる。

E 結論

血管炎に対する IL-6 シグナル阻害治療の可能性が示された。血管炎は自己免疫疾患に共通に認められる難治性病態の一つであることから、IL-6 阻害治療は他の自己免疫疾患に伴う血管炎にも有効である可能性がある。今後症例数を増やして治療効果を検討するとともに、血管炎の病態におけるサイトカインのシグナル異常を明らかにした

い。また、ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体以外に、IL-6 のシグナルを阻害する分子を用いた治療法の開発を行いたい。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

1 論文発表

- 1 Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T
Interleukin-6 In *Smolen J, Lipsky P, eds Targeted Therapy in Rheumatology London Martin Dunitz, 2003, 231-241*
- 2 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
- 3 Goya S, Matsuoka H, Mori M, Morishita H, Kida H, Kobashi Y, Kato I, Taguchi Y, Osaki I, 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, 200 82-87
- 4 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, 48 1521-1529
- 5 Saeki Y, Mima T, Ishii T, Ogata A, Kobayashi H, Oshima S, Ishida T, Tabunoki Y, Kitayama H, Mizuki M, Takada Y, Asaoku H, Kitano M, Nishimoto N, Yoshizaki K, Maeda M, Kon S, Kinoshita N, Ueda T,

Kawase I Enhanced production of osteopontin in multiple myeloma clinical and pathogenic implications *Br J Haematol* 2003 , 123 263-70

- 6 Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi I, Hashimoto J, Azuma J, Kishimoto T Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin 6 receptor antibody *Arthritis Rheum* (in press)
- 7 Ito H, Takazoe M, Fukuda Y, Hibi T, Kusugami K, Andoh A, Matsumoto T, Yamamura T, Azuma J, Nishimoto N, Yoshizaki K, Shimoyama I, Kishimoto T A Pilot Randomized Trial of a Human Anti-Interleukin-6 Receptor Monoclonal Antibody in Active Crohn's Disease *Gastroenterol* (in press)
- 8 Mihara M, Shiina M, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Akamatsu K Anti-interleukin-6 receptor antibody inhibits murine AL-amyloidosis *J Rheum* (in press)

2 学会発表

- 1) Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Hashimoto J, Kishimoto T, 67th National Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology Long-term safety and efficacy of anti-interleukin 6 receptor antibody (MRA, Atlizumab) in patients with rheumatoid arthritis Orlando, U S A 2003 10 23-28
- 2) Norihito Nishimoto, American Society of Hematology 45th ASH Annual Meeting and Exposition The long-term safety and efficacy of humanized anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody, MRA in multicentric castlemans disease San Diego, U S A 2003 12 5-9
- 3) 西本 憲弘, 第 47 回日本リウマチ学会・シンポジウム「リウマチ薬物治療の最近の進歩」 抗 IL-6 レセプター抗体 東京 2003 4 24-26
- 4) 第 47 回日本リウマチ学会・シンポジウム「EBM に基づくリウマチ治療」 抗 IL-6R 抗体療法は TNF 阻害療法とどこが違うか 東京 2003 4 24-26

- 5) 西本志弘, 第6回造血器腫瘍シンポジウム IL-6を標的とする分子治療 基礎から臨床へ 東京 2003 6-7
- 6) 西本志弘, 第21回日本炎症 再生医学会 シンポジウム「生物製剤による炎症制御」IL-6レセプター抗体(MRA)を用いた関節リウマチの治療 京都 京都国際会議場 2003 11 26-27
- 7) 西本志弘, 第33回日本免疫学会 モノクローナル抗体を用いた免疫難病の治療 福岡 福岡国際会議場 2003 12 8-10
- 8) 西本志弘, 第15回中之島リウマチセミナー 抗IL-6治療 大阪 大阪国際会議場 2003 12 13-14

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。

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

分担研究者 野島美久 群馬大学大学院医学系研究科生体制御内科 教授

研究要旨 免疫系において機能する新しいシグナリングシステムである CD47/SHPS-1 系が溶血性貧血の病態形成において抑制性の機能を示すことが明らかとなった。

A 研究目的

SHPS-1 は、主に単球マクロファージ系細胞に発現し、広く血球上に発現される CD47 とレセプターリガント関係を形成する。細胞内に ITIM モチーフを有することから抑制性のシグナルを伝達すると予想されている。特に CD47 分子を遺伝的に欠損する CD47 ノックアウトマウス由来の赤血球は脾臓内マクロファージにより容易に貪食能されてしまうことが報告され、CD47/SHPS-1 系がマクロファージ機能を抑制すると推察されている。

溶血性貧血は免疫応答の異常から自己の赤血球に対する自己抗体が産生され、自己抗体と結合した感作赤血球(オプソニン化赤血球)が脾臓内で過剰に処理されることにより発症する代表的な自己免疫疾患である。今回我々は自己免疫性溶血性貧血の病態形成における CD47/SHPS-1 系の関与を明らかにするために、すでに作成済みである SHPS-1 の細胞内領域を特異的に欠損したノックインマウス(SHPS-1 ノックインマウス)を用いて解析を行った。

B 方法

SHPS-1 ノックインマウスは、C57BL/6 に対して Back-Cross を進め 第 5 世代で 6 週齢の雌を使用した。オプソニン化赤血球は、C57BL/6J の 6 週齢雌由来の赤血球を CSFE (Molecular Probe)を用い Final 0.1 M の濃度でラベルし、その後、ラット抗マウス RBC 抗体 (CEDERLANE)と反応させることで準備した。抗体結合の

程度を FACS caliber にて確認した後、実験に用いた。

- 1 赤血球クリアランスの測定。上述の方法で用意したラベル赤血球をノックインマウスとコントロールマウスに尾静注し、末梢血中に循環する CSFE ラベル赤血球をフローサイトメーター(FCM)にて経時的に確認することでクリアランスを求めた。
- 2 ラベル赤血球貪食過程における組織染色。 静注 8 時間後の脾臓及び肝臓の凍結組織を作成し、脾臓マクロファージのマーカーとして抗マウス F4/80 抗体 (CA11AG)を クロマー細胞の同定には MOMA-1 抗体 (CEDRL1 ANF)を用いて免疫染色を行い CSFE ラベル赤血球の処理過程におけるこれらの細胞の関与を検討した。
- 3 F4/80 陽性マクロファージ数の検討。SHPS-1 ノックインマウスとコントロールマウスの脾臓をコラゲナーゼで処理し 脾細胞を F4/80 抗体で染色し FCM で解析した、マクロファージの赤血球貪食能の検討(in vitro)。腹腔よりチオクリコレート(IGC)で誘導したマクロファージを用いて検討した。具体的には TGC(Sigma)溶液を SHPS-1 ノックインマウスと、コントロールマウスの腹腔に投与し、4 日目の腹腔内マクロファージを回収し、一晚培養した後に赤血球と共培養して、マクロファージに貪食された赤血球を顕微鏡でカウントすることで貪食能を確認した。

(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 結果

- 1 赤血球クリアランスの確認。免疫クロフリンが結合しない正常赤血球を輸注したときの赤血球クリアランスの亢進は SHPS-1 ノックインマウスと、コントロールマウス共にみられず、減少の程度も同様であったか。オプノニン化赤血球を輸注したときには、赤血球クリアランスは亢進し、その程度はコントロールマウスにくらべ、SHPS-1 ノックインマウスで強かった。
 - 2 ラヘル赤血球貪食過程における組織染色。ラヘル赤血球は脾臓内では赤脾髄に散見され、主として F4/80 陽性細胞がラヘル赤血球を貪食していた。肝臓のクノハ一細胞もラヘル赤血球を処理している事が確認された。
 - 3 F4/80 陽性マクロファージ数の検討。コラケナーセ処理後の脾臓を FCM で解析したところ、コントロールマウスに比べ、SHPS-1 ノックインマウスにおいては F4/80 陽性のマクロファージ数が増加している事が確認された。
- マクロファージの赤血球貪食能の検討(in vitro)。腹腔より単離したマクロファージを用いた実験でも、免疫クロフリンで感作されない赤血球に対する貪食は弱く、ノックインマウスとコントロールマウスでほとんど差がなかったか、オプノニン化赤血球に対する貪食能は、SHPS-1 ノックインマウス由末の腹腔マクロファージで亢進していた。

D 考察

- 1 SHPS-1 ノックインマウスで in vivo 投与されたオプノニン化赤血球のクリアランスの亢進がみられた。また SHPS-1 ノックインマウス由末のマクロファージでオプノニン化赤血球に対する貪食能が亢進していることが in vitro でも確認された。これらの事実から CD47/SHPS-1 ンクナル系は Fc レセプターのンクナル伝達に関して抑制性に機能すると考えられた。
- 2 SHPS-1 ノックインマウスの脾臓の細胞成分が赤脾髄を中心に増加していることはこれまでの組織学的な検討で明らかになっているか、今回 SHPS-1 ノックインマウスにおいて F4/80 陽性のマクロファージの増加が確認され

たことから CD47/SHPS-1 ンクナル系は脾臓内マクロファージ数の調節にも関与することが明らかとなった。

E 結論

CD47/SHPS-1 ンクナル系はオプノニン化赤血球が脾臓内で処理される過程において抑制性のンクナル伝達を行う。また、CD47/SHPS-1 ンクナル系は脾臓内に分布するマクロファージの数のコントロールにも関与し、溶血性貧血の病態形成においては重要なンクナル系である事が明らかとなった。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

1 論文発表

- 1 Ota I, Maeshima A, Yamashita S, Ikeuchi H, Kaneko Y, Kuroiwa I, Hiromura 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
- 2 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

2 学会発表

- 1 石川智美, 全子和光, 岡上準, 富沢健史, 的崎尚, 野島美久 自己免疫性溶血性貧血の病態形成
- 2 における SHPS-1/CD47 ンクナル系の機能解析, 第 33 回, 日本免疫学会学術総会, 福岡, 2003 年 12 月。

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。

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

分担研究者 針谷正祥 東京医歯科大学医学部臨床試験管理センター 助教授

研究要旨

T細胞の活性化にはT細胞受容体からのシグナルに加え、共刺激分子からのシグナルが必須である。我々は全身性エリテマトーデス(SLE)末梢血 T 細胞における共刺激分子シグナル異常を解析した。CD28 costimulation および ICOS costimulation は健康人末梢血 T 細胞において mitogen-activated protein kinase (MAPK)、phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)、nuclear factor kappa B (NFkB)、p70S6 kinase 経路を活性化した。SLE 末梢血 T 細胞は CD28 costimulation による IFN- γ 産生能が有意に高く、この IFN- γ 産生亢進には転写因子 T-bet とその下流で作用する転写因子 HLX が重要な働きをしていると考えられた。

A 研究目的

我々は昨年度の本研究班で全身性エリテマトーデス(SLE)末梢血リンパ球における inducible costimulator (ICOS)の発現と機能を検討した。SLE 患者では、末梢血 T 細胞の ICOS 発現が亢進し、抗 CD3 抗体+抗 ICOS 抗体 (ICOS costimulation) 刺激下および抗 CD3 抗体+抗 CD28 抗体 (CD28 costimulation) 刺激下での SLE 患者末梢血 T 細胞の増殖能、interferon- γ 産生能が健康人に比べ、有意に亢進している事を見出した。本年度の研究では ICOS costimulation および CD28 costimulation による健康人末梢血 T 細胞の増殖に関わるシグナル伝達経路の検討および、SLE における interferon- γ ・IFN- γ 産生亢進機序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 16 例、健康者 14 例を対象とした。末梢血よりリンパ球を分離し、MACS system による negative selection により T 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 抗体または固相化抗 CD3 抗体+液相抗 CD28 抗体により行

った。細胞増殖能は 3 H-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は FLISA 法にて測定した。分離直後または刺激後 6 時間の末梢血 T 細胞より total RNA を抽出し、cDNA を作成した。定量 PCR 法によりサイトカインおよび転写因子の mRNA を定量した。

(倫理面への配慮)

採血時に全ての症例およびボランティアより試験参加の同意を得た。

C 結果

1) ICOS costimulation および CD28 costimulation による健康人末梢血 T 細胞の増殖に関わるシグナル伝達経路
健康人末梢血 T 細胞を各種 kinase 阻害剤と 37 度、30 分間インキュベーション後、ICOS costimulation または CD28 costimulation 刺激を行った。細胞増殖能を 3 H-thymidine の取り込みにより測定した。PI3 kinase 阻害剤である Wortmanin、LY290042、I κ B のリン酸化阻害剤である Bay11-7082、p70 S6 kinase 阻害剤である Rapamycin は、いずれの刺激による T 細胞増殖も強く抑制した。

LY290042 は ICOS costimulation よりも CD28 costimulation による T 細胞増殖をより低濃度で抑制した。Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路の検討では MAPK ERK kinase 1/2 (MEK1/2) 阻害剤である U0126、Jun N-terminal kinase 阻害剤である SP600125 がいずれの刺激による T 細胞増殖も強く抑制した。U0126 は CD28 costimulation よりも ICOS costimulation による細胞増殖をより低濃度で強く抑制した。

2) SIF における interferon- γ 産生亢進機序

末梢血 T 細胞を無刺激で 72 時間培養した上清中の IFN- γ 産生量は活動期 SIF 0.85 +/- 0.98 pg/ml、非活動期 SIF 0.09 +/- 0.29 pg/ml、健常人 0.19 +/- 0.63 pg/ml であり、活動期 SIF で有意に高値を示した (活動期 SIF vs 健常人 $p < 0.01$ 、活動期 SIF vs 非活動期 SIF $p < 0.01$)。次に、CD28 costimulation による末梢血 T 細胞の IFN- γ 産生能を非活動期 SIF と健常人で比較した。mRNA レベル ($p = 0.01$)、蛋白レベル ($p = 0.03$) のいずれにおいても、非活動期 SIF 末梢血 T 細胞は健常人末梢血 T 細胞に比較して CD28 costimulation による IFN- γ 産生が有意に亢進していた。また、健常人、非活動期 SIF 患者を併せて、上清中の IFN- γ 濃度と刺激 6 時間後の IFN- γ mRNA 量の相関を取ると、有意な正の相関 ($p = 0.03$ 、 $R^2 = 0.26$) が認められた (図 1)。

次に、IFN- γ を産生する Th1 型 T 細胞への分化を規定する T-bet および GATA-3 遺伝子の mRNA 発現量を分離直後の末梢血 T 細胞を用いて検討した。T-bet mRNA は非活動期 SIF 末梢血 T 細胞において健常人よりも高い傾向を認め ($p = 0.07$)、T-bet mRNA / GATA-3 mRNA 比は健常人に比較して非活動期 SIF 末梢血 T 細胞において有意に上昇していた ($p = 0.0005$) (図 2)。

IFN- γ 産生に関与するさまざまな転写因子あるいは coactivator の中で、Tbx、HLX、CREB-binding protein (CBP) 各遺伝子の mRNA レベルにおける発現を分離直後の末梢血 T 細胞を用いて検討した。HLX mRNA は健常人に比較して非活動期 SIF 末梢血 T 細胞において有意に上昇していた ($p = 0.02$)。Tbx および CBP の mRNA レベルでの発現は健常人と非活動期 SIF で有意差を認めなかった。

D 考察

昨年度の本研究で非活動期 SIF 末梢血 T 細胞が ICOS costimulation および CD28 costimulation に対して有意に高い増殖応答を示すことを我々は報告した。SIF における反応性亢進の機序を明らかにするために、本年度は健常人末梢血 T 細胞における ICOS costimulation および CD28 costimulation のシグナル伝達経路を解析し、MAPK、PI3K、NF- κ B、p70S6 kinase 経路が関与することを明らかにした。今後は、costimulation および CD28 costimulation に対するこれらの経路の活性化における SIF と健常人末梢血 T 細胞の違いを検討する予定である。

IFN- γ は単球、マクロファージの主要な活性化因子であり、SIF の病態形成にも関与している。活動期 SIF 末梢血 T 細胞の IFN- γ 産生量は健常人に比較して有意に高く、また、非活動期 SIF 末梢血 T 細胞は CD28 costimulation により健常人に比較して有意に多量の IFN- γ を産生したことから、SIF 末梢血 T 細胞は高い IFN- γ 産生能を有していると考えられる。また、T-bet mRNA / GATA-3 mRNA 比および HLX mRNA 定量結果から、SIF 末梢血 T 細胞における IFN- γ 産生には転写因子 T-bet とその下流の HLX が重要な働きをしていると考えられる。

E 結論

健常人末梢血 T 細胞における ICOS costimulation および CD28 costimulation は MAPK、PI3K、NF- κ B、p70S6 kinase 経路を活性化する。

SIF 末梢血 T 細胞における IFN- γ 産生亢進には転写因子 T-bet とその下流の HLX が重要な働きをしている。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

1 論文発表

特になし。