

D 考察

env-pX ラット CD25⁺CD4⁺ T 細胞の機能障害には同細胞における env-pX 遺伝子発現が重要な役割を果たしており、胸腺での分化成熟過程の異常が直接的な原因ではないと考えられた。env-pX ラット CD25⁺CD4⁺ T 細胞の機能障害には、CTLA-4、Foxp3、GITR や SOCS ファミリー分子の遺伝子発現の低下が関与している可能性が考えられる。今後、env-pX 遺伝子発現とこれら遺伝子の発現異常との関連性をさらに追求してゆく必要がある。

E 結論

HTLV-I env-pX 遺伝子がコードする p40Tax は複数の経路を介して宿主細胞のさまざまな遺伝子転写に影響を及ぼすことが知られている。HTLV-I 感染者に限らず p40Tax の作用経路を模倣する分子異常が生じた場合、CD25⁺CD4⁺ T 細胞に機能障害が発生し、自己免疫疾患の発症に関与する可能性が考えられる。env-pX ラットは、ヒト自己免疫疾患の発症における CD25⁺CD4⁺ T 細胞の機能障害の意義を考えるうえで非常に有用な動物モデルである。

F 健康危険情報

該当なし。

G 研究発表

1 論文発表

- 1 Higuchi, M, Ishizu, A, Ikeda, H, Hayase, H, Fugo, K, Tsuji, M, Abe, A, Sugaya, T, Suzuki, A, Takahashi, T, Koike, T, Yoshiki, T Functional alteration of peripheral CD25⁺CD4⁺ immunoregulatory T cells in a transgenic rat model of autoimmune diseases *J Autoimmun* 20 43-49, 2003
- 2 Ishizu, A, Tsuji, T, Abe, A, Saito, S, Takahashi, T, Ikeda, H, Meruelo, D, Yoshiki, T Transduction of dominant negative ATF-1 suppresses the pX gene expression in joint fibroblastic cells derived

from HTLV-I transgenic rats *Exp Mol Pathol* 74 309-313, 2003

- 3 Kawada, M, Ikeda, H, Takahashi, T, Ishizu, A, Ishikura, H, Katoh, H, Yoshiki, T Vaccination of fusion cells of rat dendritic and carcinoma cells prevents tumor growth in vivo *Int J Cancer* 105 520-526, 2003
- 4 Nakaya, H, Ishizu, A, Ikeda, H, Tahara, M, Shindo, J, Itoh, R, Takahashi, T, Asaka, M, Ishikura, H, Yoshiki, T In vitro model of suicide gene therapy for alpha-fetoprotein-producing gastric cancer *Anticancer Res* 23 3795-3800, 2003
- 5 Tsuchikawa, T, Ikeda, H, Kikuchi, K, Tsuji, T, Baba, T, Ishizu, A, Tanaka, Y, Kato, H, Yoshiki, T Hematopoietic progenitor cells as possible origins of epithelial thymoma in a human T lymphocyte virus type I pX gene transgenic rat model *Lab Invest* 84 245-252, 2004

2 学会発表

- 1 Hayase, H, Ishizu, A, Higuchi, M, Abe, A, Tsuji, M, Ikeda, H, Yoshiki, H Comparative characterization of CD25⁺CD4⁺ T cells between HTLV-I transgenic and wild type rats 11th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, San Francisco *AIDS Res Hum Retroviruses* 19 S38-39, 2003
- 2 Otsuka, N, Ikeda, H, Tanaka, S, Ishizu, A, Yoshiki, T Tissue specific expression of the env protein in fetus rats carrying a full length HERV-R gene 11th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, San Francisco *AIDS Res Hum Retroviruses* 19 S67, 2003
- 3 Ikeda, H, Abe, A, Ishizu, A, Hayase, H, Yoshiki, T A transgenic rat model of HTLV-I induced immunological diseases effect of the env-pX transgene to effector cells and target tissues in collagen induced arthritis 11th International Conference on

- Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, San Francisco AIDS Res Hum Retroviruses 19 S68, 2003
- 4 Tsuji, T, Ikeda, H, Ishizu, A, Takahashi, T, Yoshiki, T Malignant transformation of epithelial thymoma developed in HTLV-I pX transgenic rat by heterotopic transplantation and its molecular analysis 11th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, San Francisco AIDS Res Hum Retroviruses 19 S71-72, 2003
 - 5 石津明洋, 富居一範, 早瀬広子, 樋口正人, 阿部麻美, 辻 宗啓, 辻 隆裕, 高橋利幸, 他田 仁, 吉木 敬 HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラットに認める免疫異常と自己免疫疾患の発症 第 92 回日本病理学会総会, 福岡 日本病理学会会誌 92 167, 2003
 - 6 石津明洋 Dominant Negative ATF-1 を組み込んだシンヒスウイルスヘクターによる関節リウマチの遺伝子治療モデル シンポジウム-11「リウマチの動物モデルと遺伝子治療」第 47 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 東京 リウマチ 43 235, 2003
 - 7 石津明洋, 富居一範, 早瀬広子, 阿部麻美, 辻 宗啓, 宮武由甲子, 他田 仁, 吉木 敬 壊死性血管炎の発症における胸腺の関与について 第 5 回オステオポンチン研究会生体防御機能異常ワークショップ 2003 第 6 回肝臓生物学研究会合同年会, 札幌 プログラム p45
 - 8 阿部麻美, 石津明洋, 辻 宗啓, 早瀬広子, 菅谷壽晃, 鈴木 昭, 高橋利幸, 他田 仁, 吉木 敬 HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラットに認める関節炎の発症ならびに持続機序に関する検討 第 47 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 東京 リウマチ 43 411, 2003
 - 9 阿部麻美, 石津明洋, 辻 宗啓, 早瀬広子, 菅谷壽晃, 鈴木 昭, 辻 隆裕, 高橋利幸, 他田 仁, 吉木 敬 コラーゲン関節炎誘導による HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラットの関節炎発症および持続機序の検討 第 92 回日本病理学会総会, 福岡 日本病理学会会誌 92 223, 2003
 - 10 大塚紀幸, 田中 敏, 山本友希代, 石津明洋, 他田 仁, 吉木 敬 HERV-R トランスジェニックラットにおける Env 蛋白発現と抗原性の解析 第 92 回日本病理学会総会, 福岡 日本病理学会会誌 92 256, 2003
 - 11 宮武由甲子, 他田 仁, 石津明洋, 高橋利幸, 吉木 敬 検体摂取後の室温放置による cDNA アレイ解析結果への影響 第 92 回日本病理学会総会, 福岡 日本病理学会会誌 92 285, 2003
 - 12 山本友希代, 他田 仁, 石津明洋, 辻 隆裕, 高橋利幸, 吉木 敬 TNF- α およびステロイド投与によるヒト培養血管内皮細胞の遺伝子発現への影響 第 92 回日本病理学会総会, 福岡 日本病理学会会誌 92 291, 2003
 - 13 大塚紀幸, 田中 敏, 石津明洋, 他田 仁, 吉木 敬 HERV-R 遺伝子導入ラット胎児における env 蛋白の臓器特異的発現 第 36 回北海道病理談話会, 札幌 北海道医学大会プログラム p21
 - 14 阿部麻美, 石津明洋, 辻 宗啓, 早瀬広子, 菅谷壽晃, 鈴木 昭, 高橋利幸, 他田 仁, 吉木 敬 コラーゲン関節炎誘導による HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラットの関節炎発症および持続機序の検討 第 28 回北海道リウマチ研究会, 札幌 北海道医誌 78 468, 2003
 - 15 早瀬広子, 石津明洋, 宮武由甲子, 外丸詩野, 他田 仁, 吉木 敬 HTLV-I トランスジェニックラットにおける CD25+4+ regulatory T cell の解析 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会, 福岡 日本免疫学会総会・学術集会記録 33 42, 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。

PD-1 欠損マウスにおける自己免疫性拡張型心筋症に関する研究

岡崎 拓（京都大学大学院医学研究科 21 世紀 COE・分子生物学）

研究要旨

ヒトの自己免疫疾患を研究する上において、遺伝子欠損マウスは非常に有用なモデルになりうる。我々はこれまでに免疫抑制受容体 PD-1 の欠損マウスか C57BL/6 系統においては自己免疫性の糸球体腎炎および関節炎を、BALB/c 系統においては自己免疫性の拡張型心筋症を発症することを報告してきた。拡張型心筋症は原因不明の致死の疾患であり、現段階では極めて治療の困難な疾患である。昨年度までに、拡張型心筋症を発症した PD-1 欠損マウスか産生する心臓特異的抗体の抗原か心筋型トロポニン I であること、さらに心筋型トロポニン I に対するモノクローナル抗体の投与により、拡張型心筋症か惹起されることを示してきた。今回我々は、抗心筋型トロポニン I 抗体か心筋細胞の表面に結合し、心筋細胞のカルシウム電流を増強する事を明らかとした。この結果は、心筋細胞のカルシウム電流が障害を受ける事により拡張型心筋症が発症しうることを示したものであり、これまで心臓移植しか治療法かなかったこの難治性疾患に対し、免疫抑制、自己抗体の除去、カルシウム電流の調節といった新たな治療法の可能性を開いた。

A 研究目的

PD-1 は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜蛋白質であり、活性化した T、B、及びミエロイド系細胞に発現か認められる。PD-1 は、チロシン脱リン酸化酵素 SHP-2 をリクルートすることにより抗原受容体刺激を抑制し、免疫反応を負に制御している。我々はこれまでに、PD-1 欠損マウスを作製し、PD-1 欠損マウスか C57BL/6 系統においては自己免疫性の糸球体腎炎および関節炎を、BALB/c 系統においては自己免疫性の拡張型心筋症を発症することを報告してきた。

拡張型心筋症は原因不明の致死の疾患であり、現段階では極めて治療の困難な疾患である。昨年度までに、拡張型心筋症を発症した PD-1 欠損マウスか産生する心臓特異的抗体の抗原か心筋型トロポニン I であること、さらに心筋型トロポニン I に対するモノクローナ

ル抗体を野生型マウスに投与する事により、拡張型心筋症か惹起されることを示してきた。

心筋型トロポニン I は筋肉の収縮においてアクチンとミオシンの結合を調節する事が知られており、細胞質内の I ハントと呼ばれる部位に存在すると考えられている。従って、心筋型トロポニン I に対する抗体か何故心筋細胞の表面に沈着するのか、またとういった機序により心臓の拡張をもたらすのかについては全く予測がつかなかった。

そこで、心筋型トロポニン I が細胞表面に存在する可能性、及び自己抗体か心筋細胞の電気生理学的な活動にあたる影響を解明する事を目的とした。

B. 研究方法

拡張型心筋症を発症した PD-1 欠損マウスより心室筋細胞、及び心房筋細胞を単離し、

電気生理学的手法を用いて各種イオン電流の変化を検討した。また、野生型マウスから単離した心室筋細胞、及び心房筋細胞に抗心筋型トロポニン I 抗体を添加し、各種イオン電流に与える影響を検討した。

抗心筋型トロポニン I 抗体を用いて心室、及び心房切片を染色し、電子顕微鏡を用いて、細胞内局在を詳細に検討した。

C. 研究結果

拡張型心筋症を発症した PD-1 欠損マウスにおいては、心室筋細胞、心房筋細胞共に、電位依存性のカルシウム電流が野生型マウスから単離した細胞と比較して約 3 倍に増加していた (図 1)。細胞の膜容量はほとんど変化していなかったため、カルシウムチャンネル自体の変化によってカルシウム電流の増加がもたらされたと考えられた。

次に野生型マウスから単離した心室筋細胞、及び心房筋細胞に抗トロポニン I 抗体を添加し、電位依存性カルシウム電流を測定したところ、10 分間で約 1.4 倍に増加した (図 2)。拡張型心筋症を発症したマウスでみられた変化と同様の変化であるため、カルシウム電流の増加が拡張型心筋症発症の直接原因である可能性が示唆された。

抗心筋型トロポニン I 抗体を用いて心室、及び心房切片を染色したところ、心筋型トロポニン I がアクチンと結合していると思われる細胞質内の I ハントに染色が認められたのに加え、細胞表面、特に T 管の細胞膜表面に強い染色を認めた (図 3)。心筋型トロポニン I の N 末、及び C 末部分を特異的に認識する抗体を用いて染色したところ、どちらも同様の染色像が得られた。また、アクチン・ミオシンの調節においてトロポニン I と協調して働く事が知られているトロポニン T の細胞内局在を検討したところ、I ハントのみに認められ、細胞表面には認められなかった。従って、心筋型トロポニン I は完全な形で、かつアクチン・ミオシンを調節する時の結合分子とは別個に細胞表面に存在する事が示唆された。

D. 考察

これらの結果から、PD-1 欠損マウスにおいて産生される抗心筋型トロポニン I 自己抗体が、心筋細胞表面に存在する心筋型トロポニン I に結合する事により心筋細胞のカルシウム電流を増加する事が示唆された。カルシウム電流の増加と拡張型心筋症については、活性型カルシニューリンのトランスジェニックマウスが心臓肥大の後に拡張型心筋症を発症する事などが既に報告されているが、PD-1 欠損マウスでは心臓の肥大がみられる事は無いため、直接の因果関係については今後の課題である。

ヒト拡張型心筋症患者においても、抗原は異なるが、カルシウム電流を増加する自己抗体が検出されている。今回明らかになった心臓特異的自己抗体の作用機序がヒトにおいても確認されれば、新たな治療法につながる可能性がある。

E. 結論

今回我々は、PD-1 欠損マウスに発症する拡張型心筋症の原因である、抗心筋型トロポニン I 自己抗体の作用機序を明らかとした。心筋細胞のカルシウム電流が障害を受ける事により拡張型心筋症が発症しうることを示したものであり、これまで心臓移植しか治療法がなかったこの難治性疾患に対し、免疫抑制、自己抗体の除去、カルシウム電流の調節といった新たな治療法の可能性を開いた。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okazaki T, Tanaka Y, Nishio R, Mitsuiye T, Mizoguchi A, Wang J, Ishida M, Hiai H, Matsumori A, Minato N, Honjo T
Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice Nat Med 2003, 9 12, 1477-1483

- 2) Iwai Y, Terawaki S, Ikegawa M, Okazaki T, Honjo T PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver J Exp Med 2003, 198 1, 39-50

2. 学会発表

- 1) Okazaki T, Iwai Y, Honjo T Role of PD-1 in immune tolerance and tumor surveillance Workshop on molecular and genetic basis of autoimmune diseases SLE and RA 2003 Apr (Lisbon)
- 2) Okazaki T, Tanaka Y, Nishio R, Mitsuiye T, Mizoguchi A, Wang J, Ishida M, Hiai H, Matsumori A, Minato N, Honjo T Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice Workshop on molecular and genetic basis of autoimmune diseases SLE and RA 2003 Apr (Lisbon)
- 3) 岡崎拓、田中義正、光家保、松森昭、湊長博、本庶佑 PD-1 と自己免疫疾患。第26回日本医学会総会。2003年4月(福岡)
- 4) Okazaki T, Tanaka Y, Nishio R, Mitsuiye T, Mizoguchi A, Wang J, Ishida M, Hiai H, Matsumori A, Minato N, Honjo T PD-1/PD-L system and autoimmunity 第33回日本免疫学会学術集会。2003年12月(福岡)
- 5) Wang J, Okazaki T, Wang J, Honjo T Blockade of PD-1/PD-L pathway exacerbates diabetes in NOD mice 第33回日本免疫学会学術集会。2003年12月(福岡)
- 6) Otake Y, Okazaki T, Wang J, Takai T, Honjo T Synergistic regulation of autoimmune disease by PD-1 and FcγRIIB 第33回日本免疫学会学術集会。2003年12月(福岡)
- 7) Iwai Y, Terawaki S, Ikegawa M, Okazaki T, Honjo T PD-1 inhibits anti-viral immunity at the effector phase in the liver 第33回日本免疫学会学術集会。2003年12月(福岡)

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

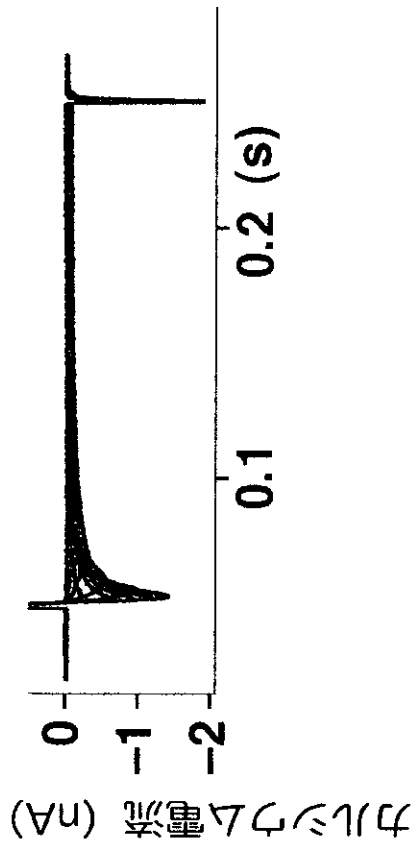
1.特許取得

申請中。

2.その他

特になし。

野生型マウス



PD-1 欠損マウス

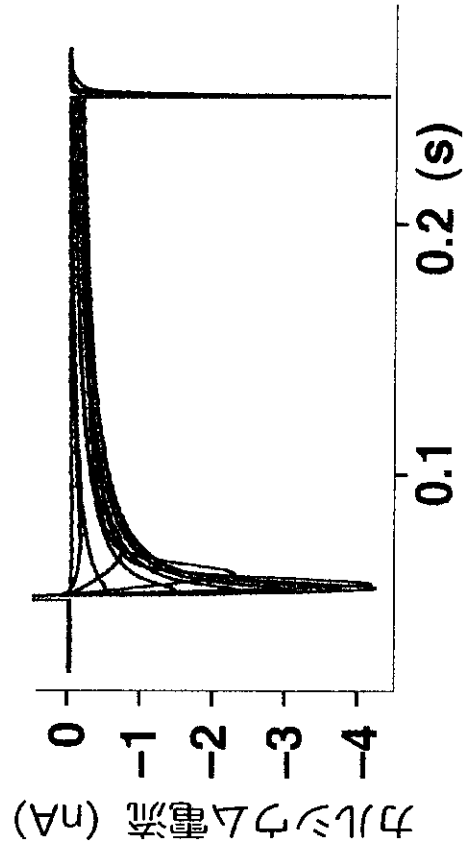


図1 PD-1 欠損マウス由来心筋細胞における電位依存性カルシウム電流の増強

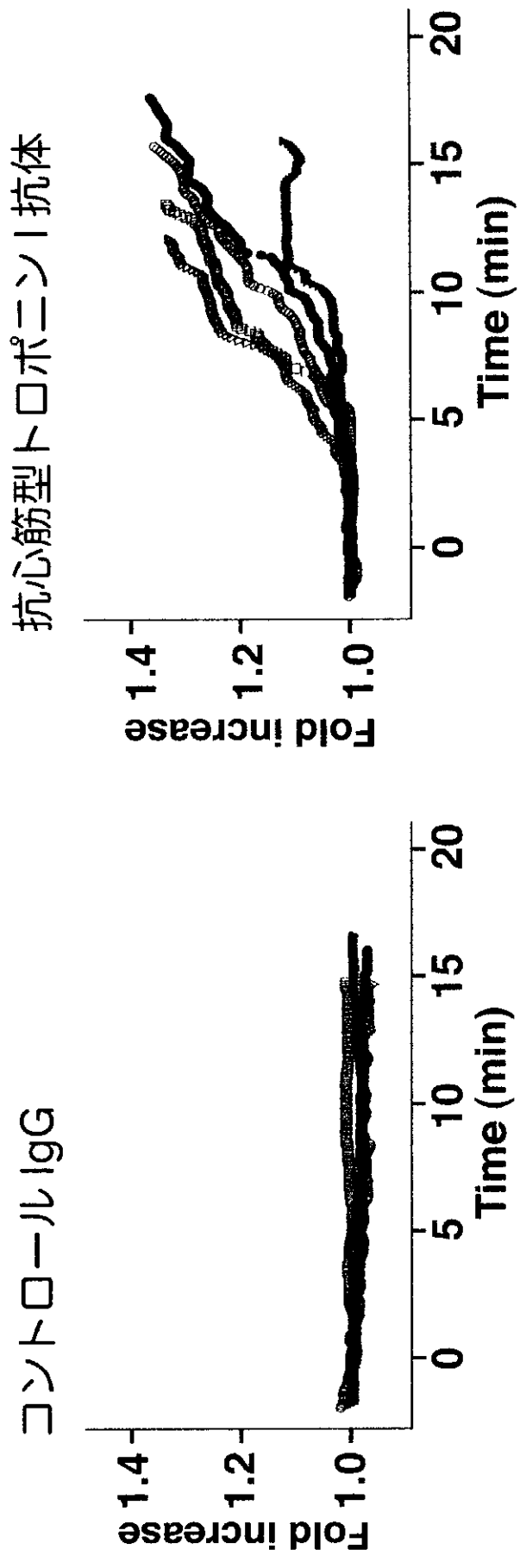


図2 抗心筋型トロポニンI抗体による電位依存性カルシウム電流の増強

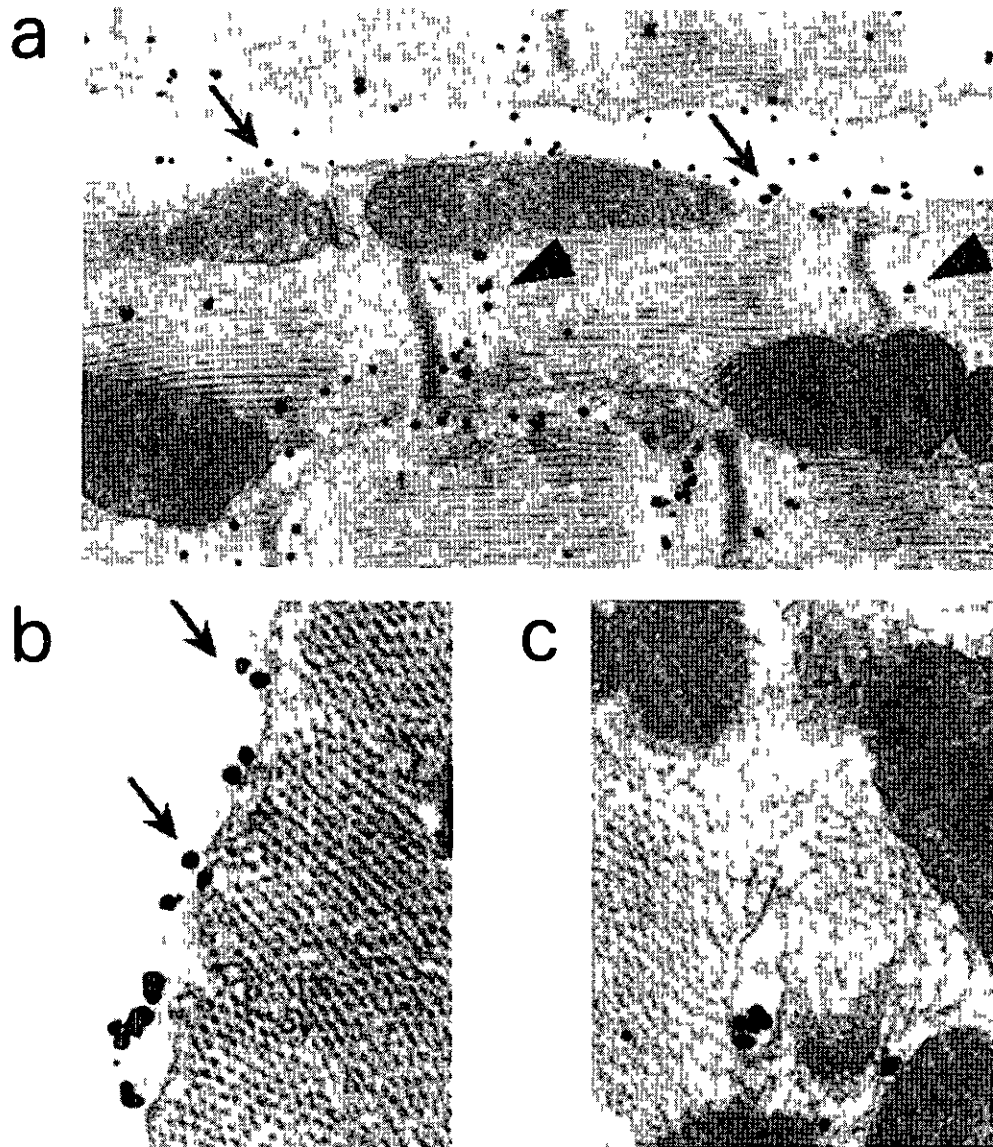


図 3 抗心筋型トロポニンI抗体による
心筋細胞表面の染色

a : 弱拡大

(矢印 ; 心筋細胞表面のシグナル、矢頭 ; I 帯上のシグナル)

b : 心筋細胞表面の強拡大 c : t 管の強拡大

免疫バランスの自己免疫病における意義

西村 孝司(北海道大学遺伝子病制御研究所免疫制御分野 教授)

研究要旨

本研究においては、免疫バランス制御に関与する免疫担当細胞の性状や調節機構を明確にするとともに、それらの自己免疫病発症における意義を明確にすることを目的とした。免疫バランス制御は自然免疫と獲得性免疫によって制御されており、前者の調節細胞としては DC, NKT, NK などが存在し、後者の制御には CD4⁺の Th1/Th2, CD8⁺の Tc1/Tc2 などが重要と考えられている。本研究では、活性化ビタミン D₃ (1,25(OH)₂D₃, VD₃) の樹状細胞サブセットや、Th1, Th2 サブセット誘導に及ぼす影響を検討して、自己免疫病の治療薬として汎用されている VD₃ の免疫バランス制御における意義を明確にすることを目的として研究をおこなった。その結果、VD₃ を BMDC1 の誘導系に加えることによって、MHC class I や共刺激分子の発現増強を著しく抑制し、BMDC1 が本来示す Th1 や Tc1 の誘導促進効果も、強く抑制された。このことから、VD₃ は IFN- γ や IL-12 の作用抑制を介して DC1 誘導を阻害し、Th1 免疫を低下させている可能性が示された。次に、ナイーフ Th 細胞から、IL-2 と抗原あるいは抗 CD3 抗体で刺激する際に、VD₃ を添加して、VD₃ の T 細胞に対する直接作用を検討した。その結果、VD₃ を添加することによって、IFN- 産生型 Th1 の誘導は抑制され、IL-4 産生型の Th2 細胞の誘導が亢進された。これらの結果から、VD₃ は DC サブセットの誘導制御を介した間接的作用、あるいは T 細胞に対する直接作用を介して、Th1 免疫を抑制し、免疫バランス制御に影響を及ぼし得ることが明確にされた。

A. 研究目的

自己免疫病の発症には免疫バランスの破綻が関与していることが明らかにされてきている。また、患者の免疫バランス体質の違いにより、同じ病名の自己免疫病でも、その発症メカニズムが異なることも報告されている。従って、現在、Th1 型免疫病、Th2 型免疫病の区別なく一義的に使用されている自己免疫病治療薬の中には、期待した効果を示さない薬がある可能性もある。その問題を解決するためには、自己免疫病患者に汎用されている薬剤の免疫バランスに及ぼす効果を明確にさせる必要がある。本研究では、自己免疫病患者に、ステロイドとともに併用されている活性化ビタミン D₃ (1,25(OH)₂D₃, VD₃) の樹状細胞サブセットや、Th1, Th2 サブセット誘導に及ぼす影響を検討して、免疫バランス制御における VD₃ の意義を明確にすることを目的として研究をおこなった。

B. 研究方法

(1) DC サブセット誘導に対する VD₃ の効果 マウス骨髄細胞を IL-3 (30 ng/ml) +GM-CSF (30 ng/ml)、IL-3+GM-CSF+ IFN- γ (15 ng/ml) +IL-12 (40 U/ml)、IL-3+GM-CSF+IL-4 (30 ng/ml) の3条件下で培養することにより、BMDC0, BMDC1, BMDC2 のサブセットが誘導された。本系に VD₃ (40 nM) を添加して誘導した DC の機能は、MHC class I (H-2^d), MHC class II (I-A^d), 共刺激分子 (CD80, CD86, CD40, LFA-1) の発現を FACS により解析した。また、誘導した DC を allogeneic マウスの脾臓細胞と MLR を行い、4日後の脾臓細胞の活性化を CD69 をマーカーとして、細胞傷害活性を ⁵¹Cr リリース法、IFN- γ の産生を細胞内染色により調べて検討した。さらに、誘導された DC の機能について調べるために、IFN- γ , IFN- α , IFN- β , STAT1, IFN- γ R, IL-12R, STAT4 の発現を RT-PCR 法により、STAT1 のリン酸化レベルについて Western blotting 法により検討を行った。

(2)Th1/Th2 細胞誘導におよぼす VD3 の効果 DO11 10TCRトランスジェニック T マウス脾細胞から CD4⁺CD45RB⁺のナイーブ T 細胞を FACS Vantage により精製し、それを OVA peptide と feeder, IL-2 存在下で刺激を行った。そこに VD3 を添加したときの Th1/Th2 分化に及ぼす影響について調べるために、誘導してから7日目の細胞について細胞内染色により、IL-4 と IFN- γ の産生を調べた。また、ヒトの臍帯血の細胞を抗 CD3 抗体と IL-2 で刺激を行った時に、VD3 の有無により Th1/Th2 分化に変化が見られるかを同様に細胞内染色により調べた。

動物実験は北海道大学遺伝子病制御研究所動物実験に関する指針に従って行った。

C. 研究結果

マウス骨髄細胞を IL-3+GM-CSF、IL-3+GM-CSF+IFN- γ +IL-12、IL-3+GM-CSF+IL-4 の3条件下で培養することにより、BMDC0, BMDC1, BMDC2 のサブセットが誘導されることを報告してきた。今回、これらの DC サブセットにおいて、VD3 レセプターの発現が異なり、VD3 は DC サブセットの誘導を制御している可能性が示された。そこで、DC サブセット誘導の際に、VD3 を添加してその影響を調べた。その結果、VD3 を BMDC1 の誘導系に加えることによって、他の DC サブセットに比べて、形態の変化が顕著に見られ、また、MHC class I や、共刺激分子、特に CD80 の発現増強を著しく抑制した。BMDC と allogeneic の脾臓細胞とを MLR したときも、BMDC1 が本来示す Th1 や Tc1 の誘導促進効果も、強く抑制され、BMDC1 に VD3 を加えた DC と反応させた脾臓細胞は、BMDC1 で刺激した脾臓細胞に比べ、CD4⁺ T 細胞と CD8⁺ T 細胞の CD69 の発現が著しく低下し、細胞傷害活性および、CD4⁺ T 細胞と CD8⁺ T 細胞からの IFN- γ の産生の顕著な低下が認められた。さらに、VD3 存在下で誘導された DC1 は、非存在下で誘導された DC1 に比べ、IFN- γ , IFN- β , STAT1 の mRNA の発現の低下が見られた。また、STAT1 のリン酸化レベルも VD3 存在下で誘導した DC は低いことが明らかとなった。しかしながら、一方で、IFN-g レセプターや IL-12 レセプターの発現は影響が

見られないことから、その下流のシグナル伝達に VD3 は影響を及ぼしている可能性が示唆された。このことから、VD3 は IFN- γ や IL-12 の作用抑制を介して DC1 誘導を阻害し、Th1 免疫を低下させている可能性が示された。

次に、マウスのナイーブ Th 細胞あるいはヒトの臍帯血の細胞から、IL-2 と抗原あるいは抗 CD3 抗体で刺激する際に、VD3 を添加して、VD3 の T 細胞に対する直接作用を検討した。その結果、VD3 を添加することによって、マウスの細胞では IFN- γ 産生型 Th1 の誘導は抑制され、IL-4 産生型の Th2 細胞の誘導が亢進された。また、ヒトの細胞でも IFN- γ の産生の低下が認められた。これらの結果から、VD3 は DC サブセットの誘導制御を介した間接的作用、あるいは T 細胞に対する直接作用を介して、Th1 免疫を抑制し、免疫バランス制御に影響を及ぼし得ることか明確にされた。

D. 考察

VD3 の免疫バランス制御に関する新たな作用が見出された。Th1 型サイトカインの存在下でより、DC に及ぼす影響が認められることから、今後、その作用機序を追求することにより、創薬開発にも繋がると考えている。VD3 は自己免疫病患者に、免疫抑制剤と共に骨粗鬆抑制剤として汎用されているか、今後はその Th1 免疫抑制作用にも着目して適用を考えていく必要性があると考えられる。

E. 結論

VD3 は DC または Th に作用して、免疫バランスを Th2 型に偏向させることか明確にされた。従って、VD3 は Th1 依存型の自己免疫病患者への投与がより好ましいと考えられる。

F 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1 論文発表

- 1 Yamamoto, S , Tsuji, T , Matsuzaki, J , Zhange, Y , Togashi, Y , Sakikawa, K , Sawada, K , Takeshima, T , Koike, T , Nishimura, T Unexpected Role of TNF- α in Graft Versus Host

- Reaction (GVHR) Donor-Derived TNF- α Suppresses GVHR via Inhibition of IFN- γ -dependent Donor Type 1 Immunity *Int Immunol* 2004 In press
- 2 Fujimura, T, Chamoto, K, Tsuji, T, Sato, T, Yokouchi, H, Aiba, S, Tagami, Y, Tanaka, JI, Imamura, M, Togashi, Y, Koda, T, Nishimura, T Generation of Leukemia-Specific T-Helper Type 1 Cells Applicable To Human Leukemia Cell-Therapy *Immunol Letters*, 2004 in press
 - 3 Li, J, Koda, T, Yamaguchi, A, Yamamoto, S, Sato, T, Togashi, Y, Nishimura, T Identification of Th1- and Th2-specific Genes by Microarray Analysis *Biomedical Res* 24(6) 299-307, Dec, 2003
 - 4 Sato, T, Saito, R, Jinushi, T, Tsuji, T, Matsuzaki, J, Koda, T, Nishimura, S, Takeshima, H, Nishimura, T, IFN-gamma-induced SOCS-1 regulates STAT6-dependent eotaxin production triggered by IL-4 and TNF-alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 Feb 6, 314(2) 468-75
 - 5 Gyobu, H, Tsuji, T, Suzuki, Y, Ohkuri, T, Chamoto, K, Kuroki, M, Miyoshi, H, Kawarada, Y, Katoh, H, Takeshima, T, Nishimura, T, Generation and targeting of human tumor-specific Tc1 and Th1 cells transduced with a lentivirus containing a chimeric immunoglobulin T cell receptor, *Cancer Res* 15,64(2) 1490-1495, 2004
 - 6 Chamoto, K, Tsuji, T, Funamoto, H, Kosaka, A, Matsuzaki, J, Sato, T, Abe, H, Fujio, K, Yamamoto, K, Kitamura, T, Takeshima, T, Togashi, Y, and Nishimura, T, Potentiation of Tumor Eradication by Adoptive Immunotherapy with T-cell Receptor Gene-Transduced T-Helper Type 1 Cells *Cancer Res* 2004 Jan 1, 64(1) 386-390
 - 7 Chamoto, K, Kosaka, A, Tsuji, T, Matsuzaki, J, Sato, T, Takeshima, T, Iwakabe, K, Togashi, Y, Koda, T and Nishimura, T, Critical Role of Th1/Tc1 Circuit for the Generation of Tumor-specific CTL during Tumor Eradication in vivo by Th1-cell Therapy, *Cancer Science*, 94(10), 924-928, Oct 2003
 - 8 Matsuzaki, J, Tsuji, T, Chamoto, K, Takeshima, T, Sendo, F, Togashi, Y and Nishimura, T, Successful elimination of memory-type CD8+ T cell subsets by the administration of anti-Gr-1 monoclonal antibody in vivo, *Cellular Immunol*, 224(2) 98-105, 2003
 - 9 Sato, M, Chamoto, K, and Nishimura, T, A novel tumor vaccine cell therapy using bone marrow-derived dendritic cell type 1 and antigen-specific T helper type 1 cells, *Int Immunol*, 15(7), 837-843, Jul 2003
 - 10 Sasaki, K, Tsuji, T, Jinushi, T, Matsuzaki, J, Sato, T, Chamoto, K, Togashi, Y, Koda, T, and Nishimura, T, Differential regulation of VLA-2 expression on Th1 and Th2 cells a novel marker for the classification of Th subsets *Int Immunol* 2003 Jun, 15(6) 701-10
 - 11 Tsuji, T, Chamoto, K, Funamoto, H, Kosaka, A, Matsuzaki, J, Abe, H, Fujio, K, Yamamoto, K, Kitamura, T, Togashi, Y, Koda, T and Nishimura, T, An efficient methods to prepare T cell receptor genetransduced cytotoxic T lymphocytes type 1 applicable to tumor gene cell-therapy *Cancer Science*, 94(4), 389-393, Apr 30, 2003

- 12 Sekimoto, M , Tsuji, T , Matsuzaki, J , Chamoto, K , Koda, T , Nemoto, K , Degawa, M , Nishimura, S and Nishimura, T, Functional expression of TrkC gene encoding a high affinity receptor for NT-3 in antigen-specific T helper-type 2(Th2) cells *Immunology letters*, 88(2003), 221-226, 2003

2 学会発表

- 1 西村孝司「癌の Th1 細胞治療における DC/Th細胞相互作用の重要性」, 第14回日本樹状細胞研究会・シンポジウム 樹状細胞を用いた細胞免疫療法のシンポジウム, 福岡市(西鉄クラントホテル), 2003年6月6日
- 2 西村孝司「Development of a novel tumor-cell therapy by adoptive transfer with Th1 cells」, 第23回札幌がんセミナー国際シンポジウム, 札幌市(ロイトン), 2003年7月31日
- 3 西村孝司「免疫バランス制御における樹状細胞サブセットの重要性」, 日本臨床免疫学会, 東京, 2003年10月10日
- 4 西村孝司「The critical role of DC1/Th1 cell-cell interaction for the initiation of antitumor immunity invivo(生体内抗腫瘍免疫誘導における DC1/Th1 細胞相互作用の重要性)」, the 34th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund “TUMOUR VACCINE”(tentative), 11/11-13(2003)
- 5 西村孝司「免疫バランスの制御と疾患」, 第33回日本免疫学会総会・学術集会, 2003年12月8-10日

H 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

- 1 特許取得
- 2 実用新案登録
- 3 その他

実験的自己免疫性筋炎(EAM)ラットの経時的病態解析に関する研究

分担研究者 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)
研究協力者 勝又 康弘(東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 助手)
研究協力者 針谷 正祥(東京医科歯科大学膠原病・リウマチ内科
／臨床試験管理センター 助教授)
研究協力者 杉浦 智子(東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 研究生)

研究要旨

組換え C 蛋白誘導性実験的自己免疫性筋炎 (experimental autoimmune myositis, EAM)ラットにおいては、ヒト多発性筋炎と近似して、CD8 陽性 T 細胞の浸潤を認め、これらの T 細胞とマクロファージ・血管内皮細胞・筋細胞間の、接着分子や IL-1 α などのサイトカインを介した相互作用が病態形成に重要であること等が明らかとなった。

A.研究目的

従来、多発性筋炎の優れた実験モデル動物作製の報告は少なく、骨格筋由来/ミオシン分画の免疫による実験的自己免疫性筋炎 (experimental autoimmune myositis, EAM)が主に報告されている。最近、ミオシン分画中に含まれる C 蛋白に、精製ミオシンよりも強い筋炎惹起性があることが、我々の共同研究者である東京都神経科学総合研究所の松本陽らによって報告され、新しい筋炎モデルとして注目を集めている。骨格筋や心筋では、ミオシン分子が重合して thick filament を形成する。C 蛋白は、骨格筋や心筋の thick filament 内に存在する 140kd のポリペプチド鎖である。その生理学的役割は不明であるが、筋収縮時の thick filament の構造支持と立体的変化における働きが示唆されている。本研究では、前年度に引き続き組換え C 蛋白による EAM をラットで作製し、更に病態の経時的な解析を行い、将来的には新規治療法の開発に役立てることを目的とした。

B.研究方法

動物は、6 週齢の雌 Lewis ラットを用いた。Lewis ラット 8 匹に、ヒト組換え C 蛋白フラグメント各 100 μ g を完全フロイントアジュバント (CFA) と共に、週 1 回、計 3 回免疫した (day 0, 7, 14)。また、百日咳菌毒素 (PT) 各 2 μ g を、ブースターとして免疫時に腹腔内投与した (day 0, 7, 14)。初回免疫の 1 週間後である day 7 および最終免疫の 2 週間後である day 28 にエチルエーテルにて各 4 匹ずつ安楽死させ、ラット後肢筋組織を採取した。この群を C 蛋白ラットと称した。対照群としては、生理食塩水と CFA のみを免疫し、かつ PT を投与したアジュバント・ラット、また無処置のコントロール・ラットを、day 7 と day 28 に屠殺して用いた。

day 28 に屠殺した C 蛋白免疫ラットのうち、2 匹から鼠径リンパ節を、4 匹から脾臓を無菌的に採取した。各組織からリンパ球を分離し、免疫に用いた組換え C 蛋白を各濃度で添加し、37 $^{\circ}$ C で 72 時間培養した。最後の 8 時間に 3 H-thymidine を加え、その取り込みを測定した。

組織学的検討として、大腿四頭筋と大腿屈筋を液体窒素で冷却したイソペンタン内で急速凍結させ、クライオスタットで 5 μ m の厚さで連続切片にした。ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、鏡検した。炎症の程度(炎症スコア)は次のように規定した。即ち、Grade 1は、1-4個の筋線維周囲に炎症細胞が浸潤している場合。Grade 2は、5-30個の筋線維周囲に炎症細胞が浸潤している場合。Grade 3は、1つの筋束全体に炎症細胞が浸潤している場合。Grade 4は、1つの筋束を越えて広範囲に炎症細胞が浸潤している場合とした。これらの病変が、1つの切片内で複数認められた場合は、更に 0.5 を加えた。

免疫組織学的検討には、ヒストファインシンプルステインキット[®](ニチレイ)を用いて免疫染色を行い、マイヤーのヘマトキシリン液で対比染色後、鏡検した。1次抗体としては、マウス・モノクローナル抗体として、抗 T cell receptor $\alpha\beta$ (TCR $\alpha\beta$)抗体 (R73)、抗 CD4 抗体 (OX-35) (helper T cell and monocyte)、抗 CD8 抗体 (OX8) (T cell and NK cell)、抗 CD11b/c 抗体 (OX42) (macrophage and granulocyte)、抗 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)抗体 (1A29)、抗 CD11a (lymphocyte function-associated antigen-1, LFA-1)抗体 (WT-1)、抗 vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) 抗体(5F10)、ヤギ・ポリクローナル抗体として抗 integrin $\alpha 4$ (VLA-4)抗体、抗 interleukin (IL) -1 α 抗体を用いた。

次に、ラット筋肉におけるサイトカイン mRNA の発現量を検討した。ラット筋肉の一部を液体窒素で凍結し、破砕した組織から TRIzol[®](Morecular Research Center)を用いて total RNA を抽出した。RT-PCR を行って total RNA から cDNA を合成した。TaqMan assay reagents system[®](Applied Biosystems)と ABI Prism 7900HT sequence detection system[®](Perkin-Elmer)を用いて定量 PCR を行った。Interleukin(IL)-1 α 、IL-1 β 、IL-6、tumor necrosis factor (TNF)- α 、interferon (IFN)- γ の各サイトカインとその内在性コントロールとして GAPDH の mRNA 発現量を測定し、その比率を算出した。

(倫理面への配慮)

EAM 誘導に用いる組換え C 蛋白の作製にあたっては、組換え DNA 実験指針(平成 14 年 1 月 31 日文部科学省告示第 5 号)に基づき実施した。

C.研究結果

C 蛋白免疫ラットのリンパ節細胞や脾細胞においては、C 蛋白の刺激によって、用量依存性に ³H-thymidine の取り込みが増加し、C 蛋白反応性リンパ球が誘導されていると考えられた。

C 蛋白ラット EAM の HE 染色にて、炎症初期の day7 においては、非壊死筋線維間に単核細胞の浸潤を認めるのみであったか、炎症極期の day28 においては、筋線維間や筋束周囲および血管周囲への単核細胞の広範な浸潤、筋線維の大小不同、壊死再生線維といった激しい筋炎所見を認めた。一方、対照群にては、day28 のアシュハント・ラットの一部の切片上にて、筋線維間への僅かな単核細胞の浸潤を認めたのみで、明らかな筋炎所見を認めなかった。また、炎症の程度を Histological score で定量化したところ、経時的な増悪を示した。

免疫組織染色の結果、炎症初期に筋炎組織に浸潤した単核細胞では、CD8 陽性 T 細胞と CD11b/c 陽性マクロファージが同程度に認められた。一方、炎症極期の病変では CD8 陽性 T 細胞数も増加を示したか、相対的には主としてマクロファージの浸潤が強く認められた。

筋組織への細胞浸潤を司る接着分子について免疫組織学的に検討したところ、炎症初期および極期において、浸潤単核細胞(連続切片による評価では主にマクロファージと考えられた)と筋組織内の血管内皮に ICAM-1 および VCAM-1 が発現していた。また、炎症初期および極期において、浸潤単核細胞(連続切片による評価では主に CD8 陽性 T 細胞やマクロファージと考えられた)に LFA-1 が発現していた。炎症極期では ICAM-1 陽性細胞、LFA-1 陽性細胞、VCAM-1 陽性細胞、VLA-4 陽性細胞の集簇が認められた。また、day28 では非壊死筋線維の筋衛星細胞に VCAM-1 の発現を認め、その周囲

に浸潤した単核細胞に VLA-4 の発現を認めた。

定量 PCR の結果、炎症初期の筋組織では IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IFN- γ の mRNA の発現が認められ、そのいずれも炎症極期には発現が低下していた。また、それらのサイトカインの中で、IL-1 α について蛋白レベルでの発現を検討したところ、炎症初期および極期において、浸潤単核細胞 (連続切片による評価では主にマクロファージと考えられた) や筋束内毛細血管内皮において、IL-1 α の発現が認められた。蛋白レベルでは、経時的な変化ははっきりしなかった。

D. 考察

組換え C 蛋白誘導性ラット EAM の病態は以下のように推測された (図 1)。

炎症初期においては、C 蛋白免疫によってリンパ節や脾臓で感作された CD8 陽性 T 細胞が局所の毛細血管から筋組織内に移行し、C 蛋白を提示する抗原提示細胞により活性化される。その際、ICAM-1/LFA-1、VCAM-1/VLA-4 のリガンド-レセプターペアが補助シグナルを送る。また活性化 T 細胞が分泌する IFN- γ がマクロファージを活性化し、活性化マクロファージが分泌する IL-1 α が paracrine あるいは autocrine に作用し、接着分子の発現をさらに亢進・持続させ、炎症細胞の浸潤を促進すると考えられる。極期には、浸潤 CD8 陽性 T 細胞・マクロファージともに増加し、次第にマクロファージ 優位の単核球浸潤に移行する。今回の検討では確かめられてはいないが、その後、活性化した T 細胞が perforin や granzyme などの酵素を分泌して、筋細胞を傷害し、壊死した筋細胞をマクロファージが貪食すると考えられる。

E. 結論

本モデル筋炎の病態は、ヒトの多発性筋炎で提唱されている病態と近似していると考えられた。今後の臨床応用として、大量免疫グロブリン療法的作用機序や、抗 CD40 リガント抗体投与などの新規治療法の有効性・作用機序をこのモデル動物を用いて検討する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Katsumata Y et al Immunohistochemical analysis of recombinant-C-protein-induced experimental autoimmune myositis (EAM) in rats 5th Korea-Japan Combined Meeting of Rheumatology, 2003

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

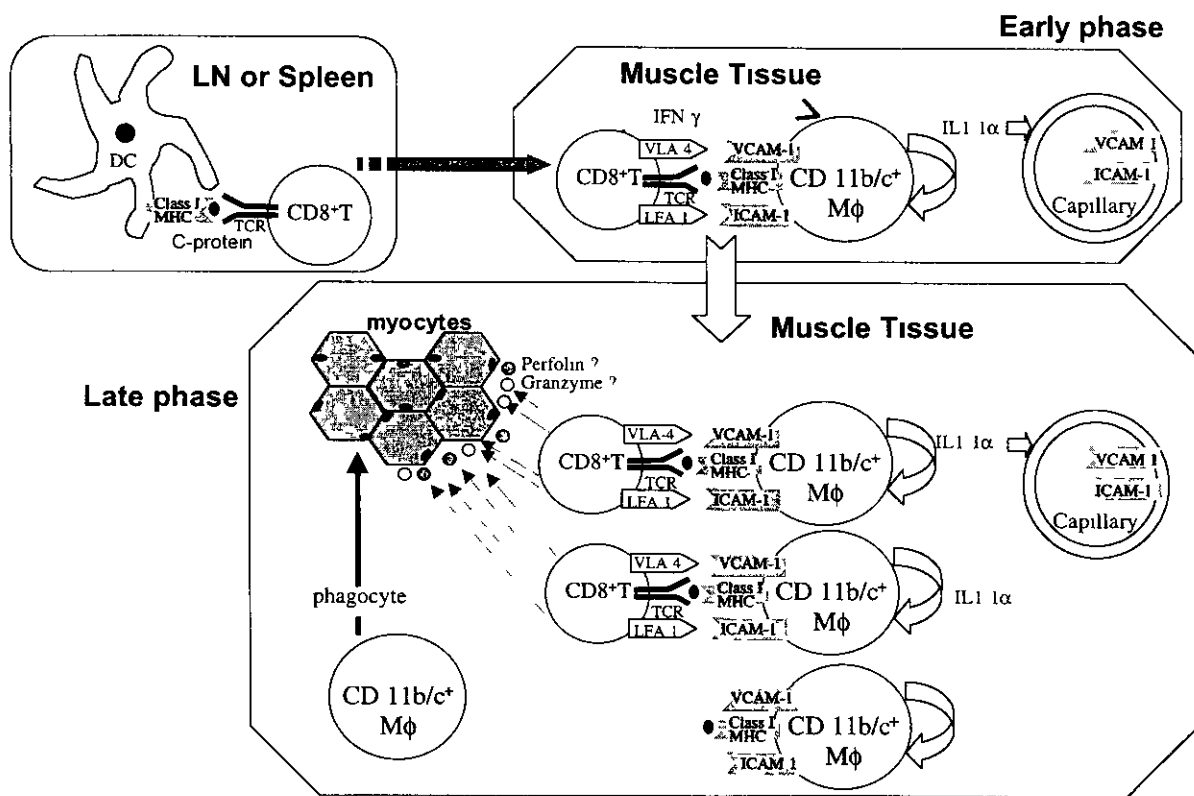


図1 C蛋白誘導性ラット自己免疫性筋炎の病態仮説

Ltk 遺伝子多型と自己反応性 B 細胞の増殖に関する研究

広瀬幸子（順天堂大学医学部・病理学第二講座）

研究要旨

SLE は多くの感受性遺伝子が関与する代表的多遺伝子疾患で、病因解明には遺伝要因の解明が必須である。今回我々は SLE 自然発症 New Zealand マウス系を用いて、自己反応性 B 細胞の増殖に係わる感受性遺伝子のゲノムワイドな連鎖解析を行った。その結果、第 2 染色体上にコードされる *Ltk* (leukocyte tyrosine kinase) 遺伝子の kinase domain に見られる NZB 型多型が、PI3 kinase の活性化を介して自己反応性 B1 細胞の増殖をきたす遺伝要因となっている可能性が示唆された。さらに、ヒトにおいても *Ltk* 遺伝子多型と SLE の相関が認められ、多型を有するヒトの SLE 相対危険度は 2.75 であった。

A. 研究目的

SLE は多くの感受性遺伝子が関与する代表的多遺伝子疾患で、その遺伝様式は極めて複雑である。今回我々は SLE 自然発症 NZB マウスにおける自己反応性 B1 細胞の増殖に関与する感受性遺伝子を同定する目的で、(NZB x NZW) F1 x NZB 退交配マウスの末梢血中の B1 細胞の比率を指標とするゲノムワイドな連鎖解析を行い、NZB マウスの第 2 染色体上の *Ltk* 遺伝子に連鎖して、B1 細胞増殖遺伝子が存在することを見出した。この発見に基づいて、*Ltk* 遺伝子多型が B1 細胞の増殖に関与する可能性について解析した。

B. 研究方法

(1) 261 匹の (NZB x NZW) F1 x NZB 退交配マウスを作製し、末梢血中の全 B 細胞に占める B1 細胞の割合を flow cytometry を用いて解析した。またヒト SLE 151 例および非 SLE 対照群 575 例を検討した。
(2) マイクロサテライト多型の解析 PCR プライマーは Research Genetics (Huntsville, AL) より購入した。退交配マウスの尾より抽出し

た DNA を用いて、NZB と NZW の間に多型の見られるマイクロサテライトマーカーについての遺伝子型を決定した。

(3) *Ltk* シークエンス マウス骨髄から RNA を抽出し、報告された配列を参考にプライマーを設定して 2181 bp の *Ltk* 遺伝子の塩基配列を NZB および NZW で解析した。また、ヒト末梢血から DNA を抽出し、9227~9726 の領域の塩基配列を解析した。

(4) シークエンスで得られた kinase domain の SNP 多型を利用して PCR-SSCP でタイピングを行った。

(5) Kinase domain の SNP を導入した *Ltk* 遺伝子の細胞内ドメインに EGFR の細胞外ドメインを結合し、マウス pro-B cell 株である Ba/F3 に transfect し、EGF 存在下での細胞増殖能に及ぼす SNP の影響を検討した。

（論理面への配慮）マウスの実験においては本研究施設の定める実験指針に基づき、また、ヒト遺伝子の研究に当たっては、倫理委員会の承認を得て行った。

C.研究結果

(1) NZB 由来の B1 細胞増殖に係わる感受性遺伝子座を検索するために、261 匹の(NZB x NZW) F1 x NZB 退交配マウスの末梢血中の全 B 細胞に占める B1 細胞の比率に基づいてマイクロサテライトマーカーを用いた QTL 解析を行った。その結果、図 1 に示すように第 2 染色体の *Ltk* 遺伝子に連鎖する D2Mit524 近傍に NZB 由来の B1 細胞増殖感受性遺伝子の存在が明らかとなった(LOD 3.56)。

Ltk 遺伝子自身が感受性遺伝子となっている可能性を検討するため、*Ltk* 遺伝子の塩基配列を NZB および NZW で解析した結果、NZW は報告された配列に一致していたが、NZB では kinase domain の PI3 kinase p85 subunit 結合 YXXM モチーフの Y 残基より 3 アミノ酸上流に G から E へのアミノ酸置換を伴う SNP が存在していた。この SNP の有無で退交配マウスのタイピングを行い QTL 解析の再検討を行った結果、LOD4.80 のピークが *Ltk* 遺伝子の部位に得られ、*Ltk* 遺伝子自身の関与が強く示唆された(図 1)。

(2) ヒト *Ltk* 遺伝子多型が SLE に相関するかどうかを解析するため、マウスで多型を認めた

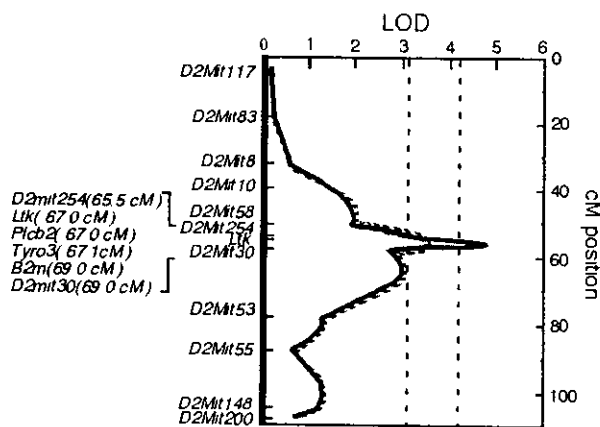


図 1 B1 細胞増殖に関する第 2 染色体における QTL 解析。(NZB x NZW) F1 x NZB 退交配マウス 261 匹を用いて、末梢血の全 B 細胞に占める B1 細胞の比率を測定し、マイクロサテライト多型に基づく QTL 解析を行った。波線は *Ltk* 多型によるタイピングを加える前、実線は加えた後の結果を示す。*Ltk* 遺伝子はセントロメアから 67 cM の部位にマップされている。

kinase domain 領域をカバーするプライマーを設定して、PCR-SSCP を行ったところ、図 2 に示すように SLE151 例中 11 例(73%)、対照群 575 例中 16 例(2.8%)に多型が認められ、両群間に有意な差を認めた($\chi^2=6.64, P=0.01$)。SLE 罹患の相対危険度は 2.75 であった。塩基配列解析で、多型部位は YXXM モチーフの Y 残基より 10 アミノ酸下流の E から K への置換を伴っていた。

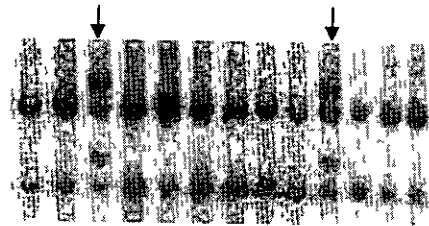


図 2 ヒト *Ltk* 遺伝子多型の PCR-SSCP 解析結果。塩基配列解析の結果、矢印は kinase domain の 763 アミノ酸に E と K の両方が存在するヘテロ型で、それ以外は E のみを有するホモ型であることが示された。SLE ではヘテロ型の頻度が対照群に比較して有意に高かった($P=0.01$)。

(3) NZB 型(750E)およびヒトの SLE で頻度の高い型 (763K)の *Ltk* 遺伝子が細胞の増殖能に与える影響を解析した。今のところ、LTK のリガンドが不明であるため、ヒト *Ltk* 遺伝子(763E)の細胞内ドメインとヒト EGFR の細胞外ドメインを結合させた遺伝子 EL3 を利用して解析した。NZB 型(750E)の *Ltk* 遺伝子と EGFR との結合遺伝子(EL3-750E)およびヒトの SLE で頻度の高い型 (763K)の *Ltk* 遺伝子と EGFR との結合遺伝子(EL3-763K)を pro-B 細胞株 Ba/F3 に transfect し、EGF 存在下で増殖能を比較した。その結果、図 3 に示すように EL3-750E、EL3-763K いずれの transfectant においても、EL3 transfectant に比較して有意に高い増殖能を示した。また、この増殖能の差は、PI3 kinase の特異的 inhibitor である Ly294002 の添加で消失することから、この差が PI3 kinase 活性の差に由来すると考えられた。

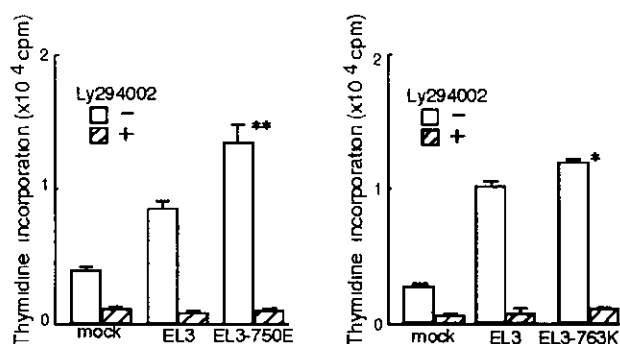


図3 Ba/F3 細胞(mock)、EL3 導入 Ba/F3(EL3)、NZB 型を導入した Ba/F3(EL3-750E)および SLE で高頻度に見られる遺伝子を導入した Ba/F3(EL3-763K)の EGF 添加による増殖能の比較。EL3-750E および EL3-763K ではいずれも EL-3 に比較して有意に高い増殖能を示した(** $P < 0.005$, * $P < 0.01$)。また、この差は Ly294002 (PI3 kinase inhibitor)の添加で消失した。

D. 考察

LTK (leukocyte tyrosine kinase) は insulin receptor superfamily に属する膜型の tyrosine kinase で、主に B 前駆細胞に発現している。Kinase domain には PI3 kinase の p85 subunit に結合する YXXM モチーフが存在し、kinase domain の活性化は、PI3 kinase の活性化を来し、細胞の増殖やアポトーシスの障害に働くと考えられる。今回の解析で、NZB 型 LTK には kinase domain の YXXM モチーフ近傍に一アミノ酸置換を伴う多型が存在し、この多型が自己反応性 B1 細胞増殖の感受性遺伝子として働いており、gain-of-function 型多型であることが示唆された。さらに SLE においても同様の多型が関与する可能性のあることが示された。

PI3 kinase pathway は様々な細胞機能に係わる重要なシグナル伝達分子である。最近の遺伝子変異マウスを用いた解析から、PI3 kinase pathway を亢進させると、脾腫、リンパ節腫大、高免疫グロブリン血症等を来すことから、PI3 kinase pathway の活性化が自己免疫疾患の発症に関与する可能性が示唆されてきている。

B1 細胞は自己反応性の特徴を有し、自己

増殖能を有している。Ltk 遺伝子多型が B1 細胞の増殖に関与し、B2 細胞増殖には関連しない理由については明らかでないが、PI3 kinase の P110 δ catalytic subunit の欠損マウスで B1 細胞が減少することが報告されていることから、B2 細胞に比較して B1 細胞がより PI3 kinase 活性化の影響を受けやすいものと推測される。

ヒト Ltk 遺伝子は 15q15 1-21 1 に存在している。オクラホマのグループが SLE と 15q15 1 近傍に存在するマイクロサテライトマーカー多型との相関を報告しており、これが Ltk 遺伝子多型との相関であるか否かの解析が必要と考えられる。

E. 結論

Ltk の kinase domain の gain-of-function 型多型が自己反応性 B 細胞の増殖能を高め、SLE の一感受性遺伝子として機能している可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Kobayashi M, Kimura H, Liao J, Abe M, Hirose S, Tomino Y Measurement of mouse urinary typeIV collagen using time-resolved fluoroimmunoassay Anal Science, 19 205-210, 2003
- Nakamura K, Xiu Y, Ohtsuji M, Sugita G, Abe M, Ohtsuji N, Hamano Y, Jiang Y, Takahashi N, Shirai T, Nishimura H, Hirose S Genetic dissection of anxiety in autoimmune disease Hum Mol Genet, 12 1079-1086, 2003
- Fujimura S, Kuwahara K, Ezaki T, Tomita K, Hirose S, Sakaguchi N Spontaneous increase of plasma-like cells with high GAMP expression in the extrafollicular region of lymphoid organs of autoimmune-prone mice Autoimmunity, 20 291-301, 2003
- Matsuoka S, Tsurui H, Abe M, Terashima K, Nakamura K, Hamano Y, Ohtsuji M, Honma

- N, Serizawa I, Ishii Y, Takiguchi M Hirose S, Shirai T A monoclonal antibody to the $\alpha 2$ domain of murine major histocompatibility complex class I that specifically kills activated lymphocytes and blocks liver damage in the concanavalin A hepatitis model J Exp Med, 198 497-503, 2003
- Iwai H, Abe M, Hirose S, Tsushima F, Tezuka K, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Miyasaka N, Azuma M Involvement of inducible costimulator-B7 homologous protein costimulatory pathway in murine lupus nephritis J Immunol, 171 2848-2854, 2003
- Tsushima F, Iwai H, Otsuki N, Abe M, Hirose S, Yamazaki T, Akiba H, Yagita H, Takahashi Y, Omura K, Okumura K, Azuma M Preferential contribution of B7-H1 to programmed death-1 mediated regulation of hapten-specific allergic inflammatory responses Eur J Immunol, 33 2773-2782, 2003
- Li N, Nakamura K, Jiang Y, Tsurui H, Matsuoka S, Abe M, Ohtsuji M, Nishimura H, Kato K, Kawai T, Atsumi T, Koike T, Shirai T, Ueno H, Hirose S Gain-of-function polymorphism in mouse and human *Ltk* implications for the pathogenesis of systemic lupus erythematosus Hum Mol Genet, 13 171-179, 2004
- Wen X, Zhang D, Abe M, Jiang Y, Nakamura K, Hamano Y, Kikuchi Y, Takatsu K, Shirai T, Hirose S Transgene-mediated over-expression of interleukin-5 suppresses autoimmune disease, but increases the risk of B cell chronic lymphocytic leukemia J Immunol, in press
- ## 2. 学会発表
- Hirose S, Hamano Y, Li N, Tsurui H, Jiang Y Genetic basis of B-cell chronic lymphocytic leukemia model Japanese Cancer Association Special Symposium on Mouse Models for Hematopoietic Neoplasm January 24-25, 2003, Kyoto
- 広瀬幸子 感受性遺伝子解析による自己免疫発症機序の解析。第 26 回日本医学会総会 シンポジウム 2 自己免疫疾患の克服 2003/4/4-6 福岡
- 阿部雅明、門脇奈穂美、高垣哲也、笹原圭一、鶴井博理、広瀬幸子 SLE マウスにおける脾臓リンパ濾胞樹状細胞の免疫組織化学的特徴 第 92 回日本病理学会総会、日本病理学会会誌 P255, 2003/4/23-25 福岡
- 松岡周二、鶴井博理、阿部雅明、大辻希樹、広瀬幸子 抗マウス MHC class I 抗体が補体非依存性に導くアポトーシス、壊死でない活性化リンパ球の細胞死 第 92 回日本病理学会総会、日本病理学会会誌 P259, 2003/4/23-25 福岡
- 大辻希樹、阿部雅明、松岡周二、白井俊一、広瀬幸子 ループス腎炎発症に及ぼす C1q 遺伝子多型の影響 第 92 回日本病理学会総会、日本病理学会会誌 P301, 2003/4/23-25 福岡
- 広瀬幸子、修 岩、阿部雅明、大辻希樹、小野 栄夫 Fcgr2b 遺伝子プロモーター領域多型と液性免疫応答 第 92 回日本病理学会総会、ワークショップ 13 自己免疫疾患の分子病理 日本病理学会会誌 P167, 2003/4/23-25 福岡
- 鶴井博理、大辻希樹、阿部雅明、奥村康、白井俊一、広瀬幸子 LPS 負荷時におけるマウス脾臓内 dendritic cell の trafficking 第 33 回日本免疫学会・学術集会 2003/12/8-10 福岡
- 松岡周二、鶴井博理、阿部雅明、大辻希樹、張丹青、白井俊一、広瀬幸子 抗体の導く壊死、アポトーシスでないリンパ球の細胞死 (アナポコーシス) の解析と応用 第 33 回日本免疫学会・学術集会 2003/12/8-10 福岡
- 大辻希樹、姜 奕、松岡周二、阿部雅明、鶴井博理、大辻奈穂美、笹原圭一、白井俊一、広瀬幸子 ループス腎炎発症における G-CSF 遺伝子多型の役割 第 33 回日本免疫学会・学術集会 2003/12/8-10 福岡
- 塚本和行、阿部雅明、松岡周二、孫国東、千葉麻子、三宅幸子、山村隆、白井俊一、広瀬幸子 NKT 細胞の活性化と SLE 病態との関連 第 33 回日本免疫学会・学術集会 2003/12/8-10 福岡
- Fuji Takuma, Saito Shigeru, Toei Junichi, Ikeda Kenichi, Kodera Yo, Matsushima Ayako, Inada Yuji, Hirose Sachiko, Shirai Toshikazu, Nishimura Hiroyuki Genome-wide mapping of genes involved in the defective immune