

tolerance in New Zealand Black (NZB) mice  
第33回日本免疫学会・学術集会  
2003/12/8-10 福岡

李 娜、中村和裕、姜 奕、阿部雅明、松岡周二、大辻希樹、白井俊一、広瀬幸子 Ltk kinase domain 多型による B 細胞増殖への影響 第33回日本免疫学会・学術集会 2003/12/8-10 福岡

Xiu Yan, Nakamura Kazuhiro, Shirai Toshikazu, Hirose Sachiko Transcriptional regulation of polymorphic Fcgr2b promoter region and contribution to autoimmune disease 第33回日本免疫学会・学術集会 2003/12/8-10 福岡

張丹青、阿部雅明、趙京元、高橋和子、鶴井博理、松岡周二、西村裕之、白井俊一、広瀬幸子 全身性エリテマトーデスにおける MHC 重鎖領域の拘束性の解析 第33回日本免疫学会・学術集会 2003/12/8-10 福岡

Takahashi Kazuko, Abe Masaaki, Tsurui Hiromichi, Zhang Danqing, Waldschmidt Thomas, Shirai Toshikazu, Hirose Sachiko Analysis of marginal zone B cells in autoimmune-prone NZB/W F1 mice 第33回日本免疫学会・学術集会 2003/12/8-10 福岡

趙京元、張丹青、阿部雅明、大辻奈穂美、笹原圭一、濱野慶朋、黒沢尚、広瀬幸子 タイプ II コラーゲン誘導関節炎の発症に係わる遺伝的要因 第33回日本免疫学会・学術集会 2003/12/8-10 福岡

濱野慶朋、広瀬幸子、鈴木和男 MPO-ANCA 関連半月体形成性腎炎自然発症モデル SCG/K1 マウスの遺伝的解析 第33回日本免疫学会・学術集会 2003/12/8-10 福岡

Yan Xiu, Kazuhiro Nakamura, Xiangshu Wen, Yi Jiang, Shuji Matsuoka, Toshikazu Shirai, Sachiko Hirose Transcriptional regulation by polymorphic Fcgr2b promoter region and contribution to humoral immune response The 33th Midwinter Conference of Immunologists, January 2004, Asilomar, CA, USA

**H.知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）**

特になし

## クラス II HLA 分子を介したシグナル伝達による免疫制御機構に関する研究

分担研究者 松下 祥 埼玉医科大学・免疫学 教授

### 研究要旨

近年、抗原提示細胞が T 細胞に抗原提示する際に、HLA クラス II 分子を介して抗原提示細胞側にも刺激が入ることか明らかになってきている。HLA クラス II 分子は、IFN の刺激によりヒト繊維芽細胞上にも発現するか、その機能については不明であった。本研究では、抗原提示の際の HLA-DR 分子を介したシグナルにより繊維芽細胞が RANTES などを産生し、これには JNK-2 の活性化が関与することを明らかにした。

### A.研究目的

抗原提示細胞(APC)上に発現しているヒト HLA クラス II(HLA-II)分子は、抗原ペプチドと複合体を形成して T 細胞の抗原認識に関わる。さらに近年、この複合体を形成した HLA-II 分子は、APC 内へシグナルを伝達するレセプター分子としても機能することか明らかとなりつつある。ヒト歯肉線維芽細胞(HGF)は、interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )存在下で細胞膜表面に HLA-II 分子を発現するが、抗原ペプチドが存在しても T 細胞の増殖を誘導しない。しかし、抗 HLA-II 抗体によって HLA-II 分子間の架橋を誘導すること、また HLA-II 分子-抗原ペプチド-T 細胞レセプター複合体を形成することによって、HGF はケモカインである Regulated on activation, normal T expressed and secreted (RANTES)や Interleukin-8(IL-8)等を産生することが知られている(Ohyama ら, Cytokine, 2001)。従って、HGF が発現する HLA-II 分子のレセプター分子としての機能を解明することは、抗リン脂質抗体症候群などにおける標的細胞の障害機構の理解へつなかる。本研究は、その際の RANTES 産生に関わるシグナル伝達経路を明らかにすることを目的とした。

### B.研究方法

Recombinant human IFN- $\gamma$ (R&D systems)を HLA-II 分子の発現誘導に、マウス抗 HLA-DR モノクローナル IgG2a(clone L243 Leinco)を HLA-II 分子と抗 HLA-II 抗体との架橋に、抗原非特異的マウス抗ヒト IgG2a (PharMingen)をその陰性対照に用いた。Genistein をプロテインチロシンキナーゼ(PTK)阻害剤として、SP600125(共に Calbiochem)を Jun N-terminal kinase(JNK)阻害剤として用いた。マウス抗リン酸化チロシン抗体(Upstate)、マウス抗リン酸化 JNK 抗体およびラビット抗 JNK 抗体(共に Cell Signaling)をイムノフロット法における一次抗体として用いた。

HGF は、健全歯周組織を有するホランティアの辺縁歯肉から分離して、Nishimura ら(J Dent Res, 1996)の記載に従って培養した。実験には、4-8 継代した細胞を用いた。INF- $\gamma$ で前処理することによって、HGF の細胞膜表面に HLA-II 分子の発現を誘導した。抗 HLA-DR 抗体と HLA-II 分子との架橋による HGF 内への刺激の誘導は、Ohyama らの方法に従って行った。

市販の Human ELISA kit(Endogen)を用いて RANTES の定量を行った。尚、培養上清は

抗 HLA-DR 抗体を加えてから 16 時間後に回収した。

Western blot は Matsuoka ら (J Immunol, 2000) の記載に従って行った。尚, HGF タンパクは, 0.5% NP-40 を含む細胞溶解緩衝液を用いて可溶化し, SDS-PAGE で展開して PVDF 膜に転写した。目的とするタンパクは, 一次抗体として上述の抗体を用い, 二次抗体として horseradish peroxidase (HRP) 標識抗マウス抗体あるいは HRP 標識抗ラビット抗体 (Amersham) を用いて検出した。

RANTES mRNA は RT-PCR 法によって行った。培養 HGF から TRIZOL<sup>®</sup> RNA 分離キット (GIBCO) を用いて RNA を抽出し, mRNA を逆転写した後, RANTES の cDNA に特異的なプライマーを用いて PCR 法を行うことにより cDNA を増幅した。

### C. 研究結果

IFN- $\gamma$  で 72 時間処理した HGF は, 抗 HLA-DR 抗体の存在下で培養すると, 抗体の濃度依存的に RANTES を産生した。HGF からの RANTES 産生は, genistein の濃度に依存的に減少した (Figure 1)。尚, genistein の濃度は, HGF に対して細胞毒性を示さず, かつ PTK を特異的に阻害する濃度とし, 50  $\mu$ M を最大とした。この濃度下で, RANTES 産生量は 50% 減少した。

この刺激によってリン酸化される蛋白は 54-kDa および 27-kDa であった (Figure 2)。

HGF からの RANTES 産生は, SP600125 の濃度に依存して減少した。尚, SP600125 の濃度は, HGF に対して細胞毒性を示さず, かつ JNK を特異的に阻害する濃度とし, 20  $\mu$ M を最大とした。この濃度下において, RANTES 産生量は 80% 減少した (Figure 3A, 3B)。

抗 HLA-DR 抗体で刺激後 3 時間から起こった HGF からの RANTES mRNA の発現は, HGF を 20  $\mu$ M の SP600125 で前処理すると阻害された (Figure 3C)。また, 蛋白レベルでも同様の現象と特異性が確認された (Figure 4)。

リン酸化 JNK に対する抗体を用いた実験では, 刺激後 30–120 分において特異的なリン酸化が観察された (Figure 5)。

### D. 考察

HGF 上の HLA-II 分子を抗 HLA-DR 抗体で架橋させた際の RANTES 産生量が PTK 阻害剤処理によって減少した。このことから, この刺激によって誘導されるシグナル伝達経路に PTK が関与していることが示唆された。同様の刺激によって, 54-kDa および 27-kDa のタンパクのチロシン残基がリン酸化を受け, さらに, JNK-2 がリン酸化を受けた。この JNK-2 の分子量は 54-kDa であり, チロシンリン酸化を受けたタンパクの分子量と一致した。JNK 阻害剤処理下における抗 HLA-DR 抗体の刺激によって, RANTES mRNA の発現が阻害され, さらに, RANTES 産生量が減少した。以上のことから, HGF において HLA-II 分子を介した刺激による RANTES 産生へ至るシグナル伝達経路には, JNK-2 が関与していることが示唆された。

HLA-II 分子を介したシグナル伝達には, HLA-II 分子自体の細胞内ドメインにシグナル伝達部位が存在しないことから, この分子と会合している他の分子が関与するものと考えられている。今後, JNK-2 に至るシグナル伝達経路の上流を調べることによってこの分子が明らかになると共に, HLA-II 分子を介したシグナル伝達の全容が明らかになるものとする。RANTES は, T 細胞, 単球, および好酸球の炎症局所への遊走と浸潤を誘導することが知られている。従って, HGF 上の HLA-II 分子は, 慢性炎症病巣の成立や維持に関与していると考えられる。

### E. 結論

HLA-II 分子を介した HGF からの RANTES 産生には, JNK-2 が関与する。

### F. 健康危険情報

特記事項なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Tanimoto, H, Shimoda, S, Nakamura, M, Ishibashi, H, Kawano, A, Kamihira, T, Matsushita, S, Gershwin, M E and Harada, M  
Promiscuous T cells selected by E coli antigen

in primary biliary cirrhosis J Autoimmunity  
20 255-263, 2003

Shimoda, S, Nakamura, M, Ishibashi, H,  
Kawano, A, Kamihira, T, Sakamoto, N,  
Matsushita, S, Tanaka, A, Worman H J,  
Gershwin, M E and Harada, M Molecular  
mimicry of mitochondrial and nuclear  
autoantigens in primary biliary cirrhosis  
Gastroenterology124 1915-1925, 2003

Meguro, M, Nishimura, F, Ohyama, H,  
Takashiba, S, Murayama, Y and Matsushita, S  
Ligation of HLA-DR Molecules on Fibroblasts  
Induces Rantes Expression via c-Jun N-terminal  
Kinase (JNK) Pathway Cytokine 22 107-115,  
2003

Ohyama H, Takeuchi K, Yamada H, Uemura Y  
and Matsushita S SNPs on IL-12 receptor gene  
associated with the susceptibility to leprosy In  
US-Japan Cooperative Medical Science Program,  
38, 105-110, 2003

松下 祥、松岡多香子、大山秀樹 抗原提示細胞、狩野庄吾、中川武正編「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(東京)pp22-27、2003

松下 祥 歯周病医療から健康科学への貢献とその展望 生物学の立場から。ザ・クインテッセンス22、193-198、2003

松下 祥、植村靖史、大山秀樹 分子擬態によるT細胞セルフトレランスの破綻。BIO Clinical 8、18-22、2003

松下 祥 自己抗原の同定と合成ワクチンのデザイン。自己抗体と自己免疫 03、株式会社医学生物学研究所(名古屋)pp43-50、2003

松下 祥、植村靖史、大山秀樹 MHC 結合性ペプチドワクチン、松島綱治編「分子予防環境医学」、本の泉社(東京)pp715-726、2003

## 2. 学会発表

松下 祥 ペプチド／非ペプチドワクチンとアレルギー。第15回日本アレルギー学会春季臨床大会シンポジウム「気管支喘息の新治療」。横浜、2003年5月13日。

松下 祥 免疫学・アレルギー学の基礎。第24回日本アレルギー学会認定医教育セミナー。東京、2003年8月31日。

Matsushita, S, Matsuoka, T and Ohyama, H  
HLA restriction in allergen-dependent IgE  
production "Genetics and IgE" in World  
Allergy Organization Congress - XVIII ICACI  
Vancouver, September 9, 2003

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

### 1. 特許取得

特記事項なし

### 2. 実用新案登録

特記事項なし

### 3. その他

特記事項なし

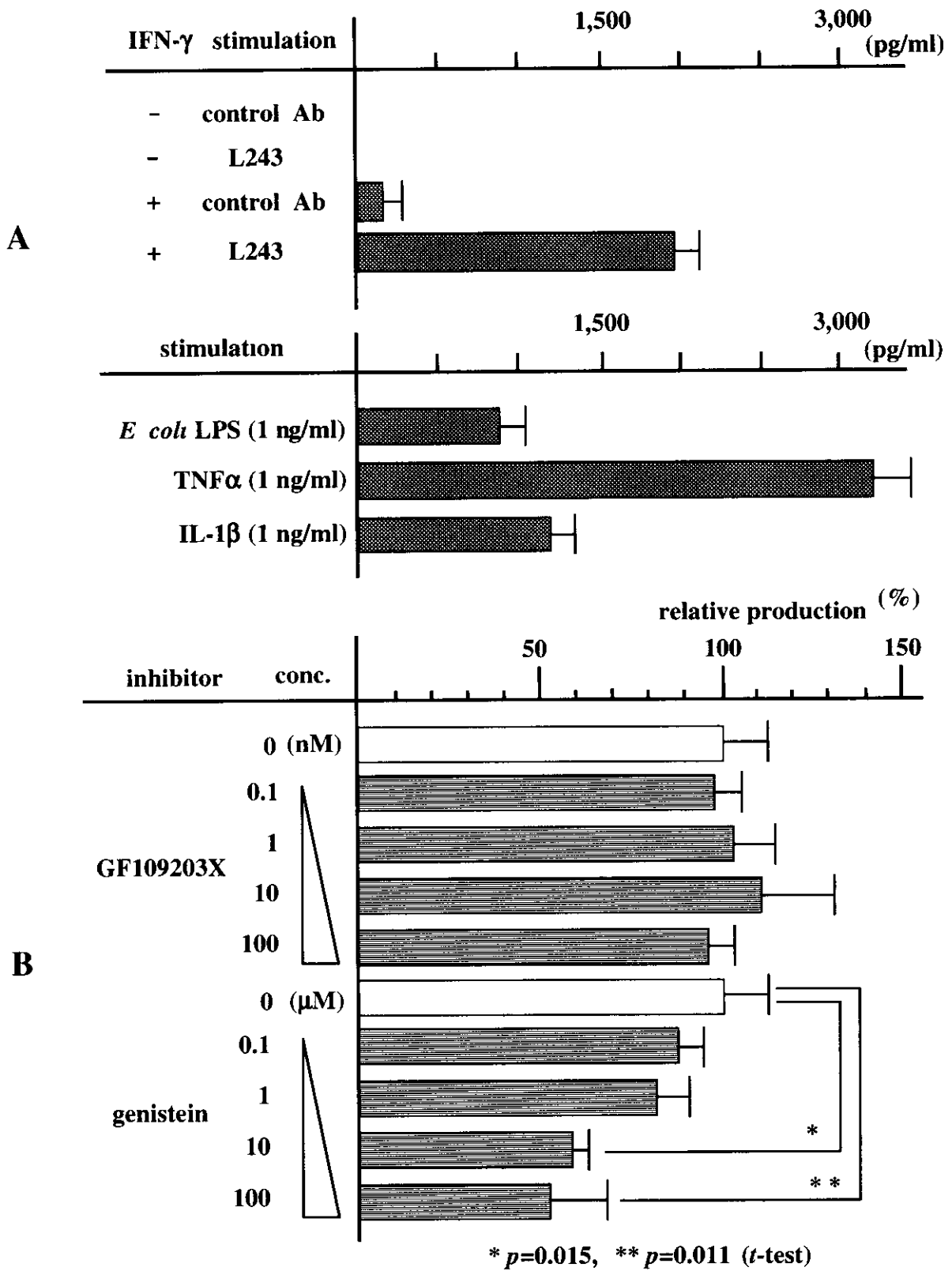


Figure 1

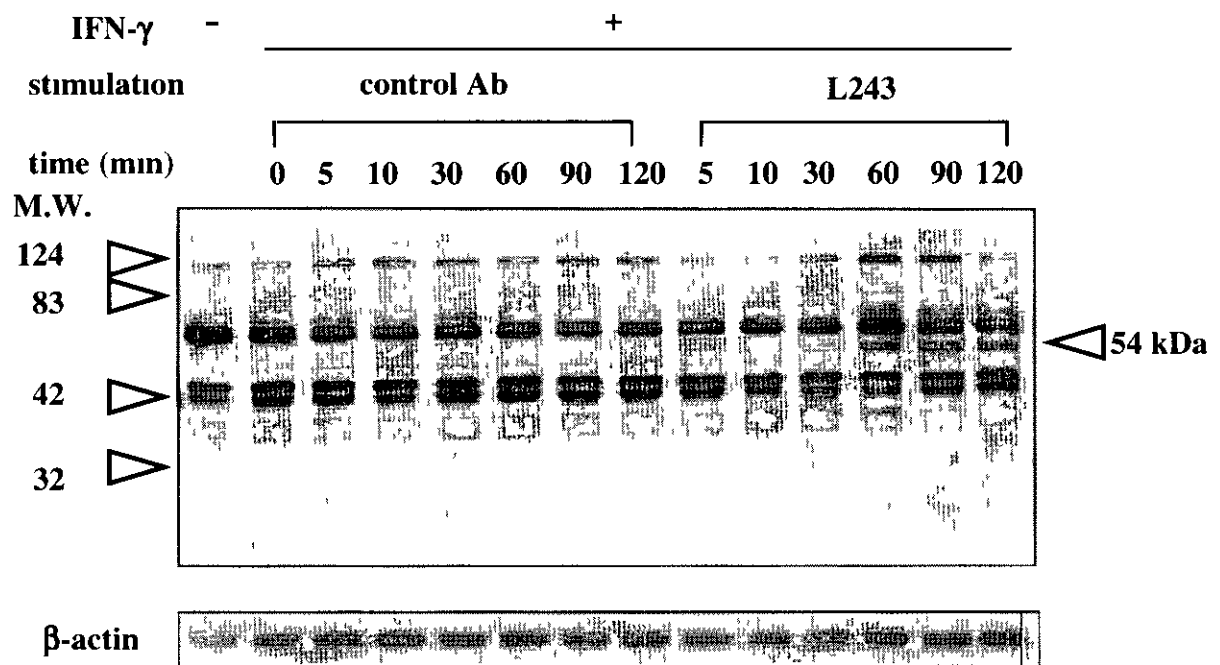


Figure 2

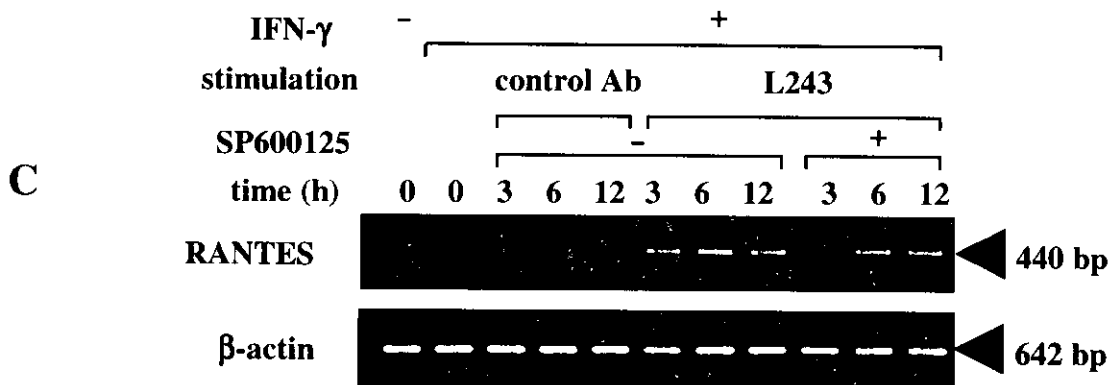
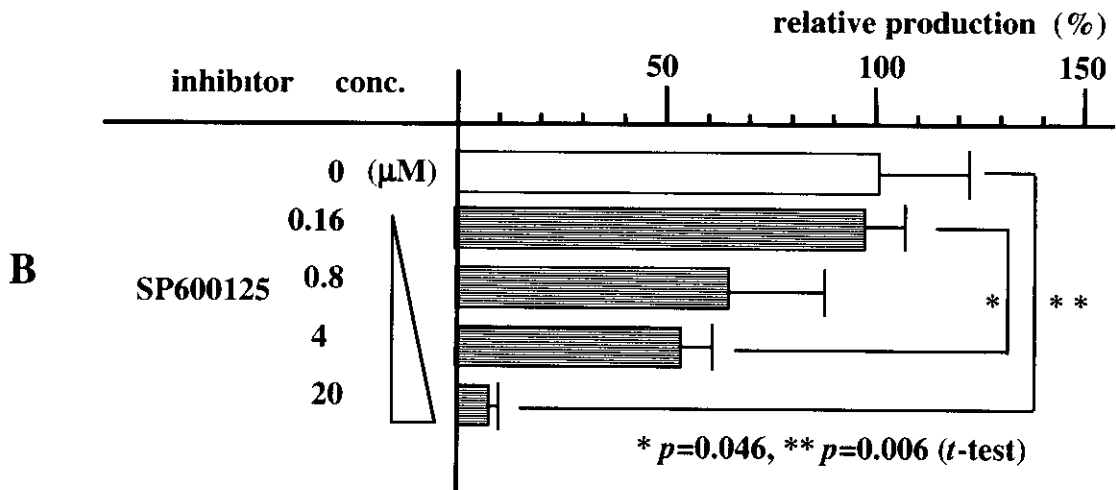
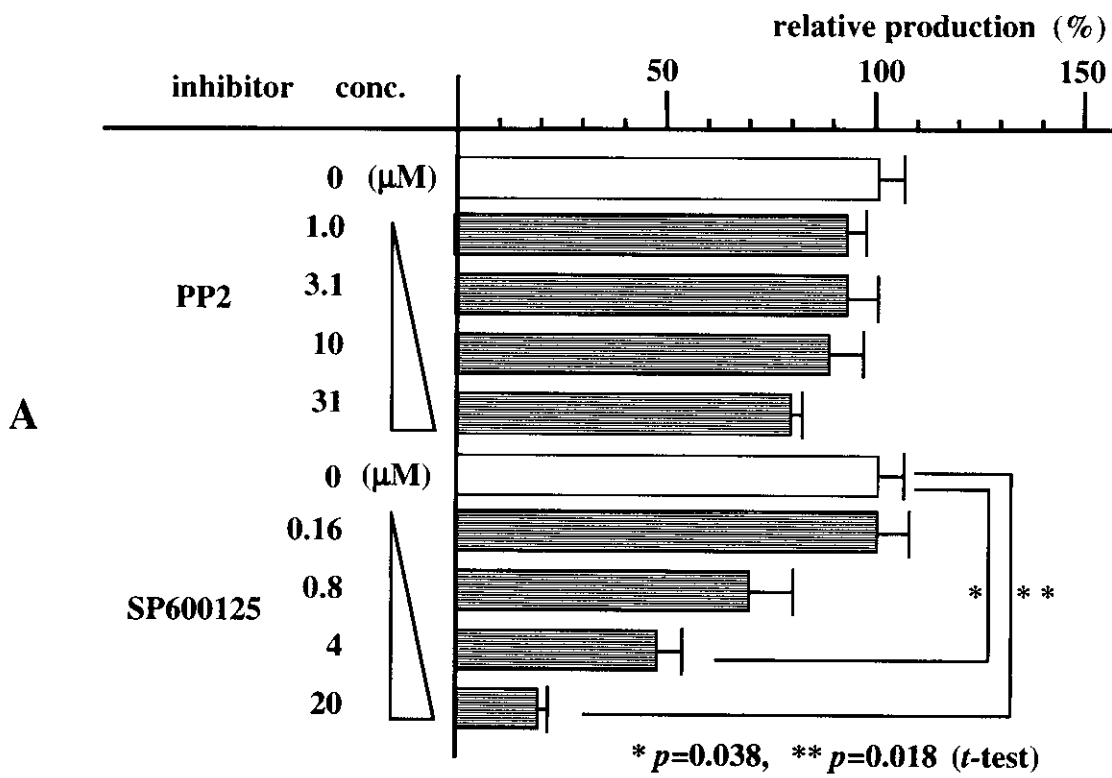


Figure 3

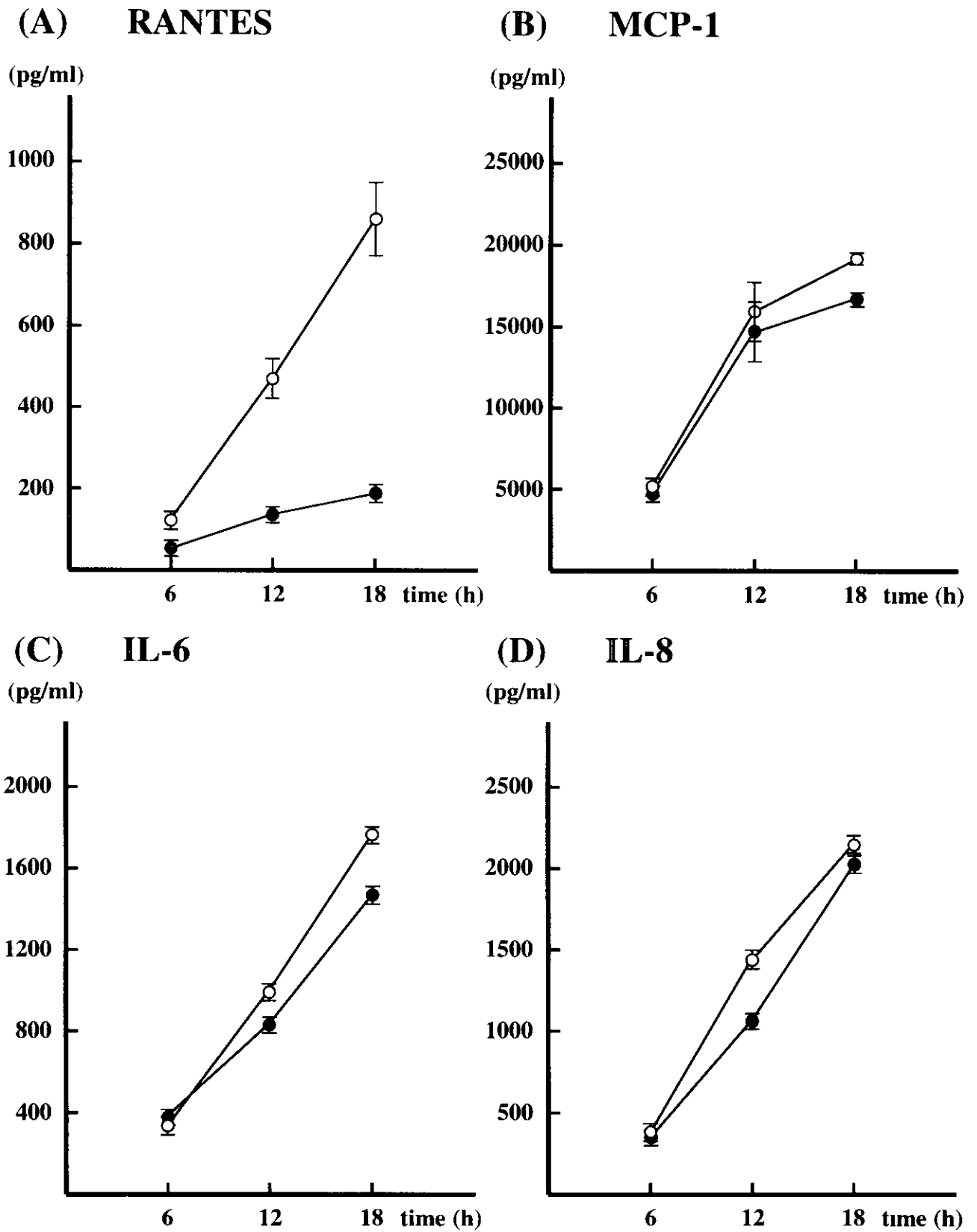


Figure 4



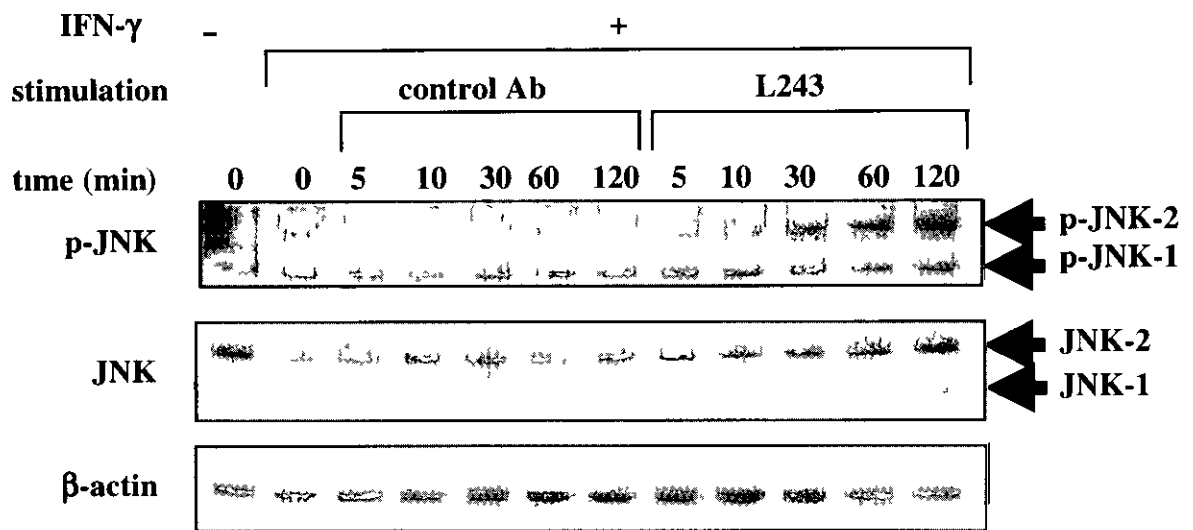


Figure 5

## CD25+CD4+T 細胞による CD4+T 細胞の増殖抑制メカニズムの解析

分担研究者 佐藤 浩二郎 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助手  
立石 晶子 東京大学医学部アレルギーリウマチ内科  
久保 かなえ 東京大学医学部アレルギーリウマチ内科  
神田 浩子 東京大学医学部アレルギーリウマチ内科助手  
山本 一彦 東京大学医学部アレルギーリウマチ内科教授  
三村 俊英 埼玉医科大学リウマチ膠原病科教授

### 研究要旨

ヘルパーT細胞(CD4+T細胞)の内、CD25+CD4+T細胞(抑制性T細胞, Treg)が免疫系において抑制的な役割を果たすことか *in vivo*, *in vitro* の実験から明らかとなり、自己免疫疾患においてこの抑制性T細胞の果たす役割が注目されている。我々はこの細胞群が免疫応答を抑制する機構を、主として抗原提示細胞(APC)に対する影響に注目して解析を進め、昨年はTregかAPCよりのIL-12産生を負に制御することを報告した。更にTregはこれまでanergicとされてきたか、他のCD4+T細胞か産生するIL-2に依存して分裂していることが判明した。*in vivo*でも同様の現象が観察され、これらのことから、Tregが炎症を検知して増殖し、炎症を終息させるという、negative feedbackのシステムの存在が示唆された。

### A.研究目的

抑制性T細胞(Treg)が免疫応答を抑制する機構を、主として抗原提示細胞(APC)に対する影響の面から解析する。

### B.研究方法

磁気ヒース法を用いて野生型のBALB/cマウスあるいはDO11.10トランスジェニックマウスよりCD25-CD4+T細胞及びCD25+CD4+T細胞を調整した。

*in vitro*の系ではこれらの細胞を単独あるいは混合し、SCIDマウス脾細胞をAPCとして共培養し抗CD3抗体にて刺激した。(トランスジェニックマウス由来のT細胞に関しては抗体の代わりに特異的ペプチドを用いて刺激した。)培養上清中のサイトカインはELISA法により測定した。T細胞の増殖の程度は(1)細胞数計測(2)3Hサ

イミシンの取り込み測定(3)CFSEにより細胞を染色し、フローサイトメリーによって分裂回数を直接評価するという3種類の方法で解析した。細胞上の抗原はフローサイトメリーにより解析した。*in vivo*の系ではMHCの異なる3種類のマウス(FVB/N, BALB/c, DBA/1)からCD25-CD4+T細胞・CD25+CD4+T細胞を調整し、SCIDマウスに移入後、4日目に所属リンパ節(鼠径リンパ節)を取り出しフローサイトメリーによる解析を行った。

(倫理面への配慮)

東京大学医学部動物実験施設が定める方法に則り実験を進めた。

### C.研究結果

CD4+T細胞、APCを共培養し刺激する *in*

in vitro の系において、Treg は dose dependent にサイミンの取り込みを抑制する (Fig 1)。この系で通常 APC から産生される IL-12 は Treg の存在により強く抑制され、このことは Treg 上の CD40L 発現誘導がかからないためである可能性があることを昨年報告した。IL-12 の産生抑制が T 細胞増殖の減弱に関与するかどうかを確認するために、in vitro において IL-12 あるいは抗 IL-12 抗体の添加が細胞増殖にどのような影響を与えるかを評価した。IL-12 添加は上記の3種類の評価法のいずれにおいても少なくとも部分的には細胞増殖の抑制を解除することが可能であった (Fig 2)。抗 IL-12 抗体添加の場合にはやや矛盾するような結果が得られたが、総合的に判断すると Treg の CD25-CD4+T 細胞に対する抑制メカニズムの一部は APC の機能抑制 (即ち APC よりの IL-12 産生の抑制) であると考えられた。またこの実験系から、興味深いことに、これまでアナジーに陥っているとされ、高濃度の IL-2 を外部より添加するなとしなければ増殖しないとされていた Treg が、CD25-CD4+T 細胞との共培養によって増殖していることが明らかになったが、この増殖は抗 IL-2 抗体の添加によって強く抑制された (Fig 3)。この Treg の分裂を in vivo の、allo の cell transfer の系で調べると、recipient と MHC の異なる CD25-CD4+T 細胞を同時に移入した場合には、CD25-CD4+T 細胞を移入しない、あるいは MHC が recipient と同一の CD25-CD4+T 細胞を移入した場合に比べて Treg の分裂回数が多いことが判明した (Fig 4)。即ち in vivo においても Treg の分裂は活性化 CD25-CD4+T 細胞に依存する可能性が示唆された。

#### D. 考察

Treg の免疫抑制機序については他の T 細胞に対する直接作用あるいは APC の機能抑制

の2つか考えられるが、我々のこれまでの結果は APC からの IL-12 産生を制御するという意味で後者を支持するものである。抗 IL-12 抗体の添加実験では予想に反してサイミンの取り込みが増加するという結果が得られたか、1つの可能性として、IL-12 が activation-induced cell death に重要なサイトカインであるため、それを阻害することによって細胞死が減少し、細胞の総数が増加することが考えられる。IL-12 産生の低下メカニズムについては、Treg が CD40L を細胞表面に発現しないことかその機序の1つである可能性があるが、Treg と CD25-CD4+T 細胞とを共培養しても CD25-CD4+T 細胞における CD40L の誘導は抑制されないこと (データ省略) を考慮すると、APC が IL-12 を産生できないのは APC と CD25-CD4+T 細胞との結合を Treg が阻害しているためかもしれない。この点で、Treg は APC 上の CD80, CD86 に対して CD28 よりも数十倍親和性が高いとされる CTLA-4 を constitutive に発現していることは興味深い。また、IL-12 は T 細胞上に IL-2 受容体  $\alpha$  鎖 (CD25) を誘導し、IL-2 に対する高親和性受容体を形成させることにより細胞増殖を促進する作用があるとされている。Treg は刺激前から既に CD25 を発現している細胞であるため IL-12 の作用を受けにくいとも考えられる。

もう一点の興味深い点として、これまでアナジーに陥っているとされてきた Treg が活性化 CD25-CD4+T 細胞の存在下では明らかに分裂するという事実が挙げられる。これは in vitro でも in vivo でも確認されたか、元々 CD25-CD4+T 細胞の僅か 1/10 しか存在しない Treg が免疫反応を抑制する機序として興味深いものとも考える。活性化 CD25-CD4+T 細胞が産生する IL-2 が Treg の増殖を誘導することか、阻止抗体の投与実験から強く示唆される。(外部から高濃度の IL-2 を加えた場合は Treg のアナジーが破れることが知られている。また Treg は IL-2 を自身では全く産生しないことか分かっている。) このように、APC により CD25-CD4+T 細胞が活性化される過程で Treg が増殖し、APC の機能を抑制することによって CD25-CD4+T 細胞の増殖が止まり免疫反

応が終結に向かうという一種のネガティブ・フィードバックシステムと考えられる。

今後このような抑制性 T 細胞の作用メカニズムの研究を更に進め、IL-12 や CD40L/CD40 をターゲットにした分子レベルの治療実験などを行っていきたいと考えている。特に自己抗原特異的免疫現象が病態の中心を成す難治性自己免疫疾患においては、Treg の機能を高めることや自己免疫反応を終結させる可能性もあり、更なる研究は今までに類を見ない抗原特異的免疫抑制治療に結びつく可能性が期待される。

## E. 結論

Treg の免疫抑制機序の少なくとも一部は APC からの IL-12 産生の抑制で説明可能である。また、これまでアナシーに陥っているとされていた Treg は、活性化 CD25-CD4+T 細胞依存性に増殖することが判明したか、これは活性化 T 細胞の産生する IL-2 に依存していることか示された。これらの事実は APC、CD25-CD4+T 細胞、Treg の3者の間で新しいネガティブ・フィードバックのシステムを形成していることを示唆するが、実際 allo の cell transfer の実験もそれと矛盾しない結果となった。今後これらの知見を、in vivo の炎症疾患モデルの治療実験に適用することを計画している。

## F. 健康危険情報

該当する情報無し。

## G. 研究発表

### (1) 論文発表

該当論文無し。

## (2) 学会発表

(1)佐藤浩二郎、立石晶子、米積亜紀、久保かなえ、神田浩子、三村俊英、山本一彦  
CD4+CD25+T 細胞による抗原提示細胞の機能抑制のメカニズムと、それか T 細胞増殖に与える影響の解析

第 47 回日本リウマチ学会総会

(2)佐藤浩二郎、佐藤詩子、久保かなえ、立石晶子、米積亜紀、神田浩子、三村俊英、山本一彦  
APECED (autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy)の原因遺伝子 AIRE (autoimmune regulator)の標的分子とそのメカニズムの解析

第31回日本臨床免疫学会総会

(3)佐藤浩二郎、立石晶子、久保かなえ、米積亜紀、神田浩子、三村俊英、山本一彦  
CD4+CD25+T細胞による抗原提示細胞の機能抑制のメカニズムと、それか T細胞増殖に与える影響の解析

第33回日本免疫学会総会

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

### 1. 特許取得

該当無し。

### 2. 実用新案登録

該当無し。

Fig 1

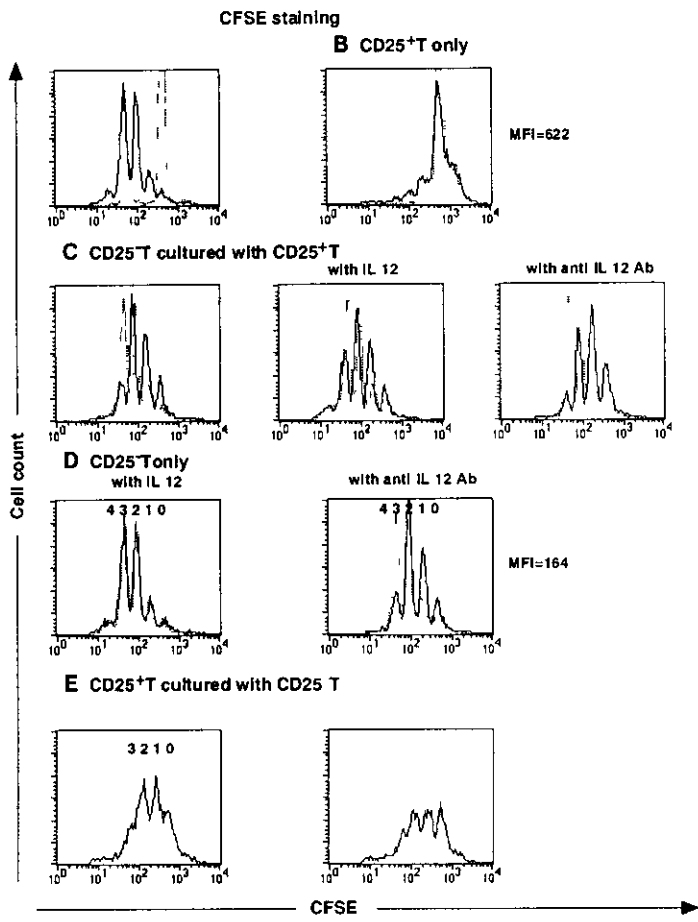
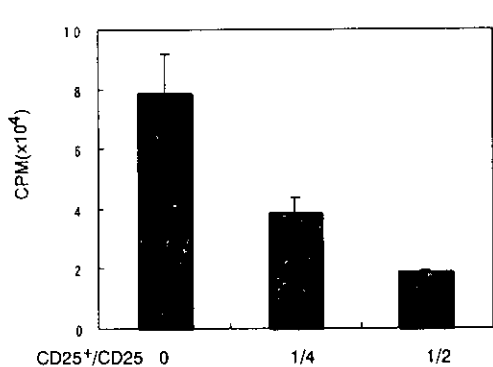


Fig 2

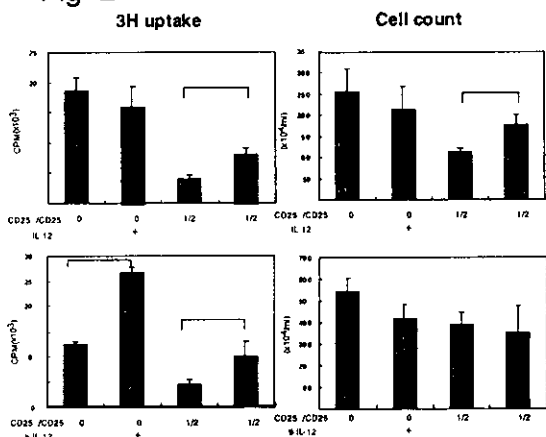


Fig 3

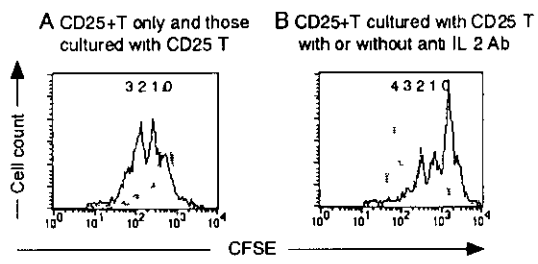
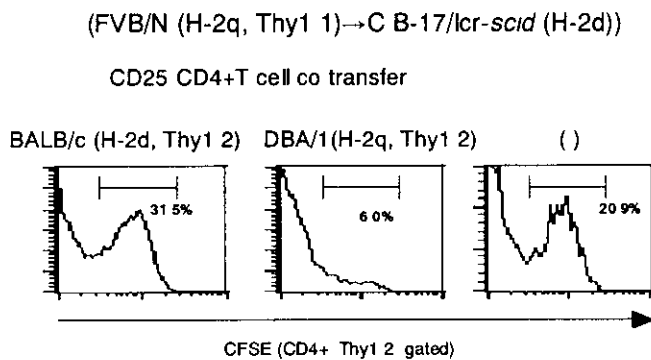


Fig 4



厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)  
分担研究報告書

全身性自己免疫疾患における自己抗体産生機構についての研究

分担研究者 鏑田武志 東京医科歯科大学大学院疾患生命科学部免疫学研究室 教授

**研究要旨**

自己抗体産生制御機構を解明するために、CD40L トランスジェニックマウスにおけるBリンパ球自己トレランス異常と産生される自己抗体の性状について検索した。その結果、自己抗体の親和性により、中枢リンパ組織または末梢リンパ組織でトレランスが誘導されることか明らかとなり、異常となっている自己トレランス機構の同定には、親和性によく依存するアッセイ系が有用であることか明らかとなった。

**A.研究目的**

全身性エリテマトーデスなどの全身性自己免疫疾患では、自己トレランスの異常により自己抗体産生がおこると考えられる。これまで、自己反応性B細胞について種々の自己トレランスメカニズムが示されてきたが、まだ全貌は明らかではない。また、自己免疫応答は種々の自己トレランス機構の内の特定の機構の破綻によっておこるのではなく、種々の自己トレランス機構のいずれかの異常によりおこると考えられる。本研究では、自己トレランス機構、とりわけ末梢リンパ臓器での自己トレランス機構について解明すると共に、出現した自己反応性B細胞の性状によりどのようなトレランス機構の異常がおこっているか診断できるかを明らかにする。

**B.研究方法**

CD40LをB細胞で異所性に発現するトランスジェニック(Tg)マウスは我々の研究室で樹立した。このマウスは、糸球体腎炎や自己抗体産生などSLE様の自己免疫疾患を発症する。抗DNA抗体56RIgH鎖Tgマウスはプリンストン大学M Weigert博士より供与を受けた。56RH鎖は種々のIgL鎖と会合して抗DNA抗体となるが、会合するL鎖によりDNAへの親和性が異なる。CD4

0LTgマウスと56RH鎖TgマウスのF1マウスの脾細胞をLPSで刺激後、ハイブリドーマを樹立し、得られたモノクローナル抗体のV<sub>K</sub>の配列を決定し、種々のV<sub>K</sub>のうちどのようなV<sub>K</sub>を用いているか検索した。また、DNAへの反応性をELISAで測定した。ELISA法としてはDNAを固相にする固相DNA-ELISAとDNAと抗体を液相で反応させる液層DNA-ELISAを行った。さらに、これらのマウスの脾細胞の亜集団をフローサイトメトリーにより同定し、細胞死についてはDiOC6への染色性により検索した。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては、当大学の動物実験の基本指針に従い動物を適正に取り扱った。

**C.研究結果**

我々は、CD40L/56RダブルトランスジェニックTgマウスでは自己トレランスが破綻し、自己抗体の産生がおこることを示した。さらに、未熟B細胞段階でのクローン除去やクローン麻痺さらにレセプター・エディティングといったトレランスの機構については正常であるが、末梢リンパ組織でのB細胞数が56Rでは、おそらく自己トレランスのために減少し、この減少が56R/CD40Lでは回復

することを示している。今回、56R マウスおよび 56R/CD40L マウスの脾臓細胞の亜集団をフローサイトメトリーで解析したところ、56R マウスでは、移行期 (transitional) B 細胞および辺縁帯 (marginal zone, MZ) B 細胞は正常ないしやや増加していたか、これらの亜集団では 50-60% の細胞が DiOC6 染色レベルが低下し、細胞死を起こしていた。一方、濾胞 B 細胞は著明に減少していた。56R/CD40L マウスでは移行期 B 細胞および MZB 細胞は増加し、移行期 B 細胞では DiOC6 低下細胞が約 30% と 56R に比べ著明に減少していたが、MZB 細胞では 56R マウスと同程度の細胞死がおこっていた。また、濾胞 B 細胞数は正常マウスのレベルにまで回復していた。これらの結果は、56R マウスにおいて自己反応性 B 細胞が移行期 B 細胞の段階で細胞死をおこして除去され、また、一部の B 細胞は MZB 細胞に分化するか、この分化段階でもさらに細胞死を起こしてトレランスが維持されていること、さらに、CD40L により移行期 B 細胞での細胞死が阻害されて濾胞 B 細胞への分化がおこることが示唆される。

56R および 56R/CD40L マウスの脾臓細胞を LPS で刺激し、ランダムにハイブリドーマを樹立したところ、56R マウス由来ハイブリドーマでは DNA に反応するものが 10-20% であったが、56R/CD40L マウス由来ハイブリドーマでは、70-80% が抗 DNA 抗体を産生した。DNA に反応しない抗体の大部分が V $\kappa$ 21D を用い、DNA に反応する抗体の多くが V $\kappa$ 38C を用いていた。固相 ELISA を行ったところ、56R/CD40L マウス由来の抗 DNA 抗体の一部は、ssDNA には反応したが dsDNA には反応しなかった。その他の抗体は ssDNA にも dsDNA にも反応した。dsDNA への反応性は、56RH 鎖/ $\lambda$ L 鎖からなる高親和性抗 DNA 抗体と同程度であった。一方、液相 ELISA で検索したところ、56R/CD40L マウス由来抗 DNA 抗体の反応性はいずれの抗体も、56RH 鎖/ $\lambda$ L 鎖の 10 分の 1 以下であった。固相との反応に比べ液相での反応はより抗体の抗原への親和性に依存するとされている。したがって、56R/CD40L マウス由来抗 DNA 抗体は DNA の親和性が十分高くない

ために、液相では高親和性の 56RH 鎖/ $\lambda$ L 鎖抗体に比べ反応性が低下すると考えられる。

#### D. 考察

CD40L 発現により骨髄の未熟 B 細胞段階でのトレランスは正常におこるか、末梢リンパ組織での移行期 B 細胞での細胞死が抑制され、自己トレランスの異常がおこることか明らかとなった。CD40L により出現する抗 DNA 抗体の性状について、当初は ssDNA にのみ反応すると考えたが、より詳細な検討により dsDNA にも反応するものかかなり出現することか明らかとなった。しかし、これらの抗体も液相 ELISA で測定すると 56RH 鎖/ $\lambda$ L 鎖からなる高親和性抗 DNA 抗体に比べ反応性が低下していたので、中間親和性の自己抗体と考えられる。56RH 鎖/ $\lambda$ L 鎖陽性 B 細胞は 56R/CD40L マウスでもその末梢リンパ組織で検出できないため、おそらく骨髄内でのトレランス機構により排除されているものと考えられる。したがって、高親和性自己反応性 B 細胞は、中枢リンパ組織の未熟 B 細胞の段階で除去されるか、中間親和性 B 細胞は、中枢でのクローン除去を受けずに成熟し、末梢リンパ組織で除去を受けると強く示唆される。今回の結果から、末梢トレランスにより制御される自己抗体と中枢トレランスで制御される自己抗体が、固相 ELISA では区別できないが、液相 ELISA では区別できることか明らかとなった。自己免疫疾患でのような機序で自己抗体の産生がおこるかを診断する上で、このような親和性依存性のアッセイの利用が重要である。

自己免疫疾患では、個々の症例により異なるメカニズムにより自己抗体の産生がおこると考えられる。それぞれのメカニズムによりどのような自己抗体の産生がおこるか明らかになると、個々の症例においてどのようなトレランス機序の異常により自己抗体の産生がおこるのかを診断し、その異常を修復するというオーダーメイド医療を開発することが可能になると予測される。また、今回の結果で、自己反応性 B 細胞が MZB 細胞に分化し、この段階で細胞死を起こすことを示した。さらに、この段階での細胞死は CD40L に

よっては阻害されない。自己免疫疾患の発症機構や病態を解明するためには、今後、自己反応性B細胞がMZB細胞に分化する意義と、MZB細胞における自己トレランスについても解析が必要である。

## E. 結論

中枢リンパ組織および末梢リンパ組織でのクローン除去により、それぞれ、高親和性および中間親和性自己反応性B細胞のトレランスが誘導されることが示唆された。また、これらの自己抗体の判別には固相ELISAではなく液相ELISAが有用であることが明らかとなった。自己免疫疾患で産生される自己抗体の性状から、異常となっているトレランス機構の判別かてきる可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1 論文発表

- 1 Suzuki, A, Kaisho, T, Ohishi, M, Tsukio-Yamaguchi, M, Tsubata, T, Koni, P A, Sasaki, T, Mak, T W, and Nakano, T (2003) Critical roles of Pten in B cell homeostasis and immunoglobulin class switch recombination *J Exp Med* 197 657-667
- 2 Hokazono, Y, Adachi, T, Wabl, M, Tada, N, Amagasa, T, and Tsubata T (2003) Inhibitory Co-receptors Activated by Antigens but Not by Anti-immunoglobulin Heavy Chain Antibodies Install Requirement of Co-stimulation through CD40 for Survival and Proliferation of B cells *J Immunol* 171 1835-1843
- 3 Hirai, H, Adachi, T, and Tsubata, T (2004) Involvement of cell cycle progression in survival signaling through CD40 in B lymphocyte line WEHI-231 *Cell Death Differ* 11 261-269
- 4 Kawamura, T, Kanai, T, Dohi, T, Uraushihara, K, Totsuka, T, Iiyama, R, Taneda, C,

Yamazaki, M, Nakamura, T, Higuchi, T, Aiba, Y, Tsubata, T and Watanabe, M (2004) Ectopic CD40 ligand expression on B cells trigger intestinal inflammation *J Immunol* (in press)



厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)  
分担研究報告書

IL-6 阻害による間質性肺炎の治療法の開発に関する研究

分担研究者 西本 憲弘 大阪大学大学院生命機能研究科免疫制御学 教授

**研究要旨**

間質性肺炎は膠原病の予後を左右する合併症の一つであり、従来の治療に抵抗性を示すことも多く、新規の治療法の開発が必要である。これまでの研究で IL-6 の阻害治療はリンパ球性間質性肺炎の治療に有効であることを明らかにしてきた。しかし、その過程で、間質性肺病変の定量的な評価方法が確立されていないという問題点も明らかになった。今回、間質性病変の CT 像のコンピュータを用いた定量評価を試みた。新規開発したホリウムヒストグラム法を用いて各種間質性肺疾患において3種の特徴量(Contrast, Entropy, Variance)の算出を行い、その傾向を比較した。さらに、膠原病に伴うNon-specific Interstitial Pneumonia (NSIP) 6症例におけるステロイド治療前後の特徴量の変化を検討した。その結果、NSIPの6症例全てにおいてステロイド治療後に Contrast が上昇し、Variance と Entropy が低下した。これよりホリウムヒストグラムを用いた特徴量解析による自動診断の可能性が示唆された。また、薬剤投与前後における特徴量の変化により薬剤の有効性の客観的評価が可能である。

**A. 研究目的**

間質性肺炎は膠原病患者の予後を左右する合併症の一つである。ステロイドや免疫抑制剤といった従来用いられている治療法に抵抗性を示す症例があり、新しい治療法の開発が必要とされている。

間質性肺炎の根本的な原因と発症機序はまだ明らかではないが、リンパ球やマクロファージなど炎症性細胞浸潤に Interleukin-6 (IL-6) が関わっていることが報告されている。これまでの研究で、リンパ球性間質性肺炎(LIP)を合併したキャスルマン病患者に対しヒト化抗IL-6レセプター抗体(MRA)による治療を行い、IL-6阻害がLIP治療に有用である

可能性を示した。さらに、高分解能CT(HRCT)を用い間質性肺炎の病変のスコア化による評価を試みその有用性を示した。しかし、放射線科医の読影による定量化には限界があり、新たな客観的診断法が必要である。

間質性肺病変の胸部CT画像ではそれぞれの病変に応じた特徴的な像が見られる。放射線科医はこれらの特徴像を視覚的に認識することにより、読影を行う。これらの病変の特徴をコンピュータを用いて自動的かつ定量的に求めることができれば客観的診断法となり、さらには自動診断につながることを期待できる。そこで、今回我々は膠原病に伴う間質性肺病変の特徴を定量的に評価することを目的として、

まずテクスチャー解析に基づくボリュームヒストグラム法を用いて胸部CT画像における各種間質性肺疾患の特徴量を算出し、その傾向の解析を行った。また、間質性肺疾患の一種であるNon-specific Interstitial Pneumonia(NSIP)を対象とし、ステロイド治療前後における特徴量の変化を検討した。

## B. 研究方法

テクスチャー解析とは隣接したいくつかの画素(pixel)の領域が持つ性質を利用して画像解析を行う方法であり、今回用いたボリュームヒストグラム法は2次元的な濃淡ヒストグラムが反映するテクスチャーの違い(テクスチャー特徴)の理論をCT画像における3次元的なvoxelデータに拡張したものである。テクスチャー特徴を計測したい画像領域に関して、濃淡ヒストグラム $H(l)$ (濃淡レベルが $l$ であれば、 $l = 0, 1, 2, \dots, L-1$ である)を求め、頻度の総数(画像領域のVoxel数 $N$ )で各濃淡レベルの頻度を割って、総画素数が1.0になるように正規化する。それを $p(l)$ とする。この $p(l)$ から計算されるスカラー量をテクスチャー特徴として利用することが可能である<sup>参考文献 a)</sup>。今回我々は、テクスチャー特徴の指標として定義される3種の特徴量(Contrast CNT, Variance VAR, Entropy EPY)を用いた。それぞれの特徴量を算出する数式を以下に示す。

$$\text{CNT} = \sum_{l=l_{\min}}^{l_{\max}} l^2 p(l) \quad (1)$$

$$\text{VAR} = \sum_{l=l_{\min}}^{l_{\max}} \{l - \text{MEN}\}^2 p(l) \quad (2)$$

$$\text{ただし、MEN} = \sum_{l=l_{\min}}^{l_{\max}} l p(l)$$

$$\text{EPY} = - \sum_{l=l_{\min}}^{l_{\max}} p(l) \log p(l) \quad (3)$$

ここで $l$ はCT値、 $p(l)$ は頻度の総数で各CT値の頻度を割った値とする。

CNTは全体的な濃淡の比率を表し、CT値の偏りを表す指標として用いることができる<sup>b)</sup>。ヒストグラム分布が高い濃淡レベルに偏っていればより大きな値となる<sup>a)</sup>。VARは統計学的には分散にあたり、CT値の分布の度合いを表す指標といえる。つまり、平均値から離れた濃淡レベルのVoxelが多く存在すれば大きな値を持つ。また、EPYとは、不確定性、乱雑さ、無秩序の度合いであり、CT値のばらつきを表す指標として用いることができる。そのため、多くの濃淡レベルを持つvoxelが存在していると大きな値となる<sup>a)</sup>。

2000年から2002年にかけて大阪大学医学部附属病院で治療を受けた患者のCT画像の中から以下に示す間質性変化を呈する4種の疾患群を抽出した。それぞれのCT画像のデータセットについて、そのボリュームヒストグラムから特徴量パラメータ(Contrast, Entropy, Variance)を算出し、それぞれの疾患群における各特徴量の傾向について比較検討を行った。

- ①主として気管支肺動脈周囲間質の肥厚像を示すもの (n=9 Multicentric Castleman's Disease 6例, Sarcoidosis 3例)
- ②主として Ground-Glass shadowを示すもの (n=6)
- ③主として Honeycombingを示すもの (UIP) (n=4)
- ④主として小葉間隔壁の肥厚像を示すもの (Lymphangitis)(n=3)

次に、2000年から2002年にかけて大阪大学医学部附属病院において、膠原病に伴う間質性肺炎のうち肺生検によりNSIPと診断され、ステロイド治療を受けた患者の中から6症例を抽出した。それぞれのCT画像のデータセットについて、ステロイド投与前後における各特徴量を算出し、その変化を検討した。また、ステ

ロイド投与前後の各症例における特徴量を、t検定を用いて評価した。

### C. 結果

Fig 1~Fig 3 に各種間質性肺疾患における特徴量(順に Contrast, Variance, Entropy)の比較を示す。①主として気管支肺動脈周囲間質の肥厚像を示す Multicentric Castleman's Disease 及び Sarcoidosis に関しては、他の疾患に比へ、Contrast が高く、Variance・Entropyが低い、という傾向が得られた。②主として Ground-Glass shadowを示すものにおいては Contrast・Variance・Entropyの全てにおいて中程度の値となった。③主として Honeycombingを示すもの(UIP)と④主として小葉間隔壁の肥厚像を示すもの(Lymphangitis)については Contrast が低く、Variance・Entropyが高いという傾向がみられた。また、Variance 及び Entropyの値は主として小葉間隔壁の肥厚像を示す Lymphangitis に比へ、Honeycombingの方が若干高い傾向にあった。NSIPにおいても Contrast が低く、Variance・Entropyが高いという傾向がみられたが、Honeycombing 及び Lymphangitis に比へてその傾向は顕著ではなかった。

次に NSIP6 症例に対するステロイド投与前後の特徴量算出を行った結果、6 症例全てに対して投薬後に Contrast が上昇し、Variance・Entropyが低下するという傾向が得られた。Fig 4~Fig 6 に NSIP に対するステロイド投与前後の特徴量(順に Contrast, Variance, Entropy)の比較を示す。また、t 検定の結果、Contrast に関しては有意差有り( $p < 0.05$ )、Variance 及び Entropy に関しては有意差無し(それぞれ  $p = 0.071$ ,  $p = 0.066$ )という結果が得られた。Table 1 に t 検定の結果を示す。

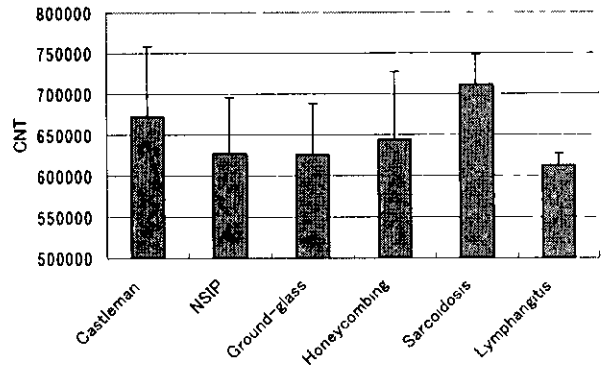


Fig 1 各種間質性肺疾患における特徴量 (Contrast) の比較

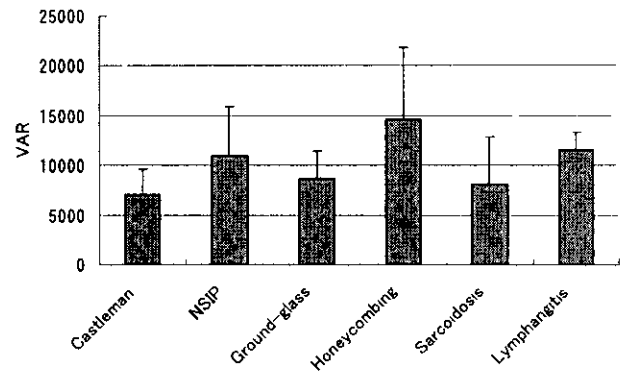


Fig 2 各種間質性肺疾患における特徴量 (Variance) の比較

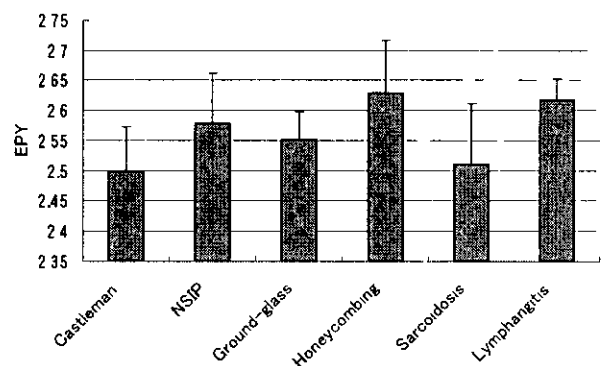


Fig 3 各種間質性肺疾患における特徴量 (Entropy) の比較

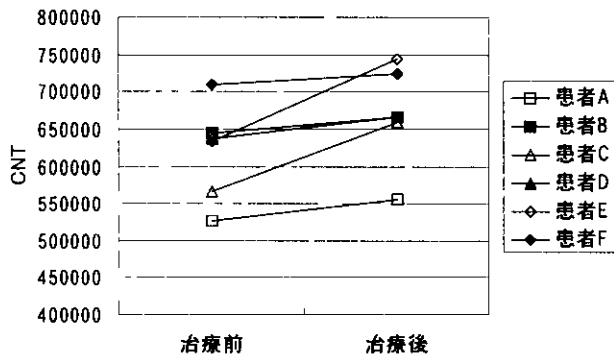


Fig 4 NSIP に対するステロイド投与前後の特徴量の比較 (CNT)

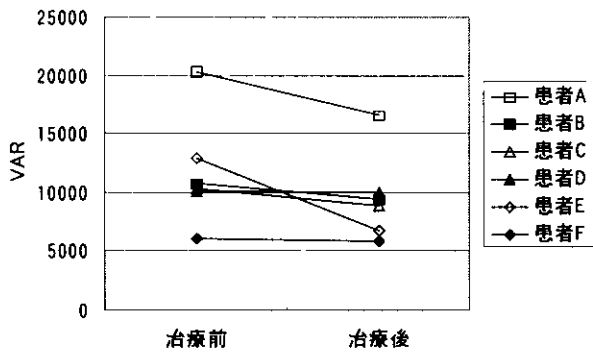


Fig 5 NSIP に対するステロイド投与前後の特徴量の比較 (VAR)

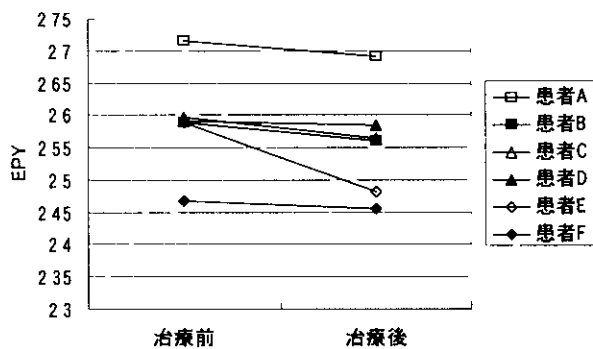


Fig 6 NSIP に対するステロイド投与前後の特徴量の比較 (EPY)

Table 1 NSIP に対するステロイド投与前後の特徴量の比較 (t 検定結果)

	平均 1回目	平均 2回目	P-value
CNT	619459.417	669190.656	0.03214245
VAR	11717.0542	9532.15243	0.07152132
EPY	2.59130567	2.55606267	0.06634541

#### D. 考察・F. 結論

各疾患のパラメータの傾向について①主として気管支肺動脈周囲間質の肥厚像を示す Multicentric Castleman's Disease 及び Sarcoidosis に関しては、局所的な病変であることか多いため Contrast・Entropy の変動が少ないと考えられる。また、正常構造(気管支・血管)の肥厚が起るため、正常構造に隣接した部位に高 CT 値の voxel が出現する。これにより Contrast は上昇すると考えられる。ただし、Ground-Glass shadow を伴う場合は Contrast の低下が起るため、特徴量の変化が相殺される可能性があるといえる。②主として Ground-Glass shadow を示すものにおいては、広範囲かつ均一に中間的な CT 値を持つ voxel が出現する。これにより Contrast の低下が起ると考えられる。また、均質な変化であるため、CT 値のはらつきが少なく、Entropy の変動は少ないと考えられる。次に、③主として Honeycombing を示すもの (UIP) と④主として小葉間隔壁の肥厚像を示すもの (Lymphangitis) については主として Ground-Glass shadow を示すものと同様、中間的な CT 値を持つ voxel が出現し、Contrast の低下が起っていると考えられる。また、通常の CT 画像上では確認できない小葉間隔壁が肥厚することにより壁構造(輪状構造物)が生じる。これにより、もともと低い CT 値を持つ肺野に高 CT 値の構造物が現れるため、相対的に Entropy が上昇すると考えられる。さらに、Honeycombing においては一般的に輪状構造物の内部は CT 値が低下する。これも Entropy 上昇に起因しているものと思われる。加えて NSIP に関しても広範囲かつ均一に中間的な CT 値を持つ voxel が多数出現する Ground-Glass shadow のために Contrast の低下が起ると考えられる。さらに局所的に壁構造を生じる場合があり、この場合は部分的に高 CT 値を持つ voxel が出現するため、全体の