

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16年度 総括・分担研究報告書

平成17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-スフィンゴ脂質の機能解析に関する研究 梅原 久範 (金沢医科大学大学院医学研究科 血液免疫制御学)	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)	17
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)	24
5. 全身性エリテマトーデス患者T細胞のゼータ鎖異常によって誘導される病態関連分子の検索 竹内 勤 (埼玉医科大学総合医療センター 第二内科)	29
6. 全身性エリテマトーデス末梢血T細胞におけるCD154発現異常に関する研究 田村 直人 (順天堂大学 医学部 膠原病内科)	32
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)	34
8. 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 野島 美久 (群馬大学大学院医学系研究科 生体統御内科)	38
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)	40
10. 免疫難病における癌関連遺伝子産物の機能解析及びこれらの分子を標的とした治療に関する研究 南 康博 (神戸大学大学院医学系研究科 ゲノム科学講座)	45
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)	47
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	51
V. 研究成果の刊行物・別刷	63

【 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	金沢医科大学大学院医学研究科 血液免疫制御学	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 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	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 ゲノム科学講座	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 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	金沢医科大学大学院医学研究科血液免疫制御学教授
	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	京都大学再生医学研究所・生体機能調節学分野教授
	高柳 広	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2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	東京医科歯科大学膠原病・リウマチ内科/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ゲノム制御科学講座教授

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追求してきた。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。膠原病の発症原因のひとつとして T 細胞の TCRシグナル伝達異常の重要性と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。即ち、SLE 患者 T 細胞に TCR ζ 鎖のエクソン 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が示され、TCR ζ 鎖の下流に位置する ZAP-70 遺伝子の変異の結果、胸腺での T 細胞選択異常、関節炎惹起性 T 細胞の産生がおき、自己免疫疾患の発症に至る事が解明された。一方、SLE 患者自己反応性 T 細胞の TCR 共刺激分子のシグナル賦活化には、 $\beta 1$ インテグリンを介するシグナルの亢進による CD40L の発現誘導を介した CD28 非依存性のシグナルが関与し、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。さらに、ノックアウトマウスを用いた検討から自己免疫性関節炎の発症に IL-6 が必須である事、また、ヒトでも IL-6 によ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ことを解明した。斯様な基礎的検討を背景に、治療抵抗性膠原病の症例に対して、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の速やかな改善が得られ、血管炎や難治性 SLE をはじめとする膠原病の新しい治療法となりうる事が示唆された

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 SLE だけで

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途上にあり、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主目的とする。平成 14, 15 年度には、TCR を介するシグナル伝達に於ける遺伝子変異、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が、自己反応性 T 細胞活性化を齎し、膠原病を引き起こす事を解明した。平成 16 年度は、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、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、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駆使する。さらに、治療抵抗性の難治性膠原病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、ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体、MRA、を使用した。なお、臨床検体を使用する場合には、研究分担者の所属機関の倫理委員会で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。患者の個人情報が入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。また、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った。

(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応するための指針」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) 遺伝カウンセリングの体制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で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。患者の個人情報が入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、ヘルシ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。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。SLE の T 細胞では、疾患活動性に応じて、共刺激分子 CD28 が減弱～消失、CD29 と CD40L が増強し、CD29 (β 1) を介するシグナルの量的、質的亢進が CD40L 等の発現を誘導すること、さらに、PTEN により制御される事が示された。即ち、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 細胞の活性化、ループス腎炎などの臓器病変の進展を齎すことが示された。

次に、斯様な自己反応性 T 細胞の出現は、抑制性 T 細胞の機能異常によって齎されることを解明した。即ち、SLE 患者 T 細胞に TCR と鎖のエクソン 7 を欠く変異、及び、short 3' -UTR 変異を見出し、抑制性シグナル伝達に重大な欠損を及ぼす点が示された。リウマチ様関節炎を自然発症する SKG マウスでは、シグナル分子 ZAP-70 の一塩基突然変異が疾患原因遺伝子である事、サイトカインのノックアウトマウスを用いた研究から、IL-6 は SKG マウス関節炎の発症に必須であることを解明し、TCR と鎖を介するシグナルの下流に位置する ZAP-70 遺伝子変異の結果、抑制性 T 細胞のシグナル異常、胸腺での自己反応性 T 細胞活性化が生じ、免疫難病の発症を引き起こすことが解明された。

これらの結果を踏まえて、難治性膠原病に対してヒト化抗 IL-6 レセプター抗体を使用するパイロットスタディを行った。その結果、発熱、紅斑、皮膚潰瘍、溶血性貧血、血管炎の改善が得られ、IL-6 阻害治療は血管炎を伴う難治性膠原病の新しい治療法となりうる事が示唆された。

D. 考察

膠原病の発症原因のひとつとして T 細胞の TCR シグナル伝達異常の重要性と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。SLE 患者自己反応性 T 細胞の TCR 共刺激分子のシグナル賦活化には、β 1 シグナルの亢進による CD40L の発現誘導が関与し、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を齎す。また、T 細胞の活性化は、抑制性シグナルの異常によって引き起こされることが解明された。即ち、SLE 患者 T 細胞に TCR と鎖のエクソン 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が示され、TCR と鎖の下流に位置する ZAP-70 遺伝子の変異の結果、胸腺での T 細胞選択異常、関節炎惹起性 T 細胞の産生がおき、自己免疫疾患の発症に至る事が解明された。さらに、ノックアウトマウスを用いた検討から自己免疫性関節炎の発症に IL-6 が必須である事、また、ヒトでも IL-6 によるシグナル伝達系は、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事を解明した。斯様な基礎的検討を背景に、治療抵抗性膠原病症例に対し、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の速やかな改善が得られ、治性膠原病の新しい治療法となりうる事が示唆された。

E. 結論

免疫難病の発症機序として、T 細胞の TCR シグナル伝達異常とシグナル異常の是正に基づく新規治療法が考えられた。自己反応性 T 細胞の TCR 共刺激分子のシグナル賦活化には、β 1 シグナルの亢進による CD40L の発現誘導が関与し、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を齎した。

また、T 細胞の活性化は、抑制性シグナルの異常、即ち、T 細胞の TCR と鎖のエクソン 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が示され、TCR と鎖の下流に位置する ZAP-70 遺伝子の変異の結果、胸腺での T 細胞選択異常、関節炎惹起性 T 細胞の産生がおき、自己免疫疾患の発症に至る事が解明された。

さらに、ノックアウトマウスや SLE 症例を用いた検討から膠原病の発症に IL-6 が必須であることを解明し、斯様な基礎的検討を背景に、治療抵抗性膠原病症例に対し、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の速やかな改善が得られ、治性膠原病の新しい治療法となりうる事が示唆された。

以上、膠原病の発症原因として、T 細胞の TCR と鎖とその下流のシグナル分子 ZAP-70 の遺伝子変異によって制御性刺激シグナルの欠損が生じ、その結果、CD29 や CD40L などの共刺激系のシグナル異常活性化が生じ、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。また、更に下流に位置するIL-6を介するシグナルの制御に関する臨床的検討により、血管炎や難治性SLEをはじめとする膠原病の新しい治療法となりうることが示唆された。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是正は、免疫難病に対する新規治療軸の確立に繋がるものと期待される。

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

- Saito K, Nakayamada S, Nakano K, Tokunaga M, Tsujimura S, Nakatsuka K, Adachi T, Tanaka Y. Detection of *Pneumocystis carinii* by DNA amplification in patients with connective tissue diseases: Reevaluation of clinical features of *P. carinii* pneumonia in rheumatic diseases. *Rheumatology* (2004) 43, 479-485
- 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* (2004) 50, 2450-2458
- Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, Nakano K, Tsukada J, Kohno K, Tanaka Y. Transcriptional regulation of multidrug resistance-1 gene by interleukin-2 in lymphocytes. *Genes Cells* (2004) 9, 1265-1273
- Tokunaga M, Fujii K, Saito K, Nakayamada S, Tsujimura S, Nawata M, Tanaka Y. Down-regulation of CD40 and CD80 on B cells in patients with life-threatening systemic lupus erythematosus after successful treatment with rituximab. *Rheumatology* (2005) 44: 176-182
- Nakayamada S, Kurose K, Saito K, Mogami A,

Tanaka Y. Small GTP-binding protein rho-mediated signaling promotes proliferation of rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* (in press)

- Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, Nakano K, Tanaka Y. Clinical relevance of expression of P-glycoprotein on peripheral lymphocytes to steroid-resistance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* (in press)

(分担研究者)

梅原久範

- Y Yamaoka S, Miyaji M, Kitano T, Umehara H, Okazaki T. Expression cloning of a human cDNA restoring sphingomyelin synthesis and cell growth in sphingomyelin synthase-defective lymphoid cells. *J Biol Chem*. 2004; 279: 18688-18693.
- Chida Y, Itoh M, Kitano T, 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, T 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.
- Taguchi Y, Kondo T, Watanabe M, Miyaji M, Umehara H, Uchiyama T, Kozutumi Y, Okazaki, T. Interleukin-2-induced survival of natural killer(NK) cells involving phosphatidylinositol-3 kinase-dependent reduction of ceramide through acid sphingomyelinase, sphingomyelin synthase and glucosylceramide synthase. *Blood* (in press)

駒形嘉紀

- Sagawa K, Nagatani K, Komagata Y, and Yamamoto K. Angiotensin receptor blockers (ARBs) suppress

antigen specific T cell responses and ameliorate collagen induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum* (in press)

- 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, S.: Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature Immunol* (in press)
- Sakaguchi, S.: Preface: Regulatory T cells in autoimmune diseases. *Int Rev Immunol* (in press)
- Sakaguchi, S. and Sakaguchi, N.: Regulatory T cells in self-tolerance and autoimmune diseases. *Int Rev Immunol* (in press)
- Fehervari, Z. and Sakaguchi, S.: T lymphocytes: Regulatory. *Nature Encyclopedia of Life Sciences*. (in press)
- Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., and Sakaguchi, S. A crucial role of IL-2 in the homeostatic maintenance of CD25+CD4+ regulatory T cells: induction of autoimmune disease by neutralization of IL-2. *J. Exp. Med.* In press.
- Yoshitomi, H., Sakaguchi, N., Brown, G., Tagami, T., Sakihama, T., Nomura, T., Akira, S., Gordon, S., Nakamura, T., and Sakaguchi, S. Environmental stimulation of innate immunity triggers chronic arthritis in mice genetically prone to produce arthritogenic autoimmune T cells: a key role of fungal α -glucans and their receptor Dectin-1. *J. Exp. Med.* In press.
- Gondek, D. C., Lu, L-F., Quezada, S. A., Sakaguchi, S., and Noelle, R. J. Cutting Edge:

Contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol.* 174: 1783-1786, 2005.

- Turk MJ, Guevara-Patino JA, Rizzuto GA, Engelhorn ME, Sakaguchi, S., and Houghton AN.: Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 200:771-82, 2004.
- Muriglan, S. J., Ramirez-Montagut, T., Alpdogan, O., Van Huystee, T. W., Eng, J. M., Hubbard, V. M., Kochman, A. A., Tjoe, K. H., Riccardi, C., Pandolfi, P. P., Sakaguchi, S., Houghton, A. N., and Van Den Brink, M. R.: GITR activation induces an opposite effect on alloreactive CD4+ and CD8+ T cells in graft-versus-host disease. *J. Exp. Med.* 200:149-157, 2004.
- Fehervari, Z., and Sakaguchi, S.: CD4+ regulatory T cells and immune control. *J. Clin. Invest.* 114:1209-117, 2004.
- Kanamaru, F., Youngnak, P., Hashiguchi, M., Nishioka, T., Takahashi, T., Sakaguchi, S., Ishikawa, I., and Azuma, M. Costimulation via glucocorticoid-induced TNF receptor in both conventional and CD25+ regulatory CD4+ T cells. *J. Immunol.* 172: 7306-7314, 2004.
- Hata, H., Sakaguchi, N., Yoshitomi, H., Iwakura, Y., Sekikawa, K., Rennick, D., Azuma, Y., Kanai, C., Moriizumi, E., Nakamura, T., and Sakaguchi, S. Distinct contribution of IL-6, TNF- α , IL-1, and IL-10 to T cell-mediated spontaneous autoimmune arthritis in mice. *J. Clin. Invest.* 114: 582-588, 2004.
- Dittmer, U., He, H., Messer, R. J., Schimmer, S., Olbrich, A. R., Ohlen, C., Greenberg, P. D., Stromnes, I. M., Iwashiro, M., Sakaguchi, S., Evans, L. H., Peterson, K. E., Yang, G., Hasenkrug, K. J.: Functional impairment of CD8+ T cells by regulatory

T cells during persistent retroviral infection. *Immunity*. 20: 1-20, 2004.

- Kajjura, F., S. Sun, T. Nomura, K. Izumi, T. Ueno, Y. Bando, N. Kuroda, H. Han, Yi Li, A. Matsushima, Y. Takahama, S. Sakaguchi, T. Mitani and M. Matsumoto.: NF- κ B-inducing kinase establishes self-tolerance in a thymic-stroma dependent manner. *J. Immunol.* 172: 2067-2075, 2004.
- Sakaguchi, S.: Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Ann. Rev. Immunol.* 22:531-562, 2004.

高柳 広

- Gohda, J., Akiyama, T., Koga, T., Takayanagi, H., Tanaka, S. and Inoue, J. RANK-mediated amplification of TRAF6 signaling leads to NFATc1 induction during osteoclastogenesis. *EMBO* 24(4),790-799(2005)
- Takatsuna, H., Asagiri, M., Kubota, T., Oka, K., Osada, T., Sugiyama, C., Saito, H., Aoki, K., Ohya, K., Takayanagi, H. and Umezawa K. Inhibition of RANKL-induced Osteoclastogenesis by (-)-DHMEQ, a Novel NF- κ B Inhibitor, through Downregulation of NFATc1. *J Bone Mineral Res* (in press)
- Matsumoto, M., Kogawa, M., Wada, S., Takayanagi, H., Tsujimoto, M., Katayama, S., Hisatake, K., Nogi, Y. Essential role of p38 MAP kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1. *J Biol Chem.* 279(44),45969-79 (2004)
- Koga, T., Inui, M., Inoue, K., Kim, S., Suematsu, A., Kobayashi, E., Iwata, T., Ohnishi, H., Matozaki, T., Kodama, T., Taniguchi, T., Takayanagi, H.*, and Takai, T.* Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature* 428,758-763 (2004)
*Corresponding authors

- Urushibara, M.*, Takayanagi, H.*, Koga, T., Kim, S., Isobe, M., Morishita, Y., Nakagawa, T., Loeffler, M., Kodama, T., Kurosawa, H., and Taniguchi, T. The antirheumatic drug leflunomide inhibits osteoclastogenesis by interfering with receptor activator of NF- κ B ligand-stimulated induction of nuclear factor of activated T cells c1. *Arthritis Rheum* 50(3), 794-804 (2004) *Equal contributors
- Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T. and Taniguchi, T. Stat1-mediated cytoplasmic attenuation in osteoimmunology. *J Cell Biochem* 94, 232-240(2005)

竹内 勤

- 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

- Kimura K, Tsuda H, Kwangseok Y, Tamura N, Kanai Y, Kobayashi S, Hashimoto H. Study of plasma levels of soluble CD40 ligand in systemic lupus erythematosus patients who have undergoing plasmapheresis. *Ther apher* 9:64-8, 2005

西本 憲弘

- Yokota S, Miyamae T, Imagawa T, Iwata N, Katakura S, Mori M, Woo P, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T. Therapeutic Efficacy of Humanized Recombinant Anti-IL 6-Receptor Antibody for Children with Systemic-Onset Juvenile Idiopathic Arthritis. *Arthritis Rheum* 52:818-825, 2005.
- Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Hashimoto J, Azuma J, Kishimoto T. Treatment of Rheumatoid Arthritis with Humanized Anti-interleukin 6 Receptor Antibody. *Arthritis Rheum* 50:1761-1769, 2004.
- Becker C, Fantini MC, Schramm C, Lehr HA, Wirtz

S, Nikolaev A, Burg J, Strand S, Kiesslich R, Huber S, Ito H, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Galle PR, Blessing M, Rose-John S, Neurath MF. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity* 21:491-501, 2004

野島美久

- 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
- Ikeuchi H, Nojima Y, et al. Expression of Interleukin-22 in Rheumatoid Arthritis: A potential role of proinflammatory cytokine. *Arthritis Rheum* (in press)

南康博

- Schwabe, G. C., Trepczik, B., Suring, K., Brieske, N., Tucker, A., Sharpe, P. T., Minami, Y., and Mundlos, S.: The Ror2 knock out mouse as a model for the developmental pathology of autosomal recessive Robinow syndrome. *Dev. Dyn.* 229: 400-410, 2004.
- Kondo, T., Kobayashi, M., Tanaka, J., Yokoyama, A., Suzuki, S., Kato, N., Onozawa, M., Chiba, K., Hashino, S., Imamura, M., Minami, Y., Minamino, N., and Asaka, M. Rapid degradation of Cdt1 upon UV-induced DNA damage is mediated by SCFSkp2 complex. *J. Biol. Chem.* 279: 27315-27319, 2004.
- Kani, S., Oishi, I., Yamamoto, H., Suzuki, H., Yoda, A., Suzuki, H., Nomachi, A., Iozumi, K., Nishita, M., Takumi, T., Kikuchi, A., and Minami, Y.: The receptor tyrosine kinase Ror2 associates with and is activated by casein kinase I α . *J. Biol. Chem.* 279: 50102-50109, 2004.
- Sammar, M., Stricker, S., Schwabe, G., Seiber, C., Hartung, A., Hanke, M., Oishi, I., Pohl, J., Minami, Y., Sebald, W., Mundlos, S., and Knaus, P.:

Modulation of GDF5/BRI- signaling through interaction with the tyrosine kinase receptor Ror2. *Genes Cells* 9: 1227-1238, 2004.

- Kato, N., Fujimoto, H., Yoda, A., Oishi, I., Matsumura, N., Kondo, T., Tsukada, J., Tanaka, Y., Imamura, M., and Minami, Y.: Regulation of Chk2 gene expression in lymphoid malignancies: involvement of epigenetic mechanisms in Hodgkin's lymphoma cell lines. *Cell Death Diff.*, 2 (S): 153-161, 2004.
- Sakakida, Y., Miyamoto, Y., Nagoshi, E., Akashi, M., Nakamura, T. J., Mamine, T., Kasahara, M., Minami, Y., Yoneda, Y., and Takumi, T.: Importina mediates nuclear transport of a mammalian circadian clock component, mCRY2, together with mPER2 through a bipartite nuclear localization signal. *J. Biol. Chem.*, (in press)

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

田中良哉

- Fas 抗原発現増強剤(特開 2003-171282)

坂口志文

- Foxp3 発現リンパ球による免疫病の治療法(特許)
- 新規単クローン抗体による制御性 T 細胞の操作(特許出願中)

竹内勤

- T 細胞リセプターと鎖タンパク、これをコードする遺伝子若しくはその一部を含む精製された核酸又は該タンパク若しくは該核酸に基づく自己免疫疾患検出方法(特願平 9-309302)
- 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。

【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 金沢医科大学血液免疫制御学 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を中心とす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。基礎的検討として、Fas 発現 WR19L 細胞よりスフィンゴミエリン欠損株 WR/Fas-SM(-)を樹立し、我々がクローニングした sphingomyelin synthase gene(SMS-1)を遺伝子導入したスフィンゴミエリン合成回復株(WR/Fas-SMS1)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討した結果、Fas 抗体架橋刺激により、SMS1 細胞は SM(-)細胞に比べ、有意に Fas の凝集、アポトーシスシグナルが誘導された。ラフトへの Fas の移動およびラフトでのセラミド合成能は、WR/Fas-SMS1 細胞で有意に増加していた。このことは細胞膜におけるスフィンゴミエリンが、ラフトの形成およびアポトーシスシグナル伝達に重要であることを示唆している。臨床的検討として、全身性エリテマトーデス患者リンパ球のラフト発現を解析し、SLE 患者 T 細胞および B 細胞におけるラフト発現が増強していることを認めた。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おり、SLE 患者における免疫異常にラフト機能の異常が関与している可能性がある。

A. 研究の目的:

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こり、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。昨年に続き我々は、基礎的検討として細胞活性化のシグナル伝達における細胞膜スフィンゴミエリンの重要性をラフトの凝集およびアポトーシスの面から明らかにし、臨床的検討として膠原病における免疫異常をラフト発現の面より解析した。

B. 研究方法:

- 1) 樹立されたスフィンゴミエリン合成酵素欠損細胞株(WR/Fas-SM(-))にスフィンゴミエリン合成酵素を導入した回復株 WR/Fas-SMS1)を樹立した。
- 2) 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 法で検討した。

- 3) 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した。
- 4) 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した。
- 5) 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討した。
- 6) スフィンゴミエリン欠損/回復細胞株におけるラフト内セラミド産生について検討した。
- 7) 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 cholelatoxinB とで 2重染色しラフト発現強度を FACS 解析した。
- 8) 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。
- 9) 末梢リンパ球を PMA およびイオノマイシンで刺激し、リンパ球活性化経過における CD45RO およびリピッドラフト発現について経時的変化を解析した。

(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. 研究結果

- 1) WR/Fas-SM(-)および WR/Fas-SM S1 細胞を IgM anti-Fas Ab(CH11)にて架橋刺激し、アポトーシスを検討したところ、WR/Fas-SM S1 細胞は WR/Fas-SM(-)細胞に比べ、有意にアポトーシスを起こした。
- 2) 両細胞の CH11 架橋刺激によるアポトーシスシグナル経路を検討した結果、WR/Fas-SM S1 細胞では、有意に Fas の凝集が亢進していた。同様に、WR/Fas-SM S1 細胞では DISC の形成、カスパーゼの活性化が増強していた。
- 3) 両細胞における Fas のラフトへの局在を検討したところ、非刺激時には両細胞に同程度の Fas が存在するが、Fas 架橋刺激により WR/Fas-SM S1 細胞では多量の Fas がラフト内へ移行した。
- 4) 両細胞におけるラフト内セラミド量を測定したところ、WR/Fas-SM S1 細胞では Fas 架橋刺激により有意な産生亢進が確認された。
- 5) 細胞外セラミド添加によるアポトーシスおよび Fas 凝集について検討したところ、両細胞におけるアポトーシスは増強したが、WR/Fas-SM (-)細胞のアポトーシスは WR/Fas-SM S1 細胞レベルには回復しなかった。
- 6) 非刺激末梢リンパ球のラフト発現は低値であるが、SLE 患者 T 細胞および B 細胞のラフト発現は正常者にくらべて有意に増強していた。
- 7) 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 患者でリンパ球と同様に増強していた。
- 8) SLE 患者 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。
- 9) リンパ球の PMA とイオノマイシン刺激により、細胞表面の CD45RO およびラフト発現量が増加した。

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ド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

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ゴミエリン欠損株 SM(-)とスフィンゴミエリン合成回復株(SMS-1)の樹立に成功した。両細胞株は Fas を含め他の細胞膜蛋白の発現および脂質組成に差が無く、細胞活性化シグナルにおけるラフト機能およびスフィンゴミエリン解析のモデルになると確信する。WR/Fas-SM S1 細胞では Fas 架橋刺激によるアポトーシス、death シグナル、Fas の凝集能が有意に増強していた。このことは、細胞膜スフィンゴミエリンが、ラフトの形成および活性化刺激の足場となるラフトの凝集に重要であることを示している。スフィンゴミエリンは活性化によりセラミドに代謝されるが、ラフト内におけるセラミド産生は、WR/Fas-SM S1 細胞でのみ産生が増強された。しかし、外部からセラミドを添加しても、WR/Fas-SM(-)細胞のアポトーシスおよび Fas の凝集を回復させることが出来なかったことより、ラフト内スフィンゴミエリンがセラミドに変換されることによりラフトの凝集を引き起こすと考えられる。以上のように、細胞膜スフィンゴミエリンが活性化シグナルの足場となるラフト凝集に一元的に関与している可能性が示唆された。

全身性エリテマトーデ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おり、その異常は制御性 T 細胞分画およびメモリー T 細胞分画において顕著であった。全身性エリテマトーデスにみられる免疫異常が、ラフト強発現細胞によりもたらされている可能性が推測された。

E. 結論

細胞活性化機構の解析のために、ラフト組成の中心脂質であるスフィンゴミエリンの欠失細胞と合成回復細胞である、WR/Fas-SM (-)細胞および WR/Fas-SM S1 細胞を樹立した。細胞膜スフィンゴミエリンが活性化シグナルおよびラフト凝集に深く関与していることが明らかとなった。全身性エリテマトーデス患者リンパ球ではラフト発現が増強しており、全身性エリテマトーデスの病因解明にラフトの解析が有用であることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamaoka, S., M. Miyaji, T. Kitano, H. Umehara, and T. Okazaki. Expression cloning of a human cDNA restoring sphingomyelin synthesis and

- cell growth in sphingomyelin synthase-defective lymphoid cells. *J. Biol. Chem.* 279:18688. 2004.
- 2) Uchida, Y., M. Itoh, Y. Taguchi, S. Yamaoka, H. Umehara, S. Ichikawa, Y. Hirabayashi, W. Holleran, and T. Okazaki. Ceramide reduction and transcriptional up-regulation of glucosylceramide synthase through DOX-activated Sp1 in drug-resistant HL-60/ADR cells. *Cancer Res.* 64:6271. 2004.
 - 3) Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, Yoshie O, Imai T. Fractalkine and vascular biology: from basic research to clinical diseases. *Arterio. Thromb. Vasc. Biol.* (Review). (2004) 24:34-40.
 - 4) 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.
 - 5) Kawabata, D., M. Tanaka, T. Fujii, H. Umehara, 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.
 - 6) 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.
 - 7) Yoneda, O., Imai, T., Inoue, H., Nishimura, M., Minami, Y., Bloom, E.T., Mimori, T., 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.
 - 8) 梅原久範, 金哲雄, 宮地理彦, 岡崎俊朗. Fas 依存性アポトーシスにおけるスフィンゴミエリンの役割. *臨床免疫* 42:292.2005
 - 9) 梅原久範, 今井俊夫, 堂前尚親. フラクタルカインと血管傷害—基礎研究から臨床病態へ. *炎症と免疫* 12:83. 2004
 - 10) 梅原久範, 山口拓郎, 三森経世. 細胞活性化シグナルにおける lipid raft の役割と自己免疫病. *分子リウマチ* 1:54. 2004
 - 11) 梅原久範, 山口拓郎, 金哲雄, 岡崎俊朗. SLE 末梢リンパ球におけるリポッドラフト発現異常. *臨床免疫* 42:675. 2004
 - 12) 梅原久範. ケモカインと接着分子. *内科診療 Q&A* 39:12. 2004
 - 13) 梅原久範. 全身性強皮症. *リウマチ・膠原病診療チェックリスト*. 三森経世. 文光堂. 2004.
- ## 2. 学会発表
- 1) 梅原久範, 岡崎, 俊朗. Fas 依存性アポトーシスにおけるスフィンゴミエリンの重要性. 第63回日本癌学会総会(博多)2004.
 - 2) 藤田義正, 藤井隆夫, 有馬俊裕, 井村嘉孝, 吉藤元, 川端大介, 田中真生, 臼井崇, 梅原久範, and 三森経世. 膠原病患者における U1RNP 構成各蛋白に対する抗体の IgG サブクラスに関する研究. 第101回内科学会総会(東京). 2004.
 - 3) 藤田義正, 藤井隆夫, 田中真生, 臼井崇, 梅原久範, and 三森経世. レプチン変異導入による MRL/Mp-Fas^{lpr} (MRL/lpr) マウスの免疫異常に及ぼす影響. *リウマチ学会* 第48回(岡山). 2004.
 - 4) 藤井隆夫, 藤田義正, 亀山香織, 田中真生, 臼井崇, 平方道人, 梅原久範, 三森経世. 自己反応性 Th1 細胞ワクチネーションによる抑制性抗 T 細胞レセプター抗体の誘導. *リウマチ学会* 第48回(岡山). 2004.
 - 5) 小林志緒, 臼井崇, 田中真生, 藤井隆夫, 有馬俊裕, 吉藤元, 川端大介, 井村嘉孝, 梅原久範, 三森経世. 免疫制御性遺伝子を導入した type II コラーゲン特異的 CD4 T 細胞移入

- による CIA 特異的な免疫制御法の可能性. 第34回日本免疫学会(札幌). 2004.
- 6) 山口拓郎, 梅原久範, 金哲雄, 吉藤元, 井村嘉孝, 川端大介, 有馬俊裕, 藤田義正, 臼井崇, 田中真生, 藤井隆夫, 三森経世. SLE 患者末梢単核球におけるリピッドラフト発現の解析. リウマチ学会 第48回(岡山). 2004.
- 7) 山口, 拓郎, 梅原久範, 宮地理彦, 金哲雄, 吉藤元, 井村嘉孝, 川端大介, 臼井崇, 田中真生, 藤井隆夫, 三森, 経世. SLE 患者T細胞活性化における Lipid raft 発現の解析. 第34回日本免疫学会(札幌). 2004.
- 8) 合田征司, 井上博, 宮地理彦, 金哲雄, 山口拓郎, 梅原久範, 堂前尚親, 池尾隆. CD3/TCR 刺激の ZAP-70, LAT を介した・1-インテグリン活性化に及ぼす影響. 第34回日本免疫学会(札幌). 2004.
- 9) 金哲雄, 宮地理彦, 山口拓郎, 山岡尚平, 岡崎俊朗, 田中真生, 藤井隆夫, 三森経世, 梅原久範. 細胞膜スフィンゴミエリンと Fas 依存性アポトーシス. 第34回日本免疫学会(札幌). 2004.
- 10) 宮地理彦, 金哲雄, 山口拓郎, 尼川龍一, 福原資朗, 山岡尚平, 岡崎俊朗, 三森経世, 梅原久範. スフィンゴミエリン/ラフトの Fas 依存性アポトーシスにおける重要性. 第34回日本免疫学会(札幌). 2004.
- 11) 吉藤元, 藤井隆夫, 梅原久範, 田中真生, 藤田義正, 川端大介, 井村嘉孝, 有馬俊裕, 臼井崇, 三森経世. 間質性肺炎(IP)が先行発症する PM/DM 例における抗アミノアシル tRNA 合成酵素(ARS)抗体の有用性. リウマチ学会 第48回(岡山). 2004.
- 12) 吉藤元, 梅原久範, 藤井隆夫, 田中真生, 臼井崇, 井村嘉孝, 川端大介, 三森経世. 強皮症の皮膚症状進行例への二重膜濾過血漿交換(DFPP)・シクロスポリン(CPA)併用療法の効果. 第34回日本免疫学会(札幌). 2004.
- 13) 井上博, 合田征司, 宮地理彦, 金哲雄, 山口拓郎, 池尾隆, 梅原久範, 堂前尚親. 2004. T 細胞の・1 インテグリン活性化における CXCL12 の影響. 第34回日本免疫学会(札

幌). 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況
無し

厚生労働科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業)
分担研究報告書

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が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 T 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。そこで T 細胞でのみ TGF- 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た。全身における TGF- β ノックアウトマウスは 3 週齢で全身の激しい炎症が見られるのに対し、このマウスでは特に若い週齢においては自己免疫様の病態はみられなかった。今後このマウスを用いた研究により、経口免疫寛容の誘導における TGF- β 産生 T 細胞の役割や、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パイエル板 T 細胞の産生する TGF- β の役割などの解明が期待される。

A.研究目的

食物として摂取された非病原性抗原に対しては全身免疫が惹起されず免疫寛容が誘導される。この経口免疫寛容を用いてヒトのアレルギー疾患や自己免疫疾患の治療への応用が期待されるが、そのメカニズムについてはまだ不明な点が多い。経口免疫寛容を mediate する T 細胞として、TGF- β を産生する CD4+抑制性 T 細胞(Th3)や IL-10 などの抑制性サイトカインを産生する様々な T 細胞が重要であるといわれているが直接的証拠はない。

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、T 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が詳細は不明である。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における TGF- β の役割も最終的結論がでない。

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 TGF- 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が、それを腸管内リンパ組織において分泌しているのは T 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、T 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 TGF- β が深く関与していることがわかっている。ところが、TGF- 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ができなかった。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 がどのような役割をもつのかを解析することとした。

B.研究方法

T 細胞でのみ TGF- β 遺伝子の発現がみられないマウスの作成は、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 配列を挿入した変異型マウス (TGF- β floxed mouse) を前年度までに作成していた。さらにこれを lck-Cre トランスジェニックマウスとを交配した。交配により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確認した。その後 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パイエル板 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+抑制性 T 細胞の分化・機能についても検討する。一方、DO11.10 マウスのナイーブな T 細胞を BALB/c マウスに移入後 FITC 標識した OVA を経口投与するという系を用い、抗原投与後経時的にパイエル板を採取して FITC 陽性細胞、OVA 特異的 T 細胞の動態と分布、またケモカインおよびケモカインレセプターの発現を、蛍光免疫染色および RT-PCR を用いて検討した。

(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. 研究結果

Ell1a-Cre マウスとの交配により得た TGF-floxed マウスを lck-Cre マウスと交配し、T 細胞 specific な targeted マウスが得られた。このマウスにおいては、胸腺細胞および末梢の T 細胞において、lineage specific な recombination がおき、その結果 TGF- β の発現がみられなくなっていることを確認した。このマウスは、全身における TGF- β のノックアウトマウスと違って、自然経過においては特に全身に自己免疫様の病態は確認できなかった。また mucosal tolerance に対するはつきりとした defect は確認できていない。一方、DO11.10 マウスでの OVA 特異的抑制性 T 細胞の解析では、FITC-OVA 投与 3 時間後には OVA を取り込んだ DC がパイエル板の subepithelial dome (SED) に出現し、24 時間後には、パイエル板の interfollicular region (IFR) に OVA 特異的 T 細胞が集積し、そこで OVA を取り込んだ DC と接触していた。パイエル板から OVA 特異的 T 細胞を集めて realtime PCR により発現遺伝子を解析したところ CCR4, CCR8 に加えて抑制性 T

細胞特異的といわれる FoxP3 も強く発現していた。これによりパイエル板において DC との接触により抑制性 T 細胞が生成されることが強く示唆された。

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が、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。最近 CD4+CD25+ regulatory T 細胞の抑制メカニズムに、TGF- β が大きく関与することが再確認されてきている。この研究の今後の発展によりその複雑なメカニズムが解明され、通常の状態では自己免疫疾患がいかにかに抑制されているのか解明されることが期待される。その破綻をいかにして制御するかが解明できれば、自己免疫疾患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

G. 研究発表

1. 論文発表

Nagatani K, Sagawa K, Komagata Y, and Yamamoto K. 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 Patches. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1029:366-370, 2004

永谷勝也、駒形嘉紀

CD4⁺CD25⁺T 細胞の腸管へのホーミング機序
臨床免疫 41:740-742, 2004

Sagawa K, Nagatani K, Komagata Y, and Yamamoto K. Angiotensin Receptor Blockers (ARBs) Suppress Antigen Specific T cell Responses and Ameliorate Collagen Induced Arthritis in Mice. *Arthritis & Rheumatism* in press.

2. 学会発表

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

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 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。このモデルを用いて様々なサイトカインが関節炎発症におよぼす効果を検討した。

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. 研究方法

SKG マウスは、ヒトの関節リウマチ(RA)と酷似した病変を自然発症する。その病因は、T 細胞特異的シグナル分子 ZAP-70 の一塩基突然変異にある。その結果、胸腺での T 細胞選択が変化し、関節炎惹起能をもつ T 細胞が産生される。最終的な関節破壊にはサイトカインの関与が重要である。SKG マウスを IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10 遺伝子欠損マウスと交配し、遺伝的背景が SKG マウスである各種サイトカインノックアウトマウスを作成した。それらのマウスについて、関節炎発症頻度・重症度の時間的経過を比較検討した。免疫組織染色によりサイトカイン産生細胞の局在を解析した。さらに、関節炎発症と自己抗体出現の関係について検討した。

(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. 研究結果

IL-1 α / β 、TNF- α を欠損させると、関節炎発症頻度・重症度とも有意に低下し、IL-6 遺伝子欠損 SKG マウスは、全く関節炎を発症しなかった。IL-4 欠損 SKG マウスでは、関節炎の発症頻度に有意差を認めなかったが、関節炎の重症度が有意に上昇した。IFN- γ 欠損 SKG マウスでは、関節炎の発症頻度・重症度に有意差を認めなかった。IL-10 欠損 SKG マウスでは、関節炎発症頻度・重症度とも有意に上昇した。興味深いことに、関節炎を発症しない IL-6 欠損 SKG マウスでもリウマチ因子は正常 SKG マウスと同頻度で出現した。サイトカインの局在を検討したところ、TNF- α と IL-1 β の発現は、滑膜表層に限局していた。IL-6 は、TNF- α と IL-1 β とは異なり、滑膜表層ではなく、滑膜表層下の細胞、恐らくマクロファージに特異的に発現していた。

D. 考察、結論

IL-1 α / β 、TNF- α 、IL-6 の炎症性サイトカインは、SKG マウスの関節炎発症に重要であり、特に IL-6 は必須のサイトカインである。IL-4、IL-10 の抗炎症性サイトカインは、関節炎の進行に対し抑制的に働くが、IFN- γ は、SKG マウス関節炎の発症に必須ではない。さらに、滑膜炎部位で