

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リ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, 細胞膜スフィンゴリ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リ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. 細胞膜スフィンゴリ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) Umehara, H., Inoue, H., Huang, J.-Y., Kono, T., Minami, Y., Tanaka, Y., Okazaki, T., Bloom, E.T., and Domae, N.: Role for adapter proteins in costimulatory signals of CD2 and IL-2 on NK cell activation. *Mol. Immunol.* (2002) 38, 587-596.
- 9) Tanaka, Y., Fujimoto, H., Okada, Y., Umehara, H., Katoka, T., and Minami, Y.: H-Ras/Mitogen-activated protein kinase pathway inhibits integrin-mediated adhesion and induces apoptosis in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* (2002) 277, 21446-21452.

- 10) Nishimura, M., Umehara, H., Nakayama, T., Yoneda, O., Hieshima, K., Kakizaki, M., Domae, N., Yoshie, O., and Imai, T.: Dualfunctions of fractalkine/CX3CR1 in trafficking of circulating cytotoxic effector lymphocytes that are defined by CX3CR1 expression. *J. Immunol.* (2002) 168, 6173-6180.
  - 11) Kondo, T., Suzuki, Y., Kitano, T., Iwai, K., Watanabe, M., Umehara, H., Daido, N., Domae, N., Tashima, M., Uchiyama, T., and Okazaki, T.: Vesnarinone causes oxidative damage by inhibiting catalase function through ceramide action in myeloid cell apoptosis. *Mol. Pharm.* (2002) 61, 620-627.
  - 12) Kondo, T., Iwai, K., Kitano, T., Watanabe, M., Taguchi, Y., Yabu, T., Umehara, H., Domae, N., Uchiyama, T., and Okazaki, T.: Control of ceramide-induced apoptosis by IGF-1: involvement of PI-3 kinase, caspase-3 and catalase. *Cell Death Differnt* (2002) 9, 682-692.
  - 13) Kawase, M., Watanabe, M., Kondo, T., Yabu, T., Taguchi, Y., Umehara, H., Uchiyama, T., Mizuno, K., and Okazaki, T.: Increase of ceramide in adriamycin-induced HL-60 cell apoptosis: detection by a novel anti-ceramide antibody. *BBA* (2002) 1584, 104-114.
  - 14) Inoue, H., Yoneda, O., Minami, Y., Tanaka, Y., Okazaki, T., Imai, H., Bloom, E., Domae, N., and Umehara, H.: Lipid rafts as the signaling scaffold for NK cell activation: Tyrosine phosphorylation and association of LAT with PI 3-kinase and PLC-g following CD2 stimulation. *Eur. J. Immunol.* (2002) 32, 2188-2198.
  - 15) 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.
  - 16) 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
  - 17) 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
  - 18) 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ピッドラフト発現異常. *臨床免疫* 42:675. 2004
  - 19) 梅原久範 (2003). 全身性強皮症, 医学のあゆみ 別冊, 68-72
  - 20) 梅原久範, 井上博, 宮地理彦 (2003). NK 細胞活性化における lipid raft の関与, *臨床免疫* 26, 9-20
  - 21) 梅原久範, 宮地理彦, 岡崎俊朗 (2003). "Lipid rafts" 細胞活性化のための"脂肪の筏", *臨床免疫学会会誌* 26, 9-20
  - 22) 梅原久範, 宮地理彦, 岡崎俊朗 (2003). T 細胞シグナル伝達における raft の役割, *炎症と免疫* 11, 100-109
  - 23) 梅原久範, 西村美由希, 今井俊夫 (2003). リンパ球と血管内皮細胞との相互作用におけるフラクタルカインの関与, *臨床免疫* 40, 371-378
  - 24) 梅原久範, 吉藤元, 三森経世 (2003). RA とフラクタルカイン, *リウマチ科* 29, 29-34
  - 25) 梅原久範. ケモカインと接着分子. *内科診療 Q&A* 39:12. 2004
  - 26) 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
  - 27) 梅原久範 (2003). *リウマチ専門医試験 例題と解説*. 日本リウマチ学会
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-Faslpr (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ポ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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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.
  - 14) 梅原久範, 今井俊夫, 吉藤元, 川端大介, 井村嘉孝, 藤田義正, 田中真生, 藤井隆夫, 三森経世. Fractalkine によるNK細胞の IFN-g 産生と Th1 反応. 第47回リウマチ学会 2003.
  - 15) 宮地理彦, 梅原久範, 岡崎俊朗, 尼川龍一, 福原資朗. raft 形成と apoptosis 誘導におけるスフィンゴミエリンの関与. 第65回日本血液学会総会. 2003.
  - 16) 井上博, 梅原久範, 岡崎俊朗, 宮地理彦, 合田征司, 堂前尚親. 細胞膜構成脂質の相違による raft 形成および Fas 感受性の変化. 第33回日本免疫学会学会総会・学術集会記録 2003.
  - 17) 宮地理彦, 尼川龍一, 福原資朗, 井上博, 合田征司, 岡崎俊朗, 梅原久範. Fas 依存性 Apoptosis におけるスフィンゴミエリンの関与. 第33回日本免疫学会学会総会・学術集会記録. 2003.
  - 18) Miyaji M, Amakawa R, Okazaki T, Umehara H, Fukuhara S. Functional roles of sphingomyelin on lipid raft formation and Fas-mediated apoptosis. 第76回日本生化学学会 2003.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
無し

## 免疫抑制性シグナル異常と経口免疫寛容の誘導に関する研究

分担研究者 駒形嘉紀 東京大学医学部附属病院アレルギーリウマチ内科 助手

### 研究要旨

腸管からの抗原に対する経口免疫寛容を誘導することにより種々の自己免疫疾患の治療を行う試み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- $\beta$ が重要であるという報告があるが、未だ明らかではない。その他にも末梢での自己抗原に対する寛容の維持、粘膜免疫システムでのIgA産生などにおいても重要な役割を担っているといわれているが、その制御については不明な点が多い。そこでこれらを解析するためT細胞でのみTGF- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ の役割などの解明が期待される。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細胞の動態と分布を調べたところ、パイエル板にOVA特異的T細胞が集積し、その遺伝子発現をrealtime PCRにより解析したところ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。

### A.研究目的

経口的に投与された非病原性抗原に対しては全身性の免疫寛容が誘導されることが知られており経口免疫寛容と呼ばれる。この現象を応用してアレルギー疾患や自己免疫疾患を治療する試みがなされており、動物モデルでは劇的な効果がみられヒトへの応用が期待されている。副作用もとくに見られず、抗原特異的な治療として今後大きく発展していくことが期待されている方法であるが、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、現在までに主にTGF- $\beta$ を産生するCD4+調節性T細胞(Th3)が重要であるといわれており、その他にIL-10などの抑制性サイトカインを産生するTr細胞や、またCD4+CD25+抑制性T細胞も関与するという報告もあ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- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$  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- $\beta$  が深く関与していることがわかっている。ところが、TGF- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  がどういう役割をもつかを解析することとした。また粘膜免疫システムの中心臓器である小腸パイエル板における DC が、経口抗原に対する特異的な抑制性 T 細胞生成の際にどのような役割を果たしているかを解析するため、経口抗原投与後のパイエル板内の DC とナイーブ T 細胞との接触を追跡し、抑制性 T 細胞の生成を検証することとした。

## B. 研究方法

T 細胞でのみ TGF- $\beta$  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- $\beta$  をコードする exon 6 の上・下流に loxP 配列を挿入した Targeting construct を作成し、ES 細胞に導入したのち blastocysto injection により loxP が exon6 上・下流にのみ挿入された変異マウスを作成した。これを embryo 期に Cre が発現する E11a-Cre と交配することにより、neo のみが部分的に delete した細胞をもつモザイクマウスを作成し、これらを wildtype と交配して loxP のみが exon6 の上下流に存在するマウスを作成した(TGF- $\beta$  floxed mouse)。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。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-

$\beta$  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無いと考えられる。

## C. 研究結果

E11a-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- $\beta$  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- $\beta$  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 に対するはっきりとした 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

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- $\beta$  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- $\beta$  が大きく関わることで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が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。

## E. 結論

## F. 健康危険情報

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

駒形嘉紀

経口免疫寛容の基礎と応用

Bio Clinica 17: 542-546, 2002

Maron R, Slavin AJ, Hoffmann E, Komagata Y, and Weiner HL.

Oral tolerance to copolymer 1 in myelin basic protein (MBP) TCR transgenic mice: cross-reactivity with MBP-specific TCR and differential induction of anti-inflammatory cytokines.

Int Immunol 14: 131-138, 2002

駒形嘉紀

粘膜免疫と経口免疫寛容

内科 91: 1271, 2003

駒形嘉紀

経口トレランスと関節炎治療への応用

Rheumatology Clinical Update 10: 36-37, August 2003

駒形嘉紀、永谷勝也、山本一彦

経口トレランス

現代医療 35: 2515-2519, 2003

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

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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>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

Y. Komagata, K. Nagatani, K. Yamamoto

Role of DC and chemokines for the induction of gut-homing CD4+CD25+ regulatory T cells in Peyer's patches

第 31 回日本臨床免疫学会，東京，2003.10

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

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し、その結果としてヒトの関節リウマチと酷似した病変を誘導する。また、関節炎の発症・進行に関与するサイトカインは、ヒト関節リウマチと酷似している。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. 研究方法

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)関節炎発症におけるサイトカインの役割を解析する。(3)関節炎発症における環境因子の役割を解析する。(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. 研究結果

(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、T 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- $\gamma$  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 T 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。

サイトカインの関与について、IL-1 $\alpha$  /  $\beta$ 、TNF- $\alpha$  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- $\gamma$ 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- $\alpha$ とIL-1 $\beta$ の発現は、滑膜表層に限局していた。IL-6は、TNF- $\alpha$ とIL-1 $\beta$ 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

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細胞の産生がおき、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。

IL-1 $\alpha/\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、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- $\gamma$ は、SKGマウス関節炎の発症に必須ではない。さらに、滑膜炎部位では、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ を産生している細胞とIL-6を産生している滑膜細胞とは異なる。

#### F. 知的財産権の出願・取得状況(予定を含む)

##### 1) 特許取得

Foxp3発現リンパ球による免疫病の治療法(特許出願中)

新規単クローン性抗体による制御性T細胞の操作(特許出願中)

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Sakaguchi, S.: Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunologic tolerance to self and non-self. *Nature Immunol.* In press.

Chai, J-G., Xue, S., Coe, D., Addey, C., Bartok, I., Scott, D., Simpson, E., Stauss, H. J., Hori, S., Sakaguchi, S., and Dyson, J. P.: T regulatory cells, derived from naive CD4+CD25- T cells by in vitro Foxp3 gene transfer, can induce transplantation tolerance. *Transplantation.* In press.

Sakaguchi, S., and Sakaguchi, N.: History of CD25+CD4+ regulatory T cells. *Progress in Inflammation Research.* In press.

Nomura, T., and Sakaguchi, S.: Regulatory T cells in tumor immunity. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 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.: A common basis of self-tolerance and transplantation tolerance: a simple way of inducing transplantation tolerance with naturally arising CD25+CD4+ regulatory T cells. *Philosophical Transactions: Biological Sciences.* In press.



- Fehervari, Z. and Sakaguchi, S.: T lymphocytes: Regulatory. *Nature Encyclopedia of Life Sciences*. In press.
- Matsubara, Y., Hori, T., Morita, R., Sakaguchi, S., and Uchiyama, T.: Phenotypic and functional relationship between adult T cell leukemia and regulatory T cells. *Leukemia* 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  $\beta$ -glucans and their receptor Dectin-1. *J. Exp. Med.* In press.
- Fehervari, Z., and Sakaguchi, S.: Regulatory T cells. In "Measuring Immunity" eds. M. T. Lotze and A. W. Thompson, Elsevier. p322-335, 2005.
- 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.
- Sakaguchi, N., Takahashi, T., Hata, H., Nomura, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Sakihama, T., Negishi, I., Nakatsuru, S., and Sakaguchi, S.: Altered thymic T-cell selection due to a spontaneous mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis. *Immunology* 2004. Medimond S.r.l., Bologna, Italy. p239-242, 2004.
- 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. *Immunology* 2004. Medimond S.r.l., Bologna, Italy. p341-344, 2004.
- Ono, M., Shimizu, J., Miyachi, Y., and Sakaguchi, S.: Induction of fatal autoimmune myocarditis and other autoimmune diseases in mice by depleting Foxp3-expressing T cells. *Immunology* 2004. Medimond S.r.l., Bologna, Italy. p193-195, 2004.
- Muriglian, 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.
- Ying Li, Y., Koshiba, T., Yoshizawa, A., Yonekawa, Y., Ito, A., Mori, T., Kawamoto, H., Tanaka, Y., Sakaguchi, S., Minato, N., Wood, K. J., and Tanaka, K: Analyses of peripheral blood

- mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *American J. Transplantation*. 4:2118-2125, 2004.
- Fehervari, Z., and Sakaguchi, S.: CD4+ regulatory T cells and immune control. *J. Clin. Invest.* 114:1209-117, 2004.
- He, H., Messer, R.J., Sakaguchi, S., Yang, G., Robertson, S. J., and Hasenkrug, K. J. Reduction of retrovirus-induced immunosuppression by *in vivo* modulation of T cells during acute infection. *J. Virology*. 78:11641-7, 2004.
- Takahata, Y., Nomura, A., Takada, H., Ohga, S., Furuno, K., Hikino, S., Nakayama, H., Sakaguchi, S., Hara, T.: CD25+CD4+ T cells in human cord blood: an immunoregulatory subset with naive phenotype and specific expression of forkhead box p3 (Foxp3) gene. *Exp Hematol*. 32:622-629, 2004.
- Yagi, H., Nomura, T., Nakamura, K., Kitawaki, T., Hori, S., Maeda, M., Onodera, M., Uchiyama, T., Fujii, S., and Sakaguchi, S.: Crucial role of *FOXP3* in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int. Immunol.* 16: 1643-1656, 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.
- Fehervari, Z., and Sakaguchi, S.: Control of CD25+CD4+ regulatory T cell activation and function by dendritic cells. *Int. Immunol.* 16:1769-1780, 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 $\alpha$ , IL-1, and IL-10 to T cell-mediated spontaneous autoimmune arthritis in mice. *J. Clin. Invest.* 114: 582-588, 2004.
- Nishimura, E., Sakihama, T., Setoguchi, R., Tanaka, K., and Sakaguchi, S.: Induction of antigen-specific immunologic tolerance by *in vivo* and *in vitro* antigen-specific expansion of naturally arising CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int. Immunol.* 16: 1189-1201, 2004.
- Dittmer, U., He, H., Messer, R. J., Schimmer, S., Oilbrich, 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.
- Suri, A., Shimizu, J., Katz, J. D., Sakaguchi, S., Unanue, E. 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.
- Kajiura, 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-kB-inducing

kinase establishes self-tolerance in a thymic-stroma dependent manner. *J. Immunol.* 172: 2067-2075, 2004.

Hori, S., and Sakaguchi, S.: Foxp3, a critical regulator of regulatory T cell development and function. *Microbes and Infection.* 6: 745-51, 2004.

Choi, B. K., Bae, J. S., Choi, E. M., Kang, W. J., Sakaguchi, S., Vinay, D. S., and Kwon, B. S. 4-1BB-dependent inhibition of immunosuppression by activated CD4+CD25+ T cells. *J. Leukoc. Biol.* 75: 785-791, 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.

Zhang, X., Koldzix, D.J., Izikson, L., Reddy, J., Nazareno, R. F., Sakaguchi, S., Kuchroo, V. K., and Weiner, H. L. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int. Immunology.* 16: 1-8, 2004.

Fehervari, Z., and Sakaguchi, S.: Development and function of CD25+CD4+ regulatory T cells. *Curr. Opinion in Immunol.* 16:203-208, 2004.

Fehervari, Z. and Sakaguchi, S.: A paragon of self-tolerance:Regulatory T cells and the control of immune responses. *Arthritis Res. Ther.* 6: 19-25, 2004.

Sakaguchi, S.: The origin of *FOXP3*-expressing CD4+ regulatory T cells: thymus or periphery. *J.*

*Clin. Invest.* 112: 1310-1312, 2003.

Sakaguchi, N., Takahashi, T., Hata, H., Nomura, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Sakihama, T., Matsutani, T., Negishi, I., Nakatsuru, S., and Sakaguchi, S.: Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature.* 426:454-60, 2003.

Sakaguchi, S.: Taming transplantation by regulatory T cells. *Nature Medicine* 9: 1117-1118, 2003.

Hori, S., Takahashi, T., and Sakaguchi, S. Control of autoimmunity by natural regulatory T cells. *Adv. Immunol.* 81: 329-369, 2003.

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.

Sakaguchi, S. Control of immune responses by naturally arising CD4+ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 197: 397-401, 2003.

Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S.: Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 299: 1057-1061, 2003.

Wood, K. and Sakaguchi, S. Regulatory T cells in transplantation. *Nature Rev. Immunol.* 3: 199-210, 2003.

Sakaguchi, S. Regulatory T cells: mediating

compromises between host and parasite. *Nature Immunol.* 4: 10-11, 2003.

Takahashi, T., and Sakaguchi, S.: The role of regulatory T cells in controlling immunologic self-tolerance. *Int. Rev. Cytol.* 225: 1-32, 2003.

Sakaguchi, S., Hori, S., Fukui, Y., Sasazuki, T., 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.

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.

Sakaguchi, S.: Immunologic tolerance maintained by regulatory T cells: Implications for autoimmunity, tumor immunity and transplantation tolerance. *Vox Sang* 83: S151-S153, 2002.

Gallimore, A., and Sakaguchi, S.: Regulation of tumor immunity by CD25+ T cells. *Immunology* 107: 5-9, 2002.

Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., and Sakaguchi, S.: Stimulation of CD25+ CD4+ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nature Immunol.* 3: 135-142, 2002.

## 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 や RANKL などのサイトカインは、免疫細胞の制御において重要な役割を果たし、自己免疫疾患における免疫系の活性化への関与も注目されている。本研究では、IFN と RANKL の細胞内シグナル伝達を膠原病との関連において詳細に検討し、膠原病治療における新たな標的経路の解明を目指した。

### A. 研究目的

膠原病に代表される自己免疫疾患の発症原因や病態にはいまなお不明の部分が多く、根治療法がない疾患が多い。本研究では、このような膠原病の発症や病態形成に重要な免疫系の異常を分子レベルで解明し新規治療標的を同定するため、免疫系を制御する重要な液性因子であるサイトカインによる遺伝子制御ネットワークの解明を進める。特に、IFN 系は、自然免疫系および獲得免疫系の双方において重要な意義をもち、ウイルス感染防御、T 細胞制御、樹状細胞等の抗原提示細胞の活性化などにおいて必須の役割をもつことが明らかにされてきた。そこで、この IFN 系に注目し、IFN 受容体の欠損マウスやその細胞内シグナル伝達に關与する IRF ファミリー転写因子および Stat1 の遺伝子欠損マウスを用いて、免疫系の機能における意義を解析した。一方、リンパ節形成、T 細胞分化誘導、樹状細胞活性化、破骨細胞分化誘導において重要なサイトカインである RANKL は、これまでの研究により IFN 系とのクロストークで制御されることが示されており、この RANKL の細胞内シグナル伝達に關しても解析を進めた。

### B. 研究方法

I 型インターフェロン受容体のコンポーネント IFNAR1 の欠損マウスにおける T 細胞の活性化を検討した。また、I 型インターフェロンによる転写活性化に重要な IRF-9 の欠損マウスを用いて同様の検討した。特に IFN によって誘導

される IP-10/CXCR3 系の発現や機能に關して検討を進めた。

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關与したり、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、ゲルシ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。

RANKL 標的遺伝子解析の中で IFN- $\gamma$  によって誘導される遺伝子発現が多数上昇していたことに注目し、IFNAR1 欠損マウス等を用いてこのシグナルの制御を生体レベルで解析した。さらに、活性化 T 細胞で重要と考えられてきた転写因子である NFATc1 が、RANKL によって非常に高度に誘導されることを見だし、NFATc1 欠損 ES 細胞を用いてその機能を検討した。

免疫グロブリン受容体と会合してシグナル伝達に寄与していることが知られている ITAM アダプター分子である DNAX activating protein 12 (DAP12) と Fc receptor common  $\cdot$  subunit (FcR $\cdot$ ) のダブルノックアウトマウスを作成し、そのマウス由来の細胞におけるシグナル伝達を解析した。特に、われわれが IFN 系とのクロストークを解明した

TNFファミリーのサイトカインである receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL)によるカルシウムシグナル活性化と転写因子 NFATc1 の誘導に注目して解析した。

#### (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.研究結果

IFNAR1 欠損マウス由来の CD8<sup>+</sup>T 細胞において、抗 CD3/CD28 抗体刺激による活性化シグナルが減弱していることを見出し、この活性化経路には IFN- $\alpha$  /  $\beta$  による、転写因子 ISGF3 が必須であることを見出した。更に、この経路には ISGF3 によって制御される IP-10/CXCR3 ケモカイン系が関与することを見出し、ケモカイン系がT細胞活性化に関与するという新しい知見を提供した。さらに、IRF-2 欠損マウスの CD8 陽性 T 細胞はアロ(同種異型)刺激の際に、過剰な活性化を示すことが自己免疫性皮膚炎発症に重要であることが明らかになっていた。この異常活性化過程において、IFN の標的遺伝子の一つである CXCR3 の過剰発現が関与しており、CD25 発現を制御し、IL-2 依存性の増殖反応を亢進させていることが明らかになった。

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 は Runx2 と結合することが分かったが、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が予想された。Runx2 は過剰発現すると効率よく核移行するが、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が明らかになった。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が明らかになった。

RANKL は c-Fos を介して IFN- $\gamma$  を誘導し、誘導された IFN- $\gamma$  は c-Fos 発現を抑制することで過剰なシグナルを抑

制することが明らかになった。即ち、c-Fos は自らの抑制因子である IFN- $\gamma$  を誘導し、「自己制御」と呼べるフィードバックループを形成していた。

RANKL によって誘導される転写因子 NFATc1 については、RANKL シグナルを伝達する最も重要な転写因子であることを示唆するデータが得られている。主な結果は、①RANKL は転写因子 NFATc1(NFAT2)を特異的に誘導し、その誘導の程度はあらゆる転写因子の中で最大レベルであり、20 倍を越えていた。②NFATc1 は RANKL 刺激により活性化し、核に集積し転写活性化していた。③ RANKL による NFATc1 の活性化は、カルシウム依存性の脱リン酸化酵素であるカルシニューリンを介しており、この抑制剤である FK506 やサイクロスポリン A は RANKL シグナルを抑制した。④NFATc1 を欠損した ES 細胞は、RANKL による細胞分化誘導能が完全に障害されていた。

DAP12 と FcR $\gamma$  のダブルノックアウトマウス由来のマクロファージ系細胞を RANKL で刺激すると、野生型細胞において観察されるカルシウムシグナルの活性化、PLC $\gamma$  の活性化、NFATc1 の誘導などが障害されていることが明らかになった。また、これらの細胞内で DAP12 や FcR $\gamma$  と会合している受容体を検索した結果、FcR $\gamma$  と会合する受容体は paired immunoglobulin-like receptor (PIR)-A, osteoclast-associated receptor (OSCAR) であり、DAP12 と会合する受容体は triggering receptor expressed by myeloid cells (TREM)-2, signal-regulatory protein (SIRP) $\gamma$ 1 であることが明らかになった。ITAM シグナルが障害された細胞においては、NFATc1 誘導が障害された結果、RANKL 誘導性の破骨細胞分化が障害された。以上から、RANKL のシグナル伝達においては、免疫グロブリン様受容体が共刺激分子として重要な役割を果たすことが明らかになった。DAP12 や FcR $\gamma$  の ITAM モチーフを介したシグナルはカルシウムシグナルの活性化と転写因子 NFATc1 を誘導することで、RANKL シグナルの増幅に必要であった。

### D.考察

T 細胞とくに CD8<sup>+</sup>T 細胞の活性化において、IFN- $\gamma$  によって誘導されるケモカインとケモカイン受容体を介して反

応を増幅することが効率よい免疫反応に必須であることが明らかになった。また、乾癬や関節リウマチ発症との関連が知られる runt ファミリー転写因子の転写活性化能が Stat1 によって制御されることが明らかになり、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ある。RANKL シグナルは、IFN 系とのクロストークの中で厳密に制御されており、IFN- $\gamma$  シグナルが負の制御で重要であること、NFATc1 がその遺伝子制御において中心的役割をもつことが解明された。RANKL シグナルにおける免疫グロブリン様受容体とそのアダプター分子の ITAM シグナルが共刺激シグナルとして必須であることが明らかになり、今後の RANKL シグナル制御に関する新たな治療標的となる可能性が示された。

## E. 結論

IFN と RANKL などのサイトカインシグナルを、IRF, Stat1, Runx2, NFAT などの細胞内シグナル伝達分子や転写因子に重点において解明した。本研究によって明らかになったさまざまなシグナル伝達経路は膠原病の新たな治療のための分子基盤を提供することとなる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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- $\kappa$ 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- $\kappa$ B ligand-stimulated induction of nuclear factor of activated T cells c1. *Arthritis Rheum* 50(3), 794-804 (2004) \*Equal contributors

Kim, S., Koga, T., Isobe, M., Kern, B. E., Yokochi, T., Chin, Y. E., Karsenty, G., Taniguchi, T., and Takayanagi, H. Stat1 functions as a cytoplasmic attenuator of Runx2 in the transcriptional program of osteoblast differentiation. *Genes Dev* 17(16), 1979-91 (2003)

Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J-I, Wagner, E. F., Mak, T. W., Kodama, T., and Taniguchi, T. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling for terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* 3, 889-901(2002)

Takayanagi, H., Kim, S., Matsuo, K., Suzuki, H., Suzuki,

T., Sato, K., Yokochi, T., Oda, H., Nakamura, K., Ida, N., Wagner, E. F. & Taniguchi, T. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of *IFN- $\gamma$* . *Nature* 416, 744-49 (2002)

Nakamura, I., Kadono, Y., Takayanagi, H., Jimi, E., Miyazaki, T., Oda, H., Nakamura, K., Tanaka, S., Rodan, G. A. & Duong le, T. IL-1 regulates cytoskeletal organization in osteoclasts via TNF receptor-associated factor 6/c-Src complex. *J Immunol* 168, 5103-9 (2002)

Yamamoto, A., Miyazaki, T., Kadono, Y., Takayanagi, H., Miura, T., Nishina, H., Katada, T., Wakabayashi, K., Oda, H., Nakamura, K. & Tanaka, S. Possible involvement of I $\kappa$ B kinase 2 and MKK7 in osteoclastogenesis induced by receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand. *J Bone Miner Res* 17, 612-21. (2002)

Ogasawara, K., Hida, S., Weng, Y., Saiura, A., Sato, K., Takayanagi, H., Sakaguchi, S., Yokochi, T., Kodama, T., Naitoh, M., De Martino, J. A. & Taniguchi, T. Requirement of the IFN- $\gamma$ -induced CXCR3 chemokine signalling for CD8<sup>+</sup> T cell activation. *Genes Cells* 7, 309-320 (2002)

Takayanagi H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *J Periodontal Res* (in press)

Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol Med* (in press)

Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T. and Taniguchi, T. Stat1-mediated cytoplasmic attenuation in osteoimmunology. *J Cell Biochem* 94, 232-240(2005)

Takayanagi, H., Kim, S., and Taniguchi, T. Signaling crosstalk between RANKL and interferons in osteoclast differentiation. *Arthritis Res* 4, S227-232 (2002)

Takayanagi, H. How does the immune system break and protect bone• *Science* (on line version, 2002) (<http://www.sciencemag.org/feature/data/pharmacia/2002/takayanagi.shl>)

高柳 広:関節リウマチにおける骨破壊の分子機構  
内科、95(2)338-342、2005

高柳 広:免疫系と骨代謝  
日本臨床、63 増刊 1、87-95、2005

高柳 広:関節リウマチにおける軟骨破壊の分子機構  
内科、95(1)136-139、2005

高柳 広:骨免疫学 オステオimmunology  
感染炎症免疫、34(4)22-32、2004

高柳 広:RANKLによる破骨細胞分化制御と関節リウマチ  
免疫 2005 *Molecular Medicine* 臨時増刊号、vol.41、  
p343-351、2004

高柳 広:運動器の形成・維持・老化にかかわる遺伝子制御  
ネットワークの解明  
ゲノムネットワーク、蛋白質核酸酵素 2004 年 12 月増刊、  
49(17)2943-2949、2004

高柳 広:オステオimmunology  
細胞工学、23(12)1424-1430、2004

高柳 広:Stat1とRunxファミリー転写因子:自己免疫疾患  
における役割  
分子リウマチ、1(3)168-175、2004

高柳 広:骨免疫制御とサイトカイン  
分子細胞治療、3(4)52-60、2004



高柳 広: ITAM を介した共刺激シグナルと RANKL による骨代謝の維持機構  
実験医学、22(12)1726-1729、2004

高柳 広: 破骨細胞活性化  
医学のあゆみ、209(10)771-778、2004

高柳 広: RA における免疫系と骨代謝の相互作用  
分子リウマチ、6(2)74-81、2004

高柳 広: 破骨細胞活性化と人為的制御  
臨床免疫、41(3)284-290、2004

高柳 広: 骨免疫学の世界・骨疾患と免疫異常  
(編集主幹および「はじめに」)  
医学のあゆみ、208(11)899、2004

金宣和、高柳広: IFN-Stat シグナルと骨代謝  
医学のあゆみ、208(11)920-925、2004

高柳 広: 骨と免疫のクロストーク  
現代医療、36(3)697-704、2004

高柳 広: 免疫系シグナルによる破骨細胞分化制御  
生化学、75(12)1535-1540、2003

高柳 広: RANKL による破骨細胞分化制御  
Annual Review 2004 免疫、143-153

高柳 広: Osteoimmunology  
内科、93(2)223-228、2004

高柳 広: インターフェロンと RANKL シグナル制御  
Molecular Medicine、40(11)1332-1340、2003

高柳 広: 免疫と骨代謝のクロストーク  
リウマチ、43(4)624-31、2003

高柳 広: RANKL の骨吸収作用を制御する IFN- $\gamma$  と IFN- $\beta$  の役割  
THE BONE、17(5)51-59(475-483)、2003

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、11(4)106-116、2003

高柳 広: 関節リウマチにおける骨破壊機序  
臨床カルシウム 13(6)16-23、2003

高柳 広: オステオimmunology  
Molecular Medicine、40(6)690-695、2003

高柳 広: 免疫と骨  
医学のあゆみ、205(3)190-192、2003

高柳 広: IRF ファミリーおよび Stat ファミリーによる骨代謝制御機構の解明  
Osteoporosis Japan、11(4)46-50(768-772)、2003

高柳 広: 整形外科クルズス(津山直一他編著、改訂第 4 版)南江堂、東京  
第一章 CIII 滑膜、第一章 G 筋 (P. 42-43, P. 63-65)

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発行、2003 年、P. 235-241

紙上座談会(中島利博、田中栄、妻木範行、高柳広); 運動器科学の黎明  
カレントセラピー、21(3)80-87、2003

高柳 広、織田弘美: 関節炎とインターフェロン  
リウマチ科、29(1)50-57、2003

高柳 広、金 宣和、谷口維紹: サイトカインと骨代謝

実験医学 2003 年 1 月増刊号「シグナル伝達研究 2003」、  
21(2)91-96(209-214)、2003 東京

門野夕峰、高柳 広、田中 栄:破骨細胞の分化、機能、  
生存におけるRANKL/RANKシグナルーIFNシグナルとの  
クロストークを含めて

実験医学 2002 年増刊号「最新の骨研究に迫る」、20  
(17)61-65 (2477-2481)、2002

高柳 広:RANKL と骨関節疾患  
医学のあゆみ、203(7)476-480、2002

高柳 広:免疫学と骨代謝の接点  
日本臨床、60(12)2287-2295、2002

高柳 広:RA における免疫学と骨代謝の接点  
THE BONE、16(5)31-37 (455-461)、2002

高柳 広:骨免疫学の新たな展開ーその生理的、病理学的  
な意義ー  
(編集主幹および総説)  
Medical Science Digest、28(11)400-401、2002

高柳 広:IFN- $\gamma$ が破骨細胞の形成を抑制する-c-Fos を  
介した RANKL シグナルの自己制御機構  
Molecular Medicine、39(7)836-841、2002

高柳 広:特集免疫病研究の最先端・分子と制御  
・RANKL-RANK シグナルと骨破壊  
Mebio、19(5)40-48、2002

## 2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

高柳 広:骨免疫制御における RANKL の補助シグナル  
第 27 回日本分子生物学会、2004.12.8、神戸

高柳 広:炎症性骨破壊と破骨細胞の制御  
日本リウマチ学会関東支部ランチョンセミナー、2004.12.4、

高柳 広:Regulation of RANKL by NFAT and ITAM  
signal in osteoclast differentiation

第34回日本免疫学会総会・学術集会、2004.12.2、札幌

乾匡範、古賀貴子、井上和也、谷口維紹、高柳 広、高井  
俊行

アダプター分子 DAP12 および Fc $\gamma$ R を介する ITAM シグナ  
ルは破骨細胞分化に必須である

第 34 回日本免疫学会総会・学術集会、札幌、2004.12.2

高網大士、長田年弘、杉山千枝、朝霧成拳、高柳 広、梅  
沢一夫

NF $\kappa$ B 阻害剤 DHMEQ による破骨細胞分化と活性化の抑  
制

第 34 回日本免疫学会総会・学術集会、札幌、2004.12.2

高柳 広:関節リウマチ骨破壊の制御

日本整形外科学会リウマチ研修会、2004.11.28、東京

高柳 広:骨免疫学における破骨細胞分化の制御機構

第 52 回国際歯科研究学会日本部会 (JADR) 総会・学術  
大会、2004.11.27、東京

高柳 広:破骨細胞分化の制御メカニズム

Bone & Joint Research Club「骨と関節の代謝調節を考え  
る基礎の会」、2004.11.14、木更津

高柳 広:骨免疫学の新展開

第 8 回 Omiya Forum on Rheumatoid Arthritis、2004.11.12、  
大宮

高柳 広:RA 骨破壊と破骨細胞の制御

第 4 回リウマチ性疾患と骨粗鬆症治療研究会、2004.11.5、  
熊本

高柳 広:破骨細胞を制御する新たな免疫シグナル

バイオサイエンスシンポジウム、2004.10.29、湘南

高柳 広:破骨細胞の起源と分化誘導機構・創薬の観点からー

第 19 回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー「骨・軟骨研究の最前線・新たな治療を目指してー」、2004.10.26、東京

高柳 広: Regulation of osteoclastogenesis by RANKL and ITAM signals  
Bone Biology Forum、2004.10.22、静岡

高柳 広:骨免疫学への遺伝子チップ応用  
第 32 回日本臨床免疫学会総会、2004.10.8、東京

H. Takayanagi: Integration of RANKL Signaling by NFATc1 in Osteoclastogenesis.  
26th Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, 2004.10.3, Seattle

T. Koga, M. Inui, A. Suematsu, T. Taniguchi, T. Takai, H. Takayanagi: ITAM-mediated costimulatory signals cooperate with RANKL for osteoclastogenesis  
26<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, 2004.10.3, Seattle (Young Investigator's Award)

H. Takayanagi: Novel regulators of RANKL-induced osteoclastogenesis  
The 11th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress, 2004.9.15, Jeju Island, Korea

高柳 広:RANKL シグナル制御と骨免疫学  
第8回 Molecular Cardiovascular Conference、2004.9.4、北海道

古賀貴子、乾匡範、末松綾子、谷口維紹、高井俊行、高柳広

ITAM を介した共シグナルは RANKL による破骨細胞分化に必須である

第 22 回日本骨代謝学会、大阪、2004.8.6

高柳 広:破骨細胞をターゲットとした炎症性骨破壊の制御

第 25 回日本炎症・再生医学会ランチョンセミナー、2004.7.13、東京

高柳 広: Costimulatory signals in osteoclast differentiation

第1回 ABJS 国際ワークショップ骨と関節の先端的疾患分子医科学、2004,6,22、東京

H. Takayanagi: Leflunomide inhibits bone destruction by interfering with RANKL signaling and osteoclastogenesis  
Annual European Congress of Rheumatology "EULAR 2004", 2004.6.11, Berlin

高柳 広:破骨細胞分化を制御する新たな免疫シグナル  
第 13 回東京免疫フォーラム、2004.5.18、東京

高柳 広:関節破壊の分子機序解明による RA 治療の新時代・新規 DMARD レフルノミドの破骨細胞への直接作用と骨破壊抑制・

第 48 回日本リウマチ学会総会ランチョンセミナー、2004.4.15、岡山

高柳 広:破骨細胞の分化と免疫シグナル  
先進口腔科学シンポジウム in 福岡、2004.3.15、福岡

高柳 広:新規 DMARD レフルノミドによる骨破壊抑制のメカニズム

第77回日本薬理学会総会、シンポジウム「抗リウマチ剤・最近のシンポ・」、2004.3.9、大阪

高柳 広:破骨細胞分化を制御する新たな免疫シグナル  
第1回 Osteoimmunology Forum、2004.1.24、東京

高柳 広:NFATc1 による破骨細胞分化制御

第2回東京骨軟骨フォーラム、2003.11.1、東京

H. Takayanagi: Novel regulatory mechanisms in osteoimmunology

2nd Wittgenstein Conference“ Bone and Cartilage in Health and Disease” 2003.10.18 Vienna

H. Takayanagi: Regulation of RANKL signaling in arthritic bone destruction

3rd Global Arthritis Research Network (GARN), 2003.9.15 Miyazaki

高柳 広: 関節リウマチにおける骨破壊の分子機序

第 40 回日本臨床分子医学会ランチョンセミナー、2003.7.10、東京

高柳 広: 骨と IFN 遺伝子

日本骨形態計測学会、シンポジウム「ゲノムと骨」2003.7.5 東京

高柳 広: IFN と骨疾患治療薬

第 108 回日本薬理学会関東部会、シンポジウム「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、幕張メッセ

H. Takayanagi: 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

T. Koga, H. Takayanagi, K. Sunhwa, M. Isobe, T. Taniguchi: Regulation of RANKL signaling in osteoclast differentiation

1st joint meeting of International Bone and Mineral Society/Japan Bone and Mineral Society, 2003.6.5 Osaka

(優秀演題賞)

H. Takayanagi: The positive and negative regulation of RANKL signaling in osteoclastogenesis

11th International Rheumatology Symposium, 2003.4.25 Tokyo

高柳 広: RANKL と骨軟骨破壊

第 47 回日本リウマチ学会ランチョンセミナー、2003.4.24 東京

高柳 広、金 宣 和、谷 口 維 紹: Regulation of bone homeostasis by RANKL and IFNs

第 32 回日本免疫学会学術集会、シンポジウム (Homeostatic regulation and cytokines)、2002.12.5 東京

H. Takayanagi, K. Sunhwa, T. Taniguchi

RANKL signaling network in positive and negative regulation of osteoclastogenesis

Meeting on genetic and molecular biology of skeletal development, Lucca, Italy

2002.10.14

高柳 広: インターフェロン系による破骨細胞分化制御

第 75 回日本生化学会、シンポジウム 70 「骨格系細胞の分化制御機構」2002.10.16

高柳 広: 免疫細胞と破骨細胞分化の接点

第 44 回歯科基礎医学会学術大会、シンポジウム免疫の最前線、2002.10.4 東京

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

特になし