

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

分担研究者 竹内 勤 埼玉医科大学総合医療センター第二内科 教授

研究要旨

全身性エリテマトーデス(SLE)における末梢血 T 細胞機能の分子機序として、T 細胞レセプターと CD3 複合体からの早期シグナル伝達に欠陥が存在し、解析した症例の60%に、TCRと鎖の蛋白合成低下が、20%前後の症例にはエクソン 7(-), short exon 8 などのスプライシング・ヴァリエントが見い出された。TCRと鎖蛋白合成障害に、この異常スプライシングを受けた TCRと鎖 mRNA ヴァリエントが、どのような機序を介して関与しているかは不明であった。その分子機序を明らかにするため、これらヴァリエント mRNA を安定して発現する T 細胞株を樹立した。それら T 細胞株の TCRと鎖 mRNA 安定性を検討した所、exon7(-)ヴァリエント、short exon 8 ヴァリエントの両者において mRNA 不安定性が確認され、それが TCRと鎖蛋白発現低下を引き起こすことが明らかにされた。

A.研究目的

SLE は自己免疫疾患の原型で、多彩な自己抗体産生とそれに引き続く組織障害を特徴とする。これには、B 細胞の自己抗体産生や自己反応性 T 細胞のエフェクター活性をコントロールすべき調節性 T 細胞の機能不全が重要な役割を演じている。T 細胞機能不全の本態の一つに早期シグナル伝達分子の機能異常が関与する事が指摘されていたため、チロシンリン酸化を指標として異常分子の同定を試みた。その結果、TCR からのシグナル伝達で中心的役割を演じている TCRと鎖の蛋白発現が低下し、一部の症例には mRNA のスプライシング・ヴァリエントが存在する事が明らかとなった。スプライシング・ヴァリエントが、どのような機序によって蛋白発現低下を惹起しているかは、不明であった。そこで、これらヴァリエントを遺伝子導入した T 細胞株を用いて、その分子機序を明らかにする。

B.研究方法、結果、考察

1) SLE 患者における short exon8 ヴァリエントの発現: 350bp の short exon8 スプライシングヴァリエントが SLE 患者 T 細胞で優位に認められるかどうかを定量的に検討するため、半定

量 PCR 法を用いて鎖 mRNA の発現を比較した。その結果、健常人コントロールでは全例で野生型 3'UTR が short exon8 ヴァリエントよりも優位に強く発現していたが、SLE 患者 7 例では全例で、short exon8 ヴァリエントが野生型よりも優位に検出された。特に 5 例の SLE 患者では、野生型が検出不能な程度まで発現低下していた。

2) SLE 患者における exon7 (-)ヴァリエントの発現: 2例で、エクソン7に相当する 36bp を欠いた exon7 (-)が見いだされ、exon7 前後に存在するスプライス・ドナー、アクセプター部位を介して生成されたスプライス・ヴァリエントと考えられた。一例では、ほぼ100%に、もう一例では約50%にこのヴァリエントが検出された。

3) short-exon8 ヴァリエント TCRと鎖遺伝子導入 T 細胞株の樹立: short-exon8 のヴァリエント TCRとメッセージが、どのような機序を介して蛋白発現低下に関わっているかを明らかにするため、以下の検討を行った。すなわち、レトロウイルスベクターに wild 型あるいはヴァリエント TCR・鎖遺伝子を組み込み、TCRと鎖欠損マウス T 細胞ハイブリドーマ MA5.8 にトランスフェクトして細胞株を樹立、その性状を検討した。short exon8 株は、wild TCRと株に比し、TCRと鎖の表

面発現が有意に低下し、同時に CD3 ε 鎖の発現も低下していた。免疫プロットによって蛋白合成を検討したところ、short exon8 株の CD3 ε 鎖は wild 株と同等であることが確認され、CD3 ε 鎖の表面発現低下は TCR ζ 鎖の産生低下による2次的現象と考えられた。アクチノマイシン処理によって TCR ζ 鎖 mRNA 安定性を検討したところ、short exon8 株では wild 株に比べ mRNA の消腿は明らかで、安定性が低下していることが明らかとなった。一方、CD3 ε 鎖の安定性は short exon8 株でむしろ亢進し、この安定性低下は TCR ζ 鎖 mRNA に特異的なものであった。

4) exon7(-) ヴァリアント TCR ζ 鎖遺伝子導入 T 細胞株の樹立: 36bp の exon7 を欠いたヴァリアントをレ T ロウイルスベクターに組み込み、TCR ζ 鎖欠損マウス T 細胞ハイブリドーマ MA5.8 にトランスフェクトして細胞株を樹立した。short exon 8 ヴァリアントと同様に、TCR ζ CD3 ε 鎖の表面発現が有意に低下していた。その mRNA 安定性をアクチノマイシン処理によって検討すると、exon 7 (-)ヴァリアントは、wild 株に比し、有意に mRNA の消腿が早く、short exon 8 ヴァリアントと同様の mRNA 不安定性が示された。

5) TCR ζ 鎖スプライシング・ヴァリアントによって誘導される分子発現異常の網羅的検索: SLE の病態形成において鍵を握る分子を探索するため、ヴァリアント TCR ζ 鎖を遺伝子導入し TCR ζ 鎖蛋白発現低下を来した2つのクローンを用いて、遺伝子チップによって網羅的 mRNA 発現解析を行った。両者に共通して発現亢進する分子として、TXK などのシグナル伝達分子、転写因子、WASP などのアダプター分子、β7 インテグリン、シンデカン・1 などの接着分子が明らかとなった。一方、発現低下する分子として、IL-2 を初めとする種々のサイトカインが明らかとなった。

6) シンデカン・1: ヴァリアント TCR ζ 鎖 mRNA 導入によって2次的に発現亢進する分子の中で、実際の患者 T 細胞において同様の発現亢進が認められる分子を検索した所、シンデカン・1 分子は、正常人 T 細胞に比し、SLE 患者 T 細胞で異常な発現様式を示すことが明らかとなり、しかも、その異常発現様式は、ζ 鎖発現低下と逆相関することが示された。

D. 結論

長い間分子機序の不明であった SLE において、シグナル伝達分子の機能異常に焦点を当て解析した結果、その分子機序の一部が明らかとなった。この研究により、分子異常が特定され、異常分子そのものその生成機序が蛋白あるいは遺

伝子レベルで明らかになれば、それを指標とした発症前診断、原因療法の開発が可能と考えられる。特に、TCR・鎖蛋白発現低下を是正するような遺伝子治療は、今後も基礎的検討を積み重ね、臨床応用の可能性を検討していく必要がある。一方、今回明らかになった TCR ζ 鎖下流で発現異常を来すシンデカン・1 分子などは、新たな治療標的となりうる可能性を秘めており、より原因に近い治療法開発に大きな進歩をもたらすものと期待される。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsuzaka T, Onoda N, Yoshimoto K, Zhang L, Pang M, Abe T, and Takeuchi T. Alternatively spliced 3' untranslated region of TCR・mRNA in the peripheral blood T cells of systemic lupus erythematosus patients. *Modern Rheum* 12: 167-173 2002.
2. Pang M, Setoyama Y, Tsuzaka K, Yoshimoto K, Amano K, Abe T, and Takeuchi T. Defective expression and tyrosine phosphorylation of the T cell receptor zeta chain in peripheral blood T cells from systemic lupus erythematosus patients. *Clin Exp Immunol* 129: 160-169-8, 2002.
3. Tsubota K, Fujita H, Tadano K, Onoda N, Tsuzaka K, and Takeuchi T. Abnormal expression of Fas ligand of lacrimal glands and peripheral blood in Sjogren's syndrome patients with enlarged exocrine glands. *Clin Exp Immunol* 129: 177-182, 2002.
4. Takeuchi T, and Abe T. Role of adhesion molecules in vasculitis syndrome. *Int Med* 41: 41-44 2002.
5. Tsuzaka K, Fukuhara I, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, and Takeuchi T. Forced expression of TCR・mRNA with alternatively spliced 3' untranslated region found in SLE patients lead to decreased production and cell surface expression of TCR・ and TCR-CD3 complex. *J Immunol* 171:2496-2503, 2003..
6. Takeuchi T, Tsuzaka K, Abe T. Altered expression of the T cell receptor-CD3 complex in systemic lupus erythematosus. *Int Rev Immunol* 23: 273-291, 2004

7. Tsuzaka K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Shiraishi K, Suzuki K, Abe T, Takeuchi T. A splice variant of the TCR ζ mRNA lacking exon 7 leads to the down-regulation of TCR ζ , the TCR/CD3 complex, and IL-2 production in SLE T cells. *J Immunol.* 174:3518-3525,2005
8. Takeuchi T, Tsuzaka K, Abe T, Yoshimoto K, Shiraishi K, and Amano K. T cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* in press.
9. Takeuchi T, Tsuzaka K, Kameda H, and Amano K. Therapeutic targets in misguided T cells in systemic lupus erythematosus. *Current Drug Target* in press.
10. 宮坂信之 小池隆夫 竹内 勤 山本一彦:膠原病治療の現況と問題点 臨床雑誌 内科 89(2):317-335, 2002
11. 竹内 勤:T細胞シグナル伝達分子機構 炎症と免疫 10(3):321,2002
12. 竹内 勤:炎症とサイトカイン・病態から治療応用へ・序論 最新医学 57(4):829-830,2002
13. 竹内 勤:全身性エリテマトーデス 総合臨床 151(7):2122-2128,2002
14. 竹内 勤:自己免疫疾患のモノクローナル抗体治療 Medical Science digest 28(8):330-333,2002
15. 亀田秀人、瀬戸山由美子、竹内 勤:T細胞シグナル伝達におけるアダプター分子の役割 炎症と免疫 10(5):83-88, 2002
16. 竹内 勤:TNF 阻害剤による治療 関節外科 22:60-66,2003
17. 竹内 勤:抗 TNF 療法 アレルギー 15(6):503-510,2003
18. 竹内 勤:新しい抗リウマチ薬・インフリキシマブ・Rheumatology Clinical Update 10:9-11,2003
19. 竹内 勤:抗 TNF 剤による治療 Pharma Medica 21(12):49-54,2003
20. 竹内 勤, 鈴木勝也:膠原病と抗サイトカイン療法 アレルギー・免疫 9(9):1067-1071 2002.9
21. 鍋木淳一、竹内 勤 他7名:SLE,SLE疑診例におけるループスアンチコアグラント測定の臨床的意義 日本医事新報 4208:25-28, 2004
22. 鈴木勝也、亀田秀人、竹内 勤:PD-1 と自己免疫 炎症と免疫 12(6):758-762,2004
2. 学会発表
 1. Takeuchi T. 国際シンポジウム リウマチ薬剤療法のエビデンスを考える RA 患者に対するインフリキシマブ療法の遠隔効果 第46回日本リウマチ学会 2002.4.24 神戸
 2. Takeuchi T. New strategy for the treatment of RA 第26回国際内科学会議 2002.5.28 京都
 3. Takeuchi T: Symposium Current RA treatment trends in JAPAN. APLAR 2002 Bangkok, Thailand.
 4. Kameda H, Ishigami H, Abe T, Takeuchi T: Expression of adapter proteins in rheumatoid synovial fibroblast-like cells and their involvements in the signaling from growth factor receptors. 67th Annual Meeting, Orlando, U.S.A., October, 2003
 5. Tsuzaka K, Fukuhara I, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, Takeuchi T. A splice variant of the TCR ζ mRNA lacking exon 7 can lead to the down-regulation of TCR ζ protein and IL-2 production in SLE T cells. American College of Rheumatology, 67th Annual Meeting, Orlando, U.S.A., October, 2003
 6. Yoshimoto K, Nudejima M, Ogasawara M, Setoyama Y, Suzuki K, Tsuzaka K, Abe T, Takeuchi T. Possible involvement of BAFF in the overproduction of IFN-gamma from PBL in SLE patients. The EULAR annual congress of rheumatology, Berlin, Germany, June, 2004
 7. Sekiguchi N, Kameda H, Nagasawa H, Ogawa H, Takei H, Tsuzaka K, Amano K, Takeuchi T. The efficacy and safety of bucillamine, a D-penicillamine analogue, in patients with active rheumatoid arthritis. The EULAR annual congress of rheumatology, Berlin, Germany, June, 2004
 8. Tsuzaka K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Shiraishi K, Suzuki K, Abe T, Takeuchi T. DNA microarray gene expression profile of T cells with the splice variants of TCR ζ mRNA observed in SLE. American College of Rheumatology, 68th Annual Meeting, San Antonio, U.S.A., October, 2004
 9. Shiraishi K, Tsuzaka K, Abe T, Takeuchi T. The 5th domain of E-cadherin is a site responsible for heterophilic adhesion with $\alpha_{\epsilon}\beta_7^+$ cells, but not for

homophilic adhesion. 68th Annual Meeting, San Antonio, U.S.A., October, 2004

10. 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 厚生労働省班研究 平成16年度合同班会議報告会 2004.12.17 東京ガーデンパレス 東京
11. 膠原病におけるT細胞シグナル伝達異常の解明と異常分子是正による新規治療法開発に関する研究 リウマチ治療の最前線 特別講演 第14回静岡県東部リウマチ膠原病医会 2004.6.26 三島グランドホテル 静岡

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

1. 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)
2. 分泌腺細胞とリンパ球との接着阻害剤(08/946838)

2. 実用新案登録

3. その他

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

分担研究者 田村直人 順天堂大学膠原病内科 講師

研究要旨

平成14年度および平成16年度:全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus: SLE)末梢血 T 細胞における CD154(CD40 ligand)発現異常に関する研究、平成 15 年度:悪性関節リウマチ血清による好中球 L-セレクチン shedding に関与する細胞内シグナル伝達経路に関する研究、以上について難治性病態の解明および治療への応用の可能性を検討するため、messenger RNA の安定化や mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) の関与などを中心に研究、報告した。

A.研究目的

全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus: SLE)や悪性関節リウマチなどでは免疫異常により難治性病態が引き起こされる。SLE では、活性化 T 細胞上の CD154 (CD40 ligand)の過剰発現が認められ、抗 DNA 抗体など自己抗体産生に深く関与していると推察されている。本研究においては CD154 過剰発現の機序を明らかにするため、CD154mRNA の安定性について検討した。また、細胞活性化の主要なシグナル経路 mitogen-activated protein kinase (MAPK)の SLE における CD154 発現への関与について検討した。また、好中球が活性化すると細胞表面分子である L-セレクチンが shedding されるが、悪性関節リウマチ患者血清由来の凝集 IgG は好中球を活性化し、L-セレクチンを shedding させることを以前報告した。この好中球 L-セレクチン shedding に関与する細胞内シグナル伝達経路を明らかにするため、好中球 L-セレクチン発現における MAPK についての検討を行った。

B.研究方法

健常人および SLE 患者末梢血単核球を分離し、PMA と ionomycin、あるいは抗 CD3 と抗 CD28 モノクローナル抗体で刺激し、CD154 蛋白および RNA 発現を検討した。また、actinomycin D を添加し、mRNA の安定性を検討した。MAPK である extracellular signal-regulated kinase (ERK)、p38MAPK、JNK それぞれの阻害薬の存在下における6時間、24 時間後の CD4 陽性 T 細胞上の CD154 の発現の変化を flow cytometry にて解析した。また、同様の刺激に

おける 6, 24, 48 時間後の MAPK のリン酸化を phosphoimmunoblot 法にて検索した。

悪性関節リウマチ患者から採取した血清を2%の濃度で健常人好中球に反応させ、経時的な細胞内 MAPK 蛋白量およびリン酸化について、Westernblot 法により解析を行った。また、予め好中球を MAPK 阻害剤あるいは TNF α 変換酵素 (TACE) 阻害薬と 15 分間反応させた後に患者血清を添加し、細胞表面上の L-セレクチンの発現をフローサイトメトリー法にて解析した。

(倫理面への配慮)

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

C.研究結果

健常人末梢血単核球では CD154mRNA の発現は認められないが、SLE では恒常的に発現が認められた。また刺激時の CD4 陽性 T 細胞上の発現は健常人においては一過性であるのに対し、SLE ではより強くまた長時間認められた。さらに CD154mRNA は SLE でより安定しており、CD154 の発現異常およびこの安定性は細胞を in vitro で数日間培養することで消失した。また、抗 CD3 と抗 CD28 モノクローナル抗体にて刺激したときの CD4 陽性 T 細胞上の CD154 の発現は、ERK 阻害薬の存在下で減弱が認められた。この減弱は6時間後よりも 24 時間後の発現で強く認められた。Phosphoimmunoblot 法にて MAPK のリン酸化をしたところ、SLE では ERK のリン酸化が健常人に比べ

長時間認められた。

一方、好中球を悪性関節リウマチ患者血清で刺激すると2時間後に ERK、p38MAPK のリン酸化が認められた。また、各 MAP キナーゼの経時的な蛋白量の変化は認められなかった。LPS 刺激による L-セレクチンの shedding は p38MAPK 阻害薬により抑制されたのに対し、悪性関節リウマチ患者血清による L-セレクチンの shedding は ERK の経路である MEK 阻害剤で抑制され、p38MAPK 阻害剤では抑制されなかった。またこの L-セレクチンの shedding は LPS 刺激と同様に TACE によって抑制された。

D. 考察

SLE の CD4 陽性 T 細胞を in vitro で刺激時に認められた CD154 過剰発現は可逆的であったことから、生体内での繰り返す抗原刺激が原因となっている可能性が考えられた。この発現はシクロスポリンにより抑制されるが、刺激後半に加えても抑制効果は認められないことから、カルシニューリン、NF-AT 以外のシグナル伝達経路が関与していると考えられ、今回の研究において、ERK を介したシグナル伝達経路が SLE における CD154 の発現の持続に関与していることが示唆された。一方で、悪性関節リウマチ患者血清による好中球活性化においては L-セレクチンの shedding に ERK を介したシグナル伝達経路が関与していると考えられた。

抗 CD154 モノクローナル抗体による治験が海外で行われ、ループス腎炎に対して有効であったが、血栓症発症により中止されている。また、一方では関節リウマチの動物モデルにおいて MAPK 阻害薬による治療効果が報告されている。SLE においても MAPK 阻害により CD154 発現減弱効果が期待できる可能性があり、今後の治療薬としての可能性に向けて、さらなる検討が必要であると考えられた。

E. 結論

MAPK のうち ERK は SLE 末梢血リンパ球における CD154 の発現や悪性関節リウマチにおける好中球活性化に関与している可能性があり、MAPK が治療のターゲットになり得る可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

Takaya M, Tamura N, Kato K, Kobayashi S, Haruta K, Tajima M, Hara M, Yang K, Tsuda H, Hashimoto H: CD154 expression and mRNA stability of activated CD4 positive T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol* 13: 220-6, 2003.

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

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.

2. 学会発表

秋元智博, 小林茂人, 田嶋美智子, 春田和彦, 田村直人, 池田真, 多田久里守, 鐘彬彬, 橋本博史. 悪性関節リウマチ由来免疫複合体による好中球 L-セレクチン shedding の機序解析, 日本リウマチ学会総会・学術集会, 岡山, 4月15日, 2004.

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

IL-6 シグナル阻害による免疫難病の治療法の開発に関する研究

分担研究者 西本憲弘 大阪大学大学院生命機能研究科免疫制御学講座 教授

研究要旨

膠原病は多臓器病変を特徴とする原因不明の免疫難病であり、ステロイド剤や免疫抑制剤による治療に抵抗性を示すことも多く、新規治療法の確立は急務である。IL-6 は免疫応答や炎症反応を調節する情報伝達分子であり、IL-6 の過剰産生が免疫難病の病態に関与することが示唆されている。難治性血管炎症候群、自己免疫性溶血性貧血ならびに難治性全身性エリテマトーデスの患者に、IL-6 のシグナルを特異的に阻害するヒト化抗 IL-6 レセプター抗体による探索的治療を行ったところ、血管炎症候群、自己免疫性溶血性貧血の改善が認められた。このことから IL-6 シグナル阻害は免疫難病の新規治療法となる可能性があることが明らかとなった。

A.研究目的

膠原病は多臓器病変を特徴とする原因不明の免疫難病である。従来、ステロイド剤や免疫抑制剤による非特異的免疫抑制療法が用いられてきたが、治療効果・副作用ともに満足できるものではなく、新規治療法の確立は急務である。IL-6 は免疫応答や炎症反応を調節する情報伝達分子であり、IL-6 の過剰産生が全身性エリテマトーデス(SLE)や血管炎症候群の自己免疫病態に関与することが示唆されている。これらの疾患モデルである NZB/WF1 マウスに抗 IL-6 レセプター抗体を投与することにより、腎炎の発症が抑制され、生存率が上がることが報告されている。したがって、IL-6 阻害により、これらの免疫難病の治療が可能かもしれない。そこで、IL-6 の細胞内シグナルの負の制御因子である Suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1)分子の遺伝子導入による制御の可能性を検討した。また、IL-6 のシグナルを特異的に阻害するヒト化抗 IL-6 レセプター抗体による難治性自己免疫疾患の治療法の開発を目指し、難治性血管炎症候群、自己免疫性溶血性貧血ならびに難治性 SLE の患者に探索的治療を行った。

B.研究方法

①細胞内シグナル制御の研究

平成 14 年度は、主に SOCS-1 分子の遺伝子導入による制御の可能性を検討した。従来のアデノウイルスベクターは、native tropism により、感染する細胞が限られていたが、アデノウイルスの fiber knob の HI loop 部位にフィブロネクチンの部分モチーフである RGD モチーフを発現させると、感染がコクサッキー・アデノウイルスレセプター(CAR)の発現量に依存しないことが Curiel らにより明らかにされた。そこで RGD を修飾した非増殖型アデノウイルスベクターに cytomegalo virus immediate early promoter、SOCS-1 cDNA、と simian virus 40 polyadenylation signal をこの順に組み込んだ RGDCMV SOCS-1 と従来型ベクターに組み込んだ AdCMVSOCS-1 を用い IL-6 阻害能を検討した。

感染効率の検討は IL-6 依存性増殖を示す種々の培養細胞を用いた。SOCS-1 分子の発現はウエスタンブロットにて確認した。さらに、細胞増殖試験を行い、IL-6 シグナルの抑制効果を検討した。また、IL-6 による STAT1 と STAT3 リン酸化が抑制されていることを確認した。

②治療への応用

平成 14 年度から 16 年度にかけて、従来用いられているステロイド剤ならびに免疫抑制剤を用いた治療に抵抗性の難治性血管炎症候群 3 例(大動脈炎症候群、結節性多発

性動脈炎)、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリテマトーデス(SLE)患者各1例に、ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体による探索的治療を行った。大阪大学附属病院先進医療審査会、産業医科大学附属病院倫理委員会、田附興風会医学研究所北野病院倫理委員会の許可、ならびに厚生労働省監視指導課の許可の下に、ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体、MRA(一般名 tocilizumab)を使用した。MRAはGMPに準拠している。臨床症状ならびに臨床検査値、画像検査による有効性の評価を行うとともに、IL-6、可溶性 IL-6 受容体、TNF \cdot 、IL-1 \cdot などのサイトカインの体内プロフィールやリンパ球サブセットの推移を検討した。

③DNA マイクロアレイによる検討

SLE 症例においては、DNA マイクロアレイを用いて、末梢血細胞中に発現している mRNA 量の推移を MRA の投与前後で検討した。DNA チップは、ヒトの 3 万個の遺伝子からデザインされたオリゴ DNA を搭載したチップ (AceGeneR Human Oligo Chip 30K、日立ソフトエンジニアリング株式会社製、横浜)を用いた。末梢血細胞から抽出した total RNA より、アミノアリル増幅 aRNA を調整し、蛍光色素 Cy3、Cy5 で間接標識後 DNA マイクロアレイにてハイブリダイゼーションを行い、蛍光スキャナーで測定した。aRNA の増幅は末梢血細胞由来 total RNA を Amino Allyl MessageAmp \cdot aRNA kit (#1752:Ambion)を用いた。aRNA を各々蛍光色素 Cy3、Cy5 で間接標識し、さらに標識ラベル Cy3 と Cy5 を入れ替えた組み合わせ (Dye swap) で発現量変化の再現性確認を行った。

(倫理面への配慮)

ヘルシンキ宣言の精神を遵守し、患者のインフォームドコンセントを得た上で、各施設倫理委員会または先進医療審査会の許可のもとに治療を行った。

C.研究結果

①細胞内シグナル制御の研究

RGD 修飾アデノウイルスは、検討した 12 種類のリンパ球系細胞すべてに効率良く感染し、8 種の細胞において従来型ベクターに比べて有意に優っていた。また、ウェスタンブロット法にて SOCS-1 の蛋白の発現が確認された。

SOCS-1 の発現により、IL-6 依存性細胞株である

S6B45、KPMM2 ヒトミエローマ細胞、KT-3 ヒト T リンパ腫、MH60 ならびに B9 マウスハイブリドーマプラズマサイトーマの in vitro での増殖は阻害された。IL-6 刺激による STAT1 と STAT3 リン酸化は SOCS-1 の発現により抑制されていた。以上より、SOCS-1 遺伝子導入による IL-6 シグナル制御の可能性が示唆された。

②治療への応用

難治性血管炎症候群3例(大動脈炎症候群2例、結節性多発性動脈炎1例)、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリテマトーデス(SLE)患者各1例に、ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体による治療を行った。いずれの症例も、従来の治療法であるステロイド剤に加え、種々の免疫抑制剤を使用したにも関わらず抵抗性であり、Cyclophosphamide 大量静注療法、白血球除去療法、血漿交換療法なども行ったがコントロールが不能であった症例である。SLE の症例はキメラ型抗 CD20 抗体 Rituximab に一度は反応したが、中和抗体出現のために再投与時には効果は無くなっていた。そこで、各施設の倫理委員会と厚生労働省監視指導課の許可の下に、ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体を使用した。

大動脈炎症候群の1例では、CTにて上行大動脈、大動脈弓3分岐、下行大動脈に著明な血管壁の肥厚と、左鎖骨下動脈の狭窄が認められ、CRPは12.6 mg/dlと高値を示し、強い持続性胸痛、1ヶ月で5kgの体重減少、意識消失発作を生じていた。しかし、ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体(200mg/週)の投与を行ったところ、2週間後にはCRPが陰性化。1ヵ月後には胸痛の改善に加え、CT上での大動脈壁の肥厚の改善、さらに頸動脈の血流の改善を認めた。また、便ヘモグロビンも陰性化し、合併していた潰瘍性大腸炎の症状も消失した。一方、ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体治療中に血中 TNF \cdot の増加を認めたが、臨床症状ならびに検査値の悪化は認めなかったことから、IL-6 がこの疾患の症状や検査異常の発現に直接関与する可能性が示唆された。同様に他の血管炎患者においても症状の改善が認められ、IL-6 シグナル阻害が血管炎症候群の新規の治療法となる可能性が示唆された。

自己免疫性溶血性貧血の症例では、ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体投与(8mg/kg 体重)により、血中の抗赤血球抗体価の減少が認められ、それまで繰り返していた溶血発作

が消失、ヘモグロビンは15g/dlまで改善した。このことからIL-6シグナル阻害はII型アレルギーの治療に有用であることが示唆された。

難治性SLEの症例ではループス腎炎に加え中枢性ループスを伴っていた。ヒト化抗IL-6レセプター抗体投与開始後、血清アルブミン増加(2.6→3.3g/dl)を認めたが2週後にTTPを併発したためMRAは中止した。しかし、それまで無効であったステロイドが奏効し、中枢性ループスがコントロールできた。この症例では、DNAマイクロアレイを用いて、IL-6阻害による末梢血細胞中のmRNAの発現変動を解析した。その結果、健康人女性に比べSLE患者で増加または減少しており、かつIL-6阻害治療に反応する分子として、機能が未知の分子を含む5つの分子が同定された。

D. 考察

従来の治療ではコントロール不可能であった難治性の血管炎患者に対しIL-6阻害治療が有効であったことから、IL-6阻害治療は血管炎の新しい治療法となりうることが示唆された。このことは同時に、IL-6が血管炎の病態形成に不可欠な分子であることを示す。血管炎は自己免疫疾患に共通に認められる難治性病態の一つであり、血管炎の治療法の確立は多くの自己免疫疾患の制御につながると思われる。一方、大動脈炎症候群の患者において、IL-6阻害治療中に血中TNF \cdot の増加を認めたが、臨床症状ならびに検査値の悪化は認めなかった。このことから、TNF \cdot よりもIL-6が大動脈炎症候群の症状ならびに検査値異常により直接的に関与すると思われる。また、II型アレルギーである自己免疫性溶血性貧血もIL-6阻害治療で改善した。SLEに関してはさらに検討する必要があるが、これらの免疫難病の治療にIL-6阻害の可能性が示された。また、DNAチップを用いた網羅的検索により、新たな標的分子を見出せるかもしれない。

また、IL-6のシグナルを制御する方法として、SOCS-1の遺伝子導入治療の可能性も示唆された。

E. 結論

IL-6シグナル阻害は免疫難病の新しい治療法となる可能性がある。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Nakahara H, Song J, Sugimoto M, Hagihara K, Kishimoto T, Yoshizaki K, Nishimoto N. Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor (VEGF) production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48:1521-1529, 2003.
5. Nishimoto N, Yoshizaki K, Maeda K, K.Kuritani T, Deguchi H, Sato B, Imai N, Kakehi T, Takagi N, Suemura M, Kishimoto T. Toxicity, pharmacokinetics, and dose-finding study of repetitive treatment with the humanized anti-interleukin 6 receptor antibody MRA in rheumatoid arthritis. Phase I/II clinical study. *J Rheumatol* 30:1426-1435, 2003.

2. 学会発表

1. Nishimoto N, et al. : 68th National Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology : Repeated treatment with anti-IL-6 receptor antibody (MRA) lead to extended clinical response rheumatoid arthritis even after cessation of MRA. San Antonio, USA 2004.10.16-22
2. Nishimoto N, et al. : 67th National Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology : Long-term safety and efficacy of anti-interleukin 6 receptor antibody (MRA; Atlizumab) in patients with rheumatoid arthritis. Orland, USA 2003.10.23-28
3. Nishimoto N, et al. : American Society of Hematology 45th ASH Annual Meeting and Exposition : The long-term safety and efficacy of humanized anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody, MRA in multicentric Castleman's disease. San Diego, USA 2003.12.5-9
4. Nishimoto N, et al. : 66th National Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology : A Multi-Center, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Humanized Anti-interleukin-6 (IL-6) Receptor Monoclonal Antibody (MRA) in Rheumatoid Arthritis (RA). New Orleans, USA.2002.10.25-30
5. Nishimoto N, et al. : American Society of Hematology 44th ASH Annual Meeting and Exposition : Improvement of Wasting by Treatment with a Humanized Anti-Interleukin-6 Receptor (IL-6R) Monoclonal Antibody, MRA in Multicentric Castleman's Disease (MCD) -A Phase II Clinical Trial of 28 MCD Patients-. Philadelphia, USA 2002.12.6-10

特記すべきことなし。

3. その他

特記すべきことなし。

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

特記すべきことなし。

2. 実用新案登録

新しい抑制性シグナリングシステム CD47-SHPS-1 系の自己免疫疾患における機能解析

分担研究者 野島美久 群馬大学大学院生体統御内科 教授

研究要旨

新しいシグナリングシステムである CD47-SHPS-1 系がマクロファージの貪食能に関して抑制性に機能し、赤血球代謝においても抑制性の機能を示すことが明らかとなった。

A. 研究目的

細胞内に抑制性レセプターの特徴的なアミノ酸配列である ITIM モチーフを有する SHPS-1 は、主に単球やマクロファージ系細胞に発現が認められ広く血球上に発現する CD47 とレセプターリガンド関係を形成し、免疫応答において抑制性のシグナルを伝達することがこれまでに示唆されている。特に赤血球が脾臓内のマクロファージによって処理される過程においては、CD47 分子を遺伝的に欠損する CD47 ノックアウトマウス由来の赤血球が脾臓内マクロファージの貪食能を抑制しないことから、CD47-SHPS-1 シグナル系がマクロファージの機能に関して抑制性のシグナルを伝達する分子であると報告されている。

これらの事実を踏まえ、免疫応答に関する CD47-SHPS-1 シグナル系の関与を明らかにするために、すでに作成済みである SHPS-1 の細胞内領域を特異的に欠損したノックインマウス(SHPS-1 ノックインマウス)を用いて解析を行った。

B. 研究方法

SHPS-1 ノックインマウスは、C57BL/6 に対して Back-Cross を進め、第 5 世代となったもので 6 週齢の雌を使用した。

1. マウス脾臓組織内における SHPS-1 の検討。SHPS-1 ノックインマウス及びコントロールマウスの脾臓から凍結切片を準備し、抗 SHPS-1 抗体と、抗 F4/80 抗体を使用し組織染色を行った。
2. フローサイトメーターを用いた脾臓内マクロファージにおける SHPS-1 の検討。コントロールマウス及びノックインマウスの脾臓をコラゲナーゼで処理して単核球を準備し、F4/80 抗体と抗 SHPS-1 抗体を使用した二重染色を行いフローサイトメーターで F4/80 陽性細胞における SHPS-1 の発現を確認した。
3. 脾臓細胞重量と細胞数の確認。ノックインマウスより脾臓を摘出し脾臓の重量をコントロールマウスと比較し検討した。

また、脾臓内の総細胞数を顕微鏡にて計測し、Gey's 溶液で赤血球を溶血させた後の脾臓内単核数を計測した。

4. 正常赤血球クリアランスの確認。コントロール及びノックインマウスより赤血球を準備して CFSE でラベルを行う。その後コントロールとノックインマウスに尾静注し、末梢血中に循環する CFSE 陽性赤血球をフローサイトメーター(FCM)にて経時的に確認することでクリアランスを求めた。
5. 脾臓内組織へモジデリン沈着の検討。コントロール及びノックインマウスの脾臓をパラホルムアルデヒドで固定し、ベルリンブルー染色を行い、脾臓内のへモジデリン沈着を検討した。
6. オプソニン化赤血球クリアランスの確認。予め CFSE でラベルし、その後抗体で感作された赤血球をノックインマウスとコントロールマウスに尾静注し、末梢血中に循環する CFSE ラベル赤血球をフローサイトメーターにて経時的に確認することでクリアランスを求めた。
7. 脾臓マクロファージの赤血球貪食能の検討(in vitro)。オプソニン化赤血球は、正常マウス由来の赤血球を、ラビット抗マウス RBC 抗体で反応させることで準備した。抗体による結合の程度はフローサイトメーターにて確認し実験に用いた。脾臓をコラゲナーゼで処理し、プラスチックディッシュに接着する細胞を脾臓マクロファージとして使用した。脾臓マクロファージと赤血球を共培養して貪食された赤血球を経時的に顕微鏡でカウントすることでマクロファージの貪食能を確認した。
8. 末梢血球の検討。6 及び 13 週齢の、コントロール及びノックインマウスより末梢血を採取し、ヘモグロビン、赤血球数、網赤血球等を自動血球分析装置 ADVIA 120 (バイエル・メディカル社製)を用いて検討した。また併せて血清鉄、不飽和鉄結合能(UIBC)を自動生化学測定装置 7180(日立ハイテクノロジーズ社製)を用いて検討した。

C. 研究結果

1. マウス脾臓組織内における SHPS-1 の検討。SHPS-1 は赤脾髄に主に分布し、SHPS-1 陽性細胞は F4/80 も陽性であった。SHPS-1 の発現の程度はノックインマウスで低下していた。また、SHPS-1 のみ陽性の細胞はおもに濾胞の辺縁に分布していた。
2. フローサイトメーターを用いた脾臓内マクロファージにおける SHPS-1 の検討。脾臓から単離された細胞を F4/80 と SHPS-1 で二重染色をすると、F4/80 陽性のマクロファージが SHPS-1 陽性となることがフローサイトメーターにおいても確認された。
3. 脾臓細胞重量と細胞数の確認。コントロールに比べノックインマウスの脾臓は約 1.5 倍に重量が増加していた。また、脾臓内の単核球数の変化はみられなかったが、脾臓内に貯留する赤血球数は約 2 倍となっていることが判明した。
4. 正常赤血球クリアランスの確認。色素標識された正常マウス由来の赤血球を用いて求められる赤血球の半減期はコントロールマウスで約 330 時間であったが、ノックインマウスでは約 180 時間と有意に短縮していた。また、半減期の測定にノックインマウス由来の赤血球を使用して結果はほぼ同様であった。
5. 脾臓内組織ヘモジデリン沈着の検討。ベルリンブルー染色では、コントロールに比べノックインマウスで赤脾髄を中心にヘモジデリン沈着の有意な増加が確認された。
6. オプソニン化赤血球クリアランスの確認。オプソニン化されない正常赤血球は、輸血後 24 時間の時点でも 80%以上が末梢血液中に残存していたが、オプソニン化赤血球をコントロール及びノックインマウスに輸血した場合、赤血球クリアランスは亢進しその程度は、ノックインマウスにおいて亢進が見られた。
7. 脾臓マクロファージの赤血球貪食能の検討(in vitro)。オプソニン化されない赤血球に対しては、コントロール及びノックインマウスの脾臓内マクロファージはほとんど貪食を示さないが、オプソニン化赤血球に対する貪食能はノックインマウス由来のマクロファージでその程度が高かった。
8. 末梢血球の検討。ノックインマウスでは、6 及び 13 週齢とも網赤血球が増加し、ヘモグロビン、赤血球数の低下を認め、貧血を呈する事が確認された。また 13 週になると血清鉄が低下し、UIBC の上昇を認め鉄欠乏性貧血となることが判明した。

D. 考察

1. SHPS-1 ノックインマウスにおいては、末梢血で貧血が確認され脾臓組織にヘモジデリン沈着が見られた。また、正常赤血球の半減期の減少もノックインマウスにおいて認められた。これらのことから、SHPS-1 ノックインマウスにおいては、脾臓内のマクロファージが活性化し、正常赤血球に対しても貪食能が亢進し、赤血球代謝が亢進することが示唆された。
2. 今回の我々の検討で明らかとなったノックインマウス由来のマクロファージが赤血球に対する貪食能が亢進するという事実は、赤血球上の CD47 が SHPS-1 を介してマクロファージ貪食を抑制するというこれまでの知見を支持すると考えられた。特に、SHPS-1 ノックインマウスにおいてオプソニン化赤血球が体内でより容易にクリアランスされることは CD47-SHPS-1 シグナル系が Fc \cdot レセプターを介した貪食能に関して抑制性のシグナル伝達系として機能すると考えられた。

E. 結論

CD47-SHPS-1 シグナル系はマクロファージ貪食能に深く寄与し、赤血球代謝に影響を及ぼすシグナル系であることが判明した。CD47-SHPS-1 シグナル系は赤血球が脾臓内で処理される過程において抑制性のシグナル伝達を行う。このような事実から、代表的自己免疫疾患である溶血性貧血の病態形成においても重要なシグナル系である事が強く示唆される。

G. 学会発表

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

石川智美, 金子和光, 富沢健史, 岡上準, 斉藤泰之, 奥沢千絵, 的崎尚, 野島美久. CD47-SHPS-1 シグナル系の赤血球代謝に関する機能解析, 第 34 回, 日本免疫学会学術総会, 札幌, 2004 年 12 月

全身性エリテマトーデス末梢血 T 細胞における共刺激分子シグナル異常に関する研究

分担研究者 針谷正祥 東京医科歯科大学 医学部 臨床試験管理センター 助教授

研究要旨

T 細胞の活性化には T 細胞受容体からのシグナルに加え、共刺激分子からのシグナルが必須である。我々は全身性エリテマトーデス(SLE)末梢血 T 細胞における共刺激分子シグナル異常を解析した。抗 CD3+抗 ICOS 刺激により健常人末梢血 T 細胞を刺激すると、有意な ^3H -thymidine の取り込み増加が認められた。非活動期 SLE ではいずれの刺激に対する T 細胞増殖反応も健常人に比較して有意に高値を示した。CD28 共刺激および ICOS 共刺激による IFN- γ 産生能は健常人に比較して SLE 患者で有意に亢進していた。Flow cytometry による解析では、CD28 共刺激後の T 細胞中の IFN- γ 産生細胞の割合は健常人に比較して SLE 患者で有意に高く、特に CD8+ T 細胞で顕著であった。末梢血 memory T 細胞の亜分画を解析したところ、CD4+ T 細胞では effector memory T 細胞の割合が、また CD8+ T 細胞では effector memory T 細胞中の TEMRA の割合が有意に高値を示した。これらの T 細胞分画は CD28 共刺激に対して IFN- γ を産生する主要な分画であり、SLE における IFN- γ 産生亢進への関与が考えられた。また、末梢血 T 細胞における転写因子 T-bet および GATA-3 の mRNA を定量し、両者の比を検討したところ、健常人に比較して SLE 患者で有意に高値を示し、IFN- γ 産生細胞への分化亢進との関連が示唆された。これらの結果は、共刺激分子シグナルが SLE 末梢血 T 細胞の IFN- γ 異常発現を通じて SLE の病態形成に寄与し、治療標的となる可能性を示している。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス(SLE)は多彩な自己抗体の産生と多臓器の障害を特徴とする全身性自己免疫疾患である。SLE の病態形成にはリンパ球機能異常が深く関与することが、これまでの多くの研究で明らかにされて来た。我々は本研究班において CD28 family に属する共刺激分子である inducible costimulator (ICOS)および CD28 に注目し、SLE における ICOS および CD28 の発現と機能を検討した。その過程で SLE 末梢血 T 細胞による interferon- γ (IFN- γ)発現亢進を見出し、その分子機序を検討した。3 年間の成果をまとめて報告する。

B. 研究方法

活動期 SLE 患者 21 例、非活動期 SLE 患者 33 例、健常人 26 例を対象とした。末梢血よりリンパ球を分離し、MACS system による negative selection により T 細胞を精製した。T 細胞の刺激は、固相化抗 CD3 抗体+固相化抗 ICOS 抗体または固相化抗 CD3 抗体+液相抗 CD28 抗体により行った。細胞増殖能は ^3H -thymidine の取り込みにより測定した。培養上清中のサイトカインは ELISA 法にて測定した。分離直後または刺激後 6 時間

の末梢血 T 細胞より total RNA を抽出し、cDNA を作成した。定量 PCR 法によりサイトカインおよび転写因子の mRNA を定量した。T 細胞中の IFN- γ 産生細胞の割合は T 細胞を固相化抗 CD3 抗体+液相抗 CD28 抗体で 6 時間刺激後に細胞内 IFN- γ を染色し flow cytometry で解析した。

(倫理面への配慮)

採血時に全ての症例およびボランティアより試験参加の同意を得た。

C. 研究結果

1. 末梢血 T 細胞の ICOS 刺激に対する増殖反応

抗 CD3+抗 ICOS 刺激により健常人末梢血 T 細胞を刺激すると、有意な ^3H -thymidine の取り込み増加が認められた。抗 CD3+抗 ICOS 刺激、抗 CD3+抗 CD28 刺激のいずれも、活動期 SLE、非活動期 SLE、健常人の T 細胞増殖反応を誘導した。非活動期 SLE ではいずれの刺激に対する T 細胞増殖反応も健常人に比較して有意に高値を示した。活動期 SLE では一部の患者が低反応性を示し、他の 2 群との間に有意差を認めなかった(平

成 14 年度)。

2. SLE における interferon- γ 産生亢進

抗 CD3+抗 ICOS 刺激、抗 CD3+抗 CD28 刺激のいずれも、活動期 SLE、非活動期 SLE、健常人の T 細胞 IFN- γ 産生を誘導した。活動期 SLE、非活動期 SLE ともに抗 CD3+抗 ICOS 刺激による IFN- γ 産生は健常人よりも有意に高値を示した。CD28 共刺激による末梢血 T 細胞の IFN- γ 産生能を非活動期 SLE と健常人で比較した。mRNA レベル(p=0.01)、蛋白レベル(p=0.03)のいずれにおいても、非活動期 SLE 末梢血 T 細胞は健常人末梢血 T 細胞に比較して CD28 共刺激による IFN- γ 産生が有意に亢進していた(平成 14 年度、16 年度)。

次に、CD28 共刺激後の IFN- γ 産生細胞の割合を flow cytometry で解析した。非活動期 SLE 末梢血 T 細胞は健常人末梢血 T 細胞に比較して CD28 共刺激による IFN- γ 産生細胞の割合 (CD3+ IFN- γ + / CD3+、CD8+ IFN- γ + / CD8+) が有意に亢進していた(平成 16 年度)。

末梢血 T 細胞に CD28 共刺激を加えると、memory T 細胞から IFN- γ が産生される。また、最近の研究により CD4+ memory T 細胞は CD45RA- CCR7+ の central memory T 細胞(TCM)と CD45RA- CCR7- の effector memory T 細胞(TEM)に、CD8+ memory T 細胞は同様に TCM、TEM および CD45RA+ CCR7- の TEMRA に分画されることが報告されている。そこで、SLE 末梢血 T 細胞におけるこれらの memory T 細胞亜分画の割合を検討した。非活動期 SLE 末梢血 T 細胞は健常人に比較して CD4+ TEM(p=0.011) および CD8+ TEMRA(p=0.015)の割合が有意に高値を示した(平成 16 年度)。

一方、IFN- γ を産生する Th1 型 T 細胞への分化を規定する T-bet および GATA-3 遺伝子の mRNA 発現量を分離直後の末梢血 T 細胞を用いて検討した。T-bet mRNA は非活動期 SLE 末梢血 T 細胞において健常人よりも高い傾向を認め(p=0.07)、T-bet mRNA / GATA-3 mRNA 比は健常人に比較して非活動期 SLE 末梢血 T 細胞において有意に上昇していた(p=0.0005)(平成 15 年度)。

3. SLE 末梢血 T 細胞の抗 dsDNA 抗体産生 B 細胞扶助能への ICOS の関与

SLE 患者末梢血リンパ球より T 細胞、B 細胞をそれぞれ分離し、1:1 の細胞数比で再構成培養を行った。無刺激、抗 CD3+抗 CD28 刺激、抗 CD3+抗 ICOS 刺激の3

種類の条件下で培養し、7日後の上清中の抗 dsDNA 抗体および total IgG を測定した。無刺激、抗 CD3+抗 CD28 刺激に比較して、抗 CD3+抗 ICOS 刺激により抗 dsDNA 抗体産生量の有意な増加を認めた(平成 14 年度)。

D. 考察

IFN- γ は単球・マクロファージの主要な活性化因子である。SLE モデルマウスおよびヒト SLE においても、特に IFN- γ 産生亢進とループス腎炎との関連が報告されている。

本研究の結果から、SLE 末梢血 T 細胞は高い IFN- γ 産生能を有していると考えられる。Flow cytometry 解析結果および転写因子解析結果から、SLE における IFN- γ 産生細胞への分化亢進の可能性が示唆された。

E. 結論

SLE 末梢血 T 細胞では ICOS 刺激、CD28 共刺激に対する IFN- γ 産生能が亢進している。その機序として IFN- γ 産生 T 細胞の割合の増加が考えられ、その増加には転写因子 T-bet とその下流の HLX が重要な働きをしている。また、SLE の T 細胞に発現する ICOS は抗 dsDNA 抗体産生を誘導することにより SLE 病態形成に重要な役割を有している。

これらの研究結果は SLE における共刺激シグナル伝達の重要性を示すと同時に、これらが治療標的となる可能性を示唆している。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Inducible costimulator contributes to abnormal cytokine and autoantibody production in systemic lupus erythematosus. Submitted.
2. 針谷正祥: 膠原病と CD40-CD154 相互作用-病態形成における重要性和新規治療戦略としての可能性- 日本臨床免疫学会会誌 27(6):379-388, 2004
3. 針谷正祥、川本 学 SLE の病態形成における IFN- γ 産生の重要性 臨床免疫 42(6):681-685,

2004

4. 針谷正祥、川本 学:SLE 患者 T 細胞における CD28 分子の発現とシグナル伝達異常 分子リウマチ 1 (3):199-205, 2004
5. 針谷正祥:難治性病態の治療ガイドライン ループス腎炎 診断と治療 92(2):294-299, 2004
6. 針谷正祥:新たな costimulatory molecule-B and T lymphocyte attenuator: BTLA- 炎症と免疫 12(2): 114-116, 2004
7. 針谷正祥:T 細胞副刺激分子 Inducible Costimulator とその異常 炎症と免疫 12(1):103-110, 2004
8. 針谷正祥 難治性病態の治療 CNS ループス Mebio 20(4):55-60, 2003
9. 針谷正祥 TNF レセプターの多様性とシグナル伝達機構 治療学 36(12):1243-1247, 2002
10. 針谷正祥 免疫グロブリン薬(膠原病治療薬とその話題) 日本病院薬剤師会雑誌 39(2):167-170, 2002
11. 針谷正祥、勝又康弘:自己免疫疾患関連血球貪

食症候群 リウマチ科 29(5):434-438, 2003

12. 針谷正祥:血清 KL-6 膠原病の臨床検査の進歩・診断・治療への正しい使い方 日本内科学会雑誌 92(10):1985-1989, 2003

2. 学会発表

1. Kawamoto, M. et al. Overexpression of inducible co-stimulator (ICOS) on peripheral blood T cells and its contribution to abnormal T cell function in patients with systemic lupus erythematosus. 66th annual scientific meeting of American College of Rheumatology. New Orleans, Louisiana, 2002
2. Harigai, M. et al. Overexpression of interferon- γ by peripheral blood T cells from patients with systemic lupus erythematosus in response to T cell receptor ligation. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会 福岡 2003

H. 知的財産権の出願・登録

なし

免疫難病のシグナル伝達異常と病態解明・治療応用に関する研究

分担研究者 南 康博 神戸大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

免疫難病におけるシグナル伝達異常を解明する目的で、核内癌関連分子群に焦点を当てて細胞外ストレスに対する細胞応答におけるこれらの分子群の機能解析を行った。その結果、細胞外ストレス応答(DNA 損傷ストレス)において癌抑制遺伝子産物 Chk2 キナーゼが、癌遺伝子産物である Wip1 ホスファターゼにより脱リン酸化・不活化されることが明らかとなった。また、メトトレキサートなどの核酸代謝阻害剤による癌関連遺伝子産物の機能への影響を検討したところ、各阻害剤によりチェックポイントキナーゼ Chk1, Chk2 の活性化誘導能ならびに細胞周期停止へ与える効果が異なることが明らかとなった。

A. 研究目的

本研究では、免疫難病における免疫細胞のシグナル伝達の異常と病態との関連を核内癌関連分子群に焦点を当てて解析するとともに、メトトレキサートをはじめとする核酸代謝阻害剤による免疫細胞における DNA 損傷応答に関わる核内癌関連分子群(Chk1, Chk2 キナーゼ、Wip1 ホスファターゼ等)の発現・機能への影響ならびに免疫細胞の機能へ与える影響を明らかにし、これらの阻害剤の膠原病治療への適応について検討することを目的とする。

B. 研究方法

細胞外ストレスに対する免疫細胞の細胞応答における癌関連分子群の動態・機能を、リン酸化・脱リン酸化による制御という観点から解析する。各癌関連分子のリン酸化状態はリン酸化部位特異的抗体を用いて解析し、また培養細胞を用いた遺伝子導入法、RNA 干渉法により各分子の発現レベルを操作し、その影響を検討する。また、T細胞株をピリミジン代謝阻害剤であるメトトレキサート(MTX)、レフロミド(LEF)、プリン代謝阻害剤であるミコフェノール酸(MPA)で処理し、Jurkat 細胞にお

ける Chk1, Chk2 キナーゼ等の癌関連分子の経時的活性変動を解析するとともに、これらの阻害剤による細胞周期へ与える影響を解析する。

(倫理面への配慮)

本研究では患者由来の検体・遺伝子を用いる実験は行っておりません。

C. 研究結果

細胞外ストレスにより ATM・ATR キナーゼの活性化を介して核内 Chk2 キナーゼが活性化され、また細胞外ストレスにより p53 依存的に誘導される核内 Wip1 ホスファターゼが Chk2 の活性化に必要な Thr68 を脱リン酸化・不活化することによりチェックポイント機構を解除することを明らかにした。また、各種の核酸代謝阻害剤 MTX、LEF、MPA を各々 Jurkat 細胞へ添加し、その後癌関連分子群 Chk1, Chk2 キナーゼの活性化動態を解析した。Jurkat 細胞に MTX、MPA 添加後、24 時間後をピークに Chk1 キナーゼの活性化が認められたが、その活性は以後速やかに消失した。それに対し、LEF 添加の場合には、24 時間後をピークに Chk1 の活性

化が認められたが、それは 72 時間後まで持続していた。Chk2 キナーゼへの影響については阻害剤間で有意差は認められなかった。また、MTX, MPA 処理後 G1 期での細胞周期停止が観察されたが、LEF 処理では S 期での細胞周期停止が認められた。

D. 考察

本研究により、癌関連分子である Chk1, Chk2 キナーゼ、Wip1 ホスファターゼなどが免疫細胞のストレス応答において重要な役割を担うことが明らかとなり、これらの分子群が免疫難病における細胞増殖・アポトーシス制御において重要な役割を担うことが考えられる。また、Jurkat 細胞を用いた解析結果から、核酸代謝阻害剤 (MTX, MPA, LEF) により DNA 損傷応答シグナル伝達系への作用ならびに細胞機能(細胞周期)への影響が異なることが明らかとなった。今後健常者由来・SLE などの膠原病罹患者由来のリンパ球を用いて、MTX, MPA, LEF 処理の DNA 損傷応答シグナル伝達系、細胞機能への影響を比較検討することが重要と考えられる。また、今回解析を行った Chk1, Chk2 キナーゼに加え、これらキナーゼの下流のエフェクター分子(p53, Cdc25, PML, E2F-1 等)への影響について関心が持たれる。

E. 結論

本研究から、癌関連分子群 Chk2, Chk1 キナーゼ、Wip1 ホスファターゼが免疫細胞の細胞外ストレス応答において重要な役割を担うこと、特に Chk2 キナーゼは Wip1 ホスファターゼによる脱リン酸化により活性制御を受けることが明らかとなった。また核酸代謝阻害剤 (DNA 損傷誘導剤)を用いた解析から、阻害剤により DNA 損傷応答シグナル伝達系・細胞機能に与える影響が異なることが明らかとなった。今後、他の核酸代謝阻害剤(DNA 損傷誘導剤)についても健常者・罹患者由来のリンパ球を用い同様の解析を行うことにより、より適切かつ効果的な阻害剤による膠原病治療への基礎的知見が得られるものと思われる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1.論文発表

Tanaka, Y., Nakayamada, S., Fujimoto, H., Okada, Y., Umehara, H., Kataoka, T., and Minami, Y.: H-Ras/Mitogen-activated protein kinase pathway inhibits integrin-mediated adhesion and induces apoptosis in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* 277: 21446-21452, 2002.

Yoneda, O., Imai, T., Nishimura, M., Miyaji, M., Mimori, T., Okazaki, T., Domae, N., Fujimoto, H., Minami, Y., Kono, T., Bloom, E. T., and Umehara, H.: Membrane bound form of fractalkine induces IFN- γ production by NK cells. *Eur. J. Immunol.* 33: 53-58, 2003.

Wu, D., Tadano, M., Edamatsu, H., Masago-Toda, M., Yamawaki-Kataoka, Y., Terashima, T., Mizoguchi, A., Minami, Y., Satoh, T., and Kataoka, T.: Neuronal lineage-specific induction of phospholipase C α in the developing mouse brain. *Eur. J. Neurosci.* 17: 1571-1580, 2003.

Oishi, I., Suzuki, H., Onishi, N., Takada, R., Kani, S., Ohkawara, B., Koshida, I., Suzuki, K., Yamada, G., Mundlos, S., Shibuya, H., Takada, S., and Minami, Y.: The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signaling pathway. *Genes to Cells* 8: 645-654, 2003.

Matsuda, T., Suzuki, H., Oishi, I., Kani, S., Kuroda, Y., Komori, T., Sasaki, A., Watanabe, K., and Minami, Y.: The receptor tyrosine kinase Ror2 associates with the MAGE-family protein Dlxin-1 and regulates its intracellular distribution. *J. Biol. Chem.*, 278: 29057-29064, 2003.

Suzuki, K., Bachiller, D., Chen, Y. P., Kamikawa, M., Ogi, H., Haraguchi, R., Ogino, Y., Minami, Y.,

(倫理面への配慮)

臨床検体を使用する場合には、所属機関の倫理委員会、或は、IRB で承認を得た研究に限定し、患者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。患者の個人情報が所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、人権擁護に努めると共に、患者は、経済的負担を始め如何なる不利益や危険性も被らない事を明確にする。

C. 結果

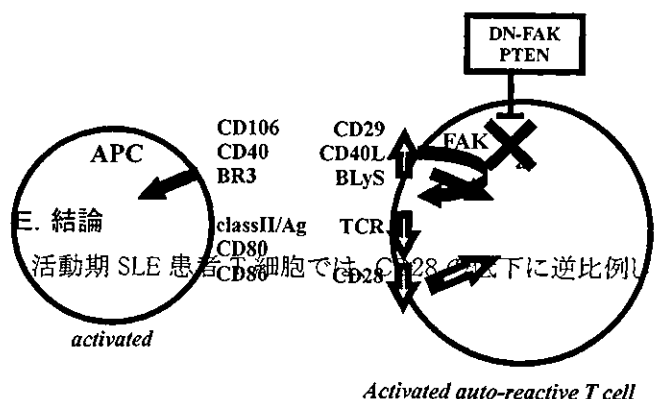
SLE 患者の末梢血 T 細胞では健常人に比し CD28 発現が著明に低下し、CD28 の発現低下は、活動期の症例やループス腎炎等の臓器病変を有する症例で顕著であった。逆に、SLE 患者 T 細胞は、無刺激下で CD40L、CD69、Fas を高発現し、細胞内 IL-2 産生が亢進した。SLE の T 細胞では、CD29、特に、活性型 CD29 の発現量が健常人 T 細胞と比し 2~3 倍増強し、CD28 と逆比例した。さらに、ループス腎炎を有する症例で、これらの発現変化が統計学的に有意であった(p<0.01)。殊に、CD29 の発現量は、患者血清補体値(CH50)と負の相関関係を示した(p<0.05)。

そこで、T 細胞の CD29 の機能的意義を明らかにするために、CD3 または CD29 を特異抗体と二次抗体による架橋刺激、あるいは、CD3 と CD29 の双方を架橋刺激して、以下の実験を行った。その結果、SLE 患者 T 細胞は、無刺激下で健常人に比し、CD40L、CD69、Fas を高発現したが、CD29 単独刺激で CD40L、CD69 の発現、および細胞増殖がさらに増強された。また、正常、及び SLE の T 細胞に於ける CD29 刺激を介する CD40L 発現や細胞増殖の誘導は、FAK の野生型遺伝子を導入することでさらに増強し、優勢抑制型変異体である FAT、FRNK を導入することで完全に阻害された。さらに、癌抑制遺伝子である野生型 PTEN の SLE 患者 T 細胞内への遺伝子導入により、CD40L の発現が完全に阻害された。

D. 考察

活動期 SLE 患者の T 細胞では、CD28 の著明な発現の

減弱に反し、CD29 の著明な発現増強を認めた。SLE 患者 T 細胞では、正常 T 細胞と異なり、CD29 単独刺激で CD40L の発現増強と細胞増殖が誘導され、 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 細胞の過剰な活性化に寄与する事が示された。さらに、斯様な自己反応性 T 細胞の活性化は FAK の優勢抑制型変異体、或は、PTEN の遺伝子導入により、特異的に制御しうる事が示された。実際、VLA-4 の発現量、活性化と SLE の活動性や血管炎との関連性が報告され、また、MRL/lpr マウス系球体腎炎組織で FAK のチロシンリン酸化酸化が亢進すること、さらに、リンパ球特異的に PTEN を欠損させると、SLE 様の自己免疫疾患の発症、腫瘍化が引き起こされる事が報告されており、CD29-FAK の賦活化シグナルと同時に PTEN の欠損が、SLE に於ける自己反応性 T 細胞の過剰な活性化に重要な役割を担う可能性が示唆される。実際、CD29 発現量は SLE 患者血清補体値と負相関し、ループス腎炎合併例で CD29 は有意に発現増強し、CD29 陽性 T 細胞の病態組織への集積との関連性も示唆された。また、SLE モデルマウスに於ける腎炎発症早期の系球体組織に於ける FAK チロシンリン酸化の亢進も本結果を支持するものである。



て、 β_1 インテグリン(CD29)-FAK を介するシグナルが量的、質的に亢進し、CD40L 等の他の共刺激分子の発現を誘導し、CD28 非依存性に自己反応性 T 細胞の過剰な活性化を齎す事が明らかになった。さらに、癌抑制遺伝子 PTEN は、FAK の活性化を負に制御することにより、自己反応性 T 細胞の活性化の抑制を介して免疫シグナル異常の是正を目的とした病態制御に有用と考えられた。

F.健康危険情報

特になし。

G.研究発表

1. 論文発表

1. Toda Y, Tsukada J, Misago M, Kominato Y, Auron PE, Tanaka Y: Autocrine induction of the human prointerleukin 1 β gene promoter by interleukin 1 β in monocytes. *J Immunol* (2002) 168, 1984-1991.
2. Iida T, Mine S, Fujimoto H, Suzuki K, Minami Y, Tanaka Y: Hypoxia-inducible factor-1 α induces cell cycle arrest of endothelial cells. *Genes Cells* (2002) 7, 143-149.
3. Tanaka Y, Nakayamada S, Fujimoto H, Okada Y, Umehara H, Kataoka T, 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.
4. Kamizono J, Okada Y, Shirahata A, Tanaka Y: Bisphosphonate induces remission of refractory osteolysis in Langerhans cell histiocytosis. *J Bone Miner Res* (2002) 17, 1926-1928.
5. Saito K, Nawata M, Nakayamada S, Tokunaga M, Tsukada J, Tanaka Y: Successful treatment with anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) of life-threatening refractory systemic lupus erythematosus with renal and central nervous system involvement. *Lupus* (2003) 12, 798-800
6. Fujii Y, Fujii K, Nakano K, Tanaka Y: Crosslinking of CD44 on human osteoblastic cells upregulates ICAM-1 and VCAM-1. *FEBS Letters* (2003) 539, 45-50
7. Nakayamada S, Saito K, Fujii K, Yasuda M, Tamura M, Tanaka Y: β 1 integrin-mediated signaling induces ICAM-1 and Fas and Fas-mediated apoptosis of rheumatoid synovial cells. *Arthritis Rheum* (2003) 48, 1239-1248
8. Yamamoto A, Fukuda A, Seto H, Miyazaki T, Kadono Y, Sawada Y, Nakamura I, Katagiri H, Asano T, Tanaka Y, Oda H, Nakamura K, Tanaka S. Suppression of arthritic bone destruction by adenovirus-mediated dominant-negative Ras gene transfer to synoviocytes and osteoclasts. *Arthritis Rheum* (2003) 48: 2682-2692
9. Nakayamada S, Okada Y, Saito K, Tamura M, Tanaka Y. β 1 integrin/focal adhesion kinase-mediated signaling induces intercellular adhesion molecule 1 and receptor activator of nuclear factor κ B ligand on osteoblast and osteoclast maturation. *J Biol Chem* (2003) 278: 45368-45374
10. Nakayamada S, Saito K, Nakatsuka K, Nakano K, Tokunaga M, Sawamukai N, Tsujimura S, Nawata M, Tanaka Y. Efficacy of mizoribine treatment in patients with Sjogren's syndrome: an open pilot trial. *Mod Rheumatol* (2003) 13, 339-345
11. Nakatsuka K, Saito K, Kohshi K, Konda I, Tanaka Y. Severe skin ulceration associated with Wegener's granulomatosis: Successful treatment with hyperbaric oxygen and prostaglandin E $_1$. *Mod Rheumatol* (2003) 13, 346-349
12. Nakayamada S, Okada S, Saito K, Tanaka Y. Etidronate prevents high-dose glucocorticoid-induced bone loss in premenopausal individuals with systemic autoimmune diseases. *J Rheumatol* (2004) 31, 163-6
13. 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
14. 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
 15. 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
 16. 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
 17. 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)
 18. 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)
 19. 田中良哉, 辻村静代, 河野公俊. 膠原病に於けるステロイド薬抵抗性の分子機構とその対策. *内科* (2002) 89, 216-220.
 20. 田中良哉, 辻村静代, 齋藤和義, 河野公俊. 膠原病・リウマチ性疾患に於けるシクロスポリン療法の理論と実際. *日本臨床免疫学会雑誌*(2002) 25, 110-114.
 21. 田中良哉. SLE一病態に応じた急性期治療と維持治療の実際. *Medical Practice* (2003) 20, 568-576
 22. 田中良哉. リウマトイド血管炎. *診断と治療* (2003) 91, 839-844
 23. 田中良哉. サイトカイン・サイトカインレセプター. *日本内科学会雑誌* (2003) 92, 1969-1976
 24. 田中良哉. 全身性エリテマトーデス. *今月の治療* (2003) 11, 1238-1245
 25. 田中良哉. 生物製剤の使い方. *Mebio* (2003) 20, 46-52
 26. 田中良哉. リウマチ・膠原病. *内科* (2003) 92, 1143-1148
 27. 田中良哉, 齋藤和義, 名和田雅夫, 徳永美貴子, 塚田順一. 抗 CD20 抗体. *臨床免疫* (2003) 40, 536-543
 28. 田中良哉. 抗 CD20 抗体. *Current Therapy* (2004) 22, 53-58
 29. 名和田雅夫, 齋藤和義, 藤井幸一, 徳永美貴子, 塚田順一, 田中良哉. 抗 CD20 抗体療法. *内科* (2004) 93, 319-325
 30. 田中良哉. 免疫学的生物製剤をいかに膠原病に適應するか. *Molecular Medicine* (2004) 41, 204-209
 31. 辻村静代, 田中良哉. 多剤耐性遺伝子を標的とする新規治療. *リウマチ科* (2004) 31, 55-61
 32. 田中良哉. CD20 を標的とした SLE 等の自己免疫疾患の分子治療. *医学のあゆみ* (2004) 208, 349-354
 33. 田中良哉. 抗 CD20 抗体による自己免疫疾患の治療. *日本臨床免疫学会雑誌*(2004)27, 28-33
 34. 田中良哉. 抗 CD20 抗体による SLE の治療. *リウマチ科*(2004)31, 559-565
 35. 田中良哉. 生物学的製剤(リツキシマブを中心に). *医学のあゆみ*(2004)210, 1034-1039
 36. 田中良哉. 抗 CD20 抗体. *分子リウマチ*(2004)1, 32-38
- ## 2. 学会発表
1. 田中良哉, 徳永美貴子, 辻村静代, 高澤(小野)亜希子, 齋藤和義. SLE の B 細胞異常とその制御. 第 46 回日本リウマチ学会総会(シンポジウム)神戸, 平