

200400724A

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

免疫疾患に対する免疫抑制療法等先端的新規治療法に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山本一彦

平成17年3月

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

免疫疾患に対する免疫抑制療法等先端的新規治療法に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山 本 一 彦

平成17年3月

目 次

I. 総括研究報告書	3
免疫疾患に対する免疫抑制療法等先端的新規治療法に関する研究 東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 主任研究者 山本 一彦	
II. 分担研究報告	
関節病変のシングルセル由来 T 細胞受容体の再構築による関節炎の抑制	11
東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 山本 一彦	
抗リン脂質抗体症候群発症機構の解析に関する研究	13
北海道大学大学院医学研究科病態制御学講座 小池 隆夫	
変異ペプチドを用いた免疫難病の治療アプローチに関する研究	17
筑波大学大学院人間総合科学研究科臨床免疫学 住田 孝之	
ヒト V α 24NKT 細胞の免疫制御性糖脂質に対する反応性に関する研究	20
国立精神・神経センター神経研究所 山村 隆	
抗原特異的 CD8T 細胞の細胞増殖とその制御に関する研究	24
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科膠原病・リウマチ内科学 上阪 等	
制御性 T 細胞に関する研究	27
京都大学再生医科学研究所 坂口 志文	
SLE に対する抗 CD20 抗体療法に関する研究	32
産業医科大学医学部第一内科学講座 田中 良哉	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	37
IV. 研究成果の刊行物・別刷	49

I. 総括研究報告

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）
総括研究報告書

免疫疾患に対する免疫抑制療法等先端的新規治療法に関する研究

主任研究者 山本 一彦 東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 教授

研究要旨 免疫難病に対する治療法は現在のところ満足するものがない。この現状を打開する目的で、我が国から発したオリジナルな概念である、CD25 陽性 CD4 陽性制御性 T 細胞、NKT 細胞の制御法、T 細胞レセプター遺伝子導入をはじめとして、欧米でホットに研究開発が展開されている末梢血幹細胞移植、CD20 に対する抗体療法、抗原変異ペプチド、細胞増殖に関する細胞内シグナルなどについて、それぞれの第一人者を集め、世界的に高いレベル研究を推進した。

分担研究者

小池隆夫 北海道大学大学院医学研究科
病態内科学講座 教授
住田孝之 筑波大学大学院人間総合科学研究科
臨床免疫学 教授
山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所
免疫研究部 部長
上阪 等 東京医科歯科大学大学院医歯学総合
研究科生体応答調節学 助教授
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
田中良哉 産業医科大学医学部
第一内科学講座 教授

治療法について、ヒト及びモデル動物での治療法を確立する事を目的とした。

B. 方法

山本は、全身性エリテマトーデスや関節炎などの動物モデルについて、病変臓器に浸潤している T 細胞クローンの動きを、独自に開発したクローン解析法で解析し、種々のパラメーターから病変特異的であると判定出来るクローンについて、その一つの細胞に発現している T 細胞レセプターの 2 つの鎖の全長 cDNA をクローニングする技術の改良を続けた。さらに複数の遺伝子を効率よくリンパ球に導入出来るベクターの開発を進め、自己のリンパ球に 2 つの T 細胞レセプター遺伝子に加えて 3 つ目の機能遺伝子を導入することで、人工改変による抗原特異的機能的 T 細胞を作成する技術の完成を目指した。これにより種々の免疫疾患に対する免疫細胞療法の技術が可能であることを示すことを目指した。

坂口はマウスの系で、自身が発見した CD25 陽性 CD4 陽性の制御性 T 細胞自体を制御する分子の検索と同定を行った。特に本年度は IL-2 および IL-2 レセプターの役割を調べるとともに、ヒトにおいて制御性 T 細胞を作成する為に、Foxp3 遺伝子に注目して、レトロウイルスベクターにて CD4 陽性細胞に遺伝子導入してその機能を調べた。山村は、すでに Nature 誌に発表している免疫制御物質 OCH のヒト NKT 細胞に対する影響を

A. 研究目的

全身性自己免疫疾患を中心とした免疫難病についての現在の治療法は、副腎ステロイドや免疫抑制薬が中心であり、一定の効果はあるものの、免疫系全体に対する抑制作用などの副作用が患者にとって不利に働くことが少なくない。したがって、より選択的、特異的で副作用の少ない治療法を開発することは緊急の課題となっている。しかし、我が国ではベンチャー企業の立ち後れ、基礎免疫と臨床免疫の相互交流の少なさなどから、この方面の研究が進んでいないのが現状である。そこで、本研究は、我が国で確立されつつあるオリジナルな概念を中心に、近未来的に実際の患者に応用可能な先端的新規

詳細に検討した。これにより NKT 細胞が産生するサイトカインのバランスを調節することで、免疫疾患を制御する方法の確立を目指した。

住田はヒトや動物モデルで既に同定してきた病因 T 細胞が認識するエピトープについて、その配列を一部改変することで病因 T 細胞の機能を修飾する方法を検討した。具体的にはコラーゲンタイプ II のエピトープの検索とそれを改変したアナログペプチドを作成し、T 細胞株の反応を検討した。また α -アミラーゼ Glucose-6-phosphate isomerase (GPI) などの T 細胞エピトープをリコンビナント蛋白や合成ペプチドで決定した。

上阪は病態形成に関わる CD8 陽性 T 細胞に注目し、その細胞増殖の速さの原因を追及した。本年度は特に JAK や STAT などの細胞内シグナル分子に注目し CD4 陽性 T 細胞との差異を検討した。

田中は、B 細胞に注目し、既に欧米では癌や一部の自己免疫疾患の治療に用いられている抗 CD20 抗体の全身性自己免疫疾患治療への適応を検討した。小池は、抗リン脂質抗体症候群の発症機構について詳細に検討するため、抗リン脂質抗体で刺激された単核球内のシグナル伝達を検討し、さらにそのシグナルの阻害による治療法の開発を試みた。

(倫理面への配慮)

動物モデルでの研究は指針に従った。ヒトの培養細胞を用いた研究はインフォームドコンセントを取得した後に行った。患者への治療に関しては各施設の倫理委員会の承認を得た。以上のことで倫理上問題ないとする。

C. 結果

山本は昨年度の全身性エリテマトーデスモデルの NZB/W F1 マウスにおける、ヌクレオソームに対する T 細胞レセプター遺伝子と抑制性の CTLA4Ig 分子をコードする遺伝子の導入による抑制実験の研究を続けた。さらにコラーゲン誘導関節炎の病変局所に集積している T 細胞の T 細胞レセプターを解析したところ、 $V\beta$ 8.1/8.2 陽性の T 細胞レセプターには DXGG という共通モチーフが存在することを見いだした。そこで

$V\beta$ 8.1/8.2 陽性の CD4 陽性 T 細胞をシングルセルソーティングを行うことで、1 つの細胞から 2 つの T 細胞レセプター遺伝子をクローニングすることに成功した。さらにこれを用いて関節炎を制御する T 細胞を作成した。以上の成果により、このような制御性 T 細胞による治療法が可能であることが判明した。坂口は自らが発見し世界的に注目されている CD25 陽性 CD4 陽性制御性 T 細胞の生存・増殖に、IL-2 が重要であることを見いだした。さらに Foxp3 遺伝子が発生、分化を司るマスター遺伝子であることを見だし、Foxp3 遺伝子導入により、ヒトにおいても制御性 T 細胞を作成出来ることを示した。山村は自己免疫疾患の制御で注目されている NKT 細胞を刺激する変異ペプチド OCH について、ヒトの NKT 細胞に対する影響を調べたところ、CD4 陽性 NKT 細胞において、マウスと同様に Th1/Th2 バランスを Th2 に偏向させる能力があることを示した。

住田はコラーゲンタイプ II の T 細胞エピトープを決定し、アナログペプチドを作成し T 細胞株の反応を検討した。また GPI、 α -アミラーゼ、ムスカリン作動性アセチルコリン受容体のエピトープの決定を進めた。上阪は増殖の速い CD8 陽性 T 細胞と CD4 陽性 T 細胞を比較し、JAK1、JAK3 およびその下流の STAT5、ERK および Akt のリン酸化がより強く認められることを示した。小池は抗リン脂質抗体を単核球に作用させたところ、凝固のイニシエーターである組織因子 (TF) の発現に MAPK 経路が関わっていることを見いだした。さらにこの中でも p38 が重要であることが判明し、特異的 p38 阻害薬 (SB203580) が TF の発現を抑制することを示した。

田中は CD20 抗体を用いた重症 SLE 患者 5 例のパイロットスタディを行い、重篤な副作用を認めず 5 例全例で 1 年以上の長期寛解状態を得ていることを示した。

D. 考察

欧米では、免疫担当の細胞や分子に対するモノクローナル抗体療法、小分子の阻害薬、遺伝子療法、細胞療法など、多くの分野の技術・資

源を動員して、免疫疾患に対する種々の治療法の開発が進められている。しかし、実際には少数の抗体療法を除いて未だに世界的に認められたものは多くないことから、さらに研究を進める必要性が提言されている。

一方、我が国では基礎免疫学は世界的なレベルにあるが、基礎免疫学と臨床免疫学を結び合わせる応用免疫学の領域の発展が種々の理由で十分ではない。従来個々の研究室レベルからは、それぞれ新しい治療法の可能性についての検討の報告は散見されているが、研究者の組織または領域として新規治療法開発を推進するような土壌がほとんどなかったのが現状である。そこで、本研究は我が国で独自の新規治療法の開発に積極的な一流の基礎免疫学者と一定のレベル以上の基礎的な研究を行いつつ疾患研究を進めている臨床免疫学者を比較的少数集め、近未来的に応用可能であることに焦点を絞り、お互いに情報・技術を交換しながら、それぞれが独自の治療法を目指した。3年間の成果としては、かなりの達成度であると考えられる。

E. 結論

これまで我が国から発したオリジナルな概念である、CD25 陽性 CD4 陽性制御性 T 細胞、NKT 細胞の制御法、抗リン脂質抗体症候群、T 細胞レセプター遺伝子導入をはじめとして、抗体療法、変異ペプチド、シグナル伝達分子などについて、それぞれの第一人者を集め、世界的に高いレベル研究を推進できた。また臨床への応用に関してはすでにヒトでの治療を始めているものから、マウスでの治療法の開発の段階までの種々の段階のものがある。今後は近未来的に応用可能なことを目指して、各段階での実際的な問題点を明らかにして、各プロジェクトがスムーズに開発に向けられるようにする必要があると思われる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

山本一彦

1. Fujio K, Okamoto A, Tahara H, Abe M, Jiang Y, Kitamura T, Hirose S, Yamamoto K. Nucleosome-specific regulatory T cells engineered by triple gene transfer suppress a systemic autoimmune disease. *J Immunol*. 173:2118-2125, 2004.

2. Yamada R, Tokuhiko S, Chang X, Yamamoto K. SLC22A4 and RUNX1: identification of RA susceptible genes. *J Mol Med*. 82:558-564, 2004.

3. Setoguchi K, Misaki Y, Kawahata K, Shimada K, Juji T, Tanaka S, Oda H, Shukunami C, Nishizaki Y, Hiraki Y, Yamamoto K. Suppression of T cell responses by chondromodulin I, a cartilage-derived angiogenesis inhibitory factor. *Arthritis Rheum*. 50:828-839, 2004.

小池隆夫

4. Yasuda S, Atsumi T, Matsuura E, Kaihara K, Yamamoto D, Ichikawa K, Koike T. Significance of valine/leucine²⁴⁷ polymorphism of β 2-glycoprotein I in antiphospholipid syndrome: increased reactivity of anti- β 2-glycoprotein I autoantibodies to the valine²⁴⁷ β 2-glycoprotein I variant. *Arthritis Rheum* 52:1.212-218.2005

5. Yasuda,S., Atsumi,T., Ieko,M., Matsuura,E., Kobayashi,K., Inagaki,J., Kato,H., Tanaka,H., Yamakado,M., Akino,M., Saitou,H., Amasaki,Y., Jodo,S, Amengual,O., Koike,T.: Nicked β 2-glycoprotein I: a marker of cerebral infarct and a novel role in the negative feedback pathway of extrinsic fibrinolysis. *Blood*. 103:10. 3766-3772.2004

6.Xiao,S.,Deshmukh,S.U.,Jodo,S.,Koike.T., Sharma,R.,Furusaki,A.,Sung,J.S.,Ju,Shyr-Tu.: Novel negative regulator of expression in Fas Ligand(CD178)Cytoplasmic tail:Evidence for Translational Regulation and against Fas Ligand Retention in secretory lysosomes. *J Immunol* 173: 5095- 5102.2004

住田孝之

7. Takahashi, R., Tsutsumi, A., Ohtani, K., Muraki,

- Y., Goto, D., Matsumoto, I., Wakamiya, N., and Sumida, T. Association of mannose-binding lectin (MBL) gene polymorphism and serum MBL concentration with characteristics and progression of systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheu. Dis.* 64:311-314, 2005.
8. Takahashi, R., Tsutsumi, A., Ohtani, K., Goto, D., Matsumoto, I., Ito, S., Wakamiya, N., and Sumida, T. Anti-mannose binding lectin antibodies in sera of Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 136: 585-590, 2004
9. Muraki, Y., Matsumoto, I., Chino, Y., Hayashi, T., Suzuki, E., Goto, D., Ito, S., Murata, H., Tsutsumi, A., and Sumida, T. GPI variants play a key role in the generation of anti-GPI Abs: possible mechanism of autoantibody production. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 60:1316-1324, 2004.
- 山村 隆
10. Oki, S., A. Chiba, T. Yamamura and S. Miyake: The clinical implication and molecular mechanism of preferential IL-4 production by modified glycolipid-stimulated NKT cells. *J. Clin. Invest.* 113: 1631-1640, 2004
11. Nakai, Y., K. Iwabuchi, S. Fujii, N. Ishimori, N. Dashtsoodol, K. Watano, T. Mishima, C. Iwabuchi, S. Tanaka, J.S. Bezbradica, T. Nakayama, M. Taniguchi, S. Miyake, T. Yamamura, A. Kitabatake, S. Joyce, L. Van Kaer, and K. Onoe: Natural killer T cells accelerate atherogenesis in mice. *Blood* 104: 2051-2059, 2004
12. Hashimoto, D., S. Asakura, S. Miyake, T. Yamamura, L. Van Kaer, C. Liu, M. Tanimoto, and T. Teshima: Stimulation of host natural killer T cells by synthetic glycolipid regulates acute graft-versus-host disease by inducing Th2 polarization of donor T cells. *J. Immunol.* 174: 551-556, 2005
13. Yu, K.O.A., J.S. Im, A. Molano, Y. Dutronc, P.A. Illarionov, C. Forestier, N. Fujiwara, I. Arias, S. Miyake, T. Yamamura, Y-T. Chang, G.S. Besra, and S.A. Porcelli: Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acyl variants of α -galactosylceramides. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 3383-3388, 2005
- 上阪 等
14. Nishio J, Suzuki M, Nanki T, Miyasaka N and Kohsaka H. Development of TCRB CDR3 length repertoire of human lymphocytes. *Int Immunol* 16(3), 423-431, 2004.
15. Liu T, Kohsaka H., Suzuki M, Takagi R, hashimoto K, Uemura Y, Ohyama H, and Matsushita S. Positional effect of amino acid replacement on peptide antigens for the increased IFN-g production from CD4 T cells. *Allergol Int* (in press)
- 坂口志文
16. Sakaguchi, S.: Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature Immunol.* In press.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.

21. 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.

田中良哉

22. 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)

23. 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)

24. 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

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・坂口志文）
- ・ 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・坂口志文）

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

II. 分担研究報告

関節病変のシングルセル由来 T 細胞受容体の再構築による関節炎の抑制

主任研究者 山本 一彦 東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 教授

研究協力者 藤尾圭志、岡本明子、荒木靖人、Yu Long、山口優美 東京大学医学部アレルギーリウマチ内科

研究要旨 関節病変に集積している T 細胞受容体 (TCR) に関するクロナリティ解析により、病態形成に関与していると考えられる CD4 陽性クローンを同定することが可能であることが判明している。この TCR の α 、 β 鎖の cDNA ペアを単一細胞から回収し、自らのリンパ球に遺伝子導入することで抗原特異的 T 細胞の再構築が可能であり、さらに機能分子として用いた炎症抑制作用を有する TNFRIg の cDNA を追加導入することで、抗原特異的免疫応答制御が可能であることを明らかにした。

A. 研究目的

これまでの免疫抑制薬、生物学的製剤による自己免疫疾患治療では全身性の免疫抑制を生じ、日和見感染症など重篤な合併症が問題となっており、より特異的、選択的な治療法の開発が望まれる。我々はこれまでにヌクレオソーム特異的 T 細胞受容体 (TCR) 及び抑制性分子 CTLA4Ig を共発現した細胞により、SLE モデルマウスの治療が可能であることを報告した。今回はマウス関節炎モデルの炎症部位に集積している TCR と抑制性分子を共発現した T 細胞を作製し、この細胞の炎症部位への集積による関節炎の治療の可能性を検討した。

B. 方法

DBA1 マウスのコラーゲン誘発性関節炎 (CIA) の炎症肢における CD4 陽性 V β 8.1/8.2 陽性 T 細胞のメジャークローンのモチーフを同定した。さらに CD4 陽性 V β 8.1/8.2 陽性 T 細胞のシングルセルソーティングを行い、シングルセル由来の cDNA を合成した。TCR β 鎖に関しては V β 8.1/8.2 の nested PCR, TCR α 鎖に関しては V α 1-22 の semi-nested スクリーニング PCR により同定した。並行して関節の T 細胞集団について TCR-RT-PCR/SSCP 解析を行い、関節に集積し共通したモチーフのある TCR β 鎖をもつシングルセルクローンを同定した。レトロウイルスベクターを用いて、同定した TCR α/β 鎖を DBA1 マウス CD4 陽性 T 細胞上に再構築した。さらに抑制性分子 TNFRIg を共導入し

た細胞を作成し関節炎の抑制効果があるかどうか検討した。導入した TNFRIg 蛋白の血清濃度は ELISA で、各臓器における TNFRIg 転写産物の発現量は real time PCR で検討した。

(倫理面への配慮)

マウスでの研究であり、実験指針にのっとり行った。

C. 結果

複数の個体の炎症肢に集積している V β 8.1/8.2 TCR の CDR3 において DXGG という共通のモチーフが認められた。シングルセルソーティングにより炎症肢に集積しているクローン B47 の TCR β 鎖の CDR3 領域にも DXGG モチーフが認められ、関節炎に共通した抗原を認識している可能性が考えられた。B47 の TCR β 鎖は V β 8.1/8.2 サブファミリーのうち 9.1% を占めていた。B47 を再構築した CD4 陽性 T 細胞は脾臓及びリンパ節の樹状細胞 (DCs) に対し増殖反応を示した。B47 導入 CD4 陽性 T 細胞は関節炎発症マウスに移入すると炎症肢に集積した。B47 に加え TNFRIg を共導入した細胞を移入したマウス (B47+TNFRIg 群) の関節炎スコアは抑制された。B47+TNFRIg 群では重症関節炎の発症率も抑制された。TNFRIg のみを導入した細胞を移入したマウス (TNFRIg 群) の関節炎スコアは軽度抑制されたのみであった。血清中の TNFRIg 蛋白濃度を検討すると B47+TNFRIg 群と TNFRIg 群で差は認められなかった。脾臓・リンパ節における TNFRIg 発現量は B47+TNFRIg

群と TNFRIg 群で差は認められなかったが、炎症肢における TNFRIg 発現量は TNFRIg 群と比較して B47+TNFRIg 群で有意に高かった。

D. 考察

関節に集積している T 細胞の TCR を末梢の CD4 陽性 T 細胞に再構築することにより、自己反応性が認められ、生体内での関節への集積性が認められた。血中 TNFRIg 濃度が上昇した TNFRIg 群では軽度の関節炎抑制が認められたのみで、B47+TNFRIg 群における関節炎の抑制には局所に集積した TNFRIg の関与が重要と考えられた。

E. 結論

我々の TCR-PT-PCR/SSCP 法とシングルセル PCR を併用することにより炎症局所に集積している T 細胞の TCR α/β 鎖を同定することが可能である。この炎症局所より同定した TCR を用いて炎症抑制分子の局所集積を誘導できることが示唆された。自己抗原特異的 TCR と抑制性分子を共発現する細胞は自己免疫疾患治療における有望な選択肢の一つであると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Chang X, Yamada R, Suzuki A, Sawada T, Yoshino S, Tokuhira S, Yamamoto K. Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2004. in press.
2. Zhou G, Fujio K, Sadakata A, Okamoto A, Yu R, Yamamoto K. Identification of systemically expanded activated T cell clones in MRL/lpr and NZB/W F1 lupus model mice. *Clin Exp Immunol*. 136:448-455, 2004.
3. Chamoto K, Tsuji T, Funamoto H, Kosaka A, Matsuzaki J, Sato T, Abe H, Fujio K, Yamamoto K, Kitamura T, Takeshima T, Togashi Y, Nishimura T. Potentiation of tumor eradication by adoptive immunotherapy with t-cell receptor gene-transduced T-helper type 1 cells. *Cancer Res*. 64:386-390, 2004.
4. Sato K, Sato U, Tateishi S, Kubo K, Horikawa R,

Mimura T, Yamamoto K, Kanda H. Aire downregulates multiple molecules that have contradicting immune-enhancing and immune-suppressive functions. *Biochem Biophys Res Commun*. 318:935-940, 2004.

4. Iikura M, Ebisawa M, Yamaguchi M, Tachimoto H, Ohta K, Yamamoto K, Hirai K. Transendothelial migration of human basophils. *J Immunol*. 173: 5189-5195, 2004.

5. Fujio K, Okamoto A, Tahara H, Abe M, Jiang Y, Kitamura T, Hirose S, Yamamoto K. Nucleosome-specific regulatory T cells engineered by triple gene transfer suppress a systemic autoimmune disease. *J Immunol*. 173:2118-2125, 2004.

6. Yamada R, Tokuhira S, Chang X, Yamamoto K. SLC22A4 and RUNX1: identification of RA susceptible genes. *J Mol Med*. 82:558-564, 2004.

7. Zhang D, Fujio K, Jiang Y, Zhao J, Tada N, Sudo K, Tsurui H, Nakamura K, Yamamoto K, Nishimura H, Shirai T, Hirose S. Dissection of the role of MHC class II A and E genes in autoimmune susceptibility in murine lupus models with intragenic recombination. *PNAS*. 101:13838-13843, 2004.

8. Setoguchi K, Misaki Y, Kawahata K, Shimada K, Juji T, Tanaka S, Oda H, Shukunami C, Nishizaki Y, Hiraki Y, Yamamoto K. Suppression of T cell responses by chondromodulin I, a cartilage-derived angiogenesis inhibitory factor. *Arthritis Rheum*. 50:828-839, 2004.

9. Kobari Y, Misaki Y, Setoguchi K, Zhao W, Komagata Y, Kawahata K, Iwakura Y, 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

抗リン脂質抗体症候群発症機構の解析に関する研究

分担研究者 小池 隆夫 北海道大学大学院医学研究科病態制御学講座・第二内科・教授
研究協力者 坊垣 幸 北海道大学大学院医学研究科病態制御学講座・第二内科・大学院生

研究要旨 抗リン脂質抗体症候群（Antiphospholipid syndrome：以下 APS）は β_2 グリコプロテイン I（以下 β_2 GPI）依存性抗カルジオリピン抗体（以下抗 CL/ β_2 GPI 抗体）をはじめとする抗リン脂質抗体と総称される一群の自己抗体が引き起こす自己免疫性血栓性疾患である。血管内皮細胞や単球系細胞に直接作用し、凝固のイニシエーターである組織因子（tissue factor：以下 TF）を細胞表面に発現することにより凝固系を活性化することにより、易血栓性が誘導されることが知られている。抗リン脂質抗体の主要な対応抗原として、 β_2 GPI やプロトロンビン等の、リン脂質に結合した凝固・線溶を制御するタンパクがあげられるが、抗体が結合した後の細胞刺激シグナルについては明らかにされていない点が多い。今回我々は、抗リン脂質抗体による細胞刺激シグナルについて検討を行った。抗 CL/ β_2 GPI 抗体の刺激によりヒト末梢血単核球で発現が増強する遺伝子発現の挙動について、cDNA アレイおよびリアルタイム PCR を用いて検討を行った。その結果、MAPK 経路が抗 CL/ β_2 GPI 抗体刺激による TF 発現に関わっていることが示唆された。さらに、単球系細胞株 RAW 264.7 を用い抗 CL/ β_2 GPI 抗体刺激による MAPK 経路のリン酸化についてウエスタンブロッティング法で検討したところ、p38 MAPK のリン酸化および NF κ B 活性化が認められた。また特異的 p38 阻害薬（SB203580）により p38 MAPK リン酸化が阻害され、TF 発現も抑制された。また、抗 CL/ β_2 GPI 抗体による p38 MAPK リン酸化は、 β_2 GPI の非存在下では認められなかった。以上の結果より、p38 MAPK 経路は、抗リン脂質抗体刺激による単球からの TF 発現に重要な役割を果たしていると考えられ、また、p38 MAPK 経路の制御は、APS 患者の血栓向性に対する新たな治療法と成り得る可能性が示唆された。

A. 研究目的

抗リン脂質抗体症候群（Antiphospholipid syndrome：以下 APS）とは、多彩な動・静脈血栓症、習慣流産および血小板減少を主要徴候として、抗カルジオリピン抗体、ループスアンチコアグラントなどの抗リン脂質抗体（リン脂質やリン脂質結合タンパク）に対する自己抗体の出現を特徴とする、難治性の自己免疫疾患である。抗リン脂質抗体症候群の本態は血栓症であり、現在ではリスクファクターの存在しない患者に認められる動・静脈血栓症のなかでも最も頻度が高いものとして位置づけられている。また最近では抗カルジオリピン抗体の存在と動脈硬化の関連も指摘されている。これまでの *in vitro* および *in vivo* の研究により、抗リン脂質抗体症候群では、 β_2 GPI 依存性抗カルジオリピン抗体をはじめとする一群の自己抗体が血管内皮細胞や単球系細胞などを刺激し、凝固反応のイニシエーターとなる組織因

子（TF）を細胞表面に発現し凝固系を活性化することにより、易血栓性が誘導されるということを明らかにされてきた。さらに、抗 β_2 GPI モノクローナル抗体や抗プロトロンビンモノクローナル抗体、または抗リン脂質抗体症候群患者から分離した抗リン脂質抗体を含むサンプルを用いて、血管内皮細胞・単球・マクロファージ細胞株に反応させ、MyD-88、NF κ B の活性化を介して、組織因子の発現が起きることを明らかになっているが、抗体が対応抗原である β_2 GPI やプロトロンビン等のリン脂質に結合した凝固・線溶を制御するタンパクに結合した後の細胞刺激シグナルについては明らかにされていない点が多い。抗リン脂質抗体による細胞刺激シグナル、細胞活性化メカニズムについて検討を行うことにより抗リン脂質抗体症候群発症機構を解明し、さらにシグナル伝達制御による病態制御を可能とすることを目的とした。

B. 研究方法

末梢血単核球および単球系細胞株を用いて、抗リン脂質抗体症候群患者の末梢血リンパ球より樹立したヒトモノクローナル IgM 型抗 CL/ β_2 GPI 抗体 (EY2C9) により刺激し、検討を行った。遺伝子発現の挙動については、ヒト末梢血単核球を用いて、cDNA アレイおよびリアルタイム PCR 法により検討を行った。その結果より、単球系細胞株 RAW264.7 を用いて抗 CL/ β_2 GPI 抗体刺激による MAPK 経路のリン酸化についてウエスタンブロッティング法で検討した。

C. 研究結果

cDNA アレイおよびリアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析より、MAPK 経路が抗 CL/ β_2 GPI 抗体刺激による TF 発現に関わっていることが示唆された。さらに、ウエスタンブロッティング法での解析にて、抗 CL/ β_2 GPI 抗体による細胞刺激により、p38 MAPK のリン酸化および NF κ B の核内移行が認められた。また、特異的 p38 阻害薬 (SB203580) にて抗 CL/ β_2 GPI 抗体刺激による p38 MAPK リン酸化が阻害され、リアルタイム PCR 法において TF 発現の抑制も確認された。また、抗 CL/ β_2 GPI 抗体による p38 MAPK リン酸化は、 β_2 GPI の非存在下では認められなかった。さらに、遺伝子発現解析の結果から、TNF α 、IL-1 β などの炎症性サイトカインやケモカインの発現亢進が認められた。

D. 考察

p38 MAPK 経路は、抗リン脂質抗体刺激による単球からの TF 発現に重要な役割を果たしていると考えられた。抗 CL/ β_2 GPI 抗体による刺激により p38 MAPK のリン酸化に引き続き、NF κ B が核内へと移行し、TF プロモーターに結合し、TF 転写が誘導されてくる可能性が考えられる。これまでの研究から、抗リン脂質抗体症候群患者由来のモノクローナル抗 β_2 GPI 抗体は、培養内皮細胞に接着因子(ICAM-1、VCAM-1、E-セレクトイン)の発現を誘導し、さらにモノクローナル抗 β_2 GPI 抗体は、単球や内皮細胞にも外因系凝固反応のトリガーである TF の mRNA や蛋白を誘導することが示

されている。p38 MAPK 阻害により TF 発現が抑制されるという今回の研究の結果より、p38 MAPK 経路の制御は APS 患者の血栓向性に対する新たな治療法と成り得る可能性が考えられる。また、抗 CL/ β_2 GPI 抗体による TF の発現は β_2 GPI が存在しているときにのみ認められ、単球の細胞活性化は β_2 GPI に依存する、すなわち細胞と β_2 GPI に結合した自己抗体との interaction によるものであると考えられる。 β_2 GPI はいわばアンカーとして存在しており、受容体分子や共役分子の存在が想定され、今後その分子の同定が必要である。

E. 結論

TF を中心にした向凝固性の蛋白誘導の細胞内刺激伝達システムをより詳細に解析することにより、抗リン脂質抗体症候群発症のメカニズムを解明するのみならず、難治性である抗リン脂質抗体症候群の新しい治療法の確立が期待される。p38 MAPK 経路の制御による TF 発現の制御は、抗リン脂質抗体症候群の血栓向性にたいする特異的な治療の一つとなる可能性がある。

F. 健康危険情報

現在のところ、APS における in vivo での p38 阻害薬の使用は行っていない。p38 MAPK 経路は TF 発現のみならず種々の生体反応における重要な経路であり、種々の副作用の発現の可能性も予想される。抗リン脂質抗体-p38 MAPK 経路の詳細な解明をさらに行い、より APS に特異的な部分をターゲットとすることにより、将来的により安全な治療法が見いだされる可能性が考えられ得る。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Li, N., Nakamura, K., Jiang, Y., Tsurui, H., Matsuoka, S., Abe, M., Ohtsuji, M., Nishimura, H., Kato, K., Kawai, T., Atsumi, T., Koike, T., Shirai, T., Ueno, H., Hirose, S. Gain-of-function polymorphism in mouse and human Ltk: implications for the pathogenesis of lupus erythematosus. *Hum Mol Genet* 13:2 171-179. 2004
2. Endo, T., Nakao, S., Koizumi, K., Nishio, M., Fujimoto, K., Sakai, T., Kuwano, K., Obara, M., Koike, T.

- Successful treatment with rituximab for autoimmune hemolytic anemia concomitant with proliferation of Epstein-Barr virus and monoclonal gammopathy in a post-non myeloblastic stem cell transplant patient. *Ann Hematol* 83:114-116.2004
3. Yasuda,S., Atsumi,T., Ieko,M., Matsuura,E., Kobayashi,K., Inagaki,J., Kato,H., Tanaka,H., Yamakado,M., Akino,M., Saitou,H., Amasaki,Y.,Jodo,S, Amengual,O., Koike,T.: Nicked β_2 -glycoprotein I: a marker of cerebral infarct and a novel role in the negative feedback pathway of extrinsic fibrinolysis. *Blood*. 103:10. 3766-3772.2004
 4. Yamamoto,S., Tsuji,T., Matsuzaki,J., Zhange,Y., Chamoto,K., Kosaka,A., Togashi,Y., Sekikawa,K., Sawada,K., Takeshima,T. Koike,T., Nishimura,T.: Unexpected role of TNF- α in graft versus host reaction (GVHR): donor-derived TNF- α suppresses GVHR via inhibition of IFN- γ -dependent donor type-1 immunity. *Int Immunol*. 16: 811-817. 2004
 5. Endo,T., Mogi,Y., Koizumi,K., Nishio,M., Fujimoto,K., Sakai,T., Kumano,K., Obara,M., Ikeda,H., Koike,T.: Peripheral blood stem cell mobilization following plus rituximab therapy combined with G-CSF in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transpl*. 33:703-707. 2004
 6. Yasuda,S.,Ogura,N.,Horita,T.,Yasuda,I.,Kioka,T., Kondo,N.,Fujisaku,A. Abacterial prostatitis and primary biliary cirrhosis with Sjogren's syndrome. *Mod Rheumatol* 14:70-72.2004
 - 7.Das,H.,Atsumi,T.,Fukushima,Y.,Shibuya,H.,Ito,K., Yamada,Y.,Amasaki,Y.,Ichikawa,K.,Amengual,O., Koike,T.:Diagnostic value of antiagalactosyl IgG antibodies in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 23:218-222.2004
 - 8.Ieko,M.,Tarumi,T.,Takeda,M.,Nito,S.,Nakabayashi, T.,Koike,T.: Synthetic selective inhibitors of coagulation factor Xa strongly inhibit thrombin generation without affecting initial thrombin forming time necessary for platelet activation in hemostasis. *J Thromb Haemost* 2: 612-622.2004
 9. Amengual,O.,Atsumi.T.,Koike,T.: Antiprothombin antibodies and the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Clin Immunol* 112: 144-149.2004
 - 10.Yang.L.,Hakoda.M.,Iwabuchi.K.,Takeda.T.,Koike.T.,Kamatani.N.,Takada.K.: Rheumatoid Factors Induce Signaling from B cells, leading to Epstein-barr virus and B-cell activation. *J Virol* 78:18. 9918- 9923.2004
 11. Kataoka,H.,Koike,T. :Lupus mortality in Japan. *Autoimmun Rev* 3: 421- 422.2004
 - 12.Xiao,S.,Deshmukh,S.U.,Jodo,S.,Koike,T.,Sharma, R.,Furusaki,A.,Sung,J.S.,Ju,Shyr-Tu.: Novel negative regulator of expression in Fas Ligand (CD178) Cytoplasmic tail:Evidence for Translational Regulation and against Fas Ligand Retention in secretory lysosomes. *J Immunol* 173: 5095- 5102. 2004
 - 13.Yasuda,S.,Atsumi,T.,Ieko,M.,Koike,T.: β_2 -glycoprotein I,anti- β_2 -glycoprotein I, and fibrinolysis. *Thromb Res* 114: 461- 465.2004
 - 14.Astumi,T.,Amengual,O.,Yasuda,S.,Koike,T.: Antiprothrombin antibodies-are they worth assaying? *Thromb Res* 114: 533-538.2004
 - 15.Hashimoto,S.,Ogawa,Y.,Ishida,T.,Mochizuki,T.,Koike.T.,Sato,H.,Ueda,T.: Steroid-sensitive nephrotic syndrome associated with positive C1q immunofluorescence. *Clin Exp Nephrol* 8: 266- 269. 2004
 - 16.Bohgaki,M.,Atsumi,T.,Yamashita,Y.,Yasuda,S.,Sakai,Y.,Furusaki,A.,Bohgaki,T.,Amengual,O.,Amasaki ,Y.,Koike,T.: The p38 mitogen-activated protein kinasa(MAPK)pathway mediates induction of the tissue factor gene in monocytes stimulated with human monoclonal anti- β_2 Glycoprotein I antibodies. *Int Immunol* 16:11. 1633- 1641.2004
 17. Yasuda S, Atsumi T, Matsuura E, Kaihara K, Yamamoto D, Ichikawa K, Koike T. Significance of valine/leucine²⁴⁷ polymorphism of β_2 -glycoprotein I in antiphospholipid syndrome: increased reactivity of anti- β_2 -glycoprotein I autoantibodies to the valine²⁴⁷ β_2 -glycoprotein I variant. *Arthritis Rheum* 52:1. 212-218.2004
 - 18.Sugiura-ogasawara.M.,Atsumi,T.,Ozaki,Y., Koike.T.,Suzumori,K.:Phosphatidylserine-dependent

antiprothrombin antibodies are not useful markers for high-risk woman with recurrent miscarriages, *Fertil Steril* 82:51440-1442.2004

2. 学会発表

1. Koike, T. : " Antiphospholipid Syndrome " 7rd International Congress SLE and Related conditions , NewYork, U.S.A., May 9-13, 2004

2. Koike, T. : " Antiphospholipid Syndrome, mechanism of thrombus and complication of reproductive system " 11rd European Congress on Reproductive Immunology, Pilzen, Czech , June 30-July 3, 2004

3. Koike, T. : " Antiphospholipid Syndrome " 11rd Asia Pacific League Associations for Rheumatology Congress, Jeju, Korea , September 11- September 15, 2004

4. Atsumi, T., Koike, T. : " Antiprothrombin-is it worth assaying? " 11rd International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Sydney, Australia, 12-19, November , 2004

5. Koike, T. : " Pathogenesis of antiprothrombin antibody " 4rd International Congress on Autoimmunity, Budapest, Hungary, 3-7, November , 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

変異ペプチドを用いた免疫難病の治療アプローチに関する研究

分担研究者 住田 孝之 筑波大学大学院人間総合科学研究科先端応用医学専攻臨床免疫学 教授

研究要旨 免疫難病の抗原特異的治療の確立を目的とした研究である。関節リウマチ(RA)およびシェーグレン症候群(SS)において、T細胞が認識する自己抗原のT細胞エピトープを決定し、それぞれのアナログペプチドを明らかにした。HLA-DR B1*0101+RAにおいては、II型コラーゲン(CII)の262G→D, Aがアナログペプチドの候補として明かとなった。HLA-DR B1*0405+SSにおいては、 α -アミラーゼのT細胞エピトープ75E→Vが、また、HLA-DR B1*0901+SSでは、ムスカリン作動性アセチルコリン受容体(M3R)の222K→K, Aがアナログペプチドの候補として選定された。本年度は、関節炎、唾液腺炎の動物モデルマウスでのアナログペプチドの選定、*in vivo*での効果判定も進めた。現在までのところ、collagen induced arthritis(CIA)モデルマウスにおいて、CII262G→D, K, AおよびCII264K→Aがアナログペプチドの候補であることを明らかにしたが、GPI誘導関節炎モデルマウス、M3R誘導唾液腺モデルマウスに関しては研究が進行中である。以上の結果から、免疫難病の抗原特異的治療戦略が*in vitro*の解析から*in vivo*での検定のプロセスに進むことができたといえよう。

A. 研究目的

免疫難病である関節リウマチ(RA)やシェーグレン症候群(SS)において、発症機序として、臓器に浸潤した自己反応性T細胞が重要な役割を果たしている。その病因T細胞が認識するT細胞エピトープをアミノ酸レベルで明らかにし、変異ペプチドを用いて抗原特異的に免疫難病を治療することを目的とする。

B. 研究方法

1) CIA動物モデルでの検定：collagen induced arthritis (CIA)モデルマウスを用いて、T細胞エピトープのアナログペプチドが関節炎を*in vivo*で実際に抑制するか否かを検討した。CIAモデルマウスであるDBA/1(H-2q)マウスのH-2に結合するCII(256-271)のアンカーモチーフはHLA-DR B1*0101と同じであったため、先に合成した21個の変異ペプチドを用いて*in vitro*でアナログペプチドの選定を行った。マウス由来の脾臓由来からCD4⁺T細胞(CD45R-, CD11b-, TER119-, Gr-1-, CD8-)を分離し、抗原提示細胞(7-4-, TER-, Gr-1-)の存在下で、CIIおよび変異ペプチドと共培養し、T細胞の増殖反応をIFN- γ

産生で検討した(図1、図2)。

2) GPI誘導関節炎モデルマウスの作成：8-10週齢の雄DBA/1マウスにリコンビナントGPI300 μ gをCFAと一緒に一回免疫して関節炎モデルマウスの作成を試みた。

3) M3R誘導唾液腺炎モデルマウスの作成：DBA/1(H-2q), C57BL/6(H-2b), BALB/c(H-2d), MRL/lpr(H-2k), NOD(H-2g7)マウス由来の脾臓からCD4⁺T細胞を分離し、*in vitro*で合成M3R(15アミノ酸：VPPGECFIQFLSEPT)と共培養し、INF- γ 産生を指標にM3R反応性T細胞を測定した。M3R誘導唾液腺炎モデルに適しているマウスの選別を行った。

C. 結果

1)HLA-DR B1*0101と同様にCII蛋白のうち262G→D, K, Aおよび264K→Aとアミノ酸を置換した場合にT細胞のINF- γ 産生能は抑制された(図1)。このことから、CII262G→D, K, AおよびCII264K→Aがアナログペプチドの候補として選定された。

2)GPIを免疫後2-3週間で、RAに類似した関節炎が認められた(図2)。今後、この動物モデルを

用いて GPI のアナログペプチドの選別、効果判定を行う。

3)M3R 誘導唾液腺炎モデルマウスとして、BALB/c を除く 4 つのマウス系統で M3R 反応性 T 細胞の存在が証明された (図 3)。今後、選別したマウスに M3R を免疫して唾液腺炎発症に関して検討する。

D. 考察 E. 結論

RA における自己抗原の一つである CII の T 細胞エピトープのアミノ酸を少し変えた変異ペプチドを作成することにより、CII 反応性 T 細胞を抑制することができるアナログペプチドが選定された。さらに、SS においても、 α -アミラーゼおよびムスカリン作動性アセチルコリン受容体 (M3R) の T 細胞エピトープのアミノ酸構造から、 α -アミラーゼ反応性 T 細胞の増殖を抑制するアナログペプチドが選定された。以上の結果から、T 細胞エピトープを決定し、アナログペプチドを選定することにより、免疫難病の病因 T 細胞を抗原特異的に制御することが現実的となってきた。本研究では、CIA や GPI 誘導関節炎モデルマウス、さらに M3R 誘導関節炎モデルマウスを用いてアナログペプチドの効果を検定する基盤研究を確立した。最終的には、免疫難病である RA や SS を対象として clinical trial を施行し、実際の治療戦略として確立することを目指す。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsutsumi, A., Takahashi, R., and Sumida, T. Mannose binding lectin: genetics and autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews*. (in press)
2. Ohnishi, Y., Tsutsumi, A., Goto, D., Itoh, S., Matsumoto, I., Taniguchi, M., and Sumida, T. TCRV α 14+ NKT cells function as effector T cells in collagen-induced arthritis mice. *Clin. Exp. Immunol.* (in press)
3. Tomoo, T., Tsutsumi, A., Yasukochi, T., Ikeda, K., Ochiai, N., Ozawa, K., Shibana, Y., Ito, S., Matsumoto, I., Goto, D., and Sumida, T. Analysis of abnormally expressed genes in synovium from patients with rheumatoid arthritis using a column gel electrophoresis-coupled subtractive hybridization technique. *Int. J. Mol. Med.* (in press)
4. Naito, Y., Matsumoto, I., Wakamatsu, E., Goto, D., Tsutsumi, A., and Sumida, T. Muscarinic acetylcholine receptor autoantibodies in patients with Sjogren's syndrome. *Ann. Rheu. Dis* (in press)
5. Takahashi, R., Tsutsumi, A., Ohtani, K., Muraki, Y., Goto, D., Matsumoto, I., Wakamiya, N., and Sumida, T. Association of mannose-binding lectin (MBL) gene polymorphism and serum MBL concentration with characteristics and progression of systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheu. Dis.* 64:311-314, 2005.
6. Takahashi, R., Tsutsumi, A., Ohtani, K., Goto, D., Matsumoto, I., Ito, S., Wakamiya, N., and Sumida, T. Anti-mannose binding lectin antibodies in sera of Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 136: 585-590, 2004
7. Kato, T., Asahara, H., Kurokawa, MS, Fujisawa, K., Hasunuma, T., Inoue, H., Tsuda, M., Takahashi, S., Motokawa, S., Sumida, T., and Nishioka, K. HTLV-I env protein acts as a major antigen in patients with HTLV-I-associated arthropathy. *Clin. Rheumatol.* 23:400-409, 2004.
8. Muraki, Y., Matsumoto, I., Chino, Y., Hayashi, T., Suzuki, E., Goto, D., Ito, S., Murata, H., Tsutsumi, A., and Sumida, T. GPI variants play a key role in the generation of anti-GPI Abs: possible mechanism of autoantibody production. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 60:1316-1324, 2004.
9. Tsutsumi, A., Adachi, Y., Murata, H., Kojo, S., Shibuya, K., Nakamura, H., and Sumida, T. G0S24, a gene that regulates TNF α production, is highly expressed in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 31:1044-1049, 2004
10. Muraki, Y., Tsutsumi, A., Takahashi, R., Suzuki, E., Hayashi, T., Chino, Y., Goto, D., Matsumoto, I., Murata, H., and Sumida, T. Polymorphisms of IL-1 β gene in Japanese patients with Sjogren's syndrome

ヒト V α 24 NKT 細胞の免疫制御性糖脂質に対する反応性に関する研究

分担研究者	山村 隆	国立精神・神経センター神経研究所	部長
研究協力者	三宅 幸子	同	室長
	荒木 学	同	研究員
	作石 かおり	同	研究員

研究要旨 多発性硬化症（MS）に代表される臓器特異的自己免疫疾患においては、Th1/Th2 バランスを Th2 に偏倚させるような治療薬の有効性が推測される。我々はマウス NKT 細胞に選択的な IL-4 産生を誘導する合成糖脂質 OCH の開発に成功し、OCH が MS の動物モデル EAE やコラーゲン誘導関節炎などの病態を抑制する活性を持つことを示してきた。本研究では、ヒトにおいても OCH による NKT 活性化が起こるか否か、起こる場合には α -GalCer と異なる反応が得られるかどうかを検討した。研究の結果、ヒト CD4⁺NKT 細胞クローンの反応性から見た場合に、OCH は α -GalCer よりも Th1/Th2 バランスを Th2 に偏倚させる能力において優れていることが明らかになった。マウスのみならずヒトにおいても、OCH が Th1 自己免疫疾患の治療薬として有効である可能性を示すものである。

A. 研究目的

多発性硬化症（MS）に代表される臓器特異的自己免疫疾患においては、Th1/Th2 バランスを Th2 に偏倚させるような治療薬の有効性が推測される。我々はマウス NKT 細胞に選択的な IL-4 産生を誘導する合成糖脂質 OCH の開発に成功し、OCH が MS の動物モデル EAE やコラーゲン誘導関節炎などの病態を抑制する活性を持つことを示してきた（Nature 413:531-534, 2001; Arthr. Rheumat. 50:305-313, 2004）。OCH は既存のリガンド α -GalCer と異なり、IFN- γ 産生をほとんど誘導しないので、Th1 細胞の介在する自己免疫疾患に対する有効性が高いものと考えられる。本研究では、ヒトにおいても OCH による NKT 活性化が起こるか否か、起こる場合には α -GalCer と異なる反応が得られるかどうかを明らかにする。

B. 研究方法

NKT 細胞クローンは健常者末梢血から以下の 2 種類の方法によって樹立した。1) 新鮮 PBMC を α -GalCer で一次刺激し NKT 細胞を増殖させ、12-18 日毎にセルソーターによって CD4⁺または CD4⁺NKT 細胞 (V α 24⁺V β 11⁺) を分離し、それぞれを自己 APC 存在下に PHA で刺激することによる方法。2) 新鮮 PBMC 中の V α 24⁺V β 11⁺細胞をセ

ルソーターで単一細胞として分離し (single cell sorting)、自己またはアロ APC 存在下に PHA で刺激。以後約 20 日毎に PHA による刺激を繰り返して樹立する方法。樹立された NKT 細胞クローンは、immature DC を APC として OCH または α -GalCer により刺激し、細胞増殖反応を通常の thymidine uptake により、またサイトカイン産生能を ELISA または CBA 法により評価した。

(倫理面への配慮)

研究のプロトコール、研究内容については国立精神・神経センターの倫理委員会の承認を受けた。

C. 研究結果

1) 4 人のドナーから計 13 種類の NKT line/clone を樹立できた。その内訳は、CD4⁺NKT が 6 クローン、DN NKT が 7 クローンであり、 α -GalCer による一次刺激で樹立した NKT が 5 クローン、single cell sorting によるものが 8 クローンである。Single cell sort で樹立したもののうち 2 クローンについては、途中で α -GalCer による刺激を追加した。
2) α -GalCer による刺激が一度でも入ったクローンでは、 α -GalCer に対する増殖反応は見られたが、OCH に対する反応はまったく見られなかった。し