

200400804-A

厚生科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

## 自己免疫疾患に関する調査研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

平成17年 3月

主任研究者 小池 隆夫

—目次—

(1)	構成員名簿	3
(2)	総括研究報告書	7
(3)	分担研究報告書	17
1.	自己免疫疾患を発症する HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラットに認める CD25 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T 細胞機能異常に関する研究 石津 明洋	19
2.	免疫抑制受容体 PD-1 の機能不全は自己免疫遺伝素因を増強し、 自己免疫疾患の発症を促進する 岡崎 拓	22
3.	CD25 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T 細胞による CD4 <sup>+</sup> T 細胞の増殖抑制メカニズムの解析 三村 俊英	25
4.	免疫バランスの自己免疫病における意義 西村 孝司	38
5.	全身性エリテマトーデス患者 T 細胞に発現される異常 TCR ゼータ鎖に関する 分子免疫学的検討 竹内 勤	32
6.	クラス II HLA 分子を介したシグナル伝達による免疫制御機構に関する研究 松下 祥	35
7.	全身性自己免疫疾患における自己抗体産生機構についての研究 鏝田 武志	40
8.	各種リン脂質存在下でのβ2-グリコプロテインIIに対する免疫応答の検討 桑名 正隆	43
9.	LDL の変性およびタンパク質修飾:免疫が関与する動脈硬化の進展機序と早期診断法 松浦 栄次	48
10.	抗リン脂質抗体の発現, 血栓症発症における接着分子の関与 —接着分子ノックアウトマウスを用いた検討— 山崎 雅英	54

11. 抗リン脂質抗体による向血栓細胞活性化の機序に関する研究 小池 隆夫	60
12. 膠原病に合併する難治性間質性肺炎に対するタクロリムスの有用性に関する検討 宮坂 信之	64
13. Clinically Amyopathic Dermatomyositis 患者血清中の 140kDa 蛋白 (CADM-140 抗原)を認識する自己抗体の臨床的意義に関する研究 平形 道人	70
14. ICOS-ICOS リガンド相互作用の阻害による実験的自己免疫性筋炎の改善に関する研究 原 まさ子	75
15. IL-6 阻害による難治性 SLE に対する探索的治療と DNA チップを用いた 病因・病態関連分子の解析に関する研究 西本 憲弘	77
16. シェーグレン症候群唾液腺上皮細胞死における CD40 の役割に関する研究 菅井 進	81
17. 自己反応性 B 細胞に対する MHC クラス II 亜領域による制御機構の解析 広瀬 幸子	90
18. 全身性エリテマトーデス疾患感受性遺伝子に関する研究 土屋 尚之	94
19. SLE における多剤抵抗性遺伝子発現とその制御 田中 良哉	103
20. 膠原病における難治性病態に関連する因子の検討 橋本 博史	106
21. 腎障害性抗 DNA 抗体の惹起因子に関する研究 佐々木 毅	110
22. プロテオミクスを用いた自己抗体の解析に関する研究 加藤 智	122
23. スタチン類の自己免疫疾患に対する治療に関する研究 養田 清次	128
24. Laser-microdissection (LMD)法によるループス腎炎モデルマウス(MRL/lprマウス)の 腎浸潤T細胞に関する研究 伊藤 聡	131
25. 初代培養唾液腺細胞での TLR3 シグナル伝達に関する研究 江口 勝美	136
(4) 研究成果の刊行に関する一覧	139

## (1) 構成員名簿

平成16年度 構成員名簿  
(H14-難治-05)

区分	氏名	所属	職名
主任研究者	小池 隆夫	北海道大学大学院医学研究科 病態内科学講座・第二内科	教授
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
	鏑田 武志	東京医科歯科大学大学院疾患生命科学高次生体制御学	教授
	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
	広瀬 幸子	順天堂大学医学部第二病理学教室	助教授
	松下 祥	埼玉医科大学医学部免疫学講座	教授
	宮坂 信之	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	教授
	石津 明洋	北海道大学大学院医学研究科病態解析学講座: 分子病理学分野	講師
	江口 勝美	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科病態解析・制御学講座(第一内科)	教授
	伊藤 聡	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分野	講師
	岡崎 拓	京都大学大学院医学研究科 21世紀COE・分子生物学	助手
	加藤 智啓	聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター生体機能・プロテオーム制御部門	助教授
	桑名 正隆	慶応義塾大学医学部 先端医科学研究所	講師
	佐々木 毅	東北大学大学院医学系研究科 内科病態学講座免疫・血液病学分野	教授
	菅井 進	金沢医科大学血液免疫制御学	教授
	田中 良哉	産業医科大学医学部第一内科学講座	教授
	土屋尚之	東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学教室	助教授
	西村 孝司	北海道大学 遺伝子病制御研究所 疾患制御部門・免疫制御分野	教授
	橋本 博史	順天堂大学医学部膠原病内科学講座	教授
	原 まさ子	東京女子医科大学 膠原病リウマチ痛風センター	教授
	平形 道人	慶応義塾大学医学部内科リウマチ研究室	講師
松浦 栄次	岡山大学大学院医歯学総合研究科 細胞化学分野	助教授	
簗田 清次	自治医科大学内科学講座アレルギー・膠原病学部門	教授	
三村 俊英	埼玉医科大学医学部リウマチ膠原病科	教授	
山崎 雅英	金沢大学医学部附属病院血液内科	助手	
事務局	渥美 達也	北海道大学大学院医学研究科 病態内科学講座・第二内科 〒060-8638 札幌市北区北15条西7丁目 TEL(011)706-5915 FAX(011)706-7710	講師
経理事務担当者	小田桐 英樹	北海道大学大学院医学研究科経理掛 TEL(011)706-5009 FAX(011)706-7873 e-mail:keiri@med.hokudai.ac.jp	

## (2) 総括研究報告書

## 自己免疫疾患に関する調査研究

主任研究者 小池 隆夫  
(北海道大学大学院医学研究科病態内科学講座)

### 研究要旨

本研究では以下の項目を分担研究として行った。

①全身性エリテマトーデス(SLE)患者 T 細胞機能の異常、②SLEにおける T 細胞-B 細胞相互関係の解析、③SLE および膠原病間質性肺炎に対する新たな治療法の展望、④抗リン脂質抗体と関連する病態の解析、⑤抗リン脂質抗体症候群における自己抗体産生機構ならびに血管病変発現機構の解析、⑥多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)の病態解析、⑦PM/DM に合併する間質性肺炎の発症機序ならびに治療の検討、⑧シェーグレン症候群の組織障害機構の解析

以下の項目を全体研究として行った。

①膠原病に合併する難治性間質性肺炎に対する新たな治療法を開発する目的で、タクロリムスの有用性について検討を開始した。②抗リン脂質抗体症候群の治療指針(案)の作製を引き続き行った。③抗リン脂質抗体測定法の標準化をすすめた。④SLE の疾患感受性遺伝子解析を、厚生労働科学研究費補助金による ヒトゲノム・再生医療等研究事業「SLE を中心とした自己免疫疾患感受性遺伝子の解明班(笹月健彦主任研究者)」との共同研究事業として継続した。

### A.研究目的

本研究の目的は各々の自己免疫疾患における免疫系の異常の特徴を明らかにし、疾患特異的治療戦略を構築し、患者の QOL の向上を計り、さらには病気の治癒を目指す事である。

### B.研究方法

昨年度にひきつづき、自己免疫疾患の中から研究調査の対象を全身性エリテマトーデス(SLE)、抗リン脂質抗体症候群(APS)、多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)、Sjogren 症候群(SJS)の4疾患に絞り、各々の疾患における免疫系の異常の特徴を明らかにし、疾患特異的治療戦略を構築し、患者の QOL の向上を計り、さらには病気の治癒を目指すために以下の研

究を行った。

1. 自己免疫疾患を発症する HTLV-1 env-pX 遺伝子導入ラットに認める CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>免疫制御性 T 細胞機能異常に関する研究
2. 免疫抑制受容体 PD-1 の機能不全は自己免疫遺伝子素因を増強し、自己免疫疾患の発症を促進することに関する研究。
3. CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞による CD4<sup>+</sup>T 細胞の増殖抑制メカニズムの解析。
4. 免疫バランス(Th1/Th2 バランス)の自己免疫病における意義。
5. 全身性エリテマトーデス患者 T 細胞に発

現される異常 TCR ゼータ鎖に関する分子免疫学的検討

6. クラスII HLA 分子を介したシグナル伝達による免疫制御機構に関する研究。
7. 全身性自己免疫疾患における自己抗体産生機構についての研究。
8. 各種リン脂質存在下での $\beta 2$ -グリコプロテインIに対する免疫応答の検討。
9. LDL の変性およびタンパク質修飾:免疫が関与する動脈硬化の進展機序と早期診断法
10. 抗リン脂質抗体の発現, 血栓症発症における接着分子の関与 接着分子ノックアウトマウスを用いた検討
11. 抗リン脂質抗体による向血栓細胞活性化の機序に関する研究
12. 膠原病に合併する難治性間質性肺炎に対するタクロリムスの有用性に関する検討。
13. Clinically Amyopathic Dermatomyositis 患者血清中の 140kDa 蛋白(CADM-140 抗原)を認識する自己抗体の臨床的意義に関する研究。
14. ICOS-ICOS リガンド相互作用の阻害による実験的自己免疫性筋炎の改善に関する研究。
15. IL-6 阻害による難治性 SLE に対する探索的治療と DNA チップを用いた病因・病態関連分子の解析に関する研究
16. シェーグレン症候群唾液腺上皮細胞死における CD40 の役割に関する研究。
17. 自己反応性 B 細胞に対する MHC クラス II 亜領域による制御機構の解析自己反応性 B 細胞の増殖に関する研究。
18. 全身性エリテマトーデス疾患感受性遺

伝子に関する研究

19. SLE における多剤抵抗性遺伝子発現とその制御。
20. 膠原病における難治性病態に関連する因子の検討。
21. 腎障害性抗 DNA 抗体の惹起因子に関する研究。
22. プロテオミクスを用いた自己抗体の解析に関する研究
23. スタチン類の自己免疫疾患に対する治療に関する研究。
24. Laser-microdissection(LMD)法によるループス腎炎モデルマウス(MRL/lpr マウス)の腎浸潤 T 細胞に関する研究。
25. 初代培養唾液腺細胞での TLR3 シグナル伝達に関する研究

### C. 研究結果と考察

1. 自己免疫疾患を発症する HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラット(env-pX ラット)では、疾患発症前から CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>免疫制御性 T 細胞に機能障害が認められる。同系正常ラットとの骨髄置換実験の結果から、CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞の機能障害には同細胞における env-pX 遺伝子発現が重要な役割を果たしており、胸腺での分化成熟過程の異常が直接的な原因ではないと考えられた。また、cDNA アレイやフローサイトメリー、定量的リアルタイム RT-PCR を用いた分子解析の結果、env-pX ラット CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞では、炎症性サイトカインのシグナルを抑制する SOCS ファミリー分子の遺伝子発現が著明に低下しており、JAK/STAT シグナル伝達系が亢進していること等が明らかになった。



2. PD-1 欠損マウスに発症する拡張型心筋症の原因である、抗心筋型トロポニン I 自己抗体の作用機序を明らかとした。心筋細胞のカルシウム電流が障害を受ける事により拡張型心筋症が発症しうることを示したものであり、これまで心臓移植しか治療法がなかったこの難治性疾患に対し、免疫抑制、自己抗体の除去、カルシウム電流の調節といった新たな治療法の可能性を開いた。I 型糖尿病のモデルマウスである NOD マウスでは、PD-1 遺伝子の欠損により糖尿病の発症が大幅に促進された。これにより PD-1 遺伝子欠損が、マウスの自己免疫素因に応じて自己免疫疾患の発症を促進することが明らかとなった。また、I 型糖尿病の発症を優性に制御する遺伝子座を連鎖解析により 2 箇所同定した。PD-1 の遺伝子変異、或は新規に同定された遺伝子座がヒト I 型糖尿病、及び他の自己免疫疾患発症にも関与することが明らかとなれば、自己免疫疾患の分子病態解明に役立つと期待される。

3. ヘルパー T 細胞 (CD4+T 細胞) の内、CD25+CD4+T 細胞 (抑制性 T 細胞; Treg) が免疫系において抑制的な役割を果たすことが *in vivo*, *in vitro* の実験から明らかとなり、自己免疫疾患においてこの抑制性 T 細胞の果たす役割が注目されている。我々はこの細胞群が免疫応答を抑制する機構を、主として抗原提示細胞 (APC) に対する影響に注目して解析を進め、前年までに (1) Treg が APC よりの IL-12 産生を負に制御すること、(2) Treg はこれまで anergic とされてきたが、他の CD4+T 細胞が産生する IL-2 に依存して分裂していることを見出した。今回 (1) については Treg は APC を刺激するリガンドである CD40L を発現しておらず、更に非 Treg の CD40L 発現を抑制することが判明し、更に APC 上の B7 (CD80, CD86) の発現も Treg により抑

制されることが分かった。これらのことから、Treg が炎症を検知して増殖し、炎症を終息させるという、negative feedback のシステムの存在が示唆された。

4. VD3 を BMDC1 の誘導系に加えることによって、MHC class I や共刺激分子の発現増強を著しく抑制し、BMDC1 が本来示す Th1 や Tc1 の誘導促進効果も、強く抑制された。このことから、V.D3 は IFN- $\gamma$  や IL-12 の作用抑制を介して DC1 誘導を阻害し、Th1 免疫を低下させている可能性が示された。次に、ナイーブ Th 細胞から、IL-2 と抗原あるいは抗 CD3 抗体で刺激する際に、VD3 を添加して、VD3 の T 細胞に対する直接作用を検討した。その結果、VD3 を添加することによって、IFN- $\gamma$  産生型 Th1 の誘導は抑制され、IL-4 産生型の Th2 細胞の誘導が亢進された。これらの結果から、VD3 は DC サブセットの誘導制御を介した間接的作用、あるいは T 細胞に対する直接作用を介して、Th1 免疫を抑制し、免疫バランス制御に影響を及ぼし得ることが明確にされた。

5. 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・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・鎖の蛋白合成低下が、一部の症例には異常スプライシングを伴ったメッセージ異常が見い出された。TCR・鎖蛋白合成障害に、この異常スプライシングを受けた TCR・鎖 mRNA ヴァリエントがどのように関与しているかは不明である。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・鎖 mRNA 安定性を検討した所、exon7(-) ヴァリエント、short 3'-UTR 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・鎖蛋白発現低下を引き起こしたものと考えられた。病態のエフェクター分子を明らかにする目的で、これら2つのT細胞株に共通して認められる発現異常分子を遺伝子チップを用いて解析したところ、両クローンに共通して発現亢進する分子として、Syndecan-1, Nectin-2.などが明らかにされた。患者T細胞における発現を検討した所、ゼータ鎖発現低下が観察される症例において syndecan-1の発現異常が存在することが確認された。

6. これまでに HLA 分子がペプチド抗原を提示するだけでなく、TCR との相互作用によって抗原提示細胞内にシグナルを伝達する分子としても機能していることを報告してきた。B 細胞、マクロファージ、活性化 T 細胞、繊維芽細胞などの細胞種によってさまざまな異なる現象が認められた。本年度は樹状細胞を用いて、クラス II アイソフォーム(DR, DQ, DP)によるシグナルの質の違いを検討した。その結果、HLA-DQ による抗原提示は DC2 の誘導を介して Th1/Th2 分化を Th2 側に傾けることが明らかとなった。
7. 辺縁帯 B 細胞において自己トレランスの存在が明らかとなった。移行期 B 細胞の自己トレランスは CD40L により解除されるが、辺縁帯 B 細胞のトレランスは解除されず、末梢リンパ組織においても、異なったトレランス機構が異なった制御を受けることが明らかとなった。CD40L-Tg マウスでは個体の成熟とともに自己トレランスの破綻がおこるが、これはヒトの自己免疫疾患でも共通の現象であり、この点の解明に CD40L-Tg マウスは有用と考えられる。
8. DRB4\*0103 を持つ健常人 6 名を対象とし、末梢血単球から作成した樹状細胞、マクロファージを APC として用いた。これ

ら APC にフォスファチジルセリン・リポソームに結合させた $\beta$ 2GPI をパルスし、IL-2 存在下で自己末梢血 CD3<sup>+</sup>T 細胞と共培養した。T 細胞を回収し、native な $\beta$ 2GPI、リコンビナント $\beta$ 2GPI 断片、p276-290 をパルスした自己 B 細胞と培養し、上清中に産生された IFN- $\gamma$ を測定した。その結果、p276-290 に対する T 細胞の特異的反応は樹状細胞を用いると 4 例、マクロファージを用いると 1 例で検出された。このようにリン脂質に結合した $\beta$ 2GPI で健常人 T 細胞を感作することにより、 $\beta$ 2GPI に対する T 細胞のプライミングを誘導できた。 $\beta$ 2GPI が陰性荷電を有する外来微生物成分やアポトーシス細胞と結合して強力な抗原提示能を持つ樹状細胞に取り込まれれば、 $\beta$ 2GPI 反応性 T 細胞の活性化を介して APS の発症につながる可能性が考えられた。

9. 酸化 LDL $\cdot\beta$ 2GPI 複合体(抗原)は SLE や APS のみならず、酸化ストレスが発症に関与すると考えられる糖尿病や梅毒患者で見られ血管内皮傷害に関連していることが示唆された。抗酸化 LDL $\cdot\beta$ 2GPI 複合体抗体に関しては、APS で高率に検出され、特に動脈血栓との関連が示された。
10. 接着分子ノックアウト(KO)マウスを用いて実験的 APS モデルマウスの作成を試み、抗リン脂質抗体(aPL)発現、血栓症発症に及ぼす接着分子の関与につき検討した。C57B2/6(wild type)マウスに $\beta_2$ -glycoprotein I ( $\beta_2$ -GPI)を能動感作することにより実験的 APS マウスを作成した。同様に ICAM-1, P-selectin, E-selectin, L-selectin KO マウスに $\beta_2$ -GPI を感作し実験的 APS マウスが作成されるか検討した。これらのマウスに LPS を腹腔内投与し FDP, TAT, および腎糸球体血栓の頻度(%GFD)を測定し、本モデルの血栓傾向を解析した。Wild

type マウスでは $\beta_2$ -GPI 感作 8 週後に有意の血小板減少, APTT延長, aCLの上昇を認め, aPL の発現が確認された。ICAM-1, P-selectin, L-selectin KO マウスでも同様の变化を認めたものの E-selectin KO マウスではいずれの変化も見られなかった。LPS腹腔内投与により,  $\beta_2$ -GPI 感作 wild type マウスでは非感作マウスと比較して有意の FDP, TATの上昇, %GFDの上昇を認めたものの, 接着分子KOマウスではいずれのマウスもFDP, TAT, %GFDの有意的上昇を認めなかった。以上の結果より, 抗リン脂質抗体発現には E-selectin が, 血栓症発症にはそのほかの接着分子が関与することが明らかになった。

11. 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示唆された。
12. 膠原病には間質性肺炎(IP)が高頻度に合併するが, 大量ステロイド療法に対しても治療抵抗例が少なくない。そのような症例には様々な免疫抑制剤が保険適応外で使用されているが十分なエビデンスは存在しないのが現状である。一方, タクロリムス(TAC)の膠原病に合併するIPにおける有効性が国内外から散発的に報告されていることから, 本剤が新たな治療薬となりうる可能性がある。タクロリムスの有用性に関する検討を行っている。第一段階として, 膠原病に合併するIP症例で TAC(目標全血中トラフ濃度 5-9ng/ml)が最低 3ヶ月以上投与された 9例(TAC 開始時年齢平均 61.6 歳,

TAC 投与前 IP 治療歴平均 37.0 ヶ月)にて臨床効果を評価した。9例全例に救命効果があり, 8例は呼吸機能検査値・血清KL-6値・及びCT画像上所見を含めた評価にて改善または安定化を示し, 残り1例は併用するプレドニゾロンの増量後に著明に改善した。副作用としては可逆性の軽度腎機能低下及び手指振戦が1例ずつに見られた。経過観察中(平均 20.5 ヶ月), 1例が細菌性肺炎を契機に IP の増悪を来し, シクロホスファミドを追加以降安定化した。第二段階として単一施設前向きオープン試験を計画し, 当院倫理審査委員会にて2004年2月に承認された。2005年1月末までに, 皮膚筋炎患者3名が候補に挙がったが, いずれも選択基準を満たさなかった。第一段階の後ろ向き解析の所見は本病態における TAC の有用性を示唆するものである。第二段階の単一施設前向きオープン試験の問題点として, 患者登録が緩徐であること, その原因として単一施設である点, 対象が「難治性」である点, そしてその上に主評価項目である呼吸機能検査が施行可能であることが選択基準に含まれる点が挙げられる。これに対して, 医学的及び倫理的見地から問題がない範囲内で選択基準・評価項目の変更を検討している。更に, 膠原病の中で合併するIPの予後が最も悪い多発性筋炎・皮膚筋炎に絞って, 日本医師会治験促進センターの援助及び治験ネットワークを利用し, 効能追加承認のためのデータ提供を直接目的とした多施設臨床治験を現在計画中である。また, 他の膠原病に合併するIPに関しては上記第二段階の臨床試験を継続し, 評価を進めていく予定である

13. 多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)において間質性肺炎(Interstitial Pneumonia, IP)は, 重要な予後因子であるが, 特に, 臨床的に筋炎症状に乏しい DM

(Clinically amyopathic DM, C-ADM) 症例に治療抵抗性の急速進行性間質性肺炎(Acute Interstitial Pneumonia, AIP)を合併することが知られている。かかる症例では、抗核抗体陰性が特徴とされてきたが、その詳細は不明である。本研究は、白血病細胞由来 K562 細胞を用いて ADM 患者血清中の自己抗体の追究を目的とした。自己抗体の検索は、白血病細胞由来 K562 細胞を用いた 35S メチオニン標識免疫沈降法でおこなった。これらの方法で、K562 細胞成分中の蛋白を認識した症例の臨床症状、検査所見、経過、治療、予後などについて検討した。その結果、1. C-ADM 患者 15 例中 8 例(53%)が免疫沈降法で 140kDa 蛋白を認識する新たな自己抗体(抗 CADM-140 抗体)を認めた。2. 抗 CADM-140 抗体は、C-ADM に特異的に検出された。3. 抗 CADM-140 抗体陽性 ADM 7 例は、IP を併発しており、うち 4 例は AIP だった。4. 抗 CADM-140 抗体陽性 DM は、陰性 DM と比較して、AIP 併発が有意に高頻度だった。C-ADM 患者血清中に、140kDa 蛋白を認識する新たな自己抗体(抗 CADM-140 抗体)の存在が示唆された。

14. 組換え C 蛋白誘導性実験的自己免疫性筋炎 (experimental autoimmune myositis, EAM)ラットにおいては、ヒト多発性筋炎と近似して、CD8 陽性 T 細胞の浸潤を認め、Inducible Costimulator (ICOS)-ICOS リガンドの相互作用が病態形成に重要であること等が明らかになった。C 蛋白誘導性 EAM の病態形成には病初期からのマクロファージの関与が重要と考えられた。
15. 難治性 SLE 患者に対するヒト化抗 IL-6 レセプター抗体 (tocilizumab) 療法を行った。また、末梢血細胞中の mRNA 発現変動をマイクロアレイ DNA チップにて測

定し、治療効果に関連する分子群の解析を行った。SLE 患者末梢血中で 48 分子が健常人に比べ有意に変動していた。tocilizumab の投与前と投与後の mRNA の比較を行ったところ IL-6 阻害に伴い変動する分子として機能が未知のものを含む 5 分子が同定された。

16. シェーグレン症候群(以下 SS) 唾液腺上皮細胞は、IFN $\alpha$  刺激により Fas、CD40 を発現し、両者を同時に刺激すると Fas death 経路の細胞死抑制分子である cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) の発現が抑制され、効率的に細胞死に至る。SS 唾液腺上皮細胞死には IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ , Fas/FasL, CD40/CD40L, c-FLIP, p38MAPK, NF- $\kappa$ B などの分子が関与していることが示唆された。SS において、これら分子の発現や機能を調節することによる唾液腺障害に対する分子標的治療法の開発が望まれる。
17. SLE は多くの感受性遺伝子が関与する代表的多遺伝子疾患である。主要組織適合遺伝子複合体(MHC)は主要な感受性遺伝子の一つであるが、MHC 領域内には複数の遺伝子が存在するため、実際にどの遺伝子が SLE 発症に関わっているかを明らかにする必要がある。今回我々は、クラス II 分子をコードする MHC 亜領域の役割を明らかにするために、MHC クラス II 亜領域内に recombination を起こさせた SLE 自然発症 New Zealand マウス系を樹立し、自己反応性 B 細胞の活性化に係わる MHC クラス II 亜領域の役割を解析した。その結果、クラス IIA 領域は自己抗体の産生を増強し SLE 発症を促進するのに対して、クラス IIE 領域は自己抗体産生を抑制し、SLE 発症の抑制に働いていることが示された。
18. FCGR2B-232T は東～東南アジア集団

共通の SLE 感受性遺伝子であり、B 細胞の抑制シグナルの減弱により、SLE 発症に関連すると考えられることが明らかになった。CD72 イントロン多型が、スプライシング効率に影響することにより、細胞外領域に位置する約40アミノ酸の置換を伴う新たなアイソフォームの産生を増加させ、それ自体で腎症抵抗性と関連し、かつ、遺伝子間相互作用により、FCGR2B 多型の SLE 発症リスクを修飾することが明らかになった。また、APRIL と SLE との既報の関連が確認され、さらに、新たな APRIL 多型と臨床病型との関連が示唆された。

19. 薬剤抵抗性は、長期間の薬剤投与により齎される薬剤耐性(二次無効)、疾患活動性が高いために薬剤に反応しない薬剤不応性に大別される。SLE 患者リンパ球では、P 糖蛋白質が発現増強し、細胞内薬物濃度が低下して薬物抵抗性の原因となり、IL-2 などによる活性化による MDR-1 転写誘導がその機序として考えられた。リンパ球の P-糖蛋白質の発現が、薬剤抵抗性の臨床的指標として普及すれば、SLE の治療のアルゴリズムに於いて、P-糖蛋白質が高発現する薬剤不応性の症例に対しては強化療法(ステロイドパルス療法や生物学的製剤)、薬剤耐性の症例には P-糖蛋白質拮抗薬(シクロスポリンなど)の併用療法などが推奨されるはずで、薬剤抵抗性の観点からのテーラーメイド医療の具現化を可能とするものである。
20. 難治性病と関連のあるステロイド治療反応性について、グルココルチコイド受容体(GR)多型とステロイド治療抵抗性の関連の解析を行った。検出された SNPs 及びハプロタイプと SLE の病態との関連が認められたが、ステロイド反応性との関連性は見出せなかった。
21. 腎障害性抗 DNA 抗体を惹起する因子の

同定は SLE の病因解明および原因療法開発に不可欠である。2次元電気泳動後のウエスタンブロッティングで自己抗原を検出し、質量分析器と蛋白データベースサーチによる同定を行った。抗原ソースを工夫することで、筋炎で高頻度に検出される抗 cofilin1 自己抗体、内皮細胞に特異性の高い自己抗原 peroxiredoxin2、あるいは酸化ストレスにより修飾を受けた蛋白の抗原性変化などが検出された。自己抗原・自己抗体の解析にプロテオミクスはたいへん有用な手法であることが判明した。

22. 本研究はプロテオミクスを用いて自己抗体の解析を網羅的に行い、新規の自己抗原の同定や蛋白修飾と自己抗原性との関連を検討することを目的とした。2次元電気泳動後のウエスタンブロッティングで自己抗原を検出し、質量分析器と蛋白データベースサーチによる同定を行った。抗原ソースを工夫することで、筋炎で高頻度に検出される抗 cofilin1 自己抗体、内皮細胞に特異性の高い自己抗原 peroxiredoxin2、あるいは酸化ストレスにより修飾を受けた蛋白の抗原性変化などが検出された。自己抗原・自己抗体の解析にプロテオミクスはたいへん有用な手法であることが判明した。
23. スタチン類の多面的効果としての免疫抑制作用の解析について、今回はループモデルマウス (MRL-lpr/lpr) に対して治療効果を示すか否かを検討した。フルバスタチン投与開始 8 週後ではコントロール群と比較して生存率の延長、尿一般検査で蛋白尿と潜血反応との改善、さらに血清 BUN の正常化が認められた。フルバスタチンは、少なくとも短期的には MRL-lpr/lpr マウスに対して治療効果を示した。
24. ループモデルマウスの MRL/lpr マウス

を対象とし、Laser-microdissection(LMD)法とRT-PCR法を用いて腎浸潤T細胞のサイトカイン産生の解析を行なった。糸球体、糸球体とほぼ同じ大きさの血管周囲浸潤細胞をくり抜いた検体をpoolしたものからRNAを抽出しcDNAを合成、RT-PCR法にてThy1、B-220、TCR-C $\beta$ 、IL-2、IL-4、IL-10、IFN $\gamma$ 遺伝子発現を行った。24-28週で屠殺した腎病変の明らかな二匹の糸球体では、IL-2、IFN $\gamma$ の発現を認め、一方血管周囲でIL-10の発現を認めた。35週まで生存したマウスでは、糸球体でIL-4とIL-10の発現を認め、血管周囲でIFN $\gamma$ の発現を認めた。LMD法とRT-PCR法を用い、ループモデルマウスでの腎内サイトカインバランスの解析が可能であることが判明した。糸球体病変の明らかなマウスの糸球体では従来の報告(Th1タイプの免疫反応)と一致し、この手法により腎内サイトカインバランスを正しく評価できると考えられた。また、血管炎は、糸球体腎炎とは異なる機序により惹起されている可能性が考えられた。

25. 私たちはシェーグレン症候群(SS)小唾液腺組織にはTLRが発現し、また、ヒト唾液腺細胞株にも機能性TLR発現があることを報告した。今回、初代培養唾液腺細胞のTLRシグナルを検討した。免疫組織染色で、SS小唾液腺組織の唾液腺細胞にはTLRに加え、NIK、核内NF- $\kappa$ Bやリン酸化Aktの発現が認められた。初代培養唾液腺細胞にはTLRとMyD88が発現し、TLRリガンド刺激[PGN、poly(I:C)、LPS]ではTLR3リガンドのpoly(I:C)に強く反応した。Poly(I:C)に対する反応は細胞活性化とともにアポトーシスが誘導され、poly(I:C)添加によりこれら細胞にはDNA断片化とミトコンドリア膜電位の低下が検出されるとともに、生存細胞にはCD54発現の増強が認め

られた。初代培養唾液腺細胞のpoly(I:C)誘導性アポトーシスはIKK阻害剤とPI3K阻害剤添加により顕著に増大した。細胞活性化とアポトーシスの亢進は、SS唾液腺組織唾液腺細胞の特徴であり、TLR3シグナルはその病態形成に深く関与していることが示唆された。

## E. 結論

1. CD25+CD4+T細胞をはじめとする調節性T細胞やT細胞機能異常として自己免疫疾患をとらえることの重要性が明らかになった。
2. 免疫調整分子としてのPD-1の重要性が明らかになった。
3. T細胞-B細胞相互作用やB細胞の機能分子の異常が自己抗体産生に関与することの重要性が明らかになった。
4. 抗リン脂質抗体症候群における対応抗原の解析が進展した。
5. 抗リン脂質抗体症候群や関連疾患の新しい疾患分類が詳細に検討された。
6. PM/DMの間質性肺炎に対する新しい画像評価法や治療法の可能性が示された。
7. SLEの遺伝子異常の解析が進展した。
8. SLEにおけるステロイド抵抗性と多剤耐性遺伝子の関係が明確になった。
9. SjSの組織障害の機序の解析が進展した。
10. タクロリムス、スタチン等、既存薬で自己免疫疾患の治療に使用可能なものが明らかになってきた。

### (3) 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)  
分担研究報告書

自己免疫疾患を発症する HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラットに認める  
CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>免疫制御性 T 細胞機能異常に関する研究

分担研究者 石津 明洋 北海道大学大学院医学研究科病態解析学講座分子病理学分野 講師

研究要旨

自己免疫疾患を発症する HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラット(env-pX ラット)では、疾患発症前から CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>免疫制御性 T 細胞に機能障害が認められる。同系正常ラットとの骨髄置換実験の結果から、CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞の機能障害には同細胞における env-pX 遺伝子発現が重要な役割を果たしており、胸腺での分化成熟過程の異常が直接的な原因ではないと考えられた。また、cDNA アレイやフローサイトメトリー、定量的リアルタイム RT-PCR を用いた分子解析の結果、env-pX ラット CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞では、炎症性サイトカインのシグナルを抑制する SOCS ファミリー分子の遺伝子発現が著明に低下しており、JAK/STAT シグナル伝達系が亢進していること等が明らかになった。

A. 研究目的

ヒト T 細胞白血病ウイルス HTLV-I の env-pX 遺伝子を導入したトランスジェニックラット(env-pX ラット)は、関節炎や壊死性血管炎など種々の自己免疫疾患を発症する。これまでに、本ラットにおける末梢リンパ球や胸腺の異常を示し、また、本ラットでは疾患発症前から CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>免疫制御性 T 細胞に機能障害があることを明らかにした。今年度は、env-pX ラットに認められる CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞の機能障害に関わる分子異常について解析した。

B. 研究方法

疾患未発症の env-pX ラットと同系正常 WKAH ラットの間であらかじめ骨髄置換を行い、生着後のラットから magnetic cell sorting により CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞を採取して、同細胞の機能障害の有無を検討した。また、疾患未発症の env-pX ラットおよび WKAH ラットの脾臓から CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞を採取し、同細胞の機能発現に関わる各種分子群について、cDNA アレイやフローサイトメトリー、定量的リアルタイム RT-PCR の手法を用いて比較検討を行った。

(倫理面への配慮)

北海道大学動物実験指針に基づいて行った。

C. 研究結果

- 1) 致死的放射線照射後に WKAH ラットの骨髄を移植した env-pX ラットの CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞では免疫反応抑制機能が保たれていたが、env-pX 骨髄を移植した WKAH ラットでは同細胞の機能障害が認められた。
- 2) env-pX ラットの CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞と WKAH ラットの CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞では、Foxp3 の遺伝子発現に有意差は認められなかった。
- 3) CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞の機能に関わるとされる TCR、CD28、CD45RC、ICAM-1、CD80、CD86、膜結合型 TGF $\beta$  の細胞表面における発現は env-pX ラットと WKAH ラットの違いがなかった。
- 4) cDNA アレイを用いた解析により、env-pX ラットの CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞における JAK/STAT シグナル伝達系の亢進が示唆された。
- 5) env-pX ラットの CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞では、炎症性サイトカインのシグナルを抑制する SOCS ファミリーの各遺伝子発現が著明に低下していた。



#### D. 考察

env-pX ラット CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞の機能障害には同細胞における env-pX 遺伝子発現が重要な役割を果たしており、胸腺での分化成熟過程の異常が直接的な原因ではないと考えられた。env-pX ラット CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞の機能障害には、炎症性サイトカインのシグナルを抑制する SOCS ファミリー分子の遺伝子発現の低下と JAK/STAT シグナル伝達系の亢進が関与している可能性が考えられる。今後、env-pX 遺伝子発現とこれら遺伝子の発現異常との関連性をさらに追求してゆく必要がある。

#### E. 結論

HTLV-I env-pX 遺伝子がコードする p40Tax は複数の経路を介して宿主細胞のさまざまな遺伝子転写に影響を及ぼすことが知られている。HTLV-I 感染者に限らず p40Tax の作用経路を模倣する分子異常が生じた場合、CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞に機能障害が発生し、自己免疫疾患の発症に関与する可能性が考えられる。env-pX ラットは、ヒト自己免疫疾患の発症における CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞の機能障害の意義を考えるうえで非常に有用な動物モデルである。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hayase H, Ishizu A, Ikeda H, Miyatake Y, Baba T, Higuchi M, Abe A, Tomaru U, Yoshiki T. Aberrant gene expression by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> immunoregulatory T cells in autoimmune-prone rats carrying the human T cell leukemia virus type-I gene. *Int Immunol* (in press)
2. Abe A, Ishizu A, Ikeda H, Hayase H, Tsuji T, Miyatake Y, Tsuji M, Fugo K, Sugaya T, Higuchi M, Matsuno T, Yoshiki T. Bone marrow cells carrying the env-pX transgene play a role in the

severity but not prolongation of arthritis in human T-cell leukemia virus type-I transgenic rats: a possible role of articular tissues carrying the transgene in the prolongation of arthritis. *Int J Exp Pathol* 85: 191-200, 2004.

3. Tsuchikawa T, Ikeda H, Kikuchi K, Tsuji T, Baba T, Ishizu A, Tanaka Y, Katoh H, Yoshiki T. Hematopoietic progenitor cells as possible origins of epithelial thymoma in a human T lymphocyte virus type I pX gene transgenic rat model. *Lab Invest* 84: 245-252, 2004.
4. Yamamoto Y, Ishizu A, Ikeda H, Otsuka N, Yoshiki T. Dexamethasone increased plasminogen activator inhibitor-1 expression on human umbilical vein endothelial cells: an additive effect to tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Pathobiology* 71: 295-301, 2004.
5. Miyatake Y, Ikeda H, Michimata R, Koizumi S, Ishizu A, Nishimura N, Yoshiki T. Differential modulation of gene expression among rat tissues with warm ischemia. *Exp Mol Pathol* 77: 222-230, 2004.
6. 石津明洋. 特集 II 自己免疫疾患の病態形成に関する新たな細胞・分子・遺伝子. HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラットにおける CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞機能異常と自己免疫疾患の発症. *臨床免疫* 42: 415-420, 2004.

##### 2. 学会発表

1. 石津明洋、早瀬広子、宮武由甲子、富居一範、樋口正人、阿部麻美、外丸詩野、池田仁、吉木 敬: 自己免疫疾患モデルとしての HTLV-1 env-pX 遺伝子導入ラット. 第 93 回日本病理学会総会, 札幌. *日本病理学会誌* 93: 163, 2004.
2. 早瀬広子、石津明洋、宮武由甲子、外丸詩野、池田 仁、吉木 敬: HTLV-I トランスジ

- エニックラットにおける CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell の解析. 第 93 回日本病理学会総会, 札幌. 日本病理学会誌 93: 294, 2004.
3. 馬場智久、石津明洋、宮武由甲子、外丸詩野、池田 仁、吉木 敬: HTLV-1 pX トランスジェニックラットと正常 Wistar ラットの交配種における全身性炎症性疾患の発症. 第 93 回日本病理学会総会, 札幌. 日本病理学会誌 93: 240, 2004.
  4. 宮武由甲子、外丸詩野、石津明洋、池田 仁、吉木 敬: HTLV-1 感染による HAM 感受性ラットおよび抵抗性ラットの脊髄における遺伝子発現の解析. 第 93 回日本病理学会総会, 札幌. 日本病理学会誌 93: 249, 2004.
  5. 外丸詩野、山野嘉久、石津明洋、池田 仁、吉木 敬: ペプチド/HLA 複合体の抗原特異的 T 細胞による獲得: 抗原提示の新しい増幅メカニズム. 第 93 回日本病理学会総会, 札幌. 日本病理学会誌 93: 239, 2004.
  6. 馬場智久、石津明洋、宮武由甲子、鈴木昭、外丸詩野、池田 仁、吉木 敬: HTLV-1 pX 遺伝子導入ラットと正常 Wistar ラットの交配種における胸腺異常と chronic GVHD 様疾患の発症. 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会. 札幌. 日本免疫学会総会・学術集会記録 34: 278, 2004.
  7. 宮武由甲子、池田 仁、鈴木 昭、馬場智久、道又理恵、外丸詩野、石津明洋、吉木 敬: HTLV-1 感染による HAM ラット病感受性および抵抗性は脊髄における宿主の対ウイルス反応性に依存する. 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌. 日本免疫学会総会・学術集会記録 34: 95, 2004.
  8. 外丸詩野、山野嘉久、石津明洋、吉木 敬: T 細胞による抗原提示と免疫抑制機構. 第 34 回日本免疫学会・学術集会, 札幌. 日本免疫学会総会・学術集会記録 34: 100, 2004.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得  
該当なし。
2. 実用新案登録  
該当なし。
3. その他  
該当なし。

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)  
分担研究報告書

免疫抑制受容体 PD-1 の機能不全は自己免疫遺伝素因を増強し、  
自己免疫疾患の発症を促進する

分担研究者 岡崎 拓  
京都大学大学院医学研究科21世紀 COE・分子生物学 特任助教授

### 研究要旨

昨年度までに我々は免疫抑制受容体 PD-1 の欠損マウスが C57BL/6 系統では SLE 様の腎炎・関節炎を発症し、BALB/c 系統では自己免疫性の拡張型心筋症を発症すると報告してきた。今回、PD-1 欠損マウスを I 型糖尿病のモデルマウスである NOD マウスに戻し交配したところ、I 型糖尿病の発症が大幅に促進された。このことから、PD-1 欠損はマウスの自己免疫感受性素因を増強し、自己免疫疾患の発症を促進することが明らかとなった。PD-1 ヘテロ欠損でも糖尿病発症が促進されたことから、PD-1 が発現量依存的に自己免疫疾患の発症を制御することが明らかとなり、ヒト自己免疫疾患患者での PD-1 発現量の解析の有用性が示された。また、NOD-PD-1 欠損マウスが高率に糖尿病を発症することを利用して連鎖解析を行ったところ、新規の糖尿病感受性遺伝子座 2 領域を含む 5 領域が糖尿病発症への連鎖を示した。今後、責任遺伝子が同定されれば、I 型糖尿病、及び他の自己免疫疾患の分子病態の解明につながるものと期待される。

### A.研究目的

昨年度までに我々は PD-1 欠損マウスが C57BL/6 系統では SLE 様の腎炎・関節炎を発症し、BALB/c 系統では自己免疫性の拡張型心筋症を発症すると報告してきた。系統によって異なる種類の自己免疫疾患を発症するのは、自己免疫素因が系統によって異なり、各々が PD-1 欠損によって増強されるためと考えられる。しかしその直接的な証明はなされていなかった。そこで、遺伝素因が詳細に解析されている I 型糖尿病モデルマウスである NOD マウスに PD-1 欠損を導入し、自己免疫素因と PD-1 欠損の関係を検討した。

また、PD-1 欠損を利用することにより各系統のマウスが有する自己免疫疾患感受性素因を効果的に解析できると仮説を立て、連鎖解析により NOD マウスが有する I 型糖尿病感受性遺伝子の同定を試みた。

### B.研究方法

C57BL/6-PD-1 欠損マウスを NOD マウスに戻し交配して NOD-PD-1 欠損マウスを作成し、糖尿病発症を観察した。週齢を追って病理標本を作製し、ランゲルハンス島炎、唾液腺炎の程度、及び他の臓器における自己免疫症状を評価した。

次項で記載するように NOD-PD-1 欠損マウスは高率に I 型糖尿病を発症したため、I 型糖尿病を発症しない C57BL/6-PD-1 欠損マウスと交配して、F2、及び BC1 交雑マウスを作成した。交雑マウスの遺伝子型をマイクロサテライトマーカーを用いて決定し、糖尿病発症との連鎖解析を行った。

(倫理面への配慮)

マウスの解剖は麻酔下で行い、苦痛を与え

ないよう最大限の注意を払った。

### C.研究結果

C57BL/6-PD-1 欠損マウスを NOD マウスに戻し交配して NOD-PD-1 欠損マウスを作成したところ、野生型 NOD マウスが30週齢で約50%しか発症しないのに比べ、全ての NOD-PD-1 欠損マウスが11週齢までに糖尿病を発症した。また PD-1 ヘテロ欠損マウスにおいても糖尿病の発症が促進されていた(図1)。NOD-PD-1 欠損マウスでは、ランゲルハンス島炎の増強を認め、野生型 NOD マウス同様、T 細胞による $\beta$ 細胞の破壊が糖尿病発症の原因と考えられた。一方、他臓器には自己免疫症状を認めなかったことから、当初予測した通り PD-1 欠損が遺伝素因に応じて自己免疫反応を増強したと考えられた。

そこで NOD-PD-1 欠損マウスと C57BL/6-PD-1 欠損マウスとの交雑マウスを作製して連鎖解析を行ったところ、優性に働く新規遺伝子座2領域を含む5領域が糖尿病発症への連鎖を示した。現在これらの染色体領域が糖尿病発症に与える影響を検討するために congenic マウスを作成中である。

### D.考察

PD-1 欠損マウスは C57BL/6 系統では SLE 様の腎炎・関節炎を発症し、BALB/c 系統では自己免疫性の拡張型心筋症を発症する。これまでマウスの系統によって異なる種類の自己免疫疾患を発症する原因は不明であったが、I 型糖尿病に感受性を有する NOD マウスが PD-1 欠損により早期に糖尿病を発症したことから、PD-1 欠損はマウスの自己免疫感受性素因を増強し、自己免疫疾患の発症を促進すると考えられた。これまで C57BL/6、あるいは BALB/c 系統のマウスが有する自己免疫感受性はあまり解析されていないが、各々腎炎や心筋症に罹患しやすい遺伝素因を有しているものと推察される。

またヘテロ欠損でも糖尿病の発症が促進されたことから、PD-1 が発現量依存的に自己免

疫疾患の発症を制御することが明らかとなり、ヒト自己免疫疾患患者における PD-1 発現量の測定、あるいは PD-1 の発現量・機能に影響をあたえる SNP の探索の有用性が示唆された。

野生型 NOD マウスは他の系統のマウスとの F2 交雑マウスを作成しても全く糖尿病を発症しない。そのため優性に働く糖尿病感受性遺伝子座は解析できできていなかった。今回 PD-1 欠損を利用することにより、C57BL/6 との F2 交雑マウスの約25%が糖尿病を発症したため、優性に働く糖尿病感受性遺伝子座が初めて全染色体領域について解析可能となった。今後、糖尿病発症への連鎖が示された新規染色体領域について責任遺伝子を同定し、自己免疫疾患発症制御における役割を解析する予定である。

### E.結論

I 型糖尿病のモデルマウスである NOD マウスでは、PD-1 遺伝子の欠損により糖尿病の発症が大幅に促進された。これにより PD-1 遺伝子欠損が、マウスの自己免疫素因に応じて自己免疫疾患の発症を促進することが明らかとなった。

また、I 型糖尿病の発症を優性に制御する遺伝子座を連鎖解析により2箇所同定した。PD-1 の遺伝子変異、或は新規に同定された遺伝子座がヒト I 型糖尿病、及び他の自己免疫疾患発症にも関与することが明らかとなれば、自己免疫疾患の分子病態解明に役立つと期待される。

### F.健康危険情報

該当無し

### G.研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Probst HC, McCoy K, Okazaki T, Honjo T, van den Broek M: Resting dendritic cells induce peripheral CD8(+) T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. Nat. Immunol.