

6(3): 280-286 (2005)

## 2. 学会発表

- 1) Okazaki T, Wang J, Otaka Y, Tanaka Y, Nishio R, Mitsuiye T, Mizoguchi A, Minato N, Honjo T : PD-1/PD-L system and autoimmunity. 第10回自己免疫研究会。2004年7月(東京)
- 2) 岡崎 拓、田中義正、西尾亮介、光家 保、溝口 明、湊 長博、本庶 佑: 拡張型心筋症自然発症モデルマウスが産生する自己抗体の抗原同定と、それに基づいた新規分子ターゲットの選定。第25回日本炎症・再生医学会。2004年7月(東京)
- 3) Okazaki T, Otaka Y, Wang J, Honjo T: Production of autoantibodies and autoimmune diseases in PD-1 knock-out mice. 第32回日本臨床免疫学会総会。2004年10月(東京)
- 4) 岡崎 拓、王 鍵、吉田 卓、湊 長博、本庶 佑: PD-1 欠損マウスを用いた自己免疫疾患のオリゴジェニック解析。第21回日本疾患モデル学会総会。2004年11月(京都)
- 5) Wang J, Otaka Y, Honjo T, Okazaki T: Diabetogenic T cells are strongly deviated toward Th1 in NOD-Pdcd1<sup>-/-</sup> mice. 第34回日本免疫学会学術集会。2004年12月(札幌)
- 6) 吉田 卓、王 鍵、湊 長博、本庶 佑、岡崎 拓: NOD-Pdcd1<sup>-/-</sup>マウスを用いた糖尿病感受性遺伝子の連鎖解析。第34回日本免疫学会学術集会。2004年12月(札幌)
- 7) 岡崎 拓、王 鍵、吉田 卓、湊 長博、本庶 佑: PD-1 欠損は NOD マウスにおいて Th1 細胞を活性化し、I 型糖尿病を増悪させる。第27回日本分子生物学会年会。2004年12月(神戸)

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

### 1. 特許取得

該当無し

## 2. 実用新案登録

該当無し

## 3. その他

特に無し

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患研究事業)  
分担研究報告書

CD25+CD4+T 細胞による CD4+T 細胞の増殖抑制メカニズムの解析

分担研究者 三村 俊英 埼玉医科大学リウマチ膠原病科 教授  
研究協力者 佐藤 浩二郎 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子情報伝達学 助手  
立石 晶子 東京大学医学部アレルギーリウマチ内科  
久保 かなえ 東京大学医学部アレルギーリウマチ内科  
神田 浩子 東京大学医学部アレルギーリウマチ内科助手  
山本 一彦 東京大学医学部アレルギーリウマチ内科 教授

**研究要旨**

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。

**A. 研究目的**

抑制性T細胞(Treg)が免疫応答を抑制する機構を、主として抗原提示細胞(APC)に対する影響の面から解析する。

**B. 方法**

磁気ビーズ法を用いて野生型のBALB/cマウスあるいはDO11.10トランスジェニックマウスよりCD25-CD4+T細胞(非Treg)、CD25+CD4+T細胞(Treg)を調整した。in vitroの系ではこれらの細胞を単独あるいは混合し、SCIDマウス脾細胞をAPCとして共培養し抗CD3抗体にて刺激した。(トランスジェニックマウス由来のT細胞に関しては抗体の代わりに特異的ペプチドを用いて刺激した。)培養上清中のサイトカインはELISA法により測定した。

T細胞の増殖の程度は(1)細胞数計測(2)3Hサイミジンの取り込み測定(3)CFSEにより細胞を染色し、FACSによって分裂回数を直接評価するという3種類の方法で解析した。細胞上の抗原はフローサイトメリーにより解析した。Treg, 非Tregとを区別するためMHCが共通でCD5の型が異なるBALB/c及びDBA/2マウスを利用した。またより純度の高いAPCを得るために、マウス骨髄細胞をGM-CSF存在下で培養

し樹状細胞に分化させて実験に供した。

(倫理面への配慮)東京医科歯科大学動物実験施設が定める方法に則り実験を進めた。

**C. 結果**

CD4+T細胞、APC(SCIDマウスの脾細胞)を共培養し刺激するin vitroの系において、Tregはdose dependentにサイミジンの取り込みを抑制するが、昨年までに、(1)この系で通常APCから産生されるIL-12はTregの存在により強く抑制されること、またこのIL-12の産生抑制がT細胞増殖の減弱に少なくとも部分的には関与することを報告した。(2)またこの実験系から、興味深いことに、これまでアナジーに陥っているとされ、高濃度のIL-2を外部より添加するなどしなければ増殖しないとされていたTregが、非Tregとの共培養によってIL-2依存性に増殖していることが明らかになった。(1)について、APCのIL-12産生を抑制するサイトカインであり、Tregから放出されることが報告されているIL-10の関与を検討したところ、Tregを培養系に加えた際に培養上清中にIL-10が増加していないことが判明した(Fig. 1)。またTregと非TregをCD5.1の有無で区別し、CD40Lの発現を評価したところTregは非TregのCD40L発現を抑制していることが分かり(Fig. 2)、このためAPC上の

CD40に刺激が入らないことがAPCのIL-12産生が抑制されるメカニズムの一つと考えられた。更に、APC上に発現する活性化マーカーであるB7(CD80及びCD86)の発現とTregとの関係性を評価するためにマウス骨髄細胞をGM-CSF存在下で培養し、樹状細胞を分化させた。この細胞をAPCとして用いても、TregによるIL-12産生の抑制はSCIDマウスの脾細胞をAPCとした場合と同様に観察され(Fig. 3A)、またCD80, CD86のいずれの発現もTregの存在によって抑制されていた(Fig. 3B)。

#### D. 考察

Tregの免疫抑制機序については他のT細胞に対する直接作用あるいはAPCの機能抑制の2つが考えられるが、我々のこれまでの結果はAPCからのIL-12産生を制御するという意味で後者を支持するものである。IL-12産生の低下メカニズムについては、TregがCD40Lを細胞表面に発現しないこと及びTregが非TregのCD40L発現を抑制することが挙げられる。またTregはAPC上のB7に対してCD28よりも数十倍親和性が高いとされるCTLA-4をconstitutiveに発現していることを考慮すると、APCと非Tregとの結合をTregが阻害する可能性がある。IL-12はT細胞上にIL-2受容体 $\alpha$ 鎖(CD25)を誘導し、IL-2に対する高親和性受容体を形成させることにより細胞増殖を促進する作用があるとされている。Tregは刺激前から既にCD25を発現している細胞であるためIL-12の作用を受けにくいとも考えられる。更にAPC上のB7の発現自体もTregにより抑制されることが今回確認された。今後本研究の展開としては、in vivoの実験系をこのような抑制性T細胞の作用メカニズムの研究を更に進め、IL-12やCD40L/CD40をターゲットにした分子レベルの治療実験などを行っていきたいと考えている。特に自己抗原特異的免疫現象が病態の中心を成す難治性自己免疫疾患においては、Tregの機能を高めることが自己免疫反応を終結させる可能性もあり、更なる研究は今までに類を見ない抗原特異的免疫抑制治療に結びつく可能性が期待される。

#### E. 結論

Tregの免疫抑制機序の少なくとも一部はAPCからのIL-12産生の抑制、APC上のB7の発現低下など、APCの機能抑制で説明しうる。また、これまでアナジーに陥っているとされていたTregは、活性化non-Treg依存性に増殖することが判明したが、これ

は活性化T細胞の産生するIL-2に依存していることが示された。これらの事実はAPC、Treg、non-Tregの3者の間で新しいネガティブ・フィードバックのシステムを形成していることを示唆する。今後in vivoにおいてもTregが同様の振る舞いをするかどうかについて検討が必要である。

#### F. 健康危険情報

該当する情報無し。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 1. 論文発表 (英文)

- (1) 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*. 2004 Jun 11;318(4):935-40.
- (2) Sato K, Tateishi S, Kubo K, Mimura T, Yamamoto K, Kanda H. Downregulation of IL-12 and a Novel Negative Feedback System Mediated by CD25+CD4+ T cells *Biochem Biophys Res Commun*. (in press)

- (1) 多線性自己免疫症候群 佐藤 浩二郎 臨床看護臨時増刊号 Vol. 30, No. 6, p831-834(2) CD25+CD4+T細胞によるCD4+T細胞の増殖抑制機構 佐藤浩二郎 臨床免疫 Vol. 42, No. 4, p421-426

###### 2. 学会発表

Sato K, Kanda H, Mimura T, Taniguchi T, Takayanagi H, Yamamoto K (2004) Modulated Cytokine Production from APCs and a Novel Negative Feedback System Mediated by CD25+CD4+T Cells 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS

#### 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。

Fig. 1

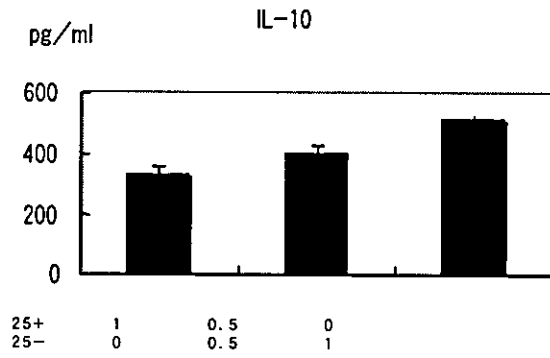


Fig. 2

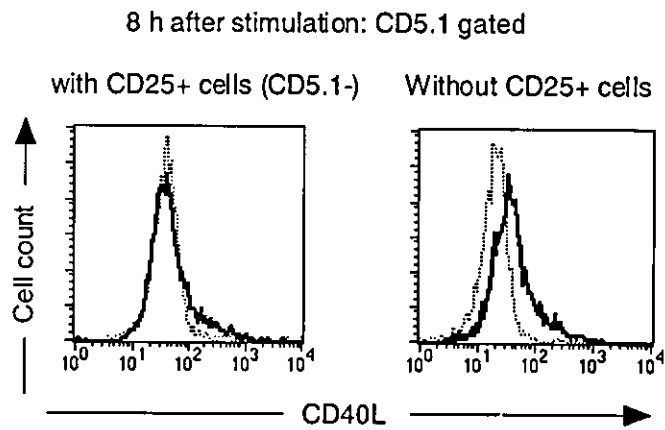
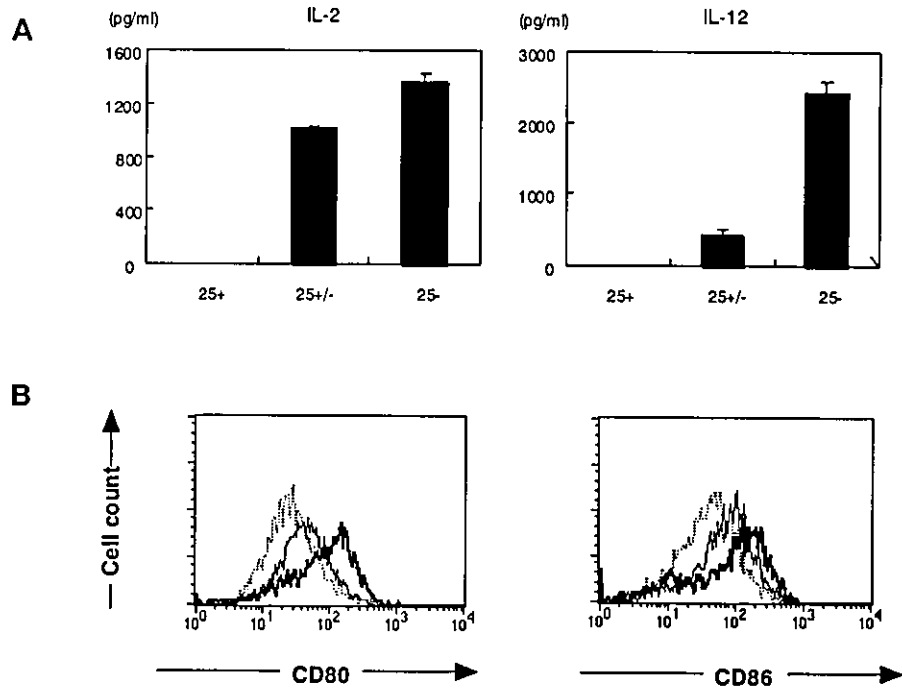


Fig. 3



免疫バランスの自己免疫病における意義

分担研究者 西村 孝司 北海道大学遺伝子病制御研究所・免疫制御分野 教授

**研究要旨**

自己免疫病の発症に Th1/Th2 バランスが重要であることはよく知られている。また、妊娠中は Th2 型に傾き、Th1 型の自己免疫疾患は症状が緩和し、逆に Th2 型の自己免疫疾患は増悪することが知られている。これには妊娠中に上昇するホルモンである progesterone が関与しているのではないかと考えられている。我々はマウスから誘導した Th1 細胞と Th2 細胞の mRNA をサブトラクション法により解析したところ、Th2 細胞のみが progesterone の代謝に関与する遺伝子を発現しており、それにより免疫バランスを調節している可能性を見出した。DO11.10 マウスの naïve Th 細胞から OVA 特異的な Th1 細胞と Th2 細胞を誘導し、P450scc と 20 $\alpha$ -HSD の発現を調べたところ、Th2 細胞でのみ発現が認められた。22R-hydroxycholesterol を加えた細胞上清中では Th2 細胞でのみ pregnenolone の産生が認められた。pregnenolone は繊維芽細胞などにより progesterone に代謝された。Th1 および Th2 細胞に高濃度の progesterone を加えて培養すると、Th1 細胞の多くは apoptosis が誘導されたが、Th2 細胞ではアポトーシスが見られなかった。また、progesterone を加えた細胞上清中の 20 $\alpha$ -hydroxyprogesterone の産生量を LC-MS で調べたところ、Th2 細胞で高い産生が見られた。さらに、naïve Th 細胞を IL-2 と抗原のみで誘導する際に progesterone を添加すると、添加しない細胞に比べて IL-4 の産生が上昇し IFN- $\gamma$  の産生が抑制、Th2 型への分化が見られた。以上のことから、Th2 細胞はステロイド代謝に関与する酵素を発現し、ホルモン代謝を利用して、Th1/Th2 バランスを Th2 に傾けることが明らかとなった。

**A.研究目的**

自己免疫病の発症には免疫バランスの破綻が関与していることが明らかにされてきている。一方、同じ患者においても性ホルモンの分泌量によって自己免疫病の重症度が異なることが報告されている。すなわち、Th1 型の自己免疫病を発症しているヒトが妊娠すると自己免疫疾患は緩和し、逆に Th2 型の自己免疫疾患は悪化する。また、男女で自己免疫疾患の発症患者数が異なることが報告されている。従って、性ホルモンと免疫バランスは密接に関与しており、お互いに影響を与えていると考えられているが、現在、ステロイドホルモンの免疫系に対する影響だけが研究されている。今回、我々はステロイド代謝酵素が Th2 細胞でのみ発現していることを見出し、その酵素の発現の意義について検討を行った。その結果、免疫細胞もまた、ステロイド代謝に影響を及ぼし、さらにそれを利用することで免疫バランスを維持していることが明らかとなり、今後の自己免疫疾患の治療に応用できるのではないかと考え、実験を行った。

**B.研究方法**

OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウスである DO11.10 マウスの脾細胞から CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> のナイーブ T 細胞を FACS Vantage により精製し、それを OVA<sub>323-335</sub> peptide, APC, IL-2 と Th1 (IL-12,

IFN- $\gamma$ , 抗 IL-4 抗体) あるいは Th2 (IL-4, 抗 IFN- $\gamma$  抗体, 抗 IL-12 抗体) 条件で Th1 と Th2 細胞を誘導した。誘導した Th1 と Th2 細胞の RNA を採取し、ノーザンブロット法により P450scc と 20 $\alpha$ -HSD の発現を調べた。細胞上清中の pregnenolone 量は RIA 法で、細胞上清中と血清中の progesterone 量は EIA 法で測定した。また、Th1 あるいは Th2 細胞に progesterone を加えたときの細胞上清中の progesterone と 20 $\alpha$ -hydroxyprogesterone の量は LC-MS にて定量を行った。Th1 と Th2 細胞に progesterone を加えたときのアポトーシスする細胞の割合については PI と annexin V で染色し FACS Caliber で解析した。Progesterone が naïve Th 細胞の Th1/Th2 分化に及ぼす影響については細胞内染色法により調べた。

(倫理面への配慮)

動物実験は北海道大学遺伝子病制御研究所の動物実験倫理指針に従って行った。

**C.研究結果**

DO11.10 マウスから誘導した Th1/Th2 細胞を mRNA のサブトラクション法により調べたところ、Th2 細胞でのみステロイド代謝、特に progesterone の代謝に関与する酵素である P450scc と 20 $\alpha$ -HSD

が発現していることを見出した。そこで、P450sccと20 $\alpha$ -HSDのmRNAの発現をノーザンブロット法で調べたところ、Th2細胞でのみ発現が見られた。また、それは抗IL-4抗体により発現が抑制されることからIL-4がそれらの発現に重要なサイトカインであることが明らかとなった。Th1あるいはTh2細胞に22R-hydroxy-cholesterolを加えると、その代謝産物であるpregnenoloneはTh2細胞の上清でのみ産生が見られた。また、Th1あるいはTh2細胞にprogesteroneを加えると、20 $\alpha$ -hydroxyprogesteroneの産生がTh2細胞でのみ確認された。また、胸腺細胞をConA刺激時にprogesteroneが存在すると増殖が抑制されるが、progesteroneを加えて4時間incubateしたTh2細胞の上清を加えると増殖の抑制が見られなくなった。これらのことから、Th2細胞で発現しているP450sccと20 $\alpha$ -HSDは機能的な酵素であることが確認された。Pregnenoloneからprogesteroneを代謝する酵素である3 $\beta$ -HSDはマウス胎児繊維芽細胞で発現が見られ、pregnenoloneを加えるとprogesteroneに代謝した。また、Th2細胞と22R-hydroxycholesterolを投与したマウスでは血清中のprogesteroneの上昇が見られたことから、cholesterolはTh2細胞とその周りのストローマ細胞によりprogesteroneに代謝されることが示唆された。さらに、Th1あるいはTh2細胞に高濃度のprogesteroneを加えると、Th1細胞はアポトーシスにより細胞死が見られたが、Th2細胞ではアポトーシスは見られなかった。これはTh2細胞が20 $\alpha$ -HSDを発現することによってprogesteroneの毒性を回避したからであると考えられる。また、naïve Th細胞にprogesteroneを加えた時にはTh2型に分化することが示された。

#### D. 考察

本実験より、免疫バランスを制御するもう一つのメカニズムが示唆された。また、P450sccと20 $\alpha$ -HSDの発現はIL-4により制御され、progesteroneはTh2分化を促進することから、妊娠中に免疫バランスがTh2型に傾くことにも関与している可能性がある。このように免疫細胞によって産生されるステロイドをimmuno-steroidと我々は呼んでいるが、免疫系と内分泌系の関係を調べるために今後重要な因子となる可能性がある。また、progesteroneは自己免疫疾患の抑制にも関与していると考えられることから、今後、病体のT細胞でのこれらの酵素の発現やprogesteroneの投与による自己免疫疾患の抑制についての検討が考えられる。近年、estrogenもTh2型に傾けることが報告されていることから、妊娠免疫を科学的に解明することによりTh1型の自己免疫疾患の発症を抑制できる可能性が考えられる。

#### E. 結論

Th2細胞はステロイド代謝酵素を発現し、progesterone代謝を利用してTh1/Th2バランスに影響を及ぼしていることが示唆された。このことは妊娠中にTh2型に傾くことにも関与している可能性が考えられ、今後さらに、ステロイドホルモンと免疫バランスの関係は自己免疫疾患発症機序の解明に重要になると考えられる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kijima, M., Saio, M., Oyang, G. F., Suwa, T., Miyauchi, R., Kojima, Y., Imai, H., Nakagawa, J., Nonaka, K., Umemura, N., Nishimura, T., Takami, T.: Natural killer cells play a role in MHC class I in vivo induction in tumor cells that are MHC negative in vitro. *Int J Oncol*, 26: 679-684, 2005.
2. Suzuki, Y., Wakita, D., Chamoto, K., Narita, Y., Tsuji, T., Takeshima, T., Gyobu, H., Kawarada, Y., Kondo, S., Akira, S., Katoh, H., Ikeda, H., Nishimura, T.: Liposome-encapsulated CpG oligodeoxynucleotides as a potent adjuvant for inducing type 1 innate immunity. *Cancer Res*, 64: 8754-8760, 2004.
3. Tsuji, T., Chamoto, K., Gyobu, H., Ikeda, H., Nishimura, T.: Application of genetically engineered tumor-specific Th1 cells to adoptive tumor immunotherapy. *Annals of Cancer Research and Therapy*, In press.
4. Matsuzaki, J., Tsuji, T., Imazeki, I., Ikeda, H., Nishimura, T.: Immunosteroid as a regulator for Th1/Th2 balance: Its possible role in autoimmune diseases. *Autoimmunity*, 2004, in press
5. Ikeda, H., Chamoto, K., Tsuji, T., Suzuki, Y., Wakita, D., Takeshima, T., Nishimura, T.: The critical role of type-1 innate and acquired immunity in tumor immunotherapy. *Cancer Sci*, 95: 697-703, 2004.
6. Hoshino, A., Tsuji, T., Matsuzaki, J., Jinushi, T., Ashino, S., Teramura, T., Chamoto, K., Tanaka, Y., Asakura, Y., Sakurai, T., Mita, Y., Takaoka, A., Nakaike, S., Takeshima, T., Ikeda, H., Nishimura, T.: STAT6-mediated signaling in Th2-dependent allergic asthma: critical role for the development of eosinophilia,

airway hyperresponsiveness and mucus hypersecretion, distinct from its role in Th2 differentiation. *Int Immunol*, 16: 1497-1505, 2004.

## 2. 学会発表

1. 西村孝司:「ワクチンでがんを闘う:免疫バランスを考慮した癌ワクチン・細胞治療への開発」、北大21世紀COE市民キャンパス・バイオとナノの融合による先端技術から先端医療への挑戦、北海道新聞社北1条館(札幌)、1/8(2005)
2. 西村孝司:「健康、環境、観光(3K)をターゲットとした地域再生へのロードマップ:免疫バランス研究の観光バイオ産業活性化への貢献」、町づくりシンポジウム、上士幌町、1/22(2005)
3. 西村孝司:「Type1/Type2免疫バランス制御を介した癌ワクチン・細胞治療の開発」北海道大学医系シンポジウム、アジュバント免疫療法100周年記念シンポジウム アジュバントによる多様な免疫活性化の分子機構、北海道大学学術交流会館大講堂、2/10(2005)
4. 茶本健司、辻武正、西村孝司:講演、個体と局所におけるTh1主導型抗腫瘍免疫応答とその重要性、第1回日本癌学会カンファレンス「癌の免疫的制御 次世代癌治療の創生を目指して」、茅野市、2/26-28(2004)
5. 脇田大功、茶本健司、成田義規、辻武正、武島嗣英、池田裕明、西村孝司:リポソーム封入CpGによるType-1免疫の選択的活性化とその癌ワクチン療法への応用、第8回基盤的癌免疫研究会総会、札幌市、7/15-16(2004)
6. 池田裕明、シュライバーロハート、西村孝司:イムノ・エディティングの分子的基盤、第8回基盤的癌免疫研究会総会、札幌市、7/15-16(2004)
7. 辻武正、大栗敬幸、茶本健司、松崎順子、東太地、新谷泰成、三好浩之、安川正貴、武島嗣英、池田裕明、西村孝司:MHC-Class I拘束性TCR遺伝子導入によるヒト癌特異的Th1細胞加工法の確立、第8回基盤的癌免疫研究会総会、札幌市、7/15-16(2004)
8. 大栗敬幸、辻武正、吉田直文、鈴木善法、阿部洋行、茶本健司、武島嗣英、池田裕明、近藤哲、西村孝司:NY-ESO-1特異的Th細胞誘導法の確立とその臨床応用の検討、第8回基盤的癌免疫研究会総会、札幌市、7/15-16(2004)
9. 茶本健司、脇田大功、成田義規、辻武正、武島嗣英、池田裕明、西村孝司:Th1細胞治療における所属リンパ節の重要性とその原発癌治療への応用、第8回基盤的癌免疫研究会総会、札幌市、7/15-16(2004)
10. 辻武正、大栗敬幸、茶本健司、松崎順子、東太地、新谷康成、三好浩之、安川正貴、武島嗣英、池田裕明、西村孝司:クラスI拘束性癌抗原特異的TCR遺伝子の導入による抗腫瘍性Th1, Tc1細胞の誘導、第63回日本癌学会学術総会、福岡国際会議場、福岡サンパレス、マリメッセ福岡、9/29-10/1、(2004)
11. 大栗敬幸、辻武正、茶本健司、武島嗣英、池田裕明、西村孝司:NY-ESO-1特異的Th細胞誘導法の確立、第63回日本癌学会学術総会、福岡国際会議場、福岡サンパレス、マリメッセ福岡、9/29-10/1、(2004)
12. 茶本健司、脇田大功、成田義規、辻武正、武島嗣英、池田裕明、西村孝司:癌のTh1細胞治療における所属リンパ節内Th1/APC相互作用の重要性、第63回日本癌学会学術総会、福岡国際会議場、福岡サンパレス、マリメッセ福岡、9/29-10/1、(2004)
13. 芦野滋、寺村崇、野口大輔、山賀聖史、地主隆文、辻武正、松崎順子、池田裕明、西村孝司:CpG-ODNのeffector phaseにおけるTh2依存的気道アレルギーの制御機構、第34回日本免疫学会総会・学術集会、ロイトン札幌、北海道厚生年金会館、ウエルシティ札幌、12/1-3(2004)
14. 張悦、松崎順子、辻武正、大栗敬幸、脇田大功、茶本健司、池田裕明、西村孝司:抗sialyl LewisX抗体によって認識されるヒトCD8+メモリーT細胞の性状、第34回日本免疫学会総会・学術集会、ロイトン札幌、北海道厚生年金会館、ウエルシティ札幌、12/1-3(2004)
15. 斉藤瑠美奈、茶本健司、松崎順子、辻武正、門脇孝、小安重夫、池田裕明、西村孝司:Th1/Th2制御の新たなシグナル伝達経路:IL-4はSTAT6非依存的、PI3K依存的にCD8陽性T細胞からのIFN- $\gamma$ 産生を誘発する、第34回日本免疫学会総会・学術集会、ロイトン札幌、北海道厚生年金会館、ウエルシティ札幌、12/1-3(2004)
16. 茶本健司、脇田大功、成田義規、斉藤瑠美奈、武島嗣英、池田裕明、西村孝司:マウス上皮性原発腫瘍によるCD4+CD25+制御性T細胞の活性化機構、第34回日本免疫学会総会・学術集会、ロイトン札幌、北海道厚生年金会館、ウエルシティ札幌、12/1-3(2004)
17. 大栗敬幸、辻景子、山岸結香、辻武正、井口剛、佐々木剛志、阿部洋行、田代弘行、池田裕明、西村孝司:Promiscuous peptideを用いたNY-ESO-1特異的Th細胞の誘導とクラスII拘束性epitopeの同定、第34回日本免疫学会総会・学術集会、ロイトン札幌、北海道厚生年金会館、ウエルシティ札幌、12/1-3(2004)
18. 西村孝司:講演「免疫バランス研究をターゲットとした医療バイオ産業の活性化」、21世紀COEプログラム「バイオとナノを融合する新生命科学拠点」、北海道バイオ産業クラスター・フォーラム事業「企業プレゼン会・研究シーズ公開会」、次世代ポストゲノム推進協議会、ホテルモントレエーデルホフ札幌、2004年2月19日
19. 西村孝司:講演「免疫バランス制御法の開発とその医薬バイオ製品開発への応用」、平成15

年度ノーステック財団「研究開発助成事業」研究成果発表会、ホテル札幌サンプラザ 2F「金枝の間」、2004年3月3日

20. 西村孝司:講演「免疫応答と免疫担当細胞」、財団法人神奈川科学技術アカデミー「免疫応答における生体防御と疾患コース」、かながわサイエンスパーク(KSP)西棟内研修室(溝の口)、2004年3月8日

21. Takashi Nishimura, Kenji Chamoto, Takemasa Tsuji:「A novel tumor cell therapy using Th1 cells: The critical role of APC/Th1 cell-cell interaction for the initiation of antitumor immunity in vivo」Tumor Antigens and Animal Models for Immunotherapy I, 2004 AACR Annual Meeting, March 27-31, 2004, Orlando, Florida.

22. 西村孝司:講演「医療バイオビジネス創出を目指した癌のテラーメイド細胞治療の開発」、先端融合研究シンポジウム、東レ株式会社先端融合研究所(神奈川県鎌倉市)、2004年5月17日

23. 西村孝司:講演「タイプ1免疫の活性化を介した癌ワクチン細胞治療」、山梨皮膚科研究会学術講演会、古名屋ホテル(山梨県甲府市)、2004年6月18日

24. 西村孝司:トピッカー輸血・移植・感染免疫学「癌の Th1 細胞治療:遺伝子改変癌特異的 Th1, Tc1 細胞加工法の確立」、第52回日本輸血学会総会、札幌コンベンションセンター、2004年6月23日-25日

25. 西村孝司:講演、抗原特異的 Th1, Th2 細胞依存的気道アレルギーの発症メカニズム、第69回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、青森県三沢市古牧温泉、7/29-31(2004)

26. 西村孝司:特別企画、Scientific seeds からベッドサイドへのロードマップ「癌のテラーメイド細胞治療開発における大学初ベンチャーの重要性」、第63回日本癌学会学術総会、福岡国際会議場、福岡サンパレス、マリンメッセ福岡、9/29-10/1、(2004)

27. 西村孝司:医療バイオ活性化を目指した癌ワクチン・細胞療法の開発ー産学官連携の重要性と問題点ー、第63回日本脳神経外科学会総会、名古屋国際会議場、10/6-8、(2004)

28. 西村孝司:フォーラム「環境化学物質と生体応答「環境因子による免疫バランスの破綻」、衛生薬学・環境トキシコロジー、千葉、10/25-26、(2004)

29. Matsuzaki, J., et. al. Immuno-steroid as a novel factor for regulation of Th1/Th2 balance: Th2-dependently produced progesterone kill Th1 cells but not Th2 cells. 12<sup>th</sup> ICI/4<sup>th</sup> FOCIS (2004)

30. Chamoto, K., et. al. Potentiation of tumor eradication by adoptive immunotherapy with T cell receptor gene-transduced T helper type 1 cells.

12<sup>th</sup> ICI/4<sup>th</sup> FOCIS (2004)

31. Nihimura, T., et. al. A novel tumor cells-therapy using T helper type 1 cells: The critical role of dendritic cell type 1/T helper type 1 cell-cell interaction for the initiation of antitumor immunity in vivo. 12<sup>th</sup> ICI/4<sup>th</sup> FOCIS (2004)

32. Tsuji, T., et. al. Generation and targeting of human tumor-specific Tc1 and Th1 cells transduced with a lentivirus containing a chimeric immunoglobulin T cell receptor. 12<sup>th</sup> ICI/4<sup>th</sup> FOCIS (2004)

33. Nishimura, T., et. al. A novel tumor cell therapy using Th1 cells: The critical role of APC/Th1 cell-cell interaction for the initiation of antitumor immunity in vivo. AACR Annual Meeting (2004)

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

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



## 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 埼玉医科大学総合医療センター第二内科  
津坂 憲政 埼玉医科大学総合医療センター第二内科

### 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・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 $\zeta$ 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 $\zeta$ 鎖蛋白合成障害に、この異常スプライシングを受けた TCR $\zeta$ 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 $\zeta$ 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 $\zeta$ 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。

### 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 $\zeta$ 鎖の蛋白発現が低下し、その mRNA に異常が存在する事を明らかにした。その生成機序を解明すると共に、どのような機構によって自己免疫現象が誘導されるのかを明らかにすることを目的とする。T 細胞機能異常の分子機序が解明されれば、より根本的で、理想的な治療薬の開発

も期待でき、診断、分子異常の部位と病態との関連、予後、遺伝性などについて、これまでにない多くの情報を得る事ができると期待される。

### B. 結果と考察

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 $\zeta$ 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) ヴァリアント TCR $\zeta$ 鎖遺伝子導入 T 細胞株の樹立：この short exon8 ヴァリアントに加え、2 例で検出されたエクソン 7 (-)の 2 種類のヴァリアント TCR ゼータメッセージが、どのような機序を介して自己免疫現象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 型あるいはヴァリアント TCR $\zeta$ 鎖遺伝子を組み込み、TCR $\zeta$ 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 3'-UTR 株は、wild TCR $\zeta$ 株に比し、TCR $\zeta$ の表面発現が有意に低下し、同時に CD 3 $\epsilon$ 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 3'-UTR 株の CD 3 $\epsilon$ 鎖は wild 株と同等であることが確認され、CD 3 $\epsilon$ 鎖の表面発現低下は TCR $\zeta$ 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 $\zeta$ 鎖 mRNA 安定性を検討したところ、short 3'-UTR 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、CD 3 $\epsilon$ 鎖の安定性は short 3'-UTR 株でむしろ亢進し、この安定性低下は TCR $\zeta$ 鎖 mRNA に特異的なものであった。

一方、exon 7 (-)ヴァリアント導入株では、wild 株に比し、より強い蛋白発現低下が、細胞質鎖ににおいても、細胞表面においても認められた。加えて、細胞質内には、14kDa の truncated 型と思われる異常バンドが検出された。この細胞株の mRNA 安定性を、アクチノマイシン処理によって検討した所、short exon 8 と同様の mRNA の不安定性が

示され、このヴァリアントにおいても、蛋白発現低下の機序の一部は、mRNA 不安定性に起因しているものと考えられた。

4) 遺伝子チップを用いたヴァリアント TCR $\zeta$ 鎖導入 T 細胞株の mRNA 発現解析：ヴァリアント型ゼータ鎖によって 2 次的に誘導され、しかも病態形成に重要な役割を果たす分子を検索するため以下の検討を行った。すなわち、TCR $\zeta$ 鎖蛋白発現低下を来した 2 つのヴァリアント・ゼータ鎖を安定して発現する T 細胞株を対象として、その遺伝子発現を、遺伝子チップによって網羅的に解析した。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、 $\beta$ 7 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

5) シンデカン-1：ヴァリアント TCR $\zeta$ 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、ゼータ鎖発現低下と逆相関することが示された。

### C. 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 $\zeta$ 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 $\zeta$ 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。

#### D.健康危険情報

特になし

#### E.研究発表

1. 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
2. Tsuzaka K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Shiraishi K, Suzuki K, Abe T, Takeuchi. A splice variant of the TCR  $\zeta$  mRNA lacking exon 7 leads to the down-regulation of TCR  $\zeta$ , the TCR/CD3 complex, and IL-2 production in SLE T cells. *J Immunol*. 174 : 3518-3525,2005
3. Takeuchi T, Tsuzaka K, Abe T, Yoshimoto K, Shiraishi K, and Amano K. T cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* in press.
4. Takeuchi T, Tsuzaka K, Kameda H, and Amano K. Therapeutic targets in misguided T cells in systemic lupus erythematosus. *Current Drug Target* in press.

#### I. 学会発表

1. 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
2. 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

3. 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 $\zeta$  mRNA observed in SLE. American College of Rheumatology, 68th Annual Meeting, San Antonio, U.S.A., October, 2004
4. Shiraishi K, Tsuzaka K, Abe T, Takeuchi T. The 5th domain of E-cadherin is a site responsible for heterophilic adhesion with  $\alpha_E\beta\gamma^+$  cells, but not for homophilic adhesion. 68th Annual Meeting, San Antonio, U.S.A., October, 2004
5. 全身性エリテマトーデス患者 T 細胞のゼータ鎖異常によって誘導される病態関連分子の検索 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
6. 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

##### 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

特になし

##### 3. その他

特になし

## 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

分担研究者 松下 祥 埼玉医科大学免疫学講座 教授

### 研究要旨

我々はこれまでに HLA 分子がペプチド抗原を提示するだけではなく、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かとなった。

### A. 研究目的

我々はこれまでに HLA 分子がペプチド抗原を提示するだけではなく、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明らかにすることを目的とした。

### B. 研究方法

#### Monocyte (Mo)-DC の誘導

健常人ボランティアの末梢血から Ficoll を用いた比重遠心法により末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell; PBMC) を分離した。さらにこの PBMCs より、CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて CD14 陽性細胞を分離した。分離した CD14 陽性細胞を 6 穴プレートに  $2 \times 10^6$  /ml になるように調整し、100 U/ml recombinant human (rh) IL-4、および 100 ng/ml rhGM-CSF (Primmune, Osaka, Japan) を加えた

10% ウシ胎児血清 (FCS, fetal calf serum) 入り RPMI1640 (SIGMA, St Louis, MO) で 5 日間培養したものを monocyte 由来樹状細胞 (Mo-DC) として用いた。

#### DC のアロ (同種異系反応) 誘導活性の評価

PBMCs より、抗ヒト CD14 マイクロビーズを用いて CD14 陽性細胞を分離し、IL-4、GM-CSF で 6 日間培養したものをモノサイト由来樹状細胞 (Mo-DC) として用いた。この細胞を回収し、DC を成熟させる刺激として  $\text{TNF}\alpha$ 、ならびに試験したいアジュバントを加えた。2 日後に培養上清を回収した後 Mo-DC を洗浄した。この培養上清については、IL-12p40, MDC, TARC, CCL-2, IL-10 などを定量した。一方、HLA-DR タイピング済みのアロ PBMCs から、negative selection 法により naive CD4T 細胞を調整した (図 1)。これを洗浄済みの Mo-DC と共培養し、MLR を誘導した。これにより、naive CD4T 細胞には Th1 または Th2 への分化圧が加わることになる。7 9 日後、分化した T 細胞に anti-CD3 と anti-CD28 で再刺激を加え、その 16 時間後に培養上清を回収した。培養上清中の IL-4, 5, 13,  $\text{IFN}\gamma$  を測定し、Th1 または

Th2 への分化を判定した。方法の全体の流れを図2に示した。

### C. 研究結果

我々は以前の研究から、通常の蛋白抗原を認識するT細胞クローンにおいてもその拘束分子（抗原提示分子）によって性質が異なっており、これは、MHC-peptide-TCR複合体が形成された際にMHCを介して抗原提示細胞内に伝えられるシグナルの差に由来することを示していた。そこで、抗HLA-DQ抗体を用いて抗原提示細胞に刺激を入れ、そのT細胞分化誘導能を観察した。予想された通り、HLA-DQ分子を介した刺激はDC2を誘導することが明らかとなった（図3）。

そこで、実際にPBMCから得られたshort-term T cell lineの拘束分子によってTh1/Th2シフトがみられるかを観察した。実際、HLA-DR拘束性クローンに比べると、HLA-DQおよびHLA-DP拘束性のT細胞クローンは明らかにTh2にシフトしたパターンを示すことが明らかとなった。

### D. 考察

マクロファージを用いた我々の以前の研究では、DRを介した刺激によりMAPK isoformのErkが強く活性化され、炎症性モノカインの誘導が強くおこること、および、DQ/DPを介した刺激によりp38が強く活性化され、抗炎症性モノカインの誘導が強くおこることが知られていた。さらにDR拘束性のT細胞クローンにはTh1寄りのものが多いのに対して、DQ/DP拘束性のクローンにはTh2寄りのものが多いことも示していた。今回の我々の研究により、この現象は、DQを介した刺激がDC分化をDC2寄りに傾けるものであることが明らかとなった。

この一連の知見は著者らが18年前に発表した免疫抑制遺伝子を細胞レベルで説明するものである。

### E. 結論

どのHLA分子によって提示される抗原であるかも、抗原提示細胞の質の決定を介してT細胞応答の質を決める要因となっていると考えられる。抗原提示分子からの刺激は、臓器特異的自己免疫疾患の制御に参与している可能性も考えられる。

### F. 健康危険情報

特記事項なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Nishimura, Y., Chen, Y-Z., Uemura, Y., Tanaka, Y., Tsukamoto, H., Kanai, T., Yokomizo, H., Yun, C., Matsuoka, T., Irie, A., and Matsushita, S. Degenerate recognition and response of human CD4+ Th cell clones: Implications for basic and applied immunology. *Mol. Immunol.* 40: 1089-1094, 2004

Ohyama, H., Kato, N., Takeuchi, K., Uemura, Y., Nishimura, F. and Matsushita, S. Monocytes of distinct clinical types of leprosy are differentially activated by crosslinking class II HLA molecules to secrete IL-12. *APMIS* 112: 271-274, 2004

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 $\gamma$  production from CD4T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113: 216-217, 2004

Matsushita, S., Ohyama, H., Kudo, H., Tabata, H. and Matsuoka, T. HLA-mediated signaling via HLA-peptide-TCR complex determines immune responses of antigen-presenting cells. *Current Topics in Peptide & Protein Research*.6: 1-20, 2004.

松下 祥：抗原特異的免疫療法。医学のあゆみ208、778-783、2004

松下 祥：免疫遺伝学、福田 健編：「総合ア

レルギー学」, 南江堂 (東京) pp52-59、2004

松下 祥: 抗原の処理と提示、烏山一編: 「免疫学イラストマップ」, 羊土社 (東京) pp72-82、2004

松下 祥: HLA による免疫応答の制御。ゲノム医学4、453-458、2004

松下 祥: Th2 応答とアジュバント。感染・炎症・免疫34: 192-198、2004

松下 祥: MHC クラス II 分子を介したシグナル伝達機構。臨床免疫42: 455-463、2004

松下 祥: Th2 アジュバント。アレルギー科18: 239-246、2004

Ohyama, H., Ogata, K., Takeuchi, K., Namisato, M., Fukutomi, Y., Nishimura, F., Naruishi, H., Ohira, T., Hashimoto, K., Liu, T., Suzuki, M., Uemura, Y., Matsushita, S. Polymorphism of the 5' flanking region of the IL-12 receptor beta2 gene partially determines the clinical types of leprosy through impaired transcriptional activity. J. Clin. Pathol. 2005, in press.

Matsushita, S., Liu, T-Y. and Uemura, Y. Adjuvants that enhance Th2 or Tr responses. Allergol. Int. 2005, in press.

松下 祥: 抗原認識、花岡炳雄編: 「臨床分子細胞生物学」, メディカルレビュー社 (東京) 印刷中、2005

成田弥生、植村靖史、松下 祥: リンパ球を用いた診断法の可能性、菊地博達編: 「悪性高熱」, 克誠堂出版 (東京)、印刷中、2005

松下 祥: T細胞シグナル伝達における HLA クラス II 分子の役割。炎症と免疫、印刷中、

2005

## 2. 学会発表

鈴木 元晴、植村 靖史、松下 祥  
ヒトインバリアント NKT 細胞サブセットにおける樹状細胞を介した免疫制御機構の解析  
日本癌学会 (福岡)、2004年9月

Liu T-Y., 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 $\gamma$  production from CD4T cells.

*American Academy of Allergy Asthma & Immunology 60<sup>TH</sup> ANNUAL MEETING MARCH, 2004*

Ohyama H., Takeuchi K., Ogata K., Namisato M., Fukutomi Y., Suzuki M., Uemura Y. Matsushita S..

The Polymorphism on the 5' Flanking Region of IL-12 Receptor  $\beta$ 2 Gene Confers the Susceptibility to Mycobacterial Infection.

*12<sup>th</sup> International Congress of Immunology and 4<sup>th</sup> Annual Conference of FOCIS July, 2004 Montreal, Canada*

松下 祥

Th2 応答とアジュバント

日本アレルギー学会 (横浜)、シンポジウム、2004年11月

劉 天懿、植村 靖史、鈴木 元晴、大山 秀樹、松下 祥

環境物質が有するヒトアレルギー誘導活性を試験管内で評価する実験系の確立

日本アレルギー学会 (横浜)、2004年11月

植村 靖史、鈴木 元晴、劉 天懿、大山 秀樹、松下 祥

ヒトインバリアント NKT 細胞サブセットの樹状細胞を介した免疫制御機構

日本アレルギー学会 (横浜)、2004年11月

鈴木 元晴、植村 靖史、劉 天懿、黄 成日、  
大山 秀樹、松下 祥  
子宮 Th2 環境の維持における脱落膜 NKT 細胞の役割  
日本アレルギー学会（横浜）、2004 年 11 月

劉 天懿、植村 靖史、鈴木 元晴、成田 弥生、  
黄 成日、大山 秀樹、松下 祥  
環境物質が有するヒトアレルギー誘導活性を  
迅速に評価する実験系の確立  
日本免疫学会（札幌）、2004 年 12 月

植村 靖史、鈴木 元晴、劉 天懿、黄 成日、  
成田 弥生、大山 秀樹、松下 祥  
ヒト V $\alpha$ 24 インバリアント NKT 細胞サブセッ  
トの樹状細胞を介した免疫制御機構  
日本免疫学会（札幌）、2004 年 12 月

鈴木 元晴、植村 靖史、劉 天懿、黄 成日、  
成田 弥生、大山 秀樹、松下 祥  
妊娠子宮 Th2 環境の維持における脱落膜  
non-invariant NKT 細胞の役割  
日本免疫学会（札幌）、2004 年 12 月

劉 天懿、植村 靖史、鈴木 元晴、大山 秀樹、  
松下 祥  
環境化学物質が有するヒトアレルギー誘導活  
性を試験管内で評価する実験系の確立  
分子予防環境医学研究会（東京）、2004 年 12  
月

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得  
特記事項なし
2. 実用新案登録  
特記事項なし
3. その他  
特記事項なし

図1

ナイーブ CD4T 細胞の分離  
MACS system (Miltenyi Biotec)

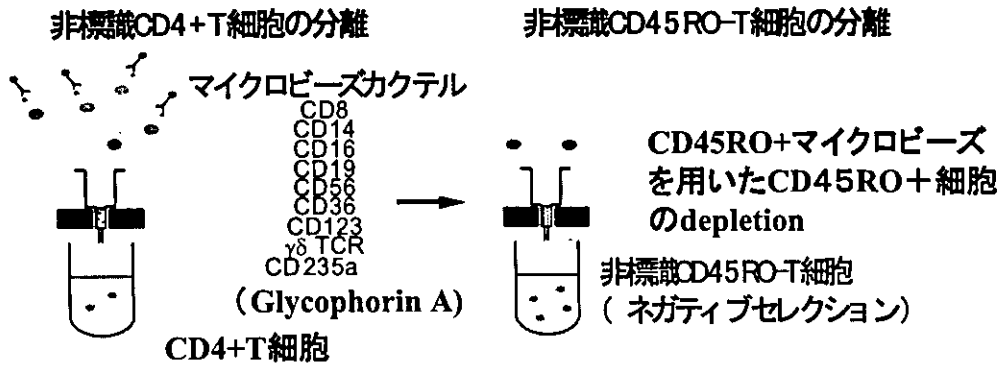


図2

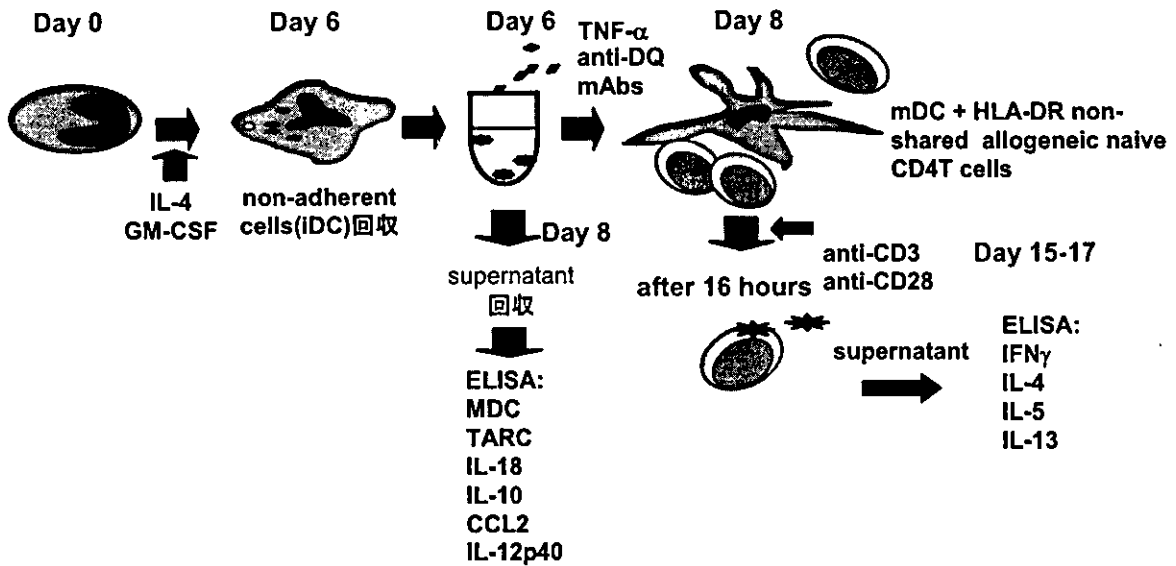
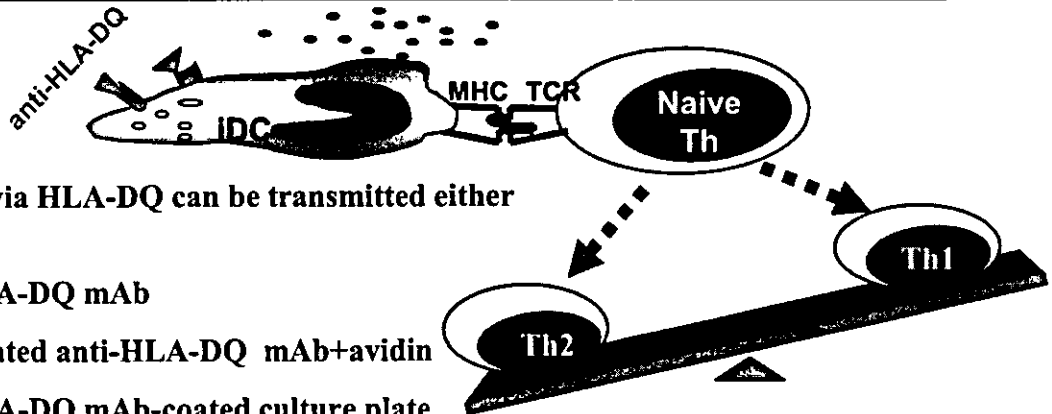


図3

DQ-restricted T-cell clones exhibited Th2-prone phenotype



Signaling via HLA-DQ can be transmitted either by

1. anti-HLA-DQ mAb
2. biotinylated anti-HLA-DQ mAb+avidin
3. anti-HLA-DQ mAb-coated culture plate
4. agarose conjugated with anti-HLA-DQ mAb
5. HLA-DQ-restricted T cell clones treated with emetine



## 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

分担研究者 鏑田武志 東京医科歯科大学大学院疾患生命科学部免疫学研究室教授

### 研究要旨

自己抗体産生制御機構を解明するために、CD40L トランスジェニックマウスにおけるBリンパ球自己トレランス異常について検索した。その結果、末梢リンパ組織においてもいくつかのトレランス機構があり、異なった制御を受けていることが明らかとなった。また、CD40L トランスジェニックマウスが自己免疫疾患患者と同様、個体の成熟と共に自己トレランスの破綻がおこるので、その機序解明のよいモデルになることが明らかとなった。

### A. 研究目的

#### A. 研究の目的

全身性エリテマトーデスなどの全身性自己免疫疾患では、自己トレランスの異常により自己抗体産生がおこると考えられる。これまで、自己反応性B細胞について種々の自己トレランスメカニズムが示されてきたが、まだ全貌は明らかではない。また、自己免疫応答は種々の自己トレランス機構の内の特定の機構の破綻によっておこるのではなく、種々の自己トレランス機構のいずれかの異常によりおこると考えられる。本研究では、自己トレランス機構の全貌を解明し、その破綻の機序を明らかにすることにより、どの自己トレランス機構の異常かを診断してその機序の修復を図る自己免疫疾患のテーラーメイド医療の開発に資することを目的とする。

### B. 研究方法

CD40LをB細胞で異所性に発現するトランスジェニック(Tg)マウスは我々の研究室で樹立した。このマウスは、糸球体腎炎や自己抗体産生などSLE様の自己免疫疾患を自然発症する。抗DNA抗体56RIgH鎖Tgマウスはプリンストン大学 Weigert

博士より供与を受けた。56RH鎖は種々のIgL鎖と会合して抗DNA抗体となる。

56R-TgマウスとCD40L-Tgマウスを交配し、56R/CD40LダブルTgマウスを作成した。

これらのマウスの自己抗体産生はELISA法で測定した。種々のB細胞亜集団の数とアポトーシスについては、脾細胞を抗B220抗体、抗CD21抗体、抗CD23抗体、抗IgM抗体、DiOC6で染色し、フローサイトメーターで解析した。また、脾臓の組織切片を抗B220抗体、抗MOMA1抗体で染色し、発色したのちに顕微鏡で観察した。

### C. 研究結果

我々は、CD40L/56RダブルTgマウスでは自己トレランスが破綻し、自己抗体の産生がおこることを示した。さらに、未熟B細胞段階でのクローン除去やクローン麻痺さらにレセプター・エディティングといったトレランスの機構については正常であるが、末梢リンパ組織でのB細胞数が56R-Tgマウスでは、自己トレランスのために減少し、この減少が56R/CD40Lでは回復することを示している。また、56Rマウスでは辺縁帯(marginal zone; MZ) B細胞の比率が増加するが、56R/CD40L-Tgマ

ウスではその増加が見られないという予備的な結果を得ていた。そこで、今回、辺縁帯 B 細胞の詳細な解析を行った。フローサイトメトリー解析により 56R-Tg マウスでは辺縁帯 B 細胞数は正常であったが、末梢 B 細胞の大部分を占める濾胞 B 細胞数が著明に現象しているため、脾臓リンパ球中での辺縁帯 B 細胞の比率が増えていることが明らかとなった。また、56R/CD40L ダブル Tg マウスでは、辺縁帯 B 細胞は正常マウスよりやや増加の傾向にあった。また、濾胞 B 細胞数が正常化していたため、脾臓細胞中での辺縁帯 B 細胞の割合が正常になっていた。また、脾臓の組織を解析し、辺縁帯の大きさを観察したところ、フローサイトメトリーの結果に一致する結果を得た。DiOC6 での染色によりアポトーシスの検索をおこなったところ、正常マウスの辺縁帯 B 細胞はアポトーシスを起こしていなかったが、56R マウス、56R/CD40L マウスともに、辺縁帯 B 細胞の 50-60% の細胞がアポトーシスを起こしていた。したがって、辺縁帯 B 細胞においても自己反応性 B 細胞の死滅がおり、自己トレランスの維持が図られるが、CD40L によってこの自己トレランスは影響を受けないことが明らかとなった。一方、移行期 B 細胞については、56R マウスでは約 60% の細胞がアポトーシスを起こしていたが、56R/CD40L マウスでは、約 30% と半減し、移行期 B 細胞での自己反応性 B 細胞の除去が CD40L によって解除されることが明らかとなった。

種々の週令のマウス血清中の自己抗体産生を検索したところ、8 週令までは、56R マウスも 56R/CD40L マウスともに自己抗体産生を認めなかったが、10 週令以降に 56R/CD40L マウスでのみ自己抗体産生を認めた。この結果から、自己抗体の産生に個体の成熟が関係することが示唆される。

#### D. 考察

辺縁帯 B 細胞の自己免疫への関与については、56R-Tg マウスなどの自己抗体 Tg マウスで辺縁帯 B 細胞の割合の増加が認められたことから、辺縁帯 B 細胞の自己免疫への関与が示唆されていた。しかし、今回、我々は、56R マウスにおいて辺縁帯 B 細胞のほとんどがアポトーシスを起こしている細胞であることを明らかにした。この結果は、辺縁帯においても自己トレランス機構が働き、自己トレランスの維持が図られていることを示している。また、CD40L の過剰発現により、移行期 B 細胞のアポトーシスは阻害されたが、辺縁帯 B 細胞のアポトーシスは阻害されないことが明らかとなった。この結果は、辺縁帯 B 細胞のトレランスが CD40L によって阻害されないことを示している。

56R/CD40L-Tg マウスにおいて、既に我々は、骨髄での未熟 B 細胞段階での、クローン除去やレセプターエディティングといったトレランス機構に異常がないことを明らかにしている。また、末梢リンパ組織においても、移行期 B 細胞での自己反応性 B 細胞の除去は異常になるが、辺縁帯 B 細胞の除去には影響がないことから、移行期 B 細胞のトレランス異常が CD40L による自己免疫の発症で重要な役割を果たすと考えられた。おそらく、移行期 B 細胞でのトレランス誘導を免れた自己反応性 B 細胞が濾胞 B 細胞に分化し、自己免疫応答に関与するものと考えられる。

自己免疫疾患では、個々の症例により異なるメカニズムにより自己抗体の産生がおこると考えられる。それぞれのメカニズムによりどのような自己抗体の産生がおこるかが明らかになると、個々の症例においてどのようなトレランス機序の異常により自己抗体の産生がおこるのかを診断し、その異常を修復するというテーラーメイド医療を開発することが可能になると予測される。このようなテーラーメイド医療の開発のためには、自己トレランス機構

の全貌の解明とその異常の診断、制御法の開発が必要である。

本研究では、個体の成熟とともに、自己抗体の産生がおこることが示されたが、ヒトの自己免疫疾患でも同様であり、興味深い。今後、個体成熟とともに自己トレランスにどのような変化がおこるのかの解析が必要であり、CD40L-Tg マウスがよいモデルとなると考えられる。

## E. 結論

辺縁帯 B 細胞においても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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Hirai, H., Adachi, T., and Tsubata, T. (2004): Involvement of cell cycle progression in survival signaling through CD40 in B lymphocyte line WEHI-231. *Cell Death Differ.* 11: 261-269.
2. Kawamura, T., Kanai, T., Dohi, T., Uraushihara, K., Totsuka, T., Iiyama, R., Taneda, C., Yamazaki, M., Nakamura, T., Higuchi, T., Aiba, Y., Tsubata, T. and Watanabe, M. (2004): Ectopic CD40 ligand expression on B cells trigger intestinal inflammation. *J. Immunol.* 172: 6388-6397.
3. Nitschke, L. and Tsubata, T. (2004): Molecular interactions regulate BCR signal

inhibition by CD22 and CD72. *Trends Immunol.* 25: 543-550

4. Tsubata, T. (2005): B cell abnormality and autoimmune disorders. *Autoimmunity* (in press)

## 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

分担研究者 桑名 正隆 慶應義塾大学医学部・先端医科学研究所 講師

### 研究要旨

昨年度までの抗リン脂質抗体症候群（APS）患者由来の $\beta_2$ -グリコプロテイン I（ $\beta_2$ GPI）反応性 CD4<sup>+</sup>T 細胞クローン株を用いた検討から、 $\beta_2$ GPI のリン脂質への結合が抗原提示細胞による抗原ペプチド発現を介して T 細胞活性化を誘導することを報告した。そこで、本年度は様々なリン脂質存在下で $\beta_2$ GPI に対する APS 患者の T 細胞および抗体の反応性を調べ、その病態における意義を追究した。抗 $\beta_2$ GPI 抗体陽性 APS5 例を対象として各種リン脂質を固相化したプレートに $\beta_2$ GPI を加えて抗体反応性を調べると、APS 血清は DOPS, BBPS, カルジオリピン, oxLig-1 を固相化した場合にのみ反応した。さらに、各種リン脂質を含むリポソームを $\beta_2$ GPI とともに自己樹状細胞に取り込ませてリコンビナント $\beta_2$ GPI で 1 回刺激した末梢血 T 細胞との反応性を調べると、いずれも DOPS, BBPS, oxLig-1 を用いた場合に IFN- $\gamma$  を産生した。抗体に認識された 4 種のリン脂質は全て $\beta_2$ GPI との結合性を有していた。したがって、APS 患者の自己抗体、自己反応性 T 細胞の $\beta_2$ GPI に対する反応性はリン脂質への結合に依存し、酸化 LDL など陰性荷電表面に結合した $\beta_2$ GPI が真の標的であ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（APS）は動静脈血栓症、不育症をきたす自己免疫疾患で、血清中には様々なリン脂質結合蛋白に対する自己抗体が検出される。抗リン脂質抗体の対応抗原として最も頻度が高いのは $\beta_2$ -グリコプロテイン I（ $\beta_2$ GPI）である。私たちはこれまで $\beta_2$ GPI を認識する CD4<sup>+</sup>T 細胞クローン株の解析から抗 $\beta_2$ GPI 抗体の産生機序を追究してきた。 $\beta_2$ GPI 反応性 T 細胞により認識される主要なエピトープはリン脂質結合ドメインを含むアミノ酸残基 276-290 番（p276-290）に存在する。ただし、このエピトープペプチドは抗原提示細胞（APC）にお

ける native な $\beta_2$ GPI 分子からのプロセッシングでは作られず、その発現には $\beta_2$ GPI の人為的な分子修飾が必要であった。 $\beta_2$ GPI がリン脂質結合ドメインを介してリン脂質と結合すると、APC でのプロセッシングにより膜表面に p276-290 が提示され、 $\beta_2$ GPI 反応性 T 細胞の活性化が誘導される。この知見は特定の T 細胞クローン株を用いた検討により得られたもので、APS 患者の *in vivo* での状態を反映していない可能性がある。そこで、本年度は様々なリン脂質存在下で $\beta_2$ GPI に対する APS 患者の自己抗体および自己反応性 T 細胞の反応性を調べ、その自己免疫応答における意義を追究した。