

200400837A

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

特定疾患対策のための免疫学的手法の 開発に関する研究班

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 住田 孝之

目次

I	構成員名簿	1
II	平成 16 年度総括研究報告	3
	主任研究者 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 住田 孝之	
III	分担研究報告	
	アナログペプチドによる抗原特異的免疫分子制御法の開発に関する研究	7
	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 住田 孝之	
	遺伝子改変マウス ES 細胞由来の樹状細胞による EAE の発症予防に関する研究	10
	熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学 西村 泰治	
	T 細胞レセプター遺伝子移入による免疫応答改変操作法の開発	12
	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	
	多発筋炎のモデルマウスの確立に関する研究	14
	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 上阪 等	
	多発性硬化症における NKT 細胞の変調と病態への関与	18
	国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 山村 隆	
	MRL/Mp- <i>Fas</i> ^{lpr} マウスにおける自己反応性 Th1 細胞ワクチネーションに関する研究 — 膠原病患者血清中における抗自己反応性 T 細胞レセプター抗体の測定 —	21
	京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学 三森 経世	
	G P I と自己抗体制御に関する研究	25
	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 松本 功	
	β 2-グリコプロテイン 1 の新たな生物学的意義：ニック β 2GPI	28
	北海道大学大学院医学研究科病態内科学講座・第二内科 小池 隆夫	

IV	研究成果の刊行に関する一覧表	35
V	平成 16 年度班会議プログラム	51
VI	研究成果刊行物・別刷	53

I 平成 16 年度構成員名簿

特定疾患対策のための免疫学的手法の開発に関する研究班

区分	氏名	所属	職名
主任研究者	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
分担研究者	山本 一彦	東京大学大学院医学系研究科内科学専攻アレルギーリウマチ学	教授
	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	"
	三森 経世	京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学	"
	西村 泰治	熊本大学大学院医学薬学研究部・免疫識別学分野	"
	山村 隆	国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第六部	部長
	上阪 等	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科膠原病・リウマチ内科学	助教授
	松本 功	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	講師
事務局	辻 奈津子	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 〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1 TEL 029-853-3221 FAX 029-853-3222	
経理事務連絡 担当者	横本 健司	筑波大学人間総合科学等支援室医学支援室会計係 TEL 029-853-3027 FAX 029-853-6309 e-mail : kyokomoto@sec.tsukuba.ac.jp	

II 平成 16 年度総括研究報告

平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

特定疾患対策のための免疫学的手法の開発に関する研究

主任研究者 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

特定疾患の多くは免疫難病であることから、本研究では免疫難病の抗原特異的治療の確立を目的とした。病因として重要な自己反応性 T 細胞の対応自己抗原の新しい解析方法の確立、T 細胞エピトープのアナログペプチドを用いた自己免疫応答の抗原特異的制御システムに関する研究が進められた。抗原提示細胞に遺伝子導入することにより T 細胞の機能を制御する基礎的研究が進展した。病因 T 細胞の抗原受容体を単細胞レベルで明らかにし再構築する技術が確立し、抗原特異的 T 細胞の人為的機能調節が期待される。TCRV α 7.2+NKT 細胞が多発性硬化症の発症と制御に関与している可能性が明らかにされた。自己抗体産生を誘導するヘルパー T 細胞のワクチネーションにより自己免疫応答が抑制されることも明らかになった。自己抗原の構造変化にともなう抗体産生の調節方法や新しいヒト疾患モデルの作成技術なども検討された。

分担研究者

- 山本一彦 東京大学大学院医学系研究科内科学専攻
アレルギーリウマチ学 教授
- 小池隆夫 北海道大学大学院医学研究科病態制御学
専攻分子病態制御学 教授
- 西村泰治 熊本大学大学院医学研究科免疫識別学
教授
- 三森経世 京都大学大学院医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
- 松本 功 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 講師

る。そのために、病因となっている自己抗原、自己反応性リンパ球の抗原受容体、抗原提示細胞上の拘束分子を検出、解析、制御する基盤技術を開発、推進すること』である。

本研究班は、特定疾患に関する横断的な免疫研究班として、平成 8 年度に山本一彦教授を主任研究者として発足し、平成 13 年度までの 6 年間に研究成果をあげてきた。昨年度から、住田が主任研究者として本研究班を継承し、これまでの研究成果をさらに発展させ基盤技術を開発することにより、免疫難病を抗原特異的に制御する実践的な治療戦略を確立する。

抗原特異的な制御方法をめざすため、自己抗原、B 細胞および T 細胞の抗原受容体、抗原提示細胞上の主要組織適合抗原（MHC）が主要なターゲット分子となる。本研究班は新しい治療開発に向けた技術・システムの開発が主目的となる横断班であるため、対象疾患は免疫難病であること以外は限定していない。

B.研究方法・C.研究結果

住田は、免疫難病の代表的疾患であるシェーグレン症候群(SS)および関節リウマチ(RA)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てきた。SS においては、HLA-DR B1*0405 陽性 SS 患者における α -アミラーゼの T 細胞エピトープ

A.研究目的

本研究班のテーマは、『免疫難病発症の分子機構について、分子免疫学的なアプローチにより解明し、サイエンスに基づく特異的治療を開発することであ

(NPF_RPWWERYQPV, AA68-80)とそのアナログペプチド NPF_RPWWVRYQPV を明らかにした。

さらに、HLA B1*0901 陽性 SS 患者においては、ムスカリン作動性アセチルコリン受容体 (M3R) の T 細胞エピトープとそのアナログペプチド、VPPGECFKQFLS EPT (222I→K) と VPPGECFIAFLSEPT (223Q→A) を明らかにした。

RA においては、HLA-DR B1*0101 陽性 RA 患者における CII の T 細胞エピトープ GKPGIAGFKGEQGPKG (AA256-271) とアナログペプチド、 GKPGIAD/AFKGEQGPKG を明らかにした。HLA-DR B1*0901 陽性 RA 患者では、GPI (AA282-301) が T 細胞エピトープの一つであることが判明した。

本年度においては、以上の選考研究を基盤として、M3R 誘導唾腺炎モデルマウス、コラーゲン誘導関節炎 (CIA) モデルマウス、GPI 誘導関節炎モデルマウスを作成し、M3R, CII, GPI のアナログペプチドによる in vivo における関節炎制御に関する研究を進めた。その結果、CIA モデルマウスにおいては、RA と同様に 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。このような動物モデルを用いた基盤研究は、SS や RA を対象とした clinical trial に進むために必要不可欠な研究課題と考えられよう。

西村班員は、樹状細胞が T 細胞に対する主要な抗原提示細胞であり免疫応答を正・負両方向に制御していることに注目した。本研究では、マウス ES 細胞に抗原遺伝子と T 細胞抑制遺伝子を導入し、in vitro で樹状細胞に分化させた ES-DC を作成し、これをマウスに先行投与することにより、自己免疫疾患の一つである実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) を抗原特異的に制御することを目的とした。すでに、マウス ES 細胞から in vitro で樹状細胞へ分化誘導する方法を確立している。本年度は、Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)p35-55 ペプチドを発現するベクター (Ii-MOG) と T 細胞抑制分子であるマウス TRAIL あるいは PD-L1 遺伝子発現ベクターを作成し用いた。これらを ES 細胞に遺伝子導入した後に樹上細胞に分化させ、マウスに先行等予後、MOGp35-55 あるいは MBP により EAE を発症させ、遺伝子導入による抑制効果を検討した。その結果、1) Ii-MOG+TRAIL および+PD-L1 遺伝子を発現した両者において MOG および MBP により誘導された EAE の発症が著明に抑制された。2) その抑制効果は抗原特異的であった。3) 免疫抑制性 T 細胞の関与について検討するために、Ii-MOG+TRAIL 発現 ES-DC を投与したマウスの脾臓 T 細胞を別のナイーブなマウスへ移入し、このレシピエントマウスにおける EAE の発症の状況を観察した。

その結果、レシピエントマウスにおいても、MOG や MBP ペプチドにより誘導される EAE の発症が抑制された。本研究により、抗原提示細胞の遺伝的改変により自己免疫疾患モデルの抗原特異的制御、その制御機構として調節性 T 細胞がかかわっている可能性を明らかにした。

山本班員は、臓器に集積した T 細胞を単細胞レベルで解析し in vitro で人工的に再構築し、新たに抑制機能を付加することにより、in vivo において免疫難病を抗原特異的に制御することを目的とした。方法は、浸潤 T 細胞の抗原受容体 (TCR) 遺伝子 (TCRV α , V β) を単細胞から単離し、感染性レトロウイルスベクターに組み込みトランスフェクタントを作成し、その抗原特異性を検定することである。本年度は、1) マウスの HIV 免疫応答モデルにおいて、抗原 P18IIIB (HIV の T 細胞エピトープの一つ) に対する CTLT 細胞クローン (TCRV α 2, V β 7) の TCR を in vitro で再構築し、in vivo において HIV に対する細胞傷害機能を確認した。2) マウス Balb/c 由来繊維細胞肉腫 CMS5 に対する CD8+T 細胞クローンを再構築し、in vivo において癌抑制効果を確認した。3) コラーゲン誘導関節炎モデルにおいて、関節局所浸潤 T 細胞を再構築しさらに可溶性 TNF 受容体 (sTNFR) 遺伝子を発現させることにより関節炎が抑制されることが明らかになった。本研究から、機能的な T 細胞の再構築が可能となり、自己免疫疾患の抗原特異的治療への応用が期待できる。

上阪班員は、特定疾患の一つである多発筋炎において、発症に係わる自己抗原を明らかにすること、マウスにおける筋炎モデルの作成を目的とした。ラットにおいて自己免疫性筋炎を誘導することがすでに判明している C 蛋白に着目しリコンビナント C 蛋白を作成した。本年度は、C57BL/6 マウスに C 蛋白を免疫して筋炎モデル (CIM) の確立に成功した。CIM の筋炎発症機構を B 細胞欠損マウス、IL-1 $\alpha\beta$ 欠損マウスを用いて解析した。その結果、CIM の発症に B 細胞は関与していないこと、IL-1 が必須であることが明らかになった。以上の研究成果から、多くのノックアウトマウスの遺伝的バックグラウンドを持つ C57BL/6 マウスを用いた筋炎モデルマウスの樹立は、筋炎発症の分子機構を解明する上で不可欠であると考えられた。

山村班員は、多発性硬化症 (MS) における NKT 細胞の機能を明らかにし、NKT 細胞を介した自己免疫応答の調節をすることを目的としている。本年度は、自己免疫疾患である多発性硬化症 (MS) において、第 2 の NKT 細胞である TCRV α 7.2J α 33+invariant T 細胞 (V α 7.2+NKT 細胞) (MR1 分子拘束) の組織分布、量的解析を行った。さらに、マウスのカウンターパートである TCRV α 19J α 33 の機能を解析す

るために B6 バックグラウンドのトランスジェニックマウスを作成し EAE の発症について検討した。結果として、1) V α 7.2+NKT 細胞は MS 末梢血、脳病変において多く検出された。2) 一方、V α 24+NKT 細胞は MS 脳局所ではほとんど検出されなかった。3) TCRV α 19J α 33 トランスジェニックマウスでは EAE は抑制された。本研究から、MS 病変の誘導、制御において V α 7.2+NKT 細胞が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。さらに、マウス TCRV α 19J α 33+NKT 細胞は EAE に対して調節性 T 細胞として機能していることが判明した。本研究から、MS 病変の誘導、制御において第二 NKT 細胞が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

三森班員は、特定疾患の代表的疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)において、自己反応性 T 細胞をワクチネーションすることにより自己抗体産生を制御することを目的とした。SLE のモデル動物である MRL/Mp-Fas lpr マウスに、ヒストンと dsDNA に反応し抗 dsDNA 抗体を産生する CD4+ $\alpha\beta$ Th1 細胞 (dna51) を放射線照射後に移入した場合、抗 dsDNA 抗体価の減少、糸球体腎炎の活動性の低下がみられた。昨年までにその抑制機序について検討し以下のことを明らかにした。1) dna51 の TCR-CDR3 領域に対する抗体産生が認められた、2) 抗 dna51 抗体は dna51 の細胞増殖反応を抑制した、3) dna51 のワクチネーションにより CD4+および CD8+細胞障害 T 細胞が誘導された。4) B 細胞の減少が認められた。本年度は、自己免疫疾患患者や正常人において、血清中の抗 dna51 抗体を測定した。その結果、SLE 患者の 44%において抗体が検出された。さらに、この抗体価は抗 DNA 抗体価や SLEDAI score と負の相関を示し、自己免疫応答を制御している自己抗体と考えられた。以上のように、T 細胞ワクチネーションや TCR-CDR3 抗体による自己反応性 T 細胞の制御機構が明らかとなり、今後、抗原特異的治療戦略の一つとして期待されよう。

松本班員は、関節炎を誘導する自己抗体の一つである抗 GPI 抗体に関して、関節炎の発症機構の解明および抗体産生の制御を目的として、関節リウマチ(RA)患者末梢血中の抗 GPI 抗体価を測定した。さらに、関節炎の制御システムを構築するために、NOD-SCID マウスやカニクイザルを用いた関節炎モデルの作成を試みた。さらに、RA における抗 GPI 抗体をヘルプする GPI 反応性 T 細胞の T 細胞エピトープ解析を行ってきた。本年度は、自己抗原 GPI に対する自己抗体の発症機序を明らかにするために、GPI 抗原に注目した。その結果、GPI 抗原には alternative splicing などによる変異ペプチドがたくさん存在することが判明した。特に GPI 抗体 RA 陽性患者においては、末梢血中の単核球に変異 GPI が

存在した。このことから、変異 GPI の存在が epitope spreading を呈して intact GPI に対する自己抗体を誘導し、最終的に関節炎を惹起する可能性が考えられた。

小池班員は、抗リン脂質抗体における主要対応抗原である、 β 2-グリコプロテイン I (β 2GPI)をプラスミンで処理したニック β 2GPI の生物学的意義を明らかにし、抗原サイドから、自己抗体産生の制御方法を確立することを目的とした。ニック β 2GPI は第 V ドメインの Lys317/Thr318 がプラスミンで切断されるため、リン脂質に対する結合能を失うことが判明している。本年度は、ニック β 2GPI の臨床的意義について検討されてきた。その結果、1)ニック β 2GPI は plasminogen 上の第 V クリングルドメインのリジンに結合し、プラスミン生成を抑制した。2)ラクナ梗塞、脳梗塞患者血中で高値であった。3) ニック β 2GPI は tPA およびフィブリンの存在下で glu-plasminogen からのプラスミン生成を有意に抑制した。本研究から、 β 2GPI が線溶系の negative feedback を担うこと、ニック β 2GPI は梗塞と関連していることが判明した。

D. 考察・E. 結論

本研究班は、免疫難病における自己免疫応答を抗原特異的に制御することを目的として、広範に応用されうる基盤技術の開発を目指している。本年度は、T 細胞の対応抗原の分子レベルでの解析とアナログペプチドによる制御、抗原提示細胞の遺伝子操作による T 細胞機能の調節、T 細胞受容体の再構築と in vivo における抗原特異的制御の検討、調節性 T 細胞やヘルパー T 細胞を用いた自己免疫応答の制御、自己抗原の構造変換、構造変異により自己抗体産生の制御に関する基盤技術の開発を進めてきた。これらは、国際的にもユニークかつエポックメイキングな発展性のある研究であり、今後は clinical trial へと発展することが期待できよう。

III 分担研究報告

アナログペプチドによる抗原特異的免疫分子制御法の開発に関する研究

主任研究者 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。シェーグレン症候群(SS)および関節リウマチ(RA)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*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。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らかとなった。本年度は、唾液腺炎、関節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

免疫難病であるシェーグレン症候群(SS)や関節リウマチ(RA)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)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(図1)。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。

2) 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INF- γ 産生で検討した(図2)。

3)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GPI 300 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(図3)。

C.結果

1)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4)。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。

2)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5)。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。

3)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6)。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。

D.考察と結論

SSにおいて、自己抗原の一つである 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

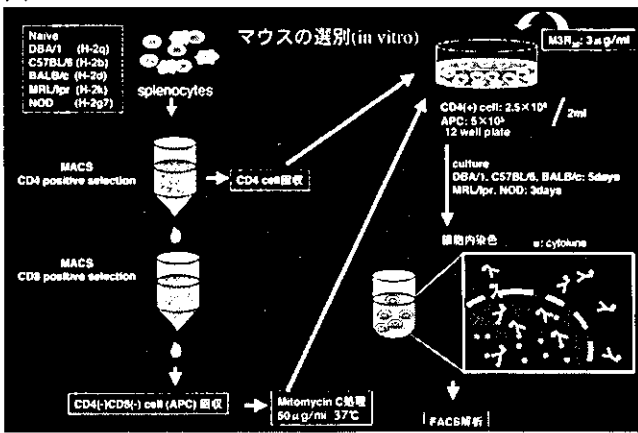
グペプチドが選定された。さらに、RAにおけるも、CIIのT細胞エピトープのアミノ酸を少し変えた変異ペプチドを作成することにより、CII反応性T細胞を抑制することができるアナログペプチドが選定された。以上の結果から、T細胞エピトープを決定し、アナログペプチドを選定することにより、免疫難病の病因T細胞を抗原特異的に制御することが現実的となってきた。本研究では、M3R誘導関節炎モデルマウス、さらにCIAやGPI誘導関節炎モデルマウスを用いてアナログペプチドの効果を検定する基盤研究を確立した。最終的には、免疫難病であるSSやRAを対象としてclinical trialを施行し、実際の治療戦略として確立することを目指す。

G.研究発表

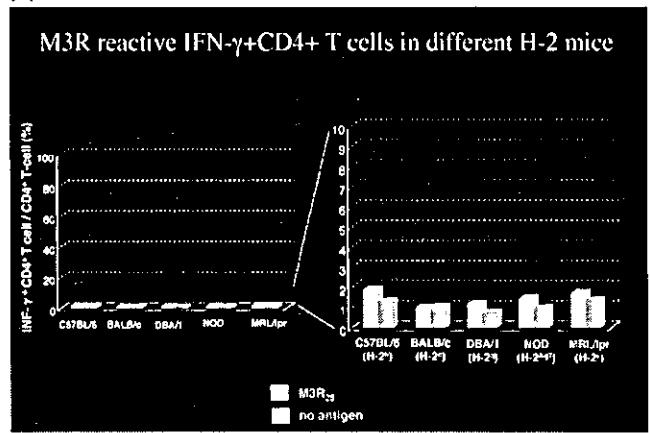
1.論文発表、

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., Shibanaka, 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. Bioph. Res. Co.* 60:1316-1324, 2004.
9. Tsutsumi, A., Adachi, Y., Murata, H., Kojo, S., Shibuya, K., Nakamura, H., and Sumida, T. GOS24, 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 and systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 31:720-725, 2004.

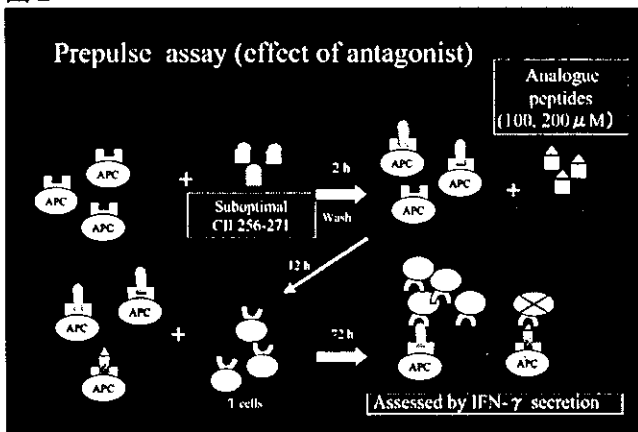
☒ 1



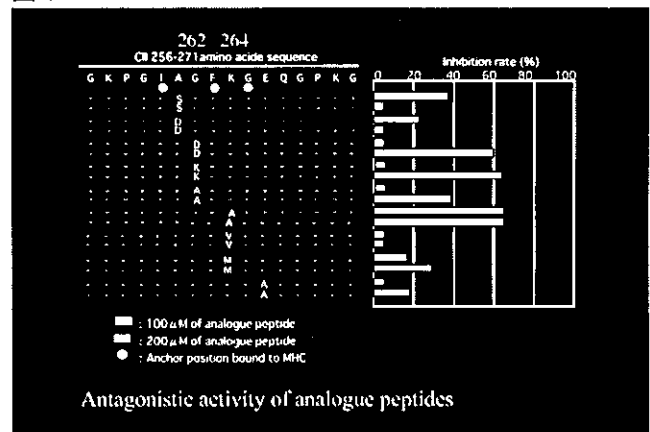
☒ 4



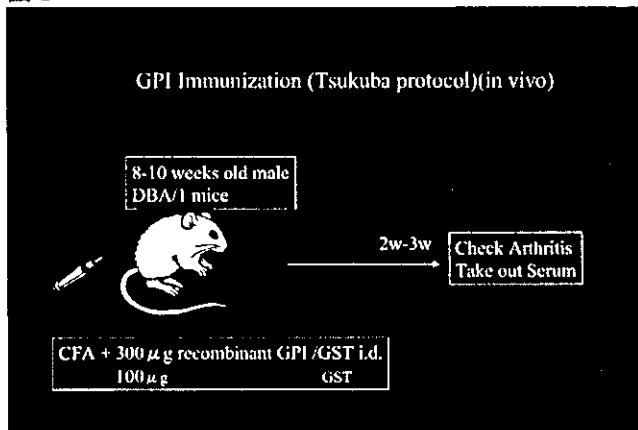
☒ 2



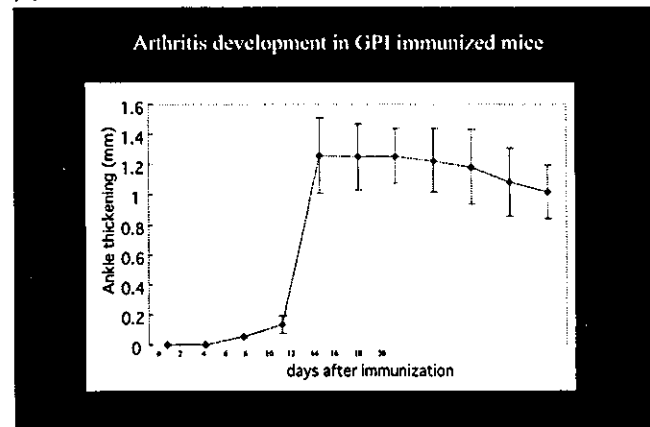
☒ 5



☒ 3



☒ 6



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

遺伝子改変マウス ES 細胞由来の樹状細胞による EAE の発症予防に関する研究

分担研究者 西村泰治 熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学 教授

研究要旨

マウス ES 細胞に MOG ペプチドと TRAIL をコードする遺伝子を導入し、これを *in vitro* で樹状細胞へ分化させた ES 細胞由来の樹状細胞 (ES-DC) を作成した。これをマウスに先行投与することにより、外来抗原に対する免疫応答を抑制することなく、MOG ペプチドだけでなく MBP ペプチドあるいは蛋白質で誘導された実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の発症を予防することができた。さらにこの抑制のメカニズムとして、免疫抑制能を有した T 細胞の誘導を介している可能性が示唆された。

A. 研究目的

自己免疫疾患や臓器移植における拒絶反応の治療において、個体の免疫応答を全身的な抑制状態に陥らせることなく、抗原特異的に抑制する手法の開発が強く求められている。

近年の免疫学研究の成果として、生体内に存在する抗原提示細胞の一種である樹状細胞が、T 細胞応答をコントロールすることを通じて、個体の免疫反応を正・負の両方向へ制御していることが明らかにされている。そして、樹状細胞による免疫制御機構により、自己に対する免疫反応が抑制され、自己免疫疾患の発症が防止されていると考えられている。申請者らは、マウスの ES 細胞を生体外において樹状細胞へ分化させる技術を開発している。さらに、ES 細胞段階で遺伝子導入を行ない、これを樹状細胞に分化させることにより、任意の遺伝子改変を行なった樹状細胞を作製する技術を開発している。この方法による遺伝子導入により免疫抑制機能を強化した樹状細胞をマウス個体へ移入することにより、この樹状細胞が発現する抗原に対して特異的に免疫寛容を誘導できることを発見している。

昨年度までの研究により、我々は、マウス ES 細胞に自己抗原遺伝子と T 細胞抑制性因子の遺伝子を導入し、*in vitro* で DC へ分化させた細胞 (ES-DC) をマウス個体へ投与して、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の発症を予防できることを示した。本年度の研究においては、このような遺伝子改変 ES-DC の投与により、治療効果が発現するメカニズムについて検討した。

B. 研究方法

MHC クラス II 分子拘束性に Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) ペプチドを効率良く T 細胞に提示させるために、ヒトインバリエント鎖の CLIP 領域を、MOG p35-55 ペプチドをコードするオリゴヌクレオチドに置換した遺伝子発現ベクター (Ii-MOG) を作製した。また、T 細胞応答抑制分子であるマウス TRAIL および PD-L1 の発現ベクターを作製した。これらの発現ベクターにおいては、プロモーターとして CAG プロモーターを、また、遺伝子導入細胞の選択に用いるマーカーとして、internal ribosomal entry site (IRES) 配列の下流に配置されたネオマイシンあるいはピューロマイシン耐性遺伝子を含んでいる。これらの発現ベクターを電気穿孔法によりマウス ES 細胞 (TT2) に導入し、選択薬剤を含む培養液中で培養することにより、高発現体を選択した。そして、これまでの研究により確立している ES 細胞から ES-DC への分化誘導法を用いることにより、これらの遺伝子改変 ES 細胞から導入遺伝子が発現する ES-DC を作製した。ES-DC における導入遺伝子の発現は、RT-PCR およびフローサイトメトリーにより確認した。

このようにして作製した遺伝子改変 ES-DC を ES 細胞と同系の (CBA x C57BL/6) F1 (CBF1) マウスの腹腔内へ先行投与し、その後に EAE を誘導するために Myelin basic protein (MBP) のペプチド、または蛋白質をアジュバントと共に免疫して EAE の発症予防効果を検討した。ES-DC を用いた治療が、外来抗原に対する通常の免疫応答能力に影響を与えていないかどうかを検討

する目的で、keyhole limpet hemocyanin (KLH) に対する免疫応答の解析も行なった。

また、免疫抑制機能を有する遺伝子改変 ES-DC の効果が、免疫応答を抑制的に制御する T 細胞の誘導あるいは活性化等を介している可能性を検討する目的で、ES-DC を投与したマウスの脾臓から T 細胞を分離し、別個体のマウスへ移入し、EAE に対する予防効果の有無を観察した。

(倫理面への配慮) 本研究は、ヒトに由来する検体等を用いた解析は含んでいない。マウスを用いた実験に際しては、熊本大学動物実験委員会の承認を得たうえで、動物愛護に十分配慮しつつ実験を行なった。

C. 研究結果

ES-DC 未投与群や Ii-MOG のみを導入した ES-DC 投与群 に比較して、Ii-MOG + PD-L1 遺伝子発現 ES-DC 投与群、および Ii-MOG + TRAIL 発現 ES-DC を先行投与した群では、MOG 誘導性の EAE が有意に抑制された。さらに、Ii-MOG + TRAIL 発現 ES-DC を投与した群では、MOG 誘導性の EAE のみならず、MBP により誘導された EAE の発症も有意に抑制された。一方、MOG や MBP とは無関係の外来抗原である KLH に対する免疫応答能力は、まったく影響を受けなかった。

免疫抑制性 T 細胞の関与について検討するために、Ii-MOG + TRAIL 発現 ES-DC を投与したマウスの脾臓 T 細胞を別のナイーブなマウスへ移入し、このレシピエントマウスにおける EAE の発症の状況を観察した。その結果、レシピエントマウスにおいても、MOG や MBP ペプチドにより誘導される EAE の発症が抑制された。

D. 考察

Ii-MOG + TRAIL 発現 ES-DC を先行投与した群で、MOG 誘導性のみでなく MBP により誘導された EAE の発症も有意に抑制されたことは、遺伝子改変 ES-DC の投与により、免疫応答を抑制的に制御する機能を有した T 細胞を誘導できる可能性を示している。さらに、Ii-MOG + TRAIL 発現 ES-DC を投与したマウスの脾臓 T 細胞を別のマウスへ移入した場合に、レシピエントマウスにおいても EAE 発症抑制効果が見られたことは、この可能性を強く支持するものである。

免疫応答を抑制する機能を有する T 細胞については、近年、多くの研究がなされており、制御性 T 細胞 (Treg)、IL-10 産生性 T 細胞 (Tr-1)、Th2 細胞等が知られている。今後の研究により、我々が観察している現象が、これらのいずれかの

抑制性 T 細胞によるものであるのか、あるいは、未知の免疫抑制性 T 細胞によるものであるのかを、明らかにしていきたいと考えている。

E. 結論

自己抗原と TRAIL の遺伝子を導入して発現させた ES-DC の先行投与により、自己抗原特異的に活性化され、抗原非特異的に免疫抑制能を発現する抑制性 T 細胞の誘導を介して、自己免疫疾患の発症が抑制される可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特にない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hirata, S., Senju, S., Matsuyoshi, H., Fukuma, D., Uemura, Y., and Nishimura, Y. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by transfer of ES cell-derived dendritic cells expressing MOG peptide along with TRAIL or PD-L1. *J Immunol.* 174: 1888-1897, 2005.

2. 学会発表

2004 年日本免疫学会学術集会、12 月 1 日～3 日 (札幌)

- ・自己抗原と TRAIL を共発現する樹状細胞は抑制性 T 細胞を誘導して自己免疫疾患を抑制する：平田真哉、千住覚、松吉秀武、福岡大喜、植村靖史、西村泰治
- ・カニクイザル ES 細胞からの樹状細胞分化誘導法の確立：千住覚、松吉秀武、平田真哉、植村靖史、CHEN Yu-Zhen、福岡大喜、西村泰治

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願

発明の名称：霊長類動物胚性幹細胞から樹状細胞の製造方法

出願日：2004 年 8 月 27 日

出願番号：特願 2004-249062

発明者：千住 覚、西村泰治

出願者：千住 覚、田辺製薬株式会社

T細胞レセプター遺伝子移入による免疫応答改変操作法の開発

分担研究者 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, 荒木靖人, 岡本明子, Yu Long 東京大学医学部アレルギーリウマチ内科

研究要旨

自己免疫疾患、癌、感染症などの病変に浸潤しているT細胞に注目し、クロナリティを解析することで、その病態における抗原特異的T細胞クローンを推定できることが判明した。そこで、このようにして同定したT細胞クローンについて、まず、生体内から採取した直後の単一細胞から、2つのT細胞レセプター遺伝子をクローニングする技術を確認した。さらにこれらの遺伝子を通常のリンパ球に遺伝子導入することで、抗原特異的T細胞を試験管内で再構築することに成功した。このようにして作成した改変T細胞は試験管内だけでなく、生体内でもその機能を発揮出来ることが判明した。本年度は特にMHCテトラマー陽性細胞のシングルセルから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。このような技術を確認することで、抗原特異的免疫応答操作が可能で新しい方法が確立できると考える。

A. 研究目的

自己免疫疾患や感染症、癌などの免疫が関係する疾病において、患者の生体内で活性化し集積している抗原特異的T細胞の免疫応答をリアルタイムでとらえ、その1つのクローンで発現しているT細胞レセプターの遺伝子情報を獲得し、効率良くリンパ球に遺伝子導入する技術を中心とした、抗原特異的T細胞再構築システムを構築することによる新たな治療法の開発を目的として研究を進めた。

B. 研究方法

本研究では、すでに確立しているT細胞クロナリティ検出法を用いて、自己免疫疾患、感染症、癌などの免疫難病患者末梢血やモデル動物の脾細胞・病変局所に集積している抗原特異的T細胞クローンの状況を、そこから採取した少量のRNAから把握した上で、重要と考えられるクローンについて、その一つの細胞で使われているT細胞レセプターの α 鎖、 β 鎖の両方の塩基配列の全情報を得る技術と、それらを自らのリンパ球に遺伝子導入し抗原特異性を再構築すると同時に、サイトカインなど期待される機能遺伝子も導入できるベクターシステムを確立することを目指している。

生体内の一つの細胞から2つの異なる遺伝子情報を獲得する方法に関しては、単一細胞分離法を中心とした技術を確認しつつある。特に本年はMHC-抗原テトラマーを用いて、抗原特異的T細胞の単一細胞よりTCR遺伝子がクローニング可能であるか否かを検討した。一方、レトロウイルスを用いたT細胞レセプターの遺伝子導入に関しては、我々のチームは既に、2つのベクターに別々に組み込んだcDNAを用いて、通常のマウス脾細胞に遺伝子導入し、内因性のT細胞

レセプターの発現にうち勝ち40%以上の高率で両遺伝子を発現させ、さらに試験管内および生体内で機能を発現させることに成功している。これらの方法をさらに発展させ、全体として生体内の情報だけから抗原特異的機能性T細胞を再構築するシステムの確立と治療実験への応用を目指した。

（倫理面への配慮）

動物モデルのレベルの実験であり、実験動物に対する動物愛護上の配慮に基づいて実験を遂行したことから倫理面では問題ないと判断される。

C. 研究結果

具体的な例として、昨年度はマウスのHIV感染モデル、コラーゲン誘発関節炎の病変局所から分離した単一細胞から、 α 、 β 鎖のT細胞レセプターcDNAをクローニングすることに成功した。本年度は、CMS5腫瘍を摂取したBALB/cマウスの腫瘍浸潤リンパ球の中から、既に腫瘍抗原として同定されているERK2の突然変異ペプチドを結合したPE標識MHCテトラマー陽性細胞をセルソーターで分離し、昨年と同様に α 、 β 鎖のT細胞レセプターcDNAをクローニングした。次にこれらを別々のレトロウイルスベクターにクローニングし、パッケージング細胞に導入後、脾臓細胞に遺伝子導入したところ、CMS5腫瘍に対して特異的な細胞傷害活性を発揮した。現在、生体内での抗腫瘍効果を検討中である。

D. 考察 E. 結論

以上の結果から、我々が目指しているT細胞レセプターの試験管内機能再構築が基本的に可能であることが示された。これらの方法は病態の解析に有用な手段

を提供するだけでなく、抗原特異的な免疫応答制御への応用が可能と考える。

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.
5. Ikura M, Ebisawa M, Yamaguchi M, Tachimoto H, Ohta K, Yamamoto K, Hirai K. Transendothelial migration of human basophils. *J Immunol*. 173:5189-5195, 2004.
6. 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.
7. Yamada R, Tokuhira S, Chang X, Yamamoto K. SLC22A4 and RUNX1: identification of RA susceptible genes. *J Mol Med*. 82:558-564, 2004.
8. 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.
9. Setoguchi K, Masaki 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 1, a cartilage-derived angiogenesis inhibitory factor. *Arthritis Rheum*. 50:828-839, 2004.
10. Kobari Y, Masaki 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

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

多発筋炎のモデルマウスの確立に関する研究

分担研究者 上阪 等 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 助教授

研究要旨 【目的】我々の研究の目的は、特定疾患の一つ多発性筋炎(PM)のモデルマウスを作成して、副作用が少なく効果的な治療法を開発することである。今回、我々は、純化抗原として組換えヒト C 蛋白を用いて、筋線維が自然壊死する SJL/J でのみ作成される従来の PM マウスモデルに代え、遺伝学的研究の容易な C57BL/6(B6)で新規モデルを確立し、PM の病態を解明する。【方法】組換えヒト骨格筋 C 蛋白を作成し、CFA ないし百日咳毒素(PT)と共にマウスに 1 回免疫した。筋炎について組織学的な評価を行い、血清中自己抗体の検索を行った。【結果】組換え C 蛋白を免疫した群は、単核球浸潤と筋線維の壊死像が認められ、PM と同様の筋炎像が確認された。PM では CD8T 細胞が病態に関与していることが報告されているが、C 蛋白誘導筋炎(CIM)では、CD8T 細胞は、内鞘の炎症細胞浸潤が認められる病変のうち筋線維が未壊死の部位に、筋壊死部位や周鞘に比較して多く浸潤していた。パーフォリン陽性細胞も CD8T 細胞と同様の分布を示した。筋壊死部位では CD11b 陽性のマクロファージの浸潤が主体で、その周囲には CD4T 細胞と少数の CD8T 細胞や B 細胞が認められた。液性免疫の関与を検討したところ、抗 C 蛋白抗体を認めたが、B 細胞欠損マウスでも同様に CIM を発症した。PM では IL-1 の病態への関与が報告されているが、CIM でも、IL-1 α 陽性細胞が多く浸潤しており、IL-1 $\alpha\beta$ 欠損マウスで筋炎の発症が抑制された。【結論】B6 で PM に近い動物モデルが作成できた。PM 同様に CD8T 細胞が筋炎発症に関与している可能性が示唆された。また遺伝学的解析では、CIM は液性免疫の関与なく発症しうること、IL-1 が CIM 発症に重要であることが示された。今後、モデルマウスで病態を解明することで、筋炎病態の理解や治療法開発に役立つものと期待される。

A. 研究目的

我々の研究の目的は、特定疾患の一つ多発性筋炎のモデルマウスを作成して、病態を解析し、副作用が少なく効果的な治療法を開発することである。しかし、ヒト多発性筋炎(PM)は、関節リウマチ、多発性硬化症、I 型糖尿病などと比較して、病態の解析や治療法が開発が遅れてきた。その大きな原因の 1 つとして、既存の筋炎のモデルマウスでは遺伝学的解析が困難であったことが挙げられる。

既存の筋炎のモデルマウスの大部分は、SJL/J マウスにミオシン粗精製物や精製ミオシンを免疫して作成されてきた。しかし、SJL/J マウスは、ヒト筋ジストロフィーの責任遺伝子である

dysferlin 遺伝子を欠損しており、6 ヶ月程度から筋線維が自然に変性、壊死し、二次性に単核球浸潤を伴った筋線維の壊死像が出現することが分かり、病態解明や治療法の開発には不相当と認識されてきている。そこで、今後、非 SJL/J マウスのうち、遺伝学的解析が容易なマウスで筋炎モデルマウスを作成することが重要と考えられる。ところが、非 SJL/J マウスを使用した筋炎モデルに関する過去の報告では、ミオシン粗精製物を免疫したが、筋炎を発症しにくかったとされている。ラットでは、ミオシン粗精製物中の C 蛋白が、ミオシンよりも少量でより重症度の高い筋炎を発症させることが報告されている。そこで、今回、我々は、純化抗原として、組換えヒト C 蛋白を用

いて、遺伝学的解析が容易なマウスで筋炎のモデルマウス作成し、遺伝学的解析を含めた病態の評価を行った。

B. 研究方法

ヒト骨格筋から RNA を抽出して、RT-PCR により骨格筋 C 蛋白 cDNA をクローニングした。骨格筋 C 蛋白は分子量が大きいので、4 分割して大腸菌に発現させ、フラグメント 1-4 の組換え C 蛋白を作成した。アミノ酸配列はフラグメント 1(fr1) 1-290, フラグメント 2(fr2) 284-580, フラグメント 3(fr3) 567-877, フラグメント 4(fr4) 864-1142。これらのフラグメントを、CFA と共に、C57BL/6 マウスないし B 細胞欠損マウスである μ MT 欠損 B6 マウス、IL-1 欠損 B6 マウスに、1 回免疫した。同時に百日咳毒素(PT)の腹腔内投与も行った。筋炎発症の評価は、大腿四頭筋と大腿屈筋について組織学的検索を行った。筋炎の評価は、筋炎を発症したマウスの頻度、組織学的に筋炎が確認されたブロックの頻度、組織学的スコアでおこなった。組織学的スコアは、Grade1 1-4 の筋線維に炎症が存在、Grade2 5-30 の筋線維に炎症が存在、Grade3 筋束全体に炎症が存在、複数の病変がある場合 +0.5。

とした。さらに、免疫染色により CD8, CD4, CD11b, B220, パーフォリン, IL-1 α , TNF- α , C3 陽性細胞の検討を行った。また、fr1-4 について SDS-PAGE を行い、マウス血清を用いて、ウェスタンブロット法により抗 C 蛋白抗体を検索した。

(倫理面への配慮)

本研究では、検体の起源の匿名性に配慮して実験を実施した。また、動物実験に関しては、東京医科歯科大学動物実験の基本指針に従い、動物福祉の観点からも適切な処置を行なった。

C. 研究結果

今回作成した筋炎のモデルマウスを C 蛋白誘導筋炎(CIA)と名付けた。fr1-4 を別々に免疫し、21 日目に、CIM 発症の程度を HE 染色で組織学的に評価したところ、fr2 を免疫したマウスで筋炎の発

症が確認された。PM では筋線維の壊死像と内鞘主体の単核球浸潤を認めるが、CIM においても、従来の PM のマウスモデル同様、PM に類似した組織像が認められた。CFA と PT のみを投与した群では、筋炎像は認められなかった。fr1-4 の筋炎惹起性を比較したところ、fr2 を免疫したマウスでは、fr1, 3, 4 に比較して、CIM を発症した頻度、組織学的に筋炎が確認されたブロックの頻度が多く、組織学的なスコアは有意に高かった。そこで以後 fr2 を免疫して CIM を作成した。

初めに、筋炎の時間経過をみるため、fr2 を 1 回免疫後 7, 14, 21, 28, 35, 49, 63 日目に組織学的検索を行ったところ、7 日目より、周鞘の血管周囲と内鞘に軽度の炎症細胞浸潤が観察されるようになり、14 日目-21 日目に複数の筋線維に及ぶ炎症細胞浸潤と筋線維の壊死像が認められた。28 日目には組織学的スコアは低下し、49 日目には筋炎はほぼ治癒し、63 日目には筋炎は観察されなかった。以上より CIM は 14-21 日目をピークに自然軽快するモデルであることが分かった。

PM では、CD8T 細胞は周鞘よりも内鞘の未壊死筋線維周囲に主に浸潤しており、筋線維に向かってパーフォリンを放出していることが報告されている。CIM で免疫染色により CD8T 細胞, CD4T 細胞, B 細胞, マクロファージの局在を検討したところ、内鞘の炎症細胞浸潤が認められる病変のうち筋線維が壊死していない部位で、筋壊死部位や周鞘に比較して、CD8T 細胞の浸潤が多く認められた。また、パーフォリン陽性細胞も CD8T 細胞と同様の分布を示した。筋線維がすでに壊死している部位では、再生線維がすでに出現してきており、壊死部位には CD11b 陽性のマクロファージの浸潤が主体に認められ、その周囲には CD4T 細胞と少数の CD8T 細胞, B 細胞が認められた。周鞘でも CD4T 細胞ヒマクロファージの浸潤が主体であった。

次に、CIM で液性免疫が病態に関与しているかを検討した。マウス血清中の抗 C 蛋白抗体を検索するため、fr1-4 について SDS-PAGE を行い、fr2 を免疫して 21 日目の血清でウェスタンブロットングを施行したところ、fr2 に対する自己抗体

が確認された。しかし、B cell deficient mice である μ MT 欠損 B6 マウスと Wild type mice で筋炎惹起性を比較したところ、両者に有意差は認められなかった。

最後に炎症性サイトカインの筋炎発症への関与について検討した。PM で生検組織を免疫染色で検討した報告によると、IL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α 陽性炎症細胞浸潤や IL-1 α 陽性の血管内皮細胞が認められ、病態への関与が報告されている。そこで、CIM で IL-1、TNF- α が関与しているかを検討することとした。CIM の組織について免疫染色により IL-1 α 、TNF- α 陽性細胞について検討したところ、筋炎病変部のうち筋線維が未壊死の部位を主体に、IL-1 α 、TNF- α 陽性細胞が多く浸潤していた。さらに、IL-1 α 欠損マウスと Wild type mice で筋炎惹起性を比較したところ、IL-1 α 欠損マウスで筋炎の発症が抑制された。今後 TNF- α 欠損マウスについても検討を予定している。

D. 考察

既存の多発性筋炎のモデルマウスでは遺伝学的解析が困難であったため、多発性筋炎の病態の解析や治療の開発が遅れてきたと考えられるが、今回、遺伝学的解析の容易な C57BL/6 マウスで、1 回の免疫で速やかに発症させることができる新規モデルマウス CIM を確立することができた。CIM の組織像は、炎症細胞浸潤が筋束内の内鞘主体に認められ筋線維の壊死、再生像が観察されており、既存の PM マウスモデル同様に、PM に類似した組織所見であった。通常の方法でミオシン粗製物を免疫した系では、C57BL/6 マウスは筋炎を発症しにくいとされているが、組換え C 蛋白 fr2 の抗原性は高かった。

PM では、CD8T 細胞が周鞘よりも内鞘の未壊死筋線維周囲に主に浸潤しており、CD8T 細胞が筋線維に向かってパーフォリンを放出していることが報告されている。また、以前われわれは、PM 患者末梢血中では CD8T 細胞がクローン性に増多しており、細胞傷害性 CD8T 細胞が PM の病態の中心にある可能性を示した。CIM は、組織全体を見ると、CD8T 細胞よりマクロファージ・CD4T 細胞

のほうが絶対数は多いが、CD8T 細胞・パーフォリン陽性細胞が、内鞘の筋炎病変のうち筋線維未壊死部位に相対的に多く認められることは、ヒト PM 同様、CD8T 細胞による筋線維の傷害が病態の中心にある可能性が示唆された。

PM では筋炎発症のメカニズムとして、T 細胞が病態の中心であることが報告されてきているが、液性免疫が筋炎発症にどの程度関与しているかは不明である。CIM において遺伝学的解析により液性免疫が関与しているのか検討したところ、抗 C 蛋白抗体が産生されていたが、B cell deficient mice でも CIM を発症することから、CIM は B 細胞、抗体の関与なく発症しうることが示された。

PM では、筋生検により得られた組織を免疫染色で検討することにより、IL-1、TNF- α 、IL-15 などが病態に関与していることが報告されている。しかし、PM で、これらの炎症性サイトカインが筋炎の病態に中心的な役割を示しているのかを直接証明することは難しい。今回、我々は IL-1 について遺伝学的解析を行うことで、初めて筋炎の発症に IL-1 が関与していることを示すことができた。今後 IL-1 を標的とした治療の開発が期待される。

CIM でこのような遺伝学的解析を行うことで、筋炎の病態について新しい知見を得ることが出来、新しい治療法の開発に繋がることを期待される。

E. 結論

組換え C 蛋白フラグメント 2 を C57BL/6 マウスに免疫して、新たな多発性筋炎のモデルマウスを確立することが出来た。この筋炎モデルは、簡便な手技で、速やかに発症させることが出来、しかも遺伝子改変マウスを使用した解析が可能であるという特長がある。今回、IL-1 が、筋炎の発症に関与しており、筋炎治療における新たな標的となることを示した。今後、このモデルを用いて筋炎病態の理解や治療法開発が飛躍的に進むことが期待される。

F. 健康危険情報