

免疫制御性分子発現多機能ウイルスベクターを用いた疾患特異的免疫制御法の開発
に関する研究

分担研究者 三森 経世（京都大学大学院医学研究科臨床免疫学・教授）

研究研究者 臼井 崇（京都大学大学院医学研究科臨床免疫学・助手）

研究要旨 関節リウマチを始めとする自己免疫疾患に対する治療は、副腎皮質ホルモンや免疫抑制剤の全身投与という疾患非特異的な治療法に頼らざるをえない。我々は疾患特異的に作用する新規免疫制御戦略を確立するため、免疫制御性遺伝子を発現する抗原特異的 CD4⁺ T細胞を用いた細胞移入療法の可能性について type II コラーゲン誘導関節炎（CIA）モデルマウスを用いて検討した。試験管内で type II コラーゲン特異的な CD4⁺ T細胞を樹立し、活性型 TGF-beta 発現レトロウイルスを感染させた後、CIA 誘導したマウス腹腔内に細胞移入することにより関節炎の発症のみならず、治療効果をも認めた。さらに、活性型 TGF-beta 発現 CD4⁺ T細胞では同時に IL-10 産生が著明に誘導されていることが判明し、本方法により病原性を有するエフェクターCD4⁺ T細胞を、Tr1 細胞に人工的に変換できることが示唆された。関節リウマチ患者においても type II コラーゲンに対する自己抗体、およびそれに反応する特異的 CD4⁺ T細胞の存在が報告されており、type II コラーゲンを含め罹患関節局所で提示されている特異的な抗原に対する特異的 CD4⁺ T細胞を樹立できれば、本方法を臨床応用する事は不可能ではないと考えられた。

A. 研究目的

現在、関節リウマチを始めとする自己免疫疾患に対する治療は、副腎皮質ホルモンや免疫抑制剤の全身投与に頼らざるをえない。これらの治療法はいずれも疾患非特異的・臓器非特異的な治療法ばかりであり、その薬理効果は全身の副作用となって現れる。本研究の目的は、より確実な効果を保ちつつ、疾患・病勢あるいは臓器特異的に作用する副作用の少ない新規免疫制御戦略を確立することである。その一つの方法として、免疫制御性遺伝子を発現する抗原特異的 CD4⁺ T細胞を用いた細胞移入療法の可能性について解析・検討することにした。我々は、まず Th1 反応過剰が病態の中心であり、膠原病の中で最も頻度が高い関節リウマチに対する新規治療戦略の構築に集中している。特に新しい遺伝子治療のひとつとして、ウイルスベクターを用いて獲得免疫制御性遺伝子を試験管内で抗原特異的エフェクターCD4⁺ T細胞に導入した後、体内に戻すという細胞移入療法の有効性を検証するため、まず type II コラーゲン誘導関節炎

（CIA）モデルマウスを用いて検討した。免疫制御性物質の候補としては、我々がこれまで詳細にその高い免疫抑制効果について検討を加えてきた、遺伝子改変により作成された活性型 TGF-beta に加え、潜在型 TGF-beta および従来より免疫制御作用を有するサイトカインとして良く知られている IL-10 を中心に解析を行った。

B. 研究方法

- 1) Type II コラーゲンで免疫した DBA1J マウスの所属リンパ節および脾臓より CD4⁺ T細胞を磁気ビーズで分離し、in-vitro でポリクローナルな刺激下に活性型 TGF-beta 発現レトロウイルスを高率に感染させ、IL-2 により維持・増殖させたのち、CIA 誘導後の DBA1J マウス腹腔内に細胞移入にし、関節炎の程度を定量的に評価した。またコントロールとして mock および潜在型 TGF-beta、IL-10 をレトロウイルスを用いて CD4⁺ T細胞に発現させた後、細胞移入した。
- 2) Type II コラーゲンで免疫した DBA1J マウスの所属リンパ節より CD4⁺ T細胞を分離し、

in-vitro で特異抗原である type II コラーゲンと抗原提示細胞を用いて刺激し、活性型 TGF-beta 発現レトロウイルスを感染させ、感染細胞を磁気ビーズにて分離後、特異抗原刺激サイクルを数回繰り返す、より type II コラーゲン特異的な CD4⁺ T 細胞集団になったことを確認後、CIA 誘導後の DBA1J マウス腹腔内に細胞移入し、関節炎の程度を定量的に評価した。

3) 上記 2) の方法で作成された細胞を、関節炎誘導後 56 日目という関節炎極期のマウス腹腔内に細胞移入し、関節炎治療効果を評価した。

4) 移入細胞の体内動態およびその副作用を解析するため、治療効果判定最終日にマウス脾臓、手足関節を凍結保存し RNA を抽出し、レポーターとして用いている GFP の mRNA レベルを real-time PCR で定量化することにより比較するとともに、各臓器における線維化の有無を病理組織学的に検討した。また同時に血清中の抗 type II コラーゲン抗体価も測定した。

5) 他の免疫制御性物質候補として最近、FoxP3 が注目されているため、FoxP3 をクローニングし in-vitro の CD4⁺ T 細胞培養系を用いて、サイトカイン産生修飾効果を、活性型 TGF-beta と比較検討した。

(倫理面への配慮)

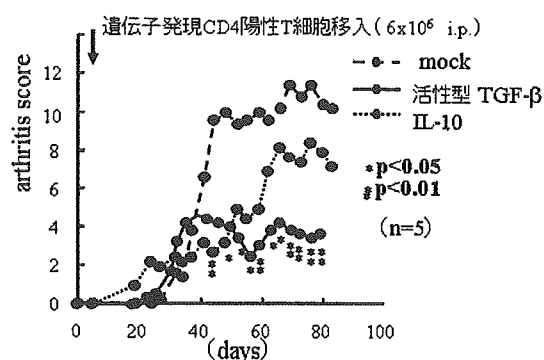
我々の有するレトロウイルスベクターはマウス、ラット等のげっ歯類のみに感染能力を有し、人への感染の危険は無く、かつ自己複製不可である。さらに感染終了した CD4⁺ T 細胞をマウスに移入する手法のため、マウスにおいてもウイルス増殖の危険はなく、また京都大学で所定の承認も得ており、問題は無い。

C. 研究結果

Type II コラーゲンで免疫していないマウスの脾臓から分離した CD4⁺ T 細胞に、活性型 TGF-beta 発現レトロウイルスを感染させ、関節炎誘導後のマウス腹腔内に細胞移入しても、関節炎抑制効果は認められなかったが、type II コラーゲンで免疫したマウスの所属リンパ節およ

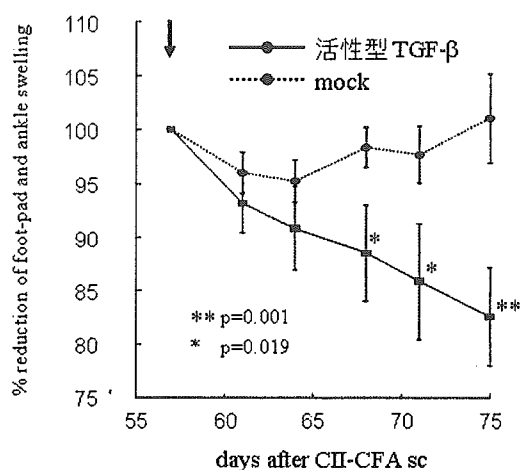
び脾臓から調整した CD4⁺ T 細胞に、活性型 TGF-beta 発現レトロウイルスを感染後、関節炎誘導後 5-10 日目に 1 回のみマウス腹腔内に細胞移入することにより、関節炎の発症はほぼ完全に抑制された (図 1)。IL-10 発現 CD4⁺ T 細胞移入でも関節炎抑制効果を認めたが、活性型 TGF-beta 発現 CD4⁺ T 細胞移入に比べ、その効果の持続性において劣る傾向を認めた。

図 1 活性型 TGF-β と IL-10 の CIA 抑制効果の比較



また潜在型 TGF-beta 発現 CD4⁺ T 細胞移入による CIA 発症抑制効果は認められなかった。次に、in-vitro で type II コラーゲンによる抗原刺激を繰り返して、より type II コラーゲン特異的な CD4⁺ T 細胞株を作成した後に、活性型 TGF-beta を発現させ CIA マウス腹腔内に細胞移入にしたところ、より少数の細胞移入で CIA 抑制効果を認めた。さらには関節炎誘導後 56 日目という関節炎が極期に達しているマウス腹腔内に同様に調整した活性型 TGF-beta 発現 type II コラーゲン特異的な CD4⁺ T 細胞株を移入したところ、明らかな関節腫脹の軽減という治療効果を認めた (図 2)。次に移入細胞の体内動態を解析するため、細胞移入後 70 日目にマウス脾臓、手足関節から RNA を抽出し、共発現レポーターとして用いている GFP の mRNA レベルを real-time PCR で定量化したところ、移入された細胞は移入後 70 日後においても関節局所に検出され、しかも脾臓と比較しより関節局所に集積していることを見出した。また同時に行った病理学的解析において、腎臓・肝臓等の臓器における線維化の亢進は認めなかった。

図 2 CIA治療効果(CIA誘導後57日目に細胞移入)



最後に、FoxP3 発現レトロウイルスをクローニング・作成し、in-vitro の CD4⁺ T 細胞培養系を用いて、サイトカイン産生修飾効果を、活性型 TGF-beta と比較検討したところ、FoxP3 発現 CD4⁺ T 細胞では、過去の報告と同様に、発現細胞においてのみ IFN-gamma・IL-4 の産生抑制を認めたが、活性型 TGF-beta では、遺伝子が導入された細胞・導入されなかった細胞両群同様に、明らかな IL-4 産生抑制効果を認めたが、IFN-gamma にたいする抑制効果は明らかではなかった。しかし、活性型 TGF-beta 発現 CD4⁺ T 細胞は同時に多量の IL-10 を産生していることが判明した。

D. 考察

我々が知る限り、炎症性自己免疫疾患モデル動物に対し、その発症予防効果のみならず治療効果をも有するサイトカインは活性型 TGF-beta のみであり、抗原特異的な CD4⁺ T 細胞を用いて活性型 TGF-beta を炎症局所にデリバリーする細胞移入療法は、その強力な抗炎症作用と共に、より副作用の可能性も低いと考えられ、有力な抗原特異的免疫制御法となり得ることが示唆された。さらに活性型 TGF-beta 導入により IL-10 も同時に誘導産生されることが明らかとなり、活性型 TGF-beta 遺伝子単独導入により IL-10 遺伝子導入効果も合わせ持つことが分かった。これは病原性を有するエフェクターCD4⁺

T 細胞を in-vitro において免疫制御性 T 細胞の一つと考えられている、Tr1 細胞に人工的に変換できることを示唆している。

E. 結論

関節リウマチ患者においても type II コラーゲンに対する自己抗体、およびそれに反応する特異的 CD4⁺ T 細胞の存在が報告されており、type II コラーゲンを含め罹患関節局所で提示されている特異的な抗原に対する特異的 CD4⁺ T 細胞を簡便に分離・樹立できる方法が確立されれば、本法を臨床応用する事は不可能ではないと考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Mimori T: Clinical significance of anti-CCP antibodies in rheumatoid arthritis. Intern Med 44(11):1122-6, 2005.
- 2) Matsukawa H, Kanai T, Naganuma M, Kamada N, Hisamatsu T, Takaishi H, Ogata H, Mukai M, Ishii H, Mimori T, Watanabe M, Hibi T: A novel apoptosis-inducing monoclonal antibody (anti-LHK) against a cell surface antigen on colon cancer cells. J Gastroenterol 40(10):945-55, 2005.
- 3) Yoshifuji H, Umehara H, Maruyama H, Itoh M, Tanaka M, Kawabata D, Fujii T, Mimori T: Amelioration of experimental arthritis by a calpain-inhibitory compound: regulation of cytokine production by E-64-d in vivo and in vitro. Int Immunol 17(10):1327-36, 2005.
- 4) Sato S, Hirakata M, Kuwana M, Nakamura K, Suwa A, Inada S, Mimori T, Ikeda Y: Clinical characteristics of Japanese patients with anti-PL-7 (anti-threonyl-tRNA synthetase) autoantibodies. Clin Exp Rheumatol 23(5): 609-15, 2005.
- 5) Miyaji M, Jin ZX, Yamaoka S, Amakawa R,

Fukuhara S, Sato SB, Kobayashi T, Domae N, Mimori T, Bloom ET, Okazaki T, Umehara H: Role of membrane sphingomyelin and ceramide in platform formation for Fas-mediated apoptosis. *J Exp Med* 202(2):249-59, 2005.

6) Handa T, Nagai S, Kawabata D, Nagao T, Takemura M, Kitaichi M, Izumi T, Mimori T, Mishima M: Long-term clinical course of a patient with anti PL-12 antibody accompanied by interstitial pneumonia and severe pulmonary hypertension. *Intern Med* 44(4):319-25, 2005.

7) Sato S, Hirakata M, Kuwana M, Suwa A, Inada S, Mimori T, Nishikawa T, Oddis CV, Ikeda Y: Autoantibodies to a 140-kd polypeptide, CADM-140, in Japanese patients with clinically amyopathic dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 52(5):1571-6, 2005.

8) Hirakata M, Suwa A, Kuwana M, Sato S, Mimori T, Hardin JA: Association between autoantibodies to the Ku protein and DPB1*. *Arthritis Rheum* 52(2):668-9, 2005.

9) Ichikawa Y, Saito T, Yamanaka H, Akizuk M, Kondo H, Kobayashi S, Oshima H, Kawai S, Hama N, Yamada H, Mimori T, Amano K, Tanaka Y, Matsuoka Y, Yamamoto S, Matsubara T, Murata N, Asai T, Suzuki Y: Therapeutic effects of the combination of methotrexate and bucillamine in early rheumatoid arthritis: a multicenter, double-blind, randomized controlled study. *Mod Rheumatol* 16:323-328, 2005

学会発表

1) 小林志緒、臼井崇、田中真生、藤井隆夫、川端大介、吉藤元、井村嘉孝、橋本美季子、橋本求、佐藤毅、三森経世：活性型 TGF- β 発現レトロウイルスと抗原特異的 T 細胞移入を用いたコラーゲン誘導関節炎特異的な治療法の試み。第 49 回日本リウマチ学会，横浜，2005 年 4 月

2) Shio Kobayashi, Takashi Usui, Mikiko Hashimoto, Hajime Yoshifuji, Takao Fujii, Masao Tanaka, Daisuke Kawabata, Yoshitaka Imura,

Motomu Hashimoto, Takeshi Sato, Tsuneyo Mimori: CIA specific immunotherapy using type II collagen-specific CD4 T cells express regulatory cytokines. 9th International Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity, Gainesville (USA), September 2005

3) 小林志緒、臼井崇、橋本美季子、吉藤元、田中真生、藤井隆夫、川端大介、井村嘉孝、佐藤毅、橋本求、三森経世：活性型 TGF- β を発現する 2 型コラーゲン特異的 CD4 陽性 T 細胞移入によるコラーゲン誘発関節炎特異的な免疫制御法の可能性。第 33 回日本臨床免疫学会，京都，2005 年 10 月

4) 小林志緒、臼井崇、橋本美季子、吉藤元、田中真生、藤井隆夫、川端大介、井村嘉孝、佐藤毅、橋本求、三森経世：活性型 TGF- β を発現する 2 型コラーゲン特異的 CD4 陽性 T 細胞移入によるコラーゲン誘発関節炎特異的な免疫制御法の可能性。第 35 回日本免疫学会，横浜，2005 年 12 月

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

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

○ MR1 拘束性 NKT 細胞を標的とした免疫療法の開発

分担研究者 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
研究協力者 J. Ludovoc Croxford 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 研究員
三宅 幸子 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 室長

研究要旨

iVα19 インバリエント T 細胞受容体 (TCR) を発現する第二の NKT 細胞は、MR1 分子に拘束され、腸管免疫の調節に関与する可能性が論議されている。我々は、同細胞を過剰発現もしくは欠損する遺伝子改変マウスを用い、この新しい NKT 細胞が自己免疫モデル実験的自己免疫性脳炎 (EAE) の制御細胞として機能することを明らかにした。そのメカニズムとして、B 細胞の IL-10 産生が重要であることを示し、CD1d 拘束性 NKT 細胞と異なる機構を明らかにした。自己免疫疾患発症の病態の理解や、治療法の開発において、MR1 拘束性 NKT 細胞の研究は、今後ますます重要になると思われる。

A. 研究目的

免疫制御細胞を人為的に修飾することによって、臓器特異的自己免疫疾患の病態が修飾されることは、CD1d 拘束性 NKT 細胞の研究において明らかになっている。我々は最近 MR1 分子拘束性でインバリエント AV19-AJ23 TCR アルファ鎖 (ヒト Vα7.2-Jα33) を発現する T 細胞を標的とする治療法の開発に取り組んでいる。Lantz らは同細胞が消化管免疫の制御に重要な役割を果たす可能性を示唆したが (*Nature* 422: 164, 2003)、我々は多発性硬化症 (multiple sclerosis, MS) の脳脊髄液や剖検脳病変において、インバリエント Vα7.2-Jα33 TCR の発現が認められることを示し、自己免疫病態の一翼を担う重要な T 細胞である可能性を示唆した (Illes et al. *Int. Immunol.* 16: 223-230, 2004)。本研究では AV19-AJ23 アルファ TCR トランスジェニックマウス、および Gilfillan による MR1 ノックアウトマウスを利用し、EAE の誘導における MR1 拘束性 T 細胞の役割を検討する。

B. 研究方法

B6 背景の Vα19-Jα33 トランスジェニックマウス (Vα19 Tg) および CD1d KO 背景の同トランスジェニックマウス (Vα19 Tg CD1d KO) および B6 背景の MR1 ノックアウト (MR1 KO) を利用した。EAE は完全フロイント・アジュバントと混和した MOG35-55 ペプチドの接種により、常法のごとく

誘導した。感作後 10 日目の所属リンパ節細胞を調製し、MOG35-55 ペプチドで刺激し、Thymidine の取込みにより細胞増殖反応を測定した。また、培養上清中のサイトカイン濃度を、ELISA および CBA 法により測定した。Vα19 Tg CD1d KO の肝臓よりリンパ球を分離し、さらにセルソーターで NK1.1⁺CD3⁺細胞を分離して、Vα19-Jα33 T 細胞として用いた。同細胞を MOG35-55 で免疫したマウスの脾臓細胞と共培養し、培養上清中のサイトカイン濃度を ELISA で測定し細胞内サイトカイン産生をフローサイトメーターで解析した。動物実験は、国立精神・神経センターの動物実験委員会の承認を受けた上で行った。

C. 研究結果

- 1) 生型 B6 マウスおよび B6 littermate では、全例で EAE 発症を見たが、一方、AV19 Tg では発症は 13 例中 10 例にとどまり、ピーク時の EAE スコアも低く EAE の抑制が見られた。また、CD1d KO を背景に持つマウスにおいても、やはり同様の結果が得られた。
- 2) Vα19-Jα33 T 細胞を受け身移入したマウスでは、EAE の発症は有意に抑制された。これらの結果は、MR1 拘束性 T 細胞の過剰発現が EAE の抑制につながることを意味する。
- 3) MR1 KO マウスでは野生型 B6 マウスと比較して、感作リンパ球の IFN-γ 産生の著明な

亢進を伴う EAE の増悪が見られた。

4) V α 19-J α 33 T 細胞と感作脾細胞の共培養実験では、B 細胞と NKT 細胞による IL-10 産生が誘導された。

5) この IL-10 産生は MR1 KO の脾臓細胞を用いた際にも認められたが、抗 ICOS 抗体で阻害された。

D. 考察

MR1 拘束性の V α 19-J α 33 T 細胞が、EAE の制御細胞として機能することが明確になった。同細胞は多発性硬化症の脳病変に浸潤傾向を示すが、局所で炎症を制御している可能性がある。作用機構としては B 細胞の IL-10 産生が重要であることが示唆された。IL-10 欠損マウスでは腸炎を自然発症することが知られているが、MR1 拘束性 NKT 細胞と B 細胞相互作用の結果産生される IL-10 が関与する可能性がある。さらに、V α 19-J α 33 T 細胞と B 細胞の相互作用には、TCR/MR1 相互作用は必要でないが、ICOS を介した costimulation が重要であることが示唆された。

E. 結論

Th1 細胞の介在する自己免疫疾患 EAE において、MR1 拘束性 NKT 細胞が制御細胞として働くことが示された。今後の病態研究や治療標的開発において、きわめて重要な知見である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ueno, Y., S. Tanaka, M. Sumii, S. Miyake, S. Tazuma, M. Taniguchi, T. Yamamura and K. Chayama: Single dose of OCH improves mucosal Th1/Th2 cytokine balance and prevents experimental colitis in the presence of V 14 NKT cells in mice. **Inflamm. Bowel Disease** 11(1): 35-41, 2005
- 2) Hashimoto D, Asakura S, Miyake S, Yamamura T, van Kaer L, Liu C, Tanimoto M and Teshima T. Stimulation of host natural killer T cells by synthetic glycolipid regulates acute graft-versus-host disease

by inducible Th2 polarization of donor T cells. **J.Immunol.** 174(1): 551-6, 2005

- 3) Murata K, Toba T, Nakanishi K, Takahashi B, Yamamura T, Miyake S and Annoura H. Total synthesis of an immunosuppressive glycolipid, (2S,3S,4R)-1-O-(alpha-d-galactosyl)-2-tetracosanoylamino-1,3,4-nonanetriol. **J.Org.Chem.** 70(6): 2398-401, 2005
- 4) Yu KO, Im JS, Molano A, Dutronc Y, Illarionov PA, Forestier C, Fjiwara N, Arias I, Miyake S, Yamamura T, Chang YT, Besra GS, and Porcellini SA. Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acylvariants of α -galactosylceramides. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA.** 102(9): 3383-8, 2005
- 5) Ota T, Takeda K, Akiba H, Hayakawa Y, Ogasawara K, Ikarashi Y, Miyake S, Wakasugi H, Yamamura T, Kronenberg M, Raulet DH, Kinoshita K, Yagita H, Smyth MJ, Okumura K. IFN- γ -mediated negative feedback regulation of NKT cell function by CD94/NKG2. **Blood**, 106(1): 184-92, 2005
- 6) Chiba A, Kaieda S, Oki S, Yamamura T and Miyake S. The involvement of V α 14 NKT cells in the pathogenesis of arthritis in murine models. **Arthritis Rheum.** 52:1941-8, 2005
- 7) Toba T, Murata K, Yamamura T, Miyake S and Annoura H. A concise synthesis of (3S,4S,5R)-1-(α -D-galactopyranosyl)-3-tetracosanoyl amino-4,5-decanediol, a C-glycoside analogue of immunomodulating α -galactosylceramide OCH. **Tetrahedron Letters** 46: 5043-7, 2005
- 8) Ronet C, Darche S, de Moraes ML, Miyake S, Yamamura T, Louis JA, Kasper LH, Buzoni-Gatel D. NKT Cells Are Critical for the Initiation of an Inflammatory Bowel Response against Toxoplasma gondii. **J.Immunol.** 175(2): 899-908, 2005
- 9) Oki S, Tomi C, Yamamura T and Miyake S.

Preferential Th2 polarization by OCH is supported by incompetent NKT cell induction of CD40L and following production inflammatory cytokines by bystander cells in vivo. **Int.Immunol.** 17(12):1619-29, 2005

- 10) Miyake S and Yamamura T. Therapeutic potential of glycolipid ligands for natural killer (NK) T cells in the suppression of autoimmune diseases. **Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.** 5 (3): 315-22, 2005

2. 学会発表

- 1) Kaieda S, Chiba A, Oki S, Yamamura T, Miyake S. The involvement of CD1-restricted NKT cells in the pathogenesis of collagen-induced and antibody-induced arthritis. 5th Annual Conference of FOCIS, Boston, May 13, 2005
- 2) Sakuishi K, Miyake S, Yamamura T. Exogenous IL-2 promotes IL-5 production by human CD4+ NKT cell clones: The role of IL-2 in the immune regulation. 5th Annual Conference of FOCIS, Boston, May 13, 2005
- 3) Kaieda S, Oki S, Yamamura T, Miyake S. A new synthetic glycolipid suppresses murine models of arthritis by blocking of natural killer T cell activation. American College of Rheumatology 69th Annual Scientific Meeting, Orlando, Florida. October 25, 2004 (Arthritis Rheum. 52:S445, 2005)
- 4) 作石かおり、荒波利昌、大木伸司、三宅幸子、山村隆 : Exogenous IL-2 promotes IL-5 production by human CD4+ NKT cell clones: The role of IL-2 in the immune regulation.第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005
- 5) Croxford Ludovic, Miyake Sachiko, Shimamura Michio, Yamamura

Takashi:V α 19-J α 33 invariant NKT cells regulated experimental autoimmune encephalomyelitis.第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

自己抗原および関節炎誘導分子修飾による自己抗体産生制御

分担研究者 松本 功（筑波大学人間総合科学研究科臨床免疫 講師）

研究要旨

関節リウマチの病因については未だ不明な点が多いが、解糖系酵素GPIに対する抗体が単独で関節炎を誘導できることがマウスで明らかになっている。また、この自己抗原 GPI を免疫して発症する関節炎モデルではわずか1週間で病気が発症する。我々はRA患者において抗GPI抗体を保持する患者が多いことも明らかにしてきたが、これら2つのGPI関連関節炎モデル、およびRAでの抗GPI抗体陽性者の共通点を見出すことにより、関節炎を修飾する分子の同定、およびそれらをターゲットにした関節炎制御療法を模索し、新規治療法の開発をめざす。

A.研究目的

関節リウマチ（RA）は発症頻度が高い自己免疫疾患であるが、その病因については未だ不明な点が多い。我々は解糖系酵素 glucose-6-phosphate isomerase（GPI）に対する免疫応答が単独で関節炎を惹起することを明らかにしてきた。また、このGPI抗体が何故関節炎だけを引き起こすのかについても我々は明らかにしており、抗原の関節軟骨表面での強発現がヒトでも重要であることが判明している。K/BxN 関節炎モデルでは、解糖系 glucose-6-phosphate isomerase（GPI）に対する自己抗体が単独で関節炎を惹起する。これらのことより、漠として考えられてきた関節に特異的な抗原に対する免疫応答とは全く別のメカニズムによる、ユビキタスな抗原により誘導される関節炎が存在する。現在までの解析で、関節リウマチ（RA）患者における抗GPI抗体の意義を検索し、抗GPI抗体陽性RA患者にのみTh1型GPI反応性T細胞が認められ、HLADRBI-0405/0901とリンクしていることや、抗GPI抗体陽性者において、FcγRIIIa-158V/Fポリモルフィズムが関節炎の発症に関与し、158F遺伝子は関節炎抵抗因子であることが判明した。RAにおけるGPIに対する免疫応答の意義をさらに理解する為に、本研究ではもう1つのGPI依存性モデルであるDBA/1マウスのGPI免疫関節炎モデルを中心に検討を進め、自己抗体や病態を制御しうる分子についての検討を行った。

B.研究方法

1) DBA/1マウスにリコンビナントヒトGPI抗原を免疫し、関節炎発症直後の脾臓細胞よりCD4+細胞を分離し、マイトマイシン処理した抗原提示細胞とGPIとともに培養し、抗原特異的に産生されるサイトカインを比較解析した。対象としては関節炎抵抗性C57BL/6マウスを用いた。
2) 抗原特異的に産生されるサイトカインの制御機構

を検討するため、このCBAシステムを用いて、共刺激分子の抗体（抗CD40L抗体、抗ICOS抗体、CTLA-4Ig）や抗サイトカイン抗体（抗TNFα抗体、抗IFNγ抗体、抗IL-12抗体）、及び転写因子阻害剤（JAK inhibitor, NFκB inhibitor）を用いてTh1サイトカインの抑制実験を行った。

3) GPI免疫マウスとコントロールマウスの脾臓細胞を用いて、アフィメトリクス社のGeneChipで比較解析し、TNFα関連遺伝子を抽出した。

4) そこから得られたTIF-X（tumor necrosis factor induced factor-X）に着目し、RNAレベルで諸臓器および細胞群の発現レベルを時間経過とともに解析し、ポリクローナル抗TIF-X抗体を作成後、臓器での発現を蛋白レベルで解析した。

5) アミノ酸配列から推測されるヒトでのcounterpart（hTIF-X）に着目し、その分子ファミリー（1-3）の中でのRNAレベルでの発現比較をRA患者末梢血、滑膜を用いて検討した。

（倫理面への配慮）

筑波大学の医の倫理特別委員会はすでに承認済みである。

C.研究結果

1) 関節炎マウスの脾臓細胞を用いた検討では抗原特異的にTNFα、IFNγが産生された。

2) CTLA-4Ig、抗TNFα抗体、NFκB inhibitorはこれら抗原特異的なTh1サイトカインの産生を抑制した。

3) 脾臓DNA arrayの発現結果で20倍以上の差があるTIF-XというTNFα誘導性分子が同定された。

4) TIF-Xは蛋白レベルでは関節炎極期にのみshort formのTIF-Xが脾臓、関節両組織に発現増加し、RNAレベルでは脾臓CD11b陽性細胞（マクロファージ）に強発現していた。また、シークエンス解析ではこの短い分子はexon3を欠失したspliced variantであった。

5) hTIF-X3（ヒトでのcounterpart）がRA滑膜組織に強

発現していた。末梢血では発現は殆ど認められなかった。

D. 考察 E. 結論

GPI 免疫モデルでは抗原特異的に Th1 サイトカイン、特に TNF α を産生し、NF κ B の制御を受けていることが判明した。また、新たな TNF α 誘導分子である TIF-X、およびその spliced valiant が関節炎の発症に関与している可能性が示唆され、この分子の抗体産生への影響などを細胞移入、特異的抗体による関節炎の制御、及び欠損マウス、トランスジェニックマウスを作成することにより解明していきたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takahashi R, Tsutsumi A, Ohtani K, Muraki Y, Goto D, Matsumoto I, Wakamiya N, and Sumida T. Association of mannose-binding lection(MBL) gene polymorphism and serum MBL concentration with characteristics and progression of systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis* 2005; 64:311-314.
2. Naito Y, Matsumoto I, Wakamatsu E, Goto D, Sugiyama T, Matsumura R, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. Muscarinic acetylcholine receptor auto antibodies in patients with Sjogren's Syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 2005;64: 510-511.
3. Tomoo T, Tsutsumi A, Yasukochi T, Ikeda T, Ochiai N, Ozawa K, Shibana Y, Ito S, Matsumoto I, Goto D, 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.* 2005; 15: 453-457.
4. Suzuki T, Muraki Y, Yasukochi T, Zhang H, Kori Y, Hayashi T, Wakamatsu E, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumichika H, Sumida T, Matsumoto I. Intraarticular injection of IgG from anti-glucose-6-phosphate isomerase antibodies positive patients with rheumatoid arthritis induces synovitis in cynomolgus monkeys. *Autoimmunity Reviews*, 2005; 4: 475-478.
5. Hayashi T, Matsumoto I, Muraki Y, Takahashi R, Chino Y, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. Clinical characteristics of anti-glucose-6-phosphate isomerase antibodies positive Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2005; 15: 258-263.
6. Matsumoto I, Muraki Y, Yasukochi T, Zhang H, Kori Y, Hayashi T, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Ikeda K, Sumichika H, Sumida T. The exploration of joint-specific immunoreactions on immunoglobulins G of anti-glucose-6-phosphate isomerase antibody-positive patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Med* 2005; 16; 793-800.
7. Matsumoto I, Zhang H, Muraki Y, Hayashi T, Yasukochi T, Kori Y, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. A functional variant of Fc γ receptor IIIA is associated with rheumatoid arthritis in anti-glucose-6-phosphate isomerase antibodies-positive individuals. *Arthritis. Res. Ther.* 2005; 7; 1183-1188.
8. Ohnishi Y, Tsutsumi A, Goto D, Itoh S, Matsumoto I, Taniguchi M, Sumida T. TCR Valpha14 natural killer T cells function as effector T cells in mice with collagen-induced arthritis. *Clin Exp Immunol.* 2005 ;141:47-53.
9. Kitagawa M, Goto D, Mamura M, Matsumoto I, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. Identification of three novel peptides that inhibit CD40-CD154 interaction. *Mod Rheumatol.* 2005; 15; 423-426.
10. Chino Y, Murata H, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Sakamoto T, Ohtsuka M, Sekisawa K, Ito S, Sumida T. T cell receptor BV gene repertoire of lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluid of polymyositis/dermatomyositis patients with interstitial pneumonitis. *Int. J. Mol. Med* 2006; 17; 101-109.
11. Naito Y, Matsumoto I, Wakamatsu E, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. Altered peptide ligands regulate muscarinic acetylcholine receptor reactive T cells of patients with Sjogren's Syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 2006; 65:269-271.
12. Kori Y, Matsumoto I, Zhang H, Yasukochi T, Hayashi T, Iwanami K, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. Characterization of Th1/Th2 type, glucose-6-phosphate isomerase reactive T cells in the generation of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*(in press)
13. Suzuki E, Tsutsumi A, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Otsu M, Onodera M, Takahashi S, Sato Y, Sumida T. Gene transduction of tristetraprolin or its active domain reduces TNF- α production in Jurkat T cells. *Int. J. Mol. Med.*(in press)
14. 松本功 K/B \times N マウス 日本臨床 2005;63:31-34.
15. 松本功, 住田孝之 抗 GPI 抗体と関節炎 炎症と免疫 2005; 13: 626-632.
16. 松本功 関節リウマチにおける自己抗体の産生機序と病因性 日本臨床免疫学会雑誌 2005;28:365-371

17. 松本功 自己抗体誘導性関節炎モデル 内科 2006;97:355-358.

18. 松本功 関節リウマチにおける抗 glucose-6-phosphate isomerase (GPI) 抗体 分子リウマチ in press

19. 松本功 関節炎における自己抗体と炎症性サイトカインの関係 臨床免疫 in press

2. 学会発表

1. 松本功、安河内孝徳、張華、後藤大輔、伊藤聡、堤明人、住田孝之 GPI誘導関節炎マウスの網羅的解析—ヒト抗 GPI 抗体陽性関節リウマチとの接点 第49回日本リウマチ学会総会 シンポジウム 2005年4月 パシフィコ横浜

2. Isao Matsumoto, Zhang Hua, Keiichi Iwanami, Takanori Yasukochi, Daisuke Goto, Satoshi Ito, Akito Tsutsumi, Takayuki Sumida Characterization of Th1 type, glucose-6-phosphate isomerase reactive T cells in the generation of arthritis. 2005 ACR annual meeting San Diego

3. 松本功、安河内孝徳、張華、岩波慶一、渡辺陽子、後藤大輔、伊藤聡、堤明人、住田孝之 GPI 免疫関節炎マウスにおける Th1 細胞 第35回日本免疫学会総会 2005年12月 パシフィコ横浜

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

全身性エリテマトーデス(SLE)における
Ras-guanyl releasing protein 1 (RasGRP1) 発現異常に関する研究

分担研究者 小池隆夫 北海道大学大学院学術研究科分子病態制御学講座免疫病態分野 教授
研究研究者 保田晋助 北海道大学大学院学術研究科分子病態制御学講座免疫病態分野 助手

研究要旨

Ras guanyl releasing protein 1 (RasGRP1)は主に T細胞に発現し、低刺激 TCR シグナルの伝達に重要であるが、その欠損でマウスに SLE 様の病態が出現することが報告されている。今回我々は、ヒト SLE における RasGRP1 の発現を検討した。健康人および SLE 患者末梢血単核球由来の cDNA を用いて RasGRP1 の配列を決定したところ、複数の新たなスプライス異常が発見され、その頻度は SLE 患者において有意に高率であった。末梢血 T細胞を用いた蛋白レベルでの検討では、RNA でスプライス異常を有する患者および健康人では正常 RasGRP1 の蛋白発現レベルが低下する傾向を認め、その原因のひとつとしてユビキチン化を介した分解が考えられた。SLE 患者における RasGRP1 蛋白の低発現が、リンパ球減少などの病態に関与することが示唆された。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス(Systemic lupus erythematosus:SLE)の主な病態は自己寛容の破綻としてとらえられ、T細胞の分化・成熟に関わる分子群に異常があることが動物実験や臨床研究などで示されている。胸腺における positive selection では、自己抗原ペプチドと弱く結合する T細胞レセプター (TCR) 刺激の下流で Ras が活性化され ERK, AP-1 が活性化、NF-AT とともに IL-2 などの遺伝子の転写を促進する。活性型、非活性型 Ras のバランスは、GTPase activating protein と guanyl nucleotide exchange factors (GEF) の両者によって制御されている。1998年、T細胞・神経細胞に主に発現する GEF である Ras-guanyl releasing protein 1 (RasGRP1) が発見され、Ca²⁺とジアシルグリセロール (DAG) 結合部位を持ち、これらの作用によって Ras を活性化することが示された。特に T細胞では、PLC- γ 1 による Ca²⁺と DAG の濃度上昇および同じく PLC- γ 1 下流の PKC θ による活性化を受け、おもにゴルジ体で Ras を活性化することがわかってきた。ノックアウトマウスにおいては胸腺における T細胞が double positive までしか成熟しないことが知られている。

近年、2系統の RasGRP1 欠損マウスにおいて SLE 様症状を自然発症することが報告された。うち 1 系統では抗核抗体、抗 DNA 抗体、抗 Sm 抗体の出現を認め、IgG および C3 の沈着を認める糸球体腎炎を発症、リンパ球減少の時期を経て自己反応性リンパ球が増殖する現象が認められた。

本研究では、SLE 患者における RasGRP1 の発現を検討し、病態の一部を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

文書による同意を得た健康人 17 名(男性 4 名、女性 13 名、平均年齢 30)、SLE 患者 27 名(男性 6 名、女性 21 名、平均年齢 31 歳)の末梢血単核球を Ficol Paque を用いて遠心分離し、total RNA を抽出、続いて cDNA を合成した。ヒト RasGRP1 特異的プライマーを設定し、PCR にて増幅後、ベクターにサブクローニングして塩基配列を決定した。それぞれの患者より 5 クローンずつの検討を行った。

次に、蛋白レベルでの RasGRP1 発現を確認する目的でヒト RasGRP1 蛋白 N 末端を認識するペプチド抗体を、ラビットを免疫して作製した。患者および健康人末梢血より精製した T細胞 lysate を SDS-PAGE に展開し、Western Blot 法にて RasGRP1 の発現を検討した。

(倫理面への配慮)

当研究は当学倫理委員会の承認を得ており、文書による患者の同意のもとに行われる。患者および健康者の末梢血単核球より RNA を抽出し、cDNA を合成・解析することに関する同意書を得て、患者においては通常の採血時に 10cc の末梢血検体を得ている。同意後であっても希望があれば検体を用いず、破棄できる事とする。また、個人を特定できないよう最大限の配慮がなされる事とする。

C. 研究結果

SLE 患者および健常人サンプルからサイズの異なる数種のスプライスバリエントが検出された。比較的頻度の高いスプライス異常として、前述の exon 11 スキップ (RasGRP1 delta 11) を認めたほか、exon 11,16 の欠損 (splice variant A), exon 11,13 の欠損 (splice variant B), exon 11,15,16 の欠損 (splice variant C), exon 11 欠損および intron 16 の一部が挿入された splice variant D) などの新たなスプライス異常を発見した。第 11 エクソンは重要なモジュールをコードしておらず、下流も in frame に保たれるが、他のスプライスバリエントでは付随する下流エクソンのスプライス異常によって新たな終止コドンが出現していた (図 1)。Exon 11 スキップを有する確率は、SLE 患者クローン中で 27.4%、健常人で 7.1% (OR 4.97, 95% CI 1.99-12.37)、何らかのスプライス異常を有する確率は、SLE 患者クローン中で 34.8%、健常人で 8.2% (OR 5.95, 95% CI 2.54-13.93) といずれも SLE 患者で有意に高かった (表)。

蛋白レベルにおいては、mRNA レベルでスプライス異常を認めたサンプルにおいては full length RasGRP1 の発現量が低い傾向にあり、さらにサイズの小さい数本のバンドが検出された (図 2)。しかし、これらの小さなバンドは予想されたスプライスバリエントに相当するサイズとは異なり、むしろ分解産物と予想された。これらのサンプルにおけるユビキチン化を検討する目的で、抗ユビキチン抗体 P4D1 (Santa Cruz Biotechnology Inc.) を用いて Western Blot 法にて検討したところ、RasGRP1 の発現量が低く分解産物を有するサンプルではスメア状のシグナルを認めた。

D. 考察

SLE 患者には RasGRP1 のスプライス異常が RNA レベルで高頻度にみられ、RasGRP1 のスプライス異常を有する場合には、正常 RasGRP1 の RNA 発現が dominant negative に調整を受け、蛋白の発現レベルが低下することが示唆された。また、スプライス異常をもつ RasGRP1 は、ユビキチン化による分解をうけると考えられた。おもに SLE 患者では、正常 RasGRP1 の発現が阻害されることにより T 細胞の正の選択に障害を来し、リンパ球減少とそれに引き続いておこる homeostatic proliferation による自己反応性 T 細胞の出現によって病態形成に関与することが示唆された。

E. 結論

健常人および SLE 患者において、末梢血での RasGRP1 発現を RNA および蛋白レベルで検討した。SLE 患者では RNA レベルでスプライス異常の頻度が有意に高く、蛋白レベルでは正常 RasGRP1 の発現が低下する傾向を認め、病態への関与が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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
2. Kataoka, H., Takahashi, S., Takase, K., Yamasaki, S., Yokosuka, T., Koike, T., Saito, T. CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells exert in vitro suppressive activity independent of CTLA-4. *Int Immunol* 17(4) 421-427.2005
3. Jodo, S., Pidiyar, V.J., Xiao, S., Furusaki, A., Sharma, R., Koike, T., Ju, S.T. Cutting Edge: Fas Ligand (CD178) Cytoplasmic Tail Is a Positive Regulator of Fas Ligand-Mediated Cytotoxicity. *J Immunol* 174(8) 4470-4474.2005
4. Nishio, S., Hatano, M., Nagata, M., Horie, S., Koike, T., Tokuhisa, T., Mochizuki, T. Pkd1 regulates immortalized proliferation of renal tubular epithelial cells through p53 induction and JNK activation. *J Clin Invest* 115(4) 910-918.2005
5. Kochi, Y., Yamada, R., Suzuki, A., Harley, J.B., Shirasawa, S., Sawada, T., Bae, S.C., Tokuhira, S., Chang, X., Sekine, A., Takahashi, A., Tsunoda, T., Ohnishi, Y., Kaufman, K.M., Kang, C.P., Kang, C., Otsubo, S., Yumura, W., Mimori, A., Koike, T.,

- Nakamura, Y., Sasazuki, T., Yamamoto, K.
A functional variant in FCRL3, encoding
Fc receptor-like 3, is associated with
rheumatoid arthritis and several
autoimmunities. *Nat Genet* 37(5)
478-485.2005
6. Imai, Y., Chou, T., Tobinai, K., Tanosaki, R.,
Morishima, Y., Ogura, M., Shimazaki, C.,
Taniwaki, M., Hiraoka, A., Tanimoto, M.,
Koike, T., Kogawa, K., Hirai, H., Yoshida, T.,
Tamura, K., Kishi, K., Hotta, T.; CliniMACS
Study Group. Isolation and transplantation of
highly purified autologous peripheral CD34+
progenitor cells: purging efficacy,
hematopoietic reconstitution in non-Hodgkin's
lymphoma (NHL): results of Japanese phase
II study. *Bone Marrow Transpl* 35(5)
479-487.2005
 7. Bando, H., Atsumi, T., Nishio, T., Niwa, H.,
Mishima, S., Shimizu, C., Yoshioka, N., Bucala,
R., Koike, T. Phosphorylation of the
6-phosphofructo-2-kinase/fructose
2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of
glycolytic regulators in human cancer. *Clin
Cancer Res* 11 5784-5792.2005
 8. Atsumi, T., Furukawa, S., Amengual, O., Koike, T.
Antiphospholipid antibody associated
thrombocytopenia and the paradoxical risk of
thrombosis. *Lupus* 14 499-504.2005
 9. Bohgaki, T., Amasaki, Y., Nishimura, N.,
Bohgaki, M., Yamashita, Y., Nishio, M.,
Sawada, K.I., Jodo, S., Atsumi, T., Koike, T. Up
regulated expression of tumour necrosis factor
converting enzyme in peripheral monocytes
of patients with early systemic sclerosis. *Ann
Rheum Dis.* 64 1165-1173.2005
 10. Atsumi, T., Amengual, O., Yasuda, S.,
Matsuura, E., Koike, T. Research around
 β 2-glycoprotein I: A major target for
antiphospholipid antibodies. *Autoimmunity*
38(5) 377-381.2005
 11. Fukae, J., Amasaki, Y., Yamashita, Y.,
Bohgaki, T., Yasuda, S., Jodo, S., Atsumi, T.,
Koike, T. Butyrate suppresses tumor necrosis
factor α production by regulating specific
messenger RNA degradation mediated
through a cis-acting AU-rich element.
Arthritis Rheum. 52(9) 2697-2707.2005
 12. Koike, T., Atsumi, T. Antiphospholipid
antibodies and cell activation: crucial role of
p38 MAPK pathway. *Lupus* 14(10)
799-801.2005
 13. Atsumi, T., Nishio, T., Niwa, H., Takeuchi, J.,
Bando, H., Shimizu, C., Yoshioka, N., Bucala, R.,
Koike, T. Expression of inducible
6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Bispho
sphatase/PFKFB3 isoforms in adipocytes
and their potential role in glycolytic
regulation. *Diabetes* 54(12) 3349-3357.2005
 14. Kasahara, H., Matsuura, E., Kaihara, K.,
Yamamoto, D., Kobayashi, K., Inagaki, J.,
Ichikawa, K., Tsutsumi, A., Yasuda, S., Atsumi, T.
., Yasuda, T., Koike, T. Antigenic structures
recognized by anti-B2-glycoprotein I
auto-antibodies. *Int immunol* 17(12)
1533-1542.2005
 15. Yasuda, S., Bohgaki, M., Atsumi, T., Koike, T.
Pathogenesis of antiphospholipid antibodies:
impairment of fibrinolysis and monocyte
activation via the p38 mitogen-activated
protein kinase pathway. *Immunobiology* 210
775-780.2005
 16. Nakabayashi, T., Mizukami, K., Naitoh, S.,
Takeda, M., Shikamoto, Y., Nakagawa, T.,
Kaneko, H., Tarumi, T., Mizoguchi, I., Mizuno,
H., Ieko, M., Koike, T. Protein C Sapporo
(protein C Glu 25 \rightarrow Lys): A heterozygous
missense mutation in the Gla domain
provides new insight into the interaction
between protein C and endothelial protein
C receptor. *Thromb Haemost* 94
942-950.2005
 17. Goto, H., Nishio, M., Endo, T., Sato, N., Koizumi,
K., Fujimoto, K., Sakai, T.,
Kumano, K., Obara, M., Koike, T. Effective in
vivo purging with rituximab and autologous
peripheral blood stem cell transplantation in
a woman with CD5 positive primary

- cutaneous diffuse large B-cell lymphoma.
Eur J Haematol. 74(6) 526-528.2005
18. Nakamura,A.,Simizu,C.,Nagai,S.,Taniguchi,
S.,Umetsu,M.,Atsumi,T.,Yoshioka,N.,Ono,
Y., Tajima,T.,Kubo,M.,Koike,T. A rare case
of Gitelman's syndrome presenting with
hypocalcemia and osteopenia. J Endocrinol
Invest 28 464-468.2005
 19. Nishio,M.,Endo,T.,Fujimoto,K.,Sato,N.
,Sakai,T.,Obara,M.,Kumano,K.,Minauchi,K.
,Koike,T. Persistent
panhypogammaglobulinemia with selected
loss of memory B cells and impaired isotype
expression after rituximab therapy for
post-transplant EBV-associated autoimmune
hemolytic anemia. Eur J Haematol. 75(6)
527-529.2005
 20. Matsumoto,R.,Shimizu,C.,Nagai,S.,
Taniguchi,S.,Umetsu,M.,Kimura,Y.,
Atsumi,T.,Yoshioka,N.,Kubo,M.,Koike,T.
Cat-eye syndrome with isolated idiopathic
hypogonadotropic hypogonadism. Internal
Med 44(10) 1069-1073.2005
 21. Ieko,M.,Tarumi,T.,Nakabayashi,T.,Yoshida,
M.,Naito,S.,Koike,T. Factor Xa inhibitors:
new anti-thrombotic agents and their
characteristics. Frontiers in Bioscience 11
232-248.2006

著書

1. Yasuda S, Atsumi T, and Koike T.
 β_2 -glycoprotein I and Anti- β_2 -glycoprotein
I antibodies In: Khamashta MA, editor.
Hughes Syndrome. London: Springer

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし.

2. 実用新案登録

なし.

3. その他

なし.

図1. full length RasGRP1と新規スプライスバリエーションのcDNA構造

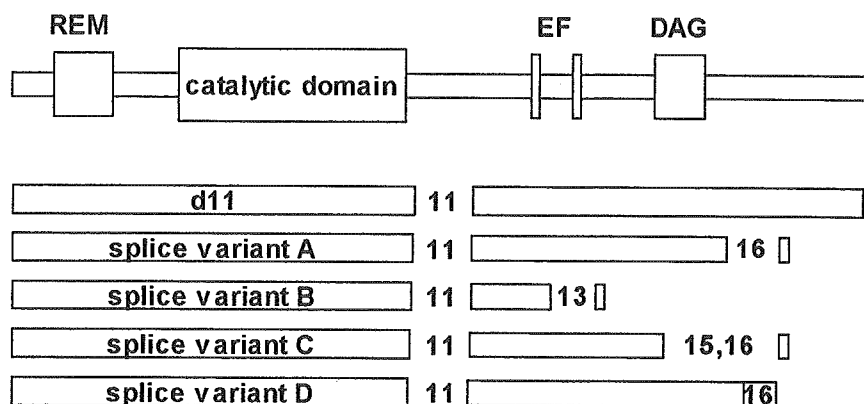
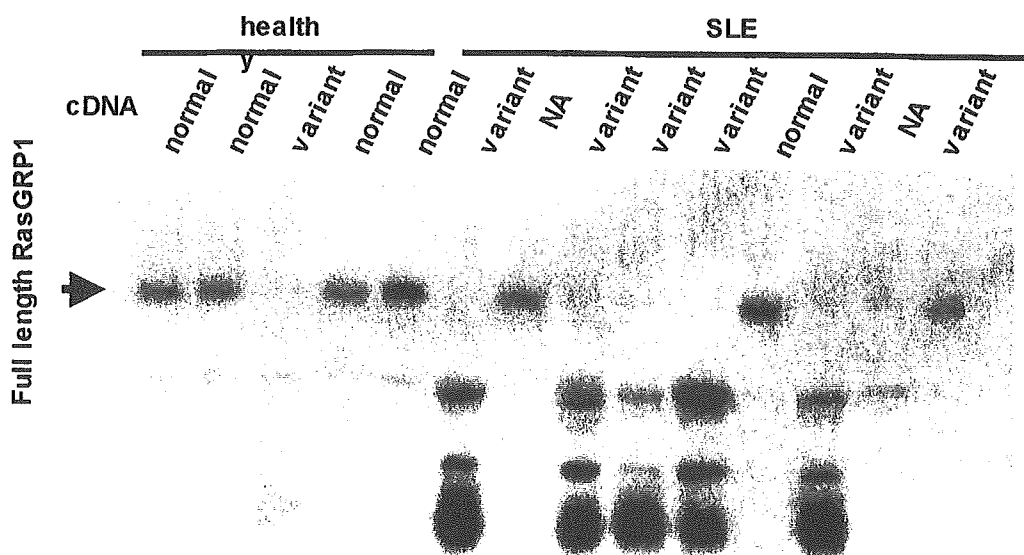


表. RasGRP1 スプライス異常の群別頻度

| | (%) | OR | 95% C.I. |
|----------------------------|------|------|--------------|
| Skipping of exon 11 | | | |
| Healthy (n=17, 85 clones) | 7.1 | | |
| SLE (n=27, 135 clones) | 27.4 | 4.97 | 1.99 – 12.37 |
| Any variants | | | |
| Healthy (n=17, 85 clones) | 8.2 | | |
| SLE (n=27, 135 clones) | 38.4 | 5.95 | 2.54 – 13.93 |

図2. 健康人およびSLE患者における末梢血T cellでのRasGRP1の蛋白発現



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

天疱瘡モデルマウスを用いた自己反応性 T 細胞株の
in vivo 病原性のスクリーニング法に関する研究

| | | | |
|-------|-------|----------------|------|
| 分担研究者 | 桑名 正隆 | 慶應義塾大学医学部内科 | 助教授 |
| 協力者 | 天谷 雅行 | 慶應義塾大学医学部皮膚科 | 教授 |
| | 高橋 勇人 | 慶應義塾大学大学院医学研究科 | 大学院生 |

研究要旨

尋常性天疱瘡(PV)において病態と関連する抗デスマグレイン3(Dsg3)抗体の産生にはDsg3を認識する自己反応性T細胞の関与が推測されている。そこで、我々はDsg3^{-/-}マウスを用いたPVモデルマウスを利用することでPVの病態を誘導する病原性を持つDsg3反応性T細胞の特性を明らかにすることを目指している。本年度は、Dsg3反応性T細胞15株(クローン10株を含む)を樹立し、その*in vivo*における病原性を評価する系を確立した。その結果、Th0型の9株中5株はDsg3^{-/-}B細胞と共にRag2^{-/-}マウスに移植するとIgG抗Dsg3抗体産生とPVの発現型を誘導したが、Th1型の6株は病原性を示さなかった。今回確立した抗原特異的T細胞の病原性の評価系は他の自己免疫疾患にも広く応用可能と考えられる。また、T細胞の病原性を規定する因子を明らかにすることにより、それらを標的とした新しい治療法の開発にもつながる。

A. 研究目的

尋常性天疱瘡(PV)は皮膚粘膜における角化細胞に対する自己免疫疾患で、デスマグレイン3(Dsg3)に対する自己抗体によりその病態が誘導される。抗Dsg3抗体のアイソタイプは主にIgG4であり、その塩基配列には突然変異の存在が確認されている。また、抗Dsg3抗体産生と特定のHLAクラスIIアレルとの強い相関も報告されている。これらの知見から、抗Dsg3抗体産生には抗原特異的なCD4⁺T細胞によるB細胞の活性化が不可欠と考えられる。これまで、PV患者を対象としたDsg3反応性T細胞の解析が複数の研究グループにより行われてきたが、Dsg3反応性T細胞がPVの病態に関与する‘病原性’を有するかについてはいまだ明らかでない。最近、AmagaiらはDsg3^{-/-}マウス脾細胞を免疫不全マウスに移植することで抗Dsg3抗体産生とPV発現型を誘導できることを報告した。そこで、我々は病原性を有するDsg3反応性T細胞の解析にこのPVモデルマウスの系を応用することを着想し、自己反応性T細胞の病原性を評価する系の確立を試みた。本研究は、1)Dsg3で免疫したDsg3^{-/-}マウスからのDsg3反応性T細胞クローンの樹立、2)T細胞クローンの特性(抗原認識機構、サイトカイン産生能など)の解析、3)T細胞クローンをDsg3^{-/-}マウスB細胞とともにRag2^{-/-}マウスへ移入し、抗Dsg3抗体産生やPV発現型による病原性の確認、の3段階から構成される。さらに、個々のDsg3反応性T細胞クローンの特性と病原性を比較することで、病原性と関連するT細胞の特性(たとえば、特定

のT細胞エピトープやサイトカイン産生能)が抽出できる。その結果はPVに対する新しい治療標的の同定につながる可能性がある。本年度は、16個のDsg3反応性T細胞株を樹立し、それらの特性および病原性を検討した。

B. 研究方法

a) リコンビナントマウス(rm)Dsg3の作成

2つの発現系でリコンビナントマウスDsg3を作成した。バキュロウイルスベクターを用いて昆虫細胞の培養系でmDsg3の細胞外ドメインとE-tag、His-tagとの融合タンパク(rmDsg3)を発現、精製した。高純度の抗原を得るため、His-tagとE-tagのアフィニティーによる精製を段階的に行った。また、大腸菌の発現系を用いてDsg3細胞外領域を10個以上のアミノ酸を重複した5つのmDsg3断片(rmDsg3-1~rmDsg3-5)に分割し、maltose-binding protein(MBP)との融合タンパクとして発現、精製した。それぞれの精製リコンビナント蛋白の純度はSDSポリアクリルアミド電気泳動後のクマシーブルー染色により評価した。

b) mDsg3反応性T細胞のクローニング

CFAで乳化した10μgのrmDsg3をDsg3^{-/-}マウスの両足底に免疫した。1週間後に膝窩リンパ節と脾臓を摘出し、RPMI-1640内ですりつぶした。脾臓はACK lysing buffer(BioWhittaker, Walkersville, ND)を用いて溶血処理を行い、単核球を調製した。培地とし

て1%の C56BL/6 由来血清を添加した RPMI-1640 を初回刺激時に用い、以後は 10%FBS 添加 RPMI-1640 を用いた。まず Day0 に単核球 (3×10^6 cell/well) を 24 穴平底プレートにまき、 $5 \mu\text{g/ml}$ の抗原 rmDsg3-1~5 を加えた。Day10 に凍結保存しておいた自己の脾細胞 (10^6 cell/well) に X 線照射 (40Gy) し、mDsg3-1~5 ($5 \mu\text{g/ml}$) とともに培養中に加えた。サイトカインとして Day3, 7, 10, 14, 17, に 1, 2, 5%T-STIM™ (Becton-Dickinson, Bedford, MA) を加えた。Day21 に抗原特異的増殖反応を検討し、特異的な反応を示した株のみを限界希釈法に用いた。T 細胞株は 3~4 日ごとのサイトカインの添加と 10~14 日ごとの抗原刺激により維持した。

c) 抗原特異的増殖反応

96 穴丸底プレートで 10^4 cell/well の T 細胞を 2×10^4 cell/well の X 線照射脾細胞とともに $5 \mu\text{g/ml}$ の rmDsg3-1~5 または MBP 存在下で培養した。56 時間後に $0.5 \mu\text{Ci/well}$ の ^3H -thymidine を添加し、その 16 時間後に細胞を回収し、 ^3H -thymidine の取り込みを測定した。rmDsg3-1~5 に対する反応性は MBP 存在下での放射活性との比として表わし、さらに MHC クラス II 拘束性の有無により特異性を検討した。

d) MHC クラス II 拘束性の検討

T 細胞の抗原特異的増殖反応において、培養液中に $4 \mu\text{g/ml}$ の抗マウス MHC class II モノクローナル抗体 (M5/114, ラット IgG_{2b}, κ) あるいはアイソタイプが一致したコントロール抗体を添加した。抗原刺激により誘導された T 細胞増殖反応が 80%以上抑制された場合を MHC クラス II 拘束性と判定した。

e) TCRV β 遺伝子再構成の検出と各種サイトカイン遺伝子発現の解析

T 細胞株を PMA(25 ng/ml)とイオノマイシン($1 \mu\text{g/ml}$)存在下で 3 日間培養後、CD4 および CD8 Dynabeads (Dynal biotech, Oslo, Norway)を用いて T 細胞を回収した。RNeasy Mini Kit (Qiagen, Maryland, USA)を用いて total RNA を抽出し、AMV RTase XL(TAKARA, Japan)存在下で cDNA を合成し、以下の PCR に用いた。TCRV β 遺伝子再構成の検出には 23 種の TCRV β 遺伝子特異的な 5' 側プライマーと共通する TCRC β 遺伝子に対応する 3' 側プライマーを用いた family PCR を行った。さらに PCR 産物の塩基配列を 3100 Genetic Analyzer(ABI PRISM)を用いて同定した。各種サイトカイン(IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TGF- β)の発現は特異的なプライマーを用いた PCR により解析した。

f) T 細胞株の病原性の検討

培養 T 細胞株(1×10^6 個)を Dsg3^{-/-}B 細胞(5×10^6

個)とともに Rag2^{-/-}マウスに移植し、抗 Dsg3 抗体産生と皮膚粘膜に生じる PV 発現型により病原性を調べた。Dsg3^{-/-}B 細胞は PV モデルマウス作成法に準じて免疫した Dsg3^{-/-}マウス脾細胞から MACS CD4 および CD8 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Germany)を用いて T 細胞を除去した後に MACS B220 MicroBeads により得た。培養 T 細胞株は移植前にリンホセパール II(IGL, Japan)を用いた比重遠心法により死細胞を除去して使用した。陽性コントロールとして、培養 T 細胞株の代わりに脾臓から CD4 および CD8 MicroBeads を用いて T 細胞をエンリッチした分画 (10×10^6 個)を用いた。陰性コントロールには Dsg3^{-/-}B 細胞のみを移植したマウスや、病原性を示さなかった Dsg3 反応性 T 細胞と Dsg3^{-/-}B 細胞を移植したマウスを作成した。移植後、経時的に採血し、血漿中の IgG 抗 Dsg3 抗体価を ELISA 法で測定した。採血終了後、マウス口蓋粘膜を採取し病理組織学的検討と Alexa488 標識抗マウス IgG 抗体を用いた直接蛍光抗体法により口蓋に沈着する IgG の検討を行った。(倫理面への配慮)

本研究は慶応義塾大学医学部動物実験委員会の承認のもと、同ガイドラインを遵守して行われた。

C. 研究結果

a) rmDsg3 の作成

rmDsg3 の純度は 80%、rmDsg3-1~5 の純度は各 95%以上であった。

b) Dsg3 反応性 T 細胞株の樹立

限界希釈法により計 52 個の Dsg3 反応性 T 細胞株を樹立した。T 細胞株の反応性は多様で、rmDsg3-1~4 のいずれかを認識した。また、すべての T 細胞株は MHC class II 拘束性であった。12 株は TCR β 鎖遺伝子解析によりクローンであることが確認された。

c) TCRV β 遺伝子再構成の検出

Dsg3 反応性 T 細胞クローンの V β 遺伝子を表 1 に示す。V β 遺伝子と認識する Dsg3 断片との関連は明らかでなかった。

d) サイトカイン発現解析

Dsg3 反応性 T 細胞クローンのサイトカイン mRNA 発現パターンを表 1 に示す。4 株が Th1 型(IFN- γ)、1 株が Th2 型(IL-4)、5 株が Th0 型(IFN- γ &IL-4)であった。

e) Dsg3 反応性 T 細胞株の病原性の検討

長期の培養が可能であった Dsg3 反応性 T 細胞 15 株で病原性の検討を行った。Th1 型 T 細胞 6 株は B 細胞と共に Rag2^{-/-}マウスへ移植後、マウス体内での抗 Dsg3 抗体価上昇、PV 発現型を認めなかった。一

方、Th0 型 9 株中 5 株は移植後にマウス体内での抗 Dsg3 抗体価の上昇 (図 1)、PV 発現型を認めた。また口蓋粘膜上皮細胞間に IgG の沈着と病理組織学的には PV に特徴的な棘融解像を認めた。また、*in vivo* で抗 Dsg3 抗体産生を誘導した T 細胞株はすべて *in vivo* での病原性を有していた。

D. 考察

我々は Dsg3 反応性 T 細胞クローン株を樹立し、PV モデルマウスの系を応用することで、T 細胞株の *in vivo* での病原性の解析を行うことができた。この実験系は PV に限らず広く自己免疫疾患に応用可能で、自己免疫病態と関連する因子の同定、さらにはそれらに対する分子標的療法の開発に有用と考えられる。

PV モデルマウスから樹立した T 細胞株はすべて MHC クラス II 拘束性であったが、抗原特異性、TCRVβ 鎖、サイトカイン発現能は多彩であった。解析した 15 株のうち、*in vivo* での抗体産生誘導能をみとめた 6 株すべてで *in vivo* における病原性を認めた。逆に、*in vivo* での抗体産生誘導能を有さない T 細胞株は病原性を発揮できず、*in vivo* での抗体産生誘導能が T 細胞の病原性と有意に相関した。このことは PV の病態において、自己抗体産生誘導能が T 細胞機能として重要であることを意味する。個々の T 細胞株をサイトカイン発現パターンにより層別化すると、Th1 型 6 株すべてで病原性を認めなかったのに対し、Th0 型クローン 9 株中 5 株で病原性を認めた。Th1 でなく Th0 の T 細胞クローンでのみ病原性を認めたことは Th2 サイトカインの重要性を想定させるが、結論を得るにはさらにデータ集積が必要である。今後、Dsg3 反応性 T 細胞クローン株の数を増やして検討することにより、T 細胞の病原性を規定する因子の同定をめざす。

E. 結論

PV モデルマウスを用いることで Dsg3 反応性 T 細胞クローン株の *in vivo* での病原性を評価する実験系を確立した。本スクリーニング法は T 細胞の病原性を規定する因子の同定に有用と考えられる。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 安岡秀剛、桑名正隆: ベーチェット病病態形成における T リンパ球細胞の役割. 医学のあゆみ、215(1):28-32, 2005.
- 2) 桑名正隆: 自己反応性 T 細胞 - 自己免疫疾患における役割 - . 炎症と免疫、13(6):114-116, 2005.

2. 学会発表

- 1) 桑名正隆: 自己反応性 T 細胞がどのように病気をおこすのか? 第 49 回日本リウマチ学会総会 (横浜). 2005. 4.
- 2) Kuwana M: Cryptic nature of epitopes recognized by autoreactive T cells in human autoimmune diseases. International Symposium: Autoimmunity in Intractable Diseases: From Bench to Clinic (Hakone). 2005. 10.
- 3) Takahashi H, Amagai M, Kuwana M: Evaluation of *in vivo* pathogenicity of autoreactive T cells using a mouse model for pemphigus vulgaris. International Symposium: Autoimmunity in Intractable Diseases: From Bench to Clinic (Hakone). 2005. 10.
- 4) 高橋勇人、天谷雅行、河上裕、桑名正隆: 天疱瘡モデルマウスを用いた自己反応性 T 細胞クローン株の *in vivo* 病原性のスクリーニング法. 第 35 回日本免疫学会総会 (横浜). 2005. 12.
- 5) 桑名正隆: 自己反応性 T 細胞の解析による難治性自己免疫疾患の病態解明と治療. 第 69 回日本皮膚科学会東京支部学術大会 (横浜). 2006.2.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

図とその説明

表 1. Dsg3 反応性 T 細胞クローンの解析結果

| Clone name | Epitope (mDsg3-x) | TCR V β chains usage | Th type | Cytokine profile |
|------------|-------------------|----------------------------|---------|--|
| 135#30 | 1 | 8.2 | Th2 | IL-4, 10, TGF- β |
| 141#70 | 1 | 6 | Th1 | IL-2, IFN- γ , TGF- β |
| 151#10 | 1 | 4 | Th1 | IFN- γ , TGF- β |
| 152#25 | 1 | 1 | Th0 | IL-4, IFN- γ , TGF- β |
| 154#33 | 1 | 8.2 | Th0 | IL-2, 4, 6, 10, IFN- γ , TGF- β |
| 129#30 | 3 | 8.3 | Th1 | IL-2, IFN- γ , TGF- β |
| 129#35 | 3 | 8.3 | Th1 | IFN- γ , TGF- β |
| 140#27 | 3 | 6 | Th0 | IL-2, 4, 10, IFN- γ , TGF- β |
| 147#27 | 3 | 8.2 | Th0 | IL-2, 4, 6, 10, IFN- γ , TGF- β |
| 147#48-2 | 3 | 8.2 | Th0 | IL-2, 4, 6, 10, IFN- γ , TGF- β |
| 149#1 | 4 | 8.1 | ND | |
| 149#19 | 4 | 8.1 | ND | |

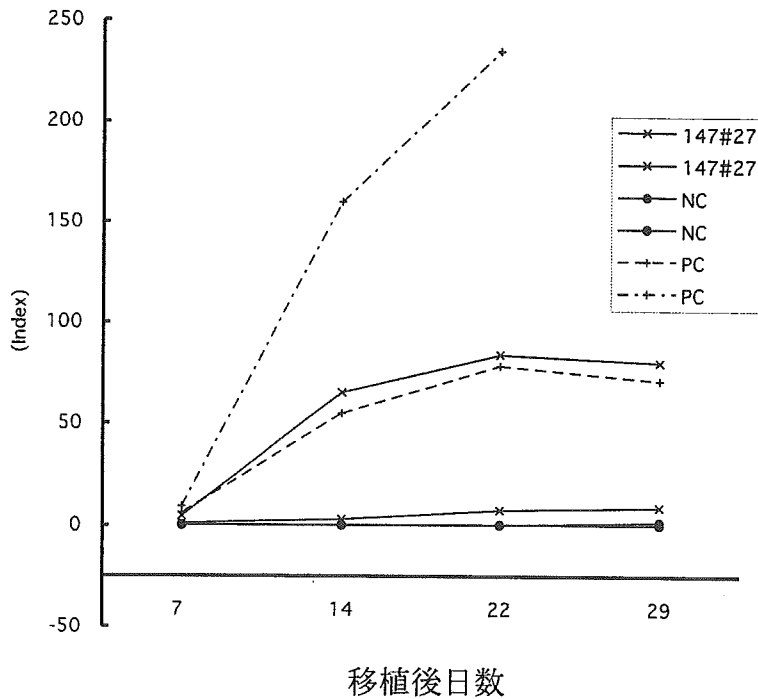


図 1. Rag2^{-/-}マウスにおける Dsg3 反応性 T 細胞クローン (CE147#27) 移植後の抗 Dsg3 抗体価の推移。T 細胞クローン 147#27 を Dsg3^{-/-}B 細胞とともに Rag2^{-/-}マウスに移植し、血漿中の抗 Dsg3 抗体価を ELISA で経時的に調べた。陽性コントロールは脾 T 細胞と Dsg3^{-/-}B 細胞を、陰性コントロールは Dsg3^{-/-}B 細胞のみを移植した。いずれの群も 2 匹の結果を示す。

IV 研究成果の刊行に関する一覧表