

-d 遺伝子を導入した細胞集団から、各 CD1 分子に対する抗体を用いて、positive magnetic sorting 法により CD1 分子の発現量の高い集団を得た。各 transfectant は、CD1a、-b、-c、および -d 分子を高レベルに発現していることを確認した (not shown)。

CD4⁺ V α 24 iNKT、および DN V α 24 iNKT サブセットのサイトカイン産生性の評価

α -GalCer (100 ng/ml) を添加した CD1 遺伝子安定発現 C1R 細胞株 (5.0×10^4)、HeLa 細胞株 (5.0×10^4)、あるいは Mo-DC (5.0×10^4) を APC として、それぞれの V α 24 iNKT サブセット (5.0×10^4) を刺激した。24 時間後、培養上清中の IFN- γ 、および IL-4 を定量することによりサイトカイン産生性の評価を行った。その結果、各 V α 24 iNKT サブセットは、CD1d 拘束性に α -GalCer を特異的に認識して IL-4、IFN- γ を産生したが、DC を APC とした場合、CD4⁺ V α 24 iNKT サブセットに比較し、DN V α 24 iNKT サブセットからの IL-4 産生量が低いことが判明した (図 1C) ($p < 0.01$)。

また、iDC を APC として用いた場合、DN サブセットの産生する IFN- γ および IL-4 は、CD4 サブセットに比較し少なかった。これらの結果は、これまでのヒト NKT サブセットに関する報告に一致する。しかし、LPS によって成熟した DC を APC として用いた場合、DN NKT サブセットにおける IFN- γ 産生は CD4 サブセットと同等レベルに達した。これに対して抗 CD3/CD28 抗体による刺激では、CD4、DN サブセット共に同等レベルのサイトカイン産生を示した。特に、CD4 サブセットは、抗 CD28 抗体を用いて共刺激を加えることにより、サイトカイン産生性が上昇したことから、そのサイトカイン産生は DN サブセットに比較し、共刺激依存性が高いことが予想された (図 1D)。

CD4⁺ V α 24 iNKT サブセット、DN V α 24 iNKT サブセットが、Mo-DC の成熟に及ぼす影響の評価

96 穴丸底プレートの 1 well につき、Mo-DC (3.0×10^4) と各 V α 24 iNKT サブセット (1.5×10^4) を共培養し、Mo-DC の IL-12 p70 (24 時間)、IL-12 p40 (48 時間)、IL-6 (48 時間) 産生を評価した。その結果、 α -GalCer によって活性化をされたそれぞれの CD4 V α 24 iNKT サブセットと共培養した Mo-DC (以下、 α -GalCer 活性化 CD4 V α 24 iNKT/Mo-DC とする) に IL-12p70、IL-12 p40、IL-6 の高産生が認められた ($p < 0.01$) (図 2A)。

また、共培養 24 時間後の DC における HLA-DR、CD40、CD80、CD83 CD86 および OX40L 分子の発現を評価したところ、 α -GalCer 添加により、CD4 V α 24 iNKT/Mo-DC、および DN V α 24 iNKT/Mo-DC は、無刺激の V α 24 iNKT/Mo-DC に比較して、CD83 分子、および CD86 分子の著しい発現上昇を認めた。特に α -GalCer 添加により、DN V α 24 iNKT/Mo-DC は、CD83 分子、CD86 および OX40L 分子の著しい発現上昇を認めた (図 2B, C)。

アロ反応性に及ぼす影響の評価

Mo-DC (1.0×10^4)、naive CD4⁺ T (5.0×10^3) に対して、図に示す割合で NKT サブセットを加えてアロ反応性を評価したところ、 α -GalCer により活性化された iNKT サブセットと共培養した DC のアロ MLR 誘導活性は NKT 細胞の数に依存して著しく上昇したが、V α 24 iNKT サブセット間でアロ反応性に及ぼす影響に有意な差を認めなかった (図 3A)。

分化 Th 細胞におけるケモカイン受容体の発現、および細胞内サイトカインの評価

Mo-DC と共培養した DN/CD4 サブセットの比を人工的に 100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 0:100 に変化させ、これにより分化したアロ Th 細胞における CCR4、および CXCR3 の発現比、および細胞内 IFN- γ 、IL-4 陽性細胞数を Flow cytometry により評価した。その結果、Mo-DC と共培養した DN/CD4 サブセットの比が上昇するに従って、分化した Th 細胞における CCR4/CXCR3 比が上昇し、IFN- γ 陽性細胞数の減少と IL-4 陽性細胞数の増加が認められた (図 3B, D)。これらの効果は、蛋白合成阻害剤である emetine によって処理された各 V α 24 iNKT サブセットを用いた場合では消失することから、これらのサブセットが抗原特異的な刺激を受けて新たに合成する蛋白が、DC1/DC2 の分化に大きく影響を与えているものと考えられる (図 3C, D)。

自己反応性 Th 細胞抑制能の評価

α -GalCer により活性化を受けた CD4 および DN iNKT サブセットと共培養した DC は、各 dose の GAD65 ペプチドに対して、GAD65 自己反応性 T 細胞クローン SA32.5 および MK20.2 の増殖応答を抑制した (図 4A)。これらの T 細胞クローンの増殖抑制は分裂が抑制されることに起因することが明らかとなった (図 4B)。以上の観察は、CD4 および DN iNKT サブセットは、その

活性化を通して DC の免疫寛容性分化を誘導することにより、自己反応性 Th 細胞の分裂・増殖を抑制することを示唆するものである。

D. 考察

1998年、Wilson S. B. らによつて、1型糖尿病の双生児および三胎児では、DN V α 24 iNKT サブセットが著しく減少していることが報告された。特に1型糖尿病進行性の患者では、DN V α 24 iNKT サブセットは、IFN- γ のみを産生しIL-4を産生しないことから、DN V α 24 iNKT サブセットからのIL-4産生の欠如が、Th1優位な免疫応答を誘導し、1型糖尿病発症を促進するものと考えられてきた。また、種々の自己免疫疾患あるいはアレルギー性疾患患者においてDN V α 24 iNKT細胞の減少、および機能不全が相次いで報告され、DN V α 24 iNKTサブセットがこれらの病因、病態に関与することが示唆されてきた。

NODマウスを用いた研究では、 α -GalCerを投与することにより脾所属リンパ節にNKT細胞、およびミエロイド系DCが集積し、これらのDCからのIL-12産生が減少して病態が改善されることが報告されている。しかし、マウスにはCD1a、-b、-c分子が存在せず、そのDCの分化にTSLPが関与しないなど、DCとNKT細胞を取り巻く分子環境はヒトとは大きく異なっている。

そこで我々は、CD4⁺ V α 24 iNKTサブセットとDN V α 24 iNKTサブセットは、ヒト生体内において異なる免疫制御機構を有しており、DCを介してそれぞれが異なるTh分化を誘導しているのではないかという仮説をたて、CD4⁺、およびDN V α 24 iNKTサブセットに分離精製し、独自のシステムを用いて検証した。解析には、ヒト生体内に存在するミエロイド系DCの主要なサブセットであるCD1c (BDCA-1)⁺ DCに類似し、*in vitro*で誘導する方法が確立されているmonocyte由来DC (Mo-DC)を用いた。

我々が樹立した健常人由来のCD4⁺、およびDN V α 24 iNKTサブセットは、ともにCD1d分子拘束性に α -GalCerを認識し、Th1サイトカインであるIFN- γ 、およびTh2サイトカインであるIL-4を産生した。しかし、DN V α 24 iNKTサブセットの産生するIL-4は、CD4⁺ V α 24 iNKTサブセットのものに比較して少ないため、自己免疫疾患に認められる過剰なTh1応答を抑制するためのIL-4の供給源として考えるのは困難である。むしろ、DN V α 24 iNKTサブセットのサイトカイン産生性から考慮すると、以前か

ら考えられていたように、このサブセットがTh1応答に重要な役割を演じているように思われた。しかし、実際に*in vitro* T細胞分化誘導システムを用いて得られた結果は異なっていた。それを以下にまとめる。

α -GalCer活性化CD4⁺ V α 24 iNKT/Mo-DCによつて刺激されたnaive CD4⁺ T細胞は、Th1に分化した。一方、 α -GalCer活性化DN V α 24 iNKT/Mo DCによつて刺激されたnaive CD4⁺ T細胞はTh2に分化した。この効果は、蛋白合成阻害剤であるemetineによつて処理された各V α 24 iNKTサブセットを用いた場合に消失することから、これらのサブセットが抗原特異的な刺激を受けて新たに合成する蛋白が、DC1/DC2の分化に大きく影響を与えているものと考えられる。

DCによるIL-12 p70, IL-12 p40, IL-6の産生は、 α -GalCer活性化CD4⁺ V α 24 iNKTサブセットと共培養した場合に顕著に認められた。DCから産生されるIL-12 p70は、Th1細胞分化を誘導する上で重要なサイトカインであるため、 α -GalCer活性化CD4⁺ V α 24 iNKTサブセットが、DCを介してTh1応答を優位に誘導することに一致する。一方、 α -GalCer活性化DN V α 24 iNKTサブセットと共培養したDCのIL-12 p70, IL-12 p40, IL-6産生量はCD4の場合に比較し著しく少なかったが、OX40Lの高発現が認められた。OX40Lは、Th2分化誘導に重要な分子であるため、 α -GalCer活性化DN V α 24 iNKTサブセットが、DCを介してTh2分化を優位に誘導した結果に一致する。

α -GalCer活性化DN V α 24 iNKTサブセットは、naive CD4⁺ T細胞をTh2分化にシフトさせるDC2を誘導する。この現象は、単にV α 24 iNKT細胞サブセットが活性化を受けて産生するサイトカイン産生プロフィールからは予測できないものであったが、DN V α 24 iNKTサブセットの減少あるいは機能不全が自己免疫現象の発症に関与するという前述の可能性と一致する。

さらにMo-DCと共培養したDN/CD4サブセットの比を人工的に100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 0:100に変化させた場合、DNサブセットの比が上昇するに従つて、分化したTh細胞におけるCCR4/CXCR3比が上昇し、IFN- γ 陽性細胞数の減少とIL-4陽性細胞数の増加が認められた。従つて、V α 24 iNKTサブセットのバランスは、末梢におけるTh1/Th2バランスを制御する重要な要因となっている可能性がある。これまで癌、自己免疫疾患の治療において α -GalCer

の投与が試されてきたが、特定の V α 24 iNKT サブセットを動員することにより、Th1、または Th2 にシフトした有効な応答を起こすことが可能かもしれない。1型糖尿病患者をはじめ、種々の自己免疫疾患患者の V α 24 iNKT サブセットが、DCを介して Th 分化をいかに誘導するかは今後の研究課題である。

NOD マウスに α -GalCer を投与することにより、脾所属リンパ節で DC における寛容性の DC 分化が誘導され、病原性の T 細胞が抑制を受けることが知られている。我々の観察では、ヒト CD4 および DN iNKT サブセットは共に α -GalCer によって活性化されることにより、寛容性の DC 分化を誘導する。つまり、DN iNKT サブセットの機能不全が認められる自己免疫疾患において、正常な機能を有する CD4 iNKT 細胞の活性化を通して、病原性の Th 細胞が抑制されることが予想される。

E. 結論

異なるヒト iNKT 細胞のサブセット (CD4/DN) は、DC を介して naive CD4 T 細胞の異なる分化 (Th1/Th2) を誘導する。ヒト iNKT 細胞サブセットのバランス制御による、人為的 Th1/Th2 応答制御の可能性を示唆する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 松下 祥: 抗原特異的免疫療法. *医学のあゆみ*, 208:778-783, 2004
- 3) 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, 52-59, 2004
- 4) 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, 72-82, 2004
- 5) 松下 祥: HLA による免疫応答の制御. *ゲノム医学* 4:453-458, 2004
- 6) 松下 祥: Th2 応答とアジュバント. *感染・炎症・免疫* 34:192-198, 2004
- 7) 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

- 8) 松下 祥: Th2 アジュバント. *アレルギー科* 18:239-246, 2004
- 9) Matsushita S, Liu T-Y. and Uemura Y. Adjuvants that enhance Th2 or Tr responses. *Allergol. Int.* 54(4):507-513, 2005
- 10) 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* 13:213-219, 2005
- 11) 松下 祥, 涌井昌俊, 植村靖史: DC2 細胞を誘導する物質. *臨床免疫*, 44(1):38-45, 2005
- 12) 松下 祥監修: 免疫力がアップする 50 の法則. 法研, 2005

2. 学会発表

- 1) 鈴木元晴, 植村靖史, 松下 祥: ヒトインバリエント 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. 9
- 2) 松下 祥: Th2 応答とアジュバント. 日本アレルギー学会, シンポジウム, 横浜, 2004. 11
- 3) 植村靖史, 鈴木元晴, 劉 天懿, 大山秀樹, 松下 祥: ヒトインバリエント 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. 11
- 4) 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 α 24 インバリエント 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. 12
- 5) 涌井昌俊, 植村靖史, 劉 天懿, 高木理英, 橋本久実子, 中野和久, 成田弥生, 松下 祥: Th1/Th2 アジュバント刺激後のヒト抗原提示細胞に認められる Notch リガンドの発現変化. 日本アレルギー学会, 盛岡, 2005. 10
- 6) 植村靖史, 劉 天懿, 鈴木元晴, 成田弥生, 大山秀樹, 中野和久, 涌井昌俊, 松下 祥: V α 24 インバリエント NKT 細胞サブセットによる DC を介した免疫制御機構の解析. 日本免疫学会, 横浜, 2005. 12

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

なし

Figure 1

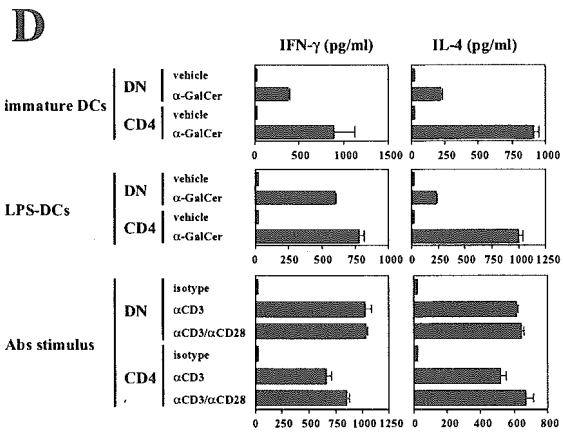
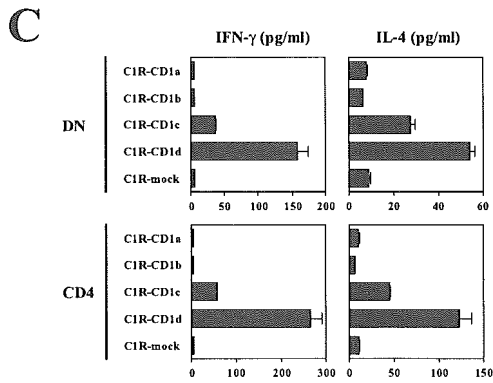
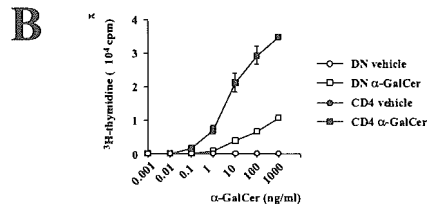
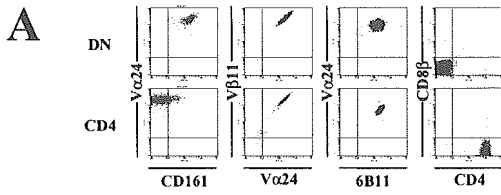


Figure 2

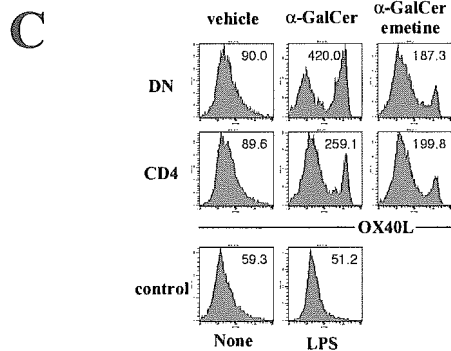
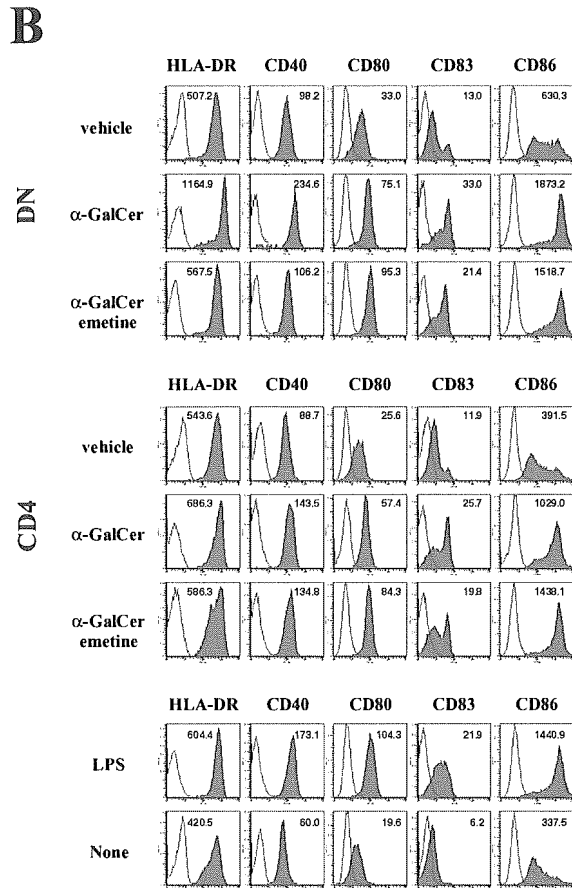
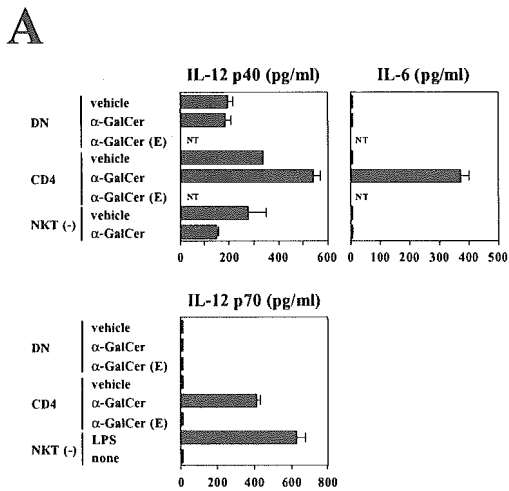


Figure 3

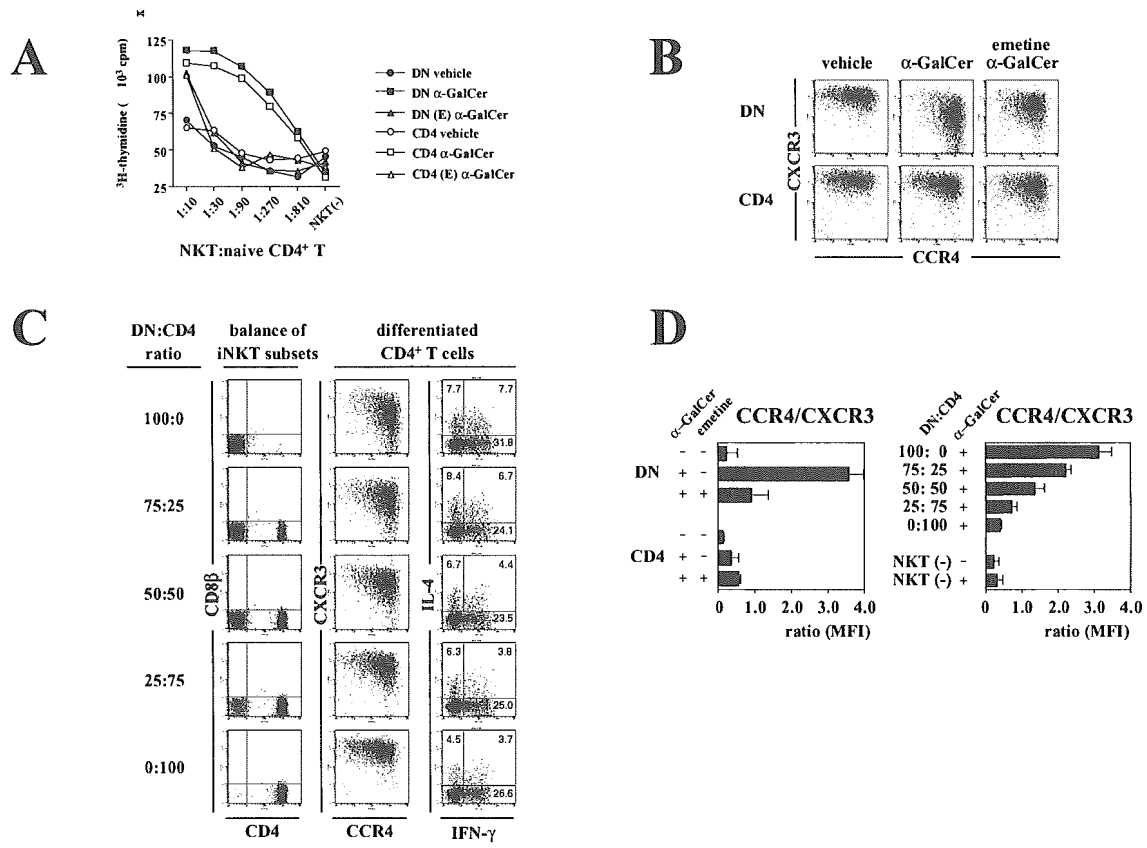
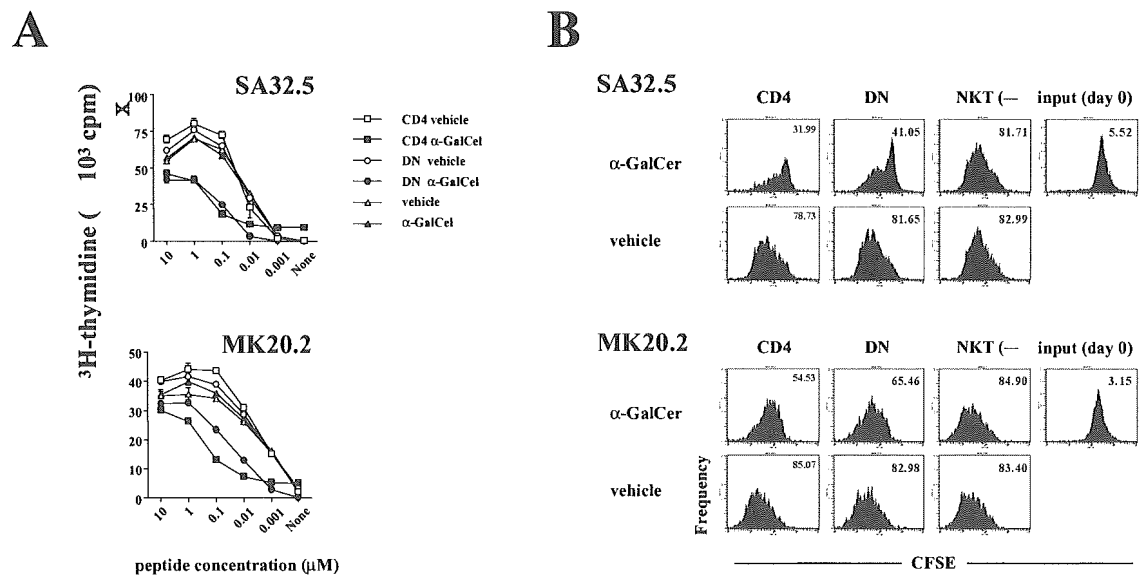


Figure 4



抗原の経口投与により肝臓で誘導される新規免疫調節性T細胞の同定と
その誘導機序・臨床応用に関する研究

分担研究者 若月 芳雄 京都大学医学研究科 講師

研究要旨： 経門脈的に肝に流入する抗原に対する、肝臓固有の抑制性免疫調節の細胞機序を明らかにした。肝類洞に存在する樹状細胞により抗原提示された CD4T 細胞の中に Fas/FasL を発現し、多量の IL-4, IL-10, TGF-beta を産生する細胞亜群を同定し、その誘導機序と免疫抑制機序を明らかにした。この細胞は経口からの抗原投与により誘導可能であり、実験的肝炎モデルにおいて抗原非特異的に肝障害を阻止した。

A. 研究目的

肝臓は胎生期の造血組織であり、胸腺依存的に分化する古典的な細胞と形質が異なる T 細胞群が存在している。肝臓の免疫学的特性として、肝臓あるいは肝臓と並行に移植された臓器は、比較的拒絶反応を受けにくいことが知られている。一方、門脈・大静脈シャントを造設したラットでは、経口免疫寛容が成立しないことから、経門脈的に肝に流入する抗原に対して起こる免疫反応が全身性の免疫寛容の誘導に関わっていることが示唆されてきた。門脈を介する膝ラ氏島細胞の肝臓内への移植は拒絶反応を受けずに生存し続けるため肝臓内においても経門脈的に遭遇する抗原に対して免疫寛容を誘導するような機序が存在することが推測される。我々は 2002 年に、経口からの抗原の投与により、肝臓内において抗原特異的に活性化され、誘導される CD4T 細胞の中に、抑制性の免疫調節細胞が存在することを明らかにしている (J Immunol 2002, 168:2188-2199)。また、我々は、消化管で起こる免疫調節の細胞機序とその臨床的な役割を過去 10 数年間にわたり解析してきた。そこでこれまでの研究成果の蓄積と、上記の新たな知見に基づき、肝臓における抑制性の免疫調節機序の誘導機序を明らかにして、これを能動的に誘導することで、免疫学的機序でおこる肝障害に対して、果たして防衛的な効果が得られるか検討した。

B. 研究方法

本研究では、抗原特異的な CD4 T 細胞の追跡・同定が必須のため、OVA (卵白アルブミン) に対する特異的な T 細胞抗原受容体を強制発現したマウス (D011.10), 及びこれに様々なサ

イトカイン遺伝子の欠失を導入したマウスを用いた。肝障害モデルとしては、上記のマウスあるいは、上記マウスより CD4T 細胞を精製してこれを移入した BALB/c マウスを用いて、リボゾームに封入した OVA を経静脈的に投与して誘導した肝障害 (抗原特異的)、あるいは BALB/c マウスに Concanavalin A を経静脈的に投与して起こす肝障害 (抗原非特異的) モデルを用いた。肝炎阻止の為の前処置としては起炎抗原を投与する前に OVA あるいは PBS を経口で隔日 5 回投与した。肝障害の評価としては、GOT, GPT の測定に加えて、HE と TUNEL 染色にて組織学的にも評価した。免疫学的解析としては、肝臓より浸潤リンパ球を精製して、その構成細胞をフローサイトメトリーで、増殖、サイトカイン産生能は、[3H]サイミジン、ELISA 法を各々用いた。

C. 研究結果

経口からの抗原投与により D011.10 マウスの肝臓およびパイエル板で抗原用量依存的に OVA 特異的 CD4T 細胞の生細胞数比率の減少と死細胞比率の増加を認めた。抗原 5 回投与後、肝臓に特異的に CD4+, Fas+FasL+細胞が出現し、投与抗原特異的 CD4T 細胞全体の約 50% に及んだ。一方抗原の投与により、抗原特異的な CD4T 細胞の肝臓でのアポトーシスも誘導され、その経時変化はパイエル板と比較して緩徐におこりかつ不完全であることが判明した。肝臓で誘導される抗原特異的 CD4+Fas+FasL+細胞は in vitro の抗原刺激に対して低反応性を示すとともに、多量の IL-4 と IL-10, TGF-beta 産生能と抗原非特異的な細胞傷害活性を有していた。この細胞を未感作個体に移入

し OVA で再チャレンジを行うと著明な遅延型過敏反応の抑制と IgE 産生の増強を認め、各々の反応には、FasL, IL-4 が重要な役割を担っていることが抗体による中和実験から明らかとなった。

次に、標識抗原を経口から投与して肝内での分布を検討すると、門脈周囲の肝類洞に存在する CD11c, class II 抗原陽性の細胞に局在することから、肝臓よりこの細胞を単離してその機能を検討した。

CD11c+, class II+細胞を肝臓より単離し、OVA をパルスし、脾臓由来の OVA 特異的細胞と共培養することで、経口より抗原を投与した場合に肝で出現する CD4T 細胞と非常に形質の類似する細胞が得られたこと、またこれは脾臓あるいはパイエル板由来の CD11c+, class II+細胞を用いた場合には、このような細胞が得られなかったことより、肝類洞に存在する樹状細胞が重要な抑制性の CD4T 細胞の誘導に充分であることが判明した。

次に、抗原特異的、非特異的におこる肝障害モデルにおいて OVA 特異的 CD4T 細胞の移入と OVA を経口で前投与することにより、ConA で起こる肝障害を阻止できることが判明した。抗原を経口投与したマウスより肝 CD4T 細胞を単離し、これを移入した個体においても同様に肝障害の抑制 (GOT, GPT の上昇阻止、TUNEL 陽性肝細胞の出現阻止) と肝組織浸潤細胞の IFN-gamma 産生の抑制をみとめたことから、肝障害抑制機序としては、抗原投与により肝に誘導された CD4T 細胞分画が直接的な役割を担っていることが判明した。

D. 考察

PBC や自己免疫性肝炎などの難治性肝疾患の起炎抗原および、肝障害機序、抑制機序の詳細は不明である。今回、経口からの抗原投与と抗原特異的 CD4T 細胞を移入することで、ConA 肝炎を阻止できたことから、免疫学的機序でおこる肝障害において、肝特異的免疫調節性 CD4T 細胞が抗原非特異的に組織障害を阻止し得ることが示された。このことは、ヒトの自己免疫性難治性肝障害においても、肝臓に存在する抑制性 CD4T 細胞を経口からのルートで活性化できれば、その起炎抗原が必ずしも同定できなくとも治療できる可能性を示している。今後の課題としては、臨床的に有意な肝障害阻止効果を得るためには、どの程度の抗原特異的 CD4T 細胞の存在が必要か、またそれを効率良く誘導するためには如何なる方法が可能か検

討する必要がある。今回は動物モデルを用いて、抗原特異的 CD4T 細胞の用量をコントロールして、理論的に初期の目的、すなわち肝臓に免疫調節性細胞を経口からのルートで抗原投与することにより肝障害阻止が可能であることを示した。

E. 結論

肝臓でおこる免疫反応を抑制する調節性 CD4T 細胞を経口からの抗原投与で誘導することが可能である。

その誘導機序として、経門脈敵に流入した抗原を提示する肝類洞樹状細胞の機能が重要な役割を担っている。抑制性免疫調節の破綻は、自己免疫性肝障害の病原機序に関与する可能性があることと、能動的な免疫調節細胞の誘導が自己免疫性肝障害の治療に有効である可能性が本研究により示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Tomohiro Watanabe, Hiroaki Katsukura, Yasuhiko Shirai, Masashi Yamori, Toshiki Nishi, Tsutomu Chiba, Toru Kita, and Yoshio Wakatsuki. A liver tolerates to a portal antigen by generating CD11c+ cells which select FasL+Th2 cells via apoptosis. *Hepatology*. 2003, 38:403-412
- 2) Tomohiro Watanabe, Hiroaki Katsukura, Yasuhiko Shirai, Masashi Yamori, Tsutomu Chiba, Toru Kita, Yoshio Wakatsuki. Helper CD4+ T cells for IgE response to a dietary antigen develop in the live *J Allergy Clin Immunology*, 2003, 111(6): 1375-1385
- 3) Tomohiro Watanabe, Tsutomu Chiba and Yoshio Wakatsuki. Portal Vein Tolerance and Development of Regulatory CD4 T cells in the liver. *Mucosal Immunology Update*. 2004, 4:3-7
- 4) Yamori M, Yoshida M, Watanabe T, Shirai Y, Iizuka T, Kita T, Wakatsuki Y. Antigenic activation of Th1 cells in the gastric mucosa enhances dysregulated apoptosis and turnover of the epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004, 316(4): 1015-1021

- 5) Watanabe T, Yamori M, Kita T, Chiba T, Wakatsuki Y. CD4+CD25+ T cells regulate colonic localization of CD4 T cells reactive to a microbial antigen. *Inflamm Bowel Dis.* 2005, 11(6):541-550
- 6) Itoh T, Seno H, Kita T, Chiba T, Wakatsuki Y. Th response to *Helicobacter pylori* differs between patients with gastric ulcer and duodenal ulcer. *Scand J Gastroenterol.* 2005, 40(6):641-647

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

- 1) 国内特許出願中 特願 2004-307885
- 2) 国外特許出願中 PCT/JP2005/019293

PBCにおけるCD4陽性T細胞を介した免疫制御

分担研究者 下田 慎治 九州大学病態修復内科学 助手

研究要旨： 原発性胆汁性肝硬変（PBC）での自己抗原ピルビン酸脱水素酵素 E2 コンポーネント（PDC-E2）抗原に反応する CD4 陽性 T 細胞クローン（TCC）を用いた解析から、側副刺激の欠損した抗原提示細胞（L-DR53）を用いることでこの TCC の一部はアナジーとなり、アナジーが誘導された T 細胞は調節性 T 細胞（regT）になることが明らかになった。一方末梢単球由来の調節性樹状細胞（regDC）を用いて、L-DR53 と同様に TCC を regTCC に変換できるかを検討したが、TCC は regT へとは変換しなかった。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変（PBC）における自己抗原（PDC-E2）反応性 T 細胞の免疫制御

B. 研究方法

抗原提示細胞（APC）として HLA-DR53 を遺伝子導入した L-DR53 や免疫調節性樹状細胞（regDC）を用いて、自己抗原反応性 T 細胞クローン（TCC）の増殖能の検討と、最終的にこの TCC が免疫調節性 TCC（regTCC）に変換されるかを検討した。

C. 研究結果

L-DR53 では regTCC の誘導が可能であった。regDC は通常の DC よりも抗原提示能は制御されたが、最終的に TCC を regTCC に変換できなかった。

D. 考察

この3年間のまとめとして、原発性胆汁性肝硬変（PBC）での自己抗原ピルビン酸脱水素酵素 E2 コンポーネント（PDC-E2）抗原に反応する CD4 陽性 T 細胞クローン（TCC）を用いた解析から、この TCC が HLA DR53 に拘束されていること、側副刺激の欠損した HLA DR53 分子導入マウス線維芽細胞（L-DR53）を抗原提示細胞（APC）として用いることでこの TCC の一部はアナジーとなり、アナジーが誘導された T 細胞は抗原特異的に他の細胞の反応を調節する機能を有する T 細胞（regT）になることが明らかになった。しかし L-DR53 を用いた場合、対象とする T 細胞の HLA 拘束性は DR53 に限定されるため、臨床応用が限られてくる可能性があった。

一方末梢単球由来の未成熟樹状細胞（DC）をデキサメサゾン（DEX）やビタミン D（VitD）で共培養す

ると調節性樹状細胞（regDC）になることや、成熟 DC にする際に IL-10, TGF- β で共培養するとこれも regDC になることが今までの研究で明らかとなっていたため、次に私は HLA 拘束性が明らかではない場合でも使用できる APC として、この2種類の regDC を用いて、今までに樹立した TCC に対して L-DR53 と同様に TCC を regTCC に変換できるかを検討した。結果 DEX 処理未成熟 DC やサイトカイン処理成熟 DC を APC として用いた場合には確かに TCC の増殖は減少したが、L-DR53 を APC として用いた場合に観察されたように増殖反応が消失するまでには至らなかった。更には、regDC を APC とした TCC は、L-DR53 を APC とした場合の TCC とは異なり regT へとは変換しなかった。

以上の結果より、今回検討した regDC では疾患を制御しにくいことが示唆された。regDC と L-DR53 の違いとして L-DR53 が付着細胞であることから、今後は HLA 拘束性が明らかではない場合でも使用できる APC として、対象患者由来の線維芽細胞を採取しこれに IFN- γ 処理し HLA class II 発現をさせたものが regT を誘導できる APC になる可能性を検討したい。

E. 結論

L-DR53 で誘導した regTCC は治療に応用できる可能性があった。しかし regDC で誘導した TCC は十分な regTCC としての機能を有さないことから治療に応用しにくいことが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Nakamura M, Takii Y, Ito M, Komori A, Yokoyama T, Shimizu-Yoshida Y, Koyabu M, Matsuyama M, Mori T, Kamihira T, Daikoku M, Migita K, Yatsushashi H, Nozaki N, Shimoda S, Ishibashi H. Increased expression of nuclear envelope gp210 antigen in small bile ducts in primary biliary cirrhosis. J Autoimmun. 2006, 26(2):138-145
- 2) Nakamura M, Shimizu-Yoshida Y, Takii Y, Komori A, Yokoyama T, Ueki T, Daikoku M, Yano K, Matsumoto T, Migita K, Yatsushashi H, Ito M, Masaki N, Adachi H, Watanabe Y, Nakamura Y, Saoshiro T, Sodeyama T, Koga M, Shimoda S, Ishibashi H. Antibody titer to gp210-C terminal peptide as a clinical parameter for monitoring primary biliary cirrhosis. J Hepatol. 2005, 42(3):386-392
- 3) Kamihira T, Shimoda S, Nakamura M, Yokoyama T, Takii Y, Kawano A, Handa M, Ishibashi H, Gershwin ME, Harada M. Biliary epithelial cells regulate autoreactive T cells: implications for biliary-specific diseases. Hepatology. 2005, 41(1):151-159
- 4) Kamihira T, Shimoda S, Harada K, Kawano A, Handa M, Baba E, Tsuneyama K, Nakamura M, Ishibashi H, Nakanuma Y, Gershwin ME, Harada M. Distinct costimulation dependent and independent autoreactive T-cell clones in primary biliary cirrhosis. Gastroenterology. 2003, 125(5):1379-87
- 5) Shimoda S, Nakamura M, Ishibashi H, Kawano A, Kamihira T, Sakamoto N, Matsushita S, Tanaka A, Worman HJ, Gershwin ME, Harada M. Molecular mimicry of mitochondrial and nuclear autoantigens in primary biliary cirrhosis. Gastroenterology. 2003, 124(7):1915-25
- 6) Tanimoto H, Shimoda S, Nakamura M, Ishibashi H, Kawano A, Kamihira T, Matsushita S, Gershwin ME, Harada M. Promiscuous T cells selected by Escherichia coli: OGDC-E2 in primary biliary cirrhosis. J Autoimmun. 2003, 20(3):255-63

2. 学会発表

- 1) 下田慎治他：原発性胆汁性肝硬変患者および健常者の自己抗原反応性T細胞の解析. 第41回日本肝臓学会総会. 大阪, 2005. 6-16-17

- 2) 下田慎治他：原発性胆汁性肝硬変患者および健常者の自己抗原反応性T細胞の解析. 第35回日本免疫学会総会. 横浜, 2005. 12. 13-15

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

なし

自己免疫性肝疾患における細胞性免疫応答の解析と治療応用に関する研究

分担研究者 喜多 宏人 自治医科大学消化器内科 助手

研究要旨： 原発性胆汁性肝硬変（PBC）に対する画期的な治療法の開発を目的とした。特に、自己抗原特異的T細胞を制御することにより PBC の進行を制御することが可能であるかどうかを明らかにすることを目標とした。PBC の自己抗原である抗ミトコンドリア抗体の主たる対応抗原であるピルビン酸脱水素酵素の E2 コンポーネント（PDC-E2）を特異的に認識する CD8 陽性自己反応性T細胞がどのような機序により生体内で活性化を受け増殖しているのかは明らかでない。抗ミトコンドリア抗体陰性患者においても CD8 陽性自己反応性T細胞が活性化されているかどうかを明らかにするため、抗ミトコンドリア抗体陰性患者における CD8 陽性自己反応性T細胞応答を解析した。また、同様に抗ミトコンドリア抗体陰性患者における CD4 陽性自己反応性T細胞応答についても併せて解析した。これらの抗ミトコンドリア抗体陰性患者の血清中の抗体反応についても解析した。抗ミトコンドリア抗体陰性 PBC 患者末梢血中にも CD8 陽性自己反応性T細胞や CD4 陽性自己反応性T細胞応答が存在しており、抗ミトコンドリア抗体陰性 PBC においても、T細胞レベルでの自己抗原に対する異常反応が病態に関与している可能性が示唆された。抗ミトコンドリア抗体陰性 PBC と抗ミトコンドリア抗体陽性 PBC は自己反応性T細胞の活性化という点で共通しており、これらの自己反応性T細胞の制御が病態進展を抑制する治療法につながる可能性が示された。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変（PBC）の病因を明らかにすることにより、PBC に対する画期的な治療法を開発することを目的とした。特に、PBC における細胞性免疫応答を解析することにより、自己抗原特異的T細胞やNKT細胞を標的としたPBC に対する免疫療法を開発することに焦点をおいた。

B. 研究方法

PBC は臓器特異的自己免疫疾患であり、自己抗原である抗ミトコンドリア抗体の主たる対応抗原であるピルビン酸脱水素酵素の E2 コンポーネント（PDC-E2）を特異的に認識する CD8 陽性自己反応性T細胞が PBC 患者の末梢血及び肝臓に存在する。しかしながら、これらの CD8 陽性自己反応性T細胞がどのような機序により生体内で活性化を受け増殖しているのかは、依然として不明である。PBC は臨床的に一様ではなく、自己抗体陰性 PBC や自己免疫性肝炎とのオーバーラップなど、多彩な病像を呈する。抗ミトコンドリア抗体陰性患者においても、抗ミトコンドリア抗体陽性患者と同様に CD8 陽性自己反応性T細胞が活性化されているかどうかを明らかにするために、抗ミトコンドリア抗体陰性患者における CD8 陽性自己反応性T細胞応答を解析した。抗原エピトープで

ある PDC-E2₁₅₉₋₁₆₇ ペプチドをパルスした樹状細胞を抗ミトコンドリア抗体陽性および陰性 PBC 患者末梢血と混合培養する事により、PDC-E2 特異的細胞障害性T細胞（CTL）を誘導した。PDC-E2₁₅₉₋₁₆₇ ペプチドをパルスした HLA-A2 陽性標的細胞に対する傷害活性を測定することにより、自己反応性T細胞の抗原特異的傷害活性を評価した。また、抗ミトコンドリア抗体陰性患者末梢血中の自己反応性 CD4 陽性T細胞の頻度を ELISPOT 法で解析した。

C. 研究結果

PBC 患者末梢血中には CD8 陽性で自己抗原である PDC-E2 抗原を特異的に認識する自己抗原特異的T細胞が存在し、抗原刺激に伴い特異的に誘導可能であった。自己抗原特異的 CD8 陽性T細胞は抗原特異的な細胞傷害性活性を示した。抗ミトコンドリア抗体陽性 PBC 患者末梢血中から PDC-E2 特異的 CTL が誘導された。また、抗ミトコンドリア抗体陰性 PBC 患者末梢血中にも CD8 陽性自己反応性T細胞が存在していた。同様に抗ミトコンドリア抗体陰性 PBC 患者末梢血中に CD4 陽性自己反応性T細胞が存在した。

D. 考察

本研究を遂行することにより、PBCの発症に自己抗原特異的CD8 T細胞やCD4 T細胞等の細胞性免疫応答が密接に関連していることが明らかになった。また、抗ミトコンドリア抗体陰性PBC患者末梢血中にもCD8陽性自己反応性T細胞が存在していることが明らかにされ、抗ミトコンドリア抗体陰性PBCにおいても、自己抗原に対するT細胞レベルでの異常反応が病態に関与している可能性が示唆された。又、抗ミトコンドリア抗体陰性PBCと抗ミトコンドリア抗体陽性PBCは、自己反応性T細胞の活性化という点で共通しており、これらの自己反応性T細胞の制御が、病態進展を抑制する可能性が示された。

E. 結論

抗ミトコンドリア抗体陰性PBCと抗ミトコンドリア抗体陽性PBCは、自己反応性T細胞の活性化という点で共通しており、これらの自己反応性T細胞の制御が、病態進展を抑制する可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Zhe-Xiong Lian, Tomoyuki Okada, Xiao-Song He, Hiroto Kita, Yong-Jun Liu, Aftab A. Ansari, Kentaro Kikuchi, Susumu Ikehara, and M. Eric Gershwin ; Heterogeneity of Dendritic Cells in the Mouse Liver: Identification and Characterization of Four Distinct Populations. *The Journal of Immunology* 170:2323-2330, 2003
- 2) Hiroto Kita, Xiao-Song He, M. Eric Gershwin ; Application of Tetramer Technology in Studies on Autoimmune Diseases. *Autoimmunity Review* 2; 43-49, 2003
- 3) Hiroto Kita, Aftab A. Ansari, Xiao-Song He, Zhe-Xiong Lian, Judy Van de Water, Ross L. Coppel, Velimir Luketic, Marshall Kaplan, Hideaki Inamori, Norio Isoda, Kentaro Sugano, Michio Imawari, and M. Eric Gershwin ; Proteasome is Required for Class I-restricted Presentation by Fc γ Receptor-Mediated Endocytosis in Primary Biliary Cirrhosis. *J of Autoimmunity* 21; 175-182, 2003
- 4) Hiroto Kita, Michio Imawari, M. Eric Gershwin; Cellular Immune Response in

Primary Biliary Cirrhosis. *Hepatology Research* 28:12-17, 2004

- 5) Hiroto Kita, Xiao-Song He, M. Eric Gershwin ; Autoimmunity and Environmental Factors in the Pathogenesis of Primary Biliary Cirrhosis. *Annals of Medicine* 36:72-80, 2004
- 6) Hiroto Kita: Are Antibodies to Carbonic Anhydrase Disease Specific Marker? *Hepatology Research* 30, 238-9, 2004
- 7) Hiroto Kita: PBC and eosinophilia: New insight from autoantibody response. *Hepatology Res* 32:12-13, 2005
- 8) Hiroto Kita: A role of NKT cells in HCV infection and development of hepatocellular carcinoma: Are they protective or destructive? *Hepatology Res* 32:197-199, 2005
- 10) Hiroto Kita: Family study in PBC as a clue to the possible involvement of genetic and environmental factors. *Hepatology Res* 33: 5-6, 2005
- 11) 喜多宏人: PBCの発症機序、細胞生物学講座. *細胞* 36(5):207-211, 2004
- 12) 喜多宏人, M. E. Gershwin: 原発性胆汁性肝硬変における樹状細胞の自己抗原提示機. *Minophagen Medical Review* 49: 218-221, 2004
- 13) 喜多宏人: 抗ミトコンドリア抗体<特集> 検査値を読む. *内科* 93(6):1242, 2004
- 14) 喜多宏人: PDC-E2 とキラー T細胞 PBC, PSC の最近の話題. *肝胆膵* 49(2)179-183, 2004
- 15) 喜多宏人: CD8陽性自己反応性T細胞の活性化を抗原特異的に阻害するT細胞受容体アンタゴニスト, 特集 II 肝疾患における免疫療法. *消化器科* 36(5):541-544, 2004
- 16) 喜多宏人: T細胞・B細胞 肝疾患と免疫 医薬ジャーナル社 (分担執筆):52-59, 2005
- 17) 喜多宏人, 宮川浩, 上野義之, 稲森英明, 磯田憲夫, 小野和則, 佐藤慎, 砂田富美子, 井戸健一, Gershwin ME, 井廻道夫, 菅野健太郎: 原発性胆汁性肝硬変における自己反応性T細胞の解析. *マイライフ社, 消化管と免疫* 41:36-39, 2005
- 18) 喜多宏人: PBC 消化器疾患の分子生物学 分子消化器病学. 先端医学社, 2:49-54, 2005

2. 学会発表

- 1) 喜多宏人: 原発性胆汁性肝硬変における細胞障害性T細胞応答 (講演). 第29回肝臓研究会. 2003. 1. 18
- 2) 喜多宏人: 原発性胆汁性肝硬変における自

己抗原特異的細胞障害性T細胞（講演）. 第10回自己抗体と自己免疫シンポジウム, 2003. 3. 8

- 3) 喜多宏人, Aftab A. Ansari, Xiao-Song He, et al. : PROTEASOME IS REQUIRED FOR CLASS I-RESTRICTED PRESENTATION OF EXOGENOUS AUTOANTIGEN ACQUIRED BY FC γ RECEPTOR-MEDIATED ENDOCYTOSIS BY HUMAN DENDRITIC CELLS. 第89回日本消化器病学会総会, 2003. 4. 26
- 4) 喜多宏人, Olga V. Naidenko, Mitchell Kronenberg et al : 原発性胆汁性肝硬変患者末梢血及び肝臓内に存在するNKT細胞のヒトCD1dテトラマーを用いた解析. 第53回日本肝臓学会総会, 2003. 5. 22
- 5) 喜多宏人, M. Eric Gershwin : 原発性胆汁性肝硬変における樹状細胞の自己抗原提示機序(講演), 第14回 The meeting of Liver and Immunology, 2003. 9. 6
- 6) 喜多宏人, M. Eric Gershwin : 原発性胆汁性肝硬変におけるCD8陽性自己反応性T細胞の活性化を抗原特異的に阻害するT細胞受容体アンタゴニズムの解析. シンポジウム3, 肝疾患治療への免疫学の挑戦. DDW-Japan 2003. 10. 15
- 7) 喜多宏人, 宮川浩, 上野義之, et al : 原発性胆汁性肝硬変における自己抗原特異的細胞障害性T細胞のサイトカイン産生能に関する検討. 第40回日本肝臓学会総会, 東京. 2004. 6
- 8) 喜多宏人, 宮川浩, 上野義之, et al : 原発性胆汁性肝硬変における自己反応性T細胞の解析. シンポジウムIII, 肝免疫の新しい展開. 第41回日本消化器免疫学会総会, 滋賀. 2004. 7
- 9) 喜多宏人, 上野義之, 宮川浩 : 原発性胆汁性肝硬変の胆管障害における自然免疫と獲得免疫の役割. パネルディスカッションII, 自己免疫性消化器疾患の病態と診断と治療の新しい展開. 第91回日本消化器病学会総会, 東京. 2005. 4. 14-16

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
なし

PBC モデルマウスの作製に関する研究

分担研究者 松浦 栄次 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻
病態機構学講座細胞化学分野 助教授

研究要旨： 平成17年度より、マウスにおけるPDC-E2に対する細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導と原発性胆汁性肝硬変(PBC)モデルの開発を目的として研究を開始した。具体的には、以下の実験を計画し実施中である。ヒトHLA-A0201遺伝子を導入(ノックイン)したトランスジェニックマウス(HHDマウス)、雌性、6週齢をPDC-E2(159-167)ペプチドあるいはホスファチジルエタノールアミン修飾ペプチドをCFAおよびMDP含有リポソームを用いて免疫しCTLを誘導する。CTL活性検討には、PDC-E2(1-414)遺伝子をpIRES2-EGFPに導入し、HLA-A0201マウス由来RMA-HHD細胞へのトランスフェクション後、GFPおよびネオマイシンでセレクションを行うことで樹立したPDC-E2(1-141)/HLA-A0201安定発現株を用いる。免疫マウスの肝臓の病理標本を調製し、胆管の周囲における様々な単核球細胞、特に、CD4陽性、 $\alpha\beta$ TCR陽性T細胞や種々のリンパ球の集簇・浸潤を観察する。

A. 研究目的

「マウスにおけるPDC-E2に対する細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導と原発性胆汁性肝硬変(PBC)モデルの開発」

本年より、当該難治性疾患克服研究事業の研究分担を開始したため、研究目的、現在までの研究結果に合わせて今後の実施計画を記載する。

本研究は、米国カリフォルニア大学デイビス校のM. Eric Gershwin教授、Patrick SC Leung博士、仏国パスツール研究所Francois Lemonnier博士、埼玉医科大学微生物学講座赤塚俊隆教授、松井政則博士との共同で実施している。

原発性胆汁性肝硬変(PBC)は、難治性の肝臓特異的な自己免疫疾患であり、炎症を伴った肝内胆管損傷が病理学的特徴である。破壊された胆管の周囲には様々な単核球細胞、特に、CD4陽性、 $\alpha\beta$ TCR陽性T細胞、胆管上皮には、種々のリンパ球の集簇・浸潤が見られる。

PBC患者では、発症のかなり以前より血中の抗ミトコンドリアドリア抗体(AMA)が出現すると共に、総IgM抗体量の上昇が見られる。また、圧倒的に女性に発症することも知られている。PBC患者末梢血中に出現するAMAは、ミトコンドリアに存在するピルビン酸脱水素酵素複合体のE2コンポーネント(E2 component of

pyruvate dehydrogenase complex ; PDC-E2)を認識していることが明らかになっている。Van de WaterらやShimodaらにより、CD4陽性T細胞のエピトープがPDC-E2の163-176番目のアミノ酸配列であること、また、AmanoらによりAMAの認識するエピトープ(B細胞エピトープ)がPDC-E2ペプチドの169-183番目のアミノ酸配列であり、更に、173番目のリジン(K)がリポイル化されることが認識に必須であることが示された。

ところで、Kitaらは、PBC患者末梢血単核球からCTLをクローニングしそれらのT細胞エピトープがPDC-E2の159-167アミノ酸部分であり、かつ、HLA-A*0201に拘束性であることを報告した。

これまでの動物を用いた実験では、PDC-E2のペプチドを、アジュバンドを用いて免疫することで、AMAを容易に誘導できることは確かめられているが胆管炎を発症させるに至っていない。また、前述の通り、PBC患者末梢血単核球細胞より、PDC-E2(159-167)に特異的なCTLがクローニングされているものの、実験動物におけるCTL誘導については報告がない。PBCに関しては、現在までに、免疫学的かつ病理学的な解析が進められているものの、動物モデルが樹立されていないために、詳細な病因解明には至っていない。そのため決定的に有効な薬剤が

なく、発症後はフィブラート系薬剤などで症状の進行を遅らせているのが現状である。

我々は、PBC 発症モデルマウスを確立するため、パスツール研究所で作製された HLA-A0201 トランスジェニックマウスを用い、PDC-E2 ペプチドに対する CTL を誘導することで PBC 様の胆管炎を誘導することが出来るか否かを検証することを目的とし検討を開始した。

B. 研究方法

免疫

マウスは、ヒト HLA-A0201 遺伝子を導入 (ノックイン) したトランスジェニックマウス (HHD マウス)、雌性、6 週齢、を使用する。PDC-E2 (159-167) ペプチドあるいはホスファチジルエタノールアミン修飾ペプチドを CFA および MDP 含有リポソームを用いて一次免疫を皮下に行った後、複数回追加免疫を行う。コントロール群には PBS を用いる。また、PDC-E2 (1-414) の組換え型タンパク質の免疫についても検討を行う。

サイトカインの測定

最終免疫から 2 週間後のマウス脾細胞を 24 穴プレートに播種し、PDC-E2 (159-167) ペプチドによる刺激をおこない、5 日間培養後、上清中のサイトカイン (IFN- γ 、IL-2、IL-4 など) を測定する。

CTL の誘導および ^{51}Cr を用いた CTL 活性測定

最終免疫から 2 週間後のマウス脾細胞を 24 穴プレートに播種し、これを PDC-E2 (159-167) ペプチドによる刺激をおこない、7 日間培養する。これをエフェクタ細胞として、細胞傷害活性の検討をする。

また PDC-E2 (1-414) 遺伝子を pIRES2-EGFP に導入し、HLA-A0201 マウス由来 RMA-HHD 細胞へのエレクトロポレーションによるトランスフェクション後、GFP およびネオマイシンでセレクトションを行い、PDC-E2 (1-414)/HLA-A0201 安定発現株を樹立する。これを CTL 活性検討の標的細胞として用いる。

定法に従い、標的細胞を RPMI-1640 10% FCS 100 ml に浮遊させ、 ^{51}Cr 1.9 MBq を加え、CO₂ インキュベータに 1 時間おく。3 回の洗浄の後、E/T 比が 20/1 となるように U 底 96 well plate に播種する。また自然遊離量および最大放出量を求めるために RPMI-1640 10%FCS、1% Triton-X 100 をそれぞれ標的細胞に加える。CO₂ インキュベータにて 4 時間保持した後、上清 100 μ l を

ガンマカウンタで測定する。細胞傷害活性は次式より求める。Cytotoxicity (%) = (release in assay - spontaneous release) / (maximum release - spontaneous release) \times 100.

病理的解析

処理マウスの肝臓の病理標本 (ホルマリン固定後パラフィン包埋、凍結切片) を調製し、胆管の周囲における様々な単核球細胞、特に、CD4 陽性、 $\alpha\beta$ TCR 陽性 T 細胞や種々のリンパ球の集簇・浸潤を観察する。

(倫理面への配慮)

本研究は、主に DNA 組み換え実験が中心となる。DNA 組み換え実験、および動物実験の承認を受けて実施している。

C. 研究結果及び考察

これまでに、Kita らにより同定された CTL エピトープおよび B 細胞エピトープを含むペプチド合成した他、免疫リポソームを作製するため、これらのペプチドとホスファチジルエタノールアミンとの複合体を作製した。

これらのペプチド含有リポソーム (LPS) リポソームの高脂血症モデルマウスである *ApoE*^{-/-} マウスへの免疫でペプチド抗体が誘導されたと共に、蛍光物質を封入したリポソームを用いる抗原特異的抗体の定量系を確立した。

現在、CTL 活性測定のための標的細胞の調製を開始している。実際には、PDC-E2 (1-414) 遺伝子 (J Exp Med 195:113, 2002) と標的細胞である RMA-HHD (J Virol 78:9093, 2004)、RMA-S-HHD (TAP1 deficient cell line)、EL4 (S3)-HHD (J Exp Med 185:2043, 1997) を用いて stable line を作製する。

この様に、HLA-A0201 (HHD) トランスジェニックマウスを用いれば、マウスでヒトと同様のエピトープを認識する CTL が誘導されることが期待される。

しかしながら、仮に CTL が誘導されたとしても、胆管炎を発症するかは不明である。二次的な targeting が必要な可能性もあり、*apoE*^{-/-} マウスや *ldlr*^{-/-} とのバッククロスを行う他、ホスファチジルセリン含有リポソームによる肝臓へのターゲティングについても検討する。

一方、PBC では細菌感染、免疫寛容の崩壊、あるいは単染色体症が発症要因として不可欠であるかも知れない。*Novosphingobium aromaticivorans* は、グラム陰性の好気性細菌で、土壌、水中、海岸の自然沈殿まで広範に存

在している。*N. aromaticivorans*はPDC-E2と高いホモロジーを持つタンパクを有しており、PBC患者血清がこのタンパクに対して反応することが報告された。このことから、*N. aromaticivorans*に対する免疫応答がトレランスを狂わせている要因の一つであると考えられている。また一方で、xenobiotics（生理活性のある生体異物、すなわち、化粧品、食品添加物などに使用される芳香族化合物が主なもの）が自己のPDC-E2を修飾することでトレランスの崩壊が起きるとも考えられている（Amano K, Matsuura E, Gershwin ME, et al., J Immunol 174:5874, 2005）。この様に、CTL誘導の他に、primaryあるいはsecondary hitについても検討する。

*FOXP3*のコンディショナルノックダウンマウスについても検討する。免疫寛容にはCD4、CD25陽性の調節性T細胞が関与していることが知られているが、この発現調節を担う因子として、近年*FOXP3*が注目された。*FOXP3*はX染色体上にコードされており、PBCにおけるトレランスの崩壊および女性に多く発症するという特徴から、PBCの発症に何らかの関与の可能性があらる。

我々はリポソームを用いたRNAiの導入による*FOXP3*ノックダウン、あるいはテトラサイクリン調節性トランス活性因子を導入したトランスジェニックマウスを作製し、テトラサイクリン誘導による*FOXP3*ノックダウンを生体内で行い、胆管炎の誘導を検討する予定である。ノックアウトでなくノックダウンにするのは、PBC患者では*FOXP3*が消失しているのではなく、変異あるいはその他の要因により発現量が低くなっていると予測されるからである。すなわち、*FOXP3*については、intron 9での変異がPBC患者で優位に見られており（Ann NY Acad Sci 1051:218, 2005）、PBC発症と*FOXP3*との関係が示唆されている。モデルマウスの作製と同時に、この点に関して追究をする必要がある。

これらのアプローチにより、PBC様の症状を誘導し、PBCの発症機序の解明を行いたい。

E. 結論

平成17年度より、分担研究者として本研究に参加させて頂いている。今年度末までにCTL誘導をHHDマウスで確認できることを目標としている。本研究には、未知の要因が多く、最終成果が得られるまでに更に数年を要することが予測される。自己免疫性肝炎特にPBCへの研究従事者は、ウイルス性肝炎の従事者に比べて

世界的に少ない。今回の、米国、フランス、日本の研究者による共同研究で、PBCの動物モデルの作製および発症機序の解明が出来れば、新規治療法の開発にも繋がり、構成行政上の効果は計り知れない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表等

- 1) Amano K, Leung PSC, Rieger R, Quan C, Wang X, Marik J, Suen YF, Kurth MJ, Nantz MH, Ansari AA, Lam KS, Zeniya M, Matsuura E, Coppel RL, Gershwin ME. Chemical xenobiotics and mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis: identification of antibodies against a common environmental, cosmetic and food additive, 2-octynoic acid. J Immunol 174:5874-5883, 2005

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

なし

新規PBC動物モデルを用いた胆道炎発症機序の解析

分担研究者 松口 徹也 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究要旨： PBC発症にはToll-like receptor (TLR)シグナルの関与するTh1タイプ優位の自己免疫反応との関連が示唆されている。本研究では、1) 肝内リンパ球におけるTLR発現パターンを検討し、2) PBCの病態モデルマウスを開発する目的でTh1タイプ免疫反応を過剰に呈する遺伝子改変マウス2系統を新たに産出し、その表現型の詳細な解析を行うとともに、マウスのピルビン酸脱水素酵素複合体(PDC)-E2由来ペプチドでの感作によるPBC様肝障害誘導の可能性について検討した。

A. 研究目的

PBCの正確な発症機構は不明であるが、最近の報告で細菌感染とPBCとの関連が指摘されており、病原体パターン認識レセプターであるToll-like receptor(TLR)からのシグナルがPBCの発症メカニズムへ関与している可能性がある。PBCの発症機構にピルビン酸脱水素酵素複合体(PDC)に対するTh1優位な抗原特異的免疫反応の関与が指摘され、抗原提示細胞におけるToll-like receptor (TLR)からのシグナルがTh1タイプの免疫反応を強力に推進する。本研究では、TLR下流シグナルの異常を持つ複数の遺伝子改変マウスを用いて、Th1型免疫反応の誘導機構の解析を進めると共に、PBC発症機構の解明と治療法開発に向けてのマウス病態モデルの開発を目指した。

B. 研究方法

- 1) C57BL/6マウス肝内リンパ球をセルソーティングにより分画し、それぞれの画分におけるTLR遺伝子発現を比較し、TLR2発現の高かった肝内NKT細胞のTLR2リガンドへの反応性を解析した。
- 2) TLR2KOマウス、FasL欠損(*gld/gld*)マウスおよびNKT欠損マウス(*Ja281-/-*)を用いて細菌感染後の肝障害をコントロールマウスと比較した。
- 3) IL-12レセプターbeta1遺伝子を単離し、その構造決定と発現調節領域の機能解析をおこなった。
- 4) CD4陽性T細胞のTh1/Th2分化誘導の培養系でMKP-Mの発現パターンを解析した。次にアデノウイルスベクターを用いたMKP-M強制発現の系を確立し、MKP-MのTh1/Th2分化決定へ

の機能的関与を検討した。

- 5) セリンスレオニンキナーゼの一つであるCot/Tpl2キナーゼのノックアウトマウス、JNK特異的なMAPキナーゼフォスファターゼ(MKP-M)のT細胞特異的トランスジェニック(Tg)マウスを作成し、それぞれのマウスにおけるTLRシグナル伝達および抗原特異的免疫反応の解析を行った。
- 6) PBCのマウスモデルを確立する目的で、上記によって得られたTh1反応優位のマウス2系統(Cot/Tpl2^{-/-}およびT細胞特異的ドミナントネガティブ(DN)型MKP-M Tg)のPDC-E2由来抗原感作を行い、抗ミトコンドリア抗体(AMA)、血清逸脱酵素値、および肝組織所見を検討した。また、2系統のマウスをSJL/Jマウス(PBC様の自己免疫性胆管炎モデルとして報告されている)に戻し交配し、SJL/J背景のTh1反応優位マウス系統を作成し、PDC感作後の所見をSJL/Jコントロールマウスと比較した。

C. 研究結果

- 1) マウス肝内リンパ球分画のうち、NKT細胞はTLR2の高い遺伝子発現レベルを示し、TLR2リガンドである合成リポペプチドの刺激によりFasL発現の著明な増加を示した。TLR2KOマウス、FasL欠損マウスおよびNKT欠損マウスそれぞれにおいて、細菌腹腔内感染における血清トランスアミナーゼ値の上昇は、コントロールマウスと比べて有意に減弱していた。
- 2) マウスIL-12レセプターbeta1遺伝子の構造・機能解析を行い、遺伝子プロモーター領域のPU.1およびIRF結合サイトの重要性を示した。
- 3) Cot/Tpl2^{-/-}マウスからのマクロファージおよび樹状細胞は、TLRリガンドによる刺激に

よってコントロールマウスと比較して著明に高いIL-12産生能を示した。また、Cot/Tp12^{-/-}マウスは卵白アルブミン(OVA)感作後に抗原特異的にTh1優位な免疫反応(IgG2a優位な免疫グロブリンサブセットプロファイル、高IFN γ 血清濃度)を示した。

4) Th1型に比べてTh2型分化T細胞はMKP-M発現量が著しく増加していた。DN型MKP-MのT細胞特異的Tgマウスは、抗原感作によってTh1優位な抗原特異的免疫反応を示した。

5) 野生型およびDN型MKP-MのcDNAをT細胞特異的Lckプロモーターに繋いだ発現ベクターをマウス受精卵に注入し、T細胞特異的MKP-Mトランスジェニックマウスを作製した。コントロールマウスに比し、野生型MKP-Mトランスジェニックマウスは卵白アルブミン感作に対してTh2偏位の抗原特異的免疫反応を示し、一方DN型マウスはTh1偏位の免疫反応を示した。また、これらのマウスから単離したCD4陽性細胞も同様のTh1/Th2分化偏位傾向を示した。

6) DN型MKP-M Tgマウスの血清中に、10週齢ほどより、自発的な抗PBC-E2抗体の発現を認めた。

6) DN型MKP-M TgマウスのPDC感作実験において、感作後3-4週間から、コントロールマウスに比べて著しい腹水貯留を認めた。

D. 考察

1) TLR2を介した肝内NKT細胞の活性化が細菌誘導性の肝障害に重要な役割を果たすことが明らかになった。

2) Cot/Tp12キナーゼはTLRシグナルの下流に存在して、IL-12産生による過度のTh1型抗原特異的免疫反応を制御することが明らかになった。

3) T細胞におけるMKP-M機能を抑制することでTh1型優位の抗原特異的免疫反応を誘導しうることが明らかになった。

4) T細胞におけるMKP-M機能を抑制することで、自発的なAMA陽性と、PDC-E2由来抗原による過剰な肝障害がマウスに誘導されることが明らかになった。

E. 結論

1) 肝内リンパ球におけるTLR発現分布および機能の解析を行った。

2) Th1反応優位な2系統の遺伝子改変マウス系統を新規に開発し、そのうち少なくとも1系統(T細胞特異的DN型MKPM Tg)がPBCマウスモデルとして有望であることを示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Musikacharoen T, Oguma A, Yoshikai Y, Chiba N, Masuda A, Matsuguchi T.: Interleukin-15 induces IL-12 receptor beta1 gene expression through PU.1 and IRF3 by targeting chromatin remodeling. *Blood* 105, 711-720, 2005

2) Sugimoto K, Ohata M, Miyoshi J, Ishizaki H, Tsuboi N, Masuda A, Yoshikai Y, Takamoto M, Sugane K, Matsuo S, Shimada Y, Matsuguchi T.: A serine/threonine kinase, Cot/Tp12, modulates bacterial DNA-induced IL-12 production and Th cell differentiation. *J. Clin. Invest.* 114, 857-866, 2004

3) Hiromatsu T, Matsuguchi T., Shimizu H, Yajima T, Nishimura H., Arai T, Yoshikai Y: NKT cells stimulated with a ligand for TLR2 at least partly contribute to liver injury caused by Escherichia coli infection in mice. *Eur. J. Immunol.* 33, 2511-2519, 2003.

4) 松口徹也: TLRのシグナル伝達機構. *臨床免疫学* 63 (14):109-114, 2005.

2. 学会発表

1) 松口徹也: 微生物リガンドに対する生体応答の分子基盤. 日本生体防御学会, シンポジウム 京都, 2003

2) 杉本憲治, 吉開泰信, 松口徹也: Cot/Tp1-2のサイトカイン産生プロファイルと適応免疫への関与の検討. 第33回日本免疫学会, 福岡, 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

生体肝移植を施行した原発性胆汁性肝硬変症例の臨床経過、再発に関する研究

分担研究者 兼松 隆之 長崎大学大学院病態解析・制御学講座 移植・消化器外科 教授

研究要旨： 進行した原発性胆汁性肝硬変(PBC)に対する根治的治療は肝移植である。生体肝移植では、ドナーとレシピエントが近縁関係であることが多く、類似した遺伝背景を有していることが多い。当科でPBCに対し生体肝移植を施行した症例を検討すると、中期的には血清学的再発はあるものの肝機能は保持されていた。組織学的には明らかなCNSDCと拒絶の判定は困難であった。

生体肝移植後に54例中3例(5.5%)に自己免疫関連が疑われる肝障害が発生した。2例で肝生検にて形質細胞が浸潤しており、IgG4関連病態を疑った。結果的には血清中IgG4は正常範囲内、肝内にIgG4陽性細胞は陰性であった(1例で散在性に陽性)。1例でAzaを導入しFK、ステロイド減量可、他の1例で類天疱瘡が発症し、ステロイド増量にて肝機能障害も緩解した。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変はいったん肝硬変に進行すれば唯一肝移植しか有効な治療法が残されていない難治性の疾患である。しかし、肝移植は深刻なドナー不足で本邦においては生体肝移植が主流である。生体肝移植は遺伝的な類似性のあるドナーの可能性があることや免疫標的である肝臓は入れ替わっても同じ臓器であることから移植後の肝臓を詳細に観察することで病変の初期像を把握することが可能である。また、一般に肝移植後は原疾患による肝不全はきたしにくいといわれており、術後の免疫抑制を通じて画期的な新治療法を見出せる可能性がある。本研究は当科で施行した生体肝移植症例について検討することである。またprotocol biopsy施行中の症例の経過についても検討した。また、肝移植後の自己免疫関連疾患の発生、特にIgG4関連病態の発生について検討した。

さらに肝細胞移植あるいは肝幹細胞移植による治療法の開発にむけて、原発性胆汁性肝硬変(PBC)肝移植症例の摘出肝の1)肝の崩壊および再生能2)肝細胞のprogenitor cellの存在状況を検討した。

B. 研究方法

対象は当科で生体肝移植を施行した5例(男性4例、女性1例 年齢36-51歳)。以下の項目について検討した。

1) 術前因子(死亡率、治療法、抗体)

2) 免疫学的因子(HLAなど)

3) 移植関連因子(グラフト、再建法)

4) 短期的経過(3ヶ月以内)

5) 現況

また、protocol biopsy施行中の症例の経過についても検討した。

HE、PCNAおよびstem cell markerによる免疫染色、対照として肝硬変・劇症肝炎による肝移植症例の摘出肝を用い比較検討した。

生体肝移植後に肝機能障害を起こした症例のうち肝生検にて形質細胞の浸潤を認めた3例。この3例の血清中IgG分画、肝生検での金沢大学がん細胞学 中沼安二教授のご協力にて肝IgG4染色を行った。

C. 研究結果

1) 術前因子では半年以内死亡率は76-99%であった。全例、抗ミトコンドリア抗体やM2が上昇しており、1例は抗核抗体も陽性であった。術前治療はUDCA投与が全例に行われていたが他の免疫抑制薬は使用していなかった。

2) 免疫学的因子としてはドナーとレシピエントの組み合わせに一定の傾向はなかった。ドナーとの関係は配偶者2例、同朋3例であった。

3) 移植関連因子としては右葉グラフトを全例に用いレシピエント標準肝容積の60%前後であったが1例は標準肝容積の46%であった。

4) 3ヶ月以内に全例拒絶反応が認められた。厳密なCNSDCとの鑑別は不能であったが、ステロイドパルスや免疫抑制剤のトラフ強化で対応

できた。死亡した高度拒絶の1例は肝容積46%の症例であった。この時点では抗ミトコンドリア抗体は上昇を認めていない。

5) HE・PCNA染色では各種疾患群に明らかな差を見いだせなかった。stem/progenitor cellはc-kit, CD34について検討を行ったが、PBC症例では肝硬変症例と同等に中等度の大きさの胆管に発現が認められた。一方、劇症肝炎の中でも長期経過をとった症例ではstem cell markerの発現が高度であった。このことから比較的強い再生刺激を一定期間うける状況でstem/progenitor cellの集積が期待されると思われる。また、肝硬変症例から分離した非実質細胞分画からprogenitor cell様細胞が認められ、PBC症例でも周囲環境から細胞を隔離してやることでprogenitor cellを活用できる可能性が示唆された。

6) 術後、肝生検にて形質細胞浸潤を確認した3例で、血清IgG4値を測定したが正常範囲内であった。IgG4の肝免疫染色では1例に散在性染色を認めるのみで明らかな陽性染色を認めなかった。当症例ではAzaを導入し、FK、プレドニンの減量が可能であった。他の1例では類天疱瘡に対するプレドニンの大量投与にて肝障害も自然緩解した。

D. 考察

肝移植は免疫学的には移植によって肝臓への攻撃をリセットする状態である。諸家の報告と同様に血清学的再発はあるものの組織学的所見に乏しいか拒絶との鑑別がつきにくい状態で、肝機能は維持されていた。免疫抑制はステロイドが必要か否かは明らかではない。AzaやCellceptの導入でも十分ではないだろうか。金沢大学 中沼教授のご助力にて肝移植後の自己免疫病態にIgG4が関連しているのかを検討したが、現在までの症例にはIgG4の関連は明らかには認めなかった。1例のみ散在性に染色が認められた症例があり、この症例ではAzaを加えることで、FKの減量が可能であり、現在プレドニンの減量中である。今後も症例の検討を進めていく予定である。

stem/progenitor cellはc-kit, CD34について検討を行ったが、PBC症例では肝硬変症例と同等に中等度の大きさの胆管に発現が認められた。一方、劇症肝炎の中でも長期経過をとった症例ではstem cell markerの発現が高度であった。このことから比較的強い再生刺激を一定期間うける状況でstem/progenitor cellの集積が期待されると思われる。また、肝硬変

症例から分離した非実質細胞分画からprogenitor cell様細胞が認められ、PBC症例でも周囲環境から細胞を隔離してやることでprogenitor cellを活用できる可能性が示唆された。今後、PBC症例に分離したprogenitor cellを移植する可能性の検討が必要である。

E. 結論

当科でPBCに対し生体肝移植を施行した症例を検討した。中期的には全例M2が上昇し、血清学的再発はあるものの肝機能は十分保持されていた。組織学的には明らかなCNSDCと拒絶の判定は困難であった。HLAも特にDQ, DRなどに有意なものは見当たらなかった。

生体肝移植後に54例中3例(5.5%)に自己免疫関連が疑われる肝障害が発生した。2例で肝生検にて形質細胞が浸潤しており、IgG4関連病態を疑ったが、血清中IgG4は正常範囲内、肝内にIgG4陽性細胞は陰性であった(1例で散在性に陽性)。1例でAzaを導入しFK、ステロイド減量可、他の1例で類天疱瘡が発症し、ステロイド増量にて肝機能障害も緩解した。移植後の自己免疫性肝炎にIgG4の関連は少ないものと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ito Y, Kanematsu T et al. Influence of serum from rats with fulminant hepatic failure on hepatocytes in a bioartificial liver system. *Int J Artif Organs*. 2004 Apr;27(4):303-10
- 2) Tsutsumi R, Kanematsu T et al. Selective suppression of initial cytokine response facilitates liver regeneration after extensive hepatectomy in rats. *Hepatogastroenterology*. 2004May-Jun;51(57):701-4
- 3) 犬尾浩之, 兼松隆之ら:劇症肝炎摘出肝の再生に関する臨床病理学的検討. *臨床と研究* 80(2):341;2003

2. 学会発表

- 1) Ito Y, Kanematsu T et al. The influence of liver failure plasma to liver specific functions of hepatocytes. The 19th World Congress of International Society for