

Treg が存在するかどうかを調べた。

B. 研究方法

CD8 Treg 細胞画分として、WT B6 マウス、あるいは OT-I TCR Tg マウスより CD8+CD122+細胞、CD8+CD28(-)細胞を FACS セルソーターにより分離した。あるいは、B6 マウスに anti-4-1BB, polyIC, OVA を i.p. 投与することにより OVA 特異的 CD8 T 細胞を誘導し、脾臓細胞より MACS にて CD8 画分を調製した。抑制される側となる CD4 T 細胞は B6 非細胞より CD25+画分を除去した後、MACS にて CD4 画分を調製した。in vitro における抑制アッセイは、CFSE ラベルした CD4 T 細胞を固定した数に対し異なる比で CD8 Treg を混合し、anti-CD3/anti-CD28 抗体ラベルポリスチレンビーズで刺激し、72 時間後に FACS にて CFSE による CD4 の細胞分裂を観察することにより行った。in vivo による抑制アッセイは、B6 マウスに上記 CD8 Treg を移入、続いて OVA/CFA で免疫し、7 日後のリンパ節細胞の OVA に対する増殖アッセイによって評価した。CD8+CD122+細胞を in vivo で選択的に増殖させる方法として、anti-IL-2 (clone S4B6, 50 ug)/IL-2 (1.5 ug)複合体を隔日 3 回、i.p. 投与し、最後の投与から 2 日後に脾臓より CD8 細胞を調製した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト検体は用いなかった。動物実験に関しては、研究機関の動物実験基本指針に従い、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

1) CD8+CD122+ Treg

CD8+CD122+細胞は B6 マウスにおいて FACS にて明確に区別できる細胞集団として検出され、CD8 細胞の 10-20%で存在した。抑制性サイトカインである TGF- β との関係を見るために、CD103 および latency-associated peptide (LAP)での表面染色を調べてみたが、CD8+細胞全体で~60%が CD103+, ~5%が LAP+であるのに対し、CD8+CD122+は CD103(-), LAP(-)であった。OT-I TCR Tg マウス

においては、CD8+CD122+細胞は明確な集団としてみられず、CD8 細胞の~1%程度しか CD122+細胞は存在しなかった。このような小集団では実験上不都合であるため、CD8+CD122+細胞を選択的に増殖させる方法として anti-IL-2/IL-2 複合体を OT-I マウスに投与したところ、CD8+CD122+細胞は CD8 の~40%にまで増加した。これら WT B6、あるいは anti-IL-2/IL-2 複合体投与 OT-I TCR-Tg マウスからの CD8+CD122+細胞が CD4 T 細胞を抑制できるかどうか in vitro で検討した。CD4 T 細胞を anti-CD3/anti-CD28 ビーズで刺激する系を用いたが、anti-CD28 を CD4 T の増殖に最適な量 (anti-CD3 比 1/1) でコートしたビーズで刺激した時は CD8+CD122+に明確な CD4 抑制活性がみられなかった。一方、anti-CD28 量を落としていくと (anti-CD3 比 1/15)、WT B6 CD8+CD122+細胞、OT-I CD8+CD122+細胞ともに、弱いながらも CD4 T 細胞の増殖を抑制した。OT-I CD8+CD122+細胞を B6 マウスに移入し、続いて OVA/CFA で免疫した時の、リンパ節細胞の OVA に対する増殖アッセイを調べたが、OT-I CD8+CD122+による CD4+ T 細胞のプライミング抑制はみられなかった。

2) CD8+CD28(-) Treg

B6 マウス比細胞の CD8+CD28(-)画分は明確に区分けできるものではなかった。そのため、比較的 CD28 発現が弱い画分 (下 5~10%) を任意にソーゲート設定した。このような画分は、CD103+, LAP(-)であり、上述の CD8+CD122+画分とは重ならない細胞集団であった。このように分離した CD8+CD28(-)細胞が in vitro で CD4 T 細胞を抑制できるかどうかを調べたが、明確な抑制はみられなかった。

3) anti-4-1BB/polyIC/antigen 投与で誘導される抗原特異的 CD8 Treg

B6 マウスに anti-4-1BB/polyIC/OVA を i.p. 投与することにより、OVA257-264/MHC K(b) dimmer (DimerXTM; BD PharMingen)により識別される OVA 特異的 CD8 T 細胞が CD8 の~10%に占めるまでに誘導された。このような OVA 特異的 CD8 T 細胞が CD4 T 細胞を抑制できるかどうかを検討するため、

OVA/CFA 免疫したマウスからのリンパ節細胞と混合し、in vitro で OVA 刺激した時の [3H] thymidine 取り込みを調べた。in vitro 刺激の OVA 濃度が 20 µg/ml と低い場合のみ、CD8 Treg 添加により [3H] thymidine の取り込みが抑制されたが、OVA 100 µg/ml では抑制はみられなかった。in vivo での抑制をみるため、CD8 Treg を B6 マウスに移入し、続いて OVA/CFA 免疫した時のリンパ節細胞の OVA に対する応答をしらべたが、[3H] thymidine 取り込みは抑制されていなかった。

D. 考察

CD8 suppressor (Ts) という概念は 1970-80 年代に広く語られた概念であるが、CD8 Ts を区別できる表面マーカーと思われた分子が否定されたこと、時代が Th1/Th2 とサイトカインの偏向による免疫制御に関心が移行したことにより、長らくの間、散発的に報告が出る程度であった。しかしながら近年名古屋大学・医学部の鈴木治彦博士らが CD122 欠損マウスでは自己免疫病を呈し、これが CD8+CD122+ Treg の欠如によるもので、CD8 Treg の補充により抑制されるものであることを報告し、にわかに実体のある細胞集団としての CD8 Treg が注目されだした。これより少し先に、CD4 Treg も、実態の不明な概念的なものから、CD4+CD25+ というより小さな細胞集団、続いて Foxp3 という抑制機能誘導を担う分子の発見により確固たる地位を築いたことも、CD8 Treg が見直される背景にあるであろう。一方、我々は、抗原特異的 CD4+Foxp3+ T 細胞を用いた CIA の治療法を検討してきた。発症前に CII 特異的 CD4+Foxp3+ T 細胞を移入することは大いに効果的であったが、発症後の移入は必ずしも十分な抑制はみられなかった。このことは、CD4+Foxp3+ Treg は病態誘導性 Th 細胞の分化誘導抑制には効果的であるものの、すでに存在する Th 細胞の機能抑制には不十分であることを示唆している。ただし、CD4+Foxp3+ Treg による Th 細胞の分化あるいは機能の抑制作用に関する分子メカニズムは現在

未解明であるため、このところを断定的にいうことは早計であるのかもしれない。

今回、我々は CD8 Treg がどれくらいの CD4 T 細胞に対し抑制活性を示すか検討してみた。残念ながら、調べた 3 つの異なる CD8 Treg 集団すべて、in vitro の抑制活性ははっきりみられないか、あるいは CD4 T 細胞を弱い刺激で増殖誘導した場合のみみられ、また in vivo でも明確な抑制効果はみられなかった。このため、現時点では CD8 Treg は自己免疫病の治療に有効であると示せなかった。ただし、CD8 Treg もまた CD4+Foxp3+ Treg 同様、その抑制分子機構はまったく不明であり、そのようなメカニズムを同定しない限り、理論に基づいた最適な治療プロトコルの作成ができず、経験的に試行錯誤で最適化しなくてはならないのが現状である。従って、今後は CD8 Treg による分子機構を探るようなアプローチが必要であると考えられる。OT-I マウスに anti-IL-2/IL-2 複合体の投与により CD8+CD122+ T 細胞を選択的に増加でき、治療応用する場合の細胞調製に道が開かれた。しかし、このような in vivo 増幅された CD8+CD122+ T 細胞が本当に元の CD8+CD122+ Treg と同等かは今後さらに検討が必要である。

E. 結論

CD8 Treg の存在は、まだ報告されはじめて時が浅く、その実態はいまだ明確になっていない。今後は、CD8 Treg の基礎的な性質を解明していくと共に、特異的表面マーカー、抑制作用分子を同定していく努力を続けることが、ひいては自己免疫病治療の臨床応用につながるものであると考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・取得状況

なし

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)

研究協力者 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

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。近年、生物学製剤として種々の分子標的薬の臨床応用が始まり注目されているが、それらの標的分子も疾患特異的なものではなく感染症の誘発などが大きな課題となる。そこで我々は疾患特異的に作用する新規免疫制御法を確立するため、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ている。試験管内で II 型コラーゲン特異的な CD4⁺ T細胞を樹立し、活性型 TGF-β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も認めた。さらに、活性型 TGF-β発現 CD4⁺ T細胞は同時に IL-10 を産生することが判明し、本方法により病原性を有するエフェクターCD4⁺ T細胞を、試験管内で Tr1 細胞に人工的に変換できる可能性が示された。また我々は抗原特異的な CD4⁺ T細胞の効率的な分離法を確立しつつあり、本方法論の臨床応用を目指している。

A. 研究目的

本研究の目的は、未だに特異的な治療法が存在しないリウマチ性疾患治療の新たな治療戦略として、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・検討することである。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(RA)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細胞に導入し体内に戻すという細胞移入治療の可能性を探るため、まず II 型コラーゲン誘導関節炎(CIA)マウスを用いて検討し、さらにヒトでの臨床応用を目指している。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-βおよびそのコントロールとしての潜在型 TGF-β、IL-10 に加え、最近話題とな

っている IL-17、さらには我々がその抗体の特異的な存在を RA で報告してきた Calpastatin およびその基質である Calpain についても解析を行った。

B. 研究方法

1) II 型コラーゲン(CII)で免疫した DBA/1J マウスの所属リンパ節および脾臓より CD4⁺ T細胞を分離し、in-vitro で polyclonal な刺激下に活性型 TGF-βとそのコントロールとして潜在型 TGF-βに加え、IL-17、天然型および分泌型 Calpastatin、Calpain 発現レトロウイルスを感染させ、IL-2 により維持・増殖させたのち、CIA誘導後の DBA/1J 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。

2) CIIで免疫した DBA/1J 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 CII と抗原提示細胞刺激下に活性型 TGF-β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、抗原刺激サイクルを数回繰り返す。

返し、より CII 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、レポーターに用いている 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 CII 抗体価を測定した。

5) ウイルスベクターを用いない遺伝子導入方法として AMAXA 社が開発した電気穿孔法を用い、primary T 細胞への遺伝子導入効率を検証した。

6) 遺伝子導入された細胞を磁気ビーズにより迅速に分別するため、レポーター遺伝子として hCD4、mCD8、hCD20 を有するベクターを作成しその可能性を検討した。

(倫理面への配慮)

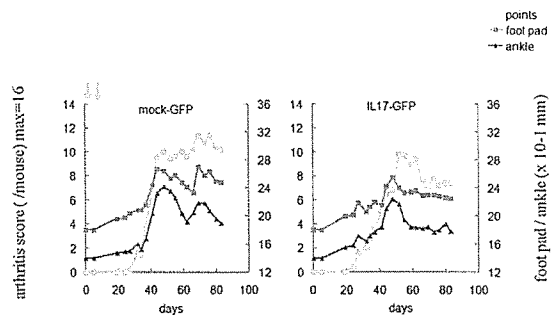
我々の有するレトロウイルスベクターは自己複製不可である。さらに感染終了した CD4T 細胞をマウスに移入する手法のため、マウスにおいてもウイルス増殖の危険はなく、また京都大学で所定の承認も得ており、問題は無い。

C. 研究結果

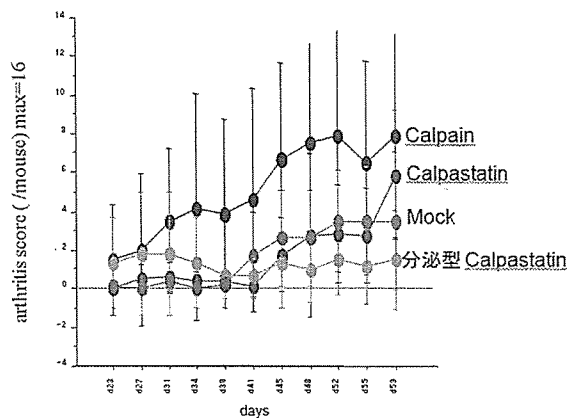
CIIで免疫していないマウスの脾臓から分離した CD4⁺ T 細胞に、活性型 TGF-β発現レトロウイルスを感染させ、CIA 誘導後のマウス腹腔内に細胞移入しても、関節炎抑制効果は認められなかったが、CII で免疫したマウスの所属リンパ節および脾臓から調整した CD4⁺ T 細胞に、活性型 TGF-β発現レトロウイルスを感染させ、CIA マウス腹腔内に細胞移入したところ、CIA 誘導後 5-10 日目に1回のみ細胞移入することで関節炎の発

症はほぼ完全に抑制された。さらに同様の実験を潜在型 TGF-β、IL-10、IL-17、Calpain および分泌型 Calpastatin でも行なった。IL-10 発現 CD4⁺ T 細胞移入群でも関節炎抑制効果を認めたが、活性型 TGF-β発現 CD4⁺ T 細胞移入群に比べ、効果の持続性において劣っていた。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 IL-17 発現 CD4⁺ T 細胞移入群では mock 群と関節炎スコアに有意な差を認めなかった(図1)。さらに Calpain および分泌型 Calpastatin 発現 CD4⁺ T 細胞移入群では、Calpain 群でやや関節炎の悪化を認める一方、分泌型 Calpastatin 群では関節炎抑制傾向が認められた(図2)。

Effect of IL-17 producing CII specific CD4⁺ T cell transfer on CIA model



(図1)



(図2)

活性型 TGF-β遺伝子を導入による免疫制御作用機序を in-vitro で検討したところ、病原性が高いと考えられる CII 特異的な Th1 細胞に活性型 TGF-βを安定に発現させると、IL-10 の産生が

強く誘導されることを見出した(図3)。この事は、抗原特異的なエフェクターTh1細胞に活性型TGF- β 遺伝子をin-vitroで導入することにより、抗原特異的な制御性Tr1細胞に強制的かつ永続的に変換できる可能性を示している。またIL-10は抗線維化作用があるため、本法で線維化が全く認められない理由の一つである可能性であると考えられた。

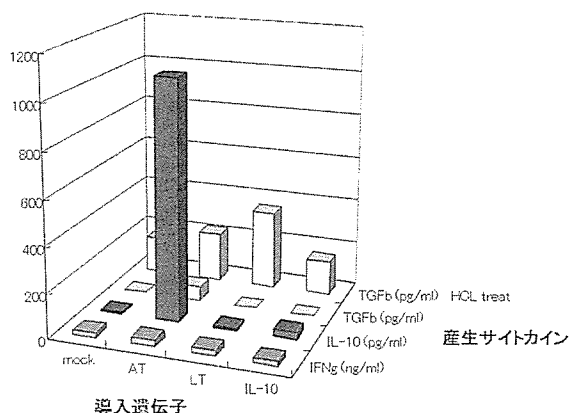


図3

次に本細胞移入療法を臨床応用する際にクリアしなければならない諸問題について検討を行った。まずウイルスベクターを用いない遺伝子導入方法としてAMAXA社電気穿孔法を用い、マウスprimary T細胞にも高率に遺伝子導入しうる事を確認した。次に遺伝子導入された細胞を磁気ビーズにより迅速に分別するため、レポーターとしてhCD4、mCD8、hCD20を導入しその可能性を検討した。MSCVをベースとするレトロウイルスベクターにおいてhCD4はレポーターとして良く働き、かつ抗hCD4抗体-磁気ビーズにより効率良く遺伝子導入細胞分別も可能であった。しかし高発現系であるMFGベースのレトロウイルスベクターでは、hCD4の細胞膜表面での発現を確認することができず、レポーターをmCD8に変更してもその発現は一過性であり実用化には問題を残した。現在hCD20エピトープ部分を用いてさらに実験を行っている。

次にヒトの細胞においても活性型TGF- β が安定に発現するかどうかが解析するため、哺乳動物細胞全般に感染性を有するAmphotropicエンベロープ含有パッケージング細胞を入手し、ヒトT細胞

における導入遺伝子発現の経時的変化の解析を行った。ヒトPBMCをPHAあるいはanti-CD3/28で刺激後Amphotropicエンベロープ含有パッケージング細胞から調整したウイルスを感染させレポーター(GFP)の発現強度を経時的に観察し、少なくとも感染後10日後までは安定して導入遺伝子発現が維持されている事を確認した。

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- β のみであり、抗原特異的なCD4⁺T細胞を用いて活性型TGF- β 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。またこれまでの研究結果より、活性型TGF- β のみならずIL-10や分泌型Calpastatinでも抗リウマチ効果ができる可能性があることが判明し、どの分子が最も有利かつ適切なのか細胞移入時期をずらすなどの実験によりさらに詳細に検討する必要があると考えられる。

ヒトへの臨床応用を視野に入れて、関節リウマチ臨床例からCII特異的なT細胞分離を行うため、まず患者保存血清を用いて、CIIに対する抗体(IgG)スクリーニングを開始し、約20%の陽性頻度との結果を得ており、RFやCCPなど他の自己抗体との関連・重症度等についてデータベースを作成している。また用いるELISAシステムによって感度・特異度が大きく異なる可能性があり、検討課題である。

最後に現在、このCII抗体陽性患者から、CII特異的なCD4⁺T細胞を効率よく分離するための準備実験として、まずマウスの系で種々の方法を試しており、今後その至適条件を検討したい。

E. 結論

ヒト関節リウマチ患者においてもCIIに対する自

己抗体、およびそれに反応する特異的 CD4⁺ T 細胞の存在も確認できつつあり、さらに primary T 細胞にウイルスベクターを用いない遺伝子導入法も確立された。後は適切な抗原の検索と抗原特異的 CD4⁺ T 細胞分離・樹立法の確立が残された課題である。これらの諸問題および倫理的な問題が解決されていけば、本法による臨床応用の可能性も大きくなるものと思われた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshifuji H, Mimori T, et al: Anti-aminoacyl-tRNA synthetase antibodies in clinical course prediction of interstitial lung disease complicated with idiopathic inflammatory myopathies. *Autoimmunity* 39(3):233-41, 2006
- 2) Miyachi K, Mimori T, et al: Anti-p97/VCP antibodies: an autoantibody marker for a subset of primary biliary cirrhosis patients with milder disease? *Scand J Immunol* 63(5):376-382, 2006
- 3) Tokunaga M, Mimori T, et al: Efficacy of rituximab (Anti-CD20) for refractory systemic lupus erythematosus involving the central nervous system. *Ann Rheum Dis* 2006, in press
- 4) 三森経世: 関節リウマチの最新治療ガイドライン. *Mebio* 23(12):16-21, 2006
- 5) 三森経世: 抗リウマチ薬 (DMARDs) の種類と選び方. *治療* 89(2): 272-276, 2007
- 6) 三森経世: 関節リウマチの早期診断とその有用性. *日本医師会雑誌* 135(5): 1038-1042, 2006
- 7) 三森経世: 節リウマチと抗シトルリン化蛋白抗体. *BIO Clinica* 21(10): 901-907, 2006
- 8) 三森経世, 橋本求: 抗シトルリン化蛋白抗体. *内科* 97(4): 721-723, 2006
- 9) 三森経世: 治療薬の使い方とピットフォールー免疫抑制薬. *内科* 97(4): 641-645, 2006

10) 三森経世: 抗シトルリン化蛋白(フィラグリリン/CCP)抗体. *日本臨床* 63(7): 472-475, 2005

2. 学会発表

- 1) 三森経世: 自己抗体による関節リウマチの臨床経過と予後の予測 (シンポジウム「関節リウマチの経過と予後予測」). 第 50 回日本リウマチ学会, 長崎, 2006 年 4 月
- 2) Nakashima R, Mimori T, et al: Prediction of clinical course and prognosis of rheumatoid arthritis by autoantibodies. 13th APLAR Congress, Kuala-Lumpur, 2006 August.
- 3) 三森経世: RA の関節破壊予測マーカー (特別シンポジウム「関節破壊」). 第 34 回日本リウマチ・関節外科学会, 新潟, 2006 年 11 月
- 4) 小林志緒, 三森経世ほか: コラーゲン誘導関節炎特異的な治療法の試み: 活性型 TGF- β 発現レトロウイルスを抗原特異的 T 細胞に導入すると多量の IL-10 を産生する抗原特異的 Tr1 細胞となる. 第 50 回日本リウマチ学会, 長崎, 2006 年 4 月
- 5) 吉藤元, 三森経世ほか: カルパイン阻害によるマウス実験的筋炎の制御. 第 50 回日本リウマチ学会, 長崎, 2006 年 4 月
- 6) Hashimoto M, Mimori T, et al: The immunological effects of the calpain-calpastatin system on CD4⁺T cell and fibroblast function. 第 36 回日本免疫学会, 大阪, 2006 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

IL-2 を介したヒト CD4 陽性 NKT 細胞クローンにおける
Th2 サイトカイン産生に関する研究

分担研究者 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
研究協力者 作石 かおり 同 研究員
三宅 幸子 同 室長

研究要旨

CD1d 拘束性 NKT 細胞は Th1 サイトカインおよび Th2 サイトカインのいずれをも産生する能力をもち、自己免疫を含め多くの免疫調節に関与する。我々はこれまで多発性硬化症の寛解期において CD4 陽性 NKT 細胞が Th2 サイトカインを産生しやすくなっていることを見出し、寛解維持に関与している可能性を報告してきた。近年、NKT 細胞の Th1 サイトカイン産生については IL-12 存在下で選択的に行われることが報告されたが、Th2 サイトカインを選択的に産生させる因子については OCH などの合成糖脂質による刺激が知られているのみである。今回我々は、ヒト NKT 細胞クローンを樹立し、IL-2 存在下において、IL-5 を主とした Th2 サイトカイン産生を選択的に産生する一群を見だし、NKT 細胞による免疫調節機構の新たな側面を示唆すると考え報告する。

A.研究目的

CD1d 拘束性 NKT 細胞は、CD1d 分子に結合した糖脂質を認識し、速やかに Th1 サイトカインおよび Th2 サイトカインのいずれをも大量に産生する能力をもつ特異なリンパ球である。この特異な性質を持つがゆえに、自然免疫と獲得免疫を結ぶ調節性細胞として働く可能性が注目されつつある。実験的自己免疫性脳脊髄炎（Experimental autoimmune encephalomyelitis）や I 型糖尿病、関節リウマチなど自己免疫動物モデルなどにおいては、NKT 細胞と病態との関与が報告されている。また、ヒトにおいても、我々はこれまで多発性硬化症の寛解期において CD4 陽性 NKT 細胞が Th2 サイトカインを産生しやすくなっていることを見出し、寛解維持に関与している可能性を報告してきた。しかし、NKT 細胞の機能が生理的状況下でどのように調整されているかは、ほとんど明らかになっていない。

近年、NKT 細胞の Th1 サイトカイン産生については、IL-12 存在下で選択的に行われることが報告されたが、Th2 サイトカインを選択的に産生させる因子については OCH などの合成糖脂質による刺激が知られているのみである。

今回、我々はヒト NKT 細胞クローンを樹立し、T 細胞増殖因子として知られる IL-2 が NKT 細胞に与える影響を検討した。

B.研究方法

健常者 7 人、多発性硬化症患者 13 人より分離した末梢血単核球細胞（PBMC）に、NKT 細胞のリガンドである α -galactosylceramide (α GC)、もしくは合成糖脂質である OCH を添加した。増えた NKT 細胞、V α 24 陽性 V β 11 陽性 CD4 陽性 CD8 陰性細胞を cell sorting にて分離し、PHA にて刺激増殖させた。以後、定期的に cell sorting と PHA 刺激を行い、ほぼ 98% 以上の純度のクローンが得られた。この、CD4 陽性 NKT 細胞を用いて、健常者の CD14 陽性単球より IL-4/ GM-CSF で誘導した未熟樹状細胞を抗原提示細胞（APC）として、IL-2 存在下および非存在下に 48 時間培養した。上清中のサイトカインを Cytometric Beads Array にて測定した。

（倫理面への配慮）細胞解析を行うことについて血液ドナーに対して十分な説明を行い、文書による同意を得て行った。

C.研究結果

健常者より 9 クローン、多発性硬化症患者より 15 クローンが得られた。そのうち各々約 30% のクローンが、IL-2 存在下では抗原添加なく著明な IL-5 産生を示した。 α GC 刺激時とは異なり、いずれも IFN γ の産生量は、IL-5 産生量に比べて低く、Th2 に偏倚したサイトカインプロファイルを呈していた。健常者と多発性硬化

症患者間において、このような IL-5 産生クローンが得られる頻度や、そのサイトカインパターンに明らかな差は認められなかった。なお、IFN β もしくはステロイド治療中の多発性硬化症患者では、IL-2 添加で IL-5 を産生するクローンの得られる確率が高い傾向を認めた。

APC 非存在下にはこのような反応は認められなかった。また、DN-NKT 細胞クローンには、このような著明な IL-5 を産生するものは認められなかった。また、IL-5 産生は CD1d transfected- Hela 細胞を APC として用いた場合のみに認められ、mock transfected-Hela 細胞を APC とした際には認められなかった。IL-2 を介した NKT 細胞による IL-5 の産生は、抗 CD3 モノクローナル抗体にて固相化刺激をおこなったところ suboptimal dose にて再現された。興味深いことに、抗 CD3 抗体の optimal dose 刺激では、IL-5 優位の反応は消失し、IFN γ 優位の反応が見られた。

IL-2 以外にも受容体として β 鎖を共有する IL-15 の添加にて同様の IL-5 の産生が認められたが、IL-2 受容体の γ 鎖を共有する IL-4, IL-7, IL-9 では IL-5 産生は認められなかった。

これが、試験管内で増やしたクローン細胞に限った現象であるか検討するため、BALB/c マウスの肝臓および脾臓より α GC を付加した CD1d-Dimer X を用いて NKT 細胞を cell sorting にて分離し、この新鮮な NKT 細胞を用いて、脾臓から分離した CD11c 陽性細胞を APC として in vitro で同様の実験をおこなった。その結果、抗原を加えることなく、IL-2 添加のみで同様の IL-5 産生が誘導されることが確認された。

D. 考察

IL-2 を介して、IL-5 を主とした Th2 偏倚のサイトカイン産生を呈する CD4 陽性 NKT 細胞クローンの一群が存在することが示された。IL-5 の産生は NKT 細胞に対する IL-2 刺激だけではほとんど認められず、T 細胞受容体 (TCR)-CD1d 間の認識、すなわち何らかの内因性抗原を介した NKT 細胞の suboptimal stimulation が必要であることが明らかになった。また、この反応は IL-2 受容体の β 鎖を介したシグナルを必要とすることが判明した。

また、同様の反応が BALB/c 由来の分離直後の NKT 細胞で認められたことから、クローンに限られた反応ではないと言える。

炎症など、IL-2 の過剰な産生が引き起こされる状況下では、CD4 陽性 NKT 細胞は IL-5 など Th2 サイトカインを優位に産生する可能性が示された。EAE など Th1 偏倚がその病態に深く関わっていると考えられる

自己免疫疾患において、Th1 偏倚を是正する調節細胞として働き得ることが初めて示されたといえる。

E. 結論

CD4 陽性 NKT 細胞クローンのうち、IL-2 の刺激下にて、IL-5 を主とした Th2 優位のサイトカインの産生が誘導される一群が明らかになった。体内の NKT 細胞においても、IL-2 を介して IL-5 が産生される可能性が示された。NKT 細胞が Th2 偏倚を誘導する生理学的機序の一端を担い得ると考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

原著

- 1) Pyz E, Naidenko O, Miyake S, Yamamura T, Berberich I, Cardell S, Kronenberg M, Herrmann T. The complementarity determining region 2 of BV8S2 (V beta 8.2) contributes to antigen recognition by rat invariant NKT cell TCR. *J. Immunol.* 176(12): 7447-7455, 2006
- 2) Miyamoto K, Miyake S, Mizuno M, Oka N, Kusunoki S and Yamamura T. Selective COX-2 inhibitor celecoxib prevents experimental autoimmune encephalomyelitis through COX-2 independent pathway. *Brain* 129: 1984-1992, 2006
- 3) Croxford JL, Miyake S, Huang Y-Y, Shimamura M and Yamamura T. Invariant V α 19i T cells regulate autoimmune inflammation. *Nat. Immunol.* 7(9): 987-994, 2006
- 4) Aranami T, Miyake S and Yamamura T. Differential expression of CD11c by peripheral blood NK cells reflects temporal activity of multiple sclerosis. *J. Immunol.* 177(8): 5659-5667, 2006
- 5) Satoh J-i, Nakanishi M, Koike F, Onoue H, Aranami T, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Saito T, Ohta M, Miyake S, Kanda T, Fukazawa T and Yamamura T. T cell gene expression profiling identifies distinct subgroups of Japanese multiple sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* 174(1): 108-118, 2006

2. 学会発表

国際学会

- 1) Sakuishi K, Aranami S, Miyake S, Yamamura T. IL-2 costimulates IL-5 production by CD1d-reactive human CD4⁺ NKT cells: a novel pathway controlling NKT cell-mediated Th2 response. Annual meeting of the American association of immunologists, Boston, May 14, 2006
- 2) Oki S, Yamamura T, Miyake S. Molecular mechanism of differential cytokine production by altered glycolipid ligand-stimulated natural killer T(NKT) cells. IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology & FAOBMB Congress, Kyoto, June 18-23, 2006
- 3) Kaieda S, Oki S, Yamamura T, Miyake S. New synthetic glycolipid ligands for NKT cells suppresses antibody-induced arthritis. 6th Annual Conference of FOCIS, San Francisco, June 2, 2006
- 4) Doi Y, Oki S, Satoh J-i, Aranami T, Miyake S, Yamamura T. NR4A2 (Nurr1), an orphan nuclear receptor, is overexpressed in peripheral blood T lymphocytes of multiple sclerosis. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 178 S1, p78, 2006)
- 5) Croxford JL, Miyake S, Shimamura M, Yamamura T. Invariant V α 19-J α 33 NKT cells promote ICOS-dependent IL-10 production by B cells which regulated inflammation in a model of multiple sclerosis. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 85 S1, p85, 2006)
- 6) Aranami T, Miyake S, Yamamura T. CD11c on NK cells mirrors the disease activity of multiple sclerosis. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 178 S1, p102, 2006)
- 7) Miyamoto K, Miyake S, Kusunoki S, Yamamura T. Selective COX-2 inhibitor celecoxib prevents experimental autoimmune encephalomyelitis through COX-2 independent pathway. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 117 S1, p117, 2006)
- 8) Sakuishi K, Miyake S, Yamamura T. Control of IL-5 production in CD1d-reactive human CD4⁺ NKT cell clones from MS patients following exogenous IL-2 co-stimulation. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 147 S1, p102, 2006)
- 9) Oki S, Yamamura T, Miyake S. Natural killer T cell ligand OCH as a potential therapeutics for multiple sclerosis: Mechanism for OCH-induced TH2 polarization in vivo. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 148 S1, p102, 2006)
- 10) Sato W, Aranami T, Yamamura T. CCR2 as a marker for human T cells producing IL-17. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 148 S1, p102, 2006)
- 11) Lin Y, Miyake S, Yamamura T. Induction of adaptive regulatory T cells during recovery of EAE sensitized with PLP136-150 in SJL/J mice: The presence of suppressor epitope within PLP. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 151 S1, p102, 2006)
- 12) Nagayama S, Miyake S, Yamamura T. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by transfer of lymphokine-activated natural killer (NK) cells. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 169 S1, p102, 2006)
- 13) Kaieda S, Oki S, Yamamura T, Miyake S. Activation of natural killer T cells with synthetic glycolipid suppresses antibody-induced arthritis. American College of Rheumatology 70th Annual Scientific Meeting, Washington, DC, November 13, 2006 (Arthritis Rheum. 54: S358, 2006)

国内学会

- 1) Croxford JL, Miyake S, Shimamura M, Yamamura T: Invariant V α 19-J α 33 NKT cells promote ICOS-dependent IL-10 production by B cells which regulate inflammation in a model of multiple sclerosis. 第18回日本神経免疫学会学術集会、名古屋、3月2日、2006
- 2) 海江田信二郎、大木伸司、山村隆、三宅幸子: NKT細胞活性制御作用を介した新規合成等脂質によるマウスモデル関節炎の抑制 第50回日本リウマチ学会、長崎、4月24日、2006
- 3) 大塚敬男、三宅幸子、林幼偉、山村隆: 実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)におけるNeuropeptide Y (NPY)の役割 第47回日本神経学会、東京、5月13日、2006
- 4) 作石かおり、三宅幸子、山村隆: IL-2を介したCD4陽性NKT細胞クローンにおけるTh2サイトカインの選択的産生 第36回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006
- 5) Lin Y, Croxford JL, Miyake S, Yamamura T. Induction of adaptive regulatory T cells expressing CD103 besides CD25 and Foxp3 during recovery of EAE. The presence of suppressor epitope within encephalitogenic peptide. 第36回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006
- 6) Croxford JL, Miyake S, Shimamura M, Yamamura T. Invariant V α 19-J α 33 NKT cells promote ICOS-dependent IL-10 production by B cells which regulated inflammation in a model of multiple sclerosis. 第36回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006
- 7) Doi Y, Oki S, Miyake S, Yamamura T. Functional analysis of NR4A2, an orphan nuclear receptor, on the development of autoimmune encephalomyelitis. 第36回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006
- 8) Fujita M, Ootsuka T, Oki S, Mizuno M, Tomi C, Kaieda S, Miyake S, Yamamura T. Role of carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. 第36回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006
- 9) Tsukamoto K, Lin Q, Ohtsuji M, Nakamura K, Tsurui H, Miyake S, Yamamura T, Hirose S. Role of NKT cells in systemic lupus erythemaotus. 第36回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006
- 10) 海江田信二郎、水野美歩、大木伸司、坂口志文、坂口敦子、山村隆、三宅幸子: SKGマウスにおける結核死菌投与による関節炎の誘導: 第36回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006
- 11) Sato W, Aranami T, Yamamura T. Human Th17 cells are identified as bearing CCR2+CCR5-phenotype. 第36回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006
- 12) Satoh J-I, Kawai M, Tabunoki H, Kanda T, Yamamura T. Microarray analysis identifies CXCR3 ligand chemokines as immediate early IFN-responsive genes in peripheral blood lymphocytes in vitro and in vivo. 第36回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006
- 13) Aranami T, Sato W, Yamamura T. CD28- T cells in multiple sclerosis might be derived from distinct precursors. 第36回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 発明の名称
IL-17産生抑制物質およびそのスクリーニング方法
発明者: 大木伸司、三宅幸子、山村隆 他一名
出願日: 2007年2月28日
出願人: 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団
出願番号または公開番号: 特願2007-49768

2) 発明の名称
IL-17に起因する炎症を改善するための医薬組成物
発明者: 大木伸司、三宅幸子、山村隆 他一名
出願日: 2007年2月28日
出願人: 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団
出願番号または公開番号: 特願2007-49769

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

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
研究協力者	天谷 雅行	慶應義塾大学医学部皮膚科	教授
	高橋 勇人	慶應義塾大学医学部皮膚科	助手

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モグレイン 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った 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。昨年度は、Dsg3 反応性 T 細胞 15 株を樹立し、Dsg3^{-/-}B 細胞とともに Rag2^{-/-}マウスへ移植することにより、その *in vivo* における病原性を評価する系を確立した。本年度はさらに 5 株を樹立し、T 細胞株を合計 20 株とした(病原性あり 7 株、なし 13 株)。各 T 細胞株の特性 (T 細胞エピトープ、T 細胞受容体遺伝子、発現サイトカイン、ホーミング能) を検討した結果、IL-4 および IL-10 のみに病原性との関連性をみとめた ($P=0.04$)。さらに、sCD40L 存在下での Dsg3^{-/-}B 細胞の培養系に、IL-4 を添加すると、IL-10 に比べて培養上清中に産生される IgG 抗 Dsg3 抗体価が高かった。また sIL-4 R α 、sIL-10R α 、sIFN- γ R1 を発現する組み換えアデノウイルスを Rag2^{-/-}マウスに投与後、Dsg3 反応性 T 細胞株と Dsg3^{-/-}B 細胞を移植すると、対照ウイルス投与群にくらべて、sIL-4 R α を発現させたマウスでのみ抗体価の上昇や PV フェノタイプの発現が抑制された。以上のことから、PV モデルマウス病態において IL-4 が重要なことが示され、IL-4 を標的とする治療法の可能性を示した。本評価系は他の自己免疫疾患にも広く応用可能であり、将来治療標的となりうる T 細胞の病原性規定因子の同定に有用であると考えられた。

A. 研究目的

尋常性天疱瘡 (PV) は皮膚粘膜上皮細胞に対する自己免疫疾患で、デスモグレイン 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 細胞の因子 (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。さらに本評価系を利用し、実際に抽出された因子の阻害効果を *in vivo* で評価し病原性規定因子を同定する。この病原性規定因子は PV に対する新しい治療標的となる可能性がある。本年度は、昨年度からさらに樹立 T 細胞株を増やして 20 個とし、実際に病原性規定因子の同定を試みた。

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 10 μ g 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 x 10⁶ cell/well) を 24 穴平底プレートにまき、5 μ 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 (10⁶ cell/well) に X 線照射 (40Gy) し、mDsg3-1~5 (各 5 μ 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-STIMTM (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) TCRV β 遺伝子再構成の検出と各種サイトカインおよびケモカイン受容体遺伝子発現の解析

T 細胞株を PMA(25 ng/ml)とイオノマイシン(1 μ g/ml)存在下で 3 日間培養後、CD4 および CD8 Dynabeads (Dyna 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)およびケモカイン受容体 (CCR7, CCR4, CXCR5, CRTH2, CXCR3) 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。

d) T 細胞株の病原性の検討

培養 T 細胞株(1 x 10⁶ 個)を Dsg3^{-/-}B 細胞(5 x 10⁶ 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(ABL, 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 x 10⁶ 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。

e) T 細胞株のホーミング能の検討

T 細胞の病原性を検討した後にマウス脾臓を採取し、その凍結切片を抗 CD19 抗体 (RM4-5; Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ) と抗 TCR β 鎖抗体 (H57-597;BD) で共染色した。リンパ濾胞中の TCR β 鎖陽性細胞数を CD19 陽性細胞との接触の有無に分けて計測し、その比率を算出した。

f) 各種サイトカインが Dsg3^{-/-}B 細胞からの抗 Dsg3 抗体産生に与える影響の検討

Dsg3^{-/-}B 細胞を d)と同様の方法で単離し、10%FBS 添加 RPMI-1640 を用いて 96 穴平底プレートにまき (2 x 10⁵ cell/well)、500 ng/ml の s CD40L (R&D, Minneapolis, MN) 存在下で各種サイトカイン IL-4, IL-10, IFN- γ を濃度別 (0, 1, 2, 4, 6, 8 pg/ml) に添加し、7 日間培養した。培養後、培養上清を採取し、ELISA 法で上清中の IgG 抗 Dsg3 抗体価を測定した。

g) 組み換えアデノウイルスを用いたサイトカイン阻害効果が T 細胞の病原性に与える影響の検討

AdEasyTM Adenoviral Vector System (Stratagene, La Jolla, CA)を用いて IL-4R α , IL-10R α , IFN- γ R1 の各細胞外領域を発現する組み換えアデノウイルスおよび対照組み換えアデノウイルス (mock) を作成した。ウイルスは CsCl₂ 密度勾配遠心法による濃縮および PBS での透析でマウス投与用に準備した。Rag2^{-/-}マウス尾静脈より 1x10⁹ IFU の各組み換えアデノウイルスを投与し、5 日後に培養 T 細胞株(1 x 10⁶ 個)と Dsg3^{-/-}B 細胞(5 x 10⁶ 個)を d)の方法に準じて尾静脈より投与し、IgG 抗 Dsg3 抗体価の測定および PV 発現型の観察を経時的に行った。

(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) Dsg3 反応性 T 細胞株の樹立

限界希釈法により本年度は新たに 7 つの Dsg3 反応性 T 細胞株を樹立し合計 59 株とし、病原性を検討できた株も 5 株追加し合計 20 株とした (表 1)。

b) TCRV β 遺伝子再構成の検出

病原性を確認できた Dsg3 反応性 T 細胞株の V β 遺伝子を RT-PCR で検出した結果、病原性と再構成された V β 遺伝子の間に関連性はみとめなかった。

c) サイトカイン発現解析

病原性を確認できた Dsg3 反応性 T 細胞株のサイトカイン mRNA 発現パターンを RT-PCR で検討した結果、7 株が Th1 型 (IFN- γ ⁺IL-4⁻)、13 株が Th0 型 (IFN- γ ⁺IL-4⁺) であった (表 1)。個々の発現サイトカインについて病原性との関連を検討したところ、IL-4 および IL-10 の発現と病原性の間に関連を認めた (P = 0.04)。

d) ケモカイン受容体発現解析

病原性を確認できた Dsg3 反応性 T 細胞株のサイトカイン mRNA 発現パターンを RT-PCR で検討した結果、病原性と関連性を示すケモカイン受容体は認めなかった。

e) T 細胞株のホーミング能の検討

脾臓リンパ濾胞内に存在する T 細胞数を組織学的に T 細胞領域と B 細胞領域にわけて計測した結果、ホーミング能と病原性との間に関連性は認めなかった。

f) 各種サイトカインが Dsg3^{-/-}B 細胞からの抗 Dsg3 抗体産生に与える影響の検討

sCD40L 存在下で Dsg3^{-/-}B 細胞から産生される抗 Dsg3 抗体価は IL-4 の添加により増加した。一方、IL-10 あるいは IFN- γ の添加は抗 Dsg3 抗体産生に影響を与えなかった。

g) 組み換えアデノウイルスを用いたサイトカイン阻害効果が T 細胞の病原性に与える影響の検討

各種組み換えアデノウイルスを Rag2^{-/-}マウスに投与した後に、T 細胞株と Dsg3^{-/-}B 細胞を移植し PV 発現型の誘導を試みた。sIL-4R α を発現させた Rag2^{-/-}マウスでは、PV 発現型が抑制された。一方、sIL-10R α や sINF- γ R1 の発現は抗 Dsg3 抗体産生、PV 発現型を抑制しなかった (図 1)。

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* での病原性の評価を行うことができた。またこの評価系を利用することで T 細胞の病原性規定因子を同定することができた。すなわち、T 細胞の特徴的な機能であるホーミング能、抗原認識能、エフェクター活性に関わる代表的因子について病原性との関連性を検討した結果、IL-4 と IL-10 のみが病原性と関連した。さらにこの 2 分子について抗 Dsg3 抗体産生に与える影響を検討した結果、IL-4 のみが実際に PV 発現系の誘導に重要であることを明らかにした。今回我々が同定した分子は PV 病態を誘導する T 細胞に高率に発現する分子であり、IL-4 を標的とした治療法がより効果の長く、選択性の高い新たな治療法となりうる可能性を示唆する。

本実験系は 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。

E. 結論

PV モデルマウス作成法を応用することで 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と新たな治療法の開発に有用であると考えられた。

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) Kuwana M, Kaburaki J, Okazaki Y, Miyazaki H, Ikeda Y. Two types of autoantibody-mediated thrombocytopenia in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*. 2006;45(7):851-4.
- 2) Yamazaki R, Kuwana M, Mori T, Okazaki Y, Kawakami Y, Ikeda Y, Okamoto S. Prolonged thrombocytopenia after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: Associations with impaired platelet production and increased platelet turnover. *Bone Marrow Transplant*. 2006;38(5):377-84.
- 3) Asahi A, Kuwana M, Suzuki H, Hibi T, Kawakami Y, Ikeda Y. Effects of *Helicobacter pylori* eradication regimen on anti-platelet autoantibody response in infected and uninfected patients with idiopathic

thrombocytopenic purpura. *Haematologica*.
2006;91(10):1436-7.

- 4) Kuwana M, Ikeda Y. *Helicobacter pylori* and immune thrombocytopenic purpura: unsolved questions and controversies. *Int. J. Hematol.* 2006;84(4):309-15.
- 5) Kajihara M, Okazaki Y, Kato S, Ishii H, Kawakami Y, Ikeda Y, Kuwana M. Evaluation of platelet kinetics in patients with liver cirrhosis: Similarity to idiopathic thrombocytopenic purpura. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2007;22(1):112-8.
- 6) Takahashi H, Amagai M, Tanikawa A, Suzuki S, Ikeda Y, Nishikawa T, Kawakami Y, Kuwana M. T helper 2-biased natural killer cell phenotype in patients with pemphigus vulgaris. *J. Invest. Dermatol.* 2007;127(2):324-30.

2. 学会発表

- 1) 朝日厚子、岡崎有佳、鈴木秀和、池田康夫、桑名正隆: ITPにおける *H. pylori* 除菌効果発現機序の解析. 第68回日本血液学会総会・第48回日本臨床血液学会総会 (福岡). 2006. 10.
- 2) Takahashi H, Amagai M, Nishikawa T, Kawakami Y, Kuwana M: Characterization of desmoglein 3-reactive helper T cells involved in pathogenic IgG production in a mouse model for pemphigus vulgaris. The Society for Investigative Dermatology 67th Annual Meeting (Philadelphia). 2006. 5.
- 3) Kuwana M, Asahi A, Suzuki H, Okazaki Y, Ikeda Y: Eradication of *Helicobacter pylori* shifts the balance of Fcγ receptors on monocytes toward the inhibitory FcγRIIB in patients with chronic ITP. The 48th Annual Meeting of American Society of Hematology (Orlando). 2006. 12.

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 細胞株の解析結果

Name	Cytokines	TH phenotype	Pathogenicity
129#30	IL-2, IFN- γ , TGF- β	TH1	-
141#70	IL-2, IFN- γ , TGF- β	TH1	-
145#27	IL-2, IFN- γ	TH1	-
146#25	IL-2, 10, IFN- γ	TH1	-
151#10	IFN- γ , TGF- β	TH1	-
159#11	IL-2, IFN- γ , TGF- β	TH1	-
162#24	IL-2, IFN- γ , TGF- β	TH1	-

140#27	IL-2, 4, 10, IFN- γ , TGF- β	TH0	+
145#28	IL-2, 4, 6, 10, IFN- γ , TGF- β	TH0	-
146#13	IL-2, 4, 6, 10, IFN- γ , TGF- β	TH0	-
147#48	IL-2, 4, 6, 10, IFN- γ , TGF- β	TH0	+
147#27	IL-2, 4, 6, 10, IFN- γ , TGF- β	TH0	+
152#25	IL-4, IFN- γ , TGF- β	TH0	-
153#5	IL-2, 4, 10, IFN- γ , TGF- β	TH0	+
154#33	IL-2, 4, 6, 10, IFN- γ , TGF- β	TH0	+
161#28	IL-2, 4, 10, IFN- γ , TGF- β	TH0	-
161#29	IL-4, 6, 10, IFN- γ , TGF- β	TH0	-
161#100	IL-2, 4, 10, IFN- γ , TGF- β	TH0	+
162#92	IL-2, 4, 6, 10, IFN- γ , TGF- β	TH0	-
164#2	IL-2, 4, 10, IFN- γ , TGF- β	TH0	+

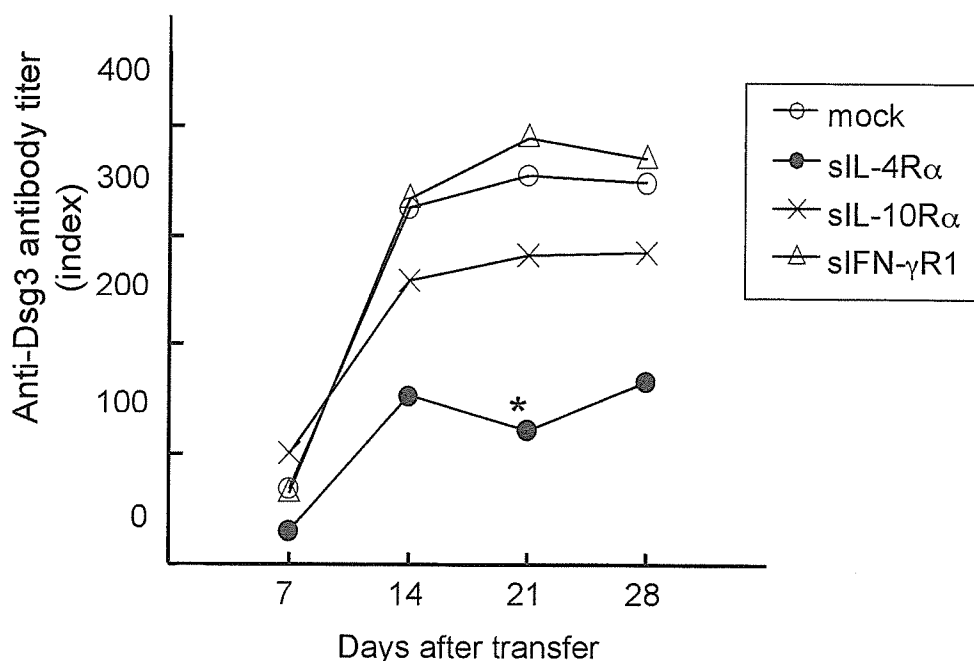


図 1. 可溶性サイトカイン受容体を発現させた Rag2^{-/-}マウスにおける Dsg3 反応性 T 細胞クローン (CE147#48) 移植後の抗 Dsg3 抗体価の推移。sIL-4R α , sIL-10R α , sIFN- γ R1 を発現する組み換えアデノウイルスおよび mock ウイルスを Rag2^{-/-}マウスに投与 5 日後、T 細胞クローン 147#48 を Dsg3^{-/-}B 細胞とともに Rag2^{-/-}マウスに移植し、血漿中の抗 Dsg3 抗体価を ELISA で経時的に調べた。各群 2 匹の平均を示す。*は P = 0.04。

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できており、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、HLADRB1-0405/0901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する分子やサイトカインについて検討した。

B.研究方法

1) DBA/1マウスにヒトリコンビナントGPIを免疫し、関節炎を誘導した。関節炎発症直後（day8）に各種生物製剤、特にRAに対する効果が注目されている抗TNF α 抗体、CTLA-4 Ig、抗IL-12抗体などを投与し効果を追跡した。また、治療群での1週後の抗GPI抗体価を測定し、自己抗体産生抑制効果を比較検討した。

2) 新しいTh細胞であるTh17細胞に着目し、まずday7に抗IL-17抗体投与を行った。また、その分化に必要なIL-6に対する受容体抗体（MR16-1）を用いて、関節炎に対する予防的効果（day0, day3）、および治療的効果（day8, day14）を詳細に検討した。予防的投与に関してのTh17への分化を所属リンパ節の細胞内染色で同定し、さらにMR16-1投与治療群における抗GPI抗体産生への影響を検討した。

3) これらの効果を確認するために、MR16-1で治療した群に対する細胞増殖をCFSでラベルしたリンパ節で検討した。

（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) GPI免疫モデルでは発症後でも抗TNF α 抗体、CTLA-4Igが著効した。また、抗GPI抗体に関してはこれら治療薬の抑制効果は、統計的にはCTLA-4 Igに認められた。一方、抗IL-12抗体では効果は殆ど認められなかった。

2) 抗IL-17抗体をday7に投与することにより関

節炎は有意に抑制された。また MR16-1 を day 0 または day 3 に投与した群では GPI 誘導性関節炎の発症はほぼ完全に抑制され、day 8 に投与した群でも関節炎は減弱された。MR16-1 を day 0 または day 3 に投与した群では所属リンパ節中の T_H17 細胞への分化は著明に抑止されることが判明した。

また、これらの群では抗 GPI 抗体産生の抑制効果も認めて、特に day8 で投与したものについての効果が最大であった。

3) CD 4 陽性 T 細胞の増殖はどの治療群でも認められ、IL-6 を抑制することによる T 細胞増殖抑制が起こることが考えられた。

D. 考察 E. 結論

GPI 免疫モデルでは生物製剤に対する治療効果が RA に近似しており、病因、および治療効果のメカニズムを探索する上で優れた動物モデルと考えられた。また、IL-6 は、特に induction phase では T_H17 を誘導することにより GPI 誘導性関節炎の発症に重要な役割を果たしていることが明らかになり、また、特に発症直後では、T 細胞増殖や自己抗体産生制御により関節炎を抑制している可能性も示唆された。これら治療の自己抗体産生機構をさらに詳細に検討していきたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.* 2006; 17: 801-809.
4. Ito S, Sugihara M, Suzuki T, Mamura M, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Sumida T. Diagnosis of Chlamydia-induced reactive arthritis. *Intern Med* 2006; 45: 37.
5. Kai S, Shibuya K, Wang Y, Kameta H, Kameyama T, Tahara-Hanaoka S, Miyamoto A, Honda S, Matsumoto I, Koyama A, Sumida T, Shibuya A. Critical role of M. tuberculosis for dendritic cell maturation to induce collagen-induced arthritis in H-2b background of C57Bl/6 mice. *Immunology* 2006; 118: 233-239.
6. 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.* 2006; 65:968-9
7. Tsutsumi A, Hayashi T, Chino Y, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Sumida T. Significance of antiprothrombin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus: clinical evaluation of the antiprothrombin assay and the antiphosphatidylserine/prothrombin assay, and comparison with other phospholipids antibody assays. *Mod.Rheumatol.*16:158-164, 2006
8. Ohnishi Y, Tsutsumi A, Matsumoto I, Goto D, Ito S, Kuwana M, Uemura Y, Nishimura Y, Sumida T. Altered peptide ligands control typeII collagen-reactive T cells from RA patients. *Mod.Rheumatol.*16:226-228,2006
9. Wakamatsu E, Matsumoto I, Yasukochi T, Naito Y, Goto D, Mamura M, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. Overexpression of phosphorylated stat1- α in labial salivary glands of patients with Sjogren's Syndrome. *Arthritis Rheum.* 54: 3476-3484, 2006.
10. Suzuki E, Tsutsumi A, Sugihara M, Mamura M, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Ikeda K, Ochiai N, Sato Y, Sumida T. Expression of TNF- α , tristetraprolin, T-cell intracellular antigen-1 and Hu antigen R genes in synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Int.J.Mol.Med.* 18:273-278,2006
11. Wakamatsu E, Nakamura Y, Matsumoto I, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. DNA microarray analysis of labial salivary gland of patients with Sjogren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.*(in press)
12. Sumida T, Wakamatsu E, Nakamura Y, Matsumoto I. Autoantibodies against muscarinic acetylcholine receptor in patients with Sjogren's syndrome.(review) In *Textbook of autoantibodies* Second edition 681-686, 2007.
13. 松本功 自己抗体誘導性関節炎モデル 内科 2006; 97: 355-358.
14. 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 2006; 3: 21-27.
15. 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 2006; 45: 292-296.

16. 松本功 抗 glucose-6-phosphate isomerase 抗体
の病原性 臨床免疫 2006; 45: 640-644.

17. 松本功、住田孝之 抗 G P I
(glucose-6-phosphate isomerase) 抗体 リウマチ科
2006; 36: 81-87.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

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 北海道大学大学院医学研究科 病態内科学講座・第二内科（教授）
研究協力者 保田晋助 北海道大学大学院医学研究科 病態内科学講座・第二内科（助手）

研究要旨

RasGRP1 はT細胞に高発現して Ras を活性化し、欠損マウスで SLE 様症状を認める。今回、SLE 患者および健康人末梢血における RasGRP1 の発現を検討した。RNA レベルでは13種の新たなスプライス異常を認め、異常を有する割合は SLE 患者において有意に高かった。末梢血 T 細胞における正常 RasGRP1 蛋白の発現は、スプライス異常を有する患者において有意に低かった。RasGRP1 のスプライス異常が、SLE における病態形成に何らかの影響を与える可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus:SLE) の病態において、胸腺・末梢における T 細胞の分化・成熟に関わる分子群に異常があることが示されてきた。T 細胞に多く発現する Ras-guanyl releasing protein 1 (RasGRP1) は、Ca²⁺ とジアシルグリセロール (DAG) 結合部位および PKC θ によるリン酸化部位を持ち、これらの作用をうけて Ras を活性化する。弱い T 細胞レセプター刺激による Ras-Erk 経路の活性化を担い、胸腺における T 細胞の正の選択に重要な分子であることが知られている。RasGRP1 欠損マウスにおいては胸腺における T 細胞の成熟が障害され、リンパ球減少をきたすが、高月齢になると自己反応性 T 細胞の増加をともなうリンパ節腫脹が出現、さらに抗核抗体、抗 DNA 抗体、糸球体腎炎等 SLE 様症状を自然発症することが報告された。本研究では SLE 患者において RasGRP1 の発現を検討し、SLE の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

対象；健康人 20 名(男性 4 名, 女性 16 名, 平均年齢 30.9 歳) SLE 患者 32 名 (男性 5 名, 女性 27 名, 平均年齢 32.0 歳) を対象として、末梢血 10cc を採血、単核球より RNA を抽出した。また、蛋白レベルでの検討を目的に、健康人 4 名、SLE 患者 12 名より末梢血 T 細胞を分離した。患者群における疾患活動性は、British Isles Lupus Assessment Group (BILAG) score を用いて評価した。

方法；スクリーニングとして、健康人、SLE 患者、他の膠原病の患者数名ずつから末梢血単核球を分離、RNA から cDNA を合成し、全長 RasGRP1 を PCR にて増幅して泳動パターンを観察した。次に、上記の健康人 20 名および SLE 患者 32 名の末梢血単核球より RNA

を抽出、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、ひとりあたり 5 クロンの塩基配列を決定した。患者および健康人末梢血より negative selection beads を用いて T 細胞を分離し、cell lysate を調整、ウサギを免疫して作成した RasGRP1 抗体を用いて蛋白レベルでの発現検討を行った。また、今回発見された代表的スプライスバリエーションを発現するベクターを作成し、HEK293 細胞に導入してその挙動を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は北海道大学倫理委員会の承認を得て、文書による同意を得た上で厳重な個人情報管理のもと行われている。

C. 研究結果

スクリーニングとして行った末梢血単核球における全長 RasGRP1 発現検討の結果、健康人および多くの SLE 患者、他の膠原病患者では約 2400bp の全長 RasGRP1 産物が主なバンドとして検出されたが、一部の SLE 患者において多数のバンドが観察され、全長 RasGRP1 に相当するバンドをほとんど検出できない者もあった (図 1)。

この結果から、一部の SLE 患者における RasGRP1 のスプライス異常が予想されたので、年齢・性をマッチさせた健康人および SLE 患者末梢血単核球由来の RasGRP1 PCR 産物を一人あたり 5 クローンずつシーケンシングした。末梢血 SLE 患者および健康人サンプルからエクソン 11 欠損、エクソン 11,16 欠損、エクソン 11,13 欠損、エクソン 11,15,16 などサイズの異なる 13 種の新たなスプライスバリエーションが検出され、図に示すようにそれぞれスプライスバリエーション A~M と名付けた (図 2)。エクソン 10, 11 または 15 の欠損では下流も in frame に保たれるが、他のスプライスバリエーション

トでは図中に*で示す休止コドンが出現していた。スプライズバリエーション E および H では、それぞれ黒のバーで示したイントロン 16, 12 のスプライズが行われず、休止コドンが出現していた。

エクソン 11 を欠損するクローンの比率は SLE 患者で有意に高く、また、何らかのスプライズ異常を有する確率は、SLE 患者クローン中で 36.0%、健常人で 13.0% ($p=0.0001$) と SLE 患者で有意に高かった (表 1)。次に、患者の臨床像とスプライズバリエーションとの関連について検討を行った (表 2)。スプライズバリエーションと性別、疾患活動性、ステロイドの投与量および治療の有無の間に統計学的な関連はなく、年齢あるいは罹病期間との関連を認めた。

蛋白レベルの RasGRP1 発現検討では、まずウサギを免疫して作製したポリクローナル抗体をウエスタンブロットを用いて評価した。今回作製したリコンビナント RasGRP1 および胸腺の lysate、末梢血 T 細胞の lysate 中の約 95kDa 蛋白を認識し、この反応は免疫に用いたペプチドによって阻害された。従って、今回作製した抗体はヒト RasGRP1 を特異的に認識することが確認された。次に、末梢血より分離した T 細胞を用いて、ウエスタンブロットにて RasGRP1 およびコントロールとしてアクチンの蛋白発現を検討した (図 3 A, B)。約 95kDa の全長 RasGRP1 に相当するシグナルを、多くの健常人および SLE 患者において認めた。一部の患者ではこのシグナルが弱く、特に SLE11 においてはほとんど検出できなかった。一方、スプライズバリエーションに相当すると考えられる小サイズのシグナルは、少なくとも SLE11,12 を除いて検出されなかった。シグナルの強度をアクチンに対する比で検討したところ、健常人-SLE 患者間で有意差はないが、患者の中には発現レベルの明らかに低い者があった。また、スプライズバリエーションを持つ者で有意に RasGRP1 の発現が低いことがわかった ($p=0.027$) (図 3 C)。

HEK293 細胞を用いた発現の検討では、全長 RasGRP1 およびスプライズバリエーション A, B, D をコードするベクターを導入し、抗生剤で導入細胞を選択した。DNA 分解酵素で処理後の RNA を cDNA に変換し、エクソン 10-12 に対するプライマーを用いて PCR を行ったところ、いずれのベクターを導入したものでも高いレベルでの発現をみとめた (図 4 A, B)。スプライズバリエーション A では全長 RasGRP1 と比較してやや低いレベルでの蛋白発現が確認されたが、スプライズバリエーション B および D では蛋白発現は認めなかった。

D. 考察

RasGRP1 は、T 細胞の分化にとって重要なシグナル分子であり、T 細胞レセプターの下流でジアシルグリセロールなどによって活性化を受け、Ras を主にゴルジ体上で活性化する。RasGRP1 の欠損では CD4+/CD8-, CD4-/CD8+ の T 細胞が減少し、さらに SLE 様の病態を

発症する。このマウスでは、自己反応性 Th2 細胞の増殖および B 細胞の活性化を認めた。今回の我々の検討で、SLE 患者において初めて RasGRP1 の発現異常を認めた。RNA レベルで RasGRP1 のスプライズ異常が SLE 患者において高頻度に認められたが、少なくとも無刺激の T 細胞では今回発見されたスプライズバリエーションに相当する蛋白発現を認めなかった。HEK293 細胞を用いた発現検討の結果から exon 11,16 欠損および exon 11,15,16 欠損では何らかの転写後調節を受けている可能性が高いと考えられるが、exon 11 欠損バリエーションの発現調整に関しては今後の検討を要する。RasGRP1 のスプライズ異常は正常 RasGRP1 分子の低発現に関与していることが末梢血 T 細胞の検討から見いだされており、RasGRP1 の機能不全に伴うリンパ球減少や自己反応性 T 細胞の出現および B 細胞の多クローン性増殖など SLE の病態に何らかの影響を与え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、RNA レベルで RasGRP1 の発現を検討した。新たなスプライズ異常が発見され、その出現頻度は SLE 患者において有意に高率であった。また、末梢血 T 細胞においてスプライズ異常は正常 RasGRP1 の蛋白発現を負に調整している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Koike T, Atsumi T.

“Resurrection of Thrombin” in the pathophysiology of the antiphospholipid syndrome.

Arthritis Rheum. (in press)

Minauchi K, Nishio M, Itoh T, Yamamoto S, Fujimoto K, Sato N, Koike T.

Hepatosplenic alpha/beta T cell lymphoma presenting with cold agglutinin disease.

Ann Hematol. 86(2):155-157,2007

Nakamura A, Shimizu C, Nagai S, Taniguchi S, Umetsu M, Atsumi T, Wada N, Yoshioka N, Ono Y, Tanizawa Y, Koike T.

A novel mutation of *WFS1* gene in a Japanese man of Wolfram syndrome with positive diabetes-related antibodies.