

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

HLA 多型が寄与する自己免疫疾患の発症機序の解明

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 反町典子

平成20年3月

目次

I.	序文 -----	3
II.	班員名簿 -----	4
III.	総括研究報告書	
	HLA 受容体による疾患関連 HLA アリル認識と免疫細胞の機能制御機構の解析 -----	6
	国立国際医療センター研究所 消化器疾患研究部 室長 反町 典子	
IV.	分担研究報告書	
1.	自己免疫疾患および HLA 多型と調節性 T 細胞の分化、機能との関係 -----	14
	国立国際医療センター研究所 臨床病理研究部 部長 鈴木 春巳	
2.	疾患関連 HLA アリルを発現するヒト化型マウスの作製 -----	19
	国立国際医療センター研究所 地域医療保健研究部 部長 高木 智	
3.	自己免疫疾患患者 HLA と臨床像の関連についての解析 -----	23
	国立国際医療センター膠原病科 第一病棟部長 三森 昭夫	
V.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	29
VI.	研究成果の刊行物・別刷 -----	33

I. 序文

難治性疾患では、長期化する治療による経済的負担と患者のQOLの低下は深刻な問題であり、その克服は急務です。特に、リウマチ膠原病をはじめとして種々の難病は、治療法が大きく進歩したものの対症療法にとどまり、原因はなお不明なものが多いのが実情です。対症療法でのステロイドの副作用も深刻な問題であり、新しい創薬ターゲットを同定することが新規治療法の開発には必須です。

難治性疾患には、免疫システムの異常が病態に寄与する免疫難病が数多く含まれ、疾患単位を越えた炎症病態の共通性として、ヒトにおける主要組織適合抗原(MHC)であるHLAの特定の分子との高い相関が報告されています。これは、免疫難病の病態におけるHLA多型の重要性を示すものであり、その分子基盤の解明と病因論の樹立は、疾患横断的な新しい診断、治療法の開発に非常に有益であると考えられます。従来、疾患関連HLA分子が結合する自己由来のペプチドを認識する自己反応性T細胞によって誘起される自己免疫応答が免疫難病の病因となる可能性が精力的に解析されてきましたが、未だに病因の理解には至っていません。私たちは、これまでのT細胞によるペプチド認識という従来のドグマとは異なる着眼点からのアプローチが必要であると考え、近年次々と同定されてきた、TCRとは異なる新しいHLA受容体による新しい免疫制御機構に焦点を当てて本研究を立案しました。HLA受容体には細胞機能を正または負に制御する多くの分子が存在することから、種々の免疫細胞の機能が、疾患関連HLAとその受容体によってどのように制御され、免疫難病の病態にどのような役割を果たすかを理解することにより、新しい治療標的候補分子を同定することを目的として研究を遂行しております。ここに研究事業1年目の成果をご報告申し上げます。

研究遂行に御尽力くださいました分担研究者、研究協力者の先生方、御指導と御尽力をいただきました厚生労働省健康局疾病対策課の方々に深謝いたしますと共に、今後とも皆様の御指導御鞭撻のほどをよろしくお願い申し上げます。

平成20年3月

難治性疾患克服研究事業 「HLA多型が寄与する自己免疫疾患の発症機序の解明」

主任研究者 反町 典子

II. 班員名簿

区分	氏名	所属
主任研究者	反町 典子	国立国際医療センター研究所 消化器疾患研究部 消化管疾患研究室
分担研究者	鈴木 春巳 高木 智 三森 明夫	国立国際医療センター研究所 臨床病理研究部 国立国際医療センター研究所 地域医療保健研究部 国立国際医療センター 膠原病科
協力研究者	伊藤 健司 土肥 多恵子 大河内 仁志 玉木 毅 武田 憲夫 山本 一彦	国立国際医療センター 膠原病科 国立国際医療センター研究所 消化器疾患研究部 国立国際医療センター研究所 消化器疾患研究部 国立国際医療センター 皮膚科 国立国際医療センター 眼科 東京大学医学部アレルギーリウマチ内科

III. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患克服事業)

HLA 受容体による疾患関連 HLA アリル認識と免疫細胞の機能制御機構の解析

主任研究者 反町 典子 国立国際医療センター研究所 消化器疾患研究部 室長

研究要旨

難治性疾患には、免疫システムの異常が病態に寄与する免疫難病が数多く含まれ、疾患単位を越えた炎症病態の共通性として、ヒトにおける主要組織適合抗原(MHC)である HLA の特定の分子との高い相関が報告されている。これは、免疫難病の病態における MHC 多型の重要性を示すものであり、その分子基盤の解明と病因論の樹立は、疾患横断的な新しい診断、治療法の開発に非常に有益である。従来、疾患関連 MHC アリルによる自己由来のペプチド結合と自己反応性 T 細胞の活性化によって誘起される自己免疫応答が免疫難病の病因となる可能性が精力的に解析されてきたが、未だに病因の理解に至っていない。本研究では、これまでの T 細胞によるペプチド認識という従来のドグマにはとらわれずに、TCR とは異なる新しい MHC 受容体による免疫細胞の機能制御という視点から病態を解析し、新しい治療標的候補分子を提示することを目的とする。本年度は、MHC クラス I とその受容体による好中球および樹状細胞の新しい機能制御の分子機構の解明、制御性 T 細胞の分化制御機構の分子基盤、自己免疫疾患の一つである重症筋無力症の治療に有望な大量ガンマグロブリン療法が MHC とその受容体による免疫制御にどのような影響を与えているかについて解析を試みた。MHC 受容体には細胞機能を正または負に制御する多くの分子が存在するが、本研究によって炎症や抗原提示をはじめ免疫制御に重要な役割を果たす自然免疫細胞群の機能が、細胞膜ドメインの動態制御という細胞の根幹的な機能を作用点として MHC とその受容体によって制御されていることが明らかとなり、疾患関連 MHC が多岐にわたる細胞機能に影響する可能性が見出された。さらに、MHC とその受容体の相互作用を阻害することにより、好中球浸潤やサイトカイン産生が抑制できることを見出し、治療標的分子としての可能性が見出された。これらの知見に基づいて、疾患関連 HLA とその受容体の相互作用によって、どのように免疫制御が攪乱され、免疫難病の病態にどのような役割を果たすかを明らかにできるものと期待される。また、臨床医との機能的な連携による基盤研究成果の臨床意義への変換を目的として、自施設通院症例のデータベース化に着手した。これは、関節リウマチの病像、治療効果と副作用、合併症を分析し、そこに HLA 情報を加えることにより、HLA 多型が自己免疫疾患の発症、病態に与える影響を考察する上で有用なデータベースとなる。

分担研究者	鈴木 春巳	国立国際医療センター研究所 臨床病理研究部 部長
	高木 智	国立国際医療センター研究所 地域医療保健研究部 部長
	三森 明夫	国立国際医療センター 膠原病科 部長

A. 研究目的

難治性疾患は、現在根治的治療法が確立されておらず、長期化する治療による経済的負担と患者の QOL の低下は深刻な問題であり、その克服は急務である。難治性疾患には、免疫システムの異常が病態に寄与する免疫難病が数多く含まれ、その病態形成に、ヒト主要組織適合抗原である HLA の特定の遺伝子多型が寄与することが、多くのゲノム疫学的解析から明らかにされている。多くの免疫難病には、複数の疾患感受性遺伝子と外的環境要因が関与するものの、疾患横断的に認められる HLA 遺伝子との高い相関は、この分子の病態形成における重要性を示すものであり、その分子基盤の解明と病因論の樹立は、疾患横断的な新しい診断、治療法の開発や創薬ターゲットの同定に大変に有益である。

本研究では、免疫学の基盤的研究から得られた最新の知見をもとに、これまで精力的に解析されてきた疾患関連アリルによるペプチド結合と T 細胞活性化という HLA の抗原提示機能とは異なる、新しい HLA 受容体による HLA 認識を介した細胞制御機能に着目し、炎症応答の主役となる好中球、マクロファージ、樹状細胞、調節性 T 細胞、さらには Th17 細胞の機能に、HLA 多型がどのように関与するかを、モデル動物、培養細胞株、患者末梢血を用いて解析し、疾患関連 HLA 分子が免疫応答制御に果たす役割とその分子機序を明らかにし、疾患関連 HLA 分子が免疫難病の病因病態に寄与するメカニズムを明らかにすることによって、新しい治療標的となりうる候補分子を同定することを目的とする。

B. 研究方法

(1) MHC クラス I による新規免疫応答制御機構の解明

MHC クラス I による新規免疫応答制御機構の分子基盤を明らかにするため、炎症性細胞に優先して発現する MHC クラス I 受容体 Ly49Q およびその恒常的不活性型を導入した細胞株とマウス、MHC クラス I 欠損細胞とマウスを用いて、MHC クラス I による新規免疫応答制御機構の解明を行った。

炎症応答は酵母や大腸菌の死菌を用いた急性炎症モデルを用いて MHC クラス I 受容体がどのように炎症制御に関わるかを解析した。

炎症性細胞の細胞応答の解析では、好中球、マクロファージ、樹状細胞、およびマクロファージ細胞株を用いて、サイトカイン産生、シグナル伝達、免疫組織学的解析、形態学的解析、フローサイトメトリーによる細胞表面分子の解析を用いて、MHC クラス I 受容体が炎症性細胞の細胞機能を制御する分子機構について詳細な解析を行った。

MHC クラス I による細胞膜ドメインの制御にはコレラトキシン B サブユニットを用いた免疫組織学的解析を用いた。

ヒト HLA クラス I の会合分子の解析には、抗 HLA 抗体を用いた免疫沈降法およびその生化学的解析を、候補分子アプローチとして既知の HLA 受容体に対する抗体を用いた免疫組織学的解析を行った。

(2) HLA 多型と調節性 T 細胞の分化および機能との関連

T 細胞応答を負に制御する制御性 T 細胞 (Treg) は、その細胞数や活性が自己免疫疾患に密接に関連することが報告されている。HLA とその受容体が抗原提示細胞の機能を制御するこ

と、Treg が胸腺内でアゴニスト選択を受けて分化誘導されることから、HLA 多型が Treg の分化に影響を及ぼす可能性が十分に考えられるが、これまで解析はなされていない。Treg 分化における HLA 多型の影響を解析する上で、自己免疫疾患の発症に重要な役割を果たす natural-Treg の分化制御機構を明らかにすることは非常に重要である。そこで本年度はまず Treg の分化に関わる因子と分化制御機構を明らかにする目的で、T 細胞分化制御因子 RhoH が制御性 T 細胞の分化に与える影響を検討した。低分子量 G たんぱく質である RhoH を欠損するマウスを用いて、制御性 T 細胞の分化について解析を行った。制御性 T 細胞の解析は、CD4 および Foxp3 抗体を用いたフローサイトメトリーによって行った。また、制御性 T 細胞の抑制機能の解析には、CSFE 希釈法による CD4+CD25-T 細胞の増殖抑制を用いた。

(3) 疾患関連 HLA アリルを発現するヒト化型マウスの作製

疾患関連 HLA アリルの病態への寄与を解析する際に、既に疾患を発症している患者および患者検体での解析からは、その分子機構や病態形成初期において標的となる細胞、固体レベルでの免疫系に及ぼす影響等についての検討は非常に困難である。そこで、疾患関連アリルを有するヒト造血幹細胞を用いてヒト免疫システムを再構築したモデルマウスを作製し、発症前および病態形成初期における疾患関連 HLA アリルの免疫応答への影響を、細胞増殖、抗体産生、サイトカイン産生および種々の炎症・感染モデルを用いて検討する。ヒト臍帯血幹細胞を全てのリンパ球を欠損し免疫不全を呈する RAG2/γc 欠損マウスに移植し、ヒト免疫担当細胞に

よる免疫系の再構築を行なう目的で、本年度は、まず移植の際のレシピエントへの投与時期および投与方法により、ドナー造血幹細胞および前駆細胞の生着率にどのような違いが出るかについて検討し、ヒト免疫系モデルマウス作成の準備を進めた。

(4) 自己免疫疾患患者 HLA と臨床像の関連についての解析

HLA の免疫制御機能という新しい視点で免疫攪乱現象を、自己免疫疾患のモデル動物の 1 つである実験的重症筋無力症マウスを用い、発病期と治療反応期での免疫担当細胞群の機能および動態、サイトカイン産生を解析した。また、重症筋無力症の治療法として有望な大量ガンマグロブリン療法における病理病態と MHC クラス I 受容体との関連を解析した。

また、疾患関連 HLA を保有する自己免疫疾患患者の病態、合併症が疾患関連 HLA を保有しない患者群と差異を示すかを検討するために必要となる、自施設通院症例のデータベース作成を開始した。

(倫理的配慮)

データベース作成時の患者へのインタビュー、および血液検体収集を含む本研究は、国立国際医療センターの倫理審査会で承認された。この申請内容を遵守する。データベースには患者の HLA 情報の追加が必要であるが、次年度での施行を目標に倫理審査予定である。

C. 研究結果

(1) MHC クラス I による新規免疫応答制御機構の解明

MHCクラスIとその受容体であるLy49Qは、細胞表面でシスに会合すること、その会合はβ2mに非依存性で、酸耐性であること、MHCクラスIとLy49Qは細胞内にエンドサイトーシスによって取り込まれ、エンドソームにおいてもその会合は安定し、MHCクラスIと共に細胞内に取り込まれることを見出した。さらに、この機構が細胞膜ラフト依存かつITIM依存的なメカニズムで制御されていること、この制御機構によって炎症性細胞の細胞移動、サイトカイン産生をはじめとして、多くの細胞の機能が制御されることを見出した。さらに、MHCとその受容体の相互作用を阻害することにより、好中球の浸潤、炎症性細胞のサイトカイン産生が抑制できることを見出し、治療標的分子としての可能性を提示できた。これらの結果から、MHCクラスIとその受容体は、細胞の根幹的な機能制御に関わっていることが明らかとなり、MHCまたはその受容体の多型によってその制御機構に影響が生じる可能性が強く示唆された。また、ヒトHLA受容体を網羅的に解析するために、HLAに対する抗体で免疫沈降および生化学的解析を行い、細胞表面上でHLAが多くのタンパク質と会合していることを明らかにし、現在その同定も進めている。同時に、細胞膜ラフトの制御に関わるヒトHLA受容体を同定するために、候補分子アプローチで同様の局在分布を示す分子の検索を行い、いくつかの候補分子を同定した。今後これらの分子について、上記で明らかになったHLAの新規免疫制御機能について解析を進めると同時に、疾患関連HLAとコントロールHLAとの間で免疫制御機能の比較を進める。

(2) HLA多型と調節性T細胞の分化および機能との関連

本分担研究から、コンベンショナルなT細胞とTregは異なる分化制御を受けていることが明らかとなった。特に、本研究によって、T細胞分化において負の選択とアゴニスト選択の間では、異なる細胞内機能分子が用いられていることがはじめて明らかとなり、これはアゴニスト選択によって分化するTregの分化制御を制御する上で、コンベンショナルなT細胞分化に影響せずにTreg分化を制御することができる標的分子が存在する可能性を提示した点において、重要な知見である。

(3) 疾患関連HLAアリルを発現するヒト化型マウスの作製

まず同種移植系を用いて、新生仔の肝臓への移植、成体の骨髄腔内への移植により生着率およびリンパ球系細胞のキメラ率に及ぼす効果を検討した。成体のRAG2/γc欠損免疫不全マウスに骨髄非破壊的な条件として低量の放射線(350Gy)を照射し、CD45アロタイプで識別可能なドナー造血前駆細胞を骨髄腔内に直接投与し、径静脈投与群とキメラ率を比較した。また、RAG2/γc欠損免疫不全マウスの生後3日以内の新生仔を用い、放射線照射の前処置を全く行わず、肝臓実質内へ直接ドナー造血前駆細胞を移入した。

骨髄腔内移植群では、ドナーの細胞数を1/5程度と少ない移植細胞数とした場合でも遜色のないキメラ率が得られ、リンパ球コンパートメントの再構築が達成された。また、生後3日以内の新生仔の肝臓実質内へ放射線の照射無しにドナー造血前駆細胞を移入した場合においても十分なリンパ球コンパートメントの再構築が

達成され、骨髄球系細胞分画においても高いキメラ率が得られたことから、次年度ではヒト造血幹細胞を用いて、モデルマウスの作出をさらに進める。

(4) 自己免疫疾患患者 HLA と臨床像の関連についての解析

免疫担当細胞群間での調節機能への HLA 受容体の関与を解析するために、実験的重症筋無力症モデルマウスを樹立し、大量免疫グロブリンを投与し、コントロール治療群に比較し、有意な歩行機能の回復を確認した。この実験系を用いて MHC 受容体による免疫制御機構への大量ガンマグロブリン投与の影響を解析する予備実験を開始した。

症例データベース解析では、関節リウマチ症例において、生物製剤の効果と継続率、慢性下気道病変の合併症および非定型抗酸菌症の検出率について集計および考察を行った。

D. 考察

本年度の研究で、MHC クラス I と受容体による新しい免疫制御機構が明らかになり、その分子機構の解明によって、MHC の多型が受容体との相互作用を介して免疫制御異常をきたす可能性が考えられた。特に、MHC クラス I と受容体は、シス相互作用を介して細胞膜ダイナミクスの制御という細胞の根幹的な機能性制御に関わることを初めて明らかにし、その制御機構が炎症性細胞の細胞遊走、サイトカイン産生をはじめ、多くの細胞機能を制御することを見出したことによって、免疫難病の病因病態における MHC クラス I の機能解析に新しい局面にさしかかったとも言える。また、MHC とその受容体の機能を阻害することにより、好中球

の浸潤や自然免疫細胞のサイトカイン産生が抑制できることから、MHC またはその受容体、または受容体のシグナル関連分子の中に治療標的としての候補分子が存在する可能性が提示できたということは非常に重要な点である。さらにヒト MHC クラス I 受容体の候補分子が得られたことから、疾患関連 HLA を発現するヒト化型マウスを用いることによって HLA による免疫制御異常の分子機構とそれに関わる機能分子を明らかにできると期待される。また、疾患関連 HLA を保有する自己免疫疾患患者の病態、合併症が疾患関連 HLA を保有しない患者群と差異を示すかを検討するために有用な、自施設通院症例のデータベースが充実することにより、HLA 多型と病態との相関をさらに詳細に解析するために有用な情報の提供が可能になりつつあることは高く評価される。

E. 結論

- ① MHC クラス I とその受容体 Ly49Q の相互作用が、細胞機能制御の根幹である細胞膜ドメイン制御を行っていること、それによって自然免疫細胞の機能を多岐にわたって制御していることを見出し、その分子基盤の一部を明らかにした。これは MHC クラス I の新規免疫制御機構であり、MHC の多型が抗原提示以外で免疫応答制御に影響を及ぼしていることを強く示唆する知見である。
- ② MHC クラス I とその受容体 Ly49Q の相互作用を阻害することにより、炎症性細胞の組織浸潤やサイトカイン産生を抑制できることから、治療標的としての可能性を見出した。
- ③ 自施設通院症例のデータベース作成を開始し、疾患関連 HLA と自己免疫疾患患者の病

態および合併症について詳細な再解析を開始した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

研究成果の刊行に関する一覧表を参照

2. 学会発表

1. Toyama-Sorimachi, N., Sasawatari, S., Inaba, K., Dohi, T.: An inhibitory MHC class I receptor, Ly49Q, is crucial for neutrophils polarization and infiltration by regulating cellular distribution of SHP-1. 第37回日本免疫学会総会・学術集会 11月20-22日, 2007, 東京
2. Sasawatari, S., Dohi, T., Inaba, K., Toyama-Sorimachi, N.: A novel regulatory mechanism of recruitment and type I interferon secretion of plasmacytoid dendritic cells. 第37回日本免疫学会総会・学術集会 11月20-22日, 2007, 東京
3. Toyama-Sorimachi, N. MHC class I and its receptor - a novel immune regulatory mechanism through membrane dynamics. 4th Annual Symposium Japanese-German Frontiers of Science, Shonan Village, Kanagawa, Japan Nov. 1-4, 2007 (招待)
4. Toyama-Sorimachi, N. A novel regulatory mechanism of neutrophil trafficking by an inhibitory MHC class I receptor, Ly49Q. Shonan Village, Kanagawa, Japan Oct. 9-12, 2007
5. 笹渡繁巳、反町典子：抑制性 MHC レセプター Ly49Q による炎症応答制御と免疫恒常性の維持 第16回東京免疫フォーラム 3月15日、2007 <フォーラム賞受賞>
6. Kawashima, R., Kawamura, Y., Mizutani, N., Toyama-Sorimachi, N., Dohi, T.: IL-13 disrupts the cell-cell adhesion of intestinal epithelial cells. 第37回日本免疫学会総会・学術集会 11月20-22日, 2007, 東京
7. Kawamura, Y., Kawashima, R., Mizutani, N., Toyama-Sorimachi, N., Dohi, T.: Siglecs, ligands for carbohydrate determinants on nonmalignant colonic epithelial cells, are expressed in the colonic lamina propria cells. 第37回日本免疫学会総会・学術集会 11月20-22日, 2007, 東京
8. Mizutani, N., Kawashima, R., Kawamura, Y., Imai, T., Toyama-Sorimachi, N., Dohi, T.: Fractalkine regulates macrophage function in a dose-dependent manner through CXCR1. 第37回日本免疫学会総会・学術集会 11月20-22日, 2007, 東京
9. Mizutani, N., Sakurai, T., Shibata, T., Uchida, K., Fujita, J., Kawashima, R., Kawamura, Y., Toyama-Sorimachi, N., Imai, T., Dohi, T.: Fractalkine regulates TNF- α secretion by macrophages with induction of peroxisome proliferator-activated receptor- γ and its ligand. Digestive Disease Week 2007 May 19-24, 2007 Washington, D.C.
10. Kawashima, R., Kawamura, Y., Mizutani, N., Toyama-Sorimachi, N., Saito, Y., Kawamura, Y. J., Konishi, F., Dohi, T.: Aberrant responses of colonic macrophage-type cells to lipopolysaccharide in ulcerative colitis:

Upregulated expression of MD-2 and production of inflammatory cytokines.

Digestive Disease Week 2007 May 19-24,

2007 Washington, D.C. Mizutani, N., Sakurai,

T., Shibata, T., Uchida, K., Fujita, J.,

Kawashima, R., Kawamura, Y.,

Toyama-Sorimachi, N., Imai, T., Dohi, T.;

Fractalkine regulates TNF- α secretion by macrophages with induction of peroxisome

proliferators-activated receptor-g and its

ligand. Digestive Disease Week 2007 May

19-24, 2007 Washington, D.C.

11. Kawashima, R., Kawamura, Y., Mizutani, N.,

Toyama-Sorimachi, N., Saito, Y., Kawamura,

Y. J., Konishi, F., Dohi, T.;

Aberrant responses of colonic macrophage-type cells to

lipopolisaccharide in ulcerative colitis:

Upregulated expression of MD-2 and

production of inflammatory cytokines.

Digestive Disease Week 2007 May 19-24,

2007 Washington, D.C.

その他それぞれの分担研究者の項目を参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

【特許の取得】

i. 申請中

発明者 白井睦訓、鈴木春巳他 権利者 山

口大学「新規T細胞機能遺伝子探索技術の

開発とそれを利用した新規T細胞分化遺

伝子」

ii. 申請準備中

発明者 白井睦訓、鈴木春巳他 権利者 山

口大学「サイトカインを利用した新規造

血・免疫系幹細胞の分化技術と人工血液医

療への応用」

IV. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患克服事業)

HLA 多型が寄与する自己免疫疾患の発症機序の解明 分担研究報告書

自己免疫疾患および HLA 多型と調節性 T 細胞の分化、機能との関係

分担研究者 鈴木春巳 国立国際医療センター研究所 臨床病理研究部長

研究要旨

免疫難病の多く、特に慢性炎症病態を主とする疾患では、主要組織適合抗原(MHC)である HLA の特定の分子との高い相関が報告されており、その分子基盤の解明と病因論の樹立は、疾患横断的な新しい診断、治療法の開発に重要である。本研究では HLA 多型と調節性 T 細胞 (Treg) との関係に着目し、自己免疫疾患と相関する HLA 分子と、Treg の分化、すなわち Treg の数、機能および TCR レパートリーに相関があるかどうかを検討する。このような研究を推進するにあたっては、Treg の分化、活性化の分子メカニズムを理解することが必須であり、本年度は Treg の分化、活性化に必要な分子、条件についての基礎的な検討を行った。我々が新規に単離した低分子 G タンパク質である RhoH の欠損マウスを用いた解析の結果、コンベンショナルな T 細胞の分化には RhoH は必須であるが、Treg をはじめとするアゴニスト選択を受ける T 細胞の分化には必須で無いことを明らかにし、Treg の分化および活性化がコンベンショナルな T 細胞とは異なるシグナル伝達経路を利用していることを初めて明らかにした。これらの結果から、Treg の分化、活性化が HLA アリルに依存する可能性が示唆された。

A.研究目的

根治的治療法が確立されていない難治性疾患においては、長期化する治療による経済的負担と患者のQOLの低下は深刻な問題であり、その克服は急務である。免疫関連の難病においてはその病態形成に、ヒト主要組織適合抗原である HLA の特定の遺伝子多型が寄与することが、多くのゲノム疫学的解析から明らかにされている。HLA 分子がどのように病因・病態に関与するかについては、これまでは、HLA の免疫システ

ムにおける根幹的な役割である、ペプチドの結合と T 細胞活性化という機能から鑑みて、疾患関連 HLA 分子が結合する自己ペプチドとそれによって惹起される免疫応答が精力的に解析されてきた。しかしながら、未だに HLA 多型と自己免疫疾患が相関する分子機序については理解に至っていない。本研究では、免疫学の基盤的研究から得られた最新の知見をもとに、新しい HLA 受容体による HLA 認識を介した細胞制御機能に着目し、調節性 T 細胞、Th17 細胞の機能

に、HLA多型がどのように関与するかを、モデル動物、培養細胞株、患者末梢血を用いて解析し、疾患関連HLA分子が免疫応答制御に果たす役割とその分子機序を明らかにする。免疫難病の新しい病因論を樹立し、関与する分子群について、新たな診断・治療法への応用を検討する。

B.研究方法

TregはT細胞免疫応答を負に制御しているT細胞の亜集団であり、Tregが存在しないIPEX患者の病態を考えると、自己反応性のT細胞クローンの反応性を抑えている重要な因子であることは相違ない。HLA多型と調節性T細胞(Treg)との関係に着目し、自己免疫疾患と相関するHLA分子と、Tregの分化、すなわちTregの数、機能およびTCRレパトリーに相関があるかどうかを検討する。これに先立ち、我々が独自に単離した新規GタンパクであるRhoHがTregの分化、機能発現に重要であるかを検討した。

RhoH欠損マウスの作製は常法に従って、Neo耐性遺伝子を第2エクソン部位に相同組換えすることにより作製した。欠損マウス中のT細胞の解析は、蛍光標識抗体を用いたフローサイトメトリー解析によって行った。Tregの分化は、細胞内染色を行いCD4陽性かつFoxP3陽性の細胞をTregとして評価した。Tregの抑制機能は、CFSEでラベルしたCD4陽性CD25陰性細胞(レスポンドー細胞)を一定数のTreg細胞と共に培養し、レスポンドー細胞の分裂を抑制する活性として検定した。同時に、Tregと同様に胸腺内で強い刺激によってアゴニスト選択をうけるとされるCD8 $\alpha\alpha$ 型の腸管上皮間T細胞(IEL)の分化についてもフローサイトメトリー解析を行って検討した。

C.研究結果

RhoHはRhoファミリーに属する低分子Gタンパク質であるが、GTPase活性を持たず、血球系の細胞に特異的に発現していることがわかっている。この分子を欠損したマウスを作製したところ、胸腺細胞の著しい萎縮が認められた(図1)。特にCD4陽性CD8陽性の未熟胸腺細胞数が1/3-1/5程度まで減少していた。末梢の脾臓、リンパ節においても成熟CD4T細胞、CD8T細胞の数は著明に減少していたが、B細胞の数は変らなかった(図2)。この欠損マウスをOT-I、OT-IIおよびHY-TCRトランスジェニックマウスと交配し、正の選択、負の選択、系列運命決定におけるRhoHの機能を検討した。その結果、RhoHは β 選択、正の選択、負の選択のいずれにおいても減弱していることが明らかとなった。

いっぽう、末梢および胸腺におけるTregの分化は抑制されていなかった(図3)。また、Tregと同様にアゴニスト選択を受けるCD8 $\alpha\alpha$ 型IELにおいても分化の阻害は見られなかった(図4)。従って、RhoHはコンベンショナルなT細胞の分化には必須であるが、Tregの分化には必要ないことが明らかとなった。

D.考察

Tregは胸腺において分化するnatural-Tregと末梢でTGF β などによって誘導されるinduced Tregの2種類があるが、免疫寛容の維持や自己免疫疾患の発症に係わっているのは主にnatural-Tregでありその分化メカニズムを知ることが極めて重要である。natural-Tregは胸腺内において自己抗原を強く認識するが、負の選択のようにアポトーシスを起こすことなく、「アゴニスト選択」を受けて成熟する。しかしながら、

このアゴニスト選択の分子基盤はまだ全くわかっていない。

今回、我々が独自に単離した新しい分子、RhoHの欠損マウスを用い、RhoHがコンベンショナルなT細胞の分化には必須であるが、TregやCD8 α 型 IEL といったアゴニスト選択においては必要ないことが初めてあきらかとなった。RhoHは負の選択とアゴニスト選択との間で要求性の異なる初めての分子であり、natural-Tregの分化の分子メカニズムの解明に大きく貢献するものと考えられる。

E. 結論

我々は、コンベンショナルなT細胞とTregの分化においてRhoHという新規分子の要求性が異なることを今回明らかにした。この結果は、胸腺内でのTregの分化の分子メカニズムの解明に大きく貢献するものであり、HLAアレルの相違による自己免疫疾患発症の分子基盤の解明に一步近づいたものである。natural-Tregを欠損するIPEX患者が重篤な自己免疫疾患を発症することを考えると、自己免疫疾患の発症におけるTregの重要性は非常に高いと考えられる。今回の我々の結果をもとにして、今後の研究によりnatural-TregとHLAアレルとの関係、およびその分子メカニズムの解析が進み、自己免疫疾患の発症機序におけるHLA多形とTregとの関係が解明されることが大きく期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

本計画に密接に関連した業績

Hiroyo Oda, Harumi Suzuki*, Kouhei Sakai, Seiji Kitahara, Michael S. Patrick, Yoshinao Azuma, Kazuro Sugi, Toshio Kitamura, Jonathan Kaye and Mutsunori Shirai *[Corresponding auhtor] Rac1 mediated Bcl-2 induction is critical in antigen-induced CD4 single positive differentiation of a CD4+CD8+ immature thymocyte line *J. Leuko. Biol.* (2007) 81: 500-508

Fumiko Shiroki, Satoshi Matsuda, Tomomitsu Doi, Mari Fujiwara, Yoshito Mochizuki, Takashi Kadowaki, Harumi Suzuki and Shigeo Koyasu The p85 α regulatory subunit of classIA phosphoinositide 3-kinase regulates β -selection in thymocyte development *J. Immunol.* (2007) 178: 1349-1356

Chida D, Nakagawa S, Nagai S, Sagara H, Katsumata H, Imaki T, Suzuki H, Mitani F, Ogishima T, Shimizu C, Kotaki H, Kakuta S, Sudo K, Koike T, Kubo M, Iwakura Y. Melanocortin receptor 2 is required for adrenal gland development, steroidogenesis and neonatal gluconeogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2007)

Masayuki Murata, Yoshinao Azuma, Koshiro Miura, Mohd. Akhlakur Rahman, Minenosuke Matsutani, Masahiro Aoyama, Harumi Suzuki, Kazuro Sugi and Mutsunori Shirai Chlamydial SET domain protein functions as a histone methyltransferase *Microbiology* (2007) 153: 585-592

計画の基礎成果となった申請前年度の論文

Kouhei Sakai, Harumi Suzuki*, Hiroyo Oda, Takaaki Akaike, Yoshinao Azuma, Tomoyuki Murakami, Kazuro Sugi, Takehito Ito, Hiroshi Ichinose, Shigeo Koyasu and Mutsunori Shirai *[Corresponding auhtor] Phosphoinositide 3-Kinase in nitric oxides synthesis in macrophage: critical dimerization of inducible nitric oxide

synthase *J. Biol. Chem.* (2006) 281:
17736-17742

2.学会発表

Hiroyo Oda, Michael S. Patrick, Yoshinori Sato,
Kohei Sakai, Takehiko Sasazuki, Sinichi Aizawa,
Mutsunori Shirai and Harumi Suzuki
FUNCTION OF RHOH IN T CELL
DEVELOPMENT Rolduc Workshop on T cell
Biology, 2007.5 Kerkrade, Netherland

小田浩代、Michael S. Patrick、佐藤義則、酒井幸
平、北原誠司、千田大、相澤慎一、白井睦訓、
鈴木春巳 T細胞分化におけるRhoHの機能 第
17回 KTCC 2007.6 京都

Hiroyo Oda, Michael Patrick, Yoshinori Sato, Dai
Chida, Takehiko Sasazuki, Mutsunori Shirai,
Harumi Suzuki

Function of RhoH in T cell development and
activation 第37回日本免疫学会総会 2007.11
東京

H.知的財産権の出願・登録情報

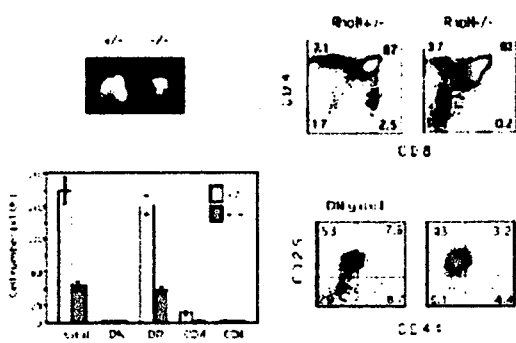
【特許の取得】

申請中

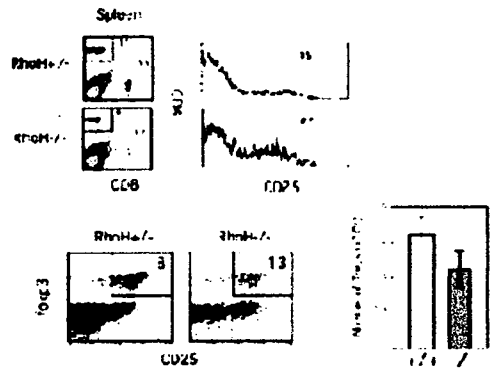
- ・ 発明者 白井睦訓、鈴木春巳他 権利者 山口
大学「新規T細胞機能遺伝子探索技術の開発
とそれを利用した新規T細胞分化遺伝子」

申請準備中

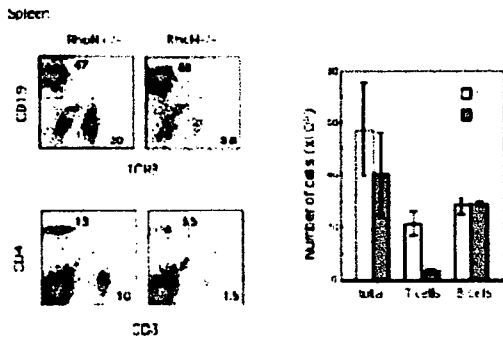
- ・ 発明者 白井睦訓、鈴木春巳他 権利者 山口
大学「サイトカインを利用した新規造血・免
疫系幹細胞の分化技術と人工血液医療への
応用」



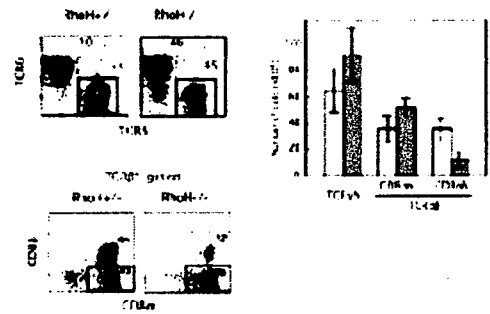
13 RhoH 敲除小鼠的 CD4 和 CD8 细胞数与 RhoH 敲入小鼠相当



14 RhoH 敲除小鼠的 CD8⁺Treg 细胞数与 RhoH 敲入小鼠相当



15 RhoH 敲除小鼠的 CD19⁺Tcd8 细胞数与 RhoH 敲入小鼠相当



16 RhoH 敲除小鼠的 CD4⁺CD8⁺细胞数与 RhoH 敲入小鼠相当

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患克服事業)

HLA 多型が寄与する自己免疫疾患の発症機序の解明 分担研究報告書

疾患関連 HLA アリルを発現するヒト化型マウスの作製

分担研究者 高木 智 国立国際医療センター研究所 地域医療保健研究部長

研究要旨

疾患関連 HLA アレルの免疫応答異常への関与について固体レベルで検討することを目的として、ヒト臍帯血幹細胞やヒト骨髄造血幹細胞を免疫不全マウスに移植することにより、ヒト免疫担当細胞群を再構築したモデルマウスを作成する。ヒト免疫疾患と強い連関を持つアリルである HLA-B*51, -DR2, -DR3 陽性群及び陰性群より好中球、マクロファージ、樹状細胞等を分離または培養により増幅し、細胞遊走能やサイトカイン産生能を比較する。各種炎症惹起刺激への応答の相違を個体レベルで検討する。

A. 研究目的

ヒト免疫疾患と強い連関が認められる HLA アリルがいくつか知られているが、疾患の病態形成および維持において疾患関連 HLA がどのように関与するのかその詳細はわかっていない。既に疾患を発症している患者および患者検体での解析からは、その分子機構や病態形成初期において標的となる細胞、固体レベルでの免疫系に及ぼす影響等についての検討は非常に困難である。そこで、疾患関連アリルを有するヒト造血幹細胞を用いてヒト免疫システムを再構築したモデルマウスを作製し、発症前および病態形成初期における疾患関連 HLA アリルの免疫応答への影響を、細胞増殖、抗体産生、サイトカ

イン産生および種々の炎症・感染モデルを用いて検討する。

B. 研究方法

ヒト臍帯血幹細胞を全てのリンパ球を欠損し免疫不全を呈する RAG2/γc 欠損マウスに移植し、ヒト免疫担当細胞による免疫系の再構築を行なう。移植の際のドナー細胞の投与方法すなわち成体骨髄腔内への移植や新生仔肝臓への移植、またドナーヒト臍帯血幹細胞への各種遺伝子導入処置による修飾や改変の効果を調べ、生着率や各種免疫担当細胞分画における再構築の効率を検討する。得られたヒト免疫系モデルマウスを用い、各種免疫担当細胞の機能、免疫系

に及ぼす疾患関連 HLA アレルのインパクトを検討する。

(倫理面への配慮)

ヒト臍帯血幹細胞は、「理化学研究所 研究用幹細胞バンク」より提供を受ける。これらの検体は、臍帯血提供者の好意にも係わらず移植適用外となってしまった場合に、その臍帯血を廃棄することなく再生医療の発展を目指した研究のために提供していただいたものである。試料提供者の個人情報については、ヒト臍帯血幹細胞検体の収集を行う「理化学研究所 研究用幹細胞バンク」にて、個人情報が削除された上で匿名化されており、個人を特定できるような試料付随情報は一切提供されない。提供を受けるにあたっては、所属機関の倫理委員会の承認を得て研究計画を遂行する。

C. 研究結果

本年度は、移植の際のレシピエントへの投与時期および投与方法により、ドナー造血幹細胞および前駆細胞の生着率にどのような違いが出るかについて検討し、ヒト免疫系モデルマウス作成の準備を進めた。まず同種移植系を用いて、新生仔の肝臓への移植、成体の骨髄腔内への移植により生着率およびリンパ球系細胞のキメラ率に及ぼす効果を検討した。成体の RAG2/ γ c 欠損免疫不全マウスに骨髄非破壊的な条件として低量の放射線 (350Gy) を照射し、CD45 アロタイプで識別可能なドナー造血前駆細胞を骨髄腔内に直接投与し、径静脈投与群とキメラ率を比較した。また、RAG2/ γ c 欠損免疫不全マウスの生後 3 日以内の新生仔を用い、放射線照射の前処置を全く行わず、肝臓実質内へ直接ドナー造血前駆細胞を移入した。移植後経時的

に抹消血を採取し、T 細胞、B 細胞、骨髄球系細胞分画のドナー細胞由来の割合を各種細胞特異的な表面マーカーおよび CD45 アロタイプの発現を指標にフローサイトメトリーにより測定した。移植後 12~16 週後以降の長期再建を果たしたレシピエントの抹消血ないし各種リンパ組織での解析結果をもって生着率および免疫担当細胞分画の再構築率を判定した。

骨髄腔内移植群では、ドナーの細胞数を 1/5 程度と少ない移植細胞数とした場合でも遜色のないキメラ率が得られ、リンパ球コンパートメントの再構築が達成された。また、生後 3 日以内の新生仔の肝臓実質内へ放射線の照射無しにドナー造血前駆細胞を移入した場合においても十分なリンパ球コンパートメントの再構築が達成され、骨髄球系細胞分画においても高いキメラ率が得られた。

D. 考察と今後の方針

同種移植系により、成体骨髄腔内への移植、新生仔の肝臓実質内への移植の効果を検討した結果、どちらも高いキメラ率を達成できた。異種移植となるヒト臍帯血幹細胞および骨髄造血幹細胞を用いた場合にどの移植法、移植時期を採用することで効率よくヒト細胞による免疫系再構築が達成できるのか検討を進める。各種免疫担当細胞分画における再構築率、またそれらの各種末梢免疫組織への分布効率を検討する。ヒト造血前駆細胞の生着率を増強し、より効率の良い免疫系再構築に役立つ分子の開発も同時に推進する。これには造血幹細胞の生着能抑制に関与することがわかっている分子の阻害体等が候補として挙げられる。

「理化学研究所 研究用幹細胞バンク」のヒト