

## 免疫疾患における TH1/TH2 細胞の役割と制御に関する研究

研究分担者 筑波大学人間総合科学研究科 高橋 智（教授）

### 研究要旨

免疫疾患の発症の一部は、TH1/TH2 細胞および TH17 細胞によって制御されている。本研究では T-bet、GATA-3、ROR $\gamma$ t を T 細胞に過剰発現したマウスに免疫疾患を誘導し、TH1/TH2 および TH17 の疾患増悪における関与を個体レベルで解析し、免疫疾患における TH1/Th2 細胞および TH17 細胞の機能について研究を行う。

### A. 研究目的

免疫疾患における TH1/TH2 細胞の役割については、90 年代よりその重要性が論じられてきた。最近では TH17 細胞の重要性についても論じられている。免疫疾患における TH1/TH2 および TH17 細胞の機能を解析し、その役割と制御について明らかにすることが本研究の目的である。

### B. 研究方法

T 細胞特異的に発現する CD2 プロモーターを有する VA vector に TH1 転写因子 T-bet、TH2 転写因子 GATA-3 を挿入し、これを用いて遺伝子改変マウスを作製した。その結果、T 細胞特異的に T-bet、GATA-3 を発現するトランスジェニックマウスの作製に成功した。作製したトランスジェニックマウスと自己免疫腎炎マウス（BXSB/MpJ-*Yaa* マウス）とを交配し、または薬物投与により自己免疫腎炎を誘導し、発症進行と T-bet、GATA-3 との関連について検討した。

### C. 研究結果

TH1 優位であることが報告されている BXSB/MpJ-*Yaa* マウスを T-bet トランスジェニックマウスと交配することにより、腎機能低下、平均寿命が短縮し、自己免疫腎炎の増悪が認められた。細胞内サイトカインでは、IFN- $\gamma$  の上昇、IL-5 の低下が認められた（*Journal of Nephrology*, in press）。一方 BXSB/MpJ-*Yaa* マウスを GATA-3 トランスジェニックマウスと掛け合わせたと、尿蛋白減少、腎機能改善、平均寿命が延長し、自己免疫腎炎の増悪緩和が認められた。また、細胞内サイトカインの解析および血中免疫グロブリンの解析から、IFN- $\gamma$  の低下、IL-5 の上昇、IgG1 の増加、IgG3 の低下など、TH1 優位な状態から TH2 背景ヘシフトしていることを確認することができた。

### D. 考察

TH1/TH2 疾患における病態改善の試みとして、これまではサイトカイン投与や抗体投与が行われてきた。本研究では、転写因子制御より病態制御を試み、TH1 優位自己免疫疾患における TH2 誘導により、疾患改善の有効性を確認した。本研究は、免疫疾患における TH1/TH2 の役割を明らかにするとともに、転写制御による疾患治療の可能性をさらに広げることが期待できる。

### E. 結論

われわれは、転写因子 T-bet と GATA-3 過剰発現トランスジェニックマウスを用いて、自己免疫疾患における転写制御と病態制御について検討を行い、本手法の有用性を確認した。現在 TH17 転写因子である ROR $\gamma$ t 過剰発現トランスジェニックマウスを既に作製完了しており、今後は免疫疾患における TH17 細胞の役割も総合的に検討し、TH1/TH2/TH17 細胞の機能解析を引き続き行う予定である。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

Li, YJ, Takizawa H, Azuma A, Kohyama T, Yamauchi Y, Takahashi S, Masayuki Y, Kawada T, Kudoh S, Sugawara I. Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to airway inflammatory responses induced by low-dose diesel exhaust particulate in mice. *Clin Immunol.* 128, 366-373, 2008.

Yano M, Kuroda N, Han H, Horike M, Nishikawa Y, Kiyonari H, Maemura K, Yanagawa Y, Obata K, Takahashi S, Ikawa T, Satoh R, Kawamoto H, Mouri Y, Matsumoto M. Aire controls differentiation program of thymic epithelial cells in the medulla for the establishment of self-tolerance. *J Exp Med.* 205, 2827-2838, 2008.

## 2. 学会発表

Yoh K, Shibuya K, Morito N, Ojima M, Matsunaga E, Ohsumi T, Fujita T, Kai H, Shibuya A, Takahashi S,  
Functional analysis of ROR $\gamma$ t-overexpressing transgenic mice. 第38回日本免疫学会総会学術集会 2008.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

特記事項なし

関節炎原生ペプチド同定と、自己免疫性関節炎における炎症性サイトカイン、自己抗体、  
Th17の病因的統合に関する研究

研究分担者 松本 功 (筑波大学人間総合科学研究科臨床免疫 准教授)

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、それらを改変したモデル、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

ユビキタな解糖系酵素 glucose-6-phosphate isomerase (GPI) に対する自己免疫応答は関節炎に直接関与することがK/BxN関節炎モデルで示され、ヒトでも特異なHLAを保持する重度の関節リウマチ(RA)患者に多く抗GPI抗体やGPI反応性Th1細胞が認められる。我々はもう1つのGPI依存性モデルであるGPI誘導性関節炎モデルを用いて解析を行い、昨年度までに抗TNF $\alpha$ 抗体やCTLA-4 IgなどのRAで有効性が証明されている生物学的製剤による関節炎治療効果について明らかにし、IL-6はTh17を選択的に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を明らかにしてきた。RA医療においてもTNF $\alpha$ 、IL-6などの炎症性サイトカイン、自己抗体は重要であることは明らかであるが、Th17に関しては不明瞭な部分が多い。これらのエレメントの病因的な統合を目指すために、よりsimpleな関節炎モデル作成のためGPIペプチド誘導性関節炎の確立および病態解析を行った。

B. 研究方法

- 1) human GPI アミノ酸配列からI-Aq (DBA/1マウス)のbinding motifに結合するペプチドを合成し、human GPI-primed CD4<sup>+</sup> T細胞の反応性をIL-17、IFN $\gamma$ のcytokine ELISAで検討した。
- 2) 同定した2種のT細胞エピトープをDBA/1マウスに免疫し、関節炎スコアおよび抗GPI抗体価を検討した。
- 3) human GPI<sub>325-339</sub>を免疫した関節炎マウスに対する抗IL-17抗体の治療効果を判定した。
- 4) human GPI<sub>325-339</sub>を免疫したときの関節局所へのIgGの沈着を免疫組織学的に検討した。  
(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) human GPI<sub>325-339</sub>を抗原としたときにhuman GPI-primed CD4<sup>+</sup> T細胞より著しいIL-17、IFN $\gamma$ の産生を認めた。GPI<sub>544-558</sub>でも弱いIL-17、IFN $\gamma$ の産生を認めた。
- 2) human GPI<sub>325-339</sub>を免疫することにより組織学的にも明らかな関節炎が誘導されたが、GPI<sub>544-558</sub>では関節炎は起きなかった。GPI<sub>325-339</sub>免疫ではhuman GPIに対する抗体価は認めなかったが、mouse GPIに対する抗体価を認めた。両ペプチドを用いた免疫ではhuman、mouseともに抗体価が上昇した。
- 3) human GPI<sub>325-339</sub>免疫マウスでは抗IL-17抗体により関節炎は有意に抑制されたが、通常のGPI誘導性関節炎に対しての効果より劣っていた。
- 4) human GPI<sub>325-339</sub>免疫マウスではGPI誘導性関節炎と同様に関節局所にIgGの沈着を認めた。

D. 考察 E. 結論

GPI誘導性関節炎においてhuman GPI<sub>325-339</sub>がT細胞エピトープと考えられ、このペプチドだけの免疫で関節炎が惹起されることが判明した。関節炎発症には抗mouse GPI抗体の存在が必要であり、交差反応性を考える上でも興味深い。今後は派生モデルであるペプチド誘導性関節炎、SCID移入関節炎とGPI誘導性関節炎との比較解析や、実際のRA患者との差異を確認しながら検討していく。更にGPI誘導性関節炎モデルを用いて、新規TNF $\alpha$ 誘導遺伝子、TIARP(tumor necrosis factor- $\alpha$  induced adipose related protein)を同定・解析しており、今後はその分子との病因論的統合を図っていく予定である。

F. 研究発表

論文発表

1. Iwanami K, Matsumoto I, Tanaka Y, Inoue A, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. Arthritogenic T cell epitope

- in glucose-6-phosphate isomerase (GPI)-induced arthritis. *Arthritis Res Ther.* 10:R130, 2008
2. Tanaka-Watanabe Y, Matsumoto I, Iwanami K, Inoue A, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. B cell play crucial role as antigen presenting cells and collaborating with inflammatory cytokines in glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis. *Clin Exp Immunol.* (in press)
  3. Ito I, Kawasaki A, Ito S, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Geoffrey Hom, Robert R. Graham, Takasaki Y, Hashimoto H, Ohashi J, Timothy W. Behrens, Sumida T, Tsuchiya N. Replication of the Association between C8orf13-BLK Region and Systemic Lupus Erythematosus in a Japanese Population. *Arthritis Rheum.* (in press)
  4. Kawaguchi Y, Nakamura Y, Matsumoto I, Nishimagi E, Kamatani N, Satoh T, Kuwana M, Sumida T, Hara M. Muscarinic-3 acetylcholine receptor autoantibody in patients with systemic sclerosis: contribution to severe gastrointestinal tract dysmotility. *Ann Rheum Dis.* (in press)
  5. Furuya T, Matsumoto I, Tsuchiya N, Hakoda M, Ichikawa N, Higami K, Nanke Y, Sumida T, Kamatani N, Kotake S.: Anti-glucose-6-phosphate isomerase, anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and HLA-DRB1 genotypes in Japanese patients with early rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 26:918-921,2008
  6. Kawasaki A, Ito I, Hikami K, Ohashi J, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Tsutsumi A, Koga M, Arinami T, Robert R. Graham, Geoffrey Hom, Takasaki Y, Hashimoto H, Timothy W Behrens, Sumida T, Tsuchiya N. Role of STAT4 polymorphisms in systemic lupus erythematosus in a Japanese population: a case-control association study of STAT1-STAT4 region. *Arthritis Res Ther.* 10:R113, 2008
  7. Ishii W, Ito S, Kondo Y, Tsuboi H, Mamura M, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Sumida T, Okoshi Y, Hasegawa Y, Kojima H, Sakashita S, Aita K, Noguchi M. Intravascular large B-cell lymphoma with acute abdomen as a presenting symptom in a patient with systemic lupus erythematosus. *J Clin Oncol.* 26:1553-1555,2008
  8. Iwanami K, Matsumoto I, Watanabe Y, Mihara M, Ohsugi Y, Mamura M, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Kishimoto T, Sumida T.:Crucial role of IL-6/IL-17 cytokine axis in the induction of arthritis by glucose-6-phosphate-isomerase. *Arthritis Rheum.* 58:754-763,2008
  9. Matsumoto I, Zhang H, Yasukochi T, Iwanami K, Tanaka Y, Inoue A, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. Therapeutic effects of antibodies to TNF alpha and IL-6 and CTLA-4 Ig in mice with glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis. *Arthritis Res Ther.* 10:R66, 2008
  10. Matsui H, Tsutsumi A, Sugihara M, Suzuki T, Iwanami K, Kohno M, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Sumida T. Visfatin(pre-B cell colony-enhancing factor) gene expression in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 67:571-572,2008
  11. Wang Y, Ito S, Chino Y, Iwanami K, Yasukochi T, Goto D, Matsumoto I, Hayashi T, Uchida K, Sumida T. Use of Laser Microdissection in the Analysis of Renal-infiltrating T cells in MRL/lpr Mice. *Mod Rheumatol.* 18:385-393,2008
  12. Yoshiga Y, Goto D, Segawa S, Ohnishi Y, Matsumoto I, Ito S, Tsutsumi A, Taniguchi M, Sumida T. Invariant NKT cells produce IL-17 through IL-23-dependent and -independent pathways with potential modulation of Th17 response in collagen-induced arthritis. *Int J Mol Med.*22:369-374, 2008
  13. Nakamura Y, Wakamatsu E, Matsumoto I, Tomiita M, Kohno Y, Mori M, Yokota S, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. High prevalence of autoantibodies to muscarinic-3 acetylcholine receptor in patients with juvenile-onset Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 67:136-137,2008

#### 著書

1. 松本功 解糖系酵素と自己免疫疾患 Annual review 免疫 2008 奥村康、平野俊夫、佐藤昇志 編集 中外医学社 259-264, 2008

#### 特許

特願 2008-022714 号 “関節炎誘発ペプチド”

## 免疫疾患におけるケモカイン・ケモカインレセプターの役割と制御戦略：SLEモデルにおけるTreg動態の解析

研究分担者 石川 昌 東京大学医学部分子予防医学教室 准教授  
研究協力者 阿部 淳 東京大学医学部分子予防医学 大学院博士課程

### 研究要旨

代表的なSLE動物モデルであるBWF1マウスにおいて、加齢に伴いCD25陽性CD4T細胞が増加していること、これらの細胞の大部分はFoxp3陽性で若齢マウスと同様に試験管内抑制機能を保持するTregであることが明らかとなった。加齢BWF1マウスにおけるTregにおいては、CD69やOX40などの活性化マーカー発現が上昇し、CCR7発現低下とCXCR4発現上昇などのケモカイン受容体の変化が認められた。リンパ組織や標的臓器においてもケモカイン発現の変化が認められ、TregはT細胞領域のみならずB細胞濾胞などの非T細胞領域や標的臓器細胞浸潤部位にも局在することが明らかとなった。これらの結果から、SLE発症の過程で定常な制御機能を有するTregが増加するが、ケモカイン動態の変化に伴い、機能を保持したまま遊走局在異常を起こすことが示唆された。

### A. 研究目的

我々はこれまでに代表的なSLE自然発症モデルである(NZB×NZW)F1マウスにおいて、B細胞ケモカインBLC/CXCL13の異所性高発現によるB1細胞の遊走局在異常と自己反応性CD4T細胞の活性化がSLE病態形成に重要な役割を果たすことを示唆する成績を報告してきた。一方、(NZB×NZW)F1マウスにおけるTregの動態についてはまだ報告がない。そこで本年度研究においては(NZB×NZW)F1マウスにおけるTregの動態および性状、自己反応性CD4T細胞活性化、IgG自己抗体産生に及ぼす影響を検討し、免疫寛容破綻機序を明らかにし、さらにケモカインを分子標的とした制御モデルの確立を目的とする。

### B. 研究方法

BWF1マウスにおけるTreg動態を明らかにするために、SLE発症の過程におけるFoxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD4T細胞の動態やケモカイン受容体を含む細胞表面マーカー発現をFCMにより解析し、その機能を試験管内T細胞増殖抑制試験により検討した。さらにリンパ組織や腎臓、肺などの標的臓器の凍結切片の免疫蛍光染色によりTregの局在や発症に伴う変化を調べた。

(倫理面への配慮)

本研究は東京大学動物実験指針に基づいて行われた。

### C. 研究結果

若齢BWF1マウスに比べて加齢BWF1マウスにおいては、CD25陽性CD4T細胞が著明に増加しており、その95%以上がFoxp3陽性であった。さらに若齢および加齢どちらのマウスの脾臓CD25陽性CD4T細胞も細胞増殖抑制試験において制御活性を示した。またリンパ組織の免疫蛍光染色において、若齢マウスではTregのほとん

どがT細胞領域に限局して存在するのに対して、加齢BWF1マウスにおいては赤脾髄やB細胞濾胞にも多数存在することが明らかになった。さらに、標的臓器においても多数のFoxp3陽性CD4T細胞の存在が認められた。FCMによる細胞表面マーカーの解析ではCD69、ICOS、OX40などの発現が上昇しており、ケモカイン受容体に関してはCCR7の発現低下とCXCR4の発現増強が認められた。

### D. 考察

加齢BWF1マウスにおけるSLE発症に伴い、Tregは著明に増加しており、その制御活性も保たれていたことから、何らかの原因によるTregによる末梢免疫寛容の破綻が考えられた。一方、加齢BWF1マウスでは、TregがB細胞濾胞など非T細胞領域にも多数存在するなどその局在異常が明らかとなり、CCR7発現低下とCXCR4発現上昇によるものと考えられた。リンパ組織や標的臓器におけるケモカイン発現もこれを支持した。これらの結果から、発症に伴うTregの局在異常により制御機能が発揮できない可能性や、このSLEモデルにおいて病態形成に重要な役割を果たすIgG自己抗体産生に対してTregが制御作用を持たない可能性などが考えられた。

### E. 結論

BWF1マウスでは発症に伴い抑制機能が保たれたTregが増加するにも拘わらずSLEが発症することが明らかとなった。一方で、加齢BWF1マウスではTregのケモカイン受容体の変化による局在異常が明らかとなった。今後、Tregの局在異常の病理学的意義やIgG自己抗体産生に対する制御機能の検討が必要であると考えられ

た。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Abe J., Ueha S., Suzuki J., Tokano Y., Matsushima K., and Ishikawa S. Increased Foxp3+CD4+ regulatory T cells with intact suppressing activity but altered cellular localization in murine lupus. **Am. J. Pathol.** 173:1682-1692, **2008**.

### 2. 学会発表

- 1) Abe J., Ishikawa S., Ueha S., Suzuki J., Matsushima K. Accumulation of Foxp3+CD4+ T cells and possible role of B1-activated CD4+ T cells in the pathogenesis of murine lupus. 日本免疫学会総会・学術集会記録 37:141, **2008**.
- 2) 阿部淳、石川昌、上羽悟史、鈴木淳、松島綱治 SLEモデルにおけるFoxp3陽性制御性T細胞の増加 第73回日本インターフェロン・サイトカイン学術集会 **2008**

## G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

### 1. 特許取得

なし。

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし。

## 新規 IL-10 産生制御性 T 細胞の分化機構に関する研究

研究分担者 藤尾 圭志 東京大学医学部アレルギーリウマチ内科 助教  
研究協力者 岡村 僚久 東京大学医学部アレルギーリウマチ内科 特任助教

### 研究要旨

これまで自己免疫応答を抑制する制御性 T 細胞として、CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性 T 細胞以外の制御性 T 細胞の存在が推測されてきた。分担研究者らは IL-10 を高産生する CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞を同定し、この細胞集団がマウスの腸炎を抑制する活性を持つ、新たな制御性 T 細胞集団であることを発見した。この CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞は、アナジーと関連する転写因子 Egr2 を高発現しており、Egr2 は CD4 陽性 T 細胞に LAG3 発現と IL-10 産生の形質を付与することが明らかとなった。そして Egr-2 の CD4 陽性 T 細胞の移入により、生体内での抗原特異的免疫応答を抑制能を付与できることが分かった。B 細胞欠損マウスおよび無菌 Germ free マウスの解析により CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の分化が B 細胞及び腸内細菌叢に依存していることを示唆する結果が得られた。今後 CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の分化機構および CD4 陽性 T 細胞での Egr2 の発現機構を解明することで、新たな自己免疫疾患治療法の開発につながる可能性があると考えられる。

### A. 研究目的

自己免疫応答を抑制する制御性 T 細胞として CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞が知られている。しかし機能的 Foxp3 欠損マウスで炎症を生じない臓器も複数みられ、CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞以外の免疫寛容メカニズムの存在が推測されている。従来 IL-10 を産生する制御性 T 細胞として試験管内で誘導される Tr1 が報告されているが、マーカーなど生物学的特性が明らかでないことから、生体内で恒常的に存在するかどうかは分かっていなかった。分担研究者らは最近生体内で恒常的に存在する CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞を同定した。この制御性 T 細胞はアナジー関連転写因子 Egr-2 を高発現している。本研究では CD4 陽性 T 細胞における Egr-2 発現機構を解析することにより、この CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞の分化様式を検討することを目的とする。

### B. 研究方法

抑制性分子 LAG-3 に着目し C57BL6 マウス脾臓において FACS 解析を行った。LAG-3 をマーカーとしてマウス脾臓よりソーティングにより細胞集団を分取し、マイクロアレイ解析・培養実験・生体への移入実験を行った。マイクロアレイ解析において発現が亢進していたアナジー関連遺伝子 Egr2 に着目し、レトロウイルスベクターによるマウス CD4 陽性 T 細胞への Egr2 遺伝子導入により誘導される遺伝子を定量 PCR により検討した。さらに Egr2 遺伝子導入細胞による遅延型過敏反応の抑制実験を行った。また B 細胞を欠損する  $\mu$ MT ノックアウトマウス、無菌状態の Germ free マウスにおいても解析を行った。

（倫理面への配慮）

○すべての研究は各施設の遺伝子倫理委員会の審査を受け、承認を受けた研究計画に則って実施された。

### C. 研究結果

LAG-3 をマーカーとして発現する細胞集団を、マウス脾臓の FACS 解析で検討したところ、CD4 陽性 CD25 陰性 CD45RB 陰性 LAG3 陽性 T 細胞（以下 CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞と記載）を同定した。CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞は IL-10 を高産生し、RAG1 ノックアウトマウスへの CD45RB 高発現 CD4 陽性 T 細胞の移入による腸炎の発症を IL-10 依存的に抑制した。マイクロアレイ解析においても、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞は Egr2, IL-10, LAG3, Blimp-1 を高発現し、CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞とは明らかに異なる遺伝子発現プロファイルであった。アナジー関連遺伝子 Egr2 に着目し解析したところ、Egr2 遺伝子導入 CD4 陽性 T 細胞で IL-10, LAG-3, Blimp-1 の発現の亢進を認めた。さらに Egr2 遺伝子導入 CD4 陽性 T 細胞は OVA によるマウス遅延型過敏反応を抑制した。機能的 Foxp3 遺伝子欠損 Scurfy マウスにおいては、試験管内での抑制活性のある CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞が増加していた。CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の分化機構を解明するために様々なマウスにおける CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞を検討した。まず B 細胞を欠損する  $\mu$ MT ノックアウトマウスを解析したところ、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞は脾臓においてもパイエル板においても著明に減少していた。また Germfree C57BL6 マウスにおいても SPFC57BL6 マウスと比較して CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞が脾臓においてもパイエル板においても著明に減少していた。

#### D. 考察

以上の結果から IL-10 を高産生する Egr2 発現 CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞は、Tr1 類似の新規制御性 T 細胞サブセットと考えられた。CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞は機能的 Foxp3 欠損マウスでも分化が認められ、その分化メカニズムは CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞とは異なると考えられた。そして CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の分化には B 細胞及び腸内細菌叢が重要と考えられた。最近 Egr2 遺伝子近傍に回腸型クローン病の感受性 SNP が存在することが報告されており (Nature Genetics 39: 596, 2007)、腸管免疫における CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の機能と炎症性腸疾患発症が関連している可能性が推測される。今後この新規制御性 T 細胞の分化機構および CD4 陽性 T 細胞での Egr2 の発現機構を解明することで、新たな自己免疫疾患治療法の開発につながる可能性があると考えられる。

#### E. 結論

新規制御性 T 細胞サブセット CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞は生体内の炎症のコントロールに大きな役割を果たしていることが推測される。今後この新規制御性 T 細胞の分化機構を解明することで、新たな自己免疫疾患治療法の開発につながる可能性があると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

Yamamoto Kazuhiko, Okamura Tomohisa, Shibuya Mihoko, Sumitomo Shuji, Shoda Hirofumi, Sakaguchi Shimon, Fujio Keishi.

IL-10 producing CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells naturally present in the immune system

第 38 回日本免疫学会総会・学術総会 シンポジウム (2008. 12. 1)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

NKT細胞を介した自己免疫性脳炎抑制の機序に関する研究

研究分担者 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 三宅幸子 国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部（室長）  
横手裕明（同研究生）、宮崎雄生（同 流動研究員）

研究要旨

近年、免疫アレルギー疾患の患者数の増加傾向が著しいが、その背景に生活環境の変化とそれに伴う免疫制御系の変調が推測されている。我々は抗生物質投与によって腸内細菌叢を偏倚させることにより、自己免疫疾患の動物モデルEAEの臨床および病理像が軽症化することを見いだした。今年度は、抗生物質投与によるEAE修飾には、CD1d拘束性NKT細胞の関与が必須であることを明らかにした。NKT細胞を欠損する遺伝子改変マウスでは抗生物質投与の効果が見られず、一方、MAIT細胞を欠損するマウスでは抗生物質の効果が見られたことから、NKT細胞の重要性が明確である。あわせて、腸管免疫におけるTh17細胞の生存・維持におけるNKT細胞の役割も証明することができた。食生活などの後天的要因が疾病発症におよぼす影響を解明し、新たな治療・予防法を開発する上で、我々の研究結果は有用な情報を与えるものと考えられる。

A. 研究目的

近年、免疫アレルギー疾患の患者数の増加傾向が著しいが、我々は腸内細菌叢と免疫系の関係に着目し、生活習慣の欧米化による腸内細菌の変化が関与する可能性を考えて研究を進めている（「自己免疫疾患の生活習慣病仮説」。昨年度までに、抗生物質投与によって腸内細菌を偏倚させると、多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳炎（EAE）の臨床および病理像が軽減することを明らかにした。抗生物質投与によるEAEの抑制には、腸内細菌叢の影響を強く受ける免疫制御細胞の活性化が関与する可能性が考えられる。本年は、抗生物質投与の影響が、腸管粘膜に存在する免疫制御細胞であるNKT細胞あるいはmucosal associated invariant T (MAIT)細胞を介する可能性を検討した。

B. 研究方法

EAEはMOG 35-55ペプチドを用いて、B6背景の野生型マウス、MR1ノックアウト（KO）マウス、 $\beta 2$ -microglobulin KO、CD1d KOおよびJ $\alpha$ 281 KOに誘導した。抗生物質（kanamycin, colistin, vankomycin；KCVと略）は、EAE誘導の1週間前より飲用水に添加した。所属リンパ節、腸間膜リンパ節、および腸管粘膜固有相よりリンパ球を分離し、フローサイトメーターおよびRT-PCRを用いてTh17細胞関連遺伝子の発現を解析した。

（倫理面への配慮）

動物実験は国立精神・神経センターの動物実験指針に基づき、同倫理審査委員会の承認を受けた上で行った。

C. 研究結果

KCV連続投与によって野生型マウスにおけるEAEの臨床症状は有意に抑制されたが、クラスI拘束性T細胞を欠損する $\beta 2$ -microglobulin KOにおいては、抑制効果が得られなかった。つぎにMAIT細胞を欠損するMR1 KOマウスとNKT細胞を欠損するCD1d KOおよびJ $\alpha$ 281 KOで同様の実験を行った。その結果、MAIT細胞欠損マウスでは抗生物質投与の影響が見られるのに対し、NKT細胞欠損マウスでは見られないことがわかった。それに平行して、腸間膜リンパ球を採取して、そのIL-17産生能を評価した。抗CD3抗体/抗CD28抗体刺激後の培養上清のサイトカインレベルを評価したところ、EAE実験の結果と同様にNKT細胞欠損マウスにおいて抗生物質投与の影響が著明に減弱していることがわかった。以上の結果から、NKT細胞が腸内環境の変化をモニターする制御細胞として重要な役割を果たすことが推測された。

D. 考察

NKT細胞はIL-4やIFN- $\gamma$ などの制御性サイトカインを大量に産生し、自己免疫疾患の制御細胞として重要な役割を果たす。特定のNKT細胞リガンドの経口投与によってEAEが抑制されることを考えると、

抗生物質投与によって腸内細菌が疾患抑制的な糖脂質リガンドを新たに産生するようになる可能性、あるいは疾患促進的な糖脂質リガンドを産生する腸内細菌が減弱する可能性などが考えられる。腸管 Th17 細胞の発生において腸内細菌叢が決定的な役割を果たすことが、複数の研究グループから報告されているが、NKT 細胞の関与を明らかにしたのは、我々の報告が初めてであり (Yokote et al. *Am J Pathol* in press)、今後のさらなる研究の展開が期待できる。

## E. 結論

抗生物質投与による腸内細菌偏倚が、NKT 細胞を介して自己免疫病態の修飾につながる可能性が考えられる。自己免疫・アレルギー疾患の増加傾向を考える際に、重要な示唆を与える結果であり、治療薬開発の観点からも重要な意義がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Doi, Y., S. Oki, T. Ozawa, H. Hohjoh, S. Miyake, and T. Yamamura: Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 8381-8386, 2008

Satoh, J-i., T. Misawa, H. Tabunoki, and T. Yamamura: Molecular network analysis of T-cell transcriptome suggests aberrant regulation of gene expression by NF- $\kappa$ B as a biomarker for relapse of multiple sclerosis. *Dis Markers* 25: 27-35, 2008

Shimamura, M., Y-Y. Huang, R. Migishima, M. Yokoyama, T. Saitoh, and T. Yamamura: Localization of NK1.1<sup>+</sup> invariant V $\alpha$ 19 TCR<sup>+</sup> cells in the liver with potential to promptly respond to TCR stimulation. *Immunol. Lett.* 121: 38-44, 2008

Yokote, H., S. Miyake, J.L. Croxford, S. Oki, H. Mizusawa, and T. Yamamura: NKT cell-dependent amelioration of a mouse model of multiple sclerosis by altering gut flora. *Am. J. Pathol.* 173: 1714-1723, 2008

Aranami, T. and T. Yamamura: Th17 cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergol. Int.* 57: 115-120, 2008

Okamoto, T., M. Ogawa, Y. Lin, M. Murata, S. Miyake, and T. Yamamura: Treatment of Neuromyelitis Optica: Current Debate. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*. 1: 43-52, 2008

Araki, M., S. Miyake, and T. Yamamura: Synthetic glycolipid ligands for human iNKT cells as potential

therapeutic agents for immunotherapy. *Curr. Medicinal Chem.* 15: 2337-2345, 2008

## 2. 学会発表

Yokote H, Miyake S, Croxford J, Mizusawa H, Yamamura T: Alteration of gut flora ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in association with contraction of inflammatory Th17 cells. FOCiS 2008, Boston, June 6, 2008

Aranami T, Sato W, Yamamura T: Abnormally differentiated CD28 null TIM-3- Th1 cells specifically respond to alpha B-crystalline. FOCiS 2008, Boston, June 7, 2008

Satoh J-i, Misawa T, Obayashi S, Tabunoki H, Yamamura T, Arima K, and Konno H: Gene expression profile of neuromyelitis optica brain lesions. 9th International Congress of Neuroimmunology, 10.26, 2008

Aranami T, Sato W, and Yamamura T: Abnormally differentiated CD28 null TH1 cells specifically respond to aB-crystalline in multiple sclerosis. 9th International Congress of Neuroimmunology, 10.26, 2008

Klemann C, Oki S, Klemann AK, Ozawa T, Doi Y, Shudo K, and Yamamura T: Synthetic retinoid AM80 ameliorates EAE by attenuating TH17-mediated inflammation. 9th International Congress of Neuroimmunology, 10.29, 2008

Lin Y, Miyake S, and Yamamura T: The dominance of encephalitogenic peptide correlates to its ability to induce potent regulatory T cells. 9th International Congress of Neuroimmunology, 10.29, 2008

山村 隆: 特別講演 V. 免疫制御システムと神経免疫疾患. 第 20 回日本神経免疫学会, 新潟, 4.17, 2008

山村 隆: 免疫疾患としての多発性硬化症. シンポジウム SY-41「多発性硬化症の病態と治療: 臨床と基礎の最前線」第 49 回日本神経学会総会, 横浜, 5.16, 2008

山村 隆：多発性硬化症の分子病態と治療標的. シンポジウム「疾患の病態と分子医学」日本臨床分子医学会, 神戸, 7.24, 2008

山村 隆：多発性硬化症の病態解析から治療標的の同定へ. シンポジウム 3「疾患の制御 -臨床から免疫へ-」, 日本臨床免疫学会, 東京, 10.18, 2008

Yamamura, T: Orphan nuclear receptor NR4A2 and inflammatory cascade of MS/EAE. Plenary Session. Effector Mechanisms, IXth International Congress of Neuroimmunology, Fort Worth, Texas, USA, October 29, 2008

G. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

## SLEにおける自己抗体産生機構とB細胞を分子標的とした治療戦略に関する研究

研究分担者 田中良哉 産業医科大学医学部第一内科学講座 教授

**研究要旨** 全身性エリテマトーデス(SLE)は代表的な膠原病で、発症過程には、自己反応性T細胞やB細胞の活性化とB細胞から過剰に産生された自己抗体による免疫複合体の形成とその組織沈着により多臓器障害が生ずる。SLEは特定疾患に指定され、治療が困難な免疫難病であるにも拘らず、保険収載されている治療はステロイド薬のみである。我々は、CD20等のB細胞特異的表面抗原は治療標的とした治療応用の研究を重ね、治療抵抗性の重症SLE 20症例を対象にB細胞抗原CD20に対する抗体リツキシマブを用いたパイロットスタディを実践した。平成20年度は、SLEに対するB細胞標的治療の長期有効性と安全性を検討すると共に、SLEにおける自己抗体産生機構とその作用機序を解明することを目的とした。その結果、リツキシマブ療法の安全性と長期に亘る有効性が確認された。リツキシマブの作用機序としては、IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>メモリーB細胞の再出現を制御してCD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>ナイーブB細胞の再構築を生じ、長期寛解導入と免疫複合体が関与する腎障害などが改善したと考えられた(液性免疫の制御)。また、リツキシマブによりSLE患者末梢血のCD40やCD80等の共刺激分子を高発現するメモリーB細胞が優先的に減少することを認め、中枢神経症状の速やかな改善については、共刺激分子を発現するメモリーB細胞の優先的除去により、リンパ球の活性化の制御を介して血管障害などを改善した(細胞性免疫の制御)可能性も考えられた。しかし、米国のSLEを対象としたリツキシマブ第II/III相試験(EXPLORER試験)は失敗し、ループス腎炎に対して別の試験が進行中である。今後、CD20に加えてCD22やTACI等のB細胞特異的表面抗原、および、B細胞受容体やサイトカイン等のシグナルを伝達する細胞内蛋白質の重要な治療標的に対する疾患制御を目指した細胞やモデルマウスレベルでの研究を遂行し、臨床応用の基礎成績を確立する。

### A. 研究目的

全身性エリテマトーデス(SLE)は代表的な膠原病で、20~30歳代の女性に好発し、本邦でも約10万人の患者数が推定される。発症過程には、自己反応性T細胞やB細胞の活性化とB細胞から過剰に産生された自己抗体による免疫複合体の形成とその組織沈着により多臓器障害が生ずる。SLEは特定疾患に指定され、治療が困難な免疫難病であるにも拘らず、保険収載されている治療はステロイド薬のみである。その発症と維持に於いて、B細胞は抗原提示を担うstimulator、T細胞依存性に自己抗体を産生するresponderとして重要な役割を担うことから、B細胞とB細胞表面抗原は治療標的として重要である。したがって、CD20等のB細胞特異的表面抗原は治療標的として重要である。CD20抗体療法は、B細胞リンパ腫を対象に保険収載される。これまで、治療抵抗性の重症SLE 20症例を対象にB細胞抗原CD20に対する抗体リツキシマブを用いたパイロットスタディを実践してきた。平成20年度は、SLEに対するB細胞標的治療の長期有効性と安全性を検討すると共に、SLEにおける自己抗体産生機構とその作用機序を解明することを目的とした。

### B. 研究方法

①ステロイドや免疫抑制剤などの既存の治療に抵抗性を示した重症SLE 20症例(BILAG カテゴリーAを1項目以上満たす)に対し、本学倫理委員会承認後に、インフォームドコンセント取得の上、原則としてCD20抗体リツキシマブ375mg/m<sup>2</sup>/週を2回投与し、臨床症候、検査成績、画像所見などを検討した。

②治療前、及び治療の経過に伴い、患者より末梢血リンパ球を抽出し、リンパ球の表面抗原をフローサイトメトリーで検出した。

③DNAマイクロアレイを用い、末梢血mRNA発現量の推移を投与前、投与後2週間目で比較検討した(阪大西本憲弘教授との共同研究)。

#### (倫理面への配慮)

臨床検体を使用する場合には、所属機関の倫理委員会、或は、IRBで承認を得た研究に限定し、患者からインフォームドコンセントを得た上で、倫理委員会の規約を遵守し、所属機関の現有設備を用いて行う。患者の個人情報が入力されたデータが漏洩せぬよう、試料や解析データは万全の安全システムをもって厳重に管理し、人

権擁護に努めると共に、患者は、経済的負担を始め如何なる不利益や危険性も被らない事を明確にする。

### C. 研究結果

①疾患活動性スコア SLEDAI は 28 日後に有意に改善し、20 例中 13 例で 6 ヶ月以内に寛解導入 (SLEDAI=0) を可能とし、寛解は 6 例で 2 年以上維持した。

②中枢神経 SLE を伴う 13 例は全例回復し、意識障害、神経症、癲癇は一部の症例では 1 週間以内に回復した。ループス腎炎を伴う 11 例では、1 年後に 7 例で尿蛋白 10mg/dl 以下まで改善した。

③ 3 例で帯状疱疹ヘルペス、肺炎、褥瘡感染症を認めた。1 例はリツキシマブ投与 7 ヶ月後にくも膜下出血で、1 例は再投与後 6 ヶ月後に皮質下出血で死亡したが、因果関係は認めなかった。5 例が 7~23 ヶ月後に再燃した。2 例はリツキシマブ再投与、2 例は IV-CY で改善した。

④末梢血 CD20 陽性 B 細胞数は全例で 14 日以内に消失し、3~9 ヶ月間維持された。

⑤ B 細胞表面抗原の解析では、CD19 陽性細胞上の CD40 と CD80 は投与後速やかに発現分子数が減少し、半年後も減弱が維持された。

⑥ CD4 陽性細胞上の CD40L と ICOS の発現も低下した。

⑦ CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>ナイーブ B 細胞は速やかに消失したが、IgD<sup>+</sup>CD27<sup>high</sup>形質細胞は 4 週間残存した。

⑧長期寛解維持症例では、CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>ナイーブ B 細胞は回復したが、IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>メモリー B 細胞の再出現は抑制された。逆に、再燃症例では、ナイーブ B 細胞とメモリー B 細胞の再上昇が見られた。

⑨ DNA マイクロアレイによりリツキシマブ投与による末梢血 mRNA 発現の短期的変動解析では、p38MAPK などのシグナル関連分子の低下を認め、リンパ球の活性化制御が示唆された。

### D. 考察

リツキシマブ療法の安全性と有効性が確認された。リツキシマブの作用機序としては、IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>メモリー B 細胞の再出現を制御して CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>ナイーブ B 細胞の再構築を生じ、長期寛解導入と免疫複合体が関与する腎障害などが改善したと考えられる (液性免疫の制御)。実際、リツキシマブにより dsDNA 抗体価は減少するが、その他の自己抗体や抗細菌抗体は変化せず、IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>メモリー B 細胞や dsDNA 抗体価の増加に引き続いて寛解後に再燃する傾向があった。一方、リツキシマブにより SLE 患者末梢血の CD40 や CD80 等の共

刺激分子を高発現するメモリー B 細胞が優先的に減少すること、さらに、CD40L や ICOS を発現する CD4 陽性 T 細胞が減少することを認めた。即ち、中枢神経症状の速やかな改善については、共刺激分子を発現するメモリー B 細胞を優先的に除去して B-T 細胞間相互作用を抑制し、リンパ球の活性化の制御を介して血管障害などを改善した (細胞性免疫の制御) 可能性も考えられる。即ち、リツキシマブによる治療効果は、SLE の病態形成において液性免疫のみならず、細胞性免疫も介在することを示唆する。

一方、SLE の治療では一定の割合でリツキシマブ無効例が存在し、米国の試験では一因として抗キメラ抗体の存在が指摘された。また、リツキシマブの投与後 3~9 ヶ月間は末梢血 B 細胞数が検出できず、免疫抑制が懸念された。平成 18 年、米国 FDA からリツキシマブを使用した SLE 患者 2 名が進行性多発性白質脳症で死亡したと報告され、未承認薬剤のオフラベル使用に対して厳しい警告が付記された。さらに、米国の SLE を対象とした第 II/III 相試験 (EXPLORER 試験) は失敗し、ループス腎炎に対して別の試験が進行中である。

今後、寛解導入に伴い減弱する遺伝子に関する DNA マイクロアレイ解析とも併せて、より効率的な疾患制御の可能性を探索する。さらに、CD20 に加えて CD22 や TACI 等の B 細胞特異的表面抗原、および、B 細胞受容体やサイトカイン等のシグナルを伝達する細胞内蛋白質 (JAK3 や Syk など) の重要な治療標的に対する疾患制御を目指した細胞やモデルマウスレベルでの研究を遂行し、臨床応用の基礎成績を確立する。

### E. 結論

治療抵抗性 SLE に対して抗 CD20 抗体リツキシマブ療法の安全性と有効性が確認された。リツキシマブの作用機序としては、メモリー B 細胞の再出現を制御してナイーブ B 細胞の再構築を生じて長期寛解導入を齎した (液性免疫の制御) と同時に、共刺激分子を発現するメモリー B 細胞を優先的に除去して B-T 細胞間相互作用を抑制した (細胞性免疫の制御) 可能性も考えられた。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Tsujimura S, Saito K, Nawata M, Nakayamada S, Tanaka Y. Overcoming drug resistance induced by P-glycoprotein on lymphocytes in patients with refractory rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* (2008) 67, 380-388
2. Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, Tanaka Y.

- Bolus infusion of human urinary trypsin inhibitor improves intractable interstitial pneumonia in patients with connective tissue diseases. *Rheumatology* (2008) **47**, 907-913
3. Nakano K, Higashi T, Hashimoto K, Takagi R, Tanaka Y, Matsushida S. Antagonizing dopamine D1-like receptor inhibits Th17 cell differentiation: Preventive and therapeutic effects on experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biochem Biophys Res Commun* (2008) **373**, 286-291
  4. Takeuchi T, Tatsuki T, Nogami N, Ishiguro N, Tanaka Y, Yamanaka H, Harigai M, Ryu J, Inoue K, Kondo H, Inokuma S, Kamatani N, Ochi T, Koike T: Post-marketing surveillance of the safety profile of infliximab in 5,000 Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* (2008) **67**, 189-195
  5. Nishida K, Okada Y, Nawata M, Saito K, Tanaka Y. Induction of hyperadiponectinemia following long-term treatment of patients with rheumatoid arthritis with infliximab (IFX), an anti-TNF-alpha antibody. *Endocrine J* (2008) **55**, 213-216
  6. Tanikawa R, Okada Y, Nakano K, Tanikawa T, Hirashima M, Yamauchi A, Hosokawa R, Tanaka Y. Interaction of galectin-9 with lipid rafts induces osteoblast proliferation through the c-Src/ERK signaling pathway. *J Bone Miner Res* (2008) **23**, 278-86
  7. Mototani H, Iida A, Nakajima M, Furuichi T, Miyamoto Y, Tsunoda T, Sudo A, Kotani A, Uchida A, Ozaki K, Tanaka Y, Nakamura Y, Tanaka T, Notoya K, Ikegawa S. A functional SNP in EDG2 increases susceptibility to knee osteoarthritis in Japanese. *Hum Mol Genet* (2008) **17**, 1790-1797
  8. Yoda A, Toyoshima K, Onishi N, Hazaka Y, Tsukuda Y, Tsukada J, Kondo T, Tanaka Y, Minami Y. Arsenic trioxide augments chk2/p53-mediated apoptosis by inhibiting oncogene wip1 phosphatase. *J Biol Chem* (2008) **283**, 18969-18979
  9. Takizawa Y, Inokuma S, Tanaka Y, Saito K, Atsumi T, Hirakata M, Kameda H, Hirohata S, Kondo H, Kumagai S, Tanaka Y. Clinical characteristics of cytomegalovirus infection in rheumatic diseases: multicentre survey in a large patient population. *Rheumatology* (2008) **47**, 1373-1377
  10. Okada Y, Nawata M, Nakayamada S, Saito K, Tanaka Y. Commencing use of alendronate protects premenopausal women from bone loss and fracture associated with high-dose glucocorticoid therapy. *J Rheumatol* (2008) **35**, 2249-2255
- ## 2. 学会発表
1. Tanaka Y, Yamamoto K, Takeuchi T, Nishimoto N, Miyasaka N, Sumida T, Sawada T, Kohsaka H, Matsumoto I, Saito K, Koike T. A 2 year-extended follow-up of the phase I/II trial of rituximab for treatment of refractory systemic lupus erythematosus. Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2008, Paris 平成20年6月11-14日
  2. Tanaka Y, Tokunaga M, Nawata M, Iwata S, Nakano K, Yamaoka K, Mima T, Nishimoto N, Saito K. Different mechanisms are involved in different organ manifestation in SLE: learning from treatments with rituximab (anti-CD20) therapy. The 72nd National Meeting of American college of Rheumatology, San Francisco. 平成20年10月25-29日
  3. Tanaka Y. Lessons learned from rituximab development in Japan. Asian SLE Summit Meeting, Tokyo, 平成20年12月11日
  4. 田中良哉. 重症 SLE 患者に対するリツキシマブ治療. 第52回日本リウマチ学会総会・学術集会 (シンポジウム) 札幌, 平成20年4月20-23日
  5. 田中良哉. 抗B細胞療法. 第52回日本リウマチ学会総会・学術集会 (シンポジウム) 札幌, 平成20年4月20-23日
- ## G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
- ### 1. 特許取得
- 1) Fas 抗原発現増強剤 (特許出願番号: 特開2003-171282)
  - 2) Akt シグナル経路の活性化阻害を目的として使用するレフルノミド (特願2005-81972)
- ### 2. 実用新案登録
- なし

自己免疫疾患における免疫担当細胞のシグナル異常とその制御  
(自己免疫疾患における RasGRP の発現検討)

研究分担者	小池隆夫	北海道大学大学院医学研究科	内科学講座・第二内科 (教授)
研究研究者	保田晋助	北海道大学大学院医学研究科	内科学講座・第二内科 (助教)
	橋本陶子	北海道大学大学院医学研究科	内科学講座・第二内科 (院生)

### 研究要旨

関節リウマチ(RA)の滑膜炎形成において、マスト細胞・マクロファージおよび樹状細胞など単球系細胞の働きは不可欠である。特に滑膜マクロファージは炎症性サイトカインである IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  を産生することが知られている。Ras-guanyl releasing protein 4 (RasGRP4) はマスト細胞に発現して Ras を活性化し、マスト細胞の分化に関与するが、末梢血単核球 (PBMCs)における発現も知られている。今回、RasGRP4 が末梢血において CD14 陽性単球に高発現し、さらにマクロファージや樹状細胞に分化した後も *in vitro* および関節リウマチ (RA)滑膜においてその発現が保たれることを示した。さらに、RA 患者末梢血においては健康人と比較して RasGRP4 転写産物が高発現していた。また、RasGRP4 転写産物の質的検討において 10 種の新たなスプライスバリエントを認め、スプライス異常を有する頻度は RA 患者において健康人と比較して有意に高かった。単球における RasGRP4 スプライス異常が RA における病態形成に影響を与える可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

RasGRP (Ras-guanyl releasing protein)はRasを活性化する guanine nucleotide exchanging factor であるが、ファミリー分子として RasGRP1-4 が知られている。

RasGRP1はT細胞に発現し、その分化に関わるが、T細胞機能の異常が報告されている全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus:SLE)患者においては、RasGRP1のスプライス異常が有意に高頻度で、全長RasGRP1の蛋白発現レベルが低いことを報告した(Yasuda S et al. J Immunol. 2007)。RasGRP4はマスト細胞に発現し、その分化に重要であるが、末梢血単核球 (PBMC)にも発現し、T、B細胞には発現しないとされていることから、単球での発現が示唆される。マスト細胞・単球系細胞ともに関節リウマチ (RA)の病態形成において必須の炎症性細胞であり、本年度の研究では、RA患者におけるRasGRP4の発現を検討することによってそ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

健康人末梢血における RasGRP4 発現細胞の同定；健康人 PBMC より CD14 陽性単球、T細胞、CD14, 3, 19 陰性細胞を分離し、それぞれにおける RasGRP4 の発現を検討した。mRNA レベルの検討では、正常 RasGRP4 の翻訳部位全長を増幅するプライマーを用いて RT-PCR を行った。加えて、エクソン 7-8 接合部を認識するプライマーセットを用いて real-time PCR を行い、それぞれの細胞分画における RasGRP4 の発現を定量

的に評価した。蛋白レベルの検討では、RasGRP4 蛋白の N 端に相当するペプチドを用いてウサギを免役することで作製したポリクローナル抗体を作製した。この抗 RasGRP4 抗体を用いてスライドグラスに固着した単球・T細胞・RasGRP4 を強制発現させた HEK293 細胞に対して免疫染色を行った。また、単球をサイトカイン刺激下にマクロファージおよび樹状細胞 (DC)に分化させ、同様の評価を行った。

RA 患者滑膜における RasGRP4 発現細胞の同定；膝関節滑膜切除術をうけた RA 患者より同意の下に切除滑膜を得、上記抗 RasGRP4 抗体、マスト細胞を同定する目的で抗 Kit 抗体、マクロファージなどの単球系細胞を同定する目的で抗 CD68 抗体を用いた組織染色を行った。

#### RA 患者 PBMC における RasGRP4 発現の量的、質的検討；

次に、文書による同意を得た健康人 38 名(男性 6 名、女性 32 名、平均年齢 50 歳)、RA 患者 41 名 (男性 11 名、女性 30 名、平均年齢 60 歳)の末梢血単核球より total RNA を抽出、cDNA を合成、RasGRP4 の発現を real-time PCR にて定量した。また、全長 RasGRP4 を PCR にて増幅後、ベクターにサブクローニングしてひとりあたり 5 クローン塩基配列を決定した。

(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

健康人末梢血における RasGRP4 発現細胞-RasGRP4 を強制発現させた HEK293 細胞は今回作製した抗 RasGRP4 抗体で染色されたが、操作を加えていない HEK293 細胞では染色が見られず、また免疫に用いたペプチドによる吸収試験の結果からも、免疫染色における抗 RasGRP4 抗体の特異性と有用性が示された。PBMC における RasGRP4 の発現は、mRNA レベルにおいても蛋白レベルにおいても、CD14 陽性単球で最も高く、T 細胞・B 細胞では低値であった。単球をマクロファージ・DC に分化させたところ、mRNA レベルでは発現量は低下傾向にあったが、蛋白レベルでの発現は保たれていた (Figs. 1,2)。

Fig.1; 末梢血および単球系細胞における RasGRP4 発現

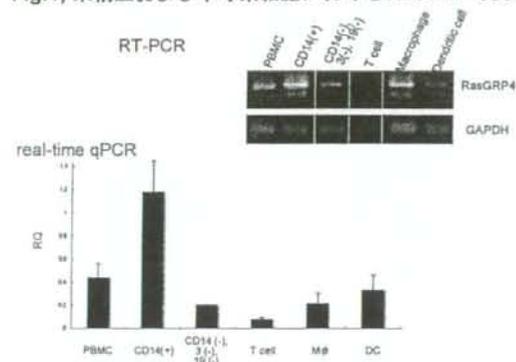
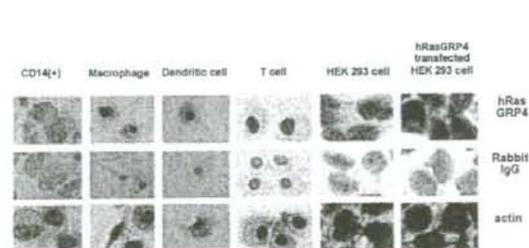
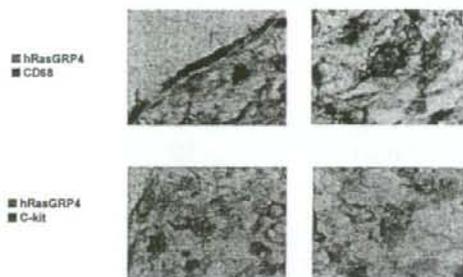


Fig.2; 抗RasGRP4抗体による蛋白発現の検討



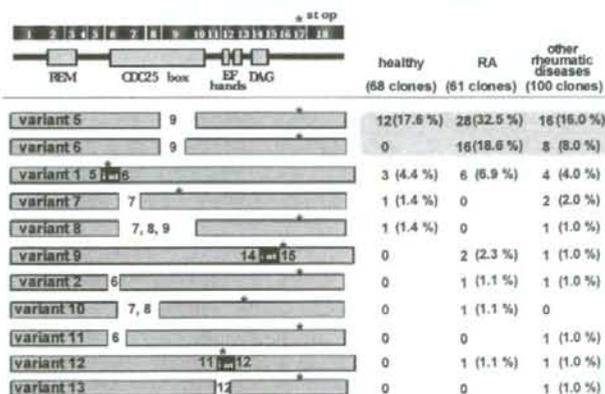
RA 患者滑膜における RasGRP4 発現細胞の同定-RA 滑膜において、RasGRP4 陽性細胞は広く炎症滑膜に存在したが、リンパ濾胞には存在しなかった。Kit 陽性マスト細胞も同定され、そのほとんどで RasGRP4 も発現していた。また、CD68 陽性細胞の 50-80% は RasGRP4 も同時に発現しており、単球系細胞における RasGRP4 蛋白の発現が示された (Fig. 3)。

Fig.3; RA滑膜・二重染色



RA 患者 PBMC における RasGRP4 発現の量的、質的検討-PBMC における RasGRP4 発現は、real-time PCR による定量評価では RA 患者において優位に発現が高かった ( $p=0.027$ )。RA 患者および健康人サンプルからサイズの異なる 10 種の新規スプライスバリエントが検出され、その頻度は優位に RA 患者で高かった (健康人 13.4%、RA 49.1%、 $p=0.0001$ ) が、疾患活動性との相関はなかった (Fig. 4)。Exon 9 全体を欠損する RasGRP4 スプライスバリエント 5、exon 9 の 5'側 207 塩基を欠損するスプライスバリエント 6 の頻度が高く、特に後者は RA 群のみに認められた。また、スプライスバリエント 6 を有する患者では、これを有しない患者に比較して PBMC における RasGRP4 の発現量が優位に高かった ( $p=0.02$ )。

Fig.4; RasGRP4 splice variants



### D. 考察

RA における関節局所では、さまざまな免疫細胞が滑膜へ集簇し活性化する。このとき、マスト細胞からは IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , 血管内皮細胞増殖因子(VEGF), プロスタ

グランジン、線維芽細胞増殖因子、ヘパリン、プロテアーゼなどが産生され、これらの炎症性メディエータを介した炎症性細胞の関節局所への遊走、マクロファージの活性化、線維芽細胞の分化、増殖滑膜における血管新生の促進がおこる。一方、末梢血中の単球は、組織においてマクロファージ、樹状細胞、破骨細胞へと分化する。RAの滑膜炎や滑膜増殖に関与するIL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ を主に産生するのは関節局所で活性化したマクロファージであり、活性化マクロファージはこれらの炎症性サイトカインを大量に産生する。滑膜組織において成熟した樹状細胞はIL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10などの炎症性サイトカインを産生するほか、クラスI, II MHC分子を高発現しており、自己反応性T細胞の活性化を促していると考えられている。このようにマスト細胞や単球系細胞は、関節炎の形成におけるエフェクターとして重要であり、RAの病態生理に深く関与しているといえる。

今回は、従来マスト細胞および末梢血に発現するとされてきたRasGRP4に注目し、まずRasGRP4がPBMC分画においては主に単球に発現していることを示した。また、マクロファージ・樹状細胞に分化後も、その発現はある程度維持されるものと考えられた。さらに、RA滑膜において分化したマクロファージなどの単球系細胞においても蛋白レベルでその発現が確認され、RAの病態に直接関わる可能性が示唆された。

RA患者ではPBMCにおけるRasGRP4発現量が高く、またスプライス異常を高頻度に認めた。今回real-time PCRに用いたプライマーセットはエクソン7-8接合部を認識するため、今回同定されたスプライスバリエーションのほとんどを認識する。特にスプライスバリエーション6は、患者群においてのみ認められ、またRasGRP4 RNAの高発現と関連していたことから、異常RNAを代償する目的で単球がRasGRP4を高発現している可能性が示唆された。さらに、このバリエーションは健康人に全く発現していないことから、RAを代表とする自己免疫疾患の診断に用いうる可能性も考えられた。

RasGRP4スプライスバリエーションが蛋白発現に与える影響については今後の検討を要するが、少なくとも今回の検討で患者群に高頻度であったバリエーション5および6は、蛋白レベルで発現があったとしてもそのGEFドメインの一部を欠くためRasを活性化する機能に関しては低下あるいは消失していることが予想される。RasGRP4スプライスバリエーションが転写後調整をうけて蛋白としてはほとんど存在しない場合、このスプライス異常は正常分子の低発現に関与する可能性が高いと考えられる。RasGRP4はマスト細胞において抑制性のIL-13レセプター $\alpha 2$ の発現を亢進させることが知られており、また単球系細胞にもIL-13レセプター $\alpha 2$ の発現が知られている。単球系細胞においてもRasGRP4がIL-13レセプター $\alpha 2$ の発現をコントロールすると仮定した場合、RasGRP4スプライス異常は正常RasGRP4の

機能を阻害することによって抗炎症性レセプターの発現低下を通じてRAの病態に影響を与えることが示唆された。

## E. 結論

1. 単球系細胞におけるRasGRP4発現を、末梢血およびRA滑膜を用いて新たに示した。
2. RA患者末梢血におけるRasGRP4転写産物のスプライス異常および発現量の増加を認めた。
3. 新規スプライスバリエーションを10種同定し、特にバリエーション6を有する患者においては同分子の転写が亢進していることを明らかにした。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Horita T, Atsumi T, Yoshida N, Nakagawa H, Kataoka H, Yasuda S, Koike T. STAT4 single nucleotide polymorphism, rs7574865 G/T, as a risk for antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis*. (in press)

Oku K, Atsumi T, Bohgaki M, Amengual O, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Koike T. Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis*. (in press)

Nishio M, Endo T, Fujimoto K, Yamamoto S, Obara M, Yamaguchi K, Takeda Y, Goto H, Kasahara I, Sato N, Koike T. FCGR3A-158V/F polymorphism may correlate with the levels of immunoglobulin in patients with non-Hodgkin's lymphoma after rituximab treatment as an adjuvant to autologous stem cell transplantation. *Eur J Haematol*. 82(2):143-7, 2008

Oku K, Atsumi T, Amengual O, Koike T. Antiprothrombin antibody testing: detection and clinical utility. *Semin Thromb Hemost*. 34(4):335-339, 2008

Fukaya S, Yasuda S, Hashimoto T, Oku K, Kataoka H, Horita T, Atsumi T, Koike T. Clinical features of haemophagocytic syndrome in patients with systemic autoimmune diseases: analysis of 30 cases. *Rheumatology*. 47(11):1686-1691, 2008

Goto H, Nishio M, Kumano K, Fujimoto K, Yamaguchi K, Koike T. Discrepancy between disease activity and levels of vascular endothelial growth factor in a patient with POEMS syndrome successfully treated with autologous stem-cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 42(9):627-629, 2008

Shiratori S, Yasumoto A, Tanaka J, Shigematsu A, Yamamoto S, Nishio M, Hashino S, Morita R, Takahata M, Onozawa M, Kahata K, Kondo T, Ota S, Wakasa K, Sugita J, Koike T, Asaka M, Kasai M, Imamura M. A retrospective analysis of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for adult T cell leukemia/lymphoma (ATL): clinical impact of graft-versus-leukemia/lymphoma effect. *Biol Blood Marrow Transplant.* 14:817-823,2008

Bohgaki M, Tsukiyama T, Nakajima A, Maruyama S, Watanabe M, Koike T, Hatakeyama S. Involvement of Ymer in suppression of NF-kappaB activation by regulated interaction with lysine-63-linked polyubiquitin chain. *Biochim Biophys Acta.* 1783(5):826-837,2008

Atsumi T, Amengual O, Koike T. Etiopathology of the Antiphospholipid syndrome, In: Tanaka K, Davie EW, editor. *Recent Advances in Thrombosis and Haemostasis 2008.*521-535,2008

Shigematsu A, Kondo T, Yamamoto S, Sugita J, Onozawa M, Kahata K, Endo T, Shiratori S, Ota S, Obara M, Wakasa K, Takahata M, Takeda Y, Tanaka J, Hashino S, Nishio M, Koike T, Asaka M, Imamura M. Excellent outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using a conditioning regimen with medium-dose VP-16, cyclophosphamide and total-body irradiation for adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 14(5):568-575,2008

Atsumi T, Horita T, Minori T, Koike T. Exchange of information in Rheumatology between East and West : From Man'yo-shu to the Future. *Arthritis Rheum.* 58(2):140-142,2008

Kon Y, Atsumi T, Hagiwara H, Furusaki A, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Amengual O, Koike T. Thrombotic microangiopathy in patients with phosphatidylserine dependent antiprothrombin antibodies and antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Rheumatol.* 26(1) : 129-132 , 2008

Okamoto T, Atsumi T, Shimizu C, Yoshioka N, Koike T. The potential role of macrophage migration inhibitory factor on the migration of vascular smooth muscle cells. *J Atheroscler Thromb.* 15(1):13-19,2008

Bohgaki T, Atsumi T, Koike T. Autoimmune disease after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Autoimmun Rev.* 7(3):198-203,2008

Kataoka H, Atsumi T, Hashimoto T, Horita T, Yasuda S, Koike T. Polymyalgia rheumatica as the manifestation of unclassified aortitis. *Mod*

*Rheumatol.* 18(1)105-108,2008

Nishio M, Endo T, Nakao S, Sato N, Koike T. Reversible cardiomyopathy due to secondary hemochromatosis with multitransfusions for severe aplastic anemia after successful non-myeloablative stem cell transplantation. *Int J Cardiol.* 127:400-401,2008

G. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

○ なし

#### IV 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表・平成20年度

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻	頁	出版年
Kawaguchi, Y., Nakamura, Y., Matsumoto, I., Nishimagi, E., Satoh, T., Kamatani, N., Kuwana, M., Sumida, T., and Hara, M.	Muscarinic-3 acetylcholine receptor autoantibody in patients with systemic sclerosis: contribution to severe gastrointestinal tract dysmotility.	Ann. Rheum. Dis.			in press
Tsutsumi, A., Kobayashi, T., Ito, S., Goto, D., Matsumoto, I., Yoshie, H., and Sumida, T.	Mannose binding lectin gene polymorphism and the severity of chronic periodontitis.	Jap. J. Clin. Immunol.			in press
Kobayashi, T., Murasawa, A., Ito, S., Yamamoto, K., Komatsu, Y., Abe, A., Sumida, T., and Yoshie, H.	Cytokine gene polymorphisms associated with rheumatoid arthritis and periodontitis in Japanese adults.	J. Periodontology			in press
Ito, I., Kawasaki, A., Ito, S., Hayashi, T., Goto, D., Matsumoto, I., Tsutsumi, A., Hom, G., Graham, R.R., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Ohashi, J., Behrens, T.W., Sumida, T., and Tsuchiya, N.	Replication of the association between the C8orf13-BLK region and systemic lupus erythematosus in a Japanese population.	Arthritis Rheum.	60	553-558	2009
Tanaka, Y., Matsumoto, I., Iwanami, K., Inoue, A., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T.	B cells play a crucial role as antigen-presenting cells and collaborate with inflammatory cytokines in glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis.	Clin. Exp. Immunol.	155	285-294	2009
Iwanami, K., Matsumoto, I., Tanaka, Y., Inoue, A., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T.	Arthritogenic T cell epitope in glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis.	Arthritis Res. Ther.	10	R130	2008
Kawasaki, A., Ito, I., Hikami, K., Ohashi, J., Hayashi, T., Goto, D., Matsumoto, I., Ito, S., Tsutsumi, A., Koga, M., Arinami, T., Graham, R. R., Hom, G., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Behrens, T.W., Sumida, T., and Tsuchiya, N.	Role of STAT4 polymorphisms in systemic lupus erythematosus in a Japanese population: a case-control association study of the STAT1-STAT4 region	Arthritis Res. Ther.	10	R113	2008
Matsumoto, I., Zhang, H., Yasukochi, T., Iwanami, K., Tanaka, Y., Inoue, A., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T.	Therapeutic effects of antibodies to TNF $\alpha$ and IL-6 and CTLA-4 Ig in mice with glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis.	Arthritis Res. Ther.	10	R66	2008
Iwanami, K., Matsumoto, I., Watanabe, Y., Inoue, A., Mihara, M., Ohsugi, Y., Mamura, M., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., Kishimoto, T., and Sumida, T.	Crucial role of IL-6/IL-17 cytokine axis in the induction of arthritis by glucose-6-phosphate-isomerase.	Arthritis Rheum.	58	754-763	2008
Nakamura, Y., Wakamatsu, E., Matsumoto I., Tomiita, M., Kohno, Y., Mori, M., Yokota, S., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T.	High prevalence of autoantibodies to muscarinic 3 acetylcholine receptor in patients with juvenile-onset Sjogren's syndrome.	Ann. Rheum. Dis.	67	136-137	2008
Matsui, H., Tsutsumi, A., Sugihara, M., Suzuki, T., Iwanami, K., Kohno, M., Goto, D., Matsumoto, I., Ito, S., and Sumida, T.	Visfatin (pre-B cell colony-enhancing factor) gene expression in patients with rheumatoid arthritis.	Ann. Rheum. Dis.	67	571-572	2008
Yoshiga, Y., Goto, D., Segawa, S., Ohnishi, Y., Matsumoto, I., Ito, S., Tsutsumi, A., Taniguchi, M., and Sumida, T.	Invariant NKT cells produce IL-17 through IL-23-dependent and -independent pathways with potential modulation of Th17 response in collagen-induced arthritis.	Int. J. Mol. Med.	22	369-374	2008
Kohno, M., Tsutsumi, A., Matsui, H., Sugihara, M., Suzuki, T., Mamura, M., Goto, D., Matsumoto, I., Ito, S., Suguro, T., and Sumida, T.	Interleukin 17 gene expression in patients with rheumatoid arthritis.	Mod. Rheumatol.	18	15-22	2008