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

新規 IL-10 産生制御性 T 細胞の IL-10 産生機序に関する研究

研究分担者 山本 一彦 東京大学医学部アレルギーリウマチ内科 教授
研究協力者 藤尾 圭志 東京大学医学部アレルギーリウマチ内科 助教
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。今後 Egr2 が関連する CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の IL-10 産生機序を解析してゆく予定である。

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 Fopx3 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 T 細胞を同定した。本研究ではこの CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の IL-10 産生機序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 Egr-2 に着目し、レトロウイルスベクターによる Egr-2 遺伝子のマウス CD4 陽性 T 細胞への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 Egr-2 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。

(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 Egr-2 に着目し解析したところ、Egr-2 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 Egr-2 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 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。

D.考察

IL-10 を高産生する Egr2 高発現 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。さらに CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の IL-10 産生には Egr-2 の関与が考えられた。最近 Egr2 遺伝子領域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。CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞および Egr2 導入細胞は Blimp-1 の発現が亢進していたが、T 細胞特異的 Blimp-1 欠損マウスでは IL-10 産生低下をきたし腸炎を発症することが報告されている。今後 Blimp-1 プロモーターの解析や T 細胞特異的 Blimp-1 欠損マウスの解析により、Egr-2 による Blimp-1 発現の誘導が IL-10 産生に関与している可能性を検討していく予定である。

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 細胞機能に重要な IL-10 産生機序を検討することで、新たな免疫疾患制御法の開発が進むと考えられる。

F.健康危険情報

特記すべきことなし

G.研究発表

1. 論文発表

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 Tcells naturally present in the immune system
第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 シンポジウム (2008.12.1)

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

多発性筋炎に対する免疫抑制療法等先端的新規治療法に関する研究

分担研究者　上阪　等　　東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科膠原病・リウマチ内科学　准教授
研究協力者　沖山奈緒子　東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科　大学院生

研究要旨【目的】 多発性筋炎（PM）の新規マウスモデルであるC蛋白誘導性筋炎（CIM）の特性を解析するとともにPMの新治療法を開発する。今までの研究で、CIM発症には自己反応性T細胞の存在とCFA皮内投与による筋局所の自然免疫活性化とが必要であること、その中でも、CFA処理により放出される炎症性サイトカインが、筋炎発症において重要であることが判明した。そこで、自己反応性T細胞の存在と筋局所の自然免疫活性化とを分けて検討できる養子移入系を用いて、どの炎症性サイトカインが治療標的としてより妥当であるかを検討する。さらに、CIM誘導性C蛋白第２断片の内、細胞傷害性T細胞が認識するMHCクラスIエピトープ候補ペプチドを用いて、細胞傷害性T細胞誘導性自己免疫性筋炎の誘導を試みる。【方法】 1）野生型のレシピエントマウスに、それぞれ抗IL-1受容体抗体, 抗TNFα抗体、抗IL-6受容体抗体を投与しておき、C蛋白提示骨髄誘導性樹状細胞にて刺激したCIMマウスリンパ節細胞を養子移入し、2週間後のレシピエントマウス大腿筋を観察する。 2）C蛋白第２断片のうち、細胞傷害性T細胞が認識するMHCクラスIエピトープ候補とされたペプチドを、様々なアジュバントとともに野生型マウスに免疫する。または、ペプチド提示骨髄誘導性樹状細胞を、野生型マウスに移入する。これらのマウスのリンパ節細胞または脾臓細胞の細胞傷害活性を、クロムリリースアッセイにて検討する。【結果】 1）CIM養子移入系では、レシピエントへのIL-1またはTNFα標的療法は奏功したが、IL-6標的療法は効果がなかった。 2）エピトープ候補を、さまざまなアジュバントの組み合わせ方法で免疫したが、病理組織学的に大腿筋に筋炎を認められなかった。ペプチド提示骨髄誘導性樹状細胞移入では、大腿筋に筋炎を確認できた。【結論】CIM養子移入系は、獲得免疫である筋炎惹起性T細胞分化と、局所自然免疫惹起を、容易に分割して解析することの出来る、in vivoの自己免疫性疾患モデルである。我々の検討では、炎症性サイトカインのうちIL-1とTNFαが局所自然免疫に重要な役割を果たしていた。また、C蛋白第2断片のうちのMHC class Iエピトープ単独免疫にて、実験的筋炎を誘導することが出来ており、細胞傷害性T細胞が筋傷害のエフェクター細胞であることを、強く裏付けている。

A. 研究目的

多発性筋炎（PM）の新規マウスモデルであるC蛋白誘導性筋炎（CIM）の特性を解析するとともにPMの新治療法を開発する。今までの研究で、CIM発症には自己反応性T細胞の存在とCFA皮内投与による筋局所の自然免疫活性化とが必要であること、その中でも、CFA処理により放出される炎症性サイトカインが、筋炎発症において重要であることが判明した。CIMの養子移入系は、CFAを下肢に皮内投与しておかないと、自己反応性T細胞を移入しても、筋炎を起こさないという系であり、自己反応性T細胞の存在と筋局所の自然免疫活性化とを分けて検討できる。この養子移入系を用いて、どの炎症性サイトカインが治療標的としてより妥当であるかを検討する。

さらに、昨年には、CIM誘導性C蛋白第２断片の内、細胞傷害性T細胞が認識するMHCクラスIエピトープ候補を見出しているため、このペプチドを用いて、細胞傷害性T細胞誘導性自己免疫性筋炎の誘導を試みる。

B. 研究方法

1）下肢にCFA皮内投与した、野生型のレシピエントマウスに、それぞれ抗IL-1受容体抗体, 抗TNFα抗体、抗IL-6受容体抗体を投与しておき、C蛋白提示骨髄誘導性樹状細胞にて刺激したCIMマウスリンパ節細胞を養子移入し、2週間後のレシピエントマウス大腿筋を、病理組織学的に観察、評価する。

2）CD4T細胞ヘルプを代替するとされる抗CD40抗体やpoly (I:C)とともに、C蛋白第２断片のうち、細胞傷害性T細胞が認識するMHCクラスIエピ

トープ候補とされたペプチドをCFAと混合してエマルジョンとし、皮内投与で野生型マウスに免疫する。または、骨髄誘導性樹状細胞にペプチドを提示させて活性化し、野生型マウスに移入する。該当ペプチド提示EL-4に対する、これらのマウスのリンパ節細胞または脾臓細胞の細胞傷害活性を、クロムリリースアッセイにて検討する。

（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）CIM養子移入系では、レシピエントへのIL-1またはTNFα標的療法は奏功したが、IL-6標的療法は効果がなかった。

2）エピトープ候補を、抗CD40抗体・poly (I:C)・百日咳毒素の組み合わせ方法で免疫したが、病理組織学的に大腿筋に筋炎を認められなかった。ただし、抗CD40抗体・poly (I:C)・百日咳毒素すべてを使用して免疫したマウスのリンパ節細胞または脾臓細胞は、ペプチド提示EL-4細胞への細胞傷害活性が認められた。また、ペプチド提示骨髄誘導性樹状細胞移入では、大腿筋に筋炎を確認できた。

D.考察

1）IL-1やTNFαは、筋傷害性T細胞のリクルートメントに、特に重要なサイトカインであると示唆された。炎症性サイトカインは、血管内皮細胞で、接着分子やケモカインの発現上昇に関わるが、IL-1やTNFαは、筋芽細胞のMHC class I発現を上げることが報告されている。IL-1またはTNFα標的療法が特に有効であったのは、筋でのMHC class I発現上昇により、CIMのエフェクター細胞である細胞傷害性T細胞のリクルートメントに、特に関与しているからと考えられる。

2）C蛋白第2断片のうち、MHC class Iエピトープ候補ペプチドにて、筋炎を発症させることに成功した。反対に、CIMマウスにおいて、このペプチドをエピトープとする細胞傷害性T細胞の存在はまだ見出せておらず、今後の課題である。

E.結論

CIM養子移入系は、獲得免疫である筋炎惹起性T細胞分化と、CFAによる局所自然免疫惹起を、容易に分割して解析することの出来る、in vivoの自己免疫性疾患モデルである。我々の検討では、炎症性サイトカインのうち、IL-1とTNFαが局所自然免疫に重要な役割を果たしており、治療標的としてより有望と考えられた。また、C蛋白第2断片のうちのMHC class Iエピトープ単独免疫にて、実験的筋炎を誘導することが出来たことから、細胞傷害性T細胞が筋傷害のエフェクター細胞であることを、強く裏付けている。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

1）沖山奈緒子、上阪等 診療科の壁を越える共通語-IL-6 を例として-多発性筋炎・皮膚筋炎の研究の発展、日本臨床免疫学会会誌 31 巻 2 号、85-92、Apr. 2008

2.学会発表

1）Naoko Okiyama Takahiko Sugihara, Hiroo Yokozeki, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka, A new mouse model of polymyositis indicates IL-6 as a therapeutic target. *The International Investigative Dermatology*, May, 14-17 2008, Kyoto

2)Hitoshi Kohsaka What we learnt from a new animal model of polymyositis International symposium on inflammatory myopathy May 23, 2008 Seoul

3) Naoko Okiyama, Hitoshi Kohsaka IL-6 as a potential therapeutic target of polymyositis. *International symposium on inflammatory myopathy*, May 23. 2008, Soul

上阪 等 Osteo-myo-immunology？ -多発性筋炎と我々のモデルマウス- 第5回 Osteoimmunology Forum 平成20年2月16日 東京

上阪 等 多発性筋炎/皮膚筋炎 - 膠原病内科医の見た目- 第16回神経免疫フォーラム 平成20年3月22日 油谷湾（山口）

杉原毅彦、沖山奈緒子、渡部直人、鈴木美穂子、宮坂信之、上阪　等　新規多発性筋炎モデルマウスに対するIL-1阻害療法の検討　東京 2008年10月17-18日　第36回日本臨床免疫学会

H. 知的財産権の出願・登録状況
（予定も含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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

核内受容体をターゲットとした新規自己免疫疾患制御法の探索に関する研究

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 大木 伸司 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 室長

研究要旨

多発性硬化症(Multiple Sclerosis: MS)、およびベーチェット病、Vogt-小柳-原田病、サルコイドーシスなどに合併するブドウ膜炎は、ともに自己抗原に対する過剰な免疫応答の結果生じる典型的な自己免疫疾患である。これらの自己免免疫疾患では、Th1 細胞、Th17 細胞などの炎症性免疫細胞の標的臓器への浸潤と、これらの細胞が産生する炎症性サイトカインが病態形成に深く関わる。我々はこれまでに、APL 治療薬として臨床応用されている合成レチノイド Am80 が、*all-trans* レチノイン酸(ATRA)を上回る Th17 細胞分化良く性能を有すること、Am80 の予防的あるいは治療的経口投与により、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の発症が有意に抑制されることを示してきた。今回、ヒトブドウ膜炎のマウスモデルとして病態研究に用いられる、マウス実験的自己免疫性ブドウ膜炎(EAU)に対する Am80 の病態抑制効果を検証するとともに、レチノイドの作用ターゲットとしてとしての Th17 細胞、制御性 T 細胞、抑制性サイトカイン IL-10 の挙動を、両病態モデルの比較解析により詳細に検討した。

A.研究目的

近年、多発性硬化症(Multiple Sclerosis: MS)に代表される種々の自己免疫疾患に対して、ATRA をはじめとするレチノイドによる Th17 細胞機能制御を介した新規治療アプローチの可能性が注目されている。本研究では、EAE と EAU という2種類のマウス病態モデルを併用することにより、合成レチノイド Am80 の病態抑制メカニズムの詳細を、Th17 細胞、制御性 T 細胞、抑制性サイトカイン IL-10 の挙動を中心に検討した。

B.研究方法

C57BL/6J(B6)マウス由来脾臓細胞より分離した T 細胞を、種々の合成レチノイド(10 nM〜1 μM)存在下に抗 CD3/CD28 抗体で刺激し、培養上清中の IL-17 を測定した。さらに脾臓 T 細胞を Th17 細胞誘導条件下(IL-6; 20 ng/ml)/TGF-β; 5 ng/ml)で合成レチノイドを添加して抗 CD3/CD28 抗体で刺激し、抗 CD3 抗体にて再試激した後の Th17 細胞分化を、IL-17 産生能を比較した。培養後の細胞から RNA を抽出し、cDNA 合成後に定量PCR法を用いて、Th17 細胞分化のマスター遺伝子である RORγt の発現を比較した。B6 マウスに MOG35-55 ペプチドを免疫後、百日咳毒素(PT)を腹腔内投与することで実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を誘導した。CMC に懸濁した各種合成レチノイドの経口投与による EAE 発症抑制効果を比較した。

MOG35-55 ペプチドあるいは hIRBP1-20 ペプチドと 1mg の結核死菌をフロイントアジュバントと混合して作製したエマルジョンを C57BL/6(B6)マウスに皮下免疫した。さらに Day0、Day2 に百日咳毒素を腹腔内投与することにより、EAE あるいは EAU を誘導した。0.5%カルボキシメチルセルロース(CMC) に懸濁した Am80 を、予防的あるいは治療的プロトコールで隔日経口投与(3mg/kg)して、病態抑制効果を比較した。それぞれの標的臓器より単核球を分離し、浸潤細胞の組成、再刺激後のサイトカイン産生能を ELISA 法にて検証するとともに、Th17 細胞のマスター遺伝子 RORγt、制御性 T 細胞のマスター遺伝子 Foxp3 および IL-10 の発現を、定量 PCR 法を用いて比較した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、当研究所の動物実験規定に従い、実験計画書の承認を受けて行った。

C.研究結果

Am80 の経口投与により、予防的プロトコールおよび治療的プロトコールの双方で、EAE に対する病態改善効果が得られた。このとき CNS 浸潤 T 細胞の IL-17 産生と RORγt 発現は、Am80 投与により有意に減少したが、Foxp3 の発現増加は認められなかっ

た。CNS浸潤細胞のIL-17産生とRORγt発現はずっと抑制され続けていたにも関わらず、EAE後期ではAm80の治療効果が減弱する傾向が認められた。このときAm80の投与群では、CNS浸潤細胞のIL-10産生が有意に抑制されており、Am80の効果の消失に関わる可能性が考えられた。さらにCNS中のIL-10は、RORγt/Foxp3両陽性のユニークな細胞集団が産生することが示された。

IRBP1-20ペプチドを免疫したEAUマウスでは、15日目前後より有意な細胞浸潤が認められた。その後、17日目頃に細胞浸潤のピークを迎え、20日目以降には浸潤細胞数が減少し、寛解した。コントロール群では、15日目にCD11b+細胞およびCD45+細胞の浸潤を、17日目にはCD4+T細胞浸潤の増大を認めた。全観察期間を通じて、CD4+T細胞を含む浸潤細胞の組成はそれほど大きくは変化しなかった。Am80投与群では、全観察期間を通じて眼球への細胞浸潤がほとんど消失し、総浸潤細胞数はCMC投与群に対して10%以下に抑制された。コントロール群およびAm80処理群のEAUマウスの脾臓T細胞では、抗原特異的(IRBPペプチド刺激)、及び抗原非特異的(固相化抗CD3抗体刺激)細胞増殖には有意な差を認めなかった。眼球浸潤CD4+T細胞におけるRORγt発現およびFoxp3発現を調べたところ、Am80は病態形成に伴うRORγtの発現増加を抑制しFoxp3発現の著明な増強を誘導することが明らかとなった。Am80を継続投与することで、EAEの場合と同様、臓器浸潤T細胞のIL-10産生抑制が認められたが、全観察期間を通じてAm80の病態抑制効果には大きな影響を認めず、本系におけるIL-10の関与は大きくはないと考えられた。

D.考察

種々の自己免疫疾患モデルあるいはヒト自己免疫疾患において、Th17細胞が病原性T細胞の主要な細胞集団であることが明らかにされている。よって、Th17細胞分化の選択的抑制により、病態制御を可能にする新規治療法開発への道が開けると考えられる。RARα/βに選択的に作用し、APL治療薬として臨床応用されている合成レチノイドAm80は、顕著なTh17細胞分化抑制効果を示し、Am80の経口投与により、EAEの発症が抑制された。Am80は、標的臓器浸潤細胞のRORγt発現とIL-17産生を著しく抑制し、EAEのみならずEAUでも顕著な病態改善効果を示した。興味深いことに、EAEではAm80により浸潤T細胞のRORγt発現が有意に減少する一方で、Foxp3発現は増加しなかったのに対し、EAUでは投与群の浸潤T細胞におけるFoxp3の著しい発現亢進を認めた。さらにいずれのモデルにおいても、Am80の継続投与により臓器浸潤T細胞からのIL-10産生が抑制されたが、EAEでは病態後期のAm80の効果の減弱が認められた一方で、EAUでは実験期間を通じてAm80による病態抑制効果の減弱は認めなかった。よって合成レチノイドAm80は、複数の自己免疫疾患モデルに共通してTh17細胞機能抑制による病態改善効果を示したが、Treg細胞誘導能は病態モデルによって異なっており、またIL-10産生抑制による投与効果の変動を考慮する必要があると考えられた。Am80の臨床応用に際しては、Th17細胞だけでなく、Treg細胞、IL-10産生など複数の作用点を勘案して、各疾患に適したプロトコールを選択する必要があると考えられた。

E.結論

Am80の経口投与により、Th17細胞機能抑制効果を介したEAEおよびEAUの病態改善効果が得られた。Am80が、種々の自己免疫疾患に対する新規治療薬として適用できる可能性が示された。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1. 論文発表

1) Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines
Yoshimitsu Doi, Shinji Oki, Tomoko Ozawa, Hirohiko Hohjoh, Sachiko Miyake, and Takashi Yamamura
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 8381-8386 (2008)

2) NKT cell-dependent amelioration of a mouse model of multiple sclerosis by altering gut flora
Hiroaki Yokote, Sachiko Miyake, J. Ludovic Croxford, Shinji Oki, Hidehiro Mizusawa, and Takashi Yamamura
Am. J. Pathol. 173, 1714-1723 (2008)

3) Retinoid signals and Th17-mediated pathology
Christian Klemann, Benjamin JE Raveney, Shinji Oki and Takashi Yamamura
日本臨床免疫学会会誌 印刷中

4) Synthetic retinoid AM80 inhibits Th17 cells and ameliorates EAE

Christian Klemann, Benjamin JE Raveney, Anna K Klemann, Tomoko Ozawa, Stephan von Hörsten, Koichi Shudo, Shinji Oki, Takashi Yamamura
Submitted

2. 学会発表

[国際学会]

1) Shinji Oki, Yoshimitsu Doi, Tomoko Ozawa, Sachiko Miyake, Takashi Yamamura: Functional involvement of NR4A2 in the pathogenesis of inflammatory demyelinating disease.
Keystone Symposia 2008: Nuclear Receptors: Orphan Brothers (Z1), Whistler CA, Apr.1st, 2008

2) Christian Klemann, Shinji Oki, Anna K Klemann, Tomoko Ozawa, Yoshimitsu Doi, Koichi Shudo, Takashi Yamamura: Synthetic Retinoid Am80 ameliorates EAE by attenuating Th17-mediated inflammation
The 9th International Congress of Neuroimmunology, Fort Worth, Oct. 26th, 2008

[国内学会]

1) Shinji Oki, Yoshimitsu Doi, Benjamin JE Raveney, Tomoko Ozawa, Hirohiko Hohjoh, Sachiko Miyake, Takashi Yamamura: Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines(シンポジウム S8 招待講演)
第 38 回日本免疫学会総会・学術集会(京都) 2008 年 12 月 1 日

2) Christian Klemann, Shinji Oki, Tomoko Ozawa, Yoshimitsu Doi, & Takashi Yamamura: Alteration of Th17 differentiation by retinoic acid signals ameliorate EAE development
第 20 回日本神経免疫学会学術集会(新潟) 2008 年 4 月 17 日

3) MR1 拘束性 Vα19iT 細胞のコラーゲン誘導関節炎(CIA)における機能解析
第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会・第 17 回国際リウマチシンポジウム 2008 年 4 月 20 日

4) Christian Klemann, Shinji Oki, Anna K Klemann, Ben JE Raveney, Tomoko Ozawa, Koichi Shudo, Takashi Yamamura: Synthetic retinoid Am80 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by attenuating Th17-mediated inflammation
第 36 回日本臨床免疫学会総会(東京) 2008 年 10 月 17 日

5) 大木伸司、Christian Klemann、Benjamin JE Raveney、Anna K Klemann、小澤智子、首藤紘一、山村隆:合成レチノイド Am80 の Th17 細胞分化制御を介した自己免疫応答抑制効果について
第 19 回日本レチノイド研究会(東京) 2008 年 11 月 21 日

6) Christian Klemann, Shinji Oki, Benjamin J.E. Raveney, Takashi Yamamura: Synthetic Retinoid Am80 ameliorates EAE by attenuating Th17-mediated inflammation
第 38 回日本免疫学会総会・学術集会(京都) 2008 年 12 月 1 日

H.知的財産権の出願・登録状況
(予定も含む)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

全身性エリテマトーデス（SLE）における末梢血抗二本鎖 DNA 抗体産生細胞に関する研究

研究分担者　桑名　正隆　　慶應義塾大学内科　准教授
研究協力者　花岡　洋成　　慶應義塾大学内科　助教

研究要旨
抗二本鎖 DNA（dsDNA）抗体は SLE の疾患標識抗体であり、その抗体価は疾患活動性と関連するとされる。B 細胞に代表される抗体産生細胞は抗原特異的 T 細胞による刺激後、骨髄や脾臓から末梢血へ動員されることが知られている。そこで我々は SLE 患者末梢血中の抗 dsDNA 抗体産生細胞を直接検出し、その診断・疾患活動性評価における有用性を検討した。さらに、SLE 患者で抗 dsDNA 抗体産生細胞が末梢血中へ動員されるメカニズムもあわせて追究した。末梢血抗 dsDNA 抗体産生細胞は SLE 患者で特異的に検出されたが、感度は 22%と低かった。一方、循環抗 dsDNA 抗体産生細胞の存在は持続性蛋白尿、男性、リンパ球減少、高疾患活動性（SLEDAI や SLAM 高値）と相関した。抗 dsDNA 抗体産生細胞数と IgG 抗 dsDNA 抗体価は弱いながらも相関し、特に抗 dsDNA 抗体価高値例で末梢血抗 dsDNA 抗体産生細胞の検出は疾患活動性の評価に有用であった。また抗 dsDNA 抗体産生細胞陽性例の末梢血 B 細胞における CXCR4 の発現がレベルが高く、そのリガンドである SDF-1 に対する高い走化性を認めた。以上より末梢血中に動員された抗 dsDNA 抗体産生細胞が SLE の病態形成に貢献する可能性が示された。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス（SLE）の約 70%で抗二本鎖 DNA（dsDNA）抗体が検出される。しかし抗 dsDNA 抗体は疾患活動性の低い症例でも陽性となることがしばしばあり、必ずしも疾患活動性を反映しない。

一方、B 細胞に代表される抗体産生細胞は抗原特異的 T 細胞による刺激後、骨髄や脾臓から末梢血へ動員されることが知られている。

したがって SLE 患者の一部、特に抗 dsDNA 抗体陽性例では末梢血中に抗 dsDNA 抗体産生細胞が存在する可能性が高い。

そこで我々は SLE 患者末梢血中の抗 dsDNA 抗体産生細胞を直接検出するアッセイを確立し、その診断や疾患活動性評価に対する有用性を検討した。さらに、抗 dsDNA 抗体産生細胞が末梢血中へ動員されるメカニズムもあわせて追究した。

B. 研究方法

a) 対象

アメリカリウマチ学会の分類基準を満たす SLE 患者 130 例、対照疾患患者 40 例（関節リウマチ 32 例、原発性 Sjögren 症候群 6 例、強皮症 2 例）、健常人 18 例を対象とした。末梢血単核球（PBMC）を比重遠心法により分離し以下の検討に用いた。

b) 抗 dsDNA 抗体産生細胞の検出

IgG 抗 dsDNA 抗体産生細胞は ELISPOT 法を用いて定量した。S1 nuclease 処理後のλファージ DNA を抗原として固相化した PVDF 膜 96 穴プレートの各ウェルに末梢血単核球を 2.5×10^5 個ずつ加えて 4 時間培養し、洗浄後アルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗体と基質を反応させた。各ウェルのスポット数を数え、PBMC 2.5×10^5 個あたりの末梢血抗 dsDNA 抗体産生細胞数として定量した。

血清 IgG 抗 dsDNA 抗体価は市販の ELISA キット（MESA CUP「dsDNA」：MBL）により測定した。SLE 患者では臨床症状を履歴的に調査した。

c) 抗 dsDNA 抗体産生細胞の同定

PBMC より MACS 磁気ビーズ結合モノクローナル抗体(Miltenyi Biotec)を用いて CD19 又は CD138 陽性細胞を除去した。これら処理後の細胞を用いて ELISPOT 法を行い、抗 dsDNA 抗体産生細胞

数を測定した。

d)B 細胞上のケモカインレセプターの解析

B 細胞上に発現するケモカインレセプター（CXCR4・CXCR5・CCR7）の発現強度はフローサイトメトリー(FACS Calibur:BD Biosciences)で評価し、末梢血抗 dsDNA 抗体産生細胞の存在と関連するケモカインレセプターのリガンドについては、B 細胞に対する走化性を以下のケモタキシスアッセイで評価した。MACS システムを用いて PBMC から CD19 陽性細胞を単離し、Transwell chamber (Coaster)の上段に加えた。下段のシャーレ内培養液中に SDF-1 (384ng/ml) を添加し 6 時間培養後、下段シャーレ内に遊走した細胞数を測定し、SDF-1 に対する走化性を評価した。

e)統計学的解析

2 群間の比較は Fisher の 2-tailed test または Mann-Whitney U-test により行った。

（倫理面への配慮）

本研究は学内の倫理委員会での承認後に行った。検体採取の際には、事前に文書によるインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

a)抗 dsDNA 抗体産生細胞と診断、疾患活動性

末梢血中の抗 dsDNA 抗体産生細胞は SLE 患者 29 例（22%）に検出された。一方、対照疾患、健常人では検出されず、SLE に対する特異度 100%と高かった（図 1）。SLE 患者を抗 dsDNA 抗体産生 B 細胞の有無で層別化すると、その存在は男性、抗 dsDNA 抗体価高値、リンパ球数低値、持続性蛋白尿、SLEDAI・SLAM 高値、多い PSL 投与量と相関した(表 1)。

b)抗 dsDNA 抗体産生細胞数と抗 dsDNA 抗体の相関の検討

SLE における IgG 抗 dsDNA 抗体産生 B 細胞数と IgG 抗 dsDNA 抗体価は相関したが、相関係数は低かった（$R^2=0.19$、$p=0.026$）。その理由として抗 dsDNA 抗体価が低い症例のほとんどで抗 dsDNA 抗体産生細胞が検出されないことが考えられた。そこで、IgG 抗 dsDNA 抗体高値陽性 43 例（>100 IU/mL）を対象とすると、抗 dsDNA 抗体産生 B 細胞が検出された 25 例は、検出されない 18 症例に比べて SLEDAI、SLAM がいずれも有意に高かった（$p<0.01$, $p<0.01$）。したがって抗 dsDNA 抗体産生細胞の検出は抗 dsDNA 抗体高値例の中で疾患活動性が高い症例の抽出に有用であった。

c)抗 dsDNA 抗体産生 B 細胞の解析

CD19 および CD138 陽性細胞を除去した細胞集団を対象に ELISPOT 法を行ったところ、いずれの処理においても抗 dsDNA 抗体産生細胞数は減少したが、少数ながらもスポットが残存した。従って末梢血に抗 dsDNA 抗体を産生する細胞は B 細胞と CD138 陽性形質細胞の両者を含むことが明らかとなった。

抗 dsDNA 抗体産生 B 細胞の有無で層別化した 2 群で末梢血 B 細胞におけるケモカインレセプターの発現強度を比較したところ、陽性例で陰性例と比べて CXCR4 の発現が強く（$p<0.05$）、CXCR5 や CCR7 の発現強度には差はなかった。さらに、抗 dsDNA 抗体産生 B 細胞陽性例由来の末梢血 B 細胞は陰性例と比較し、CXCR4 のリガンドである SDF-1 に対する高い走化性を認めた($p=0.04$)。

D. 考察

SLE 患者において活動期に末梢血抗 dsDNA 抗体産生 B 細胞が出現し、その検出は疾患活動性評価に有用であった。特に抗 dsDNA 抗体高値例の中で疾患活動性が高い症例の抽出に有用であった。結合親和性の低い抗 dsDNA 抗体は標的臓器で消費されず、血清中の抗 dsDNA 抗体価が必ずしも疾患活動性を反映しない場合がある。

したがって血清抗体ではなく産生細胞を測定することにより明確に疾患活動性を反映する可能性があり、今後の臨床検査として診療への応用が期待される。

また、抗 dsDNA 抗体産生 B 細胞が末梢血への動員される機序の一つとして CXCR4 / SDF-1 の相互作用の関与が考えられた。末梢血中に動員された抗 dsDNA 抗体産生 B 細胞はケモカインの濃度勾配により腎臓などの標的臓器へホーミングし、SLE の病態形成に関与する可能性が考えられた。これらケモカインが SLE に対する新たな治療標的になりうる可能性が考えられた。

E. 結論

ELISPOT 法による末梢血中の抗 dsDNA 抗体産生 B 細胞の測定は SLE 患者の疾患活動性の評価に有用な新たなマーカーと考えられる。また、活動期 SLE で末梢血中に動員された抗 dsDNA 抗体産生 B 細胞及び形質細胞が SLE 病態に関わる可能性が示された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

論文発表

1. Takahashi H, Amagai M, Nishikawa T, Fujii Y, Kawakami Y, and Kuwana M. Novel system evaluating *in vivo* pathogenicity of desmoglein 3-reactive T-cell clones using murine pemphigus vulgaris. ***J. Immunol.*** 2008; 181(2): 1526-1535.
2. Asahi A, Nishimoto T, Okazaki Y, Suzuki H, Masaoka T, Kawakami Y, Ikeda Y, and Kuwana M. *Helicobacter pylori* eradication shifts monocytes' Fcγ receptor balance toward inhibitory FcγRIIB in immune thrombocytopenic purpura. ***J. Clin. Invest.*** 2008; 118(8): 2939-2949.
3. Seta N, Tajima M, Kobayashi S, Kawakami Y, Hashimoto H, and Kuwana M. Autoreactive T-cell responses to myeloperoxidase in patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis and in healthy individuals. ***Mod. Rheumatol.*** 2008; 18(6): 593-600.
4. Takahashi H, Kuwana M, and Amagai M. A single helper T-cell clone is sufficient to commit polyclonal naïve B cells to produce pathogenic IgG in experimental pemphigus vulgaris. ***J. Immunol.*** 2009; 182(3): 1740-1745.

学会発表

1. 桑名正隆: 感染と自己免疫. 第52回日本リウマチ学会総会（札幌）. 2008. 4.（シンポジウム: 自己免疫疾患の機序）
2. Takahashi H, Amagai M, Kuwana M: Single desmoglein 3-reactive CD4$^+$ T cell clones activate polyclonal naïve B cells and promote the production of pathogenic IgG in experimental pemphigus vulgaris. International Investigative Dermatology 2008 (Kyoto). 2008. 5.
3. 花岡洋成, 岡崎有佳, 佐藤隆司, 桑名正隆：全身性エリテマトーデス（SLE）患者末梢血中の抗二本鎖DNA抗体産生細胞の解析. 第52回日本リウマチ学会総会（札幌）. 2008. 4

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

発明名称：全身性エリテマトーデス（SLE）の診断・活動性評価キット

出願人：学校法人　慶應義塾

発明者：花岡洋成, 桑名正隆

出願番号：特許出願 2008-237479

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1:末梢血抗 dsDNA 抗体産生細胞数の比較

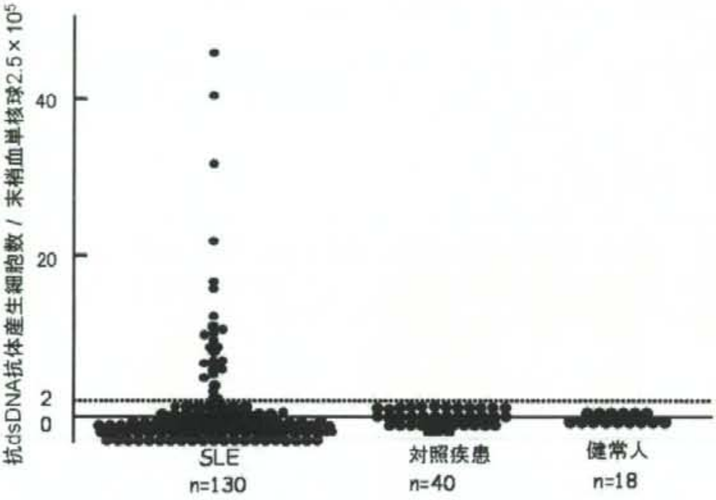


表 1:末梢血抗 dsDNA 抗体産生細胞陽性例と陰性例の臨床特徴の比較

臨床的特徴	ELISPOT 陽性 (n=29)	ELISPOT 陰性 (n=101)	*P
性差 (% 女性)	58.3	86.2	＜0.01
年齢(歳)	44.2±10.7	45.1±15.8	0.64
抗dsDNA 抗体価(IU/ml)	264.5 ±146.7	70.9 ±93.9	＜0.01
白血球数 (10^3/ul)	5.0±2.4	5.6 ±2.1	0.45
リンパ球数 (10^3/ul)	0.6 ±0.4	1.1±0.6	＜0.01
ヘモグロビン値 (g/dl)	10.9±2.0	11.7±1.9	0.36
血小板数 (10^4/ul)	15.8±7.8	20.0 ±8.6	0.26
血沈 (mm/hr)	51.0±30.3	41.4 ±32.9	0.82
ヘマトクリット (%)	33.5 ±5.7	36.1 ±5.6	0.38
血清アルブミン値 (g/dl)	3.3±0.6	3.8±0.6	0.06
CH50 (U/ml)	28.2 ±13.8	34.1 ±12.8	0.44
血清クレアチニン値(mg/dl)	0.9 ±0.3	0.7 ±0.2	0.27
持続性蛋白尿(%)	51.7	20.5	＜0.01
SLEDAI[a]	5.3±2.1	2.4±2.1	＜0.01
SLAM[b]	5.7 ±2.5	3.3 ±2.5	＜0.01
PSL投与量(mg/日)	12.7 ±12.9	8.1 ±9.4	＜0.01

a; SLE disease activity index　b; Systemic lupus activity measure　*Mann Whitney U test

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

制御性T細胞を用いた自己免疫の抑制に関する研究

分担研究者 坂口 志文 京都大学再生医科学研究所生体機能調節学分野 教授
研究協力者 小野 昌弘 京都大学再生医科学研究所生体機能調節学分野 助教

研究要旨

本研究は制御性T細胞の免疫抑制機能の分子メカニズムに着目して、病的状態における制御性T細胞の機能評価方法の確立および制御性T細胞の機能制御による自己免疫反応の制御法開発を目指す。これまでに、(1)FoxP3の転写因子Runx1などの結合因子を同定し、その分子メカニズムをこれまでに明らかにした。(2)また、制御性T細胞の抑制活性にCTLA-4が必要であることを示した。

A.研究目的

制御性T細胞の免疫抑制機能の分子メカニズムに着目して研究することで、病的状態における制御性T細胞の機能評価方法の確立および制御性T細胞の機能制御による自己免疫反応の制御法開発を目指す。

B.研究方法

制御性T細胞のマスター制御遺伝子FoxP3の分子レベルでの働きが明らかになれば、制御性T細胞の機能を動的にとらえることが出来る。また、CTLA-4は制御性T細胞の抑制機能に必要であり、CTLA-4による免疫制御メカニズムの解明は、制御性T細胞による抑制メカニズムの解明につながる。これらにより制御性T細胞の機能を評価するためのバイオマーカー候補と制御性T細胞の機能調節を目指した分子標的候補の検索を行う。

(倫理面への配慮)

動物実験およびヒト由来材料を用いた解析について、既に京都大学再生医科学研究所の審査承認を得ていており、ヒト細胞を用いた実験・動物実験については不必要なものを排除し、可能なものは細胞株を利用した代替実験を積極的に取り込んでいる

C.研究結果

(1)FoxP3の転写因子Runx1などの結合因子を同定し、その分子メカニズムをこれまでに明らかにした。(2)また、制御性T細胞の抑制活性にCTLA-4が必要であることを示した。

D.考察

今後の(1)FoxP3/Runx1による遺伝子制御の全体像の解明、および(2) CTLA-4による免疫抑制機能の分子メカニズムの解析による制御性T細胞の免疫抑制機能の解明により、病的状態における制御性T細胞の機能を評価するためのバイオマーカー候補と制御性T細胞の機能調節を目指した分子標的の検索が可能になると考えられた。

E.結論

FoxP3, Runx1, CTLA-4は制御性T細胞による免疫抑制機能に必須の分子であり、これらに着目した研究の推進は、病的状態における制御性T細胞の機能評価方法の確立および制御性T細胞の機能制御による自己免疫反応の制御法開発につながると考えられる。

F.健康危険情報

該当なし。

G.研究発表

1. 論文発表

- Satoda N, Shoji T, Wu Y, Fujinaga T, Chen F, Aoyama A, Zhang JT, Takahashi A, Okamoto T, Matsumoto I, Sakai H, Li Y, Zhao X, Manabe T, Kobayashi E, Sakaguchi S, Wada H, Ohe H, Uemoto S, Tottori J, Bando T, Date H, Koshiba T. Value of FOXP3 Expression in Peripheral Blood as Rejection Marker After Miniature Swine Lung Transplantation. J. Heart Lung Transplant. 27:1293-301, 2008.

- Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., and Sakaguchi, S. CTLA-4 control over Foxp3$^+$ regulatory T cell function. Science. 322:271-275, 2008.
- Yoshitomi, M., Koshiba, T., Haga, H., Li, Y., Zhao, X., Cheng, D., Miyagawa, A., Sakashita, H., Tsuruyama T., Ueda, M., Wood, K., Sakaguchi S., Manabe, T., Tanaka, K., and Uemoto, S. Requirement of protocol biopsy before and after complete cessation of immunosuppression following liver transplantation. Transplantation. In press.
- Li, Y., Zhao, X., Cheng, D., Haga, H., Tsuruyama, T., Wood, K., Sakaguchi, S., Tanaka, K., Uemoto, S., and Koshiba, T. The presence of FOXP3 expressing T cells within grafts of tolerance human liver transplant recipients. Transplantation. In press.
- Nagahama, K., Fehervari, Z., Oida, T., Ogawa, O., and Sakaguchi, S. Differential control of alloantigen-specific regulatory T cells and effector T cells by anti-CD4 and other agents in establishing transplantation tolerance. Int. Immunol. Being submitted.
- Sharma, S., Dominguez, A. L., Manrique, S. Z., Cavallo, F., Sakaguchi, S., and Lustgarten, J. Systemic targeting of CpG-ODN to the tumor microenvironment with anti-neu-CpG hybrid molecule and T regulatory cell depletion induces memory responses in BALB-neuT tolerant mice. Cancer Res. 68:7530-7540, 2008.
- Wakasa-Morimoto, C., Toyosaki-Maeda, T., Matsutani, T., Yoshida, R., Nakamura-Kikuoka, S., Maeda-Tanimura, M., Yoshitomi, H., Hirota, K., Hashimoto, H., Masaki, H., Fujii, F., Sakata, T., Tsuruta, Y., Suzuki, R., Sakaguchi, N., and Sakaguchi, S. Arthritis and pneumonitis produced by the same T-cell clones from mice with spontaneous autoimmune arthritis. Int. Immunol. 20:1331-1342.
- Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T., and Sakaguchi, S. Foxp3$^+$ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. Proc. Natl. Acad. Sci. *USA*. 29:10113-10118, 2008.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. Regulatory T cells and immune tolerance. Cell. 133: 775-787, 2008.
- Miyara, M., Sakaguchi, S. Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked Syndrome. Encyclopedia of Molecular Medicine. In press.
- Fehervari, Z. and Sakaguchi, S. T lymphocytes: Regulatory. Nature Encyclopedia of Life Sciences. Wiley Interscience, 2008. Available at www.els.net.
- Sakaguchi, S. Regulatory T cells in the past and for the future. Eur. J. Immunol. 38:901-937, 2008.
- Miyara,M,Wing,K,and Sakaguchi,S.Therapeutic approaches to allergy and autoimmunity based on FoxP3+ regulatory T cell activation and expansion.J.Aller.Clin.Immunol.In press.
- Sakihama T,SatoT,Iwanari H,Kitamura T,Sakaguchi S,Kodama T,Hamakubo T.A simple detection method for low-affinity membrane protein interactions by baculoviral display.PLos ONE.3(12):e4024,2008.

2. 学会発表

Kajsa Wing, Paz Prieto-Martin, Yasushi Onishi, Takashi Nomura, Shimon Sakaguchi:The role of CTLA-4 specifically for CD4+Foxp3+ regulatory T cells in vivo. World Immune Regulation Meeting-II (2008. 3. 17-20 Davos Switzerland).

Makoto Miyara, Tomoko Shima, Akihiko Kitoh, Yumiko Yosioka, Akira Niwa, Cecile Taflin, Toshio Heike, Dominique Valeyre, Alexis Mathian, Zahir Amoura, Tatsutoshi Nakahata, Tomoyuki Yamaguchi, Takashi Nomura Kajsa Wing, Guy Gorochov, Masahiro Ono, Shimon Sakaguchi: Functional delineation and differentiation dynamics of FoxP3-expressing subpopulation of CD4+ T cell in humans. World Immune Regulation Meeting-II (2008. 3. 17-20 Davos Switzerland).

鬼頭昭彦、小野昌弘、直江吉則、矢口浩子、大倉永也、北林一生、塚田俊彦、野村尚史、宮地良樹、谷内一郎、坂口志文：Foxp3+制御性T細胞の生体内抑制機能には Runx complex が必須である、第 18 回 Kyoto T

Cell Conference（2008,6,13-14.京都）

前田伸治、秋月修治、橋本求、野村尚史、坂口教子、坂口志文: TCR シグナル伝達の補正による SKG マウス自己免疫性関節炎の発症抑制、第 18 回 Kyoto T Cell Conference (2008. 6. 13-14.)

山口智之、岸歩美、坂口志文：Foxp3 による免疫制御のメカニズム/ How does Foxp3 control Treg suppression? 第 38 回日本免疫学会学術集会(2008.12.1-3. 京都)

Kitoh Akihiko, Ono Masahiro, Naoe Yoshinori, Yaguchi Hiroko, Ohkura Naganari, Kitabayashi Issei, Tsukada Toshihiko, Nomura Takashi, Miyachi Yoshiki Taniuchi Ichiro,Sakaguchi Shimon: Runx 複合体は CD4+FoxP3+制御性 T 細胞の生体内抑制活性に必須である/ Runx complexes are required for CD4+FoxP3+ regulatory T-cell function in vivo、第 38 回日本免疫学会学術集会 (2008.12.1-3. 京都)

Prieto-Martin Paz, Wing Kajsa, Yamaguchi Tomoyuki, Nomura Takashi, Sakaguchi Shimon CTLA-4 expression on Foxp3+ regulatory T cells plays a key role in tumor immunity and autoimmunity、第 38 回日本免疫学会学術集会(2008.12.1-3. 京都)

野村尚史、秋月修治、前田伸治、橋本求、斉藤隆、坂口教子、坂口志文：TCR シグナル不全による制御性T細胞分化障害と自己免疫病の発症・Autoimmune disease caused by Treg insufficiency due to defective TCR signaling、 第 38 回日本免疫学会学術集会 (2008.12.1-3. 京都)

橋本求、廣田圭司、吉冨啓之、前田伸治、寺平晋、野村尚史、坂口教子、岩倉洋一郎、三森経世、坂口志文：SKG マウスの関節炎発症における dectine-1 依存的、非依存的な経路の解析/Dectin-1-dependant and –independent pathway for the induction of arthritis in SKG mice、第 38 回日本免疫学会学術集会(2008.12.1-3. 京都)

前田伸治、田中聡、廣田圭司、橋本求、寺平晋、秋月修治、野村尚史、上田龍三、坂口教子、坂口志文：TCR シグナル伝達の補正による SKG マウス自己免疫性関節炎の発症抑制/Rescue of autoimmune arthritisin SKG mice by normalization of TCR signal transduction、第 38 回日本免疫学会学術集会(2008.12.1-3. 京都)

Yoshinaga Ito, Takashi Usui, Shio Kobayashi, Mikiko Iguchi, Hiromu Ito, Hiroyoki Yoshitomi, Takashi Nakamura, Motomu Hashimoto, Noriko Sakaguchi, Shimon Sakaguchi Tuneyo Mimori: γδT 細胞はコラーゲン誘発性関節炎局所における主要な Il-17 産生細胞である/Ganmma delta T cells are the predominant Il-17-produsing cells in affected joint of collagen-induced arthritis、第 8 回日本免疫学会学術集会(2008.12.1-3. 京都)

荒川明子、小野昌弘、藤井弘子、中村元信、坂口志文。宮地良樹　円形脱毛症患者の制御性 T 細胞減少/Altered frequency of regulatory T cells in alopecia areata patient、第 38 回日本免疫学会学術集会(2008.12.1-3. 京都)

山口智之、Paz Prieto-Martin、Kajsa Wing、大西康、坂口志文：制御性T細胞による免疫制御の機序「免疫難病・感染症等の先進医療技術」第 5 回 (最終)公開シンポジウム（2008.12.15. 品川）

小野昌弘、鬼頭昭彦、直江吉則、矢口浩子、大倉永也、北林一生、塚田俊彦、野村尚史、宮地良樹、谷内一郎、坂口志文：Foxp3+ と AML1/ Runx1 の相互作用による制御性T細胞の機能制御,「免疫難病・感染症等の先進医療技術」第 5 回(最終)公開シンポジウム（2008.12.15. 品川）

前田伸治、田中聡、廣田圭司、橋本求、寺平晋、秋月修治、野村尚史、上田龍三、坂口教子、坂口志文：TCR シグナル伝達の補正による SKG マウス自己免疫性関節炎の発症抑制「免疫難病・感染症等の先進医療技術」第 5 回 (最終)公開シンポジウム（2008.12.15. 品川）

H.知的財産権の出願・登録状況
（予定も含む）

1. 特許取得

出願番号 12/339,129

出願日　2008.12.19

発明者　坂口志文

発明の名称　4 型葉酸受容体の発現を指標とした制御性T細胞の検出方法、及び免疫賦活剤

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

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

全身性自己免疫疾患におけるIL-17の病態学的意義の解析と細胞移入による特異的治療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・創薬医学融合拠点 准教授

研究要旨

近年IL-17を産生するTh17細胞の自己免疫疾患への関係が多く示唆されているが，それらの多くはモデル動物から得られたデータであり，ヒトにおけるデータは少ない．従って我々は，モデル動物との異同を精密に比較しながらヒト全身性自己免疫疾患症例におけるIL-17の病態学的意義を解析した．まず関節リウマチ(RA)に対する代表的マウスモデルである，コラーゲン誘導関節炎モデルを用いて罹患関節局所に浸潤してくる単核球を経時的に解析したところ，関節局所にはTh1細胞は存在せず，ほぼすべてがIL-17産生細胞であり，しかもその大部分がTh17細胞ではなく，γδ T細胞であった．このγδ T細胞はCCR6+かつRORγt陽性であり，Th17 細胞と同様の表現形を有していたが，特異抗原であるII型コラーゲンには反応せず，IL-1β/IL-23というサイトカインによって増殖しIL-17を多量に産生した．我々は本細胞をγδ 17細胞と名付けた．ところがSKGマウス罹患関節局所侵潤細胞中γδ 17細胞は全く存在せず，純粋なTh17細胞反応が本マウスの特徴であることが分かった．次にヒトRA症例で同様の解析を行ったが，他者の報告通りTh17細胞は少数しか存在せず，大部分はTh1細胞であり，マウス関節炎モデルとはかなり異なる病態であることが示唆された。

A.研究目的

これまでの全身性自己免疫疾患に対する治療法は，副腎皮質ホルモン剤や免疫抑制剤投与という疾患非特異的な手法に半世紀以上も終始してきたため，重篤な感染症や骨・代謝性疾患の悪化を招いてきた．我々が開発中の細胞免疫療法は，遺伝子導入された疾患特異的な抗原特異T細胞を用いることで，病変局所において免疫制御性物質を産生させ罹患部位特異的な疾患制御が可能となる理想的な手段であるが，コスト面・技術面でまだ一般化するレベルには達していない．

次善の戦略として，より疾患特異的な分子を標的にするがあり，抗TNF-α製剤を初めてとして大きな成功を収めている製剤がある．しかしこれらの製剤によってもコントロールできない症例があること，感染症・悪性腫瘍という副作用問題が存在すること，コスト面などまだまだ理想的な治療法とは言えない．近年IL-17を産生するTh17細胞の膠原病への関係が示唆され注目を集めている．しかし，これまでのデータの多くはモデル動物から得られたものであり，ヒトにおけるデータはまだ少ない．例えば関節炎モデルマウスにおけるIL-17産生細胞の病態への関与は，様々な実験結果より明らかであるが，関節リウマチ(RA)症例を用いた解析では否定的な報告もあり，まだ結論が出ていない．

そこで我々は，関節炎モデルとしてコラーゲン誘導関節炎(CIA)およびSKGマウスという2つの関節炎モデルと，RAにおける罹患関節病変局所における侵潤細胞動態を詳細に解析し，IL-17がヒトRAの治療ターゲットに成り得るのか検証することにした．

B.研究方法

動物モデルを用いたこれまでの解析は，その手技の困難さから腫脹関節局所から直接浸潤炎症細胞を分離し，発症前から終息期に至るまで経時的に観察した報告が存在しなかった．このことが過去の報告に様々な乖離を生じる原因となっている可能性があると考えた．我々は，骨髄細胞のコンタミネーションなしにマウス手・足関節局所からリンパ球を分離する技術を確立した．この技術を用いてCIAおよびSKGマウスにおける関節局所浸潤細胞を分離し，表面マーカーとともにサイトカインプロファイルを細胞内サイトカイン染色で経時的に解析した．またRA患者からも関節液および手術時に得られる滑膜組織中の単核細胞も分離し，同様の解析を行った

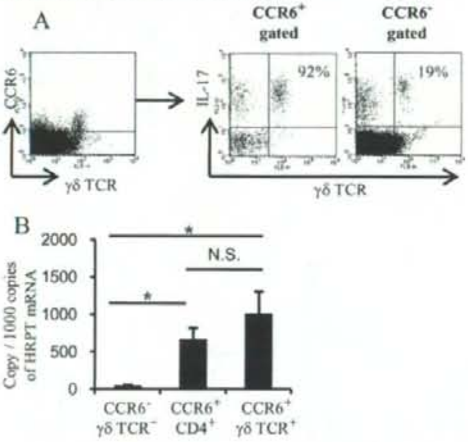
（倫理面への配慮）

以上の研究計画は，本学医の倫理委員会で審議・承認済みであり，患者由来試料はインフォー

ムドコンセントの元に採取・解析については連結可能匿名化処理後行われた.

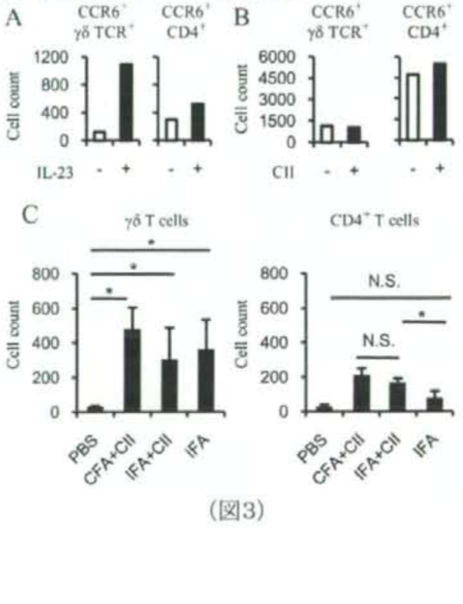
C.研究結果

CIA マウス罹患関節局所からは，ほぼ純粋な IL-17 産生細胞のみが検出され，IFN-γ産生細胞は非常に少数であった(図1:最終ページ)．さらに，この IL-17A 産生細胞の大部分は Th17 細胞ではなくγδ T 細胞であり，CCR6, ROR-γt を Th17 細胞同様発現していた(図2).



(図2)

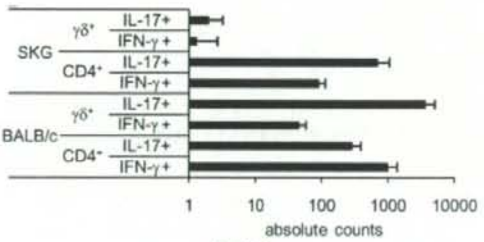
しかし特異抗原であるⅡ型コラーゲン(CII)や TCR 刺激には低反応であり，IL-1βおよび IL-23 存在下で相乗的な IL-17A 産生誘導を認め，Th17 細胞の反応性と逆であった(図3).



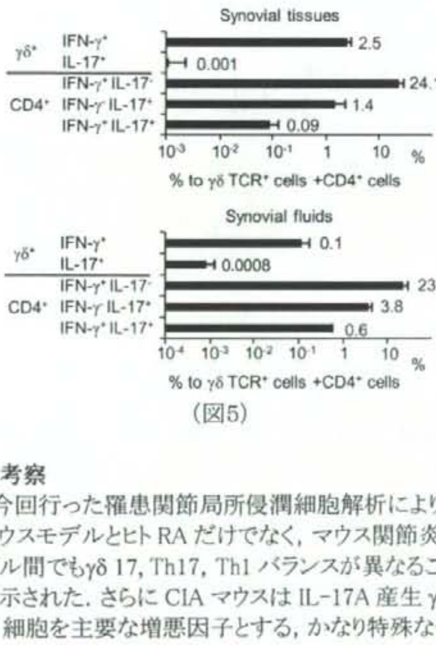
(図3)

次に関節炎を誘導した SKG マウスの罹患関節局所を解析したところ，意外な事に CIA マウスと比較して IL-17A 産生細胞はほぼすべて Th17 細胞であった(図4).

次に RA 症例から得られた，局所単核球サンプルを同様に解析したところ，IFN-γ産生細胞が主であり IL-17A 産生γ/δ T 細胞はほとんど検出されなかった(図5).



(図4)



(図5)

D.考察

今回行った罹患関節局所侵潤細胞解析により，マウスモデルとヒト RA だけでなく，マウス関節炎モデル間でもγδ 17, Th17, Th1 バランスが異なることが示された．さらに CIA マウスは IL-17A 産生 γδ T 細胞を主要な増悪因子とする，かなり特殊なモデルであることが明らかとなる一方で，SKG マウスでは恐らく ZAP-70 シグナル異常によりγδ 17が欠落している可能性が高まり，創薬過程でこれらのモデル動物を用いる場合には注意が必要であると考えられた．またヒト RA においては罹患関節局所でも，血清レベルでも IL-17A は低レベルであり，ヒト RA における Th17 の病態学的重要性を

確認することができなかった．勿論これには，ヒトRA 症例では薬物治療による修飾効果が有り得ることや，得られる関節局所サンプルが終末期に近い症例に限られること等が関与している可能性がある．しかしあまりにもIFN-γ/IL-17 バランスがマウスとヒトで大きく異なることが他施設のみならず我々の施設でも別個に確認されたことは，ヒト炎症性自己免疫疾患における IL-17A の病態学的意義をより慎重に解析することの重要性を示していると考えられた．

E.結論

CIA においては IL-17A 産生γδ T 細胞が，またSKG マウス関節炎では Th17 細胞が，病態の中心であり Th1 の関与は示されなかった．しかしヒト RA 症例では，IL-17A 産生γδ T 細胞は存在しないばかりか Th17 細胞もごく少数しか存在せず，Th1 細胞が主要な浸潤細胞であった．RA とそのモデル動物の病態がかなり異なる可能性と共に，各モデル動物間においても病態が異なることが判明した．

F.健康危険情報

特に無し

G.研究発表

1. 論文発表

1) Ito Y, Usui T, Mimori T, et al: γδ T cells are predominant source of IL-17 in the affected joints of collagen-induced arthritis, but not in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum (in revision)

2. 学会発表

1)伊藤能永，臼井崇，三森経世ほか：II型コラーゲン誘発性関節炎（CIA)局所における IL-17 分泌細胞の解析．第 52 回日本リウマチ学会，札幌，2008 年 4 月

2) Ito Y, Usui T, Mimori T, et al: Gamma delta T cells are the predominant IL-17-producing cells in affected joints of collagen-induced arthritis. 第 38 回日本免疫学会，京都，2008 年 12 月

3) Usui T, Mimori T, et al: TGF-beta and IL-17s in translational research.第 38 回日本免疫学会・国際シンポジウム，京都，2008 年 12 月

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

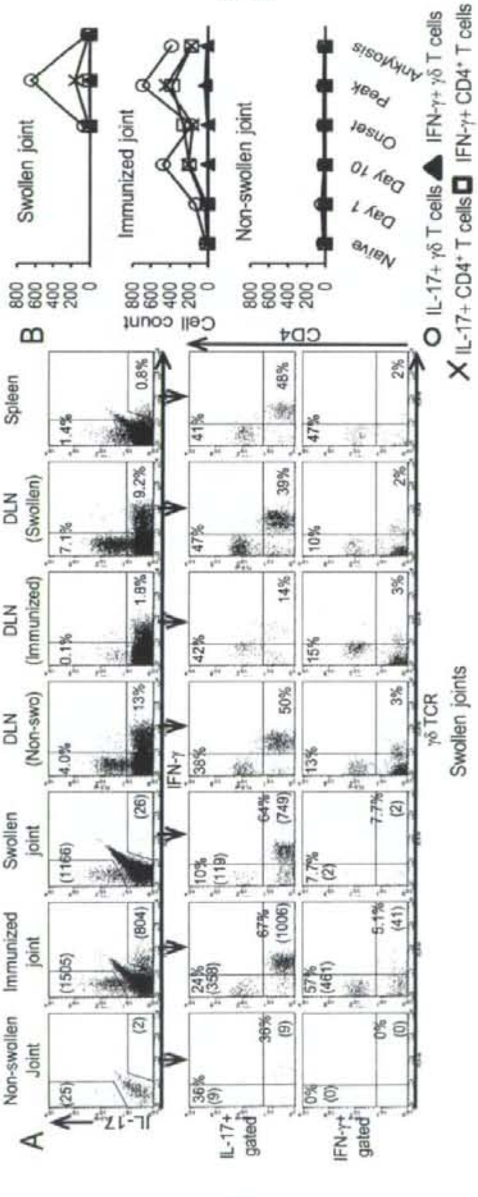
2. 実用新案登録

無し

3. 特許出願中

関節リウマチの検査方法および検査用キット
（特願 2008-240279）

（図1）



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

免疫抑制性遺伝子を強制発現させたアロ・マウスES細胞由来の樹状細胞によるアロ移植膵島に対する免疫寛容の誘導

分担研究者　千住　覚　　熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学 准教授
研究協力者　平田真哉　　熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学 助教
研究協力者　西村泰治　　熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学 教授

研究要旨

強い増殖能と分化能を有するES細胞は、再生医療における新たな移植細胞・組織の供給源として注目を浴びている。しかし、移植を必要とするレシピエントとHLAが完全に一致したES細胞を樹立して、移植供給源として用いることは、技術的および経済的に困難が多い。また、同種異系（アロ）のES細胞由来の組織を移植した場合には、レシピエントの免疫系による拒絶反応が起こると予測される。今回、我々は、TRAILやPD-L1、TGFβなどの免疫抑制性分子の遺伝子を導入したアロES細胞由来の樹状細胞(ES-DC)($H\text{-}2^{k/b}$)を先行投与することにより、ストレプトゾトシンによって糖尿病を誘導したCBAマウス($H\text{-}2^{k}$)に、ES-DCと同系であるF1(CBA x C57BL/6)マウス($H\text{-}2^{k/b}$)由来の膵島に対する免疫寛容を誘導して、膵島の生着を促進させることを試みた。その結果、TRAILを遺伝子導入したES-DC（ES-DC-TRAIL）を先行投与したマウスにおいて、未治療コントロール群やその他のES-DC投与群に比べて、アロ膵島移植後に血糖値が正常化した期間の延長が観察された。さらに、ES-DC-TRAILを投与した群では、末梢血液中の$CD4^{+}$T細胞に占める$Foxp3^{+}$制御性T(Treg)細胞の頻度の増加が認められた。以上より、ES-DC-TRAILは、Treg細胞の誘導を介して、アロ移植免疫における免疫寛容を誘導する可能性が示唆された。

A. 研究目的

自己免疫疾患や臓器移植における拒絶反応の治療において、個体の免疫応答を全身的な抑制状態に陥らせることなく、抗原特異的に抑制する手法の開発が強く求められている。近年、生体内に存在する代表的な抗原提示細胞である樹状細胞が、T細胞応答をコントロールすることにより、個体の免疫応答を正あるいは負の両方向へ制御していることが明らかにされてきた。この樹状細胞による負の免疫制御機構は、自己に対する免疫応答を抑制し、自己免疫疾患の発症を防止すると考えられている。

我々は、これまでにマウスのES細胞を *in vitro* において樹状細胞(ES-DC)へ分化させる技術を開発し、さらに、遺伝子導入したES細胞をES-DCに分化させることにより、任意の遺伝子を発現するES-DCを作製する技術を開発している。

我々は、これらの技術を用いて、種々の免疫抑制性分子を発現するES-DC(MHCハプロタイプ：$H\text{-}2^{k/b}$)を作製した。本研究は、これらの免疫抑制性ES-DCを、実験的に糖尿病を誘導したCBAマウス(MHCハプロタイプ：$H\text{-}2^{k}$)に投与することにより、ES-DCと同系であるF1(CBA x C57BL/6)マウス(MHCハプロタイプ：$H\text{-}2^{k/b}$)の膵島に対する免疫寛容を誘導して、膵島の生着を促進できるかどうか検討することを目的として、研究を行なった。