

B. 研究方法

1. マウス ES 細胞 (TT2: H-2^{k/b}) に導入するために、T 細胞応答を抑制する分子である TRAIL, PDL1, TGFβ の遺伝子発現ベクターを作製した。これらの遺伝子発現ベクターには、遺伝子導入細胞の選択に用いるマーカーとして、internal ribosomal entry site (IRES) 配列の下流に、薬剤耐性遺伝子としてネオマイシン耐性遺伝子を連結したものをを用いた。これらの遺伝子発現ベクターを電気穿孔法により TT2 に導入し、選択薬剤 (G418) を含む培養液中で培養することにより、導入遺伝子の高発現体を選択した。次いで、すでに我々が確立した ES 細胞から ES-DC への分化誘導法を用いることにより、これらの遺伝子改変 ES 細胞から導入遺伝子を発現する ES-DC (H-2^{k/b}) を作製した。
2. CBA(H-2^k) マウスに、ストレプトゾトシン (STZ) の投与により糖尿病を誘導した。4 日後、(CBAxB6)F1 マウス (H-2^{b/k}) 由来のアロ膵島を移植した。STZ 投与の 3 日前に、樹立した ES-DC-TRAIL、ES-DC-PDL1、ES-DC-TGFβ (いずれも H-2^{b/k}) 2-5x10⁶ 個/個体を腹腔内に投与して、膵島移植後の尿糖、血糖、病理組織、ならびに生存率等を観察した。

(倫理面への配慮) 本研究は、ヒトに由来する検体等を用いた解析は含んでいない。マウスを用いた実験に際しては、熊本大学動物実験委員会の承認を得たうえで、動物愛護に十分配慮しつつ実験を行なった。

C. 研究結果

種々の免疫抑制遺伝子導入 ES-DC の樹立

遺伝子発現ベクター導入後、G418 を含む培養液で選択を行なうことにより、各遺伝子を安定発現する ES 細胞株を得た。これらを限界希釈してクローン化し、TRAIL、PDL1 についてはフローサイトメトリーにより、TGF-β については、その培養上清の ELISA を施行することにより、各遺伝子の発現の高いものを選択した。これらの ES 細胞株から ES-DC を分化誘導し、混合リンパ球反応による T 細胞の増殖応答に対する抑制活性の高いクローンを選んで、以下の実験に使用した。

STZ による糖尿病の誘導とアロ膵島移植条件の決定

オスの CBA マウス (H-2^k) 6-8 週齢に、STZ (250 mg/kg) を腹腔内に 1 回注射して糖尿病の誘導を行ない、その 4 日後 500~800 個のアロ膵島細胞 (H-2^{b/k}) を移植した。血糖 300 mg/dl 以上を糖尿病発症とし、膵島移植後、300 mg/dl 以上が 2 回続いたところで、拒絶と判定した。この条件での膵島移植マウス (n=5) の平均拒絶日数は 6.7 日であった。

表 1 免疫抑制遺伝子導入 ES-DC 投与による移植膵島の生着延長

マウスの処置	平均拒絶日数
無処置	6.7 ± 1.6
ES-DCのみ	6.3 ± 0.4
ES-DC-TRAIL	16.5 ± 3.5
ES-DC-PDL1	7.3 ± 1.1
ES-DC-TGFβ	9.5 ± 2.5

免疫抑制遺伝子を導入した ES-DC の投与による移植膵島の生着延長効果の検討

ES-DC-TRAIL 先行投与群 (各 n=5) は、未投与群あるいは ES-DC のみ、ES-DC-PDL1、ES-DC-TGFβ 先行投与群に比較して、アロ移植膵島生着期間の有意な延長がみられた (表 1)。

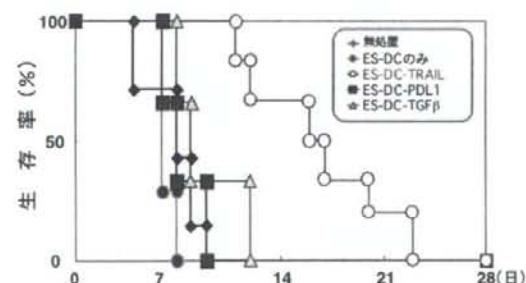
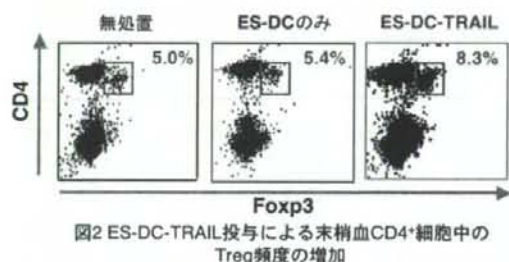


図1 ES-DC-TRAIL投与による生存期間の延長

また、ES-DC-TRAIL 先行投与群マウスにおいて、他の群と比較して生存期間の著明な延長が観察された (図 1)。

アロ ES-DC-TRAIL の先行投与によるアロ移植細胞に対する免疫寛容誘導機構の解析

アロ ES-DC-TRAIL の先行投与による、アロ移植細胞に対する拒絶反応の抑制効果のメカニズムを解析するために、 $CD4^+ CD25^+$ Treg 細胞の関与を検討した。ES-DC-TRAIL を先行投与後、STZ で DM を誘導し、その4日後に膵島細胞を移植した。移植5日後、マウス末梢血中の Treg 細胞の割合を、抗 CD4 抗体および抗 FoxP3 抗体を用いたフローサイトメトリーにより定量した(図2)。その結果、ES-DC-TRAIL 先行投与群では、無投与群あるいは ES-DC のみ投与群と比較して、有意に $CD4^+$ T 細胞中に占める Treg 細胞の頻度が増加していた。



D. 考察

STZ の腹腔内注射により誘導される糖尿病を発症するマウス(H-2^b)に、アロの膵島細胞(H-2^{b/k})を移植した。これらのマウスにあらかじめ TRAIL 発現 ES-DC(H-2^{b/k})を先行投与することにより、移植片の生着期間の延長および生存率の上昇が認められたことから、ES-DC-TRAIL の先行投与により、何らかの免疫抑制機構が活性化されて移植膵島に対する寛容が誘導された可能性が考えられた。いっぽう、ES-DC-PDL1、ES-DC-TGFβ の投与群では、ES-DC 投与群と比較して有意な効果は認められなかった。ES-DC-TRAIL の投与群は ES-DC 投与群と比較して、マウス末梢血中の $CD4^+$ FoxP3⁺ Treg 細胞の割合を有意に増加させたので、ES-DC-TRAIL 投与による移植片に対する免疫寛容の誘導は、Treg 細胞の誘導によるものである可能性が示唆された。

以上の結果は、ES-DC-TRAIL の先行投与により、アロ移植片に対する免疫応答が抑制され

る、臓器移植治療に有用な医療技術になる可能性を開く知見であると考えられた。

E. 結論

TRAIL の遺伝子を導入したアロ ES-DC の投与により、Treg 細胞の誘導を介して ES-DC と同じ H-2 遺伝子を発現する、アロ移植膵島に対する拒絶反応が抑制された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Senju S, Haruta M, Matsunaga Y, Fukushima S, Ikeda T, Takahashi K, Okita K, Yamanaka S, and Nishimura Y. Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. in press.
2. Fukushima S, Hirata S, Motomura Y, Fukuma D, Matsunaga Y, Ikuta Y, Ikeda T, Kageshita T, Ihn H, Nishimura Y, and Senju S. Multiple antigen-targeted immunotherapy with a-galactosylceramide-loaded and genetically engineered dendritic cells derived from embryonic stem cells. *J Immunotherapy*. in press.
3. Matsunaga Y, Fukuma D., Hirata S, Fukushima S., Haruta M., Ikeda T., Negishi I., Nishimura Y, Senju S. Activation of Antigen-Specific Cytotoxic T Lymphocytes by β2-Microglobulin or TAP1 Gene Disruption and the Introduction of Recipient-Matched MHC Class I Gene in Allogeneic Embryonic Stem Cell-Derived Dendritic Cells. *J Immunol*. 181: 6635–6643, 2008.
4. Tsukamoto, H., Irie, A., Senju S, Hatzopoulos, A.K., Wojnowski, L. and Nishimura Y. B-Raf-mediated signaling pathway regulates T cell development. *Eur. J. Immunol*. 38: 518-527, 2008.

2. 学会発表

- 1) Immunotherapy with multiple antigen-targeted and

- α -galactosylceramide-loaded dendritic cells derived from embryonic stem cells. Satoshi Fukushima, Shinya Hirata, Hironobu Ihn, Yasuharu Nishimura, Satoru Senju 第10回国際樹状細胞シンポジウム (神戸)、2008、October 1-5.
- 2) Genetic modifications of ES cell-derived DC to modify cell surface MHC class. Yusuke Matsunaga, Daiki Fukuma, Shinya Hirata, Satoshi Fukushima, Miwa Haruta, Tokunori Ikeda, Izumi Negishi, Yasuharu Nishimura, Satoru Senju 第10回国際樹状細胞シンポジウム (神戸)、2008、October 1-5.
- 3) ES細胞およびiPS細胞由来の免疫細胞を用いた医療技術の開発、千住覚 第32回阿蘇シンポジウム (熊本)、2008年8月1日、2日
- 4) 免疫細胞療法への応用を目指したマウスiPS細胞からの樹状細胞の作製技術の確立、千住覚、春田美和、福島聡、松永雄亮、平田真哉、池田徳典、高橋和利、沖田圭介、山中伸弥、西村泰治 第17回日本組織適合性学会大会 (大阪)、2008年9月19日～21日
- 5) 免疫細胞療法への応用を目指したマウスiPS細胞からの樹状細胞の分化誘導、千住覚、春田美和、福島聡、松永雄亮、平田真哉、池田徳典、高橋和利、沖田圭介、山中伸弥、西村泰治 人類遺伝学会第53回大会 (横浜)、2008年9月27日～30日
- 6) 免疫抑制性分子を遺伝子導入したマウスES細胞由来の樹状細胞の同種異系 (アロ) 移植への応用、平田真哉、福島聡、池田徳典、松永雄亮、千住覚、西村泰治 第36回日本臨床免疫学会 (東京)、2008年10月17日～18日
- 7) 複数抗原を標的とし、 α GalCerを負荷した遺伝子導入ES細胞由来樹状細胞を用いた癌免疫療法、福島聡、平田真哉、松永雄亮、尹浩信、西村泰治、千住覚 第36回日本臨床免疫学会 (東京)、2008年10月17日～18日
- 8) 複数抗原を標的とした α -GalCer負荷ES細胞由来樹状細胞による癌免疫療法、福島聡、平田真哉、松永雄亮、尹浩信、西村泰治、千住覚 第38回日本免疫学会総会・学術集会 (京都)、2008年12月1日～3日
- 9) Activation of antigen-specific CTL by β 2-microglobulin or TAP1 gene-disrupted and recipient-matched MHC class I gene-introduced allogeneic ES cell-derived dendritic cells、松永雄亮、福岡大喜、平田真哉、福島聡、春田美和、池田徳典、根岸泉、千住覚、西村泰治 第38回日本免疫学会総会・学術集会 (京都)、2008年12月1日～3日
- 10) TRAILを発現するアロES-DCの投与によるアロ脾臓に対する拒絶反応の抑制、平田真哉、福島聡、松永雄亮、池田徳典、千住覚、西村泰治 第38回日本免疫学会総会・学術集会 (京都)、2008年12月1日～3日
- 11) マウスiPS細胞からの樹状細胞の作製、千住覚、春田美和、松永雄亮、福島聡、平田真哉、池田徳典、高橋和利、沖田圭介、山中伸弥、西村泰治 第38回日本免疫学会総会・学術集会 (京都)、2008年12月1日～3日
- 12) 免疫制御性分子を強制発現させたアロES細胞由来の樹状細胞によるアロ移植臓器に対する免疫寛容の誘導に関する研究、西村泰治 厚生労働省難治性疾患克服研究事業「新たな診断・治療法開発のための免疫学的手法の開発」平成20年度班会議 (札幌)、2008年12月4日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
本年度の研究に関連したものはない。

(4) 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
Kameda, H., Watanabe, M., Bohgaki, M., Tsukiyama, T., Hatakeyama, S.	Inhibition of NF- κ B signaling via tyrosine phosphorylation of Ymer	Biochem Biophys Res Commun	378(4)	744-749	2009
Oshiumi, H., Matsumoto, M., Hatakeyama, S., Seya, T.	Riplet/RNF135, a RING-finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon- β induction during the early phase of viral infection	J Biol Chem	284(2)	807-817	2009
Kano, S., Miyajima, N., Fukuda, S., Hatakeyama, S.	TRIM32 facilitates cell growth and migration via degradation of Abl-interactor 2	Cancer Res	68(14)	5572-5580	2008
Miyajima, N., Maruyama, S., Bohgaki, M., Kano, S., Shigemura, M., Shinohara, N., Nonomura, K., Hatakeyama, S.	TRIM68 regulates ligand-dependent transcription of androgen receptor in prostate cancer cells	Cancer Res	68(9)	3486-3494	2008
Takahata, M., Bohgaki, M., Tsukiyama, T., Kondo, T., Asaka, M., Hatakeyama, S.	Ro52 functionally interacts with IgG1 and regulates its quality control via the ERAD system	Mol Immunol	45(7)	2045-2054	2008
6. Bohgaki, M., Tsukiyama, T., Nakajima, A., Maruyama, S., Watanabe, M., Koike T., Hatakeyama, S.	Involvement of Ymer in suppression of NF- κ B activation by regulated interaction with lysine-63-linked polyubiquitin chain	BBA-Mol Cell Res	1783(5)	826-837	2008
7. Maruyama, S., Miyajima, N., Bohgaki, M., Tsukiyama, T., Shigemura, M., Nonomura, K., Hatakeyama, S.	Ubiquitylation of ϵ -COP by PIRH2 and regulation of the secretion of PSA	Mol Cell Biochem	307(1-2)	73-82	2008
Iwanami, K., Matsumoto, I., Tanaka, Y., Inoue, A., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T.	The dominant arthrogenic T cell epitope in glucose-6-phosphate isomerase (GPI)-induced arthritis.	Arthritis Res. Ther.			in press
Tanaka, Y., Matsumoto, I., Iwanami, K., Inoue, A., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T.	B cells have crucial role as autoantibody producers in arthritis mediated by glucose-6-phosphate isomerase.	Clin. Exp. Immunol.			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 C8orf13-BLK region and systemic lupus erythematosus in a Japanese population.	Arthritis Rheum.			in press

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.	Association of STAT4 polymorphisms with systemic lupus erythematosus in a Japanese population.	Arthritis Res. Ther.				in press
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 α and IL-6 and CTLA-4 Ig in mice with glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis.	Arthritis Res. Ther.	10(3)	R66		2008
Kawaguchi, Y., Wakamatsu, E., Matsumoto, I., Nishimagi, E., Kamatani, N., Satoh, T., 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
Iwanami, K., Matsumoto, I., Watanabe, Y., 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., Tomiita, M., Kohno, Y., Yokoka, J., Goto, D., Ito, S., Matsumoto I., Tsutsumi, A., and Sumida, T.	High prevalence of autoantibodies to muscarinic 3 acetylcholine receptor in patients with juvenile 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.	Expression of Visfatin (pre-B cell colony-enhancing factor) gene 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.	NKT cells are novel accelerator of IL-17 in the pathogenesis of 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., and Sumida, T.	Expression of the Interleukin 17 (IL-17) gene in patients with rheumatoid arthritis.	Mod. Rheumatol.	18	15-22		2008
Ishii, W., Ito, S., Kondo, Y., Tsuboi, H., Mamura, M., Goto, D., Matsumoto, I., Tsutsumi, A., Okoshi, Y., Hasegawa, Y., Kojima, H., Sakashita, S., Aita, K., Noguchi, M., and Sumida, T.	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
Wang, Y., Ito, S., Chino, Y., Goto, D., Matsumoto, I., Tsutsumi, A., and Sumida, T.	Analysis of T cells infiltrated in kidneys of MRL-lpr mouse by laser-microdissection (LMD) method.	Mod. Rheumatol.	18	385-393		2008
Suzuki, T., Tsutsumi, A., Suzuki, E., Sugihara, M., Muraki, Y., Hayashi, T., Chino, Y., Goto, D., Matsumoto, I., Ito, S., and Sumida, T.	Tristetraprolin (TTP) gene polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis and healthy individuals.	Mod. Rheumatol.	18	472-479		2008

Suzuki A, Yamada R, Kochi Y, Sawada T, Okada Y, Matsuda K, Kamatani Y, Mori M, Shimane K, Takahashi A, Tsunoda T, Miyatake A, Kubo M, Kamatani N, Nakamura Y, Yamamoto K	Functional SNPs in CD244 gene increase the risk of rheumatoid arthritis in a Japanese population.	Nat Genet	40	1224-9	2008
Kawakami A, Koketsu R, Suzukawa M, Nagao M, Hiraguchi Y, Tokuda R, Fujisawa T, Nagase H, Ohta K, Yamamoto K, Yamaguchi M.	Blocking antibody is generated in allergic rhinitis patients during specific immunotherapy using standardized Japanese cedar pollen extract.	Int Arch Allergy Immunol.	1	54-60	2008
Kawakami A, Suzukawa M, Koketsu R, Komiya A, Ohta K, Yamamoto K, Yamaguchi M.	Enhancement of basophil apoptosis by olopatadine and theophylline.	Allergy Asthma Proc.	29	322-8	2008
Kawahata K, Yamaguchi M, Kanda H, Komiya A, Tanaka R, Dohi M, Misaki Y, Yamamoto K.	Severe airflow limitation in two patients with systemic lupus erythematosus: effect of inhalation of anticholinergics.	Mod Rheumatol.	18	52-6	2008
Suzukawa M, Koketsu R, Iikura M, Nakae S, Matsumoto K, Nagase H, Saito H, Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K, Yamaguchi M.	Interleukin-33 enhances adhesion, CD11b expression and survival in human eosinophils.	Lab Invest.	88	1245-53	2008
Suzukawa M, Iikura M, Koketsu R, Nagase H, Tamura C, Komiya A, Nakae S, Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K, Yamaguchi M.	An IL-1 cytokine member, IL-33, induces human basophil activation via its ST2 receptor.	J Immunol.	181	5981-9	2008
Okada Y, Mori M, Yamada R, Suzuki A, Kobayashi K, Kubo M, Nakamura Y, Yamamoto K.	SLC22A4 polymorphism and rheumatoid arthritis susceptibility: a replication study in a Japanese population and a metaanalysis.	J Rheumatol.	35	1723-8	2008
Okiyama N, Kohsaka H, Ueda N, Satoh T, Katayama I, Nishioka K, and Yokozeki H	Seborrhic area erythema as a common skin manifestation in Japanese patients with dermatomyositis.	Dermatology	217(4)	374-377	2008
Matsudaira T, Tsuzuki S, Wada A, Suwa A, Kohsaka H, Tomida M, and Ito Y	Automated microfluidic assay system for autoantibodies causing autoimmune diseases using a photoimmobilized autoantigen microarray	Biotechnology Progress	24(6)	1384-1392	2008
Doi Y, Oki S, Ozawa T, Hohjoh H, Miyake S, Yamamura T.	Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines	Proc. Natl. Acad. Sci. USA	105	8381-8386	2008
Yokote H, Miyake S, Croxford J.L., Oki S, Mizusawa H, Yamamura T.	NKT cell-dependent amelioration of a mouse model of multiple sclerosis by altering gut flora	Am. J. Pathol.	173	1714-1723	2008
Klemann C., Raveney B.J.E, Oki S., Yamamura T.	Retinoid signals and Th17-mediated pathology	日本臨床免疫学会誌			in press
Seta N., Okazaki Y., Kuwana M.	Human circulating monocytes can express receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and differentiate into functional osteoclasts without exogenous stimulation	Immunol Cell Biol	86(5)	453-459	2008

Takahashi,H.,Amagai,M.,Nishikawa,T.,Fuji,Y.,Kawakami,Y.,Kuwana,M.	Novel system evaluating in vivo pathogenicity of desmoglein 3-reactive T-cell clones using murine pemphigus vulgaris	J Immunol	181(2)	1526-1535	2008
Asahi,A.,Nishimoto,T.,Okazaki,Y.,Suzuki,H.,Masaoka,T.,Kawakami,Y.,Ikeda,Y.,Kuwana,M.	Helicobacter pylori eradication shifts monocytes' Fcγ receptor balance toward inhibitory FcγRIIB in immune thrombocytopenic purpura	J Clin Invest	118(8)	2939-2949	2008
Suzuki,S.,Satoh,T.,Sato,S.,Otomo,M.,Hirayama,Y.,Sato,H.,Kawai,M.,Ishihara,T.,Suzuki,N.,Kuwana,M.	Clinical utility of anti-signal recognition particle autoantibody in the differential diagnosis of myopathies	Rheumatology	47(10)	1539-1542	2008
Kawai,M.,Masuda,A.,Kuwana,M.	A CD40-CD154 interaction in tissue fibrosis	Arthritis Rheum	58(11)	3562-3573	2008
Yasuoka,H.,Yamaguchi,Y.,Mizuki,N.,Nishida,T.,Kawakami,Y.,Kuwana,M.	Preferential activation of circulating CD8 ⁺ and γδ T cells in patients with active Behçet's disease and HLA-B*51	Clin Exp Rheumatol	26(4, suppl)	S59-S63	2008
Hoshi,M.,Yasuoka,H.,Kuwana,M.	Estrogen receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic sclerosis	Clin Exp Rheumatol	26(5)	914-917	2008
Seta,N.,Tajima,M.,Kobayashi,S.,Kawakami,Y.,Hashimoto,H.,Kuwana,M.	Autoreactive T-cell responses to myeloperoxidase in patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis and in healthy individuals	Mod Rheumatol	18(6)	593-600	2008
Ogawa,Y.,Shimmura,S.,Kuwana,M.,Yamazaki,K.,Kawakami,Y.,Tsubota,K.	Inflammation and pathologic fibrosis in human ocular chronic graft-versus-host disease	Inflam Regen	28(6)	533-540	2008
Suzuki,S.,Suzuki,N.,Kuwana,M.	Comment on: Clinical utility of anti-signal recognition particle antibody in the differential diagnosis of myopathies: reply (letter)	Rheumatology	48(1)	90-91	2009
Suwa,A.,Hirakata,M.,Kaneko,Y.,Sato,S.,Suzuki,Y.,Kuwana,M.	Successful treatment of refractory polymyositis with the immunosuppressant mizoribine: Case report	Clin Rheumatol	28(2)	227-229	2009
Takahashi,H.,Kuwana,M.,Amagai,M.	A single helper T-cell clone is sufficient to commit polyclonal naive B cells to produce pathogenic IgG in experimental pemphigus vulgaris	J Immunol	182(3)	1740-1745	2009
Kuwana,M.	Autoantibodies to platelets: roles in thrombocytopenia	Inflam Regen	29(1)	40-46	2009
Kuwana,M.,Okazaki,Y.,Ikeda,Y.	Splenic macrophages maintain the anti-platelet autoimmune response via uptake of opsonized platelets in patients with immune thrombocytopenic purpura	J Thromb Haemost	7(2)	322-329	2009
Kawaguchi,Y.,Nakamura,Y.,Matsumoto,I.,Nishimaki,E.,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
Takada,T.,Hirakata,M.,Suwa,A.,Kaneko,Y.,Kuwana,M.,Ishihara,T.,Ikeda,Y.	Clinical and histopathological features of myopathies in Japanese patients with anti-SRP autoantibodies	Mod Rheumatol			in press

Kawaguchi, Y., Ota, Y., Kawamoto, M., Ito, J., Tsuchiya, N., Sugiura, T., Katsumata, Y., Soejima, M., Sato, S., Hasegawa, M., Fujimoto, M., Takehara, K., Kuwana, M., Yamana, H., Hara, M.	Association study of a polymorphism of the CTGF gene and susceptibility to systemic sclerosis in the Japanese population	Ann Rheum Dis				in press
Satoh, T., Pandey, J.P., Okazaki, Y., Asahi, A., Kawakami, Y., Ikeda, Y., Kuwana, M.	Single nucleotide polymorphism of interleukin-1 β associated with Helicobacter pylori infection in immune thrombocytopenic purpura	Tissue Antigens	in press			
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, Koshida 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				in press
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	2008	
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		www.wfs.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, Sato T, 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
Fujita Y, Fujii T, Nakashima R, Tanaka M, Mimori T	Aseptic meningitis in mixed connective tissue disease: cytokine and anti-U1RNP antibodies in cerebrospinal fluids from two different cases	Mod Rheumatol	18(2)	184-188	2008
Jin ZX, Huang CR, Dong L, Goda S, Kawanami T, Sawaki T, Sakai T, Tong XP, Masaki Y, Fukushima T, Tanaka M, Mimori T, Tojo H, Bloom ET, Okazaki T, Umehara H	Impaired TCR signaling through dysfunction of lipid rafts in sphingomyelin synthase 1(SMS1)-knockdown T cells	Int Immunol	20(11)	1427-1437	2008
Kondo T, Inoue H, Usui T, Mimori T, Tomimoto H, Vernino S, Takahashi R.	Autoimmune autonomic ganglionopathy with Sjögren's syndrome: Significance of ganglionic acetylcholine receptor antibody and therapeutic approach.	Auton Neurosci [Epub ahead of print]			2008
Ito Y, Usui T, Kobayashi S, Iguchi M, Ito H, Yoshitomi H, Nakamura T, Yoshifuji H, Nojima T, Ohmura K, Fujii T, Mimori T	$\gamma\delta$ 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)			2009
Senju, S., Haruta, M., Matsunaga, Y., Fukushima, S., Ikeda T., Takahashi, K., Okita, K., Yamanaka, S. and Nishimura, Y.	Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells.	Stem Cells			in press
Fukushima, S., Hirata, S., Motomura, Y., Fukuma, D., Matsunaga, Y., Ikuta, Y., Ikeda, T., Kageshita, T., Ihn, H., Nishimura, Y. and Senju, S.	Multiple antigen-targeted immunotherapy with α -galactosylceramide-loaded and genetically engineered dendritic cells derived from embryonic stem cells.	J.Immunotherapy			in press
Matsunaga, Y., Fukuma, D., Hirata, H., Fukushima, S., Haruta, M., Ikeda, T., Negishi, I., Nishimura, Y. and Senju, S.	Activation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by β 2-microglobulin or TAP1 gene disruption and the introduction of recipient-matched MHC class I gene in allogeneic ES cell-derived dendritic cells.	J.Immunol.	181	6635-6643	2008
Tsakamoto, H., Irie, A., Senju, S., Hatzopoulos, A. K., Wojnowski, L. and Nishimura, Y.	B-Raf-mediated signaling pathway regulates T cell development.	Eur. J. Immunol.	38	518-527	2008

(5) 平成 20 年度班会議プログラム・抄録

厚生労働省難治性疾患克服研究事業
「新たな診断・治療法開発のための免疫学的手法の開発」班

平成20年度 班会議

プログラム・抄録集

主任研究者 小池 隆夫

日時：平成20年 12月 4日(木) 13:30～17:30

場所：北海道大学 学術交流会館 小講堂

8. 「IL-17 産生 NKT 細胞を介した関節炎の制御」 (16:25)

住田 孝之

筑波大学大学院人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻臨床免疫学

9. 「免疫制御性分子を強制発現させたアロ ES 細胞由来の樹状細胞によるアロ移植臓器に対する免疫寛容の誘導に関する研究」 (16:45)

西村 泰治

熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学分野

10. 「関節炎モデルおよび膠原病における IL-17A/F の病態学的意義」 (17:05)

三森 経世 臼井 崇

京都大学大学院医学研究科・臨床免疫学

閉会の辞 (17:25)

自己免疫疾患に関与するユビキチン関連分子の治療に向けた応用

研究分担者 畠山 鎮次
北海道大学大学院医学研究科・教授

A. 研究目的

自己免疫疾患を含む炎症性疾患には、多くのサイトカインが関与していることが知られている。特に腫瘍壊死因子 TNF やインターロイキン-1 や LPS 受容体などの炎症誘発性サイトカインは、NF- κ B という転写因子の活性化を通じてその作用が仲介される。ユビキチン化修飾酵素 A20 は NF- κ B の強力な阻害分子として報告されているが、その作用機序に関しては不明な点が多い。本研究においては、A20 の上流の制御分子及び下流の基質分子を網羅的に同定することで、分子レベルでの NF- κ B シグナルにおける抑制機序を解明する。

B. 方法

酵母ツーハイブリッド法や質量分析計を使った高感度プルダウン法により、A20 結合タンパク質を同定し、A20 の上流の制御分子及び下流の基質分子を網羅的に同定する。さらに A20 関連タンパク質の遺伝子改変マウスもしくはトランスジェニックマウスを作製し、疾患モデルマウスとしての検討を試みる。

C. 結果

ヒト B 細胞株 cDNA ライブラリーより A20 cDNA をクローニングし、その cDNA を bait として酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行ったところ、現在まで機能が未知のタンパク質である Ymer が同定された。Ymer は、これまでに EGF 受容体刺激下でチロシンリン酸化を受けるタンパク質として報告されているのみである。Ymer を細胞内に発現させたところ、A20 との結合が確認された。また、Ymer に対する抗体を作製し、内在性の A20 と Ymer の結合も確認された。また、Ymer はリジン 63 を介したユビキチン鎖を認識し、RIP1 の安定性に影響を及ぼすことが判明した。さらに、 κ B-ルシフェラーゼレポーターにおける転写活性化に対して、Ymer は A20 と共に抑制的に作用することが判明した。

D. 考察

本研究結果は、NF- κ B 経路における制御酵素による免疫系細胞の活性化及び増殖抑制の機序に関して重要な知見と与える。また現在、個体レベルで免疫細胞及び炎症関連細胞における機能を明らかにするために、Ymer の遺伝子破壊マウス及びトランスジェニックマウスを作製し、詳細な解析を進めることが今後重要であると考えられる。

E. 結論

リウマチ性疾患を含む炎症性疾患には、多くのサイトカインが関与していることが知られている。特に腫瘍壊死因子 TNF やインターロイキン-1 や LPS 受容体などの炎症誘発性サイトカインは、NF- κ B という転写因子の活性化を通じてその作用が仲介される。A20 は NF- κ B の強力な阻害分子として報告されているが、本研究において新たな A20 結合タンパク質として Ymer を同定し、生化学的及び細胞生物学的に解析したところ Ymer は NF- κ B シグナルに抑制的に働くことが明らかとなった。

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

東京大学大学院医学系研究科内科学専攻アレルギーリウマチ学 教授

研究協力者 藤尾 圭志、岡村 僚久

東京大学医学部附属病院アレルギーリウマチ内科

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 T 細胞を同定した。本研究では CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の IL-10 産生機序を検討した。

B. 方法

アナジ-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 細胞への導入実験を試みた。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。Egr-2 遺伝子導入実験により発現が亢進したマーカーを用いて、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。

C. 結果

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。Egr-2 遺伝子導入 CD4 陽性 T 細胞で抑制性分子 IL-10, LAG-3 の発現の亢進を認めた。LAG-3 をマーカーとして検討したところ、Egr-2 遺伝子を高発現する 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 CD45RB 高発現 CD4 陽性 T 細胞は、IL-10, LAG3, Blimp1 を高発現し CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞と全く異なる遺伝子発現プロファイルであった。さらに機能的 Foxp3 欠損 Scurfy マウスにおいて、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 細胞の IL-10 産生には Egr-2 と Blimp1 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。T 細胞特異的 Blimp1 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おり、今後 Blimp1 プロモーターの解析や T 細胞特異的 Blimp1 欠損マウスの解析により、Egr-2 による Blimp1 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。

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

研究分担者 上阪 等

東京医科歯科大学大学院 膠原病・リウマチ内科 准教授

研究協力者 沖山 奈緒子

同 膠原病・リウマチ内科、皮膚科 学振特別研究員

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。そこで、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、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. 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TNF α 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、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、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。

C. 結果

- 1) CIM養子移入系では、レシピエントへのIL-1またはTNF α 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。ただし、抗CD40抗体・poly (I:C)・百日咳毒素・CFAとともに免疫した場合には、このペプチド提示EL-4細胞への細胞傷害活性は、リンパ節細胞または脾臓細胞にて認められた。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TNF α 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またはTNF α 標的療法が特に有効であったのは、IL-1やTNF α が、筋芽細胞のMHC class I発現を上げることが関与していると考えられる。
- 2) C蛋白第2断片のうち、MHC class Iエピトープ候補にて、筋炎を発症させることに成功した。CIMマウスにおいて、このエピトープが細胞傷害性T細胞を誘導しているのかについて、さらなる検討が必要である。

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、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TNF α 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。

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

研究分担者氏名 桑名 正隆
慶應義塾大学医学部内科 准教授

A. 研究目的

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が、その相関は必ずしも強くない。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 SLE 患者末梢血中の抗 dsDNA 抗体産生細胞を定量化することにより、診断や疾患活動性の評価に有用かどうかを検討することを目的とした。また、活動期に抗 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. 方法

SLE 患者 130 例、疾患対照患者 40 例 (関節リウマチ 32 例、原発性 Sjögren 症候群 6 例、強皮症 2 例)、健康人 18 例を対象とした。末梢血抗 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 96 穴プレートの各ウェルに末梢血単核球を 2.5×10^4 個ずつ加えて 4 時間培養し、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。同時に血清 IgG 抗 dsDNA 抗体価を ELISA により測定した。SLE 患者では各種臨床症状を歴史的に調査した。また、末梢血単核球より CD19 又は CD138 陽性細胞を除去することで、末梢血中の抗 dsDNA 抗体産生細胞を同定した。さらに、B 細胞上に発現するケモカインレセプター (CXCR3・CXCR4・CXCR5・CCR7) の発現強度をフローサイトメトリーで評価し、末梢血 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 B 細胞に対する走化性を調べた。

C. 結果

末梢血中の抗 dsDNA 抗体産生細胞は SLE 患者 29 例 (22.3%) にもみ検出され、SLE に対する特異度が高かった。SLE 患者で末梢血中に存在する抗 dsDNA 抗体産生細胞は CD19 陽性 B 細胞であった。SLE 患者を抗 dsDNA 抗体産生 B 細胞の有無で層別化すると、その存在は持続性蛋白尿と SLEDAI 高値と強く相関した ($p < 0.001, 0.004$)。SLE における抗 dsDNA 抗体産生 B 細胞数と IgG 抗 dsDNA 抗体価の相関は弱く ($R^2 = 0.19, p = 0.026$)、IgG 抗 dsDNA 抗体陽性例のうちわずか 29.2% で抗 dsDNA 抗体産生 B 細胞が検出された。一方、抗 dsDNA 抗体産生 B 細胞は IgG 抗 dsDNA 抗体陰性の全例で検出されなかった。IgG 抗 dsDNA 抗体高値陽性例 (> 400 IU/mL) で抗 dsDNA 抗体産生 B 細胞が検出されない症例があり、それらはいずれも活動性が低かった。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 の発現が強かった ($p = 0.047$)。また、抗 dsDNA 抗体産生 B 細胞陽性例由来の末梢血 B 細胞は 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 患者においてその活動期に末梢血抗 dsDNA 抗体産生 B 細胞が出現し、その検出は IgG 抗 dsDNA 抗体価より活動性評価に有用である可能性が示された。CXCR4/SDF-1 相互作用により末梢血中に動員された抗 dsDNA 抗体産生 B 細胞は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。

E. 結論

末梢血中の抗 dsDNA 抗体産生 B 細胞の測定は疾患活動性の評価に有用な新たなマーカーとなる可能性がある。また、活動期 SLE で末梢血中に抗 dsDNA 抗体産生細胞が動員される機序の追究は SLE 病態の解析や新たな治療の開発に有用と考えられた。

抗プロトロンビン自己抗体による向血栓細胞活性化のメカニズム

分担研究者 渥美 達也

北海道大学大学院医学研究科内科学講座・第二内科 講師

研究協力者 奥 健志

北海道大学大学院医学研究科内科学講座・第二内科

A. 研究目的

抗リン脂質抗体症候群 (APS) は血栓傾向を主症状とする自己免疫疾患である。抗リン脂質抗体の主要な対応抗原は β 2-グロブリン I とプロトロンビンであり、とりわけ抗プロトロンビン抗体は *in vitro* で抗凝固活性を示すループスアンチコアグラントの責任抗体であるとされる。分担研究者は、ホスファチジルセリンに結合したプロトロンビンを認識する「ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体 (aPS/PT)」が血栓症の存在と強く相関し、真の血栓原性抗体である可能性を示してきた。本研究では、そのメカニズムを向血栓細胞内のシグナル伝達分子と、それに関連する細胞表面分子の役割をメインに詳細に検討した。

B. 研究方法

231D は APS 患者にみられる aPS/PT 自己抗体と共通した性質をもつモノクローナル抗体である。単球系細胞株である RAW264.7 と 231D との反応性を、組織因子 mRNA 発現で検討した。単球における MAPK の活性化を Proteome Profiler で検討し、その結果から p38 の活性化を cellular signaling enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) を用いて定量した。そして、組織因子 (TF) mRNA の発現をリアルタイム PCR を用いて検討し、p38 阻害剤の効果も検討した。次に、培養内皮細胞を用いて、同様に組織因子、各種接着因子の発現に与える aPS/PT の機能を詳細に検討した。

C. 研究結果

231D はプロトロンビンとカルシウム (2.5mM) の存在下でのみ単球系細胞と強く結合した。単球系細胞をプロトロンビンの存在下と非存在下で 231D で処理すると、プロトロンビンの存在下で処理した細胞にのみ組織因子 mRNA が強く誘導された。231D の処理によって単球内の p38-MAPK のリン酸化が強力におこり、そして組織因子の発現は p38-MAPK の阻害薬によって抑制された。内皮細胞において、231D は E-セレクチン、VCAM-1 の発現の誘導、および単球と同様に組織因子を誘導し、p-38MAPK 阻害剤でその効果は減弱したものの、内皮細胞の反応は単球のそれに比べると一般に弱かった。

D. 考察

これまでの検討で、通常はトロンビン生成を抑制する (すなわちループスアンチコアグラント活性をもつ) モノクローナル aPS/PT である 231D が、条件によってはプロトロンビナーゼによるトロンビン生成を増強することが示してきた。今回さらに 231D が直接向血栓細胞に対応抗原であるプロトロンビンを介して結合し、p38-MAPK を介して刺激的に作用して組織因子を誘導し、血栓傾向となると考える。これらの分子は抗カルジオリピン抗体によるものと共通であり、APS の血栓傾向と直接関与する可能性が高い。

E. 結論

APS 患者において、向血栓細胞の活性化がキー・イベントであり、それには共通の特定のシグナル伝達物質のリン酸化が必須であることがわかったので、APS の特異的治療開発の糸口になる可能性が考えられた。