

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
分担研究報告書

新規 TNF α 誘導性蛋白 TIARP/STEAP4 の自己免疫性関節炎における役割に関する研究

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

関節リウマチ(RA)の治療において TNF α をターゲットとした治療が劇的な効果をもたらしているが、その作用メカニズムに関しての詳細は未だ不明である。Glucose-6-phosphate isomerase (GPI) 誘導関節炎では発症後でも抗 TNF α 抗体を投与することにより関節炎が治癒し、抗 IL-6 受容体抗体や CTLA-4Ig など他の生物学的製剤の治療的反応性も RA に近似している。我々はこのモデルマウスを用いて、関節炎初期に過剰発現している Tumor necrosis factor alpha-induced adipose-related protein (TIARP) 分子を Genechip により見出した。本研究では TIARP, 及びヒト ortholog である six-transmembrane epithelial antigen of the prostate-4 (STEAP4) の関節炎発症における役割を検討した。

B. 研究方法

- 1) GPI 誘導関節炎における 脾臓での TIARP 発現変動を定量 PCR 法及びウエスタンブロット法で解析した。また、関節炎マウス脾細胞における TIARP mRNA 発現細胞の同定を試み、抗 TNF α 抗体投与による TIARP 変動を確認した。
- 2) 上記同様に関節での TIARP 変動を確認し、免疫組織化学染色で TIARP の局在を検討した。
- 3) ヒト ortholog STEAP4 の末梢血 (RA, 健常人)、RA 関節滑膜での STEAP ファミリー分子 (STEAP2, 3, 4) の発現を半定量 RT-PCR にて比較した。また、RA 及び変形性関節症 (OA) 滑膜での STEAP4 発現を定量 PCR で比較し、RA, OA 滑膜での STEAP4 局在を蛍光免疫組織化学

染色で比較検討した。

- 4) RA 滑膜由来 MH7A 細胞株に TNF α を投与し (2ng/ml)、STEAP4 の発現を蛋白レベルで解析した。MH7A にプラスミドベクターを用いて STEAP4 を過剰発現、また siRNA により STEAP4 の発現を抑制し、IL-6 mRNA 発現への影響を検討した。

(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) TIARP mRNA および蛋白は関節炎発症初期の脾臓で強発現し、中でも CD11b⁺細胞で強く、抗 TNF α 抗体投与により発現が激減した。
- 2) 一方関節での発現は関節腫脹に伴って増加し、免疫組織化学染色では増殖滑膜組織に強く局在していた。
- 3) ヒトの解析において STEAP4 が STEAP ファミリー分子の中で特異的に関節滑膜組織に強発現し、RA 滑膜における STEAP4 発現は OA の発現と比較し有意差は確認されなかった。
- 4) 免疫組織化学染色で RA 患者 CD68⁺滑膜細胞に局在していたが、OA 患者では滑膜線維芽細胞に発現が強く認められた。MH7A を TNF α 刺激すると STEAP4 蛋白の発現亢進が観察された。また、滑膜細胞にベクター導入で STEAP4 を過剰発現させると IL-6 産生が抑制され、逆に siRNA による STEAP4 抑制により IL-6 mRNA の発現が亢進した ($p < 0.05$)。

D. 考察 E. 結論

TIARP は脾臓にて関節炎初期に誘導され、CD11b⁺細胞に過剰発現し、関節滑膜では腫脹とともに増強した。

ヒト STEAP 4 は関節滑膜に局在し、TNF α 刺激で発現が誘導され、IL-6 の発現を調節している可能性が示され、RA の病態に関与する”新たな関節炎制御分子”である可能性が示唆された。

G.研究発表

論文発表

1. Segawa S, Goto D, Yoshiga Y, Sugihara M, Hayashi T, Chino Y, Matsumoto I, Ito S, Sumida T. Inhibition of transforming growth factor- β signaling attenuates IL-18 plus IL-2-induced interstitial lung disease in mice. Clin. Exp. Immunol. in press
2. Umeda N, Ito S, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Sumida T. A patient with rheumatoid arthritis who had a normal delivery under etanercept treatment. Intern. Med in press
3. Iwanami K, Matsumoto I, Yoshiga Y, Inoue A, Kondo Y, Yamamoto K, Tanaka Y, Minami R, Hayashi T, Goto D, Ito S, Nishimura Y, Sumida T. Altered peptide ligands inhibit arthritis induced by glucose-6-phosphate isomerase peptide. Arthritis Res Ther. 11:R167, 2009
4. Ito I, Kawasaki A, Ito S, Kondo Y, Sugihara M, Horikoshi M, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Takasaki Y, Hashimoto H, Matsuta K, Sumida T, Tsuchiya N. Replication of association between *FAM167A(C8orf13)*-*BLK* region and rheumatoid arthritis in a Japanese population. Ann Rheum Dis. in press
5. Inoue A, Matsumoto I, Tanaka Y, Iwanami K, Kanamori A, Ochiai N, Goto D, Ito S, Sumida T. Tumor necrosis factor alpha-induced adipose-related protein expression in experimental arthritis and in rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther. 11:R118, 2009
6. Wang Y, Ito S, Chino Y, Goto D, Matsumoto I, Murata H, Tsutsumi A, Hayashi T, Uchida K, Usui J, Yamagata K, Sumida T. Laser Microdissection-based Analysis of Cytokine Balance in the Kidneys of Patients with Lupus Nephritis. Clin. Exp. Immunol. (in press)
7. Segawa S, Goto D, Yoshiga Y, Hayashi T, Matsumoto I, Ito S, Sumida T. Low levels of soluble CD1d protein alters NKT cell function in patients with rheumatoid arthritis. Int. J. Mol. Med. 24: 481-486, 2009
8. 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. 68:710-714,2009
9. Tsutsumi A, Kobayashi T, Ito S, Goto D, Matsumoto I, Yoshie H, Sumida T. Mannose binding lectin gene polymorphisms and the severity of chronic periodontitis. Jap.J.Clin.Immunol 32:48-52,2009
10. Horikoshi M, Ito S, Ishikawa M, Umeda N, Kondo Y, Tsuboi H, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Sumida T. Efficacy of mizoribine pulse therapy in patients with rheumatoid arthritis who show reduced or insufficient response to infliximab. Mod Rheumatol 19:229-234, 2009
11. Suzuki T, Ito S, Handa S, Kose K, Okamoto Y, Minami M, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Sumida T. A new low-field extremity magnetic resonance imaging and proposed compact MRI score- Evaluation of anti-tumor necrosis factor biologics on rheumatoid arthritis. Mod Rheumatol 19:358-365, 2009
12. Kondo Y, Ito S, Ohi Y, Satou H, Hiraoka T, Tsuboi H, Sugihara M, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Sumida T. A case of atypical Cogan's Syndrome with aortitis. Intern. Med 48:1093-1097,2009
13. Wakamatsu E, Matsumoto I, Yoshiga Y, Hayashi T, Goto D, Ito S, Sumida T. Altered peptide ligands regulate type II collagen-induced arthritis in mice. Mod Rheumatol 19:366-371, 2009
14. 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. 155: 285-294, 2009
15. Ito I, Kawasaki A, Ito S, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Hom G, Graham RR, Takasaki Y, Hashimoto H, Ohashi J, Behrens TW, Sumida T, Tsuchiya N. Replication of the Association between C8orf13-BLK Region and Systemic Lupus Erythematosus in a Japanese Population. Arthritis Rheum. 60:553-558, 2009

著書

1. 松本功 免疫グロブリン・補体・免疫複合体リウマチ・膠原病内科 クリニカルスタンダード 2009 in press
2. 松本功 関節炎における自己抗体の病因的意義 最新医学 in press
3. 松本功 生物学的製剤の開始を考慮するときの

留意事項 日本内科学会雑誌 98:2518-2523, 2009

4. 松本功 新規関節リウマチ治療薬開発における動物モデルの有用性 リウマチ科 42: 574-581, 2009
5. 松本功 抗 GPI 抗体は関節リウマチの病態に
関与しているか? 分子リウマチ治療 2(3)
105-109, 2009
6. 松本功、岩波慶一 GPI 誘導性関節炎における
IL-6/IL-17 の役割 Frontiers in
Rheumatology & Clinical Immunology 3:82-86,
2009
7. 井上明日香、松本功、岩波慶一、田中陽子、住
田孝之 TNF α 依存性関節炎モデル (GPI 誘導
性関節炎)における TNF α -induced adipose
related protein (TIARP) 日本臨床免疫学会
雑誌 32:15-19, 2009
8. 松本功、岩波慶一 自己免疫性関節炎における
IL-6/IL-17 の役割 リウマチ科 41:96-103,
2009

特許

特願 2008-022714 号 “関節炎誘発ペプチド”

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業研究事業）
分担研究報告書

E3 ユビキチンリガーゼ c-MIR の抗炎症効果による関節炎治療に関する研究

研究分担者 上阪 等 東京医科歯科大学大学院 膠原病・リウマチ内科学（准教授）
研究協力者 豊本 雅靖 東京医科歯科大学大学院 膠原病・リウマチ内科学

研究要旨

関節リウマチ（RA）治療で使用される免疫抑制薬は、抗炎症効果ももたすため、大きな治療効果を期待できる。そこで我々は免疫抑制分子「E3 ユビキチンリガーゼ c-MIR」に着目した。c-MIR は、RA 発症に重要とされる MHC class II や CD86 の発現を減少させることが知られている。我々は、c-MIR が自己免疫病の治療標的分子になりうるとの仮説を立て、RA モデル動物である II 型コラーゲン誘導関節炎モデルマウス（CIA）において、アデノウイルスベクターの移入による c-MIR 遺伝子治療を行った。この遺伝子治療は、CIA において全身性の免疫抑制が見られないにもかかわらず、c-MIR 発現アデノウイルスベクター移入部の関節炎が抑制され、局所治療効果が見られた。そこで、今年度はその治療効果をもたらすメカニズムを *in vitro* で検討した。様々な細胞における検討により、c-MIR 強制発現は IL-6 や TNF- α の分泌を抑制することが明らかとなった。さらに、その分泌抑制は、転写後制御の影響であり、同時に分泌される IL-1 β や IL-10 は抑制しなかった。したがって、関節局所での c-MIR 強制発現による CIA 治療効果は、c-MIR の強制発現が、IL-6 や TNF- α の産生を抑制したことによると考えられる。また、c-MIR の機能として、IL-6 や TNF- α 特異的に分泌抑制することを報告した例はなく、以上の結果は c-MIR の新機能を発見したと考えられる。

A. 研究目的

E3 ユビキチンリガーゼ c-MIR の炎症局所における発現誘導は、局所的な関節炎治療効果をもたらす。しかし、その治療効果をもたらすメカニズムについては未知である。したがって、そのメカニズムを明らかにし、関節リウマチ（RA）の新規治療法開発へとつなげる。

B. 研究方法

1. 滑膜線維芽細胞のサイトカイン産生に対する c-MIR 強制発現の影響の検討

CIA マウス関節組織由来滑膜線維芽細胞（FLS）に組換え c-MIR アデノウイルスやコントロール LacZ ウイルスを感染させた。その後、TNF- α や IL-1 β で刺激し、培養上清の IL-6 濃度を ELISA で測定した。さらに、IL-6 mRNA 発現量を比較した。

2. マクロファージにおける c-MIR 強制発現の影響の検討

c-MIR トランスジェニックマウス（Tg）および正常マウス（WT）由来骨髄マクロファージ（BMM）を分化誘導した。c-MIR トランスジェニックマ

ウスの c-MIR トランスジーンは、インバリアント鎖のプロモーターで発現するように組み込まれており、IFN- γ 刺激によって MHC class II の発現を誘導することで、c-MIR トランスジーンを発現させることができる。したがって、BMM は、IFN- γ 刺激を行って、c-MIR トランスジーンを強制発現させ、その後、LPS 刺激を行って、培養上清に分泌される TNF- α や IL-6、IL-1 β の濃度を ELISA で測定した。

3. 樹状細胞のサイトカイン産生に対する c-MIR 強制発現の影響の検討

c-MIR Tg や WT 由来の骨髄樹状細胞（BMDC）を分化誘導した。BMDC は、分化誘導時に MHC class II を発現しており、Tg 由来の BMDC は、同時に c-MIR トランスジーンも発現する。したがって、BMDC は、分化誘導後すぐに LPS 刺激を行い、培養上清に分泌される TNF- α や IL-6、IL-10 の濃度を ELISA で測定した。さらに、TNF- α や IL-6 の mRNA 発現量を比較した。

（倫理面への配慮）

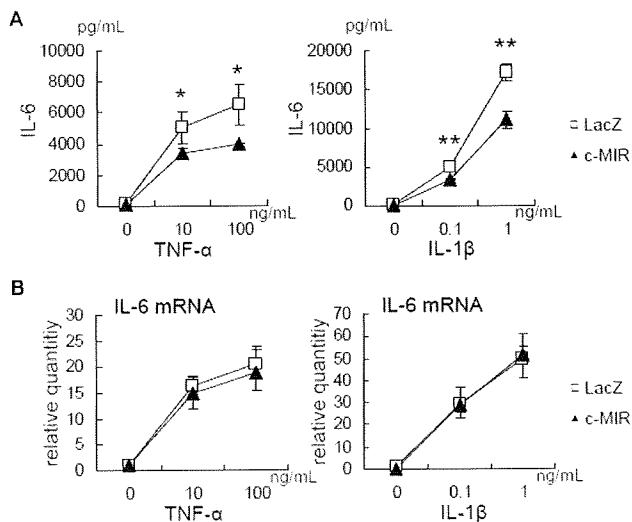
実験は「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（平成 18 年文部科学省告示第 71 号）」に則って行った。

C. 研究結果

1. 滑膜線維芽細胞のサイトカイン産生に対する c-MIR 強制発現の影響の検討

FLS を TNF- α や IL-1 β で刺激したときの IL-6 産生は、c-MIR 強制発現によって低下した (Fig. 1A)。しかし、IL-6 mRNA 発現レベルは、差がなかった (Fig. 1B)。

Fig. 1



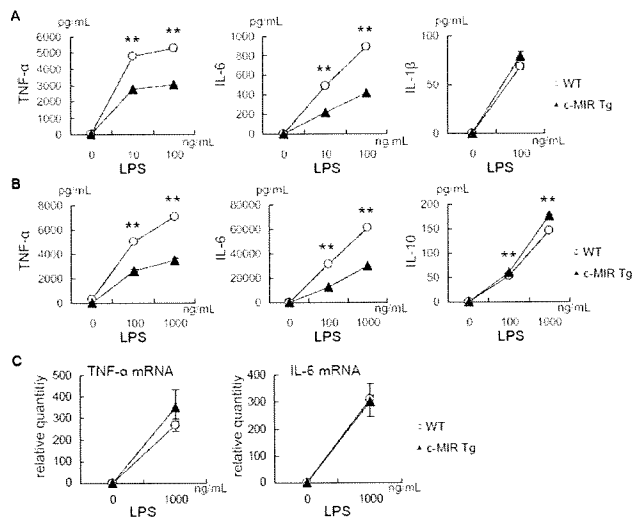
2. マクロファージのサイトカイン産生における c-MIR 強制発現の影響の検討

BMM を LPS で刺激したときの TNF- α と IL-6 の産生は、c-MIR Tg 由来 BMM で低下した。しかし、IL-1 β 産生に差はなかった (Fig. 2A)。TNF- α や IL-6 の mRNA レベルについても解析を行ったが、IFN- γ 刺激による人為的な影響が見られたため、現在その問題を回避する実験系での解析を進めている。

3. 樹状細胞のサイトカイン産生に対する c-MIR 強制発現の影響の検討

BMDC における TNF- α や IL-6 の産生は、c-MIR Tg 由来 BMDC で低下した。しかし IL-10 産生は低下しなかった (Fig. 2B)。TNF- α や IL-6 の mRNA レベルは同程度だった (Fig. 2C)。

Fig. 2



D. 考察

関節局所での c-MIR 強制発現による CIA 治療効果は、c-MIR の過剰発現が、IL-6 や TNF- α の産生を抑制することで関節炎を改善したと考えられる。

c-MIR 強制発現による IL-6 や TNF- α の分泌抑制は、LPS 刺激で同時に産生される IL-1 β や IL-10 の産生が抑制されないことから、サイトカイン産生全般を抑制したものではないと考えられる。また、これまで知られている c-MIR のユビキチン化標的分子は、MHC class II や CD86 であり、これらは膜貫通型の表面分子である。当初、c-MIR の強制発現による IL-6 や TNF- α の産生低下は、受容体の発現低下によるものではないかと予想していた。しかし、特定のサイトカイン産生のみ抑制されていること、その mRNA 発現レベルに c-MIR の影響がみられないことから、表面受容体の機能低下を招いた結果ではないと考えられた。つまり、IL-6 と TNF- α という特定のサイトカインの産生を転写後制御で抑制したといえる。

以上の結果は、これまで c-MIR について報告されたことのない現象であり、これまで知られていなかった c-MIR の新機能であると考えられる。今後、この IL-6、TNF- α 分泌抑制の分子メカニズムを解析していくことで、c-MIR 強制発現による関節リウマチ新規治療戦略に分子レベルでの説明を加えることができるだろう。

E. 結論

関節滑膜での c-MIR 遺伝子発現誘導は、IL-6 や TNF- α の分泌抑制による抗炎症効果をもたらす

し、関節炎の改善を期待できる。これはRAの新規治療戦略になり得ると考えられる。また、IL-6やTNF- α の分泌抑制メカニズムは、転写後制御によるものであり、c-MIRの新機能を発見したといえる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nonomura Y, Mizoguchi F, Suzuki A, Nanki T, Kato H, Miyasaka N, Kohsaka H.
Hypoxia-induced abrogation of contact-dependent inhibition of rheumatoid arthritis synovial fibroblast proliferation. J Rheumatol. 2009;36(4):698-705.

Murakami Y, Akahoshi T, Aoki N, Toyomoto M, Miyasaka N, Kohsaka H.
Intervention of an inflammation amplifier, triggering receptor expressed on myeloid cells 1, for treatment of autoimmune arthritis. Arthritis Rheum. 2009;60(6):1615-1623.

2. 学会発表

Masayasu Toyomoto, Satoshi Ishido, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka
"Treatment of arthritis by anti-inflammatory effect of E3 ubiquitin ligase, c-MIR"
第39回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、2009年12月 口頭発表

Masayasu Toyomoto, Satoshi Ishido, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka
"Treatment of arthritis by anti-inflammatory effect of E3 ubiquitin ligase, c-MIR"
アメリカリウマチ学会 73rd Annual Scientific Meeting、アメリカ・フィラデルフィア、2009年10月 ポスター発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

c-MIRを利用したCD40の発現調節、及びそのスクリーニング方法 (出願番号: 2007-146706)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
分担研究報告書

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）

分担研究者 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 Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School

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。Ras-guanyl releasing protein 4 (RasGRP4) はマスト細胞に発現するが、末梢血単核球 (PBMCs) における発現も知られている。今回の検討で、RasGRP4 は末梢血において CD14 陽性単球に高発現し、関節リウマチ (RA) 滑膜では CD68 陽性細胞に高発現していることを明らかにした。RA 患者末梢血においては健常人と比較して RasGRP4 転写産物が高発現しているが、一方蛋白レベルでの発現は低かった。RasGRP4 転写産物の質的検討において 12 種の新規スプライスバリエーションを認め、スプライス異常を有する頻度は RA 患者において健常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

健常人末梢血における RasGRP4 発現細胞の同定；健常人 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、さらに TNF- α , IL-6 などのサイトカイン刺激を加えたのち、RasGRP4 蛋白レベルを評価した。

RA 患者末梢血における RasGRP4 蛋白発現；

RA 患者および健常人由来の末梢血 CD14 陽性細胞を単離後、上記ポリクローナル抗体によるウエスタンブロットティング法を用いて RasGRP4 蛋白レベルを評価した。

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受けた RA 患者より同意の下に切除滑膜を得、上記抗 RasGRP4 抗体、抗 Kit 抗体および抗 CD68 抗体を用いた組織染色を行った。

RA 患者 PBMC における RasGRP4 転写産物の量的、質的検討；

次に、文書による同意を得た健常人 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、一部の健常人および RA 患者について全長 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クローンの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 細胞では低値であった(Figs. 1,2)。

Fig.1 末梢血単球・T細胞における RasGRP4発現

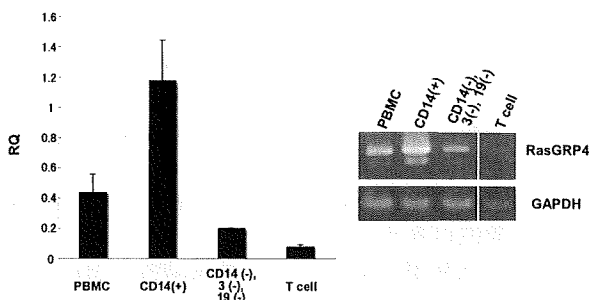
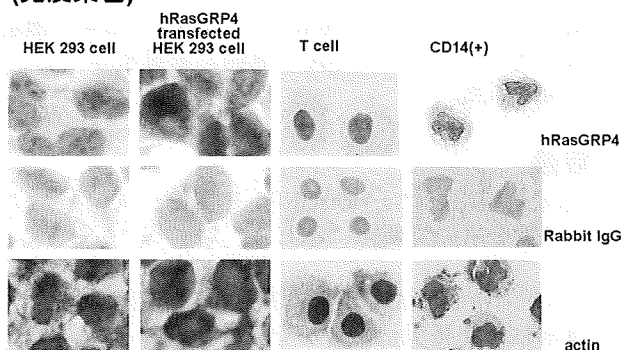


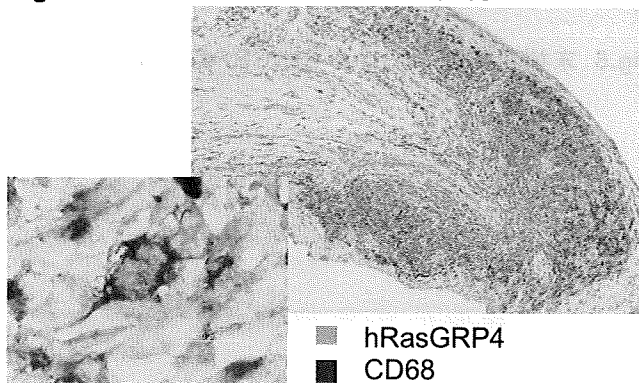
Fig.2 RA 末梢血における RasGRP4 の蛋白発現 (免疫染色)



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

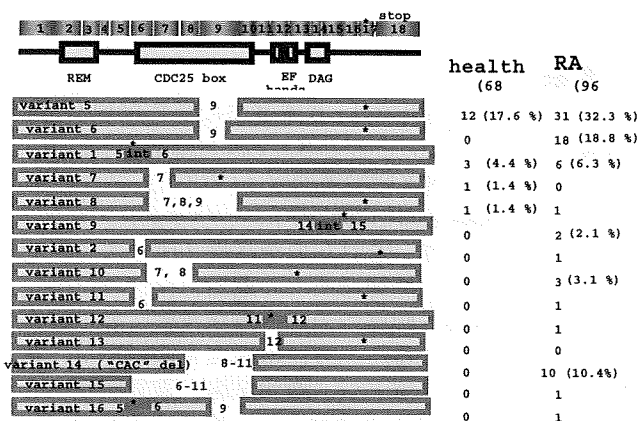
同時に発現しており、単球系細胞における RasGRP4 蛋白の発現が示された (Fig. 3)。

Fig.3 RA 滑膜における RasGRP4 の発現



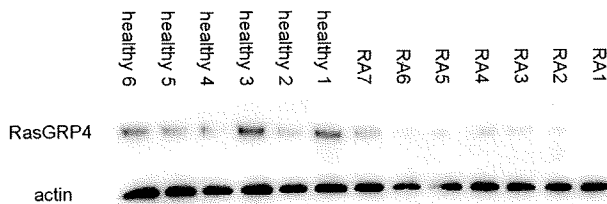
RA 患者 PBMC における RasGRP4 発現の量的、質的検討-PBMC における RasGRP4 発現は、real-time PCR による定量評価では RA 患者において優位に発現が高かった ($p=0.027$)。RA 患者および健康人サンプルからサイズの異なる 12 種の新規スプライスバリエントが検出され、その頻度は優位に RA 患者で高かった (健康人 23.5%, RA 54.1%, $p=0.0004$) (Fig. 4)。Exon 9 全体を欠損する RasGRP4 スプライスバリエント 5、exon 9 の 5'側 207 塩基を欠損するスプライスバリエント 6 の頻度が高く、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と比較して PBMC における RasGRP4 の発現量が優位に高かった ($p=0.02$)。一方、スプライスバリエントの有無と疾患活動性との間に有意な相関はなかった。

Fig.4 RA 患者末梢血における RasGRP4 のスプライス異常



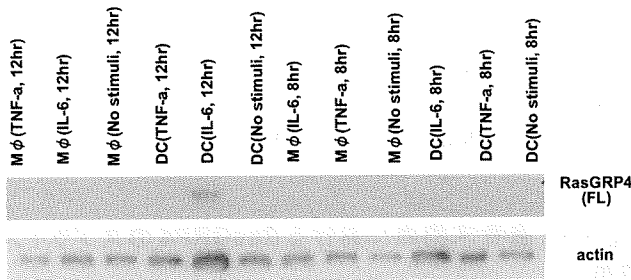
ウェスタンブロット方にて検討した末梢血単球における RasGRP4 発現は、健常人と比較して RA 患者では低値であった (Fig. 5)。また、スプライスバリエーションに相当するようなサイズの異なるバンドは、少なくとも検出感度以下であった。

Fig.5 末梢血単球における RasGRP4 の蛋白発現



in vitro で作成したマクロファージおよび樹状細胞 (DC) を TNF- α , IL-6 で刺激後に、RasGRP4 蛋白レベルを検討したところ、DC を IL-6 で刺激した際に RasGRP4 蛋白の発現が明らかとなった (Fig. 6)。

Fig.6 マクロファージ・樹状細胞における RasGRP4 蛋白の発現 (サイトカイン刺激による影響)



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- α , 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- α , TGF- β 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- α , 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、マスト細胞および PBMC 分画に発現するとされる 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。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 mRNA の発現量が高く、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。RA 患者では RasGRP4 の mRNA が高発現していることに反して蛋白レベルでは低発現であることも、この仮説に矛盾しないと考える。

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、少なくともこれまでの検討からは、バリエーション自体は転写後調整をうけている可能性が高い。スプライスバリエーションに相当する mRNA は、正常 RasGRP4 の発現を負に調整している可能性が考えられる。

末梢血で低発現である一方で滑膜局所における発現を認める点に関しては、検出法による感度の違いも考慮すべきであるが、IL-6 を代表とする炎症性サイトカインによって発現が調整されている可能性が考えられた。

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 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が、タンパク量としてはむしろ低発現であった。
3. RA 滑膜では単球系細胞に RasGRP4 の発現を認め、同分子の局所における発現はサイトカインのコントロールをうけていることが示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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.* 2009; 68(6): 1030-1035

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.* 2009;68(8): 1366-1367

Nakagawa H, Yasuda S, Matsuura E, Kobayashi K, Ieko M, Kataoka H, Horita T, Atsumi T, Koike T. Nicked β 2-glycoprotein I binds angiostatin 4.5 (plasminogen kringle 1-5) and attenuates its antiangiogenic property. *Blood.* 2009; 114(12):2553-2559

Sakai Y, Atsumi T, Ieko M, Amengual O, Furukawa S, Furusaki A, Bohgaki M, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Koike T. The effects of phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody on thrombin generation. *Arthritis Rheum.* 2009;60(8):2457-2467

Yamada H, Atsumi T, Kobashi G, Ota C, Kato EH, Tsuruga N, Ohta K, Yasuda S, Koike T, Minakami H. Antiphospholipid antibodies increase the risk of pregnancy-induced hypertension and adverse pregnancy outcomes. *J Reprod Immunol.* 2009;79: 188-195

Bohgaki T, Atsumi T, Bohgaki M, Furusaki A, Kondo M, Sato-Matsumura KC, Abe R, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Amasaki Y, Nishio M, Sawada K, Shimizu H, Koike T. Immunological reconstitution after autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with systemic sclerosis: relationship between clinical benefits and intensity of immunosuppression. *J Rheumatol.* 2009;36(6): 1240-8.

Bohgaki M, Matsumoto M, Atsumi T, Kondo T, Yasuda S, Horita T, Nakayama KI, Okumura F,

Hatakeyama S, Koike T. Plasma gelsolin facilitates interaction between beta(2) glycoprotein I and alpha5beta1 integrin. *J Cell Mol Med.* 2009 in press

H. 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

多発性硬化症における Mucosal Associated Invariant T 細胞に関する研究

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）
研究協力者 宮崎雄生 国立精神・神経センター 神経研究所 免疫研究部（流動研究員）

研究要旨

新規 Natural Killer T (NKT)細胞集団である Mucosal Associated Invariant T (MAIT)細胞の多発性硬化症 (MS) における役割を検討した。MS 患者末梢血中では MAIT 細胞の頻度が減少しており、その頻度は MS の疾患活動性を反映していた。加えて、健常者においては MAIT 細胞の頻度と CD4⁺NKT 細胞、CD56^{bright}Natural Killer 細胞の頻度との間に正の相関関係が見られたが、MS 患者ではこの相関は確認できず、MAIT 細胞はこれら免疫制御細胞とシステムを形成し免疫制御を行っていること、および MS においてこのシステムに乱れが存在する可能性が示唆された。さらに、末梢血単核細胞より MAIT 細胞を除去すると phytohemagglutinin 刺激に対する interferon (IFN)- γ 産生が増強したことから、MAIT 細胞は T 細胞からの IFN- γ 産生を抑制していると考えられた。以上より、MAIT 細胞は MS の病態抑制に関与する重要な細胞集団であると考えられた。

A. 研究目的

Mucosal Associated Invariant T (MAIT)細胞はヒト CD4/8 double negative T 細胞の解析中に V α 24 Natural Killer T (NKT) 細胞とは異なるインバリアント T 細胞抗原受容体 (TCR) (V α 7.2-J α 33) を発現する細胞集団として同定された¹⁾。MAIT 細胞は MHC class Ib 分子に属する MR1 に拘束され、腸管粘膜に多く分布し、その分化、増殖に B 細胞および常在細菌叢を必要とするなど特異な T 細胞集団である^{2,3)}。われわれは MAIT 細胞が実験的自己免疫性脳脊髄炎において疾患抑制作用を持つこと⁴⁾、多発性硬化症(Multiple Sclerosis: MS)の病巣部に MAIT 細胞が存在すること⁵⁾を報告しているが、MS における MAIT 細胞の詳細な役割は不明である。本研究の目的は MS の病態における MAIT 細胞の役割を明らかにすることである。

B. 研究方法

対象は 13 名の健常者、および 26 名（寛解期 22 名、再発期 4 名）の MS 患者である。末梢血単核細胞を分離の後、MAIT 細胞の頻度、表面抗原をフローサイトメーターで解析した。MAIT 細胞は Martin らの報告⁶⁾に従い V α 7.2⁺CD161^{high} の $\alpha\beta$ T 細胞集団と定義した。加えて、MAIT 細胞の頻度と V α 24NKT 細胞、Natural

Killer (NK)細胞、およびそれらのサブポピュレーションの頻度との相関関係を解析した。さらに、精製した MAIT 細胞や、MAIT 細胞を除去した末梢血単核細胞の各種刺激に対するサイトカイン産生を解析した。

(倫理面への配慮)

対象より血液サンプル採取は、文書を用いて説明し、同意を得た上で行った。その他個人情報の管理を含めて国立精神・神経センターの倫理規定に従った。

C. 研究結果

末梢血 $\alpha\beta$ T 細胞に占める MAIT 細胞の頻度の平均は健常者で 3.92%、寛解期 MS 患者で 2.32%、再発期 MS 患者で 0.73%であり、MS 患者では再発期、寛解期とも健常者と比べ有意に低値であった。また、MAIT 細胞の頻度は MS の疾患活動性が高い患者でより低値であり、同一患者の再発期と寛解期を比較すると、再発期でより低値であった。加えて、健常者では MAIT 細胞の頻度と CD4⁺NKT 細胞、CD56^{bright}NK 細胞の頻度との間に正の相関が見られたが、MS 患者ではこの相関は確認できなかった。MAIT 細胞は CCR5, CCR6, α 4 β 7 インテグリンを高発現していた。末梢血単核細胞より MAIT 細胞を除去すると、phytohemagglutinin に対する Interferon (IFN)- γ 産生の亢進が見られた。一

方で、MAIT 細胞は CD3, CD28 刺激に対して無反応であったが、炎症性サイトカインを組み合わせることで刺激した際に IFN- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α を産生した。

D. 考察

ヒト末梢血中において、MAIT 細胞は単一の α 鎖を発現する細胞としては非常に大きな細胞集団を形成していた。V α 24NKT 細胞が末梢血 T 細胞の 0.01~0.5% であることを考えると MAIT 細胞は極めて大きなポピュレーションであると言える。その頻度は MS の疾患活動性と関連して低下しており、MS の病勢を反映する疾患マーカーとして有用であると考えられた。加えて、CD4⁺NKT 細胞、CD56^{bright}NK 細胞の頻度との相関関係から、MAIT 細胞はこれら免疫制御細胞とシステムを形成し免疫制御を行っていること、および MS においてこのシステムに乱れが存在する可能性が示唆された。さらに MAIT 細胞は T 細胞からの IFN- γ 産生を抑制していることが示され、MS の病態抑制に関与することが推定された。一方で、MAIT 細胞は CCR5, CCR6, α 4 β 7 インテグリンを高発現し、これらを利用して MS 病巣に浸潤すると考えられるが、炎症性サイトカインの存在下では自ら IFN- γ , TNF- α を産生し炎症増強細胞として作用する可能性があり、MS 病巣における MAIT 細胞の役割を更に解明する必要があると考えられた。

E. 結論

MAIT 細胞は MS の病勢を反映して末梢血中で減少していた。MAIT 細胞は免疫抑制作用を持ち MS の病態抑制に関与すると考えられ、その機能を適切に調節することが可能となれば MS 治療への応用が期待された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Osoegawa, M., Kira, J., Fukazawa, T., Fujihara, K., Kikuchi, S., Matsui, M., Kohriyama, T., Sobue, G., Yamamura, T., Itoyama, Y., Saida, T., Sakata, T.,

Ochi, H., Matsuoka, T. The research Committee of Neuroimmunologic Diseases. Temporal changes and geographical differences in multiple sclerosis phenotypes in Japanese: nationwide survey results over 30 years. *Mult. Scler.* 15:159-173, 2009.

- 2) Ishizu, T., Kira, J., Osoegawa, M., Fukazawa, T., Kikuchi, S., Fujihara, K., Matsui, M., Kohriyama, T., Sobue, G., Yamamura, T., Itoyama, Y., Saida, T., Sakata, K. The Research Committee of Neuroimmunological Diseases: Heterogeneity and continuum of multiple sclerosis phenotypes in Japanese according to the results of the fourth nationwide survey. *J. Neurol. Sci.* 80:22-28, 2009.
- 3) Satoh, J.I., Tabunoki, H., Yamamura, T. Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain lesion proteome. *Mult. Scler.* 15:531-541, 2009.
- 4) Klemann, C., Raveney, B., Klemann, A.K., Ozawa, T., von Hörsten, S., Shudo, K., Oki, S., Yamamura, T. Synthetic retinoid AM80 inhibits Th17 cells and ameliorates EAE. *Am. J. Pathol.* 174(6): 2234-2245 2009.
- 5) Theil, M.M., Miyake, S., Mizuno, M., Tomi, C., Croxford, J.L., Hosoda, H., Theil, J., von Hoersten, S., Yokote, H., Chiba, A., Lin, Y., Oki, S., Akamizu, T., Kangawa, K., Yamamura, T. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by Ghrelin. *J. Immunol.* 183: 2859-2866, 2009.
- 6) Fujita, M., Otsuka, T., Mizuno, M., Tomi, C., Gallagher, T.M., Yamamura, T., Miyake, S. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 modulates experimental autoimmune encephalomyelitis via iNKT cell-dependent mechanism. *Am. J. Pathol.* 175: 1163-1123, 2009.
- 7) Croxford, J.L., and Yamamura, T. Back to the future for multiple sclerosis therapy: Focus on current and emerging disease-modifying therapeutic strategies. *Immunotherapy* 1: 403-424, 2009.
- 8) Miyake, S., and Yamamura, T. Ghrelin: friend of

foe for neuroinflammation. *Discov Med* 8: 64-67, 2009.

- 9) Sakuishi, K., Miyake, S., Yamamura, T. NK cells and NKT cells in MS. *Molecular Basis of Multiple Sclerosis. The Immune System Series "Results and Problems in Cell Differentiation"*, Gramm U, ed, Springer-Verlag, Heidelberg, 2009, in press.
- 10) 山村 隆: 多発性硬化症の分子標的医薬開発の現状. *BRAIN and NERVE*, 61 : 923-928, 2009.
- 11) 山村 隆, 千葉 健治: 自己免疫疾患の治療薬開発-病態の多様性を見据えて. *Yakugaku Zasshi* 129: 647-648, 2009.
- 12) 大木伸司, 山村 隆: 多発性硬化症の病態形成とオーファン核内受容体 NR4A2. *臨床免疫・アレルギー科* 52: 111-118, 2009.
- 13) 宮崎雄生, 山村 隆: NKT 細胞と自己免疫. *医学のあゆみ (最新・自己免疫疾患 Update -研究と治療の最前線)* 3230: 651-656, 2009.
- 14) 大木伸司, 山村 隆: 多発性硬化症の病態解析から治療標的の同定へ. *Jpn J Clin Immunol* 32 : 214-222, 2009.
- 15) 山村 隆, 横手裕明, 三宅幸子: 腸内細菌と自己免疫. *Current Insights in Neurological Sciences* 17: 10-11, 2009.
- 16) 山村 隆: 多発性硬化症. 連載 サイトカインと炎症性疾患・自己免疫疾患 —その病態における役割と治療展開-. *炎症と免疫*. 18: 87-91, 2010.
- 17) 荒浪利昌, 山村 隆: 多発性硬化症. 炎症・再生医学事典(松島綱治、西脇徹編集) 朝倉書店, pp216-218, 2009.
- 18) 岡本智子, 山村 隆: 脱髄性疾患. 急性散在性脳脊髄炎. 『神経疾患・診療ガイドライン-最新の診療指針-』(編集 鈴木則宏) 総合医学社, pp195-197, 2009.
- 19) 荒浪利昌, 山村 隆: EAE/experimental allergic encephalomyelitis. 「免疫の事典」(桂義元, 山本一彦, 小安重夫, 河本宏監修), 朝倉書店, pp26-218, 2009.

2. 学会発表

宮崎雄生, 三宅幸子, 山村 隆. ヒト末梢血における

mucosal associated invariant T 細胞に関する研究. 第 37 回日本臨床免疫学会総会, 東京, 11, 13, 2009.

H. 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.

参考文献

- 1) Procelli S, Yockey CE, Brenner MB, Balk SP. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4⁺ α/β T cells demonstrates preferential use of several Vβ genes and an invariant TCR α chain. *J Exp Med* 178, 1-16, 1993.
- 2) Tilloy F, Treiner E, Park SH, Garcia C, Lemonnier F, de la Salle H, Bendelac A, Bonneville M, Lantz O. An invariant T cell receptor α chain defines a novel TAP-independent major histocompatibility complex class Ib-restricted α/β T cell subpopulation in mammals. *J Exp Med* 189, 1907-21, 1999.
- 3) Treiner E, Duban L, Bahram S, Radosavljevic M, Wanner V, Tilloy F, Affaticati P, Gilfillan S, Lantz O. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature* 422, 164-9, 2001.
- 4) Croxford JL, Miyake S, Huang YY, Shimamura M, Yamamura T. Invariant Vα19i T cells regulate autoimmune inflammation. *Nat Immunol* 7, 987-94, 2006.
- 5) Illes Zsolt, Shimamura M, Newcombe J, Oka N, Yamamura T. Accumulation of Vα7.2-Jα33 invariant T cells in human autoimmune inflammatory lesions in the nervous system. *Int Immunol* 16, 223-30, 2003.
- 6) Martin E, Treiner E, Duban L, Guerri L, Laude H, Toly C, Premel V, Devys A, Moura IC, Tilloy F, Cherif S, Vera G, Latour S, Soudais C, Lantz O. Stepwise development of MAIT cells in Mouse and Human. *PLOS Biol* 7, 525-36, 2009.

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
分担研究報告書

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

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。我々はマウスにおいて IL-10 を高産生する CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞を報告した。本研究では CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞の分化のメカニズムを、OVA 特異的 OT-II またはマウス I-Ea 特異的 TEa T 細胞レセプター (TCR) トランスジェニックマウスにおいて解析した。OT-II マウス脾臓・パイエル板では B6 とほぼ同等の CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞が存在した。一方で TEa マウス脾臓・パイエル板では CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞は著明に減少していた。また TEa マウスでは CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞も著明に減少していた。さらに我々のマウス室では TEa マウスは 10-15 週で腸炎を発症した。そこで若年の TEa マウスに CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞を移入したところ、腸炎の抑制が確認できた。これらの結果から CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞が TCR に依存して分化する可能性が考えられた。そこで次に OT-II, TEa マウスの脾臓・パイエル板においてトランスジェニックした TCR 以外の内因性 TCR を発現している細胞の割合を FACS で検討した。すると TEa マウスよりも OT-II マウスの脾臓・パイエル板で内因性 TCR を発現している細胞の割合が高く、内因性 TCR を発現している細胞において LAG3 の発現頻度が高かった。CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞の分化には TCR の関与が推測された。以上の結果より CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞の存在しない条件下でも、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞は自然発症腸炎を抑制する機能を持つと考えられた。また内因性 TCR の発現と LAG3 発現に何らかの関連がある可能性が考えられた。

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。我々はマウスにおいて IL-10 を高産生する CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞を報告した。本研究では CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞の分化のメカニズムを解析した。

B. 研究方法

OVA 特異的 OT-II またはマウス I-Ea 特異的 TEa T 細胞レセプター (TCR) トランスジェニックマウスにおいて脾臓・パイエル板における CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞の割合を検討した。腸炎を自然に発症する TEa マウスに対し CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞を移入し、腸炎の抑制実験を試みた。また OT-II, TEa マウスの脾臓・パイエル板においてトランスジェニックした TCR 以外の内因性 TCR を発現している細胞の割合を FACS で検討した。

(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

OT-II マウス脾臓・パイエル板では B6 とほぼ同等の CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞が存在した。一方で TEa マウス脾臓・パイエル板では CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞は著明に減少していた。また TEa マウスでは CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞も著明に減少していた。さらに我々のマウス室では TEa マウスは 10-15 週で腸炎を発症した。そこで若年の TEa マウスに CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞を移入したところ、腸炎の抑制が確認できた。これらの結果から CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞が TCR に依存して分化する可能性が考えられた。そこで次に OT-II, TEa マウスの脾臓・パイエル板においてトランスジェニックした TCR 以外の内因性 TCR を発現している細胞の割合を FACS で検討した。すると TEa マウスよりも OT-II マウスの脾臓・パイエル板で内因性 TCR を発現している細胞の割合が高く、内因性 TCR を発現している細胞において LAG3 の発現頻度が高かった。

D. 考察

CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞の分化には TCR の関与が推測された。CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞の存在しない条件下でも、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞は自然発症腸炎を抑制する機能を持つと考えられた。また内因性 TCR の発現と LAG3 発現に何らかの関連がある可能性が考えられた。

E. 結論

CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞の分化は常在細菌叢との関連が見られている。CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞の末梢における分化には、自然免疫シグナルの関与も推測されるが、同時に TCR による抗原認識も関与している可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells controlled by the transcription factor Egr-2. Okamura Tomohisa, Fujio Keishi, Shibuya Mihoko, Sumitomo Shuji, Shoda Hirofumi, Sakaguchi Shimon, Yamamoto Kazuhiko. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106:13974-9.

2. 学会発表

Identification of a novel Egr-2 dependent IL-10 secreting CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cell. Okamura Tomohisa, Fujio Keishi, Shibuya Mihoko, Sumitomo Shuji, Shoda Hirofumi, Sakaguchi Shimon, Yamamoto Kazuhiko The 9th World Congress on inflammation 2009.7.7

The similarity between human tonsil CD4+CD25-LAG3+ T cells and mouse CD4+CD25-LAG3+ T cells. Sumitomo Shuji, Fujio Keishi, Okamura Tomohisa, Shoda Hirofumi, Yamamoto Kazuhiko. The 39th annual meeting of the Japanese Society for immunology. 2009.12.3

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
分担研究報告書

自己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に関する研究：
SLEモデルにおける濾胞性ヘルパーT細胞の増加とB1細胞によるT_{FH}様細胞誘導

研究分担者 石川 昌 東京大学医学部分子予防医学 准教授

研究要旨

加齢BWF1マウスにおいてICOS、CD69、MHCクラスII抗原などT_{FH}の表現型を有するCD4T細胞が増加しており、B1細胞のIgG抗体産生を促進した。一方、B1細胞は試験管内でFoxp3陽性CD4T細胞およびT_{FH}様CD4T細胞を誘導し、B1細胞およびB2細胞からのIgG抗体産生を促進することが明らかとなった。これらのことから、BWF1マウスにおけるSLE発症の病理学的機序の一つとして、BLCの異所性高発現によるB1細胞の遊走異常がT_{FH}を誘導することによりIgG自己抗体産生が促進することが考えられた。

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。本研究は、(NZB×NZW)F1マウスにおいてケモカイン動態を中心にその病理学的意義を明らかにし、ケモカインを標的としたSLE制御戦略を確立することを目的とする。昨年度研究においてSLEモデルのBWF1マウスにおいて、Foxp3を発現し抑制能を保持するCD25陽性CD4T細胞(Treg)がSLE発症に伴い増加することを見出したが、その病理学的意義は不明であった。最近TregとT_{FH}との可塑性が明らかになったことから、SLEモデルにおけるT_{FH}の動態を明らかにし、B1細胞により活性化される自己反応性CD4T細胞との関係について検討した。

B. 研究方法

BWF1マウスにおけるT_{FH}動態をICOS、CD69、MHCクラスII抗体などによるFACS解析により明らかにし、B1およびB2細胞に対するIgG抗体産生促進能を検討した。またCFSE標識されたCD4T細胞を試験管内IL-2存在下でB1細胞と5日間共培養し、活性化されるT細胞(T_{B1})の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、その抗体産生促進能を検討した。さらにB1細胞を加齢BWF1マウスに移入し、Tregとの細胞間相互作用を検討した。

(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

BWF1マウスでは加齢に伴い、CXCR5、MHCクラスII、ICOS、CD69発現など、いわゆる濾胞性ヘルパーT細胞のフェノタイプを有するCD4T細胞が増加していることが明らかになった。さらにこのCXCR5陽性CD4T細胞がB1細胞のIgG抗体産生を促進することも明らかとなった。一方、B1細胞はB2細胞よりはるかに強い抗原提示能を有し、自己CD25⁺CD4T細胞を活性化し、Foxp3陽性細胞を誘導する一方で、CD25⁺CD4T細胞におけるFoxp3の発現は低下させることが明らかとなった。さらにB1細胞により活性化されたT細胞(CFSE^{low}CD4T細胞)もT_{FH}のフェノタイプを一部共有しており、B1細胞やB2細胞のIgG抗体産生を促進し、この抗体産生促進は抗CD40L抗体により阻害されることが明らかとなった。一方、B1細胞の移入実験ではFoxp3陽性細胞とB1細胞が近接する像も認められた。

D. 考察

B細胞ケモカインBLC/CXCL13の異所性高発現によるB1細胞のリンパ組織や標的臓器への遊走異常が、その微小環境下でT_{FH}への分化を促進しIgG自己抗体産生に関与する可能性が示唆された。またTregとの相互作用はFoxp3発現を低下させ、免疫寛容の破綻をもたらす可能性が示唆された。近年Treg、T_{FH}、Th17が相互に密接な関係を有することが明らかになりつつあり、SLE病態における病理学的意義の解明することにより、従来にない治療戦略が可能になることが期待される。

E. 結論

BWF1マウスではSLE発症に伴い、Tregの増加とT_{FH}の増加が同時に認められることが明らかとなった。また、B1細胞がT_{FH}を誘導することによりIgG自己抗体産生に

関与すると同時に、Tregによる免疫寛容の破綻にも関与する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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) Ishikawa S.: Children's immunology, what can we learn from animal studies (3): Impaired mucosal immunity in the gut by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD): A possible role for allergic sensitization. **J. Toxicol. Sci.** 34:SP349-361, **2009**.

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**

H. 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

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、T細胞やB細胞の活性化と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。これまで、SLE に対する B 細胞標的治療の有効性とその作用機序を解明してきた。平成 21 年度は、抗 CD20 抗体リツキシマブの長期的な作用機序を解明する事を目的とした。その結果、リツキシマブはSLE症例の末梢血よりCD19⁺IgD⁺CD27⁻ナイーブ及びIgD⁻CD27⁺メモリーB細胞を除去し、2年後に寛解を維持した症例では、ナイーブB細胞は回復したが、メモリーB細胞の消失が持続し、B細胞上のCD40とCD80の発現量、発現B細胞数も、2年間に亘って低値を維持した。また、寛解維持症例では、メモリーT細胞も減少し、特に、CD4⁺T細胞上のCD69、CD40LとICOSの発現も低下し、2年間低発現を維持した。しかし、再燃例では、1例はCD40とCD80を発現したメモリーB細胞が再燃に先立ち増加したが、別の1例はメモリーB細胞数に変化はないが、再燃に先立ちCD4⁺T細胞上のICOSの高発現を認めた。一方、欧米のSLEを対象とした抗CD20抗体の治療は悉く失敗し、新たな治療標的が急務である。そこで、B細胞のシグナル伝達分子を治療標的とする基礎的研究を行い、臨床応用への可能性を追求する事を目的とした。Syk (spleen tyrosine kinase)は免疫受容体に共通の細胞内チロシンキナーゼであるが、BCRとsCD40Lで刺激したCD19⁺CD27⁺メモリーB細胞の増殖、CD80/CD86の発現、細胞周期は、Syk阻害薬で制御された。また、CpGで誘導されたBlimp-1の発現亢進、抗体産生は、Syk阻害薬で濃度依存的に抑制された。以上、抗CD20抗体リツキシマブは、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。また、Sykの阻害により、活性化メモリーB細胞の選択的制御の可能性が示唆され、SLEへの臨床応用が期待された。

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。SLEの発症過程には、T細胞やB細胞の活性化と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。平成20年度は、SLEに対するB細胞標的治療の有効性とその作用機序を解明した。平成21年度は、抗CD20抗体リツキシマブの長期的な作用機序を解明する事を目的とした。一方、欧米のSLEを対象とした抗CD20抗体の治療は悉く失敗し、新たな治療標的が急務である。本年度は、B細胞のシグナル伝達分子を治療標的とする基礎的研究を行い、臨床応用への可能性を追求する事を目的とした。

B. 研究方法

難治性SLE20症例にリツキシマブを投与し、2年後に評価可能であった10症例(寛解8例、再燃2例)の末梢血リンパ球表面抗原をフローサイトメトリーで検出した。また、B細胞シグナル分子であるSykやJakを標的とした低分子化合物のB細胞の活性化、抗体産生に及ぼす影響を検討した。

(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書類は、所属機関外に漏洩せぬよう、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

リツキシマブの投与により、SLE症例の末梢血よりCD19⁺IgD⁺CD27⁻ナイーブ及びIgD⁻CD27⁺メモリーB細胞は、速やかに除去された。2年後に寛解を維持した症例では、ナイーブB細胞は回復したが、メモリーB細胞の消失が持続した。また、B細胞上のCD40とCD80の発現量、発現B細胞数も低下したが、2年間に亘って低値を維持した。

さらに、寛解維持症例では、メモリーT細胞も減少し、特に、CD4⁺T細胞上のCD69、CD40LとICOSの発現も低下し、2年間低発現を維持した。

しかし、再燃例では、1例はCD40とCD80を発現したメモリーB細胞が再燃に先立ち増加したが、別の1例はメモリーB細胞数に変化はないが、再燃に先立ちCD4+T細胞上のICOSの高発現を認めた。

一方、Syk (spleen tyrosine kinase)は免疫受容体に共通の細胞内チロシンキナーゼであるが、BCRとsCD40Lで刺激したCD19⁺CD27⁺メモリーB細胞の増殖、CD80/CD86の発現、細胞周期は、Syk阻害薬で制御された。さらにCpGで誘導されたBlimp-1の発現亢進、抗体産生は、Syk阻害薬で濃度依存的に抑制された。しかし、同様のB細胞刺激系にJak阻害薬(CP-690,550)を添加したが、阻害作用はごく軽度のみであった。

D. 考察

SLE患者に対するリツキシマブ療法により、B細胞除去後に、長期に亘ってメモリーB細胞消失を維持したままでCD19⁺IgD⁺CD27⁺ナイーブB細胞のみが回復した。また、B細胞上の共刺激分子の発現低下、さらには、メモリーT細胞の減少も認めた。これらの結果より、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、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。

また、SLE再燃症例に於ける長期寛解後のIgD⁻CD27⁺メモリーB細胞の再出現、もしくはCD4+T細胞上のICOS高発現は、それぞれB細胞、T細胞を主体とした病勢再燃が示唆され、多様なSLE病態の一側面と考えられた。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、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。また、T細胞を主体として再燃した病態では、リツキシマブの有効性は期待できず、CTLA4-IgアバタセプトなどによるT細胞制御の必要性が示唆された。

しかし、抗CD20抗体をはじめSLEに対して生物学的製剤を用いた治験は、疾患の多様性、評価方法、PMLなどの有害事象の問題があり、捗々しい結果が得られていない。そこで、SykやJakなどの細胞内シグナル分子を標的とした低分子化合物が注目される。RAに対しては、Syk阻害薬R788、Jak阻害薬CP-690550の高い治療効果が治験で報告されている。今回の結果は、Syk阻害薬が活性化メモリーB細胞選択的に作用する可能性が示唆され、SLEへの応用も考えられる結果であった。

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

抗CD20抗体リツキシマブは、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。また、細胞内チロシンキナーゼSykの阻害により、活性化メモリーB細胞の選択的制御の可能性が示唆され、SLEへの臨床応用が期待された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka Y, Takeuchi T, Mimori T, Saito K, Nawata M, Kameda H, Nojima T, Miyasaka N, Koike T. Discontinuation of infliximab after attaining low disease activity in patients with rheumatoid arthritis, RRR (remission induction by remicade in RA) study. *Ann Rheum Dis* (in press)
2. Sawamukai N, Yukawa s, Saito K, Nakayamada S, Kambayashi T, Tanaka Y. Mast cell-derived tryptase inhibits apoptosis of human rheumatoid synovial fibroblasts via rho-mediated signaling. *Arthritis Rheum* (in press)
3. Suzuki K, Saito K, Tsujimura S, Nakayamada S, Yamaoka K, Sawamukai N, Iwata S, Nawata M, Tanaka Y. A calcineurin inhibitor, tacrolimus overcomes treatment-unresponsiveness mediated by P-glycoprotein on lymphocytes in refractory rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* (in press)
4. Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, Tanaka Y. Etanercept overcomes P-glycoprotein-induced drug resistance in lymphocytes of patients with intractable rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* (in press)
5. Ikenouchi-Sugita A, Yoshimura R, Kishi T, Umene-Nakano W, Katsuki A, Saito K, Iwata H, Tanaka Y, Nakamura J. No association between BDNF^{Val66Met} polymorphism and emergence of psychiatric symptoms in systemic lupus erythematosus. *World J Biol Psychiatry* (in press)
6. Choo Q-Y, Ho PC, Tanaka Y, Lin H-S. Histone

- deacetylase inhibitors MS-275 and SAHA induced growth arrest and suppressed lipopolysaccharide-stimulated NF- κ B p65 nuclear accumulation in human rheumatoid arthritis synovial fibroblastic E11 cells. *Rheumatology* (in press)
7. Suzuki K, Nakawaga H, Kameda H, Amano K, Kondo T, Itoyama S, Tanaka Y, Takeuchi T. Severe acute thrombotic exacerbation in two cases with anti-phospholipid syndrome after retreatment with rituximab in phase I/II clinical trial for refractory systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* (2009) **48**, 198-199
 8. Komano Y, Harigai H, Koike R, Sugiyama H, Ogawa J, Saito K, Sekiguchi N, Inoo M, Onishi I, Ohashi H, Amamoto F, Miyata M, Ohtsubo H, Hiramatsu K, Iwamoto M, Minota S, Matsuoka N, Kageyama G, Imaizumi K, Tokuda H, Okochi Y, Kudo K, Tanaka Y, Takeuchi T, Miyasaka N. Pneumocystis pneumonia in patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab: a retrospective review and case-control study of 21 patients. *Arthritis Care Research* (2009) **61**, 305-312
 9. Koike T, Harigai M, Inokuma S, Inoue, Ishiguro N, Ryu J, Takeuchi T, Tanaka Y, Yamanaka H, Fujii K, Freundlich B, Suzukawa M. Post-marketing surveillance of the safety and effectiveness of etanercept in Japan. *J Rheumatol* (2009) **36**, 898-906
 10. Iwata S, Saito K, Yamaoka K, Tsujimura S, Nawata M, Suzuki K, Hanami K, Tanaka Y. Effects of anti-TNF- α antibody infliximab in refractory entero-Behçet's disease. *Rheumatology* (2009) **48**, 1012-1013
 11. Nakano K, Higashi T, Takagi R, Hashimoto K, Tanaka Y, Matsushita S. Dopamine released by dendritic cells polarizes Th2 differentiation. *Int Immunol* (2009) **21**, 645-654
 12. Nakayamada S, Fujimoto T, Nonomura A, Saito K, Nakamura S, Tanaka Y. Usefulness of initial histological features for stratifying Sjogren's syndrome responders to mizoribine therapy. *Rheumatology* (2009) **48**: 1279-82
 13. Hirose A, Tanikawa T, Mori H, Okada Y, Tanaka Y. Advanced glycation end products increase endothelial permeability through RAGE/Rho signaling pathway. *FEBS Lett* (2009) **584**: 61-66
- ## 2. 学会発表
1. Y. Tanaka, T. Takeuchi, T. Mimori, N. Miyasaka, T. Koike. Discontinuation of infliximab therapy is possible after acquiring remission in patients with rheumatoid arthritis (RA): first report on RRR (remission induction by remicade in RA) study. The Annual European Congress of Rheumatology 2009, Copenhagen 平成 21 年 6 月
 2. Y. Tanaka, M. Suzuki, H. Nakamura, S. Toyozumi, S. H. Zwillich. The oral Jak inhibitor CP-690,550 in combination with methotrexate is efficacious, safe and well tolerated in Japanese patients with active rheumatoid arthritis with an inadequate response to MTX alone. The Annual European Congress of Rheumatology 2009, Copenhagen 平成 21 年 6 月
 3. Tanaka Y. Rheumatoid arthritis in the context of bone disease: a recent paradigm shift of the disease control. The 6th International Bone Biology Forum, Susono 平成 21 年 8 月
 4. Y. Tanaka, T. Takeuchi, T. Mimori, N. Miyasaka, T. Koike. Can infliximab discontinue after attaining remission in patients with RA?: An interim report on RRR (remission induction by remicade in RA) study. The 4th Asian Congress on Autoimmunity, Singapore 平成 21 年 9 月
 5. Y. Tanaka, T. Takeuchi, T. Mimori, N. Miyasaka, T. Koike. Discontinuation of infliximab after attaining low disease activity in patients with rheumatoid arthritis: an interim report on RRR (remission induction by remicade in RA) study. The 73rd National Meeting of American college of Rheumatology, Philadelphia 平成 21 年 10 月
- ## H. 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