

を行う培地に ^{15}N ラベル化塩化アンモニウムを含む最小培地を使用する点異なる。この蛋白質を用いて ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定する。

C. 研究結果

B27₂ について LILRB2 との結合に関する分子動学的解析から結合領域を予測し、新たな結合領域として B27 の Asp122 などに着目した。Asp122Ala 変異体を作製し、その相互作用解析を行ったところ、結合の低下が見られた。通常のペプチドを提示した形の HLA-B27 と LILRB2 との結合領域ではない Asp122 が LILRB2・B27₂ 結合に関与する可能性を示唆する結果が得られた。

LILRB2-HLA-B27 複合体の大量調製できたので、おおよそ 1000 条件での結晶化を検討できた。その結果、いくつかの PEG を含む条件で針状結晶を得ることに成功した。現在構造解析可能な単結晶の作成のため、条件の最適化に取り組んでいる。同時に複合体の安定な形成のために、混合比を検討することも進めている。他方、LILRB2 の ^{15}N ラベル体の作成にも成功し、HSQC スペクトルで約 80% の主鎖ピークが十分な分離で得られることができた。これから主鎖ピークを各アミノ酸に帰属し、複合体形成による結合領域の同定に進めて行く。

D. 考察と今後の方針

LILRB2-HLA-B27 複合体の結晶化のめどが見えてきたので、さらに構造決定可能な単結晶の作製のため、結晶化条件の更なる検討をおこなう。必要に応じて提示するペプチドを変えるなどの様々な条件検討を行う予定である。他方、LILRB2 の NMR 解析をある程度進めることができた。今後各シグナルの主鎖帰属を行い、

B27₂ との結合領域に関する構造的な情報を得たいと考えている。また、変異体解析から B27₂ 持つ新たな LILRB2 結合領域を示唆する結果が得られたことは予定以上の成果と言える。B27₂ 持つ新たな LILRB2 結合領域について、NMR 解析および変異体解析を中心により正確に同定する。これに加えて、LILRB2-HLA-B27 複合体の結晶構造からリード化合物同定のため、in silico screening に取り組む。

E. 健康危険情報

無し

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okada J, Maruyama T, Motomura M, Kuroki K, Maenaka K, Sakono M, Goto M, (2009). Enzyme-mediated protein refolding. *Chem. Commun.* 7197-7199..
- 2) Nakamura S, Kuroki K, Ohki I, Sasaki K, Kajikawa M, Maruyama T, Ito M, Kameda Y, Ikura M, Yamamoto K, Matsumoto K, Maenaka K* (2009). Molecular basis for E-cadherin recognition by killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1). *J Biol Chem.* 284, 27327-27335.
- 3) Sasaki K, Kajikawa M, Kuroki K, Motohashi T, Shimojima T, Park EY, Kondo S, Yagi H, Kato K, Maenaka K* (2009). Silkworm expression and sugar profiling of human immune cell surface receptor, KIR2DL1. *BBRC* 387, 575-580.
- 4) Ose T, Kuroki K, Matsushima M, Maenaka K*, Kumagai I* (2009). Importance of the hydrogen bonding network including Asp52 for catalysis, as revealed by Asn59 mutant hen

egg-white lysozymes. *J Biochem.* 146, 651-657.

- 5) Kajikawa M, Sasaki K, Wakimoto Y, Toyooka M, Motohashi T, Shimojima T, Takeda S, Park EY, Maenaka K* (2009). Efficient silkworm expression of human GPCR (nociceptin receptor) by a Bm bacmid DNA system. *BBRC* 385, 375-379.
- 6) Shiroishi M, Maenaka K* (2009). Crystallization and Preliminary X-Ray Analysis of the Low-Affinity Complex between Human Leukocyte Antigen-G (HLA-G) and Leukocyte Ig-Like Receptor B2 (LILRB2). *Protein Pept. Lett.* 16, 447-449.
- 7) Thananchai H, Makadzange T, Maenaka K, Kuroki K, Peng Y, Conlon C, Rowland-Jones S, Dong T (2009). Reciprocal recognition of an HLA-Cw4 restricted HIV-1 gp120 epitope by CD8+ T cells and NK cells. *AIDS* 23, 189-193.

2.学会発表

無し

G. 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. その他

無し

厚生労働科学研究研究費補助金

(難治性疾患克服事業)

HLA 多型が寄与する自己免疫疾患の発症機序の解明 分担研究報告書

自己免疫疾患および HLA 多型と調節性 T 細胞の分化、機能との関係

分担研究者 鈴木春巳 国立国際医療センター研究所 臨床病理研究部長

研究要旨

主要組織適合抗原(MHC)である HLA の特定の分子と、多くの免疫難病とは高い相関を示すことがよく知られており、特に慢性炎症を主とする疾患においては HLA との相関が特に高いことが指摘されている。HLA と疾患との関連における分子基盤の解明は、新しい診断、治療法の開発に重要である。本研究では調節性 T 細胞 (Treg) と HLA 多型との関係に着目し、Treg の分化、機能と HLA 多型との間に相関があるかどうか検討する。このためには、Treg の分化、活性化の分子メカニズムを理解することが必須であり、Treg の分化、活性化に関わる新規遺伝子の探索を行った。Treg は胸腺で分化することから、胸腺に特異的に発現する遺伝子を探索し、EST データベースを利用した *in silico* クローニングにより、新規遺伝子 *Gasp* を同定した。*Gasp* は T 細胞特異的に発現しているが、Treg においてその発現が大きく低下しており、Treg の機能に関与している可能性が示唆された。*Gasp* ノックアウトマウスを作製したところ、コンベンショナルな T 細胞の分化は強く抑制されていたが、Treg の分化の抑制の程度は、比較的軽微なものであった。これらの結果は、通常の T 細胞の分化と Treg の分化がそれぞれ異なる制御を受けていることを示唆している。以上の結果より、Treg の分化、活性化が HLA アリルに依存する可能性が示唆された。

A.研究目的

免疫難病においては病態形成に、主要組織適合抗原である HLA の特定の遺伝子アリルが大きく寄与していることが、多くのゲノム疫学的な解析から明らかにされている。治療法の確立されていない難治性疾患では、長期化する治療による経済的負担と患者の QOL の低下は深刻

な問題であり、その克服は社会的にも急務である。HLA の病因・病態への関与については、抗原ペプチドと MHC 分子の結合、すなわち、疾患関連 HLA 分子が結合する自己ペプチドとそれによって惹起される免疫応答が詳細に解析されてきた。これらの長年の研究により、各論的な自己ペプチドと特定のアリルの HLA 分

子との結合についての情報は多く得られたが、根源的なHLA多型と自己免疫疾患との相関についての分子機序の理解は進んでいない。本研究では、新しいHLA受容体によるHLA認識を介した細胞制御機能に着目し、調節性T細胞、Th17細胞の機能に、HLA多型がどのように関与するかを、モデル動物、培養細胞株を用いて解析し、疾患関連HLA分子が免疫応答制御に果たす役割とその分子機序を明らかにすることを目的としている。これらの結果を新たな診断・治療法へと応用することを最終的な目標としている。

B.研究方法

TregはT細胞免疫応答を負に制御しているT細胞の亜集団であり、Tregが存在しないIPEX患者の症状や、FoxP3ノックアウトマウスの表現型をみれば、Tregがトレランスの成立、維持にどれだけ重要な役割を果たしているかは明らかである。Tregも通常のT細胞と同様に、胸腺で自己抗原ペプチドとMHCの複合体を認識してアゴニスト選択を受けて分化する。従って、Tregの分化がMHC多型の影響を受けることは想像に難くない。自己免疫疾患と相関するHLA分子と、Tregの分化、すなわちTregの数、機能およびTCRレパートリーとの相関を検討するためには、Tregの分化の分子メカニズムを知ることが必須である。そこで、Tregが分化する場である胸腺において特異的に発現する新規遺伝子の同定、機能探索に焦点を当てて検討を行った。

我々は独自のアルゴリズムを用いて、ESTデータベースから胸腺特異的に発現する未知遺伝子をピックアップした。そのうちのひと

つがGaspである。

まずはGasp欠損マウスを作製してその機能を検討した。ノックアウトマウスの作製は常法に従い、Neo耐性遺伝子と共にb-Gal遺伝子をGaspの第1エクソン部位に相同組換えすることにより作製した。これにより、Gaspの発現をin vivoでb-Gal染色によりモニターすることができる。欠損マウスのT細胞の解析は、蛍光標識抗体を用いたフローサイトメトリー解析によって行った。Tregの分化は、CD4陽性かつFoxP3陽性の細胞をTregとして評価した。Tregの抑制機能は、CFSEでラベルしたCD4陽性CD25陰性細胞（レスポンダー細胞）を一定数のTreg細胞と共に培養し、レスポンダー細胞の分裂を抑制する活性として検定した。

C.研究結果

Gaspは既知のドメイン構造を持たない分子であり、その機能を推定することは困難である。従って、ノックアウトマウスを作製することにより、in vivoにおける正の選択、Tregの分化について検討した。驚いたことに、このマウスの胸腺においては、CD4-SPおよびCD8-SPの分化が著しく阻害されていた。CD4-SPの数は野生型に比べて5分の1から10分の1程度にまで減少しており、CD8-SPの分化はそれより若干弱い減少であった。末梢のT細胞もそれに呼応して減少しており、GaspがT細胞の正の選択に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。負の選択についてはHY-TCRとランスジェニックマウスおよびBALB/c背景における内在性スーパー抗原によるVβ除去の実験系で検討したが、意外なことに負の選択はまったく抑えられていなかった。このGasp

遺伝子は、以前に Treg において発現が減少する遺伝子の網羅的解析において、トップ3に入っていた遺伝子であり、言い換えれば、Treg における発現が減少している遺伝子である。そこで、Treg の分化について検討したところ、Treg の分化も抑制されていたが、コンベンショナルな T 細胞における抑制に比べると、非常に軽微なものであった。

この分子の機能を解析するため、生化学的な解析も同時に行った。免疫沈降と質量分析解析から、Gasp がシグナル伝達アダプターである Grb2 分子に結合することを見出した。さらに、この結合が Grb2 の N 末側の SH3 ドメインに依存していることも明らかとなった。さらに、ノックアウトマウスのシグナル伝達についても詳細に検討を行ったが、野生型との大きな相違を見出すことはできなかった。

D. 考察

Treg は胸腺において分化する nTreg と末梢で TGFβ などによって誘導される iTreg の2種類に大別される。トレランスの維持や自己免疫疾患の発症に係わっているのは主に nTreg であり、自己免疫疾患に対する新規治療法の開発においてはその分化メカニズムを知ることは極めて重要である。nTreg は胸腺内において自己抗原を強く認識するが、負の選択のようにアポトーシスを起こすことなく、「アゴニスト選択」を受けて成熟するとされている。しかしながら、このアゴニスト選択の分子基盤についてはまだ全くわかっていない。

今回、我々が独自に発見同定した新規遺伝子 Gasp は、正の選択に必須の遺伝子であり、負の選択には必要ないという非常にユニークな

性質をもった分子である。この Gasp は Treg の分化にも関わっているため、この分子の機能解析は、nTreg 分化の分子メカニズムの解明に大きく貢献するものと考えられる。

E. 結論

我々は、胸腺に特異的に発現する Gasp という新規遺伝子が、T 細胞の分化、特に正の選択に必須であることを世界で初めて見出した。この分子は正の選択にだけ必須であり、負の選択や末梢の活性化には必要ないため、この遺伝子の機能を解明することにより、胸腺内 T 細胞分化のブラックボックスを解き明かす大きな一歩となることが期待される。また、この分子は Treg の分化にも関与しているため、アゴニスト選択、すなわち、nTreg 分化の分子メカニズムの解明にも大きく貢献できるものと考えられる。今年度の結果は、HLA アリルの相違による自己免疫疾患発症の分子基盤の解明に一歩近づいたものである。今回の我々の結果を基にして、今後 nTreg と HLA アリルとの関係、およびその分子メカニズムの解析が進み、自己免疫疾患の発症機序における HLA 多形と Treg の分化、活性化との関係が解明されることが期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

本計画に密接に関連した業績

- 1) Dai Chida, Tsuyoshi Sato, Yoshinori Sato, Mitsumasa Kubo, Tetsuya Yoda, Harumi

Suzuki and Yoichiro Iwakura Characterization of mice deficient in Melanocortin 2 receptor on a B6/Balbc mix background *Mol. Cell. Endocrinol.* (2009) 300: 32-36

- 2) Hiroyo Oda, Manabu Fujimoto, Michael S. Patrick, Dai Chida, Yoshinori Sato, Hiroki Aoki, Yoshinao Azuma, Takaya Abe, Harumi Suzuki* and Mutsunori Shirai *[Corresponding auhtor] RhoH plays critical roles in FceRI-dependent signal transduction of mast cellsse *J. Immunol.* (2009) 182: 957-962
- 3) Yoshinori Sato, Hiroyo Oda, Michael S. Patrick, Yukari Baba, Ahmed A. Rus'd, Yoshinao Azuma, Takaya Abe, Mutsunori Shirai and Harumi Suzuki Rac GTPases are involved in development, survivalandd homeostatic proliferation of T cells *Immunol. Let.* (2009) 124:27-34
- 4) Michael S. Patrick, Hiroyo Oda, Kunihiro Hayakawa, Yoshinori Sato, Koji Eshima, Teruo Kirikae, Shun-ichiro Iemjura, Mutsunori Shirai, Takaya Abe, Tohru Natsume, Takehiko Sasazuki and Harumi Suzuki Gasp, a Grb2 associating protein, is critical for positive selection of thymocytesn *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2009) 106: 16345-16350

2.学会発表

- 1) HarumiSuzuki, Michael S. Patrick, Hiroyo Oda Gasp (Themis) is a novel protein essential for positive selection but for negative selection nor for peripheral activation The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (2009.12) Late braking talk, Osaka, Japan (English)
- 2) Michael S. Patrick, Hiroyo Oda, Kunihiro Hayakawa, Yoshinori Sato, Koji Eshima, Mutsunori Shirai and Harumi Suzuki A

novel Grb2 associating protein Gasp is critically required for positive selection of thymocytes 第39回日本免疫学会学術集会 2009.12 大阪

- 3) Kunihiro Hayakawa, Michael S. Patrick, Hiroyo Oda and Harumi Suzuki Analysis of novel T cell-specific gene ISC22 第39回日本免疫学会学術集会 2009.12 大阪
- 4) Michael S. Patrick, Hiroyo Oda, Yoshinori Sato, Shinichi Aizawa, Toru Natusme and Harumi Suzuki A novel gene ISC4 is critically required for positive selection of thymocytes The 5th International Workshop of Kyoto T Cell Conference 2009.6 Kyoto Japan (口頭、英語)
- 5) Harumi Suzuki, Hiroyo Oda and Michael S. Patrick A novel thymus specific gene ISC4 plays a critical role in positive selection in the thymus The 2009 Midwinter Conference of Immunologists at Asilomar 2009.1 Pacific Grove, USA (口頭、英語)
- 6) Michael S. Patrick, Kunihiro Hayakawa, Sachiko Dobashi, Hiroyo Oda, Harumi Suzuki, Gasp (Themis) plays a critical role in thymocyte positive selection by regulating ERK activation
- 7) The 19th Molecular Immunology Forum Tokyo. 2010.2, Tokyo, Japan
- 8) Michael S. Patrick, Kunihiro Hayakawa, Hiroyo Oda and Harumi Suzuki, Function of Gasp (Themis) in positive selection of thymocyte. ThymOz International Conference. 2010.3, Gladstone, Australia

H.知的財産権の出願・登録情報

【特許の取得】

申請中

- ・ 発明者 白井睦訓、鈴木春巳他 権利者 山口大学「新規T細胞機能遺伝子探索技術の

開発とそれを利用した新規T細胞分化遺伝子」

申請準備中

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

厚生労働科学研究費補助金

(難治性疾患克服事業)

HLA 多型が寄与する自己免疫疾患の発症機序の解明 分担研究報告書

疾患関連 HLA アリルを発現するヒト化型マウスの作製

分担研究者 高木 智 国立国際医療センター研究所 地域医療保健研究部長

研究要旨

疾患関連 HLA アレルの免疫応答異常への関与について固体レベルで検討することを目的として、ヒト臍帯血幹細胞やヒト骨髄造血幹細胞を免疫不全マウスに移植することにより、ヒト免疫担当細胞群を再構築したモデルマウスを作成する。ヒト免疫システムを再構築したモデルマウスの作成に向けて、ドナー造血幹細胞および前駆細胞の生着率にレシピエントへの投与時期および投与方法によりどのような違いが出るかについて検討を進めた。ヒト臍帯血由来造血幹細胞を RAG/ γ c 重複欠損免疫不全マウス、NOD.scid 免疫不全マウスへ移植した際の免疫系再構築の程度を調べた。十分なキメラ率を得るべく、マウスでの知見に基づいてヒト造血幹細胞自体の生着を増強する分子の併用による効果を検討した。造血幹細胞の機能抑制分子の阻害や発現抑制を試み、ヒト造血前駆細胞の生着率の向上がみられるかを検討した。

A. 研究目的

ヒト免疫疾患と強い関連が認められる HLA アリルがいくつか知られているが、疾患の病態形成及び維持において疾患関連 HLA がどのように関与するのかその詳細はわかっていない。既に疾患を発症している患者及び患者検体での解析からは、その分子機構や病態形成初期において標的となる細胞、固体レベルでの免疫系に及ぼす影響等についての検討は非常に困難であ

る。そこで、疾患関連アリルを有するヒト造血幹細胞を用いてヒト免疫システムを再構築したモデルマウスを作製し、発症前及び病態形成初期における疾患関連 HLA アリルの免疫応答への影響を、細胞増殖、抗体産生、サイトカイン産生及び種々の炎症・感染モデルを用いて検討することを目指した。免疫不全マウスを用いても生着率の低いヒト臍帯血幹細胞の機能修飾し、効率的なヒト免疫系の再構築を試みた。

B. 研究方法

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

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

ヒト臍帯血由来造血幹細胞を免疫不全マウスへ移植し、ヒト細胞による免疫系再構築を検討した。市販または研究用幹細胞バンクより入手した凍結 CD34 陽性ヒト臍帯血造血幹細胞をトロンボポイエチン (thrombopoietin: TPO)、幹細胞因子 (stem cell factor: SCF)、Flt-3 リガンド存在下に数時間から一晩培養し、低線量の放射線 (350Gy) を照射した RAG2/ γ c 欠損免

疫不全マウスに経静脈的に移入した。末梢血中に現れるヒト免疫担当細胞の割合を経時的に測定した。十分な生着は得られなかったため、貪食細胞の受容体多型が発見されヒト細胞の生着性が高い NOD.scid マウスを用いた。6~8 週をピークとし少量のヒト免疫細胞の産生が確認された。

ヒト臍帯血由来造血幹細胞の生着能力を増強させることにより、高効率にヒト免疫システムを再構築したモデルマウスの作成が可能になると考えられる。分担研究者は、造血幹細胞で強く発現する細胞内アダプター蛋白質 Lnk/SH2B3 を欠損するマウスでは、造血幹細胞の増加や造血能亢進が生じることを明らかにしてきた。さらに Lnk/SH2B3 のドミナントネガティブ変異体を作製し検討したところ、造血幹細胞に一過性に発現させても効果があり、免疫不全マウスの免疫系再構築に有用であることを報告した。そこで、ドミナントネガティブ効果を持つことが確認されたマウス Lnk/SH2B3 変異体を基にして、ヒト Lnk/SH2B3 に対するドミナントネガティブ変異体をデザインした。また、多量体形成に重要となるアミノ末端側はヒト由来、カルボキシル末端側はマウス由来であるキメラ変異体を作製した。培養細胞株を用いこれらの変異体の蛋白質発現を確認した。しかしながら、これらの変異蛋白質のいずれにおいても蛋白質レベルの発現量は野生型ヒト Lnk/SH2B3 に比して低下しており、立体構造変化等何らかの要因で不安定であることが考えられた。発現量が十分に期待できないこれらの変異体ではドミナントネガティブ効果を得られる可能性は低いと判断した。

次に、siRNA による発現抑制により造血前駆細胞の生着能の増強を目指した。siRNA をエレ

クトロポレーション法で細胞に遺伝子導入し、24 時間後に細胞を回収しリアルタイム PCR 法でヒト LNK の mRNA レベルの発現量を比較した。CD34 陽性の造血前駆細胞分画で最大 70% 程度の抑制効果が得られることを確認した。siRNA で処理した臍帯血由来造血幹細胞を X 線照射した RAG2/ γ c 欠損マウス、NOD.scid マウスに移入した。移植後 4 週間目から 2 週間ごとに 10 週間、各レシピエントマウスの末梢血を採取し、フローサイトメトリーによる解析を経時的に行った。RAG2/ γ c 欠損マウスについては、siRNA 処理群でもヒト血球細胞の産生は確認できなかった。NOD-Scid マウスをレシピエントとした実験群においては、数回の実験でコントロール処理群と比較して siRNA 処理群でより高いヒト血球細胞の産生が観察された。ただし、臍帯血の供給ソースの違い（個体差）によると思われる実験間のばらつきも大きく、安定した結果は得られなかった。

レンチウイルスシステムを用いて shRNA を遺伝子導入し、LNK mRNA の発現抑制の効果を検討した。5 種類の異なる部位に対する shRNA を発現するレンチウイルスについてヒト臍帯血由来造血幹細胞におけるノックダウン効果を検討した。ウイルス感染から 2 日後に遺伝子導入された GFP 陽性細胞をセルソーターにより分離し、感染から 6 日後にリアルタイム PCR 法により mRNA レベルの発現変化を解析した。最も発現抑制効果が高いコンストラクトを選別し、感染 2 日後に GFP 陽性細胞を分離して X 線照射した NOD-Scid マウス移入した。現在、末梢血の経時的なフローサイトメトリー解析を行っているところである。

D. 考察

ヒト臍帯血幹細胞及び骨髄造血幹細胞をマウスへ移植する異種移植では、RAG2/ γ c 欠損マウスをレシピエントに用いて経静脈移入した場合のヒト細胞の生着率は低く、十分な再構築は得られなかった。signal regulatory protein- α (Sirp α) は骨髄ストローマ細胞や各種血球細胞に発現する分子である。NOD マウス型 Sirp α とヒト CD47 リガンドとの相互作用の亢進が、ヒト細胞生着をサポートすることが報告された。レシピエントマウスとしての Sirp α 多型が発見された NOD.scid マウスを用いることで、生着率は若干改善したが十分なヒト細胞の生着は達成できなかった。

造血幹細胞自体の生着を増強する方法の併用が有効であると考え、まずマウスの知見に基づき造血幹細胞の機能抑制分子 Lnk/SH2B3 のヒトドミナントネガティブ阻害体作製を試みたが、マウスでみられたような十分な発現は得られなかった。siRNA によるノックダウンを行うことで生着率の向上が期待される結果が得られつつあるが、分離精製した細胞の機能解析や個体免疫応答の解析に耐える程の生着は達成できていない。安定した手技での実験が期待できる成体マウスを用いた場合は十分な再構築が得られず、新生仔肝臓内への移植、加えて造血幹細胞自体の生着を増強する方法の併用を考慮する必要がある。NOD/RAG2/ γ c (NRG) マウス等新規に開発された免疫不全マウスの使用も検討すべき課題である。

ヒト免疫担当細胞群を再構築したモデルマウス作製は、ヒト細胞間相互作用による個体免疫応答やその破綻機構の解析に有用である。発症前及び病態形成初期における疾患関連 HLA アレルの免疫応答への影響を検討する大変強力な材料となりうる。国際的にも十分なヒト免疫応

答を再現するモデル動物実験系の確立にはいた
っておらず困難な課題であるが、様々なアプロ
ーチを試みる価値は大きいと考える。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kwon SM, Suzuki T, Kawamoto A, Ii M, Eguchi M, Akimaru H, Wada M, Matsumoto T, Masuda H, Nakagawa Y, Nishimura H, Kawai K, Takaki S, Asahara T. Pivotal role of Lnk adaptor protein in endothelial progenitor cell biology for vascular regeneration. *Circulation Research*. 104: 969-977, 2009.
- 2) Kamei N, Kwon SM, Alev C, Ishikawa M, Yokoyama A, Nakanishi K, Yamada K, Horii M, Nishimura H, Takaki S, Kawamoto A, Ii M, Akimaru H, Tanaka N, Nishikawa SI, Ochi M, Asahara T. Lnk deletion reinforces the function of bone marrow progenitors in promoting neovascularization and astrogliosis following spinal cord injury. *Stem Cells*. 28: 365-375, 2010.
- 3) Takizawa H, Nishimura S, Takayama N, Oda A, Nishikii H, Morita Y, Kakinuma S, Yamazaki S, Okamura S, Tamura N, Goto S, Sawaguchi A, Manabe I, Takatsu K, Nakauchi H, *Takaki S, *Eto K. (*corresponding author) Lnk/Sh2b3 regulates integrin α IIb β 3 outside-in

signaling in platelets leading to stabilization of developing thrombus in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*. 120: 179-190, 2010.

2. 学会発表

- 1) Koyama J, Iwasaki Y, Katayama H, Hamamichi R, Iseki M, Takaki S. Regulation of dendritic cell production and function by Lnk/SH2B3, a negative regulator of lymphohematopoiesis. 第 39 回 日本免疫学会学術集会. 大阪. 2009 年 12 月.
- 2) Katayama H, Iseki M, Iwasaki Y, Ikutani M, Hamamichi R, Yoshida N, Takatsu K, Takaki S. An adopter protein Lnk/Sh2B3, negative regulator of lymphohematopoiesis, contributes to the maintenance of gut-associated lymphoid tissue. 第 39 回 日本免疫学会学術集会. 大阪. 2009 年 12 月.

F. 知的財産権の出願・登録状況

4. 特許取得

なし

5. 実用新案登録

なし

6. 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）
研究報告書

HLA 多型が寄与する自己免疫疾患の発症機序の解明

自己免疫疾患患者 HLA と臨床像の関連についての解析

分担研究者 伊藤健司 国立国際医療センター膠原病科（リウマチ科医長）
研究協力者 三森明夫 同上（第一病棟部長）

研究要旨

免疫担当細胞群間での調節機能へのHLA多型の関与を、疾患モデル動物を用いて検討する。アセチルコリン受容体で免役することで、マウスの歩行機能が低下する実験的重症筋無力症マウスを用いる。ヒトの治療と同様に、このマウスに大量免疫グロブリンを投与することで、症状が回復することを確認できている。ヒトでの報告と同様に樹状細胞、NK細胞、T細胞間での調節作用が関与していると考えられる。

疾患関連HLAを保有する自己免疫疾患患者の病態、合併症が疾患関連HLAを保有しない患者群と差異を示すかを検討するため、当科の関節リウマチ通院者430人の詳細な診療データベースを作成し、同意の得られた患者149例のHLAタイピングを完了した。疾患関連HLA-RDB1*0405を62症例（42.1%）と高率に認めた。このデータベースから得られる匿名化された情報は、同施設内の分担研究者と共有され、それぞれの研究結果の解析にも用いられる予定である。基礎資料として、当科のデータベースは有用と考えられる。

A.研究目的

HLA の免疫制御機能という新しい視点で免疫攪乱現象を解析することにより、HLA 多型と免疫難病との相関に分子基盤を与え、新たな診断・治療法の開発に資する分子標的を見出すことを目的とする。

免疫反応に関わる細胞群間での機能調節へのHLA 多型の関与は不明な点が多いが、MHC

受容体が刺激性、抑制性双方のシグナル伝達に関与しているとの報告が増加している。

自己免疫疾患のモデル動物の1つである実験的重症筋無力症マウスを用い、発病期と治療反応期での免疫担当細胞群およびサイトカイン産生の解析、またそれらの反応におけるMHC 結合分子関与を解析する。

疾患関連HLAを保有する自己免疫疾患患者

MS 明朝 10 ポイントで作成願います。

の病態、合併症が疾患関連 HLA を保有しない患者群と差異を示すかを検討する。その基礎となる自施設通院症例のデータベースを作成した。

B.研究方法

実験的重症筋無力症マウスを用いた解析
免疫担当細胞群間での調節機能への HLA 多型の関与を、株式会社ベネシスとの共同研究で、疾患モデル動物を用いて検討する。

マウスにシビレエイのアセチルコリン受容体 (AChR) で免疫することで、AChR に対する抗体価が上昇し、歩行機能が低下する実験的重症筋無力症マウスを作成する。ヒトの重症筋無力症の治療と同様に、このマウスに大量免疫グロブリン (400mg/kg/day、5日間) を投与することで、症状が回復することが分かっている。このマウスを用いて、症状発症期、治療後の免疫担当細胞群それぞれの細胞数、活性化状態、サイトカイン産生能を解析する。

症例データベース解析

本年度から、関節リウマチ通院者 430 人の診療記録 (治療薬の副作用と効果、合併症) のデータベースを作成した。今後も記載を追加し時系列化する。

データベース内容: 背景 (性別、発症連例、家族歴など)、検査値 (リウマトイド因子、抗 CCP 抗体を含む)、関節炎所見、使用薬剤 (ステロイド薬、メトトレキサート、生物製剤、ほかの抗リウマチ薬、ビスフォスフォネート)、合併症、今年度は疾患関連 HLA の DNA タイピング結果を加える。

(倫理的配慮)

データベース作成時の患者へのインタビュー、および血液検体収集を含む本研究は、国立国際医療センターの倫理審査委員会で承認された。この申請内容を遵守する。データベースに患者の HLA 情報を追加し、解析を行う本研究は、当センター遺伝子解析倫理審査委員会にて承認された。この申請内容を遵守する。

C.研究結果

実験的重症筋無力症マウスを用いた解析
実験的重症筋無力症マウスに大量免疫グロブリンを投与し、コントロール治療群に比べ、有意な歩行機能の回復を観察した。
実験的重症筋無力症マウスのリンパ節では樹状細胞より産生されるサイトカイン群の有意な上昇を認め、大量免疫グロブリン投与によって、低下することが確認された。

症例データベース解析

同意の得られた RA 患者 149 例の HLA タイピングを完了した。疾患関連 HLA-RDB1*0405 を 62 症例 (42.1%) と高率に認めた。これまでの解析では疾患関連 HLA の有無と疾患活動性、治療への反応性、関節破壊の進行、関節外症状の有無、その他臨床像との関連は見いだせなかった。

データベースの解析では、治療反応性の異なるサブグループの存在に焦点を当てて解析を進めた。

メトトレキサート治療抵抗性関節リウマチに対するミゾリビン併用効果について:

MS 明朝 10 ポイントで作成願います。

メソトレキセートは現代の関節リウマチ治療の核となる薬剤であり、当科においても78%の患者に投与されている。メソトレキセートに抵抗性の患者に対して、昨年度はタクロリムスの少量投与が有効であることを確認できた（タクロリムスの併用を行ったメソトレキセート抵抗例の52例の解析では、34例（65.3%）でDAS28の改善がみられた）。本年度はさらにミゾリビン併用の効果について検討を開始した。現時点で20例が登録されている。

TNF- α 阻害薬とビスホスホネート製剤の併用療法による画像的な関節破壊抑制効果についての検討：

TNF- α 阻害薬は著明な炎症反応抑制効果をもたらす新しい治療法である。抗炎症効果に加えて、関節リウマチの骨破壊の抑制効果が示唆されている。骨粗鬆症治療に用いられるビスホスホネートも破骨細胞分化抑制機序が示唆されており、両薬剤の併用によってより有効的な関節破壊抑制が可能になる可能性がある。TNF- α 阻害薬投与中の関節リウマチ患者でビスホスホネート製剤併用の有無によって関節破壊の抑制効果に差があるかを検討した。前年度から症例数を増やし、64例について modified total Sharp score (mTSS) の変化を比較した。併用群は非併用群に比べ、有意な骨破壊抑制を示し、mTSS が改善する症例も散見された。非併用群でも概ね良好な骨破壊抑制は観察されたが、中には骨破壊が著しく進行する症例もみられる。

D. 考察

実験的重症筋無力症マウスを大量免疫グロブリンで治療する際の病理、病態については不明である。ヒトでの報告では、NK細胞による樹状細胞への細胞障害の亢進が観察されており、結果として樹状細胞によるT細胞活性化が阻害されることになる。また、治療後長期にわたって、NK細胞のリンパ組織への移行が観察されているが、この現象と免疫抑制効果との関連は不明である。NK細胞はその表面のクラスI MHC 結合性抑制性受容体を介し、免疫調節を行っていることが報告されている。今後はこのモデルマウスにおけるクラスI MHC 結合性抑制性受容体の発現をスクリーニングし、病態および治療反応性との関連について検索予定である。今回樹状細胞由来のサイトカイン産生が大量免疫グロブリン投与によって抑制されることを確認できたが、ヒトで報告されたNK細胞や、他の免疫担当細胞群との相互作用に焦点を当てて解析を行う必要がある。

関節リウマチ患者のデータベースからは、当科の患者集団では、メソトレキセート使用率が高く、本研究計画の初期の目標であるこの薬の副作用と効果の分析が可能になると思われる。

メソトレキセート抵抗例の治療は今後の課題である。本年度は新たに、ミゾリビン併用効果の検討を開始した。解析結果はまだ集計されていないが、昨年度報告したMDR-1発現抑制を介したタクロリムスの併用効果と同様に、有効性の個人差は大きいと推測される。

関節リウマチ治療の大きな目標である関節破壊抑制に対する、TNF- α 阻害薬とビスホスホ

MS 明朝 10 ポイントで作成願います。

ネートの併用が非常に高い関節破壊抑制を示すことを確認できたが、このなかでも反応性に個人差がみられる。

このデータベースに HLA 情報を加え、HLA 多型と治療反応性の差異との関連について解析が進行中である。この情報はヒト細胞を用いた研究を予定している当研究班の分担研究者にとっても有用になると考えられる。

E. 結論

実験的重症筋無力症マウスは自己免疫疾患の活動期および治療時における免疫担当細胞群間での相互作用の解析に有用であると考えられた。

関節リウマチの病像、治療効果と副作用、合併症を分析し、そこに HLA 情報を加えることで、HLA 多型が自己免疫疾患の発症、病態に与える影響を考察するための基礎資料として、当科のデータベースは有用と考えられた。

G. 研究発表

論文発表

海外

1. Takahashi Y, Mizoue T, Suzuki A, Yamashita H, Kunitatsu J, Itoh K, Mimori A
Time of initial appearance of renal symptoms in the course of systemic lupus erythematosus as a prognostic factor for lupus nephritis. *Mod Rheumatol*. 19:293-301, 2009

学会発表

国内

1. 高橋裕子, 山下裕之, 伊藤健司, 杉山温人,

三村俊英, 三森明夫: 顕微鏡的多発血管炎と Wegener 肉芽腫症の予後決定因子. 第 53 回日本リウマチ学会総会, 東京, 2009 年 4 月

2. 國松淳和, 廣江道昭, 高橋裕子, 山下裕之, 伊藤健司, 三森明夫: SLE に伴う心筋障害 3 例にみられた異なる. 第 53 回日本リウマチ学会総会, 東京, 2009 年 4 月

3. 山下裕之, 高橋裕子, 鈴木暁岳, 國松淳和, 清水亜理紗, 江里俊樹, 伊藤健司, 三森明夫: 膠原病科における不明炎症の原因集計; 悪性リンパ腫の重要性. 第 53 回日本リウマチ学会総会, 東京, 2009 年 4 月

4. 山下裕之, 窪田和雄, 高橋裕子, 國松淳和, 清水亜理紗, 江里俊樹, 伊藤健司, 三森明夫: 血清反応陰性脊椎関節炎の診断における 18-FDG-PET/CT の有用性 (第 2 報). 第 53 回日本リウマチ学会総会, 東京, 2009 年 4 月

5. 細川美里, 山下裕之, 高橋裕子, 國松淳和, 清水亜理紗, 江里俊樹, 伊藤健司, 三森明夫: 早期診断した大動脈炎の画像診断における治療成績の検討. 第 53 回日本リウマチ学会総会, 東京, 2009 年 4 月

6. 江里俊樹, 細川美里, 山下裕之, 高橋裕子, 清水亜理紗, 伊藤健司, 三森明夫: Sjogren 症候群に合併した末梢神経障害の 3 例. 第 53 回日本リウマチ学会総会, 東京, 2009 年 4 月

MS 明朝 10 ポイントで作成願います。

7. 高橋裕子, 山下裕之, 國松淳和, 清水亜理紗, 江里俊樹, 伊藤健司, 三森明夫: 遅発ループス腎炎に対するシクロフォスファミド治療の有効性評価. 第 53 回日本リウマチ学会総会, 東京, 2009 年 4 月
8. 國松淳和, 山下裕之, 高橋裕子, 清水亜理紗, 江里俊樹, 伊藤健司, 三森明夫: リウマチ性多発筋痛症の鑑別診断; 初診例の集計. 第 53 回日本リウマチ学会総会, 東京, 2009 年 4 月

海外

1. Hiroyuki Yamashita, Kazuo Kubota, Yuko Takahashi, Junwa Kunimatsu, Arisa Shimizu, Toshiki Eri, Kenji Itoh and Akio Mimori: Value of PET/CT in Clinical Practice in

Patients with Possible Spondyloarthropathy. ACR/ARHP Annual Scientific Meeting. Philadelphia, October 2009.

2. Yuko Takahashi, Shiori Haga, Hiroyuki Yamashita, Yukihito Ishizaka and Akio Mimori: Autoantibodies to Angiotensin Converting Enzyme 2 in Patients with Rheumatic Diseases. ACR/ARHP Annual Scientific Meeting. Philadelphia, October 2009.

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

V. 研究成果の刊行に関する一覧表

V. 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
Sasawatari, S, Yoshizaki, M, Taya C., Furuyama-Tanaka K., Yonekawa H., Dohi T., Makrigiannis A P, Sasazuki T., Inaba K., Toyama-Sorimachi N.	Ly49Q plays a crucial role in neutrophil polarization and migration by regulating raft trafficking.	Immunity	32	200-213	2010
Hayashi M, Nakashima T, Kodama T, Makrigiannis AP, Toyama-Sorimachi N, Takayanagi H.	Ly49Q, an ITIM-bearing NK receptor, positively regulates osteoclast differentiation.	Biochem Biophys Res Commun.	393	432-438	2010
Yoshizaki M., Tazawa A., Kasumi E., Sasawatari S., Itoh K., Dohi T., Sasazuki T., Inaba K., Makrigiannis A.P. and <u>Toyama-Sorimachi, N.</u>	Spatiotemporal regulation of intracellular trafficking of TLR9 by an inhibitory receptor, Ly49Q.	BLOOD	114	1518-27	2009
Michael S. Patrick, Hiroyo Oda, Kunihiro Hayakawa, Yoshinori Sato, Koji Eshima, Teruo Kirikae, Shun-ichiro Iemjura, Mutsunori Shirai, Takaya Abe, Tohru Natsume, Takehiko Sasazuki and Harumi Suzuki	Gasp, a Grb2 associating protein, is critical for positive selection of thymocytes.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA	106	16345-16350	2009
Yoshinori Sato, Hiroyo Oda, Michael S. Patrick, Yukari Baba, Ahmed A. Rus'd, Yoshinao Azuma, Takaya Abe, Mutsunori Shirai and Harumi Suzuki	Rac GTPases are involved in development, survival and homeostatic proliferation of T cells	Immunol. Let.	124	27-34	2009
Hiroyo Oda, Manabu Fujimoto, Michael S. Patrick, Dai Chida, Yoshinori Sato, Hiroki Aoki, Yoshinao Azuma, Takaya Abe, Harumi Suzuki* and Mutsunori Shirai *[Corresponding author]	RhoH plays critical roles in FcεRI-dependent signal transduction of mast cells	J. Immunol	182	957-962	2009

Dai Chida; Tsuyoshi Sato; Yoshinori Sato; Mitsumasa Kubo; Tetsuya Yoda; Harumi Suzuki; Yoichiro Iwakura	Characterization of mice deficient in Melanocortin 2 receptor on a B6/Balbc mix background	Mol Cell Endocrinol.	300	32-36	2009
パトリックマイケル 鈴木春巳	胸腺内の正の選択に必須な新規分子 Gasp(Themis)の発見	感染・炎症・免疫		40	2010
Okada J, Maruyama T, Motomura M, Kuroki K, Maenaka K, Sakono M, Goto M,	Enzyme-mediated protein refolding.	Chem. Commun.		7197-7199	2009
Nakamura S, Kuroki K, Ohki I, Sasaki K, Kajikawa M, Maruyama T, Ito M, Kameda Y, Ikura M, Yamamoto K, Matsumoto K, Maenaka K*	Molecular basis for E-cadherin recognition by killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1)	J Biol Chem.	284	27327-27335	2009
Sasaki K, Kajikawa M, Kuroki K, Motohashi T, Shimojima T, Park EY, Kondo S, Yagi H, Kato K, Maenaka K*	Silkworm expression and sugar profiling of human immune cell surface receptor, KIR2DL1.	BBRC	387	575-580.	2009
Ose T, Kuroki K, Matsushima M, Maenaka K*, Kumagai I*	Importance of the hydrogen bonding network including Asp52 for catalysis, as revealed by Asn59 mutant hen egg-white lysozymes.	J Biochem.	146	651-657	2009
Kajikawa M, Sasaki K, Wakimoto Y, Toyooka M, Motohashi T, Shimojima T, Takeda S, Park EY, Maenaka K*	Efficient silkworm expression of human GPCR (nociceptin receptor) by a Bm bacmid DNA system.	BBRC	385	375-379	2009
Shiroishi M, Maenaka K*	Crystallization and Preliminary X-Ray Analysis of the Low-Affinity Complex between Human Leukocyte Antigen-G (HLA-G) and Leukocyte Ig-Like Receptor B2 (LILRB2).	Protein Pept. Lett.	16	447-449	2009

Thananchai H, Makadzange T, Maenaka K, Kuroki K, Peng Y, Conlon C, Rowland-Jones S, Dong T	Reciprocal recognition of an HLA-Cw4 restricted HIV-1 gp120 epitope by CD8+ T cells and NK cells.	AIDS	23	189-193	2009
Kwon SM, Suzuki T, Kawamoto A, Ii M, Eguchi M, Akimaru H, Wada M, Matsumoto T, Masuda H, Nakagawa Y, Nishimura H, Kawai K, Takaki S, Asahara T.	Pivotal role of Lnk adaptor protein in endothelial progenitor cell biology for vascular regeneration.	Circulation Research.	104	969-977	2009
Kamei N, Kwon SM, Alev C, Ishikawa M, Yokoyama A, Nakanishi K, Yamada K, Horii M, Nishimura H, Takaki S, Kawamoto A, Ii M, Akimaru H, Tanaka N, Nishikawa SI, Ochi M, Asahara T.	Lnk deletion reinforces the function of bone marrow progenitors in promoting neovascularization and astrogliosis following spinal cord injury.	Stem Cells.	28	365-375	2010
Takizawa H, Nishimura S, Takayama N, Oda A, Nishikii H, Morita Y, Kakinuma S, Yamazaki S, Okamura S, Tamura N, Goto S, Sawaguchi A, Manabe I, Takatsu K, Nakauchi H, *Takaki S, *Eto K. (*corresponding author)	Lnk/Sh2b3 regulates integrin α IIb β 3 outside-in signaling in platelets leading to stabilization of developing thrombus in vivo.	The Journal of Clinical Investigation.	120	179-190	2010
Takahashi Y, Mizoue T, Suzuki A, Yamashita H, Kunimatsu J, Itoh K, Mimori A,	Time of initial appearance of renal symptoms in the course of systemic lupus erythematosus as a prognostic factor for lupus nephritis.	Mod Rheumatol.	19	293-301	2009