

結果2:  
 $\alpha$ -carba-GalCer は、IFN- $\gamma$  を特異的に誘導する (in vitro)

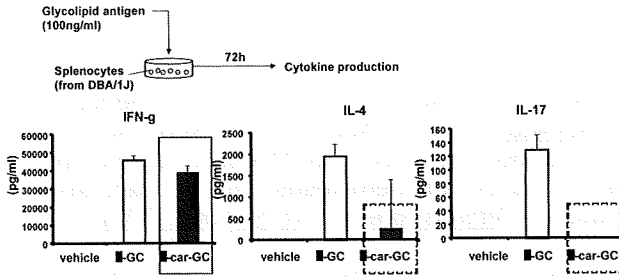
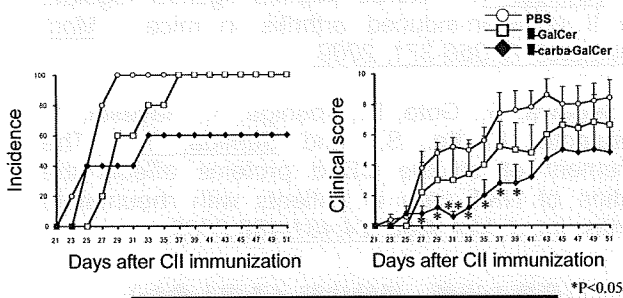


図1  $\alpha$ -c-GC は NKT 細胞からの IFN- $\gamma$  産生を特異的に誘導する。

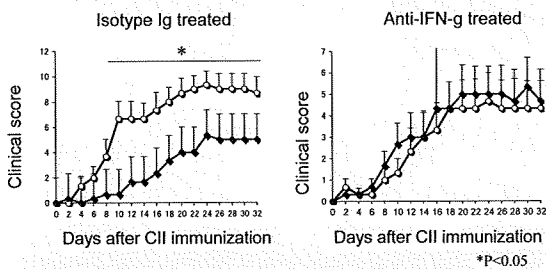
結果3:  
 $\alpha$ -carba-GalCer 投与による CIA 発症への影響



Alpha-carba-GC はCIAを抑制する

図2  $\alpha$ -c-GC 投与マウスにおいて CIA は有意に抑制された。

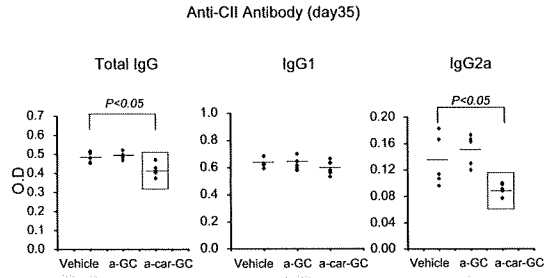
結果4:  
 $\alpha$ -carba-GalCer の関節炎抑制作用(IFN- $\gamma$  依存性)



$\alpha$ -carba-GalCer はIFN- $\gamma$  依存的にCIAを抑制する

図3  $\alpha$ -c-GC 投与マウスにおける CIA 抑制は抗 CII 抗体により解除された。

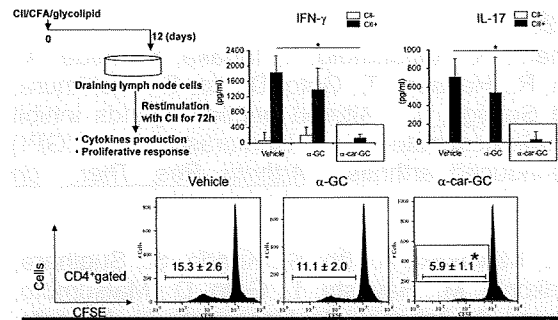
結果6:  
 $\alpha$ -carba-GalCer 投与による抗CII抗体産生への影響



$\alpha$ -carba-GalCerは、抗CII抗体の産生を抑制する

図4 血中抗 CII 抗体は有意に減少していた。

結果5:  
 $\alpha$ -carba-GalCer 投与によるCII特異的T細胞応答への影響



$\alpha$ -carba-GalCer はCII特異的T細胞応答および増殖を抑制する

図5  $\alpha$ -c-GC により CII 反応性 T 細胞からの IFN- $\gamma$ 、IL-17 産生が抑制されていた。また、T 細胞増殖も低下していた。

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)  
分担研究報告書

ヒト CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞の同定に関する研究

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、住友 秀次、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

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。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マウス生体内で恒常的に存在する CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞を同定した。マウス CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞はアナジー関連転写因子 Egr-2 や Blimp-1 を高発現していた。本研究ではヒトにおける CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の同定・解析を試みた。

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。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マウス生体内で恒常的に存在する CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞を同定した。マウス CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞はアナジー関連転写因子 Egr-2 や Blimp-1 を高発現していた。本研究ではヒトにおける CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の同定・解析を試みた。

B.研究方法

ヒト末梢血では CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞は殆ど認められなかった。一方ヒト扁桃腺においては CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞は CD4 陽性細胞の 2%前後に認められ、この細胞集団をソーティングにより回収した。回収した CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞を抗 CD3 抗体で刺激し、IL-10 産生を ELISA で検討した。またマイクロアレイ解析により、回収した CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3

陽性 T 細胞の遺伝子発現を検討し、マウス CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の遺伝子発現と比較した。

(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

ヒト扁桃腺 CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞は定量的 PCR において IL-10, Egr-2 を高発現していた。また T 細胞の IL-10 産生に重要と考えられる Blimp-1 も発現していた。さらに TCR 刺激に対し分裂しないアナジーの性質をもつ一方で、高い IL-10 産生を示した。マイクロアレイ解析ではヒトとマウスの CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の間に多くの類似性を認めた。

D.考察

マウスにおいて 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ている。ヒト扁桃腺 CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞はマウス CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞と同様に、高い IL-10 産生能を示し、Egr-2 と Blimp1

を発現していた。マイクロアレイ解析でもヒトとマウスの CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の間に多くの類似性を認め、ヒト CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞はマウス CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞に相当するポピュレーションと考えられた。

## 2. 実用新案登録

特になし

## 3. その他

特になし

## 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、マウスだけでなくヒト生体内にも存在し、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た。今後このヒト CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞を解析することで、新たな免疫疾患制御法の開発が進むと考えられる。

## F. 健康危険情報

特になし

## 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. 106:13974-9, 2009.

### 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 9<sup>th</sup> 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 39<sup>th</sup> annual meeting of the Japanese Society for immunology.  
2009. 12. 3

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

### 1. 特許取得

特になし

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 東京医科歯科大学膠原病・リウマチ科 准教授  
研究協力者 沖山奈緒子 日本学術振興会 特別研究員

研究要旨

【目的】我々が開発した新しい多発性筋炎 (PM) マウスモデルである C 蛋白誘導性筋炎 (CIM) の特性の解析を進めるとともに PM 新治療法を開発する。これまでに、CIM でも、PM と同様に、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) がエフェクター細胞であることが示唆されてきた。今年度は CTL が直接筋障害を起こしていることを明確にする。また、昨年報告したように、CIM を誘導する C 蛋白第 2 断片のなかに、筋炎を惹起することができるペプチド配列が存在する。そこで、今年度は、このペプチドを実際に細胞傷害性 T 細胞が認識するかどうかを検討した。【方法】1)  $\beta 2$  ミクログロブリン欠損マウス、パーフォリン欠損マウスに、CIM 誘導を行い、3 週間後の大腿筋を観察した。2) C 蛋白を提示する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する際、CD4 または CD8 T 細胞に純化してから移入し、2 週間後のレシピエントマウス大腿筋を観察した。3) CIM 誘導性 C 蛋白断片内の MHC クラス I エピトープ結合性ペプチド HILYSDV で、そのペプチドを提示する骨髄誘導性樹状細胞を移入し、レシピエントマウスに筋炎を惹起する際、レシピエントの CD8 細胞を除去しておいてから移入し、2 週間後のレシピエントマウス大腿筋を観察した。【結果】1)  $\beta 2$  ミクログロブリン欠損マウス、パーフォリン欠損マウスとも、CIM の発症は抑制され、特に筋壊死の減少が著明であった。2) CIM マウスの CD8 T 細胞のみで、筋壊死像の強い筋炎を養子移入出来た。3) ペプチド HILYSDV 誘導性筋炎は、免疫前の CD8 除去で発症が抑制された。【結論】CIM は、PM 同様、CTL が直接筋傷害を引き起こしていることを明らかに出来た。また、CIM 誘導性 C 蛋白断片のうちの MHC class I エピトープペプチド単独免疫にて誘導した実験的筋炎も、CTL がエフェクター細胞となっていることが確認され、抗原ペプチド特異的免疫制御研究の道が拓けた。我々のモデルは、これまで研究が進んでこなかった自己反応性 CTL の制御研究にも適していると考えられる。

A. 研究目的

我々が開発した新しい多発性筋炎 (PM) マウスモデルである C 蛋白誘導性筋炎 (CIM) の特性の解析を進めるとともに PM 新治療法を開発する。我々は、これまでに、CD8 T 細胞が筋未壊死に優位に浸潤し、抗 CD8 除去抗体にて CIM 発症が抑制されることなどを示し、CIM でも、PM と同様に、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) がエフェクター細胞であることを示唆してきた。今年度は CTL が直接筋障害を起こしていることを明確にする。また、昨年報告したように、CIM を誘導する C 蛋白第 2 断片のなかに、筋炎を惹起することができる HILYSDV ペプチド配列が存在する。この HILYSDV を提示させた骨髄誘導性樹状細胞の移入する樹状細胞免疫法でも、筋炎を誘導出来る。そこで、今年度は、このペプチドを実際に細胞傷害性

T 細胞が認識するかどうかを検討した。

また、昨年報告したように、CIM 誘導性 C 蛋白断片の内、細胞傷害性 T 細胞が認識する MHC クラス I エピトープペプチドの一つである HILYSDV を提示させた骨髄誘導性樹状細胞の移入にて、筋炎が誘導出来るため、この筋炎でも CTL がエフェクター細胞となっていることを確認する。

B. 研究方法

1) CTL の活性化や増殖に必須である MHC クラス I を欠損する  $\beta 2$  ミクログロブリン欠損マウス、CTL の細胞傷害に必須であるパーフォリン欠損マウスに、CIM 誘導を行い、3 週間後の大腿筋を観察した。

2) 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移入すると、レシピ

エントマウスへ筋炎を養子移入できるが、その際の移入細胞を、MACS isolation kit にて CD4 または CD8 T 細胞に純化して行い、移入 2 週間後のレシピエントマウス大腿筋を観察した。

3) CIM 誘導性 C 蛋白断片内の MHC クラス I エピトープペプチド HILIYSDV で、そのペプチド提示骨髄誘導性樹状細胞を移入し、レシピエントマウスに筋炎を惹起する際、レシピエントに抗 CD8 除去抗体処理を行っておき、移入 2 週間後のレシピエントマウス大腿筋を観察した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト検体は用いなかった。動物実験に関しては、研究機関の動物実験基本指針に従い、動物福祉の観点からも適切な処置を行なった。

### C. 研究結果

1)  $\beta 2$  ミクログロブリン欠損マウス、パーフォリン欠損マウスとも、野生型マウスと比べ、CIM の発症率・重症度ともに抑制された。特に筋壊死部位を計測すると、その減少が著明であった。

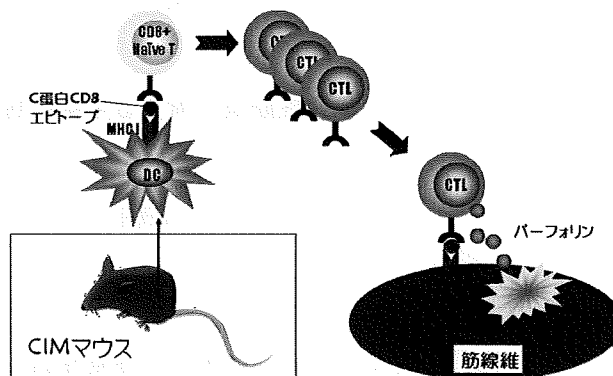
2) CIM マウスの CD8 T 細胞のみで、筋壊死像の強い筋炎を養子移入出来た。CD4 T 細胞のみでも、ごく弱い筋炎が移入できたが、これは、レシピエントへの抗 CD8 除去抗体投与に影響されなかった。

3) ペプチド HILIYSDV 誘導性筋炎は、CD8 除去にて発症率が抑制された。

### D. 考察

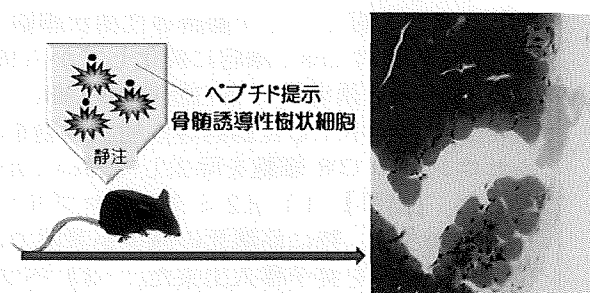
CIM は、CTL によって筋傷害・壊死を引き起こしていることが明確となった。CD4 T 細胞のみでも、ごく弱い筋炎が惹起出来たが、これは CTL 非依存的筋炎であった。

CIM では、CTL が筋線維を直接傷害する



また、CD8 エピトープのみで筋炎が誘導出来、これは CTL 依存性であることも確認した。

### CD8 エピトープ誘導性筋炎



### E. 結論

CIM や、今回新しく作成した CD8 エピトープ誘導性筋炎は、CTL によって臓器傷害を引き起こされている。これらの筋炎モデルは、今まで研究の遅れていた自己免疫性 CTL の制御の研究にも適していると期待される。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Okiyama N, Sugihara T, Iwakura Y, Yokozeki H, Miyasaka N, Kohsaka H, Therapeutic effects of IL-6 blockade on a murine model of polymyositis that does not require IL-17A., *Arthritis Rheum*, 60(8):2505-2512, 2009
- 2) Kohsaka H, Current insights in polymyositis and dermatomyositis, *Clin Exp*

- Neuroimmunol*, 1(1):22-23, 2010
- 3) Seki I, Suzuki M, Miyasaka N, Kohsaka H. Expression of CD45 isoforms correlates with differential proliferative responses of peripheral CD4+ and CD8+ T cells *Immunol Lett* (in press)
  - 4) H. Kohsaka Recent Research Developments in Rheumatic Diseases - Polymyositis / dermatomyositis Recent Research Developments in Rheumatology Editor: Antonio La Cava Transworld Research Network 166-184, 2009

## 2. 学会発表

- 1) Okiyama N, Sugihara T, Yokozeki H, Miyasaka N, Kohsaka H, Effector CD8 T cells and local innate immunity need to act in concert for development of autoimmune myositis., *Keystone Symposia*, Banff, Alberta, April 1, 2009
- 2) 沖山奈緒子、杉原毅彦、横関博雄、宮坂信之、上阪 等、自己免疫性筋炎発症には自己反応性 T 細胞と局所自然免疫の協調が必要である、第 53 回 日本リウマチ学会総会・学術集会、東京、2009 年 4 月 24 日
- 3) Okiyama N, Sugihara T, Yokozeki H, Miyasaka N, Kohsaka H, Effector CD8 T cells and local innate immunity need to act in concert for development of autoimmune myositis., *World Breckenridge, Colorado d Congress on Inflammation*, Tokyo, Japan, July 7, 2009
- 4) 上阪 等、沖山奈緒子、杉原毅彦、宮坂信之、新たな多発性筋炎動物モデルによる治療標的分子の探索、第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会、秋田、2009 年 10 月 30 日
- 5) 沖山奈緒子、杉原毅彦、横関博雄、宮坂信之、上阪 等、新たな多発性筋炎モデルにみる獲得免疫と自然免疫の協調関係、第 37 回日本臨床免疫学会総会、東京、2009 年 11 月 13 日
- 1) 上阪 等 ガンマグロブリン大量療法の科学 第51回日本小児血液学会/第25回日本小児がん学会 東京 平成21年 11月27-29日

- 2) Okiyama N, Sugihara T, Yokozeki H, Miyasaka N, Kohsaka H, Identification of CD8 T cell epitopes in skeletal muscle C-protein that induces experimental myositis of mice., *Keystone Symposia*, Breckenridge, Colorado, February 27, 2010

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

核内受容体を標的とした新規自己免疫疾患制御法の探索に関する研究

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 大木 伸司 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 室長

研究要旨

多発性硬化症(Multiple Sclerosis: MS)をはじめとする種々の自己免疫疾患では、Th1 細胞や Th17 細胞が病態形成に重要な役割を果たす。我々はこれまで MS の病原性に関わる自己反応性 T 細胞の機能制御法の確立を目的として、網羅的遺伝子発現解析による病原性 T 細胞の性状解析を進め、MS 患者由来末梢血 T 細胞で選択的に発現亢進しているオープン核内受容体 NR4A2 分子が、活性化 T 細胞からの炎症性サイトカイン産生を制御することを報告してきた。今回、T 細胞における NR4A2 の機能解析をさらに詳細にすすめ、MS の病態形成における NR4A2 機能の分子メカニズムの解明を試みた。その結果、NR4A2 が自己応答反応を含む IL-17 依存性の T 細胞反応に極めて密接な関連を示す重要な免疫応答制御因子であること、また自己免疫疾患の予測や治療における有力な標的分子の候補であることが明らかとなった。

A.研究目的

これまで MS の病原性に関わる自己反応性 T 細胞の機能制御法の確立を目的として、網羅的遺伝子発現解析による病原性 T 細胞の性状解析を進め、MS 患者由来末梢血 T 細胞で選択的に発現亢進しているオープン核内受容体 NR4A2 分子が、活性化 T 細胞からの炎症性サイトカイン産生を制御することを見出した。今回、T 細胞における NR4A2 の機能解析をさらに詳細にすすめ、MS の病態形成における NR4A2 機能の分子メカニズムの解明を試みた。

B.研究方法

C57BL/6J(B6) マウスに MOG<sub>35-55</sub> ペプチドあるいは hIRBP<sub>1-20</sub> ペプチドを免疫することで、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) あるいは実験的自己免疫性ブドウ膜炎 (EAU) を誘導した。EAE マウスの脳・脊髄、末梢血、リンパ節、脾臓をそれぞれ回収し、リンパ球の分離を行った。脳・脊髄サンプルについては、コラゲナーゼ H と DNase I を用いて酵素消化した後、パーコール密度勾配遠心法を用いて単核球を分離し、その後 AutoMACS を用いて T 細胞画分を調製した。Cytokine Secretion Assay Kit を用いて、刺激した T 細胞に対してキメラ抗体を用いた IL-17 産生細胞および IFN- $\gamma$  産生細胞の標識を行い、FACS Aria を用いて各画分を分離した。マウス脾臓由来ナイーブ T 細胞 (CD4+CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>CD62L<sup>high</sup>) に、Amaxa 社 Nucleofector を用いて NR4A2 特異的 siRNA を導入し、in vitro の Th17 細胞誘導条件 (IL-6 + TGF- $\beta$ ) 下で培養後の IL-17 産生を、ELISA 法あるいは細胞

内サイトカイン染色法などを組み合わせて定量解析した。各組織から分離した T 細胞の、NR4A2、ROR $\gamma$ t などの転写因子の発現レベルを、定量 PCR 法を用いて比較した。

(倫理面への配慮)

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

C.研究結果

MOG 誘導性 EAE を発症したマウスの中樞神経系 (CNS) に浸潤した T 細胞の中には、大量の IL-17 産生細胞および IFN- $\gamma$  産生細胞が認められ、さらに IL-17 と IFN- $\gamma$  を同時に産生する細胞も一部確認できた。Cytokine Secretion Assay Kit を組み合わせて、IL-17 と IFN- $\gamma$  の産生を指標に得られた細胞を 4 群に分画し、各画分に含まれる T 細胞から抽出した RNA を用いて NR4A2 発現を定量 PCR 解析した。その結果、IFN- $\gamma$  産生とは無関係に、IL-17 産生細胞選択的な NR4A2 の高発現が認められ、標的臓器浸潤 T 細胞の IL-17 産生能と NR4A2 発現が強く相関することが明らかとなった。また Th17 細胞の in vitro 分化時に NR4A2 特異的 siRNA を導入すると、IL-17 産生をほぼ完全に抑制することができた。この時、Th17 細胞中の NR4A2 発現の著明な減少が認められたのに対し、ROR $\gamma$ t 発現は若干の減少傾向を認めるにとどまった。この時 in vitro 分化 Th1 細胞の IFN- $\gamma$  産生は、siRNA 処理により全く影響を受けなかった。hIRBP<sub>1-20</sub> ペプチドを免疫することにより誘

導した EAU マウスでは、標的臓器に浸潤した T 細胞の NR4A2 発現亢進が発症期にピークを迎え、その後減弱したのに対し、末梢血 T 細胞の NR4A2 発現亢進はより遅れてピークを迎え、病態スコアと良い相関を示す傾向にあった。この T 細胞の NR4A2 発現の経時変化は、EAE マウスの場合と完全に一致しており、Th17 依存性の自己免疫応答時に普遍的に見られる現象である可能性が示唆された。さらに末梢血 T 細胞 NR4A2 発現誘導は、MOG<sub>35-55</sub> ペプチドや hIRBP<sub>1-20</sub> ペプチドなどの自己抗原由来ペプチド免疫時のみ認められ、卵白アルブミン由来ペプチドの免疫やアジュバント投与のみでは誘導されないことから、自己免疫応答に伴う Th17 細胞分化と強く相関することが明らかとなった。

#### D. 考察

病原性 T 細胞からの炎症性サイトカイン産生を制御する可能性が示された NR4A2 分子について、病態形成機構の観点から標的臓器浸潤 T 細胞と末梢血 T 細胞における発現の挙動を詳細に解析した。標的臓器に浸潤した T 細胞の NR4A2 発現上昇は IL-17 産生細胞のみで認められ、IFN- $\gamma$  産生能とは相関しなかった。一方、*in vitro* で分化させた Th17 細胞の IL-17 産生が NR4A2 特異的 siRNA 処理によりほぼ完全に消失したことから、NR4A2 がエフェクター T 細胞の IL-17 産生に至る T 細胞分化過程に重要な役割を果たすことが示された。以上より、NR4A2 が T 細胞の IL-17 産生および Th17 細胞機能に極めて強く相関する重要な免疫応答制御因子であることが明らかとなった。今後、NR4A2 作動性化合物を探索していくことで、全く新しい新規自己免疫疾患制御法が確立できる可能性が示された。さらに末梢血 T 細胞の NR4A2 発現が自己抗原免疫時に選択的に上昇したことから、MS を含む種々の自己免疫疾患における Th17 細胞依存性の自己免疫応答のモニタリングに、NR4A2 が有効なバイオマーカーとして応用できる可能性が示された。

#### E. 結論

NR4A2 は、自己応答反応に代表される IL-17 依存性の T 細胞反応に極めて密接な関連を示す重要な免疫応答制御因子であり、自己免疫疾患の予測や治療における標的の有効な候補と考えられる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Christian Klemann, Benjamin JE Raveney, Anna K Klemann, Tomoko Ozawa, Stephan von Hörsten, Koichi Shudo, Shinji Oki, Takashi Yamamura: Synthetic retinoid AM80 inhibits Th17 cells and ameliorates EAE  
Am. J. Pathol. 174, 2234-45 (2009)

(2) Michael-Mark Theil, Sachiko Miyake, J. Ludovic Croxford, Hiroaki Yokote, Hiroshi Hosoda, Julia Schween, Stephan von Hörsten, Asako Chiba, Youwei Lin, Shinji Oki, Takashi Akamizu, Kenji Kangawa, Takashi Yamamura: Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by ghrelin.  
J. Immunol. 181, 2859-2866 (2009)

(3) Christian Klemann., Benjamin JE Raveney, Shinji Oki, Takashi Yamamura: Retinoid signals and Th17-mediated pathology.  
日本臨床免疫学会会誌 32 (1), 20-28 (2009)

(4) Shinji Oki, Takashi Yamamura: 多発性硬化症の病態解析から治療標的の同定へ  
日本臨床免疫学会会誌 32 (4), 214-222 (2009)

##### 2. 学会発表

[国際学会]

1) Yamamura T., H. Yokote, J.L. Croxford, S. Oki, S. Miyake: NKT cell-dependent amelioration of EAE by altering gut flora. Keystone Symposia 2009: Multiple Sclerosis, Santa Fe NM, Jan. 25th, 2009

2) Yamamura T., H. Yokote, J.L. Croxford, S. Oki, H. Mizusawa, S. Miyake: NKT cell-dependent amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis by altering gut flora. The 5th international symposium on CD1/NKT cells, Kamakura Kanagawa, Mar. 26th, 2009

3) Raveney B., S. Oki, T. Ozawa, T. Yamamura: Expression of the orphan nuclear receptor NR4A2 is required for IL-17 production by Th17 cells. 9th Annual Conference of FOCIS, San Francisco, Jun. 11th-14th, 2009

4) Oki S: Nuclear receptors as therapeutic targets for multiple sclerosis. 2nd Conference



of Germany and Japan Neuroimmunology Eibsee  
Germany, Jul. 7th-11th, 2009

5) Raveney B., S. Oki, T. Ozawa, T. Yamamura:  
Expression of the orphan nuclear receptor NR4A2  
is required for IL-17 production by Th17 cells.  
2nd European Congress of Immunology, Berlin  
Germany, Sep. 13th-16th, 2009

[国内学会]

1) 大木伸司、レイバニー・ベン、クレマン・クリ  
スチャン、首藤紘一、山村隆：実験的自己免疫性ブ  
ドウ膜炎（EAU）に対する合成レチノイド Am80 の病  
態抑制効果 第21回日本神経免疫学会学術集会（大  
阪） 2009年3月13日

2) Shinji Oki、Raveney Benjamin JE、Takashi  
Yamamura：AM80, a synthetic retinoid,  
ameliorates Th17-mediated ocular autoimmunity  
and promotes the infiltration of Foxp3+ T cells  
into the eye 第39回日本免疫学会総会・学術集  
会（大阪） 2009年12月2日

3) Raveney Benjamin JE、Shinji Oki、Takashi  
Yamamura：Expression of the orphan nuclear  
receptor NR4A2 is required for IL-17 production  
by Th17 cells 第39回日本免疫学会総会・学術集  
会（大阪） 2009年12月2日

4) Daiju Ichikawa、Miho Mizuno、Shinji Oki、  
Takashi Yamamura、Sachiko Miyake：Identification  
of substrates of GRAIL E3 ligase 第39回日本  
免疫学会総会・学術集会（大阪） 2008年12月2  
日

H.知的財産権の出願・登録状況

（予定も含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

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

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

**研究要旨**

抗二本鎖 DNA (dsDNA) 抗体は SLE の疾患標識抗体であり、その抗体価は疾患活動性と関連するとされる。B 細胞に代表される抗体産生細胞は抗原特異的 T 細胞による刺激後、骨髄や脾臓から末梢血へ動員されることが知られている。そこで我々は SLE 患者末梢血中の抗 dsDNA 抗体産生細胞を直接検出し、その診断・疾患活動性評価における有用性を検討した。さらに、末梢血抗 dsDNA 抗体産生細胞陽性例の臨床的特徴の検索、および転帰につき検討した。末梢血抗 dsDNA 抗体産生細胞は SLE 患者で特異的に検出されたが、感度は 22% と低かった。一方、末梢血抗 dsDNA 抗体産生細胞の存在は持続性蛋白尿、男性、リンパ球減少、高疾患活動性 (SLEDAI や SLAM 高値) と相関し、臓器病変としては腎炎 15 例 (生検施行 7 例: ISN/RPS IV 型: 3 例, III 型: 2 例, V 型: 2 例) が最も多かった。末梢血抗 dsDNA 抗体陽性 SLEDAI 5 以下の 28 例を、前向きに検討した結果、末梢血抗 dsDNA 抗体産生細胞陽性例 8 例中 4 例が 20 か月以内に再燃した ( $p < 0.001$ )。以上より、抗 dsDNA 抗体産生細胞は SLE の活動性に伴って末梢血中へ動員され、SLE の病態形成に関与する可能性が示された。また、その検出は SLE の疾患活動性の評価に有用であった。

**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、必ずしもその相関は強くない。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。昨年度の本研究で SLE の一部で末梢血中に抗 dsDNA 抗体産生細胞が検出されることを報告した。そこで本年度は SLE 患者末梢血中の抗 dsDNA 抗体産生細胞を直接検出することにより、疾患活動性の評価が可能かどうかを検討することを目的とした。

**B. 研究方法**

**a) 対象**

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

**b) 抗 dsDNA 抗体産生細胞の検出**

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

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

**c) 抗 dsDNA 抗体産生細胞の同定**

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

**d) 抗 dsDNA 抗体産生細胞陽性例の臨床的特徴の解析**

SLE 患者を抗 dsDNA 抗体産生細胞陽性 / 陰性に分けて、臨床症状、IgG 抗 dsDNA 抗体価を比較

した。また、陽性 3 例を対象に治療後の末梢血抗 dsDNA 抗体産生細胞数の推移を評価した。抗 dsDNA 抗体高値陽性で SLEDAI5 以下の 28 例を末梢血抗 dsDNA 抗体産生細胞陽性/陰性例に層別化し、前向きに疾患活動性なしの割合を検討した。

#### e) 統計学的解析

2 群間の比較は Fisher の 2-tailed test または Mann-Whitney U-test により行った。ELISPOT 法陰性例の前向きな検討は Kaplan-Meier 法により検討した。

(倫理面への配慮)

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

### C. 研究結果

#### a) 抗 dsDNA 抗体産生細胞と診断、疾患活動性

末梢血中の抗 dsDNA 抗体産生細胞は SLE 患者 29 例 (22%) に検出された。一方、对照疾患、健常人では検出されず、SLE に対する特異度は 100% と高かった (図 1)。SLE 患者を抗 dsDNA 抗体産生 B 細胞の有無で層別化すると、その存在は男性、抗 dsDNA 抗体価高値、リンパ球数低値、持続性蛋白尿、SLEDAI・SLAM 高値、多い PSL 投与量と相関した (表 1)。陽性例の平均 SLEDAI は  $5.3 \pm 2.1$  であり、臓器病変としては腎炎 15 例 (生検施行 7 例: ISN/RPS IV 型: 3 例、III 型: 2 例、V 型: 2 例)、血球減少症: 10 例、胸膜炎 2 例、ループス腸炎 1 例、血栓性血小板減少性紫斑病 1 例であった。

一方、IgG 抗 dsDNA 抗体高値陽性 43 例 ( $>100$  IU/mL) を対象とすると、抗 dsDNA 抗体産生 B 細胞が検出された 25 例は、検出されない 18 症例に比べて SLEDAI、SLAM がいずれも有意に高かった ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ )。したがって抗 dsDNA 抗体産生細胞の検出は抗 dsDNA 抗体高値例の中で疾患活動性が高い症例の抽出に有用であった。

また、末梢血抗 dsDNA 抗体産生細胞陽性 3 例に対し、ステロイドを増量したところ、全例で疾患活動性の低下と平行して同細胞数が減少した。一方、抗 dsDNA 抗体価の減少は顕著ではなかった。

#### b) 抗 dsDNA 抗体産生 B 細胞の解析

CD19 および CD138 陽性細胞を除去した細胞集団を用いて ELISPOT 法を行ったところ、いずれの

処理においても抗 dsDNA 抗体産生細胞数は減少したが、少数ながらもスポットが残存した。従って末梢血に抗 dsDNA 抗体を産生する細胞は B 細胞と CD138 陽性形質細胞の両者を含むことが明らかとなった。

#### c) 抗 dsDNA 抗体産生細胞陽性例の予後

抗 dsDNA 抗体陽性 SLEDAI 5 以下の 28 例を、前向きに検討した結果、末梢血抗 dsDNA 抗体産生細胞陽性例 8 例中 4 例が 20 か月以内に SLEDAI5 以上となり再燃した ( $p < 0.001$ ) (図 2)。再燃した 4 症例ともに重篤な臓器合併症を併発した (心膜炎: 1 例、血小板減少症、ループス腎炎: 1 例、ループス腎炎: 1 例、血栓性血小板減少性紫斑病: 1 例)。

### D. 考察

SLE 患者において活動期に末梢血抗 dsDNA 抗体産生 B 細胞・形質細胞が出現し、その検出は疾患活動性評価に有用であった。特に抗 dsDNA 抗体高値例の中で疾患活動性が高い症例の抽出に有用であった。

結合親和性の低い抗 dsDNA 抗体は標的臓器で消費されず流血中に残存するため、血清中の抗 dsDNA 抗体価が必ずしも疾患活動性を反映しない可能性がある。したがって、流血中の抗体ではなく産生細胞を測定することで、より正確な疾患活動性の評価が可能になると考えられ、今後の臨床検査として診療への応用が期待される。また、再燃前に末梢血中に抗 dsDNA 抗体産生細胞が動員される現象が確認されたことから、病態形成に同細胞が関与している可能性が示唆される。

### E. 結論

SLE 患者末梢血抗 dsDNA 抗体産生細胞を測定することで、より正確な疾患活動性の評価が可能であり、臨床的にその有用性は高い。また、活動期に末梢血中に出現する抗 dsDNA 抗体産生細胞と SLE 病態との関連が考えられた。

### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

### G. 研究発表

論文発表

1. Sato S, Hoshino K, Satoh T, Fujita T, Kawakami Y, Fujita T, and Kuwana M. RNA helicase encoded by melanoma differentiation-associated gene 5 is a major autoantigen in patients with clinically amyopathic dermatomyositis: association with rapidly progressive interstitial lung disease. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(7): 2193-2200.
2. Suzuki S, Utsugisawa K, Yoshikawa H, Motomura M, Matsybara S, Yokoyama K, Nagae Y, Maruta T, Satoh T, Sato H, Kuwana M, and Suzuki N. Autoimmune targets to heart and skeletal muscles in myasthenia gravis. *Arch. Neurol.* 2009; 66(11): 1334-1338.
3. Seta N, Kobayashi S, Hashimoto H, and Kuwana M. Characterization of autoreactive T-cell clones to myeloperoxidase in patients with microscopic polyangiitis and healthy individuals. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2009; 27(5): 826-829.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定も含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他

学会発表

Hanaoka H, Okazaki Y, Satoh T, Kaneko Y, Yasuoka H, Seta N, Kuwana M: Emergence of anti-double strand DNA (dsDNA) antibody-secreting cells into peripheral blood predicts disease flare in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). The 73th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (Philadelphia). 2009. 10.

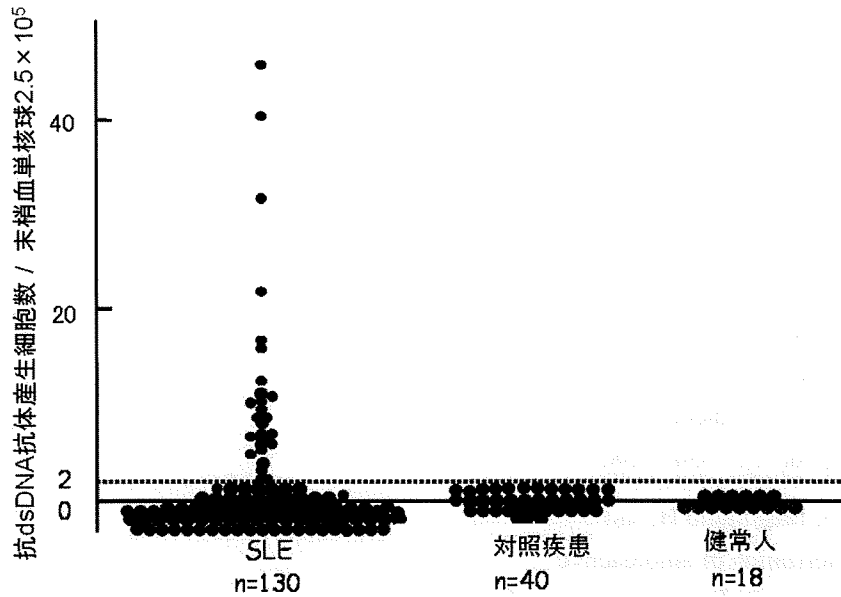


図1:末梢血抗 dsDNA 抗体産生細胞数の比較

表 1:末梢血抗 dsDNA 抗体産生細胞陽性例と陰性例の臨床特徴の比較

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

a; SLE disease activity index

b; Systemic lupus activity measure

\*Mann Whitney U test

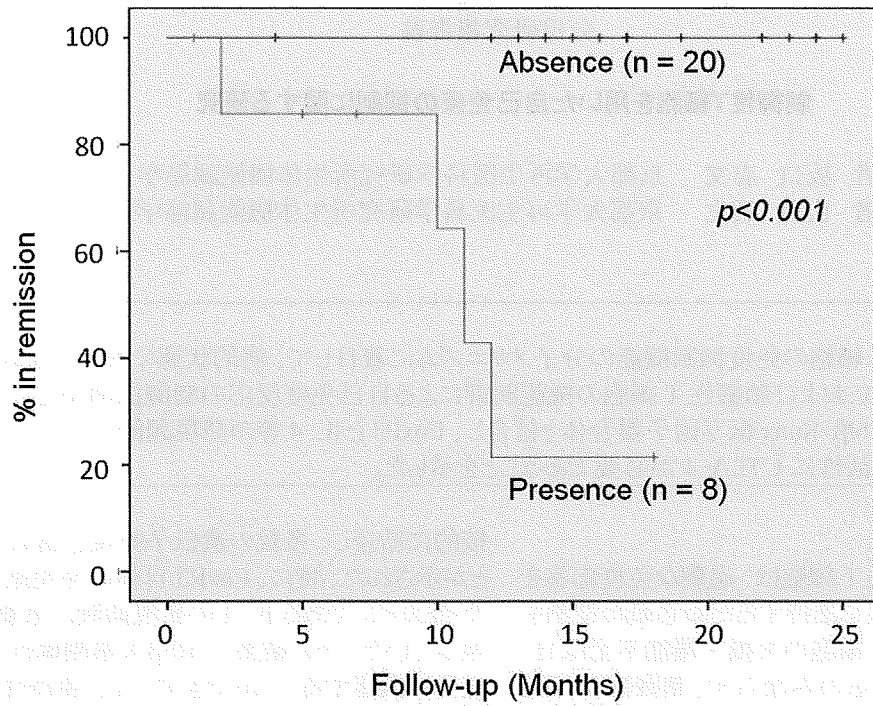


図 2;末梢血抗 dsDNA 抗体産生細胞陽性例の転帰

## 制御性T細胞を用いた自己免疫の抑制に関する研究

研究分担者 坂口 志文 京都大学再生医科学研究所生体機能調節学分野 教授  
研究協力者 山口 智之 京都大学再生医科学研究所生体機能調節学分野 助教

### 研究要旨

本研究は制御性 T 細胞の免疫抑制機能の分子メカニズムに着目して、病的状態における制御性 T 細胞の機能評価方法の確立および制御性 T 細胞の機能制御による自己免疫反応の制御法開発を目指す。これまでに、(1)FoxP3 が Cbf $\beta$ -Runx 転写因子複合体と結合し、FoxP3 と IL-4 等の発現調節をしている。また (2) 制御性 T 細胞の抑制活性に CTLA-4 が必要であることを示した。

### A.研究目的

FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>制御性 T 細胞は、過剰な免疫応答を抑制し、正常な免疫系を維持するため必須の役割を担っている。制御性 T 細胞の欠損・機能不全は自己免疫病の原因となるのみならず、制御性 T 細胞は様々な免疫疾患の病態に関与している可能性が高い。制御性 T 細胞の免疫抑制機能の分子メカニズム明らかにすることで、病的状態における制御性 T 細胞の機能評価方法の確立および制御性 T 細胞の機能制御による自己免疫反応の制御法開発につなげる。

### B.研究方法

これまでの研究で、制御性 T 細胞で重要な働きを担っている可能性のある分子が複数知られている。各遺伝子の重要領域を flox 配列で挟んだノックインマウスを作成し、FoxP3 発現細胞特異的に Cre recombinase を発現するマウスを交配し、制御性 T 細胞特異的に遺伝子を欠損するマウスを作成した。これらの遺伝子改変マウスを用いて各分子の制御性 T 細胞での重要性、役割を明らかにした。

(倫理面への配慮)

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

### C.研究結果

(1) 制御性 T 細胞のマスター制御遺伝子 FoxP3 は Runx1 および CBF $\beta$ からなる転写因子複合体と直

接的に結合し、多数の遺伝子発現を調節していることが示された。特に、FoxP3 自体の発現維持と Th2 サイトカインである IL-4 の発現抑制に重要な役割を担っていた。その結果、CBF $\beta$ 欠損制御性 T 細胞は十分に機能することができず、自己免疫性胃炎や高 IgE 血症を呈する。

(2) 制御性 T 細胞に発現する CTLA-4 は免疫抑制機能に必須であり、CTLA-4 欠損制御性 T 細胞は免疫応答を抑制できない。制御性 T 細胞上の CTLA-4 を欠損したマウスでは、過剰なリンパ球増殖、致死的自己免疫性心筋炎を呈する。

### D.考察

FoxP3 がどのような転写因子複合体を形成し、どのような遺伝子群の発現を調節し、いかにして免疫応答を抑制しているかが分子レベルで明らかになりつつある。さらに全貌を明らかにすることによって、制御性 T 細胞のバイオマーカーおよび治療標的分子の候補を同定することが可能と考えられる。

### E.結論

FoxP3, Runx-CBF $\beta$ , CTLA-4 は制御性 T 細胞による免疫抑制機能に必須の分子である。これら自体及び関連した遺伝子は、病的状態における制御性 T 細胞の機能評価方法および制御性 T 細胞の機能調節医薬の有力な候補となる。

### F.健康危険情報

該当なし。

### G.研究発表

1. 論文発表

- Wing K, and Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self-tolerance and autoimmunity. *Nat. Immunol.* 11:7-13, 2010
  - Onodera T, Jang MH, Guo Z, Yamasaki M, Hirata T, Bai Z, Tsuji NM, Nagakubo D, Yoshie O, Sakaguchi S, Takikawa O, Miyasaka M. Constitutive expression of IDO by dendritic cells of mesenteric lymph nodes: functional involvement of the CTLA-4/B7 and CCL22/CCR4 interactions. *J. Immunol.* 183:5608-5614, 2009.
  - Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int. Immunol.* 21:1105-11, 2009.
  - Kitoh, A., Ono, M., Naoe, Y., Ohkura, N., Yamaguchi, T, Yaguchi, H., Kitabayashi, I., Tsukada, T., Nomura, T., Miyachi, Y., Taniuchi, I., and Sakaguchi, S. Indispensable role of Runx1/Cbfb complexes for *in vivo* suppressive function of FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Immunity.* 31:609-620, 2009.
  - Sakaguchi, S., Wing, K., and Yamaguchi, T. Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation. *Eur. J. Immunol.* 39(9):2331-6, 2009.
  - Okamura T, Fujio K, Shibuya M, Sumitomo S, Shoda H, Sakaguchi S, Yamamoto K. CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells controlled by the transcription factor Egr-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:13974-9, 2009.
  - Ito Y, Usui T, Kobayashi S, Iguchi-Hashimoto M, Ito H, Yoshitomi H, Nakamura T, Shimizu M, Kawabata D, Yukawa N, Hashimoto M, Sakaguchi N, Sakaguchi S, Yoshifuji H, Nojima T, Ohmura K, Fujii T, Mimori T. Gamma/delta T cells are the predominant source of interleukin-17 in affected joints in collagen-induced arthritis, but not in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 60:2294-2303, 2009.
  - Piao J, Kamimura Y, Iwai H, Cao Y, Kikuchi K, Hashiguchi M, Masunaga T, Jiang H, Tamura K, Sakaguchi S, Azuma M. Enhancement of T-cell-mediated anti-tumour immunity via the ectopically expressed glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor-related receptor ligand (GITRL) on tumours. *Immunology.* 127:489-99, 2009.
  - Miyara, M., Wing, K., and Sakaguchi, S. Therapeutic approaches to allergy and autoimmunity based on FoxP3<sup>+</sup> regulatory T-cell activation and expansion. *J Allergy Clin Immunol.* 123:749-55, 2009.
  - Liu, Z., Tian, S., Falo, L. D. Jr, Sakaguchi, S., and You, Z. Therapeutic Immunity by Adoptive Tumor-primed CD4(+) T-cell Transfer in Combination With In Vivo GITR Ligation. *Mol Ther.* 17:1274-81, 2009.
  - Duan F, Lin Y, Liu C, Engelhorn ME, Cohen AD, Curran M, Sakaguchi S, Merghoub T, Terzulli S, Wolchok JD, Houghton AN. Immune rejection of mouse tumors expressing mutated self. *Cancer Res.* 69:3545-3553, 2009.
  - Ohkura, N., and Sakaguchi, S. A novel modifier of regulatory T cells *Nat Immunol.* 10: 685-686, 2009.
  - Miyara, M., Shima, T., Kitoh, A., Yoshioka, Y., Niwa, A., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., Mathian, A., Nakahata, T., Yamaguchi T., Nomura, T., Wing, K., Ono, M., Amoura, Z., Guy Gorochoy, G., and Sakaguchi, S. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4(+) T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity.* 30:899-911, 2009.
  - 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.* 21:379-391, 2009.
  - 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.* 87:606-614, 2009
2. 学会発表
- Tomoyuki Yamaguchi: Construction of regulatory T cells without Foxp3 Kyoto-University Global COE Center for Frontier Medicine International Symposium/ Retreat 2009 (2009.11.6-8 淡路島)
  - 橋本求、廣田圭司、吉富啓之、前田伸治、寺平晋、秋月修治、Prieto-Martin Paz、野村尚史、坂口教子、高橋実、藤田貞三、三森経世、坂口志文: 補体による Th-17 依存性自己免疫性関節炎の制御 第 39 回日本免疫学会総会学術集会 (2009.12.2-4 大阪)
  - 吉岡弓子、小野昌弘、小西郁生、坂口志文: Control of T cell differentiation and cytokine production by an axis made by a set of morphogens 第 39 回日本免疫学会総会学術集会 (2009.12.2-4 大阪)



- ・坂口志文、宮良亮：Functional delineation and differentiation dynamics of FoxP3-expressing subpopulation of human CD4+ T cells 第39回日本免疫学会総会学術集会（2009.12.2-4 大阪）
- ・山口智之、坂口志文：IL-2 低産生 CTLA-4 高発現の活性化T細胞は免疫抑制活性を持つ 第39回日本免疫学会総会学術集会（2009.12.2-4 大阪）
- ・秋月修治、坂口教子、藤森千尋、前田伸治、伊藤能永、橋本求、野村尚史、斎藤隆、三森経世、坂口志文：TCR シグナル不全による制御性T細胞異常と自己免疫病の発症 第39回日本免疫学会総会学術集会（2009.12.2-4 大阪）
- ・前田伸治、田中聡、廣田圭司、藤森千尋、野村尚史、秋月修治、橋本求、伊藤能永、坂口教子、坂口志文：正常 ZAP-70 の発現量操作による自己免疫性関節炎の誘導 第39回日本免疫学会総会学術集会（2009.12.2-4 大阪）

#### H.知的財産権の出願・登録状況

（予定も含む）

##### 1. 特許取得

出願番号 12/339,129

出願日 2005.10.3

発明者 坂口志文

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

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

### 新たな免疫制御戦略の探索に関する研究

研究分担者 三森 経世 京都大学大学院医学研究科・臨床免疫学・教授  
研究協力者 臼井 崇 京都大学大学院医学研究科・創薬医学融合拠点・特定准教授

#### 研究要旨

近年 IL-17 を産生する Th17 細胞の膠原病への関係が示唆され、IL-17 中和抗体の開発・治験も盛んに行われている。しかし抗体製剤は高薬価であり医療経済を圧迫する原因ともなっている。今回我々は、抗体製剤に頼らない IL-17 産生あるいは Th17 分化を抑制する戦略の一つとして、カルパスタチンの可能性を解析した。カルパスタチンはカルパインの内因性特異的阻害物質であり、それに対する抗体は関節リウマチや乾癬症例において高頻度に認められることが分かっている。内因性レトロウイルスを用いたカルパスタチンの過剰発現は Th1 および Th17 分化を抑制し、その機序として IL-2 産生への直接的な抑制および STAT3 のリン酸化抑制を認めた。また線維芽細胞におけるカルパスタチンの過剰発現は、LPS、IL-17 によって誘導される IL-6 産生をブロックし、T 細胞同様 STAT3 シグナルの減弱がその一因と考えられた。さらにカルパスタチン最小機能ドメイン発現コラーゲン特異的 T 細胞を、CIA マウスに移入したところ、関節炎抑制効果を認めた。以上の結果より、カルパイン阻害剤、あるいは分泌・膜透過型カルパスタチンによるカルパイン阻害療法は、関節リウマチ等の治療に有用である可能性があることが明らかになった。

#### A. 研究目的

近年 IL-17 を産生する Th17 細胞の膠原病への関係が示唆され、IL-17 中和抗体の開発・治験も盛んに行われており、すでにその関節リウマチ(RA)に対する有効性に関する報告も散見される。しかし抗体製剤の製造費は高く、引いては高薬価となり医療経済を圧迫する原因ともなっている。さらに IL-17 は感染症に対する生体防御因子でもあり、中和抗体製剤の効果を抗体存在期間中に取り除くことは困難である。従って中和抗体の長期的な投与は易感染性を増長させることが予想される。今回我々は、抗体製剤に頼らない IL-17 産生あるいは Th17 分化を抑制する戦略の一つとして、カルパスタチンの可能性を新たに見出したので報告する。

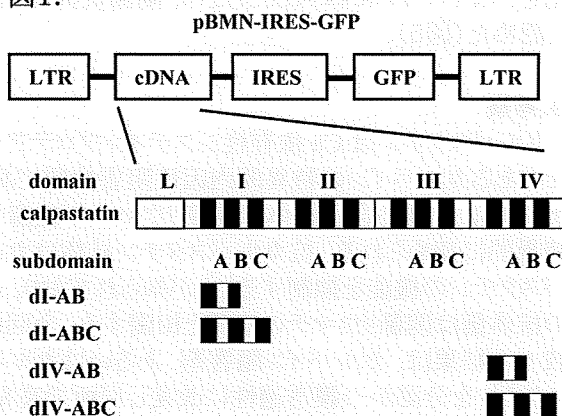
#### B. 研究方法

カルパイン、カルパスタチンおよびカルパスタチンの最小機能ドメインを含む cDNA をそれぞれクローニングし、レトロウイルスベクター発現系に組み込んで、マウス T 細胞、線維芽細胞(NIH-3T3)におけるサイトカイン産生修飾効果を解析した(図1)。同時に既存の膜透過性カルパイン阻害剤である E-64-d で同様の実験を行った。最後にコラーゲン特異的 T 細胞に、レトロウイルスベクター系を用いてカルパスタチン最小機能ドメインを含む cDNA を導入・発現させ、コラーゲン誘導関節炎(CIA)マウスに細胞移入し、その病態修飾効果を解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、DNA 組換え実験は、京都大学医学部で所定の手続きにて承認されており、問題はない。

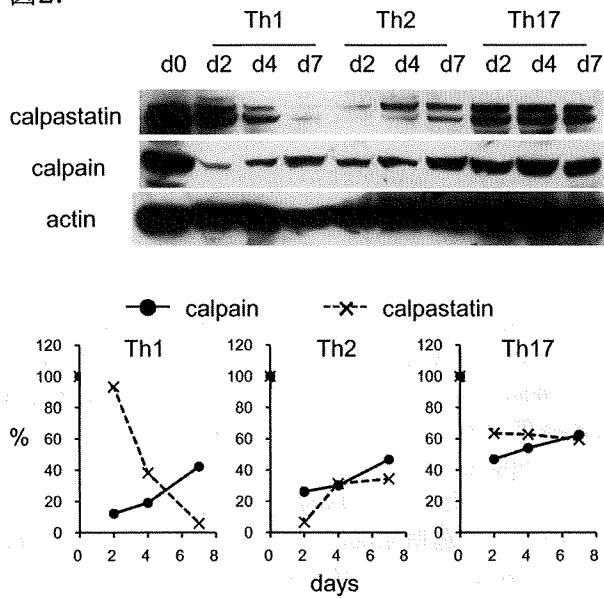
図1.



#### C. 研究結果

Naïve T 細胞からの Th1, Th2, Th17 細胞分化において、カルパインとカルパスタチン発現の経時的変化パターンは異なっており、カルパイン発現は Th1 細胞で優位、カルパスタチンの発現は Th2, Th17 の順で優位となる傾向を認めた(図2)。

図2.



レトロウイルスを用いたカルパスタチンの過剰発現は Th1 および Th17 分化を抑制し、その機序として IL-2 産生への直接的な抑制および STAT3 のリン酸化抑制を認めた(図3). 以上のことは E-64-d によっても再現された. さらに線維芽細胞におけるカルパスタチンの過剰発現は、LPS, IL-17 によって誘導される IL-6 産生をブロックし、T 細胞同様 STAT3 シグナルの減弱がその一因と考えられた(図4). カルパスタチン最小機能ドメイン発現コラーゲン特異的 T 細胞を、CIA マウスに移入したところ、関節炎抑制効果を認めた(図5).

#### D. 考察

カルパスタチンは Ca 依存性システインプロテアーゼであるカルパインの特異的内因性阻害物質であり、それに対する自己抗体は関節リウマチや乾癬で特異的に認められる. 抗カルパスタチン抗体はカルパスタチンの機能を抑制することが知られており、その抗体価は関節リウマチの病勢と相関する. 今回の我々の結果は、カルパイン阻害剤、あるいはカルパスタチンを分泌かつ膜透過性に改変し局所で高発現させることが、T 細胞においては Th1, Th17 分化を抑制し、非リンパ球系細胞においてはその IL-6 産生を抑制し、共同して抗炎症作用を発揮する可能性を示唆している.

図3.

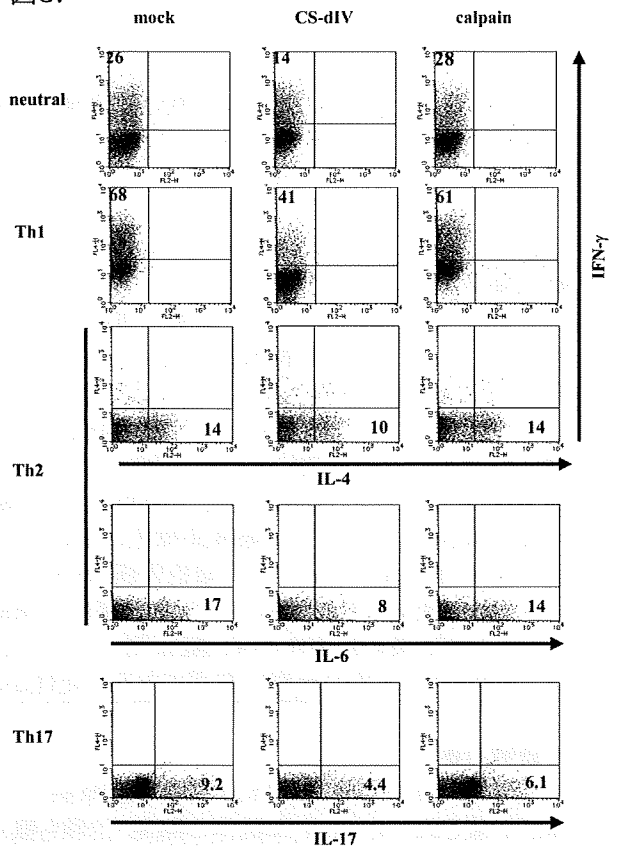


図4.

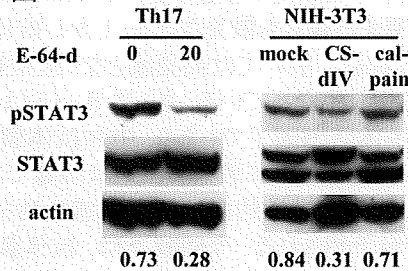
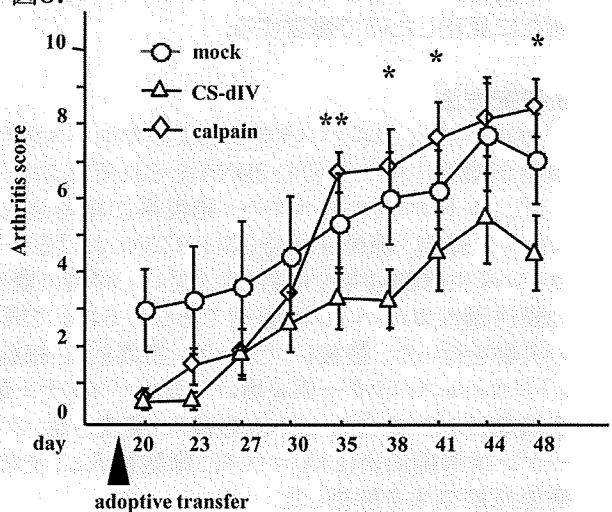


図5.



## E. 結論

カルパスタチン阻害剤,あるいはカルパスタチンの高発現は, Th 細胞に対しては Th1, Th17 分化を抑制し, 線維芽細胞においては IL-6 産生を抑制した. これらの作用機序として, IL-2 産生への直接的制御および, STAT3 シグナル抑制作用が認められた. カルパイン阻害剤,あるいは分泌・膜透過型カルパスタチンによるカルパイン阻害療法は, 関節リウマチ等の治療に有用である可能性があると考えられた.

## F. 健康危険情報

該当無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Nakashima R, Imura Y, Kobayashi S, Yukawa N, Yoshifuji H, Nojima T, Kawabata D, Ohmura K, Usui T, Fujii T, Okawa K, Mimori T: The RIG-I-like receptor IFIH1/MDA5 is a dermatomyositis-specific autoantigen recognized by anti-CADM-140 antibody. *Rheumatology (Oxford)*, 49(3):433-40, 2010.

2) Satoh T, Ishikawa O, Ihn H, Endo H, Kawaguchi Y, Sasaki T, Goto D, Takahashi K, Takahashi H, Misaki Y, Mimori T, Muro Y, Yazawa N, Sato S, Takehara K, Kuwana M: Clinical usefulness of anti-RNA polymerase III antibody measurement by enzyme-linked immunosorbent assay. *Rheumatology (Oxford)* 48(12):1570-4, 2009.

3) Fujii T, Okada M, Fujita Y, Sato T, Tanaka M, Usui T, Umehara H, Mimori T: Vaccination with autoreactive CD4(+)Th1 clones in lupus-prone MRL/Mp-Fas (lpr/lpr) mice. *J Autoimmun.* 33(2):125-34, 2009.

4) Ito Y, Usui T, Kobayashi S, Iguchi-Hashimoto M, Ito H, Yoshitomi H, Nakamura T, Shimizu M, Kawabata D, Yukawa N, Hashimoto M, Sakaguchi N, Sakaguchi S, Yoshifuji H, Nojima T, Ohmura K, Fujii T, Mimori T: Gamma/delta T cells are the predominant source of interleukin-17 in affected joints in collagen-induced arthritis, but not in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 60(8):2294-303, 2009.

### 2. 学会発表

1) 小林志緒, 臼井崇, 三森経世ほか: 血清 IL-17 値は関節リウマチの新規バイオマーカーである. 第 53 回日本リウマチ学会, 東京, 2009 年 4 月.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

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.