

免疫抑制性分子 TRAIL による自己免疫疾患の発症抑制機序に関する研究

研究分担者 千住 覚
研究協力者 西村泰治

熊本大学大学院生命科学研究部 免疫識別学分野 准教授
熊本大学大学院生命科学研究部 免疫識別学分野 教授

研究要旨

Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)は、T細胞の細胞増殖とB細胞の抗体産生の抑制、ならびに腫瘍細胞へのアポトーシスの誘導などの機能を有することが知られている。我々は以前の研究により、マウスのES細胞から*in vitro*で樹状細胞(ES-DC)を分化誘導する方法を開発し、さらに遺伝子改変により自己抗原MOGとTRAILを強制発現させたマウスES-DC(ES-DC-TRAIL/MOG)を作製して、これをマウス個体へ投与することにより、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の発症を予防できることを報告した。また我々は、このEAEの発症抑制にES-DC-TRAIL/MOGによるCD4⁺CD25⁺制御性T細胞の誘導、あるいは増殖促進が関与していることを明らかにした。そこで本年度は、TRAIL^{-/-}マウスに自己抗原MOGを免疫してEAEを誘導することにより、TRAILが制御性T細胞を中心としたT細胞の免疫応答に、どのような影響を与えるか検討した。その結果、EAEを誘導したTRAIL^{-/-}マウスでは、TRAIL^{+/+}マウスと比較して臨床症状の重症化と遷延化が観察され、これと相関するように脾臓および所属リンパ節細胞中のCD4⁺Foxp3⁺制御性T細胞の減少と、IFN- γ 産生性CD4⁺T細胞の増加が観察された。さらに、*in vitro*の実験では、CD4⁺CD25⁻T細胞の増殖反応は、可溶性TRAILにより濃度依存性に抑制されたのに対して、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞は影響を受けなかった。一方、TRAILのレセプターであるmDR5の発現量については、2種類のCD4⁺T細胞群の間に差は認められなかった。以上より、免疫抑制性分子TRAILは、IFN- γ 産生性CD4⁺T細胞や通常のCD4⁺T細胞に対して増殖抑制作用を示す一方で、制御性T細胞に対しては増殖促進作用を示す可能性が考えられた。

A. 研究目的

Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)は、TNF superfamilyに属するII型膜貫通タンパク質で、好中球やリンパ球、樹状細胞、マクロファージ等の様々な細胞に発現が確認されている。ヒトでは、TRAILのレセプターとして、デスレセプターとしてTRAIL-R1(DR4)とTRAIL-R2(DR5)が、デコイレセプターとしてTRAIL-R3(DcR1)とTRAIL-R4(DcR2)が、さらに可溶性レセプターとしてOsteoprotegerinが存在する。一方、マウスでは、デスレセプターは、TRAIL-R(mDR5)のみしか存在せず、これと2つのデコイレセプターであるmDc-TRAIL-R1とmDc-TRAIL-R2が現在までに報告されている。TRAILの機能としては、T細胞の細胞増殖とB細胞の抗体産生の抑制、ならびに腫瘍細胞へのアポトーシスの誘導などが知られている。またTRAIL遺伝子を標的破壊したTRAIL^{-/-}マウスでは、自己免疫疾患の自然発症は認められないものの、実験的自己免疫疾患が増悪

することが報告されている。

我々は、これまでの研究により、マウスのES細胞から*in vitro*において、樹状細胞(ES-DC)を分化誘導する方法を開発し、さらに遺伝子導入したES細胞をES-DCに分化させることにより、任意の遺伝子を発現するES-DCを作製する技術を開発している。さらに、この技術を用いて我々は、遺伝子改変により、自己抗原MOGとTRAILを強制発現させたマウスES-DC(ES-DC-TRAIL/MOG)を、マウス個体へ投与することにより、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の発症を予防できることを報告している。次いで、我々はこのEAEの発症抑制の機序の一因として、ES-DC-TRAIL/MOGによるCD4⁺CD25⁺制御性T細胞の誘導、あるいは増殖促進が関与していることを明らかにした。

そこで、本研究ではTRAIL^{-/-}マウスにEAEを誘導することにより、TRAILがCD4⁺T細胞、特に制御性T細胞に与える影響について検討することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

1. EAE の誘導と T 細胞のフローサイトメトリー解析

6 週から 8 週齢の C57BL/6 TRAIL^{+/+} (WT)、TRAIL^{-/-} (KO) マウスに MOG 自己抗原ペプチドを、完全フロイントアジュバントや百日咳毒素と共に免疫して EAE を誘導し、誘導後の臨床症状の評価を行った。臨床症状は以下のように評点した。0, 正常; 1, 尾部の軽度の麻痺; 2, 尾部の完全麻痺や歩行不安定; 3, 後肢筋力低下; 4, 後肢完全麻痺; 5, 四肢麻痺; 6, 死亡の 7 段階のスケールで評点した。また、EAE 誘導後 7 日、13 日、17 日、21 日での脾臓、所属リンパ節における、CD4⁺FoxP3⁺ T 細胞と IFN- γ 産生性 CD4⁺ T 細胞の頻度を、抗 CD4 抗体、抗 FoxP3 抗体、抗 IFN- γ 抗体を用いたフローサイトメトリーにより解析した。

2. T 細胞の増殖に及ぼす TRAIL の作用の解析

TRAIL-KO マウスの脾臓から CD4⁺CD25⁻ T 細胞、あるいは CD4⁺CD25⁺ 制御性 T 細胞を MACS にて分離後、細胞数 1.0×10^5 /well で、IL-2 (10U/ml) と抗 CD3/CD28 抗体 (1 μ g/ml) による刺激を加え、96 well flat プレート上で培養しつつ、さらにリコンビナント TRAIL (rTRAIL) を 1 ng/ml、10 ng/ml、100 ng/ml で各々の群に分けて加えた。それぞれの T 細胞の増殖反応は、60 時間後に ³H-Thymidine を加え、72 時間後における取り込み量を測定して定量した。さらに、CD4⁺CD25⁻ T 細胞、あるいは CD4⁺CD25⁺ 制御性 T 細胞における TRAIL 受容体 (mDR5) の発現量について、両者の細胞を各々抗 CD3/CD28 抗体 (1 μ g/ml) による刺激下で培養し、48 時間後に抗 mDR5 抗体を用いたフローサイトメトリーにより定量した。

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

C. 研究結果

1. WT および TRAIL-KO マウスにおける EAE 誘導後の臨床症状の評価

WT および TRAIL-KO マウスに MOG35-55 ペプチドとアジュバントを免疫し、EAE を誘導後、30 日間の経過観察を行い、臨床スケールにて症状の評価を行った (各 n=20)。その結果、TRAIL-KO マウスでは、WT マウスと比較して、EAE の早期発症や臨床症状の重症化が観察された (表 1)。

表 1 TRAIL-KO マウスにおける EAE の早期発症と臨床症状の重症化

マウス	平均発症日数	平均重症度スコア
WT マウス	8.7 \pm 0.7	2.5 \pm 0.4
TRAIL-KO マウス	6.6 \pm 0.6	3.4 \pm 0.5

2. EAE 誘導後の WT および TRAIL-KO マウスにおける所属リンパ節と脾臓の T 細胞分画の解析

WT および TRAIL-KO マウスに EAE を誘導後、7、13、17、21 日目の脾臓と所属リンパ節における CD4⁺Foxp3⁺ T 細胞と IFN- γ 産生性 CD4⁺ T 細胞の頻度を、フローサイトメトリーにより定量した (図 1)。

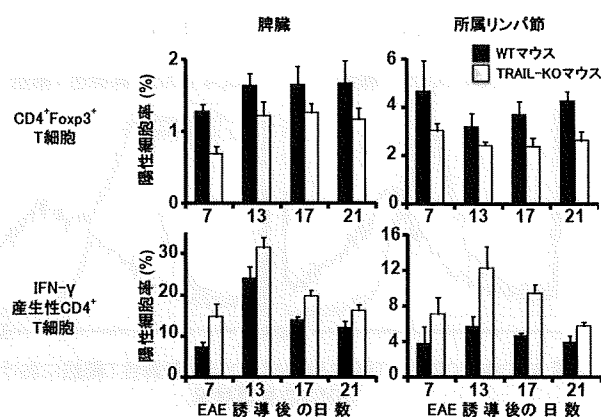


図 1 EAE 誘導後の TRAIL-KO マウスにおける CD4⁺Foxp3⁺ T 細胞の頻度の減少と IFN- γ 産生性 CD4⁺ T 細胞の頻度の増加

その結果、TRAIL-KO マウスでは、WT マウスと比較して、両臓器でともに CD4⁺Foxp3⁺ T 細胞の減少と、IFN- γ 産生性 CD4⁺ T 細胞の増加が観察された (各 n=5)。

3. TRAIL が *In vitro* における Treg 細胞の増殖に与える影響に関する検討

次に我々は、*in vitro* において、TRAIL が細胞増殖に与える影響について検討した。ナイーブな TRAIL-KO マウスの脾臓から分離した CD4⁺CD25⁻ T 細胞、あるいは CD4⁺CD25⁺ 制御性 T 細胞を IL-2、抗 CD3/CD28 抗体の刺激下で rTRAIL を加えて培養し、3 日後に ³H-Thymidine の細胞内取り込みを定量して、増殖反応を観察した。

その結果、CD4⁺CD25⁻ T 細胞では細胞増殖が rTRAIL の濃度に依存して抑制されたのに対して、CD4⁺CD25⁺ 制御性 T 細胞では、その影響は認められなかった (図 2)。

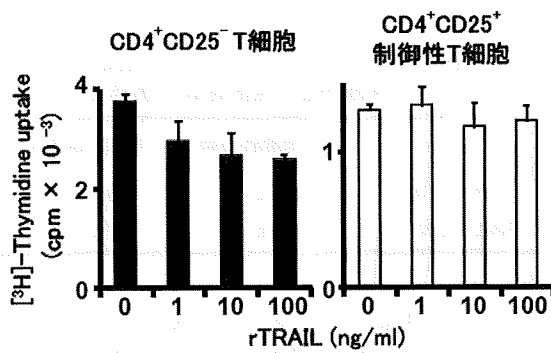


図 2 rTRAILによるCD4⁺CD25⁻ T細胞の増殖抑制

しかし、抗 CD3/CD28 抗体刺激 48 時間後の CD4⁺CD25⁻ T 細胞と CD4⁺CD25⁺ 制御性 T 細胞における mDR5 の発現状況は、2 種類の CD4⁺ T 細胞群の間に差は認められなかった (図 3)。

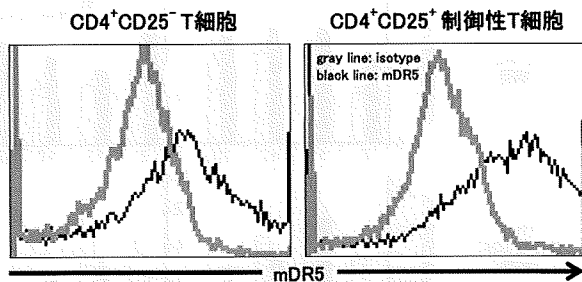


図 3 CD4⁺CD25⁻ T細胞とCD4⁺CD25⁺ 制御性T細胞における mDR5の発現状況

D. 考察

本研究成果により TRAIL は、IFN- γ 産生性 CD4⁺ T 細胞や通常の CD4⁺ T 細胞に対しては増殖抑制を誘導するが、制御性 T 細胞に対しては細胞増殖を誘導するか、あるいは影響を与えないという、相反する作用を示すことが明らかとなった。しかし、TRAIL 受容体である mDR5 の発現は、2 種類の細胞群で差が認められなかったため、デコイレセプターである mDc-TRAIL-R1 や、mDc-TRAIL-R2DR5 の発現量が異なっている可能性や、下流のシグナル伝達機構に相違が存在する可能性が示唆された。

以上より、自己免疫疾患の治療において、TRAIL が IFN- γ 産生性 CD4⁺ T 細胞等の自己反応性 T 細胞に対しては免疫抑制を誘導するが、制御性 T 細胞の増殖を促進させる可能性がある、有望な治療分子になり得ることが示唆された。

E. 結論

免疫抑制性分子 TRAIL は EAE において、2 つの異なる免疫制御機能を有していることを明らかにした。一つは、IFN- γ 産生性 CD4⁺ T 細胞や通常の CD4⁺

T 細胞に対する増殖抑制作用であり、もう一つは、CD4⁺CD25⁺ 制御性 T 細胞に対する増殖促進作用である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Senju, S.*, Haruta, M., (他 6 名), and Nishimura, Y. Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27: 1021-1031, 2009.
- 2) Uemura, Y., Senju, S., (他 20 名) Cytokine-dependent modification of IL-12p70 and IL-23 balance in dendritic cells by ligand activation of Valpha24 invariant NKT cells. *J. Immunol.* 183: 201-208, 2009.
- 3) Inoue, M., Senju, S., (他 3 名), and Nishimura, Y.* An in vivo model of priming of antigen-specific human CTL by Mo-DC in NOD/Shi-scid IL2 γ^{null} (NOG) mice. *Immunol. Lett.* 126:67-72, 2009.
- 4) Fukushima, S., Hirata, S., (他 7 名), Nishimura, Y. and Senju, S.* Multiple antigen-targeted immunotherapy with α -galactosylceramide-loaded and genetically engineered dendritic cells derived from embryonic stem cells. *J. Immunotherapy* 32: 219-231, 2009.
- 5) Yokomine, K., Senju, S., (他 14 名), and Nishimura, Y. The Forkhead Box M1 Transcription Factor, as a Possible Immunotherapeutic Tumor-Associated Antigen. *Int. J. Cancer* in press
- 6) Inoue, M., Senju, S., (他 12 名), and Nishimura, Y. Identification of SPARC as a candidate target antigen for immunotherapy of various cancers. *Int. J. Cancer* in press

2. 学会発表

- 1) Effect of TRAIL on regulatory T cell 池田 徳典、平田 真哉、福島 聡、松永 雄亮、伊藤 隆明、内野 誠、千住 覚、西村 泰治 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪)、2009 年 12 月 2 日～4 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

本年度の研究に関連したものはない

(4) 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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			in press
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.	79	188-195	2009
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	68(6)	1030-1035	2009
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.	68(8)	1366-1367	2009
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	114(12)	2553-2559	2009
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 antiprotease antibody on thrombin generation.	Arthritis Rheum	60(8)	2457-2467	2009
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	36(6)	1240-1248	2009
Hashimoto S, Yamada K, Kawata T, Mochizuki T, Schnermann JB, Koike T.	Abnormal Autoregulation and Tubuloglomerular Feedback in Prediabetic and Diabetic OLETF rats.	Am J Physiol Renal Physiol.	296	598-604	2009
Schmidt M, Sievers E, Endo T, Lu D, Carson D, Schmidt-Wolf IG.	Targeting Wnt pathway in lymphoma and myeloma cells.	Br J Haematol.	144(5)	796-798	2009
Nakamura A, Terauchi Y, Ohyama S, Kubota J, Shimazaki H, Nambu T, Takamoto I, Kubota N, Eiki J, Yoshioka N, Kadowaki T, Koike T.	Impact of small-molecule glucokinase activator on glucose metabolism and beta-cell mass.	Endocrinology	150(3)	1147-1154	2009
Endo T, Fujimoto K, Nishio M, Yamamoto S, Obara M, Sato N, Koike T.	Clearance of hepatitis C virus after changing the HAART regimen in a patient infected with hepatitis C virus and the human immunodeficiency virus.	J Med Virol	81(6)	979-982	2009
Nishio M, Endo T, Fujimoto K, Yamamoto S, Obara M, Yamaguchi K, Takeda Y, Goto H, Kasahara I, Sato N, Koike T.	FCGR3A-158V/F polymorphism may correlate with the levels of immunoglobulin in patients with non-Hodgkin's lymphoma after rituximab treatment as an adjuvant to autologous stem cell transplantation.	Eur J Haematol.	82(2)	143-147	2009
Yoshioka N, Kurihara Y, Manda N, Komori K, Kato M, Kijima H, Wada N, Yanagisawa K, Aoki S, Ono Y, Koike T.	Step-up therapy with biphasic insulin aspart-70/30—Sapporo 1-2-3 study	Diabetes Res Clin Pract.	85(1)	47-52	2009
Kondo T, El Khattabi I, Nishimura W, Laybutt DR, Geraldine P, Shah S, King G, Bonner-Weir S, Weir G, Sharma A.	p38 MAPK is a Major Regulator of MafA Protein Stability under Oxidative Stress	Mol Endocrinol.	23(8)	1281-1290	2009
Kunieda T, Nakanishi N, Matsubara H, Ohe T, Okano Y, Kondo H, Nishimura M, Shirato K, Tanabe N, Homma S, Yoshida S, Inokuma S, Kodama M, Koike T, Hishida H.	Effects of Long-Acting Beraprost Sodium (TRK-100STP) in Japanese Patients With Pulmonary Arterial Hypertension.	Int Heart J.	50(4)	513-529	2009

Kasahara I, Nishio M, Yamamoto S, Endo T, Fujimoto K, Yamaguchi K, Takeda Y, Goto H, Sato N, Koike T.	Cord blood transplantation with a reduced-intensity conditioning regimen for patients with relapsed aggressive multiple myeloma after cytoreduction with bortezomib.	Int J Hematol.	90(3)	413-415	2009
Fujimoto K, Endo T, Nishio M, Obara M, Yamaguchi K, Takeda Y, Goto H, Kasahara I, Sato N, Koike T.	Complete remission of splenic marginal zone lymphoma after an acute flare-up of hepatitis B in a hepatitis B virus carrier.	Int J Hematol.	90(5)	601-604	2009
Oshiumi, H., Matsumoto, M., Hatakeyama, S. and Seya, T	Riplet/RNF135, a RING-finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon- β induction during the early phase of viral infection.	J. Biol. Chem.	284	807-817	2009
Kameda, H., Watanabe, M., Bohgaki, M., Tsukiyama, T. and Hatakeyama, S.	Inhibition of NF- κ B signaling via tyrosine phosphorylation of Ymer.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	378	744-749	2009
Miyajima, N., Maruyama, S., Nonomura, K. and Hatakeyama, S.	TRIM36 interacts with the kinetochore protein CENP-H and delays cell cycle progression.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	381	383-387	2009
Matsumoto, M., Oyamada, K., Takahashi, H., Sato, T., Hatakeyama, S. and Nakayama, K.I.	Large-scale proteomic analysis of tyrosine phosphorylation induced by TCR or BCR activation reveals new signaling pathways.	Proteomics	9	3549-3563	2009
Kimura, T., Sakai, M., Tabu, K., Wang, L., Tsunematsu, R., Tsuda, M., Sawa, H., Nagashima, K., Nishihara, H., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Ladanyi, M., Tanaka, S. and Nakayama, K.I.	Human synovial sarcoma proto-oncogene Syt is essential for early embryonic development through the regulation of cell migration.	Lab. Invest.	89	645-656	2009
Maeda, H., Miyajima, N., Kano, S., Tsukiyama, T., Okumura, F., Fukuda, S. and Hatakeyama, S.	Ubiquitin-conjugating enzyme UBE2Q2 suppresses cell proliferation and is down-regulated in recurrent head and neck cancer.	Mol. Cancer Res.	7	1553-1562	2009
Watanabe, M., Tsukiyama, T. and Hatakeyama, S.	TRIM31 interacts with p52Shc and inhibits Src-induced anchorage-independent growth.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	388	422-427	2009
Yoshida, K., Watanabe, M. and Hatakeyama, S.	ZNRF1 interacts with tubulin and regulates cell morphogenesis.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	389	506-511	2009
Kikuchi, M., Okumura, F., Tsukiyama, T., Watanabe, M., Miyajima, N., Tanaka, J., Imamura, M. and Hatakeyama, S.	TRIM24 mediates ligand-dependent activation of androgen receptor and is repressed by a bromodomain-containing protein, BRD7, in prostate cancer cells.	BBA-Mol. Cell Res.	1793	1828-1836	2009
Suizu, F., Hiramuki, Y., Okumura, F., Matsuda, M., Okumura, A.J., Hirata, N., Narita, M., Kohno, T., Yokota, J., Bohgaki, M., Obuse, C., Hatakeyama, S., Obata, T. and Noguchi, M.	The E3 ligase TTC3 facilitates ubiquitination and degradation of phosphorylated Akt.	Dev. Cell	17	800-810	2009
Bohgaki, M., Matsumoto, M., Atsumi, T., Kondo, T., Yasuda, S., Horita, T., Nakayama, K.I., Okumura, F., Hatakeyama, S. and Koike, T.	Plasma gelsolin facilitates interaction between β 2 glycoprotein I and α 5 β 1 integrin.	J. Cell. Mol. Med.			in press
Sasai, M., Tatematsu, M., Oshiumi, H., Funami, K., Matsumoto, M., Hatakeyama, S. and Seya, T.	Direct binding of TRAF2 and TRAF6 to TICAM-1/TRIF adaptor participates in activation of the Toll-like receptor 3/4 pathway	Mol. Immunol.			in press
Iwanami, K., Matsumoto, I., Tanaka, Y., Inoue, A., Minami, R., Hayashi, T., Goto, D., Ito, S., Nishimura, Y., and Sumida, T.	Altered peptide ligands inhibit glucose-6-phosphate isomerase (GPI) peptide-induced arthritis.	Arthritis Res. Ther.			in press
Ito, I., Kawasaki, A., Ito, S., Kondo, S., Sugihara, M., Horikoshi, M., Hayashi, T., Goto, D., Matsumoto, I., Tsutsumi, A., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Matsuta, K., Sumida, T., and Tsuchiya, N.,	Replication of association between FAM167A(C8orf13)-BLK region and rheumatoid arthritis in a Japanese population.	Ann. Rheum. Dis.			in press

Segawa, S., Goto, D., Yoshiga, Y., Sugihara, M., Hayashi, T., Chino, Y., Matsumoto, I., Ito, S., Ito, S., and Sumida, T.	Inhibition of TGF- β signaling attenuates IL-18 plus IL-2-induced interstitial lung disease.	Clin. Exp. Immunol.				in press
Wang, Y., Ito, S., Chino, Y., Goto, D., Matsumoto, I., Murata, H., Tsutsumi, A., Uchida, K., Usui, J., Yamagata, K., and Sumida, T.	Analysis of cytokine balance in lupus nephritis by laser-microdissection.	Clini. Exp. Immunol.				in press
Inoue, A., Matsumoto, I., Tanaka, Y., Iwanami, K., Goto, D., Ito, S., and Sumida, T.	Role of tumor necrosis factor- α -induced adipose-related protein in autoimmune arthritis.	Arthritis Rheu. Ther.				in press
Tanaka-Watanabe, Y., Matsumoto, I., Iwamami, K., Inoue, A., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T.	B cells have crucial role as autoantibody producers in arthritis mediated by glucose-6-phosphate isomerase.	Clin. Exp. Immunol.	155	285-294		2009.
Ito, I., Kawasaki, A., Ito, S., Hayashi, T., Goto, D., Matsumoto, I., Tsutsumi, A., Hom, G., Graham, R.R., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Ohashi, J., Behrens, T.W., Sumida, T., and Tsuchiya, N.	Replication of the association between C8orf13-BLK region and systemic lupus erythematosus in a Japanese population.	Arthritis Rheum.	60	553-558		2009
Kawaguchi, Y., Wakamatsu, E., Matsumoto, I., Nishimagi, E., Kamatani, N., Satoh, T., Kuwana, M., Sumida, T., and Hara, M.	Muscarinic-3 acetylcholine receptor autoantibody in patients with systemic sclerosis: contribution to severe gastrointestinal tract dysmotility.	Ann. Rheum. Dis.	68	710-714		2009
Wakamatsu, E., Matsumoto, I., Yoshiga, Y., Iwanami, K., Tsuboi, H., Hayashi, T., Goto, D., Ito, S., and Sumida, T.	Altered peptide ligands regulate type II collagen-induced arthritis in mice.	Mod. Rheumatol.	19	366-371		2009
Segawa, S., Goto, D., Yoshiga, Y., Hayashi, T., Matsumoto, I., Ito, S., and Sumida, T.	The decrement of soluble CD1d proteins affects the function of NKT cells in patients with rheumatoid arthritis.	Int. J. Mol. Med.	24	481-486		2009
Tsutsumi, A., Kobayashi, T., Ito, S., Goto, D., Matsumoto, I., Yoshie, H., and Sumida, T.	Mannose binding lectin gene polymorphism and the severity of chronic periodontitis.	Jap. J. Clin. Immunol.				in press
Kobayashi, T., Murasawa, A., Ito, S., Yamamoto, K., Komatsu, Y., Abe, A., Sumida, T., and Yoshie, H.	Cytokine gene polymorphisms associated with rheumatoid arthritis and periodontitis in Japanese adults.	J. Periodontology				in press
Okamura Tomohisa, Fujio Keishi, Shibuya Mihoko, Sumitomo Shuji, Shoda Hirofumi, Sakaguchi Shimon, Yamamoto Kazuhiko.	CD4 ⁺ CD25 ⁺ LAG3 ⁺ regulatory T cells controlled by the transcription factor Egr-2.	Proc Natl Acad Sci U S A.	106	13974-9		2009
Okuyama 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 and Rheumatism	60(8)	2505-2512		2009
Kohsaka H	Current insights in polymyositis and dermatomyositis	Clinical and Experimental Neuroimmunology	1	22-23		2010
Christian Klemann, Benjamin JE Raveney, Anna K Klemann, Tomoko Ozawa, Stephan von Horsten, Koichi Shudo, Shinji Oki, Takashi Yamamura	Synthetic retinoid AM80 inhibits Th17 cells and ameliorates EAE	Am. J. Pathol.	174	2234-45		2009
Michael-Mark Theil, Sachiko Miyake, J. Ludovic Croxford, Hiroaki Yokote, Hiroshi Hosoda, Julia Schween, Stephan von Horsten, Asako Chiba, Youwei Lin, Shinji Oki, Takashi Akamizu, Kenji Kangawa, Takashi Yamamura	Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by ghrelin	J. Immunol.	181	2859-66		2009

Satoh T, Pandey JP, Okazaki Y, Asahi A, Kawakami Y, Ikeda Y, Kuwana M.	Single nucleotide polymorphism of interleukin-1 β associated with <i>Helicobacter pylori</i> infection in immune thrombocytopenic purpura.	Tissue Antigens	73(4)	353-357	2009
Takada T, Hirakata M, Suwa A, Kaneko Y, Kuwana M, Ishihara T, Ikeda Y.	Clinical and histopathological features of myopathies in Japanese patients with anti-SRP autoantibodies.	Mod Rheumatol	19(2)	156-164	2009
Kawaguchi Y, Nakamura Y, Matsumoto I, Nishimaki, E, Satoh T, Kuwana M, Sumida T, Hara M.	Muscarinic-3 acetylcholine receptor autoantibody in patients with systemic sclerosis: contribution to severe gastrointestinal tract dysmotility.	Ann Rheum Dis	68(5)	710-714	2009
Nagata E, Hattori H, Kato M, Ogasawara S, Suzuki S, Shibata M, Shimizu T, Hamada J, Osada T, Takaoka R, Kuwana M, Tsunoda T, Aiso S, Takizawa S, Suzuki N, Takagi S.	Identification of biomarkers associated with migraine with aura.	Neurosci Res	64(1)	104-110	2009
Fujikawa K, Kawakami A, Kaji K, Fujimoto M, Kawashiri S, Iwamoto N, Aramaki T, Ichinose K, Tamai M, Kamachi M, Nakamura H, Ida H, Origuchi T, Ishimoto H, Mukae H, Kuwana M, Kohno S, Takehara K, Sato S, Eguchi K.	Association of distinctive clinical subsets with myositis-specific autoantibodies toward anti-155/140kD polypeptides, anti-140kD polypeptides, and anti-aminoacyl tRNA synthetases in patients with dermatomyositis of Japanese population: a single-center, cross-sectional study.	Scand J Rheumatol	38(4)	1-5	2009
Arnold DM, Bernotas A, Nazi I, Stasi R, Kuwana M, Liu Y, Kelton JG, Crowther M.	Platelet count response to <i>H. pylori</i> treatment in patients with immune thrombocytopenic purpura with and without <i>H. pylori</i> infection: a systematic review.	Haematologica	94(6)	850-856	2009
Sato S, Hoshino K, Satoh T, Fujita T, Kawakami Y, Fujita T, 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	60(7)	2193-2200	2009
Fertig N, Domsic RT, Rodriguez-Reyna T, Kuwana M, Lucus M, Medsger TA Jr, Feghali-Bostwick CA.	Anti-U11/U12 RNP antibodies in systemic sclerosis: A new serologic marker associated with pulmonary fibrosis.	Arthritis Rheum	61(7)	958-965	2009
Matsuyama T, Kuwana M, Matsumoto M, Isonishi A, Inokuma S, Fujimura Y.	Heterogeneous pathogenic processes of thrombotic microangiopathies in patients with connective tissue diseases.	Thromb Haemost	102(2)	371-378	2009
Yoshida H, Ishida H, Yoshihara T, Kamesaki T, Kuwana M, Imamura T, Morimoto A.	Complication of Evans' syndrome in an infant with hereditary spherocytosis: a case report.	J Hematol Oncol	2	40	2009
Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J.	Long-term beneficial effects of statins on vascular manifestations in patients with systemic sclerosis.	Mod Rheumatol	19(5)	530-535	2009
Suzuki S, Utsugisawa K, Yoshikawa H, Motomura M, Matsuyama S, Yokoyama K, Nagae Y, Maruta T, Satoh T, Sato H, Kuwana M, Suzuki N.	Autoimmune targets to heart and skeletal muscles in myasthenia gravis.	Arch Neurol	66(11)	1334-1338	2009
Kawaguchi Y, Ota Y, Kawamoto M, Ito I, Tsuchiya N, Sugiura T, Katsumata Y, Soejima M, Sato S, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Kuwana M, Yamanaka H, Hara M.	Association study of a polymorphism of the <i>CTGF</i> gene and susceptibility to systemic sclerosis in the Japanese population.	Ann Rheum Dis	68(12)	1921-1924	2009
Seta N, Kobayashi S, Hashimoto H, Kuwana M.	Characterization of autoreactive T-cell clones to myeloperoxidase in patients with microscopic polyangiitis and healthy individuals.	Clin Exp Rheumatol	27(5)	826-829	2009

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	48(12)	1570-1574	2009
Kaneko Y, Suwa A, Hirakata M, Ikeda Y, Kuwana M	Clinical associations with autoantibody reactivities to individual components of U1 small nuclear ribonucleoprotein.	Lupus			in press
Koreeda Y, Higashimoto I, Yamamoto M, Takahashi M, Kaji K, Fujimoto M, Kuwana M, Fukuda Y, Arimura K.	Clinical and pathological findings of interstitial lung disease patients with anti-aminoacyl-tRNA synthetase autoantibodies.	Intern Med			in press
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+ regulatory T cells.	Immunity.	31	609-620	2009
Sakaguchi, S., Wing, K., and Yamaguchi, T.	Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg.	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+ 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 Gorochov, 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
Ishikawa Y, Yukawa N, Ohmura K, Hosono Y, Imura Y, Kawabata D, Nojima T, Fujii T, Usui T, Mimori T	Etanercept-induced anti-Jo-1-antibody-positive polymyositis in a patient with rheumatoid arthritis: a case report and review of the literature.	Clin Rheumatol. [Epub ahead of print]			2010
Higashi T, Nakayama T, Fukuhara S, Yamanaka H, Mimori T, Ryu J, Yonenobu K, Murata N, Matsuno H, Ishikawa H, Ochi T	Opinions of Japanese rheumatology physicians regarding clinical practice guidelines.	Int J Qual Health Care. [Epub ahead of print]			2010
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
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
Kobayashi K, Okamoto Y, Inoue H, Usui T, Ihara M, Kawamata J, Miki Y, Mimori T, Tomimoto H, Takahashi R	Leukoencephalopathy with cognitive impairment following tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis (RA) .	Intern Med	48(15)	1307-9	2009
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
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
Kyogoku C, Morinobu A, Nishimura K, Sugiyama D, Hashimoto H, Tokano Y, Mimori T, Terao C, Matsuda F, Kuno T, Kumagai S.	Lack of association between tyrosine kinase 2 (TYK2) gene polymorphisms and susceptibility to SLE in a Japanese population	Mod Rheumatol	19(4)	401-6	2009
Kitaori T, Ito H, Yoshitomi H, Aoyama T, Fujii T, Mimori T, Nakamura T	Severe erosive arthropathy requiring surgical treatments in systemic lupus erythematosus	Mod Rheumatol.	19(4)	431-6	2009
Kondo T, Inoue H, Usui T, Mimori T, Tomimoto H, Vernino S, Takahashi R	Autoimmune autonomic ganglionopathy with Sjögren's syndrome: significance of ganglionic acetylcholine receptor antibody and therapeutic approach.	Auton Neurosci	146(1-2)	33-5	2009
Senju S, Haruta M, Matsunaga Y, Fukushima S, Ikeda T, Takahashi K, Okita K, Yamanaka S, Nishimura Y.	Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells.	Stem Cells.	27(5)	1021-1031	2009

Uemura Y, Liu TY, Narita Y, Suzuki M, Nakatsura R, Araki T, Matsumoto M, Iwai LK, Hirose N, Matsuoka Y, Murakami M, Kimura T, Hase M, Kohno H, Sasaki Y, Ichihara Y, Ishihara O, Kikuchi H, Sakamoto Y, Jiao SC, Senju S, Sonoda Y.	Cytokine-dependent modification of IL-12p70 and IL-23 balance in dendritic cells by ligand activation of Valpha24 invariant NKT cells.	J. Immunol	183 (1)	201-208	2009
Inoue M, Senju S, Hirata S, Irie A, Baba H, and Nishimura Y.	An in vivo model of priming of antigen-specific human CTL by Mo-DC in NOD/Shi-scid IL2rg ^{null} (NOG) mice.	Immunol. Lett.	126 (1-2)	67-72	2009
Fukushima S, Hirata S, Motomura Y, Fukuma D, Matsunaga Y, Ikuta Y, Ikeda T, Kageshita T, Ihn H, Nishimura Y, and Senju S.	Multiple antigen-targeted immunotherapy with α -galactosylceramide-loaded and genetically engineered dendritic cells derived from embryonic stem cells.	J. Immunotherapy	32(3)	219-231	2009
Yokomine K, Senju S, Nakatsura T, Irie A, Hayashida Y, Ikuta Y, Harao M, Imai K, Baba H, Iwase H, Nomori H, Takahashi K, Daigo Y, Tsunoda T, Nakamura Y, Sasaki Y, and Nishimura Y.	The Forkhead Box M1 Transcription Factor, as a Possible Immunotherapeutic Tumor-Associated Antigen.	Int. J. Cancer			in press
Inoue M, Senju S, Hirata S, Ikuta Y, Hayashida Y, Irie A, Harao M, Imai K, Tomita Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Ito T, Nakamura Y, Baba H, and Nishimura Y.	Identification of SPARC as a candidate target antigen for immunotherapy of varipus cancers.	Int. J. Cancer			in press
Chen Y-Z, Liu G, Senju S, Wang Q, Irie A, Haruta M, Matsui M, Yasui F, Kohara M, and Nishimura Y.	Identification of SARS-CoV spike protein-derived and HLA-A2-restricted human CTL epitope by using a new muramyl dipeptide-derivative adjuvant.	International Journal of Immunopathology and Pharmacology			in press
Senju S, Hirata S, Motomura Y, Fukuma D, Matsunaga Y, Fukushima S, Matsuyoshi H, Nishimura Y.	Pluripotent stem cells as source of dendritic cells for immune therapy.	Int. J. Hematol.			in press

(5) 平成 21 年度班会議プログラム・抄録

厚生労働省難治性疾患克服研究事業

「新たな診断・治療法開発のための免疫学的手法の開発」班

平成21年度 班会議

プログラム・抄録集

研究代表者 小池 隆夫

日時：平成21年 12月 10日(木) 13:00～17:00

場所：丸ビルホール&コンファレンススクエア8F Room3

東京都千代田区丸の内2-4-1

プログラム

開会の辞 (13:00) 研究代表者 小池 隆夫

1. 「制御性T細胞を用いた自己免疫の抑制に関する研究」 (13:05)
坂口 志文 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
2. 「動物モデルを用いた多発性筋炎・皮膚筋炎の病態解明と新治療法開発」 (13:25)
上阪 等 沖山 奈緒子
東京医科歯科大学 膠原病・リウマチ内科
3. 「新たな免疫制御戦略の探索」 (13:45)
三森 経世 臼井 崇
京都大学大学院医学研究科 内科学講座・臨床免疫学
4. 「抗リン脂質抗体による向血栓細胞活性化機序: 遺伝子多型検出による検討」 (14:05)
渥美 達也 加藤 将
北海道大学大学院医学研究科 内科学講座・第二内科
5. 「免疫抑制性分子 TRAIL による自己免疫疾患の発症抑制機序に関する研究」 (14:25)
千住 覚 西村 泰治
熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学分野

休 憩 (14:45)

全体会議 (15:00)

6. 「ヒト CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞の同定」 (15:15)
山本 一彦
東京大学医学部付属病院 アレルギーリウマチ内科
7. 「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」
桑名 正隆 花岡 洋成 (15:35)
慶應義塾大学医学部 リウマチ内科

8. 「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」 (15:55)

山村 隆 大木 伸司

国立精神神経センター神経研究所免疫研究部

9. 「自己免疫疾患に関与するユビキチン関連分子の治療に向けた応用」 (16:15)

畠山 鎮次

北海道大学大学院医学研究科生化学講座 医化学分野

10. 「新規糖脂質 α -carba-galactosylceramide を介した関節炎の制御」 (16:35)

住田 孝之

筑波大学大学院人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻臨床免疫学

閉会の辞 (16:55)

制御性 T 細胞を用いた自己免疫の抑制に関する研究

研究分担者氏名 坂口 志文
京都大学再生医科学研究所 教授

正常個体中の CD4+ T 細胞の約 10% をしめる Foxp3+CD25+CD4+ 制御性 T 細胞は、免疫系の恒常性、免疫自己寛容の維持に必須の役割を担っている。制御性 T 細胞の欠損あるいは機能不全は様々な自己免疫病の原因となる。本研究では、制御性 T 細胞による免疫抑制機構を明らかにすることにより、自己免疫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している。制御性 T 細胞は転写因子 Foxp3 を特異的に発現しているが、Foxp3 は転写因子 Runx1 と結合して働いている。今回、Runx たんぱく共通の co-factor である、Cbf β を制御性 T 細胞特異的に欠損させたコンディショナルノックアウトマウス、Runx1、Runx3 のコンディショナルノックアウトマウスを作成し、解析した。Cbf β や Run1 を欠損した制御性 T 細胞を持つマウスでは、リンパ球増殖疾患、自己免疫病、IgE の高産生が認められた。Cbf β 欠損制御性 T 細胞は、*in vivo* および *in vitro* で抑制機能が低下していた。microarray 解析などを用いた解析の結果、Cbf β 欠損制御性 T 細胞では、Foxp3 の発現低下や IL-4 の高産生を含む多様な遺伝子発現パターンの変化が検出された。制御性 T 細胞内で、Runx1- Cbf β 複合体が転写を直接的に制御している遺伝子を同定する目的でクロマチン免疫沈降を用いて解析した結果、Runx1- Cbf β 複合体が 3000 以上の遺伝子座に結合することが示された。その中には *foxp3* や *Il4* の転写制御領域が含まれていた。以上の結果より、制御性 T 細胞内で Runx1- Cbf β 複合体は、多様な遺伝子の発現に関与しており、制御性 T 細胞が Foxp3 の発現を維持し抑制機能を発揮する上で必須であることが示された。

今後、制御性 T 細胞における転写制御機構の詳細を解析するとともに、Foxp3、Runx- Cbf β 複合体により制御されている遺伝子群の中から、抑制機能に重要な遺伝子や機能評価に適した遺伝子や治療の標的になりうる遺伝子の同定を進めたい。

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・リウマチ内科 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

A. 研究目的

多発性筋炎 (PM) の新規マウスモデルである C 蛋白誘導性筋炎 (CIM) の特性を解析するとともに PM の新治療法開発へつなげる。特に、CIM が自己免疫性疾患のうちでも、CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が直接筋障害を起こしている PM と同様の病態であることを、さらに明らかにしていく。

今までの研究で、CIM では、CD8 とパーフォリン陽性細胞が筋炎部位に浸潤しており、CD8T 細胞を抗体で除去したマウスでは CIM の発症が抑制される。そこで、養子移入系を用いて、CTL が Effector 細胞であることをさらに明らかにする。また、CIM 誘導性 C 蛋白断片の中で、CTL が認識する MHC クラス I エピトープペプチドの一つにて自己免疫性筋炎が誘導出来ているため、この筋炎の解析も試みる。

B. 方法

- (1) MHC クラス I を発現しない $\beta 2$ ミクログロブリン欠損マウスや、パーフォリン欠損マウスへ CIM 誘導を行い、筋炎の発症を観察する。
- (2) B6 マウスへの CIM 養子移入系を確立し、CD8 または CD4 T 細胞のみの移入も試みる。
- (3) 昨年、骨髄誘導性樹状細胞 (BMDC) に当該ペプチドを提示させて B6 マウスに実験的筋炎を誘導する系を確立した。このペプチド誘導性筋炎マウスの所属リンパ節細胞を当該ペプチドで刺激し、ELISpot にて $IFN\gamma$ の産生を確認する。また、CD8 除去抗体投与下での、ペプチド誘導性筋炎の発症を観察する。

C. 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に CIM 筋炎スコアは低減し、特に壊死筋線維数の減少が顕著であった。
- (2) CIM マウス所属リンパ節細胞を、C 蛋白断片提示 BMDC とともに 3 日間培養し、野生型 B6 マウスへ腹腔内投与することで、養子移入筋炎を発症させることが出来た。この養子移入系にて、培養細胞を、MACS にて CD4 または CD8 T 細胞に純化し、同様に野生型 B6 マウスへ腹腔内投与したところ、CD8 T 細胞移入のみで筋線維壊死像を多く認める筋炎を起こすことが出来た。
- (3) ELISpot にて、ペプチド誘導性筋炎のリンパ節細胞より、当該ペプチド刺激によって $IFN\gamma$ 産生 CD8 T 細胞が検出され、これは、ペプチド提示させていない BMDC を投与したマウスでは認められなかった。また、ペプチド誘導性筋炎の発症率は、コントロール抗体投与群で 60% であったのに対し、CD8 除去抗体投与群では 20% と低下した。

D. 考察

CIM において、CTL によって筋線維を直接傷害していることが確認でき、また、それを養子移入することにも成功した。CIM 誘導 C 蛋白断片のうち、CD8 エピトープの候補は見出されており、このペプチドにより、CTL を Effector 細胞とする実験的筋炎を誘導できることが分かったので、このペプチドが、CIM において dominant エピトープであるか、検討が必要である。

E. 結論

CIM は、CTL によって臓器障害を引き起こしていることがはっきりしている、世界唯一のモデルマウスであり、今まであまり研究されてこなかった自己免疫性 CTL の機能解析にも適していることから、研究成果は、PM のみならず、他の自己免疫疾患へも応用していくことが期待される。

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・臨床免疫学・准教授

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. 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。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。

C. 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。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。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。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。

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た。

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。

抗リン脂質抗体による向血栓細胞活性化のメカニズム

研究分担者 渥美 達也

北海道大学大学院医学研究科内科学講座・第二内科 講師

研究協力者 奥 健志、 加藤 将

北海道大学大学院医学研究科内科学講座・第二内科

A. 研究目的

抗リン脂質抗体症候群(APS)は血栓傾向を主症状とする自己免疫疾患である。抗リン脂質抗体の主要な対応抗原は β 2-グリコプロテインIとプロトロンビンである。分担研究者は、ホスファチジルセリンに結合したプロトロンビンを認識する「ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体(aPS/PT)」が血栓症の存在と強く相関し、真の血栓原性抗体である可能性を示してきた。昨年度の研究では、そのメカニズムを向血栓細胞内のシグナル伝達分子と、それに関連する細胞表面分子の役割をメインに検討した。その結果、抗 aPS/PT による向血栓細胞活性は p38MAPK を介する経路に依存しており、それは抗カルジオリピン抗体(抗 β 2-グリコプロテインI抗体:aCL/ β 2GPI)による細胞活性化経路と共通していた。そこで今年度は、aPS/PTとaCL/ β 2GPIの両者と向血栓細胞との interaction に関与する細胞表面分子の候補として、スカベンジャーレセプターのひとつである CD36 分子の関与につき、患者ゲノムを用いて検討を加えた。

B. 研究方法

CD36 は主要なスカベンジャー受容体で、様々なリガンドを認識し動脈硬化や血栓症に関与している。CD36 遺伝子多型と APS との関連を検討した。本研究では、原発性 APS39 名、全身性エリテマトーデス(SLE)合併 APS69 名、APS 非合併 SLE265 名、健常人 422 名を対象とし、CD36 欠損に関わる主要な一塩基多型 rs3765187, 及び 5' 非翻訳領域 rs1049654 を TaqMan PCR genotyping 法で検索した。

C. 結果

CD36 欠損と相関する遺伝子変異のひとつである rs3765187 の minor allele 頻度は、APS 患者において健常人と比較し有意に少なかった(2.8%(3/108) vs. 10.2%(43/422), $p=0.024$ (Fisher 直接比較法))。rs1049654 の allele 頻度には APS 患者と健常人とは差がなかった。SLE 患者ではいずれの遺伝子多型の頻度も健常人とは差がなかった。

D. 考察

APS において、aCL/ β 2GPI 陽性患者と aPS/PT 陽性患者の頻度はほぼ同じであり、かつ臨床症状との相関は aCL/ β 2GPI と aPS/PT とでは相違点がない。すなわち、aCL/ β 2GPI と aPS/PT は対応抗原がまったく異なる分子であるにもかかわらず、それらと相関する、もしくはそれらがひきおこす症状は同一であり、さらに in vitro での向血栓細胞活性化の経路も同一である。そこで、APS として共通の細胞刺激レセプターとして、自己抗原に対するレセプターとは別に、自己抗原とリン脂質との結合という特質から、スカベンジャーレセプターを想定した。遺伝子多型解析の結果、CD36 欠損と関連する遺伝子多型をもつ個体は APS を発症しにくいことが示された。この事実から、CD36 が APS の血栓病態に関与する可能性が考えられる。現在、抗リン脂質抗体の細胞活性化における CD36 の関与につき、in vitro での検討をすすめている。

免疫抑制性分子 TRAIL による自己免疫疾患の発症抑制機序に関する研究

研究分担者 千住 覚

熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学分野 准教授

研究協力者 西村 泰治

熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学分野 教授

A. 研究目的

Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)は、T細胞の細胞周期およびB細胞の抗体産生の抑制、ならびに腫瘍細胞へのアポトーシスの誘導などの機能を有することが知られている。また TRAIL 遺伝子の標的破壊 (TRAIL⁻ (KO))マウスでは、自己免疫疾患の自然発症は認められないものの、実験的自己免疫疾患が増悪することが報告されている。我々は、マウスの ES 細胞から *in vitro* で樹状細胞(ES-DC)を分化誘導する方法を開発し、遺伝子改変により、自己抗原 MOG と TRAIL を強制発現させたマウス ES-DC (ES-DC-TRAIL/MOG)を、マウス個体へ投与することにより、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE)の発症を予防できることを報告した。その際に我々は、この EAE の発症抑制に、ES-DC-TRAIL/MOG による CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞の誘導あるいは増殖促進が関与していることを明らかにした。そこで、本研究では TRAIL⁻ マウスを用いて、TRAIL が T 細胞の免疫応答に与える影響について検討することを目的とした。

B. 方法

6週から8週齢の C57BL/6 TRAIL^{+/+} (WT), TRAIL⁻ (KO) マウスに MOG 自己抗原ペプチドを免疫して EAE を誘導し、臨床症状の評価や所属リンパ節、脾臓における T 細胞分画の割合を解析した。また、*in vitro* において、抗 CD3 抗体の刺激下に、各々のマウス由来の放射線照射した骨髄由来樹状細胞 (BMDC)と、同じく各々のマウスから採取した CD4⁺CD25⁻ T 細胞、あるいは CD4⁺CD25⁺ T 細胞とを共培養し、TRAIL 存在下と非存在下において、T 細胞の増殖に差が認められるか否かについて検討した。さらに、リコンビナント TRAIL (rTRAIL) が、抗 CD3/CD28 抗体による刺激により誘導された、CD4⁺CD25⁻ T 細胞、あるいは CD4⁺CD25⁺ T 細胞の増殖反応に与える影響についても検討した。

C. 結果

TRAIL-KO マウスに EAE を誘導したところ、WT マウスと比較して、臨床症状の重症化、遷延化が観察され、さらに TRAIL-KO マウスでは、所属リンパ節、脾臓細胞中の CD4⁺Foxp3⁺ 制御性 T 細胞の減少と、CD4⁺CD25⁻ T 細胞および IFN- γ 産生性 CD4⁺ T 細胞の増加が観察された。また、抗 CD3 抗体の存在下での BMDC と CD4⁺CD25⁺ T 細胞との共培養実験では、両細胞ともに TRAIL-KO マウス由来の細胞を使用した TRAIL 非存在下での T 細胞増殖反応と、いずれかあるいは両方の細胞が WT マウス由来である TRAIL 存在下での T 細胞増殖反応とを比較した。その結果、TRAIL 非存在下では、CD4⁺CD25⁺ T 細胞の増殖は抑制されたが、CD4⁺CD25⁻ T 細胞では、逆に増殖の促進が観察された。さらに、CD4⁺CD25⁻ T 細胞の増殖反応は、rTRAIL の濃度依存性に抑制されたのに対して、rTRAIL は CD4⁺CD25⁺ T 細胞には何も影響を及ぼさなかった。一方、TRAIL の受容体である DR5 の発現量については、2種類の CD4⁺T 細胞群の間に差は認められなかった。

D. 考察

本研究結果により TRAIL は、制御性 T 細胞に対しては細胞増殖性に働き、IFN- γ 産生性 CD4⁺ T 細胞や通常の CD4⁺ T 細胞に対しては増殖抑制性に働くという、全く相反する作用を示すことが明らかとなった。しかし、TRAIL 受容体である DR5 の発現には、2種類の細胞群で差が認められなかったため、2種類の T 細胞では DR5 下流のシグナル伝達機構に相違が存在する可能性が示唆された。

E. 結論

免疫抑制性分子 TRAIL は、EAE において2つの免疫制御機能を有していることを明らかにした。一つは、IFN- γ 産生性 CD4⁺ T 細胞や通常の CD4⁺ T 細胞に対する増殖抑制作用であり、もう一つは、CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞に対する増殖促進作用である。