

## ヒト CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞の同定

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

### 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-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. 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。

### C. 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-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。

### 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。

## 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  
慶應義塾大学医学部内科 准教授

### A. 研究目的

抗二本鎖 DNA (dsDNA) 抗体は SLE の疾患標識抗体であり、その抗体価は疾患活動性と関連するとされるが、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。我々は昨年度の本研究班で 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. 方法

SLE 患者 130 例、及び疾患対象患者 49 例 (関節リウマチ 32 例、原発性 Sjögren 症候群 15 例、強皮症 2 例)、健常人 18 例を対象とした。末梢血抗 dsDNA 抗体産生細胞数は ELISPOT 法を用いて定量した。抗原として S1 nuclease 処理後の  $\lambda$  フェージ DNA を固相化した 96 穴プレートの各ウェルに末梢血単核球を  $2.5 \times 10^6$  個ずつ加えて 4 時間培養し、アルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗体と基質を反応させた。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、陽性例では、治療後の末梢血抗 dsDNA 抗体産生細胞数の経時的変化を評価した。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 / 陰性例に層別化して前向きに観察し、疾患活動性なしの割合を Kaplan-Meier 法により検討した。

### C. 結果

SLE 患者 130 例中 29 例 (22.3%) で末梢血中に抗 dsDNA 抗体産生細胞が検出されたが、疾患対象群、健常人では検出されなかった。末梢血中の抗 dsDNA 抗体産生細胞は CD19 陽性 B 細胞、CD138 陽性形質細胞がほぼ同数であった。SLE 患者を抗 dsDNA 抗体産生細胞の有無で層別化すると、末梢血中の抗 dsDNA 抗体産生細胞の存在は持続性蛋白尿陽性と SLEDAI 高値と強く相関した ( $p < 0.001$ ,  $p = 0.004$ )。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。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。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 ( $p < 0.001$ )。

### D. 考察

SLE 患者の活動期に抗 dsDNA 抗体産生細胞が末梢血中に出現し、それら細胞の検出は活動性の評価に有用であった。

### 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 抗体産生細胞が SLE 病態に関与している可能性がある。

## 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 (同室長)、ベンジャミン・レイバニー (同外来研究員)

### A. 研究目的

我々はこれまで多発性硬化症 (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、病態形成機構の観点から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てきた。その結果、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ファン核内受容体 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た。今回、病態形成機構の観点から、T 細胞における NR4A2 の機能解析を詳細に行ったので以下に報告する。

### B. 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、EAE あるいは EAU を誘導した。EAE マウスの脳および脊髄を回収し、コラゲナーゼ H と DNase I を用いて酵素消化した。得られたホモジネートからパーコール密度勾配遠心法にて単核球を分離し、AutoMACS を用いて T 細胞を調製した。さらに Cytokine Secretion Assay Kit を用いて、IL-17 産生細胞および IFN- $\gamma$  産生細胞を標識し、FACS Aria を用いて分離した。マウス脾臓由来ナイーブ T 細胞 (CD4<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>CD62L<sup>high</sup>) に 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。

### C. 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された。それぞれの細胞を産生するサイトカインを指標に 4 群に分画し、各画分に含まれる T 細胞の NR4A2 発現を定量比較したところ、NR4A2 の発現は T 細胞の IL-17 産生能と非常に良く相関することが明らかとなった。また NR4A2 特異的 siRNA を導入した *in vitro* 分化 Th17 細胞の IL-17 産生は、条件を最適化することによりほぼ完全に抑制された。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。さらに *in vitro* 分化 Th1 細胞の IFN- $\gamma$  産生は、siRNA 処理により変化しなかった。EAU マウス由来 T 細胞の NR4A2 発現亢進は、EAE の場合と同様に末梢血で先行し標的臓器へ移行した。このとき末梢血の NR4A2 発現亢進は、自己抗原に対する応答に強く相関していた。

### 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 細胞における機能を詳細に解析した。T 細胞の NR4A2 発現上昇は標的臓器に浸潤した IL-17 産生細胞のみで認められ、Th17 細胞の IL-17 産生が NR4A2 特異的 siRNA で選択的に消失したことから、NR4A2 がエフェクター T 細胞の IL-17 産生に重要な役割を果たすことが示された。末梢血 T 細胞の NR4A2 発現は、自己抗原接種時に選択的に上昇したことから、生体内の自己免疫反応の予測因子として有効であ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力な候補と考えられる。

## 自己免疫疾患に関与するユビキチン関連分子の治療に向けた応用

研究分担者 畠山 鎮次  
北海道大学大学院医学研究科・教授

### A. 研究目的

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

### B. 方法

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

### C. 結果

ヒト B 細胞株 cDNA ライブラリーより A20 cDNA をクローニングし、その cDNA を bait として酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行ったところ、現在まで機能が未知のタンパク質である Ymer が同定された。Ymer は、これまでに EGF 受容体刺激下でチロシン酸化を受けるタンパク質として報告されているのみである。Ymer を細胞内に発現させたところ、A20 との結合が確認された。また、Ymer に対する抗体を作製し、内在性の A20 と Ymer の結合も確認された。また、Ymer はリジン 63 を介したユビキチン鎖を認識し、RIP1 の安定性に影響を及ぼすことが判明した。さらに、 $\kappa$ B-ルシフェラーゼレポーターにおける転写活性化に対して、Ymer は A20 と共に抑制的に作用することが判明した。さらに、Ymer トランスジェニックマウスを樹立することで *in vivo* の Ymer の機能解析を進めた。その結果、Ymer の高発現はマクロファージ系細胞の機能に影響をもたらす、さらには LPS への反応性にも影響をもたらすことが判明した。

### D. 考察

本研究結果は、NF- $\kappa$ B 経路における制御酵素による免疫系細胞の活性化及び増殖抑制の機序に関して重要な知見と与える。また現在、個体レベルで免疫細胞及び炎症関連細胞における機能を明らかにするために、Ymer の遺伝子破壊マウス及びトランスジェニックマウスを樹立した。このトランスジェニックを解析することにより、自己免疫疾患における個体への影響を観察することができるかもしれない。

### E. 結論

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

## 新規糖脂質 $\alpha$ -carba-galactosylceramide を介した関節炎の制御

研究分担者：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 教授

研究協力者：吉賀 洋平、瀬川 誠司、堀越 正信、後藤 大輔

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

### A. 研究目的

natural killer T (NKT) 細胞はNK マーカーと T 細胞抗原受容体(TCR)を併せ持つユニークな細胞群である。その TCR $\alpha$  鎖はマウスでは TCRV $\alpha$  14、ヒトでは TCRV $\alpha$  24 の均一な遺伝子を有する。CD1d 分子上に発現した糖脂質、代表的な糖脂質は合成 $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GC)、を抗原として認識し INF- $\gamma$  および IL-4 を産生する。近年、Th1 タイプのサイトカインを主に誘導する新規糖脂質 $\alpha$ -carba-galactosylceramide( $\alpha$ -c-GC)が NKT 細胞の新たな抗原として注目されてきた。コラーゲン誘導性関節炎(CIA)においては、Th17 細胞が関節炎発症に重要であること、一方、Th1 サイトカインは Th17 細胞を抑制する事が知られている。そこで、本研究では、 $\alpha$ -c-GC により NKT 細胞を介した CIA 制御の可能性およびその機序を明らかにすることを目的とした。

### B. 方法

1)DBA/1 マウス由来の脾細胞を *in vitro* で $\alpha$ -GC あるいは $\alpha$ -c-GC( $1\mu\text{g/ml}$ )と 72 時間共培養して上清中の IL-17、IL-4、INF- $\gamma$  を ELISA 法にて測定した。2)DBA/1 マウスを用いて CIA の誘導した。初回 CII 免疫時と同時に $\alpha$ -GC あるいは $\alpha$ -c-GC をそれぞれ $2\mu\text{g}$ 皮下注射して、関節炎スコアおよび発症頻度について検討した。3)初回免疫時に抗 INF- $\gamma$  抗体を $160\mu\text{g}$ 腹腔内投与することにより関節炎スコアおよび発症頻度への影響を検討した。4) $\alpha$ -GC あるいは $\alpha$ -c-GC を投与した CIA マウス(day35)において、血清中の抗 CII 抗体価を ELISA 法にて測定した。5)day12 に採取したリンパ節由来細胞を *in vitro* で CII とともに 72 時間培養して、上清中の INF- $\gamma$  および IL-17 について ELISA 法にて解析した。6)CII 単独免疫あるいは CII+ $\alpha$ -c-GC 共免疫後 12 日目のリンパ節から CD4+T 細胞と CD11c/b+細胞 (APC) をそれぞれ分離して、CII 存在下でクリスクロスで共培養して IL-17 産生を ELISA 法にて解析した。

### B. 結果

1)  $\alpha$ -c-GC により NKT 細胞から INF- $\gamma$  が特異的に産生されていた。2) $\alpha$ -c-GC 投与マウスにおいて CIA が有意に抑制されていた。3)抗 INF- $\gamma$  抗体投与により $\alpha$ -c-GC による CIA 抑制効果が解除された。4) 抗 CII IgG 抗体、抗 CII IgG2a 抗体が有意に抑制された。5)CII 反応性 T 細胞は INF- $\gamma$  および IL-17 とともに産生低下を示した。6) $\alpha$ -c-GC 免疫マウスにおいて CII 反応性 CD4+T 細胞の IL-17 産生低下が認められた。

### D. 考察と結論

NKT 細胞から INF- $\gamma$  を有意に産生させる糖脂質抗原 $\alpha$ -c-GC により、CIA を制御することができた。その関節炎抑制機序は、INF- $\gamma$  依存性であり、CII 反応性 T 細胞および B 細胞をアナジーに誘導している可能性が示唆された。関節炎の新しい抗原特異的治療戦略として期待したい。

