

## 新規糖脂質 $\alpha$ -carba-galactosylceramide を介した関節炎制御機構に関する研究

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

### 研究要旨

コラーゲン誘導性関節炎(CIA)などの自己免疫性関節炎発症には Th17 細胞が関わっており、一方、Th1 細胞 (IFN- $\gamma$ ) は Th17 細胞への分化を抑制することが知られている。本研究では、特異的に NKT 細胞から IFN- $\gamma$  産生を誘導する新規糖脂質  $\alpha$ -carba-galactosylceramide ( $\alpha$ -c-GC) に注目し、 $\alpha$ -c-GC 投与による CIA 抑制効果について検討することを目的とした。その結果、1)  $\alpha$ -c-GC により *in vitro* において NKT 細胞から IFN- $\gamma$  産生が特異的に産生された、2)  $\alpha$ -c-GC 投与マウスにおいて CIA が有意に抑制された、3) CIA 抑制効果は抗 IFN- $\gamma$  中和抗体により解除された、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 細胞からの IFN- $\gamma$  および IL-17 産生は低下していたが、IFN- $\gamma$ /IL-17 産生比は  $\alpha$ -c-G 投与群において優位に増加していた。6)  $\alpha$ -c-GC 免疫マウスにおいて CII 反応性 CD4+T 細胞からの IL-23p19 および IL-6 の産生低下が認められた。7)  $\alpha$ -c-GC 投与により肝臓、脾臓、所属リンパ節由来の NKT 細胞からの IFN- $\gamma$  産生が増加したこと、など事明らかにしてきた。今後、本研究成果をふまえて、新規糖脂質抗原  $\alpha$ -c-GC による NKT 細胞をターゲットとした関節炎治療戦略の開発を進める。

### 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 IFN- $\gamma$  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. 研究方法

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  $\mu$ g/ml) と 72 時間共培養して上清中の IL-17、IL-4、IFN- $\gamma$  を ELISA 法にて測定した。2) DBA/1 マウスを用いて CIA を誘導した。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  $\mu$ 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 IFN- $\gamma$  抗体を 160  $\mu$ 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 IFN- $\gamma$  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 CII 反応性 CD4+T 細胞からの IL-23p19、IL-6、TGF- $\beta$  産生を解析した。7) DBA/1 マウスに CIA を誘導する際に、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  $\mu$ g 皮下注射し 3 日後に、肝臓、脾臓、所属リンパ節由来の NKT 細胞からの IFN- $\gamma$  および IL17 産生をフローサイトメトリー法で検討した。8) IFN- $\gamma$  -/- マウス (B6 バック) において、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  $\mu$ 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。

(倫理面への配慮)

ヒトの検体を使用する際には、大学の倫理委員会の承認を得た上で、患者さんにインフォームド・コンセントを施行し、十分に研究内容を理解してもらい、本人の同意を得た上で研究を実行した。マウスの実験において

は疼痛を与えないために麻酔科で対処した。

### C. 研究結果

1)  $\alpha$ -c-GC により NKT 細胞から IFN- $\gamma$  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 IFN- $\gamma$  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 細胞からの IFN- $\gamma$  および IL-17 産生は低下していたが、IFN- $\gamma$ /IL-17 産生比は  $\alpha$ -c-G 投与群において優位に増加していた。6)  $\alpha$ -c-GC 免疫マウスにおいて CII 反応性 CD4+T 細胞からの IL-23p19 および IL-6 の産生低下が認められた。7)  $\alpha$ -c-GC 投与により肝臓、脾臓、所属リンパ節由来の NKT 細胞からの IFN- $\gamma$  産生が増加した。8) IFN- $\gamma$  -/マウスにおける  $\alpha$ -c-GC の CIA への効果は検討中。

### D. E. 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、IFN- $\gamma$  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。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Yoshiga, Y., Goto, D., Segawa, S., Horikoshi, M., Hayashi, T., Matsumoto, I., Ito, S., Taniguchi, S., and Sumida, T. Activation of natural killer T cells by  $\alpha$ -carba-GalCer (RCAl-56), a novel synthetic glycolipid ligand, suppresses murine collagen-induced arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* (in press)

2. Segawa, S., Goto, D., Yoshiga, Y., Horikoshi, M., Sugihara, M., Hayashi, T., Chino, Y., Matsumoto, I., Ito, S., and Sumida, T. NK1.1+ gdT cells attenuates IL-18 plus IL-2-induced murine interstitial lung disease. *Am. J. Res. Cell. Mol. Biol.* (in press)

3. Hikami, K., Kawasaki, A., Koga, M., Ito, S., Hayashi, T., Matsumoto, I., Tsutsumi, A., Kusaoi, M., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Arinami, T., Sumida, T., and Tsuchiya, N. Association of a functional polymorphism in the 3' untranslated region of SPI1 with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* (in press)

4. Kawasaki, A., Ito, S., Furukawa, H., Hayashi, T., Goto, D., Matsumoto, I., Ohashi, J., Graham, R.R.,

Matsuta, K., Behrens, T.W., Tohma, S., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Sumida, T., and Tsuchiya, N. Association of TNFAIP3 interacting protein 1, TNIP1 with systemic lupus erythematosus in a Japanese population: a case-control association study. *Arthritis Reas. Ther.* 2010 Sep 17;12 (5) :R174. [Epub ahead of print]

5. Iizuka, M., Wakamatsu, E., Matsumoto, I., Tsuboi, H., Nakamura, Y., Hayashi, T., Goto, D., Ito, S., and Sumida, T. M3 muscarinic acetylcholine receptor reactive immune response induces Sjogren's syndrome-like sialoadenitis. *J. Autoimmunity* 35: 383-389, 2010.

6. Shen, N., Fu, Q., Deng, Y., Qian, X., Zhao, J., Kaufman, K.M., Tang, Y., Chen, J-Y, Yang, W., Wong, M., Kawasaki, A., Tsuchiya, N., Sumida, T., Kawaguchi, Y., Yum C-Y, Takasaki, Y., Hashimoto, H., Harley, J.B., Guthridge, J.M., Grossman, J.M., Cantor, R.M., Song, Y.W., Bae, S, Cehn, S, Hahn, B.H., Lau, Y.L., and Tsao, B.P. Gender specific association of X-linked TLR7 with male systemic lypus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107:15838-43, 2010.

7. Tsuboi, H., Matsumoto, I., Wakamatsu, E., Iizuka, M., Nakamura, Y., Hayashi, T., Goto, D., Ito, S., and Sumida, T. The new epitopes of anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies in patients with Sjogren's syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* 162:53-61, 2010.

8. Sumida, T., Tsuboi, H., Iizuka, M., Nakamura, Y., and Matsumoto, I. Functionla role of M3 muscarinic acetylcholine receptor (m3R) reactive T cells and anti-M3R autoantibodies in patients with Sjogren's syndrome. *Autoimmunity Reviews* 9:615-617, 2010.

9. Tashiro, T., Nakagawa, R., Inoue, S., Omori-Miyake, M., Chiba, T., FUjii, S-I, Shimizu, K., Mori, K., Yoshiga, Y., Sumida, T., Watarai, H., and Taniguchi, M. Induction of Th1-biased cytokine production by a-carba-GalCer, a neoglycolipid ligand for natural killer T cells. *Int. Immunol.* 22:319-28. Epub 2010 Feb 24.

10. Segawa, S., Goto, D., Yoshiga, Y., Sugihara, M., Hayashi, T., Chino, Y., Matsumoto, I., Ito, S., Ito, S., and Sumida, T. Inhibition of TGF- $\beta$  signaling attenuates IL-18 plus IL-2-induced interstitial lung disease. *Clin. Exp. Immunol.* 160: 394-402. Epub 2010 Jan 19.

11. Chen, Q., Lamphier, M., Muramoto, K., Ding, Y., Ynag, H., Mackey, M., Li, W., Liu, D., Inoue, Y., Massaki, N., Patel, T., Groom, A., Reynolds, D., Perron, S., Shiota, H., Matsumoto, I., Sumida, T., Spyvee, M., Schiller, S., ZGusovsky, F., and Marc, K. Prostaglandin E2 stimulation of EP4 promotes Th1 differentiation and Th17 expansion and is critical for autoimmune disease. *Br. J. Pharmacol.* 160: 292-310, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

申請準備中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記事項なし

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。

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

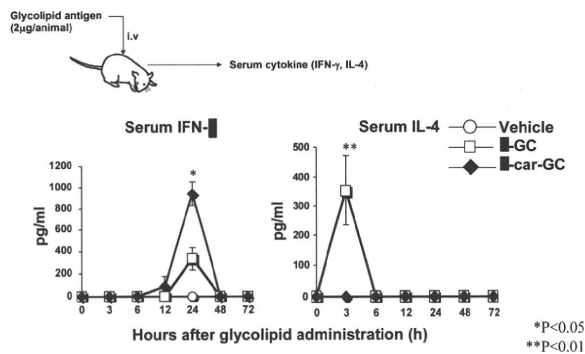
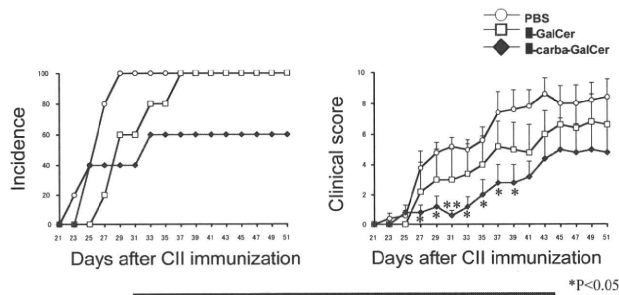


図2  $\alpha$ -c-GC 投与マウスにおいて CIA は有意に抑制された。

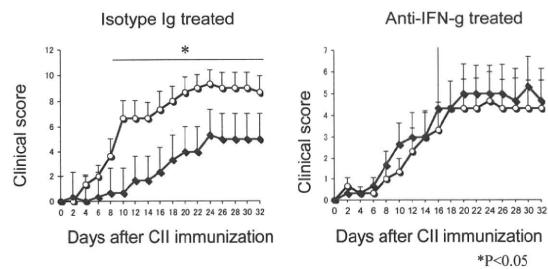
$\alpha$ -carba-GalCer 投与による CIA 発症への影響



$\alpha$ -carba-GalCer は 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 IFN- $\gamma$  抗体により解除された。

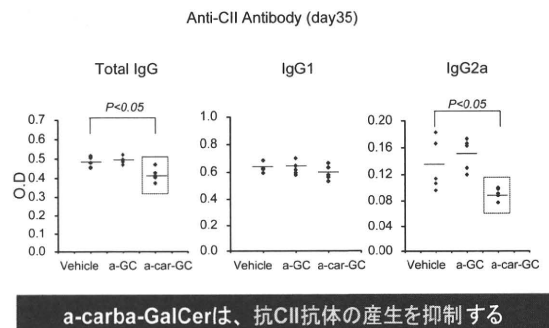
$\alpha$ -carba-GalCer の関節炎抑制作用(IFN- $\gamma$  依存性)



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

図4 血中抗 CII 抗体は有意に減少していた。

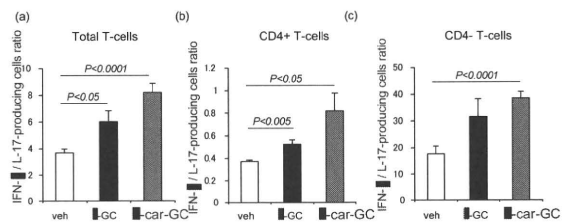
$\alpha$ -carba-GalCer 投与による抗 CII 抗体産生への影響



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

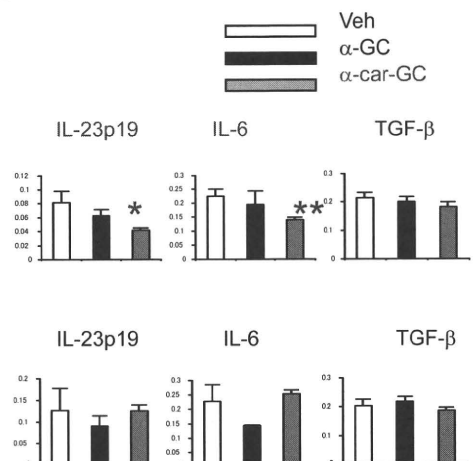
図5  $\alpha$ -c-GC により CII 反応性 T 細胞からの IFN- $\gamma$  /IL-17 産生比が増加していた。

Th1/Th17 cytokine balance in  $\alpha$ -car-GC treated mice



Alpha-carba-GalCer treatment polarized T-cell response toward Th1

図6  $\alpha$ -c-GC により CII 反応性 T 細胞からの IL-23p19 および IL-6 産生が低下していた。



## CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞による自己抗体産生抑制能に関する研究

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が、全身性自己免疫疾患ではこれ以外の制御機構も重要と考えられる。分担研究者らは転写因子 Egr2 を発現する CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞を同定した。本年度は CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞の SLE モデルマウスに対する治療効果及び、抗体産生抑制能を検討した。またヒト扁桃腺 CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の抗体産生抑制能についても検討した。自己抗体産生と腎障害は、CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞を移入した MRL/lpr マウスでは抑制されなかったが、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞の移入では抑制された。またヒト扁桃腺 CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞も B 細胞と follicular helper T 細胞による抗体産生を有意に抑制した。これらの結果より、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞は、試験管内・生体内で強い抗体産生抑制能を発揮する点で、CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞とは異なる新たな制御性 T 細胞サブセットであると考えられた。

### A.研究目的

自己免疫応答を抑制する制御性 T 細胞として CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞が知られている。しかし機能的 Foxp3 を欠損したマウス・ヒトの表現型は、全身性エリテマトーデス(SLE)などの全身性自己免疫疾患とは異なっており、全身性自己免疫疾患では CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞以外の制御機構も重要と考えられる。分担研究者らは最近、転写因子 Egr2 を発現する CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞を同定した。T 細胞特異的 Egr2 ノックアウトマウスが SLE 様の病態になることが報告されていることから、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞の SLE モデルマウスに対する治療効果及び、抗体産生抑制能を検討した。またヒト扁桃腺 CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の抗体産生抑制能についても検討した。

### B.研究方法

MRL/lpr SLE モデルマウスに、MRL/+マウス由来の CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞及び CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞を移入し、自己抗体産生、臓器障害を評価した。RAG1 ノックアウトマウスに、OT-II マウス由来の T 細胞と C57/B6 マウス由来の B 細胞を移入後に OVA-NP で免疫する実験系に、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞を共移入することで、抗体産生への影響を検討した。また OVA-NP で免疫した C57/B6 マウス由来の B 細胞と OT-II マウス由来のヘルパー T 細胞を試験管内で共培養して抗 NP 抗体を産生させる実験系に、OT-II マウス由来の CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞を加えて抗体産生への影響を検討した。

(倫理面への配慮)

実験動物に対しては過度の苦痛を与えないなど、

動物愛護上の十分な配慮を行った。臨床検体を用いた研究計画については、東京大学医学部倫理審査委員会の承認を受けた。

### C. 研究結果

自己抗体産生・腎障害は、CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞を移入した MRL/lpr マウスでは抑制されなかったが、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞の移入では抑制された。C57/B6 マウス由来の CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞は生体内での抗 NP 抗体産生を抑制した。また OT-II 由来の CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞は、共培養による試験管内の抗 NP 抗体産生能を著明に抑制した。またヒト扁桃腺 CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞も B 細胞と follicular helper T 細胞による抗体産生を有意に抑制した。

### D. 考察

CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞は、CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞とは異なり、SLE モデルマウスの自己抗体産生・腎障害を抑制した。さらに CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞は試験管内、生体内での抗体産生抑制能があることが確認された。さらにヒト扁桃腺 CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞も、抗体産生抑制能を示すことが明らかとなった。

### E. 結論

CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞は、試験管内・生体内で強い抗体産生抑制能を発揮する点で、CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞とは異なる新たな制御性 T 細胞サブセットであると考えられた。今後 CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞の抗体産生抑制メカニズムの検討を進めることで、新たな自己抗体産生抑制法を提示できる可能性があると考えられた。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

#### 論文発表

- Kochi Y, Thabet MM, Suzuki A, Okada Y, Dahan NA, Toes REM, Huizinga TWJ, Myouzen K, Kubo M, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K. PADI4 polymorphism predisposes male smokers to rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2010 in press.
- Okada Y, Suzuki A, Yamada R, Kochi Y, Shimane K, Myouzen K, Kubo M, Nakamura Y, Yamamoto K. HLA-DRB1\*0901 lowers anti-cyclic citrullinated peptide antibody levels in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 69:1569-70, 2010.
- Shimane K, Kochi Y, Horita T, Ikari K, Amano H, Hirakata M, Okamoto A, Yamada R, Myouzen K, Suzuki A, Kubo M, Atsumi T, Koike T, Takasaki Y, Momohara S, Yamanaka H, Nakamura Y, Yamamoto K. The association of a nonsynonymous single-nucleotide polymorphism in TNFAIP3 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Arthritis Rheum*. 62:574-579, 2010.
- Kochi Y, Suzuki A, Yamada R, Yamamoto K. Ethnogenetic heterogeneity of rheumatoid arthritis-implications for pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol*. 6:290-5, 2010.
- Kochi Y, Okada Y, Suzuki A, Ikari K, Terao C, Takahashi A, Yamazaki K, Hosono N, Myouzen K, Tsunoda T, Kamatani N, Furuichi T, Ikegawa S, Ohmura K, Mimori T, Matsuda F, Iwamoto T, Momohara S, Yamanaka H, Yamada R, Kubo M, Nakamura Y, Yamamoto K. A regulatory variant in CCR6 is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Nat Genet*. 42:515-9, 2010.
- Myouzen K, Kochi Y, Shimane K, Fujio K, Okamura T, Okada Y, Suzuki A, Atsumi T, Ito S, Takada K, Mimori A, Ikegawa S, Yamada R,

Nakamura Y, Yamamoto K. Regulatory polymorphisms in EGR2 are associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. Hum Mol Genet. 19:2313-20, 2010.

•Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. The family of IL-10 secreting CD4+ T cells. Advances in Immunology. 105:99-130, 2010.

•Okamoto A, Fujio K, Yamamoto K. The future of lupus therapy modulating autoantigen recognition. Lupus 19:1474, 2010.

#### 1. 学会発表

•Okamoto A, Fujio K, Yamamoto K. Identification of a disease-promoting CD4+ T cell clone from MRL/lpr kidney using single cell analysis. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology PP-017-28

•New regulatory T cell subset producing IL-10 and its role in autoimmune diseases  
Keishi Fujio  
The 19<sup>th</sup> International Rheumatology Symposium  
2010.4.23

•Immunological intervention strategies aimed at regulatory T cells.  
Keishi Fujio  
14<sup>th</sup> International Congress of Immunology  
Lunchtime Lecture 1-4  
2010.8.23

•CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells in the treatment of inflammatory diseases.  
Keishi Fujio  
The 5<sup>th</sup> Chiba University Global COE Symposium  
2010.12.4

•新規 Treg 細胞による自己免疫制御(マウスとヒト)  
藤尾圭志、岡村僚久、住友秀次、山本一彦  
第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会  
2010.11.26

#### 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

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

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 平田真哉 東京医科歯科大学膠原病・リウマチ科 助教

研究要旨

【目的】 これまでに、当教室ではヒトの病態により近い C 蛋白誘導性筋炎マウスモデル(CIM)を開発し、筋炎発症に自己反応性 T 細胞と筋局所の自然免疫の活性化が必要であることがわかった。本研究事業において昨年度までに自己反応性 T 細胞について解析をすすめ、CD8陽性 T 細胞が筋障害のエフェクター細胞であることを明らかにしてきた。本年度は、この筋炎モデルについて、自然免疫活性化因子として再生筋線維が発現するケモカインに注目して解析を行い、筋炎発症のメカニズムに迫ることを目的とする。また、この解析により、筋炎に特異性の高い治療法の開発を目指す。【方法】 筋組織から再生筋線維のみを分離することは難しく、また、筋炎組織は免疫細胞を多数混入しており、一方で in vitro における筋線維の分化は必ずしも in vivo における分化を完全に反映しない。このため、以下の多面的な解析を行った。まず、CIM の筋炎組織と筋線維芽細胞株(C2C12)から in vitro で分化誘導した筋線維について 16 種類のケモカインの RT-PCR を行った。さらに、この共通して発現していたケモカインについて、マウス骨格筋より回収した satellite 細胞から in vitro で分化した筋線維、in vivo において bupivacaine で再生筋線維を誘導した筋組織からレーザーマイクロダイセクションで回収した筋線維の RT-PCR を行った。また、satellite 細胞を筋線維に分化誘導する際の培養上清について ELISA を行い蛋白レベルの評価を行った。さらに、再生筋線維を誘導できる bupivacaine を CIM 誘導後に投与して筋炎発症を検討した。【結果】 CIM の筋組織、in vitro における筋線維芽細胞株について、mRNA レベルで 4 種類のケモカインが共通して発現していた。さらに、これらのケモカインのうち、筋 satellite 細胞から分化誘導した筋線維、in vivo における再生筋線維について、mRNA レベル、培養上清中の蛋白質レベルで、2 種類のケモカインが共通して発現していた。また、CIM 誘導後に、bupivacaine で再生筋線維を誘導したところ、筋炎を発症した。【結論】 in vitro、in vivo の再生筋線維が複数のケモカインを発現していることを明らかにした。また、in vivo において再生筋線維を誘導することによって筋炎を発症した。これらの成果は、多発性筋炎・皮膚筋炎の病態の理解を深めるとともに、新規治療法の開発についても多くの情報を寄与するものと期待される。

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してきた。また、この CIM における移入実験ならびに再燃実験の結果から、C 蛋白質を免疫したマウス個体の CD8 陽性 T 細胞のみでは CIM を発症させることが出来ず、complete Freund's adjuvant の免疫の併用が発症の誘導に必須であった。このため、筋炎発症において自然免疫活性化因子が重要と考えている。そこで、

今年度は、この CIM モデルを用いて、自然免疫活性化因子としてのケモカインについて解析を行い、筋炎発症のメカニズムを明らかにすることを目的とする。この解析による知見を通して、筋炎に比較的特異性の高い治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

多発性筋炎における筋局所自然免疫活性化因子を探るために、CIM の筋炎組織、筋線維芽細胞株(C2C12)やマウス骨格筋より回収した satellite 細胞から in vitro で myosphere 法により分化した筋線維、in vivo において筋内に bupivacaine を投与することで 7-14 日後に認められる再生筋線維が発現するサイトカインの発現を検討した。これら多方面からの解析を



行ったのは、(1)筋炎組織は免疫細胞が多数混入していること、(2)in vitro における筋線維の分化は必ずしも in vivo における分化を完全に反映しないこと、を考慮し、再生筋線維が発現するケモカインに純化するために行った。CIM の筋組織、ならびに in vitro で C2C12 細胞株から分化誘導した筋線維を回収して 16 種類のケモカインについて RT-PCR を施行した。共通して発現していたケモカインについて、筋の satellite 細胞から分化誘導した筋線維、ならびに bupivacaine を投与した組織から顕微鏡下のレーザーマイクロダイセクションで回収した再生筋線維について RT-PCR を施行して、検証した。さらに、Myosphere 法により satellite 細胞から筋線維への分化誘導した際の培養上清の ELISA を行い、蛋白レベルでの解析を行った。また、再生筋線維と筋炎発症の関連を検討するために CIM 誘導の 7 日後に対側四頭筋に bupivacaine を投与して再生筋線維を誘導し、CIM 誘導の 21 日目に筋組織を病理組織学的に評価した。

#### (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

C2C12 より分化誘導した筋線維と CIM 組織について、16 種類の chemokine の RT-PCR を施行したところ、4 種類が共通して発現していた。これらの 4 種類について、LMD で採取した再生筋線維、Myosphere 法により分化誘導した筋線維で、RT-PCR を施行したところ、MCP-2/CCL8, Mig/CXCL9, IP-10/CXCL10 が共通して発現していた。さらに、Myosphere 法による筋線維分化誘導の培養上清で、蛋白発現を ELISA にて検討したところ、MCP-2/CCL8, IP-10/CXCL10, FKN/CXCL1 の発現を認めた。また、CIM 誘導後に、対側に bupivacaine を筋内投与して再生筋線維を誘導したところ、同側に筋炎を誘導することが出来た。

### D. 考察

マウスモデルの筋炎組織、in vitro と in vivo における筋の再生・分化過程において、複数のケモカインが発現していることが明らかとなった。また、in vivo における再生筋線維の誘導時に筋炎を誘導することができ、関連が示唆される。筋は再生の過程で、マクロファージの分泌するサイトカインが重要であることが知られており、さらにこのマクロファージのリクルー

トに筋組織の発現するケモカインの関与が示唆されている。この現象もまた、筋炎の病態に関与している可能性が考えられる。今後は、これらのケモカインが筋炎の発症においてどのような役割を果たしているのかを詳しく解析するとともに、新たな治療法の開発に応用可能であるか検討を行う予定である。また、ヒトにおける筋炎発症のメカニズムを考える上で、生理的に再生筋線維が分化する状況においても筋炎を誘導することができるか検証することが必要と考えている。

### E. 結論

我々が開発したヒトの筋炎に近いマウスモデルを用いて、筋炎発症における自然免疫活性化因子として、再生筋線維が発現するケモカインに注目して解析を行った。その結果、候補となる複数のケモカインを同定した。今後、これらのケモカインの筋炎発症における役割を検証するとともに、これらの知見は筋炎に特異性の高い治療法の開発に寄与することが期待される。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Sugihara, T., N. Okiyama, M. Suzuki, K. Kohyama, Y. Matsumoto, N. Miyasaka, and H. Kohsaka. Definitive engagement of cytotoxic CD8 T cells in C protein-induced myositis, a murine model of polymyositis. *Arthritis Rheum* 62:3088-3092, 2010.
2. Seki, I., M. Suzuki, N. Miyasaka, and H. Kohsaka. Expression of CD45 isoforms correlates with differential proliferative responses of peripheral CD4+ and CD8+ T cells. *Immunol Lett* 129:39-46, 2010
3. Kohsaka H. Current insights in polymyositis and dermatomyositis *Clin Exp Neuroimmunol* 1(1), 22-32, 2010

#### 2. 学会発表

1. Hitoshi Kohsaka Autoaggressive T cells and inflammatory cytokines in autoimmune myositis. The 6th Annual Symposium at Rheumatism Research Institute, Seoul National University Seoul June 2, 2010

2. Naoko Okiyama, Takehiko Sugihara, Hiroo Yokozeki, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka. Identification of CD8 T cell epitopes in skeletal muscle C-protein that induces experimental myositis of mice., Keystone Symposia, Breckenridge, Colorado, February 27-March 4, 2010
3. Naoko Okiyama, Takehiko Sugihara, Hiroo Yokozeki, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka. a Effector T cells and Local Innate Immunity Need to Act in Concert for Development of Autoimmune Myositis 70th Annual Meeting of Society for Investigative Dearthmatology, Atlanta, May 5-8, 2010.
4. Naoko Okiyama, Takehiko Sugihara, Hiroo Yokozeki, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka. Identification of CD8 T cell epitopes in skeletal muscle C-protein that induces experimental myositis of mice. International Congress of Immunology Osaka, August 22-27, 2010
5. Ayaka Maeda, Shinya Hirata, Naoko Okiyama, Takahiko Sugihara, Eri Yoshimoto, Nobuyuki Miyasaka and Hitoshi Kohsaka Inflammatory chemokines expressed by differentiating myofibroblasts and the muscles affected by mouse model of polymyositis. International Congress of Immunology Osaka, August 22-27, 2010
6. Takahiko Sugihara, Naoko Okiyama, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka TNFa and IL-1 blockade for treatment of a murine model of polymyositis International Congress of Immunology Osaka, August 22-27, 2010
7. Takahiko Sugihara, Naoko Okiyama, Naoto Watanabe, Nobuyuki Miyasaka and Hitoshi Kohsaka. Blockade of TNF $\alpha$  or IL-1 ameliorates ongoing C-protein induced myositis of mice. American College of Rheumatology 74th National Meeting, Atlanta, Georgia, November 6-11, 2010
8. Naoko Okiyama, Takehiko Sugihara, Takahiro Satoh, Hiroo Yokozeki, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka. Identification of CD8 T cell epitopes in skeletal muscle C-protein that induces experimental myositis of mice. 35th Annual Meeting of Japanese Society of Investigative Dermatology. Wakayama, December 3-5, 2010.
9. 杉原 毅彦、沖山 奈緒子、宮坂 信之、上阪 等 多発性筋炎モデルマウスを用いた新治療法の開発第54回 日本リウマチ学会総会・学術集会 神戸 2010年4月22-25日
10. 上阪 等 多発性筋炎・皮膚筋炎研究 - 静から動へ - 順天堂大学膠原病内科講演会 東京 平成22年6月30日
11. 上阪 等 筋炎における自己反応性 T 細胞と炎症性サイトカイン 第6回自己免疫疾患研究会 東京 平成22年7月3日
12. 上阪 等 多発性筋炎と皮膚筋炎 - 膠原病内科医の診ため - 2010 北海道末梢神経・筋研究会 札幌 平成22年7月31日
13. 上阪 等 膠原病内科医から見た炎症性筋疾患の基礎と臨床 第17回熊本神経カンファレンス 学術講演会 平成22年12月1日 熊本

#### 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 (独)国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 免疫研究部 部長  
研究協力者 大木 伸司 (独)国立精神・神経医療研究センター 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)を含む種々の自己免疫疾患では、Th1 細胞や Th17 細胞が病態形成過程に重要な役割を果たす。これまで MS の病態形成に関わる自己反応性 T 細胞の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するオーファン核内受容体 NR4A2 分子を見出し、同分子が活性化 T 細胞の炎症性サイトカイン産生を制御する重要な分子であることを示してきた。さらに T 細胞における NR4A2 の詳細な機能解析をさらにすすめた結果、NR4A2 が IL-17 依存性の自己応答 T 細胞反応に極めて密接な関連をもつ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示された。さらに自己免疫病態制御因子としての NR4A2 の in vivo 機能評価を行った結果、特異的 siRNA の in vivo 投与により、EAE 病態が顕著に改善したことから、本分子が MS をはじめとする自己免疫疾患の新規治療標的として極めて有力な候補分子となりうる事が明らかとなった。

### A. 研究目的

MS の病態形成に関わる自己反応性 T 細胞の機能制御を通じて新規 MS 治療法を確立することを目的として、網羅的遺伝子発現解析による病原性 T 細胞の性状の解明を行い、MS 患者由来末梢血 T 細胞ではオーファン核内受容体 NR4A2 の発現選択的に亢進しており、本分子が活性化 T 細胞の炎症性サイトカイン産生に深く関わることを見出した。今回、病原性 T 細胞における NR4A2 の機能を解析する一環として、NR4A2 による IL-17 産生制御メカニズムの解明と、特異的 siRNA を用いた NR4A2 の in vivo 機能評価を試みた。

### B. 研究方法

C57BL/6J(B6)マウスの脾臓からナイーブ CD4 陽性 T 細胞を CD4<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>CD62L<sup>high</sup> 細胞としてソーティングにより分離し、in vitro での Th17 細胞分化誘導のため IL-6(20ng)/TGF- $\beta$ (2ng)存在下で抗 CD3/CD28 抗体刺激をおこなった。この際、あらかじめ Nucleofector を用いて、培養開始時に NR4A2 特異的 siRNA あるいは対照 siRNA を導入した T 細胞を用い、IL-17 産生と ROR $\gamma$ t 発現の変動を経時的に追うことで、NR4A2 との関連を解析した。アジュバントに封入した MOG<sub>35-55</sub> ペプチドを免疫することで EAE を誘導した B6 マウスに、市販のコラーゲンマトリックスと混合して安定化させた siRNA を単回静脈投

与し、対照マウスと併せて病態を比較解析した。EAE 発症マウスの脳・脊髄から、コラゲナーゼ・DNase I 消化後に分離した単核球から調製した T 細胞を用いて、IL-17 および IFN- $\gamma$  の産生を、ELISA 法、細胞内サイトカイン染色法、定量 PCR 法などを組み合わせて定量解析した。

(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

IL-6 と TGF- $\beta$  の存在下で in vitro で分化させた Th17 細胞では、刺激後 72 時間で IL-17 遺伝子の転写が顕著に増大し、その発現レベルは 96 時間目まで維持されたが、NR4A2 特異的 siRNA 処理することにより IL-17 遺伝子の転写はほぼ完全に抑制された。この時 Th17 細胞の分化マーカーである ROR $\gamma$ t 遺伝子の転写は、刺激開始後数時間以内に上昇し、その発現は siRNA 処理の影響をほとんど受けなかった。一方、Th17 細胞の増殖に関わるとされる IL-21 遺伝子は、刺激後 24 時間に一過性に発現上昇し、また Th17 細胞の最終分化と形質の安定化に関わるとされる IL-23 受容体遺伝子は、刺激後 24~48 時間に発現上昇した。興味深いことに、これらの遺伝子の転写活性化は、NR4A2 特異的 siRNA 処理によ

りいずれもほぼ完全に消失した。さらに、NR4A2 特異的 siRNA 処理による Th17 細胞の IL-23 受容体の発現抑制は、培養系に IL-21 を添加することにより回復傾向を示し、同時に培養上清中への IL-17 産生も、濃度依存的に回復した。さらに、MOG ペプチド免疫時に siRNA を単回静脈投与したマウスでは、対照マウスと比較して EAE の発症が顕著に抑制され、この病害抑制効果は投与後約3週間にわたり持続した。EAE マウス由来 T 細胞の、MOG 特異的 IL-17 産生は、siRNA 投与により抑制されたが、IFN- $\gamma$  産生は変化しなかった。さらに EAE マウスの脳・脊髄に浸潤した T 細胞の IL-17 産生も、siRNA 投与により顕著に抑制されていた。NR4A2 特異的 siRNA は、発症直後の単回静脈投与でも有意な病態抑制効果を示すことが明らかとなった。

#### D. 考察

MS/EAE 病態に深く関わるものが明らかとなってきた NR4A2 分子について、病原性 T 細胞の分化制御メカニズムの解明と、EAE 病態抑制効果を指標とした治療標的としての *in vivo* 評価を行った。まず Th17 細胞分化に深く関わる一連の分子群として、ROR $\gamma$ t、IL-21、IL-23 受容体の発現を解析した結果、NR4A2 による IL-17 の産生制御が、より上流の IL-21 産生と IL-23 受容体発現の制御に依存性の機構である可能性が新たに示された。さらに NR4A2 特異的 siRNA の単回静脈投与により EAE 病態を抑制することができ、MOG 抗原特異的 IL-17 産生と、脳・脊髄への Th17 細胞の集積が顕著に抑制されることを明らかにした。今回の結果は、MS をはじめとする自己免疫疾患の治療標的として、NR4A2 が極めて有力な候補分子である可能性を示唆しており、今後も精力的に関連研究を推し進めていく予定である。

#### E. 結論

NR4A2 は、MS をはじめとする種々の自己免疫疾患に関連した Th17 細胞の機能に密接に関わる、極めて重要な免疫応答制御因子であり、その機能制御を介して新しい自己免疫疾患治療法を提供する有力な治療標的候補分子である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

大木 伸司:多発性硬化症における病原性 T 細胞のサイトカイン産生制御機構、生化学(日本生化学会

編)、第 82 巻 745-750 (2010)

大木 伸司:多発性硬化症の自己免疫病態と新規治療戦略、ファルマシア(日本薬学会編) 第 46 巻 745-749, (2010)

#### 1. 学会発表

[国際学会]

Raveney B., S. Oki, T. Yamamura: Expression of the orphan nuclear receptor NR4A2 is required for IL-17 production by Th17 cells. 97<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association of Immunologist, Baltimore, May. 7<sup>th</sup>-11<sup>th</sup>, 2010

Raveney B., S. Oki, T. Yamamura: Expression of the orphan nuclear receptor NR4A2 is required for IL-17 production by Th17 cells. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, Kobe, Aug. 22<sup>nd</sup>-27<sup>th</sup>, 2010

S. Oki, Raveney B., T. Yamamura: Oral administration of the synthetic retinoid Am80 ameliorates Th17-mediated autoimmunity of the eye and central nervous system 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, Kobe, Aug. 22<sup>nd</sup>-27<sup>th</sup>, 2010

[国内学会]

大木 伸司、ベンジャミン・レイバニー、吉村 元、山村 隆: オーフアン核内受容体 NR4A2 は IL-17 産生性 T 細胞と自己免疫応答に強く連関する 第 22 回日本神経免疫学会学術集会、Mar. 17<sup>th</sup>-19<sup>th</sup>, 2010

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

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

## 全身性エリテマトーデス（SLE）における CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 細胞の異常に関する研究

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 西本 哲也 慶應義塾大学内科 大学院生

### 研究要旨

Foxp3 は制御性 T 細胞（Treg）の分化、機能に重要な役割を果たす転写因子であり、自己免疫疾患では、CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg の機能不全が想定されている。そこで、本研究では SLE 患者の病態における CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の役割を検討した。

対象はアメリカリウマチ学会の分類基準を満たす SLE 患者 39 例と健常人 19 例。フローサイトメトリーを用いて、CD4<sup>+</sup>細胞中における Foxp3<sup>+</sup>細胞の比率（%）と CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞に発現する CXCR3、CCR4、CCR6、CXCR4 の発現強度（MFI）と陽性細胞頻度（%）を測定した。

CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の比率は SLE 患者で健常人に比べて有意に増加していた。さらに、CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の比率は抗二本鎖 DNA 抗体価、SLEDAI と正の相関を、血清総補体価と負の相関を示した。同一患者の検体を用いた経時的な解析では、疾患活動性低下に伴って CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の比率が減少した。SLE 患者の CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞上では健常人と比較して CCR6 の発現低下、CXCR4 の発現上昇がみられた。

SLE 患者ではケモカイン受容体発現プロフィールが変化した CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞が増加し、病態に関わる可能性が示された。CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞が SLE の診断、疾患活動性評価に有用なバイオマーカーとなるとともに、SLE に対する新たな治療標的となる可能性がある。

### A. 研究目的

Foxp3 は制御性 T 細胞（Treg）の分化、機能に重要な役割を果たす転写因子であり、Treg のマーカーとして広く用いられている。多くの自己免疫疾患において、CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg の異常とその病態との関連が報告されている。SLE では過剰な免疫反応が自己免疫病態に関わることから、SLE 患者を対象とした Treg の検討がこれまで行われてきた。しかしながら、Treg の増減については一定の結論が得られていない。そこで、本研究では SLE 患者における CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞とその病態における役割を検討した。

### B. 研究方法

#### 1. 対象

アメリカリウマチ学会の分類基準を満たす SLE 患者 39 例、健常人 19 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。

#### 2. CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の比率とケモカイン受容体発現の解析

Foxp3 の発現は細胞表面蛋白（CD4、CXCR3、CCR4、CCR6、CXCR4）を蛍光標識後、抗 Foxp3 抗体（clone 236A/E7; eBioscience）を用いた細胞内染色により調べた。CD4<sup>+</sup>細胞中における Foxp3<sup>+</sup>細胞の比率と CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞上のケモカイン受容体の発現強度と陽性細胞頻度はフローサイトメトリー（FACS Calibur: BD Biosciences）を用いて解析した。発現強度は mean fluorescence intensity（MFI）を用いて定量化した。

また、SLE 患者 3 例を対象として活動期と寛解期の経時的変化を検討した。

#### 3. SLE 患者の臨床情報との相関解析

SLE 患者の末梢血採取時点での臨床情報（抗 dsDNA 抗体価、白血球数、リンパ球数、ヘモグ

ロビン、血小板数、ESR、ヘマトクリット、血清アルブミン、CRP、総補体価、血清クレアチニン、蛋白尿、SLEDAI、SLAM)を履歴的に調査し、CD4<sup>+</sup>細胞中におけるFoxp3<sup>+</sup>細胞の比率またはCD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞上のケモカイン受容体発現との関連を解析した。

#### 4. 統計学的解析

2群間の比較と臨床情報との相関解析はそれぞれMann-Whitney U-testとPearson's correlation coefficientを用いて解析した。

(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

#### 1. 健常人とSLE患者におけるCD4<sup>+</sup>細胞中のFoxp3<sup>+</sup>細胞比率の比較

CD4<sup>+</sup>細胞中におけるFoxp3<sup>+</sup>細胞の比率はSLE患者で健常人に比べて有意に増加していた(平均±標準偏差: 15.4±7.3% vs 8.9±2.3%、P<0.001)(図1)。同一患者の検体を用いた経時的な解析では、CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の比率が治療による疾患活動性低下に伴って減少した。

#### 2. SLE患者におけるCD4<sup>+</sup>細胞中のFoxp3<sup>+</sup>細胞比率と臨床情報との相関関係

CD4<sup>+</sup>細胞中におけるFoxp3<sup>+</sup>細胞の比率は抗二本鎖DNA抗体価(r=0.52、P=0.001)、SLEDAI(r=0.57、P<0.001)と正の相関を、血清総補体価(r=0.52、P=0.001)と負の相関を示した(図2)。

なお、他の臨床情報との間に関連は認めなかった。

#### 3. CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞におけるケモカイン受容体発現の解析

健常人とSLE患者でCD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞上のケモカイン受容体の発現を解析したところ、CXCR3、CCR4では有意な変化は見られなかった。しかし、SLE患者のCD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞上ではCCR6の発現強度(SLE患者 vs 健常人: 1.0±0.3 vs 1.1±0.3、P=0.02)、陽性細胞頻度(1.5±1.9 vs 3.6

±3.4、P=0.003)がともに低下していた。また、CXCR4の発現強度(46.9±24.6 vs 29.5±16.2、P=0.007)、陽性細胞頻度(86.0±16.2 vs 63.3±20.5、P<0.001)がともに上昇していた(図3)。一方、ケモカイン受容体の発現強度や陽性細胞頻度とSLE患者の臨床症状との間に関連はみられなかった。

### D. 考察

SLE患者においてCD4<sup>+</sup>T細胞中のFoxp3<sup>+</sup>細胞の比率は増加しており、疾患活動性と正の相関がみられた。この理由として、①Tregの免疫制御機能が低下し、それを代償するための過剰な増加、あるいは②CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞がTregとしての免疫制御活性を欠き、エフェクター細胞として病原性を発揮する可能性が考えられた。

また、SLE患者のCD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞ではCCR6発現低下、CXCR4発現上昇を認め、CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の増加だけでなく機能的な異常が存在する可能性が考えられた。ただし、疾患活動性との相関がみられなかったことから、ケモカイン受容体発現異常は疾患感受性に寄与することが推測された。

### E. 結論

SLE患者ではケモカイン受容体発現異常を有するCD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の増加し、病態に関わる可能性が示された。CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞がSLEの診断、疾患活動性評価に有用なバイオマーカーとなるとともに、SLEに対する新たな治療標的となる可能性がある。

### 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, and Kuwana M. Clinically amyopathic dermatomyositis. *Curr. Opinion Rheumatol.* 2010; 22(6): 639-643.

学会発表

1. 桑名正隆: 免疫性血小板減少性紫斑病

(Pathophysiology of immune thrombocytopenic purpura) . 第 72 回日本血液学会学術集会 (横浜). 2010. 9.

2. 桑名正隆: 教育講演 ITP; ITP の病態と新たな治療標的. 第 52 回小児血液学会総会 (大阪). 2010. 12.

#### 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

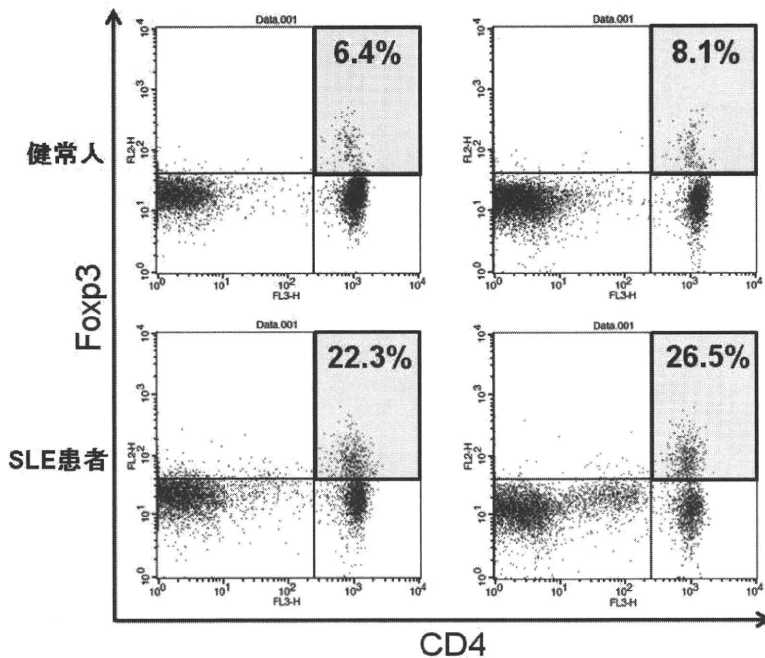
##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

A



B

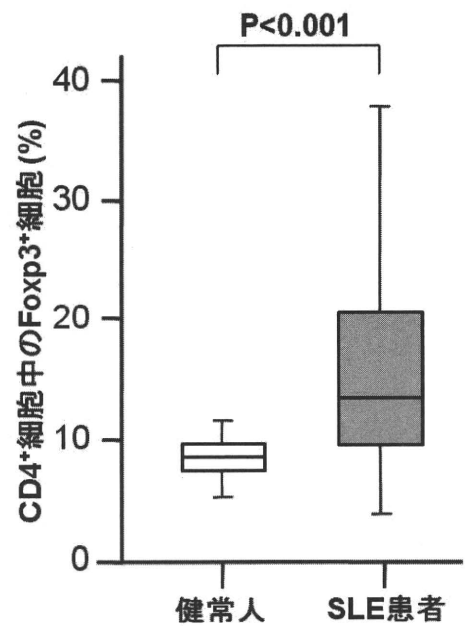


図1. 健康人とSLE患者におけるCD4<sup>+</sup>細胞中のFcγR2b<sup>+</sup>細胞の比率

A. 健康人とSLE患者の末梢血単核球をCD4、FcγR2bで蛍光染色し、フローサイトメトリーを用いて解析した(代表例)。B. 健康人(19例)とSLE患者(39例)におけるCD4<sup>+</sup>細胞中のFcγR2b<sup>+</sup>細胞の比率を示した。

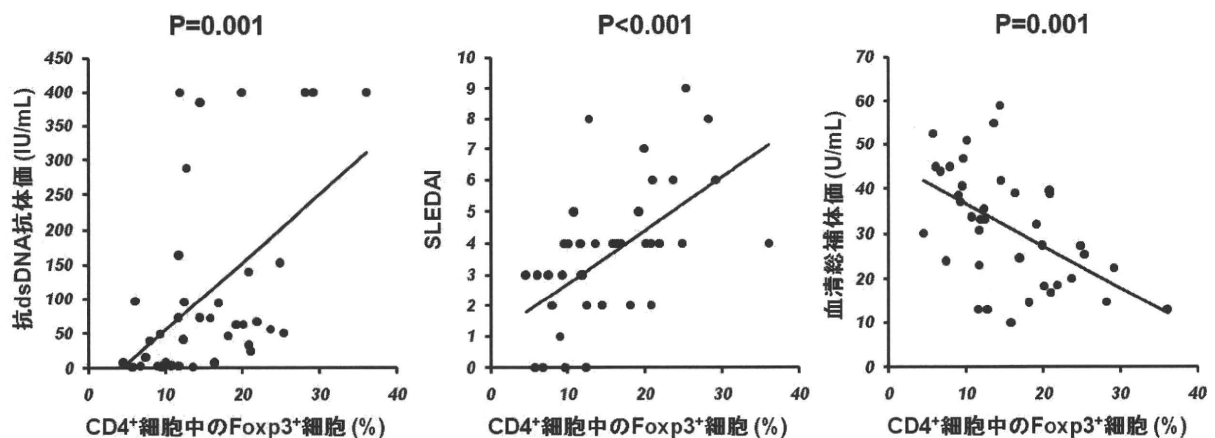


図2. CD4<sup>+</sup>細胞中のFcγR2b<sup>+</sup>細胞の比率と臨床所見の相関関係

SLE患者におけるCD4<sup>+</sup>細胞中のFcγR2b<sup>+</sup>細胞の比率と抗dsDNA抗体価、SLEDAI、血清総補体価との相関。



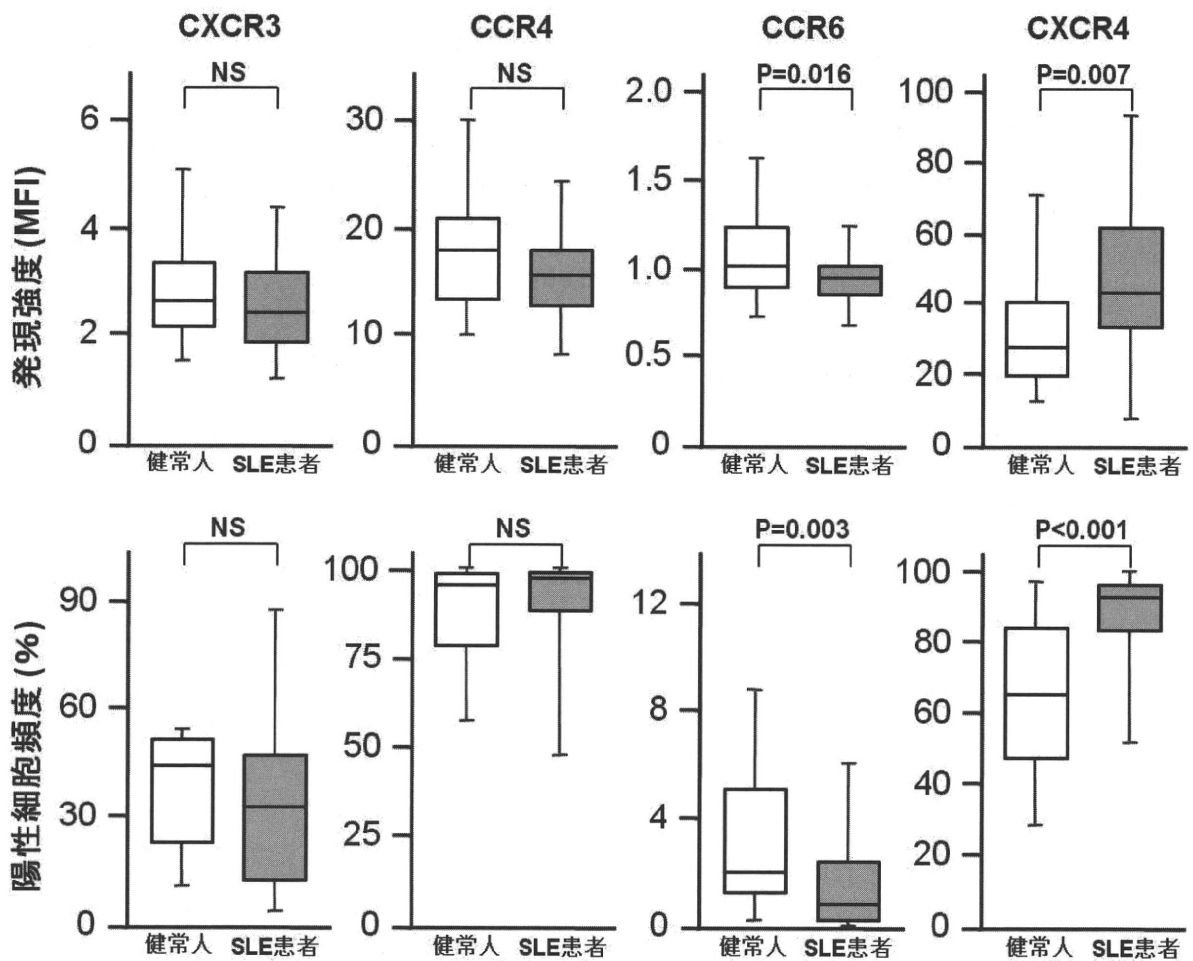


図3. 健常人とSLE患者におけるCD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞上のケモカイン受容体の発現  
 健常人とSLE患者のCD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞分画におけるケモカイン受容体(CXCR3、CCR4、CCR6、CXCR4)の発現をフローサイトメトリーにより解析し、発現強度(MFI)と陽性細胞頻度(%)で表した。

## 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する目的で、転写因子 Foxp3 が Cbfb-Runx 転写因子複合体をはじめとする複数の転写因子群と複合体を形成し、免疫応答に重要な遺伝子群の発現調節をしていることを示した。

### 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

制御性 T 細胞の機能に最も重要な転写因子は Foxp3 である。Foxp3 を中心とした転写因子複合体の構成要素を、免疫沈降法などを用いて明らかにした。さらに、複合体を形成する分子の遺伝子座を 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 を発現するマウス等と交配することで、制御性 T 細胞特異的に遺伝子を欠損するマウス等を作成した。これらの遺伝子改変マウスを用いることで各分子の制御性 T 細胞での重要性、役割を明らかにし、免疫応答を操作できるか検討する。

(倫理面への配慮)

動物実験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、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

制御性 T 細胞のマスター制御遺伝子 Foxp3 は Runx1 および Cbfb からなる転写因子複合体と直接

的に結合し、Foxp3 自体の発現維持や IL-4 発現抑制をはじめとする多数の遺伝子発現を調節していることが示された。さらに、免疫沈降法を用いた網羅的解析により、Foxp3 は Runx ファミリー以外の数多くの遺伝子とも複合体を形成していた。Foxp3 と複合体を形成する転写因子の中には、制御性 T 細胞で特徴的な発現パターンを示すものも含まれていた。

### D. 考察

制御性 T 細胞において、Foxp3 と複合体を形成し、その機能に重要な転写因子群が複数同定されたことで、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 を中心とした転写因子群が、免疫抑制機能に必須の役割を果たしており、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効な候補となる。

### F. 健康危険情報

該当なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

• Caetano-Lopes, J., Nery, A. M., Canhao, H., Duarte, J., Cascao, R., Rodrigues, A., Perpetuo, I. P., Abdulghani, S., Amaral, P. M., Sakaguchi, S., Kontinen, Y. T., Graca, L., Vaz, M. F., and

Fonseca, J. E. Chronic arthritis leads to disturbances in the bone collagen network. *Arthritis Res. Ther.* 12(1):R9, 2010.

•Tanaka, S., Maeda, S., Hashimoto. M., Teradaira, S., Hirota,K., Yoshitomi, H., Katakai, T., Shimizu, A., Nomura, T., Sakaguchi, N., and Sakaguchi, S. Graded attenuation of TCR signaling elicits distinct autoimmune diseases by altering thymic T cell selection and regulatory T cell function. *J. Immunol.* 185:2295-305, 2010.

•Hashimoto, M., Hirota, K., Yoshitomi, H., Maeda, S., Teradaira, S., Akizuki, S., Prieto-Martin, P., Nomura, T., Sakaguchi, N., Köhl, J., Heyman, B., Takahashi, M., Fujita, T., Mimori, T., Sakaguchi, S. Complement drives Th-17 cell differentiation and triggers autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 207:1135-43, 2010.

•Haque, A., Stanley, A. C., Amante, F. H., Rivera, F. D., Zhou, Y., Kuns, R. D., Yardley, V., Sakaguchi, S., Hill, G. R., and Engwerda, C. R. Therapeutic Glucocorticoid-Induced TNF Receptor-Mediated Amplification of CD4+ T Cell Responses Enhances Antiparasitic Immunity. *J. Immunol.* 184:2583-2592, 2010.

•Teng, M.W., Swann, J.B., von Scheidt B, Sharkey, J., Zerafa, N., McLaughlin, N., Yamaguchi, T., Sakaguchi, S., Darcy, P.K., and Smyth, M.J. Multiple antitumor mechanisms downstream of prophylactic regulatory T-cell depletion. *Cancer Res.* 70:2665-2674, 2010.

•Saini, M., Sinclair, C., Marshall, D., Tolaini, M., Sakaguchi, S., and Seddon, B. Regulation of Zap70 expression during thymic development allows temporal separation of CD4 and CD8 repertoire selection at different signaling thresholds. *Science Signaling.* 3(114):ra23 2010.

•Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M., and Hafler, D. A. FOXP3+ regulatory T cells in the human system. *Nat. Rev. Immunol.* 185:2295-305, 2010.

•Ohkura, N., and Sakaguchi, S. Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. *Semin. Immunopathol.* 32:95-106, 2010.

Nishikawa, H., and Sakaguchi, S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int. J. Cancer.* 127:759-67, 2010.

•Mitsui, J., Nishikawa, H., Muraoka, D., Wang, L., Noguchi, T., Sato, E., Kondo, S., Allison, J. P., Sakaguchi, S., Old, L. J., Kato, T., and Shiku, H. Two distinct mechanisms of augmented antitumor activity by modulation of immunostimulatory/inhibitory signals. *Clin. Cancer Res.* 16:2781-91, 2010.

•Nafady-Hego, H., Li, Y., Ohe, H., Zhao, X., Satoda, N., Sakaguchi, S., Wood, K., Uemoto, S., and Koshiba, T. The generation of donor-specific CD4+CD25++CD45RA+ naïve regulatory T cells in operationally tolerance patients after pediatric living-donor liver transplantation. *Transplantation.* 90:1547-55, 2010.

•Sakaguchi, S. Conditional stability of T cells. *Nature.* 468:41-42, 2010.

•Fujii, H., Arakawa, A., Kitoh, A., Miyara, M., Kato, M., Kore-Eda, S., Sakaguchi, S., Miyachi, Y., Tanioka, M., and Ono, M. Perturbations of both non-regulatory and regulatory FOXP3(+) T cells in patients with malignant melanoma. *Br. J. Dermatol.* doi: 10.1111/j.1365-2133, 2010.

•Snell, L. M., McPherson, A. J., Lin, G. H., Sakaguchi, S., Pandolfi, P. P., Riccardi, C., and Watts, T. H. CD8 T cell-intrinsic GITR is required for T cell clonal expansion and mouse survival following severe influenza infection. *J. Immunol.* 185:7223-34, 2010.

•Ohkura N, Sakaguchi S. Foxo1 and Foxo3 help Foxp3. *Immunity.* 33:835-7, 2010.

•Sakaguchi, S. Regulatory T cells: history and perspective. *Methods in Molecular Biology.* 77: 1-13, 2011.

•Côté, A. L., Zhang, P., O'Sullivan, J. A., Jacobs, V. L., Clemis, C. R., Sakaguchi, S., Guevara-Patiño, J. A., and Turk, M. J. Stimulation of the glucocorticoid-induced TNF receptor family-related receptor on CD8 T cells induces protective and high-avidity T cell responses to tumor-specific antigens. *J. Immunol.* 186:275-83, 2011.

•Peterson, L. K., Shaw, L. A., Joetham, A., Sakaguchi, S., Gelfand, E. W., and Dragone, L. L. SLAP Deficiency Enhances Number and Function of Tregs Preventing Chronic Autoimmune Arthritis in SKG Mice. *J. Immunol.* In press.

・Kurotaki, D., Kon, S., Bae, K., Ito, K., Matsui, Y., Nakayama, Y., Kanayama, M., Kimura, C., Narita, Y., Nishimura, T., Iwabuchi, K., Mack, M., van Rooijen, N., Sakaguchi, S., Uede, T., and Morimoto, J. CSF-1-dependent red pulp macrophages regulate CD4 T cell responses. *J. Immunol.* In press.

・Ohe, H., et al., Minimal but essential doses of immunosuppression: a more realistic approach to improve long-term outcomes for pediatric living-donor liver transplantation. *Transplantation.* In press.

・Miyara, M., and Sakaguchi, S. FoxP3+CD4+ regulatory T cells: their knowns and unknowns. *Immunol. Cell. Biology.* In press.

・Ohkura, N., and Sakaguchi, S. Development of regulatory T cells: regulation of Foxp3 expression by pharmacological agents. *Trends in Pharmacological Sciences.* In press.

## 2. 学会発表

坂口志文：Control of Immune Responses by Regulatory T Cells 科学技術振興調整費シンポジウム，免疫制御を基盤とする難病克服のための創薬イノベーション (2010.1.22 京都)

坂口志文：制御性T細胞による免疫応答制御 肝免疫フォーラム (2010.2.6 東京)

Shimon Sakaguchi: Control of immune responses by regulatory T cells. 8<sup>th</sup> EAACI-GAZLEN-Immunology Winter School (2010.2.11-14. Garmish-Partenkirchen, Germany)

坂口志文：制御性T細胞による免疫応答制御。第6回皮膚免疫疾患研究会 (2010.4.8 大阪)

坂口志文：SKG マウスにおける関節炎発症のメカニズム。第54回日本リウマチ学会総会・学術総会 (2010.4.22-25 神戸)

Shimon Sakaguchi: State-of-the-Art Address. Regulatory T cells for immunological

tolerance. American Transplantation Congress 2010 (2010. 5.1-5. San Diego, USA)

Shimon Sakaguchi: Control of Immune Responses by Regulatory T Cells. Gladstone Institute of Virology and Immunology Seminar Series (2010. 5. 6. San Francisco, USA)

Shimon Sakaguchi: T cell signaling, regulatory T cells, and self-tolerance. 97<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association of Immunologist (2010. 5. 7-11. Baltimore, USA)

Motomu Hashimoto: Innate immunity for Th17-mediated autoimmune disease. The 4<sup>th</sup> International Symposium of WPI-IFReC (2010. 6. 1-2. 大阪)

坂口志文：制御性T細胞とサブレッサーT細胞。東京大学グローバルCOE特別セミナー (2010.6.3. 東京)

Shimon Sakaguchi: Regulatory T Cells in Innate and Adaptive Immunity. 2010 Keystone Symposia Innate Immunity: Mechanisms Linking with Adaptive Immunity (2010. 6.7-12. Dublin Ireland)

坂口志文：制御性T細胞による免疫応答制御。第26回日本DDS学会 (2010. 6. 17-18 大阪)

Shimon Sakaguchi: Control of immune responses by regulatory T cells. IFReC-New Zealand Immunology Workshop (2010. 6. 17-18.大阪)

Shimon Sakaguchi: Control of immune responses by regulatory T cells. International Conference in Sapporo 2010 (2010. 7. 2. 札幌)

Shimon Sakaguchi: Treg cells. 14<sup>th</sup> Congress of Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (2010. 7.11-15. Hong Kong China)

Shimon Sakaguchi: Th17 and Treg in inflammatory diseases. 14<sup>th</sup> Congress of Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (2010. 7.11-15. Hong Kong China)