

プログラム

開会の辞 (13:00) 研究代表者 小池 隆夫

1. 「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」 (13:05)

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

2. 「制御性 T 細胞を用いた自己免疫の抑制に関する研究」 (13:25)

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

3. 「動物モデルを用いた多発性筋炎・皮膚筋炎の病態解明」 (13:45)

上阪 等 平田 真哉

東京医科歯科大学 膠原病・リウマチ内科

4. 「新たな免疫制御戦略の探索に関する研究」 (14:05)

三森 経世 臼井 崇

京都大学大学院医学研究科 臨床免疫学

5. 「抗リン脂質抗体による向血栓細胞活性化のメカニズム」 (14:25)

渥美 達也 加藤 将 小池 隆夫

北海道大学大学院医学研究科 内科学講座・第二内科

休憩 (14:45)

全体会議 (15:00)

6. 「NOD マウス ES 細胞由来の樹状細胞 (ES-DC) による 1 型糖尿病発症の抑制」 (15:15)

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

7. 「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に関する研究」

山本 一彦

(15:35)

東京大学医学部付属病院 アレルギー・リウマチ内科

8. 「全身性エリテマトーデス(SLE)における CD4+Foxp3+T 細胞分画異常に関する研究」
桑名 正隆 西本 哲也 (15:55)
慶應義塾大学医学部 リウマチ内科
9. 「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」 (16:15)
山村 隆 大木 伸司
国立精神・神経医療研究センター 神経研究所免疫研究部
10. 「新規糖脂質 α -carba-galactosylceramide を介した関節炎制御機構の解析」 (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)

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 島山 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・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- κ 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- κ 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- κ 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

NF- κ B シグナルの抑制分子 A20 の結合タンパク質として Ymer を同定した。細胞レベルの解析において、Ymer は NF- κ B シグナルを抑制的に機能することが判明した。さらに、全身発現型の Ymer トランスジェニックマウスを樹立し、*in vivo* での Ymer の機能解析を進めた。個体における Ymer の高発現により、LPS に対する反応は低下した。また TNF 添加によっても、NF- κ B により発現制御される多くの遺伝子の発現が抑制された。抗 Fas 抗体投与での肝臓障害モデルにおいては、Ymer 過剰発現によって、肝臓障害が亢進されることが判明した。

D. 考察

本研究結果は、NF- κ 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。Ymer は NF- κ B 経路に関しては抑制的機能を示し、一方 Fas シグナルに関しては促進的機能を果たしていることがわかり、今後はさまざまなシグナルに対する Ymer の多様な機能について解析していく必要がある。また、Ymer トランスジェニックマウスと自己免疫疾患マウスを交配することで、自己免疫疾患における Ymer の関与を調べることが重要となる。さらに、個体レベルで免疫細胞及び炎症関連細胞における生理的機能を明らかにするために、Ymer の遺伝子破壊マウスの樹立が重要となる。

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- κ 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- κ 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- κ 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。

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

A.研究目的

FoxP3⁺CD4⁺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を作成する。また、ROSA26 遺伝子座に、複合体を形成する各分子の cDNA を flox 配列で挟まれた転写抑制配列とともに挿入した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過剰発現するマウスを作製する。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、役割を明らかにする。

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 CBFβ 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 SatB1, Bcl11b などとも複合体を形成している可能性が示された。SatB1 は制御性T細胞で発現が低く、*in vitro*での SatB1の過剰発現は制御性T細胞の特徴・機能を阻害する傾向にあった。さらに、*in vitro*での SatB1の発現の抑制は制御性T細胞の特徴・機能には影響を与えなかった。Bcl11b については、Foxp3/Runx1 と複合体を形成していることが確認され、制御性T細胞特異的 Bcl11b 欠損マウスを作製した。

D.考察

制御性T細胞において、SatB1の発現・機能の抑制が、制御性T細胞の抑制機能維持に必要である可能性が考えられる。今後、SatB1 の制御性T細胞特異的過剰発現マウスを作製して解析する予定である。Bcl11b については、T細胞分化における必須の役割が示されており、Foxp3と直接的に結合していることから Tregでも重要な役割を担っている可能性が高い。SatB1 や Bcl11b の制御性T細胞特異的、もしくは T細胞特異的欠損マウス、制御性T細胞もしくは T細胞特異的過剰発現マウスを解析することで、各分子の役割を明らかにできると期待される。

E.結論

FoxP3, Runx-CBFβ, 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。これら加えて、SatB1, Bcl11b などさまざまな分子も Foxp3 と複合体を形成している。これらの分子は、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 細胞を操作する医薬の有力な標的分子候補となる。

動物モデルを用いた多発性筋炎・皮膚筋炎の病態解明

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

A. 研究目的

多発性筋炎/皮膚筋炎は臨床において非特異的免疫抑制療法が行われている。しかし、治療抵抗例やステロイド筋症などの副作用発現例も多く存在し、問題となっている。当教室ではヒトの病態により近いマウス筋炎モデル (C-protein induced myositis; CIM) の開発に成功した。この CIM の移入実験の結果から、CIM 発症マウスより回収した CD8 陽性 T 細胞のみではレシピエントマウスに 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、本研究は、この新規筋炎モデルを用いて、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。また、この解析を通して、筋炎に比較的特異性の高い治療法の開発を目指す。

B. 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* で分化した筋線維、*in vivo* における bupivacaine により誘導された再生筋線維が産生するサイトカインやケモカインの発現を検討した。筋炎組織は免疫細胞が多数混入しており、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ともあるため、多面的な解析を行った。組織、培養細胞の RT-PCR や培養上清の ELISA、組織より再生筋線維をレーザーマイクロダイセクションで回収し RT-PCR を施行した。

C. 結果

CIM の筋組織、*in vitro* における筋線維芽細胞株および筋 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、4 種類のケモカインが mRNA レベルで共通して発現していることを明らかにした。また、これらのケモカインのうち 3 種類は satellite 細胞の *in vitro* 分化誘導系において、培養上清中に発現していることを蛋白質レベルで確認できた。

D. 考察

マウス筋炎モデルの組織、*in vitro* と *in vivo* における筋の再生・分化過程において、複数のケモカインを産生していることが明らかとなった。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っていく予定である。

E. 結論

当研究室にて開発したヒトにより近い筋炎のマウスモデルを用いて筋再生時のケモカイン発現について病態解明を行った。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。

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

Naive 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 准教授

研究協力者 奥 健志、 加藤 将

A. 研究目的

抗リン脂質抗体症候群 (APS) は抗リン脂質抗体 (aPL) が持続的に検出され、血栓症または妊娠合併症を呈する自己免疫疾患である。外因系凝固反応のイニシエーターである組織因子 (TF) の向血栓細胞における発現上昇が APS の病態において最も重要な因子と考えられている。しかし、これらの一連の反応における細胞表面受容体については多くの報告があって一定の見解が得られていない。CD36 はクラス B スカベンジャー受容体ファミリーに属する 2 回膜貫通型糖タンパクで、単球、マクロファージ、血小板、毛細血管内皮細胞に発現し、脂質ラフトに局在している。CD36 は陰性荷電リン脂質、酸化 LDL など様々なリガンドを認識し、動脈硬化、血栓など様々な機能を調節する。CD36 が向血栓細胞に発現していること、陰性荷電リン脂質をリガンドとしていること、血栓に関与していることより、今回我々は CD36 が APS の病態における細胞表面受容体の 1 つとして関与している可能性を考え、遺伝学的ならびに分子生物学的検討を行った。

B. 研究方法

初めに、APS 患者 108 名、健常人 422 名を対象とし、CD36 欠損に関わる一塩基多型である rs3765187 (Pro90Ser) のアレル頻度を TaqMan PCR ジェノタイピング法を用いて調べた。次に、CD36 欠損マウス、CD36 に対し中和作用を有する抗 CD36 抗体を用い、aPL 誘導 TF 発現モデルに CD36 が与える影響をリアルタイム PCR 法で調べた。

C. 結果

rs3765187 (Pro90Ser) のマイナーアレル頻度は健常人と比べ APS 患者で低かった (2.8% (3/108) vs. 10.2% (43/422), $p=0.024$)。aPL が誘導する TF の遺伝子発現は野生型マウスと比較して CD36 欠損マウス腹腔マクロファージにおいて低く、健常人末梢血単核球において抗 CD36 抗体により濃度依存的に抑制された。同様の傾向は代表的な炎症性サイトカインである IL-6 の遺伝子発現においても認められた。

D. 考察

本研究により、CD36 欠損に関連する遺伝子変異の頻度が APS 患者において低く、CD36 の欠損および機能低下が aPL により誘導される単球 TF、IL-6 遺伝子の発現を抑制することが示された。これらの結果より、CD36 は複数存在する細胞表面受容体の 1 つとして、また脂質ラフトに局在し様々な分子と会合する特性から他の受容体と協調して APS の病態形成に関与している可能性が考えられた。また、CD36 の発現や機能を抑制することが APS の治療選択肢の 1 つとなりうる可能性が示唆された。CD36 欠損者が易出血性を含む重篤な臨床症状を呈さないことより、CD36 を標的とした治療は高い認容性が期待できる。

E. 結論

本研究において、遺伝学的、分子生物学的の両面から CD36 が抗リン脂質抗体症候群の病態形成に関与している可能性が示唆された。CD36 は新たな、より病態に即した治療標的となる可能性がある。

NOD マウス ES 細胞由来の樹状細胞 (ES-DC) による 1 型糖尿病発症の抑制

研究分担者 熊本大学大学院生命科学研究部・免疫識別学分野 西村 泰治

研究協力者 熊本大学大学院生命科学研究部・免疫識別学分野 池田 徳典

研究協力者 熊本大学大学院生命科学研究部・免疫識別学分野 千住 覚

A. 研究目的

我々は、マウス ES 細胞より OP9 (Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF) を産生しないマウス骨髄のストローマ細胞株) と GM-CSF を用いて、樹状細胞 (ES-DC) を分化誘導する方法を確立している。さらに我々は、ES 細胞に実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を誘導するミエリン蛋白質の一種である MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein) 由来のペプチドをコードする遺伝子と、免疫抑制性分子である TRAIL や PDL1 遺伝子を導入し、これを樹状細胞へ分化誘導することにより、導入抗原ペプチド+MHC クラス II 分子とリンパ球制御因子を細胞表面に高発現する ES-DC を樹立した。そして、これらの遺伝子改変 ES-DC をマウスに前投与することにより、MOG ペプチドで誘導される EAE の発症を抑制できることを報告した。そこで本研究では、EAE だけでなく 1 型糖尿病を自然発症する NOD マウスにおいても、免疫抑制性分子とその自己免疫疾患を誘導する自己抗原の遺伝子を導入した遺伝子改変 ES-DC を前投与することにより、1 型糖尿病の発症を抑制することが可能かどうかについて検討した。

B. 方法

自己免疫疾患モデルマウスとして、1 型糖尿病を自然発症する NOD マウスを選んだ。NOD マウス由来の ES 細胞 (NOD-ES 細胞) に電気穿孔法を用いて、免疫抑制性分子である TRAIL あるいは PDL1 遺伝子を導入し、NOD-ES-TRAIL および NOD-ES-PDL1 細胞株を樹立した。次いで、NOD-ES、NOD-ES-TRAIL、および NOD-ES-PDL1 の各々の細胞株に、NOD マウスの糖尿病発症に関与する自己抗原である、GAD65 あるいは insulin 由来のペプチドをコードする遺伝子を同様の手法で導入し、NOD-ES-insulin、NOD-ES-GAD65、NOD-ES-TRAIL/insulin、NOD-ES-TRAIL/GAD65、NOD-ES-PDL1/insulin、ならびに NOD-ES-PDL1/GAD65 の 6 種類の細胞株を樹立した。以上の 8 種類の細胞株から分化誘導した遺伝子改変 ES-DC と遺伝子改変を加えない ES-DC も加えた合計 9 種類の ES-DC を、4 週齢の雌の糖尿病未発症 NOD マウス (各 6 匹) に、2 週間隔の投与で合計 5 回、 5.0×10^5 匹/回の腹腔内投与を行い、その後の糖尿病発症の有無について 50 週齢まで観察した。糖尿病発症の有無については、15 週齢以降に 1 週間に 1 度の血糖測定を行い、血糖値が 300 mg/dl を超えた場合に糖尿病発症と定義し、各々の細胞株の投与群や無治療群 (19 匹) における糖尿病発症について比較検討した。

C. 結果

50 週齢まで経過観察を行った結果、各々の群での糖尿病の発症は、無治療群で 17/19 匹、非遺伝子改変 ES-DC 投与群で 0/6 匹、ES-DC-TRAIL 投与群で 0/6 匹、ES-DC-TRAIL/insulin 投与群で 0/6 匹、ES-DC-TRAIL/GAD65 投与群で 1/6 匹、ES-DC-PDL1 投与群で 2/6 匹、ES-DC-PDL1/insulin 投与群で 1/6 匹、ES-DC-TRAIL/GAD65 投与群で 2/6 匹、ES-DC-insulin 投与群で 2/6 匹、および ES-DC-GAD65 投与群で 0/6 匹であった。

D. 考察

今回の実験結果より、何らかの遺伝子改変を行った ES-DC を投与した群は、無治療群と比較して、著明に糖尿病の発症が抑制されることが明らかとなった。さらに、遺伝子改変を行われない ES-DC の投与群においても、糖尿病発症が抑制されたことより、ES-DC 自身が免疫抑制性もしくは免疫制御性の機構を有する可能性が示唆された。

E. 結論

NOD-ES-DC は、免疫抑制性あるいは免疫制御性の機構を有し、NOD マウスにおける糖尿病の発症を抑制する可能性が示唆された。

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に関する研究

研究分担者氏名 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 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. 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。

C. 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。

全身性エリテマトーデス (SLE) における CD4⁺Foxp3⁺T 細胞分画異常に関する研究

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

Foxp3 は制御性 T 細胞 (Treg) に特異的な転写因子であり、Treg の分化、機能に重要な役割を果たすとともに、Treg のマーカーとして広く用いられている。多発性硬化症など臓器特異的自己免疫疾患では CD4⁺Foxp3⁺Treg の減少が発症に関わることが報告されている。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、同様に Treg をはじめとした免疫制御機構の破綻が想定されている。そのため、SLE 患者を対象とした Treg の検討がこれまで行われてきたが、Treg の減少あるいは増加と相反する報告があり、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 Treg 分画を CD4⁺Foxp3⁺をマーカーとして検討し、その病態における役割を検討した。

B. 方法

対象はアメリカリウマチ学会の分類予備基準を満たす SLE 患者 39 例と健康人 19 例。フローサイトメトリーを用いて、CD4⁺細胞中における Foxp3⁺細胞の比率 (%) と CD4⁺Foxp3⁺細胞上に発現する CXCR3、CCR4、CCR6、CXCR4 の発現量 (MFI) と陽性細胞頻度 (%) を測定した。さらに、SLE 患者では検体採取時の臨床症状を履歴的に調べ、測定結果との関連を検討した。

C. 結果

予想に反して、CD4⁺細胞中における Foxp3⁺細胞の比率は SLE 患者で健康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)。さらに、CD4⁺細胞中における Foxp3⁺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。経時的な解析では、CD4⁺Foxp3⁺細胞の比率が疾患活動性低下に伴って減少した。

SLE 患者の CD4⁺Foxp3⁺細胞上では健康人と比較して CCR6 の発現量 (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) が低下していた。また、CXCR4 の発現量 (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) が上昇していた。SLE 患者では、ケモカイン受容体の発現量や陽性細胞頻度と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⁺T 細胞中の Treg 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② CD4⁺Foxp3⁺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⁺Foxp3⁺細胞では CCR6 発現低下、CXCR4 発現上昇を認め、これら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⁺Foxp3⁺細胞の増加し、病態に関わる可能性が示された。CD4⁺Foxp3⁺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。

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 (同室長)、ベンジャミン・レイバニー (同科研費研究員)

A. 研究目的

我々は、多発性硬化症 (MS) の病原性に関わる自己反応性 T 細胞の新しい機能制御法の探索を目指して研究を進めている。これまでに、MS 患者由来末梢血 T 細胞で選択的に発現が亢進する分子として新規に同定したオーファン核内受容体 NR4A2 分子が、活性化 T 細胞の IL-17 等の炎症性サイトカイン産生と、EAE に代表されるマウス自己免疫モデルの病態形成過程に関与することを明らかにしてきた。今回、病原性 T 細胞の分化における NR4A2 の機能解明と、自己免疫病態制御因子としての NR4A2 の *in vivo* 機能評価を、詳細に行った結果について以下に報告する。

B. 方法

C57BL/6J(B6)マウスの脾臓からナイーブ T 細胞 (CD4⁺CD44⁺CD25⁻CD62L^{high}) を分離し、Th17 細胞分化条件下 (IL-6/TGF-β) で抗 CD3/CD28 抗体刺激した。培養開始時に NR4A2 特異的 siRNA あるいは対照 siRNA を導入し、ELISA 法あるいは細胞内サイトカイン染色法などを用いて、IL-17、ROR γ t、NR4A2 などの Th17 細胞関連因子の変動を経時的に解析した。B6 マウスに MOG₃₅₋₅₅ ペプチドを免疫することで、EAE を誘導した。市販のコラーゲンマトリックスに封入して安定化した siRNA を EAE マウスに静脈投与し、病態抑制効果を解析した。EAE マウスの中枢神経系 (CNS) からコラゲナーゼと DNase I を用いて単核球を分離し、ここから調製した T 細胞の IL-17 産生および IFN-γ 産生を ELISA 法あるいは細胞内サイトカイン染色法などを用いて定量解析した。

C. 結果

In vitro で分化させた Th17 細胞の IL-17 遺伝子転写は、刺激後 72 時間に顕著に増大し、その後持続的に推移したが、NR4A2 特異的 siRNA 処理によりほぼ完全に抑制された。一方、Th17 細胞の ROR γ t 遺伝子の転写は刺激開始後数時間以内に上昇し、NR4A2 特異的 siRNA 処理によりほとんど影響を受けなかった。IL-17 細胞の増殖に関わる IL-21 遺伝子の転写は、刺激後 24 時間に一過性に上昇し、また IL-17 細胞の安定化に関わる IL-23 受容体遺伝子の転写は、刺激後 24~48 時間に上昇したが、これらの転写活性化はいずれも NR4A2 特異的 siRNA 処理によりほぼ消失した。NR4A2 特異的 siRNA による 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し、同時に培養上清中への IL-17 産生も、対照群と同レベルまで回復した。MOG ペプチド免疫時 siRNA を単回静脈投与したマウスでは EAE の発症が顕著に遅延したが、後期には対照群と同程度の臨床スコアを示した。CNS に浸潤した T 細胞の IL-17 産生は siRNA 投与により顕著に抑制された。NR4A2 特異的 siRNA は、発症時の単回静脈投与でも有意な病態抑制効果を示した。

D. 考察

MS/EAE 病態に深く関わる 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評価を行った。今回、Th17 細胞分化に深く関わる ROR γ t、IL-21、IL-23 受容体の発現を解析した結果、NR4A2 の機能が IL-17 にとどまらず IL-21 産生と IL-23 受容体発現にも関わる可能性を提示した。さらに NR4A2 特異的 siRNA の単回静脈投与により EAE 病態と CNS への Th17 細胞浸潤を顕著に抑制できることを明らかにした。MS をはじめとする自己免疫疾患の治療標的として、NR4A2 の可能性がさらに広がることを期待したい。

E. 結論

NR4A2 は、自己免疫応答に関連した 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、機能制御により新しい自己免疫疾患治療法を提供する有力な治療標的となりうる。

新規糖脂質 α -carba-galactosylceramide を介した関節炎制御機構の解析

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 α 鎖はマウスでは TCRV α 14、ヒトでは TCRV α 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 α -galactosylceramide (α -GC)、を抗原として認識し INF- γ 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 α -carba-galactosylceramide(α -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、 α -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 α -GC あるいは α -c-GC(1 μ g/ml)と 72 時間共培養して上清中の IL-17、IL-4、INF- γ 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 α -GC あるいは α -c-GC をそれぞれ 2 μ 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- γ 抗体を 160 μ 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) α -GC あるいは α -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- γ 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+ α -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。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 α -GC あるいは α -c-GC をそれぞれ 2 μ 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 INF- γ および IL17 産生をフローサイトメトリー法で検討した。8)INF- γ -/-マウス (B6 バック) において、初回 CII 免疫時と同時に α -GC あるいは α -c-GC をそれぞれ 2 μ 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。

C. 結果： 1) α -c-GC により NKT 細胞から INF- γ が特異的に産生されていた。2) α -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- γ 抗体投与により α -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 INF- γ および IL-17 産生は低下していたが、INF- γ /IL-17 産生比は α -c-G 投与群において優位に増加していた。6) α -c-GC 免疫マウスにおいて CII 反応性 CD4+T 細胞の INF- γ 産生増加が認められた。7) α -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 INF- γ 産生が増加した。8)INF- γ -/-マウスにおける α -c-GC の CIA への効果は検討中。

D. 考察と結論： NKT 細胞から INF- γ を有意に産生させる糖脂質抗原 α -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- γ 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。

