

- 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.
13. 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.
14. Yoshida, K., Watanabe, M. and Hatakeyama, S.: ZNRF1 interacts with tubulin and regulates cell morphogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 389, 506-511, 2009.
15. 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.
16. 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.
17. Kano, S., Miyajima, N., Fukuda, S. and Hatakeyama, S.: TRIM32 facilitates cell growth and migration via degradation of Abl-interactor 2, *Cancer Res.*, 68, 5572-5580, 2008.
18. Miyajima, N., Maruyama, S., Bohgaki, M., Kano, S., Shigemura, M., Shinohara, N., Nonomura, K. and Hatakeyama, S.: TRIM68 regulates ligand-dependent transcription of androgen receptor in prostate cancer cells, *Cancer Res.*, 68, 3486-3494, 2008.
19. Takahata, M., Bohgaki, M., Tsukiyama, T., Kondo, T., Asaka, M. and Hatakeyama, S.: Ro52 functionally interacts with IgG1 and regulates its quality control via the ERAD system, *Mol. Immunol.*, 45, 2045-2054, 2008.
20. Bohgaki, M., Tsukiyama, T., Nakajima, A., Maruyama, S., Watanabe, M. Koike T. and Hatakeyama, S.: Involvement of Ymer in suppression of NF- κ B activation by regulated interaction with lysine-63-linked polyubiquitin chain, *BBA-Mol. Cell Res.*, 1783 (5), 826-837, 2008.
21. Maruyama, S., Miyajima, N., Bohgaki, M., Tsukiyama, T., Shigemura, M., Nonomura, K. and Hatakeyama, S.: Ubiquitylation of ϵ -COP by PIRH2 and regulation of the secretion of PSA, *Mol. Cell. Biochem.*, 307, 73-82, 2008

学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

- 1) 築山忠維、防垣幸、松田真由子、畠山鎮次：
Ymer トランスジェニックマウスの解析・第32回日本分子生物学会・横浜・2009(12/9-12/12)
- 2) 築山忠維、畠山鎮次：K63-ポリユビキチン鎖を介して NF- κ B シグナルを抑制する Ymer の機能解析・第31回日本分子生物学会／第81回日本生化学会・神戸・2008(12/9-12/12)

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

抗リン脂質抗体による向血栓細胞活性化のメカニズムに関する研究

研究分担者	渥美 達也	北海道大学第二内科	准教授
研究協力者	奥 健志	北海道大学第二内科	助教
研究協力者	加藤 将	北海道大学第二内科	医員
研究代表者	小池 隆夫	北海道大学第二内科	教授

研究要旨

抗リン脂質抗体症候群(APS)において、組織因子(TF)の向血栓細胞における発現上昇が最も重要な病態と考えられているが、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し、動脈硬化、血栓など様々な機能を調節する。そこで本研究では CD36 が APS の病態に関与している可能性を考え、検討を行うこととした。

研究は、初めに、CD36 欠損に関わる一塩基多型 rs3765187 のアレル頻度を TaqMan PCR ジェノタイプング法で調べた。次に、CD36 欠損マウス、抗 CD36 抗体を用い、抗リン脂質抗体誘導組 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。rs3765187 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。抗リン脂質抗体誘導 TF 発現は、野生型と比べ CD36 欠損マウス腹腔マクロファージで低く、健常人末梢血単核球で抗 CD36 抗体により濃度依存的に抑制された。CD36 の機能異常が APS 発症を抑制している可能性が示唆された。

A. 研究目的

抗リン脂質抗体症候群(antiphospholipid syndrome: APS)は抗リン脂質抗体(antiphospholipid antibodies: 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(tissue factor: 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、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。そこで本研究では 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うこととした。

B. 研究方法

1. 遺伝子型分析

研究には、まず遺伝子学的検討として、原発性 APS 患者 39 名、APS を合併した全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus: SLE)患者 69 名、APS を合併していない SLE 患者 265 名、健常人 422 名、計 795 名の日本人を対象とし、日本人において CD36 欠損と強く関連する遺伝子多型である rs3765187 (Pro90Ser) のアレル頻度を TaqMan PCR ジェノタイプング法を用いて調べた。

2. マウス腹腔マクロファージ刺激実験

次に分子生物学的検討として、CD36 ノックアウト(knock out: KO)および C57BL/6J 野生型(wild type: WT)マウスより採取したマウス腹腔マクロファージ(Mouse peritoneal macrophages: MPM)を aPL で刺激し、TF の遺伝子発現解析を real-time PCR 法により行った。細胞を刺激する aPL として、抗カルジオリウピン抗体またはホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体いずれか一方が陽性の APS 患者の血清より精製した全 IgG(それぞれ Pt-aCL, Pt-aPS/PT)およびループスアンチコアグラント活性を有するマウスモノクローナルホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体(231D)を用いた。

3. ヒト末梢血単核球刺激実験

最後にマウス腹腔マクロファージ刺激実験と同様の検討を健常人より採取した末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cells: PBMC)およびヒト CD36 に対し中和作用を有するマウスモノクローナル抗 CD36 抗体(aCD36, FA6-152)を用いて行った。

(倫理面への配慮)

患者検体を使用した実験は当院倫理委員会の承認を得た上で行い、動物実験は北海道大学動物実験委員会の承認のもと北海道大学大学院医学研究科附属動物実験施設内にて行った。

C. 研究結果

1. 遺伝子型分析

rs3765187(Pro90Ser)のマイナーアレル頻度は、健常人(10.2%)と比較しAPS患者(2.8%)において有意に低かった。統計学的な有意差は得られなかったが、原発性APS患者(2.6%)、APS合併SLE患者(2.9%)それぞれにおいても健常人と比較して同様のオッズ比が得られた。一方、APSを合併していないSLE患者(7.9%)においては健常人と有意な差が認められなかった(表1)。

2. マウス腹腔マクロファージ刺激実験

実験に用いた3種類のaPL(Pt-aCL, Pt-aPS/PT, 231D)はいずれも陰性対照と比較しMPMにおいて有意にTF遺伝子の発現を誘導したが、aPLが誘導したTF遺伝子の発現はWTマウスと比較してCD36KOマウスにおいて有意に低かった。Pt-aCL, Pt-aPS/PT, 231DによるTF遺伝子の誘導はWTマウスと比較してCD36KOマウスにおいてそれぞれ38%, 40%, 41%抑制された(図1)。

3. ヒト末梢血単核球刺激実験

実験に用いた3種類のaPL(Pt-aCL, Pt-aPS/PT, 231D)はいずれも健常人PBMCにおいて陰性対照と比較し有意にTF遺伝子の発現を誘導したが、aCD36はaPLが誘導するTF遺伝子の発現を濃度依存的に抑制した。また、aCD36によるTF遺伝子の抑制はaCD36が1 μ g/mlの濃度でプラトーに達する傾向であった。Pt-aCL,

Pt-aPS/PT, 231DによるTF遺伝子の誘導は1 μ g/mlのaCD36によりそれぞれ45%, 45%, 27%抑制された(図2)。

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。

F. 健康危険情報

本研究は特に健康危険情報として報告すべきものはなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kon Y, Atsumi T, Hagiwara H, Furusaki A, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Amengual O, Takao K. Thrombotic microangiopathy in patients with phosphatidylserine dependent antiprothrombin antibodies and antiphospholipid syndrome. Clin Exp Rheumatol 26; 129-32, 2008

Oku K, Atsumi T, Amengual O, Koike T. Antiprothrombin antibody testing: detection and clinical utility. Semin Thromb Hemost 34; 335-9, 2008

Oku K, Atsumi T, Bohgaki M, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Koike T. Complement

- activation in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 68; 1030-5, 2009
- Horita T, Atsumi T, Yoshida N, Nakagawa H, Kataoka H, Yasuda S, and Koike T. STAT4 single nucleotide polymorphism, rs7574865 G/T, as a risk for antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 68, 1366-7, 2009
- Fukaya S, Yasuda S, Hashimoto T, Oku K, Kataoka H, Horita T, Atsumi T, Koike T. Clinical Features of Haemophagocytic Syndrome in Patients with Systemic Autoimmune Diseases: Analysis of 30 Cases. *Rheumatology* 47, 1686-91, 2008
- Bohgaki T, Atsumi T, Bohgaki M, Furusaki A, Kondo M, Sato-Matsumura K, 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, 1240-8, 2009
- 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, 188-95, 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 antiprothrombin antibody on thrombin generation. *Arthritis Rheum* 60, 2457-67, 2009
- Kiyohara C, Washio M, Horiuchi T, Tada Y, Asami T, Ide S, Atsumi T, Kobashi G, Takahashi H. Cigarette smoking, STAT4 and TNFRSF1B polymorphisms, and systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *J Rheumatol* 36, 2195-203, 2009
- Nakagawa H, Yasuda S, Matsuura E, Kobayashi K, Ieko M, Kataoka H, Horita T, Atsumi T, Koike T. Nicked beta2-glycoprotein I binds angiostatin4.5 (plasminogen kringle 1-5) and attenuates its anti-angiogenic property. *Blood* 114, 2553-9, 2009.
- Atsumi T, Amengual O, Koike T. Antiphospholipid syndrome: pathogenesis. In: Lahita RG, editor. *Systemic Lupus Erythematosus 5th edition*. San Diego: Academic Press; p.945-66. 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.
- Yamada H, Atsumi T, Amengual O, Koike T, Furuta I, Ohta K, Kobashi G. Anti-beta2 glycoprotein-I antibody increases the risk of pregnancy-induced hypertension: a case-control study. *J Reprod Immunol* 84, 95-99, 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 non-synonymous SNP in the TNFAIP3 gene with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Arthritis Rheum* 62, 574-9, 2010
- 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 $\alpha 5\beta 1$ integrin. *J Cell Mol Med* (in press)

Suzuki E, Amengual O, Atsumi T, Oku K, Hashimoto T, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Ieko M, Fukushima K, Koike T. Increased expression of Phospholipid Scramblase 1 in monocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 37, 1639-45, 2010

Shimada S, Yamada H, Atsumi H, Yamada H, Sakuragi N, Minakami H. Intravenous immunoglobulin therapy for aspirin-heparinoid-resistant antiphospholipid syndrome. *Reproductive Medicine and Biology* (in press)

Atsumi T, Koike T. Antiprothrombin antibody: why do we need more assays? *Lupus* 19, 436-9, 2010

Ieko M, Yoshida M, Naito S, Nakabayashi T, Kanazawa K, Mizukami K, Mukai M, Atsumi T, Koike T. Increase in plasma thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor may not contribute to thrombotic tendency in antiphospholipid syndrome because of inhibitory potential of antiphospholipid antibodies toward TAFI activation. *Int J Hemato* 91, 776-83, 2010

Kato M, Kataoka H, Odani T, Fujieda Y, Otomo K, Oku K, Horita T, Yasuda S, Atsumi T, Tsujino I, Nishimura M, Koike T. The short-term role of corticosteroid therapy for pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue diseases: report of five cases and a literatural review. *Lupus* (in press)

Bertolaccini M, Amengual O, Atsumi T,

Binder W, Laat B, Forastiero R, Kutteh W, Lambert M, Matsubayashi H, Murthy V, Petri M, Rand J, Sanmarco M, Tebo A, Pierangeli S. 'Non-criteria' aPL tests: report of a task force and preconference workshop at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Galveston, TX, USA, April 2010. *Lupus* 20, 191-205, 2011.

Ioannou Y, Zhang JY, Qi M, Gao L, Qi CJ, Yu DM, Lau H, Sturges AD, Vlachoyiannopoulos PG, Moutsopoulos HM, Rahman A, Pericleous C, Atsumi T, Koike T, Heritier S, Giannakopoulos B, Krilis SA. Novel assays of thrombogenic pathogenicity for the antiphospholipid syndrome based on the detection of molecular oxidative modification of the major autoantigen beta2-glycoprotein I. *Arthritis Rheum* (in press)

2. 学会発表

Kato M, et al. The involvement of CD36 in the monocyte activation by antiphospholipid antibodies. American College of Rheumatology 74th Annual Scientific Meeting, Atlanta, USA, 6-11 Nov. 2010

Kato M, et al. Association between CD36 single nucleotide polymorphism and antiphospholipid syndrome. American College of Rheumatology 73rd Annual Scientific Meeting, Philadelphia, USA, 18-21 Oct. 2009

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

表 1. 疾患ごとの rs3765187 (Pro90Ser) アレル頻度。APS: 抗リン脂質抗体症候群, SLE: 全身性エリテマトーデス、MAF: マイナーアレル頻度、OR (95%CI): オッズ比 (95%信頼区間)。p 値および OR (95%CI) は Fischer の直接比較法、 χ^2 検定を用い健常人との比較により算出した。

	MAF (TT+TC vs CC)	p 値	OR (95%CI)
健常人 (n = 422)	10.2% (43/422)	-	-
全 APS (n = 108)	2.8% (3/108)	0.024	0.25 (0.08 to 0.83)
全 SLE (n = 334)	6.9% (23/334)	0.11	0.65 (0.38 to 1.11)
原発性 APS (n = 39)	2.6% (1/39)	0.15	0.23 (0.03 to 1.73)
SLE+APS (n = 69)	2.9% (2/69)	0.085	0.26 (0.06 to 1.11)
SLE/非 APS (n = 265)	7.9% (21/265)	0.32	0.76 (0.44 to 1.31)

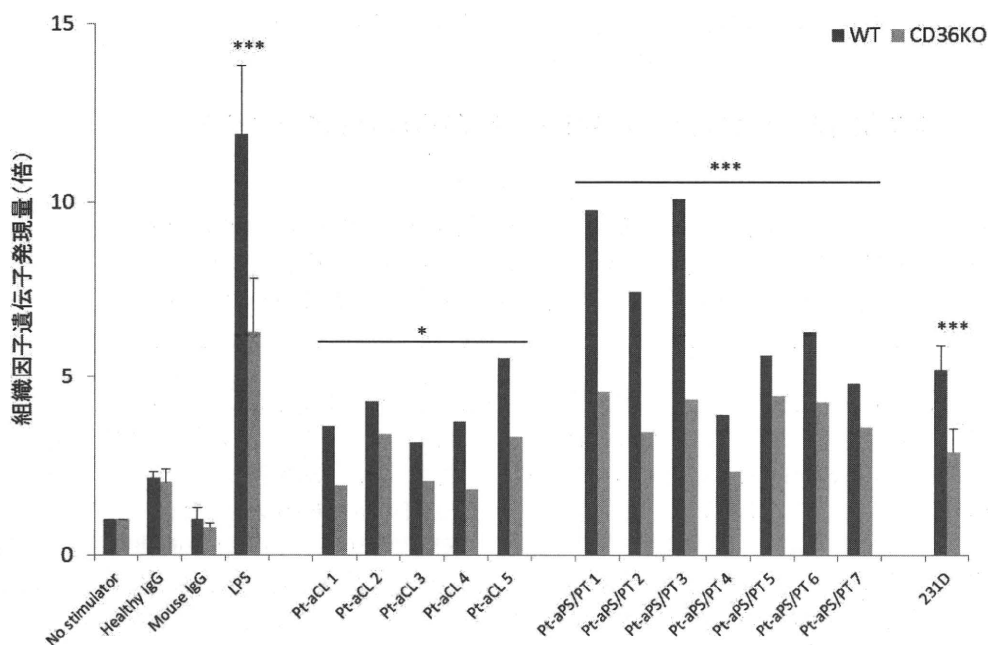


図1. マウス腹腔マクロファージにおいて抗リン脂質抗体が誘導する組織因子遺伝子発現. Y軸はCT法により相対定量化した遺伝子発現レベルを示す。エラーバーは5回以上の実験により得られた標準誤差を示す。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ 。p値はStudentのt検定を用い野生型(WT)とCD36ノックアウト(KO)との比較により算出した。

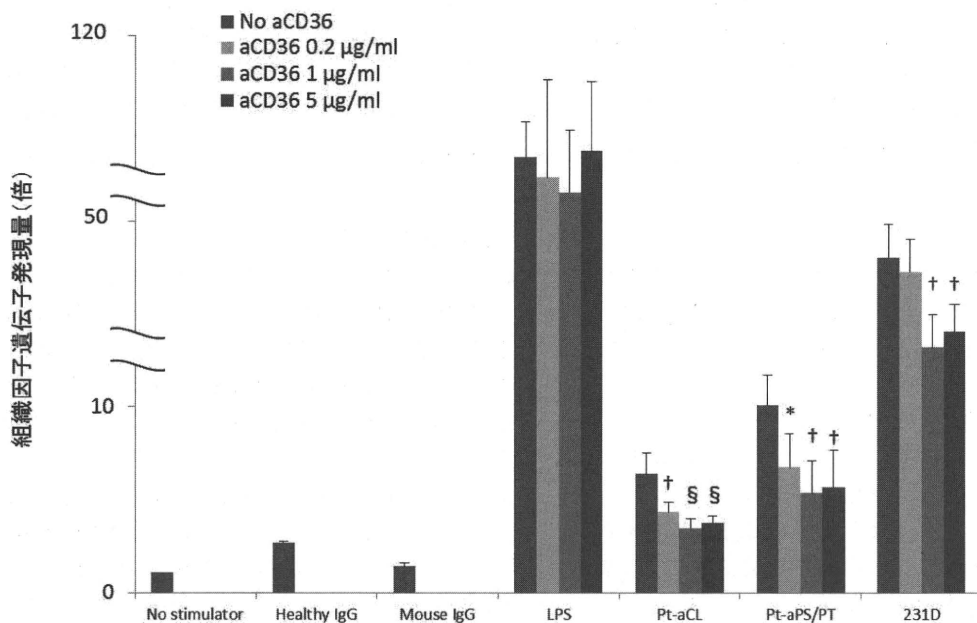


図2. ヒト末梢血単核球において抗リン脂質抗体が誘導する組織因子遺伝子発現. Pt-aCL, Pt-aPS/PT はマウス腹腔マクロファージ刺激実験で最も強くTF遺伝子発現を誘導したそれぞれ1種類を用いた。Y軸はCT法により相対定量化した遺伝子発現レベルを示す。エラーバーは5回以上の実験により得られた標準誤差を示す。*: $p < 0.05$, †: $p < 0.01$, §: $p < 0.001$ 。p値はStudentのt検定を用い抗CD36抗体(aCD36)を加えないものとの比較により算出した。

NKT 細胞を介した関節炎発症機構および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- γ) 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、抗原特異的に NKT 細胞から IL-17 産生を誘導する α -galactosylceramide (α -GC) と INF- γ 産生を誘導する新規糖脂質 α -carba-galactosylceramide (α -c-GC) をもちいて、糖脂質投与による CIA 発症機構および抑制効果について検討することを目的とした。その結果、(A) α -GC により活性化された NKT 細胞について以下の事を明らかにしてきた。1) NKT 細胞が関節炎発症に重要である事、2) NKT 細胞が CII 反応性 T 細胞からの IL-17 産生を誘導すること、3) NKT 細胞自身が IL-17 を産生すること、4) IL-17 産生 NKT 細胞は主に NK1.1-NKT 細胞であること、5) NKT 細胞からの IL-17 産生機序は、IL-23R を介した pathway と α -GC-TCR を介した IL-23 非依存的な pathway の二通りがあること、などである。

一方、(B) α -c-GC により活性化された NKT 細胞に関しては以下の事実を明確にしてきた。1) α -c-GC により *in vitro* において NKT 細胞から IFN- γ 産生が特異的に産生されること、2) α -c-GC 投与マウスにおいて CIA が有意に抑制されること、3) CIA 抑制効果は抗 INF- γ 中和抗体により解除されること、4) 抗 CII IgG 抗体、抗 CII IgG2a 抗体が有意に抑制されること、5) CII 反応性 T 細胞からの IFN- γ および IL-17 産生は低下していたが、IFN- 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ること、6) α -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ること、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 IFN- γ 産生が増加すること、などである。今後、本研究成果をふまえて、新規糖脂質抗原による 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 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、 α -galactosylceramide (α -c-GC) により NKT 細胞から Th17 タイプのサイトカインが産生されること、および新規糖脂質 α -carba-galactosylceramide (α -c-GC) が Th1 タイプのサイトカインを主に誘導することが明らかにされてきた。本研究においては、コラーゲン誘導性関節炎 (CIA) において、 α -GC 投与による関節炎発症における NKT 細胞の役割について、一方、 α -c-GC 投与による CIA の抑制機構について解析することを目的とした。

B. 研究方法

(A) α -GC 投与による関節炎誘導機構

1) C57BL/6 (B6) マウスバックグラウンドの TCRV α 14J α 281 遺伝子ノックアウトマウス (NKT KO マウス) を用いて、コラーゲンタイプ II (CII) を CFA をアジュバントとして二回免疫することにより関節炎 (CIA) の誘導を試みた。2) NKT KO マウスから所属リンパ節細胞より採取したリンパ球を用いて、CII に対する Th1、Th2、Th17 細胞由来サイトカインの産生を ELISA 法および細胞内サイトカイン産生検出法により検討した。3) NKT KO マウス由来の脾細胞を用いて α -GC で *in vitro* で刺激して IL-17 産生細胞について ELISA 法およびフローサイト法で検討しコントロールの B6 マウスと比較した。4) α -GC で刺激した NKT 細胞について、ROR γ T、IL-23R の発現について RT-PCR 法で検討した。5) IL-17 産生における IL-23 の関与を明らかにするために、APC (CD11c+細胞) と NKT 細胞

(CD3+CD1d+tet+)とを IL-23、 α -GC、IL-23 + α -GC と共培養し IL-17 の産生について ELISA 法で検討した。

(B) α -c-GC 投与による関節炎抑制機構

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 CII 反応性 CD4+T 細胞からの IL-23p19、IL-6、TGF- β 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 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 IL-17 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。

(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

(A) α -GC 投与による関節炎誘導機構

1) NKT KO マウスにおいては、関節炎の頻度および関節炎スコアがともに B6 マウス (コントロールマウス) と比較して有意に低下していることが判明した。2) INF- γ 、IL-4、IL-10 はコントロールと比べて有意差は認められなかったが、IL-17 の産生が NKT KO マウスにおいて有意に低下していた。3) NKT KO マウスにおいては、 α -GC による IL-17 の産生は全く認められなかった。一方、NKT 細胞自身が IL-17 を産生していた。

4) NKT 細胞は、Th17 細胞と同様に ROR γ T および IL-23R を発現していた。5) α -GC 刺激による NKT 細胞からの IL-17 産生は IL-23 非依存的であることが判明した。

(B) α -c-GC 投与による関節炎抑制機構

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-GC 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 細胞からの IL-23p19 および IL-6 の産生低下が認められた。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. E. 考察と結論

α -GC により NKT 細胞から IL-23 依存のおよび非依存的に IL-17 が産生され CIA が惹起されることが判明した。一方、 α -c-GC により NKT 細胞から INF- γ を優位に産生することで CIA が制御できることが判明した。今後、NKT 細胞を標的細胞として抗原特異的に関節炎を制御する新規治療戦略を開発する。

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 α -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 Res. 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 lupus 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. Functional 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 α -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- β 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., Shirota, 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.
 12. 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.* 11:R167. Epub 2009 Nov.
 13. 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.* 159:1-10. Epub 2009 Oct 6.
 14. 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 Rheum. Ther.* 11:R118. Epub 2009 Aug 6.
 15. 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.
 16. Tanaka, Y., Matsumoto, I., Iwanami, 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.
 17. 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.
 18. Iwanami, K., Matsumoto, I., Tanaka, Y., Inoue, A., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T. Arthrogenic T cell epitope in glucose-6-phosphate isomerase (GPI)-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 10:R130. Epub 2008. Nov.7.
 19. Kawasaki, A., Ito, I., Hikami, K., Ohashi, J., Hayashi, T., Goto, D., Matsumoto, I., Ito, S., Tsutsumi, A., Koga, M., Arinami, T., Graham, R. R., Hom, G., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Behrens, T.W., Sumida, T., and Tsuchiya, N. Association of STAT4 polymorphisms with systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Arthritis Res. Ther.* 10:R113, Epub 2008 Sep9.

20. Matsumoto, I., Zhang, H., Yasukochi, T., Iwanami, K., Tanaka, Y., Inoue, A., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T. Therapeutic effects of antibodies to TNF α and IL-6 and CTLA-4 Ig in mice with glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis. Arthritis Res. Ther. 10: Epub 2008 Jun 5, 2008.

21. Yoshiga, Y., Goto, D., Segawa, S., Ohnishi, Y., Matsumoto, I., Ito, S., Tsutsumi, A., Taniguchi, M., and Sumida, T. NKT cells are novel accelerator of IL-17 in the pathogenesis of collagen-induced arthritis. Int. J. Mol. Med. 22: 369-374, 2008.

22. Iwanami, K., Matsumoto, I., Watanabe, Y., Mihara, M., Ohsugi, Y., Mamura, M., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., Kishimoto, T., and Sumida, T. Crucial role of IL-6/IL-17 cytokine axis in the induction of arthritis by glucose-6-phosphate-isomerase. Arthritis Rheum. 58:754-763, 2008.

23. Matsui, H., Tsutsumi, A., Sugihara, M., Suzuki, T., Iwanami, K., Kohno, M., Goto, D., Matsumoto, I., Ito, S., and Sumida, T. Expression of Visfatin (pre-B cell colony-enhancing factor) gene in patients with rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis. 67:571-572, 2008.

24. Nakamura, Y., Wakamatsu, E., Tomiita, M., Kohno, Y., Yokoka, J., Goto, D., Ito, S., Matsumoto, I., Tsutsumi, A., and Sumida, T. High prevalence of autoantibodies to muscarinic 3 acetylcholine receptor in patients with juvenile Sjogren's syndrome. Ann. Rheum. Dis. 67:136-137, 2008

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 NKTKO マウスにおいて CIA の発症頻度、
関節炎スコアが低下

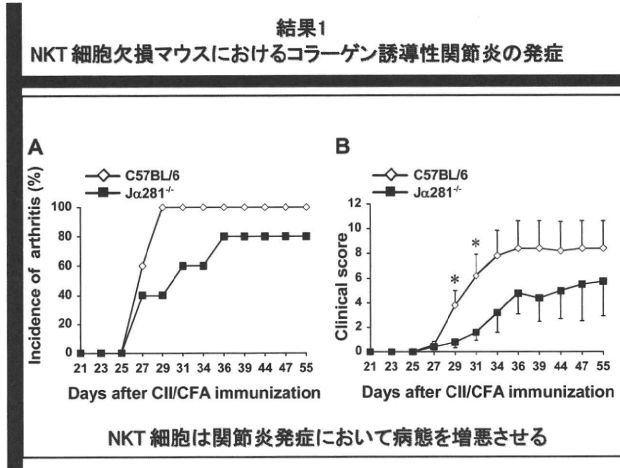


図2 NKTKO マウスにおいて CII 反応性 T 細胞
からの IL-17 産生が有意に低下

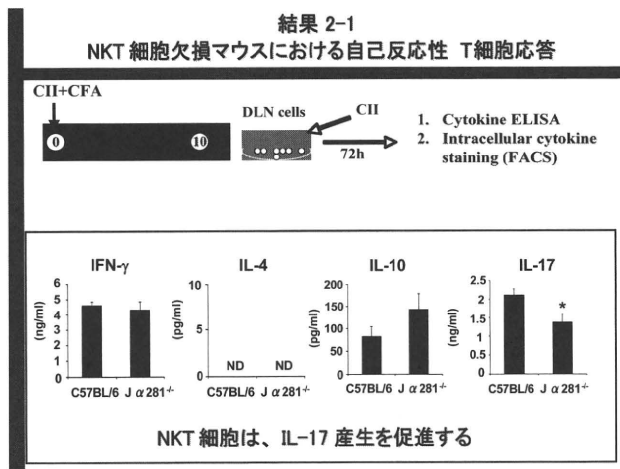


図3 NKTKO マウスにおいて IL-17 産生は抑制
されている

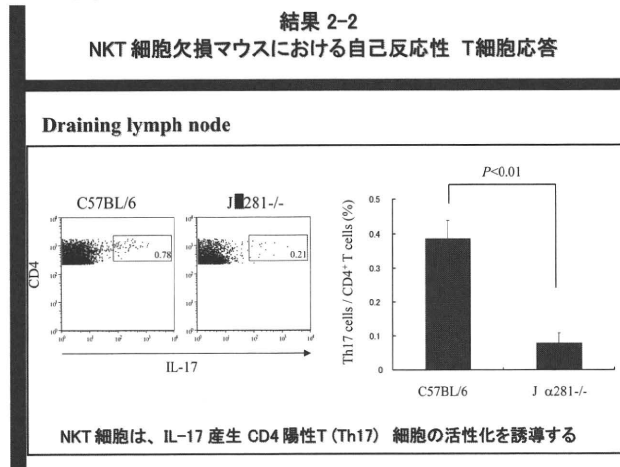


図4 NKT細胞も ROR γ t および IL-23R を発現

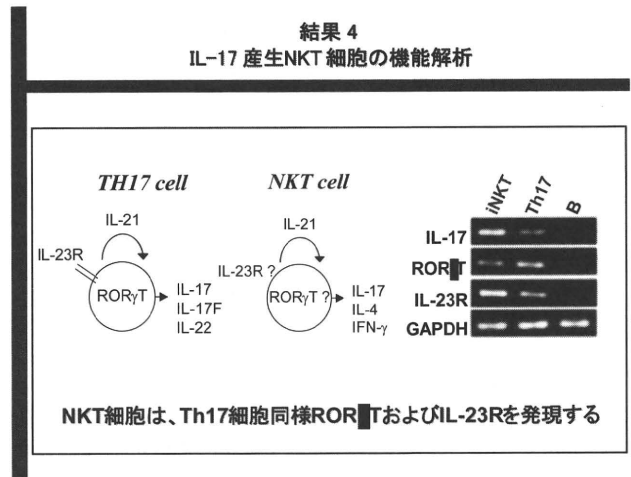


図5 IL-17の産生はNK1.1-NKT細胞から産生され、
IL-23 依存的および IL-23 非依存的な機序がある

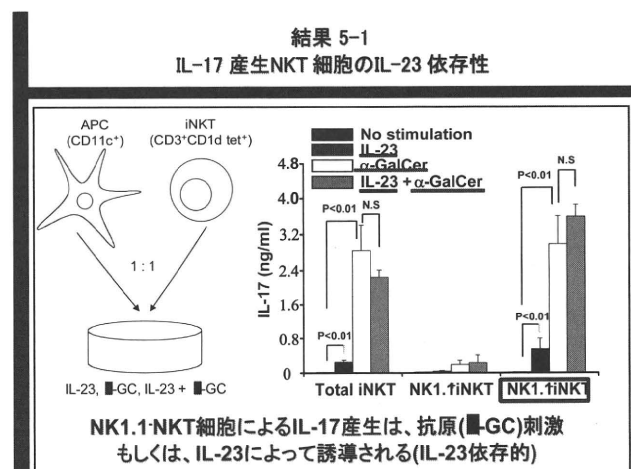


図6 NKT細胞は α -GCにより IL-23 非依存的に
IL-17を産生する

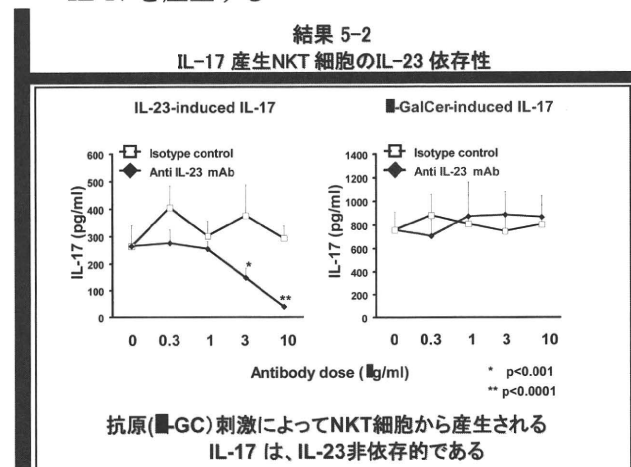


図7 α -c-GC は NKT 細胞からの IFN- γ 産生を特異的に誘導する。

α -carba-GalCer は、IFN- γ を特異的に誘導する (in vivo)

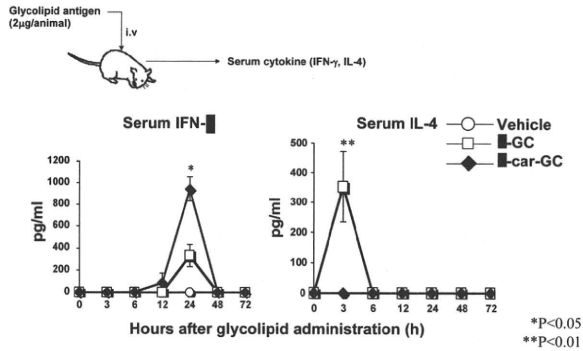
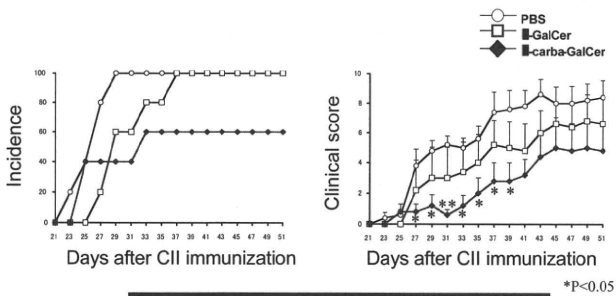


図8 α -c-GC 投与マウスにおいて CIA は有意に抑制された。

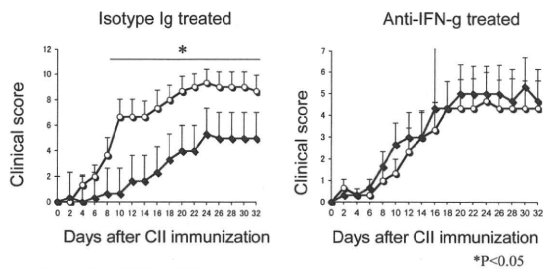
α -carba-GalCer 投与による CIA 発症への影響



α -carba-GalCer は CIA を抑制する

図9 α -c-GC 投与マウスにおける CIA 抑制は抗 IFN- γ 抗体により解除された。

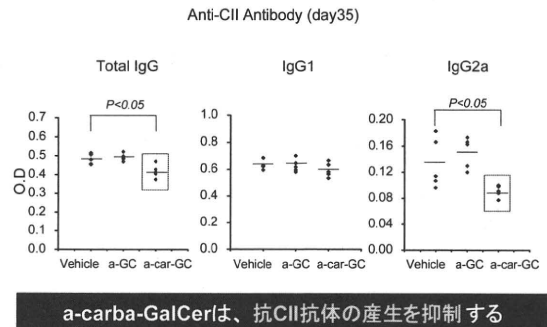
α -carba-GalCer の関節炎抑制作用 (IFN- γ 依存性)



α -carba-GalCer は IFN- γ 依存的に CIA を抑制する

図10 血中抗 CII 抗体は有意に減少していた。

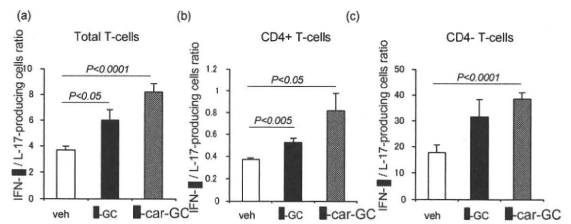
α -carba-GalCer 投与による抗 CII 抗体産生への影響



α -carba-GalCer は、抗 CII 抗体の産生を抑制する

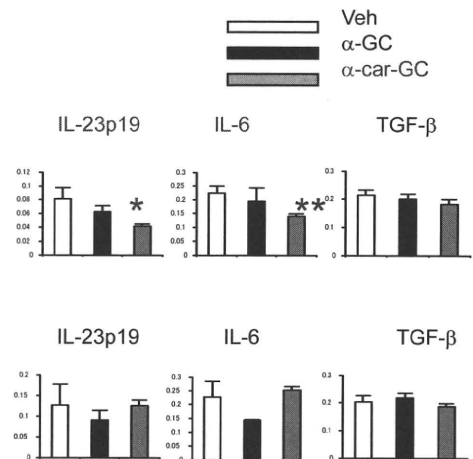
図11 α -c-GC により CII 反応性 T 細胞からの IFN- γ /IL-17 産生比が増加していた。

Th1/Th17 cytokine balance in α -car-GC treated mice



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

図12 α -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。CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞は IL-10 を高産生し、腸炎の発症を IL-10 依存的に抑制した。CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞は Egr2, IL-10, LAG3, Blimp-1 を高発現する。アナジー関連遺伝子 Egr2 に着目し解析したところ、Egr2 遺伝子導入 CD4 陽性 T 細胞で IL-10, LAG-3, Blimp-1 の発現の亢進を認めた。Germfree C57/B6 マウスを検討すると SPFC57/B6 マウスと比較して CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞が著明に減少しており、常在細菌叢と CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞分化との関連が考えられた。

次に 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。自己抗体産生および腎障害は、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 Egr-2, IL-10 を高発現し、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、試験管内および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、新たな自己抗体産生抑制法を提示できる可能性が明らかになった。

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

抑制性分子 LAG-3 に着目し C57/B6 マウス脾臓において FACS 解析を行った。LAG-3 をマーカーとしてマウス脾臓よりソーティングにより細胞集団を分取し、マイクロアレイ解析・培養実験・生体への移入実験を行った。マイクロアレイ解析において発現が亢進していたアナジー関連遺伝子 Egr2 に着目し、レトロウイルスベクターによるマウス CD4 陽性 T 細胞への Egr2 遺伝子導入により誘導される遺伝子を定量 PCR により検討した。さらに Egr2 遺伝子導入細胞による遅延型過敏反応の抑制実験を行った。また B 細胞を欠損する・MT ノックアウトマウス、無菌状態の Germ free マウスにおいても解析を行った。

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。

ヒト末梢血と扁桃腺で CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞を FACS にて検討し、細胞集団をソーティングにより回収した。回収した CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞を抗 CD3 抗体で刺激し、IL-10 産生を ELISA で検討した。またマイクロアレイ解析により、回収した CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の遺伝子発現を検討し、マウス CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の遺伝子発現と比較した。

(倫理面への配慮)

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

LAG-3 をマーカーとして発現する細胞集団を、マウス脾臓の FACS 解析で検討したところ、CD4 陽性 CD25 陰性 CD45RB 陰性 LAG3 陽性 T 細胞 (以下 CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞と記載) を同定した。CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞は IL-10 を高産生し、RAG1 ノックアウトマウスへの CD45RB 高発現 CD4 陽性 T 細胞の移入による腸炎の発症を IL-10 依存的に抑制した。マイクロアレイ解析においても、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞は Egr2, IL-10, LAG3, Blimp-1 を高発現し、CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞とは明らかに異なる遺伝子発現プロファイルであった。アナジー関連遺伝子 Egr2 に着目し解析したところ、Egr2 遺伝子導入 CD4 陽性 T 細胞で IL-10, LAG-3, Blimp-1 の発現の亢進を認めた。さらに Egr2 遺伝子導入 CD4 陽性 T 細胞は OVA によるマウス遅延型過敏反応を抑制した。機能的 Foxp3 遺伝子欠損 Scurfy

マウスにおいては、試験管内での抑制活性のある CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞が増加していた。CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の分化機構を解明するために様々なマウスにおける CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞を検討した。まず B 細胞を欠損する・MT ノックアウトマウスを解析したところ、CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞は脾臓においてもパイエル板においても著明に減少していた。また Germfree C57/B6 マウスにおいても SPFC57/B6 マウスと比較して CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞が脾臓においてもパイエル板においても著明に減少していた。

MRL/lpr マウスの自己抗体産生・腎障害は、CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞の移入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。

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

以上の結果から IL-10 を高産生する Egr2 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た。CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞は機能的 Foxp3 欠損マウスでも分化が認められ、その分化メカニズムは CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞とは異なると考えられた。そして CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 T 細胞の分化には B 細胞及び腸内細菌叢が重要と考えられた。

さらに興味深いことに、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し、ヒトにおいてもマウスCD4陽性CD25陰性LAG3陽性T細胞に相当するサブセットが存在する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

1. 論文発表

• Kochi Y, Thabet MM, Suzuki A, Okada Y, Daha 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.

• 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 USA*. 106:13974-79, 2009.

• Okada Y, Yamada R, Suzuki A, Kochi Y, Shimane K, Myouzen K, Kubo M, Nakamura Y, Yamamoto K. Contribution of a haplotype in the HLA region to anti-cyclic citrullinated peptide antibody positivity in rheumatoid arthritis, independently of HLA-DRB1.

Arthritis Rheum. 60:3582-3590, 2009.

• Kochi Y, Suzuki A, Yamada R, Yamamoto K. Genetics of rheumatoid arthritis: underlying evidence of ethnic differences. J Autoimmun. 32:158-62, 2009.

• Shimane K, Kochi Y, Yamada R, Okada Y, Suzuki A, Miyatake A, Kubo M, Nakamura Y, Yamamoto K. A single nucleotide polymorphism in the IRF5 promoter region is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in the Japanese population. Ann Rheum Dis. 68:377-83, 2009.

• Suzuki A, Yamada R, Kochi Y, Sawada T, Okada Y, Matsuda K, Kamatani Y, Mori M, Shimane K, Takahashi A, Tsunoda T, Miyatake A, Kubo M, Kamatani N, Nakamura Y, Yamamoto K. Functional SNPs in CD244 gene increase the risk of rheumatoid arthritis in a Japanese population. Nat Genet. 40:1224-9, 2008.

• Okamoto A, Fujio K, van Rooijen N, Tsuno NH, Takahashi K, Tsurui H, Hirose S, Elkon KB, Yamamoto K. Splenic phagocytes promote responses to nucleosomes in (NZB x NZW) F1 mice. J Immunol. 181:5264-71, 2008.

2. 学会発表

• Okamoto A, Fujio K, Yamamoto K. Analysis of Kidney CD4⁺ T cells in lupus-prone mice.

The 53rd Annual General Assembly and Scientific Meeting of Japan Collage of Rheumatology, IW1-1

• Okamoto A, Fujio K, Tsuno NH, Takahashi K, Yamamoto K.

Analysis of Kidney CD4⁺ T cells in lupus-prone mice.

Imflammation Research. 58:S168, 2009.

• 岡本明子、藤尾圭志、岡村僚久、山本一彦
NZB/W F₁ SLE モデルマウスにおける CD4⁺CD25⁻
LAG-3⁺制御性 T 細胞の修飾因子の検討
Inflammation and regeneration 30: 344,2010.

• Okamoto A, Fujio K, Yamamoto K.

Identification of a disease-promoting CD4⁺ T cell clone from MRL/lpr kidney using single cell analysis.

14th International Congress of Immunology, PP-017-28

• New regulatory T cell subset producing IL-10 and its role in autoimmune diseases

Keishi Fujio

The 19th International Rheumatology Symposium
2010.4.23

• Immunological intervention strategies aimed at regulatory T cells.

Keishi Fujio

14th 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 5th 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

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 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科膠原病・リウマチ内科学 准教授
研究協力者 平田真哉 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科膠原病・リウマチ内科学 助教
研究協力者 沖山奈緒子 日本学術振興会 特別研究員

研究要旨 【目的】我々は、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)を開発し、その特性を解析するとともにPMに特異的な新規治療法の開発を目指している。同モデルの解析により、CIM発症には、「自己反応性T細胞」と、「筋局所の自然免疫活性化」が必要であることがわかってきた。そこで、本研究において、自己反応性T細胞と筋局所の自然免疫活性化について詳しく解析を行い、筋炎発症のメカニズムを明らかにするとともに治療法への応用を検討することを目的とした。【方法】自己反応性T細胞の機能を解析するために以下の(1)、(2)を、筋の自然免疫系活性化の解析のために(1)、(3)を施行した。(1)CIMを誘導したマウスのリンパ節細胞を用いた養子移入系の確立と治療標的として炎症性サイトカインの検討、(2)C蛋白断片のMHCクラスI拘束性エピトープを推定し、様々なアジュバントとともにマウスに免疫して筋炎の発症を検討、(3)in vitroで分化誘導した筋線維・CIMの筋炎組織・薬剤によりin vivoで誘導された再生筋線維が産生するケモカインの発現を検討、を行った。【結果】養子移入とCFAの投与により、筋炎を発症することができ、特に、移入するT細胞はCD8陽性T細胞のみでも筋炎を発症した。また、この養子移入系において、レシピエントへのIL-1またはTNF α 標的療法が奏功した。さらに、エピトープ候補を骨髄誘導性樹状細胞にパルスして移入したところ筋炎を発症し、CD8陽性T細胞を除去すると筋炎発症が抑制された。また、 β 2m欠損マウス、パーフォリン欠損マウスとも、CIMの発症は抑制された。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、2種類のケモカインが共通して発現していた。【結論】CIM養子移入系の確立と解析により、獲得免疫である筋炎惹起性T細胞、特にCTLが筋傷害のエフェクター細胞であること、また、IL-1とTNF α が局所自然免疫に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、再生筋炎線維が産生するケモカインが自然免疫活性化因子として筋炎発症に影響を与えている可能性が示唆された。これらの結果は、自己免疫疾患におけるCTLを標的とした抗原ペプチド特異的免疫制御研究、自然免疫の制御による筋炎特異的治療法の開発に新たな道をひらくと期待される。

A.研究目的

多発性筋炎(polymyositis; PM)の治療として、副腎皮質ステロイド剤や免疫抑制剤が用いられるが、これらの治療に抵抗性の症例や、治療による副作用が臨床において問題となる。我々は、2007年に新たなマウス筋炎モデル(C蛋白誘導性筋炎、C protein-induced myositis; CIM)を開発した。このモデルはCD8陽性T細胞の浸潤が多いなど、ヒトの筋炎組織によく似たモデルである。これまで研究により、CIM発症には自己反応性T細胞の存在とComplete Freund's Adjuvant (CFA)皮内投与による局所の自然免疫活性化が必要であることがわかってきた。そこで、本研究期間において、(1)自己反応性T細胞の存在と筋局所の自然免疫活性化を明らかにする養子移入系の確立とこの系を用いた治療標的となる炎

症性サイトカインの検討、(2)養子移入の系により自己反応性T細胞として細胞傷害T細胞(CTL)が重要であることが解明されたため、このCTLが認識するC蛋白断片のMHCクラスIエピトープの解析、(3)自然免疫活性化因子として再生筋線維が産生するケモカインの解析と治療応用の検討、を行うことを目的とした。CIMの特性を解析して、筋炎発症のメカニズムを明らかにするとともに、筋炎に特異性の高い新規治療法の開発を目指すことを目的とする。

B.研究方法

(1)筋炎を発症に必要な自己反応性T細胞の解析: CIMを誘導したマウスのリンパ節細胞を回収し、C蛋白を提示した骨髄誘導性樹状細胞にて刺激し、CD4あるいはCD8陽性T細胞に純化の後、レシピ

エントマウスに養子移入を行い、2週間後のレシピエントマウス大腿筋を観察した(養子移入の系)。また、この系において、レシピエントマウスに抗 IL-1 受容体抗体、抗 TNF α 抗体、抗 IL-6 受容体抗体を投与して、筋炎発症の影響を調べた。さらに、CTL の活性化や増殖に必須である MHC クラス I を欠損する $\beta 2$ ミクログロブリン欠損マウス、CTL の細胞傷害に必須であるパーフォリン欠損マウスに、CIM が発症するか否かを検討した。(2)CTL が認識するエピトープの解析:筋炎発症に CTL が重要であることが明らかとなったため C 蛋白断片の MHC クラス I 拘束性エピトープを推定し、このエピトープペプチドを、CD4 陽性 T 細胞ヘルプを代替するとされる抗 CD40 抗体や poly (I:C) とともにマウスに免疫した。さらに、骨髄誘導性樹状細胞にペプチドをパルスし、マウスに移入する。筋炎の発症を病理組織学的に検討するとともに、これらのマウスから回収したリンパ節細胞または脾臓細胞を用いてエピトープペプチド特異的細胞傷害活性を候補ペプチドをパルスした EL-4 に対するクロミウム遊離解析にて検討した。(3)筋炎における自然免疫活性化因子としての再生筋線維が発現するケモカインの解析:筋組織からの再生筋線維の純化は難しく、また、筋炎組織は免疫細胞が多数混入しており、*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、以下の多面的手法を用いた。(a)筋線維芽細胞株(C2C12)から *in vitro* で分化誘導した筋線維、(b)マウス骨格筋より回収した satellite 細胞から myosphere 法により *in vitro* で分化した筋線維、(c)CIM の筋炎組織、(d)bupivacaine を四頭筋に投与して誘導された再生筋線維、のケモカインの発現を調べた。組織、培養細胞の RT-PCR や培養上清の ELISA、bupivacaine を投与した筋組織についてはレーザーマイクロダイセクションで再生筋線維を回収し RT-PCR を施行した。さらに、CIM 誘導時に対側下肢に bupivacaine を投与し、筋炎を誘導できるか否かを検証した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

(1)CIM養子移入の系が確立できた。また、移入する T 細胞は CD4 陽性 T 細胞よりも CD8 陽性 T 細胞で、筋壊死像の強い筋炎を発症した。さらに、レシピエ

ントへの IL-1 または TNF α 標的療法は奏功したが、IL-6 標的療法は効果を認めなかった。(2)推定されたエピトープ候補を、抗 CD40 抗体・poly (I:C)・百日咳毒素の組み合わせ方法で免疫したところ、抗 CD40 抗体・poly (I:C)・百日咳毒素すべてを使用し免疫したマウスのリンパ節細胞(または脾臓細胞)はエピトープペプチド特異的な細胞傷害活性を認めたが、いずれの組み合わせによっても病理組織学的に筋炎を認めなかった。しかし、エピトープペプチドをパルスした骨髄誘導性樹状細胞の移入では、大腿筋に筋炎の発症を認め、さらに抗体投与による CD8 陽性細胞の除去で発症が抑制された。また、 $\beta 2$ ミクログロブリン欠損マウス、パーフォリン欠損マウスとも、野生型マウスと比べ、CIM の発症率・重症度ともに抑制され、特に筋壊死部位の減少が著明であった。(3)C2C12 より分化誘導した筋線維と CIM 組織について、4 種類のケモカイン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と筋 satellite 細胞より分化誘導した筋線維の RT-PCR、筋線維分化誘導時の培養上清の ELISA にて検討したところ、MCP-2/CCL8、IP-10/CXCL10 が共通して発現していた。さらに、Bupivacaine による再生筋線維の誘導により、筋炎を誘導することが出来た。

D. 考察

本研究にて観察された結果は、CIM において、自己反応性 T 細胞として、特に CTL が筋傷害のエフェクター細胞であることを示している。すなわち、CIM は、CTL が中心的な役割を果たす動物モデルであり、これまでにない新しい自己免疫疾患モデルといえる。また、IL-1 や TNF α は、筋炎発症において筋組織側の重要なサイトカインであると示唆された。炎症性サイトカインは、血管内皮細胞で、接着分子やケモカインの発現上昇に関わるが、IL-1 や TNF α は、筋芽細胞の MHC class I 発現を上げることが報告されている。IL-1 または TNF α 標的療法が特に有効であったのは、筋での MHC class I 発現上昇により、CIM のエフェクター細胞である細胞傷害性 T 細胞のリクルートメントに、特に関与しているからと考えられる。C 蛋白断片の MHC class I 拘束性エピトープ候補により筋炎を発症させることに成功し、このことも CIM マウスモデルにおいて CTL が主たる役割を果たしていることを示唆している。一方で、CIM マウスにおいて、このペプチドをエピトープとする細胞傷害性 T 細胞の存在はまだ見出せておらず、今後の解決すべき課題である。マウス筋炎モデルの組織、*in vitro* と *in vivo* における再生筋線維において、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。また、CIM誘導後に再生筋線維を誘導することで筋炎が発症し、筋再生と筋炎発症の関与が示唆された。今後は、これらのケモカインが自然免疫活性化因子として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する予定である。

E. 結論

CIM養子移入系は、獲得免疫である筋炎を惹起する自己免疫性T細胞と、筋局所の自然免疫活性化を、分割して解析することの出来るin vivoの自己免疫性疾患モデルである。C蛋白断片のMHC class I拘束性エピトープ単独免疫にて、実験的筋炎を誘導することが出来たことをはじめ、複数のアプローチにより、細胞傷害性T細胞が筋傷害のエフェクター細胞であることが強く示唆された。また、局所自然免疫に、炎症性サイトカインのIL-1とTNF α が重要な役割を果たしており、治療標的として有望と考えられた。さらに、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の発現に注目して、複数のケモカインが候補となると考えている。

これらの知見は、筋炎に特異性の高い治療法の開発に多くの情報をもたらすことが期待される。また、この筋炎マウスモデルは、細胞障害性T細胞が重要な役割を果たす自己免疫疾患マウスモデルであり、今後の自己免疫性CTLの制御の研究に適してい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) Okiyama N, Kohsaka H, Ueda N, Satoh T, Katayama I, Nishioka K, and Yokozeki H. Seborrhic area erythema as a common skin manifestation in Japanese patients with dermatomyositis. *Dermatology*, 217(4):374-377, 2008
- 2) 沖山奈緒子, 上阪等 診療科の壁を越える共通語-IL-6を例として-多発性筋炎・皮膚筋炎の研究の発展、*日本臨床免疫学会会誌* 31 巻 2 号、85-92, Apr. 2008
- 3) Matsudaira T, Tsuzuki S, Wada A, Suwa A, Kohsaka H, Tomida M, and Ito Y. Automated microfluidic assay system for autoantibodies

causing autoimmune diseases using a photoimmobilized autoantigen microarray., *Biotechnology Progress*, 24(6):1384-1392, 2008

- 4) Okiyama N, Sugihara T, Iwakura Y, Yokozeki H, Miyasaka N, Kohsaka H. Therapeutic effects of IL-6 blockade on a murine model of polymyositis that does not require IL-17A., *Arthritis Rheum*, 60(8):2505-2512, 2009
- 5) Kohsaka H, Current insights in polymyositis and dermatomyositis, *Clin Exp Neuroimmunol*, 1(1):22-23, 2010
- 6) Kohsaka H. Recent Research Developments in Rheumatic Diseases - Polymyositis / dermatomyositis Recent Research Developments in Rheumatology Editor: Antonio La Cava Transworld Research Network 166-184, 2009
- 7) 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.
- 8) 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
- 9) Kohsaka H. Current insights in polymyositis and dermatomyositis *Clin Exp Neuroimmunol* 1(1), 22-32, 2010

2. 学会発表

- 1) Naoko Okiyama Takahiko Sugihara, Hiroo Yokozeki, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka, A new mouse model of polymyositis indicates IL-6 as a therapeutic target. *The International Investigative Dermatology*, May, 14-17 2008, Kyoto
- 2) Hitoshi Kohsaka What we learnt from a new animal model of polymyositis International symposium on inflammatory myopathy May 23, 2008 Seoul
- 3) Naoko Okiyama, Hitoshi Kohsaka IL-6 as a potential therapeutic target of polymyositis. *International symposium on inflammatory myopathy*, May 23. 2008, Soul