

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

自己免疫疾患の疫学に関する研究

研究分担者：横田 俊平

（横浜市立大学医学研究科小児科学教授）

研究要旨

反復性発熱を伴う高 IgD 症候群は、メバロン酸キナーゼ（MK）をコードする MVK 遺伝子の機能喪失型変異により発症する自己炎症性疾患の 1 つである。その臨床症状は、炎症症状としての発熱、関節炎に留まるものから、精神発達遅延、小脳失調、発育不全、白内障等の重度障害を来すものまで存在する。世界で 100 例以上が報告されているのに対し、日本では 2011 年末時点で 6 症例が報告されているのみであった。本症の特異な臨床的所見は周期性発熱のみであり、臨床所見からの確定診断は困難である。そのため、種々の自己免疫疾患とも混同されている場合もあるのではないかと推測される。欧米では発症の原因に関する研究も進歩しつつあり、コレステロール代謝の過程に関与するメバロン酸キナーゼの機能喪失により IL-1 β 産生が恒常的に起こるために周期性発熱が生じるとされる。しかし、その詳細な機構に関しては依然として不明な点が少なくない。

我々は、日本における小児自己免疫疾患について、網羅的に診療、解析を行っている。日本の小児自己免疫疾患の現状を再度評価することにより、自己炎症性疾患（高 IgD 症候群を含む）との鑑別について考察する。

A. 研究目的

反復性発熱を伴う高 IgD 症候群はメバロン酸キナーゼ (MK) をコードする MVK 遺伝子の機能喪失型変異により発症する自己炎症性疾患の 1 つである。世界で 100 例以上が報告されているのに対し、日本では平成 22 年度末で 6 症例が報告されているのみである。また、高 IgD 症候群の学会報告は散発的に認めるものの、それらを体系的に評価した報告はない。反復性発熱を伴う高 IgD 症候群の主症状は周期性発熱であり、高 IgD 症候群の診療体系が確立されていない現在、自己免疫疾患との鑑別に苦慮する症例が存在することも推測される。

自己免疫疾患は多くの症例で不明熱を初発症状として認めることから、高 IgD 症候群を鑑別するうえできわめて重要な疾患群である。とくに難治例の検討が重要であることから、難治例を対象に全国約 3,500 施設に一次調査を実施し、難治例を集計した。同時に炎症学的検討により、難治性病態の解明を行い、治療法の是非につき検討を行う。これらの研究の総合的な帰結として、現時点で最良と考えられる診断・治療ガイドラインの作成を行う。

B. 研究方法

小児期の自己免疫疾患は、臨床的にはリウマチ・膠原病の範疇に属し、わが国では依然発生頻度すら明らかにされていない。臨床的には難治例の発生とその病態を検討することが喫緊に課題であり、そのための調査研究をすすめる。方法としては、一次アンケート調査により難治例の全国的な発生数を把握し、ついで二次詳細調査により病態の詳しい検討を行う。国際的な文献検索から当調査より得られた難治例の

病態につき検討を加え、かつ死亡例の収集を行い、担当医と病理医からなる検討会を開催して難治性病態の解明に当たる。その結果をもって診断・治療ガイドラインへつなげる。

C. 研究結果

全国約 2,843 施設にアンケートを行った結果、1,123 施設から回答を得た。このうち難治例を経験した施設は 410 施設にのぼった。症例は 2,832 例であった。

また自己炎症症候群については、42 例の報告があり、PFAPA 15 例、家族性地中海熱 11 例、TRAPS 4 例、CINCA 症候群 2 例などであった。

難治例は、若年性特発性関節炎が 1,319 例、全身性エリテマトーデスが 633 例、若年性皮膚筋炎が 252 例、小児強皮症が 31 例、混合性結合組織病が 92 例、血管炎症候群が 110 例であった。

死亡例の報告も得たが、若年性皮膚筋炎で 4.8%、混合性結合組織病で 4.3%と、成人に比較しても極めて高い頻度であることが判明した。

反復性発熱を伴う高 IgD 症候群においても、長期的にはアミロイドーシスの有無が予後を決定することも報告されており、種々の自己炎症症候群および自己免疫疾患における炎症病態の検討が必要である。

そこで、若年性皮膚筋炎死亡例につき担当医と病理医からなる検討会を開催したところ、全国から 5 症例の発表の承諾を得て、臨床的・病理学的な検討を行う機会を得た。その結果、いずれも「急速進行性間質性肺炎」にて死亡していることが判明した。病態は、当初は間質性肺炎であるが、血清中 KL-6 が徐々に高値となり、凝固線溶系の過剰な機能亢進がすすみ肺臓の細

小血管における microclots の形成が予後に直接繋がっていることが報告された。したがって、まずは当初の間質性肺炎を収束させること、ついで肺内の凝固線溶系活性化をモニタリングして凝固調節因子の補充を積極的に行うことが重要であるという結論に至った。

D. 考察

反復性発熱を伴う高 IgD 症候群は周期性発熱、下肢痛などを主症状とする自己炎症症候群のひとつで、その鑑別疾患の主たるものとしてリウマチ・膠原病がある。今回、その難治性病態につき全国調査を踏まえ、実態の把握を行った。その結果、難治性病態を呈するリウマチ・膠原病は、全国くまなく存在しており、非専門施設での診断・治療に関しての混乱が読み取れた。

とくに若年性皮膚筋炎、混合性結合組織病は、死亡率が4~5%に達しており、対策は喫緊の課題であることが判明した。

E. 結論

反復性発熱を伴う高IgD症候群との主要な鑑別疾患である小児リウマチ・膠原病の難治性病態の検討から、若年性皮膚筋炎、混合性結合組織において高い死亡率が把握された。その死亡原因については依然解明されておらず、今後、病理学的な検討が必須と考えられた。

F. 研究発表

1) 論文発表

1. Ozawa, R.Inaba, Y.Mori, M.Hara, R.Kikuchi, M.Higuchi, R.Miyamae, T. Imagawa, T.Fujiwara, T.Saito, T.Yokota, S "Definitive differences in laboratory and radiological characteristics between two subtypes

of juvenile idiopathic arthritis: systemic arthritis and polyarthritis."

Mod Rheumatol.2011 Oct 9.[Epub]

2. Yanagimachi, M.Goto, H.Miyamae, T.Kadota, K.Imagawa, T.Mori, M.Sato, H. Yanagisawa, R.Kaneko, T.Morita, S.Ishii, E.Yokota, S. "Association of IRF5 Polymorphisms with Susceptibility to Hemophagocytic Lymphohistiocytosis in Children." *J Clin Immunol* **31**(6): 946-51.
3. Imagawa, T.Yokota, S.Mori, M.Miyamae, T.Takei, S.Imanaka, H.Nerome, Y.Iwata, N.Murata, T.Miyoshi, M.Nishimoto, N.Kishimoto, T. "Safety and efficacy of tocilizumab, an anti-IL-6-receptor monoclonal antibody, in patients with polyarticular-course juvenile idiopathic arthritis." *Mod Rheumatol*.2011, Jun 2. [Epub]
4. Yokota, S.Imagawa, T.Takei, S.Murata, T.Tomiita, M.Itoh, Y.Fujikawa, S.Mori, M. "Guidance on using tocilizumab for juvenile idiopathic arthritis." *Mod Rheumatol*.2011;21:563-71.
5. Mori, M.Murata, T.Takei, S.Imagawa, T.Yokota, S. "Acquisition of expanded indications for intravenous cyclophosphamide in the management of childhood rheumatic disease in general." *Mod Rheumatol* **21**(5): 449-57.
6. Mori, M.Takei, S.Imagawa, T.Imanaka, H.Nerome, Y.Kurosawa, R.Kawano, Y. Yokota, S.Sugiyama, N.Yuasa, H.Fletcher, T.Wajdula, J. S. "Etanercept in the treatment of disease-modifying anti-rheumatic drug (DMARD)-refractory polyarticular course juvenile idiopathic arthritis: experience

- from Japanese clinical trials." *Mod Rheumatol* 2011;21:572-8.
7. Tadaki, H.Saitsu, H.Kanegane, H.Miyake, N.Imagawa, T.Kikuchi, M.Hara, R. Kaneko, U.Kishi, T.Miyamae, T.Nishimura, A.Do, H.Tsurusaki, Y.Sakai, H. Yokota, S.Matsumoto, N. "Exonic deletion of CASP10 in a patient presenting with systemic juvenile idiopathic arthritis, but not with autoimmune lymphoproliferative syndrome type IIa." *Int J Immunogenet* 38(4): 287-93.
 8. Yanagimachi, M.Naruto, T.Miyamae, T.Hara, T.Kikuchi, M.Hara, R. Imagawa, T.Mori, M.Sato, H.Goto, H.Yokota, S. "Association of IRF5 polymorphisms with susceptibility to macrophage activation syndrome in patients with juvenile idiopathic arthritis." *J Rheumatol* 38(4): 769-74.
 9. Yanagimachi, M.Naruto, T.Hara, T.Kikuchi, M.Hara, R.Miyamae, T. Imagawa, T.Mori, M.Kaneko, T.Morita, S.Goto, H.Yokota, S. "Influence of polymorphisms within the methotrexate pathway genes on the toxicity and efficacy of methotrexate in patients with juvenile idiopathic arthritis." *Br J Clin Pharmacol* 71(2): 237-43.
 10. Kasai, K.Mori, M.Hara, R.Miyamae, T.Imagawa, T.Yokota, S. "National survey of childhood febrile illness cases with fever of unknown origin in Japan." *Pediatr Int* 53(4): 421-5."
 11. Tadaki, H.Saitsu, H.Nishimura-Tadaki, A.Imagawa, T.Kikuchi, M.Hara, R. Kaneko, U.Kishi, T.Miyamae, T.Miyake, N.Do, H.Tsurusaki, Y.Sakai, H.Yokota, S.Matsumoto, N. "De novo 19q13.42 duplications involving NLRP gene cluster in a patient with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis." *J Hum Genet* 56(5): 343-7.
 12. Yanagimachi, M.Miyamae, T.Naruto, T.Hara, T.Kikuchi, M.Hara, R.Imagawa, T.Mori, M.Kaneko, T.Goto, H.Morita, S.Mizuki, N.Kimura, A.Yokota, S. "Association of HLA-A*02:06 and HLA-DRB1*04:05 with clinical subtypes of juvenile idiopathic arthritis." *J Hum Genet* 56(3): 196-9.
- 2) 学会発表
1. Yokota, S. 「2nd Tocilizumab JIA Advisory Board」 E U L A R 2011.
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
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

日本人高 IgD 症候群の臨床所見の把握に関する研究

研究分担者：荒川 浩一 群馬大学大学院小児科学教授
研究協力者：水野 隆久 群馬大学医学部附属病院小児科

研究要旨

高 IgD 症候群はメバロン酸キナーゼ（MK）をコードする MVK 遺伝子の機能喪失型変異により発症する自己炎症性疾患の 1 つである。その臨床症状は、炎症症状としての発熱、関節炎に留まるものから、精神発達遅延、小脳失調、発育不全、白内障等の重度障害を来すものまで存在する。世界で 100 例以上が報告されているのに対し、日本では 2008 年末時点で 2 症例が報告されているのみであった。本症の特異な臨床的所見は周期性発熱のみであり、臨床所見からの確定診断は困難である。また、名前の由来となっている高 IgD 血症を呈さない症例の報告も多い。一方、確定診断に結びつく MK 活性測定、尿中メバロン酸測定は国内では確立されておらず、現時点での日本における高 IgD 症候群の診療体系は未整備である。

我々は、周期熱を示す 3 兄妹において、遺伝子検査、尿中メバロン酸測定、メバロン酸キナーゼ活性測定をすることにより、初めて高 IgD 症候群と診断しえた症例を経験した。本年度は、この患者さんにおける血清中サイトカイン、ケモカイン、増殖因子を網羅的に測定し、対照群と比較した。

A. 研究目的

高 IgD 症候群はメバロン酸キナーゼ (MK) をコードする MVK 遺伝子の機能喪失型変異により発症する自己炎症性疾患の 1 つである。世界で 100 例以上が報告されているのに対し、日本では H20 年度末で疑い 2 症例が報告されているのみである。

高 IgD 症候群の診断は、尿中メバロン酸高値、メバロン酸キナーゼ (MK) 活性欠損という分子学的基盤をもって確定診断となる。しかし、日本においては、尿中メバロン酸測定、メバロン酸キナーゼ (MK) 活性測定は確立されておらず、上記の症例がどのような経緯をもって診断されてきたのか、しっかり検証を行う必要がある。

今回、我々は、京都大学医学部小児科との共同研究のもと、高 IgD 症候群と確定診断し得た 3 兄妹例を経験した。本年度は、本疾患の病態に迫る目的に、患者血清を用いて、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子を網羅的に測定し検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

【症例 1】3 歳 6 カ月、男児。

【症例 2】1 歳 5 カ月、女児。

1 卵性双胎第 1 子。

【症例 3】1 歳 5 カ月、女児。

1 卵性双胎第 2 子。

3 症例ともに生後 1 カ月頃より炎症反応高値の発熱を繰り返したが、各種感染症検査、免疫能検査では異常所見はみられなかった。原因遺伝子の検索、尿中メバロン酸キナーゼ測定、メバロン酸キナーゼ活性測定にて確定診断している。患者血清を用いて、バイオプレックス (バイオ・ラド) により 27 種類のサイトカイン、ケモカイン、増殖因子 (IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, G-CSF, MCP-1,

MIP-1a, MIP-1 β , eotaxin, FGF, IP-10, RANTES, VEGF, PDGF) を測定した。

C. 研究結果

3 兄妹の MVK 遺伝子変異は、Exon4 の 1 塩基手前に Heterozygous G>A の変異、Exon9 に Heterozygous T>C を認め、Compound Heterozygous と確定した。3 兄妹におけるメバロン酸キナーゼ活性の著明な低下、尿メバロン酸の高値を示した。以上により、3 症例ともに IgD 高値を認めなかったが、高 IgD 症候群と確定した。

血清中のサイトカイン、ケモカイン、増殖因子の検討を行うために、便秘にて受診した 3 症例をコントロールとして比較した結果、IL-6 は便秘群では 1.99 pg/ml、患者群では 14.0pg/ml、IP-10 は、それぞれ 1122、2831pg/ml、G-CSF は 3.1、16.3pg/ml、VEGF は 64.5、220.1pg/ml と患者群で高値を示した。また、IL-1ra、TNF- α 、IL-10 も採血のタイミングによってはコントロール群と比較して非常に高値を示していた。

D. 考察

高 IgD 症候群は、コレステロール生合成の経路に関わるメバロン酸キナーゼの機能低下によって生じる周期性発熱症候群であり、メバロン酸キナーゼの完全欠損ではより重篤なメバロン酸尿症の病型を取る。欧州の症例では血清 IgD が高値である症例が多いとされるが、本邦では IgD 高値でなく不明熱として治療されていた症例の報告があり、我々も発見の発端となった症例は、まさにそのようであった。

病態に関しては、未だに明確とはなっていないが、最近の病態生理学的な研究や臨床的な観察から、イソプレノイド代謝と IL-1 経路の関連が示唆されている (Curr

Opin Rheumatol. 2011 23:419-23. Review)。

今回、患者血清の網羅的な検討により、炎症性サイトカインの上昇が認められ、また、IL-1ra の上昇も見られた。これらの所見は、IL-1 を介した炎症惹起を示唆している可能性もあり、最近の知見と矛盾しないと思われる。また、VEGF や G-CSF が高値を示したことである。これらは、炎症の結果として上昇している可能性もあるが、病態形成に関わる可能性もあり、興味を持たれる。

現在、本症例は HMG-CoA 還元酵素阻害薬であるシンバスタチンで治療中であり、発作頻度の減少ならびに軽症化が見られている。

E. 結論

MVK 遺伝子の Compound heterozygous 変異をもつ高 IgD 症候群の 3 兄妹例を経験した。病態形成に、炎症性サイトカインや増殖因子が関与する可能性が示唆された。

現在、京都大学で本症例の iPS 細胞の確立のために検体を採取したところである。

F. 研究発表

1) 論文発表

1) Mizuno T, Sakai H, Nishikomori R, Oshima K, Ohara O, Hata I, Shigematsu Y, Ishige T, Tamura K, Arakawa H. Novel mutations of MVK gene in Japanese family members affected with hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. Rheumatol Int. 2011 Dec 11. [Epub ahead of print]

2) Seki M, Kobayashi T, Kobayashi T, Morikawa A, Otani T, Takeuchi K, Ayusawa M, Tsuchiya K, Yasuda K, Suzuki T, Shimoyama S, Ikeda K, Ishii Y, Arakawa H. External Validation of a Risk Score to Predict Intravenous Immunoglobulin Resistance in

Patients With Kawasaki Disease. Pediatr Infect Dis J. 2011;30:145-147.

3) Kanazawa T, Shiba N, Aizawa A, Okuno H, Tamura K, Tsukada S, Kumamoto T, Yamada S, Kobayashi Y, Arakawa H. Nelarabine Resistance of Childhood T-Cell lymphoblastic Leukemia/Lymphoma Cells. Kitakanto Med J. 2011;61:119-126.

4) Shiba N, Taki T, Park MJ, Nagasawa M, Kanazawa T, Takita J, Ohnishi H, Sotomatsu M, Arakawa H, Hayashi Y. CBL mutation in childhood therapy-related leukemia. Leukemia. 2011;25:1356-1358.

5) Shiba N, Park MJ, Taki T, Takita J, Hiwatari M, Kanazawa T, Sotomatsu M, Ishii E, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. CBL mutations in infant acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol. 2011 Oct 11. [Epub ahead of print]

6) Shiba N, Hasegawa D, Park MJ, Murata C, Matsubara A, Ogawa C, Manabe A, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. CBL mutation in chronic myelomonocytic leukemia secondary to familial platelet disorder with propensity to develop acute myeloid leukemia (FPD/AML). Blood. 2011 Dec 2 [Epub ahead of print]

2) 学会発表
なし

G: 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 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

高 IgD 症候群の病態に関する検討

研究分担者：原 寿郎

（九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野教授）

研究要旨

高IgD症候群はメバロン酸キナーゼをコードするMVK遺伝子の遺伝子変異によって起こる。高IgD症候群患者は通常乳児期に発症し、周期的に発熱がおり、リンパ節腫大、腹痛、関節痛、発疹などを伴い、高IgD血症を呈する。世界で100例以上が報告されているのに対し、日本では数家系しか報告されていない。我々は平成20年度に原発性免疫不全症候群に関する全国疫学調査を行い、高IgD症候群は1次調査で4名が登録されたが、その内2名は二次調査で高IgD症候群ではないことが判明し、国内ではこの疾患は極めてまれであると考えられ、その病態の解明は進んでいない。今回、同じ自己炎症性疾患であり、発熱周期や発熱持続期間が高IgD症候群に類似するPFAPA

（periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, adenitis）患者の一部が高IgD血症を呈していたことに注目し、高IgD血症の好塩基球への影響について検討を行った。高IgD血症を呈した5名の周期性発熱患者についてMVK遺伝子を解析したがいずれの患者も異常を認めなかった。非発熱時の患者末梢血を抗CD123抗体、抗HLA-DR抗体、抗IgD抗体で染色した。顆粒球領域をさらにCD123陽性HLA-DR陰性領域で好塩基球領域にgatingし、IgDの結合の有無を検討した結果、好塩基球へのIgDの結合は認められなかった。PFAPAではシメチジンが有効であると報告されているが、シメチジンは好塩基球の活性化や遊走能を抑性することが知られており、シメチジンの作用機序の解明は高IgD症候群の病態の解明につながる可能性があると考えられた。

A. 研究目的

高 IgD 症候群はメバロン酸キナーゼをコードする MVK 遺伝子の遺伝子変異によって起こる。高 IgD 症候群患者は通常乳児期に発症し、周期的に発熱、リンパ節腫大、腹痛、関節痛、発疹がみられ、1回の発熱発作は4-8日程度であり、約4-8週間隔でおこる。世界で100例以上が報告されているのに対し、我が国からの報告は数家系であり極めて少ない。

我々は、同じ自己炎症性疾患であり、発熱周期や発熱持続期間が高 IgD 症候群に類似する PFAPA (periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, adenitis) 患者の一部が高 IgD 血症を呈していたことに注目して、高 IgD 血症の起こるメカニズム、高 IgD 血症が誘導する免疫学的作用に関して研究を継続している。昨年度は、PFAPA 患者末梢血には、IgD⁺CD27⁺B 細胞の割合が高く、その病態に関連している可能性を示した。今年度は昨年のデータをふまえて、高 IgD 血症が及ぼす好塩基球への影響について検討を行った。

B. 研究方法

九州大学病院に受診した18名のPFAPAと診断された患者を対象とした。血清のIgDを測定し、末梢血好塩基球へのIgDの結合の程度を評価するためCD123陽性HLA-DR陰性細胞の表面IgDについてフローサイトメーターにて解析した。

C. 研究結果

PFAPA患者の男女比は12:6と男性に多かった。年齢は1歳9か月から16歳であ

り、発症年齢は5か月から4歳であった。16歳の患者は扁桃摘出術にて一旦発熱がなくなっていたが、その後再発し、シメチジン内服にて寛解し、その後シメチジンも中止できた。血清IgD濃度がカットオフ値である14 mg/dlを超えた患者は5名認められた。PFAPAは発熱の周期、発熱持続期間が高IgD症候群に類似しているため、これら5名のMVK遺伝子を解析したが異常を認めなかった。

患者末梢血を抗CD123抗体、抗HLA-DR抗体、抗IgD抗体で染色した。顆粒球領域をさらにCD123陽性HLA-DR陰性領域で好塩基球領域にGatingし、IgDの結合の有無について検討した。その結果、患者末梢血好酸球へのIgDの結合は健常者およびいずれの患者でも認められなかった。

D. 考察

Chen Kらは、IgDが好塩基球に結合することによって、calcium-fluxing receptorを介して好塩基球を活性化し、B細胞活性化因子であるIL-4、IL-13、BAFFやAPRILを含む多くのサイトカインを誘導することや、IL-3存在下で好塩基球からのTNFやIL-1 β の産生を促すことを報告している。さらにPFAPA患者では扁桃にIgD結合好塩基球がみられることも報告している。

今回PFAPA患者を対象として、末梢血注のIgD結合好塩基球を解析したところ、明らかな好塩基球へのIgDの結合はみられなかった。今回の解析は非発熱時の検体であり、有熱時と比較して検討を行う必要があると考えられた。PFAPAにおい

て H2 ブロッカーであるシメチジンが有効であることが報告されているが、シメチジンは好塩基球にも作用し、ヒスタミンの分泌を抑えることも知られており、好塩基球の活性化を抑えている可能性がある。今後、有熱時と無熱時で好塩基球の IgD 結合能違いを詳細に検討し、シメチジンによる好塩基球の活性化の抑制の有無を評価する予定である。

E. 結論

高 IgD 血症を呈する PFAPA 患者では、IgD 結合好塩基球は認められなかった。PFAPA の治療薬であるシメチジンは好塩基球の活性化や遊走能を抑性することが知られており、これらの関連を明らかにすることにより、高 IgD 症候群の病態を解明できる可能性があると考えられた。

F. 研究発表

1. Ishimura M, Takada H, Doi T, Imai K, Sasahara Y, Kanegane H, Nishikomori R, Morio T, Heike T, Kobayashi M, Ariga T, Tsuchiya S, Nonoyama S, Miyawaki T, Hara T. Nationwide survey of patients with primary immunodeficiency diseases in Japan. *J Clin Immunol.* 2011 Dec;31(6): 968-76.
2. Nakagawa N, Imai K, Kanegane H, Sato H, Yamada M, Kondoh K, Okada S, Kobayashi M, Agematsu K, Takada H, Mitsui N, Oshima K, Ohara O, Suri D, Rawat A, Singh S, Pan-Hammarström Q, Hammarström L, Reichenbach J, Seger R, Ariga T, Hara T, Miyawaki T, Nonoyama S. Quantification of

κ-deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell *J Allergy Clin Immunol.* 2011 Jul;128(1):223-225.

3. Saito M, Nagasawa M, Takada H, Hara T, Tsuchiya S, Agematsu K, Yamada M, Kawamura N, Ariga T, Tsuge I, Nonoyama S, Karasuyama H, Minegishi Y. Defective IL-10 signaling in hyper-IgE syndrome results in impaired generation of tolerogenic dendritic cells and induced regulatory T cells. *J Exp Med.* 2011 Feb 14;208(2):235-49.
4. Hoshina T, Takada H, Sasaki-Mihara Y, Kusuhara K, Ohshima K, Okada S, Kobayashi M, Ohara O, Hara T. Clinical and host genetic characteristics of Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases in Japan. *J Clin Immunol.* 2011 Jun;31(3):309-14.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
原 寿郎	リウマチ熱	山口 徹 北原光夫 福井次矢	今日の治療指針～私はこう治療している～2012年度版	医学書院	日本		印刷中
原 寿郎	原発性免疫不全症候群	永井良三 大田 健	今日の治療と看護（改訂第3版）	南江堂	日本		印刷中

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Izawa K, Hijikata A, Tanaka N, Kawai T, Saito, MK, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, Yasumi T, Nakahata T, Heike T, Nishikomori R, Ohara O	Detection of Base Substitution-Type Somatic Mosaicism of the <i>NLRP3</i> Gene with >99.9% Statistical Confidence by Massively Parallel Sequencing	DNA Res		in press	2012
Sakai H, Okafuji I, Nishikomori R, Abe J, Izawa K, Kambe N, Yasumi T, Nakahata T, Heike T	The CD40-CD40L axis and IFN- γ play critical roles in Langhans giant cell formation	Int Immunol	24	5-15	2012
Murata Y, Yasumi T, Shirakawa R, Izawa K, Sakai H, Abe J, Tanaka N, Kawai T, Oshima K, Saito M, Nishikomori R, Ohara O, Ishii E, Nakahata T, Horiuchi H, Heike T	Rapid diagnosis of FHL3 by flow cytometric detection of intraplatelet Munc13-4 protein	Blood	118	1225-1230	2011

Adachi M, Watanabe A, Nishiyama A, Oyazato Y, Kamioka I, Murase M, Ishida A, Sakai H, Nishikomori R, Heike T	Familial cases of periodic fever with aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis syndrome	J Pediatr	158	155-159	2011
Tahara M, Sakai H, Nishikomori R, Yasumi T, Heike T, Nagata I, Inui A, Fujisawa T, Shigematsu Y, Nishijima K, Kuwakado K, Watabe S, Kamayama J	Patient with neonatal-onset chronic hepatitis presenting with mevalonate kinase deficiency with a novel MVK gene mutation	Mod Rheumatol	21	641-645	2011
Heike T, Saito M, Nishikomori R, Yasumi T, Nakahata T	Autoinflammatory diseases—a new entity of inflammation	Inflammation and Regeneration	31	125-136	2011
Niwa A, Heike T, Umeda K, Oshima K, Kato I, Sakai H, Suemori H, Nakahata T, Saito M	A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors	PLoS ONE	6	e22261	2011
Hoshina T, Takada H, Sasaki-Mihara Y, Kusuhashi K, Ohshima K, Okada S, Kobayashi M, Ohara O, Hara T	Clinical and host genetic characteristics of Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases in Japan	J Clin Immunol	31	309-314	2011
Mizuno T, Sakai H, Nishikomori R, Oshima K, Ohara O, Hata I, Shigematsu Y, Ishige T, Tamura K, Arakawa H	Novel mutations of MVK gene in Japanese family members affected with hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome	Rheumatol In		in press Epub ahead of print	2011

Tanaka N, Izawa K, Saito MK, Sakuma M, Oshima K, Ohara O, Nishikomori R, Morimoto T, Kambe N, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, de Saint Basile G, Neven B, van Gijn M, Frenkel J, Aróstegui JI, Yagüe J, Merino R, Ibañez M, Pontillo A, Takada H, Imagawa T, Kawai T, Yasumi T, Nakahata T, Heike T	High incidence of NLRP3 somatic mosaicism in patients with chronic infantile neurologic, cutaneous, articular syndrome: Results of an international multicenter collaborative study	Arthritis Rheum	63	3625-3632	2011
Ozawa R, Inaba Y, Mori M, Hara R, Kikuchi M, Higuchi R, Miyamae T, Imagawa T, Fujiwara T, Saito T, Yokota S	Definitive differences in laboratory and radiological characteristics between two subtypes of juvenile idiopathic arthritis: systemic arthritis and polyarthritis	Pediatric Blood & Cancer Mod Rheumatol		in press Epub ahead of print	2011
Yanagimachi M, Goto H, Miyamae T, Kadota K, Imagawa T, Mori M, Sato H, Yanagisawa R, Kaneko T, Morita S, Ishii E, Yokota S	Association of IRF5 Polymorphisms with Susceptibility to Hemophagocytic Lymphohistiocytosis in Children	J Clin Immunol	31	946-951	2011
Yokota S, Imagawa T, Murata T, Tomiita M, Fijikawa S, Mori M	Guidance on using tocilizumab for juvenile idiopathic arthritis.	Mod Rheumatol	21	563-571	2011

Tadaki H, Saito H, Kanegane H, Miyake N, Imagawa T, Kikuchi M, Hara R, Kaneko U, Kishi T, Miyamae T, Nishimura A, Doi H, Tsurusaki Y, Sakai H, Yokota S, Matsumoto N	Exonic deletion of CASP10 in a patient presenting with systemic juvenile idiopathic arthritis, but not with autoimmune lymphoproliferative syndrome type IIa	Int J Immunogenet	38	287-293	2011
Yanagimachi M, Naruto T, Hara T, Kikuchi M, H ara R, Miyamae T, Imagawa T, M ori M, Kaneko T, Morita S, Go to H, Yokota S	Influence of polymorphisms within the methotrexate pathway genes on the toxicity and efficacy of methotrexate in patients with juvenile idiopathic arthritis	Br J Clin Pharmacol y	71	237-243	2011
Kasai K, Mori M, Hara R, Miya mae T, Imagawa T, Yokota S	National survey of childhood febrile illness cases with fever of unknown origin in Japan	Pediatr In	53	421-425	2011
Seki M, Kobayashi T, Kobayashi T, Morikawa A, Otani T, Takeuchi K, Ayusawa M, Tsuchiya K, Yasuda K, Suzuki T, Shimoyama S, Ikeda K, Ishii Y, Arakawa H	External Validation of a Risk Score to Predict Intravenous Immunoglobulin Resistance in Patients With Kawasaki Disease	Pediatr Infect Dis J	30	145-147	2011

Ishimura M, Takada H, Doi T, Imai K, Sasahara Y, Kanegane H, Nishikomori R, Morio T, Heike T, Kobayashi M, Ariga T, Tsuchiya S, Nonoyama S, Miyawaki T, Hara T	Nationwide survey of patients with primary immunodeficiency diseases in Japan	J Clin Immunol	31	968-76	2011
Saito M, Nagasawa M, Takada H, Hara T, Tsuchiya S, Agematsu K, Yamada M, Kawamura N, Ariga T, Tsuge I, Nonoyama S, Karasuyama H, Minegishi Y	Defective IL-10 signaling in hyper-IgE syndrome results in impaired generation of tolerogenic dendritic cells and induced regulatory T cells.	J Exp Med	208	235-249	2011
中畑龍俊	疾患特異的iPS細胞を用 いた遺伝子治療・個別化 医療	小児科	52(12)	1743- 1749	2011

The CD40–CD40L axis and IFN- γ play critical roles in Langhans giant cell formation

Hidemasa Sakai¹, Ikuo Okafuji¹, Ryuta Nishikomori¹, Junya Abe¹, Kazushi Izawa¹, Naotomo Kambe², Takahiro Yasumi¹, Tatsutoshi Nakahata¹ and Toshio Heike¹

¹Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Kyoto University, 54 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku Kyoto 606-8507, Japan

²Department of Dermatology, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba 260-8670, Japan

Correspondence to: R. Nishikomori; E-mail: rnishiko@kuhp.kyoto-u.ac.jp

Received 25 February 2011, accepted 11 October 2011

Abstract

The presence of Langhans giant cells (LGCs) is one of the signatures of systemic granulomatous disorders such as tuberculosis and sarcoidosis. However, the pathophysiological mechanism leading to LGC formation, especially the contribution of the T cells abundantly found in granulomas, has not been fully elucidated. To examine the role of T cells in LGC formation, a new *in vitro* method for the induction of LGCs was developed by co-culturing human monocytes with autologous T cells in the presence of concanavalin A (ConA). This system required close contact between monocytes and T cells, and CD4⁺ T cells were more potent than CD8⁺ T cells in inducing LGC formation. Antibody inhibition revealed that a CD40–CD40 ligand (CD40L) interaction and IFN- γ were essential for LGC formation, and the combination of exogenous soluble CD40L (sCD40L) and IFN- γ efficiently replaced the role of T cells. Dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP), a known fusion-related molecule in monocytes, was up-regulated during LGC formation. Moreover, knock-down of DC-STAMP by siRNA inhibited LGC formation, revealing that DC-STAMP was directly involved in LGC formation. Taken together, these results demonstrate that T cells played a pivotal role in a new *in vitro* LGC formation system, in which DC-STAMP was involved, and occurred via a molecular mechanism that involved CD40–CD40L interaction and IFN- γ secretion.

Keywords: concanavalin A, granuloma, multinucleated giant cell

Introduction

Granuloma formation is a specialized inflammatory response observed in infections by certain pathogens such as *Mycobacterium* and *Cryptococcus* (1, 2). Granulomas are also found in immunodeficient conditions such as chronic granulomatous disease (CGD) (3). In addition, this response is a pathological hallmark of non-infectious idiopathic inflammatory disorders including systemic sarcoidosis and Blau syndrome/early-onset sarcoidosis (BS/EOS) (4–7). Granulomas consist of various cell types including macrophages, T cells, plasma cells and epithelioid cells, but the presence of multinucleated giant cells (MGCs) is the cardinal feature of granulomatous inflammation (1, 4). Granuloma formation is generally considered a host defense mechanism against persistent irritants or chronic infection and occurs as a consequence of the failure of the host to eliminate invading pathogens. When the irritants are large and indigestible, MGCs are formed by the fusion of monocyte–macrophage lineage cells (1, 4, 8). However, the pathophysiological mechanism of MGC development and associated granuloma formation is not well understood.

MGCs are morphologically classified into Langhans giant cells (LGCs), which show a circular peripheral arrangement of nuclei, and foreign body giant cells (FGCs), which show irregular scattering of nuclei (9). LGCs are characteristic of systemic granulomatous disorders such as tuberculosis, sarcoidosis and BS/EOS, whereas FGCs are observed as a consequence of a reaction against foreign bodies such as an implant. To explore the mechanisms of MGC formation, particularly LGC formation in systemic granulomatous disease, several *in vitro* systems of human monocyte culture have been developed. These involve the use of stimuli such as phorbol myristate acetate (10–12) and lectins such as concanavalin A (ConA) to induce LGCs (13, 14). However, a considerable degree of concurrent FGC formation is observed in systems that employ ConA.

Cytokines are also used to induce MGCs. For example, IFN- γ (15–19), IL-3 (15, 18, 19) and granulocyte macrophage colony-stimulating factor (15) are frequently used to induce LGCs, while IL-4 is known to induce FGCs (15, 20–23). Notably, IFN- γ has been regarded as a crucial factor

6 The CD40–CD40L axis is required for LGC formation

for LGC formation because LGC formation is inhibited by antibodies against IFN- γ (24). However, the roles of other factors and cell types in LGC development have not been elucidated.

T cells are one of the main components of granulomas. Therefore, the present study focused on T cells and investigated their role in the development of LGCs. A novel system was developed in which LGC-dominant MGCs could be generated from freshly isolated monocytes co-cultured with autologous T cells in the presence of ConA, and this system was used to evaluate the role of the CD40–CD40L ligand (CD40L) interaction and IFN- γ in the formation of LGCs. Moreover, the hypothesis that the stimulation of monocytes with exogenous soluble CD40L (sCD40L), recombinant human IFN- γ (rhIFN- γ) and ConA would be sufficient to induce monocyte fusion into LGCs in the absence of T cells was investigated. The findings of this study revealed a pivotal role for T cells in LGC formation and suggest a new pathophysiological mechanism contributing to LGC formation in granulomatous disorders.

Methods

Reagents and antibodies

Blocking antibodies against human CD40 (clone 82102; antagonistic antibody), CD40L, IFN- γ , IL-12 and isotype control IgG and rhIL-12 were purchased from R&D systems (Minneapolis, MN, USA). ConA, LPS and PMA were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). sCD40L was kindly provided by Dr Ashish Jain (NIAID/NIH, Bethesda, MD, USA) and also purchased from Adipogen (Incheon, Korea). rhIFN- γ was purchased from PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA). Inhibitory reagents JSH-23, BMS-345541, U0126, JNK-inhibitor II and SB-203580 were purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA).

Differentiation of MGCs from peripheral CD14⁺ monocytes

Blood was collected from healthy volunteer donors after informed consent was obtained in accordance with the guidelines of the Institutional Review Board of Kyoto University. PBMCs were isolated from whole blood using the Lymphoprep system (Axis-Shield PoC, Oslo, Norway). PBMCs were incubated with anti-CD14 microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), and CD14⁺ cells were isolated using an AutoMACS benchtop magnetic cell sorter according to the manufacturer's protocol (Miltenyi Biotec). Similarly, CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ cells were collected in a similar fashion, using CD3, CD4 and CD8 beads (Miltenyi Biotec), respectively. The purity of the isolated cells was >95%, as demonstrated by flow cytometry using a FACS Calibur system (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). In some experiments, CD3⁺ T cells were first depleted from PBMCs, and CD14⁺ monocytes were isolated from the negative fraction to obtain highly purified monocytes. (Contaminating T cells comprised <0.5% of the total cell population.)

The isolated CD14⁺ monocytes were re-suspended at a density of 100 000 cells per well in 48-well plates in RPMI-1640 medium (Nissui Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan) containing 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 50 μ M β -mercaptoethanol, 100 U ml⁻¹ penicillin and 100 μ g ml⁻¹

streptomycin. Cells were then cultured for 72 h with various supplemental reagents as described in Results. At the end of the culture period, cells were treated with Giemsa stain to detect nuclei. MGCs were defined as cells with more than three nuclei per cell, according to definitions established by previous studies (9–24).

The stained plates were examined under an Olympus IX70 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) using a \times 20 or \times 10 objective lens with a \times 10 eyepiece, and the number of nuclei and MGCs in the representative area was counted. The fusion index was calculated according to the following formula: fusion index = (number of nuclei within MGCs)/(total number of nuclei counted). More than 300 nuclei were counted for each experiment. Images were acquired with an Axio Cam camera (Carl Zeiss, Germany).

Enzyme-linked immunosorbent assay

The concentration of IFN- γ in the culture supernatants was measured by enzyme immunoassay using an OptEIA human IFN- γ ELISA set (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical staining was performed using an indirect immunofluorescent technique. Briefly, after fixation with 4% paraformaldehyde, the cells were incubated with a mouse antibody directed against human CD3 (BD Biosciences), followed by incubation with an Alexa488-labeled goat anti-mouse IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Cells were then stained with DAPI (Sigma) and visualized with an Olympus laser microscope IX70. Merged reconstruction images were created using Axio Vision SP4 software (Carl Zeiss).

Reverse transcription-PCR

RNA was extracted directly from culture plates using the RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). After DNase treatment, cDNA was obtained by reverse transcription using the Omniscript RT system (Qiagen). Reverse transcription (RT)-PCR was performed using TaKaRa LATAq (Takara, Shiga, Japan) with the following primer pairs: 5'-GATTGGGTCAGCACTTTTGG-3' and 5'-CCTCCCAAGTGAATGGATTG-3' for CD40L; 5'-GGGAGATTTACGTGTCTCCAAG-3' and 5'-GGGAGACAACACCTCTGTG-3' for dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP); 5'-GCCAGCTGGGAGAGAAGG-3' and 5'-CCTGGTGGGACTTCTCTG-3' for triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM-2); 5'-TGGAAGTCTGCCTCAGGATG-3' and 5'-ATCAGCCACTCCAAAAGG-3' for dedicator of cytokinesis 180 (DOCK180); 5'-GGCAGAGAACCAGGTGAATG-3' and 5'-GGCATACTCCGTGTGGTTG-3' for signal regulatory protein (SIRP) α ; 5'-CGCAGATCGATTTGAATATAACC-3' and 5'-GGATTCTGTCTGTGCTGTCG-3' for CD44; 5'-CAAGAGCATCTTCGAGCAAG-3' and 5'-TCCTGCTCAGGGATGTAAGC-3' for CD9; 5'-ATCTGGAGCTGGGAGACAAG-3' and 5'-CCTCAGTACACGGAGCTGTTC-3' for CD81; 5'-GAGACCGGTGAGCTGGATAG-3' and 5'-GCCGTCCTGGGTGTAGAGTC-3' for matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) and 5'-AGGTGAAGGTCGGAGTCAAC-3' and 5'-ACCTGGTGCTCAGTGTAGCC-3' for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

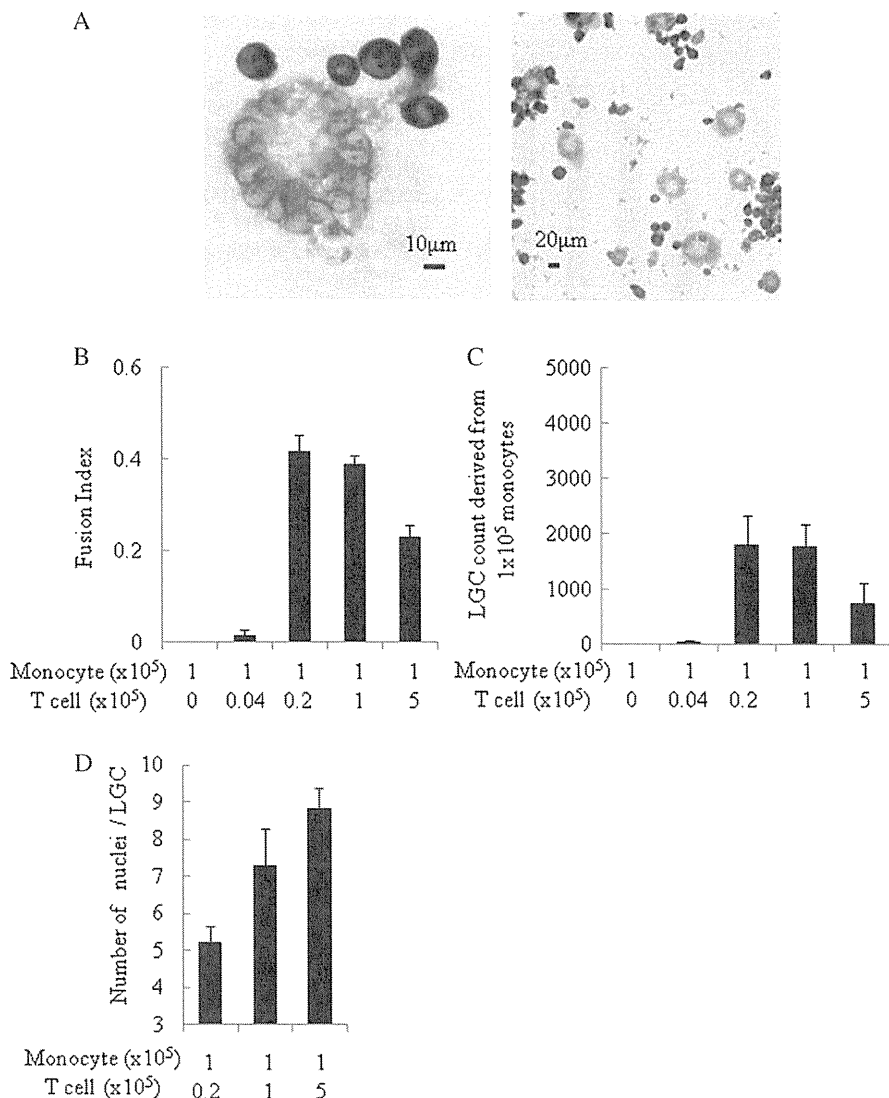


Fig. 1. Co-culture of human monocytes with autologous T cells induces LGC formation. (A) Photomicrographs of Giemsa-stained LGCs induced by co-culture of monocytes and autologous T cells stimulated with ConA. The images show typical LGCs with a circular peripheral arrangement of nuclei. (B–D) T cell-induced LGC formation depends on the ratio of T cells to monocytes. 'Monocyte' refers to the number of monocytes $\times 10^5$ and 'T cell' refers to the number of T cells $\times 10^5$. Values represent (B) the mean fusion index calculated without distinguishing between monocytes and T cells, (C) the mean total number of LGCs derived from 1×10^5 monocytes and (D) the mean number of nuclei per LGC. Error bars indicate the standard mean of the error of the indicated ratio of monocytes to T cells stimulated with ConA ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$) ($n = 3$ independent co-cultures).

siRNA transfection

Pre-designed siRNAs against DC-STAMP or control siRNAs (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) were transfected into newly isolated CD14⁺ cells using Lipofectamine RNAi-MAX (Invitrogen) according to the manufacturers' instructions. Additional transfections were performed after 12 and 24 h of culture.

Western blotting

Antibodies against phospho-(p)-ERK1/2, ERK1/2, p-JNK, JNK, p-p38, p38, p-p65 and p65 were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Isolated CD14⁺ cells were incubated without stimulation for 2 h, followed by stimulation with ConA, rhIFN- γ , sCD40L and LPS for 1 h.

The harvested cells were lysed with RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS and 1 mM orthovanadate) containing a protease inhibitor cocktail (Nacalai, Kyoto, Japan). Equal amounts of total protein were resolved on SDS-polyacrylamide gels and transferred onto Immobilon PVDF membranes (Millipore, Billerica, MA, USA). The membranes were treated with blocking buffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% tween-20, 0.05% NaN₃ and 1% FBS) and then incubated overnight with primary antibody. The membranes were then incubated for 1 h with an HRP-conjugated goat anti-rabbit secondary IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and developed with ECL Plus Western blotting detection kit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

8 The CD40–CD40L axis is required for LGC formation

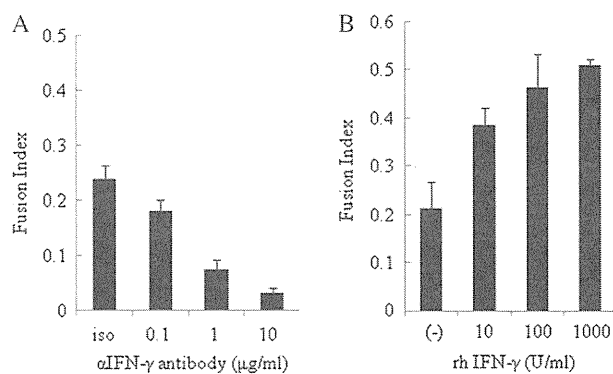


Fig. 2. IFN- γ is required for LGC formation in the co-culture of human monocytes and autologous T cells. (A) An antibody against IFN- γ abrogated LGC formation by the co-culture of monocytes and autologous T cells stimulated with ConA ($2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$). The ratio of monocytes to T cells was 1:1. 'Iso' refers to the isotype control. (B) Addition of rhIFN- γ to the co-culture of monocytes and autologous T cells stimulated with ConA enhanced LGC formation. Values represent the mean fusion index, and error bars indicate the standard mean of the error ($n = 3$ independent co-cultures).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by applying the Student's *t*-test, and a *P* value of <0.05 was considered to be significant.

Results

Co-culturing human monocytes with autologous T cells induces LGC formation

LGCs in granulomas are a specific indication of systemic granulomatous disorders. The observation that T cells are one of the main constituents of granulomas led to the hypothesis that T cells may play a key role in LGC formation. To understand the pathophysiology underlying LGC formation, a new *in vitro* LGC formation system was developed using human monocytes and T cells. When freshly isolated peripheral blood monocytes were co-cultured with autologous T cells under ConA stimulation, LGCs formed within 3 days (Fig. 1A, left), while very few FGCs were detected (Fig. 1A, right). LGC formation, as measured by the fusion index, as well as the number of LGCs per monocyte and the number of nuclei per LGC, increased along with the number of co-cultured T cells, peaking at a monocyte:T cell ratio of 1:1 (Fig. 1B–D).

IFN- γ is required for LGC formation in the co-culture of human monocytes and autologous T cells

The cytokine IFN- γ , which is reported to be critical in LGC formation (15–19, 24), was detected in the supernatants of the ConA-stimulated co-cultures (data not shown). The addition of a neutralizing antibody against IFN- γ to the co-culture system resulted in a dose-dependent inhibition of LGC formation (Fig. 2A). Furthermore, exogenous addition of rhIFN- γ accelerated LGC formation in a dose-dependent manner (Fig. 2B). These results show that IFN- γ is important in LGC formation in this co-culture system of human monocytes and autologous T cells.

Close contact between monocytes and T cells is required for LGC formation

ConA-stimulated T cells secrete several cytokines and up-regulate the expression of surface molecules that can stimulate nearby cells. Notably, differentiated LGCs were surrounded by CD3+ T cells (Fig. 3A), suggesting that direct contact between monocytes and T cells also contributed to LGC formation. The separation of T cells and monocytes by a semipermeable membrane reduced LGC formation (Fig. 3B).

We next co-cultured monocytes with either CD4+ or CD8+ T cells and assessed whether these two T cell subtypes differed in their ability to induce LGC formation. At every T cell-to-monocyte ratio tested, CD4+ T cells induced LGCs more efficiently than an equivalent number of CD8+ T cells (Fig. 3C). Since IFN- γ was required for LGC formation, the IFN- γ concentration was measured in the supernatants of the various culture conditions. The co-cultures with CD4+ T cells contained more IFN- γ than cultures with CD8+ T cells (Fig. 3D). However, the exogenous addition of rhIFN- γ to co-cultures with CD8+ T cells did not enhance LGC formation to the levels observed with CD4+ T cells (Fig. 3E). These results showed that factors other than IFN- γ , potentially surface molecules preferentially expressed on CD4+ T cells, are required for the efficient formation of LGCs in this system.

The CD40–CD40L axis is necessary for LGC formation

A literature search for differentially expressed surface molecules between CD4+ and CD8+ T cells in the expression profiles of activated human T cells (25) identified tumor necrosis factor super family 5 (TNFSF5 or CD40L) as a candidate molecule affecting LGC formation. The preferential expression of CD40L by CD4+ cells was confirmed in our co-culture system (Fig. 4A). To evaluate whether CD40L was indeed important in LGC formation, antibodies that disrupt the CD40–CD40L interaction were added to the co-culture. Blocking antibodies against CD40 and CD40L inhibited LGC formation in a dose-dependent manner (Fig. 4B). Furthermore, exogenous addition of sCD40L to the co-culture system enhanced LGC formation in a dose-dependent manner (Fig. 4C).

The importance of IFN- γ and CD40–CD40L axis in LGC formation suggested that IL-12 might contribute to LGC formation in this co-culture system since IL-12 is produced by monocytes in response to CD40 ligation and causes T cells to produce IFN- γ (26). The blocking antibody against IL-12 failed to inhibit LGC formation (Fig. 4D), although the exogenous addition of rhIL-12 to the co-culture system enhanced LGC formation (Fig. 4E). CD40 ligation also enhanced LGC formation in the presence of anti-IL-12 antibodies (Fig. 4D). Interruption of the CD40–CD40L interaction as well as the neutralization of IFN- γ abrogated LGC formation even in the presence of exogenous IL-12 (Fig. 4E). These data together indicate that the mechanisms through which CD40/CD40L and IFN- γ enhance LGC formation under the co-culture conditions employed in this study are mostly IL-12 independent, although IL-12 may enhance the LGC formation process when it is present in a high concentration.

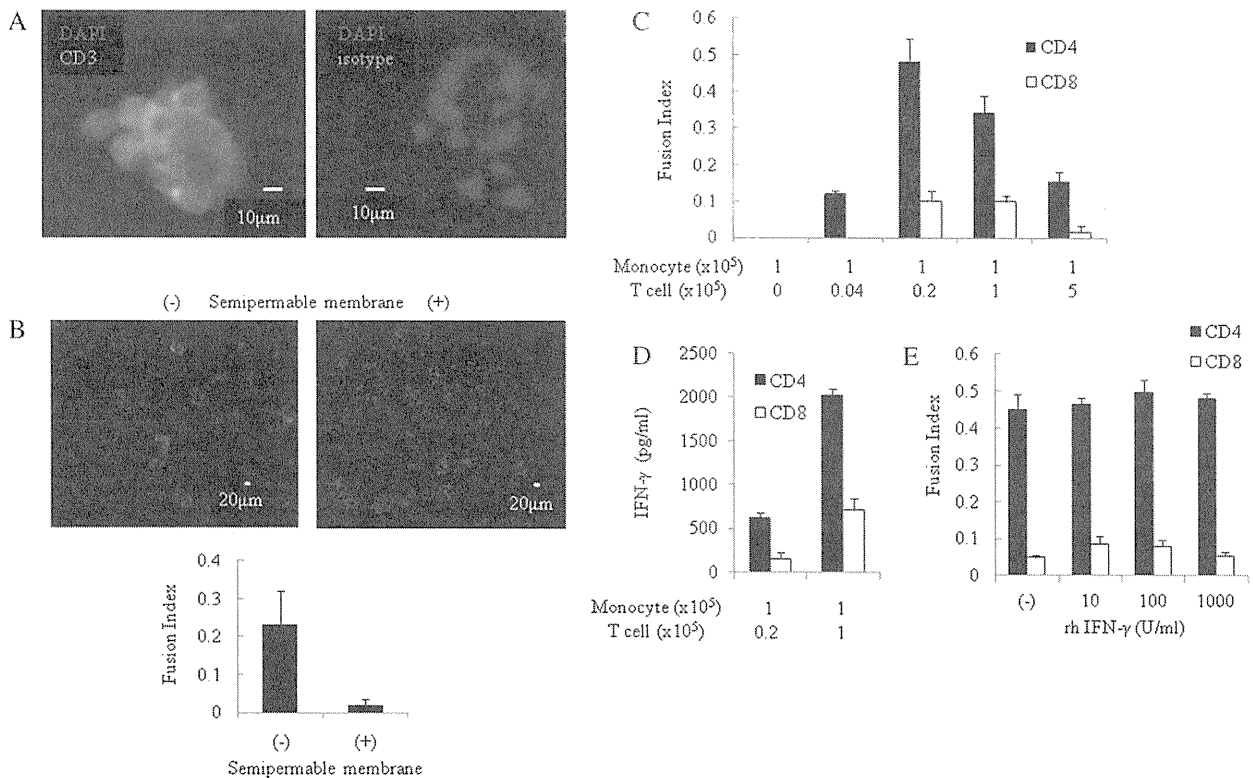


Fig. 3. Direct contact between monocytes and T cells is required for LGC formation. (A) Immunohistochemical staining of LGCs. Co-cultured cells were stained with an antibody against CD3 (green), and nuclei were stained with DAPI (blue). (B) A semipermeable membrane between the monocytes and T cells (1:1 ratio) stimulated with ConA ($2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$) abrogated LGC formation. Nuclei were distributed in a circular pattern in the absence of the semipermeable membrane (upper left), whereas this distribution was disturbed in the presence of the membrane (upper right). The mean fusion index of the cultures are shown, and error bars indicate the standard mean of the error ($n = 3$ independent co-cultures) (bottom). (C) CD4+ T cells induced LGCs more efficiently than CD8+ T cells. 'Monocyte' refers to the number of monocytes $\times 10^5$, and 'T cell' refers to the number of T cells $\times 10^5$. Values represent the mean fusion index calculated without distinguishing between monocytes and T cells, and error bars indicate the standard mean of the error of the indicated ratio of monocytes to T cells stimulated with ConA ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$) ($n = 3$ independent co-cultures). (D) CD4+ T cells produced more IFN- γ than CD8+ T cells. The data show the results of triplicate ELISAs for IFN- γ concentration in the supernatants of the experiment shown in Fig. 3(C). Error bars indicate the standard mean of the error of three independent cultures. (E) Addition of rhIFN- γ to the co-culture of monocytes with CD8+ T cells did not enhance LGC formation to the degree observed with CD4+ T cells. The culture condition was the same as Fig. 3(C and D), and the ratio of monocytes to T cells was 1:0.2. Values represent the mean fusion index and error bars indicate the standard mean of the error ($n = 3$ independent co-cultures).

T cells induce LGC formation by providing IFN- γ and CD40 stimulation

To more specifically evaluate the role of T cells in inducing LGCs, monocytes were cultured with either rhIFN- γ or sCD40L in the presence of ConA without T cells. The addition of rhIFN- γ alone did not induce LGC formation from ConA-stimulated monocytes (Fig. 5A), suggesting that T-cell factors besides or in addition to IFN- γ were required to induce the formation of LGCs. Stimulation with exogenous sCD40L did induce monocytes to differentiate into LGCs (Fig. 5B), indicating the necessity for an interaction between T cell-derived CD40L and monocyte-expressed CD40. Despite the fact that rhIFN- γ alone had no effect on LGC formation from ConA-stimulated monocytes in the absence of T cells, IFN- γ was required for LGC formation when monocytes were co-cultured with autologous T cells under ConA stimulation (Fig. 2A). Furthermore, a blocking antibody against IFN- γ abrogated LGC formation by monocytes cultured with sCD40L and ConA (Fig. 5C), indicating that the

LGC formation induced by stimulating cultured monocytes with exogenous sCD40L and ConA required IFN- γ .

Because monocytes do not produce large amount of IFN- γ , it was possible that contaminating T cells were the source of IFN- γ when monocytes were stimulated with exogenous sCD40L and ConA. Indeed, when highly purified CD14+ cells were stimulated with exogenous sCD40L and ConA, significantly less LGC formation was observed than in cultures using crude monocytes (Fig. 5D). In addition, supplementing the culture medium of highly purified monocytes with rhIFN- γ as well as exogenous sCD40L and ConA enhanced LGC formation to the same extent that was observed when crude monocytes were used (Fig. 5D). These results indicate that IFN- γ produced from T cells is required for the efficient induction of LGCs.

The next hypothesis to be evaluated was that the stimulation of highly purified monocytes with rhIFN- γ and sCD40L would be sufficient to induce LGC formation. However, this was not the case; ConA was also required for LGC formation