

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

『自己免疫疾患の制御をめざす研究拠点形成』

平成 27 年度事業報告会プログラム

平成 28 年 3 月 25 日

15:30-15:45

- 桑原 卓、近藤 元就 (免疫学講座)  
自己免疫マウスにおけるEAE不応答性機構の解明

15:45-16:00

- 遊佐 貴司、宮崎 修一 (先端医科学研究センター)  
アレルギー誘発要因の1つである微生物に対する自然免疫応答  
ーウイルスまたは細菌による感染症における解析ー

16:00-16:15

- 大原関 利章、高橋 啓 (病院病理学講座(大橋))  
カンジダ細胞壁由来多糖誘導血管炎における血清サイトカインの検討  
ー多項目同時測定システムを用いた検討ー

16:15-16:30

- 武城 英明<sup>1</sup>、鈴木康夫<sup>2</sup> (臨床検査医学講座(佐倉)<sup>1</sup>、内科学講座消化器内科学  
分野(佐倉)<sup>2</sup>  
病的細胞バイオマーカーによる自己免疫疾患細胞病態の解明

16:30-16:45

- 吉田 憲司、石井 健、石河 晃 (皮膚科学講座(大森))  
抗デスマグレイン1モノクローナル抗体を用いた落葉状天疱瘡の水疱形成機  
序の解析

16:45-17:00

- 川添 麻衣、鹿野 孝太郎、金子 開知、川合 眞一 (内科学講座膠原病学分野)  
ステロイド治療による骨形成抑制作用に関わるWnt シグナルの関与

(発表 10 分、質疑 5 分)

## 自己免疫マウスにおける EAE 不応答性機構の解明

○桑原卓 近藤元就 免疫学講座

**【目的】** Special AT-rich sequence Binding protein 1 (SATB1) は染色体構造の調節を通して遺伝子発現に関わる核内タンパク質である。我々は胸腺における T 細胞成熟過程の正常な進行に SATB1 が不可欠であることを最近報告した。胸腺で成熟した T 細胞は末梢で T 細胞受容体 (T cell receptor : TCR) を介して抗原刺激を受けとる。TCR 刺激の際も高発現する事から、エフェクター機能を獲得する過程でも SATB1 は必須であると予測できる。T 細胞が担う免疫学的機能の分子基盤を明らかにすることを目的に、SATB1 の視点で検討を進めた。

**【方法】** SATB1 を血球細胞で欠損する条件付きノックアウトマウス (cKO-V) やタモキシフェン処理により SATB1 欠損となるマウス (cKO-ER) を用いた。自己反応性 CD4 T 細胞により再現よく誘導できるヒト多発性硬化症のマウスモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を用い、個体レベルでの T 細胞機能における SATB1 の役割を解析した。モデル抗原であるミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG) 由来ペプチドや卵白アルブミンに対する T 細胞応答について検討した。セルソーターで集めた SATB1 欠損マウス由来の CD4 T 細胞を野生型マウス由来のそれと比較しながら細胞生物学的に解析した。

**【結果と考察】** MOG ペプチドの免疫により誘導した自己反応性 (EAE 病原性) CD4 T 細胞を野生型マウスに養子移入すると、レシピエント個体は四肢や尾の麻痺を示した。移入直前に SATB1 を欠損させた cKO-ER CD4 T 細胞を養子移入した場合は症状を示さなかった。野生型マウス由来に比べると cKO-V マウス由来の CD4 T 細胞は、免疫したモデル抗原に対して減弱した増殖反応やサイトカイン産生を示した。野生型 CD4 T 細胞を TCR で刺激すると情報伝達分子である Lck や ZAP70 の活性化が認められるが、cKO-V CD4 T 細胞ではそれらは低活性状態だった。これらの結果は、末梢の T 細胞において、SATB1 は TCR 刺激伝達系を正に制御することで T 細胞機能発揮に貢献する分子であることを物語り、その役割が EAE 誘導に必須である可能性を導き出す。SATB1 が教えてくれた T 細胞機能獲得に関する最新の知見を併せて紹介する

## 一 ウイルスまたは細菌による感染症における解析 一

○遊佐貴司、宮崎修一 先端医科学研究センター感染免疫部門

**【目的】** アレルギー疾患の誘発要因の一つと考えられている感染症の関与を解明するためには、感染症に対する免疫応答の解明が必要と考え、ウイルスおよび細菌感染症患者由来好中球の TLRs 発現と血液中のサイトカイン量を測定した。さらに、ウイルスおよび細菌感染マウス由来好中球機能および血中サイトカイン量も測定して解析を加えた。

**【方法】** 小児科を受診した外来患者で研究目的を説明して承諾を得た細菌感染症患者 37 例とウイルス感染症患者 34 例（合計：71 例）を対象とした（承認課題番号：24003）。基礎検討として、5 週齢の雌 C57BL/6 マウスに *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883 株または influenza virus A(H1N1) を経鼻感染させた。患者およびマウス血液を採取後直ちに遠心分離した。分離血漿中の各種サイトカイン濃度は Q-Plex™ ELISA マルチプレックスアレイで測定した。細胞層からは好中球を MACS™ 好中球磁気分離キットで分離し、FCM 解析による TLR2,4 膜発現量の測定と RT-PCR 法による TLR2,4 mRNA 量 ( $\Delta\Delta CT$  法) の測定をした。

**【結果および考察】** 細菌感染症患者由来の好中球数は来院までの感染後の日数の影響はみられず、感染 1 日、3 日及び 5 日後群共に対象群に比べ有意差をもって多かった。一方、ウイルス感染群では感染 1 日後に来院した群のみ有意差をもって多かった。次に TLR2 膜発現量は細菌感染群では感染後の日数に関係なく対象群に比べ多く、ウイルス感染群では感染後の日数が経過するに伴い増加していた。mRNA 量はウイルス感染群で感染初期に多い傾向がみられた。TLR4 発現量も TLR2 発現量と同様の結果であった。次にマウス感染モデルでは、TLR2 の発現量は細菌感染群では感染 3 日後、ウイルス感染群では感染後漸次減少する傾向がみられた。ウイルス感染マウスにおける mRNA 量は患者での結果と同様な傾向を示した。多くの細胞がサイトカインやケモカインを産生し、産生サイトカイン及びケモカインが相互作用した結果が末梢血中に現れる。現在患者及び感染マウスでの測定したサイトカイン量の解析をしている。

## カンジダ細胞壁由来多糖誘導血管炎における血清サイトカインの検討

### － 多項目同時測定システムを用いた検討 －

○大原関利章、高橋 啓 病院病理学講座(大橋)

**【目的】** 我々は *Candida albicans* 細胞壁由来のマンナン-βグルカン-蛋白複合体 (以下、CAWS)を用いた川崎病類似マウス系統的血管炎誘発モデルの病態解析を続けている。昨年度の本会では、抗 TNF-α 製剤の一種であるエタネルセプト(ETA)の治療実験の結果から血管炎発症早期に TNF-α が密接に関与する可能性について発表した。今回は、本事業で東邦大学に導入された多項目同時測定システムを用いて TNF-α 以外のサイトカインと血管炎の関連について検討した。

**【材料・方法】** マウス (C57BL/6、4 週齢、雄性)の腹腔内に 1 日あたり 4mg の CAWS を連続 5 日間接種し実験 36 日で屠殺。血管炎の有無を組織学的に検索すると共に屠殺時に得た血清の各種サイトカイン濃度を MESO QuickPlex SQ120 (MESO SCALE DISCOVERY)を用いて計測した。実験群は以下の通りである。無治療群:CAWS 接種のみ。ETA 標準投与:実験 4-32 日の期間中、2-3 日毎に 20mg/Kg の ETA を 9 回皮下接種。ETA 初期投与:実験 2-20 日の期間中、2 日毎に 9 回 ETA を投与。ETA 後期投与:実験 18-35 日の期間中、2 日毎に ETA を 9 回投与。

**【結果】** 血管炎発生率は、ETA 標準投与と ETA 初期投与で有意に低値であった。血清サイトカインは CAWS の接種により高値を示す群 (TNF-α, KC/GRO, IL-6)と検出感度~ごく低値にとどまる群 (IL-1, IL-2,IL-4, IL-10, IL12p70, INF-γ)とに分けられ、IL-6 は血管炎(+)で有意に高値であった。血管炎が抑制された ETA 標準投与、ETA 初期投与では無治療群あるいは ETA 後期投与と比較して KC/GRO、IL-6 が有意に低値であった。

**【考察】** TNF-α 以外にも KC/GRO、IL-6 が血管炎発生に密接に関与している可能性が示唆された。

## 病的細胞バイオマーカーによる自己免疫疾患細胞病態の解明

○武城英明<sup>1)</sup>、鈴木康夫<sup>2)</sup> 臨床検査医学講座(佐倉)<sup>1)</sup>、内科学講座(佐倉)<sup>2)</sup>

**【目的】** 自己免疫疾患の合併症に血管障害があげられる。血管が障害されると平滑筋細胞はフェノタイプを変え増殖能と遊走能を獲得する。この一過性の変換機構が制御されないと血管が修復されず動脈硬化に至る。昨年度我々は、血管平滑筋細胞のフェノタイプレギュレーター可溶性受容体 LR11 が、健常の平滑筋細胞では発現せず幼弱型に移行することで発現誘導され、その血中濃度が川崎病、炎症性腸疾患の合併症と関わることを示した。可溶性 LR11 は健常で脂肪細胞に最も強く発現している。今年度、脂肪細胞フェノタイプにおける LR11 の役割を明らかにすることを目的とした。

**【材料と方法、結果】** LR11<sup>-/-</sup>マウス（生後 8 週令雄）に 8 週間高脂肪食を負荷すると皮下脂肪に多数の褐色脂肪細胞が出現した。野生型マウスに比べ体重、脂肪量が少なく、肝内脂肪蓄積も見られなかった。LR11<sup>-/-</sup>マウスのエネルギー消費量、血糖、血中トリグリセライド値は野生型マウスに比べ有意に低かった。培養 LR11<sup>-/-</sup>脂肪細胞のノルエピネフリン投与後の細胞酸素消費量、熱産生遺伝子 UCP1 発現は野生型マウスに比べ有意に高く、その増大は精製可溶性 LR11 を添加すると消失した。さらに、脂肪細胞に可溶性 LR11 で処理すると BMP7 で誘導される熱産生遺伝子の増加が抑制された。糖尿病患者のヒト血中濃度を測定したところ、可溶性 LR11 は BMI および脂肪量と正相関し、減量治療にともなう脂肪量の減少とともに低下した。

**【考察】** フェノタイプレギュレーター可溶性 LR11 は皮下脂肪に強く発現し脂肪組織で褐色脂肪細胞への変換を抑制する役割を担うことが明らかになった。今後、病態との関わりを検討し自己免疫疾患の新規の合併症予防に向けて解析する予定である。

## 抗デスモグレイン 1 モノクローナル抗体を用いた落葉状天疱瘡の 水疱形成機序の解析

○吉田憲司、石井 健、石河 晃 皮膚科学講座(大森)

**【目的】** 落葉状天疱瘡 (pemphigus foliaceus : PF) はデスモソームを構成するカドヘリン型細胞接着分子であるデスモグレイン 1 (desmoglein 1 : Dsg1) に対する自己抗体 (抗 Dsg1 抗体) により生ずる自己免疫性水疱症である。天疱瘡の水疱形成機序として、①Dsg1 分子の trans-または cis-interaction 構造の直接阻害、②p38MAPK などの細胞内シグナル活性化による Dsg1 分子のエンドサイトーシスや分解、が考えられている。PF の水疱形成機序にこれらがどの程度関与しているかを検討する。

**【材料と方法】** 今回、ヒト皮膚器官培養系を用いて抗 Dsg1 モノクローナル抗体 (抗 Dsg1 mAb) 単独の場合と複数混合した場合で水疱形成の有無と Dsg1 分子の分布を観察し PF の水疱形成機序を検討した。1 種類の病原性抗 Dsg1 mAb (PF1-8-15) と 2 種類の異なる非病原性抗 Dsg1 mAb (PF1-2-6、PF1-2-22) を使用した。p38MAPK インヒビターと抗 Dsg1 mAb 単独または複数の抗 Dsg1 mAb を混合したポリクローナル抗体を正常ヒト皮膚に注射後 24 時間器官培養した検体を用いて、水疱形成の有無とデスモソーム関連分子の分布を HE 染色、蛍光抗体法で観察した。さらに、個々の抗 Dsg1 mAb とそれらを混合したポリクローナル抗体とで病原活性に違いがあるのかを培養表皮細胞シートを用いた dissociation assay で比較した。

**【結果と考察】** 個々の抗 Dsg1 mAb を用いた場合、病原性抗体でのみ水疱形成と病原活性が観察されたが、Dsg1 分子の分布に病原性抗体と非病原性抗体とでは差は無かった。一方、病原性と非病原性抗 Dsg1 mAb の混合により p38MAPK 依存性に Dsg1 分子の凝集 (clustering) が誘導され、デスモコリン 1、プラコグロビン分子の分布にも変化がみられた。また、病原性抗体単独時よりも細胞間接着が減弱した。p38MAPK インヒビターにより Dsg1 clustering は抑制されたが、病原性抗体による水疱形成は抑制されなかった。以上の結果から、病原性と非病原性抗体からなるポリクローナル抗 Dsg1 抗体は p38MAPK 依存性に Dsg1 clustering を介して表皮細胞接着阻害に関与するものの、患者皮膚における水疱形成には病原性抗体による Dsg1 分子の直接阻害が本質的に重要であると考えられた。

## ステロイド治療による骨形成抑制作用に関わる Wnt シグナルの関与

○川添 麻衣, 鹿野 孝太郎, 金子 開知, 川合 眞一 内科学講座膠原病学分野

**【目的】** Wnt シグナルは骨形成において重要な細胞内シグナルであるが、ステロイド治療の影響について十分な検討はない。そこで、リガンドである Wnt3a および阻害因子である sclerostin と Dickkopf1 (Dkk-1) に着目し、ステロイド治療における Wnt シグナルの臨床的意義を明らかにすることを目的とした。

**【方法】** 未治療の活動期膠原病患者 91 名 (56.9±17.9 歳 [平均±SD])を対象に、プレドニゾロン 30~70 mg/日による治療前、治療 1、2、3、4 週後における血清 Wnt シグナル関連因子および各種骨代謝マーカーを測定した。また正常ヒト骨芽細胞にデキサメタゾン (Dex)、IL-6 を添加し、1 時間後の sclerostin、Dkk-1 の mRNA 発現量を PCR 法にて検討した。

**【結果】** ステロイド投与 1 週目から、骨形成マーカーの血清 P1NP は有意に減少し、骨吸収マーカーの TRACP-5b は有意に増加した。血清 sclerostin、Dkk-1 は、1 週目はともに増加したが 2 週目以降は減少した。血清 Wnt3a は 1 週目から減少傾向を示した。骨芽細胞における sclerostin と Dkk-1 の mRNA 発現は、IL-6 刺激下で Dex を添加すると増加した。

**【考察】** ステロイド投与 1 週後は、血清 Wnt3a は減少し、血清 sclerostin、Dkk-1 は増加したことから、Wnt シグナル抑制により骨形成は低下したと考えられた。2 週目以降は血清 Wnt3a の減少に加え、血清 sclerostin、Dkk-1 も減少したことから、2 週目以降は Wnt シグナル以外の因子の関与が示唆された。また Dex 添加により骨芽細胞における sclerostin と Dkk-1 の mRNA 発現は増加したことから、ステロイドは *in vitro* でも Wnt シグナル抑制因子の増加を介し骨形成を低下させる可能性が示唆された。