

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601  
 研究種目：特定領域研究  
 研究期間：2007～2011  
 課題番号：19059005  
 研究課題名（和文） 自己免疫疾患の発症機構とその制御

研究課題名（英文） Mechanisms and their regulation of autoimmune disorders

## 研究代表者

山本 一彦 (YAMAMOTO KAZUHIKO)  
 東京大学・医学部附属病院・教授  
 研究者番号：80191394

## 研究成果の概要（和文）：

申請者らは、抗原 X が存在しその X に特異的な T 細胞が増殖する条件下で、ごく少量しか存在しない抗原 Y に依存して Y 特異的な T 細胞が活性化する現象を見出し、拡張抗原提示と命名した。本研究において拡張抗原提示が細胞接触と共刺激分子に依存し、生理的な自己抗原量に相当する少量の抗原で誘導されること、また特定の T 細胞レセプターに限定されずに生ずることが判明した。拡張抗原提示は、自己免疫疾患において認められるエピトープスプレディングの細胞免疫学的基盤となっている可能性が考えられ、新たな治療につながりうる重要な知見が得られたといえる。

## 研究成果の概要（英文）：

We have observed that in the presence of strong proliferation of antigen-X-specific T cells, co-existing T cells specific to antigen-Y exhibit activation in response to small amount of antigen-Y. We termed this phenomenon as ‘Extended antigen presentation (EAP)’, a new mechanism of naïve T cell activation. This project revealed that the induction of EAP depends on cell-cell contact and the amount of EAP-inducing antigen is as small as that of physiological autoantigen. Moreover, the fact that EAP induction was observed in three different T cell receptor transgenic T cells suggested universal nature of this phenomenon. EAP may be an immunological basis for epitope-spreading in autoimmune disease, and our observation could contribute to the understanding of autoimmunity and the development of therapeutic strategy.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	31,500,000	0	31,500,000
2008年度	31,500,000	0	31,500,000
2009年度	31,500,000	0	31,500,000
2010年度	31,500,000	0	31,500,000
2011年度	31,500,000	0	31,500,000
総計	157,500,000	0	157,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・

膠原病・アレルギー内科学

キーワード：遺伝学、生体分子、病理学、免疫学、臨床

## 1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患では自己免疫反応が病態に関与しているが、その詳細な原因やメカニズムは未だ不明である。自己免疫疾患における一つの特徴として、複数の自己抗原に対する T 細胞及び B 細胞レベルでの、免疫応答が出現することが挙げられ、「エピトープスプレディング」呼ばれる現象の関与が指摘されているが、この詳細なメカニズムは不明である。

研究代表者らは新規に構築した拡張抗原提示モデルを用いて、エピトープスプレディングの解析を行ってきた。具体的にはマウス MHC クラス II 分子 I-Ealpha 上のエピトープ (Ealpha52-68) に特異的な TEa T 細胞とニワトリオボアルブミン (OVA323-339) に特異的な OT-II T 細胞を用いた共培養系である。OT-II T 細胞を大量の OVA 抗原に反応して十分に増殖する Responder、TEa T 細胞をごく少量の Ealpha ペプチドに反応する Associator とし、この二組の T 細胞と抗原を抗原提示細胞と共に、抗原量を種々に変化させて培養した。すると、Ealpha ペプチドが少量で単独では Associator の TEa が殆ど分裂しない条件下でも、十分量の OVA ペプチド存在下に OT-II が強く分裂すると、TEa T 細胞は著明に分裂することを見出した。

一般的に T 細胞の活性化に関与する刺激として、抗原特異的な刺激と抗原非特異的な刺激 (サイトカンや共刺激分子) の大きく二つが挙げられる。T 細胞の活性化を誘導する機序の一つとして知られている bystander activation は「ある抗原 X に特異的な T 細胞の活性化が、別の抗原 Y に対する免疫応答に伴って生ずること」と定義され、サイトカイン等の液性因子の影響が大きいと考えられている (Bangs, S. C., Trends Immunol 27:518-524, 2006)。そこで抗原特異的な刺激と抗原非特異的な刺激 (サイトカンや共刺激分子) の寄与の重要性を検討するために、MHC クラス II (I-A<sup>b</sup>) と Ealpha ペプチドの複合体に結合する抗体 (Y-Ae) を用いて TEa T 細胞への抗原提示の阻害を試みたところ、OT-II

増殖下の TEa T 細胞の分裂は著明に抑制された。

これらの結果より、抗原 X が大量に存在しその X に特異的な T 細胞が十分に増殖する条件下で、ごく少量しか存在しない抗原 Y に依存して Y 特異的な T 細胞が活性化する現象を観察した。また、抗原 X 以外の抗原 Y による刺激に依存性が高い点で、従来 of bystander activation とは異なる新しい活性化様式と考え、これを拡張抗原提示 ‘Extended antigen presentation (EAP)’ と命名した。拡張抗原提示では免疫反応を惹起した抗原とは異なる抗原に対する免疫反応が出現しており、自己免疫病態において観察されるエピトープスプレディングの基盤現象である可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

研究代表者らが新規に同定した拡張抗原提示という現象がどのような条件下で生ずるかを詳細に検討し、エピトープスプレディングによる自己免疫疾患発症の細胞免疫学的基盤となりうるメカニズムを明らかにすることを目的とした。具体的には以下の通りである。

(1) 拡張抗原提示による T 細胞の活性化には抗原刺激が必要であること、また特定の T 細胞にのみみられる現象ではないことを複数の実験系を用いて明らかにする。

① 共培養系に抗原の存在しない Third party と設定した T 細胞をおき、Third party の T 細胞の分裂を解析する。

② Associator, Responder に設定する T 細胞の組み合わせを変えた条件でも拡張抗原提示がみられることを証明する。

③ IL-2 添加により拡張抗原提示と同様の T 細胞の活性化が誘導されるかを検討する。

④ 細胞間接着を阻害した際に拡張抗原提示による T 細胞の活性化が誘導されるかを検討する。

(2) 拡張抗原提示による T 細胞の活性化と通常の抗原提示による T 細胞の活性化との差異を明らかにする。

① 拡張抗原提示により活性化した T 細胞の表現型を解析する。

② 拡張抗原提示によって T 細胞を活性化させる際の抗原量と通常の抗原刺激によって T 細胞を活性化させる抗原量は異なっており、各々を抗原提示細胞上の MHC の占有率で比較する。

(3) これまでの実験では抗原提示細胞に放射線照射をした脾臓細胞を用いていたが、抗原提示細胞の種類によって拡張抗原提示による T 細胞の活性化がどのように変化するかを検討する。また、その際の抗原占有率についても検討する。

(4) 少量の抗原-MHC 複合体による TCR 活性化をサポートするような共刺激分子の関与を検討する。

(5) 拡張抗原提示における制御性 T 細胞の関与を検討する。

### 3. 研究の方法

3 種類の TCR トランスジェニックマウス (TEa, OTII, 2D2) 由来の CD4 陽性 T 細胞をその特異抗原 (Ealpha, OVA, MOG) と共に共培養する。特異抗原の濃度や培養条件によって変化する T 細胞の分裂やサイトカイン、共刺激分子の発現を解析する。以下に具体的な方法を述べる。

(1) ① 十分な抗原量に反応して増殖する Responder, ごく少量の抗原に反応して増殖する Associator とともに、特異抗原の全く存在しない Third party T 細胞を共培養し、各々の T 細胞の分裂を確認する。

② これまでは Associator を TEa T 細胞、Responder を OTII T 細胞とし、実験を行って来たが Associator を OTII T 細胞、Responder を TEa T 細胞として実験を行う。

③ TEa, OTII, 2D2 T 細胞に 5ng/ml の IL-2 を添加する。これは拡張抗原提示による T 細胞の活性化が観察される際の IL-2 濃度である。拡張抗原提示による活性化を起こす抗原量

単独では、T 細胞はほとんど分裂しないが、IL-2 添加によって、拡張抗原提示と同等の細胞分裂を起こしうるのか検討する。

④ トランスウェルを用いて、上段に抗原提示細胞と Responder の OTII T 細胞、下段に Ealpha ペプチド、OVA ペプチドと抗原提示細胞と Associator の TEa T 細胞を入れて培養し、拡張抗原提示による Associator の TEa T 細胞の活性化を検討する。

(2) ① 拡張抗原提示によって活性化した T 細胞と通常の抗原提示によって活性化した T 細胞を各々 FACS にて回収し、定量的 PCR によって Foxp3、サイトカインの発現を検討する。

② 分子量の判明している Quantibrite ビーズ (BD) を用いて、拡張抗原提示によって T 細胞を活性化させる際の抗原量と通常の抗原刺激によって T 細胞を活性化させる抗原量を抗原提示細胞上の MHC の占有率で比較する。

(3) 抗原提示細胞に放射線照射をした樹状細胞と B 細胞を用いて拡張抗原提示による T 細胞の活性化を検討する。また、Quantibrite ビーズ (BD) を用いて、抗原占有率についても検討する。

(4) (2) で示された結果より、拡張抗原提示による T 細胞の活性化には通常の T 細胞の活性化とは異なるシグナルを介している可能性が示唆された。共刺激分子のシグナルをブロックする抗体を共培養して、拡張抗原提示による T 細胞の活性化に関与する分子を検討した。

(5) Responder に制御性 T 細胞を含む細胞集団と含まない細胞集団を共培養して比較した。

### 4. 研究成果

(1) ① 共培養系に抗原の存在しない Third party の T 細胞は、Responder、Associator が強く分裂するような条件において分裂しなかった。このことは拡張抗原提示には特異抗原の存在が必須であることを示している。

② Associator を OTII T 細胞、Responder を TEa T 細胞と設定しても、拡張抗原提示による Associator T 細胞の活性化は観察された。よって、この現象は特定の TCR をもつ T 細胞にのみ起こる現象ではないことが示された。

③IL-2 添加のみでは、拡張抗原提示と同様の Associator T 細胞の活性化が誘導されなかった。

④トランスウェルを用いて細胞間接着を阻害すると、拡張抗原提示による Associator T 細胞の活性化は見られなかった。

以上より、拡張抗原提示の T 細胞の活性化は抗原依存的な現象であり、また特定の TCR に限定されない現象であることが示された。

(2) 拡張抗原提示による T 細胞の活性化と通常の抗原提示による T 細胞の活性化との差異を明らかにする。

①拡張抗原提示により活性化した T 細胞は通常の抗原提示によって活性化した T 細胞より Foxp3、IFN-gamma の発現が共に上昇しており、その表現型は明らかに異なっていた。

②拡張抗原提示による活性化に必要な MHC 上の抗原占有率は、通常の抗原刺激に必要な抗原占有率の 10 分の 1 程度であった。

これらより、拡張抗原提示は通常の抗原提示とは全く異なる T 細胞の活性化機構であることが示唆された。また、10 分の 1 の抗原量で T 細胞の活性化が起きているということは、通常の抗原提示とは異なる抗原刺激シグナルを介している可能性が示唆された。

(3) 抗原提示細胞に樹状細胞を用いても B 細胞を用いても拡張抗原提示による T 細胞の活性化は確認された。しかし、樹状細胞の方がより強く T 細胞の活性化を誘導することが示された。抗原提示細胞が樹状細胞であっても B 細胞であっても抗原占有率に差異は認められなかった。

(4) 抗 CD40L 抗体を共培養すると、拡張抗原提示による T 細胞の活性化を部分的に抑制した。これは CD40L シグナルが部分的に拡張抗原提示による T 細胞の活性化に関与していること、また、他の共刺激分子が関与している可能性を示唆した。

(5) Reponder に制御性 T 細胞を含む T 細胞を用いると Responder の分裂は変化しないにもかかわらず、Associator の分裂は著明に抑制された。このことは特定の Responder に対する反応の特異性 (Associator は分裂せず Responder は分裂する) を、Responder と同じ特異性の制御性 T 細胞が保っていることを示

唆していると考えられた。また制御性 T 細胞が抑制能を発揮する際の抗原特異性については意義が定まっていないが、制御性 T 細胞の抗原認識に拡張抗原提示が関与している可能性も示唆された。

以上より、拡張抗原提示の抗原特異性が複数の実験系を用いて示され、特定の TCR に限定した現象ではないことも証明された。MHC の抗原占有率や拡張抗原提示によって活性化した T 細胞の表現型から通常の抗原提示による T 細胞とは異なる活性化のメカニズムを有している可能性が示唆され、CD40L が部分的に関与していた。さらには、制御性 T 細胞が拡張抗原提示に抑制的に作用しており、抗原特異的な反応を制御性 T 細胞が担っている可能性が示唆された。

拡張抗原提示は自己免疫疾患発症の基盤となる自己反応性 T 細胞活性化の細胞レベルでの現象と考えられ、今後は生体内や動物疾患モデルを用いての検討が急務である。炎症に伴いサイトカインなどに依存して、抗原非特異的に T 細胞が活性化する現象である Bystander Activation は生体内での病態惹起性が低いとされているが (Ehl, S., J Exp Med 185:1241-51, 1997.), 拡張抗原提示によって疾患が惹起されることが示されれば、炎症に伴う自己抗原特異的な免疫寛容の破綻が初めて証明されることになる。自己免疫疾患における抗原特異的免疫寛容破綻の機序が解明される意義は大きく、新しい治療戦略にもつながる。

拡張抗原提示による T 細胞の活性化には抗原提示が必須であるが、少量の MHC-抗原複合体しか存在しない条件であることから、活性化を補助および増強する抗原提示細胞上の共刺激分子やサイトカインの関与が想定される。具体的なシグナルが判明すれば特定の分子を阻害することにより、複数の自己抗原に対する免疫応答の進行を阻害できる可能性がある。例えば SLE において抗核抗体出現から抗 2 本鎖 DNA 抗体の出現までには間隔があるが、家族歴などハイリスクの個体の抗核抗体出現時にエピトープスプレディングを阻害することで、SLE 発症の予防が可能となりうる。また制御性 T 細胞の自己抗原認識への拡張抗原提示の関与が解明できれば、特定の自己抗原投与により他の自己抗原に対する免疫応答を抑制する治療法の確立につな

がる可能性がある。

今後のエピトープスプレディングの細胞免疫学的基盤の解明により、自己免疫疾患発症の予測や新しい治療法の開発など臨床応用への展開が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

① Okada Y, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, Kawaguchi T, Stahl EA, Kurreeman FA, Nishida N, Ohmiya H, Myouzen K, Takahashi M, Sawada T, Nishioka Y, Yukioka M, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Tohma S, Takasugi K, Shimada K, Murasawa A, Honjo S, Matsuo K, Tanaka H, Tajima K, Suzuki T, Iwamoto T, Kawamura Y, Tanii H, Okazaki Y, Sasaki T, Gregersen PK, Padyukov L, Worthington J, Siminovitch KA, Lathrop M, Taniguchi A, Takahashi A, Tokunaga K, Kubo M, Nakamura Y, Kamatani N, Mimori T, Plenge RM, Yamanaka H, Momohara S, Yamada R, Matsuda F, Yamamoto K. Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Nat Genet.* 査読有. in press. DOI: 10.1038/ng.2231

② Tanikawa C, Espinosa M, Suzuki A, Masuda K, Yamamoto K, Tsuchiya E, Ueda K, Daigo Y, Nakamura Y, Matsuda K. Regulation of histone modification and chromatin structure by the p53-PADI4 pathway. *Nat Commun.* 査読有. 3:676, 2012. DOI: 10.1038/ncomms1676

③ Okada Y, Shimane K, Kochi Y, Tahira T, Suzuki A, Higasa K, Takahashi A, Horita T, Atsumi T, Ishii T, Okamoto A, Fujio K, Hirakata M, Amano H, Kondo Y, Ito S, Takada K, Mimori A, Saito K, Kamachi M, Kawaguchi Y, Ikari K, Mohammed O W, Matsuda K, Terao C, Ohmura K, Myouzen K, Hosono N, Tsunoda T, Nishimoto N, Mimori T, Matsuda F, Tanaka Y, Sumida T, Yamanaka H, Takasaki Y, Koike T, Horiuchi T, Hayashi K, Kubo M, Kamatani N, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K. A genome-wide association study identified AFF1 as a susceptibility locus for systemic lupus erythematosus in Japanese. *PLoS Genet.* 査読有. 8:e1002455, 2012.

DOI: 10.1371/journal.pgen.1002455

④ Suzuki M, Takahashi T, Katano I, Ito R, Ito M, Harigae H, Ishii N, Sugamura K. Induction of human humoral immune responses in a novel HLA-DR-expressing transgenic NOD/Shi-scid/ $\gamma c^{null}$  mouse. *Int Immunol* 査読有. 24:243-52, 2012. DOI: 10.1093/intimm/dxs045

⑤ 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.* 査読有. 70:512-5, 2011. DOI: 10.1136/ard.2010.130526. 512

⑥ Rabiyousefi M, Soroosh P, Satoh K, Date F, Ishii N, Yamashita M, Oka M, McMurtry IF, Shimokawa H, Nose M, Sugamura K, Ono M. Indispensable roles of OX40L-derived signal and epistatic genetic effect in immune-mediated pathogenesis of spontaneous pulmonary hypertension. *BMC Immunol* 査読有. 12:67, 2011. DOI: 10.1186/1471-2172-12-67

⑦ Nakayama M, Takeda K, Kawano M, Takai T, Ishii N, Ogasawara K. Interaction between NK cells and dendritic cells generate MHC class II-dressed NK cells to regulate CD4<sup>+</sup> T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 査読有. 108:18360-5, 2011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22042851>

⑧ Chagan-Yasutan H, Tsukasaki K, Takahashi Y, Oguma S, Harigae H, Ishii N, Zhang J, Fukumoto M, Hattori T. Involvement of osteopontin and its signaling molecule CD44 in clinicopathological features of adult T cell leukemia. *Leuk Res.* 査読有. 35:1484-90, 2011. DOI: 10.1016/j.leukres.2011.05.011

⑨ Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. The family of IL-10 secreting CD4<sup>+</sup> T cells. *Advances in Immunology.* 査読有. 05:99-130, 2010. DOI: [org/10.1016/S0065-2776\(10\)05004-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2776(10)05004-2)  
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. 査読有. 42:515-9, 2010. DOI: 10.1038/ng.583

⑩ Nakano M, Fukumoto Y, Satoh K, Ito Y, Kagaya Y, Ishii N, Sugamura K, Shimokawa H. OX40 ligand plays an important role in the development of atherosclerosis through vasa vasorum neovascularization. Cardiovasc Res. 査読有. 88:539-46, 2010. DOI:10.1093/cvr/cvq211

⑪ Damayanti T, Kikuchi T, Zaini J, Daito H, Kanehira M, Kohu K, Ishii N, Satake M, Sugamura K, Nukiwa T. Serial OX40 engagement on CD4+ T cells and natural killer T cells causes allergic airway inflammation. Am J Respir Crit Care Med. 査読有. 181:688-98, 2010. DOI:10.1164/rccm.200910-1598OC

⑫ 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. 査読有. 62:574-9, 2010. DOI: 10.1002/art.27190

⑬ 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. 査読有. 68:377-83, 2009. DOI:10.1136/ard.2007.085704

⑭ 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. 査読有. 40:1224-9, 2008. DOI: 10.1038/ng.205

⑮ Mousavi SF, Soroosh P, Takahashi T, Yoshikai Y, Shen H, Lefrançois L, Borst J, Sugamura K, Ishii N. OX40 costimulatory signals potentiate

the memory commitment of effector CD8+ T cells. J Immunol. 査読有. 181:5990-6001, 2008. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18941188>

〔学会発表〕 (計 1 件)

Ishii N. OX40 contributes to the generation and maintenance of memory CD4+ T cells. 第 40 回日本免疫学会学術集会国際シンポジウム. 2011 年 11 月 29 日. 千葉市

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 一彦 (YAMAMOTO KAZUHIKO)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号 : 8 0 1 9 1 3 9 4

### (2) 研究分担者

石井 直人 (ISHII NAOTO)  
東北大学・医学系研究科・教授  
研究者番号 : 6 0 2 9 1 2 6 7

### (3) 連携研究者

なし