

平成21年 5月10日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591155  
 研究課題名（和文） BTLAの自己免疫抑制機構の解明とその臨床応用に向けた基礎的検討  
 研究課題名（英文） Investigation of mechanisms by which BTLA inhibit autoimmunity and its application for the treatment of autoimmune diseases  
 研究代表者  
 氏名（ローマ字）：渡辺 紀彦（WATANABE NORIHIKO）  
 所属機関・部局・職：千葉大学・医学部附属病院・講師  
 研究者番号：20375653

## 研究成果の概要：

最近、我々は新規の抑制性副刺激分子 B and T lymphocyte attenuator (BTLA) を同定した。本研究では BTLA が NKT 細胞に発現していることを初めて見出し、BTLA 欠損マウスでは NKT 細胞依存性自己免疫モデルである conA 肝炎が増悪することを明らかにした。すなわち、BTLA が NKT 細胞の活性化抑制機能を有し、免疫寛容維持に関与していることを示した。この研究成果は、NKT 細胞に発現する BTLA が自己免疫疾患治療の標的となり得ることを示唆しており、BTLA を利用した免疫療法開発に向けた新たな方向性を示せたと考える。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

## 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・感染症内科学

キーワード：BTLA、副刺激分子、自己免疫疾患、免疫寛容、自己抗体、NKT細胞、CD4 T細胞、ノックアウトマウス

## 1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患は人口の約5%が罹患する多因子疾患である。遺伝的素因を持つ個体にウイルス感染などの環境要因が加わることにより免疫寛容が破綻し、自己に対する免疫応答が始動すると考えられているが、その分子基盤は依然不明である。また自己免疫疾患の治療についても、ステロイド薬や免疫抑制剤に加え、近年では抗CD20抗体など生物学的製剤による治療法が進歩し、一定の予後の

改善がもたらされているが、未だ疾患特異的な治療法は存在せず、病態の解明とそれに基づく新規治療法の開発が待たれている。

自己免疫疾患の発症抑制に必須である免疫寛容の維持には、T細胞等に対する抑制性副刺激シグナルが重要な役割を果たしている。抑制性副刺激分子として、これまでにCTLA-4及びPD-1が単離され、それぞれ免疫応答の負の制御に重要な役割を果たしてい

ることが明らかにされている。

近年、研究代表者らは、Th1 細胞に発現する分子を DNA アレイ法にて網羅的に解析し、第 3 番目の抑制性副刺激分子 B and T lymphocyte attenuator (BTLA) を同定した。そして BTLA の生体内での役割を明らかにするため BTLA 欠損マウスを作製し、BTLA 欠損マウスでは実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) が重症化することを報告した。また、BTLA 欠損マウスでは抗原で免疫した際の抗原特異的抗体価が野生型の 3 倍程度上昇することを明らかにし、BTLA が生体内において免疫応答を負に制御していることを示した (Nat. Immunol. 2003)。さらに最近、BTLA のリガンドが、ヘルペスウイルスの細胞内侵入に関わる TNF レセプターファミリー分子 herpesvirus-entry mediator (HVEM) であること、HVEM の homologue であるサイトメガロウイルス蛋白 UL144 が BTLA と結合することが報告された。ウイルス感染は自己免疫疾患発症のトリガーの一つとして知られており、上記の事実よりウイルス蛋白が BTLA-HVEM 結合を阻害して自己免疫疾患の発症に関与している可能性も推測される。

さらに研究代表者らは、BTLA 欠損マウスにおける自己免疫疾患の自然発症の有無を検討し、BTLA 欠損マウスでは、1) 6ヶ月齢頃より抗核抗体や抗DNA抗体などの自己抗体が出現すること、2) 胸腺における正負の選択は正常であるが、末梢における免疫寛容維持が障害されていること、3) 6ヶ月齢程度に達すると、自己免疫性肝炎及びシェーグレン症候群に類似した臓器障害を自然発症し、野生型マウスよりも短命であることを明らかにした (Arthritis Rheum. 2008)。さらに研究代表者らは、ヒト自己免疫疾患発症における BTLA の役割を解析し、日本人の BTLA 遺伝子の 590A/C 単塩基多型と関節リウマチ発症との間に関連があることを明らかにした (論文投稿中)。これらの結果は、BTLA シグナルの欠陥が自己免疫疾患の発症を誘導することを強く示唆するが、BTLA による自己免疫疾患の発症制御機構は依然不明である。

BTLA は他の 2 つの抑制性副刺激分子、CTLA-4 と PD-1 とは、その発現細胞や活性化に伴う発現変化のパターンが異なることから、免疫応答においてそれらとは異なる制御機能を担っていることが示唆される。また自己免疫性肝炎は、CTLA-4 欠損マウスや PD-1 欠損マウスでは認められないことより、BTLA は肝臓における自己免疫応答の制御にユニークな機能を有していることが示唆される。したがって、自己免疫性肝炎発症における

BTLA の役割を解明することにより、BTLA の自己免疫応答及び自己免疫疾患の発症の制御における役割を解明し、他の 2 つの抑制性副刺激分子 CTLA-4 と PD-1 との免疫学的制御機構の差異を明確にすることも可能と考えられる。

NKT 細胞は T 細胞マーカーである T 細胞レセプター (TCR) と NK 細胞マーカーである NK1.1 の両方を発現する T 細胞サブセットであり、マウス NKT 細胞の多くは V $\alpha$ 14 陽性で抗原提示細胞上の CD1d に提示された  $\alpha$ GalCer などの特異抗原に反応すると考えられている。NKT 細胞は活性化すると直ちに大量の IL-4 と IFN $\gamma$  を産生することが知られ、これまで自己免疫性肝炎を始めとする多くの自己免疫疾患の発症に関与しているという報告がある。しかし BTLA が NKT 細胞に発現しているか、また T 細胞や B 細胞と同様に抑制性の機能を有しているかはいまだ不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が単離し、自己免疫応答の抑制に重要な役割を果たしていることを示した抑制性副刺激分子 BTLA による自己免疫疾患発症抑制のメカニズムを解明し、BTLA-HVEM 系を応用した自己免疫疾患に対する新規免疫療法開発の基盤を構築することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究者は、BTLA 欠損マウスでは自己抗体と唾液腺や肺への炎症細胞浸潤の出現に加え、自己免疫性肝炎 (AIH) 様の肝障害が自然発症することに着目し、BTLA が肝においていかに免疫寛容を維持し自己免疫を抑制しているかの解明を目指した。本研究では、以下のプロトコールにより、自己免疫性肝炎発症における BTLA の NKT 細胞における役割を解析した。

(a) マウス NKT 細胞における BTLA の発現をフローサイトメトリーにより解析する。

(b) BTLA 欠損マウスおよび野生型マウスより NKT 細胞を単離し、*in vitro* における  $\alpha$ GalCer 刺激による IL-4、IFN- $\gamma$  等のサイトカイン産生能を比較する。

(c) NKT 細胞依存性のヒトの自己免疫性肝炎モデルである conA 肝炎を BTLA 欠損マウスに誘導し、BTLA の欠陥が NKT 依存性自己免疫応答に及ぼす影響を及ぼすか検討する。

(d) BTLA 欠損マウスを NKT 細胞欠損マウス (Ja281 欠損マウス) と交配し、conA 肝炎の発症が抑制されるか否かを検討する。

#### 4. 研究成果

長期飼育中に、自己免疫性肝炎 (AIH) を自然発症したBTLA欠損マウスの肝臓内の単核細胞についてフローサイトメトリーにより解析すると、BTLA欠損マウスの肝臓には主に活性化したNKT細胞とCD4陽性T細胞が浸潤していた (Arthritis Rheum. 2008)。

そこでNKT細胞にはBTLAが発現し、機能している可能性が高いと考え、野生型マウスの胸腺、脾臓、肝臓内のNKT細胞におけるBTLAの細胞表面発現を抗BTLA抗体によるフローサイトメトリーにより解析したところ、いずれの臓器においてもNKT細胞はBTLAを発現していることが判明した。免疫系細胞では、BTLAの表面発現レベルはB細胞が最も高く、NK細胞にはほとんど発現が見られなかった。NKT細胞はB細胞ほどではないが、T細胞に匹敵するレベルのBTLAを発現していることが明らかとなった (図1)。

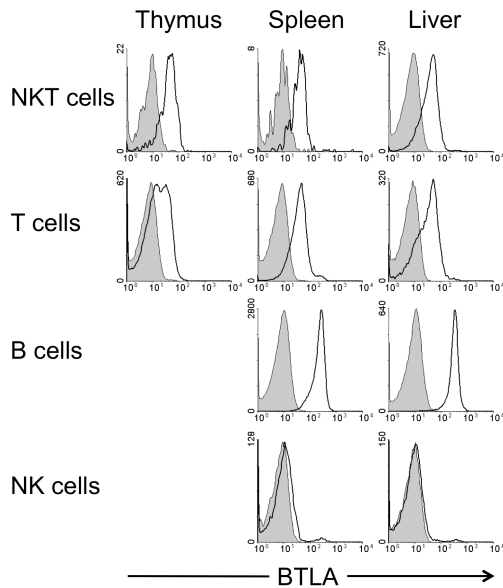


図1 NKT細胞におけるBTLAの発現

そこでBTLAはNKT細胞において何らかの役割を果たしていると考え、まずNKT細胞の分化や活性化におけるBTLAの役割を検討した。しかしBTLA欠損マウスでも野生型と同様にNKT細胞が存在し、活性化マーカーの発現レベルも同等であることから、BTLAの欠陥はNKT細胞の分化や活性化といった生体内でのホメオスタシスに対しては明らかな影響を及ぼさないことが明らかとなった (data

not shown)。

次にin vitroにおけるBTLAのNKT細胞機能における役割を検討するために、抗原刺激時のNKT細胞よりのサイトカイン産生を検討した。その結果、BTLA欠損マウス由来のNKT細胞は野生型マウス由来のNKT細胞に比べ、特異的抗原 ( $\alpha$ GalCer) 刺激の際有意にIFN $\gamma$ やIL-4を多く産生することが判明した (図2)。すなわち、BTLAはNKT細胞においても、抗原刺激依存性活性化に対して抑制的に機能していることが示唆された。

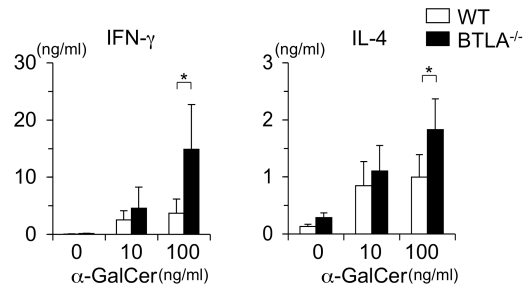


図2 抗原刺激時のBTLA欠損マウス由来NKT細胞のサイトカイン過剰産生

そこで、in vivoにおけるNKT細胞上のBTLAの役割を明らかにするために、BTLA欠損マウスにNKT細胞依存性のヒトのAIHモデルであるconA肝炎を誘導した。するとBTLA欠損マウスでは野生型マウスに比べconA肝炎が著明に悪化し、野生型マウスでは標準法でのconA注射に対して、肝障害が見られるも死亡するマウスがいなかったのに対し、BTLA欠損マウスは全例が24時間以内に死亡した (図3)。

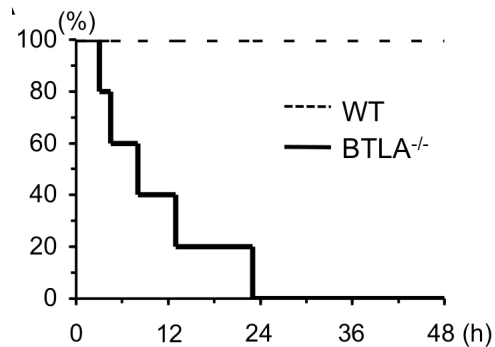


図3 conA肝炎誘導時の生存曲線

これらの実験結果は、BTLAによる肝内NKT

細胞の活性化抑制がAIHやconA肝炎の発症抑制に関与している可能性を示唆している。

さらにBTLA欠損マウスにconA肝炎を誘導させた際の免疫応答について詳細に検討するために、標準法の半量の非致死量のconAをBTLA欠損マウスに投与して、肝臓の病理像や血清中サイトカインについて解析した。その結果、BTLA欠損マウスでは、野生型マウスと比較し、著明な肝細胞壊死と門脈領域の単核球浸潤を認めた(図4)。

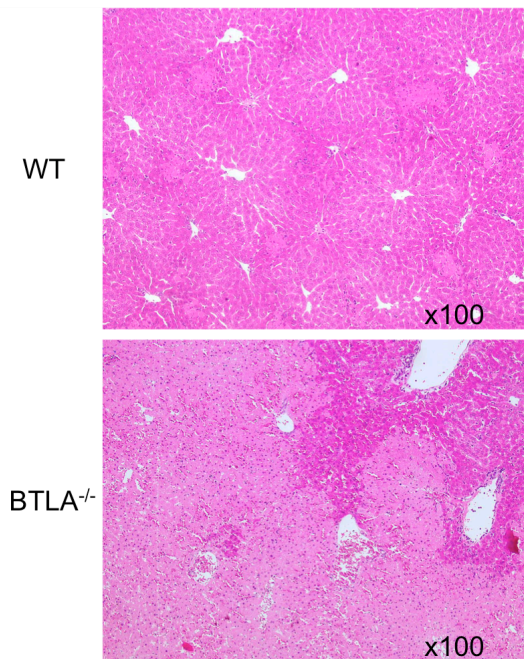


図4 conA肝炎誘導時のBTLA欠損マウスの肝病理所見

またBTLA欠損マウスではconA肝炎誘導時の血清中IFN $\gamma$ 、IL-4レベルが野生型マウスより有意に高いことが判明した。血清中TNF $\alpha$ レベルも野生型よりも高く、上昇が遷延する傾向が見られた(図5)。

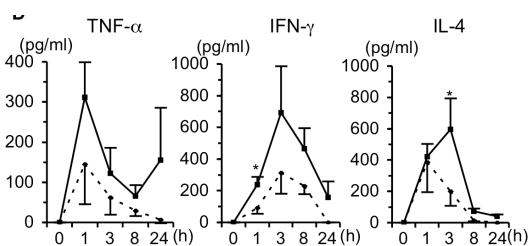


図5 conA肝炎誘導時の血清中サイトカインレベル(実線: BTLA欠損マウス、破線: 野生型マウス)

これらのサイトカインはconA肝炎においてNKT細胞依存性肝障害に重要な役割を果たしている事が知られており、BTLA欠損マウスにおける、著明な肝細胞壊死を説明する一つの機序と考えられる。

次にBTLA欠損マウスをNKT細胞欠損マウス(J $\alpha$ 281欠損マウス)と交配し、conA肝炎の発症が抑制されるか否かを検討した。その結果、BTLA/NKT細胞ダブル欠損マウスではconA肝炎の発症が完全に抑制されることが明らかとなった(図6)。すなわちBTLAが欠損する個体でも、NKT細胞が存在しなければ、conA肝炎が発症しないことが判明した。

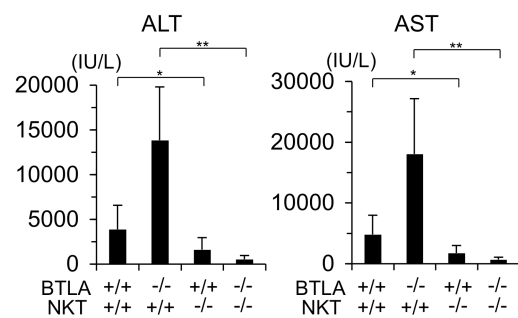


図6 BTLA/NKT細胞ダブル欠損マウスにおけるconA肝炎発症抑制

さらにNKT細胞の細胞移入実験により、NKT細胞におけるBTLAの発現が、conA肝炎の抑制に必須であることが明らかとなった(data not shown)。すなわち、BTLAは、T細胞の活性化抑制のみでなく、NKT細胞の活性化抑制にも関与し、肝における自己免疫応答を抑制していることが明らかになった。最近アメリカのグループより、BTLAリガンドであるHVEMの欠損マウスでも、conA肝炎に対する感受性亢進が見られることが報告された。このことはNKT細胞上のBTLAを介した抑制シグナルがconA肝炎を抑制するという我々の研究結果によく一致する。

以上の研究成果は、NKT細胞に発現するBTLAが自己免疫疾患治療の標的となり得ることを示唆しており、BTLA-HVEM(BTLAリガンド)系を利用した免疫療法開発に向けた新たな方向性を示せたと考える。

## 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5件)

- (1) Oya Y, Watanabe N, Hirose K, Suto A, Kagami S-i, Iwamoto I, Nakajima H (他6名) Development of Autoimmune Hepatitis-like Disease and Autoantibody Production to Nuclear Antigens in Mice Lacking B and T Lymphocyte Attenuator (BTLA) **Arthritis Rheum.** 58; 2498-2510, 2008 査読有
- (2) Suto A, Kagami S-I, Hirose K, Watanabe N, Iwamoto I, Nakajima H (他5名) Development and characterization of IL-21-producing CD4<sup>+</sup> T cells **J. Exp. Med.** 205; 1369-1379, 2008 査読有
- (3) Furuta S, Kagami S, Hirose K, Watanabe N, Nakajima H (他5名) Overlapping and distinct roles of STAT4 and T-bet in the regulation of T cell differentiation and allergic airway inflammation **J. Immunol.** 180; 6656-6662, 2008 査読有
- (4) Furuta S, Kagami S, Hirose K, Watanabe N, Nakajima H (他5名) Overlapping and distinct roles of STAT4 and T-bet in the regulation of T cell differentiation and allergic airway inflammation **J. Immunol.** 180; 6656-6662, 2008 査読有
- (5) Tokumasa N, Suto A, Kagami S-i, Watanabe N, Iwamoto I, Nakajima H (他4名) Expression of Tyk2 in dendritic cells is required for IL-12, IL-23, and IFN- $\gamma$  production and the induction of Th1 cell differentiation **Blood** 110;553-560, 2007 査読有

[学会発表] (計1件)

- (1) 岩田有史, 渡辺紀彦, 大矢佳寛, 須藤明, 廣瀬晃一, 中島裕史 (他5名) 「NKT細胞における BTLA の役割」日本免疫学会総会・学術集会 2008年12月1日 国立京都国際会館

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.jp/class/gene/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡辺 紀彦 (WATANABE NORIHIKO)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20375653

### (2) 研究分担者 (2007年度のみ)

廣瀬 晃一 (HIROSE KOHICHI)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90400887

中島 裕史 (NAKAJIMA HIROSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：00322024

### (3) 連携研究者 (2008年度のみ)

廣瀬 晃一 (HIROSE KOHICHI)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90400887

中島 裕史 (NAKAJIMA HIROSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：00322024