

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月19日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591263

研究課題名（和文） BTLAによる免疫抑制機構の解明と免疫療法の開発

研究課題名（英文） Investigation of mechanisms by which BTLA inhibit autoimmunity and development of potential therapeutic applications

研究代表者

渡辺 紀彦（WATANABE NORIHIKO）

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：20375653

研究成果の概要（和文）：

最近、我々はリンパ球上に発現する新規の抑制性副刺激分子 B and T lymphocyte attenuator (BTLA) を同定した。本研究では自己免疫疾患モデルマウスである MRL/lpr マウスの病態に BTLA が抑制的に作用していることを明らかにした。さらに、BTLA が樹状細胞に発現し、樹状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、BTLA が自己免疫疾患治療の標的となり得ることを示しており、BTLA を利用した免疫療法開発に向けた基盤を構築したと言える。

研究成果の概要（英文）：

Recently, we have identified B and T lymphocyte attenuator (BTLA) as a novel inhibitory coreceptor expressed on lymphocytes. In this study, we found that the lack of BTLA exaggerates the systemic autoimmunity in lupus-prone MRL-*lpr/lpr* mice. In addition, we found that BTLA is also expressed on dendritic cells and serves inhibitory functions in dendritic cells. These results demonstrate that BTLA plays a protective role in autoimmune diseases and also suggest potential therapeutic applications of BTLA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、樹状細胞、MRL/lpr マウス、ノックアウトマウス、自然免疫

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患は50種以上の疾患から成り立つ、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惹起さ

れ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、免疫系細胞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。抑制性副刺激シグナルを細胞内に伝達す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解析するため 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 (Clin Dev Immunol. 2011)。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抑制機構の詳細は依然不明である。

MRL/lpr マウスは Fas 遺伝子に変異を有する突然変異マウスであり、異常 T 細胞の蓄積による著しいリンパ節腫大を引き起こす。多彩な臓器障害を来し、抗 DNA 抗体や RF などの自己抗体を産生する事から、ヒトの全身性エリテマトーデス (SLE) や関節リウマチ (RA) などの自己免疫疾患のモデル動物として知られる。MRL/lpr マウスの病態として抑制性副刺激シグナルの欠陥が想定されているが、同マウスにおける自己免疫疾患の発症

における BTLA の役割はいまだ不明である。

樹状細胞 (DC) は樹状突起を有する MHC クラス II 陽性の免疫細胞で、生体内に広く分布している。病原性微生物や癌細胞などを認識した未熟樹状細胞は成熟樹状細胞となり、強力な抗原提示細胞として獲得免疫応答を誘導するとともに自然免疫応答を活性化し、これらを排除する。一方、定常状態では未熟樹状細胞は自己に対する免疫寛容を誘導する免疫寛容誘導性抗原提示細胞として、免疫学的恒常性の維持にも重要な役割を果たしている。しかし BTLA が樹状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

研究代表者は、まず SLE/RA 型自己免疫疾患モデルマウスにおいて BTLA シグナルの欠陥がいかに関免疫寛容を破綻し自己免疫を発症させるのか解明を目指した。この研究では、以下のプロトコールにより、自己免疫疾患発症における BTLA の役割を解析した。

(a) MRL/lpr マウスと BTLA ノックアウトマウスを交配し、MRL/lpr 背景かつ BTLA を欠損するマウスを作製、長期飼育し生存期間の変化を解析する。

(b) BTLA 欠損 MRL/lpr マウスおよび BTLA 野生型 (以下野生型) MRL/lpr マウスの胸腺細胞、脾臓細胞をフローサイトメトリーにより解析し、免疫系細胞の分化増殖につき比較する。

(c) BTLA 欠損 MRL/lpr マウスおよび野生型 MRL/lpr マウスの血中 IgG 値や自己抗体価を定量し、血清学的異常につき検討する。

(d) BTLA 欠損 MRL/lpr マウスおよび野生型 MRL/lpr マウスの諸臓器における自己免疫性病変を病理学的に解析する。

次に、樹状細胞における BTLA の役割を解明するために、BTLA 欠損マウスおよび野生型マウスより樹状細胞を単離し以下の検討をおこなった。

(e) リンパ球系樹状細胞、骨髄球系樹状細胞、形質細胞様樹状細胞の各サブセットにおける BTLA の発現の有無をフローサイトメトリ

一により解析する。

(f) BTLA 欠損マウスおよび野生型マウスより骨髓由来樹状細胞 (BMDC) を作製し、刺激時のサイトカイン産生を測定する。T 細胞と樹状細胞を混合培養し、抗原提示能を比較する。
(g) BTLA 欠損マウスおよび野生型マウスに樹状細胞依存性疾患モデルである DSS 誘導腸炎を誘導し、生存率や病理スコアの変化を比較する。

4. 研究成果

MRL/lprマウスの自己免疫疾患発症におけるBTLAの役割を検討するため、BTLA欠損MRL/lprマウスを作製したところ、野生型MRL/lprマウスの生存率が5ヶ月齢で75%であったのに対し、BTLA欠損MRL/lprマウスでは32%と有意に短縮していた (図1)。

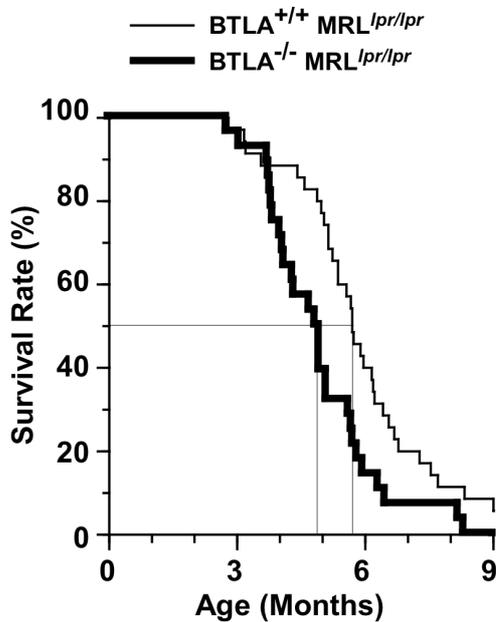


図1 BTLA欠損MRL/lprマウスの生存曲線

さらに胸腺および脾臓における免疫系細胞の分化増殖について検討したところ、胸腺細胞の分化にBTLA欠損MRL/lprマウスと野生型MRL/lprマウス間で相違はなかったが、脾臓においてはBTLA欠損MRL/lprマウスではCD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、lpr細胞の増加が見られ、著明な脾腫を呈していた (脾臓重量: BTLA欠損MRL/lprマウス = $1555 \pm 432\text{mg}$ 、野生型MRL/lprマウス = $896 \pm 333\text{mg}$) (図2)。

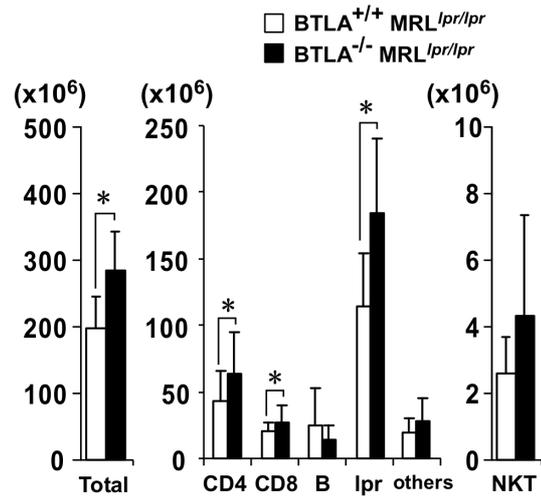


図2 BTLA欠損MRL/lprマウスの脾臓におけるリンパ球増多。 (* $p < 0.05$)

長期飼育したBTLA欠損MRL/lprマウスおよび野生型MRL/lprマウスより血清を採取し、ELISA法によりIgG、IgM型リウマチ因子、抗dsDNA抗体価を測定したところ、4ヶ月齢の時点で、BTLA欠損MRL/lprマウスでは有意に上昇していることが判明した (総IgG: BTLA欠損MRL/lprマウス = $2180 \pm 289\text{mg/dl}$ 、野生型MRL/lprマウス = $1707 \pm 234\text{mg/dl}$ 、IgM RF: BTLA欠損MRL/lprマウス = $890 \pm 327\text{mU/ml}$ 、野生型MRL/lprマウス = $159 \pm 65.3\text{mU/ml}$ 、抗dsDNA抗体: BTLA欠損MRL/lprマウス = $916 \pm 331\text{U/ml}$ 、野生型MRL/lprマウス = $575 \pm 189\text{U/ml}$) (図3)

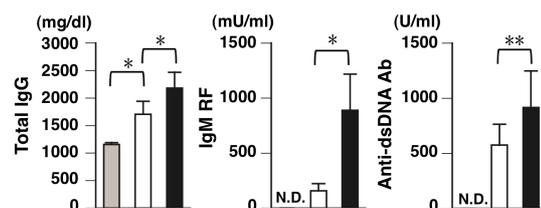


図3 BTLA欠損MRL/lprマウスにおける血清中IgG、自己抗体の上昇 (灰: BALB/Cマウス、白: 野生型MRL/lprマウス、黒: BTLA欠損MRL/lprマウス。* $p < 0.01$ 、** $p < 0.05$)

次にBTLA欠損MRL/lprマウスにおけるリンパ増殖性変化の発症について検討したところ、野生型MRL/lprマウスにて自然発症する唾液腺、肺、腎臓における炎症細胞浸潤が、BTLA欠損MRL/lprマウスでは著明に悪化していた (図4)。これらのことはMRL/lpr

マウスにおけるリンパ増殖性変化はBTLAにより抑制されていたことを示す。

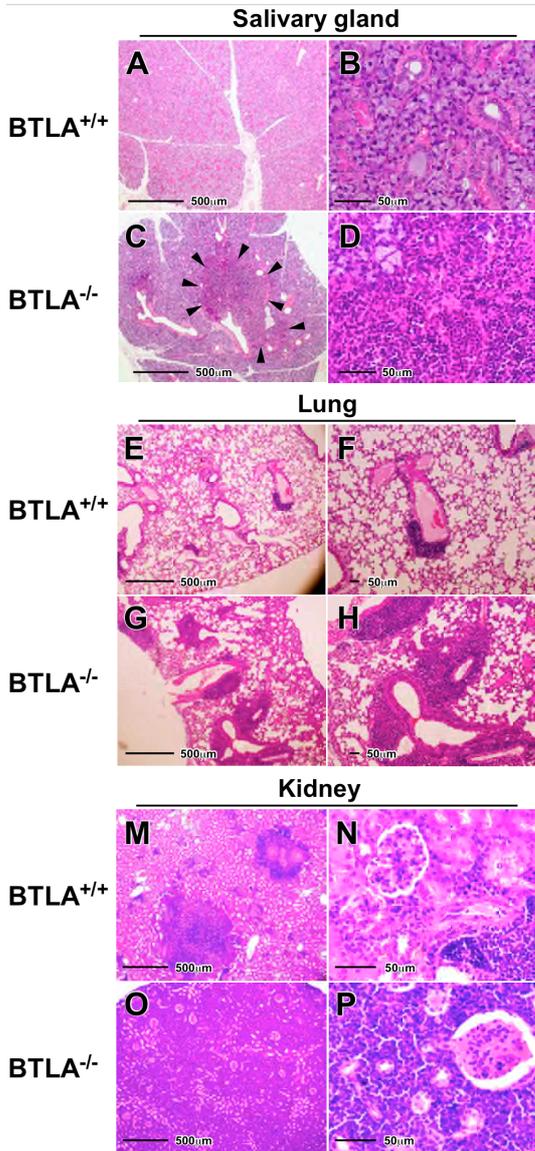


図4 BTLA欠損MRL/lprマウスにおけるリンパ増殖性変化の増悪 矢印は炎症細胞浸潤巣を示す

また、BTLA欠損MRL/lprマウスでは病理学的にAIHに一致する激しい肝障害を発症していることを見出している。

次に、樹状細胞活性化制御におけるBTLAの機能を解明し、自己免疫反応の諸相におけるBTLAの役割を明らかにすることを試みた。まず野生型マウスより脾臓細胞を採取し、フローサイトメトリーにより解析した

ところ、樹状細胞はいずれのサブセット（リンパ球系樹状細胞、骨髄球系樹状細胞、形質細胞様樹状細胞）もBTLAを発現していることが判明した（図5）。

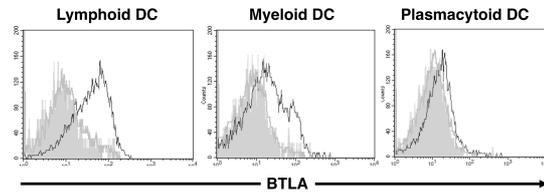


図5 樹状細胞におけるBTLAの発現（灰：陰性コントロール、細線：野生型マウス、太線：BTLA欠損マウス）

そこで野生型マウスおよびBTLA欠損マウスより骨髄由来樹状細胞(BMDC)を作製、刺激時のサイトカイン産生やT細胞に対する抗原提示能を検討した。その結果BTLAはBMDCの活性化やサイトカイン産生を抑制すること、抗原提示能を抑制していることが明らかになった（図6）。

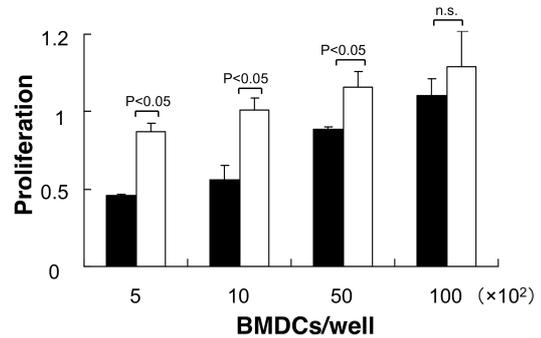


図6 BTLA欠損マウス由来樹状細胞における抗原提示能亢進（黒：野生型マウス、白：BTLA欠損マウス）

さらに生体内でのBTLAの樹状細胞における役割を検討するために、BTLA欠損マウスにおける樹状細胞依存性疾患モデルであるDSS誘導腸炎の発症を検討した。その結果、BTLA欠損マウスではDSS誘導腸炎の感受性が野生型マウスに比べ著しく上昇していることが明らかになった（図7）。

以上のように、BTLAは自己免疫疾患モデルマウスの多彩な自己免疫応答の発症に関与しており、さらに樹状細胞の活性化抑制にも関与し、樹状細胞を介した免疫応答を

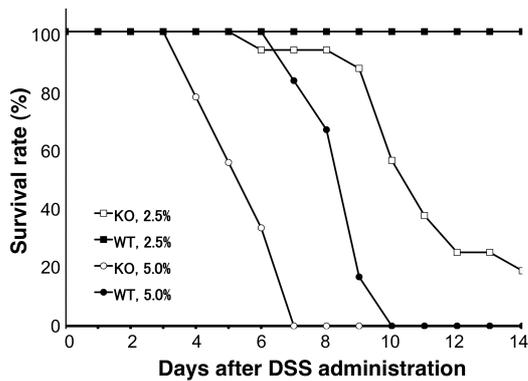


図7 BTLA 欠損マウスにおける DSS 腸炎感受性亢進

制御していることが判明した。これらの研究によりBTLAを利用して自己免疫疾患を治療する際のBTLA-HVEM(BTLA ligand)系を応用した新規免疫療法開発の基盤を構築できたと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

- (1) Oki M, Watanabe N, Owada T, Oya Y, Ikeda K, Nakajima H (他3名). A functional polymorphism in B and T lymphocyte attenuator is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis. **Clin Dev Immunol** 2011: 305656, 2011. 査読有
- (2) Oya Y, Watanabe N, Kobayashi Y, Owada T, Hirose K, Nakajima H (他5名). Lack of B and T lymphocyte attenuator exacerbates autoimmune disorders and induces Fas-independent liver injury in MRL-*lpr/lpr* mice. **Int. Immunol.** 23: 335-344, 2011. 査読有
- (3) Kanari H, Kagami S, Kashiwakuma D, Oya, Hirose K, Watanabe N, Nakajima H (他7名). Role of Th2 cells in IgG4-related lacrimal gland enlargement. **Int Arch Allergy Immunol** 152: 47-53, 2010. 査読有
- (4) Kashiwakuma D, Suto A, Hiramatsu Y, Ikeda K, Hirose K, Watanabe N, Nakajima H (他4名). B and T Lymphocyte Attenuator Suppresses IL-21 Production from Follicular Th Cells and Subsequent Humoral Immune Responses. **J. Immunol.** 185: 2730 – 36, 2010. 査読有
- (5) Hiramatsu Y, Suto A, Kashiwakuma D, Hirose K, Watanabe N, Nakajima H (他6名). c-Maf activates the promoter and enhancer of the IL-21 gene, and TGF- inhibits c-Maf-induced IL-21 production in CD4⁺ T cells. **J Leukoc Biol** 87:703-712, 2010. 査読有
- (6) Iwata A, Watanabe N, Oya Y, Owada T,

Ikeda K, Suto A, Hirose K, Nakajima H (他6名). Protective roles of B and T lymphocyte attenuator in NKT cell-mediated experimental hepatitis. **J. Immunol.** 184:127-133, 2010. 査読有

- (7) Owada T, Watanabe N, Oki M, Oya Y, Murphy KM, Nakajima H (他4名). Activation-induced Accumulation of B and T Lymphocyte Attenuator at the Immunological Synapse in CD4⁺ T Cells. **J Leukoc Biol** 87:425-432, 2010 査読有
- (8) Kagami S-I, Owada T, Kanari H, Hirose K, Watanabe N, Nakajima H (他4名). Protein geranylgeranylation regulates the balance between Th17 cells and Foxp3+ regulatory T cells. **Int Immunol** 21:679-689, 2009 査読有
- (9) Tamachi T, Takatori H, Fujiwara M, Hirose K, Watanabe N, Nakajima H (他4名). STAT6 inhibits T-bet-independent Th1 cell differentiation. **Biochem Biophys Res Commun** 382:751-755, 2009 査読有

〔学会発表〕(計1件)

- (1) 渡辺紀彦 「BTLA による自己免疫応答制御」第59回日本アレルギー学会秋季学術大会 2009年9月30日 秋田キャッスルホテル

〔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・大学院医学研究院・准教授
 研究者番号：20375653

- (2) 研究分担者
 (2009年度のみ)
 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

- (2009-2010年度のみ)
 廣瀬 晃一 (HIROSE KOHICHI)
 千葉大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：90400887
 花岡 英紀 (HANAOKA HIDEKI)
 千葉大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：80361426