「生体防御のメカニズム」
平成７年度採択研究代表者

奥村　康

（順天堂大学医学部　教授）

「免疫系と神経・内分泌系の立体的分子機構の解明」

１．研究実施の概要

ヒトTRAILが抗CD3抗体+IFNα/β処理により末梢リンパ球にTRAILの発現誘導が認められ、ヒト腎癌細胞におけるIFNα/β治療により誘導される腫瘍破壊の一つのメカニムズであることが明かとなった。TNFレセプターを介するNF-κBの活性化のメカニズムを明かにするためにTRAF2/TRAF5のダブルノックアウトマウスを作製し、それ由来の胎児線維芽細胞を用いた実験から、TNFレセプターを介するシグナル伝達系にはTRAF2とTRAF5が関与しており、一部のシグナル伝達系はTRAF2とTRAF5が相補的に働いていることが初めて明かとなった。NK細胞の一つの活性化のメカニズムを明かにし、NKT細胞がConA誘導性肝炎の発病に必須の細胞であることを明かにした。OX40/OX40L相互作用がリーシュマニア寄生虫感染症におけるTh2反応に必須の分子であることを明かにした。免疫系の恒常性維持におけるIL-1ra（IL-1レセプターアンタゴニスト）の役割を明かにするためにIL-1raKOマウスを作製した。IL-1raノックアウトマウスはBalb/cバックグラウンドにすることにより、ほぼ100%関節炎を発病した。このメカニズムとしてはIL-1raが欠損するとIL-1シグナルが過剰にはいるようになり、他の炎症性サイトカインの分泌を促し、これらが総合的に、免疫系を活性化すると共に破骨細胞を活性化し、関節炎を発症させることが明かとなった。

２．研究実施内容

１）ヒトTRAILの発現を正常末梢血リンパ球において調べた結果、未刺激状態のリンパ球においてはTRAILの発現は認められないものの、抗CD3抗体とIFNα/βの同時刺激によりCD4陽性およびCD8陽性T 細胞ともに著明な発現誘導の認められることが明らかとなった。さらにIFNα/βは主に腎癌の治療に用いられており、腎癌由来の種々の細胞株へのTRAILに対する感受性の有無を検討しところ、TRAIL遺伝子導入細胞あるいは抗CD3抗体+INFα/β処理によりTRAILの発現を誘導した末梢リンパ球は腎癌由来の細胞株に対して強い細胞障害活性を示した。このことから、腎癌治療におけるIFNα/βの治療のメカニズムの一つとしてTRAILの発現誘導によるものが考えられた。

さらにマウスTRAILに対するモノクローナル抗体を作製し、その解析からマウスにおいてはIL-2およびIL-15により活性化されたNK細胞にのみ発現が誘導され、TRAIL感受性標的細胞に強い細胞障害活性を示すことが明かとなった。

2）TRAF2およびTRAF5のそれぞれ単独のノックアウトマウスの解析から、TNFを介するNF-κBの活性化には大きな障害が認められなかったことより、TNFレセプターを介するNF-κBの活性化には両者が相補的に働いている可能性を考え、TRAF2およびTRAF5のダブルノックアウトマウスを作製した。DKOマウス胎児由来の線維芽細胞はTNFによるNF-κBの活性化が著明に現弱していることが明らかとなった。またTNF誘導性の細胞死に対して著明に感受性が上昇していることが明かとなった。これらのことより、TNFレセプターを介するシグナル伝達系にはTRAF2とTRAF5が関与しており、一部のシグナルはTRAF2とTRAF5が相補的に働いていることが初めて明かとなった。

3）マウスNK細胞の活性化にかかわるTNFレセプターファミリー分子を検討した結果、CD27が恒常的にNK細胞に発現していることが明かとなった。このCD27を介したシグナルを導入することで、NK細胞の増殖およびIFNγ産生が認められ、さらにNK1.1に対するアゴニステイックな抗体との同時投与によりそれらは増強されることが明かとなった。さらにアゴニステイックな抗CD27抗体投与単独ではNK細胞の細胞障害活性は上昇しないものの、抗CD27抗体と前処理することにより、産生されたIFNγを介して細胞障害活性が上昇することが明かとなった。またNKT細胞の存在しないCD1ノックアウトマウスはConA誘導性の肝炎が発症しないこと、およびNKT細胞をこのマウス肝臓に直接移入することにより肝炎が誘導できることから、NKT細胞がConA誘導性肝炎に必須の役割を果たしている細胞であることが明かとなった。

4）Balb/cマウスにおけるリーシュマニア感染症はTh2疾患の寄生虫感染モデルであり、この疾患モデルにおけるOX40/OX40Lの役割を検討した。その結果コントロール抗体および他のTNFファミリーに属する抗CD70, CD30L, 4-1BBL抗体などの投与によっては、疾患は改善は認められなかったもののOX40L抗体投与により、著明な改善が認められた。抗体投与群のT細胞を用いた検討からOX40L抗体投与群においてIL-4などのTh2 typeのサイトカインおよび血液中のIgEが低下していた。このことより、すくなくともリーシュマニア感染症においてはOX40/OX40L相互作用がTh2反応には必須の役割を果たしていることが明かとなった。

5）免疫系の恒常性維持におけるIL-1raの役割を明かにするためにIL-1raKOマウスを作製した。IL-raKOマウスはBalb/c バックグラウンドにすることにより、加齢と共に関節炎を発症し、10週頃には、ほぼ100％のマウスが発症した。関節では、滑膜細胞の旺盛な増殖と骨・軟骨の破壊が認められた。また、滑膜組織、関節腔に

は、好中球を中心とした炎症性細胞の浸潤が認められ、関節腔にはfibrin clot の沈着が認められた。これらの所見は、ヒトの関節リウマチと良く似たものであった。血中の自己抗体価を測定したところ、IgG、２型コラーゲン、DNAなどに対する抗体価が高いことがわかった。関節におけるサイトカインの発現を調べたところ、IL-1raKOマウスでは、IL-1や、IL-6、TNF- αなどの炎症性サイトカインの発現が亢進していることがわかった。この結果は、IL-1raが通常IL-1の作用を阻害することによって、これらのサイトカインの分泌をも調節していることを示している。以上の結果は、IL-1raが欠損するとIL-1シグナルが過剰にはいるようになり、その結果、他の炎症性サイトカインの分泌を促し、これらが総合的に、免疫系を活性化すると共に破骨細胞を活性化し、関節炎を発症させることを示唆する。これらの所見は、IL-1raが免疫系の調節因子として、きわめて重要な役割を担っていることを示している。

３．主な研究成果の発表（論文発表）

○Morimoto, S., Y. Kanno, Y. Tanaka, Y. Tokano, H. Hashimoto, S. Jacquot, C. Morimoto, S. F. Schlossman, H. Yagita, K. Okumura, and T. Kobata. CD134L engagement enhances human B cell Ig production: CD154/CD40, CD70/CD27, and CD134/CD134L interactions coordinately regulate T cell-dependent B cell responses. J Immunol. 164:4097-104, 2000.

○Satake, Y., H. Akiba, K. Takeda, M. Atsuta, H. Yagita, and K. Okumura. Characterization of rat OX40 ligand by monoclonal antibody. Biochem Biophys Res Commun. 270:1041-8, 2000.

○Takeda, K., H. Oshima, Y. Hayakawa, H. Akiba, M. Atsuta, T. Kobata, K. Kobayashi, M. Ito, H. Yagita, and K. Okumura. CD27-mediated activation of murine NK cells. J Immunol. 164:1741-5, 2000.

○Tsukada, N., H. Akiba, T. Kobata, Y. Aizawa, H. Yagita, and K. Okumura. Blockade of CD134 (OX40)-CD134L interaction ameliorates lethal acute graft-versus-host disease in a murine model of allogeneic bone marrow transplantation. Blood. 95:2434-9, 2000.

○Akiba, H., Miyahira, Y., Atsuta, M., Takeda, K., Nohara, C., Futagawa, T., Matsuda, H., Aoki, T., Yagita, H. and Okumura, K. Critical contribution of OX40 ligand to T helper 2 cell type 2 differentiation in experimental leishmaniasis. J. Exp.Med. 191:375-380, 2000.

○Sanz, L. M., T. Diaz-Meco, H. Nakano, and J. Moscat. The Atypical PKC-interacting Protein p62 Channels NF-kB Activation by the IL-1/TRAF6 Pathway. EMBO, 19;1576-1586, 2000.

○Morio, T., S. H. Hanissian, L. B. Bacharier, H. Teraoka, S. Nonoyama, M. Seki, J.

Kondo, H. Nakano, S.-K. Lee, R. S. Geha, and J.-I. Yata. Ku in the Cytoplasm Associates with CD40 in Human B Cells and Translocates into the Nucleus Following Incubation with IL-4 and Anti-CD40 mAb. Immunity 11; 339-348, 1999.

○Nakano H., S. Sakon, H. Koseki, T. Takemori, K. Tada, M. Matsumoto, E. Munechika, T. Sakai, T. Shirasawa, H. Akiba, T. Kobata, S. M. Santee, C. F. Ware, P. D. Rennert, M. Taniguchi, H. Yagita, and K. Okumura. Targeted Disruption of Traf5 gene Causes Defects in CD40- and CD27-mediated Lymphocyte Activation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96; 9803-9808, 1999.

○Tsukada, N., T. Kobata, Y. Aizawa, H. Yagita, and K. Okumura. Graft-versus-leukemia (GVL) effect and graft-versus-host disease (GVHD) can be differentiated by cytotoxic mechanisms in a murine model of allogeneic bone marrow transplantation. Blood, 93: 2738-2747, 1999.

○Suzuki, N., A. Nakajima, S. Yoshino, K. Matsushima, H. Yagita, and K. Okumura Selective accumulation of CCR5+ T lymphocytes into inflamed jount of rheumatoid arthritis. Int. Immunol., 11: 553-559, 1999.

○Kayagaki, N., N. Yamaguchi, M. Nakayama, A. Kawasai, H. Akiba, K. Okumura, and H. Yagita Involvement of TRAIL in human CD4+ T cell-mediated cytotoxicity. J. Immunol., 162; 2639-2647, 1999.

○Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Nakayama, M., Eto, H., Okumura, K. and H. Yagita. Type I Interferones (IFNs) Regulate Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) Expression on Human T Cells: A Novel Mechanism for the Antitumor Effects of Type I IFNs. J. Exp. Med. 189:1451-1460, 1999.

○Kodama, T., K. Takeda, O. Shimozato, Y. Hayakawa, M. Atsuta, K. Kobayashi, M. Ito, H. Yagita, and K. Okumura. Perforin-dependent NK cell cytotoxicity is sufficient for anti-metastatic effect of IL-12. Eur. J. Immunol. 29:1-7, 1999.

○Hatakeyama, S., M. Kitagawa, K. Nakayama, M. Shirane, M. Matsumoto, K. Hattori, H. Higashi, H. Nakano, K. Okumura, K. Onoe, R. A. Good, and K.-I. Nakayama. Ubiquitin-dependent degradation of IκB is mediated by a novel ubiquitin ligase SCF^{FWD1}. Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 3859-3863, 1999.

○Shimozato, O., K. Takeda, H. Yagita, and K. Okumura Expression of CD30 ligand (CD153) on murine activated T cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 256: 519-526, 1999.

○Jin, D.-Y., V. Giordano, K. V. Kibler, H. Nakano, and K.-T. Jeang. Role of Adapter Function in Oncoprotein-mediated Activation of NF-κB. HUMAN T-CELL LEUKEMIA VIRUS TYPE I Tax INTERACTS DIRECTLY WITH IκB KINASE γ.

J. Biol. Chem. 274 17402-17405, 1999.

○Akiba, H., H. Oshima, K. Takeda, M. Atsuta, H. Nakano, A. Nakanjima, C. Nohara, H. Yagita, and K. Okumura. CD28-independent costimulation of T cells by OX40 ligand and CD70 on activated B cells. J. Immunol. 162: 7058-7066, 1999.

○Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Nakayama, M., Takeda, K., Akiba, H., Tsutsui, H., Okamura, H., Nakanishi, K., Okumura, K. and H. Yagita. Expression and Function of TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand on Murine Activated NK Cells. J. Immunol. 163:1906-1913, 1999.

○Kotani, M., Y. Tagawa, and Y. Iwakura. Involvement of autoimmunity against type II collagen in the development of arthritis in mice transgenic for the human T cell leukemia virus type I tax gene. Eur. J. Immunol. 29, 54-64, 1999.

○Habu, K., J. Nakayama-Yamada, M. Asano, S. Saijo, K. Itagaki, R. Horai, H. Yamamoto, T. Sekiguchi, T. Nosaka, M. Hatanaka, and Y. Iwakura. The HTLV-I-tax gene is responsible for the development of both inflammatory polyarthropathy resembling rheumatoid arthritis and non-inflammatory ankylotic arthropathy in transgenic mice. J. Immunol., 162, 2956-2963, 1999.

○Saijo, S., Kotani, M., Habu, K., Ishitsuka, C., Yamamoto, H., Sekiguchi, T. and. Iwakura, Y. Bone marrow derived cells are responsible for the development of autoimmune arthritis in HTLV-I transgenic mice and those of normal mice can suppress the disease. J. Immunol., 163, 5700-5707, 1999.

○Horai, R., Saijo, S., Tanioka, H., Nakae, S., Sudo, K., Okahara, A., Ikuse, T., Asano, M., and Iwakura, Y. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. J. Exp. Med., 191, 313-320, 2000.

○Tsurui, H., Lerner, J. M., Takahashi, K., Hirose, S., Mitsui, K., Okumura, K. and Shirai, T. : Hyperspectral imaging of pathology samples. Proceedings of Three-Dimentional and Multidimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing VI. Volume 3605, 273-281, 1999.

○Tsurui, H., Nishimura, H., Hattori, S., Hirose, S., Okumura K. and Shirai, T. Seven-color Fluorescence Imaging of Tissue Samples Based on Fourier Spectroscopy and Singular Value Decomposition. J. Histo. Cyto., 48: 653-662, 2000.

○Jiang, Y., Hirose,S., Sanokawa-Akakura, R., Abe, M., Mi, X., Li, N., Miura,Y., Shirai, J., Zhang, D., Hamano, Y. and Shirai, T. : Genetically determined aberrant down-regulation of Fc γ RIIB1 in germinal center B cells associated with hyper-IgG and IgG autoantibodies in murine systemic lupus erythematosus. Int. Immunol. 11, 1685-1691,

1999.
○Shirai, J., Ida, A., Jiang, Y., Sanokawa-Akakura, R., Miura, Y., Yan, K., Hamano, Y., Hirose, S. and Shirai, T. : Genetic polymorphism of murine tissue plaminogen activator associated with antiphospholipid syndrome. Genes and Immunity 1, 130-136, 1999.
○Ochiai, K., Ozaki, S., Tanino, A., Watanabe, S., Ueno, T., Mitsui, K., Toei, J., Inada, Y., Hirose, S., Shirai, T. and Nishimura, H. : Genetic regulation of anti-erythrocyte autoantibodies and splenomegaly in autoimmune hemolytic anemia-prone New Zealand Black mice. Int. Immunol. 12, 1-8, 2000.41.
○Takumi, T., Y. Nagamine, S. Miyake, C. Matsubara, K. Taguchi, S. Takekida, Y. Sakakida, K. Nishikawa, T. Kishimoto, S. Niwa, K. Okumura and H. Okamura. A mammalian ortholog of Drosophila timeless, highly expressed in SCN and retina, forms a complex with mPER1. Genes Cells, 4, 67-75, 1999.