

平成 16 年度科学研究費補助金 (基盤研究 (S)) 研究状況報告書

ふりがな	すがむら かずお					
研究代表者氏名	菅村 和夫		所属研究機関・部局・職	東北大学・大学院医学系研究科・教授		
研究課題名	和文	免疫系シグナル伝達機構とその異常に起因する免疫病態の研究				
	英文	Signal transducing pathways in immune cells and immunological disorders caused by their dysfunctions				
研究経費	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	総合計
16年度以降は内約額 金額単位：千円	13,700	21,500	19,800	17,200	12,900	85,100
研究組織 (研究代表者及び研究分担者)						
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担 (研究実施計画に対する分担事項)			
菅村 和夫	東北大学・大学院医学系研究科・教授	免疫学・ウイルス学	研究統括・遺伝子改変マウスの作出			
田中 伸幸	東北大学・大学院医学系研究科・助教授	細胞生物学	STAM1/2 欠損マウスの解析			
石井 直人	東北大学・大学院医学系研究科・助教授	免疫学	OX40/OX40L 系の解析			
当初の研究目的 (交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。)						
<p>本研究では、免疫系のシグナル伝達異常に起因する免疫疾患の解明を目的として、下記 3 課題に取り組む。1)我々は、リンパ球の分化・増殖に不可欠なサイトカイン共通受容体 c 鎖/Jak3 キナーゼを介するシグナル伝達経路を解析する中で、Jak3 の基質分子として STAM ファミリー分子(STAM1、STAM2) と Hrs、さらに STAMs に会合する AMSH ファミリー分子(AMSH、AMSH-LP)を単離した。すでに T 細胞特異的 STAM1/STAM2 ダブル欠損(STAM1/2-KO)マウスが胸腺 T 細胞の分化障害による免疫不全マウスであることを明らかにしている。本研究では、これらシグナル分子の遺伝子改変マウスを用いて、それらの機能的役割を解明する。特に、STAM1/2-KO マウスで特異的に欠損あるいは増強している機能分子の中から、T 細胞の分化増殖に必須な分子を同定し、SCID の新たな原因遺伝子を単離する。2)我々は、免疫応答系における副刺激分子の 1 つである OX40 のリガンド(OX40L)の遺伝子単離を成し遂げ、OX40L 欠損マウスが抗原提示細胞の機能不全を示すこと、また、OX40L 遺伝子導入マウスが免疫寛容破綻を示し、自己免疫様の間質性肺炎ならびに炎症性腸疾患を自然発症することを明らかにしてきた。本研究では、OX40L-Tg マウスを自己免疫疾患の動物モデルとして、免疫寛容破綻機構を解析しながら、自己免疫疾患の発症制御機構を解明する。また、可溶性 OX40 あるいは OX40L 単クローン抗体を用いた自己免疫疾患の治療法の開発も行う。3)我々は、新たな Grb2 ファミリー分子として Gads/Grf40 を単離し、Gads が T 細胞受容体(TCR)シグナル伝達に必要なアダプター分子であること、また、Gads 変異体導入(Grf40 - dSH - Tg)マウスが T 細胞分化障害を示すことを明らかにした。本研究では、先ず、ヒト SCID 患者における Gads 変異の有無を検索する。また、T 細胞に特異的に発現する Gads 遺伝子の転写制御領域と転写因子を同定し、ヒト SCID との因果関係を調べる。</p>						

これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

1. STAMs, Hrs, AMSH の機能解析： サイトカイン共通受容体（c 鎖）の下流のシグナル分子として同定単離した VHS 蛋白分子群 (STAM1, STAM2, Hrs) が細胞内小胞輸送関連蛋白分子であることがショウジョウバエや酵母において示唆された。そこで本研究では、これらの遺伝子欠損マウス由来の細胞株を用いて、哺乳類細胞における STAMs ならびに Hrs の機能的役割について解析した。その結果、STAMs ならびに Hrs は共に初期エンドソームに存在し、これら分子の欠損によって、初期エンドソームの肥大を認めた。また、Hrs 欠損細胞および STAMs 欠損細胞では、endocytosis された EGF 受容体の degradation 遅延がみられた。これらの結果から、STAMs ならびに Hrs がサイトカイン受容体等の細胞内輸送すなわち初期エンドソームから multivesicular body (MVB) を経てライソソームへの輸送にかかわる可能性が示唆された。さらに、Hrs 欠損細胞において STAMs 発現がみられず、その STAMs 発現低下は、mRNA レベルではなく蛋白レベルであることが分かった。すなわち、Hrs が STAMs に会合することによって、STAMs の分解が抑制されている可能性が示唆された。また、STAMs ならびに Hrs が共にユビキチン結合サイト (UIM) を有することから、STAMs 分解がユビキチン-プロテアソーム系において行われている可能性が考えられた。そこで、STAMs の UIM 欠損変異体と野生型の分解を比較したところ、野生型 STAMs は分解され易かったが、UIM 欠損変異体 STAMs はより安定であることが分かった。また、Hrs 結合部位である coiled-coil 領域を欠損した STAMs も速やかに分解されることが分かった。以上の結果から、STAM1、STAM2、Hrs が小胞輸送関連分子として、サイトカイン受容体やシグナル分子等の細胞内輸送、分解あるいはサイクリングの過程に深く関わっている可能性が示唆された。他方、STAMs 会合分子として同定した AMSH の機能解析を行うために、さらに AMSH 会合分子の同定を行った。その結果、AMSH 会合分子として、新たに Vps24p/NEDF を同定した。AMSH と Vps24p/NEDF は共にエンドソームに局在することから、AMSH も Vps24p/NEDF と複合体を形成することによって、細胞内小胞輸送に関わっている可能性が考えられる。

2. OX40L-Tg マウスを用いた炎症性腸疾患 (IBD) 発症機序の解析： CD4 陽性 T 細胞移入による RAG2 欠損マウスでの IBD は、移入する T 細胞が野生型 CD4 陽性 T 細胞であっても、Treg 細胞を除去してやれば、OX40L-TgCD4 陽性 T 細胞移入と同様の発症がみられる。この実験的腸炎はヒトクローン病のモデルとされる。本実験系を用いて、IBD 発症と OX40 シグナルとの関連性について検討した。RAG2 欠損マウスに CD25 陰性 CD4 陽性 T 細胞のみを移入するとクローン病様 IBD を発症するが、CD25 陽性制御性 (Treg) T 細胞を共移入すると、Treg 細胞の免疫寛容維持機能により疾患発症が完全に抑制される。ところが、OX40L-Tg/RAG2 欠損マウスでは Treg 細胞を共移入しても、IBD 発症を全く抑制できなかった。対照的に、用いる recipient マウスを OX40L 欠損 RAG2 欠損マウスとすると、Treg 細胞非存在下にも IBD 発症は完全に抑制された。以上の結果より、OX40L-Tg マウスにおける IBD 発症のひとつの機序として、OX40L 過剰（あるいは異所性）発現が Treg 細胞依存性免疫寛容を破綻させる可能性が示唆された。他方、CD4 陽性 T 細胞移入の際に、recipient マウスに腸内殺菌処置を施すと IBD 発症は完全に抑制される。これらの結果は、病原体感染が何らかの機構で recipient 側の何らかの細胞に OX40L の発現を誘導することにより、IBD 発症を引き起こしている可能性を示唆する。これまでの知見から、OX40L 発現細胞として樹状細胞を想定している。阻害性 OX40L 単クローン抗体投与により実験的 IBD 発症が完全抑制できることから、本研究の成果は APC 発現分子を標的とした IBD 発症予防および治療法の開発へと直結する可能性が期待できる。今後、その病原体感染により活性化する host 細胞が特異的に発現する生体分子 (OX40L など) を明らかにするとともに、IBD 発症機序の解明と OX40 をターゲットとした治療法の開発を試みる。

3. 間質性肺炎および炎症性腸疾患 (IBD) の責任遺伝子の同定： OX40L-Tg マウスは C57BL/6 系統依存的に炎症性腸疾患 (IBD) および間質性肺炎を加齢とともに自然発症する。DBA/2 や BALB/c 系統では全く発症せず、すなわちヒト疾患と同様な特定遺伝背景依存的な発症を示す。従って、OX40L 遺伝子導入で疾患を発症する感受性系統と疾患を発症しない抵抗性系統を交配することによって、間質性肺炎および IBD の感受性遺伝子を同定することが可能になる。本研究では、通常の遺伝子連鎖解析法に則ってマウスにおける上記 2 疾患の感受性 / 抵抗性遺伝子を同定する。疾患感受性である C57BL/6 遺伝背景 OX40L-Tg マウスを疾患抵抗性マウス系統である BALB/c マウスと交配し、交雑 N2 を約 600 匹作成した。N2 マウスのうちで遺伝子型が OX40L-Tg マウスのみ (300 匹) を抽出し、疾患発症の有無を検索した。現在、遺伝子座同定作業が進行中である。

特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

1. 高齢者で発症頻度の高い間質性肺炎は、病状の進行と共に肺線維症に至る極めて重篤な疾患であり、また、潰瘍性大腸炎やクローン病等の炎症性腸疾患も難治性疾患として、近年、患者数が急激に増加している。これら疾患はいずれも免疫異常に基づく疾患として理解されており、アレルギー・自己免疫疾患と共に、治療法の開発が強く叫ばれている。本研究で用いる OX40L 遺伝子導入マウスは、世界で初めて樹立された自然発症間質性肺炎のモデルマウスであると同時に、炎症性腸疾患のモデルマウスでもあり、これら疾患の治療法開発に新たな手法をもたらしたことになる。
2. OX40L-Tg マウスにおける間質性肺炎ならびに IBD は、C57BL/6 マウス系統において 100%発症するが、BALB/c マウス系統では全く発症しない。さらに C57BL/6xBALB/c F1 背景の OX40L-Tg マウスでも全く疾患発症が見られない。この事実は C57BL/6 系統に疾患感受性遺伝子が、BALB/c 系統に疾患抵抗性遺伝子が存在し、前者が後者に対して劣性であることを意味する。従って、これら両系統の OX40L-Tg マウスを交配させることによって、上記疾患発症の責任遺伝子の同定が可能である。ヒトにおいても種々の自己免疫疾患の発症要因として、遺伝的要因が重要であることが分かっていることから、本研究における OX40L-Tg マウスの解析から得られる間質性肺炎ならびに IBD の発症責任遺伝子の同定は重要な知見となる。これらの遺伝子の同定は、自己免疫疾患の発症予測やそれら遺伝子や遺伝子産物を標的とした治療法の実現にも直結することが期待される。
3. アレルギー・自己免疫は、本来、免疫原性のない異物や自己抗原に対して、何らかの原因によって異常免疫反応が惹起されることによって起こる。その免疫制御機構の中で最も重要とされるのは免疫寛容である。従来、免疫寛容誘導および破綻の解析と、アレルギー・自己免疫発症の解析とを同一のモデル動物を用いて行う妥当な実験系がほとんど存在しなかった。本研究で開発した OX40L-Tg マウスは、蛋白抗原に対する免疫寛容が破綻している一方で、C57BL/6 系統依存的に自己免疫機構と考えられる間質性肺炎と炎症性腸疾患を自然発症する。従って、同マウスが、末梢性 T 細胞免疫寛容破綻と自己免疫発症を直接関連づけて解析しうる極めて有用なモデル動物であることを意味する。このような免疫寛容制御機構および自己免疫発症に有用なモデルマウス OX40L-Tg マウスを用いることによって、T 細胞 - APC 相互作用を介した免疫寛容制御機構の解明が可能である。
4. c 鎖/Jak3 下流のシグナル分子として解析してきた STAM1, STAM2, Hrs が共に、酵母等のホモログ分子によって細胞内小胞輸送に関わる機能分子であることが分かった。本研究において、これら分子が哺乳類細胞においてもサイトカイン受容体やシグナル分子の細胞内輸送とユビキチン・プロテアソーム系における分解の制御に関わっていることが明らかにされた。従って、哺乳類細胞において充分には解明されていない小胞輸送の制御機構の研究に有用な解析系を提供したことになる。これらの分子を標的としながら、免疫系との関連では、サイトカインのシグナル伝達機構における細胞内小胞輸送の役割ならびに外来性抗原ならびに内因性抗原の提示機構に関わる細胞内小胞輸送の役割、マクロファージ等の貪食細胞の機能発現に関わる細胞内小胞輸送の研究など従来殆ど解析されていない領域への取り組みが可能である。他方、哺乳類細胞に特異的なウイルス感染の制御機構における細胞内小胞輸送の役割の研究にも大きく貢献することが期待される。

研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(発表予定のものを記入することも可能。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。)

論文発表:

1. Sugamura, K., Ishii, N. and Weinberg, A. D.: Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40. *Nature Rev. Immunol.*, in press.
2. Takeda, I., Murata, K., Killeen, N., Ndhlovu, L. C., Satomi, S., Sugamura, K. and Ishii, N.: Distinct roles for the OX40-OX40L interaction in regulatory and non-regulatory T cells. *J. Immunol.*, 172, 3580-3589, 2004.
3. Ishii, N., Ndhlovu, L. C., Murata, K., Sato, T., Kamanaka, M. and Sugamura, K.: OX40(CD134) and OX40 ligand interaction plays an adjuvant role during in vivo Th2 responses. *Eur. J. Immunol.*, 33, 2372-2381, 2003.
4. Kanazawa, C., Morita, E., Yamada, M., Ishii, N., Miura, S., Asao, H., Yoshimori, T. and Sugamura, K.: Effects of deficiencies of STAMs and Hrs, mammalian class E Vps proteins, on receptor downregulation. *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, 309, 848-856, 2003.
5. Kikuchi, K., Ishii, N., Asao, H. and Sugamura, K.: Identification of AMSH-LP containing a Jab/MPN domain metalloenzyme motif. *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, 306, 637-743, 2003.
6. Hoshino, A., Tanaka, Y., Akiba, H., Asakkura, Y., Mita, Y., Sakurai, T., Takaoka, A., Nakaike, S., Ishii, N., Sugamura, K., Yagita, H. and Okumura, K.: Critical role for OX40 ligand in the development of pathogenic Th2 cells in a murine model of asthma. *Eur. J. Immunol.*, 33, 861-869, 2003.
7. Sato, T., Ishii, N., Murata, K., Kikuchi, K., Nakagawa, S., Ndhlovu, L. C. and Sugamura, K.: Consequences of OX40-OX40 ligand interactions in Langerhans cell function: enhanced contact hypersensitivity responses in OX40-transgenic mice. *Eur. J. Immunol.*, 32, 3326-3335, 2002.
8. Yamada, M., Ishii, N., Asao, H., Murata, K., Kanazawa, C., Sasaki, H. and Sugamura, K.: Signal-transducing adaptor molecule STAM1 and STAM2 are required for T-cell development and survival. *Mol. Cell. Biol.*, 22, 8648-8658, 2002.
9. Murata, K., Nose, M., Ndhlovu, L. C., Sato, T., Sugamura, K. and Ishii, N.: Constitutive OX40-OX40 ligand interaction induces autoimmune-like diseases. *J. Immunol.*, 169, 4628-4636, 2002.
10. Tateyama, M., Fujihara, K., Ishii, N., Sugamura, K., Onodera, Y. and Itoyama, Y.: Expression of OX40 in muscles of polymyositis and granulomatous myopathy. *J. Neurol. Sci.*, 194, 29-34, 2002.

学会発表:

1. Kazuo Sugamura : Gene Therapy for X-linked Severe Combined Immunodeficiency (X-SCID). 第 12 回国際医療協力シンポジウム, March 5-6, 2004.
2. Ishii, N. and Sugamura, K.: OX40/OX40 ligand system in immune regulation International Symposium on Regulation of Immune Response in Health and Disease, Osaka, Feb. 20-23, 2003.
3. Sugamura, K.: OX40-OX40L System in Regulatory T Cell Development and Function. US-Japan Immunology Meeting, Nov. 18-19, 2003.
4. Ishii, N. and K. Sugamura: OX40/OX40 ligand system in immune regulation. Australia-Japan Symposium on Biomedical Sciences, Melbourne, Feb. 25-26, 2003.
5. Sugamura, K., Murata, K. and Ishii, N.: Constitutive OX40/OX40 ligand interaction induces autoimmune-like disease. US-Japan Immunology Meeting, Dec. 7-8, 2002.
6. Sato, T., Ishii, N., Murata, K., Ndhlovu, R. C., Kikuchi, K. and Kazuo Sugamura: Critical role of the OX40/OX40L system in cutaneous immune responses. 米国免疫学会 April 20-25, 2002.
7. Murata, K., Ishii, N., Nose, M., Yamada, M., Ndhlovu, R. C. and Sugamura, K.: OX40L-transgenic mice develop autoimmune diseases linked to failed induction of peripheral T cell tolerance. 米国免疫学会 April 20-25, 2002.