

リンパ球移入による全身性自己免疫疾患動物
モデルの樹立と抗核抗体産生機序の解明

神崎 健仁

要旨

抗核抗体は膠原病における全身性自己免疫の代表的現象であり、腎炎など病態形成への関与も指摘されている。その機序には不明な点が多く、動物モデルの有用性が限定的であることも研究の障害となっている。この解決のため、本研究は、制御性 T 細胞を欠いた CD4⁺T 細胞のヌードマウスへの移入が、全例に早期より長期間持続する高抗体価の抗核抗体を誘導し、容易に誘導環境を変更できる有用な系であることを見出した。さらに本系を用いて、リンパ球減少下では末梢リンパ球が増殖し再構築する生理的な homeostatic proliferation という機構が、germinal center 形成と follicular helper T 細胞の誘導とともに抗核抗体誘導能を内在しており、その危険を制御性 T 細胞が抑制していることを明らかにした。

序文

全身性エリテマトーデスに代表される膠原病および類縁疾患の多くは、遺伝的素因に環境因子が加わることで、全身性自己抗原に対する免疫寛容が破綻して出現するといわれている。これらの疾患における特徴的所見として抗核抗体産生が挙げられるが、これは免疫寛容の破綻の結果として産生され、腎炎などの病態形成へ関与することが示唆されている。そのため、抗核抗体の産生機序を解明することは、膠原病の病態の理解や病態に則した治療を開発する上で重要な意味を持つ。

抗核抗体の産生機序についてのこれまでの知見は、 $CD4^+$ T細胞やToll-like receptor(TLR)の重要性を示唆している。まず $CD4^+$ T細胞の重要性に関しては以下の事実から示されている。抗核抗体の主体はIgGタイプであり、これを産生するにはB細胞が成熟過程でクラススイッチを起こす必要があること、また抗核抗体産生において somatic hypermutation (体細胞超変異)による affinity maturation が実際に認められることから、この両者に germinal center とその形成に関わる $CD4^+$ T細胞の重要性が示唆される。また自己免疫疾患自然発症モデルマウスにおいて germinal center が自然に形成されることが報告されており、このことから $CD4^+$ T細胞が重要と考えられている。生体内での実際の関与に関しても、ループスマウスにおいて $CD4^+$ T細胞を欠損させると IgG 型抗 DNA 抗体価が減少することが示されている[1, 2]。

TLRの重要性については以下のことから示されている。TLRは外来抗原の種々の構造をパターン認識する受容体で、バクテリアなどの非メチル化 CpG を認識する TLR9 や一本鎖 RNA を認識する TLR7/8 などがあり、形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid dendritic cell: pDC)やB細胞に豊富に発現している。TLRと抗核抗体との関連は two receptor paradigm として示唆されている。すなわち、抗核抗体の標的抗原である核酸蛋白複合体が、pDCやB細胞において細胞表面受容体とTLRを同時に架橋すると、この核酸蛋白複合体に対する抗体産生が惹起されるというものである。生体内での実際の関与に関しては、TLR欠損マウスやその活性化経路を阻害したマウスの解析があり、多くの報告において抗核抗体価の減少を認めるが[3]、上昇するとの報告もあり[4]、更なる検討が必要と考えられる。また、BXSBマウスにおいて、原因遺伝子として TLR7 の遺伝子の重複が認められている[5]。また、全身性自己免疫性疾患のプロトタイプである全身性エリテマトーデスでは IFN- α に関連した遺伝子群の活性化がみられるが[6, 7]、この IFN- α の主要な産生細胞が TLR7/8/9 を高発

現している pDC であること[8]からも、TLR と抗核抗体の関連が示唆されている。

以上のように CD4⁺T 細胞と TLR の重要性が示されているものの、統一的な抗核抗体産生機序の解明はなされていない。解明を困難にする理由の一つに、従来の動物モデルの有用性の限界があると考ええる。

全身性自己免疫疾患のモデルとして用いられるループスモデルマウスは、自然発症モデルと非生体物質等による誘導モデルとに分類される。自然発症ループスモデルマウスとして MRL/lpr マウスや BWF1 マウス、BXS^B マウスなど特殊な遺伝的背景をもつものが用いられているが[9]、発病まで 3~6 ヶ月かかること、マウスに種々の介入を行うためには遺伝的背景を維持する必要があることなどから、時間やコストの点で制約があった。誘導モデルとしては非生体物質であるプリスタンを投与して全身性自己免疫を誘導する系が頻用されるが[10]、発病まで時間がかかる点では同様であり、またこの系が模している生理的な現象についても不明である。

そのため、早期に高率に高抗体価の IgG タイプの抗核抗体が誘導でき、かつ種々の条件を加えて容易に検討が可能な、新たな系の確立が望まれている。

Homeostatic proliferation は末梢リンパ球減少下で末梢 T 細胞が分裂増殖して減少分を回復しようとする現象であり[11, 12]、自己免疫性疾患発症に関わる遺伝外因子の一つと考えられている[13, 14]。少ないリンパ球を増加させるための生理的な役割を担っていると考えられ、胸腺機能の低下、ウイルス感染後などのリンパ球が減少しうる様々な状況で生理的に作動していると考えられている。

この現象と自己免疫との関連については、ヒトの疾患、動物モデルともに報告がある。ヒトの疾患については、関節リウマチでテロメラーゼの機能不全とリンパ球におけるテロメア短縮が[15] 報告され、また全身性エリテマトーデス[16]や多発性硬化症[17]で末梢血中の TRECs(T cell receptor excision circles)含有リンパ球数の減少が報告されている。以上の報告は末梢血液中のリンパ球増殖反応を示していることから、homeostatic proliferation の圧力がかかっている可能性が示唆される。また同現象と関連する動物モデルとして、糖尿病モデルマウスである NOD マウスがよく解析されている。NOD マウスはリンパ球減少が出現して homeostatic proliferation の圧力がかかった後に自己反応性 T 細胞が増加して自己免疫に至ること、この発症機転が CFA による免疫やリンパ球移入によりリンパ球数を維持すると阻害できることが示されている[13]。また、別のモデルである lymphopenic mouse transfer model は、リンパ球全体または一部のサブセットを欠損したマウスにリンパ球を移入する

ことにより、その後のリンパ球増殖を経て自己免疫疾患を誘導するモデルである。このうち制御性 T 細胞(Treg)を除いた CD4⁺T 細胞(Tc)をヌードマウスに移入する系は、胃炎や甲状腺炎などの臓器特異的自己免疫疾患が発症し、自己免疫発症の抑制における Treg の役割を示す系として知られていた[18]が、CD4⁺T 細胞における homeostatic proliferation と自己免疫との関連、およびその抑制にあたる Treg の役割が示唆された系とも考えられる。

Homeostatic proliferation に基づく抗核抗体産生についてはほとんど検討されていないが、lymphopenic mouse transfer model においてのみわずかに報告されている。Treg を除いた CD4⁺T 細胞をヌードマウスに移入する系では、一論文中で抗核抗体の産生について触れられているがその詳細は検討されていない[18]。また別の論文では TCR β δ ノックアウトによる T 細胞欠損マウスに T 細胞を移入すると抗核抗体を産生すると報告されたが、移入した細胞は B 細胞を除去した脾細胞であり、移入 T 細胞のサブセットによる変化などは検討されておらず、移入後 2-3 週を頂点とする早期で一過性の弱い抗核抗体産生系となっており[19]、抗核抗体産生機序研究の系として用いるには、さらなる系の改良が必要であった。

さらに本研究では、この系を用いて抗核抗体産生機序を解明することを目的とした。本系においては IgG タイプの抗核抗体が産生され、B 細胞のクラススイッチが生じていることが示唆されるため、germinal center の形成と follicular helper T 細胞(Tfh)について検討した。Germinal center は、組織の免疫染色においては IgD 陽性の B 細胞濾胞領域内に IgD 陰性で PNA(peanut agglutinin)により標識される領域であり、内部の B 細胞は Germinal center B 細胞であり GL-7⁺Fas⁺ CD19⁺細胞として認識される[20, 21]。そして Tfh は germinal center に存在する CD4⁺T 細胞の新たなサブセットとして近年報告されており[22]、CCR7⁺CXCR5⁺CXCR4⁺ICOS⁺PD-1⁺CD4⁺T 細胞として存在し、Bcl-6 を転写因子として分化し[23-25]、IL-21 の産生により自身の分化や germinal center 形成に関与していると考えられている[26]。自己免疫疾患における Tfh の動態や関与は不明な点が多いが、ループスモデルマウスにおいて CXCR5⁺CXCR4⁺ICOS⁺CD4⁺T 細胞や類似細胞群である CXCR5⁺CXCR4⁺ICOS⁺CD4⁺T 細胞が出現すること[27]や、ICOS/B7RP-1 経路の阻害による Tfh 制御を介した治療が報告され[28]、全身性自己免疫疾患の病態形成との関わりが示唆されている。

目的

新たな抗核抗体産生マウスモデルを作製し、その系を用いて抗核抗体産生機序を解明することで全身性自己免疫性疾患の発症機序につながる知見を得る。

方法

マウス

7-8週齢のメスのBALB/c マウスと5-7週齢のメスのBALB/c ノードマウスを日本SLC社より購入した。RAG-2 ノックアウトマウスはTaconic Farms 社より購入した。すべてのマウスは Specific Pathogen Free 環境で飼育された。BALB/c ノードマウスは7-8週で実験に使用した。

蛍光抗体法による抗核抗体の検出

抗核抗体の検出には、フルオロ HEPANA Test Kit (Medical and Biological Laboratories, Nagoya, Japan)内のHEp-2細胞基質スライドを用いた。PBSを用いてマウス血清を40、80、160、320、640、1280、2560、5120倍希釈し、器質スライドの各wellに40 μ lずつ30分間反応させた。その後PBSで洗浄し、二次抗体として2 μ g/mlに希釈したanti-mouse IgG-Alexa 488を40 μ lずつ遮光下で30分間反応させた。反応後にPBSで洗浄し、蛍光顕微鏡で観察した。

T細胞の分離

移入細胞は、Miltenyi Biotec 社のMACS システムを用いて分離した。マウスの脾臓を採取し70- μ m セルストレイナー(BD Bioscience, San Jose, CA)を用いて単細胞にしたのち、ACK バッファーにより溶血した。

CD4⁺T細胞の分離では、この細胞をビオチン結合の抗B220(RA3-6B2)、抗CD8a(53-6.7)、抗CD11b(M1/70)、抗CD49b(DX5)、T- and B-cell activation antigen(GL7)、抗I-Ab/d(25-9-17)、抗Ly-6G/Ly-6C (Gr-1:RB6-8C5)の各抗体と反応させ、洗浄後にstreptavidin-conjugated microbeads(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)を結合させた。これをMACS システムのLD カラムを用いてネガティブセクションを行い分離した。最初の抗体反応時のビオチン結合抗CD25 抗体(7D4)の有無によりCD4⁺CD25⁻T細胞またはCD4⁺T細胞を選択した。CD4⁺CD25⁺T細胞は、上述の方法でCD4⁺細胞を回収したのち、PE 結合抗CD25 抗体と反応させ、anti-PE microbeads と反応後にMS カラムを用いポジティブセクションを行い分離した[29]。

CD8⁺T細胞の分離では、マウスの脾細胞をビオチン結合抗CD8a 抗体(53-6.7)と反応さ

せ、洗浄後に streptavidin-conjugated microbeads を結合させた。これを MACS システムの MS カラムを用いてポジティブセクションを行い分離した。

B細胞の分離

T 細胞と同様に MACS システムを用いて分離した。マウス脾細胞を採取し、FITC-抗 CD21 抗体、PE-抗 CD23 抗体とインキュベートした後、まず anti-PE microbeads と反応させた後にポジティブセクションにて細胞を回収し、これを follicular B 細胞とした。次いで CD23 陰性の細胞を anti-FITC microbeads と反応させた後にポジティブセクションにて細胞を回収し、これを marginal zone B 細胞とした[30]。

T細胞またはB細胞の養子免疫

前述の方法により分離した $CD4^{+}T$ 細胞を 2.5×10^6 個/匹、または B 細胞を 4×10^6 個/匹で、BALB/c ノードマウスまたは RAG2 欠損マウスに腹腔内注射にて移入した。

免疫沈降法

核成分は nuclear/ cytosol fractionation kit (BioVision, Palo Alto, CA) により、BALB/c マウス脾細胞より抽出した。核成分のビオチン化には Biotinylation Kit (Sigma, St. Louis, USA)を用いた。血清または抗体を含む溶液に、IgG を結合する Protein G plus/Protein A Agarose Suspension (Calbiochem, San Diego, CA)を加え、4℃、overnight でインキュベーションを行った。これを遠心して上清を除去し、3 回洗浄をしてから SDS sample buffer でアガロースより分離し回収した。

回収した溶液を SDS-PAGE により展開した後、PVDF 膜に転写し、HRP 結合ストレプトアビジンまたは HRP 結合抗 mouse IgG 抗体を二次抗体として使用して、Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, UK)を用いて可視化した。

ELISA

抗 Nucleosome 抗体の測定には Ag-specific ELISA Kit (Orgentec, Mainz, Germany, respectively) を用いた。二次抗体に HRP 結合 anti-mouse IgG Ab (Zymed Laboratories, San Francisco, CA)を用いた。抗 Sm 抗体と、抗 U1A 抗体、抗 68K 抗体の測定には Scipac 社の抗原蛋白を用いて ELISA を行った。抗原を pH 9.6、0.03 M carbonate buffer に $4\mu\text{g/ml}$ に希

釈し、50 μ l ずつ 96-well plates (Immulon4; Dynatech, Chantilly, VA)に分注し、4℃一晩静置して個層化した。洗浄後に 1% BSA-0.05% Tween20-PBS で 2 時間ブロッキングし、50 倍に希釈したマウス血清 50 μ l/well を常温、1 時間反応させた。二次抗体に HRP 結合抗 mouse IgG 抗体を用い、3,5,3',5'-tetramethylbenzidine (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) で発色させ、リン酸で発色を止めた後、波長 450nm で吸光度を測定した。標準血清として各種抗核抗体が高値をしめした特定のマウス血清をもちいて、arbitrary unit を設定した。

Flow cytometry

表面分子の染色は、細胞を4℃に保ちつつ染色を行った。反応時のバッファーは 3% bovine serum albumin, 0.05% NaN₃-PBSを用いた。抗体添加後30分で洗浄し測定した。

使用した抗体 : B220(RA3-6B2)、CD4(GK1.5)、CD8a(53-6.7)、CD21(7E9)、CD23(B3B4)、CXCR4(2B11)、CXCR5(2G8)、Fas(Jo2)、T- and B-cell activation antigen(GL7)、ICOS(C398.4A)、PD-1(RMP1-30)。

オリゴヌクレオチドによるTLRの阻害

TLR7 を阻害する IRS661 (5-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3) [31, 32]、TLR9 を阻害する IRS869 (5-TCCTGGAGGGGTTGT-3) [31, 33]が知られており、またいずれの TLR にも影響しないコントロールの Ctrl-ODN (5-TCCTGCAGGTTAAGT-3) も知られている。当実験でもホスホロチオエート化した上記のオリゴヌクレオチド(北海道システムサイエンス社にて合成)を使用した。T 細胞移入直前に 200 μ g、移入 4 日後に 100 μ g、その後週に 1 回 100 μ g を PBS に溶解し、腹腔内投与した。

PDCA-1 によるplasmacytoid DCの除去

T 細胞移入の前日と翌日に、PDCA-1(DENDRITICS, LYON, France) 125 μ g を PBS で合計 250 μ l に希釈して腹腔内投与した[34, 35]。

組織の蛍光免疫染色

マウスの脾臓を OCT コンパウンド(サクラファインテック, 日本)に包埋したのち、液体窒素で急速に凍結した。これを薄切しアセトンで固定した。Protein Block serum-free(Dako, Real carpinteria, CA)と 10 分ほど反応させた後、一次抗体を Antibody Diluent with Background

Reducing Components(Dako)で 5 μ g/ml に希釈し室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、Dylight488 または Dylight594 標識 2 次抗体(Jackson laboratories, Baltimore, PA)を 250 倍に希釈し反応させた。二重染色では二次抗体の蛍光色を変えて同様の過程をもう一度行った。その後、Vectashield(Vector laboratories, Burlingame, CA)を用いて封入し、蛍光顕微鏡で観察した。染色に使用した抗体は CD4(GK1.5)、CD19(1D3)、follicular dendritic cell(FDC-M1)、Ig-D(11-26c.2a)、MAdCAM-1(MECA367)、PDCA-1(120G8)であり、他にビオチン化 PNA(Vector laboratories Burlingame, CA)も用いた。

PCR

リンパ球サブセットを分離後、RNeasy mini kit(QIAGEN, Valencia, CA)を用いて RNA を精製し、SuperScriptTM III Reverse Transcriptase(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて推奨どおりに cDNA を作成した。PCR では Primer として

GAPDH-forward, 5'-GAAGGTCGGTGTGAACGGA-3'

GAPDH-reverse, 5'-GTTAGTGGGGTCTCGCTCCT-3'

Bcl6-forward, 5'-GCCCCACTGACCCGAAAGCC-3'

Bcl6-reverse, 5'-GCCTGCCAGGGACCTGTTCAC-3'

IL-21-forward, 5'-ATCCTGAACTTCTATCAGCTCCAC-3'

IL-21-reverse, 5'-GCATTAGCTATGTGCTTCTGTTTC-3' [36]

を用い、denature : 94 $^{\circ}$ C30 秒、annealing : 61 $^{\circ}$ C30 秒、elongation : 72 $^{\circ}$ C45 秒を 1 cycle とした PCR を行った。

共培養

BALB/c マウスの脾細胞をビオチン結合抗 CD19(1D3)抗体とインキュベートした後、ストレプトアビジンマイクロビーズと反応させて MACS システムによりポジティブセクションして B 細胞を分離した。また、Tc 移入 BALB/c ノードマウス 9 匹の脾細胞を FITC 結合抗 CD4 抗体とインキュベートした後、Anti-FITC MultiSort Kit(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)を用いてまず CD4 陽性細胞をポジティブセクションした。キットのマニュアルに従いこの CD4⁺細胞からマイクロビーズを切り離れたのち、ビオチン結合 PD-1 とインキュベートした。その後にストレプトアビジンマイクロビーズと反応させて、ポジティブセクションカラムにより CD4⁺PD1⁺ T 細胞と CD4⁺PD1⁻ T 細胞を分離した。

培養には 96well-round bottom のプレートを用い、培養液には 10%FCS-RPMI を用いた。各 well において B 細胞 2×10^5 、T 細胞 2×10^4 を混合して培養した。T 細胞の刺激は、プレートに $10 \mu\text{g/ml}$ に希釈した抗 CD3 抗体を 4°C で一晩定着させた後、培養液中に抗 CD28 抗体を $5 \mu\text{g/ml}$ で加えて行った。ICOS の抑制は、抗 ICOS 抗体(7E.17G9; BioLegend, San Diego, CA)を $5 \mu\text{g/ml}$ で加えた。IL-21 の抑制には抗 IL-21 抗体(R&D systems, Minneapolis, MN)を $10 \mu\text{g/ml}$ で加えた。各条件について 2well ずつ作成した。

培養 96 時間後に上清を回収し、IgG の測定を行った。

培養液中のIgGの測定

Affinipure Donkey anti-mouse IgG(H+L)(Jackson ImmunoResearch, Baltimore, PA)を PBS で $1.3 \mu\text{g/ml}$ に希釈し、 $50 \mu\text{l}$ ずつ 96-well plates (Immulon4; Dynatech, Chantilly, VA)に分注し、 4°C 一晩静置して個層化した。洗浄後に 1% BSA-0.05% Tween20-PBS で 2 時間ブロッキングした後、培養上清を $50 \mu\text{l/well}$ で常温、1 時間反応させた。ネガティブコントロールには培養液である 10%FCS-RPMI を、ポジティブコントロールには Chromopure Mouse IgG(Jackson ImmunoResearch, Baltimore, PA)を用いた。二次抗体に 10000 倍希釈した Peroxidase-conjugated Affinipure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-mouse IgG Fc γ Fragment-specific(Jackson ImmunoResearch, Baltimore, PA)を用いた。3,5,3',5'-tetramethylbenzidine (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)で発色させて、リン酸で発色を止めた後、波長 450nm で吸光度を測定した。

結果

蛍光抗体法による抗核抗体産生の同定

BALB/c マウスの脾細胞より $CD4^+CD25^-$ T 細胞(Tc)、 $CD4^+$ T 細胞(Tc+Treg)、 $CD4^+CD25^+$ T 細胞(Treg)を分離して 7 週齢の BALB/c ノードマウスに移入し、その後レシピエントマウスより毎週血清を採取して蛍光抗体法により抗核抗体を評価した結果、多彩な型の IgG タイプの抗核抗体産生を移入後 2 週の早期から認めたが、その中で特に homogeneous pattern が 90%以上の大部分を占めていた(図 1A)。また抗核抗体陽性率を検討すると、Tc 移入群では移入後 2 週以降において 100%の陽性率であった。細胞移入後 3 週間における homogeneous pattern の抗核抗体価をみると、Tc 移入群で特に抗核抗体価の上昇が認められた(図 1B)。Tc+Treg、Tr 移入群においても抗核抗体価の上昇が認められたが、その抗体価は Tc 移入群に比較して明らかに低値であった(図 1B)。

免疫沈降法による抗核抗体産生の同定

ビオチン化マウス核成分を T 細胞サブセット移入 4 週間後のレシピエントマウス血清と混和して免疫沈降したのち SDS-PAGE で展開し、ストレプトアビジン HRP により可視化した結果、陰性コントロールである野生型マウス血清に比較し、Tc または Treg を移入したマウスでは複数のバンドが検出され、種々のマウス核成分に対する自己抗体が産生されている事が確認された(図 2A,B)。特に Tc 移入マウスでは、陽性コントロールとしたプリスタン誘発ループスモデルマウスと同様に多数のバンドを認め、多様な抗核抗体の産生が確認された。

次に実際のヒト膠原病で高頻度に認められる抗 RNP 抗体の対応抗原の一つである U1A 蛋白に注目し、マウス核成分を T 細胞サブセット移入 4 週間後のレシピエントマウス血清で免疫沈降し SDS-PAGE にて展開後、抗 U1A 抗体で検出するとバンドが検出されたため、レシピエントマウスにおいて抗 U1A 抗体が産生されていると考えられた (図 3A,B)。そこでマウス核成分を IgG タイプの抗 U1A 抗体で免疫沈降し SDS-PAGE にて展開後、レシピエントマウス血清で検出すると同様のバンドが確認されたため(図 3C)、U1A 蛋白に対する特異抗体の産生が確認された。

ELISA法による抗核抗体の同定

ヒト全身性自己免疫疾患で認められる自己抗原のうち、U1A 以外の自己抗原に対する自己抗体の存在を検討するために、ヌクレオソーム関連として二本鎖 DNA とヌクレオソーム、スプライソゾーム関連として Sm と抗 RNP 抗体の対応抗原の一つである 68K 蛋白に対する自己抗体の有無を、経時的に採取したレシピエントマウス血清を用いて、ELISA 法により評価した結果、蛍光抗体法においては homogeneous pattern がほとんどであったが、ELISA 法では、いずれの抗原に対しても抗体の産生が確認された(図 4)。同抗体産生は CD4⁺T 細胞サブセット移入後 4 週まで週数依存性に増加し、その後 8 週間においても持続していた。Tc 移入群と Tc+Treg 移入群の間では、週数を増すごとに有意差が確認できた。これらのことより、本系ではヒト全身性自己疾患における抗核抗体と同じ対応抗原をもつ抗核抗体も産生されることが示された。

レシピエントマウス脾臓における組織学的変化の観察

Tfh および pDC の発現を検討するため、T 細胞移入後 5 日目の脾臓より凍結切片を作製して、蛍光抗体法による免疫染色を行って組織学的変化を観察した(図 5)。その結果、Tc を移入した群において MAdCAM-1 により境界されるリンパ濾胞の拡大、抗 IgD 抗体で染色される濾胞内への CD4 陽性細胞の局在、PD-1 陽性細胞の出現、pDC の増加が認められた。

レシピエントマウス脾臓におけるgerminal center形成

レシピエント脾臓における germinal center の形成について詳細に検討するために、細胞表面分子の発現について flow cytometry で解析した結果、Tc 群では Tc+Treg 群と比較して GL-7⁺Fas⁺ B220⁺細胞が明らかに増加しており、germinal center が形成されていると考えられた(図 6A)。そのため Tc 群において脾臓の組織染色を行うと、PNA(peanut agglutinin)で染まる germinal center の出現が認められ、これは B 細胞濾胞を示す IgD 染色域内に存在することが判明した(図 6B)。また、CD4 染色部位と PNA 染色部位との関係をみると、CD4⁺細胞は主に T 細胞ゾーンに存在していたが、germinal center 内にも多数の CD4⁺細胞が存在することが判明した。

移入T細胞のfollicular helper T細胞への分化

Tc 移入群では germinal center の形成が顕著に認められ、内部に CD4⁺ T 細胞が局在し

たため、Tfh のフェノタイプを有する T 細胞が存在するか検討するため、Tc または Tc+Treg 移入後 5 日目の脾細胞において、これらの表面マーカーについて flow cytometry で解析した結果、Tc 移入群において CXCR5 を発現せずに CXCR4、ICOS、PD-1 を発現する細胞が存在していた(図 7A)。同一の細胞がこれらを発現していることは、flow cytometry における多重染色にて確認しており(図 16)、CXCR5⁻CXCR4⁺ICOS⁺PD-1⁺CD4⁺T 細胞が存在していることが明らかとなった。Tfh では CCR7 を発現しなくなることが、その局在に重要な意義をもつが、この細胞も CCR7 の発現は認めなかった。

脾臓凍結切片における免疫蛍光染色においても、Tc 移入群では PD-1 発現細胞が germinal center と思われる部位に多数存在していることが判明した(図 7B)。

次に本系で認める CXCR5⁻CXCR4⁺ICOS⁺PD-1⁺CD4⁺T 細胞の局在と germinal center との関連を Tc 移入マウスの脾臓で詳細に検討した(図 8)。PD-1⁺細胞は CD19 で染色される B 細胞領域の内部に存在するものの CD19 は発現しておらず(図 8 上段)、CD4 との二重染色では黄色になることから CD4 を同時に発現していることが確認された(図 8 中段)。また CD4⁺細胞全体の中で PD-1⁺細胞の局在は、T 細胞ゾーンにはほとんどなく、B 細胞濾胞内と考えられる部位に存在していることも推察された。実際に PNA で染色される germinal center との位置関係をみると(図 8 下段)、PD-1⁺細胞が germinal center 内に存在していることが明らかとなった。

移入 5 日後の変化が最も著明な群は Tc を移入した BALB/c ノードマウスの群であったため、同群における移入 4 週間後の脾細胞を解析した(図 9)。その結果、GCB 細胞、CXCR5⁻CXCR4⁺ICOS⁺PD-1⁺CD4⁺T 細胞ともに消失せずに保たれており、移入早期のみではなく長期間持続する変化であることが確認された。

CXCR5⁻CXCR4⁺ICOS⁺PD-1⁺CD4⁺T細胞の機能の評価

CXCR5⁻CXCR4⁺ICOS⁺PD-1⁺CD4⁺T 細胞は CXCR5⁻である点を除いて Tfh に類似しているため、次に Tfh との異同を検討するために、Tfh の master 遺伝子といわれる Bcl-6 や機能分子といわれる IL-21 の発現の有無や、実際に B 細胞に対する抗体産生誘導能を有しているのかを評価した。

実験の概要は図 10A に示す通りであり、移入前の Tc 細胞、移入後の CD4⁺PD-1⁺細胞、CD4⁺PD-1⁻細胞の計 3 群において PCR で細胞の発現遺伝子を検討すると、Bcl6 は移入後の CD4⁺PD-1⁺細胞、CD4⁺PD-1⁻細胞の両群において発現を認めたが、IL-21 は CD4⁺PD-1⁺細胞

でのみ発現を認めた(図 10B)。

次に移入後の $CD4^+PD-1^+$ 細胞、 $CD4^+PD-1^-$ 細胞を BALB/c マウスの B 細胞と共培養して、B 細胞に対する IgG 産生誘導能を評価した(図 10C)。その結果、 $CD4^+PD-1^-$ 細胞に比較して $CD4^+PD-1^+$ 細胞で B 細胞に対する IgG 産生誘導作用が認められた。また、T 細胞に対して活性化刺激を加えると、特に $CD4^+PD-1^+$ 細胞において B 細胞の IgG 産生能が著明に増強された。

$CD4^+PD-1^+$ 細胞は表面分子として ICOS を有し IL-21 の遺伝子発現が亢進していたため、B 細胞に対する IgG 産生誘導能に対する ICOS と IL-21 の関与を、阻害抗体を加えた培養により検討した結果、ICOS、IL-21 のいずれを阻害しても IgG 産生誘導能が低下し、両者を阻害するとなお相加的に低下したが、完全には阻害されなかった(図 10D)。

そのため、 $CD4^+PD-1^+$ 細胞には B 細胞に対する IgG 産生誘導能があり、その機序に ICOS、IL-21 が部分的に関与していることが判明した。

野生型マウス脾臓由来B細胞、T細胞による抗核抗体産生の誘導

BALB/c ノードマウスは胸腺由来の T 細胞を欠くため、B 細胞に自己反応性が極めて高いことなどの異常が存在する可能性が否定できない。また、ノードマウスは胸腺に依存しない T 細胞などは有しているため、これが今回の自己免疫反応に主たる役割を果たしている可能性も否定できない。以上の可能性を除外し得るかを調べるために、B 細胞や T 細胞、NKT 細胞のいない RAG2 欠損マウスに、野生型マウスの脾臓から採取した B 細胞サブセットと T 細胞サブセットを移入して、上記と同様の結果が得られるかを検討した(図 11A)。またこの際、MZB と FoB の主要な B 細胞サブセットを分離投与することで、抗核抗体産生に関与する B 細胞についても検討した。

その結果、Tc を移入して 4 週間経過しても、いずれの群においても移入した B 細胞サブセットのパターンが保持されていること、それと同時に、B 細胞サブセットに偏りがあるにもかかわらず、両者において $GL-7^+Fas^+CD19^+$ 細胞が多数出現し、germinal center が多く形成されていること、そして両者において Tfh が出現していることが確認され(図 11B)、抗核抗体の産生も両者で確認された(図 11C)。

以上より、抗核抗体産生は野生型マウスの脾臓に存在する B 細胞と T 細胞のみにより十分誘導され、そして germinal center 形成と Tfh 細胞の誘導が長期にわたって持続的に起こることが確認された。

CD8⁺ T細胞による抗核抗体産生の誘導

次に、germinal center の形成と抗核抗体産生に CD4⁺CD25⁻ T 細胞が必要か検討するため、CD4⁺ T 細胞と同様に homeostatic proliferation を生じる CD8⁺ T 細胞を移入して比較検討した結果(図 12A)、CD8⁺ T 細胞を移入した群では GC B 細胞の形成が極めて少なく(図 12B)、抗核抗体の産生についても促進されていなかった(図 12C)。

以上より、効率的な germinal center の形成誘導には CD4⁺CD25⁻ T 細胞が必要で、抗核抗体産生に関しても同様であることが判明した。

抗核抗体産生におけるT細胞受容体(TCR) の特異性の関与

Homeostatic proliferation による自己免疫の誘導機序として、自己親和性の高い T 細胞が増殖しやすくなって自己免疫疾患の誘導へと至る可能性が指摘されている[13]ことから、非自己抗原であるニワトリ卵白アルブミン(OVA)を認識する単一 T 細胞受容体のみを発現する Rag2 欠損 DO11.10 マウス(RagDO マウス)由来の CD4⁺ T 細胞を移入し、本系でもこの機序が関与しているか検討した結果(図 13A)、RagDO マウス由来 CD4⁺ T 細胞をヌードマウスに移入しても、Tc 移入群と遜色のない高抗体価の抗核抗体産生を認めた(図 13B,C)。

上記の結果より、本系における homeostatic proliferation による抗核抗体の誘導機序が、自己反応性 T 細胞の選択的増殖のみでは説明できないと考えられた。

また、ヌードマウスへ Tc を移入する本系では移入後 2 ヶ月程度で胃炎や腸炎などの臓器特異的自己免疫疾患が発症することが知られているが、これらが抗核抗体産生と同様に TCR 特異性に依存しない機序で誘導されるかを検討するため、Tc、RagDO マウス由来の Tc をヌードマウスに移入後 8 週間までのレシピエントマウスの体重測定を行い(図 14A)、8 週目の病理組織学的検索も行った(図 14B)。その結果、Tc 移入群は 8 週目で有意な体重減少を認め、腸炎を発症するのに対して、RagDO マウス由来 CD4⁺ T 細胞を移入した群では体重減少を認めず、腸炎も発症しなかった。胃炎においても同様の結果であった。

そのため、全身性自己免疫応答である抗核抗体産生と臓器特異的自己免疫疾患の発症では TCR 特異性の関与が異なり、抗核抗体産生に関しては独自の機序が存在していると考えられた。

抗核抗体産生におけるToll like receptors の関与

MRL/lpr マウスなどの他のループスモデルマウスで抗核抗体産生に対する TLR7/8/9 の関与が報告されていることから、本系における関与を検討するため、ヌードマウスへ Tc を移入するとともに、TLR 阻害ホスホロチオエート化オリゴヌクレオチドを投与して TLR のシグナル伝達を阻害し、4 週目の血清を用いて蛍光抗体法で抗核抗体価を評価した結果、TLR9 の阻害により有意な抗核抗体の産生低下が認められた(図 15B)。TLR7 阻害でも同様に低下傾向を認めたが、有意差はみられなかった(図 15B)。このことより、本系においても、TLR の抗核抗体産生に対する促進的役割が確認された。

Germinal centerの形成およびTfhの分化に対するTreg、TLR9、pDCの影響

次に本系の抗核抗体産生に影響をもつ Treg と TLR9 と pDC が、germinal center の形成と Tfh の分化に及ぼす影響を検討した(図 16A)。

まず germinal center の形成について検討すると、GC B 細胞の割合は、Treg の存在のほか、TLR9 阻害や pDC 除去により減少傾向を示した(図 16B)。したがって、Tc 移入による germinal center 形成には TLR9 刺激や pDC が関与し、Treg によりこの過程が抑制されると考えられた。

次に Tfh の出現について検討すると、Treg の存在や pDC 除去により明らかな減少を認めたが(図 16C,D)、TLR9 阻害では明らかな変化を認められなかった。Tfh の出現には TLR9 以外の TLR7/8 などが関与している可能性や、オリゴヌクレオチドでは完全な阻害ができなかった可能性、germinal center 形成には TLR 刺激が重要だが Tfh 形成には重要ではない可能性などが考えられた。

次に Tc 移入によるレシピエントマウス脾臓におけるリンパ濾胞構造、CD4⁺T 細胞、PD-1⁺細胞、pDC の変化が、Treg の存在、TLR9 阻害、pDC 除去によりいかなる影響をうけるかを、脾臓凍結切片を用いて免疫蛍光染色により評価した結果(図 17)、Tc 移入により誘導されるリンパ濾胞の増大が Treg の存在や TLR9 阻害、pDC 除去下では抑制されていることが判明した。さらに、B 細胞領域における germinal center 形成に伴う CD4⁺T 細胞の増加や、同領域での PD-1⁺細胞の出現も Treg の存在や pDC 除去により抑制されていた。Tc 移入により誘導される、T 細胞領域での pDC の増加も、Treg の存在や TLR9 阻害により減少していた。

これらのことより、germinal center 形成や Tfh の分化には pDC が大きく関与し、Treg がこの過程を抑制していることが確認できた。TLR9 に関しては、germinal center 形成に対

する影響を認めた。

最後に、Tc 移入群における樹状細胞の変化が pDC だけではなく、濾胞樹状細胞(FDC)にも生じているか、組織染色により検討した(図 18)。FDC は FDC-M1 の染色で検出をした結果、いずれの群においても B 細胞濾胞部の FDC 染色は野生型マウスと比較して変化がなかった。一方、pDC は、野生型マウスでは PDCA-1 で染色されるだけではなく FDC-M1 も共発現しており、この共発現は Tc 移入群では消失し、Treg の存在、TLR9 阻害、pDC 除去によって再び認められた。以上より、Tc 移入群の pDC は、数の増大だけではなく質的な変化も生じていることが示唆された。

考察

本研究は、ヌードマウスへの Tc 移入が、全例に早期より長期間持続する IgG タイプの高抗体価の抗核抗体を産生する系となることを蛍光抗体法、免疫沈降法、ELISA 法を用いて明らかにした。本系は、T 細胞移入時やその後に抗体やサイトカインなどを投与したり、移入細胞やレシピエントを遺伝子改変マウス由来に変更したりすることで、抗体産生に与える分子や細胞群を同定するのに容易な系となっており、従来のモデルとは異なる特徴を有する有用な動物モデルと考える。

そしてこの系において、Tc の homeostatic proliferation が抗核抗体の誘導とともに脾臓に著明な germinal center 形成と germinal center 内での CXCR5⁺CXCR4⁺ICOS⁺PD-1⁺CD4⁺T 細胞の誕生を誘導していることを明らかにした。

本系においては IgG タイプのクラススイッチの生じた抗核抗体が出現することから、この germinal center 形成が抗核抗体産生に深く関わっていることが推測される。一般的に、胸腺依存性の抗原では、germinal center の形成と抗体の産生に CD4⁺T 細胞を必要としている。胸腺の欠損したヌードマウスにおいても、脾臓に存在しているわずかな T 細胞により germinal center が形成され得るが、抗体産生細胞の誕生には胸腺由来 T 細胞が必要であることが示されている[37]。一方、胸腺非依存性抗原では、T 細胞が存在しない状況下でも germinal center 形成が可能であり、濾胞外形質細胞の誕生も生じうることが報告されている[38, 39]。抗核抗体は胸腺依存性抗原であり胸腺由来 T 細胞が必要と考えられるため、germinal center 内に限局して存在する CXCR5⁺CXCR4⁺ICOS⁺PD-1⁺CD4⁺T 細胞が、germinal center の形成に重要な役割を果たしていると考えた。

この CXCR5⁺CXCR4⁺ICOS⁺PD-1⁺CD4⁺T 細胞が、機能分子として IL-21 を産生していること、そして B 細胞との共培養により IgG の産生誘導能を有することが確認でき、Tfh としての機能的要件を満たすと考えた。しかし従来報告されている Tfh は germinal center に存在するために CXCR5 を発現しているが、本系で germinal center 内に存在する T 細胞は CXCR5 の発現が認められず、Germinal center に局在するために別の分子が関与していると考えられるが、現在のところ不明である。ただ、Tfh が germinal center に存在するためには CXCR5 の発現だけではなく、T 細胞ゾーンから出るために CCR7 の発現低下も必要なことが示されている[40]が、本系で出現している CXCR4⁺ICOS⁺PD-1⁺CD4⁺細胞は CCR7 陰性であり、この要件は満たしている。また、T 細胞における CXCR5 発現を欠いたマウスにおい

ても、胸腺依存性抗原に対する免疫応答に際して **germinal center** の形成は可能であり、その内部に T 細胞が出現していることが示されている[41]。以上の知見より、**CXCR5⁺CXCR4⁺ICOS⁺PD-1⁺CD4⁺T** 細胞が、B 細胞濾胞に局在して **germinal center** の形成と抗体産生を促す細胞として機能するという Tfh の要件を満たしている。

この **CXCR5⁺CXCR4⁺ICOS⁺PD-1⁺CD4⁺T** 細胞と同様の表面分子を有する細胞が **MRL/lpr** ループスモデルマウスにおいても存在することが報告されている[27]が、これは B 細胞濾胞外に局在する **extrafollicular helper T** 細胞としての報告である。この **CXCR5⁺CXCR4⁺ICOS⁺PD-1⁺CD4⁺T** 細胞が自己免疫に関連した細胞群として、多くの自己免疫疾患モデルマウスに広く存在するのか、他のモデルでも検討を要すると考える。

ただ **CXCR5** の発現の有無に関しては、**negative control** の設定や検出抗体の変更により詳細に厳密なる検討が必要とも考えており、これは今後の課題としたい。

Tfh と抗核抗体との関連についてはこれまで、**ICOS** 欠損 **MRL-lpr/lpr** マウスで抗核抗体の産生低下を認めることや[42]、**lupus** 様の自己免疫疾患を自然発症する **sanroque mouse** で過剰な **ICOS** 発現と Tfh 分化、GC 形成、抗核抗体価上昇を認めること[43]などから関連があるとされていたが、本系での検討はこれらの断片的報告と一致した。

Homeostatic proliferation における Tfh の出現については本研究で示されたが、その詳細な機序については更なる検討を行いたい。**Homeostatic proliferation** は **IL-21** が関与し促進されることが示されているが[13]、同時にこの **IL-21** は Tfh が分化する際に重要な役割を担っており[26]、両者には **IL-21** を介した密接な関連が示唆される。生理的な現象である **homeostatic proliferation** が誘導される際に亢進する **IL-21** 産生が、Tfh の誘導を促している可能性がある。

正常リンパ球のみによる **homeostatic proliferation** で **germinal center** 形成、Tfh 分化、抗核抗体産生が誘導されることが、野生型マウスの B、T リンパ球を **RAG2** 欠損マウスに移入することで確認され、本系の病態が胸腺を欠損したヌードマウス由来のリンパ球に帰結しないことが証明された。

また **CD4⁺CD25⁺T** 細胞による **homeostatic proliferation** が Tfh の分化、**germinal center** の形成、抗核抗体産生に必要なことが、**CD4⁺T** 細胞と同様に **homeostatic proliferation** を起こす **CD8⁺T** 細胞を移入しても **germinal center** 形成、抗核抗体産生ともに促進されなかったことで証明された。

また、本系においては多様な自己抗原に対する抗核抗体が産生されるが、それぞれの自己抗原に対応する多様な TCR が必要ではないことが、単一 TCR のみを有する RagDO の CD4⁺T 細胞を移入する系でも抗核抗体が産生されたことで確認された。しかし野生型マウスの Tc 移入では長期の経過で腸炎等の臓器特異的自己免疫疾患を発症するが、RagDO の CD4⁺細胞を移入しても腸炎は全く発症しなかった。抗核抗体産生はごく早期より認められることから腸炎の誘導とは時間的な相違があることとあわせて、抗核抗体産生と腸炎発症(臓器特異的自己免疫疾患)の両者には異なる誘導機序があると考えた。また、リンパ球移入による腸炎発症の系では、IL-17 が重要な役割を担っているとする報告があり[44]、本研究モデルでも腸炎発症時の脾臓に IL-17 産生細胞が出現するのを確認しているが、抗核抗体出現時には脾臓における IL-17 の産生は認められない。このようなことから、全身性自己免疫現象である抗核抗体産生の機序は、臓器特異的自己免疫疾患発症の機序とは別に検討する必要がある。

抗核抗体産生に対して、核酸受容体である TLR7/8/9 が重要な役割を示すことがループスマウスモデルを用いた種々の論文で示されてきた[45]。実際に対応抗原の判明した抗二本鎖 DNA 抗体、抗ヌクレオソーム抗体、抗 RNP 抗体、抗 Sm 抗体などは、いずれも核酸蛋白複合体に対する抗体である。本系でもオリゴヌクレオチドによる TLR の阻害により抗核抗体価の低下傾向をみとめたが、TLR ノックアウトマウスを使用している系とは異なっているうえ、単独の TLR 阻害であったため、フェノタイプが強く出なかった可能性がある。

また、本系における TLR7/8/9 に結合する抗原の由来は同定できていない。Homeostatic proliferation に伴い activation-induced cell death が誘導されてアポトーシス細胞が増加する事により核酸蛋白複合体が大量に出現する可能性を考えるが、この解明も今後の検討を要する課題である。

一方、これらの核酸受容体を豊富に有する pDC を除去した場合、germinal center 形成や Tfh の分化が著明に障害されていた。これまでの報告でも、pDC は B 細胞免疫応答に対して、T 細胞を介する機序、介さない機序を通して影響を与えることが示されており[46]、本系でも Tc の homeostatic proliferation により増殖や活性化した pDC が、germinal center 形成や Tfh の分化に重要な役割を担ったと考えられる。

全身性エリテマトーデスにおいても pDC の病因的な役割が推測されており、全身性自己免疫における pDC の役割は興味深い。しかし、今回長期間十分に pDC を除去することがコストの面からできなかった。また pDC は生体内で多様な役割を担っていることから、

長期的に抗核抗体産生や臓器特異的自己免疫疾患に与える影響は不明である。そのため、pDC が本系において果たす役割に関しても今後の検討を要するものと思われる。

また、Tc 移入群で FDC-M1 を欠いた pDC が多数集積していた。FDC-M1 は最近の報告ではアポトーシス細胞に付着する MFG-E8 をみているものと考えられており[47, 48]、この MFG-E8 が付着したアポトーシス細胞が MFG-E8 を介して貪食細胞に補足される機序は非炎症性にアポトーシス細胞が処理されるための重要な機構となっている。そして MFG-E8 を欠いたマウスでは自己免疫が生じることが報告されている[47]。この分子は未熟樹状細胞で発現することから、Tc 移入群における MFG-E8 陰性 pDC の出現は、pDC の成熟または活性化状態を示しているだけの可能性もあるが、この分子を欠いたマウスでは全身性自己免疫疾患が生じることから、本系における自己免疫と関連の観点からも興味深い結果と思われる。

以上の本研究により、Treg を除いた CD4⁺T 細胞の homeostatic proliferation は、全例に移入後 2 週の早期から長期間、高抗体価の IgG タイプの抗核抗体を誘導し、全身性自己免疫寛容破綻の機序を検討するのに適した系であること、また本系から、制御性 T 細胞を欠く CD4⁺T 細胞の homeostatic proliferation は、germinal center 形成とその内部に局在する CXCR5⁺CXCR4⁺ICOS⁺PD-1⁺Tfh 細胞の分化とを誘導し、この過程は TLR シグナルの阻害や pDC の除去により抑制されることが判明した。即ち、生理的に重要な CD4⁺T 細胞の homeostatic proliferation は、Tc による Tfh 様細胞の分化誘導と germinal center 形成とともに抗核抗体誘導という危険を内在しているが、それを Treg が抑制し、リンパ球系の再構築という生理的機能を果たしていることが本研究より明らかになった(図 19.)。

Homeostatic proliferation や Tfh と全身性自己免疫との関連が本系で明らかになったことより、IL-21 や ICOS/B7RP-1 を標的とする薬剤が、全身性自己免疫疾患の治療につながる可能性が示唆された。既に幾つかのマウスモデルでその検討がなされているが[28]、ヒトにおける Tfh と自己免疫との関連が更に明らかになれば、Tfh を標的とする種々の治療も検討すべき価値のある課題と考える。

参考文献

1. Jevnikar, A.M., M.J. Grusby and L.H. Glimcher. *Prevention of nephritis in major histocompatibility complex class II-deficient MRL-lpr mice*. J Exp Med, **179**(4): p. 1137-43. 1994
2. Koh, D.R., A. Ho, A. Rahemtulla, W.P. Fung-Leung, H. Griesser and T.W. Mak. *Murine lupus in MRL/lpr mice lacking CD4 or CD8 T cells*. Eur J Immunol, **25**(9): p. 2558-62. 1995
3. Christensen, S.R., M. Kashgarian, L. Alexopoulou, R.A. Flavell, S. Akira and M.J. Shlomchik. *Toll-like receptor 9 controls anti-DNA autoantibody production in murine lupus*. J Exp Med, **202**(2): p. 321-31. 2005
4. Wu, X. and S.L. Peng. *Toll-like receptor 9 signaling protects against murine lupus*. Arthritis Rheum, **54**(1): p. 336-42. 2006
5. Subramanian, S., K. Tus, Q.Z. Li, A. Wang, X.H. Tian, J. Zhou, C. Liang, G. Bartov, L.D. McDaniel, X.J. Zhou, R.A. Schultz and E.K. Wakeland. *A Tlr7 translocation accelerates systemic autoimmunity in murine lupus*. Proc Natl Acad Sci U S A, **103**(26): p. 9970-5. 2006
6. Baechler, E.C., F.M. Batliwalla, G. Karypis, P.M. Gaffney, W.A. Ortmann, K.J. Espe, K.B. Shark, W.J. Grande, K.M. Hughes, V. Kapur, P.K. Gregersen and T.W. Behrens. *Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus*. Proc Natl Acad Sci U S A, **100**(5): p. 2610-5. 2003
7. Bennett, L., A.K. Palucka, E. Arce, V. Cantrell, J. Borvak, J. Banchereau and V. Pascual. *Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood*. J Exp Med, **197**(6): p. 711-23. 2003
8. Ronnblom, L., M.L. Eloranta and G.V. Alm. *Role of natural interferon-alpha producing cells (plasmacytoid dendritic cells) in autoimmunity*. Autoimmunity, **36**(8): p. 463-72. 2003
9. Santiago-Raber, M.L., C. Laporte, L. Reininger and S. Izui. *Genetic basis of murine lupus*. Autoimmun Rev, **3**(1): p. 33-9. 2004
10. Satoh, M. and W.H. Reeves. *Induction of lupus-associated autoantibodies in BALB/c mice by intraperitoneal injection of pristane*. J Exp Med, **180**(6): p. 2341-6. 1994
11. Ernst, B., D.S. Lee, J.M. Chang, J. Sprent and C.D. Surh. *The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the*

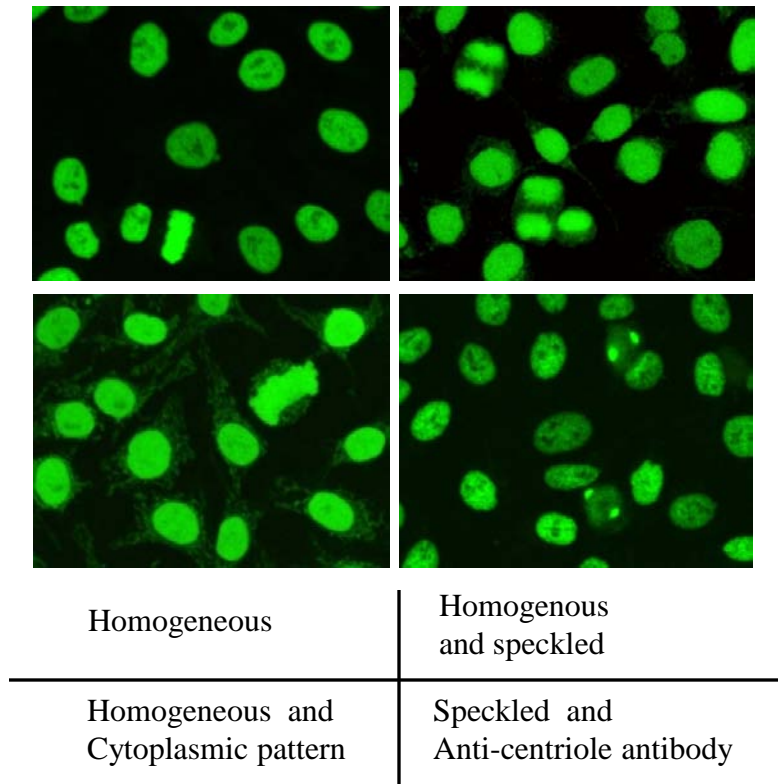
- periphery*. Immunity, **11**(2): p. 173-81. 1999
12. Baccala, R. and A.N. Theofilopoulos. *The new paradigm of T-cell homeostatic proliferation-induced autoimmunity*. Trends Immunol, **26**(1): p. 5-8. 2005
 13. King, C., A. Ilic, K. Koelsch and N. Sarvetnick. *Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity*. Cell, **117**(2): p. 265-77. 2004
 14. Le Campion, A., M.C. Gagnerault, C. Auffray, C. Becourt, M. Poitrasson-Riviere, E. Lallemand, B. Bienvenu, B. Martin, F. Lepault and B. Lucas. *Lymphopenia-induced spontaneous T-cell proliferation as a cofactor for autoimmune disease development*. Blood, **114**(9): p. 1784-93. 2009
 15. Fujii, H., L. Shao, I. Colmegna, J.J. Goronzy and C.M. Weyand. *Telomerase insufficiency in rheumatoid arthritis*. Proc Natl Acad Sci U S A, **106**(11): p. 4360-5. 2009
 16. Kurosaka, D., J. Yasuda, H. Ikeshima-Kataoka, Y. Ozawa, K. Yoshida, C. Yasuda, I. Kingetsu, S. Saito and A. Yamada. *Decreased numbers of signal-joint T cell receptor excision circle-containing CD4+ and CD8+ cells in systemic lupus erythematosus patients*. Mod Rheumatol, **17**(4): p. 296-300. 2007
 17. Hug, A., M. Korporal, I. Schroder, J. Haas, K. Glatz, B. Storch-Hagenlocher and B. Wildemann. *Thymic export function and T cell homeostasis in patients with relapsing remitting multiple sclerosis*. J Immunol, **171**(1): p. 432-7. 2003
 18. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh and M. Toda. *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol, **155**(3): p. 1151-64. 1995
 19. Lentz, V.M. and T. Manser. *Self-limiting systemic autoimmune disease during reconstitution of T cell-deficient mice with syngeneic T cells: support for a multifaceted role of T cells in the maintenance of peripheral B cell tolerance*. Int Immunol, **12**(11): p. 1483-97. 2000
 20. Cozine, C.L., K.L. Wolniak and T.J. Waldschmidt. *The primary germinal center response in mice*. Curr Opin Immunol, **17**(3): p. 298-302. 2005
 21. Fujimura, S., T. Matsui, K. Kuwahara, K. Maeda and N. Sakaguchi. *Germinal center B-cell-associated DNA hypomethylation at transcriptional regions of the AID gene*. Mol Immunol, **45**(6): p. 1712-9. 2008

22. Fazilleau, N., L. Mark, L.J. McHeyzer-Williams and M.G. McHeyzer-Williams. *Follicular helper T cells: lineage and location*. Immunity, **30**(3): p. 324-35. 2009
23. Johnston, R.J., A.C. Poholek, D. DiToro, I. Yusuf, D. Eto, B. Barnett, A.L. Dent, J. Craft and S. Crotty. *Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation*. Science, **325**(5943): p. 1006-10. 2009
24. Nurieva, R.I., Y. Chung, G.J. Martinez, X.O. Yang, S. Tanaka, T.D. Matskevitch, Y.H. Wang and C. Dong. *Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells*. Science, **325**(5943): p. 1001-5. 2009
25. Yu, D., S. Rao, L.M. Tsai, S.K. Lee, Y. He, E.L. Sutcliffe, M. Srivastava, M. Linterman, L. Zheng, N. Simpson, J.I. Ellyard, I.A. Parish, C.S. Ma, Q.J. Li, C.R. Parish, C.R. Mackay and C.G. Vinuesa. *The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment*. Immunity, **31**(3): p. 457-68. 2009
26. Nurieva, R.I., Y. Chung, D. Hwang, X.O. Yang, H.S. Kang, L. Ma, Y.H. Wang, S.S. Watowich, A.M. Jetten, Q. Tian and C. Dong. *Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages*. Immunity, **29**(1): p. 138-49. 2008
27. Odegard, J.M., B.R. Marks, L.D. DiPlacido, A.C. Poholek, D.H. Kono, C. Dong, R.A. Flavell and J. Craft. *ICOS-dependent extrafollicular helper T cells elicit IgG production via IL-21 in systemic autoimmunity*. J Exp Med, **205**(12): p. 2873-86. 2008
28. Hu, Y.L., D.P. Metz, J. Chung, G. Siu and M. Zhang. *B7RP-1 blockade ameliorates autoimmunity through regulation of follicular helper T cells*. J Immunol, **182**(3): p. 1421-8. 2009
29. Kawahata, K., Y. Misaki, M. Yamauchi, S. Tsunekawa, K. Setoguchi, J. Miyazaki and K. Yamamoto. *Generation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells from autoreactive T cells simultaneously with their negative selection in the thymus and from nonautoreactive T cells by endogenous TCR expression*. J Immunol, **168**(9): p. 4399-405. 2002
30. Mandik-Nayak, L., J. Racz, B.P. Sleckman and P.M. Allen. *Autoreactive marginal zone B cells are spontaneously activated but lymph node B cells require T cell help*. J Exp Med, **203**(8): p. 1985-98. 2006
31. Barrat, F.J., T. Meeker, J. Gregorio, J.H. Chan, S. Uematsu, S. Akira, B. Chang, O. Duramad

- and R.L. Coffman. *Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus*. J Exp Med, **202**(8): p. 1131-9. 2005
32. Pawar, R.D., A. Ramanjaneyulu, O.P. Kulkarni, M. Lech, S. Segerer and H.J. Anders. *Inhibition of Toll-like receptor-7 (TLR-7) or TLR-7 plus TLR-9 attenuates glomerulonephritis and lung injury in experimental lupus*. J Am Soc Nephrol, **18**(6): p. 1721-31. 2007
 33. Duramad, O., K.L. Fearon, B. Chang, J.H. Chan, J. Gregorio, R.L. Coffman and F.J. Barrat. *Inhibitors of TLR-9 act on multiple cell subsets in mouse and man in vitro and prevent death in vivo from systemic inflammation*. J Immunol, **174**(9): p. 5193-200. 2005
 34. Ciavarra, R.P., A. Stephens, S. Nagy, M. Sekellick and C. Steel. *Evaluation of immunological paradigms in a virus model: are dendritic cells critical for antiviral immunity and viral clearance?* J Immunol, **177**(1): p. 492-500. 2006
 35. Yoneyama, H., K. Matsuno, E. Toda, T. Nishiwaki, N. Matsuo, A. Nakano, S. Narumi, B. Lu, C. Gerard, S. Ishikawa and K. Matsushima. *Plasmacytoid DCs help lymph node DCs to induce anti-HSV CTLs*. J Exp Med, **202**(3): p. 425-35. 2005
 36. Chang, M., A.J. Lee, L. Fitzpatrick, M. Zhang and S.C. Sun. *NF-kappa B1 p105 regulates T cell homeostasis and prevents chronic inflammation*. J Immunol, **182**(5): p. 3131-8. 2009
 37. Stedra, J. and J. Cerny. *Distinct pathways of B cell differentiation. I. Residual T cells in athymic mice support the development of splenic germinal centers and B cell memory without an induction of antibody*. J Immunol, **152**(4): p. 1718-26. 1994
 38. de Vinuesa, C.G., M.C. Cook, J. Ball, M. Drew, Y. Sunners, M. Cascalho, M. Wabl, G.G. Klaus and I.C. MacLennan. *Germinal centers without T cells*. J Exp Med, **191**(3): p. 485-94. 2000
 39. Toellner, K.M., W.E. Jenkinson, D.R. Taylor, M. Khan, D.M. Sze, D.M. Sansom, C.G. Vinuesa and I.C. MacLennan. *Low-level hypermutation in T cell-independent germinal centers compared with high mutation rates associated with T cell-dependent germinal centers*. J Exp Med, **195**(3): p. 383-9. 2002
 40. Haynes, N.M., C.D. Allen, R. Lesley, K.M. Ansel, N. Killeen and J.G. Cyster. *Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell*

- death gene-1high germinal center-associated subpopulation. J Immunol*, **179**(8): p. 5099-108. 2007
41. Arnold, C.N., D.J. Campbell, M. Lipp and E.C. Butcher. *The germinal center response is impaired in the absence of T cell-expressed CXCR5. Eur J Immunol*, **37**(1): p. 100-9. 2007
 42. Tada, Y., S. Koarada, Y. Tomiyoshi, F. Morito, M. Mitamura, Y. Haruta, A. Ohta and K. Nagasawa. *Role of inducible costimulator in the development of lupus in MRL/lpr mice. Clin Immunol*, **120**(2): p. 179-88. 2006
 43. Vinuesa, C.G., M.C. Cook, C. Angelucci, V. Athanasopoulos, L. Rui, K.M. Hill, D. Yu, H. Domasch, B. Whittle, T. Lambe, I.S. Roberts, R.R. Copley, J.I. Bell, R.J. Cornall and C.C. Goodnow. *A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. Nature*, **435**(7041): p. 452-8. 2005
 44. Leppkes, M., C. Becker, Ivanov, II, S. Hirth, S. Wirtz, C. Neufert, S. Pouly, A.J. Murphy, D.M. Valenzuela, G.D. Yancopoulos, B. Becher, D.R. Littman and M.F. Neurath. *RORgamma-expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F. Gastroenterology*, **136**(1): p. 257-67. 2009
 45. Christensen, S.R., J. Shupe, K. Nickerson, M. Kashgarian, R.A. Flavell and M.J. Shlomchik. *Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. Immunity*, **25**(3): p. 417-28. 2006
 46. Cerutti, A., X. Qiao and B. He. *Plasmacytoid dendritic cells and the regulation of immunoglobulin heavy chain class switching. Immunol Cell Biol*, **83**(5): p. 554-62. 2005
 47. Hanayama, R., M. Tanaka, K. Miyasaka, K. Aozasa, M. Koike, Y. Uchiyama and S. Nagata. *Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. Science*, **304**(5674): p. 1147-50. 2004
 48. Kranich, J., N.J. Krautler, E. Heinen, M. Polymenidou, C. Bridel, A. Schildknecht, C. Huber, M.H. Kosco-Vilbois, R. Zinkernagel, G. Miele and A. Aguzzi. *Follicular dendritic cells control engulfment of apoptotic bodies by secreting Mfge8. J Exp Med*, **205**(6): p. 1293-302. 2008

A.



B.

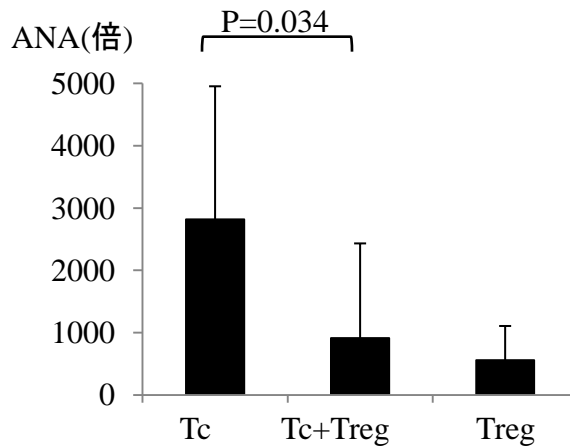
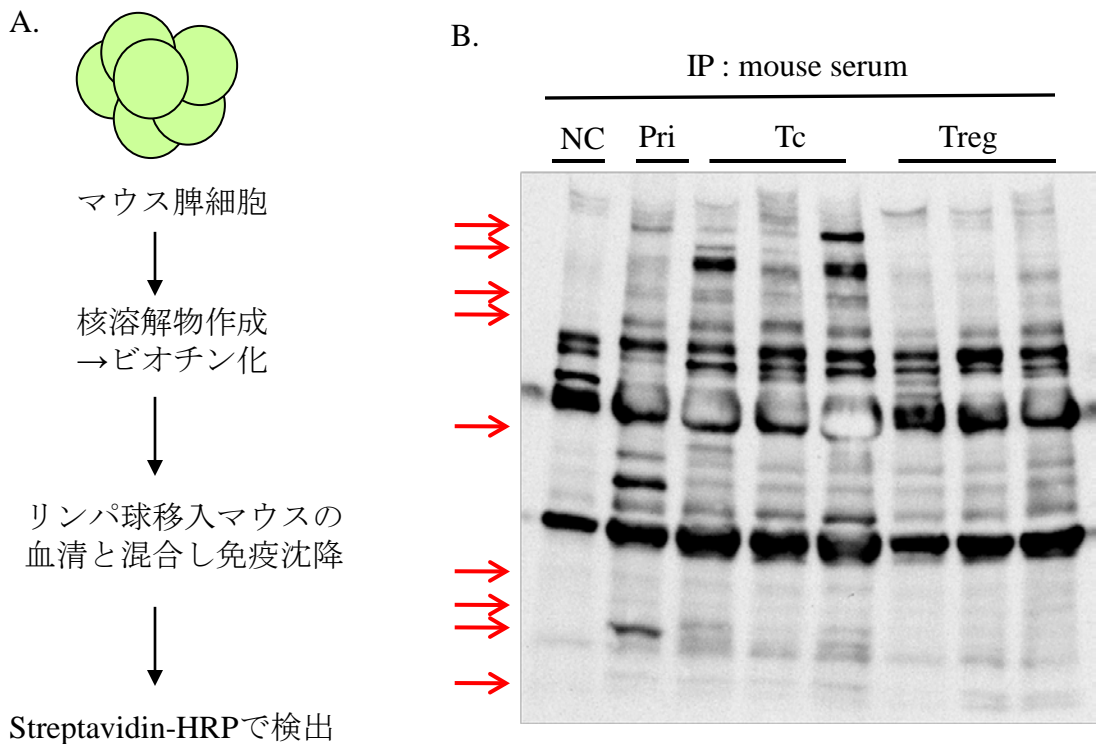


図1. 蛍光抗体法による抗核抗体産生の同定

BALB/cマウスの脾細胞より分離した 2.5×10^6 の $CD4^+CD25^-$ T細胞(Tc)、 $CD4^+$ T細胞(Tc+Treg)、 $CD4^+CD25^+$ T細胞(Treg)サブセットを7週齢のBALB/cヌードマウスに養子移入し、毎週血清を採取した。採取した血清を用いてHep2細胞を用いた蛍光抗体法で、各レシピエントにおける抗核抗体の検出を行った。

A. 移入後3週の血清で認められた抗核抗体パターンを示す。しかしいずれの群においてもhomogeneous patternが90%以上であり、他の染色パターンはごく少数である。

B. 移入後3週目における各レシピエントマウス血清における抗核抗体価を示す
(n=Tc群 10, Tc+Treg群 10, Treg群 4)



NC : negative control; 野生型BALB/cマウス

Pri : Pristane誘導による自己免疫疾患誘導マウス

(各種自己免疫症状の発現後に採取)

図2. 核内成分に対するIgGタイプの自己抗体産生についての、免疫沈降法による検討
A. 実験の概要を示す。BALB/c マウスの脾細胞より抽出した核成分をビオチン化し、TcまたはTregを移入して4週間後に採取したBALB/cヌードマウスの血清と反応させた後、免疫沈降した。沈降物に対してWestern blottingを行い、HRP結合ストレプトアビジンで可視化した。

B. 実験の結果を示す。野生型BALB/cマウスの血清を陰性コントロール、症状発現後のPristane誘導自己免疫疾患マウスの血清を陽性コントロールとした。NCにおいても非特異的なバンドが発現しているが、それと比較してもTc移入群で多彩なバンドの発現が認められた。

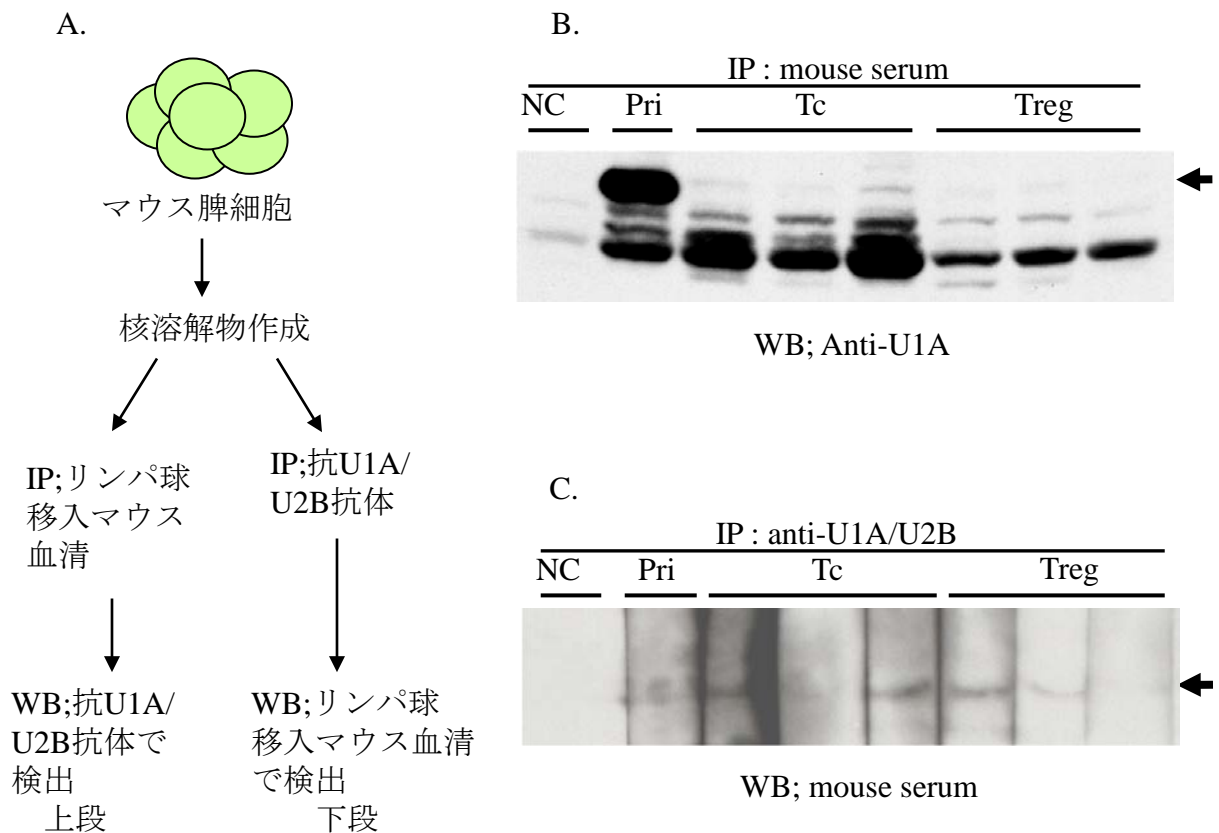


図3.ヒト全身性自己免疫疾患で認められる核内自己抗原に対する、IgGタイプの抗体産生に関する免疫沈降法による検討

A.実験の概要を示す。免疫沈降はIgGを吸着するアガロースビーズを用い、抗U1A抗体はIgGタイプのモノクローナル抗体を使用した。検出時はHRP結合抗マウスIgG抗体を使用した。T細胞移入マウスの血清は、移入後4週間のものを使用した。

B.核成分をCD4⁺T細胞サブセット移入BALB/cヌードマウス血清により免疫沈降した。沈降産物をSDS-PAGEにより展開し、抗U1A抗体によりWestern blottingを行ったところ、バンドが検出された。

C.核成分を抗U1A/U2B抗体により免疫沈降した。沈降産物をSDS-PAGEにより展開し、CD4⁺T細胞サブセット移入BALB/cヌードマウス血清によりWestern blottingを行ったところ、バンドが検出された。

U1A : 抗RNP抗体の対応抗原の一つ

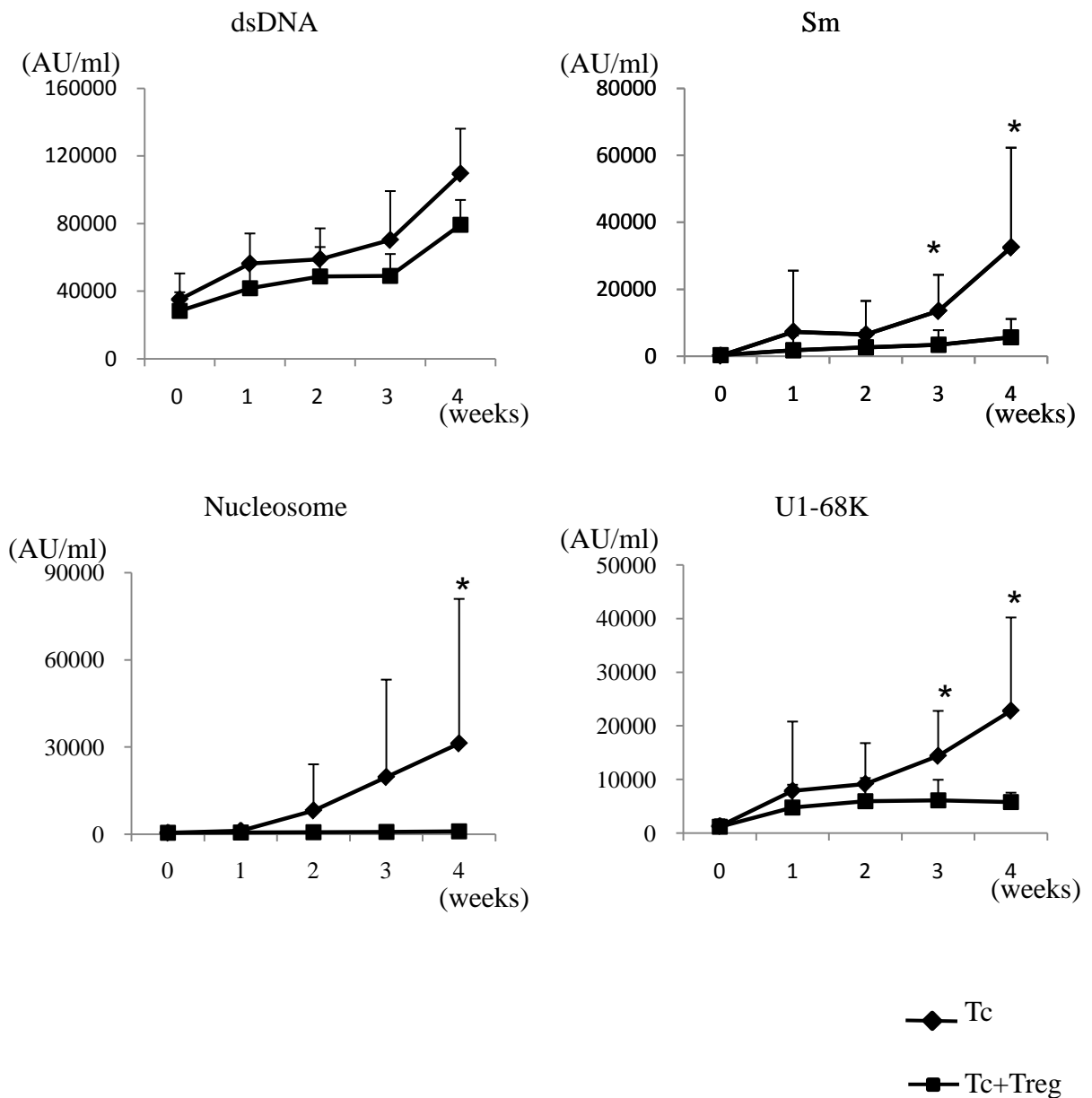


図4. ELISA法による抗核抗体の同定

T細胞サブセットを移入したレシピエントマウスの血清を50倍希釈して用い、ヌクレオソーム系としてdsDNAとnucleosome、スプライソゾーム系としてSmと68Kに対する抗体価を、ELISA法により測定した。(*: $p < 0.05$)

各群5匹。複数回の検討で、常に同様の傾向がみられた。

U1-68K：抗RNP抗体の対応抗原の一つ

AU：arbitrary unit

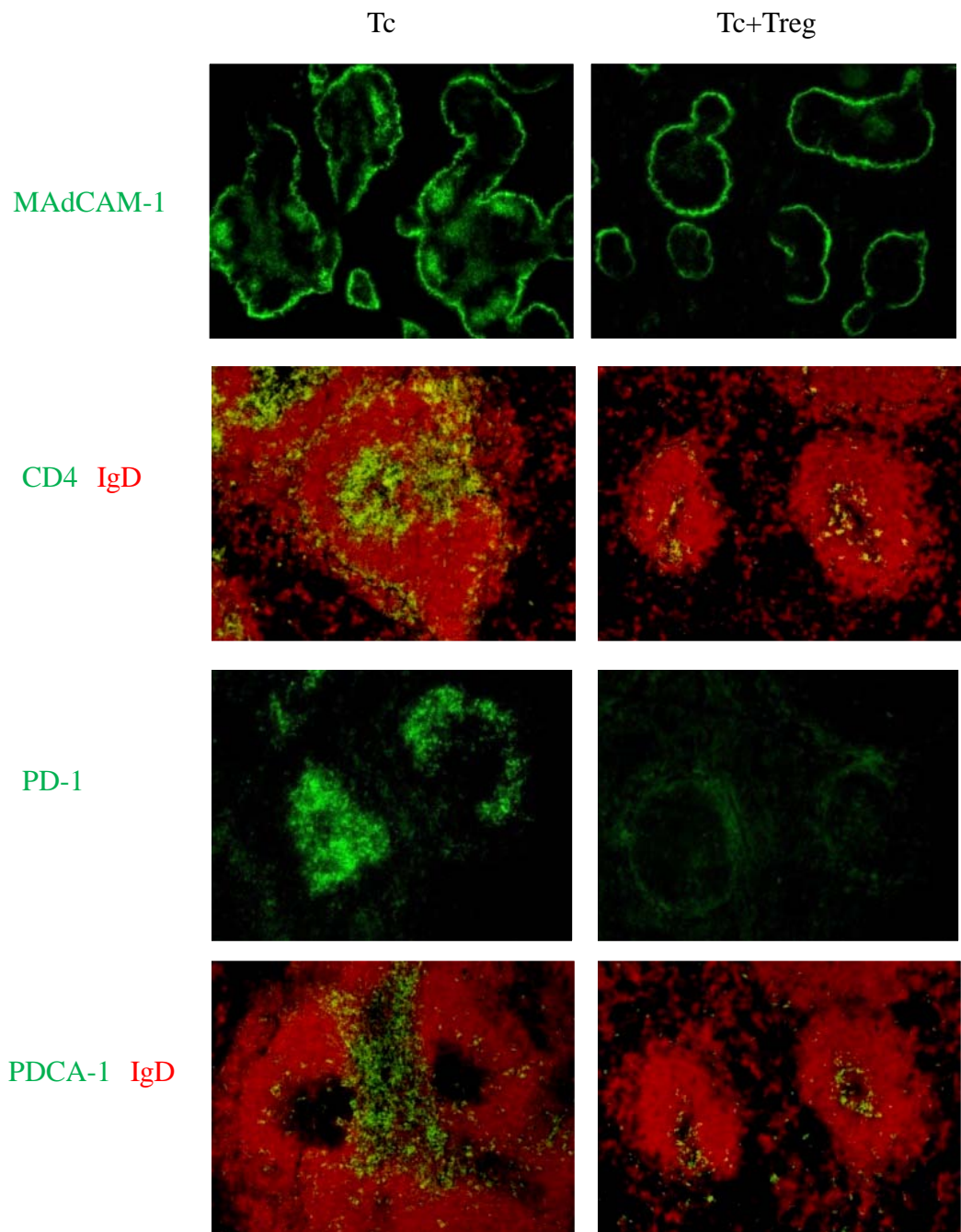


図5.レシピエントマウスの脾臓における組織学的変化の観察

TcまたはTc+Tregを7週齢のBALB/cヌードマウスに移入し、5日後に脾臓を採取した。その凍結切片を作製して、蛍光抗体法による免疫染色により両群の違いを観察した。

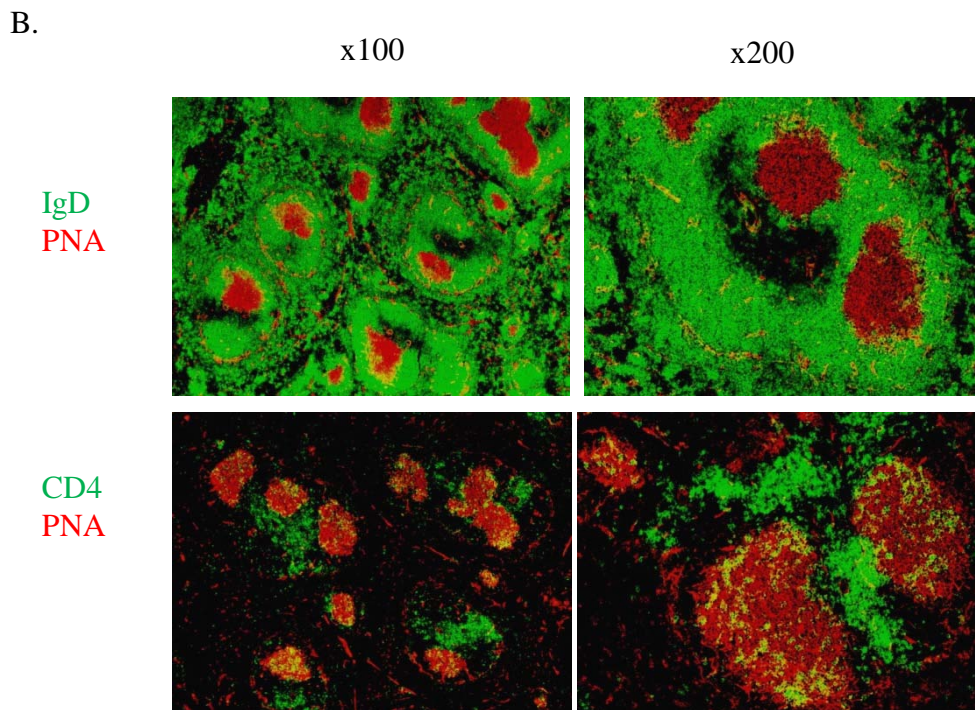
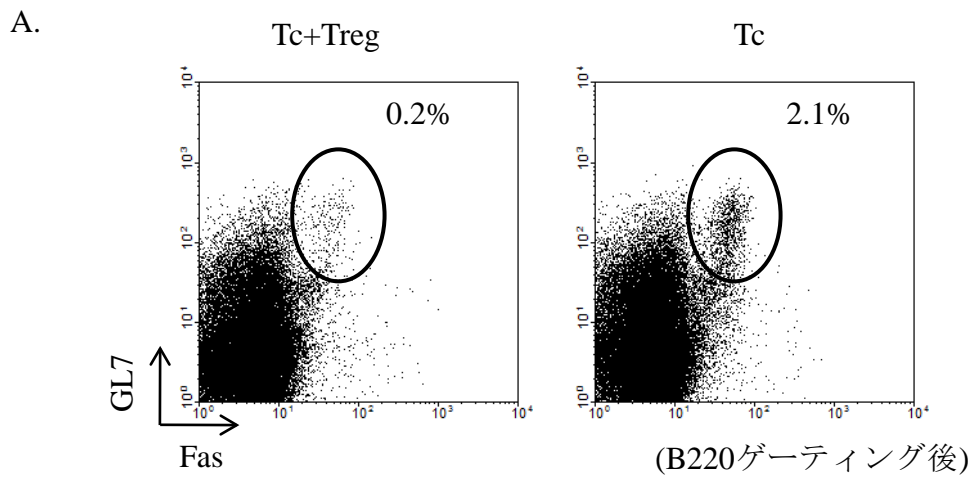
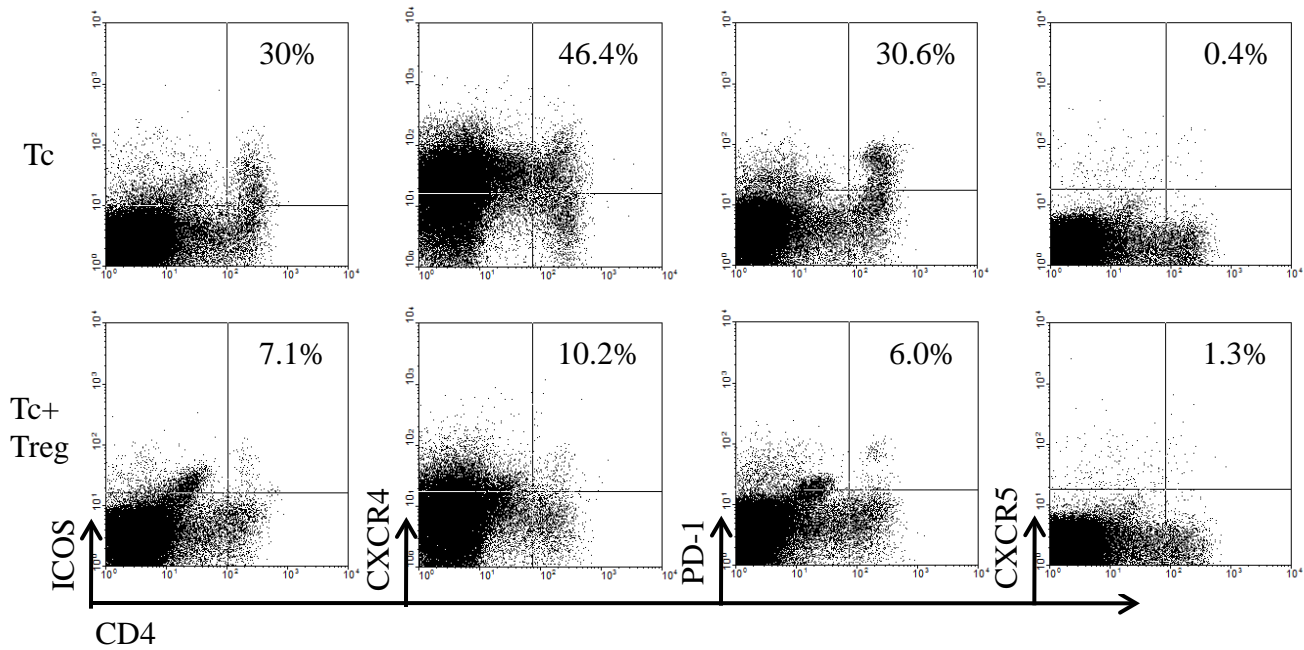


図6. Tc移入レシピエントにおけるgerminal centerの形成

A.TcもしくはTc+Tregを移入後5日で脾細胞を採取し、flow cytometryによりGL-7およびFasの発現について検討した。

B.Tcを移入して5日後のレシピエント脾臓より凍結切片を作成し、PNAや抗IgD抗体、抗CD4抗体により免疫蛍光染色を行った。

A.



B.

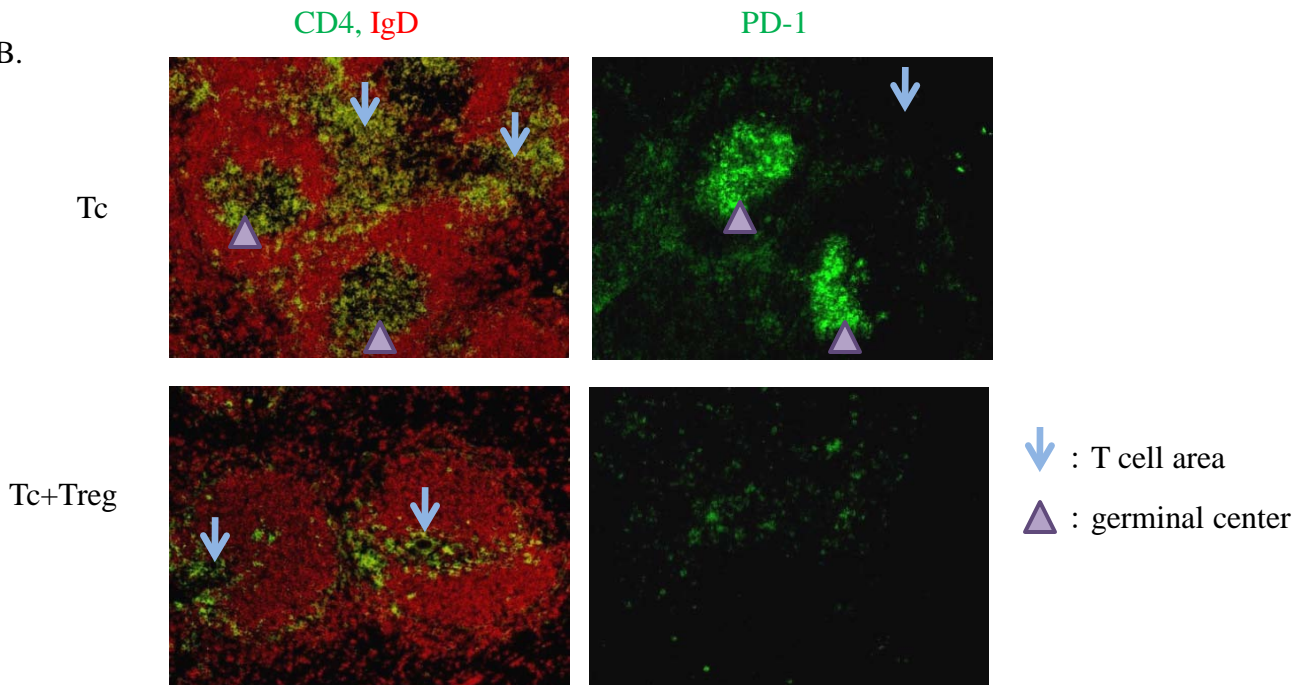


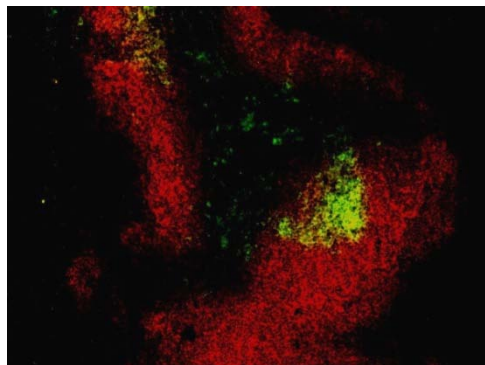
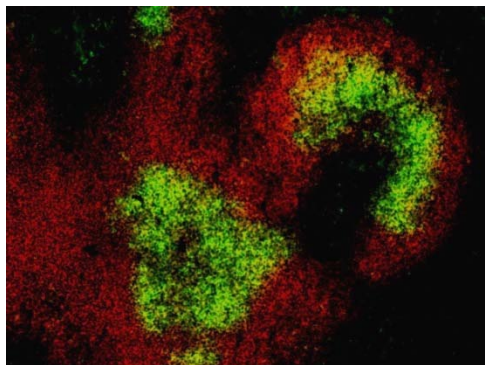
図7. Tc移入レシピエントにおけるCXCR4⁺ICOS⁺PD-1⁺T細胞の出現

TcまたはTc+Tregを移入後5日目のBALB/cヌードマウスより脾臓を採取して解析した。

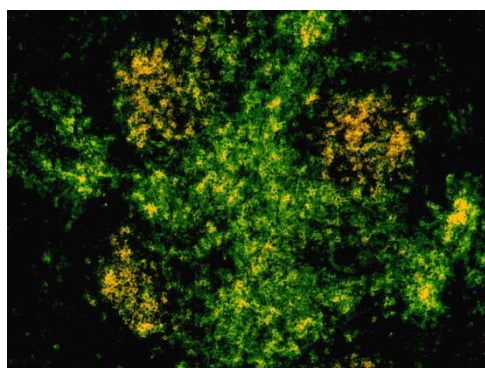
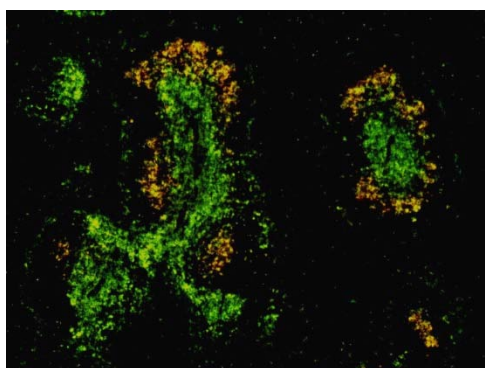
A.脾細胞におけるCD4、ICOS、CXCR4、CXCR5、PD-1の発現を、flow cytometryで解析した。

B.同時期の脾臓凍結切片におけるCD4やPD-1の発現分布を蛍光免疫染色により解析した。連続切片を使用しており、左右の組織像はほぼ同じ位置を選択している。

PD-1
CD19



CD4
PD-1



PD-1
PNA

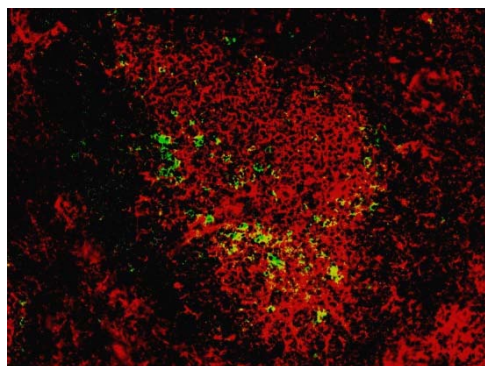
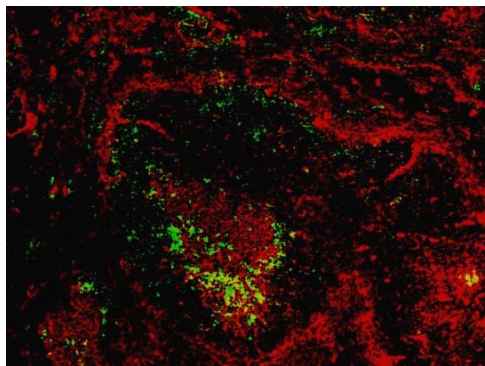
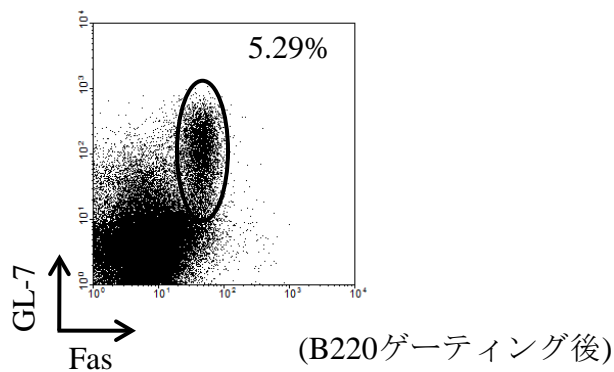


図8. Tc移入レシピエントの脾臓におけるPD-1⁺T細胞の局在に関する詳細な検討
Tc移入後5日のレシピエント脾臓凍結切片において、CD19⁺細胞、CD4⁺細胞、PNAに認識されるgerminal center、に対するPD-1陽性細胞の位置関係を二重染色で詳細に解析した。

A.



B.

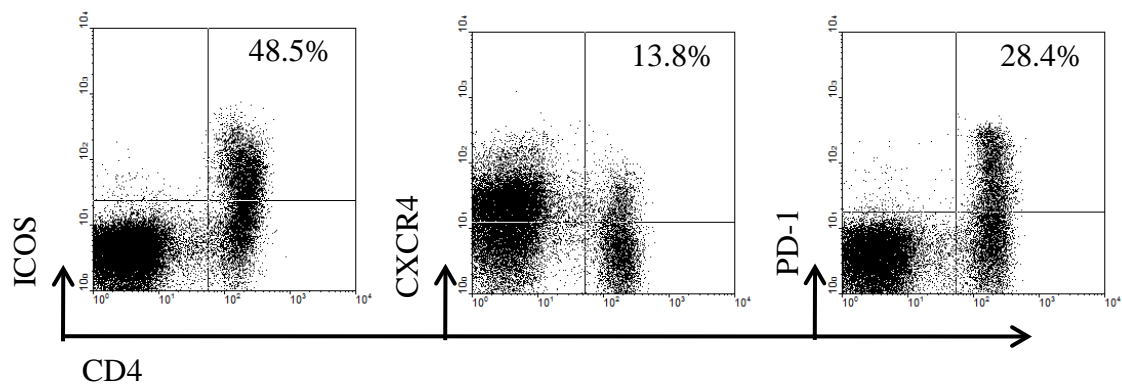
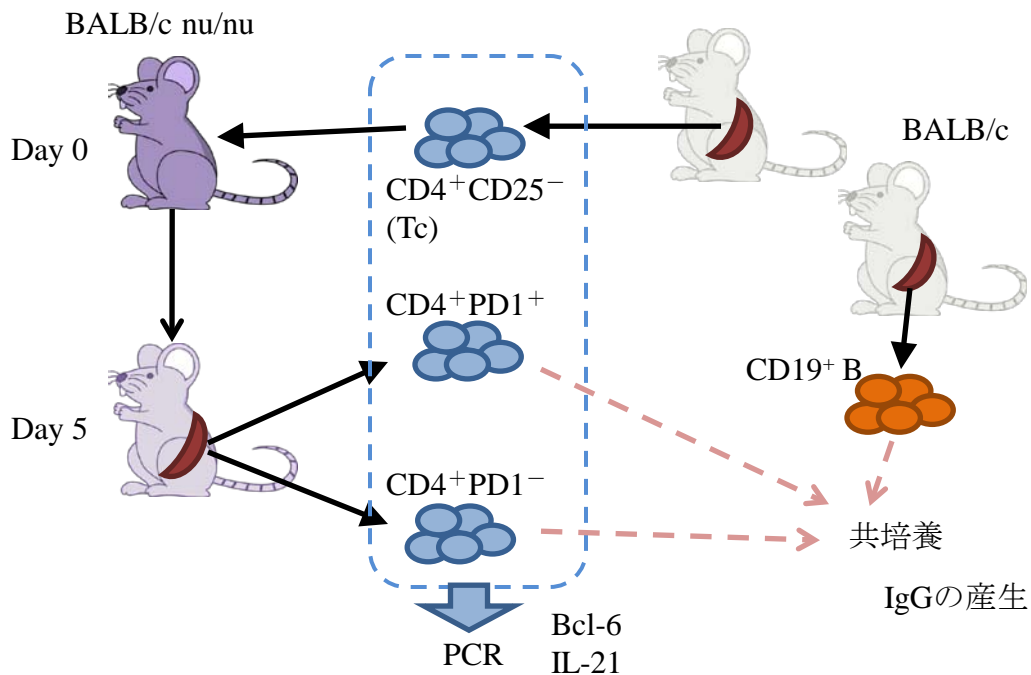


図9. Tc移入4週間後における脾細胞のリンパ球の解析

Tcを移入したBALB/cヌードマウスより、移入4週間後に脾細胞を分離して、
A: germinal center B細胞、B: Tfh様細胞について、長期における存在について
flow cytometryにより解析した。

A.



B.

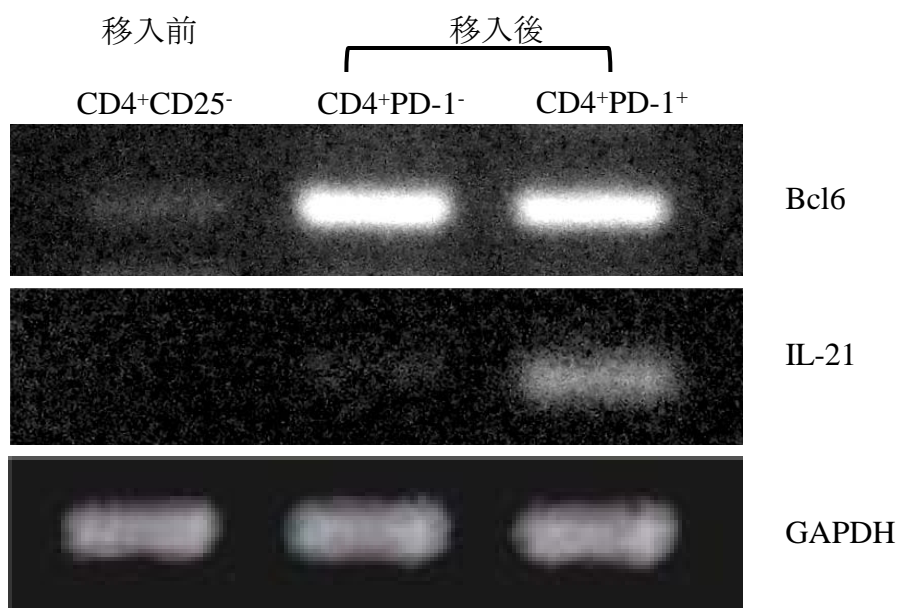


図10. CXCR5-CXCR4⁺ICOS⁺PD-1⁺CD4⁺T細胞の機能解析

A.実験の概要を示す。BALB/cマウスの脾臓よりTcを分離してBALB/cヌードマウスに移入して5日目に脾細胞を回収し、ここからCD4⁺PD1⁺細胞とCD4⁺PD1⁻細胞を分離した。これらのT細胞よりRNAを精製してPCRを行った。またBALB/cマウスよりCD19⁺B細胞を分離し、T細胞と共培養を行った。

B.移入前、移入後の各T細胞サブセットについて、半定量的PCRによりBcl6とIL-21の遺伝子発現を調べた。

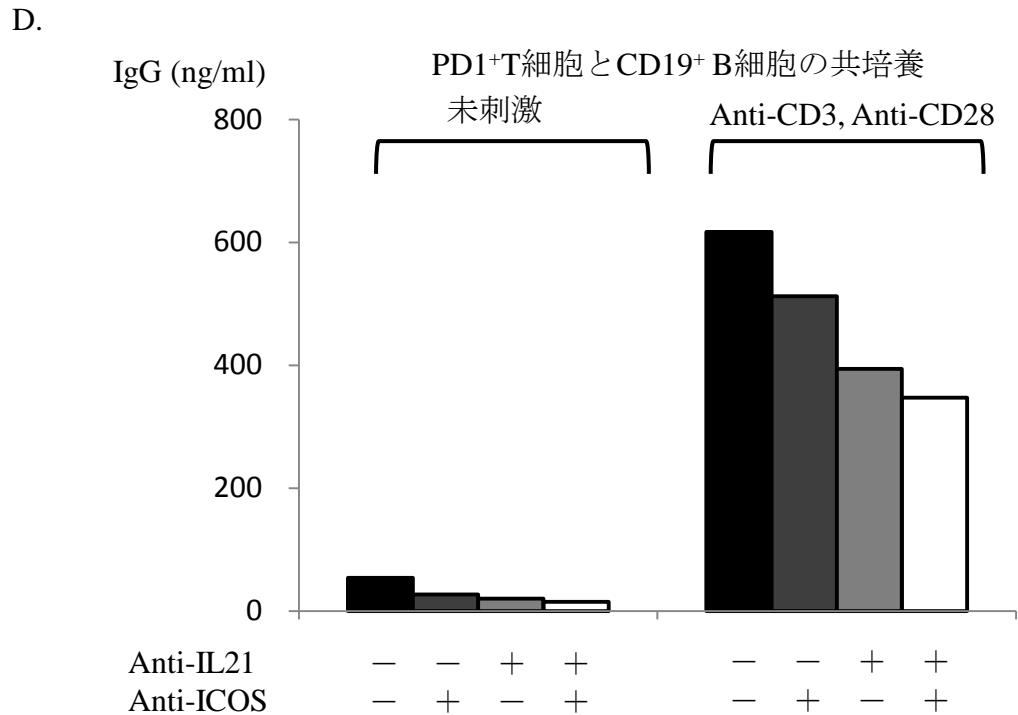
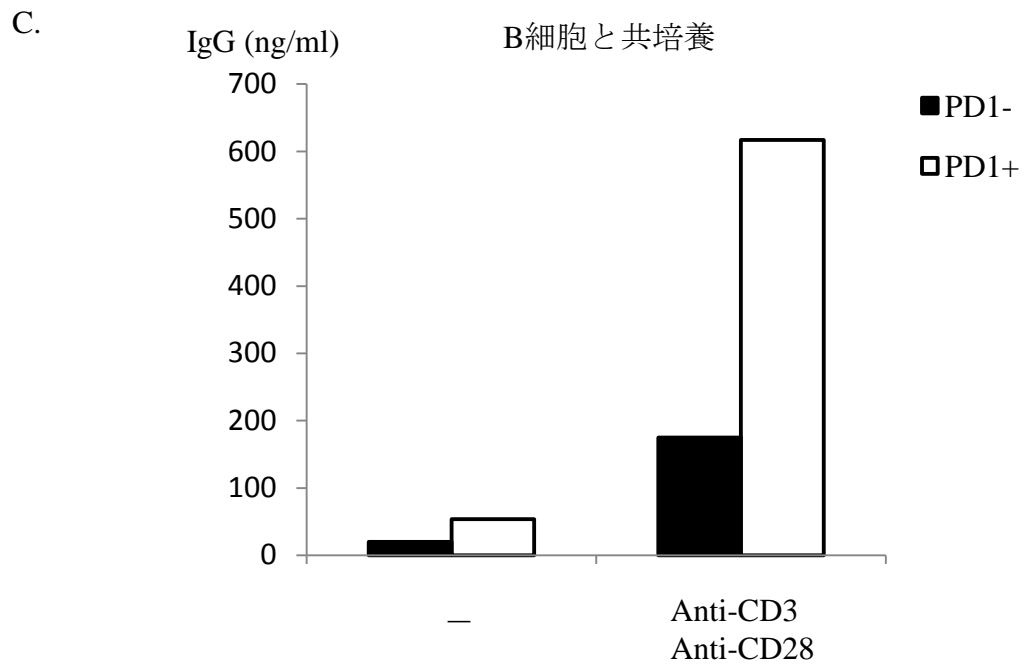


図10. CXCR5-CXCR4⁺ICOS⁺PD-1⁺CD4⁺T細胞の機能解析

C. CD4⁺PD1⁺細胞とCD4⁺PD1⁻細胞を分離し、これとBALB/cマウスのB細胞を96時間共培養した後に上清を回収してIgGの濃度を測定した。プレート結合抗CD3抗体に加えて培養液中に抗CD28抗体を追加することでT細胞を刺激し、未刺激状態と比較した。

D. CD4⁺PD1⁺細胞とB細胞との共培養において、抗IL-21抗体と抗ICOS抗体を個別または同時に加えて共培養し、96時間後に上清を回収してIgGの濃度を測定した。

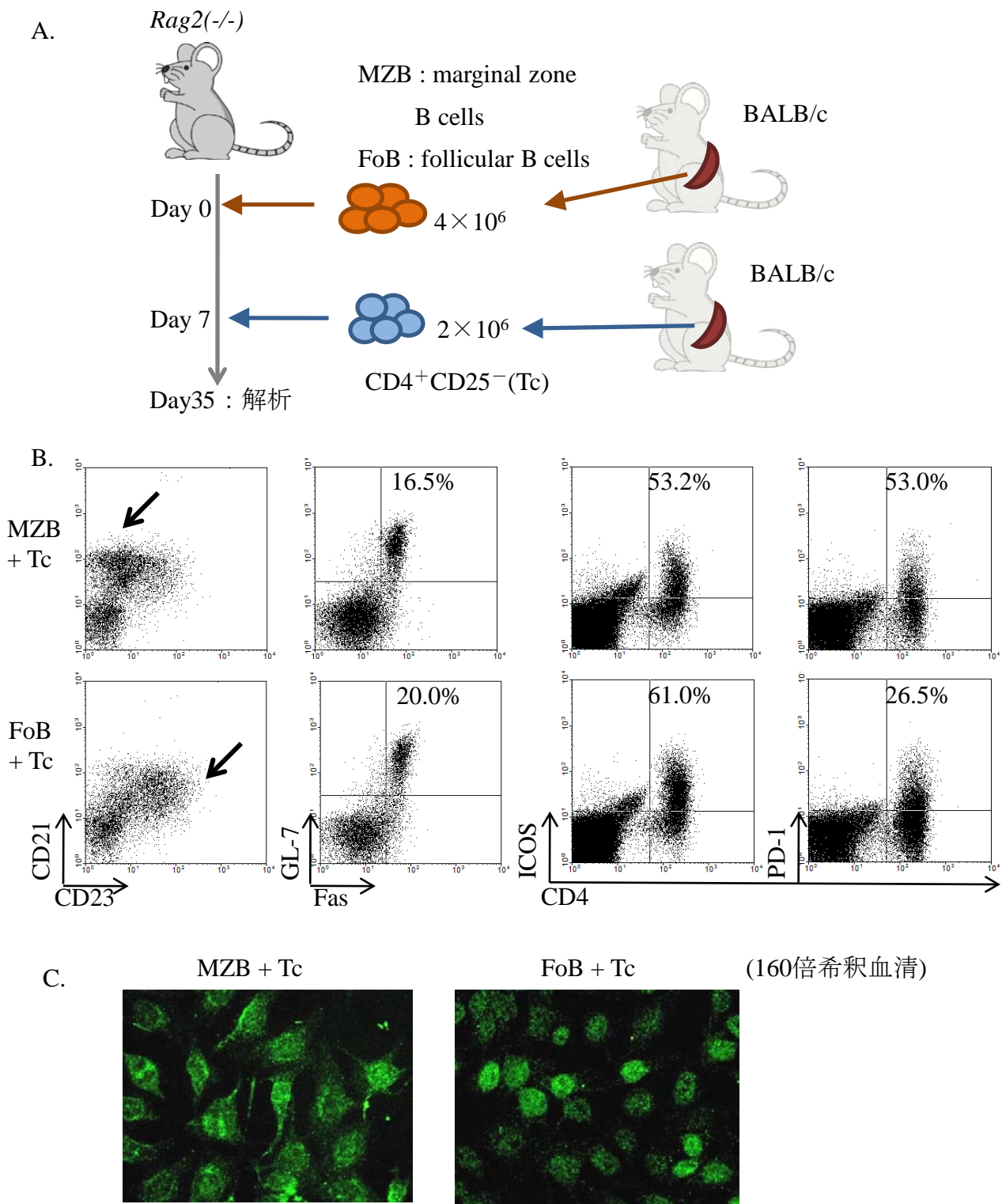


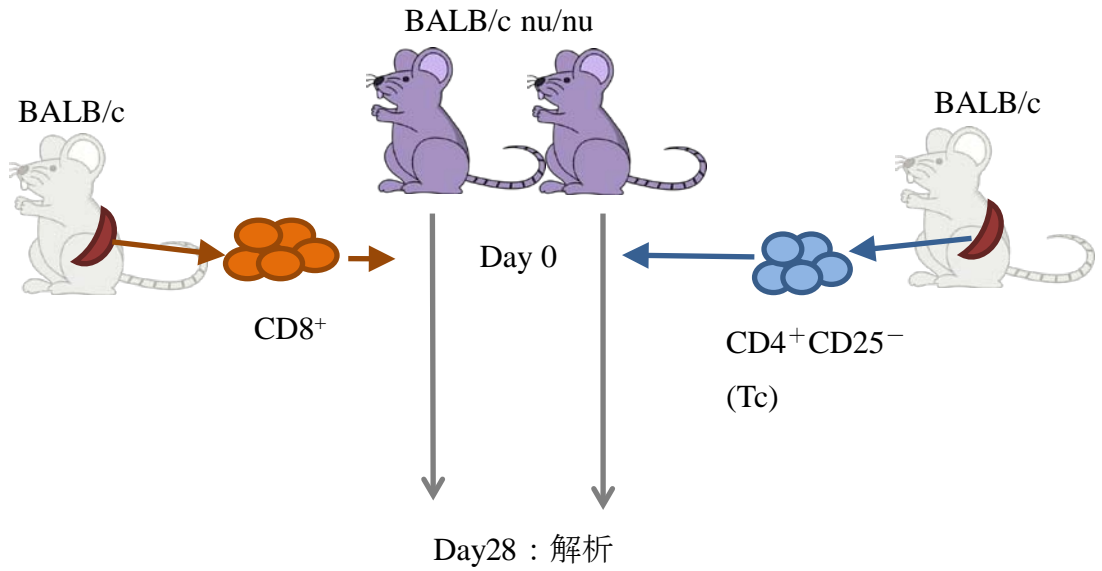
図11. 野生型マウス由来B細胞とT細胞による抗核抗体産生の産生

A. BALB/cマウスの脾臓より follicular B細胞と marginal zone B細胞を分離し、各 4×10^6 細胞を *Rag2*欠損マウスに移入した。B細胞移入1週間後に、やはりBALB/cマウスの脾臓より分離した 5×10^6 のTcを更に養子移入し、4週間後に血清と脾臓を採取して以下の検討を行った。

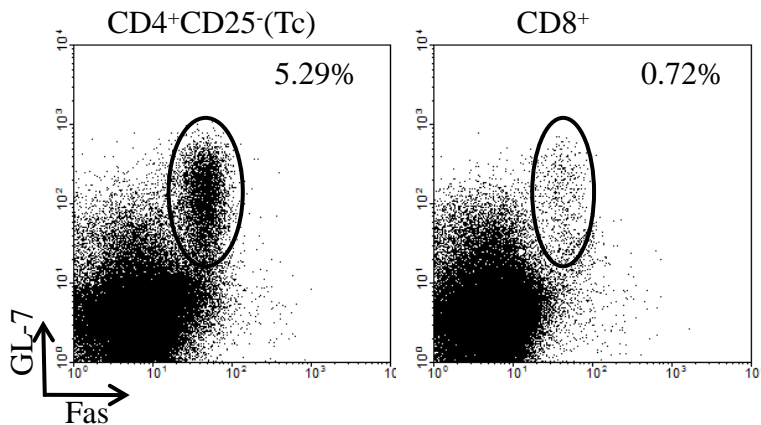
B. 脾細胞のB細胞サブセットとTfhへの分化に関してflow cytometryで検討した。

C. 抗核抗体の産生を蛍光抗体法で検討した。

A.



B.



C.

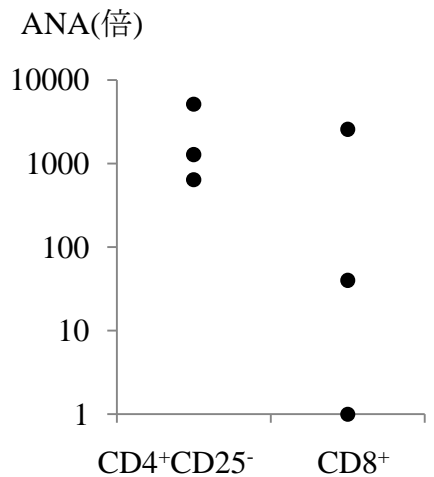


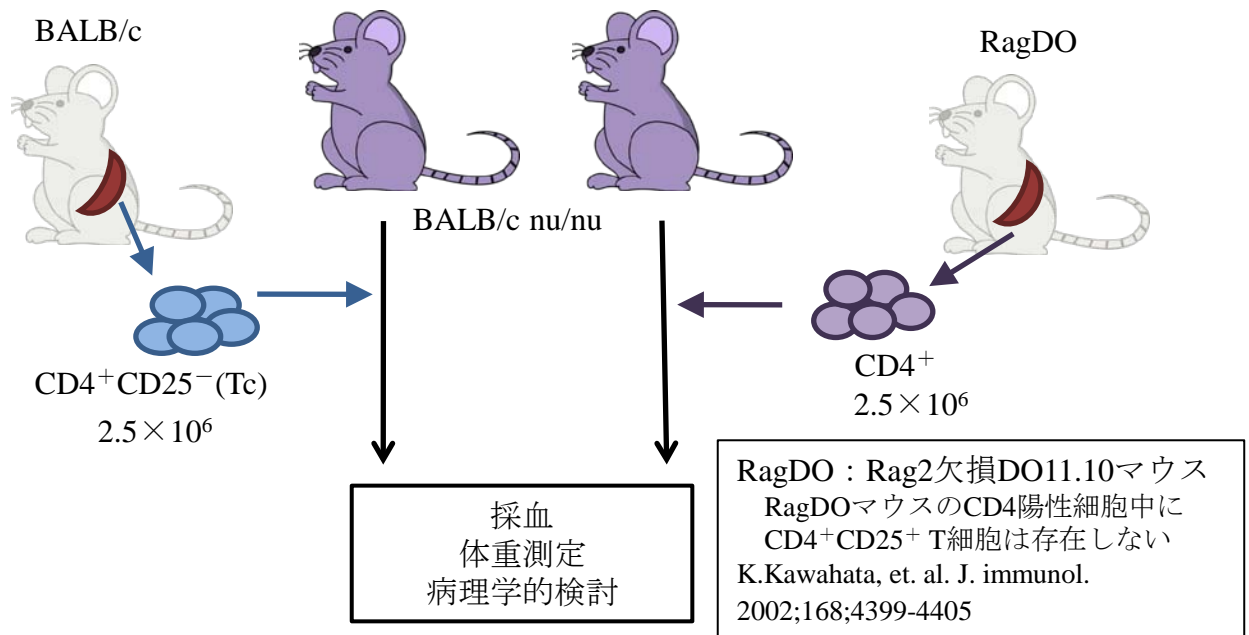
図12. CD8⁺ T細胞による抗核抗体産生の誘導

A. 7週齢のBALB/cヌードマウスに対して、BALB/cマウスの脾細胞より分離したCD8⁺T細胞またはCD4⁺CD25⁻ T細胞(Tc)を移入した2群を作製し、移入後28日で血清、脾細胞を採取して解析した(N=3)。

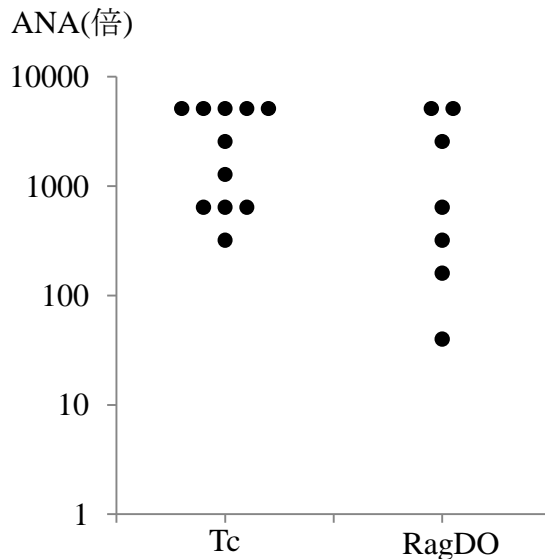
B. 移入後28日目の脾細胞におけるGC B細胞の解析結果を示す(各群2匹ずつ解析し、同じ傾向であった)

C. 移入後28日目の血清における抗核抗体価を示す

A.



B.



C.

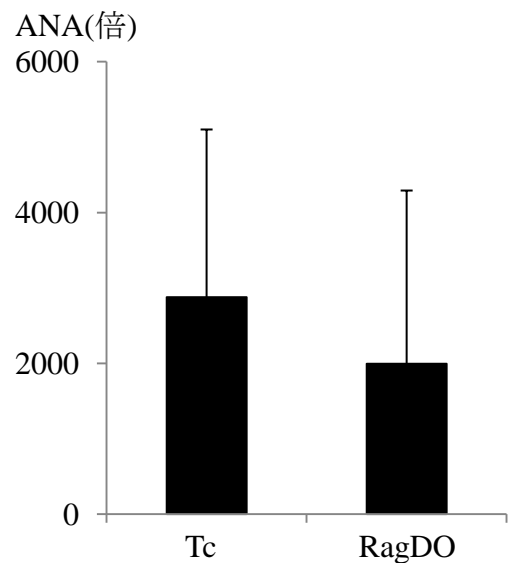


図13. 抗核抗体産生におけるT細胞受容体特異性の関与

A.野生型BALB/cマウスの脾細胞からTcを、Rag2欠損DO11.10マウス(RagDO)の脾細胞からCD4⁺T細胞を分離し、BALB/cヌードマウスに移入した。

移入後3週目の血清を用いて、蛍光抗体法により抗核抗体価を測定した。(n=7)

B. ドットプロットによる抗体価の分布を示す

C. 平均値、標準偏差を示す

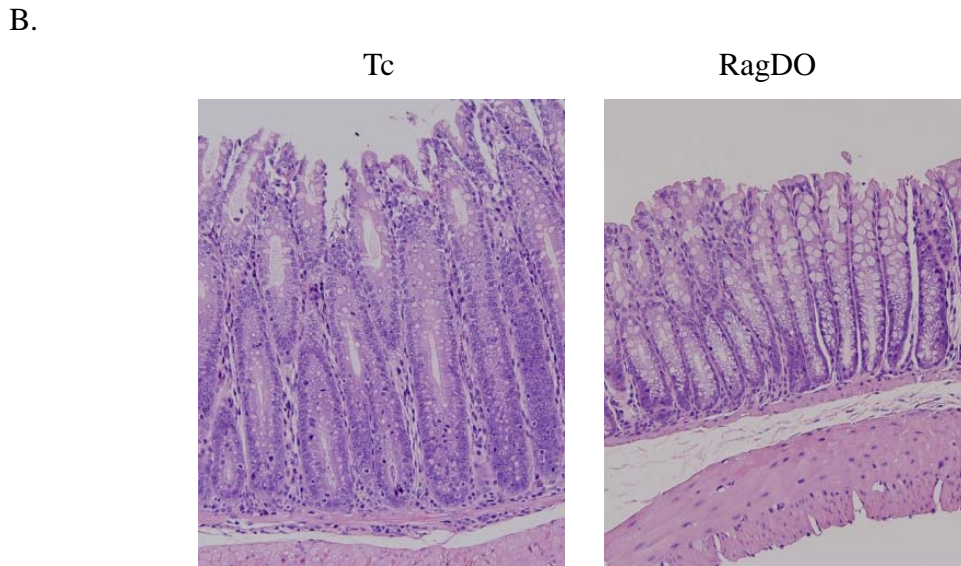
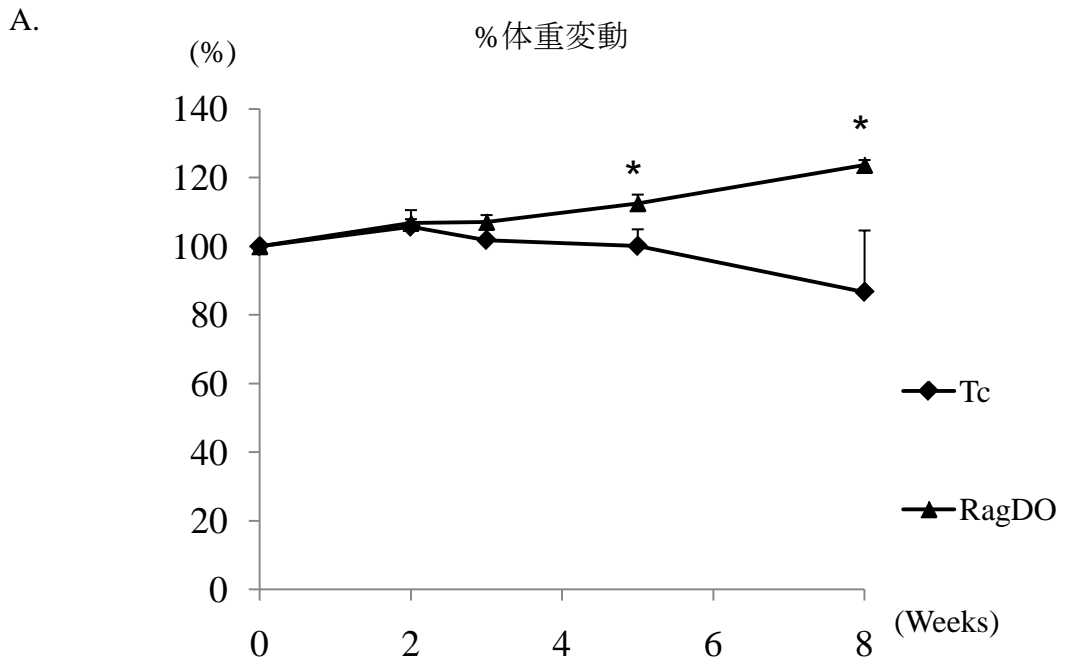


図14. 腸炎発症におけるT細胞受容体の関与

図13と同様の系において、長期の経過における体重の変動を観察し、またT細胞移入後8週目における大腸組織学的変化を観察した。(n=5)

A. %体重変化を示す(*: $p < 0.05$)

B. 大腸の病理組織を示す。各群3匹ずつ評価し、いずれも同様であった。

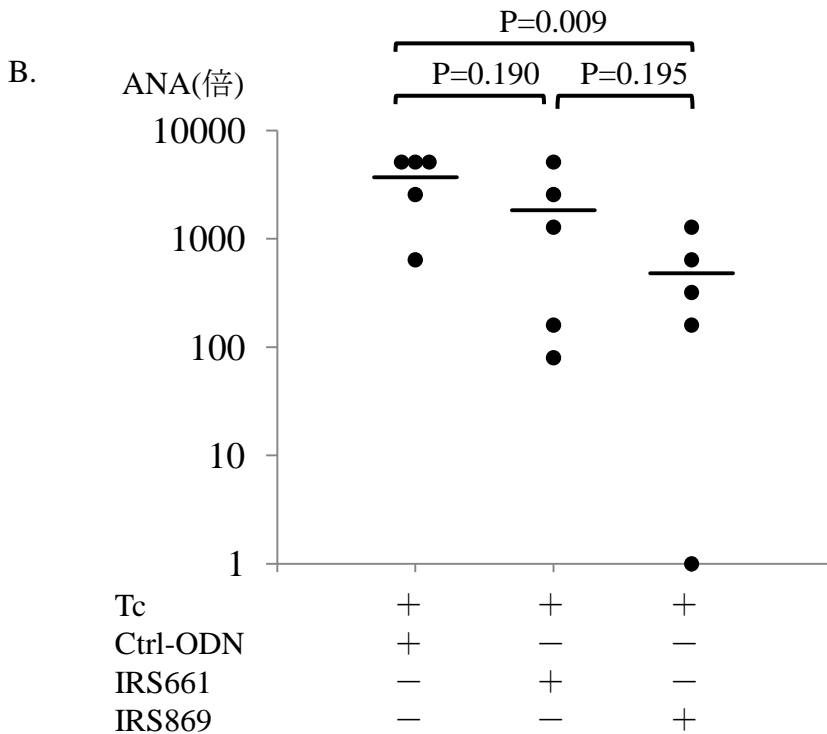
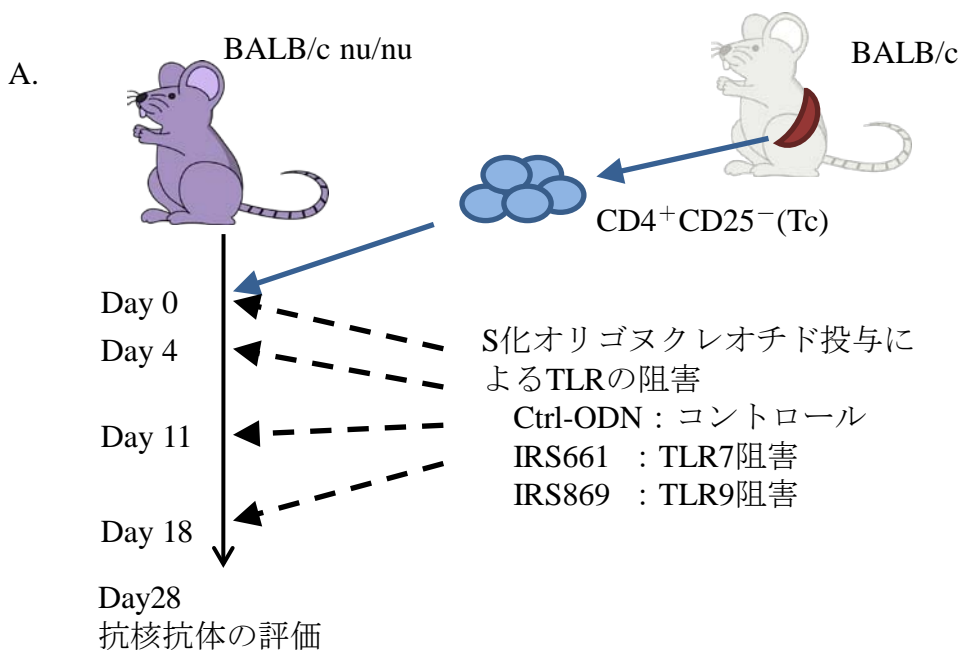


図15. 抗核抗体産生におけるTLRの関与

A. 野生型BALB/cマウス由来のTcを7週齢のBALB/cヌードマウスに移入し、これと平行してTLR7阻害オリゴヌクレオチド(IRS661)もしくはTLR9阻害オリゴヌクレオチド(IRS869)、コントロールオリゴヌクレオチド(Ctrl-ODN)を投与した(n=5)。

B. 移入後28日目の血清により抗核抗体価を蛍光抗体法により評価した。

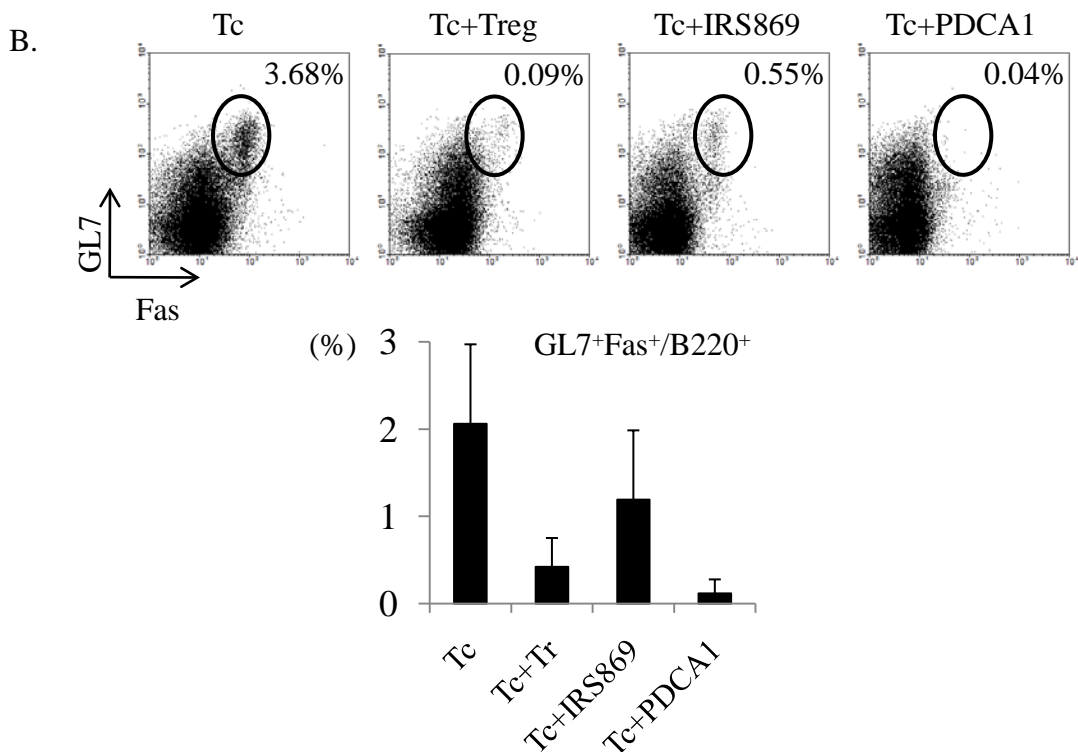
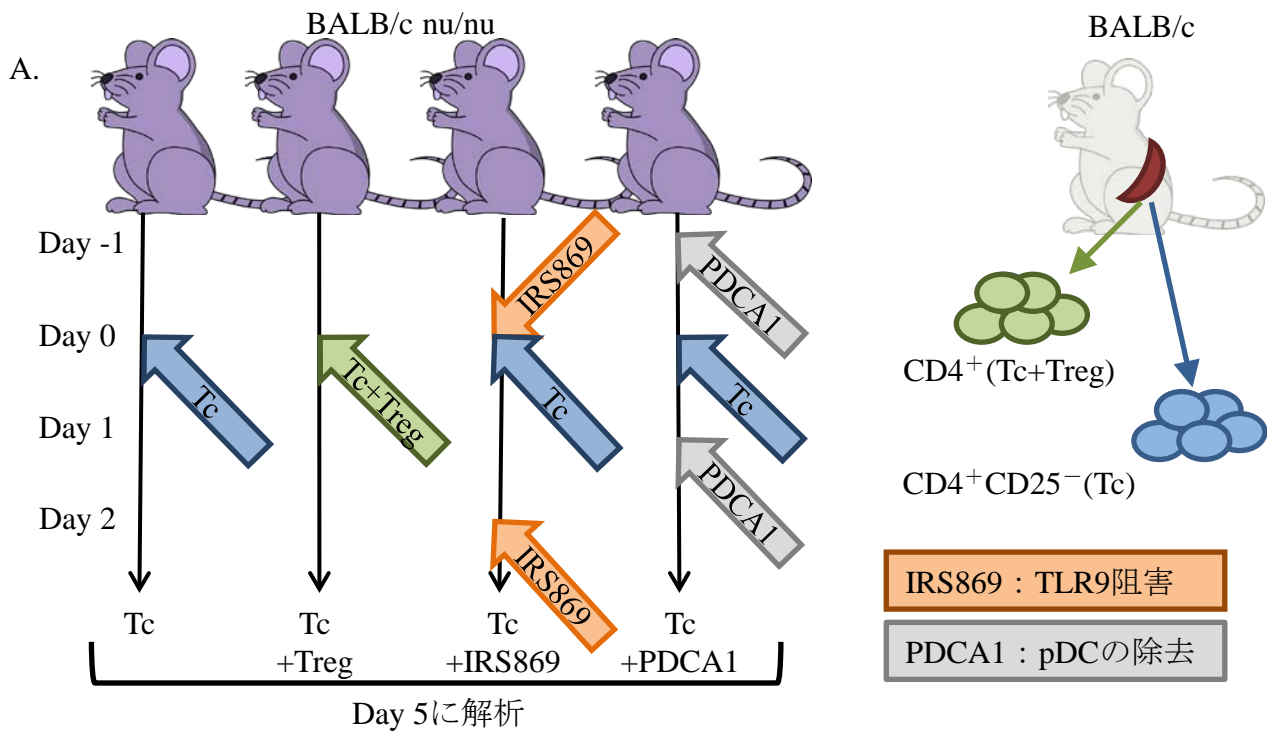


図16. germinal center B細胞形成、CXCR5- Tfh分化に影響を与える諸因子の検討
 A. Tc移入群、Tc+Treg移入群、Tc移入+TLR9阻害オリゴヌクレオチド投与群、Tc移入群、抗PDCA1抗体投与群の4群(n=3)を作成し、T細胞移入後5日目で解析した。
 B.脾細胞を採取し、flow cytometryにより、GC B細胞の産生について検討した

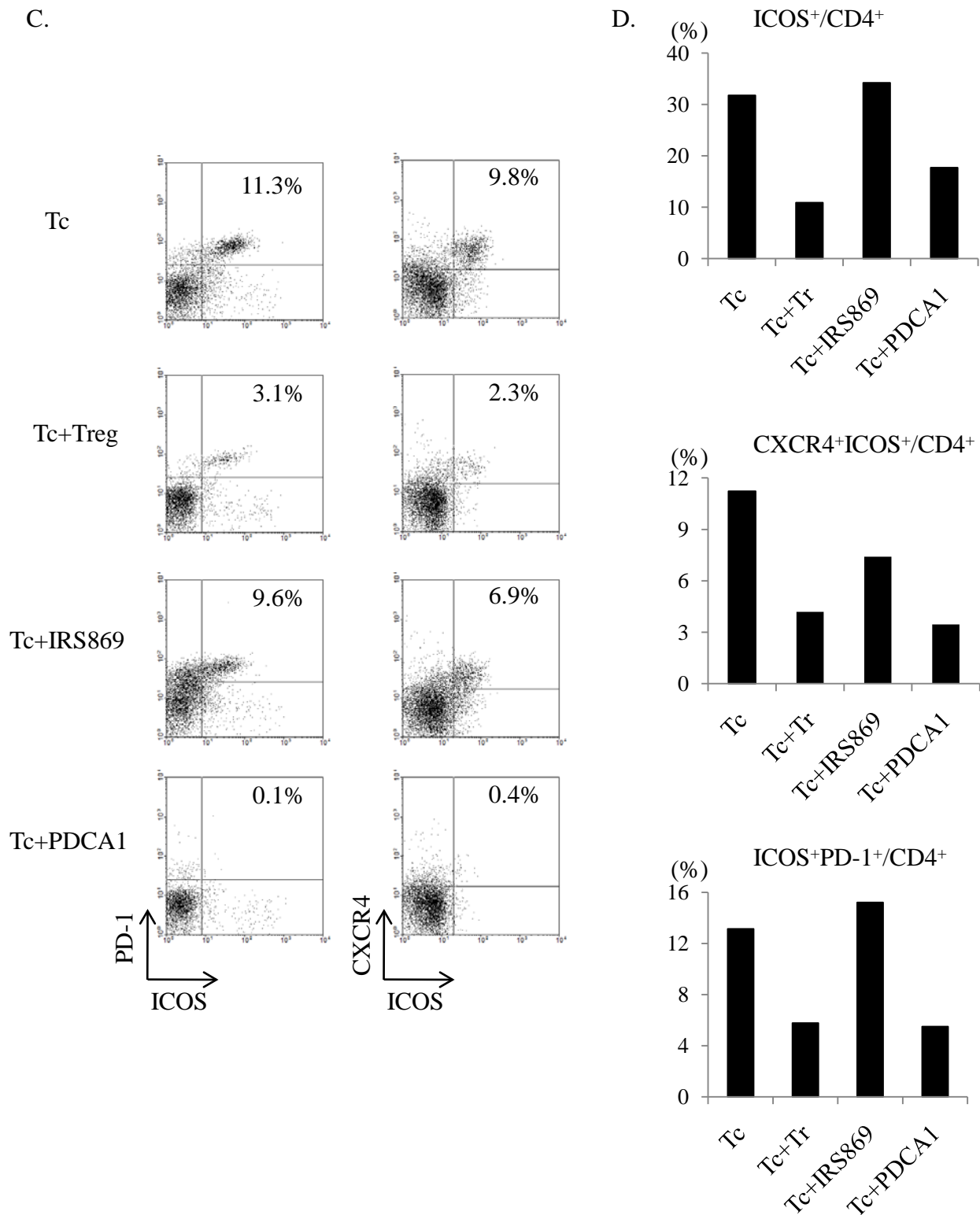


図16. germinal center B細胞形成、CXCR5- Tfh分化に影響を与える諸因子の検討(続き)
 C. flow cytometryによりCXCR5- Tfhの表面マーカーを解析して発現状態を評価した
 D. CXCR5- Tfhの表面マーカーのCD4⁺細胞における割合を示した。

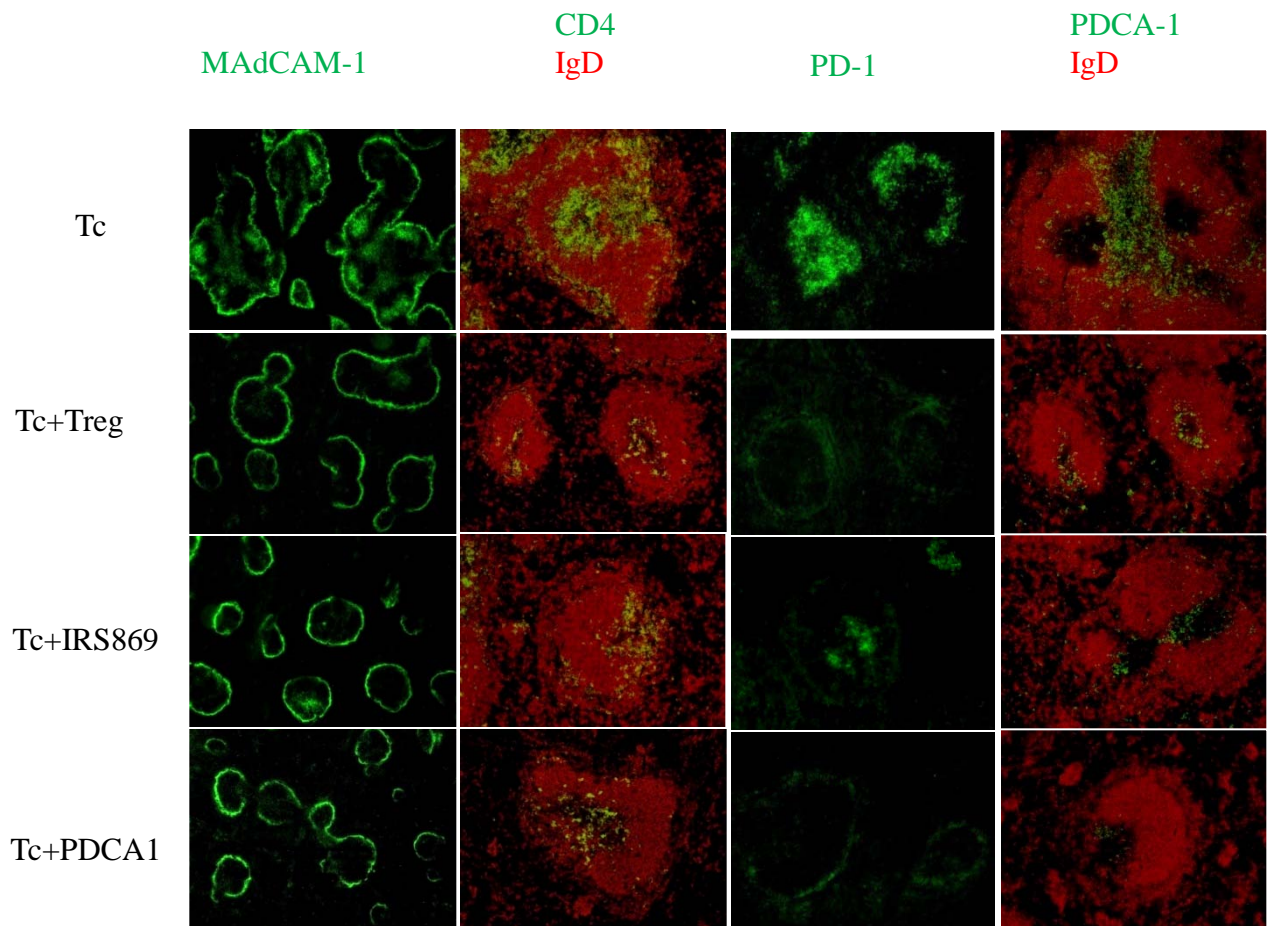


図17. Tc移入による脾臓の組織学的変化に及ぼすTreg、TLR9、pDC の影響
 図16Aの実験において、Day5 に採取した脾臓組織より凍結切片を作製し、免疫蛍光染色によりMAdCAM-1、T・B細胞の表面マーカー、PDCA-1を染色した。

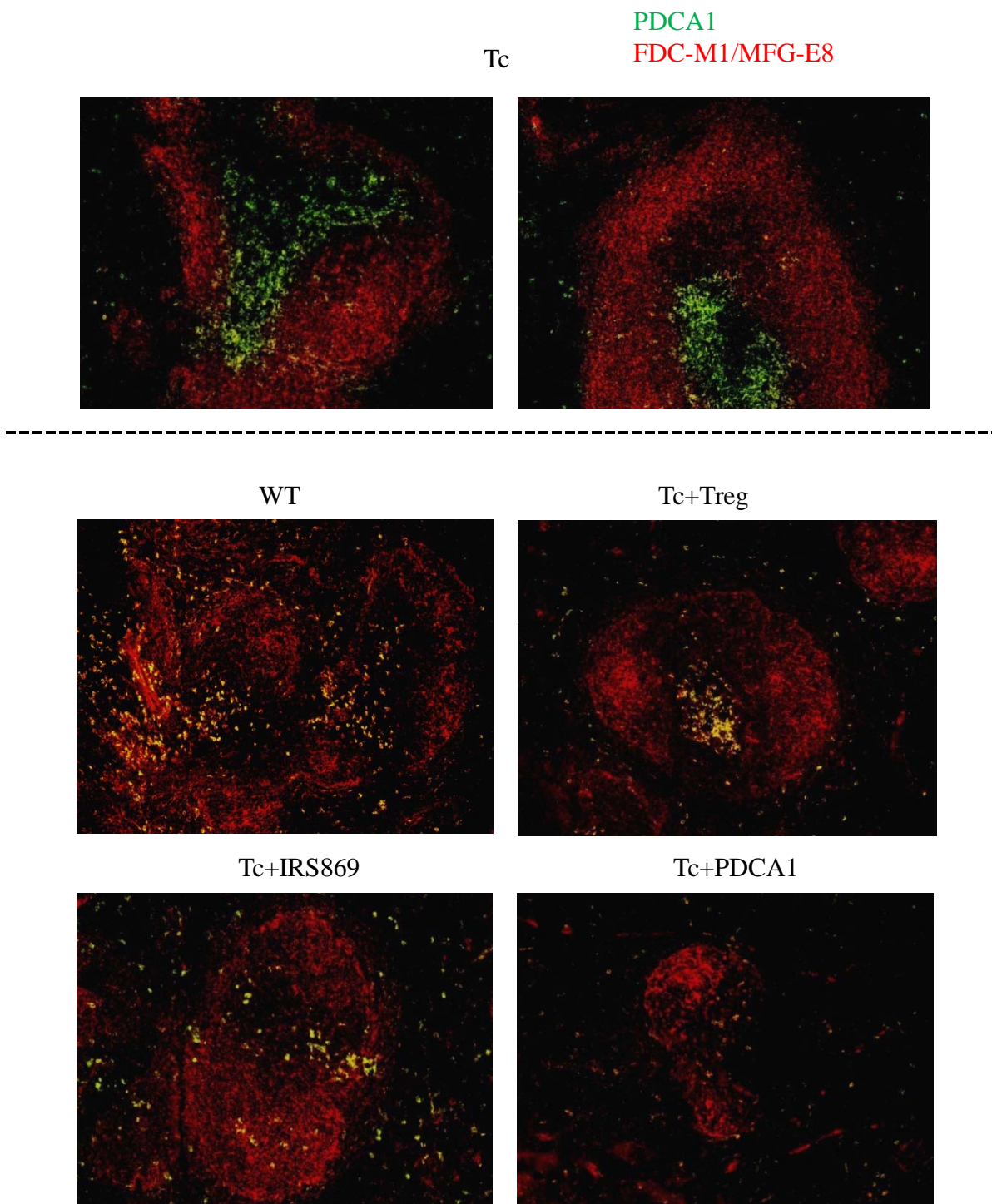


図18. Tc移入による脾臓形質細胞様樹状細胞、濾胞樹状細胞の変化
 図16Aの実験において、T細胞移入5日目の脾臓より凍結切片を作製して免疫蛍光染色により評価した。

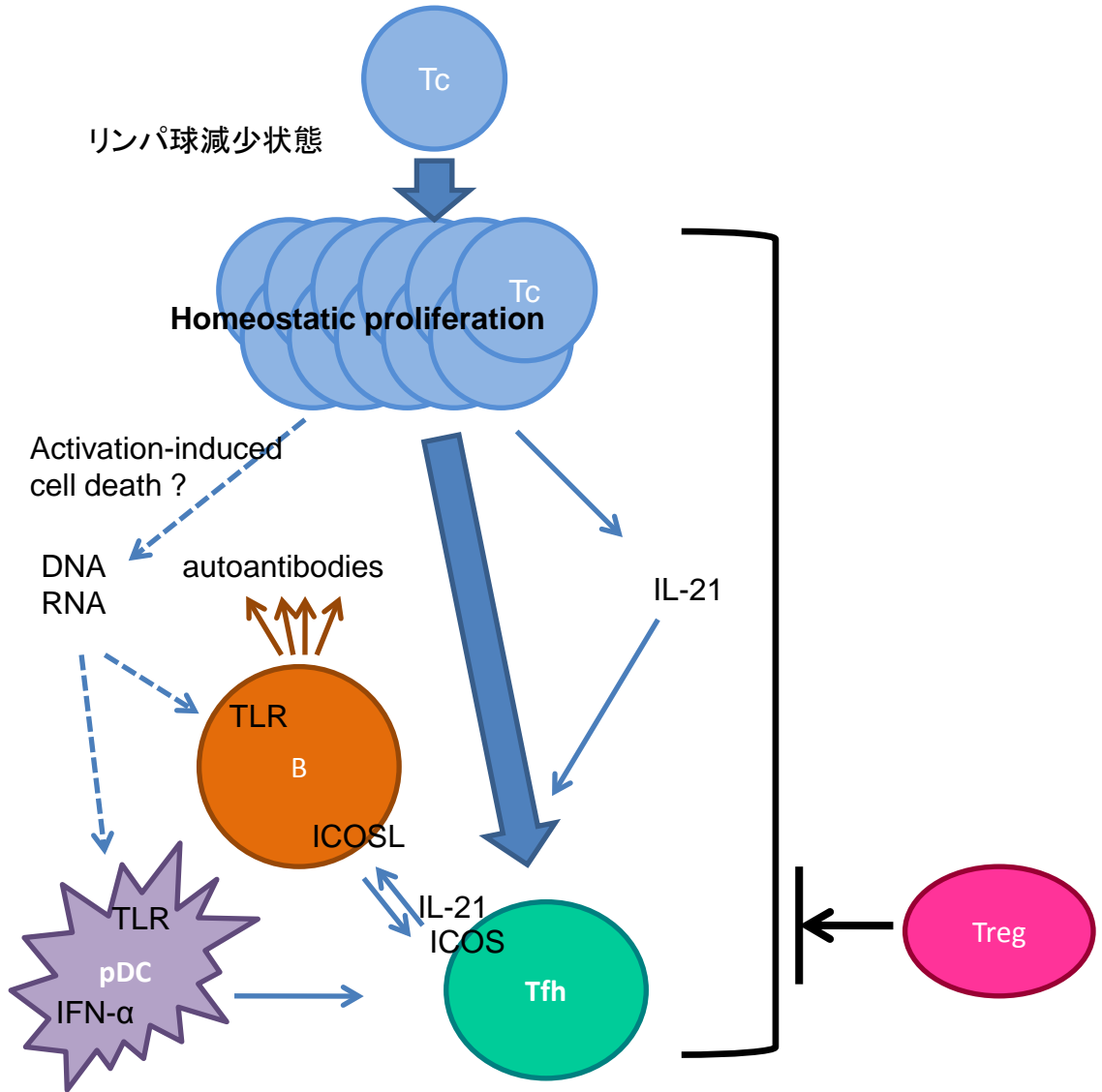


図19. 抗核抗体発現に至る機序

実線部が本実験で検討できた部分、破線部が検討できていない部分である。