

目次	
緒言	- 1
略語	- 3
第1章 多発性硬化症に完全寛解を導入できる新規治療戦略の構築	
要旨	- 4
はじめに	- 4
第1節 実験的自己免疫性脳脊髄炎に対するFTY720の治療予後	
1. 目的	- 6
2. 実験材料と実験方法	- 6
2.1. 実験動物	
2.2. FTY720 および mouse myelin oligodendrocyte glycoprotein (35-55)	
2.3. 実験的自己免疫性脳脊髄炎の誘導および評価	
2.4. 試験プロトコル	
2.5. 鼠径リンパ節由来 CD4 ⁺ T 細胞, CD11c ⁺ 細胞の分取, 共培養および細胞内サイトカイン染色	
2.6. 脊髄の組織切片の作製	
2.7. ヘマトキシリン・エオジン染色	
2.8. ルクソール・ファストブルー染色	
2.9. 浸潤 CD3 ⁺ T 細胞の染色およびその評価	
2.10. 脾臓由来 CD4 ⁺ T 細胞の分取および培養上清中サイトカイン濃度の酵素免疫測定法	
2.11. 鼠径リンパ節由来 CD4 ⁺ T 細胞中のメモリーT細胞およびナイーブT細胞の割合	
2.12. 統計解析	
3. 結果	- 15
3.1. 病勢および体重の推移	
3.2. 治療完了時のリンパ節由来 CD4 ⁺ T 細胞の病因抗原に対す	

る炎症性サイトカイン産生

- 3.3. 脊髄の組織化学的評価
- 3.4. 休薬後の脾臓由来 CD4⁺ T 細胞の病因抗原に対する活性化能
- 3.5. 鼠径リンパ節由来 CD4⁺ T 細胞中のメモリーT 細胞およびナイーブ T 細胞の割合

4. 考 察 - 23

第2節 実験的自己免疫性脳脊髄炎に対するFTY720と病因抗原の併用療法の有用性

- 1. 目 的 - 25
- 2. 実験材料と実験方法 - 25
 - 2.1. 実験動物
 - 2.2. FTY720 および MOG₃₅₋₅₅
 - 2.3. 実験的自己免疫性脳脊髄炎の誘導および評価
 - 2.4. 試験プロトコル
 - 2.5. 鼠径リンパ節中CD4⁺ T細胞の絶対数の評価
 - 2.6. 脊髄組織の凍結切片の作製
 - 2.7. 浸潤CD3⁺ T細胞の染色およびその評価
 - 2.8. 浸潤CD4⁺ T細胞の染色およびその評価
 - 2.9. 統計解析
- 3. 結 果 - 29
 - 3.1. MOG₃₅₋₅₅ の治療効果
 - 3.2. FTY720 と MOG₃₅₋₅₅ の併用療法の有用性
 - 3.3. FTY720 と MOG₃₅₋₅₅ の併用療法が休薬後の病因 CD4⁺ T 細胞の脊髄への移行性に及ぼす影響
- 4. 考 察 - 34

小 括 - 36

第 2 章 関節リウマチに対する FTY720 と病因抗原の併用療法の有用性およびその作用メカニズム	
要 旨	- 37
はじめに	- 37
第 1 節 Glucose-6-phosphate isomerase peptide (GPI ₃₂₅₋₃₃₉) 誘導性関節炎に対する FTY720 および GPI ₃₂₅₋₃₃₉ 単独療法の発症予防効果および治療効果	
1. 目 的	- 40
2. 実験材料と実験方法	- 40
2.1. 実験動物	
2.2. FTY720 および GPI ₃₂₅₋₃₃₉	
2.3. GPI ₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎の誘導および評価	
2.4. 試験プロトコル	
2.5. 関節組織切片の作製	
2.6. ヘマトキシリン・エオジン染色	
2.7. 血清中抗 hGPI ₃₂₅₋₃₃₉ total IgG 抗体価の測定	
2.8. 血清中抗 hGPI ₃₂₅₋₃₃₉ IgG サブクラス (IgG1, IgG2a, IgG2b および IgG3) 抗体価の測定	
2.9. 統計解析	
3. 結 果	- 44
3.1. GPI ₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎に対する FTY720 および GPI ₃₂₅₋₃₃₉ の発症予防効果	
3.2. GPI ₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎に対する FTY720 および GPI ₃₂₅₋₃₃₉ の治療効果	
4. 考 察	- 50
第 2 節 GPI ₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎に対する FTY720 と病因抗原の併用療法の有用性およびその作用メカニズム	
1. 目 的	- 51
2. 実験材料と実験方法	- 51
2.1. 実験動物	

2.2.	FTY720 および GPI ₃₂₅₋₃₃₉	
2.3.	GPI ₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎の誘導および評価	
2.4.	試験プロトコル	
2.5.	リンパ節切片の作製	
2.6.	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色	
2.7.	鼠径リンパ節中のアポトーシス細胞の割合の評価	
2.8.	鼠径リンパ節中の CTLA-4 ⁺ Foxp3 ⁻ CD4 ⁺ T 細胞および PD-1 ⁺ Foxp3 ⁻ CD4 ⁺ T 細胞の割合の評価	
2.9.	鼠径リンパ節中の CTLA-4 ⁺ Foxp3 ⁺ CD4 ⁺ T 細胞, GITR ⁺ Foxp3 ⁺ CD4 ⁺ T 細胞, CD39 ⁺ Foxp3 ⁺ CD4 ⁺ T 細胞および Foxp3 ⁺ Helios ⁺ CD4 ⁺ T 細胞の割合の評価	
2.10.	細胞培養および細胞内サイトカイン染色	
2.11.	統計解析	
3.	結 果	- 57
3.1.	GPI ₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎に対する FTY720 と GPI ₃₂₅₋₃₃₉ の併用療法の有用性	
3.2.	TUNEL 法を用いた鼠径リンパ節中のアポトーシス細胞の検出	
3.3.	鼠径リンパ節の CD4 ⁺ PI T 細胞中 annexin V ⁺ 細胞の割合	
3.4.	鼠径リンパ節の CTLA-4 あるいは PD-1 を発現した非制御性 T 細胞の割合	
3.5.	鼠径リンパ節中 CD4 ⁺ T 細胞の GPI ₃₂₅₋₃₃₉ に対する反応性	
3.6.	鼠径リンパ節の制御性 T 細胞の割合	
4.	考 察	- 66
第3節	GPI ₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎の完全寛解導入に対する FTY720 と病因抗原の併用療法の有用性	
1.	目 的	- 70
2.	実験材料と実験方法	- 70
2.1.	実験動物	

2.2.	FTY720 および GPI ₃₂₅₋₃₃₉	
2.3.	GPI ₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎の誘導および評価	
2.4.	試験プロトコル	
2.5.	関節組織切片の作製	
2.6.	ヘマトキシリン・エオジン染色	
2.7.	血清中抗 hGPI ₃₂₅₋₃₃₉ および抗 mGPI ₃₂₅₋₃₃₉ total IgG 抗体価の測定	
2.8.	鼠径リンパ節中の GITR ⁺ Foxp3 ⁻ CD4 ⁺ T 細胞, CTLA-4 ⁺ Foxp3 ⁻ CD4 ⁺ T 細胞および CD39 ⁺ Foxp3 ⁻ CD4 ⁺ T 細胞の割合の評価	
2.9.	Suppression Assay	
2.10.	Restimulation Assay	
2.11.	統計解析	
3.	結 果	- 75
3.1.	FTY720 と病因抗原の併用療法が追加免疫後の再燃に及ぼす効果	
3.2.	FTY720 と病因抗原の併用療法が追加免疫後の抗 human/mouse GPI ₃₂₅₋₃₃₉ 抗体産生に及ぼす効果	
3.3.	FTY720 と病因抗原の併用療法が GITR ⁺ 非制御性 T 細胞に及ぼす効果	
4.	考 察	- 83
	小 括	- 85
	結 語	- 86
	謝 辞	- 88
	引用文献	- 89

緒 言

免疫系は、生体を防御する上で欠かせない機構であり、外部からの病原体の侵入、がん細胞の増殖等を制御し、生体の恒常性維持を担っている。自己免疫疾患とは、本来、宿主細胞に対して反応しないように制御されている免疫機構が、何らかの要因によって破綻し、自己の細胞、組織が非自己と認識、破壊されてしまう疾患である。自己免疫疾患は、一般に免疫抑制薬等の治療により、一時的に寛解（見かけ上治癒した状態）を導入できるが、再燃することが多い。従って、破綻した免疫機構に対し、効果的に免疫寛容（特定抗原に対して、免疫応答が働かない状態）を誘導し、完全寛解（長期間の寛解状態）を導入できる新規治療戦略の開発が求められている。本研究では、ユニークな作用機序を有するフィンゴリモド塩酸塩（FTY720）および病因抗原を活用した新規治療戦略を開発し、その作用メカニズムの解明を試みた。

FTY720 は、Fujita らによって冬虫夏草類縁菌 *Isaria sinclairii* から発見、抽出された Immunosuppressant product-1 (ISP-1) に構造活性修飾を加えて誕生した免疫調節薬である [1, 2]。多発性硬化症の再発予防および身体的障害の進行抑制を適用に、ロシア、米国、欧州連合、オーストラリアに続き、2011 年 9 月に日本でも製造承認された。FTY720 は、移植モデル動物 [3] 以外に、重症筋無力症 [4]、アトピー性皮膚炎 [5-7]、1 型糖尿病 [8, 9] 等の様々な自己免疫疾患モデル動物に対して、優れた効果を発揮することが報告されている。FTY720 は生体内でスフィンゴシンキナーゼ 2 によって、リン酸化され、活性体の FTY720 リン酸となる [10-12]。FTY720 リン酸は、4 種類のスフィンゴシン 1-リン酸 (sphingosine 1-phosphate; S1P) 受容体 (S1P₁, S1P₃, S1P₄ および S1P₅ 受容体) に対してアゴニスト (機能的アンタゴニスト) として作用する [10]。特に、S1P₁ 受容体は、リンパ球上に高発現しており、二次リンパ組織から末梢へのリンパ球の移出に深く関与している。FTY720 リン酸は、リンパ球上の S1P₁ 受容体の内在化および分解を誘導する。即ち、S1P-S1P₁ シグナルの阻害により、二次リンパ組織からのリンパ球移出が制御 (二次リンパ組織内にリンパ球が隔離) され、免疫抑制効果が発現する [13, 14]。FTY720 は、他の免疫抑制薬とは異なり、T 細胞や B 細胞の増殖や活性には影響を及ぼさない [15]。また、二次リンパ組織への循環能を持たないリンパ球への効果は弱いと考えられている。

即ち、二次リンパ組織へのホーミングの制御に関与するケモカイン受容体のCCケモカイン受容体7 (chemokine (C-C motif) receptor 7: CCR7) や細胞接着分子のCD62Lの発現が低いエフェクターメモリーT細胞は隔離されないことが報告されている [16]. 従って、他の免疫抑制薬で問題となる重篤な日和見感染症等のリスクも低いと考えられている.

これまでに臨床で実施されている病因抗原を用いた治療には、スギ花粉症等のアレルギー疾患に対するアレルゲン免疫療法(減感作療法)が知られている. 作用機序は、十分には解明されていないが、Th1細胞の増加によるTh1/Th2バランスの是正や制御性T細胞の誘導等が考えられている [17]. 病因抗原を用いた治療の利点は、病因抗原特異的な免疫応答を抑制できることおよび治療中止後も長期寛解が期待できることである. 例えば、スギ花粉症に対する免疫療法では、治療中止後の状態を10年間は維持できたとの報告がある [18]. しかし、速効性がなく、治療に長期の日数を要するという難点もある.

本研究では、FTY720と病因抗原の併用で、自己免疫疾患一般に完全寛解を効果的に導入できる新規治療戦略の開発を試みた. 第1章では、本併用療法に着目した経緯について、第2章では、本併用療法の有用性およびその作用メカニズムについて、それぞれ多発性硬化症のモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎、関節リウマチモデルのモデルである glucose-6-phosphate isomerase peptide (GPI₃₂₅₋₂₃₉) 誘導性関節炎を用いて得られた結果を論述する.

略 語

EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis
MOG	myeline oligodendrocyte glycoprotein
PLP	proteolipid protein
Th	helper T
PT	pertussis toxin
PBS	phosphate buffered saline
FCS	fetal calf serum
BSA	bovine serum albumin
APC	allophycocyanin
PE	phycoerythrin
PI	propidium iodied
FITC	fluorescein isothiocyanate
IFN	interferon
IL	interleukin
CCR	chemokine (C-C motif) receptor
GPI	glucose-6-phosphate isomerase
Ig	immunoglobulin
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling
PD-1	programmed death-1
Foxp3	forkhead box P3
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte antigen-4
GITR	glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-family-related gene/protein
Treg	regulatory T
Tr1	type 1 regulatory T

第1章 多発性硬化症に完全寛解を導入できる新規治療戦略の構築

要 旨

本章では、多発性硬化症 (multiple sclerosis) に対し、完全寛解を導入できる治療戦略を構築する目的で、モデル動物である実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE) を用いて以下の研究を行った。1) 既に多発性硬化症の治療薬として承認されているフィンゴリモド塩酸塩 (FTY720) 単独の EAE に対する治療予後について調べた。2) EAE に対する FTY720 と病因抗原の併用療法の有用性を調べた。その結果、1) EAE に対して FTY720 単独療法は極めて優れた治療効果を示したが、FTY720 を休薬すると約1週間後に重篤な再燃が起こることが明らかとなった。一方、2) FTY720 に病因抗原を併用すると、その再燃を効果的に抑制できることを明らかとした。これらの知見は、臨床症状の経時的観察、組織化学的手法および免疫学的手法を用いて得た。

以上の結果から、FTY720 による病勢制御下に、病因抗原を投与することで免疫寛容が効果的に誘導され、休薬後の再燃を抑制できた可能性が考えられた。

はじめに

多発性硬化症は、髄鞘を構成するミエリンに対する自己免疫応答を本態とする中枢神経系の炎症性脱髄疾患である。2004年の全国多発性硬化症臨床疫学調査結果によると、日本の患者数が増加し、有病率は10万人あたり7.7名程度と推定されている。発症年齢のピークは20～30歳で、男女比は1:2.9と女性に多い [19]。多発性硬化症は、異なる病巣に由来する臨床症状 (空間的多発性) および寛解/再発の繰り返し (時間的多発性) を特徴とし、臨床経過に基づき、以下の3つの病型に分類されている [20]。

- 1) 再発寛解型多発性硬化症 (relapsing-remitting multiple sclerosis: RRMS) : 急性増悪 (再発) と寛解を繰り返すことを特徴とする
- 2) 一次性進行型多発性硬化症 (primary progressive multiple sclerosis: PPMS) : 病初期から明らかな再発を示さず進行性の経過を呈することを特徴とする
- 3) 二次性進行型多発性硬化症 (secondary progressive multiple sclerosis: SPMS) : RRMS から進行性の経過を呈する病型へ移行することを特徴とする

多発性硬化症の治療には、急性増悪期の短縮（障害の軽減）を目的に、ステロイド大量点滴静注療法や血液浄化療法が行われる。再発防止および進行抑制には、インターフェロンβ注射薬（ベタフェロン[®]（隔日 800 万国単位を皮下投与）、アボネックス[®]（週 1 回 30 μg を筋肉内投与））が用いられる。その他、本研究で用いた FTY720（ジレニア[®]／イムセラ[®]（1 日 1 回 0.5 mg を経口投与））、ヒト化抗ヒトα4 インテグリンモノクローナル抗体製剤であるナタリズマブ（タイサブリ[®]（4 週間に 1 回 300 mg を 1 時間かけて点滴静注））の製造販売が承認されている [21]。また、最近では、グラチラマー酢酸塩（コパキソン[®]（1 日 1 回 20 mg を皮下投与））の製造販売が承認された。しかし、未だ次のような臨床的課題がある。

- ・ 寛解と再発を繰り返すため、長期間に渡る薬物治療が必要である。
- ・ 進行性の多発性硬化症に対する有効性および安全性が確立されていない。

このような背景から、効果的に免疫寛容を誘導、さらにはその状態が記憶され、長期間維持（完全寛解）できる新規治療戦略の開発には強い臨床的要請がある。この要請に基づき、多発性硬化症のモデル動物である EAE を用いて、多発性硬化症に対して効果的に完全寛解を導入できる新規治療戦略の開発を試みた。なお、EAE は、髄鞘を構成する myeline oligodendrocyte glycoprotein (MOG) や proteolipid protein (PLP) の部分ペプチドを完全アジュバントおよび百日咳毒素存在下で免疫することで誘導され [22]、多発性硬化症と類似した脱髄病変等の病態を示すことから、多発性硬化症のモデル動物として広く用いられている。なお、EAE の病態形成には helper T (Th) 17 細胞や Th1 細胞が主に関わっている。以下、本研究で得られた結果を 1～2 節に渡って論述する。

第1節 実験的自己免疫性脳脊髄炎に対するFTY720の治療予後

1. 目的

多発性硬化症は、寛解と再発を繰り返す難治性自己免疫疾患である。FTY720は、タクロリムス水和物、シクロスポリン等の免疫抑制薬とは異なり、リンパ球の活性およびその機能に影響を与えることなく、二次リンパ組織からのリンパ球の移出を抑制することで免疫応答を制御する [13, 14]。従って、休薬により隔離されていたリンパ球が末梢に放出され、病態が悪化する可能性が考えられた。本節では、この可能性を調べるため、多発性硬化症のモデル動物である実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE) マウスに対するFTY720の休薬予後について検討した。

2. 実験材料と実験方法

2.1. 実験動物

C57BL/6J マウスは、日本チャールズ・リバー株式会社 (神奈川) から購入した。マウスは室温 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $55\pm 10\%$ 、明暗サイクル 12 時間の Specific-Pathogen Free (SPF) 環境下で飼育し、ケージ交換および飼料 (CRF-1, ガンマ線照射飼料; オリエンタル酵母工業株式会社, 東京) の補給は週 2 回行った。また、飼料および水は自由摂取とした。なお、本研究は動物実験の適正な実施に向けたガイドライン (日本学術会議: 2006 年 6 月 1 日) および摂南大学動物実験に関する規定に従い実施した。

許可番号: K09-16, K10-12, K12-16, K13-16

2.2. FTY720 および mouse myelin oligodendrocyte glycoprotein (35-55)

2-Amino-2-[2-(4-octylphenyl) ethyl]propane-1,3-diol hydrochloride (FTY720) は、吉富製薬株式会社 (現 田辺三菱製薬株式会社, 大阪) より恵与された。髄鞘を構成するタンパク質の 1 つである myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) の部分ペプチドである mouse myelin oligodendrocyte glycoprotein 35 (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) 55 (MOG₃₅₋₅₅) はオペロンバイオテクノロジー株式会社 (現 ユーロフィンジェノミクス株式会社, 東京) から購入した。

2.3. 実験的自己免疫性脳脊髄炎の誘導および評価

MOG₃₅₋₅₅を注射用蒸留水（大塚製薬株式会社，東京）に4 mg/mlとなるように溶解した．Freunds complete adjuvant H37Ra（BD Biosciences, CA, USA）およびMOG₃₅₋₅₅溶液（4 mg/ml）を1:1の割合で混合し，乳化させた．C57BL/6J（7-8週齢，雌性）にペントバルビタール（ネンブタール注射液，NEMBUTAL injection，大日本製薬株式会社，大阪）で麻酔下，乳化させたMOG₃₅₋₅₅溶液100 μ l（MOG₃₅₋₅₅ 200 μ g相当）を約4ヶ所に分けて，後脇腹から背中付近に皮内投与した．また，感作の当日および2日後にリン酸緩衝生理食塩水（phosphate buffered saline: PBS）に溶解した百日咳毒素（pertussis toxin: PT, List Biological Laboratories, Inc., CA, USA; 2 μ g/ml）100 μ l（PT 200 ng相当）を尾部から静脈内投与し，EAEを作製した [23]．

臨床所見は，Stromnesら [23] の方法に基づき，以下の指標で評価した（EAEスコア）．0，正常；0.5，尾の脱力；1.0，尾の完全下垂；2.0，歩行異常および後肢の不全麻痺；2.5，片後肢の脱力；3.0，両後肢の脱力；3.5，後肢の麻痺および前肢の不全麻痺；4.0，前肢の麻痺；5.0，瀕死．

2.4. 試験プロトコル

EAE症状を呈したマウスをEAEスコアの平均値に差がない2群（(1)FTY720群（FTY720（0.3 mg/kg）を発症時（EAEスコア2.0以上）から週6-7回経口投与）および（2）placebo群（注射用蒸留水を発症時から週6-7回経口投与））に分け，3-5週間治療後，休薬した．なお，FTY720は，注射用蒸留水に1 mg/mlとなるように溶解後，-20℃で保管し，用時溶解して用いた．マウスの体重を基に投与量が0.1 mlとなるように注射用蒸留水で希釈し，経口投与した．

2.5. 鼠径リンパ節由来 CD4⁺ T細胞，CD11c⁺細胞の分取，共培養および細胞内サイトカイン染色

マウスにペントバルビタール（ネンブタール注射液）50 mg/kgを腹腔内投与し，正向反射消失後，オートクレーブ滅菌した解剖用はさみで腹部を切開した．鼠径リンパ節を採取し，予め2% fetal calf serum（FCS, MA Bioproducts, Inc., MD, USAまたはBiosera, East Sussex, UK）を含むRPMI1640培地（和光純薬工業株式会社，大阪）を2 ml入れておいたシャーレ（BD Biosciences）に入れた．オ

ートクレーブ滅菌した水切放フロストスライドグラス（松浪硝子工業株式会社，大阪）を用いて，鼠径リンパ節をすり潰し，懸濁した．次に，ナイロンメッシュ（N-NO.150T，株式会社NBCメッシュテック，東京）を通過させ，15 ml コニカルチューブ（BD Biosciences）に回収した．シャーレに 2% FCS を含む RPMI1640 培地を 2 ml 加え，再度，ナイロンメッシュを通過させ，先の 15 ml コニカルチューブに回収した．400 x g で 5 分間遠心分離後，上清を除去し，0.1% bovine serum albumin（BSA；ナカライテスク株式会社，京都）を 1 ml 加えた．細胞懸濁液を 96 well の U 底フレキシブルタイプ・アッセイプレート（BD Biosciences）上で希釈し，trypan blue solution, 0.4%（Thermo Fisher Scientific, Inc., MA, USA）を等量加え，Burker-Türk 計算盤（サンリード硝子有限会社，埼玉）を用いて生細胞数をカウントした．400 x g で 5 分間遠心分離後，上清を除去し，2% FCS を含む PBS で希釈した allophycocyanin-Cy7（APC-Cy7）-conjugated anti-mouse CD4 monoclonal antibody（mAb；clone: GK1.5；BioLegend, Inc., CA, USA；1:300）および phycoerythrin（PE）-conjugated anti-mouse CD11c mAb（clone: HL3；BD Biosciences；1:300）の混合溶液を 100 μ l 加え，4°C，暗所条件下で 20 分間インキュベートした．インキュベート後，2% FCS を含む PBS を 1 ml 加えた．400 x g で 5 分間遠心分離後，上清を除去し，2% FCS を含む PBS 1 ml を加え，ナイロンメッシュ（N-NO.355T，株式会社NBCメッシュテック）を通過させ，5 ml ポリスチレンラウンドチューブ（BD Biosciences）に回収した．そのチューブを，BD FACS Aria II セルソーター（BD Biosciences）にセットし，CD4⁺T 細胞および CD11c⁺ 細胞を分取した．15 ml コニカルチューブに細胞を回収し，400 x g で 10 分間遠心分離後，上清を除去した．10% FCS，100 units/ml penicillin，100 μ g/ml streptomycin（Thermo Fisher Scientific, Inc.）および 2.5 μ M 2-mercaptoethanol（ナカライテスク株式会社）を含む RPMI1640 培地を適量加え，96 well plate（BD Biosciences）に CD4⁺T 細胞（2.0 x 10⁵ 個/well）および CD11c⁺ 細胞（2.0 x 10⁴ 個/well）を播種し，interleukin（IL）-2（Pepro Tech, Inc., NJ, USA）100 U/ml および MOG₃₅₋₅₅ 100 μ g/ml 存在下，37°C，5% CO₂ 条件下で 72 時間培養した．培養後，細胞を 1.5 ml エッペンチューブに回収し，2% FCS を含む RPMI1640 培地を 1 ml 加えた．400 x g で 5 分間遠心分離後，上清を除去し，15 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate（PMA，Merck KgaA，Darmstadt，Germany），750 ng/ml ionomycin（Merck KgaA），0.66 μ l/ml Golgistop（BD Biosciences），10%

FCS, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin および 2.5 µM 2-mercaptoethanol を含む RPMI1640 培地を 1 ml 加え, 37°C, 5% CO₂ 条件下で 5 時間培養した. 細胞内サイトカイン染色は, BD Cytotfix/Cytoperm™ Kit (BD Biosciences) を用いて実施した. 培養後, 400 x g で 5 分間遠心分離し, 上清を除去した. 2% FCS を含む PBS を 1ml 加え, 再度 400 x g で 5 分間遠心分離後, 上清を除去し, BD Cytotfix/Cytoperm solution を適量加え, 4°C で 20 分間放置した. 400 x g で 5 分間遠心分離後, 上清を除去し, BD Perm/Wash buffer を 1 ml 加えた. 400 x g で 5 分間遠心分離後, 上清を除去し, BD Perm/Wash buffer で希釈した fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-mouse interferon (IFN)-γ mAb (clone: XMG1.2; BD Biosciences; 1:200) および PE-conjugated anti-mouse IL-17A mAb (clone: TC11-18H10; BD Biosciences; 1:200) の混合溶液を 100 µl 加え, 4°C, 暗所条件下で 30 分間インキュベートした. 続いて, BD Perm/Wash buffer を 1 ml 加えた後, 400 x g で 5 分間遠心分離した. 上清を除去し, BD Perm/Wash buffer を 300 µl 加え, ナイロンメッシュ (N-NO.355T) を通過させ, 5 ml ポリスチレンラウンドチューブに回収した. BD FACS Aria II セルソーターを用いて IFN-γ⁺細胞および IL-17A⁺細胞の割合を解析した.

2.6. 脊髄の組織切片の作製

マウスにペントバルビタール (ネンブタール注射液) 50 mg/kg を腹腔内投与した. 正向反射消失後, 胸部を滅菌した解剖用はさみで切開し, 心臓を露出した. 左心室に翼状針を刺し, 右心耳を切開後, ペリスタポンプ (SJ1211H, アト一株株式会社, 東京) で PBS を灌流した. 十分に PBS で灌流後, 10% 中性緩衝ホルマリン溶液 (和光純薬工業株式会社) を灌流し, 固定した. 固定後, 脊柱ごと脊髄を取り出し, 10% 中性緩衝ホルマリン溶液に入れた. 24 時間後に脊髄を取り出し, 3 時間の流水水洗後, 迅速脱灰液の K-CX (株式会社ファルマ, 東京) に投入した. 48 時間後に取り出し, 適当な大きさに切断後, 3 時間流水水洗した. 再び 10% 中性緩衝ホルマリン溶液に投入し, 24 時間後に組織を取り出した. 3 時間流水水洗後, Tissue Cassette (greiner labortechnik, Frickenhausen, Germany) に入れ, 自動固定包埋装置 (サクラロータリーRH-12PM, サクラ精機株式会社, 長野) にセットし, 自動浸透した. 予め, 自動固定包埋装置の各層 (全 12 層) には, 80% エタノール, 95% エタノール (2 層), 100% エタノール

ール (3 層), キシレン (和光純薬工業株式会社) (3 層), パラフィン (Histoplast, Shandon Scientific Ltd., PA, USA) (3 層) を入れておいた. 自動浸透のスケジュールは, 80% エタノール (2 時間), 95% エタノール (2 時間), 95% エタノール (1 時間), 100% エタノール (1 時間 x 3 層), キシレン (1 時間 x 2 層), キシレン (2 時間), パラフィン (2 時間 x 3 層) とした. 浸透処理が完了した組織を, 予めパラフィンストレッチングプレート (EC-4030, アズワン株式会社, 大阪) 上でパラフィンを流し込んでおいたベースモールドに押しえつけ, 底が固まるまで室温で放置した. 直ちに Tissue Cassette をベースモールドの上に乗せてパラフィンを Tissue Cassette の上から流し込み, パラフィンが固まるまで室温で放置した. パラフィンブロックをベースモールドから取り外し, 4°C に保存した.

作製したパラフィンブロックをマイクロトーム (ROM-380, 大和光機工業株式会社, 埼玉) にセットし, 5 μm の厚さに薄切した. 薄切した組織を, 経木で水浴に浮かべ, 広げた. 水浴の組織を 40°C の湯浴に移し, 数秒間組織を伸展させた. 伸展した組織を MAS コートスライドガラス (松浪硝子工業株式会社) の上に乗せ, 余分な水分をキムワイプで拭き取った後, 37°C に設定したパラフィンストレッチングプレートに置き, 乾燥させた. 乾燥後, 37°C の恒温槽に一晩放置し, 固定した.

2.7. ヘマトキシリン・エオジン染色

本節・2.6.で乾燥, 固定した組織標本を染色バッド金具 (アズワン株式会社) に立て, 順にキシレン層 (2 層), 100% エタノール層 (2 層), 70% エタノール層に各々 5 分間浸し, パラフィンを除去した (脱パラ). 脱パラした組織標本を 4 分間流水水洗後, マイヤーヘマトキシリン溶液 (和光純薬工業株式会社) で 10 分間核染色した. 過剰な色素の除去および核の色出しを目的に, 流水で 15 分間水洗した. 次に, エオジン液で 2 分間染色し, 流水で 5 秒間水洗した. 続いて, 70%, 80% および 90% エタノール層の順に 5~10 回出没させた後, 100% エタノール層 (3 層) にそれぞれ 20 回出没し, 脱水した. 次に, キシレン層 (4 層) にそれぞれ 15 回出没し, 透徹した. 最後に, カナダバルサム (和光純薬工業株式会社) で封入し, 顕微鏡 (Eclipse 80i, 株式会社ニコン, 東京) で観察した.

2.8. ルクソール・ファストブルー染色

本節・2.6.で乾燥, 固定した組織標本を本節・2.7.と同様の方法で脱パラした. 脱パラした組織標本を 5 分間流水水洗後, 100 ml の精製水に対し, 10% 酢酸を 20 滴入れた溶液に 5 分間浸した. 続いて, 95% エタノールに 5 分間浸した後, Luxol[®] Fast Blue MBSN 溶液 (Acros Organics, Geel, Belgium) に 58°C 条件下, 24 時間浸した. 室温で冷却後, 95% エタノール層および精製水に各 5 分間浸し, 洗浄した. 洗浄後, 0.1% 炭酸リチウム溶液に 1~2 秒間浸し, 続いて 70% エタノール層に 5~10 回出沒させ分別した. 乾燥しないように注意して鏡検し, 分別が足りなければ, 水洗, 0.1% 炭酸リチウム溶液, 70% エタノールのステップを繰り返した. 続いて, 70%, 80% および 90% エタノール層の順に 5~10 回出沒させた後, 100% エタノール層 (3 層) にそれぞれ 20 回出沒し, 脱水した. 次に, キシレン層 (4 層) にそれぞれ 15 回出沒し, 透徹した. 最後に, カナダバルサムで封入し, 顕微鏡で観察した.

2.9. 浸潤 CD3⁺T 細胞の染色およびその評価

本節・2.6.で乾燥, 固定した組織標本を本節・2.7.と同様の方法で脱パラした. 脱パラした組織標本を 4 分間流水水洗後, 1mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 溶液 (pH 8.0) を十分量入れておいたビーカーに浸した. ビーカーの口を軽くサランラップで覆い, 電子レンジで 750W, 5 分間 x 3 回加熱処理した (賦活化). 賦活化した組織を室温になるまで放置後, PBS 層 (2 層) にそれぞれ 5 分間浸し, 洗浄した. 洗浄後, 内因性のペルオキシダーゼを失活させるために, 0.3% H₂O₂ (三菱瓦斯化学株式会社, 東京) および 0.1% NaN₃ (ナカライテスク株式会社) を含むメタノール (ナカライテスク株式会社) 溶液に 10 分間浸した. 再び PBS 層 (2 層) にそれぞれ 5 分間浸し, 洗浄した. 洗浄後, 0.1% BSA および 0.1M NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液, pH 7.0 (緩衝液 A) に室温で 45 分間浸した. 次に, 緩衝液 A で 400 倍希釈した polyclonal goat anti-mouse CD3-ε antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., TX, USA) を滴下し, 37°C で 60 分間保温した. PBS 層 (2 層) にそれぞれ 5 分間浸し, 洗浄後, 緩衝液 A で 400 倍希釈した peroxidase conjugated polyclonal rabbit anti-goat IgG (H+L chain) (株式会社医学生物学研究所, 愛知) を滴下し, 37°C で 60 分間保温した. PBS 層 (2 層) にそれぞれ 5 分間浸し, 洗浄後, 0.005% H₂O₂, 10 mM NaN₃ および 1 mg/ml

3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (株式会社同仁化学研究所, 熊本) を含む PBS を滴下し, 37°C で 10 分間反応させた. PBS 層 (2 層) にそれぞれ 5 分間浸し, 洗浄後, マイヤーヘマトキシリン溶液に 3 分間浸し, 核染色した. 過剰な色素の除去および核の色出しを目的に, 流水で 15 分間水洗した. 続いて, 70%, 80% および 90% エタノール層の順に 5~10 回出沒させた後, 100% エタノール層 (3 層) にそれぞれ 20 回出沒し, 脱水した. 次に, キシレン層 (4 層) にそれぞれ 15 回出沒し, 透徹した. 最後に, カナダバルサムで封入し, 顕微鏡下で CD3⁺ T 細胞数をカウントした. 次に, 組織の全体像を顕微鏡に取り付けたデジタルカメラ (Coolpix4500, 株式会社ニコン) で撮影した. 脊髄への単位面積 (mm²) あたりの浸潤 CD3⁺ T 細胞数は, 撮影した画像中の脊髄の面積を画像解析ソフト (Image J; National Institutes of Health, WA, USA; <http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) で求め, 算出した.

2.10. 脾臓由来 CD4⁺ T 細胞の分取および培養上清中サイトカイン濃度の酵素免疫測定法

マウスにペントバルビタール (ネンブタール注射液) 50 mg/kg を腹腔内投与し, 正向反射消失後, オートクレーブ滅菌した解剖用はさみで腹部を切開した. 脾臓を採取し, 本節・2.5.と同じ方法で脾細胞懸濁液を調製した. 別の 15 ml コニカルチューブに予め Lympholyte-M (Cedarlane Laboratories Ltd., Canada) を 5 ml 入れておき, その上に細胞懸濁液を積層した. 1,500 x g で 20 分間遠心分離後, 電子線照射済スポイト (アジア器材株式会社, 東京) を用いて新しい 15 ml コニカルチューブに単核球の層を採取した. 採取した単核球層に PBS を 5 ml 加えて懸濁した後, 800 x g で 10 分間遠心分離した. 上清を除去し, 沈殿を指で弾いて分散させ, 再度 PBS を 5 ml 加え, 電子線照射済スポイトで懸濁させた後, 800 x g で 10 分間遠心分離した. 上清を除去し, 沈殿を指で弾いて分散させた後, PBS を加え全量を 1 ml とし, 生細胞数をカウントした. 脾細胞由来 CD4⁺ T 細胞は, CD4⁺ T Cell Isolation Kit, mouse (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch, Germany) を用いて以下の手順で分取した. 脾細胞懸濁液を 300 x g で 10 分間遠心分離後, 上清を除去し, 0.5% BSA および 2 mM EDTA を含む PBS (pH7.2; MACS buffer) を細胞数 1.0 x 10⁷ 個あたり 40 μl 加え懸濁した. biotin-antibody cocktail を細胞数 1.0 x 10⁷ 個あたり 10 μl 加え, 4°C で 10 分間イ

ンキュベートした。インキュベート後、MACS buffer を細胞数 1.0×10^7 個あたり $30 \mu\text{L}$ および anti-biotin microbeads $20 \mu\text{L}$ を加えてよく混和し、 4°C で 15 分間インキュベートした。インキュベート後、MACS buffer を細胞数 1.0×10^7 個あたり 1 ml 加え、 $300 \times \text{g}$ で 10 分間遠心分離した。上清を除去し、沈殿を指で弾いて分散させた後、MACS buffer を $500 \mu\text{L}$ 加え懸濁した。LS カラム (Miltenyi Biotec GmbH) を MACS separator の磁場に装着し、MACS buffer 3 ml でリンスした。リンス後、LS カラムに細胞懸濁液を流し、 15 ml のコニカルチューブに細胞を回収した。MACS buffer 3 ml で 3 回、LS カラムを共洗いし、回収した。 $300 \times \text{g}$ で 10 分間遠心分離後、上清を除去し、沈殿を指で弾いて分散させた後、PBS を加え全量を 1 ml とし、生細胞数をカウントした。 $300 \times \text{g}$ で 10 分間遠心分離後、上清を除去し、10% FCS, 100 units/ml penicillin, $100 \mu\text{g/ml}$ streptomycin および $2.5 \mu\text{M}$ 2-mercaptoethanol を含む IMDM (GlutaMAX™ Supplement, Thermo Fisher Scientific, Inc.) を適量加えた。48 well plate (BD Biosciences) に CD4^+ T 細胞 (7.0×10^5 個/well) を播種し、IL-2 10 U/ml および MOG₃₅₋₅₅ $100 \mu\text{g/ml}$ 存在下あるいは非存在下、 37°C , 5% CO_2 条件下で 72 時間培養し、培養上清を回収した。培養上清中の IL-17A および IFN- γ の濃度は、Mouse IL-17A ELISA MAX™ Deluxe (BioLegend, Inc.) および Mouse IFN- γ ELISA MAX™ Deluxe (BioLegend, Inc.) を用いて添付のインストラクションに従って測定した。

2.11. 鼠径リンパ節由来 CD4^+ T 細胞中のメモリーT 細胞およびナイーブ T 細胞の割合

本節・2.5.と同様に、鼠径リンパ節を採取後、細胞懸濁液を調製し、生細胞数をカウントした。細胞 1.0×10^6 個を 1.5 ml エッペンチューブに移し、2% FCS を含む PBS を 1 ml 加えた。 $400 \times \text{g}$ で 5 分間遠心分離後、上清を除去し、2% FCS を含む PBS で希釈した APC-Cy7-conjugated anti-mouse CD4 mAb (clone: GK1.5; BioLegend, Inc.; 1:300), APC-conjugated anti-mouse CD44 mAb (clone: IM7.8.1; Miltenyi Biotec GmbH; 1:300) および phycoerythrin-Cy7 (PE-Cy7)-conjugated anti-mouse CD62L mAb (clone: MEL-14; BioLegend, Inc.; 1:600) の混合溶液を $100 \mu\text{l}$ 加え、 4°C , 暗所条件下で 20 分間インキュベートした。インキュベート後、2% FCS を含む PBS を 1 ml 加えた。 $400 \times \text{g}$ で 5 分間遠心分離後、上清を除去し、2% FCS を含む PBS を $300 \mu\text{l}$ 加え、ナイロンメッシュ (N-NO.355T) を通過さ

せ, 5 ml ポリスチレンラウンドチューブ (BD Biosciences) に回収した. BD FACS Aria II セルソーターを用いて, $CD4^+$ T 細胞中のエフェクターメモリーT 細胞, セントラルメモリーT 細胞およびナイーブ T 細胞の割合を解析した.

2.12. 統計解析

統計学的解析には, Statcel3 を用いた. 統計学的有意差の判定には, Mann-Whitney *U*-test あるいは unpaired *t*-test with Welch's correction を用い, $P < 0.05$ を有意差有りとした.

3. 結果

3.1. 病勢および体重の推移

FTY720 は、EAE マウスに対して優れた予防効果および治療効果を示すことが報告されている [24]. 本研究では、FTY720 の休薬が EAE の病勢に及ぼす影響を明らかとするため、EAE 症状を呈したマウスを病勢の平均値に差がない 2 群 (FTY720 群および placebo 群) に分け、5 週間治療後、休薬し (本節・2.4. 参照), 病勢の推移を経過観察し、スコア化した (本節・2.3. 参照). また、体重の推移についても調べた. Placebo 群では、急性増悪期から症状の軽減はみられたものの、その後は EAE スコア 1 程度で慢性に推移した. 一方、FTY720 群では、顕著に症状が改善され、placebo 群と比較し、治療開始から 4 日後以降で有意な改善がみられた (Fig. 1A). しかし、休薬約 1 週間後に全個体 (6 個体中 6 個体) が再燃した (Fig. 1A). その再燃に伴い、体重も有意に減少した (Fig. 1B).

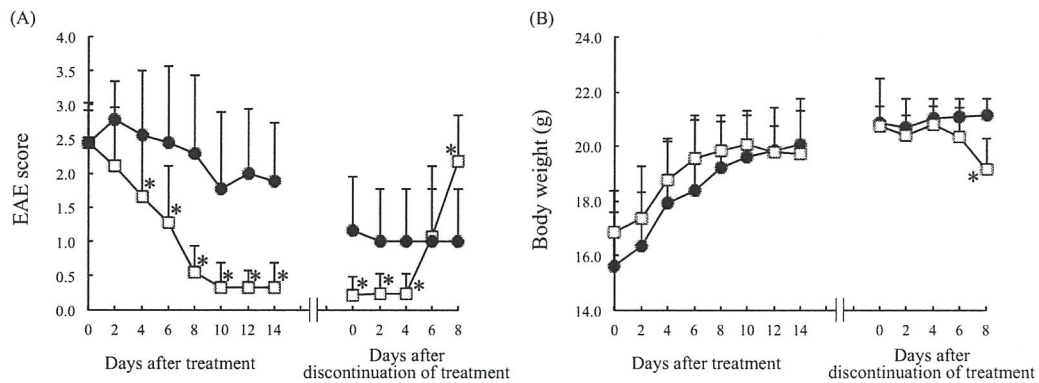


Fig. 1 Ameliorating Effect of FTY720 on Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Relapse after Discontinuation of FTY720

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mice were divided into two groups (□: the FTY720 group (n=6-9, FTY720 0.3 mg/kg) and ●: the placebo group (n=6-9, water)). EAE mice were treated with FTY720, and (A) EAE score and (B) body weight were evaluated. The results are indicated as the mean + SD. The significance of differences between the FTY720 and placebo groups was examined by using the Mann-Whitney *U*-test (* denotes $P < 0.05$).

3.2. 治療完了時のリンパ節由来CD4⁺ T細胞の病因抗原に対する炎症性サイトカイン産生

治療完了時の病因ヘルパーT (Th) 細胞 (CD4⁺ T 細胞) の病因抗原に対する反応性を明らかとするため、鼠径リンパ節由来 CD4⁺ T 細胞を MOG₃₅₋₅₅ 100 μg/ml 存在下, CD11c⁺細胞(抗原提示細胞)と 72 時間共培養(CD4⁺: CD11c⁺=10:1) した後, PE-conjugated anti-mouse IL-17A mAb および FITC-conjugated anti-mouse IFN-γ mAb を用いて細胞内サイトカイン染色し, フローサイトメトリー解析した. なお, IL-17A および IFN-γ は, それぞれ EAE の病態形成の主体として働く病因 Th 細胞である Th17 細胞および Th1 細胞が産生する代表的なサイトカインである. その結果, FTY720 群 (IL-17A⁺ 細胞: 0.52%±0.10 (平均値±標準偏差), IFN-γ⁺ 細胞: 6.00%±0.62) では, placebo 群 (IL-17A⁺ 細胞: 0.31%±0.18, IFN-γ⁺ 細胞: 2.41%±1.27) と比較して IL-17A および IFN-γ 産生細胞の割合が上昇していた (Fig. 2). 即ち, MOG₃₅₋₅₅ 特異的な病因 Th17 および Th1 細胞が鼠径リンパ節内に隔離されていることが示された.

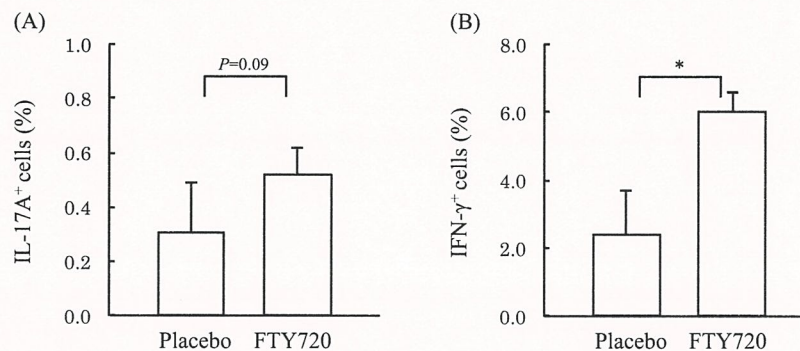


Fig. 2 Cytokine Production of Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (35-55)-specific CD4⁺ T Cells from Inguinal Lymph Nodes at the End of Treatment

At the end of treatment, CD4⁺ T cells and CD11c⁺ cells were purified from inguinal lymph nodes, and co-cultured in the presence of MOG₃₅₋₅₅ for 72 h. The percentages of (A) interleukin (IL)-17A⁺ and (B) interferon (IFN)-γ⁺ cells in CD4⁺ T cells were determined by flow cytometric analysis. The results are shown as the mean + SD (n = 4). The significance of differences between the FTY720 and placebo groups was examined by using the unpaired *t*-test with Welch's correction (*denotes *P* < 0.05).

3.3. 脊髄の組織化学的評価

FTY720群の個体から，治療開始時（発症時），治療完了時および休薬9日後の脊髄のパラフィン切片を作製し，脊髄への炎症細胞の浸潤および髄鞘の破壊について，それぞれヘマトキシリン・エオジン染色法およびルクソール・ファストブルー染色法を用いて調べた．なお，ヘマトキシリン・エオジン染色法は，ヘマトキシリンによって細胞核を青紫色，エオジンYによって細胞質，細胞間質や線維を淡赤色～濃赤色に染め分ける染色法である．また，ルクソール・ファストブルー染色法は，髄鞘を青色に染める染色法である．

発症時では，髄膜および髄膜下白質において，リンパ球および好中球の浸潤を主体とする炎症像が確認された（Figs. 3D, E）．また，それに伴う髄鞘の破壊も確認された（Fig. 3F）．治療完了時では，リンパ球，好中球等の炎症細胞の浸潤が顕著に抑制され（Figs. 3G, H），脱髄もほぼ消失していた（Fig. 3I）．一方，休薬9日後では，治療完了時と比較し，炎症細胞の浸潤（Figs. 3J, K）およびそれに伴う脱髄像（Figs. 3L）が血管周囲で再び認められた．

次に，抗CD3抗体を用いて，免疫組織化学的染色を行い，脊髄切片の単位面積あたりの浸潤CD3⁺T細胞の浸潤数（個/mm²）を算出した．発症時では，62±21個/mm²（平均値±標準偏差）であったが，治療完了時では4±2個/mm²と顕著に減少していた（Fig. 4）．しかし，休薬9日後には60±27個/mm²と再び，顕著に増加していた（Fig. 4）．

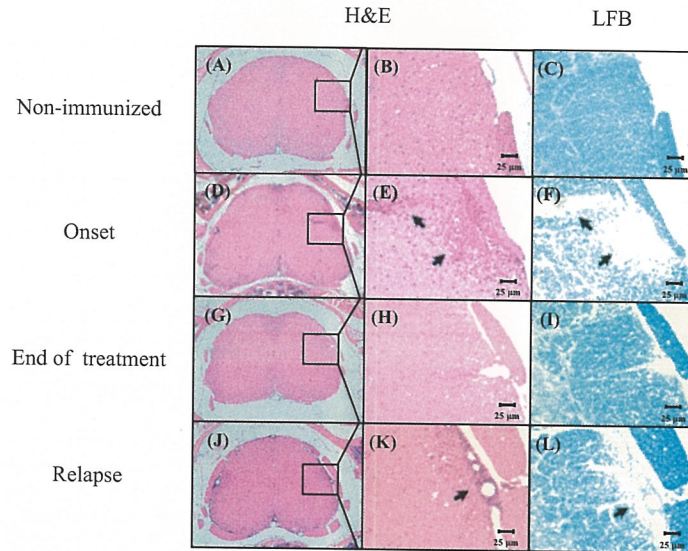


Fig. 3 Hematoxylin-eosin Staining and Luxol Fast Blue Staining of Spinal Cord

At the times of onset, end of treatment and relapse (9 days after discontinuation of FTY720), spinal cord was excised and sections were stained with hematoxylin–eosin (H&E) and luxol fast blue (LFB). (A-C): non-immunized mice; (D-F): at the time of onset; (G-I): at the time of end of treatment; (J-L): at the time of relapse. (A, B, D, E, G, H, J, K): H&E; (C), (F), (I), (L): LFB. Representative images from one mouse in each day are shown. Infiltration of lymphocytes and demyelination were observed at the times of onset and relapse (arrows).

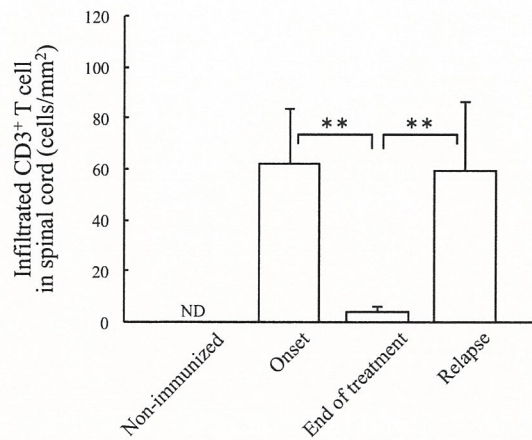


Fig. 4 Infiltrated CD3⁺ T Cell in Spinal Cord

At the times of onset, end of treatment and relapse (9 days after discontinuation of FTY720), spinal cord was excised and sections were stained with polyclonal goat anti CD3- ϵ antibody. The number of CD3⁺ T cells was counted under a microscope at a magnification of x 400, and the numbers per unit area in the spinal cord were quantified by the use of imaging software (Image J). The results are indicated as the mean + SD (n=4-6). The significance of differences was examined by using the Mann-Whitney *U*-test (** denotes $P < 0.01$; ND denotes not detected).

3.4. 休薬後の脾臓由来 CD4⁺ T 細胞の病因抗原に対する活性化能

末梢での病因 Th 細胞の病因抗原に対する反応性を明らかにするため、FTY720 群の個体から、発症時、治療完了時および休薬 9 日後の脾臓由来 CD4⁺ T 細胞を分取し、MOG₃₅₋₅₅ 100 μg/ml 存在下あるいは非存在下で、72 時間培養し、培養上清中の IL-17A および IFN-γ の濃度を酵素免疫測定法を用いて測定した。発症時の CD4⁺ T 細胞は、病因抗原特異的に、IL-17A (874 ± 389 pg/ml (平均値 ± 標準偏差)) および IFN-γ (6.0 × 10⁴ ± 1.9 × 10⁴ pg/ml) を高産生したが、治療完了時では有意に低下した (IL-17A: 78.7 ± 80.6 pg/ml, IFN-γ: 1.6 × 10⁴ ± 1.6 × 10⁴ pg/ml)。しかし、休薬 9 日後では、再び、IL-17A (717 ± 206 pg/ml) および IFN-γ (8.1 × 10⁴ ± 8.8 × 10³ pg/ml) と有意な高産生が確認された (Fig. 5)。

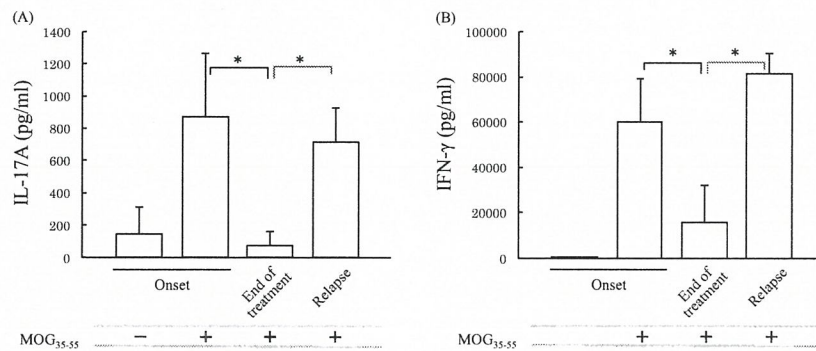


Fig. 5 Cytokine Production of Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (35-55)-specific CD4⁺ T Cells from Spleen

At the times of onset, end of treatment and relapse (9 days after discontinuation of FTY720), CD4⁺ T cells were purified from spleen, and stimulated with MOG₃₅₋₅₅ (100 μg/ml) for 72 h. IL-17 and IFN-γ concentrations in the culture supernatant were measured by using a two-site enzyme immunoassay. The results are shown as the mean + SD (n=3-4). The significance of differences was examined by using the unpaired *t*-test with Welch's correction (*denotes $P < 0.05$).

3.5. 鼠径リンパ節由来 CD4⁺T 細胞中のメモリーT 細胞およびナイーブ T 細胞の割合

FTY720 の休薬後に再燃した要因を明らかとするために、メモリーT 細胞に着目して調べた。メモリーT 細胞には、1) 次の免疫応答に備え分化能を維持した状態で二次リンパ組織に待機するセントラルメモリーT 細胞および 2) 炎症局所に存在し、同一抗原侵入時に即時にエフェクター機能を発揮するエフェクターメモリーT 細胞の 2 種類が存在する。マウス由来の両者は、共に CD44 を高発現する。エフェクターメモリーT 細胞は、リンパ球のホーミングに必要なケモカイン受容体である CC ケモカイン受容体 7 (chemokine (C-C motif) receptor 7: CCR7) や細胞接着分子の CD62L の発現は低い。一方、セントラルメモリーT 細胞は、CCR7 や CD62L を高発現している。治療完了時に鼠径リンパ節を採取し、CD4⁺T 細胞中のエフェクターメモリーT 細胞 (CD44⁺ CD62L⁻ CD4⁺T cells)、セントラルメモリーT 細胞 (CD44⁺ CD62L⁺ CD4⁺T cells) およびナイーブ T 細胞 (CD44⁻ CD62L⁺ CD4⁺T cells) の割合 (%) をフローサイトメトリー解析した。その結果、鼠径リンパ節中のエフェクターメモリーT 細胞の割合が FTY720 群でプラセボ群と比較し、顕著に増加していた (FTY720 群: 18.7 ± 4.2 % (平均値±標準偏差), placebo 群: 11.1 ± 3.0 %; Fig. 6A)。また、セントラルメモリーT 細胞の割合も増加傾向を示した (FTY720 群: 9.1 ± 3.3 %, placebo 群: 7.0 ± 4.7 %; Fig. 6B)。一方、ナイーブ T 細胞の割合は有意に減少していた (FTY720 群: 65.0 ± 7.7 %, placebo 群: 75.7 ± 5.6 %; Fig. 6C)。即ち、二次リンパ組織にリンパ球を隔離した状態では、二次リンパ組織内のエフェクターメモリーT 細胞の割合が高くなることが明らかとなった。

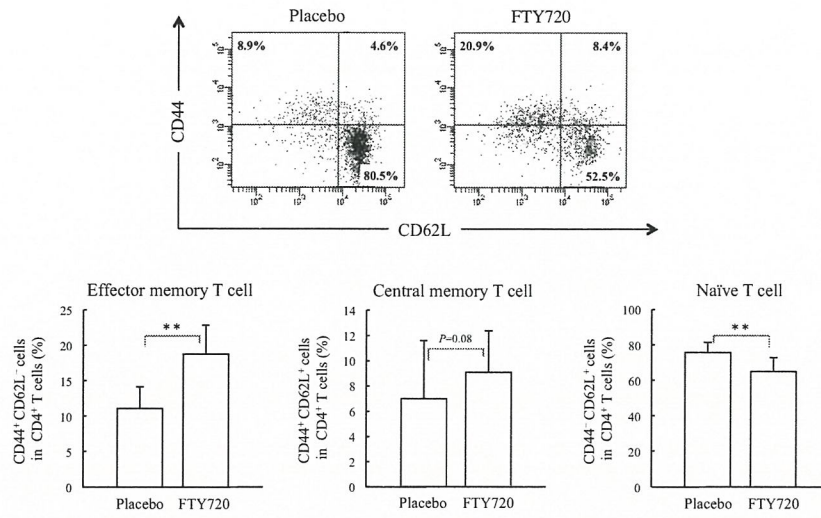


Fig. 6 Percentages of Memory T cells and Naïve T cells in Inguinal Lymph Nodes at the End of Treatment

At the end of treatment, the percentages of CD44⁺CD62L⁻ (effector memory T), CD44⁺CD62L⁺ (central memory T) and CD44⁻CD62L⁺ (naïve T) cells in CD4⁺ T cells of inguinal LNs were determined by flow-cytometric analysis. The results are shown as the mean + SD (n=9). The significance of differences between the FTY720 and placebo groups was examined by using the Mann-Whitney *U*-test (** denotes *P*<0.01).

4. 考 察

多発性硬化症の再発予防には、従来からインターフェロン β 注射薬（ベタフェロンやアボネックス）が用いられており、2011年9月から内服薬のFTY720が新たな選択肢として加わった。SJL/JマウスにPLPの部分ペプチド(PLP₁₃₉₋₁₅₁)を感作して作製した慢性再発性EAEに対して、FTY720がインターフェロン β と比較して、顕著に再燃を抑制することが報告されている [24]。また、C57BL/6マウスにMOG₃₅₋₅₅を感作して作製した慢性持続性EAEに対するFTY720の有用性についても同論文で報告されている [24]。本研究においても、FTY720の治療的投与により、EAEの病因Th細胞であるIL-17Aを産生するTh17細胞やIFN- γ を産生するTh1細胞が二次リンパ組織に隔離され、脊髄への浸潤T細胞が顕著に抑制された。このように、FTY720がEAEに対して優れた治療効果を発揮する。このことから、EAEの病態形成には、末梢組織からのリンパ球の動員が重要であることが示された。

FTY720は、臨床用量でT細胞やB細胞の活性には影響を及ぼさない [25]。また、外因性抗原の排除で主体的な役割を果たすエフェクターメモリーT細胞に対しても、二次リンパ組織への循環能がないため、影響を及ぼさない [16]。従って、他の免疫抑制薬の有害事象として問題となる重篤な日和見感染症等に対するリスクも低い。しかし、それ故に、休薬に伴い、二次リンパ組織に隔離されていた病因抗原特異的T細胞が解放されることにより、急激に症状が増悪する可能性が予測された。事実、EAEをFTY720で治療し、その後休薬したところ、約1週間後に重篤な再燃が確認された。これらは、脾臓由来Th細胞のMOG₃₅₋₅₅に対する炎症性サイトカインの産生レベルおよび免疫組織化学的所見からも裏付けられた。即ち、休薬9日後、脾臓由来Th細胞のMOG₃₅₋₅₅に対するIL-17AやIFN- γ の産生量が治療完了時と比較し、顕著に増加していた。また、脊髄への浸潤T細胞数が顕著に増加していた。従って、隔離されていた病因抗原特異的なTh17細胞やTh1細胞が所属リンパ組織から解放され、脊髄に再び浸潤し、脱髄を引き起こしたと考えられた。

一般に、活性化したエフェクターT細胞の寿命は短く、抗原提示がなくなるとほとんどの細胞に細胞死が誘導されるが、一部の細胞は残存し、免疫学的記憶において中心的な役割を担うメモリーT細胞へと分化する。従って、FTY720

での治療期間，病因 T 細胞を所属リンパ節に隔離し，免疫応答を制御したにも関わらず，休薬後再燃したことは，所属リンパ節内で免疫学的記憶が形成されたことが原因と考えられた．さらに，休薬によりリンパ球のホーミングを解除すると再燃したことから，免疫学的記憶を担うメモリー T 細胞のホーミングの解除がエフェクター機能の再活性化のトリガーとなっていると考えられた．通常，エフェクターメモリー T 細胞は，CCR7 や CD62L の発現が低いため，リンパ組織にホーミングせず，末梢組織に存在し，抗原認識後，即時にエフェクター機能を発揮する．一方，セントラルメモリー T 細胞は，CCR7 や CD62L の発現が高いため，リンパ組織に多く存在する．FTY720 による治療完了時では，鼠頸リンパ節の Th 細胞中のエフェクターメモリー T 細胞 ($CD44^+ CD62L^- CD4^+$ T cells) およびセントラルメモリー T 細胞 ($CD44^+ CD62L^+ CD4^+$ T cells) の割合がいずれも増加していた．従って，FTY720 存在下では，リンパ節内で活性化したエフェクター T 細胞が移出されず，その一部がエフェクターメモリー T 細胞およびセントラルメモリー T 細胞となり，両メモリー T 細胞のリンパ節内の割合が増加したと考えられた．

第2節 実験的自己免疫性脳脊髄炎に対するFTY720と病因抗原の併用療法の有用性

1. 目的

前節では、FTY720が多発性硬化症のモデル動物であるEAEマウスに対する優れた治療効果を示したが、休薬後、重篤な再燃が起きることおよびそのメカニズムを明らかとした。しかし、FTY720は、既存の多発性硬化症治療薬のインターフェロン β 1aに比べて、再発寛解型患者の年間再発率を有意に低下させることから [25]、その臨床的価値は高い。本節では、FTY720によって二次リンパ組織に病因抗原特異的なTh細胞を隔離し、病勢を制御下、病因抗原であるMOG₃₅₋₅₅を静脈内投与することで、休薬後の再燃を制御できることを明らかとし、続いてそのメカニズムについて検討を加えた。

2. 実験材料と実験方法

2.1. 実験動物

C57BL/6J マウスは、日本チャールズ・リバー株式会社から購入した。飼育は本章・第1節・2.1の方法に従って行った。なお、本研究は動物実験の適正な実施に向けたガイドライン（日本学術会議: 2006年6月1日）および摂南大学動物実験に関する規定に従い実施した。

許可番号: K12-16

2.2. FTY720およびMOG₃₅₋₅₅

2-Amino-2-[2-(4-octylphenyl)ethyl]propane-1,3-diol hydrochloride (FTY720) は、吉富製薬株式会社（現 田辺三菱製薬株式会社）より恵与された。Mouse myelin oligodendrocyte glycoprotein 35 (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) 55 (MOG₃₅₋₅₅) はオペロンバイオテクノロジー株式会社（現 ユーロフィンジェノミクス株式会社）から購入した。

2.3. 実験的自己免疫性脳脊髄炎の誘導および評価

EAEの誘導および臨床症状の評価は、本章・第1節・2.3と同様に行った。

2.4. 試験プロトコル

先ず、MOG₃₅₋₅₅ 単独での効果を調べるため、EAE 症状を呈したマウスを EAE スコアの平均値に差がない 3 群 ((1) FTY720 群: FTY720 (0.3 mg/kg) を発症時から週 6 回 3 週間経口投与, (2) MOG₃₅₋₅₅ 群: MOG₃₅₋₅₅ (10-20 µg/マウス) を発症時から 1 日 1 回 4 日間静脈内投与および (3) placebo 群: 注射用蒸留水を発症時から週 6 回 3 週間経口投与) に分け, 治療した.

次に, FTY720 に MOG₃₅₋₅₅ を併用することで, FTY720 休薬後の再燃を抑制できるか否かを明らかにするために, EAE 症状を呈したマウスを EAE スコアの平均値に差がない 2 群 ((1) FTY720 群: FTY720 (0.3 mg/kg) を発症時から週 6 回 3-5 週間経口投与および (2) FTY720 + MOG₃₅₋₅₅ 併用群: FTY720 (0.3 mg/kg) を発症時から週 6 回 3-5 週間経口投与 + MOG₃₅₋₅₅ (10-20 µg/マウス) を FTY720 による治療開始 2-3 日後から 1 日 1 回 4 日間静脈内投与) に分け, 治療後, 休薬した.

なお, FTY720 は, 注射用蒸留水に 1 mg/ml となるように溶解後, -20°C で保管し, 用時溶解して用いた. マウスの体重を基に投与量が 0.1 ml となるように注射用蒸留水で希釈し, 経口投与した. また, MOG₃₅₋₅₅ は, 注射用蒸留水に 4 mg/ml となるように溶解後, -20°C で保管し, 用時溶解して用いた. マウス 1 匹あたり投与量が 0.1 ml となるように PBS で希釈し, 尾部から静脈内投与した.

2.5. 鼠径リンパ節中 CD4⁺ T 細胞の絶対数の評価

本章・第1節・2.5.と同じ方法で, 鼠径リンパ節を採取後, 細胞懸濁液を調製し, 生細胞数をカウントした. 400 x g で 5 分間遠心分離後, 上清を除去し, 2% FCS を含む PBS で希釈した APC-Cy7-conjugated anti-mouse CD4 mAb (clone: GK1.5; BioLegend, Inc.; 1:300) 100 µl を加え, 4°C, 暗所条件下で 20 分間インキュベートした. インキュベート後, 2% FCS を含む PBS 1 ml を加えた. 400 x g で 5 分間遠心分離後, 上清を除去し, 2% FCS を含む PBS 300 µl を加え, BD FACS Aria II セルソーターで CD4⁺ T 細胞の割合を解析した. 鼠径リンパ節中の CD4⁺ T 細胞の絶対数は, 全細胞数に対する CD4⁺ T 細胞の割合から算出した.

2.6. 脊髄組織の凍結切片の作製

マウスにペントバルビタール（ネンブタール注射液）50 mg/kgを腹腔内投与し、正向反射消失後、胸部を解剖用はさみで切開し、心臓を露出した。左心室に翼状針を刺し、右心耳を切開後、ペリスタポンプ（SJ1211H）を用いてPBSで灌流した。十分に灌流後、脊柱ごと脊髄を取り出し、解剖用はさみを用いて脊椎を切開し、脊髄を露出させ、メスを用いて取り出した。摘出した脊髄は、ドライアイスで冷却した2-メチルブタン（和光純薬工業株式会社）に浸し、凍結した。続いて、OCT compound（サクラ精機株式会社）を満たしたベースモールドに沈め、ベースモールドごと2-メチルブタンに沈め、組織を凍結した。凍結した組織は、クリオスタット（白井松機器株式会社、大阪）にセット後、10 μ mの厚さに薄切し、MASコートスライドガラスの上に乗せ、風乾させた。続いて、アセトン（ナカライテスク株式会社）に4°Cで15分間浸し、固定した。風乾後、-20°Cで保存した。

2.7. 浸潤CD3⁺T細胞の染色およびその評価

本節・2.6.で薄切した凍結切片をPBS層（2層）にそれぞれ5分間浸し、洗浄した。洗浄後、内因性のペルオキシダーゼを失活させるために、0.3% H₂O₂および0.1% NaN₃を含むメタノール溶液に10分間浸した。再びPBS層（2層）にそれぞれ5分間浸し、洗浄した。洗浄後、0.1% および0.1 M NaClを含む10 mMリン酸緩衝液、pH 7.0（緩衝液A）に室温で20分間浸した。次に、緩衝液Aで1000倍希釈したpolyclonal goat anti-mouse CD3- ϵ antibody（Santa Cruz Biotechnology, Inc.）を滴下し、37°Cで60分間保温後、4°Cで一晩保温した。PBS層（2層）にそれぞれ5分間浸し、洗浄後、緩衝液Aで400倍希釈したperoxidase conjugated polyclonal rabbit anti-goat IgG（H+L chain）（株式会社医学生物学研究所）を滴下し、37°Cで60分間保温した。PBS層（2層）にそれぞれ5分間浸し、洗浄後、0.005% H₂O₂、10 mM NaN₃および1 mg/ml 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride（株式会社同仁化学研究所）を含むPBSを滴下し、30分間反応させた。PBS層（2層）にそれぞれ5分間浸し、洗浄後、マイヤーヘマトキシリン溶液に3分間浸し、核染色し、本章・第1節・2.9.と同様に、封入した。顕微鏡下でCD3⁺T細胞数をカウントし、画像解析ソフト（Image J）を用いて、脊髄への浸潤CD3⁺T細胞を単位面積（mm²）あたりの個数として算出した。

2.8. 浸潤CD4⁺T細胞の染色およびその評価

本節・2.6.で薄切した凍結切片をPBS層（2層）にそれぞれ5分間浸し、洗浄した。洗浄後、0.3% H₂O₂および0.1% NaN₃を含むメタノール溶液に10分間浸した。再びPBS層（2層）にそれぞれ5分間浸し、洗浄した。洗浄後、緩衝液Aに室温で20分間浸した。次に、緩衝液Aで1000倍希釈したrat anti-mouse CD4/L3T4 mAb（Beckman Coulter, Inc., CA, USA）を滴下し、37°Cで60分間保温後、4°Cで一晩保温した。PBS層（2層）にそれぞれ5分間浸し、洗浄後、N-Histofine[®] Simple Stain Mouse MAX PO（Rat）（株式会社ニチレイバイオサイエンス、東京）を滴下し、37°Cにて30分間保温した。PBS層（2層）にそれぞれ5分間浸し、洗浄後、0.005% H₂O₂、10 mM NaN₃および1 mg/ml 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochlorideを含むPBSを滴下し、30分間反応させた。PBS層（2層）にそれぞれ5分間浸し、洗浄後、マイヤーヘマトキシリン溶液に3分間浸し、核染色し、本章・第1節・2.9.と同様に、封入した。顕微鏡下でCD4⁺T細胞数をカウントし、画像解析ソフト（Image J）を用いて、脊髄への浸潤CD4⁺T細胞を単位面積（mm²）あたりの個数として算出した。

2.9. 統計解析

統計学的解析には、Statcel3 を用いた。統計学的有意差の判定には、Mann-Whitney *U*-test を用い、 $P < 0.05$ を有意差有りとした。

3. 結果

3.1. MOG₃₅₋₅₅の治療効果

多発性硬化症等の動物モデルで病因抗原の投与が発症や病勢を制御することが報告されている [26-30]. 本研究では, 先ず, MOG₃₅₋₅₅単独による治療効果を調べるために, EAE症状を呈したマウスを病勢の平均値に差がない3群 (FTY720群, MOG₃₅₋₅₅群およびplacebo群) に分け, 治療した (本節・2.4.参照). 病勢の推移を経過観察し, スコア化した (本章・第1節・2.3.参照). その結果, MOG₃₅₋₅₅群はplacebo群と比較すると, 改善傾向がみられたが, その効果は部分的であった. また, FTY720群と比較すると, その効果は有意に弱かった (Fig. 7).

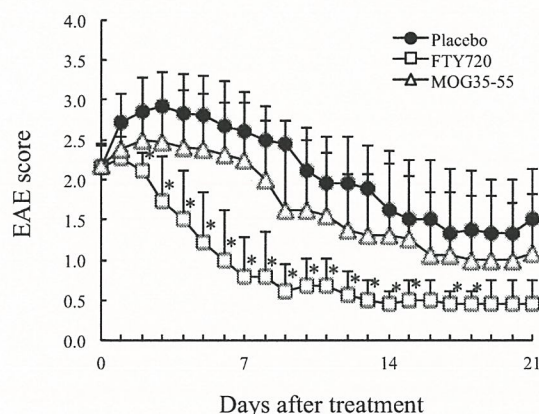


Fig. 7 Effect of Administration of Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (35-55) on Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mice were divided into three groups (□: the FTY720 group (n=9, FTY720 0.3 mg/kg), △: the MOG₃₅₋₅₅ group (n=6-8, MOG₃₅₋₅₅ 10-20 µg/mouse) and ●: the placebo group (n=7-9, water)). EAE mice were treated with MOG₃₅₋₅₅ or FTY720, and clinical symptoms (EAE score) were evaluated. The results are indicated as the mean + SD. The significance of differences between the MOG₃₅₋₅₅ and FTY720 groups was examined by using the Mann-Whitney *U*-test (* denotes $P < 0.05$).

3.2. FTY720とMOG₃₅₋₅₅の併用療法の有用性

FTY720の休薬約1週間後に確認された再燃をFTY720にMOG₃₅₋₅₅を併用投与することで抑制できるか否かを調べた。EAE症状を呈したマウスを病勢の平均値に差がない2群 (FTY720単独群およびFTY720 + MOG₃₅₋₅₅併用群) に分け、3-5週間治療後、休薬した (本節・2.4.参照)。病勢の推移を経過観察し、スコア化した (本章・第1節・2.3.参照)。その結果、FTY720 + MOG₃₅₋₅₅併用群では、FTY720単独群と同様、早期から病勢の抑制効果を示した (Fig. 8)。休薬後の病勢の推移については、FTY720単独群で、4個体中4個体 (全個体) で再燃が確認されたのに対し、FTY720 + MOG₃₅₋₅₅併用群では、8個体中7個体で再燃せず、残りの1個体も軽度な再燃を認めるにとどまった (Fig. 8)。

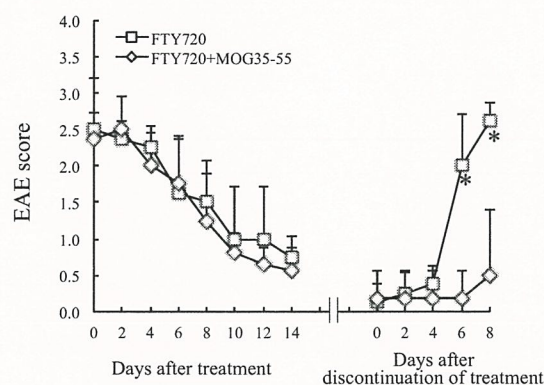


Fig. 8 Combination Treatment with FTY720 plus Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (35-55) Suppresses Relapse

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mice were divided into two groups (□: the FTY720 alone group (n=4, FTY720 0.3 mg/kg) and ◇: the FTY720 plus MOG₃₅₋₅₅ group (n=8, FTY720 0.3 mg/kg plus MOG₃₅₋₅₅ 10-20 µg/mouse)). EAE mice were treated with FTY720 alone or in combination with MOG₃₅₋₅₅, and clinical symptoms (EAE score) were evaluated. The results are indicated as the mean + SD. The significance of differences between the FTY720 alone and FTY720 plus MOG₃₅₋₅₅ groups was examined by using the Mann-Whitney *U*-test (* denotes $P < 0.05$).

3.3. FTY720とMOG₃₅₋₅₅の併用療法が休薬後の病因CD4⁺ T細胞の脊髄への移行性に及ぼす影響

FTY720とMOG₃₅₋₅₅の併用療法が、FTY720の休薬約1週間後に確認された再燃を抑制できた要因を明らかとするため、治療完了時および休薬8日後の鼠径リンパ節中のCD4⁺ T細胞数を調べた。その結果、治療完了時では、FTY720単独群およびFTY720 + MOG₃₅₋₅₅併用群間に、鼠径リンパ節中のCD4⁺ T細胞数に有意な差はみられなかった (FTY720単独群, $1.0 \times 10^6 \pm 3.1 \times 10^5$ 個 (平均値 \pm 標準偏差); FTY720 + MOG₃₅₋₅₅併用群, $1.1 \times 10^6 \pm 3.8 \times 10^5$ 個; Fig. 9A)。一方、休薬8日後では、FTY720単独群は、FTY720 + MOG₃₅₋₅₅併用群と比較し、顕著に鼠径リンパ節中のCD4⁺ T細胞数が減少していた (FTY720単独群, $3.1 \times 10^5 \pm 2.0 \times 10^5$ 個; FTY720 + MOG₃₅₋₅₅併用群, $1.3 \times 10^6 \pm 5.2 \times 10^5$ 個; Fig. 9B)。次に、FTY720の休薬によってホーミングが解除され、放出されたTh細胞の脊髄への浸潤 (移行) の程度を明らかとするために、脊髄の組織切片を作製し、免疫組織化学的に解析した。その結果、FTY720 + MOG₃₅₋₅₅群 (CD3⁺ T細胞, 13.2 ± 14.7 ; CD4⁺ T細胞, 3.2 ± 2.8) では、FTY720群 (CD3⁺ T細胞, 51.6 ± 14.3 ; CD4⁺ T細胞, 32.7 ± 26.4) と比較し、浸潤は顕著に抑制されていた (Fig. 10)。

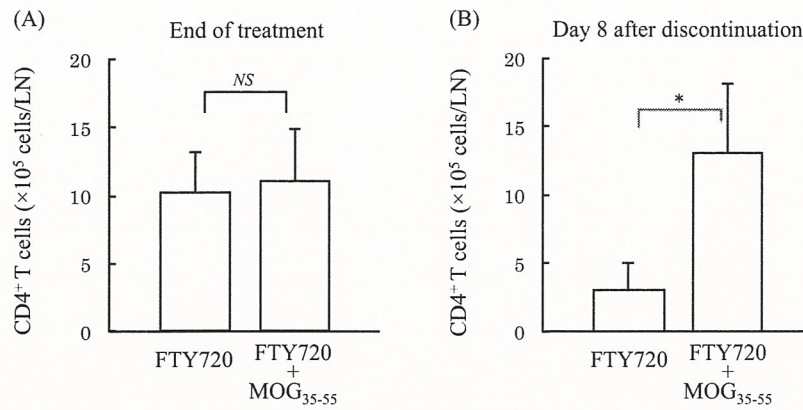


Fig. 9 Absolute Numbers of CD4⁺ T Cells in Inguinal Lymph Nodes

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mice were divided into two groups (the FTY720 alone and FTY720 plus MOG₃₅₋₅₅ groups). EAE mice were treated with FTY720 alone or in combination with MOG₃₅₋₅₅. The absolute numbers of CD4⁺ T cells in inguinal lymph nodes (A) at the end of treatment (FTY720, n=5; FTY720 plus MOG₃₅₋₅₅, n=5) and (B) at day 8 after discontinuation of treatment (FTY720, n=4; FTY720 plus MOG₃₅₋₅₅, n=8) were determined. The results are indicated as the mean + SD. The significance of differences between the FTY720 alone and FTY720 plus MOG₃₅₋₅₅ groups was examined by using the Mann-Whitney *U*-test (* denotes $P < 0.05$; NS, not significant).

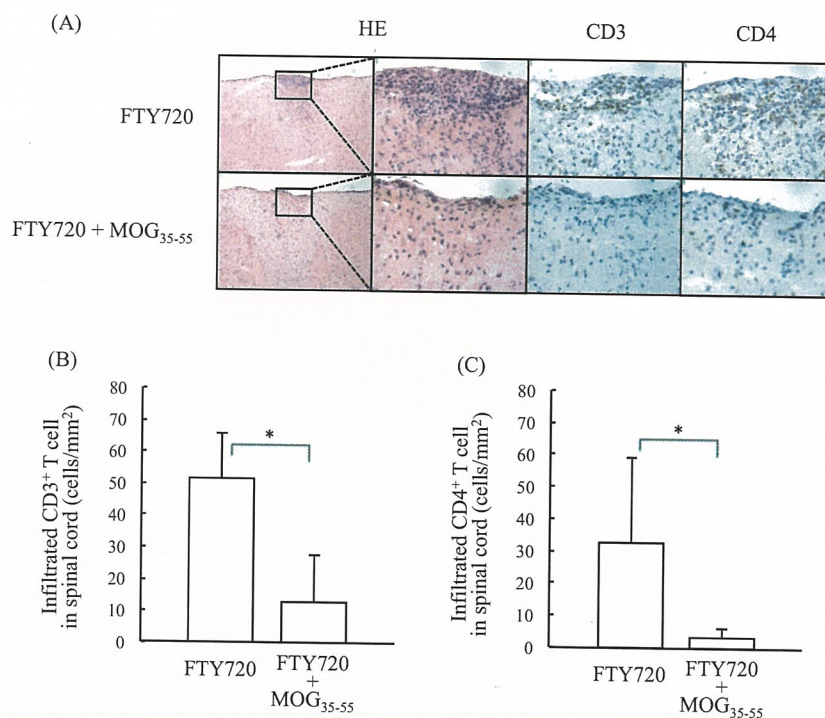


Fig. 10 Infiltration of CD3⁺ and CD4⁺ T cells per unit area in spinal cord.

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mice were divided into two groups (the FTY720 and FTY720 plus MOG₃₅₋₅₅ groups). EAE mice were treated with FTY720 alone or in combination with MOG₃₅₋₅₅. At day 8 after discontinuation of treatment, infiltration of CD3⁺ and CD4⁺ T cells in spinal cord was evaluated by immunohistostaining. (A) A representative image from one mouse in each group is shown. The numbers of (B) CD3⁺ and (C) CD4⁺ T cells were counted under a microscope at a magnification of x 400, and the numbers per unit area in the spinal cord were quantified by the use of imaging software (Image J). The results are shown as the mean values + SD. The significance of differences between the FTY720 alone (n=4) and FTY720 plus MOG₃₅₋₅₅ (n=7) groups was examined by using the Mann-Whitney *U*-test (* denotes $P < 0.05$).

4. 考 察

FTY720の休薬に伴う再燃は、本章・第1節より、二次リンパ組織内の病因抗原特異的Th細胞のホーミング解除がトリガーであると考えられた。従って、休薬に伴う再燃を抑制するためには、二次リンパ組織内で隔離されている病因抗原特異的Th細胞の脊髄への移行を制御する必要がある。即ち、病因抗原特異的Th細胞に対して特異的に免疫不応答（アナジー）を誘導できれば、病因抗原特異的Th細胞の脊髄への移行を抑制できると考えられた。

FTY720で二次リンパ組織に病因抗原特異的Th細胞を隔離下、病因抗原のMOG₃₅₋₅₅を併用すると、休薬後の再燃が顕著に抑制された。治療完了時では、FTY720単独群とFTY720 + MOG₃₅₋₅₅併用群間に、鼠径リンパ節中のTh細胞の絶対数に差はみられなかった。しかし、休薬8日後、FTY720単独群では、リンパ球がリンパ節から脊髄に移行したため、FTY720 + MOG₃₅₋₅₅併用群と比較して、脊髄へのCD3⁺T細胞およびCD4⁺T細胞の浸潤が顕著に増加した。即ち、FTY720単独治療では、鼠径リンパ節内に脊髄への移行性が高いTh細胞が多く存在し、休薬に伴い、脊髄に移行し、局所で再活性化したと考えられた。一方、FTY720 + MOG₃₅₋₅₅併用群では、その移行性が何らかの要因によって制御された可能性が示唆された。また、この病因抗原投与による一連の作用は、グラチラマー酢酸塩と類似していると考えられた。グラチラマー酢酸塩は、2015年9月に製造販売が承認された多発性硬化症の再発予防薬で、myelin basic proteinの最も主要なアミノ酸であるL-グルタミン酸、L-リシン、L-アラニンおよびL-チロシンから構成されるランダムコポリマーである [31]。抗原提示細胞上の主要組織適合遺伝子複合体クラスII分子によって提示されると、ナイーブT細胞からのTh1, Th17への分化をTh2細胞や制御性T細胞側に傾けると考えられている [32-34]。本併用療法で用いた病因抗原を、グラチラマー酢酸塩で代用できるか否かについて、今後、検討を加える予定である。

Kearneyら [35] は、病因抗原を静脈内に投与すると、リンパ節の傍皮質領域で病因抗原特異的リンパ球のアポトーシスが速やかに生じることを報告している。従って、FTY720の二次リンパ組織へのリンパ球隔離作用が、病因抗原投与による免疫寛容の誘導による病勢改善効果を後押ししている可能性が考えられた。即ち、それらの併用が治療的観点から相加あるいは相乗効果を示している

可能性が考えられた。本研究では、MOG₃₅₋₅₅の静脈内投与による単独治療による治療効果は、部分的でFTY720群と比較すると劣っていた。これは、病因抗原の静脈内投与は、ナイーブな状態では容易に免疫寛容を誘導できるが、一度感作された状態では誘導しにくいことを示唆する所見と考えられる。FTY720は、病因抗原特異的リンパ球の二次リンパ組織への隔離作用だけでなく、中枢神経系のアストログリオシスや神経細胞の障害を抑制する直接的な効果も報告されており [36]、EAEに対して単独でも十分な効果が得られたと考えられた。FTY720と病因抗原の併用療法による病勢改善効果の相加あるいは相乗効果を解析するには、病因抗原単独で効果がやや弱い、かつ、FTY720単独でも寛解導入がやや困難であるようなモデルが望ましいと考えた。第2章では、本章で見出したFTY720と病因抗原の併用療法の有用性およびその詳細な作用メカニズムについて明らかとすること、さらには併用療法の一般化を企図し、他の自己免疫疾患モデルである関節リウマチの病態モデルを用いて検討することとした。

小 括

本章では、多発性硬化症モデル動物の実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）に対するFTY720の休薬予後について調べ、以下の結果を得た。

- 1) FTY720は、EAEに対して優れた治療効果を発揮するものの、休薬約1週間後に重篤な再燃が確認された。これは、二次リンパ組織に隔離されていた病因抗原特異的Th細胞の再循環および再活性化に基づくと考えられた。
- 2) FTY720投与下、病因抗原のMOG₃₅₋₅₅を併用投与した場合、FTY720単独投与時の休薬後にみられた再燃が有意に抑制された。これは、二次リンパ組織から脊髄への病因抗原特異的Th細胞の移行性が低下したためと考えられた。

以上のことから、本併用療法は、二次リンパ組織内で効果的に免疫寛容を構築している可能性が考えられた。

第2章 関節リウマチに対する FTY720 と病因抗原の併用療法の有用性およびその作用メカニズム

要 旨

本章では、FTY720 と病因抗原の併用療法の有用性およびその詳細な作用メカニズムについて明らかとすること、さらには一般化を企図し、関節リウマチ (rheumatoid arthritis) のモデル動物である glucose-6-phosphate isomerase peptide (GPI₃₂₅₋₃₃₉) 誘導性関節炎を用いて、以下の研究を行った。1) GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎に対する FTY720 および病因抗原単独療法の発症予防効果および治療効果について調べた。2) GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎に対する FTY720 と病因抗原の併用療法の有用性およびその作用メカニズムについて、①病因 T 細胞のアポトーシス、②病因 T 細胞の免疫不応答、③制御性 T 細胞の誘導等の観点から調べた。3) GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎に対して FTY720 と病因抗原の併用療法で誘導された寛解を維持できるか否かについて調べた。その結果、1) GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎に対して FTY720 あるいは病因抗原単独療法は、優れた発症予防効果を示したが、治療効果は部分的であった。2) FTY720 と病因抗原の併用療法は、病因 T 細胞のアポトーシス、免疫不応答の誘導および制御性 T 細胞優位な環境を生み出すことで効果的かつ安定的に寛解を導入できた。また、3) FTY720 と病因抗原の併用療法で治療した個体は、追加免疫後も寛解を維持できた。さらに、4) FTY720 と病因抗原の併用療法がそれら単独では誘導できない抑制系の細胞集団 (GITR⁺非制御性 T 細胞) を増加させ、新たな免疫不応答 (アナジー) を誘導している可能性が示された。以上の結果から、関節リウマチに対して、FTY720 と病因抗原の併用療法が効果的かつ安定的に完全寛解を導入できる新規治療戦略と成り得る可能性が示された。

はじめに

関節リウマチは、慢性、対称性、多発性およびびらん性の滑膜炎による関節構造変化および運動機能障害を主症状とする全身性の自己免疫疾患であり、関節滑膜へのリンパ球浸潤や滑膜細胞増殖が起こり、肉芽組織 (関節パンヌス) が形成される。滑膜に浸潤したリンパ球や滑膜細胞によって炎症性サイトカイン、マトリックスメタロプロテアーゼ-3 (matrix metalloproteinase-3; MMP-3)

等の蛋白分解酵素が産生され、軟骨破壊が進行する。関節リウマチの診断には、アメリカリウマチ学会（American College of Rheumatology; ACR）が1987年に提唱した基準が長年用いられてきた [37]。しかし、この診断基準では、早期の関節炎を関節リウマチとして確定するには感度が低かったため、2010年に、ACR および欧州リウマチ学会（The European League Against Rheumatism; EULAR）の共同で、早期の関節炎の確定に重きを置いた新規関節リウマチ診断基準が示された [38]。この基準では、少なくとも1箇所以上の関節炎（腫脹）を有し、他の疾患が認められない患者を対象に、4項目（A: 関節病変, B: 血清学, C: 急性期反応物質, D: 症状の継続期間）についてスコアリングし、その合計が6点以上の場合、関節リウマチと診断される。

これまで関節リウマチに臨床的寛解を導入することは困難で、病勢の進行は著しく生活の質（quality of life; QOL）を低下させた。しかし、早期治療介入の重要性に対する認識が向上し、上述のように診断基準が改定され、メトトレキサートに代表される疾患修飾性抗リウマチ薬（disease modifying anti-rheumatic-drugs; DMARDs）や生物学的製剤（抗 tumor necrosis factor- α （TNF- α ）抗体製剤, 抗 IL-6 受容体抗体製剤等）を用いた治療の変革により、関節リウマチの治療予後は格段に改善された。いまや治療の最終目標が臨床的寛解へと変化した。しかし、関節リウマチは、一般に寛解・再発を繰り返すため、長期間の薬物治療が必要である。次の試みとして、臨床的寛解を導入できた患者に対し、治療薬を休薬し、寛解状態を維持できるか否かの検討が必要である。例えば、Tanaka ら [39] によって実施された RRR 研究では、抗 TNF- α 抗体製剤のインフリキシマブにより低活動性を24週間以上誘導できた102名のうち、休薬後、1年間にわたり低活動性が維持された症例は56名（55%）のみであったと報告されている。このことから、早期に臨床的寛解を導入し、さらにはその寛解を長期間ドラッグフリーの状態で維持できる新規治療戦略の開発には強い要請がある。申請者は、このような臨床的要請に応えるため、関節リウマチのモデル動物の GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎に対して、第1章で見出した FTY720 と病因抗原の併用療法が効果的に免疫寛容を導入できるか否かを検討した。なお、本モデルで用いている関節炎誘発原性ペプチドは、Iwanami, Matsumoto および Sumida らによって開発され [40]、最も一般に関節リウマチモデルとして使用される II 型コラーゲンよりも、簡便かつ安定して関節炎を誘

導できる。さらに、病態形成に $CD4^+$ T 細胞および自己抗体が両方とも必要であることやヒトで効果を示す生物学的製剤（抗 TNF- α 抗体，抗 IL-6 抗体等）に対する感受性から，ヒト関節リウマチ症状に類似していると考えられている [40, 41]。以下，本研究で得られた結果を 1～3 節にわたって論述する。

第1節 Glucose-6-phosphate isomerase peptide (GPI₃₂₅₋₃₃₉) 誘導性関節炎に対する FTY720 および GPI₃₂₅₋₃₃₉ 単独療法の発症予防効果および治療効果

1. 目的

関節リウマチの病態形成には、T 細胞、B 細胞、好中球、マクロファージ等の多くの細胞や炎症性サイトカインが関与している。FTY720 は、二次リンパ組織からリンパ球の移出を制御し、異常な免疫応答を抑制する免疫抑制薬である。一方、病因抗原を用いた治療の有用性についても、自己免疫疾患モデルで報告されている [26-30]。本節では、関節リウマチのモデル動物である GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎に対する FTY720 および病因抗原単独療法の有用性について調べた。

2. 実験材料と実験方法

2.1. 実験動物

DBA/1J マウスは、日本エスエルシー株式会社（静岡）から購入した。飼育は第1章・第1節・2.1の方法に従って行った。なお、本研究は動物実験の適正な実施に向けたガイドライン（日本学術会議: 2006年6月1日）および摂南大学動物実験に関する規定に従い実施した。

許可番号: K11-15, K12-16

2.2. FTY720 および GPI₃₂₅₋₃₃₉

2-Amino-2-[2-(4-octylphenyl) ethyl]propane-1,3-diol hydrochloride (FTY720) は、吉富製薬株式会社（現 田辺三菱製薬株式会社）より恵与された。Human glucose-6-phosphate isomerase 325 (IWYINCFGCETHAML) 339 (GPI₃₂₅₋₃₃₉) はオペロンバイオテクノロジー株式会社（現 ユーロフィンジェノミクス株式会社）から購入した。

2.3. GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎の誘導および評価

hGPI₃₂₅₋₃₃₉ 1 mg を dimethyl sulfoxide（和光純薬工業株式会社）76.9 μ l に溶解後、注射用蒸留水を加え、650 μ g/ml となるように調製後、 -20°C で保管し、用時溶解して用いた。Freunds complete adjuvant H37Ra および注射用蒸留水で希釈

した hGPI₃₂₅₋₃₃₉ 溶液 (133 µg/ml) を 1:1 の割合で混合し、乳化させた。DBA/1J (6-8 週齢, 雄性) を固定器具で固定し、乳化させた hGPI₃₂₅₋₃₃₉ 150 µl (hGPI₃₂₅₋₃₃₉ 10 µg 相当) を尾根部に皮内投与した。また、感作の当日および 2 日後に PBS で希釈した百日咳毒素 (pertussis toxin: PT, EMD Chemicals, Inc., NJ, USA; 1 µg/ml) 200 µl (PT 200 ng 相当) を腹腔内投与し、GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎を作製した [40]。

臨床所見は、Brand ら [42] の以下の評価方法に基づき、経時的に評価スコア化した (Clinical Score)。0, 正常; 1, 紅斑および軽度の限局的な足根骨あるいは足関節の腫脹; 2, 紅斑および軽度の広範囲な足根骨あるいは足関節の腫脹; 3, 紅斑および中程度の広範囲な足根骨あるいは足関節の腫脹; 4, 紅斑および重度の足関節, 足, 指にかけての腫脹あるいは肢の強直。

2.4. 試験プロトコル

hGPI₃₂₅₋₃₃₉ で感作した DBA/1J マウスを 4 群 ((1) FTY720 群: FTY720 (1 mg/kg) を週 6 回経口投与, (2) GPI₃₂₅₋₃₃₉ 群: hGPI₃₂₅₋₃₃₉ (10 µg/mouse) を 1 日 1 回静脈内投与, (3) placebo 群: 注射用蒸留水を 1 日 1 回経口投与) および (4) 未感作群: 注射用蒸留水を 1 日 1 回経口投与) に分け、処置した。発症予防効果については、FTY720 群, placebo 群および未感作群は、感作日から 22 日後まで、GPI₃₂₅₋₃₃₉ 群は感作日から 5 日後まで投与した。治療効果については、FTY720 群, placebo 群および未感作群は、発症日 (感作 8-9 日後) から 22 日後まで、GPI₃₂₅₋₃₃₉ 群は発症日 (感作 8-9 日後) から 5 日間投与した。

なお、FTY720 は注射用蒸留水に 10 mg/ml となるように溶解後、-20°C で保管し、用時溶解して用いた。マウスの体重を基に投与量が 0.1 ml となるように注射用蒸留水で希釈し、経口投与した。また、GPI₃₂₅₋₃₃₉ は本節・2.3. と同様の方法で調製後、投与量が 0.1 ml となるように PBS で希釈し、静脈内投与した。

2.5. 関節組織切片の作製

感作 22 日後 (治療完了時), マウスにペントバルビタール (ネンブタール注射液) 50 mg/kg を腹腔内投与し、正向反射消失後、前肢を切断し、10% 中性緩衝ホルマリン溶液に入れた。48 時間後に取り出し、3 時間の流水水洗後、4°C 条件下の 90% エタノールに投入した。2 日後に取り出し、4°C 条件下、迅速脱灰

液 (K-CX, 株式会社ファルマ) に投入した. 7 日後に取り出し, 3 時間流水水洗した. 再び 10% 中性緩衝ホルマリン溶液に投入し, 24 時間後に組織を取り出した. 3 時間流水水洗後, Tissue Cassette に入れ, 自動固定包埋装置 (サクラロータリーRH-12PM) にセットし, 第 1 章・第 1 節・2.6.と同様の方法で自動浸透した. 浸透処理が完了した組織を, パラフィンに埋め, パラフィンブロックを作製した. パラフィンブロックをマイクロトーム (ROM-380) にセットし, 5 μm の厚さに薄切した. 薄切した組織を伸展させ, MAS コートスライドグラスの上に乗せ, 乾燥させた. 乾燥後, 37°Cの恒温槽に一晩放置し, 固定した.

2.6. ヘマトキシリン・エオジン染色

本節・2.5.で乾燥, 固定した組織標本を第1章・第1節・2.7.と同様の方法でヘマトキシリン・エオジン染色し, 最後に, カナダバルサムで封入した. 顕微鏡で観察し, 手根中手関節付近の滑膜の過形成やリンパ球浸潤の程度について, 評価した. 1, 正常; 2, 軽度; 3, 中等度; 4, 重度. なお, 評価は, 異なる3者がブラインド条件下で行い, 平均化したものをHistological Scoreとした.

2.7. 血清中抗hGPI₃₂₅₋₃₃₉ total IgG抗体価の測定

ポリスチレンマイクロタイターウェル (EIAフラットプレート, 三光純薬株式会社, 東京) に0.1% アジ化ナトリウムを含む0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液, pH7.5で溶解したGPI₃₂₅₋₃₃₉ (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を0.1 ml入れ, 4°Cで一晩保温した. アスピレーターを用いて, 溶液を除き, 0.1 M NaClを含む10 mMリン酸緩衝液, pH 7.0 (緩衝液B) を0.25 ml入れ, 4回洗浄した. 0.1% BSAおよび0.1 M NaClを含む10 mMリン酸緩衝液, pH 7.0 (緩衝液A) を0.25 ml入れ, 4°Cで3時間保温した. アスピレーターを用いて溶液を除き, 緩衝液Aで5000倍希釈したマウスの被検血清を0.15 ml入れ, 37°Cで3時間保温後, 4°Cで一晩保温した. アスピレーターを用いて, 被検血清を除き, 先と同様に緩衝液Bでプレートを洗浄した. 緩衝液Aで7500倍希釈したgoat (anti-mouse immunoglobulin (Ig) G H+L) Fab'-HRP (株式会社医学生物学研究所) を0.15 ml入れ, 20°Cで3時間保温した. アスピレーターを用いて上記標識抗体を除き, 先と同様に緩衝液Bでプレートを洗浄した. 7.5 mM *o*-フェニレンジアミン (ナカライテスク株式会社), 0.025% BSAおよび0.025% H₂O₂を含む50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液, pH5.0を0.1 ml入れ, 37°Cで10

分間酵素反応を行った。1.2 M H₂SO₄+2.4 g/l Na₂SO₃溶液を0.05 ml入れ、酵素反応を停止させ、Microplate Reader (Model 680, Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) を用いて490 nmの吸光度を測定した。

2.8. 血清中抗hGPI₃₂₅₋₃₃₉ IgGサブクラス (IgG1, IgG2a, IgG2bおよびIgG3) 抗体価の測定

血清中IgGサブクラス抗体価の測定には、mouse monoclonal antibody isotyping reagents (Sigma-Aldrich Co. LLC., MO, USA) を用い、インストラクションを参考に実施した。ポリスチレンマイクロタイターウェル (EIAフラットプレート, 三光純薬株式会社) に0.1% アジ化ナトリウムを含む0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液, pH7.5で溶解したhGPI₃₂₅₋₃₃₉ (1 µg/ml) を0.1 ml入れ、4°Cで一晩保温した。アスピレーターを用いて、溶液を除き、洗浄溶液 (0.05% tween 20 を含むPBS) を0.25 ml入れ、4回洗浄した。緩衝液Aを0.25 ml入れ、4°Cで4時間保温した。アスピレーターを用いて溶液を除き、緩衝液Aで1000倍希釈したマウスの被検血清を0.10 ml入れ、室温で2時間保温した。アスピレーターを用いて、被検血清を除き、先と同様に洗浄溶液でプレートを洗浄した。緩衝液Aで1000倍希釈したmouse monoclonal antibody isotyping reagentsのgoat anti-mouse IgG1, goat anti-mouse IgG2a, goat anti-mouse IgG2bあるいはgoat anti-mouse IgG3を0.1 ml入れ、20°Cで30分間保温した。アスピレーターを用いて、過剰の抗体を除き、先と同様に洗浄溶液でプレートを洗浄した。緩衝液Aで5000倍希釈したanti-IgG (H+L chain) (goat) pAb-HRP (株式会社医学生物学研究所) を0.1 ml入れ、20°Cで1時間保温した。アスピレーターを用いて上記標識抗体を除き、先と同様に洗浄溶液でプレートを洗浄した。7.5 mM *o*-フェニレンジアミン, 0.025% BSA および0.025% H₂O₂を含む50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液, pH5.0を0.1 ml入れ、37°Cで10分間酵素反応を行った。1.2 M H₂SO₄+2.4 g/l Na₂SO₃溶液を0.05 ml入れ、酵素反応を停止させ、Microplate Reader (Model 680) を用いて490 nmの吸光度を測定した。

2.9. 統計解析

統計解析には、Statcel3を用いた。統計学的有意差の判定には、Mann-Whitney *U*-testを用い、*P* < 0.05を有意差有りとした。

3. 結果

3.1. GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎に対する FTY720 および GPI₃₂₅₋₃₃₉ の発症予防効果

FTY720 および GPI₃₂₅₋₃₃₉ の GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎に対する発症予防効果を明らかとするために、それぞれ感作日から感作 22 日後までおよび感作日から 5 日後まで予防的に投与した。臨床症状の変化を経時的に観察し、評価した。

Placebo 群では、感作後約 1 週間で軽度な皮膚の紅班が確認され、約 2 週間に足関節の腫脹が最大となった。FTY720 の予防的投与では、全個体で関節炎の発症が抑制され、症状の程度は、アジュバントのみで感作した非感作個体と同程度であった (Fig. 11A, B)。GPI₃₂₅₋₃₃₉ の予防的投与でも、全個体で placebo 群と比較して、有意な発症予防効果が確認された (Fig. 11A, B)。次に、感作 22 日後の関節組織切片をヘマトキシリン・エオジン染色し、滑膜の過形成および炎症細胞浸潤を評価した。FTY720 および GPI₃₂₅₋₃₃₉ の予防的投与は、いずれも滑膜の過形成および炎症細胞浸潤を顕著に抑制した (Fig. 12)。

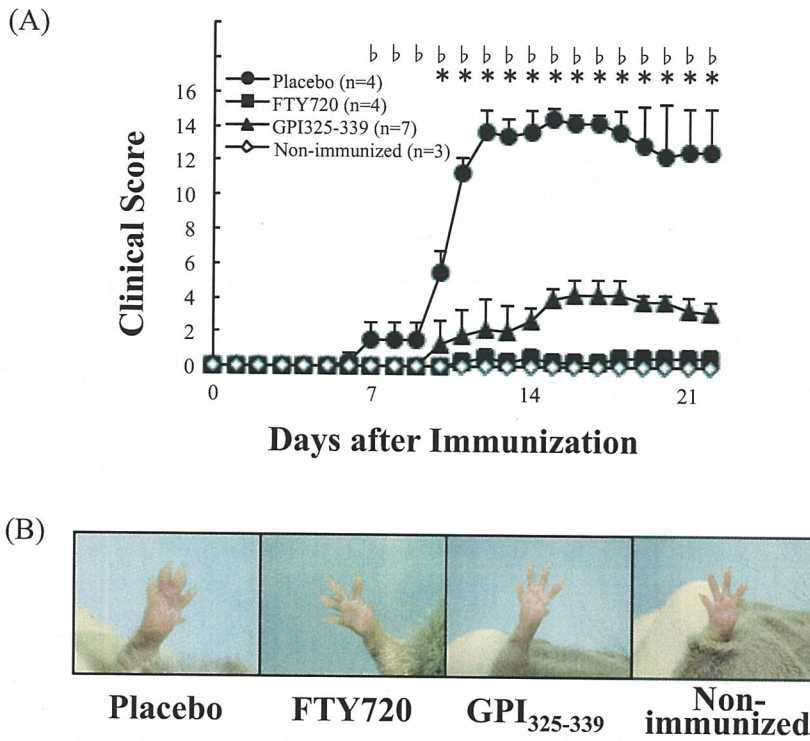


Fig. 11 Prophylactic Effect of FTY720 and GPI₃₂₅₋₃₃₉ on GPI₃₂₅₋₃₃₉-induced Arthritis

Mice with GPI₃₂₅₋₃₃₉-induced arthritis were treated with FTY720 or GPI₃₂₅₋₃₃₉ from the day of immunization. (A) Clinical symptoms of arthritis were evaluated from the day of immunization to day 22, ●: the placebo group (n=4), ■: the FTY720 group (n=4, FTY720 1 mg/kg, orally, 6 times a week, from the day of immunization to day 22), ▲: the GPI₃₂₅₋₃₃₉ group (n=7, GPI₃₂₅₋₃₃₉ 10 µg/mouse, *i.v.* once daily, from the day of immunization to day 5) and ◇: the non-immunized group (n=3). The significance of differences in clinical scores was examined by Mann-Whitney *U* test (* (the FTY720 group vs the placebo group), b (the GPI₃₂₅₋₃₃₉ group vs the placebo group) denotes $P < 0.05$). (B) Photographs showing typical paws of non-immunized mice and GPI₃₂₅₋₃₃₉-induced arthritis mice with or without FTY720 or GPI₃₂₅₋₃₃₉ treatment, taken on day 22 after immunization.

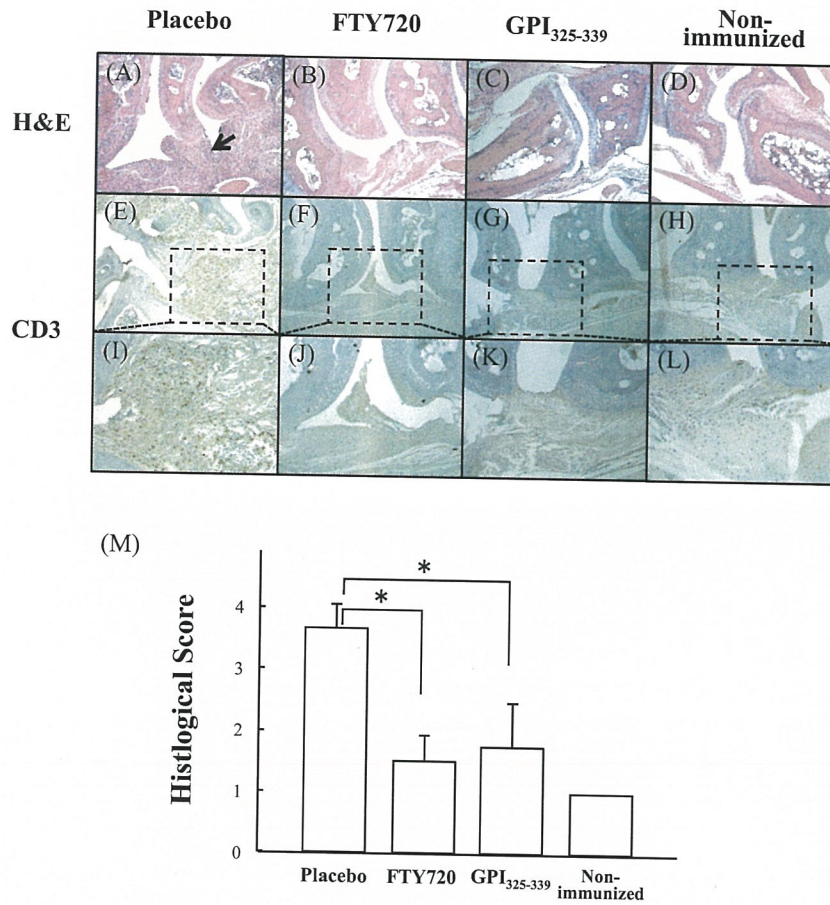


Fig. 12 Histological Staining of Carpal-metacarpal Joints

Mice with GPI₃₂₅₋₃₃₉-induced arthritis were treated with FTY720 or GPI₃₂₅₋₃₃₉ from the day of immunization. At day 22, carpal-metacarpal joint tissues were excised and stained with hematoxylin-eosin (H&E) and anti-CD3 mouse mAb. (A-D): H&E. (E-L): CD3. (A, E, I): placebo mice. (B, F, J): FTY720 treated mice. (C, G, K): GPI₃₂₅₋₃₃₉ treated mice. (D, H, L): non-immunized mice. A representative image from one mouse in each group is shown. The arrow indicates synovial hyperplasia and inflammatory cell infiltration. (M) Histological score is indicated as the mean + SD for all mice in each group (placebo: n=4, FTY720: n=4, GPI₃₂₅₋₃₃₉: n=7, non-immunized: n=3). The significance of differences was examined by Mann-Whitney *U* test (* denotes $P < 0.05$).

3.2. GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎に対する FTY720 および GPI₃₂₅₋₃₃₉ の治療効果

GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎に対する FTY720 あるいは GPI₃₂₅₋₃₃₉ 単独療法の治療効果を明らかとするために、発症日（感作 8-9 日後）から FTY720 群, placebo 群 および未感作群は 22 日後まで, GPI₃₂₅₋₃₃₉ 群は 5 日間治療した。臨床症状の変化を経時的に観察し, 評価した。FTY720 群および GPI₃₂₅₋₃₃₉ 群は共に, placebo 群と比較して, 有意に病勢を抑制した (Fig. 13)。また, いずれも滑膜の過形成および炎症細胞浸潤を有意に制御した (Fig. 14)。

次に, FTY720 および GPI₃₂₅₋₃₃₉ の治療的投与が, 抗 hGPI₃₂₅₋₃₃₉ 抗体産生に及ぼす影響を明らかとするため, 血清中の抗 hGPI₃₂₅₋₃₃₉ 抗体価 (total IgG, IgG2a, IgG2b および IgG3) を酵素免疫測定法を用いて測定した。感作 22 日後の FTY720 群 (total IgG: 1.28 ± 0.72 (平均値 \pm 標準偏差), IgG2a: 0.69 ± 0.29 , IgG2b: 1.35 ± 0.58 , IgG3, 0.23 ± 0.18) および GPI₃₂₅₋₃₃₉ 群 (total IgG: 1.54 ± 1.22 , IgG2a: 0.61 ± 0.37 , IgG2b: 1.23 ± 0.67 , IgG3, 0.19 ± 0.16) の抗体価は, placebo 群 (total IgG: 2.65 ± 0.93 , IgG2a: 1.35 ± 0.27 , IgG2b: 2.05 ± 0.65 , IgG3, 0.49 ± 0.22) と比較して, 有意に低値であった。抗 hGPI₃₂₅₋₃₃₉ IgG1 抗体価については, 各群間で有意な差はみられなかった (placebo 群: 1.40 ± 0.60 , FTY720 群: 1.41 ± 0.69 , GPI₃₂₅₋₃₃₉ 群: 1.02 ± 0.34) (Fig. 15)。IgG1 抗体価は, Th2 型の免疫応答が優位である根拠として用いられている。本治療で FTY720 群および GPI₃₂₅₋₃₃₉ 群で症状の改善がみられたにも関わらず, IgG1 抗体価に有意な差がみられなかったことから, 本モデルの病態形成には, Th2 型より Th1 型が優位で, Th1 型のサイトカイン産生の抑制により, 抗体の産生を制御している可能性が考えられた。

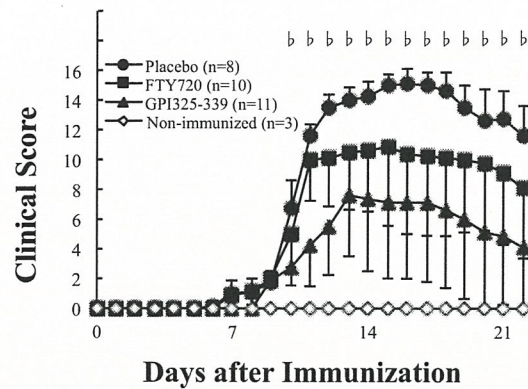


Fig. 13 Therapeutic Effect of FTY720 and GPI₃₂₅₋₃₃₉ on GPI₃₂₅₋₃₃₉-induced Arthritis

Mice with GPI₃₂₅₋₃₃₉-induced arthritis were treated with FTY720 or GPI₃₂₅₋₃₃₉ from the day of onset of symptom (day 8-9). Clinical symptoms of arthritis were evaluated from the day of immunization to day 22, ●: the placebo group (n=8), ■: the FTY720 group (n=10, FTY720 1 mg/kg, orally, 6 times a week, from the day of onset of symptom to day 22), ▲: the GPI₃₂₅₋₃₃₉ group (n=11, GPI₃₂₅₋₃₃₉ 10 µg/mouse, *i.v.* once daily, from the day of onset of symptom to day 12-13) and ◇: the non-immunized group (n=3). The results are indicated as the mean \pm SD. The significance of differences in clinical scores was examined by Mann-Whitney *U* test (* (the FTY720 group *vs* the placebo group), *b* (the GPI₃₂₅₋₃₃₉ group *vs* the placebo group) denotes $P < 0.05$).

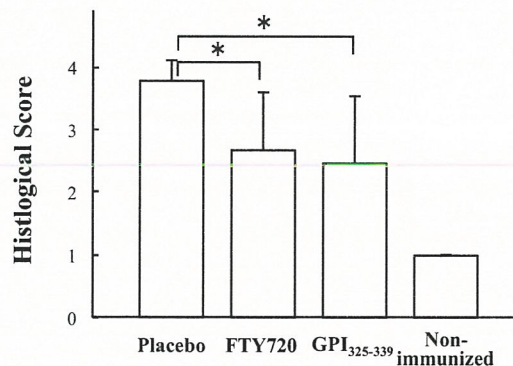


Fig. 14 Histological Staining of Carpal-metacarpal Joints

Mice with GPI₃₂₅₋₃₃₉-induced arthritis were treated with FTY720 or GPI₃₂₅₋₃₃₉ from the day of onset of symptom (day 8-9). At day 22, carpal-metacarpal joint tissues were excised and stained with hematoxylin-eosin (H&E) and histological score is indicated as the mean \pm SD for all mice in each group (placebo: n=6, FTY720: n=6, GPI₃₂₅₋₃₃₉: n=6, non-immunized: n=3). The significance of differences was examined by Mann-Whitney *U* test (* denotes $P < 0.05$).

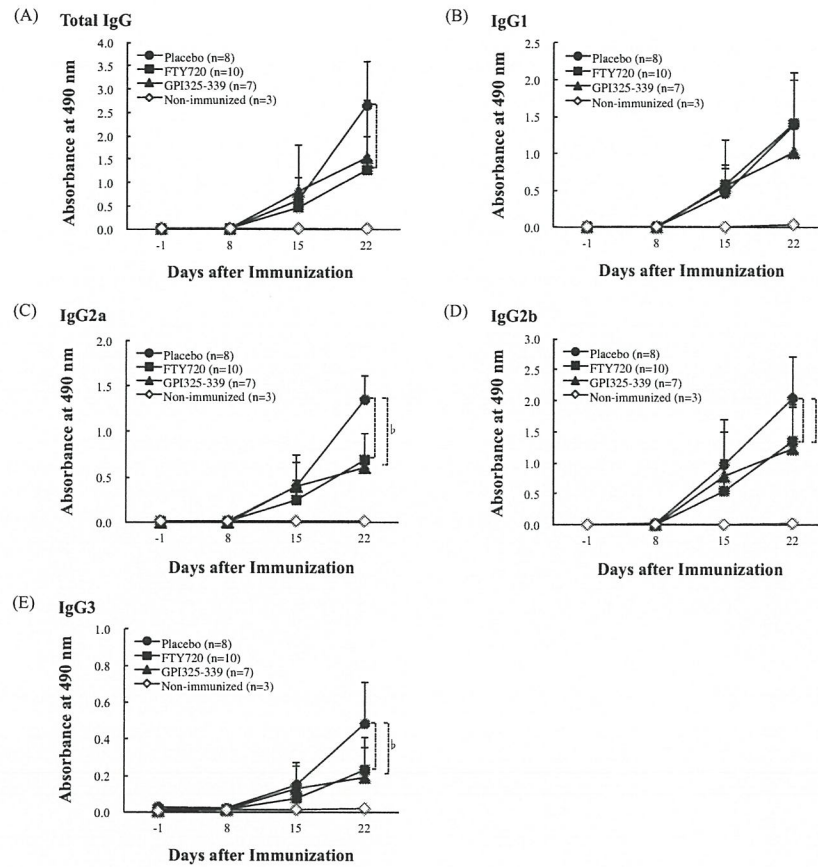


Fig. 15 Effect of FTY720 and GPI₃₂₅₋₃₃₉ on Production of Anti-GPI₃₂₅₋₃₃₉ IgG Antibody Subclasses

Mice with GPI₃₂₅₋₃₃₉-induced arthritis were treated with FTY720 or GPI₃₂₅₋₃₃₉ from the day of onset of symptoms (day 8-9). On days -1, 8, 15 and 22 after immunization, peripheral blood samples were collected, and the levels of anti-hGPI₃₂₅₋₃₃₉ IgG antibody subclasses in serum were measured by means of enzyme-linked immunosorbent assay (* denotes $P < 0.05$), ●: the placebo group (n=8), ■: the FTY720 group (n=10, FTY720 1 mg/kg, orally, 6 times a week, from the day of onset of symptom to day 22), ▲: the GPI₃₂₅₋₃₃₉ group (n=7, GPI₃₂₅₋₃₃₉ 10 μg/mouse, *i.v.* once daily, from the day of onset of symptom to day 5) and ◇: the non-immunized group (n=3). The results are indicated as the mean + SD. The significance of differences was examined by Mann-Whitney *U* test (* (the FTY720 group vs the placebo group), *b* (the GPI₃₂₅₋₃₃₉ group vs the placebo group) denotes $P < 0.05$).

4. 考 察

FTY720 の予防的投与は、GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎の発症をほぼ完全に抑制した。このことから、本モデルの発症には、末梢から関節へのリンパ球の動員が重要であり、それが抑制されたため、発症が抑制されたと考えられた。一方、FTY720 の治療的投与は、GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎の症状を改善したものの、その効果は部分的であった。FTY720 は、二次リンパ組織への循環能を有するナイーブ T 細胞やセントラルメモリー T 細胞を隔離できるが、循環能がないエフェクターメモリー T 細胞等には影響を及ぼさない [16]。即ち、二次リンパ組織内で活性化した病因 T 細胞の局所への移行は抑制できるが、既に炎症部位に移行・存在するエフェクターメモリー T 細胞等に及ぼす効果は弱いため、治療効果が部分的であったと考えられた。

病因抗原を用いた治療のメリットは、病因抗原特異的に免疫応答を抑制することである。一方、デメリットとしては、多量の抗原を必要とすること等が挙げられる。また、投与後のアナフィラキシーショックのリスクが予測されるが、本節で使用した病因抗原の投与量では、アナフィラキシーショックは確認されなかった。本節において、病因抗原の静脈内投与の有用性を検討した結果、FTY720 と同様に、予防的投与は、GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎の発症を有意に抑制したが、治療的投与ではその効果は部分的であった。即ち、抗原単独療法においても既に発症した個体への寛解導入が困難であることが示された。

病因抗原を静脈内に投与すると、抗原特異的細胞は、リンパ節傍皮質領域に迅速に集積し、消滅すると考えられている [35]。即ち、過剰な免疫応答をリンパ節内で誘発し、細胞死を誘導することが主な作用と考えられる。従って、FTY720 を病因抗原と併用した場合、二次リンパ組織から関節へ向かうリンパ球の移出が阻害、隔離され、病因抗原への作用が効果的となると予測される。また、FTY720 は、タクロリムス水和物、シクロスポリン等の免疫抑制薬とは異なり、リンパ球の活性には影響を及ぼさない [15]。即ち、病因抗原によって誘発される過剰な免疫応答が抑制されないため、アポトーシス(クローン除去)の誘導等が阻害されないと考えられる。第 2 節では、GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎に対する FTY720 および病因抗原 (GPI₃₂₅₋₃₃₉) の有用性およびその作用メカニズムについて検討を加える。

第2節 GPI₃₂₅₋₃₃₉誘導性関節炎に対するFTY720と病因抗原の併用療法の有用性およびその作用メカニズム

1. 目的

本章・第1節では、GPI₃₂₅₋₃₃₉誘導性関節炎に対するFTY720およびGPI₃₂₅₋₃₃₉単独療法の有用性について調べ、予防的投与による発症抑制効果は認められたが、治療的投与の抑制効果は部分的であった。本節では、GPI₃₂₅₋₃₃₉誘導性関節炎に対するFTY720と病因抗原GPI₃₂₅₋₃₃₉との併用療法の有用性およびその作用メカニズムについて、1) 病因T細胞の細胞死（アポトーシス）の誘導、2) 病因T細胞の病因抗原に対する免疫不応答（アナジー）の誘導、3) 制御性T細胞の増殖等の観点から調べた。

2. 実験材料と実験方法

2.1. 実験動物

DBA/1Jマウスは、日本エスエルシー株式会社から購入した。飼育は第1章・第1節・2.1の方法に従って行った。なお、本研究は動物実験の適正な実施に向けたガイドライン（日本学術会議: 2006年6月1日）および摂南大学動物実験に関する規定に従い実施した。

許可番号: K11-15, K12-16, K13-16, K14-16

2.2. FTY720およびGPI₃₂₅₋₃₃₉

2-Amino-2-[2-(4-octylphenyl) ethyl]propane-1,3-diol hydrochloride (FTY720) は、吉富製薬株式会社（現 田辺三菱製薬株式会社）より恵与された。Human glucose-6-phosphate isomerase 325 (IWYINCFGCETHAML) 339 (GPI₃₂₅₋₃₃₉) はオペロンバイオテクノロジー株式会社（現 ユーロフィンジェノミクス株式会社）から購入した。

2.3. GPI₃₂₅₋₃₃₉誘導性関節炎の誘導および評価

GPI₃₂₅₋₃₃₉誘導性関節炎の誘導および臨床症状の評価は、本章・第1節・2.3と同様に行った。

2.4. 試験プロトコル

GPI₃₂₅₋₃₃₉で感作したDBA/1Jマウスを4群 ((1) FTY720群: FTY720 (1 mg/kg) を1日1回経口投与, PBSを1日1回静脈内投与, (2) GPI₃₂₅₋₃₃₉群: 注射用蒸留水を1日1回経口投与, GPI₃₂₅₋₃₃₉ (10 µg/mouse) を1日1回静脈内投与, (3) FTY720 + GPI₃₂₅₋₃₃₉群: FTY720 (1 mg/kg) を1日1回経口投与 + GPI₃₂₅₋₃₃₉ (10 µg/mouse) を1日1回静脈内投与および (4) placebo群: 注射用蒸留水を1日1回経口投与, PBSを1日1回静脈内投与) に分け, 発症時 (感作9-10日後) から5日間, 治療した.

なお, FTY720 は, 注射用蒸留水に 1 mg/ml となるように溶解後, -20°Cで保管し, 用時溶解して用いた. マウスの体重を基に投与量が 0.1 ml となるように注射用蒸留水で希釈し, 経口投与した. また, GPI₃₂₅₋₃₃₉ は本章・第 1 節・2.3. と同様の方法で調製後, 投与量が 0.1 ml となるように PBS で希釈し, 静脈内投与した.

2.5. リンパ節切片の作製

感作 14-15 日後 (治療完了時), マウスに抱水クロラール (ナカライテスク株式会社) 溶液 (400 mg/mouse) を腹腔内投与し, 正向反射消失後, 鼠径リンパ節を採取し, 10% 中性緩衝ホルマリン溶液に入れた. 24 時間後に取り出し, 3 時間の流水水洗後, Tissue Cassette に入れ, 自動固定包埋装置 (サクラロータリーRH-12PM) にセットし, 第 1 章・第 1 節・2.6.と同様に自動浸透した. 浸透処理が完了した組織を, パラフィン包埋し, パラフィンブロックを作製した. パラフィンブロックをマイクロトーム (ROM-380) にセットし, 3 µm の厚さに薄切した. 薄切した組織を伸展させ, MAS コートスライドガラスの上に乗せ, 乾燥させた. 乾燥後, 37°Cの恒温槽に一晩放置し, 固定した.

2.6. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色

TUNEL 染色には, ApopTag® Red In Situ Apoptosis Detection Kit (Merck Millipore, MA, USA) を用いた. 本節・2.5.で乾燥, 固定した組織標本を第 1 章・第 1 節・2.7.と同様に脱パラした. 脱パラした組織標本を 4 分間流水水洗後, PBS に 5 分間浸し, 洗浄した. 洗浄後, PBS で 20 µg/ml に希釈した proteinase K (Boehringer, Mannheim, Germany) を滴下し, 室温で 15 分間静置した. PBS 層

(2層)にそれぞれ5分間浸し、洗浄後、equilibration bufferを滴下し、室温で15分間静置した。余分な溶液を取り除き、TdT enzymeとreaction bufferを3:7で混合した溶液を滴下し、37°Cで60分間反応させた。蒸留水で35倍希釈したstop/wash bufferに10分間浸した後、PBS層(3層)にそれぞれ1分間浸し、洗浄した。洗浄後、anti-digoxigenin conjugateとblocking solutionを34:31で混合した溶液を滴下し、室温で30分間静置した。PBS層(4層)にそれぞれ2分間浸し、洗浄した。洗浄後、Hoechst 33342を滴下し、室温で30分間静置した。PBS層(2層)にそれぞれ5分間浸し、洗浄後、グリセロールで封入した。染色像を顕微鏡用デジタルカメラで撮影した。TUNEL⁺細胞を異なる3人がカウントし、その平均値をアポトーシス細胞数とした。画像処理ソフトウェアのImage Jを用いて、組織面積を算出し、単位面積あたりのアポトーシス細胞数(個/mm²)を算出した。

2.7. 鼠径リンパ節中のアポトーシス細胞の割合の評価

感作14-15日後(治療完了時)、第1章・第1節・2.5.と同じ方法で、鼠径リンパ節を採取後、細胞懸濁液を調製し、生細胞数をカウントした。1.0 x 10⁵個ずつ1.5 ml エッペンチューブに分注し、400 x gで5分間遠心分離後、上清を除去した。2% FCSを含むPBSで希釈したAPC-Cy7-conjugated anti-mouse CD4 monoclonal antibody (mAb; clone: GK1.5; BioLegend, Inc.; 1:300)を100 µl加え、4°C、暗所条件下で20分間静置した。2% FCSを含むPBSを1 ml加え、400 x gで5分間遠心分離後、上清を除去した。次に、FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI (BioLegend, Inc.)を用いて細胞を染色した。Annexin V binding bufferで希釈したFITC annexin (1:40)およびpropidium iodide solution (PI; 1:500)の混合溶液を100 µl加え、室温で15分間静置した。静置後、annexin V binding bufferを400 µl添加し、ナイロンメッシュ(N-NO.355T)を通過させ、5 ml ポリスチレンラウンドチューブに回収した。BD FACS Aria IIセルソーターを用いて、CD4⁺PI⁻T細胞中のannexin V⁺細胞の割合を解析した。

2.8. 鼠径リンパ節中のCTLA-4⁺Foxp3⁻CD4⁺T細胞およびPD-1⁺Foxp3⁻CD4⁺T細胞の割合の評価

第1章・第1節・2.5.と同じ方法で、感作14-15日後(治療完了時)の鼠径

リンパ節をすり潰し、2% FCS を含む RPMI1640 培地に懸濁した。400 x g で 5 分間遠心分離後、上清を除去した。細胞カウント後、 1.0×10^5 個ずつ 1.5 ml エッペンチューブに分注し、400 x g で 5 分間遠心分離後、上清を除去した。2% FCS を含む PBS で希釈した APC-Cy7-conjugated anti-mouse CD4 mAb (clone: GK1.5; 1:300) のみ/あるいは APC-conjugated anti-mouse mAb CD279 (programmed death-1; PD-1; clone J43; BD Biosciences; 1:200) の混合溶液を 100 μ l 加え、4°C、暗所条件下で 20 分間静置した。静置後、2% FCS を含む PBS を 1 ml 加え、400 x g で 5 分間遠心分離し、上清を除去した。次に、PBS で 20 倍希釈し調製した 1 x mouse forkhead box P3 (Foxp3) fixation concentrate (BD Biosciences) を 1 ml 加え、4°C、暗所条件下で 30 分間静置した。静置後、400 x g で 5 分間遠心分離し、上清を除去した。PBS で 5 倍希釈し調製した 1x mouse Foxp3 permeabilization concentrate (BD Biosciences) 1 ml で懸濁し、400 x g で 5 分間遠心分離後、上清を除去した。再び、1x mouse Foxp3 permeabilization concentrate を 1 ml で懸濁し、37°C、暗所条件下で 30 分間静置した。静置後、400 x g で 5 分間遠心分離し、上清を除去した。1x mouse Foxp3 permeabilization concentrate で希釈した phycoerythrin (PE)-conjugated anti-mouse Foxp3 mAb (clone: MF23; BD Biosciences, 1:300) のみ/あるいは APC-conjugated anti-mouse CD152 mAb (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4: CTLA-4; clone: UC19-4F10-11; Tonbo bioscience, Inc., CA, USA, 1:200) の混合溶液を 100 μ l 加え、室温、暗所条件下で 20 分間静置した。静置後、400 x g で 5 分間遠心分離後、上清を除去した。2% FCS を含む PBS 200 μ l で懸濁し、ナイロンメッシュ (N-NO.355T) を通過させ、5 ml ポリスチレンラウンドチューブに回収した。BD FACS Aria II セルソーターを用いて、Foxp3⁺ CD4⁺ T 細胞中の CTLA-4⁺ 細胞および PD-1⁺ 細胞の割合を解析した。

2.9. 鼠径リンパ節中の CTLA-4⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ T 細胞, GITR⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ T 細胞, CD39⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ T 細胞および Foxp3⁺ Helios⁺ CD4⁺ T 細胞の割合の評価

第 1 章・第 1 節・2.5.と同じ方法で、感作 14 日後（治療完了時）の鼠径リンパ節をすり潰し、2% FCS を含む RPMI1640 培地に懸濁した。1.0 x 10⁵ 個ずつ 1.5 ml エッペンチューブに分注し、400 x g で 5 分間遠心分離後、上清を除去した。2% FCS を含む PBS で希釈した violet 500 (V500)-conjugated anti-mouse CD4 mAb (clone: RM4-5; BD Biosciences; 1:200), FITC-conjugated anti-mouse

glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-family-related gene/protein (GITR) mAb (clone: DTA-1; BD Biosciences; 1:100) および APC-conjugated anti-mouse CD39 mAb (clone: Duha59; BioLegend, Inc.; 1:200) の混合溶液を 100 μ l 加え, 4°C, 暗所条件下で 30 分間静置した. 2% FCS を含む PBS を 1 ml 加え, 400 x g で 5 分間遠心分離後, 上清を除去した. 次に, Foxp3 fixation/permeabilization buffer (eBioscience) 1 ml を加え, 4°C, 暗所条件下で 30 分間静置し, 400 x g で 5 分間遠心分離後, 上清を除去した. Permeabilization buffer (eBioscience) 1 ml 加え, 400 x g で 5 分間遠心分離後, 上清を除去した. Permeabilization buffer で希釈した brilliant violet 421 (BV421)-conjugated anti-mouse Foxp3 mAb (clone: FJK-16s; eBioscience; 1:100) および PE-conjugated anti-mouse Helios mAb (clone: 22F6; BioLegend, Inc.; 1:100) の混合溶液を 100 μ l 加え, 4°C, 暗所条件下で 30 分間静置した. Permeabilization Buffer を 1 ml 加え, 400 x g で 5 分間遠心分離後, 上清を除去した. Permeabilization Buffer 200 μ l で懸濁し, ナイロンメッシュ (N-NO.355T) を通過させ, 5 ml ポリスチレンラウンドチューブに回収した. BD FACS Aria II セルソーターを用いて, CD4⁺ T 細胞中の CTLA-4⁺ Foxp3⁺ 細胞, GITR⁺ Foxp3⁺ 細胞, CD39⁺ Foxp3⁺ 細胞の割合および Foxp3⁺ CD4⁺ T 細胞中の Helios⁺ 細胞の割合を解析した.

2.10. 細胞培養および細胞内サイトカイン染色

第 1 章・第 1 節・2.5.と同じ方法で, 感作 14-15 日後 (治療完了時) の鼠径リンパ節をすり潰し, 2% FCS を含む RPMI1640 培地に懸濁した. 400 x g で 5 分間遠心分離後, 上清を除去した. トリス-塩化アンモニウム緩衝液 (0.16 M 塩化アンモニウム溶液:0.17 M Tris 溶液=9:1, pH7.2) を 1 ml 加え, 室温で 5 分間静置した. PBS を 4 ml 加え, 400 x g で 5 分間遠心分離後, 上清を除去した. 10% FCS, 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin および 50 μ M 2-mercaptoethanol を含む RPMI1640 培地 1 ml で懸濁後, 細胞カウントした. 96 well plate に細胞 (2.0 x 10⁵ 個/well) を加え, GPI₃₂₅₋₃₃₉ (10 μ M) 存在下, 37°C, 5% CO₂ 条件下で 72 時間培養した. 培養後, 第 1 章・第 1 節・2.5.と同様の方法で染色し, BD FACS Aria Fusion セルソーター (BD Biosciences) を用いて, CD4⁺ T 細胞中の IFN- γ ⁺ 細胞および IL-17⁺ 細胞の割合を解析した.

2.11. 統計解析

統計解析には、Statcel3 あるいは IBM SPSS Statics Version 22 software を用いた。統計学的有意差の判定には、Mann-Whitney *U*-test あるいは Duncan's test を用い、 $P < 0.05$ を有意差有りとした。

3. 結果

3.1. GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎に対する FTY720 と GPI₃₂₅₋₃₃₉ の併用療法の有用性

FTY720 と GPI₃₂₅₋₃₃₉ 併用療法の GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎に対する治療効果を明らかとするために、発症日（感作9日後）から、この併用療法で5日間治療した。臨床症状の変化を経時的に観察し、本章・第1節・2.3.に従い、臨床症状を評価した。FTY720 と GPI₃₂₅₋₃₃₉ の併用療法は、それら単独治療と比較して、症状の悪化を有意に制御した (Fig. 16)。また、組織化学的な解析で、滑膜の過形成および炎症細胞浸潤が著しく制御されており、その有用性が裏付けられた (Fig. 17)。

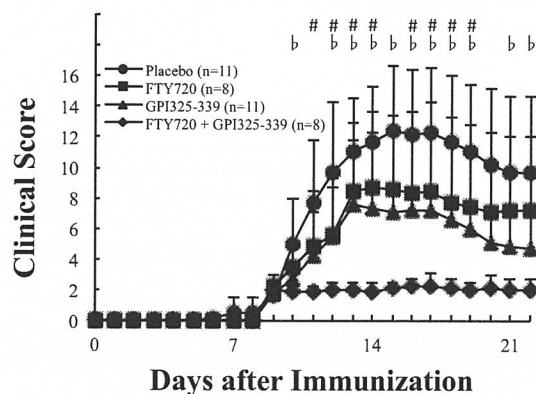


Fig. 16 Therapeutic Effect of Combination Treatment with FTY720 plus GPI₃₂₅₋₃₃₉ on GPI₃₂₅₋₃₃₉-induced Arthritis

Mice with GPI₃₂₅₋₃₃₉-induced arthritis were treated from the day of onset of symptom (day 9 after immunization) to day 13 with GPI₃₂₅₋₃₃₉ alone, FTY720 alone or the combination of GPI₃₂₅₋₃₃₉ with FTY720. (A) Clinical symptoms of arthritis were evaluated from the day of immunization to day 22, ●: the placebo group (n=11), ■: the FTY720 group (n=8, FTY720 1 mg/kg, orally, once daily), ▲: the GPI₃₂₅₋₃₃₉ group (n=11, GPI₃₂₅₋₃₃₉ 10 μg/mouse, *i.v.* once daily) and ◆: the combination group (n=8, FTY720 1 mg/kg, orally, once daily and GPI₃₂₅₋₃₃₉ 10 μg/mouse, *i.v.* once daily). The significance of differences in clinical scores was examined by Mann-Whitney *U*-test (* (the placebo group vs the combination group), b (the FTY720 group vs the combination group) and # (the GPI₃₂₅₋₃₃₉ group vs the combination group) denotes $P < 0.05$).

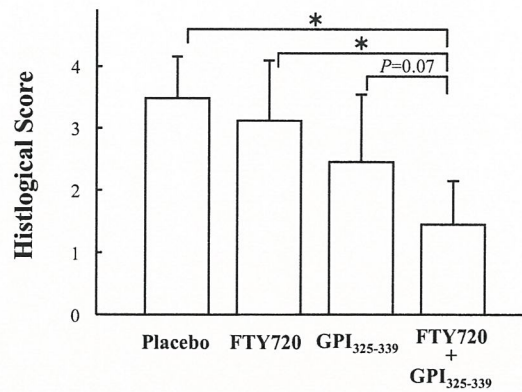


Fig. 17 Histological Staining of Carpal-metacarpal Joints

Mice with GPI₃₂₅₋₃₃₉-induced arthritis were treated with FTY720 alone, GPI₃₂₅₋₃₃₉ alone or the combination of FTY720 plus GPI₃₂₅₋₃₃₉ from the day of onset of symptom (day 9) for 5 days. At day22, carpal-metacarpal joint tissues were excised and stained with hematoxylin-eosin (H&E) and histological score is indicated as the mean + SD for all mice in each group (placebo: n=10, FTY720: n=4, GPI₃₂₅₋₃₃₉: n=6, FTY720 plus GPI₃₂₅₋₃₃₉: n=4). The significance of differences was examined by Mann-Whitney *U*-test (* denotes $P < 0.05$).

3.2. TUNEL 法を用いた鼠径リンパ節中のアポトーシス細胞の検出

FTY720 と病因抗原の併用療法が、リンパ節内で病因 T 細胞に効果的にアポトーシスを誘導しているか否かを明らかにするために、GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎症状を呈したマウスを FTY720 単独、GPI₃₂₅₋₃₃₉ 単独あるいはそれらの併用療法によって 5 日間治療後、鼠径リンパ節を採取し、TUNEL 法を用いて組織化学的に解析した。本研究で用いた TUNEL 法は、断片化した DNA の 3'末端に、ターミナルトランスフェラーゼを用いてジゴキシゲニン標識 dUTP を付加させ、ローダミン標識抗ジゴキシゲニン抗体を用いてアポトーシス細胞を検出する方法である。鼠径リンパ節の単位面積 (mm²) あたりの TUNEL⁺細胞は、FTY720 + GPI₃₂₅₋₃₃₉ 併用群 (199±16.8: 平均値±標準偏差) で、placebo 群 (140±31.6) および FTY720 単独群 (138±19.3) と比較して、有意に増加していた (Fig. 18)。GPI₃₂₅₋₃₃₉ 単独群 (172±22.0) でも placebo 群と FTY720 単独群と比較して、増加傾向を示したが、FTY720 + GPI₃₂₅₋₃₃₉ 併用群の方がより効果的に増加した (Fig. 18)。

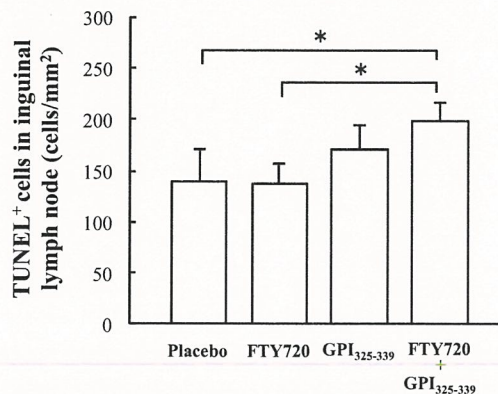


Fig. 18 Combination Treatment Increases TUNEL⁺ Apoptotic Cells in Inguinal Lymph Nodes

At the end of treatment, inguinal lymph nodes (LNs) were excised. Sections were stained with TUNEL reagents. The number of TUNEL⁺ cells was counted and the numbers per unit area in inguinal LNs were quantified by the use of imaging software (Image J). The results are shown as mean + SD (n=3-4). The significance of differences was examined by Duncan's test (*denotes $P < 0.05$).

3.3. 鼠径リンパ節の CD4⁺PI⁻ T 細胞中 annexin V⁺ 細胞の割合

本節・3.2.と同様に、FTY720 と病因抗原の併用療法が、リンパ節内で病因 T 細胞に効果的にアポトーシスを誘導しているか否かを明らかとするために、治療完了時の鼠径リンパ節由来細胞を蛍光標識抗 CD4 抗体、蛍光標識 annexin V および PI で染色し、フローサイトメトリー解析した。Annexin V はホスファチジルセリンに高い親和性を示すタンパク質である。ホスファチジルセリンは、生細胞の細胞膜の内葉に局在するが、アポトーシスが起ると細胞表面にさらされる。PI は核酸の塩基対間にインターカーレートする。即ち、annexin V⁺PI⁺ 細胞は、後期のアポトーシスあるいはネクローシスの状態、annexin V⁺PI⁻ 細胞は、早期のアポトーシスの状態を示している。鼠径リンパ節の CD4⁺PI⁻ T 細胞中 annexin V⁺ 細胞の割合は、FTY720 + GPI₃₂₅₋₃₃₉ 併用群 (21.2±4.3 : 平均値±標準偏差) および GPI₃₂₅₋₃₃₉ 単独群 (20.4±5.0) で placebo 群 (14.6±3.3) よりも、有意に高かった (Fig. 19)。

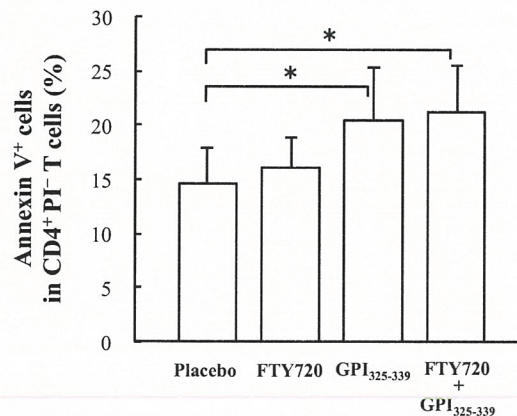


Fig. 19 Combination Treatment Increases the Percentage of Annexin V⁺ Apoptotic Cells in CD4⁺PI⁻ T Cells in Inguinal Lymph Nodes

At the end of treatment, cells were obtained from inguinal lymph nodes of treated mice and the percentage of Annexin V⁺ cells in CD4⁺PI⁻ T cells was determined by flow-cytometric analysis. The results are shown as mean + SD (n=5). The significance of differences was examined by Duncan's test (*denotes $P < 0.05$).

3.4. 鼠径リンパ節の CTLA-4 あるいは PD-1 を発現した非制御性 T 細胞の割合

CTLA-4 は、樹状細胞上の共刺激分子である CD80/86 と相互作用を示す抑制性受容体で、制御性 T 細胞 (Regulatory T cells) に多く発現する。また、活性化した T 細胞にも発現し、負のフィードバックによって免疫応答が抑制される [43]。CTLA-4 は、免疫不応答 (アナジー) の誘導において重要な分子とされている [44]。CTLA-4 以外の抑制性受容体として programmed death-1 (PD-1) がある。PD-1 は、活性化した T 細胞や B 細胞に発現し、CTLA-4 と同様に、アナジーの誘導やその維持に重要な役割を担う [45, 46]。FTY720 と病因抗原の併用療法が、これら抑制性受容体である CTLA-4 や PD-1 を発現した非制御性 T 細胞 (Foxp3⁻ CD4⁺ T 細胞) の割合に影響を及ぼすか否かを明らかにするために、本節・3.3.と同様に治療完了時の鼠径リンパ節由来細胞を採取し、フローサイトメトリー解析した。鼠径リンパ節の Foxp3⁻ CD4⁺ T 細胞中 CTLA-4⁺ 細胞の割合は、FTY720 + GPI₃₂₅₋₃₃₉ 併用群 (3.7±0.5: 平均値±標準偏差) で、placebo 群 (2.2±0.6) および FTY720 単独群 (2.2±0.4) と比較して、有意に増加していた (Fig. 20A)。GPI₃₂₅₋₃₃₉ 単独群 (3.0±1.0) でも placebo 群と FTY720 単独群と比較して、増加傾向を示したが有意ではなかった。一方、鼠径リンパ節の Foxp3⁻ CD4⁺ T 細胞中 PD-1⁺ 細胞の割合も、FTY720 + GPI₃₂₅₋₃₃₉ 併用群 (5.6±2.0) で、placebo 群 (2.1±0.5) および FTY720 単独群 (2.7±0.3) と比較して、有意に増加していた (Fig. 20B)。GPI₃₂₅₋₃₃₉ 単独群 (4.0±1.3) でも placebo 群と比較して、増加していたが、FTY720 + GPI₃₂₅₋₃₃₉ 併用群よりも低値であった。

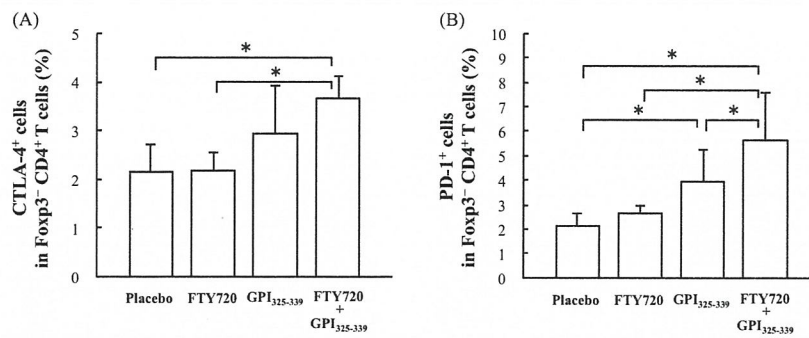


Fig. 20 Combination Treatment Increases the Percentage of CTLA-4 or PD-1-expressing Foxp3⁻ CD4⁺ T Cells in Inguinal Lymph Nodes

At the end of treatment, cells were obtained from inguinal lymph nodes of treated mice and the percentage of (A) CTLA-4⁺ cells or (B) PD-1⁺ cells in Foxp3⁻ CD4⁺ T cells were determined by flow-cytometric analysis. The results are shown as the mean + SD (n=3-5). The significance of differences was examined by Duncan's test (*denotes $P < 0.05$).

3.5. 鼠径リンパ節中 CD4⁺T 細胞の GPI₃₂₅₋₃₃₉ に対する反応性

GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎の病態形成には、Th1 細胞が産生する IFN- γ や Th17 細胞が産生する IL-17 が関与することが知られている [40, 47]. FTY720 と病因抗原の併用療法が、病因 T 細胞の病因抗原に対するサイトカイン産生を制御するか否かを明らかとするために、本節・3.3.と同様に治療完了時の鼠径リンパ節由来細胞を採取後、GPI₃₂₅₋₃₃₉ 存在下で培養し、細胞内サイトカイン染色法を用いてフローサイトメトリー解析した. CD4⁺T 細胞中の IFN- γ ⁺細胞が、FTY720 + GPI₃₂₅₋₃₃₉ 併用群 (0.18 \pm 0.13: 平均値 \pm 標準偏差), FTY720 単独群 (0.35 \pm 0.27) および GPI₃₂₅₋₃₃₉ 単独群 (0.40 \pm 0.23) で、placebo 群 (0.81 \pm 0.18) と比較して、有意に低下していた (Fig. 21A). また、FTY720 + GPI₃₂₅₋₃₃₉ 併用群は、FTY720 単独群および GPI₃₂₅₋₃₃₉ 単独群よりも有意ではないがさらに低下傾向であった. CD4⁺T 細胞中の IL-17A⁺細胞は、FTY720 + GPI₃₂₅₋₃₃₉ 併用群 (0.45 \pm 0.21: 平均値 \pm 標準偏差) および FTY720 単独群 (0.43 \pm 0.16) で、placebo 群 (0.93 \pm 0.40) と比較して、有意に低下していた (Fig. 21B).

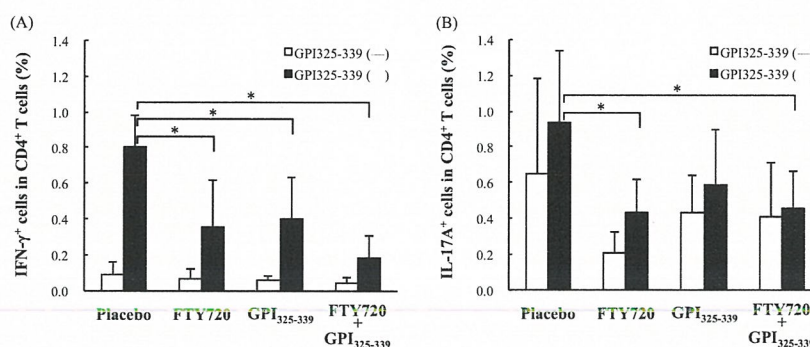


Fig. 21 GPI₃₂₅₋₃₃₉-specific Helper T cells Activation was Impaired by Treatment with FTY720 plus GPI₃₂₅₋₃₃₉

At the end of treatment, cells were obtained from inguinal lymph nodes of treated mice, and the cells were cultured in absence (open bar) or presence (filled bar) of GPI₃₂₅₋₃₃₉ for 72 hour. The percentage of IFN- γ ⁺ or IL-17A⁺ cells in CD4⁺ T cells was determined by flow cytometric analysis. The results are shown as mean + SD (n=4-5). The significance of differences was examined by Duncan's test (*denotes $P < 0.05$).

3.6. 鼠径リンパ節の制御性 T 細胞の割合

CTLA-4, GITR や CD39 は, $CD25^+ CD4^+$ 制御性 T 細胞に発現し, その免疫抑制機能の発現, 自己寛容で重要な役割を担っていると考えられている [48-50]. FTY720 と病因抗原の併用療法が, 鼠径リンパ節の制御性 T 細胞の割合に及ぼす影響を明らかとするため, 本節・3.3.と同様に治療完了時の鼠径リンパ節由来細胞を採取し, フローサイトメトリー解析した. 鼠径リンパ節の $CD4^+$ T 細胞中 CTLA-4⁺ Foxp3⁺ 細胞, GITR⁺ Foxp3⁺ 細胞および CD39⁺ Foxp3⁺ 細胞の割合は, FTY720 + GPI₃₂₅₋₃₃₉ 併用群および FTY720 単独群で placebo 群および GPI₃₂₅₋₃₃₉ 単独群と比較して, 有意に増加していた ($CD4^+$ T 細胞中 CTLA-4⁺ Foxp3⁺ 細胞 (%); placebo 群: 13.4±2.5 (平均値±標準偏差), FTY720: 17.6±2.7, GPI₃₂₅₋₃₃₉: 13.4±1.6, FTY720 + GPI₃₂₅₋₃₃₉: 18.7±2.1; Fig. 22A) ($CD4^+$ T 細胞中 GITR⁺ Foxp3⁺ 細胞 (%); placebo 群: 14.9±3.1, FTY720: 18.9±2.2, GPI₃₂₅₋₃₃₉: 14.6±1.8, FTY720 + GPI₃₂₅₋₃₃₉: 20.4±2.2; Fig. 22B) ($CD4^+$ T 細胞中 CD39⁺ Foxp3⁺ 細胞 (%); placebo 群: 12.5±3.0, FTY720: 16.2±2.0, GPI₃₂₅₋₃₃₉: 11.9±1.4, FTY720 + GPI₃₂₅₋₃₃₉: 17.2±2.2; Fig. 22C).

制御性 T 細胞は, 内在性制御性 T 細胞 (natural regulatory T cell; nTreg cell) および誘導性制御性 T 細胞 (inducible regulatory T cell; iTreg cell) に 2 分されている. エピジェネティックパターンの観点から, 内在性制御性 T 細胞の方が誘導性制御性 T 細胞よりも機能的に安定していると考えられている [51]. FTY720 投与個体で上昇していた制御性 T 細胞が内在性制御性 T 細胞あるいは誘導性制御性 T 細胞のいずれであるか明らかとするために, Helios⁺ 制御性 T 細胞の割合をフローサイトメトリー解析した. Helios は胸腺由来の制御性 T 細胞, 即ち内在性制御性 T 細胞の特異的マーカーとして知られている [52]. 鼠径リンパ節中の Foxp3⁺ $CD4^+$ T 細胞中の Helios⁺ 細胞の割合は, 全個体共に約 85%であり, 鼠径リンパ節に存在している制御性 T 細胞の大半が内在性制御性 T 細胞であった (Fig. 22D). 従って, FTY720 によって鼠径リンパ節内で増加している制御性 T 細胞の大部分が内在性制御性 T 細胞と考えられた. FTY720 は, 二次リンパ組織内に機能的な制御性 T 細胞が豊富な環境を生み出すことができることが示された.

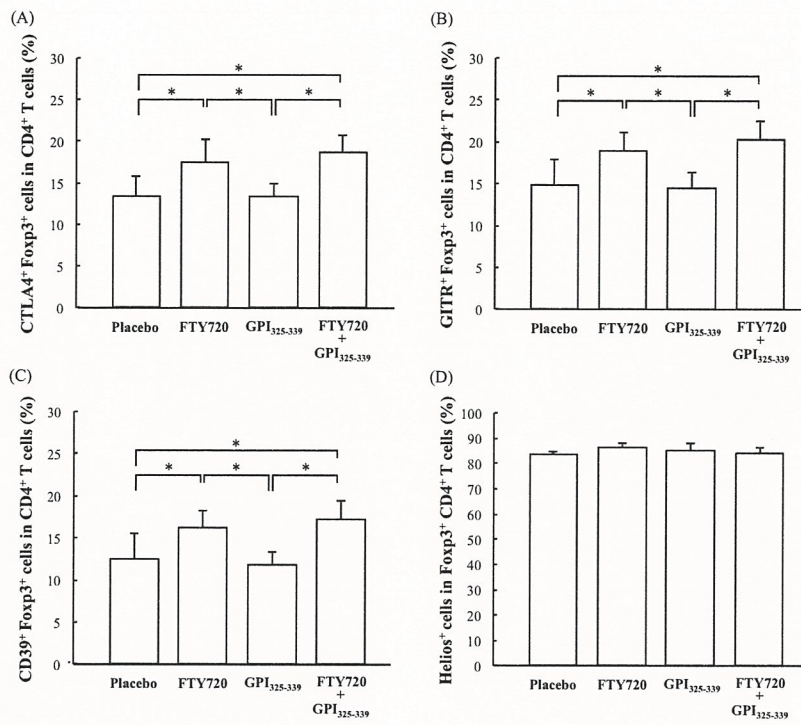


Fig. 22 Combination Treatment Increases the Percentage of Regulatory T Cells in Inguinal Lymph Nodes

At the end of treatment, cells were obtained from inguinal lymph nodes of treated mice and the percentages of (A) CTLA-4⁺Foxp3⁺ cells in CD4⁺ T cells or (B) GITR⁺Foxp3⁺ cells in CD4⁺ T cells (C) CD39⁺Foxp3⁺ cells in CD4⁺ T cells and (D) Helios⁺ cells in Foxp3⁺ CD4⁺ T cells were determined by flow-cytometric analysis. The results are shown as the mean + SD (n=4). The significance of differences was examined by Duncan's test (*denotes $P < 0.05$).

4. 考 察

FTY720 および病因抗原 (GPI₃₂₅₋₃₃₉) の併用療法は、それら単独の治療よりも効果的に GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎の症状の進行を制御した。前節の考察でも示したが、これまでに Kearney らによって、抗原の静脈内投与後、抗原特異的細胞はリンパ節の傍皮質領域に迅速に蓄積され、抗原に対して低反応性の細胞集団を残して、ほとんどの細胞が消滅すると報告されている [35]。従って、FTY720 を併用した場合、二次リンパ組織からのリンパ球の移出が制御され、病因抗原の投与によって効果的な治療効果が得られている可能性が考えられた。FTY720 と病因抗原の併用療法的作用メカニズムについて、1) 病因 T 細胞の細胞死 (アポトーシス) の誘導、2) 病因 T 細胞の病因抗原に対する免疫不応答 (アナジー) の誘導、3) 制御性 T 細胞の増殖等の観点から以下に考察する。

静脈内投与による免疫寛容のメカニズムについては、病因抗原反応性 T 細胞のアポトーシスによるクローン消失や残存する細胞の免疫不応答の誘導によるものと考えられている [27]。GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎を FTY720 と GPI₃₂₅₋₃₃₉ の併用療法で治療した場合、リンパ節内のアポトーシス細胞が顕著に増加した。また、FTY720 単独療法では、アポトーシス細胞は増加せず、GPI₃₂₅₋₃₃₉ 単独群では中程度の増加がみられた。従って、細胞死は、病因抗原 (GPI₃₂₅₋₃₃₉) の投与により誘導され、FTY720 によって二次リンパ組織に病因リンパ球を隔離することで、その作用効率が上昇したと考えられた。

補助刺激受容体の CTLA-4 や PD-1 は、T 細胞の機能を負に制御する。CTLA-4 は休息中の T 細胞上には発現しておらず、活性化した後に発現する [43]。抗原提示細胞上の B7 リガンド (CD80/86) に対して、CD28 よりも高い結合親和性を有する [43]。即ち、CTLA-4 は T 細胞機能を正に制御する補助刺激受容体の CD28 と競合し、T 細胞の活性化を制御する。PD-1 は、活性化した T 細胞や B 細胞に発現し、PD-1 のリガンドである PD-L1 はマクロファージ、樹状細胞等に発現する [53, 54]。PD-1/PD-L1 経路は、T 細胞の増殖やサイトカイン産生を抑制する [55]。GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎を FTY720 と GPI₃₂₅₋₃₃₉ の併用療法で治療した場合、鼠径リンパ節中の CTLA-4 や PD-1 を発現した非制御性 T 細胞の割合が増加していた。また、鼠径リンパ節由来細胞中の CD4⁺ T 細胞の病因抗原 (GPI₃₂₅₋₃₃₉) に対する IFN- γ や IL-17A の産生が低下していた。FTY720 および

GPI₃₂₅₋₃₃₉ の併用療法によって、二次リンパ組織内で CTLA-4 シグナルや PD-1/PD-L1 経路を介して効果的に病因 T 細胞の低反応性が誘導されたと考えられた。

制御性 T 細胞は、マスター転写因子である Foxp3 を発現しており、(1) IL-10, IL-35 や transforming growth factor- β (TGF- β) の産生、(2) IL-2 の剥奪、(3) グランザイム B の放出、(4) 細胞外アデノシンの産生等によって異常な免疫応答を抑制する [56]。自己抗原に対する免疫不応答の維持において欠かすことができない役割を担う細胞である [57]。制御性 T 細胞は、CTLA-4 を発現しており、その発現は Foxp3 によって直接制御されている [57-59]。制御性 T 細胞上の CTLA-4 は、樹状細胞上の CD80/CD86 の発現をダウンレギュレートし、エフェクター T 細胞の免疫応答を抑制する [60]。即ち、CTLA-4 は、制御性 T 細胞の免疫抑制作用を発揮するための重要な分子である。腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー (tumor necrosis factor receptor superfamily; TNFRSF) に属する GITR も、CD25⁺ CD4⁺ 制御性 T 細胞に発現している。これまでに、GITR を発現した T 細胞の除去や抗 GITR 抗体の投与によって、自己免疫疾患が誘導されることが報告されている [48, 61]。従って、制御性 T 細胞による免疫寛容の維持において GITR が重要な役割を担うと考えられている。その他、制御性 T 細胞の抑制機能に関わる重要な細胞表面抗原として CD39 が知られている。CD39 は、CD73 と制御性 T 細胞に共発現し、細胞外のアデノシン三リン酸をアデノシンに分解する。アデノシンは、T 細胞の増殖・活性を抑制することから、CD39 は制御性 T 細胞の機能分子の一つであると考えられている [49, 50]。本研究では、FTY720 単独あるいは FTY720 と GPI₃₂₅₋₃₃₉ 併用療法で治療した個体の鼠径リンパ節で、CD4⁺ T 細胞中の CTLA-4⁺、GITR⁺あるいは CD39⁺ 制御性 T 細胞の割合が増加していた。この現象は、FTY720 単独で治療した場合でも確認された。ナイーブ T 細胞から制御性 T 細胞への分化には TGF- β が必要で、TGF- β によって転写因子の Smad3 が活性化される。Liu らは、S1P₁-mTOR シグナルによって Smad3 シグナルが抑制されると、Th1 分化が亢進し、制御性 T 細胞への分化が抑制されることを明らかにしている [62]。FTY720 は S1P₁ 受容体に作用することから、S1P₁-mTOR シグナルが制御され、制御性 T 細胞への分化が亢進した可能性が考えられた。しかし、本研究で解析した鼠径リンパ節中の制御性 T 細胞の大部分が Helios 陽性であったことから、FTY720 によって末梢でナイ

ープ T 細胞から制御性 T 細胞への分化が亢進したというより、胸腺由来の内
性制御性 T 細胞が二次リンパ組織内で増加している可能性が示唆された。制御
性 T 細胞は、*in vitro* で膜によってエフェクター T 細胞との接触を阻害
した場合、エフェクター T 細胞の増殖を抑制できない [63]。即ち、制御性 T 細
胞による免疫応答抑制は、細胞と細胞との接触に依存すると考えられている。
FTY720 は、二次リンパ組織にリンパ球を隔離する。従って、二次リンパ組織
内で細胞が密の状況が生み出される。FTY720 は、*in vivo* において、制御性 T
細胞の能力を効果的に発揮できる環境を作り出し、免疫寛容の誘導を促進させ
た可能性がある。

以上のことから、GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎を FTY720 と GPI₃₂₅₋₃₃₉ の併用療法で
治療した場合、以下に示す現象が二次リンパ組織内で生じていると考えられた
(Fig. 23)。FTY720 によって、循環する GPI₃₂₅₋₃₃₉ 特異的 T 細胞が二次リンパ組
織に隔離され、二次リンパ組織内で高濃度の GPI₃₂₅₋₃₃₉ に暴露される。高用量の
抗原刺激に伴い、TUNEL⁺細胞、Annexin V⁺細胞、CTLA-4 および/あるいは PD-1
を発現した細胞が増加する。即ち、GPI₃₂₅₋₃₃₉ 特異的 T 細胞の (1) アポトーシ
スおよび (2) 免疫不応答が二次リンパ組織内で効率よく誘導される。また、二
次リンパ組織内の (3) CD4⁺ 細胞中の制御性 T 細胞の割合が増加し、効果的に
免疫応答が制御される。なお、病因抗原の投与量、投与経路等の違いにより、
それら現象のバランスが変化する可能性も考えられるため、今後それらに関す
る検討が必要である。

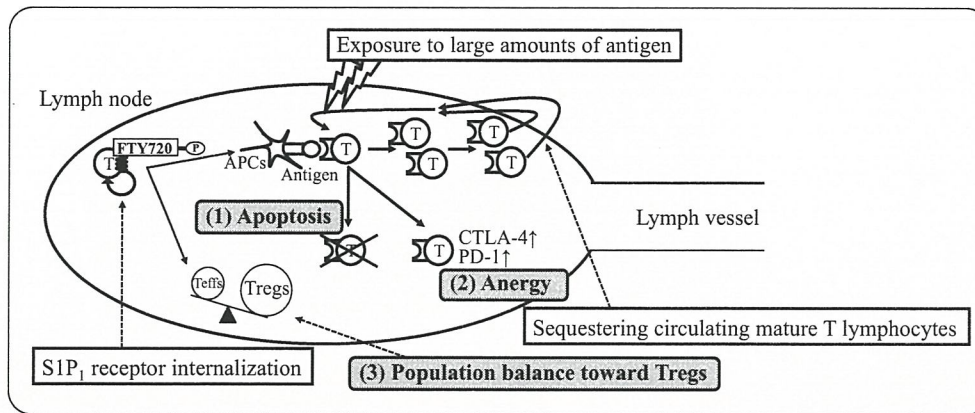


Fig. 23 Model for Functional Mechanism(s) of Combination Treatment with FTY720 plus Pathogenic Antigen

Internalization of SIP_1 receptor on T lymphocytes is induced by FTY720-P. Accordingly, circulating T lymphocytes is sequestered, and the cells are efficiently exposed large amount of $GPI_{325-339}$. $GPI_{325-339}$ -specific T cells may be activated for a short time, but most of the cells die by vigorous antigenic stimulation (1), and the remaining cells express CTLA-4 and PD-1 (2). In addition, an alteration of the population balance in lymph nodes toward Treg cells may be induced (3). The combination treatment with FTY720 plus pathogenic antigen inhibits progression of arthritis by inducing clonal deletion and anergy of pathogenic T cells and also by immune suppression *via* Treg cells. APCs; antigen presenting cells.

第3節 GPI₃₂₅₋₃₃₉誘導性関節炎の完全寛解導入に対するFTY720と病因抗原の併用療法の有用性

1. 目的

本章・第2節では、FTY720および病因抗原のGPI₃₂₅₋₃₃₉との併用療法が、1) 病因T細胞の細胞死（アポトーシス）の誘導、2) 病因T細胞の病因抗原に対する免疫不応答（アナジー）の誘導および3) 制御性T細胞を増殖させることによって効果的に免疫寛容を誘導している可能性を見出した。本節では、GPI₃₂₅₋₃₃₉誘導性関節炎に対して、FTY720と病因抗原GPI₃₂₅₋₃₃₉との併用療法によって導入された寛解状態が維持（完全寛解）できるか否かについて調べた。また、本併用療法に特化して、体内で変動している細胞の同定およびその機能解析を試みた。

2. 実験材料と実験方法

2.1. 実験動物

DBA/1Jマウスは、日本エスエルシー株式会社から購入した。飼育は第1章・第1節・2.1の方法に従って行った。なお、本研究は動物実験の適正な実施に向けたガイドライン（日本学術会議: 2006年6月1日）および摂南大学動物実験に関する規定に従い実施した。

許可番号: K15-15

2.2. FTY720およびGPI₃₂₅₋₃₃₉

2-Amino-2-[2-(4-octylphenyl) ethyl]propane-1,3-diol hydrochloride (FTY720) は、吉富製薬株式会社（現 田辺三菱製薬株式会社）より恵与された。Human glucose-6-phosphate isomerase 325 (IWYINCFGCETHAML) 339 (GPI₃₂₅₋₃₃₉) はオペロンバイオテクノロジー株式会社（現 ユーロフィンジェノミクス株式会社）から購入した。

2.3. GPI₃₂₅₋₃₃₉誘導性関節炎の誘導および評価

GPI₃₂₅₋₃₃₉誘導性関節炎の誘導および臨床症状の評価は、本章・第1節・2.3と同様に行った。

2.4. 試験プロトコル

GPI₃₂₅₋₃₃₉ で感作した DBA/1J マウスを 4 群 ((1) FTY720 群: FTY720 (1 mg/kg) を 1 日 1 回経口投与, PBS を 1 日 1 回静脈内投与, (2) GPI₃₂₅₋₃₃₉ 群: 注射用蒸留水を 1 日 1 回経口投与, GPI₃₂₅₋₃₃₉ (10 µg/mouse) を 1 日 1 回静脈内投与, (3) FTY720 + GPI₃₂₅₋₃₃₉ 群: FTY720 (1 mg/kg) を 1 日 1 回経口投与 + GPI₃₂₅₋₃₃₉ (10 µg/mouse) を 1 日 1 回静脈内投与および (4) placebo 群: 注射用蒸留水を 1 日 1 回経口投与, PBS を 1 日 1 回静脈内投与) に分け, 発症時 (感作 9 日後) から 5 日間, 治療した. 次に, Freund's incomplete adjuvant および hGPI₃₂₅₋₃₃₉ 溶液 (133 µg/ml) を 1:1 の割合で混合し, 乳化させ, 初回感作 32 日後に背中に 150 µl (hGPI₃₂₅₋₃₃₉ 10 µg 相当) 追加感作した.

なお, FTY720 は, 注射用蒸留水に 1 mg/ml となるように溶解後, -20°C で保管し, 用時溶解して用いた. マウスの体重を基に投与量が 0.1 ml となるように注射用蒸留水で希釈し, 経口投与した. また, GPI₃₂₅₋₃₃₉ は本章・第 1 節・2.3. と同様の方法で調製後, 投与量が 0.1 ml となるように PBS で希釈し, 静脈内投与した.

2.5. 関節組織切片の作製

追加免疫 10-11 日後 (初回感作 42-43 日後) にマウスに抱水クロラール (400 mg/mouse) を腹腔内投与した. 正向反射消失後, 前肢を切断し, 10% 中性緩衝ホルマリン溶液に入れた. 2 日後に取り出し, 3 時間の流水水洗後, 4°C 条件下の 90% エタノールに投入した. 2 日後に取り出し, 4°C 条件下で迅速脱灰液 (K-CX, 株式会社ファルマ) に投入した. 9 日後に取り出し, 3 時間流水水洗した. 再び 10% 中性緩衝ホルマリン溶液に投入し, 24 時間後に組織を取り出した. 3 時間流水水洗後, Tissue Cassette (greiner labortechnik) に入れ, 第 1 章・第 1 節・2.6. と同様の方法で自動浸透した. 浸透処理が完了した組織を, パラフィンに埋め, パラフィンブロックを作製した. パラフィンブロックをマイクロトーム (ROM-380) にセットし, 5 µm の厚さに薄切した. 薄切した組織を伸展させ, MAS コートスライドガラスの上に乗せ, 乾燥させた. 乾燥後, 37°C の恒温槽に一晩放置し, 固定した.

2.6. ヘマトキシリン・エオジン染色

本節・2.5.で乾燥，固定した組織標本を第1章・第1節・2.7.と同様の方法で染色し，手根中手関節付近の滑膜の過形成やリンパ球浸潤の程度について，本章・第1節・2.6.と同様の方法で評価した。

2.7. 血清中抗 hGPI₃₂₅₋₃₃₉ および抗 mGPI₃₂₅₋₃₃₉total IgG 抗体価の測定

Maxisorp/polystyrene ウェル（クリア平底イムノ未滅菌 96 ウェルプレート，Thermo Fisher Scientific, Inc.）に 0.1% アジ化ナトリウムを含む 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液，pH7.5 で溶解した human あるいは mouse GPI₃₂₅₋₃₃₉（hGPI₃₂₅₋₃₃₉ あるいは mGPI₃₂₅₋₃₃₉）1 µg/ml を 0.1 ml 入れ，4°C で一晚保温した。以降は，本章・第1節・2.7.と同様の方法で抗 hGPI₃₂₅₋₃₃₉ および抗 mGPI₃₂₅₋₃₃₉ total IgG 抗体価を測定した。なお，マウスの被検血清は，0.1% BSA および 0.1 M NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液，pH 7.0（緩衝液 A）で 10000 倍希釈して用いた。

2.8. 鼠径リンパ節中の GITR⁺Foxp3⁻CD4⁺T 細胞，CTLA-4⁺Foxp3⁻CD4⁺T 細胞 および CD39⁺Foxp3⁻CD4⁺T 細胞の割合の評価

感作 14 日後（治療完了時），マウスに抱水クロラール溶液（400 mg/mouse）を腹腔内投与し，本章・第2節・2.9.と同様の方法で鼠径リンパ節由来細胞を染色した。GITR⁺Foxp3⁻CD4⁺T 細胞，CTLA-4⁺Foxp3⁻CD4⁺T 細胞および CD39⁺Foxp3⁻CD4⁺T 細胞の割合を解析した。

2.9. Suppression Assay

感作 14 日後（治療完了時），第1章・第1節・2.5.と同じ方法で，鼠径リンパ節を採取後，細胞懸濁液を調製した。2% FCS を含む PBS で希釈した violet 500 (V500)-conjugated anti-mouse CD4 mAb（clone: RM4-5; BD Biosciences; 1:200），FITC-conjugated anti-mouse GITR mAb（clone: DTA-1; BD Biosciences; 1:100），APC-conjugated anti-mouse CD25 mAb（clone: PC61; eBioscience; 1:50）および PE-conjugated anti-mouse IA/IE mAb（clone: M5/114.152; eBioscience; 1:200）の混合溶液を 100 µl 加え，4°C，暗所条件下で 30 分間静置した。2% FCS を含む PBS を 1 ml 加え，400 x g で 5 分間遠心分離後，上清を除去した。2% FCS を含む PBS 500 µl で懸濁し，ナイロンメッシュ（N-NO.355T）を通過させ，5 ml ポリスチ

レンラウンドチューブに回収した。BD FACS Aria II セルソーター (BD Biosciences) を用いて, IA/IE⁺細胞, GITR⁻ CD25⁻ CD4⁺ T 細胞, GITR⁺ CD25⁺ CD4⁺ T 細胞および GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T 細胞を分取した。GITR⁻ CD25⁻ CD4⁺ T 細胞の一部を CellTrace™ violet cell proliferation kit, for flow cytometry (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いて染色した。細胞に最終濃度が 5 μM となるように CellTrace™ violet dye を加え, 室温, 暗所条件下で 5 分間静置した。400 x g で 5 分間遠心分離後, 上清を除去した。次に, 2% FCS を含む RPMI1640 培地 1 ml に懸濁し, 4°C, 暗所条件下で 10 分間静置した。400 x g で 5 分間遠心分離後, 上清を除去した。再度, 2% FCS を含む RPMI1640 培地 1 ml に懸濁し, 400 x g で 5 分間遠心分離後, 上清を除去した。次に, 10% FCS, 100 units/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin および 50 μM 2-mercaptoethanol を含む RPMI1640 培地を適量加え, violet fluorescence 標識-GITR⁻ CD25⁻ CD4⁺ T 細胞懸濁液を作製した。96 well plate (U 底) に violet fluorescence 標識-GITR⁻ CD25⁻ CD4⁺ T 細胞 (5.0 x 10⁴ 個/well), IA/IE⁺ 細胞 (5.0 x 10⁴ 個/well) および未標識-GITR⁻ CD25⁻ CD4⁺ T 細胞, GITR⁺ CD25⁺ CD4⁺ T 細胞あるいは GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T 細胞 (2.5 x 10⁴ 個/well) を加え, anti-mouse CD3 mAb (clone: 145-2C11; BD biosciences; 1 μg/ml) 存在下, あるいは非存在下で, 37°C, 5% CO₂ 条件下で 72 時間培養した。培養後, 細胞を 1.5 ml エッペンチューブに回収後, 2% FCS を含む PBS を 1 ml 加えた。400 x g で 5 分間遠心分離後, 上清を除去し, 2% FCS を含む PBS 500 μl に懸濁した。最終濃度が 0.1 μg/ml となるように propidium Iodide (PI) を加え, ナイロンメッシュ (N-NO.355T) を通過させ, 5 ml ポリスチレンラウンドチューブに回収した。BD FACS Aria II セルソーターを用いて, violet fluorescence の蛍光強度の減少程度を解析し, GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T 細胞および GITR⁺ CD25⁺ CD4⁺ T 細胞の抑制活性について調べた。また, proliferation index を FlowJo ソフトウェア (FlowJo, LLC, OR, USA) で解析した。

2.10. Restimulation Assay

本節・2.9.と同様の方法で, 鼠径リンパ節由来 GITR⁻ CD25⁻ CD4⁺ T 細胞, GITR⁺ CD25⁺ CD4⁺ T 細胞および GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T 細胞を分取した。96 well plate に細胞 (5.0 x 10⁴ 個/well) をそれぞれ加え, Dynabeads® Mouse T-Activator CD3/CD28 for T-Cell Expansion and Activation および IL-2 (50 U/ml) 存在下, 37°C, 5% CO₂

条件下で 72 時間培養した。培養後、細胞を 1.5 ml エッペンチューブに回収し、2% FCS を含む RPMI1640 培地を 1 ml 加えた。400 x g で 5 分間遠心分離後、上清を除去し、15 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), 750 ng/ml ionomycin, 0.66 μ l/ml Golgistop (BD Biosciences), 10% FCS, 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin および 50 μ M 2-mercaptoethanol を含む RPMI1640 培地を 1 ml 加え、37°C, 5% CO₂ 条件下で 5 時間培養した。培養後、400 x g で 5 分間遠心分離し、上清を除去した。2% FCS を含む PBS を 1 ml 加え、再度 400 x g で 5 分間遠心分離後、上清を除去した。TF diluent buffer で 4 倍希釈した 1x fix/perm buffer working solution (BD Biosciences) を 1 ml 加え、4°C 条件下で、30 分間静置した。静置後、400 x g で 5 分間遠心分離し、上清を除去した。続いて、蒸留水で 10 倍希釈し調製した 1x perm/wash buffer (BD Biosciences) を 1 ml 加え、400 x g で 5 分間遠心分離し、上清を除去した。1x perm/wash buffer で希釈した brilliant violet 421 (BV421)-conjugated anti-mouse Foxp3 mAb (clone: FJK-16s, 1:100), PE-conjugated anti-mouse CTLA-4 mAb (clone: UC10-4F10-11, 1:100) および Alexa647-conjugated anti-mouse IL-10 mAb (clone: JES5-16E3, 1:100) の混合溶液を 100 μ l 加え、4°C, 暗所条件下で 30 分間静置した。静置後、1x perm/wash buffer を 1 ml 加え、400 x g で 5 分間遠心分離し、上清を除去した。1x perm/wash buffer 200 μ l で懸濁し、ナイロンメッシュ (N-NO.355T) を通過させ、5 ml ポリスチレンラウンドチューブに回収した。BD FACS Aria II セルソーターを用いて、Foxp3⁺ 細胞, IL-10⁺ 細胞の割合および CTLA-4 の mean fluorescence intensity (MFI) を解析した。

2.11. 統計解析

統計解析には、IBM SPSS Statics Version 22 software を用いた。統計学的有意差の判定には、Duncan's test を用い、 $P < 0.05$ を有意差有りとした。相関関係の判定には、Pearson's の相関係数を用いた。

3. 結果

3.1. FTY720 と病因抗原の併用療法が追加免疫後の再燃に及ぼす効果

完全寛解を誘導するには、免疫応答を単に抑制するだけでなく、免疫抑制状態の記憶が必要である。FTY720 と病因抗原の併用療法が寛解の維持に及ぼす影響を明らかとするため、GPI₃₂₅₋₃₃₉誘導性関節炎症状を呈したマウスをFTY720 単独、GPI₃₂₅₋₃₃₉ 単独あるいはそれらの併用療法によって5日間治療した後、一定期間休薬後、GPI₃₂₅₋₃₃₉ で追加感作し、臨床症状の変化を経時的に評価した。追加感作後、placebo 群、FTY720 単独群およびGPI₃₂₅₋₃₃₉ 単独群では、全個体で重度あるいは中程度の再燃が確認された (Fig. 24)。一方、FTY720 + GPI₃₂₅₋₃₃₉ 併用群では、全個体 (n=5) で臨床症状が軽度であり、再燃が顕著に抑制された (Fig. 24)。また、滑膜の肥厚やリンパ球の浸潤も軽度あるいはみられなかった (Fig. 25)。初回感作 42-43 日後 (追加感作 10-11 日後) の臨床症状の程度は、組織学的な評価と有意に関連していた (相関係数=0.75, データ非掲載)。

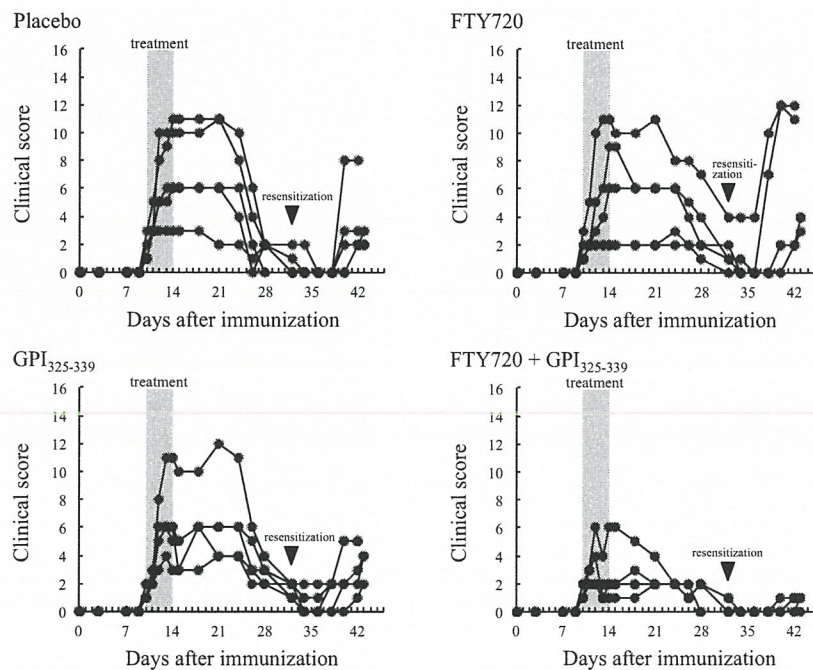


Fig. 24 Relapse after Resensitization was Suppressed by Treatment with FTY720 plus GPI₃₂₅₋₃₃₉

GPI₃₂₅₋₃₃₉-induced arthritis mice were treated with FTY720 alone, hGPI₃₂₅₋₃₃₉ alone, or combination. At day 32 after the first immunization, mice were resensitized with GPI₃₂₅₋₃₃₉. Clinical symptoms of arthritis were evaluated from the day of first immunization to day 42-43.

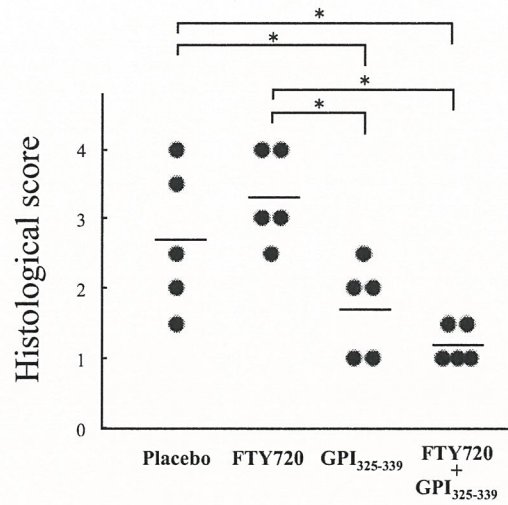


Fig. 25 State of Immune Suppression was Maintained by Treatment with FTY720 plus hGPI₃₂₅₋₃₃₉

GPI₃₂₅₋₃₃₉-induced arthritis mice were treated with FTY720 alone, hGPI₃₂₅₋₃₃₉ alone, or combination. At day 32 after the first immunization, mice were resensitized with GPI₃₂₅₋₃₃₉. At days 42-43 after the first immunization, joint tissues were excised and stained with hematoxylin-eosin. Synovial hyperplasia and lymphocyte infiltration of joints were histologically graded. The mean for all mice in each group is indicated by line. The significance of differences was examined by Duncan's test (*denotes $P < 0.05$).

3.2. FTY720 と病因抗原の併用療法が追加免疫後の抗 human/mouse GPI₃₂₅₋₃₃₉ 抗体産生に及ぼす効果

Schubert ら [64] は、(1) 抗 CD4 抗体を用いた治療による CD4⁺ T 細胞の枯渇が GPI 誘導関節炎を抑制すること、(2) GPI 誘導性関節炎マウス由来の IgG の養子免疫伝達では、関節炎症状を誘導できないことおよび (3) Fc γ 受容体欠損マウスでは、GPI 誘導関節炎に対して抵抗を示すことを報告している。Iwanami ら [40] は、抗マウス GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎で、軟骨表面に IgG 沈着がみられることから、抗 GPI 抗体がペプチド誘導関節炎の病態形成に重要な役割を担うことを報告している。これらの報告は、GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎の病態形成に、病因 T 細胞および抗 GPI₃₂₅₋₃₃₉ 抗体の両方が関与していることを示唆している。本章・第 2 節で、本併用療法が、GPI₃₂₅₋₃₃₉ に対する T 細胞の反応性を低下させることを明らかとした。本項では、FTY720 と病因抗原の併用療法が、追加免疫後の抗ヒトあるいは抗マウス GPI₃₂₅₋₃₃₉ 抗体産生に及ぼす影響を明らかとするため、追加免疫後の抗ヒトあるいは抗マウス GPI₃₂₅₋₃₃₉ 抗体価を酵素免疫測定法で測定した。抗ヒトおよび抗マウス GPI₃₂₅₋₃₃₉ 抗体価はいずれの群も個体差が大きく (Fig. 26A, B)、初回感作 42-43 日後 (追加感作 10-11 日後) の臨床症状および組織学的な評価結果との相関関係はみられなかった。

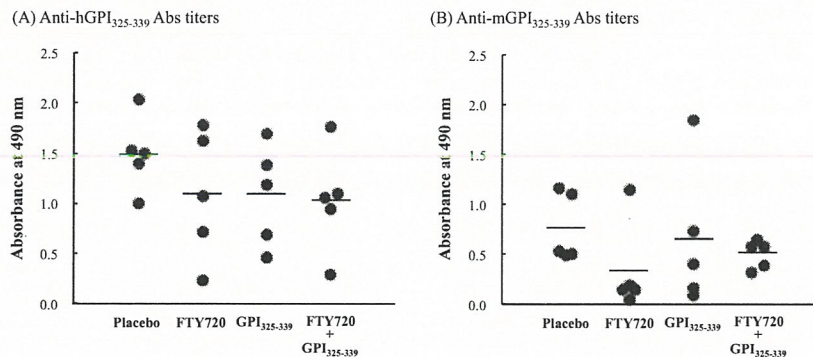


Fig. 26 Anti-GPI₃₂₅₋₃₃₉ Antibodies might be not an Important Trigger of Relapse of Arthritis

GPI₃₂₅₋₃₃₉-induced arthritis mice were treated with FTY720 alone, hGPI₃₂₅₋₃₃₉ alone, or combination. At day 32 after the first immunization, mice were resensitized with GPI₃₂₅₋₃₃₉. At days 42-43 after the first immunization, peripheral blood samples were collected, and anti-(A) human or (B) mouse GPI₃₂₅₋₃₃₉ total IgG antibody titer were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The mean for all mice in each group is indicated by line.

3.3. FTY720 と病因抗原の併用療法が GITR⁺非制御性 T 細胞に及ぼす効果

制御性 T 細胞だけでなく、CD25⁻CD4⁺T 細胞（非制御性 T 細胞）集団の中にも GITR を発現している細胞が存在し、自己免疫抑制活性を示すことが知られている [61]. FTY720 と病因抗原の併用療法が、GITR⁺非制御性 T 細胞の割合に及ぼす影響を明らかとするため、治療完了時（初回感作 14 日後）の鼠径リンパ節由来細胞をフローサイトメトリー解析した。Foxp3⁻CD4⁺T 細胞中 GITR⁺細胞の割合は、FTY720 + GPI₃₂₅₋₃₃₉ 併用群 (12.1±2.0 (平均値±標準偏差)) で、placebo 群 (8.1±2.2), FTY720 単独群 (9.0±1.3) および GPI₃₂₅₋₃₃₉ 単独群 (8.6±1.9) と比較して有意に増加していた (Fig. 27). 本章・第 2 節で、CTLA-4⁺ 非制御性 T 細胞集団が増加することを明らかとしている。また、CD39⁺ 非制御性 T 細胞集団についても、本併用療法で増加傾向を示した (データ非掲載). 増加していた GITR⁺ 非制御性 T 細胞集団は、CTLA-4⁺ 非制御性 T 細胞集団と GITR を共有しており、類似の細胞集団である可能性が示唆された。一方、CD39⁺ 非制御性 T 細胞集団とは、全く別の細胞集団であった。GITR⁺ 非制御性 T 細胞の抑制活性を明らかとするために、suppression assay (本節・2.9.参照) を実施した。その結果、GITR⁺CD25⁻CD4⁺T 細胞 (GITR⁺非制御性 T 細胞) は、GITR⁻CD25⁻CD4⁺T 細胞 (レスポンドー細胞) の増殖を有意に抑制した (Fig. 28). 次に、GITR⁺CD25⁻CD4⁺T 細胞を抗 CD3/抗 CD28 (不溶化) ビーズおよび IL-2 で刺激すると、GITR⁺CD25⁺CD4⁺T 細胞 (GITR⁺制御性 T 細胞) よりも、有意に IL-10 を産生する細胞の割合が高かった (GITR⁻CD25⁻CD4⁺T 細胞: 0.3±0.1, GITR⁺CD25⁺CD4⁺T 細胞: 1.4±0.1, GITR⁺CD25⁻CD4⁺T 細胞: 16.9±3.8; Fig. 29). この IL-10⁺細胞は、大部分が Foxp3 陰性であった。さらに、刺激後の GITR⁺CD25⁻CD4⁺T 細胞上の CTLA-4 は、GITR⁺CD25⁺CD4⁺T 細胞と同程度に高発現していた。即ち、GITR⁺CD25⁻CD4⁺T 細胞は、刺激条件下でアナジーマーカーの CTLA-4 を発現し、かつ IL-10 を高産生し、免疫応答を抑制している可能性が示唆された。以上の結果から、この細胞集団が、本併用療法によって増加し、寛解の誘導、さらにはその維持に重要な役割を担っている可能性が示唆された (Fig.30).

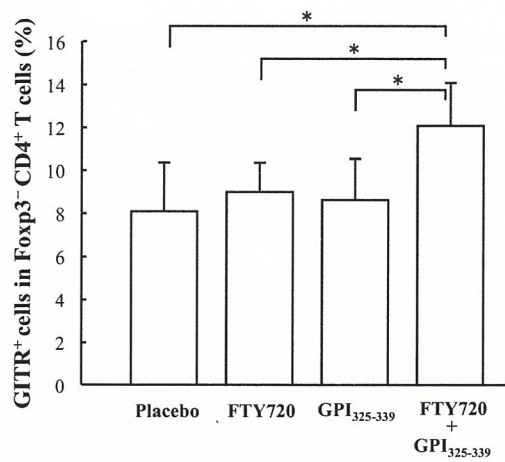


Fig. 27 Immunosuppressive Cell Populations is Induced by Combination Treatment with FTY720 plus hGPI₃₂₅₋₃₃₉ in Inguinal Lymph Nodes

At day 14 (the end of treatment), cells were obtained from inguinal lymph nodes of treated mice. The percentage of GITR⁺ T cells in Foxp3⁻ CD4⁺ T cells was determined by flow cytometric analysis. The results are shown as mean + SD (n=4). The significance of differences was examined by Duncan's test (*denotes $P < 0.05$).

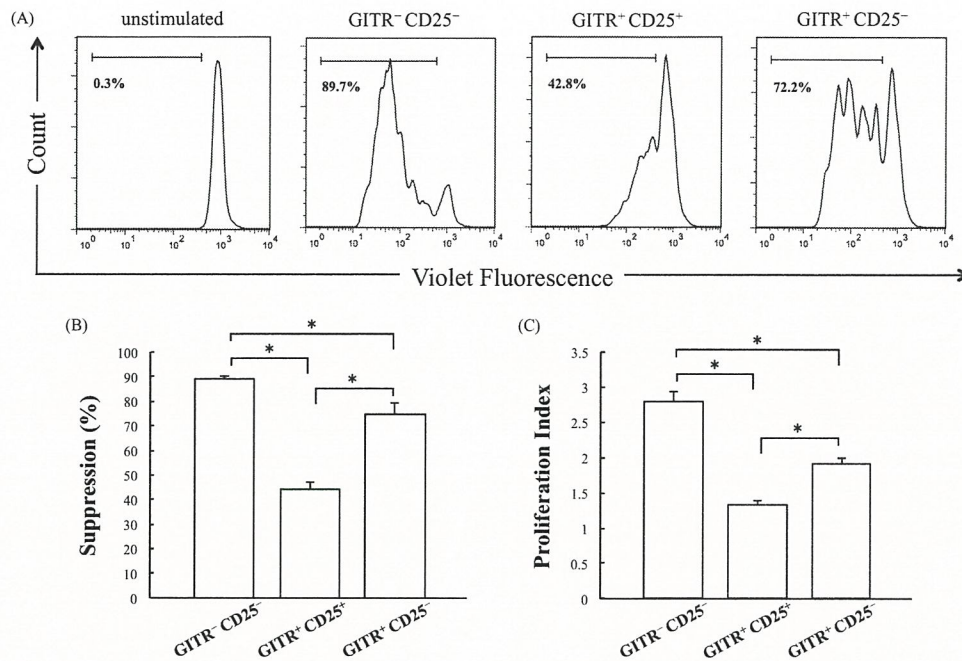


Fig. 28 GTR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T cells, which had been Induced by Combination Treatment, had Suppressive Activity

At day 14 (the end of treatment), GTR⁻ CD25⁻, GTR⁺ CD25⁺ and GTR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T cells were obtained from inguinal lymph nodes of the combination treated mice. (A) Violet fluorescence-labeled GTR⁻ CD25⁻ CD4⁺ T cells (5×10^4 cells) were cultured with unlabeled-GTR⁻ CD25⁻, GTR⁺ CD25⁺ or GTR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T cells (2.5×10^4 cells) presence of IA/IE⁺ cells (5×10^4 cells) and anti-CD3 mAb (1 μ g/ml) for 72 hours. violet fluorescence intensity was analyzed by FACS. (B) Percentage of suppression mediate by the each purified cells obtained from combination-treated mice is presented. (C) Proliferation index was analyzed by FlowJo software. The results are shown as mean + SD (n=5). The significance of differences was examined by Duncan's test (*denotes $P < 0.05$).

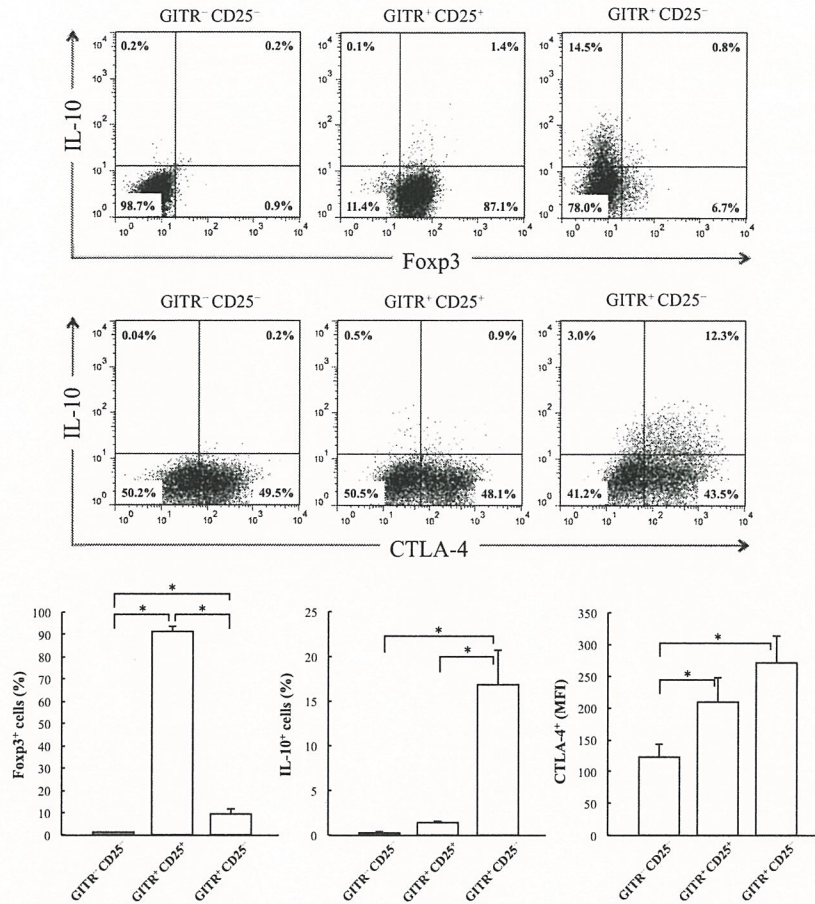


Fig. 29 GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T cells, which had been Induced by Combination Treatment, had High Ability to Produce of IL-10

At day 14 (the end of treatment), GITR⁻ CD25⁻, GITR⁺ CD25⁺ and GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T cells were obtained from inguinal lymph nodes of the combination treated mice. GITR⁻ CD25⁻, GITR⁺ CD25⁺ and GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T cells were restimulated with anti-CD3/anti-CD28 coated dynabeads and IL-2 (50 U/ml) for 72 hours. The percentage of Foxp3⁺ cells and IL-10⁺ cells, and mean fluorescence intensity (MFI) of CTLA-4 expression were determined by flow cytometric analysis (three determinations). The results are shown as mean + SD. The significance of differences was examined by Duncan's test (*denotes $P < 0.05$).

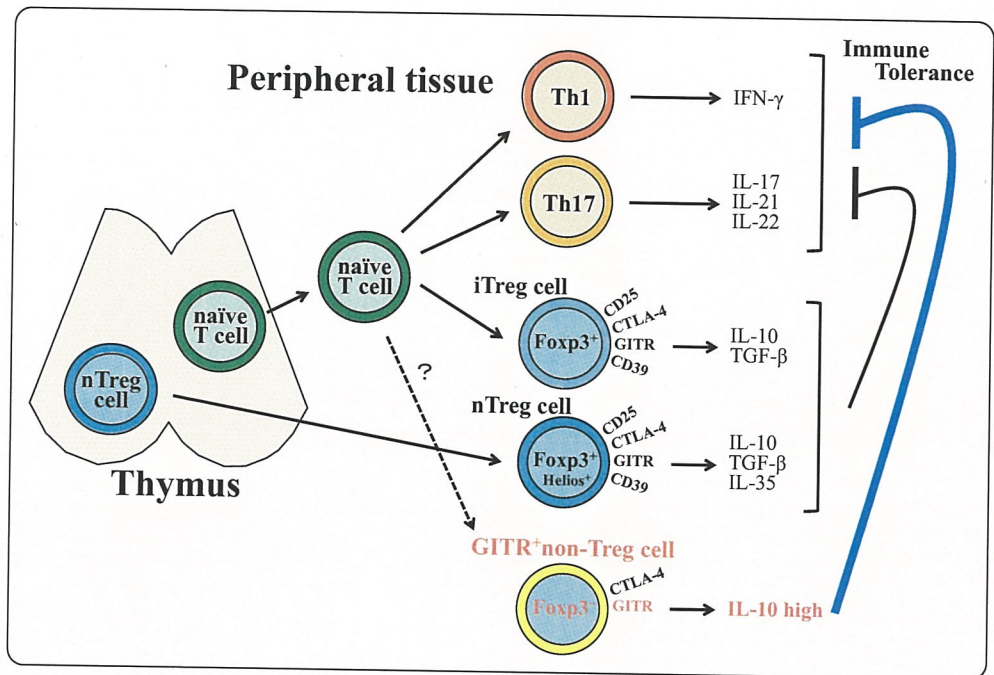


Fig. 30 Model for Induction and Maintenance of Remission by Combination Treatment with FTY720 plus Pathogenic Antigen

GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T cells (GITR⁺non-Treg cells), which were induced by combination treatment with FTY720 plus pathogenic antigen *in vivo*, had a suppressive effect on T cell proliferation and exhibited high production potential for IL-10. GITR⁺non-Treg cells contribute not only to the induction of remission but also to its maintenance.

4. 考 察

関節リウマチに対する治療は、日和見感染等の副作用の観点から抗原特異的な免疫寛容の導入が求められている。抗原の投与による免疫寛容治療は、特異性が高く、自己免疫疾患一般に理想的な治療である。申請者は、本章・第2節で、FTY720 と病因抗原 (GPI₃₂₅₋₃₃₉) の併用療法が、(1) 病因 T 細胞の細胞死 (アポトーシス) の誘導、(2) 病因 T 細胞の免疫不応答 (アナジー) の誘導および (3) 制御性 T 細胞の増殖を介して、効果的に GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎の症状の進行を抑制していることを見出した。さらに、追加免疫後も寛解が維持されることを明らかとした。これらのことから、本併用療法により、病因 T 細胞を制御する状態を維持 (完全寛解) できる可能性が考えられた。

GITR は、CD25⁺ CD4⁺ 制御性 T 細胞に高発現し、自己免疫寛容の維持に重要な役割を担うと考えられている。また、GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T 細胞、即ち、GITR⁺ 非制御性 T 細胞が自己免疫応答を抑制することも報告されている。Uraushihara ら [65] によって、GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T 細胞が (1) 炎症性腸疾患に対して抑制活性を示すこと、(2) GITR⁺ CD25⁺ CD4⁺ T 細胞と同等レベルの CTLA-4 を発現していること、(3) *in vitro* で CD4⁺ T 細胞の増殖を抑制することおよび (4) IL-10 や TGF-β を高産生することを報告している。また、Ono ら [61] も、CD25⁺ CD4⁺ T 細胞だけでなく、GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T 細胞によっても自己免疫応答が抑制されていることを報告している。一方、Shimizu らは、コンベンショナル T 細胞が活性化した時に、GITR の発現がアップレギュレートされることおよび *in vitro* 下で誘導した CD25⁻ CD4⁺ T 細胞由来 GITR⁺ 細胞が CD25⁻ CD4⁺ T 細胞の増殖抑制活性を示さないことを報告している [48]。また、GITR を制御性 T 細胞よりむしろ活性化したエフェクター T 細胞のマーカーとする報告もある [66]。従って、GITR は抑制系の細胞に必ずしも発現している訳ではないと考えられる。しかし、本節で得られた結果からも、FTY720 と病因抗原の併用療法によって *in vivo* で、T 細胞増殖抑制活性および IL-10 の高産生能を有する GITR⁺ 非制御性 T 細胞を誘導できることが示された。GITR⁺ 非制御性 T 細胞は、FTY720 単独あるいは GPI₃₂₅₋₃₃₉ 単独では誘導されなかった。このことから、GITR⁺ 非制御性 T 細胞を誘導するには、細胞が密に存在している環境および高用量の抗原刺激の両方の要素が必要と考えられた。

IL-10 を高産生する細胞として、Type 1 regulatory T (Tr1) 細胞が知られている。Tr1 細胞は、IL-10 以外に中程度の TGF- β , IFN- γ , IL-5, 少量の IL-2 を産生し、IL-4 は産生しない [67, 68]。また、表面マーカーとしては、CD49b や lymphocyte activation gene (LAG-3) を安定かつ選択的にヒトおよびマウスいずれにおいても共発現していると報告されている [69]。Asnagli ら [70] は、II 型コラーゲン特異的 TCR トランスジェニックマウス由来の細胞から *in vitro* で増加させた II 型コラーゲン特異的 Tr1 クローンが、IL-10⁺ IL-4^{neg} IFN- γ ^{int} というサイトカインプロファイルを示し、かつ GITR, granzyme B, CTLA-4 および CD39 を発現し、この Tr1 クローンの移入が、コラーゲン誘導性関節炎に対して治療効果を示すことを報告している。本節で示した FTY720 と病因抗原の併用療法で誘導された GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T 細胞の機能は、今後詳細なサイトカインプロファイルについての検討が必要ではあるが、IL-10 を高産生するという点では、Tr1 細胞と近似している可能性がある。重要なポイントは、この Tr1 様細胞を FTY720 と病因抗原の併用療法が *in vivo* で誘導できることである。この知見は、病因抗原に FTY720 を併用することで、病因抗原単独では誘導できない新たな免疫不応答（アナジー）を誘導できる可能性を示唆している。

本節で得られた結果より、FTY720 と病因抗原の併用療法が高い免疫抑制活性を示す細胞集団を誘導することによって、新たな免疫寛容を形態し、効果的に関節リウマチに完全寛解を導入していることを明らかとした。

小 括

本章では、関節リウマチモデル動物のGPI₃₂₅₋₃₃₉誘導性関節炎に完全寛解を導入できるFTY720と病因抗原（GPI₃₂₅₋₃₃₉）の併用療法による新しい治療戦略を構築し、その作用メカニズムについて調べ、以下の知見を得た。

- 1) FTY720およびGPI₃₂₅₋₃₃₉単独療法は、いずれもGPI₃₂₅₋₃₃₉誘導性関節炎に対して優れた発症予防効果を示した。
- 2) FTY720およびGPI₃₂₅₋₃₃₉単独療法は、いずれもGPI₃₂₅₋₃₃₉誘導性関節炎に対して治療効果を示したものの、その効果は部分的であった。
- 3) FTY720とGPI₃₂₅₋₃₃₉の併用療法は、GPI₃₂₅₋₃₃₉誘導性関節炎に対して、①病因T細胞の細胞死（アポトーシス）の誘導、②病因T細胞の病因抗原に対する免疫不応答（アナジー）の誘導および③制御性T細胞の増殖を介して、優れた治療効果を示した。
- 4) FTY720とGPI₃₂₅₋₃₃₉の併用療法で治療した個体で、追加免疫後も再燃が抑制されたことから、本併用療法は、効果的に免疫寛容を誘導し、完全寛解を導入できる治療方法であることが明らかとなった。
- 5) FTY720とGPI₃₂₅₋₃₃₉の併用療法で治療した個体で、細胞活性抑制能を有し、IL-10高産生能をもつGITR⁺ 非制御性T細胞（GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T細胞）が増加していた。このことから、併用療法特異的に*in vivo*で増加したGITR⁺ 非制御性T細胞が免疫寛容の成立に大きく関与している可能性が示された。

結 語

本研究で得られた成果は以下の通りである。

多発性硬化症モデル動物の実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）において：

- 1) FTY720 は、優れた速効性の改善効果を発揮するが、休薬後、二次リンパ組織に隔離されていた病因抗原特異的 Th 細胞の再循環および再活性化に伴う重篤な再燃が生じることを明らかとした。
- 2) 1) でみられた再燃を、FTY720 および病因抗原（MOG₃₅₋₅₅）の併用投与が、病因リンパ球の二次リンパ組織から脊髄への移行性を低下させ、抑制できることを明らかとした。

関節リウマチモデル動物の glucose-6-phosphate isomerase peptide（GPI₃₂₅₋₃₃₉）誘導性関節炎において：

- 1) FTY720 および病因抗原（GPI₃₂₅₋₃₃₉）単独治療は、単独で優れた発症予防効果を示した。
- 2) FTY720 および GPI₃₂₅₋₃₃₉ 単独治療での、発症後の治療効果は部分的であった。
- 3) FTY720 と GPI₃₂₅₋₃₃₉ の併用治療が、治療早期から優れた効果を示し、病勢の悪化を顕著に抑制できることを明らかとした。治療完了時のリンパ節内では、アポトーシス細胞、免疫抑制分子（CTLA-4, PD-1）を発現した T 細胞および制御性 T 細胞が増加していた。
- 4) FTY720 と GPI₃₂₅₋₃₃₉ の併用治療が、追加免疫後の再燃を抑制できることを明らかとした。
- 5) FTY720 と GPI₃₂₅₋₃₃₉ の併用治療が、T 細胞増殖抑制活性を持ち IL-10 を高産生する GITR⁺ 非制御性 T 細胞（GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T 細胞）の誘導を介して、免疫寛容を導入している可能性を見い出した。

自己免疫疾患一般に、効果的かつ安全に病態形成の主軸となる自己免疫応答を制御し、長期間の寛解状態を誘導および維持させるには、単に免疫応答を抑制するのではなく、病因リンパ球に対して、特異的に免疫不応答（アナジー）

を誘導し、その状態が記憶として植付けられるような治療が理想である。本研究で見い出した「FTY720 と病因抗原の併用療法」に期待できる特色を以下に示す。

- 1) 病因抗原を用いた治療であるため、病因リンパ球特異的な免疫応答制御が期待できる。
- 2) FTY720 のリンパ球の二次リンパ組織への隔離作用が、1) の効果を高める（効果的）ことが期待できる。
- 3) FTY720 は、T 細胞や B 細胞の増殖、活性化には影響を示さないため、タクロリムス水和物、シクロスポリン等の免疫抑制薬とは異なり、重篤な日和見感染等の有害事象のリスクは低いと考えられる。即ち、安全性が担保できる。
- 4) 生体内で、「病因抗原」の静脈内投与による高用量の抗原暴露環境および「FTY720」による二次リンパ組織内の細胞高密度状態が生み出され、抑制能が高い細胞が効果的に誘導され、さらにはそれらの細胞によって寛解状態が維持されることが期待できる。

本研究で見い出した「FTY720 と病因抗原の併用療法」は、自己免疫疾患一般に、効果的かつ安全に免疫寛容を誘導し、完全寛解を導入できる可能性を秘めている。本治療方法の作用メカニズムをさらに詳細に解明し、一般化できれば、これによる臨床的貢献度は極めて高い。

謝 辞

フィンゴリモド塩酸塩 (FTY720) を用いた貴重な研究に携わる機会を与えて下さいました元摂南大学薬学部教授・京都大学名誉教授 藤多哲朗博士に深く感謝申し上げます。

貴重な御助言を下さいました大阪大学大学院 薬学研究科 応用医療薬科学専攻 細胞生理学分野 辻川和丈教授ならびに大阪大学免疫学フロンティア研究センター 実験免疫学 三上統久博士に深く感謝申し上げます。

研究に御協力下さいました摂南大学薬学部病態医科学研究室の教員，在學生ならびに卒業生の皆様に深く感謝申し上げます。

引用文献

1. Fujita T, Inoue K, Yamamoto S, Ikumoto T, Sasaki S, Toyama R, Chiba K, Hoshino Y, Okumoto T. Fungal metabolites. Part 11. A potent immunosuppressive activity found in *Isaria sinclairii* metabolite. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **47**(2): 208-215, 1994.
2. Kiuchi M, Adachi K, Kohara T, Minoguchi M, Hanano T, Aoki Y, Mishina T, Arita M, Nakao N, Ohtsuki M, Hoshino Y, Teshima K, Chiba K, Sasaki S, Fujita T. Synthesis and immunosuppressive activity of 2-substituted 2-aminopropane-1,3-diols and 2-aminoethanols. *J. Med. Chem.*, **43**(15): 2946-2961, 2000.
3. Brinkmann V, Pinschewer D, Chiba K, Feng L. FTY720: a novel transplantation drug that modulates lymphocyte traffic rather than activation. *Trends Pharmacol. Sci.*, **1**(2): 49-52, 2000.
4. Kohno T, Tsuji T, Hirayama K, Iwatsuki R, Hirose M, Watabe K, Yoshikawa H, Kohno T, Matsumoto A, Fujita T, Hayashi M. A novel immunomodulator, FTY720, prevents development of experimental autoimmune myasthenia gravis in C57BL/6 mice. *Biol. Pharm. Bull.*, **28**(4): 736-739, 2005.
5. Kohno T, Tsuji T, Hirayama K, Watabe K, Matsumoto A, Kohno T, Fujita T. A novel immunomodulator, FTY720, prevents spontaneous dermatitis in NC/Nga mice. *Biol. Pharm. Bull.*, **27**(9): 1392-1396, 2004.
6. Tsuji T, Yoshida Y, Iwatsuki R, Inoue M, Fujita T, Kohno T. Therapeutic approach to steroid-resistant dermatitis using novel immunomodulator FTY720 (Fingolimod) in combination with betamethasone ointment in NC/Nga mice. *Biol. Pharm. Bull.*, **35**(8): 1314-1319, 2012.
7. Tsuji T, Yoshida Y, Fujita T, Kohno T. Therapeutic approach to mite-induced intractable dermatitis using novel immunomodulator FTY720 (fingolimod) in combination with betamethasone ointment in NC/Nga mice. *Arerugi*, **61**(7): 948-958, 2012.
8. Tsuji T, Inoue M, Yoshida Y, Fujita T, Kaino Y, Kohno T. Therapeutic approach for type 1 diabetes mellitus using the novel immunomodulator FTY720

- (fingolimod) in combination with once-daily injection of insulin glargine in non-obese diabetic mice. *J. Diabetes Investig.*, **3**(2): 132-137, 2012.
9. Tsuji T, Yoshida Y, Fujita T, Kohno T. Oral therapy for type 1 diabetes mellitus using a novel immunomodulator, FTY720 (fingolimod), in combination with sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, examined in non-obese diabetic mice. *J. Diabetes Investig.*, **3**(5): 441-448, 2012.
 10. Brinkmann V, Davis MD, Heise CE, Albert R, Cottens S, Hof R, Bruns C, Prieschl E, Baumruker T, Hiestand P, Foster CA, Zollinger M, Lynch KR. The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J. Biol. Chem.*, **277**(24): 21453-21457, 2002.
 11. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*, **427**(6972): 355-360, 2004.
 12. Gräler MH, Goetzl EJ. The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors. *FASEB J.*, **18**(3): 551-553, 2004.
 13. Chiba K, Yanagawa Y, Masubuchi Y, Kataoka H, Kawaguchi T, Ohtsuki M, Hoshino Y. FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. I. FTY720 selectively decreases the number of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing. *J. Immunol.*, **160**(10): 5037-5044, 1998.
 14. Yanagawa Y, Sugahara K, Kataoka H, Kawaguchi T, Masubuchi Y, Chiba K. FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. II. FTY720 prolongs skin allograft survival by decreasing T cell infiltration into grafts but not cytokine production in vivo. *J. Immunol.*, **160**(11): 5493-5499, 1998.
 15. Brinkmann V, Chen S, Feng L, Pinschewer D, Nikolova Z, Hof R. FTY720 alters lymphocyte homing and protects allografts without inducing general immunosuppression. *Transplant. Proc.*, **33**(1-2): 530-531, 2001.

16. Mehling M, Johnson TA, Antel J, Kappos L, Bar-Or A. Clinical immunology of the sphingosine 1-phosphate receptor modulator fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Neurology*, **76**(8 Suppl 3): S20-S27, 2011.
17. Jutel M, Kosowska A, Smolinska S. Allergen Immunotherapy: Past, Present, and Future. *Allergy Asthma Immunol. Res.*, **8**(3): 191-197, 2016.
18. Okuda M. A long-term follow-up study after discontinuation of immunotherapy for Japanese cedar pollinosis. *Arerugi*, **55**(6): 655-661, 2006.
19. Kira J, Ishizu T, Osoegawa M. The Research Committee of Neuroimmunological Diseases. Multiple sclerosis in Japan: Nationwide surveys over 30 years. *Neurology Asia*, **13**: 131-143, 2008.
20. 多発性硬化症治療ガイドライン 2010. 一般社団法人日本神経学会, <https://www.neurology-jp.org/guidelinem/koukasyo.html>
21. 多発性硬化症 / 視神経脊髄炎 . 難病情報センター , <http://www.nanbyou.or.jp/entry/3807>.
22. 三宅幸子, 山村隆. 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE), *CRJ Letters*, **17**(2): 1-8, 2008.
23. Stromnes IM, Goverman JM. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat. Protoc.*, **1**(4): 1810-1819, 2006.
24. Kataoka H, Sugahara K, Shimano K, Teshima K, Koyama M, Fukunari A, Chiba K. FTY720, sphingosine 1-phosphate receptor modulator, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibition of T cell infiltration. *Cell. Mol. Immunol.*, **2**(6): 439-448, 2005.
25. Cohen JA, Barkhof F, Comi G, Hartung HP, Khatri BO, Montalban X, Pelletier J, Capra R, Gallo P, Izquierdo G, Tiel-Wilck K, de Vera A, Jin J, Stites T, Wu S, Aradhye S, Kappos L; TRANSFORMS Study Group. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.*, **362**(5): 402-415, 2010.
26. Gaur A, Wiers B, Liu A, Rothbard J, Fathman CG. Amelioration of autoimmune encephalomyelitis by myelin basic protein synthetic peptide-induced anergy. *Science*, **258**(5087): 1491-1494, 1992.

27. Zhang GX, Liu TT, Ventura ES, Chen Y, Rostami A. Reversal of spontaneous progressive autoimmune encephalomyelitis by myelin basic protein-induced clonal deletion. *Autoimmunity*, **31**(4): 219-227, 1999.
28. Li H, Ciric B, Yang J, Xu H, Fitzgerald DC, Elbehi M, Fonseca-Kelly Z, Yu S, Zhang GX, Rostami A. Intravenous tolerance modulates macrophage classical activation and antigen presentation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.*, **208**(1-2): 54-60, 2009.
29. Jiang Z, Li H, Fitzgerald DC, Zhang GX, Rostami A. MOG(35-55) i.v suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis partially through modulation of Th17 and JAK/STAT pathways. *Eur. J. Immunol.*, **39**(3): 789-799, 2009.
30. Gumanovskaya ML, Myers LK, Rosloniec EF, Stuart JM, Kang AH. Intravenous tolerization with type II collagen induces interleukin-4-and interleukin-10-producing CD4⁺ T cells. *Immunology*, **97**(3): 466-473, 1999.
31. コパキソン皮下注 10mg シリンジ, インタビューフォーム,
https://www.takedamed.com/mcm/medicine/download.jsp?id=167&type=INTERVIEW_FORM
32. Weber MS, Prod'homme T, Youssef S, Dunn SE, Rundle CD, Lee L, Patarroyo JC, Stüve O, Sobel RA, Steinman L, Zamvil SS. Type II monocytes modulate T cell-mediated central nervous system autoimmune disease. *Nat. Med.*, **13**(8): 935-943, 2007.
33. Racke MK, Lovett-Racke AE. Glatiramer acetate treatment of multiple sclerosis: an immunological perspective. *J. Immunol.*, **186**(4): 1887-1890, 2011.
34. Lalive PH, Neuhaus O, Benkhoucha M, Burger D, Hohlfeld R, Zamvil SS, Weber MS. Glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis: emerging concepts regarding its mechanism of action. *CNS Drugs*, **25**(5): 401-414, 2011.
35. Kearney ER, Pape KA, Loh DY, Jenkins MK. Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. *Immunity*, **1**(4): 327-339, 1994.
36. Choi JW, Gardell SE, Herr DR, Rivera R, Lee CW, Noguchi K, Teo ST, Yung YC, Lu M, Kennedy G, Chun J. FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal

- model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) modulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108**(2): 751-756, 2011.
37. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **31**(3): 315-324, 1988.
 38. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Ménard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawski-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovský J, Wolfe F, Hawker G. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.*, **62**(9): 2569-2581, 2010.
 39. Tanaka Y, Takeuchi T, Mimori T, Saito K, Nawata M, Kameda H, Nojima T, Miyasaka N, Koike T; RRR study investigators. Discontinuation of infliximab after attaining low disease activity in patients with rheumatoid arthritis: RRR (remission induction by Remicade in RA) study. *Ann. Rheum. Dis.*, **69**(7): 1286-1291, 2010.
 40. Iwanami K, Matsumoto I, Tanaka Y, Inoue A, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. Iwanami K, Matsumoto I, Tanaka Y, Inoue A, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. Arthritogenic T cell epitope in glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, **10**(6): R130, 2008.
 41. Matsumoto I, Zhang H, Yasukochi T, Iwanami K, Tanaka Y, Inoue A, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. Therapeutic effects of antibodies to tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6 and cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 immunoglobulin in mice with glucose-6-phosphate isomerase induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, **10**(3): R66, 2008.
 42. Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nat. Protoc.*, **2**(5): 1269-1275, 2007.

43. Auchincloss H, Turka LA. CTLA-4: not all costimulation is stimulatory. *J. Immunol.*, **187**(7): 3457-3458, 2011.
44. Perez VL, Van Parijs L, Biuckians A, Zheng XX, Strom TB, Abbas AK. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity*, **6**(4): 411-417, 1997.
45. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, Honjo T. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int. Immunol.*, **8**(5): 765-772, 1996.
46. Fife BT, Guleria I, Gubbels Bupp M, Eagar TN, Tang Q, Bour-Jordan H, Yagita H, Azuma M, Sayegh MH, Bluestone JA. Insulin-induced remission in new-onset NOD mice is maintained by the PD-1-PD-L1 pathway. *J. Exp. Med.*, **203**(12): 2737-2747, 2006.
47. Iwanami K, Matsumoto I, Tanaka-Watanabe Y, Inoue A, Mihara M, Ohsugi Y, Mamura M, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Kishimoto T, Sumida T. Crucial role of the interleukin-6/interleukin-17 cytokine axis in the induction of arthritis by glucose-6-phosphate isomerase. *Arthritis Rheum.*, **58**(3): 754-763, 2008.
48. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat. Immunol.*, **3**(2): 135-142, 2002.
49. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjyoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.*, **204**(6): 1257-1265, 2007.
50. Ernst PB, Garrison JC, Thompson LF. Much ado about adenosine: adenosine synthesis and function in regulatory T cell biology. *J. Immunol.*, **185**(4): 1993-1998, 2010.
51. Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity*, **38**(3): 414-423, 2013.
52. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, Shevach EM. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member,

- differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells. *J. Immunol.*, **184**(7): 3433-3441, 2010.
53. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, **26**, 677-704, 2008.
 54. Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, Matsuda H, Aoki M, Tanno Y, Shin T, Tsuchiya H, Pardoll DM, Okumura K, Azuma M, Yagita H. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J. Immunol.*, **169**(10): 5538-5545, 2002.
 55. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.*, **192**(7): 1027-1034, 2000.
 56. Vignali D. How many mechanisms do regulatory T cells need? *Eur. J. Immunol.*, **38**(4): 908-911, 2008.
 57. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, **133**(5): 775-787, 2008.
 58. Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, Kitabayashi I, Nagamura Y, Nomura T, Miyachi Y, Tsukada T, Sakaguchi S. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature*, **446**(7136): 685-689, 2007.
 59. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, Bates DL, Guo L, Han A, Ziegler SF, Mathis D, Benoist C, Chen L, Rao A. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell*, **126**(2): 375-387, 2006.
 60. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S. CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science*, **322**(5899): 271-275, 2008.
 61. Ono M, Shimizu J, Miyachi Y, Sakaguchi S. Control of autoimmune myocarditis and multiorgan inflammation by glucocorticoid-induced TNF receptor family-related protein(high), Foxp3-expressing CD25⁺ and CD25⁻ regulatory T cells. *J. Immunol.*, **176**(8): 4748-4756, 2006.

62. Liu G, Yang K, Burns S, Shrestha S, Chi H. The S1P(1)-mTOR axis directs the reciprocal differentiation of T(H)1 and T(reg) cells. *Nat. Immunol.*, **11**(11), 1047-1056, 2010.
63. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int. Immunol.*, **10**(12): 1969-1980, 1998.
64. Schubert D, Maier B, Morawietz L, Krenn V, Kamradt T. Immunization with glucose-6-phosphate isomerase induces T cell-dependent peripheral polyarthritis in genetically unaltered mice. *J. Immunol.*, **172**(7): 4503-4509, 2004.
65. Uraushihara K, Kanai T, Ko K, Totsuka T, Makita S, Iiyama R, Nakamura T, Watanabe M. Regulation of murine inflammatory bowel disease by CD25⁺ and CD25⁻ CD4⁺ glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.*, **171**(2): 708-716, 2003.
66. Nocentini G, Ronchetti S, Cuzzocrea S, Riccardi C. GITR/GITRL: more than an effector T cell co-stimulatory system. *Eur. J. Immunol.*, **37**(5): 1165-1169, 2007.
67. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, **389**(6652): 737-742, 1997.
68. Roncarolo MG, Levings MK, Traversari C. Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. *J. Exp. Med.*, **193**(2): F5-F9, 2001.
69. Gagliani N, Magnani CF, Huber S, Gianolini ME, Pala M, Licona-Limon P, Guo B, Herbert DR, Bulfone A, Trentini F, Di Serio C, Bacchetta R, Andreani M, Brockmann L, Gregori S, Flavell RA, Roncarolo MG. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat. Med.*, **19**(6): 739-746, 2013.
70. Asnagli H, Martire D, Belmonte N, Quentin J, Bastian H, Boucard-Jourdin M, Fall PB, Mausset-Bonnefont AL, Mantello-Moreau A, Rouquier S, Marchetti I, Jorgensen C, Foussat A, Louis-Plence P. Type 1 regulatory T cells specific for collagen type II as an efficient cell-based therapy in arthritis. *Arthritis. Res. Ther.*, **16**(3): R115, 2014.