

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

若手研究者奨励研究報告書

目 次

課題番号

第1分野

20000	13001	アドレノメデュリン投与による重症心不全治療の臨床評価	永谷 憲歳	……	1
1009A	13002	子宮体癌に対するヒト型モノクローナル抗体の作製	福地 剛	……	5
1008A	13003	新しい変異導入法の開発による神経疾患モデルマウスの樹立	笹岡 俊邦	……	10
1010A	13004	病原細菌のコミュニケーションシステムを標的とした医薬品の開発	阿部 章夫	……	15
1006A	13005	糖部立体配座を固定した人工核酸によるアンチセンス医薬品の開発	小比賀 聡	……	20
1007A					

第2分野

1011A	23001	慢性C型肝炎に対するインターフェロン治療効果に関与する宿主因子の解析と医療への応用	土方美奈子	……	29
1012A	23002	ゲノム情報に基づいた移植免疫機構の解明と免疫抑制療法	梨井 康	……	35
1016A	23003	ヒトヘルペスウイルス8による悪性腫瘍発症機構の解明と医療への応用	片野 晴隆	……	42
1013A	23004	血管内造血機構の解明と臍腸間膜動脈より新規造血幹細胞因子の単離	高倉 伸幸	……	47
1014A	23005	BRS-3安定発現細胞系を用いた新規摂食調節ペプチドの同定と病態生理学的意義の解明	宮里 幹也	……	52
1015A	23006	ATP受容体を介した痛み情報伝達機序の解明と医療への応用	小泉 修一	……	57
1018A	23007	トリプトファンによる細胞性免疫の制御	五條 理志	……	61
1019A	23008	気管支喘息における気道リモデリングの制御についての検討	中尾 篤人	……	66
1017A	23009	顔面神経再生に際して発現制御を受ける遺伝子データベースの構築	赤澤 智宏	……	69

第3分野

1020A	33001	循環器病治療薬開発に不可欠な小動物における循環動態テレメトリシステムの開発	佐藤 隆幸	……	73
1022A	33002	有機アニオントランスポーターを介した小腸および腎臓における排出・分泌機構	崔 吉道	……	77
1021A	33003	組換えヒトP450酵素の代謝反応を利用した医薬品等の評価方法の開発	山崎 浩史	……	81

第4分野

1025A	43001	腹膜透析の重篤な合併症である硬化性被嚢性腹膜炎 (Sclerosing Encapsulating Peritonitis) の診断と治療に関する研究	平原 一郎	……	89
1023A	43002	多発性硬化症における病原性T細胞特異的抑制方法の検討	三宅 幸子	……	98
1024A	43003	熱帯病に対する新たな治療薬の開発に関する研究	小出 達夫	……	103

20000	第5分野		
1026A	53001	カルボシラン dendリマーを基本骨格としたペロ毒素中和剤の開発	西川喜代孝 …… 109
1027A	53002	新規抗酸化酵素ペルオキシレドキシンを標的とする抗マラリア薬の開発に関する研究	河津信一郎 …… 113
1028A	53003	Non-typable Haemophilus influenzae 由来リポオリゴ糖抗原に対するペプチドミミックのワクチン応用についての研究	橋本 雅仁 …… 119
1029A	53004	RNAヘリカーゼを標的とする抗ウイルス剤の開発	清水 博之 …… 124
1030A	53005	薬用植物の分子エンジニアリングによる抗酸化物質生産の改良	山崎 真巳 …… 132
	第6分野		
1031A	63001	分子間相互作用制御による高度安定型タンパク質製剤の設計	伊豆津健一 …… 137
1032A	63002	生分解性を有する新規な化学合成ハイドロゲルの開発と組織再建スキャホールドへの応用	山岡 哲二 …… 140
1033A	第7分野		
	73001	ヒト破骨細胞と骨芽細胞培養系を用いた薬物の有効性と安全性に関する検討	和田 誠基 …… 151

ゲノム情報に基づいた移植免疫機構の解明と免疫抑制療法

所 属 国立小児病院小児医療研センター
実験外科生体工学部
研究者 梨井 康

要 旨

臓器移植分野における移植免疫寛容状態を作り出す一連の遺伝子の発現について、実験動物ならびに生体肝移植後の臨床症例の材料を用い、細胞及び分子生物学の手法より解析した。研究結果から移植後寛容に関わる細胞集団及び関連遺伝子発現情報の整理ができ、新しい免疫抑制遺伝子の発見を期待する。

1. 研究目的

ヒトゲノムプロジェクトの進展によって、ヒト遺伝子の完全な配列の解明が現実のものとなろうとしている現在、遺伝子配列情報を病気の予防や診断、治療法の開発につなげる道を切り開くことが次の課題として浮かび上がってきている。

臓器移植の基礎ならびに臨床の分野では、移植後一定期間免疫抑制剤を使用した後、宿主に移植免疫寛容が成立する例があることを認めている。臨床症例及び動物実験で免疫寛容状態を誘導し、維持する機序を細胞免疫学の観点から解明するとともに、近年飛躍的な発展を見せている分子生物学の手法を取り入れ、寛容状態を作り出す関連遺伝子の発現を解明することをこの研究の目的としている。そのために、最近さまざまな分野で応用されているPCRを用いたmRNAのDifferential Display法(DD法)と急速に発展してきたDNAチップ法などの最先端技術を用いて移植免疫寛容関連遺伝子を解明していく。

動物実験で得られた寛容動物と生体肝移植後の臨床症例から、新しい移植免疫寛容誘導又は維持に関連した遺伝子の発現を探索することは極めて重要である。最終的には免疫反応を抑制したり、免疫寛容を成立させる遺伝子のDNAチップを作成することを目標としている。これにより、移植患者の個々の遺伝子発現の状況に応じて、免疫抑制剤を減量したり、中止したりすることが的確にできるようになり、また薬剤の再投与、増量なども安全にできるようになる。すなわち、個々の患者ニーズに合わせた遺伝子薬物療法が行えるようになるわけである。

2. 研究方法

本研究では実験動物ならびに臨床症例からの材料を用い、細胞生物学的な検討すると同時にDD法、DNAチップ法などをより拒絶反応を抑制する関係遺伝子の発現を解析をする。

(1) 臓器移植免疫寛容動物の作製及び解析

同種異系ラットの肝臓移植を行い、一定期間の免疫抑制療法によって免疫寛容動物を作成し、従来の細胞免疫学の方法を用いてそれらを解析する。同時に寛容動物から経時的に末梢血液、リンパ節およびグラフトなどからリンパ球を分離し、それからRNAを抽出後、市販のDNAチップを用い、既知遺伝子の発現プロファイルを明らかにする。また、DD法、DNAチップにて、新規遺伝子配列決定に至る実験プロセスを確立する。配列決定された遺伝子については、発現の再現性を確認し、cDNAライブラリから全長遺伝子の解明を行う。

(2) 臨床生体肝移植後の免疫抑制剤離脱症例での解析

京都大学移植外科における生体肝移植の症例数は600例となり、生存率は約80%で、本邦のみならず世界的にも単一の施設として最多の経験と良好な成績を蓄積しつつある。それらの症例の中には

免疫抑制剤を完全離脱して免疫寛容状態に至った重要な症例を現在まで20数例有している。当施設の協力の基に、移植後免疫抑制剤離脱症例に関して、合併症などのやむを得ない理由で免疫抑制剤をやめたケースと計画的に免疫抑制剤を離脱したケースを分け、末梢血液の提供を受ける。さらに临床上必要な時に施行された肝生検組織の一部の提供も受ける。得られた試料を用いてRNAを抽出後、DD法、DNAチップによる遺伝子発現の解析を行う。以上より、臓器移植後に拒絶反応を抑制する関連遺伝子の情報データベースの設計開発、及びデータ解析システムの作成を行なう。

(3) 倫理委員会への申請

人からの試料の採取に関しては、申請者が所属する国立小児病院及び研究協力機関である京都大学医学部の倫理委員会への申請手続きを行う。また、患者の臨床所見、治療歴、検査データなどの全ての情報は匿名化した上で、プライバシーに十分配慮しながら管理する。

3. 研究成果

(1) 臓器移植免疫寛容動物の作製及び解析:

(a) 細胞生物学による解析:

今回、臓器移植後に免疫抑制剤FK506を投与することにより同種異系ラット肝移植モデルにおいて、免疫寛容を誘導したラットを作成した。本作製ラットの移植片が100日を超えた後、従来の細胞免疫学的手法を用いて末梢血のリンパ球を分離した。その後FACSにて細胞表面の分子について解析を行い、CD4⁺、CD25⁺細胞集団がNaiveのラットより有意に増加していることを明らかにした。2匹の寛容ラットの末梢血リンパ球表面のCD4⁺、CD25⁺共陽性細胞はそれぞれ28.3%、15.8%なのに対して、Naiveのラットでは10.8%であった(図1)。一方、免疫寛容動物から得られたリンパ球の養子移植実験を行った(図2)。control群における心移植片の生着期間が2, 9日であるのに対して、免疫寛容を誘導したラットから分離したリンパ球を養子移植した群の心移植片の生着期間は14, 17, 20, 25, 30日であり、心移植片の顕著な延長が見られた。これにより免疫調節機能を持つリンパ球の存在が確認できた(表1)。

(b) Differential Display (DD) 法による遺伝子発現の解析:

寛容動物の末梢血から分離したリンパ球を用いてRNAの抽出をした後、アンカープライマーにより逆転写反応させ、PCRを行った。変性アクリルアミドゲルによってPCR産物の電気泳動を行った。その結果から、有意に変動があった174バンドのクローニングを実施した。そのうち16バンドの108クローンの塩基配列決定を行い、NCBIのBLAST検索後、既知遺伝子11、EST3、未知遺伝子2であることが分かった(表2)。それら遺伝子の塩基配列を基に、現在プライマー及びプローブを設定し、定量RT-PCRを行い、遺伝子発現の再確認を進めているところである。

(c) DNAチップによる遺伝子発現の解析:

寛容動物の末梢血から分離したリンパ球を用いてRNAを抽出した後、Affymetrix社のRat Genome U34Aアレイ(7000種のラット全長遺伝子を含む)を用いて、遺伝子発現プロファイルを解析した。発現データの二次元クラスター解析を行い、異系肝移植モデルによる寛容ラットと同系移植ラットのプロファイルを比較し、さらにFACSによる解析結果及びリンパ球養子移植実験の結果との関連について検討した。寛容ラットの末梢血リンパ球では、既存の免疫抑制または免疫調整遺伝子の高い発現が認められた。また、これまで免疫寛容との関連が示されていなかった遺伝子が多数見つかった。その解析結果の一部(Ratio: 4.29 ~ 4.99)を表3に示した。またその意義について、現在検討を進めている。さらに、免疫寛容との関連性が考えられる非同定遺伝子のクローニングも進めている。

(2) 臨床における生体肝移植後の免疫抑制剤離脱症例の解析:

600例におよぶ生体肝移植症例の中から、免疫抑制剤離脱症例に絞り込み、臨床所見、治療歴、検査データなどの情報解析を行った。その中から合併症などのやむを得ない理由で免疫抑制剤をやめたケースと計画的に免疫抑制剤を離脱したケースを分け、さらに健常者を対照群とし、血液、肝生検組織を採取、保存した。京都大学の倫理委員会による申請が承認されしだい、DD法、DNAチップを用いる解析を行う。

(3) 倫理委員会への申請

本研究に関わる両施設の倫理委員会への申請を行い、国立小児病院においては承認を得られた。京都大学においては今年4月に承認が得られる予定である。

4. 考察

ヒトゲノムプロジェクトの成果は、遺伝病や一部の癌に関する遺伝子治療として応用されつつある。しかしながら、臓器移植分野においては免疫寛容遺伝子の発見が他の分野に比べ遅れている。また発見された遺伝子そのものも未だ直接治療に利用しようという試みは現在ほとんど行われていない。臓器移植後は免疫抑制剤を原則として一生飲み続けなければならない。一方、京都大学移植外科において、生体肝移植症例600例のうち生存率は約80%で、さらに20例以上もの症例で免疫抑制剤を離脱できた。この実績は本邦のみならず世界的にも単一の施設として最多の経験と良好な成績である。

臓器移植の分野では、移植後一定期間免疫抑制剤を使用した後、宿主に移植免疫寛容が成立する例が確認されている。今回は臨床症例及び動物実験で免疫寛容状態を誘導し、維持する機序を細胞免疫学の観点から解析することを目的とした。免疫抑制剤FK506の投与により、同種異系ラット肝移植モデルにおいて免疫寛容ラットを作製した。寛容ラットの末梢血からリンパ球を分離し解析を行った。その結果、CD4⁺、CD25⁺の細胞集団がNaiveのラットに比べて有意に増加していることを明らかにした。この細胞集団は、最近文献で報告された免疫反応を調節するリンパ球集団と一致した。また、このリンパ球集団の養子移植実験を行ったところ、免疫調節機能を持つリンパ球の存在が確認された。これらの細胞生物学的解析から得られた結果を踏まえ、近年飛躍的な発展を見せている分子生物学の手法を取り入れ、寛容状態に関与のある遺伝子集団の発現を解明した。

DD法とは発現の見られるmRNAをポリアクリルアミドゲル上のバンドとして表示する方法である。この方法は、異なった細胞間、あるいは異なった条件下の細胞間で発現している遺伝子の違い(differentially expressed gene)を同定することができる。このように異なった細胞間で直接mRNAを比較する事によって、細胞集団間のmRNAの発現の差(特徴)を明らかにすることができる。DD法の特徴は、安価かつ簡便に少量のsampleからmRNAを増幅することにより、多数のmRNAを比較できるところである。よって、細胞のmRNA発現の変化を全体的に観察したいとき、また免疫寛容マーカーなど変化の指標になるマーカー探索には特に有用と思われる。今回の研究ではDD法による遺伝子発現の解析を行った結果、174の有意に変動が見られたバンドが見つかった。それらのクローニングを実施し、そのうちの16バンドから108クーロンの塩基配列決定を行った。NCBIにてBLAST検索を行った結果、既知遺伝子11、EST3、未知遺伝子2であった。現在、それらの遺伝子配列をもとに、プライマー及びプローブを作製し、定量RT-PCRによる遺伝子発現の再確認を進めている。

一方、高密度オリゴヌクレオチドアレイによる遺伝子発現解析は細胞あるいは組織における網羅的な発現プロファイルの探索を可能とし、その定量性についてはSAGE法との比較などから実証されている。移植後宿主が寛容状態になるには、リンパ球による調整機構が働いていることが予測される。免疫寛容個体から分離したリンパ球の遺伝子発現プロファイルを解析し、特徴的な遺伝子発現パターンを同定する事により、診断や個別の治療計画を選択することが可能となる。今回の研究では、DNAチップを用いて遺伝子発現の解析を行うと共に、FACSの解析結果及びリンパ球養子移植実験の結果との関連について検討した。既知の免疫抑制、または免疫調整遺伝子の高い発現が寛容ラットの末梢血リンパ球で認められた。また、これまで免疫寛容との関連が示されていない遺伝子が多数見つかった。その遺伝

子の免疫抑制に及ぼす機能および発現の再確認について検討を進めている。さらに、未だ同定されていない遺伝子を新たに同定する作業を進めている。

今回、動物実験で得られた寛容ラットの移植免疫寛容誘導および維持に関連した遺伝子の解析から得られた研究結果は、生体肝移植後の臨床症例から得られる関連遺伝子の発現解析の基礎的データとして極めて重要である。倫理委員会の許可が得られていないため、生体肝移植後寛容誘導できた患者からの解析ができなかった。しかし、本研究計画では最終的に寛容動物と生体肝移植後の臨床症例から関連遺伝子を探索し、その結果から移植免疫反応の抑制、あるいは免疫寛容を成立させる遺伝子を簡便に診断することができるDNAチップを作成を目標としている。臨床及び基礎的研究から得られた結果を用い、臨床的には移植患者の遺伝子発現情報の解析と整理を行うことにより、病態及び拒絶反応の診断、また基礎的には新しい免疫抑制遺伝子の発見が期待できる。そのような遺伝子を解明することにより、移植患者において免疫抑制剤を中止あるいは減量することが可能になり、さらには免疫寛容を誘導する遺伝子を導入することにより免疫寛容状態を成立させることも可能になると考えられる。さらにこれにより、移植患者の遺伝子発現の状況に応じた、免疫抑制剤の増減、中止や再投与が的確かつ安全にできるようになり、個々の患者ニーズに合わせた遺伝子薬物療法が行えると考えられる。

5. まとめ

臓器移植分野における移植免疫寛容状態を作り出す一連の遺伝子の発現について、寛容ラットの末梢血リンパ球を用い、細胞免疫学及び分子生物学的手法により解析した。研究結果から移植後寛容に関わる細胞集団及び関連遺伝子の同定を行った。今後新たな免疫抑制遺伝子の発見が期待される。

6. 研究発表

- 1) X-K. Li, M. Fujino, A. Sugioka, M. Morita, T. Okuyama, L. Guo, N. Funeshima, H. Kimura, S. Enosawa, H. Amemiya, and S. Suzuki. Fulminant Hepatitis by Fas-Ligand Expression in MRL-*lpr/lpr* Mice Grafted with Fas-Positive Livers and Wild-Type Mice with Fas-Mutant Livers. **Transplantation** 71(4):503-508, 2001.
- 2) X-K. Li, M. Fujino, L. Guo, T. Okuyama, N. Funeshima, M. Hashimoto, K. Okabe, H. Yaginuma, K. Mikoshiba, S. Enosawa, H. Amemiya, and S. Suzuki. Inhibition of Fas-mediated fulminant hepatitis in CrmA gene-transfected mice. **Biochem Biophys Res Commun** 273: 101-109, 2000
- 3) M. Ohba, X-K. Li, Y. Kita, S. Enosawa, N. Funeshima, H. Nagai, H.Q. Zhang, T. Okuyama, S. Ogoshi, S. Sasaguri, H. Amemiya, S. Suzuki. The combined therapy of CTLA4Ig-gene transfection with FTY720: FTY720 may enhance the effect of gene therapy. **World J Surg** (in press)

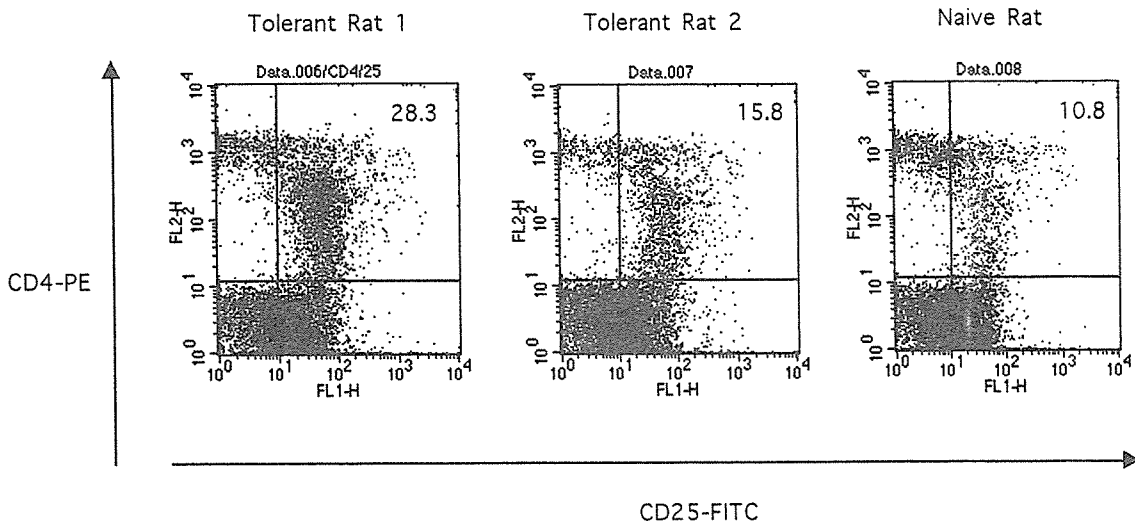


Fig. 1 移植後寛容ラット末梢血リンパ球表面CD4、CD25抗原の発現

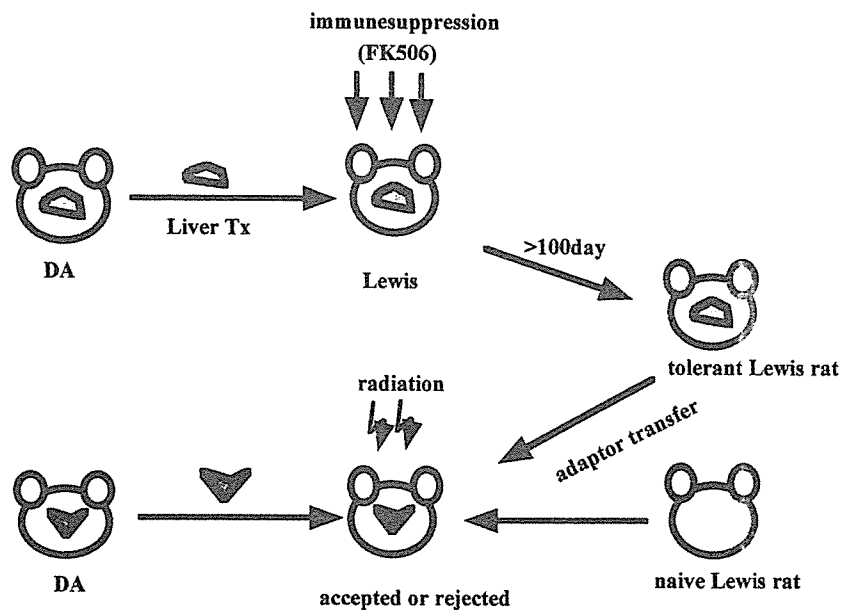


Fig.2 移植寛容ラットリンパ球の養子移植実験模型図

表. 1. 移植寛容ラットリンパ球の養子移植後心移植生存率

Treatment	n	Survival	Median	P ^a
No-Treatment	15	5x2, 6x12, 7	6	
adoptive transfer (control)	2	2, 9	5.5	
adoptive transfer (Tolerant)	5	14, 17, 20, 25, 30	20	p<0.001

adoptive transfer studies were performed in which PBL (4.5~28 million cells) from long-term(>100 days) experimental hepatic engrafted hosts were infused intravenously into middle γ -irradiated (600 R) syngeneic Lewis second recipients.

表. 2. Differential Display (DD) 法による寛容ラット遺伝子発現の解析

	Band ID	size(bp)	Identities	Description
1	B62	600	known	Rattus norvegicus monocyte differentiation antigen CD14 gene, promoter region and partial cds
2	B139	240	EST	not found
3	B225	480	known	Rattus norvegicus mitochondrial genome.
4	B61	790	known	Mouse mRNA for talin.
5	B73	590	known	musculus endothelial cell activated protein C receptor(EPCR) mRNA
6	B82	330	known	Rat hepatic steroid hydroxylase IIA2 (CYP2A2) gene, exons 1 and 2
7	B91	500	known	beta-hydroxysteroid dehydrogenase isomerase type II.2 [rats, liver, mRNA, 2675nt
8	B93	320	unknown	
9	B131	310	EST	rat embryo, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone
10	B173	170	EST	Rattus norvegicus cDNA clone
11	B205	225	unknown	
12	B227	420	known	Rat Band 3 mRNA encoding kidney band 3 Cl ⁻ /HW ⁻ 3- anion exchanger
13	B70	170	known	norvegicus retroviral-like ovarian specific transcript 30-1 mRNA
14	B94	490	known	Rattus norvegicus c-HA-ras proto-oncogene mechanism sequence
15	B102	480	known	Mus musculus adult male liver cDNA, RIKEN full-length enriched library
16	B178	640	known	Rattus rattus guanine nucleotide-releasing protein (mss4) mRNA

表.3. DNAチップによる寛容ラット遺伝子発現の解析

Probe Set	UniGene	Description	Symbol	Fold-1	Fold-2
U09870	Rn.10028	major vault protein	Mvp	4.99	5.24
M37584	Rn.3636	H2A histone family, member Z	H2afz	4.96	5.44
L26292		unknown		4.92	5.61
U42627	Rn.4313	Rattus norvegicus dual-specificity protein tyrosine phosphatase		4.82	5.18
M15428	Rn.5936	Murine leukemia viral (v-raf-1) oncogene homolog	Raf1	4.81	5.00
M38135	Rn.1997	Cathepsin H	Ctsh	4.72	3.50
S44606		unknown		4.68	4.86
AF093773	Rn.1504	Rattus norvegicus cytosolic malate dehydrogenase (Mdh) mRNA		4.65	4.85
K01933	Rn.10950	Haptoglobin	Hp	4.62	3.82
U23056	Rn.2382	R.norvegicus mRNA for C-CAM2a isoform		4.60	4.23
U56839	Rn.11102	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 2	P2ry2	4.60	4.33
M22756	Rn.11092	Rat 24-kDa subunit of mitochondrial NADH dehydrogenase		4.56	4.79
D12769	Rn.19481	Rattus norvegicus mRNA for BTE binding protein, complete		4.55	4.18
L22655	Rn.10519	Rat anti-acetylcholine receptor antibody gene, kappa-chain, V		4.51	4.66
X67788	Rn.773	ezrin	Vil2	4.51	4.94
M18330		unknown		4.50	4.28
D12770	Rn.4092	Rattus norvegicus mRNA for mitochondrial adenine nucleotide		4.47	4.07
D26180	Rn.10071	serine/threonine kinase 3	Prkcl1	4.45	4.78
S72594		unknown		4.45	4.46
D12771	Rn.3746	Rattus norvegicus mRNA for mitochondrial adenine nucleotide		4.44	4.33
X57523	Rn.10763	R.norvegicus mtp1 mRNA		4.42	3.94
L34262	Rn.1574	palmitoyl-protein thioesterase	Ppt	4.41	4.42
AF071225	Rn.1893	cyclophilin B	Ppib	4.41	5.58
U21719		unknown		4.40	5.53
U16025	Rn.54483	RT1 class Ib gene, locus M3	RT1-M3	4.40	4.23
M21060	Rn.6059	Superoxide dismutase 1, soluble	Sod1	4.38	5.15
M57664	Rn.1472	Creatine kinase, brain	Ckb	4.37	3.75
X54510	Rn.5790	R.norvegicus mRNA for coupling factor 6 of mitochondrial A		4.30	4.78
U03416	Rn.11005	Rattus norvegicus neuronal olfactomedin-related ER localized		4.29	3.61
M12672	Rn.3036	Rat guanine nucleotide-binding protein G-i, alpha subunit mRNA		4.29	4.50

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
若手研究者奨励研究報告書

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社