

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

トリプトファンによる細胞性免疫の制御

所属 埼玉医科大学総合医療センター 心臓外科
研究者 五條 理志

要 旨

胎児の免疫学的寛容状態に極めて強く関わっている Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) を発現させることで、移植臓器もしくは細胞がホストに生着することが可能ではないかという仮定を検討した。

1. 研究目的

Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) は、血管内皮細胞やマクロファージに存在し、炎症性のサイトカインで誘導されるトリプトファンを代謝する酵素であるが、その免疫系に及ぼす影響は、昨年 Science に IDO の inhibitor が同系間の妊娠マウスにはなんら影響を与えず、同種間の妊娠マウスには流産を生じさせたとの報告がある。この発表は、胎児がいかに母親の免疫系から保護されているかというメダワー以来の問いにシンプルではあるが、新たな解決への糸口を提議した。本研究では、この IDO の特性を利用し、T cell mediated immunity をコントロールする方法を検討し、移植医療に応用可能かどうかを小動物を用いた実験を行い検証する。

免疫学的寛容は中枢性と末梢性にわけられるが、末梢性寛容はリンパ球が抗原刺激を受けたとき second signal が伝達されないことにより生じるとされている。近年は、このメカニズムの解明に関して細胞間の interaction もしくは receptor/ligand を介したシグナル伝達に研究の中心が移ってきたようにも思われるが、IDO の胎児への影響に関する論文が免疫学者にもたらした驚きは大変大きなものがあつた。IDO はトリプトファンを分解し、Kynurenine を作る酵素であり、血管内皮細胞とマクロファージに様々な刺激により誘導される。現在までその増殖抑制作用が主に研究されており、ウイルスや細菌に対する防御メカニズムの一部として、また抗腫瘍効果を有するとして古くから研究され、その分子の遺伝子のクローニングは 1991 年に原田らによりクローニングされた。マクロファージによる自己反応性 T cell の抑制は、古くから知られていた現象であるが、その分子メカニズムに関しては不明のままであつた。Munn らは、Macrophage colony stimulation factor (M-CSF) により刺激されたマクロファージと接触した活性化 T cell は cell cycle に入り G1/S で停止しアポトーシスを生じることがを証明した。M-CSF は IDO の誘導因子であり、マクロファージによる末梢性トレランスのメカニズムは IDO によって説明されることが示唆された。この自己へのトレランスのメカニズムが、移植臓器へのトレラント導入維持に応用可能であるかどうかを検討する価値があると考えた。

本実験では、in vitro T cell proliferation assay で IDO 発現細胞に対して T cell が増殖抑制を示すことを確認する。次に、Non-viral vector として心臓に遺伝子導入を行う Starburst polyamidoamine dendrimer 若しくは HVJ-liposome 法を用い、発現プラスミドを移植心臓に還流させ、同種ラットの頸部に異所性移植を行ない、その生着延長効果を検討する。同種移植片における IDO の発現がレシピエントの免疫学的反応を抑制することを証明する。この IDO を用いた遺伝子導入による移植臓器に対するトレランス誘導の実験は報告されていない。現在まで移植臓器に IL-10, IL-4, A20 等の遺伝子導入による修飾で、生着延長が報告されているが、その効果は一時的であり、臨床応用にまでは至っていない。IDO の作用を考えると、その発現がたとえ一時的であつたとしても、アロ抗原により増殖を活発に行うようになった活性化 T cell がトリプトファン欠乏によってアポトー

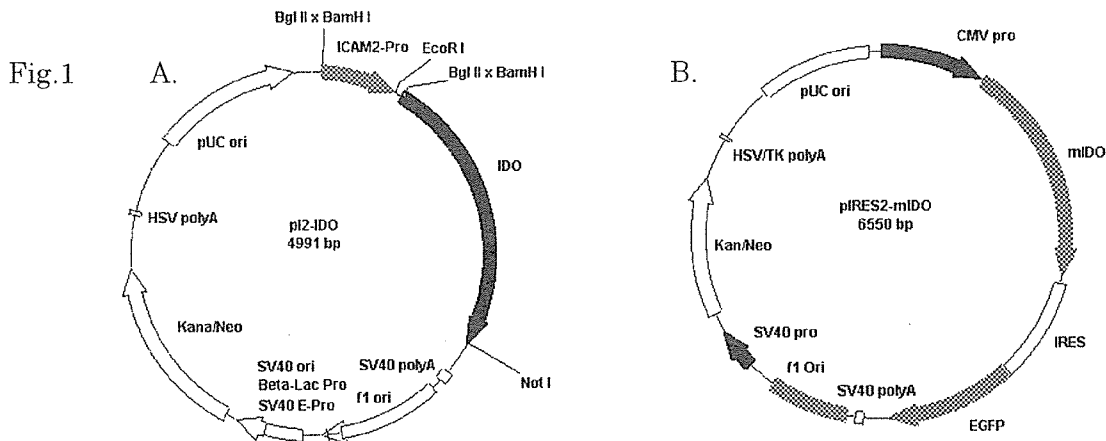
シスを生じ clonal deletion を起こすと考える。IDO の発現が消失しても移植臓器のアロ抗原に反応するリンパ球が欠落しているため、拒絶されることはないと考えられる。脳死体からの移植医療は、漸く日本でも再開されたが、慢性拒絶による Graft failure の問題が大きくクローズアップされ、その解決が待たれている。免疫学的寛容誘導は其中でも最も解決に近いプロトコールであり、その確立に向けた研究に対し NIH は多額の研究費を計上している。本実験により IDO の臨床応用への有用性が立証できれば、移植医療をより安全な治療にするための大きな一歩になると考える。

2. 研究方法

In vitro 実験：

移植臓器において T cell の最初の標的となる内皮細胞に、IDO を Overexpression させることで、Local immunosuppression が可能ではないかとの仮定のもとに実験計画を作成した。まず、内皮細胞特異的なプロモーターとして、ICAM2 Promoter をクローニングし、下流にマウス由来の IDO cDNA を結合した発現プラスミドである pI2-IDO (Fig.1 A.) を作成する。Transfection の方法は calcium precipitation を用い、G418 にて selection を行ない、幾つかのクローンをピックアップする。コントロールには Transgene として Green fluorescence protein を有する plasmid (pI2-G) によって transfection されクローニングされた細胞株を用いる。ICAM2 promoter の特異性を検討するために、繊維芽細胞株 (NIH3T3, L cell) と血管内皮細胞株 (PEDSV, SVEC) をターゲットに pI2-G の Stable transfectants に関して、GFP の発現を Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS) にて解析する。

pI2-IDO の Stable transfectants から mRNA を調製し、full length の IDO cDNA をプローブにして Northern blotting により IDO の発現量をそれぞれのクローンについて測定する。この細胞を stimulator にして T cell proliferation assay を allogeneic combination にて行ない、IDO の発現量と増殖能の抑制効果の相関を検討する。



In vivo 実験：

当初、臓器移植片 (ラット心臓) に IDO 遺伝子を導入し発現させ Allogeneic combination に移植する計画であったが、Non-viral gene transfer では発現期間および発現量、発現効率で満足する結果を得られなかった。このため、今後更に重要な医療手段となるであろう細胞移植の系において IDO の有用性を検討することとした。

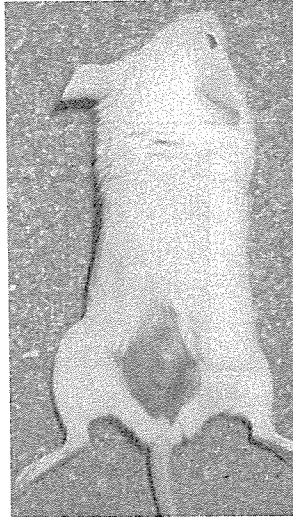
本実験で用いた細胞は、マウス骨髄間質細胞から樹立された細胞で、間葉系幹細胞としての性質を保持している (自己複製能および多分化能)。この細胞は、Syngeneic mouse の皮下に移植されると骨を形成し、Allogeneic mouse に移植されると、移植後 14 日目頃には骨破壊を伴って完全

に拒絶されるということを確認した (Fig.2 A.; Syngeneic combination, B. ; Allogeneic combination, 共に術後 13 日目)。この細胞に IDO およびドナー細胞を同定するための GFP 遺伝子の 2 つを導入し (Fig. 1 B.)、Stable transfectant を作成した。作成後、自己複製能及び多分化能に変化のないことを in vitro の条件において確認をした。この遺伝子導入 MSC 細胞を Syngeneic および Allogeneic combination において皮下に移植し、経時的に移植部位をサンプリングし病理学的検討を加えた。

Fig.2 A.



B.



3. 研究成果

In vitro experiment:

ICAM2 promoter の特異性を検討するために行われた FACS analysis の結果を Fig.3 に示す。繊維芽細胞には GFP の発現はほとんど現れず (Fig.3 A & B)、血管内皮細胞において強い発現を確認した (Fig.3 C. & D.)。ここには示していないが血球系細胞には発現を認めなかった。このことより、この Promoter を用いて血管内皮細胞に特異的に遺伝子導入することが可能であることが示唆された。

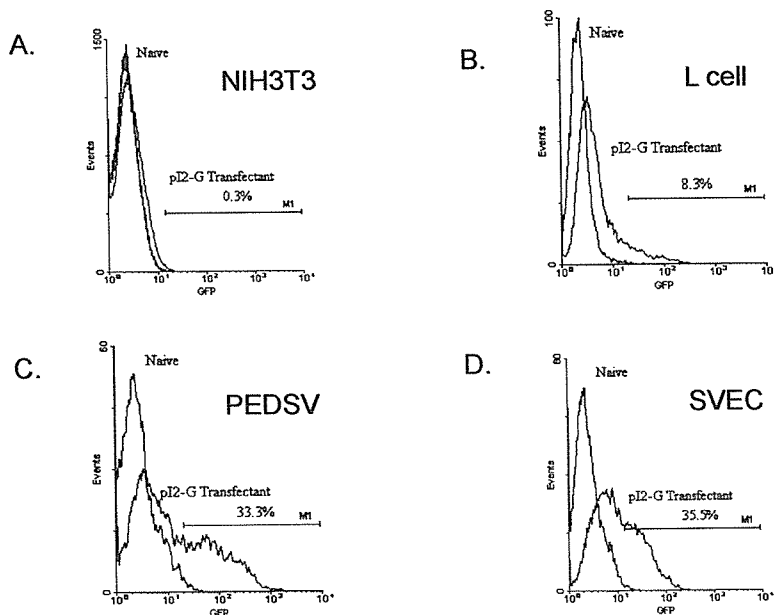


Fig.3

IDO の免疫抑制効果が T cell 増殖抑制という方法を用いて以下のように確認された。dd の

phenotype のブタ血管内皮細胞(PED)に IDO を発現させて stimulator (PED-IDO)にし、cc の phenotype のブタのリンパ球を responder にして proliferation assay を行った。IDO を発現した細胞に対しては完全に増殖を抑制した。Expression の量と増殖抑制に関する相関は、明らかなものは認めず、IDO が存在していれば T cell の同種抗原に対する増殖は完全に抑制された。このことは、in situ でのトリプトファン濃度が T cell の増殖に対して極めて Critical factor として働いていることを示唆している。IDO transfectant の増殖は Naive cell や GFP transfectant と比較してなんら変化はなく、細胞増殖に対する非特異的な影響であるとは考えられず、Activated T cell の増殖に特異的抑制作用を持っていると考えられる。

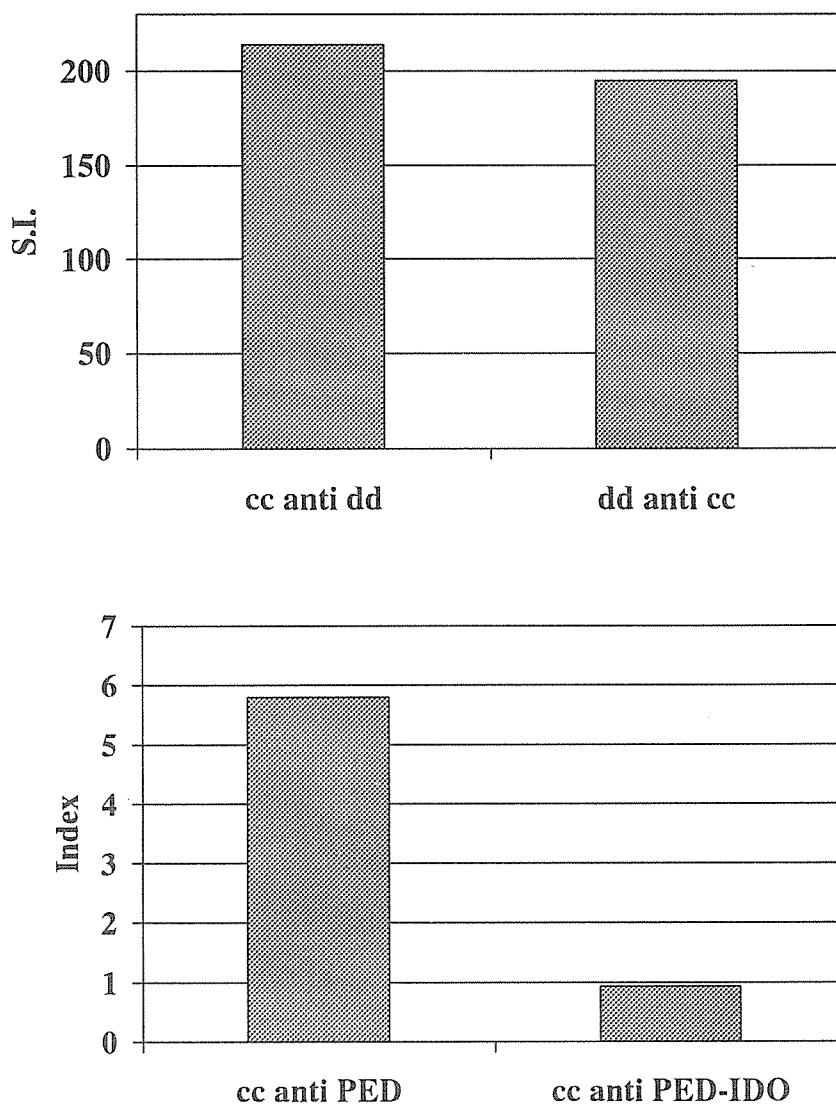


Fig. 4

In vivo の実験でも、IDO の免疫抑制作用が同種間移植において骨形成を指標に証明された。IDO transfectant MSC は増殖に関しては Naive のものと何ら変わりはない。しかしな

がら、Syngeneic combination において骨形成の大きさは、Naïve MSC transplantation に比較 (Fig. 5 A.) して有意に小さな骨しか形成しなかった。病理学的検討では、好中球の浸潤を認めており非特異的な炎症反応を確認し、それが骨形成を小さくしていると推定された。この炎症反応が Transgene の産物によるものなのか IDO の機能と何らかの関係があるのかどうかは、今後の研究課題としたい。Allogeneic combination においては、Naïve MSC は移植後 14 日目頃には骨破壊を伴って完全に拒絶されたにもかかわらず (Fig. 5 B.)、IDO transfected MSC の移植においては移植後 3 週間目においても Syngeneic mice と同等の大きさの骨を形成していた。病理学的検討では、好中球の浸潤は Allogeneic combination の方がやや多いものの、骨自体には大きな差異を認めなかった。このことは、in vitro における T cell 増殖抑制の効果が、in vivo においても T cell による Cytotoxic effects の抑制という形で確認されたことになる。

以上の結果を踏まえて、臓器移植の局所免疫抑制効果をもたらす、Ex vivo gene therapy の Target として IDO は有望な遺伝子であると考えられる。また、今後臨床応用が進むであろう細胞移植は、ドナーソースとして自己の細胞が理想的であると考えられるが、経済的側面からも Allogeneic source が重要になると考えられ、ドナーが IDO のような免疫寛容誘導をもたらす因子を発現していることは、非常に大きな進歩と考える。

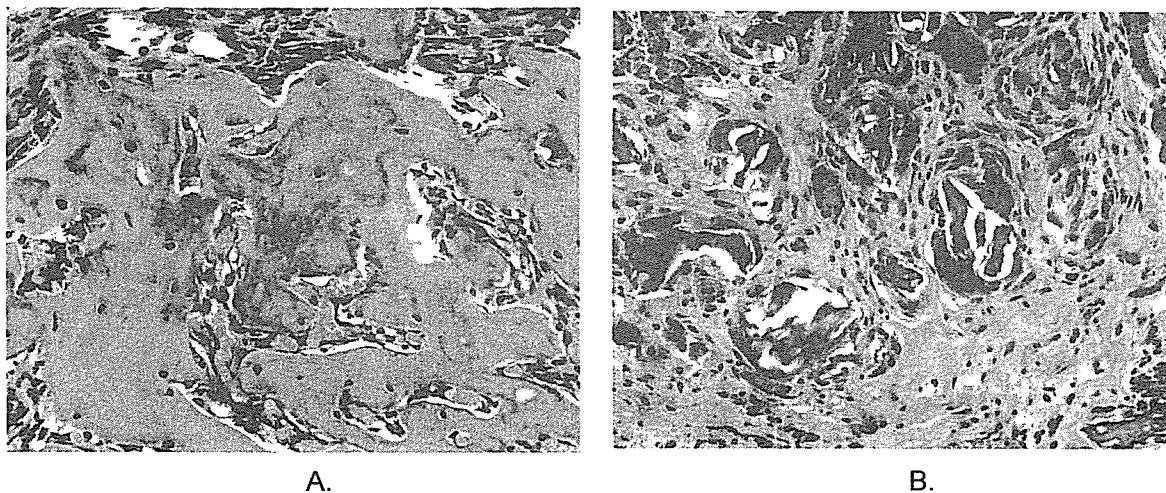


Fig. 5

4. 考 察

臓器移植の局所免疫抑制効果をもたらす、Ex vivo gene therapy の Target として IDO は有望な遺伝子であると考えられる。また、今後臨床応用が進むであろう細胞移植は、ドナーソースとして自己の細胞が理想的であると考えられるが、経済的側面からも Allogeneic source が重要になると考えられ、ドナーが IDO のような免疫寛容誘導をもたらす因子を発現していることは、非常に大きな進歩と考える。

5. まとめ

IDO は T cell immunity を抑制することに明らかに関与しており、移植医療において重要な Target となることが示された。特に、細胞移植のドナー細胞に Ex vivo gene transfer によって IDO を導入することで、免疫抑制剤からの解放が得られる可能性が高い。しかしながら、非特異的な炎症反応のメカニズムおよびそれに対する対処が今後の課題となると考えている。

6. 研究発表

なし

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