

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

## 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

所属 国立精神神経センター神経研究所 免疫研究部  
研究者 三宅 幸子

### 要旨

自己抗原反応性 T 細胞の機能解析のため、MBP 特異的 T 細胞受容体のトランスジェニックマウスを作成した。自己反応性細胞を制御する調節細胞として、NK, NKT 細胞の重要性を明らかとし、これら調節細胞を介した新規治療法の可能性を示した。

### 1. 研究目的

現在の自己免疫疾患の治療は、グルココルチコイドや免疫抑制剤といった非選択的な薬剤が中心であり、副作用も多く十分な治療効果が得られないことも多いことから、疾患特異的治療法の開発が切望されてきた。これまでは、抗原特異的治療や抗原特異的 T 細胞の T 細胞受容体を同定し、それを標的にすることが試みられてきた。しかし、ほとんどの自己免疫疾患では病因抗原は同定されておらず、また抗原特異的 T 細胞の T 細胞受容体は単一ではない上に個体差が著しく、臨床応用には多大な困難を伴っている。本研究では、自己抗原反応性 T 細胞とその働きを制御する疾患抑制性調節性細胞の機能を検討することによって、自己抗原反応性、自己免疫病惹起性細胞の選択的抑制方法の開発を目的とする。

### 2. 研究方法

自己抗原反応性 T 細胞を大量に容易に入手可能にするため、myelin basic protein (MBP) 反応性 T 細胞の T 細胞受容体をクローニングし、トランスジェニックマウスを作製した。自己反応性を制御する分子の検索には、目的とする遺伝子を効率よく T 細胞に導入するため、新規のパッケージングコンストラクト(pCL-ECO)とスピニン感染法を使用し、レトロウイルスベクターを用いて Primary T 細胞へ高率に遺伝子導入できる方法を確立した。

疾患抑制性調節性細胞の機能解析のために用いる自己免疫疾患モデルとして、C57BL/6 マウスに Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) peptide35-55 を免疫し、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を誘導した。また、EAE と類似した Th1 優位な自己免疫病と考えられる DBA/1J マウスにトリタイプ II コラーゲンを免疫し、コラーゲン関節炎 (CIA) を誘導した。これらの自己免疫疾患モデルにおいて制御しうる細胞群として、NK 細胞、NKT 細胞に注目し、それらをモノクローナル抗体にて除去もしくはサイトカインなどを用いて刺激し、EAE の臨床症状に与える影響を検討した。抗  $\alpha$ sialoGM1 抗体投与により、抗原感作時、もしくは症状出現期に NK 細胞を除去し、臨床症状を観察した。Wild type C57BL/6 マウスもしくは NKT ノックアウトマウスより調整した脾臓細胞をナイロンウールカラムを用いて、B 細胞、マクロファージを除去後、IL-2 により 48 時間刺激し、接着性の細胞のみを回収、さらに IL-2 存在下で 72 時間培養した。この細胞集団を抗 NK1.1 抗体、抗 CD3 抗体による二重染色を行い、Flowcytometry による測定により、NK 細胞の純度を確認した。この活性化 NK 細胞 ( $1 \times 10^6$ ) を抗原感作時、もしくは症状出現期に経静脈的に投与し臨床症状を観察した。NKT 細胞については、NKT ノックアウトマウスに EAE を誘導して、wild type と比較した。Wild type と NKT ノックアウトマウスからの活性化 NK 細胞の違いを検討するため、ライトサイクラーを用いた定量的 PCR 法によって、各種サイトカイン mRNA の発現量を検討した。また、培養上清中のサイトカインを ELISA 法にて測定した。また、両活性化 NK 細胞の YAC-1, Syngenic ConA blast に対する細胞傷害活性を Cr<sup>57</sup> release 法にて検討した。αガラクトシルセラミドとその合成誘導體 (ALL: Altered Lipid Ligand) を合成し、未処置マウスに投与し、血清中サイトカインを経時的に ELISA 法にて測定した。これらの合成体を、経腹腔もしくは経口投与し、

EAE に与える影響を臨床症状、病理学的解析から検討した。この際、血清中の抗 MOG 抗体ならびにそのアイソタイプを測定した。また、未処置マウスの脾臓細胞に、*in vitro* にて $\alpha$ ガラクトシルセラミドと ALL を添加し、増殖反応、培養上清中のサイトカインを測定した。

### 3. 結果成果

自己抗原反応性 T 細胞の解析を容易にするため、SJL/J マウスに MBP peptide 89-101 を免疫し、MBP 反応性 T 細胞を樹立した。さらに MBP 反応性 T 細胞より T 細胞受容体をクローニングし、そのトランスジェニックマウスの作製を行った。今後、このマウスの T 細胞をもちいて、自己抗原反応性 T 細胞と、外来抗原反応性 T 細胞 (DO11.10 マウスから、OVA 反応性 T 細胞を分離する予定) における抗原刺激時の T 細胞受容体シグナル伝達経路に違いがあるかどうかを検討する。

抗原反応性を制御する分子の検索には、目的とする遺伝子を効率よく T 細胞に導入することが重要であるが、これまでは困難であった。我々は、新規のパッケージングコンストラクト(pCL-ECO)とスピニンフェクション法を使用することにより、レトロウイルスベクターを用いて Primary T 細胞へ 60-80%と非常に高率に遺伝子導入できる方法を確立した。T 細胞受容体のトランスジェニックマウスの T 細胞 (DO11.10 マウスから、OVA 反応性 T 細胞) にも同様の効率で遺伝子導入することに成功したので、我々の作製したトランスジェニックマウスの T 細胞を用いて、EAE 制御に重要と思われる遺伝子の機能を *in vivo* で解析できるようになった。

疾患調節性細胞として、NK, NKT 細胞に注目した。抗 asialo GM1 抗体を用いて、NK 細胞を除去することにより、EAE, CIA 共に臨床症状は増悪した。ナイロンウールカラムを通した、脾臓細胞を、大量の IL-2 とともに 5 日間培養した接着性細胞 (A-LAK) は、90%程度が NK1.1 陽性、CD3 陰性の NK 細胞であった (図 1)。この活性化 NK 細胞を移入することによって、EAE, CIA 共に抑制することができた (図 2、3)。これらの効果はいずれの場合も、EAE モデルにおける NK 細胞除去を除いて、免疫前の予防的処置ではあまりみられず、疾患発症時の投与にて効果がみられた。以上の結果から、NK 細胞は、EAE, CIA といった自己免疫疾患に対しては疾患治療的に働くことが明らかとなった。NKT ノックアウトマウスから調整した活性化 NK 細胞ではさらに強い抑制効果がみられた (図 4)。Wild type 由来の活性化 NK 細胞と、NKT ノックアウト由来の活性化 NK 細胞では YAC-1, Syngenic ConA blast に対する細胞傷害活性に差はみられなかった。サイトカイン産生においては、IFN $\gamma$ 産生が NKT 由来の NK 細胞では低下していた (図 5)。また、定量的 PCR 法によって、TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ については NKT ノックアウト由来の活性化 NK 細胞の方が mRNA 発現レベルが高い傾向にあった。

NKT ノックアウトマウスでは、EAE の発症が早まることから、NKT 細胞は induction phase (誘導相)に関与することが示唆された。また、これまで抗 B7.2 抗体存在下で  $\alpha$ ガラクトシルセラミドを加えた抗原提示細胞を移入することによって、IL-4 優位のサイトカイン産生をおこし、疾患を抑制できることを示してきた。今回はさらに臨床応用を考え、 $\alpha$ ガラクトシルセラミドの誘導体を合成し、EAE を抑制する誘導体を得た。この誘導体は、経腹腔投与、経口投与のいずれでも効果が見られた。病理学的検索の結果、ALL 投与群では病変への浸潤細胞の減少を認めた。血清中の抗 MOG 抗体価は ALL 投与群では上昇しており、またアイソタイプの測定を行ったところ、IgG1/ IgG2a 比の上昇が認められ免疫応答が Th2 に偏倚していることがわかった。未処置マウスにこの ALL を投与後、経時的に血清中のサイトカインを測定し、IL-4 / IFN 比がコントロール群、 $\alpha$ ガラクトシルセラミド投与群に比較して上昇していることを見出した。NKT ノックアウトマウスではサイトカイン産生がみられないことから、NKT 細胞を刺激して、IL-4 を優位に産生させることが明らかとなった。*In vitro* においては、 $\alpha$ ガラクトシルセラミドに比較すると軽度な増殖反応を認めた。サイトカイン産生では IL-4 / IFN 比は上昇していた。EAE の抑制効果が IL-4 によるものかどうかを検討するために、抗 IL-4 抗体を  $\alpha$ ガラクトシルセラミド誘導体と同時に投与すると EAE の抑制効果が消失した。

### 4. 考察

我々の樹立した MBP 特異的な T 細胞は、Proteolipid protein (PLP) にも反応するが MBP を抗原

とした時に比べ、IFN $\gamma$ の産生が低い。また、MBP で刺激すると細胞移入によって EAE を惹起できるが、PLP で刺激した細胞を移入すると EAE を惹起できない。このことから、この細胞にとって PLP は Partial agonist であると考えられる。通常の抗原となりうる MBP と、Partial agonist となる PLP を抗原として使えることから、この T 細胞受容体のトランスジェニックマウスを用いて T 細胞受容体シグナルを解析し、さらに通常の外来抗原に対する T 細胞受容体シグナル(DO11.10 マウスから分離した OVA 反応性 T 細胞を使用) と比較することが可能になった。

NK 細胞の除去、活性化 NK 細胞移入によって、NK 細胞が自己免疫疾患に抑制的に働くことを明らかにしたが、その作用機序はまだ不明である。自己抗原反応性 T 細胞をその細胞傷害活性で処理するのか、あるいは何らかのサイトカインを介した反応かはこれからの検討事項である。最近、我々は多発性硬化症患者の緩解期に NK 細胞が IL-5 を正常人に比較して優位に多く産生していること、CD95 抗原の発現が優位に高いことから、NK2 タイプに偏倚していることを報告した。マウスにおいても NK を NK2 タイプに偏倚させることによって、EAE の発症を抑制できるかどうかを検討することで、多発性硬化症における NK2 偏倚が積極的に緩解に役立っているかどうかを証明できると考えられる。

IFN ノックアウトマウスでは NK 細胞が IL-5 優位に産生するという報告があり、我々は IFN ノックアウトマウスを入手し、上記実験を行う予定である。

NKT ノックアウトマウスから誘導した活性化 NK 細胞が EAE の抑制効果が強いことは、これまで人の自己免疫疾患で NKT 細胞の減少が報告されていること、多発性硬化症緩解期では NK 細胞が活性化していることをよく説明できて興味深い。

これまで我々は、抗 B7.2 抗体存在下で  $\alpha$  ガラクトシルセラミドを加えた抗原提示細胞を移入することによって、IL-4 優位のサイトカイン産生をおこし、疾患を抑制できることを発見したが、この方法は臨床応用を考えると煩雑であり実際的でない。蛋白抗原では、1つのアミノ酸残基の置換で T 細胞の反応性を変化させることが知られ、これらの変異抗原は altered peptide ligand (APL) と呼ばれている。APL は、多発性硬化症の治療に用いられたが、病状の改善する人、変化のない人さらに、非常に増悪する人がいることが報告された。この治療効果の多様性は、人の場合はその多様な MHC により T 細胞の反応が個体によって大きく異なることを反映している。NKT 細胞は CD1 に拘束されるが、CD1 は、MHC のような多様性がなくすべての人に均一であるため、有効な altered ligand がみつければ広く臨床応用できる可能性がある。そこで我々は、NKT 細胞の ligand として知られている  $\alpha$  ガラクトシルセラミドの誘導体を合成し NKT 細胞を Th 2 に偏倚させ、EAE を抑制できる脂質抗原が得られるかどうかを検討した。今回 3 種類の誘導体を合成したが、そのうち sphingosine base の炭素数を少なくした合成体は、NKT 細胞を刺激して IL-4 を優位に産生させることによって、Th 2 優位な環境を導き、EAE に予防的に働くことがわかった。この合成体は経口投与でも有効であることから、臨床応用も期待できる。今後はさらに有効な lipid ligand を検索する予定である。NKT 細胞については、IFN $\gamma$ 、IL-4 といったサイトカインを短時間に大量に産生するという特徴があるが、通常の T 細胞とどのような制御の違いがあるのかは分かっていない。今後は、このサイトカイン産生の機序を解明することが重要であると思われる。

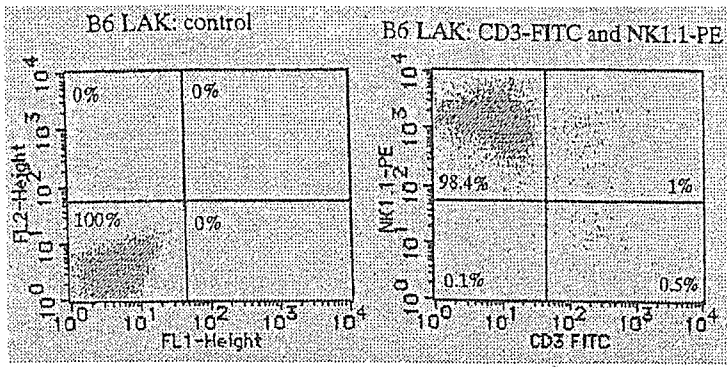
NKT 細胞、NK 細胞はクロストークがあることが報告されているが、上記活性化 NK 細胞についても、NKT 細胞の共存の有無によって、その性質が変化することがわかった。NKT を刺激する ALL についても、NK 細胞を抗 asialoGM 1 抗体で除去しておくことで EAE の抑制効果が消失することから、両細胞間でのクロストークの解析も今後興味深いテーマである。

## 5. 結論

自己抗原反応性 T 細胞の T 細胞受容体のトランスジェニックマウス作製に成功し、今後自己抗原反応性 T 細胞の機能解析、シグナル伝達機能の解析が行えるようになった。NK、NKT 細胞などの疾患調節細胞の作用機序を明らかにし、調節性細胞を介した自己免疫疾患治療の可能性があることが明らかとなった。

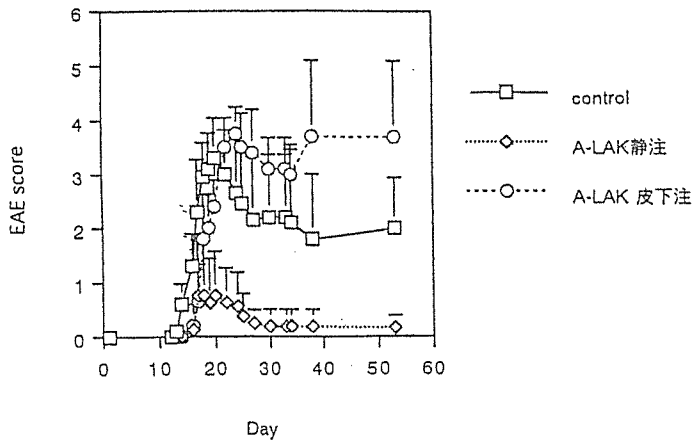
## 6. 研究発表

- 1) Endre Pal, Takeshi Tabira, Tetsu Kawano, Masaru Taniguchi, Sachiko Miyake, and Takashi Yamamura. Costimulation-dependent modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by ligand stimulation of V<sub>14</sub> natural killer (NK) T cells. *J. Immunol.* Vol.166 : 662-668, 2000
- 2) Kazuya Takahashi, Sachiko Miyake, Takayuki Kondo, Keiji Terao, Megumi Hatakenaka, Shuji Hashimoto, and Takashi Yamamura. Natural killer type 2 bias in remission of multiple sclerosis. *J. Clin. Inv.* Vol. 107 : R23- R29, 2001
- 3) 山村隆他. NK と NKT による自己免疫性脳脊髄炎の制御. *免疫 Immunology Frontier* : 10.304—307, 2000
- 4) 三宅幸子 : Cbl ファミリーによる免疫調節機構の解析 *Neuroimmunology*. Vol. 9 : p16-17
- 5) 宮本勝一他. P0+/- マウスにおける胸腺内 P0 発現低下と実験的神経炎 (EAN) 感受性の亢進 *日本免疫学会総会学術集会記録* Vol. 30 : p299
- 6) 那須薫他. IL-2 活性化 NK 細胞による EAE の抑制. *日本免疫学会総会学術集会記録* Vol. 30 : p303
- 7) 高橋和也他. 多発性硬化症 (MS) 寛解期に末梢血 NK 細胞は NK2 に偏倚し TH1T 細胞を抑制する. *日本免疫学会総会学術集会記録* Vol. 30 : p308
- 8) 宮本勝一他. P0+/- マウスにおける胸腺内 P0 発現低下と実験的神経炎 (EAN) 感受性の亢進 *Neuroimmunology*. Vol. 9 : p130-131
- 9) 那須薫他. IL-2 活性化 NK 細胞による EAE の抑制. *Neuroimmunology*. Vol. 9 : p66-67



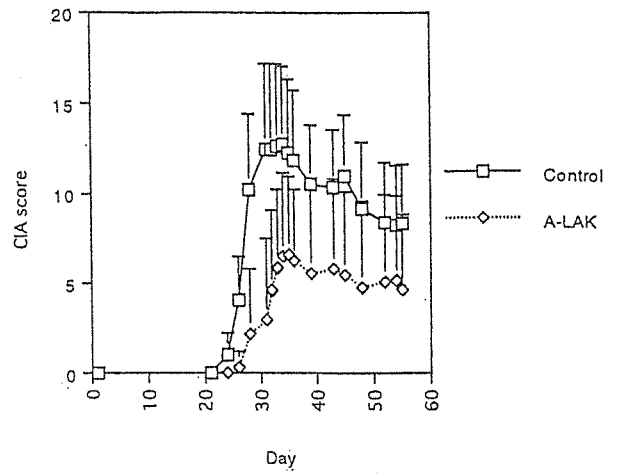
**Fig. 1**

**Characterization of adherent IL-2 activated killer cells (A-LAK)**



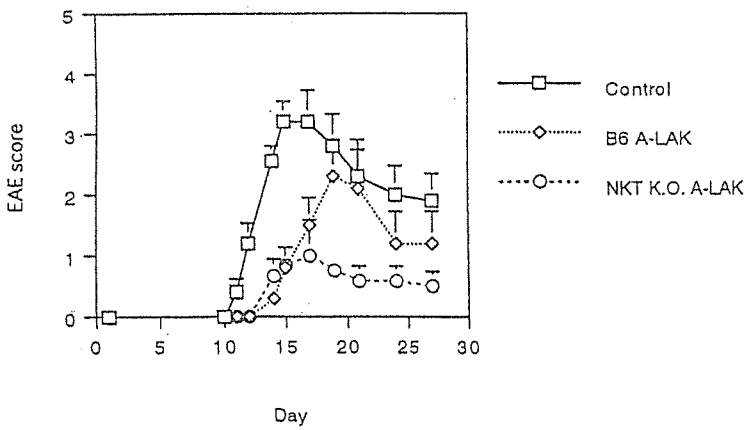
**Fig. 2**

**Inhibition of EAE by IV-administration of A-LAK**



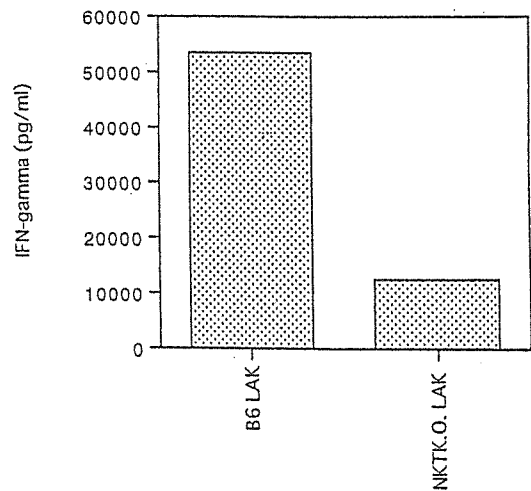
**Fig. 3**

**Inhibition of CIA by A-LAK**



**Fig. 4**

**Strong inhibition of EAE by A-LAK derived from NKT K.O. mice**



**Fig. 5**

**Comparison of IFN $\gamma$  production of A-LAK derived from Wild type and NKT K.O. mice**



---

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