

20010680

厚生科学研究研究費補助金

医薬安全総合研究事業

感染症発症抑制に関わるヒト B 細胞由来抗体の作製

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 垣生 園子

平成 13 年 (2001 年) 3 月

目次

I.総括研究報告書	
感染症発症抑制に関わるヒト B 細胞由来抗体の作製-----	3
II.分担研究報告	
生物活性抗体が認識するエピトープの解析 -----	8
瀧 孝雄	
無症候キャリアの血清の検討 -----	11
関川 巖	
NOG マウスにおけるヒト免疫系再構築の効率化と効率よい 抗原特異的ヒト B 細胞由来抗体獲得モデルの検討-----	13
竹腰 正隆	
III.研究成果の刊行に関する一覧表-----	16
IV.研究成果の刊行物・別刷-----	17

研究費の名称=厚生科学研究費補助金

研究事業名=高度先端医療研究事業

研究課題名=感染症発症抑制に関わるヒト B 細胞由来抗体の作製

国庫補助金精算所要額 (円) =20,000,000

研究期間 (西暦) =2001-2003

研究年度 (西暦) =2001

主任研究者名 (所属機関名) =垣生園子 (東海大学医学部)

分担研究者 (所属機関名) =竹腰正隆 (東海大学医学部) , 関川巖 (順天堂大学医学部) ,
瀧孝雄 (大塚製薬株式会社分子医科学研究所)

研究目的=病原体やその産物が引き起こす様々な生体の病的反応は、抗体で阻止できずことが動物実験から明らかとなっている。従って、それら病原体に対するモノクローナル抗体 (Mab) の臨床応用が期待されているが、実用に際しては、以下のような障害がある。(1) マウス・ヒトのキメラ抗体やマウス抗体からのヒト型化の作製も進んでいるが、現存する Mab の多くはマウス部分を残している。従って、安全性や効率の面から問題がある。(2) 病原体は種類によっては激しく変位を起こすので、単に病原体の構造タンパク質に対する抗体では、有効である保証はない。昨年までの研究プロジェクトにより、ヒト造血幹細胞を用いたヒト免疫系を再構築したモデル動物を開発してきた。これを用いて (1) の課題は基本的に克服できると考えられた。また、感染症の症状は示さないが病原体に反応する抗体のキャリアー血清を利用して、生物活性の高い抗体を誘導するエピトープを決定することで (2) の問題に挑戦し、それらエピトープに基づいて作製した合成ペプチドを、ヒト免疫系再構築マウスに免役して感染防御と治療に有効なヒト型抗体の作製を目指している。本年度は、患者血清からの血清収集とスクリーニングおよびそれを基盤に合成ペプチド作製をおこなう。また一方では、より良い抗体産生ができるモデルマウスの改良も続ける。

研究方法= (1) 無症候キャリアー血清のスクリーニング: 熱帯熱マラリア感染者で無症候者の血清は、Mahidol 大学付属病院から相川教授の協力の下に提供された。(2) 抗体認識エピトープの決定: ファージペプチドランダムライブラリーを用いて、熱帯熱マラリア患者血清から分画した IgM と IgG と反応するクローンをスクリーニングし、陽性クローンを大腸菌に感染させて増幅した後、再度患者血清と反応させて特異性と確認した。(3) HERV clone-4 発現 SLE 患者の検索: human endogenous retrovirus family のサブクローンである HERV clone-4 の発現は SLE と密接な関連があることが指摘されている。一方、HERV clone-4 に対する抗体は HIV と交叉反応することが示唆されているので、抗 HERV clone-4 抗体をもつ患者血清を

の存在をスクリーニングする手段として、同遺伝子の発現を RT-PCR で検索した。(4) ヒト幹細胞の移植による免疫系再構築モデルの改良：これまでのプロジェクトで使用してきた NOD-SCID マウスに、IL-2Rg KO マウスを交配して最近樹立された T および B 細胞の他に NK 細胞が欠如した NOG マウスをレシピエントとして使用した。移植するヒト幹細胞は昨年までと同様の条件で得た。このキメラマウスにおける免疫系の再構築の解析は、flowcytometry によっておこなった。

結果と考察=本年度の研究では、無症候熱帯熱マラリア患者の血清が先行して提供されたので、それらを利用して生物活性をもつ抗体が認識するエピトープ解析を、マラリアで集中的に進めた。その結果複数の該当するペプチドを決定することができた。それらは、8 量体として合成し、免疫原としての性状を保有するかを通常マウスに免疫してその抗原性をチェックした後、他の分担者によって開発されたヒト免疫系再構築 NOG モデルマウスに免疫する予定である。一方、HIV と交叉反応することが指摘されている HERV clone-4 に対する抗体の存在は、HERV clone-4 gag 分子の全長が得られなかったので、Western blotting による陽性が明確に示せなかったため、直接証明ができなかった。その代替として、今回は HERV clone-4 が SEL 患者のみに発現することを示したが、次年度は抗体を直接証明し、抗 HERV clone-4 抗体の認識エピトープの同定とそれに対するヒト抗体を作製する方向に進展させる予定である。NK 細胞の完全欠如した NOD-SCID マウスを利用することによってヒト T 細胞の分化増殖が改良されたことを示す今回の成果は、今後ヒト B 細胞由来の抗原特異的抗体作製に有用であり、その成功に期待がもたれる。

結論=熱帯熱マラリアの無症候キャリアーから得た血清を、ファージペプチランダムライブラリーによってスクリーニングし、マラリア原虫と反応する抗体が認識するペプチドを複数決定した。従って、これらペプチドは生物活性のある抗マラリア機能をもつ有効なヒト抗体作製の免疫源となる可能性をもつ。一方、HIV 感染に有用な抗 HIV 生物活性を有することが示唆されている抗 HERV clone-4 抗体の検出は SEL 患者血清で直接できなかったが、SEL 患者では HERV clone-4 遺伝子が特的に発現していることを、mRNA レベルで証明した。この結果は、今後 HERV clone-4 特異的抗体の明確な検出を進めるに当たって、1つの指標となる。以上、生物活性をもつ抗体が認識するエピトープを免役してヒト型抗体を作製するために、有用なモデル開発を NOG マウスを用いて開発した。

総括研究報告書

感染症発症抑制に関わるヒトB細胞由来抗体の作製

主任研究者 垣生園子 東海大学医学部 教授

研究要旨

病原菌感染現場における無症候者で高力価な抗体保持から提供された血清には、生物活性が高い抗体の存在が期待される。本研究ではそのような抗体をもとに免疫回避がなされなかった病原体のエピトープを同定し、同一レパートリーに対するヒト型抗体を作成することを目指している。本年度は、無症候キャリアー血清収集とスクリーニング、およびそれに続く病原体のエピトープ決定を進めている。その中でも熱帯熱マラリア (*Plasmodium falciparum*) に対する抗体を用いた検索を先行しておこなった。熱帯熱マラリアに感染した既往歴を持つが無症状と診断されたキャリアーの血清は、東海大学相川教授の協力のもとに Mahidol 大学付属病院の患者より提供されたが、2001 年度をもって同教授が米国に帰国することが急遽決定したためである。その結果、以下の研究成果を得た。(1) 高力価抗体を含有する血清を選別後、ファージランダムペプチドを用いて、熱帯熱マラリアに対する抗体と強く反応するファージクローン検索し、IgG とおよび IgM 抗体と反応するものを各々 11 と 58 クローンを得た。今後このペプチドの 8 量体を作製して、下記に記載した新しいヒト免疫系再構築マウスに免疫して抗体産生を誘導する予定である。(2) HIV-1 の構造タンパク (gp160/120) と交叉反応することが示唆されている SLE 患者における自己抗体—抗 HERV clone-4 抗体—をスクリーニングする目的で、同患者に特異的に抹消血細胞に HERV clone-4 が発現していることを mRNA レベルで明らかにした。一方では、より完全なヒト免疫系再構築マウスの改良を進めている。特に、最近開発された NOG マウスは、T,B 細胞の他に NK 細胞も完全欠損したマウスで、ヒト T 細胞が高率に胸腺内および脾臓に存在することを明らかにし、今後ヒト免疫再構築マウスとして上記抗原を免疫するのに使用予定である。

研究分担者 竹越正隆 東海大学医学部
助手
関川 巖 順天堂大学医学部
助教授
滝 孝雄 大塚製薬株式会社
医科学研究所所長

A. 研究目的
病原体やその産物が引き起こす様々な生体の病的反応は、抗体で阻止できずことが動物実験から明らかとなっている。従って、それら病原体に対するモノクローナル抗体 (Mab) の臨床応用が期待されているが、実用際には、以下のような障害がある。

(1) マウス・ヒトのキメラ抗体やマウス抗体からのヒト型化の作製も進んでいるが、現存する Mab の多くはマウス部分を残している。従って、安全性や効率の面から問題がある。(2) 病原体は種類によっては激しく変位を起こすので、単に病原体の構造タンパク質に対する抗体では、有効である保証はない。昨年までの研究プロジェクトにより、ヒト造血幹細胞を用いたヒト免疫系を再構築したモデル動物を開発してきた。これを用いて(1)の課題は基本的に克服できると考えられた。また、感染症の症状は示さないが病原体に反応する抗体のキャリアー血清を利用して、生物活性の高い抗体を誘導するエピトープを決定することで(2)の問題に挑戦し、それらエピトープに基づいて作製した合成ペプチドを、ヒト免疫系再構築マウスに免役して感染防御と治療に有効なヒト型抗体の作製を目指している。本年度は、患者血清からの血清収集とスクリーニングおよびそれを基盤に合成ペプチド作製をおこなう。また一方では、より良い抗体産生ができるモデルマウスの改良も続ける。

研究方法

(1) 無症候キャリアー血清のスクリーニング：熱帯熱マラリア感染者で無症候者の血清は、Mahidol 大学付属病院から相川教授の協力の下に提供された。

(2) 抗体認識エピトープの決定：ファージペプチドランダムライブラリーを用いて、熱帯熱マラリア患者血清から分画した IgM と IgG と反応するクローンをスクリーニングし、陽性クローンを大腸菌に感染させて増幅した後、再度患者血清と反応させて特異性と確認した。

(3) HERV clone-4 発現 SLE 患者の検

索：human endogenous retrovirus family のサブクローンである HERV clone-4 の発現は SLE と密接な関連があることが指摘されている。一方、HERV clone-4 に対する抗体は HIV と交叉反応することが示唆されているので、抗 HERV clone-4 抗体をもつ患者血清の存在をスクリーニングする手段として、同遺伝子の発現を RT-PCR で検索した。

(4) ヒト幹細胞の移植による免疫系再構築モデルの改良：これまでのプロジェクトで使用してきた NOD-SCID マウスに、IL-2R β KO マウスを交配して最近樹立された T および B 細胞の他に NK 細胞が欠如した NOG マウスをレシピエントとして使用した。移植するヒト幹細胞は昨年までと同様の条件で得た。このキメラマウスにおける免疫系の再構築の解析は、flowcytometry によっておこなった。

C. 研究成果

(1) 熱帯熱マラリアの無症候患者から得た血清中に存在する抗体と結合するペプチドを、ファージペプチドランダムライブラリーから取捨選択して陽性クローンを得た。それらのうち、患者血清の IgG および IgM 分画と特異的に結合したのは各 11 と 58 であった。これらクローンを増幅してペプチドはう列をしらべたところ、*plasmodium falciparum* 由来の抗原蛋白のそれと一致した。得られたペプチドと強反応を示した血清の提供者は、末梢血中にマラリア原虫が少なかった。現在各ペプチドの 8 量体（タンデムリピート、分子量約 20 KD）を大腸菌の発現ベクターに構築することによって、作製中である。

(2) 臨床症状の明らかな SLE 患者からの末梢血 5 サンプルを得て、RT-PCR によ

てHERV clone-4 遺伝子の gag 領域の発現を調べると、すべてにその発現が検出された。一方、健常人5サンプルにはいずれも発現がみられなかった。ところが、demethylating agent である 5-aza と培養すると、健常人では gag mRNA 発現が上昇した。しかし、SLE 患者ではその発現の亢進はなかった。これらの結果は、1) SLE 患者の細胞では、HERV clone-4 の発現が少なくとも転写レベルで亢進している 2) 健常人では DNA の methylation が HERV clone-4 gag 領域の転写を低下させているが、SEL の患者では methylation に何らかの障害がおこっていることが示唆された。なお、抗体による抗 HERV clone-4 の検索には特定に問題があり、今回はその代償として HERV clone-4 遺伝子の mRNA 発現によってスクリーニングした。

(3) NOD-SCID マウスをレシピエントとしてヒト幹細胞による免疫系の再構築を計ってきたが、T細胞の分化と末梢リンパ組織における増殖は著しく低かった。今回NK細胞も欠如した NOD-SCID マウス (NOG) マウスを使用したところ、胸腺へのヒト細胞の移住と分化が顕著に亢進した(約10倍)。また、懸案であった脾臓における成熟型T細胞の量的増加が検出された。それにこの結果は、抗原認識をしたB細胞がT細胞のよって抗体産生細胞へ容易に分化し、量的にも充分検出可能な抗体産生が誘導されることを示している。

D. 考察

本年度の研究では、無症候熱帯熱マラリア患者の血清が先行して提供されたので、それらを利用して生物活性をもつ抗体が認識するエピトープ解析を、マラリアで集中的に進めた。その結果複数の該当するペプチ

ドを決定することができた。それらは、8量体として合成し、免疫原としての性状を保有するかを通常マウスに免疫してその抗原性をチェックした後、他の分担者によって開発されたヒト免疫系再構築 NOG モデルマウスに免疫する予定である。一方、HIV と交叉反応することが指摘されている HERV clone-4 に対する抗体の存在は、HERV clone-4 gag 分子の全長が得られなかったので、Western blotting による陽性が明確に示せなかったため、直接証明ができなかった。その代替として、今回は HERV clone-4 が SEL 患者のみに発現することを示したが、次年度は抗体を直接証明し、抗 HERV clone-4 抗体の認識エピトープの同定とそれに対するヒト抗体を作製する方向に進展させる予定である。

NK細胞の完全欠如したNOD-SCIDマウスを利用することによってヒトT細胞の分化増殖が改良されたことを示す今回の成果は、今後ヒトB細胞由来の抗原特異的抗体作製に有用であり、その成功に期待がもたれる。

E. 結論

熱帯熱マラリアの無症候キャリアーから得た血清を、ファージペプチランダムライブラリーによってスクリーニングし、マラリア原虫と反応する抗体が認識するペプチドを複数決定した。従って、これらペプチドは生物活性のある抗マラリア機能をもつ有効なヒト抗体作製の免疫源となる可能性をもつ。一方、HIV 感染に有用な抗 HIV 生物活性を有することが示唆されている抗 HERV clone-4 抗体の検出は SEL 患者血清で直接できなかったが、SEL 患者では HERV clone-4 遺伝子が特的に発現していることを、mRNA レベルで証明した。この結果は、今後 HERV clone-4 特異的抗体の

明確な検出を進めるに当たって、1つの指標となる。以上、生物活性をもつ抗体が認識するエピトープを免役してヒト型抗体を作製するために、有用なモデル開発をNOGマウスを用いて開発した。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Takehito Sato, Chiharu Sato, Daisuke Suzuki, Yuki Yoshida, Satoshi Nunomura, Tatuya Matsumura, Katsuto Hozumi, and Sonoko Habu

Surface molecules essential for positive selection are retained but Interfered in thymic epithelial cells after monolayer culture

Cellular Immunology 211:71-79, 2001

(2) Atsushi Kumanogoh, Xiaosong Wang, Ihnsook Lee, Chie Watanabe, Masahito Kamanaka, Wei Shi, Kanji Yoshida, Takehito Sato, Sonoko Habu, Misako Itoh, Noriko Sakaguchi, Shimon Sakaguchi and Hitoshi Kikutani
Increased T cell autoreactivity in the absence of CD40-CD40 ligand interactions: A role of CD40 in regulatory T cell development

J. Immunol. 166:353-360, 2001

(3) Yoichi Matsunaga, Yoshio Wakatsuki, Yasuhiko Tabata, Hideo Kawasaki, Takashi Usui, Masaru Yoshida, Toshiyuki Itoh, Sonoko Habu and Toru Kita
Oral immunization with size-purified microsphere beads as a vehicle selectively induces systemic tolerance and sensitization
Vaccine 19:579-588, 2001.

2. 学会発表

(1) Kyoto T Cell Conference

2001年6月29日～30日 (京都)

穂積勝人 (東海大・医・免疫)、Ludovica Bruno and Michael J. Owen 「IL-7/IL-7R signaling regulates the proliferation of β -selected thymocytes」

(2) Kyoto T Cell Conference

2001年6月29日～30日 (京都)

妹尾誠 (東海大・医・免疫)、Lili Wang、真貝洋一、垣生園子
「TCR β 鎖再構成」に伴う転写および転写後調節機構

(3) 第5回基盤的癌免疫研究会総会

2001年7月18日～19日 (津)

亀谷美恵、斎藤雄紀、松村琢也、佐々木茂、今井浩三、徳田裕、垣生園子
「抗 erbB-2 アポトーシス抗体を誘導する erbB-2 ペプシド」

(4) 第60回日本癌学会総会

2001年9月26日～27日 (横浜)

力山俊樹、妹尾誠 (東海大・医・免疫)、西 洋孝、西 桂、松村泰子、垣生園子
「p53 関連遺伝子 p63 は EGF receptor の発現を抑制する」

(6) 第60回日本癌学会総会

2001年9月26日～27日 (横浜)

松村琢也、妹尾 誠、元吉和夫、垣生園子
「p53 ファミリー p73L/dNp63 による p21 を介した細胞増殖抑制効果」

(7) 第31回日本免疫学会総会

2001年12月11日～13日 (大阪)

玉内秀一 伊藤守 丸山弘子 寺島正純
穂積勝人 高秀華 垣生園子
「GATA-3 遺伝子導入トランスジェニックマウスを用いた気管支喘息及び皮膚炎モデル樹立の試み」

(8) 第31回日本免疫学会総会
2001年12月11日～13日 (大阪)
松村琢也 亀谷美恵 Li Changwen
安藤 潔 片野いくみ 伊藤守 元吉和夫
垣生園子
「NOD/Scid マウスを用いたヒト造血幹細胞測定系による B-1 細胞の解析」

(9) 第31回日本免疫学会総会
2001年12月11日～13日 (大阪)
妹尾誠 Wang Lili 真貝洋一 垣生園子
「TCR β 鎖再編成に伴う転写および転写後調節機構」

(10) 第31回日本免疫学会総会
2001年12月11日～13日 (大阪)
佐藤健人 佐藤千春 伊藤亮治 大野慎一郎
垣生園子
胸腺内 T 細胞の分化・増殖制御における翻訳開始因子 eIF4E の役割

(11) 第31回日本免疫学会総会
2001年12月11日～13日 (大阪)
伊藤亮治 佐藤健人 林啓太郎 佐竹正延
垣生園子
「転写因子 AML1 による胸腺内 T 細胞の分
2001年12月11日～13日 (大阪)
齋藤雄紀 亀谷美恵 松村琢也 伊藤守
垣生園子
「マウス環境下におけるヒト幹細胞の胸腺内移住と T 細胞の機能的分化の検討」

化に伴う増殖制御」
(12) 第31回日本免疫学会総会
2001年12月11日～13日 (大阪)
亀谷美恵 片野いくみ 垣生園子
「T 細胞の過剰活性化に伴うサブクラス特異的抗体産生抑制作用—TCR-Tg マウスによる解析—」

(13) 第31回日本免疫学会総会
2001年12月11日～13日 (大阪)
家森正志 若月芳雄 吉田優 渡辺智裕
白井泰彦 垣生園子 千葉勉 飯塚忠彦
北徹
「経口免疫は胃粘膜における T 細胞のサイトカイン産生能を制御する」

(14) 第31回日本免疫学会総会
2001年12月11日～13日 (大阪)
熊ノ郷淳 鈴木一博 佐藤健人 垣生園子
菊谷仁
「リンパ球セマフォリン分子 CD100 の樹状細胞を介した T 細胞活性化への関与」

(15) 第31回日本免疫学会総会

分担研究報告書

生物活性抗体が認識するエピトープの解析

分担研究者 瀧 孝雄 大塚製薬株式会社
分子医科学研究所所長

研究要旨

実際に感染者生体内で生物活性をもつと考えられる抗体を、熱帯熱マラリア (*Plasmodium falciparum*) に感染をしているが無症候の患者血清から選択した。当該血清は Mahidol 大学付属病院から提供された。それら血清が含有する抗体が認識するエピトープを、フェージランダムペプチドライブラリーを用いて検索した。その結果、患者血清と強く反応するクローンを IgG および IgM 分画から各々 11 と 58 クローンを選択した。各クローンのペプチド配列を調べたところ、*Plasmodium falciparum* 由来の抗原蛋白と一致していることが示された。

研究協力者 佐藤健人 東海大学医学部
助手
安藤 潔 東海大学医学部
講師

が無症候である患者の血清を利用する。本年度は、クロロキンをはじめとする薬剤耐性による変異が激しいとされる病原体であり、現在治療法が充分でない熱帯熱マラリアに対する抗体作製に有用なエピトープを同定することを目的とした。

A. 研究目的

病原体の種類によっては頻繁に突然変異がおこるため、あるいは薬剤耐性を獲得するため、単に病原体由来の既知の構造タンパクを免疫して作製される抗体では、感染現場における病原体と特異的に反応できない場合や生物活性が失われている場合が多い。本研究では、実際に感染者生体内で生物活性をもつと考えられる抗体を獲得することが先決で、続いてその抗体が認識するエピトープを決定することにより、上記問題点を解消しようとするものである。目的にかなった抗体を得るために、感染はしている

B. 研究方法

東海大学の相原教授の協力を得て、Mahidol 大学付属病院から熱帯熱マラリアの無症候患者の血清を 5 人分得た。この選択には相川教授らの協力を得て、MSP-1, MSP-2, RESA 等の原虫表面抗原を用いて ELISA でおこなわれた。患者血清 (5 人分) と健常人コントロール血清 (10 人分) から、IgG および IgM 分画を得て、その中に存在するであろう抗マラリア抗体の抗原結合部位に認識される擬似抗原を、既に購

入してあるファージペプチドライブラリーからパニングによりスクリーニングする。具体的には、コントロール血清 IgG と IgM に結合しなかったファージクローンを患者血清の免疫グロブリン分画と反応させて、結合したクローンを拾う。この操作は3回繰り返し、大腸菌に感染させてファージクローンを増幅させ、再度患者血清と反応させて ELISA で検討する。

C. 研究成果

熱帯熱マラリアの無症候キャリアーの血清中に含まれる抗体と結合するファージクローンをファージペプチドライブラリーからスクリーニングして270のクローンを得た。それらの特異性を患者血清由来の IgM および IgG 分画との ELISA で解析した結果、陽性および弱陽性クローンは、IgG 分画では11, IgM 分画では58であった。

上記クローンを大腸菌で増幅し、各々のペプチド配列を調べたところ、*Plasmodium falciparum* 由来の抗原蛋白のそれと一致していることが示された。

得られた一部のペプチドと強い反応性を示す血清の患者は、問い合わせたところ血液中的マラリア原虫数が少ないことが判った。現在、抗原ペプチド(8量体のタンデムリピート、分子量約20KD)を大腸菌の発現ベクターに構築して作製中である。

D. 考察

本年度のファージペプチドライブラリーを用いた検索により、患者血清中の抗体が認識するペプチド複数を決定した。それらは、*Plasmodium falciparum* 由来の抗原蛋白と一致していることから、エピトープの可能性が高い。本研究で使用した血清はいず

れも、熱帯熱マラリアに感染しているが無症候の患者から得たので、そこに含まれる抗体は生体内での生物活性があったと考えられる。この推測は、ペプチドと強い反応性を示す血清の患者では、血液中のマラリア原虫数が少ないことから支持された。今年度の結果を踏まえ、同定されたペプチドの免疫原性を確認すべく、これらをマウス続いてヒト免疫再構築モデルマウスに免疫し、抗体産生誘導能を確認していく予定である。

E. 結論

ファージペプチドライブラリーを用いた検索により、患者血清中の抗体が認識するペプチド複数を決定した無症候熱帯熱マラリア患者の血清と特異的に結合するペプチドを複数同定した。それらペプチドはまた *Plasmodium falciparum* 由来の抗原蛋白と一致していることから、抗マラリア活性をもつ抗体のエピトープである可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Detection of antibody to sialyl-i, a possible antigen in patients with Meniere's disease.

Biochim Biophys Acta 1501 81-90 (2000)

A.Ikeda., A.Komatsuzaki., T.Kasama., S.Hand
T.Taki.

(2) Thin-Layer Chromatography Blotting Using Polyvinylidene Difluoride Membrane (Far-Eastern Blotting) and Its Applications.

Methods in Enzymology (ed. Alfred H. Merrill, Jr. Yusuf A. Hannun) 312 145-157 (2000)

D.Ishikawa and T.Taki.

(3) Thin-Layer Chromatography

Immunostaining.

Methods in Enzymology (ed. Alfred H. Merrill, Jr. Yusuf A. Hannun) 312 157-159 (2000)

D.Ishikawa., and T. Taki.

(4) Suppression of GD1 α ganglioside-mediated tumor metastasi by liposomalized WHW-peptide. FEBS Letters 466, 381-384 (2001)

M. Takikawa, H. Kikkawa, T. Asai, N. Yamaguchi, D. Ishikawa, M. Tanaka, K. Ogino, T. Taki, N. Oku

(5) In vitro Inhibitory effects of Daphne Oleoides ssp. oleoides on Inflammatory Cytokines and Active-Guided Isolation of Active Constituents. Cytokine, 13, 359-364 (2001)

E. Yesilada, H. Taninak, Y. Takaishi, G. Honda, E. Sezik, H. Momota, Y. Ohmoto and T. Taki

分担研究報告書

無症候キャリアーの血清の検討

分担研究者 関川 巖 順天堂大学 助教授

研究要旨

SLE 発症と密接な関連があるとして報告してきた HERV clone 4-1(human endogenous retrovirus family)に対する抗体が、SLE 患者の血清に高いことを報告してきた。今年度は、mRNA のレベルで SEL 患者の末梢血にのみ HERV clone-4 が発現していることを明らかにした。また、HERV clone-1 の転写が亢進している機序として、同遺伝子配列の methylation が SLE 患者で障害されていることに起因することを示した。これらの成果は、HERV clone-4 が SLE 患者にのみ上昇している抗体が HERV clone-4 に特異的であることを強く示唆し、同抗体が HERV clone-4 と高い相同性をもつ HIV のエピトープ同定に有用であることを示唆した。

A. 研究目的

SLE 患者は HIV 感染に対して抵抗性があることが知られている。その機序として、同患者には HERV clone 4-1(human endogenous retrovirus family)に対する抗体が上昇していることが指摘されている。HERV clone-1 は HIV 遺伝子と高い相同性をもつ。そこで、HIV 無症候キャリアーの血清中の抗 HIV 抗体の代替として、抗 HERV clone-4 が高い SLE 患者の血清を使用して、将来抗 HIV 活性のある抗体が認識するエピトープを同定することを目指す。

B. 研究方法

(1) HERV clone-4 発現の mRNA レベルでの解析: 同意を得た SEL 患者の末梢単核球から mRNA を抽出し、HERV clone-4 の

gag region に対する primer を用いて RT-PCR により発現を調べた。

(2) HERV clone-4 遺伝子の methylation: 健常人および SEL 患者の末梢血を demethylating reagent, 5-aza, と 48 時間培養し、HERV clone-4 gag の mRNA の発現を検索した。

なお、血清を用いた Western blotting での抗 CA41B(HERV clone-4 由来のリコンビナント p30gag protein)に対する特異性に明確さが欠如したため、血清を用いた抗 HERV clone-4 のスクリーニングは施行しなかった。

C. 研究成果

臨床症状の明確な患者末梢血 5, 健常人末梢血 5 検体を用いて HERV clone-4 gag region の転写と RT-PCR で調べると、SLE

患者においてのみ、転写が検出された。また、5-aza との培養後の転写を調べると、健常人の細胞からは、clone-4 の gag mRNA が検出限界以下であったものが、亢進した。一方、SEL 患者の末梢血を解析すると、5-aza によって gag mRNA が亢進することはなかった。この結果は、1) SLE 患者では、HERV clone-4 gag の発現は転写レベルで亢進している。2) 健常人では DNA の methylation が HERV clone-4 の配列に転写を低下させているが、SLE 患者では何らかの支障がおこっていることを示唆している。

D. 考察

今回は、HIV 無症候キャリアー血清中の抗 HIV 抗体の代替として、抗 HERV clone-4 が高い SLE 患者の血清を使用するに先立って、次の事項を確認する研究を行った。すなわち、SEL 患者末梢血中に HERV clone-4 の発現が高いことは、従来抗 CA41B (HERV clone-4 由来のリコンビナント p30 gag protein 血清抗体) と患者血清を用いて Western blotting により診断していたが、対照とする抗血清の問題が浮上して、特異性に疑問が生じた。そこで、今回は RT-PCR により転写産物の存在で決定した。その結果は、検索した SEL 患者末梢血 5 検体はすべて転写発現が認められた。一方、健常人ではすべて陰性であった。また、SLE 患者末梢血細胞における clone-4 gag の転写亢進は、同遺伝子領域 methylation が障害されていることを示唆するデータを得た。今後、mRNA レベルでの発現を基盤に患者血清のスクリーニングをおこない、HERV clone-4 抗体の検索をすすめ、エピトープ検

索の手段としたい。

E. 結論

HERV clone-4 の抗体が認識するエピトープを同定する目的で、SEL 患者より同意を得て末梢血における HERV clone-4 発現を転写レベルで解析した。その結果、転写レベルで同患者に特異的に HERV clone-4 が発現していることが明らかとなった。この結果を踏まえて抗 HERV clone-4 の特異的検出を開発すると同時に、同抗体と反応するエピトープ解析の材料とする。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) H. Ogasawara, T. Naito, H. Kaneko, T. Hishikawa, I. Sekigawa, H. Hashimoto, N. Yamamoto and N. Maruyama
Sequence Analysis of Human Endogenous Retroviruses Clone 4-1 in Systemic Lupus Erythematosus
- (2) H. Ogasawara, T. Naito, H. Kaneko, T. Hishikawa, I. Sekigawa, H. Hashimoto, Y. Kaneko, N. Yamamoto, M. Maruyama
Quantitative Analyses of Messenger RNA of Human Endogenous Retrovirus in Patients with Systemic Lupus Erythematosus
J. Rheumatol: 28 533-538 2001
- (3) I. Sekigawa, H. Ogasawara, H. Kaneko, T. Hishikawa and H. Hashimoto
Retroviruses and Autoimmunity
Internat. Medicine: 40 80-60 2001

分担研究報告書

NOG マウスにおけるヒト免疫系再構築の効率化と効率よい抗原特異的ヒトB細胞由来抗体獲得モデルの検討

分担研究者 竹腰正隆 東海大学医学部 助手

研究要旨

これまでの研究プロジェクトにおいて、ヒト臍帯血由来の幹細胞を基盤にヒト免疫系の再構築を試み、NOD-SCID マウス内でヒトTおよびB細胞の分化誘導に成功した。また、免疫抗原に対して抗体産生も検出できた。また一方では、ファージディスプレイ法により、ヒトB細胞株或いは末梢血より外来病原体（赤痢アメーバおよびB型肝炎ウイルス、HBV）に対する抗体のクローニングに成功した。しかしながら、ヒト免疫系再構築モデルでの抗原特異的IgG抗体の産生は著しく低いため、ファージディスプレイ法を用いて有効な抗体を得ることは、困難であった。そこでより高い効率でヒト免疫系の再構築を試み、新しく開発されたNOGマウスを使用することにより、ヒトT細胞を胸腺および末梢組織にこれまでの10倍以上分化誘導させることに成功した。

この結果は、抗原特異的B細胞を抗体産生細胞により高率的に誘導できることを意味し、NOD-SCIDマウスにおける障害を解消できることが示唆された。今後この新しく開発されたマウスを用いて、分担者滝孝雄が同定したペプチドの免疫を進めてヒト型抗体獲得を目指す。

研究協力者 亀谷美恵 東海大学医学部
助手

A. 研究目的

臍帯血由来ヒト幹細胞をNOD-SCIDに移植し、in vivoでヒトB細胞と共にヒトB細胞の分化誘導に初めて成功した。しかし、このヒト免疫再構築マウスでは抗原特異的抗体の産生は著しく低下していた。その主原因は分化したT細胞が末梢に少ないこと

にあると考えられた。そこで、新たに開発されたNOGマウスを用いてより効率に多数のヒトT細胞を分化誘導させられるか否か、NOD-SCIDマウスとNOGマウスを比較検討した。

B. 研究方法

(1) NK活性の検討：NOGマウスはIL-2RgノックアウトマウスにNOD-SCIDマウスを戻し交配させて樹立したマウスであ

る(実験動物中央研究所、川崎)。NOG マウスとNO-SCIDマウスの脾細胞を採取し、定法により YAC-1 を標的細胞としてその細胞傷害性を検索した。

(2) ヒト T 細胞の分布: ヒト臍帯血より分離した CD34+細胞を照射した NOD-SCID および NOG マウスにそれぞれ尾静脈から移植し、経時的に胸腺と末梢リンパ組織における T 細胞を表面マーカーを指標に flowcytometer で解析した。および ELISA により検索した。

C. 研究成果

(1) NK 活性: NOD-SCID マウスの NK 活性は低いことが知られているが、NOG マウスと比較すると、後者に比較して検出可能であることが明らかとなった。

(2) ヒト CD34+細胞の胸腺への移住: ヒト臍帯血由来 CD34+細胞(2×10^6 個)の移植後 6, 8, 10, 12 週で、各マウスの胸腺細胞数および T 細胞への分化状態を検索した。その結果、NOD マウスでは 100%の胸腺が、ヒト由来 CD45 陽性で平均 10^7 個各検出された。また、T 細胞マーカーで調べると、通常のヒト胸腺細胞と同様のパターンを示し、数%の CD4-8-(DN)細胞、約 80%の CD4+8+(DP)細胞、ほぼ 10%の CD4+および CD8+細胞であった。また、CD3 も充分発現されていた。一方、NOD-SCID マウスでは、ヒト CD45+細胞が検出された個体は、30%弱であった。また、移住した細胞はヒト T 細胞マーカーを発現していたが、その数は NOG マウスの 1/10 以下であった。

(3) 胸腺内ヒト T 細胞の機能: 十分な細胞数が移住・分化した NOG 胸腺内ヒト T 細胞の機能を解析したところ、刺激に対して充分量の IL-4 および IL-2 を産生した。

(4) 脾臓におけるヒト T および B 細胞の分布: NOD-SCID マウスでは、ヒト CD45+細胞のうち T 細胞マーカーを持つ細胞は最高で 1%であったが、多くは 0.03-0.3%であった。一方、NOG マウスでは、T 細胞は 10-30%であった。ただし、脾臓内の T 細胞の割合と胸腺細胞における T 細胞数とは必ずしも一致しなかった。B 細胞は NOD-SCID においても

末梢血中のヒト T および B 細胞の解析: 脾臓或いは胸腺に比較的多数のヒト T 差一望が検出されているが、末梢血中には平均 0.5%しか検出されなかった。一方、ヒト B 細胞は 50-80%検出された。なお、血清中のヒト IgM および IgG はも ELISA にて検出された。

D. 考察

今回ヒト幹細胞を新たに開発された NOG マウスに移植することにより、胸腺のみならず脾臓においてもヒト由来 T 細胞を多数検出できた。NOG マウスはこれまでヒト免疫系再構築のためにレシピエントとして使用していら免疫不全マウス (NOD-SCID) と同じ遺伝的背景であるが、IL-2R β 遺伝子を除去されたマウスで、NK 活性が欠如している。すなわち、移植されたヒト CD34+細胞あるいは T 細胞へ分化途上の未熟 T 細胞は、NK 細胞により除去されていたことが強く示唆された。この事実は、NOD-SCID マウスに抗 asial GM1 (NK 細胞除去可能な抗体) 投与により、ヒト血液細胞の生着が亢進したというこれまでの報告と一致する。しかし、ヒト幹細胞或いは未熟 T 細胞が実際にマウス NK 細胞の標的となりうるか、in vivo および in vitro の系でこれまでに明確な報告がない。興味深い課題であるが、

本研究の目的とはことなるので、この点の解析は今後進める予定はない。

一方、NOG マウスにおいてかなりのヒト T 細胞が存在することが明らかとなったので、今後これらヒト免疫系再構築マウスに抗原を免疫することによって、抗原特異的 T 細胞の誘導とそれらにより分化した B 細胞からの抗体産生が期待される。次年度はこれらを用いて、これまでに改良してきたファージディスプレイ方でヒト型抗体の作製に挑戦する。

E. 結論

臍帯血より得たヒト CD34+細胞を NK 活性が完全に欠損した NOG マウスに移植することにより、ヒト CD34+細胞の胸腺細胞への移住、T 細胞への分化および末梢組織への移動は亢進することを明らかにした。この系は、昨年度までに開発したヒト免疫再構築マウスがもつ欠点—T 細胞が末梢リンパ組織に検出される確率が極めて低い—を補い、T 細胞依存性にヒト B 細胞からの抗体産生を促進するものとして、期待される。

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takehiko Sato, Chiharu Sato, Daisuke Suzuki, Yuki Yoshida, Satoshi Nunomura, Tatuya Matsumura, Katsuto Hozumi, and Sonoko Habu	Surface molecules essential for positive selection are retained but interfered in thymic epithelial cells after monolayer culture	Cellular Immunology	211	71-79	2001
Atsushi Kumanogoh, Xiaosong Wang, Insook Lee, Chie Watanabe, Masahito Kamakana, Wei Shi, Kanji Yoshida, Takehito Sato, Sonoko Habu, Misako Itoh, Noriko Sakaguchi, Shimon Sakaguchi and Hitoshi Kikutani	Increased T cell autoreactivity in the absence of CD40-CD40 ligand interactions: A role of CD40 in regulatory T cell development	J. Immunol	166	353-360	2001
Yoichi Matsunaga, Yoshio Wakatsuki, Yasuhiko Tabata, Hideo Kawasaki, Takashi Usui, Masaru Yoshida, Toshiyuki Itoh, Sonoko Habu and Toru Kita	Oral immunization with size-purified microsphere beads as a vehicle selectively induces systemic tolerance and sensitization	Vaccine	19	579-588	2001
Hitoshi Ogasawara, Takashi Nishikawa, Iwao Sekigawa, Hiroshi Hashimoto, Naoki Yamamoto and Naoki Murayama	Sequence Analysis of Human Endogenous Retrovirus Clone 4-1 in Systemic Lupus Erythematosus	Autoimmunity	33	15-21	2001
Hitoshi Ogasawara, Toshio Naito, Hiroshi Kaneko, Takashi Hishikawa, Iwao Sekigawa, Hiroshi Hashimoto, Yutaro Kaneko, Norio Yamamoto, Naoki Murayama	Quantitative Analysis of Messenger RNA of Human Endogenous Retrovirus in Patients with Systemic Lupus Erythematosus	J. Rheumatol	28	533-538	2001
Iwao Sekigawa, Hitoshi Ogasawara, Hiroshi Kaneko, Takashi Hishikawa and Hiroshi Hashimoto	Retroviruses and Autoimmunity	Internal Medicine	40	80-86	2001

20010680

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。