

of resistance by treatment with estrogen to
Theiler's virus induced demyelinating disease. J
Neuroimmunol, (submitted)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

多発性筋炎における筋傷害性 CD8T 細胞の同定に関する研究

分担研究者 上阪 等 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 助教授

研究要旨 多発性筋炎患者末梢で増多する CD8T 細胞の一部は、筋線維細胞を攻撃しうる内鞘浸潤細胞でありパーフォリンを発現する筋傷害性 T 細胞であることが示された。また、これらの候補病因 T 細胞の TCR $\alpha\beta$ 両鎖を決定することに成功した。これらの結果は、多発性筋炎の標的抗原決定のために有用な成果である。

研究協力者

西尾 純子 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 医員
杉原 毅彦 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 大学院生
鈴木美穂子 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 技術補佐員

内鞘の浸潤細胞を、マイクロダイセクション法により切り出し、genomic DNA を抽出後、各患者の増多 T 細胞の TCR β クロノタイプに特異的な PCR を行った。得られた PCR 産物の塩基長をフラグメント解析で確認し、内鞘局在 T 細胞のクロノタイプを決定した。

A. 研究目的

多発性筋炎(PM)では筋線維間(内鞘)に浸潤した細胞傷害性CD8 T細胞(CD8 CTL)が筋線維を傷害すると推測されている。我々はPM患者の末梢CD8T細胞のクローン性増多を示し、一部のクローンは、筋組織にも局在することから、筋組織を特異的に傷害する病因T細胞であると推定し、末梢リンパ球から病因T細胞を得ることが出来る可能性を示唆してきた (J. Immunol 167; 167(7): 4051-8).

今年度は、候補病因 T 細胞であると考えられる末梢増多クローンの、筋組織中での局在を詳細に検討し、それらクローンが筋線維を傷害しうる内鞘浸潤細胞であるかを検討した。また、内鞘に浸潤していたクローンについて、機能の解析及び TCR $\alpha\beta$ 両鎖決定を行った。

B. 研究方法

患者 2 名の凍結筋組織切片から、筋組織

T 細胞クローンの機能と TCR α 鎖決定のためには、患者の末梢リンパ球を抗 TCR β 、CD8 抗体で染色し、フローサイトメーターを用いて単一 T 細胞を分取し RNA を抽出した。この RNA から cDNA を合成し TCR β クロノタイプ特異的 PCR を行って内鞘局在クローンを選定した。また、同じ細胞の cDNA からパーフォリン(Pf)メッセージの PCR 増幅を試みた。さらに、各 TCR $\alpha\beta$ に特異的なオリゴヌクレオチドを混合した混合プライマーと、3 種類の TCR $\alpha\beta$ 特異的プライマーにより 3 段階の hemi-nested PCR を行い、得られた PCR 産物の遺伝子配列を決定した。

(倫理面への配慮)

本実験の遂行にあたっては PM 患者末梢血および筋組織を使用した。すでに本実験の概要は東京医科歯科大学倫理審査委員会にて審議され、承認されたものである。

C. 研究結果

1人の患者では、末梢で増多していた7クローンのうち2クローンが検出され、うち1つが7割を占めた。また、もう1人の患者では、末梢で増多していた2クローンとも検出され、1クローンが8割を占めた。

1人の患者で内鞘に優位に浸潤していたクローンと同一の末梢血由来のクローンからはパーフォリン mRNA を検出した。さらに TCRA 遺伝子配列を決定し、TCR α / β 両鎖の構造を明らかにした (図 1)。

D. 考察

PM 患者末梢でクローン性増多する CD8T 細胞の一部は筋線維を直接傷害しうる内鞘に存在する T 細胞で、かつパーフォリンを発現するエフェクター機能を持つことから、筋傷害性 CTL と考えられる。

筋組織内鞘に浸潤する筋傷害性 CTL の TCR α / β 両鎖が決定され、しかも、それらのクローンが末梢血に存在することから、病因 T 細胞の単離が可能となった。今後、この筋傷害性 CTL クローンを樹立し、標的抗原決定を行うことにより、PM の病態解明と治療法開発は飛躍的に進展すると考えられる。

E. 結論

PM 患者の末梢で増多している CD8 T 細

胞の一部は、筋傷害性 CTL クローンである。これらのクローンを解析することは、多発筋炎に対する抗原特異的治療法開発のために重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nishio J, Suzuki M, Miyasaka N, and Kohsaka H. Clonal biases of peripheral CD8 T cell repertoire directly reflect local inflammation in polymyositis. J Immunol 167:4051-4058, 2001

2. 学会発表

1) 第29回日本リウマチ学会総会 (東京) 多発性筋炎における病因 T 細胞の探求

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1. TCRA遺伝子配列

<AV8S1>tactctgtgca gtagattagcacctccaggaacctacaataca

Y F C A A S R L A P P G T Y K Y

atctttggaacaggcaccaggctgaaggttttagcaaat atccagaac<AC>

I F G T G T R L K V L A N I Q N

CTLA-4 を介したリンパ球異常増殖の抑制機構に関する研究

分担研究者 齊藤 隆 千葉大学大学院医学研究院 遺伝子制御学 教授

研究要旨 CTLA-4 は活性化された T 細胞表面に発現し、CD28 とリガンド結合に拮抗的に働くとともに自らがネガティブシグナルを伝えることで、T 細胞活性化を負に制御する。CTLA-4 KO マウスは T 細胞の非特異的活性化による lymphoproliferative disease にて生後早期に死亡する。我々は CTLA-4 の全長 (FL) および細胞内領域をほとんど持たない (TL) Tg マウスを作製し、リンパ球異常増殖、活性化を解析した。その結果、CTLA-4 KO マウスの lymphoproliferative disease は FL のみならず TL CTLA-4 の発現により抑制された。

共同研究者

高瀬 完 千葉大学 助手
高橋 成和 千葉大学 大学院生

A. 研究目的

CTLA-4 は活性化された T 細胞表面に発現し、CD28 とリガンド結合に拮抗的に働くとともに自らがネガティブシグナルを伝えることで、T 細胞活性化を負に制御する。また、CTLA-4 KO マウスは生後約 3~5 週で T 細胞の非特異的活性化による lymphoproliferative disease にて死亡する。一方、抑制性 T 細胞である CD4+CD25+T 細胞が恒常的に CTLA-4 を発現していることが近年明らかになった。

我々は CTLA-4 の全長 (FL) および細胞内領域をほとんど欠失した CTLA-4 (TL) を導入した T 細胞クローンでは、TL においても抑制シグナルが伝達することを示した。そこで今回 *in vivo* における CTLA-4 の機能を解析する目的で FL、TL CTLA-4 を発現する Tg マウスを作製し、CTLA-4 KO マウスにおけるリンパ球異常増殖、活性化のメカニズムを解析した。

B. 研究方法

CD2 プロモーターの下流に CTLA-4 (FL) および CTLA-4 (TL) を挿入し、Tg マウスを作製

した。TL Tg マウスに関しては発現の高いライン (TLH) および比較的低いライン (TLL) の両方を実験に用いた。各 Tg マウスおよび CTLA-4 KO マウスと交配したマウスの CTLA-4 の発現、T 細胞分化、胸腺におけるセレクション、CD25+T 細胞の数、Tg T 細胞を抗原、ConA および抗体で刺激したときの、サイトカイン産生を解析した。なお、抗原刺激の系のみ DO11-10Tg マウスを CTLA-4Tg マウスと交配して得られたマウスを使用した。

C. 研究結果

1) CTLA-4 の発現

いずれの Tg マウスも胸腺内、末梢において T 細胞表面に CTLA-4 を発現しているが、TL はほとんど細胞表面に存在するのに対し、FL は細胞内、細胞表面両方に発現が見られた。

2) リンパ球分化

胸腺における T 細胞分化を FACS にて解析したが、大きな異常は見られなかった。ただし、CD4+CD25+T 細胞は正常の 1~5 割程度に減少しており、減少は CTLA-4 の発現レベルと関連していた。

3) 胸腺におけるネガティブセレクション

抗 CD3 抗体を腹腔内に注射し、48 時間後に胸腺 DP 細胞のネガティブセレクションを

FACSにて解析した。その結果、WT マウスにおいても抗 CD3 抗体刺激により胸腺細胞表面に CTLA-4 が発現することが示され、その発現が高く恒常的である Tg マウスにおいてはネガティブセレクションに抑制がかかることが明らかとなった。

4) lymphoproliferative disease の発症

Tg マウスを CTLA-4 KO マウスと交配したところ、FL、TL いずれにおいても lymphoproliferative disease の発症が抑制され、少なくとも、50 週までは死亡曲線に差は見られなかった。

5) Tg T 細胞の反応、活性化

i) Tg マウスを CTLA-4 KO マウスと交配したマウスの脾臓から T 細胞を取り、抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体、抗 CTLA-4 抗体を組み合わせ刺激したもの、ii) ConA と APC で刺激したもの、および iii) DO11-10Tg マウスを交配したマウス脾臓 T 細胞を OVA と APC で刺激したもの、それらの IL-2 の産生を ELISA にて測定した。その結果、ConA+APC の系、OVA+APC の系ではいずれも FL、TL に関係なく、表面の発現量に応じて IL-2 の産生が抑制された。一方、抗体刺激の系においては、CTLA-4 の刺激を加えると、FL においては WT より強い抑制が誘導されたが、TL においてはまったく抑制がされなかった。

D. 考察

我々が以前報告したように、CTLA-4 の細胞表面への発現が、細胞内のソーティングシグナルによってコントロールされていることが、*vivo* においても証明された。CD4+CD25+T 細胞の減少は CTLA-4 の発現に応じており、これは CD4+CD25+T 細胞の分化、維持には CD28 を介する co-stimulation が必要であると報告されていることから、恒常的に CTLA-4 が発現することで、co-stimulation が拮抗阻害され、減少したものと考えられる。

これまでに CTLA-4 が T 細胞分化に関与するという報告はない。しかし今回作製した Tg マウスの解析から、CTLA-4 が刺激のウインドウ

によっては胸腺におけるネガティブセレクションに関与することが示唆された。

CTLA-4 KO マウスの T 細胞における反応性の増強は、T 細胞自体が CTLA-4 を欠損することによる、直接的な抑制性シグナルの欠如、あるいは CD4+CD25+T 細胞の欠損による間接的な抑制の解除が考えられる。CTLA-4 KO マウスにおいては自己反応性に CD4+T 細胞が活性化してしまい CD25+ となってしまうため、いわゆる CD25+ の regulatory T 細胞が存在するかどうか明らかではない。今回我々が行った解析から少なくとも CD28 からのシグナルを拮抗阻害するのみで lymphoproliferative disease の発症が抑制されており、CTLA-4Ig の投与で発症が抑えられるという報告を裏付けている。

我々は以前 T 細胞クローンを用いた解析から、細胞内に 6 アミノ酸しかそんざいしない CTLA-4 でもネガティブシグナルが伝達されることを証明した。今回 FL および TL Tg マウスより得た脾臓 T 細胞を用いた解析では、FL CTLA-4 では強い抑制シグナルを伝達していたが、一方 TL CTLA-4 はまったく抑制がかからなかった。この違いは T 細胞クローンは抗原刺激と IL-2 により維持されていることから、エフェクター型と考えられるが、Tg マウスから得た T 細胞はナイーブ型であり、ナイーブとエフェクターの型の違いにより、CTLA-4 のシグナル伝達経路に違いがある可能性が示唆された。実際、エフェクターとなると CD28 からの co-stimulation への依存性が低下する。したがって反応性が上昇し、抗原暴露に際し即座に対応できる状態になると考えられるが、一方それによる過剰反応を抑えるシステムとして、CTLA-4 からのネガティブシグナルがより強力に働くシステムが構築される必要があるのかもしれない。

E. 結論

CTLA-4 は胸腺細胞においても抗原刺激により発現し、ネガティブシグナルに関与する可能性が示された。CTLA-4 KO マウスにおける

性が示された。CTLA-4 KO マウスにおける lymphoproliferative disease の発症阻害には CTLA-4 自体のネガティブシグナルは不要であり、CD28 からのシグナルを阻害するのみでよいことが裏付けられた。CTLA-4 からのネガティブシグナルの伝達系は、ナイーブとエフェクターのフェノタイプにより異なる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Arase, H., Suenaga, T., Arase, N., Kimura, Y., Ito, K., Shiina, R., Ohno, H. and Saito, T.: Negative regulation of expression and function of Fc γ RIII by CD3 ζ in murine NK cells. *J. Immunol.* 166:21-25, 2001.

2) Yamasaki, S., Nishida, K., Hibi, M., Sakuma, M., Shiina, R., Takeuchi, A., Ohnishi, H., Hirano, T. and Saito, T.: Docking protein Gab2 is phosphorylated by ZAP-70 and negatively regulates T cell receptor signaling by recruitment of inhibitory molecules. *J. Biol. Chem.* 276: 45175-45183 2001.

3) Azeredo da Silveira, S., Kikuchi, S., Fossati-Jimack, L., Moll, T., Saito, T., Verbeek, J. S., Botto, M., Walport, M. J., Carroll, M. and Izui S.: Complement activation selectively potentiates the pathogenicity of the IgG2b and IgG3 isotypes of a high-affinity anti-erythrocyte autoantibody. *J. Exp. Med.* In press.

2. 学会発表

1) 齊藤 隆. T細胞活性化シグナルの負の制御とその異常. 第13回日本神経免疫学会学術集会(東京、2.1-2.2001)

2) Saito, T., Itoh, K., Sakakibara, M., Okada, M., Yamasaki, S., Takeuchi, A.: Negative regulation of immunological synapse formation through

anchoring lipid part to cytoskeleton. 11th

International Congress of Immunology (Stockholm, 7.22-27. 2001)

3) Sakurai, D., Arase, K., Park, S. Y., Arase, H.

Saito, T. In vivo function of Fc γ ITAM in FcR-mediated immune response 11th

International Congress of Immunology (Stockholm, 7.22-27. 2001)

4) 齊藤 隆、山崎 晶、大塚 誠、鈴木 勝也、椎名 律子、荒瀬 尚. 新たなファンクショナル cDNA クローニングシステム NF-AT activating molecule cloning system(NACS)の確立 (Establishment of a new functional cDNA cloning system, NF-AT activating molecule cloning system (NACS))第24回日本分子生物学会(横浜、12.9-12, 2001)

5) 大塚誠、荒瀬尚、山崎晶、竹内新、齊藤 隆. 新規 ITAM⁺細胞表面分子 NFAM-1 を介する T細胞活性化機構. 第31回日本免疫学会総会(大阪、12.11-13, 2001)

6) 鈴木 順一郎、山崎 晶、大塚 誠、椎名 律子、荒瀬 尚、齊藤 隆. NFAT activating cloning system(NACS)を用いたアダプター分子のクローニングおよび T細胞の活性化機構の解析 第31回日本免疫学会総会(大阪、12.11-13, 2001)

7) 高橋 成和、高瀬 完、原 暁、齊藤 隆. In vivoにおける CTLA-4 を介する抑制メカニズムの解析. 第31回日本免疫学会総会(大阪、12.11-13, 2001)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

対応抗原未知の T 細胞が認識するペプチドの同定法に関する研究

分担研究者 佐伯 行彦 大阪大学大学院医学系研究科分子病態内科 助手

研究要旨 ファージディスプレイペプチドライブラリー (PDPL) を用いた対応抗原未知の T 細胞が認識するペプチドの同定法を確立するために、T 細胞が認識したペプチドを提示したファージを選別する方法を検討した。T 細胞が抗原レセプターを介して、抗原提示細胞 (APC、とくに B 細胞) により提示された抗原ペプチドを認識する際には、同時に CD40L と CD40 の ligation による cognate interaction により T 細胞、B 細胞に活性化や増殖を促す種々の signal が入ることが報告されている。それらの signal の中で B 細胞には、短時間で NF- κ B の活性化が誘導されることが報告されている。この B 細胞における NF- κ B の活性化を利用し、抗原ペプチドの提示をおこなった B 細胞を選別することが可能かどうか検討した。昨年度、NF- κ B response element (NF- κ B RE) とその下流にマーカーとしての GFP (green fluorescent protein) をコードする遺伝子を有するベクター (pNF- κ B d2EGFP, CLONETEC 社) を導入した B 細胞ライン (A20) に、抗 CD40 抗体を用いてシグナルをいれると、GFP が発現することを報告した。今回は、T 細胞クローン (DO11.10; Ovalbumin³²³⁻³³⁹ peptide specific) と OVA³²³⁻³³⁹ ペプチドと pNF- κ B d2EGFP 導入 A20 を混在させ、A20 が GFP を発現するかどうか flowcytometry で検討した。A20 は、DO11.10 と OVA³²³⁻³³⁹ 共存下では GFP を発現し、蛍光発色したが、コントロールの T 細胞クローン (2B4) やコントロールペプチド (ハトチトクローム C ペプチド) 共存下では発色しなかった。今回の結果から、T 細胞に抗原を提示した時の CD40L-CD40 ligation による NF- κ B の活性化を利用し、T 細胞に抗原提示した B 細胞を選別することが可能であることが示唆された。

A. 研究目的

ファージディスプレイペプチドライブラリー (PDPL) を用いた対応抗原未知の T 細胞が認識するペプチドの同定法を確立するために、T 細胞が認識したペプチドを提示した B 細胞 (ファージ) を選別する方法を検討した。

B. 研究方法

T 細胞が抗原レセプターを介して、抗原提示細胞 (APC、とくに B 細胞) により提示された抗原ペプチドを認識する際には、同時に CD40L と CD40 の ligation による cognate interaction により T 細胞、B 細胞に活性化や増殖を促す種々の signal が入ることが報告されている。それらの signal の中で B 細胞には、短時間で NF- κ B

の活性化が誘導されることが報告されている。昨年度、NF- κ B response element (NF- κ B RE) とその下流にマーカーとしての GFP (green fluorescent protein) をコードする遺伝子を有するベクター (pNF- κ B d2EGFP, CLONETEC 社) を導入した B 細胞ライン (A20) に、抗 CD40 抗体を用いてシグナルをいれると、GFP が発現することを報告した。今年度は、T 細胞クローン (DO11.10; Ovalbumin³²³⁻³³⁹ peptide specific) と OVA³²³⁻³³⁹ ペプチドと pNF- κ B d2EGFP 導入 A20 を混在させ、A20 が GFP を発現するかどうか flowcytometry で検討した。

(1) B 細胞ライン、A20 への pNF- κ B d2EGFP 導入
制限酵素 (KpnI) で切断した pNF- κ Bd2EGFP-

Zocinresistant ベクターをエレクトロポレーション法により A20 に導入した。

(2) 抗原提示時の抗原ペプチド特異的な APC (B 細胞ライン, A20) の NF- κ B の活性化の検出

まず、抗原ペプチド (Ovalbumin³²³⁻³³⁹ peptide) と APC の pNF- κ B d2EGFP 導入 A20 (H-2^d) を 24 時間混在させ、抗原ペプチドを A20 の細胞表面の MHC class II 分子と結合させる。その後 T 細胞として、Ovalbumin³²³⁻³³⁹ peptide specific な T 細胞クローン, DO11.10 (H-2^d 拘束性) と抗原ペプチドを表面の MHC class II 分子で提示した A20 と 3 時間混合培養し、抗原提示を行わせ、A20 が GFP を発現するかどうか flowcytometry で検討した。T 細胞、抗原ペプチドのコントロールとして、それぞれ、2B4 クローン、ハトチトクローム C ペプチドを用いた。(倫理面への配慮)

今回の実験系では、直接的にヒトの検体を用いていないので、特別な配慮は必要でなかった。

C. 研究結果

pNF- κ B d2EGFP 導入 A20 は、DO11.10, Ovalbumin³²³⁻³³⁹ peptide 共存下では GFP を発現し、蛍光発色したが、コントロールの T 細胞クローン (2B4) やコントロールペプチド (ハトチトクローム C ペプチド) 共存下では発色しなかった。

D. 考察

抗原提示細胞 (B 細胞) には、抗原提示時に CD40-CD40L の ligation による NF- κ B の活性化が短時間で抗原特異的に生じることが明らかになった。また、抗原提示細胞 (B 細胞) に NF- κ B response element (NF- κ B RE) とその下流にマーカーとしての GFP (green fluorescent protein) をコードする遺伝子を有するベクター (pNF- κ B d2EGFP, CLONETEC 社) を導入し、GFP の発現を flowcytometry で検討することにより、抗原提示時の抗原提示細胞 (B 細胞) の NF- κ B の活性化を検出することが可能である

ことが判明した。

E. 結論

今回の結果から、T 細胞に抗原を提示した時の CD40L-CD40 ligation による NF- κ B の活性化を利用し、T 細胞に抗原提示した B 細胞を選別することが可能であることが示唆された。今後、このシステムをファージディスプレイペプチドライブラリー (PDPL) におけるペプチド (T 細胞の認識したペプチドを提示したファージ) の選択法として用いることにより対応抗原未知の T 細胞が認識するペプチドの同定が可能と考えられる。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saeki Y, Ohshima S, Ishida T, Shima Y, Umeshita-Sasai M, Nishioka K, Yamaguchi N, and Suemura S. Remission of the renal involvement in a patient with primary Sjogren's syndrome (SS) after pulse high-dose corticosteroid infusion therapy. Clin Rheum 20:225-228 (2001)
- 2) Tanaka T, Katada Y, Higa S, Fujiwara H, Wang W, Saeki Y, Ohshima S, Okuda Y, Suemura M, and Kishimoto T. Enhancement of T helper 2 response in the absence of Interleukin (IL-)-6; An inhibition of IL-4-mediated T helper 2 cell differentiation by IL-6. Cytokine. 13:193-201 (2001).
- 3) Segal NA, Toda Y, Huston J, Saeki Y, Shimizu M, Fuchs H, Shimaoka Y, Holcomb R, and McLean MJ. Two configurations of static magnetic fields for treating rheumatoid arthritis of the knee: a double-blind clinical trial. Arch Phys Med Rehabil 82:1453-1460 (2001)
- 4) Yamaguchi T, Ohshima S, Tanaka T, Tsukada S, Matsushita M, Kohmo S, Kanzaki T, and Saeki Y. Renal crisis due to intimal hyperplasia in a patient with mixed connective tissue disease (MCTD) with

pulmonary hypertension. Internal Medicine 40 (12): 1250-1253 (2001)

5) Suganuma M, Okabe S, Kurusu M, Iida N, Ohshima S, Saeki Y, Kishimoto T, and Fujiki H. Discrete roles of cytokines, TNF α , IL-1, IL-6 in tumor promotion and cell transformation. Int J Oncology 20(1):131-6 (2002)

6) Ohshima S, Kobayashi H, Yamaguchi N, Nishioka K, U-Sasai M, Mima T, Nomura S, Kon S, Inobe M, Uede T, and Saeki Y. Expression of osteopontin (OPN) at sites of bone erosion in murine experimental arthritis model, collagen-induced arthritis (CIA): Possible involvement of OPN in bone destruction in arthritis. Arthritis Rheum (in press)

7) Kobayashi H, Ohshima S, Nishioka K, Yamaguchi N, U-Sasai M, Ishii T, Mima T, Kishimoto T, Kawase I, and Saeki Y. Antigen induced arthritis (AIA) can be transferred by bone marrow transplantation: The evidence that IL-6 is essential for the induction of AIA. J Rheumatol (in press)

1. 学会発表

(国内)

第45回 日本リウマチ学会総会

W42-1 IL-6, TNFRI 及びダブルノックアウトマウスにおけるコラーゲン誘導関節炎の比較検討

山口統彦、梅下光子、大島至郎、西岡克泰、小林秀之、美馬 亨、佐伯行彦

W42-4 Antigen-induced arthritis (AIA)は骨髄細胞 (BMC) によりトランスファーされる
小林秀之、山口統彦、大島至郎、西岡克泰、美馬 亨、佐伯行彦

第31回日本免疫学会総会

W3-31 IL-6 および TNFRI ダブルノックアウトマウスにおけるコラーゲン誘導関節炎の相乗的な軽減効果

山口統彦、小林秀之、大島至郎、美馬 亨、田中敏郎、藤原 寛、佐伯行彦

(海外)

米国リウマチ学会 (American College of Rheumatology)

2001年

1. Synergistic effects on amelioration of collagen induced arthritis (CIA) in tumor necrosis factor receptor I (TNFRI) and interleukin 6 (IL-6) double knock-out mice. Yamaguchi N, Ohshima S, U-Sasai M, Nishioka K, Kobayashi H, Mima T, Katada Y, Shimizu M, Saeki Y.

2. Expression of osteopontin (OPN) at sites of bone erosion in experimental arthritis models. Ohshima S, Kobayashi H, Yamaguchi N, U-Sasai M, Nishioka K, Mima T, Nomura S, Kon S, Inobe M, Uede T, Saeki Y.

3. Enhanced expression of osteopontin (OPN) in rheumatoid joints: a possible marker for disease activity in rheumatoid arthritis. Ohshima S, Schedel J, Yamaguchi N, Nishioka K, Mima T, Shimizu M, Katada Y, Wakitani S, Murata N, Matsuno H, Katayama R, Kon S, Inobe M, Uede T, Petrow P, Michel BA, Gay RE, Gay S, Saeki Y.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

自己免疫病における抗原特異的分子制御に関する研究

分担研究者 住田孝之 筑波大学臨床医学系内科 教授

研究要旨 本研究では、シェーグレン症候群や慢性関節リウマチなどの自己免疫病を抗原特異的に制御するために、炎症臓器に浸潤した T 細胞が認識する自己抗原(アミラーゼ、II 型コラーゲン) についてアミノ酸レベルで解析した。その結果、HLA-DRB1*0405 陽性 SS 患者ではアミラーゼの NPFRPWERYQPV(AA68-80)が、DRB1*0101 陽性 RA 患者では II 型コラーゲンの GKPGIAGFKGEQGPKG (AA256-271)が、共通の T 細胞エピトープであることが明らかにされた。今後、アナログペプチドを選別することにより、抗原分子をターゲットとした自己免疫応答の特異的制御が可能になると考えられる。

A. 研究目的

シェーグレン症候群(SS)や慢性関節リウマチ(RA)の各臓器に浸潤した T 細胞の一部は、抗原により誘導されている。これらの自己免疫病の発症機構を明らかにし、病因抗原をターゲットとして抗原特異的に病気を制御するために、炎症局所に浸潤した自己反応性 T 細胞が認識する対応自己抗原をアミノ酸レベルで明らかにすることを目的とした。

B. 対象および方法

1)対象：HLA-DR B1*0405 を有する SS 患者 3 名を対象として α アミラーゼの T 細胞エピトープを解析した。HLA-DR B1*0101 を有する 8 名の RA 患者を対象としてタイプ II コラーゲン(CII)の T 細胞エピトープを解析した。

2) α アミラーゼリコンビナント蛋白の作成：8 種類のリコンビナント蛋白 (Ex1-1, AA15-56; Ex1-2, AA15-105; Ex1-3, AA15-171; Ex1-4, AA15-248; Ex1-5, AA15-293; Ex1-6, AA15-334; Ex1-7, AA15-367; Ex1-8, AA15-407)を作成するために、それぞれをコードした DNA を PCR で作成し、pGEX-6p-1 発現ベクターに組み込んだのち、BL21 E.coli に導入し、リコンビナント蛋白を発現させた。E.coli を sonication 後、不溶性画分を SDS-PAGE にて展開し、リコンビナント蛋白をゲルより切り出し、BioRad 社製 Model422 Electro-Eluter にて精製した。精製蛋白は Western 法にて検定した。

3) 合成アミノ酸： α アミラーゼのうち HLA DRB1*0405 に結合モチーフを持つ 9 つの合成アミノ酸 (NPFRPWERYQPV, AA68-80; VPYSGWDFN, AA144-152; GDIENYNDA, AA161-169; SKIAEYMNH, AA192-200; GDIKAILDK, AA220-228; TVIRKWNGE, AA279-287; EKMSYLKNWGEG, AA287-298; SILTFWDAR, AA326-334; RVMSSYRWPRYFEN, AA352-365)を作成した。HLA-DR B1*0101, 0401, 0405 に共通に結合する部位を含む CII のアミノ酸 GKPGIAGFKGEQGPKG (AA256-271、16mer) を合成した。

4) T 細胞応答：抗原と T 細胞を *in vitro* で共培養し、(1)MACS cytokine secretion assay (IFN- γ 産生)、(2)BrdU を用いた細胞増殖反応、(3)IL-2 産生測定、により T 細胞応答を検討した。

C. 研究結果

1) α アミラーゼの T 細胞エピトープ：

HLA-DR B1*0405 を有する SS 患者 3 例は、 α アミラーゼの AA68-80(NPFRPWERYQPV)に対して T 細胞応答が認められた。このことから、HLA-DR B1*0405 陽性 SS 患者における α アミラーゼの共通の T 細胞エピトープは NPFRPWERYQPV(AA68-80)であると推察された。

2) CII の T 細胞エピトープ：

(1)全体の CII に対して有意な細胞増殖反応を呈

した HLA-DRB1*0101 陽性の RA 患者 3 例は、CII の AA256-271 部分をコードするアミノ酸に対して増殖反応を示した。(2)HLA-DRB1*0405 陽性 RA 患者では、6 例が CII に反応したが、AA256-271 を認識したのは 1 例(17%)のみであった。以上のことから、DRB1*0101 陽性 RA における、CII の T 細胞エピトープは GKPGIAGFKGEOGPKG であり、DRB1*0405 の RA では、それ以外の CII 部分に T 細胞エピトープがあると推察された。

D. 考察

HLA-DR B1*0405 陽性の SS 患者では、αアミラーゼの共通の T 細胞エピトープは Exon2 の AA68-80(NPFRPWERYQPV)に存在する可能性が示唆された。また、HLA-DR B1*0101 陽性 RA 患者が認識するタイプ II コラーゲンの T 細胞エピトープは AA256-271 (GKPGIAGFK GEOGPKG) に存在する。一方、B1*0405 陽性 RA では、主に AA256-271 以外の部分に T 細胞エピトープがあることが判明した。今後、αアミラーゼ AA68-80 と CIIAA256-271 の T 細胞エピトープに焦点をあて、自己反応性 T 細胞の増殖反応を抑制するアナログペプチドを選別することにより、抗原分子をターゲットとした特異的制御を試みる。

E. 結論

HLA-DR B1*0405 陽性 SS のαアミラーゼ、B1*0101 陽性 RA の CII の T 細胞エピトープを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1)Sumida, T.: T cells and autoantigens in Sjogren's syndrome. *Mod. Rheumatol.* 39:471-480, 2000.
- 2)Akimoto, T., et al.: Anti-prothrombin autoantibodies in severe preeclampsia and aborsion. *Am. J. Med.* 110:188-191, 2001.
- 3)Kojo, S., et al.: Dysfunction of TCR AV24AJ18+

BV11+ double negative regulatory NKT cells in autoimmune diseases. *Arthritis Rheum.* 44: 1127-1138, 2001.

4)Tsutsumi, A., et al.: Mannose binding lectin gene: polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erthematosis, rheumatoid arthritis, and Sjogren's syndrome. *Genes immunity* 2:99-104, 2001.

5)Shimizudani, N.,et al.:Conserved CDR3 region of TCR BV gene in bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin. Exp. Immunol.* (in press).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

再生不良性貧血における抗 α グロビン抗体の意義—自己抗原の可能性

分担研究者 中尾 眞二 金沢大学大学院医学系研究科細胞移植学 教授

研究要旨 自己免疫性再生不良性貧血の骨髄 cDNA ライブラリーから SEREX 法により同定された α グロビンペプチドの意義を明らかにするため、多数の再生不良性貧血患者をスクリーニングしたところ、84%の患者にこの α グロビンペプチド (α グロビン¹⁻¹⁰¹) に対する抗体が検出された。 α グロビン¹⁻¹¹ は、造血前駆細胞上の HLA-A*0201 に結合していることが過去の研究によって示されていたため、HLA-A*0201 を持つ患者の末梢血単核細胞からこのペプチドに対する CTL の誘導を試みたところ、低頻度ではあるが、このペプチドに対する特異的な CD8 陽性細胞が誘導され、この CTL は、自己の造血前駆細胞を特異的に傷害した。以上の所見から、 α グロビンは、自己免疫性再生不良性貧血の自己抗原の一つであることが示唆された。

A. 研究目的

われわれは、自己免疫性再生不良性貧血の血清中に、 α グロビンの一部 (residue 1-101, α グロビン¹⁻¹⁰¹) に対する IgG 抗体が存在することを明らかにしてきた。慢性骨髄性白血病急性転化患者の芽球上の HLA-A*0201 には、 α グロビン residue 1-11 の 11 mer ペプチド (α グロビン¹⁻¹¹) が結合していることが知られている。HLA-A*0201 を持つ個体では、造血前駆細胞上にこのペプチドが提示されており、 α グロビンに対する免疫寛容の破綻が造血障害を引き起こしている可能性がある。そこで、 α グロビン¹⁻¹⁰¹ に対する抗体の有無を多数の患者について明らかにするとともに、 α グロビン¹⁻¹¹ 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の造血前駆細胞に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

SEREX により同定した α グロビン¹⁻¹⁰¹ cDNA と GST との fusion 蛋白を作成し、精製蛋白に対する血清抗体の有無をウェスタンブロッティングで決定した。抗 α グロビン¹⁻¹⁰¹ 抗体を検出した患者の末梢血から樹状細胞 (DC) を誘導後、 α グロビン¹⁻¹¹ をパルスした DC と共に自己の T 細胞を 3 週間培養した。培養 T 細胞の α グロビン¹⁻¹¹ に対

する特異性を、JY 細胞に対する細胞傷害性や、HLA-A2-IgG fusion 蛋白とフローサイトメトリーを用いて検討した。さらに培養 T 細胞の自己造血前駆細胞に対する影響をコロニーアッセイを用いて決定した。

C. 研究結果

α グロビン¹⁻¹⁰¹ に対する抗体は、健常者 21 例中 2 例、溶血性貧血患者 4 例を含む他の貧血患者 10 例の 1 例にしか認められなかったが、再生不良性貧血患者では 25 例中 21 例に検出された。 α グロビン¹⁻¹¹ をパルスした DC との培養により得られた T 細胞は、 α グロビン¹⁻¹¹ をパルスした JY 細胞に対して用量依存的に細胞傷害活性を示した。 α グロビン¹⁻¹¹ に特異的な CD8 陽性 T 細胞は、この培養 T 細胞の 0.55% を占めていた。この T 細胞を、患者の骨髄 CD34 陽性細胞とともに 4 時間インキュベートしたのち、メチルセルロースを加えて培養したところ、CFU-GM コロニーはリンパ球を加えない対照の 43%、BFU-E コロニーは 50% に減少した (図)。

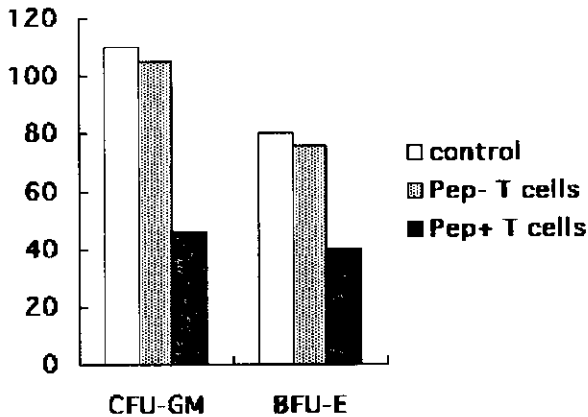


図 CTLの自己造血前駆細胞に及ぼす影響
 α グロビン¹⁻¹¹をパルスしたDCとの培養によって得られたT細胞(Pep+ T細胞)の添加のみがコロニー数(縦軸)を減少させた。

D. 考察

抗 α グロビン¹⁻¹⁰¹抗体は、特発性再生不良性貧血の大多数で検出されたことから、 α グロビンに対する免疫反応が再生不良性貧血の病態発生に関与していることが示唆された。また、抗 α グロビン¹⁻¹⁰¹抗体が検出された再生不良性貧血患者では、 α グロビン¹⁻¹¹に対するCTL precursorが存在し、これが造血前駆細胞を傷害していた可能性がある。現在、より感度の高いHLA-A2- α グロビン¹⁻¹¹テトラマーを用いて、HLA-A2陽性再生不良性貧血患者のリンパ球をスクリーニング中である。

E. 結論

HLA-A*0201を有する再生不良性貧血患者においては、 α グロビンに対する免疫寛容の破綻が造血幹細胞に対するCTLの誘導につながり、骨髓不全を引き起こしている可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Wang H, Chuhjo T, Yamazaki H, Shiobara S, Teramura M, Mizoguchi H, and Nakao S. Relative increase of granulocytes with a paroxysmal nocturnal

haemoglobinuria phenotype in aplastic anaemia patients: the high prevalence at diagnosis. *Eur J Haematol* 66: 200-205, 2001

2) Kondo Y, Shiobara S, and Nakao S. Identification of T-cell clones showing expansion associated with graft-versus-leukemia effect on chronic myelogenous leukemia in vivo and in vitro. *Exp Hematol* 29:471-476, 2001

3) Kurashima K, Fujimura M, Myou S, Kasahara K, Tachibana H, Amemiya N, Ishiura Y, Onai N, Matsushima K, and Nakao S: Effects of oral steroids on blood ccr3+ and ccr4+ t cells in patients with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 754-758, 2001

4) Takami A, Chuhjo T, Feng X, Kondo Y, Yamauchi H, Yasue S, Shiobara S, and Nakao S: Non-myeloablative stem cell transplantation for accelerated-phase chronic myeloid leukaemia: circumvention of graft rejection with donor leukocyte infusion early after transplantation. *Br J Haematol* 115: 483-484, 2001

5) Miura Y, Thoburn CJ, Bright EC, Sommer M, Lefell S, Ueda M, Nakao S, and Hess AD. Characterization of the T-cell repertoire in autologous graft-versus-host disease (GVHD): evidence for the involvement of antigen-driven T-cell response in the development of autologous GVHD. *Blood* 98: 868-876, 2001

6) Myou S, Sano H, Fujimura M, Zhu X, Kurashima K, Kita T, and Nakao S, Nonomura A, Shioya T, Kim KP, Munoz NM, Cho W, and Leff AR. Inhibition of cytosolic PLA2 and lysophospholipid synthesis blocks antigen-induced eosinophil migration and airway hyperresponsiveness. *Nat Immunol* 2:145-149, 2001
 2. 学会発表

Feng X, Murata R, Zeng W, Takami A, Wang H, Kondo Y, Chuhjo T, Shiobara S, and Nakao S. An α globin peptide presented by HLA-A*0201 on hematopoietic progenitor cells is a target of immune system attack in aplastic anemia. The American Society of Hematology 43rd Annual Meeting and Exposition. December 7-11, 2001. Orlando, Florida

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

マウス ES 細胞からの樹状細胞分化誘導法と遺伝子導入法の開発

分担研究者 西村 泰治 熊本大学大学院医学研究科免疫識別学講座 教授

研究要旨 感染性微生物の侵入に際し、樹状細胞 (DC) がこれを貪食・プロセスして抗原を T 細胞に提示し活性化することにより、免疫応答が開始される。一方で DC は自己抗原に対する T 細胞応答を抑制することにより、免疫寛容を維持していると考えられている。このように免疫応答を制御する機能をもつ DC の機能を人為的に修飾することにより、生体の免疫応答を抗原特異的に制御できる可能性が考えられる。そこで、遺伝子改変により特定の抗原と免疫制御分子を発現させた DC を生体に投与し、抗原に特異的な T 細胞の反応を制御することにより、自己免疫疾患・アレルギー疾患の治療を行うことを考えた。本研究では、マウス ES 細胞から *in vitro* で DC へ分化誘導する方法を開発し、さらに、ES 細胞に遺伝子導入したものを DC へ分化させ発現させるシステムを構築することを確認した。

A. 研究目的

樹状細胞の抗原提示機構ならびに T 細胞応答制御機構については、近年の研究により種々の知見が得られているが、未だ未知の部分が多い。また、生体内で樹状細胞が抗原提示細胞として免疫制御を中心的に担っていることより、樹状細胞を用いた免疫療法が新しい医療技術として有望視されている。本研究は、1) ES 細胞のレベルで遺伝子の標的破壊を行った樹状細胞を用いて抗原提示の分子機構の研究を行う。2) 種々の抗原遺伝子と免疫制御分子の遺伝子を ES 細胞に導入し、これを樹状細胞に分化させたものを生体移入し、個体の免疫応答を抗原特異的に制御する方法を開発する。を最終目標とし、ES 細胞から *in vitro* で樹状細胞を誘導する方法の開発を目的とする。

B. 研究方法

1. ES 細胞からの未成熟および成熟樹状細胞の *in vitro* における分化誘導 ES 細胞株として TT2 (C57BL/6 と CBA の F1 胚由来) を用いた。マウス ES 細胞を M-CSF を産生しない骨髓ストローマ細胞株である OP-9 と 5

日間共培養し、血球系細胞への分化を誘導した。次に、GM-CSF を添加した培養液中において M-CSF 産生性の骨髓ストローマ細胞である PA-6 とともに 5 日間培養を行った。この結果出現する ES 細胞由来の細胞を GM-CSF の存在下でさらに 3-7 日培養すると、不規則な形態と樹状突起を有する浮遊細胞 (未成熟樹状細胞) が誘導された。さらに、この細胞を IL-4 と TNF- α を用いて 2-4 日間刺激し、成熟樹状細胞への分化を誘導した (図 1)。

2. ES 細胞由来の樹状細胞の形態と機能の解析 未成熟および成熟樹状細胞について、位相差顕微鏡による形態の観察とフローサイトメトリーによる細胞表面分子の解析を行った。また、一次アロ MLR 反応刺激活性を指標としてナイーブ T 細胞刺激活性の解析を行った。さらに、PCC (ハトチクローム C) をモデル抗原として、抗原特異的な T 細胞に対する抗原提示活性を評価した。

3. ES 細胞への遺伝子発現ベクターの導入と樹状細胞段階での機能発現の確認 β アクチンプロモーター+IRES-Puro-R を含むベクター(pCAGGSIRESPuro, 理化学研究所・丹羽

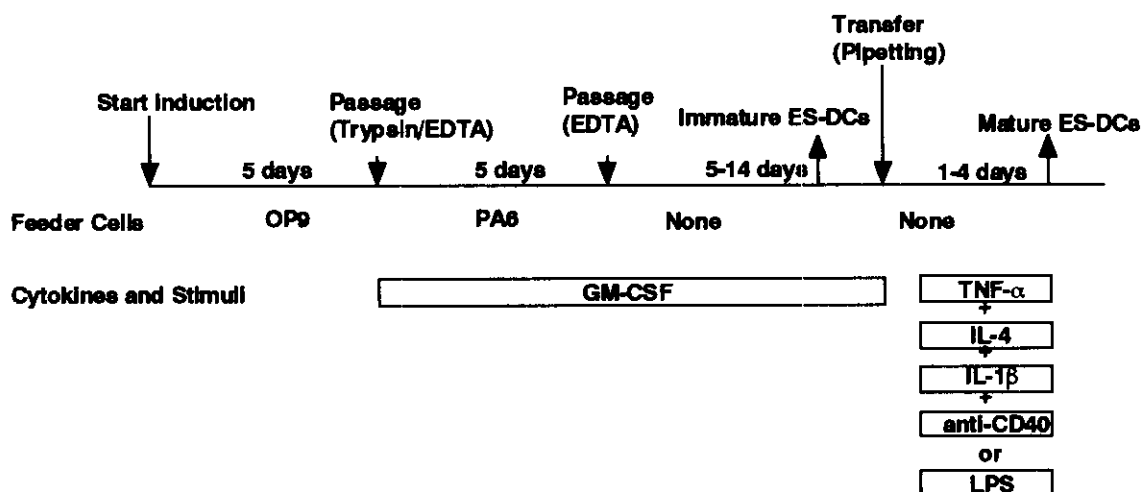


図1. マウスES細胞から樹状細胞への分化誘導法

仁史博士により供与)を用いて、抗原およびケモカイン等の発現ベクターを作製した。ES細胞への遺伝子導入は、常法に基き電気穿孔法にて行った。遺伝子導入細胞クローンを単離したのち、上記の方法により、樹状細胞へ分化させた。

C. 研究結果

ES細胞から *in vitro* において分化誘導の未成熟および成熟樹状細胞は、マウス骨髄から GM-CSF を用いて分化誘導した樹状細胞と同様の形態を有していた。また、MHC クラス II 分子、CD11c、CD86、CD40 分子等を発現しており、さらにこれらの分子の発現は、樹状細胞の成熟に伴って上昇し、この点でも骨髄細胞由来樹状細胞と類似した性質を有するものであった (図2)。ES細胞由来の樹状細胞は、蛋白質抗原をプロセスしペプチド抗原として MHC クラス II 拘束性に CD4+T 細胞に提示する機能を有していた。また、未成熟および成熟樹状細胞は一次アロ MLR 刺激活性を有しており、特に成熟樹状細胞は非常に強い刺激活性を有していた (図3)。以上のことから、我々が ES 細胞から誘導した樹状細胞は、生体内に存在する樹状細胞あるいはマウスの骨髄細胞から誘導される樹状

細胞と同等の機能を有するものであると考えられる。また、βアクトインプロモーター+IRES-Puro-R を含む発現ベクター (pCAGGSIRES-Puro)を用いることにより、ES細胞に導入した遺伝子を高い効率 (ES細胞段階で選択したクローンのうち60%以上のクローン) で ES細胞由来の樹状細胞に発現させることが可能であった。さらに、PCCエピトープを提示した樹状細胞、さらに、OVA (オブアルブミン) 抗原を発現する樹状細胞を作製し、これらが各々の抗原に特異的な T細胞を刺激しうることが確認された。

D. 考察

樹状細胞に遺伝子を導入して生体に投与する方法が、他の方法たとえば DNA ワクチンあるいは蛋白質・ペプチドワクチンより有効であることは、すでに報告されている。これまでに行われた樹状細胞における遺伝子改変では、腫瘍抗原遺伝子あるいはサイトカイン遺伝子を導入した樹状細胞を癌患者に移入し、抗腫瘍免疫応答を誘導する試みがなされている。その方法として、レトロウイルスあるいはアデノウイルスなどのウイルスベクターを用いて樹状細胞へ遺伝子を導入し生体へ投与する方法が行なわれている。一方、

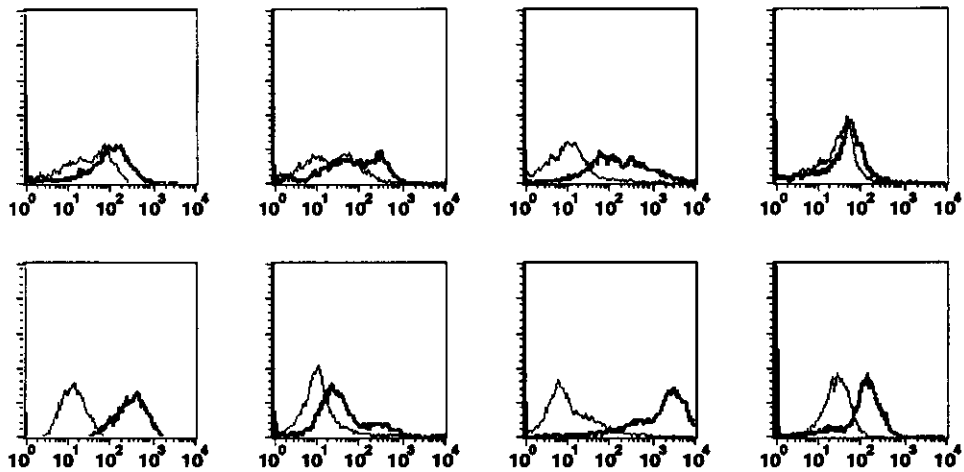


図2. ES細胞由来の樹状細胞における表面抗原の発現

我々のES細胞を用いる方法は、ウイルスベクターを用いる方法に比べ、以下のような利点を有している。

1) ES細胞においては、電気穿孔法を用いる遺伝子導入法と薬剤耐性遺伝子による遺伝子改変細胞の選択法が確立されている。また、ES細胞はクローンとして維持・増殖・凍結保存することが容易に可能である。したがって、適切な遺伝子改変を行なったES細胞のクローンを単離したうえで増殖させ凍結保存したストックを作製しておき、必要時にこれを融解して樹状細胞へ分化させることにより、遺伝的に均一であり導入遺伝子を100%発現した樹状細胞を安定して治療に用いることが可能である。

2) ウイルスベクターを用いる場合、導入できる遺伝子の数(種類)と大きさ(サイズ)に制限がある。一方、ES細胞の場合、遺伝子の共導入(co-transfection)および複数の薬剤耐性遺伝子を用いた段階的導入により複数の遺伝子を導入できる。さらに、遺伝子の標的破壊・改変・導入を行なうことも可能である。これらの特性は、単に免疫効果の増強

を目的として用いるのみでなく、免疫応答の抑制的あるいは質的な制御を行なう等の目的で、より複雑な遺伝子改変が必要とされる際には必須のものである。

3) ES細胞を用いる方法では、遺伝子改変ES細胞クローンを樹立した時点で病原微生物の混入や発がん遺伝子の活性化等の有無を検査し、さらに樹状細胞へ分化した段階での特性を十分に検討したうえで治療に用いることが可能である。従って、野生型ウイルスとの組み換えあるいは混入など潜在的な危険性を有するウイルスベクターを用いる方法に比べ、より安全性が高いと考えられる。

本研究は、マウスのES細胞を用いるものであるが、同様の方法でヒトのES細胞からも樹状細胞の誘導が可能であると予想される。最近、マウスにおいては、体細胞からの核移植により、体細胞を分離した個体と同一の遺伝的背景を有するES細胞を作製しうることが報告されている。このような近年のES細胞関連技術の進歩と組み合わせることにより、本研究の成果は、遺伝子改変を

行った樹状細胞を生体移入することによる抗原特異的免疫制御療法への実現性を秘めている。

E. 結論

我々は、マウス ES 細胞を *in vitro* において樹状細胞に分化させる方法を開発した。さらに、ベータアクチンプロモーターを含む発現ベクターを用いることにより、ES 細胞の段階で遺伝子導入を行い樹状細胞に分化した後にその遺伝子を発現する ES 細胞を高い効率で得る方法を確立した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nakatsura, T., Senju, S., Ito, M., Nishimura, Y.*, and Itoh, K.* (*equal contribution); Cellular and Humoral Immune Responses to A Human Pancreatic Cancer Antigen, CLP, Originally Defined by the SEREX Method *Eur. J. Immunol.* in press

2) Kudo, H., Matsuoka, T., Mitsuya, H., Nishimura Y., and Matsusita, S. Cross-linking HLA-DR molecules on Th1 cells induces anaergy in association with increased level of

cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 *Immunol. Lts.* in press

3) Kamata, T., Tieu, K.K, Irie, A., Springer, T.A., and Takada, Y. Amino acid residues in the α IIb subunit that are critical for ligand binding to integrin α IIb β 3 are clustered in the β -propeller model *J. Biol. Chem.* In press

4) Masuda, M., Senju, S., Fujii, S-I., Terasaki, Y., Takeya, M., Hashimoto, S-I., Matsushima, K., Yumoto, E., and Nishimura, Y.; Identification and immunocytochemical analysis of DCNP1, a dendritic cell-associated nuclear protein *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 290: 1022-1029, 2001

5) Yamada, K., Senju, S., Nakatsura, T., Murata, Y., Ishihara, M., Nakamura, S., Ohno, S., Negi, A., and Nishimura, Y. Identification of a novel autoantigen UACA in patients with panuveitis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 280:1169-1176, 2001

6) Nakatsura, T., Senju, S., Yamada, K., Jyotsuka, T., Ogawa, M., and Nishimura, Y. Gene cloning of immunogenic antigens over-expressed in pancreatic cancer. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 281: 936-944, 2001

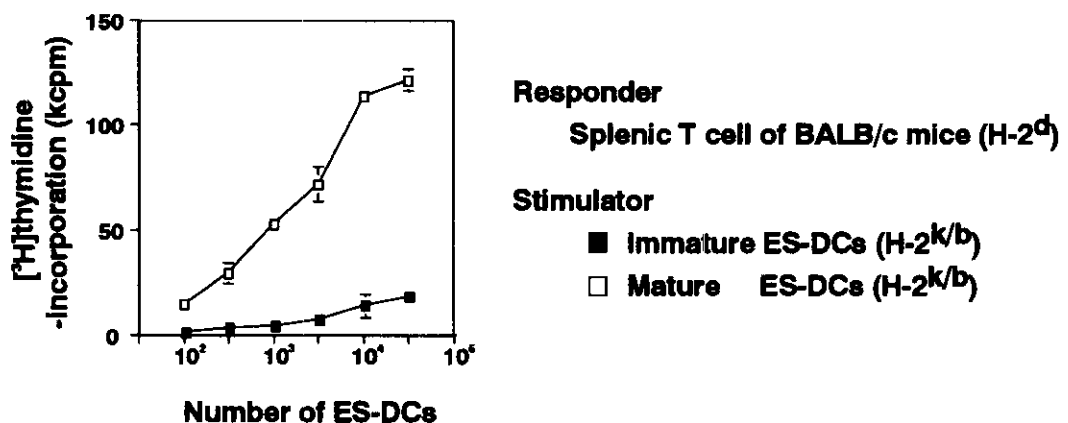


図3. ES細胞由来の樹状細胞 (ES-DC) により刺激されたアロTリンパ球の増殖反応

- 7) Maeda, A., Ohguro, H., Nabeta, Y., Hirohashi, Y., Sahara, H., Maeda, T., Wada, Y., Sato, T., Yun, C., Nishimura, Y., Kuroki, Y., Sato, N. Identification of human antitumor cytotoxic T lymphocytes epitopes of recoverin, cancer-associated retinopathy antigen, to achieve a clinical better prognosis in a paraneoplastic syndrome. *Eur. J. Immunol.* 31: 563-572, 2001
- 8) Minohara, M., Ochi, H., Matsushita, S., Irie, A., Nishimura, Y., and Kira, J-I. Differences between T cell reactivities to major myelin protein-derived peptides in opticospinal and conventional forms of multiple sclerosis and healthy controls. *Tissue Antigens* 57: 447-456, 2001
- 9) Nishimura, Y., Ito, H., Tabata, H., Fujii, S., Tokano, Y., Chen, Y-Z., Matsuda, I., Mitsuya, H., Kira, J-I., Hashimoto, H., Senju, S., and Matsushita, S. (review) Molecular and cellular analyses of HLA class II - associated susceptibility to autoimmune diseases in the Japanese population. *Modern Rheumatology* 11: 103-112, 2001
- 10) Inoue, R., Matsushita, S., Kaneko, H., Shinoda, S., Sakaguchi, H., Nishimura, Y. and Kondo, N. Identification of β -lactoglobulin-derived peptides and class II HLA molecules recognized by T Cells from patients with milk allergy. *Clin. Exp. Immunol.* 31: 1126-1134, 2001
- 11) Fujii, S.*, Uemura, Y.*, Iwai, L.K., Ando, M., Senju, S. and Nishimura, Y. (*equal contribution) Establishment of an expression cloning system for CD4⁺ T cell epitopes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 284: 1140-1147, 2001
- 12) Yamada, K., Senju, S., Shinohara, T., Nakatsura, T., Murata, Y., Ishihara, M., Nakamura, S., Ohno, S., Negi, A., and Nishimura, Y. Humoral immune response directed against LEDGF in patients with VKH. *Immunol. Letters* 78: 161-168, 2001
- 13) 西村泰治, 「MHCによるTリンパ球への抗原提示」, 特集: 免疫学研究の最新動向, 学術月報 Vol.54 No.7, pp685-689, 2001年
- 14) 植村 靖史, 西村 泰治, 「CLIP置換型インバリアント鎖遺伝子ライブラリーを用いた自己反応性 CD4⁺T 細胞が認識する抗原ペプチドの多様性の解析」, 臨床免疫, 第37巻2号, pp157-165, 2002年
2. 学会発表
- (1) 国際学会
- 1) Nishimura, Y. Identification of autoantigens associated with Vogt-Koyanagi-Harada disease by immunoscreening of a uveal cDNA expression library, Vogt-Koyanagi-Harada Syndrome second international workshop, 幕張プリンスホテル (千葉), 2001年6月27-28日
- (2) 国内学会
- 1) ヒト CD4⁺T 細胞が認識する腫瘍関連抗原ペプチドの解析, 西村泰治, Yun Chuns, 横溝 博, 藤井慎嗣, 植村靖史, 松下 祥, 千住 寛, 第5回基盤的癌免疫研究会総会 (三重県津市), 2001年7月18~19日
- 2) Degeneracy in recognition of antigenic peptides by human CD4⁺ T cell clones; its possible implications to clinical medicine. , 西村泰治, 感染研学友会シンポジウム「第1回MHCと疾患セミナー」国立感染症研究所 (東京), 2001年8月8日
- 3) SEREX法にて同定した肺癌抗原 KM-PA-2由来ペプチドに対する細胞性および液性免

疫の解析, 中面哲也, 七条茂樹, 伊藤雅昭, 千住 寛, 小川道雄, 伊東恭悟, 西村泰治, 第 60 回日本癌学会 (横浜), 2001 年 9 月 26 日~28 日

4) I型糖尿病患者より樹立した HLA-DR53 拘束性 GAD65 自己反応性 T 細胞により交差認識される多様なエピトープの解析, 西村泰治, 植村靖史, 藤井慎嗣, 田畑博己, 千住 寛, 日本人類遺伝学会第 46 回大会 (埼玉県大宮市), 2001 年 10 月 3~5 日

5) T細胞クローンが認識する抗原ペプチドの多様性と自己免疫現象, 西村泰治, 第 51 回日本アレルギー学会シンポジウム (福岡市), 2001 年 10 月 29~31 日

6) HLA クラス II 多型と自己免疫疾患, 西村泰治, 第 10 回日本組織適合性学会, シンポジウム「多因子疾患の遺伝要因としての HLA」(福岡市), 2001 年 11 月 1 日~2 日

7) Vogt-小柳-原田病に関連する自己抗原の解析, 千住 寛, 山田和博, 篠原利通, 村田恭啓, 中面哲也, 石原麻美, 中村 聡, 大野重昭, 谷原秀信, 根木 昭, 西村泰治, 第 10 回日本組織適合性学会 (福岡), 2001 年 11 月 1 日~2 日

8) HLA 遺伝子の多型による IDDM への疾患感受性の決定機序の解析: CLIP 置換型インバリアント鎖遺伝子を用いた GAD65 自己反応性 TCR リガンドの多様性の解析, 植村靖史, 藤井慎嗣, 千住 寛, 田畑博己, 西村泰治, 第 10 回日本組織適合性学会 (福岡), 2001 年 11 月 1 日~2 日

9) SEREX 法により同定した膵癌抗原 Coactosin-like protein (CLP) に対する細胞性および液性免疫の解析, 中面哲也, 千住 寛,

伊藤雅昭, 西村泰治, 伊東恭悟, 第 31 回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪), 2001 年 12 月 11~13 日

10) マウス ES 細胞からの樹状細胞分化誘導法の開発, 千住 寛, 増田聖子, 松吉秀武, 平田真哉, 植村靖史, 荒木喜美, 山村研一, 西村泰治, 第 31 回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪), 2001 年 12 月 11~13 日

11) Characteristics of hyper-reactive T cells induced by long time exposure to IL-2 alone and derived from an activated CD4⁺ T cell clone, CHEN Yu-zhen, NISIMURA yasuharu, 第 31 回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪), 2001 年 12 月 11~13 日

12) 抗原ペプチドアナログに対するヒト CD4⁺ T 細胞応答の解析における HVS 不死化 T 細胞株の有用性, 塚本博丈, 入江 厚, CHEN Yu-Zhen, 西村泰治, 第 31 回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪), 2001 年 12 月 11~13 日

13) CLIP 置換型インバリアント鎖遺伝子を用いた GAD65 自己反応性 TCR リガンドの多様性の解析, 植村靖史, 千住 寛, 田畑博己, 藤井慎嗣, 西村泰治, 第 31 回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪), 2001 年 12 月 11~13 日

14) 過剰発現させた TCR 部分アゴニスト /HLA-DR 複合体の刺激によるリン酸化 ZAP-70・LAT に依存しない T 細胞増殖, 入江 厚, CHEN Yu-Zhen, 塚本博丈, 城塚透子, 増田聖子, 西村泰治, 第 31 回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪), 2001 年 12 月 11~13 日

15) ヒト 成熟樹状細胞に発現する 新規遺