

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

# 特定疾患対策のための免疫学的手法の 開発に関する研究班

平成 14 年度 研究報告書

平成 15 年 3 月

研究代表者 住 田 孝 之

## 目 次

I. 構成員名簿 .....	1
II. 平成 12 年度総括研究報告 .....	3
主任研究者 筑波大学臨床医学系内科 住田 孝之	
III. 分担研究報告	
アナログペプチドによる抗原特異的免疫分子制御法の開発に関する研究 .....	7
筑波大学臨床医学系内科 住田 孝之	
多発筋炎の責任自己抗原同定に関する研究 .....	9
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科生体応答調節学 上阪 等	
ES 細胞からの樹状細胞分化誘導法の開発とその抗原特異的免疫制御への応用 .....	13
熊本大学大学院医学研究科免疫識別学 西村 泰治	
T 細胞レセプター遺伝子移入による免疫難病の新たな治療法の開発 .....	18
東京大学大学院医学系研究科内科学専攻 山本 一彦	
多発性硬化症における NKT 細胞の変調と病態への関与 .....	20
国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 山村 隆	
自己反応性 Th1 クローンを用いた MRL/Mp- <i>Fas</i> <sup>lpr</sup> マウス自己抗体の 産生調節に関する研究 .....	23
京都大学大学院医学研究科臨床免疫学 三森 経世	
GPI と自己抗体制御に関する研究 .....	30
筑波大学臨床医学系内科 松本 功	
$\beta$ 2-グリコプロテイン I の新たな生物学的意義：ニック $\beta$ 2GPI .....	32
北海道大学大学院医学研究科病態制御学専攻 小池 隆夫	

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	37
V. 平成 14 年度班会議プログラム .....	47
VI. 研究成果刊行物・別刷 .....	49

## I. 平成 14 年度構成員名簿

特定疾患対策のための免疫学的手法の開発に関する研究班

区分	氏名	所属	職名
主任研究者	住田 孝之	筑波大学臨床医学系内科（膠原病・リウマチ・アレルギー）	教授
分担研究者	山本 一彦	東京大学大学院医学系研究科内科学専攻アレルギー・リウマチ学	教授
	小池 隆夫	北海道大学大学院医学研究科病態制御学専攻分子病態制御学講座免疫病態内科学分野・第二内科	”
	三森 経世	京都大学大学院医学研究科臨床免疫学	”
	西村 泰治	熊本大学大学院医学研究科免疫識別学	”
	山村 隆	国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部	部長
	上坂 等	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科生体応答調節学	助教授
	松本 功	筑波大学臨床医学系内科（膠原病・リウマチ・アレルギー）	講師
（事務局） 経理事務連絡 担当責任者	住田 孝之	筑波大学臨床医学系内科（膠原病・リウマチ・アレルギー） 〒305-8575 茨城県つくば市天王台1-1-1 TEL 029-853-3221 FAX 029-853-3222	教授

## Ⅱ. 平成 14 年度総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
総括研究報告書

特定疾患対策のための免疫学的手法の開発に関する研究

住田 孝之（筑波大学大学臨床医学系内科 教授）

研究要旨

特定疾患の多くは免疫難病であることから、本研究では免疫難病の抗原特異的治療の確立を目的とした。病因として重要な自己反応性 T 細胞の対応自己抗原の新しい解析方法の確立、T 細胞エピトープのアナログペプチドを用いた自己免疫応答の抗原特異的制御システムに関する研究が進められた。抗原提示細胞に遺伝子導入することにより T 細胞の機能を制御する基礎的研究が進展した。病因 T 細胞の抗原受容体を単細胞レベルで明らかにし再構築する技術が確立し、抗原特異的 T 細胞の人為的機能調節が期待される。CD4+NKT 細胞がサイトカイン産生を介して自己免疫疾患を制御していること、自己抗体産生を誘導するヘルパー T 細胞のワクチネーションにより自己免疫応答が抑制されることも明らかになった。自己抗原の構造変化にともなう抗体産生の調節方法や新しいヒト疾患モデルの作成技術なども検討された。

分担研究者

- 山本一彦 東京大学大学院医学系研究科内科学専攻  
アレルギーリウマチ学 教授
- 小池隆夫 北海道大学大学院医学研究科病態制御学  
専攻分子病態制御学 教授
- 西村泰治 熊本大学大学院医学研究科免疫識別学  
教授
- 三森経世 京都大学大学院医学研究科臨床免疫学  
教授
- 山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所免疫研  
究部 部長
- 上阪 等 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科  
生体応答調節学 助教授
- 松本 功 筑波大学臨床医学系内科 講師

反応性リンパ球の抗原受容体、抗原提示細胞上の拘束分子を検出、解析、制御する基盤技術を開発、推進すること』である。

本研究班は、特定疾患に関する横断的な免疫研究班として、平成 8 年度に山本一彦教授を主任研究者として発足し、平成 13 年度までの 6 年間に研究成果をあげてきた。本年度から、住田が主任研究者として本研究班を継承し、これまでの研究成果をさらに発展させ基盤技術を開発することにより、免疫難病を抗原特異的に制御する実践的な治療戦略を確立する。

抗原特異的な制御方法をめざすため、自己抗原、B 細胞および T 細胞の抗原受容体、抗原提示細胞上の主要組織適合抗原（MHC）が主要なターゲット分子となる。本研究班は新しい治療開発に向けた技術・システムの開発が主目的となる横断班であるため、対象疾患は免疫難病であること以外は限定していない。

A.研究目的

本研究班のテーマは、『免疫難病発症の分子機構について、分子免疫学的なアプローチにより解明し、サイエンスに基づく特異的治療を開発することである。そのために、病因となっている自己抗原、自己

B.研究方法・C.研究結果

住田は、免疫難病の代表的疾患であるシェーグレン症候群(SS)および関節リウマチ(RA)において、T 細胞が認識する自己抗原の T 細胞エピトープを決定し、それぞれのアナログペプチドを明らかにした。SS においては、HLA-DR B1\*0405 陽性 SS 患者における $\alpha$ -アミラーゼの T 細胞エピトープ(NPFRPWERYQPV, AA68-80)をまず決定した。

それを基に6種類の変異ペプチドを合成しIFN- $\gamma$ を指標としたMACSサイトカイン産生アッセイを指標としてアナログペプチドを選定した。その結果、NPF $\overline{\text{R}}\text{PWWVRYQPV}$ がアナログペプチドの候補として明らかにされた。

RAにおいては、まず、HLA-DR B1\*0101陽性RA患者におけるCIIのT細胞エピトープGKPGIAGFKGEQGPKG(AA256-271)を決定した。予想される変異ペプチドを21種類合成し、末梢血T細胞および樹立したT細胞株を用いて、アナログペプチドの選定をおこなった。その結果、10種類の変異ペプチドがT細胞の増殖反応を60%以上抑制する効果を示しアナログペプチドとして機能していることが明らかとなった。そのうち、GKPLAD/AFKGEQGPKGの2種類のペプチドは、予想される2つのHLA結合モデルにおいて抑制効果を示したため、強いアナログペプチドとして期待される。

上阪班員は、特定疾患の一つである多発筋炎において、発症に係わる自己抗原を明らかにすることを目的として、筋内浸潤T細胞が認識する責任自己抗原の解析を二つの方法で行った。第一の方法は、モデル動物において自己免疫性筋炎を誘導することがすでに判明しているC-proteinに着目し、それに対する自己抗体、T細胞増殖反応を検討した。結果として、筋炎患者と健康人において優位な差が認められず、今後の検討が必要と結論づけられた。第二の方法は、TCR reverse-genetics法である。これは、患者から病因CD8+T細胞クローンを樹立し、筋cDNAライブラリーを発現する抗原提示細胞を用いて、対応抗原を同定する方法である。本年度は、TCRBV2+CD8+T細胞クローンの樹立をHerpes virus saimiri(HVS)を用いて成功した。また、患者由来末梢血B細胞をEBVで不死化し、さらにEcotropicレトロウイルス受容体を導入することにより、レトロウイルスによる遺伝子導入が可能なB細胞クローン(抗原提示細胞)の作成にも成功した。

西村班員は、樹状細胞がT細胞に対する主要な抗原提示細胞であり免疫応答を正・負両方向に制御していることに注目した。本研究では、樹状細胞に遺伝子導入してT細胞の免疫応答を制御し、自己免疫疾患を抗原特異的に治療することを目的とした。すでに、マウスES細胞からin vitroで樹状細胞へ分化誘導する方法を確立している。本年度は、アクチンプロモーター+IRES-Puro-Rを含む発現ベクターを用いることにより、遺伝子導入したES細胞を樹状細胞に分化する方法を確立した。また、Cre-Loxシステムを用いた遺伝子置換法による遺伝子導入も成功した。さらに、OVAに対する抗原特異的なT細胞ハイブリドーマを用いた実験から、遺伝子導入

樹状細胞が、実際にin vitro, in vivoにおいて細胞傷害性T細胞を活性化することを明らかにした。

山本班員は、臓器に集積したT細胞を人工的に再構築し、新たに抑制機能を付加することにより、免疫難病を抗原特異的に制御することを目的とした。方法は、浸潤T細胞の抗原受容体(TCR)遺伝子(TCRV $\alpha$ , V $\beta$ )を単細胞レベルで単離し、感染性レトロウイルスベクターに組み込みトランスフェクタントを作成し、その抗原特異性を検定することである。本年度は、マウスのHIV免疫応答モデルを用いて、抗原P18IIIB(HIVのT細胞エピトープの一つ)に対するCTL細胞クローン(TCRV $\alpha$ 2, V $\beta$ 7)をターゲットとしてsingle cell sorting法とsingle cell PCR法を用いてTCR遺伝子をクローニングした。レトロベクターを用いて脾細胞に遺伝子導入後、HIVに対する細胞傷害機能を確認した。

山村班員は、多発性硬化症(MS)におけるNKT細胞の機能を明らかにし、NKT細胞を介した自己免疫応答の調節をすることを目的として、DNNKT細胞とCD4+NKT細胞の定量、サイトカイン産生を検討した。方法として、患者末梢血中NKT細胞数をTCRV $\alpha$ 24, V $\beta$ 11に対する抗体およびCD1dテトラマーを用いて定量した。その結果、MSの寛解期にはDNNKT細胞は減少するが、寛解期にはCD4+NKT細胞数は変化しなかった。また、CD4+NKT細胞はIL-4産生を多量に産生していた。以上の結果から、MS寛解期にはCD4+NKT細胞がTh2細胞ヘシフトして寛解維持に働いていると考えられた。

三森班員は、特定疾患の代表的疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)において、自己反応性T細胞をワクチネーションすることにより自己抗体産生を制御することを目的とした。SLEのモデル動物であるMRL/Mp-Faslprマウスに、ヒストンとdsDNAに反応し抗dsDNA抗体を産生するCD4+ $\alpha\beta$ Th1細胞(dna51)を放射線照射後に移入した場合、抗dsDNA抗体価の減少、糸球体腎炎の活動性の低下がみられた。さらに、抗dsDNA抗体産生をヘルプするCD4+V $\beta$ 8.3T細胞が減少し、dna51に対する抗体も認められた。これらの事実から、dna51T細胞のワクチネーションによりT細胞に対する抗体を介して自己抗体の産生が制御できることが明らかにされた。

松本班員は、関節炎を誘導する自己抗体の一つである抗GPI抗体に関して、関節炎の発症機構の解明および抗体産生の制御を目的として、関節リウマチ(RA)患者末梢血中の抗GPI抗体価を測定した。さらに、関節炎の制御システムを構築するために、NOD-SCIDマウスやカニクイザルを用いた関節炎モデルの作成を試みた。本年度は、RAにおける抗



GPI 抗体が約 5%に検出されること、GPI 反応性 T 細胞が末梢血に存在すること、NOD-SCID マウスの脾臓にヒトリンパ球を移入することによりマウスにヒトの免疫系を構築することができること、を報告した。

小池班員は、抗リン脂質抗体における主要対応抗原である、 $\beta$ 2-グリコプロテイン I ( $\beta$ 2GPI)をプラスミンで処理したニック $\beta$ 2GPI の生物学的意義を明らかにし、抗原サイトから、自己抗体産生の制御方法を確立することを目的とした。ニック $\beta$ 2GPI は第 V ドメインの Lys317/Thr318 がプラスミンで切断されるため、リン脂質に対する結合能を失うことが判明している。本年度は、ニック $\beta$ 2GPI が第 IV クリングドメインのリジン結合部位により glu-plasminogen に結合し、プラスミンの生成を抑制することを明らかにした。すなわち、ニック $\beta$ 2GPI は外因系線容の negative feedback を担っていると考えられる。今後、ニック $\beta$ 2GPI を介した抗リン脂質抗体の産生調節に関する研究が進められよう。

#### D. 考察・E. 結論

本研究班は、免疫難病における自己免疫応答を抗原特異的に制御することを目的として、広範に応用されうる基盤技術の開発を目指している。本年度は、T細胞の対応抗原の分子レベルでの解析と変異ペプチドによる制御、抗原提示細胞の遺伝子操作によるT細胞機能の調節、T細胞受容体の再構築と抑制機能を持つ新たなT細胞の作成、調節性T細胞やヘルパーT細胞を用いた自己免疫応答の制御、新しい免疫病モデルの作成に関する基盤技術の開発は、国際的にもユニークかつエポックメイキングな発展性のある研究と評価できよう。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

アナログペプチドによる抗原特異的免疫分子制御法の開発に関する研究

住田 孝之（筑波大学大学臨床医学系内科 教授）

研究要旨

特定疾患の多くは免疫難病であることから、本研究では免疫難病の抗原特異的治療の確立を目的とした。免疫難病の代表的疾患であるシェーグレン症候群(SS)および関節リウマチ (RA)において、T細胞が認識する自己抗原の T細胞エピトープを決定し、それぞれのアナログペプチドを明らかにした。SS においては、 $\alpha$ -アミラーゼの T細胞エピトープ(NPFRPWERYQPV, AA68-80)から、NPFRPWWVRYQPV がアナログペプチドの候補として選定された。RA においては、II 型コラーゲン(CII)の GKPGIAGFKGEQGPKG(AA256-271)が T細胞エピトープの一つとなっており、GKPGIAD/AFKGEQGPKG がアナログペプチドの候補として明らかとなった。以上の結果から、免疫難病の抗原特異的治療戦略が進められよう。

A.研究目的

免疫難病であるシェーグレン症候群(SS)や 関節リウマチ(RA)において、発症機序として、臓器に浸潤した自己反応性 T細胞が重要な役割を果たしている。その病因 T細胞が認識する T細胞エピトープをアミノ酸レベルで明らかにし、変異ペプチドを用いて抗原特異的に免疫難病を治療することを目的とする。

B.研究方法

1)  $\alpha$ -アミラーゼ：HLA-DR B1\*0405 陽性 SS 患者における $\alpha$ -アミラーゼの T細胞エピトープは、NPFRPWERYQPV(AA68-80)であることが判明した。そこで、6 種類の変異ペプチド

(NPFA/L/MPWWERYQPV、NPFRPWWA/V/MRYQPV) を合成し、T細胞の細胞増殖反応を IL-2 産生能、IFN- $\gamma$ を指標とした MACS サイトカイン産生アッセイを指標としてアナログペプチドを選定した。

2) ムスカリン作動性アセチルコリン受容体：ムスカリン作動性アセチルコリン受容体 (M3R) の細胞外第 2 ドメインをコードする 25 マーの合成アミノ酸 (KRTVPPGECFIQFLSEPTITFTGTAI, AA212-236)を作成し B細胞、T細胞の抗原として用いた。24%の SS 患者において M3R 抗体が認められたため、同一患者において T細胞反応を細胞増殖反応、FN- $\gamma$ を指標とした MACS サイトカイン産生アッセイで検定した。

3) コラーゲンタイプ II：HLA-DR B1\*0101 陽性 RA 患者におけるコラーゲンタイプ II(CII)の T細胞

エピトープの一つは

GKPGIAGFKGEQGPKG(AA256-271)であることが判明した。予想されるアナログペプチドを 21 種類合成し、末梢血 T細胞および樹立した T細胞株を用いて、細胞増殖反応、IL-2 産生能、IFN- $\gamma$ を指標とした MACS サイトカイン産生アッセイを指標としてアナログペプチドの選択を行った。

C.結果

- 1) HLA-DR B1\*0405 陽性 SS 患者における $\alpha$ -アミラーゼの T細胞エピトープ (NPFRPWERYQPV, AA68-80)を決定した。それを基に 6 種類の変異ペプチドを合成しアナログペプチドの検定を行った。その結果、NPFRPWWVRYQPV を抗原として用いた場合に、IFN- $\gamma$ 産生 T細胞の増加を 50%以上抑制することができた。従って、この変異ペプチドがアナログペプチドの候補として明らかにされた。
- 2) M3R の T細胞エピトープの一つは細胞外第 2 ドメインであることが判明した。
- 3) HLA-DR B1\*0101 陽性 RA 患者における CII の T細胞エピトープを決定した。T細胞株を用いたアナログペプチドの選定研究の結果、10 種類の変異ペプチドが T細胞の増殖反応を 60%以上抑制する効果を示しアナログペプチドとして機能していることが明らかとなった。それらは、GKPGIS/DGFKGEQGPKG、GKPGIAD/AFKGEQGPKG、

GKPGIAGD/QKGEQGPKG,  
GKPGIAGFA/VGEQGPKG,  
GKPGIAGFKGV/MQGPKGであった。特に、  
GKPGIAD/AFKGEQGPKGの2種類のペプ  
チドは予想される2つのHLA結合モデルの  
両者において抑制効果を示し、アナログペプ  
チドとして強く期待される。

#### D. 考察と結論

SSにおいて、自己抗原の一つである $\alpha$ -アミラーゼのT細胞エピトープのアミノ酸構造から変異ペプチドを作成し、 $\alpha$ -アミラーゼ反応性T細胞の増殖を抑制するアナログペプチドを選定することができた。さらに、RAにおける自己抗原の一つであるCIIのT細胞エピトープのアミノ酸を少し変えた変異ペプチドを作成することにより、CII反応性T細胞を抑制することができるアナログペプチドを選定した。以上のように、T細胞エピトープを決定し、アナログペプチドを選定することにより、免疫難病の病因T細胞を抗原特異的に制御することが現実的となってきた。今後、SCID-huマウスなどヒトの臓器病変モデルを用いてアナログペプチドの効果を検定する。このような抗原特異的な治療戦略の開発は、現行の抗原非特異的な治療と異なり、感染症などの多くの副作用を引き起こさずに効率良く免疫難病を治療することが期待されよう。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Shimizudani N, Murata H, Keino H, Kojo S, Nakamura H, Morishima Y, Sakamoto T, Ohtsuka M, Sekisawa K, Sumida M, Sumida T, and Matsuoka K. Conserved CDR3 region of TCR BV gene in bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Clin. Exp. Immunol. 129: 140-149, 2002.
2. Murata H, Matsumura R, Koyama A, Sugiyama T, Sueishi M, Shibuya K, Tsutsumi A, and Sumida T. T cell receptor repertoire of T cells in the kidney from patients with lupus nephritis. Arthritis Rheum. 46: 2141-2147, 2002.
3. Ohnishi Y, Tsutsumi A, Sakamaki T, and Sumida T. T cell epitopes of type II collagen in HLA-DRB1\*0101 or DRB1\*0405-positive Japanese patients with rheumatoid arthritis. Int. J. Mol. Med. 11:331-335, 2003.
4. Ohnishi Y, Tsutsumi A, and Sumida T. Antibodies to type II collagen and their association with HLA DR1 allele in Japanese patients with rheumatoid arthritis.

Mod. Rheumatol. (in press)

5. Matsumoto I, Lee DM, Goldbach-Mansky R, Sumida T, Hitchon CA, Schur PH, Anderson RJ, Coblyn JS, Weinblatt ME, Brenner M, Duclos B, Pasquali J-L, El-Gabalawy H, Mathis D, and Benoist C. Low prevalence of antibodies to glucose-6-phosphate isomerase in patients with rheumatoid arthritis and a spectrum of other chronic autoimmune disorders. Arthritis Rheum. (in press)
6. Yoshida K, Tsutsumi A, Onishi Y, Akimoto T, Murata H, and Sumida T. T cell epitopes on prothrombin in patients with antiphospholipid syndrome. Ann. Rheum. Dis. (in press)

多発筋炎の責任自己抗原同定に関する研究

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  
研究協力者 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

研究要旨 我々の分担研究の目的は、多発筋炎をおこす責任自己抗原を同定し、副作用の少ない抗原特異的治療法の開発を目指すことである。今年度は、候補分子を定める方法とTCR reverse-geneticsによる方法で、責任自己抗原の同定を試みた。前者では、ラットに自己免疫性筋炎をおこすC-proteinについて調べたが、患者血清に反応性はなく、患者末梢リンパ球に増殖反応も惹起しなかった。後者に関しては、患者末梢血でクローン性に増多していたV $\beta$  2陽性CD8T細胞が、筋組織内でパーフォリンを発現する細胞傷害性細胞であることを確認した。このクローンは、IL-15で刺激しながらHVSと培養することで不死化することができた。抗原提示細胞としては、患者末梢B細胞を選び、これをEBウイルスで不死化したものにAmphotropic レトロウィルスでEcotropic受容体遺伝子を導入したところ、Ecotropicレトロウィルスによる遺伝子導入に高感受性となった細胞株を得ることができた。これらとEcotropicレトロウィルスにパッケージした筋cDNAを用いて、病態形成性CD8T細胞が認識する責任自己抗原を同定する方法も有効と考えられる。

A. 研究目的

我々の分担研究の目的は、特定疾患の一つである多発筋炎をおこす責任自己抗原を同定し、副作用の少ない抗原特異的治療法の開発を目指すことである。今年度は、候補分子を定める方法で責任自己抗原の同定を試み、これに加えて、TCR reverse-genetics による方法を進めた。TCR reverse-genetics による方法では、まず多発筋炎患者末梢血の病態形成性 CD8T 細胞を分離し、次に多発筋炎患者由来抗原提示細胞に筋 cDNA ライブラリを発現させる。最後に、両者を用いて病態形成性 CD8T 細胞が認識する筋抗原を同定する。今年度は、病態形成性 CD8T 細胞の分離と、cDNA ライブラリを発現させる患者由来抗原提示細胞筋の樹立を行った。

B. 研究方法

候補分子を定める方法では責任抗原の候補分子として骨格筋のC-proteinに着目した。まず、ヒト骨格筋からRNAを抽出して、C-protein cDNAをオーバーラップする4断片に分けてクローニングして、大腸菌に発現させ、fragment 1-4の組換えヒトC-proteinを作製した。

次にこれらのタンパクをSDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、多発筋炎患者と健常者の血清を使用してウェスタンブロット法で、多発筋炎患者血清中の抗体とC-proteinの反応性を検討した。さらに、多発筋炎患者と健常者のリンパ球を組換えC-proteinと共培養して、リンパ球刺激試験をおこなった。

以前我々は、多発筋炎患者1では、末梢血でクローン性増多していたV $\beta$  2陽性CD8T細胞が、病態形成性CD8T細胞であることを示したが、今回はこのCD8T細胞が、患者1の筋肉内でパーフォリンを発現しているかどうかを検討するため、パーフォリンとV $\beta$  2で免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で検討した。

次に、多発筋炎末梢血のV $\beta$  2陽性CD8T細胞を分離するため、Herpesvirus saimiri (以下HVS)を使用して多発筋炎患者T細胞を不死化した。従来方法であるPHAとIL-2で刺激しながらHVSで不死化する方法に加えて、IL-15で刺激する方法と、IL-2で刺激する方法を行った。不死化した時点で、磁気ビーズでCD8T細胞を分取して、BV2特異的な配

列をセンスプライマーとし、BC 特異的な配列をアンチセンスプライマーとし RT-PCR を行い、得られた PCR 産物をポリアクリアミドゲルに流して、日立 SQ5500 sequencer を用いて TCR CDR3 length specktrotyping を解析した。

患者由来抗原提示細胞としては、末梢B細胞を選び、これをEBウイルスで不死化した(EBV-BLCL)。次に、EBV-BLCLに、Amphotropicレトロウィルスで、Ecotropic受容体(Eco-R)遺伝子とピューロマイシン耐性遺伝子を導入した。さらに、ピューロマイシンで選択をおこない、ピューロマイシン耐性となったEBV-BLCLに、EcotropicレトロウィルスでGFPを遺伝子導入し、フローサイトメトリ法と共焦点顕微鏡でGFPの発現を確認した。

#### (倫理面への配慮)

本研究においては、患者末梢血リンパ球由来の細胞を使用するが、各患者より書面にてインフォームドコンセントを得た。また、本実験の概要は東京医科歯科大学倫理審査委員会で審議され、承認されたものである。

#### C. 研究結果

今回我々は、多発筋炎の責任抗原を同定する為に、二つの免疫学的方法を試みた。一つ目は候補分子を定める方法で、二つ目はTCR reverse-geneticsによる方法である。

多発筋炎の責任抗原の候補分子として、骨格筋のC-proteinに着目した。C-proteinは分子量140kDaで、myosinのthick filamentを構成するタンパクである。myosin粗精製物はラットに多発筋炎に類似した自己免疫性筋炎をおこすが、myosin粗精製物に含まれるC-proteinはmyosinよりも極く少量で確実に筋炎を起こす。そこで、C-proteinが多発筋炎の責任抗原であるかどうかを検討するため、多発筋炎患者と健常者の血清を使用して、ウェスタンブロット法で、多発筋炎患者血清中の抗体とC-proteinの4つの断片との反応性を検討した。しかし、多発筋炎患者と健常者で差異は認められなかった(図1)。さらに、多発筋炎患者と健常者のリンパ球を、

組換えC-proteinと、リンパ球刺激試験をおこなったところ、増殖反応にも差異は認められなかった(図2)。

TCR reverse-genetics による方法では、まず多発筋炎患者末梢血の病態形成性 CD8T 細胞を分離し、次に多発筋炎患者由来抗原提示細胞に筋 cDNA ライブラリを発現させる。最後に、両者を用いて病態形成性 CD8T 細胞が認識する筋抗原を同定する。今回は病態形成性 CD8T 細胞の分離と、筋 cDNA ライブラリを発現させる患者由来抗原提示細胞の樹立をおこなった。

以前我々は、多発筋炎患者の末梢血にはCD8T細胞のクローン性増多が多く、患者1ではVβ2陽性CD8T細胞が、筋組織に優位に浸潤し、末梢血ではパーフォリン遺伝子を発現することを示した。そこで患者1では、Vβ2陽性CD8T細胞が病態形成性CD8T細胞であると考えられた。多発筋炎の筋肉内では、endomysiumにCD8T細胞が浸潤しパーフォリンを放出していることが知られているが、今回は、患者1の筋肉内でVβ2陽性CD8T細胞がパーフォリンを発現しているかどうかを検討した。すると、病態形成性CD8T細胞と考えられるVβ2陽性CD8T細胞が、他のクローンと比較して高頻度に、endomysiumに浸潤しパーフォリンを放出していることが示された。

次に、多発筋炎患者1の末梢血のVβ2陽性CD8T細胞クローンを、HVSで病態形成性CD8T細胞として不死化し、TCR CDR3 length specktrotypingを解析したところ、IL-15で刺激しながら不死化したVβ2陽性CD8T細胞では、不死化前に末梢血でクローン性増多していたCD8T細胞を維持することができ、病態形成性CD8T細胞として単離することができた(図3)。PHA+IL-2で刺激すると polyclonal になり、IL-2で刺激すると oligoclonal になるため、これらの刺激では、病態形成性CD8T細胞を単離することができなかった。

一般に、患者由来抗原提示細胞として樹立した初期培養細胞 EBV-BLCLは、遺伝子導入が困難である。そこで、筋cDNAライブラリをEcotropicレトロウィルスで遺伝子導入するため、EBV-BLCLにAmphotropicレトロウィルスでEcotropic受容体遺伝子とピューロマイシン耐性遺伝子を導入した。ピューロマイシンで選択

後、EcotropicレトロウィルスでGFPを遺伝子導入したところ、Ecotropicレトロウィルスによる遺伝子導入に高感受性となったEBV-BLCLを得ることができた（図4）。

D. 考察

多発筋炎の責任抗原の候補分子として、骨格筋のC-proteinに着目したが、C-proteinが責任抗原であるという証拠は得られなかった。TCR reverse-geneticsによる方法では、まず、多発筋炎患者末梢血でクローン性増多していた病態形成性CD8T細胞を分離することができた。次に、患者由来抗原提示細胞として、Ecotropicレトロウィルスに高感受性となったEBV-BLCLを得ることができた。今後、Ecotropicレトロウィルスで筋cDNAライブラリを患者由来抗原提示細胞に発現させて、病態形成性CD8T細胞が認識する筋抗原を同定する。

E. 結論

多発筋炎の責任抗原を同定する為に、二つの免疫学的方法を試みたが、C-proteinが責任自己抗原であるという根拠は得られず、TCR reverse-geneticsによる方法が、より有効であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録

なし。

図1 組換え C-protein、多発筋炎患者と健常者の血清を使用したウェスタンブロット法。多発筋炎患者と健常者で反応性に差異は認められなかった。

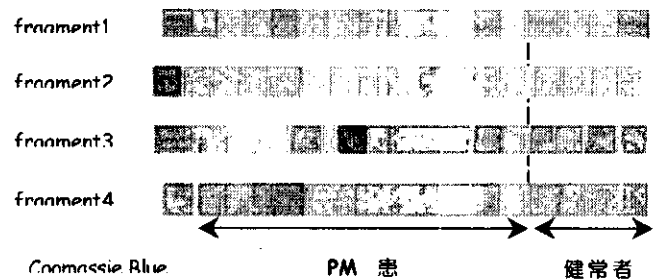


図2 多発筋炎患者と健常者のリンパ球を組換え C-protein とを共培養したリンパ球刺激試験

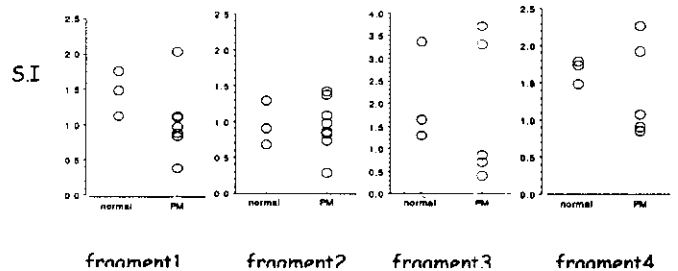


図3 HVS を使用した多発筋炎患者末梢血の Vβ2陽性 CD8T 細胞クローンを不死化。従来の方法である PHA と IL-2 で刺激しながら HVS で不死化する方法に加えて、IL-15 で刺激する方法と、IL-2 で刺激する方法を行い、不死化後 TCR CDR3 length specktrotyping を解析した図を示す

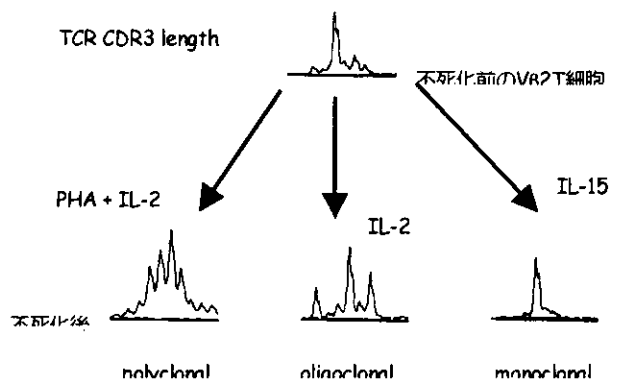
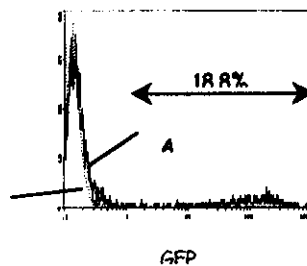


図4 患者由来抗原提示細胞として樹立した EBV-BLCL への Ecotropic レトロウイルス感染。EBV-BLCL に、筋 cDNA ライブラリを Ecotropic レトロウイルスで遺伝子導入するため、Amphotropic レトロウイルスで Ecotropic 受容体遺伝子とピューロマイシン耐性遺伝子を導入し、GFP を含む Ecotropic レトロウイルスを感染させた際の GFP 発現を示す。



なお、本成果の一部は、東京都神経科学総合研究所松本陽博士との共同研究である。

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

ES 細胞からの樹状細胞分化誘導法の開発とその抗原特異的免疫  
制御への応用

西村 泰治（熊本大学 教授）

研究要旨

樹状細胞は生体内における主要な抗原提示細胞として機能しており、強力な T 細胞活性化能を有している。一方で樹状細胞には、自己抗原に対する T 細胞応答を抑制することにより、免疫寛容を維持する働きもある。このように免疫応答を正・負両方向へ制御する機能をもつ樹状細胞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。我々は、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樹状細胞を生体に投与し、抗原に特異的な T 細胞の反応を制御することにより、自己免疫疾患やアレルギー疾患の治療を行うことを考えた。我々は、これまでの研究で、マウス ES 細胞から *in vitro* で樹状細胞へ分化誘導する方法を開発している。今年度の研究では、この分化誘導法を応用して ES 細胞に遺伝子を導入し、これを樹状細胞へ分化させ導入遺伝子発現樹状細胞を作製する手法を確立した。さらに、導入遺伝子由来するモデル抗原を発現する樹状細胞により抗原特異的な T 細胞反応を *in vitro* および *in vivo* で惹起できることを確認した。

A. 研究目的

種々の難治性疾患を含む自己免疫疾患および社会的にも大きな問題となっているアレルギー疾患の根本的な治療のためには、個体の免疫応答を抗原特異的に制御する手法の開発が望まれる。近年、生体内における主要な抗原提示細胞である樹状細胞が、免疫応答を正あるいは負の両方向へ制御する機能を有していることが明らかにされた。本研究は、遺伝子改変により樹状細胞に抗原と種々の免疫制御分子を発現させ、これを生体内に移入することにより、免疫応答を抗原特異的に制御する方法の開発を目的としている。われわれは、これまでの研究で、マウス ES 細胞から *in vitro* で樹状細胞へ分化誘導する方法を開発している。今年度の研究では、この分化誘導法を応用して ES 細胞に遺伝子を導入したものを樹状細胞へ分化させ発現させる手法を確立し、さらに、導入遺伝子由来するモデル抗原を発現する樹状細胞により抗原特異的な T 細胞反応を *in vitro* および *in vivo* で惹起できるかどうか検討することを目的として研究を行なった。

B. 研究方法

1. ES 細胞から樹状細胞への分化誘導 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 OP-9 細胞とともにさらに 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）が誘導される。さらに、この細胞を IL-4 と TNF- $\alpha$  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。

2. 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  $\beta$  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・丹羽仁史博士により供与) を用いて、抗原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。

3. 遺伝子トラップ ES 細胞クローンおよび Cre-Lox 遺伝子置換法を用いた遺伝子発現細胞株の作製 熊本大学発生医学研究センターの山村教授らとの共同研究により、遺伝子トラップ ES 細胞ライブラリーの供与を受けた。遺伝子トラップ ES 細胞クローンにおいて、ES 細胞、樹状細胞および途中の各分化段階において LacZ 活性を測定し、樹状細胞においてのみ特異的に高いレベルの LacZ 活性を有する ES 細胞クローンを選択し、発現させるべき遺伝子をその ES 細胞クローンにおいてトラップされた遺伝子座に導入した。さらに Cre-Lox システムを用いた遺伝子の標的置換技術を用いて、樹状細胞において発現する遺伝子を置換するように抗原遺伝子の導入を行なった。

4. 抗原特異的な T 細胞刺激活性の解析 *in*



in vitro における T 細胞エピトープ提示能は、抗原特異的な T 細胞ハイブリドーマを用いて解析した。in vivo における T 細胞感作活性の評価は、抗原を発現した樹状細胞をマウスに移入（腹腔内注入）した後、脾臓細胞を回収し、in vitro での 5 日間の培養の後、抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞の活性を Cr 遊離法により測定し、行なった。また、in vitro での T 細胞感作能の解析は、マウスの脾臓由来の T 細胞を抗原を発現した樹状細胞と 5 日間共培養した後に、抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞の活性を測定することにより行なった。

### C. 研究結果

$\beta$  アクチンプロモーター+IRES-Puro-R を含む発現ベクター(pCAGGSIRESPuro)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 85%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。また、Cre-Lox システムを用いた遺伝子置換法により作製した遺伝子導入 ES 細胞クローンの 90% が樹状細胞段階で導入遺伝子を高発現した。

PCC エピトープを提示した樹状細胞、さらに、OVA（卵白アルブミン）抗原を発現する樹状細胞を作製し、in vitro においてこれらが各々の抗原に特異的な T 細胞を刺激しうる事が確認された。さらに、OVA を発現する樹状細胞を用いることにより、in vivo および in vitro において OVA 特異的な細胞傷害性 T 細胞を活性化（感作）できる事が確認された。このように遺伝子導入により抗原を発現させた ES 細胞由来の樹状細胞は、抗原をタンパク質あるいはペプチドとして骨髄細胞由来の樹状細胞に負荷したものよりも当該抗原に特異的な T 細胞を強力に活性化できる事が明らかとなった。

### D. 考察

これまでに行われた樹状細胞の遺伝子改変としては、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ある。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、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。

現在、抗原と同時に T 細胞の遊走を惹起するケモカインあるいは T 細胞の応答を抑制する機能を有する分子を発現させた樹状細胞を作製して、免疫応答をより効率良くあるいは抑制的に制御する手法の開発を試みている。

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 細胞を作製しうる事が報告されている。

### E. 結論

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。さらに、この手法を用いて作製したモデル抗原を発現する樹状細胞が、in vivo および in vitro において当該抗原に特異的な T 細胞を活性化できることを確認した。

### G. 研究発表

1. RA 関連 HLA クラス II 結合ペプチド, 西村泰治, 植村靖史, 藤井慎嗣, 千住 覚, 松下 祥, 第 46 回日本リウマチ学会総会・学術集会（神戸）,（招待）2002 年 4 月 22~24 日

2. SEREX 法にて同定した膀胱癌抗原 KM-PA-2 および Coactosin-like protein (CLIP)由来ペプチドならびにそれらに相同性(分子擬態)を有する非自己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, 千住 覚, 七條茂樹, 伊藤雅昭, 原田 守, 大河内真也, 古賀 真, 伊東恭悟, 西村泰治, 第 6 回基盤的癌免疫研究会総会(久留米), 2002 年 7 月 16~17 日
3. SEREX 法による新規 cancer/testis 抗原の同定と特異的 CTL の誘導, 門司幹男, 中面哲也, 千住 覚, 吉武義泰, 井ノ口昭, 西村泰治, 第 6 回基盤的癌免疫研究会総会(久留米), 2002 年 7 月 16~17 日
4. 肝細胞癌特異的に高発現する新しい癌胎児性抗原 glypican-3 は免疫療法のターゲットおよび腫瘍マーカーになりうる, 中面哲也, 吉武義泰, 千住 覚, 門司幹男, 片桐豊雅, 古川洋一, 中村祐輔, 小川道雄, 西村泰治, 第 61 回日本癌学会総会(東京), 2002 年 10 月 1~3 日
5. ヒト膀胱癌・大腸癌特異的に高発現する hsp105 の DNA ワクチンの接種はマウスに大腸癌細胞株 Colon26 の拒絶を誘導する, 宮崎正史, 中面哲也, 門司幹男, 吉武義泰, 保坂征司, 千住 覚, 小川道雄, 西村泰治, 第 61 回日本癌学会総会(東京), 2002 年 10 月 1~3 日
6. 抗原とケモカイン共発現する ES 細胞由来樹状細胞の樹立, 松吉秀武, 千住 覚, 平田真哉, 吉武義泰, 植村靖史, 西村泰治, 第 32 回日本免疫学会総会(東京), 2002 年 12 月 4~6 日
7. 遺伝子を改変した ES 細胞由来の樹状細胞を用いた抗原特異的 T 細胞応答の誘導, 千住 覚, 平田真哉, 松吉秀武, 増田聖子, 植村靖史, 西村泰治, 第 32 回日本免疫学会総会(東京), 2002 年 12 月 4~6 日
8. 高密度 TCR 部分アゴニスト刺激により増加する T 細胞では ZAP-70 の活性化は検出されないが PKC $\mu$  は活性化されている, 入江 厚, CHEN Yu-zhen, 塚本博丈, 西村泰治, 第 32 回日本免疫学会総会(東京), 2002 年 12 月 4~6 日
9. 肝細胞癌特異的に高発現し、免疫療法のターゲットおよび腫瘍マーカーになりうる癌胎児性抗原 glypican-3 が示す細胞増殖抑制効果, 中面哲也, 千住 覚, 門司幹男, 吉武義泰, 保坂征司, 松吉秀武, 平田真哉, 西村泰治, 第 32 回日本免疫学会総会(東京), 2002 年 12 月 4~6 日
10. ヒト膀胱癌・大腸癌特異的に高発現する hsp105 を利用した DNA ワクチンが示すマウス大腸癌細胞株への拒絶効果と hsp105 特異的 T 細胞療法, 保坂征司, 中面哲也, 門司幹男, 吉武義泰, 千住 覚, 西村泰治, 第 32 回日本免疫学会総会(東京), 2002 年 12 月 4~6 日
11. エピトープ発現ライブラリーを用いた GAD65 自己反応性 TCR の認識エピトープの多様性に関する解析, 植村靖史, 千住 覚, 前仲勝実, 藤井慎嗣, 塚本博丈, CHEN Yu-zhen, 西村泰治, 第 32 回日本免疫学会総会(東京), 2002 年 12 月 4~6 日
12. 高密度 TCR アンタゴニスト刺激によりヒト CD4<sup>+</sup>T 細胞に誘導されるユニークな Ras/MEK/ERK 活性化機構の解析, 塚本博丈, 入江 厚, CHEN Yu-zhen, 西村泰治, 第 32 回日本免疫学会総会(東京), 2002 年 12 月 4~6 日
13. がん免疫療法—分子基盤—, 西村泰治, 免疫システムの成り立ちと免疫疾患コース(講師), 財団法人神奈川科学技術アカデミー(神奈川), 2002 年 12 月 7 日
14. T 細胞による HLA・ペプチド複合体の識別: その基礎と臨床医学への応用, 西村泰治, 第 2 回肺分子病態研究会(特別講演)(福岡), 2003 年 1 月 11 日
15. ヘルパー T 細胞抗原受容体が認識するペプチドの多様性解析システムの開発と自己免疫研究への応

- 用, 西村泰治, 厚生労働省特定疾患対策研究事業・班会議 (筑波), 2003年1月24日
16. T細胞の抗原認識: その基礎と臨床応用, 西村泰治, 日本組織適合性学会地方会 (シンポジウム) (大阪), 2003年2月1日
  17. 「自己免疫疾患」基礎: 疾患感受性遺伝子, 西村泰治, アレルギー・臨床免疫医を目指す人達の為の研修会 (教育講演) (福岡), 2003年3月8~9日
  18. T細胞による HLA・ペプチド複合体の識別; その基礎と臨床医学への応用, 西村泰治, 第15回日本神経免疫学会学術集会 (教育講演) (長崎), 2003年3月12~14日
4. 論文発表
1. Senju S, Hirata S, Matsuyoshi H, Masuda M, Uemura Y, Araki K, Yamamura K-I and Nishimura Y. Generation and genetic modification of dendritic cells derived from mouse embryonic stem cells. *Blood* in press
  2. Irie A, Chen Y-Z, Tsukamoto H, Jotsuka T, Masuda M and Nishimura Y. Unique T cell proliferation dependent on PKC $\mu$  activation with impaired Zap-70 phosphorylation in recognition of overexpressed HLA-DR/partially agonistic peptide complexes. *Eur. J. Immunol.* in press
  3. Uemura Y, Senju S, Fujii S, Iwai L.K, Maenaka K, Tabata H, Kanai T, Chen Y-Z and Nishimura Y. [Review] Specificity, degeneracy, and molecular mimicry in antigen recognition by HLA-class II restricted T cell receptors; Implications for clinical medicine. *Modern Rheumatology* in press
  4. Soejima H, Irie A, Miyamoto S, Kajiwara I, Kojima S, Hokamaki J, Sakamoto T, Tanaka T, Yoshimura M, Nishimura Y and Ogawa H. The preference to a Th1-type response in patients with coronary spastic angina. *Circulation.* in press
  5. Uemura Y, Senju S, Maenaka K, Iwai L.K, Fujii S, Tabata H, Tsukamoto H, Hirata S, Chen Y-Z and Nishimura Y. Systematic analysis of the combinatorial nature of epitopes recognized by TCR leads to identification of mimicry epitopes for GAD65 specific TCRs. *J. Immunol.* 170: 947-960, 2003.
  6. Nakatsura T, Senju S, Ito M, Nishimura Y\* and toh K.\* (\*equal contribution); Cellular and Humoral Immune Responses to A Human Pancreatic Cancer Antigen, CLP, Originally Defined by the SEREX Method. *Eur. J. Immunol.* 32: 826-836, 2002.
  7. Monji M, Senju S, Nakatsura T, Yamada K, Sawatsubashi M, Inokuchi A and Nishimura Y. Head and neck cancer antigens recognized by the humoral immune system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294: 734-741, 2002.
  8. 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.* 81: 149-155, 2002.
  9. 植村靖史, 西村泰治, 「HLA と免疫応答」, 先端医療シリーズ 19・アレルギー・リウマチ・膠原病の最新医療, 第1章免疫と疾患, pp8-15, 2003年
  10. 平田真哉, 千住 覚, 西村泰治, 「自己免疫疾患の細胞移入治療: 樹状細胞療法の可能性」先端医療シリーズ 19・アレルギー・リウマチ・膠原病の最新医療, 第7章リウマチ・膠原病の先端的トピックス, pp228-233, 2003年
  11. 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<sup>+</sup>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, pp156-164, 2002年
  12. 千住 覚, 西村泰治, 「樹状細胞による抗原のプ

ロセシングと提示」, 医学のあゆみ, 第 200 卷 6 号, pp467-471, 2002 年

13. 中面哲也, 門司幹男, 西村泰治, 「SEREX」第 34 回臨床免疫の近未来, Surgery Frontier, 第 9 卷 3 号, pp58-61, 2002 年