

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

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 15 年度 研究報告書

平成 16 年 3 月

主任研究者 住田 孝之

目次

I	構成員名簿	1
II	平成 15 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	
	変異ペプチドを用いた免疫難病の治療アプローチに関する研究	7
	筑波大学臨床医学系内科 住田 孝之	
	遺伝子改変マウス ES 細胞由来の樹状細胞による EAE の発症予防に関する研究	12
	熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学 西村 泰治	
	多発筋炎のモデルマウスの作成に関する研究	17
	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 上阪 等	
	T 細胞レセプター遺伝子移入による免疫応答改変操作法の開発	20
	東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 山本 一彦	
	MRL/Mp-Fas ^{lpr} マウスにおける自己反応性 Th1 細胞ワクチネーションに関する研究	23
	京都大学大学院医学研究科臨床免疫学 三森 経世	
	新しい調節性 T 細胞 (V α 7.2-J α 33 invariant T cells) の多発性硬化症における役割に関する研究	30
	国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 山村 隆	
	GP I と自己抗体制御に関する研究	34
	筑波大学臨床医学系内科 松本 功	
	β 2-グリコプロテイン I の新たな生物学的意義：ニック β 2GPI	36
	北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学講座免疫病態分野 小池 隆夫	

IV	研究成果の刊行に関する一覧表	43
V	平成 15 年度班会議プログラム	57
VI	研究成果刊行物・別刷	59

I 平成 15 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アレルギーリウマチ学	教授
	小池 隆	北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学講座免疫病態分野	”
	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薬学研究部免疫識別学	”
	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（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. T E L 029-853-3221 F A X 029-853-3222	教授

II 平成 15 年度総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
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。TCRV α 7.2+NKT 細胞が多発性硬化症の発症と制御に関与している可能性が明らかにされた。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。昨年度から、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。

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 α -アミラーゼの T 細胞エピトープ (NPFRPWWERYQPV, AA68-80)をまず決定した。

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

それを基に6種類の変異ペプチドを合成しIFN- γ 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、NPFRPWVRYQPVがアナログペプチドの候補として明らかにされた。

さらに、ムスカリン作動性アセチルコリン受容体(M3R)のT細胞エピローブが細胞外第2ドメインにあることを明らかにした。9種類の変異ペプチドを用いてHLA B1*0901陽性SS患者におけるアナログペプチドを解析した結果、VPPGECFKQFLSEPT(222I→K)とVPPGECFIAFLSEPT(223Q→A)が候補として選定された。

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GKPLIAGFKGEQGPKG(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かとなった。そのうち、GKPLIAD/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。

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、マウスES細胞に抗原遺伝子とT細胞抑制遺伝子を導入し、in vitroで樹状細胞に分化させたES-DCを作成し、これをマウスに先行投与することにより、自己免疫疾患の一つである実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)を抗原特異的に制御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、Myelin oligodendrocyte glycoprotein(MOG)p35-55ペプチドを発現するベクター(ii-MOG)とT細胞抑制分子であるマウスTRAILあるいはPD-L1遺伝子発現ベクターを作成し用いた。これらをES細胞に遺伝子導入した後に樹上細胞に分化させ、マウスに先行等予後、MOGp35-55によりEAEを発症させ、遺伝子導入による抑制効果を検討した。その結果、1)ii-MOG+TRAILおよび+PD-L1遺伝子発現した両者においてEAEの発症が著明に抑制された。2)その抑制効果は抗原特異的であった。3)Myelin basic protein(MBP)を用いた実験から、TRAILとPD-L1の抑制機序が異なることが判明した。本研究により、自己免疫疾患モデルの抗原特異的制御による予防が可能であることが明らかにされた。

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、

マウスにおける筋炎モデルの作成を目的としている。本年度は、マウスにおける筋炎モデルの作成に成功した。ラット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、4つのフラグメントにおいてリコンビナント蛋白を作成した。Balb/cマウスに免疫して筋炎の発症率、組織学的検討を行った。その結果、4つのフラグメントの混合物およびフラグメント2において100%の筋炎発症と著明な筋炎が認められた。本研究から、リコンビナントC蛋白を用いたマウスの筋炎モデルが確立された。

山本班員は、臓器に集積したT細胞を単細胞レベルで解析しin vitroで人工的に再構築し、新たに抑制機能を付加することにより、in vivoにおいて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 α , V β)を単細胞から単離し、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、1)マウスのHIV免疫応答モデルにおいて、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 α 2, V β 7)のTCRをin vitroで再構築し、in vivoにおいてHIVに対する細胞傷害機能を確認した。2)マウスBalb/c由来繊維細胞肉腫CMS5に対するCD8+T細胞クローンを再構築し、in vivoにおいて癌抑制効果を確認した。3)コラーゲン誘導関節炎モデルにおいて、関節局所浸潤T細胞を再構築しさらにIL-10遺伝子を発現させることにより関節炎が抑制されることが明らかになった。本研究から、機能的なT細胞の再構築が可能となり、自己免疫疾患の抗原特異的治療への応用が期待できる。

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いる。本年度は、自己免疫疾患である多発性硬化症(MS)において、第2のNKT細胞であるTCRV α 7.2J α 33+invariant T細胞(V α 7.2+NKT細胞)(MR1分子拘束)の組織分布、量的解析を行った。結果として、1)V α 7.2+NKT細胞はMS末梢血、脳病変において多く検出された。2)一方、V α 24+NKT細胞はMS脳局所ではほとんど検出されなかった。本研究から、MS病変の誘導、制御においてV α 7.2+NKT細胞が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

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+ α β Th1細胞

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。本研究では、その抑制機序について検討し以下のことを明かにした。1) dna51 の TCR-CDR3 領域に対する抗体産生が認められた、2) 抗 dna51 抗体は dna51 の細胞増殖反応を抑制した、3) dna51 のワクチネーションにより CD4+ および CD8+ 細胞障害 T 細胞が誘導された。4) B 細胞の減少が認められた。以上のように、T 細胞ワクチネーションによる自己反応性 T 細胞の制御機構を明かにした。

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 抗体をヘルプする GPI 反応性 T 細胞の T 細胞エピトープ解析を行った。その結果、HLA-DR B1*0901+RA 患者において、モデルマウスと同様に LSIALHVGFDNFEQLLSGAH(GPI283-301) に T 細胞エピトープが存在することが判明した。

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、 β 2-グリコプロテイン I (β 2GPI) をプラスミンで処理したニック β 2GPI の生物学的意義を明らかにし、抗原サイドから、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 β 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 β 2GPI の臨床的意義について検討した。その結果、1) ニック β 2GPI は plasminogen 上の第 V クリングルドメインのリジンに結合し、プラスミン生成を抑制した。2) ラクナ梗塞、脳梗塞患者血中で高値であった。本研究から、 β 2GPI が線溶系の negative feedback を担うこと、ニック β 2GPI は梗塞と関連していることが判明した。

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アナログ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 in vivo における抗原特異的制御の検討、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。

III 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

変異ペプチドを用いた免疫難病の治療アプローチに関する研究

住田 孝之（筑波大学大学臨床医学系内科 教授）

研究要旨

免疫難病の抗原特定の治療の確立を目的とした研究である。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、 α -アミラーゼのT細胞エピトープ(NPFRPWWERYQPV, AA68-80)から、NPFRPWWVRYQPVが、また、ムスカリン作動性アセチルコリン受容体(M3R)のT細胞エピトープ(VPPGECFIQFLSEPT, AA215-229)から、VPPGECFKQFLSEPT, VPPGECFIAFLSEPT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) α -アミラーゼ：HLA-DR B1*0405陽性SS患者における α -アミラーゼのT細胞エピトープは、NPFRPWWERYQPV(AA68-80)であることが判明した。そこで、6種類のアナログペプチド(NPFRPWWA/V/MRYQPV, NPFL/A/MPWWERYQPV)を合成し、1)と同様の方法で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(KRTVPPGECFIQFLSEPTITFGTAI, 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 γ を指標としたMACSサイトカイン産生アッセイで検定した。M3R反応性T細胞が認められたHLA-DR B1*0901陽性SS患者において、9種の変異ペプチド(M3R215-229; VPPGECFE/K/LQFLSEPT, VPPGECFIA/V/MFLSEPT,

VPPGECFIQFM/E/KSEPT)を作成してアナログペプチドの選定を1)と同様の方法で行った。

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 γ 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 α -アミラーゼのT細胞エピトープ(NPFRPWWERYQPV, 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(75E \rightarrow V)を抗原として用いた場合に、2例のSS患者においてIFN γ 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考えられた。

2)M3RのT細胞エピトープの一つは細胞外第2ドメインにあり、さらに、T細胞応答を抑制するアナログペプチドはVPPGECFKQFLSEPT(222I \rightarrow K)とVPPGECFIAFLSEPT(223Q \rightarrow A)であることが判明した。

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

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が選定された。さらに、SSにおいても、 α -アミラーゼおよびムスカリン作動性アセチルコリン受容体(M3R)のT細胞エピトープのアミノ酸構造から、 α -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が選定された。以上の結果から、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. Matsumoto, I., Lee, D.M., Goldbach-Mansky, R., Sumida, T., Hitchon, C.A., Schur, P.H., Anderson, R.J., Coblyn, J.S., Weinblatt, M.E., 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 48:944-954, 2003.
2. Tsutsumi, A., Ikegami, H., Takahashi, R., Murata, H., Goto, D., Matsumoto, I., Fujisawa, T., and Sumida, T. Mannose binding lectin gene polymorphism in patients with type I diabetes. Human Immunol. 64:621-624, 2003.

3. 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. 62:1-2, 2003
4. Kojo, S., Tsutsumi, A., Goto, D., and Sumida, T. Low expression of soluble CD1d gene in patients with rheumatoid arthritis. J. Rheumatol. 30:2524-2528, 2003.
5. Shibuya, K., Shirakawa, J., Kameyama, T., Honda, S.-I., Tahara-Hanaoka, S., Miyamoto, A., Onodera, M., Sumida, T., Nakauchi, H., Miyoshi, H., and Shibuya, A. CD226 (DNAM-1) is involved in LFA-1 costimulatory signal for naïve T cell differentiation and proliferation. J. Exp. Med. 198:1829-1839, 2003
6. Arakaki, R., Ishimaru, N., Saito, I., Kobayashi, M., Yasui, N., Sumida, T., and Hayashi, Y. Development of autoimmune exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in adoptively transferred mice with autoreactive CD4+ T cells. Arthritis Rheum. 48: 3603-3609, 2003.
7. 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. 13:69-72, 2003
8. Adachi, Y., Tsutsumi, A., Murata, H., Takemura, H., Chino, Y., Takahashi, R., Ebisuka, T., and Sumida, T. Behcet's disease accompanied by myelodysplastic syndrome with trisomy 8: Two case reports and review of 15 Japanese cases. Mod. Rheumatol. 13:90-94, 2003
9. 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.
10. Murata, H., Adachi, Ebisuka, T., Chino, Y., Takahashi, R., Hayashi, T., Goto, D., Matsumoto, I., Tsutsumi, A., Akaza, H., and Sumida, T. Reiter's syndrome following intravesical Bacillus bilie de Calmette-Guerin treatment for superficial

bladder carcinoma. Report of six cases. Mod. Rheumatol. (in press)

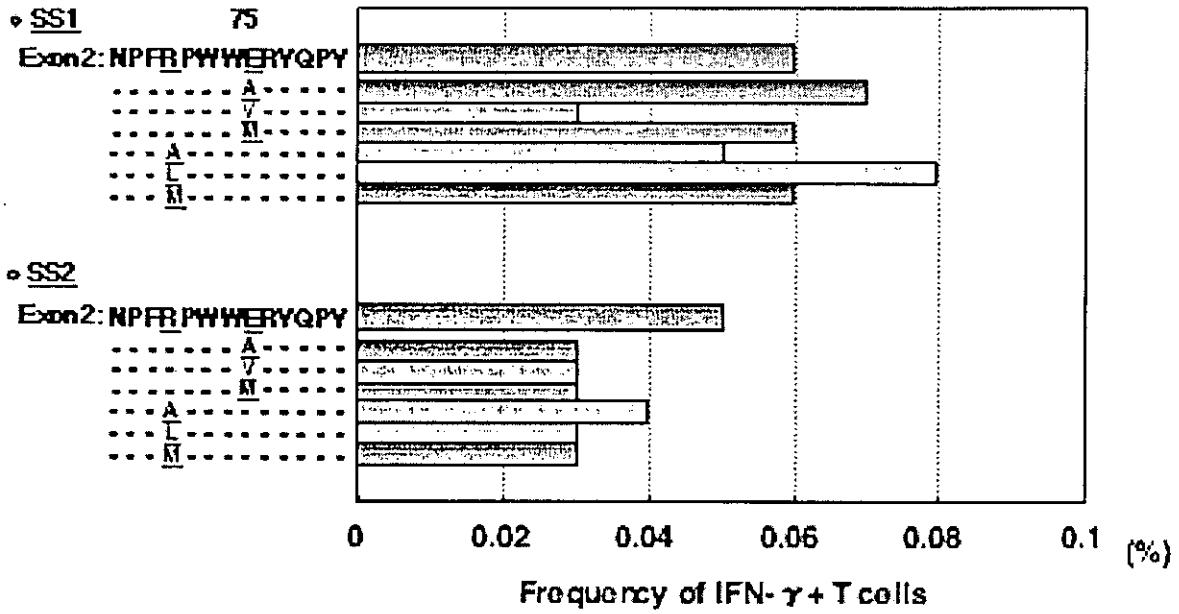
11. Muraki, Y., Tsutsumi, A., Takahashi, R., Suzuki, E., Hayashi, T., Chino, Y., Goto, D., Matsumoto, I., Murata, H., and Sumida, T. Polymorphisms of IL-1b gene in Japanese patients with Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus. J. Rheumatol. (in press)

12. Tsutsumi, A., Adachi, Y., Murata, H., Kojo, S., Shibuya, K., Nakamura, H., and Sumida, T. GOS24, a gene that regulates TNFa production, is highly expressed in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis. J. Rheumatol. (in press)

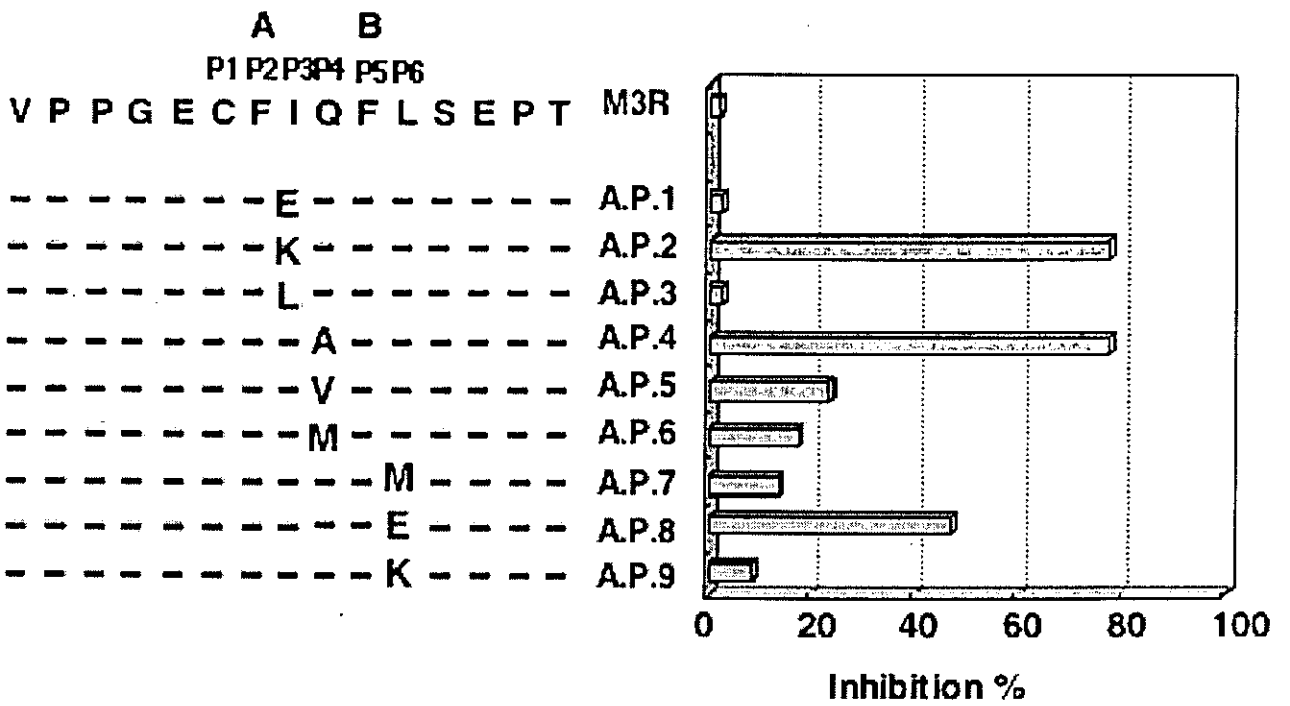
13. Takahashi, R., Tsutsumi, A., Ohtani, K., Goto, D., Matsumoto, I., Ito, S., Wakamiya, N., and Sumida, T. Anti-mannose binding lectin antibodies in sera of Japanese patients with systemic lupus erythematosus. Clin. Exp. Immunol. (in press)

- ☒ 1SSにおけるαアミラーゼのアナログペプチド
- ☒ 2SSにおけるM3Rのアナログペプチド
- ☒ 3RAにおけるCIIのアナログペプチド

☒ 1

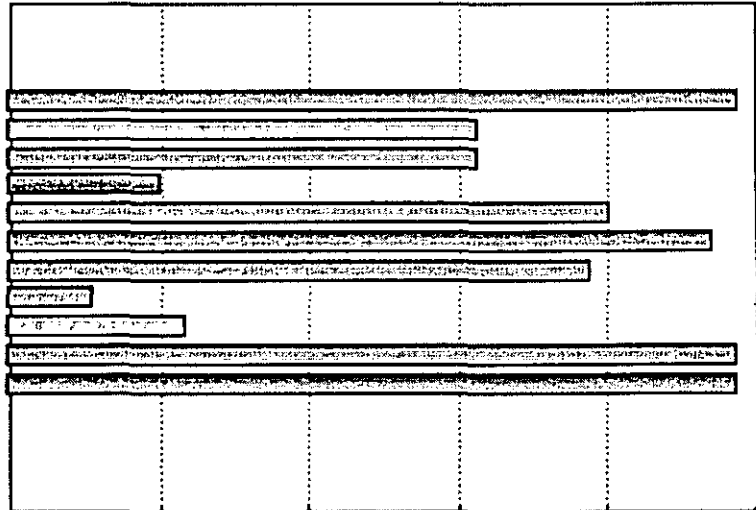
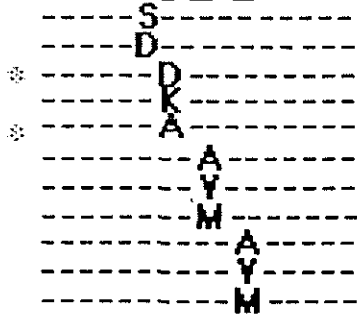


☒ 2



• CII 256-271

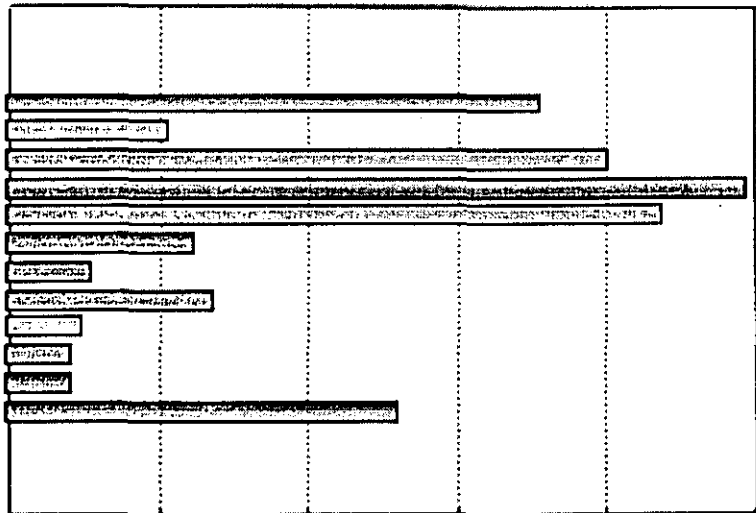
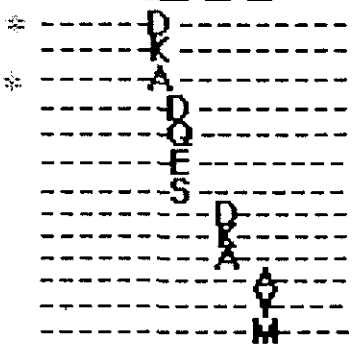
GKPGIAGFKGEQGPKG



0 20 40 60 80 100 (%)
Inhibition rate

• CII 256-271

GKPGIAGFKGEQGPKG



0 20 40 60 80 100 (%)
Inhibition rate

遺伝子改変マウス ES 細胞由来の樹状細胞による EAE の発症予防に関する研究

分担研究者 西村泰治 熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学 教授

研究要旨

マウス ES 細胞に抗原遺伝子と T 細胞抑制性因子を遺伝子導入し、これを *in vitro* で樹状細胞へ分化させた ES 細胞由来の樹状細胞 (ES-DC) を作成し、これをマウスに先行投与することで、外来抗原に対する免疫応答を抑制することなく、免疫実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の発症を予防することができた。

A. 研究目的

自己免疫疾患や臓器移植における拒絶反応の治療において、個体の免疫応答を全般的な抑制状態に陥らせることなく、抗原特異的に免疫応答を抑制する手法の開発が、強く求められている。

近年、末梢での免疫寛容の成立においても、樹状細胞 (DC) が中心的役割を担っていることが明らかにされつつある。本研究は、マウス ES 細胞に自己抗原遺伝子と T 細胞抑制性因子の遺伝子を導入し、これを *in vitro* で DC へ分化させた ES 細胞由来の樹状細胞 (ES-DC) を作成し、マウス個体へ先行投与することにより、外来抗原に対する免疫応答を抑制することなく、免疫実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の発症を予防できるか否か検討することを目的とした。

B. 方法

ヒトインバリアント鎖の CLIP 領域を Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) p35-55 ペプチドをコードするオリゴヌクレオチドに置換した遺伝子発現ベクター (Ii-MOG) を作製した。また、T 細胞応答抑制分子であるマウス TRAIL および PD-L1 の発現ベクターを作製した。これらの発現ベクターを電気穿孔法にてマウス ES 細胞 (TT2) に遺伝子導入し、高発現体を選択した後に、骨髄ストローマ細胞 (OP9) や GM-CSF などのサイトカインを用いて DC への分化を誘導した。この遺伝子改変 ES-DC を TT2 と同系のマウスへ

1×10^6 ずつ 3 回の先行投与を行い、その後に MOG p35-55 ペプチドにて EAE 発症を誘導し、発症予防効果を検討した。

C. 結果

ES-DC 未投与群や Ii-MOG のみを導入した ES-DC 投与群、OVA 蛋白質（無関係な抗原） + TRAIL あるいは OVA 抗原 + PD-L1 遺伝子発現 ES-DC 投与群に比較して、Ii-MOG + TRAIL あるいは Ii-MOG + PD-L1 遺伝子発現 ES-DC 投与群では、EAE の発症が著明に抑制された。

一方、KLH 蛋白質（無関係な抗原）に対する免疫応答能については、Ii-MOG + TRAIL あるいは Ii-MOG + PD-L1 遺伝子発現 ES-DC 投与群のマウスにおいて、ES-DC 未投与群のマウスと比較して、その低下を認めなかった。

更に、同様に遺伝子改変 ES-DC を先行投与したマウスに、EAE を誘導できる他の抗原 (Myelin basic protein (MBP) の p35-47 ペプチドあるいは総蛋白) にて EAE 発症を誘導した。その結果、ES-DC 未投与群や Ii-MOG のみ、あるいは Ii-MOG + PD-L1 遺伝子発現 ES-DC 投与群に比較して、Ii-MOG + TRAIL 遺伝子発現 ES-DC 投与群では、MBP による EAE の発症が著明に抑制された。

D. 考察

マウスの疾患モデル (EAE) において、遺伝子改変 ES-DC を投与することにより、無関係な外

来抗原に対する免疫応答能を損なうことなく、抗原特異的に免疫応答を抑制し、自己免疫疾患の発症を予防することができた。また、MBP ペプチドあるいは総蛋白による EAE の発症誘導時の結果より、Ii-MOG + TRAIL と Ii-MOG + PDL1 遺伝子発現 ES-DC は、抑制のメカニズムが異なることが推測された。

E. 結論

遺伝子改変 ES-DC は、抗原特異的に免疫応答を抑制し、マウスモデルにおいて自己免疫疾患の発症を予防することができた。今後、*in vivo* での抗原特異的免疫抑制のメカニズムについて解析していく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsuyoshi, H., Senju, S., Hirata, S., Yoshitake, Y., Uemura, Y., and Nishimura, Y. Enhanced priming of antigen-specific CTL *in vivo* by transfer of ES cell-derived dendritic cells expressing chemokine along with antigenic protein; application to anti-tumor vaccination. *J. Immunol.* 172: 776-786, 2004
2. Nishimura, Y., Chen, Y-Z., Uemura, Y., Tanakaa, Y., Tsukamoto, H., Kanaia, T., Yokomizo, H., Yun, C., Matsuoka, T., Irie, A., and Matsushita, S.; Review, Degenerate recognition and response of human CD4⁺ Th cell clones: Implications for basic and applied immunology. *Mol. Immunol.* 40: 1089-1094, 2004
3. 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* 101: 3501-3508, 2003
4. 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
5. Irie, A., Chen Y-Z, Tsukamoto, H., Jotsuka, T., Masuda, M., and Nishimura, Y.; Unique T-cell proliferation associated with PKC μ activation and impaired Zap-70 phosphorylation in recognition of overexpressed HLA-DR/partially agonistic peptide complexes. *Eur. J. Immunol.* 33: 1497-1507, 2003
6. 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 respse in patients with coronary spastic angina. *Circulation* 170: 2196-2200, 2003
7. Nakatsura, T., Yoshitake, Y., Senju, S., Monji, M., Komori, H., Motomura, Y., Hosaka, S., Beppu, T., Ishiko, T., Kamohara, H., Ashihara, H., Katagiri, T., urukawa, Y., Fujiyama, S., Ogawa, M., Nakamura, Y., and Nishimura, Y. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 306: 16-25, 2003
8. Kai, M., Nakatsura, T., Egami, H., Senju, S., Nishimura, Y., and Ogawa, M. Heat shock protein 105 is overexpressed in a variety of human tumors. *Oncology reports* 10: 1777-1782, 2003
9. Nakatsura, T., Monji, M., Senju, S., Yamada, K., Ogawa, M., Nishimura, Y. Identification of cancer antigens by SEREX. *Int. Congress Series* 1255: 343-349, 2003.
10. Kobayashi, H., Omiya, R., Sodey, B., Yanai, M., Oikawa, K., Sato, K., Kimura, S., Senju, S., Nishimura, Y., Tateno, M., Celis, E. Identification of Naturally Processed Helper T-Cell Epitopes from Prostate-Specific Membrane Antigen Using Peptide-Based *in Vitro* Stimulation *Clinical Cancer Research* 9: 5386-5393, 2003
11. 平田 真哉, 西村 泰治, HLA-DQ による HLA-DM の制御と抗原提示, 臨床免疫 (科学評論社) 39 巻 3 号, pp365-370, 2003 年

12. 中面哲也, 西村 泰治, 癌と HLA-癌細胞の排除における HLA の役割, 医学のあゆみ, 第 207 巻 8 号 pp543-548, 2003 年
13. 西村 泰治, HLA 遺伝子の多型性と疾患感受性, ゲノム医学, 第 3 巻 6 号 pp101-109, 2003 年
14. 千住 覚, 門司幹男, 西村泰治, 第 11 章移植免疫, 免疫学最新イラストレイテッド(小安重夫 編), 羊土社(東京), pp217-239, 2003 年

2. 学会発表

1) 国際学会

1. Cellular Vaccination with Genetically Modified Dendritic Cells Derived from Mouse ES cells. Satoru Senju, Hidetake Matsuyoshi, Shinya Hirata, Yasuharu Nishimura, 8th International Workshop on Langerhans Cells, September5-7, 2003, Tokyo
2. Manipulation of immune response by genetically modified dendritic cells derived from mouse ES-cells, Yasuharu Nishimura, symposium2 'Immune Response', 7th Asia-Oceania Histocompatibility Workshop and Conference and 2003 annual Scientific Meeting of Australasian and South East Asian Tissue Typing Association, September16-19, 2003, Karuizawa
3. Identification of a novel tumor marker and antigen for hepatocellular carcinoma by using a cDNA microarray analysis, Yasuharu Nishimura, International Symposium "Genome Diversity in Immunity and Disease (国際シンポジウム、免疫と疾患におけるゲノム多様性)", September22, 2003, Tokyo
4. Identification of a novel tumor marker and antigen for hepatocellular carcinoma, Yasuharu Nishimura, The 21st International Kumamoto Medical Bioscience Symposium (II) "Frontier Research for Molecular Pathogenesis in Medical Sciences", Oct.18, 2003, Kumamoto
5. Manipulation of immune response by genetically modified dendritic cells derived from mouse ES-cells, Yasuharu Nishimura, 第 33 回日本免疫学会総会(福岡)

2) 国内学会

1. Th 細胞応答における微生物抗原と自己抗原の Molecular mimicry, 西村泰治, 植村靖史, 千住 覚, 第 76 回日本細菌学会総会(熊本), 2003 年 4 月 1~3 日
2. 腫瘍免疫における HLA の役割, 西村泰治, 第 26 回日本医学会総会(福岡), 2003 年 4 月 4~6 日
3. 高感度質量分析装置を用いたヒト T 細胞活性化で誘導されるリン酸化タンパク質の解析, 入江厚, 竹下公弥子, 塚本博丈, 荒木令江, 西村泰治, 第 51 回質量分析総合討論会(筑波), 2003 年 5 月 14~16 日
4. Glypican-3(GPC3) 由来癌拒絶抗原ペプチドの同定とそれを用いた HCC の予防・治療戦略, 中面哲也, 小森宏之, 本村 裕, 小川道雄, 西村泰治, 第 15 回日本肝胆膵外科学会(金沢), 2003 年 5 月 14~16 日
5. HCC における Glypican-3(GPC3)の癌化および癌の進展における役割, 小森宏之, 中面哲也, 本村 裕, 小川道雄, 西村泰治, 第 15 回日本肝胆膵外科学会(金沢), 2003 年 5 月 14~16 日
6. HCC の新しい腫瘍マーカー、Glypican-3(GPC3), 本村 裕, 中面哲也, 小森宏之, 小川道雄, 西村泰治, 第 15 回日本肝胆膵外科学会(金沢), 2003 年 5 月 14~16 日
7. 遺伝子改変 ES 細胞由来の樹状細胞を用いた T 細胞応答の修飾, 千住覚, 松吉秀武, 平田真哉, 増田聖子, 植村靖史, 西村泰治, 荒木喜美, 山村研一, 第 13 回 KTCC(京都), 2003 年 6 月 27 日~28 日
8. ヒト CD4⁺T 細胞におけるリン酸化タンパク質のプロテオーム解析, 入江厚, 竹下公弥子, 塚本博丈, 西村泰治, 第 13 回 KTCC(京都), 2003 年 6 月 27 日~28 日
9. 高密度に提示された TCR アンタゴニスト刺激により誘導される Raf/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 13 回 KTCC(京都), 2003 年 6 月 27 日~28 日
10. 抗原とケモカイン遺伝子を発現させた ES 細

- 胞由来の樹状細胞を利用した抗腫瘍免疫療法の開発, 松吉秀武, 千住 覚, 平田真哉, 吉武義泰, 西村泰治, 第7回基盤的癌免疫研究会総会(岡山), 2003年7月17~18日
11. ヒト肝細胞癌に特異的な癌胎児性抗原 Glypican-3(GPC3)とそのマウスホモログにより誘導される *in vivo* 腫瘍拒絶モデルの解析, 中面哲也, 小森宏之, 本村 裕, 門司幹男, 千住 覚, 小川道雄, 西村泰治, 第7回基盤的癌免疫研究会総会(岡山), 2003年7月17~18日
 12. 多様な癌に発現する新規ヒトCT抗原 KM-HN-1の発現解析ならびに抗原性の証明, 門司幹男, 中面哲也, 吉武義泰, 生田義明, 千住 覚, 西村泰治, 第7回基盤的癌免疫研究会総会(岡山), 2003年7月17~18日
 13. cDNA マイクロアレイ解析による腫瘍特異抗原の探索, 西村泰治, 第27回阿蘇シンポジウム, 2003年8月1日~2日
 14. HLAの構造と機能, 西村泰治, 組織適合性検査技術者認定制度・認定HLA検査技術者講習会(講師)(軽井沢), 2003年9月15日
 15. Glypican-3(GPC3)はHCCの新しい腫瘍マーカーとして有用である, 中面哲也, 吉武義泰, 千住 覚, 小森宏之, 門司幹男, 片桐豊雅, 古川洋一, 藤山重俊, 小川道雄, 中村祐輔, 西村泰治, 第62回日本癌学会総会(名古屋), 2003年9月25日~27日
 16. 新規ヒトcancer/testis抗原 KM-HN-1に対する液性・細胞性免疫の解析, 門司幹男, 中面哲也, 千住 覚, 吉武義泰, 井之口 昭, 西村泰治, 第62回日本癌学会総会(名古屋), 2003年9月25日~27日
 17. 食道癌特異的に高発現する新規癌抗原 PP-RPは癌化と関連し、抗腫瘍免疫療法のターゲットになりうる, 吉武義泰, 中面哲也, 門司幹男, 千住 覚, 松吉秀武, 小森宏之, 片桐豊雅, 古川洋一, 篠原正徳, 中村祐輔, 西村泰治, 第62回日本癌学会総会(名古屋), 2003年9月25日~27日
 18. hsp105は多様なヒト腫瘍組織で高発現し、癌化に関わっている, 保坂征司, 中面哲也, 甲斐幹男, 江上 寛, 小川道雄, 西村泰治, 第62回日本癌学会総会(名古屋), 2003年9月25日~27日
 19. 抗原とケモカインを発現するES細胞由来樹状細胞を利用した抗腫瘍免疫療法の開発, 松吉秀武, 千住 覚, 平田真哉, 吉武義泰, 西村泰治, 第62回日本癌学会総会(名古屋), 2003年9月25日~27日
 20. Glypican-3は肝細胞癌の新しい腫瘍マーカーならびに腫瘍拒絶抗原である, 西村泰治, 中面哲也, 吉武義泰, 千住 覚, 小森宏之, 門司幹男, 片桐豊雅, 古川洋一, 藤山重俊, 小川道雄, 中村祐輔, 日本人類遺伝学会第48回大会(長崎), 2003年10月21日~24日
 21. メラノーマの新規腫瘍マーカー, 中面哲也, 西村泰治, 影下登志郎, 小野友道, 第15年度厚生労働省がん研究助成金(斎田班), 第2回班会議, 研究課題: 悪性黒色腫の新しい診断及び治療法の開発に関する研究(東京), 2003年11月1日
 22. なぜ特定のHLAをもっているヒトが自己免疫疾患にかかりやすいのか?, 西村泰治, 熊本地区リウマチ教育研修会, 2003年11月2日
 23. HCCの新しい腫瘍マーカー、Glypican-3(GPC3)と、それを標的にした免疫療法によるHCCの予防・治療戦略, 中面哲也, 小森宏之, 本村 裕, 別府 透, 中村祐輔, 藤山重俊, 小川道雄, 西村泰治, 第86回熊本肝疾患懇話会(熊本), 2003年11月19日
 24. Glypican-3(GPC3)を標的とした肝臓癌(肝細胞癌)の診断・予防・治療戦略, 中面哲也, 熊本大学研究シーズ公開シンポジウム(熊本), 2003年11月22日
 25. Heat shock protein 105(Hsp105)を標的とした大腸癌・膵臓癌など様々な癌の免疫療法, 中面哲也, 熊本大学研究シーズ公開シンポジウム(熊本), 2003年11月22日
 26. KM-HN-1を標的とした様々な癌の診断と免疫療法, 中面哲也, 熊本大学研究シーズ公開シンポジウム(熊本), 2003年11月22日
 27. PP-RPを標的とした食道癌の免疫療法, 中面哲也, 熊本大学研究シーズ公開シンポジウム(熊本), 2003年11月22日
 28. RNAiを用いたTCRを介したT細胞活性化制御におけるB-Rafの機能解析, 塚本博丈, 入江 厚, 西村泰治, 第33回日本免疫学会総会(福岡), 2003年12月8日~10日

29. 遺伝子導入により抗原とケモカインを共発現させた ES 細胞由来の樹状細胞を用いた抗腫瘍免疫療法, 松吉秀武, 千住 覚, 平田真哉, 吉武義泰, 西村泰治, 第 33 回日本免疫学会総会 (福岡), 2003 年 12 月 8 日~10 日
30. Supernatant obtained from the culture of CD4 T cells specific to non-self-or self-antigen induces tumor cell apoptosis, Chen Yu-zhen, Lai Zhong-fang, Tetsuya Nakatsura, Yasuharu Nishimura, 第 33 回日本免疫学会総会 (福岡), 2003 年 12 月 8 日~10 日
31. 食道癌特異的に高発現する新規癌抗原 PP-RP の発現解析と抗原性の証明, 吉武義泰, 中面哲也, 門司幹男, 千住 覚, 松吉秀武, 塚本博文, 小森宏之, 福岡大喜, 西村泰治, 第 33 回日本免疫学会総会 (福岡), 2003 年 12 月 8 日~10 日
32. 抗腫瘍免疫を誘導する新規ヒト cancer/testis 抗原 KM-HN-1 の同定, 門司幹男, 中面哲也, 千住 覚, 吉武義泰, 西村泰治, 第 33 回日本免疫学会総会 (福岡), 2003 年 12 月 8 日~10 日
33. 様々なヒト癌で高発現する SEREX 同定抗原 hsp105 によるヒトにおける抗腫瘍免疫応答の誘導, 中面哲也, 保坂征司, 小森宏之, 千住 覚, 西村泰治, 第 33 回日本免疫学会総会 (福岡), 2003 年 12 月 8 日~10 日
34. 多発性硬化症における HSP105 に対する免疫応答の解析, 三野原元澄, 朴華, 西村泰治, 吉良潤一, 第 33 回日本免疫学会総会 (福岡), 2003 年 12 月 8 日~10 日
35. MOG ペプチドと TRAIL あるいは PD-L1 を共発現する ES 細胞由来樹状細胞の前投与による EAE の発症予防, 平田真哉, 千住 覚, 松吉秀武, 植村靖史, 西村泰治, 第 33 回日本免疫学会総会 (福岡), 2003 年 12 月 8 日~10 日
36. 緑内障における新しい自己抗原蛋白の同定及び緑内障と HLA classII アリルとの関連, 矢野 豪, 山田和博, 三野原元澄, 吉良潤一, 千住 覚, 西村泰治, 谷原秀信, 第 33 回日本免疫学会総会 (福岡), 2003 年 12 月 8 日~10 日
37. 質量分析法によるヒト CD4 陽性 T 細胞の活性化に関わるリン酸化タンパク質の解析, 入江 厚, 竹下公弥子, 塚本博文, 荒木令江, 西村泰治, 第 33 回日本免疫学会総会 (福岡), 2003 年 12 月 8 日~10 日
38. 自己抗原と T 細胞抑制性分子を発現する ES-DC による EAE の発症予防, 厚生労働省難治性疾患克服研究事業「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」平成 15 年度班会議 (東京), 2004 年 1 月 23 日
39. MHC クラス II 分子と自己免疫疾患, 西村泰治, 愛媛県糖尿病懇話会<愛媛分子糖尿病セミナー> (愛媛), 2004 年 1 月 30 日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許出願
1. 特許出願番号: 2003-108677
発明者: 千住覚、西村泰治
発明の名称: 哺乳動物の ES 細胞由来樹状細胞の産生方法
出願人: 千住覚、西村泰治、熊本大学 TLO
出願日: 2003 年 4 月 14 日
2. 特許出願番号: 2003-368725
発明者: 西村泰治、中面哲也
発明の名称: 悪性黒色腫 (メラノーマ) の診断剤
出願人: 熊本大学 TLO
出願日: 2003 年 10 月 29 日
3. 特許出願番号: 2003-291073
発明者: 中面哲也、吉武義泰、中村祐輔、西村泰治
発明の名称: 食道癌の抗原およびその利用
出願人: 熊本大学 TLO
出願日: 2003 年 8 月 11 日