

健康人ボランティアの末梢血から Ficoll を用いた比重遠心法により末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cell; PBMC)を分離した。さらにこの PBMCs より、CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて CD14 陽性細胞を分離した。分離した CD14 陽性細胞を 6 穴プレートに 2×10^6 /ml になるように調整し、100 U/ml recombinant human (rh) IL-4、および 100 ng/ml rhGM-CSF (Primmune, Osaka, Japan) を加えた 10% ウシ胎児血清 (FCS, fetal calf serum) 入り RPMI1640 (SIGMA, St Louis, MO) で 5 日間培養したものを monocyte 由来樹状細胞 (Mo-DC) として用いた。

2. ヒト V α 24 iNKT 細胞株の樹立

健康人末梢血単核細胞 (PBMCs) より、FITC 標識抗ヒト TCRV α 24 抗体 (Beckman Coulter, Fullerton, CA)、FITC MicroBeads (Miltenyi Biotec) を用いて TCRV α 24 陽性細胞を分離した。抗原として 10 ng/ml α -galactosylceramide (α -GalCer, KRN7000, Kirin Brewery, Gunma, Japan) を添加した Mo-DC を抗原提示細胞 (APCs) とし、7 日おきに複数回刺激することにより、 α -GalCer 特異的ヒト V α 24 iNKT 細胞株を樹立した。さらに FITC 標識抗ヒト CD4 抗体 (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA)、抗ヒト CD8 β 抗体 (Beckman Coulter)、FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA)、および FITC MicroBeads (Miltenyi Biotec) を用いて、CD4⁺ V α 24 iNKT、DN V α 24 iNKT の各サブセットを分離精製した。分離した各 V α 24 iNKT 細胞サブセットは Flow cytometer (FACscan)、および CellQuest software (BD Biosciences) を用いて解析、確認を行った。

3. CD1 分子安定発現細胞株の樹立

Hela 細胞への各 CD1a、b、c、d、mock 遺伝子の導入は、Transfectam reagent (Promega, Madison, WI) を用いた lipofection 法により実施した。薬剤選択は 1000 μ g/ml G418 (Invitrogen) で実施した。

C1R 細胞株への各 CD1 遺伝子の導入は electroporation 法により実施した。薬剤選択は G418 (1000 μ g/ml) で実施した。約 2 週間培養の後、CD1 分子の発現を Flow cytometry にて確認した。確認には、マウス抗ヒト CD1a (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA)、CD1b、CD1c (Beckman Coulter)、CD1d 抗体 (BD Biosciences)、および FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (Caltag Laboratories) を用いた。さらに CD1 分子を高発現する細胞群は、FITC MicroBeads (Miltenyi Biotec) を用いて分離精製した。

4. V α 24 iNKT 細胞増殖応答の評価

96well plate 1 well あたり、各 dose の α -GalCer を添加し、irradiation (45Gy) 処理した Mo-DC (5.0×10^4) を APC として、V α 24 iNKT 細胞株 (5.0×10^4) を共培養した。48 時間培養後、1 μ Ci/well の [³H]-thymidine を添加し、さらに 16 時間後、細胞を harvest し、scintillation counter で細胞内に取り込まれた [³H]-thymidine の放射能を計測した。

5. V α 24 iNKT 細胞サイトカイン産生性の評価

96well plate 1 well あたり、各 dose の抗原を添加し、irradiation (45Gy) 処理した 5×10^4 Mo-DC、あるいは CD1 分子発現細胞株 (5.0×10^4) を APC として、V α 24 iNKT 細胞株 (5.0×10^4) を共培養した。24 時間後、培養上清を回収し、ELISA 法により定量した (Pierce Endogen, Rockford, IL)。

6. Mo-DC におけるサイトカイン産生性、および表面分子の発現の評価

48 穴プレートの 1 well につき、 α -GalCer (20 ng/ml) 添加および無添加の Mo-DC (3×10^5) と、各 V α 24 iNKT 細胞サブセット (6.0×10^4) を共培養した。その際、 α -GalCer による V α 24 iNKT 細胞の活性化に引き続く新たな蛋白合成を阻害する目的で V α 24 iNKT 細胞を emetine (Sigma-Aldrich Co., St. Louis) で処理したのもを用いた (90 μ g/ml)。未熟 DC (iDC) の成熟を誘導する陽性コントロール刺激として、1 μ g/ml *Escherichia coli* LPS (serotype 055:B5, L2880, Sigma)、50 ng/ml rhTNF- α (PeproTech, Rocky Hill, NJ) を用いた。24 時間後上清を回収し、上清中の IL-12 p70 を ELISA 法により定量した (Pierce Endogen)。

共培養開始後 48 時間後の DC 上の表面分子は、Cy-chrome 標識抗ヒト CD3 抗体 (CloneHIT3a)、PE 標識抗ヒト CD83 抗体 (CloneHB15e)、FITC 標識抗ヒト CD86 抗体 (CloneFUN-1) (BD Biosciences)、および抗ヒト OX40L 抗体を用いて、Flow cytometry により解析した。この際に、共培養で混入した V α 24 iNKT 細胞と DC を区別するために、CD3 陽性細胞を gate out して DC の解析を行った。

7. DC のアロ (同種異系反応) 誘導活性の評価

DC のドナーと HLA-DR が共通していないドナーの PBMCs より、CD4⁺ T cell isolation kit II、および CD45RO MicroBeads (Miltenyi Biotec) を用いて、CD4⁺CD45RO⁻細胞を negative selection し、これをアロの naive CD4⁺ T 細胞として用いた。

96 穴丸底プレートの 1 well につき、Mo-DC (1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、および Mo-DC なし) と、各 V α 24 iNKT 細胞サブセット (2.0×10^3) を共培養

した。16 時間培養後、放射線照射(45 Gy)し、アロの naive CD4⁺ T 細胞 (3.0×10⁴)を加え、共培養を行った。5 日後に 1 μ Ci/well の [³H]-thymidine を添加し、さらに8 時間後に [³H]-thymidine の取り込みを定量し、増殖応答を評価した。陽性コントロールの刺激として、LPS (1 μ g/ml)、TNF-α (50 ng/ml)、rhCD40L 蛋白 (5 μ g/ml); (R&D systems, Minneapolis, MN) を用いた (図 1)。

8. Th1 / Th2 分化の評価

48 穴プレートの 1 well につき、DC (2×10⁵)と、各 Vα24 iNKT 細胞サブセット(4.0×10⁴)を共培養した。16 時間培養後、放射線照射(45 Gy)し、アロの naive CD4⁺ T 細胞 (6.0×10⁵)を加え共培養した。6 日後に CD4⁺ T 細胞を回収し、96 穴平底プレートに固相化した抗ヒト CD3 抗体 (clone HIT3a)と可溶性抗ヒト CD28 抗体 (clone CD28.2) (BD Biosciences Pharmingen) によって刺激した。24 時間後上清を回収し、上清中の IFN-γ、および IL-4 を ELISA 法により定量した (Pierce Endogen) (図 1)。

C. 研究結果

1. ヒト Vα24 iNKT 細胞株の樹立と抗原特異性の評価

α-GalCer 特異的ヒト Vα24 iNKT 細胞株を効率良く樹立するために、健康人 PBMCs より、magnetic cell sorting 法を用いて TCRVα24 陽性細胞を分離した。抗原として 10 ng/ml α-GalCer を添加した Mo-DC を抗原提示細胞(APCs)とし、TCRVα24 陽性細胞を刺激することにより、α-GalCer 特異的ヒト Vα24 iNKT 細胞株を樹立した。樹立された細胞株は、CD161 陽性、TCRVα24 陽性、Vβ11 陽性 (data not shown) であった。また、これらの細胞集団は α-GalCer 濃度依存性に増殖応答を示したが、無関係な抗原である cerebroside には、全く増殖応答を示さなかったことから、α-GalCer 特異的ヒト Vα24 iNKT 細胞株であることを確認した。

さらに CD4⁺、および DN Vα24 iNKT サブセットを、CD4 および CD8β の発現を指標に magnetic cell sorting 法を用いて分離精製した。

2. CD1 分子を安定に発現する細胞株の樹立

C1R、および Hela に CD1a、-b、-c、および-d 遺伝子を導入した細胞集団から、各 CD1 分子に対する抗体を用いて、positive magnetic sorting 法により CD1 分子の発現量の高い集団を得た。各 transfectant は、CD1a、-b、-c、および-d 分子を高レベルに発現していることを確認した。

3. CD4⁺ Vα24 iNKT、および DN Vα24 iNKT サブセットのサイトカイン産生性の評価

α-GalCer (100 ng/ml)を添加した CD1 遺伝子安定発現 C1R 細胞株 (5.0×10⁴)、HeLa 細胞株 (5.0×10⁴)、あるいは Mo-DC (5.0×10⁴)を APC として、それぞれの Vα24 iNKT サブセット (5.0×10⁴) を刺激した。16 時間後、培養上清中の IFN-γ、IL-4、および IL-10 を定量することによりサイトカイン産生性の評価を行った。その結果、各 Vα24 iNKT サブセットは、CD1d 拘束性に α-GalCer を特異的に認識して IL-4、IFN-γ を産生したが、DC を APC とした場合、CD4⁺ Vα24 iNKT サブセットに比較し、DN Vα24 iNKT サブセットからの IL-4 産生量が低いことが判明した (p<0.01)。

4. CD4⁺ Vα24 iNKT サブセット、DN Vα24 iNKT サブセットが、Mo-DC の成熟に及ぼす影響の評価

48 穴プレートの 1 well につき、Mo-DC (3.0×10⁵)と各 Vα24 iNKT サブセット(6.0×10⁴)を 24 時間共培養し、Mo-DC の IL-12 p70 産生性を評価した。その結果、α-GalCer によって活性化をされたそれぞれの Vα24 iNKT サブセットと共培養した Mo-DC (以下、α-GalCer 活性化 Vα24 iNKT/Mo-DC とする)に IL-12p70 の産生が認められた。特に、α-GalCer 活性化 CD4⁺ iNKT/Mo-DC は、α-GalCer 活性化 DN Vα24 iNKT/Mo-DC より多くの IL-12 p70 を産生した (p<0.01)。

また、48 時間後にヒト DC の成熟マーカーである CD83 分子および CD86 分子の発現を評価したところ、α-GalCer 添加により、CD4 Vα24 iNKT/Mo-DC は、無刺激の CD4 Vα24 iNKT/Mo-DC に比較して、CD83 分子、および CD86 分子の著しい発現上昇を認めた。ところが α-GalCer 添加により、DN Vα24 iNKT/Mo-DC は、無刺激の DN Vα24 iNKT/Mo-DC に比較して、CD83 分子、および CD86 分子の著しい発現低下を認めた。DC2 に発現することが報告されている OX40L は、無刺激の DN Vα24 iNKT/Mo-DC のみに発現上昇が認められた (図 2)。

5. アロ反応性に及ぼす影響の評価

Mo-DC : naive CD4⁺ T の割合を 1:3、1:30、1:300、および、Mo-DC なしとしてアロ反応性を評価したところ、Mo-DC : naive CD4⁺ T = 1:3 では、異なる Vα24 iNKT サブセット間でアロ反応性に及ぼす影響に有意な差を認めなかった。しかし、Mo-DC : naive CD4⁺ T = 1:30 では、α-GalCer 活性化 DN Vα24 iNKT/Mo-DC は、著しくアロ反応性を抑制した。さらに、この emetine 処理のものを用いた場合では、アロ反応抑制活性は消失していた。また、α-GalCer を添加せず、活性化を受けない DN Vα24 iNKT サブセットと共培養した

Mo-DC(以下、活性化(-)D・V α 24 iNKT/Mo-DC とする)は、アロ反応抑制活性は示さなかった($p < 0.01$)。α-GalCer 活性化 DN V α 24 iNKT/Mo-DC のアロ反応抑制効果は、emetine 処理により消失することから、抗原特異的な刺激を受けて新たに合成される蛋白が、抑制性 DC の分化に影響を与えているものと考えられる。

6. naive CD4⁺ T 細胞における Th1/Th2 分化に及ぼす影響の評価

Mo-DC : V α 24 iNKT サブセット = 5 : 1、Mo-DC : naive CD4⁺ T = 1 : 3 で評価した場合、各 V α 24 iNKT サブセットと共培養された Mo-DC は、すべての条件下で、naive CD4⁺ T 細胞に IFN- γ 産生を誘導した。しかし、α-GalCer 活性化 CD4⁺ V α 24 iNKT/Mo-DC によって刺激された naive CD4⁺ T 細胞からの IFN- γ 産生は、活性化(-) CD4⁺ V α 24 iNKT/Mo-DC のものに比べ著しく高かった。一方、α-GalCer 活性化 DN V α 24 iNKT/Mo-DC によって刺激された naive CD4⁺ T 細胞からの IFN- γ 産生は、活性化(-) DN V α 24 iNKT/Mo-DC のものに比べ低かった。Th2 サイトカインである IL-4 は、α-GalCer 活性化 CD4⁺、および DN V α 24 iNKT/Mo-DC によって刺激された naive CD4⁺ T 細胞より産生が認められた。特に、α-GalCer 活性化 DN V α 24 iNKT/Mo-DC は、IL-4 産生誘導能が著しく高かった($p < 0.001$)。これらの効果は、emetine によって処理された各 V α 24 iNKT サブセットを用いた場合では消失することから、これらのサブセットが抗原特異的な刺激を受けて新たに合成する蛋白が、DC1/DC2 の分化に大きく影響を与えているものと考えられる。

D. 考察

1998 年、Wilson S. B. らによって、1 型糖尿病の双生児および三胎児では、DN V α 24 iNKT サブセットが著しく減少していることが報告された。特に 1 型糖尿病進行性の患者では、DN V α 24 iNKT サブセットは、IFN- γ のみを産生し IL-4 を産生しないことから、DN V α 24 iNKT サブセットからの IL-4 産生の欠如が、Th1 優位な免疫応答を誘導し、1 型糖尿病発症を促進するものと考えられている。また、種々の自己免疫疾患、あるいはアレルギー性疾患患者において DN V α 24 iNKT 細胞の減少、および機能不全が相次いで報告され、DN V α 24 iNKT サブセットがこれらの病因、病態に関与することが示唆されてきた。

NOD マウスを用いた研究では、α-GalCer を投与することにより脾臓所属リンパ節に NKT 細胞、およびミエロイド系 DC が集積し、これらの DC からの IL-12 産生が減少して病態が改善されること

が報告されている。しかし、マウスには CD1a、-b、-c 分子が存在せず、その DC の分化に TSLP が関与しないなど、DC と NKT 細胞を取り巻く分子環境はヒトとは大きく異なっている。

そこで我々は、CD4⁺ V α 24 iNKT サブセットと DN V α 24 iNKT サブセットは、ヒト生体内において異なる免疫制御機構を有しており、DC を介してそれぞれが異なる Th 分化を誘導しているのではないかと仮説をたて、CD4⁺、および DN V α 24 iNKT サブセットに分離精製し、独自のシステムを用いて検証した。解析には、ヒト生体内に存在するミエロイド系 DC の主要なサブセットである CD1c (BDCA-1)⁺ DC に類似し、*in vitro* で誘導する方法が確立されている monocyte 由来 DC (Mo-DC) を用いた。

我々が樹立した健常人由来の CD4⁺、および DN V α 24 iNKT サブセットは、ともに CD1d 分子拘束性に α-GalCer を認識し、Th1 サイトカインである IFN- γ 、および Th2 サイトカインである IL-4 を産生した。しかし、DN V α 24 iNKT サブセットの産生する IL-4 は、CD4⁺ V α 24 iNKT サブセットのものに比較して少ないため、自己免疫疾患に認められる過剰な Th1 応答を抑制するための IL-4 の供給源として考えるのは困難である。むしろ、DN V α 24 iNKT サブセットのサイトカイン産生性から考慮すると、以前から考えられていたように、このサブセットが Th1 応答に重要な役割を演じているように思われた。しかし、実際に *in vitro* T 細胞分化誘導システムを用いて得られた結果は異なっていた。それを以下にまとめる。

α-GalCer 活性化 CD4⁺ V α 24 iNKT サブセットと共培養された DC は、CD83 分子、および CD86 分子の発現上昇を示したが、α-GalCer 活性化 DN V α 24 iNKT サブセットと共培養された DC は、CD83 分子、および CD86 分子の発現低下を示した。これら活性化 DN V α 24 iNKT サブセットと共培養された DC からの共刺激シグナルの減少が、アロ MLR 誘導活性の低下に関係しているのかもしれない。DC による IL-12 p70 の産生は、α-GalCer 活性化 CD4⁺、および DN V α 24 iNKT サブセットと共培養した場合に観察された。特に、α-GalCer 活性化 CD4⁺ V α 24 iNKT サブセットと共培養された DC による IL-12 p70 の産生は、α-GalCer 活性化 DN V α 24 iNKT サブセットと共培養された DC に比べ、有意に高い値を示した。DC から産生される IL-12 p70 は、Th1 細胞分化を誘導する上で重要なサイトカインであるため、α-GalCer 活性化 CD4⁺ V α 24 iNKT サブセットが、DC を介して Th1 応答を優位に誘導する可能性が示唆された。

実際に、Th 分化をアロ MLR 反応を用いて評価し

たところ、 α -GalCer 活性化 DN V α 24 iNKT/Mo-DC は、DC : naive CD4⁺ T 細胞比が 1:30 のときにアロ MLR 誘導活性を抑制した。この現象は α -GalCer 活性化 CD4⁺ V α 24 iNKT サブセットの場合には認められなかった。さらに、 α -GalCer 活性化 CD4⁺ V α 24 iNKT/Mo-DC によって刺激された naive CD4⁺ T 細胞は、Th1 に分化した。一方、 α -GalCer 活性化 DN V α 24 iNKT/Mo DC によって刺激された naive CD4⁺ T 細胞は、IFN- γ の低産生性と IL-4 の高産生性を示す Th2 に分化した。この効果は、蛋白合成阻害剤である emetine によって処理された各 V α 24 iNKT サブセットを用いた場合に消失することから、これらのサブセットが抗原特異的な刺激を受けて新たに合成する蛋白が、DC1/DC2 の分化に大きく影響を与えているものと考えられる。したがって、 α -GalCer 活性化 DN V α 24 iNKT サブセットは、DC のアロ MLR 誘導活性を抑制し、なおかつ naive CD4⁺ T 細胞を Th2 分化にシフトさせる DC2 を誘導する。この現象は、単に V α 24 iNKT 細胞サブセットが活性化を受けて産生するサイトカイン産生プロファイルからは予測できないものであったが、DN V α 24 iNKT サブセットの減少あるいは機能不全が自己免疫現象の発症に関与するという前述の可能性と一致する。

以上より、V α 24 iNKT サブセットのバランスは、末梢における Th1/Th2 バランスを制御する重要な要因となっている可能性がある。これまで癌、自己免疫疾患の治療において α -GalCer の投与が試されてきたが、特定の V α 24 iNKT サブセットを動員することにより、Th1、または Th2 にシフトした有効な応答を起こすことが可能かもしれない。1 型糖尿病患者をはじめ、種々の自己免疫疾患患者の V α 24 iNKT サブセットが、DC を介して Th 分化をいかに誘導しうるかは今後の研究課題である。

現在、CD4、DN サブセットのバランスの変化が、DC を介して Th1/2 分化に与える影響を検討中である (図 3)。

E. 結論

異なるヒト iNKT 細胞のサブセット (CD4/DN) は、DC を介してナイーブ CD4 T 細胞の異なる分化 (Th1/Th2) を誘導する。ヒト iNKT 細胞サブセットのバランス制御による、人為的 Th1/Th2 応答制御の可能性を示唆する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

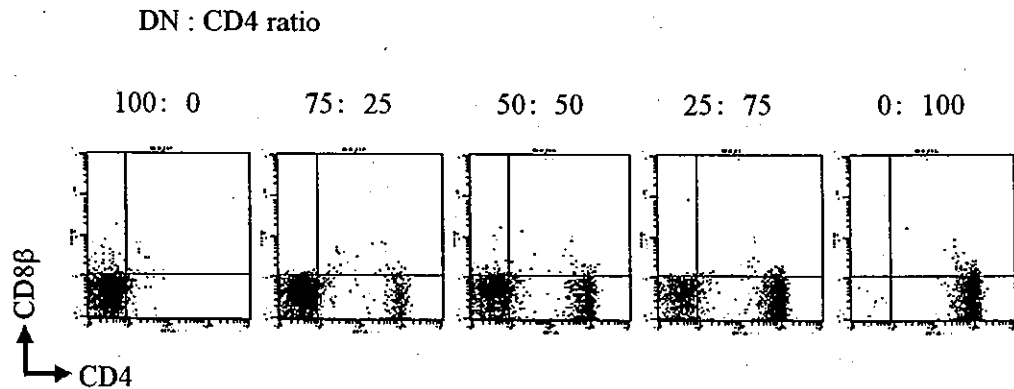
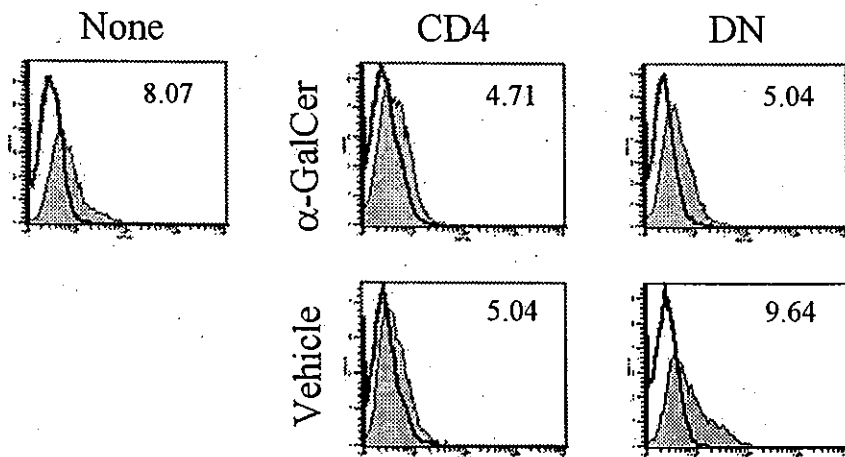
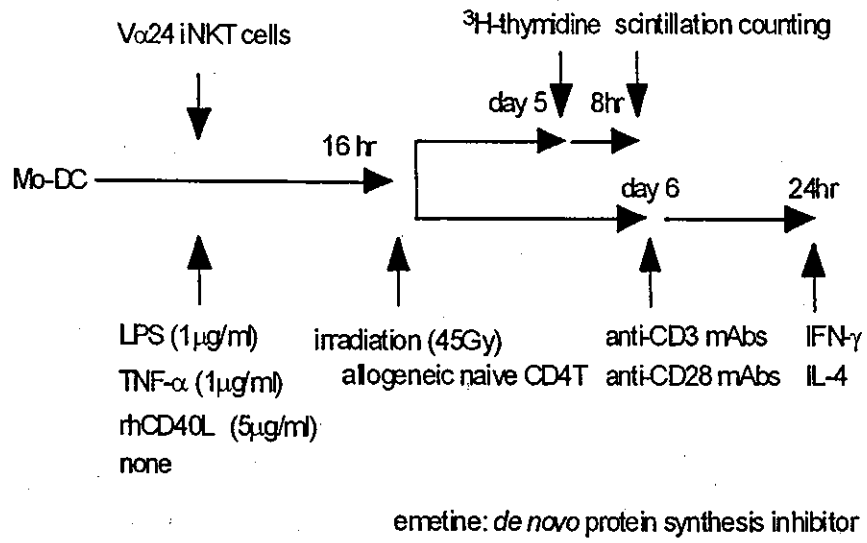
1. 論文発表

- 1) Nishimura Y, Chen Y-Z, Uemura Y, Tanaka Y, Tsukamoto H, Kanai T, Yokomizo H, Yun C, Matsuoka T, Irie A, and Matsushita S: Degenerate recognition and response of human CD4⁺ Th cell clones. Implications for basic and applied immunology. *Mol Immunol* 2004;40:1089-1094
- 2) Ohyama H, Kato N, Takeuchi K, Uemura Y, Nishimura F and Matsushita S: Monocytes of distinct clinical types of leprosy are differentially activated by crosslinking class II HLA molecules to secrete IL-12. *APMIS* 2004;112:271-274
- 3) Liu T, Kohsaka H, Suzuki M, Takagi R, Hashimoto K, Uemura Y, Ohyama H, and Matsushita S: Positional effect of amino acid replacement on peptide antigens for the increased IFN γ production from CD4T cells. *J Allergy Clin. Immunol*2004;113: 216-217
- 4) Matsushita S, Ohyama H, Kudo H, Tabata H and Matsuoka T: HLA-mediated signaling via HLA-peptide-TCR complex determines immune responses of antigen-presenting cells. *Current Topics in Peptide & Protein Research* 2004;6:1-20
- 5) 松下 祥: 抗原特異的免疫療法. *医学のあゆみ* 2004;208:778-783
- 6) 松下 祥: 免疫遺伝学, 福田 健編: 「総合アレルギー学」, 南江堂 (東京) 2004;52-59
- 7) 松下 祥: 抗原の処理と提示, 烏山一編: 「免疫学イラストマップ」, 羊土社, 東京. 2004;72-82
- 8) 松下 祥: HLA による免疫応答の制御. *ゲノム医学* 2004;4:453-458
- 9) 松下 祥: Th2 応答とアジュバント. *感染・炎症・免疫* 34:192-198, 2004
- 10) 松下 祥: MHC クラス II 分子を介したシグナル伝達機構. *臨床免疫* 42:455-463, 2004
- 11) 松下 祥: Th2 アジュバント. *アレルギー科* 2004;18:239-246
- 12) Ohyama H, Ogata K, Takeuchi K, Namisato M, Fukutomi Y, Nishimura F, Naruishi H, Ohira T, Hashimoto K, Liu T, Suzuki M, Uemura Y, Matsushita S: Polymorphism of the 5' flanking region of the IL-12 receptor beta2 gene partially determines the clinical types of leprosy through impaired

transcriptional activity. J Clin Pathol (2005 in press)

- 13) Matsushita S, Liu T-Y and Uemura Y: Adjuvants that enhance Th2 or Tr responses. Allergol Int (2005 in press)
 - 14) 松下 祥: 抗原認識, 花岡炳雄編: 「臨床分子細胞生物学」, メディカルレビュー社, 東京. (2005 in press)
 - 15) 成田弥生, 植村靖史, 松下 祥: リンパ球を用いた診断法の可能性, 菊地博達編: 「悪性高熱」. 克誠堂出版, 東京. (2005 in press)
 - 16) 松下 祥: T細胞シグナル伝達における HLA クラス II 分子の役割. 炎症と免疫. (2005 in press)
2. 学会発表
- 1) 鈴木 元晴, 植村 靖史, 松下 祥: ヒトインバリアント NKT 細胞サブセットにおける樹状細胞を介した免疫制御機構の解析. 日本癌学会, 福岡. 2004. 9
 - 2) Liu T-Y, Kohsaka H, Suzuki M, Takagi R, Hashimoto K, Uemura Y, Ohyama H and Matsushita S: Positional effect of amino acid replacement on peptide antigens for the increased IFN γ production from CD4T cells. American Academy of Allergy Asthma & Immunology 60TH ANNUAL MEETING MARCH, 2004
 - 3) Ohyama H, Takeuchi K, Ogata K, Namisato M, Fukutomi Y, Suzuki M, Uemura Y, Matsushita S: The Polymorphism on the 5' Flanking Region of IL-12 Receptor β 2 Gene Confers the Susceptibility to Mycobacterial Infection. 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS, July, 2004 Montreal, Canada
 - 4) 松下 祥: Th2 応答とアジュバント, 日本アレルギー学会, 横浜, シンポジウム, 2004. 11
 - 5) 劉 天懿, 植村 靖史, 鈴木 元晴, 大山 秀樹, 松下 祥, 環境物質が有するヒトアレルギー誘導活性を試験管内で評価する実験系の確立, 日本アレルギー学会 (横浜), 2004 年 11 月
 - 6) 植村 靖史, 鈴木 元晴, 劉 天懿, 大山 秀樹, 松下 祥: ヒトインバリアント NKT 細胞サブセットの樹状細胞を介した免疫制御機構, 日本アレルギー学会, 横浜, 2004. 11
 - 7) 鈴木 元晴, 植村 靖史, 劉 天懿, 黄 成日, 大山 秀樹, 松下 祥: 子宮 Th2 環境の維持における脱落膜 NKT 細胞の役割, 日本アレルギー学会, 横浜, 2004. 11
 - 8) 劉 天懿, 植村 靖史, 鈴木 元晴, 成田 弥生, 黄 成日, 大山 秀樹, 松下 祥: 環境物質が有するヒトアレルギー誘導活性を迅速に評価する実験系の確立. 日本免疫学会, 札幌, 2004. 12
 - 9) 植村 靖史, 鈴木 元晴, 劉 天懿, 黄 成日, 成田 弥生, 大山 秀樹, 松下 祥: ヒト Va24 インバリアント NKT 細胞サブセットの樹状細胞を介した免疫制御機構. 日本免疫学会, 札幌, 2004. 12
 - 10) 鈴木 元晴, 植村 靖史, 劉 天懿, 黄 成日, 成田 弥生, 大山 秀樹, 松下 祥: 妊娠子宮 Th2 環境の維持における脱落膜 non-invariant NKT 細胞の役割. 日本免疫学会, 札幌, 2004. 12
 - 11) 劉 天懿, 植村 靖史, 鈴木 元晴, 大山 秀樹, 松下 祥: 環境化学物質が有するヒトアレルギー誘導活性を試験管内で評価する実験系の確立. 分子予防環境医学研究会, 東京, 2004. 12
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)
なし

Figure 1



ヒト培養胆管細胞および自己免疫疾患自然発症モデル MRL/lpr マウスにおける
PPAR γ リガンドによる抗炎症効果の検討

分担研究者 原田 憲一 金沢大学大学院・形態機能病理学 講師

研究要旨：我々は、原発性胆汁性肝硬変(PBC)の障害胆管で抗炎症性分子 PPAR γ の発現低下が見られることを報告し、菌体成分に対する感受性の亢進が PBC 胆管炎の発生に加担していると推測している。今回我々は、PPAR γ リガンドによる抗炎症効果について検討した。① 培養胆管細胞を用いた検討：PPAR γ リガンドとして、内因性リガンドである 15d-deoxy-prostaglandin J2 (15d-PGJ2) と 3 種のチアゾリジン誘導体を用いて、培養胆管細胞に対する細胞障害性および LPS 誘導性 NF- κ B 活性の抑制効果について検討した。その結果、15d-PGJ2 はチアゾリジン誘導体に比べ細胞毒性が低く、また LPS 誘導性 NF- κ B 活性の抑制も示した。さらに PPAR γ アンタゴニストを用いた検討にて、胆管細胞に対する 15d-PGJ2 の抑制効果は、PPAR γ 依存性のみならず非依存性の系も存在することが明らかとなり、15d-PGJ2 は PPAR γ 発現が低下した PBC 胆管にも抗炎症効果を示しうることが期待された。② 動物モデルを用いた検討：MRL/lpr マウスは糸球体腎炎や唾液腺炎などの種々の自己免疫疾患を自然発症する遺伝子変異動物であり、また PBC 類似の胆管炎も発症する。この MRL/lpr マウスを用いて 15d-PGJ2 の抗炎症効果について検討した結果、15d-PGJ2 腹腔内投与群では、唾液腺炎、間質性肺炎、脾炎の軽減が見られた。しかし、胆管炎に関しては発生頻度及び炎症の程度に個体差が大きく、15d-PGJ2 の有効性を確認するためには更なる検討を必要とする。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変(PBC)の病因または病態形成に、細菌成分や生体異物に対する異常な免疫反応の関与が示唆されている。我々は、胆管上皮細胞における菌体成分認識受容体(Toll-like receptor)の機能的解析を行い、胆管系に固有の自然免疫機構が存在することを報告し、PBC 胆管炎の病態発生に胆管系自然免疫が関与していると推測している(Harada et al, Lab Invest, 2003)。また、昨年度我々は、肝内胆管上皮に抗炎症因子である Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ の恒常的発現を認めるが、PBC の障害胆管では発現低下が見られ、菌体成分に対する感受性の亢進が胆管炎の発生に加担している可能性を報告した。近年、潰瘍性大腸炎の腸管上皮で PPAR γ 発現が低下しており(Dubuquoy ら, Gastroenterology, 2003)、また、PPAR γ リガンド投与にて腸炎モデルマウスの症状が軽減することも報告されている(Wada ら, Trends Mol Med, 2001)。我々は、PPAR γ リガンドを用いた胆道系自然免疫の制御を PBC 治療に応用する事を目的とし、今回胆管細胞に対する PPAR γ リガンドの抗炎症作用をヒト培養胆管細胞および自己免疫疾患自然発症動物(MRL/lpr マウス)を用いて検討した。

B. 研究方法

1. 培養細胞

培養細胞は、ヒト肝内胆管癌由来培養細胞 2 株(CCKS1 と HuCCT1)、ウイルス性慢性肝炎患者由来培養胆管細胞(HIBE C1)および転移性肝癌患者由来培養胆管細胞(HIBE C2)を使用した。

2. PPAR γ リガンドと cell viability の評価

PPAR γ リガンドとして、内因性リガンドである 15d-deoxy- Δ 12, 14 prostaglandin J2 (15d-PGJ2, Calbiochem)、チアゾリジン誘導体である Troglitazone (Cayman)、Pioglitazone (Sigma)、Rosiglitazone (Alexis) を各培養細胞に添加し、濃度(0~100 μ M)および時間経過(~48 時間)に伴う cell viability を WST-1 活性(Roche)にて評価した。

3. PPAR γ リガンドによる抗炎症効果の評価

各培養細胞を、PPAR γ リガンド 15d-PGJ2(10 μ M)で前処置後、TLR4 リガンドであるリポポリサッカライド(LPS)で刺激した。培養胆管細胞の反応性は、細胞内シグナルの主要伝達分子である NF- κ B の活性化(NF- κ B-DNA binding assay)と TNF- α mRNA 産生(real time-PCR 法)で評価した。また、PPAR γ アンタゴニスト(GW9662, 10 μ M, Calbiochem)にて PPAR γ シグナル伝達を遮断した状態で、LPS 誘導性 NF- κ B 活性における 15d-PGJ2 の抑制効果を検討した。

4. 自己免疫疾患自然発症モデル MRL/lpr マウスと 15d-PGJ2 投与方法

20 週齢の MRL/lpr マウス 20 匹を三共ラボから購入し、15d-PGJ2 投与群と溶媒投与群(DMSO, 対照群)とに各々10匹ずつ供した。15d-PGJ2の投与は、400mg/kg/日で3週間、腹腔内注射にて施行した。効果判定は、主要臓器を組織学的に観察し、炎症の程度を軽度(1点)、中等度(2点)、高度(3点)に半定量した。

C. 研究結果

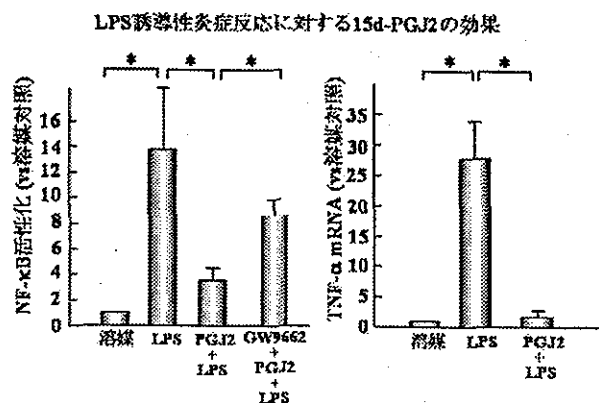
1. PPAR γ リガンドの培養胆管細胞に対する細胞毒性 (cell viability)

いずれのリガンドにおいても、経時的および濃度依存性に培養胆管細胞の cell viability の低下を認めた。同じ濃度で比較した場合、Troglitazone > Rosiglitazone = Pioglitazone > 15d-PGJ2 の順に cell viability の低下が高度であった。しかし、12 μ M の低濃度 15d-PGJ2 では、観察した 48 時間内で明らかな cell viability の低下を認めなかったため、次の抗炎症効果についての検討は 10 μ M の 15d-PGJ2 で行った。

2. LPS 誘導性炎症反応に対する PPAR γ リガンドの抗炎症効果 (図 1)

培養胆管細胞の NF- κ B 活性は、LPS 刺激にて 13.8 倍に亢進したが、15d-PGJ2 の前処置を加えることにより 3.3 倍にまで活性の亢進が押えられた。また、PPAR γ アンタゴニストである GW9662 にて PPAR γ シグナルを遮断した状態で、15d-PGJ2 の前処置および LPS 刺激を行った結果、NF- κ B の活性化は 7.5 倍にとどまり、15d-PGJ2 の抑制効果が有意に解除された。しかし、その抑制解除は約半分程度と不完全であることから、15d-PGJ2 による抑制効果は PPAR γ 依存性と非依存性の双方の系が関与していると示唆された。次に、TNF α mRNA 産生にて検討した結果、LPS 刺激にて 29 倍にまで発現が亢進し、15d-PGJ2 の前処置にて 2.2 倍にまで発現亢進が抑制された。

(図 1)

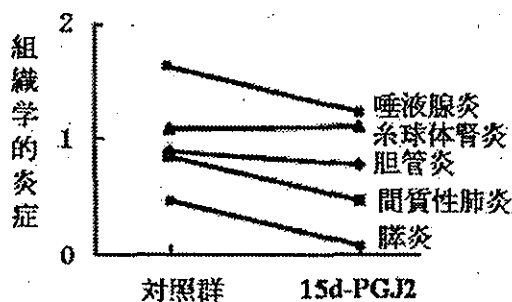


3. MRL/lpr マウスでの 15d-PGJ2 の抗炎症効果

MRL/lpr マウスは、全身のリンパ節腫脹の他、唾液腺、腎、肺、関節、肝に種々の程度の炎症を認めた。特に唾液腺炎は必発であり、ほとんどの個体で広範かつ組織破壊性の炎症を認めたが、15d-PGJ2 投与群では炎症は限局性に認めるのみであった。肝では門脈域内に種々の程度のリンパ球浸潤を認め、約 1/3 の個体に慢性非化膿性破壊性胆管炎類似的胆管炎が見られた。このような胆管炎は発生頻度及び炎症の程度に個体差が大きく、また 15d-PGJ2 投与群においても胆管炎が散見された。諸臓器における炎症の程度を組織学的半定量した結果、唾液腺炎、間質性肺炎、膵炎に関しては炎症の軽減傾向が見られたが、胆管炎、糸球体腎炎に関しては明らかな抗炎症効果は確認できなかった(図 2)。

(図 2)

MRL/lprマウスの各臓器における組織学的炎症の程度



D. 考察

自然免疫機構はマクロファージなどの免疫担当細胞のみならず胆管上皮や腸管上皮も有する機構であり、クローン病や潰瘍性大腸炎の慢性炎症性腸疾患では自然免疫の破綻または異常が病態形成に関与していることが明らかとなっている。昨年度の我々の検討課題として、胆管細胞における TLR 発現およびリガンド刺激による反応性 (NF- κ B の活性化および TNF- α 産生) を証明し、胆道系自然免疫の存在を確認した。また、脂質代謝および抗炎症作用を有する PPAR γ は、胆管上皮細胞で恒常的に発現しているが、PBC の障害胆管では PPAR γ 発現が低下していることを見出し、また Th1 型サイトカインである IFN- γ が胆管細胞の PPAR γ の発現を低下させることも明らかにした。これらの所見より、PBC 胆管周囲での Th1 型サイトカインへの偏位が胆管における PPAR γ 発現を低下させ、菌体成分に対する感受性が亢進、さらには胆管炎の発生に関与していると我々は推測している。

PPAR γ リガンドは、内因性リガンドとチアゾリジン誘導体とに大別でき、内因性リガンドはアラキドン酸カスケードのプロスタグランジン代謝産物である 15d-PGJ2 が広く知られている。チアゾリジン誘導体は、以前に糖尿病治療薬として使用されていた Troglitazone の他、現在、糖尿病や非アルコール性脂肪性肝炎の治療薬として応用されつつある Pioglitazone や Rosiglitazone などが挙げられる。これらの PPAR γ リガンドは、脂質代謝や抗炎症作用を示すこと以外に、細胞毒性(主としてアポトーシスによる細胞死誘導による)を有することも報告されている。今回、培養胆管細胞に対する細胞毒性について検討した結果、内因性リガンドとチアゾリジン誘導体のいずれのリガンドも経時的および濃度依存性に細胞毒性を示したが、低濃度(12 μ M)の 15d-PGJ2 ではほとんど細胞毒性が見られなかった。したがって、低濃度 15d-PGJ2 で抗炎症効果を検討した結果、培養胆管細胞における LPS 誘導性 NF- κ B の活性化および TNF- α mRNA の産生亢進を有意に抑制し、15d-PGJ2 が菌体成分刺激に対する炎症反応を軽減させることが示唆された。また、近年 15d-PGJ2 による NF- κ B 抑制作用は、PPAR γ 依存性のみならず PPAR γ 非依存性の系も存在することが証明され、培養細胞の種類によっては 15d-PGJ2 が PPAR γ のリガンドと成り得ないことが報告されている。今回、胆管細胞に対する 15d-PGJ2 の抗炎症作用が PPAR γ 依存性か非依存性かを検討すべく、PPAR γ アンタゴニスト(GW9662)で PPAR γ シグナル伝達を遮断することにより 15d-PGJ2 の抗炎症効果が解除されるかどうかを検討した。その結果、PPAR γ アンタゴニストの存在下では、15d-PGJ2 の抑制効果は約半分にまで解除された。すなわち、胆管細胞における 15d-PGJ2 の抑制効果は PPAR γ 依存性のみならず非依存性の系も存在することが明らかとなり、15d-PGJ2 は PPAR γ 発現が保持された胆管のみならず、PPAR γ 発現が低下した PBC 胆管にも抗炎症効果を示しうることが期待された。

次に、*in vivo*の胆管炎に対して 15d-PGJ2 が有効かどうかを検討するため、自己免疫疾患自然発症モデルである MRL/lpr マウスを用いて検討した。MRL/lpr マウスは、Fas 変異遺伝子 'lpr' によるリンパ球増殖性病変が病変の主体であり、唾液腺炎、関節炎や糸球体腎炎などの種々の自己免疫疾患を自然発症する。また、慢性非化膿性破壊性胆管炎類似の胆管炎やミトコンドリア抗体が出現することから PBC モデルの一つとして報告されている(Tsuneyama ら, Pathol Int, 2001)。今回、このマウスを用いて胆管炎に対する 15d-PGJ2 の

抗炎症効果を検証したが、胆管炎自体の発生頻度が低く、また炎症の程度も個体差が大きいため、胆管炎に対する明らかな効果は確認できなかった。しかし、このマウスで最も強い炎症を認める唾液腺炎に対しては、15d-PGJ2 投与による明らかな抗炎症効果が確認できた。今後、*in vivo*の胆管炎に対する 15d-PGJ2 の抗炎症効果を検証するために、胆管炎の発生頻度を挙げる工夫、また投与方法の見直しをする必要があると考えられた。

E. 結論

内因性 PPAR γ リガンドである 15d-PGJ2 は、胆管細胞に対する細胞毒性が低く、菌体成分誘導性の炎症反応を抑制した。また、15d-PGJ2 の抗炎症作用は PPAR γ 依存性および非依存性の系も存在することから、PPAR γ 発現が保持された胆管のみならず発現低下した PBC 胆管に対しても有効であると期待された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Harada K, Ohba K, Ozaki S, Isse K, Hirayama T, Wada A, Nakanuma Y: Peptide Antibiotic Human Beta-Defensin-1 and -2 Constitute Antimicrobial Defense in the Intrahepatic Biliary Tree. *Hepatology* 2004;40(4): 925-932.
- 2) Isse K, Harada K, Zen Y, Kamihira T, Shimoda S, Harada M, Nakanuma Y. Fractalkine and CXCR1 are involved in the recruitment of intraepithelial lymphocytes of intrahepatic bile ducts. *Hepatology* (in press)
- 3) Harada K, Isse K, Kamihira T, Shimoda S, Nakanuma Y: Th1 cytokine induced down-regulation of PPAR γ in biliary cells relates to cholangitis in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* (in press)
- 4) 原田憲一, 中沼安二: Biliary cell lineage. 2. 自然免疫の観点から. *肝臓* 2004;45(12): 642-645
- 5) 原田憲一, 中沼安二. 細菌/ウイルス感染と PBC. *肝胆膵* 2004;49(2):147-157

2. 学会発表

- 1) 原田憲一, 一瀬久美子, 中沼安二: 原発性胆汁性肝硬変の胆管炎発生における PPAR γ の関

与. 第41回日本消化器免疫学会総会
2) 原田憲一, 一瀬久美子, 尾崎聡, 中沼安二: 培養胆管上皮細胞におけるエンドトキシントレランスの誘導. 第8回日本肝臓学会大会

B. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
なし

難治性自己免疫性肝疾患の画期的治療法の開発に関する研究

分担研究者 西原 利治 高知大学医学部・消化器病態学 助教授

研究要旨： 原発性胆汁性肝硬変の治療には UDCA に加えて、新たに bezafibrate が広く用いられて始めている。しかし、PPAR- α ligand である bezafibrate を用いた新規治療法の作用機序はいまだ明らかになったとは言い難い。そこで、今回、PBC における PPAR- α の活性化の度合いを非侵襲的に検討する目的で、肝臓における脂肪酸の β 酸化能を *in vivo* で半定量化する分子イメージングシステムを開発した。

A. 研究目的

今回の研究事業では、原発性胆汁性肝硬変 (PBC) に対して胆管あるいは肝細胞におけ PPAR- α を介するシグナルの活性化の程度を系統的に検討し、原発性胆汁性肝硬変の病態における PPAR- α の役割を明らかにしたい。その上で、非侵襲的で客観的かつ再現性と定量性の高い薬効評価法を確立し、EBM の導入に努めたい。

B. 研究方法

PBC 症例に対する薬物療法として新たに bezafibrate が注目を浴びている。bezafibrate は PPAR- α の ligand であることから、PBC の肝臓では PPAR- α の signal 伝達に何らかの機能低下が存在している可能性が想定される。そこで、今回は PBC における PPAR- α の活性化の度合いを検討する目的で、肝臓における脂肪酸の β 酸化能を *in vivo* で半定量化する分子イメージングシステムを開発したので紹介する。

被検者は 10 例の右心室不全が疑われた NASH 症例であり、保険適用となっている ^{131}I で標識した長鎖脂肪酸アナログを静脈内投与し、経時的に心臓および肝臓への脂肪酸の取り込みを計測し、その減衰速度から心臓および肝臓における脂肪酸 β 酸化能の半定量化を行った。

C. 研究結果

標識した長鎖脂肪酸アナログ投与 1 分後には、標識された長鎖脂肪酸アナログはすでに心腔内に滞留していた。しかし、肝臓や筋組織への脂肪酸の取り込みを反映して 5 分後には、血中の標識された長鎖脂肪酸アナログ量は激減した。肝臓における血中の標識された長鎖脂肪酸アナログの取り込みは 3-5 分を極値として、以後脂肪酸の β 酸化による消費を反映して漸減した。投与後 5-30 分ではすべての症例で、減衰曲線は直線で近似で

きた。そこで、この部分のデータを用いて、長鎖脂肪酸アナログの減衰速度を検討したところ、0.2-1.1% に分布し、その内の 3 症例は 0.2-0.4% と極めて低値を示した

UDCA 投与では長鎖脂肪酸アナログの代謝速度の改善は得られず、前値と同一の再現性のある検査値を得ることができた。他方、PPAR- α の ligand である bezafibrate を投与すると、長鎖脂肪酸アナログの代謝速度の改善と共に、脂肪肝も明らかな改善を示した。

D. 考察

標識した長鎖脂肪酸アナログの使用により、*in vivo* の肝臓における脂肪酸の β 酸化能を判定量的に計測する方法を開発した。この方法は非侵襲的であるばかりではなく、再現性に優れ、治療による脂肪酸の β 酸化能の改善が検出できる感度を有していた。今後、PBC 症例における PPAR- α を介するシグナルの活性化の程度を明らかにする上で、この手法を用いた脂肪酸 β 酸化能の検討が望まれる。

E. 結論

標識した長鎖脂肪酸アナログの使用により、*in vivo* の肝臓における脂肪酸の β 酸化能を判定量的に計測する方法を開発した。

今回の検討でも UDCA 投与による PPAR- α を介するシグナルの増強効果を認めていないので、UDCA による PBC に対する治療効果には PPAR- α を介するシグナルの増強が関与する可能性は低いものと考えられた。

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

1) 3rd Japan Society of Hepatology Single Topic

Conference において発表された。先日お願いしたパンフレットをみて入力してください。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし

PBC 動物モデルの開発とそれを用いた胆道傷害機序の解析・治療法開発に関する研究

分担研究者 松口 徹也 鹿児島大学大学院・発生発達教育学 教授

研究要旨: 我々が最近報告した MAP キナーゼ脱リン酸化酵素である MKP-M が、CD4 T 細胞の Th2 分化で特異的に発現が亢進し、Th1 分化を抑制することを見いだした。新たに作製した T 細胞特異的なドミナントネガティブ型 MKP-M トランスジェニックマウスは Th1 タイプに偏位した抗原特異的免疫反応を示し、PBC 治療の研究のためのマウスモデルとして有用な可能性がある。

A. 研究目的

PBC の発症機構にピルビン酸脱水素酵素複合体 (PDC) に対する Th1 優位な抗原特異的免疫反応の関与が指摘されている。抗原提示細胞における Toll-like receptor (TLR) からのシグナルは主に IL-12 産生を介して Th1 タイプの免疫反応を強力に推進する。PBC の画期的治療法開発の遅れには、適切な動物病態モデルの不在も関係しているが、我々が昨年度報告した TLR 下流のセリンスレオニンキナーゼである Cot/Tpl2 キナーゼのノックアウトマウスは、IL-12 産生亢進により Th1 タイプ優位の抗原特異的免疫反応を示すことから、PBC のモデルマウス作製に有用な可能性がある。今年度は、Th1 分化誘導に関わる IL-12 レセプター発現調節機構を明らかにし、また、近年我々がクロニングした MAP キナーゼ脱リン酸化酵素 (MKP-M) の Th1/Th2 分化における役割の解析と、その T 細胞特異的トランスジェニックマウス作出による PBC 病態マウスモデルの確立を目指した。

B. 研究方法

1. IL-12 レセプター-beta1 遺伝子を単離し、その構造決定と発現調節領域の機能解析をおこなった。
2. CD4 陽性 T 細胞の Th1/Th2 分化誘導の培養系で MKP-M の発現パターンを解析した。次にアデノウイルスベクターを用いた MKP-M 強制発現の系を確立し、MKP-M の Th1/Th2 分化決定への機能的関与を検討した。
3. T 細胞特異的の野生型およびドミナントネガティブ (DN) 型 MKP-M トランスジェニックマウスを作出し、その Th1/Th2 分化および抗原特異的免疫反応の性質をコントロールマウスと比較した。
4. MKP-M 遺伝子欠損 (KO) マウス用のターゲットベクターを作製し、ES 細胞に導入した後、陽性細胞を単離した。
5. 最近報告された SJL/J マウスの PDC 抗原感作

による胆管炎モデル (Liver 20, p351, 2000) を利用する目的で、既存マウスと SJL/J マウスのバッククロス交配を進めた。

C. 研究結果

1. マウス IL-12 レセプター-beta1 遺伝子の構造・機能解析を行い、遺伝子プロモーター領域の PU. 1 および IRF 結合サイトの重要性を示した。
2. MKP-M の遺伝子および蛋白発現はナイーブ CD4 陽性細胞で弱く認められたが、Th1 方向への分化に伴って数日でほぼ消失した。一方、Th2 分化細胞では発現が著増した。またアデノウイルスベクターによる野生型の MKP-M 強制発現によって Th2 分化が強く誘導され、逆に DN 型 MKP-M 強制発現によって Th1 分化への偏りが誘導された。
3. 野生型および DN 型 MKP-M の cDNA を T 細胞特異的 Lck プロモーターに繋いだ発現ベクターをマウス受精卵に注入し、T 細胞特異的 MKP-M トランスジェニックマウスを作製した。コントロールマウスに比し、野生型 MKP-M トランスジェニックマウスは卵白アルブミン感作に対して Th2 偏位の抗原特異的免疫反応を示し、一方 DN 型マウスは Th1 偏位の免疫反応を示した。また、これらのマウスから単離した CD4 陽性細胞も同様の Th1/Th2 分化偏位傾向を示した。
4. MKP-M 遺伝子にヘテロの欠損を持つマウス ES 細胞の確立に成功した。
5. SJL/J 背景の MyD88 欠損マウス (TLR・IL1/18 シグナル欠損マウス) および Cot/Tpl2-/- マウスの確立を目指したバッククロス交配を進めている。

D. 考察

TLR からのシグナルはその後の抗原特異的免疫反応を Th1 方向に誘導するため、PBC 発症における TLR シグナルの関与は検討に値する。また、PBC の研究が進みにくい理由の一つとして明確な動

物モデルが存在しなかったことがあげられ、適切なPBC病態モデルの開発が急務である。今回我々はMAPキナーゼ脱リン酸化酵素であるMKP-MがTh1分化を抑制することを細胞および個体レベルで示した。MKP-MのトランスジェニックおよびKOマウスは、前年度示したCot/Tp12 KOマウスと同様に、PBCの治療法開発のための疾患モデルマウスとして有望と考えられる。

E. 結論

CD4陽性T細胞のTh1/Th2分化に関わる分子として、IL-12レセプター、MKP-Mの機能を解析した。MKP-MはTh1分化に抑制的に働いており、MKP-M遺伝子改変マウスの解析はPBCの病態および画期的治療法の解析に重要な可能性がある。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Musikacharoen T, Oguma A, Yoshikai Y, Chiba N, Masuda A, Matsuguchi T: Interleukin-15 induces IL-12 receptor {beta}1 gene expression through PU.1 and IRF 3 by targeting chromatin remodeling. *Blood* 2005;105:711-720
- 2) Sugimoto K, Ohata M, Miyoshi J, Ishizaki H,

Tsuboi N, Masuda A, Yoshikai Y, Takamoto M, Sugane K, Matsuo S, Shimada Y, Matsuguchi T: A serine/threonine kinase, Cot/Tp12, modulates bacterial DNA-induced IL-12 production and Th cell differentiation. *J Clin Invest* 2004;114:857-866

- 3) Hermoso MA, Matsuguchi T, Smoak K, Cidlowski JA: Glucocorticoids and tumor necrosis factor alpha cooperatively regulate toll-like receptor 2 gene expression. *Mol Cell Biol* 2004;24:4743-4756
- 4) Abe T, Arai T, Ogawa A, Hiromatsu T, Masuda A, Matsuguchi T, Nimura Y, Yoshikai Y: Kupffer cell-derived interleukin 10 is responsible for impaired bacterial clearance in bile duct-ligated mice. *Hepatology* 2004;40:414-423
- 5) Masuda A, Yoshikai Y, Kume H, Matsuguchi T: The interaction between GATA proteins and activator protein-1 promotes the transcription of IL-13 in mast cells. *J. Immunol* 2004;173:5564-5573

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)
なし

生体肝移植を施行した原発性胆汁性肝硬変症例の臨床経過

分担研究者 兼松 隆之 長崎大学大学院・移植・消化器外科 教授

研究要旨：進行した原発性胆汁性肝硬変に対する根治的治療は肝移植である。本邦で専ら施行される生体肝移植は、ドナーとレシピエントが近縁関係にある場合が多く類似した遺伝背景を有している可能性もある。今回、当科で原発性胆汁性肝硬変に対し生体肝移植を施行した症例を検討した。中期的には血清学的再発はあるものの肝機能は保持されている。組織学的には明らかな CNSDC と拒絶の判定は困難であった。拒絶や自己免疫性肝炎様の肝障害はステロイドにて改善したが、継続投与が必要であり、肝移植後の組織学的再発防止と免疫抑制剤の関連性が示唆される。

共同研究者

蒲原行雄 長崎大学医学部歯学部附属病院助手
川下雄丈 長崎大学医学部歯学部附属病院助手
高槻光寿 長崎大学医学部歯学部附属病院医員
宮本俊吾 長崎大学医学部歯学部附属病院医員
渡海大隆 長崎大学医歯薬総合大学院院生
日高匡章 長崎大学医歯薬総合大学院院生

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変はいったん肝硬変に進行すれば唯一肝移植しか有効な治療法が残されていない難治性の疾患である。しかし、肝移植は深刻なドナー不足で本邦においては生体肝移植が主流である。生体肝移植は遺伝的な類似性のあるドナーの可能性が有ることや免疫標的である肝臓は入れ替わっても同じ臓器であることから移植後の肝臓を詳細に観察することで病変の初期像を把握することが可能である。また、一般に肝移植後は原疾患による肝不全はきたしにくいといわれており、術後の免疫抑制を通じて画期的な新治療法を見出せる可能性がある。本年の研究は当科で施行した生体肝移植症例について検討する。

B. 研究方法

対象は当科で生体肝移植を施行した5例（男性4例、女性1例 年齢36-51歳）。以下の項目について検討した。

1. 術前因子（死亡率、治療法、抗体）
2. 免疫学的因子（HLAなど）
3. 移植関連因子（グラフト、再建法）
4. 短期的経過（3ヶ月以内）
5. 現況

またprotocol biopsy施行中の症例の経過についても検討した。

C. 研究結果

1. 術前因子では半年以内死亡率は76-99%であった。全例、抗ミトコンドリア抗体やM2が上昇しており、1例は抗核抗体も陽性であった。術前治療はUDCA投与が全例に行われていたが他の免疫抑制薬は使用していなかった。
2. 免疫学的因子としてはドナーとレシピエントの組み合わせに一定の傾向はなかった。ドナーとの関係は配偶者2例、同朋3例であった。
3. 移植関連因子としては右葉グラフトを全例に用いレシピエント標準肝容積の60%前後であったが1例は標準肝容積の46%であった。
4. 3ヶ月以内に全例拒絶反応が認められた。厳密なCNSDCとの鑑別は不能であったが、ステロイドパルスや免疫抑制剤のトラフ強化で対応できた。死亡した高度拒絶の1例は肝容積46%の症例であった。この時点では抗ミトコンドリア抗体は上昇を認めていない。
5. 現況は4例とも社会・家庭復帰を果たしている。抗ミトコンドリア抗体は全例以前と同じパターンで上昇しているが1例は抗核抗体の新規出現を認めている。免疫抑制剤はFK506単独が1例、cyclosporinA+steroidが3例であり、拒絶や自己免疫性肝炎のためステロイドを継続する必要があった。胆管は狭窄やステント挿入があるが、逸脱酵素・胆道系酵素とも安定している。また、頻回の生検を施行した男性症例は拒絶と胆管狭窄によるうっ滞の鑑別はつかないままステロイドにより沈静化したが後日、脂肪化が認められ代謝異常が示唆されたためbezafibrateを投与し完全に肝機能は軽快している。

D. 考察

肝移植は免疫学的には移植によって肝臓への

攻撃をリセットする状態である。諸家の報告と同様に血清学的再発はあるものの組織学的所見に乏しいか拒絶との鑑別がつきにくい状態で、肝機能は維持されているという特徴が認められた。免疫抑制は何らかの形でステロイドが必要な場合が少なくなく calcineurin inhibitor との併用が重要と思われる。また、生体部分肝は機能的には脆弱で拒絶などにより容易に肝機能を失しやすいことを念頭に置き、術後の経過観察に対する医療給付も考慮すべき問題である。

臨床的には定時的な protocol biopsy が必要である。

E. 結論

末期的原発性胆汁性肝硬変に対する生体肝移植は中期的経過では血清学的再発はあるものの肝機能は保持されていたが、組織学的な CNSDC と拒絶・胆道障害の鑑別は困難であり今後この鑑別法の確立が必要である。また、拒絶や自己免疫性肝炎様の肝障害はステロイドにて改善したが、継続投与が必要であり原疾患治療のための免疫抑制法の糸口と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) Ito Y, Eguchi S, Kamohara Y, Inuo H, Yamanouchi K, Okudaira S, Yanaga K, Furui J, Kanematsu T. Influence of serum from rats with fulminant hepatic failure on hepatocytes in a bioartificial liver system. Int J Artif Organs. 2004 Apr;27(4):303-10.
- 2) Tsutsumi R, Kamohara Y, Eguchi S, Azuma T, Fujioka H, Okudaira S, Yanaga K, Kanematsu T. Selective suppression of initial cytokine response facilitates liver regeneration after extensive hepatectomy in rats. Hepatogastroenterology. 2004 May-Jun;51(57):701-4.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし

末期肝硬変に対する組み換え型ヒト HGF の臨床応用

分担研究者 坪内 博仁 宮崎大学医学部・内科学第二講座 教授

研究要旨： 末期肝硬変に対する組み換え型ヒト HGF の臨床試験を目的として、その非臨床試験（安全性試験）を行った。急性毒性試験では致死量 >40.0 mg/kg で、特に問題となる所見はみられなかった。反復投与毒性試験では、可逆性の蛋白尿が認められたが、尿中微量アルブミン測定でモニタリング可能であり、腎機能障害をきたす個体はみられなかった。また、肝硬変には組み換え型ヒト HGF の長期投与が必要と考えられるため HGF の徐放化を可能とする HGF 含浸ゼラチンハイドロゲルを用いた薬効薬理試験を行った。一方、増殖因子である HGF の発癌性を検討するために、肝硬変を背景に肝発癌が誘導されるコリン欠乏アミノ酸置換食飼育ラットに組み換え型ヒト HGF を反復投与したが、HGF は肝癌および肝前癌病変の発生を促進しなかった。末期肝硬変に対する組み換え型ヒト HGF の臨床応用には、長期投与に対応した安全性試験を行い、さらに臨床試験の実施にはリスク&ベネフィットの観点からその妥当性を十二分に議論し、実施にいたるプロセスには透明性が必要と考えられた。

共同研究者

井戸章雄 京都大学探索医療センター・助教授
金 一徳 京都大学探索医療センター・助手
森内昭博 京都大学探索医療センター・助手
宇都浩文 宮崎大学医学部内科学第二講座・講師
蓮池 悟 宮崎大学医学部内科学第二講座・助手
沼田政嗣 宮崎大学医学部内科学第二講座・助手

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変は中年女性に好発する原因不明の疾患で、いったん肝硬変に進行すれば唯一肝移植しか有効な治療法が残されていない難治性の疾患である。一方、肝細胞増殖因子（hepatocyte growth factor: HGF）は劇症肝炎患者血漿から単離・精製された肝細胞の増殖を強力に促進する増殖因子で、上皮系細胞に対する増殖促進作用のみならず、抗線維化作用、抗アポトーシス作用など多彩な作用を有している。このような HGF の生理作用から、HGF は肝硬変に対して、肝再生促進作用のみならず肝線維化を改善し、その予後を向上させることが期待される。本研究では末期肝硬変に対する組み換え型ヒト HGF を用いた肝再生・抗線維化療法の確立を目的として、その非臨床試験（安全性試験）を行なった。

B. 研究方法

1. 単回投与毒性試験：BALB/c マウスに組み換え型ヒト HGF (0, 4.0, 40.0 mg/kg) を単回静脈内投与し、14 日間一般状態を観察した後に屠殺、剖検および病理組織学的検討を行った。

2. ラット 2 週間反復投与毒性及び 2 週間回復試験：Wistar ラットに組み換え型ヒト HGF (0.4, 1.0, 4.0 mg/kg/day) を 2 週間反復静脈内投与した後 2 週間休薬した。HGF 投与 14 日目および 28 日目（休薬後 14 日目）に屠殺し、血液生化学検査および病理学的検査を行った。
3. HGF 含浸ゼラチンハイドロゲルを用いた薬効薬理試験：ラットにジメチルニトロサミン (DMN) 10 mg/kg の腹腔内投与を週 3 回、4 週間行い肝硬変を誘導した。その後、組み換え型ヒト HGF 0.5 mg/kg/日 x 14 日分を含浸させたゼラチンハイドロゲルを背部皮下に埋め込み、HGF の肝線維化および肝再生に及ぼす影響を検討した。
4. 発癌性試験：コリン欠乏アミノ酸置換 (CDAA) 食飼育ラットに、飼育 13 週から HGF (0, 0.1, 0.5 mg/kg) を 2 週間静注+2 週間休薬を 1 クールとして 9 クール行い、飼育 60 週に屠殺し肝前癌病変および肝発癌に及ぼす影響を検討した。

C. 研究結果

1. 単回投与毒性試験：HGF を最大 40 mg/kg まで投与したが死亡する個体はみられなかった。一般状態では 0 mg/kg (溶媒のみ) 投与群で側臥位、朦朧状態を呈した個体が一匹みられたが、HGF 投与群では特に変化を認めなかった。剖検では HGF 投与群に雌の子宮が水腫様に腫大した個体が見られ、病理組織学的には卵胞の増加および子宮・膈の上皮増殖がみられたが、これらは病

的な所見ではなく、正常な発情期にみられる変化と考えられた。

2. ラット 2 週間反復投与毒性及び 2 週間回復試験：観察期間中、死亡する個体はみられなかった。肝重量は HGF 投与群において有意に増加したが、腎重量に変化はみられなかった。血液生化学検査では HGF 投与中血清アルブミン、総コレステロールが増加したが、休薬によって減少した。HGF 投与群において尿中微量アルブミンが投与 4 日目から増加し、その後用量依存性に蛋白尿が出現した。HGF 休薬後、尿中微量アルブミン、蛋白尿は回復傾向を示した。いずれの個体においても尿素窒素およびクレアチニンには変化を認めなかった。
3. HGF 含浸ゼラチンハイドロゲルを用いた薬効薬理試験：HGF 投与群において肝線維化の改善傾向がみられた。また肝重量 (g/100g 体重)、血清アルブミンは HGF 投与群において有意に増加し、血液凝固検査も改善した。
4. 発癌性試験：肝前癌病変と考えられている GST-P 陽性巣は全ての個体に発生したが、その発生数および大きさは HGF 投与群および非投与群で差を認めなかった。発癌率は、HGF 非投与群 57%、HGF 投与群 (0.1 mg/kg) 44%、(0.5 mg/kg) 23%と、HGF 投与群で低下する傾向を示したが、統計学的有意差はみられなかった。

D. 考察

製薬企業から供給される組み換え型ヒト HGF の臨床応用は医師主導型の治験として実施されることが望ましい。従って、「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」ガイドラインに基づいて安全性試験を行った。

急性毒性試験では致死量 >40.0 mg/kg で、HGF 投与によって雌の発情期が持続的に惹起された可能性は否定できない。しかし、他の反復静脈内投与試験では雌生殖器に変化を認めなかったことから偶発的に発情期の個体が多かった可能性も考えられる。一方、組み換え型ヒト HGF の一般毒性では可逆性の蛋白尿が認められた。腎機能障害をきたす個体はみられないが、その回復性を確認するために 2 週間反復投与毒性および 2 週間回復性試験を行った。HGF の休薬によって蛋白尿は回復傾向を示し、腎臓の病理学的所見も可逆性の変化にとどまっていると考えられた。また、蛋白尿の出現前に尿中微量アルブミンが増加することから、尿中微量アルブミンが腎毒性のモニタリングマーカーとなることが考えられた。

一方、肝硬変を対象とした組み換え型ヒト HGF の投与は長期にわたることも考えられるため、長

期投与に適したドラッグデリバリーシステム (DSS) の開発を目的として HGF 含浸ゼラチンハイドロゲルを用いた薬効薬理試験を行った。組み換え型ヒト HGF を背部皮下から 2 週間徐放させると、肝重量や血清アルブミンなどの肝再生マーカーは有意に改善したが、肝線維化は改善するものの有意ではなかった。今後、投与部位や剤型などを検討する必要があると考えられた。

これまで、臨床用量の HGF では発癌を促進する結果は得られていない。しかし、増殖因子である HGF による発癌性の可能性を完全に否定することは困難である。従って、組み換え型ヒト HGF 投与による発癌促進の可能性はあるというスタンスで、リスク・ベネフィットの観点から被験者の選択規準やプロトコル治療など、十二分に議論を重ねる必要があると考えられた。

E. 結論

組み換え型ヒト HGF の急性毒性試験では特に臨床応用時に問題となる所見はみられなかった。HGF の反復投与試験では可逆性の蛋白尿がみられたが、腎障害をきたす個体はなく尿中微量アルブミンでモニタリング可能であった。一方、HGF の発癌性を完全に否定することは困難であるため、臨床試験ではリスク & ベネフィットの観点からその妥当性を十二分に議論を重ね、また実施にいたるプロセスには透明性を確保することが重要と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Onaga M, Ido A, Hasuike S, et al. Enhanced expression of growth factors and imbalance between hepatocyte proliferation and apoptosis in the livers of rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet. *Hepatology* 28, 94-101, 2004.
- 2) Ido A, Moriuchi A, Kim Il, et al. Pharmacokinetic study of recombinant human hepatocyte growth factor administered in a bolus intravenously or via portal vein. *Hepatology* 30, 175-181, 2004.
- 3) Hasuike S, Ido A, Uto H, et al. Hepatocyte growth factor accelerates the proliferation and differentiation of hepatic oval cells in a 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy model in rats. *J Gastroenterol Hepatol* (in press).

2. 学会発表

- 1) 井戸章雄、森内昭博、坪内博仁. 難治性の消化器疾患に対する肝細胞増殖因子(HGF)の臨床応用. 第90回日本消化器病学会総会, 2004年4月22日
- 2) 沼田政嗣、井戸章雄、坪内博仁. 傷害粘膜の再生修復を目的とした肝細胞増殖因子(HGF)を用いた新規治療法の開発. 第46回日本消化器病学会大会, 2004年10月21日
- 3) 沼田政嗣、井戸章雄、坪内佳子ら. TNBS腸炎モデルにおける肝細胞増殖因子の傷害粘膜修復促進作用の検討. 第46回日本消化器病学会大会, 2004年10月21日
- 4) 井戸章雄、蓮池悟、坪内博仁. 肝再生を目的とした肝細胞増殖因子(HGF)を用いた新規治療法の開発. 第46回日本消化器病学会大会, 2004年10月21日(福岡)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む.)
なし

ヒト幹細胞を用いた肝再生

分担研究者 石川 文彦 日本学術振興会 特別研究員

研究要旨： われわれは、原発性胆汁性肝硬変(PBC)および自己免疫性肝炎(AIH)における画期的治療法の開発のため、ヒト幹細胞の多能性の評価およびヒト疾患モデルの作製を行った。

ヒト細胞を用いた多能性の評価として、われわれは、純化したヒト臍帯血、骨髓由来幹細胞から肝細胞、消化管上皮細胞など内胚葉系組織が再生することをあきらかとした。このことにより、造血組織を用いた将来的な再生医療が、難治性内胚葉組織疾患の治療法として開発されることが期待される。

ヒト疾患モデルの作製として、われわれは、獲得免疫系と自然免疫系の両者を障害した新規免疫不全動物とそれをレシピエントとしてヒト幹細胞を移植する異種移植アッセイ系の開発に成功した。このモデルを用いて、マウス体内で、造血・免疫担当細胞は、極めて高率にヒト細胞で置換される。特に、免疫系の再構築と上皮系の再生が純化した造血幹細胞から同時に起こることは、免疫学的異常が病因の一部として指摘される当研究分野において極めて重要である。

A. 研究目的

われわれは、PBCおよびAIHの画期的治療法の開発のため、再生医療がこれらの治療法となりうるかについて、その可能性を模索している。特に、造血組織由来細胞の可塑性は、大きな関心を集めており、従来マウス細胞の再生能力に関する評価から、われわれはヒト細胞による再生を報告した。同時に、ヒト疾患モデルのための、新規免疫不全動物作製を進めて来た。この免疫不全動物を用いて、*in vivo*における疾患の解明を行う。

B. 研究方法

幹細胞は、倫理的に国内外で未だ受容されにくい胚性幹細胞(ES細胞)ではなく、体性幹細胞を将来の治療に用いる細胞源として評価することとした。体性幹細胞の中でも、自己からも比較的容易に採取可能であり、その可塑性・多能性に近年注目されている骨髓、末梢血、臍帯血の3つの幹細胞源を用いた。ヒト幹細胞を異種体内に移植することで、生体内における幹細胞の多能性を評価することが可能である。

一方で、造血細胞だけでなく、非造血細胞の含めた primary cell の生体内での動態を解析するため、獲得免疫系と自然免疫系の両者のシステムを障害したマウスの作製を行った。特に、cytokine common gamma 鎖の complete null 変異を scid 変異にバッククロスさせることで、その効果が確認され、新規免疫不全動物を作製した。

C. 研究結果

ヒト臍帯血および骨髓細胞から CD34+細胞を純化した後に移植した結果、肝細胞、消化管上皮細胞が再生することが示された。この再生のメカニズムが、細胞融合と分化の両者が含まれ、その比率は組織によって異なることを示した。肝実質細胞や上皮細胞の再生の証明の一方で、紡錘形の fibroblast 様細胞も認められたが、この細胞の再生における役割については、今後同定する必要がある。

common gamma 鎖の complete null 変異を NOD-scid にバッククロスさせた新規免疫不全マウスでは、獲得免疫系の不全状態(T-B-)だけではなく、NK細胞、樹状細胞を含めた自然免疫系の不全状態を実現することが確認された。このマウスに異種となるヒト造血幹細胞を移植した所、これまでのマウスと比較して有意に高率な造血・免疫細胞の再構築が認められ、今後のヒト幹細胞研究に有用であることが示された。

D. 考察

ヒト組織中の CD34 陽性細胞移植で、確かに内胚葉系組織の再生が起こることから、再生能力を有する幹細胞の同定と、ヒト造血組織の将来的な応用の可能性が期待された。これまでのマウスでの研究を中心に展開してきた再生医学研究では直接臨床応用を開始することを疑問視する意見も多かったが、われわれのヒト細胞・組織を用い