

疾患特異的T細胞吸着材の開発

所属 国立病院機構 長崎神経医療センター
研究者 澁谷 統寿

研究要旨 疾患特異的なT細胞吸着のモデルとしてTCRVβ5.2+T細胞、TCRVβ8+T細胞を標的とした吸着材を作成し、その評価を行った。これらの細胞は健常人および多発性硬化症患者のいずれにおいても少数しか末梢血中に存在していなかったが、選択的吸着が可能であることを確認できた。

分担研究者

旭化成メディカル(株)第二開発研究所 安武幹智

A. 研究目的

自己免疫疾患の治療には、抗原特異的な免疫抑制が理想的である。しかし、臨床的に用いられている治療手段は、薬剤による免疫抑制および免疫調節、体外循環での液性因子の除去による免疫調節など免疫応答の最終段階であるエフェクター相を抑えるものが多い。これらは、抗体介在性の疾患では奏効しているが、T細胞介在性の多発性硬化症(MS)などには効果が少ない。T細胞介在性の免疫応答異常が主因の疾患に対する治療戦略は自己反応性T細胞を除去または不活化することである。対象疾患であるMSでは中枢(脳・脊髄)抗原特異的CD4+T細胞が病因に強く関わっており、急性期や再燃時には患者血液・髄液中に特定のT細胞の増殖あることが明らかにされている。われわれは、この病因となるCD4+T細胞をex vivoで除去し免疫調節を行う体外循環システムの開発を行ってきた。しかし、CD4+T細胞の中には疾患の発症を抑制するようなT細胞も含まれていることが明らかになり、疾患の増悪・再燃に関与するT細胞をより選択的に標的とすることでさらに安全で効率的な治療手段となることが推測される。MSやその動物モデルでは脳脊髄炎惹起性T細胞は、活性化した特定のCD4+T細胞が増殖しており、また、そのようなT細胞表面に発現するT細胞レセプター(TCR)はある程度限られているとの報告がある。したがって、より選択的はT細胞の標的分子として、活性化T細胞の表面抗原(クラスII分子、IL-2受容体、各種接着分子など)や特定のTCRが考えられる。ヒトでは主要組織適合性抗原の違いなどによりTCRの使用頻度は個体差が出てくる可能性が高いが、疾患惹起性T細胞のTCRが明らかになれば、そのTCRを標的とした

Tailor-madeな免疫療法が可能となる。一方、遺伝子工学・分子工学の進歩により、より安全性の高いヒト型(あるいはキメラ)のモノクローナル抗体の作成技術が開発されてきている。これらの技術とわれわれが既に確立した抗体を不織布に固定して体外循環治療を行う技術を組み合わせることで、ex vivoで免疫調整が可能で(抗体との接触時間が短く、体内に抗体が入らない)、より安全な治療法を開発することが可能である。この研究では、より安全で選択的な病因となる免疫担当細胞の除去・捕捉による免疫調節技術を確立するために担体物質の最適化やりガンドの精製技術を開発を行う。

今年度は、MS患者血中で増加しているとの報告のあるTCRVβ5.2+T細胞、TCRVβ8+T細胞を標的として、選択的吸着除去の可能性と評価法を検討した。

B. 研究方法

(1) モノクローナル抗体固定吸着材の調製

活性化不織布に、リガンドとして抗ヒトTCRVβ5.2モノクローナル抗体(mouse IgG1, clone:36213, IMMUNOTECH社)と抗ヒトTCRVβ8モノクローナル抗体(mouse IgG1, clone:56C5.2, IMMUNOTECH社)を用い、モノクローナル抗体PBS(-)溶液に活性化不織布を室温で浸し、固定化反応を行った。非固定化活性基をTween20(東京化成製)でブロッキングし、モノクローナル抗体固定吸着材を作成した。

(2) ミニスケールカラム作成

モノクローナル抗体固定吸着材を、内径6.8mm、容量1mLのカラムに充填し、抗体の滅菌保護剤を充填し、コバルト60γ線照射装置にて、照射線量が約25kGyとなるよう照射滅菌を行った。

(3) ミニスケール血液評価

健常人より採取した末梢血液に抗凝固剤として

ACD-A を加え（血液：ACD-A = 8：1）これを処理検体とした。ミニスケールカラムに流速 1.0 mL/min でブドウ糖液を 1.3 mL 流した後に生理食塩液 2.6 mL を流しプライミングを行った。プライミング液を空気で押し出し、処理検体 4 mL を流速 1.0 mL/min でシリンジポンプを用いて灌流した。カラム処理前後の血液をサンプリングし、白血球数、赤血球数、血小板数はマイクロセルカウンター（Sysmex 社）にて測定し、細胞の回収率を求めた。更に、蛍光標識抗体を用いたフローサイトメトリー分析により、リンパ球分画を CD4 及び TCRV β 5.2、CD4 及び TCRV β 8 の 2 カラーで分析し、TCRV β 5.2+T 細胞及び TCRV β 8+T 細胞の吸着率(%)及びその他細胞回収率(%)を求めた。

(4) MS 患者 3 名の血液を用いて同様の検討を行った。

MS 患者より採取した末梢血液に抗凝固剤として ACD-A を加え（血液：ACD-A = 8：1）これを処理検体とした。ミニスケールカラムに流速 1.0 mL/min でブドウ糖液を 1.3 mL 流した後に生理食塩液 2.6 mL を流しプライミングを行った。プライミング液を空気で押し出し、処理検体 4 mL を流速 1.0 mL/min でシリンジポンプを用いて灌流した。カラム処理前後の血液を蛍光標識抗体を用いたフローサイトメトリー分析により、リンパ球分画を CD4 及び TCRV β 5.2、CD4 及び TCRV β 8 の 2 カラーで分析した。

（倫理面への配慮）

ヒト血液を用いる *in vitro* の実験では、研究の内容および研究の目的以外には血液が使用されないことを十分説明し同意を得た上で研究協力者（ボランティア）および患者より血液の提供を受ける。

C. 研究結果

(1) 健康人末梢血を用いた TCRV β +T 細胞の選択的吸着評価

フローサイトメトリー分析により、カラム処理前後の血液細胞における TCRV β 5.2+細胞と TCRV β 8+細胞の T 細胞中の存在比率(%)について測定を行った。結果、TCRV β 5.2+T 細胞では、カラム処理前後での細胞存在比率(%)は各々 0.58 ± 0.13 %、 0.33 ± 0.11 % であり、カラム処理による吸着率は 55.1 ± 8.3 % (Mean \pm S.D., n=6) であった(Fig.1)。また、TCRV β 8+T 細胞に関しては、カラム処理前後での細胞存在比率(%)は各々 1.40 ± 0.92 %、 0.70 ± 0.56 % であり、カラム処理による吸着率は 59.3 ± 8.8 % (n=4) であった(Fig.1)。

その他細胞の回収率(%)について、抗ヒト TCRV β 5.2 固定カラムでは、RBC 回収率(%) 99.4 ± 1.7 %、

PLT 回収率(%) 82.6 ± 17.4 % (n=6) であった。同じく TCRV β 8 固定カラムでは、RBC 回収率(%) 97.6 ± 1.8 %、PLT 回収率(%) 96.0 ± 3.2 % (n=4) であった(Fig.2)。

(2) MS 患者末梢血を用いた TCRV β +T 細胞の選択的吸着評価

3 名の MS 患者より血液の提供を受け、カラム処理前後の血液細胞における TCRV β 5.2+細胞と TCRV β 8+細胞の T 細胞中の存在比率(%)についてフローサイトメトリー分析により測定を行った(Table)。3 名中 2 名では TCRV β 5.2+T 細胞、TCRV β 8+T 細胞ともに、カラム処理前後での 50% 以上の吸着が認められたが、1 名では TCRV β 5.2+T 細胞の吸着が不十分である印象であった。

D. 考察

CD4 抗原よりさらに疾患特異的な標的分子として、活性化 T 細胞の表面抗原、接着分子、特定の TCR などが考えられるが、リガンドとして用いる場合にはモノクローナル抗体が存在すること、細胞表面の密度が十分に細胞を吸着するのに十分なアフィニティーが得られることなどの条件が満たされる必要がある。可能性のある標的分子についてミニスケールの吸着器を作成し、フローサイトメトリーによる解析などを用いて *in vitro* で吸着性能および臨床的意義を評価する必要がある。

今回、MS における疾患特異的細胞である TCRV β 5.2+T 細胞及び TCRV β 8+T 細胞を標的として、選択的吸着除去評価を行い、約 60% の吸着率が得られた。これらの細胞表面マーカーを表出している細胞数が患者血液においても 5% 以下であり、解析の誤差を考えるとフローサイトメトリーのみによる解析では不十分と考えられ、今後、TCR のスペクトラタイピングや SSCP 法による解析など評価法を検討する必要があると考えられた。

その他の細胞集団の非特異的吸着はほとんど見られず、本モノクローナル抗体固定吸着材による細胞除去技術を用いることで、極めて微量な細胞においても選択的吸着が可能と考えられた。本技術を体外循環治療用デバイスに適用することができれば、微量に存在する病因細胞を安全かつ効率よく選択除去する新たな治療方法の開発に繋がる可能性があると考えられる。一方、細胞の選択特性をさらに向上させるためには、濾材の物性制御技術の検討、ならびによりアフィニティーの高いリガンドの探索が必要と考えられる。

E. 結論

TCRVβ 5. 2+T 細胞および TCRVβ 8+T 細胞の選択的吸着材を作成し、疾患惹起性の特定の TCR を持つ T 細胞を選択的に除去する技術的可能性が確認できた。

F. 研究発表

1. 論文発表：該当なし

2. 学会発表：該当なし

G. 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

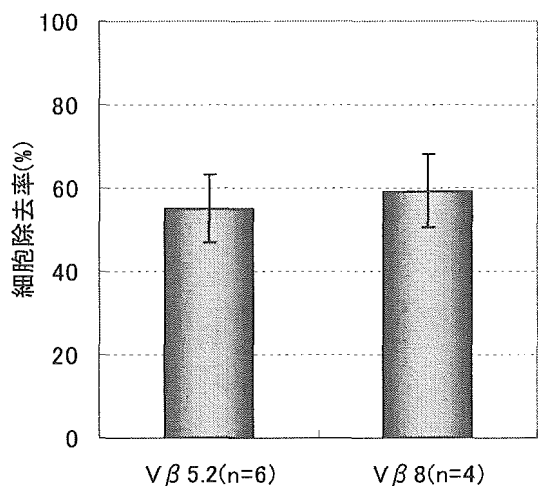


Fig.1 TCRVβ細胞の吸着率

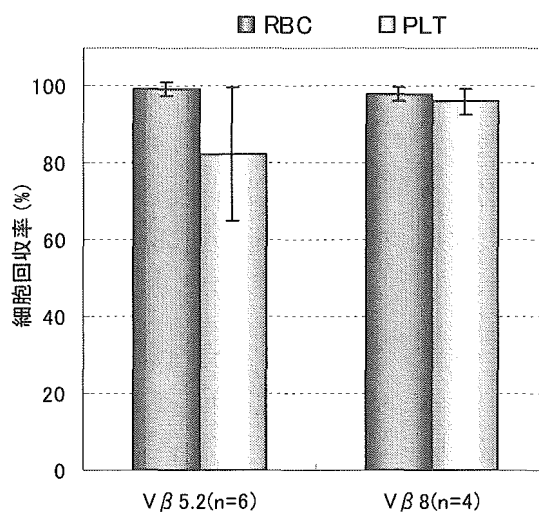


Fig.2 その他細胞の回収率

Table 多発性硬化症患者末梢血を用いた選択的 T 細胞受容体 Vβ 5.2+および 8+細胞吸着の解析

		前	後
Pt1 Vβ 5.2	Vβ 5.2/CD4	1.23%	0.66%
	Vβ 5.2/CD3	0.93%	0.57%
	memory(CD45RO+)/Vβ 5.2	100%	40%
	Activated and regulatory T (CD25+)/Vβ 5.2	50%	100%
Pt1 Vβ 8.1	Vβ 8.1/CD4	3.20%	1.75%
	Vβ 8.1/CD3	3.10%	1.39%
	memory(CD45RO+)/Vβ 8.1	ND	ND
	CD25+/Vβ 8.1	9.09%	11.10%
Pt2 Vβ 5.2	Vβ 5.2/CD4	2.40%	1.25%
	Vβ 5.2/CD3	1.40%	0.98%
	memory(CD45RO+)/Vβ 5.2	48%	50%
	CD25+/Vβ 5.2	60%	65.10%
Pt2 Vβ 8.1	Vβ 8.1/CD4	3.10%	2.50%
	Vβ 8.1/CD3	3.09%	2.30%
	memory(CD45RO+)/Vβ 8.1	21%	90%
	CD25+/Vβ 8.1	40%	63%
Pt3 Vβ 5.2	Vβ 5.2/CD4	0.60%	0.70%
	Vβ 5.2/CD3	0.60%	0.71%
	memory(CD45RO+)/Vβ 5.2	64.70%	100%
	CD25+/Vβ 5.2	75.80%	72%
Pt3 Vβ 8.1	Vβ 8.1/CD4	5.00%	3.00%
	Vβ 8.1/CD3	3.20%	2.42%
	memory(CD45RO+)/Vβ 8.1	78%	93%
	CD25+/Vβ 8.1	14.30%	75%