

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

新たな診断・治療開発のための 免疫学的手法の開発に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

平成18（2006）年3月

主任研究者 住田 孝之

目次

I	構成員名簿	1
II	平成 17 年度総括研究報告	3
	主任研究者 筑波大学大学院人間総合科学研究科先端応用医学専攻臨床免疫学 住田 孝之	
III	分担研究報告	7
	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
	筑波大学大学院人間総合科学研究科先端応用医学専攻臨床免疫学 住田 孝之	
	遺伝子導入樹状細胞を用いた抗原特異的免疫制御法の開発	10
	熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学 西村 泰治	
	関節炎局所に集積している T 細胞レセプターを用いた治療モデルの開発	13
	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	
	調節性 T 細胞を用いた抗原特異的制御法の開発に関する研究	15
	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 上阪 等	
	免疫制御性分子発現多機能ウイルスベクターを用いた疾患特異的免疫制御法の 開発に関する研究	17
	京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学 三森 経世	
	MR1 拘束性 NKT 細胞を標的とした免疫療法の開発	21
	国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 山村 隆	
	自己抗原および関節炎誘導分子修飾による自己抗体産生制御	24
	筑波大学大学院人間総合科学研究科先端応用医学専攻臨床免疫学 松本 功	

全身性エリテマトーデス (SLE) における Ras-guanyl releasing protein 1 (RasGRP1)
発現異常に関する研究…………… 27

北海道大学大学院医学研究科病態内科学講座・第二内科 小池 隆夫

天疱瘡モデルマウスを用いた自己反応性 T 細胞株の in vivo 病原性のスクリーニング法
に関する研究…………… 32

慶応義塾大学医学部内科 桑名 正隆

IV 研究成果の刊行に関する一覧表 …………… 37

V 平成 17 年度班会議プログラム …………… 49

VI 研究成果刊行物・別刷 …………… 51

I 平成 17 年度構成員名簿

新たな診断・治療法開発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	筑波大学大学院人間総合科学研究科先端応用医学専攻臨床免疫学	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内科学講座・第二内科	”
	三森 経世	京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学	”
	西村 泰治	熊本大学大学院医学薬学研究部・免疫識別学分野	”
	山村 隆	国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第六部	部長
	上阪 等	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科膠原病・リウマチ内科学	助教授
	松本 功	筑波大学大学院人間総合科学研究科先端応用医学専攻臨床免疫学	講師
	桑名 正隆	慶応義塾大学医学部内科学教室	助教授
	佐藤 由紀夫	福島県立医科大学医学部内科学第二講座	教授
事務局	辻 奈津子	筑波大学大学院人間総合科学研究科先端応用医学専攻臨床免疫学 〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1 TEL 029-853-3221 FAX 029-853-3222	
経理事務連絡 担当者	小川 春男	筑波大学人間総合科学等支援室医学支援室会計係 TEL 029-853-3033 FAX 029-853-6309 e-mail : kyokomoto@sec.tsukuba.ac.jp	

II 平成 17 年度総括研究報告

平成 17 年度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

新たな診断・治療法開発のための免疫学的手法の開発に関する研究

住田 孝之（筑波大学大学院人間総合科学研究科先端応用医学専攻臨床免疫学 教授）

研究要旨

本研究では免疫難病の新たな診断・治療法を開発するために、抗原特異的制御を柱とした免疫学的手法の確立を目的とした。自己抗原の T 細胞エピトープからアナログペプチドを選択し、それ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 *in vivo* において進められた。ES-DC 細胞に制御遺伝子 (TRAIL) を導入することにより Treg 細胞を介した自己免疫疾患の制御法に関する研究が進展した。病因 T 細胞の抗原受容体を再構築する技術と抑制分子の遺伝子導入法とを組み合わせ、自己免疫疾患の抗原特異的治療方法を確立した。抗原特異的免疫制御分子としては、Foxp-3、活性型 TGF- β が有効であることが証明された。第二の NKT 細胞である TCRV α 19J α 33+NKT 細胞が EAE を抑制することが明らかにされ、NKT 細胞による治療法が開発が期待される。自己免疫疾患の新規標的分子 (TI-X、RasGRP1) が明らかとなり、分子免疫学的手法による新しい診断・治療応用へ向けた基盤研究が進められた。病的自己抗体産生を誘導するヘルパー T 細胞の選定に、T 細胞株を用いた *in vivo* の免疫学的実験システムも検討された。

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 筑波大学大学院人間総合科学研究科
先端応用医学専攻臨床免疫学 講師
- 桑名 正隆 慶應義塾大学医学部内科 助教授
- 佐藤 由起夫 福島県立医科大学第二内科 教授

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。

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。平成 14 年度から、難治性疾患克服研究事業として、住田が主任研究者として本研究班を継承し、平成 16 年度までの 3 年間に研究を発展させてきた。平成 17 年度からは、新たなメンバーを加えて新規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。本研究班は新しい診断・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てきた。

SSにおいては、HLA-DR B1*0405 陽性 SS 患者における α -アミラーゼおよびHLA-DR B1*0901 陽性 SS 患者におけるムスカリン作働性アセチルコリン受容体 (M3R) のT細胞エピトープとそのアナログペプチドを明らかにした。

RAにおいては、HLA-DR B1*0101 陽性 RA 患者におけるCIIおよびHLA-DR B1*0901 陽性 RA 患者におけるGPIのT細胞エピトープとアナログペプチドを明らかにしてきた。

本年度においては、以上の研究を基盤として、M3R誘導唾液腺炎モデルマウス、コラーゲン誘導関節炎(CIA)モデルマウス、GPI誘導関節炎モデルマウスを作成し、M3R, CII, GPIのアナログペプチドを用いたin vivoにおける自己免疫応答制御に関する研究を進めた。その結果、CIAモデルマウスにおいては、RAと同様にCII262G→D, K, AおよびCII264K→Aがアナログペプチドの候補として、GPI免疫マウスにおいては、2つのT細胞エピトープ(YINCFGCETHAMLPYDQYL, AA327-346)(DASTNGLINFIKQQREARVQ, 539-558)が選別された。現在、CIAにおいては、アナログペプチドによる予防・治療実験を、GPI免疫マウスとM3R免疫マウスにおいてはアナログペプチドの選定研究を進めている。このような動物モデルを用いた基盤研究を進展させ、clinical trialに進む予定である。

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、マウスに先行投与後、MOGp35-55あるいはMBP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。さらにその抑制メカニズムについて検討した。その結果、1)Ii-MOG+TRAIL遺伝子を発現したES-DC投与群

において、MOG誘導EAEばかりでなく、MBP誘導EAEの発症も抑制した。2)1)のEAE抑制効果はCD4+CD25+制御性T細胞(Treg細胞)により誘導されていた。その根拠は(1)抗CD25抗体投与により抑制効果がなくなったこと、(2)CD4+CD25+T細胞の他のマウスへの細胞移入実験によりEAE発症抑制効果がみられたこと、(3)EAEが抑制されたマウスの脊髄にFoxp3+細胞が増加していたこと、である。本研究により、抗原提示細胞の遺伝的改変により自己免疫疾患モデルの抗原特異的制御が可能であり、その制御機構としてCD4+CD25+調節性T細胞がかかわってい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た。本年度は、抑制性分子としては、TNFR1gあるいはFoxp3を導入した。その結果、以下の事実を明らかにした。1)CIA関節炎モデルにおいて、関節局所浸潤自己反応性CD4+T細胞からTCRを再構築し(B47)、さらにTNFR1gあるいはFoxp3遺伝子を発現させた細胞を作成した。その細胞をCIAマウスへ導入することにより、どちらの抑制分子を発現したT細胞も関節炎を抑制した。2)CIA関節局所でFoxp3を発現したT細胞からTCRを再構築したAF25株はFoxp3遺伝子導入により関節炎を抑制した。3)関節炎抑制効果は、TNF- α , IL-1, IL-17Aの発現抑制と関連していた。本研究から、関節局所に集積しているCD4+T細胞あるいはTreg細胞由来のTCR遺伝子と抑制分子を組み合わせることで、自己免疫疾患の選択的治療が可能となった。

上阪班員は、自己免疫疾患の抗原特異的制御戦略として、抗原特異的T細胞にCD4+CD25+調節性T細胞(Treg細胞)の機能分子であるFoxp3遺伝子を導入して検討する事を目的とした。具体的には、CIA関節炎モデルにおいて、CII反応性CD4+T細胞にレトロウイルスベクターを用いてFoxp3遺伝子を導入した細胞をCIAマウスに細胞移入して関節への効果を検討した。その結果、1)CII特異的Foxp3導入T細胞はCIAを抑制したが、OVA特異的T細胞では抑制効果は認められなかったこと、2)CIA抑制効果はFoxp3の高発現細胞で強く見られたこと、を明らかにした。以上の研究成果から、Foxp3を高発現した抗原特異的T細胞が自己免疫疾患の制御に有用であることを示した。

三森班員は、自己免疫疾患をT細胞により抗原特異的に制御することを目的とした。具体的には、CIA

マウスにおいて、CD4+T細胞に活性型 TGF- β を抑制遺伝子として導入し、CIA誘導後のDBA/1マウスに細胞移入して関節炎の治療効果を検討した。結果として、1)CII免疫マウス由来のCD4+TGF- β +T細胞、CII反応性CD4+TGF- β +T細胞によりCIAの治療が可能であること、2)遺伝子導入T細胞は実際に関節局所に集積していること、3)活性型 TCF- β の作用は、IL-4抑制効果とIL-10産生効果によること、を明らかにした。以上の結果から、抗原特異的T細胞に抑制分子(活性型 TGF- β)を発現させることにより、エフェクターCD4+T細胞を免疫抑制性T細胞の一つであるTr1細胞に変換する技法を確立した。この方法により自己免疫疾患の抗原特異的な治療が期待される。

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治療法を確立することを目的とした。昨年度は、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。本年度は、マウスのカウンターパートであるTCRV α 19J α 33の機能を解析するために、B6バックグラウンドのTCRV α 19J α 33トランスジェニックマウス、TCRV α 19J α 33Tg CD1d KOマウス、MR1KOマウスを利用してEAEの発症について検討し、以下の結果が得られた。1)TCRV α 19J α 33+TgマウスではEAE発症が抑制されていた。2)TCRV α 19J α 33+NKT細胞の移入によりEAEの発症が抑制された。3)MR1KOマウスではEAEが増悪した。4)TCRV α 19J α 33+NKT細胞とB細胞の共培養によりIL-10産生が認められた。本研究より、TCRV α 19J α 33+NKT細胞がEAEを抑制する調節性T細胞として機能していること、その作用にはB細胞から産生されるIL-10が重要であること、が明らかにされた。NKT細胞によるEAEの治療応用が期待される。

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た。昨年度、DBA/1マウスにリコンビナントGPIを免疫することにより抗GPI抗体を誘導し著明な関節炎を発症するモデル動物の作成に成功した。本年度は、樹立したGPI免疫関節炎モデルマウスにおいて、重要なサイトカインの解析をおこない、さらに、関節炎発症に関わる遺伝子についてDNAarrayを用いて検討した。その結果、1)TNF- α やIFN- γ が関節炎発症に重要であること、2)関節炎にNFkBが関与していること、3)関節炎関連遺伝子として、新規遺伝子TIF-Xが発見されたこと、を報告した。これらの研究成果を基に、自己抗体誘導関節炎治療の標的分子を決定

する。

小池班員は、T細胞において低刺激TCRシグナルの伝達に重要であるras guanyl releasing protein 1(RasGRP1)分子についてSLEで検討した。その結果、以下のことを明らかにした。1)RasGRP1のスプライスバリエントが多数存在する。2)SLEの末梢血T細胞では、スプライスバリエントが高率に存在する。3)スプライス異常が認められた症例では、インタクトなRasGRP1の蛋白量が減少している。4)3)の原因としてユビキチン化による蛋白分解が考えられた。本研究の成果により、SLEにおけるT細胞の機能異常・減少のメカニズムにRasGRP1バリエントが関わっていることが示唆された。今後、RasGRP1を分子ターゲットとした治療戦略が期待される。

桑名班員は、T細胞株を用いた機能実験により、自己免疫疾患発症にかかわる自己反応性T細胞を同定し、病因となるターゲット分子を明らかにすることを目的とした。具体的には、自己免疫疾患の一つである尋常性天疱瘡(PV)において、病因的自己抗体、抗デスマogleイン3(Dsg3)抗体産生をヘルプするDsg3反応性T細胞株を樹立し、その機能解析をおこなった。Dsg3特異的T細胞株はDsg3KOマウスにリコンビナントDsg3を免疫して作成し、T細胞の病原性は、Rag2KOマウスにDsg3KOマウス由来B細胞とともに細胞移入することにより、PV発症、抗Dsg3抗体価などで検討した。結果は、1)Th0型Dsg3特異的T細胞株は抗Dsg3抗体を誘導しPVを発症したが、Th1型細胞は抗Dsg3抗体を誘導できずPVを発症しなかった。2)MHCクラスII拘束性であったが、TCRV β 鎖やサイトカイン発現は多彩であった。以上の研究成果から、in vivoにおいて病的T細胞を選定する手法を確立した。

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、アナログペプチドによる病因T細胞の制御、ES-DC細胞を用いた遺伝子操作によるT細胞機能の調節、T細胞受容体を再構築したT細胞や抗原特異的T細胞に免疫抑制分子を遺伝子導入して抗原特異的に自己免疫疾患を制御するシステムの構築、第二のNKT細胞や抗原特異的T細胞株を用いた自己免疫応答の制御、新規分子を標的とした自己抗体産生調節や自己免疫応答の制御に関する基盤技術の開発を進めてきた。これらは、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であり、今後はclinical trialへと発展することが期待できよう。

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

住田 孝之（筑波大学大学院人間総合科学研究科先端応用医学専攻臨床免疫学 教授）

研究要旨

免疫難病の抗原特異的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。HLA-DR B1*0901+SSでは、ムスカリン作働性アセチルコリン受容体(M3R)の222K→K, Aがアナログペプチドの候補として選定された。また、HLA-DR B1*0901+RAにおいては、glucose-6-phosphate isomerase (GPI)のLSIALHVGFDNFE (AA282-292)がT細胞エピトープとして機能している事を明らかにした。さらに、GPI誘導関節炎モデルマウスにおいて、YINCFGCETHAMLPYDQYL (327-346)、DASTNGLINFIKQQREARVQ (539-558)の2つがT細胞エピトープ候補として同定された。M3R誘導唾液腺モデルマウスに関しては研究が進行中である。以上の結果から、免疫難病の抗原特異的治療戦略がin vitroの解析からin vivoでの検定のプロセスに進むことができたといえよう。

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) ムスカリン作働性アセチルコリン受容体：ムスカリン作働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 (KRTVPPGECFIQFLSEPTIT FGTAI, AA 212-236) に対する自己抗体は14%のSS患者において検出される。抗体陽性のHLA-DR B1*0901患者のT細胞エピトープはVPPGECFIQFLSEPTT(AA215-229)であることが判明した。従って、9種の変異ペプチドを作成してアナログペプチドの選定をIFN- γ を指標としたMACSサイトカイン産生アッセイを行った。
- 2) M3R誘導唾液腺炎モデル動物での検定：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を100 μ gをCFAと同時にC57BL/6(B6)マウスの皮内に注射することにより抗M3R抗体を誘導し、唾液腺炎モデルマウスの作成を試みる。
- 3) glucose-6-phosphate isomerase：一部のRA患者においてglucose-6-phosphate isomerase(GPI)に対する自己抗体、T細胞が存在する。GPIのT細胞エピトープを決定するために、まずリコンビナント蛋白を作成した。抗GPI抗体陽性RA患者において、リコンビナ

ントGPIに対するT細胞反応を1)と同様の方法で検定した。

- 4) GPI誘導関節炎モデル動物での検定：リコンビナントヒトGPI抗原300 μ gをCFAとともに、DBA/1マウスの皮内に1回注射することにより、抗GPI抗体を誘導し、関節炎モデル動物を作成する。GPI蛋白の中で、DBA/1マウス(H-2q)に結合するアンカーモチーフを有する部位を選定し、20マーの合成アミノ酸を16種類合成して、サイトカインELISA法にてT細胞エピトープを決定した。

C. 結果

- 1) HLA-DR B1*0901陽性SS患者におけるM3R細胞外第2ドメインのアナログペプチドはVPPGECFKQFLSEPTとVPPGECFIAFLSEPTであることが判明した〔図1〕。
- 2) M3Rペプチド投与により、2週目より血清中に抗M3R抗体が検出された〔図2〕。M3R免疫マウスは(51+32)、コントロール(289+161) (p<0.05)に比較して、唾液量が有意に減少していた〔図3〕。M3R免疫マウスの唾液腺には、著明なIgGの沈着が認められた〔図4〕。
- 3) GPIのリコンビナント蛋白に対するT細胞反応は41%(7/17)の患者で認められた。7名のうち5名でHLA-DR B1*0405が陽性であり、2名でB1*0901が陽性であった。そのため、両方のDRのアンカーモチーフを有するLSIALHVGFDNFE (AA282-292)がT細胞エピトープとして機能している可能性が強く示唆された〔図5〕。
- 4) GPI免疫により、抗GPI抗体が検出され、

8日目より関節炎が認められた。GPIをコードする16種類の合成アミノ酸を検定した結果、YINCFGCETHAMLPYDQYL(327-346)、DASTNGLINFIKQQREARVQ(539-558)の2つがT細胞エピトープ候補として同定された〔図6〕。

D. 考察と結論

本研究では、代表的免疫難病であるSS、RAにおいて、臓器浸潤T細胞が認識するT細胞エピトープを決定し、アナログペプチドをin vitroで選定した。In vivoにおけるアナログペプチドの効果を検討するために、M3R免疫マウス、GPI免疫マウスを作成し、抗M3R抗体、抗GPI抗体、M3R反応性T細胞、GPI反応性T細胞について検討した。M3R免疫マウスでは、抗M3R抗体が唾液腺に反応して唾液分泌を障害していることを明らかにした。このことから、抗M3R抗体産生をヘルプするM3R反応性T細胞をアナログペプチドにより制御する治療戦略を進める。GPI免疫マウスでは、GPI反応性T細胞のアナログペプチドを明らかにすることができたので、in vivoにおける関節炎の抗原特異的制御方法の確立をめざす。

今後、モデル動物での有効性が明らかとなれば、免疫難病をターゲットとしたclinical trailに進むことができよう。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki, E., Tsutsumi, A., Goto, D., Matsumoto, I., Ito, S., Otsu, M., Onodera, M., Takahashi, S., Sato, Y., and Sumida, T. Gene transduction of tristetraprolin or its active domain reduces TNF- α production in Jurkat T cells. *Int. J. Mol. Med.* (in press)
2. Kori, Y., Matsumoto, I., Zhang, H., Muraki, Y., Yasukochi, T., Hayashi, T., Iwanami, K., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A. and Sumida, T. Characterization of Th1 type, glucose-6-phosphate isomerase reactive T cells in the generation of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* (in press)
3. Chino, Y., Murata, H., Goto, D., Matsumoto, I., Tsutsumi, A., Sakamoto, T., Ohtsuka, M., Sekisawa, K., Ito, S., and Sumida, T. T cell receptor BV gene repertoire in lymphocytes from bronchoalveolar lavage fluid of polymyositis/dermatomyositis patients with interstitial pneumonitis. *Int. J. Mol. Med.* 17:101-109, 2006
4. Naito, Y., Matsumoto, I., Wakamatsu, E., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T. Altered peptide ligands regulate muscarinic acetylcholine receptor reactive T cells from patients with Sjogren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 65:269-271, 2006.
5. Matsumoto, I., Hua, Z., Muraki, Y., Hayashi, T., Yasukochi, T., Kori, Y., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T. A functional variant of Fc γ receptor IIIA is associated with rheumatoid arthritis in anti-glucose-6-phosphate isomerase antibodies positive individuals. *Arthritis Res. Ther.* 7:1183-1188, 2005
6. Matsumoto, I., Muraki, Y., Yasukochi, T., Hua, Z., Kori, Y., Hayashi, T., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., Ikeda, K., Sumitaka, H., and Sumida, T. The exploration of joint specific immunoreactions on immunoglobulins G anti-glucose-6-phosphate isomerase antibodies from patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Med.* 16:793-800, 2005.
7. Ohnishi, Y., Tsutsumi, A., Goto, D., Itoh, S., Matsumoto, I., Taniguchi, M., and Sumida, T. TCRVa14+ NKT cells function as effector T cells in collagen-induced arthritis mice. *Clin. Exp. Immunol.* 141:47-53, 2005.
8. Tomoo, T., Tsutsumi, A., Yasukochi, T., Ikeda, K., Ochiai, N., Ozawa, K., Shibana, Y., Ito, S., Matsumoto, I., Goto, D., and Sumida, T. Analysis of abnormally expressed genes in synovium from patients with rheumatoid arthritis using a column gel electrophoresis-coupled subtractive hybridization technique. *Int. J. Mol. Med.* 15:453-457, 2005.
9. Naito, Y., Matsumoto, I., Wakamatsu, E., Goto, D., Tsutsumi, A., and Sumida, T. Muscarinic acetylcholine receptor autoantibodies in patients with Sjogren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 64:510-511, 2005.
10. Takahashi, R., Tsutsumi, A., Ohtani, K., Muraki, Y., Goto, D., Matsumoto, I., Wakamiya, N., and Sumida, T. Association of mannose-binding lectin (MBL) gene polymorphism and serum MBL concentration with characteristics and progression of systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 64:311-314, 2005.

図 1

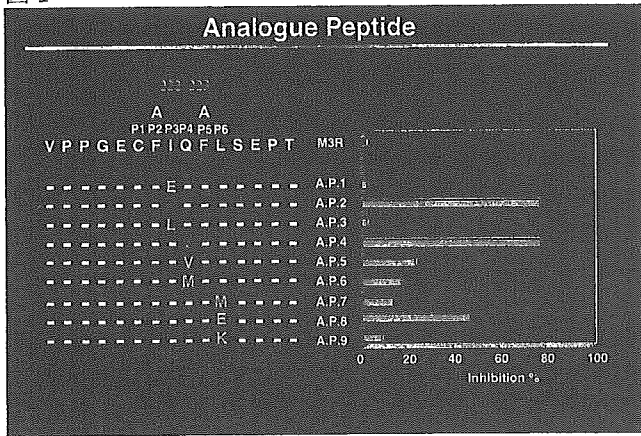


図 4

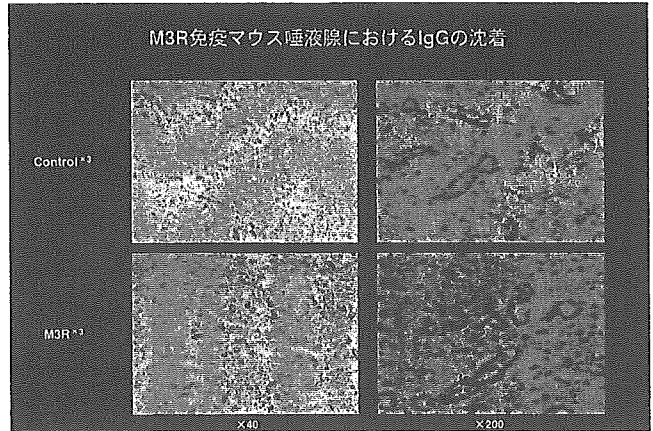


図 2

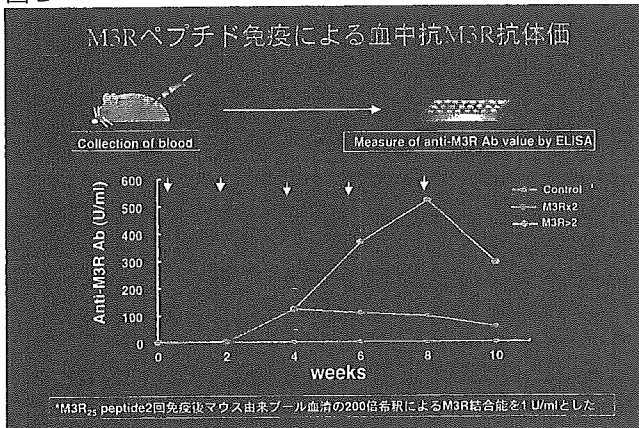


図 5

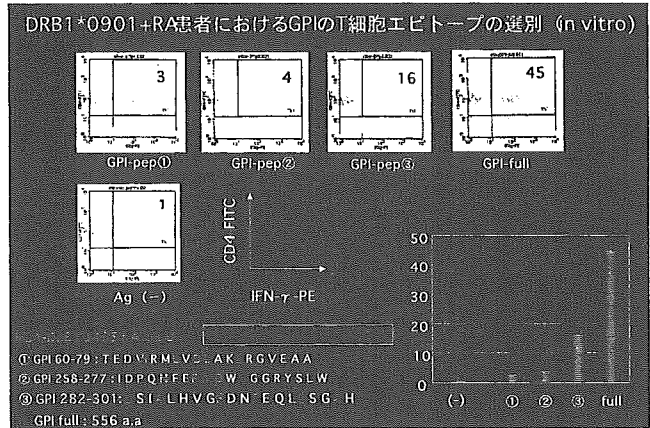


図 3

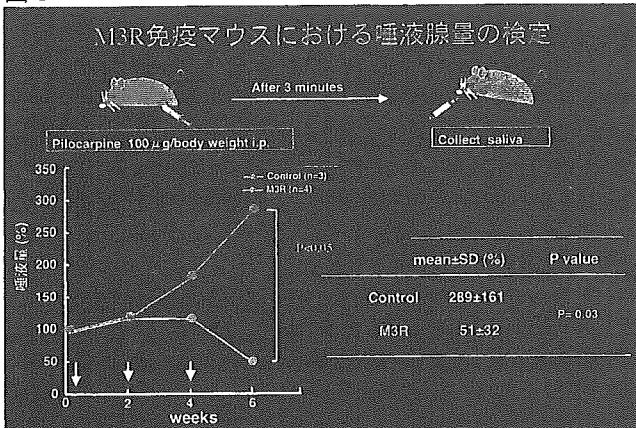
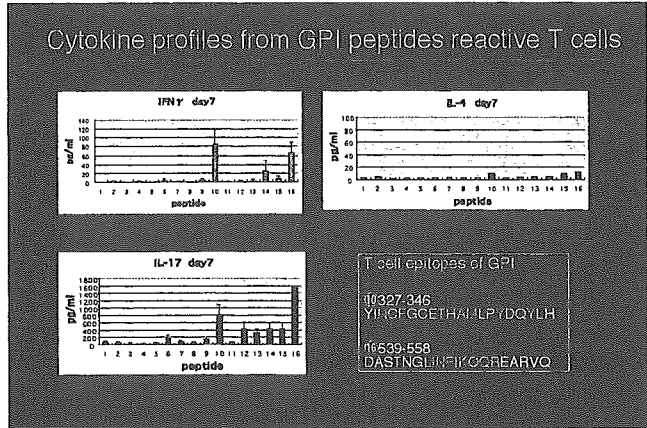


図 6



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

遺伝子導入樹状細胞を用いた抗原特異的免疫制御法の開発

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 MOG ペプチドと TRAIL をコードする遺伝子を導入し、これより *in vitro* で樹状細胞 (ES-DC) を分化誘導した。これをマウスに先行投与することにより、MOG ペプチドだけでなく MBP ペプチドあるいは MBP 蛋白質で誘導される、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。そのメカニズムを解析したところ、免疫抑制能を有する CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞の誘導を介して、EAE に至る自己免疫現象が抑制されていることが明らかとなった。

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身的な抑制状態に陥らせることなく、抗原特異的に抑制する手法の開発が強く求められている。

近年の免疫学研究の成果として、生体内に存在する代表的な抗原提示細胞である樹状細胞が、T 細胞応答をコントロールすることにより、個体の免疫応答を正あるいは負の両方向へ制御していることが明らかにされている。そして、樹状細胞による免疫制御機構により、自己に対する免疫応答が抑制され、自己免疫疾患の発症が防止されていると考えられている。申請者は、マウスの ES 細胞を *in vitro* において樹状細胞 (ES-DC) へ分化させる技術を開発した。さらに、ES 細胞に遺伝子導入を行ない、これを ES-DC に分化させることにより、任意の遺伝子を発現する ES-DC を作製する技術を開発している。

我々は、この方法を利用して、昨年度までにマウス 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、*in vitro* で DC へ分化させた細胞 (ES-DC) をマウス個体へ投与して、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の発症を予防することに成功した。さらに、このような発症抑制のメカニズムとして、免疫抑制能を持つ T 細胞が関与していることを報告してきた。本年度の研究においては、この免疫抑制性 T 細胞の性格について詳細な解析を行った。

B. 研究方法

MHC クラス II 分子拘束性に Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) ペプチドを効率良く T 細胞に提示させるために、ヒトインバリアント鎖の CLIP 領域を、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には、遺伝子導入細胞の選択に用いるマーカーとして、internal ribosomal entry site (IRES) 配列の下流に、薬剤耐性遺伝子を連結したものをを用いた。これらの発現ベクターを電気穿孔法によりマウス ES 細胞 (TT2) に導入し、選択薬剤を含む培養液中で培養することにより、導入遺伝子の高発現体を選択した。その後、すでに確立された ES 細胞から ES-DC への分化誘導法を用いることにより、これらの遺伝子改変 ES 細胞から導入遺伝子を発現する ES-DC を作製した。

このようにして作製した遺伝子改変 ES-DC を TT2 と同系の (CBA x C57BL/6) F1 (CBF1) マウスの腹腔内へ先行投与し、その後 EAE を誘導するために MOG ペプチド、あるいは Myelin basic protein (MBP) のペプチド、または蛋白質をアジュバントと共に免疫して、ES-DC による EAE の発症予防効果を検討した。

また、免疫抑制機能を有する遺伝子改変 ES-DC の効果が、免疫応答を抑制的に制御する T 細胞の誘導あるいは活性化等を介している可能性を検討する目的で、ES-DC を投与したマウスの脾臓から T 細胞を分離し、別個体のマウスへ移入し、EAE に対する予防効果の有無を観察した。

さらに、CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞 (Treg 細胞) の関与を検討する目的で、抗 CD25 抗体をマウス個体へ投与して Treg 細胞を除去したマウスに、同様に ES-DC を投与後、MBP 蛋白質で EAE を誘導してその効果を検討した。

また、制御性 T 細胞のマウス個体内での誘導の有無を検討する目的で、ES-DC を投与後に、MOG ペプチドで EAE を誘導し、ES-DC 未投与群のマウスが発症している day 11 に、その脊髄切片を Treg 細胞のマーカーとして知られている Foxp3 に対する抗体を用いて、免疫組織化学的に染色して解析した。

さらに、*in vitro* で抗 CD3 抗体と IL-2 の存在下で、TRAIL を発現する ES-DC による Treg 細胞の増殖反応の増強の有無を、³H-thymidine 取込み法で調べた。また、未処置のマウスより採取した脾臓細胞を LPS で刺激して TRAIL の発現を高め、抗 CD3 抗体と IL-2 の存在下で Treg 細胞と共培養して、Treg 細胞の増殖反応に及ぼす、抗 TRAIL 阻害抗体の影響を調べた。

(倫理面への配慮) 本研究は、ヒトに由来する検体等を用いた解析は含んでいない。マウスを用いた実験に際しては、熊本大学動物実験委員会の承認を得たうえで、動物愛護に十分配慮しつつ実験を行なった。

C. 研究結果

ES-DC 未投与群や Ii-MOG のみを導入した ES-DC 投与群、Ii-MOG + PD-L1 遺伝子発現 ES-DC 投与群に比較して、Ii-MOG + TRAIL 発現 ES-DC を先行投与した群では MOG 誘導性の EAE のみならず MBP により誘導された EAE の発症も有意に抑制された。

この抑制効果のメカニズムについて、CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞 (Treg 細胞) の関与を検討するために、抗 CD25 抗体を投与して Treg を除いたところ、Ii-MOG + TRAIL を発現する ES-DC の投与による、MBP 誘導性 EAE の発症抑制効果が認められなくなった。さらに、Ii-MOG + TRAIL 発現 ES-DC を投与したマウスの脾臓 T 細胞を別のナイーブなマウスへ移入し、このレシピエントマウスにおける EAE の発症の状況を観察した。その結果、Ii-MOG + TRAIL を発現する ES-DC を投与したマウスの脾臓 CD4⁺CD25⁺T 細胞を移入したレシピエントマウスにおいて、MOG あるいは MBP 誘導性 EAE が抑制された。また、ES-DC を投与後、MOG で EAE を誘導して、その脊髄を Foxp3 について免疫組織化学的染色を行ったところ、ES-DC 未投与群や Ii-MOG + PD-L1 発現 ES-DC 投与群と比較して、Ii-MOG + TRAIL を発現する ES-DC の投与群で Foxp3⁺細胞が増加していた。

また、*in vitro* で、抗 CD3 抗体と IL-2 の存在下で誘導される Treg 細胞の増殖に及ぼす ES-DC の影響を検討したところ、TRAIL を発現する ES-DC との共培養により、Treg 細胞のより強い増殖反応が誘導された。さらに、マウス脾臓細胞を LPS で刺激して TRAIL を発現させた抗原提示細胞と、Treg 細胞を抗 CD3 抗体と IL-2 の存在下で共培養したところ、Treg 細胞の増殖反応が抗 TRAIL

抗体により著明に抑制された。

D. 考察

Ii-MOG + TRAIL 発現 ES-DC を先行投与した群で、MOG 誘導性のみならず MBP により誘導される EAE の発症も有意に抑制されたことより、遺伝子改変 ES-DC の投与により、抗原特異的に活性化され、抗原非特異的な免疫抑制機能を発現する T 細胞が誘導された可能性が示唆された。また、この発症抑制効果が抗 CD25 抗体の投与により CD25⁺細胞を除去したマウスにおいて、観察されなくなったことは、この制御能を有する T 細胞が CD25⁺Treg 細胞であることを示唆した。さらに、Ii-MOG + TRAIL 発現 ES-DC を投与したマウスの脾臓 CD4⁺CD25⁺T 細胞を別のマウスへ移入した際に、レシピエントマウスにおいても EAE 発症抑制効果が見られたことは、この可能性を強く支持する。また、Ii-MOG + TRAIL を発現する ES-DC を投与し、MOG 誘導性 EAE の発症が抑制されたマウスにおいて、脊髄における Foxp3⁺細胞が増加していることも、この可能性を支持するものである。

E. 結論

自己抗原と TRAIL の遺伝子を導入して発現させた ES-DC の先行投与により、自己抗原特異的に活性化され、抗原非特異的に免疫抑制能を発現する CD25⁺制御性 T 細胞の誘導を介して、臓器特異的自己免疫疾患の発症が抑制されることを明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hirata, S., Senju, S., Matsuyoshi, H., Fukuma, D., Uemura, Y., and Nishimura, Y. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by transfer of ES cell-derived dendritic cells expressing MOG peptide along with TRAIL or PD-L1. *J Immunol.* 174: 1888-1897, 2005.
- 2) Hirata, S., Matsuyoshi, H., Fukuma, D., Kurisaki, A., Uemura, Y., Nishimura, Y.* and Senju, S.* (*These two authors contributed equally) Involvement of regulatory T cells in the EAE-preventive effect of dendritic cells expressing MOG plus TRAIL. *Submitted*

2. 学会発表

- 1) 4th International Workshop of Kyoto T cell Conference. (Kyoto), Apr. 6-10, 2005. Induction of T cells with regulatory function by adoptive transfer of ES-DC expressing self antigen along with TRAIL. Shinya Hirata, Satoru Senju, Hidetake Matsuyoshi, Daiki Fukuma and Yasuharu Nishimura.

- 2) 第14回日本組織適合性学会大会
平成17年10月2-3日(熊本)
MHCクラスII拘束性自己抗原とTRAIL
遺伝子を共発現する樹状細胞による
自己免疫疾患の抑制
平田真哉, 松吉秀武, 福間大喜, 栗崎
朱里, 下村真菜美, 植村靖史, 西村泰治,
千住 覚

- 3) 2005年日本免疫学会学術集会、
12月13日-15日(横浜)
自己抗原とTRAILを共発現する樹状細胞は抑制性T細胞を誘導して自己免疫疾患を抑制する：平田真哉、千住覚、松吉秀武、福間大喜、植村靖史、西村泰治

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願

発明の名称：霊長類動物胚性幹細胞からの樹状細胞の製造方法、
出願日：2004年8月27日
出願番号：特願 2004-249062
発明者：千住 覚、西村泰治
出願者：千住 覚、田辺製薬株式会社

関節炎局所に集積している T 細胞レセプターを用いた治療モデルの開発

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

研究要旨 病変局所に集積している T 細胞の注目し、その単一細胞から T 細胞レセプター (TCR) をクローニングし、自らの末梢 T 細胞に遺伝子導入することで、関節局所に特異性のある T 細胞を人工的に作成することができた。これらの関節集積性のある T 細胞の中には、免疫抗原である II 型コラーゲンでなく、自己の抗原を認識するものがあることを示した。さらにこれらの人工的自己反応性 T 細胞に TNFRIg や Foxp3 などの制御分子を共導入することで、全身への免疫抑制作用は少ない状態で関節炎の制御が可能であることを示した。

A. 研究目的

炎症性疾患において、薬剤・抗炎症分子の炎症局所への特異的な供給は、治療の特異性を高める上で大変重要である。我々は末梢 T 細胞に炎症局所に集積している T 細胞レセプター (TCR) を導入することで、炎症を特異的に抑制するモデルの作製を試みた。

B. 研究方法

疾患モデルとしては DBA1 マウスの II 型コラーゲン誘発性関節炎 (CIA) を使用した。炎症局所に存在する CD4 陽性 T 細胞をシングルセルソーティングで分離後に cDNA を合成し、単一細胞で使用されている TCR α 鎖・ β 鎖を同定した。並行して炎症局所の細胞集団において TCR-SSCP 法を行い、炎症局所に集積している TCR を同定した。同定した TCR α 鎖・ β 鎖はレトロウイルスベクターにサブクローニングし、これを用いてマウス脾臓 CD4 陽性 T 細胞に TCR 遺伝子を導入した。また TCR 遺伝子に加え TNF- α 阻害作用のある TNFRIg や、regulatory T 細胞の機能を規定する Foxp3 遺伝子を共導入した細胞作製した。これらの細胞を II 型コラーゲン免疫後 23 日目の DBA1 マウスに移入し、関節炎への効果を検討した。

(倫理面への配慮) 研究対象者には人権擁護上の配慮を行った上で、研究方法による不利益、

危険性とそれらを排除する方法等について十分なインフォームドコンセントを行った。実験動物に対しては過度の苦痛を与えないなど、動物愛護上の十分な配慮を行った。

C. 研究結果

DBA1 マウス CIA の炎症局所で集積している T 細胞クローン B47 を同定した。B47 の TCR は II 型コラーゲンに対する特異性を示さなかったが、脾臓及びリンパ節の抗原提示細胞に自己反応性を示した。B47-TCR を導入した CD4 陽性 T 細胞は炎症肢への集積性を示した。B47-TCR と TNFRIg を共導入した CD4 陽性 T 細胞と TNFRIg のみを移入した CD4 陽性 T 細胞はともに移入したマウスの血清 TNFRIg 濃度を上昇させたが、関節炎抑制能は B47-TCR と TNFRIg を共導入した CD4 陽性 T 細胞の方が強かった。また B47-TCR と Foxp3 を共導入した CD4 陽性細胞は Foxp3 のみを導入した CD4 陽性細胞よりも強い関節炎抑制能を示した。B47-TCR と Foxp3 を共導入した CD4 陽性細胞は、移入マウス後肢の TNF- α 、IL-1、IL-17A の発現を抑制し、骨破壊も抑制した。

さらに我々は B47 の他に炎症局所で集積し、Foxp3 を発現するクローン AF25 を同定した。AF25 の TCR は B47 と同様に II 型コラーゲンに対する特異性を示さなかったが、脾臓及びリンパ節の抗原提示細胞に自己反応性を示した。

AF25-TCR と Foxp3 を共導入した CD4 陽性細胞は関節炎を抑制し、移入マウス後肢の TNF- α , IL-1, IL-17A の発現を抑制し、骨破壊も抑制した。

D. 考察

可溶性分子である TNFR1g の導入実験においては TNFR1g の血中濃度よりも局所での TNFR1g 産生が重要であることを示唆する結果が得られた。細胞内分子である Foxp3 の導入実験においても TCR による抗原特異性の付与により、強い関節炎抑制効果が得られた。特に関節炎局所で Foxp3 を発現しているクローン由来の TCR と Foxp3 の共導入は、関節炎局所に存在する regulatory T 細胞機能の再構築と考えることも出来る。

E. 結論

抗炎症分子に加えて関節炎局所から同定した TCR を用いることにより、特異性のないポリクローナルな集団への抗炎症分子単独の導入に比較して強い関節炎の抑制効果が得られた。炎症局所に集積している CD4 陽性細胞または regulatory T 細胞由来の TCR を用いることで、有効な薬剤・抗炎症分子の炎症局所への供給が可能と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

・ Kochi Y, Yamada R, Suzuki A, Harley JB, Shirasawa S, Sawada T, Bae SC, Tokuhiko S, Chang X, Sekine A, Takahashi A, Tsunoda T, Ohnishi Y, Kaufman KM, Kang CP, Kang C, Otsubo S, Yumura W, Mimori A, Koike T, Nakamura Y, Sasazuki T, Yamamoto K. A functional variant in FCRL3, encoding Fc receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities. *Nature Genet.* 37:478-485, 2005.

・ Chang X, Yamada R, Suzuki A, Sawada T, Yoshino S, Tokuhiko S, Yamamoto K.

Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 44: 40-50, 2005.

・ Kawaida R, Yamada R, Kobayashi K, Tokuhiko S, Suzuki A, Kochi Y, Chang X, Sekine A, Tsunoda T, Sawada T, Furukawa H, Nakamura Y, Yamamoto K. CUL1, a component of E3 ubiquitin ligase, alters lymphocyte signal transduction with possible effect on rheumatoid arthritis. *Genes Immun.* 6:194-202, 2005.

・ Sagawa K, Nagatani K, Komagata Y, Yamamoto K. Angiotensin receptor blockers suppress antigen-specific T cell responses and ameliorate collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 52:1920-1928, 2005.

・ Suzuki A, Yamada R, Ohtake-Yamanaka M, Okazaki Y, Sawada T, Yamamoto K. Anti-citrullinated collagen type I antibody is a target of autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun.* 333:418-426, 2005.

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

調節性 T 細胞を用いた抗原特異的制御法の開発に関する研究

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 大畑順子 理研免疫・アレルギー科学総合研究センター 研究員

研究要旨

抗原特異的 CD4T 細胞に制御性 T 細胞機能の主要遺伝子、Foxp3 を強制発現させ、コラーゲン誘導関節炎(CIA)マウスに移入して CIA 抑制への有効性を検証した。Foxp3 強制発現 T 細胞の移入による CIA の抑制は CII 特異性が重要であり、OVA 特異的分画では CIA 抑制作用はなかった。宿主は免疫後に Foxp3 強制発現 T 細胞に対する抵抗性が生じ移入による抑制効果は低下した。試験管内で Foxp3 強制発現 T 細胞は Foxp3 の発現量に相関した抑制活性を示した。マウスへの移入においても Foxp3 の発現に相関した CIA 抑制効果が認められ、Foxp3 高発現分画は抵抗性を得た宿主マウスにおいても効果的に CIA を抑制した。これらの結果より標的臓器由来抗原への特異性、Foxp3 の発現量は Foxp3 強制発現細胞養子移入による CIA 抑制の効果を高めることが明らかになった。

A. 研究目的

CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞、または CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞に恒常的に発現している制御性転写因子遺伝子、Foxp3 の強制発現 CD4T 細胞は、養子移入によってある種の自己免疫病動物モデルの発症を抑制する。また、遺伝子操作によって疾患惹起抗原特異的な T 細胞受容体を発現させた制御性 T 細胞は抑制効果がより高いことが知られており、一方で抗原特異性によって非特異的な全身性の免疫抑制を抑制する効果も期待できる。我々は抗原特異的 Foxp3 強制発現 T 細胞を作成し、関節リウマチの動物モデルであるマウスコラーゲン誘導関節炎(CIA)に対するこれらの抑制効果の有無、また Foxp3 の発現量の調節による抑制効果の影響について検証した。

B. 研究方法

抗 CD3 抗体と骨髄由来樹状細胞(DC)で刺激したマウス CD4T 細胞にレトロウイルスベクターを用いて Foxp3 を遺伝子導入し、試験管内で Foxp3 遺伝子導入 T 細胞の抑制活性を Foxp3 発現量別に調べた。マウスにウシ II 型コラーゲン(CII)と CFA での初回免疫後、21 日後に追加免疫を行って CIA を誘導した。抗原添加 DC で同抗原で免疫したマウスのリンパ節 CD4T 細胞を刺激してレトロウイルスベクターを感染させ、II 型コラーゲン(CII)または卵白アルブミン(OVA)特異的 Foxp3 遺伝子導入 T 細胞を作成した。これらを宿主マウスへ免疫後に移入を行って CIA 抑制効果を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト由来の検体は扱わなかった。また、動物実験に関しては、東京医科歯科大学および理化学研究所の動物実験の基本指針に従い、動物福祉の観点からも適切な処置を行なった。

C. 研究結果

試験管内での Foxp3 遺伝子導入 T 細胞は Foxp3 の発現に相関した抑制効果を示した。免疫前の宿主マウスへの養子移入では、CII 特異的 Foxp3 遺伝子導入 T 細胞は有意な CIA の進展抑制効果がみられたが、OVA 特異的な同遺伝子導入 T 細胞では抑制効果はなかった。初回免疫後 20 日目での移入では、抑制効果を得るために免疫前の移入よりも多い細胞数が必要だった。Foxp3 の発現量の異なる分画を分離し、同様に移入を行った。対照である低発現分画は免疫前の移入では 1×10^6 細胞で有意な抑制効果を認められたが、同じ細胞数の追加免疫前の移入では効果が大幅に低下した。一方、同数の Foxp3 高発現分画は初回免疫前、免疫後 20 日目での移入ともに明らかな抑制効果を示し、Foxp3 を高発現させることで CIA 抑制効果が増強することが明らかになった。

D. 考察

CII 免疫によって宿主マウスに Foxp3 遺伝子導入細胞の抑制効果に対する耐性生じており、このことは関節リウマチへの制御性 T 細胞療法の応用は病初期の段階の方が効果を得やすいことを示唆するのかもしれない。

E. 結論

抗原特異性と Foxp3 発現を高めることにより CIA に対する Foxp3 遺伝子導入 T 細胞移入療法の効果を高めることができ、CII 免疫後に出現する Foxp3 強制発現 T 細胞への耐性に対して有用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

大畑 順子、上阪 等 制御性T細胞を用いた自己免疫疾患の治療 臨床免疫 2004, vol. 42(5);609-614.

大畑 順子、上阪 等 関節炎における制御性T細胞の役割 臨床免疫 (in press)

Type II collagen specific CD4T cells with Foxp3 transduction suppress collagen induced arthritis depending on Foxp3 level. (原稿作成中)

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-gamma production from CD4 T cells. Allergol Int 54 (1), 117-122, 2005

Suzuki F, Nanki T, Imai T, Kikuchi H, Hirohata S, Kohsaka H, Miyasaka N. Inhibition of CX3CL1 (fractalkine) improves experimental autoimmune myositis in SJL/J mice. J Immunol 175: 6987-6996, 2005

2. 学会発表

大畑順子、上阪 等 抗原特異的Foxp3強制発現CD4 T細胞移入によるコラーゲン誘導関節炎の抑制 第33回日本臨床免疫学会総会 2005年10月28-29日 京都 (Japanese J. Clin. Immunol., 28, p253, 2005)

大畑順子、上阪 等 抗原特異的Foxp3強制発現抑制性T細胞によるコラーゲン誘導関節炎の抑制 第35回日本免疫学会総会 2005年12月13-15日 横浜 (Proc. J. S. I., 35, p280, 2005)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし