

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

第1分野

課題番号

KH11001	バイオフィトニクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

第2分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)受容体(S1P3)の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG 1 蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法の作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 ……	124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 ……	129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 ……	134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 ……	142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 ……	148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 ……	152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 ……	156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 ……	160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 ……	167
 第3分野			
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 ……	175
KH31025	生薬及び漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 ……	185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤 由起子 ……	194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 ……	200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 ……	210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 ……	218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 ……	226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 ……	235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 ……	243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 ……	252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 ……	257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ ……	261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルゲンによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルゲンによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法法の確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（平成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）

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
期 間 平成16年4月～平成18年3月

研究要旨 疾患特異的な T 細胞吸着のモデルとして TCRV β 5.2+T 細胞、TCRV β 8+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。吸着材に用いる不織布の太糸径化により目的外細胞の吸着を大幅に抑制し、選択除去性能の向上が可能であった。活性化 T 細胞のマーカーのひとつと考えられる CD25 抗原で検討した場合、MS 患者では CD25^{high} の細胞集団になく制御性 T 細胞だけでは活性化 T 細胞が混入していることが示唆された。

分担研究者

旭化成メディカル(株) 機能商品事業部 技術開発部 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。

平成 16 年度は疾患の増悪・再燃に関与する T 細胞のみをより選択的に吸着除去することでさらに安全で効率的な治療手段となりうることを予想される。そこで、T 細胞の中でも T 細胞受容体である TCRV β 5.2+T 細胞、TCRV β 8+T 細胞のような極めて微量な細胞の選択的吸着除去の可能性と評価法を検討した。

疾患特異的な T 細胞除去治療は、より多く

の病因細胞を除去することを狙って頻回に施行するいわゆる intensive 療法としての応用が将来的には考えられるが、その実現のためには目的とする疾患特異的 T 細胞以外の細胞ロスを最小限に抑えうる吸着材の開発が重要となる。そこで平成 17 年度は、目的細胞の選択的吸着除去性能をさらに向上させることを目的として、吸着材物性が除去性能に与える影響を検討した。

さらに最近、MS のような免疫機能が亢進した自己免疫疾患に対して、免疫機能を抑制する働きがあるとされる制御性 T 細胞が注目されている。この制御性 T 細胞は疾患改善に寄与する可能性があると考えられる。そこで、CD4+T 細胞吸着カラムにおける制御性 T 細胞の通過性に関する評価を行った。

また、CD4+ T 細胞のなかに自己免疫を制御する細胞が含まれており、この細胞集団が CD25 抗原を発現していることが知られているが、ヒト研究においてはほかに良いマーカーがなかったために CD4+CD25^{high} T 細胞が制御性 T 細胞として解析されてきた。しかし、IL-2 受容体 α 鎖である CD25 は活性化マーカーでもあることと MS が CD4+ T 細胞の活性化を伴う自己免疫性疾患であることを考えあわせると、CD4+CD25+T 細胞の分画には疾患を惹起する活性化 T 細胞と制御性 T 細胞が混在する可能性がある。そこで、制御性 T 細胞の分化と機能発現に必須とされる Foxp3 を制御性 CD4+ T 細胞のマーカーとして制御性 T 細胞における CD25 抗原の発現を解析し、MS 末梢血制御性 T 細胞の頻度を解析した。

B. 研究方法

1) TCRV β 5.2+T 細胞、TCRV β 8+T 細胞の検討

(1) ポリプロピレン不織布への活性化基導入

ガラス製容器に、硫酸 1.8ml、ニトロベンゼン 2.0 ml、パラホルムアルデヒド 9.8 mg を入れマグネチックスターラーで攪拌した。

これに N-Hydroxymethyl-2-iodoacetamide 156 mg を加え攪拌しながら溶解した。この反応液にポリプロピレン製不織布 80 mg をそれぞれ湿潤させ 24 時間、室温で反応した。反応後の不織布をメタノールで洗浄し、更に水で十分洗浄し、活性化不織布を得た。

(2) モノクローナル抗体固定吸着材の作製

活性化不織布に、リガンドとして抗ヒト TCRV β 5.2 モノクローナル抗体(mouse IgG1,

clone: 36213, IMMUNOTECH 社)と抗ヒト TCRV β 8 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) 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。

(3) ミニスケールカラムの作製

モノクローナル抗体固定吸着材 12mg を、内径 6.8 mm、容量約 1 ml のカラムに充填し、滅菌保護剤を含む充填液で満たし、コバルト 60 にて照射線量が約 25 kGy となるよう照射滅菌を行った。

(4) ミニスケール血液評価

健康人ボランティアドナー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 (ベックマン・コールター社) にて分析し、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。

(5) 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。

2) 高選択性を有する吸着材物性の検討

(1) モノクローナル抗体固定吸着材の作製

平均繊維径の異なる 2 種類の活性化不織布に、リガンドとして抗ヒト CD4 抗体 (mouse IgG1, clone:13B8.2, 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) 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、前述の方法でミニスケールカラムを作製した。

(2) ミニスケール血液評価

健常人ボランティアドナーより採取した末梢血液に抗凝固剤として低分子ヘパリンを約 730 IU/L となるように加えこれを処理検体とした。ミニスケールカラムに流速 0.20 ml/min でブドウ糖液を 3.9 ml 流した後生理食塩液 7.8 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、吸着材の平均繊維径より算出した表面積当りの検体量が 0.027 ml/cm² となるよう調整し灌流した。灌流はシリンジポンプを用いて、実際の体外循環デバイスに近い条件である流速 0.20 ml/min で行った。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。また、フローサイトメトリー (ベックマン・コールター社) にて分析し、細胞の分画から顆粒球の回収率 (%) を、また 2 カラーの蛍光標識抗体を用いてリンパ球分画の CD4+T 細胞及び CD8+T 細胞の吸着率 (%) 及び CD4+T 細胞と CD8+T 細胞の選択性 (CD4+T 細胞吸着率/CD8+T 細胞の吸着率) を求めた。

3) 制御性 T 細胞通過性の検討

(1) モノクローナル抗体固定吸着ミニカラムの作製

平均繊維径約 16 μ m のポリプロピレン製不織布を用い、B-2. (1) (2) と同様、モノクローナル抗体固定吸着ミニカラムを作成した。

(2) ミニスケール血液評価

健常人ボランティアより採取した末梢血液に抗凝固剤として低分子ヘパリン (フラグミン、キッセイ薬品工業) を約 1000 IU/L となるように加えこれを処理検体とした。ミニスケールカラムに流速 0.20 mL/min でブドウ糖液を 3.9 mL 流した後生理食塩液 7.8 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、吸着材の平均繊維径より算出した表面積当りの検体量が 0.027 mL/cm² となるよう調整し灌流した。灌流はシリンジポンプを用いて、

実際の体外循環デバイスに近い条件である流速 0.20 mL/min で行った。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) にて測定した。また、CD4+細胞と CD25+細胞を蛍光標識抗体で染色後、FACS Calibur (Becton Dickinson) にて分析し、CD4+T 細胞中の CD4+CD25^{high} 細胞の割合から制御性 T 細胞の存在比率を測定した。

4) MS 末梢血制御性 T 細胞の頻度の解析

健常人 13 人、MS 患者 22 人 (インターフェロン β 使用; 11 人、不使用 8 人、再発 3 人を含む) の末梢血単核球細胞を検体として CD4、CD25、Foxp3 の発現を FACS Calibur にて検討した。Foxp3 の検出のために e-Bioscience PCH101 を用いて細胞内染色を行い、Foxp3 陽性 T 細胞の CD25 発現強度についても解析した。(倫理面への配慮)

研究用血液は、健常ドナーから採血し研究に供した。年間採血量、採血のインターバル、ヘモグロビン値等を個人情報保護法に基づき適切に管理し安全を確保するとともに、採血前の問診によりドナーの体調に十分配慮した上で本人同意の元、採血を実施した。

C. 研究結果

1) TCRV β 5.2+T 細胞、TCRV β 8+T 細胞の検討

(1) 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 \pm 0.13%、0.33 \pm 0.11% であり、カラム処理による吸着率は 55.1 \pm 8.3% (Mean \pm SD, 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 \pm 0.92%、0.70 \pm 0.56% であり、カラム処理による吸着率は 59.3 \pm 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 \pm 1.7%、PLT 回収率 82.6 \pm 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 \pm 1.8%、PLT 回収率 96.0 \pm 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TCRVβ5.2+細胞とTCRVβ8+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TCRVβ5.2+T細胞、TCRVβ8+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TCRVβ5.2+T細胞の吸着が不十分である印象であった。

2) 高選択性を有する吸着材物性の検討

平均繊維径の異なる2種類の不織布を用いたカラムのCD4+T細胞の吸着率(%)とCD8+T細胞の回収率(%)、その他細胞の回収率(%)をフローサイトメトリー分析により測定した。結果、平均繊維径4μmのCD4+T細胞吸着率は98.6±0.7%(Mean±SD, n=5)、CD8+T細胞回収率は38.3±24.4%であり、平均繊維径16μmのCD4+T細胞吸着率は85.6±3.5%、CD8+T細胞回収率は84.8±5.1%であった。また、CD4+T細胞吸着率とCD8+T細胞回収率において両群間には有意差(それぞれp=0.0073、p=0.010)を認めた(Fig.3)。また、これより得られるCD4+T細胞とCD8+T細胞の選択性(CD4+T細胞吸着率/CD8+T細胞回収率)は、平均繊維径4μmは1.8±0.60、平均繊維径16μmでは6.2±2.2であり、両群間には有意差(p=0.0087)を認めた(Fig.4)。

CD4抗原を発現していない顆粒球の回収率は、平均繊維径4μmでは9.1±8.2%、平均繊維径16μmにおいては83.4±8.7%であり、両群間には有意差(p=0.000062)を認めた(Fig.5)。

その他細胞の回収率について、平均繊維径4μmではRBC回収率99.8±6.1%、PLT回収率56.5±30.1%であり、平均繊維径16μmではRBC回収率95.4±5.7%、PLT回収率75.9±11.6%であった。また、RBC回収率とPLT回収率において両群間には有意差は認められなかった(Fig.6)。

3) 制御性T細胞通過性の検討

平均繊維径16μmの太径化不織布を用いたカラム通過後の回収細胞におけるCD4+T細胞中のCD4+CD25^{high}細胞の割合は、処理前血液が4.0±0.3(mean±sd, n=3)に対し、処理後血液が3.7±1.5(n=3)であり有意差は認められなかった(Fig.7)。

4) 制御性T細胞の頻度

Fig.8にCD4+T細胞中に占めるFoxp3陽性細胞陽性率を示した。健康人ではCD4陽性T細胞のなかでFoxp3陽性の制御性T細胞が占める頻度は平均5.51%であったが、インターフェロンβ非使用で寛解期にある患者では平均2.83%であった。寛解期MSで制御性T細胞は減少していた(p<0.05)。インターフェロンβ使用患者では平均4.40%であり、治療により有意に制御性T細胞が増加した(p<0.05)。インターフェロンβ治療者のうち4名は制御性T細胞の頻度は5%を超えていたが、非治療例では5%を超える例はなかった。しかし、制御性T細胞の頻度が5%を超えた例ではCD25のMFIは39.1、32.7、54.1、58.7と低下しており、CD25の発現強度が正常人と異なっていた。MS再発例3例ではCD4+T細胞中に占めるFoxp3陽性細胞は平均1.41%であった。寛解期における最小のFoxp3陽性率が1.87%であったのに対して、再発期では3人中2人が0.75%、1.24%という低値を示した。少数例での解析ではあるが、再発時に制御性T細胞が減少していることが示唆された。

D. 考察

MSにおける疾患特異的細胞であるTCRVβ5.2+T細胞及びTCRVβ8+T細胞をターゲットとして、抗ヒトTCRVβ5.2モノクローナル抗体ならびに抗ヒトTCRVβ8モノクローナル抗体をポリプロピレン不織布繊維に固定した選択的吸着濾材を開発し、健康人末梢全血を用いたin vitro試験においてTCRVβ5.2+T細胞及びTCRVβ8+T細胞の選択的吸着除去評価を行い、約60%の吸着率を認めた。即ち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であることが示された。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、細胞の選択性をさらに向上させる技術手段の検討として、抗ヒト CD4 抗体を固定化した 2 種類のポリプロピレン不織布の特異的吸着特性を評価し、その結果、不織布繊維を太径化することにより、CD4+T 細胞以外の細胞回収率を大きく向上させることが可能であった。この理由の一つとして、不織布繊維の太径化、即ち吸着濾材のポアサイズの拡大によって、サイズ濾過の効果が減弱しアフィニティー表面に対する吸着効果の影響が相対的に増大した結果、細胞の選択性が向上した可能性が挙げられる。

不織布通過後細胞における CD4+T 細胞中の制御性 T 細胞の存在比率は、処理前血液と同等であり、吸着カラムは制御性 T 細胞に対する選択性は特に認めなかった。しかし、CD4+T 細胞除去によって同時に制御性 T 細胞も除去されることから、より疾患特異的な細胞吸着が望まれる。

CD4+CD25^{high} T 細胞は健常人では大多数が制御性 T 細胞であり、一方、MS 患者では制御性 T 細胞の CD25 発現は低下しており、CD25^{high} の細胞集団は制御性 T 細胞だけではなく活性化 T 細胞が混入していることが示唆された。

E. 結論

TCRV β 5.2+T 細胞および TCRV β 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。希少な目的細胞の選択的吸着除去の技術的可能性が示された。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ものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表：該当なし
2. 学会発表：

溝田貴光、近藤誉之、斎田孝彦、松井 真、澁谷統壽、横山広美、松尾秀徳. 多発性硬化症末梢血 Foxp3+制御性 CD4+ T 細胞の CD25 発現は低下しており、その頻度も減少している. 第 18 回日本神経免疫学会学術集会 2006.3.2-3. 名古屋

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

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 Vb5.2	Vb5.2/CD4	1.23%	0.66%
	Vb5.2/CD3	0.93%	0.57%
	memory(CD45RO+)/Vb5.2	100%	40%
	Activated and regulatory T (CD25+)/Vb5.2	50%	100%
Pt1 Vb8.1	Vb8.1/CD4	3.20%	1.75%
	Vb8.1/CD3	3.10%	1.39%
	memory(CD45RO+)/Vb8.1	ND	ND
	CD25+/Vb5.2	9.09%	11.10%
Pt2 Vb5.2	Vb5.2/CD4	2.40%	1.25%
	Vb5.2/CD3	1.40%	0.98%
	memory(CD45RO+)/Vb5.2	48%	50%
	CD25+/Vb5.2	60%	65.10%
Pt2 Vb8.1	Vb8.1/CD4	3.10%	2.50%
	Vb8.1/CD3	3.09%	2.30%
	memory(CD45RO+)/Vb8.1	21%	90%
	CD25+/Vb5.2	40%	63%
Pt3 Vb5.2	Vb5.2/CD4	0.60%	0.70%
	Vb5.2/CD3	0.60%	0.71%
	memory(CD45RO+)/Vb5.2	64.70%	100%
	CD25+/Vb5.2	75.80%	72%
Pt3 Vb8.1	Vb8.1/CD4	5.00%	3.00%
	Vb8.1/CD3	3.20%	2.42%
	memory(CD45RO+)/Vb8.1	78%	93%
	CD25+/Vb5.2	14.30%	75%

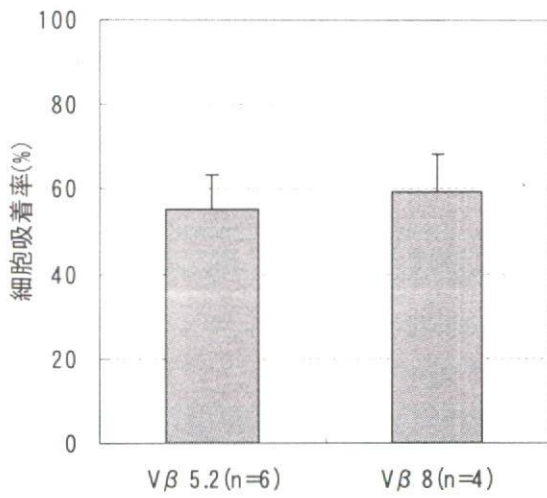


Fig.1 TCRVβ細胞の吸着率

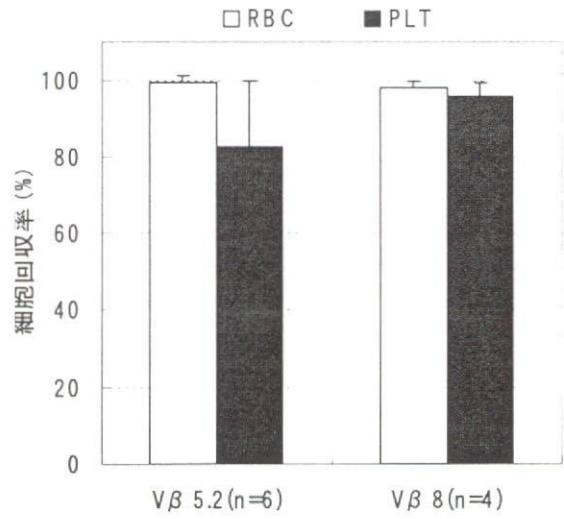


Fig.2 その他細胞の回収率

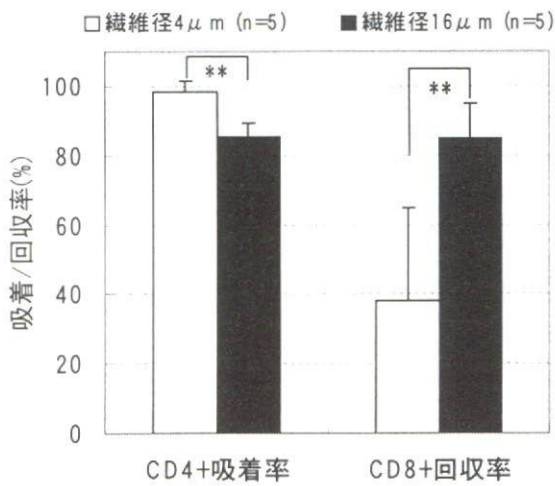


Fig.3 CD4+T細胞吸着率とCD8+T細胞回収率

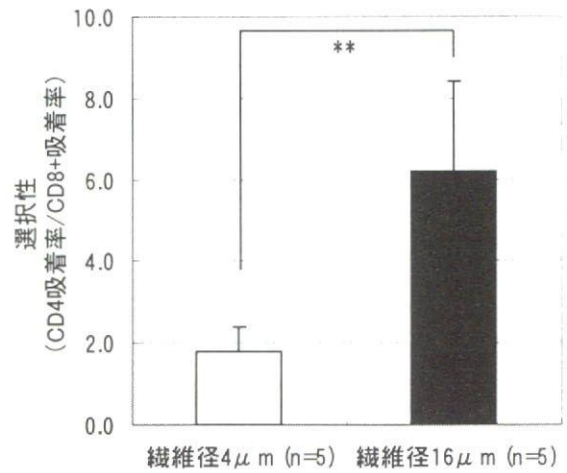


Fig.4 繊維径による選択性

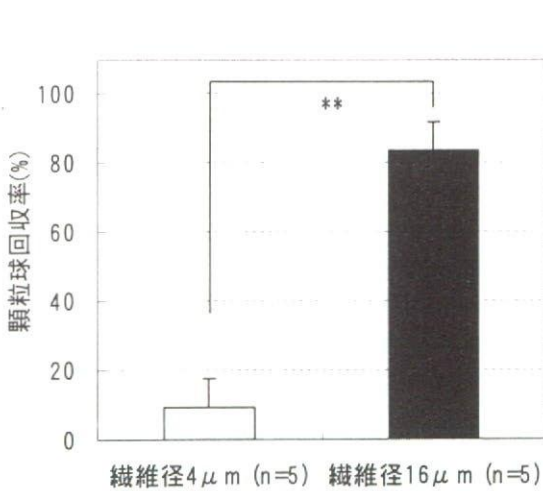


Fig.5 顆粒球回収率

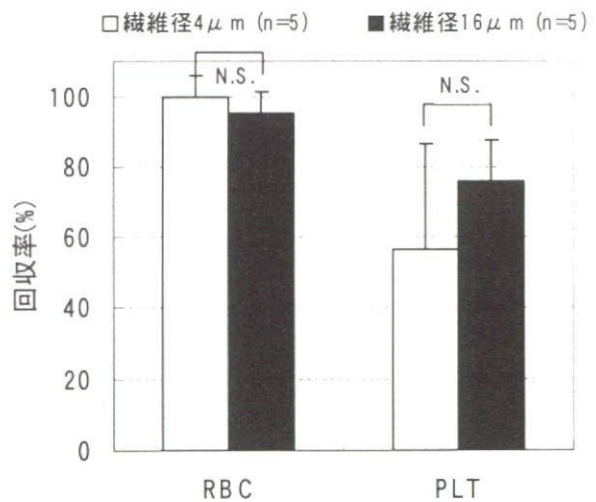


Fig.6 その他細胞回収率

(** : t検定、p<0.05)

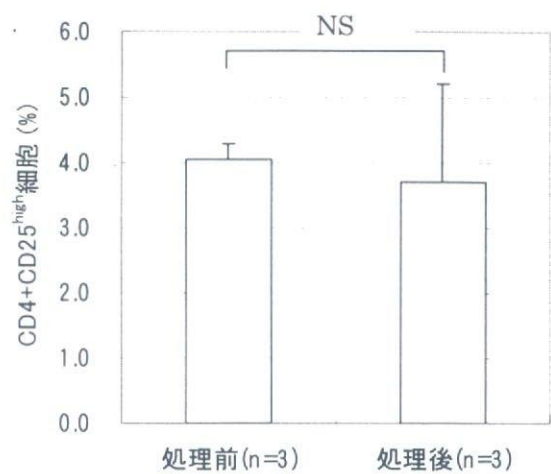


Fig.7 制御性 T 細胞割合

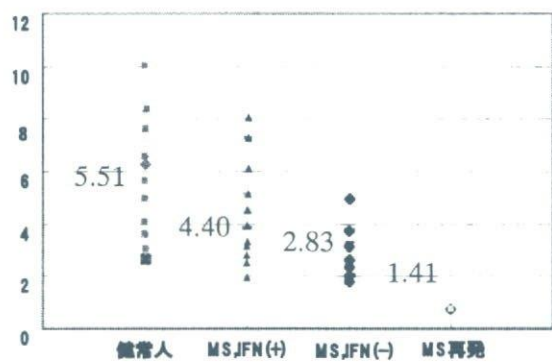


Fig.8 CD4 陽性 T 細胞中の Foxp3 陽性細胞数頻度(%)

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社