

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・治療法開発のための 免疫学的手法の開発に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

平成19（2007）年3月

主任研究者 住田 孝之

目次

I	構成員名簿	1
II	平成 18 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 千住 寛	
	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に関する研究	13
	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 山本 一彦	
	制御性 CD8 T 細胞の解析と抗原特異的治療への応用に関する研究	15
	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科膠原病・リウマチ内科学 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	18
	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	
	IL-2 を介したヒト CD4 陽性 NKT 細胞クローンにおける Th2 サイトカイン産生に関する研究	22
	国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 山村 隆	

	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	26
	慶応義塾大学医学部内科 桑名 正隆	
	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	31
	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	34
	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	
IV	研究成果の刊行に関する一覧表	43
V	平成 18 年度班会議プログラム	51
VI	研究成果刊行物・別刷	53

I 平成 18 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	〃
	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
	千住 覚	熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学	助教授
	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	〃
	桑名 正隆	慶応義塾大学医学部内科学教室	〃
	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
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	辻 芳江	筑波大学人間総合科学等支援室医学支援室会計係 TEL 029-853-3017 FAX 029-853-6309	

II 平成 18 年度総括研究報告

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、動物モデルにおいては予防、治療効果が認められた。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と機構解析に関する研究が進展した。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。レトロウイルスを介して活性型 TGF- β 遺伝子を導入した CD4T 細胞による自己免疫疾患の予防・治療システムを確立した。新しい調節性 T 細胞候補として CD8Treg 細胞の解析が進展した。第二の NKT 細胞であるヒト TCRV α 7.2J α 33+NKT 細胞が Th2 サイトカイン産生へシフトしていることを明らかにし、この細胞が Th1 依存性自己免疫疾患の治療戦略として重要であることを示した。自己抗体誘導性関節炎では、IL-6, IL-17 を標的分子とした治療戦略が有効である事を明らかにした。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を確立し、病原性規定因子の同定も可能になった。自己免疫疾患の新規標的分子 (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。

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

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

千住 寛 熊本大学大学院医学研究科免疫識別学
助教授

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

桑名 正隆 慶應義塾大学医学部内科 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

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の確立をめざしている。

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関節リウマチ (RA) およびシェーグレン症候群 (SS) 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。

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。

SS においては、HLA-DR B1*0901 陽性 SS 患者における M3R 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、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、M3R 誘導唾液腺炎モデルマウスを作成し、CII、GPI、M3R 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、一つのアナログペプチド APL6

(GKPGIAAFKGEQGPKG, AA262G→A) が関節炎を有意に治療すること、さらに、二つのアナログペプチド APL6 と APL7 (GKPGIAGFAGEQGPKG, AA264K→A) が関節炎を有意に予防することを明らかにしてきた。GPI 誘導関節炎モデルでは、アナログペプチドの一つの候補

IWYINCFCETHAML (AA332G→V) を発見した。M3R 免疫マウスにおいて唾液腺炎を作成することに成功した。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 に応用する予定である。

千住班員は、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あるいは発症後に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。本年度は、ES-DC に発現させた TRAIL と Treg 細胞の増殖の関係について、より詳細に解析を行った。その結果、(1) EAE 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。(2) 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 発症抑制効果が観察された。(3) Ii-MOG + TRAIL を発現する ES-DC を投与され、MOG 誘導性 EAE の発症が抑制されたマウスでは、脊髄における Foxp3⁺細胞の増加が観察された。(4) TRAIL を発現する ES-DC は、*in vitro* において Treg 細胞の増殖を増強し、さらに抗 TRAIL 阻害抗体により、この増強が解除された。以上の研究結果から、ES-DC による EAE の制御機構として CD4⁺CD25⁺ Treg 細胞が関与している事が判明した。また、MBP により EAE を発症したマウスに Ii-MOG + TRAIL 発現 ES-DC を投与したところ、EAE の症状が有意に抑制されたことから、このシステムは自己免疫疾患の治療にも有用であることを示唆している。

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、1) CIA モデルマウスの関節局所に集積した T 細胞の単細胞レベルの遺伝子解析を行い、IL-17、IL-17F を発現する Th17 の表現型の炎症性 T 細胞クローン AF17 と、Foxp3 を発現する制御性 T 細胞の表現型を持ったクローン AF25 それぞれを同定した。2) AF17 と AF25 は自己樹状細胞に対する自己反応性を示したが、どちらも II 型コラーゲンに対する特異性を示さなかった。3) 骨髄細胞に TCR 遺伝子を導入した骨髄キメラマウスを作製したところ、AF17-TCR の骨髄キメラマウスでは CIA が増悪し、AF25-TCR の骨髄キメラマウスでは CIA が軽減した。4) AF17-TCR と IL-17 を共に遺伝子導入した CD4 陽性 T 細胞は関節炎の増悪を、AF25-TCR と Foxp3 遺伝子を CD4 陽性 T 細胞に共導入することにより強い関節炎の抑制効果を示した。以上の基盤研究の成果から、炎症局所の制御性 T 細胞の遺伝子発現情報に基づいて制御性 T 細胞を骨髄または末梢 T 細胞上に再構築することで、有効な関節炎の治療につながる可能性を示した。

上阪班員は、新しい Treg サブセットである CD8 Treg に注目し、その抑制機能について検討し、自己免疫病治療への応用を目的とした。本年度は、近年報告されている 3 つのタイプの CD8 Treg (CD8+CD122⁺ Treg, CD8+CD28⁻ Treg, anti-4-1BB/polyIC/抗原で誘導される CD8 Treg) の抑制機能について解析した。その結果、1) WT B6 マウスの CD8+CD122⁺細胞は *in vitro* において CD4 T

細胞の増殖を CD4 T 細胞に弱い TCR 刺激を与えた場合のみ抑制した。2) CD8+CD28⁻細胞はそのような弱い刺激下においても CD4 T 細胞を抑制しなかった。3) Anti-4-1BB/polyIC/OVA で誘導した OVA 特異的 CD8 T 細胞も CD4 T 細胞を弱い抗原刺激をした場合のみ抑制した。4) OT-I TCR トランスジェニックマウスには CD8+CD122⁺細胞は WT B6 と比較しごく少数しか存在しなかったが、anti-IL-2/IL-2 複合体の投与により増加させることができた。in vivo では有効な CD4 抑制はみられなかった。以上の研究成果より、CD8 Treg による in vitro における CD4 T 細胞の抑制は、TCR 刺激が弱い場合のみにみられ、強力な抑制活性と言えるものではなかった。今後も、作用機序の解明と治療プロトコルの検討を行っていく。

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 の予防・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。今後は、ヒトへの臨床応用を考慮し、レトロウイルスより安全性の高い遺伝子導入方法を模索する。

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。作年度までに、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。さらに、マウス TCRV α 19J α 33+NKT 細胞が IL-10 を介して EAE を抑制する調節性 T 細胞として機能していることを明らかにしてきた。本年度は、ヒト CD4+NKT 細胞株を樹立し Th2 サイトカイン産生能について、さらに、BALB/c マウスの NKT 細胞についても Th2 サイトカイン産生について検討した。その結果、1) CD4+NKT 細胞株は IL-2 を介して主に IL-5 を産生することができること、2) in vivo においても NKT 細胞が IL-2 存在下で IL-5 などの Th2 サイトカインを産生すること、3) IL-2 β 受容体を介していること、を明らかにしてきた。この研究

成果から、NKT 細胞が Th2 編倚を誘導する事ができることが判明し、Th1 細胞が病因と成っている一部の自己免疫疾患の治療ターゲットとなることが期待される。

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事を目的とした。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 Dsg3 グレイン 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 を免疫して作成した。昨年度は、Dsg3 反応性 T 細胞 15 株を樹立し、Dsg3⁻B 細胞とともに Rag2⁻マウスへ移植することにより、その in vivo における病原性を評価する系を確立した。本年度はさらに 5 株を樹立し、T 細胞株を合計 20 株とした (病原性あり 7 株、なし 13 株)。各 T 細胞株の特性 (T 細胞エピトープ、T 細胞受容体遺伝子、発現サイトカイン、ホーミング能) を検討した結果、1) IL-4 および IL-10 のみに病原性との関連性をみとめた ($P = 0.04$)。2) sCD40L 存在下での Dsg3⁻B 細胞の培養系に、IL-4 を添加すると、IL-10 に比べて培養上清中に産生される IgG 抗 Dsg3 抗体価が高かった。3) sIL-4R α 、sIL-10R α 、sIFN- γ R1 を発現する組み換えアデノウイルスを Rag2⁻マウスに投与後、Dsg3 反応性 T 細胞株と Dsg3⁻B 細胞を移植すると、対照ウイルス投与群にくらべて、sIL-4R α を発現させたマウスでのみ抗体価の上昇や PV フェノタイプの発現が抑制された。以上の結果から、PV モデルマウス病態において IL-4 が重要なことが示され、IL-4 を標的とする治療法の可能性を示した。本評価系は他の自己免疫疾患にも広く応用可能であり、将来治療標的となりうる T 細胞の病原性規定因子の同定に有用であると考えられる。

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。昨年までに、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、IL-6 と IL-17 に注目して in vivo におけるサイトカイン抑制による治療効果を検討した。その結果、1) IL-6 や IL-17 が関節炎発症に重要であること、2) 抗 IL-6 受容体抗体は TH17 細胞の分化を抑制すること、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となるサイトカインを決定する。

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。5) 遺伝子導入発現システムにより、スプライスバリエントが実際に蛋白として発現しうることを証明した。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 バリエント発現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。

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 細胞の制御と免疫難病の治療、ES-DC 細胞を用いた遺伝子操作による Treg 細胞を介した自己免疫疾患の制御、抗原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、新規分子や新たなサイトカイン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。関節リウマチ(RA)およびシェーグレン症候群(SS)において、T細胞が認識する自己抗原のT細胞エпит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。本研究では、それぞれの動物モデルにおいて、タイプIIコラーゲン(CII)、GPI、M3RのT細胞エピトープ、アナログペプチドをin vitroで選定した。さらに、CII誘導関節炎モデル(CIA)においては、1つのアナログペプチド(CII AA262G→A)が関節炎抑制効果を、2つのアナログペプチド(CII AA262G→A, AA264K→A)が関節炎抑制効果を示した。以上の結果から、免疫難病の抗原特異的治療戦略が動物モデルの解析からヒトにおけるclinical trialのステップに進むことが期待される。

A. 研究目的

免疫難病である関節リウマチ(RA)およびシェーグレン症候群(SS)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) タイプIIコラーゲン: DBA/1マウスにタイプIIコラーゲン(CII)を免疫して作成したコラーゲン誘導関節炎(CIA)モデルマウスを作成する。in vitroで選定したCIIのT細胞エピトープ(GKPGIAGFKGEQGPKG, AA256-271)のアナログペプチド APL4-7(AA262G→D, K, A, 264K→A)を day24,26,28 に総量1mg 腹腔内投与することにより in vivoにおける関節炎への治療効果を検討した。
- 2) 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。リコンビナントヒト GPI 蛋白を DBA/1 マウスに免疫することにより、GPI 誘導関節炎モデルを作成した。GPI 蛋白の中で、DBA/1 マウス(I-A^q)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25種類合成して、IFN- γ , IL-17を指標とした細胞内サイトカイン染色法にてT細胞エピトープを決定する。さらに、アナログペプチドをin vitroで選定する。
- 3) 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

(KRTVPPGECFIQFLSEPTITFTGTAI, AA212-236) 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)であり、そのアナログペプチドはVPPGECFKQFLSEPTとVPPGECFIAFLSEPTであることを明らかにしてきた。本研究では、M3Rの細胞外第二ドメインをコードする25マーの合成アミノ酸を100ugCFA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。そのモデルマウスを用いて、アナログペプチドのワクチネーションによる唾液腺炎の制御、抗M3R抗体産生の抑制を試みる。

C. 結果

- 1) CIAモデルマウスに投与したアナログペプチドの一つ APL6 (GKPGIAAFKGEQGPKG, AA262G→A) により、関節炎を有意に抑制することができた(図1)。また、APL6とAPL7 (GKPGIAGFAGEQGPKG, AA264K→A) により、関節炎を有意に予防することができた(図2)。
- 2) 25種類の合成ペプチドをスクリーニングし

た結果、YINCFGCETHAMLPYDQYLH (AA327-346) と

DASTNGLINFIKQQREARVQ

(AA539-558)がT細胞エピトープとして機能していることが判明した。さらに、それぞれ4種類の合成アミノ酸による詳細な解析から、

IWYINCFGCETHAML(AA325-339) と GLINFIKQQREARVQ8AA544-558)がドミナントなT細胞エピトープであることを明らかにした(図3)。さらに、AA325-339に関しては、20種類のアナログペプチドを作成してin vitroでIL-17産生を抑制するペプチドをスクリーニングしたところ、AA332G→Vがアナログペプチドの候補として選定された(図4)。

3)B6マウス(H-2b)にM3R細胞外第2ドメインを免疫することにより、抗M3R抗体の産生、唾液腺の分泌低下、唾液腺上皮細胞への免疫グロブリン沈着が認められた。現在、H-2bのアンカーモチーフから、M3R(AA215-229)のT細胞エピトープを決定し、in vitroにおけるアナログペプチドの選定を行っている。

D. 考察と結論

本研究では、代表的免疫難病であるRA、SSにおいて、臓器浸潤T細胞が認識する分子ターゲット(タイプIIコラーゲン、GPI, M3R)を選定し、T細胞エピトープの決定、アナログペプチドの選定を行ってきた。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、コラーゲンタイプII誘導関節炎(CIA)モデルを用いてアナログペプチドによる関節炎抑制効果、及び予防効果について検討したところ、一部のアナログペプチドにより関節炎を有意に抑制、予防することが可能であった。

今後、免疫難病において、抗原分子を標的とした抗原特異的制御戦略の有用性についてclinical trailで検討する事が望まれる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Wakamatsu, E., Nakamura, Y., Matsumoto, I., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T. DNA microarray analysis of labial salivary glands from patients with Sjogren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis. (in press)*
2. Yoshioka, H., Ito, S., Handa, S., Tomiha, S., Kose, K., Haishi, T., Tsutsumi, A., and Sumida, T. Low-field compact magnetic resonance imaging system for the hand and wrist in rheumatoid arthritis. *J. Magn. Res. Ima. 23:370-376, 2006.*
3. Wakamatsu, E., Matsumoto, I., Naito, Y., Goto, D., Mamura, M., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T.

Overexpression of phosphorylated STAT-1a in the labial salivary glands from patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum 54:3476-3484, 2006.*

4. Kori, Y., Matsumoto, I., Zhang, H., Yasukochi, T., Hayashi, T., Iwanami, K., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A. and Sumida, T. Characterization of Th1/Th2 type, glucose-6-phosphate isomerase reactive T cells in the generation of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis. 65: 968-969, 2006.*
5. 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.*
6. Suzuki, E., Tsutsumi, A., Sugihara, M., Mamura, M., Goto, D., Matsumoto, I., Ito, S., Ikeda, K., Ochiai, N., Sato, Y., and Sumida, T. Expression of TNF- α , tristetraprolin, T-cell intracellular antigen-1 and Hu antigen R genes in synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Med. 18: 273-278, 2006.*
7. 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. 17:801-809, 2006.*
8. 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*

図 1

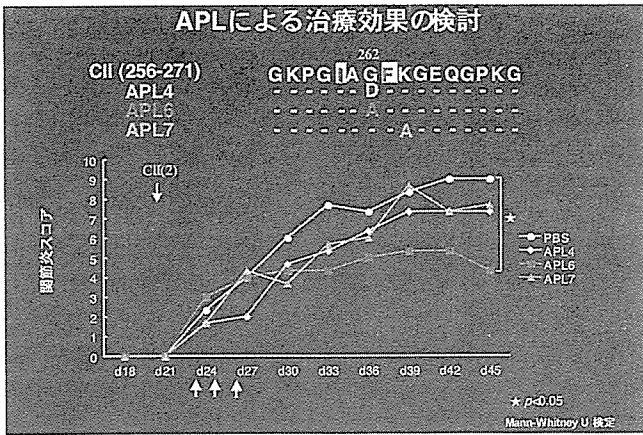


図 3

Peptide 325-339 is the dominant T cell epitope

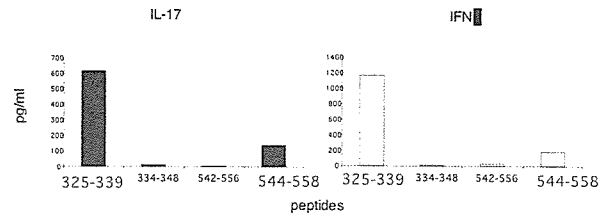


図 2

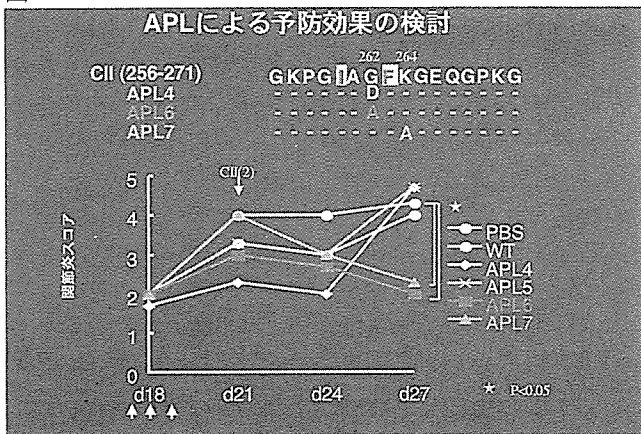
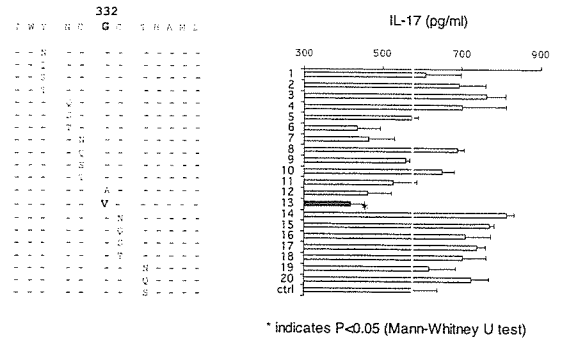


図 4

GPI AA332G→V should be a candidate for APL of GPI



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	千住 覚	熊本大学大学院医学薬学研究部	免疫識別学	助教授
研究協力者	平田真哉	熊本大学大学院医学薬学研究部	免疫識別学	助手
研究協力者	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た後に、*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、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。この現象には、免疫抑制能を有する CD4⁺CD25⁺制御性 T (Treg) 細胞の誘導が関与し、さらに、ES-DC に発現させた TRAIL は、Treg 細胞の増殖を増強す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。我々は、従来の研究により、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。本年度は、ES-DC に発現させた TRAIL と Treg 細胞の増殖の関係について、より詳細に解析を行った。

B. 研究方法

MHC クラス II 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、ヒトインバリエント鎖の 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 の遺伝子発現ベクターを作製した。これらの遺伝子発現ベクターには、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。これらの遺伝子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、その後に 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、遺伝子改変 ES-DC による EAE の発症予防効果を検討した。さらに、MBP で EAE を発症した後に、遺伝子改変 ES-DC を投与して、治療効果についても検討した。

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ために、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) の関与を検討するために、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、同様に遺伝子改変 ES-DC を投与後に MBP 蛋白質で EAE を誘導して、その効果を検討した。また、Treg 細胞のマウス個体内での集積の有無を検討するために、遺伝子改変 ES-DC を投与後に MOG ペプチドで EAE を誘導し、ES-DC 未投与群のマウスでは EAE の発症が観察される EAE 誘導後 1 1 日目に、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、その 3H -thymidine の取込みを定量して調べた。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 の発現を増強し、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 投与群と比較して、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。また、MBP の免疫により EAE を発症したマウスに ES-DC を投与したところ、ES-DC 未投与群や Ii-MOG のみを導入した ES-DC 投与群、無関係な抗原である OVA+TRAIL 遺伝子発現 ES-DC 投与群と比較して、Ii-MOG + TRAIL 発現 ES-DC を投与した群では EAE の症状が有意に抑制され、遺伝子改変 ES-DC による治療効果が観察された。

この抑制効果のメカニズムについて、 $CD4^+CD25^+$ Treg 細胞の関与を検討するために、抗 CD25 抗体を投与して体内の 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 の発症抑制効果が観察されなくなった。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、その脊髄における Foxp3 陽性細胞を免疫組織化学的に解析したところ、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。

さらに、*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。また、この現象は、抗 TRAIL 阻害抗体により有意に抑制された。さらに、マウス脾臓細胞やマクロファージを 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際に観察される Treg 細胞の増殖反応は、抗 TRAIL 抗体の存在下に著明に抑制された。

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。

さらに、以下の観察は、この制御能を有する T 細胞が CD4⁺CD25⁺ Treg 細胞である可能性を強く支持した。(1)EAE 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。(2)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 発症抑制効果が観察された。(3)Ii-MOG + TRAIL を発現する ES-DC を投与され、MOG 誘導性 EAE の発症が抑制されたマウスでは、脊髄における Foxp3⁺細胞の増加が観察された。(4) TRAIL を発現する ES-DC は、in vitro において Treg 細胞の増殖を増強し、さらに抗 TRAIL 阻害抗体により、この増強が解除された。

また、MBP により EAE を発症したマウスに Ii-MOG + TRAIL 発現 ES-DC を投与したところ、EAE の症状が有意に抑制されたことは、この方法が自己免疫疾患の治療に有用である可能性を示唆すると考えられた。

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

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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. *J Immunol.* 178: 918-925, 2007.
- 2) Ohnishi, Y., Tsutsumi, A., Matsumoto, I., Goto, D., Ito, S., Kuwana, M., Uemura, Y., Nishimura Y., and Sumida T. : Altered peptide ligands control type II collagen-reactive T cells from rheumatoid arthritis patients. *Mod. Rheumatol.* 16: 226-228, 2006.
- 3) Soejima H, Irie A, Fukunaga T, Sugamura K, Kojima S, Sakamoto T, Yoshimura M, Kishikawa H, Nishimura Y., Ogawa H.: Elevated plasma osteopontin levels were associated with osteopontin expression of CD4(+) T cells in patients with unstable angina. *Circulation J.* 70: 851-856, 2006.
- 4) 千住 覚, 西村泰治, 「T 細胞応答の抑制性制御」, 第 1 3 章 免疫応答と免疫病態の統合的分子理解に向けて (仮称) (南山堂, 東京), 印刷中
- 5) 千住 覚, 西村泰治, 「MHC とは何か」, アニテックス 2007 年 3 月号「動物 MHC」(研成社, 東京), 印刷中

2. 学会発表

- 1) Prevention of EAE through induction of Treg cells by transfer of ES-DC-TRAIL/MOG. Shinya Hirata, Satoru Senju, Hidetake Matsuyoshi, Daiki Fukuma and Yasuharu Nishimura. The 8th International Congress of Neuroimmunology. (Nagoya), Oct. 16-19 2006. (Oral presentation, Travel award 受賞)
- 2) The transfer of ES-DC expressing MOG peptide along with TRAIL prevents MBP induced-EAE via induction of regulatory T cells: 平田真哉, 千住 覚, 松吉秀武, 福岡大喜, 西村泰治, 第 36 回日本免疫学会学術集会、12 月 11 日～13 日 (大阪)

H. 知的財産権の出願・登録状況

本年度の研究に関連したものはない。

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
に関する研究

分担研究者 山本 一彦 東京大学医学部アレルギーリウマチ内科 教授
研究協力者 藤尾 圭志 東京大学医学部アレルギーリウマチ内科 助手

研究要旨

関節炎などの炎症部位には T 細胞の集積が知られている。T 細胞は抗原特異的免疫応答を規定する重要な免疫担当細胞であり、炎症局所に集積する T 細胞の解析は関節炎の治療法の開発に重要と考えられる。しかし炎症局所の T 細胞のクローナルな増殖、表現型と抗原特異性の関連は良く分かっていない。今回分担研究者らはマウスコラーゲン誘発性関節炎（CIA）局所に集積する T 細胞の単一細胞レベルの遺伝子発現を解析する手法の開発に成功した。その結果関節炎局所において IL-17、IL-17F を発現する Th17 の表現型の炎症性 T 細胞クローン AF17 と、Foxp3 を発現する制御性 T 細胞の表現型を持ったクローン AF25 それぞれを同定した。AF17 と AF25 は自己樹状細胞に対する自己反応性を示したが、どちらも II 型コラーゲンに対する特異性を示さなかった。骨髓細胞に TCR 遺伝子を導入した骨髓キメラマウスを作製したところ、AF17-TCR の骨髓キメラマウスでは CIA が増悪し、AF25-TCR の骨髓キメラマウスでは CIA が軽減した。このことは AF17 および AF25 が関節炎に深く関与していることを示唆した。AF25-TCR と Foxp3 遺伝子を CD4 陽性 T 細胞に共導入することにより炎症局所の制御性 T 細胞を再構築したところ、再構築制御性 T 細胞は強い関節炎の抑制効果を示した。よって炎症局所の制御性 T 細胞の遺伝子発現情報に基づいて制御性 T 細胞を骨髓または末梢 T 細胞上に再構築することで、有効な関節炎の治療につながる可能性が示された。

A.研究目的

関節炎を初めとする炎症部位においてはクローナルに増殖した T 細胞の集積が報告されている。さらに炎症局所には炎症性 T 細胞と制御性 T 細胞が混在していることが報告されている。またマウスを II 型コラーゲンで免疫した場合に生ずる関節炎局所においても II 型コラーゲンに特異的でない T 細胞の集積が示唆されており、炎症局所における T 細胞の抗原特異性も明らかでない。従来は炎症局所の T 細胞集団全体を T 細胞レセプター (TCR) β 鎖を手がかりに解析されてきたが、この手法では T 細胞クローン毎の発現遺伝子の解析や、TCR の α 鎖の同定は困難であった。これらの点を明らかにするためには単一 T 細胞レベルでの発現解析が必要と考えられる。今回の研究目的は炎症局所における単一 T 細胞の発現遺伝子解析により T 細胞から見た炎症の詳細な解析を目的とする。また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。我々は炎症局所に集積している制御性 T 細胞の T 細胞レセプターを同定し、これを末梢 T 細胞に導入するこ

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 細胞の中で、自己反応性 T 細胞の指標とされている CD5 と TCR 高発現の細胞をシングルセルソーティングで分離後に cDNA を合成した。cDNA から PCR を行うことで単一細胞で使用されている TCR α 鎖・ β 鎖を同定した。TCR を同定した細胞に関して制御性 T 細胞（regulatory T 細胞）の機能を規定する Foxp3 発現及び関節炎に關与する IL-17A 発現を検討した。Foxp3 または IL-17A 発現が同定できたクローンの 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、このベクターを遺伝子導入した骨髓細胞を移植することにより TCR の骨髓キメラマウスを作製した。さらにマウス脾臓 CD4 陽性 T 細胞に TCR 遺伝子に加え Foxp3 遺伝子または IL-17A 遺伝子を共導入し、炎症局所に集積した制御性 T 細胞を再構築した。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)

すべての研究は各施設の遺伝子倫理委員会の審査を受け、承認を受けた研究計画に則って実施された。

C. 研究結果

今回の手法により炎症局所に集積している T 細胞の 50-60%において TCR α 鎖の同定が可能であった。DBA1 マウス CIA の炎症局所で集積し Foxp3 を発現し制御性 T 細胞の表現型を示すクローン AF25 及び IL-17A を発現する Th17 T 細胞の表現型を示すクローン AF17 を同定した。AF25 と AF17 それぞれに属するシングルセルクローンは相互に異なる表現形を示した。AF25, AF17 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。同定した TCR を骨髄細胞に遺伝子導入後に骨髄移植して作製した骨髄キメラマウスでは、AF17-TCR を発現した場合関節炎の増悪を、AF25-TCR を発現した場合関節炎の軽減を示した。また AF17-TCR と IL-17 を共導入した CD4 陽性 T 細胞は関節炎の増悪効果を示した。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 β , IL-17A の発現を抑制し、骨破壊も抑制した。

D. 考察

関節炎局所において制御性 T 細胞の表現型を示すクローンと Th17 の表現型を示すクローンが得られ、シングルセルレベルでは相互の表現型は独立していた。このことはマウス関節炎局所における制御性 T 細胞と Th17 T 細胞が異なるメカニズムで集積していることを示唆した。これらのクローンの TCR を発現したマウスは AF17-TCR では関節炎の増悪を、AF25-TCR では関節炎の軽減を示したことから、炎症局所に集積している T 細胞は疾患惹起抗原への特異性を示さなくても関節炎と密接に関連していることが示された。

E. 結論

関節炎局所からシングルセルレベルで TCR を同定する手法の開発により、炎症局所に集積する T 細胞の詳細な解析が可能となったと考えられた。また炎症局所に集積している CD4 陽性細胞または制御性 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

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shoda H, Fujio K, Yamaguchi Y, Okamoto A, Sawada T, Kochi Y, Yamamoto K. Interactions between IL-32 and tumor necrosis factor alpha contribute to the exacerbation of immune-inflammatory diseases. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(6):R166.
- 2) Fujio K, Okamoto A, Araki Y, Shoda H, Tahara H, Tsuno NH, Takahashi K, Kitamura T, Yamamoto K. Gene therapy of arthritis with TCR isolated from the inflamed paw. *J Immunol*. 2006 ;177(11):8140-8147.
- 3) Yamamoto K, Okamoto A, Fujio K. Antigen-specific immunotherapy for autoimmune diseases. *Expert Opin. Biol. Ther*. 2007; in press.
- 4) Fujio K, Okamura T, Okamoto A, Yamamoto K. T cell receptor gene therapy for autoimmune disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; in press.

2. 学会発表

- 1) Fujio K, Okamoto A, Yasuto A, Shoda H, Tahara H, Yamamoto K. Gene therapy of arthritis with TCR accumulated in the inflammation site. *Modern Rheumatology* 2005,16 supplement: 119.
- 2) Fujio K, Okamoto A, Yasuto A, Shoda H, Tahara H, Yamamoto K. Gene therapy of arthritis with TCR from a cell in the inflammatory joints. *Autoimmunity Reviews* 2006, Abstracts of 5th international congress on autoimmunity:66

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

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

制御性 CD8 T 細胞の解析と抗原特異的治療への応用に関する研究

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膠原病・リウマチ内科学 助教授
研究協力者 種田 貴徳 理化学研究所・RCAI・自己免疫病戦略研究ユニット 研究員

研究要旨 【目的】我々は制御性 CD4 T 細胞 (CD4 Treg) を用いてマウス II 型コラーゲン誘導性関節炎 (CIA) をモデルとして、Foxp3 を遺伝子導入した II 型コラーゲン特異的 T 細胞を用いて、CD4 Treg による治療の有効性を示すと同時に、また限界も明らかにしてきた。近年、CD8 Treg の存在が報告されており、その制御機構は CD4 Treg とは異なることが推測されることから、このような CD8 Treg が自己免疫病治療に利用できるかどうか、CD8 Treg の性質解析を行った。【方法】近年報告されている 3 つのタイプの CD8 Treg を選択した。これらは 1) CD8+CD122+ Treg, 2) CD8+CD28(-) Treg, そして 3) anti-4-1BB/polyIC/抗原で誘導される CD8 Treg である。これらの CD8 Treg の in vitro および in vivo における CD4 T 細胞の抑制能を検討した。また、抗原特異的 CD8 Treg の作用を検討するために OT-I TCR トランスジェニックマウスを用いても解析した。【結果】WT B6 マウスの CD8+CD122+細胞は in vitro において CD4 T 細胞の増殖を CD4 T 細胞に弱い TCR 刺激を与えた場合のみ抑制した。一方、CD8+CD28(-)細胞はそのような弱い刺激下においても CD4 T 細胞を抑制しなかった。Anti-4-1BB/polyIC/OVA で誘導した OVA 特異的 CD8 T 細胞も CD4 T 細胞を弱い抗原刺激をした場合のみ抑制した。OT-I マウスには CD8+CD122+細胞は WT B6 と比較しごく少数しか存在しなかったが、anti-IL-2/IL-2 複合体の投与により増加させることができた。in vivo では有効な CD4 抑制はみられなかった。【結論】CD8 Treg による in vitro における CD4 T 細胞の抑制は、TCR 刺激が弱い場合のみにみられ、強力な抑制活性と言えるものではなかった。しかしながら、CD8 Treg の作用機序が不明な現在、CD8 Treg による治療応用を不可と結論づけるには早計である。今後も、作用機序の解明と治療プロトコルの検討を行ってきたい。

A. 研究目的

CD4+CD25+ Treg は正常マウスからこのポピュレーションを除去すると多臓器性自己免疫病を呈することから、正常マウスにおける免疫恒常性の維持の役割を担っている細胞集団として注目されると共に、この細胞を使って免疫恒常性が破綻した自己免疫疾患を治療できないかという試みがなされている。現状では、抗原特異的 CD4+CD25+ Treg を誘導する有効な手法がなく、抗原特異性のないポリクローナルな細胞集団としての CD4+CD25+ Treg が試されてきた。我々は、CII 特異的 CD4 T 細胞に Foxp3 をレトロウイルスを用いて遺伝子導入することにより、抗原特異的 CD4+ Treg を作りだし、CIA 治療への応用を試みてきた。CII 特異的 Foxp3+CD4+ Treg は CIA の発症前に投

与するとその後の CIA の発症を非常に効率的に抑制した。しかしながら、発症後の投与は必ずしも十分な CIA 抑制を示さなかった。近年、CD8 においても自己免疫病をコントロールしていると考えられる Treg 集団が存在するという報告が複数出てきている。そのような CD8 Treg はとは、1) CD8+CD122+、あるいは 2) CD8+CD28(-) という表現型で区別される細胞集団、および 3) anti-4-1BB/poly(IC)/antigen で誘導される抗原特異的 CD8 細胞である。このような CD8 Treg が自己免疫病を誘発している CD4 T 細胞を抑制できるかどうかは興味深い。そこで今回は CD8 Treg が本当に CD4 を抑制できるかどうかを in vitro, in vivo で調べてみた。また、抗原特異的 CD8 Treg のモデルとして、OT-I TCR Tg でもこのような CD8