

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19年度 総括・分担研究報告書

平成20（2008）年3月

主任研究者 住田 孝之

目次

I	構成員名簿	1
II	平成19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	
	ES細胞を用いた遺伝子改変ヒト樹状細胞の作製	10
	熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学 千住 覚	
	自己抗原に関連するT細胞応答のシングルセル解析を用いた研究	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	
	toll様受容体刺激調節因子を標的とした関節炎治療に関する研究	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	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	
	実験的自己免疫性脳脊髄炎における腸内フローラの役割に関する研究	20
	国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 山村 隆	

	免疫性血小板減少性紫斑病における <i>Helicobacter pylori</i> 除菌効果発現機序に関する研究	24
	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	29
	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	31
	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	37
V	平成 19 年度班会議プログラム	47
VI	研究成果刊行物・別刷	49

I 平成 19 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分野	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	〃
	千住 覚	熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学分野	准教授
	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	准教授
	松本 功 桑名 正隆	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分野 慶應義塾大学医学部内科学教室	准教授 准教授
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分野 〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1 TEL 029-853-3221 FAX 029-853-3222 e-mail : riumachi@md.tsukuba.ac.jp	
経理事務 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外部資金会計係長 TEL 029-853-3033 FAX 029-853-6309 e-mail : hogawa@sec.tsukuba.ac.jp	

II 平成 19 年度総括研究報告

平成 19 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

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）

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。ヒト ES 細胞から DC 細胞への分化法および遺伝子導入システムを確立した。T 細胞の抗原受容体を再構築する技術により関節炎局所に集積した T 細胞の機能解析方法を確立した。レトロウイルスを介して活性型 TGF- β 遺伝子を抗原特異的 T 細胞に遺伝子導入し自己免疫疾患の予防・治療システムを確立した。自然免疫に関与する Toll 様受容体の制御分子を標的とした治療戦略が進展した。抗生物質投与による腸内フローラの変化が腸管上皮や抗原提示細胞などを介して宿主の腸管免疫システムを修飾し実験的アレルギー性脳脊髄炎の制御に係わっている事が判明した。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。免疫性血小板減少性紫斑病においては、Fc γ 受容体をターゲットとした治療法の可能性が指摘された。T 細胞分化における転写因子（RasGRP1）を新規分子標的とした診断・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 覚 熊本大学大学院医学研究科免疫識別学
准教授
- 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 准教授
- 桑名 正隆 慶應義塾大学医学部内科 准教授
- 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 准教授

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 年間に研究を進展させてきた。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 モデルマウスに投与したアナログペプチドの一つ APL6 (GKPGIAAFKGEQGPKG, AA256-271) により、関節炎を有意に抑制することができた。また、APL6 および APL7 (GKPGIAGFAGEQGPKG) により関節炎を有意に予防することができた。GPI においては、IWYINCFGCETHAML (AA325-339) と GLINFIKQQREARVQ (AA544-558) 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。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、AA329N→S (APL6)、AA329N→T (APL7)、AA332G→A (APL12)、AA332G→V (APL13) がアナログペプチドの候補として選定された。関節炎マウスにおいて、APL12 が有意な治療効果を呈した。

一方、M3R 誘導唾液腺炎モデルマウスにおいては、B6 マウス (H-2b) に M3R 細胞外第 2 ドメインペプチド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。一方、リコンビナント蛋白により T 細胞浸潤を伴う唾液腺モデルを作製することができた。今後、アナログペプチドの選定と治療研究を進める。

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。昨年度までに、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に成功している。本年度は、ES-DC の将来の臨床応用を目指して、ヒト ES 細胞から ES-DC

の分化を誘導する培養プロトコールの開発を行った。さらに、ES 細胞の段階で遺伝子導入を行い、遺伝子導入 ES 細胞から ES-DC への分化誘導を行うことにより、ウイルスベクターを用いることなくヒトの遺伝子改変樹状細胞を作製できるかどうか検討した。その結果、以下の 3 段階の手順によりヒト ES 細胞から ES-DC を分化誘導できることを見出した。1) まず、未分化状態のヒト ES 細胞をマイトマイシン C 処理を行った OP9 フィーダー細胞上へ播種し、分化誘導培養を開始する。ES 細胞の分化の進行を見ながら、3 日に一度培養液を交換しつつ、通常 14-18 日間の培養を継続する。2) 第 1 段階の培養の結果として出現する非付着性の細胞を、新たに調整した OP9 フィーダー細胞上へ播種する。この段階では、培養液に GM-CSF と M-CSF を添加する。その結果、浮遊性あるいは弱付着性の球形の細胞が出現し、徐々にその数が増加する。第 2 段階の培養は、ES 細胞由来の浮遊細胞の数と OP9 細胞の状態により、7-10 日間継続する。3) 第 2 段階の培養の結果出現した ES 細胞由来の浮遊細胞をピペティング操作により回収し、GM-CSF と IL-4 を含む培養液に浮遊させて細菌培養用のディッシュへ播種する。浮遊細胞の形態は、第 2 段階の後半から第 3 段階を通じて、球形から突起を有する不規則な形態へと徐々に変化する。第 3 段階開始後、2-4 日目に成熟誘導因子として、TNF- α と LPS を加えて ES-DC の成熟を促した。

以上の培養法により、樹状細胞としての形態、細胞表面分子 (CD80、CD86、CD40、HLA-DR)、およびアロ T 細胞への一次 MLR 刺激活性と、CD4⁺T 細胞クローンへの蛋白質ならびにペプチド抗原の提示機能を有する ES-DC を分化誘導できることを確認できた。さらに、HLA-DR により GAD65 抗原ペプチドを提示するベクターを導入した ES 細胞に由来する ES-DC は、GAD65 抗原の非存在下に SA32.5 の増殖応答を誘導できた。免疫抑制分子 (PD-L1) を強制発現させた ES-DC では、未成熟 ES-DC によるアロ T 細胞増殖刺激活性が抑制されることも明らかにすることができた。本研究により、ウイルスベクターを使用することなく、電気穿孔法によりヒトの樹状細胞の遺伝子を改変する方法が確立された。今後、樹状細胞療法の実用化をめざす上で大きな意義を有する研究成果と考えられる。

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、II型コラーゲンで免疫したマウスのリンパ節細胞を試験管内でII型コラーゲン存在下に培養し、分裂するT細胞のシングルセル解析を行った。1) ICOS 高発現細胞群では Foxp3 を発現するクローンが優位で、ICOS 低発現細胞群では IL-17 を発現するクローンが優位となっていた。2) 自己抗原に対する免疫応答では制御性T細胞も強い増殖を示し、エフェクターT細胞と相互作用していると考えられた。3)最も優位な集積を認めた Foxp3 を発現するクローン、IL-17 を発現するクローンとも同定した TCR の脾臓 CD4 陽性 T細胞上への再構築では明らかな II型コラーゲンへの反応性を認めなかった。以上の基盤研究の成果から、シングルセル解析法は従来法と比較して T細胞クローンの多様性をより正確に捉えることが可能であることが判明し、この新規技術により免疫難病の T細胞応答の解析が進み TCR を遺伝子導入した治療戦略の開発が期待される。

上阪班員は、自然免疫系受容体 (toll 様受容体) の刺激調節分子である triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) と自己免疫疾患との関連を明らかにすることを目的とした。1) RA および変形性関節炎 (OA) 患者の滑液中における可溶性 TREM-1 濃度を ELISA で測定した。2) RA 患者および CIA 由来滑膜細胞上における TREM-1 の発現を FACS で解析した。3) 滑膜細胞をアゴニスト TREM-1 抗体で刺激し、TNF α の産生を ELISA で測定した。4) 可溶性 TREM-1-Ig 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター

(AxCA-sTREM-1-Ig) を作製し、マウス CIA の尾静脈に投与した。関節炎への影響を肉眼的所見、腫脹幅、病理組織学的所見から評価した。また、抗原特異的な T細胞増殖および抗体価をそれぞれ測定した。結果として、1) 可溶性 TREM-1 の濃度は RA 患者由来滑液中で有意に高かった。2) RA 患者の CD14+細胞および CIA の CD11b+細胞の滑膜細胞において TREM-1 の発現が認められた。3) 滑膜細胞をアゴニスト TREM-1 抗体で刺激すると、TNF α の産生が増強された。4) AxCA-sTREM-1-Ig を投与したマウスでは、関節炎スコア、腫脹幅、病理組織学的所見がコントロールと比較して著明に抑制された。一方、AxCA-sTREM-1-Ig の投与は、抗原特異的 T細胞増殖および血清中の抗体価 (IgG1, IgG2a, IgG2b) に影響を与えなかった。

以上の結果から、TREM-1 が関節炎の病態進展に重要な役割を果たしていることが考えられた。TREM-1 は炎症性サイトカインや細胞表面分子の発現を誘導するため、TREM-1 阻害による関節炎の治療効果は、幅広い炎症性分子の抑制を介している

ことが示唆された。免疫難病の新規治療標的として期待されよう。

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てきた。本年度は、これまで Th1 病と認識されてきた関節リウマチや II型コラーゲン誘導関節炎モデルマウス (CIA) が実は Th17 病であるとの報告が相次いだため、その Th17 分化に TGF- β が悪影響を及ぼす可能性がないかどうかについて in-vitro および in-vivo (CIA) 実験系を用いて解析した。その結果、1) 少なくとも in-vivo において活性型 TGF- β 産生細胞が他の T細胞に働き Th17 分化を促進して pro-inflammatory に働く可能性は否定された。また、最近ヒトにおいては、TGF- β は Th17 分化に何ら寄与しないとの報告もあり、活性型 TGF- β を用いた遺伝子治療において Th17 病態を悪化させる可能性は否定的と考えられた。2) 予想に反して、CIA 罹患関節局所での主たる IL-17 産生細胞が $\gamma\delta$ T 細胞であることが判明し、CIA の系でも自然免疫の持つ役割が大きいことが示唆された。今後この IL-17 産生 $\gamma\delta$ T 細胞がどこからどのように刺激を受けホーミングしてくるのが分かれば病態の理解が深まり、新たな免疫制御物質の選択あるいは開発に有用な情報になると考えられた。本研究は、自己免疫疾患の抗原特異的な治療戦略を可能とした。ヒトへの臨床応用を考慮した場合、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ことが今後の課題となる。

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研究を進めてきた。MS は、中枢神経に炎症性脱髄を引き起こす難治性自己免疫疾患であり、その発症には、遺伝的素因と環境的素因が関係しているといわれている。後者のひとつである腸内フローラは、近年、種々の自己免疫疾患やアレルギー疾患との関連が指摘されている。また、一方で腸内微生物と宿主免疫との深い関係が近年明らかになってきた。そこで本年度は、多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を用いて、腸内フローラの変化が宿主に及ぼす免疫学的影響について検討した。その結果、1) 抗生物質投与により腸内フローラは著明に変化していることがわかった。2) 免疫学的には、抗生物質投与群では MLN 由来の T細胞の増殖能は有意に低下し、TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 などの炎症性サイトカインの産生は抑制され、抗炎症性サイトカインである IL-10 は有意に上昇して

いた。3)IL-17 も強く抑制されていた。4)抗生物質投与群では EAE が有意に軽症化していた(p<0.05)。5)抗生物質投与後の MLN 細胞をナイーブ B6 マウスに移入後に EAE を惹起したところ、EAE は抑制された。6) MLN 細胞を CD8+分画と CD8-分画に分離して移入すると、CD8+分画に抑制作用があり、in vitro で IL-17 産生を抑制することがわかった。以上の研究結果から、抗生物質投与による腸内フローラの変化が腸管上皮や抗原提示細胞などを介して宿主の腸管免疫システムを修飾し、さらに腸管膜リンパ節を介して全身の免疫システムに影響を及ぼしている可能性が示唆された。

桑名班員は、本研究では *H. pylori* 除菌療法前後の各種パラメータの変化を追跡することで、*H. pylori* 除菌が血小板数を増やす機序を明らかにすることを目的とした。研究結果として、1) *H. pylori* 陽性免疫性血小板減少性紫斑病(ITP)患者では単球/マクロファージの機能亢進がみられ、それらが除菌後に血小板増加と共に是正されることが明らかとなった。2)*H. pylori* 除菌後の抗血小板抗体産生と血小板回転の低下はいずれも単球の活性化抑制による結果と考えられた。したがって、*H. pylori* 感染が単球/マクロファージの Fcγ 受容体発現を変化させることで一義的に ITP の病態を促進する。3)*H. pylori* 陽性例にみられた単球活性化は刺激性 Fcγ 受容体 (FcγRI, FcγRIIA) の発現上昇と抑制性 Fcγ 受容体 (FcγRIIB) の発現低下による相対的な Fcγ 受容体シグナルバランスの活性化への偏倚によることが示された。以上の研究成果より、Fcγ 受容体シグナルの制御が ITP に対する新たな治療戦略となる可能性を指摘した。

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、それぞれのサイトカインに対する抗体を in vivo に投与し治療効果を検討した。その結果、1) 抗 IL-17 抗体を day 7 に投与することにより関節炎は有意に抑制された。2) 抗 IL-6 受容体抗体(MR16-1)を day 0 または day 3 に投与した群では GPI 誘導性関節炎の発症はほぼ完全に抑制され、day 8 に投与した群でも関節炎は減弱された。3)MR16-1 を day 0 または day 3 に投与した群では所属リンパ節中の T_H17 細胞への分化のみ著明に抑止され、その他の Th1、Th2、Treg 細胞分画には影響を与えなかった。4)MR16-1 投与群では抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の増殖が抑制され、抗 GPI

抗体産生の抑制効果も認められた。

以上の研究成果から、IL-6 が T_H17 を選択的に誘導することにより GPI 誘導性関節炎の発症に重要な役割を果たしていること、抗原特異的 CD4+細胞の増殖や自己抗体の産生誘導にも関わっている可能性が示唆された。IL-6 を標的とした免疫病制御の分子機構を明らかにする事ができたといえよう。

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 での機能的意義について検討してきた。本年度の研究成果として、以下のことを明らかにした。1) RNA レベルでは 17 種の新たなスプライス異常が認められた。2) スプライス異常を有する割合は SLE 患者において有意に高かった。3) 末梢血 T 細胞における正常 RasGRP1 蛋白の発現は、スプライス異常を有する患者において有意に低かった。4) T 細胞株(Jurkat 細胞)の検討からは TNF-α 刺激によりスプライス異常を呈する RasGRP1 mRNA 発現増加が認められた。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 バリエーション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、ヒト ES-DC 細胞を用いた DC 細胞への分化および遺伝子導入法の確立、自然免疫関連分子を標的と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 細胞を用いた自己免疫応答の制御、新規転写分子やサイトカインを標的とした自己抗体産生調節および自己免疫応答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。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) が関節炎治療効果を、2つのアナログペプチド(CII AA262G→A, AA264K→A)が関節炎予防効果を示した。GPI 免疫関節炎モデルマウスにおいては、APL12 が関節炎治療効果をしめした。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。さらに、day11,12,14 に総量 1mg 腹腔内投与することにより予防効果についても検討した。

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_g)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-g, 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。選定したアナログペプチドを用いて GPI 誘導関節炎モデルマウスにおける治療実験を行う。

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

(KRTVPPGECFIQFLSEPTITFGTAI, AA212-236) あるいはリコンビナント M3R 蛋白を 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 抗体あるいは M3R 反応性 T細胞を誘導し、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、M3R のアナログペプチドのワクチ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, AA256-271)により、関節炎を有意に抑制することができた。また、APL6 および APL7(GKPGIAGFAGEQGPKG)により関節炎を有意に予防することができた。

2) GPI においては、IWYINCFGCETHAML (AA325-339)と GLINFIKQQREARVQ (AA544-558)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。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、AA329N→S(APL6)、AA329N→T(APL7)、AA332G→A(APL12)、AA332G→V(APL13)

がアナログペプチドの候補として選定された。関節炎マウスにおいて、APL12が有意な治療効果を呈した。

3) B6マウス(H-2b)にM3R細胞外第2ドメインペプチド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。一方、リコンビナント蛋白によりT細胞浸潤を伴う唾液腺モデルを作製することができた。今後、アナログペプチドの選定と治療研究を進める。

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。さらに、GPI免疫関節炎モデルマウスにおいてもAPLによる関節炎治療効果が認められた。

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. Iwanami, K., Matsumoto, I., Watanabe, Y., Mihara, M., Ohsugi, Y., Mamura, M., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., Kishimoto, T., and Sumida, T. Crucial role of IL-6/IL-17 cytokine axis in the induction of arthritis by glucose-6-phosphate-isomerase. *Arthritis Rheum. (in press)*

2. Matsui, H., Tsutsumi, A., Sugihara, M., Suzuki, T., Iwanami, K., Kohno, M., Goto, D., Matsumoto, I., Ito, S., and Sumida, T. Expression of Visfatin (pre-B cell colony-enhancing factor) gene in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis. (in press)*

3. Nakamura, Y., Wakamatsu, E., Tomiita, , Kohno, Y., Yokoka, J., Goto, D., Ito, S., Matsumoto I., Tsutsumi, A., and Sumida, T. High prevalence of autoantibodies to muscarinic 3 acetylcholine receptor in patients with juvenile Sjogren's

syndrome. *Ann. Rheum. Dis. 67:136-137,2008.*

4. Harashi, T., Matsumoto, I., Yasukochi, T., Chino, Y., Mamura, M., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T. Biased usage of snovial immunoglobulin heavy chain variable regions 4 by the anti-glucose-6-phosphate isomerase antibody in patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Med. 20:247-253, 2007.*

5. Sugihara, M., Tsutsumi, A., Suzuki, E., Suzuki, T., Ogishima, H., Hayashi, T., Chino, Y., Ishii, W., Manura, M., Goto, D., Matsumoto, I., Ito, S., and Sumida, T. The gene expressions of TNFa, TTP, TIA-1 and HuR in the peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis before and after infliximab therapy. *Arthritis Rheum. 56: 2160-2169, 2007.*

6. 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. 66:844-845, 2007.*

図1 APLによるCIA 関節炎治療効果

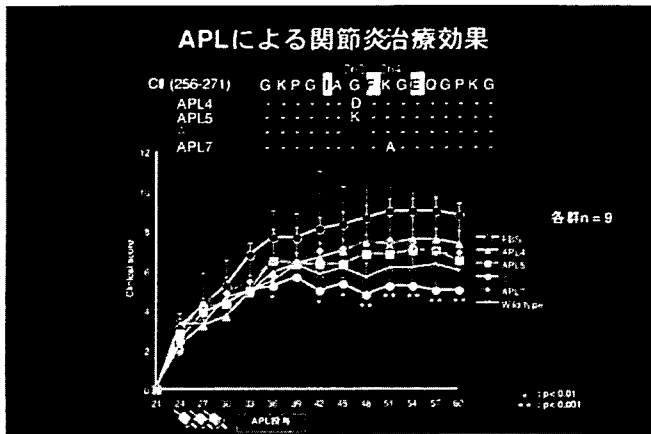


図4 GPI 免疫関節炎マウスにおける APL 治療効果

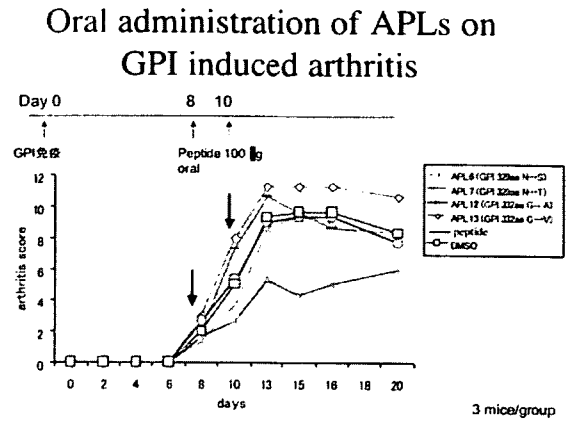


図2 APL 治療によるサイトカイン産生

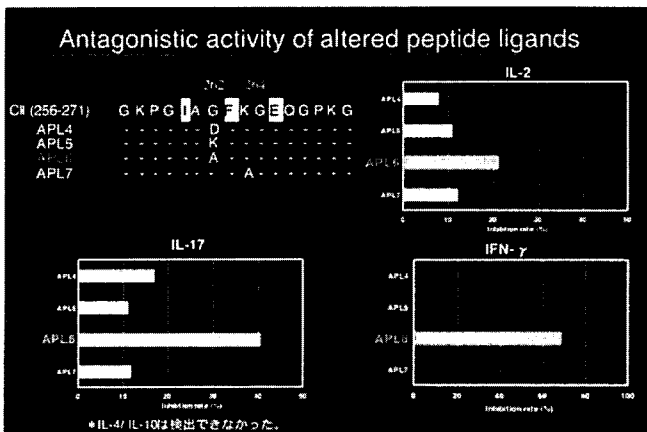
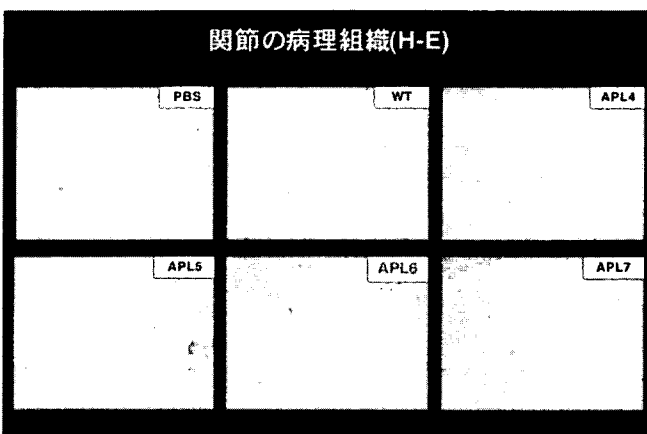


図3 APL 治療による関節組織像



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

ES細胞を用いた遺伝子改変ヒト樹状細胞の作製

分担研究者 千住 覚 熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学分野 准教授
研究協力者 西村泰治 熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学分野 教授

研究要旨

樹状細胞は、T細胞機能の制御を介して免疫応答を調節する抗原提示細胞である。我々は、昨年度までの研究により、マウスとカニクイザル胚性幹（ES）細胞から、免疫学的機能を有する樹状細胞（ES-DC）を分化誘導する方法を開発している。また、マウスを用いた実験により、ES-DCが抗腫瘍免疫の誘導、あるいは自己免疫疾患の予防において非常に有用であることを証明している。本年度は、ヒトES細胞からES-DCを分化誘導する培養プロトコルを開発した。ヒトES-DCは、細胞表面にHLA-DR、CD80、CD86、CD83とCD40等の分子を発現しており、また、HLA-DR拘束性T細胞への抗原提示機能、および同種異系T細胞に対する強い増殖応答刺激活性を有していた。さらに、電気穿孔法を用いてヒトES細胞へHLAクラスII拘束性エペトープあるいはヒトPD-L1の発現ベクターを導入した。そして、この遺伝子導入ES細胞から分化したES-DCにおいて、導入遺伝子が発現し機能することを確認した。

A. 研究目的

樹状細胞は、生体内における主要な抗原提示細胞であり、適切な免疫応答がなされるよう、免疫応答を制御する役割を担っている。自己免疫疾患に対する抗原特異的免疫制御療法など、免疫応答を人為的に制御するための手段として、生体外で培養し機能を修飾した樹状細胞を移入する細胞治療が考えられる。我々は、以前より、細胞治療に用いる樹状細胞のソースとして胚性幹（ES）細胞を用いる方法を検討しており、マウスのES細胞から樹状細胞（ES-DC）を作製する方法を開発していた。さらに、各種の遺伝子改変を行ったマウスES-DCをマウス個体へ投与することにより、抗腫瘍免疫の誘導、あるいは、自己免疫疾患の予防と治療が可能であることを確認していた。

本年度の研究では、ES-DCの将来の臨床応用を目指して、ヒトES細胞からES-DCの分化を誘導する培養プロトコルの開発を行った。さらに、ES細胞の段階で遺伝子導入を行い、遺伝子導入ES細胞からES-DCへの分化誘導を行うことにより、ウイルスベクターを用いることな

くヒトの遺伝子改変樹状細胞を作製できるかどうか検討した。

B. 研究方法

ヒトES細胞としては、京都大学再生医学研究所において樹立された株（KhES-1およびKhES-3）を使用した。ヒトES細胞の血球細胞系への分化誘導には、これまでのマウスおよびカニクイザルのES細胞を用いた研究成果に準じて、フィーダー細胞共培養法を採用した。フィーダー細胞として、マウス由来ストローマ細胞である、OP9、ST2、PA6の3種類を使用し、その効果を比較した。また、樹状細胞への分化および樹状細胞の成熟を促す因子として、ヒトGM-CSF、M-CSF、IL-4、Flt-3Lなどのサイトカイン、およびLPSの効果を検討した。樹状細胞への分化の確認は、細胞の形態ならびにフローサイトメトリーによる細胞表面分子の解析により行った。

ヒトES-DCのT細胞への抗原提示機能については、まずHLA-DRを共有しない健康なドナーから分離したアロT細胞と、ヒトES-DCとの

共培養による、アロー次混合リンパ球反応(MLR)の誘導の有無について検討した。さらに、ヒト ES-DC に GAD65 ペプチドあるいは GAD65 蛋白質を負荷した後に、I 型糖尿病患者由来の GAD65 ペプチド特異的 HLA-DR53 拘束性 CD4⁺T 細胞クローンと共培養し、その後の T 細胞増殖反応の誘導を観察することにより、ヒト ES-DC による抗原のプロセッシングと抗原提示機能を検討した。

GAD65 抗原ペプチドを MHC クラス II 分子上へ提示するベクター (CLIP 置換型抗原提示ベクター)、あるいはヒト PD-L1 発現ベクターを電気穿孔法により ES 細胞へ導入した。遺伝子導入細胞は、G418 を用いて選択し、遺伝子導入後 18-20 日に ES 細胞クローンを単離した。高濃度 (1-3 mg/ml) の G418 に耐性のクローンを分化誘導し、ES-DC へ分化した後、フローサイトメーターにより導入遺伝子の発現を確認した。

(倫理面への配慮) 本研究を開始するにあたって、熊本大学倫理委員会および文部科学省ヒト ES 細胞倫理委員会から、ヒト ES 細胞使用研究の承認を得た。さらに、ヒト ES 細胞使用研究の遂行にあたっては、文部科学省のヒト ES 細胞指針および熊本大学の倫理規定を遵守しつつ、熊本大学倫理委員会ヒト ES 細胞分科会の監視のもとに、承認された使用計画書に沿って研究を行なった。

C. 研究結果

本研究の結果として、以下の 3 段階の手順によりヒト ES 細胞から ES-DC を分化誘導できることを見出した。

[第 1 段階] まず、未分化状態のヒト ES 細胞をマイトマイシン C 処理を行った OP9 フィーダー細胞上へ播種し、分化誘導培養を開始する。ES 細胞の分化の進行を見ながら、3 日に一度培養液を交換しつつ、通常 14-18 日間の培養を継続する。

[第 2 段階] 第 1 段階の培養の結果として出現する非付着性の細胞を、新たに調整した OP9 フィーダー細胞上へ播種する。この段階では、培養液に GM-CSF と M-CSF を添加する。その結果、浮遊性あるいは弱付着性の球形の細胞が出現し、徐々にその数が増加する。第 2 段階の培養は、

ES 細胞由来の浮遊細胞の数と OP9 細胞の状態により、7-10 日間継続する。

[第 3 段階] 第 2 段階の培養の結果出現した ES 細胞由来の浮遊細胞をピペッティング操作により回収し、GM-CSF と IL-4 を含む培養液に浮遊させて細菌培養用のディッシュへ播種する。浮遊細胞の形態は、第 2 段階の後半から第 3 段階を通じて、球形から突起を有する不規則な形態へと徐々に変化する。第 3 段階開始後、2-4 日目に成熟誘導因子として、TNF- α と LPS を加えて ES-DC の成熟を促した。

以上の培養法により、樹状細胞としての形態、細胞表面分子 (CD80、CD86、CD40、HLA-DR)、およびアロ T 細胞への一次 MLR 刺激活性と、CD4⁺T 細胞クローンへの蛋白質ならびにペプチド抗原の提示機能を有する ES-DC を分化誘導できることを確認した。

HLA-DR により GAD65 抗原ペプチドを提示するベクターを導入した ES 細胞に由来する ES-DC は、GAD65 抗原の非存在下に SA32.5 の増殖応答を誘導できた。また、免疫抑制分子 (PD-L1) を強制発現させた ES-DC では、未成熟 ES-DC によるアロ T 細胞増殖刺激活性が抑制された。

D. 考察

ES 細胞は適切な培養条件下では無限に増殖させることが可能であり、樹状細胞を体外で作製するためのソースとして ES 細胞を用いることにより、ドナーを必要とせず、樹状細胞の大量生産が可能である。また、従来、樹状細胞への遺伝子導入には、ウイルスベクターの使用が不可欠であったが、本研究により、ウイルスベクターを使用することなく、電気穿孔法によりヒトの樹状細胞の遺伝子を改変する方法が確立された。以上より、本研究の成果は、樹状細胞療法の実用化をめざす上で大きな意義を有するものと考えられる。

今後の実用化への課題として、技術的にはアロ反応の問題の解決と、GMP 対応の培養技術の開発が求められる。また、ES 細胞由来の分化細胞のヒトへの投与について、倫理的な観点からの議論を行う必要があると考えられる。

E. 結論

マウス、カニクイザルに続き、抗原提示機能を有するヒト ES-DC の分化誘導技術の開発に成功した。さらに、ウイルスベクターを使用することなく、電気穿孔法により遺伝子改変 ES-DC を作製する方法を確立した。ES-DC 技術の臨床応用に向けて、今後さらなる技術的、倫理的課題の解決が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Senju, S., Suemori, H., Zembutsu, H., Uemura, Y., Hirata, S., Fukuma, D., Matsuyoshi, H., Shimomura, M., Haruta, M., Fukushima, S., Matsunaga, Y., Katagiri, T., Nakamura, Y., Furuya, M., Nakatsuji, N., and Nishimura, Y. Genetically manipulated human embryonic stem cell-derived dendritic cells with immune regulatory function. *Stem Cells* 25: 2720-2729, 2007

Tsukamoto, H., Irie, A., Senju, S., Hatzopoulos, A.K., Wojnowski, L. and Nishimura, Y. B-Raf-mediated signaling pathway regulates T cell development. *Eur. J. Immunol.* in press

Yokomine, K., Nakatsura, T., Senju, S., Nakagata, N., Minohara, M, Kira, J., Motomura, Y., Kubo, T., Sasaki, Y., and Nishimura, Y. Regression of intestinal adenomas by vaccination with heat shock protein 105-pulsed bone marrow-derived dendritic cells in ApcMin/+ mice. *Cancer Science* 98: 1930-1935, 2007

2. 学会発表

Genetic engineering of human embryonic stem cell-derived dendritic cells, 13th International Congress of Immunology,

August 21-25, 2007, Rio de Janeiro (Brazil)

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

自己抗原に関連する T 細胞応答のシングルセル解析を用いた研究

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
研究研究者 藤尾 圭志 東京大学医学部アレルギーリウマチ内科 助教

研究要旨

従来の T 細胞のクローナリティ解析では、T 細胞集団中の T 細胞レセプター (TCR) の使用頻度が指標とされてきたが、この手法ではクローナルに集積している T 細胞の表現型や抗原特異性の解明に限界があった。そこで我々は最近開発したシングルセル解析法を用いて、II 型コラーゲン免疫マウスのリンパ節細胞を II 型コラーゲン存在下に試験管内で培養し、分裂する T 細胞を解析した。ICOS の発現レベルを指標とした単一 T 細胞からの TCR α 鎖の同定効率は 50-60%で、II 型コラーゲン存在下では特定の J α 鎖が異なる実験においても共通して出現していた。ICOS 高発現細胞群では Foxp3 を発現するクローンが優位で、ICOS 低発現細胞群では IL-17 を発現するクローンが優位となっていた。特定の抗原に対する試験管内の T 細胞応答において、制御性 T 細胞クローンと Th17 細胞クローンが同時に増殖していることが示唆された。これらのクローンは II 型コラーゲンに対する試験管内での増殖反応を示さず、より複雑な抗原特異的免疫応答のネットワークの中で反応していると推測された。

A. 研究目的

従来の T 細胞のクローナリティ解析では、T 細胞集団中の T 細胞レセプター (TCR) の使用頻度が指標とされてきたが、この手法ではクローナルに集積している T 細胞の表現型や抗原特異性の解明に限界があった。そこで我々は T 細胞のシングルセル解析法を開発し、昨年度はコラーゲン誘発性関節炎局所に集積している制御性 T 細胞の表現型をもつクローンと Th17 の表現型をもつクローンを同定した。本年度は II 型コラーゲンで免疫したマウスのリンパ節細胞を試験管内で II 型コラーゲン存在下に培養し、分裂する T 細胞のシングルセル解析を行った。

B. 研究方法

II 型コラーゲンで二回免疫した B6 マウスのリンパ節より T 細胞を採取し、II 型コラーゲン存在下で培養した。増殖する細胞の Foxp3 発現を抗 Foxp3 抗体で検討した。II 型コラーゲン存在下に増殖する CD4 陽性 V α 2 陽性 T 細胞を ICOS の発現レベルを指標として、シングルセルソーティングにより回収し cDNA を合成した。cDNA から 3 ステップの PCR により TCR α 鎖、 β 鎖及び発現遺伝子を同定した。

(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

II 型コラーゲン存在下で増殖する T 細胞の約半数で Foxp3 蛋白の発現を認めた。単一 T 細胞からの TCR α 鎖の同定効率は 50-60%で、CDR3 領域のアミノ酸配列を解析すると複数のクローンの増殖がみられた。J α 鎖を指標としてシングルセル解析法と従来の T 細胞集団全体の TCR 使用頻度を解析する手法と比較すると、主要なクローンは一致していたがシングルセル解析法の方が多様なクローンを含んでいた。II 型コラーゲン存在下と非存在下では優位となる J α 鎖が異なっていたが、II 型コラーゲン存在下では特定の J α 鎖が異なる実験においても共通して出現していた。ICOS 高発現細胞群では Foxp3 を発現するクローンが優位で、ICOS 低発現細胞群では IL-17 を発現するクローンが優位となっていた。自己抗原に対する免疫応答では制御性 T 細胞も強い増殖を示し、エフェクター T 細胞と相互作用していると考えられた。最も優位な集積を認めた Foxp3 を発現するクローン、IL-17 を発現するクローンとも同定した TCR の脾臓 CD4 陽性 T 細胞上への再構築では明らかな II 型コラーゲンへの反応性を認めなかった。

D. 考察

シングルセル解析法と従来の T 細胞集団全体の TCR 使用頻度を解析する手法と比較すると、シングルセル解析法の方がクローンの多様性をより精確に

捉えていると考えられた。特定の抗原に対する試験管内の T 細胞応答において、制御性 T 細胞クローンと Th17 細胞クローンが同時に増殖していることが示唆された。これらのクローンの指標として ICOS 発現レベルが有用であった。

E. 結論

シングルセル解析法は従来法と比較して T 細胞クローンの多様性をより精確に捉えることが可能であった。今回集積を認めた Foxp3 を発現するクローン、IL-17 を発現するクローンは TCR の再構築のみでは II 型コラーゲン存在下での分裂を再現できず、これらのクローンはより複雑な抗原特異的免疫応答のネットワークの中で反応していると推測された。シングルセル解析法により、今後より詳細な T 細胞免疫応答の解明が可能となると考えられた。

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. Yamamoto K, Okamoto A, Fujio K. Antigen-specific immunotherapy for autoimmune diseases. *Expert Opin Biol Ther.* 7:359-367, 2007.
2. Okunishi K, Dohi M, Fujio K, Nakagome K, Tabata Y, Okasora T, Seki M, Shibuya M, Imamura M, Harada H, Tanaka R, Yamamoto K. Hepatocyte growth factor significantly suppresses collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol.* 179:5504-5513, 2007.
3. Fujio K, Okamura T, Okamoto A, Yamamoto K. T cell receptor gene therapy for autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 10:222-232, 2007.
4. Yamamoto K, Yamada R. Lessons from a Genomewide Association Study of Rheumatoid Arthritis. *N.Engl.J.Med.* 357:1250-1251, 2007
5. Yamaguchi Y, Fujio K, Shoda H, Okamoto A, Tsuno NH, Takahashi K, Yamamoto K. IL-17B and IL-17C are associated with TNF-alpha production and contribute to the exacerbation of inflammatory arthritis. *J Immunol.* 179:7128-36, 2007.

2. 学会発表

渋谷美穂子、藤尾圭志、岡村僚久、岡本明子、山口優美、庄田宏文、古木名和枝、中川隆雄、山本一彦 自己抗原存在下に分裂する制御性 T 細胞及びエフェクター T 細胞の単一細胞解析第 28 回 日本炎症・再生医学

会 (2007.8.2)

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

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

toll 様受容体刺激調節因子を標的とした関節炎治療に関する研究

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 准教授
研究協力者 村上 洋介 東京医科歯科大学医学部 リサーチ・レジデント

研究要旨

Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1)は、感染免疫に重要な toll 様受容体刺激調節分子として同定されたが、自己免疫疾患における役割は不明である。このため、代表的な自己免疫疾患である関節リウマチ (RA) における TREM-1 の作用を検討した。TREM-1 発現を RA およびマウス RA モデルで検討したところ、ヒトおよびマウスの関節由来滑膜細胞において TREM-1 の発現が認められた。また、マウス関節炎における TREM-1 の作用を検討するため、可溶性 TREM-1-Ig をマウスに投与し、その治療効果を検証したところ、免疫反応を障害することなく関節炎を著明に抑制した。これらのことから、TREM-1 は RA の極めて有用な治療標的分子となることが明らかとなった。

A. 研究目的

自然免疫系受容体 (toll 様受容体) は近年、感染免疫学で多いに注目されているが、この刺激を調節する細胞表面分子である Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) の存在とその作用が明らかになってきた。マウス敗血症モデルにおいて TREM-1 の阻害は、炎症および生存率を改善することから、TREM-1 が感染防御に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。一方、我々は感染とは無関係である尿酸結晶誘発性炎症モデルにおいて TREM-1 の発現が誘導され、また尿酸結晶誘発性炎症の制御に関与することを示した。このことは、TREM-1 が感染を伴わない炎症性疾患においても病態形成に関与していることを示している。しかし、自己免疫疾患における TREM-1 の役割は明らかではないため、我々は関節リウマチ患者およびそのモデル動物であるコラーゲン誘導関節炎モデル (CIA) の TREM-1 発現を解析した。また、CIA に組換え可溶性 TREM-1-Ig を静注して関節炎における TREM-1 阻害の影響を検証した。

B. 研究方法

RA および変形性関節炎 (OA) 患者の滑液中における可溶性 TREM-1 濃度を ELISA で測定した。RA 患者および CIA 由来滑膜細胞上における TREM-1 の発現を FACS で解析した。滑膜細胞をアゴニスト TREM-1 抗体で刺激し、TNF α の産生を ELISA で測定した。可溶性 TREM-1-Ig 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター (AxCA-sTREM-1-Ig) を作製し、マウス CIA の尾静脈に投与した。関節炎への影響を肉眼的所見、腫脹幅、病理組織学的所見から評価した。また、抗原特異的な T 細胞増殖および抗体価をそれぞれ測定した。

(倫理面への配慮)

実験動物に対する施設規定を遵守した。患者よりの検体採取、研究への使用に関しては、倫理審査委員会承認に基づき、文書同意を取得して研究を行った。

C. 研究結果

可溶性 TREM-1 の濃度は RA 患者由来滑液中で有意に高かった。また RA 患者の CD14+細胞および CIA の CD11b+細胞の滑膜細胞において TREM-1 の発現が認められた。滑膜細胞をアゴニスト TREM-1 抗体で刺激すると、TNF α の産生が増強された。AxCA-sTREM-1-Ig を投与したマウスでは、関節炎スコア、腫脹幅、病理組織学的所見がコントロールと比較して著明に抑制された。一方、AxCA-sTREM-1-Ig の投与は、抗原特異的 T 細胞増殖および血清中の抗体価 (IgG1, IgG2a, IgG2b) に影響を与えなかった。

D. 考察

マウスおよびヒトの関節炎において TREM-1 の発現が認められ、可溶性 TREM-1-Ig の投与は関節炎の進展を抑制したことから TREM-1 が関節炎の病態進展に重要な役割を果たしていることが考えられた。TREM-1 は炎症性サイトカインや細胞表面分子の発現を誘導するため、TREM-1 阻害による関節炎の治療効果は、幅広い炎症性分子の抑制を介していることが示唆された。

E. 結論

既存の生物製剤 (TNF 阻害剤など) では感染症リスクの増加が問題となるが、TREM-1 の阻害は感染症に有効である。このため、関節リウマチにおいて TREM-1 阻害は感染症リスクを増加させない有効な治療法となることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表