

differentiation through Arl14D/cytohesin-2/Arf6 (トークセッション) 日本分子生物学会大会 2011年12月・横浜

(2) 鳥居知宏、宮本 幸、西村浩二、田上昭人、山内 淳司: The polybasic region of cytohesin-2 determines paxillin-binding specificity to mediate cell migration 日本分子生物学会年会 2011年12月・横浜

(3) 山内淳司: ダイナミックな形態分化を伴い、神経軸索のミエリン化を制御するマウス Rho 活性化因子 Dock7 (シンポジウム 細胞の形態・運動を制御するシグナル伝達ネットワーク: 企画/座長 加藤裕教、山内淳司) 日本生化学会大会 2011年9月・横浜

(4) 宮本 幸、鳥居知宏、田上昭人、山内淳司: Ras/ERK 経路は中枢神経ミエリン形成不全を誘導する (トークセッション) 日本生化学会大会 2011年9月・横浜

(5) 鳥居知宏、宮本 幸、山盛奈月、江口貴大、濱崎 一、川口祥吾、西村浩二、田上昭人、山内淳司: サイトヘジン-2 の塩基性領域はパキシリンとの会合に必須であり、細胞遊走を制御する (トークセッション) 日本生化学会大会 2011年9月・横浜

(6) 草川森士、宮本 幸、中村和昭、三部 篤、鳥居知宏、田上昭人、山内淳司: 抗うつ剤フルオキセチンはマウス ES 細胞をグリア系細胞系譜に誘導する日本生化学会大会 2011年9月・横浜

(7) 鳥居知宏、宮本 幸、田上昭人、山内淳司: The Arl14D/Cytohesin-2/Arf6 signaling unit mediates neuriteogenesis induced by the mood-stabilizer, valproic acid (トークセッション) 日本神経科学学会大会 2011年9月・横浜

【首都大学東京 久永】

(1) Shin-ichi Hisanaga (2011) Regulation of the kinase activity and function of Cyclin-dependent kinase 5 in post-mitotic neurons. International Conference for Neurochemistry Athens (シンポジウム)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

【独立行政法人国立成育医療研究センター研究所 山内、宮本】

山内淳司、田上昭人、宮本 幸、鳥居知宏、前田雅弘「ペリチェウス・メルツバツハ病治療方法及びそれに用いる治療剤」特願 2012-021272 出願日: 2012年2月2日

【株式会社免疫生物学研究所 前田】

同「ペリチェウス・メルツバツハ病治療方法及びそれに用いる治療剤」

2. 実用新案登録

該当するものはない。

3. その他

該当するものはない。

B細胞の分化・増殖の異常に関連する稀少疾患の創薬を目的とした細胞分化・増殖、細胞死制御機構解明研究

所属 (独) 国立成育医療研究センター 研究所
小児血液・腫瘍研究部
研究代表者 清河 信敬
研究期間 平成 22 年 4 月～平成 24 年 3 月

研究要旨: B細胞の異常に起因する疾患に関して、B細胞性腫瘍における BAFF 受容体の発現、BAFF、IGF-1 の作用を明らかにし、BAFF/DAP3/Death Receptor に関連する細胞死制御機構を解析して DELE、CLIPR-59 等の会合分子の同定と機能解明を行なうとともに、関節炎モデルの病態におけるオステオポンチンの機能や受容体 $\alpha 9$ インテグリンに対する抗体の治療効果を明らかにした。

研究分担者

- (1) 北海道大学遺伝子病制御研究所病因研究部門・分子免疫分野 上出利光
- (2) 北海道大学遺伝子病制御研究所プロバイオティクス・免疫ロジー研究部門 宮崎忠昭
- (3) 株式会社免疫生物研究所 前田雅弘
- (4) ニチニチ製薬株式会社 中央研究所 嶋田 貴志 (H23 年度のみ)

A. 研究目的

B細胞には、外来抗原に対して高い特異性を持った抗体を産生するクローンを効率的に増やすとともに、同時に発生してくる自己反応性クローンや低親和性抗体産生クローンを排除するため、B細胞抗原受容体 (BCR) を中心とした刺激伝達による独自の増殖・分化制御機構が存在する。自己免疫疾患やB細胞性腫瘍は、上記機構が破綻し、B細胞の分化や増殖に異常が生じる結果発生すると想定されている。すなわち、自己免疫疾患は本来負の選択を受けるべき自己反応性抗体産生細胞が除去されずに異常に増殖する結果発生し、B細胞性腫瘍は分化の過程で正常の分化増殖制御から逸脱して不死化した B細胞の異常な増殖と考えられる。これらの B細胞の分化

や増殖の異常起因する疾患は、稀少ではあるが、医学的に重要な克服対象である。この B細胞の独自性に着目してその制御機構を分子レベルで解明し、得られた知見を基礎に B細胞に対する選択的な新規増殖制御法を開発することによって、上記稀少疾患に対する新規治療法開発へと結びつくことが期待される。

本研究では、B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)、Death associated protein 3 (DAP3)、オステオポンチン (OPN) 三者を中心とした B細胞の増殖・分化制御機構を相互の機能的関連性に着目して分子レベルで解明し、その成果を応用してこれらを連携して調節することでより効果的な B細胞の増殖制御法開発に結びつけ、B細胞の分化・増殖の異常に起因する自己免疫疾患やB細胞性腫瘍に対する新規治療法開発へ発展させることを目指す。

B. 研究方法

1. 試料、試薬、生化学的解析

本研究での臨床検体の使用は倫理委員会の承認を含む倫理手続きを経た上で行った。

ヒト B 前駆細胞性 (BCP-) 急性リンパ芽球性白血病 (ALL) 細胞株、パーキットリン

パ腫 (BL) 細胞株、ヒト Hairy cell 白血病細胞株に対して BAFF、IGF-1、TNF- α (各 100 ng/ml)、等を添加し、その効果について検討した。BL、BCP-ALL 細胞株のアポトーシスは抗 IgM 抗体、抗 CD20 抗体 (各 5 μ g/ml) あるいはデキサメサゾン、エトポシドを添加培養して誘導し、アネキシン-V の結合性によりフローサイトメトリー (FCM) により検出した。細胞増殖は、トレパンブルー法と、WST-1 アッセイにより検討した。

ヒト胎児腎由来培養細胞株 HEK293 に BAFF の、HEK293T、HeLa 細胞に CLIPR-59、TRADD、TNFR1、DR3 の発現ベクターあるいは SiRNA をトランスフェクションし、イムノブロット法および免疫沈降法等により解析した。レトロウイルスベクターにより DAP3 をマウス胸腺由来 T 細胞に感染させ、マウス胸腺細胞と共培養後、T 細胞亜群の分布について FCM 解析した。caspase の酵素活性は caspase-glo assay system (Promega) を用いて測定した。

2. 核酸の抽出と解析

RNA は、RNeasy kit (Qiagen 社) 等で抽出した。reverse transcriptase で cDNA を合成し、SYBR-Green を用いて定量 PCR を行なった。また、WT-Ovation Pico RNA Amplification System (NuGen 社) により cDNA を合成、増幅して、マイクロアレイ (Affimetrix 社 GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array) による網羅的遺伝子発現を行った。

3. マウスを用いた解析

関節リウマチモデルマウスとして、DBA/1 マウスに Type II コラーゲンと CFA を併用投与して CIA マウスを、BALB/c マウスに抗 Type II コラーゲン抗体混合液と LPS を併用投与して CAIA を誘導した。

インフルエンザウイルス感染実験は、アイソレーター内で C57BL/6 マウスに生理食塩水で 15mg/0.2ml/head に調整した熱処理 FK-23 を経口投与し、A/Puerto Rico/8/34 (PR8) (H1N1 subtype) を 1000pfu/head で経鼻感染させた。肺のウイルス力価は、プラークアッセイにより測定した。

種々の状態で調整した FK-23 を BALB/c マウスに投与し、腸間膜リンパ節とパイエル板を摘出して検討した。脾臓細胞の ex vivo 培養系に添加し、培養上清を回収して ELISA によるサイトカイン定量を行なった。

(倫理面への配慮)

本研究で実施した臨床検体を用いた解析は、実施に際して当該倫理委員会および施設責任者の承認を得て、関連指針を遵

守して実施した。また、個人情報保護法を遵守し、検体提供者への人権擁護や個人情報保護に最善、細心の注意を払って実施した。

動物実験に関しては、関連法規を遵守して動物愛護と動物福祉の観点に立った倫理的配慮をおこない、あらかじめ当該研究施設の動物実験委員会へ実験の実施について申請し、承認を得てから行った。

C. 研究結果

1. B 細胞性腫瘍に対する BAFF、IGF-1 の作用の解析

臨床症例における BAFF-R の発現を解析したところ、成熟 B 細胞性腫瘍では 30.03% で陽性であり、 λ 鎖、CD21、CD27、CD28 の発現の頻度が高い等の特徴を認めた。また、遺伝子発現解析の結果、BAFF-R、BCMA、TACI の BAFF 受容体群の発現が成熟 B リンパ性腫瘍の特徴的であることが示唆された。

BCP-ALL では 24.1% で、BAFF-R 陽性であり、成熟傾向のある亜群で陽性率が高い傾向を認めた。これに対して、IGF-1R は 16.7% で陽性であり、未分化な亜群で発現し、BAFF-R と IGF-1R は排他的な発現傾向を認めた。

一方、培養細胞株では、BL、BCP-ALL とも、ほとんどの株で BAFF-R 陽性であり、増殖優位性との関連が考えられた。いずれも BAFF の添加により濃度依存的に細胞増殖が亢進し、BL では BCR や CD20 の架橋刺激やステロイドによるアポトーシス誘導が抑制されたが、BCP-ALL では抑制されなかった。BAFF により誘導される刺激伝達について検討したところ、NF κ B1、NF κ B2 の双方の経路が活性化されたが、その活性化の状況は Hairy cell 白血病細胞株に比較して弱く、一過性であり、特に BCP-ALL では活性化が非常に軽微であり、分化段階に依存した刺激伝達の強さの差が考えられた。一方、IGF-1 は BCP-ALL に対して細胞周期に入る細胞を増加させる効果や増殖亢進する効果を示すことが明らかとなった。

2. 組替え型 BAFF の調整と市販の抗 BAFF 抗体の解析

ヒト BAFF の cDNA をクローニングして発現ベクターを構築し、ヒト胎児腎由来培養細胞株 HEK293 に発現させ、イムノブロット解析により、その蛋白発現を確認したが、抗体作製に用いる蛋白量を調整するには、大量培養系での調整が必要と考えられた。

3. アポトーシス制御機構の解析

T 細胞のネガティブセレクションの

in vitro モデル系 RTOC システムを用いた検討で、DAP3 が T 細胞のネガティブセレクションにおけるアポトーシスの亢進に働くことが示された。

DAP3 の会合分子 DELE の機能について遺伝子ノックダウンにより解析し、DELE がこれら TNF スーパーファミリーに属するサイトカインにより誘導されるアポトーシスの亢進に働く分子であることが明らかとなった。

Death receptor (DR)6 に会合する分子として同定した CLIPR-59 の機能解析を行ない、TNF- α 刺激後 CLIPR-59 と TNFR1、caspase-8、FADD、TRAD、RIP1、CYLD との会合が認められ、CLIPR-59 により RIP1 のユビキチン化が制御されることが明らかになった。

4. 関節炎モデルを用いたオステオポンチンの作用の解析

自己免疫疾患関節リウマチのモデルである CIA、CAIA マウスに対して抗 α 9 インテグリン抗体が関節炎発症に対する予防的、治療的効果を示すことを明らかにし、その作用機構が病変部細胞の滑膜線維芽細胞やマクロファージのオステオポンチンおよびテネイシン-C の α 9 インテグリンのリガンド刺激による炎症性サイトカイン/ケモカイン分泌を抑制し、Th17 細胞の機能を抑制するためであることを示した。

さらに、所属リンパ節における Th17 細胞の動態を更に詳細に検討した。効果細胞としての Th17 細胞は、所属リンパ節でクローン増殖後、病巣である関節滑膜組織へと移動する事により、組織破壊を惹起し、この移動には、Th17 細胞が発現するケモカイン受容体、CCR6 が重要な役割を果たしている。しかし、抗 α 9 インテグリン抗体を投与する事により、cDC や APC によって産生されるオステオポンチンとテナーシン C と細胞上に発現する α 9 インテグリンの autocrine and paracrine interaction を阻害することにより、Th17 細胞細胞の CCR6 発現が著明に低下し、Th17 細胞細胞の産生そのものも減弱するが、長期的には、所属リンパ節外への移動が抑制されるために関節炎の程度が改善することが示唆された。

4. FK-23 の免疫系に対する作用

インフルエンザウイルス感染マウスに事前に FK-23 投与することにより生存率が有意に上昇することが明らかとなった。ウイルス感染後の肺におけるウイルス増殖推移には差は認められなかったが、血管透過性亢進を抑制するため感染後に肺に流入する白血球が抑制さ

れていることが明らかとなった。

マウス脾臓細胞を用いた ex vivo 実験において、FK-23 の加熱処理菌体による処理は IL-6、IL-10、IL-12(p70)、IFN- γ 等のサイトカインを産生させることが明らかとなり、特に脂質性タンパク・ポリサッカライドを除去した細胞壁成分にさらに強い作用があることが明らかとなった。

D. 考察

1. B 細胞性腫瘍に対する BAFF、IGF-1 の作用の解析

BAFF-R が成熟 B 細胞性リンパ腫の約 3 割に発現していること、BAFF-R 陽性症例は陰性症例とは異なる表面形質を示す亜群であることが明らかとなった。また、マイクロアレイの結果からは、3 者の BAFF 受容体の発現が、成熟 B 細胞性腫瘍に特徴的であることが示された。また、BAFF が BAFF-R 陽性の BL 細胞に対して細胞増殖を亢進し、CD20 および BCR を介するアポトーシス誘導や、ステロイドの作用によるアポトーシス誘導に対して抑制効果を示すことが明らかとなった。この結果は、BAFF が特異的に BAFF-R 陽性の B-precursor ALL 細胞の細胞増殖を亢進し、アポトーシス誘導を抑制することを示している。今後、BAFF-R を含む膜表面分子や遺伝子の発現との関係や、治療反応性や予後などの病態との関連について検討を進め、BAFF の意義について明らかにし、新規治療法等の臨床への応用について検討を進める。

一方、BCP-ALL では約 2 割で、特に成熟傾向のある亜群に陽性例が多いことが明らかとなり、BAFF が BCP-ALL の特定の亜群に対して作用する可能性が示唆される。今後、BAFF の血中濃度の測定や予後との関係について解析を進め、BCP-ALL における BAFF-R の発現との病態との関係について検討を進める。

IGF-1R は BCP-ALL の約 2 割で、BAFF-R 陽性群とは異なる亜群に発現する傾向を認め、IGF-1 が BCP-ALL の増殖を促進すること、IGF-結合蛋白がその作用を抑制することが示された。今後、BCP-ALL の病態における IGF-1、IGF-1R、IGF-結合蛋白の意義について明らかにし、新規治療法等の臨床への応用について検討を進める。

2. 組替え型 BAFF の調整と市販の抗 BAFF 抗体の解析

先行研究での検討も含め、市販の抗 BAFF 抗体では、BAFF に対する十分な

中和活性を認めなかったことから、新たな抗 BAFF 抗体の作製が望まれる。ヒト由来細胞株で産生された組み替え型 BAFF の調整を進め、天然型 BAFF と反応する抗体の作製を目指す。

3. アポトーシス制御機構の解析

DAP の作用機構については、T 細胞のネガティブセレクションにより誘導されるアポトーシスには FADD と caspase-8 が必ずしも必要とされないことが明らかにされていることから、DAP3 が FADD と caspase-8 の活性化を伴わないアポトーシスシグナル伝達経路にも関与している可能性が考えられる。DAP3 に結合する DELE の作用機構については、アミノ酸配列の解析により、その N 末端にはタンパク質の不安定化に関わる PEST 配列が存在することが明らかになっていることから、ユビキチン-プロテアソーム経路を介したタンパク質レベルでの発現制御が DELE の機能制御に重要な働きをしていると考え、現在解析を進めている

CLIPR-59 は TNFR1 に会合しており、TNF- α 刺激後、受容体から離脱し、FADD, caspase-8, RIP1 と Complex II を形成し、この段階で、CYLD との会合により RIP1 のユビキチン化を制御して caspase-8 の活性化することが示され、TNFR1 を介するアポトーシスの亢進に働く新たな分子であることが解明された。これらの分子のユビキチン-プロテアソーム経路を介したタンパク質レベルでの発現制御が CLIPR-59 の機能制御に重要な働きをしていると考えられる。

3. CAIA 関節炎モデルを用いたオステオポンチンの作用の解析

CAIA マウスを用いた解析により、関節リウマチの病態に線維芽細胞様滑膜細胞とマクロファージが $\alpha 9$ インテグリン依存的な刺激による炎症性サイトカイン/ケモカインの産生に関わる可能性が示され、実際のリウマチ患者においても $\alpha 9$ インテグリンの機能を阻害する事によりその治療が可能である事が示唆される。異なる関節炎モデルである CIA モデルにおいても、 $\alpha 9$ インテグリンおよびそのリガンドであるオステオポンチンおよびテナーシン C との相互作用により自己免疫疾患に重要な役割を果す Th17 細胞の分化、増殖を惹起している事、抗 $\alpha 9$ インテグリン抗体 55A2C 投与が Th17 細胞の分化を阻害し、その結果関節炎を抑制していることが明らかになった。本研究で作製した抗ヒト $\alpha 9$ インテグリンモノクローナル抗体は関節リウマチ治療への応用が期待

される。

4. FK-23 の免疫系に対する作用

インフルエンザウイルス感染において、FK-23 投与により肺の血管透過性亢進が抑制されることによって肺の炎症が抑制され、肺損傷を軽減することで、同感染による死亡率の軽減に寄与していることが示唆された。

また、FK-23 の免疫調整剤としての成分が細胞壁成分に含まれていることが明らかとなり、今後さらにその成分同定や作用機序解明を進める。

E. 結論

細胞増殖、アポトーシス制御機構における BAFF、IGF-1、Death receptor 等の分子機能や、間接リウマチモデルにおけるオステオポンチンおよびその受容体である $\alpha 9$ インテグリンの機能的役割について解析を進めた他、FK-23 の免疫制御の分子機構についても検討を行なった。今後、さらにそれぞれの解析を継続するとともに、B 細胞異常によって起こる自己免疫疾患や、B 細胞性腫瘍における、それぞれの役割とその相互関係について解析を進め、新規抗体樹立による新規治療法開発について、検討を行って行く。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Onda K, Iijima K, Katagiri YU, Okita H, Saito M, Shimizu T, Kiyokawa N. Differential effects of BAFF on B cell precursor acute lymphoblastic leukemia and Burkitt lymphoma. *Int J Hematol.* 2010 Jun;91(5):808-19.
- 2) 恩田恵子, 清河信敬. BAFFによるB細胞の生存維持の分子機構. (総説) 臨床免疫・アレルギー科 2010 July;54(1):14-18.
- 3) N. Fujita, S. Fujita, Y. Okada, K. Fujita, A. Kitano, O. Yamanaka, T. Miyamoto, S. Kon, T. Uede, SR. Rittling, DT. Denhardt, S. Saika : Impaired angiogenic response in the cornea of mice lacking osteopontin. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51:790-794, 2010.
- 4) D. Iwata, M. Kitamura, N. Kitaichi, Y. Saito, S. Kon, K. Namba, J. Morimoto, A. Ebihara, H. Kitamei, K. Yoshida, S. Ishida, S. Ohno, T. Uede, K. Onoé, K. Iwabuchi : Prevention of experimental utoimmune uveoretinitis by blockade of osteopontin with small interfering RNA. *Exp Eye Res.* 90:41-48, 2010.
- 5) AM. Seier, AC. Renkl, GS. Chulz, T. Uebele, T. Ahrens, A. Sindrilaru, S. Iben, L. Liaw, S. Kon, T. Uede, JM. Weiss : Antigen-specific induction of osteopontin contributes to the chronification of allergic contact dermatitis. *Am J Pathol.* 176:246-258, 2010.

- 6) Y. Nakayama, S. Kon, D. Kurotaki, J. Morimoto, Y. Matsui, T. Uede: Blockade of interaction of alpha9 integrin with its ligands hinders the formation of granulation in cutaneous wound healing. *Lab Invest* 90:881-894, 2010.
- 7) J. Morimoto, S. Kon, Y. Matsui, T. Uede: Osteopontin; as a target molecule for the treatment of inflammatory diseases. *Curr Drug targets*. 11:494-505, 2010.
- 8) Matsuda M, Suizu F, Hirata N, Miyazaki T, Obuse C, Noguchi M. Characterization of the interaction of Influenza virus NS1 with Akt. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010 395(3):312-7
- 9) Harada T, Iwai A, Miyazaki T. Identification of DELE, a novel DAP3-binding protein which is crucial for death receptor-mediated apoptosis induction. *Apoptosis*, 2010 Oct;15(10):1247-55.
- 10) Iwai A, Shiozaki T, Kawai T, Akira S, Kawaoka Y, Takada A, Kida H, Miyazaki T. Influenza A virus polymerase inhibits type I interferon induction by binding to interferon β promoter stimulator 1. *J Biol Chem*, 2010 Oct 15;285(42):32064-74
- 11) Hayakawa S, Shiratori S, Yamato H, Kameyama T, Kitatsuji C, Kashigi F, Goto S, Kameoka S, Fujikura D, Yamada T, Mizutani T, Kazumata M, Sato M, Tanaka J, Asaka M, Ohba Y, Miyazaki T, Imamura M, Takaoka A. ZAPS is a potent stimulator of RIG-I-mediated signaling for antiviral response. *Nature Immunology*, 2011 Jan;12(1):37-44.
- 12) Shiozaki T, Iwai A, Kawaoka Y, Takada A, Kida H, Miyazaki T. Requirement of Siva-1 for replication of influenza A virus through the apoptosis induction. *J Gen Virol*. 2011 Feb;92(Pt 2):315-25.
- 13) Fujioka Y, Tsuda M, Hattori T, Sasaki J, Sasaki T, Miyazaki T, Ohba Y, Ras-PI3K signaling pathway is involved in clathrin-independent endocytosis and the internalization of influenza viruses. *PLoS ONE* *PLoS One*. 2011 Jan 20;6(1):e16324.
- 14) Hamamoto S, Yasui T, Okada A, Hirose M, Matsui Y, Kon S, Sakai F, Kojima Y, Hayashi Y, Tozawa K, Uede T, Kohri K : Crucial role of the cryptic epitope SLAYGLR within osteopontin in renal crystal formation of mice. *J Bone Miner Res*. 2011 Dec;26(12):2967-77.
- 15) Kanayama M, Morimoto J, Matsui Y, Ikesue M, Danzaki K, Kurotaki D, Ito K, Yoshida T and Uede T: Alpha9beta1 Integrin-Mediated Signaling Serves as an Intrinsic Regulator of Pathogenic Th17 Cell Generation. *J Immunol*. 2011 Dec 1;187(11):5851-64.
- 16) Morimoto J, Sato K, Nakayama Y, Kimura C, Kajino K, Matsui Y, Miyazaki T and Uede T: Osteopontin modulates the generation of memory CD8+T cells during influenza virus infection. *J Immunol*. 2011 Dec 1;187(11):5671-83.
- 17) Fujikura D, Ito M, Chiba S, Harada T, Perez F, Reed JC, Uede T, Miyazaki T. CLIPR-59 regulates TNF- α - induced apoptosis by controlling ubiquitination of RIP1. *Cell Death Dis.*, 2011;3:e264
- 18) Kondoh M, Fukada K, Fujikura D, Shimada T, Suzuki Y, Iwai A, Miyazaki T. Effect of water-soluble fraction from lysozyme-treated *Enterococcus faecalis* FK-23 on mortality caused by influenza A virus in mice. *Viral Immunology*, 2012, (1):86-90.
- 19) Sato K, Iwai A, Nakayama Y, Morimoto J, Takada A, Maruyama M, Kida H, Uede T, Miyazaki T. Osteopontin is critical to determine symptom severity of influenza through the regulation of NK cell population. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012 ;417(1):274-279.
- 20) Iwai A, Takegami T, Shiozaki T, Miyazaki T. Hepatitis C virus NS3 protein can activate the Notch-signaling pathway through binding to a transcription factor, SRCAP. *PLoS ONE.*, 2011; 6(6): e20718.
- 21) Kim E, Okumura M, Sawa H, Miyazaki T, Fujikura D, Yamada S, Sugahara K, Sasaki M, Kimura T. Paradoxical effects of chondroitin sulfate-E on Japanese. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011 ;409(4):717-22.

2. 学会発表（一部を記載）

1) 恩田恵子, 玉一博之, 山田浩之, 齋藤洋平, 鈴木恭子, 藤村純也, 齋藤正博, 清水俊明, 清河信敬. 小児 B 細胞性腫瘍における BAFF 受容体の発現と BAFF の作用 第 113 回日本小児科学会学術集会, 盛岡, 4 月 23 日-25 日, 2010.

2) 清河信敬, 飯島一智. Differential effects of BAFF on B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia and Burkitt lymphoma. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 9 月 22 日-24 日, 2010.

3) 恩田恵子, 山田浩之, 齋藤正博, 飯島一智, 清河信敬. BAFF は B 前駆細胞性 ALL の増殖を亢進するがアポトーシスは抑制しない. 第 72 回日本血液学会学術集会, 横浜, 9 月 24 日-26 日, 2010.

4) 上出利光 : 組織微小環境の内的調節因子、オステオポンチンの病態病理学」第 99 回日本病理学会、宿題報告、京王プラザホテル（東京、）4 月 27-29 日、2010.

5) 上出利光 : Matricellular proteins and their integrin receptors-new drug targets for inflammatory disorders and cancers. Novo Nordisk Symposium, China, Beijing, 11 月 4 日、2010.

6) Suzuki, Yoshimitsu; Nohmi, Takao; Fukada, Kazutake; Kondoh, Masatoshi; Miyazaki, Tadaaki; Cheng, Lei; Maeyama, Kazutaka; Okada, Shigeru; Shimada, Takashi, The therapeutic effects of *Enterococcus faecalis* FK-23 on allergic disorder and viral, International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics - IPC2010.

7) 深田一剛, 近藤正敏, 鈴木義充, 嶋田貴志, 宮崎忠昭, *Enterococcus faecalis* FK-23 の可溶性成分によるインフルエンザ予防のメカニズム, 日本乳酸菌学会 2010 年度大会 仙台 2010.7.26・27.

8) 上原純, 宮崎忠昭, DAP3 と LKB1 による anoikis 誘導機構, 第 33 回日本分子生物学会神戸ポートアイランド 2010.12.7・10

9) 清河信敬, 三春晶嗣, 山田浩之, 橋本互, 飯島一智, 森鉄也, 斎藤正博, 福島敬, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 熊谷昌明, 林泰秀, 土田昌宏, 小原明. 10 カラーフローサイトメトリーを用いた小児白血病 MRD 検出の試み. 第 21 回日本サイトメトリー学会学術集会, 京都, 6月25日-26日, 2011.

10) 清河信敬, 山田浩之, 福島敬, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 熊谷昌明, 小原明, 林泰秀, 土田昌宏. 10 カラーフローサイトメトリー解析による小児白血病のマーカー診断. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 8月12日-14日, 2011.

11) 飯島一智, 山田浩之, 三春晶嗣, 中澤温子, 藤本純一郎, 大喜多肇, 清河信敬. バーキットリンパ腫特異的分子 ZNF385B は p53 を介してアポトーシスを制御する. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 10月14日-16日, 2011.

12) 三春晶嗣, 清河信敬, 小林 健一郎, 大喜多肇, 山田浩之, 飯島一智, 森鉄也, 福島敬, 斎藤正博, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 熊谷昌明, 藤本純一郎, 林泰秀, 土田昌宏, 小原明. 10 カラーフローサイトメトリーを用いた B 前駆細胞急性リンパ芽球性白血病の MRD 検出. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 11月25日-27日, 2011.

13) 山田浩之, 田口智子, 小林健一郎, 三春晶嗣, 飯島一智, 大喜多肇, 清河信敬. B 前駆細胞性 ALL 細胞に対する IGF-1、IGFBP の作用の検討. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 11月25日-27日, 2011.

14) Iijima K, Yamada Y, Miharu M, Nakazawa A, Fujimoto J, Kobayashi K, Okita H, Kiyokawa N. Burkitt Lymphoma Specific Zinc Finger Protein ZNF385B Is Involved in Regulation of B Cell Apoptosis. 53rd ASH Annual Meeting and Exposition, San Diego, CA, December 10-13, 2011.

15) Masashi Kanayama, Junko Morimoto, Yutaka Matsui, Toshimichi Yoshida, Toshimitsu Uede : Alpha9beta1 Integrin-Mediated Signaling Serves as an Intrinsic Regulator of Pathogenic Th17 Cell Generation. 98th Annual meeting the American Association of Immunologists (San Francisco) 5.13-17, 2011

16) 村松 大輔, 岩井 淳, 青木 志保, 内山 博文, 川田 耕司, 浅田 祐弘, 岡部 満康, 草野 妃里, 二川 安弘, 宮崎 忠

昭 黒酵母 (Aureobasidium pullulans) 培養液のインフルエンザウイルス感染の重症化予防効果, 日本薬学会 第 132 回年会 2012年3月28-31日

17) Daisuke Fujikura, Masatoshi Ito, Satoko Chiba, Toshimitsu Uede, Tadaaki Miyazaki CLIPR-59 の Death receptor 誘導アポトーシスシグナルにおける機能の解析 第 34 回日本分子生物学会年会 2011年12月13-16日

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

1) 北大番号: P2009-014 (新規出願)
発明名称: Death ligand / Death receptor システム阻害による病態制御薬 宮崎忠昭

J S T と共同出願予定

2) 北大番号: P2009-108 (新規出願)
発明名称: インフルエンザウイルス感染症の治療剤

北大持分を譲渡しアウレオ単独名義で出願済 (10/8)。 宮崎忠昭

3) 北大番号: P2009-108 (国内優先出願)

発明名称: インフルエンザウイルス感染症の治療剤

上記の10/8出願を基礎とする国内優先出願を予定。 宮崎忠昭

4) 北大番号: (提出中)

発明名称: 新規な N 結合型シアロ糖鎖配糖体の製造方法

国立大学法人静岡大学農学部と共同出願中 宮崎忠昭

5) 発明名称: II型肺上皮細胞活製剤

発明者: 深田一剛, 嶋田貴志, 宮崎忠昭

6) 特願: PTC/JP2011/058804

発明名称: ウイルス感染抑制および/または感染症治療剤、ならびにウイルスの感染を抑制および/または感染症を治療する方法

発明者: 大場雄介, 宮崎忠昭

指定国: 日本を含む全指定 (PTC 加盟国)

7) 国際出願

NO: PTC/JP2011/067262

発明名称: 免疫アジュバント

発明者: 守屋直幸, 守屋祐生子

宮崎忠昭, 二川安弘, 青木志保

基礎日本特願: 特願2010-171060号

指定国: 日本を含む全指定 (PTC 加盟国)

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当無し

B細胞の分化・増殖の異常に関連する稀少疾患の創薬を目的とした細胞分化・増殖、細胞死制御機構解明研究

所 属 (独) 国立成育医療研究センター 研究所
小児血液・腫瘍研究部
研究代表者 清河 信敬

研究要旨： BAFF 受容体の小児 B 細胞性腫瘍における発現、IGF-1 受容体発現との関係やその作用を明らかにし、抗体作製に用いる BAFF 標品の調整を進めた。Death Receptor 刺激によるアポトーシス調節分子として CLIPR-59 を同定し、その機能を明らかにした。関節炎に対する抗 $\alpha 9$ インテグリン抗体の治療効果の分子機構や FK-23 の免疫制御機構を検討した。

研究分担者

- (1) 北海道大学遺伝子病制御研究所病因研究部門・分子免疫分野 上出利光
- (2) 北海道大学遺伝子病制御研究所プロバイオティクス・免疫ロジー研究部門 宮崎忠昭
- (3) 株式会社免疫生物研究所 前田雅弘
- (4) ニチニチ製薬株式会社 中央研究所 嶋田 貴志

A. 研究目的

抗体（免疫グロブリン）を産生する B 細胞は、生体防御機構における液性免疫の中心的な役割を担っている。B 細胞には、外来抗原に対して高い特異性を持った抗体を産生するクローンを効率的に増やすとともに、同時に発生してくる自

己反応性クローンや低親和性抗体産生クローンを排除するため、B 細胞抗原受容体（BCR）を中心とした刺激伝達による独自の増殖・分化制御機構が存在する。自己免疫疾患や B 細胞性腫瘍は、上記機構が破綻し、B 細胞の分化や増殖に異常が生じる結果発生すると想定されている。すなわち、自己免疫疾患は本来負の選択を受けるべき自己反応性抗体産生細胞が除去されずに異常に増殖する結果発生し、B 細胞性腫瘍は分化の過程で正常の分化増殖制御から逸脱して不死化した B 細胞の異常な増殖と考えられる。これらの B 細胞の分化や増殖の異常起因する疾患は、稀少ではあるが、医学的に重要な克服対象である。この B 細胞の独自性に着目してその制御機構を分

子レベルで解明し、得られた知見を基礎にB細胞に対する選択的な新規増殖制御法を開発することによって、上記稀少疾患に対する新規治療法開発へと結びつくことが期待される。

B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF) は、TNF ファミリーに属するB細胞生存因子として同定され、B細胞の分化段階に応じて、その生存(アポトーシス抑制)、増殖、分化因子として様々な機能を示すことが明らかにされており、その過剰作用が自己免疫疾患やB細胞性腫瘍の発症に関与することが示唆されている。BAFF受容体(-R)の会合分子とその下流のエフェクター分子が複数同定されており、そのアポトーシス制御機能について解析が行われている。

Death associated protein 3 (DAP3) は、リンパ球においてTNF family分子TRAILのアポトーシスシグナルに重要で、その過剰発現がリンパ球にアポトーシスを誘導することが明らかにされており、やはりB細胞のアポトーシス制御にかかわる分子である。

オステオポンチンは $\alpha 9\beta 1$ インテグリンのリガンドで、細胞接着、細胞遊走、増殖、生存、遺伝子発現を誘導する。オステオポンチン上の $\alpha 9\beta 1$ インテグリン結合配列に対する抗体阻害が関節リウマチモデルである抗コラーゲン抗体誘導性関節炎(CAIA)及びコラーゲン誘導性関節炎(CIA)を顕著に抑制する事が知られており、自己免疫疾患の1つ

である関節リウマチにおける $\alpha 9\beta 1$ インテグリン機能の重要性が明らかにされつつある。

三者はいずれもB細胞の分化・増殖制御やB細胞が関与する免疫応答において重要な役割を担っており、その解析が、B細胞の分化・増殖の異常によって発症する自己免疫疾患やB細胞性腫瘍の治療において有効な新規標的分子の発見につながる可能性が期待される。

そこで、本研究では、“BAFF”、“DAP3”、“オステオポンチン”三者の機能的関連性に着目してB細胞の増殖・分化制御機構を分子レベルで解明し、その成果を応用してこれらを連携して調節することでより効果的なB細胞の増殖制御法開発に結びつけ、B細胞の分化・増殖の異常に起因する自己免疫疾患やB細胞性腫瘍に対する新規治療法開発へ発展させることを目指す。

B. 研究方法

1. 臨床検体

臨床検体のBAFF-Rを含むマーカー解析は、成育医療研究センターで行っている小児白血病・リンパ腫のマーカー中央診断の一環として、倫理委員会の承認を受けた上で、中央診断に関する同意を取得した患児に対して実施した。臨床検体のマイクロアレイ解析は個人情報保護法施行以前に成育医療研究センターで保存され、連結不可能匿名化された臨床検体について、倫理委員会の承認を得た上で実施した。

2. 細胞培養、試薬、生化学的解析

ヒト B 前駆細胞性 (BCP-) 急性リンパ芽球性白血病 (ALL) 細胞株 NALM-16 および RS4;11、ヒト Hairy cell 白血病細胞株 MLMA、ヒト慢性骨髄性白血病細胞株 K562、ヒト胎児腎由来培養細胞株 HEK293 および HEK293T を用いた。一部の試験で、遺伝子組み換え型ヒト BAFF (100ng/ml)、同 IGF-1 (100ng/ml)、同 TNF- α (100 ng/ml)、ヤギポリクローナルおよびマウスモノクローナル抗 BAFF-R 抗体 (各 5 μ g/ml) を添加して効果について検討した。細胞増殖は、トレパンブルー法と、WST-1 アッセイ (同仁化学研究所) により検討した。

HEK293 細胞に BAFF 発現ベクターを、HEK293T 細胞に CLIPR-59、TRADD、TNFR1、DR3 の発現ベクターあるいは SiRNA をトランスフェクションし、免疫ブロット法および免疫沈降法により解析した。caspase の酵素活性を caspase-glo assay system (Promega) を用いて測定した。

3. フローサイトメトリー (FCM) 解析

直接法による蛍光標識抗体を用いた染色を行い、FCM により 5 カラー解析を行ない、20%以上を陽性と判定した。細胞周期については、BrDU の取り込みを FITC-標識抗 BrDU 特異抗体と 7AAD による二重染色により解析した。

4. 核酸の抽出と解析

RNA は、RNeasy kit (Qiagen 社) 等で抽出した。reverse transcriptase で cDNA を合成し、SYBR-Green を用いて定量 PCR を行なった。また、WT-Ovation Pico RNA Amplification System (NuGen 社) により cDNA を合成、増幅して、マイクロアレイ

(Affimetrix 社 GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array) による網羅的遺伝子発現を行った。

5. マウスを用いた解析

関節リウマチモデルマウスとして、DBA/1 マウスに Type II コラーゲンと CFA を併用投与することによって CIA マウスを作成し、実験に用いた。所属リンパ節、後肢足関節病変部から採取した組織、細胞を用いて、組織免疫染色、FCM、定量 PCR 法により解析を行った。

インフルエンザウイルス感染実験は、生理食塩水で 15mg/0.2ml/head に調整した FK-23 (Heat-treated *Enterococcus faecalis* FK-23) を経口投与した C57BL/6 マウスに、麻酔下、アイソレーター内で、A/Puerto Rico/8/34 (PR8) (H1N1 subtype) を 1000pfu/head で経鼻感染させた。肺のウイルス力価は、プラークアッセイにより測定した。

FK-23 の免疫調整剤としての作用について、種々の状態で調整した FK-23 を BALB/c マウスに投与し、腸間膜リンパ節とパイエル板を摘出して検討した。また、脾臓から調整した細胞の ex vivo 培養系に添加し、培養上清を回収して ELISA によるサイトカイン定量を行なった。

(倫理面への配慮)

本研究で実施した臨床検体を用いた解析は、実施に際して当該倫理委員会および施設責任者の承認を得て、関連指針を遵守して実施した。また、個人情報保護法を遵守し、検体提供者への人権擁護や個人情報保護に最善、細心の注意を払っ

て実施した。

動物実験に関しては、関連法規を遵守して動物愛護と動物福祉の観点に立った倫理的配慮をおこない、あらかじめ当該研究施設の動物実験委員会へ実験の実施について申請し、承認を得てから行った。

C. 研究結果

1. B 細胞性腫瘍に対する BAFF、IGF-1 の作用の解析

成熟 B 細胞性腫瘍 29 例について検討した結果、BAFF-R の発現を 9 例 (30.03%) で認めた。BAFF-R 陽性例では、ほとんどが鎖陽性症例で、CD21、CD27、CD28 の発現の頻度が高い、などの表面抗原の特徴を認めた。また、遺伝子発現解析の結果、BAFF-R、BCMA、TACI の BAFF 受容体群の発現が成熟 B リンパ性腫瘍の特徴的であることが示唆された。

一方、54 例の BCP-ALL 症例について検討した結果、13 例 (24.1%) で、BAFF-R 陽性であり、成熟傾向のある亜群で陽性率が高い傾向を認めた。これに対して、IGF-1R は 9 例 (16.7%) で陽性であり、未分化な亜群で発現する傾向を認め、BAFF-R と IGF-1R は排他的な発現傾向を認めた。培養細胞を用いた検討により、IGF-1 が、BCP-ALL に対して細胞周期に入る細胞を増加させる効果や増殖亢進する効果を示すことが明らかとなった。

2. 組替え型 BAFF の調整と市販の抗 BAFF 抗体の解析

ヒト由来 HEK293 細胞に、精製用の FLAG タグ配列を付加した BAFF 遺伝子を導入して、その蛋白発現を確認した。大量の精製蛋白の調整を試みたが、通常培養では免疫原として使用する量の調整は困難であった。市販の抗 BAFF 抗体について、BAFF の中和活性を検討したが、僅かな効果しか認めなかった。

3. アポトーシス制御機構の解析

Death receptor (DR)6 に会合する分子として同定した CLIPR-59 の機能解析を行なった。TNFR1 に対して CLIPR-59 の野生型は会合したが、C 末の欠失変異体は会合しなかった。また、DR3 とは会合しなかった。TNF- α 刺激により、CLIPR-59 と TNFR1 の会合が減弱した。siRNA により CLIPR-59 の発現を抑制したところ、TNF- α 刺激後の細胞の生存率が上昇し、caspase-8、caspase-3/7 の活性化が抑制された。逆に、CLIPR-59 を発現させると TNF- α 刺激による細胞死の誘導が増強した。また TNF- α 刺激後 CLIPR-59 と caspase-8 および FADD、TRAD、RIP1、CYLD との会合が認められた。さらに、CLIPR-59 により RIP1 のユビキチン化が制御されることが明らかになった。

3. CAIA 関節炎モデルを用いたオステオポンチンの作用の解析

初年度に、CAIA を誘導したマウスに対して抗 α 9 インテグリン抗体が関節炎発症に対する予防的、治療的效果を示すことを明らかにし、その作用機構が病変部細胞の 9 インテグリンのリガンド

刺激による炎症性サイトカイン/ケモカイン分泌を抑制し、Th17 細胞の機能を抑制するためであることを示した。今年度は、所属リンパ節における Th17 細胞の動態を更に詳細に検討した。効果細胞としての Th17 細胞は、所属リンパ節でクローン増殖後、病巣である関節滑膜組織へと移動する事により、組織破壊を惹起し、この移動には、Th17 細胞が発現するケモカイン受容体、CCR6 が重要な役割を果たしている。しかし、抗 α 9 インテグリン抗体を投与する事により、cDC や APC によって産生されるオステオポンチンとテナーシン C と細胞上に発現する α 9 インテグリンの autocrine and paracrine interaction を阻害することにより、Th17 細胞細胞の CCR6 発現が著明に低下し、Th17 細胞細胞の産生そのものも減弱するが、長期的には、所属リンパ節外への移動が抑制されるために関節炎の程度が改善することが示唆された。

4. FK-23 の免疫系に対する作用

インフルエンザウイルス感染マウスに事前に FK-23 投与することにより生存率が有意に上昇することが明らかとなった。ウイルス感染後の肺におけるウイルス増殖推移には差は認められなかったが、感染後に肺に流入する白血球が抑制されていることが明らかとなった。これは、血管透過性亢進を抑制するためであることが示唆された。

一方、マウス脾臓細胞を用いた ex vivo 実験において、FK-23 の加熱処理菌

体による処理は IL-6、IL-10、IL-12(p70)、IFN- γ 等のサイトカインを産生させることが明らかとなり、加熱処理菌体から脂質性タンパク・ポリサッカライドを除去したものや細胞壁成分は、さらに強い作用を示した。FK-23 サンプルの経口投与によるマウスの腸間膜リンパ節やパイエル板でのサイトカインの遺伝子発現への影響を調べたところ、同様の結果が得られた。

D. 考察

1. B 細胞性腫瘍に対する BAFF、IGF-1 の作用の解析

BAFF-R が成熟 B 細胞性リンパ腫の約 3 割に発現していること、BAFF-R 陽性症例は陰性症例とは異なる表面形質を示す亜群であることが明らかとなった。また、マイクロアレイの結果からは、3 者の BAFF 受容体の発現が、成熟 B 細胞性腫瘍に特徴的であることが示され、症例数が 3 例と少ないものの、DLBCL では全例で BAFF-R が発現していることが示唆された。今後、BAFF-R を含む膜表面分子や遺伝子の発現との関係や、治療反応性や予後などの病態との関連について検討を進める。

一方、BCP-ALL では約 2 割で、特に成熟傾向のある亜群に陽性例が多いことが明らかとなり、BAFF が BCP-ALL の特定の亜群に対して作用する可能性が示唆される。今後、BAFF の血中濃度の測定や予後との関係について解析を進め、BCP-ALL における BAFF-R の発

現との病態との関係について検討を進める。

IGF-1R は BCP-ALL の約 2 割で、BAFF-R 陽性群とは異なる亜群に発現する傾向を認め、IGF-1 が BCP-ALL の増殖を促進すること、IGF-結合蛋白がその作用を抑制することが示された。今後、BCP-ALL の病態における IGF-1、IGF-1R、IGF-結合蛋白の意義について明らかにし、新規治療法等の臨床への応用について検討を進める。

2. 組替え型 BAFF の調整と市販の抗 BAFF 抗体の解析

先行研究での検討も含め、市販の抗 BAFF 抗体では、BAFF に対する十分な中和活性を認めなかったことから、新たな抗 BAFF 抗体の作製が望まれる。今後、大量培養系を用いて、免疫原として用いる天然型の組替え型 BAFF 蛋白の大量調整を目指す。

3. アポトーシス制御機構の解析

今回、TNFR に会合するアポトーシス制御分子として CLIPR-59 を同定した。CLIPR-59 は TNFR1 に会合しており、TNF- α 刺激後、受容体から離脱し、FADD, caspase-8, RIP1 と Complex II を形成し、この段階で、CYLD との会合により RIP1 のユビキチン化を制御して caspase-8 の活性化することが示され、TNFR1 を介するアポトーシスの亢進に働く新たな分子であることが解明された。これらの分子のユビキチン-プロテアソーム経路を介したタンパク質レベルでの発現制御が CLIPR-59 の機能制御

に重要な働きをしていると考えられる。

3. CAIA 関節炎モデルを用いたオステオポンチンの作用の解析

今回の研究により、関節炎モデルにおいて、 $\alpha 9$ インテグリンとそのリガンドであるオステオポンチンおよびテナーシン C との相互作用により、自己免疫疾患に重要な役割を果す Th17 細胞の分化、増殖、所属リンパ節から病巣への移動を惹起している事、抗 $\alpha 9$ インテグリン抗体投与によりこの過程が抑制されることが関節炎に対する予防、治療効果のメカニズムの一部を担っていることが明らかになった。本研究で作製した抗ヒト $\alpha 9$ インテグリンモノクローナル抗体は関節リウマチ治療への応用が期待される。

4. FK-23 の免疫系に対する作用

インフルエンザウィルス感染において、FK-23 投与により肺の血管透過性亢進が抑制されることによって肺の炎症が抑制され、肺損傷を軽減することで、同感染による死亡率の軽減に寄与していることが示唆された。

また、FK-23 の免疫調整剤としての成分が細胞壁成分に含まれていることが明らかとなり、今後さらにその成分同定や作用機序解明を進める。

E. 結論

細胞増殖、アポトーシス制御機構における BAFF、IGF-1、Death receptor 等の分子機能や、間接リウマチモデルにおけるオステオポンチンおよびその受容体

である $\alpha 9$ インテグリンの機能的役割について解析を進めた他、FK-23 の免疫制御の分子機構についても検討を行なった。今後、さらにそれぞれの解析を継続するとともに、B 細胞異常によって起こる自己免疫疾患や、B 細胞性腫瘍における、それぞれの役割とその相互関係について解析を進め、新規抗体樹立による新規治療法開発について、検討を行なっていく。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hamamoto S, Yasui T, Okada A, Hirose M, Matsui Y, Kon S, Sakai F, Kojima Y, Hayashi Y, Tozawa K, Uede T, Kohri K : Crucial role of the cryptic epitope SLAYGLR within osteopontin in renal crystal formation of mice. *J Bone Miner Res.* 2011 Dec;26(12):2967-77.
- 2) Kanayama M, Morimoto J, Matsui Y, Ikesue M, Danzaki K, Kurotaki D, Ito K, Yoshida T and Uede T: Alpha9beta1 Integrin-Mediated Signaling Serves as an Intrinsic Regulator of Pathogenic Th17 Cell Generation. *J Immunol.* 2011 Dec 1;187(11):5851-64.
- 3) Morimoto J, Sato K, Nakayama Y, Kimura C, Kajino K, Matsui Y, Miyazaki T and Uede T: Osteopontin modulates the generation of memory CD8+T cells during influenza virus infection. *J Immunol.* 2011 Dec 1;187(11):5671-83.
- 4) Fujikura D, Ito M, Chiba S, Harada T, Perez F, Reed JC, Uede T, Miyazaki T. CLIPR-59 regulates TNF- α - induced apoptosis by controlling ubiquitination of RIP1. *Cell Death Dis.*, 2011;3:e264
- 5) Kondoh M, Fukada K, Fujikura D, Shimada T, Suzuki Y, Iwai A, Miyazaki T. Effect of water-soluble fraction from lysozyme-treated *Enterococcus faecalis* FK-23 on mortality caused by influenza A virus in mice. *Viral Immunology*, 2012, (1):86-90.
- 6) Sato K, Iwai A, Nakayama Y, Morimoto J, Takada A, Maruyama M, Kida H, Uede T, Miyazaki T. Osteopontin is critical to determine symptom severity of influenza through the regulation of NK cell population. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012 ;417(1):274-279.
- 7) Iwai A, Takegami T, Shiozaki T, Miyazaki T. Hepatitis C virus NS3 protein can activate the Notch-signaling pathway through binding to a transcription factor, SRCAP. *PLoS ONE.*, 2011; 6(6): e20718.
- 8) Kim E, Okumura M, Sawa H, Miyazaki T, Fujikura D, Yamada S, Sugahara K, Sasaki M, Kimura T. Paradoxical effects of chondroitin sulfate-E on Japanese. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011 ;409(4):717-22.

2. 学会発表

- 1) 清河信敬, 三春晶嗣, 山田浩之, 橋本 互, 飯島一智, 森鉄也, 斎藤正博, 福島敬, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 熊谷昌明, 林泰秀, 土田昌宏, 小原明. 10 カラー

- フローサイトメトリーを用いた小児白血病 MRD 検出の試み. 第 21 回日本サイトメトリー学会学術集会, 京都, 6 月 25 日-26 日, 2011.
- 2) 山田浩之, 清河信敬, 橋本互, 飯島一智, 嶋晴子, 嶋田博之, 森鉄也, 福島敬, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 熊谷昌明, 小原明, 林泰秀, 土田昌宏. 小児白血病における CD66c 発現の意義. 第 21 回日本サイトメトリー学会学術集会, 京都, 6 月 25 日-26 日, 2011.
- 3) 清河信敬, 山田浩之, 福島敬, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 熊谷昌明, 小原明, 林泰秀, 土田昌宏. 10 カラーフローサイトメトリー解析による小児白血病のマーカー診断. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 8 月 12 日-14 日, 2011.
- 4) 清河信敬, 飯島一智, 加藤元博, 藤本純一郎, 林泰秀, 小原明. MLL 関連キメラが検出されない CD10 陰性 ALL のマーカーと発現遺伝子の特徴. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 10 月 3 日-5 日, 2011.
- 5) 飯島一智, 山田浩之, 三春晶嗣, 中澤温子, 藤本純一郎, 大喜多肇, 清河信敬. バーキットリンパ腫特異的分子 ZNF385B は p53 を介してアポトーシスを制御する. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 10 月 14 日-16 日, 2011.
- 6) 小林 健一郎, 福島敬, 南木融, 清河信敬, 三春晶嗣, 山田浩之, 飯島一智, 大喜多肇, 森鉄也, 熊谷昌明, 藤本純一郎, 斎藤正博, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 林泰秀, 土田昌宏, 小原明. TCCSG ALL 登録症例のキメラ遺伝子発現と細胞マーカーとの関連に関する検討. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 11 月 25 日-27 日, 2011.
- 7) 三春晶嗣, 清河信敬, 小林 健一郎, 大喜多肇, 山田浩之, 飯島一智, 森鉄也, 福島敬, 斎藤正博, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 熊谷昌明, 藤本純一郎, 林泰秀, 土田昌宏, 小原明. 10 カラーフローサイトメトリーを用いた B 前駆細胞急性リンパ芽球性白血病の MRD 検出. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 11 月 25 日-27 日, 2011.
- 8) 飯島一智, 清河信敬, 小林 健一郎, 大喜多肇, 山田浩之, 三春晶嗣, 森鉄也, 福島敬, 南木融, 斎藤正博, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 熊谷昌明, 藤本純一郎, 林泰秀, 土田昌宏, 小原明. 東京小児がん研究グループ(TCCSG)ALL 治療研究登録症例の網羅的遺伝子発現解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 11 月 25 日-27 日, 2011.
- 9) 山田浩之, 田口智子, 小林健一郎, 三春晶嗣, 飯島一智, 大喜多肇, 清河信敬. B 前駆細胞性 ALL 細胞に対する IGF-1、IGFBP の作用の検討. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 11 月 25 日-27 日, 2011.
- 10) Katagiri YU, Kiyokawa N. The human CD10 lacking an N-glycan at Asn628 is deficient in surface expression and neutralendopeptidase activity. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 千葉, 11 月 27 日-29 日, 2011.

- 11) Iijima K, Yamada Y, Miharu M, Nakazawa A, Fujimoto J, Kobayashi K, Okita H, Kiyokawa N. Burkitt Lymphoma Specific Zinc Finger Protein ZNF385B Is Involved in Regulation of B Cell Apoptosis. 53rd ASH Annual Meeting and Exposition, San Diego, CA, December 10-13, 2011.
- 12) 上出利光 : Matricellular proteins and their integrin receptors –new drug targets for inflammatory disorders and cancers---. 平成22年度大学院教育改革支援プログラム国際推薦制度による留学生教育の実質化「生体侵襲ダイナミクス国際シンポジウム」三重大学、津、1月24日－25日、2011
- 13) Masashi Kanayama, Junko Morimoto, Yutaka Matsui, Toshimichi Yoshida, Toshimitsu Uede : Alpha9beta1 Integrin-Mediated Signaling Serves as an Intrinsic Regulator of Pathogenic Th17 Cell Generation. 98th Annual meeting the American Association of Immunologists (San Francisco) 5.13-17, 2011
- 14) 黒滝大翼, 田村智彦、上出利光 : 細胞感染時の生体防御反応におけるリンパ節CD169陽性髄質マクロファージの役割の解明。第22回日本生体防御学会学術総会(沖縄)6月29日-7月1日、2011
- 15) 村松 大輔, 岩井 淳, 青木 志保, 内山 博文, 川田 耕司, 浅田 祐弘, 岡部 満康, 草野 妃里, 二川 安弘, 宮崎 忠昭 黒酵母 (*Aureobasidium pullulans*) 培養液のインフルエンザウイルス感染の重症化予防効果, 日本薬学会 第132回年会 2012年3月28-31日
- 16) 宮崎 忠昭 インフルエンザの病態形成機構と生薬、グルカン及び乳酸菌による予防効果, 第85回日本薬理学会年会, シンポジウム 2012年3月14-16日
- 17) Daisuke Fujikura, Masatoshi Ito, Satoko Chiba, Toshimitsu Uede, Tadaaki Miyazaki CLIPR-59のDeath receptor誘導アポトーシスシグナルにおける機能の解析 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月13-16日
- 18) NAKAYAMA Yosuke, HARADA Tanenobu, ASAI Azusa, MIYAZAKI Tadaaki, MARUYAMA Mitsuo. A putative role of novel GEF, Zizimin2/DOCK11 in immunodefense and its involvement in immunosenescence. 第40回日本免疫学会学術集会 2011年11月27-29日
- 19) 内山 博文, 浅田 祐弘, 草野 妃里, 二川 安弘, 宮崎 忠昭 黒酵母培養液投与によるウシ疾病予防効果の検証 第152回日本獣医学会学術集会 2011年9月19-21日
- 20) 深田一剛、近藤正敏、中山洋佑、藤倉大輔、嶋田貴志、鈴木義充、宮崎忠昭 The effect of *Enterococcus faecalis* FL-23 on the prevention of influenza to reduce inflammatory leukocyte influx into the lung 第6回アジア乳酸菌学会 2011年9月8-10日
- 21) 内山 博文, 浅田 祐弘, 草野 妃里, 二川 安弘, 宮崎 忠昭 黒酵母培養液投与によるウシ疾病予防効果の検証. 日本畜産学会 114回大会 2011年8月26-27日

22) 村松 大輔, 内山 博文, 青木 志保,
数馬田 美香, 原田 種展, 中山 洋佑,
浅田 祐弘, 草野 妃里, 二川 安弘, 宮
崎 忠昭 高濃度 b グルカンを含む黒酵
母 Aureobasidium pullulans 培養液のイ
ンフルエンザウイルス感染防御効果
第 22 回日本生体防御学会学術集会

2011 年 6 月 29 日-7 月 1 日

23) 宮崎 忠昭 インフルエンザの病態
形成機構とその予防・治療への生薬・天
然物成分の活用, 第 62 回日本東洋医学
会学術総会, シンポジウム 2011 年 6
月 10-12 日

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

1) 発明名称: II型肺胞上皮細胞活
製剤

発明者: : 深田一剛, 嶋田貴志, 宮崎
忠昭

2) 特願 : PTC/JP2011/058804

発明名称 : ウイルス感染抑制およ
び/または感染症治療剤、ならび
にウイルスの感染を抑制および
/または感染症を治療する方法

発明者: : 大場雄介, 宮崎忠昭

指定国 : 日本を含む全指定 (PTC
加盟国)

3) 国際出願NO:

PTC/JP2011/067262

発明名称 : 免疫アジュバント

発明者 : 守屋直幸, 守屋祐生子

宮崎忠昭, 二川安弘, 青木志保

基礎日本特願 : 特願2010-171060
号

指定国 : 日本を含む全指定 (PTC
加盟国)

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

治療遺伝子発現用レトロウイルスベクターを用いた 遺伝子導入細胞による難治性疾患の治療実施のため の支援体制の構築

所 属 国立成育医療研究センター研究所
研究代表者 小野寺 雅史
研究期間 平成22年4月～平成24年3月

研究要旨 難治性疾患に対する造血幹細胞遺伝子治療の実施に向け、1) 臨床研究で使用される造血幹細胞のソースの評価、2) モデルマウスを用いた慢性肉芽症に対する遺伝子治療の有効性の評価、3) 当センターにおける細胞調製室の整備、4) 遺伝子治療臨床研究の実施体制の強化、5) 大量ヒト造血細胞を用いた Dry Run の実施、6) 患者染色体への治療ベクター挿入部同定法の確立、7) GMP 準拠ウイルスの製造に対する Working Cell Bank の作製などを行った。なお、慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療は平成 24 年 3 月 28 日に行われた厚生科学審議会科学技術部会にて了承され、平成 24 年度内の開始を目指している。

研究分担者

- (1) 峰野 純一 (タカラバイオ株式会社)
- (2) 大津 真 (東京大学医科学研究所)
- (3) 河合 利尚 (国立成育医療研究センター)

A. 研究目的

現在、欧米を中心に原発性免疫不全症等、小児難治性疾患に対する造血幹細胞遺伝子治療が広く行われ、造血幹細胞移植の適応とならない患者に対して根治療法と呼べるほどの治療成績を上げている。一方、我が国の現状を鑑みたとき、ウイルスベクターの開発など遺伝子治療の基礎的研究に関しては優れた技術を有するものの、これら技術を臨床の場で応用する橋渡し機関が欠如しているため、遺伝子治療臨床研究の実施が遅々として進まず、欧米のそれに比して大きな遅れをとっている。そこで、本研究では、小児難治性疾患に対する我が国独自の遺伝子治療臨床研究推進のため、GMP 準拠ウイルス上清の製造、効率的な造血幹細胞への遺伝子導入法や遺伝子治療臨床研究の安全性や有効性を評価する系の確立ならびに実際の遺伝子治療を行う際に必要となる実施体制の整備などを行い、包括的に造血幹細胞遺伝子治療を支援する体制を構築していく。

B. 研究方法

1. 臨床研究で使用される造血幹細胞のソースの評価

Lonza 社より入手した臍帯血、骨髄、G-CSF 刺激末梢血由来の CD34 陽性細胞を NOG マウスに移植して、その未熟性を検討した。

2. モデルマウスを用いた慢性肉芽症遺伝子治療の有効性の評価

モデルマウスとして gp91^{phox} 遺伝子欠損マウスの骨髄細胞を用いて慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療の有効性を検討した。

3. 当センターにおける細胞調製室の整備

当センター研究所 5 階に遺伝子治療臨床研究で使用される細胞調製室 (Cell Processing Room: CPM) を設置した。

4. 遺伝子治療臨床研究の実施体制の強化

専従研究者の育成及び病院内の遺伝子治療実施に関する連携を強化した。

5. 大量ヒト造血細胞を用いた Dry Run の実施

大量 Jurkat 細胞やヒト末梢血由来 T 細胞を用いた遺伝子導入実験を行った。

6. 患者染色体への治療ベクター挿入部同定法の確立

実際に遺伝子治療臨床研究を受けた患者検体を用いて、治療ベクターの染色体挿入部位の同定を行った。

7. GMP 準拠ウイルスの製造に対する Working Cell Bank の作製

Malech 博士らが BioReliance 社に依頼して作製した MCB より 15 vial の細胞株を入手し、タカラバイオ社に依頼して WCB の作製を開始した。

(倫理面への配慮)

遺伝子治療臨床研究に向けた研究においては、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成16年2月19日)に従って準備し、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」(平成14年3月27日、平成16年12月28日全部改正、平成20年12月1日一部改正)に基づいて行った。実施計画書作成に必要な前臨床研究の一部では、臍帯血等の造血幹細胞を利用しているが、それら一連の研究は施設内の倫理委員会の承認を受けている。動物実験に関しては、「動物の愛護及び管理に関する法律」「動物愛護管理法の一部を改正する法律」「国立成育医療研究センターにおける動物実験に関する指針」を遵守して行う。また、挿入部位同定に関しては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づき行い、得られたデータの管理に関しては、連結可能匿名化にて、個人情報保護法を遵守して行った。

C. 研究結果

1. 臨床研究で使用される造血幹細胞のソースの評価

マウスへの移植実験において臍帯血由来、骨髓由来、G-CSF刺激末梢由来のCD34陽性細胞の順でキメリズムが高かった。また、各々のCD34陽性細胞は骨髓球系やリンパ球系(T細胞、B細胞)へと分化したことから、分化傾向に偏りはなく、得られたキメリズムの違いは各CD34陽性細胞中に存在している未熟細胞の割合の違いによるものと推測できた。

2. モデルマウスを用いた慢性肉芽症遺伝子治療の有効性の評価

モデルマウスの骨髓に正常gp91phox遺伝子を導入し、放射線照射したマウスに移植したところ、これら細胞はすべての骨髓球系、リンパ球系に分化し、長期にわたる骨髓再構築能を示した。また、活性酸素産生量は必ずしも蛍光色素の蛍光強度と相関せず、蛍光色素陽性細胞においても活性酸素を産生しない細胞群が存在した。

3. 当センターにおける細胞調製室の整備

8m x 6mの実験室内に、細胞調整室、一次ガウンニング室と前室、器財保管のための準備室を設置し、同時に資料や細胞を保管する保管室も用意した。また、安全キャビネット(クラスIIa type)、多本架冷却遠心機、CO₂インキュベーター、輸血用大型遠心機、冷凍・冷蔵庫、-80℃冷凍庫、-150℃冷凍庫、オートクレーブなどを室内に設置した。

4. 遺伝子治療臨床研究の実施体制の強化

専従研究者の育成としては、専従研究者やその研究補助員とともに免疫学的検査法(FACS、

ELISA、免疫グロブリン産生、TRECなど)を導入した。また、病院内の体制整備としては、各診療科医師、看護部、薬剤部などのco-medicalと頻回に遺伝子治療に関する話し合いを行い、遺伝子治療が遅滞なく進むような体制強化を行った。

5. 大量ヒト造血細胞を用いたDry Runの実施

細胞のviabilityはいずれも90%を越え、大量培養による細胞の障害は少ないと考えられた。最終的に遺伝子導入効率は30%程度であり、この値はsmall scaleで得られる値と同等であった。ここで行われた操作をSOPとして文書化し、次に行われるヒト臍帯血由来CD34陽性細胞への遺伝子導入で使用し、最終的なSOPとして使用する。

6. 治療ベクター挿入部同定法の確立

すべての検体において、LAM-PCRで得られた挿入部位は網羅的解析でほぼ得ることができた。検体1、2では、約半分の遺伝子挿入部位がLAM-PCRで得られたものであったが、検体3、4ではLAM-PCRで得ることができなかった多くの挿入部位を検出することができた。検体1、2でLAM-PCRで特異的なバンドが得られ、検体3、4ではより多くのバンドが出た傾向と一致しており、検体3、4の方がクロナリティー性が低いことが示唆された。

7. GMP準拠ウイルスの製造に対するWCBの作製

臨床用ウイルス上清MFGSgp91産生細胞MCB(293-SPA-MFGSgp91-155 MCB, LN: 2037-0022)3バイアルを用いて、ワーキングセルバンク(WCB)作製のための検討を行った。BioReliance社のGMP Production Final ReportではMCBを融解した際の細胞濃度と細胞生存率はそれぞれ 5.12×10^5 /ml、95%であったが、それと比較して細胞生存率が非常に低かったが、今後も培養条件等を検討する。

D. 考察

本研究の目的は、我が国独自の遺伝子治療の実施を支援していく体制を構築することにあるが、その具体例として実際に慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療を行い、その中で起こりうる問題点や課題を解決することで、実施に必要なインフラを整備することにある。なお、当該遺伝子治療臨床研究は平成23年2月24日に当センターのIRBにて承認され、その後、国の審査として平成24年3月28日に開催された厚生科学審議会科学技術部会にて了承された。

さて、遺伝子治療臨床研究を行うためには、その準備として多大な労力と時間を要し、また、実際に遺伝子治療を行った場合でも患者安全性の観点から長期間にわたるフォロー・アップが必要となる。その具体例を下記に示すが、大きくは1.

研究的側面、2. 事務的側面、3. 実施体制の構築の3つに分類される。



1. 研究的側面

対象疾患を決定した後、準備期間中にマウス・ヒト細胞を用いて遺伝子治療の有効性、安全性を確認し、その遺伝子治療臨床研究の妥当性を評価する必要がある。たとえば、今回の対象疾患である慢性肉芽腫症は他の対象疾患である ADA 欠損症や X-SCID とは異なり、遺伝子が導入された細胞の増殖優位性は発揮されないとされ、今回の遺伝子治療の難しさを物語っている。次に前臨床期間では、大型動物を用いた研究や実際の遺伝子治療を想定した Dry Run の実施、また、臨床研究中は患者の安全性を担保する安全性検査の導入が必要となる。本研究では、マウスモデルを用いた研究、患者由来 iPS 細胞を用いた研究、大量ヒト細胞を用いた Dry Run の実施、また、治療ベクターの挿入部位の確認などがこれに当たる。

2. 事務的側面

これには治療用ベクター(GMP 準拠のウイルスベクター上清)の入手、実施計画書の作成、細胞調製の際に必要なとされる各工程の標準作業手順書の作成などがあげられるが、本研究ではこれら研究に対しては重点的に行っておらず、別の研究事業(成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業)で達成した。

3. 実施体制

これには実際に遺伝子治療臨床研究を行う医療機関における co-medical 等の連携強化、全国規模の対象疾患の連絡網の整備、遺伝子導入細胞を培養するための細胞調製室の整備、研究結果を公開していく広報などが上げられるが、本研究では、Cell Processing Room の整備や医療関係者との連携強化などがそうである。

このように実際に遺伝子治療臨床研究を行う

に際しては、hard 面、soft 面の両面を整備して行かなければならない。ただ、本研究では実際に慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療を準備することでこれらの面が整備でき、その基本構造は構築できたと思われる。今後は、この基本構造の基に遺伝子治療臨床研究を継続し、より機能的な体制を構築していきたいと考えている。

E. 結論

慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療臨床研究を実施するに当たり、

1. マウスモデル等を用いた慢性肉芽腫症の病態を解析した。
2. 遺伝子治療臨床研究の際に使用される細胞調製室の整備と遺伝子導入に関する SOP の作成を作成した。
3. 患者安全性評価に関する治療ベクターの挿入部位解析法を確立した。
4. 国内での臨床用ウイルスベクター製造に向けた GMP 準拠ウイルス製造に関する Working Cell Bank の作製を開始した。
5. 当病院の実施体制の強化などを行った。

なお、本遺伝子治療臨床研究は平成 24 年 3 月 28 日に行われた厚生科学審議会科学技術部会にて了承され、平成 24 年度内に開始する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tozuka Y, Kumon M, Wada E, Onodera M, Mochizuki H, Wada K. Material obesity impairs hippocampal BDNF production and spatial learning performance in young mouse offspring. *Neurochem Int* 57(3):235-247,2010.
2. Hirata Y Hamanaka S, Onodera M. Transactivation of the dopamine receptor 3 gene by a single provirus integration results in development of B cell lymphoma in transgenic mice generated from retrovirally transduced embryonic stem cells. *Blood* 115(19): 3930-3938,2010.
3. Miyamoto N, Tanaka R, Shimura H, Watanabe T, Mori H, Onodera M, Mochizuki H, Hattori N, Urabe T. Phosphodiesterase III inhibition promotes differentiation and survival of oligodendrocyte progenitors and enhances