

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592041
 研究課題名（和文） 難治性ぶどう膜炎に対する神経ペプチド遺伝子導入ヒト免疫制御細胞の開発
 研究課題名（英文） Development of CGRP-gene-transfected immune regulatory cells for treatment of refractory uveoretinitis in human.
 研究代表者
 毛塚 剛司（KEZUKA TAKESHI）
 東京医科大学・医学部・講師
 研究者番号：00287137

研究成果の概要：

難治性ぶどう膜炎患者由来樹状細胞を用いた神経ペプチド(CGRP)遺伝子の導入と、その免疫学的解析を行った。健常者の単核球同様、CGRP 遺伝子導入細胞からの CGRP 産生は 40～60pg/ml であった。難治性ぶどう膜炎を持つベーチェット病患者から得られた CGRP 遺伝子導入細胞由来の培養上清中サイトカインは、対照群と比べて有意差を見いだせなかった。CGRP 刺激樹状細胞表面分子で免疫調節に関与する接着分子を検討したが、有意な結果が得られなかった。これらのことから、正常細胞を用いた CGRP 遺伝子導入実験では、制御性細胞を作成できるが、ベーチェット病患者由来の細胞では免疫制御細胞を誘導しなかった。今後、他の難治性ぶどう膜炎でも同様に検討する必要がある。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2007 年度 | 2,200,000 | 660,000 | 2,860,000 |
| 2008 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：CGRP、遺伝子導入細胞、難治性ぶどう膜炎、制御性細胞、神経ペプチド

1. 研究開始当初の背景

眼球の前房内には免疫抑制物質と考えられる TGF-β2 が多く、その他種々の神経ペプチド（-MSH、CGRP、VIP など）も存在している。

以前、研究代表者らは前房内の TGF-β2 と同濃度の量でマクロファージを刺激すると刺激マクロファージが免疫制御システムを獲得する

ことを報告した。またTGF-β2だけではなく、近年新たな免疫抑制物質と考えられている神経ペプチドの一種、CGRPやVIPが眼内免疫制御システムに参与していることを証明し、失明率の高いヒト難治性ぶどう膜炎の実験モデルである、実験的自己免疫性マウスぶどう膜網膜炎 (EAU) の発症を抑制できることを立証した。また、EAUに対して、より抑制効果の高い治療法と考えられるCGRP遺伝子を導入した樹状細胞を用いて遺伝子治療を行い、EAUの発症を軽減させることに成功した。このように、免疫寛容の場である前房内に同じく存在する神経ペプチドについては、研究代表者により世界にさきがけて基礎解析が終了しつつあり、ヒト遺伝子治療をベースにした細胞治療という臨床応用への段階だと考えている。

2. 研究の目的

現在に至るまでに、マウスを用いた実験的ぶどう膜網膜炎に対するCGRP遺伝子導入樹状細胞の抑制効果の解析は終了しているので、その結果を元にヒトぶどう膜網膜炎の細胞治療へとつなげていきたいと考えている。具体的には、まずヒト正常樹状細胞とヒト正常マクロファージにCGRP遺伝子を導入して、各々の細胞の免疫学的プロファイルを調査し、その後ベーチェット病に代表される難治性ぶどう膜炎患者から樹状細胞やマクロファージを採取し、その細胞に対してCGRP遺伝子を導入する。この患者由来のCGRP遺伝子導入細胞の免疫学的プロファイルが、正常CGRP遺伝子導入細胞と比べて差異がないかを調べ、ヒト難治性ぶどう膜炎への細胞治療の有効性を検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト正常樹状細胞を用いた神経ペプチド(CGRP)遺伝子の導入と、その免疫学的プロファイルの解析：マウス樹状細胞に対するCGRP 遺伝子の導入を参考に遺伝子導入細胞

を作成し、その免疫学的プロファイルを解析するために、サイトカイン産生や免疫抑制系に参与する細胞表面分子を調査する。以下の実験は、ボランティア、難治性ぶどう膜炎患者および対照群の難治性視神経炎ともに東京医科大学倫理委員会の審査を経て学長の承認を得ている。またすべての対照患者および健康者にインフォームドコンセントを得ている。

(樹状細胞の調製)

ボランティアから得られたヒト末梢血をペトリ皿上で、10%ヒト血清加 RPMI 培養液を用いてヒト GM-CSF (20ng/ml) とともに6日間培養する。非接着細胞を回収し、CD1d、CD14、CD68 抗体を用いて autoMAX カラムでネガティブセレクションを行い、樹状細胞のみを単離する。細胞を PBS で3回洗浄し、リボポリサッカライド(LPS) 1μg/ml を加え、一晚10%ヒト血清加 RPMI 培養液で培養する。回収した細胞が成熟樹状細胞かどうか抗樹状細胞抗体(CosmoBio)を用いて確認する。

(細胞の遺伝子導入)

1. PBS で細胞を洗浄
2. 0.05% Trypsin, 0.5mM EDTA 4ml を 10cm ペトリ皿にいれ、5分間室温で培養
3. 培養液 10ml で表面を洗浄し、10回ピペッティング
4. 1300-1500 rpm で5分間遠心
5. 再度 10cm ペトリ皿 9×10^6 程度をまく
6. CGRP-DNA を FuGene と混和し、培養液に滴下する
7. 10%ヒト血清加 DMEM に交換する
8. 培養上清を回収した後、1500rpm で5分間遠心して細胞を除去し、9500rpm で一晚遠心する。
9. 10cm ペトリ皿にいれ、樹状細胞を BMDc 1×10^5 /ml に感染させる。同時に pIybrene、

SCF、20% PWM-SCM を混和する。

10. 2日に一回の割合で培養液を交換する
取り込みによる増殖反応および、FACS解析にてサイトカイン産出をみる。

(遺伝子導入細胞の解析)

樹状細胞を遺伝子導入し、遺伝子導入した樹状細胞を FACS で、MHC class I, class II, 補助刺激分子の発現を解析する。遺伝子導入した樹状細胞の培養上清を採取し、サイトカイン産生のパターン解析を ELISA 法および FACS 解析により行う。遺伝子導入した樹状細胞と網膜抗原特異的 T 細胞と反応させ、抑制性 T 細胞に変化するか in vitro にて解析する。

(CGRP 刺激樹状細胞の細胞表面分子の検索)

成熟樹状細胞を作製し、抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で刺激後、一晚培養する。CGRP 刺激樹状細胞表面分子で免疫調節に關与する接着分子 (B7-1, B7-2, B7RP-1, B7H-1, CTLA-4 分子) を FACS 解析の手法を用い検討する。CGRP 刺激樹状細胞の免疫調節に關与するサイトカイン (IL-6, IL-10 など) を ELISA キットで検討する。

(2) 難治性ぶどう膜炎患者由来樹状細胞を用いた神経ペプチド(CGRP)遺伝子の導入と、その免疫学的プロファイルの解析

樹状細胞に対する CGRP 遺伝子の導入を参考に遺伝子導入細胞を作成し、その免疫学的プロファイルを解析するために、サイトカイン産生や免疫抑制系に關与する細胞表面分子を調査する。

(樹状細胞の調製)

同意の得られた難治性ぶどう膜炎患者から得られた末梢血を用い、樹状細胞を分離する。

(細胞の遺伝子導入および解析)

樹状細胞を遺伝子導入し、遺伝子導入した樹

状細胞を FACS で、MHC class I, class II, 補助刺激分子の発現を解析する。遺伝子導入した樹状細胞の培養上清を採取し、サイトカイン産生のパターン解析を ELISA 法および FACS 解析により行う。

4 . 研究成果

(1) ボランティアから得られたヒト末梢血の単球成分を取り出し、CD14、CD68 や F4/80 抗体を用いて autoMAX カラムでマクロファージのみを単離した。またヒト末梢血をヒト GM-CSF (20ng/ml) とともに 6 日間培養し、CD1d、CD14、CD68 抗体を用いて autoMAX カラムで樹状細胞のみを単離した。細胞にリポポリサッカライド 1µg/ml を加え、一晚培養し、遺伝子導入用細胞を調製したが、マクロファージは導入効率があまりよくないため、以後は樹状細胞のみで研究を進めた。

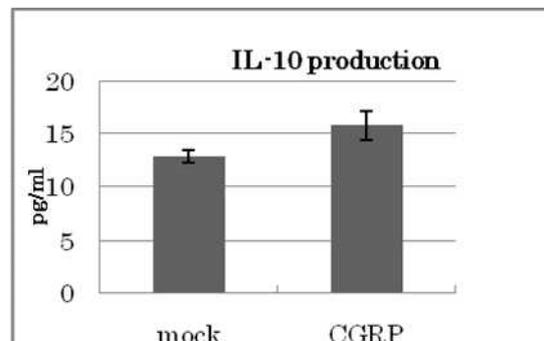
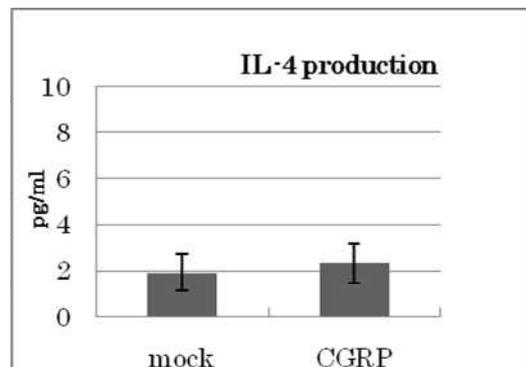
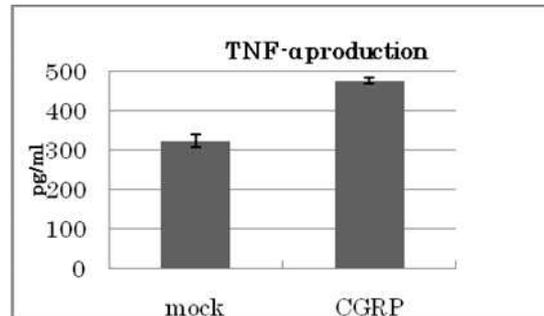
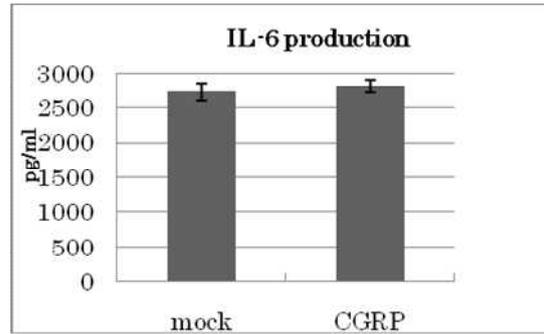
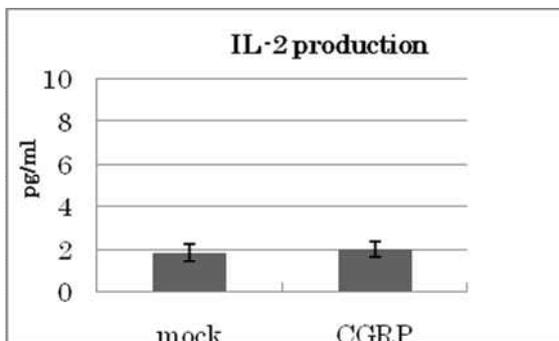
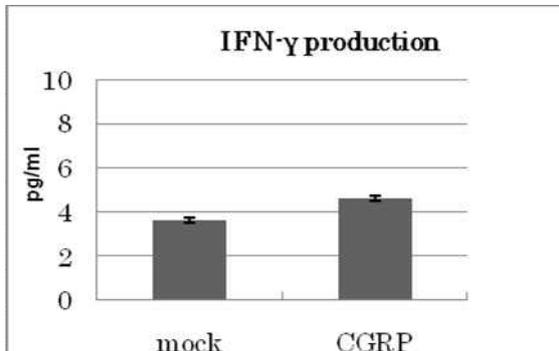
(2) マウス樹状細胞を遺伝子導入する時に使用した CGRP cDNA は ARPE-19 cell line の total RNA より合成し、Human CGRP cDNA fragment は pCR3.1-2FL plasmid に導入した。また対照ベクター群として mock(pCR3.1-2FL)も作製した。これらのプラスミド、pCR3.1-2FL-hCGRP と mock を Nucleofector II を用いて electroporation 法にてヒト樹状細胞に導入した。生存細胞数は 70% で、導入効率は 50% であった。

(3) 産生サイトカインは IL-10 がわずかながら認められたが、再現性が得られなかった。正常樹状細胞への CGRP 遺伝子導入は 50% の効率で成功したが、はっきりしたサイトカイン産生 (IFN-gamma、IL-2、TNF、IL-17) を認めることは出来なかった。また正常細胞に遺伝子導入を行ったことにより、特徴的な表面分子は認められなかった。これは、正常樹状細胞へ CGRP 遺伝子導入を行っても副次的反応は起

きず、正常生体内に安全であるとも考えることが出来た。

(4) ヒト単核球に対する CGRP 遺伝子の導入を参考に遺伝子導入細胞を作成したところ、健常者から得られた単核球同様、遺伝子導入細胞からの CGRP 産生が 40-60pg/ml であった。計画では、単核球から樹状細胞、マクロファージを単離する予定であったが、手技が複雑になり、死細胞も出現したため、単核球を用いて計画を遂行している。

(5) 難治性ぶどう膜炎患者と同時にインフォームドコンセントの得られた視神経炎患者から同様に単核球を採取して CGRP 遺伝子導入を行った。難治性ぶどう膜炎を持つベーチェット病患者から得られた CGRP 遺伝子導入細胞を ConA で刺激して培養上清中のサイトカインを FACS を用いた CBA キットでみたところ、TNF- α 、IL-6、IFN- γ 、IL-2、IL-10、IL-4 とともに対照群と比べて有意差を見いだせなかった(図)。



(6) 一方、難治性視神経炎患者から得られた CGRP 遺伝子導入細胞を ConA で刺激して培養上清中のサイトカインをみたところ、TNF- α 、IL-6 は対照群に比べて有意に低下しており、IL-2、IL-4、IFN- γ 、IL-10 は検出限界ぎりぎりです。特に有意差を認めなかった。CGRP 刺激樹状細胞表面分子で免疫調節に参与する接着分子 (B7-1, B7-2 分子) を FACS 解析の

手法を用い検討したが、有意な結果が得られなかった。これらのことから、正常細胞を用いた CGRP 遺伝子導入実験では、抑制性サイトカインを産生する細胞を作成できるが、難治性ぶどう膜炎を併発したベーチェット病患者由来の細胞では、免疫制御細胞を誘導することができなかった。一方、難治性視神経炎患者由来の細胞では、免疫制御細胞を誘導したため、今後の難治性視神経炎患者の治療に有効であることが示唆された。

今後、他の難治性ぶどう膜炎も合わせて免疫制御細胞を誘導できるか解析が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

1. Angiotensin II type 1 receptor blocker telmisartan suppresses experimental autoimmune uveitis. Okunuki Y, Usui Y, Nagai N, Kezuka T, Ishida S, Takeuchi M, Goto H. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009. in press. (査読有り)
2. Human corneal endothelial cells expressing programmed death-ligand 1 (PD-L1) suppress PD-1+ T helper 1 cells by a contact-dependent mechanism. Sugita S, Usui Y, Horie S, Futagami Y, Yamada Y, Ma J, Kezuka T, Hamada H, Usui T, Mochizuki M, Yamagami S. Invest Ophthalmol Vis Sci. 50:263-72, 2009. (査読有り)
3. Acute retinal necrosis in Japan. Usui Y, Takeuchi M, Goto H, Mori H, Kezuka T, Sakai J, Usui M. Ophthalmology. 115:1632-3, 2008. (査読有り)
4. Increased levels of monokine induced by interferon-gamma (Mig) in the vitreous of patients with diabetic retinopathy.

Wakabayashi Y, Usui Y, Okunuki Y, Takeuchi M, Kezuka T, Iwasaki T, Goto H. Diabet Med. 25:875-7, 2008. (査読有り)

5. Proteomic surveillance of retinal autoantigens in endogenous uveitis: implication of esterase D and brain-type creatine kinase as novel autoantigens.

Okunuki Y, Usui Y, Kezuka T, Hattori T, Masuko K, Nakamura H, Yudoh K, Goto H, Usui M, Nishioka K, Kato T, Takeuchi M. Mol Vis. 14:1094-104, 2008. (査読有り)

6. Functional expression of B7H1 on retinal pigment epithelial cells. Usui Y, Okunuki Y, Hattori T, Kezuka T, Keino H, Ebihara N, Sugita S, Usui M, Goto H, Takeuchi M. Exp Eye Res. 86:52-9, 2008.

(査読有り)

7. Circulating neutrophils in Behçet disease is resistant for apoptotic cell death in the remission phase of uveitis. Fujimori K, Oh-i K, Takeuchi M, Yamakawa N, Hattori T, Kezuka T, Keino H, Suzuki J, Goto H, Sakai J, Usui M. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 246:285-90, 2008. (査読有り)

8. Proteomic surveillance of autoimmunity in Behçet's disease with uveitis: selenium binding protein is a novel autoantigen in Behçet's disease. Okunuki Y, Usui Y, Takeuchi M, Kezuka T, Hattori T, Masuko K, Nakamura H, Yudoh K, Usui M, Nishioka K, Kato T. Exp Eye Res. 84:823-31, 2007. (査読有り)

[学会発表](計 3 件)

1. Kezuka T. et al. Gene therapy with calcitonin gene-related peptide suppresses murine experimental

autoimmune uveoretinitis. ARVO 2008.
April 27-30, 2008.

2. 竹内 大、服部貴明、白井嘉彦、奥貴陽子、馬 娟、山川直之、張 リナ、毛塚剛司、後藤 浩、田口 修. ラット胎児胸腺移植ヌードマウスを用いた自己免疫生ぶどう膜炎の発症メカニズムの解析. 第112回日本眼科学会 横浜 2008.4.17

3. Takeuchi M, Hattori T, Usui Y, Okunuki Y, Ma J, Yamakawa N, Zhang T, Kezuka T, Goto H, Taguchi O. The mechanisms by which spontaneous development of organ-localized autoimmune diseases induced by xenogenic thymus. ARVO 2008. April 27-30, 2008.

〔図書〕(計 1 件)

Acute retinal necrosis. Kezuka T, Atherton SS. Chem Immunol Allergy. 92:244-53, 2007. Review.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

毛塚 剛司 (KEZUKA TAKESHI)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号：00287137

(2)研究分担者

竹内 大 (TAKEUCHI MASARU)
東京医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40260939

(3)連携研究者

なし

