

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791109

研究課題名（和文）病的CD8陽性T細胞を標的とする新規抗原特異的免疫抑制療法の開発

研究課題名（英文）The novel antigen-specific immune regulation for pathogenic CD8+ T cells

研究代表者

平田 真哉 (HIRATA SHINYA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：60418829

研究成果の概要（和文）：

自己免疫疾患の治療に際して、全身的な免疫抑制状態に陥らせることなく、抗原特異的に免疫抑制する手法の開発が強く望まれている。今回、我々は、CD8陽性T細胞が炎症の主体となるマウス筋炎モデルと用いて、抗原特異的免疫制御療法を開発することを試みた。本研究期間では、マウス筋炎モデルの導入と機能的な TRAIL や PD-L1 など強発現する ES 細胞由来の樹状細胞 (ES-DC) を作製することができた。今後は、免疫抑制性分子と筋由来の抗原を発現した ES-DC を作製し、予防実験や治療実験を行う予定である。

研究成果の概要（英文）：

It is desirable to develop a therapeutic means to down-modulate immune responses in an antigen-specific manner without causing systemic immune suppression. We tried the immune regulation of pathogenic CD8+ T cells by mouse ES cell-derived dendritic cells (ES-DCs) expressing both antigen and immunosuppressive molecule, such as TRAIL or PD-L1. In this period, we brought in the C-protein induced myositis, CIM, which was disease model caused by pathogenic CD8+ T cells. The functional ES-DCs expressing immunosuppressive molecule was prepared. These ES-DCs may prevent pathogenic CD8+ T cells-derived autoimmune disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000円	990,000円	4,290,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、膠原病・アレルギー内科学

キーワード：臨床免疫学、筋炎

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患における治療においては、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。その成果として、経口トレランスや粘膜免疫トレランス、MHCクラスII拘束性エピトープのアナログペプチドや樹状細胞を用いた研究が数多く報告されてき

た。特に樹状細胞はプロフェッショナル抗原提示細胞としての働きのみならず、末梢の免疫寛容においても中心的な役割を果たしていることが知られると、樹状細胞を用いた様々な免疫制御療法が開発が行われてきた。研究代表者もこれまでに実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE) やアロ臓島移植の

マウスモデルにおいて、免疫抑制性分子と抗原分子を発現する遺伝子導入マウスES細胞由来樹状細胞 (ES cell-derived dendritic cells; ES-DC) を用いた抗原特異的な免疫制御療法の開発、ならびに TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) を発現した ES-DC による制御性 T 細胞を介した免疫制御療法の開発に携わり多くの成果を報告してきた。しかし、これまでの樹状細胞や制御性 T 細胞を用いた免疫制御療法は、主として MHC クラス II 拘束性のエピトープを認識する CD4 陽性 T 細胞を標的としたものであった。近年、多発筋炎は CD8 陽性 T 細胞が筋炎の主体であることが分かってくると、CD8 陽性 T 細胞を標的とする抗原特異的な免疫制御療法の研究が待望されたが、これまで自己反応性 CD8 陽性 T 細胞が主要となる自己免疫疾患モデルがなく実現が困難であった。しかし、2007 年に、骨格筋の速筋に含まれる C 蛋白質断片を 1 回免疫することで、筋炎局所の病理像において CD8 陽性 T 細胞の浸潤を認め、ヒトの多発筋炎により近い新たな筋炎マウスモデル (C protein-induced myositis; CIM) が開発された。この CIM マウスの詳細な解析から、CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞が発症に主要な役割をはたしている自己免疫性筋炎のマウスモデルで、あることが明らかとなった。

2. 研究の目的

本研究においては、このマウス筋炎モデルを用いて CD8 陽性 T 細胞が病態の主体である筋炎に対する抗原特異的な免疫制御療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

マウス筋炎モデル (CIM) を誘導する C 蛋白質と免疫抑制性分子を遺伝子導入した ES 細胞 (あるいは iPS 細胞) 由来樹状細胞 (ES (iPS)-DC) を作製する。これを CIM 誘導前 (予防実験) あるいは誘導後 (治療実験) に投与し、筋炎に与える影響を調べる。具体的には、具体的には、マウス ES (あるいは iPS) 細胞に、これまでに作製した免疫抑制分子である TRAIL や Program death 1 ligand (PD-L1) の発現ベクター (Neomycin 耐性遺伝子を含む) を電気穿孔法にて遺伝子導入して、Neomycin の負荷で遺伝子導入体を選別した後、単一コロニーをクローニングする。その後、高発現体を FACS にて選別し、分化

誘導して ES (iPS)-DC 上に発現することを確認する。また、CIM を誘導する抗原である C 蛋白質フラグメントの発現ベクター

(Puromycin 耐性遺伝子を含む) を作製し、免疫抑制性分子を遺伝子導入した ES (iPS) 細胞に同様に遺伝子導入して、Western blot 法により、高発現体を選択する。作製した免疫抑制性分子と C 蛋白質抗原分子を発現する B6-ES (iPS) 細胞を *in vitro* にて ES (iPS)-DC へ分化誘導して、CIM を発症前 (予防投与群)、あるいは CIM を発症後 (治療投与群) のマウス個体へ投与する。その後、筋炎の発症を、筋の病理切片、免疫組織化学染色、C 蛋白質に対する T 細胞応答、血清中サイトカインにて評価する。また、これまでに TRAIL を発現する ES-DC は、*in vivo* において CD4 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞を介して免疫抑制効果を示すことを報告しており、この効果についても検証する。また、C 蛋白質の MHC クラス I 拘束性エピトープを認識する TCR を遺伝子導入した CD8 陽性 C D122 陽性制御性 T 細胞や CIM マウスより採取した C 蛋白質を認識する CD4 陽性 T 細胞に Foxp3 遺伝子を導入して制御性 T (Treg) 細胞化をマウスに移入して CIM の発症を検証する。

4. 研究成果

平成23年度、勤務施設の異動に伴い、まずは実験系の導入を行った。C蛋白質誘導性筋炎 (C-protein induced myositis, 以下CIM) の実験系の確立のため、HisタグのついたヒトC蛋白質断片の遺伝子をトランスフェクションした大腸菌を作製し、これを培養し、蛋白質産生を誘導した。この大腸菌を超音波破砕法で粉碎し、コバルトあるいはニッケルカラムで吸着し、洗浄ののち溶出して精製した。これを、透析で溶媒置換し、リフォールディングして、作製した。およそ1Lの大腸菌培養液から、10mg前後のC蛋白質断片を精製することができた。SDS pageでサイズ、精製度も良好であった。このC蛋白質断片をC57BL/6マウスに免疫して、21日後に大腿四頭筋・屈筋を採取し、ホルマリン固定の後、パラフィン包埋し、病理組織切片を作製して、筋炎の評価を行った。以上より、CIM実験を導入することができた。

次に、筋組織に発現していて、マウス筋炎モデルの誘導抗原でもあるC蛋白質をES細胞由来の樹状細胞に遺伝子導入する発現ベクタ

一を作製した。βアクチンプロモーターを用い、マウスC蛋白質遺伝子とピューロマイシンの薬剤耐性遺伝子をIRESでつないだ。この発現ベクターをまずは細胞株であるB16に電気穿孔法で遺伝子導入して、ピューロマイシンで選別を行った。また、高濃度のピューロマイシンでも負荷をかけて、高発現体の選別に成功した。発現の確認はRT-PCRで行い、正常の筋組織をコントロールとして十分な発現が確認された。市販の抗体がないためC蛋白質を免疫したマウスの血清を用いたウエスタンブロットを行う予定である。また、TRAILやPD-L1などの免疫抑制性分子を遺伝子導入したマウスES細胞を準備した。これらの発現ベクターは上記と同様にIRESでつないだネオマイシン耐性遺伝子を持たせている。マウスC蛋白質の発現ベクターと異なる薬剤耐性遺伝子を用いることで、複数の遺伝子導入を可能とした。免疫抑制性分子を遺伝子導入したマウスES細胞がin vitroで樹状細胞に分化して、樹状細胞の機能を持ちながら、さらに遺伝子導入した免疫抑制性分子を高発現できることをフローサイトメトリーで確認している。さらに免疫抑制性分子を強発現した樹状細胞は抗CD3e抗体で刺激したT細胞の増殖を抑制し、その機能を確認することができている。

また、ヒトC蛋白質断片を認識するT細胞受容体 (TCR) を採取するため、CIMマウスから回収したCD8陽性T細胞でハイブリドーマを作製し、C蛋白質に対する抗原特異性を検証した。これまでに、安定した結果を得るに至っておらず、ex vivoでCIMマウスのCD8陽性T細胞のヒトC蛋白質断片に対する抗原特異的反応を検出することが大変難しいことをふまえると、C蛋白質断片を認識するCD8陽性T細胞集団が少ないことが予想される。目下のところ、実験系のブラッシュアップ中である。

本研究は、自己免疫疾患における病的CD8陽性T細胞を標的とした免疫制御療法の開発であり、今後の進展が期待されると考えられる。

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 10 件)

1. Nanki, T., Onoue, I., Nagasaka, K., Takayasu, A., Ebisawa, M., Hosoya, T., Shirai, T., Sugihara, T., Hirata, S.,

- Kubota, T., Harigai, M. and Miyasaka, N. Suppression of elevations in serum C reactive protein levels by anti-IL-6 autoantibodies in two patients with severe bacterial infections. *Ann Rheum Dis.* 72(6):1100-2, 2013、査読有、doi: 10.1136/annrheumdis-2012-202768.
2. 平田真哉, 「TRAIL」, **臨床免疫・アレルギー科 特集: サイトカインのすべて**, 科学評論社(東京), 54(増刊号):238-242、2012、査読無
3. 平田真哉, 筋炎におけるサイトカイン異常, *Clinical Neuroscience*, 中外医学社(東京), 30(3):296-300、2012、査読無
4. Senju, S., Matsunaga, Y., Fukushima, S., Hirata, S., Motomura, Y., Fukuma, D., Matsuyoshi, H. and Nishimura, Y. Immunotherapy with pluripotent stem cell-derived dendritic cells. *Semin Immunopathol* 33(6):603-12, 2011、査読有、doi: 10.1007/s00281-011-0263-y.
5. Kozako, T., Hirata, S., Shimizu, Y., Satoh, Y., Yoshimitsu, M., White, Y., Lemonnier, F., Shimeno, H., Soeda, S. and Arima, N. Oligomannose-coated liposomes efficiently induce human T-cell leukemia virus-1-specific cytotoxic T lymphocytes without adjuvant. *FEBS J* 278(8):1358-66, 2011、査読有、doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08055.x.
6. Imai, K., Hirata, S., Irie, A., Senju, S., Ikuta, Y., Yokomine, K., Harao, M., Inoue, M., Tomita, Y., Tsunoda, T., Nakagawa, H., Nakamura, Y., Baba, H. and Nishimura, Y. Identification of HLA-A2-restricted CTL epitopes of a novel tumour-associated antigen, KIF20A, overexpressed in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 104(2): 300-7, 2011、査読有、doi: 10.1038/sj.bjc.6606052.
7. Tomita, Y., Harao, M., Senju, S., Imai, K., Hirata, S., Irie, A., Inoue, M., Hayashida, Y., Yoshimoto, K., Shiraishi, K., Mori, T., Nomori, H., Kohrogi, H., and Nishimura Y. Peptides derived from human insulin-like growth factor-II mRNA binding protein 3 can induce human leukocyte antigen-A2-restricted

- cytotoxic T lymphocytes reactive to cancer cells. *Cancer Sci* 102(1):71-8, 2011、査読有、doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01780.x.
8. 平田真哉, 筋炎におけるサイトカイン, **医学のあゆみ**, 医歯薬出版株式会社(東京), 239(1):53-57, 2011、査読無
 9. 平田真哉, CD8+T 細胞の transcription signature は自己免疫疾患の予後予測に有用である, **リウマチ科**, 科学評論社(東京), 45(3):285-290, 2011、査読無
 10. 平田真哉, 上阪等 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) と C 蛋白誘導性筋炎 (CIM) について. **免疫疾患-疾患モデルの作製と利用**, エル・アイ・シー (東京), 92-97, 2011、査読無

[学会発表] (計 4 件)

1. 平田真哉, 野坂生郷, 宮川英子, 星乃光有, 奥野豊, 満屋裕明 関節リウマチ治療中にリンパ増殖性疾患を合併した 8 症例の解析, 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2012 年 04 月 26 日~2012 年 04 月 28 日, 東京 (グランドプリンスホテル新高輪)
2. 木村直樹, 平田真哉, 宮坂信之, 上阪等, 自己免疫性筋炎における再生筋線維の役割, 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2012 年 04 月 26 日~2012 年 04 月 28 日, 東京 (グランドプリンスホテル新高輪)
3. 平田真哉, マウス筋炎モデルにおける再生筋線維が発現するケモカインの役割について, 第 3 回筋炎ワークショップ (招待講演), 2011 年 10 月 1 日, 東京 (海運クラブ)
4. Shinya Hirata, Naoki Kimura, Nao Tateishi, Ayaka Maeda, Nobuyuki Miyasaka and Hitoshi Kohsaka, Chemokines expressed by the regenerating muscle cells in murine myositis model, 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2011 年 7 月 20 日, 神戸 (神戸ポートピアホテル)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 真哉 (HIRATA SHINYA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号: 60418829