

## 論文の内容の要旨

論文題目 全身的な免疫反応に影響を与えない IL-10 遺伝子導入  
抗原特異的 T 細胞による実験的抗原誘発性関節炎の治療研究

氏名 瀬戸口京吾

関節リウマチ (RA) は炎症性細胞の浸潤と関節破壊を伴う関節滑膜細胞の持続的な増殖によって特徴付けられる全身性の慢性炎症性破壊性疾患である。有効な生物学的薬剤が報告され続けているが、病変が全身にわたるため、全身の関節への薬剤の効果的輸送が大きな問題となっている。自己抗原特異的 T 細胞には T 細胞レセプターの抗原認識に基づいて病変局所に浸潤し、炎症を誘導し、組織破壊に至らせる。抗原特異的な T 細胞が病変局所に遊走する性質を利用すれば、治療効果のある分子を遺伝子導入することにより、関節病変を効率よく改善する新たな細胞治療法となることが期待される。このような系は実験的自己免疫性脳脊髄炎においては報告されており、ミエリン塩基性タンパクを認識する T 細胞クローンが疾患の治療に使われる可能性がうかがわれる。また NOD マウスの系でも、 $\beta$  氏島特異的 Th1 細胞に IL-10 を遺伝子導入して薬剤選択後に移入したところ糖尿病の悪化が抑制されたという報告もある。

IL-10 は単球・マクロファージ機能を低下させ、Th1 細胞により産生される炎症性サイトカインの抑制を介して広く免疫抑制効果を発揮する。RA においては抗原提示機能を有すると考えられる関節滑膜由来のマクロファージでの HLA-DR や CD86 の発現を IL-10 が抑制することが示されており、関節炎において IL-10 が有効な免疫調節作用を有することが期待される。IL-10 はコラーゲン誘発性関節炎を初めとする各種実験的関節炎の治療でその有用性が報告されてきた。

これまでの報告は IL-10 が全身の免疫系を抑制して、関節抗原に対する反応も抑制して関節炎の改善を示していると考えられるものが多かった。そこでこの IL-10 を抗原特異的 T 細胞に導入し、全身の免疫系への影響を最小限にとどめかつ関節炎に対する抑制効果を誘導することについて検討した。抗原特異的 T 細胞が関与する関節炎の中に、抗原誘発性関節炎 (antigen induced arthritis; AIA) がある。これは関節の自己抗原の代替として既に免疫した抗原を関節局所に移入することで関節炎が誘導される系で、以前より RA のモデルとして利用されてきた。この実験系を利用してマウス IL-10 (mIL-10) 遺伝子を導入した抗原特異的 T 細胞を AIA に移入して治療効果を検討した。

## 方法

実験には Ovalbumin (OVA) による AIA を用いた。BALB/c マウスを OVA で免疫し、2 週間後に booster をかけた。その 2 週間後にレトロウイルスを用いて mIL-10 遺伝子を導入した DO11.10 (OVA 反応性 T 細胞発現トランスジェニックマウス) CD4<sup>+</sup>T 細胞を移入した。移入後、左足関節内に 20  $\mu$ l の PBS に希釈した OVA 100  $\mu$ g を注入した。対側の右足関節内には比較対照として PBS のみ 20  $\mu$ l 注入した。関節の測定には 0.01 mm 単位のデジタル式キャリパーを用いた。真の関節肥厚は左足関節の増加分から右足関節の増加分を引いて求めた。

## 結果

レトロウイルスを使用して mIL-10 遺伝子を DO11.10CD4<sup>+</sup>T 細胞に導入した。pMFGmIL-10 感染後 48 時間での細胞  $10^6$  個当たりの上清中の mIL-10 を ELISA で測定した。Mock を感染させた DO11.10CD4<sup>+</sup>T 細胞の上清では mIL-10 は検出されなかったが、pMFGmIL-10 を感染させた方では  $5.2 \pm 0.5$  ng/ml と上昇しており導入に成功したことが判明した。

OVA による AIA は day1 で最大値を示し以後漸減するという経過をたどる。mock を感染させた DO11.10CD4<sup>+</sup>T 細胞を移入した場合、比較として PBS のみを注入した通常の AIA よりも悪化を示した。OVA に反応する T 細胞の頻度が移入によって増加したため、関節炎が更に悪化したことが想定される。これに比べて、mIL-10 が導入されている DO11.10CD4<sup>+</sup>T 細胞を移入した場合においては PBS のみを注入した比較対照群よりも著しい改善を示した。導入してある mIL-10 により抗原特異的 T 細胞が移入されて悪化する以上に効率よく抑制効果を示していることが想定される。この関節炎抑制効果は移入細胞数を  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$  個と変化させてみたところ、移入した細胞数と比例した。

感染効率を確認すると約 5% 弱であることが判明した。90% 以上の非感染性細胞が移入されているにもかかわらず関節炎が抑制されているので、感染効率が向上すれば移入細胞数を減少させることが可能と考えられた。そこで GFP marker を利用して感染細胞のみをフロー

られなかった。また mBSA による AIA を誘発する際に、OVA を mBSA と同時に関節内注射して誘発した群に mIL-10 導入 D011.10CD4<sup>+</sup>T 細胞が移入してあると関節炎の改善が認められた。以上から AIA の疾患活動性の改善には、D011.10CD4<sup>+</sup>T 細胞に表出される抗原特異的 T 細胞レセプターが必要であると考えられた。また、OVA に対する T 細胞反応性及び抗体産生に関しては、移入群と非移入群とにおいては有意な差は認められなかった。つまりこの抗原特異的 T 細胞を用いた治療では、全身的な免疫応答の有意な変化を誘導せずに改善が観察されたので、抗原特異的 T 細胞は病変局所において効果を発揮したと考えられる。SSCP や関節局所から採取した細胞のフローサイトメトリーからも抗原特異的 T 細胞が局所に存在したことを示した。

これまでの報告と同様に、IL-10 の関節炎に対する有効性を示すことができたが、抗原特異的 T 細胞を病変局所まで伝達させる運搬体として利用することにより、IL-10 の全身への影響をある程度抑制することもできた。調節的 T 細胞 (Tr1) は IL-10 を産生し、自己免疫性疾患で病原性があるといわれていることの多い Th1 応答と、炎症に関与する単球マクロファージの機能を制御する。よって、本研究において作成した IL-10 遺伝子導入 T 細胞は、人工的に作成された Tr1 と考えることも可能である。この人工的 Tr1 の抗原特異性は、抗原特異的免疫反応を調節するためのみではなくて、Tr1 が関節炎局所に遊走して bystander suppression を発揮するためにも必須のものである。本研究において、抗原特異的 T 細胞を用いて抗原特異的免疫制御と部位特異的免疫制御の 2 つが検証できたという意義は、今後の疾患制御法を考慮する上で大きいと考えられる。