

論文内容の要旨

論文題目 Fluorophore-assisted light inactivation 法を用いた新たな免疫制御法の開発

指導教官 山本 一彦教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 米積 亜紀

生体に備わっている自己防御機構は免疫系と呼ばれ、自己・非自己を認識し非自己を排除する極めて優れたシステムである。免疫系は自然免疫と獲得免疫に大きく分けられる。獲得免疫においては、T 細胞や B 細胞が主な役割を担っている。T 細胞は表面に T 細胞受容体 (T cell receptor: TCR) と呼ばれる抗原受容体を発現しており、B 細胞の抗原受容体である免疫グロブリンと同様 V(D)J 組み換えにより抗原認識多様性を生み出す。近年の研究から T 細胞の十分かつ強力な活性化には TCR からの第 1 シグナルに加えて、細胞表面上の補助シグナル分子を介したシグナル (第 2 シグナルあるいは補助シグナル) が必要であることが明らかにされてきた。現在までに補助シグナルを誘導する多くの分子が判明し、中でも CD28 分子は T 細胞上に恒常的に発現し、抗原提示細胞上のリガンド B7-1 (CD80) または B7-2 (CD86) との相互作用により T 細胞に活性化シグナルを伝達することが知られている。そこで私は、T 細胞上の CD28 分子を選択的に機能阻害させ、T 細胞の免疫応答を制御することを試みた。CD28 分子を機能阻害する方法としては、近年開発された FALI (Fluorophore-assisted light inactivation) 法を用いた。FALI 法とは Fluorescein Isothiocyanate (FITC) 蛍光色素を標識した特異抗体を標的分子に結合し、FITC の吸収波長の光を照射することで、一重項活性酸素が産生される。その時、標識抗体近傍半径 40 Å に存在する標的分子の構造変化が惹起され、その正常機能を阻害する新規技術である。T 細胞としては、ヒト T リンパ球性白血病株 E6.1 および末梢血単核球細胞(peripheral blood mononuclear cell: PBMCs)を用いた。

まず、E6.1 細胞を FITC 標識抗 CD28 抗体と反応させ、FITC の吸収波長である 488 nm の青色光を 1 時間照射して FALI 法を行った後、抗 CD3 抗体・抗 CD28 抗体で細胞を刺激し、3.5 時間後の IL-2 の mRNA 発現を検討した。FITC 標識抗

CD28 抗体で FALI を行った細胞 (以下 CD28-FALI) では、FITC 標識 IgG を FALI に用いたコントロールと比較して著明な IL-2 mRNA の減少を認めた。青色光照射を行わなかったコントロール、抗体を含めなかったコントロールでは抑制が認められないことから、FALI の特異性が確認された。更に CD28 非依存性に細胞を活性化する PHA で刺激した細胞においては CD28-FALI の抑制効果が認められないことから、CD28-FALI が CD28 を介した補助シグナルを特異的に抑制していることが示された。また、CD28-FALI の IL-2 mRNA 発現量は定量的 real time PCR 法においても、CD28-FALI の IL-2 mRNA 発現量は、FITC 標識 IgG を FALI に用いたコントロールと比較して、63%の有意な抑制効果($p<0.05$)を認めた。

次に CD28-FALI の効果を刺激開始後 24 時間後の培養上清中の IL-2 濃度 (ELISA 法)で検討した。CD28-FALI では、FITC 標識 IgG を FALI に用いたコントロールと比較して、培養上清中 IL-2 濃度は 60%の有意な減少($p<0.01$)を認めた。この結果により IL-2 の蛋白レベルでも CD28-FALI の効果が確認された。

次に CD28-FALI による E6.1 細胞における CD3 抗原に対する影響をフローサイトメトリーにて検討した。その結果、CD3 陽性細胞は、CD28-FALI を行った細胞では 91%に対し、光照射しなかつた細胞では 91.2%と CD3 陽性細胞の割合に差は認めなかつた。CD28-FALI 後に抗体刺激をする際用いた抗 CD28 抗体の抗原に対する影響を同様に検討した。その結果、CD28 陽性細胞は、CD28-FALI を行った細胞では 85%に対し、光照射しなかつた細胞では 89%と CD28 陽性細胞の割合に差を認めなかつた。

次に CD28-FALI における至適光照射時間を検討するために 488 nm の青色光照射時間を 15 分・30 分に短縮し、CD28-FALI の効果を検討した。培養上清中 IL-2 濃度は、照射時間 30 分の CD28-FALI 細胞で、FITC 標識 IgG を FALI に用いたコントロールと比較して、76%の有意な減少($p<0.01$)を認めた。一方、照射時間 15 分では、CD28-FALI による有意な IL-2 産生の抑制($p<0.01$)が認められたが、39%減少と抑制の程度が 30 分と比較し減弱していた。以上の結果から、30 分の青色光照射で十分な FALI 効果が認められることが示された。

次に、CD28-FALI による CD28 抑制効果の持続時間を培養上清中の IL-2 濃度で検討した。E6.1 細胞に対し CD28-FALI 後 22 時間培養後、抗 CD3 抗体・抗 CD28 抗体による刺激を行った。その結果、CD28-FALI を行った細胞の IL-2 産生量はコントロールと比較し 41%の減少傾向が認められたが有意差はなかつた。この結果から、FALI 施行後時間が経過すると、CD28-FALI の効果が減弱することが分かつた。

次に、より生理的な条件下での CD28-FALI 法の効果を検討するために、PBMCs において同様の効果が得られるかを検討した。PBMCs の活性化には特異的抗原として破傷風毒素(TT)と HBs 抗原(Hepatitis B Surface Antigen(HBsAg), Subtype adr,

Recombinant)を用いた。過去に破傷風毒素または B 型肝炎ウイルスのワクチン接種を受け、免疫を獲得していると考えられる正常ボランティアより採取した血液より PBMCs を調整し実験に使用した。CD28-FALI を行った後、TT にて刺激し 48 時間後の培養上清中の IL-2 濃度を測定した。その結果、CD28-FALI を行った細胞では FITC 標識 IgG を用いたコントロールと比較して、著明な IL-2 産生抑制効果 (86%減少) が認められた($P<0.01$)。同様に CD28-FALI を施行した後、HBs 抗原にて 66 時間刺激を行った後に培養上清中の IL-2 濃度を測定したところ、CD28-FALI を行った細胞では、コントロールと比較し、有意な IL-2 産生抑制効果 (46%減少) が認められた($P<0.05$)。以上のことから、特異抗原刺激に対する PBMCs の IL-2 産生においても、CD28-FALI が有効であることが示された。

CD28-FALI の補助シグナルの抑制効果が、FALI に伴う細胞死によるものでないことを確認するために、細胞死を定量的に解析できる MTT assay (細胞増殖アッセイ) を行った。CD28FALI を行った直後の E6.1 細胞、PBMCs、CD28FALI 後さらに 24 時間 HBs 抗原で刺激を行った後の PBMCs において、MTT assay を行ったところ、いずれの条件下でも明らかな細胞死は認められなかった。

FALI 法は FITC 標識した抗体を標的分子に結合させ、光を照射することで、時間的・空間的に随時に随意に分子を機能阻害できる新たな分子の機能解析法である。現在、分子生物学で一般的な分子機能阻害の一つは相同組換えを利用した遺伝子欠損 (ノックアウト) モデル動物であるが、その作成方法が煩雑で多くの時間を要すること、機能が代償されてしまう可能性のあること、生存に不可欠な分子の場合 (胎生致死など) 作成できないなどの問題点が存在する。一方 FALI 法は標的分子の結合抗体さえあれば非常に簡便に施行でき、時間的・空間的に随意的な阻害が可能のため、胎生致死、他の分子の代償性発現上昇などの問題点を回避できる。今回の実験でも CD28-FALI 法はノックアウト法と比較し、遜色の無く IL-2 産生を抑制したと考えられた。

その他の一般的な分子機能阻害法としては、中和抗体やドミナントネガティブ型変異体の過剰発現、アンチセンス法、RNAi 法などが挙げられる。CD28 に特有の機能阻害法としては CTLA4Ig が使用されることが多い。CTLA-4 は抑制性補助シグナルを伝える T 細胞上の受容体であり、CD28 とリガンドを共有しているが、リガンドとの親和性が CD28 より非常に高く、B7/CD28 を介した補助シグナルの阻害タンパクとして *in vitro* や *in vivo* で応用されている。このような分子に特有の機能阻害法に対し、FALI 法はどんな分子であっても結合する抗体さえあれば確実に分子を不活化できるため、応用範囲が広いという利点がある。また、アンチセンス法や RNAi 法では、初代培養細胞など細胞によってはトランスフェクション効率が低い、また用いる塩基配列の設計が難しいなどの難点があるが、FALI 法はどのような細胞にも応用可能である点が優れている。

また、FALI 法はノックアウト法や RNAi 法などの分子機能阻害法と比較し、遺伝子導入を行わなくて良いため、臨床応用がしやすいという利点を持つ。アレルギー反応や自己免疫疾患などの過剰な免疫反応を抑制するために、末梢血より分離した PBMCs に対して CD28-FALI を施行し生体内に戻すといった免疫療法への臨床応用の可能性も考えられる。しかしながら、FALI 法の生体への施行例はまだ報告がなく、FITC 標識抗体の生体への影響や生体内での FALI 効果の持続など今後検討すべき課題である。

以上、新しい分子機能阻害法である FALI 法を応用して主要な補助シグナル分子 CD28 の機能を阻害することにより T 細胞の活性化を調節することが可能であることが示された。今後、本研究で確立した方法は、アレルギー疾患や自己免疫疾患、移植後拒絶反応などの免疫病に対する治療法へと応用できることが期待される。