

平成22年度自治医科大学医学部 研究奨励金研究成果報告

培養細胞におけるE型肝炎ウイルスのレセプター分子同定の試み

感染・免疫学講座 ウイルス学部門
長嶋 茂雄

【背景・目的】

E型肝炎ウイルス(HEV)は細胞培養が困難であったため、ウイルス複製機構の解析はほとんど進んでいなかった。2007年に我々の研究室において、高力価のHEV(JE03-1760F株)を含む糞便材料を用いて、効率良く増殖する感染培養系が確立された。そこで、この実験系を応用し、感染成立の初期段階(細胞への特異的な接着)に重要なHEVの細胞レセプター分子の同定を試みた。

【方法】

HEV感受性細胞であるPLC/PRF/5細胞(肝癌由来)およびA549細胞(肺癌由来)から膜蛋白質を精製後、virus overlay protein binding assay(VOPBA)ならびに共免疫沈降法により、ウイルス粒子と結合する宿主蛋白質の探索を行った。使用したウイルス粒子は、細胞培養により得られたhigh titerのHEVであるが、培養細胞から放出されたウイルス粒子の表面には細胞由来の膜成分およびORF3蛋白質が存在している。そこで、糞便中と同じ粒子形態とするため、デオキシコール酸ナトリウムおよびトリプシンによる処理を行った。膜蛋白質と結合したウイルス粒子は、ウイルス蛋白質特異的なモノクローナル抗体(抗ORF2抗体:H6225)を用いて検出または回収を行った。質量分析は、in-gel digestion法を用いて目的蛋白質を断片化し、MALDI-TOF/TOF型質量分析計を用いて行った。その後、得られたデータをデータベース検索(Mascotサーチ)することにより蛋白質を同定した。

【結果】

VOPBAによる解析の結果、negative control

には認められない特異的なバンドが120 kDa, 65 kDaの位置に検出された。しかしながら、非特異的な結合が多く、結合したバンドを特定することは困難であった。

共免疫沈降法による解析では、3つの特異的なバンド(90 kDa, 75 kDa, 65 kDa)が検出された。また、これらのバンドはPLC/PRF/5細胞とA549細胞の両方で認められた。質量分析による蛋白質同定を行った結果、9種類の蛋白質が同定され、このうち細胞外マトリックスまたは細胞膜での局在が報告されている蛋白質は、① cartilage intermediate layer protein 2 (CILP2)、② laminin alpha 2 (LAMA2)、③ cyclin G-associated kinase (GAK)の3種類であった。

【考察】

本研究により、HEV粒子と特異的に結合する膜蛋白質を同定することができた。これまでに、細胞外マトリックスに存在する糖蛋白質がウイルスの吸着に際し、結合因子あるいはレセプターとして機能している事が報告されている。今後、同定された宿主蛋白質のPLC/PRF/5細胞およびA549細胞での局在について解析を進める予定である。また、細胞膜に局在が認められた場合は、その蛋白質に対する抗体を用いて、ウイルスの吸着ならびに侵入への影響についても解析を行い、レセプターとしての機能を明らかにすることが重要であると考えている。さらに、ウイルス粒子と相互作用が認められたその他の蛋白質についても、ウイルスの複製において何らかの役割を持つ可能性があり、興味深い。

腎線維化における末梢血単核球細胞の関与

内科学講座腎臓内科学部門

森下 義幸, 中澤 英子, 草野 英二

【背景】進行性腎疾患において尿細管間質線維化は末期腎不全に至る共通経路であり疾患の進行に強く関与する。腎線維化の機序として尿細管上皮細胞が間葉系細胞に形質転換する上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition: EMT) が重要な役割を担っている。また尿細管間質線維化は炎症細胞浸潤を伴うことが特徴である。末梢血単核球細胞 (peripheral mononuclear cell: PBMCs) に発現している $\alpha_L \beta_2$ インテグリン (Lymphocyte function-associated antigen 1: LFA-1) は通常不活型であるが conformational change により活性型へ変化し、リガンドである Intracellular adhesion molecules-1 (ICAM-1) と結合する。この活性型 LFA-1 と ICAM-1 の interaction は大部分の炎症反応において重要な役割を担っているが、尿細管 EMT における役割は明らかでない。本研究では PBMCs-LFA-1 と尿細管上皮細胞-ICAM-1 の尿細管上皮細胞 EMT における役割について検討した。

【方法】ヒト尿細管上皮細胞株: HK-2 cells の ICAM-1 の発現を flow cytometry で調べた。次に HK-2 cells を TGF- β_1 (10, 1.0, 0.1ng/ml) で前処置し、健常人から採取・精製した PBMCs と共培養した。その後 PBMCs-LFA-1 の conformational change を flow cytometry で調べた。また HK-2 cells の上皮マーカー (E-cadherin, Occludin), 間葉マーカー (Vimentin, Fibronectin) の変化、細胞内シグナル (Samd2/3, ERK, p38MAP) の変化を qRT-PCR, western blotting で、細胞形態を光学顕微鏡でそれぞれ検討した。

【結果】HK-2 cells には ICAM-1 が強発現していた。また HK-2 cells を TGF- β_1 (10, 1.0, 0.1 ng/ml) で前処置すると PBMCs-LFA-1 を活性化させるケモカイン: CXCL12 の発現が亢進した。TGF- β_1 で前処置した HK-2 cells を PBMCs と共培養したところ、PBMCs-LFA-1 は活性型に変化し、HK-2 cells でさらなる上皮マーカーの低下と間葉マーカーの上昇および細胞形態

上、線維芽細胞様の変化を認めた。その際、HK-2 cells で ERK1/2 シグナルの活性化が認められた。この PBMCs と HK-2 cells の共培養における HK-2 cells の EMT 増悪は抗 LFA-1 抗体および抗 ICAM-1 抗体でブロックされ、またあらかじめ CXCL12 を siRNA によりノックダウンした HK-2 cells では認められなかった。

【結論】TGF- β_1 刺激により HK-2 cells は PBMCs-LFA-1 を活性化するケモカイン: CXCL12 を分泌し、活性化した PBMCs-LFA-1 と HK-2 cells-ICAM-1 の interaction により HK-2 cells で ERK1/2 シグナルが活性化され TGF- β_1 で誘導された HK-2 cells の EMT がさらに増悪する。

遺伝子改変 T 細胞を用いた悪性 B リンパ腫に対する新規免疫遺伝子治療法の開発研究

塚原 智典¹, 大嶺 謙², 内堀 亮介¹,
卜部 匡司¹, 水上 浩明¹,
久米 晃啓¹, 小澤 敬也^{1,2}¹自治医科大学医学部・遺伝子治療研究部²自治医科大学医学部・血液学

【背景・目的】

悪性 B リンパ腫は世界的に増加傾向にあり、その治療法の確立は重要課題である。近年導入された抗体療法により一定の治療効果が得られているが、再発・難治例も少なくない。そのため、新たなコンセプトによる根治的療法の開発が望まれている。現在、我々は、難治性非ホジキン B 細胞性リンパ腫を対象として、CD19 抗原を認識するキメラ抗原受容体を発現させた自己 T 細胞を体外で増幅して投与する新規免疫遺伝子治療法の開発研究を行っている。本研究では、抗 CD19 キメラ抗原受容体発現 T 細胞が、CD19 陽性 B リンパ腫細胞を殺傷できるかどうかを試験管内で検討した。

【方法】

抗 CD19 キメラ抗原受容体発現 T 細胞の作製のため、健常人末梢血 T 細胞を固相化した抗 CD3 抗体とレトロネクチンであらかじめ活性化し、同キメラ抗原受容体 (抗 CD19 抗体、

CD28, T細胞受容体 CD3 ζ から構成される：米国スロンケタリング癌研究所の Brentjens 博士より供与) を PG13細胞から調製した組換えレトロウイルスを用いて遺伝子導入した。遺伝子導入 T細胞の抗原特異的な増幅のため、ヒト CD19を強制発現させたマウス NIH3T3細胞との共培養を行った。これらの T細胞におけるキメラ抗原受容体の細胞表面の発現は、フローサイトメトリーで、細胞内発現は WB で解析した。これらの T細胞の抗原特異的なサイトカインの産生は、ELISA を用いて検討した。増幅した T細胞の細胞障害活性は、クロミウム遊離法により調べた。

【結果】

抗 CD19キメラ抗原受容体発現 T細胞は、抗原特異的に増殖し、3~4 週間の培養で約1000 倍まで増幅した。また、増幅した T細胞における抗 CD19キメラ抗原受容体の細胞表面での発現は、約80% まで到達した。また、細胞内における当該キメラ抗原受容体の発現も認められた。増幅したこれらの T細胞は、抗原特異的に IL-2 および IFN γ を産生した。これらの T細胞は、コントロールの CD19陰性白血病細胞株 K562 に比べて、CD19陽性バーキットリンパ腫由来の B細胞株 (Raji および Daudi) を非常に効率よく試験管内で殺傷した。これらの結果、作製した抗 CD19キメラ抗原受容体発現 T細胞の Bリンパ腫細胞に対する抗腫瘍効果が明らかとなり、これらの遺伝子改変 T細胞は、難治性 Bリンパ腫の治療に有用である可能性が示唆された。

腎障害を早期に検出するための新規バイオマーカーの探索

自治医科大学医学部薬理学講座臨床薬理学部門
助教 細畑 圭子

【背景および目的】

薬物や虚血等による尿細管障害は、診断時にはすでに進行していることが多く、予後をさらに改善するためには早期の診断・治療開始が必要である。現在、腎障害の診断には血清クレア

チニンや血中尿素窒素 (BUN) が広く用いられているが、これらのマーカーは糸球体濾過量が50% 以下に低下して初めて上昇するため、早期の尿細管障害の検出は困難である。

本研究は、より感度の高い腎障害診断バイオマーカーを見出すことを目的とした。

【方法】

当研究室で構築したヒトプライマリ腎細胞における腎障害性物質曝露時遺伝子発現データベースを利用し、有機溶媒 (アリルアルコール, エチレングリコール, クロロホルム, フェノール, ホルムアルデヒド) に共通して発現が変動した遺伝子を抽出した。候補遺伝子の検証は、ヒト近位尿細管由来セルライン HK-2 を用いて定量的リアルタイム PCR 法にて行った。

候補分子がバイオマーカーとなり得るか否かについて *in vivo* にて検討した。7 週齢の Wistar 系雄性ラットに0.75% エチレングリコールを3 週間飲水投与するモデルと、7 週齢の Wistar 系雄性ラットにシスプラチン 5 mg/kg を腹腔内投与するモデルで検討した。各モデルにおいて、尿、血液、腎を採取し、生化学検査、遺伝子発現解析を行うとともに、候補分子の尿中への漏出を ELISA にて定量した。採取した腎組織の一部を用いて PAS 染色により病理学的検討を行い、免疫染色により候補分子の局在についても解析した。さらにリアルタイム PCR 法により候補分子の mRNA を定量した。

【結果】

網羅的遺伝子発現解析により、コントロール群に比し有機溶媒曝露群で2 倍以上の発現増加あるいは発現減少が認められた遺伝子のうち、マイクロアレイと同様の有意な mRNA 量発現変化を認めた遺伝子は *VNN1* のみであった。

vanin-1 が腎障害のバイオマーカーとなるか否かについてラットを用いて検討した。0.75% エチレングリコールを3 週間飲水投与したラットでは、組織学的に尿細管の変性および尿細管細胞の空胞化が顕著であり、明らかな腎障害が認められた。しかしながら、血清クレアチニン、BUN、尿中アルブミン、N-acetyl-beta-glucosaminidase には、いずれもエチレングリコール投与群と対照群で有意差を認めなかった。次に、腎の mRNA 発現量を検討したとこ

ろ、炎症メディエーターである MCP-1には変化は認めなかったが、vanin-1と Kim-1の有意な発現上昇を認めた。さらに、免疫蛍光法により vanin-1の腎内発現を検討したところ、vanin-1は糸球体には少なく、主に尿細管に発現しており、その発現量はエチレングリコール投与により顕著に増加していることが明らかになった。さらに、ELISAにより尿中 vanin-1濃度を測定した結果、エチレングリコール投与群では対照群に比し有意な上昇を認め、さらに、シスプラチン腎症モデルにおいても、シスプラチン投与後5日目には、組織学的な尿細管の変性および腎組織中における有意な vanin-1mRNA 量の増加を認めた。さらに、尿中 vanin-1はシスプラチン投与後1日目から vehicle 投与群に比べ有意に上昇したが、腎障害マーカーである血清クレアチニンは投与後5日目のみ有意に上昇した。

【結論】

vanin-1は、尿細管障害モデルラットにおいて既存の腎障害マーカーよりも早期に尿中濃度が上昇した。したがって、vanin-1は早期に尿細管障害が検出可能な新規非侵襲性バイオマーカーとしての臨床応用が期待できる。

胆道閉鎖症の肝組織におけるテロメア長の解析

眞田 幸弘^{1,2} 相田 順子² 川野 陽一^{2,3}
 仲村 賢一² 泉山一 下村七生貴²
 石川 直² 山田 直也¹ 岡田 憲樹¹
 脇屋 太一¹ 井原 欣幸¹ 江上 聡¹
 菱川 修司¹ 浦橋 泰然¹ 水田 耕一¹
 河原崎秀雄¹ 田久保海誉²

自治医科大学移植外科¹

東京都健康長寿医療センター研究所老年病理学研究チーム²

日本医科大学消化器外科・一般外科・移植外科³

要旨：

背景：胆道閉鎖症（BA）の肝臓は、継続的な胆汁うっ滞や再生のために、テロメアは短縮していることが予想されるが、未だ検討の報告はない。今回、BA 肝のテロメア長の測定を、

Southern blot 法と組織定量的 FISH（Q-FISH）法を用いて解析した。

対象と方法：肝移植時に摘出された BA 児の肝組織（20例）と、乳児剖検例の肝組織（10例）を用いた。Southern blot 法を施行し、Terminal restriction fragment（TRF）をテロメア長とした。また、肝組織のパラフィン切片上で FISH 法を施行し、独自に開発した解析ソフト Tissue Telo によってテロメア・セントロメア蛍光光度比（TCR）を求め、テロメア長とした。BA 児と乳児剖検例の肝組織の normalized TCR（NTCR）を測定し、Box Plot と Mann-Whitney's U test を用いて検討した。また、BA において Pediatric End-stage Liver Disease（PELD）Score とテロメア長の関係を Pearson's Correlation Coefficient を用いて検討した。

結果：BA 肝の TRF は、正常児と変わらなかったが（ $p=0.425$ ）、NTCR は、正常児に比して短縮していた（ $p<0.001$ ）。また、テロメア長と PELD スコアの回帰分析においては、有意な相関を認めた（ $p<0.001$ ）。

考察：① BA のような肝細胞の数倍もの間質細胞が存在する組織におけるテロメア長の測定は、肝細胞を選択的に測定できる Q-FISH 法が有用であった。② BA のテロメア長と PELD Score の相関から、胆汁性肝硬変の進行は細胞老化の促進の一因であると考えられた。③ BA のテロメア長は非常に短いため、BA には染色体の不安定性が存在し、将来癌が発生する可能性が示唆された。④ BA のテロメア長は PELD Score 値に関係なく、非常に短いため、自己肝の予備力が低いことを反映し、早期肝移植の適応を支持する結果であった。

結語：Q-FISH 法は肝細胞のみのテロメア長を測定できるため、肝組織全体を測定する Southern blot 法に比べて、より正確であると考えられる。BA 肝におけるテロメアは、肝不全の進行に関わらず著明に短縮しており、自己肝の肝予備能が低いことが予測された。

移植片拒絶応答におけるインターロイキン17の機能解析

自治医科大学さいたま医療センター
総合医学2
心臓血管外科 助教 伊藤 智

【背景】

インターロイキン17 (IL-17) は、近年、様々な免疫応答でその役割が注目を集めている炎症誘導性サイトカインである。移植片の拒絶応答において、これまで免疫応答は Th1-Th2 サイトカイン/細胞のバランスでその分子機構が説明されてきた。近年 Th1細胞や Th2細胞とは異なり、IFN- γ や IL-4 を産生せず、主に IL-17 を産生する新たな T 細胞「Th17細胞」が同定された。しかしながら、移植片の拒絶応答における IL-17 の役割については、その他の免疫応答における IL-17 の機能解析にくらべ遅れており、今日に至っても明確になっていない。今回、異所性心移植モデルにおける IL-17 の機能解析に関して IL-17 欠損マウスを使用し検討した。

【方法】

1. 移植心の急性期拒絶応答における IL-17 の役割の解明

レシピエントとして C57BL/6 野生型マウス、IL-17 欠損マウスを用い、それらマウスの腹部大動脈に、FVB マウスの心臓の大動脈に移植する異所性移植を行う (MHC full-mismatch)。移植された FVB マウスの心臓で生じる急性期拒絶応答の表面的な差異を、下記の一般的な免疫学および病理学的な解析により把握する。

- (1) 移植心の生着率 (拍動の有無) の経時的追跡
- (2) リンパ組織における免疫細胞のプロファイル評価 (FACS)
- (3) 白血球混合培養試験での T 細胞の増殖応答やサイトカイン産生測定 (ELISA や FACS)
- (4) 移植心の病理像解析 (H&E および TUNEL 染色)
- (5) 移植心での遺伝子発現変化 (アポトーシス関連遺伝子などの Real-time PCR)
- (6) 移植心の浸潤細胞のプロファイル評価

(FACS, 免疫染色による免疫細胞種・数の定量)

2. 移植心の急性期拒絶応答における IL-17 産生細胞の同定

移植心の急性期拒絶応答における IL-17 の役割の解明の (2) および (6) の解析結果より、免疫細胞での IL-17 産生細胞の同定がされる。予備検討では、CD4⁺T 細胞, CD8⁺T 細胞, $\gamma\delta$ T 細胞が IL-17 産生細胞の候補となっている。

- (1) C57BL/6 背景の Rag-2 欠損マウス (T/B 細胞欠損) に、C57BL/6 野生型、IL-17 欠損の TCR α/β ⁺T 細胞を移入する。このマウスに FVB マウスの心臓を移植し、生着率を評価する。(1) の結果次第で、TCR α/β ⁺T 細胞を CD4⁺T 細胞および CD8⁺T 細胞に変えて、同様の実験を行う。

【結果】

移植片の拒絶応答において、IL-17 は移植片で発現し、移植心の生着率は、野生型マウス (平均生着日数10日) に比べて IL-17 欠損マウス (平均生着日数18日, P<0.001) で有意に延長した。術後7日目での移植心の炎症細胞の浸潤、炎症性サイトカインは、有意に IL-17 欠損マウスで少なかった。IL-17 産生細胞は、CD4⁺T 細胞および CD8⁺T 細胞からの産生はごく少なく、 $\gamma\delta$ T 細胞が主な IL-17 産生細胞であることが確認された。

C57BL/6 背景の Rag-2 欠損マウス (T/B 細胞欠損) に、C57BL/6 野生型、IL-17 欠損の TCR α/β ⁺T 細胞を移入した実験からも、 $\gamma\delta$ T 細胞からの IL-17 が生着率に関与する可能性が示唆された。生着率の延長した移植心は、制御性 T (Treg) 細胞の数が野生型マウスに比べて増加していた。抗 CD25 抗体を投与して Treg 細胞を除去した IL-17 欠損マウスをレシピエントとして移植した結果、野生型マウスと同様の生着率となったことから、移植片の拒絶がされにくくなるのは、その Treg 細胞の増加に依存している可能性が考えられた。

【結語】

移植心の急性拒絶応答において、IL-17 は、重要なはたらきをしており、 $\gamma\delta$ T 細胞が主

な IL-17 産生細胞で急性拒絶に関与している。生着率の延長した移植心は、IL-17 欠損による制御性 T (Treg) 細胞の増加に関与している。これらのことから IL-17 の作用の阻害が移植片の定着率の向上に成果をあげる可能性がある。

黄色靭帯骨化症と血管新生の関連について

自治医科大学整形外科学講座

井上 泰一

【目的】

黄色靭帯骨化症は、脊柱靭帯の一つである黄色靭帯が骨化して肥厚することで脊髄を圧迫することにより、脊髄症状を呈する疾患である。アジア圏に多い疾患で、特に日本人に多い疾患である。後縦靭帯骨化症と類似点の多い疾患で、双方が合併することが多いと知られているが、原因については不明な点が多く、骨化がわかっていても直接骨化を治療する手立てはなく、脊髄症状を呈したものについては外科的切除をして除圧する以外治療の手立てがない。手術に際し、臨床の現場では出血しやすいという問題があり、周術期の出血量が多くなることをよく経験する。ところが、黄色靭帯骨化症における血管新生について注目した報告はほとんどなく、過去の報告では黄色靭帯内に血管内皮細胞増殖因子 (VEGF; vascular endothelial growth factor) の発現は確認されているが、血管新生についての言及はほとんどない。また、血管新生を起こす過程として、低酸素が引き金になり、低酸素誘導因子 (HIF-1; hypoxia inducible factor) を発現し、VEGF を放出して、血管新生が起こることが判明しており、黄色靭帯骨化症でも血管新生を起こしていることが予測される。今回、胸椎黄色靭帯骨化症において、血管新生と HIF-1 α の発現を組織学的に検討した。

【方法】

胸椎黄色靭帯骨化症患者の後方除圧時に採取した4例の黄色靭帯を対象とし、コントロールとして青壮年の脊髄腫瘍摘出術時に採取した胸椎黄色靭帯を用いた。採取した靭帯骨化部分の組織標本を作製し、HE染色、elastica

van Gieson 染色、トルイジンブルー染色、一次抗体として抗 CD31 抗体、抗 VEGF 抗体、抗 HIF-1 α 抗体を用いた免疫組織染色を行い評価した。

【結果】

コントロールとした黄色靭帯では骨化巣はなく、弾性線維が規則正しく配列し、毛細血管はほとんど存在しなかった。これに対し黄色靭帯骨化症の黄色靭帯では、骨形成、軟骨形成があり、軟骨内骨化を示唆するような組織形成があり、骨化巣内には骨髄を形成していた。黄色靭帯骨化組織標本を抗 CD31 抗体で免疫組織染色して確認したところ、骨化部分で毛細血管が増加しており、骨化辺縁部分の靭帯でも一部毛細血管が増加していた。また、VEGF・HIF-1 α 抗体で免疫組織染色を行ってみると、骨化巣内では明らかな発現は見られなかったが、軟骨巣内、骨化辺縁の線維組織内に発現が確認できた。

【考察】

本研究より、胸椎黄色靭帯骨化症は毛細血管の増加が骨化巣、骨化辺縁部分の靭帯内で見られることがわかり、軟骨層内、骨化辺縁部分で VEGF・HIF-1 α を発現していたことより、骨化の機序としてこれらの因子の関与が示唆された。他の疾患での研究と同様に黄色靭帯骨化症の血管新生についても、HIF-1 α の発現を介した機序が示唆され、低酸素が黄色靭帯骨化症のメカニズムの一つと推察することができた。今後、VEGF・HIF-1 α の関与のメカニズムがより鮮明になってくれば、動物モデルを使用してこれらの因子をブロックする薬剤の治療効果を検討していく予定である。

重症・難治性移植片対宿主病に対する間葉系幹細胞による治療効果の検討

自治医科大学内科学講座血液学部門

佐藤 一也

近年、間葉系幹細胞 (MSC) が T 細胞による同種免疫反応を抑制することが報告され、造血幹細胞移植後に発症した重症・難治性移植片

対宿主病 (GVHD) に対し、欧州を中心に高い治療成績が報告されている。造血幹細胞移植における治療成績の向上には高度免疫不全に合併する感染症と GVHD の制御が重要である。難治性の GVHD は患者の全身状態を著しく低下させ、しばしば致死的な合併症となる。治療には副腎皮質ホルモンや免疫抑制剤の追加投与が行われるが、減量に伴って再燃することが多く、重篤な感染症を惹起する危険も高い。血液学部門では臨床研究「造血幹細胞移植後に発症した難治性急性 GVHD に対する血縁者由来間葉系幹細胞を用いた治療」が自治医科大学倫理委員会の承認を得ている。本研究は MSC を用いた重症・難治性 GVHD の治療効果を追試し、その安全性及び有効性を評価することを目的とした。

対象は標準的な GVHD 予防にも関わらず、造血幹細胞移植後に GVHD を発症し、標準的治療である副腎皮質ホルモンが無効、または減量に伴って再燃した患者とした。GVHD の重症度は Glucksberg の診断基準に基づいて判定した。MSC の提供者は血縁の健常人に限り、腸骨骨髓から採取した 10ml の骨髓血を用いて輸血・細胞移植部内のセルプロセッシングルーム内で培養を行った。MSC の細胞数は 1.0×10^6 cells/kg としてコンタミネーションがないことを確認したうえで患者に経静脈的に投与した。

臨床研究は現在進行中であるが、2006年1月から2010年12月までの期間に本研究に参加した10例（男性7例、女性3例）の重症・難治性 GVHD 患者を解析対象とした。患者平均年齢は37.9歳（23～65歳）であった。骨髓血採取時に単核球数が不十分であった1例、及び早期の継代で MSC が十分な細胞数まで至らなかった2例を含む13人の健常ドナーからの骨髓血採取を実施したが、手技に伴う合併症はなかった。10例中7例は免疫抑制剤の追加や副腎皮質ホルモンの増量などによって MSC を投与することなく GVHD の改善を認めたが、治療抵抗性を示した3例に対して MSC の投与を実施した。MSC を投与した3例中1例はきわめて重篤で多臓器不全を伴っており、MSC の投与及び更なる薬剤の追加にも反応が得られなかつ

た。残りの2例はいずれも腸管を主病変とする GVHD の患者で、MSC の投与による GVHD の改善傾向を認めた。昨年度の1例は追跡期間が短いので臨床効果を判定するには現時点では時期尚早であるが、MSC の投与後から副腎皮質ホルモンは順調に減量できており、これまで再燃は認めていない。また一昨年度に経験した1例では MSC の投与前後での下部消化管内視鏡で消化管粘膜障害の改善が確認されている。MSC の投与に伴う明らかな副作用や合併症は全例でみられなかった。

重症・難治性 GVHD に対して少なくとも一部の患者で MSC の治療効果が示唆された。血液学部門ではマウス由来 MSC と GVHD モデルの実験系とを用いて免疫抑制の分子メカニズムについても基礎的検討をすすめてきた。更なる臨床データと基礎的研究の発展により、安全性が高く、より効果的な治療戦略を確立していくことが必要である。

下垂体前葉に存在する濾胞星状細胞機能解明 —特にネットワーク形成機序に注目して—

自治医科大学医学部解剖学講座組織学部門
堀口幸太郎

【背景】

下垂体前葉は、5種類のホルモン産生細胞と非ホルモン産生細胞である濾胞星状細胞 (FS 細胞) から構成される。FS 細胞には、前葉機能を調節する多様な機能が示唆されている。その一つとして同種細胞間でギャップ結合を介した情報伝達系があり、FS 細胞ネットワークとしてホルモン産生細胞の活動を修飾する可能性が想定されている。我々は、FS 細胞特異的に GFP を合成するトランスジェニックラット (S100b-GFP rat) を用いて、下垂体前葉細胞初代培養における FS 細胞の動態を living 観察した結果、細胞外マトリックス (ECM) と親和性を示すことで、突起状の細胞質を伸長させ互いに結合していく、ネットワーク形成過程が観察され、報告を行った (Horiguchi *et al.* 2009)。しかし、FS 細胞がどのように ECM と

親和性を示すのか、またどのように周囲 FS 細胞を認識し突起状の細胞質を正確に伸長させ接着していくかは不明であり、何らかのガイダンス因子の存在が予想された。本研究は、そのガイダンス因子を同定し FS 細胞ネットワークの形成機序を明らかにすることを試みたものである。

【方法】

ECM と FS 細胞ネットワーク形成との関連を解析するため、S100b-GFP rat の下垂体前葉から、FACS により単離した GFP 陽性 FS 細胞を基底膜 ECM であるラミニンコート、及び非コート上で培養し、ギャップ結合構成タンパクであるコネキシン43の遺伝子発現量変化をリアルタイム RT-PCR、タンパク量変化を Western blotting で解析した。そして、初代培養における FS 細胞間ギャップ結合を電子顕微鏡で観察した。次に、ラミニンレセプターであるインテグリン $\beta 1$ の細胞外ドメインを認識する抗体を用いて FS 細胞の初代培養を行い、形態変化を living 観察した。さらに、FS 細胞ネットワーク形成におけるガイダンス因子候補として、走化性サイトカインであるケモカインとそのレセプターに着目し、FS 細胞での発現を網羅的に解析した。

【結果】

FACS により単離した FS 細胞をラミニンコート上で培養し living 観察することで、突起状の細胞質を伸長し互いに接着する動態が顕著に増加することが明らかとなった。インテグリン $\beta 1$ 抗体添加によりその変化は阻害された。また、コネキシン43発現量がラミニンコート上の培養で増加した。さらに、FS 細胞間にギャップ結合が多く形成されることが電顕観察によって明らかとなった。そして、FS 細胞に CXC モチーフの一つであるケモカインとそのレセプターの特異的な発現を同定した。また、走化性アッセイを行なったところ、FS 細胞は、ある特定のケモカインに正の走化性を示した。

【考察】

本研究から、FS 細胞ネットワーク形成には、以下のような機序が考えられる。

- 1) FS 細胞は基底膜 ECM であるラミニンとインテグリンを介して接着する。

- 2) インテグリンの細胞内シグナリングにより、突起状の細胞質を伸長させる。
- 3) FS 細胞は、周囲 FS 細胞に対し、ケモカインをパラクライン分泌し、周囲 FS 細胞が特異的レセプターを介して受容し、その方向に対して細胞質をさらに伸長させ移動する。
- 4) 移動後周囲 FS 細胞同士で接着、その接着部位にギャップ結合を形成、それが続くことでネットワークとなる。

今後、この FS 細胞ネットワークが下垂体前葉のホルモン産生にどのように関わるか、その機能を明らかにする必要がある。

* 本研究成果は、(Horiguchi *et al.* 2011 *Journal of Endocrinology* 208: 225-232, Horiguchi *et al.* 2011 *Journal of Endocrinology* 211: 29-36) に掲載された。

IL-21のシグナル抑制と GVL 効果についての検討

自治医科大学内科学講座血液学部門
目黒 明子

造血幹細胞移植治療は現在標準的治療の選択肢のひとつとなっている。しかし同種造血幹細胞移植の場合、致命的な合併症として知られるのが移植片対宿主病 (GVHD) である。移植片はこのような負の面と共に、移植片対白血病作用 (GVL) を併せ持つことが知られており、ある程度の GVHD は白血病の治療成績を向上させると考えられている。現在、GVL を維持しながら GVHD を抑制する治療法はなくその探求は重要課題となっている。

我々はこの理想に近づく一つの手段として、IL-21を利用できないか検討した。IL-21は common γ chain (γc) family のサイトカインで、生体内では免疫グロブリン産生に関与していること、T 細胞及び NK 細胞の増殖において付加的刺激作用の役割をもつことなどが知られている。受容体は IL-21受容体と γc の二つから構成されており、T・B・NK・樹状細胞に発現し、それぞれの細胞にさまざまな作用をも

たらず。

以前我々は、マウス *graft-versus-host-disease* モデルにおいて、IL-21受容体ノックアウトマウス脾細胞を用いてIL-21のシグナルを欠損させると、GVHDが軽減することを報告した(2009 BMT, 2010 JI)。そこでIL-21シグナルを抑制すると、GVL効果も同時に減弱するかどうかを見極めるために検討を行った。

Mastocytomaのcell lineであるP815と、*bcr/abl*を導入した白血病細胞を用いて、マウスGVLモデルを作成し実験を行ったところ、IL-21シグナルを抑制してもGVL効果は軽減しないことが判明した。そこでより詳細に検討するために、脾細胞の数を漸減する実験を行った。5 × 10⁶と5 × 10⁵の間にGVL効果が消失する閾値が存在し、コントロール群とIL-21シグナル欠損群でGVL効果に差は認めなかった。しかし、興味深いことに、CD8陽性T細胞を除去した脾細胞を用いて同様の実験を行うと、IL-21シグナル欠損群ではGVL効果の減弱が認められた。

以上の結果から、IL-21^{-/-}CD4陽性T細胞だけでは十分なGVL効果を発揮できず、CD4およびCD8陽性T細胞が両方とも存在する条件下で、初めて、IL-21シグナルを抑制してもGVL効果が減弱しないことがわかった。このことより、IL-21シグナルが抑制された状況では、GVL効果においてCD8陽性T細胞が重要な役割を担っている可能性が示唆された。