

いる。また、我々は前研究において、妊娠中毒症妊婦では末梢血 Th1細胞比率が非妊婦及び正常妊婦に比較して増加していること、さらに、末梢血 Tc1細胞比率は、Th1細胞比率と有意な正の相関関係が見られること、さらに、有意差は認められないものの、妊娠中毒症妊婦の Tc1細胞比率は、正常妊婦よりも約10%高いことを報告した (47.9% vs. 37.3%)。そこで、本研究では、症例数を増加することで妊娠中毒症妊婦において Tc1細胞比率の増加がみられるかどうかを検討した。

対象及び方法

研究デザイン：case control study

対象：妊娠中毒症妊婦16例、正常コントロール妊婦21例、非妊婦18例。事前に informed consent を行い、研究の同意を得た。

方法：末梢血10mlをヘパリン採血した。直ちに血漿を分離し、 -80°C で保存。沈殿した細胞層にPBSを加えて、10mlとし、標準的な ficoll-Hypaque 法でリンパ球を分離した。リンパ球をPBSにて2回洗浄後、リンパ球数を $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ に調整した。リンパ球浮遊液を $50\mu\text{L}$ ずつ計3本試験管に分注し、Brefeldin A, Ionomycin, 及び phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を添加した。 CO_2 5%/air 95%, 37°C で4時間 incubate した。PC-5標識抗 CD8モノクローナル抗体を添加後、細胞膜に小孔をあけるために paraformaldehyde+saponin 処理を行った。続いて、1本に FITC 標識アイソタイプ IgG₁モノクローナル抗体、PE 標識アイソタイプ IgG₁モノクローナル抗体を添加し非特異的な結合を同定するためのコントロールとした。残り2本に FITC 標識抗 interferon- γ (IFN- γ) IgG₁モノクローナル抗体、PE 標識抗 interleukin (IL)-4 IgG₁モノクローナル抗体を添加し、細胞内サイトカインを標識した。洗浄後に three color flow cytometry 法を用いて、活性化 CD8⁺細胞における Tc1細胞 (細胞内 IFN- γ 陽性かつ IL-4陰性細胞と定義) 比率及び Tc2細胞 (細胞内 IFN- γ 陰性かつ IL-4陽性細胞と定義) 比率を調べた。

統計学的検討は Mann-Whitney 検定を用いて行い、 $p < 0.05$ の場合に有意差ありと判定した。

結果

非妊婦、正常妊婦、及び妊娠中毒症妊婦における末梢血中 Tc1細胞比率 (中央値) は、各々 44.9%, 41.8%, 及び 45.6% であり、妊娠中毒症妊婦における Tc1細胞比率の上昇は認められなかった。Tc2細胞比率は、各々 0.43%, 0.80%, 及び 0.60% であり、正常妊婦の Tc2細胞比率は非妊婦に比較して有意に増加していた ($p = 0.038$)。Tc1/Tc2細胞比は各群間で有意差を認めなかった。

結論

妊娠中毒症妊婦における末梢血中 Tc1細胞比率は、非妊婦及び正常妊婦と比較して有意に増加しているとはいえない。

創薬を目指した、分子構造に基づく分子間相互作用・分子機能の研究

ヒト免疫グロブリン IgG の Fc レセプター (Fc γ RIIIa) の単一核酸多型 (SNP, single nucleotide polymorphism) がどのように抗 CD20 モノクローナル抗体との相互作用に影響するかの考案

薬理学講座臨床薬理学部門 大島 康雄

背景：

2002年 Cartron らによりヒト免疫グロブリン IgG の Fc レセプター (Fc γ RIIIa) の単一核酸多型 (SNP, single nucleotide polymorphism) が抗 CD20モノクローナル抗体製剤の臨床効果に影響を及ぼすことが報告された⁽¹⁾。この報告は、分子標的薬剤の効果がヒトの遺伝多型により何らかの影響を受けることを示唆している。その機序を明らかにすることは今後の医薬品開発において重要である。我々は B 細胞ろほう非ホジキン悪性リンパ腫における抗 CD20モノクローナル抗体製剤の主作用は ADCC (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) 活性すなわち抗体依存性細胞性細胞障害活性であり、その活性にはマクロファージやナチュラルキラー細胞と言った効果細胞上での免疫グロブリン IgG の Fc レセプター (Fc γ RIIIa, FCGR3A) と抗 CD20モノクローナル抗体製剤との相互作用が重要であると

の観点から、この 2 分子の相互作用を分子モデル上で解析した。

方法：

Cartron らの報告で解析された核酸の多型は FCGR3A 蛋白質上 158 番目のアミノ酸残基のバリン (Val) またはフェニルアラニン (Phe) をコードする。これら多型のある FCGR3A のホモロジーモデルを、ヒト可溶性 CD16 の結晶構造⁽²⁾を鋳型として作成した。モデリングの方法は過去の方法に従った⁽³⁻⁶⁾。この鋳型構造は CD16 分子と IgG 分子が 1 対 1 の複合体を形成しており、その複合体の構造を基に、モデリングした多型 FCGR3A 分子とヒト免疫グロブリン IgG をスーパーインポーズすることにより FCGR3A と IgG の複合体モデルを組み立てた。

結果と考案：

モデルによると 158 番目のアミノ酸残基である Val/Phe は FCGR3A 分子の F-G ループに存在しており、IgG1 分子の Fc フラグメントがこのアミノ酸残基の側鎖部分を取り囲む。言い換えれば、この遺伝多型がコードする 158 番目のアミノ酸残基は結合インターフェースに存在する。この結果は実験的に FCGR3A 分子と IgG 分子の結合インターフェースを明らかにした報告^(7,8)に矛盾しない。Phe の側鎖は Val のそれと比較して疎水性が高く、より広い空間を占拠する。この側鎖の違いが FCGR3A 分子の主要な構造に影響を与える可能性は否定できないが、結合インターフェースの空間と疎水性へ影響を及ぼすことは明らかであり、このため FCGR3A 分子と IgG 分子の相互作用に影響を及ぼしていると考えられる。FCGR3A 分子を介した ADCC 活性は、抗 CD20 抗体以外のヒト IgG1 分子 Fc ポーションとの相互作用でも遺伝多型の影響を受けていると推測できる。したがって、ヒト化 IgG あるいはハイブリッドキメラ IgG 抗体 (ヒト IgG1Fc ポーションを有するモノクローナル抗体) 医薬品の開発において FCGR3A 遺伝子多型が効果や有害事象の発現へ影響することを考慮しておくことが必要である。

謝辞：

本研究内容はアメリカ血液学会雑誌に 2002 年掲載され⁽⁹⁾、我々が研究の発端として参考にした文献の著者である Cartron らよりお互いの

研究結果がサポートしあい、それぞれの学術的な価値をさらに高めあったことに感謝のコメントをいただいている。

文 献

1. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, Watier H: Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* 99 : 754-758., †2002
2. Sondermann P, Huber R, Oosthuizen V, Jacob U: The 3.2-A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc γRIII complex. *Nature* 406 : 267-273., †2000
3. Oshima Y, Puri RK: A novel interleukin 13 (IL-13) antagonist that blocks the biological activity of human IL-13 in immune and nonimmune cells. *Faseb J* 15 : 1469-1471., †2001
4. Oshima Y, Puri RK: Characterization of a powerful high affinity antagonist that inhibits biological activities of human interleukin-13. *J Biol Chem* 276 : 15185-15191., †2001
5. Oshima Y, Puri RK: Suppression of an IL-13 autocrine growth loop in a human Hodgkin/Reed-Sternberg tumor cell line by a novel IL-13 antagonist. *Cell Immunol* 211 : 37-42., †2001
6. Oshima Y, Tojo A, Niho Y, Asano S: Biological activity of human granulocyte colony stimulating factor with a modified C-terminus. *Biochem Biophys Res Commun* 267 : 924-927., †2000
7. Tamm A, Kister A, Nolte KU, Gessner JE, Schmidt RE: The IgG binding site of human FcγRIIIB receptor involves CC' and FG loops of the membrane-proximal domain. *J Biol Chem* 271 : 3659-3666., †1996
8. Tamm A, Schmidt RE: The binding

epitopes of human CD16 (Fc gamma RIII) monoclonal antibodies. Implications for ligand binding. *J Immunol* 157 : 1576-1581., †1996

9. Oshima Y, Fujimura A: Implication for how the single nucleotide polymorphism (SNP) of Fc receptor, Fc gamma RIIIa alters the interaction with anti-CD20 monoclonal antibody. *Blood* 99 : 4649-4650., †2002

骨髄間葉系幹細胞から平滑筋細胞への分化における物理的刺激の影響

総合医学第一講座 小林 信彦

【目的】骨髄間質細胞は造血幹細胞を支持するのみならず、それ自身が間葉系の様々な細胞に分化し得ることが知られている。近年、動脈硬化病変における肥厚内膜や血管拡張術後の新生内膜に認められる平滑筋細胞の一部が骨髄間質細胞由来であることが報告され、傷害内膜に定着した間葉系幹細胞が平滑筋細胞に分化し内膜形成に関与する可能性が示されている。培養平滑筋細胞を用いたこれまでの研究においては、ずり応力や圧負荷といった物理的刺激が脱分化した平滑筋細胞の増殖および再分化に影響することが示唆されているが、骨髄間葉系幹細胞の分化過程における物理的刺激の関与については不明である。本研究は、骨髄間質細胞から平滑筋細胞への分化における、ずり応力および圧負荷の影響を検討する。

【方法】マウス大腿骨頭を切断しPBSにて骨髄を洗い流し骨髄組織を採取する。赤血球を溶血除去した後に遠心分離した細胞を培養液 (Humedia SG2, Kurabo, Osaka) に浮遊させ、コラーゲンコートをしたプラスチックシャーレにて培養する。培地交換の際に浮遊細胞を除去し、接着能を有する間質細胞のみを選択的に培養する。Cell confluentとなった段階で trypsin-EDTA を用いて細胞を浮遊させ、Ficoll-Paque™ PLUS (Amersham Bioscience AB, Uppsala, Sweden) を用いて比重分離を

行い、間葉系幹細胞を多く含む細胞分画を採取する。採取した細胞を物理負荷用のプレート上で培養し、1, 2, 3週間経過した段階で36時間の物理負荷を加えた。物理負荷には、ずり応力と圧負荷量を任意に設定可能な Biopump system (Sanei Medis Inc., Tokyo) を用いた。ずり応力主体の負荷、圧主体の負荷、両者を含む混合負荷の3種類の負荷方法を設定し、静止状態で培養を継続したコントロールとの間で、免疫蛍光染色法、および Western blot 法にて平滑筋ミオシン重鎖 (SM-MHC) の発現を比較検討した。

【結果】免疫蛍光染色法では、SM-MHC 陽性細胞の全細胞に対する比率を計測した。静止状態のコントロールにおいては、1週間の培養では、SM-MHC 陽性細胞は出現せず、2週間で0.28%、3週間で3.3%の陽性率であった。ずり応力主体の負荷を受けた細胞群においては、培養1週間後の負荷ではコントロール同様 SM-MHC 陽性細胞は出現せず、2週目で1.2% ($P < 0.05$ vs. Cn.), 3週目で7.3% ($P < 0.01$) の発現率であった。圧主体の負荷では1週目で0.66% ($P < 0.05$ vs. Cn.), 2週目で2.5% ($P < 0.01$), 3週目で13% ($P < 0.01$) と、高い陽性率を示した。ずり応力および圧負荷の混合負荷では、1週目が1.2% ($P < 0.01$ vs. Cn.), 2週目が2.9% ($P < 0.01$), 3週目が15% ($P < 0.01$) の陽性率であり、圧主体の負荷と同等の発現率を示した。負荷を加えた細胞群の間で SM-MHC 陽性比率を比較してみると、2週間および3週間培養後の負荷では、ずり応力主体の負荷に対し、圧負荷 ($P < 0.05$) および混合負荷 ($P < 0.01$) において有意に高い陽性率が認められた。

Western blot 法にて SM-MHC の発現量を各群間で比較すると、コントロールに比べ負荷を加えた細胞群において発現が増加し、特に圧負荷および混合負荷を加えた細胞群で発現が顕著であった。この結果は免疫蛍光染色法の結果と一致するものであった。

【考察】本研究結果は、物理的負荷が骨髄間質細胞から平滑筋細胞への分化を促進することを示すものであり、その傾向はずり応力よりも圧負荷において顕著であった。