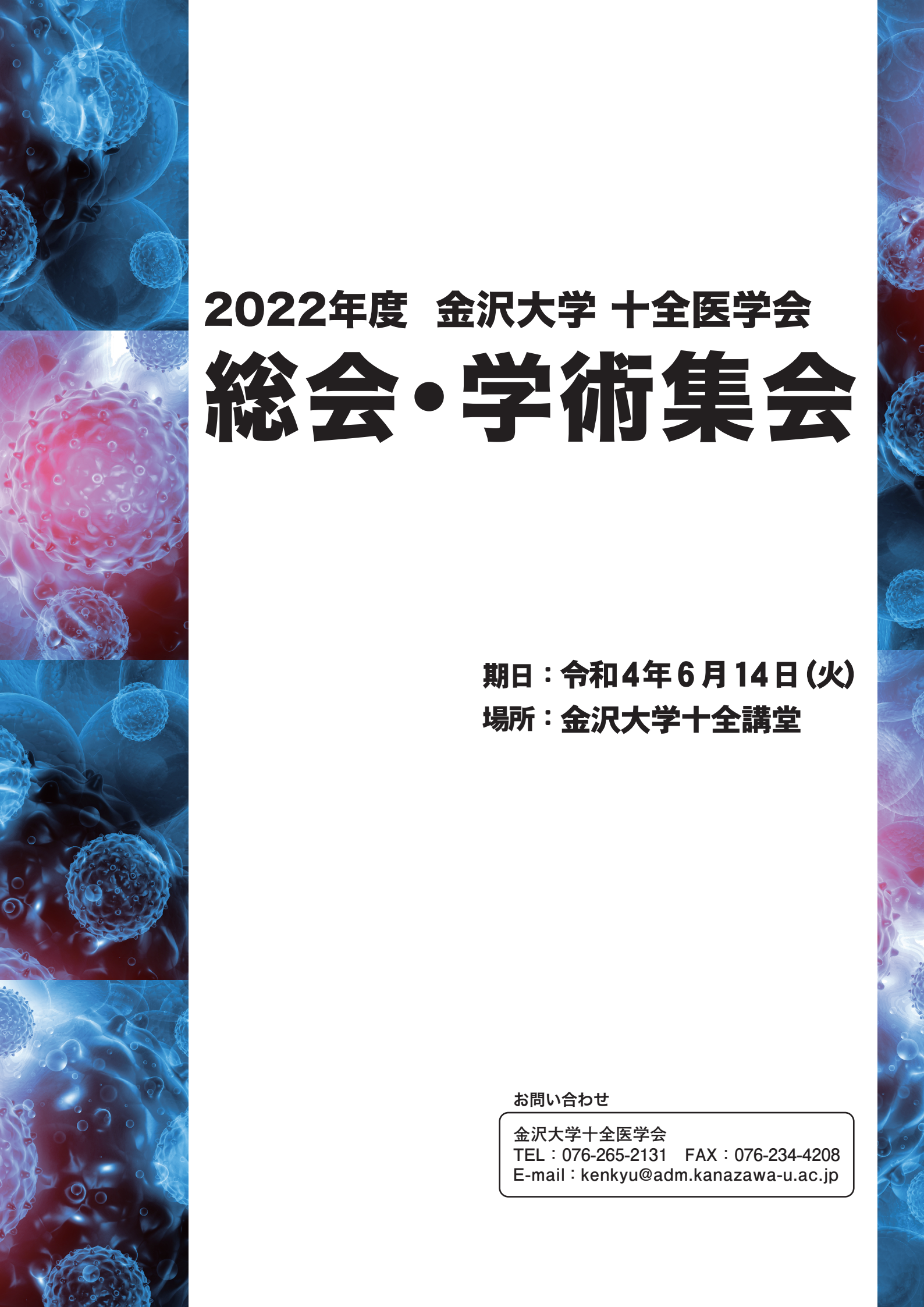




2022年度 金沢大学 十全医学会 総会・学術集会

期日：令和4年6月14日(火)

場所：金沢大学十全講堂

お問い合わせ

金沢大学十全医学会

TEL：076-265-2131 FAX：076-234-4208

E-mail：kenkyu@adm.kanazawa-u.ac.jp

Program

§ 総会

【議長：会長 土屋弘行】

12 : 40 - 13 : 00

- I. 会長挨拶
- II. 庶務報告
- III. 会計報告 1. 決算報告 2. 予算計画
- IV. 編集報告 優秀原著論文賞授賞式

§ 受賞記念講演

【進行：集会理事 三枝理博】

13 : 00 - 14 : 00

授与式 会長挨拶

第18回 金沢大学十全医学賞

「中枢概日時計及び睡眠覚醒制御回路における GABA 作動性伝達の機能的役割の解明」

金沢大学医薬保健研究域医学系 統合神経生理学 准教授 前島 隆司 先生

第2回 十全医学奨励賞

「緑内障と概日リズム –眼圧日内変動のメカニズムを探る–」

金沢大学附属病院 眼科 医員 土屋 俊輔 先生

(休憩 10分)

§ 学術集会 『免疫細胞療法』

【進行：集会理事 三枝理博】

【開会挨拶・座長：集会理事 華山力成】

14：10 – 14：40

「マウスインバリアントナチュラルキラー T細胞の胸腺内初期分化発生機構の解明 ～第二世代iPS-NKT細胞製剤の開発を睨んだ基礎研究～」

金沢大学医薬保健研究域医学系 幹細胞免疫制御学 教授 渡会 浩志 先生

14：40 – 15：45

「T細胞を知る、創る」

京都大学 医生物学研究所 所長
再生免疫学分野 教授 河本 宏 先生

(休憩 20分)

【閉会挨拶・座長：集会理事 篁 俊成】

16：05 – 16：35

「改変エクソソームを用いた新規免疫制御法の開発」

金沢大学 ナノ生命科学研究所 教授 華山 力成 先生

16：35 – 17：40

「制御性T細胞による免疫疾患の治療：抗原特異的免疫抑制をめざして」

大阪大学免疫学フロンティア研究センター・実験免疫学 特任教授
大阪大学 栄誉教授 坂口 志文 先生

中枢概日時計及び睡眠覚醒制御回路における GABA 作動性伝達の機能的役割の解明

Elucidation of the functional role of GABAergic transmission in the
central circadian clock and sleep-wake control

金沢大学医薬保健研究域医学系 統合神経生理学 准教授

前 島 隆 司



人を含む哺乳類は、多くの生物と同様、地球の自転に伴う24時間周期の環境変化に適応し、明暗サイクルのもとに活動期と休息期を設けて生活している。身体の各生理機能も行動様式に対応して調節され、1日を1周期とする変化、すなわち概日リズムを生じる。哺乳類においては、脳の視床下部に存在する視交叉上核 (Suprachiasmatic nucleus, SCN) が中枢時計として、概日リズムを制御する体内時計の中心的な役割を担っている。SCNで作られた時刻情報は、神経接続と内分泌を介して全身に配信され、睡眠・覚醒の切り替えを促し、体内の各組織に存在する末梢時計を調節して、個体としての生理機能に時間的秩序をもたらしている。

SCN内では、異なった神経ペプチドを発現する複数種のGABA作動性神経がクラスタを形成しており、それらが群内及び群間で接続して回路が形成されている。その主要な神経群はアルギニンバゾプレッシン (AVP) を発現する群と血管作動性腸管ペプチド (VIP) を発現する群で、それぞれ核の背内側と腹外側に分布する (図1)。SCN内の個々の神経は時計遺伝子の転写翻訳ループにより自律的に概

日リズムを生じるが、回路の形成によりそれらの振動体が組織化されることで、安定した時刻情報が生成され、外界の明暗サイクルに対するリズム同調 (周期と位相の調節、昼夜の長さの符号化) 機能が作り出される。しかしながら、これらの機能を発現させるSCN回路の動作原理は十分に解明されていない。

これまでにAVPやVIPなどのペプチドとその受容体、及び時計遺伝子の欠損マウスが解析され、各神経タイプはネットワーク構造における特有の機能的役割を果たす機能単位 (モジュール) として捉えられるようになっている。当研究室においても、AVP神経から時計遺伝子 *Bmal1* を欠損させた遺伝子改変マウス (AVP-*Bmal1*^{-/-}) を解析し、AVP神経が概日リズムの周期と活動時間帯の制御、及びAVP神経間の同調に寄与することを見出している。また、他の研究グループによるAVP受容体欠損マウスの解析から、AVPペプチドを介するシグナル伝達は、AVP神経間の同調性を高め、外乱に抗して概日リズムの位相を維持する作用を持つことが示されている。このように神経ペプチドの機能解析が進む一方、GABA伝達の役割については、

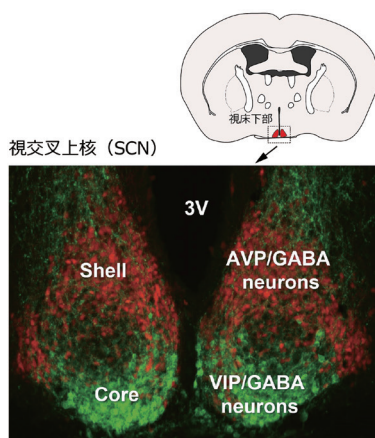


図1. 視交叉上核 (SCN) 内の神経細胞の局在

SCN内では、異なった神経ペプチドを発現する複数種のGABA作動性神経が存在し、それぞれクラスタを形成している。アルギニンバゾプレッシン (AVP) を発現するGABA神経 (赤) は核の背内側部 (Shell)、血管作動性腸管ペプチド (VIP) を発現するGABA神経 (緑) は腹外側部 (Core) に局在する。

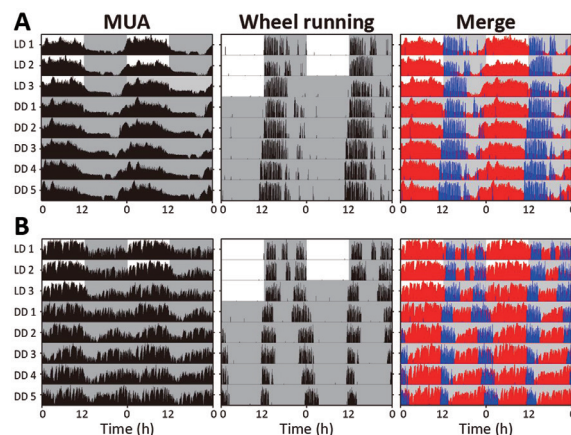


図2. SCNのin vivo マルチユニット記録

SCN回路の神経活動 (MUA) とマウスの輪回し行動の概日リズム (Wheel running)。対照マウス (A) は単峰性、AVP-*Vgat*^{+/+} マウス (B) は二峰性のMUAリズムを示した。MUAリズム (赤) の谷間にマウスの行動 (青) が現れた (Merge)。

複数の先行研究がなされてきたが、明確な結論が得られていなかった。その理由として、GABAがSCN内の神経に共通した伝達物質であり、神経タイプを分類して解析がなされていなかった点があげられる。

そこで私たちはAVP神経に焦点をあて、そのGABA伝達の機能的役割を解明することを目的とし研究を行った。実験ではAVP神経からのGABA伝達を遮断した条件での中枢時計の機能変異を解析するため、シナプス小胞にGABAを取り込む作用を持つ「小胞体GABAトランスポーター (*Vgat*)」を、Cre-loxP遺伝子組み換え法によりAVP神経特異的に欠損させた改変マウス (AVP-*Vgat*^{-/-}) を作成した。まず電気生理学的に、AVP神経からのGABA放出が欠損していることを確認した。その際、正常マウスではAVP神経からのGABA伝達は昼に高まり、夜に低くなるという概日リズムを示すことが分かった。次にマウスの自発性行動リズムを解析した。改変マウスを通常の明暗サイクルから恒暗環境下に置くと、行動の開始時刻が日を追って前進し、終了時刻は後退して、最終的に活動時間の長さが5時間以上も拡張するという行動リズムの異常を示した。興味深いことにリズム全体の周期には変化が見られなかった。この結果は、先に述べたAVP-*Bmal1*^{-/-}マウスが周期と行動時間の両方を延長させることとは対照的であり、GABA伝達の特異的な機能を推察させるものだった。

さらにこのリズム異常を生じる原因を求めるため、SCN回路の時計遺伝子発現、細胞内カルシウム変動、及び電気的神経活動の概日リズムを解析した。当初の予想と異なり、生物発光を用いた*Per2*時計遺伝子のリアルタイム計測と*in vivo*ファイバーフォトメトリー法を用いたAVP神経のカルシウム測光では、対照マウスと有意な差がみとめられなかった。その一方、*in vivo*マルチユニット記録法によりSCN回路の神経活動を観察したところ、正常マウスの神経活動が昼に高く、夜に低い単峰性のリズムを示すこととは対照的に、改変マウスでは夜にも別のピークが現れる二峰性のリズムを示し、マウスの行動

はその神経活動が低下する谷間の時間に起きていることが分かった (図2)。

これらの事から、AVP神経はGABA伝達を介してSCN回路の神経活動を制御し、細胞時計の概日リズムにそって適切な時間帯に動物の行動をオン・オフに切り替えるタイマー的な役割を担っていることが示唆された。この仕組みは、季節によって推移する昼と夜の長さを符号化し、動物の活動時間帯を調節するというSCNの回路機能と関連するため、本研究で得られた知見は季節性情動障害や概日リズム睡眠障害の治療・改善法の創出につながるものと期待している。

参 考 文 献

- 1) Maejima T, Tsuno Y, Miyazaki S, Tsuneoka Y, Hasegawa E, Islam MT, Enoki R, Nakamura TJ, Mieda M. GABA from vasopressin neurons regulates the time at which suprachiasmatic nucleus molecular clocks enable circadian behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 118: e2010168118, 2021
- 2) Saito YC*, Maejima T*, Nishitani M, Hasegawa E, Yanagawa Y, Mieda M, Sakurai T. Monoamines Inhibit GABAergic neurons in ventrolateral preoptic area that make direct synaptic connections to hypothalamic arousal neurons. *J Neurosci*. 38: 6366-6378, 2018 (*equally contributed)
- 3) Hasegawa E, Maejima T, Yoshida T, Maseck OA, Herlitze S, Yoshioka M, Sakurai T, Mieda M. Serotonin neurons in the dorsal raphe mediate the anticataplectic action of orexin neurons by reducing amygdala activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114: E3526-35, 2017
- 4) Soya S, Takahashi TM, McHugh TJ, Maejima T, Herlitze S, Abe M, Sakimura K, Sakurai T. Orexin modulates behavioral fear expression through the locus coeruleus. *Nat Commun*. 8: 1606, 2017
- 5) Maseck, O.A., Spoida, K., Dalkara, D., Maejima, T., Rubelowski, J.M., Wallhorn, L., Deneris, E.S., Herlitze, S. Vertebrate cone opsins enable sustained and highly sensitive rapid control of Gi/o signaling in anxiety circuitry. *Neuron* 81, 1263-1273 (2014).

Profile

前島 隆司 (まえじま たかし)

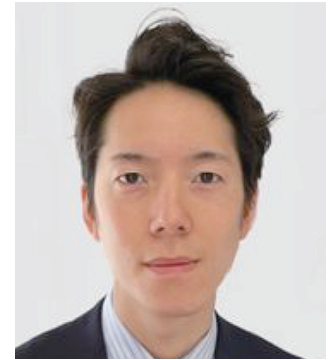
略歴

1996年 3月	大阪大学基礎工学部生物工学科卒業
1998年 3月	大阪大学大学院基礎工学研究科物理系専攻卒業
2002年 3月	金沢大学大学院医学研究科分子情報医学系専攻卒業
2002年 4月	日本学術振興会特別研究員PD
2004年 4月	生理学研究所生体恒常機能発達機構 助手
2007年10月	ケースウェスタンリザーブ大学医学部 博士研究員
2008年 4月	日本学術振興会海外特別研究員
2010年 5月	ルール大学ボーフム生物学・生物工学部 博士研究員
2013年11月	金沢大学医薬保健研究域医学系 助教
2017年 7月	金沢大学医薬保健研究域医学系 准教授

緑内障と概日リズム —眼圧日内変動のメカニズムを探る—

Glaucoma and Circadian Rhythm —exploration into the mechanism of intraocular pressure rhythm—

金沢大学附属病院 眼科 医員
土 屋 俊 輔



はじめに

緑内障は日本における失明原因の主な原因の一つであり、過去に行われた緑内障疫学調査(多治見スタディ)では40歳以上の日本人における緑内障の有病率は5.0%と報告され、20人に1人が緑内障に罹患していることになる。今後さらなる高齢社会が進むことが予想される我が国において、緑内障に対して治療が必要となる患者が増加することは想像に難くない。現在、医学の発展の恩恵により、緑内障に対する治療の選択肢が過去に比べて広がってはいるが、それでもやはりまだ緑内障が進行し、視機能が低下してしまう症例が少なからず存在している。現在緑内障の治療は、眼圧を下降させること以外にエビデンスに基づいた治療手段はない。よってその治療効果の判定や、治療方針を立てる上で眼圧値の把握が非常に重要であるが、眼圧は1日の中でも変動(日内変動)することが知られており、普段の外来では1日の変動の中のある一時点を捉えているに過ぎない。さらには、緑内障患者においてはこの日内変動が健常人のそれと違うパターンを示すことや、日内変動幅が大きいほど緑内障進行につながるなどが報告されている。そこでこの眼圧変動メカニズムを理解し、その患者の眼圧変動を予測したり、眼圧が高値の時間帯に合わせて治療計画を立てたり、変動を抑制したりすることで、緑内障に対する新規治療に繋げることができないかと考えた。

眼圧日内変動と概日リズム

眼圧日内変動研究の歴史は古く、最初の報告は100年以上前まで遡る。通常ヒトの眼圧リズムは体位変化などの影響を除外した場合にも、明け方から午前中にかけて高値を示し、それ以後低下するリズムパターンをとることが知られている。また実験動物においては、マウスやラット、そしてウサギにおいて夜間に高値を示すリズムパターンを示すことが知られている。この眼圧日内変動は一定期間、外部の周期的な光刺激がなくとも維持されるため、眼圧日内変動のリズムは生体内の概日時計に従っていることがわかる。哺乳類においては、体内時計の中核は視床下部の視交叉上核(suprachiasmatic nucleus; SCN)に存在し、この部分が中枢時計として、全身の組織における固有の概日リズムを生み出す末梢時計の位相を調節し、全身のリズムを同期させている。さらには概日時計は時計遺伝子(clock genes)と呼ばれる一連

の遺伝子群によって構成されている。

眼圧日内変動は先に述べたように概日リズムを示す生体現象の一つと考えられてきたが、その詳細なメカニズムはわかっていなかった。我々の研究室では過去に時計遺伝子の一つであるCry遺伝子をノックアウトすることで眼圧日内変動が消失してしまうことを示した¹⁾。また他のグループの報告では、眼圧を形成する房水産生である毛様体において、時計遺伝子が規則的に発現することも報告され、眼圧変動と生体の概日時計が深く関わっていることを示唆された²⁾。一方で、マウスの網膜においては、遺伝子改変により盲状態(Opn4^{-/-}; rd1/rd1, 網膜外層萎縮および網膜神経節細胞におけるメラノプシンをノックアウト)となったマウスを使用した場合、ex vivoおよびin vivoにおいても網膜は中枢時計であるSCN位相とは独立して、網膜単独で外部の明暗周期に同調していることが報告された³⁾。これらのことより、眼内の生理機能の一つである眼圧は概日リズムを示すが、中枢時計であるSCNによってそのリズムをコントロールされているのか、または網膜の末梢時計と同様に、それ単独で外部の明暗周期に同調できるのかという疑問点がでてきた。そこで我々の研究グループはまず虹彩毛様体におけるOpn3 mRNAの発現を解析し、網膜同様にOpn3, Opn4, Opn5の発現を確認した。よって虹彩毛様体も網膜と同様に独自に明暗周期に同調できる可能性があったので、次にPER2::LUCマウス(時計遺伝子の下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を導入したマウスで、PER2の発現に伴って蛍光を発するレポーターマウス)を使用し、両眼の虹彩毛様体のそれぞれをex vivoで逆位相の明暗サイクルに暴露することで虹彩毛様体の光感受性を確認した。その実験では網膜は過去の報告と同様にそれぞれの組織が明暗サイクルに同期できた一方で、虹彩毛様体は光への反応を示さなかった。さらに盲状態のOpn4^{-/-}; rd1/rd1マウスを使用し、概日リズムと外部の明暗周期を独立させることで、眼圧日内変動が中枢時計であるSCNによってコントロールされていることを示した⁴⁾。これらの実験結果より、種々の組織と同様に、眼圧日内変動はSCNからの支配を受けていることが明らかとなったが、SCNからどのようにして眼圧リズムが形成されるに至るのかという謎は残ったままであった。

SCNから末梢時計に至るまでは、まず光シグナルが

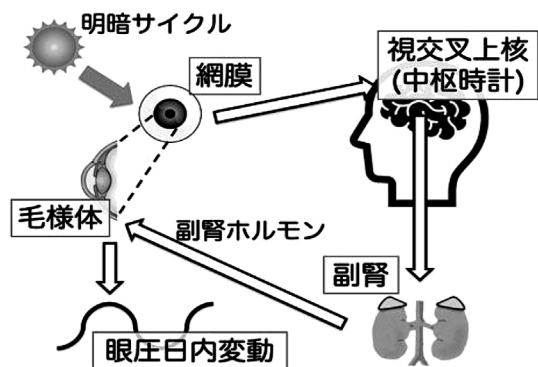


図. 現在想定している眼圧変動メカニズム

SCNに作用して位相調節を行い、その後に液性因子や神経連絡によって末梢時計の位相が調節されている。よって他の末梢時計と同様に、液性因子と神経連絡どちらの可能性も考慮しながら検討を進めた。まずアドレナリン受容体をノックアウトしたマウスを使用して、眼圧日内変動が野生型マウスと比べて変化せずに維持されることを明らかにし、交感神経系の神経連絡による眼圧リズム形成の関与の可能性が低いことを示した⁵⁾。次の可能性として、副腎ホルモンの一つであるグルコルチコイドに着目し、*ex vivo*において虹彩毛様体の時計のリセット、位相調節をできることを示した。そしてさらに副腎を摘出したマウス (ADX) を作成し、12時間の明暗サイクル下に4時間毎に眼圧を測定し、特に暗期における眼圧上昇がADXマウスでは消失することを示した⁶⁾。これらは暗期における眼圧上昇が、副腎ホルモンを介して形成され、眼圧リズムを作り出している可能性を示唆している(図)。

マウス眼圧日内変動の正確な測定および吸入麻酔薬が眼圧日内変動に与える影響

眼圧日内変動メカニズムの解明や、眼圧と疾患発症との関連、治療効果の判定など、動物モデルにおいて対象の眼圧を迅速かつ低侵襲、そして正確に眼圧値を繰り返し測定する技術は必須である。これまでマウスの眼圧を測定するために様々な方法が試みられてきたが、反跳式眼圧計の登場で、眼内への侵襲を伴わず繰り返しの眼圧測定が可能になった。しかしながら、マウスの眼は小さく、保定によるストレスも伴って眼圧値の上下動が激しく、検者間やマウス間での測定値のばらつきが大きいので、正確な眼圧を反映しているとは言い難かった。そこで我々の研究はよりマウスにおける眼圧測定を簡便にするため、イソフルランを用いた吸入麻酔薬によるごく短時

間の鎮静にて、概日リズムのどのタイミングにおいても正確に眼圧値を繰り返し測定する技法を提案した⁷⁾。この方法では、マウスに吸入麻酔をかけたとしても、麻酔開始後3分以内の眼圧測定であれば覚醒時の眼圧と有意差なく、眼圧日内変動を捉えることができた。この技術により、今後眼圧日内変動基礎実験はより正確かつ簡便になり、さらなる研究の選択肢が増えることが期待される。

おわりに

以上、我々の日内変動研究に関する取り組みについて述べさせて頂いた。新たな治療法を開発し、治療の選択肢を増やすことで、緑内障のさらなる進行抑止または発症予防につなげるために研究を行うことは我々眼科医の責務であると考え、当教室における眼圧日内変動研究はまだ発展途上ではあるが、将来的に眼圧リズムをコントロールし、変動を抑制することで緑内障に対する新規治療につながることを期待される。今後も研究に励み、将来の医学の発展につなげることができるよう、研鑽を積んでいきたい。

- 1) Maeda A, Tsujiya S, Higashide T, Toida K, Todo T, Ueyama T, Okamura H, Sugiyama K. Circadian intraocular pressure rhythm is generated by clock genes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:4050-4052, 2006
- 2) Dalvin LA, Fautsch MP. Analysis of Circadian Rhythm Gene Expression With Reference to Diurnal Pattern of Intraocular Pressure in Mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 56:2657, 2015
- 3) Buhr ED, Van Gelder RN. Local photic entrainment of the retinal circadian oscillator in the absence of rods, cones, and melanopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:8625-8630, 2014
- 4) Tsuchiya S, Buhr ED, Higashide T, Sugiyama K, Van Gelder RN. Light entrainment of the murine intraocular pressure circadian rhythm utilizes non-local mechanisms. *PloS one* 12:e0184790, 2017
- 5) Tsuchiya S, Higashide T, Toida K, Sugiyama K. The Role of Beta-Adrenergic Receptors in the Regulation of Circadian Intraocular Pressure Rhythm in Mice. *Current eye research* 42:1013-1017, 2017
- 6) Tsuchiya S, Sugiyama K, Van Gelder RN. Adrenal and Glucocorticoid Effects on the Circadian Rhythm of Murine Intraocular Pressure. *Investigative ophthalmology & visual science* 59:5641-5647, 2018
- 7) Tsuchiya S, Higashide T, Hatake S, Sugiyama K. Effect of inhalation anesthesia with isoflurane on circadian rhythm of murine intraocular pressure. *Experimental Eye*

Profile

土屋 俊輔 (つちや しゅんすけ)

略歴

2013年 金沢大学 医学部医学科 卒業
 2015年 金沢大学附属病院 眼科 入局
 2016年 University of Washington, Department of Ophthalmology, visiting scientist
 2019年 金沢大学附属病院 眼科 医員
 2020年 金沢大学大学院 医学博士課程 修了
 現在に至る

マウスインバリアントナチュラルキラー T細胞の 胸腺内初期分化発生機構の解明 ～第二世代iPS-NKT細胞製剤の開発を睨んだ基礎研究～

Elucidation of mechanisms in the initial differentiation of mouse iNKT cells
in the thymus which can be applicable to the development
of second generation human iPS-NKT cell formulation.

金沢大学医薬保健研究域医学系 幹細胞免疫制御学分野

渡 会 浩 志



インバリアントナチュラルキラー T (invariant natural killer T; iNKT) 細胞は、ヒトでVa24-Ja18/Vβ11, マウスでVa14-Ja18/Vβ8.2, 7, 2という限定されたT細胞抗原受容体 (T cell receptor; TCR) を発現するT細胞亜群で生物種を越えて存在する免疫細胞で、発見当初はT細胞, B細胞, NK細胞に続く第4のリンパ球に位置づけられた。通常αβT細胞が主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex; MHC) に提示されるペプチドを認識して分化発生するのに対して、iNKT細胞はMHCクラスI様のCD1dに提示される糖脂質を認識する。もう一つ特徴的なのは、通常αβT細胞はナイーブT細胞として胸腺から末梢に移行し、局所リンパ節などでの樹状細胞の教育によってTh1, 2, 17などの機能を有するエフェクターT細胞となるが、iNKT細胞は胸腺分化発生過程において既にiNKT1, 2, 17といったエフェクターメモリー様の細胞に分化して末梢へと移行する。従って、免疫応答能は通常αβナイーブT細胞よりも即時性があるため、自然免疫系と獲得免疫系をつなぐ役割を果たし、現在では組織特異性の高い自然Tリンパ球の一つと位置付けられている¹⁾。

臨床応用の観点からは、糖脂質α-ガラクトシルセラミドC26:0 (KRN7000) がiNKT細胞のリガンドとして作用し、強力な抗腫瘍活性をもたらすことが知られ、現在ステージⅢB/Ⅳの非小細胞肺癌や頭頸部腫瘍においても一定程度の効果が認められ、治験継続中である。この効果の程度は体内に存在するiNKT細胞数に依存することが知られ、特に癌患者ではiNKT細胞数の減少が認められることから、iNKT細胞補充療法が有効と考えられている²⁾。

山中伸弥先生による新しい多能性幹細胞であるiPS細胞樹立法の開発は再生医療の実現の大きなブレイクスルーとなった。我々はこの技術を利用し、世界に先駆けてクローナルなリンパ球を分化誘導する技術開発に成功

した³⁾。通常の体細胞とTリンパ球のゲノム上の大きな違いはTCR領域が遺伝子再構成を起こしているかいないかである。Tリンパ球から樹立したiPS細胞を試験管内分化誘導すると、通常必要な遺伝子再構成のステップをスキップすることができるため、効率的に由来するクローナルなTリンパ球に誘導することが可能である。この仮説についてマウスiNKT細胞を用いて実験的に証明することに成功した。現在では理化学研究所、千葉大学、慶応大学と協力し、ヒトiNKT細胞からのiPSマスターセルの樹立やiNKT細胞への再分化に成功し、PMDA審査等を経て、頭頸部腫瘍を対象として安全性・有効性に関する医師主導治験を進めている段階にある⁴⁾。

しかしながら、基礎研究的視点に立てばまだまだ課題も多い。iPS-NKT細胞自体においては、HLAミスマッチによる移入細胞排除やGvHの誘導、癌抗原非認識などである。これらをクリアするためにβ2m欠損、HLA-Eノックイン、CAR-Tノックイン背景のiNKT細胞由来の新しいiPSマスターセルを第2世代細胞製剤として研究開発を進めている。もう一つは培養法の改良である。ヒトiNKT細胞由来iPS細胞からiNKT細胞の誘導にはこれまで約40日という長期培養が必要な上、上述のエフェクターメモリー様の細胞への分化は認められていない。前者は同調培養法の技術確立によって、約20日の時間短縮に成功しつつある。しかしながらiNKT「らしさ」を引き出すことのハードルは著しく高いのが現状である。

本講演においては、通常αβT細胞とは異なるiNKT細胞の分化発生機構について、これまで明らかにできていない初期分化の解析に値する新規系統のマウスの樹立に成功したため、その最新の知見についてご紹介したい。本研究成果はヒトiNKT細胞由来iPS細胞からiNKT細胞への新しい分化誘導法の開発へと応用していく予定である。

文 献

- 1) Crosby CM and Kronenberg M. Tissue-specific functions of invariant natural killer T cells. Nat Rev Immunol 18(9): 559-574 (2018).
- 2) Fujii S et al. NKT cells as an ideal anti-tumor immunotherapeutic. Front Immunol 4: 409 (2013).
- 3) Watarai H et al. Murine induced pluripotent stem cells can be derived from and differentiate into natural killer T cells. J Clin Invest 120(7): 2610-2618 (2010).
- 4) Yamada D et al. Efficient regeneration of human V α 24+ invariant natural killer T cells and their anti-tumor activity in vivo. 34(12): 2852-2860 (2016).

Profile

渡会 浩志 (わたらい ひろし)

略歴

- | | |
|------------------|--------------------------------|
| 1993. 4-2002. 12 | キリンビール医薬探索研究所 研究員 |
| 2003. 1-2006. 3 | 理化学研究所 免疫アレルギー科学総合研究センター 研究員 |
| 2006. 4-2013. 3 | 理化学研究所 免疫アレルギー科学総合研究センター 上級研究員 |
| 2011. 3-2014. 3 | 科学技術振興機構 さきがけ研究者 |
| 2014. 1-2019. 5 | 東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター 特任准教授 |
| 2019. 6- | 金沢大学医薬保健研究域医学系 教授 |

T細胞を知る，創る

Generation and regeneration of T cells

京都大学 医生物学研究所 所長
再生免疫学分野 教授
河 本 宏



血液学や免疫学の教科書によく描かれている古典的造血モデルは，最初の分岐で赤血球/ミエロイド（食細胞）系列とリンパ球系列に分かれるというものである（図1A）。一方我々はこれまでに「ミエロイド基本型モデル」を提唱してきた。このモデルは，赤血球，T細胞，B細胞へ向かう各分化経路上の前駆細胞が，それぞれミエロイド細胞への分化能を保持するというものである（図1B）。これまでに我々が得た知見は，古典的モデルに対する反証となる一方，ミエロイド基本型モデルを支持するものであった^{1,2)}。このミエロイド基本型モデルは造血細胞の進化の過程を反映していると考えている。講演では，造血細胞の進化的起源について最近得た知見も紹介する。

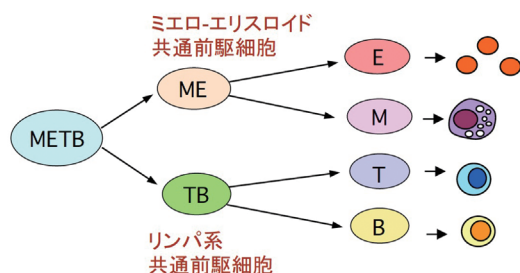
一方で，基礎研究の中で開発した培養法を臨床応用に用いる研究を，基礎研究と両輪で進めている。まず，がんの免疫療法における取り組みを紹介する。患者から取り出したT細胞を遺伝子改変して戻す方法は有効性が示されており，例えばCAR-T細胞療法はある種の白血病に対して承認されている。ただし自家T細胞を用いるため，高つく，時間がかかる，品質が不安定，などの問題点がある（図2）。これらの問題点を解決するために，我々はiPS細胞技術を用いる戦略を進めてきた。まずがん抗原特異的T細胞からiPS細胞を作製し（T-iPS細胞），そのiPS細胞からCD8T細胞を再生する事に成功した³⁾。続いてより高品質な細胞傷害性Tリンパ球（CTL）の再生に成功した⁴⁾。

臨床応用に向けては，上記のT-iPS細胞法ではなく，特

定のTCR遺伝子をiPS細胞に導入する方法（TCR-iPS細胞法）を用いる予定である（図2）。この方法がうまく作動するかを調べるために，T-iPS細胞法で再生したWT1 特異的CTLからTCRをクローニングし，レンチウイルスを用いてTCR-iPS細胞を作製した。T-iPS細胞とTCR-iPS細胞から再生したWT1-CTLは，両者とも同等の抗原特異的細胞傷害活性を示したことから，TCR-iPS細胞法の有効性が確認された⁵⁾。iPS細胞としてはCiRA-Fが提供する最頻HLAホモ株を用い，TCRとしては臨床試験で安全性と一定の有効性が示されているWT1抗原特異的TCR（Blood, 130: 1985, 2017）を用いる事にした。現在，この再生WT1-CTLを用いて京大病院の血液・腫瘍内科，細胞療法センター，先端医療研究開発機構と共同で，急性骨髄性白血病を対象にした治験に向けて開発を進めている。一方でこの再生WT1-CTLを固形がんに応用する開発研究を，秋田大学泌尿器科および京大泌尿器科と共同で進めてきた。再生WT1-CTLはWT1抗原陽性腎細胞がんの患者由来ゼノグラフトモデルで腫瘍の増殖を抑制した⁶⁾。

TCR-iPS細胞法は，ウイルス感染症に応用することもできる。この方法を用いたCOVID-19に対するT細胞製剤の開発を，藤田医科大学に研究室を開設して開始した。藤田医大ではSARS-Cov-2特異的TCRのクローニングを進めている。例えばHLA-2402拘束性のTCRを用いた再生CTLを作成できれば1種類で60%の日本人をカバーできると期待される。並行して，骨髄移植後に頻発するサ

A 古典的モデル(教科書モデル)



B ミエロイド基本型モデル

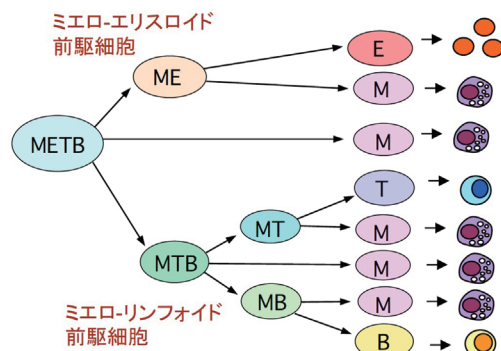
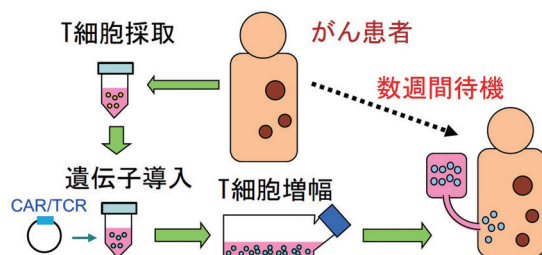


図1. 造血細胞の分化モデル

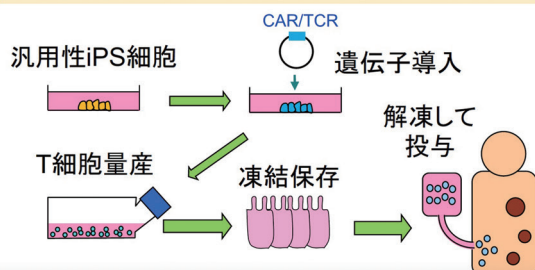
現在行われている「自家」T細胞療法



問題点：

- ・時間がかかる
- ・価格が高い
(キムリアは 3000万円台)
- ・品質がばらつく

汎用性iPS細胞を材料にした「他家」T細胞療法



- ✓ 誰にでも使える
- ✓ すぐに使える
- ✓ ローコスト
- ✓ 高品質・均質

図2. 現行の養子免疫療法の問題点と汎用性他家T細胞による解決

イトメガロウイルスやEBウイルスの再活性化に対する治療薬としてT細胞製剤の開発も開始した。これらの戦略が確立されれば、SARSやMERSなどの既知のウイルスのアウトブレイクに対してあらかじめ細胞製剤を作製して備えておくこともできる。また、未知のウイルスによるパンデミックが起こっても、即座に細胞製剤を作製することもできる。

- 1) Wada H, et al. Adult T cell progenitors retain myeloid potential. *Nature*, 452: 768-772, 2008.
- 2) Ikawa T, et al. An essential developmental checkpoint for production of the T cell lineage. *Science*. 329: 93-96, 2010.

- 3) Vizcardo R, et al. Regeneration of human tumor antigen-specific T cells from iPS cells derived from mature CD8+ T cells. *Cell Stem Cell* 12: 31-36, 2013.
- 4) Maeda T, et al. Regeneration of CD8 $\alpha\beta$ T cells from T cell-derived iPSC imparts potent tumor antigen-specific cytotoxicity. *Cancer Research* 76: 6839-6850, 2016.
- 5) Maeda T, et al. Regeneration of tumor antigen-specific cytotoxic T lymphocytes from iPSCs transduced with exogenous TCR genes. *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development*. 19: 250, 2020.
- 6) Kashima S, et al. Cytotoxic T lymphocytes regenerated from iPS cells have therapeutic efficacy in a patient-derived xenograft solid tumor model. *iScience* 23, 100998, 2020.

Profile

河本 宏 (かわもと ひろし)

略歴

1986年 京都大学医学部卒
 1986年 京大医学部附属病院 内科研修医
 1987年 関西電力病院 内科研修医
 1989年 京大病院第一内科輸血部 (伊藤和彦研) 大学院
 1994年 京大胸部疾患研究所 免疫学分野 (桂義元研) 研修生
 2001年 京大医学部 免疫細胞生物学講座 (湊長博研) 助教
 2002年 理研免疫・アレルギー科学総合研究センター チームリーダー
 2012年 京大再生医科学研究所 教授
 2016年 改組によりウイルス・再生医科学研究所 教授
 2022年 改称により医生物学研究所 教授 同所長

改変エクソソームを用いた新規免疫制御法の開発

Development of novel immuno-regulatory
methods using engineered exosomes

金沢大学ナノ生命科学研究所／医薬保健研究域医学系 教授

華 山 力 成



近年、免疫チェックポイント阻害剤を用いたがん免疫療法の著しい成果により、免疫応答を利用した治療の可能性が期待されている。しかし、これらは免疫のブレーキを外し、免疫系を“非特異的”に増強するため、その副作用として自己免疫疾患や内分泌機能異常などが発症し問題となっている。よって、“がん特異的”に免疫を増強する新たな薬剤の開発が求められている。一方、多くの自己免疫疾患ではステロイドや免疫抑制剤を用いる治療が行われているが、これらは免疫系全体を“非特異的”に抑制するため、日和見感染などの副作用が発症する。よって、自己反応性の細胞を“特異的”に抑制する方法の開発が求められている。以上の様に、免疫の特徴である“特異性”を活用した薬剤の開発により、これまでにない革新的な治療法の開発がもたらされると期待されているが、未だに達成されてはいない。そこで私たちは、エクソソームという細胞外小胞を人工的に改変することで、この“特異性”を付加した新規免疫制御法の実現を行っている。

エクソソームはほとんどの細胞が分泌する直径50～150nm前後の細胞外小胞で、分泌細胞由来のタンパク質や脂質・RNAなどを運ぶことで、様々な機能を制御する新たな細胞間情報伝達媒体として注目されている(図1)。特に免疫細胞が分泌するエクソソーム上には、免疫系を

活性化する分子(抗原-MHC複合体など)が、逆にがん細胞が分泌するエクソソーム上には、免疫系を抑制する分子(Fas-LやPD-L1など)が発現しており、これらの免疫制御分子を介して免疫応答やがん進展の制御など種々の生命現象に関与することが明らかとなっている。このことから現在、エクソソームを標的にした、もしくはエクソソームそのものを用いた創薬が大きく期待されている。

中でも近年、エクソソーム上に発現しているマーカー分子であるテトラスペニン(CD9, CD63, CD81など)とのキメラ分子を作製することで、目的のタンパク質を自在にエクソソーム上に発現させることが可能となっており、私たちは、この技術を活用してエクソソーム上に「複数の免疫制御分子を同時に発現」させる技術を開発することで、個々の単純な併用では実現することのできない「革新的な免疫制御法の実現」を目指している。すなわち、免疫細胞の効率的な活性化には、複数の免疫制御分子によるシグナルが同時に入る必要があるが、従来の免疫制御法では、これらが生体内で分散してしまう(図2左)。その結果、目的の免疫細胞を効率的に活性化できないばかりか、目的外の免疫細胞をも“非特異的”に活性化してしまい、様々な副作用が引き起こされてしまう。一方、私たちの技術では、エクソソームを介して生体内で複数の

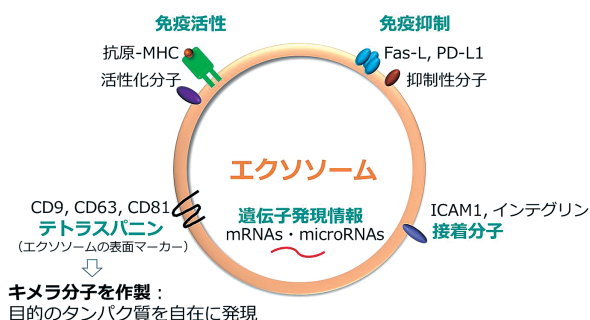


図1. 免疫系エクソソームの構成分子

エクソソームには様々な分子が載っているが、中でもテトラスペニンはエクソソームの表面マーカーとして知られている。テトラスペニンとのキメラ分子を作製することで、目的のタンパク質をエクソソーム上に自在に発現させることが可能となっている。

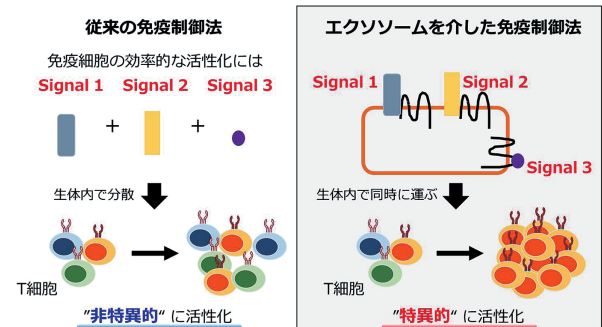


図2. 研究開発の目標

エクソソーム上に複数の免疫制御分子(Signal1, 2, 3)を同時に発現させる技術を開発することで、個々の単純な併用では実現することのできない革新的な免疫制御法の実現を目指している。

免疫制御分子を同時に運び同じ場で使うことで、個々の免疫制御分子の単純な併用では見られない相乗効果により、目的の免疫細胞のみを「特異的に」活性化させることが可能となる(図2右)。

私たちは、このように免疫制御機能を高めた改変エクソソームの開発を進めることで、これまでの技術では不可能であった「がん細胞のみを特異的に攻撃する免疫細胞」や「自己免疫疾患・アレルギーのみを特異的に抑制する免疫細胞」などを、改変エクソソームを用いて患者の体内に効率的に作り出す新規免疫制御法の開発を行っている。このことにより、これらの疾患に対して効率的かつ副作用の少ない治療法の開発を目指している。

参 考 文 献

1) Lim KS et al., Millisecond dynamic of SARS-CoV-2 spike and its interaction with ACE2 receptor and small extracellular vesicles. J Extracell Vesicles. 10(14):e12170 (2021)

2) Ma Y et al., Identification of small compounds regulating the secretion of extracellular vesicles via a TIM4-affinity ELISA. Sci Rep. 11(1):13471 (2021)

3) Araki Y et al., Osteosarcoma-derived small extracellular vesicles enhance tumor metastasis and suppress osteoclastogenesis by miR-146a-5p. Front Oncol. 11:667109 (2021)

4) Yurtsever A et al., Structural and mechanical characteristics of exosomes from osteosarcoma cells explored by 3D-atomic force microscopy. Nanoscale. 13(13):6661-77 (2021)

5) Baba T et al., Cytoplasmic DNA accumulation preferentially triggers cell death of myeloid leukemia cells by interacting with intracellular DNA sensing pathway. Cell Death Dis. 12(4):322 (2021)

6) Hanayama R. Emerging roles of extracellular vesicles in physiology and disease. J Biochem. 169(2):135-8 (2021)

Profile

華山 力成 (はなやま りきなり)

略歴:

1999年 大阪大学医学部医学科 卒業
2004年 大阪大学大学院医学系研究科 博士課程修了 博士(医学)
2005年 米国ハーバード大学医学部 HFSPフェロー
2008年 京都大学大学院医学研究科 医化学 助教
2011年 大阪大学免疫学フロンティア研究センター 独立准教授
2012年 科学技術振興機構 さきがけ研究者(兼任)
2015年 文部科学省研究振興局 学術調査官(兼任)
2015年 金沢大学医薬保健研究域医学系 免疫学 教授
2017年 金沢大学ナノ生命科学研究所 教授
2018年 科学技術振興機構 CREST研究代表者
2019年 金沢大学ナノ精密医学・理工学卓越大学院 コーディネーター

受賞歴:

1999年 山村賞(大阪大学医学部)
2004年 山村賞(大阪大学大学院医学系研究科)
2006年 GE & サイエンス誌・若手科学者賞
2009年 文部科学大臣表彰・若手科学者賞
2011年 HFSPキャリア開発賞
2012年 アステラス病態代謝研究会・最優秀理事長賞
2014年 大阪大学総長顕彰
2019年 金沢大学功労表彰
2021年 日本生化学会JB審査員賞

制御性T細胞による免疫疾患の治療： 抗原特異的免疫抑制をめざして

Treg cell therapy of immunological diseases
by antigen-specific immune suppression

大阪大学免疫学フロンティア研究センター・実験免疫学 特任教授

大阪大学 名誉教授

坂 口 志 文



制御性T細胞（以下Treg）は、免疫自己寛容、免疫恒常性の維持に必須のTリンパ球群である¹⁾。実際、Tregは、正常動物から特定のT細胞群（CD25⁺CD4⁺T細胞）を除くすると自己免疫病（例えば甲状腺炎、胃炎、I型糖尿病）が誘導され、それを補えば発症を阻止できる内在性の抑制性T細胞群として発見された。そのような内在性Tregは、ヒト末梢CD4⁺T細胞の約10%を占める。Tregの量的・質的異常は、様々な自己免疫／炎症性疾患の直接的原因となる。例えば、転写因子Foxp3は、Tregに特異的に発現し、その発生、機能発現を制御するマスター制御遺伝子であり、Foxp3遺伝子突然変異によるIPEX症候群では、高頻度にI型糖尿病、甲状腺炎、炎症性腸疾患のみならず、重篤なアレルギー（皮膚炎、食物アレルギー）を発症する¹⁾。このような単一遺伝子性自己免疫病に加えて、人口の約10%が罹患していると考えられる多遺伝子性自己免疫病（例えば、関節リウマチ）でも、その遺伝的感受性を決めるSNP（一塩基多型）の多くがTreg機能を担う遺伝子のTreg特異的エンハンサー部位に集積している²⁾。

一方、様々な動物モデルで、Foxp3⁺CD5⁺CD4⁺内在性Tregの移入により自己免疫病、アレルギー、炎症性腸炎などの免疫疾患の予防、治療が可能であり、また移植臓器に対する免疫寛容を誘導できる。さらに、正常T細胞にFoxp3を発現させると、機能、表現型の点で内在性Tregと同等の抑制性T細胞に転換できる。しかし、Foxp3の発現のみでは、Tregの遺伝子発現プロファイルあるいは機能的安定性を賦与できない。Foxp3遺伝子の発現に加えてTreg特異的遺伝子のエピゲノム制御が重要である¹⁾。

私達は、Tregを用いたヒト免疫病の治療、移植免疫寛容の誘導を目指している。特に、免疫疾患を惹起する、あ

るいは移植臓器の拒絶を媒介する抗原特異的T細胞を、機能的に安定なTreg（即ち、Foxp3を安定に高発現し、Treg特異的エピゲノムを備えた誘導性Treg）に転換する技術を開発し、これを用いたTreg細胞療法を確立しようとしている³⁻⁵⁾。本講演では、Tregによる免疫抑制の分子機構、およびTreg機能、細胞系譜の維持機構、そしてTregによる抗原特異的免疫抑制、免疫疾患治療の可能性について議論したい。

- 1) Sakaguchi S, Mikami N, Wing JB, Tanaka A, Ichiyama K, and Ohkura N. Regulatory T cells and human disease. *Ann. Rev. Immunol.* 38:541-566, 2020.
- 2) Ohkura N, Yasumizu Y, Kitagawa Y, Tanaka A, Nakamura Y, Motooka D, Nakamura S, Okada Y, Sakaguchi S. Regulatory T cell-specific epigenomic region variants are a key determinant of susceptibility to common autoimmune diseases. *Immunity.* 52:1119-1132, 2020.
- 3) Mikami N, Kawakami R, Chen KY, Sugimoto A, Ohkura N, Sakaguchi S. Epigenetic conversion of conventional T cells into regulatory T cells by CD28 signal deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 117:12258-12268, 2020.
- 4) Akamatsu M, Mikami N, Ohkura N, Kawakami R, Kitagawa Y, Sugimoto A, Hirota K, Nakamura N, Ujihara S, Kurosaki T, Hamaguchi H, Harada H, Xia G, Morita Y, Aramori I, Narumiya S, Sakaguchi S. Conversion of antigen-specific effector/memory T cells into Foxp3-expressing Treg cells by inhibition of CDK8/19. *Sci. Immunol.* 4, eaaw2707, 2019.
- 5) Wing JB, Tanaka A, Sakaguchi S. Human FOXP3⁺ regulatory T cell heterogeneity and function in autoimmunity and cancer. *Immunity.* 50:302-316, 2019.

Profile

坂口 志文 (さかぐち しもん)

学歴・職歴:

1976年 3月 京都大学医学部医学科卒業
1976年 5月 医師免許取得
1976年 4月 京都大学大学院医学研究科入学
1977年10月 愛知県癌センター研究所実験病理部門研究生
1980年 4月 京都大学医学部免疫研究施設及び附属病院輸血部医員
1983年 9月 京都大学医学部博士号取得
1983年 9月 Johns Hopkins 大学客員研究員
1987年 7月 Stanford 大学客員研究員
1989年 7月 Scripps 研究所免疫学部助教授
1992年10月 新技術事業団「さがけ21研究」研究員
1995年 4月 東京都老人総合研究所免疫病理部門部門長
1999年 2月 京都大学再生医科学研究所生体機能調節学分野教授
2007年10月 京都大学再生医科学研究所所長
2011年 4月 大阪大学免疫学フロンティア研究センター実験免疫学分野教授
2016年 4月 大阪大学荣誉教授, 京都大学名誉教授

賞罰:

1986年 7月 Lucille P. Markey Award for Biomedical Science
2004年 6月 Cancer Research Institute's William B. Coley Award
2007年 4月 文部科学大臣表彰科学技術賞
2008年11月 慶応医学賞
2009年11月 紫綬褒章
2012年 3月 日本学士院賞
2012年 5月 米国 National Academy of Sciences 会員
2015年 9月 トムソン・ロイター引用荣誉賞
2015年10月 Canada Gairdner International Award
2017年 5月 Sweden's Crafoord Prize
2017年 4月 文化功労者
2019年 7月 英国 Birmingham 大学名誉博士
2019年 9月 German Immunology Prize (Avery-Landsteiner Award)
2019年11月 文化勲章
2020年 3月 Paul Ehrlich and Ludwig Darmstaedter Prize
2020年11月 Robert Koch Prize

