

る分子標的を明らかにすることを目的とする。

【方法】 肺癌細胞株 A549 において、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により、チロシンキナーゼ阻害薬の標的として報告されている分子 (EGFR, GAK, RIPK2, NQO2) のノックアウト細胞株を樹立した。これら細胞株におけるオートファジーの変動について、抗 LC3B 抗体を用いたイムノブロットングにより評価を行うとともに、A549 細胞において EGFP-LC3B の安定導入株を作製し、オートファゴソーム形成についても解析を行った。**【結果・考察】** 作製したノックアウト細胞株を用いた解析により、定常状態における基底レベルのオートファジーフラックスおよびゲフィチニブ添加による変動は、GAK ノックアウト細胞株において最も顕著であることが示された。さらに、A549/EGFP-LC3B 細胞株において GAK のノックダウンを行うと、定常状態における EGFP-LC3B 発現亢進と、飢餓誘導による EGFP 輝点の増加が観察され、オートファゴソーム形成の亢進が示された。以上の結果から、チロシンキナーゼ阻害薬によるオートファジー調節作用に関して、今回解析を行った分子の中では、GAK の関与が最も大きいと考えられた。現在、GAK によるオートファジー調節作用の分子メカニズムについての解析を進行中である。

P2-20

Molecular imaging of the hCD19 CAR signalosomes, “CAR microclusters”

(免疫学)

○町山 裕亮、矢那瀬紀子、若松 英
豊田 博子、古畑 昌枝、秦 喜久美
横須賀 忠

(Center for Cell and Gene Therapy, Baylor College of Medicine)

Mamonkin Maksim, Brenner Malcolm K

CAR-T cell therapy is certainly one of the recent remarkable advantages in tumor immunotherapy. Human CD19 CAR is particularly shown to possess anti-tumor effects against CD19-positive B cell lymphomas and already applied for clinical use in the United States. In comparison with its worthwhile evaluation, little is known about the molecular mechanisms how

CAR introduces the activation signaling by T cells to kill the target cells and to develop into effector/memory CAR-T cells. To address these issues, we newly established hCD19 CAR imaging system by the combination of single molecule-based total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) and hCD19-expressing lipid bilayers. We've really defined the distinct signalosomes, we-called “microclusters”, and demonstrated that T cell activation is harmoniously regulated by microclusters constructed by not only TCRs but also immune checkpoint receptors in a spatio-temporal fashion. We this time identified “hCD19 CAR microclusters” by using that new imaging technique and unveils the precise mechanism of T cell activation through hCD19 CAR microclusters. These results will further develop more efficient CAR-T cells and may lead to the next generation of immunotherapy.

P2-21

リウマチ滑膜細胞における過増殖メカニズムの解明

(大学院修士課程2年運動器科学研究部門)

○横田 真穂

(医学総合研究所、未来医科学研究寄附講座、臨床共同研究センター)

中島 利博

(未来医科学研究寄附講座、医学総合研究所)

藤田 英俊

(バイオメテイクスシンポジウム (BM-S) 幹細胞治療学研究講座)

荒谷 聡子

関節リウマチは、関節腔に存在する滑膜細胞の異常増殖に伴って滑膜組織が肥大化する疾患であり、全身性の種々の免疫異常、滑膜細胞の過増殖、骨・軟骨破壊、線維化などの多段階の病的プロセスが相互作用しながら、進行することが知られているが、滑膜細胞の過増殖の根本的な原因はいまだ不明である。当研究室では、これまでリウマチ滑膜細胞の過増殖に着目し、ヒトリウマチ滑膜組織より滑膜細胞を分離・培養し、研究を行い、ほとんどの細胞は繊維芽細胞であり、均一の性質を維持していると考えてきた。しかしながら、癌細胞の研究から、癌組織

においては様々な性質を含む細胞の混在であることが明らかになりつつある。そこで、我々は、“培養リウマチ滑膜細胞は、不均一な細胞集団であり、この細胞の中に、リウマチ滑膜細胞の増殖を制御している細胞がいる”と仮説を立てるに至った。

本研究では、リウマチ滑膜組織より分離したリウマチ滑膜細胞を、同一 well に細胞が二個以上入らないように細胞溶液を希釈し、96 well プレート 10 枚に細胞を播種し、シングルセル化した。得られた細胞クローンの増殖速度を測定するとともに、増殖速度が早い細胞群と、遅い細胞群から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析、次世代シーケンズ解析を行い、発現の異なる遺伝子群・Pathway について解析を行い、その結果について報告する。

P2-22

リウマチ滑膜細胞における遺伝子発現ネットワークの解明

(未来医科学研究寄附講座、医学総合研究所)

○藤田 英俊

(医学総合研究所 運動器科学研究部門)

横田 真穂

(バイオミメティクスシンポジウム (BM-S) 幹細胞治療学研究講座)

荒谷 聡子

(医学総合研究所、未来医科学研究寄附講座、臨床共同研究センター)

中島 利博

関節リウマチは全身性の種々の免疫異常、滑膜細胞の過増殖、骨・軟骨破壊、線維化などの多段階の病的プロセスが相互作用しながら、進行することが知られている自己免疫疾患のひとつである。これまでの研究において、さまざまな転写因子が関与することが報告されていたが、滑膜細胞の増殖を制御するメカニズムはいまだ不明な点が多い。

本研究にて、我々は、転写コアクチベータである CREB binding protein (CBP) に結合する因子を探索した結果、Grap2 cyclin-D interacting protein (GCIP) を同定した。GCIP は、HLH ドメインを有し、かつ、basic ドメインを有さない inhibitor of DNA binding/differentiation (Id) ファミリーのひとつで、bHLH 型転写因子の dominant negative repressors として機能

することが報告されている。結合実験より、GCIP と CBP が *in vitro*, *in vivo* において結合していること、また、細胞増殖実験の結果、GCIP が細胞増殖を抑制することを見出した。さらに、詳細な解析の結果、GCIP による細胞増殖制御機構の一端が明らかになったので、その結果について報告する。

P2-23

核膜病モデルマウスにおける骨格筋障害機序の解明

(病態生理学)

○和田 英治、林 由起子

核膜構成タンパク質の遺伝子異常によって起こる核膜病は、多様な疾患を呈する。エメリン欠損やラミン A の遺伝子異常によって起こるエメリン-ドレイフス型筋ジストロフィーは骨格筋や心筋が障害されることが知られている。核膜が核の構造や形態維持に重要な役割を果たすことが示唆されているが、病態への具体的な関与についてはよく分かっていない。これまでも核膜病モデルマウスが報告されているものの、顕著な骨格筋症状を呈さないため骨格筋障害の詳細なメカニズムは明らかとなっていない。

我々は、エメリン欠損 (Emd) マウスと Lmna 変異導入 (H222P) マウスを交配させた二重変異 (EH) マウスを作出して病態の解析を進めている。その結果、EH マウスは H222P マウスと同様に心不全を示し、18 週頃から体重の減少が認められた。血中クレアチンキナーゼ値は正常範囲内であったものの、骨格筋においては若齢から核の構造異常や筋変性を示し、運動負荷テストでは正常対照、Emd、H222P マウスと比較して運動能が有意に低下した。また運動負荷により EH マウスの筋病理変化が増悪したことから、メカニカルストレスに対する抵抗性の減弱が示唆された。EH マウスは筋病態をよく反映しており、今後は詳細な病態メカニズムについて研究を進めていく。