

令和元年6月4日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09551

研究課題名(和文) 自己免疫疾患における抗原特異的免疫抑制療法の確立に向けた研究

研究課題名(英文) Research for establishment of antigen-specific immunosuppressive therapy in autoimmune diseases

研究代表者

長谷川 均 (Hasegawa, Hitoshi)

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40164826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫疾患の分野では、免疫寛容に導く樹状細胞(tDCs)を用いた抗原特異的な治療が注目されている。また各種物質で誘導されたtDCsはいずれも一長一短であった。本研究では、Cキナーゼ阻害剤(PKCI)、IL-10、TGF-beta、vitamin D3、dexamethazone、rapamycin、PPARgamma+retinoic acidの6種類で誘導されたtDCsとの比較検討を行い、制御性T細胞誘導能、二次リンパ節への遊走能、炎症環境下での安定から、PKCI-tDCsが最も良いことを明らかにした。また、シェーグレン症候群患者末梢血から、PKCI-tDCsの誘導は可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトのtDCsの治療効果については、欧州や米国を中心に1型糖尿病、関節リウマチ、クローン病、多発性硬化症に対して臨床試験が進められている。これらの試験において、いずれも安全性は確認されており、効果もあることが報告されている。これらの臨床研究で用いているtDCsは様々な方法で誘導したtDCsを用いているが、我々はPKCI-tDCsが最も良いことを明らかにした。PKCI-tDCsは自己免疫疾患における抗原特異的免疫抑制療法の有力なツールになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Tolerogenic dendritic cells (tDCs) are a promising therapeutic tool for specific induction of immunological tolerance. Human tDCs can be generated ex vivo using various compounds. However, the compound(s) most suitable for clinical application remain undefined. We compared the tolerogenic properties of tDCs treated with protein kinase C inhibitor (PKCI), dexamethasone, vitamin D3, rapamycin (Rapa), IL-10, TGF-beta, and a combination of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist and retinoic acid. PKCI-, TGF-beta-, and Rapa-tDCs showed CCR7 expression and migration to CCL19, but other tDCs showed little or none. PKCI- and IL-10-tDCs induced functional regulatory T cells more strongly than other tDCs. The tolerogenic properties of all tDCs were stable against proinflammatory stimuli. Furthermore, PKCI-tDCs were generated from patients with Sjogren's syndrome. Therefore, PKCI-tDCs showed the characteristics best suited for tolerance-inducing therapy.

研究分野：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：寛容型樹状細胞 自己免疫疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞(DCs)は、自己免疫疾患やアレルギー疾患などの発症,制御に大きく関わっており、獲得免疫を開始するのに強力な能力を持っている一方で、免疫寛容を導く点においても重要な役割を果たしている。現在、自己免疫疾患の患者の多くが、免疫抑制剤で治療を受けており、免疫抑制作用は強いが、その作用に比例して感染症などの副作用も多い。それゆえ、より選択的で副作用が少なく長期間寛解が維持できる治療の研究が進められており、自己反応性T細胞を標的とし免疫寛容に導く寛容型樹状細胞(tDCs)を用いた抗原特異的な治療が注目されている。今までに生理活性物質や薬剤を用いて、tDCsを誘導した報告があるが、誘導されたtDCsはいずれも一長一短であった。我々は、Cキナーゼ阻害剤(PKCI)を用いて、炎症環境下でも安定性があり、臨床応用可能な3条件を満たすtDCsを誘導している。

ヒトのtDCsの治療効果については、欧州や米国を中心にI型糖尿病、関節リウマチ、クローン病、多発性硬化症に対して臨床試験が進められている。これらの試験において、いずれも安全性は確認されており、効果もあることが報告されている。これらの臨床研究で用いているtDCsは様々な方法で誘導したtDCsを用いており、どの物質で誘導されたtDCsが優れているか検証する必要がある。また、MPO-ANCA関連血管炎とシェーグレン症候群においては、MPO-ANCAおよびM3ムスカリンアセチルコリン受容体(M3R)が病態および疾患活動性と関連することが明らかになっており、これらの疾患を対象としたtDCsを用いた抗原特異的免疫抑制療法の確立を目指した。

2. 研究の目的

自己免疫疾患の分野では、より選択的で副作用が少なく長期間寛解を維持できる治療の研究が進められており、自己反応性T細胞を標的としtDCsを用いた抗原特異的な治療が注目されている。今までに生理活性物質や薬剤を用いて、tDCsを誘導した報告があるが、誘導されたtDCsはいずれも一長一短であった。本研究では、各種生理活性物質で誘導されたtDCsを比較検討し、シェーグレン症候群とMPO-ANCA関連血管炎を対象として、抗原特異的免疫抑制療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 各種生理活性物質で誘導されたtDCsの比較

PKCI-tDCsと既報告の誘導物質、すなわち、IL-10、TGF-beta、vitamin D3 (Vit D3)、dexamethazone (Dex)、rapamycin (Rapa)、PPARgamma + retinoic acid (PPAR+RA)の7種類でそれぞれ誘導されたtDCsとの比較検討を行い、どの物質で誘導されたtDCsが臨床応用に適切かをex vivoにて検討した。検討項目は、表面マーカー、貪食能、CCL19に対する遊走能、IL-10およびTGF-betaの抑制型サイトカインの産生能、T細胞増殖抑制能、TregおよびIL-10産生細胞(Tr1)の誘導能、炎症環境下での安定性である。

(2) シェーグレン症候群とMPO-ANCA関連血管炎患者の末梢血単球からPKCI-tDCsの誘導
シェーグレン症候群とMPO-ANCA関連血管炎患者末梢血から単球を分離し、PKCI-tDCsが誘導可能かどうか検討する。さらに、シェーグレン症候群患者におけるHLA-DRB1に拘束されるM3RのT細胞エピトープ・アンカーモチーフのペプチドを同定し、抗原特異的免疫抑制療法に繋げる。

(3) PKCI-tDCsの誘導に関与するmiRNAの同定

未熟、成熟DCsおよびPKCI-tDCsから全RNAを抽出し、miRNA arrayにて比較解析(受託)を行い、PKCI-tDCsに発現の高いmiRNAをスクリーニングする。それぞれの合成miRNAをリポフェクタミンを用いてDCsに導入し、PKCI-tDCsと同様の表現型を誘導するmiRNAを同定する。

(4) 患者検体を使用する場合には、研究目的、その家族血族関係の人権および利益の保護に十分配慮を行うこと、検体の保存と将来にわたって検体を使用することを盛り込んだ研究計画を当大学臨床研究倫理審査専門委員会で承認(1007005号と1507014号)を得ており、文書による同意を得られた方からのみ実施している。

4. 研究成果

(1) 各種生理活性物質で誘導されたtDCsの比較

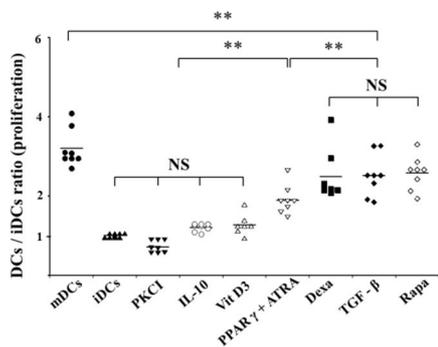
8名の健常人ドナーの末梢血単球から、PKCI、IL-10、TGF-beta、Vit D3、Dex、Rapa、PPAR+RAの7種類でそれぞれ誘導されたtDCsの比較検討を行った。以下に特徴を述べる。

7種類の物質で誘導されたtDCsはすべてsemi-matureの表現型を有していた。これらのうち、PKCI-、TGF-beta-およびRapa-tDCsは、CCR7発現およびCCL19への遊走能を認めしたが、他のtDCsはほとんど認めなかった(図1)。貪食能はすべてのtDCsに同等に認められた。炎症性サイトカイン、IL-6、IFN-gamma、IL-12の産生はすべてのtDCsで同等に低下していた。一方、抑制性サイトカイン、IL-10とTGF-betaの産生はすべてのtDCsで増加していたが、IL-10産生

は IL-10-および PKCI-tDCs、TGF-beta 産生は PKCI-tDCs で他の tDCs より有意に増加していた。

各種 tDCs による T 細胞の増殖抑制機能 (図 2) や制御性 T 細胞の誘導機能 (図 3) について比較検討した。PKCI, IL-10, VitD3 で誘導した tDCs は、高い抑制能を認めた。ナイーブ T 細胞との 5 日間共培養にて、IL-10 産生 CD4 陽性 T 細胞と Foxp3+CD4+CD25+ T 細胞の誘導について検討した。他の tDCs と比較して、PKCI-tDCs は、Foxp3+ Tregs, IL-10+ Tr1 を強く誘導した。IL-10-tDCs は、IL-10+ Tr1 を強く誘導した。

図 2 . tDCs の抑制機能の比較



各種 tDCs の安定性を検討するために炎症状態において、表面マーカー、抑制機能について解析した。炎症刺激には、LPS または TNF-alpha, IL-1beta, IL-6, IFN-gamma の炎症性サイトカインカクテルを用いた。その結果、すべての tDCs の表現型は維持されており、T 細胞の抑制能 (図 4) についても維持されていた。

図 4 . 炎症環境下での tDCs の安定性

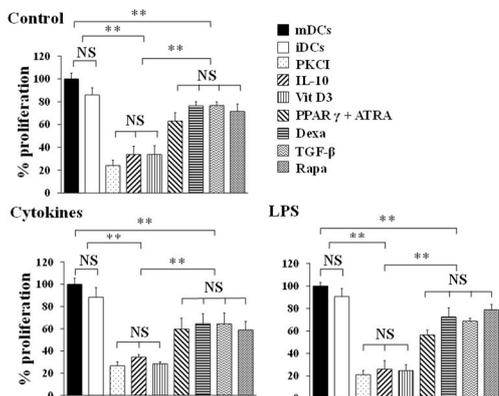


図 1 . 各種 tDCs の表面マーカーと CCR7 の発現

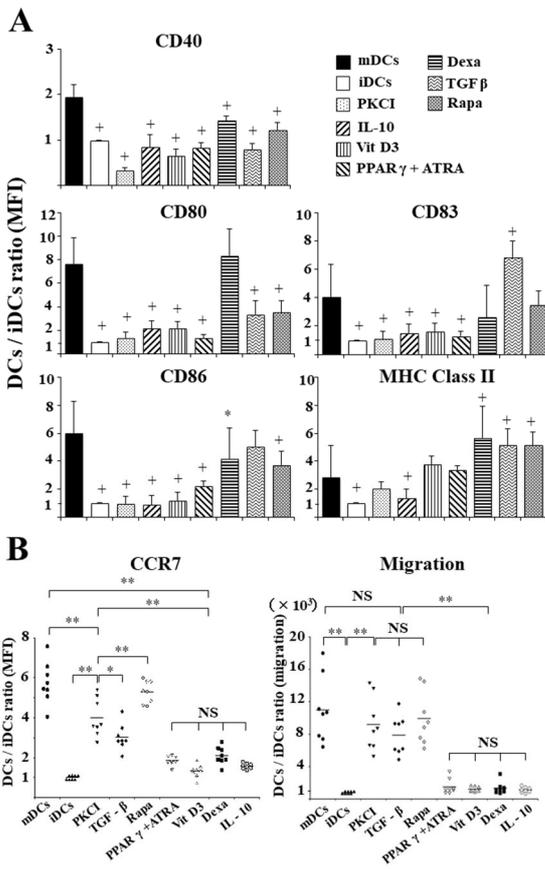
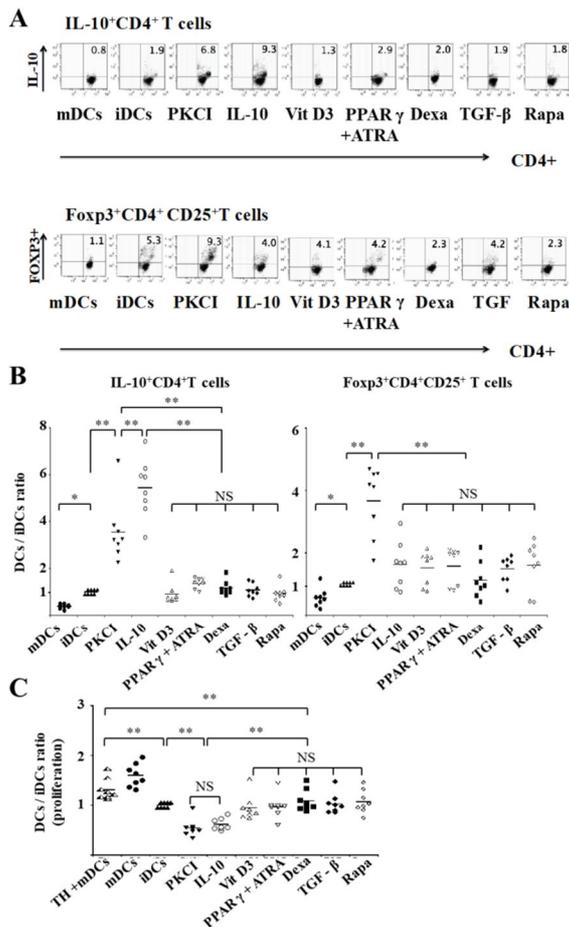


図 3 . tDCs の制御性 T 細胞誘導能の比較



結論

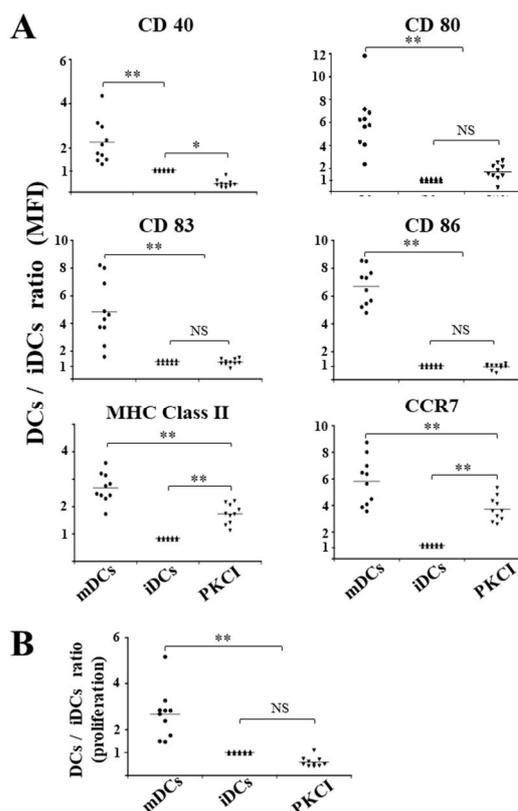
(1) ナイブ T 細胞を Treg 細胞に誘導する反応の場である二次リンパ組織への CCL19 に対する遊走能が維持されていること、(2) 炎症状況下でも安定していること、(3) Tr1 細胞や Treg 細胞などの機能的な抑制性 T 細胞が十分誘導できることの臨床応用 3 原則を満たしているのは、単独では PKCI が最も有力であった。

(2) シェーグレン症候群と MPO-ANCA 関連血管炎患者から PKCI-tDCs の誘導

次に、シェーグレン症候群と MPO-ANCA 関連血管炎を対象として、患者末梢血から PKCI-tDCs が誘導できるか検討した。10 例すべてのシェーグレン症候群患者の末梢血から PKCI-tDCs が誘導できた (図 5)。一方、8 例すべての ANCA 関連血管炎患者の末梢血から、PKCI-tDCs は誘導できなかった。これは、患者末梢血サンプルは既にステロイドや免疫抑制剤を用いており、単球、リンパ球の数や増殖が悪いためと考えられた。

さらに、シェーグレン症候群患者の HLA-DRB1 を解析し、比較的多かった HLA-DRB1*0401, 0803, 0901, 1501 などの allele を持つ患者を中心に解析している。IEDB Analysis Resource (MHC-II binding prediction) の解析から、上記の HLA-DRB1 に拘束される M3R の T 細胞エピートプ・アンカーモチーフのペプチドを推定し、上記の患者末梢血単核球にペプチドを添加し、IFN-gamma 産生 T 細胞増加数の比較にて検討している。HLA-DRB1 に拘束される可能性のある M3R のペプチドもあるが、今後さらに多くの症例で検討する必要がある。

図 5 . シェーグレン患者から PKCI-tDCs の誘導



(3) PKCI-tDCs の誘導に關与する miRNA の同定

未熟、成熟 DCs および PKCI-tDCs から全 RNA を抽出し、miRNA array (ジェネティックラボ株式会社に委託) にて比較解析を行い、PKCI-tDCs に発現の高い let-7c, miR-15a, miR-130a, miR-192 など 12 種類の miRNA をスクリーニングしている。それぞれの miRNA mimic をリポフェクタミンを用いて DCs に導入し、抑制性サイトカイン産生、共役分子や CCR7 発現を比較し、PKCI-tDCs と同様の表現型を誘導する miRNA の同定を行っている。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

1. Hasegawa H, Matsumoto T. Mechanisms of Tolerance Induction by Dendritic Cells In Vivo. *Frontiers in Immunology* 2018 9:350. doi: 10.3389/fimmu.2018.00350. 査読有
2. 松本卓也、長谷川均. C キナーゼ阻害剤で誘導されたヒト免疫寛容樹状細胞による自己免疫疾患治療への展開。 *アレルギーの臨床* 2017;37(13):49-54. 査読無
3. Adnan E, Matsumoto T, Ishizaki J, Onishi S, Suemori K, Yasukawa M, Hasegawa H. Human tolerogenic dendritic cells generated with protein kinase C inhibitor are optimal for functional regulatory T cell induction - A comparative study. *Clinical Immunology* 2016;173:96-108. doi: 10.1016/j.clim.2016.09.007. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 長谷川均、松本卓也、石崎淳、末盛浩一郎。C キナーゼ阻害剤で誘導されたヒト寛容型樹状細胞の特徴と自己免疫疾患からの誘導。第 62 回日本リウマチ学会総会学術集会 2018.
2. Hasegawa, H., Matsumoto, T., Adnan, E., Ishizaki, J., Suemori, K., Yasukawa, M. Characterization of human tolerogenic dendritic cells generated with protein kinase C inhibitor and induction from patients with autoimmune diseases. 2017 ACR/ARHP Annual Meeting. 2017.
3. 長谷川均、Adnan, E、松本卓也、石崎淳、大西佐知子、末盛浩一郎、安川正貴。各種誘導物質で誘導された免疫寛容樹状細胞の抑制機能の比較検討。第 43 回日本臨床免疫学会総会 2015.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。