

令和元年6月27日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10043

研究課題名(和文) 自然免疫刺激を介した抑制型獲得免疫誘導による移植免疫制御法の確立

研究課題名(英文) Transplantation tolerance by regulatory immune response through innate immunity stimulation

研究代表者

藤野 真之 (Fujino, Masayuki)

国立感染症研究所・エイズ研究センター・研究員

研究者番号：50392329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：糖鎖変異ウイルス、野生株、非感染の3グループのサルから分離したPBMCを用いてマイクロアレイ解析による遺伝子発現解析を行った。その結果、糖鎖変異ウイルス群において、特異的に発現の違いが見られる遺伝子群についての詳細な情報を得た。特にCXCL10の単球系細胞における発現に顕著な差が見られた。また、上記末梢血単核球から分画した細胞種ごとに抽出したRNAを用い、NGSによる遺伝子発現解析を行い、細胞種ごとの遺伝子発現プロファイルを得た。移植分野においては、ザイモザンを用いて、マウスアロ心臓移植における生着延長効果を検討した。その結果、ザイモザン投与群では、有意なアロ心臓移植片の生着が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在臓器移植は、免疫抑制剤の開発により臓器不全に対する究極的な治療法として確立されるに至っている。しかし、移植患者は終生の免疫抑制剤投与が必要とされ、感染症ならびに、癌の発生頻度が上昇するため、免疫抑制剤の投与量軽減方法、あるいは離脱方法等の移植免疫寛容誘導方法の確立が検討されている。しかし、移植免疫寛容の誘導方法は確立されておらず、詳細な免疫学的な機序ならびに分子機構は不明のままである。移植後免疫寛容の誘導方法の確立は、未だ明らかにされていない免疫制御機序の解明に寄与すると共に、移植患者のQOLの向上、医療費削減等に寄与し、移植医療のさらなる前進のために非常に重要である。

研究成果の概要(英文)：Gene expression analysis was performed by microarray analysis using peripheral blood mononuclear cells isolated from three groups of rhesus macaques, which are a sugar chain mutant virus (d5G), a wild strain, and uninfected control. As a result, in the d5G, detailed gene expression profile was obtained about the gene group in which the difference in expression is specifically seen. In particular, significant differences were observed in the expression of CXCL10 in myeloid lineage cells. In addition, gene expression analysis by NGS was performed using RNA extracted for each cell type fractionated from the peripheral blood mononuclear cells to obtain a gene expression profile for each cell type.

In the field of transplantation, zymosan was used to examine the survival prolongation effect in mouse cardiac allografting. As a result, significant cardiac allograft survival was confirmed in the zymosan administration group compared to the control group.

研究分野：移植免疫

キーワード：移植免疫

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

1. 研究開始当初の背景

自然免疫が獲得免疫の指向性決定に重大な影響を与えることが、明らかになって来ている (Front Cell Infect Microbiol. 2012;2:112.)。SIV/HIV 感染症では、ウイルス感染に伴い、自然免疫機構を介して感染防御免疫が誘導されるが、CD4T 細胞は過剰に誘導され過ぎる。ウイルスは過剰に活性化し増殖した Th1 型 CD4T 細胞に感染し、生体内で爆発的に増殖する。この慢性的免疫の活性化が、宿主の免疫による生体内でのウイルスの制御を毀損する。その結果、CD4T 細胞の恒常的な増殖とウイルス感染による細胞死により、やがては免疫系が疲弊し、AIDS 発症に至る。従って、自然免疫刺激による過剰な Th1 型の免疫反応の抑制がウイルス制御に必要であると考えられるようになってきている (Front Immunol. 2014;5:417)。

移植臓器は、宿主の免疫によりアロ抗原として認識され排除される。この移植臓器に対する免疫反応 (拒絶反応) には、主に Th1 型の免疫系の過剰亢進が知られており、Th1 型の免疫系過剰亢進を制御することが、移植臓器の生着延長効果および移植免疫寛容誘導に寄与することが明らかとなっている (Kidney Int Suppl.;(119):S2-12.)。

従来、自然免疫が移植臓器に対する免疫反応を促進し、移植臓器の拒絶反応を高め、移植免疫寛容を阻害すると考えられていた (Kidney Int. 2012;81(9):826) 。しかしながら、自然免疫は、用いられるリガンドにより単一の受容体だけではなく、複数の受容体を介することにより、免疫反応促進ではなく、免疫反応制御を行うことが明らかになって来た (Front Immunol. 2014;5:60.) 。特に TLR2 のリガンドであるザイモザンによる刺激は、免疫抑制効果を持つことが、マウス自己免疫疾患モデルにて明らかにされている (J Immunol. 2014;193(8):4203)

2. 研究の目的

自然免疫は獲得免疫の指向性に重大な影響を及ぼす。臓器移植においては、移植臓器の拒絶反応制御に、感染症においては、生体内のウイルス制御に影響を与えることが報告されている。本研究は、自然免疫惹起刺激による免疫抑制機構を介した移植免疫抑制法の確立を目的とする。研究の前半では、*in vitro* および *ex vivo* の系により、糖鎖変異ウイルスによる自然免疫刺激および、免疫抑制を誘導する機序の解析。研究の後半では、自然免疫機構を介した移植抗原特異的な免疫 (獲得免疫) 抑制方法の確立を、マウスアロ臓器移植モデル等を用いて検討する。

3. 研究の方法

糖鎖変異ウイルス感染、野生株 (SIVmac239) 感染、非感染の 3 グループ (n=5) の末梢単核球を用いたマイクロアレイ解析から糖鎖変異ウイルス感染における免疫抑制関連遺伝子の抽出を行う。さらに、*in vivo* 感染実験のデータを詳細に解析するため、分離したサル PBMC を蛍光染色し、セルソーターを用いて各種細胞群を分取する。RNA を抽出し、マイクロアレイもしくは NGS にてウイルス感染初期の遺伝子発現を検討する。遺伝子発現解析から、免疫抑制遺伝子を発現する免疫細胞を同定する。糖鎖変異ウイルスにて有為な変動が見られた遺伝子を解析し、サル PBMC による *ex vivo* ウイルス感染の系にて、ウイルス増殖、サイトカイン産生、細胞分化等に関する検討を行う。

臓器移植分野における免疫寛容を誘導するために、TLR2 リガンド、糖鎖変異ウイルスあるいは模倣リガンドを移植前および移植後に投与する。移植抗原特異的な免疫寛容を誘導するために、自然免疫刺激と同時に移植抗原投与を行う。移植抗原にはアロドナー特異的なペプチド (PLoS One. 2014;9(2):e87722.) を用いる。

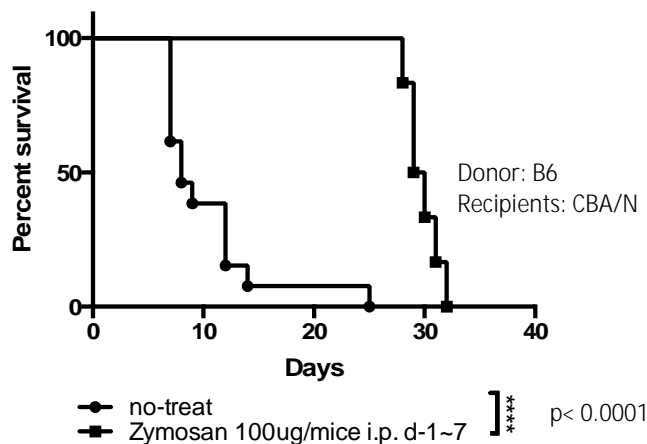
自然免疫の刺激および移植抗原の投与を行い。移植抗原特異的な免疫寛容を誘導する。生体内に

おける移植抗原特異的な免疫寛容を、FACS 等により免疫制御性細胞（制御性 T 細胞、制御性樹状細胞等）の分化を指標に解析を行う。また、免疫寛容誘導後の細胞を取り出し、免疫抑制能を MLR（Mixed Leukocyte Reaction） ELISA 等により評価する。

4．研究成果

糖鎖変異ウイルス、野生株、非感染の 3 グループのサルから分離した末梢血単核球を用いてマイクロアレイ解析による遺伝子発現解析を行った。その結果、糖鎖変異ウイルス群において、特異的に発現の違いが見られる遺伝子群について、詳細な情報を得た。特に CXCL10 の単球系の細胞における発現に顕著な差が見られた（J Virol. 2017;91(13). pii: e00439.）。また、上記末梢血単核球から分画した細胞種ごとに抽出した RNA を用い、NGS による遺伝子発現解析を行い、細胞種ごとの遺伝子発現プロファイルを得た。

移植分野においては、免疫抑制の誘導が知られている TLR2 リガンドであるザイモザンを用いて、マウスアロ心臓移植における生着延長効果を検討した。その結果、コントロール群に比してザイモザン投与群では、有意なアロ心臓移植片の生着が確認された（ $p < 0.0001$ ）。



また、ザイモザンの種類、投与量、投与経路、投与方法による免疫制御についての検討を行った結果、ip のみならず iv 投与、7 日間では無く移植前、移植時、移植後の 3 回投与によっても、臓器生着延長効果が得られることが明らかになった。

ザイモザンが移植抗原に対する制御免疫反応を検証する一環として、自然免疫による非特異的な刺激による自己免疫性肝炎に対する免疫制御効果について検討を行った。ConA を C57BL/6(B6)マウスへ静脈投与する事によって T 細胞依存性に引き起こされる肝炎に、自然免疫刺激として黒酵母由来の グルカンの投与を行った。グルカンはザイモザンの主要活性成分である。その結果、グルカン投与群では、血清中 ALT および AST の有意な減少が見られ、肝炎抑制効果が確認された。一方 T 細胞に対する免疫反応制御機構を検討するために、血中および肝臓における制御性 T 細胞の割合を検討したが有意な差は見られなかった。また、肝臓における炎症性サイトカインの発現を検討したが、何れにおいても有意な差は見られなかった。

ザイモザンや グルカンは結合する細胞受容体の一つとして Dectin-1 が知られている。Dectin-1 は自然免疫担当細胞である樹状細胞やマクロファージに発現する C 型レクチンに属する。本研究では自然免疫受容体の応用として Dectin-1 に特異的に取り込まれる siRNA デリバリーシステムを構築した。本デリバリーシステムを用い生体の自然免疫担当細胞における CD40 の発現を特異的に抑制した。CD40 の発現が抑制されたマウスは、アロ心臓移植片の永久生着を示した。同時に、移植片への CD4 および CD8T 細胞の浸潤低下と、制御性 T 細胞 および制御性ミエロイド細胞の増加が確認された。

ザイモザントとは異なる経路で、自然免疫反応を制御することが示唆されている SalB 投与による、急性移植片対宿主病 (aGvHD) の効果についての検討を行った。aGvHD は、同種造血幹細胞移植後に生じる致命的症状としてその問題が取り残されている。また自然免疫反応は aGvHD において重要な役割を果たすことが知られている。SalB は自然免疫反応に主要な効果を及ぼすことが広く報告されているが、aGVHD モデルにおける効果は未だ報告されていない。我々は B6 ドナー脾細胞を SalB 投与放射線未照射 BDF1 レシピエントに移植し、移植後 14 日目に肝臓および血清を採取した。その結果、SalB は aGvHD の肝障害を改善し、マウスの生存を促進した。また、SalB は、肝臓における aGVHD によって上昇する炎症誘発性サイトカインおよびケモカインの発現を低下させた。さらに、SalB 処置、肝臓組織における PGC-1 α および非実質細胞における HO-1 発現を増強した。一方、HO-1 阻害剤は、aGVHD を有するマウスの生存率の改善を無効にした。これらの結果は、SalB が、HO-1 の発現誘導および自然免疫反応を介して、aGvHD を制御していることを示唆している。SalB は aGvHD における新しい治療方法となる可能性を有することが示唆された。

他方、自然免疫を制御することが知られている DC および MDSC を用いた移植免疫制御に関する検討を行った。iPS 細胞から制御性の樹状細胞 (iPS-DCreg) を分化誘導させ、マウスアロ心移植モデルへの細胞治療に用いた。その結果、ドナータイプの iPS-DCreg の投与は、マウスアロ移植片の永久生着を導いた。iPS-DCreg は CTL および炎症性サイトカインを低減させた、一方、TGF- β 1 依存的に制御性 T 細胞の活性を増強させた (Stem Cell Reports. 2017;8(5):1174.)。また、iPS 細胞から MDSC を分化誘導させ、自己免疫性肝炎モデルに対する肝炎治療効果の検討を行った。その結果、iPS-MDSC は生体内外において T 細胞の増殖を抑制すること、その増殖抑制効果は iNOS 依存的であることが確認された。自己免疫性肝炎モデルに対する iPS-MDSC の投与は、ALT の低下、浸潤 T 細胞の抑制を引き起こし、自己免疫性肝炎の発症を抑制した (Stem Cell Res. 2018;29:32.)。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 45 件)

Zhou W, Wang Y, [Fujino M](#), Shi L, Jin L, Li XK, Wang J. Significant genes reveal acute rejection in murine allograft models: a standardized fold change method for microarray differential expression analysis. FEBS Open Bio. 2018 Jan 25;8(3):481-490.

Li S, Takahara T, [Fujino M](#), Fukuhara Y, Sugiyama T, Li XK, Takahara S. Astaxanthin prevents ischemia-reperfusion injury of the steatotic liver in mice. PLoS One. 2017 Nov 9;12(11):e0187810.

Cai S, [Fujino M](#), Lu L, Li XK. In vivo Priming of T Cells with in vitro Pulsed Dendritic Cells: Popliteal Lymph Node Assay. Bio-protocol 2017;7(17): e2531.

Yang X, Liu C, [Fujino M](#), Yang J, Li XK, Zou H. A modified graft-versus-host-induced model for systemic sclerosis, with pulmonary fibrosis in Rag2-deficient mice FEBS Open Bio. 2017 Aug 16;7(9):1316-1327.

[Fujino M](#), Sato H, Okamura T, Uda A, Takeda S, Ahmed N, Shichino S, Shiino T, Saito Y, Watanabe S, Sugimoto C, Kuroda M, Ato M, Nagai Y, Izumo S, Matsushima K, Miyazawa M, Ansari AA, Villinger F, Mori K. Simian Immunodeficiency Virus Targeting of CXCR3+ CD4+ T Cells in Secondary Lymphoid

Organs Is Associated with Robust CXCL10 Expression in Monocyte/Macrophage Subsets. *J Virol.* 2017 Jun 9;91(13). pii: e00439-17.

Yang XC, Fujino M, Cai SJ, Li SW, Liu C, Li XK. Genetic Polymorphisms of Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 in Primary Biliary Cholangitis: A Meta-Analysis. *J Immunol Res.* 2017;2017:5295164.

Cai S, Hou J, Fujino M, Zhang Q, Ichimaru N, Takahara S, Araki R, Lu L, Chen JM, Zhuang J, Zhu P, Li XK. iPSC-Derived Regulatory Dendritic Cells Inhibit Allograft Rejection by Generating Alloantigen-Specific Regulatory T Cells. *Stem Cell Reports.* 2017 May 9;8(5):1174-1189.

Abdelsalam M, Elgendy MY, Shaalan M, Moustafa M, Fujino M. Rapid identification of pathogenic Streptococci isolated from moribund red tilapia (*Oreochromis spp.*). *Acta Vet Hung.* 2017 Mar;65(1):50-59.

Abe T, Yazawa K, Fujino M, Imamura R, Hatayama N, Kakuta Y, Tsutahara K, Okumi M, Ichimaru N, Kaimori JY, Isaka Y, Seki K, Takahara S, Li XK, Nonomura N. High-pressure carbon monoxide preserves rat kidney grafts from apoptosis and inflammation. *Lab Invest.* 2017 Apr;97(4):468-477.

Zhao M, Zhu P, Fujino M, Zhuang J, Guo H, Sheikh IA, Zhao L, Li XK. Oxidative stress in hypoxic-ischemic encephalopathy: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Int J Mol Sci.* 2016 Dec 10;17(12). pii: E2078.

Zhao M, Zhu P, Fujino M, Nishio Y, Chen J, Ito H, Takahashi K, Nakajima M, Tanaka T, Zhao L, Zhuang J, Li XK. 5-aminolevulinic acid with sodium ferrous citrate induces autophagy and protects cardiomyocytes from hypoxia-induced cellular injury through MAPK-Nrf-2-HO-1 signaling cascade. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Oct 28;479(4):663-669

Hikichi Y, Yokoyama M, Takemura T, Fujino M, Kumakura S, Maeda Y, Yamamoto N, Sato H, Matano T, Murakami T. Increased HIV-1 Sensitivity to Neutralizing Antibodies by Mutations in The Env V3-Coding Region for Resistance to CXCR4 Antagonists. *J Gen Virol.* 2016 Sep;97(9):2427-40.

Fujino M, Zhu P, Cai S, Nishio Y, Zhuang J, Li XK. MicroRNAs involved in acute rejection and tolerance in murine cardiac allografts. *Exp Clin Transplant.* 2016 Aug;14(4):424-30.

Fujino M, Nishio Y, Ito H, Tanaka T, Li X-K. 5-aminolevulinic acid regulates the inflammatory response and alloimmune reaction. *Int Immunopharmacol.* 2016 Aug;37:71-8.

Takeda S, Takizawa M, Miyauchi K, Urano E, Fujino M, Murakami T, Murakami T, Komano J. Conformational Properties of the Third Variable Loop of HIV-1AD8 Envelope Glycoprotein in the Liganded Conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Jun 17;475(1):113-118.

等

〔学会発表〕(計 47 件)

Cai S, Hou J, Fujino M, Ichimaru N, Nishio Y, Lu L, Takahara S, Li XK. iPSCs Derived Regulatory Dendritic Cells Induce Murine Cardiac Allografts Acceptance via Generating Donor-specific Regulatory T Cells. Cutting Edge of Transplantation 2017, February 23-25, 2017, (Arizona Biltmore, Phoenix, AZ)
等

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：森一泰

ローマ字氏名：Mori Kazuyasu

所属研究機関名：国立感染症研究所

部局名：エイズ研究センター

職名：主任研究官

研究者番号 (8 桁): 20270655

研究分担者氏名：村上努

ローマ字氏名：Murakami Tsutomu

所属研究機関名：国立感染症研究所

部局名：エイズ研究センター

職名：室長

研究者番号 (8 桁): 50336385

研究分担者氏名：梨井康 (李小康)

ローマ字氏名：Ri Ko (Xiao-Kang Li)

所属研究機関名：国立成育医療センター

部局名：移植免疫研究室

職名：室長

研究者番号 (8 桁): 60321890