

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：32645

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15479

研究課題名(和文) 移植における樹状細胞の役割と治療対象としての可能性

研究課題名(英文) New Insights of Roles of Dendritic Cells in Transplantation

研究代表者

上野 琢哉 (UENO, TAKUYA)

東京医科大学・医学部・兼任講師

研究者番号：00296469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の主題は "移植医療の新しい治療対象になりうる樹状細胞の可能性の探究" にあった。近年の免疫抑制剤や術前術後管理を含めた手術方法への新しい取り組みは、手術成績や移植グラフトの生着率を飛躍的に改善させた。しかしながら、拒絶反応のメカニズムを100%把握出来てはならず、新しい治療対象の検討、拒絶反応検出のための新しい手法の開発が望まれていた。本研究期間を通じて、抗原提示細胞の1つである樹状細胞は移植前(虚血再灌流)の状態から、既に治療対象となりうる事がイメージングで明らかとなり、これまで予想し得なかったドナーへの移植前のpre-conditioningの重要性を示唆する結果に繋がった。

研究成果の概要(英文)：The main purpose of this study is to investigate whether dendritic cells (DCs) could be therapeutic targets in transplantation. To accomplish the goal, we employed an innovative tools in the study. As Dr. Ueno, the PI of the study, has been serving as a faculty member of Harvard Medical School, Boston, the United States since 2008, he has an access to any centers at the medical area such as Massachusetts General Hospital and Brigham and Women's Hospital. During the grant period, he developed a new technology to detect graft rejection by imaging tools and reported at several international conferences such as American Transplant Congress (2016, 2017), Europe ISFA (2018), and Annual Cong. of Japan Surg. Soc. (2016, 2017), which resulted in several publications (IF 35.285: J Am Soc Nephrol, Front Immunol, Cytokine, Transpl Int, Artif Organs). In sum, we shed a light on new roles of DCs in transplant immunology and this could be a new therapeutic strategy in transplantation.

研究分野：外科 移植 移植免疫 敗血症

キーワード：移植 イメージング 移植免疫 抗原提示

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性腎不全患者の増加に伴い、現在では人口透析患者数の年次増加が続いている。その結果、腎移植希望者を始め、手術症例の更なる増加が望まれている。しかしながらドナープールの拡大には時間を必要とし、移植医療当初からの問題点であったことから、海外では脳死患者や心停止患者からの臓器提供が発展したのが現状である。本邦のみならず、貴重な臓器提供をいかに安全に長期間にわたって生着を促すかは重要な課題であり、それを阻む拒絶反応のメカニズム解明は急務であった。

(2) しかしながら、拒絶反応の検出には、従来通りの超音波下の腎生検が主流であり、患者(被験者)のみならず検者にも精神的負担が多く掛かるのも事実である。その理由として、検査時の痛みやサンプルエラーの可能性がある。更には、組織レベルの判定のみならず臓器全体からの病理診断(個々全体)である事が望ましい事、検査の反復性や拒絶反応への特異性を設けている事も、検査手技としては大事なファクターであった。その点において、イメージングを用いた手法・技法はこれらを補充するのに十分な可能性を有しており、これまでの移植医療への反映は皆無であった。

(3) T細胞への免疫抑制剤開発が主体であったように、移植医療・免疫における拒絶反応の重要な治療対象は、T細胞であった。しかしながらT細胞活性に必要な過程(拒絶反応の過程)で抗原提示細胞による抗原提示は、非常に重要な要素であり、これまでは治療対象として考えられる事は無かった。

2. 研究の目的

(1) 従来の *in vitro* を用いた拒絶反応の解明のみならず、イメージングによる抗原提示反応(T細胞-抗原提示細胞)を描出し、その時期や場所(免疫担当細胞・臓器: 所属リンパ節、脾臓)を同定する事。結果として、より安全な移植医療の提供、治療戦略(Therapeutic Strategy)の検討が可能となる。

(2) 抗原提示はT細胞-抗原提示細胞間で行われるが、抗原提示細胞には樹状細胞をはじめ、単球、マクロファージやB細胞等がある。本研究では樹状細胞をイメージング対象とし、移植前後から経時的な形状変化を捉える事で、T細胞による活性時期、場所を同定する。

(3) これらの抗原提示反応に大きく影響を及ぼすのが、co-stimulatory molecule (pathway) と呼ばれる副刺激系路であり、T細胞活性(拒絶反応への第一段階)を不活化させる重要な

系路である。そのため、本研究で co-stimulatory molecule の代表的な CTLA4-Ig を用い非治療群と比較する事で、樹状細胞による拒絶反応への関与や役割、移植医療における重要性の有無の判定に繋がる。

3. 研究の方法

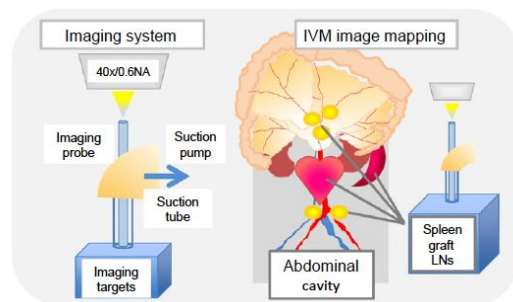
(1) 実験モデルの基本となるのは異所性心臓移植モデルを用いた動物実験である。ドナー、レシピエントには樹状細胞特異性のある B6 (CD11cYFP) を用いる事で、イメージング時での樹状細胞を描出する事が可能である。更にはレシピエント T 細胞 (CD4⁺: 赤色、CD8⁺: 青色) を術直後より静脈内注入する事で、樹状細胞(黄色)との経時的で且つ直接的な相互反応をダイナミックに描出する。

(2) また CX3CR1 pathway (樹状細胞特異系路) に特異性のある実験動物をドナーとして用いる事で、グラフト内での経時的変化にも着目した。これらのイメージングは手術同様に麻酔下で行われる為、安定した状態で撮影を行う事が出来る。更には同一検体での撮影が可能である事からも、より再現性の高い実験結果を経時的に得られる。

(3) 免疫学的アプローチとして抗原提示の有無の検証は、イメージングでの結果をより確証に近づける為に重要である。そのため、Y-ae 抗体を用いてのレシピエント内の移植臓器、所属リンパ節、脾臓、血液からのサンプルを用いて検証する。

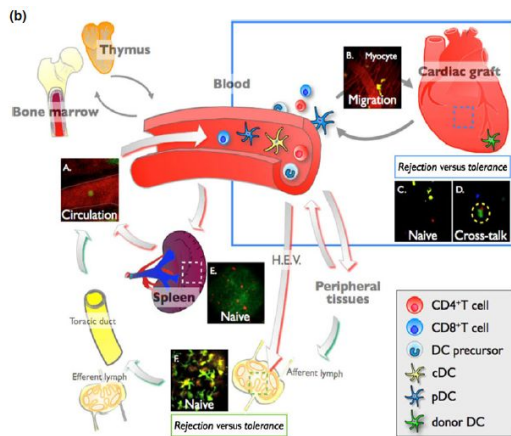
4. 研究成果

(1) 異所性心臓移植モデルでの生体下腹腔内グラフト(移植片)ならびに所属リンパ組織(リンパ節、脾臓)のライブ撮影



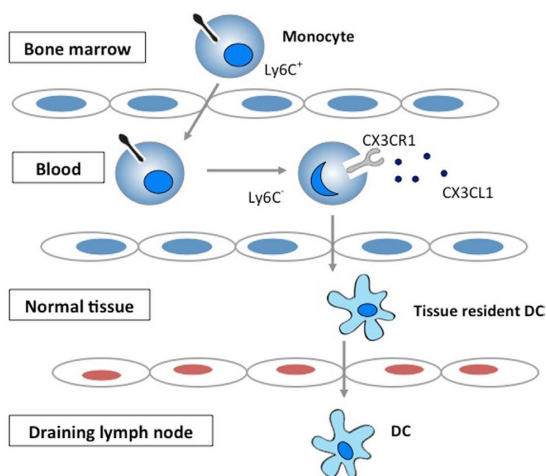
本研究の重要なプラットフォームでもあるイメージング器材の設定(上図)として、マサチューセッツ総合病院(米国、ボストン)での撮影は数度の渡米ならびに共同実験施設であるプリガムアンドウィメンズ病院の協力もあり、順調に進んだ。また、レシピエント T 細胞注入後の樹状細胞との撮影にも成功し、移植免疫において全く

新しい細胞間 cross talk にイメージング技術を用いた最新の知見にも繋がった。

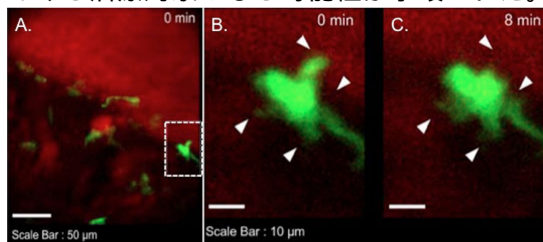


[Ueno T, et al., Imaging cell biology in transplantation. *Transpl Int.* 2016]

(2) CX3CR1 pathway (樹状細胞特異系路) に着目した異所性心移植モデルでのイメージング検討



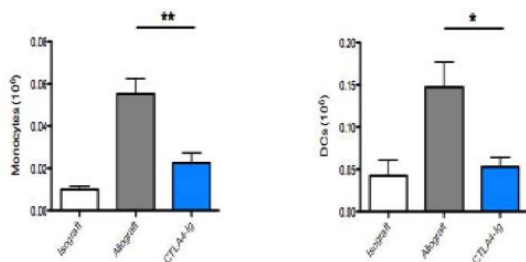
これまでケモカイン系路の1つであったCX3CR1 pathwayに関する形態変化は上記のように捉えられていた。予定していたB6 (CD11c-YFP)での移植モデルのみならず、本モデルを検討する事で、ドナーにおける樹状細胞の抗原提示としての役割につき追求する事が可能となった。結果としてドナー樹状細胞が移植医療における治療対象となる可能性が示唆された。



移植片における樹状細胞の形態変化を示す。更には血管内への樹状細胞の流入のライブ撮影にも成功した()

(3) Y-ae 抗体を用いた *in vitro*での検証

イメージングでの事象検証には限界がある。そのため、*in vitro*での検証が重要となってくる。本研究では抗原提示のリアルタイム(ビデオ撮影)のみならず、同時期の *in vitro* 検証を行う事で、イメージングでの事象を確認した。そのため、Y-ae 抗体での抗原提示の有無を検討し、更には CTLA4-Ig 投与群と比較検討する事で、本手法の有用性の検証を裏付ける事が出来た。



異所性心移植モデルでの同種間(左:白色)異種間(灰色)異種間(治療群:青色)での術後5日目での抗原提示において、異種間(非治療群:灰色)は明らかに抗原提示、つまりはT細胞活性(拒絶反応への第一段階)が優位な状態となっている。しかしながら、異種間の治療群(青)では、同種間(白)と同様の反応を示している。これらの結果はイメージングで樹状細胞の形態学的変化が治療群と非治療群での差があった事と整合性があり、樹状細胞が移植における新しい治療対象となる事を再考させる結果であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

1. Ueno T, Kim P, McGrath MM, et al, 10 名 1 番目. Live Images of Donor Dendritic Cells Trafficking via CX3CR1 Pathway. *Front Immunol.* 2016; 7:412. PMID: 27790214. DOI:[10.3389/fimmu.2016.00412](https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00412), 査読有り
2. Ueno T, Jung K, Yeung MY, et al, 9 名 1 番目. Imaging cell biology in transplantation. *Transpl Int.* 2016; 29(12):1349-1351. PMID: 27570933. DOI:[10.1111/tri.12852](https://doi.org/10.1111/tri.12852), 査読有り

3. Ueno T, Ikeda T, Yokoyama T, et al, 10 名 1 番目. Reduction in circulating level of HMGB-1 following continuous renal replacement therapy in sepsis. Cytokine. 2016 07; 83:206-209. PMID: 27155819. DOI:[10.1016/j.cyto.2016.05.004](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.05.004), 査読有り
4. Nakamura Y, Kihara Y, Iwamoto H, Ueno T, et al, 10 名 9 番目. A Novel Assessment of Vascular Regions Using an Intraoperative Near-Infrared Fluorescence. Transplant Proc. 2016 Apr; 48(3):710-5. PMID: 27234719. DOI:[10.1016/j.transproceed.2015.12.115](https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2015.12.115), 査読有り
5. Iwamoto H, Nakamura Y, Konno O, Ueno T, et al, 8 名 5 番目. Immunosuppressive Therapy for Elderly Kidney Transplant Recipients. Transplant Proc. 2016 Apr; 48(3):799-801. PMID: 27234739. DOI:[10.1016/j.transproceed.2016.02.039](https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2016.02.039), 査読有り
6. Ito T, Yamada A, Batal I, Yeung MY, McGrath MM, Sayegh MH, Chandraker A, Ueno T. The Limits of Linked Suppression for Regulatory T Cells. Front Immunol. 2016; 7:82. PMID: 27014262; PMCID: PMC4783400. DOI:[10.3389/fimmu.2016.00082](https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00082), 査読有り
7. Batal I, De Serres SA, Safa K, Ueno T, et al, 14 名 5 番目. Dendritic Cells in Kidney Transplant Biopsy Samples Are Associated with T Cell Infiltration and Poor Allograft Survival. J Am Soc Nephrol. 2015 Dec; 26(12):3102-13. PMID: 25855773; PMCID: PMC4657833

DOI:[10.1681/ASN.2014080804](https://doi.org/10.1681/ASN.2014080804), 査読有り

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Ueno T, et al. Imaging cell biology in transplantation. American Transplant Congress, 2017
2. 上野琢哉, 他. Live Images of Donor Dendritic Cells Trafficking via CX3CR1 Pathway. 日本外科学会, 2017
3. Ueno T, et al. Imaging cell biology in transplantation. American Transplant Congress, 2016
4. 上野琢哉, 他. Imaging cell biology in transplantation. 日本外科学会, 2016
5. Ueno T, et al. The roles of continuous renal replacement therapy in abdominal septic shock. 4th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon, 2016
6. Ueno T, et al. Dendritic Cells (DCs) in Kidney Transplant Biopsies Cluster with T lymphocytes and are Associated with Graft and Systemic Inflammatory Milieu and Poor Allograft Survival. 日本外科学会, 2015
7. Ueno T, et al. Donor Dendritic Cells - Potential New Therapeutic Target in Transplantation. American Transplant Congress, 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：取得年月日：国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://connects.catalyst.harvard.edu/Profiles/display/Person/59300>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 琢哉 (UENO, Takuya)

東京医科大学・医学部・兼任講師

研究者番号：00296469

(2) 研究分担者

新見 正則 (NIIMI, Masanori)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：80198415