

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20115

研究課題名(和文) 免疫制御リポソームと抗CD40抗体によるヒトNKT細胞免疫応答の制御

研究課題名(英文) Control of Human NKT cell Responses by Immunoregulatory Liposomes and Anti- CD40 Antibody

研究代表者

宮入 聡嗣 (MIYAIRI, SATOSHI)

東京女子医科大学・医学部・医療練土研修生

研究者番号：20623391

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は以前、新規ナチュラルキラーT細胞活性化剤 Lipo- GCと抗CD40リガンド抗体の併用により、マウス心臓移植モデルにおいて混合血キメラとそれに引き続いて移植免疫寛容が誘導されることを報告した。本研究では、ヒト末梢血単核細胞の培養系において、Lipo- GCは調節性T細胞の増大とインターフェロンの産生を誘導することを示した。しかし、このin vitro系において、Lipo- GCとCD40-CD40リガンド遮断剤の明らかな併用効果を確認することはできなかった。今後は、移植免疫をより反映したヒトin vitro系を用いて、両剤の反応性についてさらに検討する必要があると考える。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that combination treatment of a novel natural killer cell stimulator, liposomal α -galactosylceramide (lipo- GC), and anti-CD40L monoclonal antibody induced stable mixed hematopoietic chimerism and subsequent allograft tolerance in a murine cardiac transplant model. The current study demonstrated that Lipo- GC promoted regulatory T cell expansion and augmented interferon-gamma production in a human peripheral mononuclear cell culture system. However, no significant combined effects of lipo- GC and antibody for CD40-CD40 ligand blockade were observed in the in vitro system. In future, we should further investigate the effects of both agents in a human in vitro system that takes into account immunological factors, responses and reactions in transplantation.

研究分野：移植免疫

キーワード：移植免疫寛容 α -galactosylceramide 抗CD40抗体 調節性T細胞 ナチュラルキラーT細胞

1. 研究開始当初の背景

移植医療は、免疫抑制剤の登場により一般的な治療法として普及してきた。しかし、多くの移植患者は、移植臓器の拒絶反応を抑えるために生涯にわたって免疫抑制剤を服用する必要がある。このため、薬剤に起因する毒性とともに、その薬理活性である免疫抑制作用によって感染症や悪性腫瘍などに罹患する危険性を伴う。こうした問題を解決するために、移植臓器をあたかも自己臓器のように認識させることで、免疫抑制剤の使用が不要となる移植免疫寛容の誘導法が考案されてきた。その代表的な方法には、臓器移植の際に、臓器提供者(ドナー)の骨髄も同時に移植する混合血キメラ誘導法がある。移植患者にドナー骨髄が生着することによって、移植患者の免疫系がドナータイプの免疫系を持つように再構築されると考えられている。これまでいくつかの混合血キメラ誘導法が開発され、海外の一部の施設では臨床試験が行われているが、いずれの方法も骨髄生着のための強力な前処置が必要であるため、広く臨床応用されるには至っていない。

我々は、低侵襲な混合血キメラを誘導する移植法として、生体が元来有する免疫制御機構を活性化して免疫寛容を獲得させる方法について検討を進め、自然免疫細胞であるナチュラルキラーT細胞(以下 NKT 細胞)の免疫制御能と CD40-CD40 リガンド(以下 CD40L) 遮断剤を利用する方法を見出した。NKT 細胞の活性化剤として liposomal α -galactosylceramide (以下 Lipo- α GC) (Front Biosci 2008;13:6214-28) と CD40-CD40L 遮断剤として抗 CD40L 抗体を併用することで、マウスの心臓移植モデルにおいて、既存の免疫抑制剤を使わずに長期に移植臓器を生着できることを示した。さらにこの作用メカニズムとして、Lipo- α GC による NKT 細胞のインターロイキン(以下 IL)-10 産生増強、抗 CD40L 抗体による NK 細胞のインターフェロン γ (以下 IFN γ)産生抑制、さらにこれらのサイトカインプロファイルの変化による調節性 T 細胞(以下 Treg)の増大が混合血キメラと移植免疫寛容の誘導に関連していることを示した(Am J Transplant 2014;14(3):554-67)。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト末梢血単核細胞(以下 PBMC)における Lipo- α GC と CD40-CD40L シグナル阻害剤の Treg 誘導活性およびサイトカイン産生に対する影響について解析し、マウス心臓移植モデルにおけるデータと比較する。

3. 研究の方法

① ヒト PBMC における lipo- α GC と CD40-CD40L 遮断剤に対する反応性

ヒト PBMC (N=4) に lipo- α GC と CD40-CD40L 遮断剤 (抗 CD40L 抗体 #40804 または抗 CD40 抗体 2C10) をそれぞれ単独もしくは併用で処理して、4 日間培養した。

薬剤処理後の PBMC に対して、CD4⁺T 細胞における Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T 細胞及び CD4⁺CD25⁺CD127^{low} T 細胞)の割合、及び CD3⁺ T 細胞における NKT 細胞 (CD3⁺V α 24Ja18⁺ 細胞) の割合をフローサイトメトリーで解析した。

また、薬剤処理後の PBMC は、NK 細胞の IFN γ 産生の解析にも用いた。PBMC に対して細胞内染色を行い、NK 細胞分画における細胞内 IFN γ 量をフローサイトメトリーで解析した。

さらに、培養後の上清はサイトカイン濃度測定に用いられた。Cytometric beads array システムによって、培養上清中の IL-2、IL-4、IL-10、IL-12、及び IFN γ 濃度を測定した。

② NKT 細胞を添加したヒト PBMC における Lipo- α GC に対する反応性

NKT 細胞をより多く含有する状態での PBMC における検討を行った。本実験に供するヒト NKT 細胞は、ヒト PBMC から V α 24⁺細胞を用いて分離し、 α GC をパルスした樹状細胞と IL-2、IL-7、及び IL-15 の存在下で共培養して増幅することで得た。この NKT 細胞を 1%の細胞数比率になるようにヒト PBMC に添加して、24 時間および 4 日間培養し、方法①と同様に Lipo- α GC を反応させ、CD4⁺T 細胞における Treg の割合を解析した (N=3)。

4. 研究成果

① ヒト PBMC における Lipo- α GC と CD40-CD40L 遮断剤に対する反応性

ヒト PBMC に Lipo- α GC を 4 日間処理した後、フローサイトメトリーで Treg として CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T 細胞及び CD4⁺CD25⁺CD127^{low} T 細胞を検出した (図 1)。Lipo- α GC 濃度に依存して、CD4⁺T 細胞における Treg の割合は増加した (図 2A 及び B)。

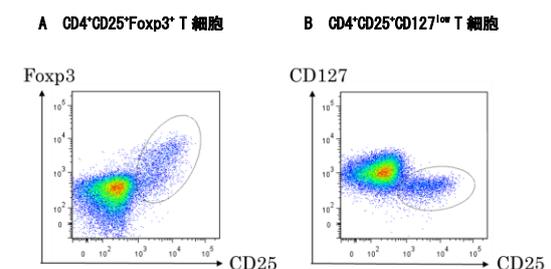


図 1 ヒト PBMC における Treg の検出

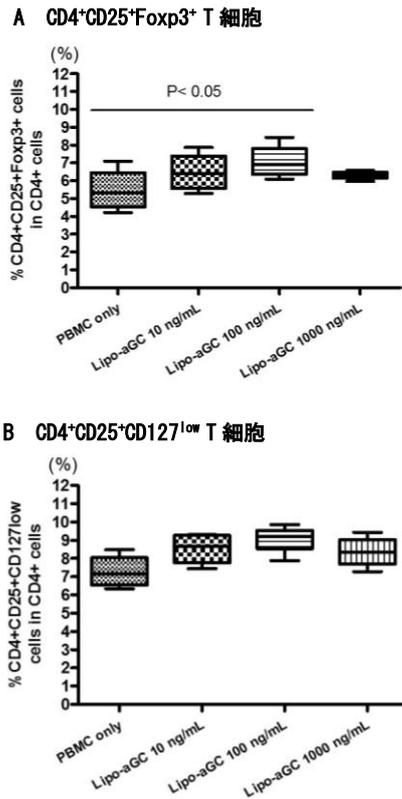


図2 ヒトPBMCをLipo-αGC処理した後のCD4⁺T細胞におけるTregの割合

しかし、Lipo-αGCの1000 ng/mL処理におけるTregの増大の程度は、100 ng/mL処理に比べて低かった(図2A及びB)。この原因として1000 ng/mLの濃度での刺激が強く、Tregの増大飽和や細胞死が起きたこと、さらにエフェクターT細胞も同時に強く活性化され、Treg誘導に対して影響を及ぼした可能性も考えられた。この結果を踏まえ、今後の試験データは、100 ng/mLのLipo-αGCでの結果を示す。

次に、ヒトPBMCをLipo-αGCと抗CD40抗体で処理した時のCD4⁺T細胞におけるTregの割合を図3に示す。CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T細胞(図3A)、CD4⁺CD25⁺CD127^{low}T細胞(図3B)のいずれにおいても、Lipo-αGC単独処理と差が認められず、CD40-CD40Lシグナル阻害による増強効果は認められなかった。

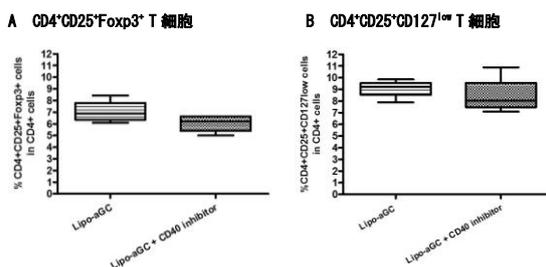


図3 ヒトPBMCをLipo-αGCと抗CD40抗体で処理した後のCD4⁺T細胞におけるTregの割合

さらに、培養上清中における各種サイトカイン濃度を測定した(N=15)。Lipo-αGC処理群のINFγ濃度は、無処理群に比べて高値を示し、Lipo-αGCと抗CD40L抗体を処理した群は、Lipo-αGC群より低い値を示した(図4)。IL-2及びIL-10の濃度に関しては群間で差が認められず、IL-4及びIL-12の濃度は検出限界濃度以下であった。

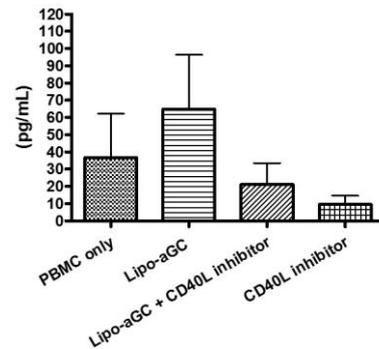


図4 ヒトPBMCをLipo-αGCと抗CD40L抗体で処理した後の培養上清中のINFγ濃度

次に、Lipo-αGCと抗CD40L抗体の処理後のPBMCに対して細胞内染色を行い、NK細胞のINFγ産生量をフローサイトメトリーで解析したが、検出限界以下で測定することができなかった。

以上から、Lipo-αGCによりヒトPBMCにおけるTregの増加が認められたものの、その増加は軽微であり(図2)、また上清中の各種サイトカイン濃度も全般的に低かったこと(図4)から、ヒトPBMCを用いた本系におけるLipo-αGCの反応性は、マウス心臓移植系で認められた反応性に比べて低い可能性が考えられた。

また、このように十分な反応性が得られなかったために、マウス心臓移植系で認められた抗CD40L抗体との併用によるTregの増大作用やNK細胞のINFγ産生に対する抑制作用も確認できなかった可能性が考えられた。

② NKT細胞を添加したヒトPBMCsにおけるLipo-αGCの反応性

本系においてNKT細胞の活性を検出するために、より多くのNKT細胞を含有する状態でのPBMCにおけるLipo-αGCに対する反応性について検討した(N=3)。

NKT細胞を1%の細胞数比率になるようにヒトPBMCに添加して4日間培養したが、NKT細胞を追加したことによるCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Tregの増大は認められなかった(図5)。CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Tregについても同様であった。

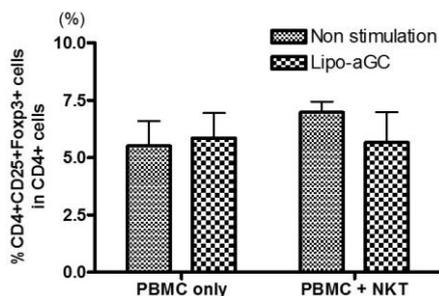


図5 NKT細胞を添加したヒトPBMCsにおけるLipo- α GCの反応性

以上の結果から、PBMCを用いたヒト *in vitro* 系において、Lipo- α GCにより Treg の増大が認められ、先に我々が報告したマウス混合血キメラ誘導における *in vivo* での Treg 増殖を支持する結果である可能性が高いと考えられた。また、*in vitro* で NKT 細胞を活性化するだけで PBMC 中の Treg を増殖させることが可能であることが示唆され、*in vitro* での Treg 培養系を確立することにより臨床応用できる可能性も示唆された。Treg の増殖には NKT 細胞の活性化が関与することが認められたが、さらに NKT 細胞の subset について解析したところ、正と負の相関を示す NKT subset が存在することを示唆するデータが現在得られつつある。

今後の課題としては、移植系により類似したヒト *in vitro* 系として、抗原提示細胞やアロ抗原の刺激を加えることにより強力な免疫応答を誘導した際のヒト PBMC における Lipo- α GC と CD40-CD40L 遮断剤の反応性について検討することがあげられる。またより効率良く *in vitro* で Treg を増大させる系を確立させるために、NKT subset の Treg 増殖に及ぼす影響を詳細に解析する必要があると考える。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

①発表者：Haruki Katsumata 発表表題：A Novel Method for iNKT Cell-mediated Ex Vivo Treg Expansion Applied to Induce Human Transplant Tolerance. 学会：2017 American Transplant Congress 発表年月日：2017年5月1日 発表場所：米国 シカゴ

②発表者：Haruki Katsumata 発表表題：In Vitro Stimulation of Human / Murine iNKT Cells Activates Regulatory T Cell through IL-2 Production. 学会：第45回日本免疫学会学術集会 発表年月日：2016年12月6日 発表場所：沖縄コンベンションセンター ラグナガーデンホテル (沖縄県 宜野湾市)

[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)研究代表者

宮入 聡嗣 (MIYAIRI, Satoshi)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：20623391

(2)研究協力者

石井 保之 (ISHII, Yasuyuki)
福田 絵美 (FUKUDA, Emi)
安倍 良 (ABE, Ryo)
平井 敏仁 (HIRAI, Toshihito)
田邊 一成 (TANABE, Kazunari)
池宮城 雅子 (IKEMIYAGI, Masako)
石井 瑠美 (ISHII, Rumi)
勝俣 陽貴 (KATSUMATA, Haruki)