

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07121

研究課題名(和文) CD8+/CD122+制御性T細胞による臓器移植免疫寛容誘導に関する研究

研究課題名(英文) Tolerance induction by CD8+/CD122+ Regulatory T Cells in Organ Transplantation

研究代表者

中村 緑佐 (Nakamura, Tsukasa)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30777959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄由来抑制細胞(MDSCs)とCD8+Tcellsの臓器移植における関係性について検討した。脾細胞をG-CSF/M-CSF、Dexamethasone存在下で培養しMDSCsを誘導した。MDSCsは脾細胞中のCD8+/IL-10+ T細胞を誘導した。MDSCsは細胞膜上のPD-L1の発現増加、CD8+/IL-10+ T細胞側(Tregs)のPD-1の増加を認めた。マウス心臓移植モデルでMDSCs輸注で生存期間延長、病理学的解析ではグラフト内のCD8+/PD-1+細胞の増加を認めた。上記の研究解析からPD-L1+ MDSCsは CD8+/IL-10+ Tregs誘導作用を持つものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Background: Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) maintain host immunity: regulating rejection. On the other hand, CD8+ Tregs also play a key role in preventing rejection. However, the relationship between MDSCs and CD8+ Tregs is unclear. Here, the results revealed that MDSCs have a potential to recruit CD8+/IL-10+ Tregs. Methods: MDSCs were isolated from bone-marrow culture with GM-CSF, M-CSF, and dexamethasone (MDSCs-Dex). In murine heterotopic cardiac transplantation, MDSCs were transferred through the tail vein. Results: Flow cytometric analyses showed that MDSCs-Dex led to significant recruitment of CD8+/IL-10+ Tregs ($3.3 \pm 2.1\%$ vs $10.2 \pm 3.6\%$, $p < 0.05$). In a MDSCs transfer model, pathological findings also confirmed accumulation of CD8+/PD-1+ Tregs in an allograft. Conclusion: MDSCs might result in recruitment of CD8+/IL-10+ Tregs. These results suggested that the synergistic effect between MDSCs and CD8+ Tregs developed a tendency to immunological tolerance.

研究分野：臓器移植

キーワード：制御性T細胞 骨髄由来抑制細胞 臓器移植

1. 研究開始当初の背景

CD8⁺/CD122⁺制御性 T 細胞による臓器移植免疫寛容誘導に関する研究

臓器移植分野において急性期の成績は免疫抑制剤の発展により比較的満足できるものとなったが、免疫抑制剤使用には重大な合併症も伴うため長期成績は十分とは言えない。したがって臓器移植分野において従来から免疫寛容誘導法の確立は主要なテーマの一つである。

Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs)は悪性腫瘍の進展(Mol Cell Biol, 2014; 11: 2017-2028.)、自己免疫疾患の抑制に働くとされる(J Immunol, 2013; 3: 1073-1081.)。さらに固形臓器移植において免疫寛容誘導に必須である事が示され(J Clin Invest, 2010; 7: 2486-2496.)臓器移植領域において近年注目を集めている。固形臓器移植において有効な MDSCs の誘導機構やその作用機序については依然不明な点が多くあったが、我々の研究により mTOR/MEK-ERK シグナルバランスにより MDSCs の活性化、誘導が生じることが明らかとなり、また MDSCs をレシピエントに輸注することによりレシピエント脾臓内、グラフト内で CD4⁺/Foxp3⁺ 制御性 T 細胞 (Tregs) の誘導を行う事が明らかとなった(Nakamura T et al. Am J Transplant, 2015; 9: 2364-2377.)。しかし、一度の MDSCs 輸注では生体内で免疫寛容誘導には至らなかった。また上記の他研究では同時に MDSCs の存在が必要条件であるが十分条件では無い事を示しており(J Clin Invest, 2010; 7: 2486-2496.)、免疫寛容誘導にはその他の重要因子の存在を示唆した。ここで、我々はその他の因子として、近年、マウス脾臓移植モデルにおいて CD4⁺/Foxp3⁺ Tregs よりも高い拒絶反応抑制効果が示された CD8⁺ Tregs の存在に着目した(Am J Transplant, 2014; 14: 39-48.)。上記の通り MDSCs が

CD4⁺/Foxp3⁺ Tregs の誘導を行うことは明らかとなっているが、未だ CD8⁺ Tregs との関連は明らかになっておらず、非常に興味深い研究領域となっている。

2. 研究の目的

臓器移植分野において免疫寛容誘導法の確立は主要なテーマの一つである。MDSCs は固形臓器移植において免疫寛容誘導に必須である事が示され近年注目を集めている。最近の我々の研究で CD8⁺ Tregs の誘導作用も示唆された。しかしその作用機序は依然として不明な点が多く、本申請研究では MDSCs による CD8⁺ Tregs の誘導機序の解明(目的 1)、マウス心移植モデルにおける MDSCs と CD8⁺ Tregs による移植臓器免疫寛容法の考案を行う(目的 2)。

目的1) MDSCsのCD8⁺新規Tregsの誘導機序の解明

研究期間内に第一にMDSCsのCD8⁺ Tregsの誘導作用について *in vitro*及び *in vivo*で検証する。特にMDSCsのPD-L1, TregsのPD-1及びCD49dの発現レベルに着目しその変化を検討する。これによりMDSCsとCD8⁺ Tregsの相互作用のメカニムの解明を行うことを目標とする。

目的2) マウス心移植モデルにおけるMDSCsとCD8⁺ Tregsによる移植臓器免疫寛容法の考案

本研究の第二の研究課題として上記の検討により得た有効な MDSCs と CD8⁺ Tregs をレシピエントモデルへ輸注することにより有効な免疫寛容が誘導できるか明らかにする。MDSCs、CD8⁺/CD122⁺ Tregs 間の相互作用及び誘導された CD8⁺/CD122⁺ Tregs の抗原特異的な免疫抑制効果について明らかにし、マウス心移植モデルにおいて生体内への輸注により生じる免疫学的効果を解析する。

3. 研究の方法

目的1) MDSCsのCD8⁺新規Tregsの誘導機序の解明

レシピエント予定と同型 Balb/c マウスから骨髄細胞採取及び脾細胞を分離し以下の研究で使用する。

マウス心移植は6週齢雌の Balb/c マウスをレシピエント、6週齢雌の C57BL/6 マウスをドナーとして、異所性同種心移植モデルを (Nakamura T et al. 2015, Am J Transplant, 15:2364-2377) を参考に施行する。

Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) Ly6G, Gr-1 positive selection により MDSCs を分離する。

(1) MDSCs 培養誘導

Balb/c マウス骨髄細胞 1×10^7 cells/ml を G-CSF/M-CSF (100ng/ml) $0.2 \mu\text{M}$ Dexamethasone 存在下で 60-mm dish で RPMI medium (10% FCS, 2mM glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin) 内で培養し MDSCs を誘導する。

(2) MDSCs の CD4 T cell 抑制活性判定試験
6週齢 Balb/c マウス脾臓から分離した CD4⁺Tcells (5×10^4) を $2.5 \mu\text{M}$ CFSE 染色を実施し、それらをマイトマイシン C にて不活性化させた 5.0×10^4 C57BL/6 もしくは C3H (third party) 脾細胞及び $1 \mu\text{g}$ CD3/CD28 Dynabeads により刺激する。ここに誘導した MDSCs を付加し RPMI 培地内で 3 日間培養し CFSE の希釈度を BD Canto II フローサイトメーターにて測定し、MDSCs の免疫抑制活性を検討する。

(3) MDSCs と脾細胞の共培養

以下の群に分け、同様の培地にて Balb/c 脾細胞 2.0×10^6 /well とマイトマイシン C 処理にて不活性化させた 1.0×10^6 /well C57BL/6 脾細胞を刺激として 3 日間培養する。

1. MDSCs 付加無し群

2. Gr-1⁺MDSCs 付加群

培養後に T 細胞の表現系を CD4, CD8, CD25, CD49, CD122, CD127, PD-1, Foxp3 の表現

系細胞の割合、絶対数をフローサイトメーターで解析し、MDSCs の T 細胞に対する作用を検討する。またそれぞれの培養上清中の IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-15, TNF-, 及び IFN- を Cytometric Beads Assay (CBA) 法にて BD Canto II フローサイトメーターで測定する。

MDSCs は PD-L1 を発現している事が我々の過去の研究で分かっており (Nakamura T et al. 2016 Transplant Proc, 48, 1275-8.)、その受容体である PD-1 を発現した CD8⁺T cell への作用が予想されるため、抗 PD-L1 抗体を加えた場合の効果を評価する。

目的 2) マウス心移植モデルにおける MDSCs と CD8⁺Tregs による移植臓器免疫拒絶反応抑制効果の検討

(1) *in vivo* での MDSCs の免疫調節力判定試験として異所性同種心移植モデルを作製する。以下の群に分けてグラフト生存期間を判定する。

(1) 無治療群

(2) 術中+術後に 2.0×10^6 MDSCs 輸注群
各群術後 7 日目に心グラフトを摘出し H&E 染色, CD4/CD8/Foxp3 抗体による免疫染色をそれぞれ施行し病理学的に心グラフトにおける拒絶所見を検討する。

また、各群における CD4⁺/Foxp3⁺ Tregs, CD8⁺ Tregs の体内での%を術後 10 日、14 日、21 日目に測定する。

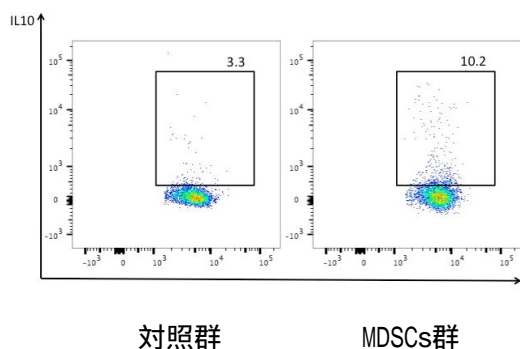
4. 研究成果

MDSCs と CD8⁺Tcells の臓器移植における関係性について検討した。

脾細胞を G-CSF/M-CSF (100ng/ml) 存在下で培養し MDSCs を誘導したところ、Dexamethasone 付加無し群において、66.7% の Gr-1⁺/CD11b⁺ MDSCs 誘導率であったが、Dexamethasone 付加群において 97.7% まで誘導率の上昇を認めた。また、誘導された MDSCs は細胞膜上の PD-L1 の発現増加を認めた。

これらのDexamethasone誘導MDSCs は *in vitro*におけるアロ抗原提示細胞存在下でCFSE染色を実施したCD4 T細胞の分裂を有意に抑制した。

*in vitro*での脾細胞との共培養試験において、Dexamethasoneによる免疫抑制効果を増強させたMDSCsにより対照群と比較しCD8⁺/IL-10⁺ T細胞の誘導を認めた (3.3±2.1% vs 10.2±3.6%, p<0.05)。誘導されたTregsのCD8輝度は若干低下した。



また、CD8⁺/IL-10⁺Tregs側の PD-1の増加を認めた。

心移植モデルにおけるMDSCs, CD8⁺/IL-10⁺Tregsのマウス心臓移植モデルにおける役割の解析を行った。MDSCs輸注群で生存期間の延長とともに、病理学的解析ではアログラフトの微小血管炎症、炎症細胞の浸潤の低下、またアログラフト内のCD8⁺/PD-1⁺細胞の増加を認めた。Anti PD-L1抗体により、誘導効果は低下した。上記の研究解析からPD-L1⁺ MDSCsはCD8⁺/IL-10⁺ Tregs誘導作用を持つものと考えられた。これらの免疫抑制系細胞の影響が免疫寛容誘導に重要な役割を果たす可能性があると考えられた。

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 2 件)

1. Nakao, T., Nakamura, T., Masuda, K., Matsuyama, T., Ushigome, H., Ashihara, E.

et al. 2018. “Dexamethasone Prolongs Cardiac Allograft Survival in a Murine Model Through Myeloid-derived Suppressor Cells.” Transplant Proceedings **50**(1), 299-304. 査読あり

2. Nakamura, T. 2018 “Myeloid-Derived Suppressor Cells as Multi-Functional Regulators in Organ Transplantation.” International Journal of Molecular Sciences, in press. 査読あり

[学会発表](計 2 件)

1. Nakamura, T., Masuda, K., Yoshimura N. Aryl Hydrocarbon Receptor Regulates Myeloid Derived Suppressor Cells by Activating the ERK Signaling in a Murine Cardiac Transplantation Model. American Transplant Congress, in Chicago, IL, April 29-May 3, 2017

2. Nakao, T., Nakamura, T., Masuda, K., Mastuyama, T., Ashihara, E., Yoshimura, N. Dexamethasone Prolongs Cardiac Allograft Survival in a Murine Model Through Myeloid-Derived Suppressor Cells. American Transplant Congress, in Chicago, IL, April 29-May 3, 2017

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

該当なし

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
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 緑佐 (Nakamura Tsukasa)
京都府立医科大学 医学研究科 助教
研究者番号：30777959

(2) 研究分担者

()

研究者番号：
該当なし

(3) 連携研究者

()

該当なし

研究者番号：

(4) 研究協力者

()

該当なし