

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20332

研究課題名(和文) 制御性T細胞のサブセットを用いた新規免疫抑制療法開発のための研究

研究課題名(英文) New immunosuppressive therapy using a subset of regulatory T cells

研究代表者

猪俣 武範 (Inomata, Takenori)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：10645667

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)：制御性T細胞は免疫応答に抑制的に働き、胸腺由来の内在性制御性T細胞と末梢由来の誘導性制御性T細胞の2つのサブセットを持つ。本研究では、炎症や血管新生が惹起されたハイリスク角膜移植における制御性T細胞ならびにそのサブセットの免疫抑制能を検討した。本研究結果から、ハイリスク角膜移植における誘導性制御性T細胞の減少ならびに誘導性制御性T細胞におけるCTLA-4、IL-10、TGF- β の発現の減少が明らかになった。これらの結果、誘導性制御性T細胞の免疫抑制能の低下がハイリスク角膜移植における拒絶反応の増加を引き起こしている可能性が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Regulatory T cells (Tregs) are crucial for allograft survival. Tregs can be divided into thymus-derived natural Tregs (tTregs) and peripherally-derived induced Tregs (pTregs). We determine whether the suppressive function of Treg subsets is hampered in hosts who are at high risk for rejecting their graft. We demonstrate that in high-risk recipients the frequencies and function of pTregs (but not tTregs) are suppressed. Reduced function of pTregs correlated with decreased expression of CTLA-4, interleukin-10, and transforming growth factor- β . Adoptive transfer of pTregs from mice at low risk of subsequent graft rejection is able to rescue graft survival in recipients that are at high risk of rejecting their grafts. Our data suggest that impaired function of pTregs, but not tTregs, mediates the loss of immune tolerance and promotes allograft rejection.

研究分野：角膜移植免疫

キーワード：角膜移植 制御性T細胞 誘導性制御性T細胞 内在性制御性T細胞 IL-10 TGF- β 角膜移植免疫 ハイリスク角膜移植

1. 研究開始当初の背景

ステロイドやシクロスポリン、タクロリムスなどの免疫抑制剤の登場により、角膜移植後の急性拒絶反応は減少し、その成績は向上したが、未だに血管新生や感染症、再移植などの炎症が惹起された角膜(ハイリスクレシピエント角膜)ではその 40-90%に拒絶反応を伴う。また免疫抑制剤の副作用(白内障、緑内障、易感染性、腎毒性、薬剤毒性)や慢性拒絶反応には無効であるなど問題が多い。また、本邦においてはドナー角膜が十分に充足しているとは言えず、移植臓器において長期的に免疫寛容(免疫抑制剤を中止しても移植臓器が十分に機能する状態)が成立することが臨床的に重要である。

制御性 T 細胞(Treg)は 1995 年に同定された比較的新規の細胞で、免疫応答に抑制的に働く。この Treg を人為的に増幅し、抗原特異的にドナー角膜に誘導させることができれば角膜移植片に副作用なく免疫寛容を成立させることができると期待されている。

申請者らは血管新生のない通常の角膜移植において、Treg の分化に必須の遺伝子である Foxp3 の発現の低下が、拒絶反応の主座を担うエフェクター T 細胞(Teff)の抑制能の低下や抑制性サイトカインの減少を引き起こし、拒絶反応に影響を与えていることを明らかにした(Chauhan S, et al, *J Immunology*, 2009)。また、低用量の IL-2 を投与することで Treg を増幅し、角膜移植片の生存を延長させることを明らかにした(Tahvildari M and Inomata T et al, *Transplantation*, 2015)。

しかし、炎症が惹起されたハイリスクレシピエント角膜に対する角膜移植における Treg の免疫抑制能の変化については未だ明らかになっておらず、最近の研究結果からも Treg の分化状態はこれまで考えられてきたほど安定ではなく、炎症などの環境の変動に対し、Foxp3 の発現および免疫抑制機能を失うことが明らかになってきた(Zhou X, et al, *Nature Immunol*, 2009)。このため Treg を用いた新規免疫抑制療法の臨床応用には Treg の安定的に誘導する免疫抑制メカニズムを解明し、移植臓器に効率的に誘導する方法を開発することが重要である。

申請者はこれまでに炎症環境下における Treg の免疫抑制能を明らかにするために、血管新生を誘導し、炎症を惹起した角膜に対する同種異系角膜移植モデル(ハイリスク角膜移植)を構築し(Inomata T et al, *J Biol Methods*, 2015)、以下の予備的な研究結果を得ている。

ハイリスク角膜移植において、

1. 頸部リンパ節細胞ならびに角膜移植片における Treg の減少ならびに Foxp3 の発現量の減少
2. Treg の Teff 増殖抑制能の低下(インビトロ)
3. Treg の免疫抑制分子 CTLA-4 の発現量の減少

4. Treg の抑制性サイトカインの IL-10、TGF- β の減少ならびに炎症性サイトカインの IFN γ の増加

これらの予備研究結果より、ハイリスク角膜移植では Foxp3 ならびに CTLA-4 や IL-10、TGF- β などの抑制性分子が減少し、Treg の機能不全を起こしていることが明らかになった。

近年、Treg は内在性 Treg と誘導性 Treg の 2 つのサブセットを持ち、Neuropilin-1 (Nrp-1)の内在性 Treg における高発現が明らかになった。内在性 Treg は免疫寛容における恒常性維持、誘導性 Treg は局所における免疫寛容に重要で、2 つは相補的に機能していると考えられているが(Yadav M et al: *Frontiers in immunology*; 2013)、炎症環境下における Treg のサブセットの分布や免疫抑制能ならびにその安定性は明らかになっていない。

本研究では、Nrp-1 を用い、ハイリスク角膜移植における誘導性 Treg と内在性 Treg の分布ならびに免疫抑制能と安定性を評価し、Treg のサブセットにおける新規免疫抑制経路を解明することで、Treg を用いた新規移植免疫寛容導入療法開発に向けた基盤となる研究を行う。

2. 研究の目的

角膜移植後の急性拒絶反応に対して、ステロイドやタクロリムスなどの免疫抑制剤を中心とした治療が行われてきたが、未だに血管新生や感染症、再移植などの炎症が惹起されたハイリスク角膜に対する角膜移植では 40-90%に拒絶反応を伴う。これまでに申請者らは角膜移植片に対する Treg を用いた免疫寛容誘導療法の可能性を明らかにしたが、Treg は炎症環境下では安定性を失い、免疫抑制機能不全となる事が臨床応用への障壁となっている。

本研究では、炎症環境下における Treg のサブセットである内在性 Treg と誘導性 Treg の免疫制御への役割ならびにその分化維持機構、安定性を明らかにし、免疫抑制経路を解明することで、Treg のサブセットを用いた新規免疫抑制療法開発に向けた基盤となる研究を行う。

3. 研究の方法

本研究では研究期間内に以下の(1)-(5)の研究方法で実施した。

- (1)血管新生を誘導し、炎症を惹起したハイリスク角膜移植モデルと血管新生のない正常角膜移植(コントロール)の比較。
- (2)誘導性 Treg と内在性 Treg の同定と Foxp3 ならびに免疫抑制分子の発現量

の解析。

- (3)抑制性/炎症性サイトカインの分泌量ならびに角膜移植片における発現量の解析。
- (4)インビトロにおいて抗原提示細胞 (APC)、T エフェクター細胞(Teff)と誘導性 Treg もしくは内在性 Treg を共培養し、T 細胞増殖抑制能の比較。
- (5)分離した誘導性 Treg もしくは内在性 Treg をマウスの尾静脈から adoptive transfer し、角膜移植片の生存率を評価し、インビボにおける Treg のサブセットの免疫抑制能ならびに安定性と有効性の評価。

平成 28 年度: ハイリスク角膜移植における誘導性 Treg と内在性 Treg の分布ならびに免疫抑制性分子の発現量の定量

(1) ハイリスク角膜移植モデルの作成

角膜実質に 14 日間ナイロン糸を留置し、新生血管を誘導したハイリスクレシピエント角膜を作成した。ドナー角膜 (C57BL/6) からレシピエント角膜 (BALB/c) に同種異系角膜移植を行った。

(2) 誘導性 Treg と内在性 Treg の同定と免疫抑制分子の発現量の計測

マウスの角膜移植における急性拒絶反応は移植後 10-14 日に始まる。角膜移植術前ならびに角膜移植 7、14 日後の頸部リンパ節ならびに角膜移植片の細胞を採取し、フローサイトメーター (FACS) にて誘導性 Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Nrp-1⁻Treg)、内在性 Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Nrp-1⁺Treg) の分布ならびに、Foxp3 の発現量を Mean Fluorescence Intensity (MFI) にて定量した。

Treg は CTLA-4、GITR、PDL-1、LAG-3 など免疫抑制性分子を介してその免疫抑制能を維持する。FACS にて誘導性 Treg ならびに内在性 Treg に発現する免疫抑制性分子の発現量を MFI にて定量化した。

(3) 誘導性 Treg と内在性 Treg のサイトカインの発現量の定量

Treg は IL-10 や TGF- β などの抑制性サイトカイン、IFN γ といった炎症性サイトカインによってその免疫抑制作用が調節される。頸部リンパ節細胞から MACS 磁気細胞分離を用い CD4⁺CD25^{hi} Treg を採取し、Nrp-1 染色を行い、FACS ソーティングで誘導性 Treg (CD4⁺CD25^{hi}Nrp-1⁻Treg) と内在性 Treg (CD4⁺CD25^{hi}Nrp-1⁺Treg) を分離した。そ

の後、PMA と Inomycin で T 細胞受容体を共刺激し、IL-10 や TGF- β 、IFN γ の分泌量を ELISA 法で評価した。さらに、角膜移植片より mRNA を抽出し、cDNA を合成し、Foxp3、IL-10、TGF- β 、IFN γ の発現量を real-time PCR を行い定量化した。

平成 29 年度: 誘導性 Treg と内在性 Treg の免疫抑制作用と安定性と有効性の評価

(4) (インビトロ)誘導性 Treg と内在性 Treg の T 細胞増殖抑制能の評価

Teff は角膜移植における急性拒絶反応の主座を担う。Treg は Teff に対し抑制的に働くことで免疫寛容を誘導する。MACS 磁気細胞分離で頸部リンパ節細胞から Treg ならびに Teff 細胞を分離した。同様の方法で、C57BL6 マウスの脾臓から APC を分離した。FACS ソーティングで分離した誘導性 Treg もしくは内在性 Treg、Teff 細胞、APC を CD3e と 3 日間共培養した。その後 BrdU 染色を行い、Treg の T 細胞増殖抑制能の評価を行った (Treg Suppression Assay)。

(5) (インビボ)内在性 Treg ならびに誘導性 Treg の adoptive transfer を用いた角膜移植片に対する免疫寛容誘導の効果ならびに安定性と有効性の評価

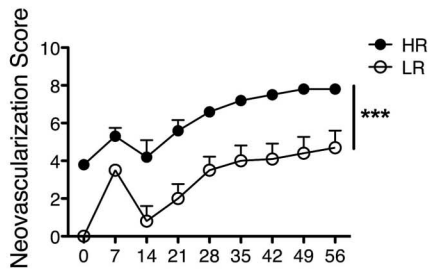
角膜移植を行ったマウスにハイリスク、コントロール角膜移植由来の誘導性 Treg、内在性 Treg を静脈投与 (adoptive transfer, 1.0×10^5 個/100ul) し、角膜移植片の生存率 (透明率) を評価し、インビボにおける Treg のサブセットの免疫抑制能ならびに安定性と有効性の評価を行った。

4. 研究成果

平成 28 年度は、(1) レシピエント角膜に炎症を惹起したハイリスク角膜移植モデルを作成し、(2) pTreg と tTreg の同定ならびに Foxp3 の発現量を計測した。免疫抑制メカニズムに対しては (2) 免疫抑制性分子の発現量ならびに (3) 抑制性/炎症性サイトカインの発現量 (real-timePCR) と分泌量 (ELISA) の評価に取り組んだ。

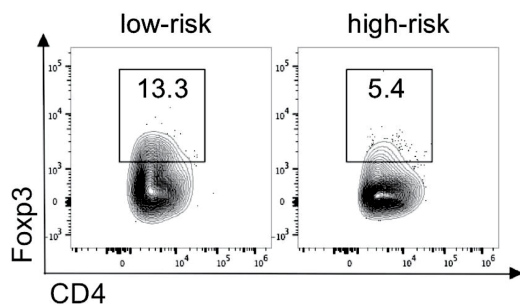
(1) ハイリスク角膜移植モデルを作成し、ハイリスク角膜移植モデルにおけるレシピエント角膜の血管新生 (CD31)、リンパ管 (Lyve-1) 新生の免疫染色を行い、血管/リンパ管新生の動態を検証した。ハイリスク角膜移植における血管新生は 2 峰性の血管新生の動態を示すことを明らかにした (図 1)。一方でレシピエント角膜におけるリンパ管の新生はコントロール角膜移植では減退するのに対し、ハイリスク角膜移植では増加を保持することが明らかになった。

(図 1)



(2) ハイリスク角膜移植におけるレシピエント角膜の Treg の減少ならびに Foxp3 の発現量の減少をフローサイトメトリーにて明らかにした (図 2)。

(図 2)

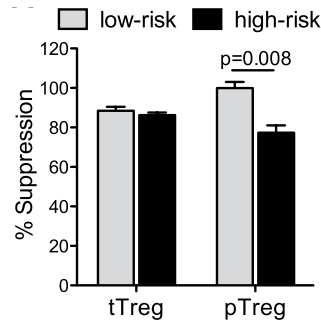


(3) ハイリスク角膜移植の頸部リンパ節における誘導性制御性 T 細胞 (pTreg) の CTLA-4 の発現の低下をフローサイトメトリーにて明らかにした。また、pTreg における IL-10、TGF- β の分泌量の減少ならびに IFN- γ の分泌量の増加を ELISA 法にて明らかにした。

平成 29 年度は、誘導性 Treg と内在性 Treg の免疫抑制作用とその安定性と有効性の評価を目的として、(4)インビトロ下に誘導性 Treg と内在性 Treg の T 細胞増殖抑制能の評価と、(5)内在性 Treg もしくは誘導性 Treg の adoptive transfer を用いた角膜移植片に対する免疫寛容誘導の効果ならびに安定性と有効性を評価した。

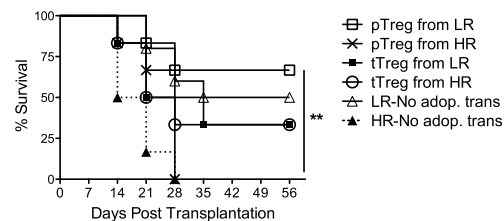
(4) tTreg と pTreg の T 細胞増殖抑制能の評価をハイリスク角膜移植と通常の角膜移植を比較したところ、tTreg の免疫抑制能に変化はなかったが、ハイリスク角膜移植における pTreg の免疫抑制能の低下が明らかになった (p=0.008, 図 3)。

(図 3)



(5) インビボにおける Treg のサブセットの免疫抑制能ならびに安定性と有効性を評価した (図 4)。分離した pTreg もしくは tTreg をマウスの尾静脈から adoptive transfer し、角膜移植片の生存率を評価したところ、コントロール角膜移植から分離した pTreg は角膜移植片の生存率を延長したが、ハイリスク角膜移植から分離した pTreg は角膜移植片の生存率を延長しなかった (p=0.129)。

(図 4)



本研究期間内に、ハイリスク角膜移植において

- (1) 2 峰性の血管新生
- (2)-1 角膜移植片の Treg の減少
- (2)-2 Foxp3 の発現量の低下
- (3)-1 頸部リンパ節における誘導性制御性 T 細胞の減少
- (3)-2 誘導性制御性 T 細胞における CTLA-4 の低下
- (3)-3 誘導性制御性 T 細胞における IL-10、TGF- β の分泌量の減少ならびに IFN- γ の分泌量の増加
- (4) Treg Suppression Assay による誘導性制御性 T 細胞の免疫抑制能の低下 (インビトロ)
- (5) Adoptive transfer による誘導性制御性 T 細胞の免疫抑制能の低下 (インビボ)

を明らかにした。

このことから、血管新生や炎症が惹起された環境下において誘導性制御性 T 細胞は可塑性を持ち、その免疫抑制能を失うことが明らかになった。

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 4 件)

- ① Inomata T, Hua J, Di Zazzo A, Dana R: Impaired Function of Peripherally Induced Regulatory T Cells in Hosts at High Risk of Graft Rejection. Sci Rep 6: 39924, 2016. (査読有)
- ② Inomata T, Mashaghi A, Di Zazzo A, Lee SM, Chiang H, Dana R: Kinetics of Angiogenic Responses in Corneal Transplantation. Cornea 36: 491-6, 2017. (査読有)
- ③ Inomata T, Ono K, Matsuba T, Shiang T, Di Zazzo A, Nakatani S, Yamaguchi M, Ebihara N, Murakami A: Pre-banking microbial contamination of donor conjunctiva and storage medium for penetrating keratoplasty. Jpn J Ophthalmol: 2017. (査読有)
- ④ Inomata T: A New Immunotherapy Using Regulatory T-Cells for High-Risk Corneal Transplantation. Juntendo Medical Journal 63: 2-7, 2017. (査読有)

[学会発表] (計5件)

- ① Inomata T, Mashaghi A, Di Zazzo A, Lee SM, Homer C, Dana R: Kinetics of Angiogenic Responses in High-Risk Corneal Transplantation, 第16回日本抗加齢医学会総会, 2016年6月.
- ② 岡野美樹子, 猪俣武範, 村上晶: ハイリスク角膜移植に対する制御性 T 細胞のサブセットを用いた新規免疫抑制療法開発のための研究. 第36回日本眼薬理学会, 2016年9月.
- ③ Inomata T, Hua J, Di Zazzo A, Dana R: IMPAIRED FUNCTION OF PERIPHERALLY INDUCED REGULATORY T CELLS IN HOSTS OF HIGH RISK OF GRAFT REJECTION, Tear Film & Ocular Surface Society 2016, 2016年9月.
- ④ 猪俣武範: 角膜移植における新規免疫抑制療法と血管新生抑制療法, 2017年度応用薬理学シンポジウム, 2017年9月.
- ⑤ 猪俣武範: 制御性 T 細胞を用いた角膜移植における新規免疫抑制療法開発のための研究, 角膜カンファレンス 2018, 2018年2月.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

猪俣 武範 (INOMATA, Takenori)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号: 1 0 6 4 5 6 6 7