

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16208

研究課題名(和文)Cキナーゼ阻害剤で誘導した免疫寛容樹状細胞を用いた抗原特異的免疫抑制療法の研究

研究課題名(英文)Study of antigen-specific immunosuppressive therapy using tolerogenic dendritic cells induced by protein kinase C inhibitor

研究代表者

松本 卓也(Matsumoto, Takuya)

愛媛大学・医学部附属病院・講師(病院教員)

研究者番号：70724780

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、以前ヒト免疫寛容樹状細胞(tolerogenic Dendritic Cells:tDCs)への分化誘導を促進する物質として、Cキナーゼ阻害剤(PKCI)を見出し、他の誘導物質と比較し、PKCI-tDCsが臨床応用可能なtDCsとして最も有力であることを証明した。シェーグレン症候群、関節リウマチの患者の検体においてPKCIを用いてtDCsが誘導できることを確認した。また、未熟DCs、成熟DCs、PKCI-tDCから全RNAを抽出し、miRNA arrayにて比較解析を行い、PKCI-tDCsに発現の高い12種類のmiRNAを見出した。これらのmiRNAをDCsに導入し解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

樹状細胞は1973年に新しい免疫担当細胞として報告されて以来、獲得免疫のみならず免疫寛容においても重要な役割を果たしていることが報告されている。本研究の特色としてCキナーゼ阻害薬によって誘導されたヒト免疫寛容樹状細胞(tDCs)が、臨床応用の可能性が十分あることを示し、実臨床の患者においてもtDCsが誘導できることを証明した。また、miRNAを解析することで、今後これらの研究をさらに発展させ、抑制機能を持ったTregsやtDCsを効率よく、安定的に誘導する方法を確立し、膠原病などの自己免疫疾患などの臨床に応用を目指している。

研究成果の概要(英文):Human tolerogenic dendritic cells(tDCs) can be generated ex vivo from DC precursors using various compounds. We previously reported that DCs treated with conventional protein kinase C inhibitor had potent immunogenic tolerance properties. In addition, PKCI-tDCs might be more useful for inducing therapeutic immunotolerance. The functional characteristics of PKCI is good for making clinical grade tDCs, compared to other compounds. And, we confirmed that we could generate PKCI-tDCs from rheumatoid arthritis or Sjogren's syndrome patients. In addition, miRNA array were performed with total RNA extracted from immature DCs, mature DCs, and PKCI-tDCs, to find functional differences of these types of DCs. As a result, we found highly expression of 12 types of miRNA in PKCI-tDCs to compared with other DCs. Functional analysis of these miRNA transducted in DCs are still going.

研究分野：免疫・膠原病

キーワード：免疫寛容樹状細胞 Cキナーゼ阻害剤

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞(DCs)は、高い抗原提示能を有する抗原提示細胞であり、血液を通じてあらゆる組織に存在する。外界から侵入してきた細菌、真菌、ウイルスなどに未熟樹状細胞が移動し、それらの抗原に反応し捕食を行い、取り込んだ樹状細胞は活性化し、成熟樹状細胞に分化する。成熟樹状細胞は、リンパ節などに移動し、T細胞に抗原を提示し、抗原に反応するT細胞を誘導するT細胞リンパ球に抗原を提示し免疫の調節を行っている。上記の様に樹状細胞は獲得免疫に置いて重要な役割を持つ抗原提示細胞である一方で、膠原病やアレルギー疾患などの免疫機能の異常な反応を抑える方向に働くという免疫寛容を導く役割を持っている。例えば、膠原病の患者の多くが、免疫抑制剤に治療を受けているが、免疫抑制剤の作用に比例して感染症などの副作用も多く、継続できない症例も多い。そこで、より選択的で副作用が少なく、長期間寛容を維持できる治療の研究がすすめられている。その中で、免疫寛容樹状細胞を用いた治療が注目されており、欧米などでは 型糖尿病、多発性硬化症、関節リウマチなどの病気に対して臨床研究が進められている。

2. 研究の目的

樹状細胞は高い抗原提示能を有した不均一な抗原提示細胞であり、免疫応答の調節を司る中心的な細胞である。生体において樹状細胞は系列、成熟段階の異なる多様なサブユニットとして末梢非リンパ組織やリンパ組織に広く存在している。造血幹細胞から未熟樹状細胞へと分化しさらに様々な刺激により MHC 分子と共刺激分子の発現が増強して成熟樹状細胞に至る。この過程において、生理活性物質や薬剤、遺伝子改変を加えて、免疫寛容樹状細胞(tDCs)を誘導したという報告が今まででも多くされている。

それぞれの物質によって、tDCs の表現型、サイトカイン産生は異なり、また T 細胞アナジーあるいは制御性 T 細胞 (Tregs) の誘導能も異なる。そこで我々は、どの物質が最も効率よく免疫寛容樹状細胞を誘導できるのかということと、生体内に移入した場合に十分働くかということの報告はなく、このため以下に述べる点が重要であると考えた。二次リンパ組織への遊走能が維持されていること、炎症状況下でも安定していること、Tr1 細胞や Tregs などの機能的な制御性 T 細胞が十分誘導できることの 3 点に注目した。

我々は以前生理活性脂質、核内受容体リガンド、キナーゼ阻害剤ライブラリーからのスクリーニングを行い、ヒト tDC への分化誘導が促進する物質として、C キナーゼ阻害剤 (PKCI) を見出した。PKCI-tDCs は上記の臨床応用可能な 3 条件を満たしていた。(J. Immunol 191:2247, 2013)。次に今まで免疫寛容樹状細胞の誘導について報告がある TGF-beta、VitaminD3(VitD3)、dexamethazone(Dexa)、rapamycin(Rapa)、PPARgamma+retinoic acid(PPAR+RA)の 6 種類で誘導した tDCs と PKCI-tDCs との比較検討を行った。表面マーカーについては、PKCI、IL-10、VitD3、PPAR+RA で誘導した tDCs は immature あるいは semi mature の表現型を示し、Dexa、Rapa、TGF-beta はやや上記物質より発現が認められた。CCR7 の発現が成熟細胞に準じた発現と遊走能が保たれており、CCL19 に対する遊走能が維持されていたのは PKCI、TGF-beta、Rapa であった。上記結果から、PKCI-tDCs は臨床応用に使用するにおいて有用である可能性が示唆された。

上記のように PKCI-tDCs は、臨床応用の期待が持てる結果であったが、臨床応用に向けて、実際の患者においても同様に誘導できるかの研究が必要であると考えた。今回の研究では、我々が見出した PKCI を用いて膠原病患者の末梢血を用いて、PKCI-tDCs が誘導出来るかを検証する。以前報告した内容をまとめ、症例を増やして検討をおこなった。また、PKCI-tDCs において発現が増強している microRNA を見出し、それを未熟樹状細胞に導入することで同様の細胞形態、作用を発現するかを確認することを目的とした。

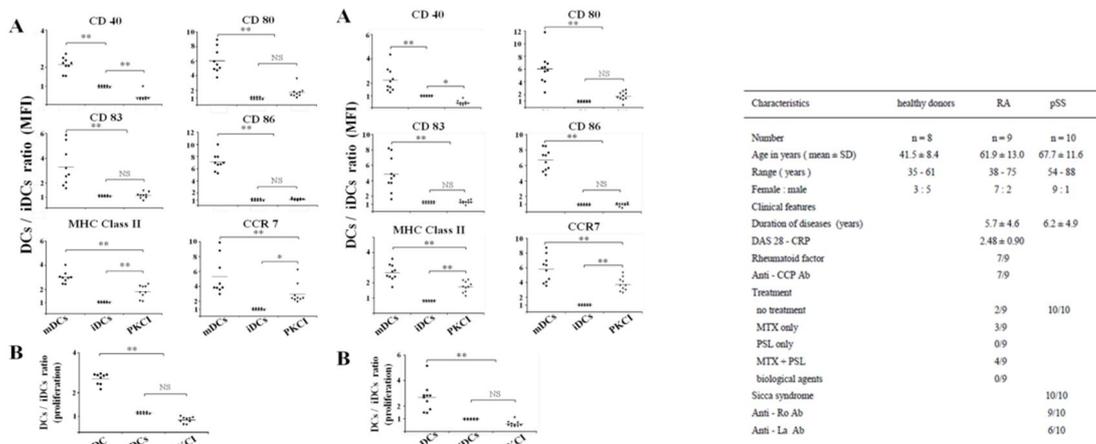
3. 研究の方法

ヒトの末梢血検体を用いて、樹状細胞を誘導した。単核球分離を行った後、CD14 陽性細胞を分離し、IL-4 + GM-CSF を用いて未熟樹状細胞を誘導し、成熟刺激として TNF + IL-1 + PGE2 を用いて成熟樹状細胞を誘導した。また、成熟樹状細胞誘導過程において、PKCI を加えて、PKCI-tDCs を誘導培養した。

関節リウマチ、シェーグレン症候群、MPO-ANCA 関連血管炎の膠原病患者の末梢血を用いて、PKCI-tDCs が誘導出来るかを検討した。また、未熟 DCs、成熟 DCs、PKCI-tDC から全 RNA を抽出し、miRNA array にて比較解析を行った。

4. 研究成果

(1)



1. 関節リウマチ患者

2. シェーグレン症候群患者

患者背景

関節リウマチ患者(RA) およびシェーグレン症候群 の患者すべてから PKCI-tDCs が誘導された。Healthy donor から誘導できた PKCI-tDCs と比較して、CD40、CD80、CD83、CD86、MHCclass ,CCR7 の表面マーカーの発現、T 細胞の増殖抑制能など比較して methotrexate や prednisolone の治療に関わらず、関節リウマチ患者やシェーグレン症候群患者から PKCI-tDCs は誘導可能であった。MPO-ANCA 関連血管炎の患者に関して誘導を再度試みたが PKCI-tDCs はやはり誘導できなかった。ANCA 関連血管炎については共同研究者のバイオマーカー検索を含めて、MPOANCA 陽性の血管炎患者について免疫応答の解析を進めている。現在シェーグレン患者の検体数を増やし、同様の結果が得られているが、さらに患者の HLA-DRB1 を解析し、比較的多かった HLA-DRB1*0401, 0803, 0901, 1501 などの allele を持つ患者を中心に解析を行っている。上記の HLA-DRB1 に拘束される M3 ムスカリンアセチルコリン受容体 (M3R) の T 細胞エピートープ・アンカーモチーフのペプチドを推定し、HLA-DRB1 に拘束される可能性のある M3R のペプチドを探索している。

(2)

	Ct			ΔCt			ΔΔCt			RQ		
	im DCs	ma DCs	tol DCs	im DCs	ma DCs	tol DCs	im DCs	ma DCs	tol DCs	im DCs	ma DCs	tol DCs
hsa-let-7a-4373169	27.40	27.64	26.33	7.61	7.98	6.41	0.00	0.37	-1.20	1.00	0.77	2.30
hsa-let-7c-4373167	30.03	30.35	28.76	10.24	10.69	8.84	0.00	0.46	-1.39	1.00	0.73	2.63
hsa-miR-15a-4373123	27.76	27.86	25.67	7.97	8.20	5.75	0.00	0.23	-2.22	1.00	0.85	4.67
hsa-miR-98-4373009	29.79	30.08	28.91	10.01	10.42	8.99	0.00	0.42	-1.02	1.00	0.75	2.02
hsa-miR-130a-4373145	33.85	36.27	31.81	14.06	16.62	11.89	0.00	2.55	-2.18	1.00	0.17	4.52
hsa-miR-138-4395395	36.54	-	32.30	16.75	-	12.38	0.00	-	-4.37	1.00	-	20.65
hsa-miR-139-5p-4395400	33.48	31.74	29.99	13.69	12.08	10.07	0.00	-1.61	-3.62	1.00	3.04	12.33
hsa-miR-192-4373108	31.17	31.04	30.19	11.38	11.39	13.20	0.00	0.01	-1.11	1.00	0.99	2.16
hsa-miR-193a-5p-4395392	30.21	29.49	28.96	10.42	9.84	9.04	0.00	-0.58	-1.38	1.00	1.50	2.60
hsa-miR-202-4395474	35.51	33.30	31.22	13.89	13.65	11.29	0.00	-0.24	-2.60	1.00	1.31	6.05
hsa-miR-218-4373081	35.62	32.13	29.98	15.83	12.48	10.06	0.00	-3.36	-5.77	1.00	10.24	54.73
hsa-miR-221-4373077	25.92	25.31	24.93	6.13	5.66	5.01	0.00	-0.47	-1.12	1.00	1.39	2.17
hsa-miR-296-5p-4373066	37.84	34.88	33.94	18.05	15.22	14.02	0.00	-2.83	-4.03	1.00	7.13	16.38
hsa-miR-376a-4373026	37.14	36.63	35.48	17.35	16.97	15.56	0.00	-0.38	-1.79	1.00	1.30	3.46
hsa-miR-423-5p-4395451	30.91	31.32	29.67	11.12	11.67	9.74	0.00	0.54	-1.38	1.00	0.69	2.60
hsa-miR-490-3p-4373215	38.95	-	35.87	19.16	9.96	9.68	0.00	-	-3.21	1.00	-	9.25
hsa-miR-509-5p-4395346	34.31	34.31	32.99	14.52	16.61	13.07	0.00	2.09	-1.45	1.00	0.23	2.74
hsa-miR-517c-4373264	38.73	37.26	34.24	18.95	17.60	14.32	0.00	-1.34	-4.62	1.00	2.53	24.65
hsa-miR-518f-4395499	35.56	35.91	32.95	15.77	15.01	15.61	0.00	-0.48	-2.74	1.00	0.72	6.69
hsa-miR-519a-4395526	35.32	-	34.42	15.53	16.25	13.03	0.00	-	-1.03	1.00	-	2.04
hsa-miR-582-3p-4395510	37.44	-	33.19	17.65	-	13.27	0.00	-	-4.38	1.00	-	20.81
hsa-miR-616-4395525	34.30	34.75	32.83	14.51	15.10	12.91	0.00	0.59	-1.60	1.00	-0.67	3.04
hsa-miR-708-4395452	35.65	35.52	32.70	15.86	15.86	12.78	0.00	0.00	-3.08	1.00	1.00	8.45

miRNA array をやり直し、未熟、成熟 DCs および PKCI-tDCs から全 RNA を抽出し、miRNA array にて比較解析を行った(ジェネティックラボ株式会社と共同)。約 370 種類について解析を行い、PKCI-tDCs に発現の高い miRNA をスクリーニングした。その中から let-7c, miR-15a, miR-130a, miR-192 など 12 種類の miRNA mimics を作成した。リポフェクタミンなどを用いて未熟樹状細胞に導入し、同様の細胞形態、作用について解析を行っている。

今後これらの研究をさらに発展させ、PKCI で誘導した免疫寛容樹状細胞の機序の解明を進めてき、他物質と比較を行いながら抑制機能を持った Tregs や tDCs を効率よく、安定的に誘導する方法を確立し、自己免疫疾患やアレルギー、移植後 GVHD などに対する抗原特異的治療へ展開させていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hitoshi Hasegawa, Takuya Matsumoto	4. 巻 9
2. 論文標題 Mechanisms of Tolerance Induction by Dendritic Cells In Vivo.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2018.00350	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 松本卓也, 長谷川均	4. 巻 37(13)
2. 論文標題 Cキナーゼ阻害剤で誘導されたヒト免疫寛容樹状細胞による自己免疫疾患への展開	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 49-54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 長谷川均、松本卓也、石崎淳、末盛浩一郎
2. 発表標題 Cキナーゼ阻害剤で誘導されたヒト寛容型樹状細胞の特徴と自己免疫疾患からの誘導
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hasegawa, H., Matsumoto, T., Adnan, E., Ishizaki, J., Suemori, K., Yasukawa, M.
2. 発表標題 Characterization of human tolerogenic dendritic cells generated with protein kinase C inhibitor and induction from patients with autoimmune diseases.
3. 学会等名 2017 ACR/ARHP Annual Meeting, San Diego, U.S.A. 2017.11.6. (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----