

令和元年5月23日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18137

研究課題名(和文) NKT細胞の活性化によりドナー T 細胞を制御する新しい免疫寛容誘導法の確率

研究課題名(英文) A novel approach inducing transplant tolerance through NKT cell activation in combination with T cell transfer

研究代表者

石井 瑠美 (ISHII, Rumi)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：40751178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：移植免疫寛容の誘導によって、移植臓器は免疫抑制剤を使用せずとも生涯に渡り生着することが可能となる。我々は以前、liposomal α -galactosylceramide (lipo- α GC)を投与しiNKT細胞を活性化させ、抗CD40L抗体を投与して骨髄移植を行うことで、非骨髄破壊的放射線照射の低侵襲な前処置でも、混合血キメラを誘導できるマウス移植免疫寛容誘導モデルについて報告した。本研究では、このプロトコルにドナー T細胞の移入を加えることで、より少ない骨髄細胞数で完全キメラを誘導できる免疫寛容誘導法を新たに確立した。移植免疫寛容の臨床応用により近づいた方法を確立できたと考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立した移植免疫寛容誘導法は少ない骨髄細胞数で完全キメラを誘導できることから、移植免疫寛容の臨床応用により近づいたと考える。さらに、本研究結果の対象は臓器移植や血液がんのみならず、低侵襲な骨髄移植法の確立による自己免疫疾患患者の骨髄置換による治療や近年進歩の著しい再生医療分野における免疫寛容誘導に展開する可能性もある。本研究の成果は、新しい免疫治療分野を生み出す発展性があると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Transplant tolerance induction makes it possible to preserve functional grafts for a lifetime without immunosuppressants. One powerful method is to generate mixed hematopoietic chimeras in recipients by adoptive transfer of donor-derived bone marrow cells (BMCs). In our murine transplantation model, we established a novel method for mixed chimera generation using sublethal irradiation, CD40-CD40L blockade, and invariant natural killer T-cell activation. However, numerous BMCs that are required to achieve stable chimerism makes it difficult to apply this model for human transplantation. Here, we show that donor-derived splenic T cells could contribute to not only the reduction of BMC usage but also the establishment of complete chimerism in model mice. By cotransfer of T cells together even with one-fourth of the BMCs used in our original method, the recipient mice yielded complete chimerism and could acquire donor-specific skin-allograft tolerance.

研究分野：移植免疫学

キーワード：免疫寛容 移植片対宿主病 ナチュラルキラーT細胞 制御性T細胞 T細胞 抗CD40リガンド抗体 臓器移植

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトでの臓器移植が行われてから約 60 年が過ぎたが、現在でも移植後は生涯に渡り免疫抑制剤の内服が必要である。免疫抑制剤の継続的な内服は、感染症や悪性腫瘍罹患の増加、副作用や高額な医療費といった問題のみならず、移植患者の QOL を大きく損なっている。これらの問題を一挙に解決する方法には、移植免疫寛容の確立がある。移植免疫寛容とは、免疫抑制剤を使用しなくても移植臓器が自己臓器のように生着する状態で、このような状態を意図的に作り出す代表的な方法に、混合血キメラ誘導法がある。これは臓器移植の際に同一ドナーの骨髄を移植し、レシピエントの免疫系をドナータイプに入れ替えることで拒絶反応を防ぐ。いくつかの混合血キメラ誘導の実験モデルが報告されているが、実際に臨床応用された例は少ない。これは、いずれの方法においても移植前に侵襲的な前処置が必要であること、また移植骨髄中のドナー T 細胞による移植片対宿主病 (以下 GvHD) の発症が懸念されているためである。

我々はこれまでのマウスを用いた研究で、ナチュラルキラー T 細胞 (以下 NKT 細胞) を適切に活性化することで、低侵襲な前処置でもドナー骨髄を安全に生着できることを報告している⁽¹⁾ (Am J Transplant 2014;14(3):554-67)。この方法は、従来の方法のように強力な前処置を用いてアロ免疫反応を“抑制”しようとするのではなく、調節性 T 細胞 (以下 Treg 細胞) などの免疫制御機能を“活性化”させることで混合血キメラの誘導に成功している点で極めて革新的である。方法はシンプルであり、3Gy の低線量放射線照射後に骨髄移植を行い、同時に NKT 細胞の免疫制御能を高める liposomal α -galactosylceramide (以下 lipo-aGC) と抗 CD40L 抗体を投与する。これによりドナー骨髄は生着し、その後同一ドナーからの心臓移植を行うと、免疫抑制剤を使用しなくても移植心は恒久的に生着する。他施設でのプロトコールでよく用いられている抗癌剤のような毒性の高い薬剤を使用する必要はなく、ヒトへの応用にも忍容性のあるプロトコールといえる。

しかし、臨床的には得られる骨髄細胞数に限りがあることや、ドナータイプとホストタイプの免疫系細胞が体内で混在する状態 (混合血キメラ) は不安定であるため免疫細胞を完全にドナータイプにおきかえる状態 (完全キメラ) が推奨される。このため、より少ない骨髄細胞移入で完全キメラを誘導できるようなプロトコールが求められている。混合血キメラ誘導のもう一つの問題点は GvHD 発症の危険性である。急性 GvHD はドナー成熟 T 細胞により引き起こされるため、臨床での移植の際には、ドナー成熟 T 細胞は除去するのが一般的である。一方で、ドナー T 細胞には、骨髄生着を促進するとの報告があり⁽²⁾ (Jurnal of Immunol. 1984;133:1769-1774)、さらに骨髄移植の臨床研究において lipo-aGC 単剤で GvHD を予防するとの報告がある⁽³⁾ (Biol Blood Marrow Transplant 2011;17:1154-68)。従って、lipo-aGC を用いた本免疫寛容誘導プロトコールならば、ドナー T 細胞移入を行っても GvHD のリスクを高めることなく、骨髄生着を促進できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、我々の発見した lipo-aGC と抗 CD40L 抗体を用いた免疫寛容誘導法にドナー T 細胞移入を併用することで、少ない移入骨髄細胞数で完全キメラの誘導を可能にする新たなキメラ誘導法を確立する事を目的とする。更に、このキメラマウスが GvHD を起こさないことを確認し、また移入 T 細胞の骨髄生着を促進するメカニズムについて解析する。

3. 研究の方法

(1) ドナー成熟 T 細胞移入による免疫寛容系の確立

3Gy の低線量放射線照射後のレシピエント BALB/c (H2^d) マウスに、ドナー B6 (H2^b) マウスより採取した 5×10^6 個の骨髄細胞を移植し、lipo-aGC と抗 CD40L 抗体を投与した。これに B6 マウスの脾細胞から分離した T 細胞 5×10^5 個を移入する群と移入しない群で、ドナー細胞の生着について flow cytometry で比較した。さらにキメラマウスに、骨髄細胞と一致したドナー B6 マウスもしくは 3rd party である C3H (H2^k) マウスより採取した皮膚を移植し、皮膚移植片の生着期間について評価した。

(2) GvHD の評価

キメラマウスの体重と臨床 GvHD スコア⁽⁴⁾ (Blood 1996;Oct 15;88(8):3230-9) で評価した。GvHD の標的臓器である皮膚・肝臓・腸管・唾液線の各組織に対して Hematoxylin Eosin 染色を行い、病理組織学的評価を行った。キメラマウスの脾臓 T 細胞の GvH 反応性の評価を CFSE proliferation assay を用いて行った。またドナー T 細胞における host 反応性 TCR V β レパートアの減少の評価を flow cytometry で解析した。

(3) 骨髄生着促進作用を有するドナー成熟 T 細胞の解析

Green Fluorescent Protein 遺伝子 (GFP) を発現させた B6 系統のトランスジェニックマウス GFP (H2^b) の T 細胞を移入することで、キメラマウスの各組織 (胸腺、脾臓、リンパ節、肝臓、骨髄、末梢血) における移入後のドナー T 細胞 (GFP⁺ 細胞) の分布を flow cytometry で解析した。

これまでに骨髄生着の促進に重要な T 細胞は CD8⁺ T 細胞との報告があり、またこの CD8⁺ T 細

胞では、CD62L、CD44、C-C chemokine receptor type 7 (CCR7)、lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1)、Fas ligand の発現が増大していると報告されている⁽⁵⁾⁻⁽⁷⁾ (Blood 2013;121:1220-28, Blood 2011;117(3):1042-1052, J Immunol 2004;173:6660-6666)。本研究では、キメラマウスの GFP⁺T 細胞の CD62L、CD44、CCR7、LFA-1、Fas-L の発現を flow cytometry で解析した。さらに、CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞に分離して移入して、骨髄生着への影響を比較した。

(4) ドナー成熟 T 細胞移入がレシピエント免疫細胞に与える影響

骨髄生着作用を有する CD8⁺T 細胞は、MAPK kinase (MEK)/extracellular signal regulated kinase (ERK) シグナル経路を介して、ドナー反応性のホスト CD8⁺T 細胞のアポトーシスを導くことで、拒絶反応を抑えるという報告がある (Transplantation 2010;90(4):380-386)。そこで、キメラマウスに MEK/ERK inhibitor を投与し、キメラ誘導への影響について評価した。また、各群のホスト CD8⁺T 細胞の population を、flow cytometry で解析した。

4. 研究成果

(1) ドナー成熟 T 細胞移入による免疫寛容系の確立

3Gy 放射線照射後のレシピエント BALB/c マウスに、ドナー B6 マウスの 5×10^6 個の骨髄細胞を移植し、lipo-aGC と抗 CD40L 抗体を投与した。この条件ではドナー骨髄細胞は生着しないが、ここに B6 マウスの成熟 T 細胞を移入することで、ドナー細胞が生着し、完全キメラの状態を得た (図 1)。得られたキメラマウスは、骨髄ドナーである B6 マウスの皮膚移植片のみ生着し、3rd party である C3H マウスの皮膚移植片を拒絶した (図 2)。

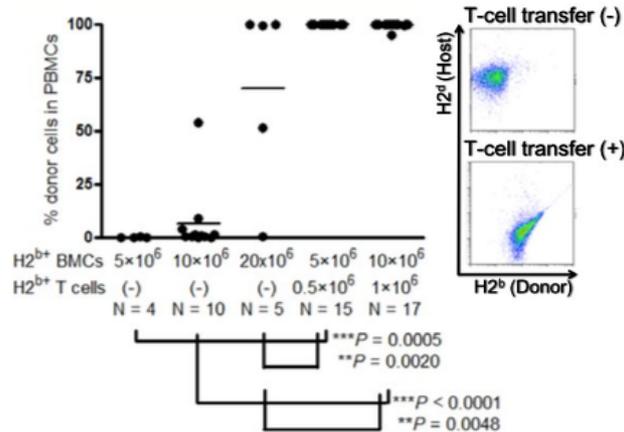


図1. 末梢血中のドナー細胞の割合:
ドナー成熟 T 細胞を移入すると、ドナー細胞が生着した。

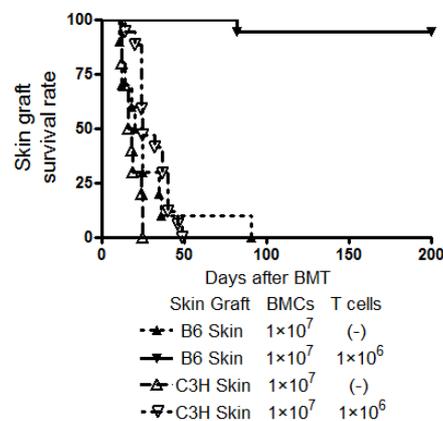


図2. 皮膚移植片の生着期間:
ドナー成熟 T 細胞を移入したキメラマウスでは、ドナー特異的に皮膚移植片が生着した。

(2) GvHD の評価

キメラマウスでは、体重減少は認められず、また臨床 GvHD スコアの増大も認めず、病理学的評価においても GvHD の所見は認められなかった。CFSE proliferation assay では、キメラマウスの T 細胞はドナー抗原やレシピエント抗原に反応性を示さなかった (図 3)。また、キメラマウスの T 細胞においてホスト 反応性 TCR の V β レパートアの減少を認めた (図 4)。以上の結果から、キメラマウスの T 細胞において GvH 反応性は認められなかった。

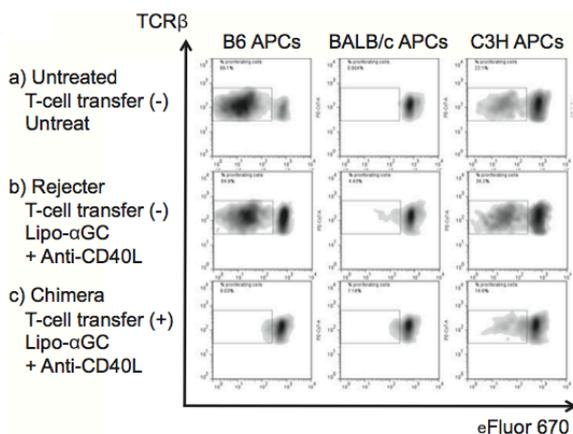


図3. CFSE proliferation assay :
キメラマウスの T 細胞は、ドナー抗原・レシピエント抗原には反応せず、3rd party 抗原には反応した。

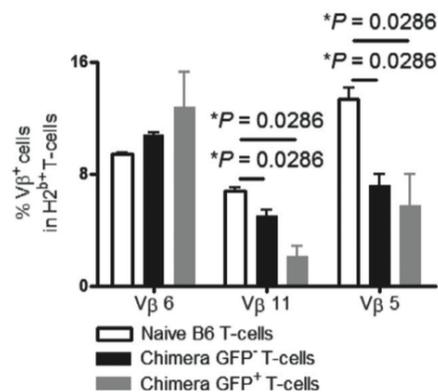


図4. 末梢血中の V β レパートア解析:
キメラマウスのドナー T 細胞は、ホスト反応性 TCR の V β レパートアが減少した。

(3) 骨髄生着促進作用を有するドナー成熟 T 細胞の解析

キメラマウスのドナー T 細胞は、初期には 移入した GFP⁺ 細胞が優位で全身のリンパ組織に分布するが、その後は速やかに骨髄由来の de novo T 細胞に置き換わった(図 5)。キメラマウスの GFP⁺T 細胞は、CD8⁺T 細胞の割合が多く、CD62L、CD44、CCR7、LFA-1、Fas-L の発現を認めた。CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞に分けて別々に移入した実験において、CD4⁺T 細胞を移入した場合にはドナー細胞は拒絶され、CD8⁺T 細胞を移入した場合にはドナー細胞が生着して完全キメラの状態となった(図 6)。以上より、移入 T 細胞のうち、ドナー CD8⁺T 細胞が骨髄生着促進作用を有し、移入後は CD62L、CD44、CCR7、LFA-1、Fas-L 発現が増大し、骨髄生着促進作用を発揮する可能性が示唆された。

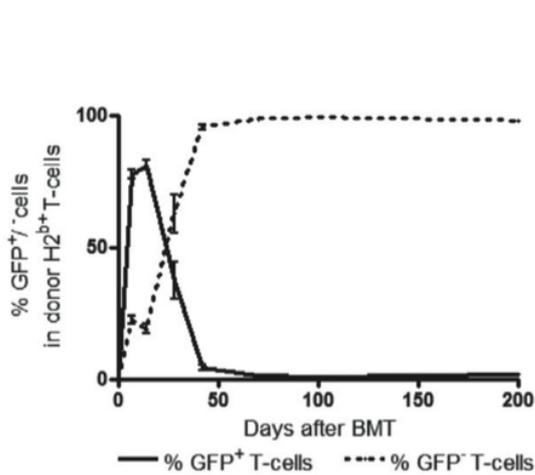


図5. 末梢血中の GFP⁺/⁻ 細胞の推移:
キメラマウスのドナー T 細胞は、GFP⁺ 細胞優位に増加するが、速やかに GFP⁻ 細胞に置き換わった。

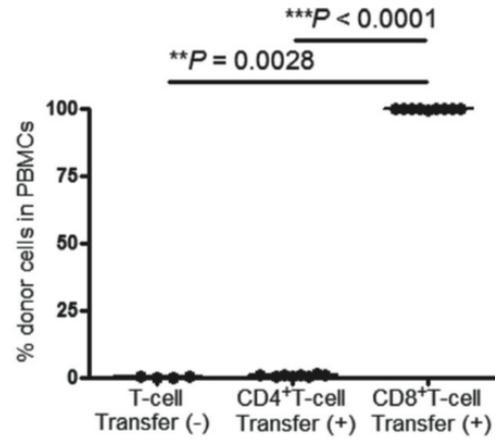


図6. 末梢血中のドナー細胞の割合:
CD4⁺T 細胞ではなく、CD8⁺T細胞を移入した場合に、ドナー細胞が生着した。

(4) ドナー成熟 T 細胞移入がレシピエント免疫細胞に与える影響

キメラマウスを誘導する際に MEK/ERK inhibitor を投与すると、ドナー細胞は拒絶され、キメラ誘導はできなかった(図 7)。キメラマウスではホスト CD8⁺T 細胞の割合は低下していたが、MEK/ERK inhibitor を投与した場合にはホスト CD8⁺T 細胞の割合が増加した(図 8)。したがって、移入 T 細胞は、MEK/ERK signaling を介してホスト CD8⁺T 細胞を抑制することで拒絶反応を抑え、骨髄生着を促進させる可能性が示唆された。

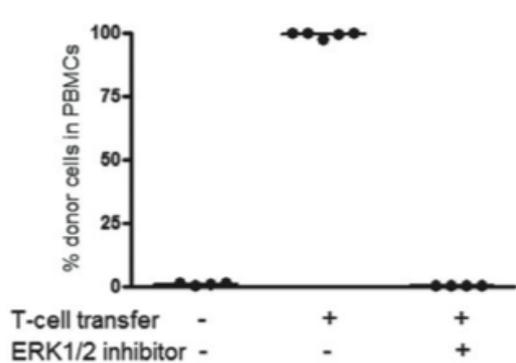


図7. 末梢血中のドナー細胞の割合:
MEK/ERK inhibitor を投与すると、ドナー細胞は拒絶された。

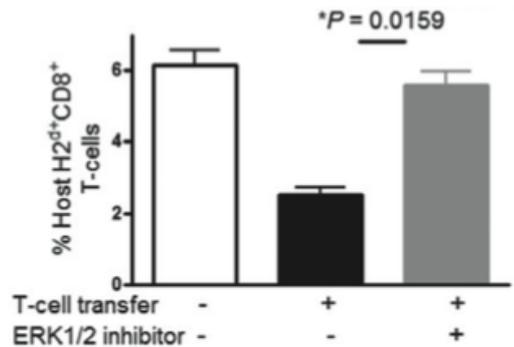


図8. 末梢血中のホスト CD8⁺T 細胞の割合:
キメラマウスでは、ホスト CD8⁺T 細胞の割合が低下した。MEK/ERK inhibitor を投与すると、ホスト CD8⁺T 細胞の割合が増加した。

以上の結果から、本研究では、NKT 細胞の活性化、抗 CD40L 抗体の投与、ドナー成熟 T 細胞移入により、より少ない骨髄細胞数でも完全キメラを誘導できるような、新たな免疫寛容誘導プロトコルを確立した。

<引用文献>

- (1) Hirai T, Ishii Y, Ikemiyagi M, et al. A novel approach inducing transplant tolerance by activated invariant natural killer T cells with costimulatory blockade. Am J Transplant. 2014;14:554-567.
- (2) Fink PJ, Rammensee HG, Benedetto JD, Staerz UD, Lefrancois L, Bevan MJ. Studies on

the mechanism of suppression of primary cytotoxic responses by cloned cytotoxic T lymphocytes. J Immunol. 1984;133:1769-1774.

(3) Duramad O, Laysang A, Li J, Ishii Y, Namikawa R. Pharmacologic expansion of donor-derived, naturally occurring CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells reduces acute graft-versus-host disease lethality without abrogating the graft-versus-leukemia effect in murine models. Biol Blood Marrow Transplant. 2011;17:1154-1168.

(4) Cooke KR, Kobzik L, Martin TR, Brewer J, Delmonte J Jr, Crawford JM, Ferrara JL. An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin.

(5) Ophir E, Or-Geva N, Gurevich I, et al. Murine anti-third-party central-memory CD8(+) T cells promote hematopoietic chimerism under mild conditioning: lymph-node sequestration and deletion of anti-donor T cells. Blood. 2013;121:1220-1228.

(6) Milstein O, Hagin D, Lask A, et al. CTLs respond with activation and granule secretion when serving as targets for T-cell recognition. Blood. 2011;117:1042-1052.

(7) Reich-Zeliger S, Gan J, Bachar-Lustig E, Reisner Y. Tolerance induction by veto CTLs in the TCR transgenic 2C mouse model. II. Deletion of effector cells by Fas-Fas ligand apoptosis. J Immunol. 2004;173:6660-6666.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

iNKT cell activation plus T-cell transfer establishes complete chimerism in a murine sublethal bone marrow transplant model.

Rumi Ishii Toshihito Hirai Satoshi Miyairi Kazuya Omoto Masayoshi Okumi Yasuyuki Ishii Kazunari Tanabe

American Journal of Transplantation. 2018 Feb;18(2):328-340. doi: 10.1111/ajt.14453.

Epub 2017 Sep 15. 査読有.

[学会発表] (計0件)

[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) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者指名：石井 保之

ローマ字氏名：(ISHII, Yasuyuki)

研究協力者指名：福田 絵美

ローマ字氏名：(FUKUDA, Emi)

研究協力者指名：安倍 良

ローマ字氏名：(ABE, Ryo)

研究協力者指名：奥見 雅由

ローマ字氏名：(OKUMI, Masayoshi)

研究協力者指名：田邊 一成

ローマ字氏名：(TANABE, Kazunari)