

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08540

研究課題名(和文)ステロイド受容体を標的にした新規制御性T細胞誘導法の開発と臓器移植への応用

研究課題名(英文) Establishment of a therapeutic method to induce Treg through steroid receptor in organ transplantation.

研究代表者

田中 友加 (Tanaka, Yuka)

広島大学・医系科学研究科(医)・准教授

研究者番号：90432666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ステロイドは、炎症、自己免疫性疾患など様々な病態治療において汎用されているが、副作用も多く、いまだに作用機構は不明な点が多い。臓器移植でも、拒絶反応の予防薬および急性細胞性拒絶反応(ACR)の治療薬として汎用される。しかしその効果は個体差があり、ACRの20-50%でステロイドパルス抵抗性を示す。

制御性T細胞(Treg)は、臓器移植における抗ドナー応答性T細胞の過剰な反応を制御する。本研究では、Treg細胞のマスター遺伝子であるFOXP3の遺伝子多型によるステロイド感受性の解析と臓器移植における関与解析を実施した。その結果、術後DSA発症との関連性にFOXP3-SNPが関連する可能性を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臓器移植後の拒絶反応の治療には、ステロイドパルスが第一選択として用いられる。移植以外の分野でもステロイドパルス療法は、その免疫抑制効果から経験的に使用されてきたが、免疫機構に対しての明らかなエビデンスは不明な点が多い。ステロイドレセプターを介した制御性T細胞の誘導・機能変化が明らかになれば、臓器移植のみならず自己免疫疾患、癌治療など制御性T細胞が関与する様々な病態において非特異的ステロイド療法に代わる新規治療法の開発へつながることが予測される。

研究成果の概要(英文)：Steroids are routinely widely used in the treatment of various pathological conditions such as inflammation and autoimmune diseases, but they have many side effects and the mechanism of action is still unclear. It is also widely used in organ transplantation as a preventive agent for rejection and a therapeutic agent for acute cellular rejection (ACR). However, the effect varies from individual to individual, and 20 to 50% of ACR shows steroid pulse resistance.

Regulatory T cells (Tregs) control the overreaction of anti-donor responsive T cells in organ transplants. In this study, we analyzed steroid sensitivity by gene polymorphism of FOXP3, which is a master gene of Treg cells, and analyzed its involvement in organ transplantation. As a result, it was obtained that FOXP3-SNP may be related to the association with the onset of postoperative DSA.

研究分野：移植免疫

キーワード：制御性T細胞 ステロイド 臓器移植 遺伝子多型

1. 研究開始当初の背景

ステロイドは、炎症、自己免疫性疾患など様々な病態治療において日常的に汎用されているが、副作用も多く、いまだに作用機構は不明な点が多い。臓器移植でも、拒絶反応の予防薬および急性細胞性拒絶反応 (ACR) の治療薬として各種免疫抑制薬とともに汎用される。しかし、その効果は個体差があり、ACR の 20~50% でステロイドパルス抵抗性を示す。現在まで、ステロイド抵抗性拒絶反応を予見・診断する特異的マーカーはなく、過剰なステロイド投与に伴う感染症の併発や慢性拒絶反応への移行などにより致命的病態に陥ることも経験される。

制御性 T 細胞 (Treg) は、臓器移植における抗ドナー応答性 T 細胞の過剰な反応を制御し、肝臓移植において移植グラフト内への浸潤が拒絶反応の抑制に寄与する可能性が報告されている。しかし、拒絶発症後の治療感受性と Treg との関連性は全く不明である。

2. 研究の目的

我々は、自己あるいはアロ抗原応答 T 細胞が活性化した状態において、ステロイドのパルス投与はステロイドレセプターを介した Treg の誘導および抑制機能の発揮に寄与しているのではないかと仮説を立てた。そこで、臓器移植後の同種異系 (アロ) 免疫応答におけるステロイドレセプターを介した Treg の誘導機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

1. 臓器移植後の de novo DSA 産生メカニズムにおける FOXP3-SNP の関与解析

我々は、肝臓移植において、術後細胞性急性拒絶反応発症率と FOXP3 のプロモーター領域の (rs3761547)[33499 A/G], (rs3761548)[3279 A/C], (rs2232365)[924 A/G] の SNP との関連性を解析し、拒絶反応発症率には差がないものの、(rs3761548)[3279 A/C] において A carrier を示す症例は全例ステロイド抵抗性拒絶反応であり、CC homozygote 症例は全例ステロイド感受性を示し、FOXP3 の遺伝子多型が個々のステロイドパルス感受性と相関することを発見した。また、移植後の de novo DSA の出現が 80% と高率であることを突き止めた。移植後の de novo DSA は術後長期における慢性拒絶反応や生命予後に影響する因子である。この結果が、腎臓移植においても関与するか腎臓移植症例の FOXP3 の遺伝子多型を解析し、術後拒絶反応や de novo DSA 発症との相関性を評価した。

2. アロ抗原応答性制御性 T 細胞の解析

健常人ボランティア末梢血単核球を用いて、抗 CD3/CD28 ビーズを用いた T 細胞刺激あるいは HLA のミスマッチボランティア単核球を stimulator としたリンパ球混合試験を行った。リンパ球混合試験は CFSE 蛍光色素とフローサイトメトリーを用いた CFSE-MLR アッセイで評価した。この培養系に、IL-2 を添加することで、拒絶反応を模倣した。さらに、本培養系にメチルプレドニゾン添加し、抗ドナー応答 T 細胞の抑制に加え、制御性 T 細胞の出現が培養早期に認められるか否かを評価した。

3. ステロイド受容体を介した FOXP3 機能制御における FOXP3 遺伝子多型の影響解析

実験 1 に示す通り、我々は、肝臓移植において、FOXP3 の遺伝子多型が個々のステロイドパルス感受性と相関することを発見した。そこで、実験 2 で実施した健常人ボランティアの実験結果が、FOXP3 遺伝子多型によって影響するか否かを評価した。

4. 研究成果

1. 臓器移植後の de novo DSA 産生メカニズムにおける FOXP3-SNP の関与解析

肝臓あるいは腎臓移植術後症例について、術後 5 年以内のドナー特異的抗体 (DSA) の発症頻度結果と、FOXP3 のプロモーター領域の (rs3761547)[33499 A/G], (rs3761548)[3279 A/C], (rs2232365)[924 A/G] の SNP との関連性を解析した。その結果、(rs3761548)[3279 A/C] において A carrier を示す症例は CC homozygote 症例に比べ、DSA 発症が高い傾向にあった (図 1)。その他の SNP との関連性は今回の解析では見いだせなかった。なお、肝臓移植での ACR に伴うステロイド感受性との関連を腎臓移植で検討を試みたが、ACR 発症率が少なく解析に至らなかった。移植後の de novo DSA は術後長期における慢性拒絶反応や生命予後に影響することが知られており、症例を重ねて相関を確認する必要があることが示唆された。

図 1 肝移植後 DSA 発症率 (5 年以内)

FOXP3-SNP	Total	de novo DSA	Frequency
CC	30	5	16.7%
A carrier	17	5	29.4%

腎移植後 DSA 発症率 (5 年以内)

FOXP3-SNP	Total	de novo DSA	Frequency
CC	65	8	12.3%
A carrier	17	4	23.5%

2. ドナー抗原応答性制御性T細胞の解析

末梢血における制御性T細胞の割合をフローサイトメトリーで解析し、FOXP3(rs3761548)[3279 A/C] SNPによる差を確認した。CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺で示されるTreg細胞の割合は、CC homozygoteよりむしろA carrierで多い傾向にあった(図2)。次に、健常人ボランティア末梢血単核球を用いて、抗CD3/CD28ビーズを用いたT細胞刺激に、IL-2を添加し、24~48時間培養後に、CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg細胞の誘導を検討した(各n=5)。培養24時間よりも48時間後にTreg細胞が増加したが、その存在率はA carrierがCC homozygoteに比べ高い結果であった。しかし、その誘導効率には個体差があり、有意差には至らなかった(図3)。また、HLAの異なる健常人ボランティアPBMCのリンパ球混合試験においても、FOXP3-SNPによる応答性の差は見られなかった。

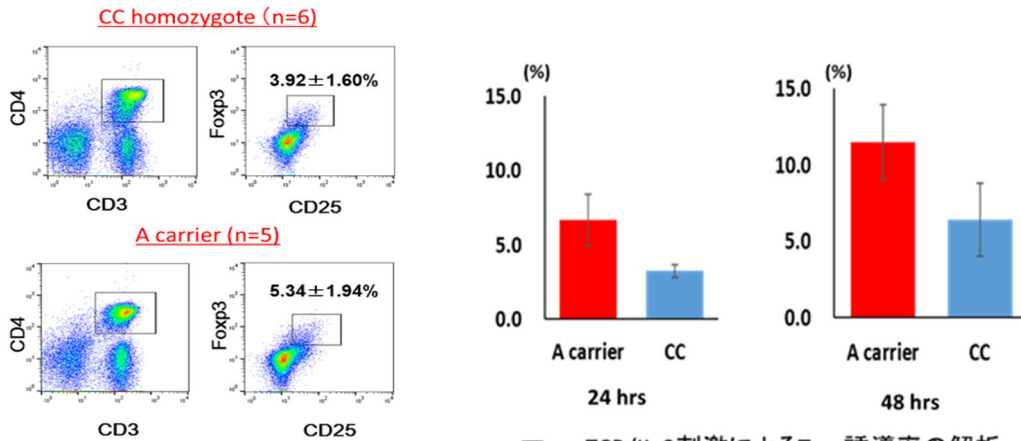


図2. 末梢血Treg細胞の存在比率

図3. TCR/IL-2刺激によるTreg誘導率の解析

3. ステロイド受容体を介したFOXP3機能制御におけるFOXP3遺伝子多型の影響解析

前述の培養系にステロイドを添加し誘導効率の違いを評価した。臓器移植後の拒絶治療薬として用いられるメチルプレドニゾロンを、通常免疫抑制維持量(1ug/ml)、パルス濃度(10ug/ml)で添加した。また、T細胞刺激は抗CD3/CD28Beads刺激とともにHLAの異なる同種異系(アロ)PBMCをstimulatorとしたアロ刺激で実施した。拒絶状態を模倣するために、IL-2を1000U/mlで添加した。4日間培養後の分裂応答性T細胞ポピュレーションにおけるTreg細胞存在をステロイド非添加群を1とした場合の比率で評価すると、ステロイド添加量に応じてreactive Treg細胞は増加傾向にあった。この傾向は、A carrier群に対し、CC群で強く、また、抗CD3/CD28Beadsによる非特異的T細胞刺激に比べ、HLAミスマッチのアロ細胞刺激に対しての誘導能がより強く反映される結果であった(図4,5)。

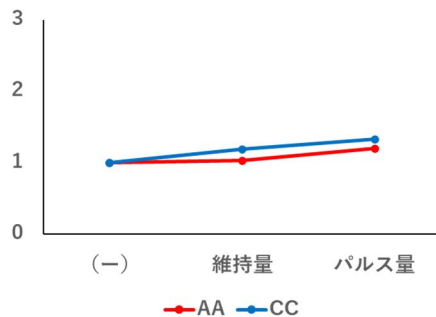


図4. ステロイド添加によるTreg細胞増殖実験(抗CD3/CD28刺激)

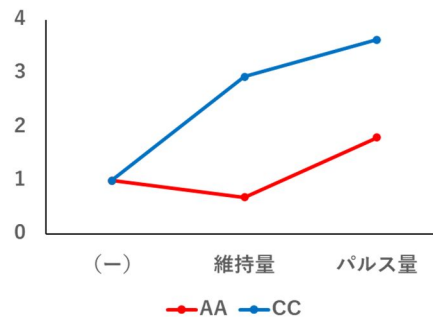


図5. ステロイド添加によるTreg細胞増殖実験(アロPBMC刺激)

ただし、今回の検討では、SNPによる個体差の優位性は確認できなかった。今後は、肝臓移植による拒絶反応でのサイトカイン条件や、グラフト内と末梢血循環細胞との機能性について詳細に検討し、これらを反映するモデルによるさらなる検討が必要と思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中友加、大平真裕、田原裕之、井手健太郎、黒田慎太郎、小林剛、大段秀樹
2. 発表標題 免疫モニタリングとゲノム情報による個別化療法
3. 学会等名 第37回日本肝移植学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中友加、井手健太郎、山根宏昭、田原裕之、大平真裕、森本博司、大段秀樹
2. 発表標題 臓器移植後のde novo DSA発症におけるFoxp3遺伝子多型の影響
3. 学会等名 第28回日本組織適合性学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中友加、山根宏昭、井手健太郎、大平真裕、田原裕之、森本博司、田中飛鳥、秋本修志、今岡祐輝、佐藤幸毅、黒田慎太郎、小林剛、大段秀樹
2. 発表標題 臓器移植後DSA産生におけるゲノム情報と免疫学的個体差の解析
3. 学会等名 第55回日本移植学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大平真裕、今岡祐輝、佐藤幸毅、井出隆太、築山尚史、小野紘輔、山根宏昭、谷峰直樹、田原裕之、井手健太郎、小林剛、田中友加、大段秀樹
2. 発表標題 肝臓移植におけるDSA症例の検討
3. 学会等名 第56回日本移植学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野紘輔、谷峰直樹、築山尚史、井出隆太、佐藤幸毅、山根宏明、今岡祐輝、秋本修志、田原裕之、大平真裕、井手健太郎、小林剛、田中友加、大段秀樹
2. 発表標題 リンパ球混合試験を用いた免疫モニタリングの肝移植免疫抑制漸減に関するCross-sectional study
3. 学会等名 第56回日本移植学会総会
4. 発表年 2020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
研究分担者	大段 秀樹 (Ohdan Hideki) (10363061)	広島大学・医系科学研究科(医)・教授 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------