

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16265

研究課題名(和文) 抗CD80/86抗体により誘導される免疫寛容維持機序の解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms of immunotolerance induced by anti-CD80/86 antibodies

研究代表者

内山 雅照(Uchiyama, Masateru)

帝京大学・医学部・助教

研究者番号：60713295

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)：研究成果の概要は以下の3点である。CD80/86抗体によって、アロ反応が制御性T細胞以外の細胞群によって制御可能である。CD80/86抗体はB細胞の活性化を抑制し、ドナー特異的抗体の産生抑制を誘導する。CD80/86抗体によって誘導されたCD4+アナジー細胞は、アロ反応抑制だけでなく、DSA産生抑制効果も持つ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臓器移植術という究極的な治療において、最も重要なことは如何に移植臓器と折り合いをつけ、長期にわたり機能不全を起こさないようにするかである。現在も、それを達成するために、基本的な拒絶反応治療薬であるステロイドを始めとする非特異的な免疫抑制剤が使用されるが、副作用や新規悪性腫瘍などの多くの問題を抱えている。当検討において判明したCD80/86抗体による免疫寛容維持の機序の解明は、ドナー特異的な拒絶反応に対する治療、つまりオーダーメイド治療に繋がると考えられる。もちろん、この抗体のみですべての臓器移植に関する治療が完結するわけではないが、免疫抑制剤の減量に繋がる重要な知見を含む検討であると思われる。

研究成果の概要(英文)： The CD80/86 antibodies could control allo-proliferation through a specific cell population other than Treg.

The CD80/86 antibodies could induce the downregulation of a donor-specific antibody through B cell suppression.

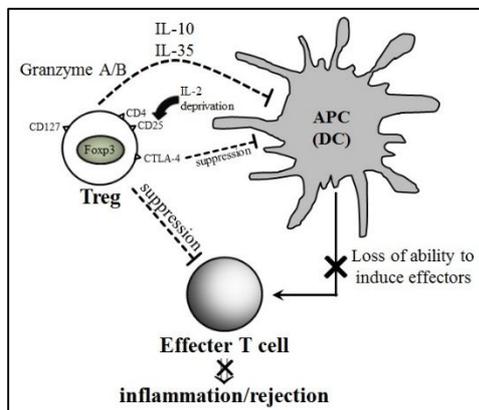
CD80/86-induced CD4+ anergy T cells show the suppression of allo-proliferation and a donor-specific antibody.

研究分野：移植免疫学

キーワード：移植免疫学 CD80/86 制御性T細胞 養子移植 ドナー特異的抗体 アナジー細胞 免疫寛容 マウス
心臓移植

1. 研究開始当初の背景

1990 年前半、右図に示すような免疫制御細胞に興味を持っていた研究者は殆どいなかった。しかし、免疫制御細胞の存在自体は、脾細胞を無処置のレシピエントに移入し、心臓移植をすると移植片の拒絶期間が有意に延長することから確認されていた。その後、免疫反応の抑制機能に特化した T 細胞の存在仮説 (J Immunol. 1995) が提唱されて以来、移植免疫学における『免疫寛容の誘導』に関する多くの報告が毎年出されている。Treg に関していえば、人工的に作成した誘導性 Treg は転写因子 Foxp3 を発現し、内在性 Treg に類似した機能を持っているが、Foxp3 の発現に不安定さがあり (Immunity. 2009) Treg 内の Foxp3 を如何に安定的に発現させるかが焦点となっている。つまり、安定した Foxp3 陽性 Treg による免疫寛容がどのように維持されるのかを解明することが臨床応用への一歩と考えられている。



誘導性 Treg は転写因子 Foxp3 を発現し、内在性 Treg に類似した機能を持っているが、Foxp3 の発現に不安定さがあり (Immunity. 2009) Treg 内の Foxp3 を如何に安定的に発現させるかが焦点となっている。つまり、安定した Foxp3 陽性 Treg による免疫寛容がどのように維持されるのかを解明することが臨床応用への一歩と考えられている。

2. 研究の目的

制御性 T 細胞 (以下、Treg) が免疫抑制、免疫寛容の中心であると提唱され (Wood KJ and Sakaguchi S. Nature Rev Immunol 2003;3:199-210) 10 数年が経過した。仮に、Treg が免疫抑制の主役であると仮定して、特定抗原に対して寛容を示す Treg が新たに胸腺から供給される naïve T 細胞を教育しているのか否かは解明されていない。また、移植された免疫寛容な Treg がどこに移動し、どのように作用しているかも解明されていない。当研究ではマウス心臓移植モデルを用いて、抗 CD80/86 抗体により誘導された Treg による免疫寛容がどのように維持されるのかについて調査、解析する。

3. 研究の方法

概要：実験モデルはマウスの異所性心臓移植モデルである。方法は原著論文 (J Heart Lung Transplant 2001;20(10):1123-8.) で詳細に記載されている。マウス心臓移植モデルを用いて、Treg による naïve T 細胞への寛容伝達 (教育) を in vitro で確認し、移入した免疫制御細胞の体内動態を調査することで、免疫寛容の維持を解明する。

1 年目 (2018 年) はマウス移植心の生着延長期間の測定と制御性 T 細胞の誘導の確認を中心に行った。マウス心臓移植モデル (レシピエント B6 マウス、ドナー Balb/c マウス使用) に CD80/86 抗体を術後 5 日間毎日腹腔内投与し、100 日以上長期生着群の作成を行った。長期生着心臓をもつマウスの脾臓を採取し、CD3 や CD4、Foxp3 陽性細胞絶対数・割合の測定をした。

2 年目 (2019 年) は 2018 年度の長期生着プロトコルを基に、CD80/86 抗体を投与し 30 日以上生着した心臓移植マウスの脾臓から CD4 陽性 CD25 陽性細胞を分離し、Adoptive transfer を行った。また、定期的にドナー特異的抗体 (以下、DSA) を測定し、抗体関連拒絶反応が抑制されているかどうかを調査した。さらに、GFP マウスによる transfer cell の体内同定も調査した。

3 年目 (2020 年) は CD4 陽性 CD25 陽性細胞の Adoptive transfer 実験の結果を踏まえ、CD4 陽性細胞のみの Adoptive transfer を施行した。また、2 年目と同様に DSA の測定も継続し

た。

4. 研究成果

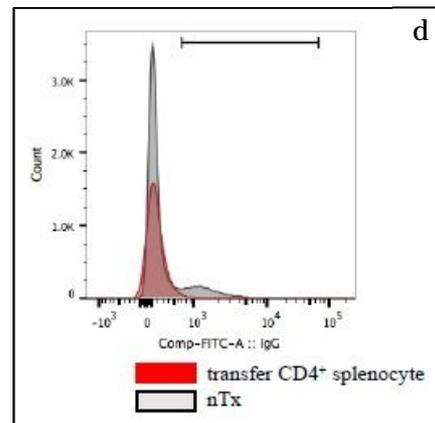
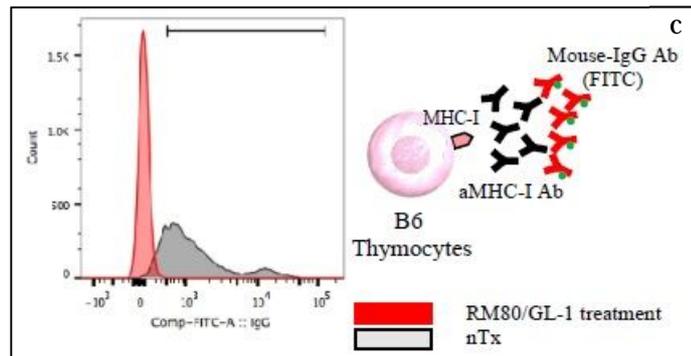
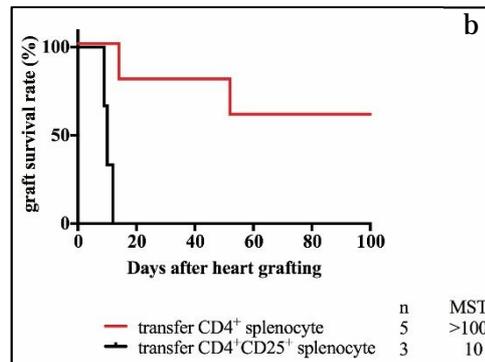
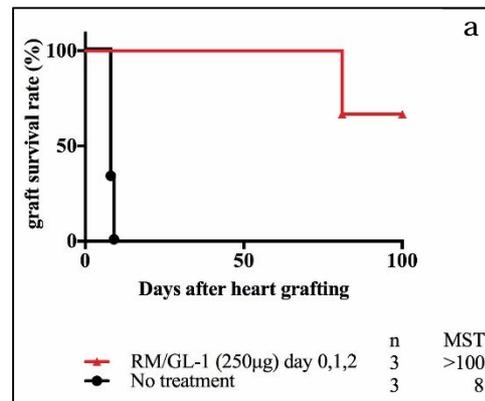
マウス心臓移植モデルに対して CD80/86 抗体を用いた当検討では、100 日以上の上着延長期間を誘導可能であった(右 a 図)。30 日状の上着延長を可能にした機序の解析の中で、当モデルで免疫寛容のカギとなる CD4+CD25+Treg は全く増加していないことが判明した。念のために、モデル内に誘導された Treg の機能評価の Adoptive transfer を行ったが、この Treg を移植された心臓移植モデルは上着延長を呈さなかった(右中図)。つまり、この Treg は免疫寛容作用を示していなかった。次に、上着延長マウスから CD4+T 細胞のみを Adoptive transfer したところ、100 日以上の上着延長を認めた(右 b 図)。この結果から、この CD80/86 抗体投与によって、ドナーに対するアロ反応性が Treg 以外の機序で制御されていることが判明した。この細胞の詳細な解析は当検討では行えなかったが、今までの免疫学の知見からこの細胞はアナジ-T 細胞と想定している。

また、この抗体投与による移植片上着延長効果の機序として、ドナー特異的抗体の産生抑制が判明した。ドナーマウスの胸腺細胞を用いて、レシピエントマウス血清内に産生された抗 MHC-I ドナー特異的抗体を測定したところ、無治療群と比べ明らかに DSA 産生が抑制されていた(右 c 図)。

この産生抑制効果は、機能的な Treg の誘導を来さなかったという結果、つまり樹状細胞からの抗原提示時に T 細胞へのシグナルがこの CD80/86 抗体によって阻害、もしくは negative signal として入力された結果と判断すれば、T 細胞を介した B 細胞の活性化の抑制に起因したものと考えられた。さらに、この DSA 産生抑制効果が抗体の効果以外に、上記 CD4+T 細胞に因るものかどうかとも調査した。右 d 図に示したように、抗体を投与した上着延長マウスの CD4+アナジ-T 細胞を Adoptive

transfer すると、CD80/86 抗体が存在しないにもかかわらず、移植 1 週間後の DSA 産生抑制が認められた。以上の結果から、この抗体により誘導される免疫寛容維持は、CD4+アナジ-T 細胞によるアロ抑制と同時に B 細胞抑制による DSA 産生抑制によって維持されると考えられた。

この検討内では、アナジ細胞のさらなる表面マーカーや細胞内因子の特定までは調査できなかった。また、adoptive transfer による細胞移植によって DSA が制御可能であった期間は 2 週



間程度であり、1回の細胞投与で完全なる免疫寛容に至ったわけではなかった。今後の検討では上記の内容を解明していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Adigbli George, Hua Peng, Uchiyama Masateru, Roberts Irene, Hester Joanna, Watt Suzanne M., Issa Fadi	4. 巻 12
2. 論文標題 Development of LT-HSC-Reconstituted Non-Irradiated NBSGW Mice for the Study of Human Hematopoiesis In Vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 642198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.642198	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 該当する
1. 著者名 Keiichi Fujimoto, Koichiro Uchida, EnzhiYin, Jun Zhu, Yuko Kojima, Masateru Uchiyama, Yasuto Yamamoto, Hisashi Bashuda, Ryu Matsumoto, Koji Tokushige, Masaki Harada, Takenori Inomata, Jiro Kitaura, Akira Murakami, Ko Okumura, Kazuyoshi Takeda.	4. 巻 67
2. 論文標題 Analysis of therapeutic potential of monocytic myeloid-derived suppressor cells in cardiac allotransplantation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transplant Immunology	6. 最初と最後の頁 101405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.trim.2021.101405.	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 Atsushi Yamamoto, Joanna Hester, Philip S. Macklin, Kento Kawai, Masateru Uchiyama, et al.	4. 巻 129
2. 論文標題 Systemic silencing of Phd2 causes reversible immune regulatory dysfunction.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Invest	6. 最初と最後の頁 793-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI124099.	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Mitsuru Iida, Masateru Uchiyama, Tomoki Shimokawa.	4. 巻 43
2. 論文標題 A Successful Case of Percutaneous Left Ventricular Assist Device "Impella" to Post-Myocardial Infarction Ventricular Septal Perforation in Japan.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Artificial Organs	6. 最初と最後の頁 806-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/aor.13434.	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Mitsuru Iida, Kenji Nishimura, Kaori Kono, Ken Chen, Tsukasa Ikeda, Hiroo Ota, Masateru Uchiyama, Naomi Ozawa, Tomohiro Imazuru, Tomoki Shimokawa	4. 巻 6
2. 論文標題 The Early Outcome of Aortic Valve Replacement Surgery for Dialysis Patients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cardiol Ther	6. 最初と最後の頁 793-7
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 有
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 -

1. 著者名 Enzhi Yin, Masanori Hara, Masateru Uchiyama, Masanori Niimi	4. 巻 50
2. 論文標題 Graft protective effect of HMG-CoA reductase inhibitor Pravastatin in murine cardiac allograft transplantation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 2804-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transproceed.2018.05.029.	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Enzhi Yin, Shigefumi Matsuyama, Masateru Uchiyama, Kento Kawai, Masanori Niimi	4. 巻 -
2. 論文標題 Graft Protective Effect and Induction of CD4+Foxp3+ cell by Thrombomodulin on allograft arteriosclerosis in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cardiothoracic Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13019-018-0731-8.	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Kento Kawai, Masateru Uchiyama, Joanna Hester, Kathryn Wood, Fadi Issa	4. 巻 79
2. 論文標題 Regulatory T cells for tolerance	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Human Immunology	6. 最初と最後の頁 294-303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.humimm.2017.12.013.	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Yasuto Yamamoto, Masateru Uchiyama, Kazuhito Iguchi, Kento Kawai, Tomohiro Imazuru, Masafumi Kawamura, Tomoki Shimokawa	4. 巻 54
2. 論文標題 Effects of Glycyrrhizic Acid in Licorice on Prolongation of Murine Cardiac Allograft Survival.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 476-481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transproceed.2021.12.009.	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Kento Kawai, Masateru Uchiyama, Joanna Hester, Fadi Issa*	4. 巻 21
2. 論文標題 IL-33 drives the production of mouse regulatory T cells with enhanced in vivo suppressive activity in skin transplantation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Transplantation	6. 最初と最後の頁 978-992
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ajt.16266.	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Yin E, Uchiyama M, Niimi M.	4. 巻 50
2. 論文標題 Rikkunshito (TJ-43) Improved Reduction of Food Intake in Murine Cardiac Transplant	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 283-292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transproceed.2017.12.022.	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Yin E, Uchiyama M, Niimi M.	4. 巻 50
2. 論文標題 Induction of Regulatory CD4+ Cells and Prolongation of Fully Major Histocompatibility Complex Mismatched Murine Cardiac Allograft by Shigyakusan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 274-282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transproceed.2017.12.021.	査読の有無 有
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11件(うち招待講演 0件/うち国際学会 9件)

1. 発表者名 Yasuto Yamamoto, Masateru Uchiyama, Koichiro Uchida, Hideo Yagita, Masanori Niimi.
2. 発表標題 Agonistic anti-CD272 antibody (6B2) suppressed donor specific antibody through inducible regulatory T cells.
3. 学会等名 American Transplant Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本 康人、内山 雅照、新見正則
2. 発表標題 マウストレッドミル運動モデルを用いた芍薬甘草湯による筋肥大抑制効果とCD8陽性細胞の機能抑制効果
3. 学会等名 日本獣医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasuto Yamamoto, Masateru Uchiyama, Enzhi Yin, and Masanori Niimi.
2. 発表標題 Anti-CD272 Antibody (6B2) Induced Indefinite Survival of Fully MHC-Mismatched Murine Cardiac Allograft.
3. 学会等名 アメリカ移植学会(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本康人、内山雅照、八木田秀雄、新見正則
2. 発表標題 抗BTLA抗体によるマウス移植心の生着延長効果について
3. 学会等名 第162回 日本獣医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuto Yamamoto, Hiroko Ochiai, Masateru Uchiyama and Masanori Niimi.
2. 発表標題 Effects of Shinrin-yoku to alloimmune responses in murine model.
3. 学会等名 第16回 アジア移植学会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuto Yamamoto, Masateru Uchiyama, Koichiro Uchida, Hideo Yagita, Masanori Niimi
2. 発表標題 Anti-CD272 antibody (6B2) generated Foxp3+ regulatory T cells and suppressed donor specific antibody in murine cardiac transplant model.
3. 学会等名 American Transplant Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuto Yamamoto, Koichiro Uchida, Masanori Niimi, Masateru Uchiyama
2. 発表標題 Anti-CD80/86 Antibody (RM80/GL-1) Suppressed Donor Specific Antibody
3. 学会等名 第17回 アジア移植学会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuto Yamamoto, Masanori Niimi, Masateru Uchiyama
2. 発表標題 Saireito Suppressed Donor-Specific Antibody in a Murine Cardiac Allograft Transplant Model
3. 学会等名 第17回 アジア移植学会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuhito Iguchi, Yasuto Yamamoto, Masateru Uchiyama, Tomoki Shimokawa
2. 発表標題 Evaluation of Cardiac Graft Function by Echocardiography in Mice
3. 学会等名 第17回 アジア移植学会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuto Yamamoto, Masateru Uchiyama, Masanori Niimi
2. 発表標題 Saireito induced the suppression of donor-specific antibody in a murine cardiac allograft transplant model
3. 学会等名 ヨーロッパ移植学会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuto Yamamoto, Koichiro Uchida, Kazuhito Iguchi, Hiroo Ota, Hironori Masaoka, Tomohiro Imazuru, Masateru Uchiyama.
2. 発表標題 Anti-CD80/86 Antibody (RM80/GL-1) Suppressed murine Donor Specific Antibody through anergy CD4+ T cells.
3. 学会等名 アメリカ移植学会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

・帝京大学医学部 外科学・心臓血管外科学講座 移植免疫・腫瘍免疫研究室
<https://teikyo-trig.amebaownd.com/>
 ・research map
<https://researchmap.jp/mautiya/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------