

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18066

研究課題名(和文) 骨髄由来抑制細胞による制御性T/B細胞誘導を用いた移植免疫寛容誘導に関する研究

研究課題名(英文) Tolerance Induction in Organ Transplantation by Myeloid-Derived Suppressor Cells through Recruitment of Regulatory T and B cells

研究代表者

中村 緑佐 (NAKAMURA, TSUKASA)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30777959

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)：骨髄由来免疫抑制細胞 Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) は未熟な骨髄由来細胞で免疫抑制効果を示し、制御性T細胞やB細胞を誘導するため、拒絶反応、過剰免疫抑制が問題となる臓器移植領域で応用が期待される。

マウス心臓移植術後にMDSCs輸注をすることで制御性T/B細胞誘導とともに、移植臓器を障害する抗体産生が明らかに抑制され、組織学的にも移植臓器に対する拒絶反応抑制の効果を認め、移植臓器生存期間は無治療群 $8.1 \pm 0.9$ 日に比較し $24.1 \pm 3.8$ 日へ延長を認めた。臓器移植におけるMDSCsによる拒絶反応抑制効果が確認され、臨床応用が期待される結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臓器移植において拒絶反応の制御は最重要課題の一つである。免疫調節能を持つ細胞として制御性T細胞が従来から注目されているが、単独効果での免疫寛容誘導は種々の報告からも難しい可能性がある。一方、近年免疫抑制効果を持つ、MDSCsが免疫抑制、寛容誘導に重要な役割を担っている可能性がある。本研究成果はMDSCsが臓器移植において抗体産生を抑制することを明らかにし、その結果、移植臓器生存期間の延長につながることを示唆した。既存報告と併せ、MDSCsは細胞性拒絶反応、抗体関連型拒絶反応共に制御することを示した。今後、臨床での免疫抑制剤の減量、拒絶反応の治療、また免疫寛容誘導への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) are heterogenous myeloid-origin population which potentially suppresses immunological rejection in the field of transplantation. A recipient C3H mouse received a cardiac graft from a Balb/C mouse. In the untreated group, both class I and II DSA production in serum were confirmed on post-operative days (POD) 10. Upon POD 10, Intra-graft class I DSA deposition was clearly observed, whilst class II DSA started to accumulate. On the other hand, monocytic MDSCs (Ly6G<sup>-</sup>/Ly6C<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>) were isolated from the spleens of rapamycin-treated C3H recipient mice on POD 7. These MDSCs were transferred just before reperfusion and on POD 2. As a result, the indices of both class I and II DSA in serum were significantly lower on POD 10. Subsequent intra-graft DSA deposition was also notably suppressed. Taken together, the transfer of MDSCs may postpone DSA production. Consequently, the graft survival was prolonged ( $8.1 \pm 0.9$  vs.  $24.1 \pm 3.8$ )

研究分野：臓器移植

キーワード：臓器移植 骨髄由来免疫抑制細胞 免疫寛容

## 1. 研究開始当初の背景

臓器移植領域において細胞性拒絶は免疫抑制剤の発展とともに良好に制御が可能となっている。しかし、抗体関連拒絶については現在でも制御は不十分であり臨床臓器移植において長期生着を阻む最大の問題となっており、その制御が非常に重要な課題となっている。我々はマウス心移植における Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) の免疫寛容誘導における役割について検討し、その中でも Monocytic MDSCs 誘導により移植臓器生着期間の延長、CD4<sup>+</sup>制御性T細胞(Tregs)を誘導する能力を有することを報告した。さらに Monocytic MDSCs による免疫調節効果を持つ IL-10<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Tregs, 制御性 B 細胞(Bregs)の誘導作用も示され MDSCs の免疫寛容誘導への一助である可能性があると考えられた。

## 2. 研究の目的

固形臓器移植における MDSCs の動態を調べた報告は散見されるが、本申請課題のように臓器移植モデルでの Tregs および Bregs との関連に着目した検討は過去に例はない。またグラフト内抗 MHC 抗体の検出での評価を行なっている研究も他に例はない。それらによる臓器移植モデルでの抗体関連拒絶に対する影響を解明し、抗体関連型拒絶反応制御を目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1. Ex vivo における Monocytic MDSCs の B 細胞への影響

6 週齢雌の C3H マウスをレシピエント、6 週齢雌の Balb/c マウスをドナーとして、異所性同種心移植モデルを作製し、(Nakamura T et al. 2015, Am J Transplant, 15:2364-2377)を参考に Rapamycin 腹腔内投与にて治療を行ったレシピエントまたは PBS 投与レシピエントより Magnetic Activated Cell Sorting(MACS)により Ly6G<sup>-</sup>/Ly6C<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>と定義される Monocytic MDSCs を分離する。

(1) B 細胞 を CFSE 染色し、F(ab')<sub>2</sub> IgM fragment/CpG oligodeoxyribonucleotides により刺激する。MDSCs 無付加群に加え、Monocytic MDSCs と 1:4, 1:2, 1:1 の比率になるように共培養を実施し、Monocytic MDSCs が B 細胞分裂に与える影響を検討する。また、培養液上清中の IgM 濃度を測定することで抗体産生抑制効果を検討する。

(2) B 細胞 + MDSCs 無付加群(2) B 細胞+ Rapamycin 治療群由来 Monocytic MDSCs 培養後に B 細胞の表現系を割合、絶対数をフローサイトメーター、また産生サイトカインを Cytometric Beads Assay(CBA)法解析する。

4. Monocytic MDSCs の Effector とされる iNOS による B 細胞への影響を判定する為、L-NG monomethyl arginine citrate (L-NMMA ( iNOS 阻害剤 )) 500 μM を加え影響を検討する。

### 2. 移植臓器内抗 MHC 抗体検出法の確立 (マウス心移植モデル)

現在、血清中の DSA(s-DSA) (ドナー特異的抗体) 及び病理学的な変化から抗体関連拒絶の診断を行う事が主流であるが、DSA 産生が少量である場合は、移植臓器への抗



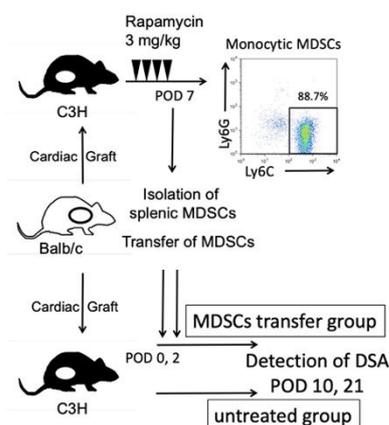
体付着により血清中には検出されない例があり、また病理学的所見は軽微な場合や、他病変の混在により診断困難例も存在する。そこで我々は臨床臓器移植において移植臓器内抗 MHC 抗体の迅速かつ正確な検出法を考案した。(Nakamura T et al., Immunol Invest, 2017; 3: 295-304.)。抗体関連拒絶に関する研究の推進の為にマウスで同様に抗 MHC 抗体の検出法は非常に重要であると考えられ、その手法を確立する。

#### 1. ビーズの作製, マウス血球での ICFA 法の確立

市販の種々の抗マウス MHC モノクローナル抗体の反応性の確認(Class I H-2K, H-2D, H-2L, Class II H-2A, H-2E を区別することを目標とする)を行い、良好な結果を得た抗体を Luminex で検出可能なビーズに結合させる(Wakunaga, Graft Immunocomplex Capture Fluorescence Analysis 法と同様に作製する。)

### 3. マウス心移植モデルでの Monocytic MDSCs の B 細胞への効果の検討

MDSCs の Bregs の誘導を心移植モデルにおいてその効果を検討するため Balb/c マウスをドナーとし C3H マウスに心移植を実施し、POD 0, 2, 4, 6 に 3 mg/kg rapamycin にて加療後、脾臓摘出し MACS にて Monocytic MDSCs を分離し新たなレシピエント C3H へ POD0 再灌流後にグラフト冠動脈より  $2.0 \times 10^6$  個、POD2 に  $2.0 \times 10^6$  個を静脈輸注する(右図)。無治療群、Monocytic MDSCs 輸注群において心移植後のグラフト生存、脾臓中 Bregs 存在率、g-DSA、心グラフト H&E 染色における微小血管炎を中心とした拒絶所見を検討、血中 IgG/M 濃度について比較検討する。



#### 4. 研究成果

##### Ex vivo

MDSCs の B 細胞への影響を判断するために、F(ab')<sub>2</sub> IgM fragment/CpG oligodeoxyribonucleotides にて活性化された B 細胞 (CFSE 染色) と Rapamycin 腹腔内投与にて治療を行ったレシピエントから MACS により分離された Monocytic MDSCs を共培養したところ MDSCs 細胞数依存的に B 細胞の分裂を抑制した。共培養中に L-NMMA を 1mM 追加したところ MDSCs の B 細胞に対する増殖抑制効果は部分的に拮抗されたことから Monocytic MDSCs が産生する iNOS は B 細胞に対しても抑制的に働くことが示された。B 細胞に対する影響を判断するために培養液中の IgM 濃度を測定した。Monocytic MDSCs 共培養群において B 細胞の CD27<sup>high</sup>/CD38<sup>high</sup>/CD138<sup>+</sup> 形質細胞への分化を抑制し、IgM 産生が有意に減少した。また共培養により B 細胞表面上の PD-L1 発現頻度が上昇し、Cytometric Beads Assay 法にて B 細胞中の IL-10 産生が増加したことから Monocytic MDSCs は B 細胞に対して免疫調節効果を持つ Bregs へと誘導する効果を持つと考えられた。

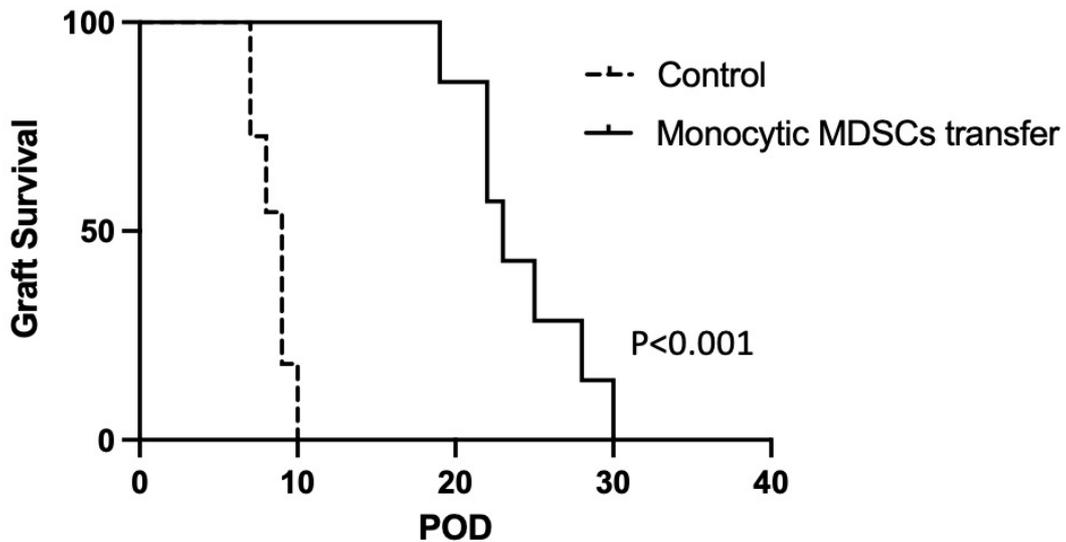
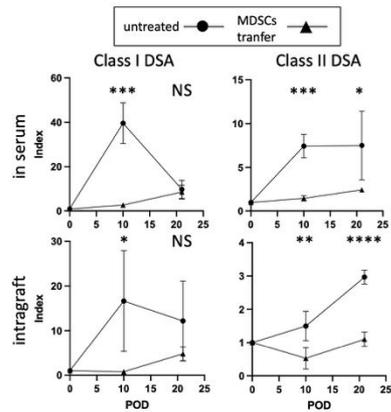
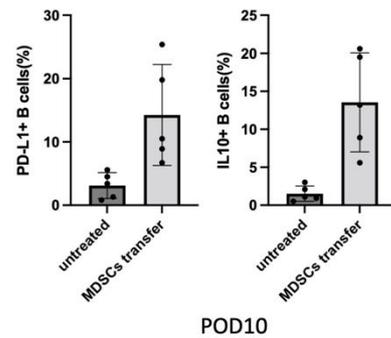
##### In vivo

移植臓器内抗 MHC 抗体の迅速かつ正確な検出法として ICFA 法を使用した。前感作の無いマウス心移植後 (アログラフト) 自然経過では術後 3 週の時点では Class I/II とともに Donor Specific anti-MHC antibody の産生を認め、上記の手法で移植グラフト内の MHC に特異的に結合、補体結合性を持ち抗体関連型拒絶反応に至ることが確認された。

移植術後の周術期に Monocytic MDSCs 輸注をすることで POD10 にはレシピエント脾臓内で PD-L1<sup>high</sup>/IL10<sup>+</sup> Bregs 誘導とともに(右図) 術後 10 日には血清中 class I/II DSA 産生量低下と共にアログラフト内 class I/II DSA 蓄積が抑制された(右下図)。

結果、組織学的にもアログラフトに対する拒絶反応抑制の効果を認め、グラフト生存期間は無治療群 8.1±0.9 日に比較し 24.1±3.8 日へ延長を認めた(p<0.001) (下図)。我々の以前の検討でレシピエントへの L-NMMA また anti-Gr-1 の投与によりグラフト生存期間の延長効果は消失することを確認しており、Monocytic MDSCs による Tregs への誘導効果のみならず Bregs への効果も消失することによる結果と判断された。

臓器移植における Monocytic MDSCs による拒絶反応抑制効果が確認され、臨床応用が期待される結果であった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 中村緑佐	4. 巻 35
2. 論文標題 臓器移植における骨髄由来免疫抑制細胞の役割	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BioClinica	6. 最初と最後の頁 61-64
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 Nakamura, T., Shirouzu, T., Nakata, K., Yoshimura, N., Ushigome, H.	4. 巻 20
2. 論文標題 The Role of Major Histocompatibility Complex in Organ Transplantation - Donor Specific Anti-Major Histocompatibility Complex Antibodies Analysis Goes to the Next Stage -	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4544-4565
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20184544	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 Nakamura, T., Shirouzu, T., Kawai, S., Matsuyama, T., Harada, S., Nobori, S., et al.	4. 巻 51
2. 論文標題 Graft Immunocomplex capture fluorescence analysis can detect intra-graft anti MHC antibodies in mice cardiac transplantation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transplant Proceedings	6. 最初と最後の頁 1531-1535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transproceed.2019.01.114	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 Nakamura, T., Shirouzu, T., Kawai, S., Imanishi, Y., Matsuyama, T., Harada, S. et al.	4. 巻 51
2. 論文標題 Detection of Intra-Graft Anti-Blood Group A/B Antibodies following Renal Transplantation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transplant Proceedings	6. 最初と最後の頁 1371-1377
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transproceed.2019.01.128	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 Nakamura, T., Yoshimura, N., Akioka, K., Shirouzu, T., Kawai, S., Imanishi, Y. et al.	4. 巻 51
2. 論文標題 Clearance of Intra-graft Donor Specific Anti-HLA Antibodies in the Early Stage of Antibody-Mediated Rejection following Rituximab and Apheresis Therapy in Renal Transplantation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transplant Proceedings	6. 最初と最後の頁 1365-1370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transproceed.2019.01.126	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 Nakamura, T., Shirouzu, T., Harada, S., Sugimoto, R., Nobori, S., Yoshikawa, M. et al.	4. 巻 105
2. 論文標題 The Abundance of Anti-Galactose-deficient IgA1 Autoantibodies Results in Glomerular Deposition and IgA Nephropathy Recurrence after Renal Transplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transplantation	6. 最初と最後の頁 407-408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/TP.00000000000003879	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 Nakamura, T., Nobori, S, Harada, S., Sugimoto, R., Yoshikawa, M., Ushigome, H., et al.	4. 巻 54
2. 論文標題 Single vs Multiple Artery Reconstruction in Living Donor Liver Transplantation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 399-402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transproceed.2021.08.069	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 Nakamura, T., Shirouzu, T., Kawai, S., Sugimoto, R., Harada, S., Yoshikawa, M. et al.	4. 巻 54
2. 論文標題 Intra Liver Allograft C3d Binding Donor Specific anti HLA Antibodies Predict Rejection After Liver Transplantation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 450-453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transproceed.2021.08.065	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 Nakamura, T., Nobori, S, Harada, S., Sugimoto, R., Yoshikawa, M., Ushigome, H., et al.	4. 巻 54
2. 論文標題 The impact of the donors and the recipients age on the outcomes of living-donor liver transplantation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 438-442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transproceed.2021.08.068	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 Nakamura, T., Shirouzu, T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Antibody-Mediated Rejection and Recurrent Primary Disease: Two Main Obstacles in Abdominal Kidney, Liver, and Pancreas Transplants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 5417-5446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm10225417	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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Tsukasa Nakamura
2. 発表標題 The Index of Intra-graft Donor Specific Anti-HLA Antibodies Predicts Responsiveness to Rejection Therapies.
3. 学会等名 American Society for Histocompatibility & Immunogenetics (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村緑佐
2. 発表標題 グラフトICFA法によるグラフト内ドナー特異的抗HLA抗体検出の有用性
3. 学会等名 日本移植学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村緑佐
2. 発表標題 DSAに対する新たな取り組み～血清DSAからグラフト内DSA検出へ～
3. 学会等名 腎移植血管外科研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakamura, T., Shirouzu, T., Kawai, S., Sugimoto, R., Harada, S., Yoshikawa, M. et al.
2. 発表標題 Intra Liver Allograft C3d Binding Donor Specific anti HLA Antibodies Predict Rejection After Liver Transplantation.
3. 学会等名 Congress of the Asian Society for Transplantation（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nakamura, T., Nobori, S, Harada, S., Sugimoto, R., Yoshikawa, M., Ushigome, H.
2. 発表標題 Single vs Multiple Artery Reconstruction in Living Donor Liver Transplantation.
3. 学会等名 Congress of the Asian Society for Transplantation（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nakamura, T., Nobori, S, Harada, S., Sugimoto, R., Yoshikawa, M., Ushigome, H.
2. 発表標題 The impact of the donors and the recipients age on the outcomes of living-donor liver transplantation.
3. 学会等名 Congress of the Asian Society for Transplantation（国際学会）
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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