

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2013

課題番号：21390446

研究課題名(和文) Tregバンク(CD28SA+幹細胞共培養)免疫寛容+MF1導入：移植腎永久生着

研究課題名(英文) Novel approach of induction of donor specific immune tolerance: adoptive transfer of Treg cells combined with MF1 gene transfection

研究代表者

東 治人 (Azuma, Haruhito)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：40231914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円、(間接経費) 3,960,000円

研究成果の概要(和文)：HGFとMSPのキメラであるMF-1遺伝子を、レンチウイルスベクター(アデノウイルス並みの使いやすさ、および、安全で高率にゲノム内に遺伝子導入が可能)、および、超音波照射用造影剤(オプチゾン)を併用したレンチウイルス超音波照射遺伝子導入法を新しい腎組織遺伝子導入法として確立した。また、この新規遺伝子導入法によってMF-1遺伝子を移植腎組織ゲノム内に導入することによって、Tregバンクから投与された非特異的な免疫制御細胞を移植腎内で増殖させ、免疫寛容誘発率を有意に向上させた。

研究成果の概要(英文)：We have developed a novel approach of highly effective gene transfection technique using lenti-virus vector combined with ultrasound mediated gene transfection procedure. We have performed successful gene transfection of metron factor, which is the engineered chimeric factors containing selected functional domains of HGF and MSP, into the transplanted kidney tissue. Local production of MF-1, which may enhance the expansion of Treg cells in vivo, combined with the adoptive transfer of Treg cells, successfully induced the donor specific immune tolerance in more than 70% of recipients in our rat kidney transplant model.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：CD28-Superagonist 非特異的な免疫制御細胞 Tregバンク CD34+幹細胞 ドナー特異的な免疫寛容 MF-1遺伝子導入 レンチウイルス 超音波照射遺伝子導入法

## 1. 研究開始当初の背景

近年、免疫抑制剤の開発により移植腎の短期生着率は飛躍的に向上したが、腎移植患者の約半数は術後 10 年以内に移植腎機能廃絶に陥り、その約 80% が慢性拒絶反応 Chronic allograft nephropathy (CAN) による原因である。しかし、現時点では確立された治療はなく、CAN は現在腎移植における最大の問題である。我々は、約 20 年前から CAN の治療、および移植腎永久生着を目標に研究を重ね、以下のことを明らかにしてきた。1) 我々が作成した CAN モデル (F344-Lew 平均生存期間: 約 52 週) では術後 8 週目頃から生じる接着分子の発現、およびサイトカイン産生増加が CAN の発症過程で重要である (Azuma, et al. PNAS, 1995; J Clin Invest 1994)。2) 主要組織適合性抗原が同一であるアイソグラフト間における腎移植 (Lew-Lew) でも、発症時期は異なるがアログラフトと同様の CAN 像を認めた (Azuma, et al. Transplantation, 1994; Ann Surg., 1994)。3) 腎阻血再灌流障害の CAN に対する影響を明らかにするため、移植していない naive Lew ラットに腎阻血再灌流障害を生じさせ (Ischemia) 1 年間観察したところ、発症時期は異なるがアログラフト同様の CAN 像を認めた (Azuma, et al. Transplantation, 1994)。4) 機能系球体数の異なるラット CAN モデル、すなわち、a) 通常の CAN モデル (1A); b) 系球体数減少モデル (腎動脈分枝 3 本中 2 本を結紮, 1/3 Allografts); c) 系球体数増加モデル (左右 2 つの F344 腎を 1 匹の Lew ラットに移植, 2 Allografts) を作成した結果、1/3A では早期から単位ネフロン GFR (SNGFR) は著明に増加し (hyperfiltration)、術後 10 週目に CAN を発症したのに対してドナー腎を 2 個移植した 2A モデル (機能系球体数増加) では SNGFR はほぼ均一に保たれ、全観察期間を通して CAN を発症しなかった (J. Clin. Invest. 1994; Transplantation, 1997)。5) ラット CAN モデルに、腎組織の再生を促す細胞増殖因子 hepatocyte growth factor (HGF) を全身投与することにより、術後早期の尿細管壊死を著明に抑制し、機能系球体数を保持することで CAN の発症を防止した。

## 2. 研究の目的

これまでの研究成果における臨床的な問題点は“長期的な HGF 全身投与による悪性腫瘍誘発する危険性が示唆されている”ことである。そこで我々は HGF、および Macrophage stimulating Factor (MSP) の持つ“アポトーシス抑制作用”を強く認めるが悪性腫瘍を誘発させる作用は殆ど認めない HGF と MSP のキメラ“メトロンファクター 1 (MF-1)”を投与することにより、悪性腫瘍を発症させることなく CAN を抑制し、永久生着させることを目的に研究を進めてきた。これまでの研究結果から、1) 免疫抑制剤と MF-1-レンウイルスを腎移植急性拒絶モデルに対して併

用した場合、有意な生着延長効果を認めたと永久生着を誘導することは不可能であり、機能廃絶に陥った移植腎を解析した結果、移植腎が永久生着に至らない理由として subclinical acute rejection の存在が示唆され、これを防止するためには、免疫学的寛容の導入が必要であることが考えられた。そこで我々は、高率に、安全に、かつ強力に免疫寛容を誘導する、全く新しい免疫寛容誘導法“Treg バンクによる術后感作性免疫寛容療法”を考案しドナー特異的な免疫寛容の誘導に成功した。我々が考案する“Treg バンクによる術后感作性免疫寛容療法”は、無処置ラットの抹消血液中から、CD4+CD25+ 非特異的免疫制御細胞 (non-specific regulatory T cell: NS-Treg cell) を cell sorter を用いて収集し、これを HGF、および、CD28 Superagonist (CD28-SA) 投与下に、マウスから抽出した CD3+ 幹細胞と共培養することによって *in vitro* での細胞培養により十分に増殖させる。すなわち、必要なときに必要な量の NS-Treg cell をいつでも供給可能な Treg バンクが得られることになる (Treg バンクの作成は、必要なときに必要な量を供給可能なだけでなく、レシピエントに抗体を投与することによる重篤な副作用のリスクを避けることが可能となり、临床上、非常に画期的である (CTLA-4 投与療法では、米国で重篤な副作用の出現により臨床応用禁止となった))。さらに興味深いことに、この NS-Treg cell は、ラット腎移植急性拒絶反応モデルのレシピエントに術前投与すると、投与直後の腎移植 (一次移植) のみならず、一次移植の半年後に行った同種ドナーからの心移植をも免疫抑制剤を全く使用することなく永久生着、すなわち“ドナー特異的な免疫寛容”を誘導する (Azuma et al. Am J. Transplant, 2008) ため、直接抗体投与を必用としない「Treg 術后感作性免疫寛容療法」が実現可能となる。また、現在研究進行中であるが、HGF と MSP のキメラ“MF-1”は移植モデルにおいて、体内に自然に存在する Treg を増殖させることによって免疫寛容を誘導し、移植臓器の明らかな生着延長効果を示すこと、また、さらには、CD28-SA 投与による免疫寛容誘率を有意に向上させることが明らかとなっている。本研究では、これまでの我々の研究成果である、レンチウイルスベクター (アデノウイルス並みの使いやすさ、および、安全で高率にゲノム内に遺伝子導入が可能) および、超音波照射用造影剤 (オプチゾン) を併用した超音波照射遺伝子導入法による「MF-1 遺伝子移植腎局所導入」を「Treg 術后感作性免疫寛容療法」と組み合わせることにより、移植腎永久生着を目的とする画期的な治療法である。さらに、術後のフォローアップとして、分子イメージングシステムを採用し臨床で利用されている PET に類似したシステムで、種々の糖鎖、抗体、および、標識分子を用いることで、移植腎を

摘出することなく腎内の免疫反応や腎機能をリアルタイムに把握し、拒絶反応の診断に有効であるのみならず、抗体糖鎖を選択することで、移植腎の局所治療をも可能である)術前後から長期的に移植腎内の免疫反応をリアルタイムに把握することによって、NS-Treg cell がドナー特異性を獲得する機序を含めたさらに詳細な免疫学的メカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

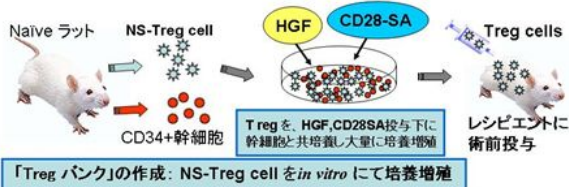
I. T reg バンクの作成: CD28-SA、および、HGF 投与下に CD34+幹細胞との共培養による、T reg 増殖

#### 1) CD28-SA の作成 (梨井)

国立医療センター、梨井 Dr により既に調整済みであり、必要な量を順次作成している。また、既にラット心臓移植モデル、腎臓移植モデルなどで、In vivo での実験効果が確認されている(Transplant. Int. 17(1):15-21; 2004.Am. J. Transplant, 2008)。

#### 2) 無処置 Lew ラットからの CD4+CD25+Treg、および、CD34+幹細胞の収集、(東)

無処置 Lew ラットの脾臓、および抹消血から、cell sorter を用いて、CD4+CD25+ Treg、および、CD34+幹細胞をそれぞれ収集する。



#### 3) CD28-SA、および、HGF 投与下に CD34+幹細胞との共培養による *in vitro* での Treg 培養増殖 (T reg バンクの作成)(東)

CD28-SA(1mg/L)、および、HGF(10μg/L)を添加し、CD34+幹細胞(1x10<sup>4</sup>/ml)と CD4+CD25+ Treg(1x10<sup>4</sup>/ml)を RPMI1640, 10%FBS, Streptomycin/penicillin, の培養液で培養し、ドナー非特異的な CD25+CD4+Treg 細胞を充分量獲得する。

条件設定: CD28-SA、および、HGF の投与濃度については、それぞれ、0.1-10mg/L, 1-100μg/L の濃度で予備実験を行い、CD28-SA(1mg/L) および、HGF

II. T reg バンクからの T reg adoptive transfer による免疫学的寛容の導入

a) 条件設定: Tregの投与量、投与日、および投与回数については、これまでの実験結果をもとに検討する(Am.J. Transplant, 2008)

- 投与量、1x10<sup>4</sup>/ml/day で投与。
- 投与日、投与回数: day -2, day 0, day 2 の3パターンでの一回投与、および day -2, day 0, day 2 の3回投与を比較検討(すでに予備実験において、一回投与では移植手術日を基準として day -2, day 0, day 2 のうち、day -2 が最も効率が高いこと、さらに day -2, day 0, day 2 による3回投与の方が一回

投与より高率に免疫学的寛容を導入可能であることを確認済みである

b) 実験モデル: Donor, Wistar; Recipient, Lewis (250g) micro surgery を用いてドナー腎を同所性に腎移植する(腎動静脈および尿管は顕微鏡下にレシピエントの腎動静脈および尿管と 10-0 ナイロン糸にて端々吻合)。レシピエントの固有腎は術当日に摘除。

c) 実験群: 上記モデルを用いて次の2つを作成 (東) Gp 1) *in vitro* Treg-cell 細胞移入による治療群(n=54) Gp 2) vehicle のみの対照群(n=54)

両グループで 2days, 4days, 6days, 14days, (n = 6 / time point/group), 8weeks, 16weeks, 24weeks, 32weeks, 52weeks (n = 4 / time point/group) の timepoint を設定し、それぞれの timepoint で移植腎を摘出し凍結切片(免疫組織化学、molecular analysis 用)と 4%ホルマリン保存切片(病理組織用)を作成する。更に生存日数の延長効果を検索するためそれぞれ 10 匹ずつ

d) 効果判定: (東、高原、猪阪)

- 移植腎機能の評価: 術後2日毎に尿中蛋白量および血清クレアチニン値を測定。
- 移植腎生着延長効果の検討: 生存日数を比較検討、iii) 病理組織学的検索: HE, PAS、および trichrome and silver masson 染色。
- 免疫組織化学的検索: 組織内浸潤細胞の同定や各種サイトカイン(IL-6, iNOS, MCP-1, RANTES, TGF-beta, TNF-alpha, IFN-gamma)の産生について検索する。v) RT-PCR assay: 各種サイトカインについて検索; 移植した後2、4、6、8、14日目に移植腎を摘出し、FITCの発現レベルと組織障害の程度を免疫組織染色、および組織学的に検討する。

vi) 分子イメージングシステム(種々の糖鎖、抗体、および、標識分子を用いる)によって、腎内の免疫反応や腎機能を移植腎を摘出することなくリアルタイムに把握する: 臨床で利用されている PET システム(動物用 PET)で、抗体、および、糖鎖を選択することで、移植腎を摘出することなく腎内の免疫反応(糖鎖に付着させる抗体の種類を選択することによって細胞浸潤や、接着分子、サイトカイン産生の状態を把握)や腎機能をリアルタイムに把握し、拒絶反応の診断に有効であるのみならず、移植腎の治療(拒絶反応による移植腎内の炎症発症部位局所に、抗体、Si-RNA、decoy などの分子治療薬を投与)も可能である。

III. 超音波照射を用いた MF-1 遺伝子導入

1) MF-1—Plasmid の作成

2) MF-1—レンチウイルスの作成

- 1) で作成した MF-1- Plasmid を、アデノウイルス並みの導入効率と、ゲノムに入ることによって半永久的な遺伝子発現が可能なレンチウイルスをベクターとして腎組織に遺伝子導入するため、レンチウイルス内に MF-1- Plasmid を挿入した、MF-1-Renti を作成する。

### 3)超音波照射を用いた MF-1—レンチウイルス移植腎局所導入の条件設定 (東)

- i) ドナー腎を実体顕微鏡下に腎動脈を損傷させることなく harvest し、脳血管外科用血管クリップを用いてクランプする。
- ii) 次に 2) で作成した MF-1-Renti virus を種々の濃度 ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  pfu) の懸濁液 0.5 ml とし、腎動脈から電動ポンプ、およびシリコンチューブを用いて腎組織内に挿入し、(腎動脈から注入する懸濁液の量はラットでは 0.5 ml とするのが最適であることが、これまでの実験結果からあきらかである。)、腎動脈を脳血管外科用血管クリップにてクランプする。懸濁液 0.5 ml が注入された腎を water bath の中に入れ、超音波照射を行う。この際、遺伝子導入効率を上げるには、超音波照射は、組織障害を及ぼすので時間が超音波照射時間 (10, 20, 30, or 40 min) 腎組織内で作用させる。
- iii) 遺伝子導入を終了した腎を、生理食塩水にて環流した後、レシピエントに移植し、2、4、6、8 日後における MF-1 の腎組織内蛋白濃度および組織障害の程度を分子生物学的、および形態学的に検討する。iv) 遺伝子導入を終了した腎を、生理食塩水にて灌流した後、レシピエントに移植し、2、4、6、8 日後における MF-1 の腎組織内蛋白濃度および組織障害の程度を分子生物学的、および形態学的に検討する。

### 4)ラットアログラフト腎移植モデルにおける免疫学的寛容導入、および MF-1—遺伝子導入の *in vivo* における治療効果の検討

#### a) 実験モデル : Donor, Wistar Recipient, Lewis (250g)

2) で設定した条件でドナー腎に MF-1 遺伝子導入を予め施行する。micro surgery を用いてドナー腎を同所性に腎移植し、レシピエントの固有腎は術当日に摘除。  
実験群 : 上記モデルを用いて次の 4 つの実験群を作成 (東) Gp 1) Treg バンクからの Treg Adoptive transfer による免疫寛容導入、単独投与治療群 (n=54) Gp 2) Treg Adoptive transfer による免疫寛容導入 + MF-1 遺伝子導入併用治療群 (n=54) Gp 3) MF-1 遺伝子導入単独治療群 (n=54) Gp 4) vehicle のみの対照群 (n=54) 全グループで 2days, 4days, 6days, 14days, (n=6/time point/group), 8weeks, 16weeks, 24weeks, 32weeks, 52weeks (n=4/time point/group) の timepoint を設定し、それぞれの timepoint で分子イメージングシステムによる移植腎機能評価、免疫学的検討を行うとともに、移植腎を摘出し凍結切片 (免疫組織化学、molecular analysis 用) と 4%ホルマリン保存切片 (病理組織用) を作成する。更に生存日数の延長効果を検索するためそれぞれ 10 匹ずつ作成。

#### b) 効果判定 :

i) 移植腎機能の評価 ii) 移植腎生着延長効果の検討 iii) 病理組織学的検索 : iv) 免疫組織化学的検索 v) 分子生物学的検索 vi) 分子イメージングシステムによる、腎内の免疫反応や腎機能をリアルタイムに把握

### 4. 研究成果

本研究は、大きく以下の 2 つの事項を併用することによる全く新しい免疫寛容導入法を開発、および、確立し、移植腎の永久生着を実現させる極めて画期的な研究である。Treg バンクによる術後感作性免疫寛容療法”、MF-1 遺伝子導入による “移植腎組織保護遺伝子導入療法” また、さらに、術後のフォローアップとして、分子イメージングシステムを採用し術前後から長期的に移植腎内の免疫反応をリアルタイムに把握することによって、さらに詳細な免疫学的メカニズムの解明に成功した。

#### Treg バンクによる術後感作性免疫寛容療法

これまでの研究成果における臨床的な問題は “長期的な HGF 全身投与による悪性腫瘍誘発する危険性が示唆されている” ことである。そこで我々は HGF、および Macrophage stimulating Factor (MSP) の持つ “アポトーシス抑制作用” を強く認めるが悪性腫瘍を誘発させる作用は殆ど認めない HGF と MSP のキメラ “メトロンファクター 1 (MF-1)” を投与することにより、悪性腫瘍を発症させることなく CAN を抑制し、永久生着させることを目的に研究を進めた。これまでの研究結果から、免疫抑制剤と MF-1—レンチウイルスを腎移植急性拒絶モデルに対して併用した場合、有意な生着延長効果を認めたが永久生着を誘導することは不可能であり、機能廃絶に陥った移植腎を解析した結果、移植腎が永久生着に至らない理由として subclinical acute rejection の存在が示唆され、これを防止するためには、免疫学的寛容の導入が必要であることが考えられた。そこで我々は、高率に、安全に、かつ強力に免疫寛容を誘導する、全く新しい免疫寛容誘導法 “Treg バンクによる術後感作性免疫寛容療法” を考案しドナー特異的な免疫寛容の誘導に成功した。我々が考案する “Treg バンクによる術後感作性免疫寛容療法” は、無処置ラットの抹消血液から、CD4+CD25+ 非特異的免疫制御細胞 (non-specific regulatory T cell: NS-Treg cell) を cell sorter を用いて収集し、これを HGF、および、CD28 Superagonist (CD28-SA) 投与下に、マウスから抽出した CD34+ 幹細胞と共培養することによって *in vitro* で細胞培養により十分に増殖させる。すなわち、必要なときに必要な量の NS-Treg cell をいつでも供給可能な Treg バンクが得られることになる {Treg バンクの作成は、必要なときに必要な量を供給可能だけでなく、レシピエントに抗体を投与することによる重篤な副作用のリスクを避けることが可能となり、臨床上、非常に画期的である (CTLA-4 投与療法では、米国で重篤な副作用の出現により臨床応用禁止となった)}。さらに興味深いことに、この NS-Treg cell は、ラット腎移植急性拒絶反応モデルのレシピエントに術前投与すると、投与直後の腎移植 (一次移植) のみならず、一次移植の半年後に行った同種ドナーからの心移植をも免疫抑制剤を全く使用することなく永久生着、すなわち “ドナー特異的な免疫寛容” を誘導す

る (Azuma et al. Am J. Transplant, 2008) ため、直接抗体投与を必要としない「Treg 術後感作性免疫寛容療法」が実現可能となる。また、現在も尚研究進行中であるが、HGFとMSPのキメラ“MF1”は移植モデルにおいて、体内に自然に存在するTregを増殖させることによって免疫寛容を誘導し、移植臓器の明らかな生着延長効果を示すこと、また、さらには、CD28-SA投与による免疫寛容誘率を有意に向上させることが明らかとなったことは、今回の研究成果報告の最も大きな収穫の一つといえる。

#### MF-1遺伝子導入による“移植腎組織保護遺伝子導入療法”

今回のもう一つの大きな研究成果としてあげられるのが、アデノウイルス並みの使いやすさ、および、安全で高率にゲノム内に遺伝子導入が可能なレンチウイルスベクターを用い、さらに、導入時に超音波照射用造影剤(オプチゾン)を併用した超音波照射遺伝子導入法を使用することによって、腎臓組織内への遺伝子導入を確立したことである。これまで極めて困難とされていた腎臓組織内への遺伝子導入法を確立したことは極めて画期的である。この新規導入法を用いてMF-1遺伝子を移植腎に局所導入し、前述した「Treg 術後感作性免疫寛容療法」を組み合わせることで、移植腎の生着期間は有意に延長した。

#### 分子イメージングシステムを用いた免疫学的メカニズムの解明

術後のフォローアップとして、分子イメージングシステムを採用し、術前後から長期的に移植腎内の免疫反応をリアルタイムに把握することによって、元来、非特異的なTreg cellが、移植術後にレシピエントに投与されることによってドナー特異性を獲得する機序を含めた、詳細な免疫学的メカニズムを解明した。今回使用した分子イメージングシステムは、実際に臨床で利用されているPETに類似したシステムで、種々の糖鎖、抗体、および、標識分子を用いることで、移植腎を摘出することなく腎内の免疫反応や腎機能をリアルタイムに把握し、拒絶反応の診断に有効であるのみならず、抗体糖鎖を選択することで、移植腎の局所治療をも可能である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3件)

1. Azuma, H., Ibuki, N., Inamoto, T., Koyama, K., Utimoto, S., Fujisue, Y., Mizutani, Y., Nomi, H., Ubai, T., Katsuoka, Y. Utility of transrectal ultrasonography guidance and seven key elements of operative skill for early recovery of urinary continence after laparoscopic radical prostatectomy. Int. J. Oncol. In press
2. Azuma, H., Inamoto, T., Ibuki, N., Ubai, T., Kotake, Y., Takahara, K., Kiyama, S., Nomi, H., Uehara, H., Komura, K., Yamamoto, K., Narumi, Y., Katsuoka, Y. Utility of the novel bladder preservation therapy, BOAI-CDDP-radiation

(OMC-regimen), for elderly patients with invasive bladder cancer. Int. J. Oncol.

38: 13-243,2011.

3. Azuma, H., Isaka, Y., Nomi, H., Inamoto, T., Li, XK., Höunig, T., Takabatake, Y., Ichimaru, N., Ibuki, N., Matsumoto, K., Ubai, T., Katsuoka, Y., Takahara, S. Induction of Donor-Specific Tolerance Using Superagonistic CD28 Antibody in Rat Renal Allografts: Regulatory T-Cell Expansion Before Engraftment May Be Important. Transplantation. 90(12):1328-1335, 2010

〔学会発表〕(計 2件)

1. 第27回日本生殖免疫学会総会・学術集会

「移植腎慢性機能不全の発症メカニズムとその治療：新規免疫寛容誘導法の開発に向けて」東 治人. 大阪医科大学(大阪) 2012/12/9

2. 第42回日本腎臓学会西部学術大会

「免疫学的ハイリスク症例の腎移植について」平野 一, 東 治人, 八木澤 隆史、野崎 大史、清水 朋一、石田 英樹、田邊 一成. 沖縄コンベンションセンター(沖縄) 2012/10/26

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

東 治人 (Azuma Haruhito)  
大阪医科大学・医学部・教授  
研究者番号：40231914

##### (2)研究分担者

猪阪 善隆 (Isaka Yoshitaka)  
大阪大学・医学(系)研究科・准教授  
研究者番号：00379166

朝日 通雄 (Asahi Michio)  
大阪医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10397614

梨井 康 (Li Xiaokang)  
国立成育医療センター(研究所)・移植、外科研究部・室長  
研究者番号：60321890

高原 史朗 (Takahara Siro)  
大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座教授  
研究者番号：7017954