

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16884

研究課題名（和文）体外培養した骨髄由来免疫抑制細胞の局所炎症環境下における免疫抑制能の解析

研究課題名（英文）Ex Vivo Induced Bone Marrow-Derived Myeloid Suppressor Cells Prevent Corneal Allograft Rejection in Mice

研究代表者

藤本 啓一（Fujimoto, Keiichi）

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：10876684

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）：C57/BL6Jマウスの骨髄細胞をIL-6、顆粒球単球コロニー刺激因子(GM-CSF)と共培養し、骨髄由来免疫抑制細胞(BM-MDSC)を誘導した。IL-6とGM-CSFの共培養により誘導性一酸化窒素合成酵素(iNOS)の発現が増加したBM-MDSCが誘導された。BM-MDSCの混合リンパ球反応への付加により炎症性サイトカインの減少、抑制性サイトカインの増加、T細胞増殖の抑制、制御性T細胞の誘導を認めた。結膜下注射によるBM-MDSCの角膜移植片へ移行ならびに生存率の延長、血管新生ならびにリンパ管新生の抑制を認めた。BM-MDSCはiNOS経路を介したマウス角膜移植片の拒絶反応抑制を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、体外培養した骨髄由来免疫抑制細胞(BM-MDSC)の免疫抑制効果を高リスク角膜移植マウスモデルで検証し、ヒト角膜移植における新規免疫寛容療法開発の基盤研究を実施した。BM-MDSCの混合リンパ球反応への付加により炎症性サイトカインの減少、抑制性サイトカインの増加、T細胞増殖の抑制、制御性T細胞の誘導を認めた。結膜下注射によるBM-MDSCの角膜移植片へ移行ならびに生存率の延長、血管新生ならびにリンパ管新生の抑制を認めた。BM-MDSCは誘導性一酸化窒素合成酵素経路を介したマウス角膜移植片の拒絶反応抑制を示した。

研究成果の概要（英文）：Bone marrow-derived immunosuppressed cells (BM-MDSCs) were induced by co-culturing bone marrow cells from C57/BL6J mice with IL-6 and granulocyte monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF). Addition of BM-MDSCs to the mixed lymphocyte response decreased inflammatory cytokines, increased inhibitory cytokines, suppressed T cell proliferation, and induced regulatory T cells. Subconjunctival injection of BM-MDSCs into corneal allografts prolonged survival and suppressed angiogenesis and lymphangiogenesis, and BM-MDSCs suppressed rejection of murine corneal allografts via the iNOS pathway.

研究分野：眼免疫

キーワード：骨髄由来免疫抑制細胞 角膜移植 血管新生 リンパ管新生 制御性T細胞 免疫寛容 炎症 免疫

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ステロイド・シクロスポリン・タクロリムス等の免疫抑制剤の登場により、角膜移植後の急性拒絶反応は減少したが、未だに感染症・自己免疫疾患の合併・再移植等で血管新生が生じた高リスク角膜移植ではその40-90%に拒絶反応を伴う(The Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group, *Arch Ophthalmol*, 1992)。しかし免疫抑制剤は慢性拒絶反応には無効であることや、その副作用(緑内障、糖尿病等)等未だ問題が多い。また、本邦においてはドナー角膜が充足しているとはいえ、移植臓器における長期的な免疫寛容(免疫抑制剤を中止しても移植臓器が十分に機能する状態)の成立が臨床的に重要である。

角膜移植における拒絶反応の段階は、角膜移植によって新生した血管由来のレシピエント免疫系細胞が、移植したドナー角膜を異物として認識、頸部リンパ節で抗原提示、ナイーブT細胞がエフェクターT細胞へ分化、そして標的移植角膜を破壊である(Amouzegar A, *Journal of Immunology*, 2016)。制御性T細胞は抗原特異的にこの免疫応答に抑制的に働く(Inomata T, *Sci Rep*, 2016)が、転写因子 *foxp3* の誘導と制御性T細胞型エピゲノム形成がともに必要であるため、ヒト生体内で制御性T細胞の増幅は困難である(Ohkura N, *Immunity*, 2012)。その問題解決には、制御性T細胞の有効な増幅方法の開発や炎症環境下でも制御性T細胞を安定的に誘導する免疫抑制経路を解明し、移植角膜に効率的に誘導することが重要である。

骨髄由来免疫抑制細胞(Myeloid-derived suppressor cell, MDSC)は顆粒球系細胞の前駆細胞であり、癌や炎症性疾患等の病的環境下で体内誘導される(体内誘導 MDSC)。この体内誘導 MDSCは、IL-10、TGF- β など抑制性サイトカインの産生に係る制御性T細胞の誘導や、iNOS 活性化を介してNOを産生し、アポトーシス誘導によるエフェクターT細胞の増殖抑制能を有する。注目すべきは、最近の研究から MDSC は骨髄細胞に癌や炎症性疾患の微小環境に含まれる因子を加えることで体外培養できると判明したこと(体外培養 MDSC)、そして、体内誘導 MDSC と同様に制御性T細胞の誘導能やエフェクターT細胞の増殖抑制能を有すとの報告である(Pistoia V, *Front Oncol*, 2013)。ただし、局所炎症環境下の高リスク角膜移植に対する体外培養 MDSC の応用は、拒絶反応を抑える有効な技術として期待できるが、局所炎症環境においてどれほど効率的にこの細胞が免疫抑制を誘導するのか不明瞭なことが学術的な課題である。

2. 研究の目的

本研究は、新生血管・炎症を誘導した高リスク角膜移植マウスモデルの利用により、体外培養 MDSC 移入による免疫抑制効果を検証し、体外培養 MDSC を用いたヒト角膜移植における新規免疫寛容療法開発の基盤となる科学的根拠を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

上記の背景ならびに目的を達成するために、次の(1)~(5)の目標を設定する。

(1) 体外培養MDSCの作成

マウス脛骨から骨髄細胞を採取して、シャーレ内でGM-CSF、IL-6を付加した培養液とともに4-5日間37°Cで培養する。骨髄細胞はドナーマウス(C57BL/6)もしくはレシピエントマウス(BALB/c)から採取する。フローサイトメーター(FCM)にてCD11b⁺Gr-1⁺体外培養MDSCを単離する。

(2) 体外培養MDSCの免疫抑制能の評価

レシピエントマウスのリンパ球にドナーマウスのリンパ球でアロ抗原刺激を加え(混合リンパ球反応)、そこに体外培養MDSC ならびにiNOSやアルギナーゼ阻害薬等を共培養に追加し、3日後にトリチウム試験にてMDSCの免疫抑制機構を同定する。

(3) マウス高リスク角膜移植モデルの作成

角膜実質に14日間ナイロン糸を留置して、新生血管を誘導した高リスクレシピエント角膜を作成する。ドナー(C57BL/6)からレシピエント(BALB/c)に同種異系角膜移植を行う。

(4) 投与したMDSCの角膜移植片への移行性の評価

GFPトランスジェニックマウス(C57BL/6)の骨髄細胞から培養したGFP陽性体外培養MDSCを移植後に結膜下投与する。投与した体外培養MDSCの局在を評価するために、移植投与1~2日後に角膜移植片及び頸部リンパ節を採取し、GFP陽性MDSC(CD11b⁺Gr-1⁺細胞)の局在をFCMで確認する。

(5) 体外培養MDSC移入における高リスク角膜移植における血管・リンパ管新生抑制能評価

(1)で作成した体外培養MDSCを高リスク角膜移植に結膜下投与する。投与後8週間にて角膜移植片の混濁スコア、血管新生スコアを細隙灯顕微鏡にて評価する。そして、経時的に採取した角膜移植片に対して、血管内皮細胞(CD31)、リンパ管(Lyve-1)を免疫染色し、角膜移植片の血管・リンパ管新生をImage Jを用いて定量化する。

4. 研究成果

(1) 体外培養 MDSC の作成

マウス脛骨から骨髄細胞を採取して、シャーレ内で GM-CSF、IL-6 を付加した培養液とともに 4-5 日間 37°C で培養し、CD11b⁺Gr-1⁺体外培養 MDSC を誘導した(図 1)。

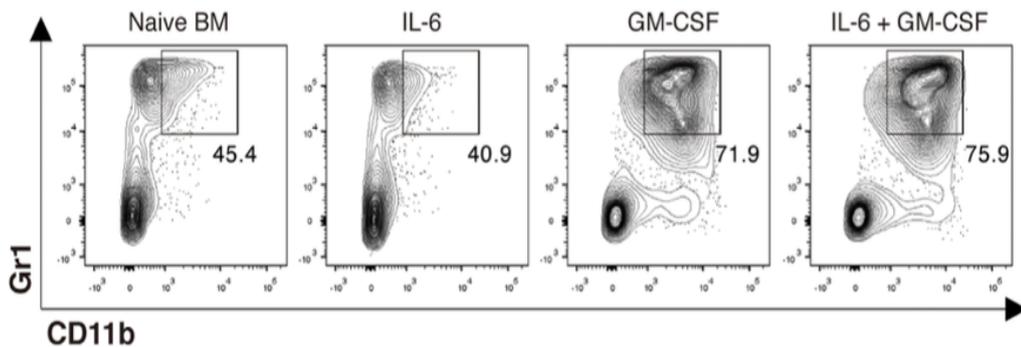


図 1 体外培養 MDSC の誘導

(2) 体外培養 MDSC の免疫抑制能の評価

混合リンパ球反応に体外培養 MDSC ならびに iNOS やアルギナーゼ阻害薬等を加えて共培養し、3 日後にトリチウム試験にて BM-MDSC の免疫抑制効果ならびに iNOS 阻害薬による BM-MDSC の免疫抑制阻害効果を同定した(図 2)。

(3) マウス高リスク角膜移植モデルの作成

角膜実質に14日間ナイロン糸を留置して、新生血管を誘導した高リスクレシピエント角膜を作成した。ドナー(C57BL/6)からレシピエント(BALB/c)に同種異系角膜移植を行った。

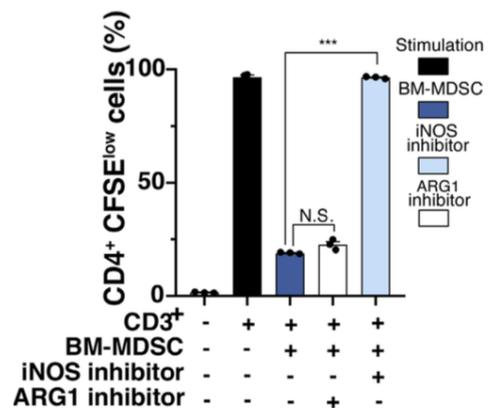


図 2 混合リンパ球反応による体外培養 MDSC の免疫抑制能の評価

(4) 投与した MDSC の角膜移植片への移行性の評価

GFP トランスジェニックマウス(C57BL/6)の骨髄細胞から培養した GFP 陽性体外培養 MDSC を角膜移植後に結膜下投与した。移植投与 1~2 日後に角膜移植片及び頸部リンパ節を採取し、GFP 陽性 MDSC (CD11b⁺ Gr-1⁺細胞) の局在を FCM で確認した(図 3)。

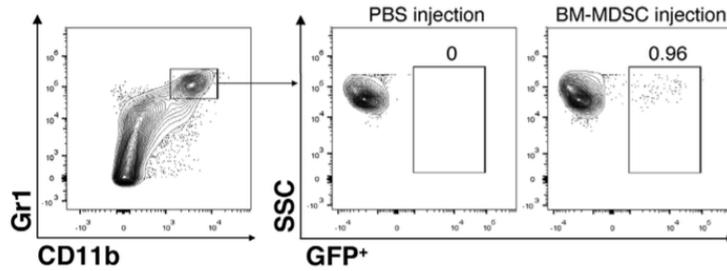


図 3 MDSC の角膜移植片への移行性の確認

(5) 体外培養 MDSC 移入における高リスク角膜移植における血管・リンパ管新生抑制能評価

体外培養MDSCを高リスク角膜移植に結膜下投与したところ、投与後8週間にて角膜移植片の混濁スコア、血管新生スコアの改善ならびに角膜移植片の生存効果延長効果を認めた。

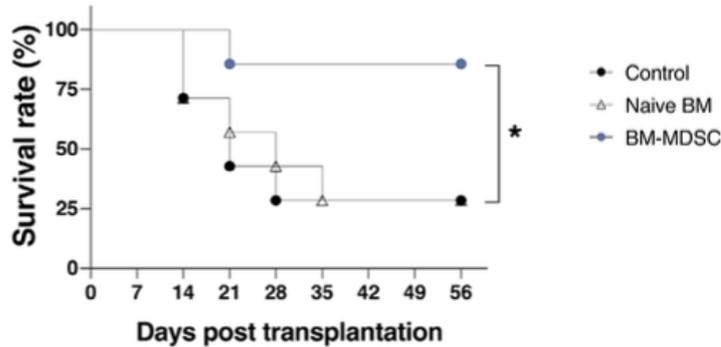


図4 体外培養MDSC移入による角膜移植片の生存効果の延長

また、経時的に採取した角膜移植片に対して、血管内皮細胞(CD31)、リンパ管(Lyve-1)を免疫染色し、角膜移植片の血管・リンパ管新生をImage Jを用いて定量化した(図5A)。体外培養MDSCによる血管新生抑制効果(図5B)ならびにリンパ管新生抑制効果(図5C)を明らかにした。

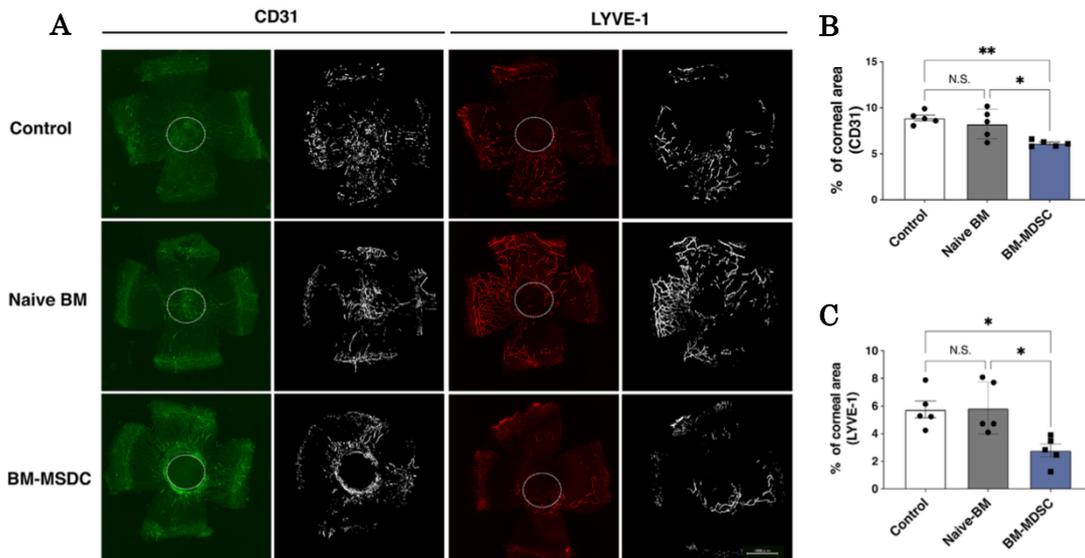


図5 体外培養MDSCによる血管新生抑制効果ならびにリンパ管新生抑制効果

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Zhu J, Inomata T, Di Zazzo A, Kitazawa K, Okumura Y, Coassin M, Surico PL, Fujio K, Yanagawa A, Miura M, Akasaki Y, Fujimoto K, Nagino K, Midorikawa-Inomata A, Hirosawa K, Kuwahara M, Huang T, Shokirova H, Eguchi A, Murakami A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Role of Immune Cell Diversity and Heterogeneity in Corneal Graft Survival: A Systematic Review and Meta-Analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 4667 ~ 4667
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm10204667	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 Zhu J, Inomata T, Fujimoto K, Uchida K, Fujio K, Nagino K, Miura M, Negishi N, Okumura Y, Akasaki Y, Hirosawa K, Kuwahara M, Eguchi A, Shokirova H, Yanagawa A, Midorikawa-Inomata A, Murakami A	4. 巻 62
2. 論文標題 Ex Vivo-Induced Bone Marrow-Derived Myeloid Suppressor Cells Prevent Corneal Allograft Rejection in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology and Visual Science	6. 最初と最後の頁 3 ~ 3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/iovs.62.7.3	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

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tianxiang H, Zhu J, Inomata I, Fujimoto K, Uchida K, Fujio K, Nagino K, Miura M, Negishi N, Okumura Y, Akasaki Y, Hirosawa K, Kuwahara M, Eguchi A, Hurrarnon S, Yanagawa A, Midorikawa-Inomata A, Murakami A
2. 発表標題 Ex vivo-induced bone marrow-derived myeloid suppressor cells prevent corneal allograft rejection in mice
3. 学会等名 第54回日本眼炎症学会
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
---------	---------