

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 16 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22591418

研究課題名（和文） マウス肝移植モデルを用いた免疫寛容誘導機序の解明と新規免疫抑制法の開発

研究課題名（英文） The clarify of the mechanism of induction of immunological tolerance using mouse liver transplantation model and development of novel immunosuppression.

研究代表者 森田 美和 (MORITA MIWA)

独立行政法人国立成育医療研究センター・RI 管理室・共同研究員

研究者番号：90329699

研究成果の概要（和文）：臓器移植における新たな拒絶反応抑制法の開発のため、免疫寛容誘導モデルであるマウス同所性肝移植モデルを用いて移植臓器生着のメカニズムについて検討した。免疫反応の共刺激分子である PD-1/PD-L1 経路は移植臓器の生着に重要であることを示した。また肝移植後の拒絶反応および臓器生着に関わる microRNA を検討した。さらに、肝実質細胞内の骨髄由来免疫抑制細胞は拒絶反応の抑制に重要な役割を持っている可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：For the development of novel immunosuppression in organ transplantation, we have analyzed the mechanism of graft acceptance using orthotopic mouse liver transplantation, which can induce immunological tolerance without immunosuppressive drugs. It shows that one of the co-stimulatory molecule, PD-1/PD-L1 pathway is essential for graft acceptance. And it has analyzed that microRNA which associated with rejection or acceptance of allografts. And it suggested that myeloid-derived suppressor cells has an important role for inhibition for graft rejection.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：外科学一般

キーワード：移植免疫、免疫寛容、移植外科、マウス同所性肝移植モデル、マイクロ RNA、骨髄由来免疫抑制細胞

## 1. 研究開始当初の背景

現在の移植医療において免疫抑制剤の使用は欠かせないが、免疫抑制剤は標的以外の細胞へ作用するため、その副作用および過剰な薬剤投与による感染症や発癌等が問題となっている。これを防ぐためには、より特異的は免疫反応を制御する方法や薬剤の開発が

急務である。

マウス肝移植モデルにおいて、移植肝は他の臓器あるいは肝細胞と異なり、MHC のバリアーを越えて免疫抑制剤なしで自然生着する。しかし、拒絶反応が起こらないわけではなく、移植肝の組織学的所見では、移植後 14 日目あたりをピークとしてリンパ球の浸潤が認

められるものの、その後自然消失する。また、肝移植後はドナー特異的免疫寛容が段階的に誘導され、移植後 40 日目以降には移植肝と同系マウスの皮膚移植片は完全生着するようになる<sup>1)</sup>。このことから、リンパ球の浸潤のはじまりから収束までに間には、きわめて特殊なメカニズムが働いていることが推測される。

## 2. 研究の目的

本研究はマウス肝移植自然生着免疫寛容モデルを用いて、1. 自然生着破綻モデルを確立することにより、PD-L1 分子等の免疫反応における役割を解析することで、当該分子、あるいは当該発現細胞の免疫寛容誘導機序を明らかにする；2. 移植免疫寛容および拒絶反応に関与する mRNA および miRNA の探索をおこない、見出された mRNA または miRNA の標的分子を同定する；3. 近年、免疫抑制反応効果について注目されている骨髄由来免疫抑制細胞(Myeloid-derived Suppressor cells : MDSC)の移植免疫寛容誘導における関与について検討することを目的とする。本研究により免疫寛容誘導のメカニズムが解明されれば、臨床においてより特異的な免疫抑制剤による拒絶反応抑制法の開発に結びつくと考えられる。

## 3. 研究の方法

### 1. PD-L1 分子等の免疫寛容誘導における役割の検討

自然免疫寛容モデルはドナーを B10. BR (H-2<sup>b</sup>)、レシピエントを B10. D2 (H-2<sup>d</sup>)とし、同所性肝移植をおこなった<sup>2)</sup>。移植後 8, 14, 30, 100 日目にグラフトを摘出し、その凍結切片を抗 PD-L1 抗体、抗 F4/80 抗体、抗 CD105 抗体、抗 Desmin 抗体および抗 H-2Kd 抗体を用いて免疫組織化学染色をおこなった。移植免疫寛容破綻モデルの作製として、移植後に抗 PD-L1 抗体を週に 2 回投与し、レシピエントの生存日数(グラフトの拒絶)を検討した(n=6)。また PD-L1 のリガンドである PD-1 ノックアウトマウスをレシピエントとし、ドナーを BALB/c を用いて肝移植モデルを作製するとともに移植後 8 日目の肝組織の病理組織学的検討をおこなった。

### 2. 移植免疫寛容状態に関わる mRNA および miRNA の探索

自然免疫寛容モデルとして、ドナーを B10. BR (H-2<sup>b</sup>)、レシピエントを B10. D2 (H-2<sup>d</sup>)とし同所性肝移植をおこない<sup>2)</sup>、移植後 5, 8, 14, 30 および 100 日目にグラフトを摘出し、HE 染色をおこなったものを Banff 分類による組織学的判定をおこなった。拒絶モデルとしてドナーを C57BL/10 (H-2<sup>b</sup>)、レシピエントを CBA (H-2<sup>k</sup>)とした異所性心移植モデルを作

製した<sup>3)</sup>。肝移植後に経時的に採取した血清における GOT および GOT を測定した。一方、グラフトから抽出した total RNA より miRNA アレイをおこない、同系モデルとの発現比較において、±3fold の差を持つものを抽出した。移植免疫反応に相関のある miRNA は定量性 RT-PCR をおこない、normalized U6 snRNA 値をもとにそのコピー数で表した。Banff 分類<sup>4)</sup>における拒絶反応スコアの血清中 GOT 値に対する相関は one-way aNOVA 解析およびボアソン分布解析をおこなった。また、移植免疫反応に関連した miRNA を用いて、同系、異系、異系長期生存例の心グラフトにおける発現を肝移植モデルと同様に比較した。

### 3. 骨髄由来免疫抑制細胞 (Myeloid-derived Suppressor cells: MDSC) の移植免疫寛容誘導における関与の検討

マウス肝移植モデルはドナーを BALB/c (H-2<sup>d</sup>)、レシピエントを C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>)を用いた。移植後 14 日目と 50 日目にグラフト非実質細胞を抽出し、CD11b(+)Gr-1(+)細胞の割合をフローサイトメトリーにて確認した。さらにグラフト内における MDSC の拒絶反応抑制効果を検討するために、移植後 14 日目と 50 日目のグラフト非実質細胞から CD11b(+)細胞をマグネティックビーズにてソーティングし、CFSE dilution assay における regulator として用いた。responder としては CFSE ラベルした C57BL/6 由来の T 細胞を、stimulator としては BALB/c 骨髄細胞から GM-CSF および IL-4 を用いて分化誘導させた BM-DC<sup>5)</sup>を用いた。また、骨髄細胞から Hepatic Stellate Cell HSC と GM-CSF を用いて分化誘導させた MDSC (Bone Marrow -MDSC : BM-MDSC)<sup>2)</sup>の形態をギムザ染色で確認するとともに、それぞれの CD11b(+)細胞における CD11c、CD40、CD86、B7H1、MHC class II、F4/80、および Gr-1 発現をフローサイトメトリーにて BM-DC と比較した。さらに、ex vivo における実験と同様に、BM-MDSC の免疫反応抑制効果を検討するため、CFSE ラベルした C57BL/6 の T 細胞を responder、BALB/c 由来の BM-DC を stimulator とし、BM-MDSC を regulator とし、コントロールに BM-DC を用いて CFSE dilution assay をおこなった。

## 4. 研究成果

### (1) PD-L1 分子等の免疫寛容誘導における重要性の検討

肝移植後のグラフトにおける PD-L1 の発現を免疫組織化学染色により確認したところ、移植後 14 日目にリンパ球浸潤領域および類洞における発現がもっとも強く観察されたものの、移植後 100 日目にはその発現部位は減

少し、なおかつ発現強度も減弱していることが示された。これまでの報告で、マウス自然免疫寛容モデルにおいて、移植肝に対するリンパ球の浸潤は移植後 14 日をピークとして、その後徐々に消褪する<sup>1)</sup>。PD-L1 の発現も移植後 14 日目をピークとしていることから、拒絶反応もしくは拒絶反応の抑制に関与していることが示唆される。PD-L1 が類洞内皮およびリンパ球浸潤部位に局在していることから、抗 CD105、抗 F4/80 および抗 H-2Kd 抗体を用いて二重染色をおこなったところ、いずれも共染色を示した。類洞内皮細胞およびマクロファージが PD-L1 を発現していることが示唆されたが、これはこれまでの報告と一致する<sup>6),7)</sup>。またリンパ球浸潤部位において PD-L1 は H-2Kd と共染色を示したことから、移植肝だけではなく、レシピエント由来のリンパ球も免疫寛容誘導に関与している可能性が示唆された。今後は浸潤細胞の同定を進めるとともに、その継時的変化を検討し、免疫寛容誘導のメカニズムを解明する必要がある。一方、他の臓器と比べて、肝臓が特異的に免疫寛容を誘導することから、肝臓特異的な細胞が免疫寛容誘導に寄与している可能性があると考えられる。そのひとつとして星細胞を候補に挙げ、そのマーカーである desmin との二重染色を試みたが、共染色は得られず、PD-L1 分子が関与する免疫寛容誘導において星細胞の関与の可能性は低いことが示唆された。

## (2) 移植免疫寛容状態に関わる mRNA および miRNA の探索

自然免疫寛容モデルであるマウス同所性肝移植モデルの移植後のグラフトにおける miRNA 発現プロファイリングをおこない、急性拒絶反応時および免疫寛容時に関わる miRNA の探索をおこなった。同系移植モデルと比較して、upregulate された miRNA は mmu-mir-146a, 15b, 223, 23a, 27a, 34a, 451 であり、downregulate されたものは mmu-mir-101a, 101b, 148a であった。これらの miRNA の発現量と拒絶反応との相関を、Banff 分類における拒絶反応スコアとで解析したところ、いずれも高い相関を示し、免疫反応の活性化とこれらの miRNA に関連があることが示された。Mir-146 はヒト腎移植における拒絶グラフトにも高い発現を示しており<sup>8)</sup>、この miRNA は naïve T cell には低い発現を示し、Th1 cell においては高い発現を、Th2 cell においては発現を示さず、Th1 特異的 miRNA を考えられている<sup>9)</sup>。また mir-223 は顆粒球、血小板、単球、T および B 細胞でも発現していることが知られているが、T および B 細胞では顆粒球と比較して発現が低い<sup>10)</sup>。mir-223 は upregulate された miRNA の中でもっとも高い発現を示した。

また、免疫寛容時に高い発現を示した mir-101 は、その発現を抑えることで、naïve T cell の ICOS 発現が高まり、effector T cell 様となり、自己免疫疾患を引き起こす<sup>11)</sup>ことから、T cell の活性化抑制に関連があると考えられる。

また肝グラフトにおいて免疫寛容時に高い発現を示した miRNA は、心グラフトにおいても同様の傾向を示した。ただ、急性拒絶反応時に高い相関を示した miRNA は心グラフトにおいて必ずしも同じ相関が見られるわけではなかった。肝移植モデルは免疫寛容モデルであり、心グラフトは拒絶モデルであることから、その違いが肝移植の免疫寛容誘導に関する miRNA である可能性が示唆された。

## (3) 骨髄由来免疫抑制細胞 (Myeloid-derived Suppressor cells: MDSC) の移植免疫寛容誘導における関与の検討

マウスにおける MDSC の表面マーカーである CD11b および Gr-1(+)細胞<sup>12)</sup>を、マウス肝移植後のグラフトにおける推移を確認したところ、同系移植モデルではその陽性細胞がほとんど見られなかったのに対し、アロ移植モデルでは大幅にその割合が上昇していた。MDSC は炎症に伴って集積することが報告されているが<sup>13)</sup>、同系肝移植における CD11b および Gr-1(+)細胞は手術侵襲による炎症反応を反映したものであり、アロ移植モデルにおける拒絶反応による炎症反応を反映しているものと考えられる。しかし、マウス肝移植のグラフトへのリンパ球浸潤は、術後 14 日目がピークであり、その後徐々にグラフトへのリンパ球浸潤は消褪し、60 日目にはその痕跡を残すのみとなる。ところが、本実験では、グラフトにおける MDSC の割合は移植後 50 日目に高い割合を示している。一方、移植後にグラフトよりソーティングされた CD11b(+)細胞の免疫反応抑制効果は、50 日目のものは 14 日目のものと比べてより高い T 細胞増殖抑制効果を示した。MDSC は癌患者や担癌モデルの免疫寛容状態において観察されることが報告されている<sup>14),15)</sup>。このことから、移植後のグラフトに対する拒絶反応が抑制され、免疫寛容状態においてもなお高い割合で存在することは、継続的なグラフトへのリンパ球の攻撃に対して、MDSC が防御の一端を担っていることが示唆される。

マウス骨髄細胞から分化誘導させた MDSC について、その形態を確認したところ、大型単核の円形細胞であったことから、これらの細胞は monocytic MDSC であると示唆される<sup>16)</sup>。また、CD11b(+)細胞における phenotype は、BM-DC と比較して、CD11c の発現が低く、典

型的な樹状細胞とは異なる表現系を示した。また免疫反応の活性化シグナルにおける co-stimulatory signal である CD40 および CD86 そして MHC class II の低い発現を示し、これはこれまでの報告と一致し<sup>2</sup>、免疫反応活性化シグナルと抗原提示能力の低さを示している。これは LPS による刺激に対しても変化はなく<sup>5)</sup>、MDSC の T 細胞に対する活性化の欠如を示している。

MDSC には大まかに分けて granulocytic - MDSC (G-MDSC) と monocytic-MDSC (M-MDSC) に分けられ、前者は CD11b(+) Gr-1<sup>int</sup>、後者は CD11b(+) Gr-1<sup>high</sup> という表現系を示す<sup>16)</sup>。本研究における BM-MDSC の CD11b(+) 細胞における Gr-1 発現は intermediate であり、これは M-MDSC の phenotype と一致した。グラフトからソーティングされた CD11b(+) 細胞はアロ反応性 T 細胞の増殖を著明に抑制したことから、MDSC が肝移植後の免疫寛容誘導に大きな役割を持っていることが示唆される。今後、免疫寛容誘導に関わる MDSC の詳細を検討するために、グラフト内にはどのタイプの MDSC が T 細胞の抑制に関わっているのかを検討する必要がある。また MDSC は regulatory T 細胞の誘導に関連があるとの報告があり<sup>17)</sup>、今後、グラフトにおける Treg と MDSC との関連についても検討する予定である。

#### 参考文献

- 1) Sugioka, A. et al. Graft acceptance and tolerance induction in mouse liver transplantation using wild mice. *Transplant. Proc.* 33. 137-139, 2001
- 2) Morita M, et al. Spontaneous tolerance involving natural killer T cells after hepatic grafting in mice. *Transpl Immunol* 18(2):142-145, 2007
- 3) Morita M, et al. PD-1/B7-H1 interaction contribute to the spontaneous acceptance of mouse liver allograft. *Am J Transplant* 10(1):40-46, 2010
- 4) Demetrius AJ, et al. Banff schema for grading liver allograft rejection: An international consensus document. *Hepatology* 25: 658-663, 1997
- 5) Chou HS, et. al. Hepatic stellated cells regulate immune response by way of induction of myeloid suppressor cells in mice. *Hepatology* 53:1007-1019, 2011

6) Iwai, Y. et. al. PD-1 inhibit antiviral immunity at the effector phase in the liver. *J. Exp. Med.* 198. 39-50, 2003.

7) Oikawa, T. et. al. Intrahepatic expression of the co-stimulatory molecules programmed death-1, and its ligands in autoimmune liver disease. *Pathol. Int.* 57. 485-492, 2003.

8) Anglicheau D, et al. MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status. *PNAS* 106:5330-5335, 2009

9) Monticelli S, et al. MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system. *Genome Biol* 6:R71. 15, 2005

10) Merkerova M, et al. Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages *Eur J Haematol* 81 : 304-310, 2005

11) Yu D, et al. Roquin represses autoimmunity by limiting inducible T-cell co-stimulator messenger RNA. *Nature* 450 : 299-303, 2007

12) Bunt SK, et. al. Inflammation enhances myeloid-derived suppressor cell cross-talk by signaling through Toll-like receptor 4 *Inflammation enhances myeloid-derived suppressor cell cross-talk by signaling through Toll-like receptor 4*

13) Gabrilovich DI, et. al. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system *Nature Reviews Immunology* 9:162-174, 2009

14) Increased production of immature myeloid cells in cancer patients : a mechanism of immunosuppression in cancer. *J. immunol.* 166: 678-689, 2001

15) Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J. immunol.* 181 : 5791-5802, 2008

16) Youn JI, et. al. The biology of myeloid-derived suppressor cells : The

blessing and the course of morphological and functional heterogeneity. Eur. J. Immunol. 40(11) : 2969-2975, 2010

17) Huang B. et.al. Gr-1+CD11b+ myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. Cancer Res. 66:1123-1131, 2006

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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

(1) Songjie Cai, 第 39 回日本免疫学会総会, 幕張. 2011. 11. 27-29.

(2) 李小康: マウス肝移植モデルを用いた免疫寛容誘導機序の解明 日本移植学会 2012. 9. 20 名古屋

(3) Liu C: To induce mixed chimerism and specific transplantation immune tolerance via donor hematopoietic stem cells. The 3<sup>rd</sup> International Conference on Regulatory T cells and Helper T cell Subsets and Clinical Application Human Diseases. 2012. 10. 12 Shanghai, China

(4) 劉馳: ドナー造血幹細胞移植後のキメラ構築による特異的臓器移植免疫寛容の誘導 第 39 回日本臓器保存生物医学会 2012. 11. 16 福島

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田美和 (MORITA MIWA)

(独) 国立成育医療研究センター・RI 管理室・共同研究員

研究者番号: 90329699

(2) 研究分担者

梨井 康 (RII KOU)

(独) 国立成育医療センター・RI 管理室・室長

研究者番号: 60321890

杉岡 篤 (SUGIOKA ATSUSHI)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号: 20171150

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: