

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390315

研究課題名(和文) 移植医療への応用を目指した次世代免疫細胞療法の構築に関する研究

研究課題名(英文) To establish the next generation method for immune cell therapy in transplantation

研究代表者

梨井 康 (Li, Xiao-Kang)

独立行政法人国立成育医療研究センター・移植免疫研究室・室長

研究者番号：60321890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：研究期間中、1. iPS細胞から細胞免疫治療に用いる各種DCを簡易に大量作製するための分化誘導法を樹立した。また、制御性DCへの分化誘導を行い、その抑制機能有することを明らかにした。2. マウス肝移植後免疫寛容モデルにて、グラフトにMDSCの存在を確認し、有意にT細胞の増殖を抑制することを明らかにした。3. siRNAを抗原提示細胞特異的なDDS技術と抱き合わせることで、CD40-CD154の活性化を抑制することで、移植心生着延長の効果を明らかにした。4. 新規免疫抑制剤として、5-ALA/SFCのHO-1発現誘導効果を検証し、制御性DCを誘導することで、移植心生着延長の効果を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：During the study period, 1st, we established a method on differentiation DC from murine iPS cells for immune cell therapy. Also, we attempted to generate and characterize DCregs, revealed immune responsiveness regulation effects both in vitro and in vivo, and the ability to generate regulatory T-cells in vitro; 2nd, using mouse tolerant liver transplantation model, we confirmed the presence of MDSC in the grafts, significantly suppressed the T cells proliferation; 3rd, we developed a novel siRNA delivery system, specifically silencing CD40 genes, revealed the effect of the transplanted heart survival prolongation by suppressing the activation of the CD40/CD154 pathway and increased the DCreg cells; Last, we demonstrated that 5-ALA/SFC could inhibited T cell proliferation in response to alloantigens and increased number of regulatory DC and T cells, resulting in permanent cardiac allograft acceptance in mice. These findings highlight the important roles of HO-1 in inducing tolerance.

研究分野：移植免疫学

キーワード：移植・再生医療 幹細胞 細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

現在用いられている免疫抑制剤による移植医療は、移植を臓器不全に対する最終的な解決方法としての医療へと導きはしたが、半永久的な投与による副作用、精神的および経済的な負担が大きい為、新たな拒絶反応抑制方法の確立が切望されている。胚性 (ES) 幹細胞、特に人工多能性幹 (iPS) 細胞は、幅広い研究領域において革新的な発展を遂げる可能性を秘めた「夢の細胞」として、大きな注目を集めている。近年定常状態での免疫寛容誘導における未熟樹状細胞 (DC)、免疫抑制分子等により T 細胞活性化能が減弱した制御性 DC として作用することも示されている。また、ミエロイド由来抑制細胞 (Myeloid-derived suppressor cells: MDSC) は、強力な T 細胞機能障害誘導活性を持つ未成熟な骨髄性細胞の不均一な細胞集団で、種々の病的な状態 (ガン、感染、自己免疫疾患) において、未成熟なミエロイド系前駆細胞の、顆粒球、マクロファージ、樹状細胞への分化が部分的に阻害され、その結果として、この未成熟な集団が増殖して数を増やしたものである。世界で初めてマウスおよびヒト ES 細胞から DC への試験管内における分化誘導が成功したと報告された。近年、制御性 DC、MDSC による臓器移植後の拒絶反応抑制、自己免疫疾患の治療に対する臨床応用の可能性が期待されている。しかしながら、骨髄由来細胞はマウス等実験動物ではその採取が容易であるが、ヒトの場合骨髄細胞の採取は患者に大きな負担を課す。また、制御性 DC、MDSC への分化・誘導には長い期間が必要であり、細胞調整は容易では無く臨床応用の可能性が制限されている。ES、iPS 細胞の利用は患者への負担が極めて少なく、培養は実験室レベルで大規模に行う事が可能であり、十分な細胞が供給できる。本研究の展開により、幹細胞の免疫担当細胞への分化誘導を中心とした再生医学を樹立することにより、移植後の拒絶反応抑制、自己免疫疾患の治療に新たな可能性を生み出せると確信している。

2. 研究の目的

現在これら細胞の免疫制御機能の解析を進めている。動物移植モデルにおいて免疫を制御する事が明らかとなれば、臓器移植および自己免疫疾患に対する免疫制御細胞療法に用いる事が可能になると考えられる。このような幹細胞の移植免疫抑制への利用が可能になれば、拒絶反応抑制に用いる細胞の採取に関しても選択の幅が大きく広がる。また、本研究は幹細胞を利用した新たな移植免疫抑制の方法を開発する医療の面に留まらず、免疫系および幹細胞系それぞれの細胞系統間の相互作用、幹細胞の免疫系への関与、分化機序およびその生理学的な意味の解明といった基礎医学に寄与する事ができると期待される。

本研究予想される成果は免疫反応を負に

調節する細胞の発生・分化および幹細胞の免疫系への関わりについて新たな知見を生み出す。これは新たな移植免疫抑制の方法を開発するに留まらず、自己免疫疾患発症の機序解明にも繋がる。また、当然ながらこの研究成果は移植医療を受ける患者に対して安全な免疫抑制方法の提供を可能とし、移植後患者の QOL を飛躍的に向上させることができる。さらに、免疫抑制剤の投与停止により医療費の抑制にも繋がる。

3. 研究の方法

(1) iPS 細胞からより簡易・大量に樹状細胞 (DC) 作製する方法の確立および iPS 細胞から制御性 DC (iPS-DCreg) への分化誘導およびその機能解析。

(2) マウスアロ同所性肝移植後免疫寛容誘導モデルにて、移植後のグラフトにおけるミエロイド由来抑制細胞 (MDSC) の存在及びその抑制機能の解析。

(3) siRNA を抗原提示細胞特異的な DDS 技術と組み合わせることで、共刺激因子シグナル CD40-CD154 の活性化を抑制するによる移植臓器生着延長および制御性 DC 誘導の検討。

(4) 新規免疫抑制剤として、ALA 塩酸塩およびクエン酸第一鉄ナトリウム (SFC) の合剤のヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) 発現誘導効果の検証および制御性 DC 誘導の検討。

4. 研究成果

(1) 今まで確立した ES、iPS 細胞から樹状細胞を作成する分化誘導技術を基盤として、細胞免疫治療に用いる各種 DC を簡易に大量に作製するための分化誘導方法を検討した。Step-1 で 7 日間培養し、iPS 細胞のコロニーが十分に分化したことを確かめたのち、Step-1 の 1 枚の培養皿をトリプシン処理し、iPS 細胞、OP9 細胞とも単細胞にし、ゼラチンコートした Step-1 と同サイズの培養皿 3 枚に等量に播種し、Step-2 の培養過程に入り、十分量の分化誘導された浮遊細胞を得ることができた。Step-2 の速い時期で、その後の培養により、DC の能力を十分に備えた細胞を既存培養方法よりも 3 日ほど早く、かつ 2 倍ほどの大量な分化細胞を得ることができた。また、Step-3 での分化誘導培養時に使用する培養皿に多くの細胞が接着し、マクロファージに分化しやすい傾向があった。この点を改良するため HydroCell 培養皿に播種したところ、DC の性質に相応した培養ができ、効率的に DC を得ることができた。

一方、iPS-DCreg 細胞の誘導は、IL-10、TGF- β 等様々なサイトカインの添加によって検討した。その結果、iPS-DCreg では、骨髄由来制御性 DC (BM-DCreg) とほぼ同様に、Ia、CD80、CD86、CD40 等表面分子の発現は通常性 (Conventional) DC (DCconv) より顕著に減

弱した。ギムザ染色による細胞形態の観察においてもBM-DCregとの差が見られなかった。また、卵白アルブミン(OVA、タンパク質抗原)或はデキストラン(Dextran、糖質抗原)の抗原プロセッシング機能が維持されていることが確認できた。さらに、iPS-DCregは、BM-DCregと同様アロ刺激によるT細胞増殖の抑制機能がiPS-DCregの用量に比例していた。これらの結果からiPS細胞から制御性DCに分化誘導することができたといえる。

(2) マウスアロ同所性肝移植後免疫寛容誘導モデルにて、移植後のグラフトにおけるミエロイド由来抑制細胞(MDSC)の存在を確認した上、非実質細胞(NPC)から単離したCD11b陽性細胞を用い、有意にT細胞の増殖を抑制出来ることを明らかにした。次に、マウス骨髄細胞にhepatic stellate cells(HSC)を共培養したものにGM-CSFの存在下MDSCへの分化誘導を試み、得られた細胞のCD11b陽性細胞がGr-1の発現は高いものの、CD11cの発現は極めて低く、典型的なMDSCであることを確認した。この細胞をregulatorとして、リンパ球混合反応(MLR)の実験系に添加したものは、CD4、CD8T細胞のアロ反応増殖は抑制された。MDSCが肝移植後免疫寛容誘導には関わっていることや、MDSCがin vitroで骨髄から分化誘導することが示唆された。

(3) siRNAを抗原提示細胞特異的なDDS技術と抱き合わせることで、共刺激因子シグナルCD40-CD154の活性化を抑制するによる移植臓器生着延長の検討を行った。(i)100日以上の上安定的なグラフト生着、(ii)レシピエントにTreg、DCregの誘導を確認したこと、(iii)ドナー特異的な免疫寛容であったことを明らかにした。また、移植後の拍動日数が30日のマウス脾臓から各分画の細胞を調製し、CD11c(+)マクロファージ、或はCD4(+)CD25(+)Treg細胞を添加したグループにおいて、アロ応答による細胞増殖を50~65%程度抑制することが確認できた。レシピエントの生体内で誘導されている免疫的寛容状態が、ドナー抗原特異的なものであるかどうか確認する実験として、Adoptive cell transfer(養子移入試験)を実施し、コントロールと比較して、有意なグラフト生着延長を確認した。

(4) 新規免疫抑制剤として、ALA塩酸塩およびクエン酸第一鉄ナトリウム(SFC)の合剤のヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)発現誘導効果を検証し、臓器移植への応用の可能性を検討した。ヘム合成経路の中間体である5-アミノレブリン酸(5-ALA)は鉄イオン(Fe²⁺)と同時に細胞に作用させることで著しいヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)発現を誘導した。実際に、マウスマクロファージ様細胞株RAW 264において5-ALAとFe²⁺を作用させることで細胞内ヘム量の上昇が確認された。ヘムはHO-1転写

抑制因子Bach1と結合することでその分解を誘導することが知られている。Bach1を標的とした免疫沈降により得られたサンプル中にもヘムが確認されたことから5-ALAの添加によってもBach1-ヘム複合体の形成が起き、Bach1分解によるHO-1誘導の促進が起きていることが示唆された。また、Nrf2の上流にあるとされるマイトジェン活性化プロテインキナーゼ(MAPK)ファミリーであるErk1/2とp38のリン酸化も確認されており、それぞれの阻害剤によって部分的にはあるが5-ALAとFe²⁺によるHO-1誘導が阻害されたことからこれらの経路がRAW 264における5-ALAとFe²⁺によるHO-1誘導に関係していることがわかった。これらの結果から5-ALAとFe²⁺はRAW 264においてヘムへの代謝を促進することでBach1の分解を誘導し、同時にErk1/2とp38を活性化することでNrf2の活性化をもたらす2つの経路によってHO-1を誘導していると考えられた。

一方、ALA 塩酸塩およびクエン酸第一鉄ナトリウム(SFC)のHO-1発現誘導効果の結果を踏まえ、マウス同種異系心移植モデルを用いて、5-ALA/SFCの投与による免疫抑制、免疫寛容の誘導効果を検討した。移植後、5-ALA/SFCの投与で移植臓器の長期生着効果が得られ、その効果は5-ALA/SFCの濃度に依存であった。また、5-ALAおよびSFCによる長期的な免疫寛容の誘導はHO-1阻害剤ZnPPIXの投与によって完全に失われたことから、5-ALA/SFCによる移植心への長期的な免疫寛容の誘導にHO-1が関係していることがわかった。5-ALA/SFCを投与したマウスの術後14日における移植心ではCD8陽性細胞の増加は確認されなかったが、Foxp3陽性CD4細胞の増加が確認された。これらの結果から、5-ALA/SFCの投与はマウス移植心への免疫細胞の増殖を抑制するとともに免疫応答の抑制に関わるTregの誘導と増殖をもたらすことがわかった。さらに、5-ALA/SFCを投与したマウス移植心や脾臓においてMHCクラスII分子を強く発現しながらも共刺激分子CD40の発現が弱い樹状細胞がみられた。これらのことから、5-ALA/SFCの投与終了後に起こる長期的な移植心への免疫寛容の誘導にはこれら5-ALA/SFCの投与によって増加した免疫抑制性樹状細胞が関係していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

1. Zhang Q, Ichimaru N, Higuchi S, Cai SJ, Hou JG, Fujino M, Nonomura N, Kobayashi M, Ando H, Uno A, Sakurai K, Mochizuki S, Adachi Y, Ohno N, Zou HJ, Xu JH, Li Xiao K, Takahara S. Permanent acceptance of mouse cardiac allografts with CD40 siRNA to induce regulatory myeloid cells by use of a novel polysaccharide siRNA delivery system. *Gene Ther* 22(3):1-10; 2015.

- 2.Hou JG, Zhang Q, Fujino M, Cai SJ, Ito H, Takahashi K, Abe F, Nakajima M, Tanaka T, Xu JH, Zou HJ, Ding Q, Li Xiao K. 5-aminolaevulinic acid with ferrous iron induces permanent cardiac allograft acceptance in mice via the induction of regulatory cells. *J Heart Lung Transplant* 34(2): 254-63; 2015.
- 3.Morita M, Chen J, Fujino M, Kitazawa Y, Sugioka A, Zhong L, Li Xiao K. Identification of microRNAs involved in acute rejection and spontaneous tolerance in murine hepatic allografts. *Sci Rep*. 4:6649; 2014.
- 4.Nishio Y, Fujino M, Zhao MY, Ishii T, Ishizuka M, Ito H, Takahashi K, Abe F, Nakajima M, Tanaka T, Taketani S, Nagahara Y, Li Xiao K. 5-aminolevulinic acid combined with ferrous iron enhance the expression of heme oxygenase-1. *Int Immunopharmacol*.19(2):300-307; 2014.
- 5.Zhang Q, Fujino M, Iwasaki S, Hirano H, Cai S, Kitajima Y, Xu J, Li Xiao K. Generation and characterization of regulatory dendritic cells derived from murine induced pluripotent stem cells. *Sci Rep*. 4:3979; 2014.
- 6.Fujino M, Li Xiao K. Role of STAT3 in regulatory T lymphocyte plasticity during acute graft-vs-host-disease. *JAKSTAT*.1; 2(4): e24529; 2013.
- 7.Liu C, Zhu P, Saito T, Isaka Y, Nagahara Y, Zhuang J, Li Xiao K. Non-myeloablative conditioning is sufficient to induce mixed chimerism and subsequent acceptance of donor specific cardiac and skin grafts. *Int Immunopharmacol* 16(3): 392-8; 2013.
- 8.Liu Z, Hou J-G, Chen J-J, Tsumura H, Ito M, Ito Y, Hu X, Li Xiao K. Deletion of CD98hc in T cells results in cardiac allograft acceptance by increasing regulatory T cells. *Transplantation* 93(11): 1116-24; 2012.
- 9.Kitazawa Y, Li Xiao K, Xie L, Zhu P, Kimura H, Takahara S. Bone marrow derived conventional, but not cloned, mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation and prevent graft-versus-host disease in rats. *Cell Transplant*. 21(2): 581-90; 2012.
- 10.Xie L, Ichimaru N, Morita M, Chen JJ, Zhu P, Wang JH, Urbanellis P, Shalev I, Nagao S, Sugioka A, Zhong L, Nonomura N, Takahara S, Levy GA, Li Xiao K. Identification of a novel biomarker gene set with sensitivity and specificity to distinguish between allograft rejection and tolerance. *Liver Transplant* 18:444-454; 2012.
- 〔学会発表〕(計12件)
1. Songjie Cai, Naotsugu Ichimaru, Mingyi Zhao, Li Xiao K. A novel preservation solution prolonged cold storage in mouse cardiac grafts. 2014.7.26-31. World Transplant Congress 2014. San Francisco.
2. Li Xiao K. 5-ALA attenuate immune responses via induction of HO-1 to induce T cell and regulatory dendritic cells. 2014.8.14-17. The 12th China Congress, International Society of Heart Research. Harbin.
3. 西尾佳明、藤野真之、趙明一、李小康. 5-アミノレブリン酸と鉄イオンによるヘム合成の促進とヘムオキシゲナーゼ-1の誘導. 2014.4.26 第4回ポリフィリン・ALA学会年会 (ワークショップ), 神戸.
4. Songjie Cai, Naotsugu Ichimaru, Sadaharu Higuchi, Li Xiao K. Silencing CD40 gene to induce transplantation tolerance using a novel siRNA delivery system. 2013.11.7-9. 13th TTS Basic Science Symposium. Paris.
5. Chi Liu, Xue Yang, Masayuki Fujino, Li Xiao K. 5-aminolevulinic acid prevents skin and internal organs inflammation and fibrosis in murine sclerodermatous grafts-versus-host disease, a model for human scleroderma. 2013.11.20-23. Autoimmunity Congress Asia 2013. Hong Kong.
6. CAI Songjie, ICHIMARU Naotsugu, HIGUCHI Sadaharu, Li Xiao K. Silencing CD40 gene to induce specific regulatory dendritic cells resulting in permanent acceptance of mouse cardiac allograft using a novel siRNA delivery system 2013.12.11-13 第42回日本免疫学総会 (ワークショップ), 幕張.

7. 西尾佳明、伊東秀典、安部史紀、李小康. 5-アミノレブリン酸によるヘムオキシゲナーゼ-1 誘導の促進 2013.4.27. 第3回ポルフィリン-ALA 学会年会(ワークショップ), 横浜.

8. Yuya Kitajima, Songjie Cai, Yoshiaki Nishio, Li Xiao K. 5-aminolevulinic acid induces permanent acceptance of murine cardiac allografts via induction of regulator dendritic cells and expansion of alloantigen-specific Tregs 2013.4.27. 第3回ポルフィリン-ALA 学会年会(ワークショップ), 横浜.

9. Zhang Q, Cai SJ, Hou JG, Yazawa K, Ichimaru N, Kobayashi M, Higuchi S, Uno A, Ando H, Sakurai K, Adachi Y, Ohno N, Xu JH, Li Xiao K, Takahara S. A novel siRNA delivery system specifically silencing target gene to induce permanent acceptance of mouse cardiac allograft. 24th International Congress of the Transplantation Society. Berlin, Germany; 2012.7.15-19.

10. 李小康, 森田美和, 杉岡篤. マウス肝移植モデルを用いた免疫寛容機序の解明. 第48回日本移植学会総会 名古屋. 2012.9.20-22.

11. Songjie Cai, Miwa Morita, Yuya Kitajima, Qi Zhang, Jiangan Hou, Hiromitsu Kimura, Lina Lu, Li Xiao K. The requirement of the myeloid-derived suppressor cells for spontaneous acceptance after liver transplantation in mice. 第39回日本免疫学会総会 幕張. 2011.11.27-29.

12. Jiangan Hou, Songjie Cai, Qi Zhang, Yusuke Kitazawa, Hiromitsu Kimura, Jun Shimizu, Li Xiao K. Long-term acceptance

of cardiac allografts with superagonist anti-CD28 and anti-GITR mAbs. 第40回日本免疫学会総会 幕張. 2011.11.27-29.

〔図書〕(計 1 件)

1. Fujino M, Zhu P, Kitazawa Y, Chen JM, Zhuang J, Li Xiao K. Mesenchymal stem cells attenuate rat graft-versus-host disease. Methods Molecular Biology 2014; 1213:341-53.

〔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
梨井 康(LI Xiaokang)
国立成育医療研究センター・移植免疫研究室・室長
研究者番号: 60321890

(2)研究分担者
木村 廣光(KIMURA Hiromitsu)
国立成育医療研究センター・共同研究管理室・室長
研究者番号: 80115477

高原 史郎(TAKAHARA Shiro)
大阪大学・先端移植基盤医療学・教授
研究者番号: 70179547

奥見 雅由(OKUMI Masayoshi)
大阪大学・泌尿器学・助教
研究者番号: 60512978