

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 13 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591464

研究課題名(和文) ヒト制御性T細胞および免疫抑制系樹状細胞の効率良い誘導法の確立と治療への展開

研究課題名(英文) Establishment of the method for efficient induction of human regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells and application to therapy

研究代表者

長谷川 均 (Hasegawa, Hitoshi)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40164826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：免疫寛容樹状細胞(tDCs)は、アレルギーや自己免疫疾患において免疫寛容を導き、細胞治療への応用が期待されている。我々は、生理活性脂質などのライブラリーからスクリーニングを行い、強い免疫寛容誘導能を持つCキナーゼ阻害剤(PKCI)を単離した。PKCI-tDCsは、表現型はセミ成熟型で、IL-10を産生し、IL-10産生およびFoxp3陽性T細胞の制御性T細胞を効率よく誘導し、T細胞抑制能を示した。また、CCR7の発現は十分に保たれており、炎症環境下でも安定していた。マウスPKCI-tDCsはヒトと同様の表現型と機能を有し、GVHDモデルマウスに移入すると、GVHDは有意に抑制された。

研究成果の概要(英文)：Tolerogenic dendritic cells (tDCs) are a promising tool for cellular therapy for allergy and autoimmunity. From libraries of bioactive lipids, nuclear receptor ligands, and kinase inhibitors, we screened conventional protein kinase C inhibitors (PKCIs) with strong tolerogenic potential. The PKCI-treated DCs had a semi-mature phenotype, showing high production of IL-10, and efficiently induced IL-10-producing T cells and functional Foxp3+ regulatory T cells from naive CD4+ T cells, thus eliciting a strong immunosuppressive function. They also showed CCR7 expression and sufficient capacity for migration toward CCR7 ligands. In addition, PKCI-treated DCs were highly stable when exposed to inflammatory stimuli such as proinflammatory cytokines or LPS. Moreover, PKCI-treated mouse DCs that had properties similar to PKCI-treated human DCs prevented graft-vs-host disease (GVHD) in a murine model of acute GVHD. Conventional PKCI-treated DCs may be useful for tolerance-inducing therapy.

研究分野：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：dendritic cells regulatory T cells protein kinase C

1. 研究開始当初の背景

免疫系には、免疫寛容というシステムが存在し、自己免疫、アレルギー、炎症といった病的な免疫反応を抑制して免疫恒常性の維持に重要な役割を果たしている。免疫寛容の誘導を司る細胞として、制御性 T 細胞(Tregs)と免疫抑制系樹状細胞(tDCs)があり、これらの相互作用によって、免疫寛容が維持される。

近年、Tregs や tDCs の分化誘導や機能に影響を与える生理活性物質や薬剤が注目されており、これらによって、免疫の調節が可能である。しかしながら、tDCs を導く生理活性物質については多くの報告があるが、それぞれの生理活性物質によって、tDCs の表現型、サイトカイン産生は異なり、また T 細胞のアナジーを誘導する能力あるいは異なるサブタイプの Tregs の誘導能もそれぞれ異なる。ここで問題になるのは、どの物質が最も効率よく tDCs を誘導できるのかということと、生体内に移入した場合に十分働くかということである。このためには以下の 3 点が重要である。1) ナイーブ T 細胞を Tregs に誘導するために反応の場である二次リンパ組織への遊走能が維持されていること、つまり CCR7 の発現が十分あること、2) 炎症状況下でも安定していること、3) Tr1 細胞や Treg 細胞などの機能的な制御性 T 細胞が十分誘導できることがあげられる。今まで報告されている tDCs 誘導物質はいずれも一長一短があり、上記の臨床応用 3 条件を満たす新たな誘導物質の単離が必要であった。

2. 研究の目的

ヒト tDCs を対象にし、生理活性脂質などのライブラリーから、これらの細胞への分化誘導を促進させる物質を単離し、その役割と機序を解明するとともに、これらを用いて、Tregs や tDCs への効率が良く、生体内でも安定な誘導法の確立と抗原特異的 Tregs の作成を目指す。

3. 研究の方法

ライブラリーは核内受容体リガンド、生理活性脂質、キナーゼ阻害剤の約 150 種類を用いた。スクリーニング法は、CD14+細胞に GM-CSF, IL-4 を加え単球由来の樹状細胞を誘導させ、成熟刺激を加え成熟樹状細胞を誘導する。その過程において、上記の物質を添加し、細胞の CD80, CD83, CD86 の発現と IL-10 産生量を調べた。スクリーニングから、11 種類を単離し(表 1)、これらのうち、最も強く反応したのは Bisindolylmaleimide I のプロテインキナーゼ C 阻害剤 (PKCI) で、その他 G66983, Ro32-0432 の 2 種類を加えた conventional PKC (cPKC) の阻害剤にて誘導した樹状細胞(PKCI-tDCs)の特徴とその臨床的有用性について検討した。

表 1 スクリーニングから単離された誘導物質

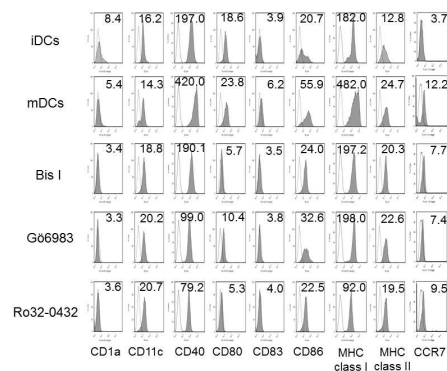
Bisindolylmaleimide I	(Protein kinase C inhibitor)
Dexamethazone	(GR agonist)
TTNPB	(RAR agonist)
6-formylindolocarbazole	(AHR agonist)
25-hydroxyvitamin D3	(VDR agonist)
Ciglitazone	(PPARγ agonist)
AM580	(RARα agonist)
AM251	(cannabinoid antagonist)
AG879	(NGFR kinase inhibitor)
Indirubin	(GSK3 beta, CDK5 inhibitor)
Indirubin-3-monoxime	(GSK3 beta inhibitor)

4. 研究成果

PKCI-tDCs の特徴を以下に述べる。

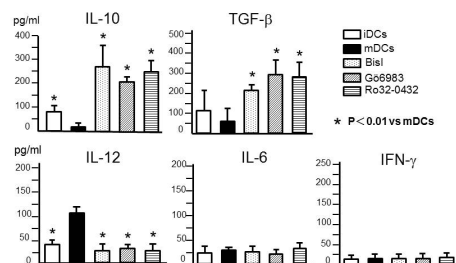
- (1) 表面マーカーに関しては CD14, CD80, CD83, CD86, MHC class の発現は低下していたが、CD1a, CD11c, MHC class の発現は比較的保たれていた。また、CCR7 の発現も比較的高く、二次リンパ組織への遊走能は維持されていた(図 1)。貪食能についても FITC-dextran にて高く維持されていた。

図 1 PKCI-tDCs の表面形質



- (2) 炎症性サイトカイン、IL-6, IFN-γ, IL-12 の産生は低下している一方で、抑制性サイトカイン、IL-10 と TGF-β の産生は著しく増加していた(図 2)。

図 2 PKCI-tDCs のサイトカインの産生



(3) PKCI-tDCs による T 細胞の増殖抑制機能 (図 3) や制御性 T 細胞の誘導機能 (図 4) について検討した。ナイーブ T 細胞との 5 日間共培養にて、IL-10 産生 CD4 陽性 T 細胞と Foxp3+CD4+CD25+T 細胞の誘導について検討した。PKCI-tDCs と共培養した T 細胞は増殖能が低下しており、また IL-10, Foxp3 の発現細胞が有意に増加していた。

図 3 PKCI-tDCs の T 細胞増殖抑制能

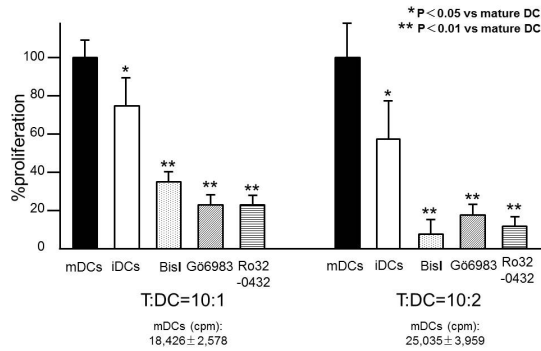
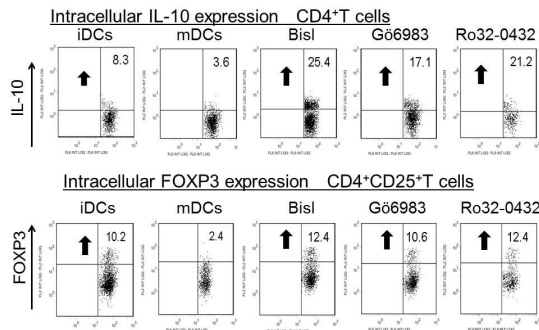


図 4 PKCI-tDCs の制御性 T 細胞の誘導能



(4) PKCI-tDCs とナイーブ T 細胞との共培養において、誘導された T 細胞は、MLR において T 細胞の増殖能を抑制した。この抑制能は抗 IL-10 抗体, 抗 TGF-β 抗体を加えることで一部回復し、transwell の実験でほぼ 100% 回復した。このことは、PKCI-tDCs を用いて誘導した T 細胞の effector T 細胞への抑制能は IL-10 と TGF-β による抑制性サイトカインに加えて、細胞接触が重要な役割を果たすことが明らかになった (図 5)。

(5) PKCI-tDCs の安定性を検討するために炎症状態において、表面マーカー、機能、サイトカインの産生について解析した。炎症刺激には、LPS または TNF-α, IL-1β, IL-6, IFN-γ の炎症性サイトカインカクテルを用いた。その結果、PKCI-tDCs の表現型は維持されており、IL-10 と TGF-β の産生も増加しており、T 細胞の抑制能についても維持されていた (図 6, 7, 8)。

図 5 PKCI-DCs で誘導した T 細胞は、T 細胞抑制機能を示した

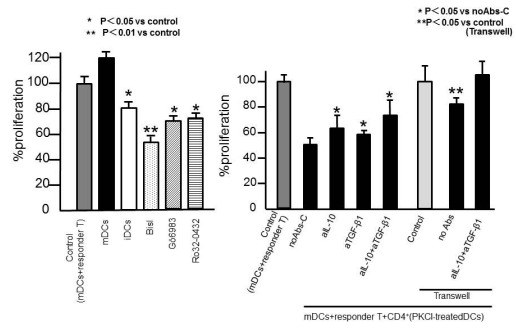


図 6 PKCI-tDCs の安定性 表面形質

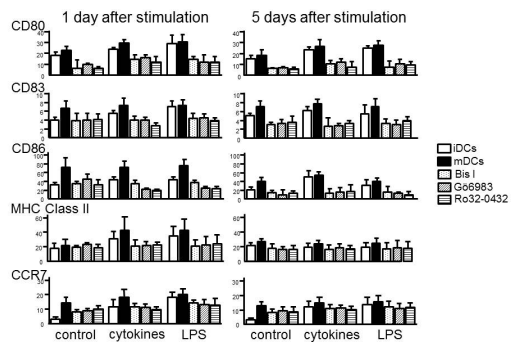


図 7 PKCI-tDCs の安定性 サイトカイン

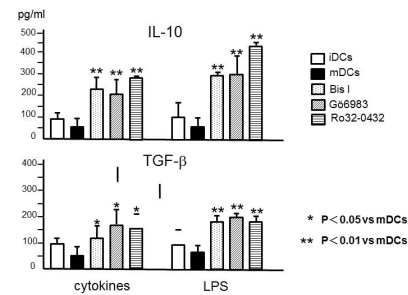
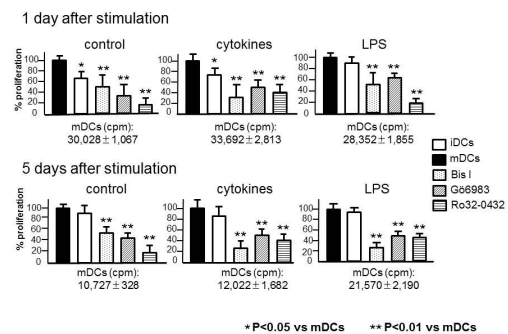


図 8 PKCI-tDCs の安定性 MLR



(6) 次に PKCI が免疫寛容樹状細胞を誘導する機序について解析した。DC 上の共刺激分子の発現に転写因子 NF κ B, IL-10 の発現に cAMP/CREB が重要な役割を演ずる。このために、PKCI 存在下と非存在下で TNF- α , IL-1 β , PGE₂ を加え、比較検討したところ、PKCI 存在下では NF κ B の発現の低下と細胞内 cAMP の上昇が認められ、これらの機序によって免疫寛容樹状細胞が誘導されることが明らかになった (図 9, 10)。

図 9 PKCI は樹状細胞の NF B 活性化を阻害する

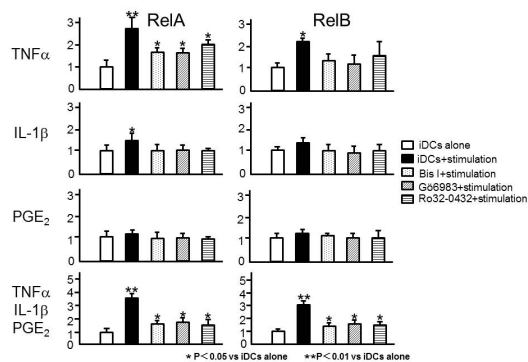
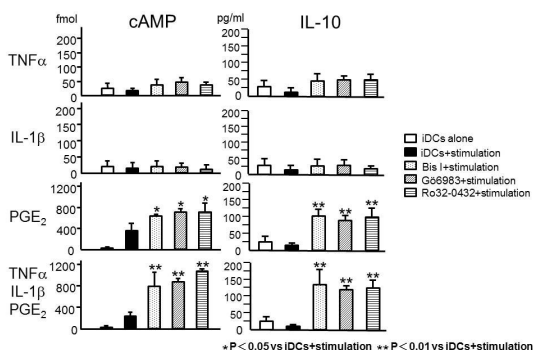
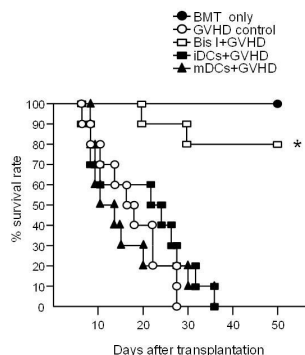


図 10 PKCI は樹状細胞内の cAMP 濃度を増加させ、IL-10 の産生も増加していた



(7) さらに、マウス PKCI-tDCs はヒトと同様の表現型と機能を有した。PKCI-tDCs を GVHD モデルマウスに移入すると、GVHD は有意に抑制され、in vivo においても有効性が証明された (図 11)。

図 11 GVHD モデルマウスに各種樹状細胞投与後の生存期間の比較



(8) 結論

cPKCI で誘導された樹状細胞は、臨床応用 3 条件を満たした。PKCI 存在下では、成熟刺激を加えた際に、樹状細胞の核内 NF- κ B の発現の低下と細胞内 cAMP の上昇が認められ、これらの機序によって PKCI は tDCs を誘導すると考えられた。マウス PKCI-tDCs はヒトと同様の表現型と機能を有した。PKCI-tDCs を GVHD モデルマウスに移入すると、GVHD は有意に抑制され、in vivo においても有効性が証明された。今後の臨床応用が期待できる。[この研究成果は、2013 年 9 月号の Journal of Immunology 誌上(In This Issue で掲載)で高く評価された]

(10) その他

ヒト Tregs を効率よく誘導する物質として、PPAR γ にレチノイン酸 (RA) の併用を報告した (Journal of Immunology 185: 7186-7198, 2010)。上記のライブラリーからスクリーニングしている物質を検討したが、PPAR γ +RA 以上の物質は見いだせなかった。

ANCA 関連血管炎患者末梢血から誘導した PKCI-tDCs を用いて、PR3-ANCA もしくは MPO-ANCA に対する抗原特異的 Treg 細胞の作成を ex vivo で行ったが、現時点では十分できていない。これは、患者末梢血サンプルの多くはステロイドや免疫抑制剤を用いており、リンパ球の数や増殖が悪いためと考えられた。

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 4 件)

1. 長谷川均、末盛浩一郎。免疫トレランス誘導性樹状細胞の誘導による自己免疫疾患の治療。臨床免疫・アレルギー科 62: 469-474, 2014 査読無
2. 長谷川均、松本卓也、安川正貴。樹状細胞のトレランス誘導機能と protein kinase C。臨床免疫・アレルギー科 61:141-150, 2014 査読無
3. Matsumoto T, Hasegawa H, Onishi S, Ishizaki J, Suemori K, Yasukawa M. Protein kinase C inhibitor generates stable human tolerogenic dendritic cells. Journal of Immunology 191: 2247-2257, 2013 doi: 10.4049/jimmunol.1203053 査読有
4. 松本卓也、長谷川均、安川正貴。免疫トレランスを誘導する樹状細胞を発現させる生理活性物質。臨床免疫・アレルギー科 59: 483-490, 2013 査読無

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Adnan E, Matsumoto T, Ishizaki J, Onishi S, Suemori K, Yasukawa M, Hasegawa H. Human tolerogenic dendritic cells generated with protein kinase C inhibitor are optimal

- for regulatory T cell induction- A comparative study. 2014 Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology Boston USA 2014.11.18
2. 長谷川均。寛容型樹状細胞の誘導と臨床応用の可能性。第42回日本臨床免疫学会総会 シンポジウム。京王プラザホテル（東京都新宿区）。2014.9.25
 3. 長谷川均。生理活性物質による安定性のあるヒト制御性T細胞および寛容型樹状細胞の誘導と臨床応用。第41回日本臨床免疫学会総会 シンポジウム。海峡メッセ下関（山口県下関市）。2013.11.29
 4. Matsumoto T, Hasegawa H, Ishizaki, J., Suemori K, Onishi S, Yasukawa, M. Protein kinase C inhibitor generates human tolerogenic dendritic cells that induce Tr1 and Foxp3+regulatory T cells. 2012 Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology. Washington D. C, USA. 2012.11.12
 5. Hasegawa H, Matsumoto T, Onishi S, Suemori K, Yasukawa M. Analysis of the bioactive molecules that promote the induction of human tolerogenic dendritic cells, and application to therapy for Bechet's disease. 15th International Conference on Bechet's Disease. PACIFICO Yokohama, Japan. 2012.7.14

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 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 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

長谷川 均 (Hasegawa, Hitoshi)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：40164826

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
末盛 浩一郎 (Suemori, Koichiro)
愛媛大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80571083