

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462535

研究課題名(和文) 標的細胞特異的 DDS技術を用いた免疫抑制siRNAによる移植臓器の免疫寛容誘導

研究課題名(英文) Permanent acceptance of allografts with CD40 siRNA by use of a novel polysaccharide siRNA delivery system.

研究代表者

市丸 直嗣 (ICHIMARU, Naotsugu)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座准教授

研究者番号：70346211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：CD40/CD154共刺激経路は同種免疫応答において重要な役割を果たす。small interfering RNA (siRNA) を効果的に送達するsiCD40/SPGを作成した。受容体Dectin-1がsiCD40/SPGを樹状細胞内にエンドサイトーシスで取り込むことにより、CD40が抑制される。ドナーをC57BL/10、レシピエントをCBAとしたマウス異所性心移植モデルでこのsiCD40/SPGの効果を検討したところ、siCD40/SPG投与群の移植心は全例が100日以上生着した。adoptive transferでの検討ではドナー特異的な免疫学的低応答が誘導された。

研究成果の概要(英文)：The CD40/CD154 co-stimulatory pathway is crucial in alloimmune response. We developed a small interfering RNA (siRNA) delivery system. This was captured and incorporated into dendritic cells (DCs) through its receptor, Dectin-1, specifically silencing CD40 genes (siCD40) to exert immunoregulatory activity. As a result, siCD40/SPG-treated CBA mice permanently accepted B10 fully mismatched cardiac allografts. In addition, naive CBA recipients given an adoptive transfer of splenocytes from the primary recipients with siCD40/SPG accepted a heart graft from donor-type B10, but not third-party Balb/c mice.

研究分野：臓器移植

キーワード：免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

現在の臓器移植ではカルシニューリン阻害薬などの全身投与による免疫抑制で拒絶反応を予防する。多剤併用免疫抑制療法による強力な免疫抑制作用により、急性拒絶反応は制御され臓器移植後の短期成績は向上した。しかし免疫抑制の結果生じる感染症と悪性腫瘍が本邦の腎移植後死因の上位になっており重大な問題となっている。またカルシニューリン阻害薬を用いると薬剤性腎障害などの副作用が好発するため、常時血中濃度モニタリングが永続的に要求される。加えて皮肉なことに免疫抑制薬の投与が、制御性 T 細胞 (Treg) の増殖を抑制するため免疫寛容の成立を阻害する。このことから免疫抑制薬などの薬物治療が臓器移植後には永続的に欠かせない。

我々は siRNA を抗原提示細胞特異的な Drug Delivery System (DDS) 技術と抱き合わせることで、共刺激因子シグナルである CD40-CD154 の活性化を適切に抑制したマウス心臓移植モデルの予備的検討で、単剤投与で移植片生着期間が有意に延長することを確認できた。この予備的検討は免疫応答シグナルに関与する主要な細胞膜表面タンパクを、遺伝子のレベルから制御し、標的細胞特異的に応答の減弱を誘導することによる急性拒絶応答治療を実現するための第一歩となった。この移植片の長期生着が、アロ抗原特異的な寛容の誘導に由来していることが実証できれば、*ex vivo* 細胞療法を *in vivo* で達成する新規治療方法の樹立にも繋がる。

日本では、末期腎不全に対する治療法として、相変わらず人工透析を選択する割合が圧倒的に高い。このことは医療財政の圧迫や若年層患者の社会生活への期待感の阻害の一因となっている。一方、移植治療は健常者とほぼ同等の社会復帰を期待できるものの、現在の拒絶反応抑制治療では脱薬への期待は低く、長期的な経済的負担を強いている。我々の進めている新規治療法は、移植臓器の永続的生着を果たし、

脱薬への期待を飛躍的に高めるものである。即ち、現在から大きく進歩した未来の移植医療のパラダイムシフトを企画し、また日本の医療行政の効率的運用に貢献するものと考えた。

研究計画として、マウス異所性心臓移植モデルを通じて、この薬理効果の移植免疫的な意義を精緻に調査すること、治療需要として最も高い腎移植への実用性を我々がこれまで数多くの実験を行って実証してきたラット同所性腎移植モデルを用いて確立すること、治療レジメンを意識しながら医薬粒子の最適化を繰り返し行い、Chemistry, Manufacturing and Control 研究へ橋渡しすること、の 3 点を柱とした。成功すれば拒絶反応を抑えて移植臓器の生着期間を延長し、免疫抑制療法が起こす種々の合併症を回避して患者死亡率を減らすことができる。従来必要であった永続的な薬物療法も不要になることにより日本の保険医療の効率的運用に高く貢献できる、安心かつ安全な拒絶反応抑制治療の実用化研究を目指した。

共刺激シグナル(Signal 2) の制御によるアロ応答の制御には数多くの知見が存在する。特に抗体を用いたシグナル制御は医薬開発に発展している。しかし、標的細胞指向性を持たないことから、標的部位や標的細胞以外にも作用し免疫不全を呈する懸念は依然払拭できていない。我々は 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 の活性化を適切に抑制し得ることを確認した。また本 DDS 化 siRNA は混合リンパ球培養反応(MLR)で、アロ応答によるリンパ球活性を有意に抑制することを確認した。そして、マウス心臓移植モデルの予備的検討では、単剤投与で移植片生着の有意な延長を確認できた。このことは、細胞膜表面上で免疫応答シグナルに関与する主要なタンパク発現を遺伝子のレベルから制御することで、標的細胞特異的に応答の減弱を誘導できることを意味しており、結果として少量の単剤投与による急性拒絶応答治療の実現に限りなく近づいていると考えた。

この移植片の長期生着がアロ抗原特異的な寛容の誘導に由来していることが実証できれば、*ex vivo* 細胞療法を *in vivo* で達成する新規治療方法としての確立にも繋がる。ドナー抗原特異的免疫寛容を実現し移植片の永続的生着が可能となれば、まさに拒絶反応抑制治療のパラダイムシフトとなる。

本治療方法の実用化は、日本の保険医療制度の効率的運用にも高い貢献を果たす。末期腎不全に対する治療法として、日本では人工透析を選択する割合が圧倒的に高い。健常者とほぼ同等の社会復帰を期待できる腎臓移植治療において、精神的・経済的な負担を軽減し安心感を提供する治療方法の確立が重要である。その一つとして、移植後の拒絶反応抑制治療法の改善が掲げられる。現在の腎臓移植医療の現場では、免疫抑制薬としてステロイド薬・代謝拮抗薬・カルシニューリン阻害薬を用いているが、残念ながら脱薬への期待は低いため、長期的な負担を強いることに繋がっている。我々の進めている研究は、ドナー抗原に対する寛容を生体内で誘導することを主眼としている。これによって移植臓器の永続的生着を果たし、脱薬への期待が大いに高まる。また、この治療方法の実用化は、遠くは異種移植も視野に入れられることから、ドナー負担を軽減する可能性もある。即ち、現在から未来の移植後治療のパラダイムシフトの設計を許容し、日本の医療行政の効率的運用に貢献するものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、標的細胞特異的 DDS 技術を臓器移植における免疫抑制 siRNA 医薬に採用することで、単剤・小用量の薬剤投与で免疫寛容を誘導することにより、移植臓器の拒絶反応を抑制して画期的な生着延長を確立しかつ全身への副作用を最小限にする新規治療方法を樹立することである。

3. 研究の方法

マウス異所性心臓移植モデル (HTx モデル) とラット腎臓移植モデル (KTx モデル) を用いた 2 種の臓器移植モデル動物実験系を採用した。

マウス HTx については、予備的検討において移植臓器の長期生着を確認し、物性評価・分子生物学的評価・基礎薬理評価はすでに終了した DDS 化 siRNA を投与した。具体的には、マウス siRNA 配列の設計・DDS 材料の SPG との包摂化・剤型の決定・製造方法の最適化・*in vitro*・*in vivo* MLR による基礎薬理評価について最適化を終了したものを投与した。本研究では、量および頻度など投与スケジュールの最適化を進め、さらにその再現性を確保し、各種コントロール群との比較を周到にし、最後に免疫的な分析を精緻に行った。

ラット KTx については、siRNA 配列を設計から行った。粒子最適化実験を行った後、その後の腎臓移植実験を進めた。急性拒絶反応の抑制を確認し、慢性拒絶反応の主因と考えられる動脈の内膜肥厚が CD40-CD154 のシグナル制御で抑制される可能性を含めた観察と移植免疫学的評価を行った。

核酸-SPG 複合体による抗原提示細胞特異的な DDS 技術

グルカン (SPG) と一本鎖核酸-SPG 複合体を作成し、機能性核酸のキャリアとして用いた。一本鎖核酸の末端に機能性核酸をホスホジエステル結合で包摂して用いた。

受容体 Dectin-1 を介したエンドサイトーシスで核酸-SPG 複合体をキャリアとした siRNA を細胞内に導入した。受容体 Dectin-1 は抗原提示細胞 (DC) に特異的に発現するため、SPG 側鎖と結合し siRNA のキャリアである核酸-SPG 複合体が細胞内にエンドサイトーシスで取り込まれる。

in vivo MLR

このような性質を有する DDS 技術に CD40 mRNA の発現を抑制する siRNA を包摂して、マウスおよびラットの MLR を行った。マウス前実験においては siRNA/SPG は、2 μ g/head の投与でアロ応答によるリンパ球の活性化を有意に抑

制することを確認しており、これを参考にラットにおける siRNA の配列選択と SPG 複合体の最適化を行い、マウス同様に MLR を行ってリンパ球活性化の抑制を確認した。

マウス異所性心臓移植モデル

マウス心臓移植における移植臓器の生着延長を確認した。ドナーマウスを C57BL/10(B10)、レシピエントマウスを CBA とした。異系統マウスを用いたモデルとしては、ドナーマウスを Balb/c、レシピエントマウスを C57BL/6 とした。移植心の拍動を確認して生着と判定し、投与サンプルの効果有効性の内容を確認した。生着延長の免疫的意義の確認として、MST>7days・MST>30days・MST>100days のレシピエントマウスからグラフトや脾臓を摘出し、リンパ球の増殖性を測定し、サイトカイン産生の推移を観察し、免疫制御細胞 (Treg, regDC) の誘導を確認した。また、長期生着 (MST >100 days) を果たしたレシピエントマウスへ naïve ドナーマウスの皮膚を移植し、免疫的寛容の樹立が達成しているか確認した。siRNA/SPG を、移植後 7 日までに合計 16 μg を分割投与し、コントロール群と比較して移植臓器の生着を確認した。

投与法

ドナー: 2 $\mu\text{g}/\text{head}/\text{each}$ 尾静脈投与 day -3, -1

レシピエント: 2 $\mu\text{g}/\text{head}/\text{each}$ 尾静脈投与 day -3, -1, 1, 3, 5, 7。

拒絶反応を制御し且つ免疫寛容を誘導するという目的を達するには、レシピエント T 細胞の応答をある程度まで減弱させることが必要と考え、ドナー Balb/c、レシピエント C57BL/6 の組み合わせで、siCD40/SPG とエベロリムスを併用して免疫寛容を誘導できる投与スケジュールを検討した。

ラット siRNA の配列選択と SPG 複合体の最適化 siRNA 配列を設計し、最も CD40 mRNA を抑制し且つ加水分解しにくいものを選択した。その上で SPG との包摂体を作成し、物性評価・分子細胞学的評価 in vitro RNAi 活性評価を進めて最終剤型を確定した。基礎薬理は siRNA を尾静脈

投与して MLR を実施しアロ応答の減弱が果たされているか確認した。

ラット腎臓移植モデル

ドナー Fisher ラット左腎をレシピエント Lewis ラット左腎と置き換え、急性拒絶応答前までの死亡例を除いたレシピエントラット群から、右腎を摘出した後、レシピエントラットの生存を観察した。サンプルの投与スケジュールは、マウス心臓移植モデルの結果から決定した。同時に、尿量・尿タンパク・血清クレアチニン濃度・クレアチニンクリアランスなどを測定して、移植腎の機能の回復あるいは不全を観察した。

4. 研究成果

ドナーマウスを B10、レシピエントマウスを CBA とした異所性心臓移植モデルでは、移植心の拍動確認を生着と評価して、投与した siCD40/SPG の有効性を確認した。

前処置なしのコントロール群、siCD40 投与群、siGAPDH/SPG 投与群のレシピエントマウスにおいて移植心はそれぞれ 7.3 ± 0.6 日 (n=12), 7.3 ± 0.8 日 (n=7), 8.9 ± 4.9 日 (n=7) で拒絶されたのに対し、本研究目的の siCD40/SPG 投与群レシピエントマウスにおいて移植心は全例が 100 日以上生着した (n=16)。この長期生着した移植心の病理組織標本では、僅かな間質への炎症細胞浸潤を認めるのみで、心筋障害は認めなかった。このため siCD40-SPG 複合体はマウス心臓移植モデルにおいて長期生着を誘導すると考えられた。

ex vivo MLR において、siCD40/SPG 投与群レシピエントマウスから取り出した脾細胞は、ドナータイプ由来の DC で再刺激しても増殖能が低下していたのに対し、third party である Balb/c 由来の DC で刺激した場合は増殖能が保たれていた。さらに、siCD40/SPG 投与群レシピエントマウスから取り出した脾細胞を別の無処置 CBA マウスに adoptive transfer した後にドナータイプの B10 から心臓移植した場合は生着したが、third party の Balb/c から心臓移植した場合は拒絶された。こ

のことから siCD40/SPG 投与により, ドナー特異的な免疫学的低応答が誘導されることが示唆された。

ドナー Balb/c, レシピエント C57BL/6 の組み合わせで, エベロリムスで長期生着に至らない用量を探索し, 0.8mg/kg/day で day 0-7 投与と設定した。このモデルに siCD40/SPG を併用すると移植心生着率は改善する傾向にあり Hazard 比は 0.52 であった。

ラット同所性腎臓移植モデルにおける siCD40/SPG の生着延長効果の検討では, ラット siRNA の配列選択と SPG 複合体の最適化を行ない, 本配列がマウス有効配列とホモロジーが高くマウスにも有効に RNAi が誘導されることを確認した。この SPG 複合体を, ラット同所性腎臓移植モデルに投与した。腎移植後の血清クレアチニン値は, siCD40/SPG 投与群でコントロール群と比較して低下傾向であった。

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 1 件)

1. Zhang Q, Ichimaru N, Higuchi S, Cai S, Hou , Fujino M, Nonomura N, Kobayashi M, Ando H, Uno A, Sakurai K, Mochizuki S, Adachi Y, Ohno N, Zou H, Xu J, Li XK, 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 Therapy (査読有) Mar;22(3), 2015 :217-26. doi: 10.1038/gt.2014.119.

6. 研究組織

(1)研究代表者

市丸 直嗣 (ICHIMARU Naotsugu)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号: 70346211

(2)研究分担者

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

高原 史郎 (TAKAHARA Shiro)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号: 70179547

貝森淳哉 (KAIMORI Jun-ya)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号: 70527697