

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461944

研究課題名(和文)末梢血由来MDSCおよびトランスジェニックブタ細胞を用いた異種移植拒絶反応の抑制

研究課題名(英文) MDSC-induced suppression of xenogeneic rejection in combination with gene-modification in porcine endothelial cells

研究代表者

前田 晃 (Maeda, Akira)

大阪大学・医学系研究科・招へい研究員

研究者番号：00319708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSC)は非常に多能な免疫抑制細胞である。我々はヒト末梢血よりこのMDSCを非常に効率的に誘導する方法を確立し、さらにこの手法で得られたMDSCはNK細胞、細胞傷害性T細胞、マクロファージによる異種拒絶反応を著明に抑制することを明らかにした(Xenotransplantation 2014:21:46-56, Transpl Immunol 2015:33:140-5)。
また、様々なgene-modified ブタ血管内皮細胞における異種移植拒絶反応の抑制を検討し、さらに有効な異種移植免疫寛容誘導法の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that myeloid-derived suppressor cells (MDSC) are associated with long-term survival and tolerance in transplantation. We demonstrated that monocytic MDSCs are successfully induced from peripheral blood monocytes with our established method and these MDSCs significantly suppressed the xenogeneic rejection by NK cells, cytotoxic T cells and macrophages(Xenotransplantation 2014:21:46-56, Transpl Immunol 2015:33:140-5). Moreover, we examined the suppression of xenogeneic rejection in gene-modified porcine endothelial cells. Our findings indicate that MDSC has a potential to induce more powerful tolerance against xenogeneic rejection in combination with generation of gene modified pigs.

研究分野：異種移植

キーワード：MDSC 異種移植 拒絶反応 トランス

1. 研究開始当初の背景

国内外の臓器移植においては深刻なドナー不足に悩まされており、現在まで異種移植の臨床応用に向け精力的に研究されてきた。

-Gal エピトープをノックアウトしたブタや補体制御因子トランスジェニックブタなど遺伝子改変ブタの開発等により、ブタ臓器を用いた異種移植の臨床での実用化が現実味を帯びてきた。しかし異種移植においては、超急性拒絶反応をはじめとして、NK細胞・マクロファージ・補体による傷害、細胞傷害性T細胞による攻撃などありとあらゆる拒絶反応を想定しなければならない。例えば HLA-E 遺伝子などの発現により NK 細胞からの拒絶反応を抑制できることは既に報告されているが、同時に NK による感染防御や自己反応性T細胞の除去といった必要不可欠な役割をも抑制していることを忘れてはならない。すなわち免疫を抑えるのではなく調節することが肝要で、今回の研究においては MDSC を中心に如何に異種拒絶反応を調節するかを検討する。

myeloid-derived suppressor cells (MDSC) は T 細胞および NK 細胞に対し抑制効果があることが知られており、異種移植を含む移植においてもその有効性が報告されている。しかしそのメカニズムおよびファンクションに関しては特にヒト MDSC においてははまだ不明な点が多い。近年我々はヒト末梢血より単球由来の免疫抑制性の細胞を分離することに成功した。健常人ヒト末梢血単核球から得られた単球を GM-CSF および IL-4 存在下で 24 時間培養し、その後 LPS や poly IC などで活性化させると HLA-DR 陰性 CD33 陽性細胞の著明な増殖を見た。我々が分離した細胞は HLA-DR 陰性 CD14 陽性の単球由来の細胞で、これらの細胞が異種のブタ細胞に対する cytotoxic T cell (CTL) および NK 細胞の細胞傷害活性を著明に抑制することが明らかとなった (Maeda A et al. Xenotransplantation 2014, 21:46-56, Maeda A et al. Transpl proc 2014, 46: 1254-5)。本研究はこの MDSC を用いた新たな異種移植拒絶反応を抑制する手法を確立することにある。

2. 研究の目的

myeloid-derived suppressor cells (MDSC) は T 細胞および NK 細胞に対し抑制効果があることが知られており、異種移植を含む移植においてもその有効性が報告されている。しかしそのメカニズムおよびファンクションに関しては特にヒト MDSC においてははまだ不明な点が多い。近年我々はヒト末梢血より単球由来の免疫抑制性の細胞を分離することに成功した。我々が分離した細胞は HLA-DR 陰性 CD14 陽性の単球由来の細胞で、これらの細胞が異種のブタ細胞に対する cytotoxic T cell (CTL) および NK 細胞の細胞傷害活性を著明に抑制することが明らかとなった。本

研究はこの MDSC を用いた新たな異種移植拒絶反応を抑制する手法を確立し、異種移植における有用性を検討することである。さらに現在世界中で様々な遺伝子導入ブタの作成が行われているが、MDSC の活性化を促す遺伝子をブタ細胞に導入することにより MDSC による異種移植拒絶反応抑制作用を増強できるかを検討し、いかなる遺伝子導入ブタが異種移植に有用かを明らかにする。

3. 研究の方法

健常人ヒト末梢血単核球から得られた単球を GM-CSF および IL-4 存在下で 24 時間培養し、その後 LPS や poly IC などで活性化させると HLA-DR 陰性 CD33 陽性細胞の著明な増殖を見た。この HLA-DR 陰性 CD33 陽性細胞をマグネティックソーティングにより分離し、MDSC として使用した。この MDSC の T 細胞や NK 細胞、マクロファージなどによる異種移植拒絶反応に対する抑制効果を *in vitro* に於いて検討した。

ブタ血管内皮細胞に対する拒絶反応は LDH assay, WST-8 assay, CFSE assay により検討した。

さらにブタ血管内皮細胞に様々な遺伝子を導入し、マクロファージなどによる異種移植拒絶反応に対する抑制効果を検討した。

4. 研究成果

上記方法にて得られた MDSC は T 細胞、NK 細胞、マクロファージによる異種移植拒絶反応を著明に抑制した。

また、様々な免疫細胞から産生される炎症性サイトカインを MDSC が抑制することが明らかとなった。特に活性化した MDSC に於いてはインドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO) の発現が著明であり、IDO インヒビターである 1-メチルトリプトファンにより MDSC の抑制効果が消失したことから、IDO によるトリプトファン欠乏が MDSC による拒絶抑制の最も重要なメカニズムと考えられる。

さらに HLA-E や HLA-G などの遺伝子を導入したブタ血管内皮細胞に於いては、著明なマクロファージによる細胞傷害活性の抑制を認めた。

これらの結果から MDSC と遺伝子改良ブタを組み合わせた治療は異種移植拒絶反応において相乗効果が期待できる。

これらの知見は国際学会等にて発表し、英文雑誌にて報告した。

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. Maeda A, Eguchi H, Nakahata K, Lo PC, Yamanaka K, Kawamura T, Matsuura R, Sakai R, Asada M, Okuyama H, Miyagawa S. Monocytic MDSCs regulate

macrophage-mediated xenogeneic cytotoxicity. Transpl Immunol, 査読有り, 33巻, 2015年, 140-145頁

2. Eguchi H, Maeda A, Lo PC, Matsuura R, Esquivel EL, Asada M, Sakai R, Deguchi K, Ueno T, Okuyama H, Miyagawa S. HLA-G1, but not HLA-G3, suppresses human monocyte/macrophage-mediated swine endothelial cell lysis. Transplant Proceedings, 査読有り, 48巻, 2016年, 1285-1287頁, DOI: 10.1016/j.transproceed.2015
3. Maeda A, Choi TV, Lo PC, Sakai R, Asada M, Yamanaka K, Nakahata K, Matsuura R, Eguchi H, Okuyama H, Miyagawa S. Human HLA-Ev(147) Expression in Transgenic Animals. Transplant Proceedings, 査読有り, 48巻, 2016年, 1323-1325頁, DOI: 10.1016/j.transproceed.2015
4. Sakai R, Maeda A, Matsuura R, Eguchi H, Lo PC, Hasuwa H, Ikawa M, Nakahata K, Zenitani M, Yamamuchi T, Umeda S, Okuyama H, Miyagawa S. Expression of a Synthetic Gene of CTDM by Transgenic Animals. Transplant Proceedings, 査読有り, 48巻, 2016年, 1279-1281頁, DOI: 10.1016/j.transproceed.2015

〔学会発表〕(計9件)

1. 前田 晃, Monocytic myeloid-derived suppressor cells suppress macrophage-mediated cytotoxicity, World Transplantation Congress 2014, 2014年7月26-31日, サンフランシスコ アメリカ
2. 前田 晃, MDSCの炎症性マクロファージに対する抑制効果の検討 日本移植学会, 2014年9月10-12日, 東京
3. 前田 晃, Monocytic MDSC suppresses macrophage-mediated cytotoxicity via NO suppression, 14th Congress of Asian Society of Transplantation, 2015年8月23-26日, シンガポール
4. 前田 晃, CD55発現ブタ血管内皮細胞に対するマクロファージ誘導細胞傷害活性の検討, 日本移植学会, 2015年10月1-3日, 熊本
5. 前田 晃, Ectopic expression of human CD55 on porcine cells suppresses macrophage-mediated xenogeneic rejection, IPITA, IXA, CTS 2015 Joint Congress, 2015年11月11-15日, メルボルン オーストラリア

6. 前田 晃, ヒトCD55によるマクロファージ誘導細胞傷害活性の抑制効果の検討, 日本異種移植研究会, 2016年2月20日, 長崎
7. 前田 晃, 末梢血由来単球性MDSCはマクロファージにおけるARG-1産生を誘導し細胞傷害活性を抑制する, 日本外科学会, 2016年4月14-16日, 大阪
8. 前田 晃, Human CD200 suppresses the M0 macrophage-mediated cytotoxicity in xenotransplantation, 26th International Congress of the Transplantation Society, 2016年8月16-18日, 香港 中国
9. 前田 晃, The strategies for preventing the macrophage-mediated rejection in xenotransplantation, Joint Conference of 5th KXA symposium and 12th Soul Forum on Xenotransplantation, 2016年11月24日, ソウル 韓国

〔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:
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
前田 晃(MAEDA, Akira)
大阪大学医学系研究科・招聘研究員
研究者番号:319708

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
宮川 周士 (MIYAGAWA, Shuji)
大阪大学医学系研究科・准教授
研究者番号：90273648

(4)研究協力者
()