

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860752

研究課題名(和文)Cキナーゼ阻害剤で誘導されたヒト免疫寛容樹状細胞による自己免疫疾患治療への展開

研究課題名(英文)Development of the treatment for autoimmune disorders using human tolerogenic dendritic cells induced by protein kinase C inhibitor.

研究代表者

松本 卓也(Matsumoto, Takuya)

愛媛大学・医学部附属病院・講師(病院教員)

研究者番号：70724780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：以前我々はヒトの未熟樹状細胞の成熟過程において、Cキナーゼ阻害剤(PKCI)を用いて、炎症環境下でも安定性のある強い免疫寛容能を持つ免疫寛容樹状細胞(tDCs)が誘導出来ることを報告した。PKCI-tDCsと他のtDCsを誘導する物質にとの比較により、PKCI-tDCsが最もtDCsとして優れていることが示された。また、膠原病患者(シェーグレン症候群、関節リウマチ)の末梢血からもPKCI-tDCsが誘導することができた。上記結果から、PKCI-tDCsは、臨床応用において有用である可能性を示し得た。

研究成果の概要(英文)：Previously, we reported that we could induce tolerance dendritic cell (tDCs) which had strong immune tolerance ability with the stability in the condition of the inflammatory environment by using C kinase inhibitors (PKCI) in the maturity process of the dendritic cell of human. In addition, we made a comparison between PKCI-tDCs and tDCs derived other materials, PKCI-tDCs was shown to be superior effects than other tDCs. Also PKCI-tDCs could be derived from the peripheral blood of the patient with collagen diseases (Sjogren's syndrome and rheumatoid arthritis). From these results mentioned above, PKCI-tDCs might have useful possibility in clinical application.

研究分野：リウマチ膠原病学

キーワード：免疫寛容樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞(DCs)は、自己免疫疾患やアレルギー疾患などの発症、制御に大きく関わっており、獲得免疫において強力な能力を持っている一方で、免疫寛容を導く点においても重要な役割を果たしていることが報告されている。自己免疫疾患の患者の多くが、免疫抑制剤に治療を受けている。免疫抑制剤は、免疫抑制作用は強いが、その作用に比例して感染症などの副作用も多い。それゆえ、より選択的で副作用が少ない長期間寛解を維持できる治療の研究がすすめられており、自己反応性 T 細胞を標的とした免疫寛容を導く DCs を用いた抗原特異的な治療が注目されている。

2. 研究の目的

今までに生理活性物質や薬剤を用いて、免疫寛容樹状細胞(tDCs)を誘導した報告があるが、それぞれの物質によって、tDCs の表現型、サイトカイン産生は異なり、また T 細胞アナジールあるいは制御性 T 細胞(Tregs)の誘導能も異なる。

ここで問題になるのは、どの物質が最も効率よく免疫寛容樹状細胞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。このためには以下に述べる点が重要であると考えた。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、炎症状況下でも安定していること、Tr1 細胞や Tregs 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。

そこで、我々は生理活性脂質、核内受容体リガンド、キナーゼ阻害剤ライブラリーからのスクリーニングを行い、ヒト tDC への分化誘導が促進する物質として、C キナーゼ阻害剤(PKCI)を見出した。PKCI-tDCs は IL-10、TGF-beta の産生能は亢進し、Tregs も十分誘導した。PKCI-tDCs は炎症環境下でも安定しており、CCR7 の発現も高く、リンパ節への遊走能も十分保たれていた。以上より、PKCI-tDCs は上記の臨床応用可能な 3 条件を満たしていた。また、ヒト PKCI-tDCs とマウス PKCI-tDCs は同様の表現型と機能を持つこと示し、GVHD モデルマウスに、マウス PKCI-tDCs を投与したところ、生存期間の延長が確認でき、生体内でも十分働くことが証明され報告した。(J. Immunol 191:2247, 2013)。

上記のように PKCI-tDCs は、自己免疫疾患、アレルギー疾患において臨床応用の期待が持てる結果であったが、他の物質との比較と膠原病患者においても同様に誘導できるかの研究が必要であると考え、今回の研究では、我々が見出した PKCI と今まで報告されている免疫寛容樹状細胞を導くほかの物質との比較を行い、いずれの物質が臨床応用に優れているかを研究する。加えて、膠原病患者の末梢血を用いて、PKCI-tDCs が誘導出来る

かを検証する。また、シェーグレン患者において、MR3T 細胞エピトープの解析をすすめる

3. 研究の方法

PKCI-tDCs と既報告の誘導物質、IL-10、TGF-beta、VitaminD3(VitD3)、dexamethazone(Dexa)、rapamycin(Rapa)、PPARgamma+retinoic acid(PPAR+RA)の 6 種類のいずれかを加えて誘導した tDCs との比較検討を行った。未熟樹状細胞の成熟過程において上記物質を加え、tDCs を誘導し、(1)表面マーカー、(2)貪食能、(3)CCL19 に対する遊走能、(4)IL-10 および TGF-beta の抑制型サイトカインを含めたサイトカイン、(5)T 細胞増殖抑制能、(6)抑制性 T 細胞(FOXP3 陽性 T 細胞: Tregs、IL-10 産生 T 細胞: Tr1)の誘導能について比較検討を行った。

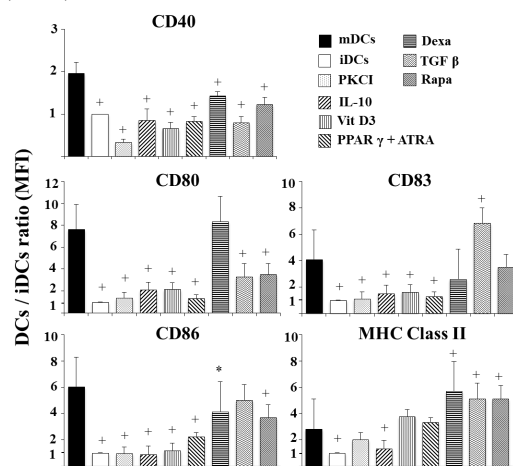
シェーグレン症候群、MPO-ANCA 関連血管炎、関節リウマチの膠原病患者の末梢血を用いて、PKCI-tDCs が誘導出来るかを検討した。

4. 研究成果

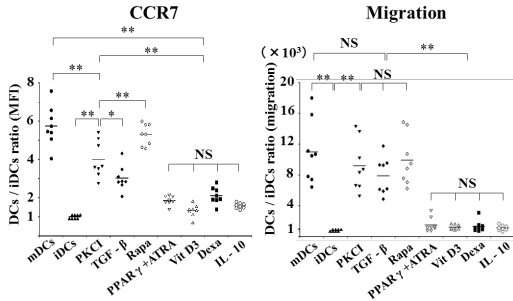
PKCI-tDCs と既報告の誘導物質、IL-10、TGF-beta、VitaminD3(VitD3)、dexamethazone(Dexa)、rapamycin(Rapa)、PPARgamma+retinoic acid(PPAR+RA)の 6 種類のいずれかを加えて誘導した tDCs との比較検討した結果、表面マーカーについては、PKCI、IL-10、VitD3、PPAR+RA で誘導した tDCs は immature あるいは semi mature の表現型を示し、Dexa、Rapa、TGF-beta はやや上記物質より発現が認められた。(図 1)

CCR7 の発現が成熟細胞に準じた発現と遊走能が保たれていたのは CCL19 に対する遊走能が維持されていたのは PKCI、TGF-beta、Rapa であった。(図 2)

(図 1)表面マーカーの解析

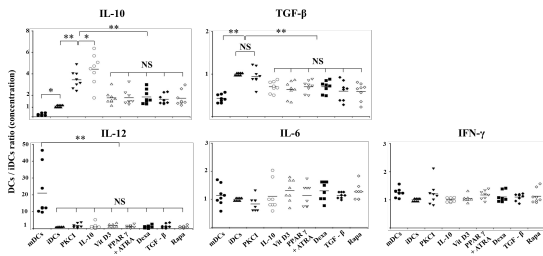


(図2) CCR7の発現と遊走能

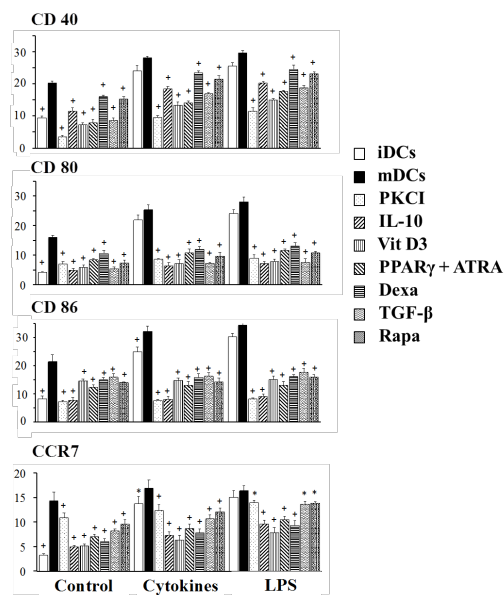


サイトカインにおいて、IL-10の産生はIL-10とPKCIで誘導したtDCsで多く、TGF-betaはPKCI-tDCsで高値であった。(図3) T細胞増殖抑制能が高いのは、PKCI、IL-10、VitD、PPAR+RAの4種類から誘導されたtDCsであった。(図4) Treg誘導能が高いのはPKCIとPPAR+RAであり、Th1誘導能が高いのはIL-10とPKCIであった。(図5) 上記結果から、PKCI-tDCsは臨床応用に使用するにおいて有用である可能性が示唆された。

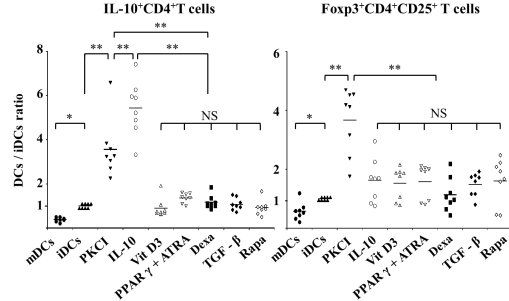
(図3) 各種tDCs産生サイトカインの比較



(図4) T細胞増殖抑制能の比較

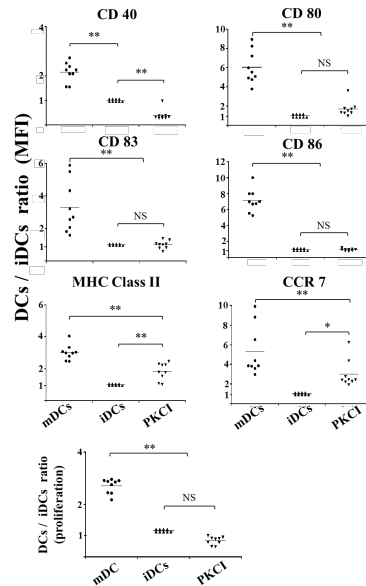


(図5) 各種tDCsの制御性T細胞誘導能の比較



次に膠原病患者の末梢血から、PKCI-tDCsが誘導できるかを検討した。その結果、PKCI-tDCsが誘導でき、強いT細胞増殖抑制能が認められた。シェーグレン患者においては、約20名の患者の末梢血からPKCI-tDCsが誘導できた。また、関節リウマチ患者においても、9名からPKCI-tDCsの誘導が確認できた(図6)。MPO-ANCA関連血管炎の患者に関しては、PKCI-tDCsは誘導できなかった、理由として対象患者においてステロイドなどの免疫抑制剤がすでに治療として投与されており、単球、リンパ球の数が少なく、増殖が悪いためと考えられた。また、シェーグレン患者において、MR3T細胞エピートープの解析を行っており、その候補エピートープをパルスし自己抗原特異的なTregの誘導について解析を行っている。

(図6)



本研究の特色・独創的な点は、PKCIによって誘導されたヒトtDCsが、新たなtDCsとして、臨床応用の可能性が十分あるということを示すことができた点である。今後これらの研究をさらに発展させ、抑制機能を持ったTregsやtDCsを効率よく、安定的に誘導する方法を確立し、自己免疫疾患やアレルギー、移植片拒絶などに対する抗原特異的治療へ展開させていく方針である。

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 2 件)

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 functional regulatory T cell induction – a comparative study. Clinical Immunology, 査読有、173 巻、2016、96-108  
DOI:10.1016/j.clim.2016.09.007

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、査読無、61 巻、2014、141-150

〔学会発表〕(計 3 件)

長谷川均、Endy Adnan, 松本卓也、石崎淳、大西佐知子、末盛浩一郎、安川正貴  
各種誘導物質で誘導された免疫寛容樹状細胞の抑制機能の比較検討  
第 43 回日本臨床免疫学会総会、2015/10/22-10/24、神戸国際会議場、兵庫県神戸市、日本

Endy Adnan, Takuya Matsumoto, et al  
Human tolerogenic dendritic cells generated with protein kinase C inhibitor are optimal for functional regulatory T cell induction – a comparative study.  
Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology 2014/11/18, Boston, USA

松本卓也、大西佐知子、石崎淳、末盛浩一郎、安川正貴、長谷川均  
プロテインキナーゼ C 阻害剤誘導免疫寛容樹状細胞の生体での効果と他の免疫寛容樹状細胞との比較  
第 58 回日本リウマチ学会、2014/4/24-4/26、グランドプリンスホテル新高輪、東京都港区、日本

〔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  
松本 卓也 (Matsumoto, Takuya)  
愛媛大学・医学部附属病院・講師(病院教員)  
研究者番号：70724780

(2)研究分担者  
研究者番号：

(3)連携研究者 ( )  
研究者番号：

(4)研究協力者 ( )