

令和 3 年 5 月 22 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04277

研究課題名(和文) 抗原特異的な移植免疫寛容を誘導するための自然・獲得免疫時空間ネットワークの構築

研究課題名(英文) Construction of a innate/acquired immune spatiotemporal network to induce antigen-specific transplant immune tolerance

研究代表者

梨井 康 (Rii, Ko)

国立研究開発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) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：現在の免疫抑制療法では、半永久的な免疫抑制剤の投与が必要であり、不必要な免疫抑制による副作用が問題となっている。本研究は、「生体内での移植抗原特異的免疫制御環境の構築と移植抗原特異的免疫寛容誘導法の確立」を目的とし、制御性樹状細胞、抗体とドナー抗原の移植前投与、ゼイモサン、天然ハーブの主要な生物活性成分であるオリドニン等様々な方法で、マウスアロ心臓移植モデルを用いて、グラフトの生着延長効果を確認した上、生体内での移植抗原特異的免疫制御環境の構築の作用機序を解析した。これらの研究成果は、自然免疫の制御が移植臓器の生着期間延長効果、移植免疫寛容の誘導にも重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、生体内で自然免疫を惹起する刺激を引き起こし、移植抗原特異的な免疫制御環境を構築することであり、移植抗原特異的な免疫(獲得免疫)制御機序を誘導し、免疫抑制剤投与の減少に移植免疫寛容を成り立たせることの可能性を示唆された。これら研究成果を近い将来臨床応用する際、本邦の生体移植が行われる割合が高い特徴を生かして、移植に先んじて移植抗原の同定が可能であることから、あらかじめ同定された移植抗原を用いて、移植患者において移植臓器特異的な免疫制御機序を誘導することが可能と予想する。移植後の初期段階から少ない免疫抑制剤の投与、あるいは投与無しに移植臓器の生着を成し遂げることが可能と期待する。

研究成果の概要(英文)：Current immunosuppressive therapies require the administration of permanent immunosuppressive drugs, and side effects due to unnecessary immunosuppression have become a problem. The purpose of this study is to "construct a transplant antigen-specific immunoregulatory environment in vivo and establish a transplant antigen-specific immunotolerance induction method". Using pre-transplant administration of regulatory dendritic cells, antibodies with donor antigens, zymosan, Oridonin, which is a major biologically active component of natural herbs, etc., we confirmed their effect for prolonging grafts survival days in mouse allo-cardiac transplant model. The mechanism which was constructed an antigen-specific immunoregulatory environment in vivo was analyzed. These research results suggest that the innate immunity may play an important role for prolonging allograft survival and inducing transplantation immune tolerance.

研究分野：移植免疫

キーワード：免疫寛容 自然免疫 獲得免疫 臓器移植

1. 研究開始当初の背景

臓器移植医療においては、移植後、終生に渡る免疫抑制剤投与が必須となっている。免疫抑制剤の長期投与は、移植臓器への拒絶反応に対する免疫反応を抑制するのみならず、感染症、腫瘍に対する免疫反応も抑制するために、患者の生活の質（QOL）を低下させる原因となっている。従って、如何にして免疫抑制剤の使用から離脱するか、あるいは免疫抑制剤投与量の減量を行うかが、移植医療の重大なテーマである。カルシニューリン阻害剤投与等の既存の免疫制御療法は、T細胞活性化の阻害を標的としている。しかし、これら抗原提示細胞（APC）により抗原提示を受けたT細胞による拒絶反応（獲得免疫による攻撃）の抑制だけでは、免疫寛容の誘導は困難である。一方、移植医療の初期より免疫抑制剤として用いられてきたステロイドは、T細胞のみならず、自然免疫に関与する細胞群にも影響を与え、免疫抑制効果を発揮している。しかしながら、ステロイドは非炎症性の細胞にも作用し、様々な細胞の代謝機能に影響を与える事から、消化性潰瘍をはじめとする重篤な副作用をもたらす。従って、副作用の無い自然免疫刺激による免疫寛容の誘導が望まれている。

2. 研究の目的

本研究は、既存の免疫抑制剤による非特異的な免疫抑制を廃し、移植臓器特異的な免疫抑制を移植医療において確立させることを目的とし、「生体内での移植抗原特異的免疫制御環境の構築と移植抗原特異的免疫寛容誘導法の確立」を行う。本方法の確立を通して、自然免疫による非特異的な刺激が、移植抗原特異的免疫制御（獲得免疫）を誘導することの本質を理解し、移植臓器特異的免疫寛容を成立させる手技を樹立する。

3. 研究の方法

全体の研究内容を「非特異的な自然免疫系の刺激による自然免疫刺激受（自然免疫惹起）細胞の解析」；「生体内における移植抗原特異的な免疫制御機序の解析」；「移植モデルを用いた、自然・獲得免疫の時空間ネットワーク構築による移植免疫寛容誘導法の樹立」の三つのテーマに絞って研究を行なった。

4. 研究成果

（1）初年度は移植抗原特異的な免疫反応の制御に重要な役割を果たしている制御性樹状細胞（DCreg）の機能と移植抗原特異的免疫制御に関する理解を深めるために、DCregを用いた抗原特異的な移植免疫寛容誘導に関する検討を行った。DCregを用いた免疫療法は移植拒絶反応に対する有用な治療材料であると認識されている。本研究では、強力な免疫刺激下でも「安定した未熟期」ととどまる可能性があるDCregをマウス誘導多能性幹細胞（iPSC）から分化誘導させ、iPS-DCregが制御性T細胞（Treg）を生成するためのネガティブワクチンとして働き、ドナー特異的同種移植片受容を誘導するかを検討した。ナイーブCBA（H-2K^b）マウスにB6（H-2K^b）iPS-DCregを移入すると、TregがCBA脾細胞において有意に増加し、ドナー（B6）特異的に心臓移植

片が永久生着した。ドナー由来iPS-DCregがTGF- β 1を分泌することにより、ドナー抗原ペプチドはナイーブCD4⁺T細胞を生体内でエフェクターT細胞の代わりに、ドナー特異的Foxp3⁺Tregに分化させた。これらの知見は、臨床移植における重要な細胞療法リソースとしてのiPS-DCregの可能性を強く示唆するものである。

(2) 次年度は、抗CD4、CD8抗体とドナー抗原であるペプチドの移植前投与による抗原特異的免疫制御環境の構築に伴うマウスアロ心臓移植モデルの生着延長効果について検討した。コントロールとして、B6マウスの心臓をC3Hマウスに異所性に移植し、グラフトの生存期間は(n=15; MST=7day)でした。抗CD4またはCD8抗体の投与7日後、B6の心臓をC3Hに移植した。その結果、抗CD4抗体単独投与では、グラフトの生存期間は(n=14; MST=100day)で、抗CD8抗体単独投与では、グラフトの生存期間は(n=17; MST=21day)であった。その結果を踏まえて、抗CD4またはCD8抗体の移植前投与を行うと共にドナー抗原であるペプチド(Kb peptide 54-68: QEGPEYWERETQKAKG; 5 μ g/head)を移植前5,3,1日に投与した。その結果、抗CD4抗体+ペプチドでは、1例除いて、他の全例は100日(n=14; MST=100day)を超え、グラフトの永久生着を得た。一方、抗CD8抗体+ペプチドでは、グラフトの生存期間は(n=12; MST=16.5day)で、有意なドナー臓器の生着延長効果を認めなかった。

(3) 第三年度は、今までの研究成果を踏まえて、まず、移植前に自然免疫刺激を加え移植抗原特異的な免疫制御環境を構築する目的で、より強いMHCの組み合わせで(ドナー: B6, H2-K^bマウス、レシピエント: Balb/c, H2-K^dマウス)、マウス心臓移植の実験を行った。コントロールのグラフトの生存期間は(n=6; Mean \pm SD=7.5 \pm 0.84 days)に対して、抗CD4抗体単独投与では、グラフトの生存期間は(n=6; Mean \pm SD=26.3 \pm 12.18 days)で、抗CD4抗体の移植前投与を行うと共に、ドナー抗原であるペプチドを移植前6,4,2日に投与のグループでは、グラフトの生存期間は(n=6; Mean \pm SD=69.2 \pm 31.98 days)であった。顕著なグラフト生存期間延長効果を示した。また、移植前プレコンディショニングによる移植抗原特異的免疫制御環境誘導系の確立の目的で、移植に先立ち、Zymoanの投与で自然免疫による刺激を加えることで、その効果について検証した。コントロールグループでは、B6(H2-K^b)マウスの心臓、C3H(H2-K^k)マウスに移植した。グラフトの生存期間は(n=21; Mean \pm SD=8.05 \pm 0.59 days)であった。Zymoanを用いて、様々な投与方法・投与量を検討したところで、最終的には、100 μ g; -3,3; i.v.の投与で、最もグラフトの生存期間(n=12; Mean \pm SD=61.75 \pm 35.27 days)が得られた。Zymoanが顕著なグラフトの生存期間延長効果を示した。

(4) 最終年度は、自然免疫に重要な役割を果たしているNLRP3インフラマソーム共有結合阻害剤として報告されている天然の抗炎症ハーブ*Rabdosia rubescens*の主要な生物活性成分であるオリドニン(Oridonin)を用いて、移植抗原特異的な免疫制御環境を構築する目的で、今までの研究成果を踏まえて、完全にMHCミスマッチのマウス心臓移植後の長期生存効果を検証した上、その作用機序について解析した。コントロールグループでは、B6(H2-K^b)マウスの心臓、C3H(H2-K^k)マウスに移植した。グラフトの生存期間は(n=21; Mean \pm SEM = 8.05 \pm 0.1 days)であった。オリドニンを用いて、投与量を3、10、15mg/kgで検討したところ、15mg/kgの

投与で、最も長いグラフトの生存期間(n=8; Mean \pm SEM = 67.3 \pm 14.1 days; p<0.0001)が得られた。オリドニンが顕著なグラフトの生存期間延長効果を示した。同種移植片組織学の検討では、浸潤性CD8⁺T細胞とマクロファージが減少し、制御性T細胞 (Treg) が増殖していることがわかった。また、移植片浸潤細胞のIL-1bおよびIFN- γ のmRNA発現は減弱された。一方、オリドニン *in vivo*での効果の作用機序を検証するため、*in vitro*の実験を行なった。オリドニンで処理された骨髄由来樹状細胞 (BMDC) は、アロIFN- γ CD4⁺ T細胞の増殖を抑制し、TregとIL-10⁺CD4⁺T細胞の増殖を促進した。さらに、LPS活性化BMDCにおけるNF- κ BおよびI κ B のリン酸化の減弱、NLRP3、カスパーゼ-1、IL-1 β 、IL-18およびIFN- γ タンパクレベルでの発現の減弱も確認できた。これらの研究成果は、自然免疫の制御が移植臓器の生着期間延長効果、移植免疫寛容の誘導にも重要な役割を果たしていることがわかり、新規で天然の免疫抑制剤としてのオリドニンの可能性が示唆された。

<引用文献>

1. Zhao J, Que WT, Du XX, Fujino M, Ichimaru N, Ueta H, Tokuda N, Guo WZ, Zabrocki P, Haard HD, Nonomura N, Li Xiao K*. Monotherapy with anti-CD70 antibody causes long-term mouse cardiac allograft acceptance with induction of tolerogenic dendritic cells. **Frontiers in Immunology** 11:555996; 2021.
2. Matsuda Y, Hiramitsu T, Li Xiao K, Watanabe T. Characteristics of immunoglobulin M type antibodies of different origins from the immunologic and clinical viewpoints and their application in controlling antibody-mediated allograft rejection. **Pathogens** 10(1), 4;2021.
3. Wang ZD, Ma K, Liu C, Hu X, Que WT, Ito H, Takahashi K, Nakajima M, Tanaka T, Ren K, Guo WZ, Yi SQ, Li Xiao K*. 5-Aminolevulinic acid combined with sodium ferrous ameliorated liver injury in a murine acute graft-versus-host disease model by reducing inflammation responses through PGC-1 activation. **Drug Discoveries & Therapeutics** 14(6):304-312; 2020.
4. Que WT, Guo WZ, Li Xiao K*. Manipulation of regulatory dendritic cells for induction transplantation tolerance. **Frontiers in Immunology** 11:582658; 2020.
5. Jiang YZ, Que WT, Zhu P, Li Xiao K*. The role of diverse liver cells in liver transplantation tolerance. **Frontiers in Immunology** 11:1203; 2020.
6. Liu C, Fujino M, Zhu S, Isaka Y, Ito H, Takahashi K, Nakajima M, Tanaka T, Zhu P, Li Xiao K*. 5-ALA/SFC enhances HO-1 expression through the MAPK/Nrf2 antioxidant pathway and attenuates murine tubular epithelial cell apoptosis. **FEBS Open Bio.** 9(11): 1928-1938; 2019.
7. Zhao J, Yang XC, Fujino M, Ichimura N, Que WT, Li Xiao K*, Takahara S. Salvianolic acid B ameliorates liver injury in a murine aGvHD model by decreasing

- inflammatory responses via upregulation of HO-1. **Transpl Immunol.** 55: 101203; 2019.
8. Toyama S, Migita O, Fujino M, Kunieda T, Kosuga M, Fukuhara Y, Nagahara Y, Li Xiao K*, Okuyama T. New treatment method for mucopolysaccharidosis type VI by liver transplantation. **Pediatr Int.** 261(2): 180-189; 2019.
 9. Joyce D, Fujino M, Morita M, Araki R, Fung J, Qian S, Lu L, Li Xiao K*. Induced pluripotent stem cells-derived myeloid-derived suppressor cells regulate the CD8⁺ T cell response. **Stem Cell Res.** 29:32-41; 2018.
 10. Zhou WC, Wang Y, Fujino M, Shi LM, Jin L, Li Xiao K*, Wang JC. A standardized fold change (SFC) method for microarray differential expression analysis used to reveal genes involved in acute rejection in murine allograft models. **FEBS Open Bio** 8(3): 481-490; 2018.
 11. Cai SJ, Hou JG, Fujino M, Zhang Q, Ichimaru N, Takahara S, Araki R, Lu L, Chen JM, Zhuang J, Zhu P, Li Xiao K*. iPSC-derived Regulatory Dendritic Cells Inhibit Allograft Rejection via Generating Alloantigen-specific Regulatory T Cells. **Stem Cell Reports** 8(5): 1174-1189; 2017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 8件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Zhao Jing, Que Weitao, Du Xiaoxiao, Fujino Masayuki, Ichimaru Naotsugu, Ueta Hisashi, Tokuda Nobuko, Guo Wen-zhi, Zabrocki Piotr, de Haard Hans, Nonomura Norio, Li Xiao-Kang	4. 巻 11
2. 論文標題 Monotherapy With Anti-CD70 Antibody Causes Long-Term Mouse Cardiac Allograft Acceptance With Induction of Tolerogenic Dendritic Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 555996
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.555996	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Matsuda Yoshiko, Hiramitsu Takahisa, Li Xiao-kang, Watanabe Takeshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Characteristics of Immunoglobulin M Type Antibodies of Different Origins from the Immunologic and Clinical Viewpoints and Their Application in Controlling Antibody-Mediated Allograft Rejection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 4~4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pathogens10010004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wang Zhidan, Ma Kuai, Liu Chi, Hu Xin, Que Weitao, Ito Hidenori, Takahashi Kiwamu, Nakajima Motowo, Tanaka Tohru, Ren Ke, Guo Wen-Zhi, Yi Shuang-Qin, Li Xiao-Kang	4. 巻 14
2. 論文標題 5-Aminolevulinic acid combined with sodium ferrous citrate (5-ALA/SFC) ameliorated liver injury in a murine acute graft-versus-host disease model by reducing inflammation responses through PGC1- activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Discoveries & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 304~312
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5582/ddt.2020.03112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Que Weitao, Guo Wen-Zhi, Li Xiao-Kang	4. 巻 11
2. 論文標題 Manipulation of Regulatory Dendritic Cells for Induction Transplantation Tolerance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 582658
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.582658	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Jiang Yanzhi, Que Weitao, Zhu Ping, Li Xiao-Kang	4. 巻 11
2. 論文標題 The Role of Diverse Liver Cells in Liver Transplantation Tolerance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 12003
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.01203	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Liu Chi, Fujino Masayuki, Zhu Shuoji, Isaka Yoshitaka, Ito Hidenori, Takahashi Kiwamu, Nakajima Motowo, Tanaka Tohru, Zhu Ping, Li Xiao Kang	4. 巻 9
2. 論文標題 5 ALA/SFC enhances HO-1 expression through the MAPK/Nrf2 antioxidant pathway and attenuates murine tubular epithelial cell apoptosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1928 ~ 1938
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12729	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Zhao Jing, Yang Xing-Chen, Fujino Masayuki, Ichimaru Naotsugu, Que Weitao, Li Xiao-Kang, Takahara Shiro	4. 巻 55
2. 論文標題 Salvianolic acid B ameliorates liver injury in a murine aGvHD model by decreasing inflammatory responses via upregulation of HO-1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transplant Immunology	6. 最初と最後の頁 101203 ~ 101203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.trim.2019.03.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Toyama Sumika, Migita Ohsuke, Fujino Masayuki, Kunieda Tetsuo, Kosuga Motomichi, Fukuhara Yasuyuki, Nagahara Yukitoshi, Li Xiao Kang, Okuyama Torayuki	4. 巻 261
2. 論文標題 New treatment method for mucopolysaccharidosis type VI by liver transplantation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 180~189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.13751	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Joyce Daniel, Fujino Masayuki, Morita Miwa, Araki Ryoko, Fung John, Qian Shiguang, Lu Lina, Li Xiao-Kang	4. 巻 29
2. 論文標題 Induced pluripotent stem cells-derived myeloid-derived suppressor cells regulate the CD8+ T cell response	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 32 ~ 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2018.03.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Zhou Weichen, Wang Yi, Fujino Masayuki, Shi Leming, Jin Li, Li Xiao-Kang, Wang Jiucun	4. 巻 8
2. 論文標題 A standardized fold change method for microarray differential expression analysis used to reveal genes involved in acute rejection in murine allograft models	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 481 ~ 490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12343	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Cai Songjie, Hou Jiangang, Fujino Masayuki, Zhang Qi, Ichimaru Naotsugu, Takahara Shiro, Araki Ryoko, Lu Lina, Chen Ji-Mei, Zhuang Jian, Zhu Ping, Li Xiao-Kang	4. 巻 8
2. 論文標題 iPSC-Derived Regulatory Dendritic Cells Inhibit Allograft Rejection by Generating Alloantigen-Specific Regulatory T Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1174 ~ 1189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2017.03.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Xiao-Kang Li
2. 発表標題 Manipulation of dendritic cells as an approach for induction transplantation tolerance
3. 学会等名 17th International Congress of Immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Weitao Que, Xin Hu, Masayuki, Fujino, and Xiao-Kang Li
2. 発表標題 Combinations of superagonistic anti-CD28 and anti-GITR antibodies induced mouse cardiac allograft tolerance via Type 1 regulatory T cells induction
3. 学会等名 17th International Congress of Immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Que WT, Hu X, Fujino M, Yamada Y, Zhong L, Li Xiao K
2. 発表標題 Supercooling Preservation Prolonged Mouse Cardiac Graft Cold Ischemia Time
3. 学会等名 American Transplant Congress 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Liu C, Yang X, Fujino M, Zou H, Li XK
2. 発表標題 Combination of 5-aminolevulinic acid and iron prevents skin fibrosis in murine sclerodermatous grafts-versus-host disease
3. 学会等名 第46回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2017年～2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	西尾 佳明 (Nishio Yoshiaki) (80727347)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・R I 管理室・ 共同研究員 (82612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------