

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390371

研究課題名(和文) 免疫寛容による臓器(心臓)移植：薬剤誘導性免疫寛容系の展開

研究課題名(英文) Experimental organ transplantation: Application of the drug-induced immune tolerance

研究代表者

富田 幸裕 (TOMITA YUKIHIRO)

九州大学・医学研究院・研究員

研究者番号：90180174

研究成果の概要(和文)：

＜背景＞

サイクロフォスファミド (CP, cyclophosphamide) を用いた移植免疫寛容誘導は、混合キメリズム現象を誘導することで成立する実験系である。近年、我々は invariant Natural Killer T (iNKT) 細胞がこの実験系に必須であることを明らかにした。本研究では、iNKT 細胞が産生するサイトカインの役割を検討した。

本寛容誘導系において、iNKT 細胞の調節性機能は寛容誘導初期の段階で必須であること、調節性機能には iNKT 細胞が産生する IFN- γ 、IL-4、IL-10 などのサイトカインが単独で機能しているのではないことが示された。

研究成果の概要(英文)：

Cyclophosphamide (CP)-induced tolerance is a mixed chimerism-based tolerance induction protocol. Recently, we reported that invariant natural killer T (iNKT) cells were essential for the tolerance induction in this system. In this study, we evaluated the roles of the cytokines produced by iNKT cells.

iNKT cells were required in the initial phase of the induction of chimerism. Our results indicated that known major cytokines produced by iNKT cells were dispensable for the regulatory function of iNKT cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：キメリズム、サイクロフォスファミド、免疫寛容誘導

1. 研究開始当初の背景

近年の免疫抑制療法の進歩・定着に伴い、臨床における臓器移植の成績は向上しつつある。しかしながら、依然として急性・慢性拒絶反応が克服されず存在することが、臓器移

植における大きな課題である。ドナー混合キメリズムの誘導は、ドナー特異的な臓器移植片の寛容誘導に有用な方法と考えられている。以前から我々が報告しているように、サイクロフォスファミド (CP) 誘導性免疫寛容

誘導は、ドナー混合キメリズムの誘導に基づく寛容誘導法である。その方法は、day 0 に 10^8 個のドナー脾細胞 (SC, spleen cell) の経静脈的投与、day 2 に CP を 200 mg/kg 腹腔内投与するというものである。この寛容誘導処置により、H-2 (主要組織適合性抗原) が一致しているドナー・レシピエントの組み合わせでは、永続的なキメリズムと皮膚移植片の永久生着が、ドナー特異的に観察される。我々はこれまで、本寛容誘導系の機序を解明してきた。その機序とは、ドナー抗原の投与により反応・増殖するドナー反応性 T 細胞が、その後投与される CP により消去される現象、その後胸腺においてキメリズムが成立するとともに、胸腺においてドナー反応性 T 細胞が消失する現象 (13)、調節性 T 細胞の出現による免疫寛容状態の維持という現象である。さらに重要なこととして、皮膚移植片に対する寛容誘導には、より高レベルのキメリズムが必要であることや、iNKT 細胞が発現する Ly49 レセプターがキメリズム成立に関与している可能性を報告している。

iNKT 細胞は、いくつかのサイトカインを即座・豊富に産生することが特徴であり、そのサイトカイン産生を介して、免疫反応を多様に制御している。例えば、iNKT 細胞は IFN- γ などの Th1 サイトカイン産生を介して細胞性免疫活性を高め、感染免疫では病原体排除、腫瘍免疫では腫瘍拒絶など、主に生体防御に作用する。反対に、iNKT 細胞は IL-4・IL-10 などの Th2 サイトカイン産生を介する免疫抑制作用を高め、自己免疫疾患の抑制作用を有すると考えられている。移植免疫の分野でも、iNKT 細胞が産生するサイトカインに関する報告がある。同種心移植の実験系において、iNKT 細胞の産生する IFN- γ が寛容誘導に関与するという報告や、異種移植の実験系において、iNKT 細胞の産生する IFN- γ ・IL-4 は寛容誘導に関与しないという報告である。iNKT 細胞の機能に関してさらに考えを複雑にさせていることは、以上の報告とは正反対の結果も報告されていることである。iNKT 細胞の産生するサイトカインは、自己免疫疾患の (抑制ではなく) 悪化に作用するという報告や、膵島移植の実験系において iNKT 細胞の産生する IFN- γ が Gr-1⁺ 細胞を活性化することで移植された膵島細胞を拒絶するという報告がなされている。このように、実験系の違いが異なる結果を生じており、*vivo* における iNKT 細胞の作用は完全に解明されたいはいえない。近年では、GC 投与後に産生された IL-10 が移植免疫寛容誘導に関与するという報告もある。

2. 研究の目的

本研究においては、iNKT 細胞を活性化あるい

は不活性化した状態で CP 誘導性免疫寛容を行い、キメリズムおよび寛容誘導が成立するかを検討した。また、iNKT 細胞が産生する各種サイトカイン (IFN- γ , IL-4, IL-10) の機能を解析した。

3. 研究の方法

<動物>

BALB/c AnNCrj (BALB; H-2^d, Lyt-1.2, Mls-1^b) マウス、DBA/2 NCrj (DBA; H-2^d, Lyt-1.1, Mls-1^a) マウスは KBT オリエンタル (Saga, Japan) から購入した。BALB background の IFN- γ , IL-4, IL-10 KO マウスは Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) より購入した。B10.D2 SnS1c (H-2^d) マウスは SLC Inc. (Hamamatsu, Shizuoka, Japan) より購入した。BALB background J α 18^{-/-} マウスは Dr. M. Taniguchi (RIKEN, Japan) より譲渡を受けた。マウスは 12-16 週令のものを実験で使用した。すべての動物は九州大学動物実験における動物愛護規定 (No. 105) 及び日本国政府における動物愛護規定 (No. 6) に基づいて取り扱われた。

<CP 誘導性免疫寛容系の寛容誘導処置>

DBA マウスの脾細胞 (SC, Spleen cells) は RPMI 1640 medium (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) 中で氷冷し、RPMI 1640 medium により 3 度洗浄した。Trypan blue を用いて正常の有核細胞のみを数え、 2×10^8 個/mL に調節し、0.5 mL (1×10^8 個) をレシピエントの尾静脈より静注した。その 2 日後に、10 mg/mL に調整した CP (Endoxan; Shionogi, Osaka, Japan) を 200 mg/kg の量でレシピエントに腹腔内投与した。 α -galactosylceramide (GC, KR7000) は Kirin Brewery (Takasaki, Japan) より譲渡を受けた。寛容誘導前に iNKT 細胞を活性化させるため、2 μ g の GC の単回投与を day 0 または day -1 に、もしくは GC の 3 回投与を day -7, -4, -1 に行った。

<iNKT KO マウスに対する iNKT 細胞の移入再建法>

脛骨および腓骨の骨髓細胞 (BMC, bone marrow cells) は RPMI Medium により 2 度洗浄した。iNKT KO マウスに day -28 に 300 cGy の放射線照射を行い、同日に WT マウス、IFN- γ KO マウス、IL-4 KO マウス、IL-10 KO マウス から採取した (1×10^7 個の SC + 5×10^6 個の BMC) を移入した (16)。このようにして移入再建された iNKT 細胞が、確かに存在することをフローサイトメトリーにより確認した。

<皮膚移植>

以前より報告している方法にて皮膚移植を行った。ドナーマウスの尾より 1 cm² 正方形の皮膚片を採取し、レシピエントの右体幹に

グラフト床を用意し、グラフトをグラフト床に8本の5-0糸にて固定した。グラフトが完全に委縮するか癒痕になった場合、拒絶されたと判定した。グラフト生着は mean survival time (MST) \pm standard deviation (SD) と median survival time (median) で評価した。

<フローサイトメトリー法>

低浸透圧ショック法にて処置した白血球 (WBC, White blood cells) を準備した。ドナーキメリズムの解析では、phycoerythrin (PE) にて標識した anti-Ly-1 mAb (Ly-1.1 and Ly-1.2) (BD Pharmingen, San Diego, CA) と、fluorescein-isothiocyanate (FITC) にて標識した Ly-1.1 mAb (BD Pharmingen) により、30分、4°Cにて染色後、2度洗浄した。非特異的なFc γ Rによるバックグラウンドを減らすため、2.4G2 (rat anti-mouse Fc γ R mAb) にてブロックした。

ドナー反応性T細胞の解析では、WBCおよびSCをFITCにて標識された anti-V β 6, V β 4, V β 8.1/8.2 mAb (BD Pharmingen) と、PEにて標識された anti-CD4 mAb (BD Pharmingen) により染色した。胸腺細胞のTCR鎖の解析では、FITCにて標識された anti-V β 6, V β 4 mAb (BD Pharmingen)、PEにて標識された anti-CD4 mAb (BD Pharmingen)、Allophycocyaninにて標識された anti-CD8 mAb (BD Pharmingen) により染色した。すべてのデータはFACSCalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) を用いて収集し、FlowJo software v7.2 (Tree Star Inc., Ashland, OR) を用いて解析した。低レベルのforward scatterを示す細胞と、高いpropidium iodideの取り込みを示す細胞は死細胞と判定した。

< α -galactosylceramide (GC) による刺激後のサイトカイン産生>

GC投与後2時間及び18時間後の血清を採取した。IL-2, IL-4, IL10, IL-12, IFN- γ の血清濃度を、サンドイッチELISA法により検出した (Bio-Source International Inc., Camarillo, CA)。

<統計>

データがparametricである場合、Student's *t* test または one-way analysis of variance (ANOVA, Bonferroni's multiple comparison test) を使用した。データがnon-parametricである場合、Mann-Whitney *U* test を使用した。P値が0.05以下をもって統計学的有意とした。

4. 研究成果

WT レシピエントに対し、寛容誘導前にGCを3回投与した群では、皮膚移植片に対する免疫寛容が誘導されなかった

以前の報告と同様、WT レシピエントにDBA SC/CP という寛容誘導処置を行うと、ドナー

皮膚移植片の永久生着が観察された。

(*n*=6; MST>100 days) (Fig. 1)。

対照的に、iNKT KO レシピエントに対するDBA SC/CP 処置では、ドナー皮膚移植片の慢性拒絶が観察された (*n*=10, MST \pm SD: 70.0 \pm 10.3, median: 71 days)。iNKT細胞は、GC投与の直後に活性化した後、長期アナジー状態に陥ることが報告されている。またiNKT細胞は、頻回のGC投与後にはもはや反応しない、いわば気絶状態 (stunned) となることが報告されている。以前の報告と同様、脾・肝臓のiNKT細胞は、3回のGC投与後少なくとも14日間は検出されなかった (data not shown)。WT レシピエントに対して、day -7, -4, -1 にGC3回投与した後、DBA SC/CP による処置を行うと、ドナー皮膚移植片は慢性拒絶された (*n*=10, MST \pm SD: 75.5 \pm 18.4 days, median: 71 days)。この結果はiNKT KO レシピエントにおける結果と類似していた (Fig. 1)。WT レシピエントに対して、GCをday 0またはday -1に1回投与した後、DBA SC/CP による寛容誘導処置を行った場合、ドナー皮膚移植片は永久生着した。同様に、WT レシピエントに対して、DBA SC/CP による寛容誘導処置を行った後、day 35, 38, 41 にGC3回投与した場合、ドナー皮膚移植片は永久生着した (Fig. 1)。以上の結果から、キメリズム誘導の初期段階でiNKT細胞が必須であると示唆された。また、GC1回投与によりiNKT細胞を寛容誘導初期に活性化させても、高いキメリズムは得られなかった。さらに、GC1回投与によりiNKT細胞活性化後に長期アナジーが生じても、キメリズムの成立は妨げられなかった。

SC/CP による寛容誘導処置後のキメリズムと、Mls-1^a 抗原反応性 CD4⁺V β 6⁺ T細胞の減少の解析

これまで我々は、皮膚移植片に対する免疫寛容誘導は、キメリズムのレベルと相関することを報告している (14, 36)。今回、GC1回投与群とGC3回投与群における、SC/CP 処置後のキメリズムレベルの差を検討した (Table 1)。SC/CP 処置後の2週間後には、全ての群でレシピエントBALB (Ly-1.2⁺) マウスのWBC中に、ドナーDBA由来のLy-1.1⁺ T細胞が検出された。しかし、寛容誘導前のday -7, -4, -1 にGC3回投与群では、キメリズムは8-14週後には減少していた (experiment 6, group 4)。iNKT KO レシピエントでもキメリズム消失という結果が観察された (experiment 3, group 4)。反対に、GC1回投与群 (experiment 4 and 5, group 4)、寛容誘導後のday 35, 38, 41 にGC3回投与群 (experiment 6, group 5) では、安定し持続するキメリズムが観察された。

以前に我々は、免疫寛容誘導のメカニズムの一つとして、ドナーが有するMls-1^a 抗原に反

応し、レシピエントにおいて増殖する CD4⁺Vβ6⁺T 細胞が、CP 投与後に減少する現象 (clonal destruction) を報告した (6, 9)。そこで、レシピエント WBC 中の CD4⁺Vβ6⁺T 細胞の減少 (clonal destruction) について検討した (Table 1)。まず、WT レシピエントに対する SC/CP 処置では、CD4⁺Vβ6⁺T 細胞の clonal destruction が観察された。 (experiment 2, group 4)。同様に、寛容誘導前の day -1 または day 0 の GC1 回投与後に SC/CP 処置を行った群 (experiment 4 and 5, group 4)、SC/CP 処置後の day 35, 38, 41 の GC3 回投与を行った群では (experiment 6, group 5)、CD4⁺Vβ6⁺T 細胞の clonal destruction が観察された。ここで観察された WBC 中の clonal destruction は、ドナー抗原に非特異的な CD4⁺Vβ4⁺T 細胞では観察されず、ドナー抗原に特異的な CD4⁺Vβ6⁺T 細胞でのみ観察された。

SC/CP の寛容誘導処置に加えて、GC1 回または 3 回投与を行った場合の、レシピエント脾臓内 clonal destruction と胸腺内 clonal deletion の解析

iNKT 細胞の機能をさらに検討するため、レシピエント脾臓中の CD4⁺Vβ6⁺T 細胞の経時的变化を解析した (Fig. 2A)。SC/CP の寛容誘導処置後、WT レシピエント脾臓中の CD4⁺Vβ6⁺T 細胞は、day 2 には 35% まで著明に増加し、その後 3% 程度に減少した。同様の CD4⁺Vβ6⁺T 細胞の経時的变化は、iNKT KO レシピエント脾臓中でも確認された。SC/CP の寛容誘導処置の前に 1 回または 3 回の GC 投与を行った場合、WT レシピエント脾臓中の CD4⁺Vβ6⁺T 細胞は、day 2 に 20-25% まで増大し、その後 3% 程度に減少した。day 2 における CD4⁺Vβ6⁺T 細胞のパーセンテージは、GC による前処置の有無により優位差を生じた ($P < 0.05$)。

次に、レシピエント胸腺細胞中のドナー反応性 T 細胞を解析した。胸腺内 clonal deletion は、WT レシピエントにおいて SC/CP 処置後の 6 週間後までに生じるが、iNKT KO レシピエントでは生じないことを以前に報告した。WT マウスでも、iNKT KO マウスでも、その胸腺中には、CD4⁺CD8⁺Vβ6⁺T 細胞が 9% 程度存在する (Fig. 2B)。WT レシピエント胸腺中の CD4⁺CD8⁺Vβ6⁺T 細胞は、SC/CP 処置後、あるいは GC1 回前投与 + SC/CP 処置後には、day 14 まで変化しないが、day 56 までには 2% まで減少した。しかし、iNKT KO レシピエント胸腺中の CD4⁺CD8⁺Vβ6⁺T 細胞は、SC/CP 処置後に減少は認めるものの、比較的高いレベルで残存していた。さらに同様の結果が、GC3 回前投与 + SC/CP 処置後の WT レシピエント胸腺中でも観察された。

GC1 回または 3 回投与後のサイトカイン産生の評価

キメリズムの誘導と維持に対するサイトカインの関与を評価するため、血清中における IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-12 産生量を ELISA 法にて測定した。Fig 3 に示すように、GC1 回投与後には、即座で豊富な IL-2, IL-4, IFN- γ の産生が観察された。反対に、GC3 回投与後には、IL-2, IL-4, IFN- γ の産生は観察されなかった。IL-10 に関しては、GC1 回投与後にも GC3 回投与後にも全く検出されなかった (data not shown)。

iNKT KO レシピエントに IFN- γ KO, IL-4 KO, IL-10 KO 由来の iNKT 細胞を移入・再建すると、ドナー皮膚移植片に対する寛容誘導が可能となった。

GC1 回投与と 3 回投与後のサイトカイン産生能の差により、SC/CP 処置後の寛容誘導に差が生じる可能性を考えた。そこで、iNKT 細胞自身が産生するサイトカインを解析した。iNKT KO レシピエントに 3Gy の放射線照射の後、iNKT 細胞の移入・再建を行った。iNKT KO マウスに移入する iNKT 細胞の供給源として、WT マウス、IFN- γ KO マウス、IL-4 KO マウス、IL-10 KO マウス由来の iNKT 細胞を使用した。iNKT 細胞の移入・再建後に、SC/CP 処置を行った (Fig. 4)。以上の移入・再建処置により、免疫寛容誘導に十分な量の iNKT 細胞が再建され、肝単核細胞 (LMNC, liver mononuclear cells) 中では、WT マウスと比較し 50% 程度に iNKT 細胞 (GC/CD1d-tetramers⁺CD3⁺細胞) が再建される。iNKT KO マウスに、WT マウス由来の iNKT 細胞を再建したレシピエントでは、SC/CP 処置によりキメリズムが誘導され (Table 2, experiment 6)、皮膚移植片の永久生着が観察された (Fig. 4)。対照的に、iNKT KO マウスに、iNKT KO マウス由来 (SC+BMC) 細胞を移入したレシピエントでは、SC/CP 処置後にドナー皮膚移植片は慢性拒絶された (n=6, MST \pm SD: 67.2 \pm 15.0 days, median: 70.5 days) (Fig. 4)。移入・再建方法として、SC 細胞のみ・放射線照射なしで再建を試みた場合、iNKT 細胞 (GC/CD1d-tetramers⁺CD3⁺細胞) 数は、WT マウスと比較すると 20% 程度であり (4.3% \pm 0.5% vs. 19.5% \pm 5.4%)、SC/CP 処置後に 7 例中 3 例の皮膚移植片が慢性拒絶されたため、SC 細胞のみ・放射線照射なしの再建法は不十分と考えられた。

iNKT KO マウスに、IFN- γ KO, IL-4 KO, IL-10 KO iNKT 細胞を移入・再建したレシピエントでは、SC/CP 処置により、WT iNKT 細胞を移入・再建したレシピエントと同レベルのキメリズムが観察され (Table 2, group 8, 9, and 10 vs. group 6)、皮膚移植片は永久生着した (Fig. 4)。以上の結果から、iNKT 細胞が産生するサイトカインが単一で欠損しても、キメリズム誘導と皮膚移植片の寛容誘導は阻害されないことが示された。

以上の結果から、iNKT細胞が産生する各種サイトカイン（IFN- γ 、IL-4、IL-10）は、そのサイトカインが単独で寛容誘導に必須なのではないこと示された。さらに、寛容誘導初期に iNKT 細胞を活性化してもキメリズムのレベルは変化しなかったが、寛容誘導初期に iNKT 細胞を不活性化した場合、キメリズムが消失し皮膚移植片に対する免疫寛容は誘導されないという現象が明らかになった。

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 件）

Onzuka T, Tomita Y, Shimizu I, Okano S, Yamada H, Yoshikai Y, Tominaga R
Role of the cytokine profiles produced by iNKT cells in the initial phase of cyclophosphamide-induced tolerance
Transplantation 86 (9) : 1301-1310, 2008

T. Onzuka, Y. Tomita, S. Okano, I. Shimizu, H. Yamada, Y. Yoshikai and R. Tominaga
Antibody-Mediated T-cell reduction or increased levels of chimerism overcome resistance to cyclophosphamide-induced tolerance in NKT-deficient mice
Scand J Immunol 72:106-117, 2010

T. Onzuka, Y. Tomita, S. Okano, I. Shimizu, H. Yamada, Y. Yoshikai and R. Tominaga
Effects of Toll-like receptor agonist on the induction of mixed chimerism in cyclophosphamide-induced tolerance
Scand J Immunol 70:423-430, 2009

〔学会発表〕（計 件）

Onzuka T, Tomita Y, Shimizu I, Tominaga R :
Pivotal role of the natural killer T cell for the induction of mixed chimerism in the thymus (Poster)
American Transplant Congress 2008, 2008

Onzuka T, Tomita Y, Shimizu I, Tominaga R :
Requirement of iNKT cells for the maintenance of mixed chimerism in cyclophosphamide-induced tolerance (一般演題)
XXII International Congress of The Transplantation Society, 2008

Onzuka T, Tomita Y, Shimizu I, Tominaga R :
Pivotal role of the natural killer cell for the induction of mixed chimerism in the

thymus (一般演題)

XXII International Congress of The Transplantation Society, 2008

恩塚龍士、富田幸裕、神尾明君、前田武俊、馬場啓徳、清水一郎、富永隆治 :
Cyclophosphamide 誘導性免疫寛容系敗血症モデルにおける寛容誘導阻害効果の検討 (一般演題)

第105回日本循環器学会九州地方会、2008

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 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 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 ()

研究者番号 :

(2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :