

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670575

研究課題名(和文)免疫記憶制御分子を標的とした腎移植後慢性拒絶反応の予防法の開発

研究課題名(英文)Development of the molecular targeted therapy for the chronic rejection after renal transplantation that control immunological memory

研究代表者

渋谷 和子 (SHIBUYA, Kazuko)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：00302406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：腎移植後の慢性拒絶反応の予防には、現在長期にわたり免疫抑制剤の多剤投与が行われている。しかし、免疫抑制剤の長期投与は易感染性などの副作用の問題がある。

慢性拒絶反応では、病態形成の一因に、アロ抗原特異的メモリーT細胞による慢性炎症の惹起があるとされている。本研究では、DNAM-1 遺伝子欠損マウスを用いて、DNAM-1がアロ抗原特異的免疫記憶の成立に重要な役割を担っていることを示した。さらに、DNAM-1遺伝子欠損マウスでは、腎移植後の腎の繊維化が軽減されていることを観察した。これらの結果より、DNAM-1を標的として慢性拒絶反応を予防できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：For the prevention of the chronic rejection after renal transplantation, the polypharmacy of the immunosuppressive drug for a long term is provided. However, the long-term dosage of the immunosuppressive drugs results in the immunodeficiency.

It is known that chronic inflammation induced by the alloantigen-specific memory T cells is one of the causes of the chronic rejection. Here, we show that DNAM-1 plays an important role in generation of alloantigen-specific memory of immunity by using DNAM-1-deficient mice. Moreover, we observed that fibrosis of the kidney after renal transplantation was much milder in DNAM-1-deficient mice compared with those in wild-type mice. These results suggest that DNAM-1 might be a good molecular target for prevention of the chronic rejection after the renal transplantation.

研究分野：免疫学、臨床免疫学

キーワード：免疫系受容体 慢性拒絶反応 腎移植 免疫記憶 分子標的療法

1. 研究開始当初の背景

(1) 腎移植後の慢性拒絶反応の予防法の現状
腎移植後に最も問題となる合併症のひとつに拒絶反応がある。移植後3ヶ月以内に起こる急性拒絶反応のみならず、それ以降におこる慢性拒絶反応の予防のためにも、現状では長期にわたり免疫抑制剤の多剤投与が行われている。しかし、免疫抑制剤は、抗原特異性に関係なく、免疫応答全般を抑制するため、易感染性などの副作用の問題が少なからず存在する。代替医療によって免疫抑制剤の減量や投与期間の短縮ができれば患者の負担が軽減されるため、慢性拒絶反応の病態を特異的に予防できる方法の開発が望まれる。

慢性拒絶反応では、病態形成の一因に、アロ抗原特異的メモリーT細胞による慢性炎症の惹起と、慢性炎症による腎の線維化が考えられており、この制御が慢性拒絶反応の予防につながると予測される。

(2) DNAM-1のアロ反応への関与と免疫記憶の誘導

DNAM-1は、イムのグロブリン様ドメインを2つ有する活性化受容体で、T細胞やNK細胞、マクロファージなどの免疫細胞や血小板に発現している。これまで私たちはCD8⁺T細胞やナチュラルキラー(NK)細胞上のDNAM-1が細胞傷害活性を惹起することや、CD4⁺T細胞上のDNAM-1がTh1細胞分化を誘導することを報告してきた。

また私たちは、T細胞上のDNAM-1がプライミング時にリガンドと結合すると、腫瘍抗原特異的免疫記憶の成立が促進されることを明らかにした(*Blood*, 107:1491, 2006, *J. Exp. Med.* 205:2959, 2008)。

さらに、私たちは骨髄移植後の急性GVHDにおいて、DNAM-1がアロ抗原特異的T細胞を活性化し、病態を増悪させていることを示した。また、私たちは急性GVHDを発症したマウスに抗DNAM-1抗体を投与すると病態が改善することを観察し、DNAM-1が生体内アロ反応の治療標的になる可能性を示した(*Proc Natl Acad Sci USA*, 107:18593, 2010)。

これらの知見より、DNAM-1が、アロ抗原特異的T細胞の免疫記憶の成立にも関与している可能性が推測された。

(3) 本研究が社会的に重要な背景

本研究は、アロ抗原特異的T細胞の免疫記憶の成立を人為的に制御することによって、腎移植後の慢性拒絶反応を予防するアイデアであるが、この方法が成功すれば、腎移植に限らず、他の臓器移植後の慢性拒絶反応の予防にも応用できる。慢性炎症や線維化を伴う慢性拒絶反応は、一度起きてしまうと、なかなか有効な治療法がなく、移植臓器のみならず患者の生命予後にも影響を与えることがありうる重大な病態である。このため、副作用の問題があるにしても、免疫抑制剤の長期投与をせざるを得ないのが現状である。

しかし、本研究で提案するようにアロ特異的メモリーT細胞の特異的な抑制が実現できれば、易感染性などの副作用がなく、慢性拒絶反応のみを回避できる画期的な予防法といえる。

2. 研究の目的

腎移植後の慢性拒絶反応では、病態形成の一因に、アロ抗原特異的メモリーT細胞による慢性炎症の惹起と、慢性炎症による腎の線維化が考えられている。一方、私たちはDNAM-1分子がアロ免疫応答に関与していることやT細胞の免疫記憶の成立に重要な役割を担っていることを明らかにしてきており、DNAM-1がアロ抗原特異的T細胞の免疫記憶の成立にも関与している可能性が考えられた。

これらのことより、DNAM-1を標的として腎移植後の慢性拒絶反応を制御できる可能性を考え、本研究では、

(1)アロ抗原特異的T細胞の免疫記憶の成立におけるDNAM-1の役割

ならびに

(2)腎移植後の慢性拒絶反応におけるDNAM-1の役割

について検討することとした。

3. 研究の方法

(1)アロ抗原特異的T細胞の免疫記憶の成立におけるDNAM-1の役割

C57BL/6系統のDNAM-1遺伝子欠損マウスもしくは野生型マウスにBALB/cマウスから採取した皮膚を移植した。移植後50日目にレシピエントマウスからT細胞を採取し、これをC57BL/6系統RAG-1遺伝子欠損免疫不全マウスに移入した。その後、T細胞移入を受けたRAG-1遺伝子欠損マウスにBALB/cマウスの心臓を移植し、心臓が拒絶されるまでの日数を観察した。

(2)腎移植後の慢性拒絶反応におけるDNAM-1の役割

BALB/cマウスの腎臓をC57BL/6系統のDNAM-1遺伝子欠損マウスと野生型マウスに移植した。移植後56日目に、腎機能の評価のため、レシピエントマウスの血清中クレアチニン値と尿素窒素値を測定した。また、レシピエントマウスより腎臓を採取して、組織標本を作製し、マッソントリクローム染色または、免疫染色を行い、移植腎の線維化やコラーゲン量を、DNAM-1遺伝子欠損レシピエントマウスと野生型レシピエントマウスの間で比較検討した。

4. 研究成果

(1)アロ抗原特異的T細胞の免疫記憶の成立におけるDNAM-1の役割

C57BL/6系統のDNAM-1遺伝子欠損マウスもしくは野生型マウスにBALB/cマウスから採取した皮膚を移植後50日目にレシピエ

ントマウスから T 細胞を採取し、これを C57BL/6 系統 RAG-1 遺伝子欠損免疫不全マウスに移入、さらにこのマウスに BALB/c マウスの心臓を移植し、移植心臓の生存率を比較検討した。本実験は、最初の皮膚移植によって活性化されたアロ抗原特異的 T 細胞が 50 日の間にメモリー T 細胞となり、その後移植された心臓を拒絶するかどうかによって、免疫記憶の成立を解析する実験である。その結果、DNAM-1 欠損 T 細胞を移入したマウスでは野生型 T 細胞を移入したマウスと比較して心臓の拒絶が有意に遅延していた。このことは、移入した DNAM-1 欠損 T 細胞と野生型の T 細胞の免疫記憶に差があったことを示している。すなわち、DNAM-1 がアロ抗原特異的 T 細胞の免疫記憶の成立に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

(2) 腎移植後の慢性拒絶反応における DNAM-1 の役割

BALB/c マウスの腎臓を C57BL/6 系統の DNAM-1 遺伝子欠損マウスと野生型マウスに移植後 56 日目に、レシピエントマウスの血清中クレアチニン値と尿素窒素値、移植腎の繊維化やコラーゲン量を比較検討した。その結果、DNAM-1 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスと比較して、いずれの指標も軽減していた。このことから、DNAM-1 が腎移植後の慢性拒絶反応において重要な役割を担っていることが示唆された。

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 9 件)

1. Iguchi-Manaka A., Okumura G., Kojima H., Cho Y., Hirochika R., Bando H., Sato T., Yoshikawa H., Hara H., Shibuya A., Shibuya K. Increased soluble CD155 in the serum of cancer patients. *PLOS ONE*, 11(4), 2016(査読有)
2. Nakahashi-Oda C., Udayanga K., Nakamura Y., Nakazawa Y., Totsuka N., Miki H., Iino S., Tahara-Hanaoka S., Honda S., Shibuya K., Shibuya A. Apoptotic epithelial cells control regulatory T cell expansion. *Nat. Immunol.* 17(4):441-450, 2016 (査読有)
3. Vo.A.V., Takenaka E., Shibuya A., Shibuya K. Expression of DNAM-1 (CD226) on inflammatory monocytes. *Mol Immunol*, 69:70-76, 2016 (査読有)
4. Weinstein JR., Quan Y, Hanson JF., Colonna L., Iorga M., Honda S., Shibuya K., Shibuya A., Elkon KB., M.A.N.vlller T. IgM-Dependent Phagocytosis in Microglia Is Mediated by Complement Receptor 3, Not Fcα/μ Receptor. *J Immunol.* 195:5309-5317, 2015 (査読有)
5. Yamashita-Kanemaru Y., Takahashi Y., Wang Y., Tahara-Hanaoka S., Honda S., Bernhardt G,

- Shibuya A., Shibuya K. CD155 (PVR/Necl5) mediates a costimulatory signal in CD4+ T cells and regulates allergic inflammations. *J. Immunol.* 94:5644-56 (査読有) 53, 2015
6. Takeshima K., Sato K., Nabekura T., Nagamune K., Hamada H., Yoshikawa H., Shibuya A., Shibuya K. Increased CD11b+ Gr-1+ cell population in the placenta after infection with *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Immunol.* 59:95-98, 2015 (査読有)
7. Nagumo Y., Iguchi-Manaka A., Shibuya A., Shibuya K. Increased CD112 expression in methylcholanthrene-induced tumors in CD155-deficient mice. *PLoS ONE.* 9(11), 2014 (査読有)
8. Totsuka N., Kim YG., Tahara-Hanaoka S., Nakahashi-Oda C., Honda S., Shibuya K., Shibuya A. Toll-like receptor 4 and MAIR-II/CLM-4/LMIR2 immunoreceptor regulate VLA-4-mediated inflammatory monocyte migration. *Nat. Commun.* 5:4710, 2014 (査読有)
9. Satake K., Shimizu Y., Sasaki Y., Yanagawa H., Suzuki H., Suzuki Y., Horikoshi S., Honda S., Shibuya K., Shibuya A., Tomino Y. Serum under-O-glycosylated IgA1 level is not correlated with glomerular IgA deposition based upon heterogeneity in the composition of immune complexes in IgA nephropathy. *BMC Nephrology.* 15:89, 2014 (査読有)

[学会発表](計 21 件)

1. Vo AV, Takenaka E, Shibuya A, Shibuya K. Expression of DNAM-1 (CD226) on inflammatory monocytes The 55th Midwinter Conference of Immunologists Asilomar Conference Grounds, Pacific Grove California, USA 2016.1.24
2. Iguchi-Manaka A, Shibuya A, Shibuya K. Increased soluble CD155 in patients with various cancers 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会 札幌コンベンションセンター(北海道) 2015.11.20
3. Takenaka E, Vo AV, Shibuya A, Shibuya K. Involvement of DNAM-1 (CD226) expressed on small peritoneal macrophages in antigen presentation 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会 札幌コンベンションセンター(北海道) 2015.11.19
4. Sato K, Honda S, Shibuya K., Shibuya A. Development of a novel method for isolation of follicular dendritic cells 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会 札幌コンベンションセンター(北海道) 2015.11.19
5. Shibuya K., Iguchi-Manaka A, Kojima H, Cho Y, Hirochika R, Shibuya A. The role of DNAM-1 and CD155 in tumor immunity and escape International Symposium on Immune Regulation Oarai Park Hotel,

- Ibaraki 2015.10.30
6. Nakahashi-Oda C, Udayanga K G S, Nakamura Y, Nakazawa Y, Totsuka N, Miki H, Iino S, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Shibuya K, Shibuya A. Apoptotic epithelial cells control regulatory T cell expansion International Symposium on Immune Regulation Oarai Park Hotel, Ibaraki 2015.10.29
 7. Honda S, Sato K, Totsuka N, Fujiyama S, Fujimoto M, Miyake K, Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Shibuya K, Shibuya A. Marginal zone B cells exacerbate endotoxic shock via interleukin-6 secretion induced by Fcα/μR-coupled TLR4 signaling International Symposium on Immune Regulation Oarai Park Hotel, Ibaraki 2015.10.29
 8. Iguchi-Manaka A, Hiroshi Kojima, Cho Y, Shibuya A, Shibuya K. Increased soluble CD155 in the serum of cancer patients 第74回日本癌学会学術総会 名古屋国際会議場(名古屋) 2015.10.8
 9. 井口 研子、渋谷 彰、渋谷 和子 癌患者血清における可溶性 CD155 の上昇 第7回血液疾患免疫療法研究会学術集会 東京大学 伊藤国際学術研究センター(東京) 2015.9.26
 10. 建石奈緒、木村直樹、平田真哉、渋谷和子、渋谷彰、上阪等 CD226 阻害による自己免疫性筋炎モデルの治療 第1回日本骨免疫学会 ホテルブリーズベイマリーナ(宮古島) 2015.7.1
 11. 阿部 史枝、渋谷 和子、渋谷 彰 Critical role of DNAM-1 in acute and chronic allograft rejection 第3回筑波大学・東京理科大学生命医科学研究所合同リトリート 東京理科大学セミナーハウス(野田) 2015.3.20(ポスター発表)
 12. Iguchi-Manaka A, Shibuya A, Shibuya K. Soluble CD155 is involved in the escape from tumor immunity. 第5回新学術発がんスパイラル国際シンポジウム 神戸ポートピアホテル(神戸) 2015.2.26
 13. Takenaka E, Shibuya A, Shibuya K. DNAM-1 (CD226) plays an important role in antigen presentation by small peritoneal macrophages. 第5回新学術発がんスパイラル国際シンポジウム 神戸ポートピアホテル(神戸) 2015.2.26
 14. Iguchi-Manaka A, Shibuya A, Shibuya K. Soluble CD155 is involved in the escape from tumor immunity. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 国立京都国際会館(京都) 2014.12.10-12
 15. Takenaka E, Shibuya A, Shibuya K. DNAM-1 (CD226) plays an important role in antigen presentation by small peritoneal macrophages. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 国立京都国際会館(京都) 2014.12.11
 16. Totsuka N, Kim YG, Kanemaru K, Niizuma K, Umemoto E, Nagai K, Tahara-Hanaoka S, Nakahashi-Oda C, Honda S, Miyasaka M, Shibuya K, Shibuya A. Toll-like receptor 4 and MAIR-II/CLM-4/LMIR2 immunoreceptor regulate VLA-4-mediated inflammatory monocyte migration. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 国立京都国際会館(京都) 2014.12.10
 17. Kanaya M, Shibuya K, Abe F, Teshima T, Shibuya A. CD155 regulates regulatory T cell population and attenuates acute graft-versus-host disease. 第76回日本血液学会学術集会 大阪国際会議場(大阪) 2014.10.31
 18. Iguchi A, Kojima H, Yoshikawa H, Shibuya A, Shibuya K. Involvement of soluble CD155 in cancer Immune escape. 第73回日本癌学会学術総会(横浜) 2014.9.25-9.27
 19. 渋谷 彰、井口 研子、渋谷 和子 DNAM-1 による腫瘍免疫監視と DNAM-1 リガンドによる腫瘍免疫逃避のパラドックス 第6回血液疾患免疫療法研究会学術集会 京都大学医学部 芝蘭会館(京都) 2014.9.6
 20. 井口 研子、渋谷 彰、渋谷 和子 腫瘍免疫逃避機構における可溶性 CD155 の役割 第23回乳癌基礎研究会 青木屋(つくば) 2014.7.26-27
 21. 井口 研子、清松 裕子、池田 達彦、坂東 裕子、渋谷 彰、渋谷 和子、原尚人 腫瘍免疫逃避機構における可溶性 CD155 の役割 第114回日本外科学会定期学術集会 国立京都国際会館(京都) 2014.4.3-5
- 〔図書〕(計 2件)
1. 金丸由美、渋谷和子、細胞内染色法を用いたサイトカイン産生の解析 実験医学別冊 最強のステップ UP シリーズ 直伝! フローサイトメトリー 面白いほど使いこなせる! 275 (90-99), 2014
 2. 渋谷和子、「炎症」メディカルサイエンス臨床化学検査学、病態生化学の視点から 418 (102-106), 2014
- 〔産業財産権〕
出願状況(計 2件)
- 1, 名称: 可溶性 CD155 タンパク質を用いた癌の検出方法
発明者: 渋谷彰、渋谷和子、井口研子
権利者: 国立大学法人筑波大学
種類: 特許
番号: 特願 2015-012511 (2013-242319 の

分割出願)

出願年月日：2015年1月26日

国内外の別：国内

- 2, 名称：免疫疾患に対する医薬組成物
発明者：渋谷和子、渋谷彰、山下由美
権利者：国立大学法人筑波大学
種類：特許
番号：特願 2013-050403
出願年月日：2014年3月13日
国内外の別：国内

取得状況(計 2件)

- 1, 名称：可溶型 CD155 タンパク質を用いた
癌の検出方法
発明者：渋谷彰、渋谷和子、井口研子
権利者：国立大学法人筑波大学
種類：特許
番号：特許第 5850508 号
取得年月日：2015年12月11日
国内外の別：国内
- 2, 名称：可溶型 CD155 タンパク質を用いた
癌の検出方法
発明者：渋谷彰、渋谷和子、井口研子
権利者：国立大学法人筑波大学
種類：特許
番号：特許第 5,686,361 号
取得年月日：2015年1月30日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://immuno-tsukuba.com>

6. 研究組織

(1)研究代表者

渋谷 和子 (SHIBUYA, Kazuko)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：00302406