

令和元年8月30日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10224

研究課題名(和文) BTLAとPD-1制御による冠動脈内膜肥厚とドナー特異的抗体産生抑制効果の解析

研究課題名(英文) Graft protective effect and induction of CD4+CD25+Foxp3+ T cell by combination of anti-BTLA mAb and anti-PD-1 mAb

研究代表者

今水流 智浩 (Imazuru, Tomohiro)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：70713436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：臓器移植における最大の課題である拒絶反応の中で長期生着の阻害要因である慢性拒絶反応を制御する薬剤の探究のため、T細胞表面抗原であり細胞内に抑制シグナルを送るBTLAとPD-1に対するアゴニステック抗体に注目した。両抗体をマウス心臓移植モデルに投与すると、生着期間は無治療群7日間に対して、抗体併用群は100日以上と著明な延長効果を示した。この結果は各抗体を単独投与した際の期間よりも明らかに延長効果を示していた。さらに、抗体併用群の移植4週後の評価において、脾臓内にはCD4+CD25+Foxp3+T細胞が増加し、臓器保護や血管保護効果を示していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗BTLA抗体と抗PD-1抗体の併用による各抗体の単独投与よりも強い生着延長効果、制御性T細胞の誘導による拒絶反応の制御を証明することは、非特異的な免疫抑制剤の減量と慢性拒絶反応制御の解明に繋がり、現代移植医療にとって望ましい結果をもたらす。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effect of anti-PD (programmed death)-1 monoclonal antibody (mAb) and anti-BTLA (B and T lymphocyte attenuator) mAb in fully MHC-mismatched murine model of cardiac allograft transplantation. CBA mice underwent transplantation of C57BL/6 hearts and received one dose of combination of 6B2 and PIM-2 on day 0. Adoptive transfer was performed to determine whether regulatory cells were generated. Cell-proliferation and cytokine assessments were also performed. When CBA mice were given with combination for one dose of 6B2 and PIM-2, the allograft survival was indefinitely prolonged (MST, >100 days). Secondary CBA recipients given whole splenocytes from primary combination-treated CBA recipients with C57BL/6 cardiac allografts 30 days after grafting had prolonged C57BL/6 allograft survival. In conclusion, combination of anti-BTLA mAb and anti-PD-1 mAb could induce indefinite survival of cardiac allografts and may generate regulatory cells.

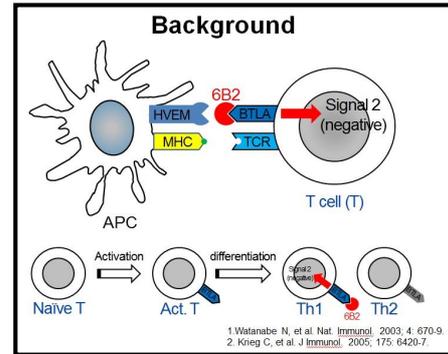
研究分野：心臓血管外科学

キーワード：BTLA PD-1 心臓移植 マウス 制御性T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

- [1] 急性拒絶反応に関してはシクロスポリン等の免疫抑制薬やステロイドの使用により、一定の制御が可能になった。しかし、慢性拒絶反応に関しては、上記の薬剤では制御が困難であり、慢性拒絶反応を制御可能にすることが最新の移植医療の命題である。
- [2] 右図が示すように、BTLA (B and T Lymphocyte Attenuator) は CD28、CTLA-4、ICOS 及び PD-1 等を含む受容体の CD28 ファミリーメンバーである。BTLA は Th1 細胞における差次的発現に関するスクリーニングを介して発見され、CTLA-4 に類似した抑制性シグナルを提供すると言われている (Watanabe, et al. *Nat. Immunol.* 2003; 4: 670-679)。CD28 ファミリーメンバーの解明の進歩に従い、抗 PD-1 抗体や抗 CTLA-4 抗体等の抑制性受容体に着目した抗体に関する研究は多く成されている。特に、抗 PD-1 抗体と抗 CTLA-4 抗体の組み合わせを用いた研究は、慢性拒絶動物モデルを作成する上で競うように研究されている。
- [3] 国内外での基礎研究や臨床治験は以下の様に、マウス移植心の生着延長やヒトの移植片対宿主病や幹細胞移植後の患者に対して行われているが、心臓冠血管内膜やドナー特異的抗体に注目した基礎研究は殆ど無い。



## 2. 研究の目的

マウス心臓移植モデルを用いて、抗 BTLA 抗体と抗 PD-1 抗体の併用を以下の点において評価し、慢性拒絶反応抑制効果について解析する。

- [1] 抗体併用の相乗効果による長期生着延長効果
- [2] 抗体併用による IL-10 依存性制御性 T 細胞 (regulatory T cell。以下、Treg) の誘導
- [3] 慢性拒絶反応の原因となる冠動脈内膜肥厚とドナー特異的抗体産生の抑制効果

## 3. 研究の方法

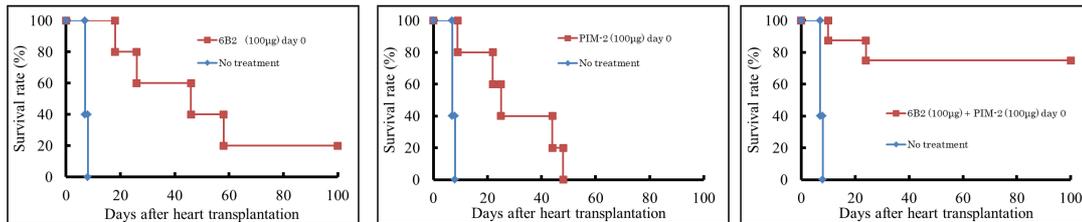
実験モデルはマウスの異所性心臓移植モデルである。方法は原著論文 (Niimi M. The technique for heterotopic cardiac transplantation in mice: experience of 3000 operations by one surgeon. *J Heart Lung Transplant* 2001;20(10):1123-8.) で詳細に記載されている。手術用顕微鏡は 6 台あり、その内 1 台は Teaching 可能な眼科脳外科手術用顕微鏡システムであり、多くの国内、国外留学生が実験に使用している。使用する抗体は順天堂大学免疫学教室八木田英雄先生のご厚意で無償提供していただいている。移植心血管内膜評価に使用する免疫学的解析設備は既に整備された状態である。

- [1] C57BL/6 マウス心臓を手術用顕微鏡を用いて CBA マウスの腹部に移植すると、無処置 (無治療) では中央値が 7~8 日で拒絶される。このモデルの移植実験は現在までに 1000 組以上が行われ、英文論文として多数報告している。
- [2] 移植当日に抗 BTLA 抗体と抗 PD-1 抗体を 1 回投与し、生着延長期間を測定した。30 日以上生着したマウスの脾臓内の Treg を解析するとともに、生着移植心の免疫染色を行う。
- [3] Treg の誘導と機能評価に関しては、養子移植を用いて評価する。抗 BTLA 抗体と抗 PD-1 抗体を 4 回投与し 30 日以上生着延長している移植心を持つ CBA レシピエント

( Primary recipient ) の脾細胞を採取精製し、別の CBA レシピエント ( Secondary recipient ) の尾静脈もしくは陰茎静脈から投与する。投与直後に C57BL/6 の心移植を行う。

#### 4. 研究成果

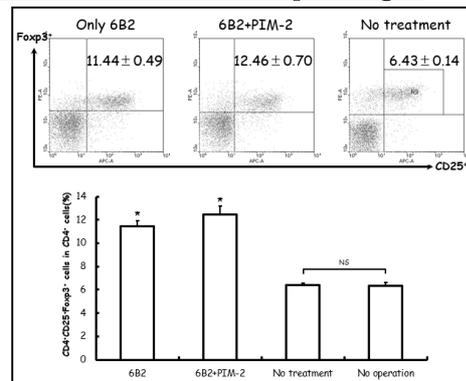
##### [1] 抗 BTLA 抗体と抗 PD-1 抗体併用による移植心着延長効果 ( Significant prolonged allograft survival )



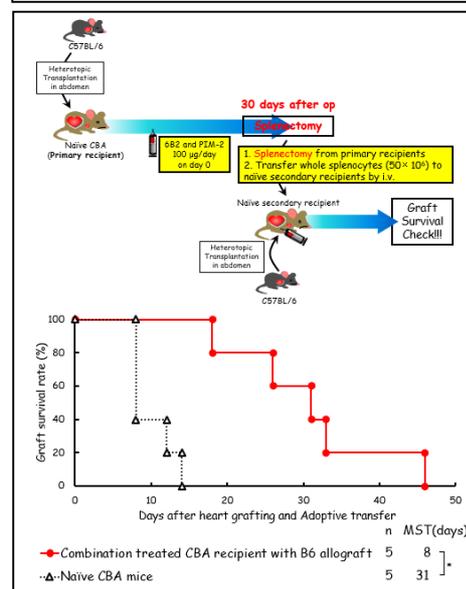
抗 BTLA 抗体と抗 PD-1 抗体によるマウス移植心着延長期間を測定した。両抗体のそれぞれを投与した場合、抗 BTLA 抗体術当日 1 回 ( 上左図 ) では生着期間中央値 ( 以下、MST ) 46 日、抗 PD-1 抗体術当日 1 回 ( 上中図 ) では MST25 日であった。両抗体術当日 1 回 ( 上右図 ) では MST100 日以上となった。抗体単体よりも併用によって明らかな相乗効果を示していたため、このスケジュールを基準に実験を進めていく。

##### [2] 抗体治療による Treg の誘導 ( Prominent induction of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg )

抗体併用による生着延長効果を解明するために、長期生着心を持つマウスの脾臓内 Treg を無治療群と比較した。無治療群は長期間 ( 100 日以上 ) 経過すると、移植心が線維化し免疫反応を比較できなくなるため、術後 4 週目を比較のタイミングとした。フローサイトメーターを用いて、抗体併用群では、抗 BTLA 抗体単体よりも、また無治療群よりも CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg が誘導されていた ( 右上図 ) 。



また、その誘導された Treg が機能的に免疫抑制効果を持つかどうかを調査するために、養子移植 ( 右下図 : Adoptive transfer もしくは suppression test ) を行った。両抗体併用マウスの術後 30 日目に脾臓を採取し脾細胞を精製後、その細胞を別の移植マウスに静脈内投与し、生着延長期間を測定した。結果は有意な生着延長を認め、抗体併用によって誘導された Treg が抑制効果を持つことが示された。



抗体併用によって生着延長効果が示された可

能性として、我々の今までの報告 ( Masateru Uchiyama, et al. *Transplantation* 2014;

97:301-9.) や過去の文献から抗体自体の免疫抑制効果も挙げられるが、今回の検討内では、急性期の移植心への Treg の誘導が臓器保護や炎症抑制となり、生着延長に繋がったことが示された。但し、両抗体投与による長期的なドナー特異的抗体の制御に関する検討は現在も継続中であり、今後も検討が必要である。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 5 件)

- [1] **Tomohiro Imazuru**, Masateru Uchiyama, Shigefumi Matsuyama, Mitsuru Iida, Tomoki Shimokawa. Surgical treatment of a huge hepatic artery aneurysm without revascularization - Case report. International Journal of Surgery Case Reports 2018;51:95-8.
- [2] Enzhi Yin, Xiangyuan Jin, Masateru Uchiyama, Qi Zhang, Takako Yanagisawa, Akira Inoue, Yu Guo, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, **Tomohiro Imazuru**, Masafumi Kawamura, Masanori Niimi. Seven Japanese Herbals Prolonged Cardiac Allograft Survival. Transplantation Proceedings 2018;50:2789-93.
- [3] Masateru Uchiyama, Enzhi Yin, Takako Yanagisawa, Xiangyuan Jin, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, **Tomohiro Imazuru**, Koichiro Uchida, Masafumi Kawamura, Masanori Niimi. Yogurt Feeding Induced the Prolongation of Fully MHC-mismatched Murine Cardiac Graft Survival by induction of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells. Transplantation Proceedings 2017;49:1477-82.
- [4] Xiangyuan Jin, Lei Yu, Masateru Uchiyama, Enzhi Yin, Tadanori Harada, Ken Otsuka, Shigefumi Matsuyama, **Tomohiro Imazuru**, Tomoki Shimokawa, Masanori Niimi. Combination of Paeoniae Radix and Cnidii rhizome Prolonged Survival of Fully Mismatched Cardiac Allografts and Generated Regulatory Cells in Mice. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2014;2014:841408.
- [5] Masateru Uchiyama, Xiangyuan Jin, Hironori Matsuda, Hisashi Bashuda, **Tomohiro Imazuru**, Tomoki Shimokawa, Hideo Yagita, Masanori Niimi. An Agonistic Anti-BTLA mAb (3C10) Induced Generation of IL-10 Dependent Regulatory CD4<sup>+</sup> T Cells and Prolongation of Murine Cardiac Allograft. Transplantation 2014;97:301-9.

### 〔学会発表〕(計 13 件)

#### 2015 年度 (平成 27 年度)

ATC [アメリカ移植学会] (アメリカ・フィラデルフィア) 5 月 2 日 ~ 6 日開催

- [1] Masateru Uchiyama, Enzhi Yin, Xiangyuan Jin, **Tomohiro Imazuru**, Tomoki Shimokawa, Hideo Yagita and Masanori Niimi. Anti-BTLA Antibody (6B2) Induced Prolongation of Fully MHC-Mismatched Murine Cardiac Allograft and Generation of Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells.
- [2] Enzhi Yin, Masateru Uchiyama, Xiangyuan Jin, **Tomohiro Imazuru**, Tomoki Shimokawa, Hideo Yagita and Masanori Niimi. Indefinite Survival of Fully MHC-Mismatched Murine Cardiac Allografts by Combination of Anti-BTLA mAb (6B2) and Anti-PD-1 mAb (PIM-2).

#### 2016 年度 (平成 28 年度)

ATC [アメリカ移植学会] (アメリカ・ボストン) 6 月 11 日 ~ 15 日

- [3] Masateru Uchiyama, Enzhi Yin, Takako Yanagisawa, Xiangyuan Jin, Satoko Mizuno,

Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, **Tomohiro Imazuru**, Hideo Yagita, Masanori Niimi. Anti-BTLA Antibody (6B2) Induced Prolongation of Fully MHC-Mismatched Murine Cardiac Allograft and Generation of Foxp3+ Regulatory T Cells.

- [4] Enzhi Yin, Masateru Uchiyama, Xiangyuan Jin, Takako Yanagisawa, Xiangyuan Jin, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, **Tomohiro Imazuru**, Hideo Yagita, Masanori Niimi. Indefinite Survival of Fully MHC-Mismatched Murine Cardiac Allografts by Combination of Anti-BTLA mAb (6B2) and Anti-PD-1 mAb (PIM-2).

TTS[国際移植学会] (中国・香港) 8月18日～23日

- [5] Masateru Uchiyama, Enzhi Yin, Takako Yanagisawa, Xiangyuan Jin, Satoko Mizuno, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, **Tomohiro Imazuru**, Hideo Yagita, Masanori Niimi. Anti-CD272 antibody (6B2) induced prolongation of fully MHC-mismatched murine cardiac allograft and generation of Foxp3+ regulatory T cells.
- [6] Enzhi Yin, Masateru Uchiyama, Takako Yanagisawa, Xiangyuan Jin, Satoko Mizuno, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, **Tomohiro Imazuru**, Hideo Yagita, Masanori Niimi. A Traditional Chinese Herbal Medicine “Huaier” Induced Prolongation of Fully MHC-Mismatched Murine Cardiac Allograft.

2017年度(平成29年度)

15<sup>th</sup> CAST [アジア移植学会] (フィリピン・セブ) 11.27～30

- [7] Masateru Uchiyama, Xiangyuan Jin, Enzhi Yin, Takako Yanagisawa, Akira Inoue, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, **Tomohiro Imazuru**, Hideo Yagita, Masafumi Kawamura, Masanori Niimi. Anti-CD272 antibody (6B2) induced prolongation of fully MHC-mismatched murine cardiac allograft and generation of Foxp3+ regulatory T cells.
- [8] Enzhi Yin, Masateru Uchiyama, Takako Yanagisawa, Akira Inoue, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, **Tomohiro Imazuru**, Hideo Yagita, Masafumi Kawamura, Masanori Niimi. 7 Components of Traditional Japanese Herbal Medicines Prolonged Survival of Fully Allogeneic Cardiac Grafts in Mice.
- [9] Enzhi Yin, Masateru Uchiyama, Takako Yanagisawa, Akira Inoue, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, **Tomohiro Imazuru**, Hideo Yagita, Masafumi Kawamura, Masanori Niimi. The effects of a traditional Chinese herbal medicine “Huaier” in murine cardiac allograft transplantation.
- [10] Enzhi Yin, Masateru Uchiyama, Takako Yanagisawa, Akira Inoue, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, **Tomohiro Imazuru**, Hideo Yagita, Masafumi Kawamura, Masanori Niimi. Appetite Stimulation by Rikkunshito (TJ-43) Improved Reduction of Food Intake in Murine Cardiac Transplant Model
- [11] Masateru Uchiyama, Enzhi Yin, Shigefumi Matsuyama, Xiangyuan Jin, Takako Yanagisawa, Akira Inoue, Masanori Hara, **Tomohiro Imazuru**, Masafumi Kawamura, Masanori Niimi. Administration of Thrombomodulin (CD141) could improve cardiac allograft survival in mice.
- [12] Masateru Uchiyama, Enzhi Yin, Masanori Hara, Xiangyuan Jin, Takako Yanagisawa, Akira Inoue, Shigefumi Matsuyama, **Tomohiro Imazuru**, Masafumi Kawamura, Masanori Niimi. Graft protective effect of HMG-CoA reductase inhibitor Pravastatin in murine cardiac allograft

transplantation.

[13] Akira Inoue, Enzhi Yin, Masateru Uchiyama, Takako Yanagisawa, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, **Tomohiro Imazuru**, Masafumi Kawamura, and Masanori Niimi Glycyrrhizic acid in Licorice prolonged cardiac allograft survival in mice.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

研究分担者氏名：今水流 智浩  
所属研究機関名：帝京大学  
職名：准教授

ローマ字氏名：IMAZURU, Tomohiro  
部局名：医学部・心臓血管外科学講座  
研究者番号(8桁)：70713436

### (2)研究分担者

研究分担者氏名：内山 雅照  
所属研究機関名：帝京大学  
職名：助教

ローマ字氏名：UCHIYAMA, Masateru  
部局名：医学部・心臓血管外科学講座  
研究者番号(8桁)：60713295

### (3)研究分担者

研究分担者氏名：飯田 充  
所属研究機関名：帝京大学  
職名：准教授

ローマ字氏名：IIDA, Mitsuru  
部局名：医学部・心臓血管外科学講座  
研究者番号(8桁)：20386022

### (4)研究分担者

研究分担者氏名：松山 重文  
所属研究機関名：帝京大学  
職名：講師

ローマ字氏名：MATSUYAMA, Shigefumi  
部局名：医学部・心臓血管外科学講座  
研究者番号(8桁)：90713420

### (5)研究分担者

研究分担者氏名：尾澤 直美  
所属研究機関名：帝京大学  
職名：助教

ローマ字氏名：OZAWA, Naomi  
部局名：医学部・心臓血管外科学講座  
研究者番号(8桁)：60713435