

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10649

研究課題名(和文) pDCを用いた末梢性免疫寛容誘導による移植臓器長期生着への戦略

研究課題名(英文) Prolongation of graft survival through peripheral tolerance mechanism via plasmacytoid dendritic cells

研究代表者

篠田 和伸 (Shinoda, Kazunobu)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：60348737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウス腎移植におけるspontaneous tolerance現象のメカニズムを解明しそれを臓器移植に応用することを目的とした。Spontaneous toleranceが成立する組み合わせgroup A (DBA C57/BL6)と成立しない組み合わせgroup B (C3H C57/BL6)でドナーpDCとレシピエントのナイーブT細胞の共培養をした。C57/BL6からのTreg誘導率はgroupAでは10-15%であったのに対しgroupBでは3-5%と有意な差が見られた。誘導されたTregを含む共培養細胞を1週間前に投与し心臓移植するとgroupAではgroupBよりも生着延長が得られた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate the mechanism of spontaneous tolerance in mice kidney transplantation. We employed the tolerance combination (group A: DBA C57/BL6) and non-tolerance combination (group B: C3H C57/BL6) and cocultured donor type plasmacytoid DC and recipient type naive T cells. The induction rate of Tregs were significantly higher in group A (10-15%) than in group B (3-5%). Significant prolonged heart allograft survival was observed in group A by administering co-cultured cells containing induced Tregs a week before transplant.

研究分野：腎移植

キーワード：末梢性免疫寛容 pDC

1. 研究開始当初の背景

近年における免疫抑制剤の目覚ましい進歩により、腎移植における細胞性急性拒絶反応は格段に減少し、その結果、腎移植後早期の移植腎生着率は格段に向上して来ている。臓器移植は免疫抑制剤による免疫応答の抑制なくしては成立しない医療となっている。しかしながら長期の免疫抑制剤使用による不利益を患者にもたらすといった負の側面もある。具体的には、重症感染症や糖尿病、高血圧、高脂血症の発症や悪性腫瘍の発生といった、免疫抑制剤を使用しなければ発症しなかったであろう疾患に患者は悩まされているのが現状である。従って、免疫抑制剤を使用しなくても免疫応答を制御できる方法を探索するのが急務の課題であり、その方法の一つとしてドナー特異的免疫寛容を誘導し、免疫抑制剤を早期に離脱する治療戦略がある。

(1) 中枢性免疫寛容の誘導。

中枢性免疫寛容のうち、腎移植の臨床に応用されているのは Mixed chimerism の誘導のみであり、Massachusetts General Hospital で初めて行われた (New England Journal of Medicine. 2008; 358(4): 353-61) 5 例の患者が術後一年以内に免疫抑制剤が不要となっているが、このプロトコルでは、chimerism を誘導するために骨髄移植を同時に行う必要がある。

(2) 末梢性免疫寛容誘導の可能性

中枢性免疫寛容を誘導するためには骨髄移植が必要であったが、末梢性免疫寛容の誘導のみで腎移植が可能であれば、骨髄移植をする必要がなく、これに伴う有害事象を回避できる。T 細胞、抗原提示細胞間応答の共刺激分子応答 (CD40-CD154, CD80, CD86-CD28) を抑制することで末梢性免疫寛容を実験的に誘導する手法は確立されている。一方で、マウスの腎移植では、ある組み合わせの allo-transplantation では、免疫抑制剤を使

わなくとも免疫寛容が誘導される spontaneous acceptance の現象が 1978 年に Paul S. Russell らにより発表された (J.Exp.Med.1978; 147: 1449-68)。2001 年には Bickerstaff らにより DBA/2(H2d) から C57/BL6 (H2b) への移植の場合、spontaneous acceptance は腎移植のみ成立し、心臓、皮膚移植では成立しない事が発表された (図 1)。そして 2011 年 Miyajima らにより、spontaneous tolerance が誘導された移植腎には腎内動脈周囲に局在するリンパ球の集合組織が確認され、Foxp3+ Regulatory T cell (Treg) が優位な構成成分であることから TOL (Treg-rich organized lymphoid structure) と命名された (図 2) (Am J Pathol. 2011; 178: 1635-45)。興味深いことに Foxp3 陽性細胞が除去すると、一度免疫寛容が誘導された移植腎が拒絶されることがわかった。Spontaneous acceptance の維持には Treg による末梢性免疫寛容機構が非常に重要である事が証明されたが、その成立に關与する因子は未だ不明である。

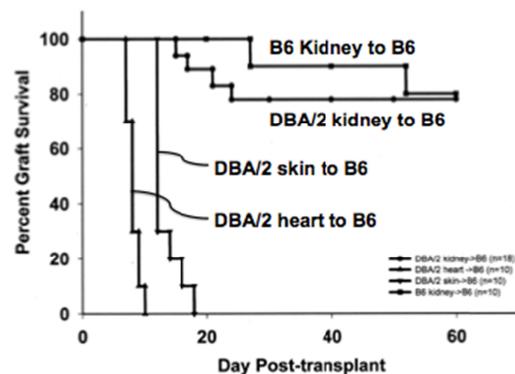


図 1

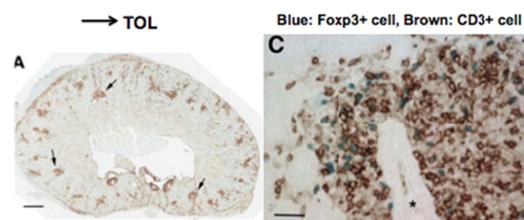


図 2

2. 研究の目的

本研究の目的は、spontaneous tolerance を成立させるメカニズムをより深く解明することである。免疫応答の場における DBA/2 由来 pDC と C3H 由来 pDC が産生するサイトカインのうち、どこに差があるかを見極め、そのサイトカインを用いて Indirect Pathway(レシピエントタイプの pDC を用いる)により Treg 誘導が有効に行われることを確認し、腎移植以外の移植モデル(心移植、皮膚移植)において免疫抑制剤なしでどれだけの移植臓器生着延長が得られるかを確認する。同様の手法で spontaneous tolerance が成立しない組み合わせ(C3H から C57/BL6)での腎移植モデルで tolerance が誘導されるかを確認する。この手法が臓器間を越え、画一的に有効であることが証明されれば、次の段階として大動物(ブタ、サル)において検証し、ヒト臨床応用の基礎へとつながるものとする。本研究が基礎となり、有効な末梢性免疫寛容の誘導が可能となれば、骨髄移植も回避できるとともに免疫抑制剤を早期に離脱でき、様々な合併症、副作用が解決され、移植臓器長期生着が可能になる。

3. 研究の方法

(1) まずは上記の spontaneous tolerance が成立する組み合わせ(DBA C57/BL6)と成立しない組み合わせ(C3H C57/BL6)でリンパ球の混合試験を行う。DBA、あるいは C3H マウスの骨髄細胞の single cell suspension を作成し、Miltenyi 社の pDC separation キットを用い MACS カラムにて pDC を分離する。また C57/BL6 から摘出した脾臓を処理し、CD4+CD25-T 細胞 separation キットを用いてナイーブ T 細胞を分離しておく。それらを共培養し、その上清を抽出し、上清中のサイトカイン(IFN- α , IL-2, IL-27, IL-10, TGF- β)を測定する。DBA 由来 pDC と C3H 由来 pDC を用いた時の上清でどのサイトカインが DBA 由来 pDC で有意かを ELISA キットで測定し検証する。同

時にフローサイトメトリーで細胞内サイトカインを測定し、上記結果との consistency を確認する。また同時にナイーブ T 細胞からの Treg 誘導率の差を比較する。フローサイトメトリーで Foxp3 陽性細胞の比率を比較する。

(2) レシピエントタイプ(C57/BL6)のマウス骨髄から pDC を分離し、sonicate したドナー(DBA もしくは C3H)臓器組織断片、ヌクレオチド、上記(1)で差が見られたサイトカインを加え、レシピエントタイプのナイーブ T 細胞から Treg が有効に誘導されるか検証する。

(3) (2)で調整した細胞と、感作されたエフェクター T 細胞(DBA/2 の皮膚移植片を拒絶した C57/BL6 マウスから分離)で、混合リンパ球試験を行いエフェクター細胞の増殖が抑制されているかを確認し、調整した pDC を移植前に投与し、心移植、皮膚移植モデルで免疫寛容誘導を確認する。

4. 研究成果

(1)

使用するマウスとして DBA, C3H, C57/BL6 を用いたが、それらの骨髄細胞を single cell suspension とし Miltenyi 社の pDC separation キットで pDC を分離することができた。さらにフローサイトメトリーで B220^{high}Ly6c^{high}CD11c^{low} の集団であることを確認できた。

DBApDC と C57/BL6 の共培養では、C3HpDC を使用する時に比べ IL-10, TGF- β が有意に産生されているという結果であった。

既知の事実として、DBA ドナーから C57/BL6 レシピエントへの腎移植においては spontaneous tolerance が成立するが、C3H ドナーからの移植では成立しない事が分かっている。そこで DBA および C3H 由来の pDC を用いて、C57/BL6 由来のナイーブ T 細胞(CD4+CD25-)と共培養し、Treg(Foxp3+T 細胞)の誘導率をフローサイトメト

リーで検討した。上記の細胞を3日間共培養し、T細胞の細胞内染色を行いFoxp3陽性細胞の割合を検討した。C3Hでは誘導率3-5%程度であったのに対し、DBAでは10-15%と有意に高値であった。

(2)

上記(1)は免疫細胞応答におけるDirect pathwayの実験であった。これをIndirect pathwayに応用すべく次の実験を行なった。レシピエントタイプ(C57/BL6)のマウス骨髄からpDCを分離し、sonicateしたドナー(DBAもしくはC3H)臓器組織断片、ヌクレオチド、上記(1)で差が見られたIL-10, TGF- β を加え、レシピエントタイプのナイーブT細胞からTregが有効に誘導されるか検証した。Tregの誘導率を上記(1)のDBApDCを使った場合と同じくらいの高い誘導率に導くのが目的であった。ところが種々の条件を色々変更し実験を行なったがTreg誘導率は中々上がらなかった。この過程で実験の進行が大幅に遅れてしまった。

(3)心移植・皮膚移植モデルでの検討

当初は(2)のIndirect pathwayにより誘導された制御性リンパ球を移植モデルに応用する予定でいたが、Treg誘導率が低かったためこれを断念せざるを得なかった。そこで(1)のDirect pathwayにより誘導された制御性リンパ球集団を心臓移植・皮膚移植モデルに用いた。

DBA由来のpDCとC57/BL6由来のナイーブT細胞を3日間共培養したリンパ球集団(5×10^6 個)をC57/BL6レシピエントの尾静脈より静注し、DBAから採取した心移植片、もしくは皮膚移植片を移植した。細胞の投与タイミングは移植の1週間前もしくは2週間前とした。DBApDCのみ投与する群も作り検討した。各群6例の移植モデルを作成した。結果は図3のようになった。pDC単独投与であればコントロール(術前処置なし)の群と同様に心移植片は約7日目で拒絶された。し

かし、1週間前もしくは2週間前にDBApDCとC57/BL6ナイーブT細胞の共培養集団を投与しておく、移植片は最大で15日まで生着が延長した。しかし、同様な結果は皮膚移植片では見られなかった。心移植モデルにおいては、DBApDCに誘導されたTregを含む細胞集団を術前に投与しておくことで心移植片の生着延長が得られたが、腎臓のように永久的なspontaneous toleranceを誘導するまでには至らなかった。

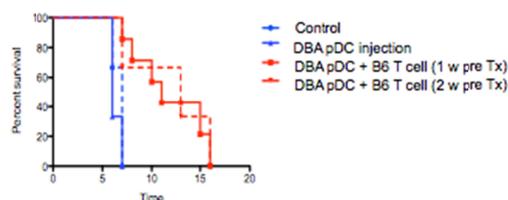


図3

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)

6. 研究組織

(1)研究代表者

篠田 和伸 (Kazunobu, Shinoda)
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・
泌尿器科講師
研究者番号: 60348737

(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