

令和元年12月24日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11064

研究課題名(和文) 抗CD70抗体を用いた臓器移植における次世代免疫抑制療法の開発

研究課題名(英文) Development of next-generation immunosuppressive therapy in organ transplantation using anti-CD70 antibody

研究代表者

市丸 直嗣 (Ichimaru, Naotsugu)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：70346211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウス同種異所性心臓移植モデルにおいて、無処置群では移植心生着日数中央値が8日であったのに対し、抗CD70抗体投与により100日以上移植心生着を達成し、脾臓と移植心での樹状細胞誘導が観察された。B6マウスから心移植したC3Hマウスの脾細胞を別のC3Hマウスに養子移入し、B6マウスあるいはBalb/cマウスから心移植したところ、B6由来の移植心にほとんど単核球浸潤を認めず、ドナー特異的免疫寛容が示唆された。抗CD70抗体により誘導された制御性樹状細胞は免疫抑制的に作用した。抗CD70抗体はマウス心移植モデルにおいて制御性樹状細胞を誘導し、効果的に拒絶反応を予防することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末期臓器不全患者において、臓器移植は唯一の根治療法となる。ヒトでの同種臓器移植においては拒絶反応を防ぐために数種の免疫抑制薬の併用が欠かせない。残念ながらそれでも拒絶反応は完全には防ぎえないだけでなく、本来宿主に有用な腫瘍免疫などを抑制してしまい悪性腫瘍の頻度が増加するという重大な副作用を生じている。本研究結果により、移植臓器に対してだけ免疫反応を抑制し、抗腫瘍免疫などの宿主に有用な免疫反応を維持するドナー特異的免疫寛容に抗CD70抗体が有用である可能性が示唆され、その機序は制御性樹状細胞の誘導によることが示された。

研究成果の概要(英文)：Anti-CD70 antibody treatment induced permanent acceptance (>100 days) of allogeneic cardiac grafts in mice, while median cardiac graft survival of no treatment group was 8 days after transplant surgery. Anti-CD70 antibody treatment induced regulatory dendritic cells in spleen and graft. The splenocytes from anti-CD70 antibody treated C3H recipients bearing B6 grafts were adoptively transferred into naive C3H mice, and then the C3H mice were given B6 or Balb/c allografts. Histologic studies of harvested cardiac grafts revealed few mononuclear cell infiltration in B6 allografts, which suggested donor specific tolerance. The regulatory dendritic cells generated following anti-CD70 antibody treatment were actively immunosuppressive. These results showed that anti-CD70 antibody treatment induced regulatory dendritic cells in recipient mice and effectively prevented rejection in cardiac transplantation model.

研究分野：臓器移植

キーワード：抗CD70抗体 免疫抑制療法 臓器移植

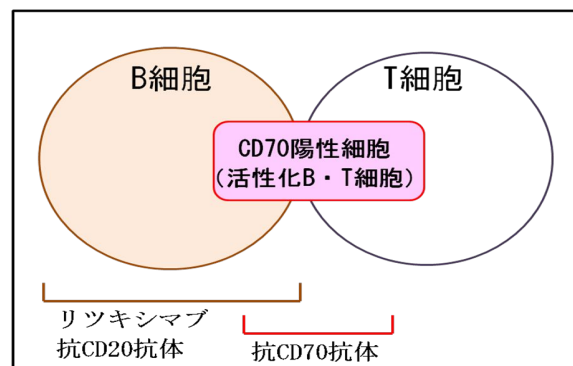
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在の臓器移植ではカルシニューリン阻害薬など多種免疫抑制剤を全身投与する非特異的免疫抑制療法で拒絶反応を予防する。この多剤併用免疫抑制療法による強力な免疫抑制作用により、急性拒絶反応は制御され臓器移植の短期成績は向上したが、免疫抑制薬による薬物治療は永続的に欠かせない。この長期間にわたる免疫抑制の結果生じる感染症と悪性腫瘍が本邦の腎移植後死因の上位になっており重大な問題となっており、対策が急がれている。またカルシニューリン阻害薬を用いると薬剤性腎障害などの副作用が好発するため、血中濃度モニタリングが永続的に要求される。

腫瘍壊死因子 (TNF) スーパーファミリーの一員である CD70 (TNF-SF7) は、活性化 B 細胞、T 細胞、樹状細胞上に一過性に発現し、リンパ球のエフェクター機能およびメモリー機能に役割を果たす。CD70 の発現は免疫系のエフェクター細胞に制限されるため、CD27-CD70 を阻害すると、自己免疫疾患や臓器移植の治療として有用と考えられる。

臓器移植の実臨床で用いられている既存の抗体療法であるリツキシマブ (抗 CD20 抗体) がすべての B 細胞を除去するのと異なり、活性化 B 細胞・T 細胞のみを抗 CD70 抗体により選択的に除去すれば、有害事象が少なく、的を絞った免疫抑制療法となる。また抗 CD70 抗体は、抗 CD20 抗体と異なり、B 細胞だけでなく活性化した T 細胞も除去できるので、高い有効性が期待できる。抗 CD70 抗体により、まさに次世代免疫抑制療法が可能となる。



2. 研究の目的

CD70 は、活性化 B 細胞、T 細胞、樹状細胞上に一過性に発現し、リンパ球のエフェクター機能およびメモリー機能に役割を果たす。活性化 B 細胞・T 細胞のみを抗 CD70 抗体により選択的に除去すれば、有害事象が少なく、的を絞った免疫抑制療法となる。マウス異所性心臓移植モデルを通じて、抗 CD70 抗体投与による生着延長効果を検討し、有効性を確認し、至適な投与量とタイミングを探索する。また抗 CD70 抗体の薬理効果について、移植免疫学的な意義を検討する。移植臓器の拒絶反応を抑制して画期的な生着延長を確立し、かつ全身の有害事象・副作用を最小限にする新規治療法の樹立を目的とする。

3. 研究の方法

まず、マウス心臓移植モデルで抗 CD70 抗体の有効性確認、至適投与タイミングの探索、効果発現メカニズムの検討を行う。生着延長効果の検討、免疫担当細胞の FACS での測定、各種サイトカインの RT-PCR での定量、移植心の免疫染色を行い、抗 CD70 抗体の効果を検討する。次に、実臨床に近づけた投与法を検討する。ラパマイシンなど既存の免疫抑制薬と抗 CD70 抗体を併用投与し、移植心の更なる生着延長効果を検討する。抗 CD70 抗体併用投与により、既存の免疫抑

制薬の投与量を減量できるなど、実臨床を目指した抗 CD70 抗体の位置づけについて検討した。

(1) マウス同種異所性心臓移植モデル

ドナーおよびレシピエント

雄性 C57BL/6 (B6)マウスをドナーとし、C3H マウスをレシピエントに選択した。

顕微鏡下異所性心臓移植手術

据置型の高倍率手術用顕微鏡を用い、顕微鏡下微細血管縫合手技にて、レシピエントマウス腹腔内の腹部大血管にドナーマウスより採取した心臓を異所性に移植した。

移植心の生着確認と拒絶反応の診断

心臓移植手術日(day 0)より毎日、移植心の生着有無をレシピエントの腹部触診で確認し、被験薬の有効性を検討する。また拒絶反応の確定診断は、移植心の Hematoxylin-Eosin 染色による病理組織診断で行った

(2) 被験薬と実験群

被験薬：抗 CD70 抗体

抗 CD70 抗体をマウス尾静脈から投与した。

実験群 1

コントロール群：被験薬投与なし。

投与群：抗 CD70 抗体を day -1, day0 にそれぞれ 500 μ g 投与し, day 1,3,5 に 250 μ g 投与した。

実験群 2

B6 マウスから心移植した C3H マウスの脾細胞を心移植 60 日後に採取して別の C3H マウスに養子移入した後,この C3H マウスに B6 マウスから心移植した群と Balb/c マウスから心移植した群を作成した。

(3) 検体採取と解析

レシピエントマウスから血清・末梢血リンパ球・移植心・脾臓を採取し、解析に用いた。

FACS

血中および脾臓の T 細胞(CD4、CD8、Treg)、活性化 B 細胞、DC (樹状細胞)、MDSC (骨髄由来免疫抑制細胞)を FACS で測定し、抗 CD70 抗体の効果を検討した。

定量的 RT-PCR

拒絶反応に重要な役割を果たすことが知られているサイトカインの血中および移植心の mRNA レベルを定量的 RT-PCR で測定した。

免疫組織染色

移植心での GIL (graft infiltration lymphocyte) と CD8-CTL、Foxp3-Treg を、それぞれ特異的な抗体を用いて、免疫組織染色で検討した。

4. 研究成果

無処置のコントロール群では移植心生着期間中央値が 8 日であったのに対し、抗 CD70 抗体投与により 100 日以上 of 移植心生着を達成した。(図 1)

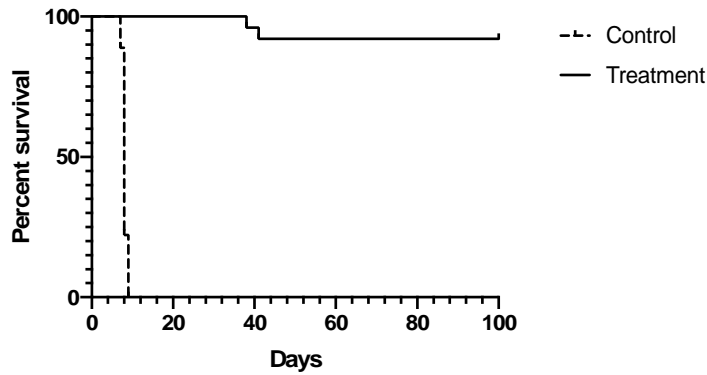


図 1 . 生着率

移植後 7 日目に採取した脾臓と移植心での解析では、樹状細胞誘導が観察された。(図 2 脾臓) , (図 3 , 移植心)

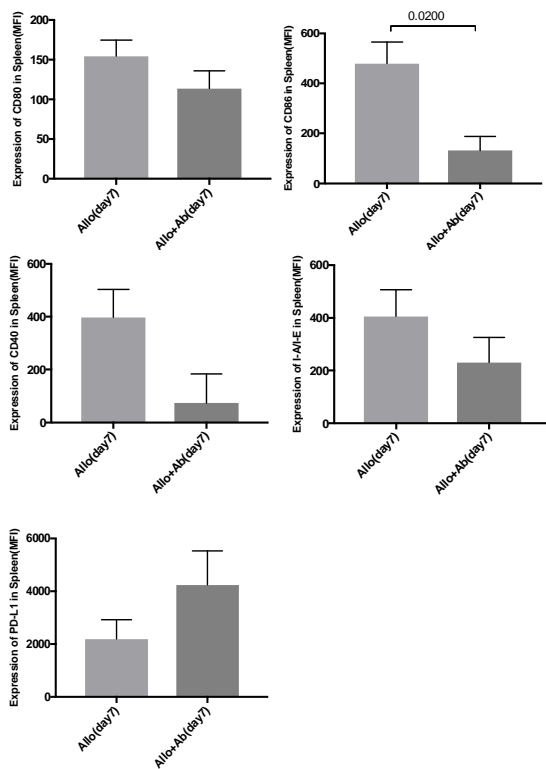


図 2 . Spleen

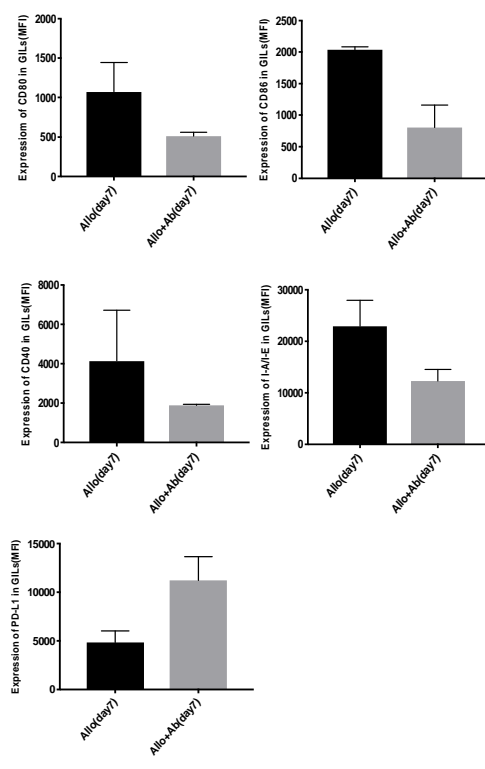


図 3 . GIL

B6 マウスから心移植した C3H マウスの脾細胞を心移植 60 日後に採取して別の C3H マウスに養子移入した。この C3H マウスに Balb/c マウスから心移植した群では、Balb/c マウス由来の移植心は中央値 7 日で早期に拒絶された。この C3H マウスに B6 マウスから心移植した群では、B6 由来の移植心は生着し、単核球浸潤をほとんど認めず、ドナー特異的免疫寛容が示唆された。抗 CD70 抗体投与はマウス心移植モデルにおいて制御性樹状細胞を誘導し、効果的に拒絶反応を予防することが示された。

ヒトでの同種臓器移植においては拒絶反応を防ぐために数種の免疫抑制薬の併用が欠かせない。残念ながらそれでも拒絶反応は完全に防ぎえないだけでなく、本来宿主に有用な抗腫瘍免疫などを抑制してしまい悪性腫瘍が増加するという重大な副作用がある。本研究成果により、移植臓器に対する免疫反応だけを抑制し、抗腫瘍免疫などの宿主に有用な免疫反応を維持するドナー特異的免疫寛容に、抗 CD70 抗体投与が有用である可能性が示唆され、その機序は制御性樹状

細胞の誘導によることが示された。

日本では、末期腎不全に対する治療法として、相変わらず人工透析を選択する割合が圧倒的に高い。このことは医療財政の圧迫や若年層患者の社会生活への期待感を阻害する一因となっている。一方、臓器移植による治療は健常者とほぼ同等の社会復帰を期待できるものの、現在の免疫抑制治療は脱薬への期待は低く、長期的な経済的負担と悪性腫瘍や感染症などの有害事象のリスクを強めている。我々の進めているこの次世代免疫抑制療法は、移植臓器の永続的生着を目指すと共に、有害事象を減らすことにより末期腎不全患者の生命予後を改善するものである。即ち、現在から大きく進歩した未来の移植医療のパラダイムシフトを企画し、また日本の医療行政の効率的運用に貢献するものとする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. 八木澤 隆, 三重野 牧子, 市丸 直嗣, 森田 研, 中村 道郎, 堀田 記世彦, 日本臨床腎移植学会・日本移植学会. 腎移植臨床登録集計報告(2018)2017 年実施症例の集計報告と追跡調査結果. 移植, 査読有, 53 巻 2-3 号: 89-108
2. 八木澤 隆, 三重野 牧子, 市丸 直嗣, 森田 研, 吉村 了勇, 湯沢 賢治, 高原 史郎. 腎移植臨床登録集計報告(2017)2016 年実施症例の集計報告と追跡調査結果. 移植, 査読有, 52 巻 2-3 号 113-133

〔図書〕(計 2 件)

1. 高山 智美, 市丸 直嗣. 腎と透析ベッドサイド検査事典 第 14 章 腎移植患者の検査 組織適合性検査, 腎と透析 84 巻増刊 426-428, 東京医学社, 2018 年
2. 市丸 直嗣. 臓器移植の現状と課題 腎移植, 医学のあゆみ 262 巻 9 号 815-819, 医歯薬出版株式会社, 2017 年

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 梨井 康

ローマ字氏名: RII KO

所属研究機関名: 国立研究開発法人国立成育医療センター

部局名: 移植免疫研究室

職名: 室長

研究者番号(8桁): 60321890

研究分担者氏名: 高原 史郎

ローマ字氏名: TAKAHARA SHIRO

所属研究機関名: 大阪大学

部局名: 医学系研究科

職名: 招へい教授

研究者番号(8桁): 70179547

研究分担者氏名： 貝森 淳哉

ローマ字氏名： KAIMORI JYUNYA

所属研究機関名： 大阪大学

部局名： 医学系研究科

職名： 寄附講座准教授

研究者番号(8桁)： 70527697

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。