

令和元年5月24日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11071

研究課題名(和文) 移植免疫寛容誘導の臨床試験実施に向けたTreg細胞の機能及び遺伝子発現解析

研究課題名(英文) Analysis of regulatory T cell function and gene expression for clinical implementation of transplantation tolerance induction

研究代表者

田邊 一成 (TANABE, Kazunari)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：80188359

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)：我々が報告したLiposomal alpha-galactosylceramideによるナチュラルキラーT細胞活性化とCD40-CD40リガンド遮断を利用したマウス同種異系キメラ誘導においてタクロリムス(TAC)及びエベロリムス(EVL)の併用が与える影響を検証した。免疫抑制剤は骨髄移植7日後まで継続したが、その後TAC併用マウスでは経時的にドナー細胞が拒絶された。一方でEVL併用マウスでは長期に混合キメラが維持された。この現象はTAC併用マウスではEVL併用マウスに比較して骨髄移植7日後の脾臓に含まれる制御性T細胞が少なく、同細胞の免疫制御能も低下していたことに起因していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫寛容の確立は臓器移植患者における免疫抑制剤の永続的内服を不要とするだけでなく、自己免疫性疾患の根治治療にも応用可能である。しかし、臨床応用を考慮すると、移植後初期の拒絶反応を抑制するため従来の免疫抑制剤の一時的な併用は必須と考えられる。本研究では我々の報告した免疫寛容誘導モデルを用いて、免疫抑制剤が及ぼす影響を明らかとし、免疫寛容誘導における免疫抑制剤使用の在り方について意義深い提案ができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We previously reported a mixed hematopoietic chimerism induction regimen that promotes regulatory T cell (Treg) proliferation by stimulating invariant natural killer T cells under CD40 blockade. Here we evaluated the impact of tacrolimus (TAC) or everolimus (EVL) on this regimen. In the immunosuppressive drug-dosing phase, peripheral blood chimerism was comparably maintained by both TAC and EVL. After dosing was discontinued, TAC-treated mice showed gradual graft rejection, whereas EVL-treated mice sustained long-term robust chimerism. Treg from TAC-treated mice showed lower expression of both Ki67 and cytotoxic T lymphocyte antigen-4, and lower suppressive activity in vitro than those from EVL-treated mice, indicating that TAC negatively impacted the regimen by interfering with Treg proliferation and activation. Our results suggest that the usage of calcineurin inhibitors should be avoided if utilizing the regimen to induce Treg for the establishment of mixed hematopoietic chimerism.

研究分野：泌尿器、腎移植、骨髄移植、免疫寛容

キーワード：同種異系キメラ誘導 移植 免疫寛容 タクロリムス エベロリムス 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

移植免疫寛容は臓器移植患者における永続的な免疫抑制剤内服を不要とし、臓器不全患者における唯一の根治治療として世界中で研究が進められている。我々はマウスモデルにおいて免疫制御を担当する自然免疫細胞であるナチュラルキラーT細胞(NKT細胞)をLiposomal alpha-galactosylceramide(以下Lipo-GalCer)(引用文献)により活性化し、さらにCD40-CD40リガンド(以下CD40L)遮断として抗CD40L抗体を併用することで、効率的な免疫寛容誘導が可能となるプロトコルを報告した(引用文献)。しかしながら、本治療戦略を臨床応用するためにはまだ課題が残されている。その課題の一つとして併用免疫抑制剤の影響の検討がある。

我々の作製した混合血キメラマウスではドナー骨髄由来樹状細胞がレシピエント胸腺に生着し、ドナー反応性T細胞が選択的に除去されることにより免疫寛容が維持されている。樹状細胞の胸腺内生着には約14日間が必要であり、それまでの免疫制御には体内で増殖した制御性T細胞(Treg)が関与していた(引用文献)。ヒトにおいては骨髄移植と同時期に臓器移植を行えることが望ましいが、これを安全に実現するためには、移植後数日間はカルシニューリン阻害剤やmTOR阻害剤などの従来の免疫抑制剤を併用する必要がある。

しかし、現在最も用いられているカルシニューリン阻害剤はインターロイキン2(IL-2)シグナルを抑制することで免疫抑制活性を發揮するが、その維持にIL-2が必要とされるTregに対しても悪影響を与えることが知られている。従来の免疫抑制剤の使用によりTregによる免疫制御機構が抑制されることで、免疫寛容の誘導へ阻害的に作用する可能性があるが、十分に検証がなされておらず、より適切なプロトコルの模索のため、これらの免疫抑制剤と我々の用いる免疫寛容誘導法の相互作用を明らかにすることが必要と考えられた。

2. 研究の目的

Lipo-GalCerおよび抗CD40L抗体を使用したマウス同種異系キメラ誘導モデルを用いて、骨髄移植後一時的に併用した免疫抑制剤(カルシニューリン阻害剤及びmTOR阻害剤)が混合血キメラの維持およびTregの増殖や機能へ与える影響について検証を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス心臓移植モデルの作製および免疫抑制剤投与量の設定

ドナー(B6マウス)の大動脈および肺動脈以外を結紮して心臓を摘出、速やかにレシピエント(BALB/cマウス)の腹部大動脈と下大静脈に各々端側吻合することで心臓移植を施行した。手術後は体表より心拍動を触知し、拍動の消失により拒絶反応を確認した。免疫抑制剤はカルシニューリン阻害剤としてタクロリムス(TAC)、mTOR阻害剤としてエベロリムス(EVL)を選択し、手術翌日より14日間連日投与した。EVLの投与量を1.0 mg/kg/day(N=6)とし、TACを1.0 mg/kg/day(N=6)あるいは5.0 mg/kg/day(N=4)での投与を行い、その後の心臓グラフとの生着期間を比較して、EVLと等条件となるTACの投与量を決定した。

(2) TACおよびEVLが骨髄キメラ誘導へ与える影響に関する評価

骨髄移植はBALB/cマウスに3Gyの放射線照射を行い、B6由来の骨髄細胞を $20-25 \times 10^6$ 個ずつ経静脈投与して行い、骨髄移植の施行日にLipo-GalCerおよび抗CD40L抗体の投与も行なった。免疫抑制剤が骨髄キメラ誘導に与える影響を評価するため、TAC(5.0 mg/kg/day, N=11)あるいはEVL(1.0 mg/kg/day, N=8)を骨髄移植翌日より14日間連日投与した。移植後14日、28日、42日、56日後に末梢血を採取し、フローサイトメトリー(FCM)を用いてドナーMHCクラスI抗原陽性細胞(H2K^b細胞)の割合を計測し、免疫抑制剤の併用を行わないキメラコントロール群(N=13)を含めた3群間で比較した。

(3) TACおよびEVLが移植後のclonal deletionへ与える影響の評価

キメラコントロール群(N=4)、TAC併用群(N=4)、EVL併用群(N=4)の他に、Lipo-GalCerおよび抗CD40L抗体の投与を行わず、骨髄の生着が起きない拒絶群(N=4)も評価対象とし、各々のマウスより骨髄移植7日後に脾臓細胞を採取した。脾臓細胞からCD4⁺CD25⁻細胞を分離してCFSEによる染色を行なった後に、各種濃度(0、10、100、1000 units/mL)のIL-2存在下で、死活処理したドナー抗原提示細胞と4日間共培養することにより混合リンパ球反応試験を施行した。CFSE減衰率をFCMで測定し、レシピエントT細胞のドナー抗原に対する反応性を評価した。次にAKRマウスをドナーとし、拒絶群(N=5)、キメラコントロール群(N=7)、TAC併用群(N=5)における移植7日後の末梢血中のVβ6⁺T細胞の割合をFCMで測定し、比較した。

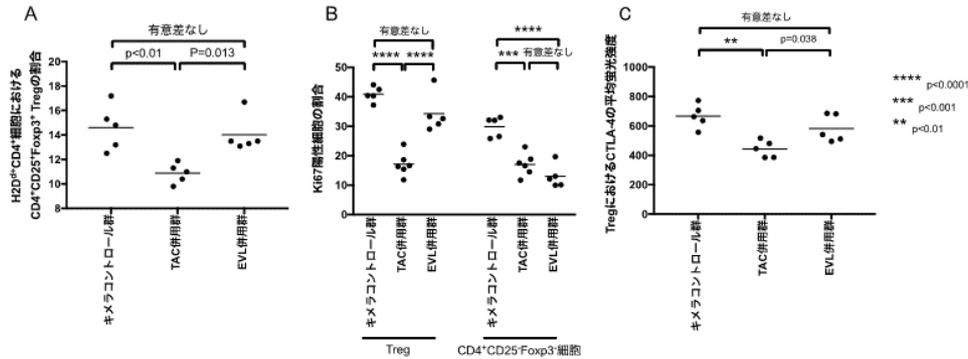
(4) TACおよびEVLがTregの増殖および免疫抑制能へ及ぼす影響の評価

キメラコントロール群(N=5)、TAC併用群(N=5)、EVL併用群(N=5)の各群で、骨髄移植7日後における、脾臓細胞中のドナーCD4⁺細胞(H2D^dCD4⁺細胞)に含まれるTreg(CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞)の割合をFCMで測定した。また、TregおよびH2D^dCD4⁺CD25⁻Foxp3⁻T細胞におけるKi67発現、並びにTregにおける細胞傷害性Tリンパ球抗原4(CTLA-4)発現をFCMで測定した。さらに、骨髄移植7日後にキメラコントロール群(N=3)、TAC併用群(N=4)、EVL併用群(N=3)の脾臓細胞よりTreg(CD4⁺CD25^{high}細胞)をセルソーターを用いて分離し、CD3/CD28ビーズで

(4) TAC および EVL が Treg の増殖および免疫抑制能へ及ぼす影響の評価

Lipo-GalCer と抗 CD40L 抗体を用いた免疫寛容誘導プロトコルでは、製剤投与後に Treg が増殖することも免疫寛容の確立に重要であることが分かっており(引用文献) TAC が Treg の増殖能や免疫抑制能へ影響を与えた結果キメラが破綻した可能性を考慮した。骨髄移植 7 日後の脾臓細胞におけるレシピエント CD4⁺細胞 (H2D^dCD4⁺細胞) 中の Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞) の割合をキメラコントロール群、TAC 併用群、EVL 併用群の 3 群間で比較したところ、キメラコントロール群、EVL 併用群に比較して TAC 併用群で有意に Treg の割合が少なかった (図 5A)。

図5. 骨髄細胞移植7日後の脾臓におけるTregの割合、Ki67およびCTLA4の発現

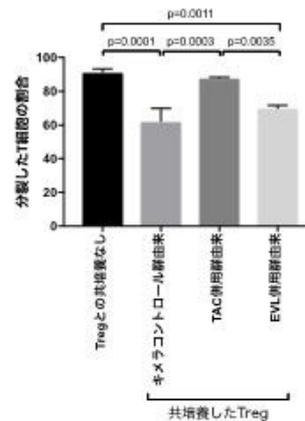


また、Treg における Ki67 発現も同様に TAC 併用群で他 2 群に比して有意に低いことが示された (図 5B)。一方で、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞に関してはキメラコントロール群に比較して免疫抑制剤併用群 (TAC 併用群および EVL 併用群) で有意に Ki67 発現が低かった。TAC、EVL ともに免疫抑制剤として CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞の増殖を抑制しているものの、TAC では加えて Treg の増殖も抑制していた。

続いて Treg の免疫抑制能自体にも TAC が影響を及ぼしている可能性を検証した。まず、骨髄移植 7 日後における Treg の CTLA-4 発現を評価したが、キメラコントロール群および EVL 併用群に比して TAC 併用群で有意に発現が低かった (図 5C)。

実際に免疫抑制能が低下していることを確認するため、これらのマウスの脾臓細胞より Treg (CD4⁺CD25^{high}細胞) を分離し、抗 CD3/CD28 ピーズによる増殖刺激を加えた BALB/c マウスの T リンパ球と共培養した。Treg との共培養を行わなかった場合、分裂せずに残った細胞は 10%前後であり、これを比較対象とした。キメラコントロール群および EVL 併用群より分離した Treg と共培養を行なった場合は分裂の見られない細胞は 40%前後と有意に抑制されていたが、TAC 併用群より分離した Treg の場合は 10%前後であり、Treg との共培養を行わない場合と同等であった (図 6)。

図6. 分裂刺激を加えたT細胞に対するTregの抑制能



以上の結果より、TAC の併用は Treg の増殖を抑制し、さらにはその Treg の免疫抑制能に対しても阻害的に作用し、その結果キメラが破綻した可能性が示唆された。これに対して EVL の併用は Treg に影響せず、キメラ形成を長期的に維持できたと考えられた。

< 引用文献 >

Ishii Y, Nozawa R, Takamoto-Matsui Y, *et al.* Alpha-galactosylceramide-driven immunotherapy for allergy, *Front Biosci* 2008; 13: 6214-28.
 Hirai T, Ishii Y, Ikemiyagi M, *et al.* A novel approach inducing transplant tolerance by activated invariant natural killer T cells with costimulatory blockade. *Am J Transplant* 2014; 14: 554-67.
 Hirai T, Ishii R, Miyairi S, *et al.* Clonal Deletion Established via Invariant Natural Killer T Cell Activation and Costimulatory Blockade Required In Vivo Expansion of Regulatory T Cells. *Am J Transplant* 2016; 16: 426-39.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Katsumata H, Miyairi S, Ikemiyagi M, Hirai T, Fukuda H, Kanzawa T, Ishii R, Saiga K, Ishii Y, Omoto K, Okumi M, Yokoo T and Tanabe K. Evaluation of the impact of

conventional immunosuppressant on the establishment of murine transplantation tolerance - an experimental study. *Transplant Int* 2019; 32(4): 443-53. (DOI : 10.1111/tri.13390)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

池宮城 雅子、石井 保之、石井 瑠美、奥見 雅由、尾本 和也、勝俣 陽貴、川口 絵美、神澤 太一、雑賀 寛、長谷川 純平、平井 敏仁、福田 洋典、宮入 聡、山川 貴史、横尾 隆

ローマ字氏名：

(IKEMIYAGI, masako)、(ISHII, yasuyuki)、(ISHII, rumi)、(OKUMI, masayoshi)、(OMOTO, kazuya)、(KATSUMATA, Haruki)、(KAWAGUCHI, emi)、(KANZAWA, taichi)、(SAIGA, kan)、(HASEGAWA, junpei)、(HIRAI, toshihiito)、(FUKUDA, hironori)、(MIYAIRI, satoshi)、(YAMAKAWA, takafumi)、(YOKOO, takashi)

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。