

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16411

研究課題名(和文) 肺移植の拒絶反応における免疫チェックポイント分子の関与及び免疫寛容の誘導

研究課題名(英文) Immune checkpoint molecules in lung transplant rejection and induction of immune tolerance.

研究代表者

海竇 大輔(Kaiho, Taisuke)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30802558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マイナー抗原不一致のマウス皮下気管移植モデルでは、レシピエントに抗PD-L1抗体を投与することにより、拒絶反応は増悪した。免疫チェックポイント分子が拒絶反応に関与していることが示唆された。マウス同所性肺移植モデルへの応用により、検証を続けていく。PD-L1を含む免疫チェックポイント分子を遺伝子導入したレトロウイルスベクターを作製し、マウス胸腺のリンパ球に強発現させることは可能であった。MHC class IIと免疫チェックポイント分子を同時に遺伝子導入し発現させ、抗原抗体反応を評価することにより、免疫寛容に関わる免疫チェックポイント分子の同定を進めていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

他臓器移植と比較して予後不良である肺移植において、その最大の要因である慢性拒絶反応(CLAD)の機序解明、治療法の確立への研究が果たす役割は大きい。今回の研究成果で免疫チェックポイント分子が拒絶反応に関与していることが示唆された。腫瘍免疫で注目されている免疫チェックポイント分子が、肺移植後の拒絶反応に関与しており、新たな免疫寛容誘導の開発の一助となる可能性が示されることは、腫瘍免疫と移植免疫の橋渡し研究 translational researchとして、意義は大きいと考えられる。肺移植ひいては難治性肺疾患の予後向上をもたらす橋渡し研究と考えられる。

研究成果の概要(英文)：In a murine subcutaneous tracheal transplant model with minor antigen mismatch, administration of anti-PD-L1 antibody to recipients exacerbated rejection. It has been suggested that immune checkpoint molecules are associated with rejection. We will continue to apply it to a murine orthotopic lung transplant model.

It was possible to prepare a retrovirus vector into which an immune checkpoint molecule, including PD-L1, was inserted and to strongly express it in lymphocytes of murine thymus. MHC class II and immune checkpoint molecules could be expressed at the same time by a retrovirus vector, and the antigen-antibody reaction will be evaluated to identify immune checkpoint molecules strongly associated with immune tolerance.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺移植 慢性拒絶反応(CLAD) 免疫チェックポイント分子 免疫寛容

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺移植は他の固形臓器移植と比較して予後不良であり、その最大の要因である慢性拒絶反応(CLAD)の病態は解明されておらず、治療法も確立していない。当研究室ではマイナー組織適合抗原不一致によるマウス同所性肺移植後 CLAD モデルを確立し、その病態が collagen type(V) による自己免疫や IL-17 に依存的であることを報告してきた。通常抗原曝露されていない環境にある collagen type(V)などの抗原が移植による刺激により樹状細胞などの抗原提示細胞を経由して抗原提示された場合、自己免疫を誘導し、拒絶反応の促進から CLAD に至ると考察してきた。

(2) 1992年に日本で同定された PD-1 分子は、自己反応性 T 細胞の抑制に関与することが明らかとなり、免疫編集 (immuno-editing) された腫瘍細胞に応用され免疫チェックポイント阻害剤として急速に臨床研究・基礎研究が進行中である。肺癌においても盛んに研究が進行中で腫瘍免疫では最も注目される分野であるが、肺移植における免疫チェックポイント分子に関する研究についての報告はまだ無い。

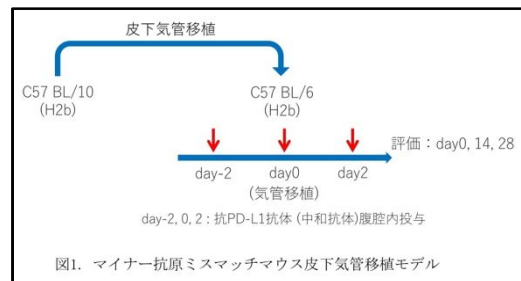
2. 研究の目的

(1) 肺移植後の拒絶反応における免疫チェックポイント分子の関与を明らかにする。

(2) 免疫チェックポイント分子に対するモノクローナル抗体を用いた免疫チェックポイント阻害療法の機序に着目し、肺移植における免疫チェックポイント分子を用いた免疫寛容誘導法を探索する。

3. 研究の方法

(1) 拒絶反応への免疫チェックポイント分子の関与を調べるために、C57BL/10 と C57BL/6 を用いた皮下気管移植モデルを用いて、C57BL/6 から C57BL/6 へと気管を移植する isograft をコントロール群として、ドナー C57BL/10 (MHC H2b) からマイナー抗原ミスマッチのレシピエント C57BL/6 (MHC H2b) に移植するモデル (ミスマッチ群) を作成し、レシピエントへのマウス抗 PD-L1 抗体投与の有無 (抗 PD-L1 抗体投与あり群、なし群) による拒絶反応の変化を day0, 14, 28 で評価した (図 1)。病理標本は HE 染色、trichrome 染色を行い、拒絶反応は気管の閉塞率で評価した³⁾。[閉塞率 = 1 - (気管内腔面積 / 気管軟骨外周内の面積)]



(2) PD-L1 を含む免疫チェックポイント分子の遺伝子をクローニングし、免疫チェックポイント分子の遺伝子を導入したレトロウイルスベクターの作製を行う。また、レトロウイルスベクターを用いて CIITA 遺伝子を遺伝子導入することにより MHC classII を発現させる手法を利用して、抗原提示能を有するマウス免疫細胞を作製し、PD-L1 を含む免疫チェックポイント分子を同時に強発現させることにより、拒絶反応 (抗原抗体反応) を抑えられるかどうかを検討する。(PD-L1 遺伝子を導入したレトロウイルスベクターを用いて、PD-L1 遺伝子を樹状細胞に導入することを試みるも、PD-L1 は発現されなかった。レンチウイルスベクターに変更して遺伝子導入を試み、さらには、マウス骨髄細胞から血液幹細胞を分離培養し、そこにウイルスベクターを用いて PD-L1 を遺伝子導入し、樹状細胞に分化させることを試みたが、成功しなかった。)

4. 研究成果

(1) コントロール群ではほぼ気管閉塞を認めなかったが、ミスマッチ群では day14、day28 とともに気管閉塞を起こしており、拒絶反応を認めた (図 2)。HE 染色の所見では、内腔への炎症細胞の浸潤を認めた。閉塞率は day14 に比較して、day28 ではさらに高値であった。ミスマッチ群の中でも、抗 PD-L1 抗体投与あり群では、さらに気管閉塞が増悪しており、抗 PD-L1 抗体投与なし群と比較して、day14、day28 とともに有意に閉塞率が高値であった ($p=0.035$ 、 $p=0.025$) (図 3)。trichrome 染色では線維化が進んでいる所見を認めた (図 2)。拒絶反応への免疫チェックポイント分子の関与が示唆された。

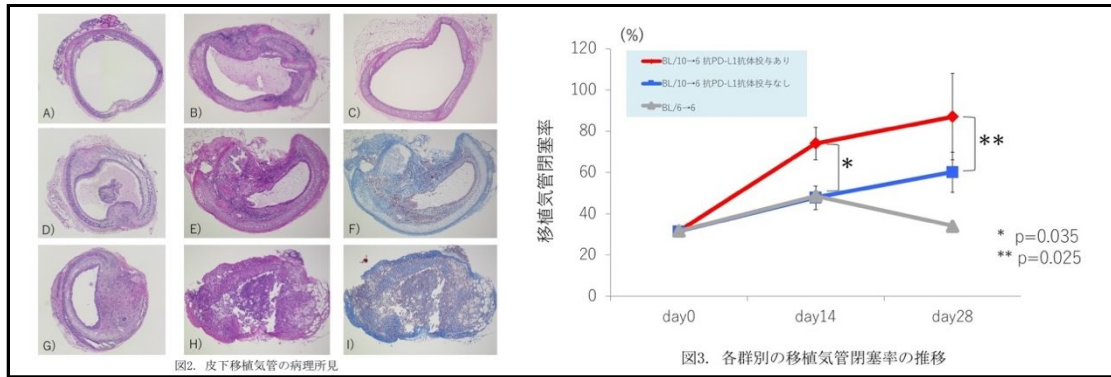


図 2. A) day0、B) コントロール群 day14、C) コントロール群 day28、D) ミスマッチ群/抗 PD-L1 抗体投与なし day14、E) F) ミスマッチ群/抗 PD-L1 抗体投与なし day28 [F) trichrome 染色]、G) ミスマッチ群/抗 PD-L1 抗体投与あり day14、H) I) ミスマッチ群/抗 PD-L1 抗体投与あり day28 [I) trichrome 染色]

マウス同所性肺移植モデルについては、慢性拒絶反応 (CLAD) モデルの作成はできているが、研究途中で C57BL/10 の入手が困難となったため、十分な解析ができなかった。モデル変更も視野に入れて、肺移植モデルでの研究を引き続き進めていく予定である。

(2) マウス胸腺のリンパ球に対して、実際に作製した PD-L1、PD-L2 遺伝子導入レトロウイルスベクターと何も遺伝子導入されていないレトロウイルスベクター (Mock) をそれぞれ感染させることにより、前者で PD-L1 がリンパ球で強発現していることを確認した (図 4)。同様に、レトロウイルスベクターを用いることにより、MHC class II および免疫チェックポイント分子を同時に強発現することは可能であった (図 5)。

現在、in vitro で OVA および OVA 特異的 T 細胞受容体を有する T 細胞の反応系を用いて、抗原抗体反応が起こると T 細胞が分裂することを利用して、CFSE (色素) で分裂回数を判定する実験系にて、抗原抗体反応への影響について検討中である。

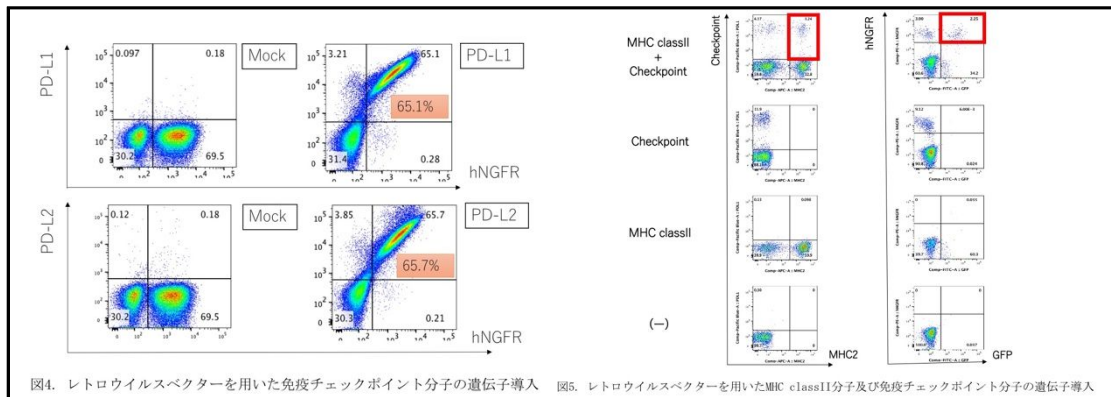


図 4. レトロウイルスベクターを用いた免疫チェックポイント分子の遺伝子導入 図 5. レトロウイルスベクターを用いた MHC class II 分子及び免疫チェックポイント分子の遺伝子導入

引用文献

Weber DJ, Wilkes DS. The role of autoimmunity in obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013

Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 1992 Nov;11(11):3887-95.

Sato M, Liu M, Anraku M, Ogura T, D'Cruz G, Alman BA, Waddell TK, Kim E, Zhang L, Keshavjee S. Allograft airway fibrosis in the pulmonary milieu: a disorder of tissue remodeling. *Am J Transplant*. 2008 Mar;8(3):517-28.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 海竇 大輔、鈴木 秀海、佐田 諭己、椎名 裕樹、田中 教久、山本 高義、坂入 祐一、和田 啓伸、中島 崇裕、木内 政宏、本橋 新一郎、中山 俊憲、吉野 一郎
2. 発表標題 肺移植の拒絶反応における免疫チェックポイント分子を用いた免疫寛容の誘導に向けての基礎研究
3. 学会等名 第55回日本移植学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----