

令和 4 年 11 月 25 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16935

研究課題名（和文）抗CD80/86抗体誘導制御性T細胞を用いた新規角膜移植免疫寛容療法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel corneal transplant immunotolerance therapy using anti-CD80/86 antibody-induced regulatory T cells

研究代表者

猪俣 武範（Inomata, Takenori）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10645667

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）：本研究では血管新生を誘導したマウスハイリスク角膜移植モデルを作製し、抗CD80/86抗体の角膜移植片に対する免疫抑制効果の機序を検証し、ヒト角膜移植における新規免疫寛容誘導療法開発に向けた基盤研究を実施した。本研究から、抗CD80/86抗体投与により、Th1優位の免疫抑制効果が明らかになった。さらに、MLRから炎症性サイトカインの減少効果を明らかにした。これらにより、抗CD80/86抗体を用いた新規免疫抑制療法が可能な可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

角膜移植後の急性拒絶反応に対して、ステロイドやタクロリムスなどの免疫抑制剤を中心とした治療が行われているが、感染症、自己免疫疾患の合併、再移植などで血管新生を生じたハイリスク症例では未だにその40-90%に高い拒絶反応を伴う。本邦においてはドナー角膜が充足しているとは言えず、移植臓器において長期的に免疫寛容（免疫抑制剤を中止しても移植臓器が十分に機能する状態）が成立することが臨床的に重要である。本研究から抗CD80/86抗体投与により、Th1優位の免疫抑制効果が明らかになった。これらの結果は抗CD80/86抗体を用いた新規免疫抑制療法開発の基盤となる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we used a mouse high-risk corneal transplant model that induced neovascularization, investigated the mechanism of immunosuppressive effect of anti-CD80/86 antibody on corneal grafts for developing a new immune tolerance induction therapy in corneal transplantation. The administration of anti-CD80/86 antibody revealed a Th1-dominant immunosuppressive effect. Furthermore, the effect of reducing inflammatory cytokines was clarified from MLR. These may enable novel immunosuppressive therapy with anti-CD80/86 antibody.

研究分野：角膜移植免疫

キーワード：角膜移植免疫 免疫寛容 抗CD80/86抗体 拒絶反応 制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

ステロイドやシクロスポリン、タクロリムスなどの免疫抑制剤の登場により、角膜移植後の急性拒絶反応は減少し、その治療成績は向上したが、未だに感染症、自己免疫疾患の合併や再移植などで血管新生が生じた角膜ではその 40-90%に拒絶反応を伴う。免疫抑制剤はその副作用(感染症、薬剤毒性、白内障、緑内障)や慢性拒絶反応には無効であるなど未だ問題が多い。また、本邦においてはドナー角膜が充足しているとは言えず、移植臓器において長期的に免疫寛容(免疫抑制剤を中止しても移植臓器が十分に機能する状態)が成立することが臨床的に重要である。

角膜移植における拒絶反応は、角膜移植によって新生した血管由来のレシピエント免疫系細胞が移植した異物であるドナー角膜を異物と認識し、頸部リンパ節で抗原提示を行いナイーブ T 細胞はエフェクター T 細胞(Teff)へと細胞分化し、標的細胞を破壊する。制御性 T 細胞(Treg)は 1995 年に同定された比較的新規の T 細胞サブセットで、抗原特異的に免疫応答に抑制的に働く。この Treg を人為的に生体外で増幅し、抗原特異的にドナー角膜に誘導させることができれば、副作用なく角膜移植片に免疫寛容を成立させることができると期待されている。

申請者らはこれまでに、血管新生を誘導したハイリスクレシピエント角膜に対する角膜移植(ハイリスク角膜移植)において、角膜移植片における Treg の減少と、Treg の分化・維持に必須の遺伝子である Foxp3 の発現の低下が拒絶反応の主座を担う Teff の抑制能の低下を引き起こしていることを明らかにした(Inomata T, et al, Sci Rep. 2016)。また、同研究から、抑制性サイトカイン(IL-10 や TGF- β)の減少や免疫抑制性分子である CTLA-4 の発現の低下が、炎症性サイトカイン(IFN- γ)を増加し、拒絶反応を誘導していることが明らかになった。

さらに、最近の研究結果から Treg の分化状態はこれまで考えられてきたほど安定ではなく、炎症などの環境の変動に対し、Foxp3 の発現および免疫抑制機能を失うことが明らかになってきた(Zhou X, et al, Nature Immunol, 2009)。また、ヒト生体内での Treg の増幅は難しく、Treg を用いた新規免疫抑制療法の臨床応用には、Treg の有効な体外増幅方法の開発や Treg を安定的に誘導する免疫抑制経路を解明し、移植臓器に効率的に誘導することが重要である。

これまでに本学では、ヒトにおける肝・腎移植において、抗 CD80/86 抗体で誘導・培養した Treg を用いた臨床実験を開始し、良好な成績を示している(Todo S, et al, Hepatology. 2016)。しかし、血管新生を誘導したハイリスク角膜移植という局所炎症環境下において、抗 CD80/86 抗体を用いた免疫抑制効果は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、無血管組織である角膜に手術的侵襲によって新生血管を誘導したハイリスク角膜移植モデルをマウスで作製し、抗 CD80/86 抗体の角膜移植片での免疫抑制効果を検証し、ヒト角膜移植における新規免疫寛容誘導療法開発に向けた研究を行う。

3. 研究の方法

本研究では研究期間内に以下の研究を実施した。

(1) マウスハイリスク角膜移植モデルの作成

角膜実質に 14 日間ナイロン糸を留置し、新生血管を誘導したハイリスクレシピエント角膜を作成する。ドナー(C57BL/6)からレシピエント(BALB/c)に同種異系角膜移植を行う。コントロールとして同種同型角膜移植あるいは血管新生誘導のみのマウスをおく。

(2) 抗 CD80/86 抗体の T 細胞増殖抑制能の評価

頸部リンパ節から単離した BALBc 由来のエフェクター T 細胞と放射線照射(20Gy)した C57BL6 マウス(♀)の脾細胞を用いた混合リンパ球反応(MLR)による細胞増殖と、BrdU 染色でその免疫抑制能を評価する。また、炎症性サイトカインの発現を ELISA 法、real-time PCR(RT-PCR)法により評価する。

(3) 抗 CD80/86 抗体の腹腔内投与によるハイリスク角膜移植モデルマウスにおける血管/リンパ管新生と角膜の形態学的比較解析

抗 CD80/86 抗体の腹腔内投与によるハイリスク角膜移植片の混濁スコア、血管新生スコアを 8 週に渡り細隙灯顕微鏡観察する。

(4) 抗 CD80/86 抗体の腹腔内投与によるハイリスク角膜移植片における免疫細胞ならびに免疫抑制性分子の発現の解析

抗 CD80/86 抗体の腹腔内投与後、マウスハイリスク角膜移植モデルから角膜移植片を採取し、そこに浸潤した炎症細胞ならびにサイトカインの発現をフローサイトメトリーならびに real-time PCR 法にて評価する。

(5) 角膜移植片における発現変動遺伝子の同定

ハイリスク角膜移植後 14 日後の角膜移植片を採取し、RNA を抽出した。NEBNext Poly (A) mRNA Magnetic Isolation Module (NEB, Ipswich, MA, USA)ならびに NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB)を用いて RNAseq ライブラリを作成した(7)。RNAseq ライブラリに対してシーケンシングを行い、ハイリスク角膜移植における角膜移植片の発現

変動遺伝子発現を解析する。

4. 研究成果

(1) 抗 CD80/86 抗体の T 細胞増殖抑制能の評価

混合リンパ球反応により、抗 CD80/86 抗体の CD4 陽性 CFSE^{low}T 細胞の増殖能の抑制(図 1a, b)と CD4 陽性 IFN- γ 陽性 T 細胞(図 2c, d)の抑制を明らかにした。

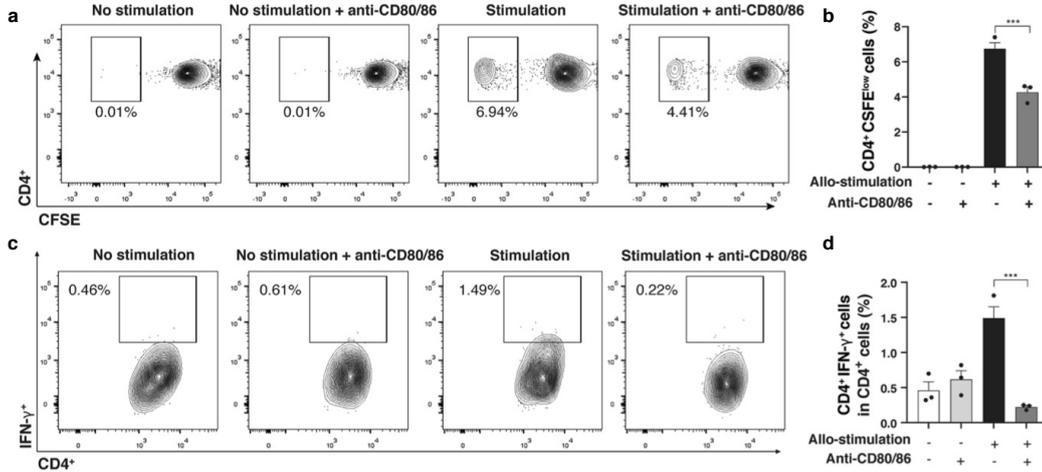


図 1. 混合リンパ球反応による抗 CD80/86 抗体の T 細胞増殖抑制能の評価

(2) 抗 CD80/86 抗体による炎症性サイトカインの抑制

混合リンパ球反応により、抗 CD80/86 抗体の IFN- γ (図 2a)、IL-1 β (図 2b)、IL-2 (図 2c)、IL-10 (図 2d)、TNF- α (図 2e)、IL-12 (図 2f)などの炎症性サイトカインの産生の有意な減少が明らかになった (ELISA 法)。

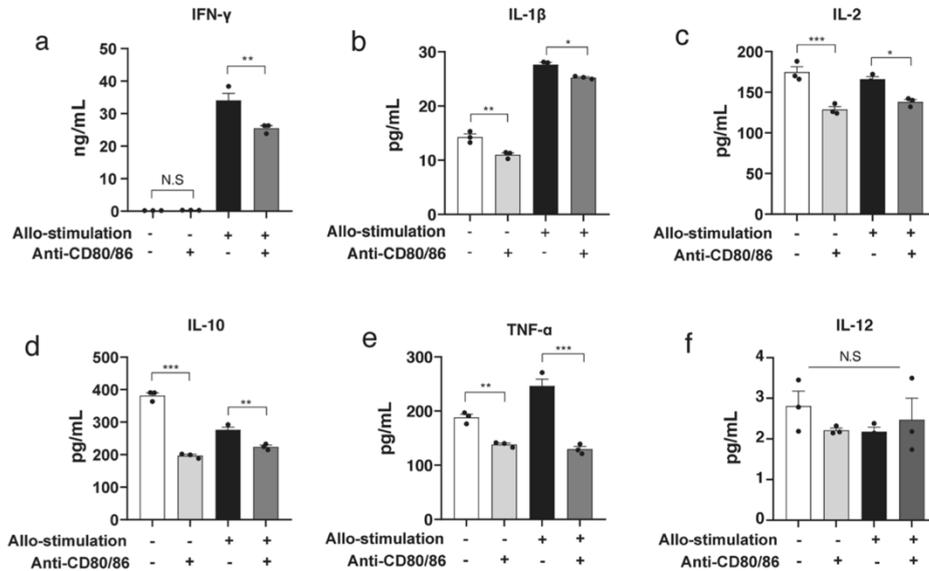


図 2. 混合リンパ球反応による抗 CD80/86 抗体のサイトカイン産生能の評価

(3) 抗 CD80/86 抗体腹腔内投与による角膜移植片の混濁と血管新生の抑制と生着率の向上

マウスハイリスク角膜移植モデルに対し、抗 CD80/86 抗体の腹腔内投与により、角膜移植片の混濁(図 3a)と血管新生(図 3b)の有意な抑制を認めた。また、抗 CD80/86 抗体の腹腔内投与により角膜移植片の生存率の延長(図 3c)ならびに生存期間の中央値の延長(図 3d)を認めた。

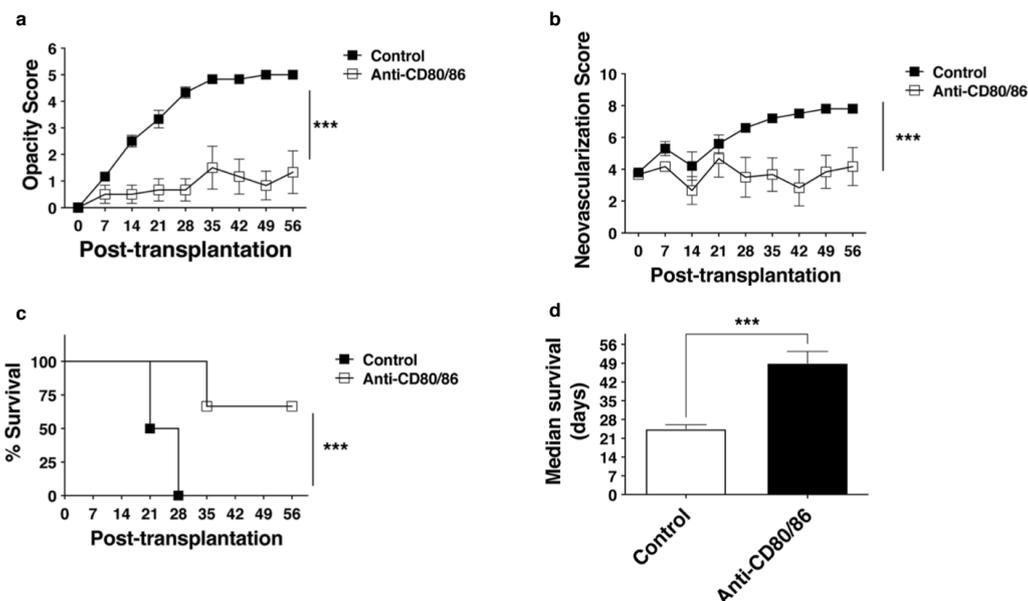


図 3. 抗 CD80/86 抗体の腹腔内投与による角膜移植片の混濁と血管新生の抑制と生着率の向上

(4) 抗 CD80/86 抗体の腹腔内投与による角膜移植片の CD4 陽性 IFN- γ 陽性 T 細胞の減少

マウスハイリスク角膜移植モデルに対し、抗 CD80/86 抗体の腹腔内投与により、角膜移植片の CD4 陽性 IFN- γ 陽性 T 細胞(図 4a)の有意な減少(図 4b)を認めた。

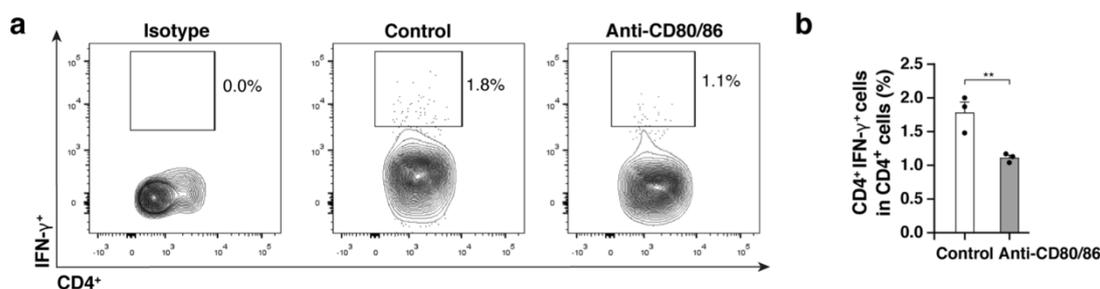


図 4. 抗 CD80/86 抗体の腹腔内投与による角膜移植片の CD4 陽性 IFN- γ 陽性 T 細胞の発現

(5) 抗 CD80/86 抗体の腹腔内投与による角膜移植片における発現遺伝子の変化

マウスハイリスク角膜移植モデルに対し、抗 CD80/86 抗体の腹腔内投与により、角膜移植片の IFN- γ 、IL-1 β 、IL-2、TNF- α 、IL-10 の発現の減少ならびに TGF- β 1 の発現の増加が明らかになった。

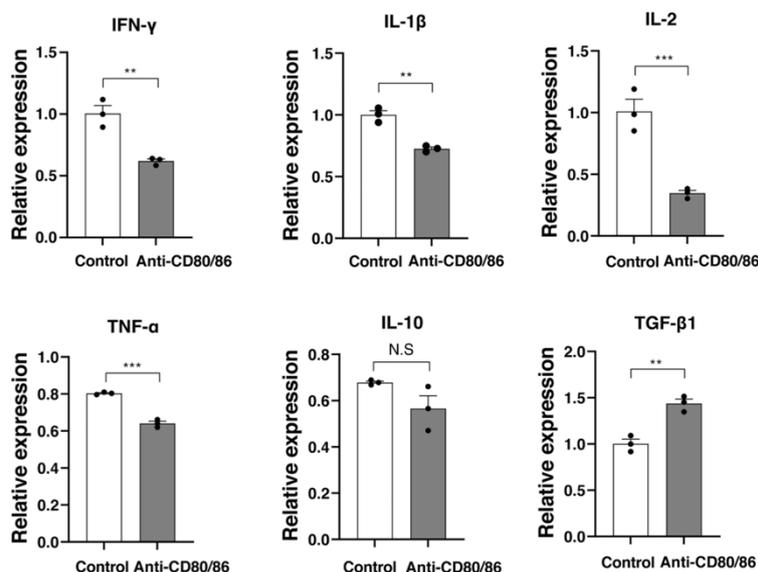


図 5. 抗 CD80/86 抗体の腹腔内投与による角膜移植片における発現遺伝子

(6) 抗 CD80/86 抗体 の腹腔内投与による角膜移植片における発現変動遺伝子の変化
 マウスハイリスク角膜移植モデルに対し、抗 CD80/86 抗体の腹腔内投与により、角膜移植片における発現変動遺伝子が明らかになった(図 6a)。Gene Ontology 解析から炎症応答、サイトカインを介したシグナル伝達経路、T 細胞の活性化、IFN- γ 産生などのシグナリング経路に発現変動遺伝子の濃縮を認めた(図 6b)。

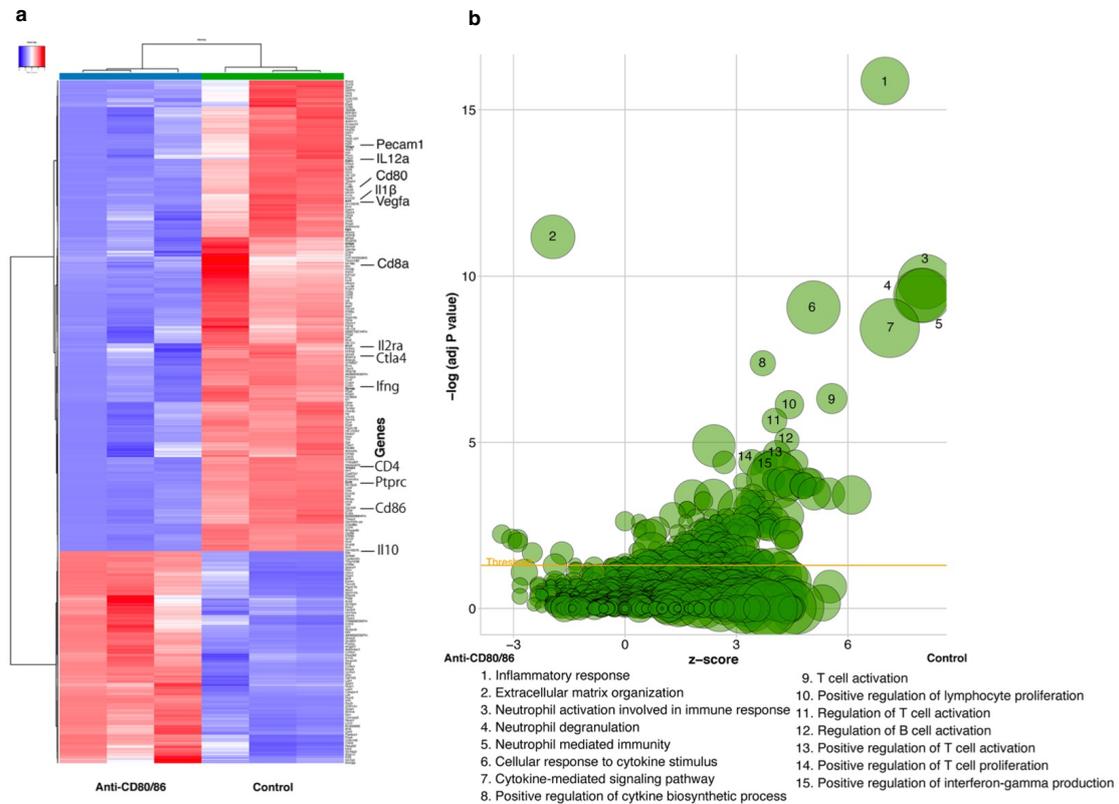


図 6. 抗 CD80/86 抗体 の腹腔内投与による角膜移植片における発現変動遺伝子

<引用文献>

① Zhu J, Inomata T, Nakamura M, Fujimoto K, Akasaki Y, Fujio K, Yanagawa A, Uchida K, Sung J, Negishi N, Nagino K, Okumura Y, Miura M, Shokirova H, Kuwahara M, Hirosawa K, Midorikawa-Inomata A, Eguchi A, Huang T, Yagita H, Habu S, Okumura K, Murakami A. Anti-CD80/86 antibodies inhibit inflammatory reaction and improve graft survival in a high-risk murine corneal transplantation rejection model. *Sci Rep.* 2022;12(1):4853. doi:10.1038/s41598-022-08949-9.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 8件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Tahvildari Maryam、Inomata Takenori、Amouzegar Afsaneh、Dana Reza	4. 巻 6
2. 論文標題 Regulatory T Cell Modulation of Cytokine and Cellular Networks in Corneal Graft Rejection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current Ophthalmology Reports	6. 最初と最後の頁 266～274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s40135-018-0191-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ogawa Mamoru、Inomata Takenori、Shiang Tina、Tsubota Kazuo、Murakami Akira	4. 巻 5
2. 論文標題 Method for selective quantification of immune and inflammatory cells in the cornea using flow cytometry	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Methods	6. 最初と最後の頁 e102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14440/jbm.2018.237	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Hua Jing、Inomata Takenori、Chen Yihe、Foulsham William、Stevenson William、Shiang Tina、Bluestone Jeffrey A.、Dana Reza	4. 巻 8
2. 論文標題 Pathological conversion of regulatory T cells is associated with loss of allotolerance	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7059
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-25384-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Tan Xuhua、Chen Yihe、Foulsham William、Amouzegar Afsaneh、Inomata Takenori、Liu Yizhi、Chauhan Sunil K.、Dana Reza	4. 巻 16
2. 論文標題 The immunoregulatory role of corneal epithelium-derived thombospondin-1 in dry eye disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Ocular Surface	6. 最初と最後の頁 470～477
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jtos.2018.07.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Inomata Takenori, Fujimoto Keiichi, Okumura Yuichi, Zhu Jun, Fujio Kenta, Shokirova Hurrarmon, Miura Maria, Okano Mikiko, Funaki Toshinari, Sung Jaemyoung, Negishi Naoko, Murakami Akira	4. 巻 10
2. 論文標題 Novel immunotherapeutic effects of topically administered ripasudil (K-115) on corneal allograft survival	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-76882-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shokirova Hurrarmon, Inomata Takenori, Saitoh Tsuyoshi, Zhu Jun, Fujio Kenta, Okumura Yuichi, Yanagawa Ai, Fujimoto Keiichi, Sung Jaemyoung, Eguchi Atsuko, Miura Maria, Nagino Ken, Hirosawa Kunihiko, Kuwahara Mizu, Akasaki Yasutsugu, Nagase Hiroshi, Murakami Akira	4. 巻 11
2. 論文標題 Topical administration of the kappa opioid receptor agonist nalfurafine suppresses corneal neovascularization and inflammation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-88118-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Zhu Jun, Inomata Takenori, Fujimoto Keiichi, Uchida Koichiro, Fujio Kenta, Nagino Ken, Miura Maria, Negishi Naoko, Okumura Yuichi, Akasaki Yasutsugu, Hirosawa Kunihiko, Kuwahara Mizu, Eguchi Atsuko, Shokirova Hurrarmon, Yanagawa Ai, Midorikawa-Inomata Akie, Murakami Akira	4. 巻 62
2. 論文標題 Ex Vivo-Induced Bone Marrow-Derived Myeloid Suppressor Cells Prevent Corneal Allograft Rejection in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 3~3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.62.7.3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Zhu Jun, Inomata Takenori, Nakamura Masahiro, Fujimoto Keiichi, Akasaki Yasutsugu, Fujio Kenta, Yanagawa Ai, Uchida Koichiro, Sung Jaemyoung, Negishi Naoko, Nagino Ken, Okumura Yuichi, Miura Maria, Shokirova Hurrarmon, Kuwahara Mizu, Hirosawa Kunihiko, Midorikawa-Inomata Akie, Eguchi Atsuko, Huang Tianxiang, et al	4. 巻 12
2. 論文標題 Anti-CD80/86 antibodies inhibit inflammatory reaction and improve graft survival in a high-risk murine corneal transplantation rejection model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-08949-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Okumura Y, Inomata T, Fujimoto K, Uchida K, Shiang T, Murakami A
2. 発表標題 Blockade of CD80/86 prolongs corneal allograft survival
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Cornea and Ocular Surface Biology and Pathology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤本啓一, 猪俣武範, 内田浩一郎, Tina Shiang, 村上晶
2. 発表標題 抗CD80/86抗体の角膜移植における免疫学的効果の検討
3. 学会等名 角膜カンファランス2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 猪俣 武範
2. 発表標題 制御性T細胞を用いた角膜移植における新規免疫抑制療法開発のための研究
3. 学会等名 角膜カンファランス2018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤本啓一、猪俣武範、内田浩一郎、奥村雄一、村上晶
2. 発表標題 抗CD80/86抗体のマウス角膜移植における制御性T細胞への影響の検討
3. 学会等名 第122回日本眼科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiichi Fujimoto, Takenori Inomata, Koichiro Uchida, Tina Shiang, Yuichi Okumura, Akira Murakami
2. 発表標題 The effect of Anti-CD80/86 antibody on regulatory T cells in murine corneal transplantation
3. 学会等名 ARVO 2018 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------