

平成 22 年 4 月 28 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007 ～ 2009
 課題番号：19390414
 研究課題名 (和文) ドナー抗原特異的制御性 T 細胞を用いた移植腎免疫寛容の試み
 研究課題名 (英文) Induction of kidney graft tolerance using donor-specific regulatory T cells
 研究代表者 高原 史郎 (TAKAHARA SHIRO)
 大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授
 研究者番号：70179547

研究成果の概要 (和文)：

制御性 T 細胞(regT)は、移植臓器の拒絶反応抑制効果を有する。移植腎急性拒絶反応モデルに CD28 スーパーアゴニスト抗体を投与すると、regT を増殖させることを介して、移植腎の拒絶反応を抑制し、生着延長効果を示した。また、この免疫誘導は、抗原特異的な免疫寛容を誘導することが明らかとなり、スーパーアゴニスト抗体投与による生体内 regT の増殖と移植免疫寛容誘導効果は、今後の臓器移植において有用な戦略となりうると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

Regulatory T (Treg) cells play an important role in graft tolerance. We examined whether a superagonistic monoclonal antibody specific for CD28 (CD28SA), using rat acute renal allograft model (Wistar to Lewis). CD28SA induced marked infiltration of Treg cells into the allografts. 90% of recipients treated with CD28SA survived over 100 days, and 70% survived with well-preserved graft function until graft harvest at 180 days. Furthermore, these long-surviving recipients showed donor-specific tolerance. In conclusion, CD28SA treatment successfully induces donor-specific tolerance with the involvement of Treg cells, and thus the therapeutic value of this approach warrants further investigation and preclinical studies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2008 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2009 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：腎移植、免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

免疫抑制剤の進歩により急性拒絶が抑制され、腎移植の成績は急速に向上したが、慢性

移植腎症による移植腎の喪失、免疫抑制の結果に起きる感染症及び免疫抑制剤の副作用は残された大きな課題である。従って、免疫抑

制剤の使用なしに移植腎が十分に機能している状態、すなわち免疫寛容が誘導されることは、患者にとって大変望ましいことである。これらのヒトにおける免疫寛容のメカニズムは明らかではないが、制御性 T 細胞が、免疫反応を抑制的に調節し、移植腎における免疫寛容を誘導する可能性が示唆されている。

樹状細胞は、ナイーブ T 細胞を活性化し、免疫応答における Th1/Th2 タイプの応答など質的偏向を誘導するとともに、制御性 T 細胞などを介して免疫応答の調節を行うことが知られている。CD28 は代表的な costimulatory 分子の一つであり、T 細胞レセプター (TCR) を介した一次刺激と協調して T 細胞に働きかけ、増殖因子であるインターロイキン 2 (IL-2) 産生と引き続く細胞増殖を誘導する。樹状細胞の CD80/86 分子は、CD28 を介して、ポジティブな”co-stimulatory”シグナルを伝達することが知られており、抗 CD28 抗体を用いた CD28 経路遮断が、移植における拒絶反応を抑制することが報告されている。近年の研究により、末梢における免疫寛容の維持に、CD4⁺T 細胞のうち CD25⁺CD4⁺Treg (regulatory T cell) が重要な役割を果たしていることが報告されている。また、成熟した樹状細胞を抗原提示細胞とすることで、抗原特異的な CD25⁺CD4⁺Treg の増殖が誘導されることも報告されている。

2. 研究の目的

最近、Superagonist CD28 抗体が CD25⁺CD4⁺Treg の増殖を促進することが報告された。この Superagonist CD28 抗体は、従来報告されていた抗 CD28 抗体と異なり、TCR を介したシグナル伝達を遮断するのではなく、TCR を介して CD25⁺CD4⁺Treg を誘導すると報告されている。そこで、Superagonist CD28 抗体を用いることにより、移植腎の免疫寛容を誘導する治療法の臨床応用を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

従来の抗 CD28 抗体は、B7 結合領域のそばに結合するとされるが、Hünig らが報告した CD28 スーパーアゴニスト抗体は、C'D loop 領域に結合し、first signal を介した抗原刺激がないにも関わらず、細胞増殖が起こると報告された。そこで、まず、正常ラットに CD28 スーパーアゴニスト抗体を投与し、その効果を検討した。

制御性 T 細胞は、移植臓器の拒絶反応抑制効

果を有すると考えられるが、生体内に存在するのはごく僅かであり拒絶反応を抑制するには至らない。そこで、移植腎急性拒絶反応モデルを作製し、腎臓移植の3日前、当日および3日後に CD28 スーパーアゴニスト抗体を投与し、移植腎に与える影響を検討した。

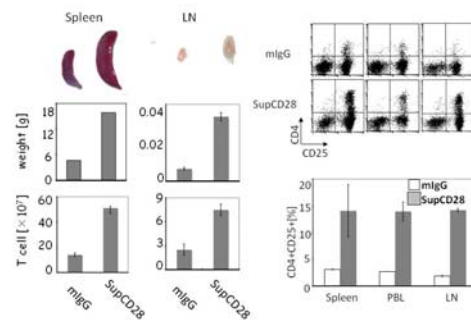
さらに移植腎の生着の延長効果が、スーパーアゴニスト抗体による直接作用なのか、あるいは CD28 スーパーアゴニスト抗体による制御性 T 細胞の増加を介した間接作用によるものかを検討するために、制御性 T 細胞の移植実験を行った。CD28Lewis ラットに CD28 スーパーアゴニスト抗体を投与し、3 日後 CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞と CD4⁺CD25⁻細胞を分離した。CD4⁺CD25⁺細胞もしくは CD4⁺CD25⁻細胞を投与した Lewis ラットに、Wistar ラットから腎臓移植を行い、移植腎生着期間への効果を検討した。

一般的に活性化した CD4⁺CD25⁺ T 細胞による増殖抑制効果は抗原非特異的であるとされているが、移植腎に対するドナー抗原特異的な免疫寛容が誘導されるのかどうかは、いまだ不明である。そこで、CD28 スーパーアゴニスト抗体を投与により移植腎が生着し免疫寛容が成立したと考えられる、腎臓移植後 120 日目のレシピエントに、移植腎と同じ Wistar および third party である BN ラットをドナーとした2つの心臓移植を施行し、免疫寛容が起こるかどうかを検討した。

4. 研究の成果

我々の検討によると、興味深いことに、CD28 スーパーアゴニスト抗体をラットに投与すると、脾臓やリンパ節の腫大が起こり、T 細胞が増加するが、なかでも CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞が増殖する (図 1)。

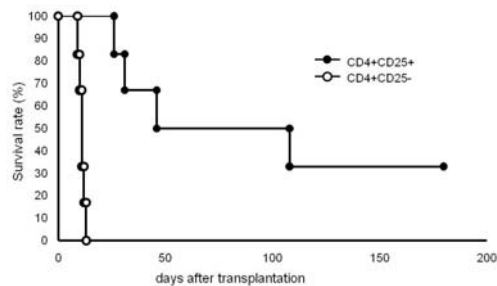
図 1 CD28 スーパーアゴニスト抗体による制御性 T 細胞増殖効果



上述したように、CD28 スーパーアゴニスト抗体を投与することにより、劇的に制御性 T 細胞が増加することが確かめられたことから、

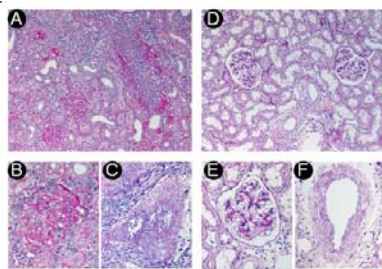
移植腎に対する CD28 スーパーアゴニスト抗体の効果を検討した。Wistar をドナー、Lewis をレシピエントとした移植腎急性拒絶反応モデルを作製し、腎臓移植の 3 日前、当日および 3 日後に CD28 スーパーアゴニスト抗体を投与した。mouse IgG (mIgG) 投与群および無治療群では 10 日前後で急性拒絶反応により全例死亡したが、CD28 スーパーアゴニスト抗体投与群では、10 例中 1 例が術後 30 日で死亡したが、残りは 100 日以上生存した(図 2)。

図 2 CD28 スーパーアゴニスト抗体による急性移植腎拒絶反応への効果(生存曲線)



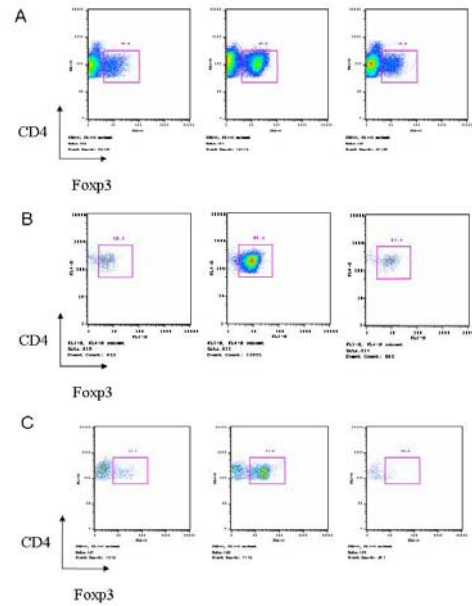
移植後 6 日目の mIgG 群の腎臓の組織所見では、細胞浸潤を伴う尿細管細胞の壊死、間質障害など典型的な急性拒絶反応所見を呈していたのに対し、CD28 スーパーアゴニスト抗体投与群では、尿細管間質障害は極めて軽度であった(図 3)。

図 3 移植腎に対する CD28 スーパーアゴニスト抗体の効果 (移植後 6 日目、A-C; コントロール、D-F; D28 スーパーアゴニスト抗体)



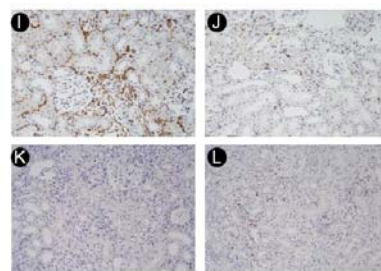
腎移植後 6 日目に、フローサイトメトリーにて、末梢血・脾臓・腎臓における CD4+Foxp3+ 制御性 T 細胞の割合を検討したところ、CD28 スーパーアゴニスト抗体投与群では、mIgG 投与群や腎臓移植を受けていない Lewis ラットと比べて CD4+Foxp3+ 制御性 T 細胞が著増していることが確認できた(図 4)。

図 4 CD28 スーパーアゴニスト抗体による CD4Foxp3 陽性細胞への影響(左移植腎 mIgG 治療群、中移植腎スーパーアゴニスト抗体治療群、右 正常コントロール)



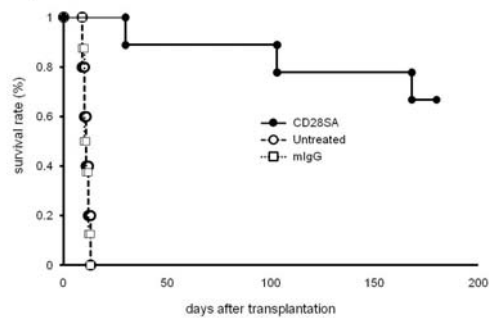
移植腎に浸潤した細胞を免疫染色にて検討すると、mIgG 投与群では、マクロファージのマーカーである ED1 陽性細胞が著明に移植腎に浸潤していたが、Foxp3 陽性の制御性 T 細胞の浸潤はほとんど認めなかった。一方、CD28 スーパーアゴニスト抗体投与群では、間質内に多くの Foxp3 陽性の制御性 T 細胞の浸潤が認められたのに対し、ED1 陽性のマクロファージ浸潤が抑制されていた(図 5)。

図 5 CD28 スーパーアゴニスト抗体による移植腎への ED1 陽性細胞、Foxp3 陽性の制御性 T 細胞の浸潤(移植後 6 日目、I,K; コントロール、J,L; D28 スーパーアゴニスト抗体、I,J; ED1 染色、K,L; Foxp3 染色)



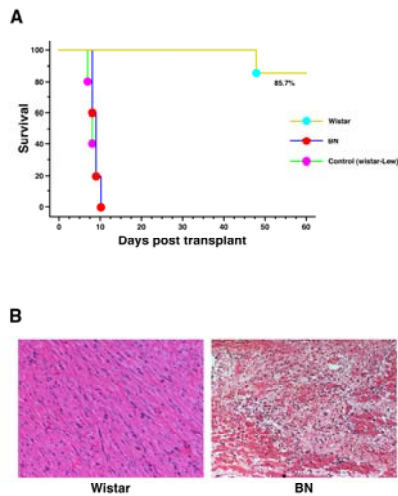
CD4+CD25-細胞を投与したラットでは、移植腎はほぼ移植後 10 日目に廃絶したが、CD4+CD25+細胞の投与を受けたラットでは、移植腎の生着期間が延長したことから、移植腎の生着期間の延長は CD28 スーパーアゴニスト抗体による制御性 T 細胞の増加を介したものであることが確認された(図 6)。

図 6 急性拒絶腎移植モデルラットへの制御性 T 細胞の adoptive transfer の効果



Wistar をドナーとした移植心は、ナイーブの Lewis ラットに移植した場合はすぐに拒絶されてしまうが、CD28 スーパーアゴニスト抗体投与により移植腎が生着した Lewis ラットは拒絶反応を起こさず、移植した心臓は生着する。しかしながら、third party である BN ラットから移植した心臓は、移植後速やかに拒絶されることが確認された(図 7)。

図 7 CD28 スーパーアゴニスト抗体投与後、長期生存ラットへの心臓移植の効果



このことは、少なくとも腎移植後 120 日目の免疫寛容が成立したと考えられる時期では、非特異的な免疫寛容ではなく、ドナー特異的な免疫寛容が成立していると考えられる。当然のことながら、CD28 スーパーアゴニスト抗体を投与し、腎臓移植を行った際の拒絶反応の抑制は、Foxp3+制御性 T 細胞の増殖による抗原非特異的な免疫抑制であったと考えられる。なぜ、腎臓移植 120 日後に心臓移植を行った際には、抗原特異的な免疫寛容を獲得していたのか、そのメカニズムは不明であるが、移植した臓器に常に暴露しているために、抗

原特異的な制御性 T 細胞は常に刺激を受けた状態で常に活性化されているが、それ以外の非特異的な制御性 T 細胞は、抗原に暴露していないために、アポトーシスに陥るなどして減少してしまうからではないかと、我々は推察している。

最近、ヒト型スーパーアゴニスト CD28 抗体である GN1412 の初回臨床試験は 0.1 mg/kg の静脈投与で実施されたが、被験者 6 名全員に重度のサイトカイン放出症候群が生じ、多臓器不全に陥った。症状は極めて重篤であったものの救命処置により幸い死亡には至らなかった。事故の原因分析は、英国および欧州規制当局によって詳細に実施されている。

TGN1412 の作用の in vitro 検出系を用いた解析結果によると、カニクイザルのリンパ球に比べて、ヒトリンパ球では、低濃度でアゴニスト作用が起こることが報告された。このように、アゴニスト抗体は天然の生理活性物質では予測困難な薬理作用を示すことがあり、作用機構の解析、濃度作用相関あるいは用量作用相関の解析を行うために、適切な in vitro 系、適切な種の動物を用いた in vivo 解析系の構築が必要である。

アゴニスト抗体を直接投与しない方法として、レシピエントから制御性 T 細胞を分離し、in vitro で CD28 スーパーアゴニスト抗体を添加して培養した後、レシピエントに移植する方法も考えられる。制御性 T 細胞が、抗原特異的な免疫寛容を獲得する可能性を考慮すると、培養時にドナー細胞と共培養すれば、ドナー抗原特異的な制御性 T 細胞を得ることができる可能性があり、日和見感染症などの副作用のない強力な免疫抑制療法となる可能性があると考えられる。

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)

[雑誌論文] (計 5 件)

① Kitazawa, Y.; Fujino, M.; Li, X. K.; Xie, L.; Ichimaru, N.; Okumi, M.; Nonomura, N.; Tsujimura, A.; Isaka, Y.; Kimura, H.; Hunig, T.; Takahara, S. Superagonist CD28 antibody preferentially expanded Foxp3-expressing nTreg cells and prevented graft-versus-host diseases. Cell transplantation 18(5):627-637; 2009

② Xie, L.; Li, X. K.; Funeshima-Fuji, N.; Kimura, H.; Matsumoto, Y.; Isaka, Y.; Takahara, S. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis by curcumin treatment through inhibition of IL-17 production. Int

Immunopharmacol 9(5):575-581; 2009.

③ Azuma, H.; Isaka, Y. Li, X.; Hunig, T.; Sakamoto, T.; Nohmi, H.; Takabatake, Y.; Mizui, M.; Kitazawa, Y.; Ichimaru, N.; Ibuki, N.; Ubai, T.; Inamoto, T.; Katsuoka, Y.; Takahara, S. Superagonistic CD28 antibody induces donor-specific tolerance in rat renal allografts. Am J Transplant 8(10):2004-2014; 2008.

④ Kitazawa, Y.; Fujino, M.; Sakai, T.; Azuma, H.; Kimura, H.; Isaka, Y.; Takahara, S.; Hunig, T.; Abe, R.; Li, X. K. Foxp3-expressing regulatory T cells expanded with CD28 superagonist antibody can prevent rat cardiac allograft rejection. J Heart Lung Transplant 27(4):362-371; 2008.

⑤ 猪阪善隆「CD28 スーパーアゴニスト抗体による制御性 T 細胞の誘導」臨床免疫・アレルギー科 2008; 50(4 号): 451-457

[学会発表] (計 1 件)

① A superagonistic monoclonal antibody for CD28 induced donor-specific tolerance Y Isaka, Y Takabatake, M Mizui, H Tanaka, X Li, H Azuma, T Hünig, R Imamura, N Ichimaru, E Imai, S Takahara, American Society of Nephrology, 2007.11.3 , San Francisco USA

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/jp/kastudo/kifu.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高原 史郎 (TAKAHARA SHIRO)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号 : 70179547

(2) 研究分担者

猪阪 善隆 (ISAKA YOSHITAKA)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号 : 00379166

梨井 康 (NASHII KO)

国立成育医療センター・医科学研究所・室長

研究者番号 : 60321890

(H19→H20 : 連携研究者)

東 治人 (AZUMA HARUHITO)

大阪医科大学・医学系研究科・准教授

研究者番号 : 40321914

(H19→H20 : 連携研究者)

(3) 連携研究者
()

研究者番号 :