

令和 4 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09092

研究課題名(和文) ヒトTIGITおよびPQA-18誘導MDSCによる異種移植拒絶反応抑制効果の検討

研究課題名(英文) The suppression of macrophage-mediated xenogeneic rejection by human TIGIT and PQA-18

研究代表者

前田 晃 (Maeda, Akira)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：00319708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究では新規免疫抑制剤であるPQA-18およびブタ細胞上に強制発現させたヒトTIGIT分子のマクロファージ誘導拒絶反応に対する抑制効果をin vitroの系を用いて検討した。PQA-18およびTIGITはマクロファージによる細胞傷害活性を著明に抑制した。また抑制メカニズムを検討する目的で抑制性シグナルであるSHP-1のリン酸化をウェスタンブロット法により検討したところヒトTIGITがマクロファージにおけるSHP-1のリン酸化を誘導することが明らかとなった。これらの結果はPQA-18およびhuman TIGITが異種移植において有用であることを示すものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ブタの臓器や細胞を用いた異種移植は今後移植におけるドナー不足を解決するために非常に重要な課題である。今回の研究でPQA-18という新たな免疫抑制剤とヒトTIGITの遺伝子導入が異種移植拒絶反応の抑制に有効であることが分かった。つまりヒトTIGIT分子を発現するブタを作り出すことが異種臓器・細胞の生着率の改善につながることを意味している。また従来の免疫抑制剤に加えてPQA-18を使用することによってブタ細胞および臓器の生着のさらなる改善が見込める。

研究成果の概要(英文)：In this study, the suppressive effect of a novel immunosuppression, PQA-18, and human TIGIT on porcine cells was investigated. Both PQA-18 and human TIGIT on porcine cells significantly suppressed macrophage-mediated cytotoxicity. Furthermore, to study the mechanism of the suppression by TIGIT, the phosphorylation of SHP-1 was assessed using a western blotting analysis. Our study revealed that human TIGIT induced a significant phosphorylation of SHP-1 in macrophages. These findings indicate that PQA-18 and human TIGIT are effective measures against xenogeneic rejection.

研究分野：異種移植

キーワード：異種移植 マクロファージ PQA-18 TIGIT 自然免疫 MDSC

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

国内外の臓器移植においては深刻なドナー不足に悩まされており、現在まで異種移植の臨床応用に向け精力的に研究されてきた。α-Gal エピトープをロックアウトしたブタや補体制御因子トランスジェニックブタなど遺伝子改変ブタの開発等により、ブタ臓器を用いた異種移植の臨床での実用化が現実味を帯びてきた。また NK 細胞に対しても HLA class Ib 分子発現ブタが作出されるなど NK 細胞による拒絶も抑えることが可能になってきた。

一方でマクロファージに関してはヒト CD47 を発現させることにより拒絶を抑制できると考えられてきたが、CD47 は近年の *in vivo* の系を用いた検討でむしろ移植片の生着期間を短縮することが明らかとなりつつあり、マクロファージに関してはヒト CD47 以外の抑制方法の検討が必要となってきた。

## 2. 研究の目的

マクロファージ誘導拒絶反応に対し新たな制御法を見出すべく、TIGIT 発現ブタ細胞と PQA-18 の炎症性マクロファージに対する効果を検討する。

## 3. 研究の方法

### ヒト TIGIT 発現ブタ血管内皮細胞の作成

ブタ血管内皮細胞にヒト TIGIT 発現ベクターをリポフェクションやエレクトロポレーション法により導入し、TIGIT 発現細胞をクローニングする。

### ヒト TIGIT によるマクロファージ抑制効果の検討

マクロファージのブタ血管内皮細胞に対する細胞傷害活性を で作成したトランスジェニックブタ血管内皮細胞を用いて行う。WST-8 assay や CFSE assay にて細胞傷害活性の抑制効果を検討する。コントロールに CD47 及び HLA-E 発現ブタ血管内皮細胞を用いる。

### PQA-18 による *in vitro* における抑制効果の検討

細胞傷害型 T 細胞(CTL)や NK 細胞、マクロファージによるブタ血管内皮細胞に対

する細胞傷害を PQA-18 誘導の存在下および非存在下で検討する。アッセイは WST-8 assay や CFSE を用いた mixed lymphocyte reaction (MLR) により行う。

#### 4 . 研究成果

今回の研究では新規免疫抑制剤である PQA-18 およびブタ細胞上に強制発現させたヒト TIGIT 分子のマクロファージ誘導拒絶反応に対する抑制効果を *in vitro* の系を用いて検討した。PQA-18 および TIGIT はマクロファージによる細胞傷害活性を著明に抑制した。また抑制メカニズムを検討する目的で抑制性シグナルである SHP-1 のリン酸化をウェスタンブロット法により検討したところヒト TIGIT がマクロファージにおける SHP-1 のリン酸化を誘導することが明らかとなった。これらの結果は PQA-18 および human TIGIT が異種移植において有用であることを示すものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maeda Akira, Lo Pei-Chi, Sakai Rieko, Noguchi Yuki, Kodama Tasuku, Yoneyama Tomohisa, Toyama Chiyoshi, Wang Han-Tang, Esquivel Emilio, Jiaravuthisan Patmika, Choi Thuy-Vy, Takakura Chihiro, Eguchi Hiroshi, Tazuke Yuko, Watanabe Masahito, Nagashima Hiroshi, Okuyama Hiroomi, Miyagawa Shuji	4. 巻 104
2. 論文標題 A Strategy for Suppressing Macrophage-mediated Rejection in Xenotransplantation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transplantation	6. 最初と最後の頁 675 ~ 681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/TP.0000000000003024	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Lo Pei-Chi, Maeda Akira, Kodama Tasuku, Takakura Chihiro, Yoneyama Tomohisa, Sakai Rieko, Noguchi Yuki, Matsuura Rei, Eguchi Hiroshi, Matsunami Katsuyoshi, Okuyama Hiroomi, Miyagawa Shuji	4. 巻 224
2. 論文標題 The novel immunosuppressant prenylated quinolinecarboxylic acid-18 (PQA-18) suppresses macrophage differentiation and cytotoxicity in xenotransplantation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Immunobiology	6. 最初と最後の頁 575 ~ 584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.imbio.2019.04.003	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 -

1. 著者名 Noguchi Yuki, Maeda Akira, Lo Pei-Chi, Takakura Chihiro, Haneda Tomoko, Kodama Tasuku, Yoneyama Tomohisa, Toyama Chiyoshi, Tazuke Yuko, Okuyama Hiroomi, Miyagawa Shuji	4. 巻 224
2. 論文標題 Human TIGIT on porcine aortic endothelial cells suppresses xenogeneic macrophage-mediated cytotoxicity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Immunobiology	6. 最初と最後の頁 605 ~ 613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.imbio.2019.07.008	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Akira Maeda
2. 発表標題 The novel immunosuppressant PQA- 18 suppresses macrophage differentiation cytotoxicity in xenotransplantation and
3. 学会等名 15th congress of International Xenotransplantation Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akira Maeda
2. 発表標題 Human tigit on swine endothelial cells suppresses xenogeneic macrophage-mediated cytotoxicity
3. 学会等名 15th congress of International Xenotransplantation Association (国際学会)
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------