

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18070

研究課題名(和文)アロ移植片の免疫寛容維持における単球系抑制性細胞の役割

研究課題名(英文) Analysis of Therapeutic Potential of Monocytic Myeloid-derived Suppressor Cells in Cardiac Allograft Transplantation

研究代表者

内田 浩一郎 (Uchida, Koichiro)

順天堂大学・健康総合科学先端研究機構・准教授

研究者番号：80648329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,700,000円

研究成果の概要(和文)：臓器移植は免疫抑制剤の開発により標準医療として確立されたものの、生涯免疫抑制剤を内服するリスクをもつ。免疫寛容の誘導は、免疫抑制薬の問題をすべて解決できる戦略となる。トランス維持の機構として、骨髄由来免疫抑制細胞の役割が癌免疫の分野を中心に明らかになってきている。骨髄細胞にGM-CSFとIL-6のサイトカイン添加によりin vitroでMDSCを誘導し、その中でも単球系MDSCが特にT細胞の増殖活性を抑制し、FOXP3陽性の制御性T細胞を分化増殖させることを確認した。さらにこの単球系MDSC養子細胞治療により、マウス・アロ心移植モデルにおいてグラフトが長期生着する効果を発揮することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

単球系の骨髄由来抑制細胞のターゲットとした新たな免疫抑制治療の効果メカニズムが解明された。これらにより、副作用の強い薬剤の全身投与ではなく、抑制性細胞治療という炎症部位を選択的に制御できる方法論の治療コンセプトを確立することができた。

この細胞療法は、制御性T細胞治療のように、レシピエントのMHCを合わせなくても、投与可能であり、効果を発揮する。また骨髄細胞は、比較的容易に採取可能であり、将来の安定供給可能な体制を構築しやすい。

研究成果の概要(英文)：Syngeneic and allogeneic bone marrow-derived MDSCs (BM-MDSCs) were induced and their effect on graft survival and suppressive capacity were analyzed. Moreover, we compared the ability of syngeneic monocytic MDSCs (Mo-MDSCs) and polymorphonuclear MDSCs (PMN-MDSCs) to inhibit graft rejection and analyze the mechanisms of suppression.

Results Not only syngeneic but also allogeneic donor- or allogeneic third party-derived BM-MDSCs prolonged graft survival, although syngeneic BM-MDSCs inhibited anti-donor immune responses most effectively in vitro. Mo-MDSCs, rather than PMN-MDSCs, were responsible for immune suppression through inducible nitric oxide synthase (iNOS), and expanded naturally occurring thymic originated Treg (nTreg) in vitro. Adoptive transfer of Mo-MDSCs, but not PMN-MDSCs, prolonged graft survival and increased Treg infiltration into the graft heart.

研究分野：移植免疫

キーワード：移植 拒絶反応 細胞治療 骨髄由来抑制性細胞

### 1. 研究開始当初の背景

臓器移植は免疫抑制薬の開発や手術法の確立により移植後の成績は安定する時代となり、生命予後のみならず生活の質や医療経済的にも推奨される治療法として確立された。しかし移植後生涯継続して免疫抑制剤を内服する必要性は、結果的に感染症、発癌、代謝性疾患(糖尿病、高血圧)、内服コンプライアンス、薬剤の高コストといったあらたな課題を生み出した。この難題に対して免疫寛容(トレランス)の誘導とその維持は、免疫抑制薬の問題をすべて解決できる戦略となる。トレランス維持の機構として、骨髄由来免疫抑制細胞(myeloid derived suppressor cells: MDSC)の役割が近年、癌免疫の分野を中心に明らかになってきている。それらは、癌細胞から分泌・産生されるエキソソーム(RNAを分解する多タンパク複合体)およびサイトカインやケモカイン等の可溶性分子が、骨髄系前駆細胞に働き、マクロファージ、樹状細胞、顆粒球といった免疫系細胞への分化誘導が阻害され、未熟な細胞集団 MDSC として、骨髄外から全身に移行され、免疫能を低下させている。また臓器移植の基礎実験では、免疫抑制剤の使用により、グラフト内に MDSC が浸潤し、癌のように局所で免疫拒絶反応から守っているとの報告もある。申請者を中心とした研究グループは、マウス・アロ心移植トレランス誘導モデル(T細胞共刺激分子 CD80/CD86 の阻害)の他、今回新たに、マウス骨髄細胞から、GM-CSF と IL-6 の添加により *in vitro* で単球系 MDSC を誘導し、それが(1)T細胞の増殖活性を抑制し、(2)ナイーブ T細胞を FOXP3 陽性の制御性 T細胞を誘導し、(3)MDSC 養子細胞治療により、アロ心移植モデルにおけるグラフト長期生着を発表してきた。この 2 つのモデルを用いて、移植トレランス維持における MDSC の役割と、MDSC のサブpopulation の解析により、*in vitro* 誘導性の MDSC 治療の開発基盤を確立させていく。

### 2. 研究の目的

骨髄由来抑制性細胞を用いた細胞治療法の開発基盤の確立、すなわち至適培養条件と安定的に有効性を示すための投与方法、さらに生体内における免疫抑制メカニズムを探索する。

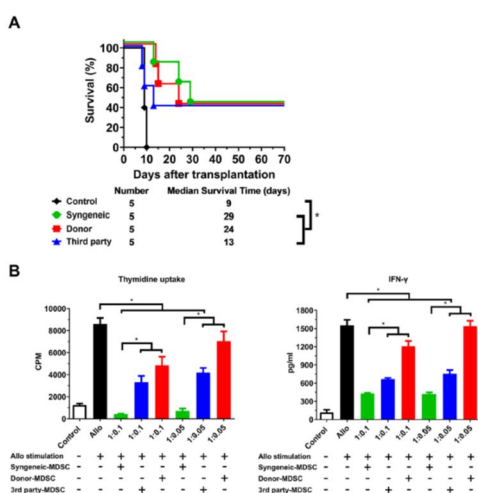
### 3. 研究の方法

同系、同種のマウスの骨髄細胞から MDSC を誘導し、アロ異所性心臓移植モデルに養子移入し、グラフト生着期間、MDSC の生体内分布、単球系ならびに顆粒球系の MDSC の抑制効果とそのメカニズムを解析した。

### 4. 研究成果

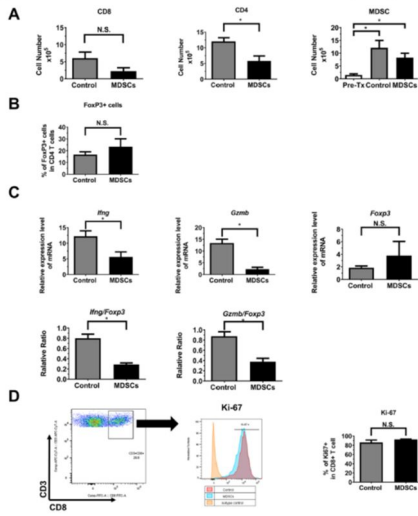
(1)誘導した MDSC のうち、アロ移植片の長期生着やアロリンパ球混合試験の抑制能への貢献は、レシipient由来、ドナー由来、第 3 者ドナー由来の順で強い傾向があった。

図 1



A: MDSC をレシipient(同系)、ドナー(同種)、3rdP ドナー(同種)のマウスから誘導し、マウス・アロ異所性心臓移植モデルに投与した。  
 B: 上記の MDSC の抑制機能をアロリンパ球混合試験で確認した。レシipient(同系)の MDSC が最も強い抑制効果を示した。

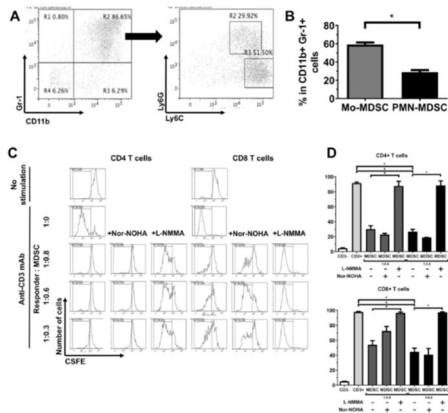
☒ 2



A~D: マウス・アロ異所性心移植モデルにおいて、心臓グラフトに浸潤するリンパ球を評価した。CD4・CD8T細胞の浸潤は、有意にMDSC治療群で低下した、細胞傷害性サイトカインも低下していた。一方で、MDSC治療群ではTregの割合は有意に増加しており、MDSC治療により、アロ抗原反応性のT細胞の増殖が抑えられ、制御性T細胞が増殖していることが確認された。

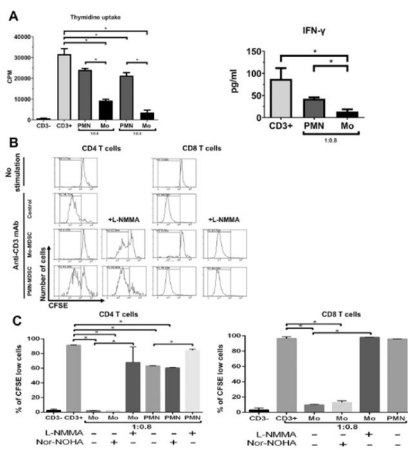
(2) 誘導されたMDSCのうち、Ly6C陽性の単球系MDSCは、Ly6G陽性の顆粒球系MDSCと比較し、上記のグラフト生着や抑制能が有意に高く、胸腺由来の自然発生制御性T細胞を分化増殖させ、その効果はiNOSを介して発揮されていることが確認された。

☒ 3



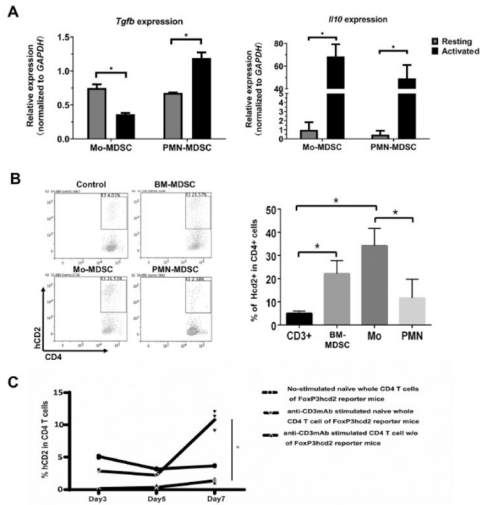
A~D: 誘導されたMDSCは、単球系と顆粒球系のフェノタイプが混在していることが確認された。その抑制能はiNOSを介したメカニズムであることが判明した。

☒ 4



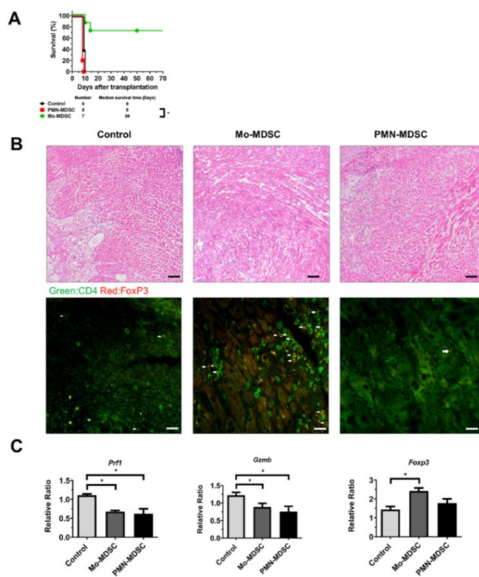
A~C: 単球系と顆粒球系のMDSCの抑制能を比較検討した。単球系と顆粒球系のどちらにも抑制能はあるものの、単球系でより強い効果が確認された。これらのMDSCは、アロ抗原刺激で反応するCD4およびCD8T細胞の活性化を抑制していた。

☒ 5



A~C: 単球系 MDSC と共培養することで、制御性 T 細胞は効率よく分化増殖され、その機能である TGF- $\beta$ 、IL-10 という抑制性サイトカインの産生効率を上げていた。また分化増殖した制御性 T 細胞は、ナイーブ T 細胞から分化誘導されたものではなく、胸腺由来の自然発生型であることが判明された。

6



A~C: 誘導した MDSC から単球系のフェノタイプだけを抽出し、マウス・アロ異所性心移植モデルに投与した。移植片の生着期間は有意に延長し、制御性 T 細胞が多く浸潤していることが確認された。

この成果により、臓器移植における MDSC 治療の有効性ならびに生体内における効果発揮のメカニズムが確認され、将来の臨床応用へのコンセプトを策定することが可能となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fujimoto Keiichi, Uchida Koichiro, Yin Enzhi, Zhu Jun, Kojima Yuko, Uchiyama Masateru, Yamamoto Yasuto, Bashuda Hisashi, Matsumoto Ryu, Tokushige Koji, Harada Masaki, Inomata Takenori, Kitaura Jiro, Murakami Akira, Okumura Ko, Takeda Kazuyoshi	4. 巻 67
2. 論文標題 Analysis of therapeutic potential of monocytic myeloid-derived suppressor cells in cardiac allotransplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transplant Immunology	6. 最初と最後の頁 101405 ~ 101405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.trim.2021.101405	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 -

〔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 Keiichi Fujimoto
2. 発表標題 Bone Marrow Derived Myeloid Suppressor Cell (BM-MDSCs) Prolongs the Graft Survival in Murine Heart Transplantation
3. 学会等名 International Congress of The Transplantation Society
4. 発表年 2019年 ~ 2020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
---------	---------