

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390349

研究課題名(和文) 移植医療への応用を目指した免疫制御細胞療法の確立に関する研究

研究課題名(英文) Establishment of immune cell therapy for transplant medical application

研究代表者

梨井 康 ( LI XIAOKANG )

(独) 国立成育医療研究センター・研究所・RI 管理室長

研究者番号：60321890

研究成果の概要(和文)：これまでの研究成果として、1) 抗 CD28superagonist 抗体を用い、*in vitro* で増殖させた Treg 細胞の動物モデルにおける有用性が示された；2) ラット骨髄から MSC を用いて、T 細胞増殖反応および GvHD への抑制効果を明らかにした。また、クローン化 MSC との遺伝子発現プロファイルの活用により、MSC 細胞における標的分子のスクリーニングや、免疫生物学の抑制機能について解析した；3) 同種心臓、肝臓移植拒絶・寛容モデルの解析及び移植後拒絶・寛容予測するバイオマーカーの探索を行い、移植後拒絶・寛容を予測できるバイオマーカーの発見、免疫抑制療法の軽減や休止の指標として期待したい。

研究成果の概要(英文)：The results of the present research project are summarized: 1) The supCD28mAb can preferentially expand nTregs, which induced a potent inhibition of the lethality of GvHD via an antigen-specific manner. These data also provide evidence that GvHD is associated with a decrease of Foxp3 nTregs in the periphery of the host. The determination of the Foxp3 Tregs can be a helpful tool to discriminate the severity and lethality of GvHD after allogeneic stem cell transplantation; 2) Our rat model showed differences in the suppression of lymphocyte proliferation and GvHD prevention between the short-term cultured conventional BM-MSCs and cloned MSCs and the mechanisms of functional MSCs still remain to be identified; 3) We demonstrated that utilizing the multiplex PCR GeXP system, to identify a set of immunoregulatory genes which provides sensitivity and specificity for diagnosing rejection and tolerance in mouse hepatic and cardiac transplant models. These data may usher in an era of increased utilization of these gene-based tests for the routine diagnosis of rejection and/or tolerance and thus may be a useful new technology for identification of new biomarkers for the diagnosis of allograft rejection and tolerance in transplant patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学臨床医学

キーワード：移植・再生医療、遺伝子、細胞・組織、免疫寛容、細胞療法、バイオマーカー

## 科学研究費補助金研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

免疫制御性リンパ球 (Treg細胞) は *in vitro* および *in vivo* において免疫細胞の活性化を抑制することが知られており、その臨床応用が期待されている。しかし、Treg細胞の免疫制御機構についての詳細はまだ完全に明らかになっていない。我々これまでの研究で、動物臓器移植寛容モデルおよび生体部分肝移植後免疫寛容が誘導された患者の臨床症例について、細胞生物学および分子生物学的手法を用いて免疫寛容の成立に関わる細胞集団および関連遺伝子の発現情報解析並びに新規免疫抑制遺伝子の探索を行っていた。その結果、今まで免疫抑制に関与することが知られていなかったある遺伝子が、Treg細胞で有意に発現している事を明らかにした。特にリンパ球の活性化に関与する事が知られている副刺激シグナル分子群に属する遺伝子および転写制御因子が、今まで考えられていた以上に深く関与する事が明らかとなった。また、*in vivo* において、組み換えCTLA4Ig蛋白質および抗ICOS抗体を用いて、T細胞増殖に必要な不可欠な副刺激シグナルを遮断する事で、ラットの臓器移植の系で安定かつ強固な免疫寛容が誘導される事を見出した。さらに、その寛容ラットの末梢リンパ球を養子移植すると、別の個体に免疫寛容を誘導出来る事を明らかにし、*in vitro* における免疫制御細胞調製の可能性に有用な根拠を提示した。

一方、様々な組織に分化する事が知られている間葉系幹細胞は、再生医療において組織再生の中核を担う細胞として期待されている。間葉系幹細胞は細胞表面の特殊な性質によって非免疫原性という特性を持ち、特定の環境において免疫細胞の活性を抑制する作用を示す事から、移植時免疫寛容の誘導等の可能性が期待されている。我々これまでの研究で、ラットの骨髄およびヒト臍帯血内の幹細胞の機能解析を現在精力的に行い、特に間葉系幹細胞の同定に力をいれており、臍帯血の有核細胞を用いて、間葉系幹細胞の分離・培養方法を開発した。分離出来た間葉系幹細胞の表面マーカーについて検討を行い、ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞との比較したところ、同じであることを確認した。また、間葉系幹細胞の骨芽、脂肪細胞への分化誘導のための培養条件についても検討を行い、これら細胞への分化を染色にて確認した。さらに、間葉系幹細胞への遺伝子導入について GFP 遺伝子を組み込んだアデノ、レンチ二種類のウイルスベクターを用いて比較検討を行

い、遺伝子導入後の発現効率、発現期間および細胞の毒性等において、レンチウイルスベクターが間葉系幹細胞への遺伝子導入には有用であることを明らかにした。現在本細胞の免疫制御機能の解析を進めている。動物移植モデルにおいて免疫を制御する事が明らかとなれば、臓器移植および自己免疫疾患に対する免疫制御細胞療法に用いる事が可能になると考えられる。この様な幹細胞の移植免疫抑制への利用が可能になれば、拒絶反応抑制に用いる細胞の採取に関しても選択の幅が大きく広がる。また、本研究は幹細胞を利用した新たな移植免疫抑制の方法を開発する医療の面に留まらず、免疫系および幹細胞系それぞれの細胞系統間の相互作用、幹細胞の免疫系への関与、分化機序およびその生理学的な意味の解明といった基礎医学に寄与する事ができると期待される。

本研究予想される成果は免疫反応を負に調節する細胞の発生・分化および幹細胞の免疫系への関わりについて新たな知見を生み出す。これは新たな移植免疫抑制の方法を開発するに留まらず、自己免疫疾患発症の機序解明にも繋がる。また、当然ながらこの研究成果は移植医療を受ける患者に対して安全な免疫抑制方法の提供を可能とし、移植後患者の生活の質 (QOL) を飛躍的に向上させることができる。さらに、免疫抑制剤の投与停止により医療費の抑制にも繋がる。

## 2. 研究の目的

現在用いられている免疫抑制剤による移植医療は、移植を医療としての段階へ導きはしたが、半永久的な投与による副作用、精神的および経済的な負担が大きい為、新たな拒絶反応抑制方法の確立が切望されている。我々は移植医療への応用を目指して、免疫制御リンパ球 (Treg 細胞)、間葉系幹細胞を移植片拒絶反応抑制に利用する免疫 (抑制) 細胞療法の確立を本研究の目標とする。これらの細胞を用いる事により、免疫抑制剤の使用を極力減らし、安全かつ患者の生活の質 (QOL) を向上させる。科学研究費の交付を希望する期間内の研究計画としては、免疫寛容動物および患者由来の制御リンパ球を用いた解析から得られた遺伝子発現情報の成果を踏まえて、免疫 (抑制) 細胞療法の確立を本研究の最終目標として：1) 制御性 T 細胞および間葉系間細胞の免疫抑制機序の解明；2) ヒト臍帯血由来制御性 T 細胞の体外増殖法の確立；3) 小、大動物臓器移植実験にて免疫制御細胞

療法の確立；以上の目標を達成する予定であった。

### 3. 研究の方法

本研究目的を達成するため、全体の研究内容を主に：制御性T細胞および間葉系間細胞の免疫抑制機序の解明、免疫制御リンパ球における免疫寛容関連遺伝子の同定および機能評価、間葉系間細胞の免疫抑制機序の解明、間葉系幹細胞における免疫関連遺伝子の同定、動物臓器移植実験にて免疫制御細胞療法の確立、移植動物モデルにおける免疫細胞療法の実施、組織学的検討、マルチプレックスRT-PCRアプローチ (GeXP) を用いる移植後拒絶・寛容を予測できるバイオマーカーの発見等について研究を行った。

### 4. 研究成果

初年度の研究では、制御性 T (Treg) 細胞の移植医療の臨床応用を目指して、今までの研究で明らかになった生体内数少ない細胞増殖抑制作用を持つ Treg 細胞を優位的に増やせる抗 CD28 superagonist 抗体 (SupCD28 抗体) を用い、腎移植、Graft versus Host Disease (GvHD) モデルにて、抗体投与後の活性化 Foxp3 陽性 Treg 細胞の動態をターゲットとし、その動態、抗原特異性および免疫抑制効果の機序について検討した。腎移植モデルを用いた移植片の生着延長効果の検討では、移植前或は直後に抗体を投与する事により顕著な生着延長効果が得られた。また、腎移植後の特異的な免疫寛容が誘導され、心臓テストグラフトの生着も確認できた。さらに、抗体の投与によるグラフト生着延長効果は、末梢血中のみならず、グラフト中浸潤細胞の FoxP3 陽性 Treg 細胞による免疫抑制が関与していることが示唆された。GvHD モデルにおいては、生後 24hr 以内の DA ラット新生児に、(LEW × DA)F1 骨髄を投与し、Neonatal tolerance ラットの作成し、GvHD の実験に用いた。SupCD28 抗体を Lewis ラット由来のナイーブリンパ球移入前 (-3 日) に (LEW × DA)F1 ラット、或は DA tolerant of (LEW × DA)F1 ラットに投与し、GvH 反応の抑制効果を検討した。(LEW × DA)F1 ラットにおいては、SupCD28 投与で増殖した Treg の抑制効果は GvH 反応発症の早期に有効であることを確認された。一方、DA tolerant of (LEW × DA)F1 においては、SupCD28 抗体投与有無関係なく、GvHD が発症した。Tolerant of (LEW × DA)F1 ラットの SupCD28 抗体投与によって増殖された Foxp3 陽性 Treg が DA ラット由来であり、Lewis ラット由来ナイーブリンパ球による GvHD の発症を抑制できなかつたため、Treg の免疫抑制作用は抗原特異的であることを示唆された。今後、移植領域においてこの抗体の新しい免

疫抑制剤として期待されたい。

次年度の研究では、主に間葉系幹細胞の移植片拒絶反応抑制に利用するための機序の解明であった。ラット骨髄 1 ヶ月間を培養後、附着細胞を回収し、磁気細胞分離 (MACS) にて、抗 CD11b 抗体、抗 CD45 抗体を用いて、マクロファージ (Mφ、CD45+CD11b+CD90-) 細胞、間葉系幹細胞 (MSC、CD11b-CD45-CD90+) を精製分離した。また、MSC からクローニングし、クローン化 MSC (cMSC) が得られた。これら三種類の細胞も用いて、抗体、ConA、アロ抗原刺激による T 細胞反応系に添加したところ、MSC は Mφ と同様各刺激に対する T 細胞増殖反応の抑制機能を示した。しかし、cMSC は T 細胞の増殖反応を増強した。一方、F1 (LEW × DA, 4~6 週齢/120g) を放射線 (6Gy) 処理後、三種類の細胞 ( $1.0 \times 10^7$  cells) をそれぞれ投与し、翌日 Naïve Lewis リンパ球 ( $1.0 \times 10^7$  cells) を移植した GvHD モデルにおいては、MSCs および Mφ 細胞投与群では 60 日以上生存が得られ、cMSC 投与群では、無処置群と同様に 23 日前後であった。さらに、上記三種類の細胞の遺伝子発現プロファイルによる包括的遺伝子発現パターンを比較した結果、MSC 細胞においては特異的発現している遺伝子を明らかにした。ラット骨髄短期 (1 ヶ月間) 培養後で分離精製した MSC が同時期のマクロファージと同様各刺激による T 細胞増殖活性および GvH 反応に対し抑制効果を有しており、今後、GvHD 治療だけでなく臓器移植においても、この細胞を新たな免疫抑制細胞としての可能性を期待したい。また、クローン化 MSC との機能違いの検討結果および遺伝子発現プロファイルの活用により、MSC 細胞における標的分子のスクリーニングや、MSC 細胞の免疫生物学の抑制機能における分子機序について理解・解明されたい。

最終年度の研究では、主にマウス同種異系心臓、肝臓移植拒絶・寛容モデルの解析及び移植後拒絶・寛容予測するバイオマーカーの探索であった。移植寛容モデルとして、B10. BR (H-2K<sup>b</sup>) マウスの肝臓を B10. D2 (H-2K<sup>d</sup>) マウスへ同所性に肝移植を行った自然免疫寛容モデルにて、移植後 5、8、14、30、100 日目に移植肝、脾臓、リンパ節、血清等サンプルを採取した。一方、移植拒絶モデルとして、同様に B10. BR (H-2K<sup>b</sup>) マウスの心臓を B10. D2 (H-2K<sup>d</sup>) マウスへ異所性に心臓移植を行った拒絶モデルにて、移植心、脾臓、血清等を採取した。組織は mRNA を精製し、蛍光物質で標識しプローブを作製し、作製したプローブをマイクロアレイにハイブリダイズし、移植心、肝組織、脾臓 mRNA 発現プロファイルを解析した。肝移植寛容モデルにおいては、30、100 日目と移植後早期である 5、8、14 日目と比べ、数百個の有意に変化し

た遺伝子を見いだした。その中から統計学的な処理(t-test)を行い、109個(p<0.01)の候補遺伝子を見つけた。心移植拒絶モデルでは、遺伝子発現のパターンは主に移植後5、8日での急性拒絶期では500数個の統計学的に有意に変化した候補遺伝子を見つけ、既存の免疫活性に関わる遺伝子の高発現が認められた。また、肝臓移植モデルの移植後早期(5、8、14日)との相関・相同性についても確認できた。アレイ結果の検証方法として多機能ジーンエクスペレッサー-GeXPを試みた。GeXPはマルチプレックスRT-PCRアプローチを使い、25遺伝子の発現定量解析を1反応で同時に測定することができ、その発現をさらに定量RT-PCRにて確認を行い、アレイでの結果の相関性の確認が出来た。今後GeXP法による移植後拒絶・寛容を予測できるバイオマーカーの発見、患者に対する免疫抑制療法の軽減や休止の指標として期待したい。さらに、今年度では、Naïve B6マウスの脾臓からT細胞を精製分離し、BDF1(B6xDBA)マウスへのリンパ球輸入による急性GvHDモデルも確立でき、今後、免疫細胞療法の実施へと繋げていきたいと考えている。

#### 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11件)

- ①Kitazawa Y, Li X-K, Xie L, Zhu P, Kimura H, Takahara S. Bone marrow derived conventional, but not cloned, mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation and prevent graft-versus-host disease in rats. 査読有. Cell Transplant (In press).
- ②Chen J, Xie L, Toyama S, Hünig T, Takahara S, Li X-K, Zhong L. The effects of Foxp3-expressing regulatory T cells expanded with CD28 superagonist antibody in DSS-induced mice colitis. 査読有. Int Immunopharmacol. 11(5):610-7; 2011.
- ③Miyasato K, Takabatake Y, Kaimori J, Kimura T, Kitamura H, Kawachi H, Li X-K, Hünig T, Takahara S, Rakugi H, Isaka Y CD28 superagonist-induced regulatory T cell expansion ameliorates mesangioproliferative glomerulonephritis in rats. 査読有. Clin Exp Nephrol. 5(1): 50-7; 2010.
- ④Azuma H, Isaka Y, Nomi H, Inamoto T, Li X-K, Hünig T, Takabatake Y, Ichimaru N, Ibuki N, Matsumoto K, Ubai T, Katsuoka Y, Takahara S. Induction of Donor-Specific Tolerance Using Superagonistic CD28

Antibody in Rat Renal Allografts: Regulatory T-Cell Expansion Before Engraftment May Be Important. 査読有. Transplantation 90 (12):1328-1335; 2010.

⑤Kitazawa Y, Li X-K, Liu Z, Kimura H, Isaka Y, Hunig T, Takahara S. Prevention of graft-versus-host diseases by *in vivo* supCD28mAb-expanded antigen-specific nTreg cells. 査読有. Cell Transplant 19(6):765-74; 2010.

⑥Morita M, Fujino M, Jiang GP, Kitazawa Y, Xie L, Azuma M, Yagita H, Nagao S, Sugioka A, Kurosawa Y, Takahara S, Fung J, Qian S, Lu L, Li X-K. PD1/B7-H1 interaction contribute to the spontaneous acceptance of mouse liver allograft. 査読有. Am J Transplant 10(1):40-46; 2010.

⑦Kitazawa 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. 査読有. Cell Transplant 18(5): 627-37; 2009.

⑧Pan XC, Deng YB, Sugawara Y, Makuuchi M, Okabe M, Ochiya T, Sugiura W, Kitazawa Y, Fuji N, Li X-K, Miyamoto M, Kimura H. Immunological behavior of enhanced green fluorescent protein (EGFP) as a minor histocompatibility antigen with a special reference to skin isograft and specific regulation of local graft-versus-host reaction (GvHR). 査読有. Immunol Lett. 123(2): 103-13; 2009.

⑨Tsuji A.B, Morita M, Li X-K, Sogawa C, Sudo H, Sugyo A, Fujino M, Sugioka A, Koizumi M, Saga T. 18F-FDG PET for the Semiquantitative Evaluation of Acute Allograft Rejection and the Immunosuppression Therapy Efficacy in Liver Transplantation Rat Models. 査読有. J Nucl Med 50(5): 827-30; 2009.

⑩Azuma H, Isaka Y, Li X-K, Hunig T, Skamoto T, Takabatake Y, Mizui M, Kitazawa Y, Ichimaru N, Ibuki N, Inamoto T, Katsuoka Y, Takahara S. Superagonistic CD28 antibody induces donor-specific tolerance in rat renal allografts. 査読有. Am J Transplant 8(10): 2004-14; 2008.

⑪Kitazawa Y, Fujino M, Sakai T, Azumu H, Kimura H, Isaka Y, Takahara S, Hünig T, Abe R, Li X-K. Foxp3-expressing regulatory

T-cells expanded with CD28 superagonist antibody prevent rat cardiac allograft rejection. 査読有. J Heart Lung Transplant 27(4): 362-71; 2008.

[学会発表] (計 11 件)

①L. Xie, M. Morita, J.H. Wang, J.J. Chen, S. Nagao, A. Sugioka, S. Takahara, G. A. Levy, and X-K. Li. A novel biomarker gene set predicts allograft rejection by multiplex reverse

transcription-polymerase chain reaction. 第 14 回国際免疫学会, 神戸. 2010. 8. 22-27

②M. Inubushi, N. Hatayama, X-K. Li, Y.N. Jin, M. Koizumi, and T. Saga. [<sup>18</sup>F] FDG-PET studies of heterotopic heart transplantation in rats. 第 40 回世界核医学会, ケープタウン. 2010. 9. 18-23.

③阿部豊文, 李小康, 畑山直之, 角田洋一, 蔦原宏一, 奥見雅由, 矢澤浩治, 貝森淳哉, 高原史郎. 一酸化炭素を用いた新たな臓器保存法の試み. 第 46 回日本移植学会総会. 京都. 2010. 10. 20-22.

④Z. Liu, K. Kato, N. Hatayama, L. Xie, Y. Nagahara, X-K. Li. Eicosapentaenoic acid attenuate allograft rejection in HLA-B27/EGFP transgenic rat cardiac transplantation model. 第 37 回日本臓器保存生物医学会. 新潟. 2010. 11. 19-20.

⑤外山扇雅, 右田王介, 国枝哲男, 長原礼宗, 奥山虎之, 李小康. 肝臓移植による先天性代謝疾患の新規治療法の開発. 第 37 回日本臓器保存生物医学会. 新潟. 2010. 11. 19-20.

⑥畑山直之, 梨井康, 内藤宗和, 小嶋智弘, 関邦博. ラット摘出心臓による CO を用いた高圧乾燥保存法の保存限界とメカニズム. 第 37 回日本臓器保存生物医学会. 新潟. 2010. 11. 19-20.

⑦Kitazawa Y, Li X-K, Kimura H, Isaka Y, Takahara S. Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation and prevent rat graft-versus-host disease but cloned MSCs are failed. The Okayama 2009 CTS-JSOPMB Joint Conference, Okayama, 2009. 4. 20-21.

⑧森田美和, 辻厚至, 曾川千鶴, 須藤 仁美, 須堯 綾, 藤野真之, 謝琳, 長尾静子, 高原史郎, 木村廣光, 杉岡篤, 小泉 満, 佐賀 恒夫, 李小康. 拒絶反応の非侵襲的診断法としての FDG-PET の有用性の検討. 第 45 回日本移植学会総会, 東京. 2009. 9. 16-18.

⑨Morita M, Kitazawa Y, Xie L, Kimura H, Azuma M, Nagao S, Sugioka A, Li X-K. The

importance of the PD-1/PD-L1 co stimulatory signal for spontaneous acceptance after mouse liver allografting. 第 39 回日本免疫学会総会, 大阪. 2009. 12. 2-4.  
⑩李 小康, 北沢祐介, 東 治人, 猪阪義隆, 高原史郎. CD28superagonist を用いた免疫寛容誘導 第 44 回日本移植学会総会 大阪 2009. 9. 19-21.

⑪李 小康. 移植免疫寛容の誘導・維持機序の解明および免疫制御細胞療法の確立 第 36 回日本臨床免疫学会総会 東京 2009. 10. 17-18.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

梨井 康 (LI XIAOKANG)

(独) 国立成育医療研究センター・研究所・RI 管理室長  
研究者番号: 62321890

(2) 研究分担者

高原史郎 (TAKAHARA SHIRO)

大阪大学大学院医学研究科・先端移植基盤医療学・教授  
研究者番号: 70179547

木村廣光 (KIMURA HIROMITSU)

(独) 国立成育医療研究センター・研究所・

共同研究管理室長  
研究者番号：80115477

(3)連携研究者  
なし