

平成 22 年 5 月 11 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790693

研究課題名（和文） 遺伝子改変マウス ES 細胞由来の樹状細胞による免疫制御療法の開発

研究課題名（英文） The development of immune regulation by genetically modified ES-DC

研究代表者

平田 真哉（HIRATA SHINYA）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60418829

研究成果の概要（和文）：

樹状細胞（DC）は個体において免疫応答を制御する重要な細胞の一つである。今回、マウスを用いた実験において、遺伝子導入・改変を比較的容易に行うことができ、強力な増殖能力を持つ ES 細胞より DC（ES-DC）を分化誘導する手法を応用して、(1)NOD マウスにおける糖尿病自然発症の抑制、(2)糖尿病発症マウスに対する同種異系（アロ）の膵島移植モデルにおける長期生着、を試みた。これらの成果は、自己免疫疾患の治療、アロ移植片の拒絶の抑制に役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Recent studies showed that DCs physiologically play significant roles in regulating immune responses both positively and negatively. For genetic modification of DC, we used a previously established method to generate DC from mouse ES cells in vitro (ES-DC). We tried 1) the prevention of diabetes by transfer of ES-DC expressing islet-derived antigen along with immunosuppressive molecules in NOD mice, and 2) the prolongation of islet allograft survival by transfer of ES-DC expressing immunosuppressive molecules. These strategies may also be useful for the treatment of subjects with autoimmune diseases and for the induction of transplantation tolerance.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：臨床免疫学、移植免疫学、ES 細胞由来樹状細胞、糖尿病、制御性 T 細胞、TRAIL

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患や臓器移植における拒絶反応の治療において、個体の全身的な免疫応答を損なうことなく、抗原特異的に抑制する手法が強く求められ、開発されてきた。

一方で、多くの自己免疫疾患において、病

原性リンパ球が認識する抗原は、いまだに明らかでなく、さらに、経過中に認められる epitope spreading 現象により、ひとつの自己抗原に対する病原性リンパ球を抗原特異的に抑制しても、自己免疫疾患をコントロールできない可能性が懸念されている。そこで、自

己免疫疾患の標的である組織に特異的に発現する自己抗原を認識する制御性 T 細胞 (Treg 細胞) を誘導することにより、その組織の病原性リンパ球を、抗原特異性を問わずに抑制することで、自己免疫疾患を制御できるのではないかと考えた。

また、近年、ES 細胞から機能的な膵島 β 細胞など様々な組織や細胞への分化誘導が報告され、新たな移植細胞・組織の供給源として注目されている。しかし、レシピエントと HLA が一致していない ES 細胞由来の組織はレシピエントの免疫系により拒絶される。近年、iPS 細胞の発明により、レシピエントと完全に一致した多能性幹細胞を作成することができるようになったが、全てのレシピエントに準備することには、技術的にも経済的にも実現困難であり、その解決が期待されている。そこで、免疫応答を制御する樹状細胞(DC)に注目し、ES 細胞から DC (ES-DC) を作る手法を応用して、免疫抑制性分子を遺伝子導入した ES-DC により、アロ抗原に対する免疫寛容を誘導し、アロ移植片の拒絶を抑制出来るのではないかと考えた。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、(1) 膵島 β 細胞に特異的な抗原と免疫抑制性分子を遺伝子導入した NOD マウス ES-DC を作製して、組織抗原特異的な免疫抑制性 T 細胞を誘導し、組織特異的な免疫抑制により NOD マウスの糖尿病の自然発症を予防すること、また、(2) 糖尿病を誘導した CBA マウス (H-2^k) に、免疫抑制性分子を遺伝子導入したアロ ES-DC (H-2^{k/b}) を事前に投与することにより、アロ抗原 (H-2^{k/b}) に対する免疫寛容を誘導して、全身的な免疫抑制状態に陥らせることなく、ES 細胞と同系の膵島 (H-2^{k/b}) の生着期間を延長することを試みた。

3. 研究の方法

(1) NOD マウスにおける糖尿病自然発症の抑制：膵島抗原であるマウス Glutamate decarboxylase 65 (mGAD65) とプロインスリンの遺伝子と、抑制性 T 細胞を誘導することが報告されている免疫抑制性分子の TRAIL, IL-10, TGF- β 、および活性化 T 細胞を抑制することが報告されている PD-L1 の遺伝子を NOD マウス由来の ES 細胞 (NOD-ES 細胞) に遺伝子導入して、高発現体をクローニング

する。そして、In vitro において ES-DC に分化誘導し、これを糖尿病 (DM) 発症前の若齢 NOD マウスへ投与して、その後の DM 発症を観察する。

(2) 糖尿病発症マウスにおける同種異系

(アロ) の膵島移植実験：免疫抑制性分子である TRAIL、PD-L1、TGF- β 、IL-10 をマウス ES 細胞 (TT2, H-2^{k/b}) に電気穿孔法にて遺伝子導入して、高発現体をクローニングする。これを in vitro で ES-DC に分化誘導する。ストレプトゾトシンにより DM を誘導した CBA マウス (H-2^k) に、免疫抑制性分子を発現したアロ ES-DC (H-2^{k/b}) を投与して、アロ抗原 (H-2^{k/b}) に対する免疫寛容を誘導する。このマウスに、ES-DC と同系の (CBAxC57BL/6) F1 マウス (H-2^{k/b}) 由来の膵島を移植し、血糖や尿糖をモニタリングすることにより、アロ膵島の生着期間を評価する。

4. 研究成果

(1) NOD マウスにおける糖尿病自然発症の抑制

：免疫抑制性分子 (TRAIL あるいは PD-L1) と膵島 β 細胞の自己抗原 (マウス mGAD65 あるいはプロインスリン) を高発現する NOD-ES 細胞の作製に成功した。さらに、これらの遺伝子導入 ES 細胞を in vitro で ES-DC に分化誘導することに成功した。また、導入遺伝子の発現および機能活性を確認した。これらの ES-DC を、DM を発症する前の若齢 NOD マウス (4 週齢頃) に投与して、DM 発症率における影響を検証している。

(2) 糖尿病発症マウスにおける同種異系

(アロ) の膵島移植実験：免疫抑制性分子である TRAIL、PD-L1、TGF- β 、IL-10 をマウス ES 細胞 (TT2, H-2^{k/b}) に遺伝子導入して、それぞれの高発現体をクローニングすることに成功した。さらに in vitro で ES-DC へ分化誘導して、導入遺伝子の機能を確認することができた。これらの免疫抑制性分子を遺伝子導入した ES-DC (H-2^{k/b}) をストレプトゾトシンで糖尿病を誘導した CBA マウス (H-2^k) に投与し、その後 ES-DC と同系の (CBAxC57BL/6) F1 マウスより採取した膵島 (H-2^{k/b}) を移植し、その生着を血糖や尿糖でモニタリングした。その結果、TRAIL を遺伝子導入した ES-DC を投与したマウスにおいて、アロ膵島の生着期間(血

糖の正常化期間)を遺伝子導入していない ES-DC 投与群の 6.3 ± 0.4 日から 16.5 ± 3.5 日へ延長することが出来た。さらに、この TRAIL を発現する ES-DC を移植前に3回投与したところ、アロ腓島の生着期間(血糖の正常化期間)を 41.9 ± 19.8 日へ延長することが観察された。この TRAIL を強発現させたアロ ES-DC の投与により、(1)アロ抗原 (H-2^{kb}) に対する CD4 陽性 T 細胞、および CD8 陽性 T 細胞の免疫反応が低下していること、(2)無関係な抗原である KLH に対する免疫応答に影響を与えないこと、(3)投与されたマウス個体において免疫抑制能を持つ制御性 T 細胞が増加していることを明らかにした。さらに、(4)in vitro においても、TRAIL を遺伝子導入した ES-DC が親株の ES-DC より強くアロ制御性 T 細胞を増殖させることを発見した。現在、これらの成果をまとめて、科学雑誌に投稿中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Hirata, S., Fukushima, S., Ikeda, T., Matsunaga, Y., Moriyama, H., Yokono, K., Nagata, M., Senju, S. and Nishimura, Y. The transfer of ES cell-derived dendritic cells expressing TRAIL prolonged islets allograft survival. *Transplantation* 査読有り, *in revision*
2. Ikeda, T., Hirata, S., Fukushima, S., Matsunaga Y., Ito, T., Uchino, M., Nishimura, Y. and Senju, S. Dual effects of TRAIL to suppress autoimmunity: the inhibition of Th1 cells and the promotion of regulatory T cells. *J Immunol* 査読有り, *in revision*
3. Senju, S., Hirata, S., Motomura, Y., Fukuma, D., Matsunaga, Y., Fukushima, S., Matsuyoshi, H. and Nishimura, Y. Pluripotent stem cells as source of dendritic cells for immune therapy. *Int J Hematol* 査読有り, 91(3): 392-400, 2010
4. Inoue, M., Senju, S., Hirata, S., Ikuta, Y., Hayashida, Y., Irie, A., Harao, M., Imai, K., Tomita, Y., Tsunoda, T., Furukawa, Y., Ito, T., Nakamura, Y., Baba, H. and Nishimura, Y. Identification of SPARC as a candidate target antigen for immunotherapy of various cancers. *Int J Cancer* 査読有り, 2010 [Epub ahead of print]
5. Kozako, T., Fukada, K., Hirata, S., White, Y., Harao, M., Nishimura, Y., Kino, Y., Soeda, S., Shimeno, H., Lemonnier, F., Sonoda, S., and Arima, N. Efficient induction of human T-cell leukemia virus-1-specific CTL by chimeric particle without adjuvant as a prophylactic for adult T-cell leukemia. *Mol Immunol* 査読有り, 47: 606-613, 2009
6. Inoue, M., Senju, S., Hirata, S., Irie, A., Baba, H. and Nishimura, Y. An in vivo model of priming of antigen-specific human CTL by Mo-DC in NOD/Shi-scid IL2rgamma(null) (NOG) mice. *Immunol Lett* 査読有り, 126(1-2): 67-72, 2009
7. Fukushima, S., Hirata, S., Motomura, Y., Fukuma, D., Matsunaga, Y., Ikuta, Y., Ikeda, T., Kageshita, T., Ihn, H., Nishimura, Y. and Senju, S. Multiple Antigen-targeted Immunotherapy With alpha-Galactosylceramide-loaded and Genetically Engineered Dendritic Cells Derived From Embryonic Stem Cells. *J Immunother* 査読有り, 32(3): 219-231, 2009
8. Ikuta, Y. *, Hayashida, Y. *, Hirata, S., Irie, A., Senju, S., Kubo, T., Nakatsura, T., Monji, M., Sasaki, Y., Baba, H., and Nishimura, Y. (*equal contribution) Identification of the H2-Kd-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes of a tumor-associated antigen, SPARC, which can stimulate antitumor immunity without causing autoimmune disease in mice. *Cancer Sci* 査読有り, 100(1): 132-7, 2009
9. Matsunaga, Y., Fukuma, D., Hirata, S., Fukushima, S., Haruta, M., Ikeda, T., Negishi, I., Nishimura, Y., and Senju S. Activation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by beta 2-microglobulin or TAP1 gene disruption and the introduction of recipient-matched MHC class I gene in allogeneic embryonic stem cell-derived dendritic cells. *J Immunol* 査読有り, 181(9): 6635-43. 2008
10. Imai, K., Hirata, S., Irie, A., Senju, S., Ikuta, Y., Yokomine, K., Harao, M., Inoue, M., Tsunoda, T., Nakatsuru, S., Nakagawa, H., Nakamura, Y., Baba, H., and Nishimura Y. Identification of a novel tumor-associated antigen, cadherin

3/P-cadherin, as a possible target for immunotherapy of pancreatic, gastric, and colorectal cancers. *Clin Cancer Res* 査読有り, 14(20): 6487-95. 2008

11. Harao, M., Hirata, S., Irie, A., Senju, S., Nakatsura, T., Komori, K., Ikuta, Y., Yokomine, K., Imai, K., Inoue, M., Harada, K., Mori, Y., Tsunoda, T., Nakatsuru, S., Daigo, Y., Nomori, H., Nakamura, Y., Baba, H., and Nishimura, Y. HLA-A2-restricted CTL epitopes of a novel lung cancer-associated cancer testis antigen, cell division cycle associated 1, can induce tumor-reactive CTL. *Int J Cancer* 査読有り, 123(11): 2616-25. 2008
12. Uemura, Y., Suzuki, M., Liu, TY., Narita, Y., Hirata, S., Ohyama, H., Ishihara, O. and Matsushita, S. Role of human non-invariant NKT lymphocytes in the maintenance of type 2 T helper environment during pregnancy. *Int Immunol* 査読有り, 20(3): 405-12. 2008
13. Liu, TY., Uemura, Y., Suzuki, M., Narita, Y., Hirata, S., Ohyama, H., Ishihara, O. and Matsushita, S. Distinct subsets of human invariant NKT cells differentially regulate T helper responses via dendritic cells. *Eur J Immunol* 査読有り, 38(4): 1012-23. 2008
14. 平田真哉, 千住覚, 西村泰治「TRAIL 発現樹状細胞によるレギュラトリー T 細胞の誘導と実験的自己免疫性脳脊髄炎の治療」, *臨床免疫・アレルギー科* 査読無し, 科学評論社(東京), 51(1): 72-76, 2009.
15. 平田真哉, 千住覚, 西村泰治, 「ES-DC」, *炎症と免疫* 査読無し, 先端医学社(東京), 16(1): 133-135, 2008.

[学会発表] (計 2 件)

1. 平田真哉ら、免疫抑制性分子を遺伝子導入したマウス ES 細胞由来の樹状細胞の同種異系 (アロ) 移植への応用、第 36 回日本臨床免疫学会総会、2008 年 10 月 17 日～18 日、東京
2. 平田真哉ら、TRAIL を発現するアロ ES-DC の投与によるアロ膵島に対する拒絶反応の抑制、第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、2008 年 12 月 1 日～3 日、京都

[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

<http://www.tmd.ac.jp/grad/rheu/rheu-J.htm>

<http://www.medic.kumamoto-u.ac.jp/dept/immunoge/immunoge.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

平田 真哉 (HIRATA SHINYA)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60418829

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし