

平成 22年 6月 10日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790931

研究課題名 (和文) CD14<sup>+</sup>単球由来内皮様細胞による T 細胞制御法の確立と移植免疫制御への応用研究課題名 (英文) Establishment of a strategy to regulate alloreactive T cells by CD14<sup>+</sup>monocyte-derived endothelial-like cells for applying in organ transplantation

研究代表者

田中 友加 (TANAKA YUKA )

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90432666

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、臓器移植後に非特異的な免疫抑制剤を使用することなく拒絶反応を制御する方法の確立を目的として、末梢血由来 CD14<sup>+</sup>単球から T 細胞寛容誘導特性を有する内皮様細胞の誘導法を確立した。さらにこの免疫修飾法を解析するための *in vivo* マウスモデル (肝内皮キメラ免疫不全マウス) の確立を試みた。誘導した再生内皮様細胞は、抗原提示能 (CD80, CD86, class II) とともに、抑制性分子である PDL-1、ILT-3 が発現していた。さらに、リンパ球混合試験において、異系間リンパ球混合試験培養途中に刺激細胞と同系の再生内皮様細胞を添加すると、特異的な T 細胞応答抑制効果を認めた。以上より、ドナー CD14<sup>+</sup>単球由来の再生内皮様細胞を移入することで、臓器移植後の特異的な免疫寛容が誘導しうる可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

We have established a strategy to inhibit alloreactive T cells without nonspecific immunosuppressants by using immune-regulatory endothelial-like cells (ELCs) derived from peripheral blood CD14<sup>+</sup> monocytes. We have also attempted to establish an *in vivo* mouse model to investigate the strategy to regulate alloreactive T cells (i.e. liver endothelia-chimeric Rag-2/ $\gamma$ -chain double knockout mice reconstructed with syngeneic T cells). The ELCs regenerated from peripheral blood CD14<sup>+</sup> monocytes expressed MHC class II, CD80 and CD86 together with PDL-1 and ILT-3 (inhibitory molecules against T cells). Adding the stimulator-type ELCs into the culture of mixed reaction assay resulted in the significant inhibition of T cell proliferation in the stimulator-specific fashion. These findings suggest that adoptive transfer with the ELCs regenerated from donor peripheral blood CD14<sup>+</sup> monocytes specifically induces tolerance among alloreactive T cells in organ transplantation.

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：移植免疫学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：臓器移植、免疫寛容、内皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

臓器移植後に行われる非特異的免疫抑制療法は感染症の起因となり得る。また、免疫抑制剤の使用下でも、難治性の慢性拒絶反応を経験する場合も認める。そこで、正常な生体防御能を保ちつつ移植抗原に対する免疫応答のみを抑制しうる特異的免疫寛容誘導プロトコルの確立が望まれる。

一般的に、肝臓移植は、他の臓器移植と比べ拒絶反応が起き難いことが知られている。我々は、マウスから肝構築細胞を分離し免疫原性を解析したところ、肝類洞内皮細胞によって抗原提示された同種異系（アロ）反応性 T 細胞は死滅あるいは麻痺に陥り、移植抗原特異的免疫寛容が誘導されることを確認した。臓器移植ドナーから類洞内皮細胞と類似する機能を有する細胞を分離し、レシピエントに移入できれば、肝臓以外の臓器移植においても特異的免疫寛容を誘導できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

私は平成 18～19 年度の若手スタートアップ研究において、末梢血 CD14<sup>+</sup>単球から特殊な培養条件下で内皮様細胞に分化/再生させ、T細胞寛容特性を誘導することに成功した。すなわち、CD14<sup>+</sup>単球に表出する Toll-like receptor (TLR)4 に lipopolysaccharide (LPS)を結合させることで、分化した内皮様細胞にアポトーシス誘導分子の発現が確認でき、反応性 T 細胞が選択的に消去された。この寛容性内皮細胞をドナー末梢血から再生させ、レシピエントに移入することで、移植抗原に対する免疫寛容が誘導できる可能性がある。しかし、LPS で処理した細胞を生体に投与することは、生体への有害事象を否定し得ない。本研究では、低/無毒性合成 LPS アナログを用いた寛容誘導性内皮細胞の誘導法の確立と移植免疫制御への応用の可能性について解明した。さらに、ヒト CD14<sup>+</sup>単球末梢血由来内皮様細胞を免疫不全マウスに門脈内移入して、肝臓内の類洞内皮をキメラ化させた後に、移入したヒトアロ T 細胞が寛容化するか否かを解明（寛容特性を解明する *in vivo* モデルの確立とそれを用いた TLR アゴニスト/LPS アナログによって誘導した内皮細胞の寛容特性の解明）した。

## 3. 研究の方法

(1)末梢血 CD14<sup>+</sup>単球からの再生内皮様細胞の誘導

健康人ボランティアの末梢血単核球から磁気ソーティング法で CD14<sup>+</sup>細胞を分離したのち、GM-CSF、IL-4、血管内皮細胞増殖因子

を加えた培養液で数日間培養した。ここに lipopolysaccharide (LPS)、LPS の代替として monophosphoryl lipid A や TLR アゴニストをさまざまな濃度で添加し、分化した内皮様細胞の形態学的変化と細胞表面フェノタイプおよび、T 細胞応答を抑制する PDL-1 分子の発現の変化をフローサイトメトリーで確認した。

(2)再生内皮様細胞による T 細胞アポトーシスと制御性 T 細胞誘導の評価

CFSE 色素を用いたリンパ球混合試験

(CFSE-MLR) を用いて、分化再生した内皮様細胞とアロ T 細胞を共培養し、T 細胞応答の抑制効果を検討した。アロ T 細胞は細胞機能を温存したままあらかじめ CFSE 色素で細胞質染色しておく、T 細胞の分裂・増殖を定量化し得ることは確認している。さらに、再生内皮様細胞と接触したアロ T 細胞を再生内皮様細胞と同系の末梢血由来樹状細胞によって二次刺激し、応答の抑制効果を検討した。

また、分化再生内皮様細胞が共培養したアロ反応性 T 細胞をアポトーシスに誘導しうるかもしくは CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>制御性 T 細胞を誘導しうるかについて、マルチパラメーターフローサイトメトリーを用いて解析した。

(3)マウスモデルを用いた内皮様細胞の T 細胞免疫応答能の評価

末梢血単球由来の再生内皮様細胞に T 細胞寛容特性を誘導し、門脈内に移入することで臓器移植後に非特異的な免疫抑制剤を使用することなく拒絶反応を制御する方法のアニマルテストを行った。まず、重度免疫不全モデルマウス (Rag-2/ $\gamma$ -chain ダブルノックアウトマウス) に、同種異系マウスの肝類洞内皮細胞を門脈内移入することで、マウス肝類洞に同種異系内皮様細胞が混在したキメラ類洞内皮状態を誘導し、生着率を評価した。さらにこの類洞内皮キメラマウスを同系 T 細胞で免疫再構築し、移入した内皮細胞のドナー特異的免疫制御能をリンパ球混合試験で確認した。

## 4. 研究成果

(1)末梢血 CD14<sup>+</sup>単球からの再生内皮様細胞の誘導と TLR アゴニスト/LPS アナログの選択

健康人ボランティアの末梢血から、磁気ソーティング法を用いて CD14<sup>+</sup>細胞を分離したのち、GM-CSF、IL-4、血管内皮細胞増殖因子および低濃度 LPS を加えた培養液を用い、コラーゲンコートディッシュで約 14 日間培養

した。その結果、誘導した再生内皮細胞は、抗原提示に必要とされる表面分子 (CD80、CD86、class II) を発現するとともに、抑制性レセプターである programmed death ligand (PDL) 1 分子と Immunoglobulin-like transcript (ILT) 3 が表出することをフローサイトメトリーで確認した (図 1、2)。さらに、臨床応用を目的として、LPS の代替となりうる低/無毒性合成アナログとして、CD14 の結合部位である Toll like receptor (TLR) 4 アゴニストのうち、細胞毒性を有しない LPS の免疫誘導活性の本体として認識されている合成 Lipid A や、その誘導体である Monophosphoryl lipid A を、あるいは、TLR9 リガンドである CpG オリゴヌクレオチドを選択した。

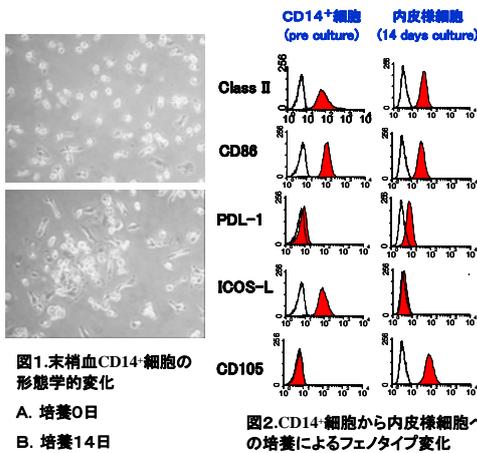


図1.末梢血CD14<sup>+</sup>細胞の形態学的変化

A. 培養0日  
B. 培養14日

図2.CD14<sup>+</sup>細胞から内皮様細胞への培養によるフェノタイプ変化

## (2) 再生内皮様細胞のドナー特異的低応答誘導の確認

再生内皮様細胞の免疫応答能に対する働きを確認するために、再生内皮様細胞と異系リンパ球を混合培養した。その結果、CD4<sup>+</sup>T細胞の応答は認められたが、細胞傷害性CD8<sup>+</sup>T細胞は誘導されなかった。異系リンパ球混合培養では、刺激細胞と同系の再生内皮様細胞を培養初期に添加すると、CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞ともに増殖が抑制された。また、本培養中では、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>T細胞の出現率の促進と、CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>の細胞傷害性T細胞の出現率の抑制が確認された (図3)。しかし、サードパーティである異系の再生内皮様細胞には同様の効果は認められず、組織適合性抗原に依存した現象であることが考えられた。以上の結果から、再生内皮様細胞は、制御性T細胞を誘導し、さらに組織適合性抗原特異的に細胞傷害性T細胞を抑制する可能性が示され、ドナー由来の再生内皮様細胞を移入することで、臓器移植後の特異的免疫寛容を誘導しうる可能性が示唆された。

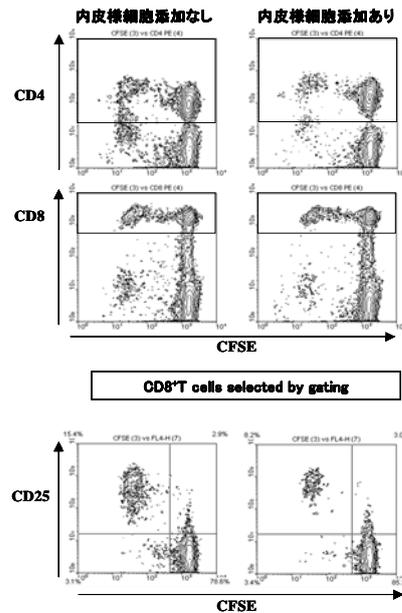


図3. 異系間リンパ球混合培養途中 (培養開始3日後) に刺激細胞と同系の再生内皮様細胞を添加すると、T細胞応答抑制効果を認め、細胞傷害性を示すCD25陽性細胞の割合も減少した。

## (3) 内皮様細胞の in vivo T細胞免疫応答能評価のためのマウスモデルの確立

同種異系の組み合わせによる肝臓内皮細胞の門脈移入による細胞の生着率の評価を蛍光免疫組織染色により評価した。その結果、T、B、NK細胞を有しない免疫不全レシピエントマウス (Rag-2/ $\gamma$ -chain ダブルノックアウトマウス) の肝臓に同種異系の Balb/c マウスの内皮細胞を移入すると、生着は確認できたものの置換率は1%未満であった。しかし、モノクローリンを用いて宿主の肝臓内血管内皮障害を施すことで、移入した肝臓内皮細胞の生着率が5%程度に向上した。この内皮細胞キメラマウスを同系T細胞で免疫再構築した後に、ドナー特異的免疫制御能をリンパ球混合試験で確認すると、移入した内皮の系統由来 (Balb/c マウス) の脾細胞 Stimulator に対し、特異的なT細胞応答抑制を認めた。この免疫寛容誘導機構を解明するために、Fas ligand 欠損マウス由来の内皮細胞を用いて同様の実験を行った。その結果、Fas ligand 欠損 Balb/c マウスの内皮細胞でもT細胞の免疫寛容は誘導され、Fas Ligandはアロ抗原に対する免疫寛容誘導に中心的な役割は担っていないものと考えられた。

## 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2件)

1. Tahara H, Ide K, Basnet NB, Tanaka Y,

Matsuda H, Takematsu H, Kozutsumi Y, Ohdan H. Immunological property of antibodies against N-glycolylneuraminic acid epitopes in cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase-deficient mice. J Immunol. 15;184(6):3269-3275. 2010. 査読有

2. Tahara H, Ide K, Basnet NB, Tanaka Y, Ohdan H. Determination of the precursor frequency and the reaction intensity of xenoreactive human T lymphocytes. Xenotransplantation. 2010. In press. 査読有

〔学会発表〕(計2件)

1. 番匠谷将孝、尾上隆司、五十嵐友香、田中友加、井手健太郎、伊禮俊充、田原裕之、田澤宏文、田代裕尊、大段秀樹. 肝類洞内皮細胞の抗原特異的免疫寛容誘導能の解析. 第46回日本肝臓学会総会. 2010. 5. 27. 山形.

2. Yuka Tanaka, Hiroataka Tashiro, Hideki Ohdan. Optimization of immunosuppressive therapy on the basis of immune monitoring by a multiparametric mixed lymphocyte reaction assay reduces infectious complications and mortality in living-donor liver transplantation. American Transplant Congress 2010. 2010. 5. 4. San Diego, USA.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中友加 (TANAKA YUKA)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90432666

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：